



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανακάλυψη και απομόνωση ενζύμων από μυκητιακά
στελέχη και εφαρμογή τους στην αποικοδόμηση συνθετικών
πολυμερών»**

Φωκά Αικατερίνη

Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος,
αναπληρωτής καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα
Σεπτέμβριος 2022

Ευχαριστίες

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

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον κύριο Ευάγγελο Τόπακα, για την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον αντικείμενο, που απασχολεί ολοένα και περισσότερο την επιστημονική κοινότητα.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Γεώργιο Ταξείδη, ο οποίος βρισκόταν στο πλευρό μου καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Η βοήθεια, η υπομονή και η στήριξη του υπήρξαν καταλυτικές για την ολοκλήρωση της μελέτης μου.

Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλους όσους εργάζονται στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, οι οποίοι με βοήθησαν και με συμβούλευσαν σε οτιδήποτε χρειάστηκα.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους φίλους μου, οι οποίοι με στήριξαν σε αυτή μου την προσπάθεια, όπως με στήριξαν και καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στη σχολή.

Κατερίνα Φωκά

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2022

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της δυνατότητας του μύκητα *Abortiporus biennis* να αποικοδομεί συνθετικά πολυμερή, ενώ παράλληλα απομονώθηκε και εκφράστηκε ετερόλογα ένα οξειδωτικό ένζυμο του *A. biennis* με ενεργότητα λακκάσης (AbiLac). Το δυναμικό του ενζύμου AbiLac στον αποπολυμερισμό συνθετικών πολυμερών μελετήθηκε εκ νέου στα πλαίσια μια πιο πράσινης εναλλακτικής για την εκμετάλλευση των πλαστικών απορριμμάτων.

Για την επίτευξη των παραπάνω, αρχικά παρασκευάστηκαν στερεές καλλιέργειες του μικροοργανισμού *A. biennis* με τα πλαστικά πολυστυρένιο (PS), πολυουρεθάνη (PU) και τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) και μελετήθηκε ο βαθμός αποικοδόμησής τους έπειτα από 30 ημέρες επώασης. Σοβαρές ενδείξεις υποβάθμισης παρατηρήθηκαν μόνο στην περίπτωση του PS, ενώ μικρή ποσότητα προϊόντων αποικοδόμησης προσδιορίστηκε και στα δείγματα του PET. Σε θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας του μύκητα εντοπίστηκε ενεργότητα οξειδωτικών ενζύμων, ενώ στην περίπτωση του PET εντοπίστηκε και ενεργότητα εστερασών.

Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος εκφράστηκε ετερόλογα σε κύτταρα ζύμης *Pichia pastoris* και βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες παραγωγής της. Έτσι, σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες, η παραγωγή του ενζύμου πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 23 °C, παρουσία CuSO_4 συγκέντρωσης 25 μM και 1% v/v μεθανόλη. Έπειτα, ακολούθησε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, με το ένζυμο να έχει μοριακό βάρος περίπου ίσο με 85 kDa και μέγιστη ενεργότητα σε θερμοκρασία 60 °C και pH ίσο με 3.5. Επίσης, η λακκάση βρέθηκε να είναι πολύ σταθερή σε όξινα pH, ενώ βέλτιστη σταθερότητα εμφάνισε στους 30 °C, στους οποίους η ενεργότητά της διατηρείται πάνω από το 50% της αρχικής έπειτα από 24 h επώασης.

Η δυνατότητα της AbiLac να αποπολυμερίζει συνθετικά πολυμερή εκτιμήθηκε έπειτα από επώαση διαφορετικών Units (U) του ενζύμου με σκόνη PS και PET, ενώ στην περίπτωση του PS εξετάστηκαν και η προσθήκη mediators στην αντίδραση. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η λακκάση εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα υποβάθμισης στο PET, καθώς φαίνεται να οδηγεί στον πολυμερισμό του PS, με την παρουσία των mediators να μην επηρεάζουν τη δράση του ενζύμου. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε ο μηχανισμός διάσπασης μοντέλων υποστρωμάτων του PET από τη λακκάση, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η AbiLac είναι κυρίως ενεργή απέναντι σε υποστρώματα με μεγαλύτερου μήκους αλυσίδα, απελευθερώνοντας ως κύριο προϊόν τερεφθαλικό οξύ.

Τελικά, εξετάστηκε και ο βαθμός αποδόμησης καινοτόμων υλικών PET διαφορετικής σύστασης και κατεργασίας από την κουτινάση LCC. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον έλεγχο της αποικοδόμησης καινοτόμων μιγμάτων PET – αμύλου από την κουτινάση LCC, η οποία είναι γνωστή στον αποπολυμερισμό του PET, ενώ ταυτόχρονα μελετήθηκαν συνεργιστικές δράσεις LCC και εμπορικής αμυλάσης. Τα μίγματα του PET με άμυλο εμφανίζουν καλύτερη αποδομησιμότητα όσο αυξάνεται το ποσοστό του αμύλου στο μίγμα και αποκτούν μεγαλύτερο βαθμό αποικοδόμησης από το καθαρό υλικό όταν το άμυλο βρίσκεται σε ποσοστό 30% στο μίγμα. Παράλληλα, μελετήθηκε η αποδόμηση προεπεξεργασμένων ή ανακυκλωμένων υλικών PET από την LCC, γεγονός που δεν είχε το αναμενόμενο αποτέλεσμα, μιας και η προεπεξεργασία του PET δεν οδήγησε σε αύξηση του βαθμού αποικοδόμησής.

Abstract

The main purpose of the present study was to study not only the activity of the fungus *Abortiporus biennis*, but also the potential of a laccase (AbiLac) isolated from this microorganism in the degradation of synthetic polymers. The potential of this enzyme in the depolymerization of synthetic polymers has been re-studied in the context of a greener alternative for the exploitation of plastic waste.

Firstly, the degradation of synthetic polymers polystyrene (PS), polyurethane (PU), and polyethylene terephthalate (PET) was studied, after the incubation of the fungus *A. biennis* with the virgin plastics in static cultures for 30 days. In the case of PS, important evidence of degradation was observed, while in PET samples a small amount of degradation products was also detected. In all the fungal cultures activity of oxidative enzymes was measured, while in the case of PET cultures, esterase activity was also noticed.

Moreover, the heterologous expression of AbiLac in *Pichia pastoris* cells was performed and the production conditions were optimized. Thus, the optimum production conditions were found to be at 23 °C, in the presence of 25 uM CuSO₄ and 1% v/v methanol. Afterwards, the molecular weight of the recombinant protein was determined to be about 85 kDa and biochemical characterization of the enzyme showed that its optimal activity was at 60 °C and the optimum pH was around 3.5. Also, the laccase was found to be very stable at acidic pH, while optimal stability appeared at 30 °C, in which its activity was maintained above 50% of the initial, after 24 h of incubation.

The potential of AbiLac was evaluated after the reactions of PS and PET with different Units (U) of the enzyme, and in the case of PS the presence of mediators in the reaction mixture was also examined. The experiments showed that the laccase presented better degradation results in PET, since the reaction with the PS lead to its polymerization, with the presence of mediators not affecting the action of the enzyme. Furthermore, the mechanism of cleavage of PET model substrates by this laccase was studied, concluding that AbiLac is active against the model substrates, releasing terephthalic acid as the main product.

Last but not least, the degree of degradation of some innovative PET materials of different compositions and treatment was examined by the LCC cutinase. For this purpose, some experiments were conducted to test the degradation of innovative PET – starch mixtures by the LCC cutinase, which is a well-known enzyme in PET degradation, while synergistic actions of LCC and commercial amylase were also studied. It emerged that mixtures of PET with starch present better degradability as the percentage of starch in the mixture increases and acquire a greater degree of degradation than pure material when starch is 30% in the mixture. At the same time, the degradation of pretreated or recycled PET materials by the same enzyme was studied, which did not have the expected effect, since the pretreatment of PET did not lead to an increase in the degree of degradation.

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	i
Περίληψη.....	iii
Abstract	v
Πίνακας συντομογραφιών	xi
Εισαγωγή.....	1
Θεωρητικό μέρος.....	3
1.1 Πλαστικά και Μικροπλαστικά	3
1.1.1 Προβλήματα που σχετίζονται με την μόλυνση από τα πλαστικά.....	5
1.1.2 Συμβατικοί τρόποι διαχείρισης πλαστικών απορριμμάτων.....	7
1.1.3 Βιοδιασπώμενα πολυμερή και βιοπλαστικά.....	9
1.1.4 Πολυμερικά μίγματα	11
1.2 Ενζυμική και μικροβιακή αποικοδόμηση πλαστικών	12
1.2.1 Δομή και μηχανισμός δράσης των ενζύμων.....	13
1.2.2 Ένζυμα που εμπλέκονται στην βιοαποικοδόμηση των πλαστικών	15
1.2.3 Ενζυμική αποικοδόμηση των ευρέως χρησιμοποιούμενων πλαστικών	16
Πειραματικό Μέρος.....	19
2.1 Υλικά.....	19
2.1.1 Όργανα και Συσκευές.....	19
2.1.2 Θρεπτικά υλικά.....	19
2.1.3 Ρυθμιστικά διαλύματα.....	21
2.2 Ρυθμιστικά διαλύματα.....	21
2.2.1 Μέθοδοι.....	22
2.2.1.1 Μελέτη δράσης του μανιταριού <i>A. biennis</i> σε συνθετικά πολυμερή.....	22
2.2.1.2 Μελέτη της αποικοδόμησης των πλαστικών με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC).....	22
2.2.1.3 Μελέτη της απώλειας μοριακών βαρών με χρωματογραφία διείσδυσης γέλης (Gel permeation chromatography – GPC).....	23
2.2.2 Προσδιορισμός ενεργότητας εκκρινόμενων ενζύμων	24
2.2.2.1 Ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος και χαρακτηρισμός του ενζύμου	26
2.2.2.2 Βιοπληροφορική ανακάλυψη του γονιδίου ενδιαφέροντος και απομόνωση του πλασμιδιακού του DNA.....	26
2.2.2.3 Ηλεκτροφόρηση πλασμιδίου σε κύτταρα ζύμης <i>P.pastoris</i>	26
2.2.2.4 Screening των γενετικά τροποποιημένων στελεχών	27
2.2.2.5 Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός του ενζύμου AbiLac	27

	Ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	30
	Εύρεση βέλτιστων συνθηκών παραγωγής ενζύμου AbiLac.....	33
	Χαρακτηρισμός ενζύμου AbiLac	33
2.2.2.5	2.2.2.7.1 Βέλτιστες συνθήκες δράσης ενζύμου	33
	2.2.2.7.2 Μελέτη σταθερότητας του ενζύμου	34
2.2.2.6	2.2.2.7.3 Μελέτη δράσης ενζύμου σε πλαστικά.....	34
2.2.2.7	Μελέτη του βαθμού αποικοδόμησης του μίγματος τερεφθαλικού πολυεστέρα – αμύλου	35
	Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός του ενζύμου LCC	35
2.2.3	Μελέτη δράσης ενζύμου LCC με υλικά PET διαφορετικής σύστασης και κατεργασίας.....	37
2.2.3.1	Αποτελέσματα	39
	Δράση μύκητα <i>Abortiporus biennis</i> σε συνθετικά πολυμερή.....	39
3.1	Μελέτη δράσης του <i>A. biennis</i> σε φιλμ πλαστικού PS.....	39
3.1.1	Μελέτη δράσης του <i>A. biennis</i> σε φιλμ πλαστικού PU	42
3.1.2	Μελέτη δράσης του <i>A. biennis</i> σε φιλμ πλαστικού PET	44
3.1.3		
3.2	Επιλογή βέλτιστου μετασχηματισμένου κλώνου για την παραγωγή της πρωτεΐνης AbiLac47	
3.3	Βέλτιστες συνθήκες παραγωγής και χαρακτηρισμός ενζύμου	49
3.3.1	Βέλτιστες συνθήκες παραγωγής ενζύμου.....	49
3.3.2	Προσδιορισμός καθαρότητας και μεγέθους της ετερόλογα εκφρασμένης πρωτεΐνης AbiLac με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	51
3.3.3	3.3.3.1 Χαρακτηρισμός και μελέτη σταθερότητας ενζύμου AbiLac.....	52
	3.3.3.2 Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της AbiLac (T optimum)	52
	3.3.3.3	
	3.3.3.4 Προσδιορισμός του βέλτιστου pH δράσης της AbiLac (pH optimum).....	53
3.4	Προσδιορισμός της θερμοσταθερότητας της AbiLac.....	54
3.4.1	Προσδιορισμός της σταθερότητας pH της AbiLac	55
3.4.2	Αποτελέσματα της δράσης του ενζύμου AbiLac στα συνθετικά πολυμερή PET και PS	56
3.5	Μελέτη της δράσης του ενζύμου AbiLac στο PS.....	56
3.6	Μελέτη της δράσης του ενζύμου AbiLac στο PET	59
	Εύρεση μηχανισμού διάσπασης του PET από το ένζυμο AbiLac.....	60
	Προσδιορισμός καθαρότητας και μεγέθους της ετερόλογα εκφρασμένης πρωτεΐνης LCC με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	62
	Αποτελέσματα δράσης του ενζύμου LCC σε υλικά PET διαφορετικής σύστασης και κατεργασίας.....	62

Μελέτη δράσης της LCC σε υλικά PET με άμυλο διαφορετικής συγκέντρωσης
63

	Μελέτη δράσης της LCC σε υλικά PET διαφορετικής κατεργασίας	65
	Συζήτηση αποτελεσμάτων και μελλοντικές προτάσεις	69
3.6.1	Συζήτηση αποτελεσμάτων και συμπεράσματα	69
	Αποικοδόμηση συνθετικών πολυμερών από το μικροοργανισμό <i>A. Biennis</i> ..	69
3.6.2	Μελέτη του ετερόλογα εκφρασμένου ενζύμου AbiLac	70
4.1	Μοριακό βάρος και καθαρότητα AbiLac	70
4.1.1	Βέλτιστες συνθήκες παραγωγής ενζύμου AbiLac	70
4.1.2	Βέλτιστες συνθήκες δράσης και σταθερότητας της AbiLac	71
4.1.2.1		
4.1.2.2	Δράση του ενζύμου AbiLac σε πλαστικά.....	71
4.1.2.3	Ενζυμική αποικοδόμηση μοντέλων υποστρωμάτων του PET λόγω δράσης	
4.1.2.4	της AbiLac.....	72
4.1.2.5	Σύγκριση δράσης μικροοργανισμού <i>A. biennis</i> και ενζύμου AbiLac	73
4.1.2.6	Μοριακό βάρος και καθαρότητα ετερόλογα εκφρασμένης LCC	73
4.1.3	Αξιολόγηση υλικών PET διαφορετικής κατεργασίας	74
4.1.4	Μελλοντικές προτάσεις	75
4.2	Βιβλιογραφία.....	77
	Παράρτημα.....	91
	Καμπύλες αναφοράς πρότυπων δειγμάτων ενώσεων TPA, MHET και BHET	91

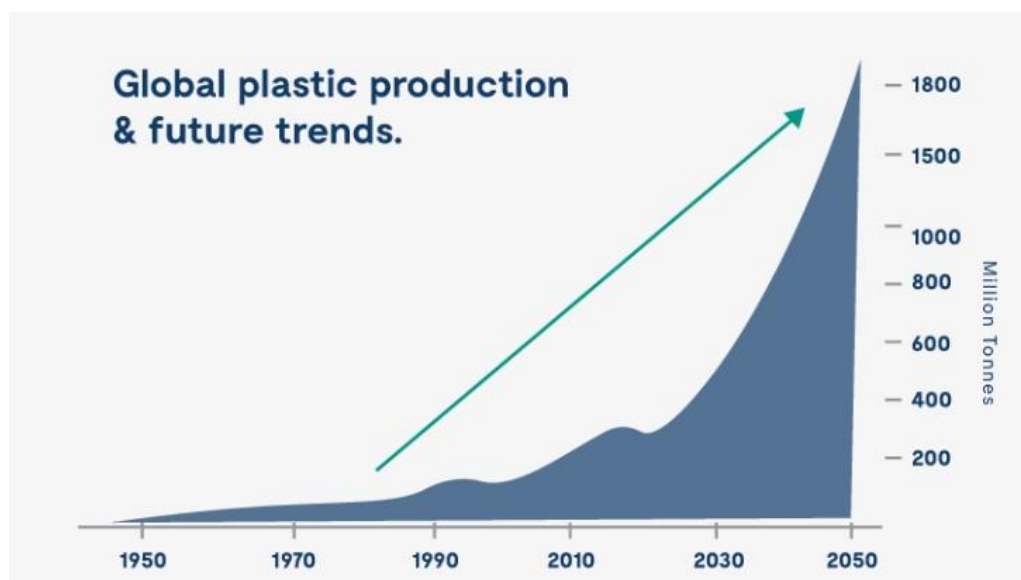
Πίνακας συντομογραφιών

Πολυαιθυλένιο	PE
Πολυπροπυλένιο	PP
Πολυστυρένιο	PS
Πολυβινυλοχλωρίδιο	PVC
Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο	PET
Πολυουρεθάνες	PU
Πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας	HDPE
Πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας	LDPE
Πολυκαπρολακτόνη	PCL
<i>Abortiporus biennis</i>	<i>A. biennis</i>
<i>Pichia pastoris</i>	<i>P. pastoris</i>
Λακκάση από το μικροοργανισμό <i>Abortiporus biennis</i>	AbiLac
High Performance Liquid Chromatography	HPLC
Τερεφθαλικό οξύ	TPA
Μονο-(2-υδροξυαιθυλ)τερεφθαλικό οξύ	MHET
Δι-(2-υδροξυαιθυλ)τερεφθαλικό	BHET
Gel permeation chromatography	GPC
Μέσου αριθμού μοριακό βάρος	Mn
Μέσου βάρους μοριακό βάρος	Mw
Τετραϋδροφουράνιο	THF
Column volume	CV
Δωδεκυλοθειικό νάτριο	SDS
leaf and branch compost cutinase	LCC
p-nitrophenyl butyrate	pNPB
4-νιτροφαινόλη	pNP
Dimethyl sulfoxide	DMSO
Δινιτροσαλικυλικό οξύ	DNS
Monomethyl terephthalate	MTPA
1-(2-hydroxyethyl)- 4-methylterephthalate	M(HET)1
Monomethyl bis(2-hydroxyethyl terephthalate)	M(HET)2
Monomethyl tris(2-hydroxyethyl terephthalate)	M(HET)3
1,4-Benzenedicarboxylic acid,	M2(HET)1.5
1,4-bis[2-[[4-(methoxycarbonyl)benzoyl]oxy]ethyl] ester	
Ethylene glycol bis(methyl terephthalate)	M2(HET)2.5

Εισαγωγή

Ένα από τα πιο σημαντικά περιβαλλοντικά ζητήματα της εποχής μας είναι η ρύπανση του περιβάλλοντος από τα πλαστικά. Λόγω των εξαιρετικών χαρακτηριστικών τους, όπως είναι η ανθεκτικότητα, η σταθερότητα, το χαμηλό κόστος παραγωγής τους, αλλά και η δυνατότητα να μορφοποιούνται σε διάφορα σχήματα, τα πλαστικά χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο στην καθημερινή ζωή. Η ανάγκη για συνεχή χρήση των πλαστικών έχει οδηγήσει σε εκθετική αύξηση της παραγωγής τους, με αποτέλεσμα το 50% του συνολικού όγκου τους να έχει παραχθεί μόλις τα τελευταία 15 χρόνια, αφού η παραγωγή τους αυξήθηκε από 2.3 εκατομμύρια τόνους το 1950 σε 448 εκατομμύρια τόνους το 2015 κι αναμένεται να υπερδιπλασιαστεί μέχρι το 2050 [1]. Στην Ευρώπη περίπου το 40% των παραγόμενων πλαστικών χρησιμοποιούνται ως υλικά συσκευασίας [2], με αποτέλεσμα μετά από μία μόνο χρήση τους να απορρίπτονται στο περιβάλλον, όπου χρειάζονται πάνω από 1.000 χρόνια να αποικοδομηθούν [3]. Δυστυχώς, τα ίδια χαρακτηριστικά που καθιστούν τα πλαστικά τόσο ελκυστικά για χρήση, είναι αυτά που ευθύνονται και για την ανεξέλεγκτη συσσώρευσή τους στο περιβάλλον. Η κακή διαχείριση των πλαστικών απορριμμάτων έχει ως αποτέλεσμα να παραμένουν στο περιβάλλον για χιλιάδες χρόνια, αποτελώντας μια από τις πιο σημαντικές πηγές ρύπανσης.

Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν στραφεί στην εύρεση τρόπων βιοαποικοδόμησης των πλαστικών και πιο συγκεκριμένα στην αναζήτηση μικροοργανισμών και ενζύμων που εμφανίζουν κάποια δράση στη διάσπαση των συνθετικών πολυμερών. Παράλληλα, γίνονται προσπάθειες για την ανάπτυξη καινοτόμων υλικών, τα οποία θα παρουσιάζουν ιδιότητες αντίστοιχες ή και καλύτερες από τα συμβατικά πλαστικά αλλά θα είναι πιο εύκολα αποικοδομήσιμα. Στα πλαίσια αυτά εξετάστηκε και η δράση του μικροοργανισμού *A. biennis* και της AbiLac και μελετήθηκαν τα μίγματα του συνθετικού πολυμερούς PET με το φυσικό πολυμερές άμυλο.



Εικόνα 1: Ετήσια παγκόσμια παραγωγή πλαστικών από το 1950 έως σήμερα και εκτίμηση της παραγωγής τους τις επόμενες δεκαετίες. [4]

Θεωρητικό μέρος

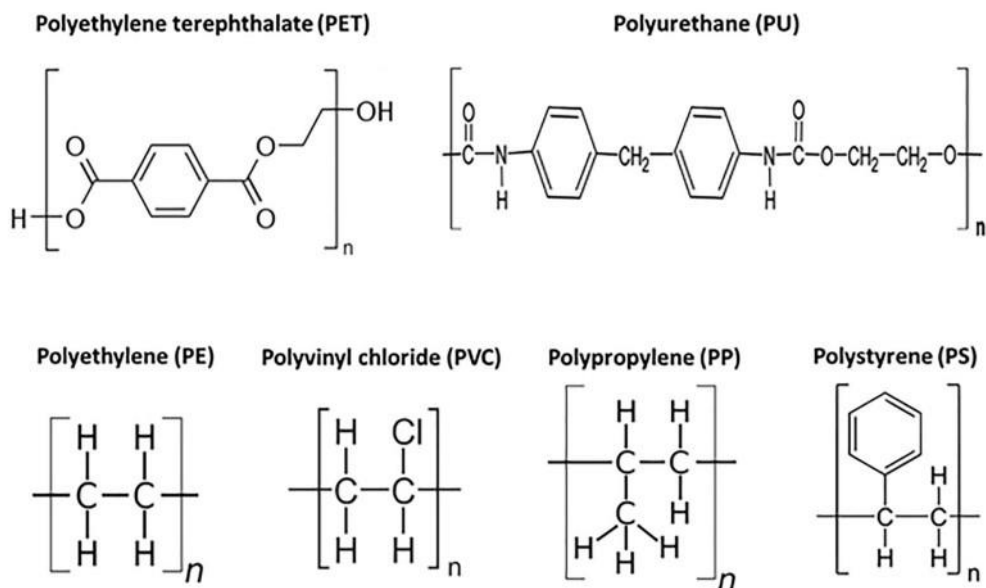
1.1 Πλαστικά και Μικροπλαστικά

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC) ως πλαστικά ορίζονται τα πολυμερικά υλικά που μπορεί να περιέχουν επιπρόσθετες ουσίες για τη βελτίωση της απόδοσης ή/και για τη μείωση του κόστους παραγωγής τους [5].

Τα πλαστικά ανήκουν σε ένα ευρύ φάσμα συνθετικών ή ημι-συνθετικών υλικών, τα οποία απαρτίζονται από πολυμερικές αλυσίδες μεγάλου μήκους και συνδέονται μεταξύ τους με ποικίλους δεσμούς. Βασικό χαρακτηριστικό των πλαστικών είναι το μεγάλο μοριακό βάρος, ενώ συχνά εμφανίζονται να έχουν υποκαταστάσεις αλογόνου. Η κατασκευή των συνθετικών πολυμερών γίνεται, συνήθως, από οργανικά πολυμερή και έχουν τη δυνατότητα να διαμορφώνονται σε στερεά αντικείμενα διαφόρων σχημάτων, μέσω των διαδικασιών τη χύτευσης, της εξώθησης ή της συμπίεσης. Εξαιτίας της προσαρμοστικότητάς τους, αλλά και του ευρέως φάσματος ιδιοτήτων που διαθέτουν, τα πλαστικά χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο, κυρίως ως υλικά συσκευασίας, σε διάφορες ηλεκτρικές συσκευές, σε κατασκευές κτιρίων, αλλά και στην παρασκευή ιατρικών συσκευών και εργαλείων, με αποτέλεσμα να υποκαθιστούν σταδιακά φυσικά υλικά, όπως το χαρτί, το γυαλί και άλλα προϊόντα με βάση την κυτταρίνη. Οι πιο βασικές ιδιότητες που έχουν συμβάλει στην ταχεία εξάπλωση των πλαστικών είναι η σταθερότητα και η ανθεκτικότητά τους, οι οποίες διαρκώς βελτιώνονται, ενώ ένα ακόμα πλεονέκτημά τους είναι οι ευνοϊκές μηχανικές και θερμικές ιδιότητες που συχνά υπερτερούν έναντι των άλλων υλικών [6], [7].

Στις μέρες μας, τα πλαστικά κατασκευάζονται από ανόργανες και οργανικές πρώτες ύλες, όπως ο άνθρακας, το πυρίτιο, το υδρογόνο, το άζωτο, το οξυγόνο, το χλώριο και προέρχονται από χημικές ουσίες που βασίζονται σε ορυκτά καύσιμα, όπως το φυσικό αέριο ή το πετρέλαιο. Εκτιμάται ότι σχεδόν το 8% της παγκόσμιας παραγωγής ορυκτών καυσίμων αξιοποιείται ως πρώτες ύλες ή για την παροχή ενέργειας κατά την κατασκευή των πλαστικών [6]. Ωστόσο, γίνονται σημαντικές προσπάθειες να περιοριστεί η χρήση των παραγώγων του πετρελαίου για την παραγωγή πλαστικών, γι' αυτό ως εναλλακτική λύση έχει προταθεί η χρήση ανανεώσιμων υλικών, τα οποία είναι και πιο φιλικά προς το περιβάλλον, όπως είναι το καλαμπόκι και το βαμβάκι [8].

Η συνεχώς αυξανόμενη παραγωγή διαφορετικών ειδών πλαστικών, οδήγησε στην κατηγοριοποίησή τους σύμφωνα με την κύρια αλυσίδα, τα μονομερή, τις ιδιότητες, τον τρόπο πολυμερισμού και τη χρήση τους. Οι βασικότεροι τύποι πλαστικών που χρησιμοποιούνται ευρέως και αντιστοιχούν στο 80% της συνολικής ζήτησης στην Ευρώπη είναι το πολυαιθυλένιο (PE), το πολυπροπυλένιο (PP), το πολυστυρένιο (PS), το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) και οι πολυουρεθάνες (PU) [6].



Εικόνα 2: Δομές των κύριων εμπορικών συνθετικών πολυμερών. [9]

Κάποιες από τις βασικές χρήσεις των πλαστικών αυτών παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Βασικές εφαρμογές των βασικότερων τύπων συνθετικών πολυμερών.

Πλαστικό	Βασικές εφαρμογές
Πολυαιθυλένιο (PE)	Συσκευασίες τροφίμων, μεμβράνες, πλαστικές σακούλες, ιατρικά προϊόντα, σωλήνες [10]
Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET)	Δοχεία τροφίμων και ποτών, ηλεκτρονικά εξαρτήματα και εξαρτήματα αυτοκινήτων, ίνες στα ρούχα [11]
Πολυουρεθάνες (PU)	Μονωτικό υλικό, αφρός, βαφή, κόλλα, ελαστική ίνα, μαξιλάρια και στρώματα [2], [12]
Πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC)	Αδιάβροχα μπουκάλια, σόλες παπουτσιών, σωλήνες κήπου και ηλεκτρισμού, υδραυλικές εγκαταστάσεις, επικάλυψη παραθύρων και πορτών [7], [13]
Πολυπροπυλένιο (PP)	Πλαστικά έπιπλα, γρανάξια, συσκευασίες προϊόντων καθαρισμού, ιατρικά εργαλεία (π.χ σύριγγες) [14]
Πολυστυρένιο (PS)	Συσκευασίες ποτών και τροφίμων, κατασκευές [15], [16]

Μικροπλαστικά

Ως μικροπλαστικά χαρακτηρίζονται τα θραύσματα οποιουδήποτε τύπου πλαστικού, τα οποία είναι μικρότερα από 5 mm και αποτελούν μια από τις σημαντικότερες πηγές μόλυνσης για το περιβάλλον και τα οικοσυστήματα. Τα μικροπλαστικά εισέρχονται στο περιβάλλον από ποικίλες πηγές και διεργασίες, όπως η παρασκευή ρούχων, καλλυντικών κι άλλων πλαστικών προϊόντων που βρίσκουν εφαρμογή στην καθημερινή ζωή, χρησιμοποιούνται στη βιοϊατρική, ενώ συχνά προκύπτουν από την φθορά και την αποικοδόμηση μεγαλύτερων πλαστικών υλικών. Επομένως, τα μικροπλαστικά έχουν εντοπιστεί σχεδόν σε όλα τα σημεία του πλανήτη, από τα βουνά ως τους ωκεανούς, από τον αέρα μέχρι και το πόσιμο νερό και τελικά ακόμα και στον ανθρώπινο οργανισμό.

Τα μικροπλαστικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα πρωτογενή και τα δευτερογενή, ανάλογα με τη μορφή που έχουν όταν εισέρχονται στο περιβάλλον [17].

Τα πρωτογενή μικροπλαστικά κατασκευάζονται σκόπιμα μικρά σε μέγεθος κι έτσι εισέρχονται στα οικοσυστήματα απευθείας ως μικροπλαστικά. Αυτού του είδους τα μικροπλαστικά βρίσκονται στα ρούχα με τη μορφή μικροϊνών και σε πολλά καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής υγιεινής, με τη μορφή μικροσφαιριδίων που έχουν ενσωματωθεί σε αυτά. Επομένως, αυτά τα μικροπλαστικά μετά τη χρήση τους καταλήγουν στα οικιακά απορρίμματα κι έτσι εισέρχονται στο περιβάλλον. Ακόμα, τα μικροσφαιρίδια αξιοποιούνται σε βιοϊατρικές εφαρμογές και σε έρευνες σχετικές με τις επιστήμες υγείας, όποτε καταλήγουν και πάλι στο περιβάλλον ως ρύποι. Επιπλέον, μικροπλαστικά είναι και κάποιες από τις πρώτες ύλες που αξιοποιούνται ως δομικές μονάδες για την κατασκευή άλλων πλαστικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται στην καθημερινότητα και τελικά απορρίπτονται στο περιβάλλον.

Τα δευτερογενή μικροπλαστικά είναι αυτά που προκύπτουν από την αποικοδόμηση μεγαλύτερων πλαστικών προϊόντων μέσω φυσικών, χημικών ή βιολογικών διεργασιών. Όταν τα πλαστικά βρίσκονται στο περιβάλλον υπόκεινται σε διάφορες διεργασίες υποβάθμισης, για παράδειγμα εξαιτίας της ηλιακής ακτινοβολίας και της αλληλεπίδρασης με ζωντανούς οργανισμούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το αρχικό πλαστικό να κατακερματίζεται και τελικά να προκύπτουν μικρότερα πλαστικά κομμάτια με διάμετρο μικρότερη των 5 mm. Η θραύση ενός πλαστικού σε μικρότερα κλάσματα μπορεί να συμβεί και πριν αυτό εισέλθει στο περιβάλλον, εξαιτίας της φθοράς ή της έντονης μηχανικής καταπόνησης που δέχεται κατά τη χρήση του [18], [19].

Και οι δύο κατηγορίες μικροπλαστικών εισέρχονται στο περιβάλλον με ποικίλους τρόπους και είναι πολύ δύσκολο να απομακρυνθούν, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται σε μεγάλες ποσότητες και να μολύνουν τα οικοσυστήματα στα οποία καταλήγουν, προσβάλλοντας ταυτόχρονα και τους ζωντανούς οργανισμούς [20].

1.1.1 Προβλήματα που σχετίζονται με την μόλυνση από τα πλαστικά

Οι ολοένα και αυξανόμενοι ρυθμοί παραγωγής συνθετικών πολυμερών αποτελούν απειλή για το περιβάλλον, καθώς η μαζική παραγωγή πλαστικών συνεπάγεται την εκμετάλλευση των ορυκτών πόρων, με αποτέλεσμα τη ρύπανση του περιβάλλοντος, ενώ η κακή διαχείριση των απορριμμάτων τους οδηγεί σε ανεξέλεγκτη εναπόθεσή στα οικοσυστήματα [21]. Αυτό συμβαίνει καθώς τα πλαστικά που προέρχονται από τα παράγωγα του πετρελαίου εμφανίζουν αξιοσημείωτη αντοχή και ανθεκτικότητα σε χημικά αντιδραστήρια, αλλά και σε αβιοτικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και το ηλιακό φως, με αποτέλεσμα η αποδόμησή τους να είναι πολύ δύσκολη και να χρειάζεται πολλά χρόνια για να πραγματοποιηθεί [22]. Ο αργός ρυθμός αποδόμησης των πλαστικών αποδίδεται και στη σύντομη παρουσία τους στη φύση, αφού η εξέλιξη δεν έχει προλάβει να σχεδιάσει νέες δομές ενζύμων ικανές να αποικοδομούν συνθετικά πολυμερή [7]. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την έλλειψη άμεσης τοξικότητάς των υλικών αυτών, οδήγησε στην ακατάσχετη συσσώρευσή τους στο περιβάλλον. Η παρουσία των πλαστικών στο περιβάλλον δημιουργεί σημαντικά προβλήματα για τη φύση και τους ζώντες οργανισμούς και συνεπάγεται μια πληθώρα αρνητικών επιπτώσεων για τα οικοσυστήματα.

Τα πλαστικά χάνονται σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής τους, δηλαδή κατά την παραγωγή, τη χρήση και την απόρριψή τους, και εισέρχονται με ποικίλους τρόπους στο

περιβάλλον. Συνήθως, τα πλαστικά απορρίμματα καταλήγουν σε χωματερές, όπου με την πάροδο του χρόνου και την επίδραση αβιοτικών παραγόντων, ξεκινούν να αποδομούνται με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν επικίνδυνες χημικές ουσίες. Αν και τα πλαστικά είναι αδρανή, πολλά από τα πρόσθετα που περιέχουν, όταν απελευθερωθούν, γίνονται βιοδιαθέσιμα και πλέον μπορούν να ασκήσουν την κρυμμένη τοξικότητά τους στο περιβάλλον και σε οργανισμούς – στόχους. Για παράδειγμα, πολλές συσκευασίες και μπουκάλια περιέχουν δισφαινόλη Α (BPA), η οποία διαταράσσει το ενδοκρινικό σύστημα και δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στο θυροειδή και στο αναπαραγωγικό σύστημα των γυναικών. Επίσης, τα περισσότερα πλαστικά περιέχουν πλαστικοποιητές και επιβλαβείς χρωστικές ουσίες, τα οποία επηρεάζουν τη γονιμότητα του εδάφους, ενώ παράλληλα μολύνουν τα υπόγεια ύδατα, υποβαθμίζοντας την ποιότητα του νερού [23].

Ακόμα, μεγάλος όγκος πλαστικών απορριμμάτων καταλήγει στους ωκεανούς, είτε επειδή απορρίπτονται κατευθείαν σε αυτούς, είτε επειδή μεταφέρονται από τη στεριά μέσω του υδροφόρου ορίζοντα. Εκεί, εξαιτίας της διάβρωσης από το φως, του θαλασσινού νερού, της μηχανικής δράσης και πιθανώς κάποιων ζωντανών οργανισμών, τα μεγάλα πλαστικά αντικείμενα κατακερματίζονται σε μικρότερα κομμάτια, τα λεγόμενα μικροπλαστικά. Τα μικροπλαστικά, λόγω του πολύ μικρού μεγέθους τους είναι επικίνδυνο να προσληφθούν από τους ζωντανούς οργανισμούς και να μεταφερθούν μέσω της τροφικής αλυσίδας στον ανθρώπινο οργανισμό. Επίσης, έχουν την ικανότητα να συγκεντρώνουν ανθεκτικούς οργανικούς ρύπους στην επιφάνειά τους, δηλαδή υδρόφοβες ενώσεις με υψηλή συγγένεια με τα μικροπλαστικά, οι οποίοι εισέρχονται μαζί με αυτά στην τροφική αλυσίδα και σε περίπτωση απελευθέρωσής τους μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα στην υγεία των οργανισμών [24], [25].

Η συνεχώς αυξανόμενη ποσότητα πλαστικών απορριμμάτων που καταλήγει στα θαλάσσια ύδατα έχει συχνά θανατηφόρες συνέπειες για τα θαλάσσια θηλαστικά. Πιο αναλυτικά, είναι πιθανό για τα θαλάσσια ζώα να εγκλωβιστούν σε πλαστικά δίχτυα ή να περιοριστούν κινητικά από πλαστικά περιτυλίγματα, γεγονός που στη χειρότερη περίπτωση τα εμποδίζει να φτάσουν στην επιφάνεια για να αναπνεύσουν οδηγώντας τα στον πνιγμό. Επίσης, τα πλαστικά θραύσματα μπορούν να καταποθούν από πολλούς θαλάσσιους οργανισμούς και να φράξουν την πεπτική ή την αναπνευστική τους οδό, αποτελώντας τη βασική αιτία θανάτου τους. Ταυτόχρονα, η κατάποση των πλαστικών απορριμμάτων έχει ως αποτέλεσμα την είσοδό τους στην τροφική αλυσίδα, απ' όπου μπορούν να μεταφερθούν σε ανώτερα διατροφικά επίπεδα, καταλήγοντας εν τέλει στον άνθρωπο [6], [24].

Μια ακόμα σημαντική αρνητική συνέπεια της ύπαρξης των πλαστικών αποβλήτων στα οικοσυστήματα, είναι η ικανότητά τους να μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις. Το γεγονός αυτό είναι επικίνδυνο, διότι τα πλαστικά υλικά έχουν αναγνωριστεί ως φορείς μικροβίων, τα οποία όταν ταξιδεύουν μαζί με τα πλαστικά καταλήγουν σε καινούργια περιβάλλοντα, επηρεάζοντας και διαταράσσοντας της ισορροπίες των μικροβίων στις νέες περιοχές. Έτσι, μαζί με τα πλαστικά απορρίμματα μεταφέρονται παθογόνα και επιθετικά είδη σε μεγάλες αποστάσεις, προσβάλλοντας παρθένα οικοσυστήματα [24], [26].

Καταληκτικά, ίσως η λιγότερο σημαντική συνέπεια της παρουσίας των πλαστικών και των ογκωδών αντικείμενων στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα, συνιστά η αισθητική υποβάθμιση των περιοχών [24].

1.1.2 Συμβατικοί τρόποι διαχείρισης πλαστικών απορριμμάτων

Μελετώντας την επίδραση των πλαστικών στο περιβάλλον, γίνεται φανερή η ανάγκη για αποτελεσματική διαχείριση των πλαστικών αποβλήτων, προκειμένου να περιοριστούν οι δυσμενείς επιπτώσεις που έχουν αρχικά στο περιβάλλον και κατ' επέκταση στον άνθρωπο. Μέχρι στιγμής, μετά την απόρριψή τους τα πλαστικά μπορούν να ακολουθήσουν τρεις προκαθορισμένες διαδρομές, οι οποίες είναι η εναπόθεση σε ΧΥΤΑ, η καύση ή αποτέφρωση και η ανακύκλωσή με σκοπό την αξιοποίησή τους έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία. Η διαδρομή που ακολουθεί κάθε πολυμερές, ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών πλαστικών αλλά και των χωρών που τα διαχειρίζονται [24]. Για παράδειγμα, στην Ευρώπη το 2012 περίπου το 26% των πλαστικών απορριμμάτων ανακυκλώθηκε [27], ενώ στις ΗΠΑ την ίδια χρονιά μόνο το 9% ανακυκλώθηκε [28].



Εικόνα 3: Μέθοδοι διαχείρισης πλαστικών απορριμμάτων. [29]

Απόρριψη σε ΧΥΤΑ

Η εναπόθεση και η ταφή των απορριμμάτων σε χώρους υγειονομικής ταφής (ΧΥΤΑ) αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη λύση για τη διαχείριση των πλαστικών αποβλήτων, με αποτέλεσμα τα πλαστικά να αντιπροσωπεύουν πλέον το 20-30% του συνολικού όγκου των στερεών αποβλήτων που περιέχονται στους ΧΥΤΑ. Ωστόσο, θα έπρεπε σταδιακά να αρχίσει να μειώνεται η ροή των απορριμμάτων που οδηγούνται σε αυτή την κατεύθυνση, μιας και εξαιτίας της ταχείας αύξησης του πληθυσμού ο όγκος των απορριμμάτων που δημιουργείται είναι αρκετά μεγάλος, ενώ οι ΧΥΤΑ όπου μπορούν να απορριφθούν είναι περιορισμένοι σε αριθμό [30]. Ακόμα, αφού τα πλαστικά απόβλητα είναι ανθεκτικά στην αποικοδόμηση καταλήγουν να παραμένουν στους ΧΥΤΑ για μεγάλα χρονικά διαστήματα, μειώνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής των χώρων αυτών. Επίσης, η αποθήκευση των πλαστικών στους ΧΥΤΑ εγκυμονεί κινδύνους για το περιβάλλον, καθώς με την πάροδο του χρόνου τα πλαστικά απελευθερώνουν ρυπογόνες χημικές ουσίες, όπως είναι τα φουράνια και οι διοξίνες, τα οποία είναι επικίνδυνα για το περιβάλλον και τα οικοσυστήματα [26], [31].

Καύση – Αποτέφρωση

Μια άλλη προσέγγιση είναι η αποτέφρωση των πλαστικών απορριμμάτων. Πρόκειται για μια πιο ώριμη τεχνική, η οποία εφαρμόζεται εδώ και αρκετά χρόνια και στοχεύει στην ανάκτηση του ενεργειακού περιεχομένου των πλαστικών. Με λίγα λόγια, η αποτέφρωση είναι μια διαδικασία θερμικής επεξεργασίας των πλαστικών αποβλήτων, υπό την παρουσία

οξυγόνου και σε υψηλή θερμοκρασία (870-1200 °C) [32]. Καθώς τα πλαστικά προέρχονται από παράγωγα του πετρελαίου έχουν υψηλή ενεργειακή αξία, οπότε με την καύση των απορριμμάτων τους παράγεται σημαντική ποσότητα θερμικής ενέργειας η οποία μπορεί να αντισταθμίσει ακόμα και πλήρως την ενέργεια που χρειάζεται για τη διαδικασία της θέρμανσης. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος παρουσιάζει ορισμένα βασικά μειονεκτήματα που σχετίζονται κυρίως με την αέρια μόλυνση [21]. Αρχικά, εκτός από την θερμότητα, απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα και σημαντικές ποσότητες επιβλαβών αερίων, όπως είναι το διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο είναι υπεύθυνο για την επιδείνωση του φαινομένου του θερμοκηπίου και συμβάλει στην υπερθέρμανση του πλανήτη. Επιπλέον, παράγονται οξείδια του αζώτου (NO_x) και του θείου (SO_x), τα οποία είναι τοξικά και αποτελούν απειλή για την ανθρώπινη υγεία και συμβάλλουν στην παγκόσμια ρύπανση [30]. Η συλλογή και η απομάκρυνση των καυσαερίων που παράγονται μπορεί να επιτευχθεί με τη βοήθεια κατάλληλων φίλτρων, όμως πρόκειται για μια απαιτητική και χρονοβόρα διαδικασία που έχει ακόμα πολλά περιθώρια εξέλιξης.

