



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

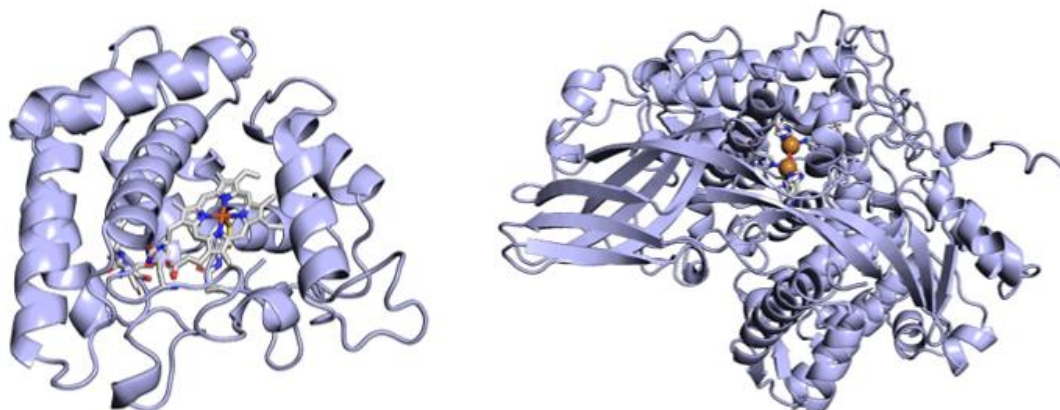
Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανακάλυψη και χαρακτηρισμός καινοτόμων οξειδωτικών ενζύμων
με δυνατότητα αποπολυμερισμού/τροποποίησης πολυολεφινών**



Ιάσων Σοφιανόπουλος

Επιβλέπων:

Ευάγγελος Τόπακας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα 2023

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευάγγελου Τόπακα.

Η εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε ένα από τα σημαντικότερα στάδια της εκπαιδευτικής μου πορείας, το οποίο θεωρώ με έπλασε καταλυτικά για την επιτυχή μετεξέλιξη μου ως επιστήμονα και άνθρωπο. Το σύνολο των απαιτήσεων και προκλήσεων που κλήθηκα να αντιμετωπίσω τόσο σε ερευνητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο, μου παρείχαν πολύτιμες ικανότητες και επιστημονικές γνώσεις, μέσω των οποίων τέθηκαν οι βάσεις για τη βαθύτερη κατανόηση του αντικείμενου που μελετήθηκε και τη διαχείριση μελλοντικών ερευνητικών και εργασιακών προκλήσεων με πλείων ευκολία. Ορμώμενος από την ολοκλήρωση αυτής της βαρυσήμαντης για τον εαυτό μου εργασίας, θα ήθελα να αποδώσω ευχαριστίες σε όλα τα άτομα που συντέλεσαν στην υλοποίηση της και με βοήθησαν καθ' όλη την περίοδο αυτή.

Πρώτα και κυριότερα, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Ευάγγελο Τόπακα για τη μοναδική ευκαιρία που μου παρείχε να εργαστώ σε ένα τόσο ενδιαφέρον και φλέγον επιστημονικό θέμα, το οποίο ταλανίζει και απασχολεί σημαντικό μέρος της σύγχρονης επιστημονικής κοινότητας. Εξαιρετικής σημασίας ήταν φυσικά η καθοδήγηση αλλά και η εμπιστοσύνη που μου έδειξε οι οποίες σε συνδυασμό με τη δυνατότητα που είχα να εφαρμόσω γνώσεις που έλαβα κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, ενέπνευσαν το γνήσιο και γόνιμο ενδιαφέρον μου για την έρευνα και κινητοποίησαν τη συνεχή ενασχόληση με το αντικείμενο.

Εν συνεχεία, θερμές ευχαριστίες οφείλουν να αποδοθούν στον διδάκτορα και Ε.ΔΙ.Π. του Ε.Μ.Π. κ. Ευστράτιο Νικολάβιτς και στον υποψήφιο διδάκτορα του Ε.Μ.Π. κ. Κωνσταντίνο Μακρυνιώτη για την άψογη και αξέχαστη συνεργασία μας. Θέλω να τους ευχαριστήσω για την αδιάκοπη ενασχόληση τους με τα ανακυπτόμενα ζητήματα του ερευνητικού αυτού θέματος παρόλο τον όγκο εργασίας και λοιπών απαιτήσεων που χρειαζόταν να αντιμετωπίσουν καθημερινά. Δίχως τη συμβολή τους θα ήταν ανέφικτη η ομαλή διεξαγωγή της ερευνητικής αυτής μελέτης. Τους θαυμάζω για το άσβεστο ενδιαφέρον τους καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής, για την εύρεση και τον σχεδιασμό των επόμενων ερευνητικών βημάτων της, ενώ δε θα ξεχάσω την ατέρμονη στήριξη που μου προσέφεραν η οποία διαδραμάτισε καταλυτικό ρόλο στην ολοκλήρωση αυτού του πονήματος. Ο τρόπος εργασίας τους και αντιμετώπισης του συνόλου των προβλημάτων που προέκυπταν ανά τα διάφορα στάδια της μελέτης μου σε συνδυασμό με την ατέρμονη υπομονή τους ως προς την εξοικείωση μου με τις διάφορες πειραματικές τεχνικές, θεωρώ τους κατέστησαν μνημειακά πρότυπα για το πρόσωπο και τον χαρακτήρα μου και κρίνω πως θα έχω επιτύχει αν κάποια στιγμή κατορθώσω να υιοθετήσω έστω και μερικές από τις αξίες που τους διακρίνουν ως ερευνητές αλλά και ως ανθρώπους.

Ένα τεράστιο «ευχαριστώ» επιθυμώ να αποδώσω σε όλα τα μέλη της ομάδας του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τη θέρμη που μου έδειξαν και με έκαναν να αισθανθώ πραγματικό μέλος και τμήμα αυτού του συνόλου· η προθυμία τους δε για αλληλοβοήθεια ήταν ύψιστης σημα-

σίας για μια ομαλή και ευχάριστη λειτουργία του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας και των ατόμων που εργάζονται εντός του. Ο χαρακτήρας αυτής της ομάδας μου επέτρεψε να αναπτύξω διαπροσωπικές σχέσεις πέραν του εργασιακού και εκπαιδευτικού επιπέδου, ενώ το ευχάριστο κλίμα που έχει αναπτυχθεί κατέστησε την ολοκλήρωση της τωρινής ερευνητικής μελέτης και του σημαντικού αυτού κύκλου σπουδών μου μια εμπειρία ολίγον τι γλυκόπικρη.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς τα μέλη της οικογένειας μου και τους φίλους μου που με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, υπέμειναν τις όσες δύσκολες περιόδους που χρειάστηκε να βιώσω και κατανόησαν τις προσπάθειες που απαιτήθηκαν να καταβάλω.

Ιάσων Σοφιανόπουλος
Αθήνα, Σεπτέμβριος 2023

Περίληψη

Πλήθος νέων και επιζήμιων περιβαλλοντικών προβλημάτων έχει ανακύψει από τη διευρυμένη χρήση συνθετικών πολυμερών, των οποίων η ανθεκτικότητα στην αποικοδόμηση οδηγεί στη συσσώρευση τους ανά τα διάφορα οικοσυστήματα του πλανήτη. Η διαχείριση των πλαστικών απορριμμάτων πραγματοποιείται κατά βάση με συμβατικές μεθόδους που συνοδεύονται από αξιοσημείωτες αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και γι' αυτό η εύρεση καινοτόμων μεθόδων με περιορισμένο περιβαλλοντικό αντίκτυπο έχει ελκύσει σημαντικό μέρος της επιστημονικής κοινότητας. Η ενσωμάτωση και αξιοποίηση βιοκαταλυτών για τη διάσπαση των πλαστικών υλικών τους έχει καταδείξει ως την πλέον φιλικότερη προς το περιβάλλον μέθοδο διαχείρισής τους. Υπό αυτό το πρίσμα, στόχος της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός οξειδωτικών ενζύμων ικανών για αποικοδόμηση ή/και τροποποίηση πολυολεφινών

Προς την επίτευξη αυτού, μελετήθηκαν πέντε οξειδοαναγωγάσες από μύκητες του γένους *Aspergillus* και από το έντομο του είδους *Galleria mellonella*. Οι τέσσερις εξ αυτών εντοπίστηκαν βιβλιογραφικά και επιλέχθηκαν λόγω των ενδείξεων για πιθανή δράση τους είτε σε πολυολεφινικά υλικά είτε σε παρεμφερή αλειφατικά υποστρώματα. Συγκεκριμένα, οι τρεις (A55, A57 και A58) προέρχονται από τον μύκητα *Aspergillus transmontanensis* και ανήκουν στην κατηγορία των μη ειδικών υπεροξυγενασών (Unspecific Peroxygenases - UPOs) ενώ η τελευταία (Demetra) αποτελεί χαλκοένζυμο της κατηγορίας των αρυλφορινών από το είδος *Galleria mellonella*, όπου πρωτοεομικές αναλύσεις κατέδειξαν την ομολογία του με τις προφαινολοξειδάσες. Ακολούθως αναζητήθηκαν υψηλής ομολογίας αλληλουχίες με αυτή του ενζύμου Demetra μέσω του βιοπληροφορικού εργαλείου BLAST® επιλέχθηκε το μεταλλοένζυμο AsqI από τον μύκητα *Aspergillus nidulans* για να διερευνηθεί το ενδεχόμενο παρόμοιας δράσης του με το αρχικό ένζυμο.

Αρχικά, τα γονίδια για την κωδικοποίηση της έκφρασης των ανωτέρω ενζύμων συντέθηκαν χημικά, αλλά και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pPICZα A, από την εταιρεία GenScript. Έπειτα, με τους συντεθειμένους φορείς μετασχηματίστηκαν επιλεκτικά κύτταρα X33 του ζυμομύκητα *Pichia pastoris* μέσω ηλεκτροδιάτρησης και πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη έκφραση των ενζύμων με συμβατικά πρωτόκολλα. Ακολούθησε διαλογή εκ των μετασχηματισμένων στελεχών ως προς την έκφραση και την ανάπτυξη και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου έκφρασης με την εξέταση παραμέτρων, διαφορετικών για κάθε είδος ενζύμου, όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος επαγωγής, η προσθήκη και η συγκέντρωση των κατάλληλων συμπαραγόντων.

Τα εκφρασμένα ένζυμα απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και προσδιορίστηκε το μοριακό βάρος και η καθαρότητα τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Για τις UPOs επιβεβαιώθηκε η ορθή έκφραση τους ενώ παρουσίασαν ενεργότητα σε υπόστρωμα ABTS. Το ένζυμο Demetra εκφραζόταν σε μικρότερο μοριακό βάρος εκ του αναμενόμενου, ενώ το AsqI κατέστη αδύνατο να εκφραστεί. Τα τελευταία δεν παρουσίασαν ενεργότητα σε κατεχόλη, σύνηθες υπόστρωμα για τη μελέτη δράσης φαινολοξειδασών. Αντλήθηκαν επίσης φασματοφωτομετρικά δεδομένα στα οποία αναγνωρίστηκαν οι αναμε-

νόμηνες χαρακτηριστικές κορυφές των UPOs και του ενζύμου Demetra εξαιτίας της δέσμευσης τους με τους αντίστοιχους συμπαραγόντες (αίμη και χαλκός αντίστοιχα).

Μελετήθηκε η δράση των ενζύμων σε αλειφατικά υποστρώματα. Για τις UPOs χρησιμοποιήθηκαν αλκάνια (κ-εννιάνιο, κ-δωδεκάνιο και κ-εικοσιτετράνιο) και οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 30 °C για 24 h σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 50 mM με pH 7,0. Η δράση τους εξετάστηκε με την ανίχνευση πιθανών προϊόντων των αλκανίων μέσω Gas Chromatography – Mass Spectroscopy. Για το ένζυμο Demetra χρησιμοποιήθηκε σκόνη LDPE με τις συνθήκες των αντιδράσεων να είναι 30 °C για 3 μέρες και pH 6,0 με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ιόντων 100 mM. Η ικανότητα του ενζύμου αυτού να δράσει επί του πολυμερικού υλικού εξετάστηκε με την διερεύνηση πιθανών τροποποιήσεων στο χρησιμοποιούμενο LDPE μέσω Fourier-Transform Infrared Spectroscopy.

Τα ένζυμα A55 και A58 παρουσίασαν δράση επί του κ-εικοσιτετρανίου καθότι ανιχνεύτηκαν ως πιθανά προϊόντα αντίστοιχου ή μικρότερου αριθμού ατόμων άνθρακα λιπαρών οξέων. Το ένζυμο Demetra παρουσίασε αρκετά περιορισμένη μεταβολή του φάσματος του τυπικού LDPE, η οποία δεν μπορεί να συνδεθεί με κάποια γνωστή τροποποίηση επί του μορίου του πολυμερούς και ίσως να δύναται να θεωρηθεί ως αμελητέα. Εν κατακλείδι, αξιοσημείωτη αναδείχθηκε η παραγωγή πιθανών προϊόντων οξυγόνωσης και οξείδωσης του κ-εικοσιτετρανίου μέσω της καταλυτικής δραστηριότητας των UPOs A55 και A58, η οποία μπορεί να αποτελέσει αφορμή για την περαιτέρω μελέτη της δράσης τους στην αποικοδόμηση πολυολεφινών.

Λέξεις-κλειδιά: πλαστικά, πολυολεφίνες, πολυαιθυλένιο, ετερόλογη έκφραση, βιοαποικοδόμηση, μη ειδική υπεροξυγενάση (UPO), φαινολοξειδάση, ΡΕάση, Demetra, *Galleria mellonella*

Abstract

The ability of synthetic polymers to resist natural degradation and their extensive use as core packaging and manufacturing materials have driven the upsurge of many critical environmental problems related to the destabilization of the ecosystems that tend to accumulate plastic waste. Plastic waste management has been conventionally carried out via methods that seem to have considerable environmental implications; thus, substantial portion of the scientific community is focused on finding novel methods for the management and degradation of synthetic polymers. As such, during recent decades the use of biocatalysts has arisen as a fitting candidate for a rather environmentally friendly and relatively economical way of degrading plastic materials. In this context, the purpose of this diploma thesis is the discovery and the biochemical characterization of oxidative enzymes capable of either biodegrading or modifying polyolefins.

To that end, five oxidoreductases were studied from fungi of the genus *Aspergillus* and the insect species *Galleria mellonella*; four of these were identified through bibliographic research and were chosen due to evidence of their action on polyolefins or aliphatic substrates. More specifically, of these enzymes, the A55, A57 and A58 are characterized as unspecified peroxygenases (UPOs) from the fungus *Aspergillus transmontanensis*, while the enzyme Demetra is a copper enzyme and is considered an arylphorin of the species *Galleria mellonella* homologous to prophenoloxidases. However, the fifth enzyme (AsqI) was chosen through the search for high homologue proteins to the sequence of Demetra using the bioinformatic tool BLAST[®], in order to investigate if it possesses similar activity with the above enzyme.

The heterologous expression of these enzymes was carried out by chemically synthesizing and cloning the necessary genes in plasmid vectors pPICZ α A from the company GenScript, which were then used to transform competent X33 *Pichia pastoris* yeast cells through electroporation. Subsequently, a screening of the different transformed stems was executed and it was followed by an optimization of the expression protocols considering different expression parameters such as temperature, induction time, introduction and concentration of the required enzyme cofactors.

The heterologous expressed enzymes were isolated with immobilized metal affinity chromatography, all the while their molecular was determined through polyacrylamide gel electrophoresis. It was determined that the UPOs were properly expressed and, additionally, they presented activity by oxidizing ABTS. However, Demetra was being expressed with lower molecular weight than the expected value, while AsqI was inadequately expressed. None of these two enzymes presented activity by oxidizing catechol, a common substrate for phenoloxidase activity assays. Nonetheless, spectrophotometric data indicated the expected characteristic peaks of the UPOs and Demetra stemming from their interaction with the corresponding cofactors.

Afterwards, the expressed enzymes reacted with different substrates; alkanes (n-nonane, n-dodecane and n-tetracosane) were used as aliphatic substrates for the UPOs with reaction conditions at 30 °C for 24 h in 50 mM Sodium Phosphate buffer of pH 6,0 and their possible products

were identified using Gas Chromatography – Mass Spectroscopy. The enzyme Demetra reacted with LDPE pellets at 30 °C for 3 days in Potassium Phosphate buffer of pH 7,0. The identification of possible modifications to the added LDPE was carried out through Fourier-Transform Infrared Spectroscopy.

The enzymes A55 and A58 presented activity in degrading or modifying n-tetracosane by the identification of fatty acids with the same or smaller carbon chain as possible products. On the other hand, the activity of the enzyme Demetra was correlated with a relatively limited modification to the FTIR spectrum of the reactive LDPE, which could not be definitively linked to a known type of degradation of the polyethylene molecule.

In summary, the oxygenation and oxidation of n-tetracosane by the UPOs A55 and A58 arose as a key result to actuate further investigation of the role of these enzymes in the biodegradation of polyolefins.

Keywords: plastics, polyolefins, polyethylene, biodegradation, heterologous expression, unspecified peroxygenase (UPO), phenoloxidase, PEase, Demetra, *Galleria mellonella*

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	i
Abstract	iii
Περιεχόμενα πινάκων.....	ix
Περιεχόμενα εικόνων	xi
Περιεχόμενα σχημάτων.....	xiii
Πίνακας Συντομογραφιών.....	xvi
1. Θεωρητικό μέρος.....	1
1.1. Εισαγωγή	1
1.2. Πλαστικά.....	3
1.2.1. Κατηγορίες πλαστικών	3
1.2.2. Ιδιότητες και εφαρμογές πλαστικών.....	5
1.2.3. Συνέπειες από τη χρήση πλαστικών	7
1.2.3.1. Μικροπλαστικά.....	8
1.2.4. Συμβατικές μέθοδοι διαχείρισης πλαστικών	9
1.3. Αποικοδόμηση πλαστικών	12
1.3.1. Αβιοτικοί μηχανισμοί αποικοδόμησης πλαστικών	12
1.3.2. Βιοαποικοδόμηση πλαστικών.....	15
1.3.2.1. Μηχανισμός βιοαποικοδόμησης πλαστικών	16
1.3.2.2. Παράμετροι που καθορίζουν την βιοαποικοδόμηση των πλαστικών.....	18
1.3.2.3. Βιοπλαστικά	20
1.3.2.4. Οργανισμοί που συμμετέχουν στη βιοαποικοδόμηση.....	22
1.4. Ένζυμα	27
1.4.1. Ορισμός και μηχανισμός δράσης ενζύμων	27
1.4.2. Κατηγορίες ενζύμων	28
1.4.2.1. Ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοαποικοδόμηση πολυαιθυλενίου	29
1.4.3. Ετερόλογη έκφραση ενζύμων.....	34
1.4.3.1. Ο ξενιστής <i>P. pastoris</i> ως σύστημα ετερόλογης έκφρασης.....	36
2. Πειραματικό μέρος.....	42

2.1.	Υλικά.....	42
2.1.1.	Όργανα και συσκευές.....	42
2.1.2.	Μελετώμενα ένζυμα.....	43
2.1.3.	Ξενιστής και φορέας ετερόλογης έκφρασης ενζύμων.....	46
2.1.4.	Αντιδραστήρια.....	48
2.1.4.1.	Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας.....	48
2.1.4.2.	Ρυθμιστικά διαλύματα.....	52
2.1.4.3.	Διαλύματα καθαρισμού παραγόμενων ενζύμων.....	53
2.1.4.4.	Διαλύματα ηλεκτροφόρησης ενζύμων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	54
2.2.	Μέθοδοι.....	56
2.2.1.	Βιοπληροφορικά εργαλεία.....	56
2.2.2.	Πολλαπλασιασμός και απομόνωση πλασμιδιακών φορέων.....	56
2.2.2.1.	Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i>	57
2.2.2.2.	Καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων <i>E. coli</i>	58
2.2.2.3.	Απομόνωση πλασμιδίου από τις καλλιέργειες <i>E. coli</i>	58
2.2.3.	Μετασχηματισμός κυττάρων της ζύμης <i>P. pastoris</i> με ηλεκτροδιάτρηση.....	59
2.2.3.1.	Γραμμικοποίηση πλασμιδίων.....	59
2.2.3.2.	Ηλεκτροφόρηση γραμμικοποιημένων πλασμιδίων σε πήκτωμα αγαρόζης.....	59
2.2.3.3.	Προετοιμασία και ηλεκτροδιάτρηση επιλεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i>	60
2.2.4.	Αποθήκευση μετασχηματισμένων κυττάρων σε γλυκερόλη (Glycerol Stock).....	63
2.2.5.	Ετερόλογη έκφραση ενζύμων στον ξενιστή <i>P. pastoris</i>	64
2.2.6.	Καθαρισμός και απομόνωση των επιθυμητών ενζύμων.....	67
2.2.6.1.	Φυγοκέντρηση.....	67
2.2.6.2.	Διήθηση υπό κενό.....	67
2.2.6.3.	Συμπύκνωση.....	67
2.2.6.4.	Εξισορρόπηση.....	70
2.2.6.5.	Απομόνωση ενζύμου μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας (IMAC).....	72
2.2.7.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.....	75
2.2.7.1.	Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου για SDS-PAGE.....	76

2.2.7.2.	Προετοιμασία δειγμάτων για SDS-PAGE	78
2.2.7.3.	Ηλεκτροφόρηση	79
2.2.7.4.	Χρώση και αποχρωματισμός του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου	80
2.2.8.	Φωτομετρικές μέθοδοι υπολογισμού συγκέντρωσης και ενεργότητας ενζύμου και κυτταρικών καλλιιεργειών	81
2.2.8.1.	Υπολογισμός κυτταρικής πυκνότητας καλλιιεργειών	81
2.2.8.2.	Υπολογισμός συγκέντρωσης ενζύμου	81
2.2.8.3.	Υπολογισμός ενεργότητας ενζύμου	82
2.2.9.	Εξέταση στελεχών της <i>P. pastoris</i> και συνθηκών για τη βελτιστοποίηση της ετερόλογης έκφρασης (Screening).....	85
2.2.9.1.	Εξέταση στελεχών	85
2.2.9.2.	Εξέταση συνθηκών ενζυμικής έκφρασης	86
2.2.10.	Αντιδράσεις ενζύμων με αλκάνια	88
2.2.11.	Αντιδράσεις ενζύμων με σκόνη LDPE	89
3.	Αποτελέσματα	90
3.1.	Βιοπληροφορική ανάλυση	90
3.2.	Πολλαπλασιασμός πλασμιδίων.....	97
3.3.	Μετασηματισμός κυττάρων <i>P. pastoris</i>	98
3.4.	Ετερόλογη έκφραση των μεταλλοενζύμων Demetra και AsqI.....	99
3.4.1.	Εξέταση μετασηματισμένων στελεχών	99
3.4.2.	Καλλιέργειες για παραγωγή των μεταλλοενζύμων	102
3.4.2.1.	Ετερόλογη έκφραση των ενζύμων AsqI και Demetra σε μεγαλύτερη κλίμακα ακολουθώντας συμβατικό πρωτόκολλο.....	102
3.4.2.2.	Ετερόλογη έκφραση των ενζύμων AsqI και Demetra ακολουθώντας τροποποιημένο πρωτόκολλο	104
3.4.2.3.	Εξέταση συνθηκών ενζυμικής έκφρασης	108
3.4.2.4.	Ετερόλογη έκφραση των ενζύμων AsqI και Demetra σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο	113
3.5.	Ετερόλογη έκφραση των ενζύμων A55, A57 και A58	117
3.5.1.	Εξέταση μετασηματισμένων στελεχών	117
3.5.2.	Ετερόλογη έκφραση των UPOs ακολουθώντας συμβατικό πρωτόκολλο	120

3.5.2.1. Αντιδράσεις ενζύμου A55 με αλκάνια.....	122
3.5.3. Εξέταση συνθηκών ενζυμικής έκφρασης.....	125
3.5.3.1. Εξέταση συμπληρωμάτων και συμπαραγόντων.....	125
3.5.3.2. Εξέταση χρόνου επαγωγής.....	128
3.5.4. Ετερόλογη έκφραση των UPOs ακολουθώντας βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης 130	
3.5.5. Ετερόλογη έκφραση των UPOs σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες.....	132
4. Συμπεράσματα μελέτης, εμπόδια και μελλοντικές προτάσεις.....	135
4.1. Συζήτηση αποτελεσμάτων και συμπεράσματα.....	135
4.1.1. Δομή μελετώμενων ενζύμων.....	135
4.1.2. Ετερόλογη έκφραση μελετώμενων ενζύμων.....	136
4.1.2.1. Πρωτόκολλο έκφρασης.....	136
4.1.2.2. Ταυτοποίηση και καθαρότητα απομονωμένων ενζύμων.....	137
4.1.3. Δράση μελετώμενων ενζύμων σε αλειφατικά υποστρώματα ή PE.....	139
4.1.4. Γενικά συμπεράσματα.....	140
4.2. Μελλοντικές προτάσεις.....	141
Βιβλιογραφία.....	143
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: Μεθοδολογία προσδιορισμού ενεργότητας οξειδωτικών ενζύμων στο υπόστρωμα ABTS.....	157
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: Αποτελέσματα εξέτασης μετασχηματισμένων στελεχών των μελετώμενων ενζύμων.....	158
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ: Αποτελέσματα εξέτασης συγκέντρωσης συμπαραγόντων έκφρασης για τα ένζυμα A55 και AsqI.....	160
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ: Χρωματογραφήματα GC-MS για τις αντιδράσεις των UPOs με αλκάνια.....	162

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1. Εφαρμογές ορισμένων ευρέως διαδεδομένων συνθετικών πολυμερών [2], [8], [22]..	6
Πίνακας 2. Είδη πλαστικών και τα αντίστοιχα είδη μικροοργανισμών που τα αποικοδομούν [2], [48], [75], [76], [80], [81].	23
Πίνακας 3. Σύσταση θρεπτικού μέσου LB.	48
Πίνακας 4. Σύσταση θρεπτικού μέσου YPD.	49
Πίνακας 5. Σύσταση θρεπτικού μέσου YPDS.	49
Πίνακας 6. Σύσταση του θρεπτικού μέσου BMGY.	50
Πίνακας 7. Σύσταση του θρεπτικού μέσου BMMY.	50
Πίνακας 8. Σύσταση θρεπτικού μέσου MM.	51
Πίνακας 9. Σύσταση διαλύματος YNB 10x.	51
Πίνακας 10. Σύσταση διαλύματος TES.	52
Πίνακας 11. Σύσταση και pH των χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων.	52
Πίνακας 12. Σύσταση διαλυμάτων για τον καθαρισμό των παραγόμενων ενζύμων.	53
Πίνακας 13. Διαλύματα για τη μέθοδο SDS-PAGE και συστάσεις αυτών.	54
Πίνακας 14. Συστάσεις των γελών πολυακρυλαμιδίου για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών.	55
Πίνακας 15. Συγκεντρώσεις των συμπαραγόντων που εξετάστηκαν για τα ένζυμα A55 και AsqI.	87
Πίνακας 16. Θεωρητικώς υπολογισμένο μοριακό βάρος, ισοηλεκτρικό σημείο και συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας των μελετώμενων ενζύμων.	90
Πίνακας 17. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων 100B από την εξέταση στελεχών των AsqI και Demetra.	101
Πίνακας 18. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων 100B κατά την έκφραση των ενζύμων AsqI και Demetra με συμβατικό πρωτόκολλο.	102
Πίνακας 19. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων 100B κατά την έκφραση των ενζύμων AsqI και Demetra με τροποποιημένο πρωτόκολλο.	105
Πίνακας 20. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων 100B για την εξέταση θερμοκρασίας και χρόνου επαγωγής για το ένζυμο Demetra.	109
Πίνακας 21. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων έκλουσης ενζύμου AsqI κατά την εξέταση συγκέντρωσης συμπαραγόντων.	112
Πίνακας 22. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων 100B κατά την μεγάλη ζ κλίμακας παραγωγή των ενζύμων AsqI και Demetra.	113

Πίνακας 23. Συγκεντρώσεις και ενεργότητες χρωματογραφικών κλασμάτων από τις καλλιέργειες των αποδοτικότερων στελεχών για το ένζυμο A55.	119
Πίνακας 24. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων 100B από έκφραση των UPOs με συμβατικό πρωτόκολλο.	120
Πίνακας 25. Διαφορετικές περιπτώσεις συμπληρωματικών διαλυμάτων για την έκφραση του ενζύμου A55.	125
Πίνακας 26. Απόλυτες και ανηγμένες ενεργότητες ενζυμικών δειγμάτων προς την οπτική πυκνότητα από τις καλλιέργειες με αιμίνη κατά την εξέταση συμπληρωμάτων έκφρασης.	127
Πίνακας 27. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων έκλουσης του ενζύμου A55 κατά την εξέταση συμπληρωμάτων έκφρασης.	127
Πίνακας 29. Συγκεντρώσεις και ενεργότητες χρωματογραφικών κλασμάτων 100B από την έκφραση των UPOs με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο.	130
Πίνακας 29. Ενεργότητες των χρωματογραφικών κλασμάτων από την έκφραση των UPOs σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο.	132
Πίνακας 30. Αποτελέσματα μετρήσεων εξέτασης στελεχών για AsqI και Demetra κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών.	158
Πίνακας 31. Αποτελέσματα μετρήσεων εξέτασης στελεχών για AsqI και Demetra κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών (Συνέχεια).	158
Πίνακας 32. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας και ενεργότητας για τις καλλιέργειες της εξέτασης μετασηματισμένων στελεχών καθ' όλες τις μέρες επαγωγής.	159
Πίνακας 34. Αποτελέσματα μετρήσεων εξέτασης συγκέντρωσης συμπαράγοντα για την AsqI κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών.	160
Πίνακας 35. Αποτελέσματα μετρήσεων εξέτασης συγκέντρωσης συμπαράγοντα για την AsqI κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών (Συνέχεια).	160
Πίνακας 36. Αποτελέσματα μετρήσεων εξέτασης συμπληρωμάτων για την A55 κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών.	161
Πίνακας 37. Αποτελέσματα μετρήσεων εξέτασης συμπληρωμάτων για την A55 κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών (Συνέχεια).	161

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1. Αναπαράσταση ενός τυπικού Χώρου Υγειονομικής Ταφής (ΧΥΤΑ) [39].....	11
Εικόνα 2. Προνύμφη και ενήλικας του είδους <i>Galleria mellonella</i> [92].	26
Εικόνα 3. Μηχανισμός αλληλεπίδρασης ενζύμου και υποστρώματος σύμφωνα με το μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής (προσαρμόστηκε από [108]).	28
Εικόνα 4. Απεικόνιση του μορίου της αίμης τύπου B [126].....	32
Εικόνα 5. Διάταξη παρασκευής πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδιου της Bio-Rad κατά την πήξη του πηκτώματος διαχωρισμού.	77
Εικόνα 6. Κελί ηλεκτροφόρησης κατά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού 50 V σε δύο πηκτώματα πολυακρυλαμίδιου με πρωτεϊνικά δείγματα.	80
Εικόνα 7. Τρισδιάστατες δομές των A55 (αριστερά), A57 (μέση) και A58 (δεξιά).	91
Εικόνα 8. Πολλαπλή ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των ενζύμων MroUPO, A55, A57 και A58, όπου έχουν σημειωθεί εντός κόκκινου πλαισίου οι αλληλουχίες αμινοξέων που συμμετέχουν στη δέσμευση της αίμης.	92
Εικόνα 9. Α) Αλληλεπικάλυψη των δομών των ενζύμων A55 (πράσινο), A57 (γαλάζιο), A58 (ροζ) και της UPO από τον <i>M. rotula</i> 5FUJ (κίτρινο), όπου παρουσιάζεται και το δεσμευμένο μόριο της αίμης με κίτρινη απόχρωση στο εσωτερικό των τρισδιάστατων δομών. Β) Απεικόνιση των καταλοίπων αμινοξέων που δεσμεύουν και αλληλεπιδρούν με την αίμη στο μόριο του 5FUJ όπου και αντιπαρατίθενται τα αντίστοιχα αμινοξέα των UPOs A55 (πράσινο), A57 (γαλάζιο) και A58 (ροζ).	92
Εικόνα 10. Τρισδιάστατη δομή των ενζύμων AsqI (αριστερά) και Demetra (δεξιά), όπου παρουσιάζεται ο δεσμευμένος Zn του ενζύμου AsqI ως μωβ σφαίρα.	94
Εικόνα 11. Αλληλεπικάλυψη των δομών των ενζύμων Demetra (πράσινο) και AsqI (γαλάζιο), όπου απεικονίζεται και ο συμπαράγοντας του AsqI, ο Zn, ως μωβ σφαίρα.....	94
Εικόνα 12. Αλληλεπικάλυψη των δομών των ενζύμων AsqI (πράσινο), Demetra (γαλάζιο) και μιας αιμοκυανίνης 1NOL (ροζ), όπου απεικονίζονται τα δύο άτομα χαλκού της αιμοκυανίνης ως καφέ σφαίρες με την υπεροξειδική γέφυρα (κόκκινες σφαίρες) αλλά και το άτομο Zn της AsqI ως μωβ σφαίρα.....	95
Εικόνα 13. Πήκτωμα αгарόξης με τα γραμμικοποιημένα πλασμίδια και τις αντίστοιχες φθορίζουσες μπάντες τους σε σύγκριση με τον χρησιμοποιούμενο ladder (FastGene 1 kb DNA Marker Plus, NIPPON Genetics GmbH).	97
Εικόνα 14. Τρυβλία ανάπτυξης μετασχηματισμένων κυττάρων <i>P. pastoris</i>	98
Εικόνα 15. Τρυβλία ανάπτυξης ανακαλλιεργειών από τις αποικίες των τρυβλίων με τα μετασχηματισμένα στελέχη.	99

Εικόνα 16. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κλασμάτων 100A, 100B και 100C κατά την έκφραση των AsqI (αριστερά του δείκτη) και Demetra (δεξιά του δείκτη) με συμβατικό πρωτόκολλο.	104
Εικόνα 17. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κλασμάτων 100A, 100B και 100C από την έκφραση των ενζύμων AsqI (πρώτες 3 θέσεις) και Demetra (τελευταίες 3 θέσεις) με τροποποιημένο πρωτόκολλο.	106
Εικόνα 18. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κλασμάτων 100B για την παραγωγή του ενζύμου Demetra κατά την εξέταση θερμοκρασίας και χρόνου επαγωγής (1 ^η θέση – 1 ημέρα επαγωγής, 2 ^η θέση – 2 ημέρες επαγωγής).....	110
Εικόνα 19. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κλασμάτων 100A, 100B και 100C για μεγαλύτερης κλίμακας παραγωγή του ενζύμου Demetra με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης. (καλλιέργεια 3 ημερών αριστερά του δείκτη και καλλιέργεια 4 ημερών δεξιά του δείκτη).	115
Εικόνα 20. Τρυβλία δοκιμής δράσης του ενζύμου A55 σε ABTS για διάφορα στελέχη: αριστερά οι αποικίες που αναπτύχθηκαν και δεξιά οι ίδιες αποικίες έπειτα από την προσθήκη H ₂ O ₂	117
Εικόνα 21. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης χρωματογραφικών κλασμάτων έκλουσης από την παραγωγή των UPOs με συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης (A55 – αριστερά του δείκτη, A57 & A58 – δεξιά του δείκτη).....	121
Εικόνα 22. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κλασμάτων 100B από την έκφραση των UPOs με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο.....	131
Εικόνα 23. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κλασμάτων Flowthrough και Wash για την έκφραση των UPOs σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο.....	133

Περιεχόμενα σχημάτων

Σχήμα 1. Δομές αλυσίδας πολυαιθυλενίου: (a) γραμμική αλυσίδα, (b) ελαφρώς διακλαδισμένη αλυσίδα [15].....	4
Σχήμα 2. Τυπική δομή ενός θερμοσκληρυνόμενου πλαστικού (προσαρμόστηκε από [15]).....	5
Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση του παραγόμενου διοξειδίου του άνθρακα και πλαστικού τα τελευταία 70 χρόνια [9].	7
Σχήμα 4. Παράδειγμα εκκίνησης οξειδωτικών αντιδράσεων από μεταλλικά ιόντα σε ένα πολυμερές [40].....	13
Σχήμα 5. Αντίδραση υδρόλυσης μιας καρβονυλομάδας ενωμένης με κάποιο ετεροαλυσιδικό στοιχείο (προσαρμόστηκε από [40]).....	13
Σχήμα 6. Συνοπτική παρουσίαση των διαφόρων μορφών αποικοδόμησης πολυμερών (προσαρμόστηκε από [6]).	15
Σχήμα 7. Μηχανισμός βιοαποικοδόμησης πολυαιθυλενίου (PE) (προσαρμόστηκε από [54]).....	18
Σχήμα 8. Κατηγορίες βιοπλαστικών με μερικά από τα πλαστικά που τις απαρτίζουν (προσαρμόστηκε από [50]).	21
Σχήμα 9. Κύριες κατηγορίες ενζύμων (προσαρμόστηκε από [109, p. 2]).....	28
Σχήμα 10. Αντίδραση οξείδωσης μιας κατεχόλης στην αντίστοιχη κοινόνη από μια φαινολοξειδάση [118].	30
Σχήμα 11. Μηχανισμός οξυγόνωσης ενός ατόμου άνθρακα και μεταβολής του συμπλέγματος σιδήρου εντός του ενεργού κέντρου μιας μη ειδικής υπεροξυγενάσης [127].	32
Σχήμα 12. Απεικόνιση ενός τυπικού πλασμιδιακού φορέα και των κυριότερων χαρακτηριστικών του (προσαρμόστηκε από [133]).....	35
Σχήμα 13. Μέθοδος μετασχηματισμού κυττάρων της <i>P. pastoris</i> (προσαρμόστηκε από [135])..	39
Σχήμα 14. Ενζυμική συστολή δακτυλίου κυκλοπεπτίνης για την παραγωγή της ένωσης viridicatin λόγω της δράσης του ενζύμου AsqI [148].	44
Σχήμα 15. Λεπτομερής απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pPICZα A και των βασικών περιοχών του [150].	47
Σχήμα 18. Απεικόνιση μιας διάταξης υπερδιήθησης τύπου αναδευόμενου δοχείου της εταιρείας Amicon με τα εξής εξαρτήματα: (1) κάλυμμα της συσκευής που φέρει την εισοδο του αερίου πίεσης, (2) βαλβίδα εκτόνωσης, (3) πλαστικό πλαίσιο στηρίξεως, (4) κύρια σώμα δοχείου, (5) πτερύγιο ανάευσσης με άξονα περιστροφής, (6) ελαστικός στεγανωτικός δακτύλιος, (7) μεμβράνη, (8) αυλακωτή βάση στήριξης της μεμβράνης και (9) έξοδος συλλογής διηθήματος [153].....	69
Σχήμα 19. Απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας της διαπίδυσης [154].	71

Σχήμα 20. Απεικόνιση της σύνδεσης της ετικέτας ιστιδίνης του ενζύμου με το χηλικώς ακινητοποιημένο μεταλλοκατιόν (Me^{2+}) είτε σε ιμινοδιοξικό οξύ (IDA) είτε σε νιτριλοτριοξικό οξύ (NTA) [153].	73
Σχήμα 21. Μηχανισμός αποδιάταξης και γραμμικοποίησης των πρωτεϊνικών μορίων πριν την ηλεκτροφόρηση τους στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (προσαρμόστηκε από [156]).	76
Σχήμα 22. Μηχανισμός πολυμερισμού ακρυλαμιδίου μέσω των ουσιών APS και TEMED (προσαρμόστηκε από [155]).	78
Σχήμα 23. Ενζυμική οξειδωση ενός μορίου ABTS με την αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου [158].	83
Σχήμα 22. Απεικόνιση αντίδρασης οξειδωσης μιας κατεχόλης προς κινόνη [159].	84
Σχήμα 23. Διαγραμματική απεικόνιση των λόγων απορροφήσεων Bradford/ OD_{600} για τα μετασηματισμένα στελέχη των ενζύμων: A) AsqI και B) Demetra, παράλληλα με τα μη μετασηματισμένα στελέχη X33.	100
Σχήμα 24. Φάσμα απορρόφησης κλασμάτων 100B, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), από την εξέταση στελεχών για το ένζυμο Demetra (250-500 nm).	101
Σχήμα 25. Φάσμα απορρόφησης κλασμάτων 100B των ενζύμων Demetra και AsqI, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), κατά την έκφραση με συμβατικό πρωτόκολλο (250-500 nm).	103
Σχήμα 26. Φάσμα απορρόφησης κλασμάτων 100B των ενζύμων Demetra και AsqI, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), από την παραγωγή του ενζύμου Demetra με τροποποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης (250-500 nm).	105
Σχήμα 27. Φάσμα FTIR των πολυμερικού υπολείμματος των αντιδράσεων των ενζύμων AsqI και Demetra με σκόνη LDPE κατά την παραγωγή τους με τροποποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης.	108
Σχήμα 28. Φάσμα απορρόφησης χρωματογραφικών κλασμάτων 100B, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), από την εξέταση χρόνου επαγωγής για το ένζυμο Demetra των 2 ημερών επαγωγής (250-500 nm).	109
Σχήμα 29. Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστιαίων διαφορών Bradford/ OD_{600} από την τιμή του τυφλού για διαφορετικές συγκεντρώσεις θεικού χαλκού στην έκφραση του ενζύμου AsqI.	111
Σχήμα 30. Φάσμα απορρόφησης χρωματογραφικών κλασμάτων 100B, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), από την μεγαλύτερης κλίμακας παραγωγή του ενζύμου Demetra με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης (250-500 nm).	114
Σχήμα 31. Φάσμα FTIR των πολυμερικού υπολείμματος των αντιδράσεων του ενζύμου Demetra με σκόνη LDPE κατά την εκτεταμένη παραγωγή της με τροποποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης.	116

Σχήμα 32. Διαγραμματική απεικόνιση της ανηγμένης ενεργότητας για τα μετασχηματισμένα στελέχη των UPOs: Α) Α55, Β) Α57 και Γ) Α58, παράλληλα με τα μη μετασχηματισμένα στελέχη X33.....	118
Σχήμα 33. Φάσμα απορρόφησης χρωματογραφικών κλασμάτων 100B, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), από την έκφραση των UPOs με συμβατικό πρωτόκολλο (250-500 nm).....	120
Σχήμα 34. Χρωματογραφήματα ανάλυσης δειγμάτων αντιδράσεων της Α55 με κ-εννιάριο σε GC-FID.	122
Σχήμα 35. Χρωματογραφήματα ανάλυσης δειγμάτων αντιδράσεων της Α55 με κ-δωδεκάνιο σε GC-FID.	123
Σχήμα 36. Χρωματογράφηματα GC-MS και ταυτοποίηση χημικών ενώσεων (για αξιοπιστία άνω του 80%) από την ανάλυση των δειγμάτων για τις αντιδράσεις με κ-εικοσιτετράριο των Flowthrough από την έκφραση των UPOs σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο: Α) για το τυφλό δείγμα με H ₂ O ₂ και) για το δείγμα του ενζύμου Α55.....	124
Σχήμα 37. Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστιαίων διαφορών Bradford/OD ₆₀₀ από την τιμή του τυφλού για διαφορετικά είδη συμπληρωματικών ουσιών στην έκφραση του ενζύμου Α55.	126
Σχήμα 38. Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοστιαίας διαφοράς της ανηγμένης ενεργότητας μεταξύ των ημερών επαγωγής κατά την έκφραση των UPOs.	129
Σχήμα 39. Φάσμα απορρόφησης χρωματογραφικών κλασμάτων 100B, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), από την έκφραση των UPOs με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο (250-500 nm).	130
Σχήμα 40. Χρωματογράφηματα GC-MS και ταυτοποίηση χημικών ενώσεων (για αξιοπιστία άνω του 85%) από την ανάλυση των δειγμάτων για τις αντιδράσεις με κ-εικοσιτετράριο των Flowthrough από την έκφραση των UPOs σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο: Α) για το τυφλό δείγμα με H ₂ O ₂ και) για το δείγμα του ενζύμου Α58.....	134
Σχήμα 41. Χρωματογράφηματα GC-MS από την ανάλυση των δειγμάτων για τις αντιδράσεις με κ-εικοσιτετράριο των Flowthrough από την έκφραση των UPOs σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο: Α) για το τυφλό δείγμα με H ₂ O ₂ , Β) για την Α55, Γ) για την Α57 και Δ) για την Α58.	162

Πίνακας Συντομογραφιών

Πολυβινυλοχλωρίδιο	PVC
Πολυαιθυλένιο	PE
Πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας	LDPE
Πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας	HDPE
Πολυπροπυλένιο	PP
Πολυστυρένιο	PS
Πολυγαλακτικό οξύ	PLA
Πολυκαρβονικά	PC
Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο	PET
Πολυηλεκτρικός βουτυλεστέρας	PBS
Πολυουρεθάνες	PU
Πολυκαπρολακτόνη	PCL
Πολυαιθυλενογλυκόλη	PEG
Χώροι υγειονομικής ταφής	XYTA
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Pichia pastoris</i>	<i>P. pastoris</i>
<i>Marasmius rotula</i>	<i>M. rotula</i>
Unspecific peroxygenase / Μη ειδική υπεροξυγενάση	UPO
Methanol utilization pathway	Mut
Asptr551984	A55
Asptr579462	A57
Asptr585095	A58
Ετικέτα πολυϊστιδινικής ουράς	His-tag
Απιονισμένο νερό	dH ₂ O
Υπερκάθαρο νερό	mQ H ₂ O
Luria-Bertani	LB
Yeast extract Peptone Dextrose medium	YPD

Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol medium	YPDS
Buffered Glycerol-complex medium	BMGY
Buffered Methanol-complex medium	BMMY
Minimal Methanol medium	MM
Διάλυμα εκχυλίσματος αζωτούχας βάσης χωρίς αμινοξέα	YNB
Trace Elements Solution	TES
Διμεθυλοσουλφοξείδιο	DMSO
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid	ABTS
Δωδεκυλοθειικό νάτριο	SDS
Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	SDS-PAGE
N,N,N',N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη	TEMED
Υπερθειικό αμμώνιο	APS
Basic Local Alignment Search Tool [®]	BLAST [®]
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	PCR
Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ	EDTA
Immobilized Metal Affinity Chromatography / Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου	IMAC
Molecular Weight Cut-off / Όριο μοριακού βάρους	MWCO
Νιτριλοτριοξικό οξύ	NTA
Ιμινοδιοξικό οξύ	IDA
Column Volume	CV
Απορρόφηση	ABS
Αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας	GC-FID
Αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας	GC-MS
Φασματομετρία υπερύθρων μετασχηματισμού Fourier	FTIR

1. Θεωρητικό μέρος

1.1. Εισαγωγή

Ο 20^{ος} αιώνας αποτέλεσε μια περίοδο ραγδαίων τεχνολογικών, κοινωνικών και πολιτικών μεταβολών, αλλάζοντας την καθημερινότητα του σύγχρονου ανθρώπου σε όλες τις εκφάνσεις της. Ανάμεσα σε αυτές τις εξελίξεις, η τεχνολογία αναπτύχθηκε με ιλιγγιώδεις ρυθμούς και η ποιότητα ζωής του ανθρώπινου είδους βελτιώθηκε σημαντικά· κύρια εξ αυτών των εξελίξεων ήταν η δημιουργία συνθετικών πολυμερών ή αλλιώς πλαστικών, όπως και ευρέως αποκαλούνται πλέον.

Τα πλαστικά αποτελούν υλικά που έχουν αντικαταστήσει σε σημαντικό βαθμό συμβατικά υλικά όπως τα μέταλλα, το ξύλο κ.α., λόγω της αυξημένης σταθερότητας και αντοχής τους, του μικρού βάρους, της ενισχυμένης μονωτικής ικανότητας τους, καθώς και του μικρού κόστους παραγωγής τους σε συνδυασμό με την εύκολη παρασκευή διαφορετικών σχημάτων και μορφών [1]–[3]. Άλλωστε οι απαιτητικές διαδικασίες εξόρυξης των μετάλλων αλλά και οι καταστρεπτικές τακτικές παραγωγής ξύλου κατέστησαν ακόμη πιο άμεση και γρήγορη την ενσωμάτωση των πλαστικών σε όσες περισσότερες συμβατικές εφαρμογές ήταν εφικτό. Ωστόσο, με εφιαλτήριο αυτά τα πλεονεκτήματα των πλαστικών, οι οικονομικές και κοινωνικές τάσεις της εποχής έχουν οδηγήσει στη διάδοση των αποκαλούμενων «πλαστικών μιας χρήσης». Ενδεικτικά, η παραγωγή πλαστικών έχει φτάσει σε τεράστια μεγέθη συγκριτικά με τις προηγούμενες δεκαετίες όπου η ετήσια παραγωγή τους το 1950 ήταν 1,3 εκατομμύρια τόνοι ενώ σήμερα φτάνει τους 350 με 400 εκατομμύρια τόνους, δηλαδή μια αύξηση κατά 300 φορές [3], [4]. Το γεγονός αυτό έχει προκαλέσει μάλιστα την άκρατη απόρριψη υψηλού ποσοστού των υλικών αυτών στο περιβάλλον χωρίς κάποιον προέλεγχο ή κάποια προεπεξεργασία, με αποτέλεσμα να κατευθύνονται και να διασπείρονται ετησίως μέχρι και 100 εκατομμύρια τόνοι πλαστικού στο περιβάλλον. Η εκτεταμένη αυτή απόρριψη των πλαστικών μολύνει σχεδόν ανεπανόρθωτα τα εκάστοτε οικοσυστήματα καθώς η εξαιρετική ανθεκτικότητα υλικών αυτών σε οποιαδήποτε μορφή αποικοδόμησης επιτρέπει την παραμονή εντός των οικοσυστημάτων έως και για 400 χρόνια [3], [5], [6].

Πέρα από την απόρριψη ολόκληρων πλαστικών, σημαντικό ρόλο στο όλο και διογκούμενο περιβαλλοντικό πρόβλημα έχει και η διάδοση των μικροπλαστικών· αποτελούν δε πλαστικά σωματίδια με διάμετρο μικρότερη του 1 mm, συνήθως αόρατα στο ανθρώπινο μάτι, τα οποία είτε παράγονται εξ αρχής σε πολύ μικρά μεγέθη για την εφαρμογή τους σε είδη ατομικής υγιεινής και ως πρώτη ύλη για την παρασκευή νέων υλικών είτε προκύπτουν από τη θραυσματοποίηση των κοινών πλαστικών λόγω της επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας στη φύση ή διάφορων μηχανικών καταπονήσεων [7]–[9]. Μολαταύτα, οι επιπτώσεις των μικροπλαστικών ίσως είναι εντονότερες καθώς διασπείρονται πολύ πιο εύκολα τόσο διαμέσου των υδάτινων διαδρομών όσο και διαμέσου του αέρα, ώστε να καταναλώνονται από πλήθος ζώων και τελικά να εισέρχονται στους ιστούς ακόμη και των ανθρώπινων οργανισμών, όπου σε περίπτωση υψηλής βιοσυσώρευσης τους καθίστανται ιδιαίτερος τοξικά [10].

Η μεγάλη αυτή συσσώρευση πλαστικών στο περιβάλλον έχει καταστήσει επιτακτική την ανάγκη διαχείρισης τους. Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι διαχείρισης τους διακρίνονται ωστόσο από πλήθος μειονεκτημάτων ή και περαιτέρω περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Ενδεικτικά, η ανακύκλωση των πλαστικών γίνεται σε αρκετά περιορισμένο βαθμό και μάλιστα για συγκεκριμένα πλαστικά όπως το πολυαιθυλένιο (PE) και το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), ενώ συνδυάζεται αρκετές φορές από παραγωγή πλαστικού υψηλότερου κόστους και χαμηλότερης ποιότητας [11], [12]. Αξίζει να σημειωθεί ότι αντίστοιχα η αξιοποίηση των πλαστικών απορριμμάτων για παραγωγή ενέργειας συνοδεύεται από εκπομπή υψηλών ποσοτήτων CO₂ ή και διαφόρων τοξικών αερίων, γεγονός που συμβάλλει σε μια σημαντική περιβαλλοντική ρύπανση [11].

Η σοβαρότητα των παραπάνω θεμάτων έχει αναδείξει τα τελευταία χρόνια τη σύνθεση νέων πλαστικών που μπορούν να διασπαστούν ευκολότερα, όπως και την ανάπτυξη νέων μεθόδων διάσπασης ή διαχείρισης των πλαστικών απορριμμάτων που θα είναι όχι μόνο αποδοτικές αλλά και φιλικές προς το περιβάλλον. Την επίτευξη αυτού του σκοπού φαίνεται να υπόσχεται η ανακάλυψη ενζύμων αλλά και ο γενετικός μετασχηματισμός κατάλληλων μικροοργανισμών για τη διάσπαση των πλαστικών υλικών, ώστε τελικά να μειωθεί τόσο το κόστος όσο και η περιβαλλοντική επιβάρυνση των διεργασιών αποικοδόμησης τους.

1.2. Πλαστικά

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC) ως πλαστικά ορίζονται τα πολυμερικά υλικά που ίσως περιέχουν άλλες επιπρόσθετες ουσίες για τη βελτίωση της επίδοσης ή και τη μείωση του κόστους παραγωγής τους [13], [14]. Τα υλικά αυτά προκύπτουν από την ένωση πολύ μεγάλου αριθμού μικρών μορίων, τα οποία ονομάζονται μονομερή και απαρτίζουν την πολυμερική αλυσίδα αλλά περιέχουν και επιπρόσθετες ουσίες για τη βελτίωση ορισμένων ιδιοτήτων τους. Συγκεκριμένα, τα μονομερή ενώνονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς ενώ η διαδικασία ένωσης των μονομερών ονομάζεται πολυμερισμός, ο οποίος μπορεί να διακριθεί στον πολυμερισμό προσθήκης και στον πολυμερισμό συμπύκνωσης [1], [15], [16]. Επίσης, ο αριθμός μονομερών που περιέχει ένα πολυμερές ονομάζεται βαθμός πολυμερισμού [15].

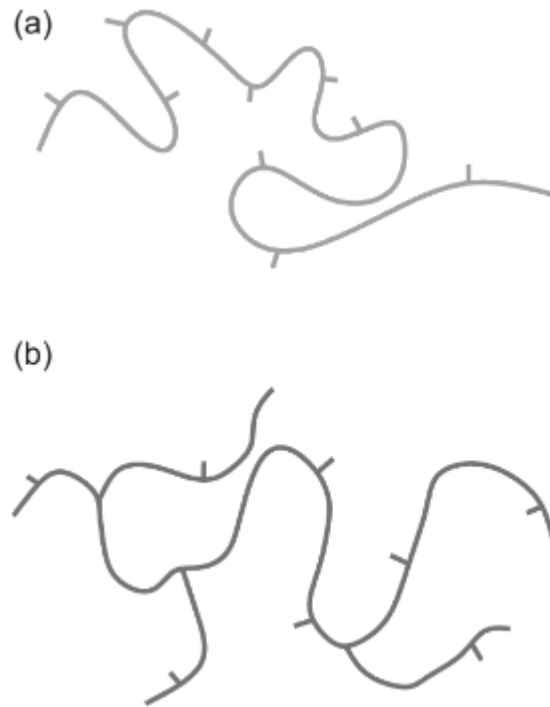
Βέβαια τα πλαστικά πολυμερή παράγονται ως επί το πλείστον από προϊόντα της πετροχημικής βιομηχανίας και κατ' επέκταση αποτελούνται στο μεγαλύτερο ποσοστό τους από άτομα άνθρακα, όμως η παρουσία διαφόρων άλλων ατόμων (π.χ. H, O, N, Cl, Si, κλπ.) επιτρέπει την κατασκευή αμέτρητων πολυμερικών δομών με πλήθος διαφορετικών ιδιοτήτων [5], [15], [17]. Οι ιδιότητες των πλαστικών δεν εξαρτώνται μόνο από τη δομή της πολυμερικής τους αλυσίδας αλλά και από τις εκάστοτε επιπρόσθετες ουσίες (πρόσθετα) που συμπληρώνουν τη διαδικασία παραγωγής τους. Αυτές οι ουσίες εισέρχονται στα αρχικά στάδια παραγωγής του πλαστικού, πριν πάρει την τελική του μορφή, και μπορούν να ενισχύσουν ή και να προσδώσουν ιδιότητες στα συνθετικά πολυμερή για να βελτιστοποιηθεί η αποδοτικότητα τους κατά τη χρήση. Τα πρόσθετα μπορεί να είναι αντιοξειδωτικά, χρωστικές, πλαστικοποιητές, υλικά πλήρωσης, θερμικοί σταθεροποιητές, λιπαντικά και ουσίες οι οποίες προστατεύουν το πλαστικό από κάποια πιθανή διάβρωση -οξειδωτική, θερμική ή από ακτινοβολία-, προσδίδοντας ιδιότητες που είναι απαραίτητες για κάποια συγκεκριμένη εφαρμογή του υλικού [15], [18].

