



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

**Βιοχημικός χαρακτηρισμός καινοτόμων πολυεστερασών με
δυνατότητα ενζυμικής αποικοδόμησης πλαστικών**

Διπλωματική εργασία
Τριαντοπούλου Αφροδίτη

Επιβλέπων
Τόπακας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Αθήνα, 2022

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022 στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τομέα Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Τόπακα Ευάγγελου.

Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας, απέκτησα σημαντικές γνώσεις και εμπειρίες και για τον λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όσους με βοήθησαν να την ολοκληρώσω επιτυχώς.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Ευάγγελο Τόπακα, αφενός για τη δυνατότητα που μου προσέφερε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος να ασχοληθώ με ένα καίριο αντικείμενο της Βιοτεχνολογίας και αφετέρου για την εμπιστοσύνη και τη βοήθειά του καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της Διπλωματικής Εργασίας.

Στη συνέχεια, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον υποψήφιο Διδάκτορα Ε.Μ.Π. Μακρυνιώτη Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές που μου προσέφερε. Το ενδιαφέρον και η αφοσίωσή του ήταν καθοριστικός παράγοντας τόσο στον σωστό προγραμματισμό των πειραματικών διαδικασιών όσο και στη μετάδοση πολύτιμων γνώσεων και εργαστηριακών τεχνικών. Ήταν δίπλα μου σε όλα τα στάδια πραγματοποίησης της Διπλωματικής Εργασίας και πάντα πρόθυμος, παρά το πιεσμένο πρόγραμμά του.

Ακόμα, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τη βοήθεια και τις συμβουλές που ήταν πάντα πρόθυμοι να προσφέρουν, δημιουργώντας ένα πολύ ευχάριστο κλίμα.

Τέλος, τις μεγαλύτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην οικογένειά μου, στους φίλους μου και στα κοντινά μου πρόσωπα για τη συνεχή υποστήριξη που μου προσέφεραν καθόλη τη διάρκεια της φοίτησής μου.

Περίληψη

Η εκτεταμένη χρήση πλαστικών υλικών έχει οδηγήσει σε σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα λόγω της ανικανότητας βιοαποικοδόμησης και της συσσώρευσής τους. Οι συμβατικοί τρόποι διαχείρισης των πλαστικών απορριμμάτων εμφανίζουν αρκετά μειονεκτήματα και για τον λόγο αυτό γίνονται προσπάθειες εύρεσης νέων τρόπων, πιο φιλικών προς το περιβάλλον, για την αντιμετώπιση της πλαστικής ρύπανσης. Προς αυτήν την κατεύθυνση πραγματοποιούνται αρκετές μελέτες ανακάλυψης ενζύμων που έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν πολυμερικά υλικά.

Έτσι, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο πλήρης βιοχημικός χαρακτηρισμός ενζύμων που έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν πλαστικά υλικά και εν συνεχεία η μελέτη της δράσης τους σε αυτά.

Έτσι, μελετήθηκε η δράση συνολικά έξι ενζύμων. Τα δύο από αυτά (DmEst και Se1JFR) ανακαλύφθηκαν ύστερα από βιοπληροφορική ανάλυση, ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα (LCC, PETase, PHOase και PUase) βρέθηκαν βιβλιογραφικά, με την LCC και την PETase να αποτελούν γνωστές υδρολάσες του τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου, οπότε χρησιμοποιήθηκαν ως ένζυμα αναφοράς. Τα πολυμερικά υλικά στα οποία μελετήθηκε η δράση των συγκεκριμένων ενζύμων είναι πολυεστερικά, δηλαδή διαθέτουν εστερικούς δεσμούς στο μόριό τους, οπότε αυτό που μελετήθηκε είναι η υδρόλυση των δεσμών αυτών από τα ένζυμα. Πιο συγκεκριμένα, τα πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι η πολυκαπρολακτόνη (PCL), η πολυουρεθάνη (PU), το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB), ο πολύ-ηλεκτρικός βουτυλεστέρας (PBS) και το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET).

Τα γονίδια των μελετώμενων ενζύμων εισήχθησαν αρχικά σε πλασμιδιακούς φορείς pET-22b(+) και pET-26b(+) και ακολούθησε η ετερόλογη έκφρασή τους σε επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* BL21 (DE3) με βάση μοντέλα βελτιστοποίησης έκφρασης.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός των ενζύμων χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το pNPB. Συγκεκριμένα, το ένζυμο DmEst εμφάνισε βέλτιστη δράση σε pH=6,0 και T= 50 °C, παρέμεινε γενικά σταθερό σε μέσες και ελαφρώς αλκαλικές τιμές pH (7,0-9,0) και σε θερμοκρασιακό εύρος 20-50 °C, είχε μεγαλύτερη συγγένεια με το υπόστρωμα pNPB και κινητικές σταθερές Michaelis-Menten με αυτό ίσες με $u_{max} = 59,9 \text{ Units/mg}_{prot}$ και $K_m = 0,1938 \text{ mM}$. Το ένζυμο LCC έδρασε βέλτιστα σε pH=8,5 και T=60 °C, ενώ ήταν αρκετά σταθερό στο εύρος pH=5,0-10,0 και T=20-80 °C. Το ένζυμο Se1JFR παρουσίασε βέλτιστη δράση σε pH=7,0 και T=35 °C, ενώ παρέμεινε σταθερό κυρίως σε μέσες και αλκαλικές τιμές pH (7,0-10,0) και σε θερμοκρασιακό εύρος 20-30 °C και εμφάνισε μεγαλύτερη συγγένεια με το υπόστρωμα pNPD. Όσον αφορά το ένζυμο PETase, έδρασε βέλτιστα σε pH=7,0 και T=35 °C, παρέμεινε σταθερότερο σε αλκαλικές τιμές pH (8,0-10,0) και σε θερμοκρασίες 20-30 °C και εμφάνισε μεγαλύτερη συγγένεια με το υπόστρωμα pNPA. Το ένζυμο PHOase εμφάνισε βέλτιστη δράση σε pH=6,0 και T=40 °C, παρέμεινε γενικά σταθερό στο εύρος pH=5,0-10,0 και σε θερμοκρασιακό εύρος 20-40 °C και παρουσίασε μεγαλύτερη συγγένεια με το υπόστρωμα pNPA. Τέλος, το ένζυμο PUase είχε βέλτιστη δράση σε pH=6,0 και T=40 °C, παρέμεινε σταθερότερο σε μέσες τιμές

pH (6,0-8,0) και σε θερμοκρασίες 20-40 °C και εμφάνισε μεγαλύτερη συγγένεια με το υπόστρωμα pNPB.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις των ενζύμων με τα πολυεστερικά πλαστικά, από όπου προέκυψε ότι όλα τα ένζυμα εμφάνισαν ενδείξεις αποικοδόμησης αυτών. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε pH=7,0 και T=50 °C για τα ένζυμα DmEst και LCC, σε pH=7,0 και T=30 °C για τα ένζυμα Se1JFR και PETase και σε pH=6,0 και T=40 °C για τα ένζυμα PHOase και PUase, ενώ όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα ήταν φωσφορικών ιόντων 0,1 M. Η χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 3 ημέρες (με εξαίρεση την PCL που ήταν μία ημέρα) και η συγκέντρωση των ενζύμων στις αντιδράσεις ήταν 13 μM. Όσον αφορά τα πολυεστερικά πλαστικά πλην του PET τα αποτελέσματα δράσης των ενζύμων μελετήθηκαν με βάση τη διαφορά μάζας του υλικού, ενώ στο PET εκτός της διαφοράς μάζας, μελετήθηκε και η απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης. Προέκυψε το συμπέρασμα ότι σε όλα τα υλικά πλην του PET το ένζυμο LCC είχε την βέλτιστη δράση έναντι των υπολοίπων ενζύμων με μοναδική εξαίρεση την PU όπου το καλύτερο αποτέλεσμα εμφανίστηκε για την Se1JFR. Ωστόσο, και τα υπόλοιπα ένζυμα είχαν δράση στα πλαστικά που μελετήθηκαν, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι πρόκειται πράγματι για πολυεστεράσες. Όσον αφορά το PET, τα πιο αξιολογικά συμπεράσματα που προέκυψαν είναι η μείωση μάζας που προκάλεσε το ένζυμο Se1JFR στην κρυσταλλική σκόνη, μία μείωση που είναι συγκρίσιμη με αυτήν που προκάλεσε η γνωστή PET-υδρολάση, PETase ($\Delta m=1,3\%$ έναντι $\Delta m=2,3\%$ για την PETase). Ακόμα, αξιοσημείωτη είναι η δράση της DmEst στο συγκεκριμένο υλικό εφόσον προκάλεσε σχεδόν όμοια συγκέντρωση απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης στο cPET με την LCC (1,43 mM και 1,9 mM αντίστοιχα), ενώ αξιολογη δράση είχε και στα δύο καινοτόμα υλικά oPET και rPET, προκαλώντας στο τελευταίο τη μεγαλύτερη μείωση μάζας σε σχέση με τα υπόλοιπα ένζυμα ($\Delta m=26,6\%$).

Λέξεις-κλειδιά: Βιοχημικός χαρακτηρισμός, ενζυμική αποικοδόμηση, πολυεστεράσες, πολυεστερικά πλαστικά, PET, DmEst, LCC, Se1JFR, PETase, PHOase, PUase.

Abstract

The excessive use of plastic materials has led to important environmental issues due to their disability to biodegrade and the accumulation of their waste. The conventional utilization methods display many drawbacks and for this reason numerous and more environmentally friendly efforts in order to prevent plastic pollution are made. For this purpose, plenty of enzymes with the ability to degrade polymeric materials are being studied.

Thus, the aim of this Thesis is the complete biochemical characterization of enzymes capable of degrading plastic materials and the research of their effect on them.

Therefore, the effect of six enzymes is studied. Two of them (DmEst and Se1JFR) are discovered using bioinformatics tools, while the remaining four (LCC, PETase, PHOase and PUase) are obtained bibliographically, since especially LCC and PETase are well-studied hydrolases of polyethylene terephthalate and are used as reference enzymes. The polymeric materials in which the enzymes were imposed were polyesters, so they had ester bonds in their structure and consequently the hydrolysis of this bonds by the enzymes was studied. In particular, the plastics that were used, were polycaprolactone (PCL), polyurethane (PU), polylactic acid (PLA), polyhydroxybutyrate (PHB), polybutylene succinate (PBS) and polyethylene terephthalate (PET).

The genes of the studied enzymes were initially inserted into the plasmid vectors pET-22b(+) and pET-26b(+), followed by their heterologous expression in competent bacterial cells *Escherichia coli* BL21 (DE3) based on optimized expression models.

The next step was the biochemical characterization of the enzymes using as substrate pNPB. The enzyme DmEst had optimum pH=6.0 and optimum T=50 °C, it appeared to be generally stable in medium and slightly alkaline pH (7.0-9.0) and in a temperature range 20-50 °C, while it showed higher specificity with the substrate pNPB (Michaelis-Menten kinetic constants $u_{\max} = 59.9 \text{ Units/mg}_{\text{prot}}$ and $K_m = 0.1938 \text{ mM}$). The enzyme LCC had optimum pH=8.5 and optimum T=60 °C, while it was fairly stable within the range pH=5.0-10.0 and T=20-80 °C. The enzyme Se1JFR had optimum activity at pH=7.0 and T=35 °C, it remained stable mostly in medium and alkaline pH (7.0-10.0) and in a temperature range 20-30 °C and it had higher specificity with the substrate pNPD. Regarding the enzyme PETase, its optimal operating conditions were pH=7.0 and T=35 °C, was more stable in alkaline pH values (8.0-10.0) and temperature values 20-30 °C and showed higher specificity with the substrate pNPA. The enzyme PHOase had optimum pH=6.0 and optimum T=40 °C, remained stable within the range pH=5.0-10.0 and in a temperature range 20-40 °C and had higher specificity with the substrate pNPA. Finally, the enzyme PUase had optimum activity at pH=6.0 and T=40 °C, remained stable in medium pH (6.0-8.0) and in a temperature range 20-40 °C and had higher specificity with the substrate pNPB.

Then, the reactions between enzymes and polyester plastics were conducted, resulting in the conclusion that all enzymes showed degradation evidences. The reactions were carried out at pH=7.0 and T=50 °C for enzymes DmEst and LCC, at pH=7.0 and T=30 °C for enzymes Se1JFR and PETase, and at pH=6.0 and T=40 °C for enzymes PHOase

and PUase, while all reactions' buffers were phosphate-phosphate 0.1 M. The duration of the reactions was 3 days (except for PCL for which it was 1 day) and the enzymes' concentration in the reactions was 13 uM. Regarding the polyester plastics, except for PET, the results were studied by the mass reduction of the material, although as regards PET besides the mass reduction, the concentration of released hydrolysis products was studied as well. The conclusion drawn was that in all materials apart from PET, the enzyme LCC had superior action than the rest of the enzymes, with only exception of PU, for which the best result was observed by Se1JFR. However, the rest of the enzymes showed hydrolytic activity in the plastics that were studied too and so they can be characterized as polyesterses. Regarding PET, the most noteworthy conclusions reached are the mass reduction induced by the enzyme Se1JFR in the crystalline powder, which is comparable with the one induced by the well-known PET-hydrolase, PETase ($\Delta m=1.3\%$ against $\Delta m=2.3\%$ for PETase). Moreover, the effect of DmEst in the material is also adequate, since it caused similar concentration of released hydrolysis products in cPET as LCC (1.43 mM and 1.9 mM respectively), while it displayed noteworthy action in the two innovative materials oPET and rPET, inducing in the later the biggest mass reduction compared to the other enzymes ($\Delta m=26.6\%$).

Key-words: Biochemical characterization, enzymatic degradation, polyesterses, polyester plastics, PET, DmEst, LCC, Se1JFR, PETase, PHOase, PUase.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	iv
Abstract.....	vi
Περιεχόμενα διαγραμμάτων.....	xii
Περιεχόμενα εικόνων	xiv
Περιεχόμενα πινάκων.....	xv
1. Θεωρητικό μέρος.....	1
1.1. Εισαγωγή.....	1
1.2. Πλαστικά υλικά.....	2
1.2.1. Εισαγωγικά στοιχεία.....	2
1.2.2. Κατηγοριοποίηση πλαστικών υλικών	3
1.2.3. Ιδιότητες πλαστικών υλικών.....	4
1.2.4. Εφαρμογές των πλαστικών υλικών.....	5
1.2.5. Συνέπειες χρήσης των πλαστικών υλικών.....	5
1.2.6. Διαχείριση πλαστικών απορριμμάτων.....	7
1.2.7. Βιοαποικοδόμηση πλαστικών υλικών.....	9
1.2.8. Βιοδιασπώμενα πλαστικά	11
1.2.9. Πολυεστερικά πλαστικά.....	12
1.2.9.1. Πολυκαπρολακτόνη (PCL).....	13
1.2.9.2. Πολυουρεθάνες (PUs).....	16
1.2.9.3. Πολυγαλακτικό οξύ (PLA).....	20
1.2.9.4. Πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB).....	24
1.2.9.5. Πολύ-ηλεκτρικός βουτυλεστέρας (PBS).....	27
1.2.9.6. Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET)	31
1.3. Ένζυμα.....	37
1.3.1. Εισαγωγικά στοιχεία για τα ένζυμα.....	37
1.3.1.1. Εστεράσες.....	37
1.3.1.2. Λιπάσες	38
1.3.1.3. Κουτινάσες.....	38
1.3.2. Ετερόλογη έκφραση ενζύμων.....	39
1.3.2.1. Ετερολόγη έκφραση στον ξενιστή <i>Escherichia coli</i>	40
2. Πειραματικό μέρος	42
2.1. Υλικά.....	42
2.1.1. Όργανα και συσκευές.....	42
2.1.2. Αντιδραστήρια.....	43

2.1.2.1. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης	43
2.1.2.2. Ρυθμιστικά διαλύματα.....	44
2.1.2.3. Ξενιστής ετερόλογης έκφρασης	45
2.1.2.4. Φορέας ετερόλογης έκφρασης.....	45
2.1.2.5. Αντιβιοτικά επιλογής	46
2.1.2.6. Επαγωγέας έκφρασης (IPTG).....	46
2.1.2.8. Πολυμερικά υλικά	47
2.2. Μέθοδοι.....	48
2.2.1. Παραγωγή ενζύμων	48
2.2.1.1. Μετασχηματισμός πλασμιδίων στα κύτταρα E.coli.....	48
2.2.1.3. Εισαγωγή προκαλλιεργείων	49
2.2.1.4. Εισαγωγή καλλιεργείων.....	50
2.2.2. Παραλαβή ενζύμων	51
2.2.2.1. Φυγοκέντρηση καλλιεργείων.....	51
2.2.2.2. Επαναίωρηση των κυττάρων.....	52
2.2.2.3. Διάρρηξη κυτταρικών μεμβρανών.....	52
2.2.2.4. Φυγοκέντρηση διαλύματος μετά τη διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών..	53
2.2.2.5. Απομόνωση επιθυμητής πρωτεΐνης	53
2.2.2.6. Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	56
2.2.2.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	56
2.2.2.8. Συμπύκνωση πρωτεϊνών.....	58
2.2.2.9. Εξισορρόπηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της διαπίδυσης	59
2.2.3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός ενζύμων	60
2.2.3.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης ενζύμων.....	60
2.2.3.2. Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων.....	61
2.2.3.3. Εύρεση βέλτιστου pH δράσης των ενζύμων.....	62
2.2.3.4. Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης των ενζύμων.....	62
2.2.3.5. Μελέτη σταθερότητας των ενζύμων σε διάφορες τιμές pH.....	63
2.2.3.6. Μελέτη σταθερότητας των ενζύμων σε διάφορες θερμοκρασίες.....	64
2.2.3.7. Μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα.....	65
2.2.3.8. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten των ενζύμων.....	66
2.2.4. Αντιδράσεις ενζύμων με πολυμερικά πολυεστερικά υλικά.....	67
2.2.4.1. Εισαγωγή αντιδράσεων	67
2.2.4.2. Απώλεια μάζας των πολυμερικών υλικών.....	68

2.2.4.3. Ανάλυση προϊόντων υδρόλυσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).....	69
2.2.4.4. Επίδρασης της ανανέωσης ενζύμου κατά το χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της αντίδρασης	70
3. Αποτελέσματα	72
3.1. Γονίδια ενζύμων.....	72
3.2. Πρωτεϊνική συγκέντρωση.....	73
3.3. Αξιολόγηση καθαρότητας των ενζύμων από το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες	73
3.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός πολυεστερασών.....	74
3.4.1. Προσδιορισμός ενεργότητας των πολυεστερασών	74
3.4.2. Προσδιορισμός του βέλτιστου pH δράσης των πολυεστερασών.....	74
3.4.3. Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης των πολυεστερασών	78
3.4.4. Προσδιορισμός της σταθερότητας των πολυεστερασών σε διάφορες τιμές pH ...	80
3.4.5. Προσδιορισμός της σταθερότητας των πολυεστερασών σε διάφορες τιμές θερμοκρασιών.....	84
3.4.6. Προσδιορισμός της εξειδίκευσης των πολυεστερασών σε διάφορα υποστρώματα	88
3.4.7. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten.....	89
3.5. Αντιδράσεις ενζύμων με πολυμερικά υλικά.....	91
3.5.1. Αντιδράσεις των ενζύμων με την πολυμερική σκόνη πολυκαπρολακτόνης (PCL)	92
3.5.2. Αντιδράσεις των ενζύμων με την πολυμερική σκόνη πολυουρεθάνης (PU).....	93
3.5.3. Αντιδράσεις των ενζύμων με την πολυμερική σκόνη πολυγαλακτικού οξέος (PLA)	93
3.5.4. Αντιδράσεις των ενζύμων με την πολυμερική σκόνη πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB).....	94
3.5.5. Αντιδράσεις των ενζύμων με την πολυμερική σκόνη του πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα (PBS).....	95
3.5.6. Αντιδράσεις των ενζύμων με την πολυμερική σκόνη του τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET).....	96
3.5.6.1. Άμορφο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (aPET)	97
3.5.6.2. Κρυσταλλικό τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (cPET).....	99
3.5.6.3. Πρότυπο ανακυκλώσιμο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (oPET).....	100
3.5.6.4. Ανακυκλώσιμο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο προκατεργασίας REX (rPET)	102
3.5.7. Μελέτη της επίδρασης της ανανέωσης ενζύμου στο χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της αντίδρασης.....	104
4. Συζήτηση αποτελεσμάτων, συμπεράσματα και μελλοντικές προτάσεις	106
4.1. Συζήτηση αποτελεσμάτων	106

4.1.1. Καθαρότητα και μοριακά βάρη των μελετώμενων ενζύμων	106
4.1.2. Βέλτιστο pH δράσης των μελετώμενων ενζύμων.....	107
4.1.3. Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των μελετώμενων ενζύμων.....	107
4.1.4. Σταθερότητα των ενζύμων σε τιμές pH.....	109
4.1.5. Σταθερότητα των ενζύμων σε διάφορες τιμές θερμοκρασιών.....	109
4.1.6. Μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα.....	110
4.1.7. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten.....	110
4.1.8. Δράση μελετώμενων ενζύμων σε πολυεστερικά πλαστικά	110
4.1.9. Σύγκριση αποτελεσμάτων των μελετώμενων ενζύμων με τη βιβλιογραφία.....	114
4.1.10. Ανανέωση ενζύμου κατά το χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της αντίδρασης	117
4.2. Συμπεράσματα.....	117
4.3. Μελλοντικές προτάσεις.....	118
5. Βιβλιογραφία.....	120
Παράρτημα Α: Μοριακά βάρη πολυεστερασών βάσει της αμινοξικής τους ακολουθίας....	128
Παράρτημα Β: Συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας των πολυεστερασών.....	128
Παράρτημα Γ: Προσδιορισμός ενεργότητας πολυεστερασών σε υπόστρωμα pNPB.....	128
Παράρτημα Δ: Καμπύλες αναφοράς pNP για τα ρυθμιστικά διαλύματα διαφόρων pH.....	129
Παράρτημα Ε: Ισοηλεκτρικό σημείο (pI) πολυεστερασών.....	131
Παράρτημα ΣΤ: Χρόνοι έκλυσης των προϊόντων υδρόλυσης του PET (TPA, MHET και BHET)	131

Περιεχόμενα διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Σχετική ενεργότητα συναρτήσει του pH της αντίδρασης για τα ένζυμα: (α) DmEst, (β) LCC, (γ) Se1JFR, (δ) PETase, (ε) PHOase και (στ) PUase.....	76
Διάγραμμα 2. Σχετική ενεργότητα συναρτήσει της θερμοκρασίας της αντίδρασης για τα ένζυμα: (α) DmEst, (β) LCC, (γ) Se1JFR, (δ) PETase, (ε) PHOase και (στ) PUase.	79
Διάγραμμα 3. Σχετική ενεργότητα στα διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα αποθήκευσης: (α) DmEst, (β) LCC, (γ) Se1JFR, (δ) PETase, (ε) PHOase και (στ) PUase.....	82
Διάγραμμα 4. Υπολειπόμενη ενεργότητα σε διάφορες θερμοκρασίες για τα ένζυμα: (α) και (β): DmEst, (γ): LCC, (δ) και (ε): Se1JFR, (στ) και (ζ): PETase, (η) και (θ): PHOase και (ι): PUase.....	86
Διάγραμμα 5. Μελέτη εξειδίκευσης ως προς τα υποστρώματα pNPA, pNPB, pNPO και pNPD για τα ένζυμα: (α) Se1JFR, (β) PETase, (γ) PHOase και (δ) PUase.....	88
Διάγραμμα 6. Διάγραμμα Michaelis-Menten του ενζύμου DmEst με τα υποστρώματα: (α) pNPA, (β) pNPB, (γ) pNPO και (δ) pNPD.	90
Διάγραμμα 7. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας της πολυκαπρολακτόνης ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.....	92
Διάγραμμα 8. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας της πολουρεθάνης ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.	93
Διάγραμμα 9. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας του πολυγαλακτικού οξέος ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.....	94
Διάγραμμα 10. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας του πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.	95
Διάγραμμα 11. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας του πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.	96
Διάγραμμα 12. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας και απελευθερωμένα προϊόντα υδρόλυσης του άμορφου τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.....	97
Διάγραμμα 13. Συγκέντρωση των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης (TPA, MHET, BHET) της πολυμερικής σκόνης aPET.....	98
Διάγραμμα 14. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας και απελευθερωμένα προϊόντα υδρόλυσης του κρυσταλλικού τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.....	99
Διάγραμμα 15. Συγκέντρωση των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης (TPA, MHET, BHET) της πολυμερικής σκόνης cPET.....	100
Διάγραμμα 16. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας και απελευθερωμένα προϊόντα υδρόλυσης του πρότυπου ανακυκλώσιμου τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.	101
Διάγραμμα 17. Συγκέντρωση των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης (TPA, MHET, BHET) της πολυμερικής σκόνης oPET.....	102
Διάγραμμα 18. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας και απελευθερωμένα προϊόντα υδρόλυσης του ανακυκλώσιμου τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου προκατεργασίας REX ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.....	103
Διάγραμμα 19. Συγκέντρωση των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης (TPA, MHET, BHET) της πολυμερικής σκόνης rPET.....	104
Διάγραμμα 20. Μελέτη της επίδρασης της ανανέωσης ενζύμου κατά το χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της αντίδρασης: (α) DmEst με άμορφο PET, (β) DmEst με κρυσταλλικό PET, (γ) LCC με άμορφο PET και (δ) LCC με κρυσταλλικό PET.....	105

Διάγραμμα Δ. 1. . Καμπύλες αναφοράς για το pNP σε διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα: (α) διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών ιόντων pH=5,0, (β) διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών ιόντων pH=6,0, (γ) διάλυμα φωσφορικών-φωσφορικών ιόντων pH=6,0, (δ) διάλυμα φωσφορικών-φωσφορικών ιόντων pH=7,0, (ε) διάλυμα φωσφορικών-φωσφορικών ιόντων pH=8,0, στ) διάλυμα ιόντων της βάσης Tris (ρύθμιση με HCl) pH=8,0, ζ) διάλυμα ιόντων της βάσης Tris (ρύθμιση με HCl) pH=8,5 και η) διάλυμα ιόντων της βάσης Tris (ρύθμιση με HCl) pH=9,0.
..... 130

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση ενός θερμοπλαστικού και ενός θερμοσκληρυνόμενου δικτύου. [6].....	4
Εικόνα 2. Σχηματική παρουσίαση των συμβατικών τρόπων διαχείρισης πλαστικών απορριμμάτων. [11].....	9
Εικόνα 3. Διαδικασία βιοαποικοδόμησης πολυμερών υλικών. [3].....	10
Εικόνα 4. Κατηγορίες βιοδιασπώμενων πολυμερών υλικών. [17]	12
Εικόνα 5. Δομή της πολυκαπρολακτόνης. [15]	13
Εικόνα 6. Σπάσιμο της πολυμερικής αλυσίδας της πολυκαπρολακτόνης κατά την αποικοδόμηση σε υψηλότερες θερμοκρασίες (πάνω) και χαμηλότερες θερμοκρασίες (κάτω). [19].....	15
Εικόνα 7. Πολυπροσθήκη ενός ισοκυανίου σε μία ομάδα -OH προς σχηματισμό ενός ουρεθανικού δεσμού. [3].....	17
Εικόνα 8. Μηχανισμοί ενζυμικής υδρόλυσης των χημικών δεσμών των πολυουρεθάνων. [26]	19
Εικόνα 9. Οπτικά ισομερή του γαλακτικού οξέος, δομικής μονάδας του πολυγαλακτικού οξέος. [30].....	21
Εικόνα 10. Δομική μονάδα πολυγαλακτικού οξέος. [15]	22
Εικόνα 11. Δομική μονάδα του πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα. [15]	25
Εικόνα 12. Διαδικασία παραγωγής του πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα από τα μονομερή του. [45].....	28
Εικόνα 13. Συνοπτικό διάγραμμα ροής της παραγωγής του πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα. [44].....	28
Εικόνα 14. Δομική μονάδα του τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου. [56].....	31
Εικόνα 15. Κύρια ένζυμα που αποικοδομούν το PET και βασικές πληροφορίες για αυτά. [61]	34
Εικόνα 16. Δράση εστερασών. [71].....	37
Εικόνα 17. Εμφάνιση αποικιών ύστερα από την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων σε τρυβλίο Petri.	49
Εικόνα 18. Προκαλλιέργειες μετά την overnight επώαση.	50
Εικόνα 19. Καλλιέργειες πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την overnight επώαση.	51
Εικόνα 20. Το κυτταρικό διάλυμα πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) το σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών.....	53
Εικόνα 21. Καθαρισμός του πρωτεϊνικού διαλύματος σε στήλες χρωματογραφίας TalonR. .	54
Εικόνα 22. Διαλύματα καθαρισμού. Με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά, είναι: Flow Through, Wash, 5 mM, 10 mM, 100A, 100B, 100C.....	56
Εικόνα 23. Διάταξη ηλεκτροφόρησης πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου. [84]	58
Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου της διαπίδυσης. [85].....	59
Εικόνα 25. Εστέρας του παρα-νιτροφαίνυλο βουτυρικού οξέος και προϊόντα υδρόλυσής του. [86].....	61
Εικόνα 26. Διάγραμμα Michaelis-Menten. [87].....	67
Εικόνα 27. Προϊόντα υδρόλυσης του PET. [88].....	69
Εικόνα 28. Πηκτή πολυακρυλαμίδιου στην οποία διακρίνονται τα πρωτεϊνικά διαλύματα των ενζύμων (δεξιά) και η αντιστοίχιση των μοριακών βαρών με βάση πρότυπη ένωση (αριστερά).....	73

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1. Παγκόσμια κατανάλωση πλαστικών (2015). [8].....	5
Πίνακας 2. Ένζυμα που αποικοδομούν την πολυκαπρολακτόνη, οι συνθήκες αντίδρασης και τα αποτελέσματά τους.....	15
Πίνακας 3. Ένζυμα που αποικοδομούν τις πολυουρεθάνες, οι συνθήκες αντίδρασης και τα αποτελέσματά τους.....	19
Πίνακας 4. Ένζυμα που αποικοδομούν το πολυγαλακτικό οξύ, οι συνθήκες αντίδρασης και τα αποτελέσματά τους.....	23
Πίνακας 5. Ένζυμα που αποικοδομούν τον πολύ-υδροξυ-βουτυρικό εστέρα, οι συνθήκες αντίδρασης και τα αποτελέσματά τους.....	26
Πίνακας 6. Ένζυμα που αποικοδομούν τον πολύ-ηλεκτρικό βουτυλεστέρα, οι συνθήκες αντίδρασης και τα αποτελέσματά τους.....	30
Πίνακας 7. Ένζυμα που αποικοδομούν το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο, οι συνθήκες αντίδρασης και τα αποτελέσματά τους.	34
Πίνακας 8. Ταξινόμηση των ενζύμων. [69], [70].....	37
Πίνακας 9. Περιγραφή θρεπτικού μέσου LB.....	43
Πίνακας 10. Περιγραφή θρεπτικού μέσου 2xYT.	43
Πίνακας 11. Περιγραφή θρεπτικού μέσου TB.....	43
Πίνακας 12. Ρυθμιστικά διαλύματα.....	44
Πίνακας 13. Διαλύματα διεργασίας ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	46
Πίνακας 14. Συστατικά και συστάσεις πηκτωμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.	47
Πίνακας 15. Πολυμερικά υλικά.....	47
Πίνακας 16. Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης, αντιβιοτικό επιλογής, συγκέντρωση αντιβιοτικού και συγκέντρωση επαγωγέα έκφρασης για την παραγωγή του εκάστοτε ενζύμου.....	51
Πίνακας 17. Ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης εκάστοτε ενζύμου.....	60
Πίνακας 18. Ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του βέλτιστου pH δράσης κάθε ενζύμου.....	62
Πίνακας 19. Μελετώμενες θερμοκρασίες για τον προσδιορισμό της βέλτιστης κάθε ενζύμου.	62
Πίνακας 20. Ρυθμιστικά διαλύματα μελέτης της σταθερότητας των ενζύμων σε τιμές pH... ..	63
Πίνακας 21. Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η εξειδίκευση των ενζύμων.....	65
Πίνακας 22. Ρυθμιστικό διάλυμα και θερμοκρασία αντίδρασης για κάθε ένζυμο.....	68
Πίνακας 23. Συνθήκες υγρής χρωματογραφίας για την ανάλυση δειγμάτων PET.....	70
Πίνακας 24. Γονίδια μελετώμενων ενζύμων.....	72
Πίνακας 25. Τελικές συγκεντρώσεις των ενζύμων.....	73
Πίνακας 26. Προσδιορισμός του μοριακού βάρους των ενζύμων με βάση το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	74
Πίνακας 27. Ενεργότητα πολυεστερασών σε υπόστρωμα pNPB.....	74
Πίνακας 28. Βέλτιστο pH ($pH_{optimum}$) δράσης κάθε πολυεστεράσης.....	77
Πίνακας 29. Βέλτιστη θερμοκρασία ($T_{optimum}$) δράσης κάθε πολυεστεράσης.....	80
Πίνακας 30. Κινητικές σταθερές Michaelis-Menten και δείκτης προσαρμογής του μοντέλου για το ένζυμο DmEst και τα μελετώμενα υποστρώματα.....	91
Πίνακας A. 1. Μοριακά βάρη πολυεστερασών βάσει της αμινοξικής τους ακολουθίας.....	128
Πίνακας B. 1. Συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας των πολυεστερασών βάσει της αμινοξικής τους ακολουθίας.....	128

Πίνακας Δ. 1. Συντελεστές καμπυλών αναφοράς (A410-CpNP) για τα διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα.....	131
Πίνακας Ε. 1. Ισοηλεκτρικό σημείο (pI) πολυεστερασών.....	131
Πίνακας ΣΤ. 1. Χρόνοι έκλυσης των προϊόντων υδρόλυσης του PET (TPA, MHET και BHET).....	131

1. Θεωρητικό μέρος

1.1. Εισαγωγή

Τα πλαστικά αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία υλικών και χωρίζονται σε πολλές κατηγορίες με διαφορετικές ιδιότητες παρουσιάζοντας αρκετά εκτεταμένη χρήση τόσο σε απλές εφαρμογές της καθημερινής ζωής όσο και σε αρκετά πιο εξειδικευμένες εφαρμογές. Η συνεχής εξέλιξη της βιομηχανίας των πλαστικών φέρνει στον ορίζοντα συνεχώς νέα δεδομένα και οδηγεί σε σημαντική βελτίωση και διευκόλυνση της ζωής των ανθρώπων. Εξαιτίας, λοιπόν, των ιδιοτήτων που τα χαρακτηρίζουν, τα πλαστικά βρίσκουν όλο και πιο ευρεία χρήση και αντικαθιστούν σε πολλούς τομείς άλλα παραδοσιακά υλικά όπως το ξύλο, το γυαλί και το ατσάλι. Προς αυτήν την κατεύθυνση συμβάλλει σημαντικά το μικρό τους βάρος και το χαμηλό κόστος παραγωγής τους. [1]

Τα πλεονεκτήματα, ωστόσο, των πλαστικών, έρχονται να αντισταθμίσουν οι επιπτώσεις που προκύπτουν από την τόσο εκτεταμένη παραγωγή τους. Υπολογίζεται ότι η παραγωγή πλαστικών απορριμμάτων αγγίζει τους 6300 εκατομμύρια τόνους ετησίως και τα απορρίμματα αυτά μεταφέρονται κατά πολύ μεγάλο ποσοστό που φτάνει το 79% στις χωματερές. [2] Το 2010, περισσότεροι από 275 εκατομμύρια τόνοι πλαστικών απορριμμάτων παρήχθησαν σε παράκτιες περιοχές και εκτιμάται ότι 5-13 εκατομμύρια τόνοι από αυτά κατέληξαν τελικά στους ωκεανούς. Για τον λόγο αυτό, στη λίστα της διεθνούς ένωσης αμιγούς και καθαρής χημείας (IUPAC) που δημοσιεύτηκε το 2019 με θέμα την ανάπτυξη τεχνολογιών που θα καταστήσουν τον πλανήτη βιώσιμο, επιτονίζεται ιδιαίτερα η ανάγκη μετατροπής των πλαστικών υλικών σε μονομερή και ολιγομερή και η μετέπειτα αξιοποίηση και επαναχρησιμοποίηση αυτών. [3]

Το πρόβλημα απόρριψης των πλαστικών απορριμμάτων στο περιβάλλον εντείνεται και από την αδυναμία των πλαστικών υλικών να βιοαποικοδομηθούν, δηλαδή να διασπαστούν στη φύση υπό την επίδραση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Οι τρόποι που εφαρμόζονται σήμερα για την αντιμετώπιση της ρύπανσης που προκαλείται από τα πλαστικά απορρίμματα είναι κατά βάση η ανακύκλωση και η ενεργειακή αξιοποίηση. [1], [3]

Η ανακύκλωση είναι ο πιο επιθυμητός τρόπος αντιμετώπισης της πλαστικής ρύπανσης μεταξύ των συμβατικών τρόπων διαχείρισης, καθότι έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων που μπορούν να αξιοποιηθούν εκ νέου στη βιομηχανία σαν πρώτες ύλες ή στην παραγωγή προϊόντων που είναι πιο εύκολα διαχειρίσιμα σε σχέση με τα αρχικά πλαστικά υλικά. Ωστόσο, το ποσοστό ανακύκλωσης που πραγματοποιείται τελικά είναι αρκετά περιορισμένο και εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες. Για παράδειγμα στις αναπτυγμένες χώρες υπάρχουν κανονισμοί που ορίζουν με σαφήνεια θέματα σχετικά με την ανακύκλωση, αλλά και οργανισμοί που ενθαρρύνουν και ευαισθητοποιούν σχετικά με αυτά τα θέματα, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται αρκετά υψηλότερα ποσοστά ανακύκλωσης σε σχέση με τις αναπτυσσόμενες χώρες. Συγκεκριμένα, το ποσοστό ανακύκλωσης των αναπτυγμένων χωρών αγγίζει το 30% έναντι ποσοστού αρκετά κοντά στο 0% που επιτυγχάνεται στις αναπτυσσόμενες χώρες. [1]

Από την άλλη πλευρά, αναφορικά με την ενεργειακή αξιοποίηση των πλαστικών ενυπάρχει το μειονέκτημα της απελευθέρωσης επικίνδυνων αέριων ρύπων, όπως CO₂, που εντείνει το φαινόμενο του θερμοκηπίου και οδηγεί σε γενικότερη επιδείνωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης, ενώ έχει και αρνητικές συνέπειες στην υγεία των ανθρώπων. [1]

Για όλους τους λόγους που αναφέρονται παραπάνω, κρίνεται απαραίτητη η ανάγκη αντιμετώπισης της ρύπανσης των πλαστικών πιο μεθοδικά και αποτελεσματικά. Η αντιμετώπιση αυτή μπορεί να εντοπίζεται στο στάδιο της παραγωγής των πλαστικών μέσω της ανακάλυψης και χρήσης «νέων» βιοαποικοδομήσιμων υλικών. Ωστόσο, οι πιο σημαντικές προσπάθειες εντοπίζονται στην εφαρμογή νέων τρόπων διαχείρισης των πλαστικών απορριμμάτων που θα αντισταθμίζουν τα προβλήματα των μεθόδων που εφαρμόζονται έως τώρα. Μία αρκετά ελπιδοφόρα προσέγγιση είναι η ανακάλυψη ενζύμων ικανών να αποικοδομούν τα πλαστικά υλικά και η γενετική τροποποίηση μικροοργανισμών, προκειμένου τα ένζυμα αυτά να μπορούν να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες με τον βέλτιστο τρόπο, ποιοτικά και οικονομικά.

1.2. Πλαστικά υλικά

1.2.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Τα πλαστικά είναι συνθετικά πολυμερικά υλικά που αποτελούνται από μακριές αλυσίδες ατόμων. Παράγονται από ακατέργαστες πρώτες ύλες, οι οποίες προέρχονται κατά ποσοστό 90% από την πετροχημική βιομηχανία και τα ορυκτά καύσιμα. [1], [4], [5] Τα πολυμερή συντίθενται με επαναλαμβανόμενη προσθήκη μονομερών, τα οποία μπορεί να είναι του ίδιου ή διαφορετικού είδους. Κατά κύριο λόγο τα πολυμερή αποτελούνται από άτομα άνθρακα, αλλά στη δομή πολλών από αυτά εμφανίζονται και άλλα χημικά στοιχεία, με αποτέλεσμα να προκύπτουν χιλιάδες διαφορετικές δομές. Πιο συγκεκριμένα, τα στοιχεία που εμφανίζονται στις υπάρχουσες πολυμερικές δομές είναι: άνθρακας, υδρογόνο, οξυγόνο, άζωτο, θείο, χλώριο, φθόριο και πυρίτιο. [4]

Η χρήση των πλαστικών υλικών εμφανίζει ραγδαία αύξηση και αυτό οφείλεται στην πληθώρα ιδιοτήτων που τα χαρακτηρίζουν. Ορισμένες από τις ιδιότητες αυτές είναι η αντοχή στη διάβρωση, η εύκολη μορφοποίηση και παραγωγή τους και οι καλές ηλεκτρικές τους ιδιότητες. Ακόμα, το γεγονός ότι μπορούν να παραχθούν εύκολα και γρήγορα λόγω της ικανότητάς τους να αλλάζουν σχήμα, καθιστά τη διεργασία αρκετά οικονομική. [4], [5]

Παρότι τα πλαστικά υλικά εμφανίζουν αυτούσια αρκετά επιθυμητές ιδιότητες που τα καθιστούν κατάλληλα για χρήση σε πολλές εφαρμογές, κατά τη διαδικασία παραγωγής τους γίνεται χρήση και άλλων υλικών και προσθέτων, προκειμένου το τελικό προϊόν να έχει ακόμα πιο βελτιωμένες ιδιότητες και πιο εξειδικευμένη χρήση. Παραδείγματα προσθέτων που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία πολυμερών είναι υλικά πλήρωσης, πλαστικοποιητές και χρωστικές ουσίες. Όσον αφορά τις χρωστικές, καθόσον ελάχιστα πλαστικά κυκλοφορούν στην αγορά με το φυσικό τους χρώμα, υπολογίζεται ότι κυκλοφορούν πάνω από 800 χρωστικές ουσίες. Όλα αυτά τα πρόσθετα, εισάγονται στην παραγωγή του πολυμερούς στα αρχικά στάδια, πριν το πολυμερικό υλικό λάβει την τελική του μορφή. Αυτό συμβαίνει, καθώς είναι απαραίτητο να επιτευχθεί καλή ομογενοποίηση των υλικών και να συγκολληθούν τα διαφορετικά κομμάτια που το

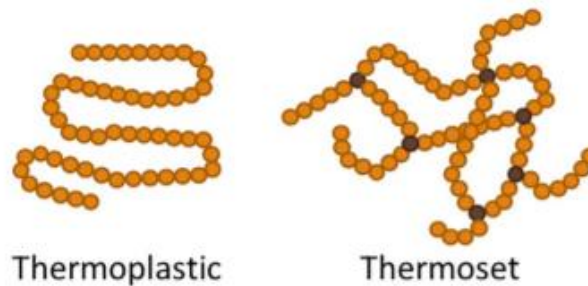
απαρτίζουν μεταξύ τους. Για να πραγματοποιηθεί η καλή ομογενοποίηση των υλικών, γίνεται χρήση διαλυτών. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία διαλυτών που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των πλαστικών και η επιλογή τους γίνεται ανάλογα με το παραγόμενο πλαστικό και τη χρήση που πρόκειται να έχει. Με τον τρόπο αυτό παράγονται πλαστικά με εντελώς ξεχωριστά χαρακτηριστικά που μπορούν να βρουν χρήση σε πλαστικά μπουκάλια του νερού έως σε εφαρμογές της αεροδιαστημικής βιομηχανίας. [4]

1.2.2. Κατηγοριοποίηση πλαστικών υλικών

Τα πολυμερή υλικά χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση τη χημική και τεχνολογική τους συμπεριφορά: τα θερμοπλαστικά και τα θερμοσκληρυνόμενα.

- **Θερμοπλαστικά:** Τα θερμοπλαστικά πολυμερή είναι υλικά που χαρακτηρίζονται από γραμμικές ή ελαφρώς διακλαδισμένες δομές. Αποτελούνται από μακριές αλυσίδες που καθεμία είναι ανεξάρτητη της άλλης και για τη σύνθεσή τους, τα μονομερή που χρησιμοποιούνται έχουν λειτουργικότητα 2 ($f=2$), δηλαδή διαθέτουν δύο χαρακτηριστικές ομάδες οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν. Είναι υλικά διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες με την ικανότητα να τήκονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, όταν εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες προσλαμβάνουν μία απαλή υφή, ενώ όταν ψύχονται γίνονται σκληρά. Με την εναλλαγή των συνθηκών θέρμανσης και ψύξης, τα υλικά αυτά έχουν την ικανότητα να μορφοποιούνται πολλές φορές. Ωστόσο, ο αριθμός των κύκλων θέρμανσης-ψύξης που μπορεί να υποστεί ένα υλικό εξαρτάται από τη φύση του και τα πρόσθετα που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά την παραγωγή του. Έτσι, αν ξεπεραστεί το όριο του αριθμού αυτού, το υλικό οδηγείται σε απώλεια των ιδιοτήτων και των χαρακτηριστικών του και καθίσταται ακατάλληλο. Ένα ακόμα γνώρισμα της κατηγορίας αυτής είναι ότι στις υψηλές θερμοκρασίες τα υλικά αποκτούν συμπεριφορά υγρού συστήματος, ενώ στις χαμηλές έχουν υαλώδη ή ελαφρώς κρυσταλλική δομή. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι οι δομές που αποτελούνται αποκλειστικά από άτομα άνθρακα είναι αρκετά ανθεκτικές στην αποδόμηση και στο σπάσιμο των δεσμών. [3], [4], [5], [6]
- **Θερμοσκληρυνόμενα:** Τα θερμοσκληρυνόμενα πολυμερή υλικά χαρακτηρίζονται από μεγάλες τρισδιάστατες δομές εξαιρετικά διακλαδισμένες. Τα μονομερή που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεσή τους έχουν λειτουργικότητα μεγαλύτερη από 2 ($f>2$), δηλαδή διαθέτουν περισσότερες από δύο χαρακτηριστικές ομάδες που μπορούν να αντιδράσουν. Τα υλικά αυτά δεν είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες και δεν μπορούν να μορφοποιηθούν με αύξηση της θερμοκρασίας, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των θερμοπλαστικών υλικών. Η παραγωγή τους πραγματοποιείται με στερεοποίηση του αρχικού υλικού που έχει τηχθεί σε υψηλές θερμοκρασίες. Η μετατροπή αυτή σε στερεό είναι μη αντιστρεπτή και η αύξηση της θερμοκρασίας δεν οδηγεί ξανά σε τήξη του υλικού, αλλά σε σπάσιμο των χημικών δεσμών και αποσύνθεσή του. Κατά τη διαδικασία παραγωγής τους, όλα τα μικρά μόρια ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα πολύ μεγάλο δίκτυο. Η διασύνδεση των μορίων και ο σχηματισμός αυτού του δικτύου δυσχεραίνουν την κίνηση των αλυσίδων και αυτός είναι και ο λόγος που δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί τήξη τους αφού πάρουν την τελική τους μορφή. Από τη στιγμή που το δίκτυο ενός θερμοσκληρυνόμενου υλικού αποτελείται από ετεροάτομα, αυτό καθίσταται

επιρρεπές στο σπάσιμο των χημικών δεσμών, όπως οι εστερικοί και οι αμιδικοί [3], [4], [5], [6]



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση ενός θερμοπλαστικού και ενός θερμοσκληρυνόμενου δικτύου. [6]

1.2.3. Ιδιότητες πλαστικών υλικών

Ορισμένες βασικές ιδιότητες των πλαστικών υλικών που τα καθιστούν προτιμότερα σε σύγκριση με άλλα παραδοσιακά υλικά παρουσιάζονται στη συνέχεια:

- Βάρος: Τα περισσότερα πλαστικά είναι αρκετά ελαφριά κι αυτή η ιδιότητα τα καθιστά προτιμότερα από άλλα παραδοσιακά υλικά σε διάφορες εφαρμογές.
- Σκληρότητα: Η σκληρότητα των πλαστικών είναι συγκρίσιμη με αυτήν του αλουμινίου. Κατά βάση τα θερμοσκληρυνόμενα πολυμερή υλικά είναι πιο σκληρά από τα θερμοπλαστικά. Η θερμοκρασία επιδρά σημαντικά στις ιδιότητες τους και οι υψηλές θερμοκρασίες μαλακώνουν σημαντικά την υφή των περισσότερων πλαστικών.
- Θερμικές ιδιότητες: Τα περισσότερα πλαστικά ανήκουν στην κατηγορία των θερμικών μονωτών, δηλαδή έχουν πολύ χαμηλή θερμική αγωγιμότητα. Γενικά, η θερμική τους συμπεριφορά εξαρτάται από τον τρόπο παραγωγής τους κι από το αν είναι άμορφα ή κρυσταλλικά. Άμορφα ονομάζονται τα υλικά που δεν έχουν διατεταγμένη δομή, δηλαδή τα άτομα, τα μόρια και τα ιόντα δεν έχουν συγκεκριμένη γεωμετρική μορφή. Αντίθετα, τα κρυσταλλικά υλικά διαθέτουν αυστηρά διατεταγμένη δομή, σχηματίζοντας καλά καθορισμένα τρισδιάστατα πλέγματα. Έτσι, γενικά στα κρυσταλλικά υλικά η αυξημένη πυκνότητα της κρυσταλλικής περιοχής, οδηγεί σε μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ της τηγμένης και στερεής μορφής με αποτέλεσμα να επιδεινώνεται το φαινόμενο της θερμικής συρρίκνωσης.
- Ηλεκτρικές ιδιότητες: Τα περισσότερα πολυμερικά υλικά είναι κακοί αγωγοί του ηλεκτρισμού, ιδιαίτερα στη στερεή φάση και για αυτό ορισμένοι από τους καλύτερους μονωτές που υπάρχουν ανήκουν στην κατηγορία των πλαστικών. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί και υλικά ικανά να άγουν το ηλεκτρικό ρεύμα. Η διηλεκτρική τους σταθερά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δομή του υλικού και συνήθως ελαττώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας.
- Οπτικές ιδιότητες: Ορισμένα πλαστικά υλικά είναι εξαιρετικά διαυγή ενώ άλλα ημιδιαφανή. Η ιδιότητα αυτή εξαρτάται από τη μικροδομή των υλικών και από τυχόν ανωμαλίες στην επιφάνειά τους καθώς αυτά καθορίζουν τον τρόπο που το φως σκεδάζεται διαπερνώντας τα μόρια του υλικού.

- Χημικές ιδιότητες: Συνήθως τα πλαστικά είναι πιο ανθεκτικά από χημικής άποψης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε σχέση με άλλα υλικά, όπως το τσιμέντο, το ξύλο και τα μέταλλα. Είναι γενικά ανθεκτικά στο θαλασσινό νερό, στα ανόργανα οξέα, στα άλατα, στις βάσεις και στην υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ όχι τόσο κατά την επαφή τους με οξειδωτικές ουσίες. Ακόμα, τα θερμοσκληρυνόμενα υλικά είναι αρκετά ανθεκτικά στους οργανικούς διαλύτες σε αντίθεση με τα θερμοπλαστικά υλικά.

[4], [7]

1.2.4. Εφαρμογές των πλαστικών υλικών

Λόγω των πολύ επιθυμητών και διαφορετικών ιδιοτήτων που χαρακτηρίζουν τα πλαστικά υλικά αλλά και του αρκετά οικονομικού κόστους τους, αυτά βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε μία πληθώρα τομέων. Βρίσκουν εφαρμογή σε πολλά προϊόντα της καθημερινής ζωής αλλά και σε αρκετά εξειδικευμένα προϊόντα, όπως σε κλειδιά της αεροδιαστημικής βιομηχανίας, σε βιοϊατρικές συσκευές, σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων και στην αυτοκίνηση. [4], [5] Στη συνέχεια θα αναφερθούν τα πιο συνήθη πλαστικά και οι κυριότερες εφαρμογές τους. Αρχικά, αναφέρονται το πολυπροπυλένιο, το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας και το πολυβινυλοχλωρίδιο που βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε φιλμ και στη συσκευασία προϊόντων. Ακολουθεί το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο, το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας και το πολυβινυλοχλωρίδιο που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μπουκαλιών, σωλήνων, αγωγών και μονωτικών υλικών. Αμέσως μετά κατατάσσονται το πολυστυρένιο, το πολυβινυλοχλωρίδιο και το πολυπροπυλένιο με χρήση σε δεξαμενές και κοντέινερς. Έπειτα συναντώνται και πάλι το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας και το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας με εφαρμογή σε πλαστικές σακούλες. Τέλος, τα πολυουρεθανικά υλικά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βαφών, προϊόντων συσκευασίας, επικαλυπτικών και μονωτικών υλικών. [5] Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η παγκόσμια κατανάλωση των πιο συνήθων πλαστικών το έτος 2015.

Πίνακας 1. Παγκόσμια κατανάλωση πλαστικών (2015). [8]

Πλαστικό	Παγκόσμια κατανάλωση (%)
Πολυπροπυλένιο	23
Πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας	17
Πολυβινυλοχλωρίδιο	16
Πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας	15
Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο	7
Πολυστυρένιο	7

1.2.5. Συνέπειες χρήσης των πλαστικών υλικών

Η όλο και αυξανόμενη χρήση των πλαστικών υλικών εκτός από τα πλεονεκτήματα που προσφέρει, οδηγεί και στην παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων απορριμμάτων που ένα μεγάλο μέρος τους καταλήγει στο περιβάλλον και συσσωρεύεται σε αυτό λόγω της ανικανότητας βιοαποικοδόμησής τους. Από τη στιγμή που τα πλαστικά απορρίμματα απελευθερώνονται στο περιβάλλον, φτάνουν σε όλα τα οικοσυστήματα και επιδρούν με τα φυσικά, χημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά τους προκαλώντας ποικίλες

επιπτώσεις. Η αλληλεπίδραση των πλαστικών με τα οικοσυστήματα εξαρτάται από το είδος, τη δομή, το μέγεθος και το σχήμα του πολυμερούς. Παρακάτω αναλύονται οι επιπτώσεις της ρύπανσης των πλαστικών σε διάφορα οικοσυστήματα.

- **Χερσαίο περιβάλλον:** Η απελευθέρωση πλαστικών απορριμμάτων στο χερσαίο οικοσύστημα επηρεάζει σημαντικά τα προϊόντα που προέρχονται από τη γη αλλά και τους οργανισμούς που ζουν στη ξηρά. Τα μικροπλαστικά (πλαστικά με μέγεθος της κλίμακας των μm) έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στα προϊόντα που καλλιεργούνται στη γη, επηρεάζοντας μέσω της τροφικής αλυσίδας τα ζώα αλλά και τον άνθρωπο που χρησιμοποιούν τα προϊόντα αυτά ως τροφή, προκαλώντας θέματα υγείας, όπως για παράδειγμα στο πεπτικό σύστημα. Ακόμα, πολλές φορές καταναλώνονται από τους ζωικούς οργανισμούς εν αγνοία τους προκαλώντας σημαντικά προβλήματα, ακόμα και θάνατο. Επιπλέον, προκαλούν σημαντική αισθητική υποβάθμιση των τοπίων, ενώ με τη συμβολή και των καιρικών φαινομένων, διαλυτοποιούνται και μεταφέρονται στα υπόλοιπα οικοσυστήματα, κυρίως στα υδάτινα. Τέλος, η συσσώρευση πλαστικών στο χερσαίο περιβάλλον μπορεί να έχει και έμμεσες αρνητικές επιπτώσεις, όπως κατά την εκδήλωση πυρκαγιών μέσω της απελευθέρωσης επικίνδυνων αέριων ρύπων. [2], [9], [10]
- **Ατμόσφαιρα:** Λόγω του πολύ χαμηλού τους βάρους, τα πλαστικά υλικά είναι πολύ εύκολο να διασπαρθούν στην ατμόσφαιρα. Συνήθως, εκεί συναντώνται υλικά μικρότερου μεγέθους (μικρο- και νανοκλίμακας), αλλά πολλές φορές και υλικά συγκεκριμένων χαρακτηριστικών, όπως οι πλαστικές σακούλες μίας χρήσης. Τα πλαστικά εισέρχονται στην ατμόσφαιρα από ποικίλες οδούς, όπως η αποσύνθεση απορριμμάτων, η διάβρωση υλικών από τον αέρα, η βιομηχανική σκόνη και διάφορες άλλες. Ωστόσο, η συγκέντρωση των πλαστικών στην ατμόσφαιρα μεταβάλλεται πολύ γρήγορα καθώς επηρεάζεται από τα καιρικά φαινόμενα. Με τον τρόπο αυτό, τα πλαστικά μεταφέρονται πολύ εύκολα και στα υπόλοιπα οικοσυστήματα. Ακόμα, ένα σημαντικό πρόβλημα που προκύπτει από την ύπαρξη πλαστικών στην ατμόσφαιρα είναι ότι λόγω του μικρού τους μεγέθους, μπορούν εύκολα να εισέλθουν στο αναπνευστικό σύστημα ανθρώπων και ζώων προκαλώντας σημαντικά προβλήματα υγείας. [2], [9], [10]
- **Υδάτινο οικοσύστημα:** Τα πλαστικά καταλήγουν στο υδάτινο οικοσύστημα μέσω πολλών ανθρώπινων δραστηριοτήτων, όπως για παράδειγμα το ψάρεμα. Ακόμα, μεγάλες ποσότητες πλαστικών εισρέουν στις θάλασσες και τα ποτάμια μέσω των υγρών αποβλήτων των βιομηχανιών. Για τον λόγο αυτό, στα υδάτινα οικοσυστήματα συναντώνται πολλές κατηγορίες πλαστικών, οι οποίες με τη συμβολή των καιρικών φαινομένων και της ενέργειας των κυμάτων μεταφέρονται και στα υπόλοιπα είδη οικοσυστημάτων. Τα πλαστικά αυτά καταλήγουν στους υδρόβιους οργανισμούς και ευθύνονται σε πολύ μεγάλο ποσοστό για τον θάνατο πολλών από αυτούς. Αυτό οδηγεί στο να απειλούνται με εξαφάνιση διάφορα είδη οργανισμών, στο να διαταράσσεται η τροφική αλυσίδα και εντέλει στο να απειλείται η ομαλή λειτουργία της ζωής στον πλανήτη. Επιπροσθέτως επηρεάζεται σημαντικά η εύρυθμη λειτουργία του οικοσυστήματος, καθώς η συσσώρευση πλαστικών μπορεί να προκαλέσει υπεραύξηση ορισμένων ειδών φυκιών και μετανάστευση πληθυσμών λόγω αδυναμίας εύρεσης τροφής. Ακόμα, προκαλούν αισθητική υποβάθμιση των υδάτινων τοπίων και καθιστούν πολλές περιοχές ακατάλληλες για αξιοποίηση. Για παράδειγμα, η ύπαρξη πλαστικών ρύπων σε

πολλές θάλασσες και παραλίες τις κάνουν ακατάλληλες για κολύμβηση και άλλες δραστηριότητες. Αυτό οδηγεί αφενός σε υποβάθμιση της ζωής των ανθρώπων και σε ερημοποίηση πολλών περιοχών και αφετέρου σε οικονομικά και κοινωνικά προβλήματα, όπως για παράδειγμα η αδυναμία εξάσκησης επαγγελματιών, όπως το ψάρεμα και τα τουριστικά. [2], [9], [10]

1.2.6. Διαχείριση πλαστικών απορριμμάτων

Πλαστικά απορρίμματα παράγονται με ταχύτετους ρυθμούς στη σημερινή κοινωνία. Η προέλευση των υλικών αυτών από το πετρέλαιο και η αδυναμία βιοαποικοδόμησής τους, οδηγεί σε σημαντικά προβλήματα, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω (1.2.5. Συνέπειες χρήσης των πλαστικών υλικών). Η παραγωγή των απορριμμάτων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως κοινωνικοί, οικονομικοί και μετεωρολογικοί. Γενικά, σε πολλές χώρες και κυρίως στις αναπτυγμένες γίνονται προσπάθειες μείωσης του ποσοστού των πλαστικών απορριμμάτων που καταλήγουν στις χωματερές μέσω της θέσπισης τοπικών κανονισμών ή ολιστικών νόμων. Ακόμα, η δράση διαφόρων φορέων συμβάλει στην ενημέρωση και ευαισθητοποίηση των πολιτών πάνω σε θέματα ανακύκλωσης. Ένας άλλος επιθυμητός τρόπος διαχείρισης των πλαστικών απορριμμάτων είναι η επαναχρησιμοποίηση των προϊόντων αυτούσιων χωρίς περαιτέρω επεξεργασία, κάτι το οποίο οδηγεί σε εξοικονόμηση τόσο πρώτων υλών όσο και ενέργειας. Ωστόσο, το ποσοστό ανακύκλωσης παραμένει σχετικά χαμηλό και η επαναχρησιμοποίηση των προϊόντων είναι δύσκολη, ειδικά σε περιπτώσεις με πολύ αυστηρές προδιαγραφές, όπως στη συσκευασία τροφίμων. Έτσι, η διαχείριση των πλαστικών απορριμμάτων καταλήγει να γίνεται με τους παραδοσιακούς τρόπους, που παρουσιάζουν αρκετά επακόλουθα προβλήματα, και είναι η κατάληξη σε χωματερές και η αποτέφρωση. [10] Στη συνέχεια αναλύονται οι συμβατικοί τρόποι διαχείρισης των πλαστικών απορριμμάτων.

1) Ανακύκλωση: Η ανακύκλωση των πλαστικών απορριμμάτων πρέπει να οδηγεί σε ελαχιστοποίηση της ρύπανσης στις διεργασίες της, αυξάνοντας την αποδοτικότητα των υλικών. Οδηγεί σε υλικά με διαφορετικές ιδιότητες από τα αρχικά, τα οποία όμως μπορούν να αξιοποιηθούν σε διάφορες εφαρμογές. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ανακύκλωσης, όπως μηχανική και βιολογική. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι κατηγορίες ανακύκλωσης.

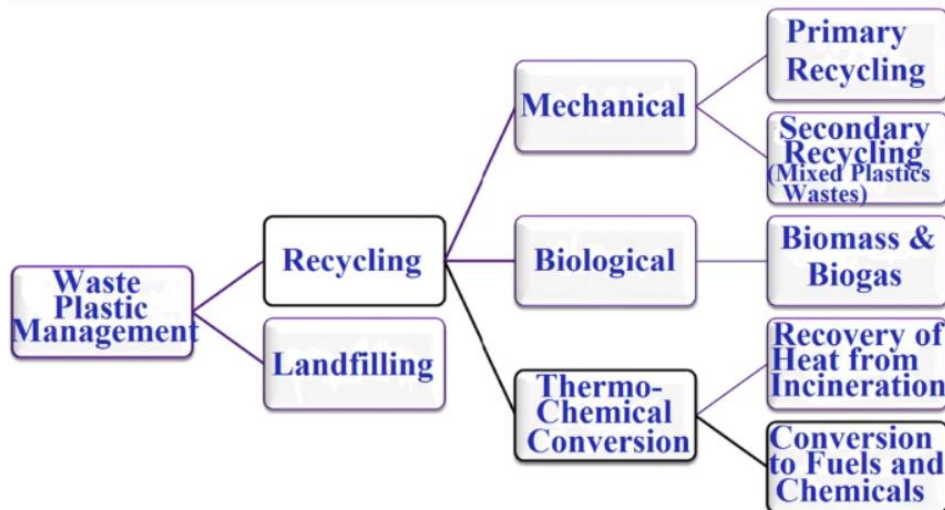
- Πρωτογενής ανακύκλωση: Η πρωτογενής ανακύκλωση έχει σαν σκοπό προϊόντα με ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του αρχικού υλικού. Τα υλικά που προκύπτουν χρησιμοποιούνται εκ νέου στη βιομηχανία και η διεργασία ανακύκλωσης εστιάζει κυρίως στην αποκατάσταση των ιδιοτήτων και χαρακτηριστικών του αρχικού υλικού.
- Δευτερογενής ανακύκλωση: Η δευτερογενής ανακύκλωση οδηγεί σε προϊόντα με διαφορετικές ιδιότητες από τα αρχικά υλικά. Τα προϊόντα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καινούριες εφαρμογές λιγότερο απαιτητικές από αυτές στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν τα αρχικά υλικά.
- Τριτογενής ανακύκλωση: Η τριτογενής ανακύκλωση κάνει χρήση των πλαστικών απορριμμάτων για την παραγωγή κοινών καυσίμων και χημικών προϊόντων. Οι διεργασίες αυτές όσον αφορά τα πλαστικά απαιτούν περισσότερο χρόνο σε σχέση με άλλα υλικά, όπως τα μέταλλα και το γυαλί. Αν ένα προϊόν προέρχεται από την

ανάμειξη δύο ή περισσότερων πολυμερικών υλικών, κατά την επεξεργασία τους και συγκεκριμένα στο στάδιο της τήξης, προκαλείται διαχωρισμός φάσεων. Αν τα προϊόντα αυτά χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή νέων υλικών, τότε αυτά θα εμφανίσουν αστοχίες. Για το λόγο αυτό αποφεύγεται η τριτοταγής ανακύκλωση πλαστικών που έχουν προκύψει από ανάμειξη υλικών. Προκειμένου, ωστόσο, αυτά να μπορούν να ανακυκλωθούν, πραγματοποιούνται αρχικά, όπου είναι δυνατόν, διεργασίες διαχωρισμού.

- Τεταρτοταγής ανακύκλωση: Η τεταρτοταγής ανακύκλωση αφορά την ενεργειακή αξιοποίηση των πλαστικών απορριμμάτων μέσω καύσης/αποτέφρωσης. Οι διεργασίες αυτές οδηγούν στην μείωση χρήσης των χωματερών, αλλά προκύπτουν πολλοί προβληματισμοί σχετικά με ορισμένα επακόλουθά τους. Για παράδειγμα, η καύση των πλαστικών υλικών οδηγεί στην απελευθέρωση επικίνδυνων αέριων ρύπων. Το πολυβινυλοχλωρίδιο αλλά και διάφορα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των πολυμερών κατά την καύση τους απελευθερώνουν διοξίνες, φουράνιο και πολυχλωριωμένα διφαινύλια με αποτέλεσμα τόσο την μόλυνση του περιβάλλοντος αλλά και την εμφάνιση προβλημάτων υγείας ύστερα από την είσοδο τους στο αναπνευστικό σύστημα των ανθρώπων. Για τον λόγο αυτό, η συγκεκριμένη μέθοδος συνήθως δεν προτιμάται, καθώς το κόστος διαχείρισης των αερίων που εκπέμπονται υπερνικά το τελικό ποσοστό της ανακτώμενης ενέργειας.