Ανακύκλωση

Τέλος, η πιο βιώσιμη λύση για την αντιμετώπιση του προβλήματος των πλαστικών είναι η ανακύκλωση. Η συλλογή και επεξεργασία των υλικών, με σκοπό την επαναχρησιμοποίησή τους για την παραγωγή νέων πλαστικών ειδών με παρόμοια ή διαφορετική χρήση είναι η πιο φιλική προς το περιβάλλον επιλογή και αμβλύνει ουσιαστικά το πρόβλημα [24]. Η διαδικασία της ανακύκλωσης περιλαμβάνει την απομάκρυνση των πλαστικών απορριμμάτων, το διαχωρισμό τους σε κατηγορίες ανάλογα με τον τύπο και τη διαδικασία παραγωγής τους και τέλος την επανεπεξεργασία τους με σκοπό τη δημιουργία νέων προϊόντων [30]. Ανάλογα με το τελικό προϊόν που προκύπτει διακρίνονται τέσσερις διαφορετικές διεργασίες ανακύκλωσης. Η πρωτογενής ανακύκλωση έχει να κάνει με την επανεπεξεργασία του πλαστικού αποβλήτου, με τη βοήθεια της διαδικασίας της εξώθησης, προκειμένου να μετατραπεί εκ νέου στο αρχικό προϊόν και να έχει την ίδια ή παρόμοια χρήση. Η δευτερογενής ανακύκλωση, ή αλλιώς μηχανική ανακύκλωση, μετατρέπει το πλαστικό σε πρώτη ύλη μέσω της μηχανικής του επεξεργασίας. Το πρόβλημα με αυτό το είδος ανακύκλωσης είναι ότι τα προϊόντα που προκύπτουν είναι χαμηλότερης ποιότητας σε σχέση με το αρχικό υλικό κι έτσι είναι και πιο δύσκολο να ανακυκλωθούν ξανά. Η τριτογενής ανακύκλωση επεμβαίνει στη χημική δομή των πλαστικών και οδηγεί στον αποπολυμερισμό τους, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μικρότερα μόρια, ολιγομερή ή και μονομερή, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να επαναπολυμεριστούν προς σχηματισμό του ίδιου ή και διαφορετικού υλικού. Τέλος, υπάρχει και η τεταρτογενής ανακύκλωση, η οποία δεν είναι άλλη από τη θερμική επεξεργασία των πλαστικών με σκοπό την αξιοποίηση του ενεργειακού τους περιεχομένου [33]. Σε όλες της τις μορφές, η ανακύκλωση είναι μια δαπανηρή διαδικασία, καθώς απαιτείται ξεχωριστή συλλογή, μεταφορά και επεξεργασία των πλαστικών απορριμμάτων, ενώ οι διαδικασίες αυτές έχουν αυξημένο κόστος. Επίσης, τις περισσότερες φορές το τελικό ανακυκλωμένο πλαστικό είναι χαμηλότερης ποιότητας σε σχέση με το πρωτογενές υλικό και έχει χαμηλότερη αξία στην αγορά [34]. Ωστόσο, το μεγαλύτερο πρόβλημα που αντιμετωπίζει η εναλλακτική της ανακύκλωσης είναι η ελλιπής ενημέρωση των πολιτών για τη σωστή διαδικασία που πρέπει να ακολουθείται και τα υλικά που μπορούν να ανακυκλωθούν [35], [36]. Ένα ακόμα εμπόδιο στην Ελλάδα συγκεκριμένα, είναι η έλλειψη υποδομών καθώς οι κάδοι ανακύκλωσης δεν επαρκούν, ενώ το δίκτυο ανακύκλωσης περιορίζεται στα μεγάλα αστικά κέντρα [37], [38]. Παρά τις δυσκολίες, τα τελευταία 10 χρόνια η ανακύκλωση πλαστικών συσκευασιών αυξήθηκε κατά 50%,

φτάνοντας σε σημείο το 2019 να ανακυκλωθούν τα 14.1 από τα 34.4 kg πλαστικών απορριμμάτων που παρήχθησαν ανά κάτοικο στην Ευρώπη [39].

1.1.3 Βιοδιασπώμενα πολυμερή και βιοπλαστικά

Τα τελευταία χρόνια, έχει αναπτυχθεί μια ακόμα προσέγγιση για την αντιμετώπιση των πλαστικών αποβλήτων κι αυτή δεν είναι άλλη από την ανάπτυξη των βιοαποικοδομήσιμων ή βιοδιασπώμενων πολυμερών. Τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά είναι τα πλαστικά που μπορούν να αποσυντεθούν από τη δράση ζωντανών οργανισμών, συνήθως μικροβίων, σε νερό, διοξείδιο του άνθρακα και βιομάζα. Συνήθως παράγονται με ανανεώσιμα ακατέργαστα υλικά, μικροοργανισμούς, πετροχημικά προϊόντα ή συνδυασμό των παραπάνω. Συχνά τα βιοδιασπώμενα πλαστικά μπερδεύονται με τα βιοπλαστικά. Η διαφορά ανάμεσα σε αυτά τα δυο είδη είναι ότι τα βιοπλαστικά προέρχονται αποκλειστικά και μόνο από ανανεώσιμες πηγές, όπως η λιγνίνη, η κυτταρίνη και το άμυλο, ενώ δεν είναι πάντα βιοδιασπώμενα [6].

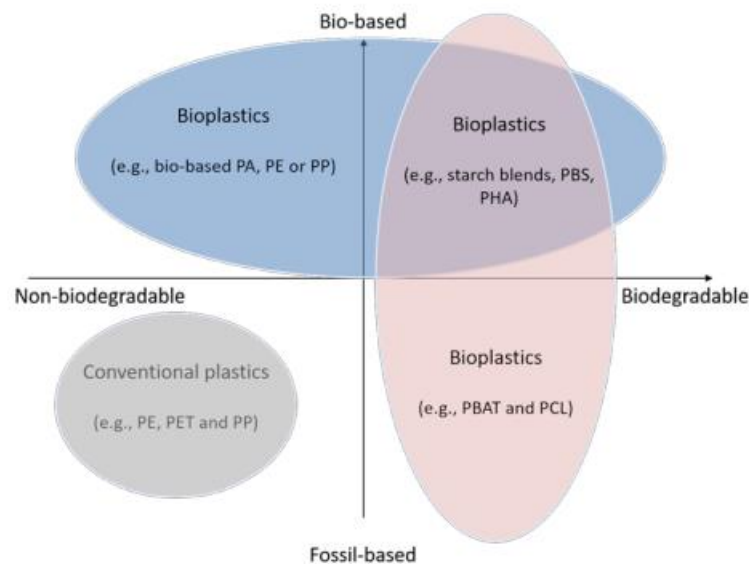
Τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση, καθώς αντικαθιστούν σταδιακά τα ανθεκτικά πολυμερή που κατασκευάζονται από τα πετροχημικά προϊόντα. Το σημαντικότερο πλεονέκτημά τους είναι ότι αποδομούνται εύκολα από μικροοργανισμούς και απορροφούνται από το φυσικό περιβάλλον ή από τους χώρους υγειονομικής ταφής απορριμμάτων, χωρίς να προκαλούν οικολογικά προβλήματα. Χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, ανάλογα με την προέλευσή τους, στα βακτηριακά πολυμερή, στα πολυμερή φυτικής προέλευσης και στα πολυμερή χημικής σύνθεσης [31]. Τα μικροβιακά συνθετικά πλαστικά είναι ένα είδος πολυεστέρα με αλειφατική δομή και εστερική ομάδα στην κύρια αλυσίδα τους, και παράγονται από ειδικά μικρόβια με ζάχαρη και οργανικό οξύ μέσω των διαδικασιών της ζύμωσης και της σύνθεσης. Από την άλλη, τα πλαστικά χημικής σύνθεσης είναι αυτά που προκύπτουν από το συνδυασμό ενός φυσικού πολυμερούς, όπως είναι το άμυλο και η κυτταρίνη, με συνθετικά πρόσθετα και χάρη στην εύκολη αποικοδόμηση του φυσικού πολυμερούς, διευκολύνεται η διάσπαση και ολόκληρου του συνθετικού πολυμερούς [30].

Ακόμα, σύμφωνα με το μηχανισμό υποβάθμισης γίνεται ένας διαχωρισμός σε οξο-βιοδιασπώμενα και υδρο-διασπώμενα πλαστικά. Τα οξο-βιοδιασπώμενα πλαστικά είναι συμβατικά πλαστικά με πρόσθετα, όπως είναι τα λιπαρά οξέα, προκειμένου να διασπώνται πιο εύκολα στην αρχή με τη διαδικασία της οξειδωσης. Από την άλλη, τα υδρο-βιοδιασπώμενα πλαστικά είναι αυτά που παρασκευάζονται από φυτικές πηγές, όπως είναι το καλαμπόκι, το σιτάρι και το σακχαροκάλαμο και η αποικοδόμησή τους ξεκινάει με υδρόλυση. Για την περαιτέρω υποβάθμιση και των δυο ειδών, πραγματοποιείται κάποια βιολογική διεργασία κατά τη διάρκεια της οποίας εκπέμπεται διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), ενώ στην περίπτωση των υδρο-βιοδιασπώμενων πλαστικών μεθάνιο. Μόνο τα οξο-βιοδιασπώμενα πλαστικά μπορούν να ανακυκλωθούν [40], [41].

Τέλος, τα βιοδιασπώμενα πολυμερή κατηγοριοποιούνται και ανάλογα με το βαθμό βιοαποικοδομησιμότητάς τους σε:

- Βιολογικής ή μερικής βιολογικής προέλευσης πλαστικά, όπως είναι το πολυαιθυλένιο (PE), το πολυπροπυλένιο (PP) και το τereφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν επίσης τα πολυμερή υψηλών αποδόσεων και τα θερμοπλαστικά πολυεστερικά ελαστομερή, τα οποία είναι μη βιοδιασπώμενα.

- Βιοδιασπώμενα και βιολογικής προέλευσης, όπως είναι το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), τα πολυδρόζυ αλκανοϊκά (PHA) και το ηλεκτρικό πολυβουτυλένιο (PBS), το άμυλο και τα μίγματα άμυλου.
- Βιοδιασπώμενα πλαστικά από ορυκτά καύσιμα, όπως το τερεφθαλικό αδιτικό πολυβουτυλένιο (PBAT). Τα πλαστικά που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άμυλο ή άλλα βιοπλαστικά, καθώς βελτιώνουν την απόδοσή τους με την βιοαποδομησιμότητα και τις μηχανικές τους ιδιότητες [42].



Εικόνα 4: Κατανομή των πολυμερών ανάλογα με το βαθμό βιοαποικοδομησιμότητάς τους. [19]

Η ανάπτυξη βιοδιασπώμενων πλαστικών είναι πολύ σημαντική για πολυμερή, τα οποία διαλύονται στο νερό ή δεν αναμιγνύονται με αυτό, διότι τέτοιου είδους πολυμερή καταλήγουν σε ρεύματα αποβλήτων που δεν μπορούν να ανακυκλωθούν ή να αποτεφρωθούν. Προκειμένου να κατασκευαστούν βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά, θα πρέπει πρωτίστως να γίνουν κατανοητές σε βάθος οι απαιτήσεις της βιοαποδόμησης και των μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή. Για να συμβεί αυτό θα πρέπει να μελετηθούν διεξοδικά οι αλληλεπιδράσεις που έχουν τα φυσικά και συνθετικά πολυμερή με διάφορους μικροοργανισμούς, καθώς και οι βιοχημικές μεταβολές που πραγματοποιούνται [7].

Ωστόσο, ακόμα και αυτή η προσέγγιση παρουσιάζει ορισμένες δυσκολίες. Καταρχάς, τα βιοδιασπώμενα πλαστικά αποτελούν μια καινούργια κατηγορία πολυμερών, η οποία δεν είναι απαραίτητα συμβατή με τους ήδη υπάρχοντες τρόπους διαχείρισης πλαστικών αποβλήτων, ενώ και η παρασκευή τους απαιτεί διαφορετικό εξοπλισμό, με αποτέλεσμα η χρήση και η κλίμακα παραγωγής τους να είναι ακόμα περιορισμένες [6]. Ταυτόχρονα, το κόστος παραγωγής τους με τις υπάρχουσες διαδικασίες είναι αρκετά υψηλότερο (από 3 έως και 10 φορές μεγαλύτερο) συγκριτικά με εκείνων των πλαστικών που κατασκευάζονται από πετροχημικά παράγωγα [30]. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, τα βιοπλαστικά θα αποδειχθούν στο μέλλον φθηνότερα από τα πετροχημικά εξαιτίας της συνεχούς αύξησης των τιμών του πετρελαίου, ενώ σίγουρα θα πρέπει αν ληφθεί υπόψη το επιπλέον κόστος για την προμήθεια σύγχρονου εξοπλισμού, απαραίτητο για τη διαλογή και το διαχωρισμό τους [19].

Εκτός από το μεγάλο τους κόστος, δύσκολη φαίνεται να είναι η αποδόμηση και των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών. Τα περισσότερα βιοδιασπώμενα πλαστικά έχουν μεγάλη αλυσίδα, υψηλό μοριακό βάρος και σύνθετη χημική δομή, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εισέλθουν στους μικροοργανισμούς για περαιτέρω διάσπαση ή να αποικοδομηθούν μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Ακόμα, παρότι έχουν μικρότερη ανθεκτικότητα από τα πετροχημικά πλαστικά, παραμένουν στο περιβάλλον για μεγάλα χρονικά διαστήματα, αφού η αποσύνθεση τους εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, πολλά βιοδιασπώμενα υλικά, αποδομούνται μόνο εφόσον εκτεθούν σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες εξαρτώνται από την αντίδραση με το οξυγόνο, τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, το pH και την υγρασία. Οι συγκεκριμένες συνθήκες που είναι απαραίτητες για τη βιοαποδόμηση αυτών των πλαστικών δεν είναι πάντα εφικτές να βρεθούν στο φυσικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα τα βιοδιασπώμενα πλαστικά τελικώς να μην αποσυντίθενται σε λογικά χρονικά διαστήματα [43]. Τέλος, τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να ξεκινήσουν να διασπώνται σε σύντομο χρονικό διάστημα κι επομένως δεν είναι κατάλληλα για πολλαπλές χρήσεις ή για χρήσεις μεγάλης διάρκειας [19], [30].

1.1.4 Πολυμερικά μίγματα

Η ανάμιξη πολυμερών έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον ως εύκολη και οικονομικά αποδοτική μέθοδος για την ανάπτυξη νέων υλικών. Τα πολυμερικά μίγματα είναι μίγματα δύο ή περισσότερων πολυμερών που έχουν αναμειχθεί μεταξύ τους για να δημιουργήσουν ένα νέο υλικό με διαφορετικές φυσικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές του νέου υλικού μπορούν να προσαρμοστούν με τις ανάγκες της αγοράς, καθώς διαφορετικοί συνδυασμοί πολυμερών μπορούν να οδηγήσουν στην παρασκευή διαφορετικών μιγμάτων με επιθυμητές ιδιότητες. Μέσω αυτής της μεθόδου ανάπτυξης υλικών, γίνονται προσπάθειες να απομακρυνθούν από την αγορά συμβατικά πλαστικά, τα οποία έχουν αρνητικές επιπτώσεις για την υγεία του ανθρώπου και παραμένουν αναλλοίωτα στο περιβάλλον μολύνοντάς το [44].

Συχνά, στα πολυμερικά μίγματα επιλέγεται η ανάμιξη ενός πλαστικού με καλές μηχανικές και θερμικές ιδιότητες με ένα φυσικό πολυμερές, όπως είναι το άμυλο ή η λιγνίνη, τα οποία αποικοδομούνται εύκολα από διάφορους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στη φύση. Η ανάμιξη ενός εύκολα αποικοδομήσιμου πολυμερούς με κάποιο συνθετικό πολυμερές, οδηγεί στο σχηματισμό ενός νέου, αποικοδομήσιμου πολυμερούς, καθώς ο βαθμός αποικοδόμησης του μίγματος ελέγχεται από το πιο εύκολα αποικοδομήσιμο συστατικό. Έτσι, όταν το ένα από τα υλικά βρεθεί σε συνθήκες αποδόμησης, θα επηρεαστεί η δομική ακεραιότητα ολόκληρου του μίγματος και μεγαλύτερη επιφάνεια του εναπομείναντος πολυμερούς θα είναι διαθέσιμη σε μικρόβια και εκκρινόμενα αποικοδομητικά ένζυμα [7], [45].

Ένα φυσικό πολυμερές που επιλέγεται πολύ συχνά για ανάμιξη με συνθετικά πολυμερή είναι το άμυλο. Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος βρίσκεται σε αφθονία στη φύση και αποτελεί ένα φθινό υλικό, το οποίο διασπάται σε μεγάλο βαθμό από υδρολυτικά ένζυμα. Η προσθήκη αμύλου σε θερμοπλαστικά υλικά, όπως είναι το PET, φαίνεται να βελτιώνει τις μηχανικές ιδιότητες και να αυξάνει το ρυθμό βιοαποικοδόμησης του υλικού [46], [47]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μιγμάτων με άμυλο είναι τα μίγματα PE/ αμύλου, στα οποία η προσθήκη του αμύλου βελτίωσε τα ποσοστά αποικοδόμησης του υλικού παρουσία του μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* και βακτηρίων που ανήκουν στο γένος του *Streptomyces* [48], και τα μίγματα αμύλου/ πολυκαπρολακτόνης (PCL), τα οποία παρουσίασαν βελτιωμένη βιοδιασπασιμότητα και χαμηλότερο κόστος παραγωγής [49].

1.2 Ενζυμική και μικροβιακή αποικοδόμηση πλαστικών

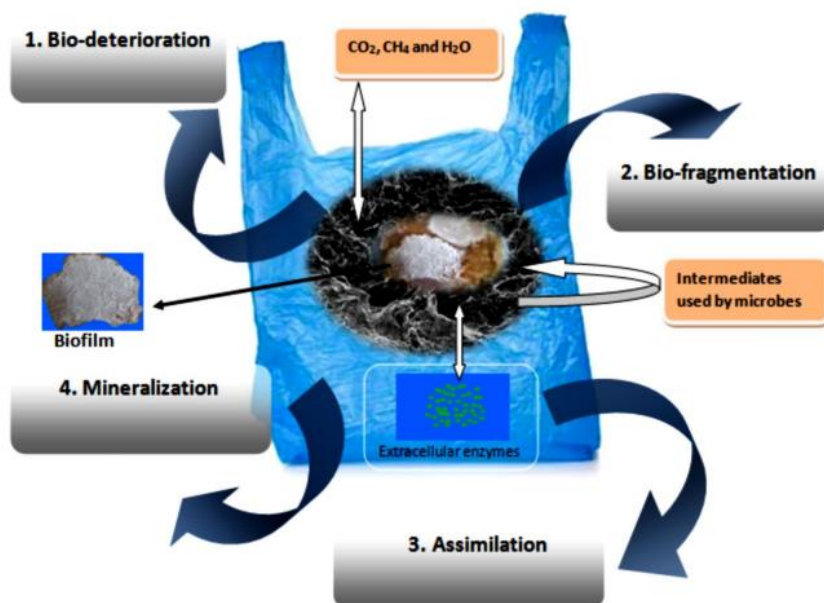
Οι παραδοσιακές τεχνικές διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων φαίνεται ότι αποτυγχάνουν να δώσουν μια ικανοποιητική λύση στο πρόβλημα που δημιουργείται με τη συσσώρευση των πλαστικών στο περιβάλλον, για το λόγο αυτό, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει την προσοχή της στην ανάπτυξη στρατηγικών βιοαποικοδόμησης των πλαστικών [50].

Η βιοαποικοδόμηση των πλαστικών είναι μια περίπλοκη διεργασία, κατά την οποία μεταβάλλονται οι ιδιότητες του πολυμερούς και χάνεται, μερικώς ή ολικώς, η λειτουργικότητά του [7]. Μέσω της δράσης διαφόρων μικροοργανισμών τα πλαστικά πολυμερή διασπώνται σε μικρότερα μόρια, ολιγομερή και μονομερή, τα οποία μπορούν να εισέλθουν στα κύτταρα των μικροοργανισμών και να μεταβολιστούν [51]. Η βιοαποικοδόμηση περιλαμβάνει αρκετά βήματα, που εξαρτώνται κάθε φορά από το είδος του πλαστικού αλλά και από το μικροοργανισμό, και η διαδικασία της υποβάθμισης ενός πλαστικού μπορεί να σταματήσει σε κάθε ένα από τα βήματα αυτά.

Γενικά, ο μηχανισμός της βιο-αποικοδόμησης βασίζεται στη λειτουργία των μικροβιακών ενζύμων που δρουν στην επιφάνεια των πλαστικών. Πιο συγκεκριμένα, μικροοργανισμοί, όπως είναι τα βακτήρια και οι μύκητες, αρχικά προσδένονται στην επιφάνεια των πλαστικών και στη συνέχεια εκκρίνουν ένζυμα, τα οποία αναπτύσσονται αξιοποιώντας τα πλαστικά υλικά ως πηγή θρεπτικών συστατικών. Έτσι, σταδιακά τα πολυμερή υποβαθμίζονται και μετατρέπονται σε H_2O , CO_2 και CH_4 , αλλά και βιομάζα [52], [53].

Αναλυτικότερα, η διαδικασία της βιοαποικοδόμησης μπορεί να ταξινομηθεί σε τέσσερα βασικά στάδια [29], [54], [55]:

1. **Βιο-φθορά:** Μέσω της συνδυασμένης δράσης μικροβιακών κοινοτήτων, μικροοργανισμοί προσκολλώνται στην επιφάνεια του πολυμερούς. Η επακόλουθη ανάπτυξη των μικροβιακών κοινοτήτων στην επιφάνεια έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγάλων πόρων και ρωγμών στο υλικό, οι οποίες μεταβάλουν τις φυσικές, χημικές και μηχανικές του ιδιότητες. Η βιοφθορά εξαρτάται από τη φύση του πολυμερούς αλλά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες.
2. **Βιο-κατακερματισμός:** Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στην επιφάνεια του πολυμερούς εκκρίνουν ένζυμα, τα οποία είναι ικανά να διασπάσουν το πολυμερές σε μικρότερα, υδατοδιαλυτά μόρια, ολιγομερή, διμερή και μονομερή. Κάποια από αυτά τα μικρότερα μόρια μπορούν να διαπεράσουν την πλασματική μεμβράνη, ενώ τα πιο μεγάλα μόρια πρέπει να υποστούν περαιτέρω διάσπαση ή τροποποίηση προτού εισέλθουν στο κύτταρο.
3. **Αφομοίωση:** Τα μικρότερα μόρια πολυμερούς που έχουν δημιουργηθεί κατά το βιο-κερματισμό διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και ενσωματώνονται στο μεταβολισμό των κυττάρων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή νέας βιομάζας αλλά και ως πηγή ενέργειας, παράγοντας ταυτόχρονα πολυάριθμους πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες.
4. **Ανοργανοποίηση:** Σε αυτό το τελικό στάδιο οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες οξειδώνονται πλήρως και διασπώνται στα τελικά τους προϊόντα. Έτσι, παράγονται απλά μόρια όπως CO_2 , N_2 , CH_4 , H_2O και διάφορα άλατα, τα οποία απελευθερώνονται στο εξωτερικό του κυττάρου και παράγεται και ενέργεια η οποία συμβάλει στην ανάπτυξη του.



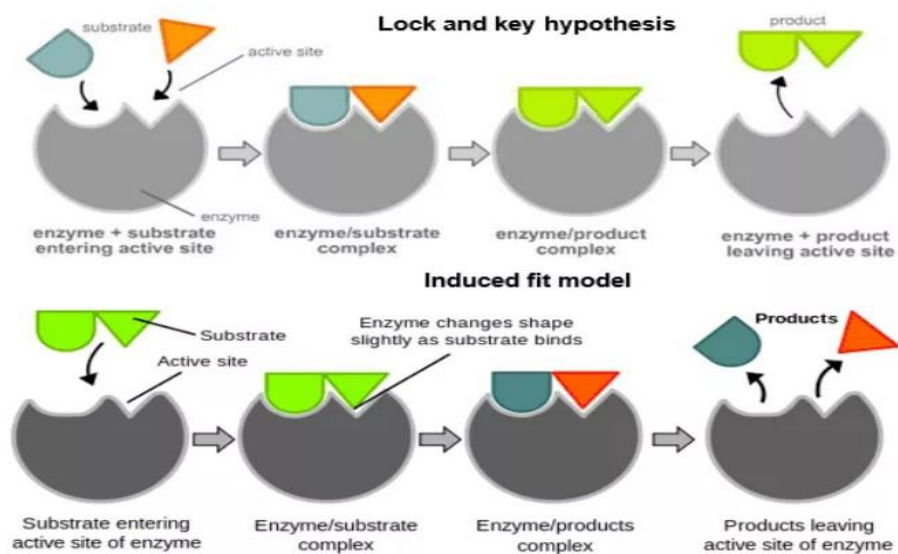
Εικόνα 5: Τα διαδοχικά βήματα της βιοαποικοδόμησης ενός πλαστικού. [26]

Συνοπτικά, μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πάνω από 400 είδη μικροοργανισμών ικανών να υποβαθμίσουν τα συνθετικά πολυμερή, όπως είναι τα βακτήρια, οι μύκητες και τα φύκια [56]. Από αυτούς, οι μύκητες έχουν μια φυσική και μοναδική ικανότητα να εισβάλουν σε μακρο- και μικροπλαστικά υποστρώματα, εκκρίνοντας μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμων σε σχέση με τους άλλους μικροοργανισμούς [57]. Τα ένζυμα μέσω της οξειδωσης ή της υδρόλυσης επιτυγχάνουν τον αποπολυμερισμό των πολυμερών μεγάλου μοριακού βάρους σε oligομερή ή και μονομερή, τα οποία μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και να ενσωματωθούν στο μεταβολισμό του κυττάρου [7].

1.2.1 Δομή και μηχανισμός δράσης των ενζύμων

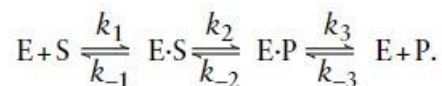
Τα ένζυμα είναι συνήθως πρωτεΐνες μεγάλου μεγέθους, που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς και καταλύουν βιοχημικές αντιδράσεις, μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης των αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν. Είναι ικανά να επιταχύνουν τις αντιδράσεις έως και 20 φορές, αποτρέποντας τις παράλληλες αντιδράσεις ενδιάμεσων προϊόντων και καταλύοντας στερεοεκλεκτικές και στερεοειδικές αντιδράσεις [58]. Καθώς πρόκειται για πρωτεΐνες, τα ένζυμα έχουν καθορισμένη δομή, που απαρτίζεται από μια συγκεκριμένη ακολουθία αμινοξέων. Τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας έτσι την πρωτοταγή δομή του ενζύμου, η οποία στη συνέχεια αναδιπλώνεται μέσω των α-ελίκων και των β-πτυχωτών φύλλων για να δώσει τη δευτεροταγή δομή. Η περαιτέρω αναδίπλωση των αλυσίδων ώστε τα υδρόφοβα αμινοξέα να προσανατολιστούν προς το κέντρο της πρωτεΐνης, μακριά από το νερό, και τα υδρόφοβα αμινοξέα να βρεθούν στην επιφάνεια της δομής, οδηγεί στο σχηματισμό της τριτοταγούς δομής [59]. Τα περισσότερα ένζυμα, πέραν του πρωτεϊνικού τμήματός τους, περιέχουν επίσης ένα μικρό μη πρωτεϊνικό τμήμα που ονομάζεται συμπαραγοντας. Ο συμπαραγοντας μπορεί να είναι ένα ανόργανο ιόν, όπως Zn^{2+} , ή ένα μικρό οργανικό μόριο που ονομάζεται συνένζυμο.

Ο μηχανισμός δράσης των ενζύμων βασίζεται στην ύπαρξη ειδικά διαμορφωμένων θέσεων στη δομή τους, τα λεγόμενα ενεργά κέντρα, πάνω στα οποία προσδένεται το υπόστρωμα της καταλυόμενης αντίδρασης. Υπάρχουν δυο θεωρίες σχετικά με τον τρόπο δέσμευσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η πρώτη είναι γνωστή ως μοντέλο κλειδιού – κλειδαριάς και προτείνει ότι το σχήμα και η χημεία του υποστρώματος (κλειδί) είναι συμπληρωματικά με το σχήμα και τη χημεία τους ενεργού κέντρου του ενζύμου (κλειδαριά). Αυτό σημαίνει ότι μόνο τα υποστρώματα κατάλληλου μεγέθους και σχήματος μπορούν να εφαρμόσουν τέλεια με το ενεργό κέντρο και τα δυο να συνδεθούν ώστε να σχηματίσουν το σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος. Η άλλη προσέγγιση είναι γνωστή ως μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής και υποθέτει ότι το ένζυμο και το υπόστρωμα δεν έχουν από την αρχή συμπληρωματικό σχήμα και μέγεθος, αλλά το ένζυμο έχει τη δυνατότητα να προσαρμόζει τη δομή του όταν αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα ώστε να πετύχει τη δέσμευσή του [60], [61].



Εικόνα 6: Σχηματική παρουσίαση μοντέλου κλειδιού – κλειδαριάς (πάνω) και μοντέλου επαγόμενης προσαρμογής (κάτω). [62]

Τα ένζυμα λειτουργούν μέσω μιας πορείας που περιλαμβάνει αρχικά τον σχηματισμό ενός συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος [ES], ακολουθούμενο από μια χημική μετατροπή πολλών σταδίων του δεσμευμένου με το ένζυμο υποστρώματος σε δεσμευμένο με το ένζυμο προϊόν [EP], και τελικά απελευθέρωση του προϊόντος από το σύμπλοκο. Μετά από την απελευθέρωσή του από το προϊόν, το ένζυμο είναι και πάλι ελεύθερο να επαναλάβει την καταλυτική διαδικασία [63].



Εικόνα 7: Στάδια ενζυμικής αντίδρασης.

Ανάλογα με την ενζυμική τους δράση και τις ιδιότητες των αντιδράσεων που καταλύουν, τα ένζυμα χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

- Οξειδοαναγωγικά ένζυμα: καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης/αναγωγής [64]
- Τρανσφεράσες: καταλύουν τη μεταφορά συγκεκριμένων λειτουργικών ομάδων από ένα μόριο – δότη, σε ένα άλλο μόριο – δέκτη [65]
- Υδρολάσες: καταλύουν την υδρόλυση διαφόρων δεσμών, οδηγώντας στο σπάσιμο μεγαλύτερων μορίων σε μικρότερα [66]
- Λυάσες: καταλύουν το σπάσιμο διαφόρων χημικών δεσμών με άλλα μέσα εκτός από την υδρόλυση και την οξείδωση, οδηγώντας συχνά στο σχηματισμό ενός νέου διπλού δεσμού ή μιας νέας δομής δακτυλίου [67]
- Ισομεράσες: καταλύουν αντιδράσεις που περιλαμβάνουν τη δομική αναδιάταξη ενός μορίου [68]
- Λιγάσες: ή αλλιώς συνθετάσες, καταλύουν τη σύνδεση δυο μορίων αντλώντας την απαιτούμενη ενέργεια από τη διάσπαση ενός πλούσιου σε ενέργεια φωσφορικού δεσμού [69]

Οι παραπάνω βασικές κατηγορίες, χωρίζονται σε υποκατηγορίες ανάλογα με το μηχανισμό δράσης του ενζύμου, το υπόστρωμα που καταλύουν και τα προϊόντα που παράγονται.

1.2.2 Ένζυμα που εμπλέκονται στην βιοαποικοδόμηση των πλαστικών

Έχουν βρεθεί διάφορα ένζυμα, τα οποία είναι ικανά να αποικοδομήσουν τα μεγάλα μοριακού βάρους πολυμερή σε μόρια μικρότερου μεγέθους, έτσι ώστε να μεταφερθούν στο εσωτερικό των κυττάρων και να αποπολυμεριστούν στα μονομερή τους.

Κουτινάσες

Οι κουτινάσες ανήκουν στην οικογένεια των εστερασών και έχουν την ικανότητα να υδρολύουν πολυεστέρες με υψηλή μοριακή μάζα [70]. Πρόκειται για α/β υδρολάσες ή υδρολάσες καρβοξυλικού εστέρα, οι οποίες παρατηρήθηκαν σε παθογόνους μύκητες φυτών, όπως είναι ο *Fusarium solani pisi*, εξαιτίας της ικανότητάς τους να υδρολύουν την κουτίνη που βρίσκεται στην επιφάνεια των φύλλων [71]–[73]. Οι κουτινάσες καταλύουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, υδρολύοντας διαλυτούς εστέρες λιπαρών οξέων, τριγλυκερίδια και αδιάλυτα πολυμερή. Σύμφωνα με μελέτες ειδικότητας υποστρώματος με εστέρες παρανιτροφαινόλης, η πλειοψηφία των κουτινασών προτιμά να διασπά αλυσίδες μικρού μήκους από δύο έως τέσσερα άτομα άνθρακα ή και λίγο περισσότερο, ενώ υπάρχουν και ορισμένες κουτινάσες με διαφοροποιημένα καταλυτικά προφίλ, ευνοώντας την υδρόλυση εστέρων με αλυσίδες οκτώ και δώδεκα άτομα άνθρακα [74]. Οι κουτινάσες έχει αναφερθεί ότι μπορούν να υδρολύσουν και αλειφατικούς πολυεστέρες, όπως είναι η πολυκαπρολακτόνη (PCL) και αλειφατικούς, αρωματικούς συμπολυεστέρες, όπως είναι το PET [9]. Το *Idonella sakaiensis* 201-F6 είναι ένα βακτήριο που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και έχει την ικανότητα να χρησιμοποιείται το PET ως πηγή άνθρακα και ενέργειας [75]. Το βακτήριο αυτό εκκρίνει ένα υδρολυτικό ένζυμο, το οποίο παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τις κουτινάσες, ωστόσο κατηγοριοποιείται σε μια καινούργια οικογένεια ενζύμων, τις PETάσες, λόγω της αυξημένης ικανότητάς του να αποικοδομεί το PET και της μικρότερης δραστηριότητάς του έναντι αλειφατικών εστέρων [74].

Λιπάσες

Οι λιπάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των λιπιδίων και ανήκουν και αυτές στην οικογένεια των εστερασών. Πρόκειται για υδρολάσες σερίνης, οι οποίες ενεργοποιούνται μόνο εφόσον απορροφηθούν σε μια διεπιφάνεια λαδιού – νερού και δεν υδρολύουν υποστρώματα διαλυμένα σε υγρό [76]. Πολλά είδη μυκήτων έχουν βρεθεί να παράγουν λιπάσες, οι οποίες συμβάλλουν στην αποικοδόμηση των πολυμερών, όπως είναι οι πολυουρεθάνες [77]. Οι μυκητιακές λιπάσες είναι ακυλοϋδρολάσες των τριγλυκεριδίων που υδρολύουν κυρίως τριγλυκερίδια σε γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα, ενώ επίσης καταλύουν την υδρόλυση και τη σύνθεση εστέρων [78].

Λακκάσες

Οι λακκάσες είναι μια ευρέως διαδεδομένη κατηγορία οξειδωτικών ενζύμων και αποτελούν μονομερείς γλυκοπρωτεΐνες που σχηματίζουν σύμπλοκα με ιόντα χαλκού [79]. Τα ένζυμα αυτά αξιοποιούν το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων προκειμένου να οξειδώσουν φαινολικά μόρια, πετυχαίνοντας παράλληλα την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό [80]. Οι λακκάσες ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στο χυμό του ιαπωνικού δέντρου *Rhus vernicifera*, ενώ έκτοτε έχουν βρεθεί σε πολλά είδη μυκήτων που ανήκουν στους ασκομύκητες, τους δευτερομύκητες και τους βασιδιομύκητες [81]. Γενικά, δραστηριότητα λακκάσης έχει βρεθεί σε φυτά, ορισμένα έντομα [82] και λίγα βακτήρια [83]. Το χαρακτηριστικό που τις καθιστά άξιες ενδιαφέροντος είναι η ιδιαίτερη ικανότητά τους να οξειδώνουν τη λιγνίνη και ενώσεις με δομή παρόμοια σε αυτή, συμμετέχοντας έτσι στην αποικοδόμησή τους [84].

Υπεροξειδάσες

Οι υπεροξειδάσες, ή αλλιώς καταλάσες, είναι οξειδοαναγωγικά ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης οργανικών και ανόργανων ενώσεων και την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω της δράσης ελεύθερων ριζών [85]. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η μη εξειδίκευσή τους και η ικανότητά τους να οξειδώνουν υποστρώματα με υψηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής [86]. Σε αυτή την κατηγορία ενζύμων ανήκουν οι υπεροξειδάσες λιγνίνης (LiP) και οι υπεροξειδάσες μαγγανίου (MnP), οι οποίες είναι πολύ αποτελεσματικές στην υποβάθμιση της λιγνίνης και βρίσκονται σε λιγνινολυτικούς μύκητες, όπως είναι οι μύκητες λευκής σήψης (white-rot fungi) [87].

1.2.3 Ενζυμική αποικοδόμηση των ευρέως χρησιμοποιούμενων πλαστικών

Αποικοδόμηση πολυαιθυλενίου (PE)

Το PE είναι από τα πιο άφθονα συνθετικά πλαστικά που παράγονται παγκοσμίως [88]. Αποτελείται από μακριές, γραμμικές αλυσίδες μονομερών αιθυλενίου (C_2H_4)_n, και χωρίζεται σε πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) και πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE), ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα και το μοριακό του βάρος [89]. Το LDPE έχει μοριακό βάρος 40.000 Daltons και η επεξεργασία του περιλαμβάνει την εφαρμογή υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας. Από την άλλη, το HDPE έχει μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 100.000 – 250.000 Daltons και επεξεργάζεται σε χαμηλή πίεση και θερμοκρασία [90]. Το

πολυαιθυλένιο έχει συνήθως ημι-κρυσταλλική δομή και είναι εξαιρετικά ανθεκτικό στη βιοαποικοδόμηση, εξαιτίας της υψηλής υδροφοβικότητάς του και των μακρών αλυσίδων άνθρακα [91]. Πολλοί μικροοργανισμοί ικανοί να υδrolύσουν το PE έχουν βρεθεί στο χώμα, το θαλασσίνο νερό, το κομπόστ και τη λάσπη, όμως το μεγάλο μοριακό του βάρος περιορίζει τη δράση τους [92]. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η μείωση του μοριακού του βάρους με κάποια προκατεργασία, όπως είναι η έκθεση σε υπερϊώδη ακτινοβολία ή η θερμική επεξεργασία. Πολλά βακτηριακά είδη, όπως είναι ο *Bacillus* spp., [93] ο *Rhodococcus* spp. [94] και η *Pseudomonas* spp., [95] και μύκητες, όπως είναι ο *Aspergillus* και ο *Fusarium* [96], έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αποικοδομήσουν το PE. Η αποδόμηση του πολυμερούς επιτυγχάνεται κατά κύριο λόγο μέσω της έκκρισης οξειδωτικών ενζύμων, όπως είναι οι λακκάσες, οι υπεροξειδάσες και οι υδροξυλάσες αλκανίων [97], [98]. Το ένζυμο που έχει βρεθεί να έχει τα καλύτερα αποτελέσματα στην αποικοδόμηση του PE είναι μια υδροξυλάση αλκανίων από το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* E7. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, έπειτα από επώαση του παραπάνω βακτηρίου με σκόνη PE χαμηλού μοριακού βάρους (LMWPE) αναμεμιγμένη με αποστειρωμένο κομποστ στους 37 °C για 80 ημέρες, παρατηρήθηκε ανοργανοποίηση του πολυμερούς που έφτασε το 40.8% [99].

Αποικοδόμηση τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET)

Το PET είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα θερμοπλαστικά πολυμερή στις βιομηχανίες συσκευασίας και κλωστοϋφαντουργίας [100]. Είναι ένας ημικρυσταλλικός πολυεστέρας, που αποτελείται από τερεφθαλικό οξύ (TPA) και αιθυλενογλυκόλη (EG), με το μέσο μοριακό του βάρος να κυμαίνεται από 20.000 έως 50.000 Daltons [101]. Αν και σε αντίθεση με τους υπόλοιπους πολυεστέρες το PET είναι εξαιρετικά ανθεκτικό στη βιοαποικοδόμηση [102], έχουν βρεθεί ορισμένοι μικροοργανισμοί ικανοί να το αποπολυμερίσουν. Κάποιοι από αυτούς τους μικροοργανισμούς ανήκουν στις οικογένειες των μυκητών *Aspergillus* [103], *Fusarium* [104] και *Penicillium* [105]. Τα ένζυμα που εκκρίνουν αυτοί οι μικροοργανισμοί και είναι κατά βάση υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του PET είναι υδρολυτικά ένζυμα που δρουν σε εστερικούς δεσμούς, όπως είναι οι κουτινάσες, οι λιπάσες και οι καρβοξυλεστεράσες [106]. Οι πιο γνωστές υδρολάσες που είναι αποτελεσματικές στην υδρόλυση του PET είναι η κουτινάση HiC που εκκρίνεται από το μικροοργανισμό *Humicola insolens* [107] και η PETase που παράγεται από το μικροοργανισμό *Ideonella sakaiensis* [108]. Το ένζυμο που έχει βρεθεί να έχει τα καλύτερα αποτελέσματα στην αποικοδόμηση του PET είναι η κουτινάση TfCut2 που εκκρίνεται από το μικροοργανισμό *Thermobifida fusca*, και εκφράζεται σε βακτήριο *Bacillus megaterium*. Έπειτα από επώαση χρησιμοποιημένου χαρτοκιβωτίου από PET με το ένζυμο στους 70 °C για 7 ημέρες και σε ρυθμιστικό διάλυμα phosphate με pH = 8, παρατηρήθηκε απώλεια βάρους του δείγματος που κυμαινόταν από 23.9 – 56.6 % [109].

Αποικοδόμηση πολυστυρενίου (PS)

Το PS είναι το πιο άφθονο πλαστικό που παράγεται παγκοσμίως και χρησιμοποιείται για την κατασκευή υλικών συσκευασίας τροφίμων και πιάτων μιας χρήσης [110]. Πρόκειται για ένα συνθετικό, αρωματικό πολυμερές που αποτελείται από μονομερή στυρενίου και έχει μοριακό τύπο $(C_8H_8)_n$ [111]. Το μεγάλο μοριακό βάρος και η υδροφοβικότητά του, συμβάλλουν στην ακαμψία και τη σκληρότητά του [9], ενώ η παρουσία δεσμών άνθρακα –

άνθρακα στην κύρια αλυσίδα του έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή ανθεκτικότητά του στην ενζυμική διάσπαση μέσω διαδικασιών οξειδωσης ή αναγωγής [112]. Η διαδικασία της βιοαποικοδόμησης του PS στη φύση πραγματοποιείται με πολύ αργούς ρυθμούς και μόνο λίγες μελέτες έχουν αποδώσει σημαντικά αποτελέσματα για την υποβάθμισή του. Κάποιοι από τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στην αποδόμηση του PS είναι τα βακτήρια *Bacillus* sp., *Sphingobacterium* sp. και *Xanthomonas* sp. [113] και οι μύκητες *Aspergillus* [114], *Penicillium* [115] και *Pleurotus ostreatus* [116]. Όσον αφορά στα ένζυμα που είναι ικανά να αποικοδομήσουν το PS, δεν υπάρχουν αναφορές για ένζυμα που προέρχονται από μύκητες και εμφανίζουν κάποια δράση απέναντι στο συγκεκριμένο πλαστικό, με τα βακτηριακά ένζυμα να είναι τα μόνα που μέχρι στιγμής έχουν καταφέρει να αποικοδομήσουν το πολυστυρένιο. Το ένζυμο που έχει βρεθεί να έχει τα καλύτερα αποτελέσματα στην αποικοδόμηση του PS είναι μια υπεροξειδάση υδροκινόνης (hydroquinone peroxidase) από το βακτήριο *Azotobacter beijerinckii*. Έπειτα από επώαση διαλυμένου PS με το ένζυμο παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου και τετραμεθυλο-υδροκινόνης, για 10 min σε pH = 7 και θερμοκρασία 30 °C παρατηρήθηκε μείωση του μέσου αριθμού μοριακού βάρους του πλαστικού από 1.000 σε 300 μονάδες [117].

Αποικοδόμηση πολυουρεθανών (PU)

Οι πολυουρεθάνες είναι μια κατηγορία πολυμερών που χρησιμοποιούνται ευρέως στην αυτοκινητοβιομηχανία, σε ιατρικές και άλλες βιομηχανικές εφαρμογές. Είναι συνθετικά, θερμοσκληρυνόμενα πολυμερή με βάση το πετρέλαιο και αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες καρβαμικού αιθυλεστέρα ($H_2NCO_2C_2H_5$) και δεσμούς ουρεθάνης με ουρία, αιθέρα, εστέρα και αρωματικές ομάδες [118]. Ανάλογα με τις πολυόλες που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση συμπύκνωσης για την παραγωγή PU, μια πολυουρεθάνη μπορεί να θεωρηθεί πολυεστέρας (ester type PU) ή πολυαιθέρας (ether type PU) [119]. Οι πολυουρεθάνες με βάση τους εστερικούς δεσμούς είναι πιο δεκτικές στη μικροβιακή αποικοδόμηση, καθώς οι πολυεστέρες μπορούν να υποβληθούν σε υδρόλυση καταλυόμενη τόσο από οξέα, όσο και από βάσεις, με αποτέλεσμα τη διάσπαση των εστερικών δεσμών [120]. Από την άλλη, οι πολυουρεθάνες με βάση τους αιθερικούς δεσμούς είναι πιο ανθεκτικές στην υποβάθμιση, καθώς οι αντίστοιχοι δεσμοί είναι ιδιαίτερα σταθεροί και η διάσπασή τους μπορεί να επιτευχθεί με οξείδωση που περιλαμβάνει την αφαίρεση του α-υδρογόνου που βρίσκεται δίπλα στο οξυγόνο [121]. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των πολυουρεθανών ανήκουν στην οικογένεια των υδρολασών και είναι πρωτεάσες, εστεράσες, ουρεάσες και λιπάσες [122]. Το ένζυμο που έχει βρεθεί να έχει τα καλύτερα αποτελέσματα στην αποικοδόμηση των πολυουρεθανών είναι μια λιπάση από το μικροοργανισμό *Cryptococcus* sp. MTCC 5455. Έπειτα από επώαση κύβων πολυεστερικής PU με συμπυκνωμένο ένζυμο ενεργότητας 1500 Units, για 96 h στους 30 °C και σε pH = 6, μετρήθηκε απώλεια βάρους ίση με 96% και παρατηρήθηκε η παραγωγή διαιθυλενογλυκόλης και αδιτικού οξέος [123].