1.2.1. Κατηγορίες πλαστικών

Τα πλαστικά χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση τη χημική και τεχνολογική συμπεριφορά τους [1], [15], [18], [19]: (α) τα θερμοπλαστικά και (β) τα θερμοσκληρυνόμενα.

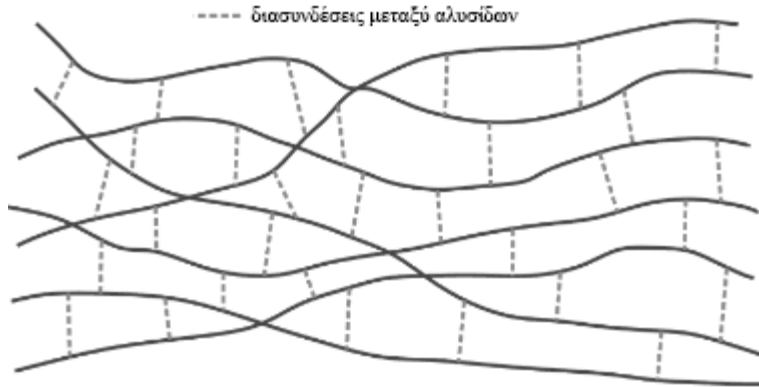
Α) Θερμοπλαστικά: είναι πολυμερικά υλικά μπορούν και μαλακώνουν όταν εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες και μάλιστα δύνανται να λιώσουν πλήρως, ενώ σκληραίνουν όταν ψύχονται αποκτώντας υαλώδη/κρυσταλλική δομή· αυτό μπορεί να επαναληφθεί αρκετές φορές και έτσι γίνεται να μεταβάλλεται εύκολα το σχήμα των πλαστικών αυτών [15], [17]. Μολαταύτα, υπάρχει περιορισμός στον αριθμό των φορών που μπορεί ένα τέτοιο υλικό να λιώσει και να σκληρύνει, πράγμα που εξαρτάται κυρίως από τα πρόσθετα και την αντοχή τους σε αυτές τις μεγάλες διαφορές θερμοκρασίας. Τα θερμοπλαστικά αποτελούνται από μακριές αλυσίδες, είτε γραμμικές είτε διακλαδισμένες όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1 για το πολυαιθυλένιο, οι οποίες είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους και των οποίων τα μονομερή ενώνονται μεταξύ τους με αδύναμες δυνάμεις Van der Waals και γι' αυτό η αύξηση της θερμοκρασίας περιορίζει την ισχύ των δεσμών μεταξύ των μορίων-αλυσίδων [15]. Οι ιδιότητες τους εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το

μήκος και το πλήθος των διακλαδώσεων των αλυσίδων· χαρακτηριστικά που μπορούν να καθοριστούν κατά τη διαδικασία του πολυμερισμού και καθίσταται δυνατή η κατασκευή υλικών με ποικιλία διαφορετικών ιδιοτήτων ακόμα και από το ίδιο είδος πολυμερούς. Μερικά σημαντικά θερμοπλαστικά πολυμερή είναι το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), το πολυαιθυλένιο (PE), το πολυπροπυλένιο (PP), το πολυστυρένιο (PS), το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) τα πολυκαρβονικά (PC) και μερικοί πολυεστέρες (PET, PBS) [15], [17].



Σχήμα 1. Δομές αλυσίδας πολυαιθυλενίου: (a) γραμμική αλυσίδα, (b) ελαφρώς διακλαδισμένη αλυσίδα [15].

B) Θερμοσκληρυνόμενα: αποτελούν υλικά που παράγονται σε δύο στάδια· πρώτα σχηματίζονται μακριές αλυσίδες παρόμοιες με εκείνες των θερμοπλαστικών και ύστερα εφαρμόζεται στο υγρό πλέον υλικό θέρμανση, πίεση ή ακόμη και υπεριώδης ακτινοβολία, το οποίο όταν ψυχθεί στερεοποιείται αποκτώντας μια δομή αποτελούμενη από ένα συμπαγές μα σύνθετο σύστημα διακλαδώσεων (Σχήμα 2) [15]–[17]. Η διαδικασία αυτή αποκαλείται σκλήρυνση και η αύξηση της θερμοκρασίας δεν επιφέρει την τήξη του υλικού αλλά την αποσύνθεσή του. Αυτή η διασύνδεση των μορίων και αλυσίδων των θερμοσκληρυνόμενων πλαστικών τα καθιστά εξαιρετικά άκαμπτα υλικά· οι ιδιότητες τους επίσης δεν είναι ευαίσθητες στη θερμότητα [15]. Παραδείγματα θερμοσκληρυνόμενων πλαστικών είναι η φαινολοφορμαλδεΐδη (βακελίτης), η σιλικόνη, οι εποξεικές ρητίνες και οι πολυουρεθάνες (PU).



Σχήμα 2. Τυπική δομή ενός θερμοσκληρυνόμενου πλαστικού (προσαρμόστηκε από [15]).

1.2.2. Ιδιότητες και εφαρμογές πλαστικών

Η φύση του τρόπου παραγωγής των πλαστικών αλλά και το πλήθος των παραμέτρων που την καθορίζουν προσδίδουν διάφορες ιδιότητες στα υλικά αυτά ώστε να ανταγωνίζονται συμβατικά υλικά που χρησιμοποιούνταν για πολλά χρόνια από τον άνθρωπο. Οι κυριότερες ιδιότητες αναλύονται κατωτέρω [17], [20]:

- **Βάρος:** τα πλαστικά είναι ιδιαίτερα ελαφριά γεγονός που αποτελεί κύριο λόγο αντικατάστασης των μετάλλων σε πλήθος εφαρμογών από κατάλληλα πλαστικά.
- **Σκληρότητα:** δεν διακρίνονται από εξαιρετική σκληρότητα και μάλιστα είναι παρόμοια με εκείνη του μπρούντζου και του αλουμινίου, ωστόσο υπάρχουν πλαστικά πιο σκληρά από άλλα όπως είναι τα θερμοσκληρυνόμενα σε σχέση με τα θερμοπλαστικά.
- **Θερμικές ιδιότητες:** τα πλαστικά αποτελούν θερμικούς μονωτές καθώς διακρίνονται από χαμηλή θερμική αγωγιμότητα.
- **Ηλεκτρικές ιδιότητες:** τα πλαστικά διακρίνονται και από κακή ηλεκτρική αγωγιμότητα, οπότε είναι εξαιρετικοί μονωτές του ηλεκτρισμού. Μάλιστα μπορούν και διατηρούν αυτή τους την ιδιότητα για μεγάλες χρονικές περιόδους εντός υδατικού περιβάλλοντος.
- **Οπτικές ιδιότητες:** κάθε είδος πλαστικού διακρίνεται και από διαφορετικές οπτικές ιδιότητες καθώς μερικά είναι πλήρως διαφανή (άμορφα θερμοπλαστικά) ενώ άλλα είναι είτε ημιδιαφανή είτε αδιαφανή (κρυσταλλικά θερμοπλαστικά).
- **Δυνατότητα τήξης:** όπως αναφέρθηκε στα θερμοπλαστικά και θερμοσκληρυνόμενα πολυμερή τα πρώτα μπορούν και τήκονται για τη μεταβολή του σχήματος τους ενώ τα τελευταία είναι αδύνατο να τηχθούν και είναι αρκετά άκαμπτα.
- **Χημικές ιδιότητες:** τα πλαστικά είναι αρκετά ανθεκτικά σε περιβάλλοντα που διαβρώνουν διάφορα συμβατικά υλικά, καθώς δεν αντιδρούν με ανόργανα άλατα, οξέα και βάσεις. Αλληλεπιδρούν επίσης με διάφορους διαλύτες είτε με διαλυτοποίηση είτε με διό-

γκωση τους, επιτρέποντας την αποτελεσματική εφαρμογή τους σε διάφορα συστήματα. Παρόλα αυτά είναι ευαίσθητα σε οξειδωτικούς παράγοντες και στην υπεριώδη ακτινοβολία, φαινόμενα που αποτελούν τον κύριο λόγο διάβρωσης των πλαστικών.

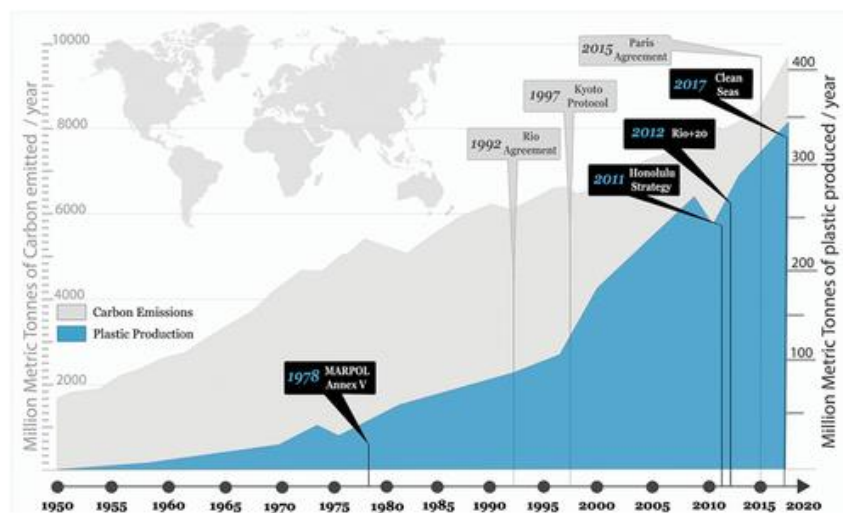
Οι ανωτέρω ιδιότητες καθιστούν φανερό το γεγονός ότι αποτελούν υλικά με πλήθος πλεονεκτημάτων και εξηγούν την αντικατάσταση συμβατικών υλικών όπως μέταλλο, ξύλο, γυαλί. Η πολύ καλή σταθερότητα και ανθεκτικότητα τους αλλά και οι ικανοποιητικές μηχανικές και θερμικές ιδιότητες τα έχουν καταστήσει ως υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αμέτρητες εφαρμογές και τομείς. Η εύκολη πρόσδοση σχήματος αλλά και η μεταβολή αυτού σε δευτερεύοντα χρόνο (θερμοπλαστικά) αποτελεί ακόμη ένα σημαντικό πλεονέκτημα τους. Ένα κύριο παράδειγμα αντικατάστασης ενός παραδοσιακού υλικού είναι εκείνο των μετάλλων στα αυτοκίνητα όπου πλέον χρησιμοποιούνται κατάλληλα ανθεκτικά πλαστικά όπως PP, PU, PVC, PC που λόγω και του πολύ χαμηλότερου βάρους τους έχουν επιτρέψει την κατασκευή πολύ πιο ελαφριών και κατ' επέκταση πιο γρήγορων και αποδοτικών αυτοκινήτων [19], [21]. Διακρίνονται δηλαδή από μια «πλαστικότητα» σε όλες τις εκφάνσεις της παραγωγής και επεξεργασίας τους αφού πλέον είναι εφικτό να κατασκευαστεί ένα πολυμερές με οποιαδήποτε επιθυμητή ιδιότητα είτε μέσω της επιλογής του κατάλληλου πολυμερούς είτε μέσω της χρήσης των βέλτιστων προσθέτων που θα ενισχύσουν το εκάστοτε πολυμερές. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση πλαστικών συνδέεται μάλιστα με αυξημένη ασφάλεια του ανθρώπου καθώς αποφεύγονται τυχόν επιμολύνσεις του νερού και των εδώδιμων προϊόντων. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα πιο διαδεδομένα πλαστικά και οι εφαρμογές τους.

Πίνακας 1. Εφαρμογές ορισμένων ευρέως διαδεδομένων συνθετικών πολυμερών [2], [8], [22].

Πολυαιθυλένιο (PE)	Πλαστικές σακούλες, μπουκάλια νερού και γάλακτος, φιλμ για αποθήκευση φαγητού
Πολυπροπυλένιο (PP)	Καπάκια μπουκαλιών, καλαμάκια, συσκευασίες φαρμάκων, σύριγγες, προφυλακτήρες αυτοκινήτων
Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET)	Διάφανα μπουκάλια
Πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC)	Καλύμματα καθισμάτων αυτοκινήτου, κουρτίνες μπάνιου, αδιάβροχα, σόλες παπουτσιών
Πολυουρεθάνες (PU)	Λάστιχα, σφουγγάρια, σωσίβια, επιστρώματα επίπλων
Πολυστυρένιο (PS)	Ποτήρια μιας χρήσης, συσκευασίες, ηλεκτρονικά είδη

1.2.3. Συνέπειες από τη χρήση πλαστικών

Με όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως, καθίστανται φανεροί οι λόγοι για τους οποίους τα πλαστικά έχουν εισχωρήσει σε κάθε πτυχή της καθημερινότητας του σύγχρονου ανθρώπου. Τα πλεονεκτήματα που τα χαρακτηρίζουν κατά την εφαρμογή τους είναι συντριπτικά, διακρίνονται από φθηνή παραγωγή, έχουν εξελίξει δραματικά την ανθρώπινη ποιότητα ζωής και επιτρέπουν μαζική παραγωγή για την κάλυψη των αναγκών ενός ολοένα και αυξανόμενου ανθρώπινου πληθυσμού. Γι' αυτό αυξάνεται διαρκώς από έτος σε έτος η συνολική παραγόμενη ποσότητα συνθετικών πολυμερών και προβλέπεται ότι θα συνεχίσει να αυξάνεται σημαντικά· η ετήσια παραγόμενη ποσότητα πλαστικού έχει πολλαπλασιαστεί σχεδόν 300 φορές από το 1950 μέχρι σήμερα και προβλέπεται να διπλασιαστεί έως το 2050, αύξηση η οποία απεικονίζεται στο Σχήμα 3 [4], [23], [24].



Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση του παραγόμενου διοξειδίου του άνθρακα και πλαστικού τα τελευταία 70 χρόνια [9].

Η τεράστια παραγωγή πλαστικών προκύπτει βέβαια και από την έλευση των μη επαναχρησιμοποιούμενων πλαστικών -των πλαστικών «μιας χρήσης»- όπου έχει δημιουργηθεί μια συνεχής ζήτηση για τέτοια προϊόντα ώστε να υπάρχει μια αντίστοιχη διαρκής παραγωγή πλαστικού, η οποία συμβάλλει σε μεγάλο ποσοστό της κερδοφορίας της βιομηχανίας πλαστικών. Σε αυτήν την κατηγορία μπορούν να ενταχθούν τα πλαστικά μπουκάλια, οι πλαστικές σακούλες όπως και άλλα πλαστικά υλικά (π.χ. κουτάλια, καλαμάκια κλπ.). Ενδεικτικά, αγοράζονται 1 εκατομμύριο πλαστικά μπουκάλια ανά λεπτό και 5 τρισεκατομμύρια σακούλες ανά έτος [25]. Η διάδοση αυτών των υλικών έχει προκαλέσει μια άκρατη και ανεξέλεγκτη απόρριψη πολυμερικών υλικών στο περιβάλλον και ειδικότερα στους ωκεανούς, στους οποίους ετησίως απορρίπτονται 8 εκατομμύρια τόνοι πλαστικού. Αν ληφθεί υπόψη και το γεγονός ότι τα υλικά αυτά είναι εξαιρετικά ανθεκτικά στη διάβρωση τόσο από το περιβάλλον όσο και από ζωντανούς οργανισμούς, χαρακτηριστικό που ενισχύεται σημαντικά από τα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται κατά την κατασκευή τους, επιτυγχάνεται μια διάρκεια ζωής που μπορεί να αγγίζει και τα 400 χρόνια [23], [24]. Συνε-

πώς, μπορούν να αποτελέσουν ένα πολύ ενοχλητικό και επιβλαβή ρύπο για τα οικοσυστήματα στα οποία υπεισέρχονται.

Το προαναφερθέν φαινόμενο έχει αποτελέσει αξιοσημείωτο κίνδυνο για διάφορα ζώα του πλανήτη, καθώς εκατομμύρια ζώα πεθαίνουν λόγω πλαστικών υλικών ετησίως. Διάφορα πτηνά, ψάρια, φώκιες, φάλαινες και χελώνες είτε παγιδεύονται σε πλαστικά που έχουν απορριφθεί σε υδάτινα περιβάλλοντα και οδηγούνται σε πνιγμό, είτε τα καταναλώνουν και προκαλούνται έτσι επιπλοκές όπως περιορισμένη κινητικότητα, αναπαραγωγικότητα και δημιουργία έλκων, που μπορούν να καταστούν και θανατηφόρα [4], [25], [26]. Αντίστοιχα, διάφορα μεγάλα θηλαστικά της ξηράς υποφέρουν από όμοια συμπτώματα λόγω κατανάλωσης πλαστικών. Έχει βρεθεί ότι περίπου πάνω από 260 είδη ζώων είτε καταναλώνουν είτε παγιδεύονται σε πλαστικά απορρίμματα [27]. Τα πλαστικά αποτελούν όμως και εμπόδιο για πολλά ζώα να βρουν τροφή ή και να αναπτυχθούν με φυσιολογικό τρόπο, γεγονός εύλογο αν ληφθεί υπόψη ότι τα πλαστικά απορρίμματα έχουν ξεπεράσει πια σε συνολική μάζα τα πλαγκτόν, που βρίσκονται στη βάση της τροφικής αλυσίδας για τα υδάτινα οικοσυστήματα, το οποίο προμηνύει έναν αισθητό κίνδυνο για την ισορροπία των μολυσμένων με πλαστικό οικοσυστημάτων [28].

1.2.3.1. Μικροπλαστικά

Αρκετά επιζήμια είναι ωστόσο και η συμβολή των μικροπλαστικών στην επίδραση του περιβάλλοντος και των οικοσυστημάτων. Μικροπλαστικά είναι τα κομμάτια πλαστικού με διάμετρο μικρότερη του 1 mm, όπου αρκετές φορές είναι αδύνατο να εντοπισθούν από το ανθρώπινο μάτι και προέρχονται από διάφορες πηγές όπως απορρίμματα, καλλυντικά και ενδύματα. Το μέγεθος τους επιτρέπει τη διασπορά τους κατά μήκος όλου του όγκου του νερού ενός υδατικού οικοσυστήματος ή του εδάφους ενός χερσαίου. Οι επιπτώσεις που προκαλούνται λόγω των μικροπλαστικών συνδέονται κυρίως με την κατανάλωση τους από τους μικρότερους οργανισμούς, όπως τα ζωοπλαγκτόν, οι οποίοι έπειτα αποτελούν κύρια τροφή άλλων ανώτερων οργανισμών εντός των οποίων μπορεί να γίνει συσσώρευση αυτών των υλικών στους ιστούς ώστε τελικά να καταστούν τοξικά [3], [7]–[9]. Έτσι, είναι δυνατό να διαδοθούν καθ' όλη την τροφική αλυσίδα προκαλώντας αντίστοιχα συμπτώματα στους οργανισμούς ανώτερης τάξης και κατ' επέκταση στον άνθρωπο. Επιπλέον, η ανάπτυξη των οργανισμών που ζουν σε χερσαία περιβάλλοντα δυσχεραίνεται αρκετά από την παρουσία μικροπλαστικών στο έδαφος τα οποία μεταβάλλουν τις συνθήκες του εδάφους, περιορίζοντας τη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών όπως άζωτο και φώσφορος και ενισχύοντας την απορρόφηση τοξικών μετάλλων και ουσιών [29]. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι τα μικροπλαστικά μπορούν και διαταράσσουν την ισορροπία ενός οικοσυστήματος σε σημαντικό βαθμό.

Βέβαια, τα μικροπλαστικά μπορούν και επηρεάζουν όπως αναφέρθηκε την ποιότητα και ποσότητα τροφής που δέχεται ο άνθρωπος από την μεταβολή των λειτουργιών των διαφόρων ζώων, όμως είναι επίσης δυνατό να συσσωρευτεί επικίνδυνη ποσότητα αυτών εντός του ανθρώπινου οργανισμού προκαλώντας διάφορες επιπλοκές. Η απορρόφηση των μικροπλαστικών μπορεί να γίνει και μέσω του αέρα και του νερού και μπορεί να δημιουργήσει διαταραχές στο νευρικό, γα-

στρεντερικό, ενδοκρινικό και αναπαραγωγικό σύστημα, ενώ η χρόνια λήψη μικροπλαστικών έχει συνδεθεί και με πρόκληση καρκίνου του πνεύμονα ή του οισοφάγου [6], [10], [26]–[28], [30].

1.2.4. Συμβατικές μέθοδοι διαχείρισης πλαστικών

Τα προβλήματα που συνδέονται με την απόρριψη πλαστικών υλικών έχουν καταστήσει επιτακτική την ανάγκη διαχείρισης και αξιοποίησης τους. Προς τούτο, έχουν ληφθεί πρωτοβουλίες, ειδικότερα στις ανεπτυγμένες χώρες, για τη μείωση του ποσοστού των ακράτως απορριπτόντων πλαστικών υλικών θεσπίζοντας μια κατάλληλη και λειτουργική νομοθεσία. Έχουν βρει έτσι πρόσφορο έδαφος διάφορες μέθοδοι οι οποίες μάλιστα σταδιακά έχουν υιοθετηθεί από τους φορείς αρκετών χωρών. Μια τέτοια διαδικασία είναι η επαναχρησιμοποίηση ή ανακύκλωση των πλαστικών η οποία όμως γίνεται ακόμη σε αρκετά μικρό βαθμό ώστε να μην επαρκεί το τελικό αποτέλεσμα για την επίλυση του προβλήματος. Ο μικρός βαθμός ανακύκλωσης οφείλεται ως επί το πλείστον στη μη υιοθέτηση αυτής της μεθόδου από τους πολίτες αλλά και στο υψηλό κόστος της παραγωγής νέων προϊόντων από ανακυκλώσιμα υλικά, χαρακτηριστικό το οποίο δεν αποτελεί κίνητρο για τη βιομηχανία να προωθήσει μια τέτοια διαδικασία. Εντός αυτού του πλαισίου δύναται βέβαια να συμβάλει θετικά η ευαισθητοποίηση των πολιτών με διάφορες δράσεις και κινητοποιήσεις σχετικά με τα πλεονεκτήματα και την αναγκαιότητα μιας πιο ενισχυμένης ανακύκλωσης. Γι' αυτό, οι κυρίαρχοι τρόποι διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων είναι ακόμη η απλή εναπόθεση τους σε χωματερές και η αποτέφρωση τους. Αυτές οι μέθοδοι αξιοποιούνται εδώ και αρκετές δεκαετίες αλλά διακρίνονται από μια σημαντική επιβάρυνση του εγγύς περιβάλλοντος τους. Αξίζει να υπογραμμιστεί ότι στην Ευρωπαϊκή Ένωση, όπου έχουν καθιερωθεί εκτεταμένες νομοθεσίες για την ενίσχυση της ανακύκλωσης, από τους 26 εκατομμύρια τόνους πλαστικών αποβλήτων που παράγονται ετησίως μόλις το 32,5% ανακυκλώνεται ενώ το υπόλοιπο 67,5% καταλήγει σε χωματερές ή για ενεργειακή αξιοποίηση [31]. Για ορθότερη σύγκριση των επικρατουσών μεθόδων διαχείρισης πλαστικών, αυτές αναλύονται κατωτέρω:

Α) **Ανακύκλωση:** είναι η διαδικασία επαναχρησιμοποίησης ή αξιοποίησης ήδη χρησιμοποιούμενων υλικών για την παραγωγή υλικών ίδιας ή χαμηλότερης ποιότητας. Τα βήματα που απαρτίζουν την κύρια διαδικασία της ανακύκλωσης είναι η διαλογή των απορριμμάτων που είναι ανακυκλώσιμα, ο διαχωρισμός ανά κατηγορία ανακυκλώσιμου υλικού και η επεξεργασία του υλικού αυτού που θα επιφέρει την παραγωγή νέων προϊόντων. Γενικά η ανακύκλωση χωρίζεται σε τέσσερις κατηγορίες [11], [32]–[36]:

- Πρωτοταγής ανακύκλωση: περιλαμβάνει την επεξεργασία αποβλήτων σε προϊόντα αντίστοιχης ποιότητας με το αρχικό προϊόν και να μπορεί να έχει την ίδια χρήση με αυτό.
- Δευτεροταγής ανακύκλωση: περιλαμβάνει την επεξεργασία των αποβλήτων σε προϊόντα που είναι χαμηλότερης ποιότητας συγκριτικά με το αρχικό προϊόν και δύνανται να αξιοποιηθούν σε διαφορετικές εφαρμογές όπου οι απαιτήσεις σε σχέση με την ποιότητα είναι μικρότερες.
- Τριτοταγής ανακύκλωση: περιλαμβάνει την ανάκτηση των πετροχημικών περιεχομένων των αποβλήτων για την παραγωγή απλών καυσίμων και χημικών προϊόντων. Το πολυμε-

ρές συνήθως αποπολυμερίζεται με μια χημική διαδικασία και τα oligομερή ή μονομερή του που προκύπτουν κατευθύνονται για την παραγωγή είτε νέου πλαστικού είτε νέων χημικών προϊόντων. Η μέθοδος αποπολυμερισμού χαρακτηρίζεται ως χημική, αφού συνήθεις διαδικασίες είναι η οξείδωση και η υδρόλυση του πλαστικού, αλλά μπορεί να είναι και θερμική καθώς αρκετά συχνά εφαρμόζεται και η διεργασία της πυρόλυσης. Ωστόσο, αποτελεί γενικότερα μια σχετικά μη συμφέρουσα διεργασία από οικονομικής άποψης συγκριτικά με τη χρήση της ήδη φτηνής και έτοιμης πετροχημικής πρώτης ύλης, που είναι λογικό αφού αντιστρέφεται η αρκετά ενεργοβόρα διαδικασία του πολυμερισμού.

- Τεταρτοταγής ανακύκλωση: περιλαμβάνει την ανάκτηση του ενεργειακού περιεχομένου των πλαστικών αποβλήτων είτε με καύση είτε με αποτέφρωση και χρησιμοποιούνται κατά βάση ως καύσιμο για την παραγωγή ατμού, ηλεκτρισμού κλπ.

Η πρωτοταγής και δευτεροταγής ανακύκλωση χαρακτηρίζονται ως μηχανικές ανακυκλώσεις όπου το πλαστικό μεταποιείται σε σχήμα ή και σε ιδιότητες με την εφαρμογή θερμότητας, η τριτοταγής ως χημική ανακύκλωση ενώ η τεταρτοταγής ως μια διαδικασία ανάκτησης ενέργειας. Με πρωτοταγή και δευτεροταγή ανακύκλωση μπορούν αρκετά εύκολα να επεξεργαστούν τα θερμοπλαστικά πολυμερή λόγω της δυνατότητας μεταβολής του σχήματος τους με επιβολή θερμότητας, πράγμα σημαντικό αν ληφθεί υπόψη ότι το σημαντικότερο μέρος των πλαστικών απορριμμάτων αποτελείται από θερμοπλαστικά πολυμερή, καθώς από αυτά παρασκευάζονται τα πλαστικά μιας χρήσης [37]. Τα θερμοσκληρυνόμενα πολυμερή, από την άλλη πλευρά, δεν γίνεται να ανακυκλωθούν με την ίδια θερμική επεξεργασία και απαιτούν μια μηχανική επεξεργασία με άλεση ή κονιορτοποίηση όπου τα παραγόμενα κομματιασμένα πολυμερή θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικά υλικά κατά την κατασκευή νέων.

B) Χωματερές: αποτελούν τον κυριότερο τρόπο διαχείρισης απορριμμάτων για δεκαετίες και στοχεύουν στη συγκέντρωση των απορριμμάτων σε μια συγκεκριμένη και μικρή περιοχή έτσι ώστε να περιοριστούν οι επιπτώσεις τους στο ευρύτερο περιβάλλον. Μολαταύτα, σταδιακά περιορίζονται οι διαθέσιμοι χώροι για την κατασκευή χωματερών ενώ η μόλυνση του περιβάλλοντος δεν αποφεύγεται πλήρως. Υπάρχει ο κίνδυνος μόλυνσης του εδάφους και των υδάτων περί της χωματερής είτε από τα πρόσθετα είτε από τα παραπροϊόντα των εναποτιθέμενων πλαστικών. Επιπλέον, σημαντικό μειονέκτημα των χωματερών είναι ότι δεν ανακτάται σε κανέναν βαθμό το υλικό που περιέχεται στα πλαστικά απορρίμματα με αποτέλεσμα να μην ενισχύεται η επαναχρησιμοποίηση υλικών στα πλαίσια μιας άκρως ωφέλιμης κυκλικής οικονομίας [11], [32], [35], [36].

Γ) Χώροι Υγειονομικής Ταφής (ΧΥΤΑ): αποτελούν μια αναβαθμισμένη μορφή των παραδοσιακών χωματερών και είναι ειδικά κατασκευασμένοι χώροι εντός των οποίων γίνεται η ταφή των απορριμμάτων των πόλεων. Ενισχύονται με ειδικά τοιχώματα από συνθετικά υλικά και στρώματα πηλού όπου διαχωρίζονται τα επικίνδυνα/τοξικά από τα κοινά απόβλητα και η τυπική δομή ενός ΧΥΤΑ παρουσιάζεται στην Εικόνα 1 [11], [38]. Έτσι, αποτρέπεται η διαρροή επικίνδυνων ουσιών που μπορούν να μολύνουν το γύρω έδαφος και ταυτόχρονα λαμβάνεται με ειδικά συστήματα το παραγόμενο διοξείδιο του άνθρακα και μεθάνιο (βιοαέριο) από την αποσύνθεση των αποβλήτων ώστε να αξιοποιηθούν αυτά τα αέρια έπειτα για παραγωγή ενέργειας. Ακόμη ένα

σημαντικό χαρακτηριστικό ενός ΧΥΤΑ είναι ο περιορισμός της διασποράς των τοξικών και προβληματικών παραπροϊόντων των πλαστικών απορριμμάτων στο περιβάλλον, το οποίο αποτελεί ένα κύριο πρόβλημα των κλασικών χωματερών [11]. Παρόλα τα θετικά ενός ΧΥΤΑ, η αποθήκευση πλαστικών απορριμμάτων εντός ενός τέτοιου χώρου δεν συνδέεται με ικανοποιητική παραγωγή αερίου καταλλήλου για παραγωγή ενέργειας λόγω της αρκετά αργής αποικοδόμησης τους [35]. Συνέπεια αυτού είναι ότι όταν ένα πλαστικό αποθηκευτεί σε ΧΥΤΑ τότε πραγματοποιείται αρκετά περιορισμένη ανάκτηση των πολύτιμων και επαναχρησιμοποιήσιμων πετροχημικών υλικών που περιέχει, λόγω της χαμηλών επιπέδων παραγωγής βιοαερίου.



Εικόνα 1. Αναπαράσταση ενός τυπικού Χώρου Υγειονομικής Ταφής (ΧΥΤΑ) [39].

Δ) **Αποτέφρωση:** είναι κατά βάση η τεταρτοταγής ανακύκλωση επειδή όμως αποτελεί μια διεργασία που πραγματοποιείται αρκετές δεκαετίες προϋπάρχει της έννοιας της ανακύκλωσης και πολλές φορές εφαρμόζεται ως πρώτο μέτρο για τη διαχείριση των πλαστικών απορριμμάτων δίχως να έχει εφαρμοστεί έστω και μερική ανακύκλωση ανώτερης τάξης. Ανακτάται άλλωστε η περιεχόμενη ενέργεια των πλαστικών αποβλήτων μέσω της αποτέφρωσης των οποίων η θερμογόνος δύναμη είναι αντίστοιχη με εκείνη του κοινού κάρβουνου. Ακόμη, μειώνεται σημαντικά ο όγκος των απορριμμάτων έως και κατά 95% ενώ αποτελεί και μια επιπλέον πηγή εγχώριας παραγωγής ενέργειας. Κύριο όμως πρόβλημα της αποτέφρωσης είναι η πιθανή εκπομπή τοξικών αερίων όπως διοξίνες και φουράνες τα οποία προκύπτουν από τη φύση τόσο της πρώτης ύλης των πλαστικών όσο και των πρόσθετων που συμμετέχουν στην κατασκευή τους [11], [32], [35]. Η ατμοσφαιρική ρύπανση από τις μονάδες αποτέφρωσης πλαστικών είναι αρκετά σημαντική και συνδέεται με υψηλά κόστη παραγωγής ενέργειας και διαχείρισης των εκπεμπόμενων αερίων, γεγονός που δεν αντισταθμίζει τελικά τα μειονεκτήματα της μεθόδου.

Συμπεραίνεται λοιπόν ότι όλες οι παραδοσιακές μέθοδοι διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων διακρίνονται από αρκετά μη αμελητέα αρνητικά χαρακτηριστικά που συνήθως συνεπάγονται μια αξιοσημείωτη περιβαλλοντική μόλυνση, αν και μικρότερη από εκείνη που θα προέκυπτε από την ανεξέλεγκτη απόρριψη των πλαστικών στο περιβάλλον. Εξαιρέση αποτελούν η πρωτοταγής, δευτεροταγής και τριτοταγής ανακύκλωση, οι οποίες αν εφαρμοστούν σε μεγάλη κλίμακα απο-

τρέπουν την πλειονότητα των επιπτώσεων των πλαστικών απορριμμάτων και περιορίζεται η ανάγκη για παραγωγή νέων συνθετικών πολυμερικών υλικών. Ωστόσο, μέχρι και σήμερα η ανακύκλωση πραγματοποιείται σε μικρό ποσοστό ανά την υφήλιο, με τα υψηλότερα ποσοστά να παρατηρούνται σε ανεπτυγμένες χώρες κυρίως της ΕΕ. Αυτή η διαπίστωση έχει οδηγήσει την παγκόσμια κοινότητα να αναζητήσει νέους τρόπους και πρώτες ύλες για την κατασκευή καινοτόμων πλαστικών ώστε η ανακύκλωση να μην αποτελεί τον μόνο τρόπο διαχείρισης τους.

1.3. Αποικοδόμηση πλαστικών

Τα συνθετικά πολυμερή χρησιμοποιούνται πλέον σε όλους τους τομείς της καθημερινότητας και σε όλα τα πεδία της σύγχρονης βιομηχανίας. Κύρια αιτία είναι η εξαιρετική ανθεκτικότητα τους στη διάβρωση από περιβαλλοντικούς παράγοντες και η δυνατότητα προσαρμογής αυτών στις επιθυμητές συνθήκες και το επιθυμητό περιβάλλον. Αυτό το χαρακτηριστικό των πλαστικών αποτελεί το κύριο πρόβλημα για τα οικοσυστήματα που δέχονται υψηλές ποσότητες πλαστικών απορριμμάτων. Τα πλαστικά απορρίμματα όταν πια εναποθεθούν στο περιβάλλον, μπορούν να διασπαστούν δε μόνο από τους διάφορους μηχανισμούς αποικοδόμησης, όσο αργά κι αν μπορεί να δρουν αυτοί.

1.3.1. Αβιοτικοί μηχανισμοί αποικοδόμησης πλαστικών

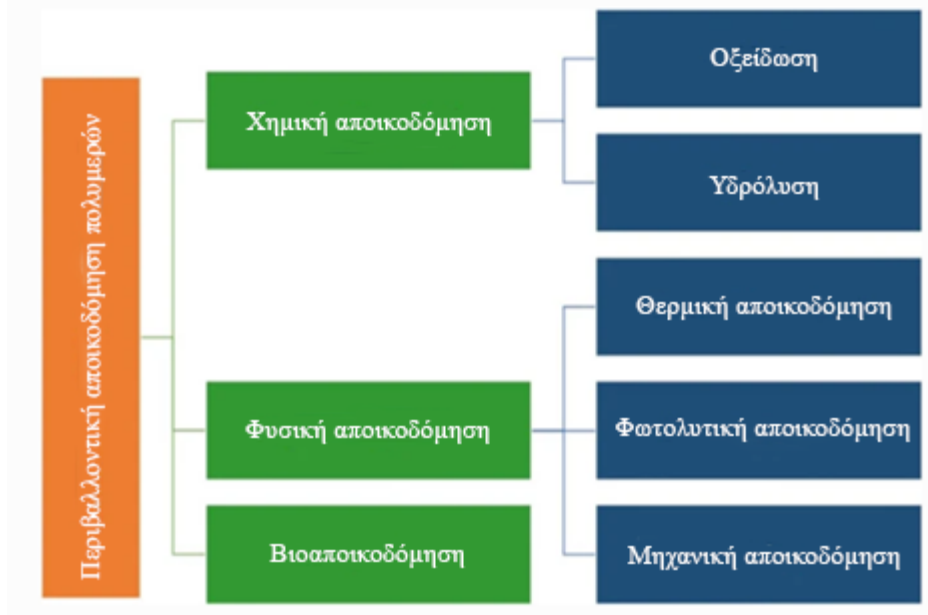
Η αποικοδόμηση των συνθετικών πολυμερών μπορεί να πραγματοποιηθεί από ένα σύνολο μηχανισμών που εξαρτώνται από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες αλλά και τη φύση του ίδιου του πολυμερούς. Οι μηχανισμοί διακρίνονται σε τρεις γενικές κατηγορίες: (α) χημική αποικοδόμηση, (β) φυσική αποικοδόμηση και (γ) βιοαποικοδόμηση, ενώ διακρίνονται με τη σειρά τους σε ορισμένες υποκατηγορίες (Σχήμα 6) [1], [6]. Παρακάτω αναλύονται οι κύριοι τύποι χημικής και φυσικής αποικοδόμησης.

A) Χημική αποικοδόμηση

1. **Οξειδωση:** είναι η διαδικασία δημιουργίας ελεύθερων ριζών στην αλυσίδα ενός πολυμερούς, γεγονός που συμβάλλει στη διάσπαση ορισμένων δεσμών του για τη σχάση της πολυμερικής του αλυσίδας και τον σχηματισμό παραπροϊόντων. Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί απαιτεί την παρουσία κάποιου καταλύτη ο οποίος συνήθως είναι κάποιο μεταπτωσηκό μέταλλο (Fe, Co, Pt, Cu, Ni) ή κάποιος κλασικός καταλύτης όπως οι ζεολιθικοί καταλύτες [1], [40]. Με τη διάσπαση των μετάλλων αυτών στα ιόντα τους καθίσταται δυνατή η δημιουργία ελευθέρων ριζών στο πολυμερές ώστε να μπορέσει έπειτα να διασπαστεί [1], [41]. Ενδεικτικά, ορισμένες από τις οξειδωτικές αντιδράσεις που καταλύουν οι μεταλλικοί καταλύτες παρατίθενται στο Σχήμα 4. Έχει βρεθεί ότι συμβατικές διεργασίες θερμικής επεξεργασίας πλαστικών αποβλήτων, όπως η πυρόλυση, μπορεί να βοηθηθεί από την παρουσία τέτοιων καταλυτών απαιτώντας χαμηλότερες θερμοκρασίες και αυξάνοντας τη μετατροπή του πολυμερούς [1], [42], [43].

δών, κετονών, οξέων, αλκοολών αλλά και είτε στο σπάσιμο είτε στη συνένωση των πολυμερικών αλυσίδων [1], [3], [41], [44]. Πολυμερή όπως το PE είναι ανθεκτικά σε αυτού του είδους την αποσύνθεση όμως πιθανές ατέλειες στη δομή του επάγουν τη διέγερση των εσωτερικών δεσμών του· αντίθετα το PVC που διαθέτει ακόρεστους διπλούς δεσμούς αποσυντίθεται ευκολότερα και προκύπτουν αντίστοιχα τα διάφορα προϊόντα της αποσύνθεσης [3].

2. Θερμική αποικοδόμηση: ομοίως με την φωτοαποικοδόμηση, επάγεται μια αντίδραση αποπολυμερισμού οδηγούμενη από τις ατέλειες στην αλυσίδα του πολυμερούς αλλά εδώ εφαρμόζεται υψηλή θερμοκρασία για την επαγωγή οξειδωτικών μεταβολών. Απαρτίζεται κυρίως από μια ακανόνιστη σχάση δεσμών μεταξύ μονομερών του πολυμερούς, μειώνοντας το μοριακό βάρος του, και από μια σχάση των ακριανών δεσμών C-C που οδηγούν στον σχηματισμό πτητικών προϊόντων [1], [3], [45], [46]. Τα περισσότερα πλαστικά υπόκεινται σε αυτού του είδους την αποσύνθεση σε θερμοκρασίες κοντά στους 200 °C όμως πολυμερή με υψηλότερη θερμοκρασία τήξης (T_m) απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες [1]. Είναι λογικό ότι μια τέτοια διαδικασία δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα στη φύση, ωστόσο παρατηρείται μια αργή θερμική αποικοδόμηση σε περιοχές εκτεθειμένες σε υψηλές σχετικά θερμοκρασίες με τη συνεργιστική δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας από τον ήλιο.
3. Μηχανική αποικοδόμηση: αποτελεί τη διάσπαση του πολυμερούς λόγω διάφορων εξωτερικών δυνάμεων των οποίων το αποτέλεσμα εξαρτάται από τις μηχανικές ιδιότητες του εκάστοτε πολυμερούς. Πολλά πλαστικά υπόκεινται σε συχνή καταπόνηση είτε κατά τη χρήση τους είτε κατά την παραμονή τους στο περιβάλλον ως απορρίμματα. Μερικά παραδείγματα μηχανικής καταπόνησης είναι η αλληλεπίδραση των πλαστικών με πέτρες, άμμο, θαλάσσια ύδατα, το οικιακό πλύσιμο ρούχων από συνθετικές ίνες και η διαρκής τριβή των λάστιχων από τις ρόδες οχημάτων με την επιφάνεια των δρόμων [1], [3], [45]. Όλα τα παραπάνω συμβάλλουν σε μια ατελή διάσπαση των πλαστικών σε διάφορα προϊόντα ή μικροπλαστικά που μολύνουν το ευρύτερο περιβάλλον. Επίσης, η αποδυνάμωση των πλαστικών λόγω πιθανής εφαρμογής θερμοκρασίας ή ακτινοβολίας καθιστά ευκολότερη φυσικά την μηχανική αποσύνθεση των συνθετικών πολυμερών.



Σχήμα 6. Συνοπτική παρουσίαση των διαφόρων μορφών αποικοδόμησης πολυμερών (προσαρμόστηκε από [6]).

Όλοι όμως οι παραπάνω τρόποι αποικοδόμησης των πλαστικών συνοδεύονται από αρκετά μειονεκτήματα. Πρώτον, όσοι μπορούν να πραγματοποιηθούν στο περιβάλλον μπορούν να διασπασουν μόνο μερικώς το πολυμερές οδηγώντας στη συσσώρευση μικρότερων πλαστικών κομματιών που πιθανώς να ζημιώνουν την ισορροπία του οικοσυστήματος. Δεύτερον, ο ρυθμός δράσης των μηχανισμών αυτών στο περιβάλλον είναι αρκετά αργός και απαιτούνται συνήθως αρκετά χρόνια για να μπορέσει να διασπαστεί πλήρως ένα πλαστικό. Για να μπορέσουν να γίνουν αποδοτικοί αυτοί οι μηχανισμοί απαιτούν την εφαρμογή αρκετά ακραίων συνθηκών, φυσικά σε μια ελεγχόμενη ειδική μονάδα ή αντιδραστήρα· επί παραδείγματι η θερμική αποικοδόμηση χρειάζεται θερμοκρασίες περίπου στους 200 °C, η μηχανική αποικοδόμηση μεγάλα ποσά ενέργειας για τη λειτουργία των μηχανημάτων θραύσης των πολυμερών ενώ η χημική υδρόλυση εκτελείται συνήθως σε ακραίες τιμές pH. Έτσι, οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους διάσπασης των πλαστικών έχουν κάποια περιβαλλοντική επίπτωση με τη μορφή είτε άμεσων είτε έμμεσων ρύπων, όπου έμμεσοι είναι οι ρύποι που προκύπτουν από την διαδικασία παραγωγής της καταναλισκόμενης ενέργειας για την επίτευξη των απαιτούμενων συνθηκών. Η πιο φιλική προς το περιβάλλον είναι ίσως η φωτοαποικοδόμηση αλλά όταν χρησιμοποιείται χαμηλής έως μέσης ενέργειας ακτινοβολία είναι μια αρκετά κοστοβόρα διεργασία [2].

1.3.2. Βιοαποικοδόμηση πλαστικών

Τα προαναφερθέντα προβλήματα έρχεται να λύσει η βιοαποικοδόμηση, καθώς μπορεί να πραγματοποιηθεί υπό ήπιες συνθήκες περιβάλλοντος, δεν οδηγεί σε υψηλά κόστη λειτουργίας και το περιβαλλοντικό της αποτύπωμα είναι σχεδόν μηδενικό [2]. Βιοαποικοδόμηση ορίζεται ως η βιοχημική μετατροπή ενώσεων μέσω της αποσύνθεσης τους από ζωντανούς οργανισμούς [1]. Συγκεκριμένα, η αποσύνθεση οργανικών ενώσεων από έμβια συστήματα οδηγεί στην παραγωγή

CO₂ και H₂O υπό αερόβιες συνθήκες ή CO₂ και CH₄ υπό αναερόβιες συνθήκες [47]. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μάλιστα από την ενζυμική δράση των ζωντανών οργανισμών που συμμετέχουν, οι οποίοι είναι ως επί το πλείστον βακτήρια και μύκητες· αποικίες αυτών αναπτύσσονται στην επιφάνεια του προς αποικοδόμηση υλικού και εκκρίνουν ένα σύνολο από εξειδικευμένα ένζυμα, τα οποία αρχίζουν και δρουν επάνω στο υλικό αυτό. Μέσω των διεργασιών της βιοαποικοδόμησης μπορούν οι οργανισμοί να διασπάσουν οργανικά υλικά σε πολύ μικρότερες μονάδες που δύναται να αποτελέσουν πηγή άνθρακα και άλλων απαραίτητων στοιχείων για την ανάπτυξη τους, ώστε μεταβολίζοντας τα να απελευθερώνεται CO₂, CH₄ ή H₂O και ενέργεια διαθέσιμη για τον οργανισμό μαζί με την δημιουργία νέας βιομάζας [47].

Είναι μια διαδικασία που τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει να υιοθετείται ως τρόπος διαχείρισης πολλών εκ των διαθέσιμων συνθετικών πολυμερών, τα οποία αποτελούν άλλωστε οργανικές ενώσεις κατάλληλες για πηγή άνθρακα για ορισμένα συστήματα, διότι αν εφαρμοστεί σωστά και σε ευρεία κλίμακα έχει την προοπτική να φέρει μια οριστική λύση για τα ολοένα και αυξανόμενα πλαστικά απορρίμματα [48]–[50]. Η φιλικότητα της προς το περιβάλλον, τα αδρανή και μη τοξικά προϊόντα της και οι ήπιες συνθήκες στις οποίες μπορεί να πραγματοποιηθεί - δράση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και pH κοντά σε τιμές όπου αναπτύσσονται ζωντανοί οργανισμοί- αποτελούν ηχηρά πλεονεκτήματα που δικαιολογούν μια μελλοντική επικράτηση της έναντι των υπολοίπων μεθόδων αποικοδόμησης [51]. Επιπλέον, η βιοαποικοδόμηση μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να οδηγεί μόνο στον αποπολυμερισμό του πολυμερούς στα μονομερή του και έπειτα στην κατασκευή νέου πολυμερούς μέσω του επαναπολυμερισμού αυτών των μονομερών, οδηγώντας σε μια μορφή ανακύκλωσης του πλαστικού [52].

1.3.2.1. Μηχανισμός βιοαποικοδόμησης πλαστικών

Έχοντας ορίσει τη γενικότερη βιοαποικοδόμηση για οργανικές ουσίες, μπορεί να οριστεί με τη σειρά της η βιοαποικοδόμηση πλαστικών ως την πλήρη αποσύνθεση οργανικών πολυμερών σε αέρια, όπως CO₂ και CH₄, ή οργανικές ενώσεις μικρού μεγέθους μέσω τεσσάρων διαδικασιών-βημάτων: (α) βιοαλλοίωση, (β) βιοθραυσματοποίηση, (γ) βιοαφομοίωση, και (δ) ανοργανοποίηση [53]. Αυτές αναλύονται εκτενέστερα παρακάτω [47], [52], [54]–[62].

A) Βιοαλλοίωση (biodeterioration): η συνήθης αλλοίωση αποτελεί την επιφανειακή φθορά ενός υλικού μεταβάλλοντας τις μηχανικές, φυσικές και χημικές ιδιότητες του. Η βιοαλλοίωση αναφέρεται στην ίδια διαδικασία, η οποία όμως πραγματοποιείται από τη δράση μικροοργανισμών και ενζύμων που αυτοί παράγουν είτε εξωκυτταρικά είτε εσωκυτταρικά. Αποτελεί, ωστόσο, το πρώτο βήμα στη συνολική διαδικασία της βιοαποικοδόμησης που καθιστά το προσβαλλόμενο υλικό πιο ευάλωτο σε περαιτέρω επεξεργασία. Διάφοροι μικροοργανισμοί μπορούν να συμμετέχουν στη διεργασία αυτή, από βακτήρια μέχρι φύκη και μύκητες. Τα παραπροϊόντα αυτής της επιφανειακής βιοαλλοίωσης των πολυμερών εν προκειμένω μπορούν να αποτελέσουν κι αυτά σημαντικές πηγές άνθρακα και αζώτου για τους μετέχοντες μικροοργανισμούς.

B) Βιοθραυσματοποίηση (biofragmentation): σε αυτό το στάδιο συμμετέχουν πλήθος διαφορετικών ενζύμων με τα κυριότερα να ανήκουν στις κατηγορίες των υδρολασών, οξειδασών, υπε-

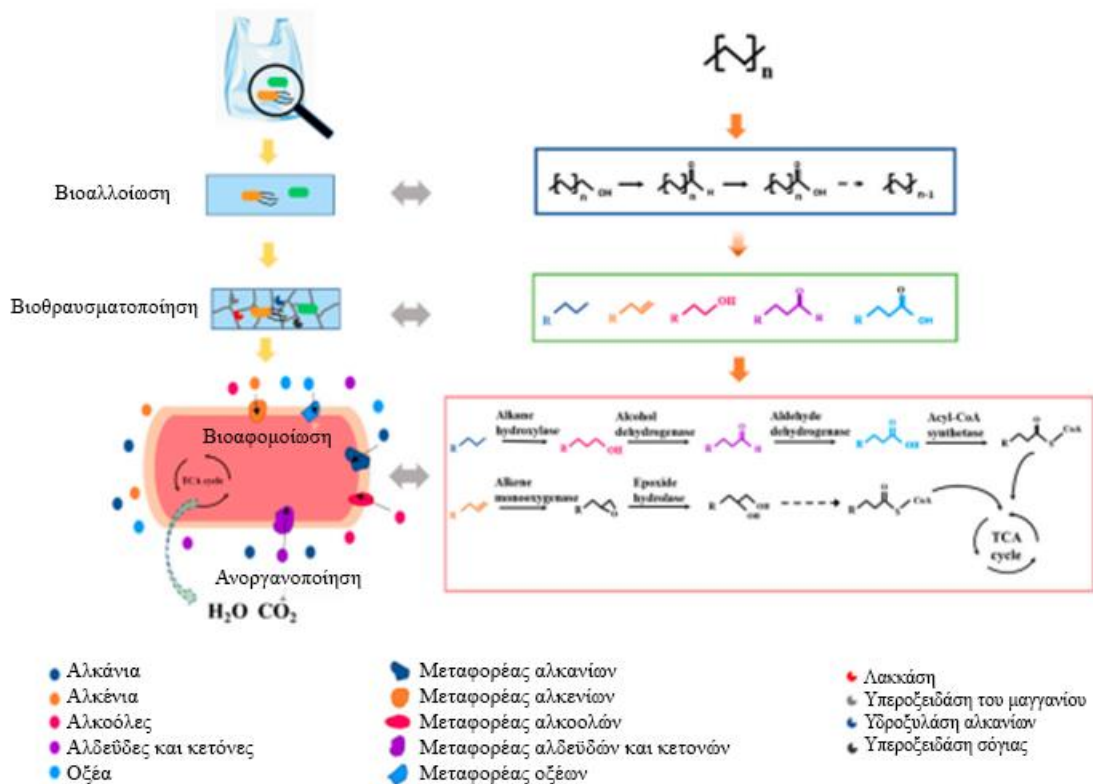
ροξειδασών, οξυγενασών και υπεροξυγενασών. Αυτά τα ένζυμα εκκρίνονται φυσικά από μικροοργανισμούς και είτε υδρολύουν δεσμούς του ίδιου του πολυμερούς όπως γίνεται στους εστερικούς δεσμούς ενός πολυεστέρα είτε σχηματίζουν υπεροξειδικές ή αλκοολικές ομάδες στην πολυμερική αλυσίδα καθιστώντας την πιο ευαίσθητη σε μετέπειτα υδρόλυση. Έτσι, τα πολυμερή που διακρίνονται από τα μεγάλα μοριακά τους βάρη θραυσματοποιούνται σε μικρότερου μοριακού βάρους ενώσεις οι οποίες είναι πιο εύκολα επεξεργάσιμες από τους μικροοργανισμούς.

Γ) Βιοαφομοίωση (bioassimilation): κατ' αυτό το στάδιο τα μονομερή και ολιγομερή μέχρι περίπου 50 άτομα άνθρακα, των θραυσματοποιημένων πια πολυμερών ενσωματώνονται ως ενέργεια, ιχνοστοιχεία και θρεπτικά συστατικά για τη λειτουργία και ανάπτυξη των κυττάρων μέσω μεταβολικών μονοπατιών. Φυσικά η βιοαφομοίωση διευκολύνεται από τα προηγούμενα στάδια και συνήθως δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί δίχως αυτά καθώς για να αφομοιωθούν στο κύτταρο τα διάφορα μονομερή του πλαστικού θα πρέπει να είναι αρκετά μικρά και υδρόφιλα ώστε να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.

Δ) Ανοργανοποίηση (mineralization): αποτελεί το τελικό στάδιο της βιοαποικοδόμησης όπου τα καταβολισμένα προϊόντα υδρόλυσης αποδομούνται περαιτέρω από ένζυμα των μικροοργανισμών και μετατρέπονται σε νέα βιομάζα με την παράλληλη παραγωγή προϊόντων μεταβολισμού του μικροοργανισμού.

Για παράδειγμα, η βιοαποικοδόμηση του PE από αερόβια βακτήρια ακολουθεί την εξής πορεία ενώ αναπαρίσταται σχηματικά παρακάτω (Σχήμα 7) [54]:

- Οξειδωτικά ένζυμα των βακτηρίων καταλύουν τον σχηματισμό καρβονυλικών ομάδων στην γραμμική αλυσίδα του πολυμερούς και είναι εφικτό να προχωρήσει περαιτέρω η οξείδωση και να μετατραπούν οι ομάδες καρβονυλίου σε ομάδες καρβοξυλίου.
- Είτε υδρολύονται οι πλέον προσβάσιμοι οξειδωμένοι δεσμοί είτε οξειδώνονται λοιποί δεσμοί σε υπεροξειδικές ομάδες. Αυτή η υδρόλυση επιτρέπει τη διάσπαση του πολυμερούς σε ενδιάμεσα μικρότερα προϊόντα που είναι μακραλυσιδικές αλειφατικές ενώσεις όπως αλκάνια και αλκένια.
- Αφομοιώνονται και μεταβολίζονται τέλος τα προϊόντα της βιοθραυσματοποίησης και επιτυγχάνεται παραγωγή ενέργειας, νέας βιομάζας και προϊόντων μεταβολισμού όπως CO₂ και H₂O.



Σχήμα 7. Μηχανισμός βιοαποικοδόμησης πολυαιθυλενίου (PE) (προσαρμόστηκε από [54]).

Η βιοαποικοδόμηση δεν αποτελεί τίποτε άλλο παρά μια ακόμη μορφή της χημικής αποικοδόμησης καθώς είναι κατά βάση μια καταλυτική διεργασία όπου χρησιμοποιούνται κατάλληλα μόρια ως καταλύτες. Οι μέθοδοι, οι μηχανισμοί και τα ένζυμα που συμμετέχουν στην βιοαποικοδόμηση πλαστικών είναι τόσα πολλά και περίπλοκα που χρειάζεται να χαρακτηριστεί ως μια ξεχωριστή κατηγορία αποικοδόμησης και να μπορέσει να μελετηθεί εις βάθος. Άλλωστε η κατάλυση προέρχεται ως επί το πλείστον από ολόκληρα έμβια συστήματα τα οποία για να κατανοηθούν απαιτούνται εκτεταμένες γνώσεις βιολογίας, μικροβιολογίας και βιοχημείας.

1.3.2.2. Παράμετροι που καθορίζουν την βιοαποικοδόμηση των πλαστικών

Είναι δεδομένο ότι η βιοαποικοδόμηση πλαστικών παρόλα τα προτερήματα της αποτελεί μια γενικά αργή διαδικασία [63], [64]. Το επιθυμητό αποτέλεσμα από την αξιοποίηση της βιοαποικοδόμησης θα επέλθει μόνο όταν επιτευχθεί ένας καλύτερος ρυθμός των φαινομένων που απαρτίζουν αυτή τη διαδικασία. Η συγκεκριμένη διαπίστωση καθιστά επιτακτική την ανάγκη εύρεσης των παραγόντων που επηρεάζουν τόσο τον βαθμό όσο και την ταχύτητα βιοαποικοδόμησης ώστε με την κατάλληλη βελτιστοποίηση να καταστεί μια ανταγωνιστική μέθοδος αποσύνθεσης πλαστικών αποβλήτων. Οι παράγοντες που ελέγχουν τη διαδικασία αυτή είναι οι ιδιότητες του υλικού/πολυμερούς, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών και οι τρόποι βιοαποικοδόμησης.