[11], [12]

2) Χώροι υγειονομικής ταφής: Χώροι υγειονομικής ταφής καλούνται οι καλά διαμορφωμένοι χώροι στους οποίους γίνεται η ταφή των απορριμμάτων των πόλεων. Η κατάληξη των πλαστικών απορριμμάτων στους χώρους υγειονομικής ταφής είναι ο παραδοσιακός τρόπος διαχείρισής τους. Ωστόσο, η κατάληξη αυτή οδηγεί σε αρκετές αρνητικές επιπτώσεις. Αρχικά, σε πολλές χώρες έχει προκληθεί πρόβλημα χώρου, καθώς έχουν περιοριστεί αρκετά οι εκτάσεις που μπορούν να διατεθούν ως χωματερές. Θεωρητικά, μία καλά οργανωμένη χωματερή δε θα έπρεπε να προκαλεί επιπλέον προβλήματα ρύπανσης πέραν αυτών που προκύπτουν κατά τις διαδικασίες συλλογής και μεταφοράς των απορριμμάτων. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό στην πράξη. Έτσι, η συγκεκριμένη πρακτική οδηγεί σε υποβάθμιση του στερεού υπεδάφους και των υπόγειων υδάτων λόγω των προσθέτων που περιέχονται στα πλαστικά αλλά και των προϊόντων αποσύνθεσης που προκύπτουν από αυτά. Το γεγονός αυτό έχει και έμμεσες συνέπειες τόσο στην υγεία των ανθρώπων όσο και στην υγεία των ζώων. Καταλήγοντας, αξίζει να τονιστεί ότι από άποψη αειφορίας η απόρριψη πλαστικών στις χωματερές οδηγεί στην ανικανότητα αξιοποίησης οποιασδήποτε πρώτης ύλης χρησιμοποιείται στην διεργασία παραγωγής του πλαστικού. [11], [12]



Εικόνα 2. Σχηματική παρουσίαση των συμβατικών τρόπων διαχείρισης πλαστικών απορριμμάτων. [11]

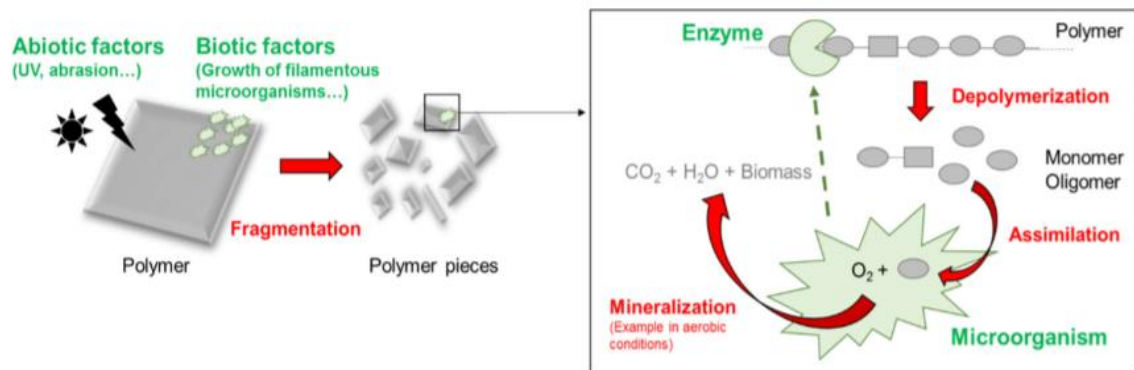
Το συμπέρασμα που προκύπτει από την ανωτέρω ανάλυση είναι ότι η εφαρμογή των συμβατικών τρόπων διαχείρισης των πλαστικών απορριμμάτων έχει οδηγήσει σε ένα τέλμα και τα προβλήματα που προκύπτουν γίνεται ολοένα και πιο δύσκολο να ξεπεραστούν. Η ανακύκλωση πραγματοποιείται σε ποσοστό σχεδόν 0% στις αναπτυσσόμενες χώρες, η ενεργειακή αξιοποίηση οδηγεί σε εμφάνιση νέων περιβαλλοντικών θεμάτων και προβλημάτων υγείας και η απόρριψη στις χωματερές οδηγεί σε μία γραμμική οικονομία και όχι κυκλική όπως θα ήταν το επιθυμητό. Τα θέματα αυτά οδηγούν σε μεγάλο προβληματισμό την επιστημονική κοινότητα και κάνουν όλο και πιο επιτακτική την ανάγκη εύρεσης και εφαρμογής καινοτόμων τρόπων διαχείρισης των πλαστικών απορριμμάτων.

1.2.7. Βιοαποικοδόμηση πλαστικών υλικών

Η βιοαποικοδόμηση ορίζεται ως η διαδικασία αποσύνθεσης ενός υλικού με τη συμβολή βιολογικών παραγόντων, δηλαδή μικροοργανισμών ή ενώσεων που προέρχονται από αυτούς, όπως ένζυμα. Ένα υλικό μπορεί να χαρακτηριστεί ως βιοαποικοδομήσιμο αν φτάνει σε ποσοστό αποσύνθεσης 90% εντός χρονικού διαστήματος έξι μηνών υπό συνθήκες κομποστοποίησης. Η αποσύνθεση αυτή έγκειται στην αλλαγή της δομής και των ιδιοτήτων του υλικού, λόγω της μείωσης βάρους, της μηχανικής καταπόνησης και των αλλαγών στην πολυμερική επιφάνεια εξαιτίας της δράσης του ενζύμου ή του μικροοργανισμού. Οι βιολογικοί παράγοντες με ικανότητα αποικοδόμησης πλαστικών συναντώνται σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως στη θάλασσα, στο έδαφος και στην ενεργό ιλύ. Είναι σημαντική η μελέτη της κατανομής και του πληθυσμού των μικροοργανισμών αυτών στα διάφορα οικοσυστήματα, καθώς προκύπτουν αξιολογες πληροφορίες για τον τρόπο δράσης τους. [3], [13], [14]

Το πρώτο στάδιο της βιοαποικοδόμησης είναι συνήθως το σπάσιμο της πολυμερικής αλυσίδας και η επιφανειακή φθορά του υλικού. Σε αυτό, εκτός των βιοτικών παραγόντων (μικροοργανισμοί και τα ένζυμά τους), συμβάλλουν και αβιοτικοί παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, η διάβρωση, η θερμοκρασία και το pH. Ουσιαστικά, οι παράγοντες αυτοί συμβάλλουν στην εξασθένιση των δεσμών της πολυμερικής αλυσίδας διευκολύνοντας την επακόλουθη δράση των βιοτικών

παραγόντων. Τα μακρομόρια διασπώνται στη συνέχεια από τη δράση των ενζύμων, των μικροοργανισμών και την οξείδωση από την ατμόσφαιρα σε μικρότερα μόρια, ολιγομερή και μονομερή. Όσον αφορά τους μικροοργανισμούς, χρησιμοποιούν τα συστατικά του πλαστικού ως πηγή ενέργειας, άνθρακα, αζώτου και θρεπτικών συστατικών συμβάλλοντας στην ανάπτυξή τους. Στη συνέχεια τα μονομερή και τα ολιγομερή μετατρέπονται από το κύτταρο μέσω των μεταβολικών του μονοπατιών σε ακόμα πιο απλά μόρια όπως νερό, μεθάνιο, διοξείδιο του άνθρακα και βιομάζα. [3], [13]



Εικόνα 3. Διαδικασία βιοαποικοδόμησης πολυμερών υλικών. [3]

Η διεργασία βιοαποικοδόμησης ενός πολυμερούς εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, όπως οι φυσικές και χημικές ιδιότητές του. Οι επιφανειακές συνθήκες του υλικού, όπως το εμβαδόν της επιφάνειας και η υδροφιλικότητα, τα πρωτογενή χαρακτηριστικά όπως η χημική δομή, το μοριακό βάρος και η κατανομή του μοριακού βάρους και τα δευτερογενή χαρακτηριστικά, όπως η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, η θερμοκρασία τήξης, το μέτρο ελαστικότητας και η κρυσταλλικότητα είναι ορισμένοι από αυτούς τους παράγοντες. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι τα μόρια που έχουν πλευρικές αλυσίδες είναι πιο δύσκολο να αποικοδομηθούν σε σχέση με αυτά που δεν έχουν. Ακόμα, αναφορικά με το μοριακό βάρος, όσο μεγαλύτερο είναι ένα μόριο τόσο ελαττώνεται η ικανότητα αποδόμησής του. Όσον αφορά τη θερμοκρασία τήξης ενός πολυμερούς, αυτή έχει υψηλή επίδραση στην βιοαποικοδόμησή του και συγκεκριμένα όσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία τήξης τόσο μικρότερη είναι η ικανότητα βιοαποικοδόμησης. Αυτό συμβαίνει, καθώς στη θερμοκρασία τήξης οι πολυμερικοί δεσμοί καθίστανται λιγότερο ισχυροί και έτσι είναι πιο εύκολη η προσέγγισή τους από τους μικροοργανισμούς και τα ένζυμα. Ωστόσο, ίσως ο πιο σημαντικός παράγοντας που παίζει ρόλο στην βιολογική αποδόμηση των πλαστικών είναι ο βαθμός κρυσταλλικότητάς του πολυμερικού τους πλέγματος. Έχει παρατηρηθεί ότι τα ένζυμα, κυρίως, έχουν την ικανότητα να προσβάλλουν την άμορφη περιοχή των υλικών, ενώ η κρυσταλλική περιοχή είναι πιο ανθεκτική στη δράση τους. Αυτό συμβαίνει, καθώς στην κρυσταλλική περιοχή τα μόρια είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους, ενώ στην άμορφη περιοχή οι δεσμοί είναι πιο ευέλικτοι και άρα πιο εύκολα προσβάσιμοι από τους μικροοργανισμούς και τα ένζυμα. [13], [14]

Η βιολογική αποικοδόμηση των πλαστικών έχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της χημικής ανακύκλωσης, κυρίως όσον αφορά την προστασία του περιβάλλοντος από συνθήκες ρύπανσης και τη διασφάλιση της κυκλικής οικονομίας. Για το λόγο αυτό,

έχει εστιάσει αρκετά η έρευνα στην ανακάλυψη και βελτιστοποίηση των συνθηκών βιοαποικοδόμησης πλαστικών υλικών. Στα πλαίσια αυτά συμβάλλει σημαντικά και η γενετική μηχανική μέσω τροποποιήσεων και μεταλλάξεων στα ένζυμα βελτιώνοντας περαιτέρω την ικανότητα αποσύνθεσης πολυμερών και των λειτουργικών συνθηκών δράσης τους. Όλα αυτά προσφέρουν σημαντικές προσδοκίες για καινοτόμες τεχνολογίες ως προς τον τρόπο διαχείρισης των πλαστικών απορριμμάτων. [3], [13], [14]

1.2.8. Βιοδιασπώμενα πλαστικά

Τα συνθετικά πολυμερή είναι ευρέως διαδεδομένα λόγω της σωρείας πλεονεκτημάτων που προσφέρουν και έτσι χρησιμοποιούνται σε πολλές εφαρμογές. Ωστόσο, η προέλευσή τους από το πετρέλαιο και η ανικανότητα βιοαποικοδόμησης έχει οδηγήσει σε σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα και έτσι πραγματοποιούνται προσπάθειες μείωσης ή αντικατάστασής τους. Για τον λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία τάση ανάπτυξης και βελτίωσης βιοδιασπώμενων πλαστικών υλικών. [15], [16]

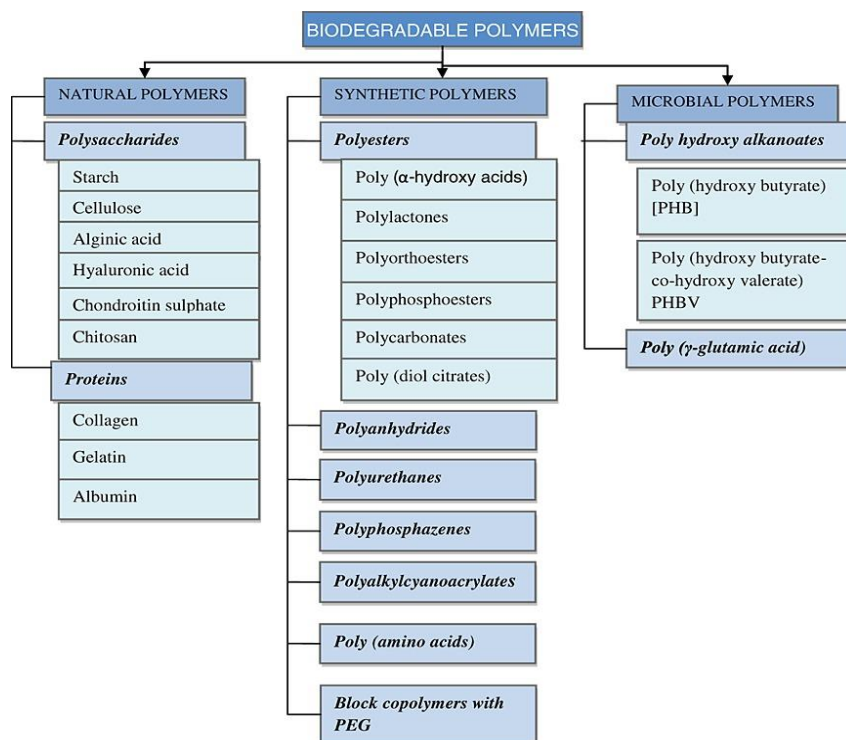
Βιοδιασπώμενα χαρακτηρίζονται τα πλαστικά υλικά που υφίστανται σπάσιμο των δεσμών της πολυμερικής αλυσίδας και στη συνέχεια μετατρέπονται σε απλά ανόργανα υλικά με τη δράση μικροοργανισμών που συναντώνται στη φύση. [15], [17] Η ανάγκη ανάπτυξης βιοδιασπώμενων υλικών εκτός του ότι συμβάλλει σημαντικά στη μείωση της ρύπανσης και στη μείωση επικίνδυνων ουσιών για την υγεία, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική για διάφορες εφαρμογές που απαιτούν τη χρήση βιοϋλικών. Οι εφαρμογές αυτές συναντώνται κυρίως στον τομέα της ιατρικής και ορισμένα παραδείγματα είναι: η ελεγχόμενη μεταφορά φαρμάκων, η ορθοπεδική και η μακροχρόνια χρήση εμφυτευμάτων. Στις εφαρμογές αυτές, η αποικοδόμηση του υλικού είναι βασικό κριτήριο επιλογής και για το λόγο αυτό τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά έχουν σημαντικό πλεονέκτημα. Ορισμένες ακόμα ιδιότητες που λαμβάνονται υπόψη σε τέτοιες εφαρμογές είναι η βιοσυμβατότητα, η τοξικότητα, τα προϊόντα αποσύνθεσης, η σταθερότητα και το κόστος. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση παίζουν σημαντικό ρόλο και οι μηχανικές ιδιότητες του υλικού ώστε να μπορεί να ανταπεξέλθει στην εφαρμογή για την οποία επιλέγεται. [16], [17]

Τα βιοδιασπώμενα πολυμερή χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: 1) φυσικά βιοδιασπώμενα πολυμερή, 2) συνθετικά βιοδιασπώμενα πολυμερή και 3) βιοδιασπώμενα πολυμερή που έχουν προέλθει από μικροοργανισμούς.

- **Φυσικά βιοδιασπώμενα πολυμερή:** Τα φυσικά βιοδιασπώμενα πολυμερή είναι αυτά που παράγονται από όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Η βιοαποικοδόμησή τους είναι μία αρκετά αργή διεργασία και μέσω αυτής παράγονται ανανεώσιμες πηγές. Οι αργοί ρυθμοί βιοαποικοδόμησής τους δεν προκαλούν κάποια περιβαλλοντική ανησυχία ή επιβάρυνση, καθότι όλα θεωρούνται περιβαλλοντικά αποδεκτά υλικά σε αντίθεση με τα συνθετικά πολυμερή. Τα πιο συνηθισμένα προϊόντα που συναντώνται σε αυτήν την κατηγορία είναι οι πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη, οι πολυεστέρες, όπως οι πολύ-υδροξυαλκανοϊκοί και οι πρωτεΐνες, όπως το μετάξι και το κολλαγόνο. [15]
- **Συνθετικά βιοδιασπώμενα πολυμερή:** Τα συνθετικά βιοδιασπώμενα πολυμερή είναι υλικά που δύσκολα επιδέχονται βιοαποικοδόμηση. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες εξαιρέσεις όπως οι αλειφατικοί πολυεστέρες που είναι γενικά επιρρεπείς

σε μικροβιακή «επίθεση», ενώ και άλλες κατηγορίες υλικών έχει βρεθεί ότι μπορούν να υδρολυθούν από ένζυμα όπως λιπάσες και εστεράσες. Ορισμένα γνωστά εμπορικά προϊόντα που είναι συνθετικά βιοδιασπώμενα πολυμερή είναι: η πολυκαπρολακτόνη, το πολυγαλακτικό οξύ και η πολυβινυλο-αλκοόλη. [15]

- Βιοδιασπώμενα πολυμερή που έχουν προέλθει από μικροοργανισμούς: Τα υλικά αυτά ονομάζονται και μικροβιακά πολυμερή και η παραγωγή τους γίνεται στη φύση, μέσω του κύκλου ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Έτσι, αυτοί προσλαμβάνουν θρεπτικά συστατικά και ενέργεια και στη συνέχεια τα μεταβολίζουν προς παραγωγή άλλων ουσιών, όπως η συγκεκριμένη κατηγορία βιοδιασπώμενων πλαστικών. Η πιο γνωστή κατηγορία των υλικών αυτών είναι οι πολύ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες και κυρίως ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB). [15]



Εικόνα 4. Κατηγορίες βιοδιασπώμενων πολυμερών υλικών. [17]

1.2.9. Πολυεστερικά πλαστικά

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παραγωγή και η βιοχημική και βιοτεχνολογική μελέτη πολυεστερασών, δηλαδή ενζύμων που έχουν την ικανότητα να διασπούν εστερικούς δεσμούς. Για τον λόγο αυτό, θα γίνει και πιο εκτενής αναφορά και ανάλυση των πολυεστερικών πλαστικών υλικών που μελετώνται σε αυτήν την εργασία.

Οι πολυεστέρες είναι μια κατηγορία πολυμερών υλικών που περιέχουν εστερικό δεσμό σε κάθε επαναλαμβανόμενη μονάδα της πολυμερικής τους αλυσίδας. Στην αγορά κυκλοφορούν πολλές κατηγορίες πολυεστερικών πολυμερών με ευρεία εφαρμογή. Η σύνθεση τους γίνεται κυρίως με δύο τρόπους: 1) με αντίδραση πολυσυμπύκνωσης μεταξύ ενός ανδρίτη, ενός υδροξυοξέος ή ενός διοξέος με μία δευτεροταγή αλκοόλη και 2) με αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου. Οι συνθετικοί πολυεστέρες δεν είναι βιοαποικοδομήσιμα υλικά, ωστόσο προσφέρουν τα πλεονεκτήματα της

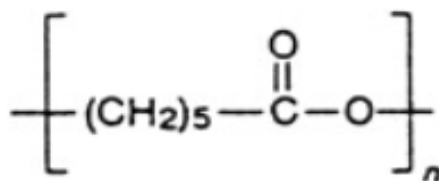
εύκολης κατεργασίας τους και των προσαρμόσιμων φυσικομηχανικών ιδιοτήτων τους και είναι υλικά πολύ ανθεκτικά, ιδιότητα μεγάλης σημασίας για τις περισσότερες εφαρμογές. Ωστόσο, εκτός των συνθετικών μη βιοαποικοδομήσιμων πολυεστέρων, υπάρχουν και βιοαποικοδομήσιμοι πολυεστέρες, οι οποίοι προσφέρουν τα πλεονεκτήματα του χαμηλού κόστους, της βιοσυμβατότητας και του γεγονότος ότι τα περισσότερα μονομερή κατά την παραγωγή τους προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Η βιοσυμβατότητα είναι ένα χαρακτηριστικό που επιτρέπει τη χρήση των υλικών αυτών σε βιολογικές και βιοϊατρικές εφαρμογές όπως η μηχανική των ιστών. [18]

Πέραν του κριτηρίου της βιοαποικοδομησιμότητας, οι πολυεστέρες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τους αλειφατικούς και τους αρωματικούς. Αλειφατικοί πολυεστέρες είναι αυτοί που αποτελούνται από ανοιχτές δομές, ευθείες ή διακλαδισμένες, και δεν περιέχουν δακτυλίους ενώ αρωματικοί πολυεστέρες χαρακτηρίζονται αυτοί που έχουν έναν συνδυασμό ιδιοτήτων, με χαρακτηριστικότερη την ύπαρξη του αρωματικού δακτυλίου, που διαμορφώνουν τον λεγόμενο «αρωματικό χαρακτήρα». [5], [18]

Συνοπτικά όσον αφορά την ικανότητα βιοαποικοδόμησης των πολυεστερικών πολυμερών, οι αλειφατικοί πολυεστέρες είναι πιο επιρρεπείς σε μικροβιακή «επίθεση» σε σχέση με τους αρωματικούς. Συγκεκριμένα, η διαδικασία αποικοδόμησής τους ξεκινά με την επιφανειακή διάβρωση του υλικού που οδηγεί σε αποπολυμερισμό και ακολουθεί η υδρόλυση από ένζυμα που οδηγεί σε προϊόντα διαλυτά στο νερό που μπορούν στη συνέχεια να αφομοιωθούν από μικροοργανισμούς. Αναφορικά με τους αρωματικούς πολυεστέρες αυτοί εμφανίζουν εξαιρετικές ιδιότητες αλλά δεν είναι βιοαποικοδομήσιμοι. Για τον λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες εισαγωγής αρωματικών δακτυλίων σε αλειφατικούς πολυεστέρες με σκοπό την ανάπτυξη υλικών που θα εμφανίζουν βελτιωμένες θερμικές και μηχανικές ιδιότητες αλλά και αυξημένη τάση για βιοαποικοδόμηση. [5], [18]

1.2.9.1. Πολυκαπρολακτόνη (PCL)

Η πολυκαπρολακτόνη (PCL) είναι ένας αλειφατικός πολυεστέρας και κυκλοφορεί σαν προϊόν στην αγορά από το 1975. [15] Τα δύο κύρια μονοπάτια παραγωγής της είναι: 1) πολυσυμπύκνωση του 6-υδροξυλο-εξανοϊκού οξέος και 2) πολυμερισμός μέσω διάνοιξης δακτυλίου της ε-καπρολακτόνης. Η δεύτερη μέθοδος είναι σήμερα η πιο συνηθισμένη. [19] Η δομή της πολυκαπρολακτόνης παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Δομή της πολυκαπρολακτόνης. [15]

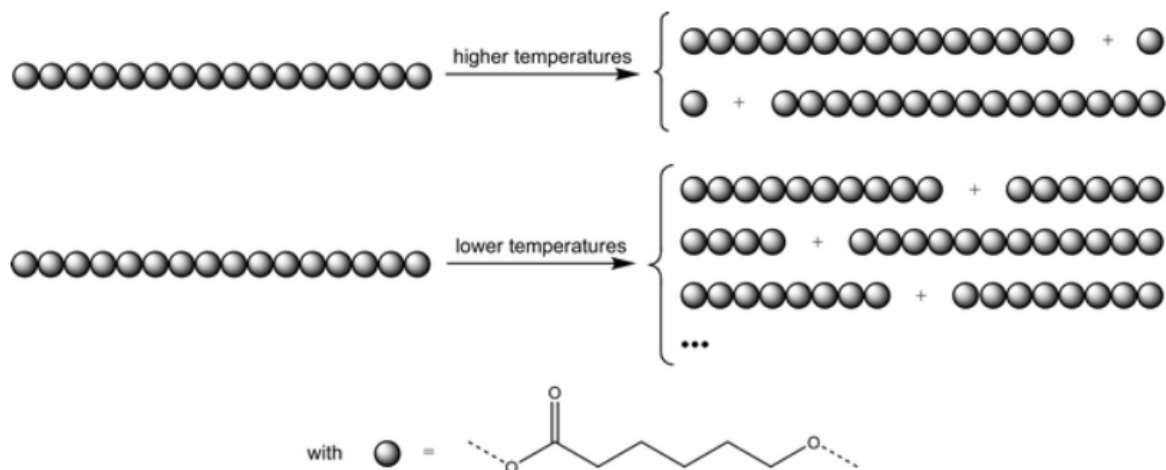
Η πολυκαπρολακτόνη είναι ημικρυσταλλικό υλικό, ο βαθμός κρυσταλλικότητάς του μπορεί να φτάσει μέχρι και στο 69% και η δομική της μονάδα είναι ορθορομβική. Το μοριακό της βάρος ποικίλει και μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 2000 και 80000

Daltons. [19] Γενικά, οι φυσικές, θερμικές και μηχανικές ιδιότητες του υλικού εξαρτώνται από το μοριακό βάρος και την κρυσταλλικότητά του. Το σημείο τήξης της είναι περίπου στους 60 °C και το σημείο υαλώδους μετάπτωσης περίπου στους -60 °C. [13], [15], [19] Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης ορίζεται ως η βαθμιαία και αντιστρεπτή μετάβαση ενός άμορφου υλικού από την σκληρή υαλώδη κατάσταση στην ιξώδη κατάσταση με συμπεριφορά υγρού συστήματος. Σε θερμοκρασία δωματίου, η πολυκαπρολακτόνη είναι διαλυτή σε διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο, το διχλωρομεθάνιο, το βενζόλιο και το τολουόλιο, είναι μερικώς διαλυτή σε διαλύτες όπως ακετόνη, διμεθυλοφορμαμίδιο και ακετονιτρίλιο και αδιάλυτη σε διαλύτες όπως ο πετρελαϊκός αιθέρας, ο διαιθυλεθέρας και το νερό. Επιπροσθέτως, η πολυκαπρολακτόνη εμφανίζει την χαρακτηριστική ιδιότητα ότι είναι αναμειζιμη με πολλά άλλα πολυμερή με χαρακτηριστικό παράδειγμα το πολυβινυλοχλωρίδιο. [19] Ακόμα, είναι και μηχανικά συμβατή με άλλα πολυμερή, όπως το πολυαιθυλένιο και το πολυπροπυλένιο. [19]

Η πολυκαπρολακτόνη έχει χαρακτηριστικά που την καθιστούν κατάλληλη για χρήση σε μεγάλο εύρος εφαρμογών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η βιοσυμβατότητα, η ελεγχόμενη αποσύνθεση, η προέλευση των πρώτων υλών από ανανεώσιμες πηγές και φυσικά το γεγονός ότι μπορεί να συνδυασθεί με άλλα πολυμερή υλικά. Οι εφαρμογές στις οποίες χρησιμοποιείται η πολυκαπρολακτόνη είναι σε επικαλυπτικά, σε ελαστομερή, σε φιλμ, στη μηχανική των ιστών, στην ορθοπαιδική, στα μακροχρόνια συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, στην μικροηλεκτρονική ως πρόσθετο και στη συσκευασία προϊόντων. Ωστόσο, σημαντικό κομμάτι των χρήσεων της πολυκαπρολακτόνης καταλαμβάνει ο συνδυασμός της με άλλα πολυμερή συνδυάζοντας τα πλεονεκτήματα των δύο υλικών και μειώνοντας την επίδραση των μειονεκτημάτων τους στο τελικό προϊόν. Για παράδειγμα, μπορεί να συνδυαστεί με ένα υλικό με καλύτερες μηχανικές ιδιότητες προσφέροντας το πλεονέκτημα το τελικό προϊόν να είναι πιο επιρρεπές στην βιοαποικοδόμηση διευκολύνοντας τη διαχείριση των πλαστικών απορριμμάτων. [13], [15], [16], [19]

Σχετικά με την βιοαποικοδόμηση, η πολυκαπρολακτόνη αποσυντίθεται στη φύση σε χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από μερικούς μήνες έως και μερικά χρόνια. Το χρονικό διάστημα εξαρτάται από τις ιδιότητες του υλικού και ειδικότερα από το μοριακό βάρος, τον βαθμό κρυσταλλικότητας και τις συνθήκες αποικοδόμησης. Γενικά, στη φύση υπάρχει μια πληθώρα μικροοργανισμών (και ορισμένων φάγων φυτών) με την ικανότητα να βιοαποικοδομούν πλήρως την πολυκαπρολακτόνη είτε υπό αερόβιες είτε υπό αναερόβιες συνθήκες και συναντώνται σε διάφορες κατηγορίες οικοσυστημάτων. Η ανακάλυψη της δυνατότητας αποικοδόμησης της πολυκαπρολακτόνης έγινε χρησιμοποιώντας ένα στέλεχος του *Penicillium sp.* που απομονώθηκε από το έδαφος. Όσον αφορά την ενζυμική αποικοδόμηση της πολυκαπρολακτόνης, αυτή επιτυγχάνεται κυρίως με χρήση λιπασών και εστερασών. Γενικά, όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, η πολυκαπρολακτόνη στις περισσότερες εφαρμογές της συναντάται αναμειζιμη με πολλά πολυμερή με την ικανότητα αυτή να συμβάλλει σημαντικά στην ενίσχυση της βιοαποικοδόμησης των πολυμερικών αυτών υλικών, αφού τα συμπολυμερή έχουν χαμηλότερο βαθμό κρυσταλλικότητας και χαμηλότερο σημείο τήξης από τα ομοπολυμερή γεγονός που τα καθιστά περισσότερο επιρρεπή σε βιοαποικοδόμηση. [13], [16], [20]

Αρχικά, οι μικροοργανισμοί δρουν στην άμορφη περιοχή του υλικού που είναι πιο εύκολο να προσβληθεί. Αυτό οδηγεί σε αύξηση του βαθμού κρυσταλλικότητας, ενώ το μοριακό βάρος παραμένει αμετάβλητο. Στη συνέχεια, το σπάσιμο των εστερικών δεσμών οδηγεί σε μείωση του μοριακού βάρους. Στις υψηλότερες θερμοκρασίες, το σπάσιμο των δεσμών στην πολυκαπρολακτόνη πραγματοποιείται στα άκρα του πολυμερούς, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες το σπάσιμο των δεσμών γίνεται σε τυχαία σημεία κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας. Η αποικοδόμηση της πολυκαπρολακτόνης αυτοκαταλύεται και από την απελευθέρωση καρβοξυλικών οξέων κατά τη διεργασία υδρόλυσης. [19]



Εικόνα 6. Σπάσιμο της πολυμερικής αλυσίδας της πολυκαπρολακτόνης κατά την αποικοδόμηση σε υψηλότερες θερμοκρασίες (πάνω) και χαμηλότερες θερμοκρασίες (κάτω). [19]

Αξίζει επιπλέον να τονισθεί ότι παρόλο που η πολυκαπρολακτόνη αποικοδομείται ενζυμικά στο περιβάλλον, δεν πραγματοποιείται το ίδιο και στο ανθρώπινο σώμα, καθιστώντας την κατάποση και εισπνοή μικροπλαστικών πολυκαπρολακτόνης επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία. Τέλος, το γεγονός ότι η πολυκαπρολακτόνη σαν υλικό αποικοδομείται σχετικά εύκολα οδηγεί σε σημαντικά μειονεκτήματα, όπως οι όχι τόσο καλές μηχανικές ιδιότητες και η ανικανότητα επεξεργασίας της σε ορισμένες συνθήκες, όπως οι υψηλές θερμοκρασίες, λόγω του χαμηλού σημείου τήξης της, καθότι αυτό μπορεί να οδηγήσει στην πρόκληση αστοχιών στο τελικό προϊόν. [13], [19]

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται ορισμένα σημαντικά αποτελέσματα που έχουν προκύψει σχετικά με την ενζυμική αποικοδόμηση της πολυκαπρολακτόνης.

Πίνακας 2. Ένζυμα που αποικοδομούν την πολυκαπρολακτόνη, οι συνθήκες αντίδρασης και τα αποτελέσματά τους.

Μορφή πολυμερούς	Ένζυμο	Συνθήκες αντίδρασης	Αποτέλεσμα
Ορθογώνια κομμάτια 10x10x0,3 (mm) [21]	Λιπάση από τον <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 37 °C pH: 7,4	100% απώλεια μάζας

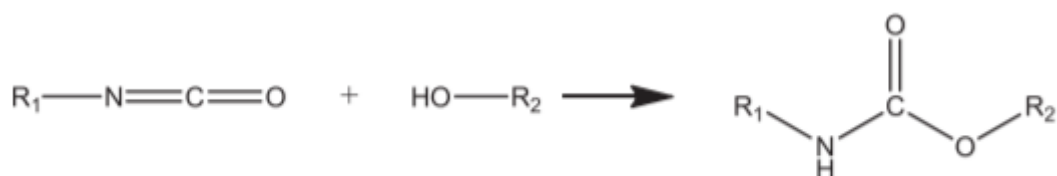
		Ένζυμο: 40 Units/mL (στο διάλυμα της αντίδρασης) Όγκος αντίδρασης: 5 mL Χρόνος: 14 ημέρες	
Φιλμ διαστάσεων 0,5x1 (cm) [22]	Κουτινάση από τον <i>Thielavia terrestris</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl Θερμοκρασία: 50 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 0,869 nmol (65 Units/mL στο αρχικό της διάλυμα) Όγκος αντίδρασης: 1 mL Χρόνος: 48 ώρες	≈ 70% απώλεια μάζας
Σφαιρίδια διαμέτρου 1,5 cm και πάχους 40 μm [23]	Εμπορική λιπάση (Merck)	Υγρή καλλιέργεια σε διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 37 °C pH: 7,4 Ένζυμο: 0,25 mg/mL (ανανέωση κάθε 3 μέρες) Χρόνος: 6 ημέρες	≈ 30% απώλεια μάζας
Φιλμ διαστάσεων 10x10x0,1 (mm) [24]	Λιπάση από τον <i>Lactobacillus plantarum</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl Θερμοκρασία: 37 °C pH: 8,1 Ένζυμο: 1 και 5 mg/mL Όγκος αντίδρασης: 10 mL Χρόνος: 10 ημέρες Μάζα φιλμ: 3,5 mg	10% απώλεια μάζας (για συγκέντρωση ενζύμου 1 mg/mL) 60% απώλεια μάζας (για συγκέντρωση ενζύμου 5 mg/mL)
Φιλμ διαστάσεων 0,5x1 (cm) [22]	Λιπάση από τον <i>T. lanuginosus</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl Θερμοκρασία: 35 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 0,869 nmol (105 Units/mL στο αρχικό της διάλυμα) Όγκος αντίδρασης: 1 mL Χρόνος: 48 ώρες	≈ 37% απώλεια μάζας
Φιλμ 1 (cm) x 1 (cm) x 250 (μm) [25]	Κουτινάση από τον <i>Aspergillus oryzae</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl Θερμοκρασία: 40 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 8,8 μM (στην αντίδραση) Όγκος αντίδρασης: 2,5 mL Χρόνος: 6 ώρες Μάζα φιλμ: 30-35 mg	Απώλεια μάζας ανά επιφάνεια: ≈ 30 mg/cm ²
Φιλμ 1 (cm) x 1 (cm) x 250 (μm) [25]	Κουτινάση από τον <i>F. solani</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl Θερμοκρασία: 40 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 8,8 μM (στην αντίδραση) Όγκος αντίδρασης: 2,5 mL Χρόνος: 6 ώρες Μάζα φιλμ: 30-35 mg	Απώλεια μάζας ανά επιφάνεια: ≈ 10 mg/cm ²

1.2.9.2. Πολυουρεθάνες (PUs)

Οι πολυουρεθάνες συντέθηκαν πρώτη φορά τη δεκαετία του 1930 από τον Γερμανό χημικό Otto Bayer. Η χρήση τους ήταν αρκετά εκτεταμένη κατά τον δεύτερο

παγκόσμιο πόλεμο και έκτοτε λόγω των ιδιοτήτων τους συνεχώς παρουσιάζει αύξηση. Το 2016 η παραγωγή πολυουρεθανών αποτελούσε το 5.3% της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών, καθιστώντας τις το έκτο πιο χρησιμοποιούμενο πλαστικό. Οι πολυουρεθάνες δεν είναι βιοαποικοδομήσιμα υλικά, παρόλο που ορισμένες από αυτές είναι μερικώς ευαίσθητες σε ενζυμική αποικοδόμηση και για τον λόγο αυτό συμβάλλουν σημαντικά στην περιβαλλοντική ρύπανση. Μάλιστα σε μία έρευνα που έγινε το 2016 σε μια βρετανική παραλία, από τα 70 κομμάτια πλαστικών που βρέθηκαν, τα 39 ανήκαν στην κατηγορία των πολυουρεθανών, αποδεικνύοντας τη μεγάλη συνεισφορά τους στη μόλυνση των υδάτινων οικοσυστημάτων. [3]

Οι πολυουρεθάνες σαν κατηγορία υλικού χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη στο μόριο τους ενός ουρεθανικού ή καρβαμιδικού δεσμού. Η δημιουργία του δεσμού αυτού μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, αλλά ο πιο συνηθισμένος είναι με την πολυπροσθήκη ενός ισοκυανίου σε μία ομάδα -OH, που συναντάται σε κάποια πολυόλη (οργανική ένωση που περιέχει πολλές ομάδες -OH). Με τον τρόπο αυτό, προκύπτουν πολυουρεθάνες αιθερικής ή εστερικής βάσης. [3]



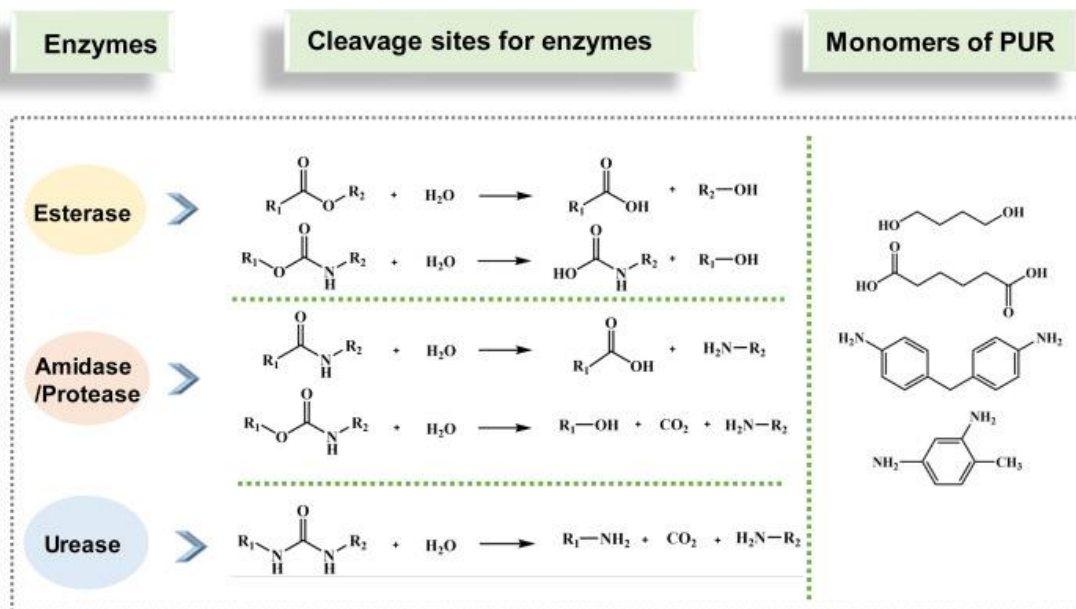
Εικόνα 7. Πολυπροσθήκη ενός ισοκυανίου σε μία ομάδα -OH προς σχηματισμό ενός ουρεθανικού δεσμού. [3]

Τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα ισοκυάνια είναι αρωματικά και λειτουργικότητας 2 (f=2), όπως το 4,4'-μεθυλ-διφαινυλ-ισοκυάνιο (MDI) και το τολουενο-διϊσοκυάνιο (TDI). Άλλες κατηγορίες ισοκυανίων που χρησιμοποιούνται είναι τα αλειφατικά, όπως το εξανο-διϊσοκυάνιο (HDI) και ορισμένα ισοφορο-διϊσοκυάνια. Ακόμα, στην προσπάθεια παραγωγής υλικών πιο φιλικών για το περιβάλλον, παράγονται και πολυουρεθανικά υλικά χωρίς τη χρήση ισοκυανίων, καθότι τα ισοκυάνια προέρχονται από το φωσγένιο γεγονός που τα καθιστά εν γένει τοξικά υλικά. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι τα ισοκυάνια, λόγω της μεγάλης δραστικότητάς τους, είναι πολύ ασταθή στο νερό. Για τον λόγο αυτό αν υπάρχουν στο πολυμερικό πλέγμα ισοκυάνια που δεν αντέδρασαν κατά τη σύνθεση, αυτά αντιδρούν αμέσως αν βρεθούν σε υδατικό μέσο, απελευθερώνοντας τοξικά παραπροϊόντα. Έτσι, δεν εντοπίζονται ισοκυάνια ούτε πριν ούτε μετά την αποσύνθεση του υλικού. [3], [6]

Όσον αφορά τις πολυόλες, κυρίως χρησιμοποιούνται πολυαιθερικές ή πολυεστερικές, ενώ πιο σπάνια και πολυκαρβονικές. Οι πολυόλες προέρχονται κυρίως από τα ορυκτά καύσιμα, αλλά γίνονται και προσπάθειες χρήσης πολυολών που προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές, όπως το άμυλο. Ορισμένες πολυόλες και διόλες έχουν έναν ακόμη ρόλο κατά τη σύνθεση των πολυουρεθανών. Συγκεκριμένα, μικρού μοριακού βάρους μόρια, όπως η 1,4-βουτανοδιόλη και η αιθυλενογλυκόλη χρησιμοποιούνται για να επεκτείνουν την πολυμερική αλυσίδα οδηγώντας στον σχηματισμό πολυμερούς μεγαλύτερου μοριακού βάρους. [3], [6]

Οι πολυουρεθάνες μπορεί να ανήκουν είτε στην ομάδα των θερμοπλαστικών είτε στην ομάδα των θερμοσκληρυνόμενων. Οι θερμοπλαστικές πολυουρεθάνες είναι για παράδειγμα ελαστομερή με ευρεία χρήση σε αθλητικό ρουχισμό, παπούτσια και ιατρικές συσκευές. Οι πολυουρεθάνες που χρησιμοποιούνται για βιοϊατρικές εφαρμογές είναι επιρρεπείς στην ενζυμική αποικοδόμηση όταν βρίσκονται σε επαφή με τον ιστό, προκειμένου να ικανοποιούνται οι ανάγκες βιοσυμβατότητας και βιοαπορρόφησης. Όσον αφορά τις θερμοσκληρυνόμενες πολυουρεθάνες, αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως σε πολυουρεθανικούς αφρούς. Οι αφροί χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τους ευέλικτους και τους άκαμπτους. Οι άκαμπτοι αφροί αποτελούν το 36% των παραγόμενων πολυουρεθανών και χρησιμοποιούνται ως μονωτικά κτηρίων και σε συστήματα εξοικονόμησης ενέργειας. Οι ευέλικτοι αφροί αποτελούν το 32% των παραγόμενων πολυουρεθανών και χρησιμοποιούνται ως επενδυτικά, σε έπιπλα και στην αυτοκίνηση. Άλλες χρήσεις των πολυουρεθανών είναι ως στεγανωτικά, ως επικαλυπτικά και ως πρόσθετα. Τέλος, τα περισσότερα πολυουρεθανικά υλικά, επειδή προορίζονται για μακροχρόνια χρήση, κατασκευάζονται με σκοπό να είναι ανθεκτικά σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η μικροβιακή αποδόμηση, η διάβρωση και η υπερϊώδης ακτινοβολία. [3] [6]

Όσον αφορά την βιοαποικοδόμηση των πολυουρεθανών, αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα μοριακά χαρακτηριστικά του υλικού. Το είδος των χημικών δεσμών, το μοριακό βάρος και η κρυσταλλικότητα είναι οι πιο σημαντικοί παράγοντες που διαμορφώνουν την αντοχή του υλικού σε μικροβιακή «επίθεση». Γενικά, οι πολυουρεθάνες πολυεστερικής βάσης αποικοδομούνται πιο εύκολα σε σχέση με αυτές πολυαιθερικής βάσης και αυτό οφείλεται στη μεγαλύτερη ευκολία υδρόλυσης του εστερικού δεσμού. Η βιοαποικοδόμηση των πολυουρεθανών μπορεί να επιτευχθεί είτε από μία μικροβιακή κοινότητα (δηλαδή ομάδα μικροοργανισμών που συμβιώνουν στο ίδιο περιβάλλον και μοιράζονται τα θρεπτικά συστατικά) είτε από ένα αυτόνομο στέλεχος. Τα είδη μικροοργανισμών που έχει βρεθεί ότι αποικοδομούν τις πολυουρεθάνες είναι βακτήρια και μύκητες. Βακτήρια που έχει βρεθεί ότι αποικοδομούν τις πολυουρεθάνες ανήκουν στα γένη: *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acitenobacter* και *Corynebacterium*. [26] Αντίστοιχα μύκητες που έχει βρεθεί ότι έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν πολυουρεθάνες ανήκουν στα γένη: *Aspergillus*, *Pestalotiopsis*, *Cladosporium*, *Fusarium* και *Penicillium*. [26] Όσον αφορά την ενζυμική αποικοδόμηση των πολυουρεθανών, τα ένζυμα που έχει βρεθεί ότι τις αποικοδομούν ανήκουν κυρίως στις κατηγορίες των εστερασών, των ουρεασών και των αμιδασών/πρωτεασών. Όσον αφορά τις εστεράσες, αυτές δρουν στον εστερικό δεσμό των πολυεστερικών πολυουρεθανών και οδηγούν στην απελευθέρωση προϊόντων με καρβοξυλικά και υδροξυλικά άκρα. Οι ουρεάσες δρουν στους ουρικούς δεσμούς που εμφανίζονται στις πολυουρεθάνες όταν χρησιμοποιούνται διαμίνες για την επέκταση των αλυσίδων αντί για πολυόλες. Οι αμιδάσες και οι πρωτεάσες έχουν δράση στον ουρεθανικό δεσμό των πολυουρεθανών και οδηγούν στην απελευθέρωση προϊόντων, όπως αλκοόλες, αμίνες και διοξείδιο του άνθρακα. Σε πιο σπάνιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί και σπάσιμο του ουρεθανικού δεσμού από εστεράσες. [3], [6], [26], [27]



Εικόνα 8. Μηχανισμοί ενζυμικής υδρόλυσης των χημικών δεσμών των πολυουρεθανών. [26]

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται ορισμένα σημαντικά αποτελέσματα που έχουν προκύψει σχετικά με την ενζυμική αποικοδόμηση των πολυουρεθανών.

Πίνακας 3. Ένζυμα που αποικοδομούν τις πολυουρεθάνες, οι συνθήκες αντίδρασης και τα αποτελέσματά τους.

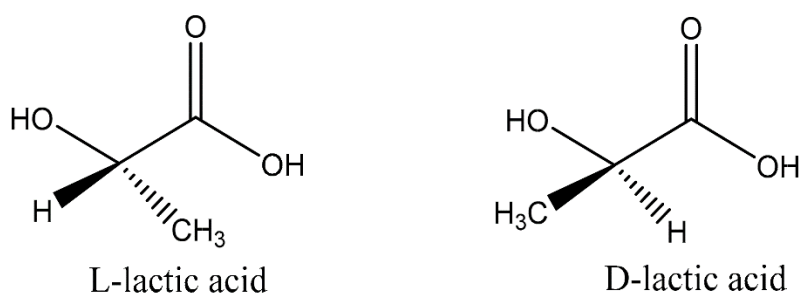
Μορφή πολυμερούς	Ένζυμο	Συνθήκες αντίδρασης	Αποτέλεσμα
Φιλμ 0,5 (cm)x0,5 (cm)x0,3 (mm) [27]	E3576 (εστεράση)/ εμπορικά διαθέσιμη (Proteus, France)	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 37 °C pH: 7,0 Ένζυμο: 100 µL Όγκος αντίδρασης: 1 mL Χρόνος: 20 και 40 ημέρες Μάζα φιλμ: 50-80 mg	Απώλεια μάζας ≈ 18% (20 ημέρες) 33% (40 ημέρες)
Κομμάτια με πάχος της κλίμακας των µm [28]	Λακάση από τον <i>Trametes versicolor</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα νατρίου-οξικού άλατος Θερμοκρασία: 37 °C pH: 4,5 Ένζυμο: 9 mUnits στο διάλυμα της αντίδρασης (αρχική ενεργότητα 0,01 Units/mg) Όγκος αντίδρασης: 5 mL Χρόνος: 18 ημέρες Μάζα κομματιών PU: 20 mg	10% απώλεια μάζας
Αφρός 1,2x1,2x1,2 (cm) [28]	Λακάση από τον <i>Trametes versicolor</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα νατρίου-οξικού άλατος Θερμοκρασία: 37 °C pH: 4,5	3,5% απώλεια μάζας

		Ένζυμο: 9 mUnits στο διάλυμα της αντίδρασης (αρχική ενεργότητα 0,01 Units/mg) Όγκος αντίδρασης: 5 mL Χρόνος: 18 ημέρες	
Κύβος 0,5x0,5x0,2 (cm) 1) Elastollan B85A-10 2) Elastollan C85A-10 [29]	LCC (κουτινάση)	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 60 και 70 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 50 µg/mL Όγκος αντίδρασης: 1 mL Χρόνος: 100 h και 200 h Μάζα κύβου PU: 80 mg	Απώλεια μάζας: 1) Elastollan B85A-10: 100 h, 60 °C: 1,2% 100 h, 70 °C: 3,2% 200 h, 70 °C: 4,9% 2) Elastollan C85A-10: 100 h, 60 °C: 1,2% 100 h, 70 °C: 2,5% 200 h, 70 °C: 4,1%
Κύβος 0,5x0,5x0,2 (cm) 1) Elastollan B85A-10 2) Elastollan C85A-10 [29]	TfCut2 (κουτινάση) από τον <i>Thermobifida fusca</i> KW3	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 60 και 70 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 50 µg/mL Όγκος αντίδρασης: 1 mL Χρόνος: 100 h Μάζα κύβου PU: 80 mg	Απώλεια μάζας: 1) Elastollan B85A-10: 100 h, 60 °C: 1,0% 100 h, 70 °C: 1,9% 2) Elastollan C85A-10: 100 h, 60 °C: 1,1% 100 h, 70 °C: 1,5%
Κύβος 0,5x0,5x0,2 (cm) 1) Elastollan B85A-10 2) Elastollan C85A-10 [29]	Tcur0390 (κουτινάση) από τον <i>Thermomonospora curvata</i> DSM43183	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 60 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 50 µg/mL Όγκος αντίδρασης: 1 mL Χρόνος: 100 h Μάζα κύβου PU: 80 mg	Απώλεια μάζας: 1) Elastollan B85A-10: 0,3% 2) Elastollan C85A-10: 0,4%
Κύβος 0,5x0,5x0,2 (cm) 1) Elastollan B85A-10 2) Elastollan C85A-10 [29]	Tcur1278 (κουτινάση)	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 60 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 50 µg/mL Όγκος αντίδρασης: 1 mL Χρόνος: 100 h Μάζα κύβου PU: 80 mg	Απώλεια μάζας: 1) Elastollan B85A-10: 0,6% 2) Elastollan C85A-10: 0,8%

1.2.9.3. Πολυγαλακτικό οξύ (PLA)

Το πολυγαλακτικό οξύ είναι ένας βιοαποικοδομήσιμος θερμοπλαστικός πολυεστέρας, που τα μονομερή του προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, καθιστώντας το φιλικό προς το περιβάλλον. Το μονομερές του πολυγαλακτικού οξέος είναι το γαλακτικό οξύ και απομονώνεται από υλικά όπως το καλαμπόκι, το σιτάρι και το άχυρο. Ωστόσο, για την παραγωγή του έχουν μελετηθεί διάφορες συνθετικές μέθοδοι και καμία από αυτές δεν είναι οικονομική και εύκολο να εφαρμοσθεί. Αυτό οφείλεται στην ανάγκη χρήσης καταλυτών, στα ενδιάμεσα στάδια και στον εξοπλισμό που απαιτείται για τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος. [30]

Το μονομερές του πολυγαλακτικού οξέος, το γαλακτικό οξύ, είναι μία πολύ συνηθισμένη ένωση στη φύση, καθώς συμβάλει στην ανάπτυξη των ζωντανών οργανισμών. Υπάρχουν δύο οπτικά ισομερή του γαλακτικού οξέος το L-γαλακτικό οξύ και το D-γαλακτικό οξύ. Συνήθως το γαλακτικό οξύ παράγεται μέσω διεργασιών ζύμωσης σακχάρων, όπως γλυκόζη, μαλτόζη, άμυλο και λακτόζη που λαμβάνονται από την πατάτα και το καλαμπόκι. Η διεργασία της ζύμωσης πραγματοποιείται με χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου συνήθως σε θερμοκρασία 40 °C, pH=5,0 για 3-5 ημέρες. [31] Ωστόσο, μετά το πέρας της διεργασίας πρέπει να ακολουθήσουν διαδικασίες καθαρισμού του προϊόντος, καθώς αυτό είναι τοξικό, που συνήθως είναι ενεργοβόρες και μη οικονομικές. [30] Έχουν αναπτυχθεί και χημικές μέθοδοι σύνθεσης γαλακτικού οξέος με κυριότερες αυτές του λακτονιτριλίου, του ακρυλονιτριλίου και του προπιονικού οξέος. [31] Ωστόσο, η σύνθεση του γαλακτικού οξέος με χρήση μικροοργανισμών αποτελεί το 90% της παγκόσμιας σύνθεσής του. Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη ζύμωση για την παραγωγή του γαλακτικού οξέος είναι διάφορα είδη του αμυλολυτικού μύκητα *Rhizopus oryzae*, καθώς και βακτηριακά στελέχη των *Lactobacillus pentosus* και *Bacillus sp.*, που έχουν την ικανότητα να διασπούν πεντόζες και εξόζες που είναι βασικά σάκχαρα της βιομάζας. [30], [31]



Εικόνα 9. Οπτικά ισομερή του γαλακτικού οξέος, δομικής μονάδας του πολυγαλακτικού οξέος. [30]

Ο Carothers το 1932 συνέθεσε για πρώτη φορά προϊόντα πολυγαλακτικού οξέος με μικρό μοριακό βάρος. Ωστόσο, το κόστος και η έλλειψη σταθερότητας κατέστησαν την προσπάθεια αυτή ανεπιτυχή. [30] Επειδή το γαλακτικό οξύ έχει δύο ισομερή, έτσι και το πολυγαλακτικό οξύ εμφανίζεται με τρεις μορφές: πολύ-L-γαλακτικό οξύ (PLLA), πολύ-D-γαλακτικό οξύ (PDLA) και πολύ-LD-γαλακτικό οξύ (PDLLA). Το πολυγαλακτικό οξύ συντίθεται χημικά με τρεις κυρίως μεθόδους: 1) πολυμερισμό συμπύκνωσης, 2) συμπύκνωση αζεοτροπικής αφυδάτωσης και 3) πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου του λακτιδίου. [30], [31]

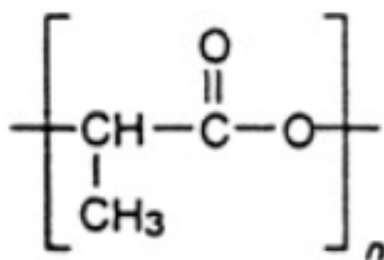
1) Πολυμερισμός συμπύκνωσης: Τα στάδια του συγκεκριμένου τρόπου σύνθεσης είναι δύο. Το πρώτο βήμα είναι η συμπύκνωση των ομάδων υδροξυλίου και καρβοξυλίου με αποτέλεσμα την παραγωγή πολυγαλακτικού οξέος μικρού μοριακού βάρους. Στη συνέχεια προκειμένου να επεκταθεί η πολυμερική αλυσίδα, είναι απαραίτητο να προστεθούν συζευκτικά μέσα και επιταχυντές της εστεροποίησης. Ωστόσο, η προσθήκη αυτών των παραγόντων οδηγεί στην παρουσία ακαθαρσιών που δεν μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν και έτσι καθιστούν το προϊόν ακατάλληλο για ορισμένες εφαρμογές, όπως για παράδειγμα βιοϊατρικές. Προκειμένου να προκύψουν πιο καθαρά προϊόντα μικρού μοριακού βάρους είναι απαραίτητη η χρήση εύφλεκτων διαλυτών που όμως οδηγεί σε προβλήματα στην ασφάλεια της διεργασίας. Το

πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι εμφανίζει το χαμηλότερο κόστος. [30], [31]

2) Συμπύκνωση αζεοτροπικής αφυδάτωσης: Στη συγκεκριμένη μέθοδο το γαλακτικό οξύ, αρχικά, οδηγείται σε απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση στους 130 °C για 2-3 ώρες για να απομακρυνθεί το νερό. Στη συνέχεια προστίθεται στη διεργασία καταλύτης και διαλύτης και το μείγμα της αντίδρασης περνάει από μοριακό κόσκινο. Στη συνέχεια επιστέφει στην αποστακτική στήλη στους 130 °C για 30-40 ώρες. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, μπορεί να διαχωριστεί και να οδηγηθεί σε περαιτέρω καθαρισμό. Τα μειονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η χρήση διβασικών οξέων και γλυκολών ως διαλύτες και η δυσκολία απομάκρυνσης του καταλύτη από το τελικό προϊόν. Η τοξικότητα του καταλύτη (βαρύ μέταλλο) για το ανθρώπινο σώμα καθιστά το τελικό προϊόν ακατάλληλο για ιατρικές εφαρμογές. [30], [31]

3) Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου του λακτιδίου: Είναι ο πιο συνηθισμένος βιομηχανικός τρόπος σύνθεσης πολυγαλακτικού οξέος μεγάλου μοριακού βάρους. Η διεργασία αυτή βασίζεται στη διάνοιξη του δακτυλίου του διμερούς γαλακτικού οξέος (λακτιδίου) υπό την παρουσία καταλύτη και πραγματοποιείται σε τρία κύρια βήματα: πολυσυμπύκνωση, αποπολυμερισμός και διάνοιξη δακτυλίου. Μετά την παραγωγή του προϊόντος απαιτούνται επιπλέον βήματα καθαρισμού που συχνά είναι περίπλοκα και ακριβά. Το είδος του πολυγαλακτικού οξέος (L- ή D-) που παράγεται μπορεί να ελεγχθεί μέσω του χρόνου της αντίδρασης, της θερμοκρασίας και τους είδους και της συγκέντρωσης του καταλύτη. Καταλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συγκεκριμένη διεργασία είναι κασσίτερος, αλουμίνιο, μόλυβδος, βισμούθιο και ψευδάργυρος. [30], [31]

Ακόμα, μελετάται πλέον και η ενζυμική παραγωγή του πολυγαλακτικού οξέος που είναι μία διεργασία εξαιρετικά φιλική για το περιβάλλον καθότι απαιτεί ήπιες συνθήκες λειτουργίας, ενώ τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι αποτελεσματικά, οικονομικά και με υψηλά επίπεδα εξειδίκευσης. [30]



Εικόνα 10. Δομική μονάδα πολυγαλακτικού οξέος. [15]

Όσον αφορά τις ιδιότητες του πολυγαλακτικού οξέος εμφανίζει καλή εφελκυστική τάση και ολκιμότητα που του επιτρέπουν να μπορεί να ανταπεξέλθει στις συνθήκες λειτουργίας διαφόρων διεργασιών. Πολλές ιδιότητες του πολυγαλακτικού οξέος σχετίζονται με τον βαθμό κρυσταλλικότητας της πολυμερικής του αλυσίδας. Για παράδειγμα, όσον αφορά τη διαλυτότητα, τα άμορφα πολυμερή είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες, όπως η ακετόνη και το ακετονιτρίλιο, ενώ τα κρυσταλλικά είναι διαλυτά μόνο σε διχλωρομεθάνιο και βενζένιο σε υψηλές θερμοκρασίες. Η

θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και η θερμοκρασία τήξης είναι, επίσης, ιδιότητες που σχετίζονται με την κρυσταλλικότητα αλλά και το μοριακό βάρος του υλικού. Η πρώτη είναι περίπου στους 55 °C και η δεύτερη μεταξύ των τιμών 150-200 °C. [30] Ακόμα, το πολυγαλακτικό οξύ έχει πολύ καλή βιοσυμβατότητα και για τον λόγο αυτό επιλέγεται εξαιρετικά συχνά σε ιατρικές εφαρμογές. Τα προϊόντα αποδόμησης του γαλακτικού οξέος αφομοιώνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό χωρίς να είναι τοξικά. Ακόμα η ικανότητα αποδόμησης του, το καθιστά ικανό για χρήση στην ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων στον οργανισμό. Έτσι, το πολυγαλακτικό οξύ βρίσκει κυρίως εφαρμογή στην μηχανική των ιστών, σε εμφυτεύματα και στη μεταφορά φαρμάκων. [30], [31]

Αναφορικά με την βιοαποικοδόμηση του πολυγαλακτικού οξέος, αυτή συνήθως συμβαίνει μέσω διάσπασης των εστερικών δεσμών. Είναι μια διεργασία που επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η φωτοαποσύνθεση, η οξειδωση, η υδρόλυση και η θερμοκρασία. Το πολυγαλακτικό οξύ εκτός του ότι βιοαποικοδομείται πλήρως, οδηγεί σε προϊόντα αποσύνθεσης που δε ρυπαίνουν το περιβάλλον. Η αποικοδόμηση από τους μικροοργανισμούς πραγματοποιείται πρώτα εξωκυτταρικά προκαλώντας αποπολυμερισμό. Στη συνέχεια, ο αποπολυμερισμός πραγματοποιείται εσωκυτταρικά και οδηγεί στη διάσπαση των εστερικών δεσμών, απελευθερώνοντας ολιγομερή και μονομερή. Τα συστατικά αυτά χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από το κύτταρο για την ανάπτυξη του οδηγώντας, τελικά, στην απελευθέρωση νερού, διοξειδίου του άνθρακα και μεθανίου. [32]

Παρότι, η πλήρης βιοαποικοδόμηση του πολυγαλακτικού οξέος είναι εφικτή, συνήθως στη φύση διέρχεται μεγάλο χρονικό διάστημα μέχρι να ξεκινήσει η διαδικασία και οι ρυθμοί της είναι σχετικά χαμηλοί. Ωστόσο, διενεργείται μεγάλη επιστημονική έρευνα στο συγκεκριμένο κομμάτι και έχουν βρεθεί διάφοροι μικροοργανισμοί στο έδαφος και στο νερό με την ικανότητα να αποικοδομούν το πολυγαλακτικό οξύ. Αυτοί ανήκουν κυρίως σε τρεις κατηγορίες: 1) ακτινομύκητες, όπως διάφορα στελέχη του *Amycolatopsis* και του *Pseudonocardia*, 2) βακτήρια, όπως διάφορα στελέχη του *Bacillus* και του *Pseudomonas* και 3) μύκητες, όπως οι *Trichoderma viride* και *Aspergillus oryzae RIB40*. [32]

Όσον αφορά την ενζυμική αποικοδόμηση του πολυγαλακτικού οξέος, αυτή πραγματοποιείται κυρίως με πρωτεάσες και σε χαμηλότερο βαθμό με εστεράσες και κουτινάσες. [32] Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται ορισμένα σημαντικά αποτελέσματα που έχουν προκύψει σχετικά με την ενζυμική αποικοδόμηση του πολυγαλακτικού οξέος.

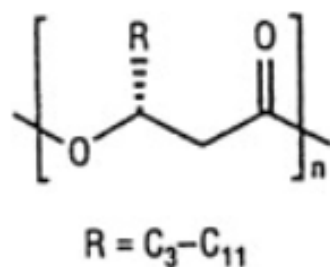
Πίνακας 4. Ένζυμα που αποικοδομούν το πολυγαλακτικό οξύ, οι συνθήκες αντίδρασης και τα αποτελέσματά τους.

Μορφή πολυμερούς	Ένζυμο	Συνθήκες αντίδρασης	Αποτέλεσμα
Κομμάτια 10x10x1 (mm) [33]	Πρωτεϊνάση K από τον <i>Tritirachium album</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl Θερμοκρασία: 37 °C pH: 8,6 Ένζυμο: 0,08 mg/mL (30 Units/mg στο αρχικό διάλυμα) Όγκος αντίδρασης: 5 mL Χρόνος: 8 ημέρες	Απώλεια μάζας: ≈ 70% με ημερήσια ανανέωση ενζύμου ≈ 14% χωρίς ημερήσια ανανέωση ενζύμου

Φιλμ διαστάσεων 20x30x0,08 (mm) [34]	CH1 από τον <i>S. Pavanii</i>	Υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Θερμοκρασία: 30 °C pH: 7,5 Χρόνος: 20 ημέρες Μάζα φιλμ: 40 mg	≈ 42% απώλεια μάζας
Κομμάτια 10x10x1 (mm) [33]	Πρωτεΐνάση K από τον <i>Tritirachium album</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl Θερμοκρασία: 37 °C pH: 8,5 Ένζυμο: 0,01-0,05 mg/mL (30 Units/mg στο αρχικό διάλυμα) Όγκος αντίδρασης: 5 mL Χρόνος: 9 ημέρες	Απώλεια μάζας: ≈ 15% για συγκέντρωση ενζύμου 0,05 mg/mL ≈ 12% για συγκέντρωση ενζύμου 0,01 mg/mL
Φιλμ PDLA διαστάσεων 15x5 (mm) [35]	CLE από τον <i>Cryptococcus sp. S-2</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου Θερμοκρασία: 37 °C pH: 7,0 Ένζυμο: 50 μg Όγκος αντίδρασης: 2 mL Χρόνος: 4 ημέρες	14% απώλεια μάζας
Φιλμ διαστάσεων 20x30x0,08 (mm) [34]	WS3 από τον <i>P. Geniculata</i>	Υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Θερμοκρασία: 30 °C pH: 8,0 Χρόνος: 20 ημέρες Μάζα φιλμ: 40 mg	≈ 11% απώλεια μάζας

1.2.9.4. Πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB)

Τα τελευταία 10 χρόνια μία κατηγορία βιοπολυμερών που εμφανίζουν ραγδαία ανάπτυξη είναι αυτή των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων (PHAs). [15] Οι πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες είναι γραμμικά, θερμοπλαστικά πολυμερή που μπορούν να συντεθούν από πολλούς μικροοργανισμούς. Κυρίως διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: σε αυτούς με μικρό μήκος πολυμερικής αλυσίδας και σε αυτούς με μακρύτερο μήκος πολυμερικής αλυσίδας. [36] Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα της πρώτης κατηγορίας είναι ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB). Ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας είναι το πρώτο πολυμερές της κατηγορίας των πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε πλήρως. Συναντάται σαν εμπορικό προϊόν τόσο ως ομοπολυμερές όσο και σε διάφορα πολυμερικά μείγματα. Είναι ένα υλικό αποθήκευσης άνθρακα και παράγεται σε πολλά μικροβιακά στελέχη στη φύση αλλά και βιομηχανικά μέσω βακτηριακής ζύμωσης. Ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας είναι ένα βιοαποικοδομήσιμο υλικό και αποσυντίθεται από μικροοργανισμούς που συναντώνται σε διάφορα οικοσυστήματα, όπως στο έδαφος και στο νερό, είτε υπό αερόβιες είτε υπό αναερόβιες συνθήκες. Ακόμα, σαν υλικό παρουσιάζει πολύ καλές μηχανικές ιδιότητες και ανταγωνίζεται σε διάφορες εφαρμογές συνήθη συνθετικά πολυμερή. [15], [36]



Εικόνα 11. Δομική μονάδα του πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα. [15]

Η σύνθεση του πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα πραγματοποιείται στο εσωτερικό του κυττάρου του μικροοργανισμού ως προϊόν δευτερογενούς μεταβολισμού, συνήθως σε συνθήκες «στρες» για το κύτταρο, όπως είναι η περίσσεια άνθρακα υπό την έλλειψη των υπόλοιπων θρεπτικών συστατικών και μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο σε gram θετικά όσο και σε gram αρνητικά βακτήρια. Συνήθως, το πρώτο στάδιο της παραγωγής του πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα με ζύμωση περιλαμβάνει την εισαγωγή στο σύστημα όλων των θρεπτικών υλικών που χρειάζονται για την ανάπτυξη της βιομάζας, όπως κάποια πηγή άνθρακα, αμμωνία και οξυγόνο, έως ότου η συγκέντρωση βιομάζας φτάσει σε ένα επιθυμητό επίπεδο. Στη συνέχεια, διακόπτεται η εισροή στο σύστημα της πηγής αζώτου, ενώ η πηγή άνθρακα και το οξυγόνο συνεχίζουν να εισέρχονται κανονικά. Αυτό οδηγεί στον τερματισμό της ανάπτυξης της βιομάζας και στην ανακατεύθυνση της μετατροπής της πλεονάζουσας ποσότητας άνθρακα σε PHB. [37] Υπάρχουν διάφορα είδη μικροοργανισμών στα οποία έχει μελετηθεί και εφαρμοσθεί η παραγωγή πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα και ορισμένοι από αυτούς ανήκουν στα είδη *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus* και *Pseudomonas*. [36]

Αναφορικά με τις ιδιότητες του πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα, αυτός έχει συνήθως υψηλή κρυσταλλικότητα. Στο μόριο του εμφανίζονται τόσο άμορφες όσο και κρυσταλλικές περιοχές και ο βαθμός κρυσταλλικότητάς του κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 50% και 60%. Είναι ένα υλικό υδρόφοβο και η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης εντοπίζεται μεταξύ των τιμών 5 και 9 °C. Ακόμα, η θερμοκρασία τήξης του ανέρχεται στους 165-175 °C. Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας έχει εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες, όπως είναι το μέτρο εφελκυσμού, η εφελκυστική τάση και το σπάσιμο ύστερα από επιμήκυνση. Εξαιτίας, λοιπόν της αντοχής και της ανθεκτικότητάς του μπορεί να μορφοποιηθεί με διάφορες διεργασίες. Μπορεί να δώσει ίνες, φιλμ, αλλά και να συνδυασθεί με διάφορα άλλα πολυμερή. [36]

Ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάφορες εφαρμογές, όπως στις αγροτικές καλλιέργειες, στις κατασκευές και στην αυτοκίνηση. Σε εφαρμογές, όπως η συσκευασία προϊόντων πολλές φορές προτιμάται έναντι του πολυαιθυλενίου και πολυπροπυλενίου λόγω της ελαττωμένης διαπερατότητας που προσφέρει. [36] Ακόμα, έχει βρεθεί ότι είναι υλικό πιο άκαμπτο και λιγότερο ευέλικτο από το πολυπροπυλένιο, ενώ σε διάφορες άλλες εφαρμογές ανταγωνίζεται το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο και το πολυβινυλοχλωρίδιο. [36] Ακόμα, ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας είναι ένα υλικό συμβατό με το ανθρώπινο σώμα και για αυτό χρησιμοποιείται σε πολλές εφαρμογές της ιατρικής, όπως η χειρουργική και η

ορθοπεδική. [37], [38] Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται σε ιατρικές συσκευές εμφύτευσης, όπως είναι βιοαποικοδομήσιμες βίδες για τους χόνδρους και τα κόκαλα, οι βιοαποικοδομήσιμες μεμβράνες για περιοδοντική θεραπεία και τα βιοαποικοδομήσιμα ράμματα που χρησιμοποιούνται στη χειρουργική, στην οδοντιατρική και στην πλαστική χειρουργική του δέρματος. [38] Επιπλέον, ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας προσφέρει νέες προοπτικές στον τομέα της φαρμακολογίας για την ανάπτυξη καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων με τη μορφή φιλμ του πολυμερούς. Σε αυτήν την περίπτωση, ο ρυθμός αποδέσμευσης του φαρμάκου εξαρτάται από τη φύση του, από το πάχος του πολυμερικού φιλμ, από την αναλογία βάρους του φαρμάκου και του πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα και από το μοριακό βάρος του πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα. Τέλος, ο πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας μπορεί να αποδώσει συστήματα μεταφοράς φαρμάκων με τη μορφή μικροσφαιριδίων και μακροκάψουλων. Έτσι, μπορούν να μεταφερθούν φάρμακα διαλυτά στο νερό, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, ενώ ο βαθμός απελευθέρωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διάμετρο των μικροσφαιριδίων. [38]

Αναφορικά με την βιοαποικοδόμηση του πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα, έχει βρεθεί ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες χωρίς να οδηγεί στον σχηματισμό τοξικών προϊόντων. Οι πρώτοι μικροοργανισμοί που βρέθηκαν ότι βιοαποικοδομούν τον πολύ-υδροξυ-βουτυρικό εστέρα ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Pseudomonas* και *Streptomyces*. Από τότε έχουν ανακαλυφθεί πάρα πολλοί αερόβιοι και αναερόβιοι μικροοργανισμοί με αυτήν την ικανότητα σε διάφορους τύπους οικοσυστημάτων, όπως στο έδαφος, σε αναερόβια και ενεργό ιλύ, στο θαλασσινό νερό και στο νερό των λιμνών. Συνήθως, οι μικροοργανισμοί αυτοί δρουν σε μεσόφιλες θερμοκρασίες και λίγοι από αυτούς σε υψηλότερες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι κυρίως βακτήρια και ακτινομύκητες. [13]

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται ορισμένα σημαντικά αποτελέσματα που έχουν προκύψει σχετικά με την ενζυμική αποικοδόμηση του πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα.