Πειραματικό Μέρος

Υλικά

Όργανα και Συσκευές

- 2.1 Κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν βασικά εργαστηριακά όργανα όπως είναι οι αυτόματες πιπέτες διαφορετικών όγκων, οι πιπέτες Pasteur, ογκομετρικοί κύλινδροι, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, γυάλινα μπουκάλια αποστείρωσης, χωνιά, τρυβλία, σπαθίδες, δοχεία Eppendorf των 1.5 και 2.0 mL, δοχεία Falcon των 15 και 50 mL, αποστειρωμένες σύριγγες μιας χρήσης και φίλτρα σύριγγας 0.22 mm και 0.45 mm.

Εκτός από αυτόν τον τυπικό εργαστηριακό εξοπλισμό, χρησιμοποιήθηκε και πιο εξειδικευμένος εξοπλισμός, ο οποίος επισημαίνεται στην πορεία όπου έγινε χρήση του.

Θρεπτικά υλικά

- 2.1.2 Για όλα τα θρεπτικά υλικά χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης απιονισμένο νερό και πριν από τη χρήση τους υποβλήθηκαν σε διαδικασία αποστείρωσης σε αυτόκαυστο (Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO - Η.Π.Α.). Τα θρεπτικά υλικά που δεν περιλαμβάνουν γλυκόζη αποστειρώθηκαν σε συνθήκες θερμοκρασίας 121 °C για 20 min, ενώ στην περίπτωση που υπήρχε γλυκόζη οι συνθήκες ήταν 109 °C για 40 min, καθώς παρατηρείται καραμελοποίηση της γλυκόζης σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Θρεπτικό υλικό YPD

Για την ανάπτυξη και την αποθήκευση μικροοργανισμών χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο YPD, το οποίο αποτελείται από 1% εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), 2% πεπτόνη (peptone), 2% γλυκόζη (glucose). Πριν τον εμβολιασμό του, το θρεπτικό αποστειρώνεται στους 109 °C για 40 min, ενώ για την κατασκευή τρυβλίων YPD 2% άγαρ (nutrient agar) προστίθεται στο μέσο.

Θρεπτικό υλικό LB

Για την ανάπτυξη των βακτηρίων το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται ονομάζεται LB και αποτελείται από 0.5% εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), 1% τρυπτόνη (tryptone), 1% NaCl και είναι ρυθμισμένο σε pH = 7.4. Πριν τον εμβολιασμό του, το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται στους 121 °C για 20 min.

Θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη του μανιταριού *Abortiporus biennis* (*A. biennis*)

Για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού παρασκευάζονται αρχικά προκαλλιέργειες που περιέχουν 5.7% w/v d-ξυλόζη (d-xylose), 30 g/L εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), 1g/L K₂HPO₄, 0.2 g/L MgSO₄·7H₂O και είναι ρυθμισμένες με HCl σε pH = 6.0. Στις

προκαλλιέργειες προστίθεται αντιβιοτικό σε συγκέντρωση 0.1 mg/mL και εμβολιάζονται με 3 κομμάτια τρυβλίου μεγέθους 0.5x0.5 εκ., το καθένα. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται καλλιέργειες που περιέχουν 4% w/v στελέχη αραβοσίτου, 1 g/L NH₄NO₃, 0.8 g/L KH₂PO₄, 0.2 g/L Na₂HPO₄, 0.5 g/L MgSO₄, 2 g/L (NH₄)₂C₄H₄O₆ και ρυθμίζονται σε pH = 6.0. Οι καλλιέργειες εμβολιάζονται με βιομάζα από τις προκαλλιέργειες και επωάζονται για 15 ημέρες στους 27 °C. Αντιβιοτικό σε συγκέντρωση 0.1 mg/mL προστίθεται και στις καλλιέργειες για αποφυγή πιθανής επιμόλυνσής τους, καθώς ο ταχύτατος βαθμός ανάπτυξης των βακτηρίων, μπορεί να καταστρέψει την ανάπτυξη των μανιταριών.

Θρεπτικά μέσα για screening τροποποιημένων κυττάρων

Για τη διαλογή των κατάλληλα τροποποιημένων κυττάρων μετά τη διαδικασία ηλεκτροφόρησης των κυττάρων της ζύμης *Pichia pastoris* χρησιμοποιούνται δυο διαφορετικά μέσα. Το πρώτο θρεπτικό μέσο (Minimal Dextrose - MD) περιέχει 10% v/v διάλυμα ζύμης αζωτούχας βάσης (yeast nitrogen base – YNB), 0.2% v/v βιοτίνη (biotine), 2% γλυκόζη (glucose) και 1.5% w/v άγαρ (nutricient agar). Το διάλυμα ζύμης αζωτούχας βάσης (YNB) είναι ένα βασικό μέσο για την παρασκευή ζύμης και περιέχει δυο βασικά συστατικά σε καθορισμένες συγκεντρώσεις: 3.4% w/v διάλυμα ζύμης αζωτούχας βάσης (YNB) και 10% w/v θειικό αμμώνιο (ammonium sulfate). Κατά αντιστοιχία, το δεύτερο μέσο περιέχει 10% v/v διάλυμα ζύμης αζωτούχας βάσης (YNB), 0.2% v/v βιοτίνη, 0.5% v/v μεθανόλη, 0.1% v/v CuSO₄, 1.5% w/v άγαρ και 2mM υποστρώματος ABTS.

Για την παρασκευή και των δυο μέσων το διάλυμα ζύμης αζωτούχας βάσης (YNB), το άγαρ μαζί με το H₂O και η γλυκόζη σε στερεή μορφή αποστειρώνονται το καθένα ξεχωριστά στους 109 °C για 40 min. Τα διαλύματα βιοτίνης και CuSO₄ αποστειρώνονται με χρήση αποστειρωμένου φίλτρου 0.22 μm (filter sterilization) και προστίθενται μετά την αποστείρωσή του, όπως και η μεθανόλη, η οποία δεν αποστειρώνεται. Να σημειωθεί ότι για το διάλυμα CuSO₄ χρησιμοποιείται υπερκάρθαρο νερό και παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 100 φορές μεγαλύτερη από την απαιτούμενη, ενώ μετά την χρήση του αποθηκεύεται στους 5 °C.

Θρεπτικά υλικά για παραγωγή της λακκάσης που προέρχεται από το μικροοργανισμό *A.biennis* (AbiLac)

Για την παραγωγή της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος του μανιταριού *A.biennis* χρησιμοποιούνται δυο διαφορετικά θρεπτικά μέσα, ένα για τις προκαλλιέργειες κι ένα για τις καλλιέργειες του μικροοργανισμού. Το θρεπτικό μέσο για τις προκαλλιέργειες (BMGY) αποτελείται από 1% w/v εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), 2% w/v πεπτόνη (peptone), 10% v/v ρυθμιστικό διάλυμα καλλιεργείων *P. pastoris* (pichia buffer), 10% v/v διάλυμα ζύμης αζωτούχας βάσης (YNB), 0.2% v/v βιοτίνη (biotine) και 10% v/v γλυκερόλη (glycerol), ενώ το θρεπτικό υλικό για τις καλλιέργειες (BMMY) περιέχει 1% w/v εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), 2% w/v πεπτόνη (peptone), 10% v/v ρυθμιστικό διάλυμα καλλιεργείων *P. Pastoris* (pichia buffer), 10% v/v διάλυμα ζύμης αζωτούχας βάσης (YNB), 0.2% v/v βιοτίνη (biotine), 0.5% v/v μεθανόλη (methanol) και 0.1 v/v CuSO₄. Το ρυθμιστικό διάλυμα καλλιεργείων *P. pastoris* είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελείται από KH₂PO₄ – K₂HPO₄, συγκέντρωσης 1M και pH = 6, και αποστειρώνεται ξεχωριστά, όπως και το διάλυμα ζύμης αζωτούχας βάσης (YNB), το οποίο είναι ίδιο με προηγούμενος. Πριν τον εμβολιασμό τους, τα θρεπτικά αποστειρώνονται στους 121 °C για 20 min.

Διάλυμα Mineral Medium

Το mineral medium είναι ένα πλούσιο σε ανόργανα άλατα θρεπτικό μέσο, το οποίο αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά:

- 19 mM NaH₂PO₄, 33.5 mM K₂HPO₄, 7.6 mM (NH₄)₂C₄H₄O₆ και
- 250 μM MgSO₄·7H₂O, 147 μM FeCl₃·6H₂O, 14 μM ZnCl₂·4H₂O, 12 μM CoCl₂·6H₂O, 12 μM Na₂MoO₄·2H₂O, 10 μM CaCl₂·2H₂O, 11 μM CuCl₂, 12 μM MnCl₂, 12 μM H₃BO₃, 1,8 mM HCl

Η διαλυτοποίηση των αλάτων που αναφέρονται δεύτερα γίνεται σε υπερκάθαρο H₂O και επειδή βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες παρασκευάζεται ένα διάλυμα σε συγκέντρωση 100 φορές μεγαλύτερη από την απαιτούμενη. Από αυτό το διάλυμα παραλαμβάνεται κάθε φορά η απαραίτητη ποσότητα, στην οποία προστίθενται και τα άλατα της πρώτης κατηγορίας, ώστε να προκύψει τελικά το θρεπτικό μέσο.

Ρυθμιστικά διαλύματα

2.1.3 Διάλυμα ενυδάτωσης PBS

Το διάλυμα PBS είναι ένα ισοτονικό διάλυμα αλάτων που αποτρέπει τη διάρρηξη των μεμβρανών του κυττάρου λόγω οσμωτικής πίεσης. Αποτελείται από 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ και διαλύεται σε απιονισμένο H₂O. Αν το διάλυμα πρόκειται να προστεθεί σε κάποια καλλιέργεια, τότε αποστειρώνεται στους 121 °C για 20 min.

Talon buffer

Το διάλυμα που χρησιμοποιείται για την εξισορρόπηση και την απομόνωση της πρωτεΐνης LCC περιέχει 50 mM Tris-base, 300 mM NaCl και ρυθμίζεται σε pH = 8 με πυκνό HCl.

Ρυθμιστικά διαλύματα για τον χαρακτηρισμό του ενζύμου AbiLac

Για το χαρακτηρισμό της λακκάσης από το μανιτάρι *A. biennis* χρησιμοποιούνται αρκετά ρυθμιστικά διαλύματα με εύρος pH από 3 έως 9. Η σύσταση αυτών των διαλυμάτων μαζί με τη συγκέντρωση και το pH τους παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Σύσταση, συγκέντρωση και pH ρυθμιστικό διαλυμάτων για το χαρακτηρισμό του ενζύμου AbiLac.

Ρυθμιστικό διάλυμα	Συστατικά	Συγκέντρωση	pH
citrate - phosphate	κιτρικό οξύ – NaH ₂ PO ₄	100 mM	3
citrate - phosphate	κιτρικό οξύ – NaH ₂ PO ₄	100 mM	4
citrate - phosphate	κιτρικό οξύ – NaH ₂ PO ₄	100 mM	5
citrate - phosphate	κιτρικό οξύ – NaH ₂ PO ₄	100 mM	6
sodium - phosphate	Na ₂ HPO ₄ – NaH ₂ PO ₄	100 mM	6
sodium - phosphate	Na ₂ HPO ₄ – NaH ₂ PO ₄	100 mM	7
sodium - phosphate	Na ₂ HPO ₄ – NaH ₂ PO ₄	100 mM	8
Tris - HCl	Tris base – π. HCl	100 mM	8
Tris - HCl	Tris base – π. HCl	100 mM	9

Μέθοδοι

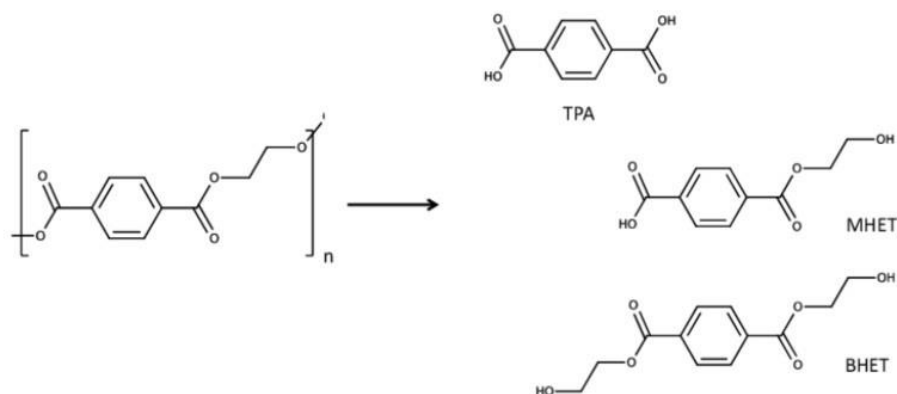
Μελέτη δράσης του μανιταριού *A. biennis* σε συνθετικά πολυμερή

- 2.2 Για τη μελέτη της δράσης του μύκητα *A. biennis* παρασκευάστηκαν στερεές καλλιέργειες με συνθετικά πολυμερή. Τα πλαστικά υλικά που επιλέχθηκε να μελετηθούν ήταν το PS, το PU και το PET, τα οποία βρίσκονταν σε μορφή φιλμ και ήταν άμορφα. Πιο αναλυτικά, σε γυάλινα φιαλίδια προστίθεται από 1 mL θρεπτικού υλικού mineral medium και 1.5% άγαρ για να σταθεροποιηθεί. Στην πλούσια σε ανόργανα άλατα στερεή καλλιέργεια τοποθετείται ένα προζυγισμένο φιλμ πλαστικού, το οποίο αποτελεί τη μόνη πηγή άνθρακα για το μικροοργανισμό και ακολουθεί ενυδάτωση της καλλιέργειας με διάλυμα PBS. Σε κάποιες από τις καλλιέργειες προστέθηκε και 20% κασιγάρος, ο οποίος είναι ένα παραπροϊόν της παραγωγής ελαιόλαδου, πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, οι οποίες έχει βρεθεί ότι διασπώνται από διάφορους μικροοργανισμούς [124]. Οι στερεές καλλιέργειες αφήνονται σε σκιερό μέρος και θερμοκρασία περιβάλλοντος συνολικά για 30 ημέρες και ανά 10 ημέρες μελετάται ο βαθμός αποικοδόμησης σε όλες τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν. Για το σκοπό αυτό, ορισμένες από τις καλλιέργειες διακόπτονται και στο στερεό μέσο προστίθενται 3 mL PBS με σκοπό την εκχύλιση των ενζύμων τους, ενώ το πλαστικό φιλμ καθαρίζεται και αποστειρώνεται με διάλυμα αιθανόλης 70% προκειμένου να μελετηθεί η μείωση της μάζας και του μοριακού του βάρους. Όλες οι καλλιέργειες ενυδατώνονταν τακτικά με πρόσφατα αποστειρωμένο διάλυμα PBS, καθώς το φυσικό περιβάλλον ανάπτυξης του μανιταριού *A. biennis* απαιτεί υψηλά ποσοστά υγρασίας.

2.2.1.1 Μελέτη της αποικοδόμησης των πλαστικών με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

Η εύρεση προϊόντων αποικοδόμησης, όπως είναι τα μονομερή και τα ολιγομερή του πολυμερούς, αποτελεί μια πολύ καλή ένδειξη της δράσης του μικροοργανισμού και των ενζύμων που αυτό απελευθερώνει. Η επιβεβαίωση της ύπαρξης προϊόντων αποδόμησης και η ποσοτικοποίησή τους πραγματοποιείται με τη βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Μέσω αυτής της ενόργανης μεθόδου χημικής ανάλυσης, τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται καθώς διαπερνούν τη στήλη της χρωματογραφίας με διαφορετικές ταχύτητες. Πιο συγκεκριμένα, τα υδρόφοβα μόρια προσροφώνται σε μια στήλη C₁₈, η οποία αποτελείται από μια υδρόφοβη στατική φάση (Στήλη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) CC 250/4.6 NUCLEOSIL 100-5 C18 Cat. No: 721662.46, MACHEREY-NAGEL - Γερμανία) και στη συνέχεια εκλύονται σταδιακά από αυτή λόγω της ροής μιας έντονα πολικής, κινητής φάσης [125].

Στην περίπτωση του PET, τα προϊόντα αποικοδόμησης είναι το τερεφθαλικό οξύ (TPA), το μονο-(2-υδροξυαιθυλ)τερεφθαλικό οξύ (MHET) και το δι-(2-υδροξυαιθυλ)τερεφθαλικό (BHET). Οι παραπάνω ενώσεις διαφέρουν κατά ένα μόριο αιθυλενογλυκόλης, το οποίο αυξάνει την υδροφοβικότητα των μορίων και οδηγεί σε αυξανόμενους χρόνους έκλυσης με τη σειρά: $t_{TPA} < t_{MHET} < t_{BHET}$. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την έκλυση των παραπάνω ενώσεων αποτελείται από 20% ακετονιτρίλιο, 20% πυκνό θειικό οξύ και 60% υπερκάθαρο νερό.



Εικόνα 8: Προϊόντα αποικοδόμησης PET.

Προκειμένου να αναλυθούν τα δείγματα του πλαστικού, πρώτα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 10000 στροφές. Ακολούθως, 300 μ L από το υπερκείμενο υγρό τοποθετήθηκαν σε ειδικά γυάλινα vials των 1.5 mL και εισάχθηκαν στον υποδοχέα του αναλυτικού συστήματος υγρής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας πηκτώματος (HPLC & GPC Agilent 1260 Infinity II LC, Agilent Technologies - Η.Π.Α.). Έπειτα, ορίστηκαν οι συνθήκες διεξαγωγής της ανάλυσης στο λογισμικό του συστήματος της HPLC, δηλαδή καθορίστηκε η ροή της κινητής φάσης ίση με 0.8 mL/min και ο χρόνος ανάλυσης του κάθε δείγματος ίσος με 13 min. Μετά το τέλος της ανάλυσης, το ίδιο λογισμικό εξάγει το χρωματογράφημα του κάθε δείγματος στο οποίο ταυτοποιούνται οι ενώσεις που περιέχει σύμφωνα με το χρόνο έκλουσής τους. Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των παραπάνω ουσιών έγινε μετά από σύγκριση των χρόνων έκλουσης με τα χρωματογραφήματα πρότυπων διαλυμάτων.

2.2.1.2

Μελέτη της απώλειας μοριακών βαρών με χρωματογραφία διείσδυσης γέλης (Gel permeation chromatography – GPC)

Η μέτρηση της μείωσης του μοριακού βάρους ενός πολυμερούς αποτελεί, επίσης, ένδειξη της δράσης των μικροοργανισμών και των ενζύμων τους. Η μελέτη του μοριακού βάρους ενός υλικού επιτυγχάνεται με τη χρωματογραφία διείσδυσης γέλης (GPC), η οποία διαχωρίζει τα μακρομόρια βάσει του μοριακού τους μεγέθους. Μέσω της παραπάνω ανάλυσης υπολογίζεται το μέσου αριθμού μοριακό βάρος (M_n) και το μέσου βάρους μοριακό βάρος (M_w) του δείγματος. Μια μείωση στο M_n υποδηλώνει τη διάσπαση πολλών μακρομορίων διαφόρων μεγεθών, ενώ μια μείωση στο M_w υποδηλώνει τη διάσπαση μεγάλων μακρομορίων.

Με τη μέθοδο αυτή αναλύθηκαν τα δείγματα των PS και PU. Τα πλαστικά φιλμ των πλαστικών διαλύθηκαν σε τετραϋδροφουράνιο (THF), ο οποίος αποτελεί και το διαλύτη της ανάλυσης, σε συγκέντρωση 2 mg/mL. Μετά την προσθήκη του THF, τα δείγματα επωάζονται στους 30 °C για περίπου μισή ώρα και στη συνέχεια φιλτράρονται με φίλτρο πορώδους 0.22 μ m. Περίπου 1 mL από τα φιλτραρισμένα δείγματα μεταφέρεται σε ειδικά γυάλινα vials των 1.5 mL, τα οποία εισάγονται στον υποδοχέα του αναλυτικού συστήματος υγρής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας πηκτώματος (HPLC & GPC Agilent 1260 Infinity II LC, Agilent Technologies - Η.Π.Α.). Έπειτα, ορίζονται οι συνθήκες διεξαγωγής της ανάλυσης στο λογισμικό του συστήματος της GPC, με τη ροή της κινητής φάσης να ορίζεται ίση με 1 mL/min και ο χρόνος ανάλυσης του κάθε δείγματος ίσος με 30 min. Στο τέλος της ανάλυσης,

το λογισμικό της GPC εξάγει ένα χρωματογράφημα για κάθε δείγμα, από το οποίο προκύπτουν οι τιμές για τα μέσα μοριακά βάρη, έπειτα από σύγκριση με καμπύλη αναφοράς μέσω των μοριακών βαρών γνωστών πολυμερών.

Προσδιορισμός ενεργότητας εκκρινόμενων ενζύμων

2.2.1.3 Η ενζυμική δραστηριότητα ενός ενζύμου μετράται σε Units. Το 1 Unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$) ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει την μετατροπή ενός μmol υποστρώματος ανά λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες της μεθόδου ανάλυσης, οι οποίες είναι συνήθως οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου. Ο προσδιορισμός της ενεργότητας γίνεται συνήθως με τη χρήση εργαστηριακών τεχνικών φασματοφωτομετρικής ανάλυσης. Κατά τη διάρκεια αυτών των αναλύσεων λαμβάνονται δεδομένα για την απορρόφηση που δίνει το επιλεγμένο υπόστρωμα, τα οποία με τη βοήθεια του νόμου Lambert-Beer μετατρέπονται σε συγκέντρωση ενζύμου και στη συνέχεια σε ενεργότητα ανά ml ενζύμου (Units/ml ενζύμου).

Προσδιορισμός ενεργότητας λακκασών

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ενεργότητα των λακκασών, σε ορισμένη ποσότητα δείγματος προστίθεται κατεχόλη, η οποία οξειδώνεται από τη λακκάση και το προϊόν οξειδώσεώς της είναι έγχρωμο και απορροφά στα 450 nm. Ένας ακόμα τρόπος προσδιορισμού της ενεργότητας της λακκάσης, είναι η μέτρηση της απορρόφησης μετά από προσθήκη του αντιδραστήριου ABTS. Το ABTS αποτελεί ένα υπόστρωμα το οποίο παρουσία λακκάσης οξειδώνεται, αποκτά ένα πράσινο χρώμα και απορροφά στα 420 nm. Η διαδικασία που ακολουθείται και για τις δυο περιπτώσεις αντιδραστηρίων είναι η ακόλουθη:

- ✓ Σε ένα κελί του Microplate προστίθενται 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος citrate-phosphate με $\text{pH} = 4.5$ και συγκέντρωση $C = 100 \text{ mM}$.
- ✓ Σε διπλανό κελί τοποθετούνται 25 μL κατεχόλης ή ABTS. Η κατεχόλη παραλαμβάνεται από stock συγκέντρωσης 50 mM, με αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση στην αντίδραση να είναι 5mM, ενώ το ABTS παραλαμβάνεται από stock συγκέντρωσης 20 mM, με αποτέλεσμα η τελική του συγκέντρωση στην αντίδραση να είναι 2 mM.
- ✓ Σε τρίτο κελί τοποθετούνται 25 μL δείγματος, τα οποία έχουν προηγουμένως φυγοκεντρηθεί και λαμβάνεται μόνο το υπερκείμενο.
- ✓ Λίγο πριν τοποθετηθεί το Microplate στο φωτόμετρο, στο κελί του ρυθμιστικού διαλύματος προστίθενται διαδοχικά το αντιδραστήριο και το δείγμα. Αυτό το βήμα γίνεται τελευταία στιγμή, έτσι ώστε η αντίδραση να ξεκινήσει περίπου τη στιγμή στην οποία θα αρχίσει και η επώαση.
- ✓ Ρυθμίζεται η θερμοκρασία του φωτόμετρου και εισάγεται το Microplate στον ειδικό θάλαμο της συσκευής για επώαση. Στην περίπτωση της κατεχόλης η επώαση πραγματοποιείται στους 40 °C για 10 min, ενώ στην περίπτωση του ABTS πραγματοποιείται επώαση στους 35 oC για 15 min.
- ✓ Μετά το πέρας του χρόνου λαμβάνεται η μέτρηση της απορρόφησης, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ενεργότητα του ενζύμου.

Προσδιορισμός ενεργότητας υπεροξειδασών

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των υπεροξειδασών, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα η βερατρυλική αλκοόλη (veratryl alcohol or 3,4-dimethylbenzyl alcohol). Όταν η βερατρυλική αλκοόλη αντιδράσει με κάποια υπεροξειδάση, παρουσία υπεροξειδίου του

υδρογόνου, οξειδώνεται σε βερατραλδεΰδη (veratraldehyde), η οποία απορροφά στα 310 nm [126]. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι αναλυτικά η ακόλουθη:

- ✓ Σε ένα κελί του Microplate προστίθενται 200 μL διαλύματος που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα citrate-phosphate με $\text{pH} = 4.5$ και συγκέντρωση $C = 100 \text{ mM}$ και 2.5 μL H_2O_2 , το οποία παραλαμβάνεται από stock συγκέντρωσης 50 mM, με αποτέλεσμα η τελική του συγκέντρωση στην αντίδραση να είναι 0.5 mM.
- ✓ Σε διπλανό κελί τοποθετούνται 25 μL υποστρώματος .
- ✓ Σε τρίτο κελί τοποθετούνται 25 μL δείγματος, τα οποία έχουν προηγουμένως φυγοκεντρηθεί και λαμβάνεται μόνο το υπερκείμενο.
- ✓ Λίγο πριν τοποθετηθεί το Microplate στο φωτόμετρο, στο κελί του ρυθμιστικού διαλύματος προστίθενται διαδοχικά το διάλυμα του υποστρώματος και το δείγμα. Αυτό το βήμα γίνεται τελευταία στιγμή, έτσι ώστε η αντίδραση να ξεκινήσει περίπου τη στιγμή στην οποία θα αρχίσει και η επώαση.
- ✓ Ρυθμίζεται η θερμοκρασία του φωτόμετρου στους 35 °C και εισάγεται το Microplate στον ειδικό θάλαμο της συσκευής για επώαση 30 min.
- ✓ Μετά το πέρας του χρόνου λαμβάνεται η μέτρηση της απορρόφησης, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ενεργότητα του ενζύμου.

Προσδιορισμός ενεργότητας εστερασών

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των εστερασών, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα ο εστέρας του 4-νιτροφαινόλου βουτυρικού οξέος (p-nitrophenyl butyrate, pNPB). Το pNPB όταν αντιδράσει με την κουνιάση διασπάται, απελευθερώνοντας την 4-νιτροφαινόλη (pNP) η οποία απορροφά στα 410 nm. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι αναλυτικά η ακόλουθη:

- ✓ Σε ένα κελί του Microplate προστίθενται 217.35 μL ρυθμιστικού διαλύματος citrate-phosphate με $\text{pH} = 6$ και συγκέντρωση $C = 100 \text{ mM}$.
- ✓ Σε διπλανό κελί τοποθετούνται 12.65 μL pNPB, το οποία παραλαμβάνεται από stock συγκέντρωσης 20 mM, με αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση του pNPB στην αντίδραση να είναι 1 mM. Για την παρασκευή του stock, το pNPB διαλύεται σε διμεθυλ-σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO).
- ✓ Σε τρίτο κελί τοποθετούνται 20 μL δείγματος, τα οποία έχουν προηγουμένως φυγοκεντρηθεί και λαμβάνεται μόνο το υπερκείμενο.
- ✓ Λίγο πριν τοποθετηθεί το Microplate στο φωτόμετρο, στο κελί του ρυθμιστικού διαλύματος προστίθενται διαδοχικά το διάλυμα pNPB και το δείγμα. Αυτό το βήμα γίνεται τελευταία στιγμή, έτσι ώστε η αντίδραση να ξεκινήσει περίπου τη στιγμή στην οποία θα αρχίσει και η επώαση.
- ✓ Ρυθμίζεται η θερμοκρασία του φωτόμετρου στους 35 °C και εισάγεται το Microplate στον ειδικό θάλαμο της συσκευής για επώαση 15 min.
- ✓ Μετά το πέρας του χρόνου λαμβάνεται η μέτρηση της απορρόφησης, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ενεργότητα του ενζύμου.

Για τη μετατροπή των απορροφήσεων που προκύπτουν από τις φασματοφωτομετρικές τεχνικές σε ενζυμική ενεργότητα χρησιμοποιείται ο νόμος Lambert – Beer, ο οποίος περιγράφεται από την εξίσωση: $A = \epsilon \cdot b \cdot C$ (1). Με άλλα λόγια, η συγκέντρωση των ενζύμων που υπάρχουν στο διάλυμα συνδέεται με τη μετρούμενη απορρόφηση μέσω της γραμμομοριακής απορροφητικότητας ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) και της οπτικής διαδρομής ή αλλιώς μήκους της κυψελίδας, b (cm). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο φωτόμετρο (SPECTROstar Nano Microplate Reader, BMG Labtech - Γερμανία), για το οποίο ισχύει ότι

$b = 0.6 \text{ cm}$. Οι γραμμομοριακές απορροφητικότητες για τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Τιμές γραμμομοριακής απορροφητικότητας ϵ για τον υπολογισμό της ενζυμικής ενεργότητας οξειδωτικών και υδρολυτικών ενζύμων.

Μήκος κύματος	ϵ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
310	9970 [127]
410	2230
420	36000 [128]
450	928

Ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος και χαρακτηρισμός του ενζύμου

2.2.2 Βιοπληροφορική ανακάλυψη του γονιδίου ενδιαφέροντος και απομόνωση του πλασμιδιακού του DNA

2.2.2.1

Με βάση ένα διαφορετικό στέλεχος του μικροοργανισμού *A. biennis* που έχει ήδη αλληλουχηθεί, έγινε ο σχεδιασμός του γονιδίου που εκφράζει το ένζυμο μελέτης με ενεργότητα λακκάσης. Τα δυο στελέχη του *A. biennis* παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό ομολογίας, επομένως έπειτα από την αλληλούχιση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, εντοπίστηκε το γονίδιο, το οποίο και συντέθηκε από την εταιρεία Genscript. Το γονίδιο που εκφράζει το γονίδιο ενδιαφέροντος εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pPICZac, ο οποίος ακολούθως εισήχθη σε βακτήρια *E. Coli* Top10. Έπειτα από την ανάπτυξη των βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνη για 24 h στους 37 °C, ακολούθησε η συλλογή των κυττάρων και η χημική τους λύση σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδίων (plasmid extraction). Τελικά, πραγματοποιήθηκε γραμμικοποίηση του πλασμιδίου, η επιτυχία της οποίας και ελέγχθηκε σε πηκτή αγαρόζης, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο δεν έχει χάσει κάποιο μέρος της αλληλουχίας του. Τελικά, το πλασμίδιο εισάγεται σε κύτταρα ζύμης μέσω της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης, με αποτέλεσμα να προκύψουν μετασηματισμένα κύτταρα ζύμης με ικανότητα να εκφράζουν το ένζυμο ενδιαφέροντος.

2.2.2.2

Ηλεκτροφόρηση πλασμιδίου σε κύτταρα ζύμης *P.pastoris*

Για την ενσωμάτωση των γραμμικοποιημένων πλασμιδίων σε κύτταρα *P. pastoris* η διαδικασία που ακολουθείται παρουσιάζεται παρακάτω:

Αρχικά, παρασκευάζονται τρυβλία YPD, στα οποία αναπτύσσονται κύτταρα *pichia pastoris* (X33). Στη συνέχεια, από τα τρυβλία εμβολιάζονται YPD προκαλλιέργειες των 50 mL και έπειτα από μια ημέρα, 10 mL από τις προκαλλιέργειες χρησιμοποιούνται ως εμβόλιο για YPD καλλιέργειες των 300 mL. Οι καλλιέργειες επωάζονται έως ότου η απορρόφηση στα 600 nm (OD_{600}) φτάσει να είναι 1.3 - 1.5. Όταν η απορρόφηση φτάσει την επιθυμητή τιμή οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται και τα κύτταρα ξεπλένονται δυο φορές με παγωμένο υπερκίθαρο νερό. Ακολουθεί η προσθήκη 1M σερβιτόλης, η οποία κάνει τα κύτταρα επιδεκτικά και το διάλυμα επαναφυγοκεντρείται. Έπειτα, προστίθεται εκ νέου μικρή ποσότητα σορβιτόλης και τα κύτταρα τοποθετούνται σε κυβέτα ηλεκτροφόρησης μαζί με το

γραμμικοποιημένο πλασμίδιο. Η κυβέτα εισάγεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ρυθμίζεται το κατάλληλο πρόγραμμα για ηλεκτροφόρηση κυττάρων *pichia pastoris*. Κατά την ηλεκτροφόρηση, ηλεκτρικό ρεύμα διαπερνάει και ψήνει τα κύτταρα, γι' αυτό στο τέλος της διαδικασίας προστίθεται και πάλι σορβιτόλη για να μειωθεί η θερμοκρασία. Τελικά, τα κύτταρα μεταφέρονται σε falcon κατάλληλου όγκου και αφήνονται σε φούρνο στους 30 °C για δυο ώρες.

Με τα κύτταρα που έχουν υποστεί ηλεκτροφόρηση εμβολιάζονται τρυβλία YPD, τα οποία περιέχουν και ζεοσίνη ως αντιβιοτικό. Από τα τρυβλία στα οποία παρατηρείται ανάπτυξη, επιλέγεται ένας μεγάλος αριθμός αποικιών και μελετώνται ως προς την ικανότητά τους να εκφράσουν το επιθυμητό γονίδιο. Για να συμβεί αυτό οι αποικίες ανακαλλιεργούνται σε τρυβλία YPD με 1M ζεοσίνη και ακολουθεί η διαλογή τους (screening).

Screening των γενετικά τροποποιημένων στελεχών

2.2.2.3 Για τη διαλογή των στελεχών που εκφράζουν το ζητούμενο γονίδιο παρασκευάζονται δυο τρυβλία, ένα με γλυκόζη (MD) κι ένα χωρίς γλυκόζη (MM). Στο τρυβλίο χωρίς γλυκόζη έχει προστεθεί και υπόστρωμα ABTS, το οποίο αποτελεί δείκτη για την παραγωγή του γονιδίου καθώς πρασινίζει παρουσία λακκάσης. Στα τρυβλία χωρίς γλυκόζη προστίθεται 0.5% v/v μεθανόλη, η οποία αποτελεί πηγή άνθρακα και λειτουργεί ως επαγωγέας για την παραγωγή της πρωτεΐνης. Η προσθήκη της μεθανόλης γίνεται στο καπάκι του τρυβλίου ώστε ο ατμός της μεθανόλης να δράσει ως επαγωγέας γιατί διαφορετικά τα κύτταρα δηλητηριάζονται και πεθαίνουν.

2.2.2.4 **Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός του ενζύμου AbiLac**

Αρχικά, παρασκευάζονται υγρές προκαλλιέργειες BMGY των 50 mL, βρίσκονται σε κωνικές φιάλες των 250 mL και παραμένουν σε επώαστήρα στους 30 °C. Οι προκαλλιέργειες αυτές έχουν εμβολιαστεί με μετασχηματισμένα κύτταρα που περιέχουν την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος κι έχουν αναπτυχθεί σε τρυβλίο YPD. Έπειτα από περίπου μια ημέρα, λαμβάνεται δείγμα από τις κωνικές φιάλες, το οποίο αραιώνεται και μετράται η απορρόφηση που έχει στα 600 nm (OD_{600}), η οποία είναι αντιπροσωπευτική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Φωτόμετρο S-22 UV/Vis. Spectrophotometer, BOECO - Γερμανία). Στη συνέχεια, καθώς το γινόμενο του όγκου με την απορρόφηση θεωρείται σταθερό, υπολογίζεται ο όγκος της προκαλλιέργειας που χρειάζεται έτσι ώστε η καλλιέργεια να έχει OD_{600} ίσο με 1. Ο απαραίτητος όγκος συλλέγεται σε falcon των 15 mL και φυγοκεντρείται για περίπου 15 min (φυγόκεντρος ROTANTA 460R, Hettich ZENTRIFUGEN - Γερμανία). Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται, καθώς δεν περιέχει κύτταρα και το ίζημα επαναιωρείται με προσθήκη μικρή ποσότητας θρεπτικού και ήπια ανακίνηση. Τα επαναιωρημένα κύτταρα προστίθεται στις καλλιέργειες BMMY, οι οποίες έχουν τελικό όγκο ίσο με 500 mL, βρίσκονται σε κωνικές φιάλες των 2 L και αφήνονται για επώαση στους 30 °C.

Μετά από 6 ημέρες οι υγρές καλλιέργειες τερματίζονται και το περιεχόμενο των κωνικών φιαλών χωρίζεται ισοβαρώς σε δοχεία φυγοκέντρωσης των 250 mL. Για την καταβύθιση των κυττάρων οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται για 15 min στις 14000 στροφές (Φυγόκεντρος Beckman Model J2-21 Centrifuge, Beckman Coulter - Η.Π.Α.). Ακολούθως, τα δοχεία

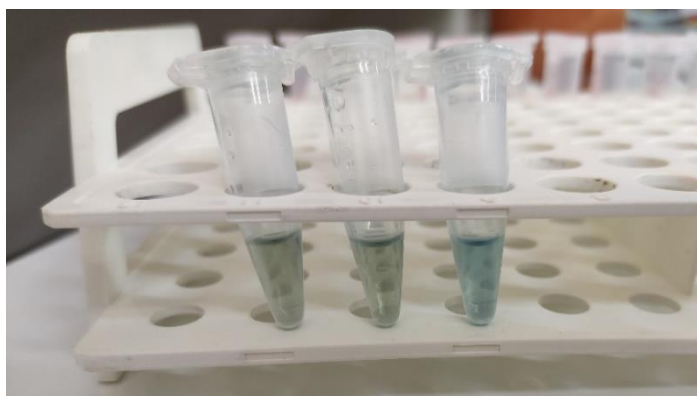
τοποθετούνται σε παγώλουτρο και το υπερκείμενο υγρό διηθείται υπό κενό, χρησιμοποιώντας διαδοχικά απλό διηθητικό χαρτί και φίλτρα με διάμετρο πόρων 0.8 μm , 0.45 μm και 0.22 μm .

Στη συνέχεια, το φιλτραρισμένο διάλυμα οδηγείται προς συμπίκνωση. Πιο αναλυτικά, το διάλυμα μεταφέρεται σε αναδευόμενο θάλαμο υπερσυμπύκνωσης (Amicon chamber 8400), στον οποίο χρησιμοποιείται μεμβράνη με πορώδες 10 kDa (Biomax 10 kDa, Millipore, Billerica, MA), γεγονός που σημαίνει ότι στο εσωτερικό της συσκευής θα συκρατηθούν μακρομόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10 kDa, ενώ τα υπόλοιπα θα περάσουν και θα συλλεχθούν σε μια ξεχωριστή κωνική φιάλη. Σταδιακά, ο συνολικός όγκος του διαλύματος συμπυκνώνεται και φτάνει τελικά η πρωτεΐνη να βρίσκεται σε όγκο περίπου 50 mL.



Εικόνα 9: Συσκευή και διάταξη συμπύκνωσης Amicon.

Η επιβεβαίωση της διαδικασίας συμπύκνωσης γίνεται με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Bradford, το οποίο όταν ανιχνεύει πρωτεΐνη αλλάζει χρώμα έπειτα από δέσμευση της χρωστικής Coomassie Blue G250 στην πρωτεΐνη [129]. Κατά τη συμπύκνωση δεν πρέπει να ανιχνεύεται πρωτεΐνη στο διήθημα, οπότε το αντιδραστήριο θα πρέπει να διατηρεί το αρχικό, καφετί του χρώμα, ενώ σε περίπτωση που έχει περάσει ποσότητα της πρωτεΐνης το χρώμα του αλλάζει και γίνεται μπλε.



Εικόνα 10: Τυφλό δείγμα (αριστερά), δείγματα υπερδιηθήματος (μέση) και συμπυκνώματος (δεξιά) έπειτα από την προσθήκη αντιδραστηρίου Bradford.

Στη συνέχεια, το συμπυκνωμένο διάλυμα υπόκειται σε μια διαδικασία αφαλάτωσης μέσω μεμβρανών διαπίδυσης, ή αλλιώς dialysis. Κατά τη διαδικασία αυτή, το ενζυμικό διάλυμα εξισορροπείται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο θα διευκολύνει στη συνέχεια την απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Πιο αναλυτικά, η αφαλάτωση μέσω μεμβρανών διαπίδυσης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού κατά την οποία με τη βοήθεια μιας ημιπερατής μεμβράνης πραγματοποιείται μετακίνηση επιλεκτικών μορίων βάσει του μοριακού τους βάρους. Η διέλευση των μορίων από τη μεμβράνη βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης και διαρκεί έως ότου να αποκατασταθεί ισορροπία ανάμεσα στο αρχικό και το επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα [130]. Για τη διαδικασία του dialysis χρησιμοποιείται μια ημιπερατή μεμβράνη (Dialysis tubing cellulose membrane w. 25mm), με μήκος ανάλογο της ποσότητας του ενζυμικού διαλύματος. Η μεμβράνη αφήνεται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει βρασμένο υπερκάρω H₂O για περίπου 30 min με σκοπό την ενυδάτωσή της. Στη συνέχεια, το ένα άκρο της μεμβράνης σφραγίζεται με πλαστικό σφιγκτήρα, ενώ στο άλλο άκρο δημιουργείται με προσοχή ένα μικρό άνοιγμα μέσα από το οποίο η μεμβράνη πληρώνεται με το ενζυμικό διάλυμα. Έπειτα, σφραγίζεται και το δεύτερο άκρο και η μεμβράνη τοποθετείται σε περιέκτη που περιέχει το επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα σε όγκο εκατονταπλάσιο από τον όγκο του ενζυμικού διαλύματος. Ο περιέκτης αφήνεται για 17-20 h στους 4 °C έτσι ώστε να γίνει η αφαλάτωση και η πρωτεΐνη να εξισορροπηθεί στο διάλυμα επιλογής. Μετά από το απαραίτητο χρονικό διάστημα παραμονής στους 4 °C, η μεμβράνη ανοίγεται και το περιεχόμενό της αποθηκεύεται σε πλαστικά Falcon κατάλληλου όγκου.

Ο καθαρισμός και η απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης γίνεται με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής. Με αυτό το είδος χρωματογραφίας μπορούν να διαχωριστούν μόρια με διαφορετικό φορτίο και ο διαχωρισμός τους βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ ενός φορτισμένου μορίου με μια αντίθετα φορτισμένη ρητίνη χρωματογραφίας. Συνήθως, η ρητίνη με την οποία πληρώνεται η στήλη είναι τέτοια ώστε να εξασφαλίσει την πρόσδεση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σε αυτή κατά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος στο σύστημα [131]. Στη συνέχεια, οι συνθήκες έκλουσης ρυθμίζονται κατάλληλα ώστε οι δεσμευμένες ουσίες να εκλούνται σταδιακά.

Στην περίπτωση της λακκάσης, χρησιμοποιείται μια στήλη σεφαρόζης (Q Sepharose) για τη δέσμευση της πρωτεΐνης, καθώς το ισοηλεκτρικό σημείο της ακατέργαστης πρωτεΐνης, άρα και αυτό που αναμένεται να είναι το ισοηλεκτρικό σημείο της καθαρισμένης πρωτεΐνης, είναι μικρότερο από 7.0.