Πρώτον, κύρια μνεία πρέπει να γίνει στις ιδιότητες του πολυμερούς και το ρόλο τους καθώς είναι χαρακτηριστικές για κάθε πολυμερές και απαιτούν ένα συνήθως ακλόνητο εμπόδιο στην αποικοδόμηση του· άλλωστε είναι εύλογο να επηρεάζουν τον ρυθμό με τον οποίο ένας μικροοργανισμός θα διασπάσει ένα πολυμερές. Οι ιδιότητες αναφέρονται στο μοριακό βάρος, τη χημική σύνθεση, το μέγεθος, την επιφάνεια, την κρυσταλλικότητα, η υδροφοβικότητα και τα πρόσθετα του πλαστικού.

Αναλυτικότερα, έχει αποδειχτεί ότι ένα μεγάλου μοριακού βάρους πολυμερές προβάλλει δυσκολίες στους μικροοργανισμούς αφού θα πρέπει να διασπαστούν περισσότεροι δεσμοί για τον κατακερματισμό του και θα λαμβάνονται πιο δύσκολα τα ολιγομερή που χρησιμοποιούνται κατά τον μεταβολισμό και συνεπώς μειώνεται ο ρυθμός αποικοδόμησης του [1], [50], [52]. Η χημική σύνθεση διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο αν ληφθεί υπόψη ότι πολυμερή που εξ αρχής διαθέτουν δεσμούς και ομάδες εύκολα υδρολύσιμες από τα ένζυμα των μικροοργανισμών θα χρίζουν αυξημένης ταχύτητας βιοαποικοδόμησης· η αυξημένη κρυσταλλικότητα περιορίζει δε τη βιοαποικοδόμηση διότι όσο περισσότερο κρυσταλλικό το πολυμερές τόσο πιο διατεταγμένο είναι στον χώρο καθιστώντας δυσκολότερη την επεξεργασία του πολυμερούς από τα δρώντα ένζυμα [60], [65]. Το σχήμα και το μέγεθος ωστόσο μπορούν να επιταχύνουν την αποικοδόμηση αν μειωθούν, για παράδειγμα με μια άλεση του πολυμερούς σε σφαιρίδια, όπου η ελεύθερη επιφάνεια είναι μεγαλύτερη, υπάρχουν περισσότερα διαθέσιμα άκρα πολυμερικών αλυσίδων και επιτρέπεται στους μικροοργανισμούς να αναπτυχθούν και να δράσουν ευκολότερα [66]. Έπειτα η υδροφοβικότητα αποτελεί ακόμη ένα κριτήριο αργής βιοαποικοδόμησης· ένα αρκετά υδρόφοβο πολυμερές θα διαθέτει πολύ λίγες υδροφιλικές ομάδες όπως υδροξύλια, καρβονύλια ή καρβοξύλια που ενισχύουν την ενζυμική οξείδωση και υδρόλυση του. Τέλος, τα πρόσθετα είναι καθοριστικά για τον ρυθμό βιοαποικοδόμησης του πλαστικού αφού πολλές φορές χρησιμοποιούνται αντιοξειδωτικά και σταθεροποιητές που εμποδίζουν τη δράση των μικροοργανισμών αλλά μπορεί και να είναι τοξικά γι' αυτούς [60], [67]. Βέβαια μερικά πρόσθετα όπως ιόντα μετάλλων έχουν αντίθετη λειτουργία και ενισχύουν τις οξειδωτικές διεργασίες επί της πολυμερικής αλυσίδας [68].

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν με τη σειρά τους τον ρυθμό αποικοδόμησης για διάφορους λόγους. Αρχικά, κάθε μικροοργανισμός και κάθε ένζυμο λειτουργεί βέλτιστα σε δεδομένη θερμοκρασία και pH γεγονός που σημαίνει ότι τιμές μακριά από τις βέλτιστες θα μειώσουν την ταχύτητα δράσης τους [59]. Βέβαια υψηλή θερμοκρασία μπορεί να συνδέεται και με μερική θερμική αποικοδόμηση του πολυμερούς φαινόμενο που μπορεί να διευκολύνει την περαιτέρω βιοαποικοδόμηση, ωστόσο δεν πρέπει να είναι τόσο υψηλή ώστε να καταστέλλεται η δραστηριότητα των βιοτικών παραγόντων (μικροοργανισμοί και ένζυμα) [1], [52]. Καθ' όμοιο τρόπο επηρεάζουν και οι ακραίες τιμές pH που όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο (1.3.1) επιτυγχάνεται χημική υδρόλυση πολυμερών παρουσία οξέων ή βάσεων. Επιπλέον, σημαντική είναι και η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας η οποία επάγει φωτοοξειδωτικές αντιδράσεις και τον σχηματισμό υδρόφιλων ομάδων στην πολυμερική αλυσίδα, οι οποίες θα μπορέσουν έπειτα να υδρολυθούν από τα κατάλληλα ένζυμα. Παρόλα αυτά η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να έχει αντίθετο αποτέλεσμα στην περίπτωση που δημιουργήσει διασυνδέσεις μεταξύ των πολυμε-

ρικών αλυσίδων και να δυσχεράνει την πρόσβαση των μικροοργανισμών στους δεσμούς του πολυμερούς [47], [69]. Επίσης, η παρουσία υγρασίας είναι εξίσου σημαντική όχι μόνο επειδή ενισχύει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αλλά και γιατί επάγει αντιδράσεις υδρόλυσης και βοηθάει στη σχάση των πολυμερικών αλυσίδων [48], [69].

Αξίζει να σημειωθεί και η επίδραση των χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών και των τρόπων βιοαποικοδόμησης στην ταχύτητα της διεργασίας. Πιο συγκεκριμένα, κάθε μικροβιακό στέλεχος διακρίνεται από μια εκλεκτικότητα ως προς συγκεκριμένα υποστρώματα, οπότε η χρήση του κατάλληλου μικροοργανισμού είναι απαραίτητη αφού γίνεται να προκληθεί είτε αυξημένη δράση σε ένα πολυμερές είτε αυξημένη ανάπτυξη του μικροβίου αποδίδοντας έτσι πιο εκτεταμένη αποσύνθεση του υλικού. Αντίστοιχα, καταλυτικό είναι και το μέσο στο οποίο πραγματοποιείται η βιοαποικοδόμηση. Υπάρχουν τρία κύρια μέσα: το χώμα εδάφους, το κομπόστ, το θαλασσινό νερό και η ενεργή ιλύς [52], [63], [69], [70]. Το χώμα εδάφους είναι το παραδοσιακό μέσο βιοαποικοδόμησης ωστόσο διατηρεί συγκεκριμένες ιδιότητες που δεν επιτρέπει την πλήρη αξιοποίηση των δυνατοτήτων των οργανισμών. Το κομπόστ από την άλλη είναι ένα ενισχυμένο εδαφικό σύμπλεγμα από διάφορα φυτικά υπολείμματα εμπλουτισμένα με κάποιο άλλο οργανικό υλικό αλλά διαθέτει περιορισμένη περιεκτικότητα σε μέταλλα. Μαζί με την ενεργή ιλύ αποτελούν μέσα πλούσια σε διάφορα συστατικά για την ενισχυμένη ανάπτυξη μικροοργανισμών. Ανάλογα βέβαια τη φύση του μικροοργανισμού απαιτείται και το κατάλληλο μέσο το οποίο θα προσφέρει τη βέλτιστη δράση του εκάστοτε μικροβίου.

Γίνεται φανερό από τα παραπάνω ότι μια προκατεργασία του συνθετικού πολυμερούς πριν την εκκίνηση της διαδικασίας της βιοαποικοδόμησης του θα συνέβαλλε στην επιτάχυνση της, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από την εκτεταμένη έρευνα που έχει γίνει στο συγκεκριμένο πεδίο [2], [71]–[74]. Η προκατεργασία γίνεται δε συνήθως χρησιμοποιώντας κάποια αβιοτική μέθοδο αποικοδόμησης πλαστικών (θερμική, μηχανική, φωτολυτική ή συνδυασμός αυτών). Αυτό επιτυγχάνει φυσικά τη μεταβολή ορισμένων ιδιοτήτων του πολυμερούς για να διευκολυνθεί η δράση των βιοτικών παραγόντων [53], [67]. Για παράδειγμα, η εφαρμογή μηχανικής τάσης σε ένα πολυμερικό υλικό μειώνει την τακτικότητα του στον χώρο, δημιουργεί πολλές φορές ρωγμές στην επιφάνεια του που επιτρέπουν ευκολότερη πρόσβαση των μικροοργανισμών στους δεσμούς των μονομερών του.

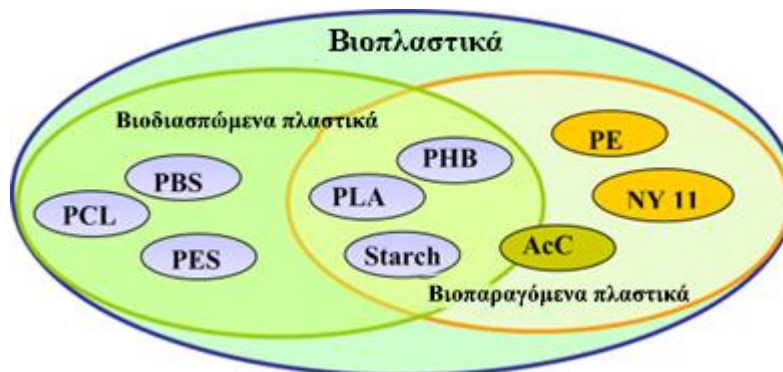
Καθίσταται βέβαια αντιληπτό ότι το εγχείρημα της βελτιστοποίησης της βιοαποικοδόμησης πλαστικών είναι πολυσχιδές, ωστόσο πιθανώς θα ήταν πιο αποδοτική η επιλογή και βελτιστοποίηση συγκεκριμένων παραμέτρων. Άλλωστε η ταυτόχρονη αξιοποίηση και εξέταση πολλών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει πιο συχνά στην αλληλοεξουδετέρωση των επιμέρους επιδράσεων ή στη συνολική επιδείνωση του συστήματος βιοαποικοδόμησης και σπανιότερα στην αθροιστική βελτίωση του.

1.3.2.3. Βιοπλαστικά

Προς απάντηση στα καίρια περιβαλλοντικά ζητήματα που έχουν ανακύψει από την ανάπτυξη και επέκταση της βιομηχανίας στη σύγχρονη εποχή έχουν αρχίσει και αξιοποιούνται σε ολοένα

και αυξανόμενο βαθμό τα λεγόμενα βιοπλαστικά. Ως βιοπλαστικό έχει οριστεί οποιοδήποτε βιοδιασπώμενο είτε οποιοδήποτε βιοπαραγόμενο συνθετικό πολυμερές (Bio-based plastic) [2], [50]. Συγκεκριμένα, βιοδιασπώμενο είναι κάθε πλαστικό που μπορεί και αποικοδομείται διαμέσου βιολογικής δράσης οδηγώντας σε μείωση του μεγέθους των πολυμερικών αλυσίδων που το απαρτίζουν εντός ενός εύλογου χρονικού διαστήματος. Βιοπαραγόμενο είναι δε κάθε πλαστικό το οποίο παράγεται είτε μερικώς είτε εξ ολοκλήρου από προϊόντα προερχόμενα από βιομάζα κάθε είδους [13], [65].

Απαιτείται βέβαια να επισημανθεί ότι δεν είναι όλα τα βιοπαραγόμενα πλαστικά βιοδιασπώμενα και δεν είναι όλα τα βιοδιασπώμενα πλαστικά βιοπαραγόμενα, όπου παραδείγματα για κάθε κατηγορία φαίνονται στο Σχήμα 8. Τα βιοδιασπώμενα πλαστικά μπορούν να προέρχονται από πετροχημικές πηγές αλλά η φύση των δεσμών τους επιτρέπει την προσβολή και διάσπαση τους από τα ένζυμα που παράγουν ορισμένοι μικροοργανισμοί. Τέτοια πολυμερή είναι το PBS, το PCL και το PES [47], [48], [50]. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν βιοπαραγόμενα πλαστικά που δεν μπορούν να αποικοδομηθούν από μικροοργανισμούς κι αυτό γιατί παράγονται μεν από βιολογικά προϊόντα και άρα η παραγωγή τους δεν αξιοποιεί υλικά επιβαρυντικά για το περιβάλλον, αποτελούνται δε από τέτοια μονομερή που ενώνονται με τέτοιους δεσμούς που δυσκολεύουν αρκετά τη δράση μικροοργανισμών και ενζύμων. Για παράδειγμα, το πολυαιθυλένιο μπορεί να παραχθεί είτε από πετροχημικά προϊόντα είτε από ουσίες βιολογικής προέλευσης, αλλά σε καμία από τις περιπτώσεις δεν είναι βιοαποικοδομήσιμο αφού η χημική σύνθεση του παραμένει ίδια όπως και η πλειονότητα των ιδιοτήτων του [64]. Βέβαια δεν πρέπει να παραλειφθούν και τα βιοπαραγόμενα συνθετικά πολυμερή που είναι και βιοαποικοδομήσιμα, που είναι και το πιο σύνηθες για αυτού του είδους τα πλαστικά, όπως το PLA, το PHB και μερικά βιοπολυμερή όπως το άμυλο [47], [66].



Σχήμα 8. Κατηγορίες βιοπλαστικών με μερικά από τα πλαστικά που τις απαρτίζουν (προσαρμόστηκε από [50]).

Τα πλεονεκτήματα της υιοθέτησης βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών για την αντικατάσταση άλλων πλαστικών που απαιτούν αρκετά απαιτητικές και επιζήμιες διεργασίες αποικοδόμησης είναι φανερό ότι είναι πολυπληθή. Αρχικά, τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή μπορούν να αξιοποιηθούν ως υποστρώματα για έμβια συστήματα ώστε να λάβουν θρεπτικά στοιχεία και απαραίτητες ουσίες για την ανάπτυξη τους και την παραγωγή βιομάζας. Έτσι, υποβοηθείται το οικοσύστημα στο οποίο εναποτίθενται αυτού του είδους τα πλαστικά και αποτρέπονται οι τοξικές επι-

πτώσεις των συμβατικών πλαστικών και των παραπροϊόντων τους στο περιβάλλον [75]. Ακόμη, όπως αναφέρθηκε υπάρχει η δυνατότητα κατασκευής βιοαποικοδομήσιμων συνθετικών πολυμερών από βιολογικής προέλευσης πρώτες ύλες, γεγονός το οποίο μπορεί να συμβάλει στον περιορισμό των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου κατά την παραγωγή τους και καθιστώντας πιο εφικτή μια κυκλική οικονομία στο πεδίο των πλαστικών [50].

1.3.2.4. Οργανισμοί που συμμετέχουν στη βιοαποικοδόμηση

Στη διαδικασία της βιοαποικοδόμησης συνθετικών πολυμερών, όπως έχει γίνει κατανοητό, συνδράμουν έμβια συστήματα με την πλειονότητα τους να κατηγοριοποιούνται ως μικροοργανισμοί. Υπάρχουν ωστόσο διάφορα άλλα είδη οργανισμών τα οποία μπορούν και αποσυνθέτουν ένα πλαστικό.

1.3.2.4.1. Μικροοργανισμοί

Κατά τις πρώτες μελέτες της διαδικασίας της βιοαποικοδόμησης τα συστήματα που φάνηκαν να την διεξάγουν ήταν εκείνα ορισμένων μικροοργανισμών. Τέτοιοι οργανισμοί μπορεί να είναι βακτήρια, μύκητες, μικροφύκη, αρχαία και πρωτόζωα αλλά τα περισσότερα ανήκουν στα βακτήρια και στους μύκητες [76]. Τα είδη μικροοργανισμών των οποίων η δράση εμφανίζει ενδείξεις αποικοδόμησης πλαστικού είναι πολυάριθμα και συνεχώς ανακαλύπτονται νέα είδη από διάφορα οικοσυστήματα και συνήθως από περιοχές αυξημένης περιεκτικότητας σε πλαστικά απόβλητα όπου η φυσική επιλογή έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων μεταβολικών μονοπατιών ή στην μετατροπή ήδη υπαρχόντων ώστε να μπορέσουν οι οργανισμοί αυτοί να διασπάσουν αυτά τα υλικά. Η έρευνα και αναζήτηση τέτοιων μικροοργανισμών έχει επεκταθεί σε διάφορα χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα όπως το έδαφος μιας χωματερής, θαλάσσια ύδατα με αρκετή ποσότητα πλαστικών απορριμμάτων, νερά αποχετεύσεων κ.α. [77].

Το πρώτο μάλιστα βακτήριο που βρέθηκε να αποικοδομεί κάποιο πλαστικό ήταν ένα *Flavobacterium* όπου σε λίμνες υδατικών αποβλήτων έξω από ένα εργοστάσιο νάιλον παρατηρήθηκε διάσπαση παρατημένων προϊόντων νάιλον [51], [78]. Έπειτα ξεκίνησε μια ραγδαία ανακάλυψη νέων μικροοργανισμών που είχαν παρόμοια δράση σε διάφορα πλαστικά. Συγκεκριμένα, η πλειονότητα των μικροβίων (βακτηρίων και μυκήτων) που διασπούν πλαστικά είναι αερόβια και μέσω εξωκυτταρικών ενζύμων, τα οποία παράγουν και εκκρίνουν, ενώ διασπούν τελικά τα πολυμερή σε CO₂, H₂O και ενέργεια χρησιμοποιώντας το O₂ ως δέκτη ηλεκτρονίων μέσω του μηχανισμού που περιεγράφηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο (1.3.2.1). Υπάρχουν βέβαια και αναερόβια βακτήρια που αποικοδομούν αντίστοιχα υλικά αλλά χρησιμοποιούν νιτρικά, θειικά ιόντα ή σίδηρο και μαγγάνιο ως δέκτες ηλεκτρονίων και γενικότερα επιφέρουν πιο αργή διάσπαση πλαστικών [48], [79]. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται διάφορα είδη μικροοργανισμών και τα είδη συνθετικών πολυμερών που μπορούν και αποικοδομούν.

Πίνακας 2. Είδη πλαστικών και τα αντίστοιχα είδη μικροοργανισμών που τα αποικοδομούν [2], [48], [75], [76], [80], [81].

Είδος πλαστικού	Μικροοργανισμός
Πολυαιθυλένιο (PE)	<i>Brevibacillus borstelensis</i> , <i>Rhodococcus rubber</i> , <i>Penicillium simplicissimum</i> , <i>Nocardia asteroides</i> , <i>Acitenobacter baumannii</i>
Άμυλο/Πολυαιθυλένιο	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium funiculosm</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET)	<i>Ideonella sakaiensis</i> , <i>Humicola insolens</i> , <i>Phaeodactylum tricorntutum</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Vibrio gazogenes</i> , <i>Polyangium brachysporum</i>
Πολυουρεθάνη (PU)	<i>Comamonas acidovorans</i> , <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pseudomonas chlororaphis</i> , <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>Geomyces pannorum</i>
Πολυγαλακτικό οξύ (PLA)	<i>Bacillus brevis</i> , <i>Amylocolatopsis sp.</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Rhizopus delemar</i> ,
Πολυκαπρολακτόνη (PCL)	<i>Aspergillus niger/flavus</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Clostridium botulinum</i>
Πολυηλεκτρικός βουτυλεστέρας (PBS)	<i>Rhizopus delemar</i> , <i>Cryptococcus sp.</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Candida antarctica</i>
Πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC)	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Πολυστυρένιο (PS)	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Cephalosporium sp.</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Pantoea</i>

Εν συνεχεία, αξίζει να αναφερθεί ότι δεν είναι απαραίτητο να λειτουργεί μόνο ένας μικροοργανισμός για την βιοαποικοδόμηση ενός πλαστικού. Στη φύση άλλωστε τα μικρόβια συμβιώνουν με αμέτρητα άλλα είδη και συνεργάζονται για τον αποδοτικό διαμοιρασμό των θρεπτικών στοιχείων και την αβίαστη ανάπτυξη των επιμέρους οργανισμών, όταν φυσικά είναι αρκετή η ποσό-

τητα πηγών ενέργειας που δεν απαιτείται ανταγωνισμός μεταξύ τους [82]–[85]. Προς τούτο έχουν ερευνηθεί η δράση συμπλεγμάτων βακτηρίων (consortia) κυρίως αποτελούμενα από περισσότερα του ενός τύπου βακτηρίων και έχει βρεθεί ότι αρκετές φορές ένα τέτοιο σύστημα είναι πιο αποτελεσματικό στην αποικοδόμηση πολυμερικών υλικών. Το PVC μάλιστα αποικοδομείται σε καλύτερο βαθμό όταν χρησιμοποιείται ένα τέτοιο σύμπλεγμα από 5 βακτήρια (*Pseudomonas otitidis*, *Bacillus aerius*, *Acanthopleurobacter pedis*, *Acanthopleurobacter pedis*, *Bacillus cereus*) [82]. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι διάφοροι μικροοργανισμοί αρκετές φορές έχουν συνεργατική δράση και αποφέρουν καλύτερα αποτελέσματα από ό,τι η χρήση του ενός μικροοργανισμού. Επιπλέον, οι συνθήκες και η λειτουργία ενός συμπλέγματος μικροοργανισμών προσομοιάζει πιθανώς τις πραγματικές συνθήκες ενός οικοσυστήματος όπου πολυάριθμα μικρόβια λειτουργούν και αναπτύσσονται ταυτόχρονα. Έτσι, μπορεί να βελτιστοποιηθεί δηλαδή ένα τέτοιο σύστημα διαφόρων μικροοργανισμών για την αποσύνθεση συγκεκριμένου πολυμερούς και έπειτα να μπορέσει αυτό το σύστημα να ενσωματωθεί στη φύση και να λειτουργήσει σε ικανοποιητικό βαθμό. Άλλωστε, ένας από τους στόχους ανάπτυξης διεργασιών βιοαποικοδόμησης είναι να μπορούν να πραγματοποιηθούν και *in situ*, οπότε ένα σύμπλεγμα μικροβίων ίσως είναι πιο ικανό να αναπτυχθεί και να δράσει σε ένα οικοσύστημα σε αντίθεση με έναν μόνο μικροοργανισμό που μπορεί να δέχεται διάφορες παρεμποδίσεις και ανταγωνισμούς από άλλα ενδογενή μικρόβια [83].

1.3.2.4.2. Ασπόνδυλα ζώα

Ένα ραγδαία αναδυόμενο πεδίο στο πεδίο της αποικοδόμησης συνθετικών πολυμερών αποτελεί εκείνο της ανακάλυψης πολυκύτταρων οργανισμών και δη εντόμων που είναι ικανά να διασπάσουν αυτά τα υλικά, τα επονομαζόμενα «πλαστικοφάγα» ασπόνδυλα ζώα. Ειδικότερα, πλήθος ειδών εντόμων έχουν βρεθεί ότι μπορούν και εκτελούν μια τέτοια λειτουργία όχι στην ενήλικη μορφή τους αλλά στη μορφή προνυμφών [86]. Σημαντικό τμήμα της ερευνητικής κοινότητας έχει στραφεί στην εύρεση τέτοιων εντόμων και αυτή η αναζήτηση κατευθύνεται συνήθως από τις τροφές που καταναλώνουν τα εκάστοτε έντομα και η συγγένειά τους με κάποιο συνθετικό πολυμερές [87]–[90]. Μερικά αρκετά μελετημένα είδη εντόμων που διαθέτουν προνύμφες με αυτά τα χαρακτηριστικά είναι τα σκαθάρια *Tenebrio molitor*, *Tenebrio obscurus* και οι νυχτοπεταλούδες *Achroia grisella*, *Plodia interpunctella*, *Galleria mellonella* [51], [88], [89], [91], [92]. Το είδος *Galleria mellonella* αποτελεί ίσως το πιο γνωστό εκ των εντόμων που μπορούν και καταναλώνουν πλαστικά στο στάδιο ανάπτυξης των προνυμφών, όπου έχει αποδειχθεί ότι 100 κάμπιες αυτής της νυχτοπεταλούδας μπορούν και καταναλώνουν 92 mg PE εντός 12 ωρών [52], [77], [80], [92]. Τα είδη *Achroia grisella*, *Corcyra cephalonica*, *Plodia interpunctella* αποτελούν όμως μερικά ακόμη έντομα τα οποία έχει αποδειχθεί η ικανότητά τους να αποικοδομούν το PE [76]. Βέβαια πέρα από το PE, το PS μπορεί και αποικοδομείται από αρκετά τέτοια είδη εντόμων όπως τα *Tenebrio molitor*, *Tenebrio obscurus*, *Tribolium castaneum*, *Alphitobius diaperinus*, *Plseiophthalmus davidis* και *Zophobas atratus* [51].

Ο μηχανισμός διάσπασης πλαστικών από τις προνύμφες εντόμων βασίζεται κυρίως στο μικροβίωμα του εντέρου αυτών των οργανισμών που σε συνδυασμό με τις διάφορες βιολογικές

λειτουργίες τους διευκολύνεται η αποικοδόμηση πολυμερικών υλικών. Αυτό έχει αποδειχθεί από το γεγονός ότι από τέτοια πλαστικοφάγα έντομα έχουν απομονωθεί αρκετά βακτήρια ή μύκητες, που παρουσιάζουν βιοαποικοδομητική δράση σε πλαστικά [93]–[97]. Επί παραδείγματι, από το έντομο *Galleria mellonella* έχουν απομονωθεί τα *Enterobacter asburiae*, *Bacillus sp.* με επιθυμητή δράση σε πλαστικά. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να αναλυθεί στα εξής στάδια [51]:

- I. Το πλαστικό κομματιάζεται σε ένα βαθμό από το στόμα της κάμπιας και εισέρχεται στο εντερικό σύστημα της.
- II. Μικρόβια παρόντα στο έντερο της κάμπιας προσκολλώνται στο πλαστικό και το διαβρώνουν.
- III. Το πλαστικό αποπολυμερίζεται σε ολιγομερή του μέσω οξειδωτικών και υδρολυτικών ενζύμων, τα οποία παράγονται είτε από την ίδια την κάμπια είτε από το εντερικό μικροβίωμα της.
- IV. Η κάμπια παρέχει βιογαλακτωματοποιητές (bioemulsifiers) οι οποίοι ενισχύουν την αποτελεσματικότητα των δρώντων ενζύμων να προσβάλλουν το πλαστικό.
- V. Οι δεσμοί των ολιγομερών διασπώνται και δημιουργούνται λιπαρά οξέα.
- VI. Τα παραγόμενα λιπαρά οξέα αποσυντίθενται μέσω του μεταβολισμού της κάμπιας.

Τα πρώτα έντομα που ανακαλύφθηκαν να έχουν τέτοια δράση φαίνεται να είναι ορισμένα είδη καμπιών που τρέφονται με μελισσοκέρι. Ήταν σχετικά τυχαία αυτή η ανακάλυψη αφού μια ερευνήτρια στο Institute of Biomedicine and Biotechnology of Cantabria, Spain που διατηρούσε ορισμένα μελίτσια υπό την επίβλεψη της, όταν μολύνθηκαν τα μελίτσια από τέτοια έντομα, μετέφερε τις κάμπιες σε μια πλαστική σακούλα από την οποία διέφυγαν σε αρκετά μικρό χρονικό διάστημα καθώς διέσπασαν το πολυμερές της σακούλας [87].

Σημαντικό πλεονέκτημα των πλαστικοφάγων εντόμων έχει αποδειχθεί ότι είναι ο αυξημένος ρυθμός αποικοδόμησης των πλαστικών σε αντίθεση με αντίστοιχα στελέχη μικροοργανισμών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει μια συμβιωτική σχέση και δράση του ίδιου του οργανισμού και των εντερικών του μικροοργανισμών όπου οι βιολογικοί μηχανισμοί του επεξεργάζονται σε έναν βαθμό είτε μηχανικά είτε ενζυμικά το πλαστικό υλικό και διατηρούν τις κατάλληλες συνθήκες για να μπορέσει το πλαστικό να αποικοδομηθεί πιο αποτελεσματικά από το μικροβίωμα του [89], [93]. Το πρόβλημα βέβαια της αξιοποίησης των εντόμων αυτών είναι ότι η ανάπτυξη τους είναι αρκετά πιο αργή από εκείνη των μικροοργανισμών και υπάρχει περιορισμός στο μέγεθος των αποικιών που θα αναπτυχθούν για αυτή τη λειτουργία καθώς απαιτούν πολύ περισσότερο χώρο ανάπτυξης. Επίσης, οι προνύμφες μόλις λάβουν τις απαραίτητες θερμίδες μπαίνουν στο στάδιο της νύμφης όπου υπόκεινται στη διαδικασία της μεταμόρφωσης και λαμβάνουν τελικά την ενήλικη μορφή τους κατά την οποία δεν μπορούν να καταναλώσουν πλαστικά. Αυτό προβάλλει έναν ακόμη περιορισμό και στον χρόνο που μπορεί να δρα μια αποικία προνυμφών επί κάποιου πλαστικού και απαιτείται έπειτα από κάποιο σημείο ανάπτυξη μιας νέας σειράς προνυμφών. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των προνυμφών, ειδικά του είδους *Galleria mellonella*, είναι ότι το πολυαιθυλένιο, εν προκειμένω, δεν μπορεί να αποτελέσει τη μόνη τροφή τους καθώς διατηρείται και αναπτύσσεται μεν το λιπιδικό απόθεμα της κάμπιας αλλά παρουσιάζεται έλλειψη

σε λοιπούς μεταβολίτες όπως αμινοξέα και σάκχαρα περιορίζοντας τη συνολική ανάπτυξη και επιβίωση τους [98], [99]. Απαιτείται λοιπόν μια ενίσχυση της διατροφής με κατάλληλα συμπληρώματα και θρεπτικά συστατικά.

Αξίζει τώρα να αναλυθεί το ευρέως μελετημένο είδος νυχτοπεταλούδας *Galleria mellonella* του οποίου οι προνύμφες έχουν αναγνωρισθεί για την αξιοσημείωτη αποικοδόμηση του πολυαιθυλενίου. Η *Galleria mellonella* είναι ένα ολομετάβολο έντομο και αναπτύσσεται σε τέσσερα διαφορετικά στάδια: αυγό, προνύμφη, νύμφη και ενήλικα (Εικόνα 2) [100]. Η προνύμφη αναφέρεται φυσικά στη γνωστή μορφή κάμπιας που λαμβάνουν τα έντομα, η νύμφη στη δημιουργία της αποκαλούμενης χρυσαλλίδας κατά την οποία υπόκειται ο οργανισμός στη διαδικασία της μεταμόρφωσης και λαμβάνει τελικά την ενήλικη μορφή του. Η συνολική διάρκεια του κύκλου ζωής του συγκεκριμένου εντόμου μπορεί να κρατήσει από βδομάδες μέχρι μήνες ανάλογα με τον ανταγωνισμό που αντιμετωπίζει για την εύρεση τροφής, τα πιθανά παράσιτα στο εγγύς περιβάλλον, την ποιότητα της τροφής του αλλά και τις περιβαλλοντικές συνθήκες [100]. Οι συγκεκριμένες προνύμφες υπό κανονικές συνθήκες τρέφονται κυρίως με μελισσοκέρι, το οποίο είναι ένα φυσικό πολυμερές αποτελούμενο από λιπιδικές ουσίες όπως αλκάνια, αλκένια, λιπαρά οξέα και εστέρες και παρουσιάζει συγχονούς αλειφατικούς δεσμούς $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ · αυτοί οι δεσμοί είναι και οι βασικοί δεσμοί της πολυμερικής αλυσίδας του πολυαιθυλενίου [95], [96], [101], [102]. Αν και άγνωστος ο ειδικός μηχανισμός μεταβολισμού του μελισσοκεριού και κατ' επέκταση του πολυαιθυλενίου από την *Galleria mellonella*, έχει υποθεθεί ότι καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει το εντερικό μικροβίωμα της κατά το στάδιο της προνύμφης· περαιτέρω έρευνες ωστόσο έχουν δείξει δράσεις βιοαποικοδόμησης και του ίδιου του οργανισμού της κάμπιας, όπως από ένζυμα που περιέχονται σίελο της, δίχως τη βοήθεια του μικροβιώματος της [86], [96], [103].



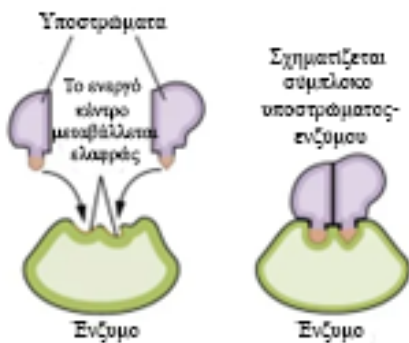
Εικόνα 2. Προνύμφη και ενήλικας του είδους *Galleria mellonella* [92].

1.4. Ένζυμα

1.4.1. Ορισμός και μηχανισμός δράσης ενζύμων

Βάσει όσων έχουν αναφερθεί προηγουμένως έχει γίνει κατανοητό το γεγονός ότι η βιοαποικοδόμηση συνθετικών πολυμερών στηρίζεται στη δράση διαφόρων ενζύμων, τα οποία παράγονται από τους ζωντανούς οργανισμούς και με βάση αυτό γίνεται λόγος για βιοαποικοδόμηση από οργανισμούς. Ως ένζυμα ορίζονται μόρια πρωτεϊνικής φύσεως, αποτελούμενα δηλαδή από μια σειρά αμινοξέων, που παρουσιάζουν ισχυρή καταλυτική δράση για την επιτάχυνση μιας χημικής αντίδρασης με εξαιρετική εκλεκτικότητα για τον τύπο αντίδρασης και υποστρώματος [104], [105]. Μέσω αυτών των μορίων μπορούν και πραγματοποιούνται οι πολυάριθμες και πολύπλοκες βιοχημικές διεργασίες εντός όλων των ζωντανών οργανισμών· ο μεταβολισμός της «τροφής» των οργανισμών γίνεται μάλιστα εφικτός από τη δράση κατάλληλων ενζύμων που επιτρέπουν τη διάσπαση των θρεπτικών μακρομορίων -πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες- σε μικρότερα μόρια για την παραγωγή ενέργειας ή την αύξηση της βιομάζας [104]. Γενικά, πέρα από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως θερμοκρασία και pH, η δράση των ενζύμων επηρεάζεται και από άλλες παραμέτρους όπως τη συγκέντρωση του ενζύμου, τη συγκέντρωση του υποστρώματος και διάφορα μόρια που μπορεί να δρουν είτε ως συμπαραγοντες είτε ως παρεμποδιστές όταν προσάπτονται σε αυτά [106].

Η αρχή λειτουργίας των ενζύμων βασίζεται στο ενεργό κέντρο που διαθέτουν του οποίου η δομή είναι τέτοια ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση ενός συγκεκριμένου υποστρώματος ή είδους υποστρωμάτων [107]. Η πρόσδεση διευκολύνει την εκτέλεση μιας χημικής αντίδρασης που μεταβάλλει το υπόστρωμα για την παραγωγή κάποιου προϊόντος, το οποίο απελευθερώνεται έπειτα από το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ύστερα της διαδικασίας αυτής το ένζυμο παραμένει πρακτικά αμετάβλητο δίχως να χάνει την καταλυτική του δράση. Το μοντέλο που περιγράφει καλύτερα τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης των ενζύμων με τα διάφορα υποστρώματα είναι το μοντέλο της επαγόμενης προσαρμογής. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό η περιοχή του ενεργού κέντρου μεταβάλλεται κατά κάποιον βαθμό όταν εισέρχεται το υπόστρωμα και τότε γίνεται το ενεργό κέντρο καταλλήλως συμπληρωματικό του υποστρώματος και επιτυγχάνεται έτσι η ισχυρή πρόσδεση του [108]. Στην **Εικόνα 3**. Μηχανισμός αλληλεπίδρασης ενζύμου και υποστρώματος σύμφωνα με το μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής (προσαρμόστηκε από [108]). **Εικόνα 3** αναπαρίσταται ο μηχανισμός που περιγράφεται από το μοντέλο της επαγόμενης προσαρμογής.



Εικόνα 3. Μηχανισμός αλληλεπίδρασης ενζύμου και υποστρώματος σύμφωνα με το μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής (προσαρμόστηκε από [108]).

1.4.2. Κατηγορίες ενζύμων

Τα ένζυμα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μπορούν και καταλύουν πλήθος διαφορετικών χημικών αντιδράσεων και βάσει του είδους αντίδρασης που καταλύουν διαχωρίζονται σε 6 μεγάλες κατηγορίες (Σχήμα 9).



Σχήμα 9. Κύριες κατηγορίες ενζύμων (προσαρμόστηκε από [109, p. 2]).

1.4.2.1. Ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοαποικοδόμηση πολυαιθυλενίου

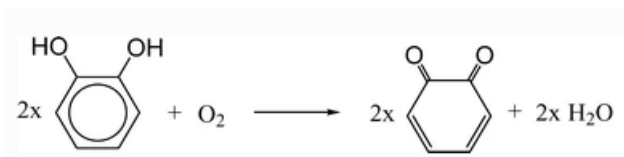
Σε προηγούμενα κεφάλαια έχει γίνει αναφορά για την εξαιρετική ανθεκτικότητα του πολυαιθυλενίου στα διάφορα είδη αποικοδόμησης και δη στη βιοαποικοδόμηση. Το πολυαιθυλένιο αποτελεί άλλωστε το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο πλαστικό στη σύγχρονη εποχή και γι' αυτό σημαντικό κομμάτι της ερευνητικής κοινότητας έχει αφιερωθεί στην εύρεση τρόπων για την ακίνδυνη αποικοδόμηση του [49]. Έχει γίνει ήδη μνεία για τους οργανισμούς που μπορούν να αποικοδομήσουν το πολυαιθυλένιο, συμβάλλοντας στην κατανόηση και επέκταση της βιοαποικοδόμησης του. Βέβαια προς αυτήν την κατεύθυνση μπορεί να συμβάλλει η ανακάλυψη των ίδιων των ενζύμων που συνδράμουν στην αποσύνθεση του πολυαιθυλενίου καθώς έτσι όχι μόνο κατανοείται καλύτερα ο μηχανισμός της βιοαποικοδόμησης του αλλά και δύναται να χρησιμοποιηθούν ευκολότερα σε μεγάλης κλίμακας βιομηχανικές διαδικασίες λόγω του μεγαλύτερου χρόνου ζωής που διαθέτουν συγκριτικά με τους διάφορους οργανισμούς. Επιτρέπουν, επίσης, απλούστερο σχεδιασμό στην αντίστοιχη βιομηχανικής κλίμακας διεργασία και χρίζουν ευκολότερου ελέγχου και βελτιστοποίησης. Όσα ένζυμα είναι ικανά να αποικοδομήσουν το πολυαιθυλένιο εντάσσονται σε μια ευρύτερη κατηγορία ανεξαρτήτως δομικής ομοιότητας και χαρακτηρίζονται ως ΡΕάσες,

Ωστόσο, η μεγάλη αδράνεια και ανθεκτικότητα, χαρακτηριστικά που διακρίνουν το πολυαιθυλένιο έχουν αποτελέσει σημαντικό εμπόδιο στην ανακάλυψη τέτοιων ενζύμων. Το υλικό αυτό αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από δεσμούς C-C και C-H οι οποίοι προσδίδουν σταθερότητα και υδροφοβικότητα, ενώ ο βαθμός κρυσταλλικότητας και το μοριακό βάρος ενισχύουν περαιτέρω την ανθεκτικότητα του στην ενζυμική αποικοδόμηση, όπου για παράδειγμα το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) παρουσιάζει υψηλότερη ανθεκτικότητα σε σχέση με το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE) και γι' αυτό χρησιμοποιείται σε πιο απαιτητικές εφαρμογές όπως σωληνώσεις υδάτων, μπουκάλια απορρυπαντικών κ.α. [49], [110]. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στην καθιέρωση μιας προεπεξεργασίας τού προς βιοαποικοδόμηση πλαστικού με κάποιες αβιοτικές μεθόδους όπως υπεριώδη ακτινοβολία, θερμότητα κλπ. Η απουσία δηλαδή υδρόλυσιμων δεσμών είναι η κύρια αιτία αυτής της προεπεξεργασίας του πολυαιθυλενίου, αφού για να μπορέσει να διασπαστεί χρειάζεται πρώτα να οξειδωθούν ορισμένοι δεσμοί του ώστε να μπορέσουν διάφορα συνήθη ένζυμα να το αποικοδομήσουν, γεγονός που αποτελεί και το περιοριστικό στάδιο της βιοαποικοδόμησης του [58], [111]. Για τους παραπάνω λόγους τα κύρια ένζυμα που μπορούν και διασπούν το πολυαιθυλένιο είναι οι οξειδοαναγωγάσες καθώς οξειδώνουν τους δεσμούς του και επιτρέπουν την περαιτέρω επεξεργασία του. Συγκεκριμένα, οι πιο γνωστές κατηγορίες οξειδοαναγωγασών για τη βιοαποικοδόμηση του πολυαιθυλενίου είναι οι υπεροξειδάσες και οι οξειδάσες, ενώ οι οξυγενάσες έχουν αναδειχθεί ως κύρια ένζυμα για την αποικοδόμηση των αλειφατικών παραπροϊόντων του [49], [54], [110].

1.4.2.1.1. Οξειδάσες

Οι οξειδάσες αποτελούν μια κατηγορία ενζύμων τα οποία καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης χρησιμοποιώντας ένα μόριο οξυγόνου ως τον δέκτη ηλεκτρονίων παράγοντας είτε H₂O είτε H₂O₂ [112].

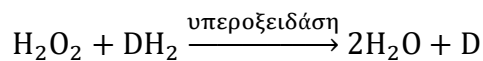
Μια άκρως σημαντική κατηγορία των οξειδασών αποτελούν οι φαινολοξειδάσες· είναι οξειδάσες οι οποίες καταλύουν την οξείδωση διαφόρων αρωματικών ενώσεων και ειδικότερα των φαινολών (Σχήμα 10) [113]. Ανήκουν σε μια κατηγορία μεταλλοπρωτεϊνών και η πλειονότητα τους διαθέτει ενεργά κέντρα χαλκού τύπου 3, εντός των οποίων προσδένονται δύο άτομα χαλκού σε 3 μόρια ιστιδίνης το καθένα [114], [115]. Οι περισσότεροι γνωστές φαινολοξειδάσες είναι οι λακκάσες για τις οποίες έχει παρατηρηθεί αξιοσημείωτη δράση επί της αλυσίδας του πολυαιθυλενίου. Μια πρόσφατη ανακάλυψη αποτελεί δε η απομόνωση μιας φαινολοξειδάσης από τον σίελο της προνύμφης της *Galleria mellonella*, η οποία είναι μια αρυλφορίνη και περιέχεται ως επί το πλείστον εντός της αιμολύμφης του συγκεκριμένου εντόμου [116]. Η προαναφερθείσα φαινολοξειδάση που έχει λάβει την ονομασία «Demetra» παρουσίασε οξείδωση και εμφανή αλλοίωση του πολυαιθυλενίου [103], [111]. Επιπλέον, απομονώθηκε μια ακόμη εξαμερίνη, δηλαδή μια πρωτεΐνη μεταφορέας οξυγόνου εντός της αιμολύμφης των εντόμων, η οποία όμως είχε μικρότερη δράση από την προηγούμενη αρυλφορίνη [103]. Και οι δύο πρωτεΐνες έχουν μεγάλη συγγένεια με την οικογένεια των αιμοκυανινών. Οι αιμοκυανίνες είναι πρωτεΐνες μεταφοράς οξυγόνου των αρθροπόδων, οι οποίες περιέχουν δύο άτομα χαλκού και παρουσιάζουν γενικά υψηλή συγγένεια στη δομή τους με τις φαινολοξειδάσες, λόγος που ίσως εξηγεί την πιθανή δράση τους για τη διάσπαση του πολυαιθυλενίου [117].



Σχήμα 10. Αντίδραση οξείδωσης μιας κατεχόλης στην αντίστοιχη κοινόνη από μια φαινολοξειδάση [118].

1.4.2.1.2. Υπεροξειδάσες

Στην ίδια αρχή με τις οξειδάσες στηρίζεται και η δράση των υπεροξειδασών οι οποίες χρησιμοποιούν ως δέκτη ηλεκτρονίων το H₂O₂ είτε κάποιο άλλο υπεροξείδιο αντί του O₂. Παρακάτω παρουσιάζεται μια γενική αντίδραση καταλυόμενη από υπεροξειδάση· αποτελείται γενικά από δύο στάδια όπου στο καθένα λαμβάνει χώρα η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου και παράγεται συνήθως το ενδιάμεσο προϊόν DH [119].

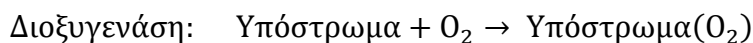
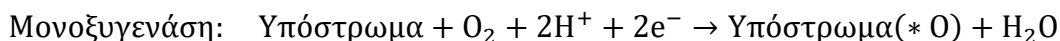


Οι περισσότερες υπεροξειδάσες είναι αιμοπρωτεΐνες δηλαδή ενώνονται με ένα μόριο αίμης είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Οι πιο διαδεδομένες υπεροξειδάσες που συνδράμουν στην βιοαποικοδόμηση του πολυαιθυλενίου είναι η υπεροξειδάση του μαγγανίου και της λιγνί-

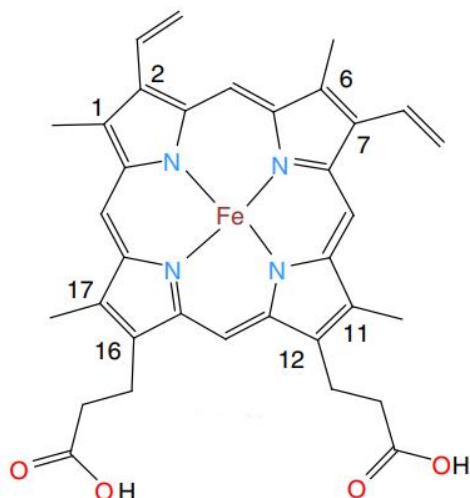
νης [111], [120]. Οι υπεροξειδάσες αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως για την οξείδωση φαινολικών και αρωματικών ουσιών αλλά η δράση τους φαίνεται να επεκτείνεται και στην οξείδωση δεσμών της αλυσίδας του πολυαιθυλενίου· η υπεροξειδάση του μαγγανίου μάλιστα καταλύει την οξείδωση του δισθενούς μαγγανίου σε τρισθενές παρουσία ενώσεων που σχηματίζουν σύμπλοκα με το τρισθενές μαγγάνιο και έπειτα αυτά τα σύμπλοκα πραγματοποιούν την οξείδωση των οργανικών υποστρωμάτων [121].

1.4.2.1.3. Οξυγενάσες

Οι οξυγενάσες μπορούν και καταλύουν την προσθήκη ατόμου οξυγόνου σε κάποιο οργανικό υπόστρωμα προκαλώντας τη δημιουργία ενός νέου οξειδωμένου προϊόντος, αξιοποιώντας το O₂ ως δότη. Χωρίζονται βέβαια στις μονοξυγενάσες και στις διοξυγενάσες με κριτήριο την προσθήκη ενός ή δύο ατόμων οξυγόνου στο υπόστρωμα· στην περίπτωση της προσθήκης ενός ατόμου οξυγόνου, το άλλο άτομο οξυγόνου του μορίου O₂ προορίζεται για την παραγωγή H₂O ως δευτερεύοντος προϊόντος [122]. Παρακάτω παρουσιάζεται μια γενική μορφή των αντιδράσεων που καταλύουν οι οξυγενάσες [122]:

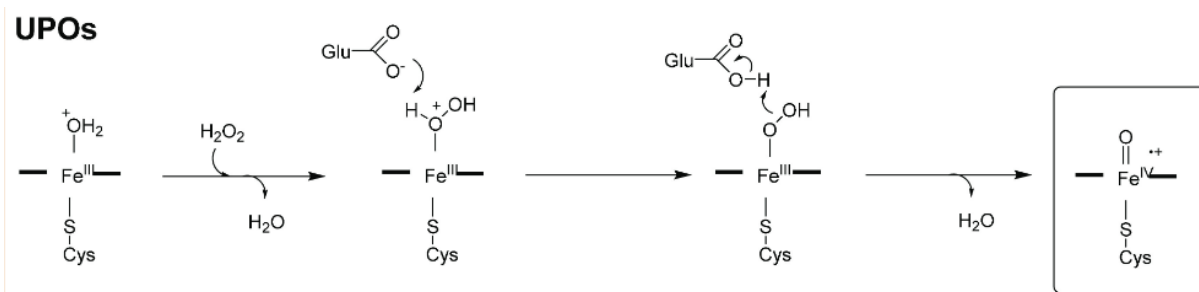


Ωστόσο, υπάρχει μια κατηγορία ενζύμων, οι υπεροξυγενάσες, οι οποίες έχουν παρόμοια δράση με τις οξυγενάσες χρησιμοποιώντας όμως το H₂O₂ ως δότη, αντί του O₂. Οι σημαντικότερες εκ των υπεροξυγενασών είναι οι μη ειδικές υπεροξυγενάσες («Unspecific Peroxygenases» / «UPOs») οι οποίες έχουν λάβει και την ευρύτερη προσοχή της ερευνητικής κοινότητας [123]. Οι UPOs προέρχονται από μυκητιακά συστήματα και έχουν χαρακτηριστεί ως μη ειδικές λόγω της ποικιλίας αντιδράσεων που δύνανται και καταλύουν. Παρουσιάζουν αρκετή συγγένεια με τις P450 μονοξυγενάσες από την άποψη ότι και τα δύο είδη ενζύμων ενώνονται με ένα μόριο αίμης τύπου B (Εικόνα 4) μέσω μιας κυστεΐνης και φαίνεται να καταλύουν την ίδια ποικιλία αντιδράσεων· άλλωστε πραγματοποιούν τη μεταφορά ενός μόνο ατόμου οξυγόνου από το H₂O₂ στο εκάστοτε υπόστρωμα όπως και μια μονοξυγενάση από ένα μόριο O₂ [124]. Βέβαια οι UPOs έχουν γίνει σημαντικά πιο προτιμητέες από τις ήδη διαδεδομένες P450 μονοξυγενάσες διότι οι τελευταίες απαιτούν συμπληρωματικές φλαβοπρωτεΐνες και ακριβούς συμπαραγόντες ενώ παρουσιάζουν εσωκυτταρική παραγωγή και αρκετά πολύπλοκους μηχανισμούς μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω NAD(P)H, χαρακτηριστικά που καθιστούν την βελτιστοποίηση και κλιμάκωση της αντίστοιχης διεργασίας ιδιαίτερα προβληματική [125].



Εικόνα 4. Απεικόνιση του μορίου της αίμης τύπου B [126].

Η πρώτη UPO που ανακαλύφθηκε ήταν από τον μύκητα *Agrocybe aegerita* (AaeUPO) το 2004 και έκτοτε έχουν απομονωθεί 22 άλλες τέτοιες υπεροξυγενάσες και έχουν διακριθεί σε 2 ομάδες: (α) στις «μακριές» UPOs με μέσο μέγεθος τα 44 kDa, και (β) τις «βραχείς» UPOs με μέσο μέγεθος τα 29 kDa [125]. Η κύρια λειτουργική διαφορά των δύο ομάδων έγκειται στο ότι οι μακριές UPOs παρουσιάζουν καλύτερη ενεργότητα σε σχετικά μικρά υποστρώματα ενώ οι βραχείς UPOs σε πιο ογκώδη. Βέβαια η οξειδωτική δράση των UPOs στηρίζεται στο μόριο αίμης με το οποίο ενώνονται· συγκεκριμένα το τρισθενές υπεροξικό σύμπλεγμα σιδήρου που περιέχεται εντός του ενεργού κέντρου του ενζύμου οξειδώνεται από το H_2O_2 (με προσθήκη οξυγόνου) και έπειτα αυτό το σύμπλοκο πραγματοποιεί την οξείδωση του υποστρώματος (Σχήμα 11) [127]. Αξίζει να αναφερθεί επίσης ότι οι μακριές UPOs παρουσιάζουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και ενεργότητα σε αρωματικές ενώσεις ενώ οι βραχείς UPOs σε αλειφατικές ενώσεις [125].



Σχήμα 11. Μηχανισμός οξυγόνωσης ενός ατόμου άνθρακα και μεταβολής του συμπλέγματος σιδήρου εντός του ενεργού κέντρου μιας μη ειδικής υπεροξυγενάσης [127].

Οι κύριοι τύποι αντιδράσεων που μπορούν και καταλύουν οι συγκεκριμένες υπεροξυγενάσες είναι οι εξής [123], [128], [129]:

- Υδροξυλίωση αλειφατικών δεσμών C-H (αλκάνια και κυκλοαλκάνια)
- Υδροξυλίωση αρωματικών δεσμών C-H
- Εποξείδωση αλκενίων

- Σουλφοξείδωση
- Ο-απαλκυλίωση και Ν-απαλκυλίωση

Επομένως, αντιλαμβανόμενοι την καταλυτική δράση των περισσότερων UPOs εξηγείται η επέκταση του ερευνητικού ενδιαφέροντος για τη διερεύνηση της πιθανής τους δράσης στην αλειφατική αλυσίδα του πολυαιθυλενίου καθώς είναι άκρως σημαντική η δυνατότητα οξείδωσης των εξαιρετικά αδρανών δεσμών C-H ώστε να επιταχυνθεί το αρκετά αργό αρχικό αυτό στάδιο της βιοαποικοδόμησης του [110], [120], [123]. Βέβαια διερευνάται και ο ρόλος τους στην πλήρη διάσπαση και επεξεργασία των ενδιάμεσων προϊόντων της αποικοδόμησης πολυολεφινών, καθότι φαίνεται να δρουν κυρίως στα άκρα των υποστρωμάτων που προσβάλλουν και κατά τη διάσπαση της πολυαιθυλενικής αλυσίδας θα προκύπτουν περισσότερα μόρια τα οποία προσβάλλονται ευκολότερα αυτού του είδους τα ένζυμα [110]. Η επιτυχημένη άλλωστε αξιοποίηση διαφόρων λιπαρών οξέων μέσω της υδροξυλίωσης τους από τη δράση των UPOs που επιτρέπει την περαιτέρω επεξεργασία τους και την παραγωγή υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντων, έχει ενισχύσει τη θέση των ενζύμων αυτών ως πιθανών για την βιοαποικοδόμηση πολυολεφινών [130], [131].

1.4.3. Ετερόλογη έκφραση ενζύμων

Για την επιτυχή και αποτελεσματική μελέτη της δράσης των ενζύμων αλλά και για την κατασκευή μιας αποδοτικής και μεγάλης κλίμακας διεργασίας βάσει των ενζύμων αυτών απαιτούνται σημαντικές ποσότητες των πρωτεϊνών αυτών, που η απλή καλλιέργεια των αρχικών μικροοργανισμών και η μετέπειτα απομόνωση του ενζύμου από αυτούς αποτελεί μια εξαιρετικά εξαντλητική και δύσκολη διαδικασία. Αυτό το πρόβλημα έρχεται να λύσει η ετερόλογη έκφραση των επιθυμητών ενζύμων, δηλαδή η έκφραση τους σε κάποιο άλλο σύστημα-οργανισμό. Έτσι, επιτυγχάνεται μάλιστα και ενισχυμένη παραγωγή μόνο της επιθυμητής πρωτεΐνης και καλύτερος έλεγχος της διεργασίας. Αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν οδηγήσει στην ενσωμάτωση πλήθους ενζυμικών προϊόντων σε διάφορους τομείς της σύγχρονης βιομηχανίας όπως τα τρόφιμα, τα φάρμακα, την κτηνοτροφία και την κατάλυση διεργασιών και αντιδράσεων.

Η διαδικασία της ετερόλογης έκφρασης ενζύμων είναι πολυσχιδής και για να μπορέσει να εκτελεστεί απαιτείται η αξιοποίηση των εργαλείων της γενετικής μηχανικής. Η γενετική μηχανική καθιστά δυνατή την τροποποίηση του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών ώστε να προκληθούν νέες και επιθυμητές λειτουργίες στον οργανισμό (π.χ. την αυξημένη παραγωγή μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης): το στάδιο αυτό επιτυγχάνεται μάλιστα με τη σύνθεση των κατάλληλων γονιδίων μέσω της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA. Τα νέα αυτά γονίδια μπορεί είτε να διαθέτουν κάποιες μεταλλάξεις σε ένα ήδη υπάρχον γονίδιο του μικροοργανισμού από τον οποίο προήλθαν είτε να αποτελούν μια εντελώς καινούργια γενετική πληροφορία για τον μικροοργανισμό-στόχο, ο οποίος αποκαλείται πλέον ξενιστής. Τα συνολικά στάδια της γενετικής μηχανικής με στόχο την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω όπου η έκφραση γίνεται σε έναν μικροοργανισμό ξενιστή [132], [133]:

- I. Παραλαβή του επιθυμητού γονιδίου από τον μικροοργανισμό δότη (μέσω κλωνοποίησης τυφλής-στόχευσης, υβριδίσωσης με ανιχνευτές θραυσμάτων DNA, πλήρους χημικής σύνθεσης ή κατασκευής cDNA από αντίστροφες μεταγραφάσες για γονίδια που περιέχουν ιντρόνια)
- II. Στοχευμένη κοπή ενός κυκλικού φορέα (μικρό μόριο DNA με τη μορφή πλασμιδίου) μέσω περιοριστικών ενζύμων
- III. Εισαγωγή του γονιδίου στον φορέα με τη χρήση λιγάσης και κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA (rDNA).
- IV. Εισαγωγή του ανασυνδυασμένου DNA στα κύτταρα του ξενιστή μέσω μετασχηματισμού αυτών (θερμικό σοκ ή ηλεκτροδιάτρηση).
- V. Διαλογή των κυττάρων που έχουν λάβει επιτυχώς το ανασυνδυασμένο DNA (χρήση αντιβιοτικού ή αυξοτροφικά).
- VI. Καλλιέργεια των τροποποιημένων κυττάρων ξενιστή, επαγωγή και έκφραση του ετερόλογου γονιδίου, παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης και απομόνωση αυτής.