Πίνακας 5. Ένζυμα που αποικοδομούν τον πολύ-υδροξυ-βουτυρικό εστέρα, οι συνθήκες αντίδρασης και τα αποτελέσματά τους.

Μορφή πολυμερούς	Ένζυμο	Συνθήκες αντίδρασης	Αποτέλεσμα
Φιλμ 1,5 (cm) x 0,5 (cm) x 0,2 (mm) [39]	Αποπολυμεράση Β από τον <i>Pseudomonas lemoignei</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl Θερμοκρασία: 37 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 3 µg/mL Χρόνος: 220 ώρες	≈ 50% απώλεια μάζας
Σφαιρίδια διαμέτρου 1,5 cm και πάχους 40 µm [23]	Εμπορική λιπάση (Merck)	Υγρή καλλιέργεια σε διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 37 °C pH: 7,4 Ένζυμο: 0,25 mg/mL (ανανέωση κάθε 3 μέρες) Χρόνος: 6 ημέρες	≈ 6% απώλεια μάζας

Φιλμ A ₁ : 12x8 (mm) A ₂ : 20x7 (mm) A ₃ : 25x8 (mm) [40]	Αποπολυμεράση Α από τον <i>P.lemoignei</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl Θερμοκρασία: 37 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 13 µg/mL Όγκος αντίδρασης: 1,5 mL Χρόνος: 20 ώρες	Απώλεια μάζας: A ₁ : ≈ 0,6 mg A ₂ : ≈ 1,1 mg A ₃ : ≈ 1,25 mg
Φιλμ διαστάσεων 10x10 (mm) 1) C ₅₀ 2) A ₁₀₀ 3) C ₁₀₀ 4) A ₁₃₀ * [41]	Αποπολυμεράση από τον <i>Aureobacterium saperdae</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου Θερμοκρασία: 37 °C pH: 7,0 Ένζυμο: 15 µg Όγκος αντίδρασης: 2 mL Χρόνος: 25 ώρες Μάζα φιλμ: 20 mg	Απώλεια μάζας ανά επιφάνεια: 1) C ₅₀ : ≈ 12 mg/cm ² 2) A ₁₀₀ : ≈ 6 mg/cm ² 3) C ₁₀₀ : ≈ 2 mg/cm ² 4) A ₁₃₀ : ≈ 0,5 mg/cm ²
Φιλμ 10x10x0,1 (mm) [42]	Αποπολυμεράση από τον <i>A.faecalis T1</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 37 °C pH: 7,4 Ένζυμο: 1 µg Όγκος αντίδρασης: 1 mL Χρόνος: 5 ώρες Μάζα φιλμ: 10-25 mg	Απώλεια μάζας ≈ 2 mg
Φιλμ πάχους 25x8x0,26 (mm) [43]	Αποπολυμεράση Α από τον <i>P.lemoignei</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl Θερμοκρασία: 37 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 1 και 13 µg/mL Χρόνος: 20 ώρες Όγκος αντίδρασης: 1,5 mL	Απώλεια μάζας ≈ 1,2 mg (για συγκέντρωση ενζύμου 1 µg/mL) Απώλεια μάζας ≈ 1,6 mg (για συγκέντρωση ενζύμου 13 µg/mL)

* Η διαφορά μεταξύ των τεσσάρων ειδών φιλμ αφορά τις διαφορετικές συνθήκες σύνθεσης των φιλμ:

C₅₀: ισοθερμική κρυστάλλωση στους 50 °C για 7 min

A₁₀₀: ισοθερμική κρυστάλλωση στους 50 °C για 7 min ακολουθούμενη από ανόπτηση στους 100 °C για 30 min

C₁₀₀: ισοθερμική κρυστάλλωση στους 100 °C για 30 min

A₁₃₀: Ψύξη από την θερμοκρασία τήξης (185 °C) στους 130 °C με ρυθμό 0,5 °C/min ακολουθούμενη από ανόπτηση στους 130 °C για 96 h

1.2.9.5. Πολύ-ηλεκτρικός βουτυλεστέρας (PBS)

Ο πολύ-ηλεκτρικός βουτυλεστέρας είναι ένα βιοαποικοδομήσιμος, αλειφατικός και θερμοπλαστικός πολυεστέρας με αρκετές επιθυμητές ιδιότητες. Συνήθως παράγεται με τον πολυμερισμό του ηλεκτρικού οξέος και της 1,4-βουτανοδιόλης, όπου και οι δύο αυτές ενώσεις μπορεί να προέρχονται είτε από την πετροχημική βιομηχανία είτε μέσω μικροβιακής ανάπτυξης από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. [44], [45] Ο πολύ-ηλεκτρικός βουτυλεστέρας είναι εμπορικά διαθέσιμος από το 1993, όπου χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή φιλμ, σακουλών και ενδυμάτων. [44] Σήμερα, εκτός των ομοπολυμερών υλικών, ο πολύ-ηλεκτρικός βουτυλεστέρας συμμετέχει στην παραγωγή συμπολυμερών μειγμάτων, για παράδειγμα με δικαρβοξυλικά οξέα και διόλες, μεγεθύνοντας συνεχώς το πεδίο εφαρμογών του. [44], [45] Μάλιστα, το 2020 η παγκόσμια παραγωγή του ανήλθε στους 100000 τόνους. [44]

βιοαποικοδομησιμότητα, την θερμοπλαστική συμπεριφορά και την ικανότητα επεξεργασίες σε εύρος θερμοκρασιών που χρησιμοποιεί ο συμβατικός εξοπλισμός παραγωγής πλαστικών. Το σημείο τήξης του είναι στους 115 °C περίπου. [45] Ωστόσο, οι φυσικές ιδιότητες και ο βαθμός αποικοδόμησης του υλικού μπορούν να τροποποιηθούν ελέγχοντας τις συνθήκες της σύνθεσής του και το μοριακό του βάρος. Ακόμα, παράγονται πολλά είδη συμπολυμερών με τη συμμετοχή του πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα με τις μηχανικές ιδιότητες και τον βαθμό βιοαποικοδόμησης του τελικού προϊόντος να καθορίζονται από την αναλογία των διαφόρων ειδών πολυμερών που χρησιμοποιούνται. [45] Παρόλα αυτά υπάρχουν και ορισμένα χαρακτηριστικά του πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα που τον καθιστούν ακατάλληλο για ορισμένες εφαρμογές. Αυτά είναι η μικρή θερμική σταθερότητα, η υψηλή ευφλεκτότητα και οι σχετικά κακές μηχανικές του ιδιότητες. [44]

Οι κύριες εφαρμογές του πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα σχετίζονται με τα προϊόντα συμπολυμερισμού του με άλλα υλικά. Έτσι, χρησιμοποιείται σε πολλούς τομείς, όπως η συσκευασία προϊόντων, η αγροτική βιομηχανία, το ψάρεμα και οι ηλεκτρονικές συσκευές. Για παράδειγμα, τόσο ο πολύ-ηλεκτρικός βουτυλεστέρας όσο και τα συμπολυμερή του με την πολυκαπρολακτόνη πέραν των κλασικών εφαρμογών στην παραγωγή φιλμ και στη συσκευασία, εμφανίζονται και σε αρκετά εξειδικευμένες εφαρμογές, όπως σε συστήματα ενκαυλίωσης φαρμάκων, στην ορθοπεδική, σε αφρούς και στις κάψουλες του καφέ. [45] Ακόμα, ύστερα από διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια, έχει αρχίσει η αύξηση της χρήσης του στη βιομηχανία τροφίμων. Μία συσκευασία τροφίμων πρέπει να παραμένει σταθερή και ταυτόχρονα να προσφέρει προστασία του τρόφιμου από τις συνθήκες του περιβάλλοντος διατηρώντας την ποιότητά του και μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο πολύ-ηλεκτρικός βουτυλεστέρας πληροί αυτές τις προδιαγραφές. [44], [46]

Ο πολύ-ηλεκτρικός βουτυλεστέρας είναι ένα βιοαποικοδομήσιμο υλικό. Ωστόσο ο ρυθμός αποικοδόμησης εξαρτάται από διάφορες ιδιότητες του πολυμερούς, όπως είναι το μοριακό βάρος, ο βαθμός κρυσταλλικότητας και η χημική δομή. Όσον αφορά τη χημική δομή, αναφέρεται ότι ο εστερικός δεσμός των συγκεκριμένων πολυμερών, που είναι ο πιο επιρρεπής σε μικροβιακή «επίθεση» είναι ο κυριότερος παράγοντας που καθορίζει την βιοαποικοδομησιμότητα. Ένας ακόμα τρόπος βιολογικής αποικοδόμησης που μπορεί να εφαρμοσθεί στην περίπτωση του πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα είναι η κομποστοποίηση, όπου σε αυτήν την περίπτωση ο βαθμός αποσύνθεσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος και το σχήμα του πολυμερούς. [45], [47] Κομποστοποίηση είναι μία διεργασία που πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς που συναντώνται στο περιβάλλον και οδηγεί στη μετατροπή διαφόρων οργανικών απορριμμάτων σε μία ουσία πλούσια σε θρεπτικά συστατικά που ονομάζεται κομπόστ και που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα σε φυτά και ως εδαφοβελτιωτικό. Ορισμένα παραδείγματα μικροοργανισμών με την ικανότητα να βιοαποικοδομούν τον πολύ-ηλεκτρικό βουτυλεστέρα είναι: *Cryptococcus sp.*, *Aspergillus fumigatus* και *Candida rugosa*. [47], [48]

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται ορισμένα σημαντικά αποτελέσματα που έχουν προκύψει σχετικά με την ενζυμική αποικοδόμηση του πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα.

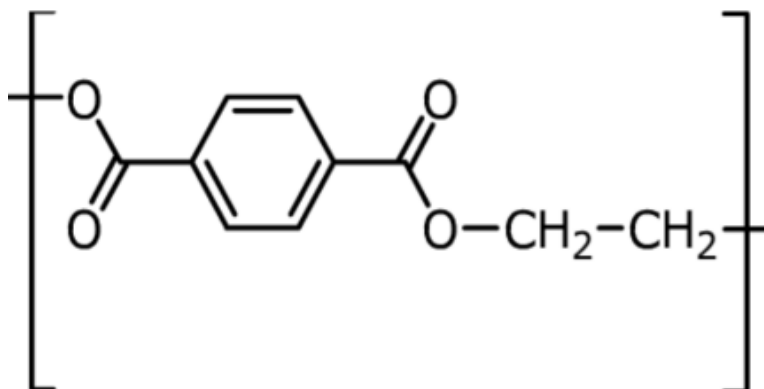
Πίνακας 6. Ένζυμα που αποικοδομούν τον πολύ-ηλεκτρικό βουτυλεστέρα, οι συνθήκες αντίδρασης και τα αποτελέσματά τους.

Μορφή πολυμερούς	Ένζυμο	Συνθήκες αντίδρασης	Αποτέλεσμα
Φιλμ 30x10x0,1 (mm) [49]	Κουτινάση από τον <i>Fusarium solani</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl Θερμοκρασία: 40 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 20 µg/mL Χρόνος: 6 ώρες	≈ 100% απώλεια μάζας
Φιλμ 3x1 (cm) PBS-a PBS-b PBS-c PBS-d * [50]	Κουτινάση	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 37 °C pH: 7,4 Ένζυμο: 0,15 mg/mL Όγκος αντίδρασης: 10 mL Χρόνος: 48 ώρες	Απώλεια μάζας: PBS-a: ≈ 100% PBS-b: ≈ 80% PBS-c: ≈ 70% PBS-d: ≈ 95%
Φιλμ 0,5x1 (cm) [51]	Κουτινάση 1 από τον <i>Thermobifida cellulolytica</i> (έχει υποστεί μετάλλαξη)	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 65 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 5µM Όγκος αντίδρασης: 1 mL Χρόνος: 96 ώρες	≈ 90% απώλεια μάζας
Φιλμ 30x10x0,1 (mm) [52]	Αποπολυμεράση από τον <i>Fusarium sp. FS1301</i>	Υγρή καλλιέργεια σε διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 30 °C Όγκος υγρής καλλιέργειας: 100 mL Χρόνος: 25 ημέρες	≈ 80% απώλεια μάζας
Φιλμ 0,5x1 (cm) [51]	Κουτινάση 1 από τον <i>Thermobifida cellulolytica</i> (πρωτεΐνη χωρίς μεταλλάξεις)	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 65 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 5µM Όγκος αντίδρασης: 1 mL Χρόνος: 96 ώρες	≈ 40% απώλεια μάζας
Φιλμ πάχους 0,1 mm [53]	Λιπάση PS από τον <i>Pseudomonas sp.</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 37 °C pH: 7,0 Ένζυμο: 5 Units/mg _{πολυμερούς} Χρόνος: 240 ώρες Μάζα φιλμ: 30 mg	≈ 15% απώλεια μάζας
Φιλμ πάχους 61,1 nm [54]	Λιπάση από τον <i>Rhizopus oryzae</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα ακετικών Θερμοκρασία: 40 °C pH: 5,0 Ένζυμο: 100 µg/mL Χρόνος: 4 ώρες	Απώλεια μάζας ανά μονάδα επιφάνειας ≈ 7 µg/cm ²

* Η διαφορά των τεσσάρων φιλμ είναι ότι χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός καταλύτης κατά τη σύνθεσή τους.

1.2.9.6. Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET)

Το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο είναι ένα μη βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές που δύσκολα αποσυντίθεται αλλά εμφανίζει τεράστια βιομηχανική σημασία. Συγκεκριμένα, η μεγάλη ζήτηση των προϊόντων του τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου και κυρίως αυτών που σχετίζονται με τη συσκευασία, οδήγησε στην παραγωγή 18,8 εκατομμυρίων τόνων του πλαστικού το 2018, ενώ η συνολική παραγωγή όλων των πλαστικών ανερχόταν στους 269 εκατομμύρια τόνους. Από τη συνολική παραγωγή του PET μόνο το 28,4% ανακυκλώνεται προς παραγωγή φιλμ, φύλλων και μπουκαλιών, ενώ όλο το υπόλοιπο απορρίπτεται στο περιβάλλον. [55]



Εικόνα 14. Δομική μονάδα του τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου. [56]

Το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο συντίθεται με πολυσυμπύκνωση του τερεφθαλικού οξέος (TPA) και της αιθυλενογλυκόλης (EG) που προέρχονται από το αργό πετρέλαιο. Τα δύο μονομερή που συνθέτουν το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο συνδέονται μεταξύ τους με εστερικούς δεσμούς. Σε κάποιες περιπτώσεις για την παραγωγή του PET, αντί του τερεφθαλικού οξέος, χρησιμοποιείται το δι(2-υδροξυλο-αιθυλο) τερεφθαλικό οξύ (BHET). [55]

Το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο είναι ένας υψηλού μοριακού βάρους πολυεστέρας. Είναι υλικό ημικρυσταλλικό και για τον λόγο αυτό περιλαμβάνει τόσο άμορφες όσο και κρυσταλλικές περιοχές. Συνήθως, όσον αφορά την κρυσταλλικότητα τα προϊόντα του PET μπορούν να χαρακτηριστούν ως υλικά χαμηλής κρυσταλλικότητας αν ο βαθμός κρυσταλλικότητάς τους είναι έως 7% και υλικά υψηλής κρυσταλλικότητας αν ο βαθμός κρυσταλλικότητάς τους είναι μεταξύ 30-35%. Γενικά, όσο αυξάνεται η κρυσταλλικότητα του υλικού τόσο αυξάνεται και η ακαμπτότητα των δεσμών στο μόριο του πολυμερούς. Το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο έχει θερμοκρασία τήξης μεταξύ 240-250 °C και θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης μεταξύ 75-80 °C. Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης είναι αυτή στην οποία αυξάνεται η κινητικότητα του μορίου και οι δεσμοί μπορούν να προσεγγιστούν πιο εύκολα. Ακόμα, το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο είναι ανθεκτικό σε διάφορους παράγοντες, όπως οι οργανικοί διαλύτες, η οξείδωση και η ιονιζόμενη ακτινοβολία καθιστώντας το υλικό επιθυμητό για μία σωρεία εφαρμογών. Άλλες ιδιότητες του PET είναι η ανθεκτικότητα και η θερμική σταθερότητά του. Τέλος είναι ένα υλικό άχρωμο, υγροσκοπικό με πολύ καλά μηχανικά χαρακτηριστικά, όπως ανθεκτικότητα στη φθορά και στο σχίσιμο και υψηλή εφελκυστική τάση. Ωστόσο, όλες αυτές οι ιδιότητες που συμβάλλουν στην υψηλή του αντοχή σε διάφορες συνθήκες, σχετίζονται και με την ανικανότητα βιοαποικοδόμησης

του συγκεκριμένου υλικού, οδηγώντας σε σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα από τη συσσώρευση των αποβλήτων του. [55]

Αναφορικά με τις εφαρμογές του τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου, αυτές σχετίζονται κυρίως με την συσκευασία προϊόντων, όπως σε πλαστικά μπουκάλια νερού και αναψυκτικών, σε βαζάκια φαγητού και σε διάφορα φιλμ. [55] Ωστόσο, οι μεγάλες δυνατότητες που προσφέρει το συγκεκριμένο υλικό, έχουν επεκτείνει τη χρήση του σε πολλούς τομείς και σε αρκετά εξειδικευμένες εφαρμογές που αφορούν για παράδειγμα την καρδιολογία [57] και την παιδική ογκολογία [58].

Καθότι το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο δεν βιοαποικοδομείται και ένα μόνο μικρό μέρος του ανακυκλώνεται, τα απορρίμματά του διαχέονται στο περιβάλλον προκαλώντας σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα. Οι μεγαλύτερες ποσότητες των απορριμμάτων του PET οδηγούνται στις χωματερές ή για αποτέφρωση. Ωστόσο όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω (1.2.6. Διαχείριση πλαστικών απορριμμάτων) οι τρόποι αυτοί διαχείρισης εμφανίζουν πολλά προβλήματα και για τον λόγο αυτό γίνονται προσπάθειες αντικατάστασής τους. [55]

Το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο, εφόσον διαθέτει εστερικό δεσμό, θα μπορούσε θεωρητικά να αποσυντίθεται στη φύση από μικροοργανισμούς που έχουν την ικανότητα να υδρολύουν αυτό το είδος δεσμών. Ωστόσο, οι ρυθμοί βιοαποικοδόμησης του PET στο περιβάλλον είναι εξαιρετικά αργοί. Τα προϊόντα υδρόλυσης του PET είναι τα μονομερή του, δηλαδή το τερεφθαλικό οξύ και η αιθυλενογλυκόλη. Ωστόσο, πολλές φορές προκύπτουν προϊόντα μερικής υδρόλυσης, όπως το μόνο(2-υδροξυλο-αιθυλο) τερεφθαλικό οξύ (MHET) και το δι(2-υδροξυλο-αιθυλο) τερεφθαλικό οξύ (BHET). Τα προϊόντα αυτά μπορούν στη συνέχεια να υδρολυθούν περαιτέρω και να αποδώσουν τερεφθαλικό οξύ και αιθυλενογλυκόλη. Τα δύο αυτά μονομερή μπορούν, τελικά, να χρησιμοποιηθούν από διάφορους μικροοργανισμούς και να μεταβολιστούν περαιτέρω στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος. Οι περισσότερες μελέτες που σχετίζονται με την βιοαποικοδόμηση του τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου αφορούν ένα gram αρνητικό αναερόβιο βακτήριο, το *Ideonella sakaiensis*. [59], [60]

Όσον αφορά την ενζυμική αποικοδόμηση του τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου, αυτή απασχολεί σε τεράστιο βαθμό την επιστημονική κοινότητα ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, με αποτέλεσμα να έχουν ανακαλυφθεί έως τώρα πάνω από 24 ένζυμα με την ικανότητα να αποσυνθέτουν το PET. Όλα αυτά τα ένζυμα είναι υδρολάσες που στοχεύουν στον εστερικό δεσμό και οδηγούν στην παραγωγή TPA, EG, MHET και BHET. Οι υδρολάσες αυτές μπορούν να χαρακτηριστούν περαιτέρω ως λιπάσες, εστεράσες και κουτινάσες. [61] Από αυτές τις κατηγορίες των υδρολασών, οι λιπάσες έχουν την χαμηλότερη αποτελεσματικότητα στην αποικοδόμηση του PET, επειδή το ενεργό τους κέντρο χαρακτηρίζεται από «καπακωτές» δομές και έτσι εμποδίζεται η επαφή του με το υπόστρωμα. Οι κουτινάσες δρουν συνήθως ισχυρά στα προϊόντα του PET, καθώς διαθέτουν μεγάλες θήκες για το υπόστρωμα, χωρίς να εμφανίζουν «καπακωτές» δομές, στοιχεία που είναι ευνοϊκά για την επαφή του ενεργού τους κέντρου με το PET. Βέβαια, οι κουτινάσες αποικοδομούν το PET συνήθως σε υψηλότερες θερμοκρασίες (50-70 °C), ενώ οι εστεράσες το υδρολύουν πιο αποτελεσματικά σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (περίπου 30 °C). [60] Η ενζυμική αποικοδόμηση του PET επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την θερμοκρασία υαλώδους

μετάπτωσης του υλικού, η οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω έχει σχετικά υψηλή τιμή. Το να προσεγγίσει το υλικό τη συγκεκριμένη θερμοκρασία είναι σημαντικό, καθώς κάνει τη δομή του πιο εύκολα προσβάσιμη από τα ένζυμα. Ωστόσο, η πρόκληση που επιφέρει αυτό το δεδομένο είναι να μπορούν τα ένζυμα να δράσουν σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες. [61] Υπό αυτό το πρίσμα συμβάλλει σημαντικά και ο τομέας της μηχανικής των ενζύμων και έτσι πραγματοποιούνται προσπάθειες βελτίωσης των ενζύμων που αποικοδομούν το PET. Οι προσπάθειες αυτές εστιάζουν για παράδειγμα στην αύξηση της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων, στην αύξηση του σημείου τήξης τους, στην αύξηση της αποτελεσματικότητάς τους και στις αλλαγές στις θέσεις πρόσδεσης ενζύμου-υποστρώματος για πιο αποτελεσματική σύνδεση. Για παράδειγμα, η προσθήκη δισθενών ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου, ο σχηματισμός δισουλφιδικής γέφυρας ή γέφυρας αλάτων και η γλυκοζυλίωση έχει βρεθεί ότι συμβάλλει σημαντικά στη σταθερότητα των ενζύμων. Τέλος, τα ένζυμα που αποικοδομούν το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο μπορεί να προέρχονται από διάφορους μικροοργανισμούς. [61], [60] Για παράδειγμα η κουτινάση HiC είναι μια θερμοσταθερή κουτινάση με εξαιρετική δράση στο PET και προέρχεται από τον μύκητα *Humicola insolens*, ενώ δύο σημαντικές εστεράσες για την αποσύνθεση του PET, η IsPETase και η IsMHETase προέρχονται από το βακτήριο *Ideonella sakaiensis 201-F6*. [60]

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα κύρια ένζυμα που αποικοδομούν το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο, ο οργανισμός από τον οποίο προέρχονται, τα επιβεβαιωμένα υποστρώματά τους και τα κυριότερα προϊόντα υδρόλυσης.

Enzyme	Organism	UniProt Code	Preferred Substrates	Major Products	Number of Disulfide Bonds
IsPETase	<i>Ideonella sakaiensis</i>	A0A0K8P6T7	●	▲	2
IsMHETase	<i>Ideonella sakaiensis</i>	A0A0K8P8E7	▲	■ ◆	5
PaPETase	<i>Pseudomonas aestusnigri</i>	A0A0K8P6T7	● ▲	▲	2
LCC	unknown	G9BY57	●	▲ ■	1
ThCut	<i>Thermomonospora fusca</i>	Q6A0I4	●	■	1
SvCut190	<i>Saccharomonospora viridis</i>	W0TJ6	●	▲ ■ ▲	1
TfCut2	<i>Thermobifida fusca</i>	E5BBQ3	●	▲ ■	1
TcCut2	<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	E5BBQ3	●	▲ ■	1
TcCut1	<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	E9LVH8	●	▲ ■	1
FoCut5a	<i>Fusarium oxysporum</i>	X0BTD8	●	▲ ■	1
HiCut	<i>Humicola insolens</i>	A0A075B5G4	●	▲ ■ ▲	1
FsCut	<i>Thermomonospora fusca</i>	Q6A0I4	●	▲ ■ ▲	1
CaLipB	<i>Candida antarctica</i>	P41365	●	■ ▲	3
TaEst1	<i>Thermobifida alba</i>	D4Q9N1	●	■	
TlLip	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	M4TP71	●	▲ ■ ▲	3
TfCa	<i>Thermobifida fusca</i>	P86325	●	▲	1
EsEstB	<i>Enterobacter</i> sp. HY1	A0A4Y5UXE5	●	▲ ■ ▲	
BhrPETase	HR29	A0A2H5Z9R5	●	▲ ■ ▲	1
BsEstB	<i>Bacillus subtilis</i>	A5HLW9	●	▲ ■	
ScSub1	<i>Streptomyces scabies</i>		●	■	2
PmCut	<i>Pseudomonas mendocina</i>	A4Y035	●		
TcCut0390	<i>Thermomonospora curvata</i>	D1A2H1	●		
TcCut1278	<i>Thermomonospora curvata</i>	D1A9G5	●		
ThEst	<i>Thermobifida alba</i>	H6WX58	●	▲ ■	

● PET ▲ MHET ■ TPA ▲ BHET ◆ EG

Εικόνα 15. Κύρια ένζυμα που αποικοδομούν το PET και βασικές πληροφορίες για αυτά. [61]

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται ορισμένα σημαντικά αποτελέσματα που έχουν προκύψει σχετικά με την ενζυμική αποικοδόμηση του τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου.

Πίνακας 7. Ένζυμα που αποικοδομούν το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο, οι συνθήκες αντίδρασης και τα αποτελέσματά τους.

Μορφή πολυμερούς	Ένζυμο	Συνθήκες αντίδρασης	Αποτέλεσμα
Φίλμ 15 (mm) x 15 (mm) x 250 (μm) (κρυσταλλικότητας 7%) [62]	HiC (κουτινάση) από τον <i>Humicola insolens</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl Θερμοκρασία: 70 °C pH: 7,5 Ένζυμο: 10 nmol/mL Χρόνος: 96 ώρες Μάζα πολυμερούς: 80 mg	97% απώλεια μάζας
Φίλμ 1x1 (cm) (άμορφο PET) [63]	LCC ανασυνδυασμένη σε <i>E. coli</i> (μη γλυκοζυλιωμένη)	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα HEPES Θερμοκρασία: 70 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 1 μM Χρόνος: 48 ώρες Όγκος αντίδρασης: 3 mL	≈ 95% απώλεια μάζας

Φιλμ 1x1 (cm) (άμορφο PET) [63]	LCC ανασυνδρασμένη σε <i>P. pastoris</i> (γλυκοζυλιωμένη)	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα HEPES Θερμοκρασία: 70 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 1 μM Χρόνος: 48 ώρες Όγκος αντίδρασης: 3 mL	≈ 95% απώλεια μάζας
Θραύσμα από: 1) συσκευασία Agripak της Groupe Guillin (AP-PET) 2) συσκευασία Carton Pack Srl της Rutigliano (CP-PET) 3) Άμορφο φιλμ (GF-PET) [64]	TfCut2 (κουτινάση) από τον <i>Thermobifida fusca</i>	Θερμοκρασία: 70 °C Ένζυμο: 1 nmol/cm ² Χρόνος: 168 ώρες	Απώλεια μάζας: 1) AP-PET: ≈ 50% 2) CP-PET: ≈ 55% 3) GF-PET: ≈ 97%
Φιλμ διαμέτρου 12 mm 1) PET-B (από μπουκάλι αναψυκτικού) 2) PET-G (από πέλλετ) [65]	Υδρολάση TfH από τον <i>Thermobifida fusca</i> DSM43793 ανασυνδρασμένη σε <i>E.coli</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 55 °C pH: 7,0 Ένζυμο: 0,5 mg Όγκος αντίδρασης: 5mL Χρόνος: 21 ημέρες Μάζα πολυμερούς: 20-25 mg	Απώλεια μάζας: 1) PET-B: 50% 2) PET-G: 50%
Φιλμ διαμέτρου 12 mm 1) PET-B (από μπουκάλι αναψυκτικού) 2) PET-G (από πέλλετ) [65]	Υδρολάση TfH από τον <i>Thermobifida fusca</i> DSM43793 ανασυνδρασμένη σε <i>E.coli</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Θερμοκρασία: 55 °C pH: 7,0 Ένζυμο: 0,5 mg Όγκος αντίδρασης: 5mL Χρόνος: 21 ημέρες Μάζα πολυμερούς: 20-25 mg	Απώλεια μάζας: 1) PET-B: 43,1% 2) PET-G: 54,2%
Φιλμ 3x0,5 (cm) (άμορφο PET) [66]	G62A/I213S (κουτινάση) που έχει προκύψει με πολλαπλές μεταλλάξεις της TfCut2 του <i>Thermobifida fusca</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris- HCl Θερμοκρασία: 65 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 50 μg Όγκος αντίδρασης: 1,8 mL Χρόνος: 50 ώρες Μάζα πολυμερούς: 45 mg	Απώλεια μάζας 42,9%
Φιλμ 3x0,5 (cm) (άμορφο PET) [66]	G62A (κουτινάση) που έχει προκύψει από μετάλλαξη ενός σημείου της TfCut2 του <i>Thermobifida fusca</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris- HCl Θερμοκρασία: 65 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 50 μg Όγκος αντίδρασης: 1,8 mL Χρόνος: 50 ώρες	Απώλεια μάζας 42,6%

		Μάζα πολυμερούς: 45 mg	
Φιλμ 3x0,5 (cm) (άμορφο PET) [66]	G62A/I178V (κουτινάση) που έχει προκύψει από μετάλλαξη διπλού σημείου της TfCut2 του <i>Thermobifida fusca</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris- HCl Θερμοκρασία: 65 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 50 µg Όγκος αντίδρασης: 1,8 mL Χρόνος: 50 ώρες Μάζα πολυμερούς: 45 mg	Απώλεια μάζας 42,3%
Φιλμ 3x0,5 (cm) (άμορφο PET) [66]	G62A/I178V/I213S (κουτινάση) που έχει προκύψει από μετάλλαξη τριπλού σημείου της TfCut2 του <i>Thermobifida fusca</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris- HCl Θερμοκρασία: 65 °C pH: 8,0 Ένζυμο: 50 µg Όγκος αντίδρασης: 1,8 mL Χρόνος: 50 ώρες Μάζα πολυμερούς: 45 mg	Απώλεια μάζας 41,7%
Φιλμ 15 (mm) x 15 (mm) x 250 (µm) (κρυσταλλικότητας 7%) [62]	PmS (κουτινάση) από τον <i>Pseudomonas mendocina</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris- HCl Θερμοκρασία: 50 °C pH: 7,5 Ένζυμο: 10 nmol/mL Χρόνος: 96 ώρες Μάζα πολυμερούς: 80 mg	≈10% απώλεια μάζας
Φιλμ 15 (mm) x 15 (mm) x 250 (µm) (κρυσταλλικότητας 7%) [62]	FcS (κουτινάση) από τον <i>Fusarium solani</i>	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris- HCl Θερμοκρασία: 40 °C pH: 7,5 Ένζυμο: 10 nmol/mL Χρόνος: 96 ώρες Μάζα πολυμερούς: 80 mg	≈10% απώλεια μάζας
Φιλμ 5x5x0,6 (mm) (άμορφο PET) [67]	LCC (κουτινάση)	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris- HCl Θερμοκρασία: 50-70 °C pH: 8,0 Χρόνος: 24 ώρες Μάζα πολυμερούς: 20-25 mg	Απώλεια μάζας: ≈ 0,5 mg (50 °C) ≈ 2 mg (60 °C) ≈ 5,5 mg (70 °C)
Προσχηματισμένα κομμάτια από μπουκάλι της Coca Cola (άμορφο PET) [68]	IsPETase W159H/F229Y από τον <i>Ideonella sakaiensis</i> (μετάλλαξη διπλού σημείου στο κανονικό στέλεχος του ενζύμου)	Διαλύτης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris Θερμοκρασία: 40 °C pH: 9,5 Ένζυμο: 15 µL (αρχική συγκέντρωση 14 mg/mL) Όγκος αντίδρασης: 215 µL Χρόνος: 72 ώρες Μάζα πολυμερούς: 10,8 mg	Απώλεια μάζας 1,8 mg

1.3. Ένζυμα

1.3.1. Εισαγωγικά στοιχεία για τα ένζυμα

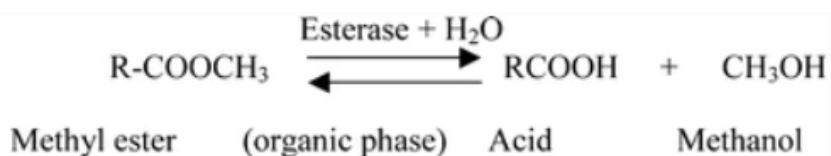
Τα ένζυμα είναι μόρια τα οποία δρουν ως βιοκαταλύτες, μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης των αντιδράσεων. Είναι κυρίως πρωτεΐνες, ενώ έχουν ανακαλυφθεί και κάποια μόρια RNA (ριβονουκλεϊκά οξέα) με καταλυτική δράση. Τα ένζυμα είναι πολύ σημαντικά για τη διατήρηση της ζωής και παίρνουν μέρος σε πολλές κρίσιμες λειτουργίες των ζωντανών οργανισμών, όπως στον μεταβολισμό και στη μετατροπή της ενέργειας. Όσον αφορά τη δομή των ενζύμων, άλλα έχουν απλή δομή, όπως μία διπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα, ενώ άλλα έχουν πιο σύνθετες δομές και μπορεί να αποτελούνται από περισσότερες από μία υπομονάδες. Οι επιπλέον υπομονάδες συμβάλλουν στο να είναι το ένζυμο ενεργό και μπορεί να είναι κάποιος απλός ανόργανος συμπάραγοντας ή κάποιο σύνθετο μόριο, γνωστό ως συνένζυμο. Γενικά, τα ένζυμα έχουν αυστηρή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα στο οποίο δρουν και η ταξινόμησή τους πραγματοποιείται με βάση την αντίδραση που καταλύουν. Στον Πίνακα 8 παρουσιάζεται η παγκόσμια ταξινόμηση των ενζύμων. [69], [70]

Πίνακας 8. Ταξινόμηση των ενζύμων. [69], [70]

Κατηγορίες ενζύμων	Χαρακτηριστικά
Οξειδοαναγωγάσες ή οξειδοοικοδομικές	Καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις
Τρανσφεράσες	Καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς ενεργών ομάδων
Υδρολάσες	Καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση δεσμών
Λυάσες	Καταλύουν την απόσπαση ομάδων, χωρίς υδρόλυση, αλλά με τον σχηματισμό διπλών δεσμών
Ισομεράσες	Καταλύουν αντιδράσεις ισομερισμού
Λιγάσες	Καταλύουν το σχηματισμό δεσμών με διάσπαση του μορίου ATP

1.3.1.1. Εστεράσες

Οι εστεράσες είναι ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των υδρολασών και έχουν την ικανότητα να καταλύουν τον σχηματισμό και τη διάσπαση των εστερικών δεσμών. Όταν βρίσκονται σε οργανική φάση, ευνοείται ο σχηματισμός εστερικού δεσμού, ενώ σε υδατική φάση ευνοείται η διάσπασή του. Είναι ένζυμα με πολύ καλή σταθερότητα, χημειοεκλεκτικότητα, τοποεκλεκτικότητα και στερεοεκλεκτικότητα και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται σε πολλές εφαρμογές. Οι εστεράσες δρουν κυρίως σε εστέρες διαλυτούς στο νερό και οδηγούν στην απελευθέρωση μορίων με μικρές αλυσίδες (συνήθως μικρότερες από 8 άτομα άνθρακα). [71], [72]



Εικόνα 16. Δράση εστερασών. [71]

Καθότι, οι εστεράσες εμφανίζουν αυξημένο ενδιαφέρον, γίνονται σημαντικές μελέτες σχετικά με την ετερόλογη έκφρασή τους, την απομόνωσή τους και τη βιοτεχνολογική τους μελέτη. Το γεγονός αυτό ενισχύεται και από την πληθώρα των τομέων στους οποίους βρίσκουν εφαρμογή τα συγκεκριμένα ένζυμα. Ορισμένοι από αυτούς τους τομείς είναι στη βιομηχανία τροφίμων, στη βιομηχανία φαρμάκων, στις αγροτικές καλλιέργειες και στη χημική βιομηχανία. [71], [72]

Για παράδειγμα, ουσίες που συναντώνται συχνά στην βιομηχανία τροφίμων είναι το σιναπικό οξύ, το φερούλικό οξύ και το καφεϊκό οξύ. Οι εστέρες αυτών των οξέων συναντώνται σε δημητριακά και στη βιοπούλπα. Έτσι, οι εστεράσες μπορούν να δράσουν σε κόκκους ρυζιού, μπαμπού και σακχαρότευτλα, οδηγώντας στην απελευθέρωση των ενώσεων που αναφέρθηκαν. [73] Στη φαρμακευτική βιομηχανία, συναντώνται εστέρες σε πολλά φαρμακευτικά σκευάσματα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα χρήσης εστερασών στη φαρμακευτική βιομηχανία είναι κατά την παραγωγή εμπορικά διαθέσιμων αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, όπως η ιβουπροφαίνη. [74] Στην αγροτική βιομηχανία, οι εστεράσες χρησιμοποιούνται κατά βάση για την αποικοδόμηση τοξικών μορίων, όπως διαφόρων οργανοφωσφορικών ενώσεων. [75] Τέλος, αναφορικά με τη χημική βιομηχανία, οι εστεράσες βρίσκουν εφαρμογή σε βιομηχανίες χαρτιού, δέρματος και υφασμάτων. Στη βιομηχανία χαρτιού, για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται για την αποικοδόμηση ουσιών που αλλοιώνουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος και προκαλούν προβλήματα στην παραγωγική διαδικασία. [76]

1.3.1.2. Λιπάσες

Οι λιπάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των υδρολασών. Παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των λιπαρών και η φυσική τους ιδιότητα είναι το σπάσιμο μεγάλων αλυσίδων τριγλυκεριδίων. Οι λιπάσες είναι υδατοδιαλυτά ένζυμα, ενώ τα φυσικά τους υποστρώματα δε διαλύονται στο νερό και έτσι η αντίδραση μεταξύ ενζύμου-υποστρώματος συνήθως πραγματοποιείται στη διεπιφάνεια υδατικής και λιπαρής φάσης. Η δράση των λιπασών οδηγεί στην απελευθέρωση λιπαρών οξέων με μεγάλες αλυσίδες (συνήθως μεγαλύτερες από 8 άτομα άνθρακα). [72], [77] Οι λιπάσες ως υποκατηγορία των εστερασών βρίσκουν εφαρμογή στους τομείς που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, αλλά και στην παραγωγή βιοντίζελ και καινοτόμων βιοπολυμερικών υλικών. [78]

1.3.1.3. Κουτινάσες

Οι κουτινάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των υδρολασών. Αρχικά, ανακαλύφθηκαν σε φυτοπαθογόνους μύκητες που είχαν την ικανότητα να αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα την κουτίνη. Η κουτίνη είναι το φυσικό υπόστρωμα των κουτινισών και αποτελεί ένα σύνθετο βιοπολυμερές (πολυεστέρα) που αποτελείται κυρίως από εποξειδία και υδροξυ-λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα της κουτίνης αποτελούνται συνήθως από 16 ή 18 άτομα άνθρακα. Στη φύση, η κουτίνη συναντάται στις εξωτερικές στοιβάδες των ανώτερων φυτών που καλύπτουν τα φύλλα, τους καρπούς, τα άνθη και τα μη ξυλώδη μέρη των βλαστών. Οι κουτινάσες έχουν τη χαρακτηριστική ιδιότητα να μπορούν να είναι ενεργές ακόμα και στη διεπιφάνεια νερού-ελαίου, ενώ εμφανίζουν και υψηλή σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες και ιοντικά υγρά. Έτσι, τα ένζυμα αυτά εκτός από τη διάσπαση των εστερικών

δεσμών, καταλύουν και αντιδράσεις υδρόλυσης, αντιδράσεις σχηματισμού εστερικού δεσμού, αντιδράσεις μετεστεροποίησης και αντιδράσεις αμινόλυσης. Οι κουτινάσες προέρχονται κυρίως από μύκητες, αλλά έχουν ανακαλυφθεί και σε βακτηριακά στελέχη. Τα ένζυμα αυτά βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς τομείς, όπως στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, εξειδικευμένων χημικών και παρασιτοκτόνων. [79], [80]

1.3.2. Ετερόλογη έκφραση ενζύμων

Η ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών είναι μία διαδικασία κατά την οποία εισάγεται σε έναν οργανισμό-δέκτη η γενετική πληροφορία για την έκφραση μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, η οποία συνήθως δεν απαντάται φυσικά στον συγκεκριμένο οργανισμό. Η διεργασία αυτή οδηγεί στην παραγωγή γενετικά τροποποιημένων οργανισμών στους οποίους παράγεται μία ξένη πρωτεΐνη. Στη συνέχεια, η διεργασία οδηγείται σε βελτιστοποίηση προκειμένου να παράγονται πιο αποδοτικά και οικονομικά, όσο το δυνατόν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της επιθυμητής πρωτεΐνης. [69]

Η ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών είναι μία πολύ χρήσιμη διεργασία αλλά προκειμένου να πραγματοποιηθεί σωστά και να δώσει τα βέλτιστα αποτελέσματα πρέπει να δοθεί προσοχή σε διάφορες παραμέτρους. Η γενετική μηχανική είναι ένας τομέας που συμβάλλει ιδιαίτερα στην ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών και διαθέτει ένα σύνολο εργαλείων που βοηθούν στη διεκπεραίωση της επιθυμητής διεργασίας. [69]

Με τη βοήθεια, λοιπόν, της γενετικής μηχανικής, καθορίζονται τα βήματα και οι ενέργειες που οδηγούν στην τελική έκφραση των πρωτεϊνών. Το πρώτο από αυτά τα βήματα είναι η λήψη του επιθυμητού γονιδίου που εκφράζει την πρωτεΐνη. Η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες τεχνικές, όπως είναι η κλωνοποίηση τυφλής στόχευσης (παραλαβή του DNA του οργανισμού στον οποίο εμφανίζεται το γονίδιο της πρωτεΐνης, στη συνέχεια τεμαχισμός όλου του DNA του και απομόνωση του γονιδίου-στόχου με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων), η υβριδίαση (γίνεται χρήση χημικών ανιχνευτών που συνδέονται με τμήματα του γονιδίου-στόχου) και η εξολοκλήρου χημική σύνθεση του επιθυμητού γονιδίου. Αφού γίνει η απομόνωση του γονιδίου-στόχου, αυτό εισάγεται σε ένα μόριο-φορέα, που συνήθως είναι ένα πλασμίδιο, και πάλι με τη συμβολή των περιοριστικών ενζύμων. Έτσι, το δεύτερο βήμα για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών είναι η εισαγωγή του μορίου-φορέα στο κύτταρο-δέκτη, στο οποίο θα γίνει η παραγωγή της πρωτεΐνης. Η εισαγωγή αυτή πραγματοποιείται με τεχνικές, όπως η επιβολή υψηλής θερμοκρασίας για μικρό χρονικό διάστημα, που οδηγεί στη διατάραξη του κυττάρου και στην είσοδο του πλασμιδίου ή η επιβολή υψηλού ηλεκτρικού δυναμικού ώστε να ανοίξουν οι πόροι της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα, και πάλι, να εισέλθει το πλασμίδιο εντός του κυττάρου. Το βήμα που ακολουθεί της εισόδου του πλασμιδίου στο κύτταρο, είναι η εύρεση μίας μεθόδου επιλογής που θα βοηθά να διαχωριστούν τα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί, δηλαδή έχουν λάβει το πλασμίδιο, από εκείνα που δεν έχουν μετασχηματιστεί. Αυτό συνήθως γίνεται με χρήση αντιβιοτικών επιλογής, καθώς έχει εισαχθεί στα πλασμίδια, εκτός από το γονίδιο της επιθυμητής πρωτεΐνης, και κάποιο γονίδιο αντίστασης σε αντιβιοτικό. Έτσι, με τη χρήση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού, τα κύτταρα που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο θα είναι ανθεκτικά παρουσία του αντιβιοτικού και θα αναπτύσσονται κανονικά, ενώ αυτά που δεν έχουν λάβει το πλασμίδιο δε θα αναπτύσσονται. Το τελευταίο βήμα αποτελεί ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου-δέκτη και η επακόλουθη έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Η

βελτιστοποίηση της έκφρασης αυτής εξαρτάται από μία πληθώρα παραγόντων και συνθηκών, με πολύ σημαντική παράμετρο τη σωστή επιλογή του οργανισμού που θα πραγματοποιηθεί η ετερόλογη έκφραση. [69]

1.3.2.1. Ετερόλογη έκφραση στον ξενιστή *Escherichia coli*

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.3.2. Ετερόλογη έκφραση ενζύμων, η επιλογή του κατάλληλου οργανισμού-ξενιστή για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών είναι καίρια για την επιτυχημένη έκβαση της διεργασίας. Ένας μικροοργανισμός που βρίσκεται εκτεταμένη χρήση σε αυτόν τον τομέα είναι το βακτήριο *Escherichia coli* και χρησιμοποιείται σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι gram αρνητικό και στη φύση συναντάται στη χλωρίδα του παχέος εντέρου του ανθρώπινου οργανισμού. Ωστόσο, αν μετασχηματιστεί, μπορεί να δώσει μεγάλες ποσότητες της επιθυμητής πρωτεΐνης δρώντας βέλτιστα υπό αερόβιες συνθήκες στους 37 °C. [81]

Οι λόγοι που καθιστούν τη χρήση του βακτηρίου αυτού τόσο συχνή είναι αρχικά η πληθώρα των γνώσεων που υπάρχουν για αυτό. Το *E.coli* μελετάται εδώ και πολλά χρόνια και οι γνώσεις που υπάρχουν για τη φυσιολογία και τη γενετική του, ξεπερνούν τις γνώσεις για οποιονδήποτε άλλο οργανισμό. Έτσι, το πλήθος αυτών των γνώσεων διευκολύνει τους περίπλοκους γενετικούς μηχανισμούς και οδηγεί σε γενικότερη απλοποίηση της διεργασίας. Ακόμα, βασικά πλεονεκτήματα που προσφέρει η χρήση του συγκεκριμένου οργανισμού είναι οι υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης και οι εξαιρετικά υψηλές παραγωγικότητες ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας. Τέλος, εξίσου σημαντικό με τα προηγούμενα είναι ότι το *E.coli* μπορεί να αναπτυχθεί σε απλά και οικονομικά θρεπτικά υλικά και έτσι αποτελεί μία οικονομική επιλογή. [69], [82]

Ωστόσο, πέραν των πλεονεκτημάτων που προσφέρει η χρήση του *E.coli* ως κύτταρο-ξενιστής, υπάρχουν και ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα που πολλές φορές είναι ανασταλτικά για τη χρήση του συγκεκριμένου βακτηρίου. Ένα από αυτά είναι για παράδειγμα, η αδυναμία του μικροοργανισμού να πραγματοποιήσει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις καθώς είναι προκαρυωτικός οργανισμός. Για τον λόγο αυτό, σε περιπτώσεις που οι τροποποιήσεις αυτές είναι απαραίτητες για τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, η χρήση του *E.coli* ως ξενιστής, απορρίπτεται. Ένα άλλο σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι στο *E.coli* οι πρωτεΐνες δεν εκκρίνονται. Οι πρωτεΐνες παράγονται ενδοκυτταρικά και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε συνέπειες, όπως η τάση του κυττάρου να ενεργοποιεί μηχανισμούς πρωτεολυτικής δράσης με αποτέλεσμα την αποδιάταξη των «ξένων» πρωτεϊνών και τη δημιουργία κυτταρικών εγκλείστων σε περιπτώσεις υψηλής παραγωγής της πρωτεΐνης. Στα εγκλείστα αυτά ενδέχεται εκτός από την επιθυμητή πρωτεΐνη να περιέχονται και άλλες ουσίες, αλλά το σημαντικότερο πρόβλημα είναι ότι συνήθως οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στα εγκλείστα έχουν λάθος αναδίπλωση που οδηγεί σε δυσκολίες κατά την παραλαβή τους. Ακόμα, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη παράγεται ενδοκυτταρικά κάνει απαραίτητη τη λύση των κυττάρων για την παραλαβή της και την προσεκτική απομόνωσή της, ώστε να απομακρυνθούν ανεπιθύμητα συστατικά που συνυπάρχουν με την επιθυμητή πρωτεΐνη στο κυτταρικό διάλυμα μετά το σπάσιμο των μεμβρανών των κυττάρων. Τέλος, ένας ακόμα περιορισμός στη χρήση του *E.coli* είναι ότι ενδέχεται να μην επιτραπεί ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών προκαλώντας αλλαγές στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης. [69], [82]

Παρόλα αυτά αξίζει να αναφερθεί ότι με κατάλληλους χειρισμούς υπάρχει η δυνατότητα να παρακαμφθούν αρκετά από τα εμπόδια που εμφανίζονται κατά την ετερόλογη έκφραση σε *E.coli*. Για παράδειγμα, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί έκκριση ή απέκκριση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Έκκριση καλείται η απελευθέρωσή της στον περιπλασμικό χώρο και απέκκριση η απελευθέρωσή της στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η έκκριση των πρωτεϊνών είναι η εν μέρει αποφυγή των πρωτεολυτικών παραγόντων που υπάρχουν στο εσωτερικό του κυττάρου και η εξασφάλιση σωστής αναδίπλωσης του μορίου και δημιουργίας δισουλφιδικών γεφυρών. Η απέκκριση προσφέρει ακόμα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα, καθώς οδηγεί στη δυνατότητα αποφυγής της λύσης των κυττάρων. [69], [82]

2. Πειραματικό μέρος

2.1. Υλικά

2.1.1. Όργανα και συσκευές

Κατά τη διάρκεια εκπόνησης των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν συνήθη εργαστηριακά όργανα, όπως: ογκομετρικοί κύλινδροι, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, μπουκάλια αποστείρωσης, σπαθίδες, γυάλινα ραβδιά, χωνιά, μαγνητικοί αναδευτήρες, δοχεία ζύγισης, σωλήνες Falcon (15 mL και 50 mL), σωλήνες Eppendorf (1,5 mL και 2 mL), σωλήνες Eppendorf με κλείδωμα ασφαλείας (1,5 mL), αυτόματες πιπέτες, πολυπιπέτα, tips αυτόματων πιπετών, πιπέτες Pasteur, τρυβλία Petri, σύριγγες και φίλτρα σύριγγας.

Ωστόσο, εκτός των βασικών εργαστηριακών οργάνων, έγινε χρήση και εξειδικευμένου εργαστηριακού εξοπλισμού, ο οποίος παρουσιάζεται παρακάτω:

- Αναλυτικός ζυγός ABS 120-4, Kern & Sohn GmbH
- Αναλυτικός ζυγός New Classic MS, METTLER TOLEDO
- Ανακινούμενος επωαστήρας ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co LTD
- Ανακινούμενος επωαστήρας για Eppendorfs Thermomixer Comfort, Eppendorf
- Αποστειρωμένος χώρος εργασίας UNIFLOW UV 1200
- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO
- Ζυγοί Mark 2060 και Mark 4065, BEL ENGINEERING
- Θερμαινόμενη πλάκα Model 692, nahita blue
- Στήλες φυγοκέντρησης Amicon Ultra-0.5 mL, Centrifugal filters, Ultracell-10K
- Στήλη υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης HPLC column S 5 ODS2, SPHERISORB
- Στήλη βαρύτητας, Biorad με ρητίνη TalonR ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου, Clontech
- Συσκευή απιονισμένου νερού
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης διαχωρισμού πρωτεϊνών Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad
- Συσκευή λυοφιλίωσης με θάλαμο κενού ALPHA 1-4, Braun Biotech International
- Συσκευή υπερήχων Vibra Cell Processor VC 400, Sonics and Materials
- Συσκευή υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Merck Milipore
- Συσκευή φωτομέτρησης microplate SPECTRA MAX 250, Molecular Devices
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας πηκτώματος Agilent 1260 INFINITY IILC, Agilent Technologies
- Πλάκα μαγνητικής ανάδευσης VELP SCIENTIFICA
- Υδατόλουτρο, ΚΟΝΙΔΑΡΗΣ
- Υπερκατάψυξη -86C FREEZER, forma scientific
- Φούρνος επώασης τρυβλίων WT binder 7200, TOTTLINGEN/Germany
- Φυγόκεντρος δοκιμαστικών σωλήνων Vortex Mixer LVM-202, LabTech
- Φυγόκεντρος Eppendorf zentrifuge 3200, EPPENDORF

- Φωτόμετρο S-20 Spectrophotometer, BOECO Germany
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Centrifuge 4239R, ALC INTERNATIONAL
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος 3K30, SIGMA
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος ROTANTA 460R, Hetlich ZENTRIFUGEN
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος J2-21 Centrifuge, BECKMAN
- pH-μετρο pH 537, WTW

2.1.2. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων είχαν προμηθευτεί από τις εταιρίες: SIGMA-ALDRICH, CARLO, ERBA REAGENTS, labkem, Duchera Biochemie, Applichem και fisher chemical.

2.1.2.1. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων προκειμένου να γίνει η παραγωγή των επιθυμητών ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη θρεπτικών μέσων ανάπτυξης. Τα υλικά από τα οποία αποτελούνταν και η σύστασή τους παρουσιάζονται στον πίνακα Πίνακας 9, Πίνακας 10 και Πίνακας 11. Τέλος, να αναφερθεί ότι σε όλα τα θρεπτικά μέσα χρησιμοποιήθηκε σαν διαλύτης απιονισμένο νερό, ενώ πριν τη χρήση τους πραγματοποιήθηκε αποστείρωση. Συγκεκριμένα, τα θρεπτικά μέσα LB και 2xYT αποστειρώθηκαν σε συνθήκες 121 °C, 20 min, ενώ το θρεπτικό υλικό TB σε συνθήκες 109 °C, 40 min, διότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες η γλυκερόλη διασπάται και τα προϊόντα που προκύπτουν είναι τοξικά για την ανάπτυξη των κυττάρων.

Πίνακας 9. Περιγραφή θρεπτικού μέσου LB.

Θρεπτικό μέσο LB	
Συστατικό	Σύσταση (%w/v)
NaCl	1
Τρυπτόνη	1
Εκχύλισμα ζύμης	0,5
Άγαρ*	1,5

*Το άγαρ προστίθεται μόνο στην περίπτωση που το θρεπτικό μέσο χρησιμοποιείται για καλλιέργεια σε τρυβλία.

Πίνακας 10. Περιγραφή θρεπτικού μέσου 2xYT.

Θρεπτικό μέσο 2xYT	
Συστατικό	Σύσταση (g/L)
Τρυπτόνη	16
Εκχύλισμα ζύμης	10
NaCl	5

Πίνακας 11. Περιγραφή θρεπτικού μέσου TB.

Θρεπτικό μέσο TB	
Συστατικό	Σύσταση
Εκχύλισμα ζύμης	2,4% w/v
Τρυπτόνη	2% w/v
Γλυκερόλη	0,4% v/v

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4)	10% v/v
---	---------

2.1.2.2. Ρυθμιστικά διαλύματα

Για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των ενζύμων έγινε χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων των οποίων τα συστατικά, οι συγκεντρώσεις και το pH παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Ρυθμιστικά διαλύματα.

Ρυθμιστικό διάλυμα	Συστατικά	Συγκέντρωση	pH
Talon 10x	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (Tris base) NaCl HCl	0,5 M 3 M Ρύθμιση pH	8,05
Citrate-Phosphate	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ Na_2HPO_4	0,1 M 0,1 M	5,0
Citrate-Phosphate	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ Na_2HPO_4	0,1 M 0,1 M	5,5
Citrate-Phosphate	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ Na_2HPO_4	0,1 M 0,1 M	6,0
Citrate-Phosphate	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ Na_2HPO_4	0,2 M 0,2 M	5,0
Citrate-Phosphate	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ Na_2HPO_4	0,2 M 0,2 M	6,0
Sodium-Phosphate	Na_2HPO_4 NaH_2PO_4	0,1 M 0,1 M	6,0
Sodium-Phosphate	Na_2HPO_4 NaH_2PO_4	0,1 M 0,1 M	7,0
Sodium-Phosphate	Na_2HPO_4 NaH_2PO_4	0,1 M 0,1 M	8,0
Sodium-Phosphate	Na_2HPO_4 NaH_2PO_4	0,2 M 0,2 M	6,0
Sodium-Phosphate	Na_2HPO_4 NaH_2PO_4	0,2 M 0,2 M	7,0
Sodium-Phosphate	Na_2HPO_4 NaH_2PO_4	0,2 M 0,2 M	8,0
Tris-HCl	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ HCl	0,1 M 0,1 M	8,0
Tris-HCl	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ HCl	0,1 M 0,1 M	8,5
Tris-HCl	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ HCl	0,1 M 0,1 M	9,0
Tris-HCl	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ HCl	0,2 M 0,2 M	8,0
Tris-HCl	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ HCl	0,2 M 0,2 M	9,0
Gly-NaOH	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ NaOH	0,2 M 0,2 M	9,0
Gly-NaOH	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	0,2 M	10,0

	NaOH	0,2 M	
--	------	-------	--

2.1.2.3. Ξενιστής ετερόλογης έκφρασης

Για την έκφραση των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε σαν ξενιστής το στέλεχος BL21 (DE3) του βακτηρίου *Escherichia coli* (*E. coli*). Το συγκεκριμένο στέλεχος έχει υποστεί γενετική τροποποίηση ώστε να μεγιστοποιείται η επαγόμενη έκφραση μίας ετερόλογης πρωτεΐνης, αλλά και για να καταστούν τα κύτταρα επιδεκτικά, δηλαδή να διευκολυνθεί η είσοδος του πλασμιδίου στο εσωτερικό τους. Όσον αφορά, την τροποποίηση που έχουν υποστεί για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής της πρωτεΐνης, αυτή βασίζεται στον τρόπο λειτουργίας του οπερονίου της λακτόζης (*lac*). Έτσι, στο χρωμόσωμα των συγκεκριμένων κυττάρων βρίσκονται κατά σειρά: ένας υποκινητής, ένας *lac* χειριστής, το γονίδιο έκφρασης της T7 RNA πολυμεράσης και το γονίδιο έκφρασης ενός *lac* καταστολέα. Με τον τρόπο αυτό, όταν από το σύστημα απουσιάζει η λακτόζη, παράγεται ο *lac* καταστολέας που προσδένεται στον *lac* χειριστή και παρεμποδίζεται η έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης. Όταν συμβαίνει αυτό η επιθυμητή πρωτεΐνη δεν εκφράζεται και τα κύτταρα απλά πολλαπλασιάζονται. Όταν στο σύστημα εισαχθεί λακτόζη, αυτή προσδένεται στον *lac* καταστολέα και τον εμποδίζει να προσδεθεί στον *lac* χειριστή. Τότε, εκφράζεται το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης που στη συνέχεια συμβάλλει στην έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Ωστόσο, επειδή το κύτταρο καταναλώνει τη λακτόζη, αυτή θα ήθελε συνεχή ανανέωση και θα καθιστούσε τη διαδικασία αντικονομική. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιείται σαν επαγωγέας έκφρασης ένα άλλο μόριο, ανάλογο της λακτόζης, το β-D-1-ισοπροπυλο-θειογαλακτοπυρανοζίδιο ή IPTG. Το μόριο αυτό, επιτρέπει μεν την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης όταν εισαχθεί στο σύστημα, όμως χωρίς να καταναλώνεται και συνεπώς προστίθεται στο σύστημα μόνο μία φορά.

2.1.2.4. Φορέας ετερόλογης έκφρασης

Τα πλασμίδια είναι δίκλιωνα κυκλικά μόρια DNA που εντοπίζονται σε πολλά βακτήρια και περιέχουν μικρό ποσοστό της γενετικής πληροφορίας. Το DNA του πλασμιδίου δεν είναι στο χρωμόσωμα του μικροοργανισμού και για τον λόγο αυτό καλείται εξωχρωμοσωμικό. Στα πλαίσια της γενετικής μηχανικής, τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης, καθώς διαθέτουν τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα μέσα σε έναν οργανισμό-ξενιστή. Έτσι, στο πλασμίδιο εισάγεται η επιθυμητή γενετική πληροφορία και αυτό στη συνέχεια εισέρχεται εντός οργανισμού-ξενιστή για την κωδικοποίηση της πληροφορίας. Υπάρχουν διάφορα είδη πλασμιδίων. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα δύο που αναφέρονται στη συνέχεια:

- Πλασμίδιο pET-26b (+): Το συγκεκριμένο πλασμίδιο είναι ένα δίκλινο κυκλικό μόριο DNA μήκους περίπου 5400 ζευγών βάσεων. Χρησιμοποιείται για την βακτηριακή έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών και επιτυγχάνονται υψηλά επίπεδα έκφρασης. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο φέρει γονίδιο αντίστασης στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και το γονίδιο έκφρασης του επιθυμητού ενζύμου που ελέγχεται από έναν υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης. Η T7 RNA πολυμεράση παράγεται ύστερα από την εισαγωγή στο σύστημα του επαγωγέα IPTG με τον μηχανισμό που περιγράφηκε ανωτέρω (2.1.2.3. Ξενιστής ετερόλογης έκφρασης). Το συγκεκριμένο είδος πλασμιδίου χρησιμοποιείται για την ετερόλογη έκφραση του ενζύμου LCC.

- Πλασμίδιο pET-22b (+): Το συγκεκριμένο πλασμίδιο εμφανίζει τα ίδια χαρακτηριστικά με το πλασμίδιο pET-26b (+). Η μόνη διαφορά τους είναι ότι το πλασμίδιο pET-22b (+) φέρει γονίδιο αντίστασης στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη, έναντι της καναμυκίνης που φέρει το πλασμίδιο pET-26b (+). Το συγκεκριμένο είδος πλασμιδίου χρησιμοποιείται για την ετερόλογη έκφραση των ενζύμων DmEst, Se1JFR, PETase, PHOase και PUase.

2.1.2.5. Αντιβιοτικά επιλογής

Για την ανάπτυξη μόνο των βακτηριακών κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο έκφρασης των επιθυμητών ενζύμων, έναντι όλων των υπολοίπων, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός παράγοντα επιλογής. Ο παράγοντας αυτός είναι η χρήση αντιβιοτικού, στο οποίο εμφανίζουν αντίσταση τα βακτήρια στα οποία έχει εισαχθεί το πλασμίδιο και αναπτύσσονται κανονικά, ενώ όλα τα υπόλοιπα δεν αναπτύσσονται.

Τα αντιβιοτικά επιλογής που χρησιμοποιήθηκαν είναι η αμικικιλίνη και η καναμυκίνη που παρελήφθησαν από Stock αποθήκευσης με συγκέντρωση 100 mg/mL έκαστο. Τα αντιβιοτικά επιλογής προστέθηκαν σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των κυττάρων, δηλαδή κατά τη ανάπτυξη σε τρυβλία, κατά την ανάπτυξη στις προκαλλιέργειες και κατά την ανάπτυξη στις καλλιέργειες, ενώ η συγκέντρωση και το είδος τους εξαρτάται από το ένζυμο που πρόκειται να εκφραστεί (Πίνακας 16).

2.1.2.6. Επαγωγέας έκφρασης (IPTG)

Σαν επαγωγέας ετερόλογης έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το μόριο IPTG (β-D-1-ισοπροπυλο-θειογαλακτοπυρανοζίδιο). Το IPTG βρισκόταν σε μορφή διαλύματος συγκέντρωσης 1 M σε Stock αποθήκευσης που είχε παρασκευαστεί με χρήση αποστειρωμένου υπερκάθαρου νερού και αντιδραστηρίου IPTG σε μορφή σκόνης.