Η διαδικασία που ακολουθείται για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης παρουσιάζεται ακολούθως:

- 1) Προσθήκη της ρητίνης στη στήλη ιοντοεναλλαγής.
- 2) Προσθήκη 10 όγκων στήλης (column volume – CV) H₂O στη στήλη, έως ότου να τοποθετηθεί σωστά η ρητίνη με ρυθμό 4.8 mL/min.
- 3) Προσθήκη 10 CV διαλύματος A (Bis – Tris 20 mM, pH = 7) με τον ίδιο ρυθμό, με σκοπό την εξισορρόπηση της στήλης και του ανιχνευτή. Με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα έχει εξισορροπηθεί και το πρωτεϊνικό διάλυμα κατά τη διαδικασία της διαπίδυσης.
- 4) Προσθήκη του δείγματος στη στήλη.
- 5) Έκπλυση της στήλης με διάλυμα A, έως ότου ο ανιχνευτής να εντοπίζει μόνο το ρυθμιστικό διάλυμα.
- 6) Έκπλυση της στήλης με καθορισμένο πρόγραμμα, προκειμένου να εκλουστούν σταδιακά τα συστατικά του δείγματος και να παραληφθεί ξεχωριστά η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Για

την έκλουση της πρωτεΐνης χρησιμοποιείται εκτός από το διάλυμα A κι ένα δεύτερο διάλυμα B (διάλυμα A + NaCl 1M). Το πρόγραμμα έκλουσης είναι το εξής:

- I. Από 0 έως 20 min, ισοκρατική ροή 90% ρυθμιστικού διαλύματος (A) και 10% διαλύματος (B). Επομένως, η τελική συγκέντρωση του NaCl στην κινητή φάση είναι 100 mM.
 - II. Από 21 έως 51 min, βαθμίδωση της ροής από 10% (B) έως 25% (B). Επομένως, η τελική συγκέντρωση του NaCl στην κινητή φάση αυξάνεται σταδιακά από 100 mM σε 250 mM.
 - III. Από 52 έως 72 min, βαθμίδωση της ροής από 25% (B) έως 50% (B). Επομένως, η τελική συγκέντρωση του NaCl στην κινητή φάση αυξάνεται σταδιακά από 250 mM σε 500 mM.
 - IV. Από 73 έως 103 min, ισοκρατική ροή διαλύματος NaCl 1 M (B) για καθαρισμό της στήλης.
- 7) Ξέπλυμα της στήλης με H₂O και στη συνέχεια με 20% αιθανόλη.



2.2.2.5 *Εικόνα 11: Διάταξη καθαρισμού πρωτεΐνης με στήλη Q-Sepharose συνδεδεμένη με κλασματοσυλλέκτη.*

Ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου από αποδιατακτικές συνθήκες πραγματοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι πρωτεΐνες διατρέχουν τη σχηματιζόμενη γέλη με διαφορετικό ρυθμό, ο οποίος εξαρτάται από το μέγεθός, τη δομή και το φορτίο τους.

Βασικά αντιδραστήρια για τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης είναι το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) και η 2-μερκαπτοαιθανόλη. Η χρήση αυτών των αντιδραστηρίων μηδενίζει την επίδραση της δομής και του φορτίου των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός τους να βασίζεται μόνο στο μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας. Πιο συγκεκριμένα, το διάλυμα του

SDS χαρακτηρίζεται ως ανιονικό απορρυπαντικό. Σκοπός του είναι να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και να τους επιδίδει αρνητικό φορτίο. Τα ανιόντα του SDS συνδέονται με τις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα προσδίδοντας στο σύμπλοκο τόσο ισχυρό φορτίο, ώστε το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης να θεωρείται αμελητέο. Η μερκαπτοαιθανόλη, από την άλλη, πετυχαίνει την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών που έχουν αναπτυχθεί ανάμεσα σε δυο ομάδες κυστεϊνών (-SH). Οι δεσμοί αυτοί είναι υπεύθυνοι για τη σωστή αναδίπλωση των μορίων οπότε το “σπάσιμό” τους οδηγεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών, οι οποίες ξεδιπλώνονται σε γραμμικές αλυσίδες με αρνητικό φορτίο ανάλογο του μεγέθους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Τελικά, έπειτα από την προσθήκη αυτών των αντιδραστηρίων στο δείγμα και με την επιβολή δυναμικού στο χώρο της πηκτής, οι πρωτεΐνες, αρνητικά φορτισμένες και αποδιαταγμένες πλέον, μετακινούνται από την άνοδο προς την κάθοδο με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους. Εκείνες που έχουν μεγάλο μοριακό βάρος κινούνται πιο αργά, καθώς διαπερνούν δυσκολότερα τους πόρους της γέλης πολυακρυλαμίδιου, ενώ οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους περνούν μέσα από τις οπές κι έτσι κινούνται πιο γρήγορα [132], [133].

Διαδικασία

Αρχικά, παρασκευάζεται γέλη η οποία περιέχει 3.4 mL απιονισμένο H₂O, 9.4 mL Tris/SDS 0.75 M, 5.88 mL bis-acrylamide, 20 μL TEMED και 100 μL φρέσκο APS 10% (resolving gel). Με την προσθήκη των αντιδραστηρίων TEMED και APS, το resolving gel πολυμερίζεται πολύ γρήγορα, για το λόγο αυτό τα δυο αυτά συστατικά προστίθενται στο τέλος της διαδικασίας. Ανάλογα με το resolving gel παρασκευάζεται μια δεύτερη γέλη (stacking gel), η οποία περιέχει 3 mL απιονισμένο H₂O, 3.8 mL Tris/SDS 0.25 M, 0.76 mL bis-acrylamide, 15 μL TEMED και 50 μL φρέσκο APS 10%.

Στη συνέχεια, το resolving gel προστίθεται στο μεσοδιάστημα ενός ζεύγους ορθογώνιων γυάλινων πλακών, οι οποίες απέχουν μεταξύ τους 1.5 mm και είναι τοποθετημένες σε κατάλληλο στήριγμα, στη βάση του οποίου βρίσκεται ένα κομμάτι σπογγώδους υλικού. Το μεσοδιάστημά των πλακών πληρώνεται έως ότου να μείνει στην επιφάνεια ένα περιθώριο περίπου 2 εκατοστών για την μετέπειτα προσθήκη του stacking gel. Το κενό αυτό καλύπτεται με νερό, έτσι ώστε να αποφευχθεί η διόγκωση του πήγματος κατά τον πολυμερισμό του και το gel που θα προκύψει να είναι ομοιόμορφο.

Αφού το resolving gel αφηθεί για περίπου μισή ώρα ώστε να σταθεροποιηθεί, το νερό αφαιρείται από την κορυφή και η γυάλινη πλάκα συμπληρώνεται με stacking gel, ενώ στην κορυφή της τοποθετείται ένα χτενάκι, το οποίο είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό πηγαδιών, δηλαδή θέσεων στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα.

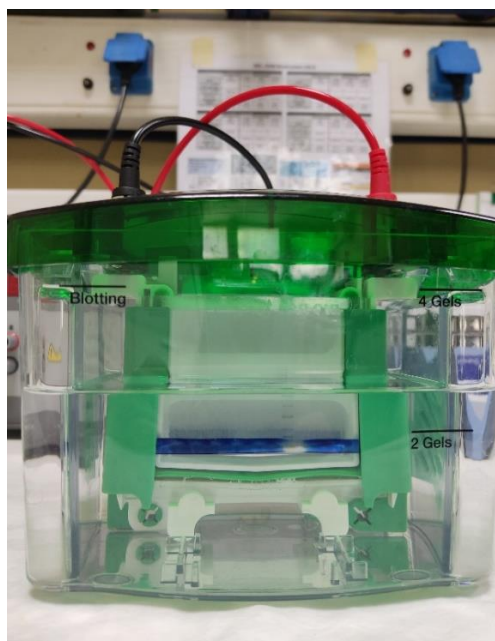
Μετά τη σταθεροποίηση του πήγματος, οι πλάκες μεταφέρονται σε ειδική συσκευή, η οποία διαθέτει ένα σύρμα για την επιβολή του δυναμικού. Έπειτα, το χτενάκι αφαιρείται με προσοχή ώστε να μη χαλάσουν οι θέσεις φόρτωσης που έχουν σχηματιστεί, και το εσωτερικό της συσκευής πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα SDS running buffer, το οποίο αποτελείται από διαλύματα Tris 250 mM, γλυκίνης 1.92M και SDS 1% και είναι ρυθμισμένο σε pH = 8.3.

Το επόμενο βήμα είναι η προετοιμασία των δειγμάτων και η προσθήκη τους στις ειδικές θέσεις της πλάκας. Σε 40 μL δείγμα προστίθενται 10 μL SDS loading buffer (20%) και

ακολουθεί ο βρασμός τους για 5 min. Το SDS loading buffer περιέχει 312.5 mM Tris-HCl ρυθμισμένο σε pH = 6.8, 10% SDS, 50% γλυκερόλη, 25% β-μερκαπτεθανόλη και 0.025% μπλε της βρωμοφαινόλης. Μετά από αυτό, τα δείγματα είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση και τοποθετούνται στις ειδικά σχηματισμένες θέσεις του πήγματος. Εκτός από τα δείγματα, σε μια θέση του gel προστίθενται 3.5 μ L πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, το οποίο λειτουργεί ως οδηγός (ladder) για την ταυτοποίηση του μοριακού βάρους των δειγμάτων.

Στη συνέχεια, ένα ειδικό καπάκι τοποθετείται πάνω στη συσκευή, με αποτέλεσμα το κύκλωμα να κλείσει και να μπορεί πλέον να εφαρμοστεί δυναμικό, με τη βοήθεια ηλεκτροδίων. Αρχικά, η τάση που επιβάλλεται είναι 50 V για περίπου μισή ώρα, προκειμένου τα δείγματα να διαπεράσουν το stacking gel και να ευθυγραμμιστούν στην αρχή του resolving gel. Ακολούθως, η τάση αυξάνεται στα 100 V, έως ότου ο ladder να φτάσει στη βάση της πηκτής, διαδικασία που χρειάζεται γύρω στις 2.5 – 3 h.

Όταν τελειώσει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, το ρυθμιστικό διάλυμα SDS συλλέγεται για επαναχρησιμοποίηση και η πηκτή αφαιρείται προσεκτικά από τη συσκευή και εισάγεται σε ειδικό περιέκτη μαζί με διάλυμα χρώσης, ο οποίος τοποθετείται σε συσκευή ήπιας ανάδευσης για 1 h. Ύστερα, το χρωστικό διάλυμα αφαιρείται και αποθηκεύεται για μετέπειτα χρήση, ενώ στον περιέκτη προστίθεται υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού τόσο ώστε να καλυφθεί πλήρως η πηκτή από αυτό και ο περιέκτης αφήνεται overnight (~20 h) σε ήπια ανάδευση. Το διάλυμα χρωματισμού αποτελείται από 0.25% μπλε βαφή Comassie Brilliant Blue (CBB), 40% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ διαλυμένα σε νερό, ενώ το διάλυμα αποχρωματισμού περιέχει 20% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ διαλυμένα σε νερό. Όταν το διάλυμα αποχρωματισμού απομακρυνθεί, η πηκτή έχει αποχρωματιστεί πλήρως εκτός από τα τμήματα στα οποία βρίσκονται οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, καθώς αυτές συνδέονται ομοιοπολικά με το διάλυμα χρώσης. Έτσι, στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου που παραλαμβάνεται τελικά ξεχωρίζουν πρωτεϊνικές ζώνες, οι οποίες συγκρίνονται με τις αντίστοιχες του πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών (ladder) και επιβεβαιώνεται το μοριακό βάρος και επομένως και η ταυτότητα των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν.



Εικόνα 12: Συσκευή ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες .

Εύρεση βέλτιστων συνθηκών παραγωγής ενζύμου AbiLac

Προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή παραγωγή της λακκάσης AbiLac σε καλλιέργειες BMMY, μελετήθηκαν 4 βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του ενζύμου σε αυτές τις καλλιέργειες. Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του θεικού χαλκού (CuSO_4), ο οποίος προστέθηκε στο θρεπτικό σε συγκεντρώσεις 0, 10, 25, 50, 100 και 200 μM . Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η βέλτιστη ποσοστιαία σύσταση της καλλιέργειας σε μεθανόλη δοκιμάζοντας συγκεντρώσεις μεθανόλης σε ποσοστά 0.5, 1, 1.5 και 2 %, ενώ σε ορισμένες καλλιέργειες προστέθηκε 1% w/v casamino acids, τα οποία δρουν ως αναστολείς πρωτεάσης, προκειμένου να ερευνηθούν οι επιπτώσεις των πρωτεασών στην παραγωγή ενός λειτουργικού ενζύμου. Τέλος, αναζητήθηκε και η βέλτιστη θερμοκρασία παραγωγής, επωάζοντας τις καλλιέργειες BMMY σε θερμοκρασίες 23 °C και 30 °C.

Για κάθε μελέτη, παραλαμβάνεται δείγμα από τις καλλιέργειες κάθε 24 h και προσδιορίζεται η ενεργότητα του ενζύμου τη δεδομένη στιγμή, μέσω φασματοφωτομετρικής ανάλυσης έπειτα από την προσθήκη υποστρώματος ABTS. Η επώαση των καλλιεργειών και οι δειγματοληψίες συνεχίζονται έως ότου παρατηρηθεί πτώση στην ενεργότητα του ενζύμου, καθορίζοντας έτσι και τη βέλτιστη χρονική διάρκεια ανάπτυξης του ενζύμου. Η συνθήκη η οποία δίνει τη μέγιστη ενεργότητα για κάθε παράγοντα που μελετάται θεωρείται και η βέλτιστη για την παραγωγή του ενζύμου.

2.2.2.7 Χαρακτηρισμός ενζύμου AbiLac

2.2.2.7.1 Βέλτιστες συνθήκες δράσης ενζύμου

Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της AbiLac (T_{optimum})

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της AbiLac εξετάστηκαν 7 διαφορετικές θερμοκρασίες από 35-70 °C. Για κάθε διαφορετική θερμοκρασία πραγματοποιήθηκε μια ξεχωριστή φασματοφωτομετρική ανάλυση με υπόστρωμα ABTS και ρυθμιστικό διάλυμα citrate-phosphate, pH = 4.5 και C = 100 mM. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου, αλλάζοντας κάθε φορά τη θερμοκρασία επώασης. Οι τελικές τιμές ενεργότητας που προέκυψαν από τις απορροφήσεις συγκρίθηκαν και η μέγιστη τιμή έδωσε τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης.

Βέλτιστο pH δράσης της AbiLac ($\text{pH}_{\text{optimum}}$)

Για τον προσδιορισμό του βέλτιστου pH δράσης της AbiLac εξετάστηκαν 8 διαφορετικές τιμές pH εύρους 2.5-9. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαλύματα citrate – phosphate για pH = 2.5 – 6 , phosphate – phosphate για pH = 6 – 8 και Tris – HCl για pH = 8 – 9. Για κάθε διαφορετικό pH πραγματοποιήθηκε μια φασματοφωτομετρική ανάλυση με υπόστρωμα ABTS και θερμοκρασία επώασης τους 35 °C. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι αντίστοιχη με αυτή που περιγράφηκε για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου, μόνο που αντί για τη χρήση ενός συγκεκριμένου ρυθμιστικού διαλύματος, έγιναν μετρήσεις σε πολλά διαφορετικά ρυθμιστικά. Οι τελικές τιμές ενεργότητας που προέκυψαν από τις απορροφήσεις συγκρίθηκαν και η μέγιστη τιμή έδωσε το βέλτιστο pH δράσης.

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης της λακκάσης πραγματοποιήθηκαν δυο αντιδράσεις με το ένζυμο και δυο με τυφλά δείγματα. Ακόμα, τα απαραίτητα διαλύματα για το χαρακτηρισμό των ενζύμου παρασκευάζονται μαζικά (mastermix) έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα μέτρησης.

2.2.2.7.2 Μελέτη σταθερότητας του ενζύμου

Προσδιορισμός θερμοσταθερότητας της AbiLac

Για τον προσδιορισμό της θερμοσταθερότητας της AbiLac εξετάστηκαν θερμοκρασίες από 30 - 70 °C. Ποσότητα ενζύμου μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα citrate – phosphate pH = 4.5 τοποθετείται για επώαση σε θερμαινόμενους και ανακινούμενους επωαστήρες Eppendorf (Eppendorf Thermomixer Comfort 1.5 & 2.0 mL – Γερμανία). Σε χρονικά διαλύματα από 0 έως και 24 h λαμβάνονται δείγματα, στα οποία προστίθεται υπόστρωμα ABTS και μέσω φασματοφωτομετρικής ανάλυσης υπολογίζεται η ενεργότητα του ενζύμου.

Προσδιορισμός της σταθερότητας της AbiLac σε διάφορες τιμές pH

Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας της AbiLac σε διαφορετικές τιμές pH εξετάστηκαν οι τιμές pH 3 και 4. Ποσότητα ενζύμου μαζί με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα αφήνεται για επώαση στους 4 °C. Σε χρονικά διαστήματα 0, 24, 48 και 120 h λαμβάνονται δείγματα, στα οποία προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα citrate – phosphate με pH = 4 και υπόστρωμα ABTS και μέσω φασματοφωτομετρικής ανάλυσης υπολογίζεται η ενεργότητα του ενζύμου.

2.2.2.7.3 Μελέτη δράσης ενζύμου σε πλαστικά

Για τη μελέτη της δράσης του ενζύμου AbiLac πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με πολυμερικά υλικά PET και PS. Τα υλικά αυτά βρίσκονται σε μορφή σκόνης κι έχουν κοκκομετρία μικρότερη από 500 nm.

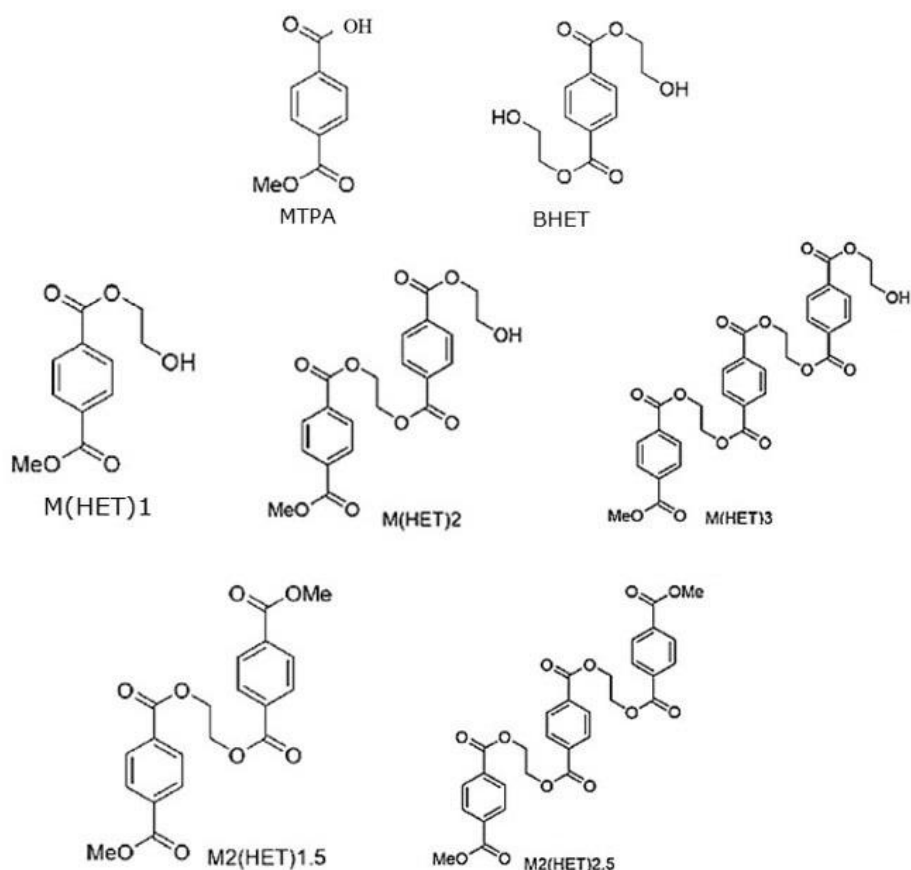
Αρχικά, προσδιορίστηκε η τιμή της ενεργότητας η οποία αντιστοιχεί σε ικανοποιητική δράση του ενζύμου. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων 10 mg πολυμερικής σκόνης ανά mL αντίδρασης επώαστηκαν με διαφορετικά Units ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα citrate – phosphate pH = 4.5. Οι αντιδράσεις διήρκησαν 96 h σε θερμοκρασία 30 °C και ανάδευση 1200 rpm. Κάθε 24 h, ποσότητα ενζύμου ίση με το μισό της αρχικής προστίθεται στις αντιδράσεις, έτσι ώστε να διατηρηθούν σταθερές οι μονάδες ενεργότητας του ενζύμου. Παράλληλα, η δράση του ενζύμου αξιολογήθηκε συνδυαστικά με τη χρήση mediators, δηλαδή ουσιών που προάγουν την οξειδοαναγωγική δράση όπως είναι τα HBT και TEMPO. Η τελική συγκέντρωση των mediators στην αντίδραση ήταν 500μM, η ενεργότητα του ενζύμου ήταν 4 Units/mL και οι συνθήκες αντίδρασης ίδιες με αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Εύρεση μηχανισμού διάσπασης του PET χρησιμοποιώντας συνθετικά μοντέλα υποστρώματα

Για την εύρεση του μηχανισμού δράσης του ενζύμου στην αποικοδόμηση του PET χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα υποστρώματα του PET, τα οποία έχουν συντεθεί χημικά από το

Ινστιτούτο Μοριακής και Γενετικής Μηχανικής στη Σερβία (IMGGE) [134]. Η διάσπαση των υποστρωμάτων έγινε χρησιμοποιώντας ποσότητα υποστρώματος ίση με 1mg/mL μαζί με 4.3 Units ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα citrate – phosphate pH = 4.5. Οι αντιδράσεις διήρκησαν 24 h κι οι συνθήκες αντίδρασης ήταν ίδιες με αυτές που παρουσιάστηκαν προηγουμένως.

Μετά το πέρας των παραπάνω αντιδράσεων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία για τον εντοπισμό προϊόντων αποικοδόμησης του PET και την εύρεση του μηχανισμού δράσης της ενζυμικής κατάλυσης.



Εικόνα 13: Δομές συνθετικών μοντέλων υποστρωμάτων PET.

2.2.3

2.2.3.1

Μελέτη του βαθμού αποικοδόμησης του μίγματος τereφθαλικού πολυεστέρα – αμύλου

Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός του ενζύμου LCC

Για την αποικοδόμηση του πλαστικού υλικού PET, εκτός από στερεές καλλιέργειες με το μανιτάρι *A. biennis*, πραγματοποιήθηκαν και αντιδράσεις με το ένζυμο leaf and branch compost cutinase (LCC). Το ένζυμο αυτό εκφράστηκε σε κύτταρα *Escherichia coli* BL21, χρησιμοποιώντας τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET22b(+).

Για την παραγωγή της LCC παρασκευάζονται προκαλλιέργειες LB των 5 mL με αντιβιοτικό καναμυκίνη σε συγκέντρωση 50 µg/mL, οι οποίες επώαζονται για 12 h στους 37 °C. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται καλλιέργειες LB των 500 mL με ανάλογη προσθήκη καναμυκίνης, οι οποίες αναπτύσσονται στους 37 °C μέχρι η απορρόφηση στα 600 nm (OD_{600}) να φτάσει στο 0.6 οπότε και επάγονται με 0.2 mM β-D-1-θειογαλακτοπυρανοζίδιο (IPTG) στους 16 °C για 16 ώρες. Ακολούθως, συλλέγονται τα κύτταρα της καλλιέργειας, φυγοκεντρώνται για 15 min στις 14000 στροφές (Φυγόκεντρος Beckman Model J2-21 Centrifuge, Beckman Coulter - Η.Π.Α.) και επαναιωρούνται σε διάλυμα Talon. Έπειτα, τα κύτταρα διαρυνγνώνονται με τη βοήθεια υπερήχων (Συσκευή υπερήχων Vibra-Cell Processor VC 400, Sonics and Materials - Η.Π.Α.) και φυγοκεντρώνται και πάλι (φυγόκεντρος Sigma 3K30 Centrifuge, B. Braun Biotech - Γερμανία). Τελικά, η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος καθαρίζεται με υγρή χρωματογραφία Talon, με διαδικασία που παρουσιάζεται παρακάτω.

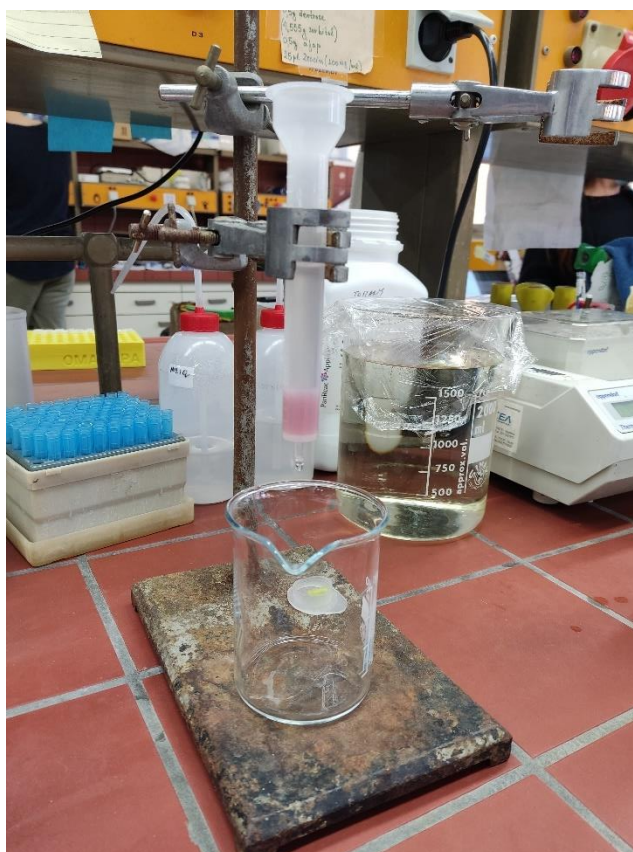
Μετά την εξισορρόπηση του ενζυμικού διαλύματος με το επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα (Talon), ακολουθεί η απομόνωση της πρωτεΐνης και ο καθαρισμός της LCC από τα ανεπιθύμητα συστατικά του διαλύματος. Η απομόνωση της πρωτεΐνης γίνεται με τη βοήθεια μιας στήλης χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography/IMAC), όπου ο διαχωρισμός των συστατικών του διαλύματος στηρίζεται σε ειδικές χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του διαλύματος και της στατικής φάσης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η επιθυμητή πρωτεΐνη διαθέτει στο ένα άκρο της μια ουρά ιστιδινών, η οποία συνδέεται με τα ακινητοποιημένα ιόντα κοβαλτίου από τα οποία αποτελείται η ρητίνη Talon που πληρώνει τη στήλη χρωματογραφίας TalonR (στήλη βαρύτητας, Biorad - Η.Π.Α., με ρητίνη TalonR ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου, Clontech - Η.Π.Α.). Με αυτό τον τρόπο, η πρωτεΐνη δεσμεύεται στη στήλη χρωματογραφίας και για να αποδεσμευτεί θα πρέπει από τη στήλη να περάσει ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος, το οποίο δρα ανταγωνιστικά με τις ιστιδίνες όσον αφορά στην πρόσδεση τους στη ρητίνη. Ένα τέτοιο ρυθμιστικό διάλυμα είναι το διάλυμα ιμιδαζολίου, καθώς τα μόρια του ιμιδαζολίου αλληλεπιδρούν πιο έντονα με τα ιόντα κοβαλτίου της ρητίνης αντικαθιστώντας την πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα αυτή να απελευθερώνεται και να παραλαμβάνεται με την κινητή φάση.

Πιο αναλυτικά, τα βήματα που ακολουθούνται για την καθαρισμό της πρωτεΐνης με τη βοήθεια της στήλης Talon είναι τα ακόλουθα:

- 1) Ξέπλυμα της στήλης από το διαλύτη αποθήκευσης (αιθανόλη 20%) με απιονισμένο H_2O .
- 2) Εξισορρόπηση της στήλης με το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζυμικού διαλύματος (Talon).
- 3) Προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος στη στήλη και συλλογή του εκπλύματος (flowthrough) σε Falcon. Από το στάδιο αυτό και μετά συλλέγονται όλα τα κλάσματα έκπλυσης, τα οποία αποθηκεύονται σε παγόλoutρο.
- 4) Έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα Talon όγκου 6 mL. Σε αυτό το στάδιο, η κινητή φάση παρασέρνει όλες τις πρωτεΐνες που δεν έχουν δεσμευτεί στη ρητίνη.
- 5) Έκπλυση της στήλης με διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 5 mM και όγκου 6 mL. Σε αυτό το στάδιο εκλούνται οι πρωτεΐνες που είναι ασθενώς συνδεδεμένες με τη ρητίνη.
- 6) Έκπλυση της στήλης με διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 10 mM και όγκου 6 mL. Σε αυτό το στάδιο εκλούνται οι πρωτεΐνες που είναι πιο ισχυρά συνδεδεμένες με τη ρητίνη.
- 7) Έκπλυση της στήλης με διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 100 mM και όγκου 6 mL. Σε αυτό το στάδιο αποδεσμεύεται και εκλύεται η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, καθώς το διάλυμα ιμιδαζολίου υψηλής συγκέντρωσης δρα ανταγωνιστικά με την πρωτεΐνη για την αλληλεπίδραση με τα ιόντα κοβαλτίου της στήλης.

- 8) Έκπλυση της στήλης και πάλι με διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 100 mM και όγκου 6 mL. Σε αυτό το στάδιο εκλούεται με την κινητή φάση και η υπόλοιπη ποσότητα της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος που πιθανώς να μην εκλούστηκε στο προηγούμενο βήμα.
- 9) Τα κλάσματα έκπλυσης φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 280 nm, όπου ανιχνεύονται οι πεπτιδικοί δεσμοί, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι έχει εκλουστεί όλη η ποσότητα της πρωτεΐνης, αλλά και να προσδιοριστούν τα κλάσματα στα οποία βρίσκεται.
- 10) Ξέπλυμα της στήλης από το διάλυμα ιμιδαζολίου με απιονισμένο H₂O. Για ικανοποιητικό καθαρισμό της στήλης, αυτή πληρώνεται με H₂O 3 φορές.
- 11) Ξέπλυμα της στήλης με αιθανόλη 20% και αποθήκευσή της στο διάλυμα αυτό.

Να σημειωθεί ότι τα διαλύματα ιμιδαζολίου που χρησιμοποιούνται στην παραπάνω διαδικασία διαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα Talon.



2.2.3.2

Εικόνα 14: Διάταξη διαδικασίας καθαρισμού ενζύμου LCC με στήλη χρωματογραφίας TalonR.

Μελέτη δράσης ενζύμου LCC με υλικά PET διαφορετικής σύστασης και κατεργασίας

Για τη μελέτη της δράσης της LCC σε διάφορες μορφές PET πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις του ενζύμου με φιλμ ανακυκλωμένου PET και σκόνες pretreated PET και PET με άμυλο σε ποσοστά 0 έως και 40%. Οι αντιδράσεις έγιναν χρησιμοποιώντας ποσότητα υποστρώματος ίση με 1 mg/mL μαζί με 60 μg ενζύμου LCC και 5 mL εμπορικού ενζύμου αμυλάσης (liquozyme), σε ρυθμιστικό διάλυμα citrate – phosphate pH = 7.0. Οι αντιδράσεις διήρκησαν 96 h σε θερμοκρασία 70 °C και ανάδευση 1200 rpm. Κάθε 24 h, ποσότητα ενζύμου ίση με την αρχική προστίθεται στις αντιδράσεις, έτσι ώστε να διατηρηθούν σταθερές οι μονάδες ενεργότητας του ενζύμου.

Τελικά, ο βαθμός αποικοδόμησης των διαφόρων πλαστικών προσδιορίστηκε μελετώντας την απώλεια βάρους των δειγμάτων και εντοπίζοντας τα προϊόντα αποικοδόμησης του PET με HPLC, εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε νωρίτερα.

Άλλη μια ένδειξη της αποικοδόμησης των δειγμάτων του PET με το άμυλο είναι η παρουσία αναγωγικών σακχάρων στο διάλυμα της αντίδρασης. Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος όταν αποδομηθεί θα απελευθερώσει μόρια γλυκόζης, τα οποία αποτελούν τη δομική του μονάδα και ανήκουν στα αναγωγικά σάκχαρα, καθώς ο ανωμερής άνθρακας της γλυκόζης είναι απευθείας συνδεδεμένος με μια υδροξυλομάδα [135]. Ο εντοπισμός αυτών των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη βοήθεια του δινιτροσαλικυλικού οξέος (dinitrosalicylic acid – DNS). Το DNS είναι μια αρωματική ένωση με κίτρινο χρώμα, η οποία αντιδρά με αναγωγικά μόρια και σχηματίζει την ένωση 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ, η οποία απορροφά έντονα στα 540 nm [136]. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι αναλυτικά η ακόλουθη:

- ✓ Προσθήκη σε ένα Eppendorf των 1.5 mL 50 μ L δείγματος και 50 μ L αντιδραστηρίου DNS.
- ✓ Βράσιμο του δείγματος για 5 min και άμεση μετακίνησή του σε παγόλουτρο.
- ✓ Προσθήκη 400 μ L H₂O και ανάδευση σε φυγόκεντρο δοκιμαστικών σωλήνων (Vortex-2-Genie, Fischer Scientific – Η.Π.Α.).
- ✓ Μεταφορά 250 μ L δείγματος σε Microplate και μέτρηση της απορρόφησης, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων στο δείγμα.

Η παραπάνω ανάλυση είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τον προσδιορισμό της παρουσίας αναγωγικών σακχάρων σε ένα διάλυμα, ωστόσο έχει μικρή επαναληψιμότητα και η παρουσία άλλων ενεργών καρβονυλικών ομάδων είναι πιθανό να επηρεάσει την απόδοση της αντίδρασης καθώς μπορούν δυνητικά να αντιδράσουν με το DNS [137].

Αποτελέσματα

Δράση μύκητα *Abortiporus biennis* σε συνθετικά πολυμερή

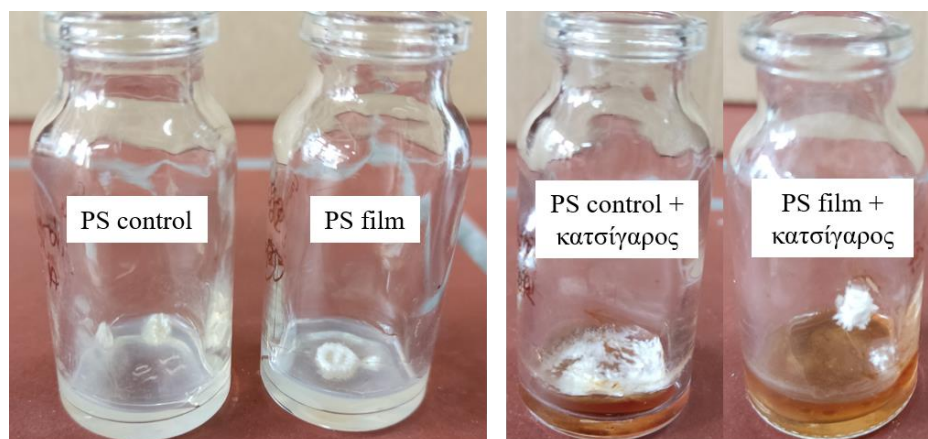
Τα δείγματα των πλαστικών PS, PU και PET που επωάζονται με το μικροοργανισμό *A. biennis* βρίσκονται σε γυάλινα φιαλίδια, τα οποία ανοίγονται κάθε 10 ημέρες προκειμένου να μελετηθεί η δράση του μύκητα στα φιλμ του πλαστικού.

3.1

Η μελέτη της δράσης του μανιταριού *A. biennis* αξιολογήθηκε με τη μέτρηση της μεταβολής της μάζας και των μοριακών βαρών των υλικών, αλλά και με τον έλεγχο της παρουσίας προϊόντων αποικοδόμησης στα φιλμ του PET, σύμφωνα με τις παραγράφους 1.2.1.2 και 1.2.1.1. Παράλληλα, για κάθε πλαστικό έγινε προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας που εντοπίζεται στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης μέσω φασματοφωτομετρικών τεχνικών αναλύσεων, οι οποίες παρουσιάζονται στην παράγραφο 1.2.1.3.

Μελέτη δράσης του *A. biennis* σε φιλμ πλαστικού PS

3.1.1



Εικόνα 15: Απεικόνιση των γυάλινων φιαλιδίων με τα δείγματα του PS, έπειτα από επώαση του μικροοργανισμού στις στερεές καλλιέργειες.

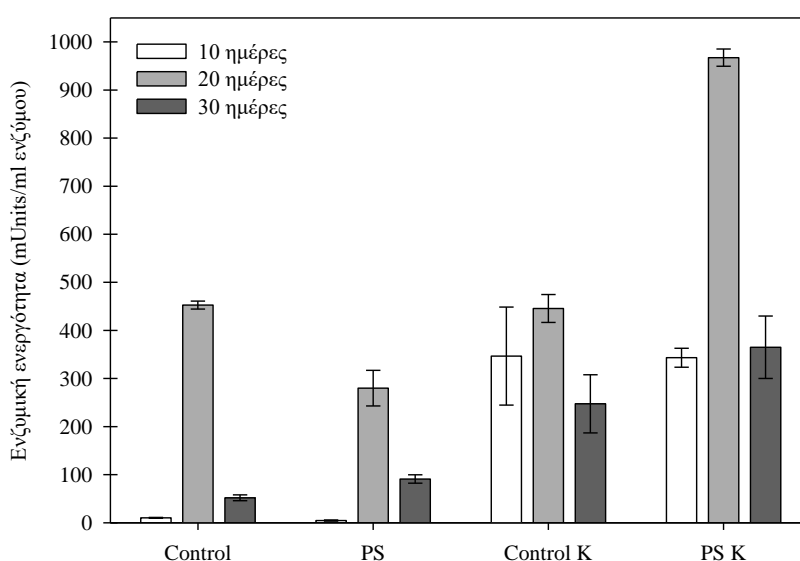
Η μέτρηση απώλειας βάρους ενός υλικού αποτελεί μια πρώτη ένδειξη της βιοαποικοδόμησής του, χωρίς ωστόσο να παρέχει ακριβή συσχέτιση με το βαθμό υποβάθμισης [7]. Για το λόγο αυτό, έπειτα από την επώαση του μανιταριού *A. biennis* με τα φιλμ του PS το πρώτο βήμα για τη μελέτη της δράσης των παραγόμενων ενζύμων είναι η μέτρηση της μεταβολής του βάρους του πλαστικού. Το βάρος του συνθετικού πολυμερούς μετρήθηκε πριν και μετά την αλληλεπίδραση με το μικροοργανισμό σε αναλυτικό ζυγό (Abs 120-4N, KERN & Sohn GmbH – Γερμανία). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4) παρουσιάζεται η επί τοις εκατό απώλεια βάρους του υλικού έπειτα από επώαση με το μικροοργανισμό για χρονικά διαστήματα 10, 20 και 30 ημερών.

Πίνακας 4: Απώλεια βάρους φιλμ PS μετά από επώαση με το μικροοργανισμό *A. biennis* με/χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου σε χρονικά διαστήματα 10, 20 και 30 ημερών.

Συνθετικό πολυμερές	Απώλεια βάρους μετά από 10 ημέρες (%)	Απώλεια βάρους μετά από 20 ημέρες (%)	Απώλεια βάρους μετά από 30 ημέρες (%)
PS	1.9 ± 0.6	0.3 ± 0.3	0.6 ± 0.6
PS + κατσίγαρος (PS K)	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.6	0.0 ± 0.0

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 4 φαίνεται πώς το πλαστικό παρουσιάζει μια μικρή μείωση στο βάρος του έπειτα από την επώαση με το μικροοργανισμό. Επομένως, το μανιτάρι *A. biennis* εμφανίζει κάποια δράση απέναντι στο συγκεκριμένο συνθετικό πολυμερές. Ωστόσο, η απώλεια βάρους δεν αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου όπως θα ήταν αναμενόμενο. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε σφάλματα κατά τη μέτρηση των βαρών ή και κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον, καθώς τα βιολογικά συστήματα δεν υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο, δεν μπορεί να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των μετρήσεων στα διπλά δείγματα.

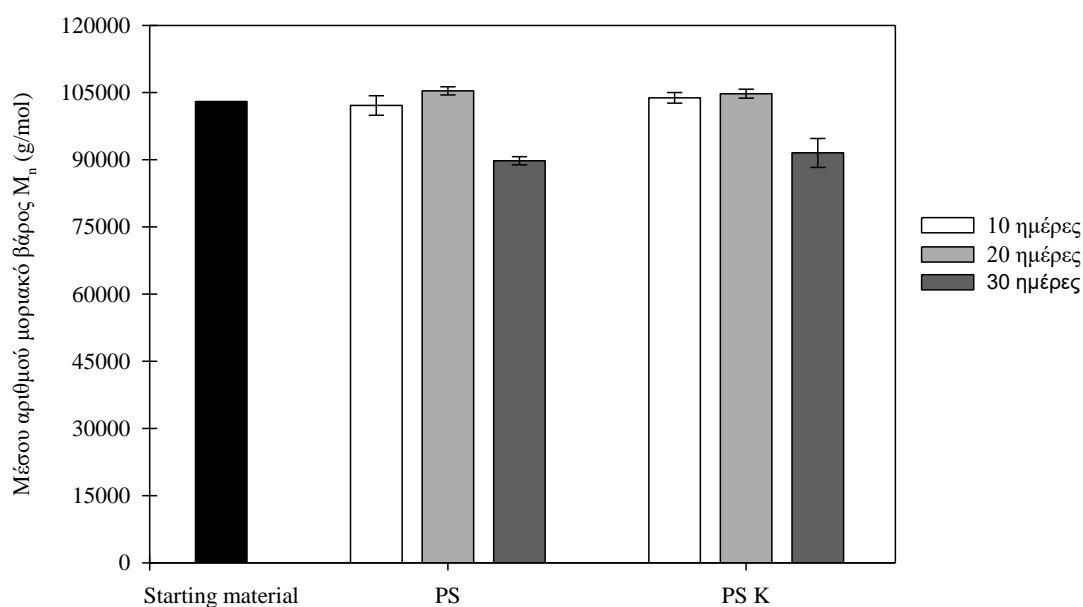
Σε συνέχεια της μέτρησης της απώλειας βάρους, εξετάστηκε το διάλυμα του στερεού μέσου επώασης με το PBS ως προς την ύπαρξη οξειδωτικών ενζύμων, και συγκεκριμένα λακκασών και υπεροξειδασών. Καθώς οι μετρήσεις ενεργότητας για τις υπεροξειδάσες δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα, δεν παρουσιάζονται σχετικά διαγράμματα, και συμπεραίνεται ότι τα ένζυμα που δρουν ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των λακκασών. Έτσι, έπειτα από τον υπολογισμό της ενζυμικής ενεργότητας χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο ABTS, προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 1), στο οποίο απεικονίζεται η ενζυμική ενεργότητα έπειτα από επώαση του μικροοργανισμού με φιλμ PS για τα χρονικά διαστήματα 10, 20 και 30 ημερών.



Διάγραμμα 1: Ενεργότητα των εκκρινόμενων οξειδωτικών ενζύμων σε καλλιέργειες του μικροοργανισμού *A. biennis* με φιλμ PS με/χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου έπειτα από διάστημα 10 ημερών (άσπρο), 20 ημερών (ανοιχτό γκρι) και 30 ημερών (σκούρο γκρι).

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 1) η αλληλεπίδραση του μανιταριού *A. biennis* με τα φιλμ του PS, έχει σαν αποτέλεσμα την έκκριση οξειδωτικών ενζύμων, τα οποία είναι πιθανό να συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του πλαστικού. Στα δείγματα του πλαστικού φιλμ με τον κατσίγαρο, τα ένζυμα εντοπίζονται από τις πρώτες κιόλας μέρες, καθώς ο κατσίγαρος δρα ως επαγωγέας της παραγωγής τους, ενώ η ενεργότητα που μετράται είναι μεγαλύτερη από αυτή των δειγμάτων χωρίς κατσίγαρο. Γενικά, παρατηρείται ότι η ενζυμική ενεργότητα είναι μικρή τις πρώτες μέρες, κατά τις οποίες ο μικροοργανισμός προσαρμόζεται στις νέες συνθήκες ανάπτυξης, παίρνει τη μέγιστη τιμή έπειτα από 20 ημέρες επώαση.

Εκτός από τη μέτρηση της ενεργότητας των παραγόμενων ενζύμων, για τον έλεγχο της αποικοδόμησης του πλαστικού PS από το μικροοργανισμό, εξετάζεται και η μεταβολή των μοριακών βαρών των δειγμάτων. Έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της GPC προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 2).