Οι πλασμιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA αποτελούν τροποποιημένα βακτηριακά πλασμίδια που μπορούν και αυτοαντιγράφονται. Υπάρχουν φορείς κλωνοποίησης, που προορίζονται για την αποκλειστική παραγωγή κλώνων του πλα-

σμίδιου εντός του κυττάρου-ξενιστή, και φορείς έκφρασης οι οποίοι διαθέτουν επιπλέον κάποιες ρυθμιστικές ακολουθίες για τη μεταγραφή και μετάφραση του επιθυμητού γονιδίου. Τα κύρια χαρακτηριστικά των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης παρουσιάζονται στο Σχήμα 12 και αναλύονται κατωτέρω:

1. Θέση έναρξης αντιγραφής (Origin of Replication - ori): είναι η θέση στην οποία πραγματοποιείται η εκκίνηση της αντιγραφής του πλασμιδίου από τον ξενιστή. Η παρουσία του είναι κρίσιμη για να μπορέσει να μοιραστεί το πλασμίδιο κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.
2. Υποκινητής (promoter): επιτρέπει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης και άλλων μεταγραφικών παραγόντων για την έναρξη της μεταγραφής του πλασμιδίου.
3. Επιλέξιμος δείκτης (selectable marker): αποτελεί το τμήμα του πλασμιδίου που παρέχει έναν συγκεκριμένο φαινότυπο όπως αντίσταση σε κάποιο αντιβιοτικό και επιτρέπει την εύκολη διαλογή των κυττάρων που έχουν λάβει τον πλασμιδιακό φορέα.
4. Πολυσυνδετική περιοχή (Multiple Cloning Site - MCS): περιέχει συγκεκριμένες αναγνωριστικές ακολουθίες για διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες ώστε να κοπεί το πλασμίδιο και να προσαρτηθεί το επιθυμητό γονίδιο. Οι ακολουθίες αυτές βρίσκονται αποκλειστικά σε αυτήν την περιοχή ώστε να κοπεί το πλασμίδιο μόνο σε αυτά τα σημεία και να αποφευχθεί η ανεξέλεγκτη θραυσματοποίηση του από τις ενδονουκλεάσες.



Σχήμα 12. Απεικόνιση ενός τυπικού πλασμιδιακού φορέα και των κυριότερων χαρακτηριστικών του (προσαρμοσθηκε από [133]).

1.4.3.1. Ο ξενιστής *P. pastoris* ως σύστημα ετερόλογης έκφρασης

Η επιλογή του κατάλληλου ξενιστή για την ετερόλογη έκφραση μιας πρωτεΐνης αποτελεί βήμα υψίστης σημασίας στη διαδικασία της παραγωγής πρωτεϊνών. Υπάρχουν διάφοροι ξενιστές που χρησιμοποιούνται ως πλατφόρμες για την ετερόλογη έκφραση και ο καθένας προορίζεται για συγκεκριμένη χρήση και συγκεκριμένα είδη πρωτεΐνης. Ο πιο γνωστός και διαδεδομένος μικροοργανισμός-ξενιστής είναι το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*) μέσω του οποίου μπορεί και εκφράζεται πλήθος ετερόλογων πρωτεϊνών. Ωστόσο, η παραγωγή ευκαρυωτικών πρωτεϊνών στο *E. coli* μπορεί να μην είναι εφικτή ορισμένες φορές λόγω της απουσίας των κατάλληλων μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων όπως δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, γλυκοζυλίωση και εκκριτική έκφραση [134]. Για τη σύνθεση λοιπόν τέτοιων πρωτεϊνών έχει εδραιωθεί η χρήση ζυμομυκήτων οι οποίοι είναι ικανοί να παράγουν επιτυχώς αυτά τα προϊόντα σε συνδυασμό με μερικά χαρακτηριστικά των προκαρυωτικών οργανισμών όπως γρήγορη ανάπτυξη, φθηνά θρεπτικά μέσα και δυνατότητα κλιμάκωσης των εκάστοτε διεργασιών. Ένας τέτοιος μύκητας είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ο οποίος μάλιστα έχει χαρακτηριστεί ως GRAS («Generally Regarded As Safe») και αξιοποιείται πλέον σε πλήθος εφαρμογών. Τα μειονεκτήματα βέβαια του *S. cerevisiae*, που συνδέονται με την υπεργλυκοζυλίωση των ετερόλογων πρωτεϊνών και την ανάπτυξη του μέσω ζύμωσης η οποία συνεπάγεται μικρή γενικά ανάπτυξη και μικρή απόδοση, έχουν επιτρέψει την αξιοποίηση ενός άλλου ζυμομύκητα σε ακόμη μεγαλύτερο εύρος πεδίων και εφαρμογών, του οργανισμού *Pichia pastoris* [134]. Ο *P. pastoris* αποτελεί μια μεθυλοτροφική ζύμη η οποία εντοπίστηκε πρώτα σε μια καρυδιά στη Γαλλία και μέσω γενετικών τροποποιήσεων μπορεί και αξιοποιεί τη μεθανόλη ως τη μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας [135].

1.4.3.1.1. Χαρακτηριστικά του ξενιστή *Pichia Pastoris*

Η πλειονότητα των στελεχών της ζύμης *P. pastoris* που χρησιμοποιούνται για ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών διαθέτουν δύο κύρια κωδικοποιησιμα γονίδια που ελέγχουν την κατανάλωση και αξιοποίηση της μεθανόλης· τα γονίδια αυτά ονομάζονται AOX1 και AOX2 τα οποία κωδικοποιούν την παραγωγή δύο αλκοολικών οξειδασών που επιτρέπει την ενεργοποίηση του μεταβολικού μονοπατιού Mut («Methanol Utilization») εντός του υπεροξεισώματος και του κυτταροπλάσματος [136]. Συγκεκριμένα, μέσω αυτών των οξειδασών η μεθανόλη οξειδώνεται σε φορμαλδεΐδη και υπεροξειδίο του υδρογόνου, όπου το τελευταίο διασπάται έπειτα σε νερό και οξυγόνο παρουσία μιας καταλάσης. Ένα μέρος της παραγόμενης φορμαλδεΐδης μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όπου οξειδώνεται ενζυμικά σε μυρμηκικό ανιόν και CO₂ και απελευθερώνει ενέργεια σε μορφή NADH [134]. Η εναπομείνασα φορμαλδεΐδη υφίσταται κάποιες μετατροπές που επιτρέπουν την παραγωγή διυδροξυακετόνης και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη μέσω μιας συνθάσης της διυδροξυακετόνης (DAS) και μιας αφυδρογονάσης (GAP). Οι υποκινητές των γονιδίων AOX1, AOX2, DAS και GAP μπορούν να χρησιμοποιηθούν όλοι για την κατασκευή πλασμιδίων με στόχο την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, όμως έχει παρατηρηθεί ότι ο ισχυρότερος υποκινητής είναι το AOX1 αφού παρουσία μεθανόλης ως τη μόνη πηγή άνθρακα, μέχρι και το 30% των παραγόμενων πρωτεϊνών απαρτίζεται από την αντίστοιχη οξειδάση [134].

Η οξειδάση του AOX2 συνεισφέρει μόνο στο 15% της συνολικής ενεργότητας των AOX εντός του κυττάρου και γι' αυτό ο AOX2 είναι πιο αδύναμος υποκινητής. Όπως αναφέρθηκε, λοιπόν, τα περισσότερα στελέχη *P. pastoris* διαθέτουν και τα δύο αυτά γονίδια οξειδασών και μάλιστα χαρακτηρίζονται ως Mut⁺ ενώ διακρίνονται από την υψηλότερη ανάπτυξη σε μεθανόλη μεταξύ των υπόλοιπων ειδών στελεχών [135].

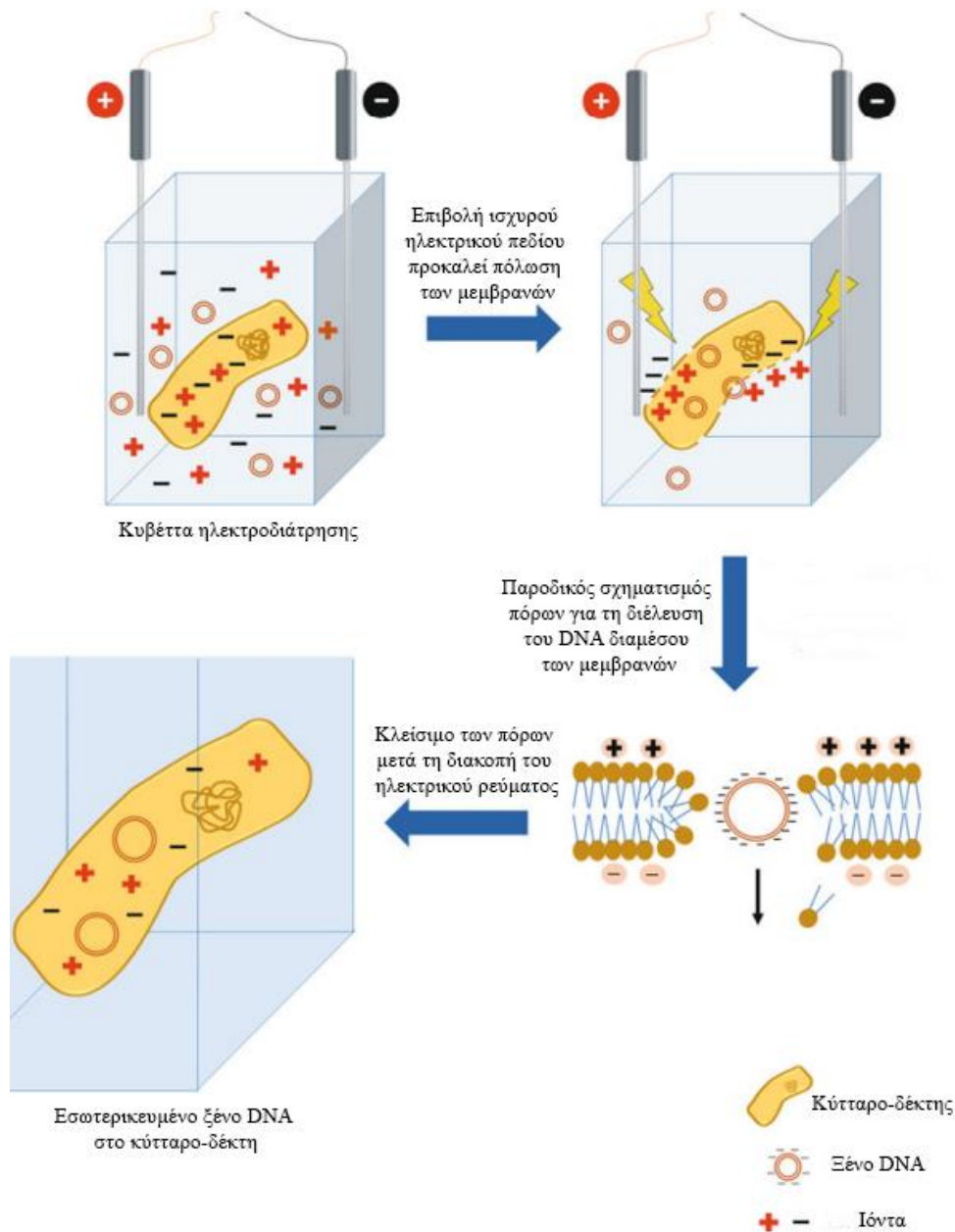
Η ζύμη *P. pastoris* συνοδεύεται λοιπόν από διάφορα πλεονεκτήματα, τα κύρια εκ των οποίων αναφέρονται κατωτέρω [135], [137]–[139]:

- I. Διαθέτει τους ισχυρά επαγόμενους υποκινητές AOX1 και AOX2 παρουσία μεθανόλης ως τη μόνη πηγή άνθρακα που αξιοποιούνται για την ετερόλογη έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών. Οι υποκινητές αυτοί παρεμποδίζονται σημαντικά παρουσία άλλων πηγών άνθρακα όπως γλυκόζη, γλυκερόλη ή αιθανόλη και επάγονται μόνο παρουσία μεθανόλης. Έτσι υπάρχει η δυνατότητα χρήσης ενός αρκετά φθηνού αλλά τοξικού επαγωγέα αλλά και να διαχωριστεί η φάση ανάπτυξης με την φάση επαγωγής. Ο διαχωρισμός των δύο φάσεων επιτελεί στη αρχική γρήγορη συσσώρευση βιομάζας μέσω άλλων πηγών άνθρακα που είναι πιο αποδοτικές για την ανάπτυξη των κυττάρων της ζύμης. Δύναται λοιπόν να αξιοποιηθεί όλη η διαθέσιμη ενέργεια είτε για ανάπτυξη είτε για παραγωγή πρωτεΐνης αντίστοιχα ώστε να λειτουργούν αποδοτικότερα σε κάθε περίπτωση και να ελέγχονται με μεγάλη ακρίβεια τα διάφορα στάδια της καλλιέργειας.
- II. Η σχεδόν αποκλειστική ικανότητα της ζύμης αυτής να χρησιμοποιεί τη μεθανόλη ως πηγή άνθρακα προσφέρει μια εγγενή μέθοδο αποφυγής επιμολύνσεων της καλλιέργειας.
- III. Δυνατότητα χρήσης ενός επαγωγέα όπου τελευταίες τεχνολογικές εξελίξεις στην παραγωγή μεθανόλης από CO₂ μέσω τεχνικών πλάσματος, επιτρέπουν τη δημιουργία εξ ολοκλήρου πράσινων βιοδιεργασιών με βάση την *P. pastoris* που θα συμβάλλουν στην επίτευξη μιας πράσινης και κυκλικής οικονομίας.
- IV. Ταχεία ανάπτυξη των κυττάρων και υψηλά επίπεδα έκφρασης της ετερόλογης πρωτεΐνης.
- V. Εκτέλεση αρκετών μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων στις παραγόμενες πρωτεΐνες, όπως σωστή αναδίπλωση, σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών και γλυκοζυλιώσεις τύπου O- και N-, ώστε να επιτρέπεται η σύνθεση ακόμη και μερικών ανθρώπινων πρωτεϊνών.
- VI. Ελάχιστες εκ των ενδογενών πρωτεϊνών της ζύμης εκκρίνονται εξωκυτταρικά και κατορθώνεται έτσι η πλειονότητα των πρωτεϊνών που απεκκρίνονται στο θρεπτικό μέσο να είναι οι ετερόλογες. Αυτό πραγματοποιείται με την ενσωμάτωση στο πλασμίδιο κατάλληλων ακολουθιών που κωδικοποιούν το σήμα για εξωκυτταρική έκκριση (π.χ. το σήμα της οξικής φωσφατάσης της *P. pastoris*) πράγμα που διευκολύνει σημαντικά την παραλαβή και τον καθαρισμό της επιθυμητής πρωτεΐνης (κατιούσα διεργασία).
- VII. Ευκολία στην κλιμάκωση της διεργασίας λόγω αμελητέας μεταβολής της παραγωγικότητας κατά την μετάβαση από ανακινούμενες φιάλες σε υψηλής πυκνότητας ζυμωτήρες.

Βέβαια η χρήση της ζύμης αυτής δεν παύει να διακρίνεται και από μερικά μη αμελητέα μειονεκτήματα όπως [134]–[136]:

- I. Η μεθανόλη είναι μια εξαιρετικά εύφλεκτη ουσία και η αποθήκευση μεγάλης ποσότητας αυτής αποτελεί έναν σημαντικό κίνδυνο για μια μεγάλης κλίμακας βιοδιεργασία.
- II. Απαιτείται διαρκής έλεγχος των συνθηκών της διεργασίας, ο οποίος μάλιστα είναι αρκετά δύσκολος στην περίπτωση της συγκέντρωσης της μεθανόλης.
- III. Η χρήση δύο διαφορετικών πηγών άνθρακα αν και αυξάνει την αποδοτικότητα συνοδεύεται από απαιτητικές και ενεργοβόρες πρακτικές για την αλλαγή μεταξύ των δύο πηγών άνθρακα.
- IV. Υπάρχει πιθανότητα Ο-υπερογλυκοζυλίωσης όπου πραγματοποιείται μερικές φορές σε πρωτεΐνες που δεν γλυκοζυλιώνονται στον οργανισμό-προέλευση τους, ενώ παρουσιάζονται περιπτώσεις και Ν-υπεργλυκοζυλίωσης με την προσθήκη πολλών μορίων μανόζης στο μόριο.
- V. Πρωτεολυτική αποικοδόμηση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που εξαρτάται συνήθως από την αμινοξική ακολουθία των μορίων αυτών. Παρουσιάζεται υψηλότερη παραγωγή ενδο- και εξωκυτταρικών πρωτεασών παρουσία μεθανόλης, πιθανώς είτε λόγω της τοξικότητας της ίδιας της μεθανόλης είτε εξαιτίας της μετάβασης μεταξύ διαφορετικών πηγών άνθρακα.

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται για την γενετική τροποποίηση κυττάρων της *P. pastoris* διαθέτουν φυσικά τη γενική μορφή που απεικονίζεται στο Σχήμα 12. Σε αντίθεση με άλλους ξενιστές όπως το *E. coli* που μετασχηματίζονται μέσω θερμικού σοκ, τα κύτταρα της *P. pastoris* μετασχηματίζονται με μια διαφορετική μέθοδο. Αρχικά, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρειάζεται να γραμμικοποιηθούν μέσω κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων για να μπορέσουν να ενσωματωθούν στο χρωμόσωμα [135]. Η εισαγωγή έπειτα των πλασμιδίων εντός των κυττάρων πραγματοποιείται με την επιβολή ηλεκτρικών παλμών (ηλεκτροδιάτρηση) (Σχήμα 13). Έτσι, όλη η γενετική πληροφορία του πλασμιδίου προσαρτάται στο γονιδίωμα των κυττάρων και μάλιστα στη θέση του φυσιολογικού υποκινητή AOX1, όπου εισέρχεται το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο με αφετηρία τον δικό του υποκινητή AOX1 [137]. Επομένως, παρουσία επαγωγέα ενεργοποιούνται τα αντίστοιχα γονίδια και παράγεται η επιθυμητή πρωτεΐνη. Επίσης, παρέχεται συνήθως αντίσταση σε κάποιο αντιβιοτικό για την ευκολότερη διαλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων και το αντίστοιχο γονίδιο βρίσκεται σαφώς στη θέση του επιλέξιμου δείκτη· τα πιο διαδεδομένα αντιβιοτικά για τα κύτταρα της *P. pastoris* είναι η γενταμικίνη, η ζεοσίνη, βλαστικιδίνη και η αμπικιλίνη [135].



Σχήμα 13. Μέθοδος μετασχηματισμού κυττάρων της *P. pastoris* (προσαρμόστηκε από [135]).

1.4.3.1.2. Παράμετροι που καθορίζουν την ετερόλογη έκφραση ενζύμων

Όπως κάθε διεργασία, η ετερόλογη έκφραση ενζύμων σε κάποιο σύστημα-ξενιστή και δη στο σύστημα της ζύμης *Pichia pastoris* επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες είτε περιβαλλοντικούς είτε άλλης φύσεως. Ειδικά τα συστήματα της ετερόλογης έκφρασης είναι τόσο σύνθετα και πολύπλοκα που είναι πιθανό να επιδρούν σε αυτό πλήθος διαφορετικών παραμέτρων και μάλιστα να μπορούν να αναγνωριστούν και να ελεγχθούν μόνο λίγες εξ αυτών. Οι διεργασίες λοιπόν που σχεδιάζονται βάσει αυτών των συστημάτων απαιτούν συχνά αυστηρή ρύθμιση παραμέτρων

όπως η θερμοκρασία, ο ρυθμός ανάδευσης, η σύσταση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης, η συγκέντρωση του επαγωγέα αλλά και η συγκέντρωση απαραίτητων συμπληρωματικών ενώσεων. Η αναγνώριση και ο έλεγχος των διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν τη διεργασία αυτή απαιτεί κρίσιμο βήμα όχι μόνο για να μπορέσει να τεθεί η διεργασία σε βιομηχανική εφαρμογή αλλά και για να επιτευχθεί η βελτιστοποίηση της μέσω εύρεσης των κατάλληλων συνθηκών και τεχνικών λειτουργίας.

Οι κύριες παράμετροι που καθορίζουν την επιτυχή και αυξημένη έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών στη ζύμη *P. pastoris* συνοψίζονται ως εξής [134]–[136], [140]–[145]:

- I. Θερμοκρασία: το αρχικό στάδιο παραγωγής βιομάζας πραγματοποιείται γενικά στο θερμοκρασιακό εύρος 27-30 °C ενώ η επαγωγή στο εύρος 20-27 °C. Το τελευταίο εύρος αποτελεί την κύρια μεταβλητή για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής πρωτεϊνών και απαιτεί την εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας όπου παράγεται μεν ικανοποιητική ποσότητα ενζύμου, αποφεύγεται δε η πρωτεολυτική δραστηριότητα κατά το στάδιο της επαγωγής. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες περιορίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων που δεν είναι επιθυμητό αλλά τουναντίον μειώνουν την ενεργότητα των πιθανών πρωτεασών.
- II. pH: το pH του χρησιμοποιούμενου θρεπτικού μέσου επηρεάζει τόσο τη σταθερότητα των εκφραζόμενων πρωτεϊνών όσο και την πρωτεολυτική ενεργότητα. Η ζύμη *P. pastoris* μπορεί και αναπτύσσεται σε pH από 3,0 μέχρι 7,0 όμως έρευνες έχουν δείξει ότι οι βέλτιστες τιμές pH του μέσου καλλιέργειας είναι μεταξύ 5,5 και 7,0 όπου η πρωτεολυτική ενεργότητα είναι αρκετά περιορισμένη. Το εύρος οφείλεται ίσως στο γεγονός ότι δύο κύριες πρωτεάσες (ασπαρτική πρωτεάση και πρωτεάση σερίνης) που παράγει η ζύμη αυτή ενεργοποιούνται σε χαμηλές τιμές pH αλλά ο βαθμός πρωτεόλυσης εξαρτάται πάντα και από τη δομή της ετερόλογης πρωτεΐνης.
- III. Θρεπτικό μέσο: αποτελεί την πηγή άνθρακα, αζώτου και λοιπών συστατικών που χρειάζεται η ζύμη *P. pastoris* για να αναπτυχθεί. Οι πιο συνήθεις πηγές άνθρακα για την κυτταρική ανάπτυξη είναι η γλυκόζη και η γλυκερόλη ενώ οι πηγές αζώτου είναι η πεπτόνη, το εκχύλισμα ζύμης και το εκχύλισμα ζύμης αζωτούχας βάσης. Η χρήση του κατάλληλου θρεπτικού μέσου καθορίζει και την έκφραση της ετερόλογης πρωτεΐνης αφού επηρεάζει την ανάπτυξη και την ακεραιότητα των κυττάρων. Επίσης, ο εμπλουτισμός του θρεπτικού μέσου με θρεπτικά συστατικά και κυρίως σύνθετες πηγές αζώτου και αμινοξέων επιτελεί στον περιορισμό της πρωτεολυτικής ενεργότητας λόγω αποφυγής της εξάντλησης αυτών των συστατικών.
- IV. Αερισμός: ως αερόβιος μικροοργανισμός η *P. pastoris* απαιτεί σημαντικές ποσότητες αέρα και ειδικά επειδή μπορεί και αναπτύσσεται με σχετικά γρήγορους ρυθμούς.
- V. Συγκέντρωση μεθανόλης: τα επίπεδα μεθανόλης κατά το στάδιο της επαγωγής προτείνεται να είναι μεταξύ 0,5% έως 1%, ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις όπου συγκεντρώσεις 2,5% ή και 5% αποφέρουν υψηλότερη παραγωγικότητα για ορισμένες πρωτεΐνες. Η αύξηση συγκέντρωσης του επαγωγέα συνοδεύεται φυσικά από αύξηση της ετερόλογης έκφρασης όμως η μεθανόλη μπορεί να αποτελέσει τοξική σε υψηλές συγκεντρώσεις για τα κύτταρα λόγω είτε της τοξικότητας της ίδιας της ουσίας είτε της συσσώρευσης της παραγόμενης

φορμαλδεΰδης και του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Παρόλα αυτά χαμηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης ενισχύουν την πρωτεόλυση των ετερόλογων πρωτεϊνών.

- VI. Χρόνος επαγωγής: αποτελεί ακόμη μια μεταβλητή της οποίας η βέλτιστη τιμή έγκειται στον συμβιβασμό μεταξύ επιπέδων κυτταρικής ανάπτυξης και έκφρασης της ετερόλογης πρωτεΐνης. Όσο αυξάνεται ο χρόνος επαγωγής αυξάνεται φυσικά και η κυτταρική πυκνότητα εντός της καλλιέργειας, μολαταύτα η εκτεταμένη αύξηση του συνοδεύεται πολλές φορές και από μη αμελητέα πρωτεόλυση των παραγόμενων πρωτεϊνών. Ενδεικτικά, οι πιο συνηθεις χρόνοι επαγωγής κυμαίνονται μεταξύ 48 και 96 ωρών.
- VII. Παρουσία συμπαράγοντα ενζύμου: πολλά ένζυμα απαιτούν κάποια ουσία για να αποκτήσουν την πλήρη λειτουργικότητα τους· τέτοιες ουσίες είναι οι συμπαράγοντες. Για παράδειγμα, ένζυμα όπως οι μη ειδικές υπεροξυγενάσες και οι φαινολοξειδάσες χρειάζεται να ενωθούν με μόρια αίμης και χαλκού αντίστοιχα για να είναι λειτουργικά. Η προσθήκη αυτών των ουσιών είναι κρίσιμο να γίνεται κατά την έκφραση και παραγωγή αυτών των ενζύμων, δηλαδή στο θρεπτικό μέσο, για να είναι αποτελεσματικότερη η παραγωγή τους και αυξάνεται κατά συνέπεια η παραγωγικότητα της διεργασίας.
- VIII. Παρουσία ιχνοστοιχείων: συχνά η προσθήκη διαφόρων μετάλλων όπως σίδηρος, ψευδάργυρος, χαλκός, μαγγάνιο και κοβάλτιο στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας συμβάλλει στην επίτευξη ενισχυμένης κυτταρικής ανάπτυξης και ίσως σε βελτιωμένη έκφραση των ετερόλογων πρωτεϊνών.

Κάθε ετερόλογα εκφρασμένο ένζυμο απαιτεί με τη σειρά του και την υλοποίηση μιας διαδικασίας βελτιστοποίησης της παραγωγής του καθώς όπως είναι φυσικό ο οργανισμός-ξενιστής δεν είναι κατασκευασμένος για την αποδοτική έκφραση του. Η βελτιστοποίηση αυτή αποτελεί γενικά μια εργώδη διαδικασία κατά την οποία πρέπει να εξεταστούν πλήθος παραγόντων και η εκάστοτε επίδραση τους στη διεργασία. Οι κύριοι παράγοντες που χρειάζεται να εξεταστούν κάθε φορά αναφέρθηκαν παραπάνω και συνήθως μελετάται η διαφορά στην ποσότητα και την ενεργότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης λόγω μεταβολής κάποιας παραμέτρου της διεργασίας. Παρόλα αυτά η προσθήκη παρεμποδιστών των πρωτεασών και η αξιοποίηση στελεχών της *P. pastoris* που διακρίνονται από περιορισμένη παραγωγή πρωτεασών, αποτελούν τεχνικές που επηρεάζουν αποκλειστικά τη πρωτεολυτική ενεργότητα [136]. Υπάρχουν όμως και λοιπές μέθοδοι που μπορούν να επιφέρουν καλύτερη έκφραση και παραγωγικότητα του ετερόλογου ενζύμου· μερικές τέτοιες μέθοδοι είναι οι εξής [134], [141]:

- Βελτιστοποίηση κωδικονίων
- Εισαγωγή τεχνητών περιοχών γλυκοζυλίωσης
- Τροποποίηση του υποκινητή
- Τροποποίηση του πεπτιδικού σήματος για εξωκυτταρική έκκριση του ετερόλογου ενζύμου

2. Πειραματικό μέρος

2.1. Υλικά

2.1.1. Όργανα και συσκευές

Καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός όπως ογκομετρικοί κύλινδροι, κωνικές φιάλες, ποτήρια ζέσεως, χωνιά, υάλινες ράβδοι, σπαθίδες, μαγνητικοί αναδευτήρες, υάλινα μπουκάλια αποστείρωσης, δοχεία ζύγισης, σωλήνες Falcon των 15 mL και 20 mL, σωλήνες Eppendorf των 1,5 mL (με ή χωρίς κλείδωμα ασφαλείας) και 2 mL, αυτόματες πιπέτες, πολυπιπέτα, πιπέτες Pasteur, ρύγχη αυτόματων πιπετών, αποστειρωμένα τρυβλία Petri, αποστειρωμένες σύριγγες μιας χρήσης, αποστειρωμένα φίλτρα σύριγγας Mini Kleenpak 25 mm Syringe Filter w/ 0,2 µm Fluorodyne® EX Membrane της εταιρείας PALL Life Sciences και 96-well Microplates.

Πέρα από τα παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν επίσης και τα επόμενα εργαστηριακά όργανα και συσκευές:

- Αναλυτικοί ζυγοί ABS και ADJ, Kern & Sohn GmbH
- Αναδευτήρας δίνης (Vortex) RSLAB-6PRO
- Ανακινούμενοι επωαστήρες της εταιρείας ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co LTD
- Ανακινούμενοι και θερμαινόμενοι επωαστήρες για Eppendorfs Thermomixer Comfort, Eppendorf
- Αποστειρωμένος χώρος εργασίας UNIFLOW UV 1200
- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO
- Ζυγοί Mark 2060 και Mark 4065, BEL ENGINEERING
- Θερμαινόμενη και μαγνητική πλάκα ανάδευσης Model 692, nahita blue
- Όργανο μέτρησης pH MW151 MAX, Milwaukee
- Όργανο αέριας χρωματογραφίας GC-17A, SHIMADZU με ανιχνευτή FID
- Όργανο αέρας χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας GCMS-QP2020 NX
- Στήλη βαρύτητας TALON®, Bio-Rad με ρητίνη Talon ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου, Clontech
- Στήλη ρητίνης παραγωγής απιονισμένου νερού
- Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού Labaqua HPLC, Biosan
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης διαχωρισμού πρωτεϊνών Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad
- Συσκευή εφαρμογής διαφοράς δυναμικού Microcomputer Electrophoresis Power Supply E863, CONSORT
- Συσκευή διήθησης υπό κενό της εταιρείας PALL
- Συσκευή παραγωγής πάγου της εταιρείας Focchetti Scientific Refrigerators
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης MicroPulser, Bio-Rad

- Υπερκατάψυξη -86C FREEZER, Forma Scientific
- Φούρνος επώασης τρυβλίων WT Binder, TOTTLINGEN/Germany
- Φυγόκεντρος Eppendorf zentrifuge 3200, EPPENDORF
- Φωτόμετρο S-20 Spectrophotometer, BOECO Germany
- Φωτόμετρο για microplates SpectraMax ABS Plus, Molecular Devices
- Φωτόμετρο για microplates SpectraMax 250, Molecular Devices
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Centrifuge 4239R, ALC INTERNATIONAL
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος ROTANTA 460R, Hetlich ZENTRIFUGEN

2.1.2. Μελετώμενα ένζυμα

Τα ένζυμα που μελετήθηκαν και εκφράστηκαν κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων είναι τα εξής ευκαρυωτικής προέλευσης ένζυμα, για τα οποία συντέθηκαν τα κατάλληλα γονίδια από την εταιρεία GenScript και κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pPICZα A, αφού πρώτα πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση κωδικονίων για έκφραση στη ζύμη *Pichia pastoris*:

- I. **Asptra551984, Asptra579462 και Asptra585095:** είναι μη ειδικές υπεροξυγενάσες από τον νηματοειδή μύκητα *Aspergillus transmontanensis* και παρακάτω παρατίθενται οι αμινοξικές τους ακολουθίες. Από εδώ και στο εξής θα αναφέρονται ως A55, A57 και A58 αντίστοιχα.

Αμινοξική ακολουθία Asptra551984:

EFDPGGHEFRAPGPFDSRSPCPGLNALANHGYLPRDGKNLDYEMINKAAQAAYN
FESGFYIDAVNMVFEFNISTTNRPNETFHLRDLARHDTIEADGSLTRNDIYFGDDL
HFDATVWEPVAKDLGLDHYRDVDSFVTVDTAATAKATQNRVGLAMSANPQFNASE
LWKQFQYGTALYLLTLWDNDHNAVPKPWVKALMGEDRIPYKEGYTKGNVTKT
GKRIQAMNKAVRDAVGLKSDHHHHHHH

Αμινοξική ακολουθία Asptra579462:

EFQKIPWSPPGPDDVRSRSPVNLALANHDILQHDGKDITQQDTVRAMDALHVDE
ELSNLFAAALKTNLTPNATTFSLDDLHNNIIEHDGSLSRGDFYFGDNHSFNQTL
FDQVKSYSWTEPLIDLHLGAKARLAGVNRSKATNPTFDLSGFRLRFSYAQTATYILV
FGDKVSGTVNKTWIEYLFEKERLPIELGWEKRENPISTSDLDSMIERVMEATKEIE
NSQEMVDHHHHHHH

Αμινοξική ακολουθία Asptra585095:

EFRLPTEGQLSNRRQASIPAGHPPVHWKPAAGPDVRAPCPMLNTLANHGY
LPHDGKNITEHTIRALKVALNIEEELSQYLFQEALTTNPAENATTFSLNDL
SRHNILEHDASLRLDHYFGDNHDFNQKIFDQTRSYWDPVISVQAAANA
REARVKASNATNPTFALSELGLAFGYGETAAYIIILGNKTTGLVNRSWVEY
LFENERLPSELGWVKREDPISLSDLENMLQQVNVNATGNSEETKLDMIKRG

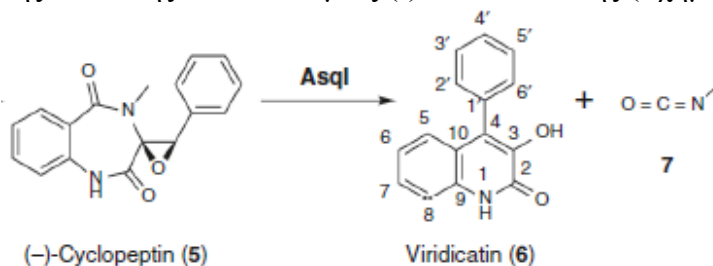
DFHIGRRSVDHHHHHH

- II. **Demetra:** όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα (1.4.2.1.1), είναι μια αρυλφορίνη -κατηγορία πρωτεϊνών παρουσών στην αιμολύμφη προνυμφών των εντόμων και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και τη μεταμόρφωση τους- η οποία απομονώθηκε από τον σίελο προνυμφών του εντόμου *Galleria mellonella* και αναγνωρίστηκε ως μια πρωτεΐνη με ενεργότητα φαινολοξειδάσης που ενώνεται με άτομα χαλκού [103], [146], [147]. Άλλωστε έχει αποδειχθεί ότι οι αρυλφορίνες συγγενούν φυλογενετικά με τις φαινολοξειδάσες και τις αιμοκυανίνες ενώ ανήκουν στην «υπεροικογένεια» των προφαινολοξειδάσων/εξαμερινών των αρθρόποδων. Αντίστοιχα παρατίθεται παρακάτω η αμινοξική της ακολουθία.

Αμινοξική ακολουθία Demetra:

EFFNLWFHCNSVTVYFLTEYFILNNLFAVDPNLVNIQKKVLLLLLENWKQVDPDDE
YYKIGKEYNIEANIESYTNREVVTEFLSLYKTGF TAKNQIFSIIYENQALEVRALYR
LFYYAKDFETFYKTA AFARVWLN EGQFIYAFYIAVIHRADTRGIVLPAPYEIWPEYF
VNSDVLAKINRIQMOKGLILPETAQYYGVLAKDNAYYFYANYS GPWPTYENNENL
LSYFIEDVAWNSYYYYFHSKLQFWEKGENAIGPFKERRGEIYYFIYQQILARYYLE
RLSNGLGEIPRFNWNDR LQAGYYPLLTTHQIPFAQRNGDY YLANDDNIEDIQFVD
SYEKTFLQFLQKGQFKAYKQEV DLYNSKSVNFVGN YWQANVDLYEKVPQRNYL
RSYEDAARRILGAAPRNSYENLNVPTALDFYQTS LRDPAFYQLYAKILDFINQYKE
YLEPYTQDVLHFVGVKINDVKVDKLVTYFEYFDWNATNAVYLSEQQLD TGSPSY
IVRQPRLNNQPFTVTIDIKSDVESEAVIKIFIGPKYDGNGYPIDLENNWVNLVEIDW
FTHKLTSGQNKIERKSENF FWFKEDSVSVSKIYELLNNGQVPRYMIEKFLLLPRRL
LLPRGTEGGVPFQFFVFPYQAPYKEWEP MKEFVVDNKPF GYPFDRPVTESYY
FTQPNMYFKDVYIYQEGEEYPY YTSYWSQNQVPKHVDHHHHHH

- III. **AsqI:** αποτελεί μια κυκλοπενάση η οποία αναγνωρίστηκε από το βιοσυνθετικό γονιδιακό σύμπλεγμα για τη σύνθεση ασποκοινολόνης (aspoquinolone – asq) από τον μύκητα *Aspergillus nidulans*, ενώ συμμετέχει και στον σχηματισμό του αντιβιοτικού viridicatin μέσω κατάλυσης της συστολής δακτυλίου μιας (-)-κυκλοπεπτίνης (Σχήμα 14) [148].



Σχήμα 14. Ενζυμική συστολή δακτυλίου κυκλοπεπτίνης για την παραγωγή της ένωσης viridicatin λόγω της δράσης του ενζύμου AsqI [148].

Η πρωτεΐνη αυτή είναι ομόλογη των αιμοκυανινών, ορισμένων μεταλλοενζύμων που περιέχουν δύο άτομα χαλκού τα οποία ενώνονται αντιστρεπτά με ένα μόριο οξυγόνου και αποτελούν τον κύριο τύπο μεταφορέων οξυγόνου στα ασπόνδυλα ζώα ενώ παρουσιάζουν και ενεργότητα φαινολοξειδάσης. Η αμινοξική ακολουθία της AsqI παρουσιάζεται κατωτέρω.

Αμινοξική ακολουθία AsqI:

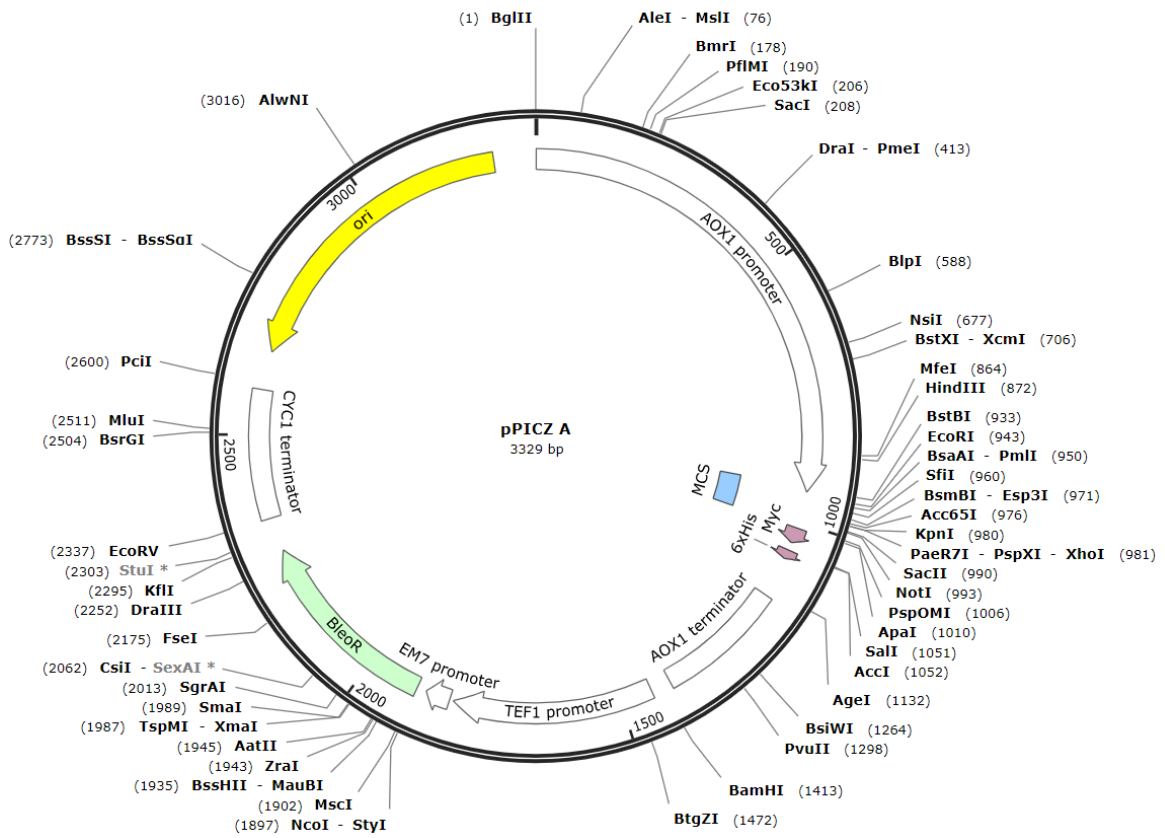
EFTCTLRDLNSLLEISSVRNDAQCCRCPAHNPSTAFAPTTKVRVSSDVRGIFALPVQ
KDHKPYNGLSPEHLETMKAVSLMLDAAGPKLEDGISKAKELLEERINPELMRDA
LGIYLTHSKDAQQRKIFPPPLKNHPFFSTKTRRPANVAGEICTADTLHGHALLSYW
RDDYDLNDSHYYYWHMVYRGAGGDN SKNVGDFDRHGEVFLYVHSQMVARYTE
SLCWSLPLVRPWNQYDDFLENGYAPISSLIEHYGGYPPFSTWYSIRNPDPDTLNV
TIPRARLEEWRDNIYAAIRKKGQFETTSKDKPLVLTRDNCLNFVGGILDAQYPSLNK
LLGGCSLDEERYGNLHNYGLGKFAEMAYRNKPGEKSPYGLTISNFGAPRDPFCWR
WYKHLQYYGRLAATRYPQDITAHRAEVVLSNLVVRLQDRSSPHYLDGHITTF LGP
PAVNFMESKAKLGHPEYEWNVQVKSCRRSPPSKENPQTLTLRLFIAAEDLMNDY
HSWIEMDRATVQLTDESAITKVRLDTDSSVARKMGNYGEPDPRYASAVFRHGWP
QNLMLPVGKVEGMPFVAFCIATDDGIPDPAPAPPFHYYHDPRGMGYPFNRWTQL
TEDSTGKASIRTIISNAELYPFITSTTFKIYRTTKFETKQIIQPTTVTWENTIRGYFKD
ADRACMRSEYGYDLYNYDHVMLHADAILDATASKRMPLQMGKYTQDNPDPEH
PLWTVKMCENFRAWLLNGCPKGTDPVDHHHHHHH

2.1.3. Ξενοστής και φορέας ετερόλογης έκφρασης ενζύμων

Η έκφραση των ενζύμων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ζυμομύκητα *Pichia pastoris* ως ξενοστή. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το αγρίου τύπου (wild-type) στέλεχος X33 του ζυμομύκητα. Ο πλασμιδιακός φορέας που αξιοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό των κυττάρων είναι ο pPICZα A μέσω του οποίου δίνεται και το σήμα για εξωκυτταρική έκφραση των ενζύμων από την αλληλουχία για τον παράγοντα α (α-factor). Τα μετασχηματισμένα κύτταρα θα αποδώσουν δε φαινότυπο υψηλού μεθυλότροφου ρυθμού Mut⁺ (Methanol utilization plus) και αντίσταση στο αντιβιοτικό ζεοσίνη.

Ο προαναφερόμενος φορέας αποτελείται από συνολικά 3493 βάσεις (δίχως το επιθυμητό γονίδιο προς κλωνοποίηση), ο οποίος παρουσιάζεται κατωτέρω στο Σχήμα 15 και αναλύονται παράλληλα οι κύριες περιοχές του:

- Υποκινητής 5' AOX1 – AOX1 (TT): είναι ο υποκινητής για την ετερόλογη έκφραση του ενζύμου και επάγεται ισχυρά παρουσία μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.
- AOX1 terminator: είναι η αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής του επιθυμητού γονιδίου που περιέχει τις περιοριστικές περιοχές Pme I, EcoRI, Sac II, Sall οι οποίες επιτρέπουν την γραμμικοποίηση του πλασμιδίου από ενδονουκλεάσες για την εισαγωγή του στο γονιδίωμα της *P. pastoris*.
- Σήμα έκκρισης παράγοντα α (α-factor): είναι γονίδιο πεπτιδίου-σήματος για την εξωκυτταρική έκκριση του ετερόλογου ενζύμου.
- Περιοχή πολυσύνδεσης (Multiple Cloning Site – MCS): περιέχει πολλαπλά σημεία ακολουθιών που αναγνωρίζονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες και λιγκάσες για την εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου
- Myc-tag και 6xHis-tag: προστίθενται οι ετικέτες αυτές στο τέλος της αμινοξικής ακολουθίας των ετερόλογων ενζύμων για την αποτελεσματική και εύκολη απομόνωση τους μέσω χρωματογραφίας συγγένειας με αντισώματα anti-myc ή με αλληλεπίδραση ακινητοποιημένου μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography – IMAC) όπου η ετικέτα 6xHis-tag αλληλεπιδρά με άτομα κοβαλτίου ή νικελίου.
- Υποκινητής TEF1: είναι υποκινητής για την έκφραση του γονιδίου αντίστασης σε ζεοσίνη για *P. pastoris* και *E. coli*.
- Υποκινητής EM7: είναι προκαρυωτικός υποκινητής για την έκφραση του γονιδίου αντίστασης σε ζεοσίνη.
- Γονίδιο αντίστασης σε ζεοσίνη (BleoR): προσδίδει τη δυνατότητα στα κύτταρα να αναπτύσσονται παρουσία ζεοσίνης και επιτρέπει την εύκολη διαλογή των επιτυχώς μετασχηματισμένων κυττάρων είτε είναι του *E. coli* είτε της *P. pastoris*. Προέρχεται από το βακτήριο *Streptoalloteichus hindustanus* και εκφράζει την σύνθεση μιας πρωτεΐνης που δεσμεύει τη ζεοσίνη και αναστέλλει τη διάσπαση του DNA [149].
- CYC1 terminator: είναι η αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής
- pUC ori: αποτελεί τη θέση έναρξης αντιγραφής σε *E. coli*.



Σχήμα 15. Λεπτομερής απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pPICZα A και των βασικών περιοχών του [150].

2.1.4. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες SIGMA-ALDRICH, CARLO ERBA REAGENTS, Fisher Chemical, Lach-Ner, Alfa-Aesar, PENTA Chemicals Unilimited, Condalab, Duchefa Biochemie, Chem-Lab NV και Applichem.

2.1.4.1. Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας

Η ανάπτυξη κυττάρων *E. coli* πραγματοποιείται στο θρεπτικό μέσο LB στο οποίο προστίθεται άγαρ όταν επιθυμείται η καλλιέργεια σε τρυβλία Petri μαζί με το αντιβιοτικό ζεοσίνη.

Πίνακας 3. Σύσταση θρεπτικού μέσου LB.

Luria-Bertani (LB)	
Συστατικό	Σύσταση (σε απιονισμένο νερό)
NaCl	1% w/v
Τρυπτόνη	1% w/v
Εκχύλισμα ζύμης	0,5% w/v
Άγαρ	1,5% w/v
Ζεοσίνη	25 µg/mL

Η ανάπτυξη κυττάρων *P. pastoris* πραγματοποιείται στο θρεπτικό μέσο YPD (Yeast extract Peptone Dextrose medium) στο οποίο προστίθεται άγαρ όταν επιθυμείται η καλλιέργεια σε τρυβλία Petri, παρουσία του αντιβιοτικού ζεοσίνη στα ανασυνδυασμένα κύτταρα και απουσία αυτού στα μη ανασυνδυασμένα X33. Επίσης, κατά τη διαδικασία του ανασυνδυασμού κυττάρων X33 με τον πλασμιδιακό φορέα παρασκευάζεται και το θρεπτικό μέσο YPDS (Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol medium) με άγαρ για καλλιέργειες σε τρυβλία Petri.

Πίνακας 4. Σύσταση θρεπτικού μέσου YPD.

YPD (Yeast extract Peptone Dextrose medium)	
Συστατικό	Σύσταση (σε απιονισμένο νερό)
Εκχύλισμα ζύμης	1% w/v
Πεπτόνη	2% w/v
Δεξτρόζη	2% w/v
Άγαρ	2% w/v
Ζεοσίνη	100 µg/mL

Πίνακας 5. Σύσταση θρεπτικού μέσου YPDS.

YPDS (Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol medium)	
Συστατικό	Σύσταση (σε απιονισμένο νερό)
Εκχύλισμα ζύμης	1% w/v
Πεπτόνη	2% w/v
Δεξτρόζη	2% w/v
Σορβιτόλη	1 M
Άγαρ	2% w/v

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για προκαλλιέργειες και καλλιέργειες της ζύμης *P. pastoris* είναι το BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium) και το BMMY (Buffered Methanol-complex Medium) αντίστοιχα. Σε αυτά τα θρεπτικά μέσα, πέρα από τα συνήθη συστατικά τους, εμπλουτίζονται και με διάφορα συμπληρωματικά συστατικά τα οποία παρέχουν τους απαραίτητους συμπαραγόντες και ιχνοστοιχεία, ουσίες κρίσιμες για την ορθή και αποδοτική έκφραση των ενζύμων σύμφωνα με συμβατικά πρωτόκολλα έκφρασης για το κάθε είδος ενζύμων. Για τις UPOs (A55, A57, A58) ο συμπαραγόντας παρέχεται μέσω διαλύματος αιμίνης (Hemin) ενός πρόδρομου μορίου της αίμης, ενώ στα μεταλλοένζυμα AsqI και Demetra ο συμπαραγόντας παρέχεται μέσω ενός διαλύματος θεικού χαλκού. Τα συστατικά που προστίθενται μόνο στις UPOs σημειώνονται με πράσινο χρώμα ενώ εκείνα που προστίθενται στα μεταλλοένζυμα με πορτοκαλί.

Πίνακας 6. Σύσταση του θρεπτικού μέσου BMGY.

BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium)	
Συστατικό	Σύσταση (σε απιονισμένο νερό)
Εκχύλισμα ζύμης	1% w/v
Πεπτόνη	2% w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (1M, pH=6,0)	10% v/v
Διάλυμα YNB 10x (aq)	10% v/v
Διάλυμα γλυκερόλης 10% (aq)	10% v/v
Διάλυμα Βιοτίνης 0,02% w/v (aq)	0,2% v/v
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (TES)	0,4% v/v
Διάλυμα αιμίνης 2mM (σε DMSO)	0,5% v/v
Διάλυμα θειικού χαλκού 25 mM (aq)	0,1% v/v

Πίνακας 7. Σύσταση του θρεπτικού μέσου BMMY.

BMMY (Buffered Methanol-complex Medium)	
Συστατικό	Σύσταση (σε απιονισμένο νερό)
Εκχύλισμα ζύμης	1% w/v
Πεπτόνη	2% w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (1M, pH=6,0)	10% v/v
Διάλυμα YNB 10x (aq)	10% v/v
Διάλυμα Βιοτίνης 0,02% w/v (aq)	0,2% v/v
Μεθανόλη	0,5% v/v

Διάλυμα ιχνοστοιχείων (TES)	0,4% v/v
Διάλυμα αιμίνης 2 mM (σε DMSO)	0,5% v/v
Διάλυμα θειικού χαλκού 50 mM (aq)	0,1% v/v

Επίσης, για τη μελέτη ενεργότητας των εκφρασμένων UPOs σε υπόστρωμα ABTS σε πηκτωμα, που ονομάζεται «ABTS Plate Assay», χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο MM (Minimal Methanol medium).

Πίνακας 8. Σύσταση θρεπτικού μέσου MM.

MM (Minimal Methanol medium)	
Συστατικό	Σύσταση (σε απιονισμένο νερό)
Άγαρ	1,5% w/v
Διάλυμα YNB 10x	10% v/v
Διάλυμα Βιοτίνης 0,02% w/v (aq)	0,2% v/v
Μεθανόλη	0,5% v/v
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (TES)	0,4% v/v
Διάλυμα αιμίνης 2 mM (σε DMSO)	0,5% v/v
Διάλυμα ABTS 20 mM (aq)	10% v/v

Τα διαλύματα YNB και TES που προστίθενται στα θρεπτικά μέσα BMGY και BMMY παρασκευάζονται σύμφωνα με τις ακόλουθες συνταγές:

Πίνακας 9. Σύσταση διαλύματος YNB 10x.

YNB 10x (Yeast Nitrogen Base)	
Συστατικό	Σύσταση (σε απιονισμένο νερό)
Εκχύλισμα ζύμης αζωτούχας βάσης χωρίς αμινοξέα	3,4% w/v
Θειικό αμμώνιο	10% w/v

Πίνακας 10. Σύσταση διαλύματος TES.

TES (Trace Elements Solution)	
Συστατικό	Σύσταση (σε υπερκάθαρο νερό)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	24,00 mM
NaI	0,53 mM
MnSO ₄ ·2H ₂ O	19,87 mM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10,00 mM
ZnCl ₂	10,00 mM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,83 mM
H ₃ BO ₃	0,32 mM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,10 mM
H ₂ SO ₄ 96% w/w	0,1% v/v

2.1.4.2. Ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα συνοδευόμενα από τα συστατικά και την τιμή pH τους.

Πίνακας 11. Σύσταση και pH των χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Ρυθμιστικό διάλυμα	Συστατικά	Συγκέντρωση	pH
Talon 10x	Tris NaCl HCl 1M (aq)	0,5 M 3 M Στάγδην προσθήκη για ρύθμιση pH	8,0
Citrate-Phosphate (C-P)	Κιτρικό οξύ Na ₂ HPO ₄	0,2 M 0,2 M	4,5

Citrate-Phosphate (C-P)	Κιτρικό οξύ	0,2 M	5,0
	Na ₂ HPO ₄	0,2 M	
Citrate-Phosphate (C-P)	Κιτρικό οξύ	0,2 M	6,0
	Na ₂ HPO ₄	0,2 M	
Sodium Phosphate	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,2 M	5,0
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,2 M	
Sodium Phosphate	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,2 M	6,0
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,2 M	
Tris-HCl	Tris	0,2 M	8,0
	HCl	20 mM	

2.1.4.3. Διαλύματα καθαρισμού παραγόμενων ενζύμων

Ο καθαρισμός και η απομόνωση των εκφρασμένων ενζύμων πραγματοποιούνταν σε στήλη βαρύτητας TALON[®] με ρητίνη Talon ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου και αξιοποιούνταν τα παρακάτω διαλύματα:

Πίνακας 12. Σύσταση διαλυμάτων για τον καθαρισμό των παραγόμενων ενζύμων

Διάλυμα	Συστατικά	Σύσταση
Απιονισμένο νερό	-	-
Αιθανόλη	Καθαρή αιθανόλη (≥99,8%)	20% v/v
	Απιονισμένο νερό	80% v/v
Ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1x	Ρυθμιστικό διάλυμα Talon 10x	10% v/v
	Απιονισμένο νερό	90% v/v
Διάλυμα ιμιδαζολίου	Ιμιδαζόλιο	5 mM – 200 mM
	Ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1x	100% v/v

2.1.4.4. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης ενζύμων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα του επόμενου πίνακα.

Πίνακας 13. Διαλύματα για τη μέθοδο SDS-PAGE και συστάσεις αυτών.