2.1.2.7. Διαλύματα και πηκτώματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα που αναφέρονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Διαλύματα διεργασίας ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

Διάλυμα	Συστατικά	Συστάσεις
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης	TRIS Γλυκίνη SDS	30,3 g/L 144 g/L 10 g/L
Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης	SDS TRIS Γλυκερόλη 2-μερκαπταιθανόλη Μπλε της βρωμοθυμόλης	1 g 5 mL 0,25 M 2,5 mL 50% 2,5 mL 4 mL 0,1%
Διάλυμα χρώσης	Coomasie Brilliant Blue Οξικό οξύ Μεθανόλη Απιονισμένο νερό	0,1% w/v 10% v/v 40% v/v 50% v/v

Διάλυμα αποχρωματισμού	Απιονισμένο νερό Μεθανόλη Οξικό οξύ	70% v/v 20% v/v 10% v/v
------------------------	---	-------------------------------

Ακόμα παρουσιάζονται τα συστατικά και οι συστάσεις των δύο ειδών πηκτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση για την περίπτωση που η διεργασία πραγματοποιήθηκε για μία πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

Πίνακας 14. Συστατικά και συστάσεις πηκτωμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

Πήκτωμα	Συστατικά	Συστάσεις (1 πηκτή πολυακρυλαμίδιου)
Επιστοιβάσης	Απιονισμένο νερό TRIS/SDS Ακρυλαμίδιο TEMED (ενεργοποιητής) APS (υπερθειικό αμμώνιο)	1,5 mL 1,9 mL 0,38 mL 10 μL 30 μL
Διαχωρισμού	Απιονισμένο νερό TRIS/SDS Ακρυλαμίδιο TEMED (ενεργοποιητής) APS (υπερθειικό αμμώνιο)	1,75 mL 4,7 mL 2,9 mL 15 μL 90 μL

2.1.2.8. Πολυμερικά υλικά

Τα πολυμερικά υλικά που εισάγονται στις αντιδράσεις με τα ένζυμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Πολυμερικά υλικά.

Πολυμερές	Υπόστρωμα	Εταιρία	Κρυσταλλικότητα (%)	Σύσταση
Πολυκαπρολακτόνη (PCL)	PCL CARA 6500	Ravago Chemicals	45	100% PCL
Πολυουρεθάνη (PU)	PU LRP7560	Coim Laripur	-	100% PU
Πολυγαλακτικό οξύ (PLA)	PLA 4043D	NatureWorks	11	100% PLA
Πολύ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB)	PHB Biomer P226	Biomer	49	100% PHB
Πολύ-ηλεκτρικός βουτυλεστέρας (PBS)	PBS NaturePlast PBE003	NaturePlast	64	100% PBS
Άμορφο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (aPET)	PBS NaturePlast PBE003	NaturePlast	6	100% aPET
Κρυσταλλικό τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (cPET)	PET PAPET clear	Lotte Chemical	35	100% cPET

Πρότυπο ανακυκλώσιμο τереφθαλικό πολυαιθυλένιο (οPET)		-	9	95% PET 3% PE * 2% Green Pigment **
Ανακυκλώσιμο τереφθαλικό πολυαιθυλένιο προκατεργασίας REX (rPET)		-	0.4	80,8% PET 11,5% PE * 7,7% Green Pigment **

* PE: πολυαιθυλένιο

** Green Pigment: χρωστική ουσία πράσινου χρώματος

Το πρότυπο ανακυκλώσιμο τереφθαλικό πολυαιθυλένιο (οPET) είναι ένα υλικό που έχει προκύψει από μείγμα ανακυκλώσιμων πολυμερών και χρησιμοποιείται σε κανονικές εφαρμογές. Το ανακυκλώσιμο τереφθαλικό πολυαιθυλένιο προκατεργασίας REX (rPET) ονομάζεται έτσι επειδή έχει υποστεί επεξεργασία αντιδραστικής εξώθησης, μίας βιομηχανικής μεθόδου που συνδυάζει τις παραδοσιακές χημικές μεθόδους (π.χ. πολυμερισμό) με την εξώθηση, σε μία ενιαία διεργασία που λαμβάνει χώρα στον εξωθητή.

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Παραγωγή ενζύμων

Το πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας αποτελεί η παραγωγή των ενζύμων, που πραγματοποιήθηκε με χρήση βακτηριακών κυττάρων *E.coli*.

2.2.1.1. Μετασχηματισμός πλασμιδίων στα κύτταρα *E.coli*

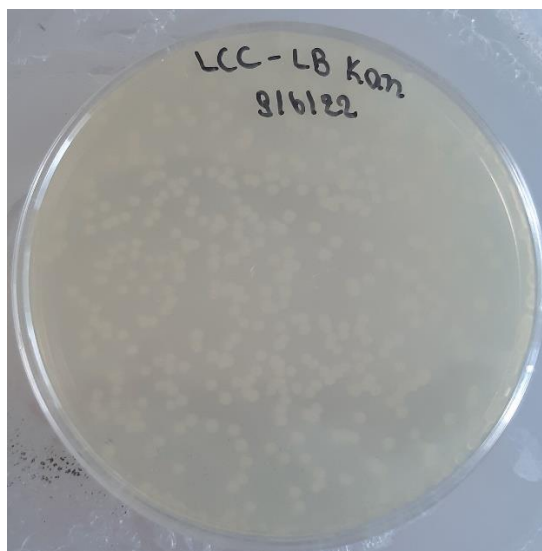
Το πρώτο στάδιο στην παραγωγή των ενζύμων είναι ο μετασχηματισμός των κυττάρων *E.coli*, ώστε να εισαχθεί σε αυτά το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο έκφρασης του εκάστοτε ενζύμου.

Αρχικά, 50 μ L κυττάρων *E.coli* και 1 μ L πλασμιδίου προστέθηκαν σε Eppendorf των 1,5 mL. Γενικά, ένα πλασμίδιο είναι αρνητικά φορτισμένο, ενώ μία κυτταρική μεμβράνη θετικά φορτισμένη και έτσι το πρώτο βήμα ήταν η επώαση σε πάγο για 30 min, ώστε τα δύο διαλύματα να προσεγγίσουν το ένα το άλλο. Στη συνέχεια, ακολούθησε η διαδικασία heat shock, όπου κατά τη διάρκεια της το πλασμίδιο εισήχθη στα βακτηριακά κύτταρα. Η διεργασία αυτή έλαβε χώρα σε θερμοκρασία 42 °C και είχε χρονική διάρκεια 80 s. Έπειτα, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε πάγο και εκεί προστέθηκαν 150 μ L θρεπτικού μέσου LB (2.1.2.1. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης). Τέλος, το διάλυμα που προέκυψε τοποθετήθηκε σε ανακινούμενο επωαστήριο Eppendorf σε θερμοκρασία 37 °C, υπό ανάδευση 500 rpm και για χρονική διάρκεια 1 h. Αυτό το στάδιο στοχεύει στο να εξοικειωθούν τα κύτταρα με το θρεπτικό μέσο και να πραγματοποιηθεί ένας αρχικός πολλαπλασιασμός.

2.2.1.2. Στρώσιμο σε τρυβλία

Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων *E.coli*, ακολουθεί το στρώσιμο του περιεχομένου του Eppendorf σε τρυβλία Petri. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στον αποστειρωμένο χώρο εργασίας, ενώ τα όργανα, τα σκεύη και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επίσης αποστειρωμένα.

Αρχικά, 20-25 mL του θρεπτικού υλικού LB, στο οποίο είχε προστεθεί και κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού επιλογής, τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri με απόχυση. Το περιεχόμενο του τρυβλίου αφέθηκε για κάποια ώρα μέχρι να στερεοποιηθεί μέσω της δράσης του άγαρ. Στη συνέχεια αφού στερεοποιήθηκε, το περιεχόμενο του Eppendorf, που αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο (2.2.1.1. Μετασχηματισμός πλασμιδίων στα κύτταρα E.coli), παρελήφθη με τη χρήση αποστειρωμένου tip και τοποθετήθηκε στην επιφάνεια του τρυβλίου. Η ποσότητα αυτή, με χρήση σπαθίδας ή διαστολέα, στρώθηκε, ώστε να απλωθεί ομοιόμορφα και να καλύψει ολόκληρη την επιφάνεια του τρυβλίου. Τέλος, το τρυβλίο τοποθετήθηκε σε φούρνο για επώαση σε θερμοκρασία 37 °C overnight (17-20 h).



Εικόνα 17. Εμφάνιση αποικιών ύστερα από την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων σε τρυβλίο Petri.

2.2.1.3. Εισαγωγή προκαλλιιεργειών

Κάθε προκαλλιέργεια αναπτύχθηκε σε ειδικό δοχείο Sterilin και είχε όγκο 5 mL θρεπτικού μέσου LB στο οποίο είχε προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού επιλογής. Σε αυτόν τον όγκο, έγινε προσθήκη μίας μεμονωμένης αποικίας από το τρυβλίο Petri με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου tip. Τέλος, το δοχείο Sterilin με το περιεχόμενό του τοποθετήθηκε σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 37 °C και υπό ανάδευση 180 rpm για overnight ανάπτυξη. Πριν την επώαση το διάλυμα της προκαλλιέργειας ήταν διαυγές, ενώ μετά την επώαση το διάλυμα κατέστη θολό. Αυτή η οπτική αλλαγή είναι χαρακτηριστική ένδειξη ότι έχει επέλθει βακτηριακή ανάπτυξη. Κάθε προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως εμβόλιο μίας κύριας καλλιέργειας.

Αξίζει να τονισθεί ότι οι διαδικασίες προετοιμασίας των προκαλλιιεργειών πραγματοποιήθηκαν στον αποστειρωμένο χώρο εργασίας, ενώ όλα τα όργανα, τα σκεύη και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επίσης αποστειρωμένα.



Εικόνα 18. Προκαλλιέργειες μετά την overnight επώαση.

2.2.1.4. Εισαγωγή καλλιέργειών

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω μία προκαλλιέργεια αποτέλεσε εμβόλιο για μία καλλιέργεια με αναλογία όγκων: $V_{\text{προκαλλιέργειας}}/V_{\text{καλλιέργειας}} = 1/100$. Έτσι, κάθε καλλιέργεια αποτελούταν από 500 mL θρεπτικού υλικού, το οποίο ήταν LB, TB ή 2xYT (2.1.2.1. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης) ανάλογα με το ένζυμο που επρόκειτο να παραχθεί (Πίνακας 16). Η επιλογή του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης έγινε βάσει προηγούμενων πειραμάτων βελτιστοποίησης της παραγωγής των ενζύμων. Σε αυτά τα 500 mL, λοιπόν, προστέθηκε και κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού επιλογής και στη συνέχεια με απόχυση προστέθηκε επιπλέον ολόκληρος ο όγκος μίας προκαλλιέργειας. Έπειτα, οι κυρίως καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 37 °C και υπό ανάδευση 180 rpm. Προκειμένου να αρχίσει η παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης, ήταν απαραίτητη η προσθήκη του επαγωγέα IPTG στην καλλιέργεια (2.1.2.6. Επαγωγέας έκφρασης (IPTG)). Ωστόσο, για να είχε η έκφραση της πρωτεΐνης τη μέγιστη δυνατή απόδοση, η ποσότητα αυτή του επαγωγέα, έπρεπε να προστεθεί όταν ο όγκος της καλλιέργειας είχε φτάσει σε συγκεκριμένα όρια οπτικής πυκνότητας, δηλαδή κατά την εκθετική ανάπτυξη. Για το θρεπτικό μέσο LB η επιθυμητή τιμή οπτικής πυκνότητας είναι 0,8, ενώ για τα θρεπτικά μέσα TB και 2xYT η επιθυμητή τιμή είναι 3,0. Έτσι, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, παρελήφθη όγκος 1 mL από την καλλιέργεια και οδηγήθηκε για φωτομέτρηση στα 600 nm. Ως δείγμα blank για την φωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 1 mL από την καλλιέργεια το οποίο, όμως, πρώτα είχε φυγοκεντρηθεί ώστε να καθιζάνουν τα κύτταρα.

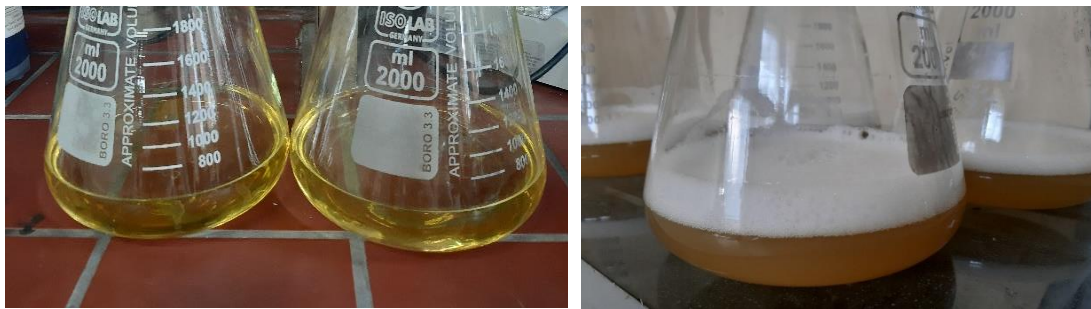
Όταν, η κυρίως καλλιέργεια προσέγγισε τα επιθυμητά όρια οπτικής πυκνότητας, τοποθετήθηκε για διάστημα 20-30 min στους 4 °C προκειμένου να σταματήσει η κυτταρική ανάπτυξη. Στη συνέχεια, και αφού είχε φτάσει σε θερμοκρασία 16-17 °C, προστέθηκε σε αυτήν η κατάλληλη ποσότητα του επαγωγέα IPTG, προκειμένου να ξεκινήσει η ετερόλογη έκφραση του επιθυμητού ενζύμου. Σαν τελικό βήμα, η καλλιέργεια τοποθετήθηκε για overnight επώαση στους 17 °C υπό ανάδευση 180 rpm, ώστε να πραγματοποιείται σωστός αερισμός των κυττάρων.

Όλες οι διαδικασίες που προαναφέρθηκαν πραγματοποιήθηκαν στον αποστειρωμένο χώρο εργασίας, ενώ όλα τα όργανα, τα σκεύη και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επίσης αποστειρωμένα.

Πίνακας 16. Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης, αντιβιοτικό επιλογής, συγκέντρωση αντιβιοτικού και συγκέντρωση επαγωγέα έκφρασης για την παραγωγή του εκάστοτε ενζύμου.

Ένζυμο	Θρεπτικό υλικό	Αντιβιοτικό	Συγκέντρωση αντιβιοτικού (μg/mL)	Συγκέντρωση IPTG (mM)
DmEst	TB	Αμπικιλλίνη	100	0.2
LCC	LB	Καναμυκίνη	50	0.2
Se1JFR	LB+1% (w/v) γλυκόζη*	Αμπικιλλίνη	100	1
PETase	LB	Αμπικιλλίνη	100	0.2
RHOase	TB	Αμπικιλλίνη	100	0.2
PUase	2xYT	Αμπικιλλίνη	100	0.2

*Η γλυκόζη δρα ως καταστολέας έκφρασης και έχει επιλεγεί ύστερα από πειράματα βελτιστοποίησης έκφρασης.



Εικόνα 19. Καλλιέργειες πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την overnight επώαση.

2.2.2. Παραλαβή ενζύμων

Αφού τα ένζυμα παρήχθησαν, ακολούθησε η απομόνωσή τους από τον μικροοργανισμό-ξενιστή, ώστε αυτά να παραληφθούν σε καθαρή μορφή και στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με σκοπό να μελετηθούν βιοχημικά και βιοτεχνολογικά.

2.2.2.1. Φυγοκέντρηση καλλιιεργειών

Η παραγωγή των ενζύμων γίνεται εσωκυτταρικά στα βακτηριακά κύτταρα *E.coli* και έτσι προκειμένου να παραληφθεί το ένζυμο, πρέπει αρχικά να γίνει η παραλαβή των κυττάρων του μικροοργανισμού από τον υγρό όγκο καλλιέργειας. Η παραλαβή αυτή επιτυγχάνεται με φυγοκέντρηση.

Αρχικά, οι κυρίως καλλιέργειες, που ήταν μέσα σε κωνικές φιάλες, εξήχθησαν από τον επωαστήρα και τοποθετήθηκαν σε πάγο, έτσι ώστε λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας να απενεργοποιηθούν τα μεταβολικά μονοπάτια του κυττάρου. Αυτό είναι απαραίτητο, διότι στις συνθήκες της φυγοκέντρησης τα κύτταρα αντιλαμβάνονται την «ξένη» πρωτεΐνη ως εχθρό και τείνουν να κάνουν προσπάθειες να την πρωτεολύσουν. Κάτι τέτοιο είναι πολύ σημαντικό να αποφευχθεί. Έτσι, το υγρό των κυρίως καλλιιεργειών διαμοιράστηκε σε ειδικά δοχεία φυγοκέντρησης των 250 mL. Σε αυτό το στάδιο ήταν απαραίτητο να δοθεί προσοχή στη σωστή ζυγοστάθμιση των αντιδιαμετρικών δοχείων προκειμένου να μη δημιουργηθεί πρόβλημα κατά την διαδικασία της φυγοκέντρησης. Τέλος, οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η φυγοκέντρηση ήταν θερμοκρασία

4 °C, υπό ανάδευση 13500 rpm για χρόνο 17 min στη ψυχόμενη φυγόκεντρο J2-21 Centrifuge, BECKMAN.

2.2.2.2. Επαναιώρηση των κυττάρων

Μετά τη φυγοκέντρηση των κυττάρων ακολούθησε επαναιώρησή τους σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1x, το οποίο προέκυψε από αραιώση κατά 10 φορές του ρυθμιστικού διαλύματος Talon 10x (Πίνακας 12). Αρχικά, μετά τη φυγοκέντρηση, τα δοχεία τοποθετήθηκαν σε πάγο, δίνοντας έμφαση στον χειρισμό τους, ώστε τα κύτταρα να μην επαναιωρηθούν. Ακολούθησε απόχυση του υγρού που απέμεινε μετά τη φυγοκέντρηση, με φορά αντίθετη από αυτήν που είχαν καθιζάνει τα κύτταρα, ώστε να μην υπάρξει απώλεια κυτταρικής μάζας. Το υγρό αποβλήθηκε, καθότι, όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, το ένζυμο είχε παραχθεί εσωκυτταρικά, άρα οτιδήποτε είχε παραχθεί στο υγρό της καλλιέργειας δεν αποτελούσε ένωση ενδιαφέροντος. Στη συνέχεια στα εναπομείναντα κύτταρα προστέθηκε το διάλυμα Talon 1x στην επιθυμητή ποσότητα. Συγκεκριμένα, για κυτταρική πυκνότητα 0,8, έγινε προσθήκη 30 mL Talon 1x, ενώ για κυτταρική πυκνότητα 3,0, προστέθηκε όγκος ίσος με 50 mL. Τέλος, με χειροκίνητη ανάδευση και με τη βοήθεια σπαθίδας, πραγματοποιήθηκε η επαναιώρηση των κυττάρων στο ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1x. Το διάλυμα των επαναιωρημένων κυττάρων μεταφέρθηκε σε Falcon των 50 mL και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη (≈ -20 °C).

2.2.2.3. Διάρρηξη κυτταρικών μεμβρανών

Εφόσον, τα επιθυμητά ένζυμα παρήχθησαν εσωκυτταρικά, προκειμένου να παραληφθούν, ήταν απαραίτητο να προηγηθεί η διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών. Η διάρρηξη αυτή επετεύχθη μέσω της χρήσης υπερήχων. Συγκεκριμένα, λόγω της ενέργειας που προκύπτει από τα υπερηχητικά κύματα, δημιουργούνται φυσαλίδες στο κυτταρικό διάλυμα, οι οποίες όταν σπάνε απελευθερώνουν ενέργεια ικανή να οδηγήσει στη διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών.

Η διαδικασία της διάρρηξης των μεμβρανών, ξεκίνησε με την απόχυση του περιεχομένου του Falcon των 50 mL σε ποτήρι ζέσεως. Το ποτήρι ζέσεως καθόλη τη διάρκεια της λύσης των κυττάρων ήταν τοποθετημένο σε πάγο, καθώς η ενέργεια των υπερηχητικών κυμάτων μπορεί να υπερθερμάνει το κυτταρικό διάλυμα σε μη επιθυμητά όρια, κάτι το οποίο οδηγεί στη θερμική απενεργοποίηση των πρωτεϊνών. Ακολούθως, το ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε στη συσκευή υπερήχων και το ύψος του μοχλού της ρυθμίστηκε να είναι περίπου βυθισμένο στο μέσο του ύψους του υγρού. Αν το ύψος του μοχλού είναι αρκετά κοντά στον πυθμένα του ποτηριού ζέσεως ενδέχεται η αλληλεπίδραση των υπερηχητικών κυμάτων με τον πυθμένα του ποτηριού να οδηγήσει σε τοπική υπερθέρμανση και μετουσίωση των πρωτεϊνών, ενώ αν αυτός τοποθετηθεί πολύ κοντά στην επιφάνεια, η ενέργεια των υπερηχητικών κυμάτων, δε θα φτάνει στον κύριο όγκο του κυτταρικού διαλύματος, με αποτέλεσμα να μην προκαλείται λύση όλων των κυττάρων κάτι το οποίο οδηγεί σε απώλεια ποσότητας πρωτεΐνης. Η διάρρηξη κάθε κυτταρικού διαλύματος πραγματοποιήθηκε σε 4 κύκλους με ένταση 40% της μέγιστης ισχύος της συσκευής. Κάθε κύκλος πραγματοποιήθηκε για χρόνο 1 min με διαστήματα 8 s επιβολή υπερηχητικής ενέργειας και 5 s παύση επιβολής αυτής. Από τον ένα κύκλο στον άλλο πραγματοποιούνταν έλεγχος της θερμοκρασίας των τοιχωμάτων του ποτηριού ζέσεως και προσθήκη επιπλέον πάγου αν

κρινόταν απαραίτητο. Μετά το πέρας και των τεσσάρων κύκλων, το περιεχόμενο του ποτηριού ζέσεως μεταφέρθηκε σε νέο Falcon των 50 mL, το οποίο τοποθετήθηκε σε πάγο.

Στην Εικόνα 20 παρουσιάζεται το κυτταρικό διάλυμα πριν και μετά το σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών. Στο διάλυμα πριν το σπάσιμο, παρατηρούνται τα κύτταρα σαν στερεή μάζα και διαχωρίζονται από τον κύριο υγρό όγκο, ενώ μετά το σπάσιμο, το διάλυμα εμφανίζει ομοιογένεια και τα συστατικά είναι διαλυμένα στην κύρια μάζα του υγρού.



Εικόνα 20. Το κυτταρικό διάλυμα πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) το σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών.

2.2.2.4. Φυγοκέντρηση διαλύματος μετά τη διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών

Μετά τη διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών, τα επιθυμητά ένζυμα είχαν απελευθερωθεί από το εσωτερικό των κυττάρων στον κύριο όγκο του διαλύματος. Έτσι, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση προκειμένου να απομακρυνθούν από το διάλυμα τα κυτταρικά θραύσματα και υπολείμματα.

Αρχικά, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε δοχεία φυγοκέντρησης των 30 mL. Ακολούθησε ζυγοστάθμιση των αντιδιαμετρικών δοχείων, προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα κατά τη διαδικασία της φυγοκέντρησης. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε στη ψυχόμενη φυγόκεντρο 3K30, SIGMA και σε δύο κύκλους των 30 min και 20 min σε θερμοκρασία 5 °C και ταχύτητα περιστροφής 15048 rpm (20000 RCF). Μεταξύ των δύο κύκλων, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του στερεού υπολείμματος.

2.2.2.5. Απομόνωση επιθυμητής πρωτεΐνης

Στο διάλυμα που προέκυψε μετά τη φυγοκέντρηση και την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων, εκτός της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, υπήρχαν διαλυμένες και άλλες πρωτεΐνες που είχαν παραχθεί από τα κύτταρα, ενώ και διάφορα άλλα συστατικά. Για τον λόγο αυτό ήταν απαραίτητο να πραγματοποιηθεί διεργασία καθαρισμού, προκειμένου να παραληφθεί η επιθυμητή πρωτεΐνη σε υψηλή καθαρότητα χωρίς άλλες προσμίξεις.

Η απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας αλληλεπίδρασης μετάλλου σε στήλη ρητίνης TalonR, που αποτελούσαν από

ρητίνη Talon με ιόντα κοβαλτίου. Γενικά, τα ιόντα κοβαλτίου αλληλεπιδρούν με τα μόρια ιστιδίνης που βρίσκονται στις πρωτεΐνες. Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης είναι κατάλληλα τροποποιημένος, ώστε να εκφράζεται στο ένζυμο η επιθυμητή αλληλουχία ιστιδίνης και έτσι το ένζυμο να προσδένεται στα ιόντα κοβαλτίου και να κατακρατάται σε αυτά, τη στιγμή που τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος δεν έχουν αυτήν την ικανότητα. Στη συνέχεια, η απομάκρυνση των ενζύμων από τη στήλη γίνεται με διαλύματα που έχουν συγγένεια με τα ιόντα κοβαλτίου και άρα ανταγωνίζονται το ένζυμο ως προς την πρόσδεση σε αυτά, με αποτέλεσμα το ένζυμο τελικά να απομακρύνεται από τη στήλη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το διάλυμα ανταγωνισμού είναι διάλυμα ιμιδαζολίου. Αξίζει να αναφερθεί ότι για την παρασκευή των διαλυμάτων ιμιδαζολίου όλων των συγκεντρώσεων, το ιμιδιζαζόλιο διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1x.

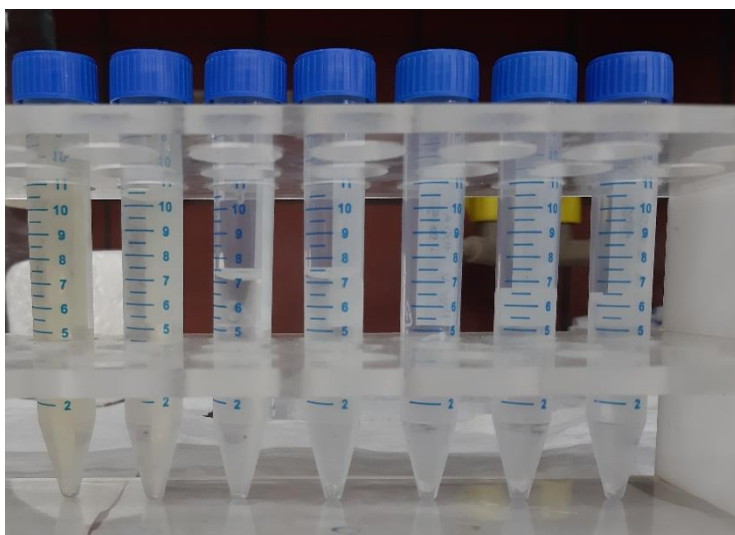


Εικόνα 21. Καθαρισμός του πρωτεϊνικού διαλύματος σε στήλες χρωματογραφίας TalonR.

Αμέσως παρακάτω αναφέρονται τα βήματα που ακολουθούνται για την απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης:

- 1) Απομάκρυνση της ποσότητας αιθανόλης (20%v/v σε απιονισμένο νερό, καθαρότητας 99,8%) που περιέχεται στη στήλη καθώς αποτελεί το διάλυμα αποθήκευσής της.
- 2) Ξέπλυμα της στήλης με δύο όγκους στήλης απιονισμένου νερού.
- 3) Εξισορρόπηση της στήλης με 3 όγκους στήλης του ρυθμιστικού διαλύματος Talon 1x.
- 4) Εισαγωγή στη στήλη ολόκληρης της ποσότητας του διαλύματος που προέκυψε μετά την απομάκρυνση του στερεού υπολείμματος. Κατά τη διάρκεια που το υγρό διαπερνά τη στήλη, το ένζυμο λόγω συγγένειας με τα ιόντα κοβαλτίου, προσδένεται σε αυτά και παραμένει εντός της στήλης. Το περιεχόμενο που βγαίνει από τη στήλη συλλέγεται σε Falcon των 15 ή 50 mL και ονομάζεται διάλυμα Flow Through.

- 5) Έκπλυση της στήλης με διάλυμα 10 mL Talon 1x με στόχο την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των συστατικών που δεν δεσμεύτηκαν στη ρητίνη. Το περιεχόμενο που βγαίνει από τη στήλη συλλέγεται σε Falcon των 15 mL και ονομάζεται διάλυμα Wash.
- 6) Έκπλυση της στήλης με 7 mL διαλύματος ιμιδαζολίου 5 mM, με στόχο την απομάκρυνση των μορίων που έχουν δεσμευτεί στη στήλη αλλά έχουν ασθενή συγγένεια με τα ιόντα κοβαλτίου. Το περιεχόμενο που βγαίνει από τη στήλη συλλέγεται σε Falcon των 15 mL και ονομάζεται διάλυμα 5 mM.
- 7) Έκπλυση της στήλης με 7 mL διαλύματος ιμιδαζολίου 10 mM, με στόχο την απομάκρυνση των μορίων που έχουν δεσμευτεί στη στήλη αλλά έχουν μέτρια συγγένεια με τα ιόντα κοβαλτίου. Το περιεχόμενο που βγαίνει από τη στήλη συλλέγεται σε Falcon των 15 mL και ονομάζεται διάλυμα 10 mM.
- 8) Έκπλυση της στήλης με 4 mL διαλύματος ιμιδαζολίου 100 mM, συγκέντρωση που δρα ανταγωνιστικά με το ένζυμο ως προς την πρόσδεση στα ιόντα κοβαλτίου και που οδηγεί στην αποδέσμευση του ενζύμου. Το περιεχόμενο που βγαίνει από τη στήλη συλλέγεται σε Falcon των 15 mL και ονομάζεται διάλυμα 100A.
- 9) Έκπλυση της στήλης με 6 mL διαλύματος ιμιδαζολίου 100 mM, το οποίο οδηγεί σε απομάκρυνσή από τη στήλη του ενζύμου, που απελευθερώθηκε στο προηγούμενο βήμα. Παράλληλα μπορεί να προκαλέσει και την αποδέσμευση επιπλέον ποσοτήτων ενζύμου που δεν κατέστη δυνατό να απελευθερωθούν στο προηγούμενο στάδιο. Το περιεχόμενο που βγαίνει από τη στήλη συλλέγεται σε Falcon των 15 mL, ονομάζεται διάλυμα 100B και σε αυτό αναμένεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση του ενζύμου.
- 10) Έκπλυση της στήλης με 6 mL διαλύματος ιμιδαζολίου 100 mM, που οδηγεί στην απομάκρυνση των επιπλέον ποσοτήτων πρωτεΐνης που δεν απελευθερώθηκαν στο προηγούμενο στάδιο. Το περιεχόμενο που βγαίνει από τη στήλη συλλέγεται σε Falcon των 15 mL και ονομάζεται διάλυμα 100C.
- 11) Έκπλυση της στήλης με έναν όγκο στήλης διαλύματος ιμιδαζολίου 200mM, ώστε να είναι βέβαιο ότι έχει απομακρυνθεί οτιδήποτε μπορεί να ήταν δεσμευμένο στα ιόντα κοβαλτίου και η στήλη να μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί με ασφάλεια.
- 12) Έκπλυση της στήλης με τρεις όγκους στήλης απιονισμένου νερού για απομάκρυνση εναπομείναντων ποσοτήτων των προηγούμενων διαλυμάτων.
- 13) Έκπλυση της στήλης με έναν όγκο στήλης αιθανόλης (20% v/v σε απιονισμένο νερό, καθαρότητας 99.8%) μέχρι αυτή να φτάσει σε όγκο 5 mL, όπου αυτή η ποσότητα παραμένει στη στήλη για την μετέπειτα αποθήκευσή της.



Εικόνα 22. Διαλύματα καθαρισμού. Με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά, είναι: Flow Through, Wash, 5 mM, 10 mM, 100A, 100B, 100C.

2.2.2.6. Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Προκειμένου να αξιολογηθεί η απόδοση του καθαρισμού, τα κλάσματα αυτού οδηγήθηκαν για φωτομέτρηση στα 280 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος απορροφούν κάποια αμινοξέα με αρωματικούς δακτυλίους, όπως για παράδειγμα η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη, που συναντώνται στα περισσότερα ένζυμα. Έτσι, 250 μ L από κάθε διάλυμα τοποθετήθηκαν σε ένα κελί του microplate και πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 280 nm. Το μέγεθος της απορρόφησης είναι ανάλογο της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο εκάστοτε διάλυμα. Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, στο διάλυμα 100B αναμένεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση του επιθυμητού ενζύμου.

2.2.2.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι μία από τις πιο κοινές αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και τον χαρακτηρισμό πρωτεϊνών από ένα πρωτεϊνικό μείγμα. Ο διαχωρισμός αυτός οφείλεται στις διαφορές του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών που συναντώνται στο μείγμα. Συγκεκριμένα, η λειτουργία της μεθόδου αυτής βασίζεται στην αποδιάταξη και την ηλεκτρική φόρτιση (αρνητική) των πρωτεϊνών, που επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων, ώστε ύστερα από την επιβολή ηλεκτρικού πεδίου, η κίνηση αυτών να εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. [83]

Η τριτοταγής διαμόρφωση των πρωτεϊνών σταθεροποιείται μέσω της δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η 2-μερκαπταιθανόλη είναι ένα αντιδραστήριο με την ικανότητα να καταστρέφει τις δισουλφιδικές γέφυρες οδηγώντας στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Το αντιδραστήριο SDS, που αλλιώς καλείται δωδεκυλοθειϊκό νάτριο, είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο όταν διαλυθεί εμφανίζει αρνητικό φορτίο σε μεγάλο εύρος pH. Τα πολύ αρνητικά φορτισμένα μόρια του SDS, έχουν αφενός την ικανότητα να αποδιατάσσουν περαιτέρω το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα και αφετέρου να προσδεθούν

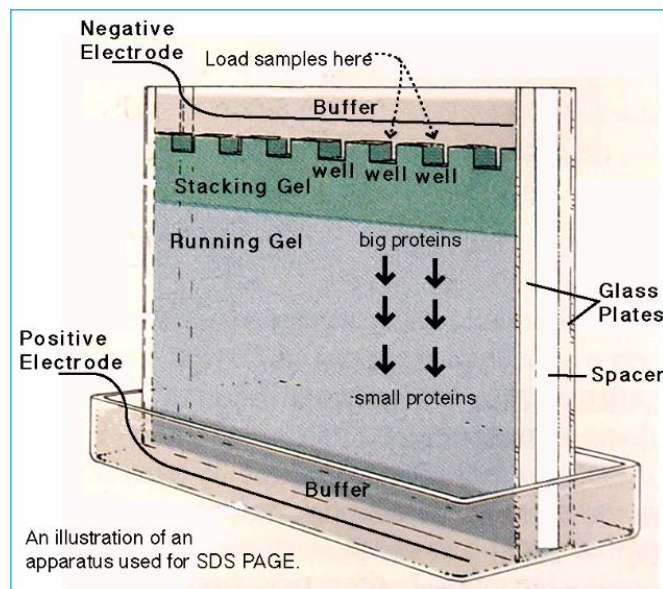
σε αυτό. Επιπλέον, κατά την επιβολή ηλεκτρικού πεδίου τα μόρια αυτά έλκονται πολύ ισχυρά από την άνοδο, που είναι θετικά φορτισμένη.

Έτσι, αρχικά πραγματοποιήθηκε η προκατεργασία του δείγματος με ένα διάλυμα που περιείχε 2-μερκαπταιθανόλη και ακολούθησε θέρμανση, ώστε να γίνει η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, τόσο το διάλυμα φόρτωσης όσο και το πήκτωμα περιείχαν SDS. Με τον τρόπο αυτό, ύστερα από την επιβολή ηλεκτρικού δυναμικού, τα μόρια των πρωτεϊνών, που ήταν αρνητικά φορτισμένα, κινούνταν προς την άνοδο και η κίνηση αυτή εξαρτιόταν από το μοριακό βάρος της εκάστοτε πρωτεΐνης. Αυτό συμβαίνει, καθώς στο πήκτωμα εμφανίζονται πόροι διαφόρων μεγεθών. Έτσι, πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους έχουν την ικανότητα να διαπερνούν πιο γρήγορα τα όρια των πόρων, συναντώντας μικρή αντίσταση και να κινούνται πιο γρήγορα, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται ο επιθυμητός διαχωρισμός βάσει του μεγέθους τους.

Η πειραματική διαδικασία της συγκεκριμένης τεχνικής ξεκίνησε με την προετοιμασία των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Το καθένα από τα δείγματα είχε συνολικό όγκο 50 μL . Αυτός ο όγκος αποτελούταν από 10 μL του διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) (Πίνακας 13) και από 40 μL του διαλύματος της πρωτεΐνης, αφού όμως πραγματοποιήθηκε κατάλληλη αραιώση με σκοπό η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στον τελικό όγκο των 50 μL να είναι 15 μg . Το διάλυμα φόρτωσης είναι ένα διάλυμα μπλε χρώματος που λόγω της σύστασής του συμβάλλει στο ξεδίπλωμα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και στην μερική αποδιάταξή τους. Στη συνέχεια, το δείγμα οδηγήθηκε σε βρασμό για 5 min, με σκοπό την πλήρη αποδιάταξη των πολυπεπτιδικών αλυσίδων.

Ύστερα, ακολούθησε η προετοιμασία του πηκτώματος. Το πήκτωμα περιεχόταν μεταξύ δύο γυάλινων πλακιδίων, τα οποία ήταν κατάλληλα τοποθετημένα ώστε να έχουν κενό πάχους 1.5 mm μεταξύ τους. Αφού τοποθετήθηκαν και σταθεροποιήθηκαν τα γυάλινα πλακίδια, τοποθετήθηκε νερό στο εσωτερικό τους ώστε να ελεγχθεί η ύπαρξη τυχόν διαρροών στο σύστημα. Αφού ελέγχθηκε το σύστημα ως προς διαρροές, το νερό απομακρύνθηκε και μεταξύ των γυάλινων πλακιδίων τοποθετήθηκε το διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (resolving gel) (Πίνακας 14) μέχρι να καλυφθεί το 70-75% του χώρου μεταξύ των γυάλινων επιφανειών καθ' ύψος. Στη συνέχεια, αφέθηκε να περάσει χρονικό διάστημα περίπου 20 min, ώστε να πήξει το πήκτωμα. Αφού διήλθε αυτό το χρονικό διάστημα, ακριβώς πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού, τοποθετήθηκε το διάλυμα πηκτώματος επιστοίβασης (stacking gel) (Πίνακας 14), μέχρι να καλυφθεί εντελώς ο κενός χώρος μεταξύ των γυάλινων πλακιδίων. Στο πήκτωμα επιστοίβασης, έγινε και η τοποθέτηση ειδικού χτενακίου, ώστε να σχηματιστούν κατάλληλα διαμορφωμένες θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων. Ύστερα, αφέθηκε και πάλι να περάσει χρονικό διάστημα περίπου 20 min για την πήξη του πηκτώματος επιστοίβασης. Η ύπαρξη δύο διαφορετικών πηκτωμάτων εξυπηρετούσε ώστε αρχικά τα δείγματα να κινηθούν ομοιόμορφα στο πήκτωμα επιστοίβασης, λόγω της ύπαρξης μεγάλου μεγέθους πόρων σε αυτό, και να αποκτήσουν κοινή αφετηρία, ενώ ύστερα να κινηθούν με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους στο πήκτωμα διαχωρισμού, λόγω της ύπαρξης μικρότερου μεγέθους πόρων σε αυτό, και να πραγματοποιηθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός.

Ακολούθως, το σύστημα των γυάλινων πλακιδίων, τοποθετήθηκε σε ειδικό κελί ηλεκτροφόρησης που περιείχε σύρμα στο εσωτερικό για την επιβολή ηλεκτρικού δυναμικού. Το κελί επιπλέον πληρώθηκε μέχρι κατάλληλου ύψους με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) (Πίνακας 13). Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε από την επιφάνεια του πηκτώματος επιστοίβασης το ειδικό χτενάκι και ακολούθησε η τοποθέτηση των δειγμάτων στις κατάλληλες θέσεις που είχαν διαμορφωθεί. Σε μία από αυτές τις θέσεις τοποθετήθηκαν 3,5 μL πρότυπου διαλύματος για την μετέπειτα εξακρίβωση του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών που εμφανίστηκαν στο πήκτωμα. Αφού, ολοκληρώθηκε η τοποθέτηση των δειγμάτων, εφαρμόστηκε στη συσκευή ηλεκτρικό δυναμικό. Αρχικά, η τάση του πεδίου ορίστηκε στα 50 V για αρχικό χρόνο 20-30 min και έπειτα ορίστηκε στα 100 V μέχρι ολοκλήρωσης της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 23. Διάταξη ηλεκτροφόρησης πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου. [84]

Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία αυτή, το πήκτωμα αφαιρέθηκε και τοποθετήθηκε μέσα σε διάλυμα χρώσης (Πίνακας 13) για περίπου 2 h. Το διάλυμα χρώσης περιέχει συστατικά που προσδένονται στις πρωτεΐνες και έτσι αυτές «χρωματίζονται». Ύστερα ακολούθησε ο αποχρωματισμός του πηκτώματος, αφού τοποθετήθηκε σε ειδικό διάλυμα αποχρωματισμού (Πίνακας 13) και παρέμεινε σε αυτό υπό ανάδευση 60 rpm overnight. Τα συστατικά που προκαλούν τον χρωματισμό απομακρύνονται κατά το στάδιο του αποχρωματισμού από όλη την επιφάνεια της πηκτής εκτός από τα σημεία που υπάρχουν πρωτεΐνες. Για τον λόγο αυτό, στο τέλος της διαδικασίας οι πρωτεΐνες έγιναν ευδιάκριτες στην επιφάνεια του πηκτώματος από το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα που έλαβαν. Έτσι μετά, το τέλος του αποχρωματισμού, οι θέσεις στις οποίες εμφανίστηκαν οι πρωτεΐνες - και μόνο αυτές - παρέμειναν χρωματισμένες μπλε και πραγματοποιήθηκε η εξακρίβωσή τους.

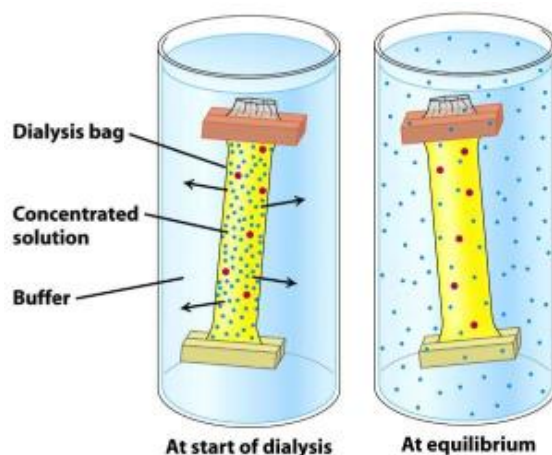
2.2.2.8. Συμπύκνωση πρωτεϊνών

Σε περίπτωση που το κλάσμα της πρωτεΐνης δεν είχε την επιθυμητή συγκέντρωση για τη χρήση του στα μετέπειτα πειράματα, πραγματοποιούταν συμπύκνωσή του. Η συμπύκνωση έγινε με χρήση ειδικών φίλτρων φυγοκέντρωσης. Τα φίλτρα αυτά ήταν

τοποθετημένα εντός ειδικών στηλών Amicon Ultra-0.5 mL, Centrifugal filters, Ultracell-10K και μέσω αυτών διέρχονταν μόρια με μέγεθος μικρότερο των 10 kDa. Έτσι, στο υγρό συμπύκνωσης περιεχόταν το ένζυμο ενδιαφέροντος και στο υπερδιήθημα άλλα μόρια του ενζυμικού διαλύματος που δεν ήταν επιθυμητό να υπάρχουν και έτσι αποχύνονταν. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε εντός ψυχόμενης φυγοκέντρου στους 4 °C και υπό ανάδευση 4000 rpm για όσους κύκλους ήταν απαραίτητο ώστε να πραγματοποιηθεί η επιθυμητή συμπύκνωση.

2.2.2.9. Εξισορρόπηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της διαπίδυσης

Προκειμένου να ολοκληρωθούν τα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο, ήταν απαραίτητη η διέλευση κάποιου χρονικού διαστήματος κατά τη διάρκεια του οποίου το ένζυμο διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 4 °C. Προκειμένου το ένζυμο να παραμείνει σταθερό, να μην καταβυθιστεί και να μη χάσει την ενεργότητά του κατά το διάστημα αυτό, ήταν αναγκαίο να επιλεγεί για την αποθήκευσή του ένα ρυθμιστικό διάλυμα που θα ικανοποιούσε αυτές τις προϋποθέσεις. Μετά τον καθαρισμό τους, όλες οι πρωτεΐνες βρίσκονταν εντός του ρυθμιστικού διαλύματος Talon 1x. Προκειμένου να γίνει αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος αποθήκευσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διαπίδυσης. Η μέθοδος της διαπίδυσης, πραγματοποιήθηκε εντός μεμβρανών μέσω της διαδικασίας της ώσμωσης. Γενικά, ανάμεσα σε δύο ρυθμιστικά διαλύματα που οριοθετούνται από μία μεμβράνη, πραγματοποιείται η ανταλλαγή μορίων μικρού μοριακού βάρους, όπως αλάτων, αλλά όχι μεγαλύτερων μορίων, όπως πρωτεϊνών, μέχρι να επέλθει τελική ισορροπία μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού της μεμβράνης. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται τελικά αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο βρίσκεται το επιθυμητό ένζυμο.



Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου της διαπίδυσης. [85]

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία, αρχικά η μεμβράνη διαπίδυσης έπρεπε να κοπεί στο επιθυμητό μέγεθος και ύστερα να ακολουθήσει ο καθαρισμός της. Αναφορικά με το μέγεθος της μεμβράνης λήφθηκε υπόψιν ο εμπειρικός κανόνας που υποδεικνύει ότι κάθε cm της μεμβράνης αντιστοιχεί σε 1,5-2 mL του πρωτεϊνικού διαλύματος. Επιπλέον, αφέθηκε ένα περιθώριο 4-5 cm τόσο στο επάνω όσο και στο κάτω μέρος της μεμβράνης ώστε να εφαρμόσουν τα ειδικά μανταλάκια. Αφού η μεμβράνη κόπηκε στο επιθυμητό μέγεθος, τοποθετήθηκε εντός ποτηριού ζέσεως που ήταν πληρωμένο με υπερκάθαρο νερό. Με τη βοήθεια γυάλινου ραβδιού,

πραγματοποιήθηκε προσεκτική ανάδευση της μεμβράνης με σκοπό το ξέπλυμα από το υλικό αποθήκευσής της. Ύστερα, το νερό αποχύθηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες 3 φορές συνολικά έως ότου το νερό να παραμείνει διαυγές. Όλα τα ξεπλύματα πραγματοποιήθηκαν με υπερκάρθαρo νερό. Ύστερα, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε άλλο ποτήρι ζέσεως που περιείχε βραστό υπερκάρθαρo νερό με στόχο την ενυδάτωσή της για τουλάχιστον 30 min. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, η μεμβράνη απομακρύνθηκε από το νερό και ασφαλίστηκε με μανταλάκι στο κάτω μέρος της. Στο πάνω μέρος της ανοίχθηκε με τη βοήθεια μικρού χωνιού και μέσω αυτού αποχύθηκε εντός της μεμβράνης ο όγκος του πρωτεϊνικού διαλύματος. Έπειτα, ασφαλίστηκε και στο πάνω μέρος της με το ειδικό μανταλάκι. Μετά από αυτό το στάδιο, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε δοχείο που περιείχε το επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα σε όγκο τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερο από τον όγκο του ενζυμικού διαλύματος εντός της μεμβράνης. Τέλος, το σύστημα σκεπάστηκε με αλουμινόχαρτο και παρέμεινε στους 4 °C overnight. Μετά το πέρας της διαδικασίας, η μεμβράνη ανοίχθηκε και το περιεχόμενό της τοποθετήθηκε εντός Falcon το οποίο αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 4 °C.

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζονται τα ρυθμιστικά διαλύματα αποθήκευσης για κάθε ένζυμο:

Πίνακας 17. Ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης εκάστοτε ενζύμου.

Ένζυμο	Ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης
DmEst	Talon 0,5x-20 mM imidazole
LCC	Talon 0,5x
Se1JFR	Talon 0,5x
PETase	Talon 0,5x
PHOase	Talon 0,5x
PUase	Talon 0,5x

2.2.3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός ενζύμων

2.2.3.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης ενζύμων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης έγινε μέσω του νόμου Lambert-Beer. Ο νόμος αυτός, συνδέει την απορρόφηση του πρωτεϊνικού διαλύματος στα 280 nm με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Για την εφαρμογή της σχέσης Lambert-Beer απαραίτητη είναι μόνο η γνώση του πάχους της κυψελίδας στην οποία φωτομετρήθηκε το διάλυμα και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας, που είναι χαρακτηριστικό μέγεθος κάθε πρωτεΐνης και υπολογίζεται βάσει της αμινοξικής της ακολουθίας. Η εξίσωση Lambert-Beer είναι η ακόλουθη:

$$A = \epsilon * b * C$$

Όπου, A: η απορρόφηση στα 280 nm

ϵ : ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας (1/(M * cm))

b: το πάχος του κελιού του microplate (cm). Είναι γνωστό από κατασκευής και ίσο με 0,67 cm.

C: η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (mol/L)

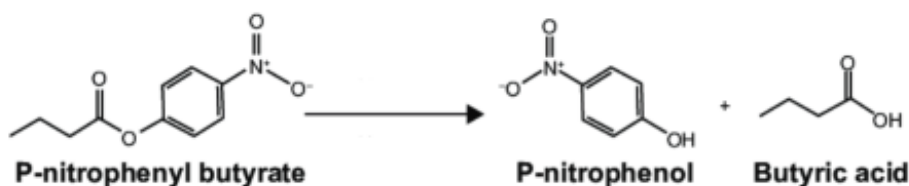
Ωστόσο, αυτό που ενδιαφέρει συνήθως είναι η έκφραση της συγκέντρωσης ως προς μονάδες μάζας και για τον λόγο αυτό η εξίσωση Lambert-Beer, τροποποιείται ως εξής:

$$A = \frac{\epsilon * b * C}{MW} \Rightarrow C = \frac{A * MW}{\epsilon * b}$$

Το μοριακό βάρος των ενζύμων μπορεί να βρεθεί, όπως και στην περίπτωση του συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας, βάσει της αμινοξικής τους ακολουθίας. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτει τελικά η συγκέντρωση σε g/L ή mg/mL.

2.2.3.2. Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης υδρόλυσης του ενζυμικού διαλύματος με ένα κοινά χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα για προσδιορισμό της εστερικής δράσης, που ονομάζεται pNPB. Το pNPB είναι συντομογραφία και η ένωση που αντιπροσωπεύει είναι ο εστέρας του παρα-νιτροφαινόλης βουτυρικού οξέος και όταν υδρολυθεί απελευθερώνονται δύο προϊόντα, η 4-νιτροφαινόλη (pNP) και το βουτυρικό οξύ. Το pNP είναι ένα ασθενές οξύ, η ιονισμένη μορφή του οποίου απορροφά σε μήκος κύματος 410 nm. Μέσω της μέτρησης της απορρόφησης, αυτή μπορεί στη συνέχεια να αναχθεί σε ενεργότητα ενζύμου με τη χρήση κατάλληλης μεθόδου προσδιορισμού που αναφέρεται στο Παράρτημα Γ: Προσδιορισμός ενεργότητας πολυεστερασών σε υπόστρωμα pNPB.



Εικόνα 25. Εστέρας του παρα-νιτροφαινόλης βουτυρικού οξέος και προϊόντα υδρόλυσής του. [86]

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία, παρασκευάστηκε ένα αρχικό διάλυμα pNPB συγκέντρωσης 20 mM σε διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Συγκεκριμένη ποσότητα αυτού του αρχικού διαλύματος, προστέθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών ιόντων με pH=6, ώστε η συγκέντρωση του pNPB στο διάλυμα αυτό να είναι 1,1 mM. Στη συνέχεια 230 μL αυτού του διαλύματος τοποθετήθηκαν σε ένα κελί του microplate στο οποίο προστέθηκαν επίσης 20 μL του ενζυμικού διαλύματος. Με τον τρόπο αυτό, η συγκέντρωση του pNPB στην αντίδραση διαμορφώθηκε σε 1 mM. Ύστερα, ακολούθησε φωτομέτρηση του διαλύματος στα 410 nm, σε θερμοκρασία 35 °C, για χρόνο 10 min με λήψη μέτρησης ανά 20 s. Τα αποτελέσματα μετά το πέρας της φωτομέτρησης μετατράπηκαν σε ενεργότητα ενζύμου. Η συγκεκριμένη διαδικασία έγινε για όλα τα ένζυμα. Για καθεμία περίπτωση πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις (triplicates) για μεγαλύτερη ακρίβεια, ενώ σαν τυφλό διάλυμα, χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης του κάθε ενζύμου.

2.2.3.3. Εύρεση βέλτιστου pH δράσης των ενζύμων

Για την εύρεση του βέλτιστου pH δράσης κάθε ενζύμου, πραγματοποιήθηκε αντίδραση υδρόλυσης χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα το pNPB διαλυμένο σε ρυθμιστικά διαλύματα διαφόρων τιμών pH και είδους ιόντων. Σε καθένα από αυτά τα διαλύματα το pNPB είχε συγκέντρωση 1,1 mM. Σε κάθε περίπτωση το pNPB περιεχόταν σε αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 20 mM και σε διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο. Το είδος των ιόντων και το pH κάθε ρυθμιστικού διαλύματος που μελετήθηκε φαίνονται στον Πίνακα 18:

Πίνακας 18. Ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του βέλτιστου pH δράσης κάθε ενζύμου.

Είδος ιόντων	pH
Κιτρικά-Φωσφορικά	5,0
Κιτρικά-Φωσφορικά	6,0
Φωσφορικά-Φωσφορικά	6,0
Φωσφορικά-Φωσφορικά	7,0
Φωσφορικά-Φωσφορικά	8,0
Tris-HCl	8,0
Tris-HCl	9,0

Ακολούθως, τοποθετήθηκαν σε ένα κελί του microplate 230 μ L ρυθμιστικού διαλύματος/pNPB και 20 μ L του ενζυμικού διαλύματος. Έτσι, στην αντίδραση το pNPB βρισκόταν σε συγκέντρωση 1 mM. Ακολούθησε φωτομέτρηση στα 410 nm, σε θερμοκρασία 35 °C και για χρόνο 10 min με ενδιάμεση λήψη μέτρησης ανά 20 s. Σε καθεμία περίπτωση πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις (triplicate) για αύξηση της ακρίβειας, ενώ σαν τυφλό χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης του κάθε ενζύμου. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο παρατηρήθηκε η μέγιστη απορρόφηση, αποτελεί και το βέλτιστο pH δράσης του εκάστοτε ενζύμου.

Το φωτόμετρο δίνει αξιόπιστες τιμές στο εύρος απορρόφησης 0-1. Για τον λόγο αυτό, στα ένζυμα πραγματοποιήθηκε αραίωση με σκοπό να δίνουν απορρόφηση εντός των ασφαλών ορίων του οργάνου.

2.2.3.4. Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης των ενζύμων

Για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης κάθε ενζύμου, πραγματοποιήθηκε αντίδραση υδρόλυσης του υποστρώματος pNPB σε ένα ορισμένο εύρος θερμοκρασιών και στη συνέχεια συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα όλων των θερμοκρασιών που μελετήθηκαν. Στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν για κάθε ένζυμο:

Πίνακας 19. Μελετώμενες θερμοκρασίες για τον προσδιορισμό της βέλτιστης κάθε ενζύμου.

Ένζυμο	Μελετώμενες τιμές θερμοκρασίας (°C)
DmEst	30, 40, 50, 55, 60, 70
LCC	30, 40, 50, 60, 70, 80, 90
SeIJFR	7, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70
PETase	7, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70
PHOase	7, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60
PUase	7, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα pNPB συγκέντρωσης 20 mM σε διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο. Από αυτό, παραλήφθηκε συγκεκριμένη ποσότητα και προστέθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών pH=6,0, ώστε η συγκέντρωση του pNPB να ισούται με 1,1 mM. Από το διάλυμα αυτό, μεταφέρθηκε ποσότητα ίση με 275 μ L σε Eppendorf των 1,5 mL. Το Eppendorf τοποθετήθηκε σε θερμομίξερ της εκάστοτε θερμοκρασίας και αφέθηκε για 3 min, ώστε το διάλυμα να φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία. Έπειτα, προστέθηκαν στο Eppendorf 25 μ L αραιωμένου ενζυμικού διαλύματος, ώστε η τελική συγκέντρωση του pNPB στον κύριο όγκο της αντίδρασης να είναι 1 mM, και έγινε μια αρχική μικρή ανάδευση, ώστε το διάλυμα να είναι ομοιογενές. Έπειτα, το Eppendorf παρέμεινε εντός του θερμομίξερ της εκάστοτε θερμοκρασίας για 10 min και μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, μεταφέρθηκε σε πάγο για τον τερματισμό της αντίδρασης. Αφού πέρασαν 2-3 min και η αντίδραση τερματίστηκε, 250 μ L από το Eppendorf μεταφέρθηκαν σε κελί του microplate και οδηγήθηκαν για φωτομέτρηση στα 410 nm. Η θερμοκρασία της αντίδρασης στην οποία παρατηρήθηκε η μέγιστη απορρόφηση για κάθε ένζυμο, αποτελεί και τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου. Για κάθε θερμοκρασία, τοποθετήθηκαν στο θερμομίξερ τρία Eppendorf (triplicate), από τα οποία παραλήφθηκε δείγμα για μεγαλύτερη ακρίβεια και σαν τυφλό χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης κάθε ενζύμου.

Το φωτόμετρο δίνει αξιόπιστες τιμές στο εύρος απορρόφησης 0-1. Για τον λόγο αυτό, στα ένζυμα πραγματοποιήθηκε αραιώση με σκοπό να δίνουν απορρόφηση εντός των ασφαλών ορίων του οργάνου.

2.2.3.5. Μελέτη σταθερότητας των ενζύμων σε διάφορες τιμές pH

Η μελέτη της σταθερότητας σε pH, πραγματοποιήθηκε με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων διαφόρων pH και είδους ιόντων. Τα ρυθμιστικά διαλύματα φαίνονται στον Πίνακα 20:

Πίνακας 20. Ρυθμιστικά διαλύματα μελέτης της σταθερότητας των ενζύμων σε τιμές pH.

Είδος ιόντων	pH
Κιτρικά-Φωσφορικά	5,0
Κιτρικά-Φωσφορικά	6,0
Φωσφορικά-Φωσφορικά	6,0
Φωσφορικά-Φωσφορικά	7,0
Φωσφορικά-Φωσφορικά	8,0
Tris-HCl	8,0
Tris-HCl	9,0
Glycine-NaOH	9,0
Glycine-NaOH	10,0

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία, σε ένα Eppendorf των 1,5 mL τοποθετήθηκε συνολικός όγκος 100 μ L που αποτελούνταν από ποσότητα του εκάστοτε ρυθμιστικού διαλύματος μαζί με συγκεκριμένη ποσότητα ενζύμου. Αφού προετοιμάστηκαν τα Eppendorfs για όλες τις τιμές pH παρέμειναν για 24 h στους 4 °C. Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος, τα Eppendorfs μεταφέρθηκαν σε πάγο για να σταματήσει η επίδραση οποιουδήποτε παράγοντα. Το περιεχόμενο των Eppendorf αραιώθηκε με κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών pH=6,0. Η αντίδραση

μελέτης της σταθερότητας σε pH πραγματοποιείται σε τελικό pH=6,0. Για τον λόγο αυτό η αραίωση που πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας των 24 h είχε σκοπό η συγκέντρωση των ιόντων των ρυθμιστικών διαλυμάτων αποθήκευσης να είναι πολύ μικρή, ώστε το pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων αποθήκευσης να μην επηρεάζει το τελικό pH της αντίδρασης. Έπειτα, σε ένα κελί του microplate τοποθετήθηκαν 230 μ L διαλύματος pNPB/ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών pH=6,0 με συγκέντρωση pNPB 1,1 mM. Στο κελί προστέθηκαν ακόμα 20 μ L του αραιωμένου διαλύματος που περιεχόταν το ένζυμο, ώστε η συγκέντρωση του pNPB στην αντίδραση να είναι 1 mM. Το περιεχόμενο του microplate στη συνέχεια φωτομετρήθηκε στα 410 nm, στους 35 °C, για χρόνο 10 min με λήψη μέτρησης ανά 20 s. Η ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για τα ρυθμιστικά διαλύματα των διαφόρων pH, πραγματοποιήθηκε και για την παραμονή κάθε ενζύμου στο αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσής του. Συγκεκριμένα, η μέτρηση που λήφθηκε για το ένζυμο στο ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσής του (Πίνακας 17), χρησιμοποιήθηκε σαν μέτρο σύγκρισης για τις μετρήσεις σε όλα τα υπόλοιπα ρυθμιστικά διαλύματα. Όπως και στις υπόλοιπες μετρήσεις που έχουν αναφερθεί, σε καθεμία περίπτωση πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις (triplicate) για αύξηση της ακρίβειας.

2.2.3.6. Μελέτη σταθερότητας των ενζύμων σε διάφορες θερμοκρασίες

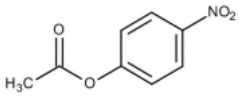
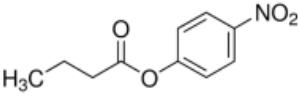
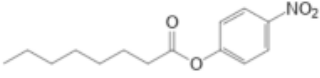
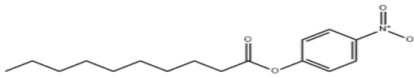
Για τον προσδιορισμό της θερμικής σταθερότητας για κάθε ένζυμο μελετήθηκαν διάφορες τιμές θερμοκρασιών. Για την μελέτη της εκάστοτε θερμοκρασίας τοποθετήθηκε εντός της συσκευής επώασης ένα Eppendorf των 1,5 ml με ορισμένη ποσότητα ενζύμου. Για διάφορες χρονικές στιγμές απομακρύνθηκε ορισμένη ποσότητα ενζύμου και μετρήθηκε η ενεργότητά του. Οι χρονικές στιγμές ήταν επτά και συγκεκριμένα: 1, 3, 5, 8, 24, 48 και 72 h. Σε περιπτώσεις που το ένζυμο δεν ήταν σταθερό σε κάποια θερμοκρασία και απενεργοποιούνταν σε χρονική στιγμή μικρότερη της μίας ώρας, οι χρονικές στιγμές δειγματοληψίας μεταβλήθηκαν και παραλήφθηκε δείγμα στους εξής χρόνους: 15 min, 30 min, 45 min, 1 h. Ακόμα, αν από κάποια χρονική στιγμή και μετά, το ένζυμο σταματούσε να είναι ενεργό σε κάποια θερμοκρασία, δεν πραγματοποιούνταν δειγματοληψία στις μετέπειτα χρονικές στιγμές. Οι θερμοκρασίες στις οποίες μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα των ενζύμων ήταν: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C. Για την παραμονή των Eppendorf σε αυτές τις θερμοκρασίες έγινε χρήση θερμομίξερ, επωαστήρων και υδατόλουτρων. Έτσι, μετά το πέρας κάθε χρονικής στιγμής απομακρύνθηκε, αρχικά, το αντίστοιχο Eppendorf από την θερμοκρασία επώασης και τοποθετήθηκε σε πάγο για να σταματήσει οποιαδήποτε δράση. Όπου ήταν απαραίτητο ακολούθησε περαιτέρω αραίωση του ενζυμικού διαλύματος, ώστε κατά τη φωτομέτρηση οι τιμές απορρόφησης να είναι εντός των ορίων ασφαλείας του οργάνου. Ύστερα, τοποθετήθηκαν στο microplate 230 μ L διαλύματος pNPB/ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών pH=6,0 με συγκέντρωση pNPB 1,1 mM και 20 μ L από το ενζυμικό διάλυμα που βρίσκεται στον πάγο. Έτσι η συγκέντρωση του pNPB στην τελική αντίδραση διαμορφώθηκε στο 1 mM. Ακολούθησε φωτομέτρηση του περιεχομένου στα 410 nm, στους 35 °C, για χρόνο 10 min και λήψη μέτρησης ανά 20 s. Κάθε χρονική στιγμή, πραγματοποιήθηκε αντίδραση και για το ένζυμο που βρισκόταν στους 4 °C, ώστε να είναι το πρότυπο με το οποίο συγκρίθηκαν οι τιμές που προέκυψαν για όλες τις άλλες θερμοκρασίες. Σαν τυφλό κάθε φωτομέτρησης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης κάθε ενζύμου, ενώ σε καθεμία

περίπτωση πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις (triplicate) για αύξηση της ακρίβειας.

2.2.3.7. Μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα

Για μία πιθανή πολυεστεράση είναι σημαντική γνώση η ικανότητα υδρολυτικής διάσπασης του εστερικού δεσμού ανάλογα με το μήκος της αλυσίδας του υποστρώματος, γεγονός που μπορεί να δώσει πληροφορίες για την υδρολυτική δράση του ενζύμου και σε πολυμερικά υλικά. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε έλεγχος εξειδίκευσης του ενζύμου σε υποστρώματα με ίδια χημική δομή αλλά διαφορετικό μήκος αλυσίδας. Τα υποστρώματα που μελετήθηκαν και η δομή τους φαίνεται στον Πίνακα 21:

Πίνακας 21. Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η εξειδίκευση των ενζύμων.

Υπόστρωμα	Δομή
pNPA ή pNP-C ₂ (εστέρας του παρανιτροφαίνυλο ακετικού οξέος)	
pNPB ή pNP-C ₄ (εστέρας του παρανιτροφαίνυλο βουτυρικού οξέος)	
pNPO ή pNP-C ₈ (εστέρας του παρανιτροφαίνυλο οκτανοϊκού οξέος)	
pNPD ή pNP-C ₁₀ (εστέρας του παρανιτροφαίνυλο δεκανοϊκού οξέος)	

Κατά την υδρόλυση όλων των ανωτέρω υποστρωμάτων απελευθερώνεται η ένωση pNP, που απορροφά στα 410 nm, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.2.3.2. Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων, στην οποία αναφέρεται και η πειραματική διαδικασία που είναι ίδια για όλα τα υποστρώματα. Έτσι, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως στην περίπτωση του pNPB. Η τελική αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1 mM του εκάστοτε υποστρώματος. Ωστόσο, στο αρχικό διάλυμα υποστρώματος/ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών pH=6,0 προστέθηκαν και ποσότητες 1%v/v Triton-X και 0,125%w/v αραβικό κόμμι (gum Arabic). Οι ουσίες αυτές είναι τασιενεργά που βοηθούν στη διάλυση των υποστρωμάτων με μεγαλύτερες ανθρακικές αλυσίδες, καθότι αυτά είναι αρκετά ελαιώδη και άρα δυσδιάλυτα στο υδατικής βάσης ρυθμιστικό διάλυμα. Ωστόσο, οι ουσίες αυτές δεν προστέθηκαν μόνο στα διαλύματα των υποστρωμάτων με μεγάλες ανθρακικές αλυσίδες, αλλά σε όλα τα διαλύματα των υποστρωμάτων, με σκοπό το ένζυμο να επηρεάζεται το ίδιο σε όλες τις αντιδράσεις από την ύπαρξη αυτών των ουσιών. Έτσι, σε ένα κελί του microplate, προστέθηκαν 230 μL του διαλύματος που αναλύθηκε παραπάνω και 20 μL του αραιωμένου ενζυμικού διαλύματος. Το microplate, οδηγήθηκε για φωτομέτρηση στα 410 nm, στους 35 °C, για χρόνο 10 min

και με λήψη μέτρησης ανά 20 s. Σαν τυφλό κάθε φωτομέτρησης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης κάθε ενζύμου, ενώ σε καθεμία περίπτωση πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις (triplicate) για αύξηση της ακρίβειας. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίστηκε το υπόστρωμα στο οποίο δρα βέλτιστα το κάθε ένζυμο και η τιμή αυτού συγκρίθηκε με τις τιμές για όλα τα υπόλοιπα υποστρώματα που μελετήθηκαν.