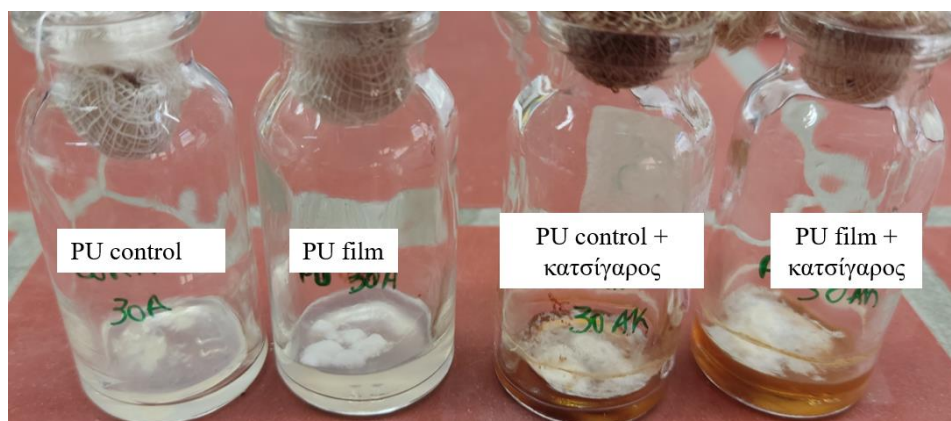


Διάγραμμα 2: Μεταβολή των μέσου αριθμού μοριακού βάρους των φιλμ PS με/χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου, έπειτα από επώαση με το μικροοργανισμό *A. biennis* σε διάστημα 10 ημερών (άσπρο), 20 ημερών (ανοιχτό γκρι) και 30 ημερών (σκούρο γκρι).

Εξετάζοντας το Διάγραμμα 2 προκύπτει ότι τα δείγματα δεν παρουσιάζουν διαφορές στα μοριακά τους βάρη έπειτα από 10 και 20 ημέρες επώασης, ωστόσο παρατηρείται μια σημαντική μείωσή τους μετά από τις 30 ημέρες επώασης. Όσον αφορά στα δείγματα του κατσίγαρου, αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τις πρώτες μέρες ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται αξιοποιώντας ως πηγή άνθρακα τον κατσίγαρο, με τη βοήθεια του οποίου παράγονται πιο εύκολα τα ένζυμα ενδιαφέροντος που προσβάλλουν στη συνέχεια το πλαστικό.

Μελέτη δράσης του *A. biennis* σε φιλμ πλαστικού PU

3.1.2



Εικόνα 16: Απεικόνιση των γυάλινων φιαλιδίων με τα δείγματα του PU, έπειτα από επώαση του μικροοργανισμού στις στερεές καλλιέργειες.

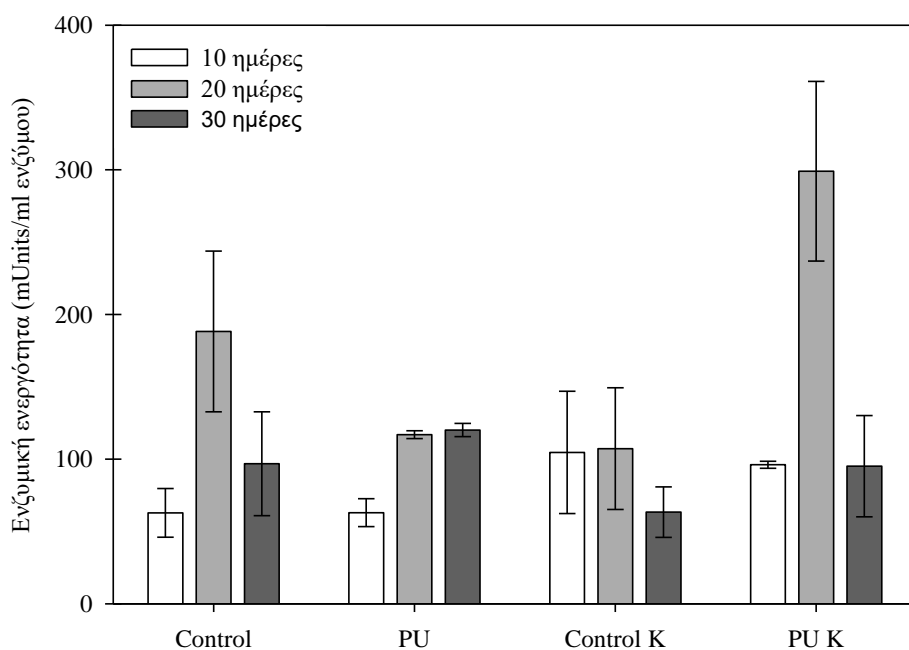
Έπειτα από την επώαση του μικροοργανισμού με τα φιλμ του PU, το πρώτο βήμα για τον έλεγχο της αποικοδόμησης του πλαστικού είναι η μέτρηση της μεταβολής του βάρους του. Έτσι, το βάρος του συνθετικού πολυμερούς μετρήθηκε πριν και μετά την αλληλεπίδραση με το μικροοργανισμό και ακολούθως (Πίνακας 5) παρουσιάζεται η επί τοις εκατό απώλεια βάρους του υλικού έπειτα από επώαση 10, 20 και 30 ημερών.

Πίνακας 5: Απώλεια βάρους φιλμ PU μετά από επώαση με το μικροοργανισμό *A. biennis* με/χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου σε χρονικά διαστήματα 10, 20 και 30 ημερών.

Συνθετικό πολυμερές	Απώλεια βάρους μετά από 10 ημέρες (%)	Απώλεια βάρους μετά από 20 ημέρες (%)	Απώλεια βάρους μετά από 30 ημέρες (%)
PU	0.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.5
PU + κατσίγαρος (PU K)	1.0 ± 0.8	4.5 ± 1.6	2.6 ± 1.2

Από τον Πίνακα 5 προκύπτει ότι τα φιλμ του PU παρουσιάζουν μια μείωση στο βάρος τους, έπειτα από την επώαση με το μικροοργανισμό, ειδικά τα δείγματα που επωάζονται παρουσία κατσίγαρου. Επομένως, το μανιτάρι *A. biennis* εμφανίζει κάποια δράση απέναντι και στο συγκεκριμένο συνθετικό πολυμερές, η οποία ενισχύεται παρουσία κατσίγαρου. Ωστόσο, και πάλι η απώλεια βάρους δεν αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου όπως θα ήταν αναμενόμενο, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε πειραματικά σφάλματα, αλλά και στη μικρή επαναληψιμότητα των μετρήσεων στα διπλά δείγματα των βιολογικών συστημάτων.

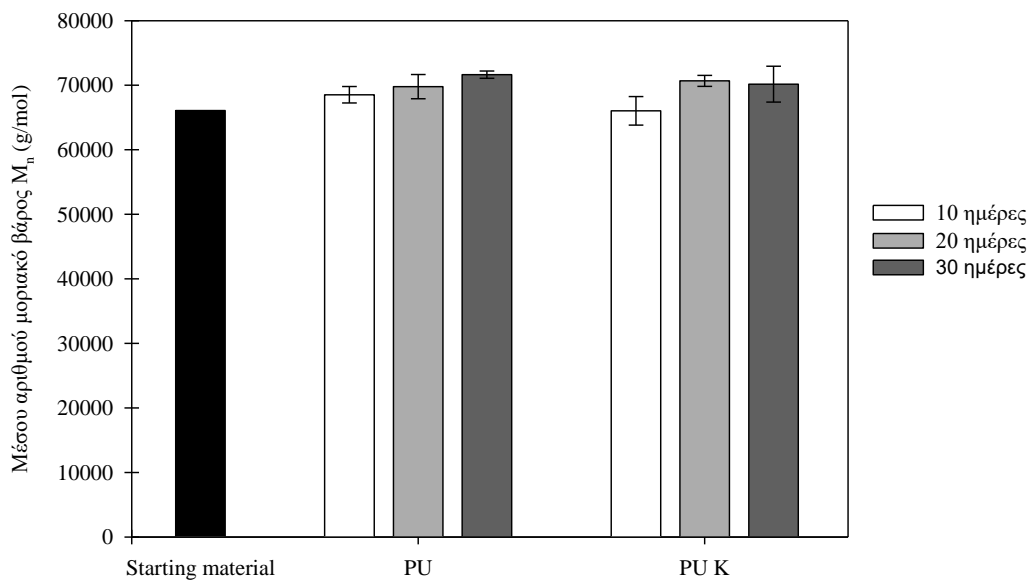
Μετά από τη μέτρηση της απώλειας βάρους, εξετάζεται το διάλυμα του στερεού μέσου επώασης με το PBS ως προς την ύπαρξη οξειδωτικών ενζύμων, και συγκεκριμένα λακκασών και υπεροξειδασών. Όπως προέκυψε και για το PS, οι μετρήσεις ενεργότητας για τις υπεροξειδάσες δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα κι επομένως δεν παρουσιάζονται σχετικά διαγράμματα, ενώ συμπεραίνεται ότι τα ένζυμα που δρουν ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των λακκασών. Έτσι, έπειτα από τον υπολογισμό της ενζυμικής ενεργότητας χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο ABTS, προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 3), στο οποίο απεικονίζεται η ενζυμική ενεργότητα έπειτα από επώαση του μικροοργανισμού με φιλμ PU για τα χρονικά διαστήματα 10, 20 και 30 ημερών.



Διάγραμμα 3: Ενεργότητα των εκκρινόμενων οξειδωτικών ενζύμων σε καλλιέργειες του μικροοργανισμού *A. biennis* με φιλμ PU με/χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου έπειτα από διάστημα 10 ημερών (άσπρο), 20 ημερών (ανοιχτό γκρι) και 30 ημερών (σκούρο γκρι).

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3 κατά την αλληλεπίδραση του μανιταριού *A. biennis* με τα φιλμ του PU εκκρίνονται οξειδωτικά ένζυμα, τα οποία ενδεχομένως συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του πλαστικού. Τα ένζυμα εντοπίζονται σε όλα τα δείγματα από τις πρώτες μέρες, ενώ παρατηρείται ότι μετά από επώαση 20 ημερών η ενεργότητα φτάνει στις μέγιστες τιμές της. Αν και τις πρώτες μέρες η ενεργότητα των δειγμάτων με τον κατσίγαρο είναι μεγαλύτερη, στο τέλος των 30 ημερών τα χωρίς κατσίγαρο δείγματα είναι αυτά που έχουν υψηλότερες τιμές ενεργότητας.

Εκτός από τη μέτρηση της ενεργότητας των παραγόμενων ενζύμων, για τον έλεγχο της αποικοδόμησης του πλαστικού PU από το μικροοργανισμό, εξετάζεται και η μεταβολή των μοριακών βαρών των δειγμάτων. Έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της GPC προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 4).

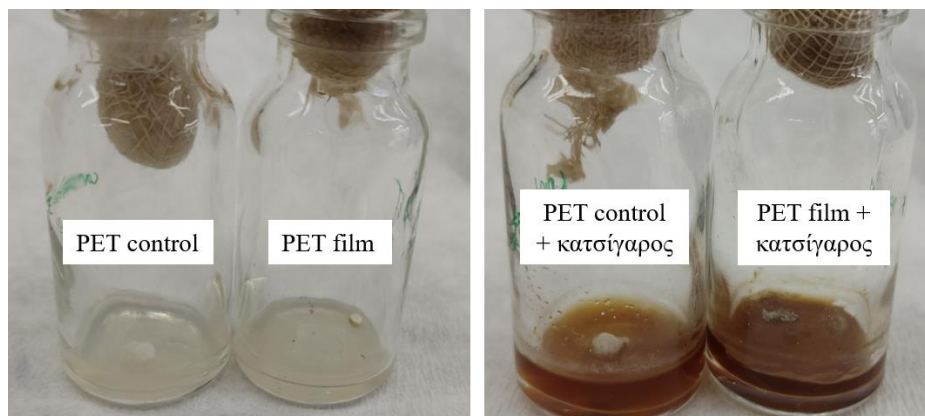


Διάγραμμα 4: Μεταβολή των μέσου αριθμού μοριακού βάρους των φιλμ PU με/χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου, έπειτα από επώαση με το μικροοργανισμό *A. biennis* σε διάστημα 10 ημερών (άσπρο), 20 ημερών (ανοιχτό γκρι) και 30 ημερών (σκούρο γκρι).

Μελετώντας το Διάγραμμα 4 δεν είναι δυνατόν να προκύψει κάποιο ξεκάθαρο συμπέρασμα για τη δράση του μικροοργανισμού στο πλαστικό, καθώς τα μοριακά βάρη παρουσιάζουν έντονες αυξομειώσεις, με σημαντικά σφάλματα. Αν ληφθούν υπόψη τα σφάλματα αυτά, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα μοριακά βάρη δε μεταβάλλονται έπειτα από την αλληλεπίδραση του πλαστικού με το μικροοργανισμό.

3.1.3

Μελέτη δράσης του *A. biennis* σε φιλμ πλαστικού PET



Εικόνα 17: Απεικόνιση των γυάλινων φιαλιδίων με τα δείγματα του PET, έπειτα από επώαση του μικροοργανισμού στις στερεές καλλιέργειες.

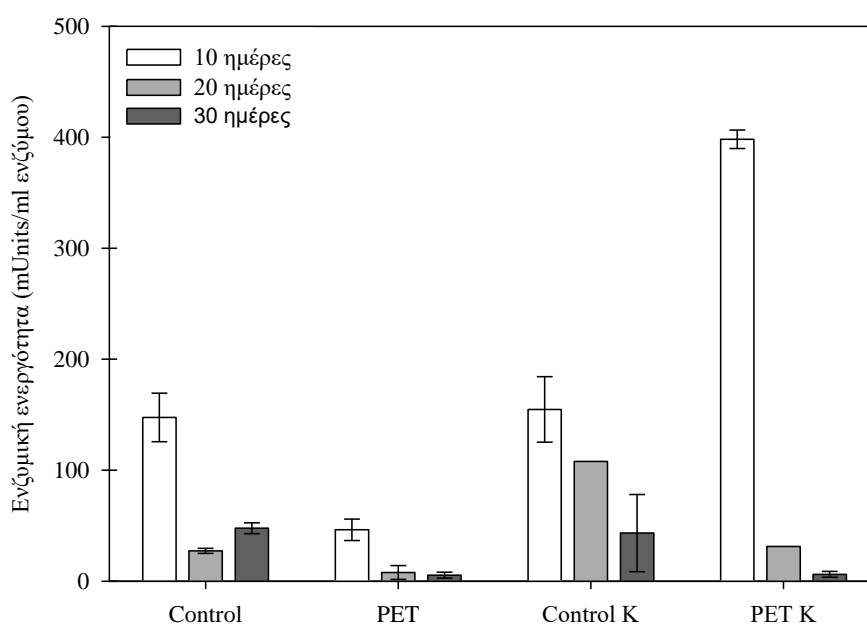
Μετά από την επώαση του μικροοργανισμού με τα φιλμ του PET, το πρώτο βήμα για τον έλεγχο της αποικοδόμησης του πλαστικού είναι η μέτρηση της μεταβολής του βάρους του. Έτσι, το βάρος του συνθετικού πολυμερούς μετρήθηκε πριν και μετά την αλληλεπίδραση με το μικροοργανισμό και ακολούθως (Πίνακας 6) παρουσιάζεται η επί τοις εκατό απώλεια βάρους του υλικού έπειτα από επώαση 10, 20 και 30 ημερών.

Πίνακας 6: Απώλεια βάρους φιλμ PET μετά από επώαση με το μικροοργανισμό *A. biennis* με/χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου σε χρονικά διαστήματα 10, 20 και 30 ημερών.

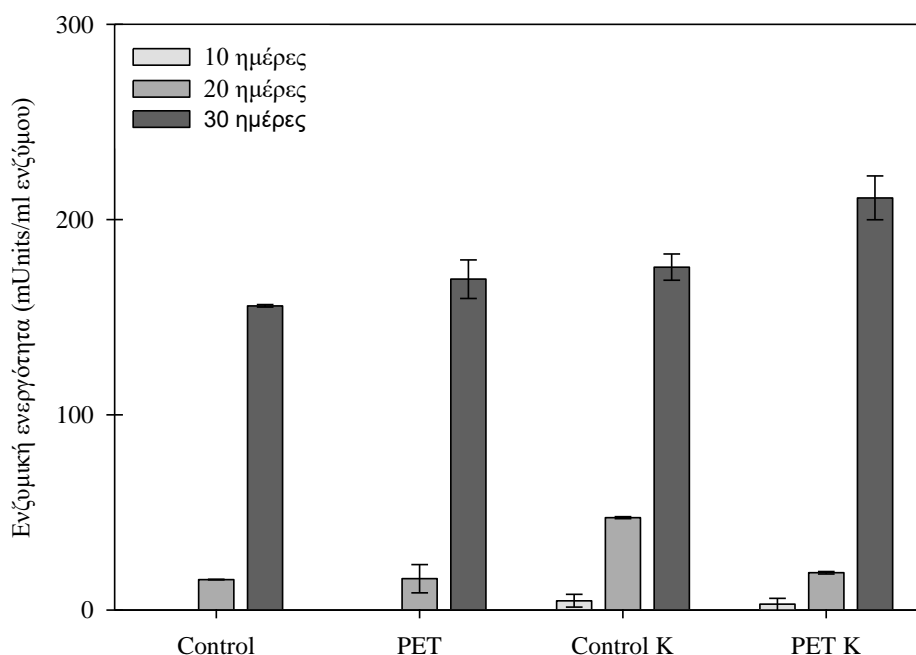
Συνθετικό πολυμερές	Απώλεια βάρους μετά από 10 ημέρες (%)	Απώλεια βάρους μετά από 20 ημέρες (%)	Απώλεια βάρους μετά από 30 ημέρες (%)
PET	3.1 ± 0.0	3.4 ± 0.5	0.5 ± 0.5
PET + κατσίγαρος (PET K)	4.5 ± 0.3	1.4 ± 1.4	0.0 ± 0.0

Παρατηρώντας τον Πίνακα 6 φαίνεται ότι τα φιλμ του PET παρουσιάζουν μια μείωση στο βάρος τους, έπειτα από την επώαση με το μικροοργανισμό, επομένως, το μανιτάρι *A. biennis* εμφανίζει κάποια δράση απέναντι και στο συγκεκριμένο συνθετικό πολυμερές. Ωστόσο, η απώλεια βάρους εμφανίζεται να είναι μεγαλύτερη τις πρώτες ημέρες επώασης, το οποίο δεν είναι λογικό καθώς με την πάροδο του χρόνου ακόμα κι αν δεν αποικοδομείται περαιτέρω το πλαστικό θα πρέπει να διατηρεί την ίδια μείωση στο βάρος του. Το παράδοξο αυτό μπορεί να αποδοθεί σε πειραματικά σφάλματα, αλλά και στη μικρή επαναληψιμότητα των μετρήσεων στα διπλά δείγματα των βιολογικών συστημάτων.

Τη μέτρηση της απώλειας βάρους ακολουθεί ο έλεγχος του διαλύματος του στερεού μέσου επώασης με το PBS ως προς την ύπαρξη οξειδωτικών και υδρολυτικών ενζύμων, και συγκεκριμένα εστερασών. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της φασματοφωτομετρικής μεθόδου με τα αντιδραστήρια ABTS και pNPB οδήγησε στα ακόλουθα διαγράμματα (Διάγραμμα 5 & 6), στα οποία παρουσιάζεται η ενεργότητα των οξειδωτικών ενζύμων και των εστερασών έπειτα από επώαση του μικροοργανισμού με το PET για χρονικά διαστήματα 10, 20 και 30 ημερών.



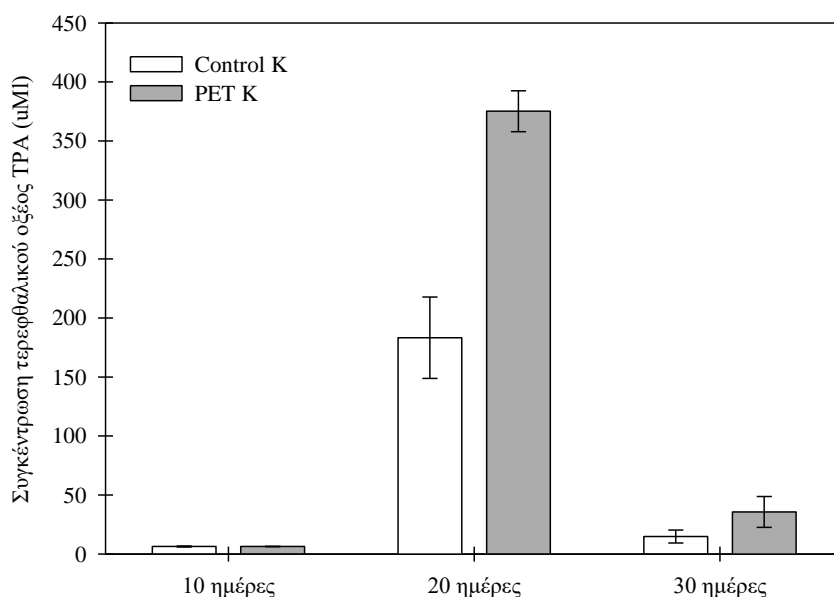
Διάγραμμα 5: Ενεργότητα των εκκρινόμενων οξειδωτικών ενζύμων σε καλλιέργειες του μικροοργανισμού *A. biennis* με φιλμ PET με/χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου έπειτα από διάστημα 10 ημερών (άσπρο), 20 ημερών (ανοιχτό γκρι) και 30 ημερών (σκούρο γκρι).



Διάγραμμα 6: Ενεργότητα των εκκρινόμενων εστερασών σε καλλιέργειες του μικροοργανισμού *A. biennis* με φιλμ PET με/χωρίς την προσθήκη κατσίγαρου έπειτα από διάστημα 10 ημερών (άσπρο), 20 ημερών (ανοιχτό γκρι) και 30 ημερών (σκούρο γκρι).

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα (Διαγράμματα 5 & 6) κατά την αλληλεπίδραση του μανιταριού *A. biennis* με τα φιλμ του PET εκκρίνονται και οξειδωτικά ένζυμα όπως είναι οι λακκάσες και εστεράσες, οι οποίες συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του πλαστικού. Παρατηρείται ότι τις πρώτες μέρες επώασης η απελευθέρωση οξειδωτικών ενζύμων είναι μεγάλη, αφού τότε παρατηρείται και η μέγιστη ενεργότητα, η οποία όσο περνάνε οι μέρες μειώνεται αισθητά. Από την άλλη, τις πρώτες μέρες δεν εντοπίζονται σχεδόν καθόλου ένζυμα με ενεργότητα εστεράσης, ενώ με την πάροδο του χρόνου η ενεργότητα εστερασών αυξάνεται εκθετικά. Με άλλα λόγια, στην αρχή ο μικροοργανισμός απελευθερώνει οξειδωτικά ένζυμα για την αποικοδόμηση του PET, τα οποία σταδιακά αντικαθιστώνται με ένζυμα που παρουσιάζουν ενεργότητα εστεράσης.

Εκτός από τη μέτρηση της ενεργότητας των παραγόμενων ενζύμων, για τον έλεγχο της αποικοδόμησης του πλαστικού PET από το μικροοργανισμό, εξετάζεται και η ύπαρξη προϊόντων αποικοδόμησής του, δηλαδή TPA, MHET, BHET. Στα δείγματα του πλαστικού χωρίς κατσίγαρο δεν προσδιορίστηκε κανένα προϊόν αποικοδόμησης, ενώ στα δείγματα που περιείχαν κατσίγαρο ανιχνεύτηκε μόνο TPA. Ύστερα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της HPLC για τα δείγματα του κατσίγαρου προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 7).



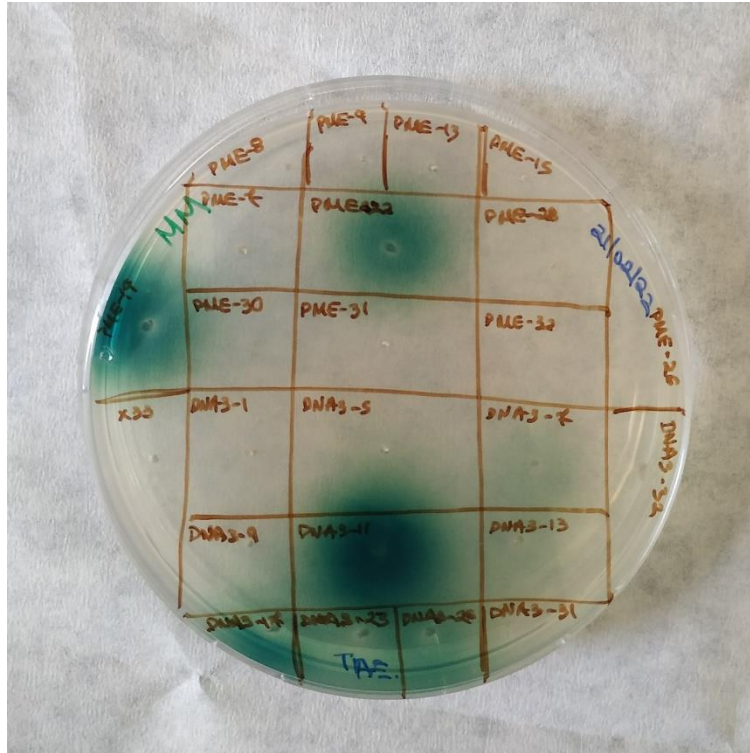
Διάγραμμα 7: Συγκέντρωση του παραγόμενου TPA στις καλλιέργειες του μικροοργανισμού *A. biennis* με/χωρίς φιλμ PET με την προσθήκη κατσίγαρου (άσπρο/ανοιχτό γκρι) έπειτα από διάστημα 10, 20 και 30 ημερών.

Μελετώντας το Διάγραμμα 7 φαίνεται η επίδραση του μανιταριού *A. biennis* στο συνθετικό πολυμερές PET. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται μια σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση του TPA που ανιχνεύεται από τις 10 στις 20 ημέρες, γεγονός που υποδεικνύει τη δράση του μικροοργανισμού το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Με άλλα λόγια, τις πρώτες μέρες ο μικροοργανισμός προσαρμόζεται στο καινούργιο περιβάλλον καταναλώνοντας κατσίγαρο, ενώ στη συνέχεια αρχίζει να αξιοποιεί το πλαστικό ως κύρια πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη του, προκαλώντας παράλληλα την αποικοδόμησή του. Ο κατσίγαρος αποτελεί εύκολη τροφή για το μικροοργανισμό και τον βοηθά να αναπτυχθεί ώστε να μπορέσει να τραφεί ακολούθως από το πλαστικό. Για το λόγο αυτό, στα δείγματα του PET χωρίς κατσίγαρο δεν παρατηρείται ανάπτυξη του μανιταριού και δεν ανιχνεύονται προϊόντα αποδόμησης, αφού ο μικροοργανισμός δυσκολεύεται να μεγαλώσει και να προσβάλλει το πλαστικό.

3.2

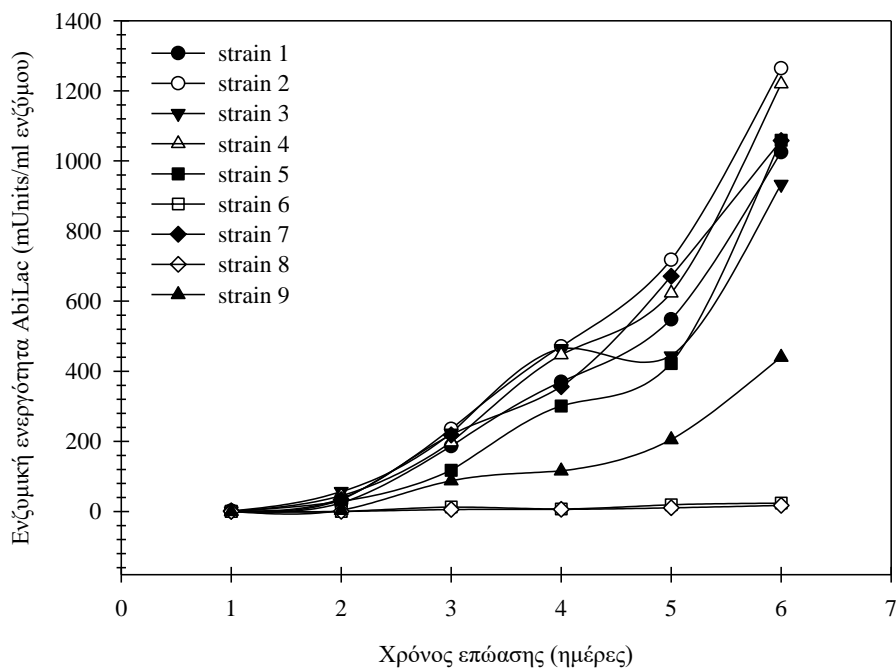
Επιλογή βέλτιστου μετασχηματισμένου κλώνου για την παραγωγή της πρωτεΐνης AbiLac

Για την εύρεση και την επιλογή του καταλληλότερου στελέχους που εκφράζει το ζητούμενο γονίδιο ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 1.2.2.3. Τα τρυβλία MM που παρασκευάζονται και περιέχουν ABTS ελέγχονται καθημερινά και οι αποικίες που θα εμφανίσουν την εκτενέστερη υδρόλυση του υποστρώματος ABTS επιλέγονται ως οι καλύτεροι για την παραγωγή του γονιδίου.



Εικόνα 18: Υδρόλυση υποστρώματος ABTS από τις αποικίες των μετασηματισμένων στελεχών.

Στη συνέχεια, οι κλώνοι που έδειξαν τη μεγαλύτερη ανάπτυξη στο τρυβλίο, χρησιμοποιούνται για την παρασκευή υγρών καλλιεργειών BMGY και BMMY προκειμένου να συγκριθούν ως προς την παραγωγή του επιθυμητού γονιδίου μέσω ενός ABTS assay. Τα αποτελέσματα της φασματοφωτομετρικής ανάλυσης για τους 9 κλώνους που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 8).



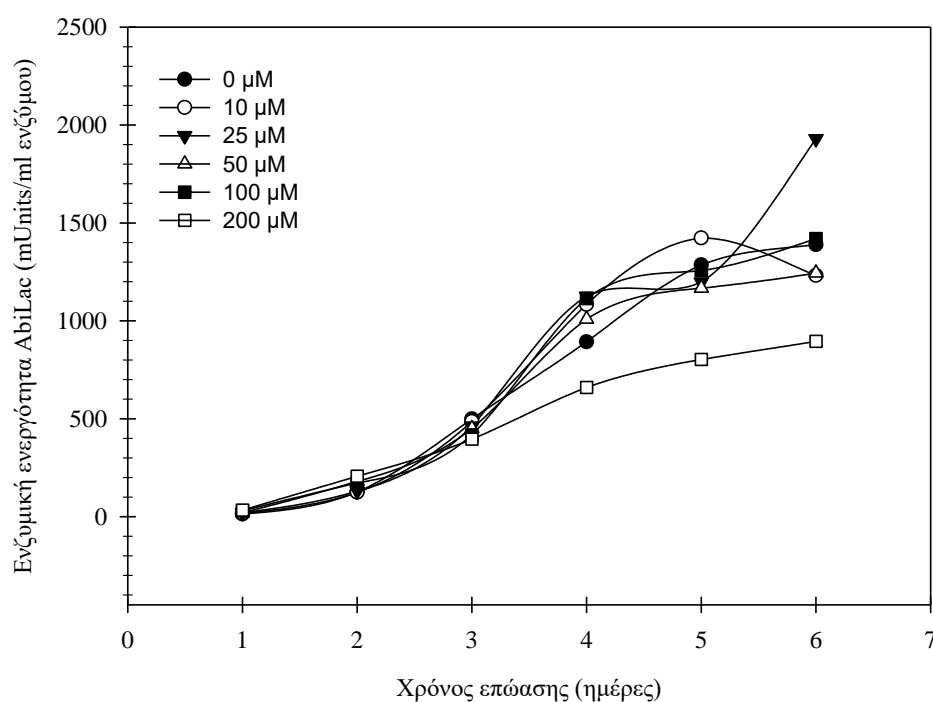
Διάγραμμα 8: Ενεργότητα παραγόμενης λακκάσης συναρτήσει του χρόνου επώασης για κάθε κλώνο που εξετάζεται.

Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι κλώνοι 2 και 4 εμφανίζουν τη μέγιστη παραγωγή του επιθυμητού γονιδίου έπειτα από επώαση 6 ημερών, ενώ ακολουθούν οι κλώνοι 5 και 7 με μικρές διαφορές στην ενεργότητα του ενζύμου που παράγεται. Από την άλλη, οι κλώνοι 6 και 8 αν και ανταποκρίθηκαν θετικά στον έλεγχο με το αντιδραστήριο ABTS, στην υγρή καλλιέργεια φαίνεται πως απέτυχαν να παράξουν το επιθυμητό ένζυμο.

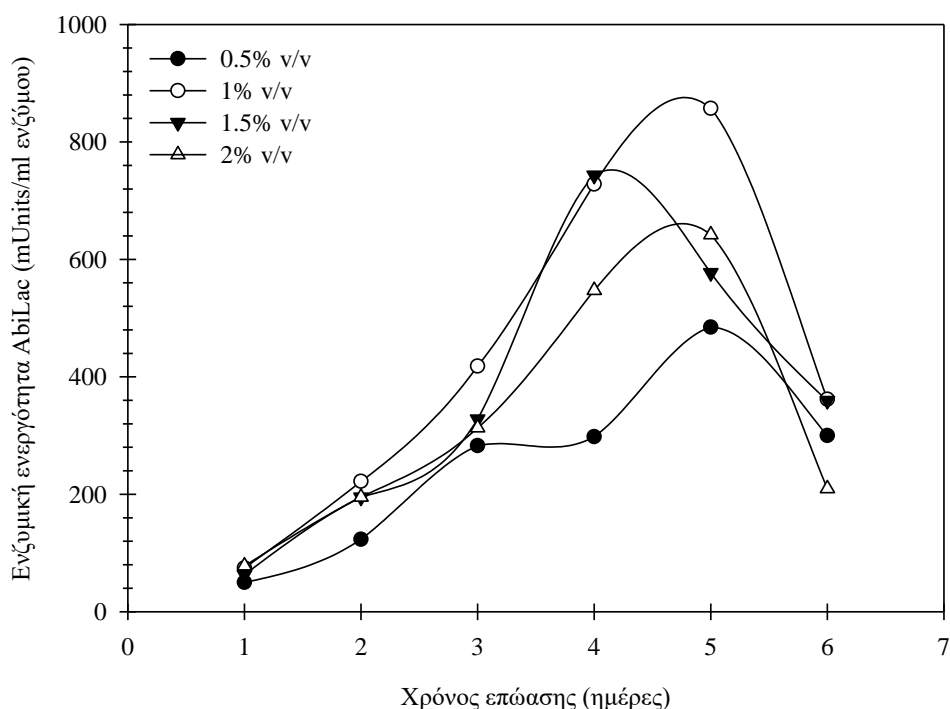
Βέλτιστες συνθήκες παραγωγής και χαρακτηρισμός ενζύμου

Βέλτιστες συνθήκες παραγωγής ενζύμου

- 3.3 Ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών παραγωγής του ενζύμου AbiLac πραγματοποιήθηκε μελετώντας την επίδραση της συγκέντρωσης του CuSO_4 , της ποσοστιαίας σύστασης της καλλιέργειας σε μεθανόλη, της θερμοκρασίας και της παρουσίας αναστολέων πρωτεάσης. Η πειραματική διαδικασία και οι τιμές που δοκιμάστηκαν παρουσιάζονται στην παράγραφο 1.2.2.6. Στα διαγράμματα που ακολουθούν (Διάγραμμα 9 & 10) παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του θεικού χαλκού και της μεθανόλης στην ενεργότητα του ενζύμου.



Διάγραμμα 9: Ενζυμική ενεργότητα της AbiLac συναρτήσει του χρόνου επώασης για συγκεντρώσεις θεικού χαλκού (CuSO_4) από 0 έως και 200 μM .



Διάγραμμα 10: Ενζυμική ενεργότητα της AbiLac συναρτήσει του χρόνου επώασης για ποσοστιαίες συστάσεις σε μεθανόλη από 0% έως και 2%.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται πως η μέγιστη παραγωγή του ενζύμου AbiLac παρουσιάζεται όταν στην καλλιέργεια προστεθεί χαλκός συγκέντρωσης 25 μ M και μεθανόλη σε ποσοστό 1% v/v. Ακόμα, από το Διάγραμμα 2 προκύπτει το συμπέρασμα ότι η βέλτιστη χρονική διάρκεια επώασης των καλλιεργειών είναι ίση με 5 ημέρες, καθώς στην έκτη ημέρα παρατηρείται σημαντική πτώση της ενεργότητας του ενζύμου.

Όσον αφορά στη μελέτη της παρουσίας αναστολέα πρωτεασών και της επίδρασης της θερμοκρασίας, χρησιμοποιήθηκε μια καλλιέργεια ελέγχου (control) και για τους δυο παράγοντες, στην οποία δεν έχει προστεθεί κάποιος αναστολέας και βρίσκεται στους 30 °C. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από επώαση 6 ημερών παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Ενεργότητα του ενζύμου AbiLac έπειτα από επώαση 6 ημερών σε καλλιέργειες ελέγχου, παρουσία αναστολέα και σε θερμοκρασία 23 °C.

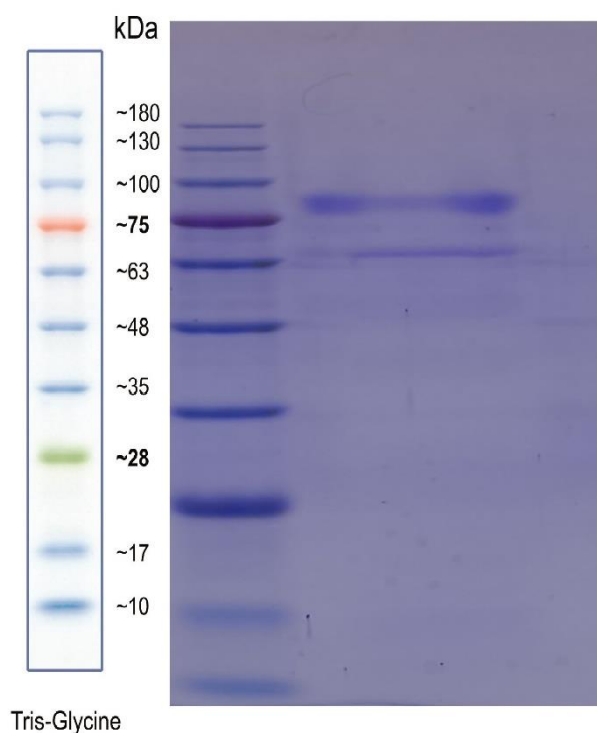
Συνθήκες καλλιέργειας	mUnits/ml _{enzyme}
Control (30°C, χωρίς αναστολέα πρωτεασών)	299,83
Παρουσία αναστολέα πρωτεασών	964,51
23 °C	938,27

Από τα δεδομένα του Πίνακα 7 εξάγεται το συμπέρασμα ότι με μείωση της θερμοκρασίας επώασης από τους 30 °C στους 23 °C ή με την προσθήκη κάποιου αναστολέα πρωτεασών στην καλλιέργεια, η ενεργότητα του ενζύμου που παράγεται μετά από χρονικό διάστημα 6 ημερών είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερη.

Καθώς η προσθήκη αναστολέα πρωτεασών έχει σχεδόν την ίδια επίδραση στην παραγωγή του ενζύμου με τη μείωση της θερμοκρασίας, κατά την παραγωγή του ενζύμου επιλέγεται να εφαρμοστεί η μια από τις δυο αυτές συνθήκες και πιο συγκεκριμένα η επώαση στους 23 °C, για εξοικονόμηση αντιδραστηρίων.

Προσδιορισμός καθαρότητας και μεγέθους της ετερόλογα εκφρασμένης πρωτεΐνης AbiLac με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

3.3.2 Η καθαρότητα και το μοριακό βάρος πρωτεΐνης ενδιαφέροντος AbiLac εκτιμήθηκε με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Εκτός από το δείγμα της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, ηλεκτροφορήθηκε και πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, το οποίο λειτούργησε ως οδηγός για την ταυτοποίηση του μεγέθους της πρωτεΐνης. Η πηκτή πολυακρυλαμίδιου που προέκυψε μετά την ηλεκτροφόρηση, το χρωματισμό και τον αποχρωματισμό της παρουσιάζεται στην Εικόνα 19.



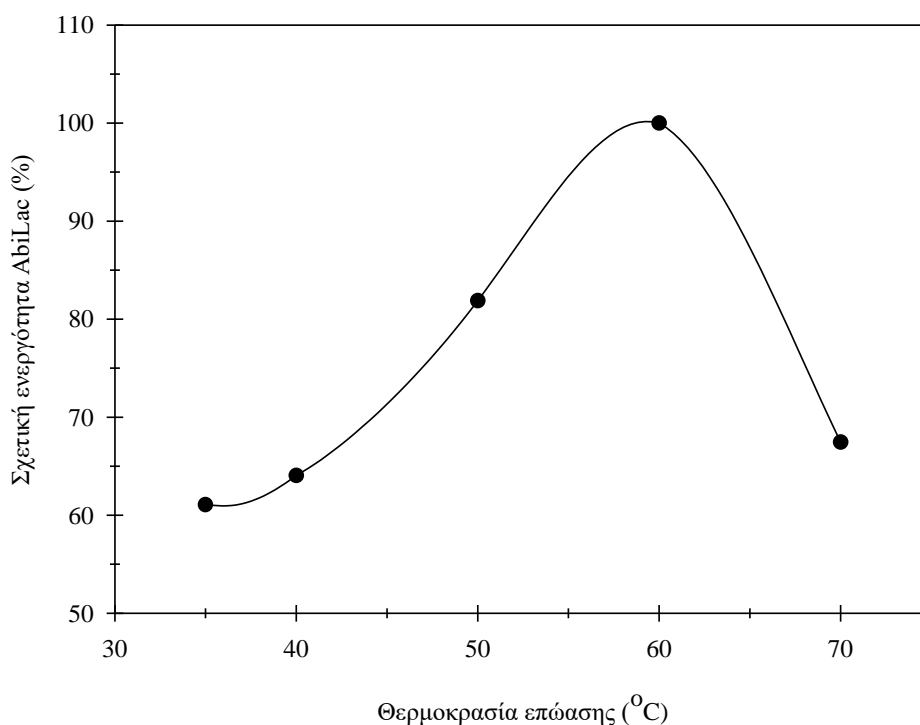
Εικόνα 19: Απεικόνιση πηκτώματος ηλεκτροφόρησης της πρωτεΐνης AbiLac υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

Τα πρωτεϊνικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν έπειτα από καθαρισμό της πρωτεΐνης με τη στήλη ιοντοεναλλαγής Q. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης προσδιορίζεται από τη σύγκριση της έντονης ζώνης της καθαρής πρωτεΐνης με τις αντίστοιχες ζώνες του πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Έτσι, προέκυψε ότι η ετερόλογα εκφρασμένη πρωτεΐνη AbiLac έχει μοριακό βάρος περίπου ίσο με 85 kDa.

Χαρακτηρισμός και μελέτη σταθερότητας ενζύμου AbiLac

Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της AbiLac ($T_{optimum}$)

Ο προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου AbiLac πραγματοποιήθηκε μελετώντας την επίδραση θερμοκρασιών εύρους 35-70 °C. Στο διάγραμμα 3.3.3 που ακολουθεί (Διάγραμμα 11) παρουσιάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δράση, η οποία εκφράζεται μέσω της σχετικής ενεργότητας (%) του ενζύμου θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης.

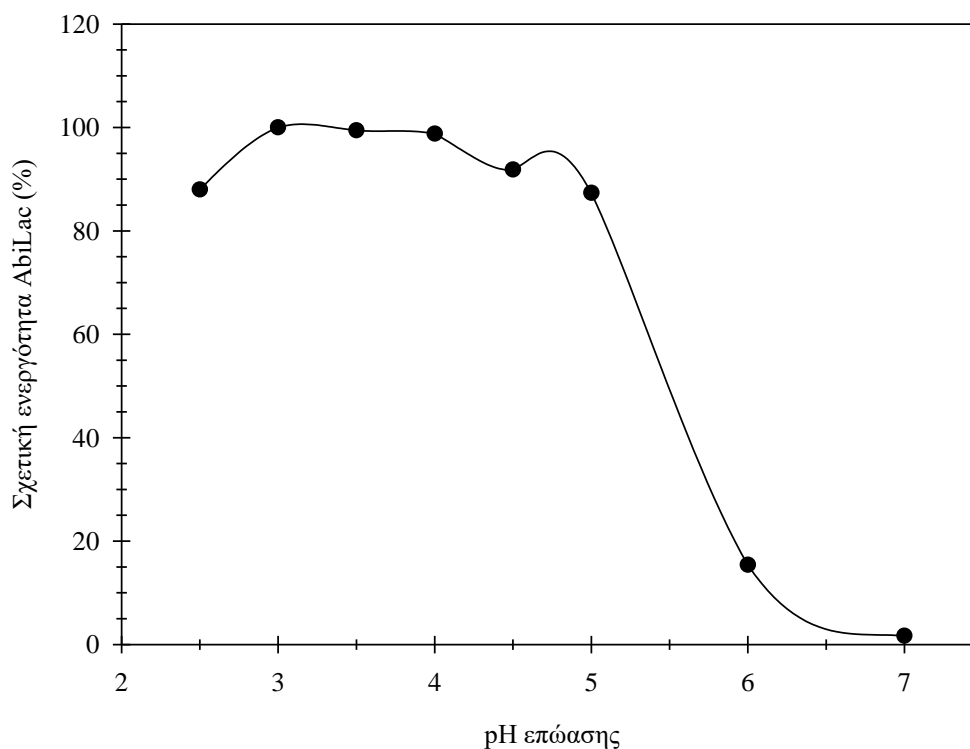


Διάγραμμα 11: Σχετική ενεργότητα της AbiLac συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 11), η λακκάση AbiLac παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα στη θερμοκρασία των 60 °C, όταν αντιδρά με υπόστρωμα ABTS σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH = 4.5. Επίσης, παρατηρείται ότι ακόμα και για τη μικρότερη τιμή της θερμοκρασίας που δοκιμάστηκε, δηλαδή τους 35 °C, η ενεργότητα δεν πέφτει κάτω από το 60% της μέγιστης δυνατής τιμής της.