Διάλυμα	Συστατικά	Συστάσεις
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (SDS Running Buffer 10x)	Tris (pH=8,3) Γλυκίνη SDS	250 mM 1,92 M 1% w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (SDS Loading Buffer 5x)	Tris (pH=6,8) SDS Γλυκίνη β-μερκαπταιθανόλη μπλε της βρωμοθυμόλης 0,1%	312,5 mM 10% w/v 50% v/v 25% v/v 0,025% w/v
Διάλυμα χρώσης (Staining solution)	Coomasie Brilliant Blue Απιονισμένο νερό Μεθανόλη Οξικό οξύ	0,25% w/v 50% v/v 40% v/v 10% v/v
Διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution)	Απιονισμένο νερό Μεθανόλη Οξικό οξύ	70% v/v 20% v/v 10% v/v

Για την παρασκευή του χρησιμοποιούμενου πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου, η οποία αποτελείται από ένα πήκτωμα επιστοιβάσης και ένα πήκτωμα διαχωρισμού, κατά την οποία πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνταγές:

Πίνακας 14. Συστάσεις των γελών πολυακρυλαμιδίου για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών.

Πήκτωμα	Συστατικά	Σύσταση	
		Για 1 λεπτό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου	Για 1 παχύ πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου
Επιστοίβασης (Stacking gel) 12,5%	Υπερκάθαρο νερό 0,75 M Tris/SDS 0,2% (pH=8,8) 40% Δισακρυλαμίδιο TEMED 10% v/v Υπερθεϊκό αμμώνιο (aq) (APS)	0,75 mL 0,95 mL 0,19 mL 3,75 μL 12,5 μL	1,5 mL 1,9 mL 0,38 mL 7,5 μL 25 μL
Διαχωρισμού (Resolving gel) 12,5%	Υπερκάθαρο νερό 0,25 M Tris/SDS 0,2% (pH=6,8) 40% Δισακρυλαμίδιο TEMED 10% v/v Υπερθεϊκό αμμώνιο (aq) (APS)	0,9 mL 2,4 mL 1,47 mL 5 μL 25 μL	1,7 mL 4,7 mL 2,94 mL 10 μL 50 μL

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Βιοπληροφορικά εργαλεία

Έχοντας ως αφετηρία την αμινοξική ακολουθία των προς μελέτη ενζύμων χρειάστηκαν να αξιοποιηθούν κάποια λογισμικά βιοπληροφορικής ώστε να μπορέσουν να μελετηθούν ορισμένα χαρακτηριστικά τους είτε δομικά είτε λειτουργικά, να αναζητηθούν ένζυμα με τα οποία συγγενεύουν, καθώς και για να επιτευχθεί η ορθή έκφραση των ενζύμων αυτών. Τα λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα κάτωθι:

- Ο αλγόριθμος Standard Protein BLAST (blastp) του εργαλείου Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) του National Center for Biotechnology Information (NCBI) [151] για την διερεύνηση της ομολογίας πρωτεϊνών της παγκόσμιας πρωτεϊνικής βάσης δεδομένων ως προς μια αμινοξική ακολουθία. Στον αλγόριθμο αυτό εισάγεται ως αρχική πληροφορία η αμινοξική ακολουθία μιας πρωτεΐνης και συγκρίνεται με αλληλουχίες άλλων πρωτεϊνών που βρίσκονται στην παγκόσμια πρωτεϊνική βάση δεδομένων. Αποτελέσματα του αλγορίθμου είναι η ομολογία και το ποσοστό κάλυψης με άλλες αλληλουχίες οι οποίες αποδίδονται κατά φθίνουσα τιμή των μεγεθών αυτών. Βάσει των αποτελεσμάτων μπορούν να αναχθούν συμπεράσματα για τη λειτουργία και την ταξινόμια της πρωτεΐνης που αναλύθηκε, ενώ μπορούν να βρεθούν λοιπές πρωτεΐνες που έχουν παρόμοια δομή και δράση.
- Το υπολογιστικό εργαλείο ProtParam της διαδικτυακής βιοπληροφορικής πλατφόρμας ExPASy του Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) για την εύρεση φυσικοχημικών ιδιοτήτων μιας πρωτεΐνης παρέχοντας ως δεδομένο την αμινοξική της ακολουθία [152]. Συγκεκριμένα, προβλέπεται το μοριακό βάρος, το ισοηλεκτρικό σημείο, ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας και ο χρόνος ημιζωής της προς ανάλυση πρωτεΐνης.
- Ο αλγόριθμος τεχνητής νοημοσύνης AlphaFold της DeepMind για την πρόβλεψη των τρισδιάστατων δομών των πρωτεϊνών. Παρέχεται ως κύρια πληροφορία η αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης και παριστάνεται έπειτα η πιθανή τρισδιάστατη δομή της με το εκάστοτε εύρος αξιοπιστίας του αλγορίθμου για τα διάφορα τμήματα που την απαρτίζουν.
- Το λογισμικό PyMOL με το οποίο μπορούν να αναπαρασταθούν οι τρισδιάστατες δομές πρωτεϊνών και τα επί μέρους τμήματα τους. Είναι συμβατό κυρίως με αρχεία τύπου .pdb τα οποία παρέχουν την τρισδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης, δομές οι οποίες έχουν προκύψει είτε μέσω κρυσταλλογραφίας είτε ως αποτέλεσμα του αλγορίθμου AlphaFold της DeepMind.

2.2.2. Πολλαπλασιασμός και απομόνωση πλασμιδιακών φορέων

Ορισμένες από τις πειραματικές μεθόδους που πραγματοποιήθηκαν, όπως η μέθοδος που περιγράφεται σε αυτήν την ενότητα, περιλάμβαναν την ανάπτυξη καλλιιεργειών μικροοργανισμών,

ο χειρισμός των οποίων χρειάζεται να γίνεται υπό ασηπτικές συνθήκες· οι ασηπτικές συνθήκες επιτυγχάνονται με την εκτέλεση των αντίστοιχων μεθοδολογιών σε ειδικά αποστειρωμένο χώρο εργασίας UNIFLOW UV1200 με απαγωγό πλησίον φλόγας από εστία υγραερίου. Επίσης, τα απαιτούμενα ρύγγη αυτοματοποιημένων πιπετών μεταβλητού όγκου καθώς και τα πιθανά απαραίτητα σκεύη και θρεπτικά μέσα αποστειρώνονται στα αυτόκαυστα Labo Autoclave, SANYO, εντός των οποίων τα θρεπτικά μέσα τοποθετούνται σε μπουκάλια αποστείρωσης.

Πρώτο βήμα στη διεξαχθείσα πειραματική διαδικασία αποτελεί ο πολλαπλασιασμός των πλασμιδιακών φορέων σε κύτταρα *E. coli* TOP10. Η αρχική ποσότητα των πλασμιδίων είναι αρκετά μικρή, και γι' αυτό απαιτείται η παραγωγή επιπλέον ποσότητας γενετικού υλικού για να υπάρχει η δυνατότητα διεξαγωγής πλήθους μελλοντικών πειραμάτων.

2.2.2.1. Μετασηματισμός κυττάρων *E. coli*

Αρχικά, χρειάζεται να εισαχθεί το πλασμίδιο εντός των βακτηριακών κυττάρων με την εφαρμογή θερμικού σοκ για να μπορέσει να αντιγραφεί κατά την πολλαπλασιασμό τους, δηλαδή να μετασηματιστούν τα κύτταρα.

Ο μετασηματισμός γίνεται ως εξής:

1. Για κάθε διαφορετικό φορέα παρασκευάζονται 25 mL θρεπτικού μέσου LB με άγαρ και 1 mL LB χωρίς άγαρ και αποστειρώνονται στους 121 °C για 20 min.
2. Το θρεπτικό LB με άγαρ αφήνεται να κρυώσει περίπου μέχρι τους 60 °C και προστίθενται 62,5 μL ζεοσίνης με συγκέντρωση 100 mg/mL και μοιράζεται σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri. (Η ζεοσίνη είναι γλυκοπεπτίδιο χηλικώς συμπλοκοποιημένο με χαλκό, η οποία είναι θερμοευαίσθητη, και προστίθεται στο θρεπτικό αφού κρυώσει, δίχως να πήξει βέβαια, για να μην απενεργοποιηθεί εξαιτίας υψηλής θερμοκρασίας)
3. Προστίθενται 0,8 μL του διαλύματος πλασμιδίου σε 50 μL κυττάρων TOP10, τα οποία είναι αποθηκευμένα σε Eppendorf των 1,5 mL σε υπερκατάψυξη στους -80 °C.
4. Το Eppendorf με τα κύτταρα και το πλασμίδιο επωάζονται σε παγόλουτρο για 30 min. (Κατά την επώαση αυτή το αρνητικά φορτισμένο πλασμίδιο προσεγγίζει την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία έχει φορτιστεί θετικά με τη χρήση κατάλληλων χημικών)
5. Το Eppendorf μεταφέρεται ταχέως σε ανακινούμενο και θερμαινόμενο επωαστήριο Eppendorf των 1,5 mL στους 42 °C για 80 s και μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος αυτού μεταφέρονται πάλι ταχέως στο αρχικό παγόλουτρο. (Αυτό είναι το στάδιο εισαγωγής του πλασμιδίου εντός των κυττάρων κατά τη διάνοιξη των πόρων τους λόγω της απότομης μεταβολής θερμοκρασίας από τους 4 °C στους 42 °C)
6. Προστίθενται 150 μL LB χωρίς άγαρ στο Eppendorf και τοποθετείται έπειτα σε ανακινούμενο και θερμαινόμενο επωαστήριο Eppendorf των 1,5 mL σε θερμοκρασία 37 °C για 1 h και ρυθμό ανάδευσης 500 rpm.

7. Το περιεχόμενο του Eppendorf ($\approx 200 \mu\text{L}$) στρώνεται στο τρυβλίο Petri που περιέχει το πηγμένο πια θρεπτικό LB με τη ζεοσίνη. Το στρώσιμο πραγματοποιείται με τη βοήθεια αποστειρωμένου μεταλλικού διαμοιραστήρα.
8. Το τρυβλίο επωάζεται στους 37°C σε επωαστήρα για 17-20 h (overnight).

2.2.2.2. Καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli*

Για τη παραγωγή ποσότητας των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες όγκου 5 mL των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli*, μία για κάθε διαφορετικό πλασμίδιο, και ακολουθούν τα κατωτέρω βήματα:

1. Παρασκευάζεται 15 mL θρεπτικού μέσο LB για κάθε πλασμίδιο και αποστειρώνεται στους 121°C για 20 min.
2. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Sterilin των 20 mL τοποθετούνται 5 mL του θρεπτικού LB (δηλαδή 3 Sterilin για κάθε πλασμίδιο) και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ζεοσίνης 100 mg/mL.
3. Από το αντίστοιχο τρυβλίο Petri με τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* λαμβάνεται μια μεμονωμένη διακριτή αποικία με ένα ρύγχος πιπέτας μεταβλητού όγκου και απορρίπτεται το ρύγχος εντός του σωληναρίου Sterilin.
4. Το Sterilin τοποθετείται για 16-20 h σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 37°C και ρυθμό ανάδευσης 180 rpm.

2.2.2.3. Απομόνωση πλασμιδίου από τις καλλιέργειες *E. coli*

Σε αυτό το στάδιο απαιτείται η λήψη του καθαρού πλασμιδίου από το εσωτερικό των κυττάρων των καλλιεργειών. Η διαδικασία πραγματοποιείται μέσω ενός έτοιμου Plasmid Extraction kit με το εμπορικό όνομα «NucleoSpin[®] Plasmid» της εταιρείας MACHEREY-NAGEL που παρέχει τις απαραίτητες οδηγίες για την απομόνωση πλασμιδίων καθώς και τα απαραίτητα ρυθμιστικά διαλύματα. Συγκεκριμένα, τα βήματα που περιλαμβάνει είναι η λύση των κυττάρων *E. coli* με τρία είδη επιφανειοδραστικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, ο καθαρισμός του υγρού της λύσης, η δέσμευση και η έκλυση του γενετικού υλικού με την προσθήκη ρυθμιστικών διαλυμάτων και συνοδευόμενη από φυγοκέντρησεις σε ειδική στήλη δέσμευσης NucleoSpin[®] Plasmid/Plasmid (NoLid) η οποία παρέχεται. Τελικά, προκύπτουν 3 διαλύματα των 50 μL για κάθε διαφορετικό πλασμιδιακό φορέα, τα οποία αποθηκεύονται σε κατάψυξη στους -20°C .

2.2.3. Μετασχηματισμός κυττάρων της ζύμης *P. pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση

Για να μπορέσει όμως να πραγματοποιηθεί η ετερόλογη έκφραση των επιθυμητών ενζύμων σε καλλιέργειες κυττάρων της *P. pastoris* χρειάζεται πρώτα να μετασχηματιστούν καταλλήλως τα κύτταρα αυτά ώστε να διαθέτουν τα απαραίτητα γονίδια που κωδικοποιούν την έκφραση αυτή καθώς και ορισμένες δευτερεύουσες, αλλά ιδίως σημαντικές, λειτουργίες. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιείται με την εισαγωγή των διαθέσιμων πλασμιδίων εντός του γονιδιώματος στελεχών X33 της *P. pastoris* μέσω πρώτα γραμμικοποίησης των πλασμιδίων και, έπειτα, με κατάλληλη προετοιμασία επιδεικτικών κυττάρων και ηλεκτροδιάτρηση αυτών.

2.2.3.1. Γραμμικοποίηση πλασμιδίων

Η εισαγωγή των ξένων γονιδίων, που υπάρχουν στο πλασμίδιο, εντός του γονιδιώματος των κυττάρων της *P. pastoris* απαιτεί τη γραμμικοποίηση των πλασμιδιακών φορέων, δηλαδή τη διάνοιξη των κυκλικών αυτών φορέων μέσω κατάλληλου περιοριστικού ενζύμου. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι δε η περιοριστική ενδονουκλεάση *SacI* και πραγματοποιούνται τα εξής βήματα:

1. Για κάθε διαφορετικό γονίδιο λαμβάνονται 80 μL του παραγόμενου γενετικού υλικού των προηγούμενων σταδίων και προστίθενται σε ειδικό σωληνάκι για PCR (PCR tube).
2. Προστίθενται έπειτα στα 80 μL κάθε γονιδίου 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλο για τη βέλτιστη λειτουργία του περιοριστικού ενζύμου (παρέχεται από την εταιρεία συνοδευτικά του ενζύμου), 8 μL mQ H_2O και 2 μL της ενδονουκλεάσης *SacI* με αυτή τη σειρά.
3. Τα PCR tubes επωάζονται για 3 h στους 37 °C σε όργανο PCR για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση γραμμικοποίησης.
4. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το περιεχόμενο των PCR tubes καθαρίζεται με ειδικό CleanUp kit για να ληφθούν μόνο τα γραμμικοποιημένα πλασμίδια και να ξεπλυθούν από το ρυθμιστικό διάλυμα και τα ένζυμα της αντίδρασης.
5. Το υγρό που περιέχει πια καθαρό το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο αποθηκεύεται σε κατάψυξη και δείγμα αυτού υφίσταται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί η ορθή γραμμικοποίηση του.

2.2.3.2. Ηλεκτροφόρηση γραμμικοποιημένων πλασμιδίων σε πήκτωμα αγαρόζης

Για να επιβεβαιωθεί ότι τα γενετικά υλικά που απομονώθηκαν στο προηγούμενο στάδιο αποτελούν τα επιθυμητά πλασμίδια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση αυτών σε πήκτωμα αγαρόζης κατά την οποία θα φανερωθεί το μοριακό βάρος τους. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα επόμενα:

1. Παρασκευάζεται το πήκτωμα αγαρόζης με την διάλυση 0,5 g αγαρόζης σε 50 mL TBE (Tris 0,1 M, Βορικό οξύ 0,1 M και EDTA 0,2 mM). Η πλήρης διάλυση επιτυγχάνεται με τη θέρμανση του μείγματος σε θερμαινόμενη πλάκα.
2. Αφήνεται να ψυχθεί το διάλυμα αγαρόζης, χωρίς να στερεοποιηθεί, και προστίθεται έπειτα 4 μ L χρωστικής Midori Green.
3. Στήνεται η διάταξη για την ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης και τοποθετείται το κατάλληλο χτενάκι το οποίο σχηματίζει κοιλότητες στο πήκτωμα όπου θα εισαχθούν τα δείγματα γενετικού υλικού.
4. Αποχύνεται εντός της διάταξης το διάλυμα αγαρόζης και αφήνεται να πήξει για περίπου 20 min.
5. Από κάθε δείγμα DNA λαμβάνονται 5 μ L, τα οποία αναμειγνύονται με 8,5 μ L mQ H₂O και 1,5 μ L ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer 10x), προς τελικό όγκο 15 μ L δείγματος.
6. Πριν την εισαγωγή των δειγμάτων αφαιρείται το χτενάκι και τότε φορτώνονται τα δείγματα στις σχηματισμένες κοιλότητες μαζί με έναν δείκτη ζευγών βάσεων FastGene 1kb DNA Marker Plus (προμηθεύεται από την εταιρεία NIPPON Genetics EUROPE GmbH).
7. Συμπληρώνεται η διάταξη και εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού ίση με 50 V για 30~60 min, όπου τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA κινούνται προς την άνοδο.
8. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα ακτινοβολείται με υπεριώδη ακτινοβολία και φανερώνονται οι μπάντες που αντιστοιχούν στο γενετικό υλικό των δειγμάτων. Αυτές συγκρίνονται με τις μπάντες του δείκτη και επιβεβαιώνεται ο αριθμός ζευγών βάσεων τους. Επιθυμείται η παρουσία μίας μπάντας σε κάθε δείγμα διότι η εμφάνιση επιπλέον μπαντών σημαίνει ότι υπάρχει γενετικό υλικό που είτε δεν περιέχει το επιθυμητό γονίδιο είτε το περιέχει σε πολλαπλότητα είτε περιέχει λοιπές προσμίξεις.

2.2.3.3. Προετοιμασία και ηλεκτροδιάτρηση επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*

Για να μπορέσει να γίνει η έκφραση των επιθυμητών ενζύμων χρειάζεται να μετασχηματιστούν τα X33 κύτταρα της ζύμης *P. pastoris* με τα πλασμίδια που παρήχθησαν στα προηγούμενα στάδια. Χρειάζεται να επανασημειωθεί ότι ο μετασχηματισμός κυττάρων της συγκεκριμένης ζύμης πραγματοποιείται με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου) αφού τα κύτταρα γίνουν καταλλήλως επιδεκτικά για να λάβουν το ξένο γονίδιο. Ακολουθήθηκε λοιπόν η παρακάτω πειραματική πορεία:

1. Παρασκευάζονται 50 mL YPD για κάθε επιθυμητή προκαλλιέργεια και 300 mL YPD για κάθε καλλιέργεια, τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 250 mL και του 1 L αντίστοιχα και αποστειρώνονται στους 109 °C για 40 min.
2. Με ένα ρύγχος πιπέτας μεταβλητού όγκου λαμβάνεται ποσότητα κυττάρων από ένα τρυβλίο Petri όπου έχουν αναπτυχθεί κύτταρα X33 και απορρίπτεται εντός της κωνικής φιάλης των 250 mL.

3. Η εμβολιασμένη πια καλλιέργεια τοποθετείται σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 30 °C και ρυθμό ανάδευσης 180 rpm overnight.
4. Την επόμενη μέρα λαμβάνονται 10 mL από τις προκαλλιέργειες των 50 mL και χρησιμοποιούνται για να εμβολιαστούν οι κωνικές φιάλες του 1 L που περιέχουν 300 mL θρεπτικού μέσου. Αυτές επωάζονται στις ίδιες συνθήκες για περίπου 3~4 h μέχρις ότου να επιτευχθεί οπτική πυκνότητα 1,3~1,6 στα 600 nm.
5. Παρασκευάζονται 50 mL θρεπτικού μέσου YPDS με άγαρ και 20 mL σορβιτόλης 1 M για κάθε διαφορετικό γονίδιο. Αυτά αποστειρώνονται στους 109 °C για 40 min μαζί με 1 L mQ H₂O και όλα τα απαραίτητα σκεύη που θα χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. (Μετά την αποστείρωση το mQ H₂O και η σορβιτόλη τοποθετούνται σε πάγο διότι θα χρησιμοποιηθούν για επαναιώρηση κυττάρων και πρέπει να είναι προψυγμένα)
6. Μετρίεται η οπτική πυκνότητα λαμβάνοντας 1 mL δείγμα από τις καλλιέργειες μετά το πέρας της 3^{ης} ώρας επώασης και αραιώνοντας το 4 φορές προσθέτοντας 250 μL αυτού σε 750 μL dH₂O. Μετρίεται έπειτα η οπτική του πυκνότητα στα 600 nm στο φωτόμετρο S-20 Spectrophotometer και ανάγεται η κανονική τιμή προ αραιώσης.
7. Αν η οπτική πυκνότητα βρίσκεται εντός του επιθυμητού εύρους (1,3-1,6), πραγματοποιούνται οι εξής φυγοκεντρήσεις του υγρού των καλλιεργιών στην ψυχόμενη φυγόκεντρο RO-TANTA 460R στα 4500 rpm για 20 min και στους 4 °C:
 - 7.1. Αποχύνεται το υγρό καλλιέργειας σε ειδικά δοχείο της ψυχόμενης φυγοκέντρου και φυγοκεντρείται.
 - 7.2. Απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 150 mL προψυγμένου mQ H₂O και επαναφυγοκεντρούνται.
 - 7.3. Απορρίπτεται το υπερκείμενο, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 150 mL προψυγμένου mQ H₂O για ακόμη μια φορά και επαναφυγοκεντρούνται.
 - 7.4. Απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό, τα κύτταρα επαναιωρούνται τώρα σε 12 mL προψυγμένης σορβιτόλης 1M και αφού μεταφερθούν σε αποστειρωμένα Falcon των 50 mL επαναφυγοκεντρούνται.
 - 7.5. Απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό και τα κύτταρα επαναιωρούνται για τελευταία φορά σε 600 μL προψυγμένης σορβιτόλης 1 M και μεταφέρονται τελικώς σε Eppendorf των 1,5 mL.

Μετά το πέρας της διαδικασίας τα κύτταρα X33 έχουν γίνει πλέον καταλλήλως επιδεκτικά για να δεχθούν το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο.

8. Πραγματοποιείται εν συνεχεία η διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης για το καθένα γονίδιο ως εξής:
 - 8.1. Λαμβάνονται 80 μL των επιδεκτικών πλέον κυττάρων X33 αναμειγνύονται με 30 μL του γραμμικοποιημένου πλασμιδίου σε νέο Eppendorf των 1,5 mL.

- 8.2. Τα 110 μL υγρού κυττάρων και πλασμιδίου μεταφέρονται σε μια ειδική κυψελίδα του οργάνου ηλεκτροδιάτρησης και αφήνεται για επώαση στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 5 min.
 - 8.3. Εισάγεται η κυψελίδα στο όργανο MicroPulser, Bio-Rad όπου εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο και γίνεται η ηλεκτροδιάτρηση του πλασμιδίου εντός των κυττάρων,
 - 8.4. Προστίθεται έπειτα στο υγρό 1 mL προψυγμένης σορβιτόλης 1 M και το περιεχόμενο μεταφέρεται σε Falcon των 15 mL, το οποίο επωάζεται στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1~2 h.
9. Από τα διάλυματα που προέκυψαν για τα διάφορα γονίδια μετά την ηλεκτροδιάτρηση, λαμβάνονται 400 μL για κάθε γονίδιο, εκ των οποίων μοιράζονται και στρώνονται 100 μL σε 1 τρυβλίο Petri και 300 μL σε άλλο τρυβλίο Petri που περιέχουν στερεό θρεπτικό μέσο YPDS με άγαρ και κατάλληλη ποσότητα ζεοσίνης 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ προς τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Προκύπτουν έτσι δύο τρυβλία για κάθε γονίδιο.
 10. Τα τρυβλία Petri επωάζονται στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 3~4 μέρες.
 11. Στη συνέχεια 8 από τις αποικίες των μετασηματισμένων κυττάρων κάθε τρυβλίου επανακαλλιεργούνται σε νέο τρυβλίο το οποίο είναι χωρισμένο σε 8 περιοχές και η κυτταρική ποσότητα της μιας αποικίας απλώνεται κατά μήκος της επιφάνειας της εκάστοτε περιοχής. Τα νέα τρυβλία επωάζονται στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1~2 μέρες.

2.2.4. Αποθήκευση μετασχηματισμένων κυττάρων σε γλυκερόλη (Glycerol Stock)

Το Glycerol Stock αποτελεί μια μέθοδο αποθήκευσης μετασχηματισμένων κυττάρων *P. pastoris* και επιτρέπει τη λήψη κυτταρικής ποσότητας από κατεψυγμένα κυτταρικά διαλύματα για τον εμβολιασμό τρυβλίων Petri. Έτσι, όταν έχει επιτευχθεί ορθός μετασχηματισμός των κυττάρων της *P. pastoris* είναι εφικτό να μην χρειαστεί να επαναληφθεί αυτή η εργώδης διαδικασία και να διευκολυνθούν αρκετά οι μελλοντικές διεργασίες ετερόλογης έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

Αποτελεί δε μια διήμερη διαδικασία, όπου την πρώτη μέρα παρασκευάζονται προκαλλιέργειες των 50 mL με θρεπτικό μέσο YPD και εμβολιάζονται με το επιθυμητό μετασχηματισμένο στέλεχος. Αυτές οι προκαλλιέργειες υπόκεινται σε overnight επώαση σε ανακινούμενο επωαστήριο στους 30 °C και με ρυθμό ανάδευσης 180 rpm. Την επόμενη μέρα παρασκευάζονται 50 mL YPD και 50 mL γλυκερόλης (aq) 10% w/v, τα οποία αποστειρώνονται στους 109 °C για 40 min παράλληλα με Falcon των 50 mL και Eppendorf των 1,5 mL. Επιπλέον, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των προκαλλιεργιών στα 600 nm και υπολογίζεται ο κατάλληλος όγκος προκαλλιέργειας που πρέπει να φυγοκεντρηθεί ώστε να υπάρχει οπτική πυκνότητα ίση με 100 στον επιθυμητό όγκο διαλύματος YPD και γλυκερόλης (10% w/v aq) 15% v/v. Δηλαδή για $OD_{600\text{ nm}}(1:50) = 0,5$ τότε η πραγματική οπτική πυκνότητα της προκαλλιέργειας είναι $OD_{600\text{ nm}} = 25$. Άρα για τελικό $OD_{600\text{ nm}} = 100$ σε τελικό επιθυμητό όγκο των 10 mL ισχύει ότι:

$$\frac{OD_{600\text{ nm}}(\text{αρχ})}{OD_{600\text{ nm}}(\text{τελ})} = \frac{V_{\text{glycerol stock}}}{V_{\text{προκαλλιέργειας}}} \Rightarrow \frac{25}{100} = \frac{10\text{ mL}}{V_{\text{προκαλλιέργειας}}} \Rightarrow$$
$$V_{\text{προκαλλιέργειας}} = 40\text{ mL}$$

Έτσι, λαμβάνονται 40 mL της προκαλλιέργειας σε αποστειρωμένο Falcon των 50 mL και έπειτα φυγοκεντρώνται στην ψυχόμενη φυγόκεντρο ROTANTA 460R υπό 4500 rpm για 20 min. Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται εντός του ειδικά αποστειρωμένου χώρου εργασίας και τα κύτταρα, τα οποία καταλαμβάνουν όγκο περίπου των 2 mL, επαναιωρούνται σε 6,5 mL YPD και 1,5 mL γλυκερόλης 10% w/v (aq) για να επιτευχθεί τελικός όγκος 10 mL. Το μείγμα μοιράζεται πλέον ανά 1 mL σε αποστειρωμένα Eppendorf των 1,5 mL, τα οποία αποθηκεύονται τελικώς σε υπερκατάψυξη στους -80 °C. Αν πραγματοποιείται δε αυτή η διαδικασία για περισσότερα του ενός ενζύμου, που σημαίνει ότι υπάρχουν περισσότερες της μίας προκαλλιέργειες, τότε ολοκληρώνονται ξεχωριστά για κάθε ένζυμο η επαναίωρηση των κυττάρων, τα μοίρασμα του μείγματος και η αποθήκευση του ώστε να περιοριστεί όσο το δυνατόν περισσότερο η παρουσία του μείγματος κυττάρων-γλυκερόλης εκτός υπερκατάψυξης και κατ' επέκταση η ανάπτυξη των κυττάρων εντός του μείγματος.

Αν επιθυμείται η παρασκευή τελικού μείγματος μικρότερου όγκου προσαρμόζονται ανάλογα οι υπολογισμοί και οι όγκοι των συστατικών του.

2.2.5. Ετερόλογη έκφραση ενζύμων στον ξενιστή *P. pastoris*

Πριν την επεξήγηση των διαφορετικών ειδικών μεθοδολογιών κρίθηκε απαραίτητο να περιγραφούν πρώτα οι κύριες μέθοδοι ανάπτυξης, επαγωγής των κυττάρων καθώς και η συνολική κατιούσα διεργασία του καθαρισμού και απομόνωσης των επιθυμητών ενζύμων, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν εκτενώς κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης και μάλιστα στην πλειονότητα των διαφόρων πειραματικών μεθοδολογιών. Γι' αυτό αναλύονται παρακάτω οι κύριες αυτές μέθοδοι.

Παρασκευή και εμβολιασμός τρυβλίων για τον ξενιστή *P. pastoris*

Για την παρασκευή τρυβλίων ανάπτυξης κυττάρων της ζύμης *P. pastoris* χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο YPD με άγαρ και ζεοσίνη όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο (2.1.4.1). Συγκεκριμένα, παρασκευάζονται 25 mL YPD με άγαρ για κάθε τρυβλίο που επιθυμείται να παρασκευαστεί με ζύγιση των κατάλληλων συστατικών (πλην της ζεοσίνης) και την ύστερη διάλυση τους στην αντίστοιχη ποσότητα απιονισμένου νερού (dH₂O). Το ανακυπτόμενο διάλυμα τοποθετείται σε κατάλληλο μπουκάλι αποστείρωσης και αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο στους 109 °C για 40 min. Μετά το πέρας της αποστείρωσης, το μπουκάλι αποστείρωσης που περιέχει το YPD τοποθετείται στον ειδικά αποστειρωμένο χώρο και αφήνεται να κρυώσει υπό θερμοκρασία δωματίου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για να προστεθεί η ζεοσίνη στο θρεπτικό μέσο θα πρέπει αυτό να έχει θερμοκρασία μικρότερη των 60 °C για να αποφευχθεί η απενεργοποίηση της ζεοσίνης χωρίς όμως να κρυώσει σε τέτοιο βαθμό ώστε να έχει λάβει μορφή πήγματος λόγω της παρουσίας άγαρ. Όταν έχει φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία το θρεπτικό, προσθέτονται 100 μL ζεοσίνης 100 mg/mL ανά 10 mL θρεπτικού (για να επιτευχθεί η τελική συγκέντρωση των 100 μg/mL) και η οποία έχει προηγουμένως αποψυχθεί καθώς αποθηκεύεται σε κατάψυξη και βρίσκεται σε στερεή μορφή. Μετά την προσθήκη της ζεοσίνης αποχύνεται το YPD σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri μέχρις ότου να καλυφθεί η επιφάνεια του τρυβλίου (≈25 mL). Αφήνεται έπειτα το τρυβλίο εντός του αποστειρωμένου χώρου για να πήξει το θρεπτικό μέσο και να στερεοποιηθεί. Ύστερα πραγματοποιείται ο εμβολιασμός του τρυβλίου με κύτταρα της *P. pastoris*, λαμβάνοντας ποσότητα κυττάρων με ένα αποστειρωμένο ρύγχος πιπέτας μεταβλητού όγκου και διασπείροντας αυτήν την ποσότητα επί της επιφάνειας του στερεού πια θρεπτικού εντός του τρυβλίου· η διασπορά των κυττάρων πραγματοποιείται με το ίδιο το ρύγχος πιπέτας και με ελαφρές (και κυρίως οριζόντιες) κινήσεις κατά μήκος του τρυβλίου. Το εμβολιασμένο πια τρυβλίο επωάζεται overnight σε ειδικό θερμαινόμενο επωαστήριο δίχως ανάδευση σε θερμοκρασία 30 °C.

Παρασκευή και εμβολιασμός προ- και κύριων καλλιιεργειών

Για την παρασκευή προ- και κύριων καλλιιεργειών της ζύμης *P. pastoris* χρησιμοποιούνται τα θρεπτικά BMGY και BMMY αντίστοιχα. Ανάλογα με τον επιθυμητό όγκο και αριθμό των κύριων καλλιιεργειών παρασκευάζεται και η αντίστοιχη ποσότητα BMGY και BMMY λαμβάνοντας υπόψη ότι ο όγκος των προκαλλιιεργειών πρέπει να είναι υποδεκαπλάσιος του όγκου των καλλιιεργειών (π.χ. για 2 καλλιιεργείες των 500 mL απαιτούνται 2 προκαλλιιεργείες των 50 mL και συνεπώς 100 mL BMGY και 1000 mL BMMY). Έτσι, παρασκευάζονται τα θρεπτικά ζυγίζοντας

πρώτα την κατάλληλη ποσότητα πεπτόνης και εκχύλισματος ζύμης τα οποία διαλύονται σε όγκο dH₂O ίσο με το 70% και 80% αντίστοιχα του τελικού όγκου του θρεπτικού (σύμφωνα με το προηγούμενο παράδειγμα 1 g εκχύλισμα ζύμης και 2 g πεπτόνης διαλύονται σε 70 mL dH₂O για το BMGY ενώ 10 g εκχύλισμα ζύμης και 20 g πεπτόνης διαλύονται σε 800 mL dH₂O για το BMMY). Έπειτα ακολουθεί η παρασκευή του διαλύματος YNB 10x και του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών· το ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευάζεται φτιάχνοντας ξεχωριστά διαλύματα K₂HPO₄, του οποίου η πλήρης διάλυση απαιτεί ελαφριά θέρμανση, και K₂HPO₄ συγκέντρωσης 1 M και αναμειγνύοντας τα σε αναλογία περίπου 4:1 για να προκύψει διάλυμα με pH=6. Παρασκευάζεται επίσης το διάλυμα γλυκερόλης ζυγίζοντας σε ογκομετρικό κύλινδρο την απαιτούμενη ποσότητα γλυκερόλης, καθότι βρίσκεται σε υγρή μορφή, και συμπληρώνοντας με dH₂O μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ανακινάται για να διαλυθεί η γλυκερόλη. Όλα τα διαλύματα τοποθετούνται σε ξεχωριστά μπουκάλια αποστείρωσης και δίχως να σφραγιστεί το πάωμα και κατευθύνονται για αποστείρωση στους 109 °C για 40 min. Παράλληλα αποστειρώνονται και οι κατάλληλες κωνικές φιάλες όπου θα πραγματοποιηθούν οι καλλιέργειες των κυττάρων και χρειάζεται να υπάρχει αναλογία υγρού καλλιέργειας και όγκου φιάλης τουλάχιστον 1:4, ώστε να επιτευχθεί ο κατάλληλος αερισμός (στο παράδειγμα που αναφέρθηκε προηγουμένως θα χρησιμοποιούνταν 2 κωνικές φιάλες των 250 mL για τις προκαλλιέργειες και 2 κωνικές φιάλες των 2 L για τις κύριες καλλιέργειες)· οι κωνικές φιάλες ταπώνονται με ειδικά πάωμα διαπερατά από τον αέρα, τα οποία επικαλύπτονται με τη σειρά τους με μια στρώση αλουμινόφυλλου. Τα διαλύματα αιμίνης, βιοτίνης και θεικού χαλκού είναι προαποστειρωμένα με αποστειρωμένο φίλτρο 0,2 μm και αποθηκεύονται σε ψυγείο σε θερμοκρασία 4 °C· για το διάλυμα ιχνοστοιχείων αποστειρώνεται κάθε φορά η ποσότητα που θα χρειαστεί και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Επίσης, αποστειρώνεται και κατάλληλου μεγέθους ογκομετρικοί κύλινδροι για να μπορέσει να ληφθεί η ακριβής ποσότητα των ξεχωριστών διαλυμάτων και να προστεθούν στα θρεπτικά μέσα. Μετά την αποστείρωση τα θρεπτικά μέσα, τα διαλύματα και τα σκεύη τοποθετούνται σε χώρο ψύξης (4 °C) για να μειωθεί η θερμοκρασία τους υπό των 30 °C.

Ύστερα της πτώσης της θερμοκρασίας των θρεπτικών μέσων, προστίθενται αρχικά οι απαιτούμενες ποσότητες των διαλυμάτων YNB, γλυκερόλης, βιοτίνης και φωσφορικών για να παρασκευαστεί το BMGY. Έπειτα στις κωνικές των προκαλλιέργειών μοιράζεται η κατάλληλη ποσότητα BMGY καθώς και των διαφόρων συμπληρωματικών διαλυμάτων· σημειωτέον ότι όταν πραγματοποιούνται καλλιέργειες κυττάρων και για τα 5 διαφορετικά ένζυμα, η προσθήκη των συμπληρωματικών διαλυμάτων εκτελείται μετά τον διαμοιρασμό του θρεπτικού στις κωνικές φιάλες καθώς δεν απαιτούνται τα ίδια διαλύματα για όλα τα ένζυμα. Εμβολιάζονται εν συνεχεία οι προκαλλιέργειες απορρίπτοντας ένα αποστειρωμένο ρύγχος πιπέτας με το οποίο έχει ληφθεί προηγουμένως ποσότητα κυττάρων από το αντίστοιχο τρυβλίο Petri. Οι εμβολιασμένες προκαλλιέργειες τίθενται σε επώαση overnight σε ανακινούμενο επωαστήριο με θερμοκρασία 30 °C και ρυθμό ανάδευσης 180 rpm.

Την επόμενη μέρα αποστειρώνονται οι ταπωμένες κωνικές φιάλες των καλλιέργειών μαζί με τους απαιτούμενους ογκομετρικούς κυλίνδρους για τα θρεπτικά μέσα και λαμβάνεται 0,5 mL δείγμα από κάθε προκαλλιέργεια χρησιμοποιώντας φυσικά αποστειρωμένα ρύγχη για τη μέτρηση

της οπτικής τους πυκνότητας. Το δείγμα αραιώνεται 50 φορές προσθέτοντας 20 μL του δείγματος σε 980 μL dH_2O ενώ φτιάχνεται και ένα επιπλέον αραιωμένο δείγμα το οποίο φυγοκεντρείται υπό 11000 rpm για 5 min, όπου το υπερκείμενο υγρό θα λειτουργήσει ως τυφλό δείγμα. Μετρείται η οπτική πυκνότητα των αραιωμένων δειγμάτων στα 600 nm στο φωτόμετρο S-20 Spectrophotometer αφού πρώτα πραγματοποιηθεί βαθμονόμηση του οργάνου με το τυφλό δείγμα. Υπολογίζεται μετά η απαιτούμενη ποσότητα που πρέπει να ληφθεί από τις προκαλλιέργειες για να εμβολιαστούν οι κύριες καλλιέργειες σύμφωνα με τον νόμο αραιώσης:

$$V_{\text{εμβολίου}} \cdot \text{OD}_{600 \text{ nm}}_{\text{προκαλλιέργειας}} = V_{\text{καλλιέργειας}} \cdot (\text{OD}_{600 \text{ nm}}_{\text{καλλιέργειας}} = 1)$$

Λαμβάνεται έτσι ο κατάλληλος όγκος εμβολίων από τις προκαλλιέργειες, μεταφέρεται σε αποστειρωμένα Falcon και φυγοκεντρώνται στην ψυχόμενη φυγόκεντρο ROTANTA 460R υπό 4500 rpm για 20 min στους 4 °C. Επίσης, αναμειγνύονται τα διάφορα συστατικά του BMMY και διαμοιράζεται στις κωνικές φιάλες μέσω ογκομετρικού κυλίνδρου και προστίθενται τότε τα διάφορα συμπληρωματικά διαλύματα. Μετά τη φυγοκέντρωση των εμβολίων απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό εντός ποτηριού ζέσεως στον ειδικά αποστειρωμένο χώρο παρουσία φλόγας και επαναιωρούνται τα κύτταρα σε 2 mL θεραπευτικού μέσου που λαμβάνεται από την εκάστοτε κωνική φιάλη που πρόκειται να εμβολιαστεί. Τα επαναιωρημένα κύτταρα προστίθενται στην προοριζόμενη κωνική φιάλη και εμβολιάζονται έτσι οι κύριες καλλιέργειες, οι οποίες τίθενται σε πολυήμερη επώαση (συνήθως για 4 μέρες) σε ανακινούμενο επωαστήριο με ρυθμό ανάδευσης 180 rpm και θερμοκρασία συνήθως στους 27-28 °C, ώστε να πραγματοποιηθεί η επαγωγή μέσω της μεθανόλης. Κάθε μέρα επώασης προστίθεται και η κατάλληλη ποσότητα καθαρής μεθανόλης για τελική σύσταση 0,5% v/v διότι η αρχική μεθανόλη καταναλώνεται ύστερα από μια ημέρα ενώ δεν μπορεί να προστεθεί εξ αρχής όλη η ποσότητα μεθανόλης που θα χρειαστεί αφού μπορεί να γίνει τοξική για τα κύτταρα. Ωστόσο, ο χρόνος και η θερμοκρασία επαγωγής δεν είναι ίδιες για όλες τις φορές παραγωγής των ενζύμων κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς αποτελούν κύριες μεταβλητές της έκφρασης πρωτεϊνών και εφαρμόστηκαν ορισμένες φορές διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνοι επαγωγής για να αποφανθεί η επίδραση τους στην έκφραση των ενζύμων.

2.2.6. Καθαρισμός και απομόνωση των επιθυμητών ενζύμων

Η κατιούσα διεργασία του καθαρισμού και απομόνωσης των επιθυμητών ενζύμων αποτελεί γενικά μια αρκετά κοπιώδη διαδικασία με διάφορα και απαιτητικά στάδια. Ειδικότερα, η ανωτέρω διεργασία απαρτίζεται από τα εξής κύρια στάδια, τα οποία αναλύονται εκτενώς στη συνέχεια:

- A. Φυγοκέντρηση
- B. Διήθηση
- C. Συμπύκνωση
- D. Εξισορρόπηση
- E. Απομόνωση ενζύμου μέσω IMAC

2.2.6.1. Φυγοκέντρηση

Στα γονίδια που εισήχθησαν στα κύτταρα X33 κατά τον μετασχηματισμό τους υπήρχε και το γονίδιο του παράγοντα alpha (signal peptide) ο οποίος κωδικοποιεί την εξωκυτταρική έκκριση των επιθυμητών ενζύμων. Βάσει του παραπάνω γεγονότος, θεωρείται ότι οι πρωτεΐνες-στόχοι βρίσκονται στο εξωκυττάριο υγρό. Προς τούτο εκτελείται φυγοκέντρηση των περιεχομένων των κωνικών φιαλών, μετά το τέλος της επώασης, σε ειδικά δοχεία της ψυχόμενης φυγοκέντρου ROTANTA 460R υπό 4500 rpm για 30 min στους 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό, το οποίο χρειάζεται να διατηρείται σε πάγο, και στον πυθμένα των δοχείων της φυγοκέντρου έχουν κατακαθίσει τα κύτταρα.

2.2.6.2. Διήθηση υπό κενό

Κατά το προηγούμενο στάδιο της φυγοκέντρωσης έχουν απομακρυνθεί μεν τα κύτταρα, μπορεί να έχουν παραμείνει δε διάφορα στερεά υπολείμματα τα οποία είναι ανάγκη να απομακρυνθούν. Η απομάκρυνση των υπολειμμάτων αυτών πραγματοποιείται μέσω διήθησης υπό κενό στο με όργανο δημιουργίας κενού χρησιμοποιώντας τους εξής ειδικούς ηθμούς (φίλτρα):

- A. Ηθμός με διάμετρο πόρων 0,8 μm και ονομαστική διάμετρο 47 mm.
- B. Ηθμός με διάμετρο πόρων 0,45 μm και ονομαστική διάμετρο 47 mm.
- C. Ηθμός με διάμετρο πόρων 0,22 μm και ονομαστική διάμετρο 47 mm.

Χρειάζεται να σημειωθεί εδώ ότι τα προαναφερθέντα φίλτρα αξιοποιούνται για τη διήθηση όγκου πρωτεϊνικού διαλύματος από 500 mL έως 1 L· για μικρότερους όγκους μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο οι ηθμοί των 0,45 και 0,22 μm ενώ για μεγαλύτερους όγκους απαιτείται συνήθως επιπλέον χρήση των ηθμών με διάμετρο πόρων 0,8 μm και 1,2 μm.

2.2.6.3. Συμπύκνωση

Η συμπύκνωση του πρωτεϊνικού διαλύματος πραγματοποιείται για να διευκολυνθούν τα επόμενα στάδια της πειραματικής μελέτης είτε γιατί είναι ευκολότερα διαχειρίσιμοι οι μικρότεροι όγκοι διαλύματος είτε γιατί η συμπύκνωση αυξάνει τη συγκέντρωση πρωτεΐνης στο διάλυμα και επομένως αποφέρει πιο εμφανή και διακριτά αποτελέσματα κατά τις περαιτέρω αναλύσεις που

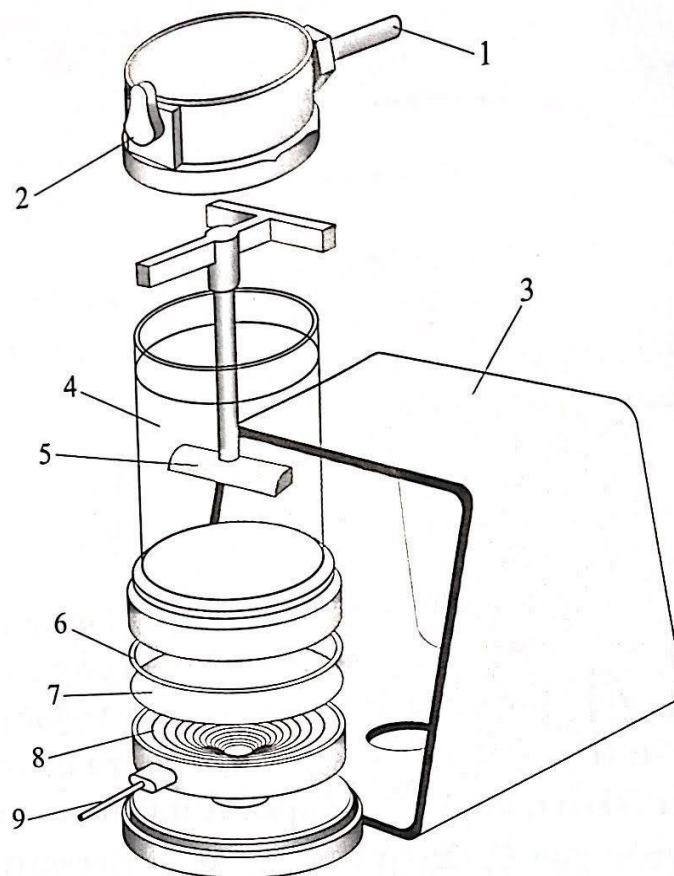
θα διεξαχθούν με την παραγόμενη πρωτεΐνη. Μπορεί να πραγματοποιηθεί δε είτε μέσω υπερδιήθησης είτε μέσω φυγοκέντρησης:

2.2.6.3.1. Συμπύκνωση με υπερδιήθηση

Η διεργασία της συμπύκνωσης πραγματοποιείται μέσω υπερδιήθησης αδιεξόδου ροής με τη χρήση της συσκευής Amicon Stirred Cell της Merck Millipore. Η αρχή λειτουργίας βασίζεται στη χρήση μεμβρανών με όριο μοριακού βάρους (Molecular Weight Cut-Off - MWCO) 10 ή 30 kDa -για τις UPOs χρησιμοποιούνται οι μεμβράνες των 10 kDa ενώ για τα μεταλλοένζυμα εκείνες των 30 kDa- όπου με εφαρμογή πίεσης αέρα 60 psi εξαναγκάζονται μόρια με μικρότερο μοριακό βάρος των παραπάνω MWCO να διαπερνούν τη μεμβράνη ενώ μόρια όπως οι επιθυμητές πρωτεΐνες να παρακρατούνται. Έτσι, ο διαλύτης, διάφορα άλατα και μικρού μεγέθους πρωτεΐνες διέρχονται από τη μεμβράνη και συμπυκνώνεται το πρωτεϊνικό διάλυμα.

Οι συσκευές Amicon Stirred Cell παρέχονται με χωρητικότητα είτε 350 mL είτε 50 mL, οι οποίες διαθέτουν κάτω όριο 50 mL και 5 mL αντίστοιχα, πράγμα που σημαίνει ότι μόλις η στάθμη του περιεχόμενου υγρού φτάσει αυτό το όριο πρέπει να διακοπεί η λειτουργία της συσκευής. Η διαδικασία της υπερδιήθησης είναι η εξής:

1. Συναρμολογείται η συσκευή Amicon Stirred Cell με προσεκτική τοποθέτηση της κατάλληλης μεμβράνης και συνδέεται με δίκτυο αέρα υψηλής πίεσης μέσω μειωτήρα και ρυθμίζεται η πίεση στα 60 psi.
2. Πραγματοποιείται ξέπλυμα της συσκευής με 300 mL dH₂O. (Σε κάθε φορά έναρξης λειτουργίας της συσκευής εφαρμόζεται πρώτα η πίεση αέρα και μετά ενεργοποιείται η ανάδευση για να μην τραυματιστεί η μεμβράνη από τον αναδευτήρα)
3. Προστίθεται έπειτα το πρωτεϊνικό διάλυμα, το οποίο αν έχει όγκο μεγαλύτερο της συσκευής, διακόπτεται η λειτουργία της μόλις προσεγγίσει η στάθμη του υγρού το κατώτατο όριο και συμπληρώνεται η υπόλοιπη ποσότητα του διαλύματος. Το υπερδιήθημα συλλέγεται για έλεγχο της ορθής λειτουργίας της συσκευής. (Κατ' αυτό το στάδιο η συσκευή βρίσκεται εντός πάγου ή παγόλουτρου για να διατηρείται χαμηλή η θερμοκρασία του πρωτεϊνικού διαλύματος και να αποφευχθεί πιθανή απενεργοποίηση των πρωτεϊνών)
4. Μετά την συμπύκνωση του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος στο κατώτατο όριο της συσκευής, λαμβάνεται το συμπύκνωμα και ξεπλένεται η συσκευή με περίπου 100 mL υδατικού διαλύματος καυστικού νατρίου 0,1 M και έπειτα με περίπου 300 mL dH₂O.
5. Αποσυναρμολογείται η συσκευή και η μεμβράνη αποθηκεύεται εντός υδατικού διαλύματος αιθανόλης 20% v/v στους 4 °C.



Σχήμα 16. Απεικόνιση μιας διάταξης υπερδιήθησης τύπου αναδεδυμένου δοχείου της εταιρείας Amicon με τα εξής εξαρτήματα: (1) κάλυμμα της συσκευής που φέρει την εισοδο του αερίου πίεσης, (2) βαλβίδα εκτόνωσης, (3) πλαστικό πλαίσιο στηρίξεως, (4) κύρια σώμα δοχείου, (5) πτερύγιο ανάευσης με άξονα περιστροφής, (6) ελαστικός στεγανωτικός δακτύλιος, (7) μεμβράνη, (8) αυλακωτή βάση στήριξης της μεμβράνης και (9) έξοδος συλλογής διηθήματος [153].

2.2.6.3.2. Συμπύκνωση με φυγοκέντρωση

Η συμπύκνωση μέσω φυγοκέντρωσης χρησιμοποιείται γενικά για μικρότερους όγκους πρωτεϊνικού διαλύματος που είναι δύσκολο να επεξεργαστούν μέσω υπερδιήθησης. Βασίζεται στη χρήση ειδικών στηλών φιλτραρίσματος που περιέχουν φίλτρα σε κατακόρυφη θέση εκατέρωθεν της θέσης εισαγωγής του δείγματος και κατά τη φυγοκέντρωση διέρχονται τα μόρια με μικρότερο μοριακό βάρος από το MWCO της στήλης. Οι ειδικές στήλες που χρησιμοποιούνται γι' αυτή τη μέθοδο είναι οι Amicon Ultra – 0,5 mL Centrifugal Filters, Merck Millipore Ltd με MWCO=10 kDa που είναι κατάλληλες για αρκετά μικρά δείγματα της τάξης των 0,5-5 mL, ενώ για μεγαλύτερα δείγματα της τάξης των 5-10 mL χρησιμοποιούνται είτε οι στήλες Vivaspin® 6 των 6 mL με MWCO=3 kDa είτε οι στήλες Vivaspin® 15R των 15 mL με MWCO=10 kDa. Το πρώτο είδος στηλών φυγοκεντρείται εντός της ψυχόμενης φυγοκέντρου ALC 4239R με κάθε κύκλο φυγοκέντρωσης να πραγματοποιείται συνήθως υπό 11000 rpm για 5 min· το δεύτερο είδος των μεγαλύτερων στηλών φυγοκεντρείται δε εντός της ψυχόμενης φυγοκέντρου ROTANTA

460R και κάθε κύκλος πραγματοποιείται υπό 4500 rpm για 15 min. Το υγρό που έχει παραμείνει εντός της στήλης μετά τη φυγοκέντρηση αποτελεί το συμπύκνωμα και δύναται να ληφθεί με τη χρήση κατάλληλου μεγέθους πιπέτας μεταβλητού όγκου· το διερχόμενο υγρό στον πυθμένα της στήλης είτε συλλέγεται είτε απορρίπτεται. Βέβαια σε περίπτωση που ο συνολικός όγκος του πρωτεϊνικού διαλύματος είναι μεγαλύτερος από τη χωρητικότητα της εκάστοτε στήλης πραγματοποιούνται παραπάνω από ένας κύκλος φυγοκέντρησης επαναγεμίζοντας την με το προς συμπύκνωση διάλυμα.

Το πρωτόκολλο χρήσης των παραπάνω στηλών είναι το εξής:

1. Ξέπλυμα με dH₂O για έναν κύκλο φυγοκέντρησης.
2. Εισαγωγή του επιθυμητού όγκου πρωτεϊνικού διαλύματος για όσους κύκλους φυγοκέντρησης χρειάζεται.
3. Συλλογή του συμπυκνώματος.
4. Ξέπλυμα με dH₂O για δύο κύκλους φυγοκέντρησης.
5. Αποθήκευση των στηλών στους 4 °C με πλήρωση του εσωτερικού των στηλών με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 20% v/v.

2.2.6.4. Εξισορρόπηση

Η διαδικασία της εξισορρόπησης του πρωτεϊνικού διαλύματος πραγματοποιείται για να αλλαχθεί ο διαλύτης του διαλύματος αυτού και συνήθως για να βρίσκεται η πρωτεΐνη στο επιθυμητό και βέλτιστο ρυθμιστικό διάλυμα όπου και θα έχει αυξημένη σταθερότητα. Η εξισορρόπηση γίνεται τόσο στο στάδιο ακριβώς μετά τη συμπύκνωση ώστε να βρίσκεται η πρωτεΐνη στο κατάλληλο διάλυμα για να διευκολυνθεί η απομόνωση της μέσω IMAC όσο και μετά το στάδιο αυτό της απομόνωσης όπου επιθυμείται η μείωση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου που χρησιμοποιείται κατά τη χρωματογραφία καθώς αποτελεί συνήθως παρεμποδιστικό παράγοντα για πολλά ένζυμα.

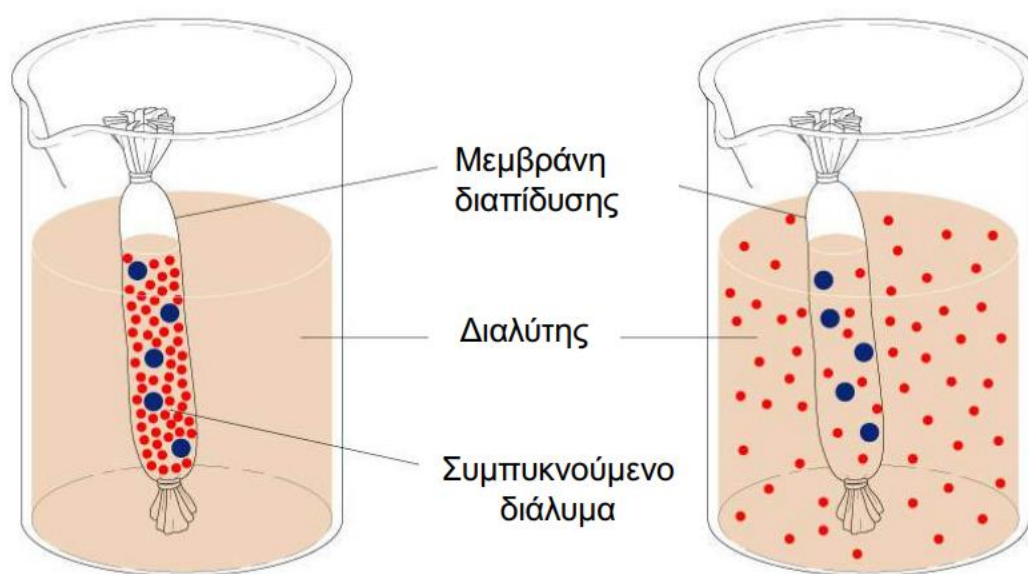
Η εξισορρόπηση γίνεται με τρεις τρόπους:

A. Διαπίδυση (Dialysis):

Στη διαπίδυση πραγματοποιείται κατά βάση ένα φαινόμενο διάχυσης μορίων από ένα διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης. Τα δύο διαλύματα χωρίζονται με μια μεμβράνη η οποία επιτρέπει τη διέλευση συγκεκριμένου μεγέθους μορίων που βρίσκονται κάτω από το MWCO που τη χαρακτηρίζει. Καθίσταται εύλογο λοιπόν ότι η διαπίδυση χρησιμοποιείται για την μεταβολή της συγκέντρωσης συστατικών ή ακόμη και του ίδιου του διαλύτη ενός πρωτεϊνικού διαλύματος.

Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία της διαπίδυσης εκκινείται με τη λήψη του κατάλληλου μήκους μεμβράνης κυτταρίνης -το απαιτούμενο μήκος της μεμβράνης υπολογίζεται προσεγγιστικά ως εξής: 10 cm + 0,5 cm/mL- διαμέτρου 15,9 mm και με MWCO=12-14 kDa προμηθευομένη από την εταιρεία Medicell Membranes Ltd, η οποία πριν τη χρήση της χρειάζεται να ξεπλυθεί ελαφρώς τρεις φορές μέσα σε dH₂O και έπειτα να ενυδατωθεί σε υπερκάθα-

ρο νερό θερμοκρασίας περίπου 100 °C για 30 min. Παράλληλα έχει παρασκευαστεί και το επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα με το οποίο θα γίνει η εξισορρόπηση· παρασκευάζεται δε όγκος ρυθμιστικού διαλύματος τουλάχιστον 100 φορές τον όγκο του πρωτεϊνικού διαλύματος, δηλαδή 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος για κάθε 1 mL διαλύματος πρωτεΐνης. Εμβαπτίζεται λοιπόν ελαφρώς η ενυδατωμένη μεμβράνη εντός του ρυθμιστικού διαλύματος, σφραγίζεται το ένα της άκρο και προστίθεται το πρωτεϊνικό διάλυμα με τη βοήθεια μικρού χωνιού του οποίου η άκρη έχει ενυδατωθεί προηγουμένως για να εισαχθεί ευκολότερα εντός της μεμβράνης. Τέλος, σφραγίζεται και το εναπομείναν άκρο της μεμβράνης και τοποθετείται η πλήρης μεμβράνη εντός του ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο βρίσκεται συνήθως εντός ποτηρίου ζέσεως ή δοχείου. Το δοχείο με την μεμβράνη αφήνεται ολονυκτίως στους 4 °C.



Σχήμα 17. Απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας της διαπίδυσης [154].

B. Προσθήκη:

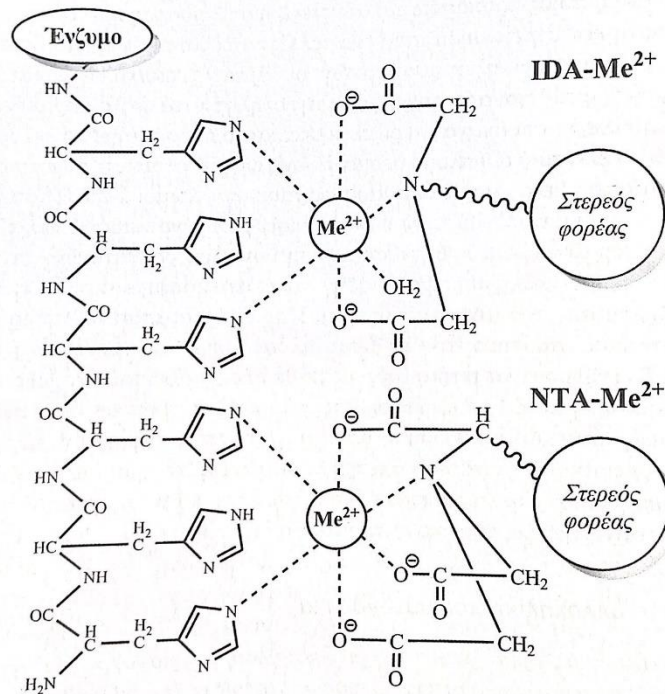
Η εξισορρόπηση με προσθήκη αποτελεί μια πιο απλοϊκή και λιγότερη αξιόπιστη μέθοδο κατά την οποία πραγματοποιείται απλή προσθήκη του επιθυμητού ρυθμιστικού διαλύματος σε υψηλότερη συγκέντρωση, συνήθως 10 φορές, από εκείνη που θα χρησιμοποιούταν για διαπίδυση και ύστερα της ανάμειξης του ρυθμιστικού διαλύματος με το πρωτεϊνικό διάλυμα επιτυγχάνεται η φυσιολογική συγκέντρωση του ρυθμιστικού. Ωστόσο, με αυτή τη μέθοδο δεν είναι δυνατή η μείωση της συγκέντρωσης ανεπιθύμητων συστατικών του πρωτεϊνικού διαλύματος.

C. Φυγοκέντρωση ή υπερδιήθηση:

Κατά την εξισορρόπηση τόσο με φυγοκέντρωση όσο και με υπερδιήθηση εφαρμόζεται η ίδια αρχή λειτουργίας: ο διαλύτης διέρχεται διέρχεται από τη μεμβράνη/φίλτρο ενώ η επιθυμητή πρωτεΐνη όχι, οπότε με διαδοχικές συμπυκνώσεις μπορεί να γίνει αλλαγή του διαλύτη προσθέτοντας κάθε φορά τον νέο διαλύτη όταν συμπυκνώνεται επαρκώς το διάλυμα της πρωτεΐνης. Έτσι, επιτυγχάνεται αραίωση του αρχικού διαλύτη και σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του επιθυμητού (ρυθμιστικό διάλυμα). Για παράδειγμα, στην περίπτωση της υπερδιήθησης μέσω της συσκευής Amicon Stirred Cell μπορεί να επιτευχθεί κατά προσέγγιση 50 φορές αραίωση του αρχικού διαλύτη έπειτα από δυο διαδοχικές προσθήκες και συμπυκνώσεις από τα 350 mL στα 50 mL.

2.2.6.5. Απομόνωση ενζύμου μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας (IMAC)

Η αποκλειστική παραλαβή του επιθυμητού ενζύμου, δίχως την παρουσία παράπλευρων πρωτεϊνών που παράγει ο οργανισμός-ξενιτής, υλοποιείται μέσω χρωματογραφίας συγγένειας και συγκεκριμένα μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας ή αλλιώς χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography – IMAC). Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου έγκειται στη σύνδεση των «ετικετών» ιστιδίνης (His-tag, δότες ηλεκτρονίων), που έχουν ενσωματωθεί στο τέλος της αμινοξικής ακολουθίας των εκφρασμένων πρωτεϊνών, με άτομα κοβαλτίου (δέκτες ηλεκτρονίων) τα οποία συγκρατούνται σχηματίζοντας χηλικό σύμπλοκο με μια χηλιποιητική ένωση η οποία βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την χρωματογραφική ρητίνη [153]. Η χηλιποιητική ένωση που χρησιμοποιείται είναι το νιτριλοτριοξικό οξύ (NTA) του οποίου 3 καρβοξυλικά οξυγόνα και 1 άζωτο σχηματίζουν μέσω δεσμών συναρμογής το χηλικό σύμπλοκο με το κοβάλτιο, αφήνοντας δύο ελεύθερες θέσεις στο κοβάλτιο για επιπλέον θέσεις στις οποίες μάλιστα ενώνονται τα μόρια ιστιδίνης [153].



Σχήμα 18. Απεικόνιση της σύνδεσης της ετικέτας ιστοιδίνης του ενζύμου με το χηλικάς ακινητοποιημένο μεταλλοκατιόν (Me^{2+}) είτε σε ιμινοδιοξικό οξύ (IDA) είτε σε νιτριλοτριοξικό οξύ (NTA) [153].

Ειδικότερα, το συμπυκνωμένο και εξισορροπημένο πρωτεϊνικό διάλυμα διέρχεται από στήλη χρωματογραφίας TALON[®] η οποία περιέχει τη ρητίνη ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου TALON και παρακρατείται μόνο η πρωτεΐνη-στόχος με την ετικέτα ιστοιδίνων, η οποία αποδεσμεύεται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ενός χημικού ανταγωνιστή, του ιμιδαζολίου, που μπορεί και αντικαθιστά τα δεσμευμένα πρωτεϊνικά μόρια στις θέσεις κοβαλτίου· ο όγκος δε της ρητίνης εντός της στήλης είναι περίπου 5 mL, ο οποίος όγκος χαρακτηρίζεται ως Column Volume (CV), ενώ η συνολική χωρητικότητα της στήλης είναι 20 mL επομένως ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να προστεθεί στη στήλη κάθε φορά είναι 15 mL (3 CV). Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται κατ' αυτήν τη μέθοδο έχουν αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα μαζί με τη σύσταση τους (2.1.4.3). Σημειωτέον ότι η στήλη TALON[®] μαζί με την περιεχόμενη ρητίνη αποθηκεύονται με 1 CV (δηλαδή 5 mL) υδατικού διαλύματος αιθανόλης 20% v/v στους 4 °C με την κατάλληλη σφράγιση.

Η διαδικασία IMAC αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

1. Η στήλη στήνεται κατακορύφως και αφαιρείται η άνω και κάτω σφράγιση για να εκρυσταλλωθεί η περιεχόμενη αιθανόλη.
2. Προσθήκη 6 CV dH_2O . (Ξεπλένεται η ρητίνη από την αιθανόλη και αντικαθίσταται με dH_2O)
3. Εξισορροπείται η ρητίνη με 9 CV ρυθμιστικού διαλύματος Talon 1x.
4. Προστίθεται το εξισορροπημένο πλέον με Talon 1x πρωτεϊνικό διάλυμα (Κλάσμα «Flowthrough – FT»).

5. Προστίθενται 10 mL Talon 1x. (Ξεπλένεται η ρητίνη από τον διαλύτη των πρωτεϊνών). (Κλάσμα «Wash»)
6. Προστίθενται 7 mL ιμιδαζολίου 5 mM. (Κλάσμα «5 mM»)
7. Προστίθενται 7 mL ιμιδαζολίου 10 mM. (Κλάσμα «10 mM»)
8. Προστίθενται 4 mL ιμιδαζολίου 100 mM. (Κλάσμα «100A»)
9. Προστίθενται 6 mL ιμιδαζολίου 100 mM. (Κλάσμα «100B»)
10. Προστίθενται 6 mL ιμιδαζολίου 100 mM. (Κλάσμα «100C»)
11. Ξεπλένεται η ρητίνη με 3 CV ιμιδαζολίου 200 mM για την απομάκρυνση διαφόρων μορίων που παρέμειναν εντός.
12. Ξεπλένεται τέλος η ρητίνη με 9 CV dH₂O. (Απομακρύνεται τόσο το περιεχόμενο ιμιδαζόλιο όσο και λοιπά εναπομείναντα μόρια)
13. Προστίθενται 3 CV υδατικού διαλύματος αιθανόλης 20% v/v και όταν η στάθμη της αιθανόλης φτάσει το 1 CV τότε η στήλη σφραγίζεται και επαναποθηκεύεται.

Τα προαναφερθέντα κλάσματα συλλέγονται σε Falcon και διατηρούνται προσωρινά στους 4 °C. Η σταδιακή αύξηση δε της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου που προστίθεται γίνεται για να απομακρυνθούν τυχόν ακαθαρσίες ή μη επιθυμητά συνδεδεμένα μόρια από τη ρητίνη δίχως να παρασυρθεί ποσότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης λόγω απότομης αλλαγής της συγκέντρωσης όπου είναι πιθανό να αντικαταστηθεί η πρωτεΐνη από το διερχόμενο ιμιδαζόλιο. Η επιθυμητή πρωτεΐνη αποδεσμεύεται στα κλάσματα 100A, 100B και 100C με την περισσότερη ποσότητα να βρίσκεται στο κλάσμα 100B.

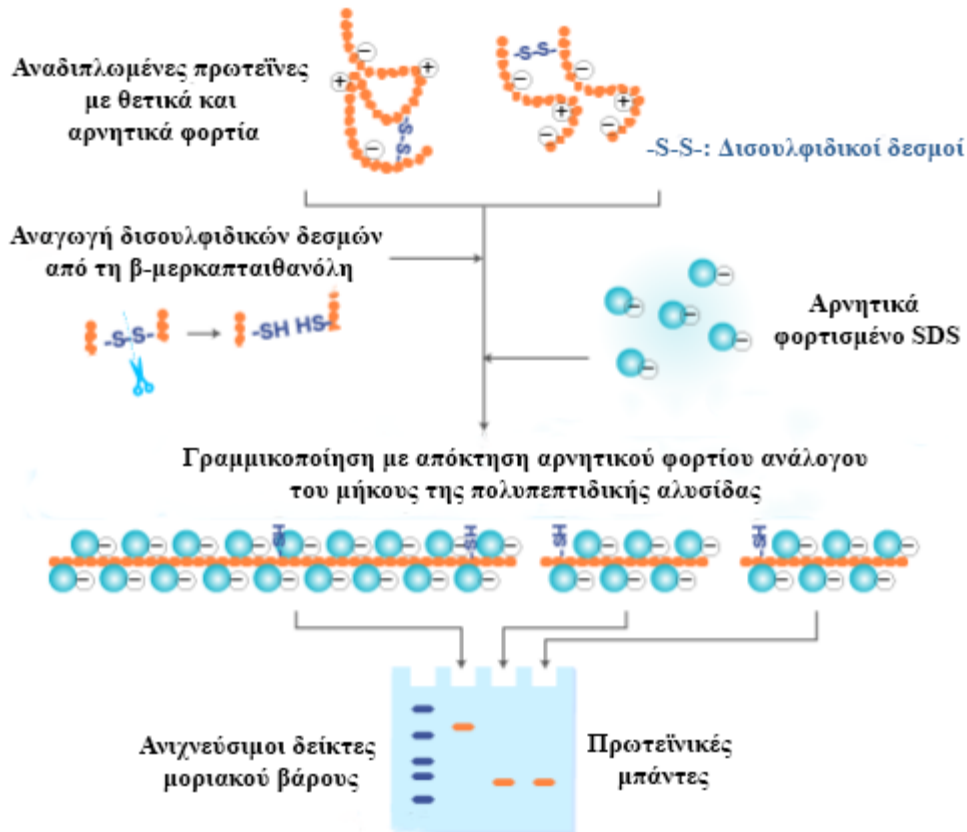
Μετά το πέρας της χρωματογραφίας υπολογίζεται η συγκέντρωση των κλασμάτων 100A, 100B και 100C πραγματοποιώντας φωτομέτρηση της οπτικής πυκνότητας τους στα 280 nm τοποθετώντας 250 μ L κάθε κλάσματος σε κυψελίδα ενός 96-well microplate για φάσμα υπεριώδους φωτός.

2.2.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Για να μπορέσει να ταυτοποιηθεί η πρωτεΐνη που παράγεται κατά την φάση της ετερόλογης έκφρασης και απομονώνεται έπειτα μέσω της μεθόδου ΙΜΑC, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση του πρωτεϊνικού διαλύματος σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου-δωδεκυλοθειικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis – SDS-PAGE). Αποτελεί μια μέθοδο αναγνώρισης του μοριακού βάρους μιας πρωτεΐνης και της καθαρότητας της, όταν αυτή διέρχεται διαμέσου ενός πηκτώματος και συγκρίνοντας τη θέση στην οποία βρίσκεται μετά το τέλος της μεθόδου σε σχέση με ένα διάλυμα με ειδικώς χρωματισμένες πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους.

Οι πρωτεΐνες για να μπορέσουν να διαχωριστούν ορθά και αποτελεσματικά χρειάζεται πρώτα να αποδιαταχθούν και να γραμμικοποιηθούν ώστε ακόμη και μικρές διαφορές στο μοριακό βάρος να έχουν επίδραση στην απόσταση που θα διανύσει η πρωτεΐνη εντός του πηκτώματος. Αυτή η αποδιάταξη πραγματοποιείται με τη χρήση δύο ουσιών: το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) και την β-μερκαπταιθανόλη. Το SDS είναι μια εξαιρετικά ανιονική επιφανειοδραστική ουσία και αρκετά διαδεδομένο απορρυπαντικό η οποία διασπάει τους δεσμούς υδρογόνου και διάφορες άλλες δυνάμεις Van der Waals που διατηρούν τη δομή μιας πρωτεΐνης, ενώ παράλληλα φορτίζει πλήρως αρνητικά το πρωτεϊνικό μόριο λόγω της σύνδεσης του SDS με πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων (σε αναλογία ένα μόριο SDS ανά 2 αμινοξέα) [155], [156]. Η β-μερκαπταιθανόλη είναι ένα αναγωγικό αντιδραστήριο και συμβάλλει με τη σειρά της στην αναγωγή και σχάση των εξαιρετικά ισχυρών δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι σχηματίζουν δισουλφιδικές γέφυρες και συνδέουν μόρια κυστεΐνης της ίδιας ή διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. επιμέρους πρωτεϊνικές αλυσίδες μεταξύ τους [155]. Τέλος, η πλήρης αποδιάταξη επιτυγχάνεται με την εφαρμογή θερμότητας για τη διάσπαση όλων των συνδετικών δεσμών.

Μετά την αποδιάταξη και την αρνητική φόρτιση των πρωτεϊνών εντός των πρωτεϊνικών διαλυμάτων, τα τελευταία φορτώνονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού οι πρωτεΐνες κινούνται προς την άνοδο και τα μικρότερα μόρια μπορούν και διέρχονται ευκολότερα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος ώστε τελικά να διανύουν μεγαλύτερη απόσταση.



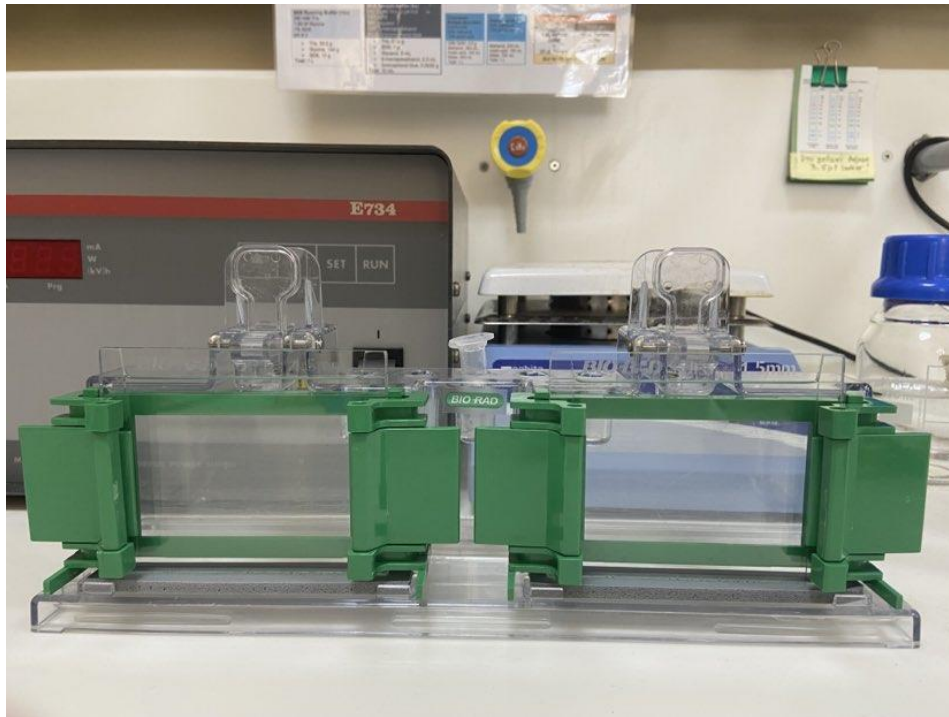
Σχήμα 19. Μηχανισμός αποδιάταξης και γραμμικοποίησης των πρωτεϊνικών μορίων πριν την ηλεκτροφόρηση τους στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (προσαρμόστηκε από [156]).

Η πειραματική διαδικασία της SDS-PAGE αναλύεται κατωτέρω.

2.2.7.1. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου για SDS-PAGE

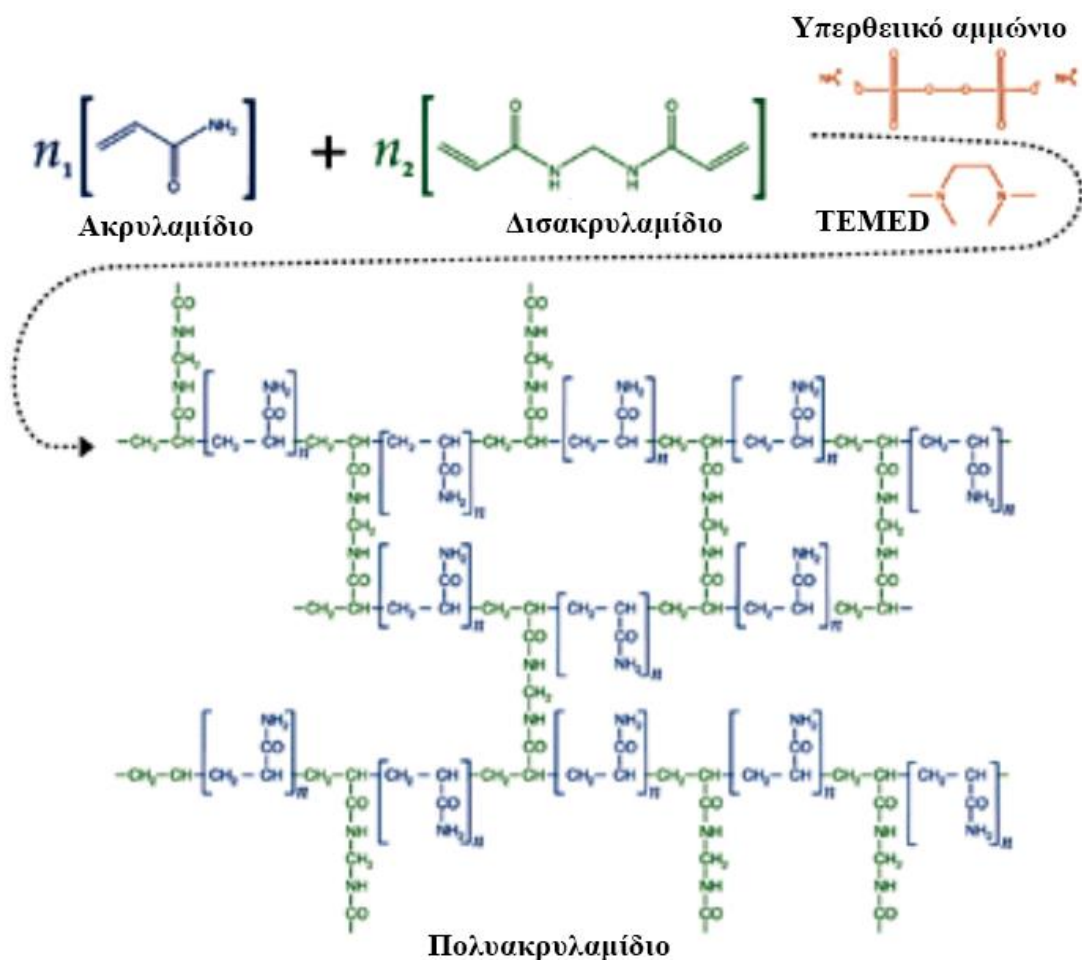
Για να ετοιμαστεί το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου χρειάζεται να στηθεί πρώτα η κατάλληλη διάταξη στην οποία στηρίζονται τα υάλινα πλακίδια που θα περιέχουν το πήκτωμα. Κατά την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά τα σκεύη και οι συνταγές για την παρασκευή παχέος πηκτώματος 12,5%, δηλαδή πάχους 1,5 mm. Το κάτω μέρος της διάταξης εφάπτεται σε ειδικούς υδρόφοβους σπόγγους και αρχικά γεμίζεται το περιεχόμενο των πλακιδίων με mQ H₂O για να ελεγχθεί τυχόν διαρροή της διάταξης. Σε σωληνάριο τύπου Sterilin παρασκευάζεται τότε το διάλυμα για το πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving gel) δίχως τα συστατικά N,N,N',N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) και υπερθεϊκό αμμώνιο (APS), τα οποία προστίθενται ύστερα της απόρριψης του νερού που έχει εισαχθεί στη διάταξη ενώ κατά την προσθήκη τους πραγματοποιείται ανάδευση με την χρησιμοποιούμενη αυτοματοποιημένη πιπέτα. Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου με το N,N'-μεθυλενοδιακρυλαμίδιο (Δισακρυλαμίδιο) επιταχύνεται σημαντικά με την προσθήκη των δύο τελευταίων συστατικών καθώς το APS σχηματίζει ελεύθερες ρίζες στο ακρυλαμίδιο, η οποία διεργασία καταλύεται δε από την παρουσία του TEMED [155]. Σχηματική αναπαράσταση του πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου παρουσιάζεται στο Σχή-

μα 20. Το παρασκευασμένο διάλυμα προστίθεται εντός της διάταξης των υάλινων πλακιδίων μέχρι να καλυφθούν περίπου τα 3/4 της συνολικής χωρητικότητας της διάταξης. Έπειτα με αυτοματοποιημένη πιπέτα μεταβλητού όγκου των 1~5 mL γεμίζεται με mQ H₂O και με αρκετά αργή ροή το υπόλοιπο τμήμα της διάταξης, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες στην επιφάνεια του διαλύματος πηκτώματος· το νερό έχει μικρότερη πυκνότητα από το διάλυμα αυτό και παραμένει στην επιφάνεια ωστόσο προστίθεται με αργή ροή για να αποφευχθεί τυχόν ανάμειξη των δύο υγρών. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει για περίπου 20 min. Παρακάτω απεικονίζεται η διάταξη παρασκευής των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου της Bio-Rad.



Εικόνα 5. Διάταξη παρασκευής πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου της Bio-Rad κατά την πήξη του πηκτώματος διαχωρισμού.

Ύστερα της πήξης του διαλύματος, απορρίπτεται το υπερκείμενο νερό και παρασκευάζεται το διάλυμα για το πήκτωμα επιστοιβάσης (Stacking gel) καθ' όμοιο τρόπο με το πήκτωμα διαχωρισμού. Γεμίζεται τότε το υπόλοιπο κενό τμήμα της διάταξης με το παρασκευασμένο διάλυμα και εισάγονται κατάλληλα χτενάκια στο άνω μέρος της διάταξης, τα οποία διαθέτουν 10 προεξοχές και συμβάλλουν στη δημιουργία κοιλοτήτων στο πήκτωμα επιστοιβάσης εντός των οποίων θα εισαχθούν τα προς ανάλυση πρωτεϊνικά δείγματα. Χρειάζεται να σημειωθεί ότι με την εισαγωγή των χτενακίων είναι πιθανό να ξεχειλίσει ποσότητα του άνωθεν διαλύματος· είναι απαραίτητο να σκουπιστεί και να στεγνωθεί διεξοδικώς όση ποσότητα ξεχειλίσει διότι έπειτα θα σχηματιστούν τμήματα πηκτώματος στο εξωτερικό της διάταξης που μπορούν να επηρεάσουν την ορθή λειτουργία της μεθόδου δημιουργώντας ανεπιθύμητες αντιστάσεις στο αναπτυσσόμενο ηλεκτρικό κύκλωμα.



Σχήμα 20. Μηχανισμός πολυμερισμού ακρυλαμιδίου μέσω των ουσιών APS και TEMED (προσαρμόστηκε από [155]).

2.2.7.2. Προετοιμασία δειγμάτων για SDS-PAGE

Κατά τη χρήση παχέος πήκτωματος απαιτείται όγκος δείγματος 40 μL , αντίθετα για λεπτό πήκτωμα ο απαιτούμενος όγκος είναι 20 μL . Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, τα πρωτεϊνικά δείγματα χρειάζεται να αποδιαταχθούν πριν εισαχθούν στη διάταξη ηλεκτροφόρησης. Η αποδιάταξη πραγματοποιείται με την προσθήκη 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 5x (SDS Loading Buffer 5x) για παχύ πήκτωμα ή την προσθήκη 5 μL για λεπτό πήκτωμα. Στο ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης περιέχεται SDS και β -μεραπτοαιθανόλη καθώς και γλυκίνη για να προσδώσει στο δείγμα μεγάλη πυκνότητα και να καταβυθίζεται σε υδατικά διαλύματα αλλά και μια αρνητικά φορτισμένη χρωστική ονόματι μπλε της βρωμοθυμόλης, η οποία βοηθάει στον οπτικό έλεγχο της πορείας της ηλεκτροφόρησης αφού λόγω μικρού μοριακού βάρους μπορεί και κινείται ελεύθερα στο πήκτωμα. Με την αυτοματοποιημένη πιπέτα που προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα εκτελείται ομογενοποίηση του δείγματος με το ρυθμιστικό διάλυμα. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 10 s στην Mini Centrifuge, Nippon Genetics Europe GmbH και εν συνεχεία θερμαίνονται σε υδατόλουτρο των 100 $^{\circ}\text{C}$ για 5 min.

2.2.7.3. Ηλεκτροφόρηση

Για την διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων στήνεται η αντίστοιχη διάταξη που αποτελεί ουσιαστικά ένα κελί στο οποίο τοποθετούνται τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου και αναπτύσσεται διαφορά δυναμικού. Η τοποθέτηση των πηκτωμάτων γίνεται σε μια ειδική γέφυρα που διαθέτει άνοδο και κάθοδο και διαμέσου της οποίας θα διέλθει το ηλεκτρικό ρεύμα. Μετά την τοποθέτηση των πηκτωμάτων εντός της γέφυρας και την εισαγωγή της γέφυρας στο αντίστοιχο κελί, συμπληρώνεται το περιεχόμενο της γέφυρας με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (SDS Running Buffer 10x), το οποίο βρίσκεται παρασκευασμένο σε δεκαπλάσια σύσταση και αραιώνεται 10 φορές πριν χρησιμοποιηθεί στην ηλεκτροφόρηση. Ελέγχεται τότε η γέφυρα για πιθανή διαρροή ρυθμιστικού διαλύματος και αν είναι καλά συναρμολογημένη, συμπληρώνεται και το υπόλοιπο κελί με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης μέχρι την αντίστοιχη ένδειξη για τον αριθμό πηκτωμάτων που χρησιμοποιούνται. Συγκεκριμένα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε δύο είτε τέσσερα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση, ωστόσο όταν επιθυμείται η χρήση ενός ή τριών πηκτωμάτων τότε εισάγεται στη γέφυρα με το ένα πηκτώμα ένα πλαστικό πλακίδιο στην κενή θέση πηκτώματος για να μπορέσει να κλείσει το ηλεκτρικό κύκλωμα και να μην υπάρχει διαρροή ρυθμιστικού διαλύματος από τη γέφυρα. Αφαιρούνται τα ειδικά χτενάκια με προσοχή και στις σχηματισμένες κοιλότητες φορτώνονται τα πρωτεϊνικά δείγματα, ενώ αφιερώνεται μια θέση σε κάθε πηκτώμα όπου εισάγονται 3,5 μL ενός οπτικώς ανιχνεύσιμου δείκτη (ladder) με γνωστού μοριακού βάρους πρωτεΐνες BlueStar Prestained Protein Marker που προμηθεύεται από την εταιρεία NIPPON Genetics EUROPE GmbH. Τέλος, ολοκληρώνεται η διάταξη ηλεκτροφόρησης και εφαρμόζεται αρχικά διαφορά δυναμικού των 50 V για 30 min μέσω της συσκευής Microcomputer Electrophoresis Power Supply E863, CONSORT ώστε να μπορέσουν τα πρωτεϊνικά δείγματα να επιστοιβαχθούν ομοιόμορφα κατά μήκος του άνω μέρους του πηκτώματος διαχωρισμού. Ύστερα εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού ίση με 100 V για περίπου 80 min για να ξεκινήσουν οι πρωτεΐνες να διατρέχουν το πηκτώμα διαχωρισμού και να εκτελεστεί ο διαχωρισμός τους μέχρις ότου η χρωστική των δειγμάτων να φτάσει στο κάτω μέρος του πηκτώματος.



Εικόνα 6. Κελί ηλεκτροφόρησης κατά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού 50 V σε δύο πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου με πρωτεϊνικά δείγματα.

2.2.7.4. Χρώση και αποχρωματισμός του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

Η φανέρωση των πρωτεϊνών που διέτρεξαν το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου κατά τη μέθοδο SDS-PAGE υλοποιείται χρωματίζοντας τες με τη χρήση του διαλύματος χρώσης (Staining solution) το οποίο περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, τα πηκτώματα αφαιρούνται από τη διάταξη και με προσεκτική διάνοιξη των εκατέρωθεν πλακιδίων και παράλληλη ενυδάτωση του εσωτερικού τους με νερό, εισάγονται εντός δοχείου που περιέχει το διάλυμα χρώσης. Τίθενται έπειτα σε ήπια ανάδευση για 2 h.

Κατά το χρονικό διάστημα της χρώσης, χρωματίζεται όλο το πήκτωμα όμως η χρωστική μπορεί και συνδέεται ισχυρά με διάφορα αμινοξέα των περιεχόμενων πρωτεϊνών. Έτσι λοιπόν ύστερα της χρώσης ακολουθεί ο αποχρωματισμός του πηκτώματος με την ολονύκτια επώαση του εντός ενός διαλύματος αποχρωματισμού (Destaining Solution) υπό ήπια ανάδευση. Το διάλυμα αυτό αφαιρεί την χρωστική από τα μέρη του πηκτώματος δίχως πρωτεΐνες ενώ οι τελευταίες διατηρούν το μπλε χρώμα τους και την επόμενη μέρα φανερώνεται η θέση τους στο πήκτωμα σε μπάντες. Συγκρίνεται, τότε η θέση τους με τις μπάντες του ladder και προσδιορίζεται προσεγγιστικά το μοριακό τους βάρος.

2.2.8. Φωτομετρικές μέθοδοι υπολογισμού συγκέντρωσης και ενεργότητας ενζύμου και κυτταρικών καλλιιεργειών

2.2.8.1. Υπολογισμός κυτταρικής πυκνότητας καλλιιεργειών

Η μέτρηση της κυτταρικής πυκνότητας των καλλιιεργειών είναι απαραίτητη για την εύρεση του βαθμού ανάπτυξης των αναπτυσσόμενων κυττάρων· η τεχνική αυτή έχει αναφερθεί μάλιστα και σε προηγούμενη ενότητα (2.2.5) αλλά ως βήμα της συνολικής διαδικασίας της παρασκευής καλλιιεργειών.

Το μέγεθος αυτό μετρείται σε ειδικό φασματοφωτόμετρο (S-20 Spectrophotometer) σε μήκος κύματος των 600 nm. Βέβαια για να μπορέσει να μετρηθεί η κυτταρική πυκνότητα απαιτείται αραιώση του κυτταρικού δείγματος καθώς η θολερότητα του είναι αρκετά μεγάλη και η μέτρηση του οργάνου πρέπει να βρίσκεται εντός του βαθμονομημένου εύρους 0~1. Πιο συγκεκριμένα, η λήψη δείγματος από προ- ή κύριες καλλιιεργειες κυττάρων της *P. pastoris* απαιτείται 50 φορές αραιώση σε τελικό όγκο 1 mL (20 μ L δείγματος + 980 μ L dH₂O). Από την άλλη η λήψη δείγματος από καλλιιεργειες για τον μετασχηματισμό κυττάρων X33 απαιτείται 4 φορές αραιώση σε τελικό όγκο 1 mL (250 μ L δείγματος + 750 μ L dH₂O) διότι υφίστανται μόνο σε τρίωρη επώαση.

Εκτός της αραιώσης παρασκευάζεται πριν από κάθε κύκλο μετρήσεων ένα τυφλό δείγμα με την αντίστοιχη αραιώση ενός κυτταρικού δείγματος και την μετέπειτα φυγοκέντρηση του υπό 11000 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο υγρό αποτελεί το τυφλό δείγμα. Έτσι, εισάγοντας τα αραιωμένα δείγματα σε ειδική κυψελίδα, βαθμονομείται αρχικά το φασματοφωτόμετρο με το τυφλό δείγμα και πραγματοποιούνται τότε οι μετρήσεις των υπόλοιπων δειγμάτων, ξεπλένοντας το εσωτερικό της κυψελίδας δύο φορές με dH₂O. Τέλος, υπολογίζεται η πραγματική οπτική πυκνότητα των αρχικών δειγμάτων πολλαπλασιάζοντας την καθαρή απορρόφηση με τις φορές αραιώσης τους.

2.2.8.2. Υπολογισμός συγκέντρωσης ενζύμου

2.2.8.2.1. Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μια αρκετά διαδεδομένη χρωματομετρική μέθοδο εύρεσης της συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Χρησιμοποιείται δε το αντιδραστήριο Bradford, το οποίο είναι η οξιμισμένη μορφή της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 και υπό αυτές τις όξινες συνθήκες βρίσκεται στην κατιονική του μορφή που διαθέτει καστανό χρώμα. Όταν ωστόσο ενώνεται με πρωτεΐνες μετατρέπεται στην ανιονική της αποπρωτονιωμένη μορφή η οποία διαθέτει μπλε χρώμα. Αυτή η αλλαγή πραγματοποιείται εντός του ορατού φάσματος από τα 470 nm (καστανό χρώμα) στα 595 nm (μπλε χρώμα).

Για την εύρεση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών χρησιμοποιείται 96-well Microplate στα πηγάδια του οποίου εισάγονται 240 μ L του αντιδραστηρίου Bradford και 10 μ L του προς ανάλυση δείγματος ενώ σε ένα επιπλέον πηγάδι προστίθεται και ένα τυφλό δείγμα. Μετά την προσθήκη

των δειγμάτων αφήνεται το Microplate για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και ύστερα φωτομετρείται η απορρόφηση στα 595 nm σε κατάλληλο φασματοφωτόμετρο (SpectraMax ABS Plus). Ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού δείγματος πραγματοποιείται με την αφαίρεση της απορρόφησης του τυφλού από την απορρόφηση του δείγματος και την εύρεση της αντίστοιχης τιμής συγκέντρωσης σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς για την πρωτεΐνη BSA.

Χρειάζεται να υπογραμμιστεί εδώ ότι κατά την παρούσα μελέτη η μέθοδος Bradford χρησιμοποιήθηκε όχι ποσοτικά αλλά ποιοτικά για να βρεθεί η σχετική διαφορά των απορροφήσεων των δειγμάτων συγκριτικά με ένα πρωτεϊνικό δείγμα που θεωρείται τυφλό.

2.2.8.2.2. Μέθοδος απορρόφησης σε υπεριώδη ακτινοβολία

Η συγκέντρωση ενός πρωτεϊνικού δείγματος μπορεί να υπολογιστεί και με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας/απορρόφησης του στα 280 nm, μήκος κύματος στο οποίο απορροφούν κυρίως οι αρωματικοί δακτύλιοι ορισμένων αμινοξέων των πρωτεϊνών όπως η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη, η φαινυλανίνη και η ιστιδίνη, και φανερώνεται έτσι η ποσότητα της περιεχόμενης πρωτεΐνης [157]. Επίσης, κατά την πειραματική διαδικασία πραγματοποιούνταν και μέτρηση της απορρόφησης των πρωτεϊνικών διαλυμάτων στο φάσμα ακτινοβολίας 250~700 nm για να βρεθούν υπόλοιπα μήκη κύματος στα οποία πιθανώς να απορροφούν οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες και αντληθούν κατ' αυτόν τον τρόπο πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά τους. Λαμβάνονται δηλαδή 250 μ L του δείγματος τα οποία τοποθετούνται σε ένα πηγάδι ενός 96-well Microplate για υπεριώδη ακτινοβολία και μετριέται η απορρόφηση του στα 280 nm σε κατάλληλο φασματοφωτόμετρο (SpectraMax ABS Plus). Παράλληλα μετριέται και η απορρόφηση ενός τυφλού δείγματος, το οποίο είναι συνήθως ο διαλύτης του πρωτεϊνικού διαλύματος που μετρήθηκε. Έπειτα αφαιρείται η απορρόφηση του τυφλού από την απορρόφηση του δείγματος και από τον νόμο Lambert-Beer προκύπτει ο επόμενος τύπος με τον οποίο υπολογίζεται η συγκέντρωση του τελευταίου:

$$ABS_{600 \text{ nm}} = \varepsilon \cdot l \cdot C_{\text{πρωτεΐνης}}(M) \Rightarrow$$

$$C_{\text{πρωτεΐνης}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{ABS_{600 \text{ nm}} \cdot Mr_{\text{πρωτεΐνης}}}{\varepsilon \cdot l}$$

όπου:

- $ABS_{600 \text{ nm}}$: η σχετική απορρόφηση του πρωτεϊνικού δείγματος στα 600 nm
- ε : ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας ίσος με $191270 \frac{1}{\text{M} \cdot \text{cm}}$
- l : το μήκος της διαδρομής που φωτομετρείται στο πηγάδι του Microplate

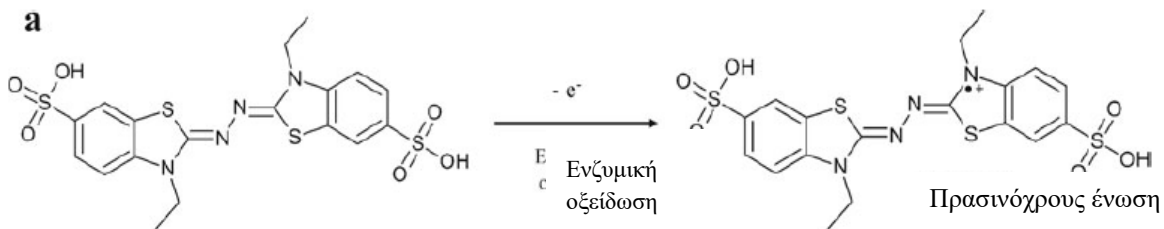
2.2.8.3. Υπολογισμός ενεργότητας ενζύμου

Η εύρεση της ενεργότητας ενζύμου είναι ένα άκρως σημαντικό μέγεθος καθώς ποσοτικοποιείται και προ πάντων επιβεβαιώνεται η δράση ενός ενζύμου σε κατάλληλα υποστρώματα ώ-

στε να επιτραπεί η εξέλιξη της μελέτης της δράσης του σε πιο πολύπλοκα αλλά επιθυμητά υποστρώματα.

2.2.8.3.1. Δοκιμή δράσης σε ABTS (Assay)

Η δοκιμή που πραγματοποιήθηκε κατά την παρούσα πειραματική μελέτη αφορά τη δράση των UPOs στο ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). Το ABTS είναι μια ουσία η οποία όταν οξειδώνεται αποδίδει ένα πράσινο χρώμα και γι' αυτό αποτελεί ένα εξαιρετικά διαδεδομένο υπόστρωμα για την εκτέλεση τέτοιων δοκιμών σε οξειδωτικά ένζυμα. Βέβαια για να μπορέσουν να δράσουν οι UPOs στο ABTS απαιτούν την παρουσία H_2O_2



Σχήμα 21. Ενζυμική οξείδωση ενός μορίου ABTS με την αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου [158].

Συγκεκριμένα, η δοκιμή δράσης των UPOs στο υπόστρωμα ABTS πραγματοποιείται σε διάλυμα που περιέχει 1 mM ABTS, 2 mM H_2O_2 και 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος Citrate-Phosphate pH=4,5. Τα παραπάνω συστατικά παρασκευάζονται ως ακολούθως:

- Το ABTS παρασκευάζεται σε διάλυμα συγκέντρωσης 20 mM διαλύοντας 22 mg σκόνης ABTS σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος Citrate-Phosphate 200 mM με pH=4,5. Αποθηκεύεται σε κατάψυξη στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$ και για τη χρήση του διατηρείται σε πάγο αφού ξεπαγώσει.
- Το H_2O_2 παρασκευάζεται σε διάλυμα συγκέντρωσης 200 mM αναμειγνύοντας 10 μL υδατικού διαλύματος H_2O_2 30% w/v και 490 μL dH $_2$ O. Αποθηκεύεται στους $4\text{ }^\circ\text{C}$ όπου και διατηρείται για 2 εβδομάδες.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα Citrate-Phosphate με pH=4,5 βρίσκεται αποθηκευμένο στην κατάψυξη στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$ σε συγκέντρωση 200 mM.

Η δε μέτρηση της δράσης πραγματοποιείται εντός πηγαδιών ενός 96-well Microplate όπου κάθε πηγάδι χωράει 250 μL ενώ η ποσότητα ενζυμικού διαλύματος που προστίθεται σε κάθε πηγάδι είναι 20 μL . Επομένως, τα υπόλοιπα 230 μL θα αποτελούνται από το διάλυμα του υποστρώματος με το H_2O_2 και ειδικότερα τα συστατικά που απαιτούνται για 1 αντίδραση, δηλαδή ένα πηγάδι, είναι τα εξής:

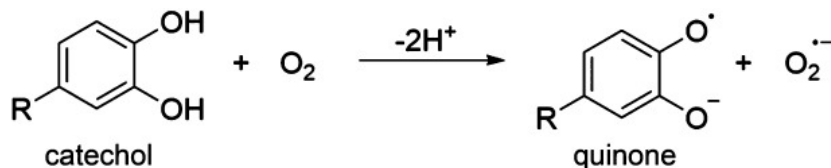
- 112,5 μL Ρυθμιστικού διαλύματος Citrate-Phosphate 200 mM με pH=4,5
- 102,5 μL dH $_2$ O
- 12,5 μL ABTS 20 mM
- 2,5 μL H_2O_2 200 mM
- 20 μL Ενζύμου (προστίθεται λίγο πριν την έναρξη φωτομέτρησης)

Για όσες αντιδράσεις θα πραγματοποιηθούν φτιάχνεται και η αντίστοιχη ποσότητα του παραπάνω διαλύματος (δίχως το ένζυμο) και έπειτα μοιράζεται ανά 230 μL στα πηγάδια του Microplate. Σε διαφορετικά αλλά ίδιας οριζόντιας σειράς πηγάδια τοποθετούνται 30 μL ενζυμικού διαλύματος. Με μια αυτοματοποιημένη πολυπιπέτα λαμβάνονται 20 μL των ενζυμικών διαλυμάτων και προστίθενται στα πηγάδια με το υπόστρωμα. Εκτελείται τότε φωτομέτρηση των γεμάτων πηγαδιών στα 420 nm για 20 min.

Μετά το πέρας της φωτομέτρησης παράγεται μια καμπύλη για κάθε αντίδραση και από το γραμμικό τμήμα της κάθε καμπύλης αντλείται η κλίση του που εκφράζει τη μεταβολή της απορρόφησης στο χρονικό διάστημα της αντίδρασης και υπολογίζεται έπειτα η ενεργότητα κάθε ενζυμικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Παράρτημα Α.

2.2.8.3.2. Δοκιμή δράσης σε Κατεχόλη (Assay)

Πραγματοποιήθηκε και δοκιμή δράσης των μεταλλοενζύμων AsqI και Demetra σε κατεχόλη. Οι κατεχόλες μπορούν και οξειδώνονται ενζυμικά προς τις αντίστοιχες κινόνες (Σχήμα 22), οι οποίες αποδίδουν χρώμα στα 420 nm, από φαινολοξειδάσες και ορισμένες υπεροξειδάσες.



Σχήμα 22. Απεικόνιση αντίδρασης οξείδωσης μιας κατεχόλης προς κινόνη [159].

Για την εκτέλεση της δοκιμής δράσης παρασκευάζεται διάλυμα κατεχόλης 15 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα Potassium Phosphate 50 mM με pH=7,5, διαλύοντας 3,3 mg σκόνης κατεχόλης σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του τελικού διαλύματος αντίδρασης πρέπει να περιέχει 5 mM κατεχόλης και 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος Potassium Phosphate με pH=7,5. Έτσι, η σύσταση του διαλύματος αντίδρασης των 250 μL που τοποθετείται στο πηγάδι του 96-well Microplate είναι η εξής:

- 147 μL Ρυθμιστικού διαλύματος Potassium Phosphate 50 mM με pH=7,5
- 83 μL Κατεχόλης 5 mM
- 20 μL Ενζύμου

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι παρόμοια με τη δοκιμή δράσης σε ABTS και η φωτομέτρηση εκτελείται στα 420 nm για 20 min.

2.2.9. Εξέταση στελεχών της *P. pastoris* και συνθηκών για τη βελτιστοποίηση της ετερόλογης έκφρασης (Screening)

Η μέθοδος της εξέτασης μεταξύ διάφορων μετασχηματισμένων στελεχών της *P. pastoris* για ένα δεδομένο ένζυμο είναι χρήσιμη για τη γρήγορη εύρεση εκείνων των στελεχών που παράγουν και εκφράζουν καλύτερα το ένζυμο ώστε να χρησιμοποιηθούν αυτά τα στελέχη για την μεγαλύτερης κλίμακας παραγωγή του. Έπειτα της εύρεσης του κατάλληλου στελέχους μπορεί να ακολουθήσει μια εξέταση των διαφόρων συνθηκών που επηρεάζουν την έκφραση του ενζύμου. Αποτελεί δηλαδή μια τεχνική βελτιστοποίησης η οποία συμβάλλει στην μεγιστοποίηση της απόδοσης της διεργασίας παράγοντας είτε μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου είτε μεγαλύτερης δραστηριότητας ένζυμο. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται συνήθως μετά τον μετασχηματισμό των κυττάρων για να ελεγχθεί κιόλας αν είναι επιτυχής.

2.2.9.1. Εξέταση στελεχών

Η εξέταση στελεχών μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:

A. Μικρού μεγέθους καλλιέργειες:

Παρασκευάζονται τρεις καλλιέργειες των 50 mL για κάθε διαφορετικό ένζυμο (π.χ. στην περίπτωση των UPOs θα παρασκευαστούν 9 καλλιέργειες των 50 mL) με την πλήρη διαδικασία που περιεγράφηκε στην ενότητα 2.2.5. Οι τρεις αυτές καλλιέργειες εμβολιάζονται με διαφορετικό στέλεχος, τα οποία στελέχη έχουν σχηματιστεί κατά την καλλιέργεια των μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλία-πίτες. Επίσης, παρασκευάζεται και 1 καλλιέργεια των 50 mL η οποία εμβολιάζεται με μη μετασχηματισμένα κύτταρα X33. Η επώαση των καλλιεργειών πραγματοποιείται σε ανακινούμενο επωαστήριο για 5~6 μέρες στους 28 °C με ρυθμό ανάδευσης 180 rpm. Κάθε μέρα ανάπτυξης των καλλιεργειών λαμβάνεται από κάθε μία 0,5 mL δείγμα για να μετρηθεί τόσο η κυτταρική πυκνότητα του όσο και η πρωτεϊνική συγκέντρωση μέσω Bradford ή η ενεργότητα των περιεχόμενων ενζύμων του μέσω ABTS assay. Σημειώνεται εδώ ότι για να μετρηθεί είτε η συγκέντρωση είτε η ενεργότητα πρέπει πρώτα να φυγοκεντρηθούν τα κυτταρικά δείγματα (τυπικές συνθήκες: 11000 rpm για 5 min) ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα. Τέλος, ακολουθείται η διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης των παραγόμενων ενζύμων για να μελετηθεί διεξοδικότερα η ταυτότητα και η δράση τους.

B. Δοκιμή δράσης σε τρυβλία (Plate Assay)

Αποτελεί μια ταχεία ποιοτική μέθοδο εξέτασης της ενζυμικής έκφρασης διαφόρων στελεχών και πραγματοποιείται στην επιφάνεια τρυβλίων Petri. Για την εκτέλεση αυτής της εξέτασης αρχικά παρασκευάζεται θρεπτικό μέσο MM με άγαρ, και YNB χωριστά, για τόσα τρυβλία όσα και τα εξεταζόμενα ένζυμα και αποστειρώνεται στους 121 °C για 20 min. Το άγαρ αναμειγνύεται σε dH₂O όγκου ίσου με τον τελικό επιθυμητό όγκο του θρεπτικού MM μείον τους όγκους των υδατικών διαλυμάτων YNB και ABTS που θα προστεθούν έπειτα της αποστείρωσης. Αφού κρυώσει το θρεπτικό περίπου στους 60 °C προστίθενται η βιοτίνη, η

μεθανόλη, τα συμπληρωματικά διαλύματα αιμίνης και ιχνοστοιχείων (TES) αλλά και η κατάλληλη ποσότητα υδατικού διαλύματος ABTS συγκέντρωσης 20 mM ώστε η τελική συγκέντρωση του να είναι 2 mM. Μοιράζεται το θρεπτικό μέσο σε τρυβλία, αναμένεται η πήξη τους και έπειτα χωρίζονται σε τόσες περιοχές όσα τα στελέχη που θα εξεταστούν για κάθε ένζυμο. Εν προκειμένω, δημιουργούνται 16 τετράγωνα περιοχές στο κάτω μέρος του τρυβλίου κατασκευάζοντας ένα ευρύτερο τετράγωνο με απόσταση 0,8 cm των πλευρών του από τις άκρες του τρυβλίου και 16 εσωτερικά τετράγωνα πλευράς περίπου 1,6 cm. Κάθε τετράγωνη περιοχή εμβολιάζεται με διαφορετικό στέλεχος λαμβάνοντας μικρή ποσότητα κυττάρων με την άκρη ενός ρύγχους πιπέτας και απλώς ακουμπώντας την άκρη στο κέντρο της εκάστοτε περιοχής. Επίσης, μια κενή περιοχή των τρυβλίων εμβολιάζεται με μη μετασχηματισμένα κύτταρα X33. Τα τρυβλία επωάζονται σε ειδικό επωαστήριο στους 30 °C για 3 μέρες και κάθε μέρα επώασης προστίθενται 200 μ L καθαρής μεθανόλης στο καπάκι του τρυβλίου και αναδεύοντας το ελαφρώς. Μετά το πέρας των τριών ημερών επώασης, προστίθενται 20 μ L H₂O₂ (aq) συγκέντρωσης 2 mM σε κάθε αποικία 3 φορές ανά 10 min και παρατηρούνται οι περιοχές γύρω από τις αποικίες όπου αναμένεται ο σχηματισμός μιας πράσινης άλω, η οποία υποδεικνύει την οξειδωση του υποστρώματος ABTS. Οι αποικίες που σχηματίζουν γρηγορότερα και εντονότερα αυτήν την άλω αντιστοιχούν στα στελέχη με την αυξημένη παραγωγή ενζύμου.

2.2.9.2. Εξέταση συνθηκών ενζυμικής έκφρασης

Η εξέταση συνθηκών πραγματοποιείται για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ετερόλογης έκφρασης των επιθυμητών ενζύμων όσον αφορά είτε στις συνθήκες όπως θερμοκρασία και μέρες επώασης είτε στη συγκέντρωση συμπαραγόντων. Για κάθε διαφορετική τιμή μιας παραμέτρου παρασκευάζονται 2 καλλιέργειες των 50 mL για κάθε ένζυμο ενώ η υπόλοιπη διαδικασία είναι όμοια με την εξέταση στελεχών με μικρού μεγέθους καλλιέργειες (2.2.9.1).

Κατά τα διεξαγόμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εξετάσεις συνθηκών για τις ημέρες επώασης και τη συγκέντρωση των συμπαραγόντων. Έτσι, για τα ένζυμα A55 και AsqI πραγματοποιήθηκε εξέταση των συγκεντρώσεων των απαραίτητων συμπαραγόντων αναγράφονται στον επόμενο πίνακα.

Πίνακας 15. Συγκεντρώσεις των συμπαραγόντων που εξετάστηκαν για τα ένζυμα A55 και AsqI.

A55			AsqI		
Αρίθμηση διαφορετικών καλλιεργειών	Ένωση/Διάλυμα	Συγκέντρωση	Αρίθμηση διαφορετικών καλλιεργειών	Ένωση/Διάλυμα	Συγκέντρωση
1	-	-	1	-	-
2	TES	0,4% v/v	2	CuSO ₄	25 μM
3	TES FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,4% v/v 0,96 mM	3	CuSO ₄	50 μM
4	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 mM	4	CuSO ₄	75 μM
5	Αιμίνη	10 μM	5	CuSO ₄	100 μM
6	TES Αιμίνη	0,4% v/v 10 μM	-	-	-

2.2.10. Αντιδράσεις ενζύμων με αλκάνια

Για να εξεταστεί η δράση των UPOs σε νέα υποστρώματα τα οποία φέρουν ομοιότητες με πολυολεφίνες όπως το πολυαιθυλένιο, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις αυτών με αλκάνια και συγκεκριμένα με κ-εννιάνιο, κ-δωδεκάνιο και κ-εικοσιτετράνιο. Για κάθε ένζυμο παρασκευάστηκε τυφλό δείγμα δίχως H₂O₂, τυφλό δείγμα με H₂O₂ και αντίδραση με κάθε ένα από τα παραπάνω αλκάνια· κάθε δείγμα είχε συνολικό όγκο 200 μL και φτιαχνόταν εις διπλούν. Η συγκέντρωση των συστατικών των δειγμάτων σχεδιάστηκε να είναι η εξής:

- 50 mM Ρυθμιστικού διαλύματος Sodium Phosphate με pH=6
- 0,5 mM αλκανίου
- 10% v/v ακετόνη ≥99,8%
- 2,5 mM H₂O₂

Επομένως, η ογκομετρική σύσταση κάθε δείγματος ήταν η ακόλουθη:

- 100 μL Ρυθμιστικού διαλύματος Sodium Phosphate 100 mM με pH=6
- 77,5 μL Ενζύμου (για τις αντιδράσεις) είτε 77,5 μL Tris-Cl από το διάλυμα διαπίδυσης του ενζυμικού διαλύματος (για τα τυφλά δείγματα)
- 20 μL Αλκανίου 5 mM
- 2,5 μL H₂O₂ 200 mM

Ωστόσο, λόγω ατελούς διάλυσης των αλκανίων εντός των τελικών διαλυμάτων των δειγμάτων προτιμάται η διαδοχική προσθήκη κάθε ενός από τα συστατικά που φαίνονται παραπάνω σε κάθε δείγμα ξεχωριστά. Τα διαλύματα αλκανίων φτιάχνονται σε συγκέντρωση 5 mM με διαλύτη ακετόνη ≥99,8%. Για το εννιάνιο και δωδεκάνιο που βρίσκονται σε υγρή μορφή, ζυγίζονται 1,3 mg και 1,7 mg υγρού και διαλύονται έπειτα σε 2 mL καθαρής ακετόνης. Για το εικοσιτετράνιο που βρίσκεται σε μορφή σκόνης, ζυγίζονται 1,7 mg σκόνης και διαλύονται σε 1 mL ακετόνης.