Το φωτόμετρο δίνει αξιόπιστες τιμές στο εύρος απορρόφησης 0-1. Για τον λόγο αυτό, στα ένζυμα πραγματοποιήθηκε αραίωση με σκοπό να δίνουν απορρόφηση εντός των ασφαλών ορίων του οργάνου.

2.2.3.8. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten των ενζύμων

Η αντίδραση Michaelis-Menten είναι:



Όπου, E: ένζυμο

S: υπόστρωμα

ES: ενδιάμεσο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P: προϊόν

Η κινητική Michaelis-Menten δίνεται από την εξίσωση:

$$u = \frac{u_{\max} * [S]}{K_m + [S]}$$

Όπου, u: η ταχύτητα της αντίδρασης κάθε χρονική στιγμή

[S]: η συγκέντρωση υποστρώματος κάθε χρονική στιγμή

u_{\max} : η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης

K_m : σταθερά κινητικής Michaelis-Menten

Η σταθερά της κινητικής Michaelis-Menten δίνεται από την εξίσωση:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

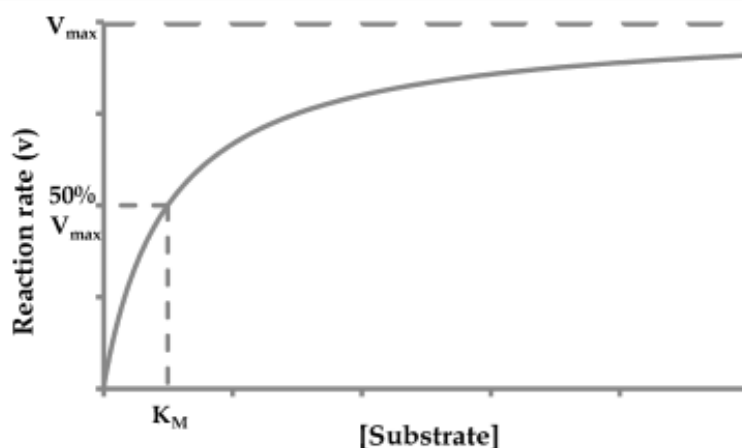
Όπου, k_1 : σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου ES

k_{-1} : η σταθερά διάσπασης του συμπλόκου ES προς E και S

k_2 : η σταθερά σχηματισμού του προϊόντος P

Ακόμη, υπολογίζεται και η σταθερά k_{cat} που προσδιορίζεται από την εξίσωση:
 $k_{cat}(\text{min}^{-1}) = u_{\max} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \right) * MW \left(\frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \right) * 10^{-3}$

Το διάγραμμα Michaelis-Menten αποτυπώνει την εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Το συγκεκριμένο διάγραμμα για τα περισσότερα ένζυμα έχει τη μορφή που παρουσιάζεται στην Εικόνα 26.



Εικόνα 26. Διάγραμμα Michaelis-Menten. [87]

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία μελετήθηκαν τέσσερα υποστρώματα: pNPA, pNPB, pNPO, pNPD (Πίνακας 21) και για κάθε υπόστρωμα παρασκευάστηκαν διαλύματα υποστρώματος/ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών pH=6,0 με μεταβλητές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Στα διαλύματα των υποστρωμάτων pNP-C₈ και pNP-C₁₀ προστίθενται και ποσότητες 1% v/v Triton-X και 0,125% w/v αραβικό κόμμι προκειμένου να υποβοηθηθεί η διαλυτοποίηση. Στη συνέχεια, 230 μ L του διαλύματος της κάθε συγκέντρωσης μεταφέρθηκαν σε ένα κελί του microplate. Στο ίδιο κελί προστέθηκαν και 20 μ L αραιωμένου ενζυμικού διαλύματος και το microplate φωτομετρήθηκε στα 410 nm, στους 35 °C, για 10 min με λήψη μέτρησης ανά 20 s. Σαν τυφλό κάθε φωτομέτρησης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης κάθε ενζύμου, ενώ σε καθεμία περίπτωση πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις (triplicate) για αύξηση της ακρίβειας. Τέλος, έγινε προσαρμογή στο μοντέλο Michaelis-Menten με χρήση του λογισμικού GraphPad. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίστηκαν οι κινητικές v_{max} , k_{cat} και K_m για κάθε υπόστρωμα.

Το φωτόμετρο δίνει αξιόπιστες τιμές στο εύρος απορρόφησης 0-1. Για τον λόγο αυτό, στο ένζυμο πραγματοποιήθηκε αραιώση με σκοπό να δίνουν απορρόφηση εντός των ασφαλών ορίων του οργάνου.

2.2.4. Αντιδράσεις ενζύμων με πολυμερικά πολυεστερικά υλικά

2.2.4.1. Εισαγωγή αντιδράσεων

Για τη μελέτη της δράσης των ενζύμων σε πολυμερικά πολυεστερικά υλικά, καθώς και για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφόρων ενζύμων, επιλέχθηκε μια κοινή αρχική συγκέντρωση ενζύμου 13 μ M. Προκειμένου να επιτευχθεί η συγκεκριμένη συγκέντρωση σε κάθε ένζυμο, πραγματοποιήθηκε αραιώση με το εκάστοτε ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης.

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία, αρχικά ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό 5 mg από κάθε πολυμερική σκόνη και τοποθετήθηκαν σε Eppendorf 1,5 mL. Στη συνέχεια, στο Eppendorf προστέθηκαν 450 μ L ρυθμιστικού διαλύματος, με σκοπό την πραγματοποίηση της αντίδρασης σε συγκεκριμένο pH, και 50 μ L του αραιωμένου διαλύματος (συγκέντρωσης 13 μ M) κάθε ενζύμου. Ακολούθως, τα Eppendorfs τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενους επωαστήρες Eppendorf ρυθμισμένους στην

κατάλληλη θερμοκρασία για κάθε ένζυμο. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση 1300 rpm και για χρονικό διάστημα 3 ημερών (με μοναδική εξαίρεση τις αντιδράσεις της πολυκαπρολακτόνης που είχαν διάρκεια 1 ημέρα). Ανά 24 ώρες πραγματοποιούταν ανανέωση του ενζύμου και στην αντίδραση γινόταν προσθήκη επιπλέον 25 mL ενζυμικού διαλύματος. Η ανανέωση του ενζύμου, εξυπηρετούσε στην αντικατάσταση ποσοτήτων ενζύμου που ήταν πιθανό να έχουν απενεργοποιηθεί λόγω των συνθηκών της αντίδρασης. Μετά το πέρας των 3 ημερών, οι αντιδράσεις σταμάτησαν και τα εναπομείναντα πολυμερικά υλικά οδηγήθηκαν προς επεξεργασία και ανάλυση.

Στον Πίνακα 22, παρουσιάζεται το είδος του ρυθμιστικού διαλύματος και η θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις για κάθε ένζυμο.

Πίνακας 22. Ρυθμιστικό διάλυμα και θερμοκρασία αντίδρασης για κάθε ένζυμο.

Ένζυμο	Ρυθμιστικό διάλυμα	Θερμοκρασία (°C)
DmEst	Φωσφορικών-φωσφορικών pH=7,0	50
LCC	Φωσφορικών-φωσφορικών pH=7,0	50
Se1JFR	Φωσφορικών-φωσφορικών pH=7,0	30
PETase	Φωσφορικών-φωσφορικών pH=7,0	30
PHOase	Φωσφορικών-φωσφορικών pH=6,0	40
PUase	Φωσφορικών-φωσφορικών pH=6,0	40

Για κάθε ένζυμο και κάθε πλαστικό πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις (triplicates), ενώ επίσης για κάθε θερμοκρασία και κάθε πλαστικό έγινε εισαγωγή και τυφλών δειγμάτων, όπου αντί για ένζυμο, προστέθηκε αντίστοιχη ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος αποθήκευσης του κάθε ενζύμου.

2.2.4.2. Απώλεια μάζας των πολυμερικών υλικών

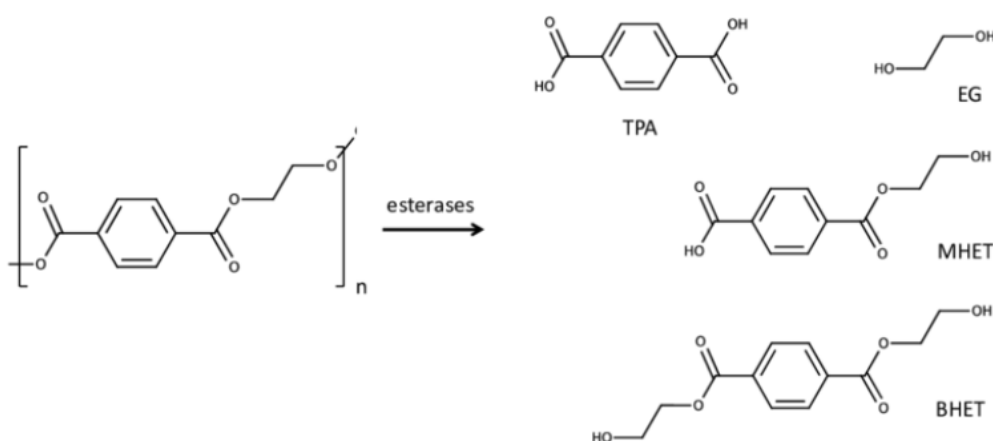
Για τη μελέτη απώλειας μάζας των πολυμερικών υλικών, αρχικά ήταν απαραίτητο η πολυμερική σκόνη που είχε απομείνει μετά την αντίδραση να εκπλυθεί και ύστερα να απομακρυνθεί η υγρασία από αυτήν. Έτσι, μετά το πέρας των αντιδράσεων, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των Eppendorf σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C, υπό ανάδευση 10000 rpm για χρόνο 10 min. Όταν ολοκληρώθηκε η φυγοκέντρηση, απομακρύνθηκε με τη χρήση πιπέτας ο υγρός όγκος (υπερκείμενο) με μεγάλη προσοχή ώστε να μην παρασυρθούν μαζί με το υγρό και κομμάτια σκόνης. Ακολούθησε η έκπλυση της σκόνης. Συγκεκριμένα, σε κάθε Eppendorf προστέθηκε 1 mL υπερκάθαρου νερού και όλα τα Eppendorfs οδηγήθηκαν εκ νέου για φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν αμέσως παραπάνω. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το νερό απομακρύνθηκε προσεκτικά από τη σκόνη με χρήση πιπέτας και η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε συνολικά ακόμα δύο φορές. Μετά την απομάκρυνση του νερού του τελευταίου κύκλου, τα Eppendorfs καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο στο οποίο ανοίχθηκαν μικρές τρύπες για να μπορεί να εξέλθει η

δεσμευμένη υγρασία και αφού προηγήθηκε ψύξη του περιεχομένου τους, τοποθετήθηκαν για ξήρανση στους $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ υπό κενό overnight στη συσκευή λυοφιλίωσης με θάλαμο κενού ALPHA 1-4 της εταιρίας Braun Biotech International. Αφού ολοκληρώθηκε η ξήρανση, τα Eppendorfs με τη σκόνη που είχε απομείνει ζυγίστηκαν και έτσι υπολογίστηκε η απώλεια μάζας του πολυμερικού υλικού.

2.2.4.3. Ανάλυση προϊόντων υδρόλυσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

Σημαντική ένδειξη της δράσης των ενζύμων είναι η απελευθέρωση στον όγκο της αντίδρασης προϊόντων διάσπασης των πολυμερικών υλικών. Η ύπαρξη και η εξακρίβωση των συστατικών αυτών πραγματοποιείται με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ύπαρξη δύο φάσεων, μίας κινητής και μίας στατικής. Οι ουσίες που διαπερνούν τη χρωματογραφική στήλη, κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων ανάλογα με τη συγγένεια που έχουν με κάθε φάση. Ουσίες με μεγαλύτερη συγγένεια με την κινητή φάση, κατανέμονται σε αυτήν με αποτέλεσμα να μετακινούνται πιο γρήγορα και να εκλύονται πρώτες από τη στήλη. Το αντίθετο συμβαίνει με τις ουσίες με μεγαλύτερη συγγένεια με τη στατική φάση. Έτσι, ανάλογα με τον χρόνο έκλυσης κάθε ουσίας μπορεί να ταυτοποιηθεί η ουσία αυτή και στη συνέχεια με διάφορες μεθόδους ποσοτικοποίησης που διαθέτει το λογισμικό να προσδιοριστεί και η ποσότητα της συγκεκριμένης ουσίας στον όγκο της αντίδρασης.

Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης, εφαρμόζεται για τις αντιδράσεις των ενζύμων με όλες τις μορφές του τереφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET). Τα προϊόντα υδρόλυσης του PET είναι το TPA, το MHET και το BHET.



Εικόνα 27. Προϊόντα υδρόλυσης του PET. [88]

Καθένα από τα προϊόντα διάσπασης του PET διαφέρει από το προηγούμενο ως προς την ύπαρξη μίας επιπλέον ομάδας αιθυλενογλυκόλης. Για την ανάλυση των συγκεκριμένων προϊόντων έγινε χρήση στήλης υγρής χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως, όπου η στατική φάση ήταν υδροφοβική, ενώ η κινητή φάση έντονα πολική. Έτσι ο διαχωρισμός των ουσιών έγινε με κριτήριο την υδροφοβικότητα/υδροφιλικότητά τους. Πιο συγκεκριμένα η στατική φάση αποτελούταν από οξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με πολυανθρακικές αλυσίδες 18 ατόμων άνθρακα στη στήλη S 5 ODS2 της εταιρίας SPHERISORB, ενώ η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε, είχε την

ακόλουθη σύσταση: 60% υπερκάθαρο νερό, 20% ακετονιτρίλιο, 20% θειϊκό οξύ 10 mM και ήταν έντονα πολική. Όσον αφορά, τα προϊόντα διάσπασης του PET στις συγκεκριμένες συνθήκες αναμένεται να εκλουσθούν με την εξής σειρά: TPA, MHET, BHET. Αυτό συμβαίνει καθώς με την σειρά αυτή, αυξάνεται και η υδροφοβικότητα των μορίων, λόγω της ύπαρξης μίας επιπλέον ομάδας αιθυλενογλυκόλης που διαθέτει το επόμενο ως προς το προηγούμενο. Έτσι, όσο πιο υδρόφοβο είναι ένα μόριο, τόσο μεγαλύτερη συγγένεια έχει με τη στατική φάση και τόσο περισσότερο θα αργήσει να εξέλθει από τη στήλη.

Όσον αφορά το πειραματικό μέρος, όταν ολοκληρώθηκαν οι αντιδράσεις, ελέγχθηκε ο όγκος του διαλύματος αντίδρασης στα Eppendorfs, καθώς υπήρχε το ενδεχόμενο να έχει επηρεαστεί λόγω της παραμονής σε υψηλές θερμοκρασίες για χρονικό διάστημα τριών ημερών. Σε περίπτωση που υπήρχε διαφορά μεταξύ των όγκων των υγρών, πραγματοποιήθηκε προσθήκη υπερκάθαρου νερού, με σκοπό την εξισορρόπηση του όγκου του υγρού στα 550 μL σε όλες τις αντιδράσεις. Αυτό ήταν πολύ σημαντικό, ώστε στο τέλος να είναι σωστή η σύγκριση των συγκεντρώσεων των προϊόντων υδρόλυσης σε όλες τις αντιδράσεις. Ακολούθως, τα Eppendorfs οδηγήθηκαν για φυγοκέντρηση στους 4 °C, υπό ανάδευση 10000 rpm και για χρόνο 10 min. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, παρελήφθη με προσοχή το υπερκείμενο με τη χρήση πιπέτας. Στο στάδιο αυτό ήταν αναγκαίο να δοθεί προσοχή ώστε να μην απομακρυνθεί μαζί με το υγρό και ποσότητα πολυμερικής στερεής σκόνης. Έπειτα, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο Eppendorf αφού ταυτόχρονα πέρασε από φίλτρο 0,45 μm . Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος HCl 1:1 σε ποσότητα 0,1% v/v ως προς τον όγκο του υγρού στα Eppendorfs. Η προσθήκη HCl συνέβαλε στην απενεργοποίηση τυχόν ποσοτήτων ενζύμου, ώστε να επέλθει τερματισμός της αντίδρασης. Τέλος, από κάθε Eppendorf, παρελήφθη υγρό όγκου 300 μL με τη βοήθεια πιπέτας και μεταφέρθηκε σε δοχεία vials 1,5 mL. Τα vials τοποθετήθηκαν στον υποδοχέα του συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Αξίζει να τονισθεί, επίσης, ότι πριν την έναρξη της δειγματοληψίας είχε προηγηθεί εξισορρόπηση της στήλης με τον διαλύτη της κινητής φάσης και η εισαγωγή των κατάλληλων συνθηκών στο λογισμικό της συσκευής υγρής χρωματογραφίας για την ανάλυση των δειγμάτων και την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι συνθήκες αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 23:

Πίνακας 23. Συνθήκες υγρής χρωματογραφίας για την ανάλυση δειγμάτων PET.

Όγκος δείγματος	Κινητή φάση	Ροή κινητής φάσης	Χρόνος ανάλυσης δείγματος	Μήκος κύματος ανιχνευτή	Θερμοκρασία φούρνου	Μέθοδος
20 μL	60% υπερκάθαρο νερό 20% ακετονιτρίλιο 20% θειϊκό οξύ	0,8 mL/min	15 min	241 nm	38 °C	Ισοκρατική

2.2.4.4. Επίδρασης της ανανέωσης ενζύμου κατά το χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της αντίδρασης

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της ανανέωσης ενζύμου ανά 24 ώρες στον υγρό όγκο της αντίδρασης. Προκειμένου να συμβεί αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο σετ αντιδράσεων της LCC και της DmEst με άμορφο και κρυσταλλικό PET. Στο πρώτο σετ έγινε προσθήκη ενζύμου κατά την έναρξη των

αντιδράσεων και ύστερα ανά 24 ώρες, όπως και σε όλα τα πειράματα αντιδράσεων που αναφέρθηκαν έως τώρα, ενώ στο δεύτερο σετ πραγματοποιήθηκε προσθήκη ενζύμου μόνο κατά την έναρξη των αντιδράσεων. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος των τριών ημερών, οι αντιδράσεις τερματίστηκαν. Στη συνέχεια, και τα δύο σετ αντιδράσεων οδηγήθηκαν προς ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, όπου μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των προϊόντων υδρόλυσης του PET, με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.4.3. Ανάλυση προϊόντων υδρόλυσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).

3. Αποτελέσματα

3.1. Γονίδια ενζύμων

Για τις πειραματικές αναλύσεις μελετήθηκαν έξι ένζυμα. Τα τέσσερα από αυτά επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία, καθώς εμφάνιζαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον τρόπο δράσης τους, ως προς την υδρόλυση διαφόρων πολυεστέρων, ενώ τα άλλα δύο ανακαλύφθηκαν βιοπληροφορικά με βάση την ομολογία τους ως προς τα δύο πιο υποσχόμενα βιβλιογραφικά ένζυμα για δράση στο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), PETase και LCC. Τα γονίδια των ενζύμων παρουσιάζονται στον Πίνακα 24.

Πίνακας 24. Γονίδια μελετώμενων ενζύμων.

Ένζυμο	Είδος	Προέλευση	Αμινοξική ακολουθία
DmEst	Λιπάση	<i>Deinococcus maricopensis</i> (βιοπληροφορική ανάλυση)	MKQIKSNTLLSFLAASALLFSLSA AAANNPAPTPTPTPTPGTPSAYQR GPAPSVSFLQASRGDLSVRTSRVSSFTSGFGGGTIHYPTGTTGTMAAI VVPGYVSAESSIEWWGPKLASYGFVVMTIDTNSGFDQPPSRARQIN SALDYLVSQNSSSRSPVRGMIDTNRLLGVVWWSMGGGGTLRVAEEG RIKAAIPLAPWDTTNFRDNYTPTLIFACQSDVIAPVNQHASPFYINQIPS STDKAFVELSGGSHYCGNGGGVYNNVLGRLGVSWMKRHLQDQTR YDQFLCCGNHESDSRRISEYRGNCSN
LCC [89]	Κουτινάση	Μετάλλαξη τετραπλού σημείου του αρχικού στελέχους (F243I/D238C/S283C/Y127G)	MSNPYQRGNPNTRSALTADGPFVATYTVSRLSVSGFGGGVIYY PTGTSLTFGGIAMSFGYTADASSLAWLGRRLASHGFVVLVINTN SRFDGPDSRASQLSAALNYLRTSSPSAVRARLDANRLAVAGHS MGGGGTLRIAEQNPSLKAAPLTPWHTDKTFNTSVPVLIVGAE ADTVAPVSHAIIPFYQNLPTPKVYVELCNASHIAPNSNNAAIS VYTISWMKLVVDNDTR YRQFLCNVNDPALCDFRTNRRHCQLE HHHHHH
Se1JFR	Λιπάση	- (βιοπληροφορική ανάλυση)	MDAANPYERGPAPTNASIEASRG PYATSQTSVSSLVSGFGGGTIY YPTSTADGTFGAVVISPGFTA YQSSIAWLGPRLASQGFVFTIDTNTT LDQPDSRGRQLLSALDYLQRSSVVRTRVDATRLGVMGHSMGGGG LEAAKSRTSLKAAIPLTGWNTDKTWPELRTPTLVVGDGDTVAPVA THSKPFYELPGSLDKAYLELRGASHFTPTNTSDTTIAKYSISWLKRFID SDTRYEQFLCPIPRPSLTIAEYRGTCPHTSLEHHHHHH
PETase [90]	Υδρολάση	<i>Ideonella sakaiensis</i>	MNFPRASRLMQAAVLGGLMAVS AAATAQTNPYARGPNPTAA SLEASAGPFTVRSFTVSRPSGGYAGTVYYPTNAGGTVGAIAIVP GYTARQSSIKWWGPRLASHGFVVTIDTNSLTDQPSRSSQQMA ALRQVASLNGTSSSPIYGVVDTARMGMVGMWSMGGGGSLISAA NNPSLKAAPQAPWDSSTNFSSVTVPTLIFACENDSIAPVNSAL PIYDSMSRNAKQFLEINGGSHSCANSNGSNQALIGKKGVAWMK RFMDNDTRYSTFACENPNSTRVSDERTANCS
PHOase [91]	Αποπολυμεράση	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MPLRLLCGLLAVCLGQH ALAMDASRCSEPRPTLLRPAEVS CSYQSTWLDLGLVGRKIIYQPLGTPPAGGWPVVLIIYQGSFFP LNDFSYHSNLPFGGYEGKLVQNLDDHGYAVIAPSAPADLFWQ TNIPGLAQAYELSTDYDFLGNVLAASGHFGPLNAQRQYATGI SSGGYNTSRMAVSFPKFRALAVQSGSYATCSGPLCVVPDQLP ADHPPTLFLHGFVDAVVPWWSMDLYYDRLLHQGIETARYTEPL GGHEWFAASPGKVLAWFNAHPLEHHHHHH
PUase [92]	Εστεράση	<i>Comamonas acidovorans</i>	MNSRSLTKAIRFP TILALAGFVSLGAMDCGGSDNDSSNNQG APAVAITVAGVQVAVDRLGMRRYFGIPFAAPPVGNLRWMPAP PQS WAAPLAKTQSNAPCMQTGATDPLRLPNGTEDCLYLDVHAP ATGEGFPFVVMVWIHGGAFFSIGGTITYADPSPLVSKGVVNNIAYR MGAMGFLGHPSLRAADGTVGNYGIMDQQAALRWVQDNIAAF GGDKSNVTIFGESAGGFSVMTHLASPLSKGLFAKAIVQSGGYGF DRQLTQAQLEAQS TSIVNSALAAAGVSCPTVDAACLRGLSAEL VNQLATAFTTANWSPVPSVDGKVLPKSIKATFVAGENNKVPLV NGSNQDEWSYFVASREL VAGPLTAAQYPSYLQTSGLLPPSLAT VYPLTDYGTNTAQQPSLAATAAGTDMHFS CPALNLSKR VLSQA TPIFMYEFRDRTAIPSIGRNTISFNQAGHTYELQYLFNLRDLET AEHRDLQASMAR YWTNFAR TSNPNNGDPVATS WPAFTGPTKV LGLDVASAGGIRELATFETDHCNTAWTSLTFLEHHHHHH

*Με γραφή bold επισημαίνονται τα πεπτίδια σήματος που έχουν βρεθεί με βιοπληροφορική ανάλυση.

3.2. Πρωτεϊνική συγκέντρωση

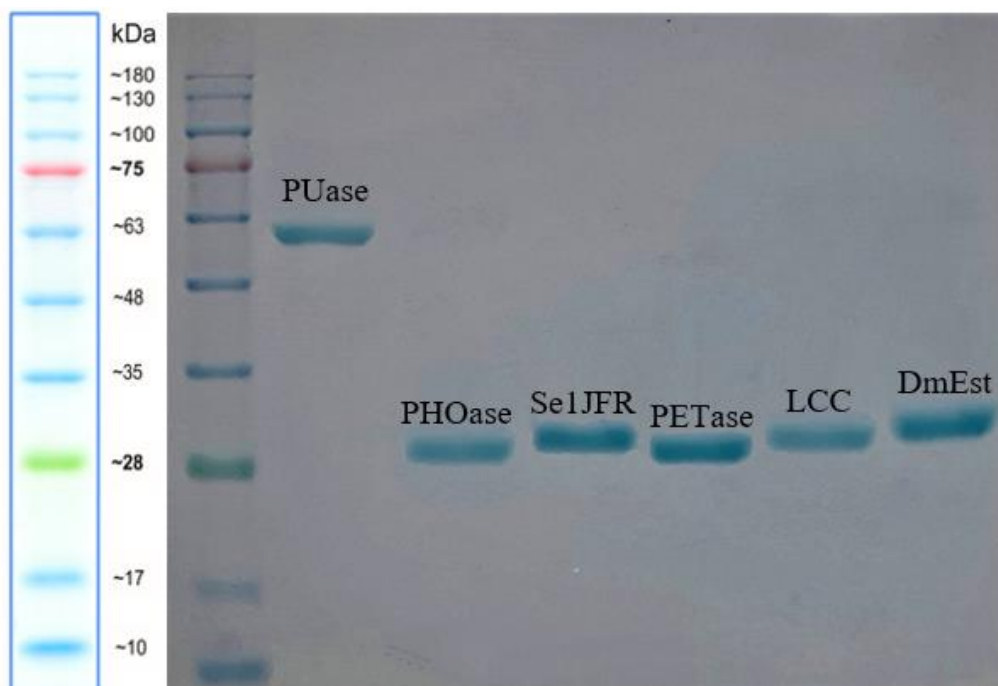
Αφού πραγματοποιήθηκαν όλες οι διαδικασίες παραγωγής, παραλαβής και απομόνωσης των ενζύμων, που αναφέρθηκαν στις παραγράφους 2.2.1. Παραγωγή ενζύμων και 2.2.2. Παραλαβή ενζύμων, υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους στα τελικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στον χαρακτηρισμό και στη μελέτη της δράσης τους. Αυτό έγινε με φωτομέτρηση στα 280 nm και χρήση του νόμου Lambert-Beer. Η συγκέντρωση αυτή παρουσιάζεται στον Πίνακα 25.

Πίνακας 25. Τελικές συγκεντρώσεις των ενζύμων.

Ένζυμο	Συγκέντρωση (mg/mL)	Συγκέντρωση (μM)
DmEst	0,56	18,1
LCC	0,94	32,5
Se1JFR	0,91	31
PETase	0,64	22
PHOase	0,23	7,7
PUase	0,78	13,8

3.3. Αξιολόγηση καθαρότητας των ενζύμων από το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Τα αποτελέσματα της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες ύστερα από τα στάδια χρωματισμού και αποχρωματισμού παρουσιάζονται στην Εικόνα 28.



Εικόνα 28. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην οποία διακρίνονται τα πρωτεϊνικά διαλύματα των ενζύμων (δεξιά) και η αντιστοίχιση των μοριακών βαρών με βάση πρότυπη ένωση (αριστερά).

Από την Εικόνα 28 προσδιορίζονται τα μοριακά βάρη των ενζύμων με βάση την αντιστοίχιση των χρωματισμένων ζωνών με τα μοριακά βάρη στην πρότυπη ένωση.

Πίνακας 26. Προσδιορισμός του μοριακού βάρους των ενζύμων με βάση το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

Ένζυμο	Προσδιοριζόμενο μοριακό βάρος (kDa)
DmEst	≈ 31
LCC	≈ 29
Se1JFR	≈ 30
PETase	≈ 28
PHOase	≈ 29
PUase	≈ 58

3.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός πολυεστερασών

Από τις πολυεστεράσες που μελετήθηκαν, οι τέσσερις (DmEST, Se1JFR, PHOase και PUase) είναι ένζυμα που δεν υπάρχει ο χαρακτηρισμός τους στη βιβλιογραφία. Όσον αφορά την LCC που χρησιμοποιήθηκε, παρότι για το αρχικό στέλεχος υπάρχει βιβλιογραφικός χαρακτηρισμός, δε συμβαίνει το ίδιο και για το στέλεχος με την τετραπλή μετάλλαξη που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Τέλος, όσον αφορά το ένζυμο PETase, υπάρχει ένας στοιχειώδης χαρακτηρισμός βιβλιογραφικά, κυρίως όσον αφορά τη βέλτιστη θερμοκρασία και το βέλτιστο pH δράσης, αλλά δεν είναι ολοκληρωμένος. Για τον λόγο αυτό αλλά και για ανάγκες σύγκρισης μεταξύ των ενζύμων πραγματοποιήθηκε εξολοκλήρου ο χαρακτηρισμός και αυτού του ενζύμου.

3.4.1. Προσδιορισμός ενεργότητας των πολυεστερασών

Η ενεργότητα των πολυεστερασών υπολογίζεται μέσω της απορρόφησης A_{410} του ιονισμένου μορίου pNP που απελευθερώνεται κατά την αντίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα pNPB. Η διαδικασία παρουσιάζεται πιο αναλυτικά στο Παράρτημα Γ: Προσδιορισμός ενεργότητας πολυεστερασών σε υπόστρωμα pNPB. Ακόμα, η ενεργότητα εκφράζεται σε μονάδες Units/mg_{prot}, όπου ως Unit ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol pNP σε χρόνο 1 min. Τα αποτελέσματα της ενεργότητας των ενζύμων παρουσιάζονται στον Πίνακα 27.

Πίνακας 27. Ενεργότητα πολυεστερασών σε υπόστρωμα pNPB.

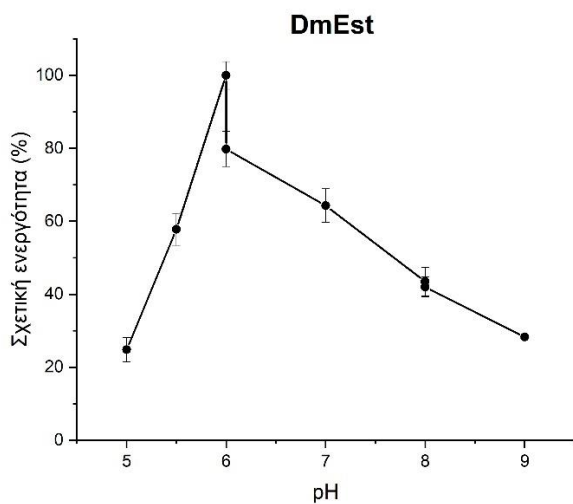
Ένζυμο	Ενεργότητα (Units/mg _{prot})
DmEst	153,5
LCC	229,3
Se1JFR	97,7
PETase	30,5
PHOase	22,0
PUase	92,8

3.4.2. Προσδιορισμός του βέλτιστου pH δράσης των πολυεστερασών

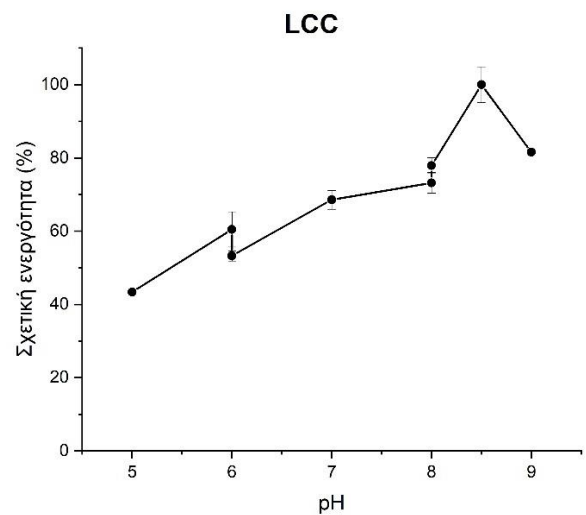
Ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας είναι μία παράμετρος που εξαρτάται από τη φύση του μορίου. Για τον λόγο αυτό, μεταβάλλεται ανάλογα με το pH, εφόσον αλλάζει η αναλογία ιονισμένης/μη ιονισμένης μορφής του μορίου. Έτσι, σχεδιάστηκαν καμπύλες αναφοράς για διάφορες συγκεντρώσεις pNP στις διάφορες τιμές pH με σκοπό τον προσδιορισμό της συσχέτισης της απορρόφησης με τη συγκέντρωση και την

κατάλληλη επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Οι καμπύλες αναφοράς παρουσιάζονται στο Παράρτημα Δ: Καμπύλες αναφοράς pNP για τα ρυθμιστικά διαλύματα διαφόρων pH.

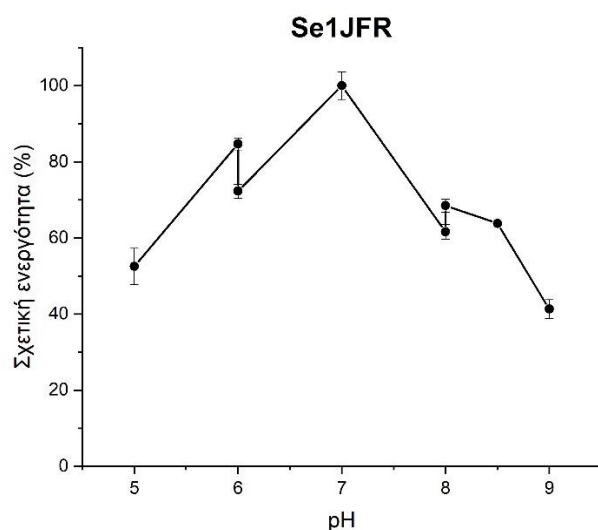
Ο προσδιορισμός του βέλτιστου pH δράσης κάθε ενζύμου γίνεται με τη βοήθεια διαγραμμάτων, όπου στον άξονα x παρουσιάζεται το εύρος των τιμών pH που μελετήθηκαν και στον άξονα y η σχετική ενεργότητα του ενζύμου (%). Η σχετική ενεργότητα για κάθε τιμή pH προσδιορίστηκε σε σύγκριση με την ενεργότητα στην τιμή pH στην οποία εμφανίστηκε η βέλτιστη δράση.



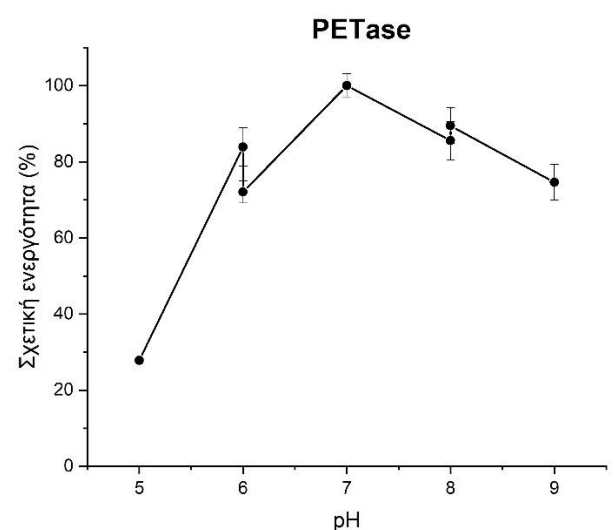
(α)



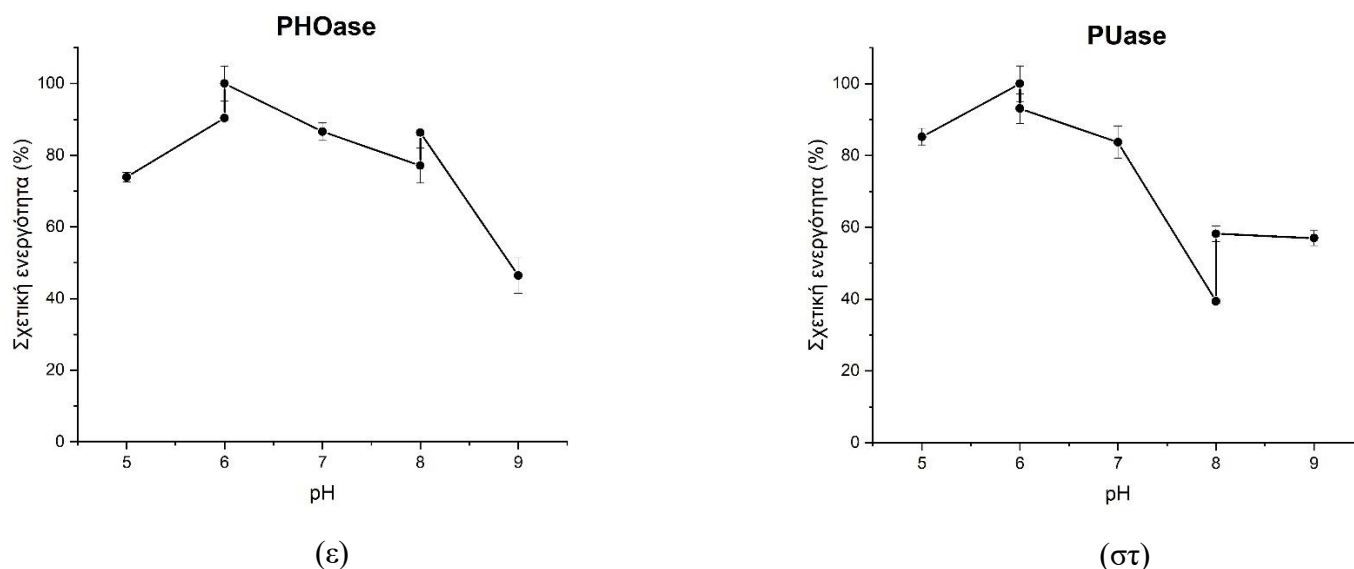
(β)



(γ)



(δ)



Διάγραμμα 1. Σχετική ενεργότητα συναρτήσεως του pH της αντίδρασης για τα ένζυμα: (α) DmEst, (β) LCC, (γ) Se1JFR, (δ) PETase, (ε) PHOase και (στ) PUase.

Η επιλογή του εύρους των μελετώμενων τιμών pH έγινε κυρίως με βάση δύο κριτήρια. Το πρώτο ήταν η φύση των ενζύμων. Τα ένζυμα γενικά, πλην των εξτρεμόφιλων ενζύμων στην κατηγορία των οποίων δεν ανήκουν τα μελετώμενα ένζυμα, χάνουν την ενεργότητά τους σε ακραίες τιμές pH, ενώ όπως διαπιστώθηκε και στην ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο κεφάλαιο 1. Θεωρητικό μέρος και συγκεκριμένα στις παραγράφους 1.2.9.1. Πολυκαπρολακτόνη (PCL) έως 1.2.9.6. Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), τα ένζυμα που ανήκουν στις ίδιες κατηγορίες με τα μελετώμενα, εισάγονταν στα πειράματα σε μέσες τιμές pH. Το δεύτερο κριτήριο αφορά την αυτοϋδρόλυση του υποστρώματος rNPB σε υψηλές τιμές pH (μεγαλύτερες του 9,0) κάτι το οποίο θα οδηγούσε σε πειράματα με μη ασφαλή αποτελέσματα. Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκε ένα μελετώμενο εύρος μέσων τιμών pH=5,0-9,0.

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1 (α) το ένζυμο DmEst εμφάνισε βέλτιστο pH δράσης στην τιμή 6,0 και σε διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών ιόντων. Στις πιο ακραίες τιμές pH που μελετήθηκαν, δηλαδή 5,0 και 9,0, το ένζυμο είχε αρκετά μειωμένη ενεργότητα, περίπου στο 25% της μέγιστης. Στο διάλυμα φωσφορικών-φωσφορικών και pH=6,0 εμφάνισε περίπου το 80% της βέλτιστης δράσης, ενώ σε όλες τις υπόλοιπες τιμές pH η ενεργότητα ήταν κάτω του 65% της μέγιστης. Τέλος, το ένζυμο φαίνεται να έχει σημαντική προτίμηση σε διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών ιόντων έναντι φωσφορικών ιόντων καθότι για την ίδια τιμή pH (pH=6,0) στο μεν πρώτο εμφάνισε ενεργότητα 100% ενώ στο δεύτερο 80%.

Στο Διάγραμμα 1 (β) παρουσιάζεται το ένζυμο LCC που εμφάνισε βέλτιστη δράση σε διάλυμα ιόντων Tris-HCl με pH=8,5. Στα διαλύματα με pH=8,0 και pH=9,0 το ένζυμο είχε ενεργότητα περίπου το 80% της μέγιστης, ενώ είναι αισθητό ότι σε μικρότερες τιμές pH (5,0-7,0) η ενεργότητα ελαττώνεται κατά 10-15% της μέγιστης με πτώση της τιμής του pH κατά μία μονάδα στο διάστημα αυτό.

Αναφορικά με το ένζυμο Se1JFR αυτό παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1 (γ), από το οποίο διαπιστώνεται ότι το βέλτιστο pH δράσης του συγκεκριμένου ενζύμου

εμφανίζεται σε διάλυμα φωσφορικών-φωσφορικών και pH=7,0. Το ένζυμο εμφάνισε, επίσης, αυξημένη ενεργότητα (περίπου 85% της μέγιστης) σε διάλυμα κιτρικών φωσφορικών με pH=6,0. Την ελάχιστη ενεργότητα εμφάνισε το ένζυμο σε pH=9,0, ενώ αρκετά μειωμένη ήταν, επίσης, και σε pH=5,0. Τέλος, αν γίνει σύγκριση της ενεργότητας μεταξύ των όμοιων τιμών pH και διαφορετικού είδους ιόντων, το ένζυμο φαίνεται να δρα ασθενέστερα κατά τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών-φωσφορικών σε σύγκριση με τα ρυθμιστικά διαλύματα άλλου είδους ιόντων.

Όσον αφορά το ένζυμο PETase παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1 (δ). Από εκεί διαπιστώνεται ότι το βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου εμφανίζεται σε διάλυμα φωσφορικών-φωσφορικών με pH=7,0. Γενικά, το ένζυμο εμφανίζει αυξημένη ενεργότητα (κοντά στο 75% και άνω) σε όλες τις τιμές pH και είδη ιόντων, με μοναδική εξαίρεση την τιμή pH=5,0, όπου παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη ενεργότητα (μικρότερη του 30%). Τέλος, όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση του ενζύμου Se1JFR, έτσι και για το ένζυμο PETase η δράση του φαίνεται μειωμένη κατά τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών-φωσφορικών σε σύγκριση με τα ρυθμιστικά διαλύματα άλλου είδους ιόντων.

Στο Διάγραμμα 1 (ε) παρουσιάζεται το ένζυμο PHOase που εμφανίζει βέλτιστο pH δράσης σε διάλυμα φωσφορικών-φωσφορικών με pH=6,0. Το συγκεκριμένο ένζυμο εμφανίζει γενικά υψηλή ενεργότητα της τάξεως του 75% της μέγιστης και άνω σε εύρος τιμών pH=5,0-8,0. Στην τιμή pH=9,0 το ένζυμο εμφανίζει ελαττωμένη ενεργότητα, περίπου 45% της μέγιστης.

Τέλος στο Διάγραμμα 1 (στ) παρουσιάζεται το ένζυμο PUase. Το συγκεκριμένο ένζυμο εμφανίζει βέλτιστη δράση σε διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών ιόντων με pH=6,0. Σε τιμές pH=5,0 και pH=7,0 το ένζυμο φαίνεται να έχει, επίσης, υψηλή ενεργότητα κοντά στο 85% της μέγιστης. Αντίθετα στις τιμές pH=8,0-9,0 η ενεργότητα του ενζύμου ελαττώνεται και ιδιαίτερα για pH=8,0 και διάλυμα φωσφορικών-φωσφορικών η ενεργότητα πέφτει στο 40% της μέγιστης. Αυτό αποτελεί σημαντική ένδειξη ότι η δράση του ενζύμου μειώνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα με το συγκεκριμένο είδος ιόντων. Αυτό μπορεί να γίνει αντιληπτό και κατά τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών-φωσφορικών με pH=6,0, όπου η ενεργότητα ελαττώνεται στο 93% έναντι του 100% στο ίδιο pH και σε διάλυμα με κιτρικά-φωσφορικά ιόντα.

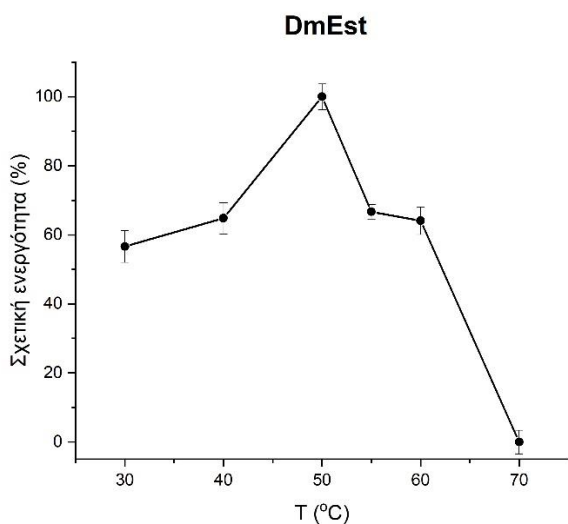
Στον Πίνακα 28 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα για το βέλτιστο pH δράσης των μελετώμενων πολυεστεράσεων.

Πίνακας 28. Βέλτιστο pH (pH_{optimum}) δράσης κάθε πολυεστεράσης.

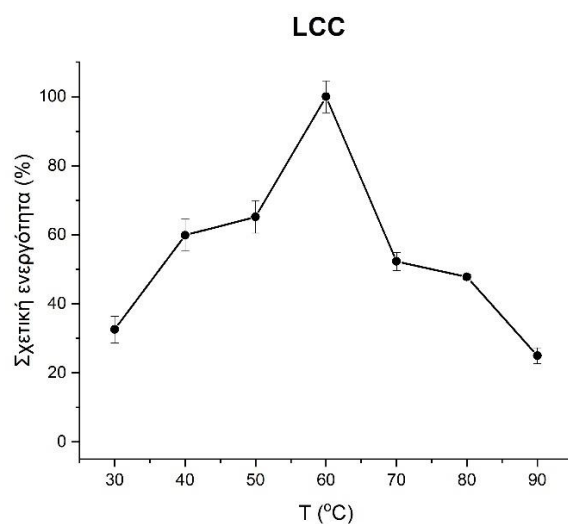
Ένζυμο	Βέλτιστο pH (pH_{optimum})	Είδος ιόντων
DmEst	6,0	Κιτρικά-Φωσφορικά
LCC	8,5	Tris-HCl
Se1JFR	7,0	Φωσφορικά-Φωσφορικά
PETase	7,0	Φωσφορικά-Φωσφορικά
PHOase	6,0	Φωσφορικά-Φωσφορικά
PUase	6,0	Κιτρικά-Φωσφορικά

3.4.3. Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης των πολυεστερασών

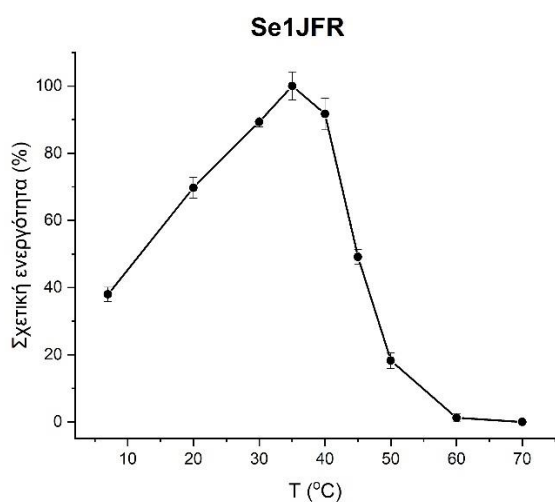
Ο προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης κάθε ενζύμου γίνεται με τη βοήθεια διαγραμμάτων, όπου στον άξονα x παρουσιάζεται το εύρος των θερμοκρασιών που μελετήθηκαν και στον άξονα y η σχετική ενεργότητα του ενζύμου (%). Η σχετική ενεργότητα για την κάθε θερμοκρασία προσδιορίστηκε σε σύγκριση με την ενεργότητα στη θερμοκρασία στην οποία εμφανίστηκε η βέλτιστη δράση.



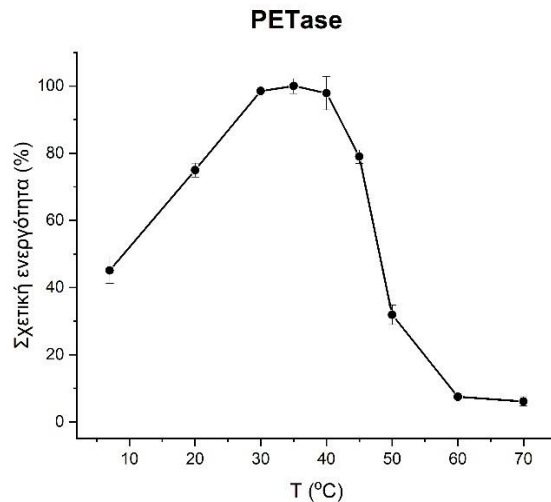
(α)



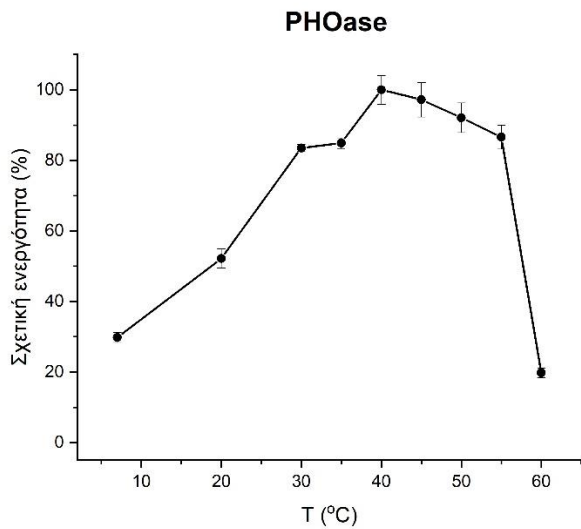
(β)



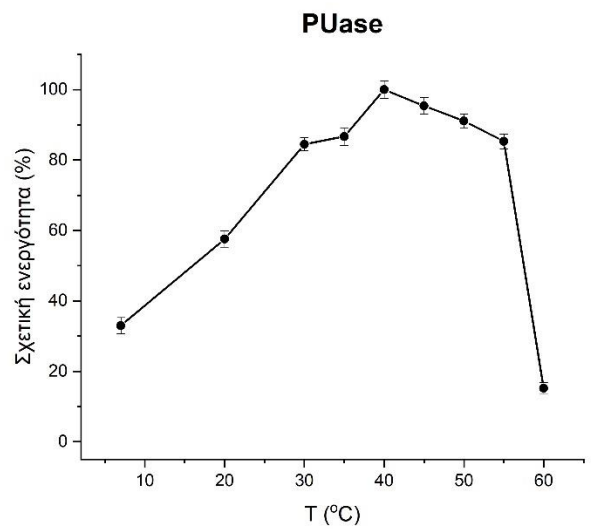
(γ)



(δ)



(ε)



(στ)

Διάγραμμα 2. Σχετική ενεργότητα συναρτήσεως της θερμοκρασίας της αντίδρασης για τα ένζυμα: (α) DmEst, (β) LCC, (γ) Se1JFR, (δ) PETase, (ε) PHOase και (στ) PUase.

Η επιλογή των θερμοκρασιών που μελετήθηκαν έγινε με βάση τη φύση και την προέλευση των ενζύμων. Το ένζυμο DmEst προέρχεται από έναν μικροοργανισμό που συναντάται σε εδάφη της ερήμου, ενώ το ένζυμο LCC είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι είναι θεμόφιλο. Έτσι, επιλέχθηκε για τα ένζυμα αυτά να γίνει μελέτη και σε υψηλότερες θερμοκρασίες δράσης. Όσον αφορά τα υπόλοιπα ένζυμα, η επιλογή των θερμοκρασιών στηρίχθηκε, αρχικά, στο ότι δεν προέρχονται από εξτρεμόφιλους μικροοργανισμούς και εν συνεχεία σε βιβλιογραφικά δεδομένα ενζύμων με κοινά χαρακτηριστικά με τα μελετώμενα.

Στο Διάγραμμα 2 (α) παρουσιάζεται το ένζυμο DmEst. Προκύπτει ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι οι 50 °C, κάτι το οποίο καθιστά το ένζυμο θεμόφιλο. Το ένζυμο εμφανίζει μειωμένη ενεργότητα περίπου στο 65% της μέγιστης σε τιμές 5-10 °C γύρω από τη θερμοκρασία που εμφανίζεται η βέλτιστη δράση. Ένα ακόμα σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι παρότι το ένζυμο είναι θεμόφιλο, στους 70 °C έχει χάσει πλήρως την ενεργότητά του.

Στο Διάγραμμα 2 (β) παρουσιάζεται η μελέτη της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου LCC. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο ένζυμο έχει την υψηλότερη ενεργότητα σε θερμοκρασία 60 °C. Ακόμα, διαπιστώνεται ότι στις υπόλοιπες θερμοκρασίες το ένζυμο εμφανίζει αρκετά μειωμένη ενεργότητα με την αμέσως καλύτερη να εμφανίζεται στους 50 °C και να προσδιορίζεται ως το 65% της μέγιστης.

Όσον αφορά τη μελέτη βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου Se1JFR, αυτή παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 2 (γ). Το συγκεκριμένο ένζυμο δρα βέλτιστα στους 35 °C εμφανίζοντας, όμως, αρκετά υψηλή ενεργότητα και στις θερμοκρασίες των 30 °C και 40 °C. Στους 45 °C παρουσιάζεται ακαριαία μείωση της ενεργότητας του ενζύμου, ενώ σε θερμοκρασίες 60 °C και 70 °C το ένζυμο καθίσταται πρακτικά ανενεργό.

Στο Διάγραμμα 2 (δ) παρουσιάζεται η μελέτη για το ένζυμο PETase. Από αυτό προκύπτει ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του συγκεκριμένου ενζύμου είναι οι 35

°C, όπως και στην περίπτωση του ενζύμου Se1JFR. Το ένζυμο PETase εμφανίζει εξαιρετική δράση, κοντά στο 100%, και στις θερμοκρασίες 30 °C και 40 °C. Ακόμα σε θερμοκρασίες 20 °C και 45 °C εμφανίζει επίσης σημαντική δράση της τάξης του 75-80% της μέγιστης. Σε θερμοκρασίες ίσες ή υψηλότερες των 50 °C, η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται αισθητά, ενώ σε θερμοκρασίες 60 °C και 70 °C το ένζυμο χάνει σχεδόν πλήρως την ενεργότητά του.

Στο Διάγραμμα 2 (ε) παρουσιάζεται η μελέτη που αφορά το ένζυμο PHOase. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι οι 40 °C. Ακόμα, διαπιστώνεται ότι σε θερμοκρασίες 45 και 50 °C το ένζυμο εμφανίζει εξαιρετική δράση (πάνω από 90% της μέγιστης), ενώ και στις θερμοκρασίες 30 °C, 35 °C και 55 °C η δράση παραμένει αρκετά καλή (σχεδόν 85%). Τέλος, ένα πολύ σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι στους 60 °C η δράση του ενζύμου ελαττώνεται ραγδαία και η ενεργότητά του πέφτει κάτω από το 20% της μέγιστης.

Στο Διάγραμμα 2 (στ) φαίνεται η μελέτη της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου PUase. Η θερμοκρασία αυτή καθορίστηκε στους 40 °C. Όσον αφορά τις υπόλοιπες θερμοκρασίες που μελετήθηκαν το ένζυμο PUase είχε ακριβώς όμοια συμπεριφορά με το ένζυμο PHOase.

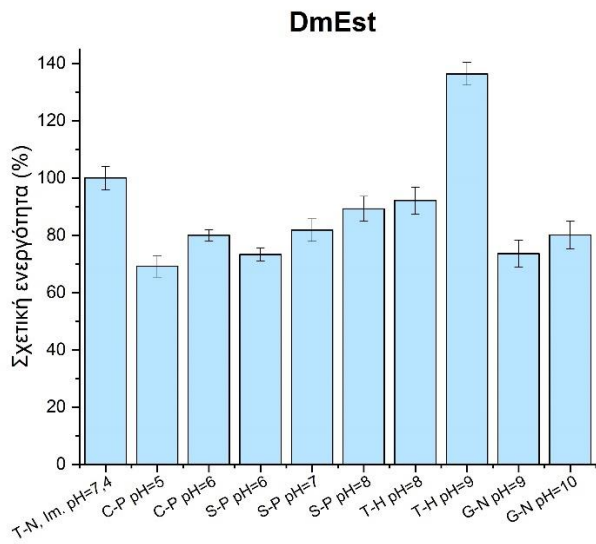
Στον Πίνακα 29 παρουσιάζονται ολοκληρωμένα τα αποτελέσματα της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης των πολυεστερασών.

Πίνακας 29. Βέλτιστη θερμοκρασία (T_{optimum}) δράσης κάθε πολυεστεράσης.

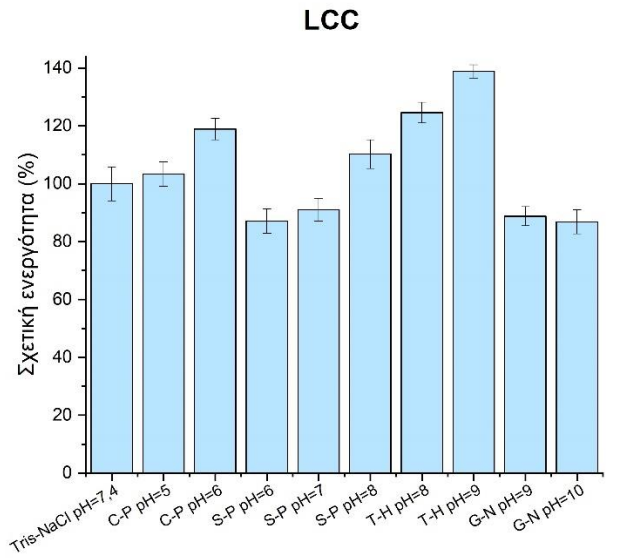
Ένζυμο	Βέλτιστη θερμοκρασία (T_{optimum})
DmEst	50 °C
LCC	60 °C
Se1JFR	35 °C
PETase	35 °C
PHOase	40 °C
PUase	40 °C

3.4.4. Προσδιορισμός της σταθερότητας των πολυεστερασών σε διάφορες τιμές pH

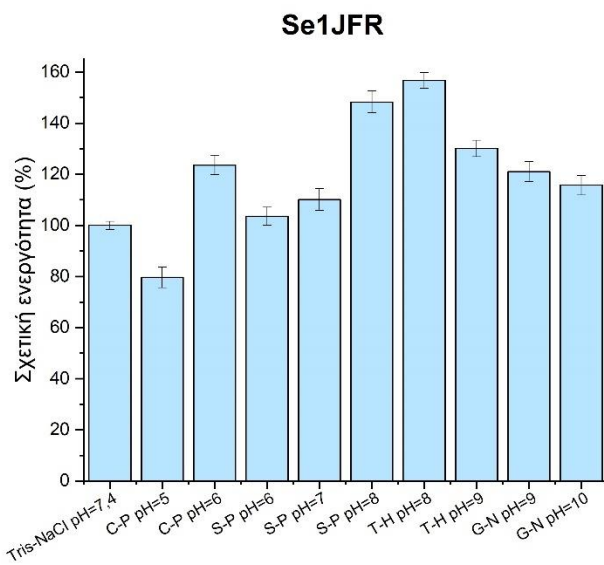
Ο προσδιορισμός της σταθερότητας των ενζύμων σε διάφορες τιμές pH γίνεται με τη βοήθεια ραβδογραμμάτων, όπου στον άξονα x φαίνεται το είδος των ρυθμιστικών διαλυμάτων και στον άξονα y η σχετική ενεργότητα (%). Σημειώνεται ότι ως 100% ενεργότητα θεωρήθηκε αυτή που είχε το ένζυμο κατά την παραμονή του στο ρυθμιστικό διάλυμα αρχικής αποθήκευσής του. Η σχετική ενεργότητα για όλα τα υπόλοιπα διαλύματα υπολογίστηκε σε σύγκριση με αυτήν.



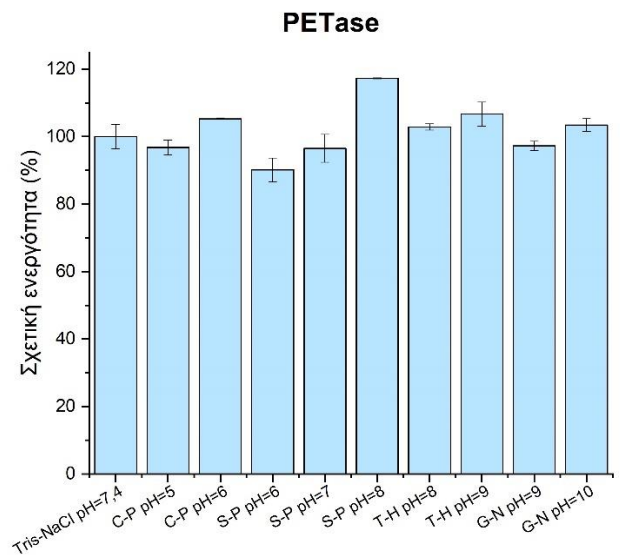
(α)



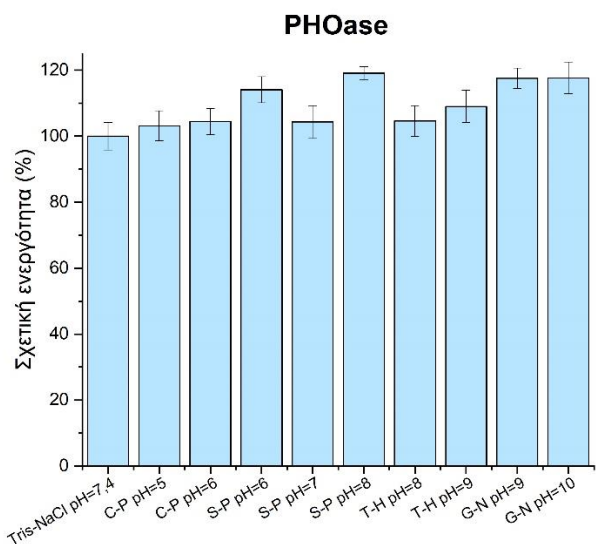
(β)



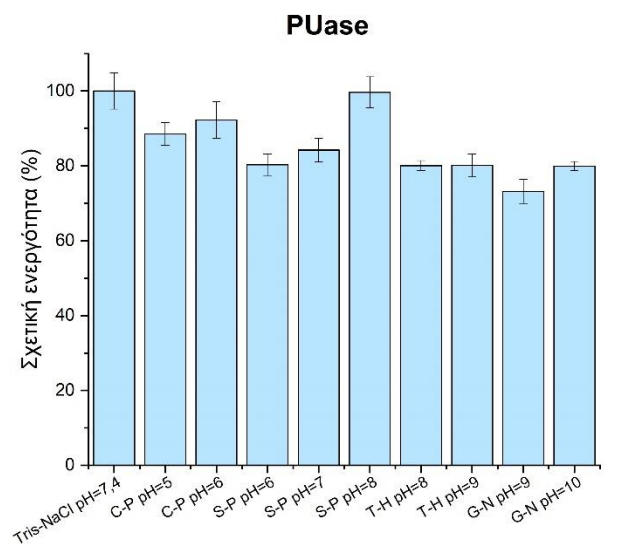
(γ)



(δ)



(ε)



(σ)

Διάγραμμα 3. Σχετική ενεργότητα στα διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα αποθήκευσης: (α) DmEst, (β) LCC, (γ) SeIJFR, (δ) PETase, (ε) PHOase και (στ) PUase.

Στο Παράρτημα Ε: Ισοηλεκτρικό σημείο (pI) πολυεστερασών παρατίθενται τα ισοηλεκτρικά σημεία των μελετώμενων ενζύμων.

Όσον αφορά το ένζυμο DmEst (Διάγραμμα 3 (α)), με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τα πειράματα σταθερότητας σε pH διαπιστώθηκε γενικά ότι με αύξηση της αλκαλικότητας μέχρι pH=9,0 αυξάνεται σταδιακά και η σταθερότητα του ενζύμου. Για το ίδιο pH και αποθήκευση σε διαφορετικό είδος ιόντων, διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο είναι πιο σταθερό σε κιτρικά-φωσφορικά ιόντα παρά σε φωσφορικά. Αντίστοιχα, ανάμεσα σε φωσφορικά και ιόντα της βάσης Tris, το ένζυμο είναι πιο σταθερό στην δεύτερη περίπτωση. Το ένζυμο παρουσιάζει την ελάχιστη σταθερότητα σε pH=5,0 και αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι αυτή η τιμή pH είναι αρκετά όξινη και δεν ευνοείται η διαλυτότητα. Η βέλτιστη σταθερότητα εμφανίζεται σε pH=9,0 σε ιόντα της βάσης Tris και είναι η μοναδική περίπτωση που είναι προτιμότερη σε σχέση με την αποθήκευση σε Talon 0,5x, Imidazole 20mM. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η τιμή pH=9,0 είναι μεν κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο του ενζύμου αλλά όχι τόσο όσο η τιμή pH=7,4, στην οποία το ένζυμο ενδεχομένως θα καθιζάνει πιο γρήγορα. Μία άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι το διάλυμα με pH=9,0 έχει συγκέντρωση αλάτων 200 mM, ενώ το διάλυμα αποθήκευσης του ενζύμου έχει συγκέντρωση αλάτων 195 mM. Αυτή η μικρή αύξηση στη συγκέντρωση των αλάτων στην πρώτη περίπτωση αλλά και η διαφορετική φύση των ιόντων πιθανώς βοηθά τη σταθεροποίηση του ενζύμου. Τέλος, παρότι γενικά παρατηρείται αύξηση της σταθερότητας με αύξηση του pH, αξίζει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην περίπτωση αποθήκευσης σε ιόντα γλυκίνης. Τότε, λοιπόν, το ένζυμο εμφανίζει μεν μεγαλύτερη σταθερότητα σε pH=10,0 σε σχέση με το pH=9,0 και άρα εξακολουθεί να ισχύει το γενικό μοτίβο, αλλά η σταθερότητα εμφανίζεται μειωμένη σε σχέση με τα υπόλοιπα ρυθμιστικά διαλύματα pH=8,0 και pH=9,0. Από αυτό προκύπτει το συμπέρασμα ότι η σταθερότητα του ενζύμου επηρεάζεται αρνητικά από την ύπαρξη των ιόντων γλυκίνης στα υψηλά pH.