Προσδιορισμός του βέλτιστου pH δράσης της AbiLac (pH optimum)

Ο προσδιορισμός του βέλτιστου pH δράσης του ενζύμου AbiLac πραγματοποιήθηκε μελετώντας την επίδραση διαφορετικών τιμών pH από 2.5-9.0. Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 12) παρουσιάζεται η επίδραση του pH στην ενζυμική δράση, η οποία εκφράζεται μέσω της σχετικής ενεργότητας (%) του ενζύμου θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου στο βέλτιστο pH δράσης.

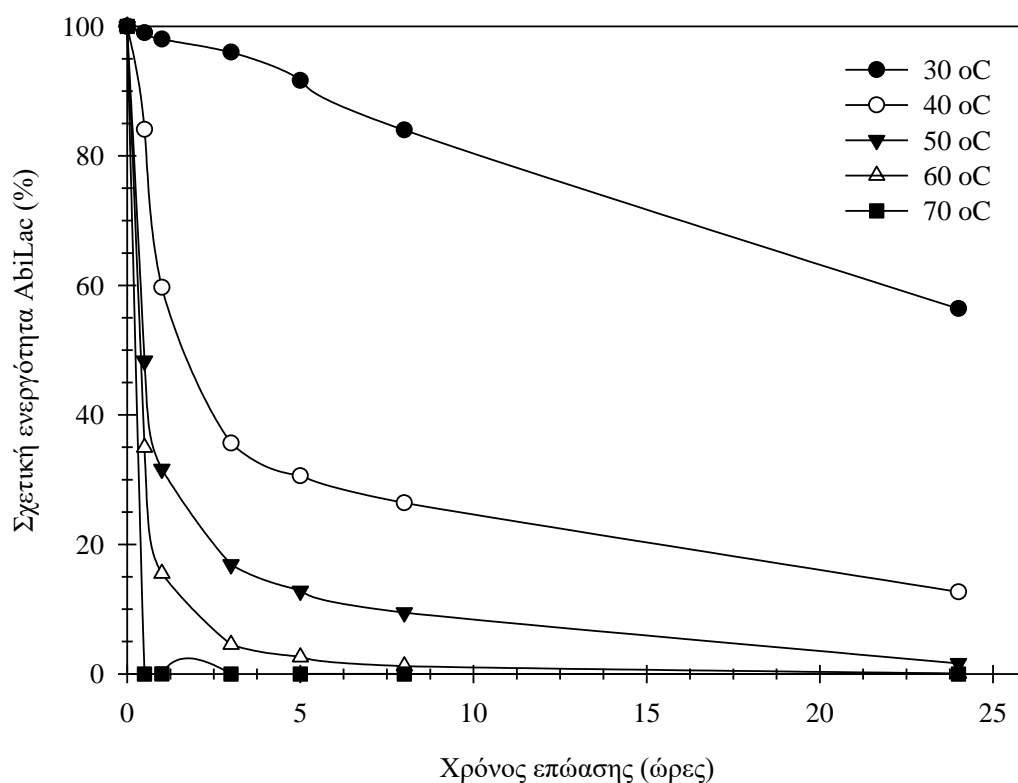


Διάγραμμα 12: Σχετική ενεργότητα της AbiLac συναρτήσει του pH.

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 12, προκύπτει το συμπέρασμα ότι για τιμές pH μεταξύ του 3.0 και του 4.0 το ένζυμο AbiLac παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα όταν αντιδρά με υπόστρωμα ABTS. Γενικότερα, για pH 2.5-5.0 η ενζυμική δράση της λακκάσης είναι πάνω από 80% της μέγιστης δυνατής, ενώ για pH μεγαλύτερο του 5.0 παρατηρείται απότομη πτώση της ενεργότητας.

Προσδιορισμός της θερμοσταθερότητας της AbiLac

3.3.3.3 Για τη μελέτη της θερμοκρασιακής σταθερότητας του ενζύμου AbiLac εξετάστηκε η μεταβολή της ενεργότητας του ενζύμου με το πέρασμα του χρόνου για διαφορετικές τιμές της θερμοκρασίας. Η πειραματική διαδικασία και οι τιμές που δοκιμάστηκαν παρουσιάζονται στην παράγραφο 2.2.2.7.2. Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 13) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης, με την ενζυμική δράση να εκφράζεται μέσω της σχετικής ενεργότητας (%) του ενζύμου θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου τη χρονική στιγμή μηδέν.

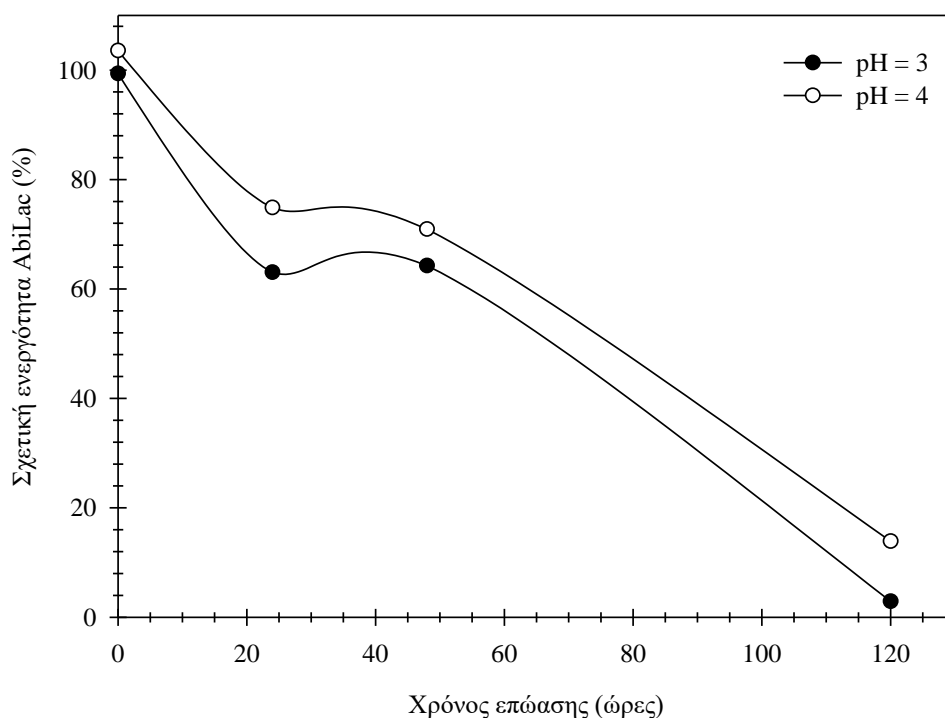


Διάγραμμα 13: Σχετική ενεργότητα της AbiLac συναρτήσει του χρόνου επώασης, για θερμοκρασίες 30-70 °C.

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 13 φαίνεται ότι στους 30 °C το ένζυμο παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας έπειτα από 24 h επώασης, με την ενζυμική δράση να έχει διατηρηθεί πάνω από το 50% της αρχικής. Για τις μεγαλύτερες θερμοκρασίες παρατηρείται πτώση της ενεργότητας κάτω του 30% μόλις μετά από 5 h, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι στους 70 °C το ένζυμο χάνει άμεσα την ενεργότητα του.

Προσδιορισμός της σταθερότητας pH της AbiLac

3.3.3.4 Για τη μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου AbiLac σε διαφορετικές τιμές pH εξετάστηκε η μεταβολή της ενεργότητας του ενζύμου με το πέρασμα του χρόνου σε διαφορετικά pH. Η πειραματική διαδικασία και οι τιμές που δοκιμάστηκαν παρουσιάζονται στην παράγραφο 2.2.2.7.2. Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Διάγραμμα 14) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης, με την ενζυμική δράση να εκφράζεται μέσω της σχετικής ενεργότητας (%) του ενζύμου θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου που βρίσκεται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl pH = 7.0 σε κάθε χρονική στιγμή.



Διάγραμμα 14: Σχετική ενεργότητα του ενζύμου AbiLac συναρτήσει του χρόνου επώασης για pH = 3 και pH = 4.

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 14, εξάγεται το συμπέρασμα πώς το ένζυμο απενεργοποιείται ταχύτερα όταν βρίσκεται αποθηκευμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα citrate – phosphate με pH = 3.0. Ακόμα, καθώς και στα δυο pH που μελετήθηκαν η ενεργότητα του ενζύμου έχει μειωθεί σημαντικά στο τέλος τους πειράματος φαίνεται πώς τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα δεν είναι ικανοποιητικά για την αποθήκευση του ενζύμου και τη διατήρηση της σταθερότητάς του.

Αποτελέσματα της δράσης του ενζύμου AbiLac στα συνθετικά πολυμερή PET και PS

3.4 Η επώαση ολόκληρου του μικροοργανισμού *A. biennis* με τα συνθετικά πολυμερή PS, PU και PET, είχε ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση μόνο των PS και PET, έπειτα από επώαση 30 ημερών. Για το λόγο αυτό, στα συγκεκριμένα πολυμερή εξετάστηκε σε πρώτη φάση και η δράση του καθαρού ενζύμου. Προκειμένου να μελετηθεί η δράση του ετερόλογα εκφρασμένου ενζύμου AbiLac πραγματοποιούνται αντιδράσεις σύμφωνα με την παράγραφο 2.2.2.7.3 και επεξεργάζονται τα αποτελέσματα που δίνουν όσον αφορά στη μεταβολή της μάζας και των μοριακών βαρών των υλικών, αλλά και στην παρουσία προϊόντων αποικοδόμησης όταν το εξεταζόμενο υλικό είναι το PET.

Μελέτη της δράσης του ενζύμου AbiLac στο PS

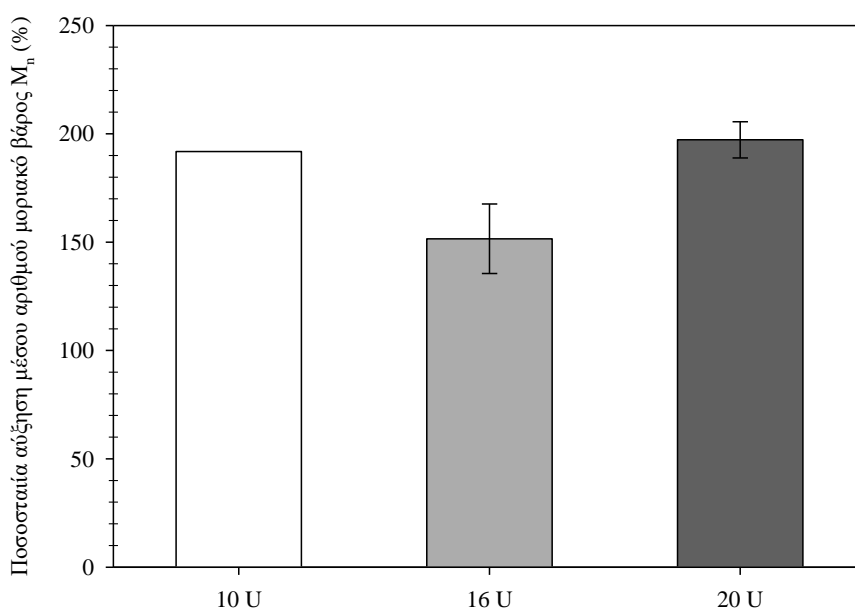
3.4.1 Για να μελετηθεί η δράση της AbiLac στο PS, αρχικά πραγματοποιούνται αντιδράσεις του πλαστικού με διαφορετικές ενεργότητες του ενζύμου. Μετά το τέλος των αντιδράσεων, υπολογίζεται η μεταβολή του βάρους του πλαστικού, η οποία αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για τη βιοαποικοδόμηση του πολυμερούς λόγω της δράσης του ενζύμου. Το βάρος του υλικού μετρήθηκε πριν και μετά την αντίδραση με τις διαφορετικές ενεργότητες ενζύμου και στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8) παρουσιάζεται η επί τοις εκατό απώλεια βάρους μετά το πέρας των αντιδράσεων.

Πίνακας 8: Απώλεια βάρους του PS έπειτα από αντίδραση με 10, 16 και 20 Units του ετερόλογα εκφρασμένου ενζύμου AbiLac.

Συνθετικό πολυμερές σε αντίδραση με AbiLac διαφορετικών ενεργοτήτων	Απώλεια βάρους μετά το τέλος της αντίδρασης (%)
PS control	0.1 ± 0.1
PS + 10U enzyme	0.2 ± 0.2
PS + 16U enzyme	0.0 ± 0.0
PS + 20U enzyme	0.0 ± 0.0

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που εμφανίζονται στον Πίνακα 8, φαίνεται πώς το βάρος των δειγμάτων δεν μεταβάλλεται έπειτα από την αντίδραση με διαφορετικές ενεργότητες της λακκάσης κι επομένως η μεταβολή του βάρους δεν μπορεί από μόνη της να δώσει πληροφορίες για την αποικοδόμηση του πλαστικού από το ένζυμο ενδιαφέροντος.

Για την επιβεβαίωση της δράσης του ενζύμου στο PS εξετάστηκε η μεταβολή των μοριακών βαρών των δειγμάτων και τα αποτελέσματα της GPC παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 15).



Διάγραμμα 15: Ποσοστιαία αύξηση του μέσου αριθμού μοριακού βάρους του πλαστικού PS, έπειτα από την αντίδραση με 10 Units (άσπρο), 16 Units (ανοιχτό γκρι) και 20 Units (σκούρο γκρι) του ετερόλογα εκφρασμένου ενζύμου AbiLac.

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 15 φαίνεται ότι η αντίδραση του πλαστικού με την AbiLac οδηγεί σε αύξηση του μοριακού του βάρους, η οποία αγγίζει περίπου το 200% στην περίπτωση που το ένζυμο έχει ενεργότητα 10 και 20 Units. Η αύξηση του μοριακού βάρους μπορεί να οφείλεται στο ότι το διαθέσιμο για αντίδραση υπόστρωμα δεν είναι επαρκές κι έτσι οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη δράση της λακκάσης έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα από το επιθυμητό. Πιο αναλυτικά, αν οι ελεύθερες ρίζες δυσκολεύονται να βρουν διαθέσιμο μόριο πολυμερούς να αντιδράσουν αυξάνονται οι πιθανότητες να αντιδράσουν μεταξύ τους κι έτσι αντί για διάσπαση του πλαστικού να πραγματοποιηθεί πολυμερισμός του.

Από τις τρεις διαφορετικές ενεργότητες που δοκιμάστηκαν, τα 16 Units ενζύμου παρουσιάζουν την καλύτερη αναλογία ενζύμου – υποστρώματος, καθώς για αυτή την ενεργότητα παρατηρείται η μικρότερη αύξηση του M_n . Για το λόγο αυτό, για τη συγκεκριμένη ενεργότητα επιλέχθηκε να εξεταστεί η επίδραση ορισμένων mediators στην αντίδραση με το πλαστικό, οι οποίοι έχουν την τάση να οξειδώνονται από τις λακκάσες κι έτσι μπορούν να αυξήσουν το διαθέσιμο υπόστρωμα στην αντίδραση.

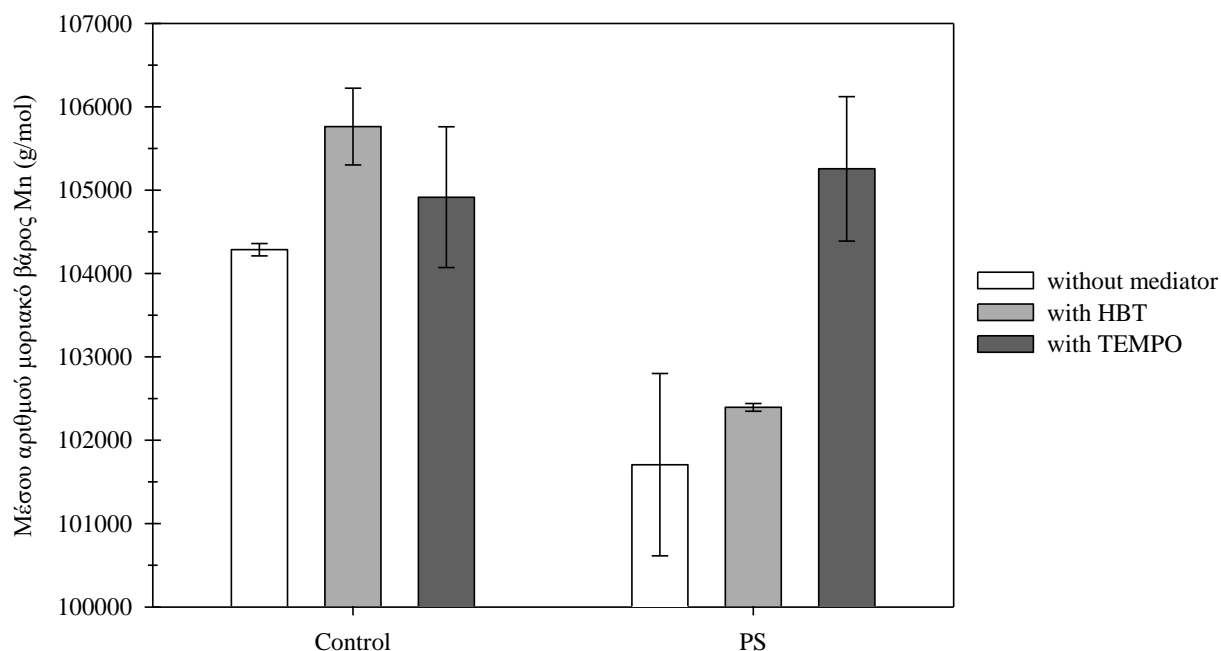
Η μελέτη της αποικοδόμησης του συνθετικού πολυμερούς PS από τη συνδυαστική δράση του ενζύμου AbiLac με κάποιο mediator αξιολογήθηκε αρχικά με τη μέτρηση της μεταβολής τους βάρους του πλαστικού. Το βάρος του PS μετρήθηκε πριν και μετά την αντίδρασή του με το ένζυμο και τους mediators και στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9) παρουσιάζεται η επί τοις εκατό απώλεια βάρους των υλικών μετά το πέρας των αντιδράσεων.

Πίνακας 9: Απώλεια βάρους του PS έπειτα από αντίδραση μόνο με το ένζυμο *AbiLac* και σε συνδυασμό με τους mediators *HBT* και *TEMPO*.

PS σε αντίδραση με <i>AbiLac</i> και διαφορετικούς mediators	Απώλεια βάρους μετά το τέλος της αντίδρασης (%)
PS control	33.8 ± 1.2
PS + <i>HBT</i> control	34.8 ± 0.2
PS + <i>TEMPO</i> control	35.0 ± 4.4
PS + <i>AbiLac</i>	33.6 ± 22.6
PS + <i>AbiLac</i> + <i>HBT</i>	19.4 ± 2.0
PS + <i>AbiLac</i> + <i>TEMPO</i>	8.6 ± 3.6

Τα σφάλματα κατά τη μέτρηση του βάρους των δειγμάτων μετά την αντίδραση με το ένζυμο ήταν μεγάλα κι επομένως, οι μεγάλες απώλειες βάρους που παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 δεν αντιστοιχούν στην πραγματική απώλεια βάρους των δειγμάτων λόγω αποδόμησής τους από το ένζυμο.

Για την επιβεβαίωση της δράσης του ενζύμου στο PS εξετάστηκε και η μεταβολή των μοριακών βαρών των δειγμάτων και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση GPC παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 16).



Διάγραμμα 16: Μεταβολή του μέσου αριθμού μοριακού βάρους του πλαστικού PS, έπειτα από την αντίδραση με το ετερόλογα εκφρασμένο ένζυμο *AbiLac* χωρίς την παρουσία mediator (άσπρο), με την παρουσία *HBT* (ανοιχτό γκρι) και με την παρουσία *TEMPO* (σκούρο γκρι).

Εξετάζοντας το Διάγραμμα 16 και συνυπολογίζοντας τα σφάλματα των μετρήσεων, παρατηρείται ότι η παρουσία του HBT στο διάλυμα της αντίδρασης οδηγεί σε μείωση του μοριακού βάρους του υλικού, παραπλήσια με τη μείωση που προκύπτει από τη δράση μόνο του ενζύμου. Από την άλλη, η παρουσία του TEMPO στο διάλυμα της αντίδρασης δεν έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του μοριακού βάρους των δειγμάτων κι επομένως δεν βελτιώνει την αποδόμηση του PS.

Μελέτη της δράσης του ενζύμου AbiLac στο PET

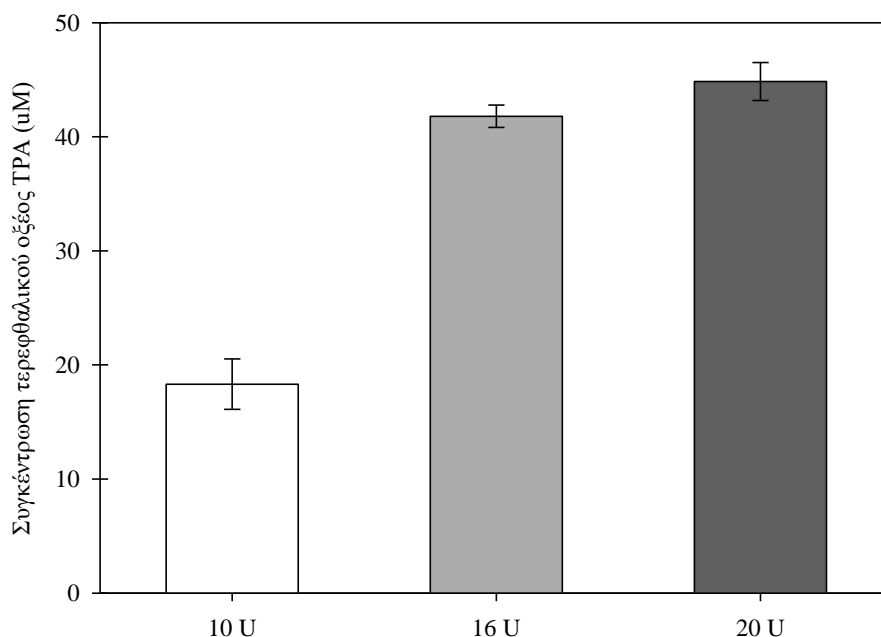
Για να μελετηθεί η δράση της AbiLac στο PET, αρχικά πραγματοποιούνται αντιδράσεις του πλαστικού με διαφορετικές ενεργότητες του ενζύμου. Μετά το τέλος των αντιδράσεων, 3.4.2 υπολογίζεται η μεταβολή του βάρους του πλαστικού, η οποία αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για τη βιοαποικοδόμηση του πολυμερούς λόγω της δράσης του ενζύμου. Το βάρος του υλικού μετρήθηκε πριν και μετά την αντίδραση με τις διαφορετικές ενεργότητες ενζύμου και στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10) παρουσιάζεται η επί τοις εκατό απώλεια βάρους μετά το πέρας των αντιδράσεων.

Πίνακας 10: Απώλεια βάρους του PET έπειτα από αντίδραση με 10, 16 και 20 Units του ετερόλογα εκφρασμένου ενζύμου AbiLac.

Συνθετικό πολυμερές σε αντίδραση με AbiLac διαφορετικών ενεργοτήτων	Απώλεια βάρους μετά το τέλος της αντίδρασης (%)
PET control	0.1 ± 0.1
PET + 10U enzyme	0.2 ± 0.0
PET + 16U enzyme	0.0 ± 0.0
PET + 20U enzyme	0.0 ± 0.0

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που εμφανίζονται στον Πίνακα 10, φαίνεται πώς το βάρος των δειγμάτων δεν μεταβάλλεται έπειτα από την αντίδραση με διαφορετικές ενεργότητες της λακκάσης κι επομένως η μεταβολή του βάρους δεν μπορεί από μόνη της να δώσει πληροφορίες για την αποικοδόμηση του πλαστικού από το ένζυμο ενδιαφέροντος.

Για την επιβεβαίωση της δράσης του ενζύμου στην περίπτωση του PET, το διάλυμα στο οποίο βρισκόταν το κάθε δείγμα πλαστικού μελετήθηκε ως προς την ύπαρξη προϊόντων αποικοδόμησής του, δηλαδή TPA, MHET και BHET. Στα δείγματα του PET ανιχνεύτηκε μόνο TPA, ενώ στο δείγμα ελέγχου που δεν περιείχε πλαστικό δεν ανιχνεύτηκε κανένα προϊόν αποικοδόμησης κι έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της HPLC προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 17).



Διάγραμμα 17: Συγκέντρωση του παραγόμενου TPA στα δείγματα του PET, έπειτα από την αντίδραση με 10 Units (άσπρο), 16 Units (ανοιχτό γκρι) και 20 Units (σκούρο γκρι) του ετερόλογα εκφρασμένου ενζύμου AbiLac.

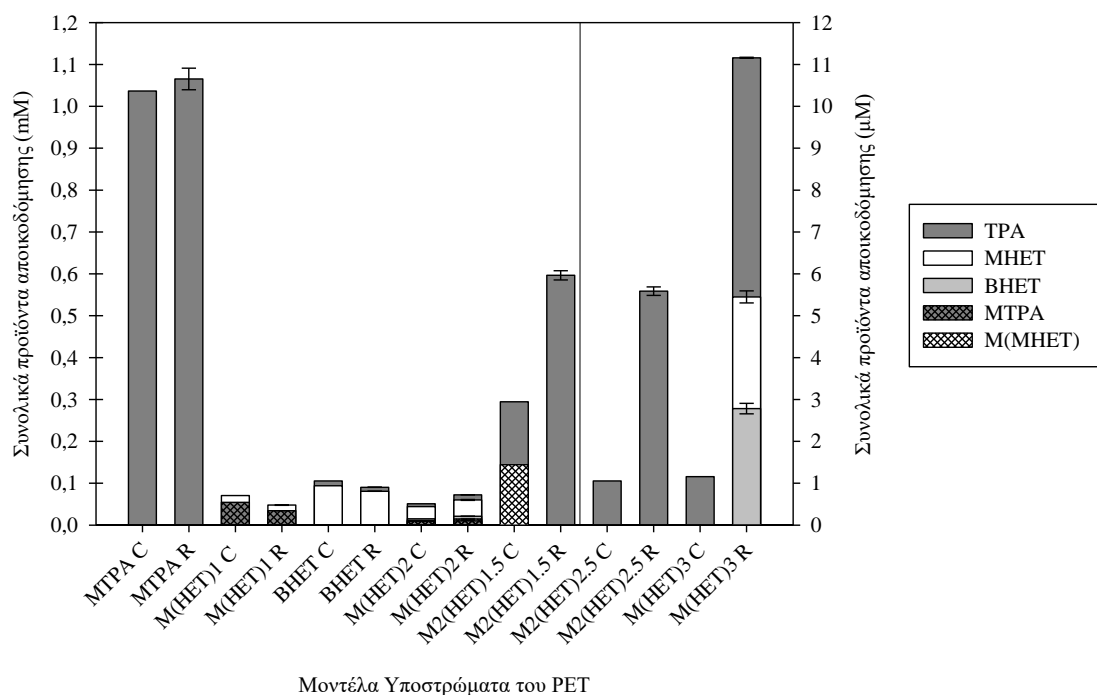
Σύμφωνα με το Διάγραμμα 17, όσο αυξάνεται η ενεργότητα του ενζύμου στην αντίδραση με το PET, τόσο αυξάνεται και η συγκέντρωση του TPA που ανιχνεύεται. Καταρχάς, η παρουσία TPA στο διάλυμα της αντίδρασης συνεπάγεται την αποδόμηση του PET, επομένως επιβεβαιώνεται η δράση της λακκάσης στο πλαστικό. Επίσης, η αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου που αντιδρά οδηγεί σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις TPA, άρα και σε μεγαλύτερο βαθμό αποικοδόμησης του υλικού. Παρατηρείται μάλιστα, ότι η απελευθέρωση TPA αυξάνεται πολύ περισσότερο όταν η ενεργότητα αυξηθεί από 10 σε 16 Units (56.2%), ενώ αν ληφθούν υπόψη και τα σφάλματα η διαφορά από τα 16 στα 20 Units δεν είναι και τόσο μεγάλη (6.8%). Γι' αυτό, στις αντιδράσεις με τα συνθετικά πολυμερή η προσθήκη 16 Units ενζύμου είναι προτιμότερη, καθώς έτσι δεν δαπανάται μεγάλη ποσότητα ενζύμου.

3.4.3

Εύρεση μηχανισμού διάσπασης του PET από το ένζυμο AbiLac

Επειδή δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για τη διάσπαση του PET από λακκάσες, η μελέτη του μηχανισμού δράσης του συγκεκριμένου ενζύμου στο πλαστικό αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Προκειμένου να βρεθεί ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου AbiLac στο συνθετικό πολυμερές PET, μελετήθηκαν τα προϊόντα αποικοδόμησης που προέκυψαν από την αντίδραση του ενζύμου με μοντέλα υποστρώματα του PET. Έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της HPLC προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 18), στο οποίο παρουσιάζονται τα προϊόντα αποικοδόμησης του κάθε υλικού και οι συγκεντρώσεις τους.

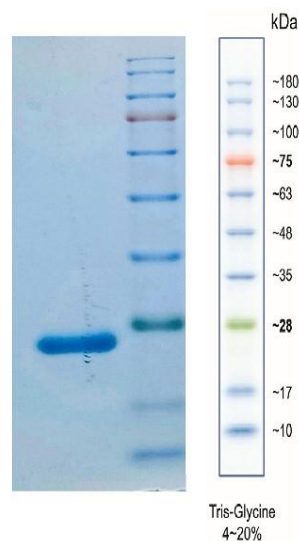


Διάγραμμα 18: Από την ενζυμική αποικοδόμηση των μοντέλων υποστρωμάτων του PET έπειτα από αντίδραση με το ένζυμο AbiLac, προέκυψαν ως προϊόντα αποικοδόμησης το TPA (σκούρο γκρι), το MHET (άσπρο), το BHET (ανοιχτό γκρι), το MTPA (σκούρο γκρι με διαγραμμώσεις) και το M(MHET) (άσπρο με διαγραμμώσεις).

Εξετάζοντας το Διάγραμμα 18 φαίνεται πώς στα μικρότερα υποστρώματα M(HET)1, BHET και M(HET)2, η AbiLac δεν εμφανίζει κάποια δράση, σε αντίθεση με το MTPA και τα υποστρώματα μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Όσον αφορά στα προϊόντα αποικοδόμησης, κατά την αντίδραση της λακκάσης με το MTPA προκύπτει ως μοναδικό προϊόν το TPA, το οποίο έχει αρκετά μεγάλη συγκέντρωση και στο δείγμα ελέγχου και στο δείγμα της αντίδρασης, μεγάλο μέρος της οποίας πιθανότητα οφείλεται στην αυτοϋδρόλυση του υποστρώματος. Μοναδικό προϊόν το TPA παρουσιάζουν και οι αντιδράσεις του ενζύμου με τα υποστρώματα M2(HET)1.5 και M2(HET)2.5, ενώ TPA εμφανίζεται και στα προϊόντα αποικοδόμησης του BHET, με το MHET ωστόσο να αποτελεί το κύριο προϊόν της αντίδρασης του με τη λακκάση. Κατά την αντίδραση της AbiLac με το M(HET)1 απελευθερώνεται MHET και MTPA, με το MTPA να εμφανίζεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ η αντίδραση του ενζύμου με το M(HET)2 είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση TPA, MHET, BHET, MTPA και M(HET)1 με το BHET να βρίσκεται σε λίγο μεγαλύτερες ποσότητες. Τέλος, η αντίδραση της λακκάσης με το M(HET)3 οδήγησε στην απελευθέρωση TPA, MHET και BHET, με τα MHET και BHET να αποτελούν τα βασικά προϊόντα αποικοδόμησης.

Προσδιορισμός καθαρότητας και μεγέθους της ετερόλογα εκφρασμένης πρωτεΐνης LCC με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

3.5 Η καθαρότητα και το μοριακό βάρος πρωτεΐνης LCC εκτιμήθηκε με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Εκτός από το δείγμα της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, ηλεκτροφορήθηκε και πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, το οποίο λειτούργησε ως οδηγός για την ταυτοποίηση του μεγέθους της πρωτεΐνης. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου που προέκυψε μετά την ηλεκτροφόρηση, το χρωματισμό και τον αποχρωματισμό της παρουσιάζεται στην Εικόνα 20.



Εικόνα 20: Απεικόνιση πηκτώματος ηλεκτροφόρησης της πρωτεΐνης LCC υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

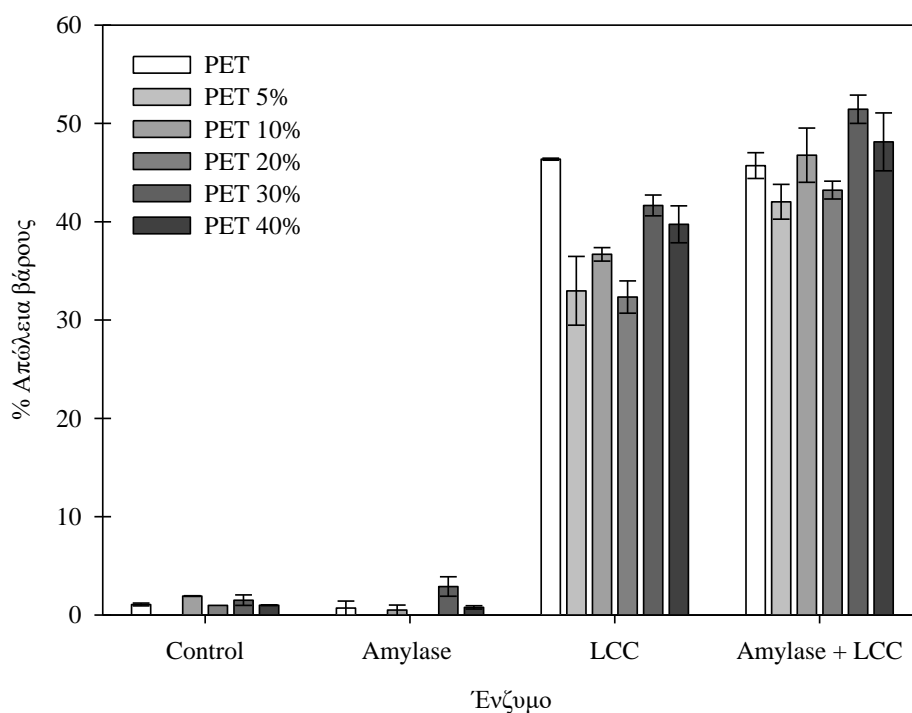
3.6 Τα πρωτεϊνικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν έπειτα από καθαρισμό της πρωτεΐνης με τη στήλη χρωματογραφίας TalonR. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης προσδιορίζεται από τη σύγκριση της έντονης ζώνης της καθαρής πρωτεΐνης με τις αντίστοιχες ζώνες του πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Έτσι, προέκυψε ότι η ετερόλογα εκφρασμένη πρωτεΐνη LCC έχει μοριακό βάρος περίπου ίσο με 27 kDa.

Αποτελέσματα δράσης του ενζύμου LCC σε υλικά PET διαφορετικής σύστασης και κατεργασίας

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση του ετερόλογα εκφρασμένου ενζύμου LCC πραγματοποιούνται αντιδράσεις σύμφωνα με την παράγραφο 2.2.3.3 και επεξεργάζονται τα αποτελέσματα που δίνουν όσον αφορά στη μεταβολή της μάζας, στην παρουσία προϊόντων αποικοδόμησης, αλλά και στην απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων στο διάλυμα της αντίδρασης. Ο τελευταίος έλεγχος γίνεται μόνο στα δείγματα του PET με το άμυλο, καθώς το άμυλο είναι αυτό που όταν αποδομηθεί θα δώσει αναγωγικά σάκχαρα, τα οποία εντοπίζονται με τη μέθοδο του DNS που παρουσιάστηκε. Για την αποδόμηση του αμύλου στα δείγματα αυτά, εκτός από την LCC προστίθεται στην αντίδραση και αμυλάση, είτε μόνη της είτε μαζί με την κουτινάση.

Μελέτη δράσης της LCC σε υλικά PET με άμυλο διαφορετικής συγκέντρωσης

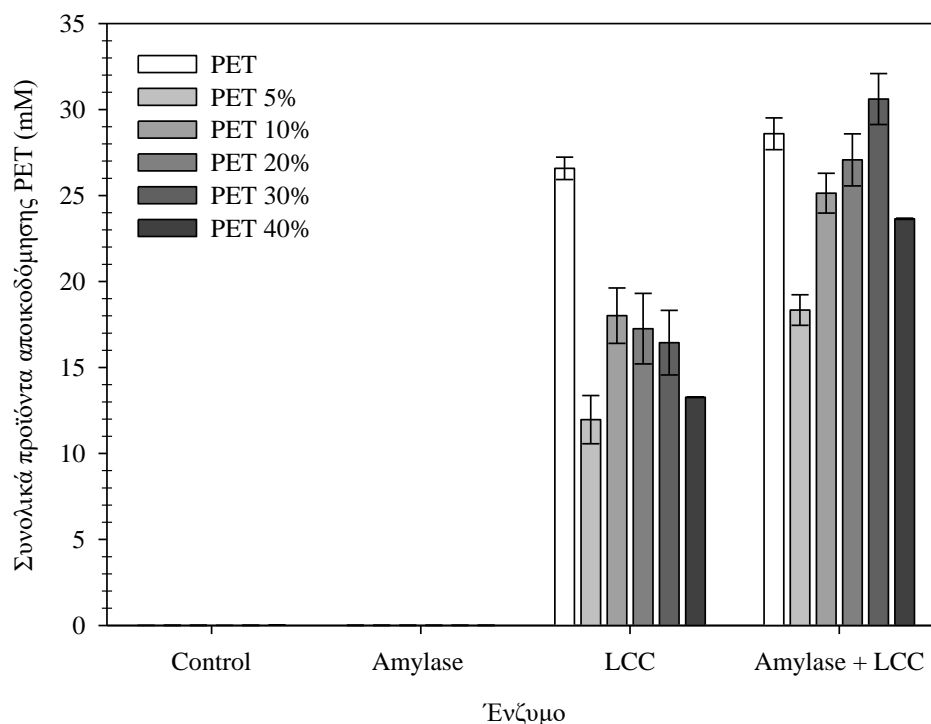
3.6.1 Έπειτα από την αντίδραση των διαφορετικών μιγμάτων του PET με άμυλο με τα ένζυμα LCC και αμυλάση, το πρώτο βήμα για τον έλεγχο της βιοαποικοδόμησης λόγω της δράσης των ενζύμων είναι η μέτρηση της μεταβολής του βάρους των διαφόρων πλαστικών. Το βάρος των συνθετικών πολυμερών μετρήθηκε πριν και μετά την αντίδρασή τους με τα ένζυμα. Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 19) παρουσιάζεται η επί τοις εκατό απώλεια βάρους των υλικών μετά το πέρας των αντιδράσεων.



Διάγραμμα 19: Απώλεια βάρους υλικών PET με άμυλο διαφορετικής σύστασης έπειτα από αντίδραση με τα ένζυμα LCC και αμυλάση, ξεχωριστά ή συνδυαστικά. Στο διάγραμμα τα υποστρώματα παρουσιάζονται με σειρά αυξανόμενου ποσοστού άμυλου (βαθμιαία από άσπρο – PET χωρίς άμυλο, μέχρι σκούρο γκρι – PET με 40% άμυλο).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 19, τα υλικά του PET με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις άμυλου παρουσιάζουν μείωση στο βάρος τους, λόγω της δράσης των ενζύμων LCC και αμυλάση, τα οποία δρουν ξεχωριστά ή συνεργιστικά. Πιο αναλυτικά, παρατηρείται ότι η LCC επιφέρει σημαντικές μειώσεις στο βάρος των υλικών, οι οποίες γίνονται ακόμα μεγαλύτερες όταν συνδυαστεί η δράση της με αυτή της αμυλάσης. Από την άλλη, η αμυλάση από μόνη της δεν φαίνεται να επηρεάζει και πολύ το βάρος των δειγμάτων, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στη δομή του υλικού, δηλαδή στο αν το άμυλο βρίσκεται επιφανειακά ή στο εσωτερικό του συνθετικού πολυμερούς. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι όταν στα μίγματα του PET περιέχεται άμυλο 30% η απώλεια βάρους που παρατηρείται είναι μεγαλύτερη κατά 12.6% από αυτή του καθαρού υλικού.

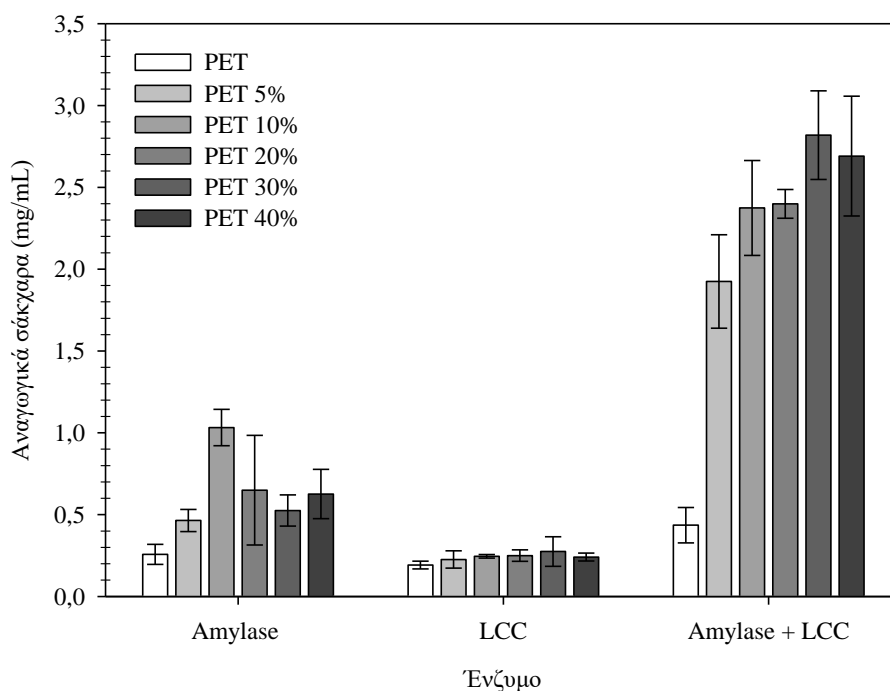
Καθώς η μείωση του βάρους των δειγμάτων αποτελεί μόνο μια ένδειξη της αποικοδόμησης των πλαστικών, για την επιβεβαίωση της δράσης των ενζύμων εξετάστηκε το διάλυμα στο οποίο βρισκόταν το κάθε δείγμα πλαστικού ως προς την ύπαρξη προϊόντων αποικοδόμησής του, δηλαδή TPA, MHET και BHET. Σε πολλά από τα δείγματα εντοπίστηκαν και τα τρία προϊόντα αποικοδόμησης, ενώ το κύριο προϊόν αποικοδόμησης του PET βρέθηκε να είναι το τερεφθαλικό οξύ (TPA). Έτσι, έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της HPLC προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 20), στο οποίο παρουσιάζεται η συνολική συγκέντρωση των προϊόντων αποικοδόμησης.



Διάγραμμα 20: Συγκέντρωση συνολικών προϊόντων αποικοδόμησης υλικών PET με άμυλο διαφορετικής σύστασης, έπειτα από αντίδραση με τα ένζυμα LCC και αμυλάση. Στο διάγραμμα τα υποστρώματα παρουσιάζονται με σειρά αυξανόμενου ποσοστού άμυλου (βαθμιαία από άσπρο – PET χωρίς άμυλο, μέχρι σκούρο γκρι – PET με 40% άμυλο).