Έπειτα της παρασκευής των δειγμάτων, επωάζονται σε ειδικό θερμαινόμενο και αναδεδόμενο επωαστήριο για Eppendorf των 1,5 mL για 24 h στους 30 °C και με ρυθμό ανάδευσης 900 rpm. Μετά το πέρας των 24 h τα δείγματα αποθηκεύονται σε κατάψυξη στους -20 °C και λαμβάνονται κάθε φορά τα δείγματα που επρόκειτο να αναλυθούν την ίδια μέρα σε όργανο αέριας χρωματογραφίας. Τα όργανα που χρησιμοποιούνται είναι τα GC-FID και GC-MS της SHIMADZU.

Για την ανάλυση σε όργανο GC χρειάζεται να γίνει πρώτα εκχύλιση των ολεφινικών περιεχομένων των δειγμάτων και των πιθανών προϊόντων τους κατά την αντίδραση τους με τα ένζυμα. Αυτό πραγματοποιείται με την προσθήκη 200 μL κ-εξανίου σε κάθε δείγμα και έπειτα από ανάδευση σε Vortex για 30 s, λαμβάνεται η άνω οργανική φάση η οποία προορίζεται έπειτα για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο. Σημειωτέον ότι η ανάλυση στο όργανο GC-FID απαιτεί πρώτα την ανάλυση ενός δείγματος καθαρού κ-εξανίου και κάθε δείγμα λαμβάνεται με μια ειδική σύριγγα των 3 μL, η οποία μετά από κάθε δειγματοληψία ξεπλένεται δύο φορές με καθαρό κ-εξάνιο.

2.2.11. Αντιδράσεις ενζύμων με σκόνη LDPE

Για την ένδειξη της βιοαποικοδομητικής δράσης των εκφρασμένων ενζύμων στο πολυαιθυλένιο εκτελούνται αντιδράσεις αυτών με σκόνη LDPE LD 653 της ExxonMobil· ακολουθούνται δε τα εξής βήματα:

1. Για κάθε ένζυμο πραγματοποιούνται τριπλές αντιδράσεις ενώ παρασκευάζονται και δύο επιπλέον αντιδράσεις που λειτουργούν ως τυφλές.
2. Για κάθε αντίδραση ζυγίζονται $5,0 \pm 0,5$ mg σκόνης PE εντός Eppendorf των 1,5 mL.
3. Σε κάθε Eppendorf αντίδρασης προστίθενται 450 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Potassium Phosphate 100 mM με pH=7,0 και 50 μ L ενζύμου (ή 50 μ L του διαλύτη του ενζύμου για τα τυφλές αντιδράσεις).
4. Τα Eppendorfs των αντιδράσεων επωάζονται σε θερμαινόμενο και ανακινούμενο επωαστήρα Eppendorf των 1,5 mL στους 30 °C με ρυθμό ανάδευσης 1350 rpm για 3 ημέρες. (Κάθε ημέρα επώασης προστίθενται 25 μ L ενζύμου ή διαλύτη στις αντιδράσεις)
5. Μετά το πέρας της επώασης, φυγοκεντρώνονται τα Eppendorfs υπό 11000 rpm για 10 min και λαμβάνεται με σύριγγα το περιεχόμενο υγρό δίχως να απομακρυνθούν τα κομμάτια PE που βρίσκονται στην επιφάνεια του.
6. Πραγματοποιούνται 2 ξεπλύματα του περιεχομένου των Eppendorfs για απομάκρυνση των αλάτων, όπου κάθε ξέπλυμα περιλαμβάνει την προσθήκη 1 mL mQ H₂O, την ανάδευση με δίνη (vortex), τη φυγοκέντρηση του υπό τα 11000 rpm για 10 min και την απομάκρυνση του υγρού με σύριγγα.
7. Ύστερα των ξεπλυμάτων τα στόμια των Eppendorfs καλύπτονται με αλουμινοφύλλο στο οποίο έχουν διανοιχθεί μικρές τρύπες και τοποθετούνται σε κατάψυξη στους -20 °C μέχρις ότου να παγώσει το περιεχόμενό τους, το οποίο περιέχει μικρή ποσότητα νερού.
8. Τα Eppendorfs κατευθύνονται έπειτα προς λυοφιλίωση για απομάκρυνση του εναπομείναντος νερού και την παραλαβή της σκόνης PE.
9. Τέλος, οι σκόνες PE των αντιδράσεων αναλύονται σε όργανο FTIR όπου λαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα απορροφήσεων τους ως προς ένα εύρος κυματαριθμών. (Η ανάλυση του φάσματος FTIR επιτρέπει την ποιοτική αναγνώριση πιθανής μεταβολής της δομής του PE λόγω ενζυμικής αποικοδόμησης)

3. Αποτελέσματα

3.1. Βιοπληροφορική ανάλυση

Οι αμινοξικές ακολουθίες των ενζύμων που μελετήθηκαν αναφέρονται στην ενότητα 2.1.2. οι οποίες σχεδιάστηκαν για ετερόλογη έκφραση στο σύστημα-ξενιστή *P. pastoris* ενώ σχεδιάστηκαν και οι πλασμιδιακοί φορείς pPICZα A με τα αντίστοιχα γονίδια. Αξιοποιώντας το λογισμικό PyMOL μπορούν και αναπαρίστανται οι τρισδιάστατες δομές των μελετώμενων ενζύμων, οι οποίες έχουν προκύψει από τον αλγόριθμο AlphaFold της DeepMind με εξαίρεση εκείνη του ενζύμου AsqI το οποίο έχει κρυσταλλογραφηθεί (PDB ID: 5YY2) [148]. Επίσης, έχει μελετηθεί η ομολογία τους με λοιπά ένζυμα ή μεταξύ τους μέσω του αλγορίθμου blastp, καθώς και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες μέσω του εργαλείου ExPASy οι οποίες παρατίθενται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16. Θεωρητικός υπολογισμένο μοριακό βάρος, ισοηλεκτρικό σημείο και συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας των μελετώμενων ενζύμων.

Ένζυμο	Μοριακό βάρος (kDa)	pI	ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
A55	27,5	5,9	38390
A57	26,8	5,2	29450
A58	30,3	5,9	32430
Demetra	84,7	5,3	191270
AsqI	85,5	6,6	141485

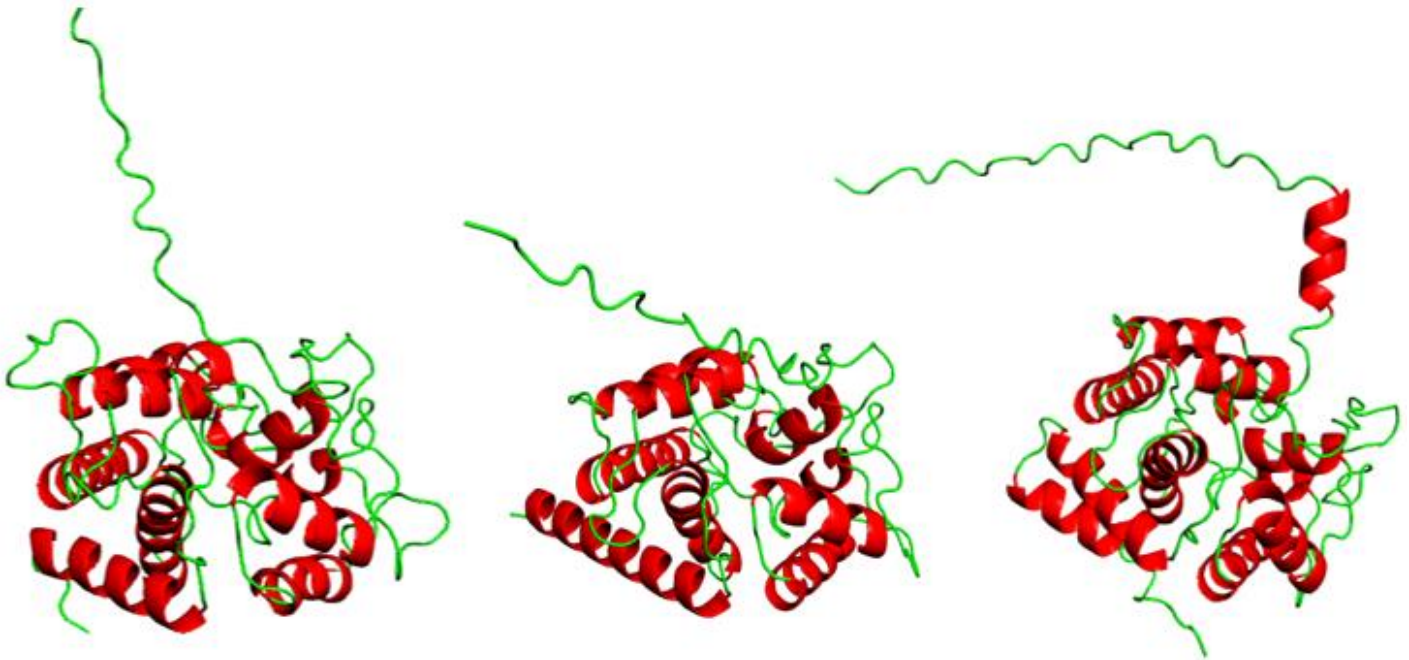
Εν συνεχεία, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την περαιτέρω βιοπληροφορική και δομική ανάλυση των ενζύμων ανά κατηγορία:

UPOs

Έχει ήδη αναφερθεί ότι οι μη ειδικές υπεροξυγενάσες και δη εκείνες που ανήκουν στην ομάδα των «βραχέων» UPOs αποτελούν ένζυμα τα οποία δρουν και οξειδώνουν αλειφατικές ενώσεις όπως αλκάνια και λιπαρά οξέα. Βάσει αυτής τους της ιδιότητας επιλέχθηκαν τρεις τέτοιες UPOs από τον μύκητα *Aspergillus transmontanensis*, ο οποίος έχει παρουσιάσει αποικοδομητική δράση σε μεγάλης αλυσίδας αλκάνια ενώ φαίνεται να εκφράζει ένζυμα που διασπούν το πολυαιθυλένιο [160]. Στόχος λοιπόν της επιλογής των συγκεκριμένων ενζύμων ήταν η διερεύνηση της δράσης

τους σε αλειφατικές ενώσεις και με την προοπτική ότι να μπορέσουν να δράσουν πιθανώς στην αλειφατική αλυσίδα του πολυαιθυλενίου.

Οι τρισδιάστατες δομές τους απεικονίζονται κατωτέρω:



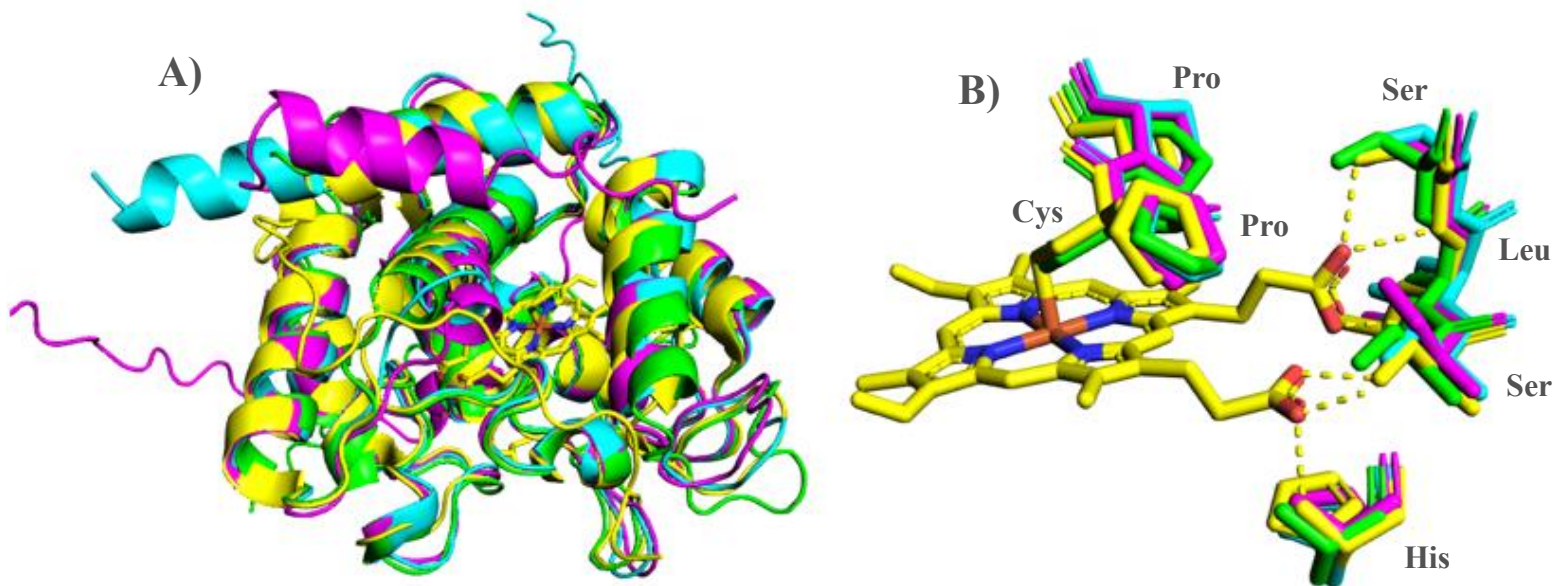
Εικόνα 7. Τρισδιάστατες δομές των A55 (αριστερά), A57 (μέση) και A58 (δεξιά).

Φαίνεται από τις ανωτέρω απεικονίσεις (Εικόνα 7) ότι οι δομές των τριών ενζύμων είναι όμοιες, με ποσοστό ομολογίας 35% του ενζύμου A55 με τα υπόλοιπα δύο, τα οποία δύο ένζυμα (A57 και A58) παρουσιάζουν μεταξύ τους ποσοστό ομολογίας ίσο με 58%. Σημειωτέον ότι έχει καθιερωθεί ότι δύο εξεταζόμενες πρωτεΐνες είναι ομόλογες μεταξύ τους για ποσοστά άνω του 25-30% [161]. Συνεπώς, μπορούν να χαρακτηριστούν αυτά τα τρία ένζυμα ως ομόλογα μεταξύ τους. Ωστόσο, και τα τρία διαθέτουν μια αλληλουχία 20-35 αμινοξέων στην αρχή της πρωτοταγούς τους δομής οι οποίες δεν παρουσιάζουν δευτεροταγή χαρακτηριστικά και έχουν σημειωθεί όμως από τον αλγόριθμο AlphaFold ως περιοχές μικρής αξιοπιστίας για την πραγματική θέση τους στον χώρο και είναι πιθανό να μην απεικονίζονται ορθώς.

Επιπλέον, ευθυγραμμίστηκαν οι αλληλουχίες και οι δομές των ανωτέρω ενζύμων με μια κρυσταλλογραφημένη μη ειδική υπεροξυγενάση από τον μικροοργανισμό *Marasmius rotula* (*MroUPO*) με κωδικό 5FUJ στη βάση πρωτεϊνικών δεδομένων Protein Data Bank (PDB), η οποία ανήκει στην ίδια κατηγορία υπεροξυγενάσεων και έχει παρουσιάσει οξειδωτική δράση σε μεγάλης αλυσίδας αλκάνια για την παραγωγή καρβοξυλικών/λιπαρών οξέων [162]. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των αλληλουχιών και των δομών των ενζύμων παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 8 και Εικόνα 9)

<i>Mro</i> UPO	1	-----SAHP---WKAPGPND SRG PCPGLNLANHGFLPRNGRNISVPMIVKAGFEGYNVQ----SD	54
A55	1	EFD-----PGGHE---FRAPGPFDSR S PCPGLNALANHGYPRLDGNLDYEMINKAAQAAYNFESGFYID	62
A57	1	EFRLPTEGQLSNRRQASIPAGHPPVHNKPAGPGDVRAP CP MLNLANHGYPHLDGKNITEEHTIRALKVALNIE----EE	76
A58	1	EFQ-----KIP-----WSPPGPDDVRS PC PVNLALANHDILQHDGKDITQQDQTVRAM-DALHVD----EE	55
<i>Mro</i> UPO	55	ILILAGKIGMLTS-RE-ADTISLEDLKLHG TI EH D ASLSREDVAIGDNLHFNEAIFTTLANSNPGAD-----VYNISS	125
A55	63	AVNMVFEFNISTTNRPN-ETFHLRDLARH DI EADGSLTRNDIYFGDDLHFDATVWEPVAK-DLGLDHYRDVDSFVTVDT	140
A57	77	LSQYLFQEALTTNPAENATTFSLNDLSRH NI EH D ASLSRLDHYFGDNHDFNQKIFDQTRSYP-----DPVISVQA	148
A58	56	LSNTLFAAALKTNLTPNATTFSLDDLDH HN IEH D GSLSRGDFYFGDNHSFNQTLFDQVKS Y WT-----EPLIDLHL	127
<i>Mro</i> UPO	126	AAQVQHDLADSLARNPNVTNTDLTATIR S SESAFFLTVMSAGDPLRGEAPKKFVNVVFFREERMPIKEGWKRSTTPTITIP	205
A55	141	AAKATQNRVGLAMSANPQFNASELWKQFQY G TALYLLTLWDND--HNAVPKPWKALMGEDRIPYKEGYTKGNVTKT--	216
A57	149	AANAREARVKASMATNPTFALSELGLAF G YGETAAYIIIL--GNKTTGLVNR S WVEYLFENERLPSELG W KREDPISLS	226
A58	128	GAKARLAGVNRSKATNPTFDLSGFRLRF S YAQTATYILVF--GDKVSGTVNKTWIEYLF E KERLPIELG W EKRENPISTS	205
<i>Mro</i> UPO	206	LLGPIIERITELSDWKPTGDNCGAI V LSPEL-----	236
A55	217	--GKRIQAMN-----KAVRDAVGLK-----SVD	237
A57	227	DLENMLQQVVN-----ATGNSEETKLD M IKRGDFHIGRRSVD	263
A58	206	DLDSMIERVME-----ATKEIENSQ-----EMVD	229

Εικόνα 8. Πολλαπλή ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των ενζύμων *Mro*UPO, A55, A57 και A58, όπου έχουν σημειωθεί εντός κόκκινου πλαισίου οι αλληλουχίες αμινοξέων που συμμετέχουν στη δέσμευση της αίμης.



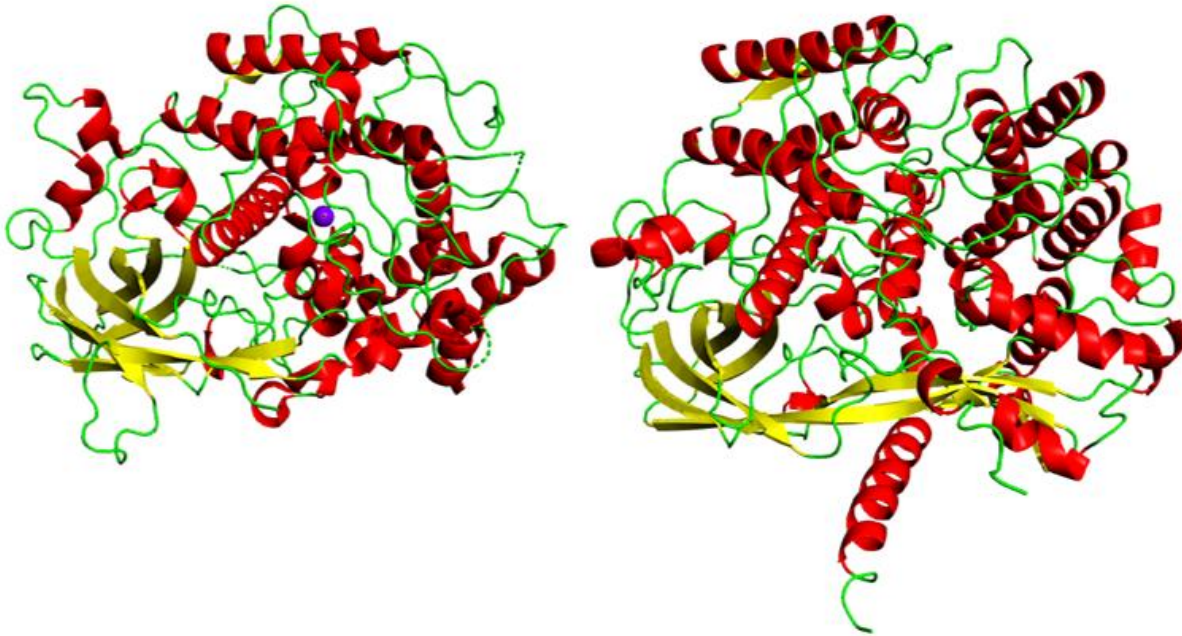
Εικόνα 9. Α) Αλληλεπικάλυψη των δομών των ενζύμων A55 (πράσινο), A57 (γαλάζιο), A58 (ροζ) και της UPO από τον *M. rotula* 5FUJ (κίτρινο), όπου παρουσιάζεται και το δεσμευμένο μόριο της αίμης με κίτρινη απόχρωση στο εσωτερικό των τρισδιάστατων δομών. Β) Απεικόνιση των καταλοίπων αμινοξέων που δεσμεύουν και αλληλεπιδρούν με την αίμη στο μόριο του 5FUJ όπου και αντιπαρατίθενται τα αντίστοιχα αμινοξέα των UPOs A55 (πράσινο), A57 (γαλάζιο) και A58 (ροζ).

Στις απεικονίσεις της Εικόνας 9 είναι ευδιάκριτο το μόριο αίμης με κόκκινο χρώμα στο εσωτερικό των δομών και επιτρέπει μάλιστα την οπτική αναγνώριση της περιοχής του ενεργού κέντρου των συγκεκριμένων ενζύμων. Το ένζυμο *Mro*UPO είναι ομόλογο με τα μελετώμενα ένζυμα καθώς παρουσιάζει ποσοστό ομολογίας 36% με το A55 και 34% με τα A57 και A58. Η ομολογία των ενζύμων μπορεί να επιβεβαιωθεί και από την εκτεταμένη επικάλυψη των δομών τους στις ανωτέρω απεικονίσεις. Μάλιστα έπειτα από διερεύνηση των αμινοξέων που σχηματίζουν δεσμούς με το μόριο αίμης του κρυσταλλογραφημένου ενζύμου και το προσδένουν στο υπόλοιπο πρωτεϊνικό μόριο, βρέθηκε ότι αλληλεπίδραση με την αίμη παρουσιάζει μια αλληλουχία HDASLS όπου τους δεσμούς τους σχηματίζουν στην ουσία τα μόρια ιστιδίνης (H), σερίνης (S) και λευκίνης (L) της αλληλουχίας. Μέσω ευθυγράμμισης των αλληλουχιών των ενζύμων επιτεύχθηκε η αναγνώριση των αντίστοιχων αμινοξέων στις μελετώμενες UPOs. Συγκεκριμένα, η ίδια αλληλουχία βρέθηκε στο ένζυμο A58 αλλά και στο A57 με ένα διαφορετικό αμινοξύ ως HDGSLS που όμως δεν επηρεάζει τα αμινοξέα που σχηματίζουν τους δεσμούς με την αίμη. Από την άλλη στο ένζυμο A55 βρέθηκε η θέση που αντιστοιχεί στην επιθυμητή αλληλουχία όμως είχε τη μορφή ADGSLT όπου τα μόρια ιστιδίνης και σερίνης έχουν αντικατασταθεί με μόρια αλανίνης (A) και θρεονίνης (T) αντίστοιχα, ενώ διατηρούνται τα ίδια λοιπά αμινοξέα που ομοιάζουν με την αλληλουχία του A57. Επίσης, επιβεβαιώθηκε η παρουσία της τριπλέτας αμινοξέων PCP στο μόριο του κρυσταλλογραφημένου ενζύμου, όπου τα δύο μόρια προλίνης (P) εκθέτουν αποτελεσματικά την υδροθειική ομάδα της κυστεΐνης (C) με την οποία ενώνεται το άτομο σιδήρου της αίμης [163]. Η ίδια τριπλέτα παρατηρήθηκε και στις τρεις μελετώμενες UPOs πλησίον της αναμενόμενης θέσης του ενεργού κέντρου. Η αντιστοίχιση των αλληλουχιών που αναφέρθηκαν και στα τέσσερα ένζυμα φανερώνεται τόσο στην Εικόνα 8 όπου οι αναφερόμενες αλληλουχίες περιέχονται σε κόκκινο πλαίσιο, όσο και στην Εικόνα 9, όπου παρουσιάζεται η τρισδιάστατη αλληλεπικάλυψη των αμινοξέων που συμβάλλουν στη δέσμευση της αίμης. Συνεπώς, τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν τόσο τη δυνατότητα όσο και την ακριβή θέση πρόσδεσης της αίμης στα ένζυμα A55, A57 και A58, φανερώνοντας παράλληλα τη θέση του ενεργού τους κέντρου.

Μεταλλοένζυμα Demetra & AsqI

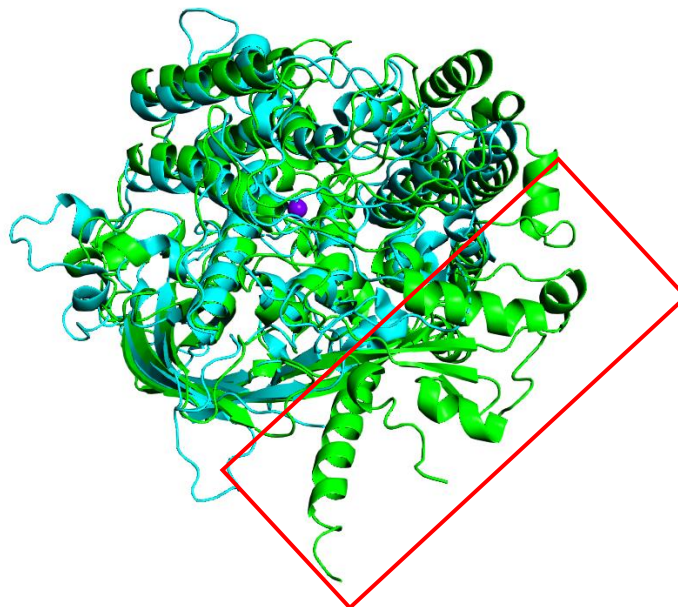
Επιλέχθηκε αρχικά η αρυλφορίνη Demetra (μέρος της οικογένειας των εξαμερινών), για το οποίο μια ομάδα ερευνητών απέδειξε ότι είχε αποικοδομητική δράση τόσο σε φιλμ όσο και σε κοκκοποιημένου πολυαιθυλενίου, και η μελέτη του οποίου θεωρήθηκε σημαντική για τη διερεύνηση βιοαποικοδομητικών πλατφορμών του πολυαιθυλενίου [103]. Βάσει αυτού του ενζύμου αναζητήθηκαν διάφορα ομόλογα ένζυμα τα οποία πιθανώς να είχαν παρόμοια δράση, με την πλειονότητα τους να αποτελούν χαλκοένζυμα τύπου 3, δηλαδή κυρίως αιμοκυανίνες και φαινολοξειδάσες, οικογένειες με τις οποίες συγγενεύει φυλογενετικά σε υψηλότερο βαθμό. Έτσι, επιλέχθηκε τελικά η κυκλοπενάση AsqI με κωδικό 5YY2 στην PDB, η οποία παρουσίαζε αρκετά μεγάλη ομολογία με τις αιμοκυανίνες ενώ φάνηκε να παρουσιάζει υψηλή συγγένεια και με το ένζυμο Demetra σε ποσοστό 25%.

Η Demetra έχει μοριακό βάρος ίσο με 84,7 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο $pI=5,3$, ενώ η AsqI μοριακό βάρος ίσο με 85,5 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο $pI=6,6$. Οι τρισδιάστατες δομές τους φαίνονται στην Εικόνα 10:



Εικόνα 10. Τρισδιάστατη δομή των ενζύμων AsqI (αριστερά) και Demetra (δεξιά), όπου παρουσιάζεται ο δεσμευμένος Zn του ενζύμου AsqI ως μωβ σφαίρα.

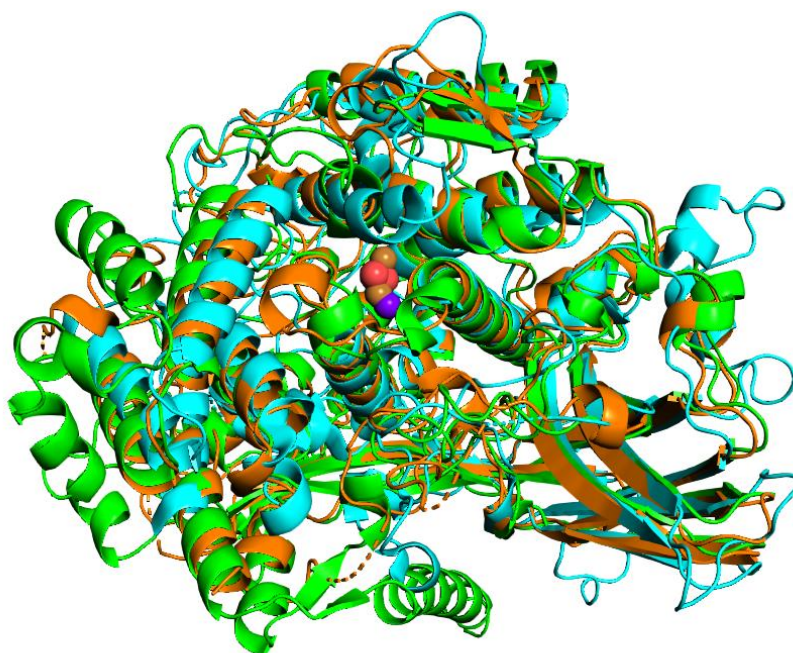
Αντιστοίχως, πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση των δομών των δύο αυτών ενζύμων για να αναδειχθούν οι δομικές διαφορές τους.



Εικόνα 11. Αλληλεπικάλυψη των δομών των ενζύμων Demetra (πράσινο) και AsqI (γαλάζιο), όπου απεικονίζεται και ο συμπαράγοντας του AsqI, ο Zn, ως μωβ σφαίρα.

Καθίσταται εμφανές από την Εικόνα 11 ότι στην περιοχή γύρω από το ενεργό κέντρο του AsqI (όπου φαίνεται η μωβ σφαίρα που απεικονίζει ένα μόριο Zn) η πλειονότητα των δευτεροταγών δομικών στοιχείων των δύο ενζύμων (α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα) παρουσιάζουν αλληλεπικάλυψη. Μπορεί να αναχθεί το συμπέρασμα ότι η περιοχή του ενεργού κέντρου της Demetra βρίσκεται στο ίδιο σημείο όπου βρίσκεται και το AsqI λόγω της υψηλής ομοιότητας τους στο δεδομένο σημείο. Στο κόκκινο πλαίσιο της Εικόνας 11 φαίνεται ωστόσο να υπάρχουν βέβαια επιπλέον δομές που διαθέτει η Demetra τις οποίες δεν διαθέτει η AsqI. Η διαπίστωση αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η δομή της AsqI έχει προκύψει από κρυσταλλογραφία και πιθανώς να μην έχουν αποτυπωθεί ορισμένα τμήματα της καθότι η AsqI έχει ελαφρώς μεγαλύτερο μοριακό βάρος πράγμα που δεν δικαιολογεί αυτή τη διαφορά στον αριθμό των δομών. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη σύγκριση του αριθμού αμινοξέων της AsqI και του αριθμού αμινοξέων που έχουν απεικονιστεί στην τρισδιάστατη δομή της κατά την κρυσταλλογραφία.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση των δεδομένων ενζύμων με μια κρυσταλλογραφημένη αιμοκυανίνη του αρθρόποδου *Limulus polyphemus* με κωδικό 1NOL στην PDB, η οποία αποτελεί ομόλογη πρωτεΐνη και των δύο, με ποσοστό ομολογίας 27% και 26% για τα ένζυμα Demetra και AsqI αντίστοιχα. Μέσω αυτής της σύγκρισης των μελετώμενων ενζύμων επιθυμείται να διερευνηθούν οι πιθανές θέσεις και μορφές των κέντρων δέσμευσης χαλκού από το ένζυμο Demetra, καθώς οι πρωτεΐνες με τις οποίες συγκρίνεται διαθέτουν είτε ένα είτε δύο κέντρα δέσμευσης μετάλλων τύπου 3.

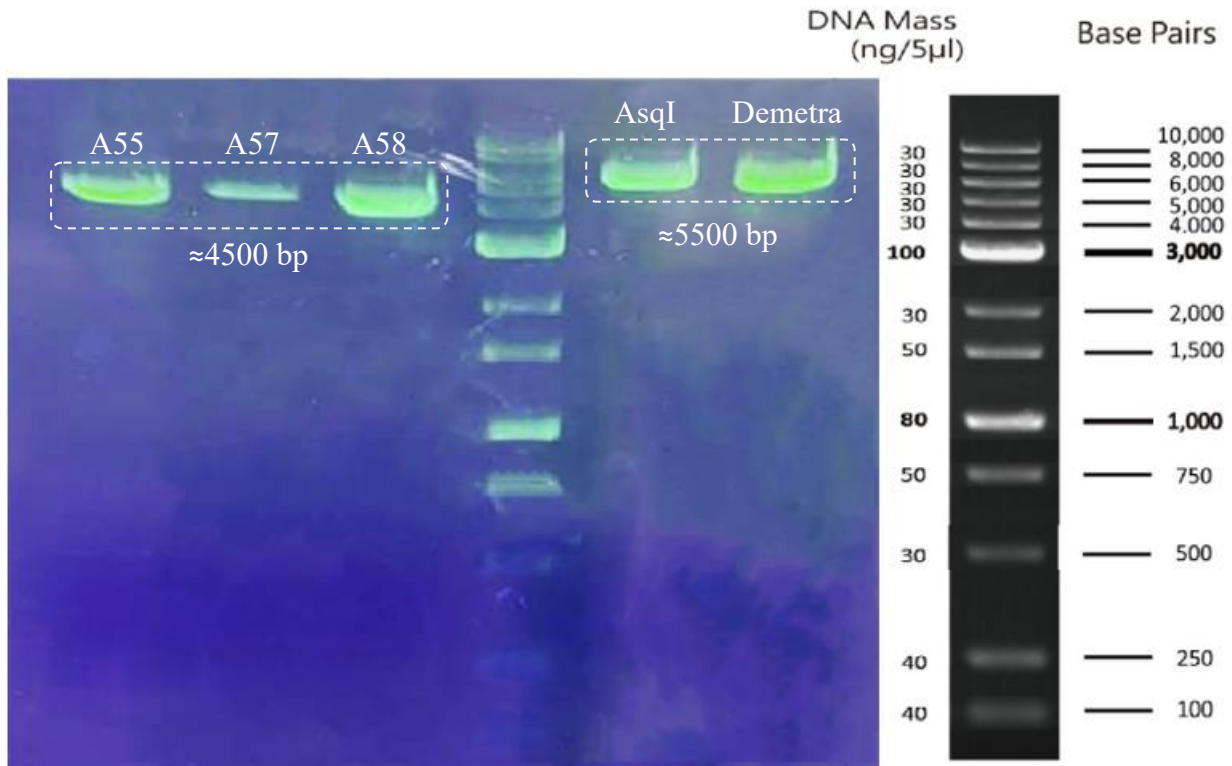


Εικόνα 12. Αλληλεπικάλυψη των δομών των ενζύμων AsqI (πράσινο), Demetra (γαλάζιο) και μιας αιμοκυανίνης 1NOL (ροζ), όπου απεικονίζονται τα δύο άτομα χαλκού της αιμοκυανίνης ως καφέ σφαίρες με την υπεροξειδική γέφυρα (κόκκινες σφαίρες) αλλά και το άτομο Zn της AsqI ως μωβ σφαίρα.

Η συγγένεια των πρωτεϊνικών δομών καθίσταται επίσης εμφανής στην ανωτέρω εικόνα (Εικόνα 12), ενώ εμφανίζονται και τα δύο άτομα χαλκού που έχει δεσμεύσει η αιμοκυανίνη, τα οποία σηματοδοτούν τη θέση δέσμευσης οξυγόνου και συνεπώς τη θέση του ενεργού κέντρου όταν η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δρα ως φαινολοξειδάση. Παρατηρείται ότι το άτομο ψευδαργύρου που έχει δεσμεύσει η AsqI βρίσκεται σχεδόν στην ίδια θέση με το ένα άτομο χαλκού, πράγμα που επιβεβαιώνει για ακόμη μια φορά την ομολογία των ενζύμων. Τα άτομα χαλκού, αλλά και ψευδαργύρου, δεσμεύονται μέσω χηλικής σύνδεσης με τρία μόρια ιστιδίνης το καθένα, όμως με την εξέταση των αμινοξέων που βρίσκονται πλησίον των μετάλλων αλλά στο μόριο της Demetra δεν βρέθηκε αντίστοιχος αριθμός μορίων ιστιδίνης· υπήρχε μόνο ένα μόριο ιστιδίνης και στις υπόλοιπες θέσεις βρέθηκαν μόρια τυροσίνης, συγκρίνοντας φυσικά με το μόριο της αιμοκυανίνης.

3.2. Πολλαπλασιασμός πλασμιδίων

Κατά τον πολλαπλασιασμό των χρησιμοποιούμενων πλασμιδίων σε κύτταρα *E. coli* και την ύστερη γραμμικοποίηση για την εισαγωγή τους κύτταρα *P. pastoris* πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Το ανακυπτόμενο πήκτωμα φαίνεται στην Εικόνα 13.

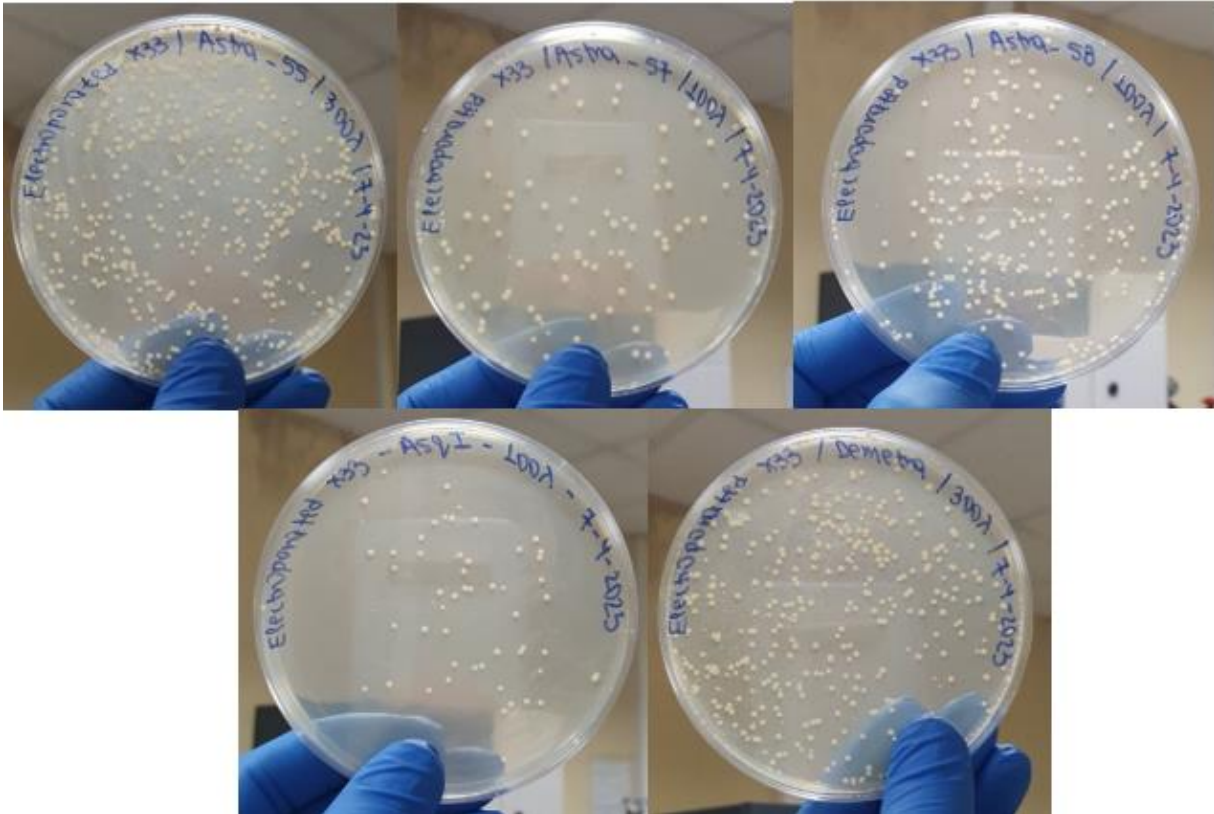


Εικόνα 13. Πήκτωμα αγαρόζης με τα γραμμικοποιημένα πλασμίδια και τις αντίστοιχες φοριζουσες μπάντες τους σε σύγκριση με τον χρησιμοποιούμενο ladder (FastGene 1 kb DNA Marker Plus, NIPPON Genetics GmbH).

Φαίνεται από τα παραπάνω ότι τα πλασμίδια έχουν πολλαπλασιαστεί και απομονωθεί επιτυχώς δίχως προσμίξεις ή λανθασμένες επανενώσεις των δακτυλίων. Επιπλέον, τα πλασμίδια των ενζύμων A55, A57 και A58 βρίσκονται στο ίδιο ύψος περίπου που αντιστοιχεί στα 4500 ζεύγη βάσεων, ενώ τα πλασμίδια των ενζύμων Demetra και AsqI είναι ελαφρώς υψηλότερα στα 5500 ζεύγη βάσεων.

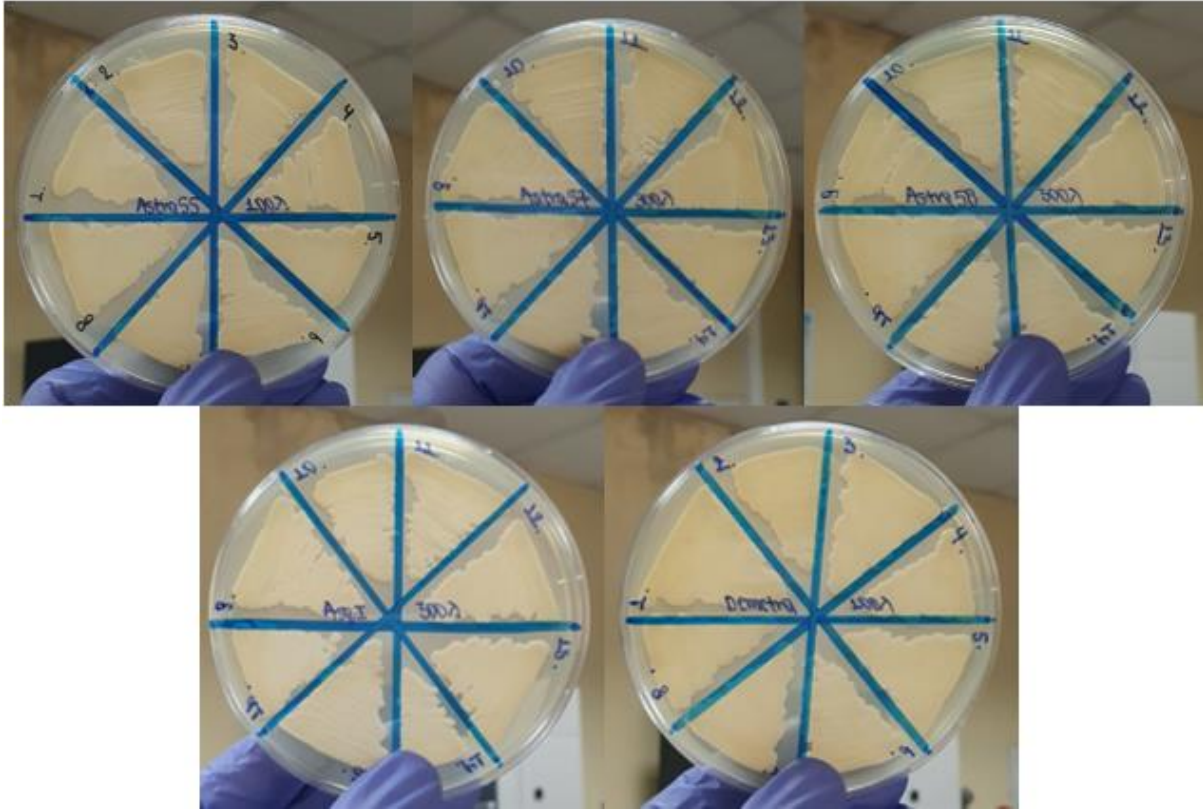
3.3. Μετασχηματισμός κυττάρων *P. pastoris*

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός κυττάρων X33 της ζύμης *P. pastoris* μέσω ηλεκτροδιάτρησης με τα 5 πλασμίδια που φέρουν τη γενετική πληροφορία για τα 5 μελετώμενα ένζυμα. Τα αρχικά τρυβλία με τα μετασχηματισμένα κύτταρα που προέκυψαν ήταν δύο για κάθε ένζυμο και παρακάτω παρατίθεται το ένα τρυβλίο του εκάστοτε ενζύμου όπου φαίνονται οι ανεπτυγμένες αποικίες (Εικόνα 14), πράγμα που αποτελεί την πρώτη ένδειξη για την επιτυχία του μετασχηματισμού αφού τα κύτταρα παρουσίασαν αντίσταση στη ζεοσίνη.



Εικόνα 14. Τρυβλία ανάπτυξης μετασχηματισμένων κυττάρων *P. pastoris*.

Έπειτα έγινε ανακαλλιέργεια 8 αποικιών από κάθε τρυβλίο σε τρυβλία χωρισμένα σε 8 περιοχές και παρακάτω παρουσιάζεται το ένα τρυβλίο εκ των δύο που προέκυψαν για κάθε ένζυμο (Εικόνα 15). Επίσης, επιβεβαιώνεται η αντίσταση των κυττάρων στη ζεοσίνη που συνεπάγεται τον επιτυχή μετασχηματισμό τους.



Εικόνα 15. Τρυβλία ανάπτυξης ανακαλλιέργειών από τις αποικίες των τρυβλίων με τα μετασχηματισμένα στελέχη.

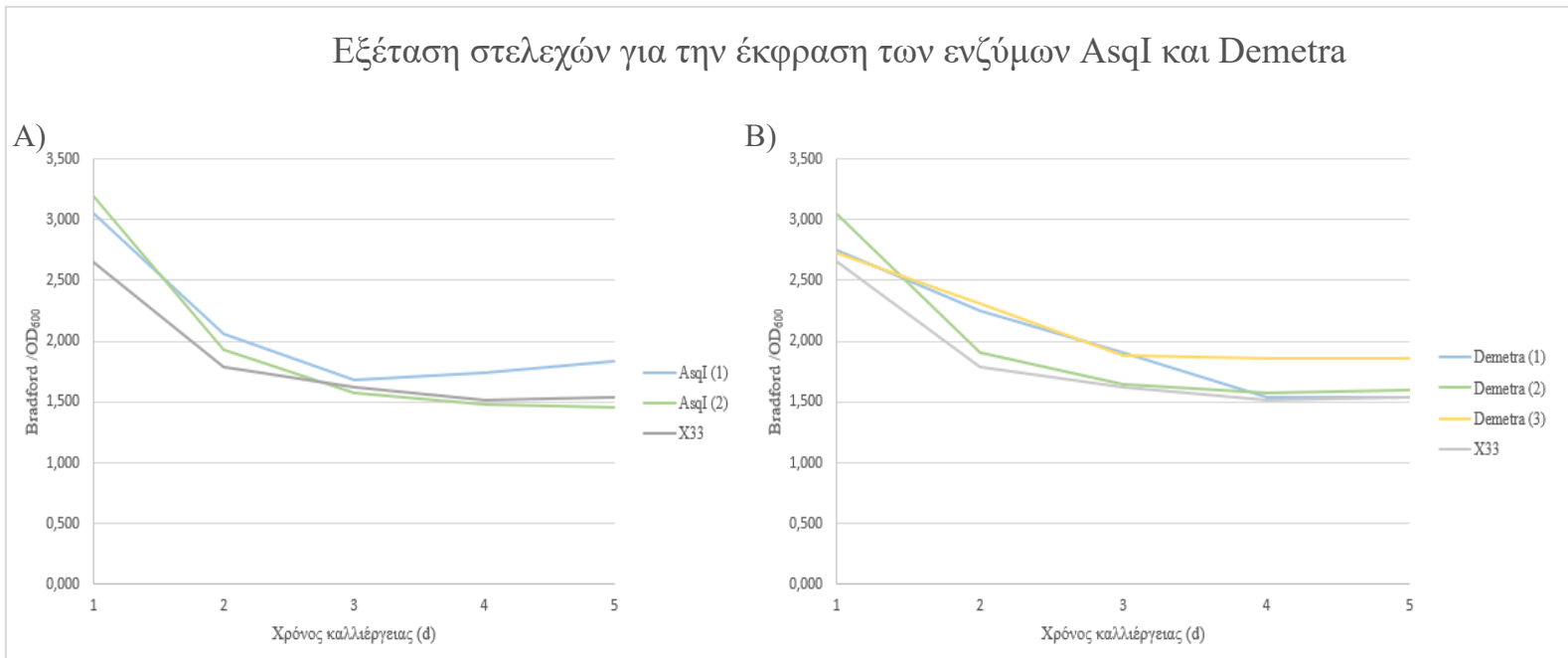
3.4. Ετερόλογη έκφραση των μεταλλοενζύμων Demetra και AsqI

Κατ' αρχάς, χρειάζεται να σημειωθεί ότι έγινε η παραδοχή ότι κατά την απομόνωση των ενζύμων μέσω IMAC τα πρωτεϊνικά διαλύματα που προκύπτουν αποτελούνται αποκλειστικά από το επιθυμητό ένζυμο και βάσει αυτού πραγματοποιείται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ενζυμικών διαλυμάτων.

3.4.1. Εξέταση μετασχηματισμένων στελεχών

Για να βρεθούν τα στελέχη με την αποδοτικότερη παραγωγή των ενζύμων Demetra και AsqI, πραγματοποιήθηκε εξέταση των στελεχών, που προέκυψαν με τον μετασχηματισμό, με μικρές υγρές καλλιέργειες. Σημειώτεον ότι ακολουθήθηκε ένα συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης για την έκφραση μεταλλοενζύμων που περιλαμβάνει θερμοκρασία έκφρασης 27~28 °C και συγκέντρωση συμπαραγόνα, δηλαδή θεικού χαλκού, στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ίση με 25 μM. Συγκεκριμένα για την εξέταση λήφθηκαν 2~3 αποικίες από κάθε σύνολο στελεχών που μετα-

σχηματίστηκαν με το ίδιο πλασμίδιο και 1 αποικία από μη μετασηματισμένα κύτταρα X33 και αναπτύχθηκαν στους 28 °C για 6 μέρες και με ρυθμό ανάδευσης 180 rpm. Οι ημερήσιες μετρήσεις οπτικής πυκνότητας και Bradford των καλλιέργειών παρουσιάζονται στο Παράρτημα Β, όπου έχει υπολογιστεί ο λόγος της απορρόφησης Bradford προς την οπτική πυκνότητα κάθε καλλιέργειας, μέγεθος που αντικατοπτρίζει την πρωτεϊνική έκφραση κάθε στελέχους ανά ποσότητα κυτταρικής βιομάζας, αλλά και της καλλιέργειας των μη μετασηματισμένων που αποτελεί δείγμα ελέγχου και βάση σύγκρισης των μετρήσεων. Παρακάτω παρουσιάζεται ο λόγος της απορρόφησης Bradford/OD₆₀₀ ανά τις μέρες καλλιέργειας (Σχήμα 23).

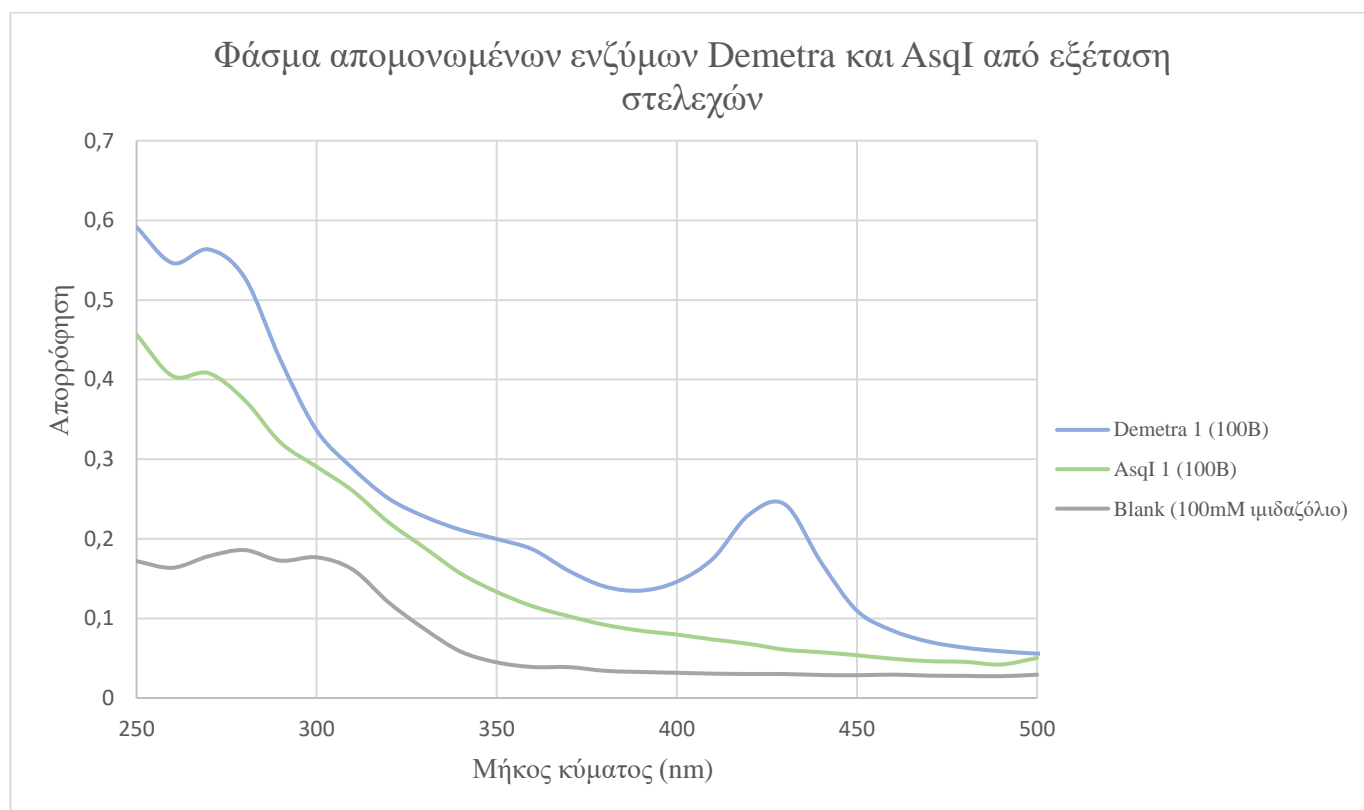


Σχήμα 23. Διαγραμματική απεικόνιση των λόγων απορροφήσεων Bradford/OD₆₀₀ για τα μετασηματισμένα στελέχη των ενζύμων: Α) AsqI και Β) Demetra, παράλληλα με τα μη μετασηματισμένα στελέχη X33.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα, αποφάνθηκε ότι τα καλύτερα στελέχη ήταν το AsqI (1) και το Demetra (1) για τα δύο ένζυμα αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες των στελεχών αυτών υπέστησαν την κατάλληλη επεξεργασία για να απομονωθούν τα παραγόμενα ένζυμα. Έτσι, μετά την απομόνωση τους κατά τη χρωματογραφία IMAC μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των κλασμάτων 100B στα οποία εκλούεται η περισσότερη ποσότητα πρωτεΐνης. Στον Πίνακα 17 παρουσιάζονται οι ενζυμικές συγκεντρώσεις των κλασμάτων καθώς και το φάσμα απορρόφησης από τις καλλιέργειες έκφρασης των ενζύμων στο εύρος 250~500 nm στο Σχήμα 24.