Γενικά, όσον αφορά το ένζυμο LCC (Διάγραμμα 3 (β)), αυτό εμφανίζει ικανοποιητική σταθερότητα σε όλα τα pH που εξετάστηκαν και μάλιστα και σε σύγκριση με την αποθήκευση σε Talon 0,5x. Αυτό δείχνει ότι το ένζυμο είναι πιο σταθερό σε υψηλότερη συγκέντρωση αλάτων, καθώς το Talon 0,5x έχει συγκέντρωση αλάτων 175 mM, ενώ όλα τα υπόλοιπα ρυθμιστικά διαλύματα έχουν συγκέντρωση 200 mM. Μεταξύ των ρυθμιστικών διαλυμάτων με ίδια φύση ιόντων το ένζυμο είναι πιο σταθερό όσο το pH αυξάνεται. Αυτό δεν παρατηρείται μόνο στην περίπτωση των ρυθμιστικών διαλυμάτων με ιόντα γλυκίνης, στα οποία γενικά εμφανίζεται κι η μικρότερη σταθερότητα του ενζύμου. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα ιόντα γλυκίνης δεν είναι ευνοϊκά για την αποθήκευση του ενζύμου LCC. Ανάμεσα στα διαλύματα ίδιου pH και διαφορετικής φύσης ιόντων, το ένζυμο παραμένει πιο σταθερό στα κιτρικά-φωσφορικά ιόντα παρά στα φωσφορικά και αντίστοιχα στα ιόντα της βάσης Tris σε σχέση με τα φωσφορικά. Για τον λόγο αυτό, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι μέσες τιμές pH, δηλαδή pH=6,0 και pH=7,0, και η χρήση διαλύματος φωσφορικών-φωσφορικών, δεν είναι ευνοϊκές παράμετροι για την αποθήκευση του ενζύμου. Η βέλτιστη σταθερότητα του ενζύμου επιτυγχάνεται σε pH=9,0 και σε ιόντα της βάσης Tris. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση αλάτων που σταθεροποιεί το ένζυμο αλλά και στην

ιδιαίτερη συνεισφορά των ιόντων Tris, καθώς οι δύο τιμές pH που χρησιμοποιήθηκαν τα συγκεκριμένα ιόντα είναι και οι δύο καλύτερες τιμές από άποψης σταθερότητας του ενζύμου.

Με βάση τα πειράματα που διενεργήθηκαν για την Se1JFR (Διάγραμμα 3 (γ)), παρατηρήθηκε ότι το συγκεκριμένο ένζυμο εμφανίζει υψηλότερη σταθερότητα σε όλες τις τιμές pH και σε όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα σε σχέση με το Talon 0,5x εκτός της τιμής pH=5,0, που αποτελεί αρκετά όξινη τιμή για το ένζυμο. Το γεγονός της αυξημένης σταθερότητας στα ρυθμιστικά διαλύματα που εξετάστηκαν σε σχέση με το Talon 0,5x, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αυξημένη συγκέντρωση αλάτων σταθεροποιεί το ένζυμο. Στο εύρος τιμών pH=5,0-8,0, με αύξηση της αλκαλικότητας παρατηρείται αύξηση της σταθερότητας του ενζύμου, ενώ σε τιμές pH=8,0-10,0, ισχύει το αντίστροφο. Αυτό, αποδεικνύει ότι για το ένζυμο είναι πιο ευνοϊκές οι μέσες τιμές pH, δηλαδή οι τιμές pH=6,0-8,0, ενώ οι πιο όξινες και πιο αλκαλικές, δηλαδή pH=5,0 και pH=9,0-10,0 είναι λιγότερο ευνοϊκές για τη σταθερότητά του. Ανάμεσα στα διαλύματα ίδιου pH και διαφορετικής φύσης ιόντων, το ένζυμο παρέμεινε πιο σταθερό στα κιτρικά-φωσφορικά ιόντα παρά στα φωσφορικά και αντίστοιχα στα ιόντα της βάσης Tris σε σχέση με τα φωσφορικά. Έτσι προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα διαλύματα με φωσφορικά ιόντα πρέπει να αποφεύγονται για την αποθήκευση του ενζύμου. Η βέλτιστη συνθήκη αποθήκευσης είναι σε τιμή pH=8,0 και σε ιόντα βάσης Tris. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα προηγούμενα συμπεράσματα σχετικά με την προτίμηση αυξημένης συγκέντρωσης αλάτων και τη χρήση μέσων τιμών pH.

Με βάση τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι το ένζυμο PETase (Διάγραμμα 3 (δ)) με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων ίδιων ιόντων, εμφάνισε υψηλότερη σταθερότητα με αύξηση της αλκαλικότητας. Μεταξύ των διαλυμάτων ίδιου pH αλλά διαφορετικής φύσης ιόντων, διαπιστώθηκε ότι είναι πιο ευνοϊκή η χρήση κιτρικών-φωσφορικών ιόντων έναντι φωσφορικών και αντίστοιχα η χρήση φωσφορικών έναντι ιόντων της βάσης Tris. Η χαμηλότερη τιμή σταθερότητας εμφανίζεται σε pH=5,0-7,0. Η υψηλότερη τιμή σταθερότητας εμφανίζεται σε pH=8,0 και με χρήση διαλύματος φωσφορικών-φωσφορικών. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ένζυμο είναι πιο σταθερό σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων και σε μέσες προς αλκαλικές τιμές pH.

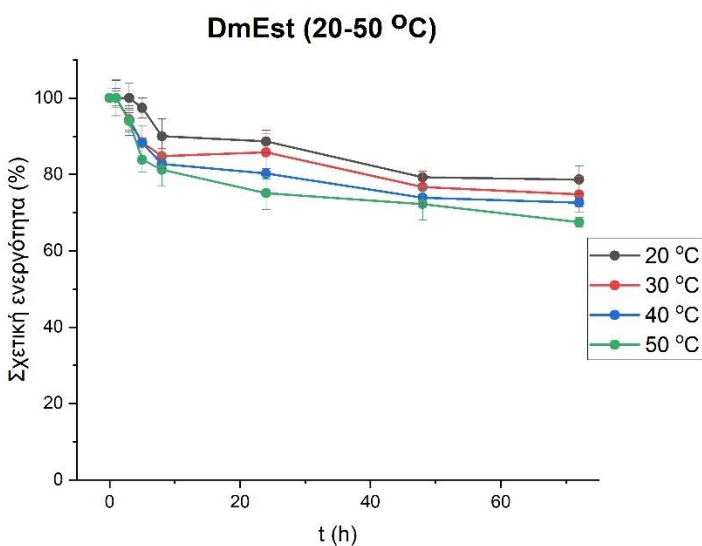
Όσον αφορά την PHOase (Διάγραμμα 3 (ε)), με βάση τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι το συγκεκριμένο ένζυμο ήταν πιο σταθερό σε όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα που μελετήθηκαν σε σχέση με το Talon 0,5x, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ένζυμο είναι πιο σταθερό σε υψηλότερα επίπεδα αλάτων. Ακόμα, φαίνεται ότι σε διαλύματα με όμοιο είδος ιόντων, με αύξηση του pH, αυξάνεται και η σταθερότητα του ενζύμου. Η μοναδική εξαίρεση είναι μεταξύ των τιμών pH=6,0 και pH=7,0, όπου εμφανίζεται μείωση της σταθερότητας με αύξηση του pH, κάτι το οποίο δικαιολογείται, αφού το ισοηλεκτρικό σημείο του ενζύμου είναι μεταξύ αυτών των δύο τιμών. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ίδια τιμή pH και διαφορετικό είδος ιόντων, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το ένζυμο είναι πιο σταθερό σε φωσφορικά ιόντα τόσο σε σύγκριση με τα κιτρικά-φωσφορικά όσο και σε σύγκριση με τα ιόντα της βάσης Tris. Η βέλτιστη περίπτωση σταθερότητας για το ένζυμο εμφανίζεται κατά τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών-φωσφορικών pH=8,0. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το ένζυμο φαίνεται να

παραμένει πολύ σταθερό και κατά την χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων γλυκίνης τόσο σε pH=9,0 όσο και σε pH=10,0.

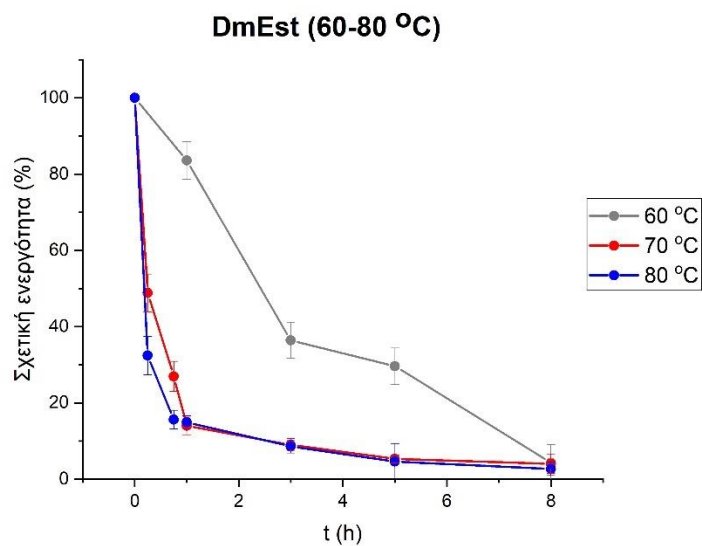
Αναφορικά με την PUase (Διάγραμμα 3 (στ)), στα ρυθμιστικά διαλύματα που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε μειωμένη σταθερότητα σε σχέση με το Talon 0,5x, το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η σταθερότητα του ενζύμου ευνοείται σε χαμηλότερη συγκέντρωση αλάτων. Μεταξύ των ρυθμιστικών διαλυμάτων με όμοιο είδος ιόντων, φαίνεται ότι η σταθερότητα βελτιώνεται με αύξηση της αλκαλικότητας. Μεταξύ των ρυθμιστικών διαλυμάτων με διαφορετικό είδος ιόντων και όμοιο pH, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το ένζυμο είναι πιο σταθερό με χρήση κιτρικών-φωσφορικών ιόντων σε σχέση με χρήση φωσφορικών ιόντων και όμοια με χρήση φωσφορικών ιόντων συγκριτικά με τα ιόντα της βάσης Tris. Η βέλτιστη σταθερότητα για το ένζυμο παρατηρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-φωσφορικών και pH=8,0. Τέλος παρατηρείται ότι χαμηλότερη σταθερότητα έχει το ένζυμο ύστερα από την αποθήκευσή του σε διάλυμα γλυκίνης τόσο σε pH=9,0 όσο και σε pH=10,0. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι για την αποθήκευση του ενζύμου πρέπει να αποφεύγονται ρυθμιστικά διαλύματα με ιόντα γλυκίνης καθώς και υψηλές τιμές pH, οι οποίες είναι αρκετά αλκαλικές για το συγκεκριμένο ένζυμο.

3.4.5. Προσδιορισμός της σταθερότητας των πολυεστερασών σε διάφορες τιμές θερμοκρασιών

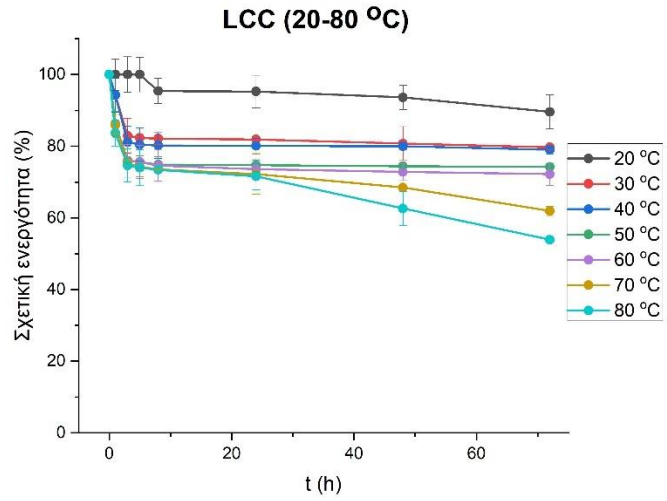
Ο προσδιορισμός της σταθερότητας των ενζύμων σε διάφορες τιμές θερμοκρασιών γίνεται με τη βοήθεια διαγραμμάτων, στα οποία αποτυπώνονται καμπύλες που η καθεμία αντιπροσωπεύει μία θερμοκρασία και όπου στον άξονα x παρουσιάζεται ο χρόνος, ενώ στον άξονα y η σχετική ενεργότητα (%) του ενζύμου. Σημειώνεται ότι ως 100% ενεργότητα θεωρήθηκε αυτή που είχε το ένζυμο κατά την αποθήκευση και παραμονή του σε θερμοκρασία 7 °C. Η σχετική ενεργότητα για όλα τα υπόλοιπα διαλύματα υπολογίστηκε σε σύγκριση με αυτήν.



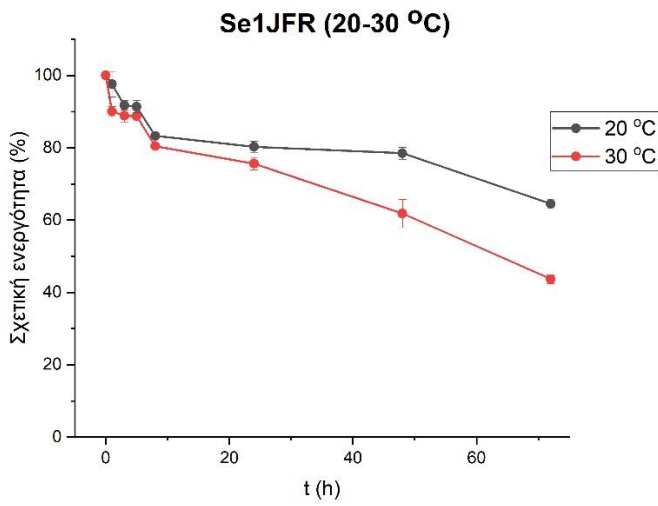
(α)



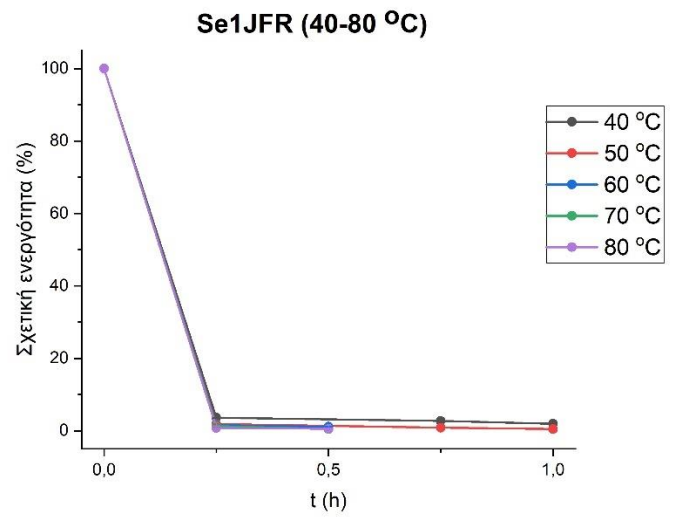
(β)



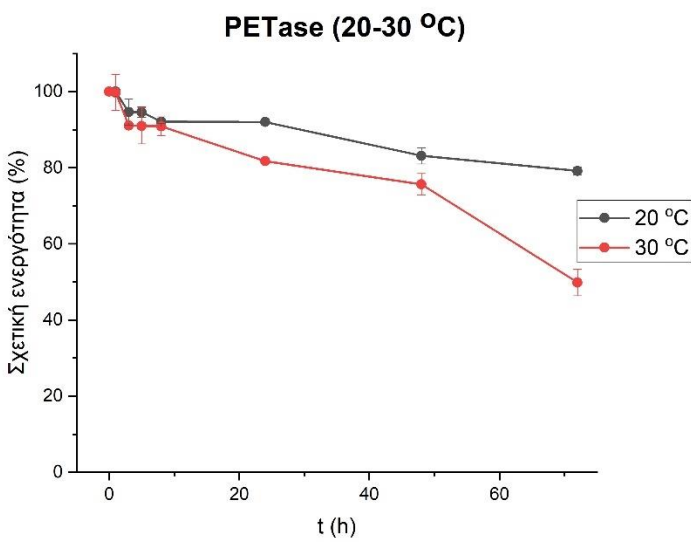
(γ)



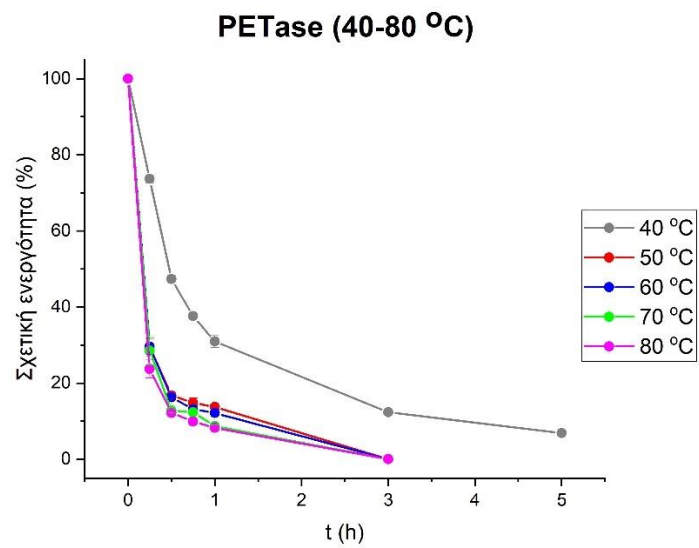
(δ)



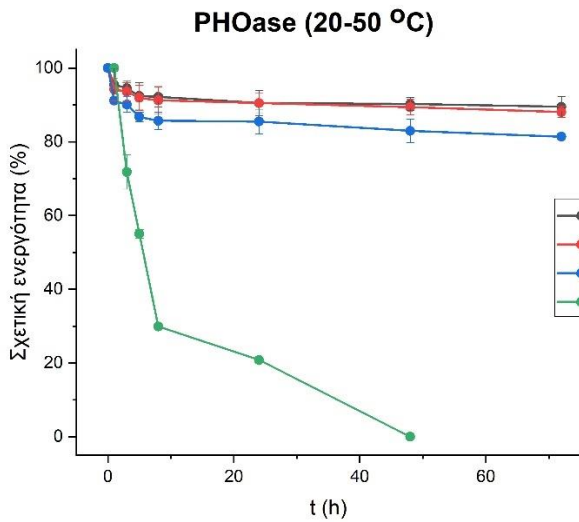
(ε)



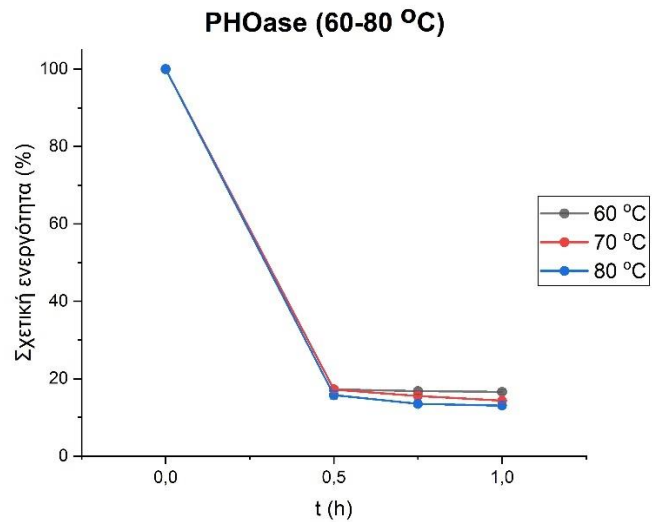
(στ)



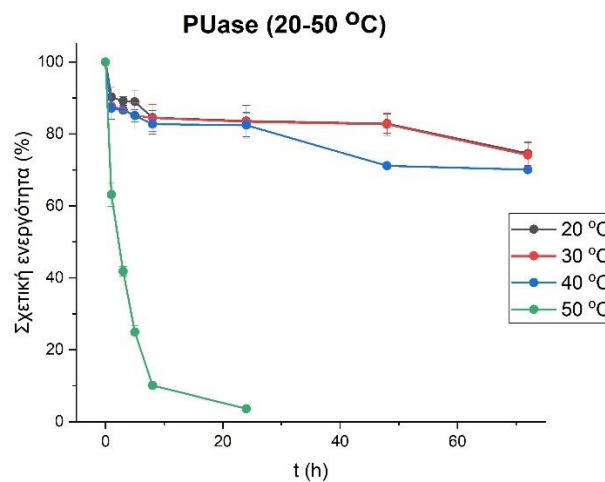
(ζ)



(η)



(θ)



(ι)

Διάγραμμα 4. Υπολειπόμενη ενεργότητα σε διάφορες θερμοκρασίες για τα ένζυμα: (α) και (β): DmEst, (γ): LCC, (δ) και (ε): Se1JFR, (στ) και (ζ): PETase, (η) και (θ): PHOase και (ι): PUase.

Στο Διάγραμμα 4 (α) και (β) παρουσιάζεται η μελέτη θερμικής σταθερότητας για το ένζυμο DmEst. Για θερμοκρασίες 20 °C, 30 °C και 40 °C παρατηρείται ότι η υπολειπόμενη ενεργότητα του ενζύμου είναι πάνω από 70% ύστερα από 72 h, ενώ και στους 50 °C η υπολειπόμενη ενεργότητα έχει τιμή που προσεγγίζει το 70% την ίδια χρονική στιγμή. Από αυτό προκύπτει το συμπέρασμα ότι το ένζυμο είναι αρκετά ανθεκτικό σε θερμοκρασίες μέχρι τους 50 °C. Αντίθετα, στους 60 °C το ένζυμο φαίνεται να είναι αρκετά ενεργό ύστερα από 1 h με υπολειπόμενη ενεργότητα πάνω από 80%, αλλά στις μετέπειτα χρονικές στιγμές, η υπολειπόμενη ενεργότητα ελαττώνεται ραγδαία, έως ότου ύστερα από 8 h, το ένζυμο φαίνεται να έχει απενεργοποιηθεί πλήρως. Στους 70 °C και στους 80 °C το ένζυμο δεν διατηρεί την ενεργότητά του, αφού μόλις μετά από 15 min η υπολειπόμενη ενεργότητά του είναι κάτω από 50%, ενώ ύστερα από 8 h το ένζυμο έχει πρακτικά απενεργοποιηθεί.

Στο Διάγραμμα 4 (γ) παρουσιάζεται η μελέτη σταθερότητας σε διάφορες τιμές θερμοκρασιών για το ένζυμο LCC. Το συγκεκριμένο ένζυμο φαίνεται γενικά ανθεκτικό

σε όλες τις τιμές θερμοκρασιών που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, ύστερα από 72 h το ένζυμο στους 20 °C διατηρεί το 90% της δράσης του, ενώ στους 30 °C και στους 40 °C το 80% της δράσης του. Στην ίδια χρονική στιγμή, στους 50 °C και στους 60 °C το ένζυμο διατηρεί πάνω από το 70% της δράσης του, στους 70 °C πάνω από το 60% της δράσης του και στους 80 °C πάνω από το 50% της δράσης του. Αυτή η συμπεριφορά είναι αξιοσημείωτη για ένα ένζυμο. Ωστόσο, να αναφερθεί ότι κάτι τέτοιο ήταν αναμενόμενο, καθώς η συγκεκριμένη μετάλλαξη που μελετήθηκε είχε σαν σκοπό την περαιτέρω αύξηση της θερμοανθεκτικότητας του ενζύμου.

Στο Διάγραμμα 4 (δ) και (ε) παρουσιάζεται η μελέτη θερμικής σταθερότητας του ενζύμου Se1JFR. Παρατηρείται ότι στους 20 °C και στους 30 °C μετά το πέρας των 72 h, το ένζυμο έχει υπολειπόμενη ενεργότητα 65% και 45% αντίστοιχα. Στους 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C και 80 °C το ένζυμο φαίνεται να είναι αρκετά ασταθές, αφού ακόμα και ύστερα από 15 min παραμονής στις συγκεκριμένες θερμοκρασίες, είχε χάσει σχεδόν πλήρως τη δράση του.

Στο Διάγραμμα 4 (στ) και (ζ) παρουσιάζεται η μελέτη θερμικής σταθερότητας για το ένζυμο PETase. Ύστερα από 72 h στους 20 °C το ένζυμο φαίνεται αρκετά ενεργό με υπολειπόμενη ενεργότητα σχεδόν 80%, ενώ στους 30 °C κατά το ίδιο διάστημα η υπολειπόμενη ενεργότητα είναι 50%. Στους 40 °C το ένζυμο έχει υπολειπόμενη ενεργότητα 50% μετά από 30 min, ενώ μετά από 5 h το ένζυμο έχει σχεδόν πλήρως απενεργοποιηθεί. Στους 50 °C, 60 °C, 70 °C και 80 °C, το ένζυμο έχει υπολειπόμενη ενεργότητα κάτω από 30% ύστερα από χρόνο 30 min, ενώ μετά από 1 h έχει χάσει σχεδόν όλη τη δράση του.

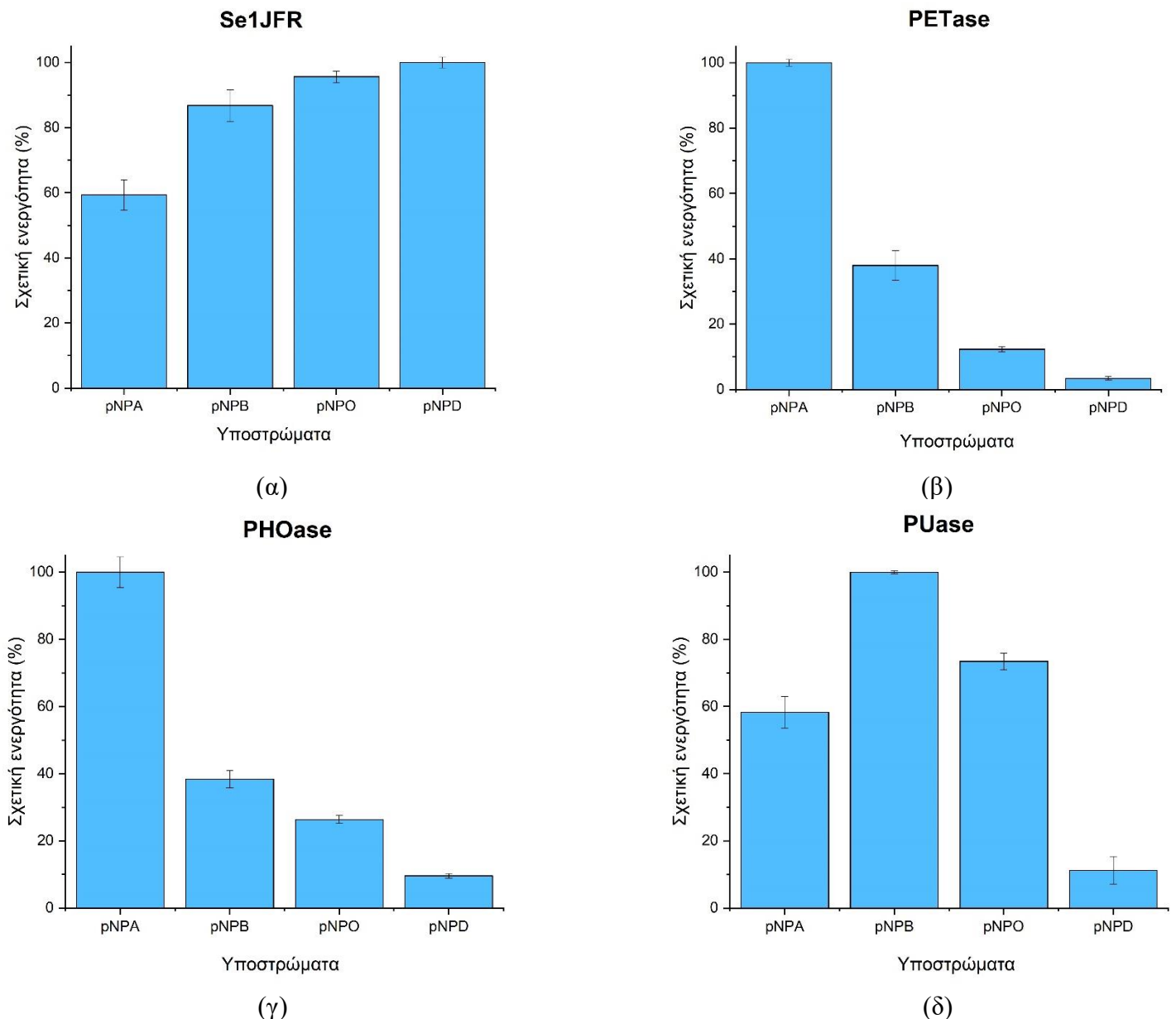
Στο Διάγραμμα 4 (η) και (θ) παρουσιάζεται η μελέτη σταθερότητας σε διάφορες τιμές θερμοκρασιών για το ένζυμο PHOase. Εκεί φαίνεται ότι το ένζυμο μετά το πέρας των 72 h στους 20 °C, 30 °C και 40 °C έχει υπολειπόμενη ενεργότητα πάνω από 80%. Το γεγονός αυτό καθιστά το ένζυμο αρκετά ανθεκτικό στις συγκεκριμένες θερμοκρασίες. Στους 50 °C, το ένζυμο έχει πάνω από 50% υπολειπόμενη ενεργότητα μετά το πέρας 3 h, ενώ μετά από 24 h η υπολειπόμενη ενεργότητα έχει πέσει κάτω από 10%. Στους 60 °C, 70 °C και 80 °C, το ένζυμο παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά, όπου μετά από 1 h παραμονής σε αυτές τις θερμοκρασίες, η υπολειπόμενη ενεργότητά του είναι κοντά στο 15%.

Στο Διάγραμμα 4 (ι) παρουσιάζεται η μελέτη θερμικής σταθερότητας για το ένζυμο PUase. Μετά το πέρας των 72 h, το ένζυμο έχει υπολειπόμενη ενεργότητα πάνω από 70% στους 20 °C, 30 °C και 40 °C, γεγονός που το καθιστά σημαντικά ανθεκτικό στις συγκεκριμένες θερμοκρασίες. Στους 50 °C, το ένζυμο έχει υπολειπόμενη ενεργότητα 40% μετά από 3 h, ενώ μετά από 24 h έχει σχεδόν πλήρως απενεργοποιηθεί. Στο διάγραμμα δεν παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες 60 °C, 70 °C και 80 °C, καθότι το ένζυμο είχε καταστεί ανενεργό ήδη στα πρώτα 15 min.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι και στα έξι ένζυμα όσον αφορά μία συγκεκριμένη θερμοκρασία, η υπολειπόμενη ενεργότητα ελαττωνόταν με το πέρασμα του χρόνου, ενώ όσον αφορά μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή η υπολειπόμενη ενεργότητα μειωνόταν με αύξηση της θερμοκρασίας.

3.4.6. Προσδιορισμός της εξειδίκευσης των πολυεστερασών σε διάφορα υποστρώματα

Για τα ένζυμα Se1JFR, PETase, PHOase και PUase πραγματοποιήθηκε έλεγχος εξειδίκευσης σε τέσσερα υποστρώματα: pNPA, pNPB, pNPO και pNPD. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης παρουσιάζονται σε ραβδογράμματα, όπου στον άξονα x παρουσιάζεται το είδος του υποστρώματος και στον άξονα y η σχετική ενεργότητα (%). Ως 100% ενεργότητα θεωρήθηκε για κάθε ένζυμο αυτή την οποία εμφάνιζε στο υπόστρωμα με τη μέγιστη δράση. Η σχετική ενεργότητα για τα υπόλοιπα υποστρώματα υπολογίστηκε βάσει αυτής της τιμής.



Διάγραμμα 5. Μελέτη εξειδίκευσης ως προς τα υποστρώματα pNPA, pNPB, pNPO και pNPD για τα ένζυμα: (α) Se1JFR, (β) PETase, (γ) PHOase και (δ) PUase.

Στο Διάγραμμα 5 (α) παρουσιάζεται η μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα για το ένζυμο Se1JFR. Παρατηρείται ότι το συγκεκριμένο ένζυμο έχει τη μεγαλύτερη δράση στο υπόστρωμα pNPD που είναι αυτό με τη μεγαλύτερη ανθρακική αλυσίδα.

Ακόμη, διαπιστώνεται ότι η δράση του ενζύμου αυξάνεται τμηματικά με την αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας του υποστρώματος. Βέβαια, δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην ενεργότητα του ενζύμου μεταξύ των υποστρωμάτων pNPB, pNPO και pNPD και αυτή προσδιορίζεται στα 87%, 96% και 100% αντίστοιχα. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι το συγκεκριμένο ένζυμο δρα καλύτερα σε εστερικά υποστρώματα μεγαλύτερου μήκους αλυσίδας.

Στο Διάγραμμα 5 (β) παρουσιάζεται η μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα για το ένζυμο PETase. Εδώ, παρατηρείται ακριβώς αντίθετη δράση σε σχέση με το ένζυμο Se1JFR. Δηλαδή, το ένζυμο δρα βέλτιστα στο pNPA που είναι το υπόστρωμα με την μικρότερη ανθρακική αλυσίδα, ενώ η δράση του ελαττώνεται τμηματικά με αύξηση της αλυσίδας. Εδώ, παρατηρείται μία πιο αισθητή ελάττωση της δραστηριότητας του ενζύμου όταν μεταβάλλεται το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, συγκεκριμένα από 100% ενεργότητα στο υπόστρωμα pNPA εμφανίζει ενεργότητα κάτω του 40% στο υπόστρωμα pNPB, ενώ στα υποστρώματα pNPO και pNPD η ενεργότητα είναι 12% και 3% αντίστοιχα.

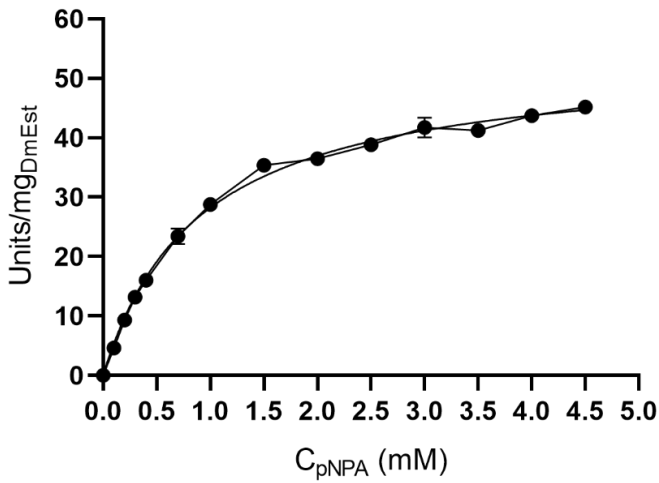
Στο Διάγραμμα 5 (γ) παρουσιάζεται η μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα για το ένζυμο PHOase. Το συγκεκριμένο ένζυμο εμφανίζει ίδιο προφίλ δράσης με το ένζυμο PETase, δηλαδή με αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας ελαττώνεται η δραστηριότητά του. Η τιμή της σχετικής ενεργότητας για τα υποστρώματα pNPA και pNPB είναι επίσης στα ίδια όρια με το ένζυμο PETase, ενώ στα υποστρώματα pNPO και pNPD εμφανίζεται μια μικρή διαφοροποίηση με την PHOase να εμφανίζει ενεργότητα 26% και 10% αντίστοιχα στα δύο αυτά υποστρώματα.

Στο Διάγραμμα 5 (δ) παρουσιάζεται η μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα για το ένζυμο PUase. Το συγκεκριμένο ένζυμο εμφανίζει τη βέλτιστη δράση στο υπόστρωμα pNPB. Την αμέσως καλύτερη τιμή σχετικής ενεργότητας εμφανίζει το ένζυμο στο υπόστρωμα pNPO (σχεδόν 75%), ενώ η χειρότερη δράση παρατηρείται στο υπόστρωμα pNPD με την ενεργότητα να έχει τιμή 11% της μέγιστης. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο ένζυμο εμφανίζει καλύτερη δραστηριότητα σε υποστρώματα με μέσες σε μήκος ανθρακικές αλυσίδες (4-8 άτομα άνθρακα).

3.4.7. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten

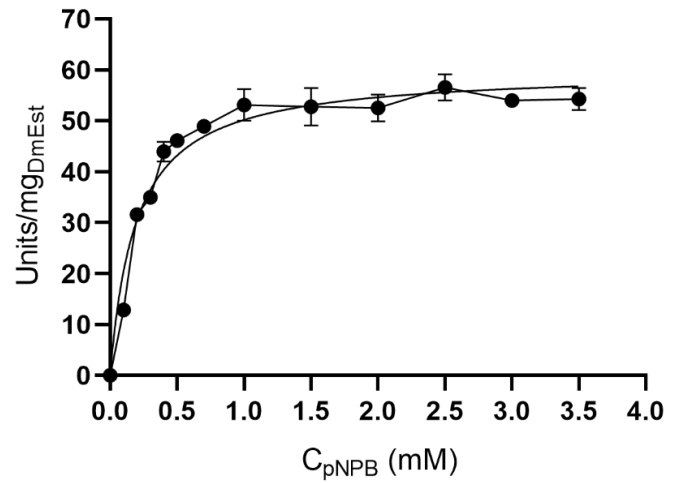
Με βάση και προηγούμενα πειράματα μελέτης της δράσης των ενζύμων σε πλαστικά, το ένζυμο DmEst είναι αυτό που αναμένεται να έχει την καλύτερη αποτελεσματικότητα (κυρίως στο PET που είναι το πλαστικό με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον) σε σχέση με τα υπόλοιπα καινοτόμα ένζυμα. Για τον λόγο αυτό, για το συγκεκριμένο ένζυμο δεν έγινε απλά μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα, αλλά κατάστρωση κινητικών μοντέλων Michaelis-Menten για τα υποστρώματα pNPA, pNPB, pNPO και pNPD. Αρχικά, παρουσιάζονται τα διαγράμματα Michaelis-Menten του ενζύμου για όλα τα υποστρώματα που μελετήθηκαν και στη συνέχεια οι σταθερές κάθε κινητικού μοντέλου που προέκυψαν με προσαρμογή. Στα διαγράμματα Michaelis-Menten στον άξονα x απεικονίζεται η συγκέντρωση του υποστρώματος και στον άξονα y η ενεργότητα του ενζύμου.

DmEst Activity = $f(C_{pNPA})$



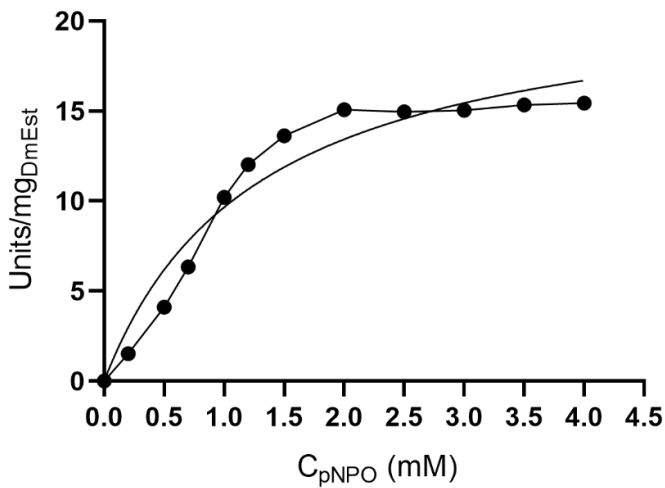
(α)

DmEst Activity = $f(C_{pNPB})$



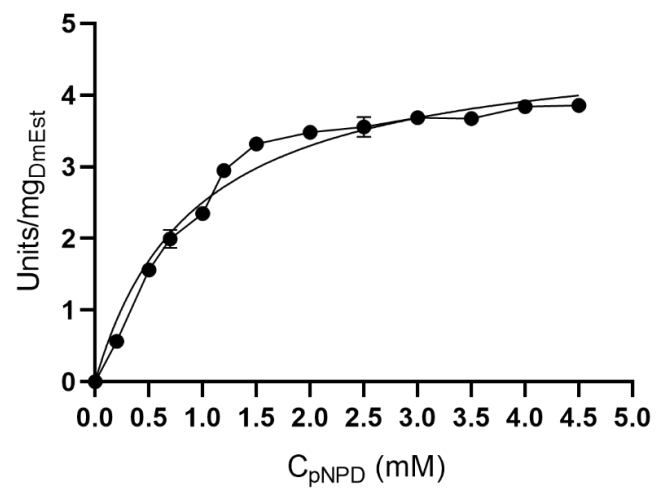
(β)

DmEst Activity = $f(C_{pNPO})$



(γ)

DmEst Activity = $f(C_{pNPD})$



(δ)

Διάγραμμα 6. Διάγραμμα Michaelis-Menten του ενζύμου DmEst με τα υποστρώματα: (α) pNPA, (β) pNPB, (γ) pNPO και (δ) pNPD.

Η μορφή των διαγραμμάτων Michaelis-Menten είναι αυτή που αναμενόταν θεωρητικά και που παρουσιάζεται στην Εικόνα 26. Από την προσαρμογή των δεδομένων προκύπτουν τα μεγέθη K_m και v_{max} , ενώ υπολογίζεται και η σταθερά k_{cat} , με τον τρόπο που παρουσιάστηκε στην παράγραφο 2.2.3.8. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten των ενζύμων. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 30.

Πίνακας 30. Κινητικές σταθερές Michaelis-Menten και δείκτης προσαρμογής του μοντέλου για το ένζυμο DmEst και τα μελετώμενα υποστρώματα.

Υπόστρωμα	u_{max} (Units/ mg _{prot})	K _m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m	Δείκτης προσαρμογής του μοντέλου (R^2)
pNPA	53,600±0,694	0,9004±0,0366	27,54±0,69	30,58±1,46	0,9964
pNPB	59,900±1,406	0,1938±0,0212	30,78±1,41	158,80±18,89	0,9635
pNPO	22,060±1,541	1,2850±0,2287	11,33±1,54	8,82±1,21	0,9488
pNPD	4,816±0,146	0,9245±0,0872	2,47±0,15	2,68±0,30	0,9671

Γενικά, το ένζυμο DmEst εμφανίζει υψηλές τιμές u_{max} για τα υποστρώματα pNPA και pNPB, χαμηλότερη τιμή για το υπόστρωμα pNPO και την χαμηλότερη τιμή για το υπόστρωμα pNPD. Από άποψης συγγένειας του ενζύμου με τα υποστρώματα, φαίνεται ότι το ένζυμο DmEst έχει τη μεγαλύτερη συγγένεια με το υπόστρωμα pNPB, λόγω της μικρότερης τιμής της σταθεράς K_m . Ακολουθεί το υπόστρωμα pNPA και μετά το υπόστρωμα pNPD με μικρή διαφορά μεταξύ τους. Τη μικρότερη συγγένεια εμφανίζει το ένζυμο με το υπόστρωμα pNPO. Ο δείκτης προσαρμογής για όλα τα μοντέλα έχει τιμές μεγαλύτερες από 95%, καθιστώντας την προσαρμογή του μοντέλου Michaelis-Menten στατιστικά ακριβή.

Όσον αφορά τη σταθερά k_{cat} αυτή έχει τη μεγαλύτερη τιμή στο υπόστρωμα pNPB. Αρκετά κοντινή είναι και η τιμή της συγκεκριμένης σταθεράς στο υπόστρωμα pNPA. Αντίθετα, στο υπόστρωμα pNPO η τιμή της σταθεράς είναι περίπου 3 φορές μικρότερη σε σχέση με την τιμή στο υπόστρωμα pNPB, ενώ στο υπόστρωμα pNPD η τιμή της σταθεράς είναι περίπου 12 φορές μικρότερη σε σχέση με την τιμή στο υπόστρωμα pNPB.

Τέλος, το ένζυμο φαίνεται να έχει τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στο υπόστρωμα pNPB, καθότι εκεί εμφανίζεται ο μεγαλύτερος λόγος k_{cat}/K_m και μάλιστα με αρκετά μεγάλη διαφορά, τουλάχιστον πενταπλάσια, σε σχέση με τα υπόλοιπα υποστρώματα που μελετήθηκαν.

3.5. Αντιδράσεις ενζύμων με πολυμερικά υλικά

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων επιλέχθηκε μία κοινή συγκέντρωση για όλα τα ένζυμα, η οποία βασίστηκε στην ελάχιστη συγκέντρωση εκ των παραγόμενων πολυεστερασών, προκειμένου τα αποτελέσματα να μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους. Όσον αφορά τα πολυμερικά υλικά πλην του PET μελετήθηκε η δράση όλων των ενζύμων εκτός της PETase, η οποία είναι προσανατολισμένη αποκλειστικά στην αποικοδόμηση PET. Για την πραγματοποίηση των συγκεκριμένων αντιδράσεων, τα αποτελέσματα των οποίων αποτελούν μία πρώτη αξιολόγηση της πολυεστερικής δράσης των μελετώμενων ενζύμων, επιλέχθηκαν οι συνθήκες με βάση τον πλήρη χαρακτηρισμό των ενζύμων. Έτσι για τα ένζυμα DmEst και LCC επιλέχθηκαν σαν θερμοκρασία οι 50 °C και pH=7,0, για το ένζυμο Se1JFR οι 30 °C και pH=7,0 και τέλος για τα ένζυμα PHOase και PUase οι 40 °C και pH=6,0, ενώ όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα που επιλέχθηκαν είχαν φωσφορικά ιόντα.

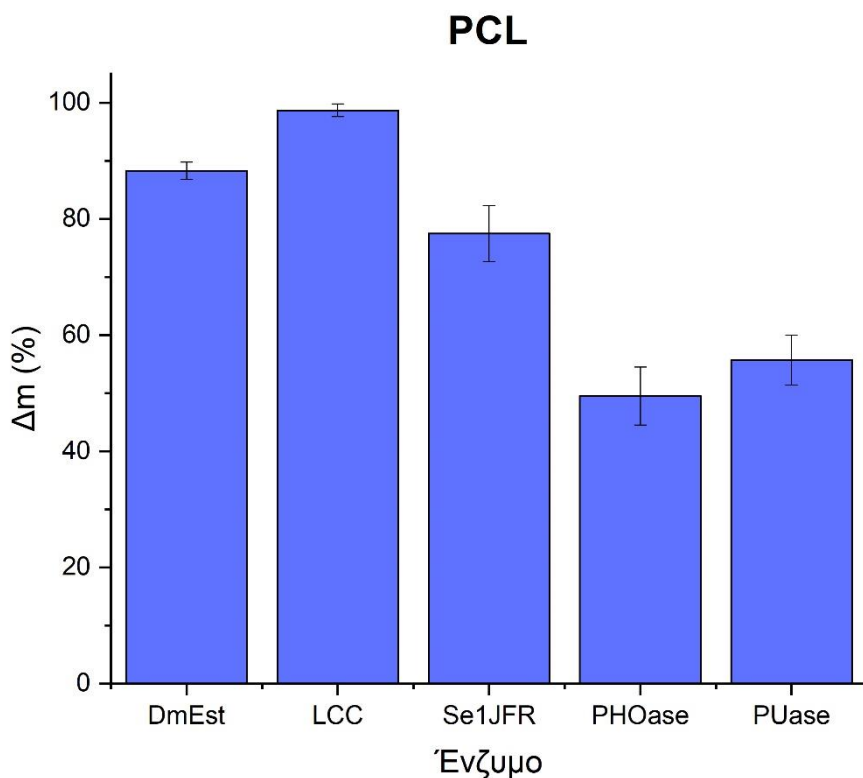
Όσον αφορά τις αντιδράσεις των ενζύμων με το PET όμοια επιλέχθηκε, μία κοινή ενζυμική συγκέντρωση, με σκοπό να είναι τα αποτελέσματα συγκρίσιμα και η επιλογή

των συνθηκών έγινε και πάλι με βάση τον πλήρη χαρακτηρισμό των ενζύμων. Έτσι, οι συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν είναι αυτές που αναφέρονται και στην περίπτωση των υπόλοιπων πολυεστερικών πλαστικών, ενώ για το ένζυμο PETase οι συνθήκες αντίδρασης είναι όμοιες με αυτές για το ένζυμο Se1JFR.

Οι αντιδράσεις των ενζύμων με τα πολυμερικά υλικά πραγματοποιήθηκαν όπως ακριβώς αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.4. Αντιδράσεις ενζύμων με πολυμερικά πολυεστερικά υλικά.

3.5.1. Αντιδράσεις των ενζύμων με την πολυμερική σκόνη πολυκαπρολακτόνης (PCL)

Όσον αφορά την πολυμερική σκόνη PCL, μετρήθηκε η διαφορά μάζας πριν και μετά την αντίδραση με κάθε ένζυμο και υπολογίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή μάζας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ραβδόγραμμα, όπου στον άξονα x παρουσιάζονται τα ένζυμα και στον άξονα y η ποσοστιαία μεταβολή μάζας (Δm) που προκάλεσε καθένα από αυτά στη σκόνη PCL.



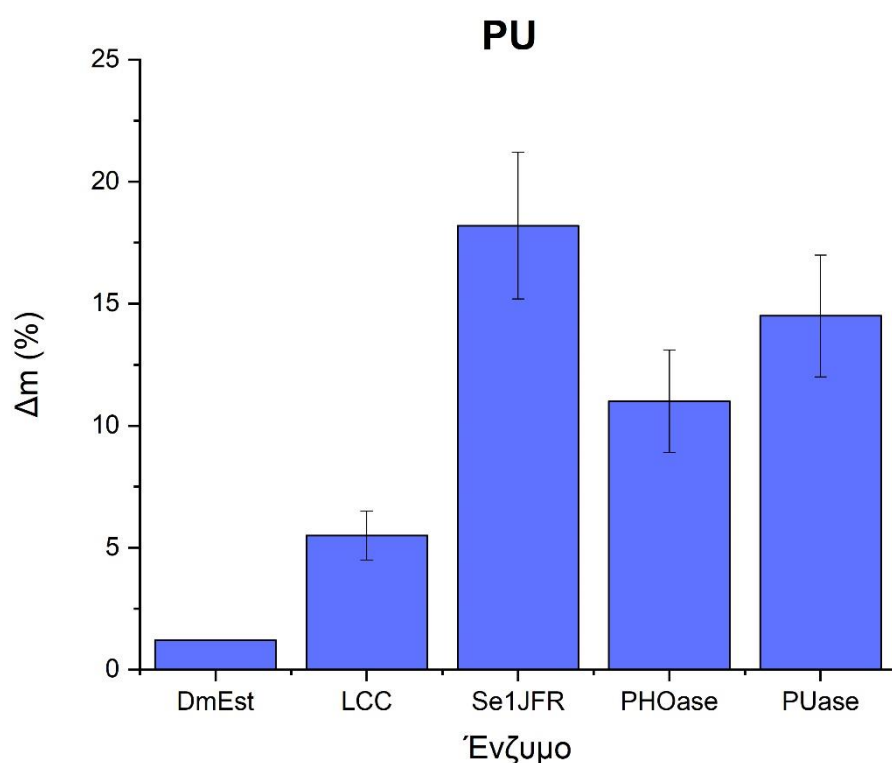
Διάγραμμα 7. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας της πολυκαπρολακτόνης ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 7 τα αποτελέσματα της δράσης των ενζύμων στην πολυμερική σκόνη PCL είναι αρκετά αξιόλογα. Συγκεκριμένα, όσον αφορά το ένζυμο LCC προκάλεσε σχεδόν πλήρη υποβάθμιση του υλικού, αφού παρατηρήθηκε 98,7% μεταβολή της μάζας του, ενώ και το ένζυμο DmEst εμφάνισε εξαιρετική δράση προκαλώντας 88,3% μείωση στη μάζα του πλαστικού. Όμως, και τα υπόλοιπα ένζυμα προκάλεσαν σημαντική υποβάθμιση του υλικού. Συγκεκριμένα, το ένζυμο Se1JFR

οδήγησε σε μεταβολή της μάζας κατά 77,5%, ενώ τα ένζυμα PHOase και PUase προκάλεσαν μικρότερη μεταβολή μάζας σε σχέση με τα υπόλοιπα που διαμορφώθηκαν στα 49,5% και 55,7% αντίστοιχα.

3.5.2. Αντιδράσεις των ενζύμων με την πολυμερική σκόνη πολυουρεθάνης (PU)

Όσον αφορά την πολυμερική σκόνη PU, μετρήθηκε η διαφορά μάζας πριν και μετά την αντίδραση με κάθε ένζυμο και υπολογίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή μάζας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ραβδόγραμμα, όπου στον άξονα x παρουσιάζονται τα ένζυμα και στον άξονα y η ποσοστιαία μεταβολή μάζας (Δm) που προκάλεσε καθένα από αυτά στη σκόνη PU.



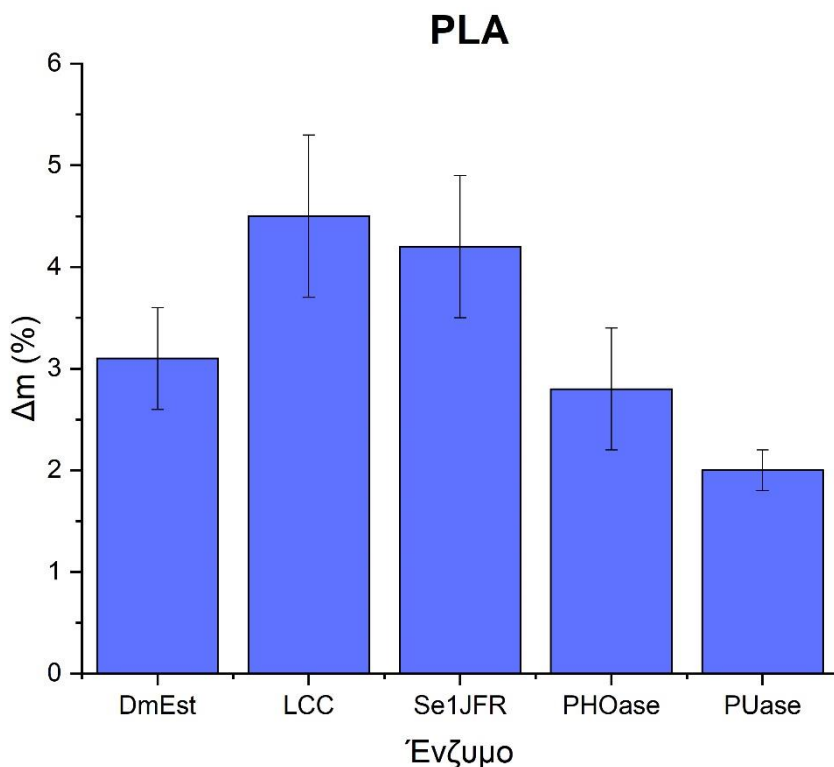
Διάγραμμα 8. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας της πολυουρεθάνης ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.

Από το Διάγραμμα 8 φαίνεται η δράση των μελετώμενων ενζύμων στη σκόνη πολυουρεθάνης, ύστερα από αντίδραση με αυτή. Το ένζυμο που προκάλεσε τη μεγαλύτερη υποβάθμιση είναι η Se1JFR οδηγώντας σε μεταβολή μάζας 18,2%. Τα δύο ένζυμα που ακολουθούν είναι η PUase προκαλώντας μεταβολή μάζας 14,5% και η PHOase προκαλώντας μεταβολή μάζας 11%. Τόσο το ένζυμο DmEst όσο και το ένζυμο LCC, φάνηκε να έχουν ασθενέστερη δράση στη σκόνη πολυουρεθάνης, προκαλώντας 1,2% και 5,5% μεταβολή μάζας αντίστοιχα.

3.5.3. Αντιδράσεις των ενζύμων με την πολυμερική σκόνη πολυγαλακτικού οξέος (PLA)

Όσον αφορά την πολυμερική σκόνη PLA, μετρήθηκε η διαφορά μάζας πριν και μετά την αντίδραση με κάθε ένζυμο και υπολογίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή μάζας. Τα

αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ραβδόγραμμα, όπου στον άξονα x παρουσιάζονται τα ένζυμα και στον άξονα y η ποσοστιαία μεταβολή μάζας (Δm) που προκάλεσε καθένα από αυτά στη σκόνη PLA.

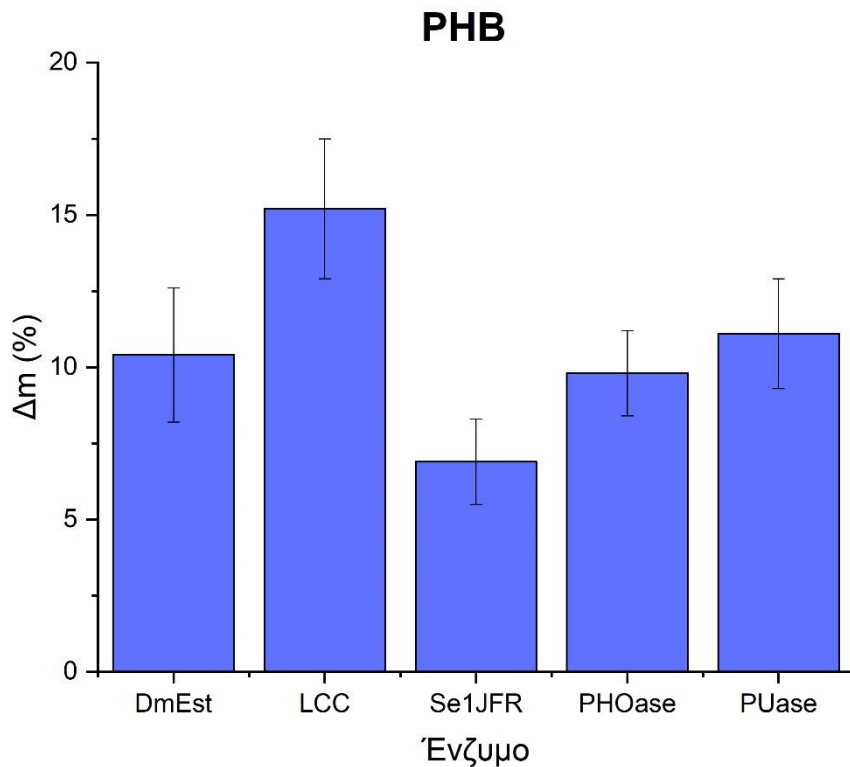


Διάγραμμα 9. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας του πολυγαλακτικού οξέος ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.

Στο Διάγραμμα 9 απεικονίζεται η μεταβολή μάζας του PLA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης του με τα μελετώμενα ένζυμα. Το ένζυμο που είχε την καλύτερη δράση στο PLA είναι η LCC που προκάλεσε μεταβολή μάζας 4,5% και ακολούθησε η Se1JFR που προκάλεσε μεταβολή 4,2%. Όσον αφορά τα υπόλοιπα ένζυμα, η DmEst οδήγησε σε μείωση μάζας κατά 3,1%, η PHOase σε μεταβολή μάζας κατά 2,8% και η PUase που είχε την μικρότερη απόδοση, προκάλεσε μεταβολή μάζας μόλις 2,0%.

3.5.4. Αντιδράσεις των ενζύμων με την πολυμερική σκόνη πολύ-υδροξυβουτυρικού εστέρα (PHB)

Όσον αφορά την πολυμερική σκόνη PHB, μετρήθηκε η διαφορά μάζας πριν και μετά την αντίδραση με κάθε ένζυμο και υπολογίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή μάζας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ραβδόγραμμα, όπου στον άξονα x παρουσιάζονται τα ένζυμα και στον άξονα y η ποσοστιαία μεταβολή μάζας (Δm) που προκάλεσε καθένα από αυτά στη σκόνη PHB.

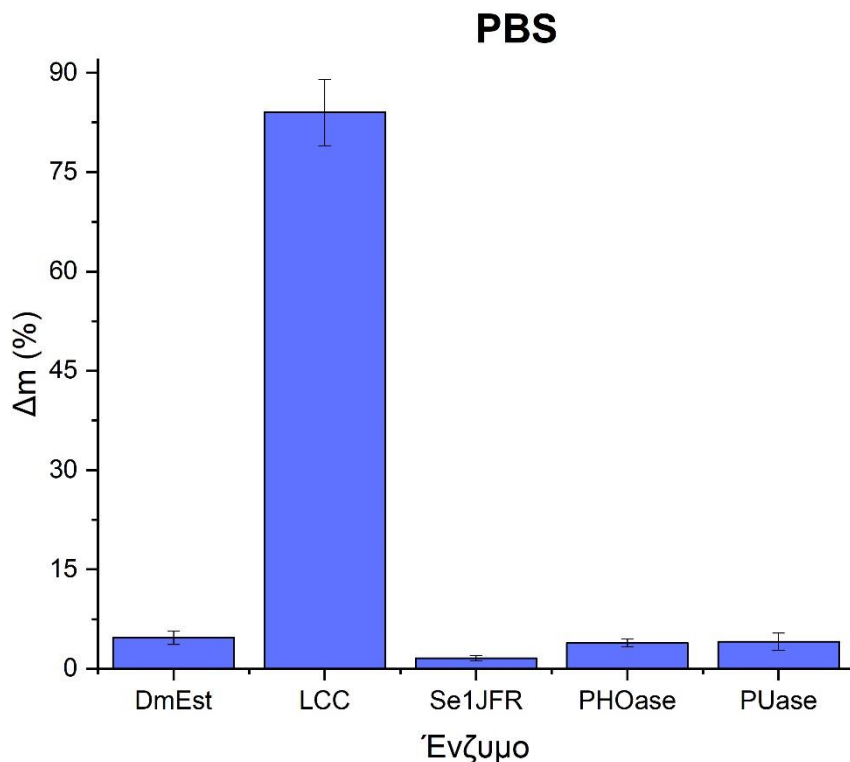


Διάγραμμα 10. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας του πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.

Στο Διάγραμμα 10 παρουσιάζεται η μεταβολή μάζας του PHB μετά τη αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι τη βέλτιστη δράση στο συγκεκριμένο πολυμερές έχει το ένζυμο LCC που προκάλεσε μεταβολή μάζας κατά 15,2% ενώ το ένζυμο DmEst προκάλεσε μεταβολή 10,4%. Τα ένζυμα PHOase και PUase προκάλεσαν μείωση μάζας κατά 9,8% και 11,1% αντίστοιχα. Τέλος, όσον αφορά το ένζυμο Se1JFR οδήγησε σε μεταβολή μάζας κατά 6,9%.

3.5.5. Αντιδράσεις των ενζύμων με την πολυμερική σκόνη του πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα (PBS)

Όσον αφορά την πολυμερική σκόνη PBS, μετρήθηκε η διαφορά μάζας πριν και μετά την αντίδραση με κάθε ένζυμο και υπολογίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή μάζας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ραβδόγραμμα, όπου στον άξονα x παρουσιάζονται τα ένζυμα και στον άξονα y η ποσοστιαία μεταβολή μάζας (Δm) που προκάλεσε καθένα από αυτά στη σκόνη PBS.



Διάγραμμα 11. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας του πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.

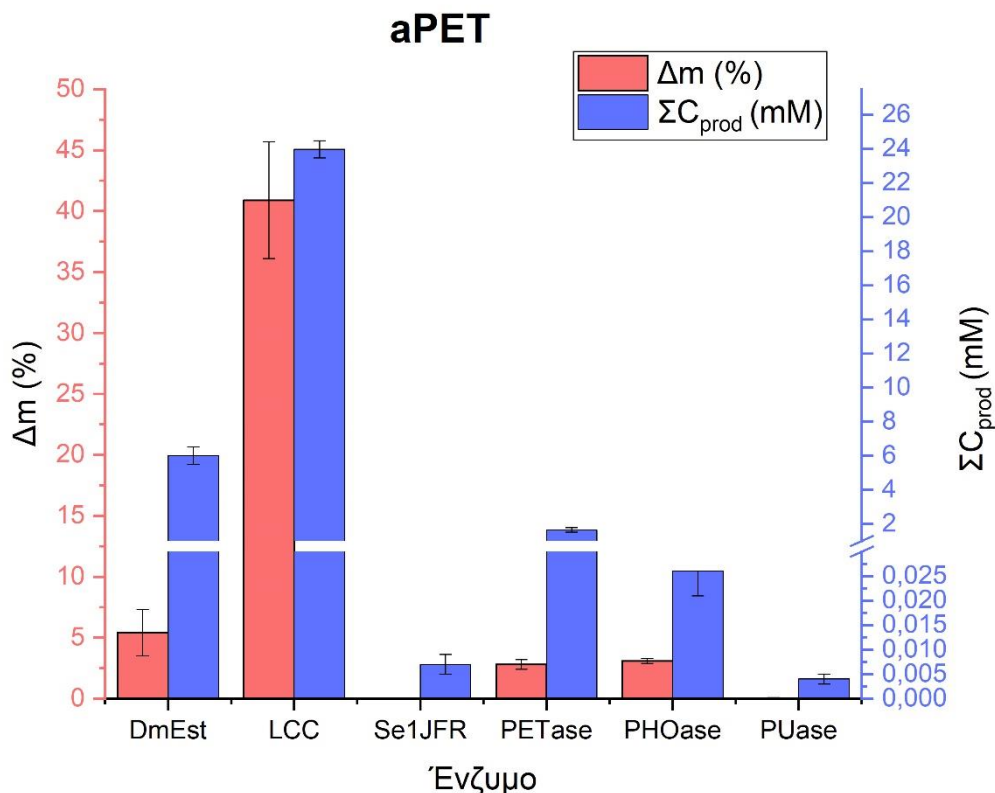
Στο Διάγραμμα 11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεταβολής μάζας του PBS μετά την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το ένζυμο LCC έχει πολύ καλή δράση στο συγκεκριμένο πολυμερές προκαλώντας μεταβολή της μάζας του κατά 84%. Τα υπόλοιπα ένζυμα εμφάνισαν σημαντικά ασθενέστερη δράση στο PBS με την DmEst να οδηγεί σε μείωση μάζας κατά 4,7%, την PUase κατά 4,1% και την PHOase κατά 3,9%. Το ένζυμο Se1JFR εμφάνισε την μικρότερη δράση στο συγκεκριμένο πολυμερικό υλικό μειώνοντας το βάρος του μόλις κατά 1,6%.

3.5.6. Αντιδράσεις των ενζύμων με την πολυμερική σκόνη του τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET)

Αρχικά, όσον αφορά το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο μελετήθηκε η δράση των ενζύμων σε τέσσερις πολυμερικές σκόνες του υλικού, στο aPET, στο cPET, στο oPET και στο rPET (Πίνακας 15). Εκτός από τη διαφορά μάζας, που μελετήθηκε στα υπόλοιπα πολυμερή υλικά, στην περίπτωση του τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου μελετήθηκαν και τα προϊόντα υδρόλυσης που απελευθερώθηκαν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Τα προϊόντα υδρόλυσης του PET είναι τρία, το TPA, το MHET και το BHET (1.2.9.6. Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), 2.2.4.3. Ανάλυση προϊόντων υδρόλυσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)). Στη συνέχεια, αναλύεται ξεχωριστά κάθε διαφορετική πολυμερική σκόνη του PET και τα αποτελέσματα δράσης των ενζύμων σε αυτό.

3.5.6.1. Άμορφο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (aPET)

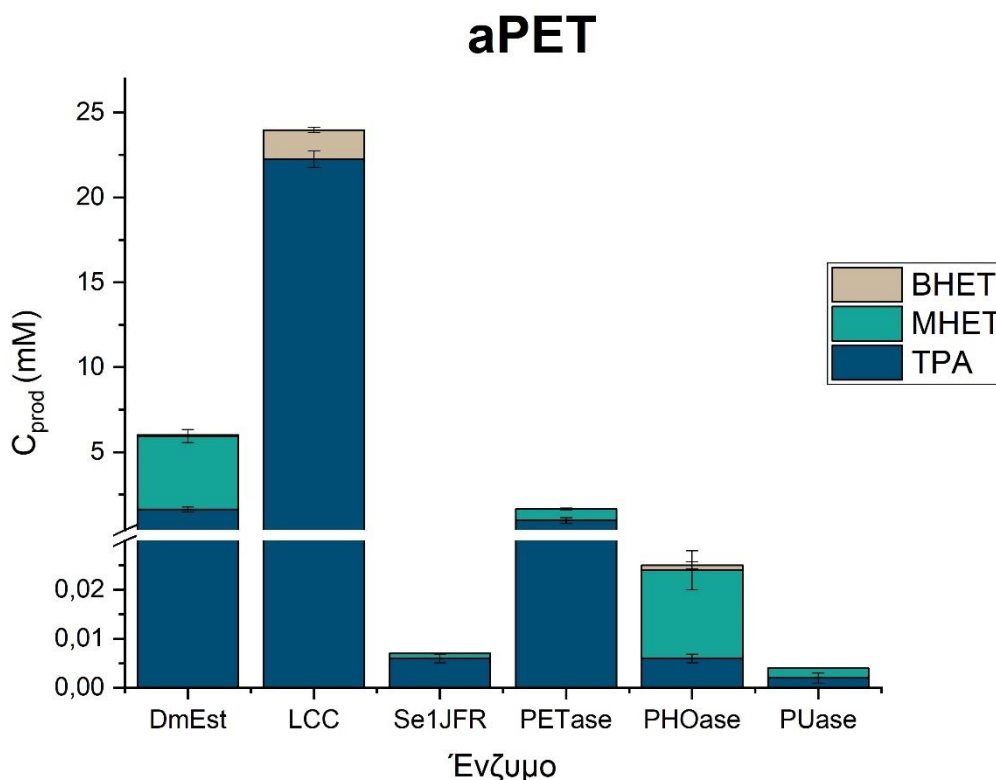
Τα αποτελέσματα της δράσης των ενζύμων στο άμορφο PET παρουσιάζονται σε ραβδόγραμμα. Στον άξονα x παρουσιάζονται τα μελετώμενα ένζυμα, στον έναν άξονα y (αριστερά) παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή μάζας (Δm) του υλικού πριν και μετά την αντίδραση, ενώ στον δεύτερο άξονα y (δεξιά) παρουσιάζεται η συνολική συγκέντρωση των προϊόντων υδρόλυσης που απελευθερώθηκαν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης του πολυμερούς υλικού με τα μελετώμενα ένζυμα (ΣC_{prod}).