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 20 γίνεται ολοφάνερη η δράση που έχει το ένζυμο LCC στην αποικοδόμηση των νέων υλικών PET με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις άμυλου. Πιο συγκεκριμένα, αν και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προϊόντων αποικοδόμησης παρουσιάζουν τα δείγματα του PET χωρίς το άμυλο και τα υπόλοιπα υλικά εμφανίζουν σημαντικές συγκεντρώσεις προϊόντων αποικοδόμησης μετά τη δράση της LCC, οι οποίες φτάνουν πολύ κοντά σε αυτές του καθαρού PET όταν η κουτινάση δρα συνεργιστικά με την αμυλάση. Μάλιστα, όταν το άμυλο βρίσκεται σε ποσοστό 30% η συνεργιστική δράση των ενζύμων έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μεγαλύτερης ποσότητας προϊόντων αποικοδόμησης σε σχέση με το καθαρό PET. Όταν η αμυλάση βρίσκεται μόνη της στα δείγματα του PET με το άμυλο, δεν προκύπτουν προϊόντα αποικοδόμησης, όπως και αναμένεται, καθώς το ένζυμο αυτό δεν συμβάλει στην αποικοδόμηση του PET.

Τέλος, το διάλυμα στο οποίο βρισκόταν το πλαστικό εξετάζεται και ως προς την ύπαρξη αναγωγικών σακχάρων. Έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της φασματοφωτομετρικής μεθόδου DNS, προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 21), στο οποίο παρουσιάζεται η συνολική συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων στο διάλυμα της αντίδρασης.

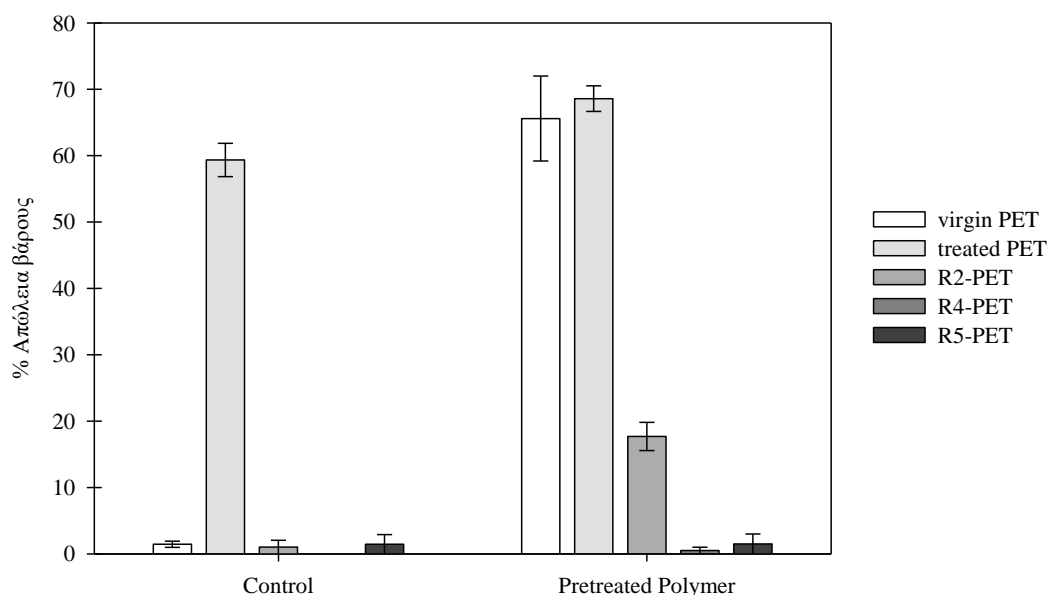


Διάγραμμα 21: Συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων στο διάλυμα της αντίδρασης των υλικών του PET με άμυλο διαφορετικής σύστασης. Στο διάγραμμα τα υποστρώματα παρουσιάζονται με σειρά αυξανόμενου ποσοστού άμυλου (βαθμιαία από άσπρο – PET χωρίς άμυλο, μέχρι σκούρο γκρι – PET με 40% άμυλο).

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 21 η συνεργιστική δράση της LCC με την αμυλάση έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων αναγωγικών σακχάρων, γεγονός που σημαίνει την αποδόμηση του άμυλου και κατ' επέκταση ολόκληρου του υλικού. Ειδικότερα, η αμυλάση από μόνη της οδηγεί μεν στην απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων, αλλά οι ποσότητες που εντοπίζονται είναι αρκετά μικρές καθώς το άμυλο μπορεί να βρίσκεται στο εσωτερικό του συνθετικού πολυμερούς. Η συνδυαστική δράση, όμως, της αμυλάσης με την LCC έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση σημαντικών ποσοτήτων αναγωγικών σακχάρων, καθώς η αμυλάση διασπά όχι μόνο το άμυλο που βρίσκεται στην επιφάνεια του πολυμερούς, αλλά και αυτό το οποίο μένει εκτεθειμένο λόγω της δράσης της LCC στο PET.

Μελέτη δράσης της LCC σε υλικά PET διαφορετικής κατεργασίας

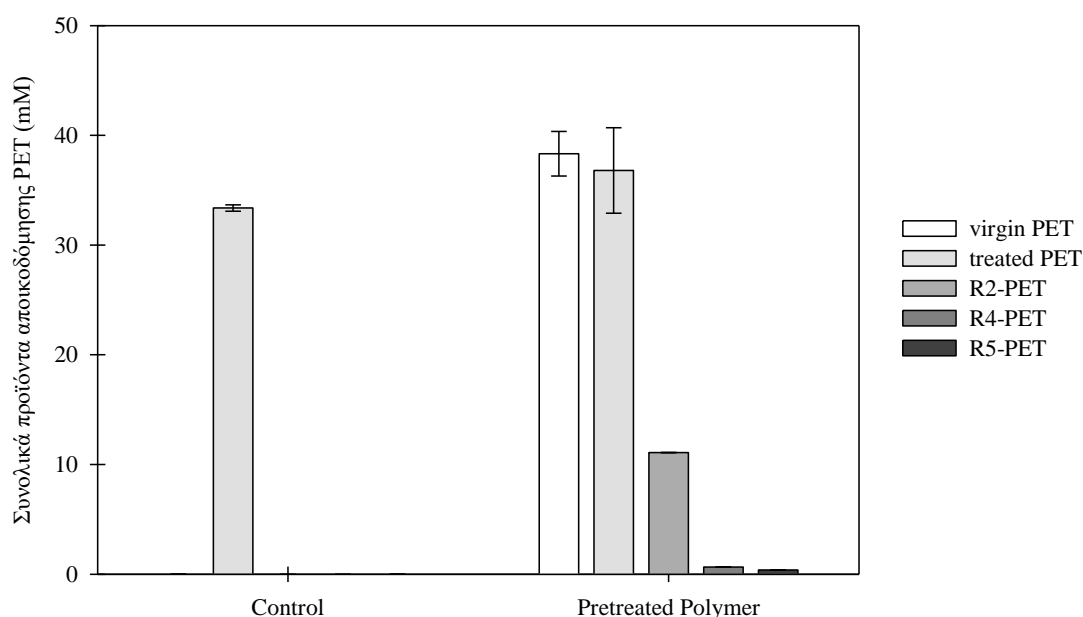
Έπειτα από την αντίδραση των διαφορετικής κατεργασίας υλικών PET με το ένζυμο LCC, το πρώτο βήμα για τον έλεγχο της βιοαποικοδόμησης λόγω της δράσης του ενζύμου είναι η μέτρηση της μεταβολής του βάρους των διαφόρων πλαστικών. Το βάρος των συνθετικών πολυμερών μετρήθηκε πριν και μετά την αντίδρασή τους με τα ένζυμα. Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 22) παρουσιάζεται η επί τοις εκατό απώλεια βάρους των υλικών μετά το πέρας των αντιδράσεων.



Διάγραμμα 22: Απόλεια βάρους κατεργασμένων υλικών PET έπειτα από αντίδραση με το ένζυμο LCC. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται το καθαρό PET, το προεπεξεργασμένο PET, το δύο φορές ανακυκλωμένο PET, το τέσσερις φορές ανακυκλωμένο PET και το πέντε φορές ανακυκλωμένο PET (με τη σειρά των χρωματικών διαβαθμίσεων από άσπρο μέχρι και σκούρο γκρι).

Μελετώντας τα αποτελέσματα του Διαγράμματος 22 μπορούν να εξαχθούν δυο διαφορετικά συμπεράσματα, ένα που αφορά στην αποδοτικότητα της επεξεργασίας του PET κι ένα άλλο που έχει να κάνει με την αποδόμηση του ανακυκλωμένου PET. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι η επεξεργασία που υπέστη το πλαστικό δεν βελτίωσε ιδιαίτερα τη διαδικασία της ενζυμικής αποικοδόμησης, καθώς η απώλεια βάρους έπειτα από τη δράση της LCC είναι παρόμοια είτε με επεξεργασία είτε χωρίς (περίπου 66%). Από την άλλη, όσον αφορά στα δείγματα του ανακυκλωμένου PET, παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη απώλεια βάρους εμφανίζεται όταν το υλικό έχει ανακυκλωθεί μόνο 2 φορές, ενώ όσο περισσότερες φορές ανακυκλώνεται τόσο μικρότερη απώλεια βάρους καταγράφεται.

Καθώς η μείωση του βάρους των δειγμάτων αποτελεί μόνο μια ένδειξη της αποικοδόμησης των πλαστικών, για την επιβεβαίωση της δράσης του ενζύμου εξετάστηκε το διάλυμα στο οποίο βρισκόταν το κάθε δείγμα πλαστικού ως προς την ύπαρξη προϊόντων αποικοδόμησης του, δηλαδή TPA, MHET και BHET. Σε πολλά από τα δείγματα εντοπίστηκαν και τα τρία προϊόντα αποικοδόμησης κι έτσι, έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της HPLC προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 23), στο οποίο παρουσιάζεται η συνολική συγκέντρωση των προϊόντων αποικοδόμησης.



Διάγραμμα 23: Συγκέντρωση συνολικών προϊόντων αποικοδόμησης επεξεργασμένων υλικών PET έπειτα από αντίδραση με το ένζυμο LCC. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται το καθαρό PET, το προεπεξεργασμένο PET, το δύο φορές ανακυκλωμένο PET, το τέσσερις φορές ανακυκλωμένο PET και το πέντε φορές ανακυκλωμένο PET (με τη σειρά των χρωματικών διαβαθμίσεων από άσπρο μέχρι και σκούρο γκρι).

Εξετάζοντας το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 23) φαίνεται η αδυναμία της επεξεργασίας του PET να βελτιώσει το βαθμό αποικοδόμησής του, αλλά και η δυσκολία με την οποία αποικοδομείται το PET όταν έχει ανακυκλωθεί πολλές φορές, συμπεράσματα τα οποία συμφωνούν με τα αποτελέσματα της μείωσης του βάρους των υλικών. Αναλυτικότερα, παρατηρείται ότι το επεξεργασμένο PET εμφανίζει αρκετά υψηλή συγκέντρωση προϊόντων αποικοδόμησης προτού καν αντιδράσει με το ένζυμο LCC, γεγονός που υποδεικνύει ότι η συγκεκριμένη επεξεργασία είναι ικανή από μόνη της να αποδομήσει ως ένα βαθμό το PET. Ωστόσο, μετά την αντίδραση με την κουτινάση η τελική συγκέντρωση προϊόντων αποικοδόμησης είναι παρόμοια με αυτή του μη επεξεργασμένου PET (περίπου 36 mM), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τελικά η επεξεργασία του υλικού δεν οδήγησε σε μεγαλύτερο βαθμό αποικοδόμησης του. Επιπλέον, παρατηρείται ότι στα δείγματα του PET που έχουν ανακυκλωθεί 4 και 5 φορές δεν εντοπίζονται σημαντικές ποσότητες προϊόντων αποικοδόμησης, σε αντίθεση με τα δείγματα του 2 φορές ανακυκλωμένου PET. Επομένως, όσο περισσότερες φορές έχει ανακυκλωθεί το PET, τόσο πιο δύσκολη γίνεται και η αποικοδόμησή του από την LCC.

Συζήτηση αποτελεσμάτων και μελλοντικές προτάσεις

Συζήτηση αποτελεσμάτων και συμπεράσματα

Αποικοδόμηση συνθετικών πολυμερών από το μικροοργανισμό *A. Biennis*

- 4.1 Έπειτα από επώαση 30 ημερών των φιλμ του PS με το μανιτάρι *A. biennis* παρατηρήθηκε αποικοδόμηση του πλαστικού και πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της GPC έδειξαν
- 4.1.1 μείωση στο μέσο μοριακό βάρος που έφτασε το 12.9% και 9.1% για τα δείγματα χωρίς και με κατσίγαρο, αντίστοιχα. Αποικοδόμηση του PS έχει παρατηρηθεί και από άλλους μύκητες, όπως είναι οι *Cephalosporium sp.* και *Mucor sp.*, οι οποίοι έπειτα από επώαση 8 εβδομάδων με το πλαστικό προκάλεσαν μείωση στο μοριακό βάρος των δειγμάτων κατά 4.7% και 4.6%, αντίστοιχα [138]. Φαίνεται ότι η δράση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού είναι καλύτερη από αυτή των μυκήτων που έχουν μελετηθεί, καθώς σε μικρότερο χρονικό διάστημα επιτυγχάνει καλύτερα αποτελέσματα υποβάθμισης του πλαστικού.

Από την άλλη, η μελέτη της επώασης των φιλμ των PU και PET με τον μικροοργανισμό δεν έδειξε σημάδια αποικοδόμησης των συγκεκριμένων πλαστικών. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για την αποικοδόμηση του PET από ολόκληρο μυκητιακό στέλεχος, ενώ όλες οι μελέτες που έχουν γίνει για τις PU, αφορούν τις πολυουρεθάνες με βάση τους εστερικούς δεσμούς. Μάλιστα, για τις πολυουρεθάνες με βάση τους εστερικούς δεσμούς έχουν βρεθεί σημαντικά ποσοστά αποδόμησης από μύκητες όπως είναι ο *A. flavus*, ο οποίος έπειτα από επώαση 30 ημερών προκάλεσε περίπου 60.6% μείωση του βάρους των δειγμάτων, ενώ στο διάλυμα της επώασης η ενεργότητα εστερασών μετρήθηκε ίση με 3.18 U/mL [139], δηλαδή περίπου 16 φορές μεγαλύτερη από αυτή που προσδιορίστηκε κατά την επώαση αιθερικής PU με τον *A. biennis*.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της δράσης του μικροοργανισμού *A. biennis* στα πλαστικά που μελετήθηκαν εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο μύκητας ήταν πιο αποτελεσματικός στην αποικοδόμηση του PS. Πιο συγκεκριμένα, έπειτα από την επώαση του μικροοργανισμού με τα φιλμ του συνθετικού πολυμερούς PS παρατηρείται μια σημαντική μείωση στο μοριακό βάρος των δειγμάτων, γεγονός που υποδεικνύει την υποβάθμιση του πλαστικού. Αντίστοιχα δείγματα αποδόμησης δεν παρατηρήθηκαν για τα άλλα δυο πλαστικά, αφού στα δείγματα του PU δεν σημειώθηκαν μεταβολές στα μοριακά βάρη των φιλμ, ενώ στα δείγματα του PET δεν εντοπίστηκαν σημαντικές ποσότητες προϊόντων αποικοδόμησης.

Όσον αφορά στις παρατηρούμενες ενζυμικές ενεργότητες, στα δείγματα των πλαστικών PU και PET εντοπίζεται στο διάλυμα επώασης ενεργότητα οξειδωτικών ενζύμων από τις πρώτες κιόλας μέρες, η οποία ωστόσο δεν παίρνει μεγάλες τιμές. Από την άλλη, στα δείγματα του PS μπορεί να μην μετράται αρχικά σημαντική ενζυμική ενεργότητα στο διάλυμα, ωστόσο στη συνέχεια οι τιμές της ενεργότητας οξειδωτικών ενζύμων που προσδιορίζονται είναι πολύ υψηλότερες από αυτές των άλλων δυο υλικών. Ακόμα, στα δείγματα του PET εκτός από οξειδωτικά ένζυμα εντοπίζονται και ένζυμα με ενεργότητα εστεράσης, τα οποία στοχεύουν στην υδρόλυση των εστερικών δεσμών του συνθετικού πολυμερούς. Μάλιστα, με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται μείωση της μετρούμενης ενεργότητας οξειδωτικών ενζύμων στο διάλυμα επώασης και αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων με εστερική δράση.

Μελέτη του ετερόλογα εκφρασμένου ενζύμου AbiLac

Μοριακό βάρος και καθαρότητα AbiLac

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της παραγόμενης λακκάσης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες επιβεβαίωσαν την καθαρότητα της πρωτεΐνης στο ενζυμικό διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα, καθώς στο δείγμα του ενζύμου παρουσιάστηκε μόνο μια μπάντα σε όλη την έκταση της γέλης, συμπεραίνεται ότι το διάλυμα της πρωτεΐνης καθαρίστηκε επιτυχώς μέσω της χρωματογραφίας ιοντοεναλλαγής με τη στήλη σεφαρόζης. Επίσης, η ύπαρξη μιας μόνο μπάντας φανερώνει τη σωστή διαχείριση του ενζυμικού διαλύματος, καθώς η πρωτεΐνη δεν έσπασε σε μικρότερα κομμάτια, τα οποία θα απέδιδαν περισσότερες μπάντες σε μικρότερα μοριακά βάρη.

Ακόμα, μέσω της μεθόδου ηλεκτροφόρησης προσδιορίστηκε το μοριακό βάρος της AbiLac, το οποίο βρέθηκε ίσο με ≈ 85 kDa. Γενικά, η μοριακή μάζα των λακκασών κυμαίνεται από 50 έως 140 kDa, ανάλογα με τον μικροοργανισμό, ενώ συγκεκριμένα μια τυπική λακκάση από μύκητα έχει μοριακό βάρος 60 – 70 kDa [140], [141]. Επομένως, η λακκάση που απομονώθηκε από τον *A. biennis* εμφανίζει λίγο μεγαλύτερο μοριακό βάρος από το τυπικό των μυκητιακών λακκασών, ωστόσο, έχουν απομονωθεί κι άλλα ένζυμα με ενεργότητα λακκάσης τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη μοριακή μάζα. Για παράδειγμα, το μοριακό βάρος της λακκάσης από το μύκητα λευκής σήψης (white rot fungus) *Trametes versicolor*, προσδιορίστηκε περίπου ίσο με 97 kDa, αρκετά μεγαλύτερο από των υπολοίπων λακκασών της βιβλιογραφίας [142]. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν ανακαλυφθεί και λακκάσες από μύκητες με μικρότερα μοριακά βάρη από τα τυπικά, όπως είναι η λακκάση από τον *Cladosporium cladosporioides*, της οποίας το μοριακό βάρος εκτιμάται στα 50 kDa [143].

4.1.2.2

Βέλτιστες συνθήκες παραγωγής ενζύμου AbiLac

Έπειτα από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, βρέθηκε ότι μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου εντοπίζεται στις καλλιέργειες όταν η επώαση τους πραγματοποιείται στους 23 °C, με 1% v/v μεθανόλη και 25 μM CuSO₄. Όσον αφορά στη μεθανόλη, η αύξηση της συγκέντρωσης της από 0.5% v/v σε 2% v/v οδήγησε σε διακυμάνσεις της ενεργότητας του παραγόμενου ενζύμου. Αναλυτικότερα, όταν η συγκέντρωση της μεθανόλης είναι 0.5% η μετρούμενη ενεργότητα είναι περίπου 0.5 U/mL έπειτα από επώαση 5 ημερών, ενώ για συγκέντρωση 1% παίρνει τη μέγιστη δυνατή τιμή, δηλαδή 0.85 U/mL. Όταν η συγκέντρωση της μεθανόλης είναι μεγαλύτερη από 1%, η ενεργότητα στις καλλιέργειες κυμαίνεται ανάμεσα στις παραπάνω τιμές. Για όλες τις τιμές συγκέντρωσης που δοκιμάστηκαν, έπειτα από την 6^η ημέρα επώασης η ενεργότητα που μετράται στις καλλιέργειες έχει μειωθεί δραστικά, δηλαδή η παρουσία της μεθανόλης οδήγησε στο θάνατο των λακκασών που παράχθηκαν. Από την άλλη, για συγκεντρώσεις CuSO₄ από 0μM – 100μM η ενεργότητα των λακκασών στις καλλιέργειες έχει παραπλήσιες τιμές, ενώ μετά από την 5^η ημέρα η καλλιέργεια των 25 μM αρχίζει να ξεχωρίζει και τελικά φτάνει σε ενεργότητα μεγαλύτερη από των υπολοίπων κατά 0.5 U/mL. Η καλλιέργεια με τα 200 μM CuSO₄ έχει από την αρχή μικρότερη ενεργότητα και καταφέρνει να φτάσει μόλις στο μισό της μέγιστης παρατηρούμενης. Τέλος, η βέλτιστη θερμοκρασία επώασης βρέθηκε να είναι η μικρότερη που δοκιμάστηκε, δηλαδή οι 23 °C. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η παραγωγή κυττάρων στις καλλιέργειες, άρα και η παραγωγή του επιθυμητού ενζύμου, είναι μεγαλύτερη [144].

Βέλτιστες συνθήκες δράσης και σταθερότητας της AbiLac

Οι περισσότερες μυκητιακές λακκάσες εμφανίζουν βέλτιστη δράση σε ένα θερμοκρασιακό εύρος 50 °C – 70 °C, ενώ έχουν βρεθεί και ένζυμα με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης αρκετά μικρότερη [145]. Για παράδειγμα, η λακκάση από τον μικροοργανισμό *Ganoderma lucidum* εμφανίζει μέγιστη ενεργότητα στους 25 °C [146]. Όσον αφορά στη θερμοσταθερότητα των λακκασών, αυτή διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τον οργανισμό προέλευσης και γενικά κυμαίνεται στους 30 °C – 50 °C, ενώ για θερμοκρασίες πάνω από 60 °C τα ένζυμα χάνουν γρήγορα τη δραστηριότητά τους [147].

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης και τον προσδιορισμό της θερμοσταθερότητας του ενζύμου AbiLac, προέκυψε ότι η λακκάση παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα σε υπόστρωμα ABTS, όταν βρίσκεται στους 60 °C, ενώ το ένζυμο είναι πιο σταθερό στους 30 °C. Πιο συγκεκριμένα, αν και στους 60 °C η ενεργότητα του ενζύμου παίρνει τις μέγιστες δυνατές τιμές, στη θερμοκρασία αυτή το ένζυμο χάνει πάνω από το 95% της ενεργότητας του μετά από μόλις 4 h επώασης. Από την άλλη, στους 30 °C η ενεργότητα πέφτει στο 60% της μέγιστης δυνατής, η οποία παρουσιάζεται στην υψηλότερη θερμοκρασία, όμως η ενζυμική δράση διατηρείται πάνω από το 50% της αρχικής έπειτα από επώαση 24 h. Επομένως, για τη χρήση της AbiLac σε αντιδράσεις με συνθετικά πολυμερή προτιμάται η ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 30 °C, όπου ναί μεν η ενεργότητα του ενζύμου δεν είναι η μέγιστη δυνατή, αλλά η δράση του διατηρείται καλύτερα με το πέρασμα του χρόνου.

Το βέλτιστο εύρος pH δράσης των μυκητιακών λακκασών κυμαίνεται μεταξύ 2.0 – 6.0 και εξαρτάται από το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται, με τις περισσότερες λακκάσες να έχουν βέλτιστο pH δράσης γύρω στο 3.0 όταν πρόκειται για οξείδωση του υποστρώματος ABTS [148], [149]. Για τη σταθερότητα των μυκητιακών λακκασών είναι γνωστό ότι είναι γενικά υψηλότερη σε όξινα pH [150], αν και υπάρχουν και εξαιρέσεις, όπως είναι για παράδειγμα η λακκάση από το μύκητα λευκής σήψης (white rot fungus) *Daedalea quercina*, η οποία είναι πιο σταθερή σε αλκαλικές τιμές pH [151].

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση του βέλτιστου pH δράσης και τον προσδιορισμό της σταθερότητας του ενζύμου AbiLac σε διαφορετικά pH, προέκυψε ότι η λακκάση παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα σε υπόστρωμα ABTS, όταν βρίσκεται σε pH = 3.0 – 4.0. Μάλιστα, η δραστηριότητα του ενζύμου είναι αρκετά υψηλή για ένα ευρύ φάσμα pH από 2.5 – 5.0, ενώ για μεγαλύτερες τιμές pH το ένζυμο σχεδόν απενεργοποιείται. Επίσης, το ένζυμο εμφανίστηκε να είναι πιο σταθερό για pH = 4.0, οπότε για τις αντιδράσεις της AbiLac με τα συνθετικά πλαστικά χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα με αυτό το pH.

Δράση του ενζύμου AbiLac σε πλαστικά

Γενικά, οι μυκητιακές λακκάσες έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν ενώσεις με φαινολικούς δακτυλίους στη δομή τους [152], όπως είναι για παράδειγμα το φυσικό πολυμερές λιγνίνη. Επομένως, και η λακκάση ενδιαφέροντος που απομονώθηκε από το μανιτάρι *A. biennis* αναμένεται να εμφανίζει ενζυμική δράση σε αντίστοιχα υποστρώματα και για το λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδρασή της στην αποικοδόμηση των πλαστικών PS και PET. Αν και η μικροβιακή αποικοδόμηση του PS έχει επιβεβαιωθεί, τα ένζυμα που εμπλέκονται στον αποπολυμερισμό του και η δράση τους δεν έχουν καθοριστεί με ακρίβεια [153], [154]. Όσον αφορά στην ενζυμική αποικοδόμηση του PET, έχουν μελετηθεί κυρίως βακτηριακά ένζυμα

που συμμετέχουν στη διάσπαση του [155], [156], ενώ τα κύρια μυκητιακά ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοαποικοδόμηση του είναι υδρολυτικά ένζυμα που δρουν στους εστερικούς δεσμούς [153]. Επομένως, για κανένα από τα δυο πλαστικά που μελετήθηκαν δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για τη συμβολή μυκητιακών λακκασών στην αποικοδόμησή τους.

Σύμφωνα με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, μελετώντας τις μεταβολές στο μοριακό βάρος των δειγμάτων PS που αντέδρασαν με AbiLac διαφορετικών ενεργοτήτων, προκύπτει πώς η αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου στην αντίδραση προκαλεί αύξηση στο μοριακό βάρος των δειγμάτων. Με άλλα λόγια, η παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων λακκάσης στο δείγμα δεν έχουν τα επιθυμητά αποτελέσματα, δηλαδή μείωση του μοριακού βάρους του υλικού κι επομένως αποικοδόμησή του, καθώς φαίνεται να συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο. Από την άλλη, η αύξηση της ενεργότητας της AbiLac στην αντίδραση με το πλαστικό PET οδηγεί στην απελευθέρωση μεγαλύτερων ποσοτήτων TPA, το οποίο αποτελεί βασικό προϊόν αποικοδόμησης του PET. Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η λακκάση μπορεί να υποβαθμίσει ως ένα βαθμό το συγκεκριμένο πλαστικό και μάλιστα όσο μεγαλύτερη η ενεργότητα της στο διάλυμα της αντίδρασης, τόσο μεγαλύτερος και ο βαθμός αποικοδόμησης του υλικού. Ωστόσο, δεν παρατηρούνται μεταβολές στο βάρος των δειγμάτων και η ποσότητα του TPA που απελευθερώνεται είναι μόλις 45 μM , επομένως ο βαθμός αποικοδόμησης του PET που παρατηρείται δεν είναι σημαντικός, καθώς άλλα ένζυμα είναι ικανά να προκαλέσουν και σχεδόν πλήρη αποδόμηση του υλικού. Για παράδειγμα, η κουτινάση από το μικροοργανισμό *Humicola insolens* (HiC), έπειτα από επώαση 96 ωρών με δείγματα PET χαμηλής κρυσταλλικότητας επιτυγχάνει μείωση στο βάρος του πλαστικού που αγγίζει το 97% [107]. Ενδιαφέρον θα είχε η μελέτη των δομικών μεταβολών του PET λόγω της δράσης της AbiLac και η επίδρασή τους στη δράση ενζύμων που ήδη το αποικοδομούν.

4.1.2.5 Ενζυμική αποικοδόμηση μοντέλων υποστρωμάτων του PET λόγω δράσης της AbiLac

Η ενζυμική δράση που παρουσιάζει η λακκάση όταν αντιδρά με τα μοντέλα υποστρώματα του PET είναι αρκετά μικρότερη από τη δράση που παρατηρήθηκε να έχει η εστεράση που απομονώθηκε από το βακτήριο *Moraxella sp.* (MoPE) στα αντίστοιχα υλικά [157]. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς η AbiLac ανήκει στα οξειδωτικά ένζυμα και έχει την ικανότητα να τροποποιεί τα μόρια μέσω του μηχανισμού ελευθέρων ριζών, ενώ η MoPE είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο κι έτσι μπορεί να υδρολύει τα μοντέλα υποστρώματα του PET. Ειδικότερα, το PET έχει βρεθεί ότι αποικοδομείται μέσω της υδρόλυσής του, οπότε το ίδιο αναμένεται να συμβαίνει και με τα oligομερή μοντέλα υποστρώματα του PET κι επομένως η δράση της εστεράσης είναι δικαιολογημένη. Ωστόσο, η δράση που εμφανίζει η λακκάση δεν οφείλεται στην ικανότητά της για υδρόλυση, αλλά στην τάση που έχει να οξειδώνει τις ενώσεις με τις οποίες αλληλεπιδρά. Πιο συγκεκριμένα, το πιο πιθανό είναι η αντίδραση της AbiLac με τα μοντέλα υποστρώματα να έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, οι οποίες αντιδρούν με τα υποστρώματα του PET και οδηγούν σε προϊόντα διάσπασης.

Παρατηρώντας τα προϊόντα αποικοδόμησης που προκύπτουν από τη δράση της AbiLac για κάθε μοντέλο υπόστρωμα, προκύπτει πως τα μικρά υποστρώματα δεν διασπώνται, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια αποικοδομούνται και δίνουν ως κύριο προϊόν το TPA, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της MoPE. Η μόνη διαφορά ανάμεσα σε αυτά τα δύο ένζυμα είναι ότι η πρόσδεση της MoPE στο υπόστρωμα φαίνεται να παρεμποδίζεται από την ύπαρξη μεθυλιωμένων πλευρικών ομάδων και γι' αυτό εντοπίζονται και αρκετά μεγάλες ποσότητες

ΜΤΡΑ έπειτα από τη δράση της εστεράσης. Από την άλλη, καθώς η AbiLac δρα με το μηχανισμό ελευθέρων ριζών φαίνεται να μην ξεχωρίζει της πλευρικές αιθυλομάδες ή μεθυλομάδες, δίνονται ως τελικό προϊόν το ΤΡΑ, το οποίο αποτελεί δομική μονάδα για τον επαναπολυμερισμό του συνθετικού πολυμερούς. Η ικανότητα της λακκάσης ενδιαφέροντος να μη διαχωρίζει τις πλευρικές ομάδες και να οδηγεί στην απελευθέρωση ΤΡΑ αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα του ενζύμου.

Σύγκριση δράσης μικροοργανισμού *A. biennis* και ενζύμου AbiLac

Έπειτα από όλα τα πειράματα που διεξάχθηκαν για την αποικοδόμηση των συνθετικών πολυμερών από το μικροοργανισμό *A. biennis*, αλλά και από τη λακκάση AbiLac που απομονώθηκε από αυτόν, μπορεί να γίνει κάποια σύγκριση της δράσης τους. Αρχικά, παρατηρείται ότι η επώαση του μικροοργανισμού με το PS οδηγεί σε αποικοδόμηση του πλαστικού, καθώς εντοπίζεται μείωση του μοριακού βάρους των δειγμάτων περίπου κατά 11%. Από την άλλη, η αντίδραση της λακκάσης με σκόνη του ίδιου πολυμερούς φαίνεται όχι μόνο να μην το αποικοδομεί, αλλά να συμβάλει στον περαιτέρω πολυμερισμό του, καθώς παρατηρείται αύξηση του μοριακού βάρους των δειγμάτων. Επιπλέον, μετά από επώαση 30 ημερών του μανιταριού με το PET παρουσία κατσίγαρου, απελευθερώνονται 375 μM ΤΡΑ, το οποίο αποτελεί το βασικό προϊόν αποικοδόμησης του PET, ενώ η απελευθέρωση τερεφθαλικού οξέος που παρατηρείται μετά τις αντιδράσεις του ίδιου πλαστικού με την AbiLac είναι μόλις 45 μM . Επομένως, ολόκληρος ο μικροοργανισμός εμφανίζει μεγαλύτερη δυναμική στην αποικοδόμηση των συνθετικών πολυμερών PS και PET, γεγονός που οφείλεται στην έκκριση περισσότερων ενζύμων από το μανιτάρι, τα οποία δρουν συνεργιστικά για τη διάσπαση των πλαστικών.

Η ενεργότητα της απομονωμένης από το μανιτάρι λακκάσης είναι αρκετά μεγαλύτερη από την ενεργότητα λακκασών που υπολογίζεται στα διαλύματα επώασης του *A. biennis* με τα φιλμ των πλαστικών, το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς ο σκοπός της ετερόλογης έκφρασης του γονιδίου της λακκάσης είναι η παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων ενζύμου. Αξίζει να σημειωθεί πως η ενεργότητα που εντοπίζεται στα διαλύματα επώασης του μικροοργανισμού δεν οφείλεται αποκλειστικά στη λακκάση ενδιαφέροντος, αλλά είναι αποτέλεσμα πολλών διαφορετικών λακκασών που παράγονται από το μανιτάρι. Ωστόσο, είναι πιθανό να μην εμφανίζουν όλες οι παραγόμενες λακκάσες κάποια δράση, καθώς αυτή εξαρτάται από το δυναμικό του κάθε ενζύμου.

Μοριακό βάρος και καθαρότητα ετερόλογα εκφρασμένης LCC

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της ετερόλογα εκφρασμένης LCC σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες επιβεβαίωσαν την καθαρότητα της πρωτεΐνης στο ενζυμικό διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα, καθώς στο δείγμα του ενζύμου παρουσιάστηκε μόνο μια μπάντα σε όλη την έκταση της γέλης, συμπεραίνεται ότι το διάλυμα της πρωτεΐνης καθαρίστηκε επιτυχώς μέσω της χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) με τη στήλη TalonR. Επίσης, η ύπαρξη μιας μόνο μπάντας φανερώνει τη σωστή διαχείριση του ενζυμικού διαλύματος, καθώς η πρωτεΐνη δεν έσπασε σε μικρότερα κομμάτια, τα οποία θα απέδιδαν περισσότερες μπάντες σε μικρότερα μοριακά βάρη.

Επιπλέον, μέσω της μεθόδου ηλεκτροφόρησης προσδιορίστηκε το μοριακό βάρος της LCC, το οποίο βρέθηκε ίσο με ≈ 27 kDa, λίγο μικρότερο από το αρχικά υπολογισμένο μοριακό βάρος των 31.5 kDa [158]. Οι κουτινάσες συνήθως παρουσιάζουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται στα 20 – 30 kDa [159] και πολλά ένζυμα αυτής της κατηγορίας που εμφανίζουν υδρολυτική δράση απέναντι στο PET έχουν μοριακά βάρη μέσα στο εύρος αυτό. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι οι κουτινάσες από του μύκητες *Humicola insolens*, *Fusarium solani* και *Thermobifida fusca*, οι οποίες έχουν μοριακά βάρη 20.3, 22 και 29 kDa, αντίστοιχα [160], [161].

Αξιολόγηση υλικών PET διαφορετικής κατεργασίας

4.1.4 Η προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων αμύλου στο συνθετικό πολυμερές PET οδήγησε στη δημιουργία καινοτόμων υλικών, τα οποία λόγω της δράσης των ενζύμων LCC και αμυλάση, αποικοδομούνται σε ποσοστά μικρότερα ή ίσα με αυτά του καθαρού πολυμερούς. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι η δράση μόνο της LCC οδηγεί σε μικρότερη υποβάθμιση των μιγμάτων του PET με το άμυλο, σε σχέση με το καθαρό PET. Ωστόσο, η συνεργιστική δράση της LCC με την αμυλάση, έχει ως αποτέλεσμα η αποικοδόμηση που επιτυγχάνεται να αυξηθεί σημαντικά και μάλιστα όσο αυξάνεται το ποσοστό του αμύλου, τόσο να αυξάνεται και ο βαθμός αποικοδόμησης του πολυμερούς. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι αυξάνοντας την ποσότητα του αμύλου στο μίγμα, μειώνεται και η κρυσταλλικότητα του υλικού, καθιστώντας το πιο ευάλωτο στην υποβάθμιση.

Όσον αφορά στα υλικά του PET τα οποία είχαν υποστεί κάποια προεπεξεργασία, παρατηρήθηκε ότι η επεξεργασία από μόνη της οδήγησε σε σημαντική υποβάθμιση του υλικού, η οποία δεν συνεχίστηκε με τη δράση του ενζύμου. Έτσι, το επεξεργασμένο και το μη επεξεργασμένο PET κατέληξαν να έχουν παραπλήσιους βαθμούς αποικοδόμησης μετά το τέλος των αντιδράσεων. Επίσης, η ανακύκλωση του PET φαίνεται να οδήγησε σε υλικά πιο ανθεκτικά στην αποικοδόμηση, καθώς το δύο φορές ανακυκλωμένο υλικό εμφάνισε απώλεια βάρους περίπου 4 φορές μικρότερη από αυτή του αρχικού υλικού. Μάλιστα, όσο περισσότερες φορές ήταν ανακυκλωμένο το υλικό, τόσο μικρότερη ήταν η υποβάθμισή του.

Μελλοντικές προτάσεις

4.2 Η μελέτη της βιοαποικοδόμησης των πολυμερών από το μύκητα *A. biennis* και ο προσδιορισμός των ενζύμων που ευθύνονται για αυτή, στοχεύει στη δημιουργία βιώσιμων διεργασιών για τη διάσπαση των συμβατικών πλαστικών, αλλά και νέων υλικών που αναπτύσσονται. Από την άλλη, η μελέτη της δράσης της LCC στα μίγματα του PET με το άμυλο στοχεύει στην ανάπτυξη καινούργιων υλικών, με καλύτερες μηχανικές και θερμικές ιδιότητες, τα οποία μπορούν εύκολα να αποικοδομηθούν στη φύση.



Για να μπορέσουν να αξιοποιηθούν τα αποτελέσματα της έρευνας που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, χρειάζεται να διεξαχθούν κάποια επιπλέον πειράματα που αφορούν τόσο στη δράση του μύκητα και των εκκρινόμενων ενζύμων του, όσο και στα νέα αναπτυσσόμενα υλικά PET.

Πιο συγκεκριμένα, προτείνεται η μελέτη της ενζυμικής δράσης ολόκληρου του μικροοργανισμού *A. biennis* και σε άλλα πλαστικά που παρουσιάζουν ίδια ή και διαφορετική δομή από αυτή που ήδη μελετήθηκε. Παράλληλα, πρέπει να διερευνηθεί η δράση της λακκάσης που απομονώθηκε στα συνθετικά πολυμερή στα οποία εμφανίζει δραστηριότητα ο μικροοργανισμός, αλλά και σε υλικά στα οποία εμφανίζουν ενεργότητα άλλες γνωστές λακκάσες. Η δράση της AbiLac μπορεί να διερευνηθεί και στα νέα υλικά του PET με το άμυλο, τα οποία θα πρέπει επιπλέον να μελετηθούν ως προς τις μηχανικές τους ιδιότητες και τη δυνατότητα εμπορικής εφαρμογής τους. Επιπροσθέτως, η δράση του μικροοργανισμού και της λακκάσης ενδιαφέροντος θα μπορούσε να ελεγχθεί και σε προεπεξεργασμένα πολυμερικά υλικά, τα οποία διαθέτουν μειωμένη κρυσταλλικότητα και είναι πιο εύκολο να αποικοδομηθούν.

Ακόμα, καλό θα ήταν να επαναληφθούν με μικρές διαφοροποιήσεις ορισμένα από τα πειράματα που διενεργήθηκαν. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αντιδράσεις της AbiLac με το PS η διεξαγωγή αντιδράσεων με μικρότερη ενεργότητα λακκάσης κρίνεται απαραίτητη ώστε να αξιολογηθεί η δράση του ενζύμου. Επίσης, ενδιαφέρον θα είχε η μελέτη του συνεργιτισμού της AbiLac με κάποια εστεράση στις αντιδράσεις με τα μοντέλα υποστρώματα του PET, αφού η μελετώμενη λακκάση ως οξειδωτικό ένζυμο τροποποιεί τα μόρια του υποστρώματος, ενώ οι εστεράσες ως υδρολυτικά ένζυμα υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς των μορίων.

Τέλος, μια οικονομική μελέτη που σχετίζεται με τη διαδικασία απομόνωσης του ενζύμου ενδιαφέροντος από το μικροοργανισμό και τη μαζική παραγωγή του είναι επιθυμητή προκειμένου να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα του εγχειρήματος και να γίνει το επόμενο βήμα για την πρακτική εφαρμογή του στην αποικοδόμηση των πλαστικών.

Βιβλιογραφία

- [1] “Plastic pollution facts and information.” <https://www.nationalgeographic.com/environment/article/plastic-pollution> (accessed Sep. 04, 2022).
- [2] PlascticsEurope, “Plastics-the Facts 2021 An analysis of European plastics production, demand and waste data.”
- [3] “The Problems with Plastics - Public Health Post.” <https://www.publichealthpost.org/research/problems-with-plastics/> (accessed Sep. 04, 2022).
- [4] “The problem –  CleanPlasticSolutions .https://cleanplasticsolutions.com/the-problem/ (accessed Sep. 04, 2022).
- [5] J. P. da Costa, P. S. M. Santos, A. C. Duarte, and T. Rocha-Santos, “(Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects,” *Science of the Total Environment*, vol. 566–567. Elsevier B.V., pp. 15–26, Oct. 01, 2016. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.041.
- [6] R. Wei and W. Zimmermann, “Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?,” *Microbial Biotechnology*, vol. 10, no. 6. John Wiley and Sons Ltd, pp. 1308–1322, Nov. 01, 2017. doi: 10.1111/1751-7915.12710.
- [7] A. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, and S. Ahmed, “Biological degradation of plastics: A comprehensive review,” *Biotechnology Advances*, vol. 26, no. 3. pp. 246–265, May 2008. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.
- [8] “Plastics Division: life cycle of a plastic product.” https://web.archive.org/web/20100317004747/http://www.americanchemistry.com/s_plastics/doc.asp?CID=1571&DID=5972 (accessed Sep. 03, 2022).
- [9] N. Mohanan, Z. Montazer, P. K. Sharma, and D. B. Levin, “Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics,” *Front Microbiol*, vol. 11, p. 2837, Nov. 2020, doi: 10.3389/FMICB.2020.580709/XML/NLM.
- [10] “Polyethylene (PE) - Properties, Uses & Application.” <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polyethylene-plastic> (accessed Sep. 03, 2022).
- [11] “Polyethylene Terephthalate (PET) - Uses, Properties & Structure.” <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polyethylene-terephthalate-pet-plastic> (accessed Sep. 03, 2022).
- [12] “Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes.”
- [13] B. Y. Peng *et al.*, “Biodegradation of Polyvinyl Chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae,” *Environ Int*, vol. 145, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.ENVINT.2020.106106.

- [14] “Polypropylene Plastic Uses (PP) | Plastic Properties & Applications.” <https://adrecoplastics.co.uk/polypropylene-uses/> (accessed Sep. 03, 2022).
- [15] M. C. Krueger *et al.*, “Degradation of polystyrene and selected analogues by biological Fenton chemistry approaches: Opportunities and limitations,” *Chemosphere*, vol. 173, pp. 520–528, 2017, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.01.089.
- [16] “The Safety of Styrene-Based Polymers for Food-Contact Use 2013 Submitted to: U.S. Food and Drug Administration (FDA) Food Additive Master File (FAMF) Update,” 2015.
- [17] M. C. Rillig, “Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil?,” *Environmental Science and Technology*, vol. 46, no. 12. pp. 6453–6454, Jun. 19, 2012. doi: 10.1021/es302011r.
- [18] M. Cole, P. Lindeque, C. Halsband, and T. S. Galloway, “Microplastics as contaminants in the marine environment: A review,” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 62, no. 12. pp. 2588–2597, Dec. 2011. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.
- [19] J. da Pinto Costa, T. Rocha-santos, A. C. Duarte, D. of Chemistry, and U. of Aveiro, “The environmental impacts of plastics and micro-plastics use, waste and pollution: EU and national measures Policy Department for Citizens’ Rights and Constitutional Affairs Directorate-General for Internal Policies PE.”
- [20] S. Karbalaei, P. Hanachi, T. R. Walker, and M. Cole, “Occurrence, sources, human health impacts and mitigation of microplastic pollution,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, no. 36. Springer Verlag, pp. 36046–36063, Dec. 01, 2018. doi: 10.1007/s11356-018-3508-7.
- [21] A. Magnin, E. Pollet, V. Phalip, and L. Avérous, “Evaluation of biological degradation of polyurethanes,” *Biotechnology Advances*, vol. 39. Elsevier Inc., Mar. 01, 2020. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107457.
- [22] M. Hajighasemi *et al.*, “Screening and Characterization of Novel Polyesterases from Environmental Metagenomes with High Hydrolytic Activity against Synthetic Polyesters,” *Environ Sci Technol*, vol. 52, no. 21, pp. 12388–12401, Nov. 2018, doi: 10.1021/acs.est.8b04252.
- [23] A. Okunola A, O. Kehinde I, A. Oluwaseun, and A. Olufiropo E, “Public and Environmental Health Effects of Plastic Wastes Disposal: A Review,” *Journal of Toxicology and Risk Assessment*, vol. 5, no. 2, Apr. 2019, doi: 10.23937/2572-4061.1510021.
- [24] M. C. Krueger, H. Harms, and D. Schlosser, “Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, no. 21. Springer Verlag, pp. 8857–8874, Nov. 01, 2015. doi: 10.1007/s00253-015-6879-4.
- [25] “Persistent organic pollutants in the marine food chain - United Nations University.” <https://unu.edu/publications/articles/persistent-organic-pollutants-in-the-marine-food-chain.html> (accessed Sep. 04, 2022).