Διάγραμμα 12. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας και απελευθερωμένα προϊόντα υδρόλυσης του άμορφου τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.

Στο Διάγραμμα 12 παρουσιάζεται η δράση των μελετώμενων ενζύμων στο άμορφο PET, το οποίο λόγω της πολύ χαμηλής του κρυσταλλικότητας είναι θεωρητικά πιο εύκολο να υποβαθμιστεί σε σχέση με το κρυσταλλικό PET. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι την καλύτερη δράση, τόσο στη μείωση μάζας όσο και στην απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης, είχε το ένζυμο LCC. Συγκεκριμένα, η δράση του οδήγησε σε μείωση μάζας κατά 40,9% και στην απελευθέρωση συνολικά 23,98 mM προϊόντων υδρόλυσης του PET στον κύριο όγκο της αντίδρασης. Το δεύτερο ένζυμο με την καλύτερη δράση ήταν η DmEst που οδήγησε σε μεταβολή μάζας 5,4% και σε συνολική απελευθέρωση προϊόντων 6,01 mM, σχεδόν υποτετραπλάσια της αντίστοιχης του ενζύμου LCC. Τα ένζυμα PETase και PHOase είχαν παρόμοια αποτελέσματα ως προς τη μεταβολή μάζας με το ποσοστό να διαμορφώνεται στα 2,8% και 3,1% αντίστοιχα. Ωστόσο, όσον αφορά την απελευθέρωση προϊόντων στον υγρό όγκο της αντίδρασης, τα δύο αυτά ένζυμα εμφάνισαν αρκετά διαφορετική συμπεριφορά, με την PETase να

οδηγεί στην απελευθέρωση προϊόντων συνολικής συγκέντρωσης 1,65 mM και την PHOase να οδηγεί στην απελευθέρωση μόλις 0,026 mM. Τέλος, όσον αφορά τα ένζυμα Se1JFR και PUase δεν προκάλεσαν καμία μεταβολή στη μάζα του υλικού, ενώ από άποψη απελευθερωμένων προϊόντων η Se1JFR οδήγησε σε συγκέντρωση 0,007 mM και η PUase σε συγκέντρωση μόλις 0,004 mM.

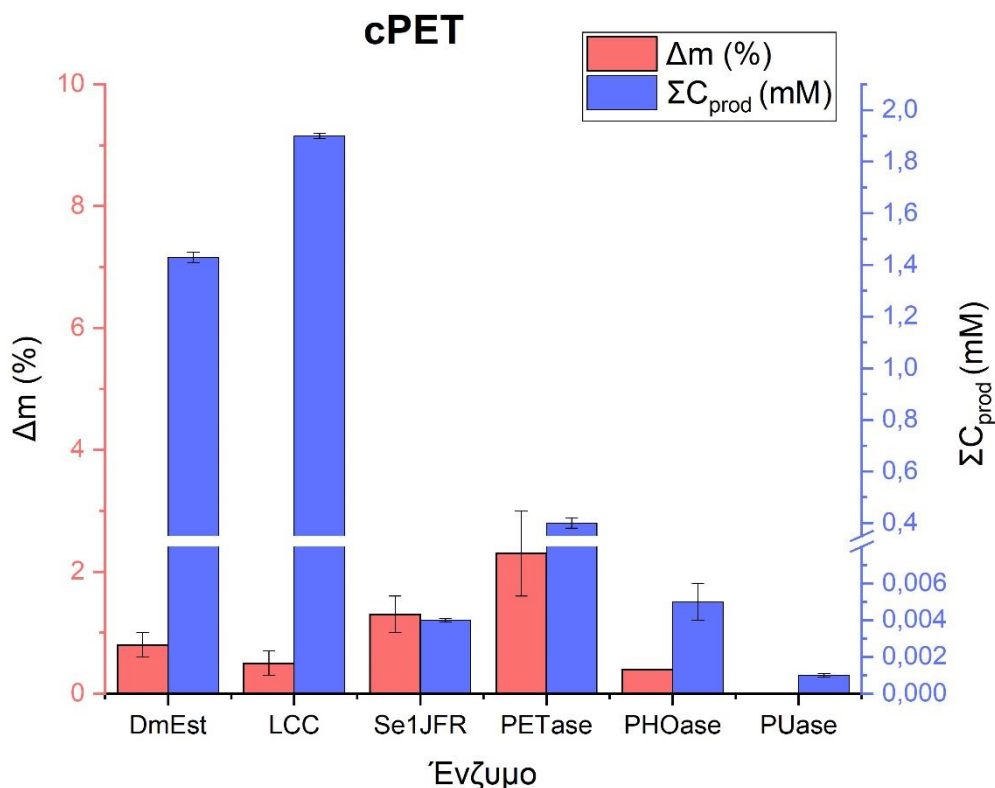


Διάγραμμα 13. Συγκέντρωση των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης (TPA, MHET, BHET) της πολυμερικής σκόνης aPET.

Στο Διάγραμμα 13 παρουσιάζεται η συγκέντρωση καθενός εκ των προϊόντων υδρόλυσης του άμορφου PET. Τα δύο ένζυμα με την καλύτερη δράση στο υλικό αυτό, η DmEst και η LCC, παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά ως προς τα απελευθερωμένα προϊόντα. Συγκεκριμένα, η DmEst οδήγησε σε απελευθέρωση TPA:MHET σε αναλογία περίπου 1:3 και σε ελάχιστη συγκέντρωση BHET. Αντίθετα, η LCC οδήγησε σχεδόν εξ ολοκλήρου σε απελευθέρωση TPA, με μηδενική συγκέντρωση MHET και αναλογία TPA:BHET ίση περίπου με 13:1. Το ένζυμο PETase οδήγησε σε αναλογία TPA:MHET ίση με 1,4:1 και μηδενική συγκέντρωση BHET, ενώ παρόμοια συμπεριφορά είχε και το ένζυμο PUase με αναλογία TPA:MHET 1:1 και όμοια μηδενική συγκέντρωση BHET. Ακόμα, το ένζυμο Se1JFR απελευθέρωσε προϊόντα υδρόλυσης TPA:MHET σε αναλογία 6:1 και σε καθόλου BHET. Τέλος, το ένζυμο PHOase οδήγησε σε απελευθέρωση και των τριών προϊόντων υδρόλυσης με τριπλάσια συγκέντρωση MHET σε σχέση με το TPA και σε έξι φορές μικρότερη συγκέντρωση BHET συγκριτικά με το TPA.

3.5.6.2. Κρυσταλλικό τereφθαλικό πολυαιθυλένιο (cPET)

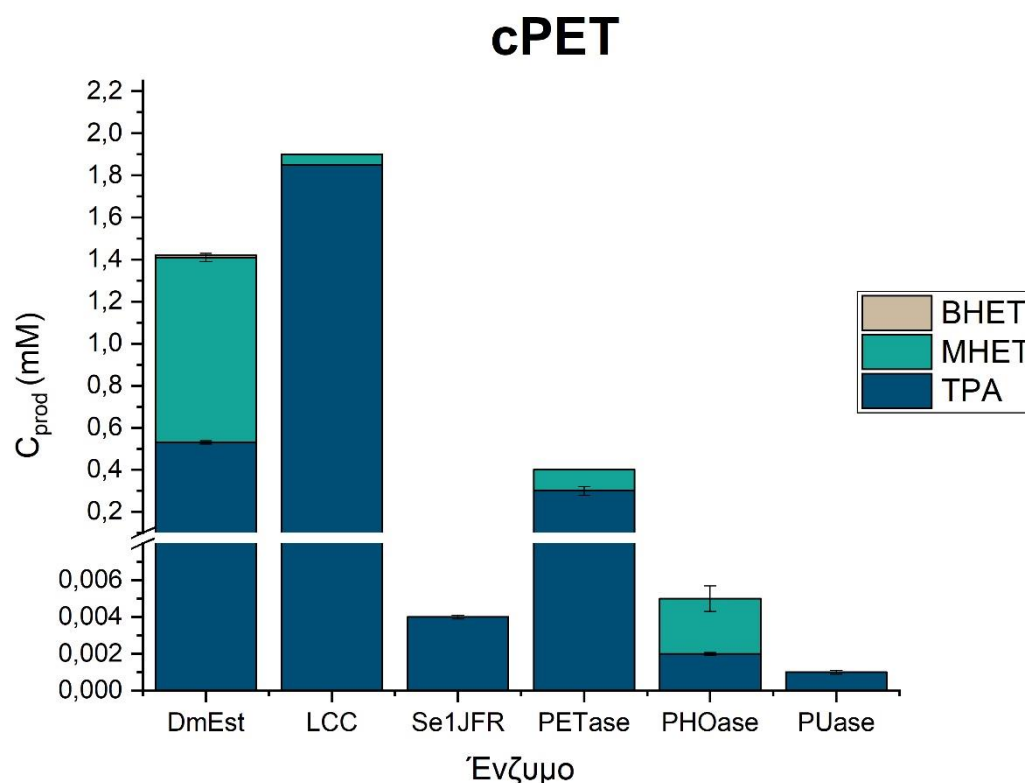
Τα αποτελέσματα της δράσης των ενζύμων στο κρυσταλλικό PET παρουσιάζονται σε ραβδόγραμμα. Στον άξονα x παρουσιάζονται τα μελετώμενα ένζυμα, στον έναν άξονα y (αριστερά) παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή μάζας (Δm) του υλικού πριν και μετά την αντίδραση, ενώ στον δεύτερο άξονα y (δεξιά) παρουσιάζεται η συνολική συγκέντρωση των προϊόντων υδρόλυσης που απελευθερώθηκαν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης του πολυμερούς υλικού με τα μελετώμενα ένζυμα (ΣC_{prod}).



Διάγραμμα 14. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας και απελευθερωμένα προϊόντα υδρόλυσης του κρυσταλλικού τereφθαλικού πολυαιθυλενίου ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.

Στο Διάγραμμα 14 παρουσιάζεται η δράση των ενζύμων στο κρυσταλλικό PET που όπως προαναφέρθηκε λόγω του υψηλού βαθμού κρυσταλλικότητας είναι θεωρητικά το πιο δύσκολο να αλλοιωθεί από τη δράση των ενζύμων συγκριτικά με τις υπόλοιπες πολυμερικές σκόρες του PET χαμηλότερης κρυσταλλικότητας που μελετώνται. Όσον αφορά την ποσοστιαία μεταβολή μάζας, το ένζυμο που είχε την καλύτερη δράση είναι η PETase, οδηγώντας σε μείωση της μάζας του υλικού κατά 2,3%, ενώ αυτό που ακολούθησε είναι η Se1JFR προκαλώντας μείωση κατά 1,3%. Η DmEst προκάλεσε μεταβολή μάζας κατά 0,8%, ενώ τα ένζυμα LCC και PHOase είχαν παρόμοια δράση προκαλώντας μείωση μάζας κατά 0,5% και 0,4% αντίστοιχα. Τέλος, όσον αφορά το ένζυμο PUase δε φάνηκε να έχει κάποια επίδραση στη μάζα του υλικού. Ωστόσο, αναφορικά με τα προϊόντα υδρόλυσης παρουσιάζεται μία διαφορετική εικόνα. Συγκεκριμένα, τα ένζυμα που οδήγησαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι η LCC και η DmEst με αποτελέσματα αρκετά παρεμφερή. Έτσι, η LCC οδήγησε σε

απελευθέρωση 1,9 mM προϊόντων και η DmEst σε απελευθέρωση 1,43 mM προϊόντων. Μετά από αυτά τα δύο ένζυμα ακολούθησε η PETase που οδήγησε σε απελευθέρωση συνολικής συγκέντρωσης προϊόντων 0,4 mM. Τα ένζυμα Se1JFR, PHOase και PUase είχαν παρόμοια αποτελέσματα ως προς τα απελευθερωμένα προϊόντα οδηγώντας σε συγκεντρώσεις 0,004 mM, 0,005 mM και 0,001 mM αντίστοιχα.



Διάγραμμα 15. Συγκέντρωση των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης (TPA, MHET, BHET) της πολυμερικής σκόνης cPET.

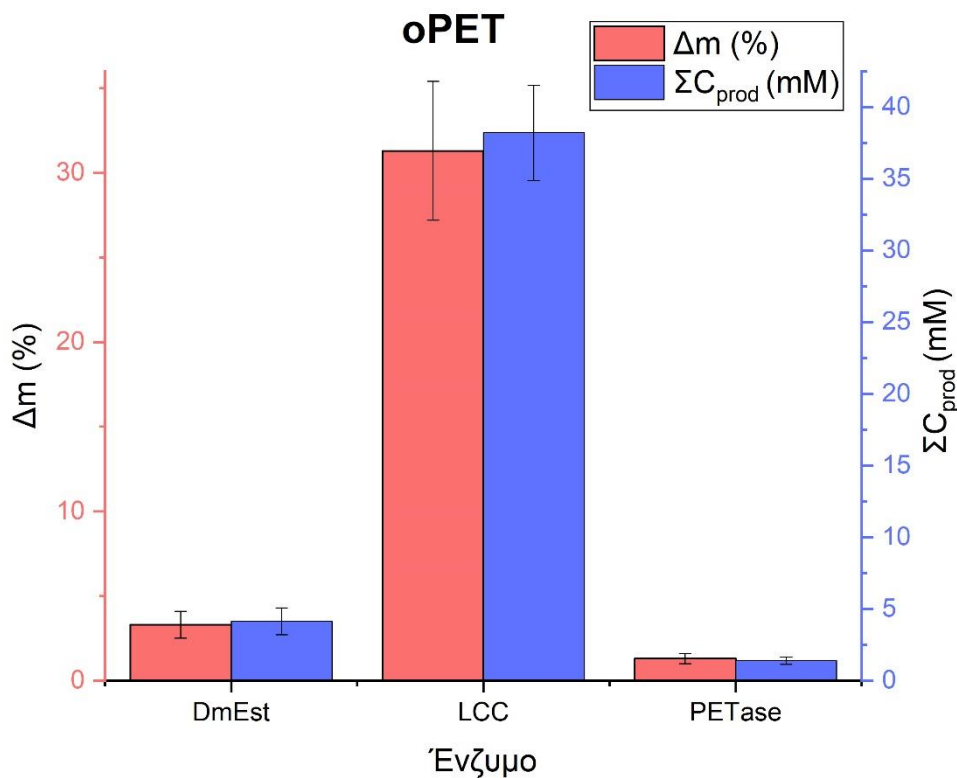
Στο Διάγραμμα 15 παρουσιάζεται η συγκέντρωση καθενός εκ των προϊόντων υδρόλυσης του κρυσταλλικού PET. Τα δύο ένζυμα που οδήγησαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προϊόντων υδρόλυσης είναι η LCC και η DmEst. Οι συγκεντρώσεις των προϊόντων που απελευθερώθηκαν από τη δράση των συγκεκριμένων ενζύμων εμφανίζουν παρόμοιο προφίλ όπως και στην περίπτωση του άμορφου PET. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της DmEst απελευθερώθηκαν TPA:MHET σε αναλογία 1:1,7 και ελάχιστη ποσότητα BHET. Αντίθετα, στην περίπτωση της LCC απελευθερώθηκε σχεδόν αποκλειστικά TPA, ελάχιστη ποσότητα MHET και καθόλου BHET. Όσον αφορά τα ένζυμα Se1JFR και PUase οδήγησαν σε απελευθέρωση μόνο του προϊόντος TPA. Τέλος, τα ένζυμα PETase και PHOase οδήγησαν σε μηδενική συγκέντρωση BHET και σε αναλογία TPA:MHET ίση με 3:1 και 1:1,5 αντίστοιχα.

3.5.6.3. Πρότυπο ανακυκλώσιμο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (oPET)

Στο πρότυπο ανακυκλώσιμο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο μελετήθηκαν τα τρία ένζυμα που φάνηκε να έχουν συνολικά την καλύτερη δράση στο άμορφο και στο κρυσταλλικό

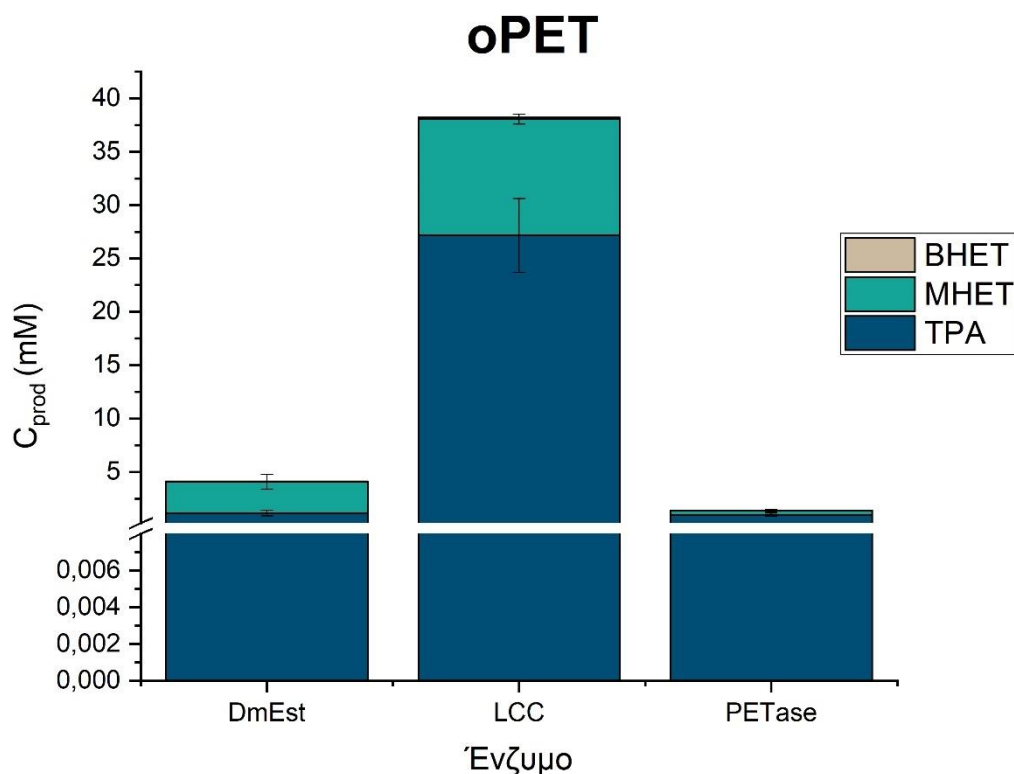
PET. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα τα ένζυμα αυτά είναι η DmEst, η LCC και η PETase.

Τα αποτελέσματα της δράσης των ενζύμων στο πρότυπο ανακυκλώσιμο PET παρουσιάζονται σε ραβδόγραμμα. Στον άξονα x παρουσιάζονται τα μελετώμενα ένζυμα, στον έναν άξονα y (αριστερά) παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή μάζας (Δm) του υλικού πριν και μετά την αντίδραση, ενώ στον δεύτερο άξονα y (δεξιά) παρουσιάζεται η συνολική συγκέντρωση των προϊόντων υδρόλυσης που απελευθερώθηκαν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης του πολυμερούς υλικού με τα μελετώμενα ένζυμα (ΣC_{prod}).



Διάγραμμα 16. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας και απελευθερωμένα προϊόντα υδρόλυσης του πρότυπου ανακυκλώσιμου τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.

Στο Διάγραμμα 16 παρουσιάζεται η δράση των ενζύμων στο πρότυπο ανακυκλώσιμο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο. Παρατηρείται ότι το ένζυμο με τη βέλτιστη δράση στο συγκεκριμένο υλικό τόσο από άποψη διαφοράς μάζας όσο και από άποψη απελευθέρωσης προϊόντων, είναι η LCC. Συγκεκριμένα, το ένζυμο αυτό οδήγησε σε μείωση της μάζας του υλικού κατά 31,3% και σε συνολική συγκέντρωση προϊόντων 38,21 mM. Το ένζυμο με την αμέσως καλύτερη δράση είναι η DmEst που προκάλεσε μεταβολή μάζας 3,3% και οδήγησε στην απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης υποδεκαπλάσιας σχεδόν συγκέντρωσης συγκριτικά με το ένζυμο LCC, 4,14 mM. Τέλος, το ένζυμο PETase μείωσε τη μάζα του υλικού κατά 1,3%, ενώ τα συνολικά προϊόντα που απελευθερώθηκαν είχαν συγκέντρωση 1,39 mM.



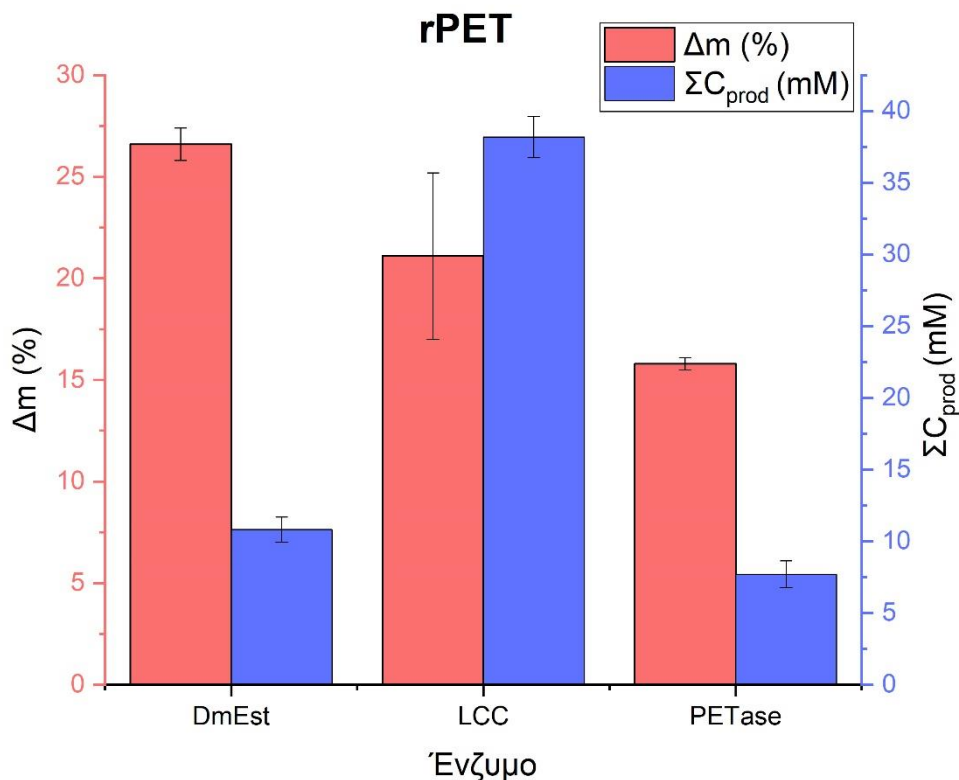
Διάγραμμα 17. Συγκέντρωση των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης (TPA, MHEt, BHEt) της πολυμερικής σκόνης oPET.

Στο Διάγραμμα 17 παρουσιάζεται η συγκέντρωση καθενός εκ των προϊόντων υδρόλυσης του πρότυπου ανακυκλώσιμου PET. Από εκεί προκύπτει το συμπέρασμα ότι το ένζυμο DmEst απελευθερώνει εξαιρετικά μικρή ποσότητα BHEt και τα άλλα δύο προϊόντα σε αναλογία TPA: MHEt ίση με 1:2,6. Όσον αφορά το ένζυμο LCC απελευθερώνει σε μεγαλύτερη αναλογία TPA και συγκεκριμένα σε τριπλάσια ποσότητα σε σχέση με το MHEt, ενώ απελευθερώνεται και ελάχιστη ποσότητα BHEt. Τέλος, το ένζυμο PETase οδηγεί σε απελευθέρωση TPA:MHEt με λόγο 1:2,6 και σε μηδενική απελευθέρωση BHEt.

3.5.6.4. Ανακυκλώσιμο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο προκατεργασίας REX (rPET)

Στο ανακυκλώσιμο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο προκατεργασίας REX μελετήθηκαν τα τρία ένζυμα που φάνηκε να έχουν συνολικά την καλύτερη δράση στο άμορφο και στο κρυσταλλικό PET. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα τα ένζυμα αυτά είναι η DmEst, η LCC και η PETase.

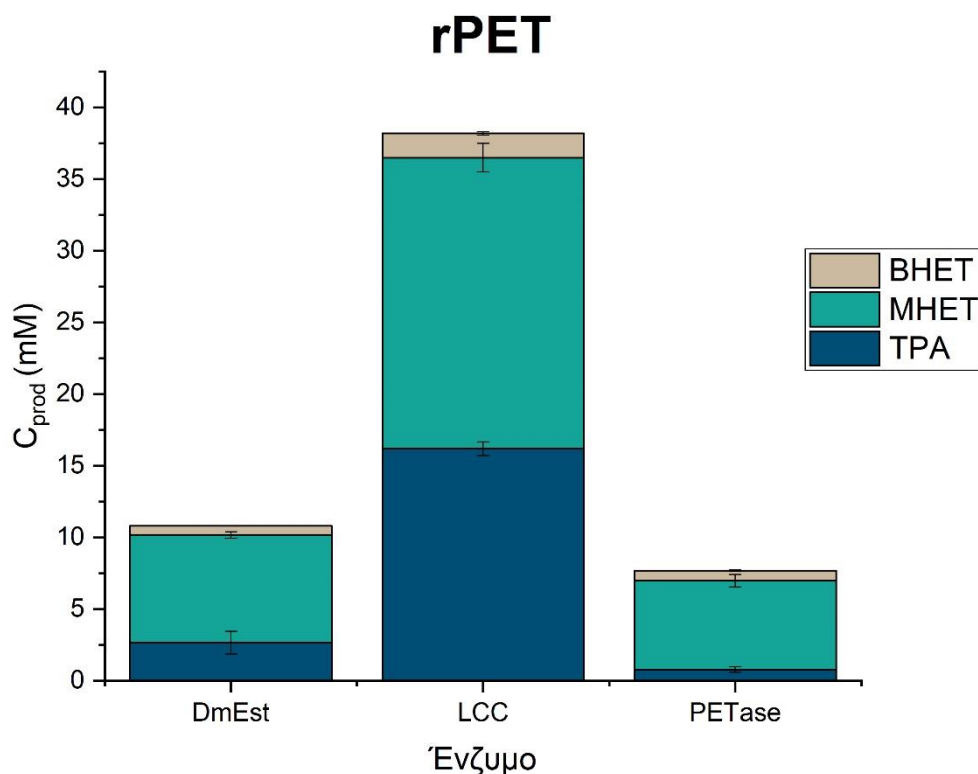
Τα αποτελέσματα της δράσης των ενζύμων στο ανακυκλώσιμο PET προκατεργασίας REX παρουσιάζονται σε ραβδόγραμμα. Στον άξονα x παρουσιάζονται τα μελετώμενα ένζυμα, στον έναν άξονα y (αριστερά) παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή μάζας (Δm) του υλικού πριν και μετά την αντίδραση, ενώ στον δεύτερο άξονα y (δεξιά) παρουσιάζεται η συνολική συγκέντρωση των προϊόντων υδρόλυσης που απελευθερώθηκαν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης του πολυμερούς υλικού με τα μελετώμενα ένζυμα (ΣC_{prod}).



Διάγραμμα 18. Ποσοστιαία μεταβολή μάζας και απελευθερωμένα προϊόντα υδρόλυσης του ανακυκλώσιμου τereφθαλικού πολυαιθυλενίου προκατεργασίας REX ύστερα από την αντίδραση με τα μελετώμενα ένζυμα.

Στο Διάγραμμα 18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δράσης των ενζύμων στο ανακυκλώσιμο τereφθαλικό πολυαιθυλένιο προκατεργασίας REX. Όπως, φαίνεται τα ένζυμα με τη βέλτιστη δράση στη μείωση μάζας και στην απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης διαφέρουν. Συγκεκριμένα, η DmEst εμφάνισε το καλύτερο αποτέλεσμα στη μείωση μάζας οδηγώντας σε μεταβολή 26,6%, ενώ τα συνολικά προϊόντα που απελευθερώθηκαν από τη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου είχαν συγκέντρωση 10,81 mM. Αντίθετα, το ένζυμο LCC είχε τη βέλτιστη δράση στην απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης οδηγώντας σε συγκέντρωση 38,19 mM, ενώ η μεταβολή μάζας που προκάλεσε ήταν 21,1%. Τέλος, το ένζυμο PETase προκάλεσε μείωση μάζας κατά 15,8% και συνολική συγκέντρωση προϊόντων υδρόλυσης 7,69 mM.

Τέλος, στο συγκεκριμένο υλικό, από την ανάλυση του χρωματογραφήματος, προέκυψε ότι για όλα τα ένζυμα, παρατηρήθηκαν δύο κορυφές που δεν αφορούσαν τα προϊόντα υδρόλυσης του PET. Οι κορυφές αυτές ίσως σχετίζονται με το πολυαιθυλένιο που εμφανίζεται σε σημαντικό ποσοστό στο συγκεκριμένο υλικό και πιθανώς αποικοδομείται από τα ένζυμα αυτά. Ωστόσο, η παρατήρηση αυτή πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.



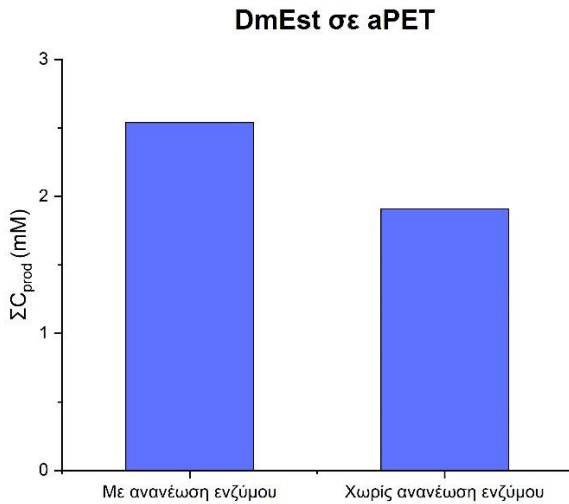
Διάγραμμα 19. Συγκέντρωση των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης (TPA, MHET, BHET) της πολυμερικής σκόνης rPET.

Στο Διάγραμμα 19 παρουσιάζεται η συγκέντρωση καθενός εκ των προϊόντων υδρόλυσης του ανακυκλώσιμου PET που έχει υποστεί προκατεργασία REX. Από εκεί προκύπτει το συμπέρασμα ότι το ένζυμο DmEst οδηγεί σε απελευθέρωση σχεδόν τριπλάσιας ποσότητας MHET σε σχέση με το TPA και σχεδόν υποτετραπλάσιας ποσότητας BHET σε σχέση με το TPA. Το ένζυμο LCC οδηγεί σε απελευθέρωση παρόμοιας συγκέντρωσης TPA και MHET και σε αρκετά μικρότερη ποσότητα BHET. Τέλος, το ένζυμο PETase οδηγεί σε απελευθέρωση περίπου οκταπλάσιας συγκέντρωσης MHET συγκριτικά με το TPA και το BHET, αφού τα δύο τελευταία απελευθερώνονται σε σχεδόν ίσες ποσότητες.

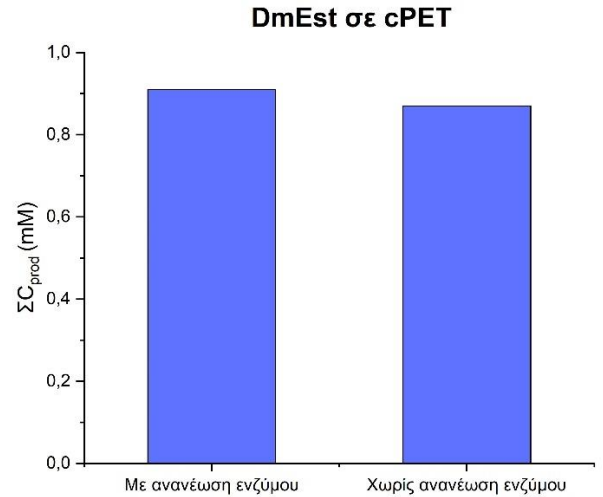
3.5.7. Μελέτη της επίδρασης της ανανέωσης ενζύμου στο χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της αντίδρασης

Η μελέτη επίδρασης της ανανέωσης ενζύμου κατά το χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της αντίδρασης έγινε στα ένζυμα DmEst και LCC καθώς εν γένει παρουσίασαν την καλύτερη δράση στο PET.

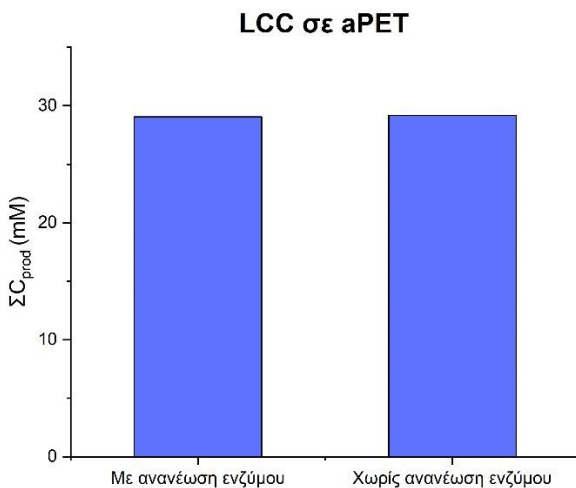
Τα αποτελέσματα της μελέτης της επίδρασης της προσθήκης ενζύμου κατά το χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της αντίδρασης παρουσιάζεται σε ραβδόγραμμα. Στον άξονα x παρουσιάζεται αν πραγματοποιήθηκε ή όχι προσθήκη ενζύμου και στον άξονα y παρουσιάζεται η συνολική συγκέντρωση των προϊόντων υδρόλυσης σε mM.



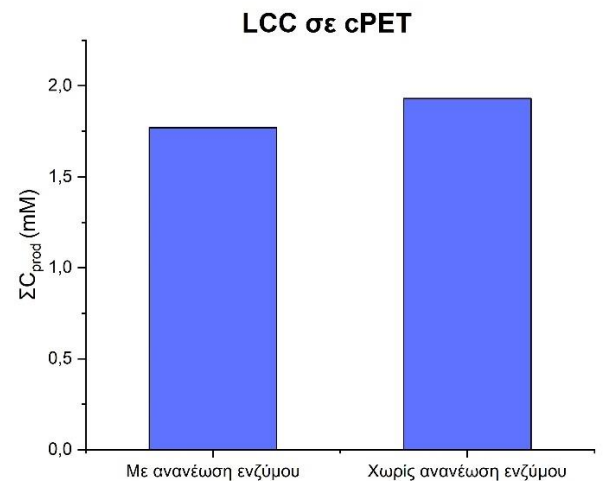
(α)



(β)



(γ)



(δ)

Διάγραμμα 20. Μελέτη της επίδρασης της ανανέωσης ενζύμου κατά το χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της αντίδρασης: (α) DmEst με άμορφο PET, (β) DmEst με κρυσταλλικό PET, (γ) LCC με άμορφο PET και (δ) LCC με κρυσταλλικό PET.

Όσον αφορά την αντίδραση του ενζύμου DmEst με το άμορφο PET προκύπτει το συμπέρασμα ότι με την ανανέωση του ενζύμου κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αυξάνεται η συνολική συγκέντρωση των προϊόντων υδρόλυσης κατά μόλις 1,33 φορές. Ωστόσο, τόσο στην περίπτωση της DmEst με το κρυσταλλικό PET όσο και στην περίπτωση της LCC και με τα δύο είδη PET, παρατηρείται ότι η προσθήκη ενζύμου επηρεάζει ανεπαίσθητα τη συγκέντρωση των απελευθερωμένων προϊόντων σε σχέση με την μη προσθήκη ενζύμου. Συνεπώς, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η προσθήκη ενζύμου κατά τη διάρκεια της αντίδρασης πρακτικά δεν επηρεάζει τη συγκέντρωση των προϊόντων υδρόλυσης που απελευθερώνονται.

4. Συζήτηση αποτελεσμάτων, συμπεράσματα και μελλοντικές προτάσεις

Τα πλαστικά υλικά διακρίνονται σε πολλές κατηγορίες και χρησιμοποιούνται σε μία πληθώρα καθημερινών αλλά και αρκετά πιο εξειδικευμένων εφαρμογών λόγω των επιθυμητών ιδιοτήτων που τα χαρακτηρίζουν και των πλεονεκτημάτων που απορρέουν από τη χρήση τους. Ωστόσο, αυτή η εκτεταμένη χρήση των πλαστικών, η οποία βαίνει συνεχώς αυξανόμενη, έχει οδηγήσει σε σημαντικές περιβαλλοντικές ανησυχίες που οφείλονται στη συσσώρευση πλαστικών απορριμμάτων λόγω της ανικανότητας των υλικών αυτών να βιοαποικοδομηθούν. Οι συμβατικοί τρόποι διαχείρισης των πλαστικών απορριμμάτων εμφανίζουν σημαντικά μειονεκτήματα και για τον λόγο αυτό πολλές επιστημονικές μελέτες προσανατολίζονται στην εύρεση νέων πιο βιώσιμων τεχνικών διαχείρισης της πλαστικής ρύπανσης. Ένας από αυτούς τους τρόπους είναι η ενζυμική αποικοδόμηση των πλαστικών υλικών και έτσι η παρούσα Διπλωματική Εργασία ασχολείται, αρχικά με τον βιοχημικό χαρακτηρισμό ορισμένων ενζύμων που φαίνεται να πληρούν τις προϋποθέσεις αποικοδόμησης πολυμερών και ύστερα τη μελέτη δράσης τους σε πλαστικά υλικά. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτήν τη μελέτη παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον και αναλύονται στη συνέχεια.

4.1. Συζήτηση αποτελεσμάτων

4.1.1. Καθαρότητα και μοριακά βάρη των μελετώμενων ενζύμων

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες επιβεβαίωσε την καθαρότητα και τα μοριακά βάρη των μελετώμενων πολυεστερασών.

Συγκεκριμένα, στην Εικόνα 28 παρουσιάζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην οποία αναλύθηκαν τα πρωτεϊνικά δείγματα. Από εκεί προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα μελετώμενα ένζυμα βρίσκονται σε πολύ καθαρή μορφή στα διαλύματά τους, εφόσον σε κάθε πρωτεϊνικό δείγμα εμφανίζεται μόνο μία μπλε γραμμή (μπάντα) στην πηκτή που αντιστοιχεί στο εκάστοτε ένζυμο. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σε κάθε ενζυμικό διάλυμα έχει απομονωθεί αποτελεσματικά αποκλειστικά το εκάστοτε επιθυμητό ένζυμο.

Τα μοριακά βάρη των ενζύμων που προκύπτουν από την Εικόνα 28 και παρουσιάζονται στον Πίνακα 26 έρχονται σε συμφωνία με τα μοριακά βάρη που έχουν προκύψει από την αμινοξική ακολουθία των ενζύμων και παρουσιάζονται στο Παράρτημα Α: Μοριακά βάρη πολυεστερασών βάσει της αμινοξικής τους ακολουθίας. Αυτό επιβεβαιώνει ότι στο εκάστοτε πρωτεϊνικό διάλυμα συναντάται πράγματι το ένζυμο ενδιαφέροντος. Η ανυπαρξία μπλε γραμμών (μπαντών) σε μικρότερα μοριακά βάρη πάνω στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ένζυμο βρίσκεται στη φυσιολογική κατάσταση χωρίς να υπάρχουν ενδείξεις αποικοδόμησης ή πρωτεόλυσής του. Αν το ένζυμο είχε μερικώς διασπαστεί τότε θα υπήρχαν στο ενζυμικό διάλυμα τμήματα αυτού με μικρότερο μοριακό βάρος τα οποία θα εμφανίζονταν στην πηκτή κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, κάτι το οποίο δε συμβαίνει.

4.1.2. Βέλτιστο pH δράσης των μελετώμενων ενζύμων

Στον Πίνακα 28 παρουσιάζεται το βέλτιστο pH δράσης των μελετώμενων ενζύμων. Από εκεί προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα ένζυμα δρουν βέλτιστα σε μέσες τιμές pH, είτε ελαφρώς όξινες είτε ελαφρώς αλκαλικές.

Οι βέλτιστες τιμές pH των μελετώμενων ενζύμων συναντώνται στο εύρος 6,0-8,5 και ταυτίζονται με αυτές αρκετών ανακαλυμμένων ενζύμων με δράση σε πολυμερικά υλικά. Από βιβλιογραφική αναζήτηση βρέθηκε ότι μόνο δύο ένζυμα δρουν σε αρκετά όξινες τιμές pH, μία λιπάση από τον *Rhizopus oryzae* [54] και μία λακάση από τον *Trametes versicolor* [28]. Όλα τα υπόλοιπα ένζυμα με δράση σε πλαστικά εμφανίζουν βέλτιστο pH δράσης στο εύρος 7,0-8,0. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την αποικοδόμηση του PET σε pH=7,0 δρουν οι κουτινάσες PmS από τον *Pseudomonas mendocina* [62] και FcS από τον *Fusarium solani* [62], καθώς και η υδρολάση TfH από τον *Thermobifida fusca* [65]. Ακόμα, η κουτινάση HiC από τον *Humicola insolens* [62] δρα βέλτιστα σε pH=7,5, ενώ η κουτινάση TfCut2 από τον *Thermobifida fusca* [66] δρα βέλτιστα σε pH=8,0. Σε αντίστοιχο εύρος pH δρουν βέλτιστα και τα ένζυμα LCC, Se1JFR και PETase.

Όσον αφορά το ένζυμο LCC στις βιβλιογραφικές εφαρμογές που χρησιμοποιήθηκε, εισήχθη σε pH=8,0 [29], [63], ενώ ο βιβλιογραφικός χαρακτηρισμός για το γονίδιο άγριου τύπου υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο ένζυμο έχει βέλτιστο pH=8,5 σε υπόστρωμα pNPB, ενώ σε εύρος pH=7,0-9,5 το ένζυμο διατηρεί πάνω από το 70% της δράσης του. [93] Αυτά τα δεδομένα συμφωνούν πλήρως με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον χαρακτηρισμό του στελέχους με την τετραπλή μετάλλαξη, το οποίο εμφάνισε βέλτιστο pH=8,5 σε υπόστρωμα pNPB.

Αναφορικά με το ένζυμο PETase, στο βιβλιογραφικό πείραμα που χρησιμοποιήθηκε για την αποικοδόμηση πλαστικού μπουκαλιού από PET, εισήχθη σε pH=9,5. [68] Ο βιβλιογραφικός χαρακτηρισμός αναφέρει ότι για δράση σε υλικό PET και φιλμ, η βέλτιστη δράση επιτυγχάνεται σε pH=9,0, ενώ σε υπόστρωμα pNPB, το ένζυμο εμφανίζει βέλτιστη δράση στο εύρος pH=7,0-9,0 και σε τιμές pH μικρότερες του 6,0 χάνει σχεδόν πλήρως την ενεργότητά του. [94] Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα των πειραμάτων χαρακτηρισμού του ενζύμου PETase, το οποίο εμφάνισε βέλτιστη δράση σε pH=7,0 σε υπόστρωμα pNPB, ενώ σε pH=5,0, το ένζυμο είχε σημαντική απώλεια της ενεργότητάς του.

Συμπερασματικά, τα περισσότερα ένζυμα που μελετώνται για δράση σε πλαστικά υλικά δρουν βέλτιστα σε εύρος pH=7,0-8,0. Τα ένζυμα LCC, PETase και Se1JFR εμφανίζουν βέλτιστη δράση, επίσης, σε αυτό το εύρος. Ωστόσο, τα ένζυμα DmEst, PHOase και PUase εμφάνισαν βέλτιστη δράση σε pH=6,0 σε υπόστρωμα pNPB. Βέβαια, είναι πιθανόν το βέλτιστο pH δράσης στο συγκεκριμένο υπόστρωμα να διαφέρει λίγο σε σχέση με τη δράση σε κάποιο πολυμερικό υπόστρωμα. Παρόλα αυτά, και τα συγκεκριμένα ένζυμα συμφωνούν με τη γενική τάση που υποδεικνύει ότι τα ένζυμα που αποικοδομούν πλαστικά δρουν βέλτιστα σε μέσες τιμές pH.

4.1.3. Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των μελετώμενων ενζύμων

Στον Πίνακα 29 παρουσιάζονται οι βέλτιστες τιμές θερμοκρασιών για τα μελετώμενα ένζυμα. Όπως γίνεται αντιληπτό είναι μεγάλο το εύρος θερμοκρασιών βέλτιστης

δράσης (35 °C-60 °C) σε αντίθεση με το βέλτιστο pH δράσης, όπου το εύρος ήταν πιο περιορισμένο.

Τα περισσότερα ένζυμα που βρέθηκαν με βιβλιογραφική αναζήτηση και κυρίως όσα αφορούν την αποικοδόμηση των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών υλικών (PCL, PLA, PHB και PBS), δρουν βέλτιστα σε εύρος θερμοκρασιών 30-40 °C με πιο χαρακτηριστική τιμή τους 37 °C. Τα παραδείγματα με τα καλύτερα αποτελέσματα στους 37 °C αφορούν τη δράση της λιπάσης από τον *Pseudomonas fluorescens* που αποικοδόμησε σε ποσοστό 100% κομμάτια πολυκαπρολακτόνης [21], τη δράση της λιπάσης Β από τον *Pseudomonas lemoignei* που αποικοδόμησε σε ποσοστό 50% φιλμ πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα [39] και τη δράση της κουτινάσης από τον *Fusarium solani* που αποικοδόμησε σε ποσοστό 100% φιλμ πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα [49]. Άλλα χαρακτηριστικά παραδείγματα δράσης σε αυτό το εύρος θερμοκρασιών είναι το ένζυμο CH1 από τον *S. ravanii* που στους 30 °C προκάλεσε 42% απώλεια μάζας σε φιλμ πολυγαλακτικού οξέος [34] και η αποπολυμεράση από τον *Fusarium sp.* που οδήγησε σε μείωση μάζας κατά 80% φιλμ πολύ-ηλεκτρικού βουτυλεστέρα [52]. Σε αυτό το εύρος θερμοκρασιών, σύμφωνα με τα προαναλύοντα πειραματικά αποτελέσματα, δρουν βέλτιστα τέσσερα από τα μελετώμενα ένζυμα και συγκεκριμένα η PETase και η Se1JFR που έχουν βέλτιστη θερμοκρασία τους 35 °C και η PHOase και η PUase με βέλτιστη θερμοκρασία τους 40 °C.

Αντίθετα, στα μη βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά (PU, PET) τα ένζυμα που εμφανίζουν βέλτιστη δράση εισάγονται σε αρκετά υψηλότερες θερμοκρασίες, κυρίως στους 50-70 °C, ενώ εμφανίζονται και κάποιες εξαιρέσεις δράσης σε υψηλές θερμοκρασίες και στην περίπτωση των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών. Για παράδειγμα, η κουτινάση από τον *Thielavia terrestris* μείωσε τη μάζα φιλμ πολυκαπρολακτόνης κατά 70% στους 50 °C [22], ενώ η κουτινάση 1 από τον *Thermobifida cellulolytica* προκάλεσε μείωση μάζας 90% σε φιλμ πολύ-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα στους 65 °C [51]. Όσον αφορά τα πολυουρεθανικά υλικά τρεις κουτινάσες μελετήθηκαν στο εύρος 60-70 °C οδηγώντας σε μεταβολές 1-4% στο βάρος του υλικού. Οι κουτινάσες αυτές ήταν η LCC [29], η TfCut2 από τον *Thermobifida fusca* [29] και η Tcur0390 από τον *Thermomonospora curvata* [29]. Τέλος, όσον αφορά την αποικοδόμηση του PET όλα τα μελετώμενα ένζυμα είχαν βέλτιστη δράση στο εύρος 60-70 °C με χαρακτηριστικό παράδειγμα το ένζυμο HiC από τον *Humicola insolens* που οδήγησε σε μείωση μάζας 97%. Έτσι, όμοια και τα μελετώμενα ένζυμα DmEst και LCC εμφανίζουν βέλτιστη δράση σε υψηλές θερμοκρασίες και συγκεκριμένα στους 50 °C και στους 60 °C αντίστοιχα.

Όσον αφορά το ένζυμο LCC, στις βιβλιογραφικές αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκε εισήχθη σε θερμοκρασίες 60 °C και 70 °C [29], [63]. Ο βιβλιογραφικός χαρακτηρισμός του κανονικού στελέχους του ενζύμου αναφέρει ότι σε υπόστρωμα pNPB έχει βέλτιστη θερμοκρασία τους 50 °C, ενώ στο PET δρα βέλτιστα σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 70 °C. [93] Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με αυτά που προέκυψαν για το στέλεχος με την τετραπλή μετάλλαξη το οποίο, όμως, βρέθηκε να έχει βέλτιστη θερμοκρασία τους 60 °C σε υπόστρωμα pNPB.

Τέλος, όσον αφορά το ένζυμο PETase, στη βιβλιογραφική αντίδραση που χρησιμοποιήθηκε εισήχθη στους 40 °C [68]. Ο βιβλιογραφικός χαρακτηρισμός του

ενζύμου υποδεικνύει ότι το ένζυμο δρα βέλτιστα στο εύρος 35-45 °C σε υπόστρωμα pNPB, στους 40 °C στην περίπτωση φιλμ PET και στους 30 °C σε οποιαδήποτε άλλη περίπτωση υλικού PET [94]. Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων χαρακτηρισμού, από όπου προέκυψε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία του συγκεκριμένου ενζύμου είναι οι 35 °C.

4.1.4. Σταθερότητα των ενζύμων σε τιμές pH

Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η μελέτη σταθερότητας σε διάφορες τιμές pH για τα έξι μελετώμενα ένζυμα. Από εκεί προκύπτει το συμπέρασμα ότι, γενικά, τα ένζυμα παραμένουν πιο σταθερά κατά την αποθήκευσή τους σε ελαφρώς αλκαλικές και αλκαλικές τιμές pH. Συγκεκριμένα, εκτός της PUase, τα υπόλοιπα ένζυμα διαπιστώθηκε ότι διατηρούν τη σταθερότητά τους καλύτερα σε εύρος pH=8,0-9,0, ενώ όσον αφορά την PUase, φάνηκε να παραμένει πιο σταθερή σε διάλυμα με pH=7,4. Ωστόσο, σε αυτά τα συμπεράσματα ενδέχεται να έπαιξε ρόλο και η αλατότητα των διαλυμάτων. Έτσι, όλα τα ένζυμα εκτός της PUase παρέμειναν πιο σταθερά σε διαλύματα με μεγαλύτερη αλατότητα. Ακόμα, βασικό ρόλο στη σταθερότητα έπαιξε και το είδος των ιόντων των ρυθμιστικών διαλυμάτων. Έτσι, προέκυψε ότι τα τρία (DmEst, LCC, Se1JFR) από τα συνολικά έξι ένζυμα που μελετήθηκαν είχαν ισχυρή προτίμηση στα ρυθμιστικά διαλύματα με ιόντα της βάσης Tris ρυθμισμένα με HCl, ενώ τα δύο από αυτά (PETase, PHOase) σε φωσφορικά ιόντα. Τέλος, και στην περίπτωση της PUase το διάλυμα στο οποίο το ένζυμο παρέμεινε σχεδόν 100% σταθερό, εκτός του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος αποθήκευσης, είχε, επίσης, φωσφορικά ιόντα.

4.1.5. Σταθερότητα των ενζύμων σε διάφορες τιμές θερμοκρασιών

Στο Διάγραμμα 4 παρουσιάζεται η μελέτη θερμικής σταθερότητας για τα έξι μελετώμενα ένζυμα. Από εκεί προκύπτει το συμπέρασμα ότι το ένζυμο DmEst παραμένει σταθερό σε εύρος θερμοκρασιών 20-50 °C, το ένζυμο LCC παραμένει σταθερό σε όλο το εύρος μελετώμενων θερμοκρασιών (20-80 °C), τα ένζυμα Se1JFR και PETase παραμένουν σταθερά στο εύρος 20-30 °C και τέλος τα ένζυμα PHOase και PUase είναι σταθερά στο εύρος 20-40 °C. Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι το γονίδιο άγριου τύπου του ενζύμου LCC διατηρεί αρκετά τη δράση του σε εύρος θερμοκρασιών 30-70 °C και είναι γενικά θερμοανθεκτικό. [93] Τα δεδομένα αυτά ταιριάζουν με τα αποτελέσματα των πειραμάτων χαρακτηρισμού. Βέβαια, σε αυτά το ένζυμο παρέμεινε σταθερό και σε υψηλότερη θερμοκρασία, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο, καθότι η τετραπλή μετάλλαξη του γονιδίου άγριου τύπου που μελετήθηκε είχε σαν στόχο την αύξηση της θερμοσταθερότητας του ενζύμου. Άλλα ένζυμα που βρέθηκαν βιβλιογραφικά με δράση σε πλαστικά όπως το ένζυμο Tcur1278 από τον *Thermomonospora curvata* εμφάνισε σταθερότητα μέχρι τους 50 °C και στους 60 °C εμφανίστηκε απότομη πτώση της ενεργότητας. [95] Η συμπεριφορά αυτή μοιάζει αρκετά με αυτήν του ενζύμου DmEst. Αντίθετα, το ένζυμο Tcur0390 από τον μικροοργανισμό *Thermomonospora curvata* εμφάνισε πτώση της σταθερότητάς του από τους 50 °C, ενώ στους 60 °C είχε απενεργοποιηθεί πλήρως. Η συμπεριφορά αυτή είναι παρόμοια με αυτήν των ενζύμων PHOase και PUase. [95] Τέλος, μία κουτινάση από τον *Fusarium solani* διατήρησε περίπου το 85% της δράσης της στους 30 °C ύστερα από 1 h [49], παρόμοια με τα ένζυμα Se1JFR και PETase.

4.1.6. Μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα

Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζεται η μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα για τα ένζυμα Se1JFR, PETase, PHOase και PUase. Τα υποστρώματα που μελετήθηκαν είναι τα pNPA, pNPB, pNPO και pNPD. Τα ένζυμα PETase και PHOase εμφάνισαν μεγαλύτερη εξειδίκευση στο υπόστρωμα pNPA, το ένζυμο Se1JFR εμφάνισε μεγαλύτερη συγγένεια με το υπόστρωμα pNPD και το ένζυμο PUase με το υπόστρωμα pNPB. Ένζυμα με δράση στα πλαστικά που βρέθηκαν βιβλιογραφικά, όπως για παράδειγμα το ένζυμο TfCut2 από τον *Thermobifida fusca* [96] και μία κουτινάση από τον *Fusarium solani* [25] εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα pNPA, όπως τα μελετώμενα ένζυμα PETase και PHOase. Αντίθετα, η κουτινάση από τον *Aspergillus oryzae* εμφανίζει μεγαλύτερη εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα pNPB [25], όπως το μελετώμενο ένζυμο PUase.

Προκύπτει, λοιπόν, το συμπέρασμα ότι τα ένζυμα με δράση σε πλαστικά, εμφανίζουν συμπεριφορά που ποικίλλει στα διάφορα pNP υποστρώματα και καθένα από αυτά παρουσιάζει διαφορετική εξειδίκευση ως προς το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας των pNP υποστρωμάτων.

4.1.7. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten

Στο Διάγραμμα 6 και στον Πίνακα 30 παρουσιάζεται η κινητική Michaelis-Menten για το ένζυμο DmEst με τα υποστρώματα pNPA, pNPB, pNPO και pNPD, καθώς και οι σταθερές που προέκυψαν ύστερα από προσαρμογή των κινητικών μοντέλων Michaelis-Menten.

Το ένζυμο DmEst εμφάνισε τη μεγαλύτερη συγγένεια ($K_m = 0,1938 \text{ mM}$) αλλά και τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ($k_{cat}/K_m = 158,8 \text{ s}^{-1} * \text{mM}^{-1}$) με το υπόστρωμα pNPB.

Ένζυμα με δράση σε πλαστικά που βρέθηκαν βιβλιογραφικά, όπως μία κουτινάση από τον *Aspergillus oryzae* [25] εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα pNPB, όπως το μελετώμενο ένζυμο DmEst. Συγκρινόμενη με άλλα ένζυμα, όπως η LCC και η PETase, το ένζυμο DmEst εμφανίζει περίπου όμοια συγγένεια με το υπόστρωμα pNPB σε σχέση με την LCC [93] και 2 φορές μεγαλύτερη συγγένεια με το pNPB σε σχέση την PETase [94]. Όσον αφορά το υπόστρωμα pNPA, το ένζυμο DmEst εμφανίζει μικρότερη συγγένεια κατά 2 φορές σε σχέση με το ένζυμο PETase [94] και κατά 5 φορές μικρότερη συγγένεια συγκριτικά με το ένζυμο TfCut2 [96].

Το ένζυμο DmEst εμφάνισε τιμές k_{cat} ίσες με 27,54, 30,78, 11,33 και 2,47 s^{-1} για τα υποστρώματα pNPA, pNPB, pNPO και pNPD αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι μικρότερες σε σύγκριση με άλλα ένζυμα με ικανότητα δράσης σε πολυμερή υλικά, όπως η LCC [93], η PETase [94], η TfCut2 [96] και η κουτινάση C275/292A [67].

4.1.8. Δράση μελετώμενων ενζύμων σε πολυεστερικά πλαστικά

Εκτός από τον πλήρη βιοχημικό χαρακτηρισμό των ενζύμων, πραγματοποιήθηκε και μελέτη της δράσης τους σε πολυεστερικά πλαστικά και κυρίως στο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο. Το PET λόγω της μεγάλης κατανάλωσής του και της ανικανότητας βιοαποικοδόμησής του, βρίσκεται στο επίκεντρο των ερευνών που αφορούν την

ενζυμική αποικοδόμηση πλαστικών υλικών. Έτσι, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα μελετώμενα ένζυμα αναλύονται στη συνέχεια.

Όσον αφορά το ένζυμο DmEst το οποίο έχει βρεθεί με βιοπληροφορική ανάλυση επέδειξε ορισμένα αξιολογικά αποτελέσματα τόσο στα υπόλοιπα πολυεστερικά υλικά όσο και στο PET. Αρχικά, στο PCL προκάλεσε μείωση μάζας κατά 88,3% σε χρονικό διάστημα μίας ημέρας, αποτέλεσμα που προσεγγίζει αρκετά την πλήρη αποικοδόμηση. Στα υπόλοιπα πολυεστερικά υλικά, το συγκεκριμένο ένζυμο φάνηκε να έχει δράση σε όλα, αλλά προκαλώντας μεταβολή μάζας σε μικρότερα ποσοστά. Για παράδειγμα, στο PHB προκάλεσε αλλαγή μάζας κατά 10,4% σε χρονικό διάστημα 3 ημερών, ενώ στο PBS προκάλεσε διαφορά 4,7% παρουσιάζοντας, όμως, τη δεύτερη καλύτερη επίδοση στο συγκεκριμένο υλικό, συγκριτικά με τα υπόλοιπα μελετώμενα ένζυμα. Ακόμα, από τη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου προκλήθηκε μεταβολή μάζας 3,1% στο PLA και 1,2% στην PU. Αναφορικά με τη δράση στο PET το ένζυμο DmEst επέδειξε αρκετά αξιολογική δράση, κυρίως όσον αφορά την απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης, κάτι που επιβεβαιώνει τη διάσπαση του υλικού. Συγκεκριμένα, στο άμορφο PET προκάλεσε μεταβολή μάζας 5,4%, ενώ η συνολική συγκέντρωση των απελευθερωμένων προϊόντων ήταν 6,01 mM, καθιστώντας τη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου τη δεύτερη καλύτερη μετά από αυτή του ενζύμου LCC, που είναι μία αρκετά αναγνωρισμένη PET-υδρολάση. Στο κρυσταλλικό PET, προκάλεσε διαφορά μάζας 0,8%, ενώ προϊόντα υδρόλυσης απελευθερώθηκαν σε συγκέντρωση 1,43 mM, καθιστώντας και πάλι την επίδοση του συγκεκριμένου ενζύμου τη δεύτερη καλύτερη και μάλιστα με πολύ παρεμφερή αποτέλεσμα σε σχέση με τη δράση του ενζύμου LCC που είχε την καλύτερη απόδοση. Όσον αφορά τα δύο καινοτόμα υλικά, το πρότυπο ανακυκλώσιμο PET και το ανακυκλώσιμο PET προκατεργασίας REX, το ένζυμο DmEst επέδειξε αξιολογική δράση και σε αυτά τα δύο υλικά. Συγκεκριμένα, στο oPET προκάλεσε μεταβολή μάζας κατά 3,3% και απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης συνολικής συγκέντρωσης 4,14 mM, ξεπερνώντας σε αυτό το αποτέλεσμα το ένζυμο PETase που είναι από τα πιο γνωστά ένζυμα δράσης στο PET. Επιπροσθέτως, όσον αφορά το rPET, η DmEst προκάλεσε μεταβολή μάζας κατά 26,6%, που είναι η υψηλότερη μεταβολή μάζας που μπόρεσε να επιτευχθεί στο συγκεκριμένο υλικό, ενώ οδήγησε και σε απελευθέρωση προϊόντων συνολικής συγκέντρωσης 10,81 mM. Τέλος, ένα σημαντικό συμπέρασμα για τη δράση του ενζύμου προκύπτει από την παρατήρηση των προϊόντων που απελευθερώνονται από την υδρόλυση όλων των πολυμερικών σκονών PET. Το συμπέρασμα αυτό, έγκειται στο γεγονός ότι κατά τη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου απελευθερώνεται μεγαλύτερη ποσότητα MHET σε σχέση με το TPA και αρκετά μικρή ποσότητα BHET. Αυτό ίσως σημαίνει ότι το ένζυμο έχει ενδο-δράση, καθότι αν έκοβε στις άκρες της αλυσίδας θα απελευθερώνονταν κυρίως μικρά μόρια TPA που συναντώνται εκεί. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται και συνεπώς πιθανόν το ένζυμο έχει την ικανότητα να κόβει κατά βάση στο εσωτερικό των πολυμερικών αλυσίδων. Ακόμα, η ανάλυση των προϊόντων υδρόλυσης που απελευθερώνονται οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η δράση του συγκεκριμένου ενζύμου μπορεί να ενισχυθεί σημαντικά αν εισαχθεί σε αντιδράσεις συνεργιστικά με κάποιο ένζυμο με την ικανότητα να διασπά περαιτέρω το MHET (MHETase).

Αναφορικά με το ένζυμο LCC, όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, είναι αρκετά αναγνωρισμένη PET-υδρολάση. Ωστόσο, πέραν της αξιοσημείωτης δράσης στο PET,

το συγκεκριμένο ένζυμο επέδειξε εξαιρετική δράση και σε όλα τα υπόλοιπα πολυεστερικά πλαστικά. Συγκεκριμένα, σε 4 από τα 5 υλικά ήταν το ένζυμο με τη μεγαλύτερη δραστηριότητα. Έτσι, στο PCL προκάλεσε μεταβολή μάζας 98,7%, γεγονός που πρακτικά σημαίνει ότι προκάλεσε πλήρη αποικοδόμηση του υλικού, ενώ και στο PBS προκάλεσε αλλαγή μάζας 84%, αποτέλεσμα που απείχε εξαιρετικά από το αποτέλεσμα οποιουδήποτε άλλου μελετώμενου ενζύμου. Ακόμα, το ένζυμο LCC οδήγησε σε μεταβολή μάζας κατά 15,2% στο PHB και κατά 4,5% στο PLA, έχοντας την καλύτερη δράση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μελετώμενα ένζυμα και σε αυτά τα δύο υλικά. Έπειτα, όσον αφορά το υλικό PU, το ένζυμο οδήγησε σε μεταβολή 5,5% της μάζας του. Αναφορικά με τη δράση του ενζύμου στο PET, η LCC προκάλεσε τη μεγαλύτερη μεταβολή μάζας στο aPET σε ποσοστό 40,9%, ενώ οδήγησε και στη μεγαλύτερη απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης σε συγκέντρωση 23,98 mM. Στο cPET, προκάλεσε μεταβολή μάζας μόλις 0,5%, ενώ οδήγησε σε συγκέντρωση απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης 1,9 mM. Επίσης, στο oPET προκάλεσε μείωση μάζας κατά 31,3%, που ήταν το καλύτερο αποτέλεσμα στο συγκεκριμένο υλικό, ενώ επιπλέον απελευθερώθηκαν προϊόντα συνολικής συγκέντρωσης 38,21 mM, αποτέλεσμα που, επίσης, είναι το καλύτερο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ένζυμα για το συγκεκριμένο υλικό. Ακόμα, όσον αφορά το rPET, η LCC προκάλεσε μείωση μάζας κατά 21,1%, έχοντας τη δεύτερη καλύτερη απόδοση, με το ένζυμο DmEst να έχει την καλύτερη, ενώ προκάλεσε και απελευθέρωση 38,19 mM προϊόντων υδρόλυσης, που αποτελεί το βέλτιστο αποτέλεσμα. Τέλος, όσον αφορά τη συγκέντρωση καθενός εκ των προϊόντων υδρόλυσης των πολυμερικών σκονών PET, προκύπτει το συμπέρασμα ότι γενικά το ένζυμο LCC οδηγεί σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις TPA σε σχέση με τα υπόλοιπα δύο προϊόντα. Αυτό σημαίνει ότι το ένζυμο πιθανώς έχει εξω-δράση, δηλαδή «κόβει» στα άκρα των αλυσίδων απελευθερώνοντας τα μόρια TPA που συναντώνται εκεί και σε πολύ μικρό ποσοστό τυχαία στο εσωτερικό των αλυσίδων, όπου η δράση εκεί οδηγεί στην απελευθέρωση των μεγαλύτερων μορίων MHET και BHET. Ωστόσο, υπάρχει και το ενδεχόμενο να καταφέρνει να διασπά εσωτερικά τον σκελετό του PET απελευθερώνοντας μόρια MHET και BHET και στη συνέχεια να τα διασπά προς TPA.

Το ένζυμο Se1JFR ανακαλύφθηκε, επίσης, ύστερα από βιοπληροφορική ανάλυση και επέδειξε και αυτό ορισμένα αρκετά ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, όσον αφορά το PCL προκάλεσε σε διάστημα μίας ημέρας 77,5% μεταβολή της μάζας του, σε θερμοκρασία 30 °C. Το πιο αξιόλογο αποτέλεσμα ίσως είναι η δράση του συγκεκριμένου ενζύμου στην PU, όπου σε αυτήν την περίπτωση ήταν το ένζυμο με την καλύτερη δράση και προκάλεσε μείωση μάζας κατά 18,2%. Ακόμα, στο PLA εμφάνισε τη δεύτερη καλύτερη δράση μειώνοντας τη μάζα του υλικού κατά 4,2%. Επιπλέον, στο υλικό PHB οδήγησε σε μείωση μάζας κατά 6,9% και στο υλικό PBS κατά μόλις 1,6%. Όσον αφορά τη δράση του ενζύμου Se1JFR στο PET, αυτό προκάλεσε μικρές μεταβολές στις πολυμερικές σκόνες που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, στο aPET προκάλεσε μηδενική μεταβολή μάζας και απελευθέρωση μόλις 0,007 mM προϊόντων, ενώ στο cPET προκάλεσε μία σημαντική μεταβολή μάζας σε ποσοστό 1,3%, ενώ και πάλι η συγκέντρωση των απελευθερωμένων προϊόντων ήταν αρκετά χαμηλή και συγκεκριμένα 0,004 mM. Τέλος, όσον αφορά το είδος των προϊόντων υδρόλυσης, προκύπτει το συμπέρασμα ότι κατά τη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου, απελευθερώνεται κυρίως TPA, όπως και στην περίπτωση της LCC που

προαναφέρθηκε, υποδεικνύοντας πιθανή εξω-δράση του ενζύμου ή παράλληλη ενδο-δράση και περαιτέρω διάσπαση των απελευθερωμένων μορίων MHET και BHET.

Το ένζυμο PETase, είναι από τα πιο γνωστά ένζυμα δράσης στο PET και για τον λόγο αυτό μελετήθηκε η δράση του μόνο στο συγκεκριμένο υλικό ως ένζυμο αναφοράς. Στο aPET, το ένζυμο PETase προκάλεσε μεταβολή μάζας κατά 2,8%, ενώ οδήγησε σε ικανοποιητική απελευθέρωση προϊόντων συγκέντρωσης 1,65 mM. Στο cPET, το συγκεκριμένο ένζυμο προκάλεσε τη μεγαλύτερη μείωση μάζας σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μελετώμενα ένζυμα σε ποσοστό 2,3% και οδήγησε σε συγκέντρωση απελευθερωμένων προϊόντων 0,4 mM. Το συμπέρασμα για τη μείωση της μάζας του cPET είναι πολύ σημαντικό, καθώς είναι το πιο δύσκολο να αποικοδομηθεί σε σύγκριση με τα υπόλοιπα υλικά PET, λόγω του υψηλού βαθμού κρυσταλλικότητας, ενώ λίγες μελέτες επικεντρώνονται στο συγκεκριμένο είδος PET. Όσον αφορά το oPET, το ένζυμο PETase προκάλεσε μείωση μάζας μόλις κατά 1,3%, ενώ απελευθερώθηκαν προϊόντα συνολικής συγκέντρωσης 1,39 mM, ενώ όσον αφορά το rPET το ένζυμο PETase οδήγησε σε 15,8% απώλεια μάζας και σε απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης με συγκέντρωση 7,69 mM. Τέλος, όσον αφορά το είδος των προϊόντων που απελευθερώνονται από τη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου, όπως και στην περίπτωση της LCC, παρατηρείται κυρίως απελευθέρωση TPA, κάτι το οποίο πιθανόν σημαίνει ότι το ένζυμο εμφανίζει εξω-δράση ή παράλληλη ενδο-δράση και περαιτέρω διάσπαση των απελευθερωμένων μορίων MHET και BHET.

Όσον αφορά το ένζυμο PHOase εμφάνισε κατά βάση μικρότερη δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα μελετώμενα ένζυμα, αλλά παρόλα αυτά είχε δραστηριότητα σε όλα τα πολυμερικά υλικά που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, στο PCL προκάλεσε μεταβολή μάζας 49,5%, στην PU μεταβολή 11% και στο PHB μεταβολή 9,8%. Παρόλο που το ένζυμο PHOase δεν είχε τη βέλτιστη δράση στο υλικό PHB συγκρινόμενη με τα υπόλοιπα μελετώμενα ένζυμα, ωστόσο το αποτέλεσμα που προέκυψε κρίνεται αξιολογικό και πιθανόν επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση δράσης της στο συγκεκριμένο πολυμερές λόγω της απομόνωσής της από μικροοργανισμό (*Pseudomonas fluorescens*) που εμφανίζει ενδείξεις αποικοδόμησης του PHO (πλαστικό της οικογένειας των PHB) [91]. Η PHOase προκάλεσε μικρότερη μείωση μάζας στα υλικά PBS και PLA με ποσοστά 3,9% και 2,8% αντίστοιχα. Τέλος, όσον αφορά τη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου στο PET, προκάλεσε μεν μεταβολή μάζας και στο aPET και στο cPET, αλλά οδήγησε σε μικρές συγκεντρώσεις προϊόντων υδρόλυσης. Συγκεκριμένα, στο aPET οδήγησε σε μείωση μάζας κατά 3,1% και στο cPET κατά 0,4%, ενώ οδήγησε σε συνολική συγκέντρωση απελευθερωμένων προϊόντων 0,026 mM και 0,005 mM στο aPET και στο cPET αντίστοιχα. Τέλος, από τη μελέτη των προϊόντων που απελευθερώθηκαν από τη δράση του ενζύμου στις πολυμερικές σκόνες PET προκύπτει το συμπέρασμα ότι παράγεται σε μεγαλύτερη αναλογία MHET σε σχέση με το TPA, κάτι που πιθανόν σημαίνει ότι το ένζυμο έχει ενδο-δράση, όπως και το ένζυμο DmEst.

Τέλος, όσον αφορά το ένζυμο PUase επέδειξε, επίσης, ορισμένα αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Αρχικά, οδήγησε σε μείωση μάζας του υλικού PCL κατά 55,7% σε χρονικό διάστημα μίας ημέρας. Δύο ακόμα υλικά στα οποία το συγκεκριμένο ένζυμο επέδειξε πολύ καλή δράση είναι η PU, επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση δράσης της στο υλικό αυτό λόγω της απομόνωσής της από μικροοργανισμό (*Comamonas acidovorans*) που εμφανίζει ενδείξεις αποικοδόμησης του συγκεκριμένου πλαστικού

[92], και το PHB. Και στα δύο αυτά υλικά η PUase είχε τη δεύτερη καλύτερη απόδοση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μελετώμενα ένζυμα και συγκεκριμένα οδήγησε σε μεταβολή της μάζας τους κατά 14,5% στην PU και κατά 11,1% στο PHB. Ακόμα, όσον αφορά τα υλικά PBS και PLA το συγκεκριμένο ένζυμο προκάλεσε μείωση μάζας σε ποσοστό 4,1% και 2% αντίστοιχα. Τέλος, αναφορικά με τη δράση της PUase στο PET, εκεί δεν προέκυψαν ιδιαίτερα αισιόδοξα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, δεν προκάλεσε καμία μεταβολή μάζας ούτε στο aPET ούτε στο cPET, ενώ και η συγκέντρωση των προϊόντων που απελευθερώθηκαν κατά την αντίδραση ήταν αρκετά χαμηλή και είχε τιμές 0,004 mM για το aPET και 0,001 mM για το cPET. Τέλος, όσον αφορά το είδος των προϊόντων που απελευθερώθηκαν κατά τη δράση του ενζύμου στις πολυμερικές σκόνες PET δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με τη δράση του ενζύμου, καθώς στο aPET οδήγησε σε ίσες ποσότητες TPA και MHET, ενώ στο cPET οδήγησε μόνο σε απελευθέρωση TPA. Άλλωστε, γενικά οι συγκεντρώσεις των προϊόντων υδρόλυσης PET από τη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου ήταν αρκετά μικρές, οπότε δεν μπορεί να προκύψει κάποιο γενικό συμπέρασμα για τον τρόπο δράσης του.

4.1.9. Σύγκριση αποτελεσμάτων των μελετώμενων ενζύμων με τη βιβλιογραφία

Πραγματοποιείται σύγκριση των αποτελεσμάτων των μελετώμενων ενζύμων με τα αποτελέσματα ενζύμων από τη βιβλιογραφία προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο τα μελετώμενα ένζυμα προσφέρουν συγκρίσιμα και ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αποικοδόμηση των πλαστικών υλικών.

Όσον αφορά, το PCL, η λιπάση από τον *Pseudomonas fluorescens* προκάλεσε 100% αποικοδόμηση του πολυμερούς σε παρόμοιες συνθήκες θερμοκρασίας και pH με τα μελετώμενα ένζυμα [21]. Ωστόσο, και τα μελετώμενα ένζυμα LCC και DmEst προκάλεσαν αρκετά υψηλά ποσοστά αποικοδόμησης και συγκεκριμένα 98,7% και 88,3% αντίστοιχα. Ωστόσο, η LCC και η DmEst έδωσαν αυτά τα αξιοσημείωτα αποτελέσματα σε χρονικό εύρος μίας ημέρας, ενώ η λιπάση από τον *Pseudomonas fluorescens* σε χρονικό διάστημα 14 ημερών. Η κουτινάση από τον *Thielavia terrestris* προκάλεσε 70% μεταβολή μάζας του PCL σε χρονικό διάστημα 48 ωρών [22] και σαν αποτέλεσμα είναι συγκρίσιμο με την μείωση μάζας κατά 77,5% που προκάλεσε το βιοπληροφορικά ανακαλυμμένο ένζυμο Se1JFR σε χρονικό διάστημα 24 ωρών. Τέλος, η εμπορική λιπάση από την εταιρία Merck προκάλεσε σε χρονικό διάστημα 6 ημερών μόλις 30% απώλεια μάζας του PCL και η λιπάση από τον *Lactobacillus plantarum* σε υψηλή συγκέντρωση προκάλεσε μεταβολή μάζας κατά 60% σε 10 ημέρες [24], ενώ τα μελετώμενα ένζυμα PHOase και PUase προκάλεσαν μείωση μάζας 49,5% και 55,7% αντίστοιχα. Συνεπώς, τα μελετώμενα ένζυμα επέδειξαν αξιοσημείωτη συμπεριφορά στο συγκεκριμένο πλαστικό με αποτελέσματα εν γένει καλύτερα από τα βιβλιογραφικά.

Όσον αφορά τα υλικά της PU γενικά εμφανίζουν αρκετά μειωμένα ποσοστά αποικοδόμησης σε σχέση με το PCL, που κατά βάση κυμαίνονται μεταξύ 1-5%. Όσον αφορά τα βιβλιογραφικά αποτελέσματα, τα ένζυμα E3576 (εμπορικά διαθέσιμο) [27] και μία λακάση από τον *Trametes versicolor* [28] είχαν την καλύτερη δράση στο συγκεκριμένο υλικό. Το πρώτο προκάλεσε απώλεια μάζας κατά 18% σε χρονικό διάστημα 20 ημερών και απώλεια μάζας 33% σε χρονικό διάστημα 40 ημερών, ενώ το δεύτερο εντός 18 ημερών προκάλεσε απώλεια μάζας κατά 10%. Ωστόσο, το

μελετώμενο ένζυμο Se1JFR προκάλεσε σχεδόν ίδιο ποσοστό μεταβολής μάζας με το ένζυμο E3576, συγκεκριμένα 18,2%, σε χρονικό διάστημα τριών ημερών, δηλαδή σε χρόνο επτά φορές μικρότερο σε σχέση με το εμπορικά διαθέσιμο ένζυμο. Αντίστοιχα τα μελετώμενα ένζυμα PUase και PHOase προκάλεσαν εντός τριών ημερών απώλεια μάζας 14,5% και 11% αντίστοιχα, αποτελέσματα αρκετά πιο βελτιωμένα σε σύγκριση με την λακάση από τον *Trametes versicolor*. Τέλος, τα μελετώμενα ένζυμα LCC και DmEst προκάλεσαν μεταβολή μάζας του υλικού κατά 5,5% και 1,2% αντίστοιχα σε χρονικό διάστημα 72 ωρών και τα αποτελέσματα αυτά είναι συγκρίσιμα με τα βιβλιογραφικά ένζυμα TfCut2, Tcur0390 και Tcur1278 [29] που προκάλεσαν αντίστοιχες μεταβολές αλλά σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της τάξης των 100-200 ωρών.

Αναφορικά με το PLA, τα περισσότερα ένζυμα που βρέθηκαν βιβλιογραφικά επιτύχαναν απώλεια μάζας που κυμαινόταν μεταξύ των ορίων 10-15% σε συνθήκες θερμοκρασίας και pH παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν και στα πειράματα των μελετώμενων ενζύμων. Τα πιο αξιολογικά βιβλιογραφικά αποτελέσματα στο PLA επιτεύχθηκαν με χρήση της πρωτεΐνάσης K από τον *Tritirachium album* [33] και του ενζύμου CH1 από τον *S. ravanii* [34]. Το πρώτο εξ αυτών προκάλεσε μείωση μάζας στο PLA κατά 70% σε χρονικό διάστημα 8 ημερών με ημερήσια ανανέωση ενζύμου, ενώ το δεύτερο προκάλεσε απώλεια μάζας 42% εντός 20 ωρών. Τα υπόλοιπα ένζυμα που βρέθηκαν βιβλιογραφικά προκάλεσαν μικρότερες μεταβολές στη μάζα του PLA της τάξης του 10-15% σε χρονικό διάστημα, συνήθως, άνω των οκτώ ημερών. Τα μελετώμενα ένζυμα στην περίπτωση του συγκεκριμένου υλικού δεν έδωσαν αποτελέσματα συγκρίσιμα με αυτά που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία, καθότι σε χρονικό διάστημα τριών ημερών προκάλεσαν μεταβολή της μάζας του υλικού μεταξύ των ορίων 2-5%.

Όσον αφορά το PHB, δύο βιβλιογραφικά ένζυμα που βρέθηκαν, η αποπολυμεράση B από τον *Pseudomonas lemoignei* [39] και μία εμπορική λιπάση από την εταιρία Merck [23] οδήγησαν σε απώλεια μάζας 50% σε χρονικό διάστημα 220 ωρών και 6% σε χρόνο 6 ημέρες εντός υγρής καλλιέργειας ανάπτυξης του ενζύμου σε συνθήκες θερμοκρασίας και pH στα ίδια όρια με αυτά που μελετήθηκαν τα ένζυμα αναφοράς της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας. Τα μελετώμενα ένζυμα προκάλεσαν μεταβολή μάζας του συγκεκριμένου πολυμερικού υλικού μεταξύ των ορίων 7-15% εντός χρονικού διαστήματος 3 ημερών. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν μεγάλο ενδιαφέρον και σε πολλές περιπτώσεις είναι συγκρίσιμα με τα βιβλιογραφικά.

Αναφορικά με το PBS, υπάρχουν αρκετά ένζυμα βιβλιογραφικά που επιτυγχάνουν πλήρη ή σχεδόν πλήρη αποικοδόμηση του υλικού. Ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι μία κουτινάση από τον *Fusarium solani* [49] που εντός μόλις 6 ωρών οδήγησε σε 100% μεταβολή μάζας του υλικού, δηλαδή σε πλήρη αποικοδόμηση του, καθώς και η κουτινάση 1 από τον *Thermobifida cellulolytica* (στέλεχος με μετάλλαξη) [51] που σε χρονικό διάστημα 96 ωρών προκάλεσε μείωση μάζας του υλικού κατά 90%. Από τα μελετώμενα ένζυμα το μόνο που παρουσίασε αξιολογημένη δράση στο PBS είναι το ένζυμο LCC που προκάλεσε μείωση μάζας του υλικού κατά 84% σε χρονικό διάστημα 72 ωρών. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να συγκριθεί τόσο με τη δράση της κουτινάσης 1 από τον *Thermobifida cellulolytica* (στέλεχος με μετάλλαξη), όσο και με τη δράση μίας αποπολυμεράσης από τον *Fusarium sp. FS1301*

[52], που οδήγησε σε μεταβολή μάζας 80% εντός υγρής καλλιέργειας και σε χρονικό διάστημα 25 ημερών. Τα υπόλοιπα μελετώμενα ένζυμα εμφάνισαν μικρή δράση στο συγκεκριμένο πολυμερικό υλικό, προκαλώντας μεταβολή μάζας μεταξύ των ορίων 2-5% και τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι συγκρίσιμα με αυτά που προέκυψαν από βιβλιογραφική αναζήτηση.

Όσον αφορά τη δράση των ενζύμων στο PET, αρχικά θα γίνει αναφορά στο άμορφο PET (aPET). Βιβλιογραφικά βρέθηκαν κάποια ένζυμα, που σε αρκετά υψηλή θερμοκρασία (70 °C) οδήγησαν σε πολύ υψηλά ποσοστά αποικοδόμησης του aPET, όπως για παράδειγμα το ένζυμο HiC από τον *Humicola insolens* [62], όπου στους 70 °C και εντός 96 ωρών οδήγησε σε μείωση μάζας 97% του aPET κρυσταλλικότητας 7%. Από τα μελετώμενα ένζυμα, τη μεγαλύτερη μείωση μάζας του aPET προκάλεσε το ένζυμο LCC σε ποσοστό 40,9% εντός 72 ωρών και σε θερμοκρασία 50 °C. Το αποτέλεσμα αυτό είναι συγκρίσιμο με τα αποτελέσματα που προκάλεσαν διάφορα μεταλλαγμένα στελέχη του ενζύμου TfCut2 από τον *Thermobifida fusca* [66] σε θερμοκρασία 65 °C. Τα υπόλοιπα μελετώμενα ένζυμα προκάλεσαν μικρή μεταβολή μάζας του υλικού μεταξύ των ορίων 0-5% και τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι συγκρίσιμα με τα βιβλιογραφικά. Ωστόσο, παρόλο που η μείωση μάζας ήταν αρκετά μικρή, η απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης ήταν σημαντική ιδιαίτερα στο ένζυμο DmEst. Η μικρή δράση των υπολοίπων ενζύμων στο PET ίσως οφείλεται στις χαμηλές θερμοκρασίες αντίδρασης (30-40 °C) που χρησιμοποιήθηκαν και οι οποίες απέιχαν σημαντικά από το σημείο υαλώδους μετάπτωσης του υλικού, όπου εκεί καθίσταται πιο επιρρεπές σε αποικοδόμηση λόγω της ευκολότερης προσέγγισης των δεσμών που συμβαίνει εξαιτίας του «ξετυλίγματος» των αλυσίδων.

Όσον αφορά το κρυσταλλικό PET βρέθηκαν ελάχιστα δεδομένα στη βιβλιογραφία που να ασχολούνται με το συγκεκριμένο υλικό, πιθανώς λόγω του υψηλού βαθμού κρυσταλλικότητας είναι το πιο δύσκολο να αποικοδομηθεί μεταξύ των διαφορετικής κρυσταλλικότητας PET. Ωστόσο, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 14, παρουσιάστηκαν ενδείξεις αποικοδόμησης του υλικού από τα μελετώμενα ένζυμα. Τη μεγαλύτερη μεταβολή μάζας προκάλεσε το ένζυμο PETase που αποτελεί, άλλωστε, και μία από τις πιο γνωστές PET-υδρολάσες [68], ενώ όσον αφορά την απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης, ενθαρρυντικά ήταν τα αποτελέσματα των ενζύμων LCC και DmEst που προκάλεσαν παρόμοια συγκέντρωση απελευθερωμένων προϊόντων, 1,9 mM και 1,43 mM αντίστοιχα. Δύο ένζυμα που βρέθηκαν βιβλιογραφικά, η MoPE από τον μικροοργανισμό *Moraxella sp.* και η FoFaeC από τον μικροοργανισμό *Fusarium oxysporum*, κατά την αντίδραση με PET κρυσταλλικότητας 35% οδήγησαν σε απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης σε συγκέντρωση περίπου 0,0015 mM και 0,0005 mM αντίστοιχα. [97] Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα μελετώμενα ένζυμα, και ιδίως η ανακαλυμμένη DmEst, υπερέχουν σημαντικά στη δράση σε κρυσταλλικό PET έναντι των βιβλιογραφικών.

Τέλος, αναφορικά με τα δύο νέα υλικά, το oPET και το rPET, αφού είναι καινοτόμα, δεν υπάρχει κάποια βιβλιογραφική πηγή που να ασχολείται με αυτά. Τα αποτελέσματα που προκάλεσαν τα μελετώμενα ένζυμα είναι αισιόδοξα, καθώς εμφάνισαν δράση και στα δύο αυτά υλικά προκαλώντας τόσο μείωση της μάζας τους, όσο και απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης. Ένα αρκετά αξιοσημείωτο αποτέλεσμα είναι η δράση του ενζύμου DmEst στο υλικό rPET, όπου προκάλεσε τη μεγαλύτερη μείωση μάζας και

μάλιστα σε σύγκριση με τα ένζυμα LCC και PETase που αποτελούν ευρέως γνωστές υδρολάσες του PET. Ακόμα, ένα σημαντικό συμπέρασμα που προέκυψε είναι η σημασία της προκατεργασίας REX στο υλικό που το καθιστά πιο επιρρεπές σε ενζυμική αποικοδόμηση μειώνοντας τον βαθμό κρυσταλλικότητάς του. Συγκεκριμένα, όσον αφορά το ένζυμο LCC οδήγησε σε περίπου ίση συγκέντρωση απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης στα υλικά oPET και rPET, αλλά τα ένζυμα DmEst και PETase οδήγησαν σε σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση προϊόντων υδρόλυσης στο rPET σε σχέση με το oPET, ενώ επίσης αυξήθηκε σημαντικά και η μεταβολή μάζας που προκάλεσαν στο υλικό αυτό. Πιο αναλυτικά όσον αφορά το ένζυμο DmEst οδήγησε στην απελευθέρωση προϊόντων 0,87 mM/mg_{PET} στην περίπτωση του oPET και 2,67 mM/mg_{PET} στην περίπτωση του rPET, ενώ το ένζυμο PETase οδήγησε στην απελευθέρωση προϊόντων 0,3 mM/mg_{PET} και 1,9 mM/mg_{PET} στο oPET και το rPET αντίστοιχα. Η αναγωγή αυτή ανά mg του υλικού προέκυψε λαμβάνοντας υπόψιν το ποσοστό PET από το οποίο αποτελείται καθένα από τα δύο υλικά, καθώς το rPET αποτελείται από μικρότερο ποσοστό PET σε σχέση με το oPET. Ωστόσο η πιο βελτιωμένη δράση των ενζύμων στο rPET ίσως οφείλεται και στο γεγονός της μειωμένης κρυσταλλικότητάς του σε σχέση με το oPET. Συνεπώς, η προκατεργασία που έχει υποστεί το υλικό βοηθά σημαντικά στην περαιτέρω αποικοδόμησή του από τα μελετώμενα ένζυμα.

4.1.10. Ανανέωση ενζύμου κατά το χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της αντίδρασης

Όσον αφορά τη μελέτη της ημερήσιας ανανέωσης ενζύμου που πραγματοποιήθηκε για τα ένζυμα DmEst και LCC σε άμορφο και κρυσταλλικό PET, προέκυψε το συμπέρασμα ότι εκτός από μία περίπτωση, όπου η ανανέωση ενζύμου οδήγησε σε ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα, στις υπόλοιπες περιπτώσεις η ανανέωση του ενζύμου επηρέασε ελάχιστα τα αποτελέσματα υδρόλυσης. Από βιβλιογραφική αναζήτηση βρέθηκε ότι στην περίπτωση του PLA όταν χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνωση K από τον *Tritirachium album*, προκλήθηκε μεταβολή μάζας 70% σε περίπτωση που γινόταν ημερήσια ανανέωση ενζύμου και μόλις 14% αν δε γινόταν ανανέωση. [33] Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση η ανανέωση του ενζύμου ήταν καθοριστική. Βέβαια, το πείραμα με την πρωτεΐνωση K από τον *Tritirachium album* πραγματοποιήθηκε για χρονικό διάστημα 8 ημερών, ενώ το πείραμα ανανέωσης ενζύμου της παρούσας Διπλωματικής πραγματοποιήθηκε για 3 ημέρες. Η διαφορά αυτή στο χρονικό πλαίσιο, αλλά και το διαφορετικό πολυμερικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στα δύο πειράματα (PLA και PET) ενδέχεται να σχετίζεται με το διαφορετικό συμπέρασμα που προκύπτει στις δύο περιπτώσεις.

4.2. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, όσον αφορά τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των ενζύμων που πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα rNPB, προκύπτει ότι τα μελετώμενα ένζυμα δρουν βέλτιστα σε στενό εύρος pH μεταξύ των τιμών 6,0-8,5, ενώ όσον αφορά τις βέλτιστες θερμοκρασίες δράσης εμφανίζουν πιο ευρεία κατανομή και παρατηρούνται μεταξύ των τιμών 35-60 °C. Όσον αφορά τη σταθερότητα σε τιμές pH προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα ένζυμα που μελετώνται παραμένουν πιο σταθερά σε αλκαλικές τιμές pH, ενώ η θερμοσταθερότητα των ενζύμων ποικίλλει σημαντικά, κάτι το οποίο δικαιολογείται σε

μεγάλο βαθμό από τη φύση και την προέλευση των ενζύμων. Τέλος, αναφορικά με την εξειδίκευση σε διάφορα εστερικά υποστρώματα, παρατηρήθηκε ότι τα μελετώμενα ένζυμα εμφάνισαν διαφορετική συμπεριφορά ως προς το μήκος της αλυσίδας του εστερικού υποστρώματος στο οποίο είχαν την υψηλότερη δράση. Όσον αφορά τη δράση των ενζύμων σε πολυμερικά υλικά, προκύπτει ότι όλα τα μελετώμενα ένζυμα εμφάνισαν ενδείξεις αποικοδόμησης στα μελετώμενα πολυεστερικά πλαστικά. Τα αποτελέσματα της δράσης των συγκεκριμένων ενζύμων σε ορισμένες περιπτώσεις ήταν συγκρίσιμα ή και πιο ικανοποιητικά από τα βιβλιογραφικά ενώ σε ορισμένες άλλες δεν υπερίσχυαν των αντίστοιχων βιβλιογραφικών. Αρχικά, ισχυρή ήταν η δράση όλων των ενζύμων στο βιοαποικοδομήσιμο υλικό PCL με την πιο ενδιαφέρουσα δράση να εμφανίζουν τα ένζυμα LCC, DmEst και Se1JFR. Όσον αφορά το μη βιοαποικοδομήσιμο πλαστικό PU, το ένζυμο Se1JFR οδήγησε σε εξαιρετικά αποτελέσματα πιο βελτιωμένα σε σχέση με τα βιβλιογραφικά, ενώ και τα αποτελέσματα των υπολοίπων ενζύμων ήταν συγκρίσιμα με τα βιβλιογραφικώς αναφερόμενα. Στην περίπτωση των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών PLA και PBS, τα μελετώμενα ένζυμα δεν εμφάνισαν ιδιαίτερα ισχυρή δράση και δεν προέκυψαν συγκρίσιμα αποτελέσματα, με μοναδική εξαίρεση το ένζυμο LCC στην περίπτωση του PBS που προκάλεσε αρκετά μεγάλη μεταβολή μάζας. Ακόμα, όσον αφορά την περίπτωση του βιοαποικοδομήσιμου πλαστικού PHB, και πάλι τα μελετώμενα ένζυμα είχαν αυξημένη δραστηριότητα και προέκυψαν συγκρίσιμα αποτελέσματα. Στην περίπτωση του PET, τα πιο αξιόλογα αποτελέσματα που προέκυψαν σχετίζονται με τη δράση του βιοπληροφορικά ανακαλυμμένου ενζύμου DmEst, όπου στην περίπτωση του κρυσταλλικού PET οδήγησε στην απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυση σε συγκέντρωση αρκετά παρόμοια με αυτήν που προκάλεσε η γνωστή PET-υδρολάση, LCC και στην περίπτωση του καινοτόμου υλικού rPET προκάλεσε τη μεγαλύτερη μείωση μάζας συγκρινόμενη με την LCC και την PETase που είναι δύο από τα πιο γνωστά ένζυμα με δράση στο PET. Τέλος, ένα αρκετά ενδιαφέρον συμπέρασμα αφορά τη δράση του ενζύμου Se1JFR στο κρυσταλλικό PET σε χαμηλή θερμοκρασία αντίδρασης (30 °C), όπου προκάλεσε μείωση μάζας μεγαλύτερη σε σχέση με το ένζυμο LCC και σε ποσοστό αρκετά συγκρίσιμο με αυτό που προέκυψε από τη δράση του ενζύμου PETase.

4.3. Μελλοντικές προτάσεις

Οι μελλοντικές προτάσεις σχετίζονται με τη βελτίωση της δράσης των ενζύμων και την προσπάθεια κλιμάκωσης της διεργασίας, ώστε να μπορεί να επεκταθεί και σε βιομηχανικό επίπεδο. Έτσι προτείνεται:

1. Τροποποίηση των ενζύμων μέσω διαδικασιών γενετικής μηχανικής για τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους, όπως για παράδειγμα την αύξηση της θερμοσταθερότητάς τους, με σκοπό τη χρήση τους σε αντιδράσεις υψηλών θερμοκρασιών όπου ενοείται η αποικοδόμηση των περισσότερων πολυμερών. Παρατηρήθηκε στη βιβλιογραφία ότι στην περίπτωση των μη βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών και ιδιαιτέρως όσον αφορά το PET, οι αντιδράσεις που έδωσαν τα πιο αξιοσημείωτα αποτελέσματα, πραγματοποιούνταν σε υψηλές θερμοκρασίες της τάξης των 70 °C. Έτσι, αύξηση της θερμοσταθερότητας, για παράδειγμα του ενζύμου DmEst, που εμφάνισε αρκετά αισιόδοξα αποτελέσματα στην περίπτωση

του PET, ώστε να είναι πιο ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες, ίσως συμβάλλει σημαντικά στη βελτίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, καθιστώντας το συγκεκριμένο καινοτόμο ένζυμο το ισχυρότερο στην αποικοδόμηση του PET βάσει των μέχρι σήμερα βιβλιογραφικών δεδομένων.

2. Μελέτη της επίδρασης του χρόνου των αντιδράσεων στα αποτελέσματά τους. Από τη συγκεκριμένη μελέτη, μπορεί να προκύψει είτε το συμπέρασμα ότι σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα προκύπτουν αρκετά πιο βελτιωμένα αποτελέσματα, οπότε οι αντιδράσεις θα πρέπει να συνεχιστούν για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των τριών ημερών, είτε ότι από ένα χρονικό σημείο και μετά τα αποτελέσματα παραμένουν ίδια, οπότε η διακοπή των αντιδράσεων σε μικρότερο χρόνο, θα οδηγήσει σε σημαντική εξοικονόμηση πόρων.
3. Μελέτη της συνεργιστικής δράσης μεταξύ των ενζύμων. Τα αποτελέσματα δράσης των ενζύμων έδειξαν ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα οι μηχανισμοί δράσης κάθε ενζύμου σε κάθε διαφορετικό πλαστικό να διαφέρουν. Έτσι, μπορούν να πραγματοποιηθούν μελέτες ταυτόχρονης δράσης ορισμένων ενζύμων μεταξύ τους με στόχο τη βελτίωση των αποτελεσμάτων που θα έδιναν με ξεχωριστή δράση σε καθένα διαφορετικό πολυεστέρα. Ωστόσο, κάτι τέτοιο θα μπορούσε να οδηγήσει και σε πιθανή παρεμπόδιση, οπότε χρίζει περαιτέρω μελέτης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προς αυτήν την κατεύθυνση, πάντως, θα είχε για παράδειγμα η μελέτη της συνεργιστικής δράσης της DmEst με κάποιο ένζυμο με την ικανότητα να υδρολύει MHET (MHETase) στην περίπτωση των πολυμερικών σκονών PET. Ακόμα, μπορούν να πραγματοποιηθούν μελέτες δημιουργίας ενζυμικών «κοκτέιλ» των πολυεστερασών για την αποικοδόμηση μείγματος πολυεστέρων, όπως τα πραγματικά ρεύματα πλαστικών αποβλήτων.
4. Μελέτη της δράσης των ενζύμων σε «πραγματικά» και μετακαταναλωτικά (post-consumer) πολυμερικά υλικά, όπως για παράδειγμα στα διάφορα μέρη ενός πλαστικού μπουκαλιού PET και ανάλυση της απόδοσής τους.
5. Μελέτη της δυνατότητας κλιμάκωσης της διαδικασίας σε βιομηχανικό επίπεδο (scale-up). Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της χρήσης μεγαλύτερης συγκέντρωσης ενζύμων και υψηλότερων ποσοτήτων πολυμερικών υλικών και μελέτη της αντίστοιχης απόδοσης.

5. Βιβλιογραφία

- [1] W. D’ambrières, “Plastics recycling worldwide: Current overview and desirable changes,” *F. Actions Sci. Rep.*, vol. 2019, no. Special Issue, pp. 12–21, 2019, [Online]. Available: <https://journals.openedition.org/factsreports/5102>
- [2] F. M. Windsor, I. Durance, A. Horton, R. Thompson, C. Tyler, and S. Ormerod, “A catchment-scale perspective of plastic pollution,” *Global Change Biology*, pp. 1207–1221, 2019.
- [3] A. Magnin, E. Pollet, V. Phalip, and L. Avérous, “Evaluation of biological degradation of polyurethanes,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 39, no. November 2019, p. 107457, 2020, doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107457.
- [4] M. Alauddin, I. A. Choudhury, M. A. El Baradie, and M. S. J. Hashmi, “Plastics and their machining: A review,” *J. Mater. Process. Tech.*, vol. 54, no. 1–4, pp. 40–46, 1995, doi: 10.1016/0924-0136(95)01917-0.
- [5] Y. Zheng, E. K. Yanful, and A. S. Bassi, “A review of plastic waste biodegradation,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 25, no. 4, pp. 243–250, 2005, doi: 10.1080/07388550500346359.
- [6] A. Magnin, E. Pollet, and L. Avérous, “Characterization of the enzymatic degradation of polyurethanes,” *Methods Enzymol.*, vol. 648, pp. 317–336, 2021, doi: 10.1016/bs.mie.2020.12.011.
- [7] M. J. S. A W Birley, R J Heath, *PLASTICS MATERIALS Properties and Applications*, 2nd ed. New York: Blackie & Son Ltd, 1988.
- [8] S. K. Nigel Mills, Mike Jenkins, *PLASTICS Microstructure and Engineering Applications*, 4th ed. Butterworth-Heinemann, 2020.
- [9] G. G. N. Thushari and J. D. M. Senevirathna, “Plastic pollution in the marine environment,” *Heliyon*, vol. 6, no. 8, p. e04709, 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04709.
- [10] P. Singh and V. P. Sharma, “Integrated Plastic Waste Management: Environmental and Improved Health Approaches,” *Procedia Environ. Sci.*, vol. 35, pp. 692–700, 2016, doi: 10.1016/j.proenv.2016.07.068.
- [11] C. I. Idumah and I. C. Nwuzor, “Novel trends in plastic waste management,” *SNApl. Sci.*, vol. 1, no. 11, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1007/s42452-019-1468-2.
- [12] J. Siddiqui and G. Pandey, “A Review of Plastic Waste Management Strategies,” *Int. Res. J. Environ. Sci. Int. Sci. Congr. Assoc.*, vol. 2, no. 12, pp. 84–88, 2013, [Online]. Available: www.isca.me
- [13] Y. Tokiwa, B. P. Calabia, C. U. Ugwu, and S. Aiba, “Biodegradability of plastics,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 9, pp. 3722–3742, 2009, doi: 10.3390/ijms10093722.
- [14] L. S. Lens-Pechakova, “Recent studies on enzyme-catalysed recycling and biodegradation of synthetic polymers,” *Adv. Ind. Eng. Polym. Res.*, vol. 4, no. 3, pp. 151–158, 2021, doi: 10.1016/j.aiepr.2021.06.005.

- [15] P. L. Nayak, “Biodegradable polymers: Opportunities and challenges,” *J. Macromol. Sci. - Rev. Macromol. Chem. Phys.*, vol. 39 C, no. 3, pp. 481–505, 1999, doi: 10.1081/mc-100101425.
- [16] K. Leja and G. Lewandowicz, “Polymer biodegradation and biodegradable polymers - A review,” *Polish J. Environ. Stud.*, vol. 19, no. 2, pp. 255–266, 2010.
- [17] S. Doppalapudi, A. Jain, W. Khan, and A. J. Domb, “Biodegradable polymers-an overview,” *Polym. Adv. Technol.*, vol. 25, no. 5, pp. 427–435, 2014, doi: 10.1002/pat.3305.
- [18] A. Larrañaga and E. Lizundia, “A review on the thermomechanical properties and biodegradation behaviour of polyesters,” *Eur. Polym. J.*, vol. 121, no. June, p. 109296, 2019, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109296.
- [19] M. Labet and W. Thielemans, “Synthesis of polycaprolactone: A review,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 12, pp. 3484–3504, 2009, doi: 10.1039/b820162p.
- [20] M. Bartnikowski, T. R. Dargaville, S. Ivanovski, and D. W. Hutmacher, “Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 96, pp. 1–20, 2019, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2019.05.004.
- [21] J. H. Ashton *et al.*, “Polymeric endoaortic paving: Mechanical, thermoforming, and degradation properties of polycaprolactone/polyurethane blends for cardiovascular applications,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 1, pp. 287–294, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.09.004.
- [22] M. Liu, T. Zhang, L. Long, R. Zhang, and S. Ding, “Efficient enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone) by an engineered bifunctional lipase-cutinase,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 160, pp. 120–125, 2019, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.12.020.
- [23] V. A. Zhuikov *et al.*, “The growth of 3t3 fibroblasts on phb, pla and phb/pla blend films at different stages of their biodegradation in vitro,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 1, pp. 1–23, 2021, doi: 10.3390/polym13010108.
- [24] I. Khan, J. Ray Dutta, and R. Ganesan, “Lactobacillus sps. lipase mediated poly (ϵ -caprolactone) degradation,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 95, pp. 126–131, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.040.
- [25] L. Zhiqiang *et al.*, “Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: Enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 43, pp. 15711–15716, 2009, doi: 10.1021/ja9046697.
- [26] J. Liu *et al.*, “Biodegradation and up-cycling of polyurethanes: Progress, challenges, and prospects,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 48, no. March, p. 107730, 2021, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107730.
- [27] A. Magnin *et al.*, “Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: Synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks,” *Waste Manag.*, vol. 85, pp. 141–150, 2019, doi: 10.1016/j.wasman.2018.12.024.

- [28] A. Magnin, L. Entzmann, E. Pollet, and L. Avérous, “Breakthrough in polyurethane bio-recycling: An efficient laccase-mediated system for the degradation of different types of polyurethanes,” *Waste Manag.*, vol. 132, no. June, pp. 23–30, 2021, doi: 10.1016/j.wasman.2021.07.011.
- [29] J. Schmidt *et al.*, “Degradation of polyester polyurethane by bacterial polyester hydrolases,” *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 2, p. 65, 2017, doi: 10.3390/polym9020065.
- [30] P. Acid *et al.*, “Synthesis and Biological Application of Polylactic acid,” 2020.
- [31] M. S. Singhvi, S. S. Zinjarde, and D. V. Gokhale, “Polylactic acid: synthesis and biomedical applications,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 127, no. 6, pp. 1612–1626, 2019, doi: 10.1111/jam.14290.
- [32] X. Qi, Y. Ren, and X. Wang, “New advances in the biodegradation of Poly(lactic) acid,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 117, pp. 215–223, 2017, doi: 10.1016/j.ibiod.2017.01.010.
- [33] L. Cui *et al.*, “Quantitative analysis of factors determining the enzymatic degradation of poly(lactic acid),” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 209, no. January, pp. 1703–1709, 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.04.121.
- [34] T. Bubpachat, N. Sombatsompop, and B. Prapagdee, “Isolation and role of polylactic acid-degrading bacteria on degrading enzymes productions and PLA biodegradability at mesophilic conditions,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 152, pp. 75–85, 2018, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.03.023.
- [35] F. Kawai *et al.*, “Different enantioselectivity of two types of poly(lactic acid) depolymerases toward poly(l-lactic acid) and poly(d-lactic acid),” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 96, no. 7, pp. 1342–1348, 2011, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2011.03.022.
- [36] B. McAdam, M. B. Fournet, P. McDonald, and M. Mojicevic, “Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics,” *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 12, pp. 1–20, 2020, doi: 10.3390/polym12122908.
- [37] P. Rathore, “Bioprospects of PHB : A Review pragya rathore Bioprospects of PHB: A Review,” *Int. J. Emerg. Trends Sci. Technol.*, [Online]. Available: www.ijetst.in
- [38] M. K. Roohi, Mohd Rehan Zaheer, “PHB poly- -hydroxybutyrate and its enzymatic degradation.” p. 11, 2017. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/pat.4126>
- [39] A. Spyros, R. Kimmich, B. H. Briese, and D. Jendrossek, “¹H NMR imaging study of enzymatic degradation in poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Evidence for preferential degradation of the amorphous phase by PHB depolymerase B from *Pseudomonas lemoignei*,” *Macromolecules*, vol. 30, no. 26, pp. 8218–8225, 1997, doi: 10.1021/ma971193m.
- [40] M. Scandola, M. L. Focarete, and G. Frisoni, “Simple kinetic model for the heterogeneous enzymatic hydrolysis of natural poly(3-hydroxybutyrate),”

- Macromolecules*, vol. 31, no. 12, pp. 3846–3851, 1998, doi: 10.1021/ma980137y.
- [41] M. Canetti, M. Urso, and P. Sadocco, “Influence of the morphology and of the supermolecular structure on the enzymatic degradation of bacterial poly(3-hydroxybutyrate),” *Polymer (Guildf.)*, vol. 40, no. 10, pp. 2587–2594, 1999, doi: 10.1016/S0032-3861(98)00503-5.
- [42] N. Yoshie *et al.*, “Effect of low molecular weight additives on enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate),” *Polymer (Guildf.)*, vol. 41, no. 9, pp. 3227–3234, 2000, doi: 10.1016/S0032-3861(99)00547-9.
- [43] D. J. Gianpaolo Tomasi, Mariastella Scandola, Bern Holger Briese, “Enzymatic Degradation of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate) by a Depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*,” *Macromolecules*, pp. 507–513, 1996, [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ma951067n>
- [44] M. Barletta *et al.*, “Progress in Polymer Science Poly (butylene succinate) (PBS): Materials, processing, and industrial applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 132, p. 101579, 2022, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2022.101579.
- [45] L. Aliotta, M. Seggiani, A. Lazzeri, V. Gigante, and P. Cinelli, “A Brief Review of Poly (Butylene Succinate) (PBS) and Its Main Copolymers: Synthesis, Blends, Composites, Biodegradability, and Applications,” *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 4, 2022, doi: 10.3390/polym14040844.
- [46] V. Siracusa, N. Lotti, A. Munari, and M. Dalla Rosa, “Poly(butylene succinate) and poly(butylene succinate-co-adipate) for food packaging applications: Gas barrier properties after stressed treatments,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 119, pp. 35–45, 2015, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.04.026.
- [47] J. Kaushal, M. Khatri, and S. K. Arya, “Recent insight into enzymatic degradation of plastics prevalent in the environment: A mini - review,” *Clean. Eng. Technol.*, vol. 2, no. March, p. 100083, 2021, doi: 10.1016/j.clet.2021.100083.
- [48] A. K. Urbanek, A. M. Mirończuk, A. García-Martín, A. Saborido, I. de la Mata, and M. Arroyo, “Biochemical properties and biotechnological applications of microbial enzymes involved in the degradation of polyester-type plastics,” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1868, no. 2, p. 140315, 2020, doi: 10.1016/j.bbapap.2019.140315.
- [49] X. Hu, Z. Gao, Z. Wang, T. Su, L. Yang, and P. Li, “Enzymatic degradation of poly(butylene succinate) by cutinase cloned from *Fusarium solani*,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 134, pp. 211–219, 2016, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.10.012.
- [50] W. Pan, Z. Bai, T. Su, and Z. Wang, “Enzymatic degradation of poly(butylene succinate) with different molecular weights by cutinase,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 111, pp. 1040–1046, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.107.
- [51] C. Gamerith *et al.*, “Enzymatic degradation of aromatic and aliphatic polyesters by *P. pastoris* expressed cutinase 1 from *Thermobifida cellulositica*,” *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. MAY, pp. 1–14, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00938.

- [52] H. Mao, H. Liu, Z. Gao, T. Su, and Z. Wang, “Biodegradation of poly(butylene succinate) by *Fusarium* sp. FS1301 and purification and characterization of poly(butylene succinate) depolymerase,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 114, pp. 1–7, 2015, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.01.025.
- [53] C. Tsutsumi, N. Hayase, K. Nakagawa, S. Tanaka, and Y. Miyahara, “The enzymatic degradation of commercial biodegradable polymers by some lipases and chemical degradation of them,” *Macromol. Symp.*, vol. 197, pp. 431–442, 2003, doi: 10.1002/masy.200350737.
- [54] M. S. Michael Thomas Zumstein, Hans-Peter E. Kohler, Kristopher McNeil, “Enzymatic Hydrolysis of Polyester Thin Films: Real-Time Analysis of Film Mass Changes and Dissipation Dynamics,” *Environ. Sci. Technol.*, pp. 197–206, 2015, [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.est.5b04103>
- [55] A. Maurya, A. Bhattacharya, and S. K. Khare, “Enzymatic Remediation of Polyethylene Terephthalate (PET)–Based Polymers for Effective Management of Plastic Wastes: An Overview,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, no. November, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.602325.
- [56] I. Katip and C. Universitesi, “IMPACT MODIFIED POLY (ETHYLENE TEREPHTHALATE) -ORGANOCLAY,” no. March, 2018, doi: 10.13140/RG.2.2.27185.48489.
- [57] J. Pan and M. Salerno, “Clinical Utility and Future Applications of PET/CT and PET/CMR in Cardiology,” *Diagnostics*, vol. 6, no. 3, p. 32, 2016, doi: 10.3390/diagnostics6030032.
- [58] H. Nadel and L. Biassoni, “SPECT/CT in Pediatric Oncology,” *Pediatr. Oncol.*, vol. 10, no. 2, pp. 75–89, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-03777-2_5.
- [59] K. Hiraga, I. Taniguchi, S. Yoshida, Y. Kimura, and K. Oda, “ Biodegradation of waste PET ,” *EMBO Rep.*, vol. 20, no. 11, pp. 1–5, 2019, doi: 10.15252/embr.201949365.
- [60] X. Qi, W. Yan, Z. Cao, M. Ding, and Y. Yuan, “Current advances in the biodegradation and bioconversion of polyethylene terephthalate,” *Microorganisms*, vol. 10, no. 1, pp. 1–25, 2022, doi: 10.3390/microorganisms10010039.
- [61] R. P. Magalhães, J. M. Cunha, and S. F. Sousa, “Perspectives on the role of enzymatic biocatalysis for the degradation of plastic pet,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 20, 2021, doi: 10.3390/ijms222011257.
- [62] Å. M. Ronkvist, W. Xie, W. Lu, and R. A. Gross, “Cutinase-Catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate),” *Macromolecules*, vol. 42, no. 14, pp. 5128–5138, 2009, doi: 10.1021/ma9005318.
- [63] R. A. G. Abhijit N. Shirke, Christine White, Jacob A. Englaender, Allison Zwarycz, Glenn L. Butterfoss, Robert J. Linhardt, “Stabilizing Leaf and Branch Compost Cutinase (LCC) with Glycosylation: Mechanism and Effect on PET Hydrolysis,” *Biochemistry*, vol. 57, no. 7, pp. 1190–1200, 2018, [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.biochem.7b01189>

- [64] R. Wei *et al.*, “Biocatalytic Degradation Efficiency of Postconsumer Polyethylene Terephthalate Packaging Determined by Their Polymer Microstructures,” *Adv. Sci.*, vol. 6, no. 14, 2019, doi: 10.1002/advs.201900491.
- [65] R. J. Müller, H. Schrader, J. Profe, K. Dresler, and W. D. Deckwer, “Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): Rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*,” *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 26, no. 17, pp. 1400–1405, 2005, doi: 10.1002/marc.200500410.
- [66] R. Wei *et al.*, “Engineered bacterial polyester hydrolases efficiently degrade polyethylene terephthalate due to relieved product inhibition,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 113, no. 8, pp. 1658–1665, 2016, doi: 10.1002/bit.25941.
- [67] S. Sulaiman, D. J. You, E. Kanaya, Y. Koga, and S. Kanaya, “Crystal structure and thermodynamic and kinetic stability of metagenome-derived LC-cutinase,” *Biochemistry*, vol. 53, no. 11, pp. 1858–1869, 2014, doi: 10.1021/bi401561p.
- [68] X. Meng *et al.*, “Protein engineering of stable IsPETase for PET plastic degradation by Premuse,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 180, pp. 667–676, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.058.
- [69] F. K. Michael L. Shuler, *Bioprocess Engineering*, 2nd ed. 1992.
- [70] Z. Tao, B. Dong, Z. Teng, and Y. Zhao, “The Classification of Enzymes by Deep Learning,” *IEEE Access*, vol. 8, pp. 89802–89811, 2020, doi: 10.1109/ACCESS.2020.2992468.
- [71] T. Panda and B. S. Gowrishankar, “Production and applications of esterases,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 67, no. 2, pp. 160–169, 2005, doi: 10.1007/s00253-004-1840-y.
- [72] D. Romano, F. Bonomi, M. C. de Mattos, T. de Sousa Fonseca, M. da C. F. de Oliveira, and F. Molinari, “Esterases as stereoselective biocatalysts,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 5, pp. 547–565, 2015, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.006.
- [73] M. Karra-Chaabouni, S. Pulvin, D. Touraud, and D. Thomas, “Enzymatic synthesis of geraniol esters in a solvent-free system by lipases,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 18, no. 9, pp. 1083–1088, 1996, doi: 10.1007/BF00129736.
- [74] G. J. Kim, G. S. Choi, J. Y. Kim, J. B. Lee, D. H. Jo, and Y. W. Ryu, “Screening, production and properties of a stereospecific esterase from *Pseudomonas* sp. S34 with high selectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester,” *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, vol. 17, no. 1, pp. 29–38, 2002, doi: 10.1016/S1381-1177(01)00077-7.
- [75] I. Horne, R. L. Harcourt, T. D. Sutherland, R. J. Russell, and J. G. Oakeshott, “Isolation of a *Pseudomonas monteilli* strain with a novel phosphotriesterase,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 206, no. 1, pp. 51–55, 2002, doi: 10.1016/S0378-1097(01)00518-3.
- [76] H. Kontkanen, M. Tenkanen, R. Fagerström, and T. Reinikainen, “Characterisation of steryl esterase activities in commercial lipase preparations,” *J. Biotechnol.*, vol. 108, no. 1, pp. 51–59, 2004, doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.11.003.

- [77] P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, M. E. Leser, and R. Miller, “Lipases at interfaces: A review,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 147–148, no. C, pp. 237–250, 2009, doi: 10.1016/j.cis.2008.06.001.
- [78] K. E. Jaeger and T. Eggert, “Lipases for biotechnology,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 13, no. 4, pp. 390–397, 2002, doi: 10.1016/S0958-1669(02)00341-5.
- [79] T. F. Pio and G. A. Macedo, *Chapter 4 Cutinases: Properties and Industrial Applications*, 1st ed., vol. 66, no. 08. Elsevier Inc., 2009. doi: 10.1016/S0065-2164(08)00804-6.
- [80] C. M. L. Carvalho, M. R. Aires-Barros, and J. M. S. Cabral, “Cutinase: From molecular level to bioprocess development,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 66, no. 1, pp. 17–34, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(1999)66:1<17::AID-BIT2>3.0.CO;2-F.
- [81] A. Kai, N. Konishi, and H. Obata, “Diarrheagenic Escherichia coli,” *Nippon rinsho. Japanese J. Clin. Med.*, vol. 68 Suppl 6, no. 1, pp. 203–207, 2010, doi: 10.1128/cmr.11.2.403.
- [82] B. C. Joseph, S. Pichaimuthu, and S. Srimeenakshi, “An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in Escherichia coli,” *J. Cell Sci. Ther.*, vol. 06, no. 05, 2015, doi: 10.4172/2157-7013.1000221.
- [83] A. B. Nowakowski, W. J. Wobig, and D. H. Petering, “Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions,” *Metallomics*, vol. 6, no. 5, pp. 1068–1078, 2014, doi: 10.1039/c4mt00033a.
- [84] S. Howerton, M. Kerzic, A. Nagpal, and K. Woods, “SDS Page Gel Electrophoresis,” 2001. https://williams.chemistry.gatech.edu/course_Information/4581/syllabus.html
- [85] “Protein Purification Methods.” https://comis.med.uvm.edu/vic/coursefiles/MD540/MD540-Protein_Methods_Learning_Module_10400_593281210/Protein-methods/Protein_Methods4.html
- [86] A. N. Zaid *et al.*, “Pharmacodynamic testing and new validated HPLC method to assess the interchangeability between multi-source orlistat capsules,” *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 11, pp. 3291–3298, 2017, doi: 10.2147/DDDT.S138926.
- [87] R. Walsh, “Alternative Perspectives of Enzyme Kinetic Modeling,” *Med. Chem. Drug Des.*, no. January, 2012, doi: 10.5772/36973.
- [88] M. Salvador *et al.*, “Microbial genes for a circular and sustainable bio-PET economy,” *Genes (Basel)*, vol. 10, no. 5, 2019, doi: 10.3390/genes10050373.
- [89] A. M. V Tournier, C M Topham, A Gilles, B David, C Folgoas, E Moya-Leclair, E Kamionka, M-L Desrousseaux, H Texier, S Gavalda, M Cot, E Guémard, M Dalibey, J Nomme, G Cioci, S Barbe, M Chateau, I André, S Duquesne, “An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles,” *Nature*, pp. 216–2019, 2020, [Online]. Available:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32269349/>
- [90] K. O. Shosuke Yoshida, Kazumi Hiraga, Toshihiko Takehana, Ikuo Taniguchi, Hironao Yamaji, Yasuhito Maeda, Kiyotsuna Toyohara, Kenji Miyamoto, Yoshiharu Kimura, “A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate),” *Science* (80-.), pp. 1196–1199, 2016, [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26965627/>
- [91] D. J. A Schirmer, “Molecular characterization of the extracellular poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] depolymerase gene of *Pseudomonas fluorescens* GK13 and of its gene product,” *J Bacteriol.*, vol. 176, no. 22, pp. 7065–7073, 1994, [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7961472/>
- [92] Y. Akutsu, T. Nakajima-Kambe, N. Nomura, and T. Nakahara, “Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 1, pp. 62–67, 1998, doi: 10.1128/aem.64.1.62-67.1998.
- [93] “G9BY57 · PETH_UNKP.” <https://www.uniprot.org/uniprotkb/G9BY57/entry>
- [94] “A0A0K8P6T7 · PETH_IDESA”, [Online]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A0K8P6T7/entry>
- [95] M. Alisch-Mark, A. Herrmann, and W. Zimmermann, “Increase of the hydrophilicity of polyethylene terephthalate fibres by hydrolases from *Thermomonospora fusca* and *Fusarium solani* f. sp. pisi,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 28, no. 10, pp. 681–685, 2006, doi: 10.1007/s10529-006-9041-7.
- [96] “Q6A0I4 · PETH2_THEFU.” <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q6A0I4/entry>
- [97] E. T. Efstratios Nikolaiivits, George Taxeidis, Christina Gkountela, Stamatina Vouyiouka, Veselin Maslak, Jasmina Nikodinovic-Runic, “A polyesterase from the Antarctic bacterium *Moraxella* sp. degrades highly crystalline synthetic polymers,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 130, no. 1-2 SPEC. ISS., 2006, doi: 10.1016/j.jhazmat.2005.07.035.

Παράρτημα Α: Μοριακά βάρη πολυεστερασών βάσει της αμινοξικής τους ακολουθίας

Τα μοριακά βάρη των παραγόμενων πολυεστερασών όπως προσδιορίστηκαν με βάση την αμινοξική τους ακολουθία παρουσιάζονται στον Πίνακα Α. 1.

Πίνακας Α. 1. Μοριακά βάρη πολυεστερασών βάσει της αμινοξικής τους ακολουθίας.

Ένζυμο	Μοριακό βάρος (kDa)
DmEst	30,827
LCC	28,834
Se1JFR	29,252
PETase	28,870
PHOase	29,290
PUase	56,308

Παράρτημα Β: Συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας των πολυεστερασών

Οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας των πολυεστερασών προσδιορίστηκαν βάσει της αμινοξικής τους ακολουθίας και παρουσιάζονται στον Πίνακα Β. 1.

Πίνακας Β. 1. Συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας των πολυεστερασών βάσει της αμινοξικής τους ακολουθίας.

Ένζυμο	Συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας, ϵ (1/M*cm)
DmEst	40005
LCC	37150
Se1JFR	38515
PETase	39670
PHOase	61100
PUase	72225

Παράρτημα Γ: Προσδιορισμός ενεργότητας πολυεστερασών σε υπόστρωμα pNPB

Η ενεργότητα των ενζύμων εκφράζεται σε Units/mg_{prot}, όπου ως Unit ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που οδηγεί σε απελευθέρωση 1 μ mol pNP ανά λεπτό. Παρακάτω αναλύεται ο τρόπος υπολογισμού της ενεργότητας.

$$A_{410} * \alpha = C_{pNP} \text{ (mM)} \Rightarrow A_{410} * \alpha = \frac{n_{pNP} \text{ (mmol)}}{V_{\text{react}} \text{ (L)}} \Rightarrow$$

$$n_{pNP} \text{ (}\mu\text{mol)} = A_{410} * \alpha * V_{\text{react}} * 10^3 \text{ (1)}$$

$$\text{mg}_{\text{prot}} = C_{\text{prot}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) * V_{\text{prot}} \text{ (mL)} \text{ (2)}$$

$$(1), (2) \Rightarrow \frac{\text{Units}}{\text{mg}_{\text{prot}}} = \frac{A_{410} * \alpha * V_{\text{react}} \text{ (L)} * 10^3}{C_{\text{prot}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) * V_{\text{prot}} \text{ (mL)}}$$

A_{410} : Η απορρόφηση του διαλύματος της αντίδρασης στα 410 nm ανηγμένη στον χρόνο.

α : Ο συντελεστής που συνδέει τη συγκέντρωση του pNP με την απορρόφηση στα 410 nm ανάλογα με το pH της αντίδρασης και που εδώ ισούται με 0,4667, διότι όλα τα πειράματα ενεργότητας πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών pH=6 (Παράρτημα Δ: Καμπύλες αναφοράς pNP για τα ρυθμιστικά διαλύματα διαφόρων pH).

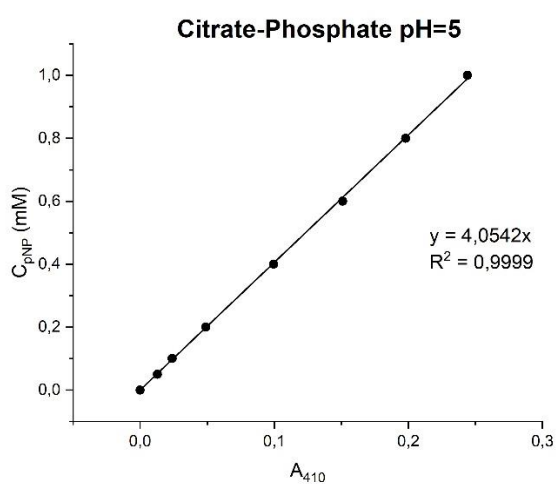
V_{react} : Ο συνολικός όγκος αντίδρασης που είναι ίσος με 250 μL .

C_{prot} : Η συγκέντρωση κάθε πρωτεϊνικού διαλύματος (Πίνακας 25).

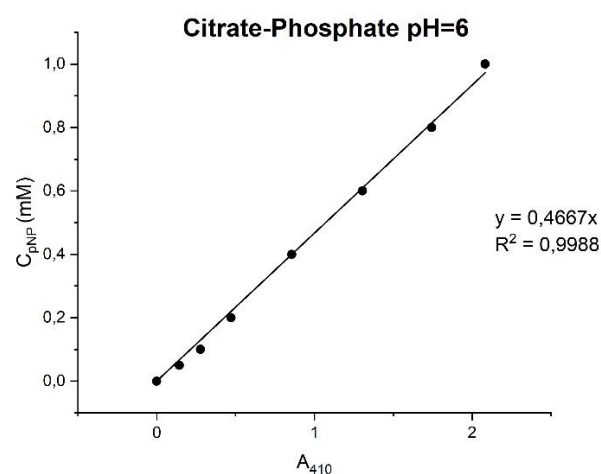
V_{prot} : Ο όγκος του πρωτεϊνικού διαλύματος που εισήχθη στη αντίδραση ίσος με 20 μL .

Παράρτημα Δ: Καμπύλες αναφοράς pNP για τα ρυθμιστικά διαλύματα διαφόρων pH

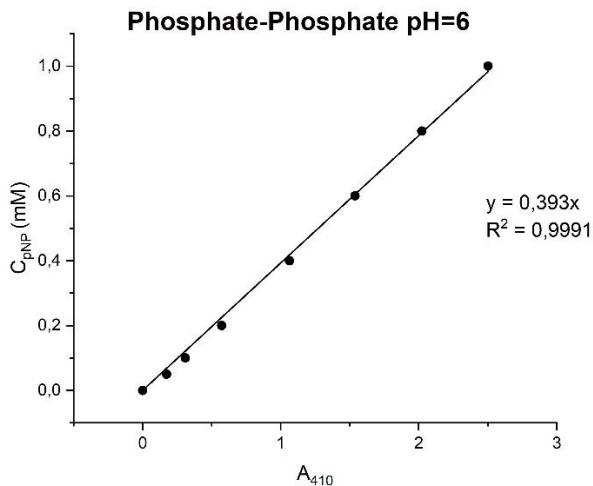
Στο Διάγραμμα Δ. 1 παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς για το pNP, προκειμένου να υπολογιστεί η διόρθωση του συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας στις διαφορετικές τιμές pH. Κάθε διάγραμμα αφορά μία τιμή pH και στον άξονα x παρουσιάζεται η απορρόφηση του διαλύματος στα 410 nm, ενώ στον άξονα y διαφορετικές συγκεντρώσεις του pNP.



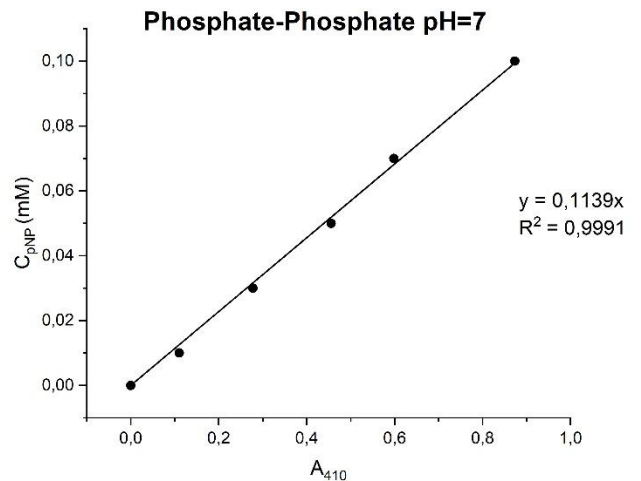
(α)



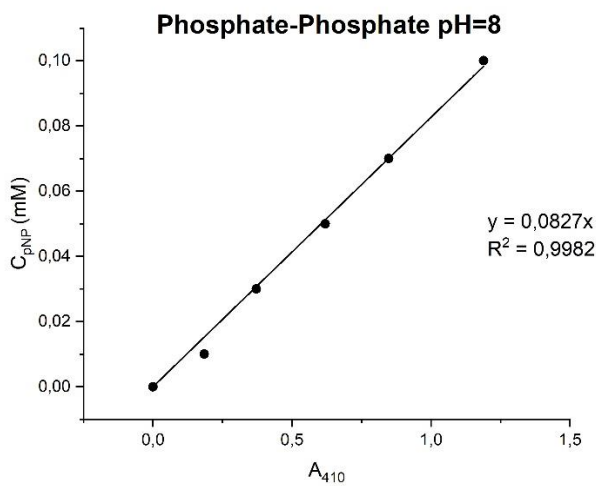
(β)



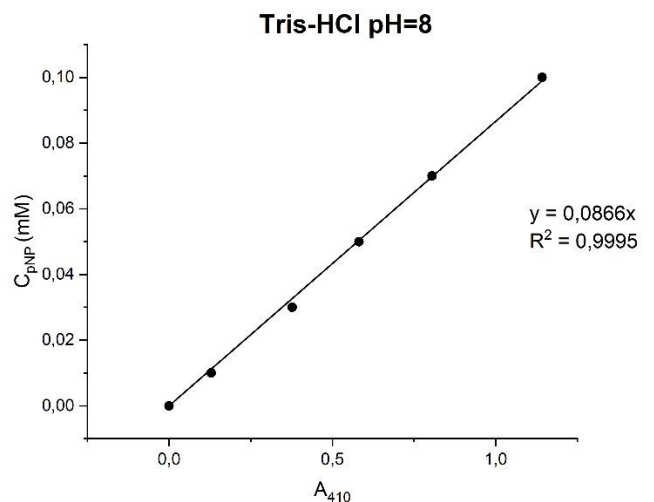
(γ)



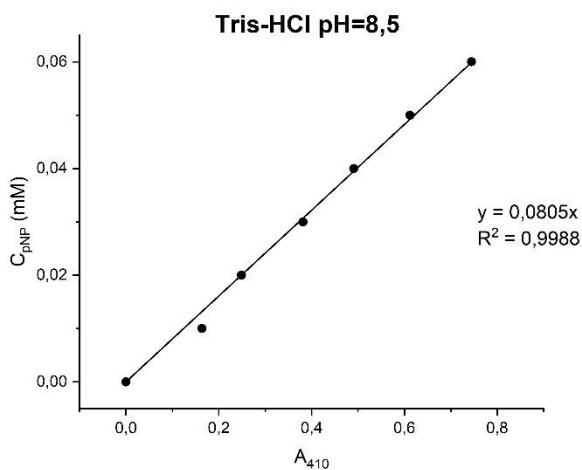
(δ)



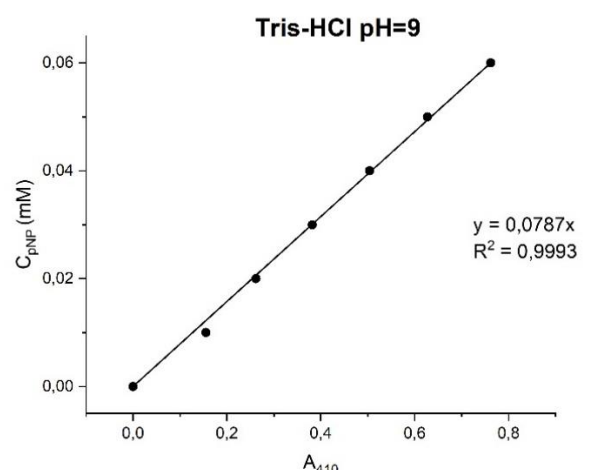
(ε)



(στ)



(ζ)



(η)

Διάγραμμα Δ. 1. . Καμπύλες αναφοράς για το pNP σε διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα: (α) διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών ιόντων pH=5,0, (β) διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών ιόντων pH=6,0, (γ) διάλυμα φωσφορικών-φωσφορικών ιόντων pH=6,0, (δ) διάλυμα φωσφορικών-φωσφορικών ιόντων pH=7,0, (ε) διάλυμα φωσφορικών-φωσφορικών ιόντων pH=8,0, (στ)

διάλυμα ιόντων της βάσης Tris (ρύθμιση με HCl) pH=8,0, ζ) διάλυμα ιόντων της βάσης Tris (ρύθμιση με HCl) pH=8,5 και η) διάλυμα ιόντων της βάσης Tris (ρύθμιση με HCl) pH=9,0.

Στον Πίνακα Δ. 1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι συντελεστές των καμπυλών αναφοράς για τα διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα.

Πίνακας Δ. 1. Συντελεστές καμπυλών αναφοράς ($A_{410}-C_{pNP}$) για τα διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα.

Ρυθμιστικό διάλυμα	Συντελεστής καμπύλης αναφοράς
Citrate-Phosphate pH=5,0	4,0542
Citrate-Phosphate pH=6,0	0,4667
Phosphate-Phosphate pH=6,0	0,393
Phosphate-Phosphate pH=7,0	0,1139
Phosphate-Phosphate pH=8,0	0,0827
Tris-HCl pH=8,0	0,0866
Tris-HCl pH=8,5	0,0805
Tris-HCl pH=9,0	0,0787

Παράρτημα Ε: Ισοηλεκτρικό σημείο (pI) πολυεστερασών

Το ισοηλεκτρικό σημείο των πολυεστερασών παρουσιάζονται στον Πίνακα Ε. 1.

Πίνακας Ε. 1. Ισοηλεκτρικό σημείο (pI) πολυεστερασών.

Ένζυμο	Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)
DmEst	7,80
LCC	9,14
SeIJFR	7,16
PETase	9,65
PHOase	6,12
PUase	6,04

Παράρτημα ΣΤ: Χρόνοι έκλυσης των προϊόντων υδρόλυσης του PET (TPA, MHET και BHET)

Οι χρόνοι έκλυσης των προϊόντων υδρόλυσης του PET παρουσιάζονται στον Πίνακα ΣΤ. 1 και προσδιορίστηκαν μέσω ανάλυσης προτύπων δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης.

Πίνακας ΣΤ. 1. Χρόνοι έκλυσης των προϊόντων υδρόλυσης του PET (TPA, MHET και BHET).

Προϊόν υδρόλυσης	Χρόνος έκλυσης (min)
TPA	6,65
MHET	7,656
BHET	9,438