- [26] V. M. Pathak and Navneet, “Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach,” *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 4, no. 1. Springer, Dec. 01, 2017. doi: 10.1186/s40643-017-0145-9.
- [27] “An analysis of European plastics production, demand and waste data.”
- [28] H. Pillsbury, U. Epa, and O. of Solid Waste pillsburyhope, “Municipal Solid Waste Generation, Recycling, and Disposal in the United States, Tables and Figures for 2012,” 2014.
- [29] J. Singh Jadaun, S. Bansal, A. Sonthalia, A. K. Rai, and S. P. Singh, “Biodegradation of plastics for sustainable environment,” *Bioresource Technology*, vol. 347. Elsevier Ltd, Mar. 01, 2022. doi: 10.1016/j.biortech.2022.126697.
- [30] S. S. Ray and M. Bousmina, “Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world,” *Progress in Materials Science*, vol. 50, no. 8. pp. 962–1079, Nov. 2005. doi: 10.1016/j.pmatsci.2005.05.002.
- [31] T. Ishigaki, W. Sugano, A. Nakanishi, M. Tateda, M. Ike, and M. Fujita, “The degradability of biodegradable plastics in aerobic and anaerobic waste landfill model reactors,” *Chemosphere*, vol. 54, no. 3, pp. 225–233, 2004, doi: 10.1016/S0045-6535(03)00750-1.
- [32] M. D. Fernández Rodríguez, M. C. García Gómez, N. Alonso Blazquez, and J. v. Tarazona, “Soil Pollution Remediation,” in *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, Elsevier, 2014, pp. 344–355. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00579-0.
- [33] S. M. Al-Salem, P. Lettieri, and J. Baeyens, “Recycling and recovery routes of plastic solid waste (PSW): A review,” *Waste Management*, vol. 29, no. 10. pp. 2625–2643, Oct. 2009. doi: 10.1016/j.wasman.2009.06.004.
- [34] J. M. R. da Luz, S. A. Paes, M. D. Nunes, M. de C. S. da Silva, and M. C. M. Kasuya, “Degradation of Oxo-Biodegradable Plastic by *Pleurotus ostreatus*,” *PLoS One*, vol. 8, no. 8, Aug. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0069386.
- [35] “Μπλε κάδοι, χωματερή ανευθυνότητας | Η ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ.” <https://www.kathimerini.gr/society/561625927/mple-kadoi-chomateri-aneythynotitas/> (accessed Sep. 03, 2022).
- [36] “Public ‘frustration’ growing with lack of recycling information | Resource Magazine.” <https://resource.co/article/public-frustration-growing-lack-recycling-information-11384> (accessed Sep. 03, 2022).
- [37] “Το 96% των Ελλήνων ζητά περισσότερους κάδους ανακύκλωσης σε δημόσιους χώρους - ΤΑ ΝΕΑ.” <https://www.tanea.gr/2020/12/20/science-technology/to-96-ton-ellinon-zita-perissoterous-kadous-anakyklosis-se-dimosious-xorous/> (accessed Sep. 03, 2022).
- [38] “Μονάδες Ανακύκλωσης – ΕΟΑΝ.” <https://www.eoan.gr/%ce%b5%ce%bd%ce%b1%ce%bb%ce%bb%ce%b1%ce%ba%cf%84%ce%b9%ce%ba%ce%ae-%ce%b4%ce%b9%ce%b1%cf%87%ce%b5%ce%af%cf%81%ce%b9%cf%83%ce%b7%ce%bc%ce%bf%ce%bd%ce%b1%ce%b4%ce%b5%cf%82->

- %ce%b1%ce%bd%ce%b1%ce%ba%cf%85%ce%ba%ce%bb%cf%89%cf%83%ce%b7%cf%82/ (accessed Sep. 03, 2022).
- [39] “EU recycled 41% of plastic packaging waste in 2019 - Products Eurostat News - Eurostat.” <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/ddn-20211027-2> (accessed Sep. 03, 2022).
- [40] “Biodegradable Plastic: Types, Properties & Material Table.” <https://omnexus.specialchem.com/polymer-properties/properties/biodegradable> (accessed Sep. 05, 2022).
- [41] I. E. Napper and R. C. Thompson, “Environmental Deterioration of Biodegradable, Oxo-biodegradable, Compostable, and Conventional Plastic Carrier Bags in the Sea, Soil, and Open-Air over a 3-Year Period,” *Environ Sci Technol*, vol. 53, no. 9, pp. 4775–4783, May 2019, doi: 10.1021/ACS.EST.8B06984.
- [42] E. Bioplastics, “FACT SHEET.” [Online]. Available: www.european-bioplastics.org/multimedia
- [43] M. Shen *et al.*, “Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution?,” *Environmental Pollution*, vol. 263. Elsevier Ltd, Aug. 01, 2020. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114469.
- [44] J. Parameswaranpillai, S. Thomas, and Y. Grohens, “Polymer Blends: State of the Art, New Challenges, and Opportunities,” *Characterization of Polymer Blends: Miscibility, Morphology and Interfaces*, vol. 9783527331536, pp. 1–6, Feb. 2015, doi: 10.1002/9783527645602.CH01.
- [45] J.-C. Huang, A. S. Shew, and M.-S. Wang, “Biodegradable Plastics: A Review.”
- [46] “(PDF) Microbial Degradation of Starch Based Polypropylene.” https://www.researchgate.net/publication/263550783_Microbial_Degradation_of_Starch_Based_Polypropylene (accessed Sep. 06, 2022).
- [47] S. Sumarji, M. G. D. Aqsho, H. A. Basuki, and M. Asrofi, “Tensile Properties and Fracture Morphology of Polyethylene Terephthalate Mixed Rice Starch Particle Based Blend Composites,” *Material Science Research India*, vol. 17, no. Issue 1, pp. 47–53, May 2020, doi: 10.13005/MSRI/170107.
- [48] B. Lee, A. L. Pometto, A. Fratzke, and T. B. Bailey, “Biodegradation of degradable plastic polyethylene by phanerochaete and streptomyces species,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 57, no. 3, pp. 678–685, 1991, doi: 10.1128/AEM.57.3.678-685.1991.
- [49] T. Niranjana Prabhu and K. Prashantha, “A review on present status and future challenges of starch based polymer films and their composites in food packaging applications,” *Polym Compos*, vol. 39, no. 7, pp. 2499–2522, Jul. 2018, doi: 10.1002/PC.24236.
- [50] J.-D. Gu, “Biodegradability of plastics: the issues, recent advances, and future perspectives”, doi: 10.1007/s11356-020-11501-9/Published.
- [51] S. Skariyachan, N. Taskeen, A. P. Kishore, and B. V. Krishna, “Recent advances in plastic degradation – From microbial consortia-based methods to data sciences and

- computational biology driven approaches,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 426. Elsevier B.V., Mar. 15, 2022. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.128086.
- [52] A. C. Frazer, “O-Demethylation and Other Transformations of Aromatic Compounds by Acetogenic Bacteria,” *Acetogenesis*, pp. 445–483, 1994, doi: 10.1007/978-1-4615-1777-1_17.
- [53] 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, doi: 10.1139/cjm-2018-0335.
- [54] 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, Sep. 2008. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.064.
- [55] B. K. H. Lim and E. S. Thian, “Biodegradation of polymers in managing plastic waste — A review,” *Science of the Total Environment*, vol. 813, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151880.
- [56] S. Wallström, E. Strömberg, and S. Karlsson, “Microbiological growth testing of polymeric materials: An evaluation of new methods,” *Polym Test*, vol. 24, no. 5, pp. 557–563, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.polymertesting.2005.02.005.
- [57] A. H. Ekanayaka *et al.*, “A Review of the Fungi That Degrade Plastic,” *Journal of Fungi*, vol. 8, no. 8, p. 772, Jul. 2022, doi: 10.3390/jof8080772.
- [58] S. D. Copley, “8.02 Evolution and the Enzyme.”
- [59] J. R. Whitaker, “ENZYMES | Functions and Characteristics,” *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, pp. 2119–2125, 2003, doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00419-3.
- [60] T. Lewis and W. L. Stone, “Biochemistry, Proteins Enzymes,” *StatPearls*, Apr. 2022, Accessed: Sep. 01, 2022. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554481/>
- [61] P. K. Robinson, “Enzymes: principles and biotechnological applications,” *Essays Biochem*, vol. 59, p. 1, Nov. 2015, doi: 10.1042/BSE0590001.
- [62] “Biological Catalysts - Enzymes | A-Level Biology Revision Notes.” <https://alevelbiology.co.uk/notes/biological-catalysts-enzymes/> (accessed Sep. 01, 2022).
- [63] John McMurry, *Organic Chemistry*, 9th ed. 2015.
- [64] G. Hommes, C. A. Gasser, E. M. Ammann, and P. F-X Corvini, “Determination of Oxidoreductase Activity Using a High-Throughput Microplate Respiratory Measurement,” 2012, doi: 10.1021/ac302716j.
- [65] “transferase | enzyme | Britannica.” <https://www.britannica.com/science/transferase> (accessed Aug. 24, 2022).
- [66] E. Shukla, A. D. Bendre, and S. M. Gaikwad, “Hydrolases: The Most Diverse Class of Enzymes,” Jan. 2022, doi: 10.5772/INTECHOPEN.102350.

- [67] “Lyase | Keywords | UniProt.” <https://www.uniprot.org/keywords/KW-0456> (accessed Aug. 24, 2022).
- [68] “isomerase | enzyme | Britannica.” <https://www.britannica.com/science/isomerase> (accessed Aug. 24, 2022).
- [69] “ligase | biochemistry | Britannica.” <https://www.britannica.com/science/ligase> (accessed Aug. 24, 2022).
- [70] S. Chen, L. Su, J. Chen, and J. Wu, “Cutinase: Characteristics, preparation, and application,” *Biotechnol Adv*, vol. 31, no. 8, pp. 1754–1767, Dec. 2013, doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2013.09.005.
- [71] P. E. Kolattukudy and L. Brown, “Fate of naturally occurring epoxy acids: A soluble epoxide hydrase, which catalyzes cis hydration, from *Fusarium solani* pisi,” *Arch Biochem Biophys*, vol. 166, no. 2, pp. 599–607, Feb. 1975, doi: 10.1016/0003-9861(75)90425-7.
- [72] P. E. Kolattukudy, R. E. Purdy, and I. B. Maiti, “Cutinases from Fungi and Pollen,” *Methods Enzymol*, vol. 71, no. C, pp. 652–664, Jan. 1981, doi: 10.1016/0076-6879(81)71078-4.
- [73] A. Heredia, “Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer,” *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, vol. 1620, no. 1–3, pp. 1–7, Mar. 2003, doi: 10.1016/S0304-4165(02)00510-X.
- [74] 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, MDPI, Dec. 01, 2018. doi: 10.3390/catal8120612.
- [75] S. Yoshida *et al.*, “A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate).” [Online]. Available: <http://science.sciencemag.org/>
- [76] R. Sharma, Y. Chisti, and U. C. Banerjee, “Production, purification, characterization, and applications of lipases,” *Biotechnol Adv*, vol. 19, no. 8, pp. 627–662, 2001, doi: 10.1016/S0734-9750(01)00086-6.
- [77] “Hydrolytic degradation of polyurethane,” 2001.
- [78] N. Gupta, V. Sahai, and R. Gupta, “Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor,” *Process Biochemistry*, vol. 42, no. 4, pp. 518–526, Apr. 2007, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2006.10.006.
- [79] M. Bilal, T. Rasheed, F. Nabeel, H. M. N. Iqbal, and Y. Zhao, “Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation – A review,” *J Environ Manage*, vol. 234, pp. 253–264, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.JENVMAN.2019.01.001.
- [80] S. v. Surwase, S. A. Patil, S. Srinivas, and J. P. Jadhav, “Interaction of small molecules with fungal laccase: A Surface Plasmon Resonance based study,” *Enzyme Microb Technol*, vol. 82, pp. 110–114, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2015.09.002.

- [81] P. Giardina, V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle, and G. Sannia, "Laccases: a never-ending story," *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009 67:3, vol. 67, no. 3, pp. 369–385, Oct. 2009, doi: 10.1007/S00018-009-0169-1.
- [82] N. T. Dittmer *et al.*, "Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*," *Insect Biochem Mol Biol*, vol. 34, no. 1, pp. 29–41, 2004, doi: 10.1016/J.IBMB.2003.08.003.
- [83] H. Claus, "Laccases and their occurrence in prokaryotes," *Arch Microbiol*, vol. 179, no. 3, pp. 145–150, Mar. 2003, doi: 10.1007/S00203-002-0510-7/TABLES/3.
- [84] J. F. Osma, J. L. Toca-Herrera, and S. Rodríguez-Couto, "Uses of laccases in the food industry," *Enzyme Res*, vol. 2010, 2010, doi: 10.4061/2010/918761.
- [85] K. Ikehata, I. D. Buchanan, and D. W. Smith, "Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment," *Journal of Environmental Engineering and Science*, vol. 3, no. 1. ICE Publishing, pp. 1–19, 2004. doi: 10.1139/S03-077.
- [86] A. Conesa, P. J. Punt, and C. A. M. J. J. van den Hondel, "Fungal peroxidases: Molecular aspects and applications," *J Biotechnol*, vol. 93, no. 2, pp. 143–158, Feb. 2002, doi: 10.1016/S0168-1656(01)00394-7.
- [87] M. Srikanth, T. S. R. S. Sandeep, K. Sucharitha, and S. Godi, "Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 9, no. 1. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, Dec. 01, 2022. doi: 10.1186/s40643-022-00532-4.
- [88] Z. Montazer, M. B. H. Najafi, and D. B. Levin, "Challenges with Verifying Microbial Degradation of Polyethylene," *Polymers 2020, Vol. 12, Page 123*, vol. 12, no. 1, p. 123, Jan. 2020, doi: 10.3390/POLYM12010123.
- [89] D. K. R. Bardají, J. A. S. Moretto, J. P. R. Furlan, and E. G. Stehling, "A mini-review: current advances in polyethylene biodegradation," *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 36, no. 2, pp. 1–10, Feb. 2020, doi: 10.1007/S11274-020-2808-5/TABLES/1.
- [90] B. Lee, A. L. Pometto Iii, A. Fratzke, and T. B. Bailey, "Biodegradation of Degradable Plastic Polyethylene by Phanerochaete and Streptomyces Speciest," 1991.
- [91] L. Contat-Rodrigo and A. Ribes Greus, "Biodegradation studies of LDPE filled with biodegradable additives: Morphological changes. I," *J Appl Polym Sci*, vol. 83, no. 8, pp. 1683–1691, Feb. 2002, doi: 10.1002/APP.10087.
- [92] Z. Montazer, M. B. Habibi Najafi, and D. B. Levin, "In vitro degradation of low-density polyethylene by new bacteria from larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*," *Can J Microbiol*, vol. 67, no. 3, pp. 249–258, 2021, doi: 10.1139/CJM-2020-0208.
- [93] M. Sudhakar, M. Doble, P. S. Murthy, and R. Venkatesan, "Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes," *Int Biodeterior Biodegradation*, vol. 61, no. 3, pp. 203–213, Apr. 2008, doi: 10.1016/J.IBIOD.2007.07.011.

- [94] S. Bonhomme, A. Cuer, A. M. Delort, J. Lemaire, M. Sancelme, and G. Scott, "Environmental biodegradation of polyethylene," *Polym Degrad Stab*, vol. 81, no. 3, pp. 441–452, 2003, doi: 10.1016/S0141-3910(03)00129-0.
- [95] H. Rajandas, S. Parimannan, K. Sathasivam, M. Ravichandran, and L. Su Yin, "Analysis method," *Polym Test*, vol. 8, no. 31, pp. 1094–1099, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.POLYMERTESTING.2012.07.015.
- [96] S. Zahra, S. S. Abbas, M. T. Mahsa, and N. Mohsen, "Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium," *Waste Management*, vol. 30, no. 3, pp. 396–401, Mar. 2010, doi: 10.1016/J.WASMAN.2009.09.027.
- [97] E. Santacruz-Juárez, R. E. Buendia-Corona, R. E. Ramírez, and C. Sánchez, "Fungal enzymes for the degradation of polyethylene: Molecular docking simulation and biodegradation pathway proposal," *J Hazard Mater*, vol. 411, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2021.125118.
- [98] M. G. Yoon, H. J. Jeon, and M. N. Kim, "Biodegradation of Polyethylene by a Soil Bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell," *Journal of Bioremediation & Biodegradation 2012 3:4*, vol. 3, no. 4, pp. 1–8, Apr. 2012, doi: 10.4172/2155-6199.1000145.
- [99] H. J. Jeon and M. N. Kim, "Functional analysis of alkane hydroxylase system derived from *Pseudomonas aeruginosa* E7 for low molecular weight polyethylene biodegradation," *Int Biodeterior Biodegradation*, vol. 103, pp. 141–146, Sep. 2015, doi: 10.1016/J.IBIOD.2015.04.024.
- [100] T. Sang, C. J. Wallis, G. Hill, and G. J. P. Britovsek, "Polyethylene terephthalate degradation under natural and accelerated weathering conditions," *Eur Polym J*, vol. 136, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2020.109873.
- [101] J. Pang, M. Zheng, R. Sun, A. Wang, X. Wang, and T. Zhang, "Synthesis of ethylene glycol and terephthalic acid from biomass for producing PET," *Green Chemistry*, vol. 18, no. 2. Royal Society of Chemistry, pp. 342–359, 2016. doi: 10.1039/c5gc01771h.
- [102] 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, Jun. 2019, doi: 10.1007/S00253-019-09717-Y/TABLES/1.
- [103] R. Sarkhel, S. Sengupta, P. Das, and A. Bhowal, "Comparative biodegradation study of polymer from plastic bottle waste using novel isolated bacteria and fungi from marine source," *Journal of Polymer Research*, vol. 27, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2020, doi: 10.1007/S10965-019-1973-4/FIGURES/9.
- [104] T. Nimchua, H. Punnapayak, and W. Zimmermann, "Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. pisi," *Biotechnol J*, vol. 2, no. 3, pp. 361–364, Mar. 2007, doi: 10.1002/BIOT.200600095.
- [105] "Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) modified with polyester "Bionolle Ò "by *Penicillium funiculosum*."

- [106] 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, Dec. 2014, doi: 10.1186/S13568-014-0044-9/FIGURES/5.
- [107] 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, Jul. 2009, doi: 10.1021/ma9005318.
- [108] S. Yoshida *et al.*, “A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate),” *Science*, vol. 351, no. 6278, pp. 1196–1199, Mar. 2016, doi: 10.1126/SCIENCE.AAD6359.
- [109] R. Wei *et al.*, “Biocatalytic Degradation Efficiency of Postconsumer Polyethylene Terephthalate Packaging Determined by Their Polymer Microstructures,” *Advanced Science*, vol. 6, no. 14, p. 1900491, Jul. 2019, doi: 10.1002/ADVS.201900491.
- [110] “Plastics-the Facts 2017 An analysis of European plastics production, demand and waste data”.
- [111] B. T. Ho, T. K. Roberts, and S. Lucas, “An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach,” *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 38, no. 2. Taylor and Francis Ltd, pp. 308–320, Feb. 17, 2018. doi: 10.1080/07388551.2017.1355293.
- [112] A. S. Goldman, “Carbon–carbon bonds get a break,” *Nature 2010 463:7280*, vol. 463, no. 7280, pp. 435–436, Jan. 2010, doi: 10.1038/463435a.
- [113] E. OIKAWA, K. T. Linn, T. ENDO, T. OIKAWA, and Y. ISHIBASHI, “Isolation and Characterization of Polystyrene Degrading Microorganisms for Zero Emission Treatment of Expanded Polystyrene,” *ENVIRONMENTAL ENGINEERING RESEARCH*, vol. 40, pp. 373–379, Nov. 2003, doi: 10.11532/PROES1992.40.373.
- [114] N. Atiq, “Biodegradability of Synthetic Plastics Polystyrene and Styrofoam by Fungal Isolates,” 2011.
- [115] L. Tian *et al.*, “Mineralisation of 14C-labelled polystyrene plastics by *Penicillium variabile* after ozonation pre-treatment,” *N Biotechnol*, vol. 38, pp. 101–105, Sep. 2017, doi: 10.1016/J.NBT.2016.07.008.
- [116] O. Milstein, R. Gersonde, A. Huttermann, M. J. Chen, and J. J. Meister, “Fungal biodegradation of lignopolystyrene graft copolymers,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 58, no. 10, pp. 3225–3232, 1992, doi: 10.1128/AEM.58.10.3225-3232.1992.
- [117] K. Nakamiya, G. Sakasita, T. Ooi, and S. Kinoshita, “Enzymatic degradation of polystyrene by hydroquinone peroxidase of *Azotobacter beijerinckii* HM121,” *J Ferment Bioeng*, vol. 84, no. 5, pp. 480–482, 1997, doi: 10.1016/S0922-338X(97)82013-2.
- [118] G. T. Howard, “Biodegradation of polyurethane: A review,” *Int Biodeterior Biodegradation*, vol. 49, no. 4, pp. 245–252, 2002, doi: 10.1016/S0964-8305(02)00051-3.

- [119] J. Álvarez-Barragán, L. Domínguez-Malfavón, M. Vargas-Suárez, R. González-Hernández, G. Aguilar-Osorio, and H. Loza-Tavera, “Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 82, no. 17, pp. 5225–5235, 2016, doi: 10.1128/AEM.01344-16/SUPPL_FILE/ZAM018167360SO1.PDF.
- [120] N. Mahajan and P. Gupta, “New insights into the microbial degradation of polyurethanes,” *RSC Advances*, vol. 5, no. 52. Royal Society of Chemistry, pp. 41839–41854, 2015. doi: 10.1039/c5ra04589d.
- [121] S. J. Stachelek *et al.*, “Prevention of oxidative degradation of polyurethane by covalent attachment of di-tert-butylphenol residues,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 78, no. 4, pp. 653–661, Sep. 2006, doi: 10.1002/jbm.a.30828.
- [122] A. Loredó-Treviño, G. García, A. Velasco-Téllez, R. Rodríguez-Herrera, and C. N. Aguilar, “Polyurethane as substrate for fungal strains,” *Advances in Bioscience and Biotechnology*, vol. 02, no. 02, pp. 52–58, 2011, doi: 10.4236/abb.2011.22009.
- [123] K. Thirunavukarasu, S. Purushothaman, M. K. Gowthaman, T. Nakajima-Kambe, C. Rose, and N. R. Kamini, “Utilization of fish meal and fish oil for production of *Cryptococcus* sp. MTCC 5455 lipase and hydrolysis of polyurethane thereof,” *Journal of Food Science and Technology 2014 52:9*, vol. 52, no. 9, pp. 5772–5780, Jan. 2015, doi: 10.1007/S13197-014-1697-8.
- [124] Ε. Γκατζάρου, “Αποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιουργείου με χρήση λιγνινολυτικών μυκήτων.”
- [125] M. S. H. Akash and K. Rehman, “High Performance Liquid Chromatography,” *Essentials of Pharmaceutical Analysis*, pp. 175–184, 2020, doi: 10.1007/978-981-15-1547-7_14.
- [126] D. S. Arora and P. K. Gill, “Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase,” *Enzyme Microb Technol*, vol. 28, no. 7–8, pp. 602–605, May 2001, doi: 10.1016/S0141-0229(01)00302-7.
- [127] J. O. Romero, E. Fernández-Fueyo, F. Avila-Salas, R. Recabarren, J. Alzate-Morales, and A. T. Martínez, “Binding and Catalytic Mechanisms of Veratryl Alcohol Oxidation by Lignin Peroxidase: A Theoretical and Experimental Study,” *Comput Struct Biotechnol J*, vol. 17, pp. 1066–1074, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.CSBJ.2019.07.002.
- [128] S. S. More, P. S. Renuka, K. Pruthvi, M. Swetha, S. Malini, and S. M. Veena, “Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp.,” *Enzyme Res*, vol. 2011, no. 1, 2011, doi: 10.4061/2011/248735.
- [129] “Quick Start™ Bradford Protein Assay Instruction Manual”.
- [130] “Dialysis Methods for Protein Research | Thermo Fisher Scientific - GR.” https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/dialysis-methods-protein-research.html?gclid=Cj0KCQjwwJuVBhCAARIsAOPwGARD-IDt_bfOXBx5nIw8Sk2CjIuhQcs2gTcMeotpjNMxFD6sUfGQa7kaAsArEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjwwJuVBhCAARIsAOPwGARD-

- IDt_bfOXBx5nIw8Sk2CjIuhQcs2gTcMEotpjNMxFD6sUfGQa7kaAsArEALw_wcB: G:s&s_kwcid=AL!3652!3!386235918378!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con (accessed Aug. 03, 2022).
- [131] “Ion exchange columns and media Selection Guide imagination at work.”
- [132] “The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) | MBL Life Science -JAPAN-.” <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/sds-page.html> (accessed Aug. 03, 2022).
- [133] “SDS-PAGE - Gel Based Protein Separation - Pacific BioLabs.” <https://pacificbiolabs.com/sds-page/> (accessed Aug. 03, 2022).
- [134] M. Djapovic *et al.*, “Synthesis and characterization of polyethylene terephthalate (PET) precursors and potential degradation products: Toxicity study and application in discovery of novel PETases,” *Chemosphere*, vol. 275, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.130005.
- [135] Z. Ππερίγκου and M. Ερευνήτρια, “Β Ι Ο Χ Η Μ Ε Ι Α Τ Ρ Ο Φ Ι Μ Ω Ν,” 2020.
- [136] W.-H. Jeong, K. Harada, T. Yamada, J. Abe, and K. Kitamura, “Establishment of new method for analysis of starch contents and varietal differences in soybean seeds,” *Breed Sci*, vol. 60, pp. 160–163, 2010, Accessed: Aug. 31, 2022. [Online]. Available: www.soygrowers.com
- [137] N. N. Deshavath, G. Mukherjee, V. v. Goud, V. D. Veeranki, and C. v. Sastri, “Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural,” *Int J Biol Macromol*, vol. 156, pp. 180–185, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.04.045.
- [138] A. K. Chaudhary and R. P. Vijayakumar, “Studies on biological degradation of polystyrene by pure fungal cultures,” *Environ Dev Sustain*, vol. 22, no. 5, pp. 4495–4508, Jun. 2020, doi: 10.1007/S10668-019-00394-5/TABLES/5.
- [139] G. Mathur and R. Prasad, “Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC 6051) isolated from soil,” *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 167, no. 6, pp. 1595–1602, Jul. 2012, doi: 10.1007/S12010-012-9572-4.
- [140] P. Baldrian, “Fungal laccases – occurrence and properties,” *FEMS Microbiol Rev*, vol. 30, no. 2, pp. 215–242, Mar. 2006, doi: 10.1111/J.1574-4976.2005.00010.X.
- [141] C. M. Rivera-Hoyos, E. D. Morales-Álvarez, R. A. Poutou-Piñales, A. M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez, and J. M. Delgado-Boada, “Fungal laccases,” *Fungal Biol Rev*, vol. 27, no. 3–4, pp. 67–82, Dec. 2013, doi: 10.1016/J.FBR.2013.07.001.
- [142] “Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* - PubMed.” <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16410773/> (accessed Sep. 09, 2022).
- [143] M. S. Aslam, A. Aishy, Z. Q. Samra, I. Gull, and M. A. Athar, “Identification, purification and characterization of a novel extracellular laccase from *Cladosporium*

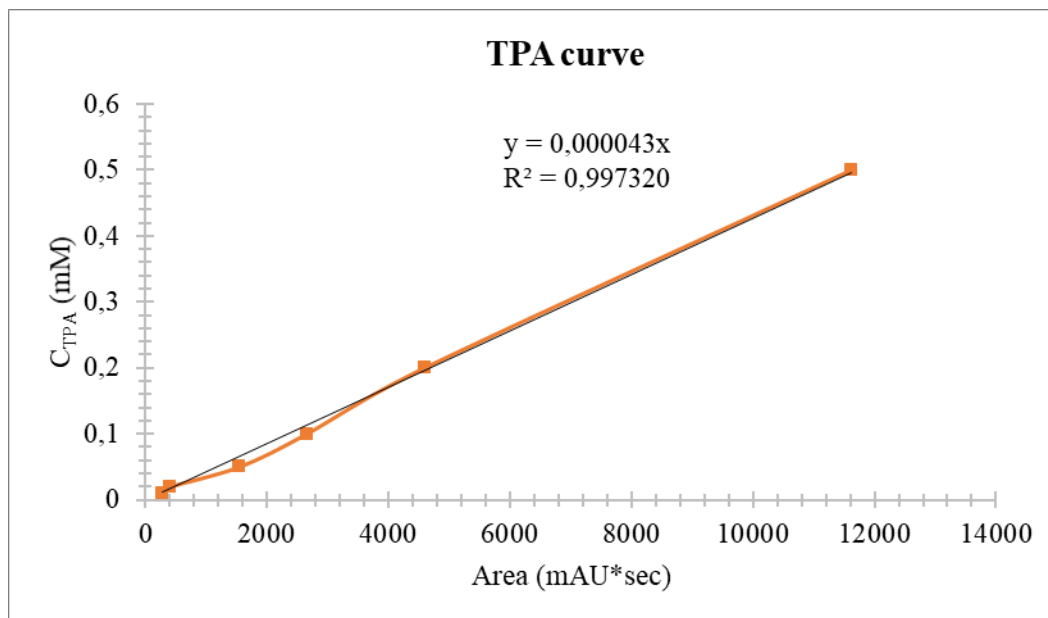
- cladosporioides,” *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 26, no. 6, pp. 3345–3350, 2012, doi: 10.5504/bbeq.2012.0107.
- [144] J. A. Joseph, S. Akkermans, and J. F. M. van Impe, “Effects of Temperature and pH on Recombinant Thaumatin II Production by *Pichia pastoris*,” *Foods*, vol. 11, no. 10, May 2022, doi: 10.3390/foods11101438.
- [145] P. Baldrian, “Fungal laccases – occurrence and properties,” *FEMS Microbiol Rev*, vol. 30, no. 2, pp. 215–242, Mar. 2006, doi: 10.1111/J.1574-4976.2005.00010.X.
- [146] E. M. Ko, Y. E. Leem, and H. T. Choi, “Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 57, no. 1–2, pp. 98–102, 2001, doi: 10.1007/S002530100727.
- [147] B. Viswanath, B. Rajesh, A. Janardhan, A. P. Kumar, and G. Narasimha, “Fungal laccases and their applications in bioremediation,” *Enzyme Res*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/163242.
- [148] R. Kumar, J. Kaur, S. Jain, and A. Kumar, “Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization,” *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 14, no. 1, pp. 125–131, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.JGEB.2016.05.006.
- [149] Y. Sun *et al.*, “Purification and Characterization of a Thermo- and pH-Stable Laccase From the Litter-Decomposing Fungus *Gymnopus luxurians* and Laccase Mediator Systems for Dye Decolorization,” *Front Microbiol*, vol. 12, p. 1746, Aug. 2021, doi: 10.3389/FMICB.2021.672620/XML/NLM.
- [150] A. Leonowicz, R. U. Edgehill, and J. M. Bollag, “The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*,” *Archives of Microbiology* 1984 137:2, vol. 137, no. 2, pp. 89–96, Feb. 1984, doi: 10.1007/BF00414446.
- [151] P. Baldrian, “Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 63, no. 5, pp. 560–563, Feb. 2004, doi: 10.1007/S00253-003-1434-0/FIGURES/2.
- [152] C. F. Thurston, “The structure and function of fungal laccases,” *Microbiology (N Y)*, vol. 140, no. 1, pp. 19–26, Jan. 1994, doi: 10.1099/13500872-140-1-19/CITE/REFWORKS.
- [153] M. E. E. Temporiti, L. Nicola, E. Nielsen, and S. Tosi, “Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation,” *Microorganisms*, vol. 10, no. 6, Jun. 2022, doi: 10.3390/MICROORGANISMS10061180.
- [154] A. Amobonye, P. Bhagwat, S. Singh, and S. Pillai, “Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes,” *Science of The Total Environment*, vol. 759, p. 143536, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2020.143536.
- [155] C. M. Carr, D. J. Clarke, and A. D. W. Dobson, “Microbial Polyethylene Terephthalate Hydrolases: Current and Future Perspectives,” *Front Microbiol*, vol. 11, Nov. 2020, doi: 10.3389/FMICB.2020.571265.

- [156] 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, May 2019, doi: 10.1021/ACSCATAL.8B05171/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CS-2018-05171U_0012.GIF.
- [157] E. Nikolaiivits *et al.*, “A polyesterase from the Antarctic bacterium *Moraxella* sp. degrades highly crystalline synthetic polymers,” *J Hazard Mater*, vol. 434, Jul. 2022, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2022.128900.
- [158] S. Sulaiman *et al.*, “Isolation of a Novel Cutinase Homolog with Polyethylene Terephthalate-Degrading Activity from Leaf-Branch Compost by Using a Metagenomic Approach,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 78, no. 5, p. 1556, Mar. 2012, doi: 10.1128/AEM.06725-11.
- [159] D. Kold *et al.*, “Thermodynamic and structural investigation of the specific SDS binding of *humicola insolens* cutinase,” *Protein Sci*, vol. 23, no. 8, p. 1023, 2014, doi: 10.1002/PRO.2489.
- [160] “Cutinase - *Humicola insolens* (Soft-rot fungus) | UniProtKB | UniProt.” <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A075B5G4/entry> (accessed Sep. 09, 2022).
- [161] W. Zimmermann and S. Billig, “Enzymes for the Biofunctionalization of Poly(Ethylene Terephthalate),” *Adv Biochem Eng Biotechnol*, vol. 125, pp. 97–120, 2011, doi: 10.1007/10_2010_87/FIGURES/4.

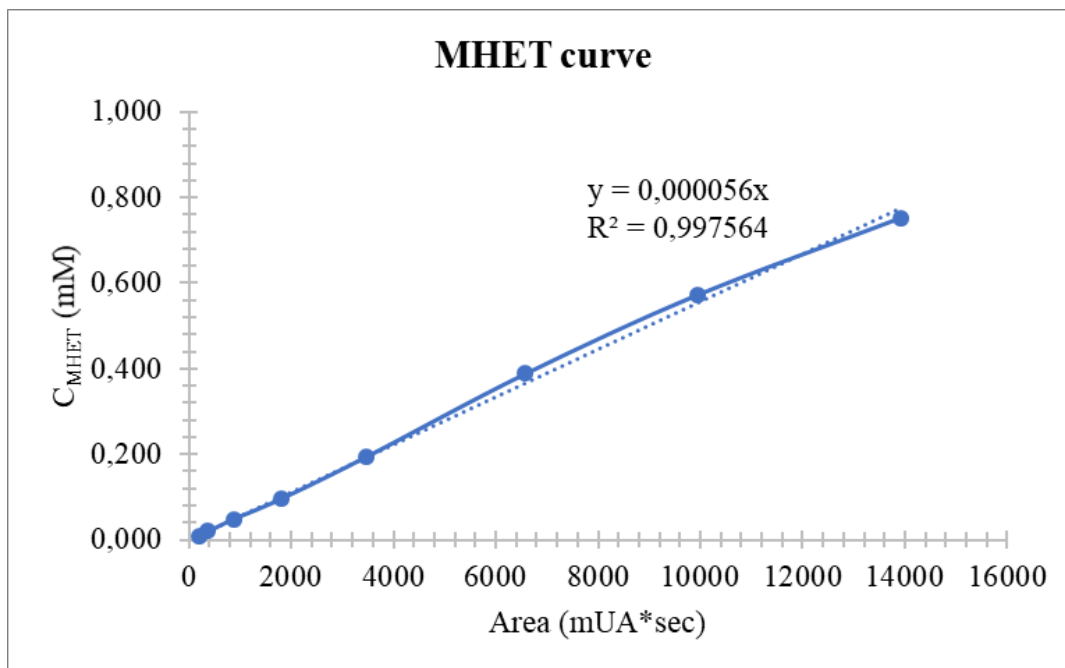
Παράρτημα

Καμπύλες αναφοράς πρότυπων δειγμάτων ενώσεων TPA, MHET και BHET

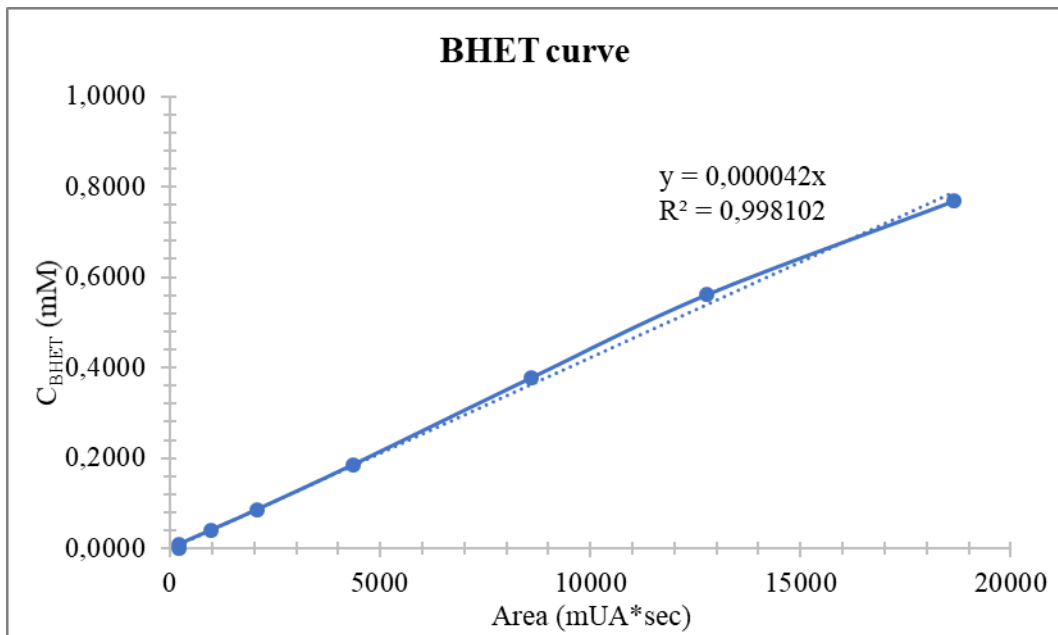
Οι συγκεντρώσεις των προϊόντων αποικοδόμησης του PET συνδέονται με το εμβαδόν των κορυφών που προκύπτουν από το χρωματογράφημα της HPLC, μέσω των συντελεστών μετατροπής που εξάγονται από τα παρακάτω διαγράμματα.



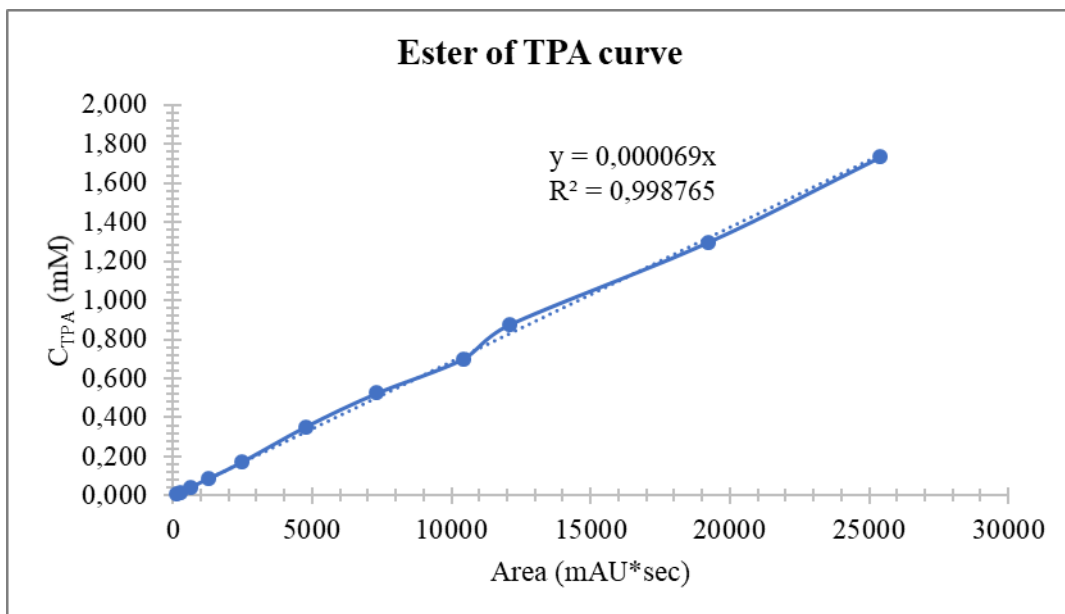
Διάγραμμα 24: Συσχέτιση συγκέντρωσης TPA με το εμβαδόν της κορυφής του χρωματογραφήματος, για συγκεντρώσεις μικρότερες από 0.5 mM.



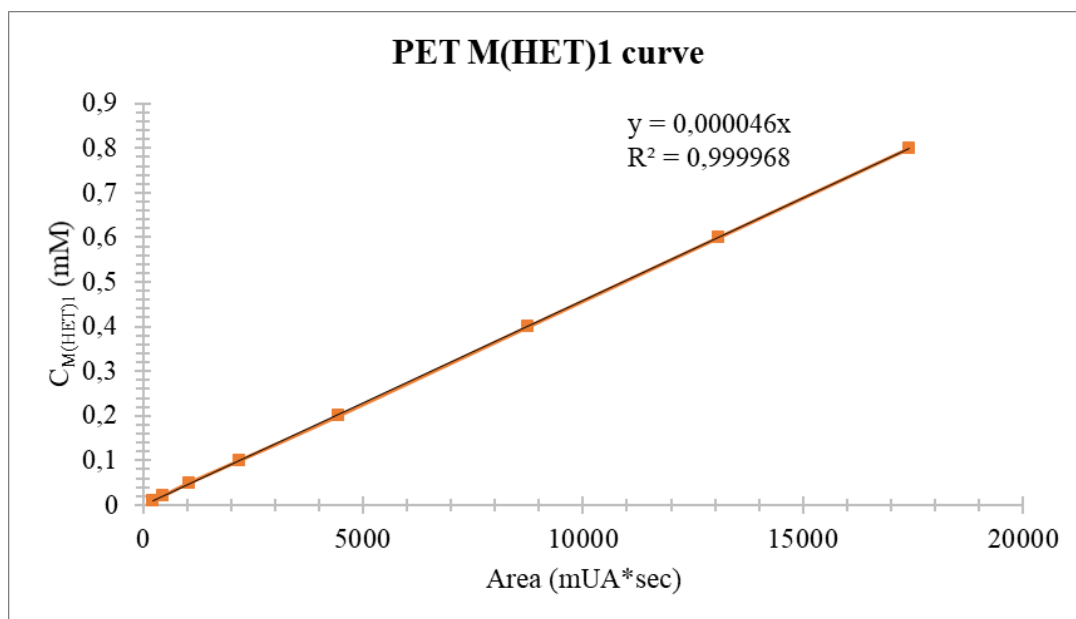
Διάγραμμα 25: Συσχέτιση συγκέντρωσης MHET με το εμβαδόν της κορυφής του χρωματογραφήματος.



Διάγραμμα 26: Συσχέτιση συγκέντρωσης BHET με το εμβαδόν της κορυφής του χρωματογραφήματος..



Διάγραμμα 27: Συσχέτιση συγκέντρωσης TPA με το εμβαδόν της κορυφής του χρωματογραφήματος..



Διάγραμμα 28: Συσχέτιση συγκέντρωσης M(HET)1 με το εμβαδόν της κορυφής του χρωματογραφήματος..

Επομένως, οι συντελεστές μετατροπής για τα βασικά προϊόντα αποικοδόμησης του PET παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 11: Συντελεστές μετατροπής των εμβαδών των κορυφών του χρωματογραφήματος της HPLC σε συγκέντρωση προϊόντων αποικοδόμησης του PET.

Προϊόν αποικοδόμησης	Συντελεστής μετατροπής
TPA	0.00043
MHET	0.000056
BHET	0.000042
Ester TPA	0.000069
M(HET)1	0.000046