Πίνακας 17. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων 100B από την εξέταση στελεχών των AsqI και Demetra.

Ένζυμο/Καλλιέργεια	Ενζυμική συγκέντρωση (mg/mL)
AsqI-1	0,44
Demetra-1	1,16



Σχήμα 24. Φάσμα απορρόφησης κλασμάτων 100B, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), από την εξέταση στελεχών για το ένζυμο Demetra (250-500 nm).

Στο Σχήμα 24, πέρα από την κορυφή που αποδίδουν οι πρωτεΐνες στα 280 nm, λόγω της απορρόφησης των αρωματικών δακτυλίων συμβατικών αμινοξέων, παρατηρείται επίσης μια έντονη κορυφή στα 420 nm για το ένζυμο Demetra. Η κορυφή των 420 nm είναι χαρακτηριστική ορισμένων χαλκοενζύμων και προκύπτει από τη δέσμευση του χαλκού στο ενεργό κέντρο του ενζύμου που αποδίδει μια κιτρινίζουσα χρώση στο πρωτεϊνικό διάλυμα. Για το ένζυμο AsqI δεν παρατηρήθηκε κάποια κορυφή εκτός των 280 nm, όπου βέβαια αναμενόταν μια κορυφή στα 420 nm αντίστοιχη του ενζύμου Demetra από τη πιθανή δέσμευση του χαλκού. Τα στελέχη λοιπόν AsqI (1) και Demetra (1) των δύο ενζύμων αξιοποιήθηκαν έπειτα για τις μεγαλύτερης κλίμακας

καλλιέργειες παραγωγής τους, ενώ αποθηκεύτηκαν και σε διάλυμα γλυκερόλης σύμφωνα με τη διαδικασία της ενότητας 2.2.4 για μελλοντική χρήση.

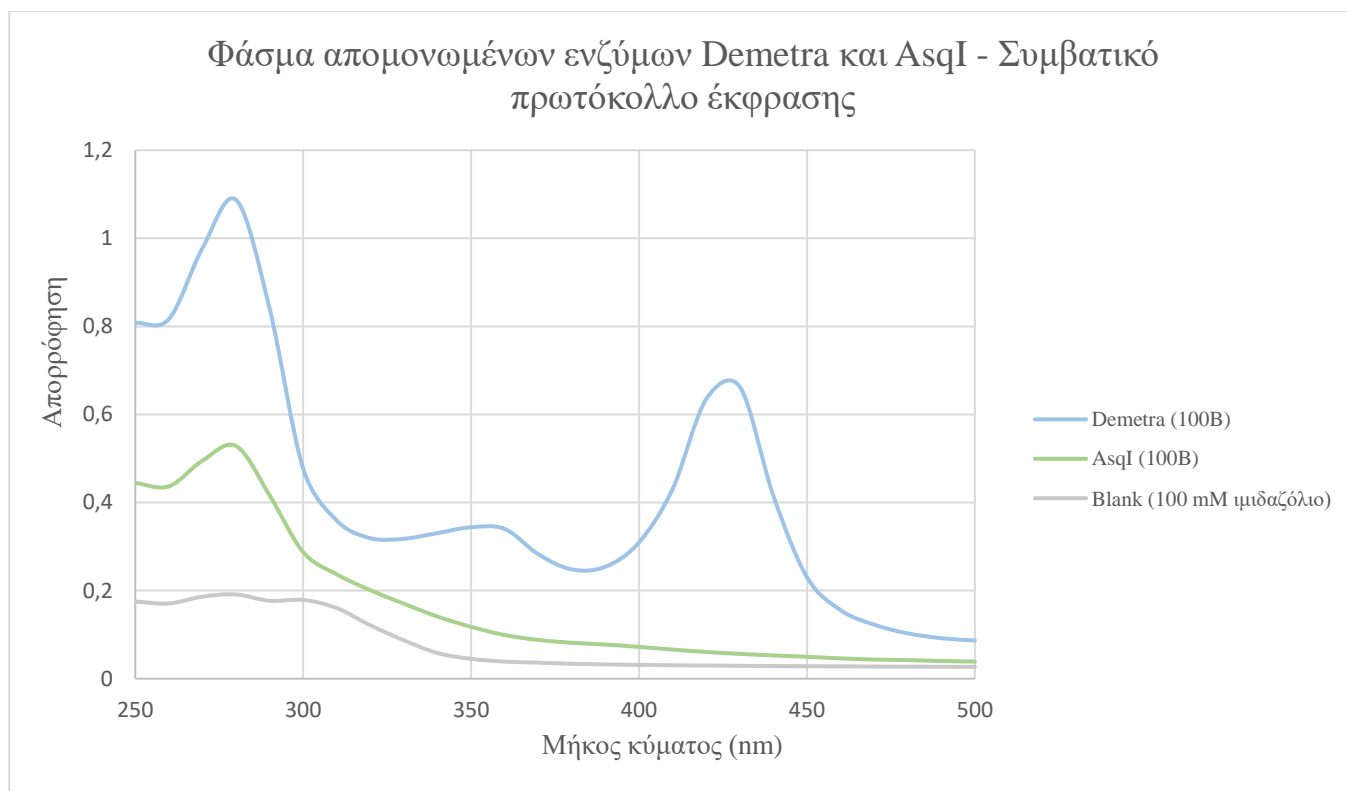
3.4.2. Καλλιέργειες για παραγωγή των μεταλλοενζύμων

3.4.2.1. Ετερόλογη έκφραση των ενζύμων AsqI και Demetra σε μεγαλύτερη κλίμακα ακολουθώντας συμβατικό πρωτόκολλο

Αφού αναζητήθηκαν και επιλέχθηκαν τα βέλτιστα στελέχη για κάθε ένζυμο, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη των βέλτιστων στελεχών σε καλλιέργειες των 200 mL (μία για κάθε ένζυμο) με επαγωγή στους 28 °C για 5 μέρες σύμφωνα με το συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης μεταλλοενζύμων, Συγκεκριμένα, αυξήθηκε ο όγκος των καλλιεργείων σε σχέση με τις προηγούμενες καλλιέργειες (3.4.1) ώστε να επιτευχθεί υψηλότερη παραγωγή των ενζύμων και να μπορέσουν να εκτελεστούν εν συνεχεία περαιτέρω πειραματικές τεχνικές και αναλύσεις για τη μελέτη των ιδιοτήτων και της δράσης τους. Έπειτα της ανάπτυξης των καλλιεργείων ακολούθησε η κατάλληλη επεξεργασία του κυτταρικού υγρού και απομονώθηκαν τελικώς τα ένζυμα στα χρωματογραφικά κλάσματα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 100 mM. Παράλληλα, μετρήθηκε η απορρόφηση των κλασμάτων στα 280 nm και υπολογίστηκε η ενζυμική συγκέντρωση τους, οι τιμές των οποίων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα, καθώς και τα αντίστοιχα φάσματα των 250-500 nm:

Πίνακας 18. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων 100B κατά την έκφραση των ενζύμων AsqI και Demetra με συμβατικό πρωτόκολλο.

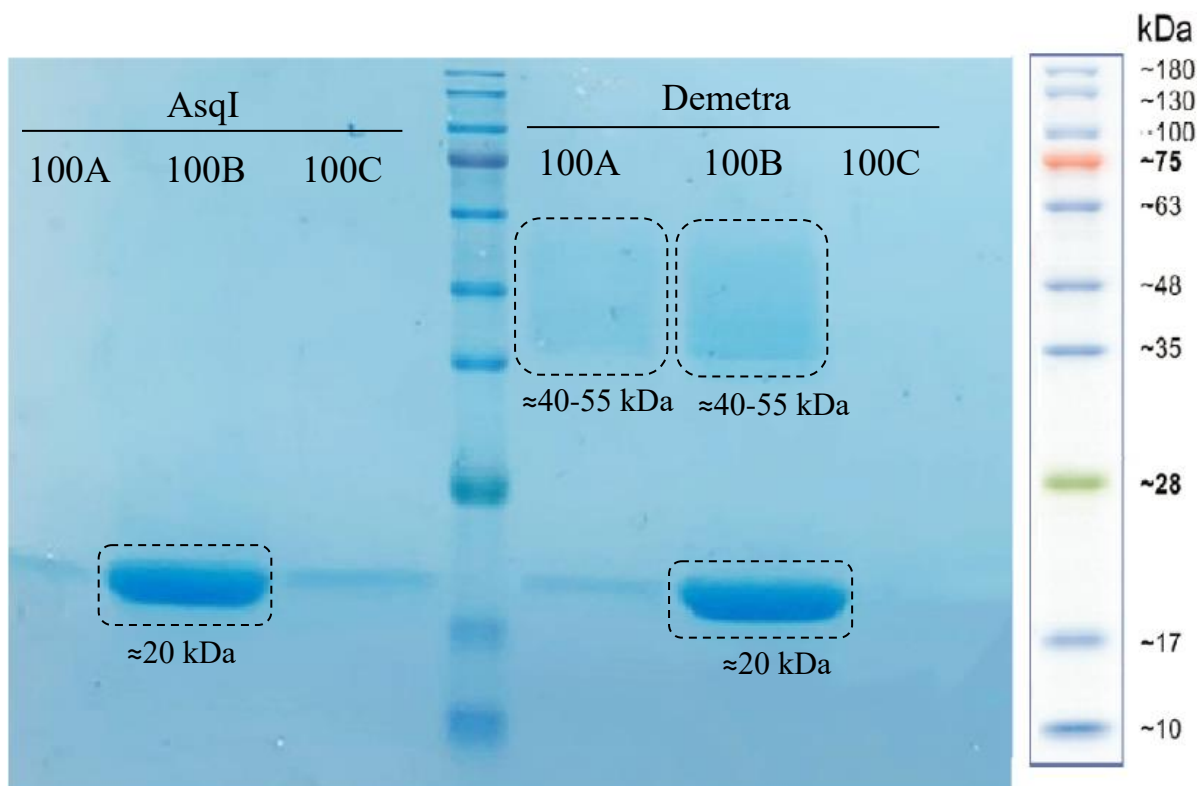
Κλάσμα	Ενζυμική συγκέντρωση (mg/mL)	
	AsqI	Demetra
100B	0,84	3,08



Σχήμα 25. Φάσμα απορρόφησης κλασμάτων 100B των ενζύμων Demetra και AsqI, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), κατά την έκφραση με συμβατικό πρωτόκολλο (250-500 nm).

Όπως είναι αναμενόμενο η μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμου αντιστοιχεί στα κλάσματα 100B. Από τον Πίνακα 18 φαίνεται ωστόσο σημαντικά μεγαλύτερη παραγόμενη ποσότητα του ενζύμου Demetra συγκριτικά με το ένζυμο AsqI. Επίσης, στο ανωτέρω σχήμα (Σχήμα 25) απεικονίζεται η αντίστοιχη χαρακτηριστική κορυφή του ενζύμου Demetra 420 nm όπως και στο Σχήμα 24, αλλά μεγαλύτερης έντασης λόγω πιθανώς της μεγαλύτερου όγκου παραγωγής. Για το ένζυμο AsqI δεν παρατηρήθηκε κάποια επιπλέον κορυφή πέρα των 280 nm παρόλη τη μεγαλύτερου όγκου παραγωγή.

Έπειτα, δείγματα των παραπάνω κλασμάτων ηλεκτροφορήθηκαν υπό της τεχνικής SDS-PAGE και προέκυψε το εξής πήκτωμα της Εικόνας 16:



Εικόνα 16. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κλασμάτων 100Α, 100Β και 100C κατά την έκφραση των AsqI (αριστερά του δείκτη) και Demetra (δεξιά του δείκτη) με συμβατικό πρωτόκολλο.

Αρχικά, σε όλα τα δείγματα απομόνωσης των εξεταζόμενων ενζύμων AsqI και Demetra, παρατηρήθηκαν εμφανείς πρωτεϊνικές μπάντες στο μέγεθος των 20 kDa οι οποίες ωστόσο δεν αντιστοιχούν σε κάποια γνωστή παραγόμενη πρωτεΐνη και απέχουν από το πραγματικό μέγεθος των ενζύμων (84,7 kDa για τη Demetra και 85,5 kDa για την AsqI), οπότε θεωρήθηκαν είτε ανεπιθύμητες προσμίξεις πιθανώς από τη χρωματογραφική στήλη είτε αποτέλεσμα της πρωτεόλυσης των πρωτεϊνών. Παράλληλα, ευρείς πρωτεϊνικές μπάντες είναι διακριτές στις θέσεις των κλασμάτων 100Α και 100Β του ενζύμου Demetra και αντιστοιχούν περίπου στο μέγεθος των 40-55 kDa. Και σε αυτήν την περίπτωση το μέγεθος είναι αρκετά μικρότερο του πραγματικού μοριακού βάρους του ενζύμου. Η μη καθαρότητα των πρωτεϊνικών διαλυμάτων, καθώς και η δυσκολία αναγνώρισης του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κλασμάτων απομόνωσης, οδήγησε στη διαπίστωση πως αν εκφράζονται τα ένζυμα με το συμβατικό πρωτόκολλο τότε πρωτεολύονται και γι' αυτό παρουσιάζονται τα κομμάτια πρωτεϊνών μικρότερου μοριακού βάρους. Αποφασίστηκε λοιπόν να εκφραστούν εκ νέου τα ένζυμα με μειωμένο χρόνο επαγωγής για να περιοριστεί η πιθανή πρωτεόλυση τους.

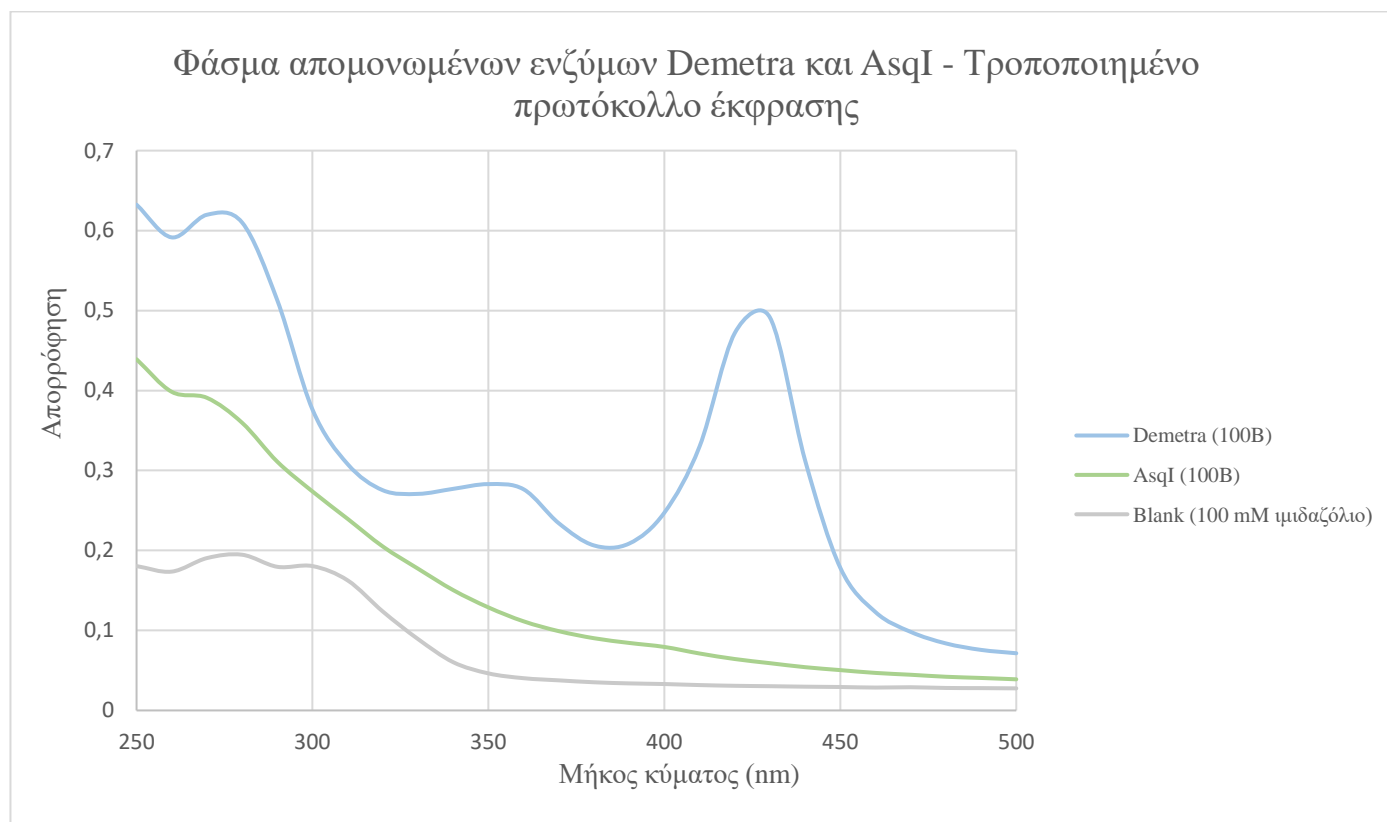
3.4.2.2. Ετερόλογη έκφραση των ενζύμων AsqI και Demetra ακολουθώντας τροποποιημένο πρωτόκολλο

Πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων X33 σε καλλιέργειες των 200 mL, για την οποία η θερμοκρασία επαγωγής διατηρήθηκε στην ίδια τιμή με το συμβατικό

πρωτόκολλο στους 28 °C αλλά μειώθηκε ο χρόνος επαγωγής στις 3 μέρες, για να περιοριστεί η πιθανή πρωτεόλυση των ενζύμων. Απομονώθηκαν τα παραγόμενα ένζυμα και προέκυψαν οι εξής συγκεντρώσεις και φάσματα των ενζυμικών διαλυμάτων (Πίνακας 19 και Σχήμα 26):

Πίνακας 19. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων 100B κατά την έκφραση των ενζύμων AsqI και Demetra με τροποποιημένο πρωτόκολλο.

Κλάσμα	Ενζυμική συγκέντρωση (mg/mL)	
	AsqI	Demetra
100B	0,53	1,59

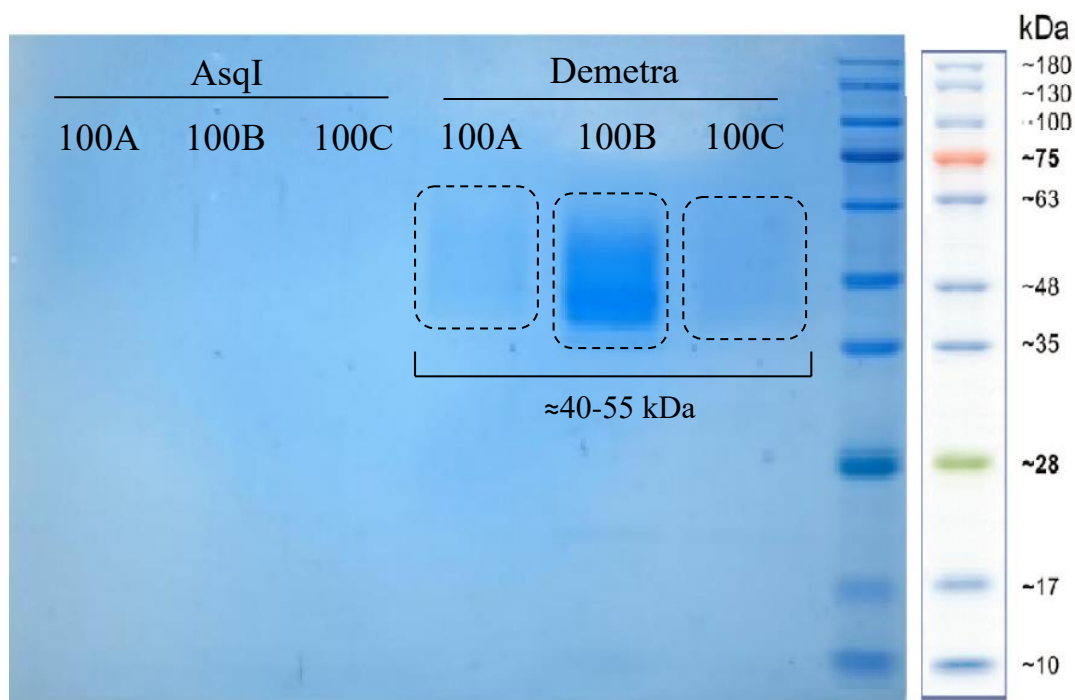


Σχήμα 26. Φάσμα απορρόφησης κλασμάτων 100B των ενζύμων Demetra και AsqI, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), από την παραγωγή του ενζύμου Demetra με τροποποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης (250-500 nm).

Αντίστοιχα με τα αποτελέσματα του συμβατικού πρωτοκόλλου έκφρασης, η μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου βρίσκεται στα κλάσματα 100B, ενώ η ποσότητα της Demetra είναι και τώρα μεγαλύτερη της AsqI καθώς η συγκέντρωση του πυκνότερου κλάσματος είναι σχεδόν τριπλάσια. Εκ πρώτης όψεως φαίνεται ότι σε αυτήν την περίπτωση η ενζυμική παραγωγή είναι μικρότερη

συγκριτικά με τα δεδομένα της παραγωγής με συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης (Πίνακας 18), ωστόσο οι προσμίξεις που βρέθηκαν σε εκείνα τα πρωτεϊνικά διαλύματα δεν επιτρέπουν τον ακριβή προσδιορισμό της ποσότητας της επιθυμητής πρωτεΐνης. Επομένως, οποιαδήποτε σύγκριση μεταξύ των δύο περιπτώσεων ως προς την παραγωγικότητα δεν μπορεί να θεωρηθεί δόκιμη. Παρόλα αυτά παρουσιάζεται και εδώ η χαρακτηριστική κορυφή του ενζύμου Demetra στα 420 nm, ενώ για το AsqI δεν παρουσιάζεται ούτε σε αυτήν την περίπτωση εμφανής κορυφή εκτός των 280 nm.

Κατ' επανάληψη ηλεκτροφορήθηκαν με τη μέθοδο SDS-PAGE τα χρωματογραφικά κλάσματα του παραπάνω πίνακα για να αναδειχθεί το μοριακό βάρος των περιεχόμενων πρωτεϊνών. Το ανακυπτόμενο πήκτωμα φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 17. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κλασμάτων 100A, 100B και 100C από την έκφραση των ενζύμων AsqI (πρώτες 3 θέσεις) και Demetra (τελευταίες 3 θέσεις) με τροποποιημένο πρωτόκολλο.

Στο πήκτωμα της Εικόνας 17 παρουσιάζονται οι παρόμοιες πρωτεϊνικές μπάντες του ενζύμου Demetra μεγέθους 40-55 kDa όπως και στο πήκτωμα της παραγωγής με συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης (Εικόνα 16). Στις θέσεις των πρωτεϊνικών δειγμάτων της AsqI δεν εμφανίζεται καμία πρωτεϊνική μπάντα και έτσι δεν μπορεί να αναγνωριστεί κάποια περιεχόμενη πρωτεΐνη. Επιπλέον, φαίνεται να απουσιάζουν οι πρωτεϊνικές μπάντες των 20 kDa που παρουσιάστηκαν στο πήκτωμα του συμβατικού πρωτοκόλλου έκφρασης, ενώ απεικονίζονται εντονότερες οι υψηλότερες ευρείς μπάντες του μεγαλύτερου μοριακού βάρους (40-55 kDa) και οι οποίες ίσως αποτελούν αρχικό στάδιο της πρωτεόλυσης. Είναι πιθανό λοιπόν να επιβραδύνθηκε η πρωτεόλυση με τη μείωση του χρόνου επαγωγής και να αποφεύχθηκε ο εκτεταμένος κατακερματισμός των ενζύμων, που εκδηλώνεται από την εμφάνιση των πρωτεϊνικών μπαντών των 20 kDa.

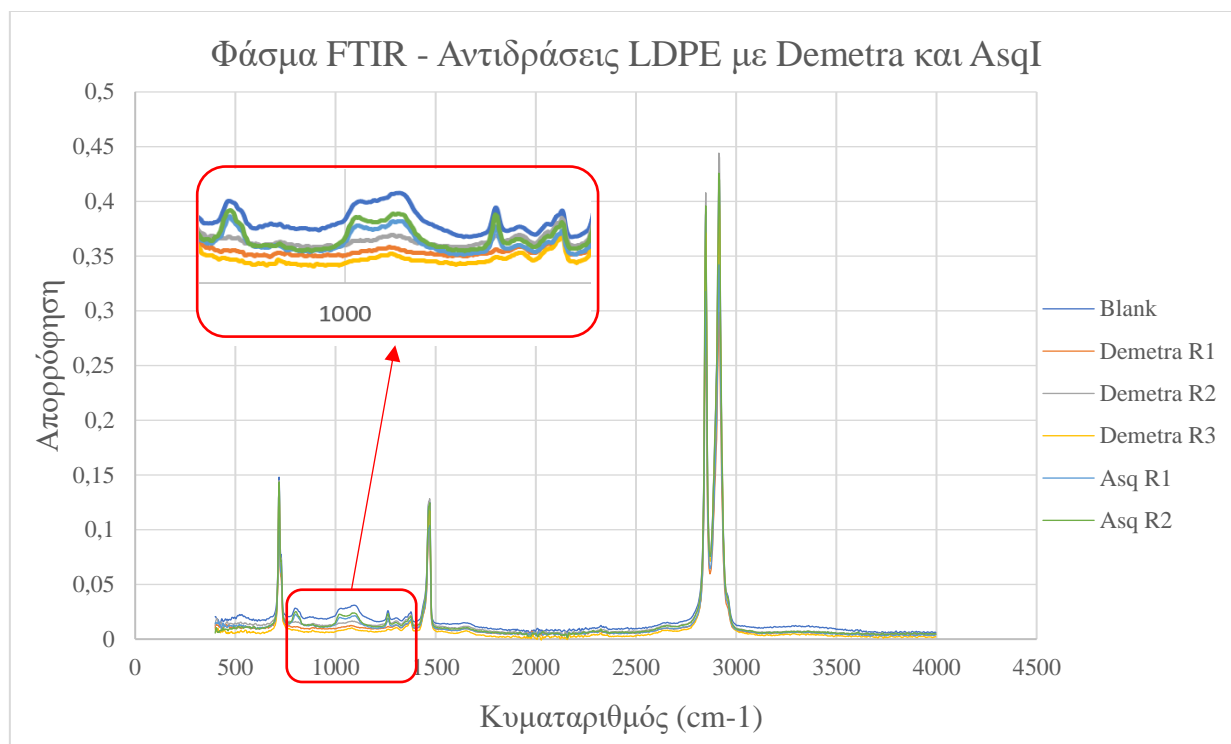
Ωστόσο, η παρουσία των πρωτεϊνικών μπαντών στο ύψος των 40-55 kDa και στις δύο παραγωγές του ενζύμου Demetra οδήγησε στην ανάγκη να διερευνηθεί αν η ενζυμική ποσότητα που παραγόταν αντιστοιχούσε στο μελετώμενο ένζυμο, αποτελώντας ίσως μια μη ολοκληρωμένη μορφή του ως αποτέλεσμα πρωτεόλυσης ή κάποιου άλλου παράγοντα. Άλλωστε είναι πιθανό να παραμένει άθικτο το ενεργό κέντρο του ενζύμου καθότι, όπως έχουν καταδείξει οι κορυφές στα 420 nm των προηγούμενων φασμάτων (Σχήμα 26), πραγματοποιείται δέσμευση του χαλκού η οποία αναμένεται να γίνεται στην περιοχή του ενεργού κέντρου. Προς τούτο θα συνέβαλε η εξέταση τόσο της ενεργότητας σε κάποιο κατάλληλο υπόστρωμα όσο και της βιοαποικοδομητικής δράσης του σε κάποια πολυλεφίνη. Στο ενδεχόμενο απουσίας δράσης του ενζύμου θα αποπειραθεί η περαιτέρω τροποποίηση του πρωτοκόλλου έκφρασης.

3.4.2.2.1. Δοκιμή δράσης σε κατεχόλη και εκτέλεση αντιδράσεων με LDPE

Αφού πρώτα υλοποιήθηκε διαπίδυση των κλασμάτων 100B και των δύο ενζύμων σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 20 mM με pH=8 ώστε να αφαιρεθεί το πιθανώς παρεμποδιστικό ιμιδαζόλιο και εκτελέστηκε δοκιμή δράσης των ενζύμων σε κατεχόλη για να προσδιοριστεί η ενεργότητά τους, όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 2.2.8.3.2.

Παρόλα αυτά, η ενεργότητα των παραγόμενων ενζύμων απεδείχθη να είναι μηδενική. Βέβαια η απουσία δράσης των πρωτεϊνών μπορεί να οφείλεται είτε στη μη ορθή έκφραση τους, που προκύπτει από το χαμηλότερο μοριακό βάρος που διαθέτει το εκφρασμένο ένζυμο Demetra (Εικόνα 17), είτε από τη χρήση μη συμβατού υποστρώματος με τα μελετώμενα ένζυμα.

Έπειτα δοκιμάστηκαν να πραγματοποιηθούν αντιδράσεις με σκόνη πολυαιθυλενίου LDPE σύμφωνα με τα βήματα που περιεγράφηκαν στην ενότητα 2.2.11. Έτσι, λήφθηκε το φάσμα FTIR του λυοφιλοποιημένου υπολείμματος των αντιδράσεων, το οποίο παρουσιάζεται συγκεντρωτικά για τόσο για τα τυφλά όσο και για τα ενζυμικά δείγματα.



Σχήμα 27. Φάσμα FTIR των πολυμερικού υπολείμματος των αντιδράσεων των ενζύμων AsqI και Demetra με σκόνη LDPE κατά την παραγωγή τους με τροποποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης.

Το φάσμα που προέκυψε από την ανάλυση σε όργανο FTIR αποτελεί συνήθη μορφή φάσματος πολυαιθυλενίου όπου παρουσιάζονται οι τυπικές κορυφές των δεσμών του στα 720, 1470, 2850 και 2920 cm^{-1} [164]. Στην περιοχή που έχει μεγεθυνθεί στο Σχήμα 27 παρουσιάζονται επίσης δύο μικρές κορυφές περίπου στα 800 και 1100 cm^{-1} τόσο στα τυφλά όσο και στα ενζυμικά δείγματα της AsqI, οι οποίες όμως απουσιάζουν από τα δείγματα του ενζύμου Demetra. Χαρακτηρισμοί του πολυαιθυλενίου έχουν δείξει ότι στην περιοχή των 1100 cm^{-1} αποδίδει αρκετά μικρής ισχύος κορυφή η παραμόρφωση μέσω σείσης (Wagging deformation), επομένως απουσία του μπορεί να αποτελεί ένδειξη κάποιας δράσης του ενζύμου Demetra επί της αλυσίδας πολυαιθυλενίου ώστε να μην εμφανίζεται το συγκεκριμένο είδος παραμόρφωσης [164]. Το γεγονός αυτό πιθανώς υποδηλώνει τροποποίηση του πολυαιθυλενίου από το ένζυμο Demetra.

3.4.2.3. Εξέταση συνθηκών ενζυμικής έκφρασης

Εφόσον λοιπόν επιβεβαιώθηκε με τις προηγούμενες δοκιμές ότι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κλασμάτων απομόνωσης των ενζύμων, είτε δεν αντιστοιχεί στο επιθυμητό ένζυμο είτε αποτελείται από μια πρωτεολυμένη μη ενεργή μορφή του, ενώ παράλληλα ούτε τα αποτελέσματα της αποικοδόμησης πολυαιθυλενίου απέδωσαν κάποιο ξεκάθαρο και αξιοσημείωτο συμπέρασμα, ακολουθήθηκε μελέτη επικεντρωμένη στη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου έκφρασης των ενζύμων AsqI και Demetra μέσω διερεύνησης παραγόντων και για τα δύο ένζυμα.

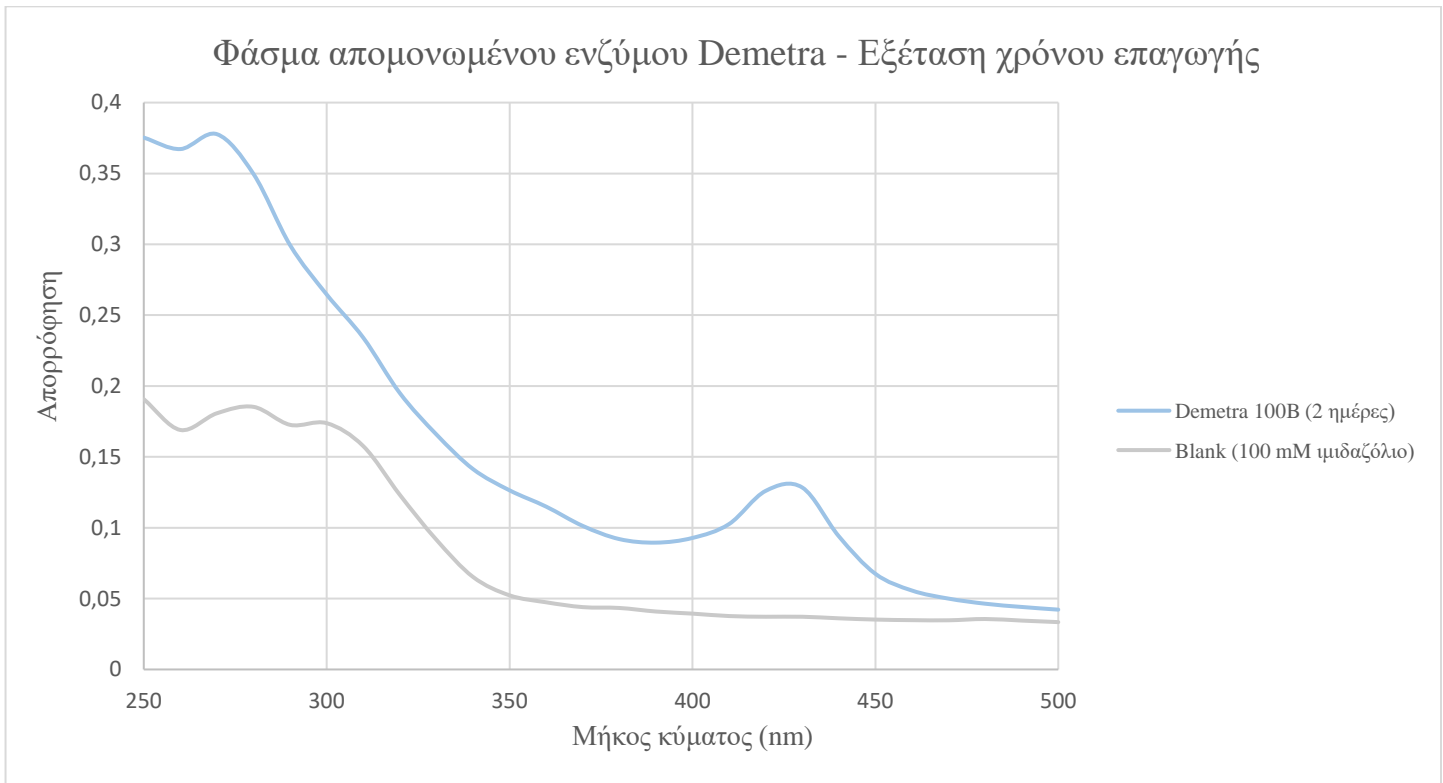
3.4.2.3.1. Εξέταση θερμοκρασίας και χρόνου επαγωγής

Πρώτα εξετάστηκε διαφορετική θερμοκρασία και χρόνοι επαγωγής των 1 και 2 ημερών. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη 2 καλλιέργειών των 200 mL για το ένζυμο Demetra, όπου η μία υποβλήθηκε σε 1 ημέρα επαγωγής ενώ η δεύτερη σε 2 ημέρες επαγωγής. Η θερμοκρασία δε επαγωγής αποφασίστηκε να είναι 23 °C. Οι συνθήκες αυτές επιλέχθηκαν για να διερευνηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου στην πρωτεόλυση του ενζύμου.

Έτσι, απομονώθηκαν τα ένζυμα από τις καλλιέργειες και ελήφθησαν οι εξής συγκεντρώσεις των χρωματογραφικών κλασμάτων μαζί με το φάσμα για την καλλιέργεια των δύο ημερών:

Πίνακας 20. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων 100B για την εξέταση θερμοκρασίας και χρόνου επαγωγής για το ένζυμο Demetra.

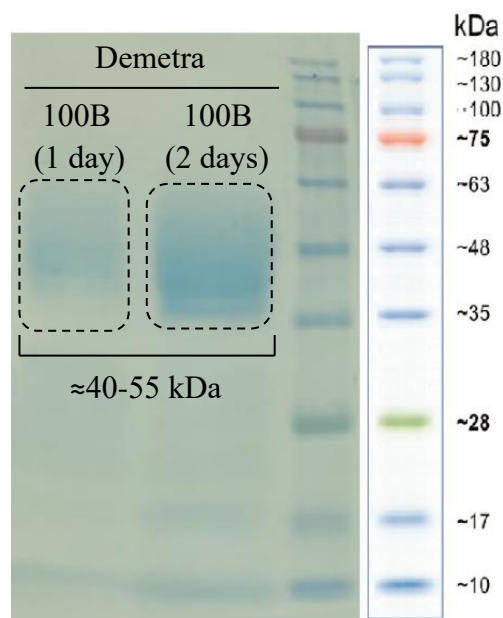
Κλάσμα	Ενζυμική συγκέντρωση (mg/mL)	
	Demetra (1 ημέρα)	Demetra (2 ημέρες)
100B	0,34	0,56



Σχήμα 28. Φάσμα απορρόφησης χρωματογραφικών κλασμάτων 100B, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), από την εξέταση χρόνου επαγωγής για το ένζυμο Demetra των 2 ημερών επαγωγής (250-500 nm).

Παρατηρείται από τον Πίνακα 20 ότι η μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου παράχθηκε κατά τις 2 ημέρες επαγωγής, όπως αναμενόταν άλλωστε καθώς αύξηση του χρόνου επαγωγής συνεπάγεται αύξηση της πρωτεϊνικής παραγωγής. Ακόμα, φαίνεται σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις των κλασμάτων 100B σε σχέση με τα κλάσματα της παραγωγής κατά το προεξεταζόμενο τροποποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης (Πίνακας 19). Το τελευταίο οφείλεται πιθανώς στην μειωμένη θερμοκρασία και στον μειωμένο χρόνο επαγωγής καθότι όχι μόνο η συντομότερη επαγωγή αποφέρει μικρότερη πρωτεϊνική ποσότητα αλλά και η χαμηλότερη θερμοκρασία επιβραδύνει τα μεταβολικά μονοπάτια των κυττάρων, πράγμα που συνεπάγεται την περιορισμένη λειτουργία τους για την ετερόλογη έκφραση των ενζύμων. Εμφανίζεται επιπλέον στο Σχήμα 28 και η χαρακτηριστική κορυφή του ενζύμου στα 420 nm, η οποία είναι βέβαια μικρότερης έντασης συγκριτικά με εκείνες των προηγούμενων εξεταζόμενων πρωτοκόλλων έκφρασης για αντίστοιχους λόγους (Σχήμα 25 και Σχήμα 26).

Τα κλάσματα 100B ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αφού πρώτα συμπυκνώθηκαν ώστε να αυξηθεί το πρωτεϊνικό περιεχόμενο στον όγκο του εξεταζόμενου δείγματος ηλεκτροφόρησης. Προέκυψε έτσι το ακόλουθο αποτέλεσμα:



Εικόνα 18. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κλασμάτων 100B για την παραγωγή του ενζύμου Demetra κατά την εξέταση θερμοκρασίας και χρόνου επαγωγής (1^η θέση – 1 ημέρα επαγωγής, 2^η θέση – 2 ημέρες επαγωγής).

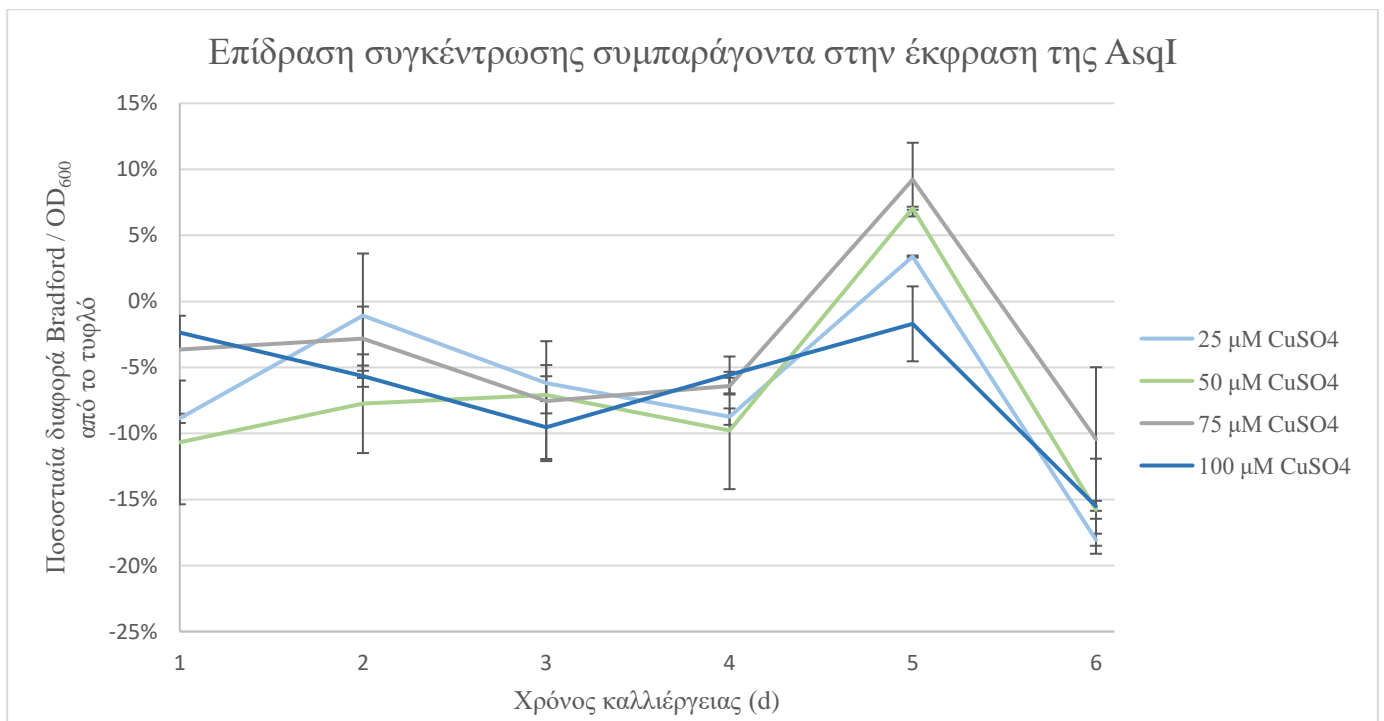
Παρουσιάζεται στο παραπάνω σχήμα η ίδια μορφή πρωτεϊνικών μπαντών μικρότερου του επιθυμητού μεγέθους όπως και στα προηγούμενα πήκτωματα πολυακρυλαμιδίου, ενώ παράλληλα η εντονότερη χρώση της δεξιά μπάντας δικαιολογείται από το γεγονός ότι το κλάσμα της Demetra των 2 ημερών διαθέτει μεγαλύτερη πρωτεϊνική ποσότητα. Παρόλα αυτά παρουσιάζονται χαμηλότερης έντασης κομμάτια κάτω των 35 kDa για χρόνο επαγωγής ίσο με 1 ημέρα, γεγονός που οφείλεται ίσως είτε στη μικρότερη ποσότητα παραγόμενου ενζύμου σε αυτήν την περίπτωση είτε σε περιορισμένη πρωτεόλυση του ενζύμου. Συμπεράθηκε ωστόσο ότι η μείωση της θερμο-

κρασίας και του χρόνου επαγωγής επέφεραν απλώς μείωση της παραγόμενης ποσότητας ενζύμου και όχι ικανοποιητική βελτιστοποίηση της έκφρασης του.

3.4.2.3.2. Εξέταση συγκέντρωσης συμπαραγόνα

Όπως προαναφέρθηκε με τις προηγούμενες τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου έκφρασης στόχος αποτελούσε ο περιορισμός της πιθανής πρωτεόλυσης των εκφραζόμενων ενζύμων. Για το ένζυμο AsqI δεν είχε επιτευχθεί έως τώρα ικανοποιητική έκφραση ώστε να μπορέσει να αναγνωριστεί και να ταυτοποιηθεί κάποια μορφή του ενζύμου σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Επομένως, στόχος για το ένζυμο AsqI αποτέλεσε η μελέτη διαφορετικού παράγοντα ο οποίος επηρεάζει την έκφραση και όχι την πρωτεόλυση, όπως είναι η συγκέντρωση του συμπαραγόνα (θειικός χαλκός). Κατ' αυτόν τον τρόπο εξετάζεται η περίπτωση αδυναμίας έκφρασης του ενζύμου AsqI λόγω περιορισμένης παροχής του κατάλληλου συμπαραγόνα.

Προς τούτο, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη καλλιιεργειών των 50 mL για 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις θειικού χαλκού από 0 μM έως 100 μM με βήμα 25 μM (2 καλλιιεργείες για κάθε συγκέντρωση). Η επαγωγή των καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκε στους 27 °C για 6 μέρες. Μετρούνταν λοιπόν για κάθε ημέρα επαγωγής η οπτική πυκνότητα των κυτταρικών υγρών και το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο μέσω Bradford· οι μετρήσεις αυτές παρατίθενται στο Παράρτημα Β όπου τυφλό θεωρείται το δείγμα από την καλλιιεργεία με συγκέντρωση θειικού χαλκού 0 μM και η ποσοστιαία διαφορά υπολογίστηκε από τον μέσο όρο των δύο τυφλών της εκάστοτε ημέρας. Παρακάτω απεικονίζεται η ποσοστιαία διαφορά των διαφόρων καλλιιεργειών από το τυφλό συναρτήσει των ημερών καλλιιεργείας:



Σχίμα 29. Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστιαίων διαφορών Bradford/OD₆₀₀ από την τιμή του τυφλού για διαφορετικές συγκεντρώσεις θειικού χαλκού στην έκφραση του ενζύμου AsqI.

Τα αποτελέσματα του Σχήματος 29 οδήγησαν στη διαπίστωση ότι η μεγαλύτερη πρωτεϊνική παραγωγή προέκυψε κατά την ανάπτυξη σε συγκέντρωση θειικού χαλκού 75 μM και μάλιστα κατά την 5^η μέρα επαγωγής, συγκριτικά πάντα με την ανάπτυξη σε μηδενική συγκέντρωση θειικού χαλκού (τυφλό δείγμα). Έπειτα της επώασης των καλλιέργειών αναμείχθηκαν οι 2 καλλιέργειες για συγκέντρωση 0 μM και οι 2 καλλιέργειες για 75 μM και απομονώθηκαν χρωματογραφικά οι παραγόμενες πρωτεΐνες. Η έκλυση των πρωτεϊνών έγινε ωστόσο με 7 διαδοχικές προσθήκες 2 mL ιμιδαζολίου 100mM εν αντιθέσει με το σύνηθες πρωτόκολλο IMAC, έτσι ώστε να προκύψουν περισσότερο συμπυκνωμένα κλάσματα αφού το μέγεθος των καλλιέργειών δεν αναμένεται να αποφέρει μεγάλη ποσότητα ενζύμου. Οι απορροφήσεις των κλασμάτων φαίνονται στον Πίνακα 21.

Πίνακας 21. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων έκλυσης ενζύμου AsqI κατά την εξέταση συγκέντρωσης συμπαραγόντα.

Κλάσμα	Ενζυμική συγκέντρωση (mg/mL)	
	AsqI (0 μM CuSO_4)	AsqI (75 μM CuSO_4)
100-1	0,00	0,26
100-2	0,00	0,03
100-3	0,20	0,19
100-4	0,28	0,57
100-5	0,21	0,37
100-6	0,20	0,23
100-7	0,17	0,18

Απομονώθηκε τελικώς περισσότερη πρωτεΐνη από την καλλιέργεια με συγκέντρωση 75 μM θειικού χαλκού πράγμα που αποτελεί μια ακόμη ένδειξη ότι αυξάνεται η παραγόμενη ποσότητα ενζύμου με την προσθήκη θειικού χαλκού σε συγκέντρωση 75 μM στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας για το ένζυμο AsqI.

Τέλος, ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα από τα χρωματογραφικά κλάσματα με τη μεγαλύτερη απορρόφηση (100-4 και 100-5) σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου τα οποία είχαν προηγουμένως συμπυκνωθεί. Ωστόσο, δεν προέκυψε κάποια εμφανής πρωτεϊνική μπάντα στο πήκτωμα ώστε να αναγνωριστεί το παραγόμενο ένζυμο και γι' αυτό παραλείπεται η απεικόνιση του.

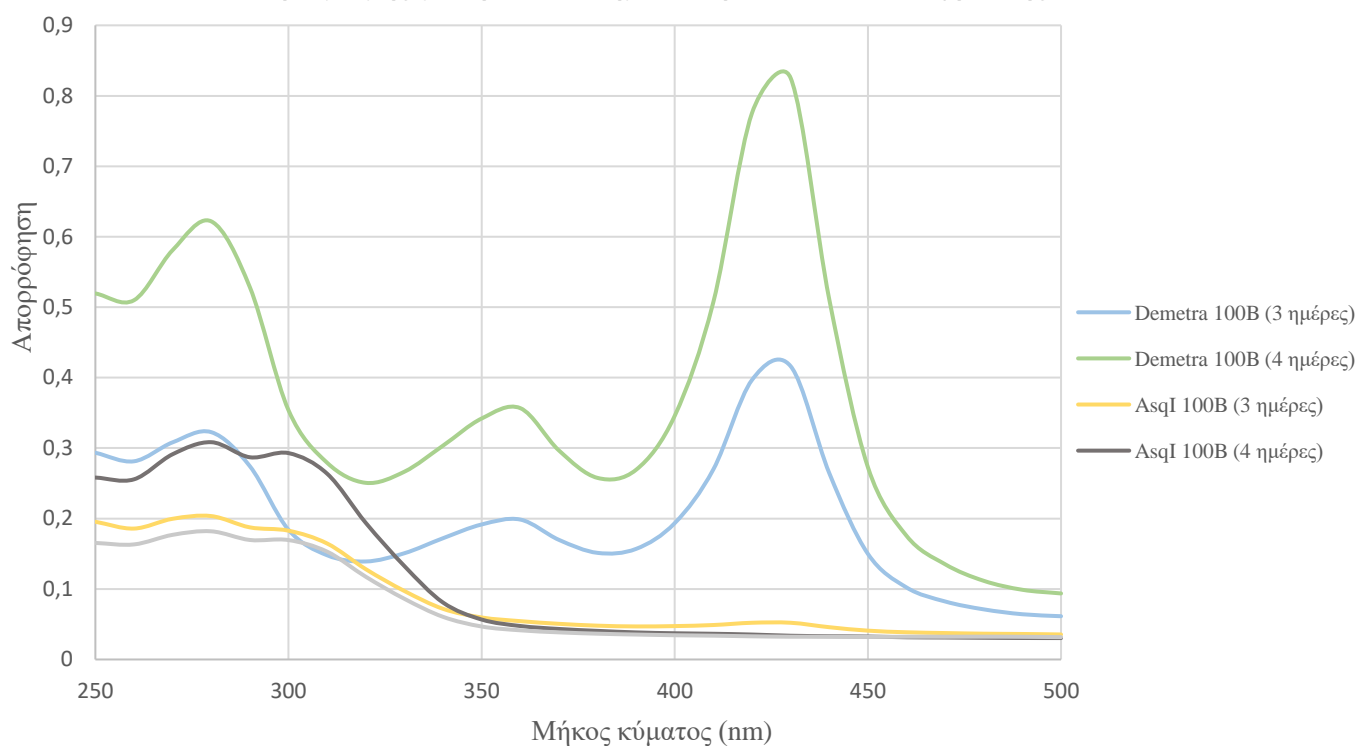
3.4.2.4. Ετερόλογη έκφραση των ενζύμων AsqI και Demetra σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο

Στόχος της παραγωγής αυτής των μεταλλοενζύμων ήταν να επιτευχθεί εκτεταμένη έκφραση αυτών ώστε η μεγαλύτερη ενζυμική ποσότητα που θα παραχθεί, να καταστήσει πιο ξεκάθαρο το αποτέλεσμα πιθανής αποικοδόμησης του πολυαιθυλενίου, για την οποία δεν ήταν εφικτό να αποφανθεί κάποιο αξιοσημείωτο συμπέρασμα κατά την ανάλυση που περιεγράφηκε στην ενότητα 3.4.2.2.1. Για αυτόν τον λόγο η συγκεκριμένη παραγωγή των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σε 2 καλλιέργειες των 500 mL ανά ένζυμο και με θερμοκρασία επαγωγής τους 25 °C όπου η μία καλλιέργεια υποβλήθηκε σε 3 ημέρες επώαση ενώ η δεύτερη σε 4 ημέρες. Χρησιμοποιήθηκε δηλαδή ένα βελτιστοποιημένο συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης με μικρή μείωση της θερμοκρασίας και του χρόνου επαγωγής ώστε να παραχθεί ικανοποιητική ποσότητα ενζύμου δίχως την εκτεταμένη πρωτεόλυση που παρουσιάστηκε κατά την εφαρμογή του συμβατικού πρωτοκόλλου. Απομονώθηκαν λοιπόν τα ένζυμα AsqI και Demetra από τις καλλιέργειες αυτές και οι συγκεντρώσεις και τα φάσματα των αντίστοιχων χρωματογραφικών κλασμάτων που προέκυψαν φαίνονται κατωτέρω:

Πίνακας 22. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων 100B κατά την μεγάλης κλίμακας παραγωγή των ενζύμων AsqI και Demetra.

Κλάσμα	Ενζυμική συγκέντρωση (mg/mL)			
	AsqI (3 ημέρες)	AsqI (4 ημέρες)	Demetra (3 ημέρες)	Demetra (4 ημέρες)
100B	0,02	0,54	1,51	2,12

Φάσμα απομονωμένου ενζύμου Demetra - Μεγαλύτερης κλίμακας παραγωγής με τροποποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης

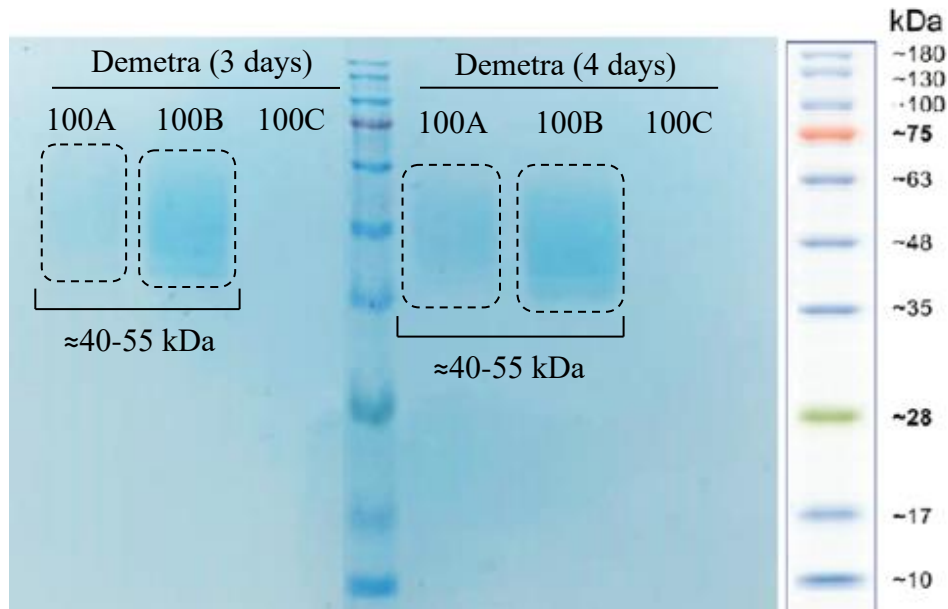


Σχήμα 30. Φάσμα απορρόφησης χρωματογραφικών κλασμάτων 100B, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), από την μεγαλύτερης κλίμακας παραγωγή του ενζύμου Demetra με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης (250-500 nm).

Φαίνεται από τον ανωτέρω πίνακα (Πίνακας 22) ότι η παραγωγή είναι μεγαλύτερη για τις περισσότερες ημέρες επαγωγής, όπως και αναμένεται άλλωστε. Παρόλα αυτά λαμβάνοντας υπόψη τις μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, η πρωτεϊνική συγκέντρωση των κλασμάτων 100B αυξήθηκε κατά μικρό βαθμό -για τις 4 ημέρες επαγωγής παρατηρήθηκε αύξηση 33% ενώ για τις 3 ημέρες παρατηρήθηκε δε μείωση της τάξης του 5%- συγκρίνοντας με τα αποτελέσματα της μικρότερης κλίμακας παραγωγής με το αρχικό τροποποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης (Πίνακας 19). Βέβαια αυτή η περιορισμένη αύξηση της παραγωγής πιθανώς οφείλεται στην εφαρμογή μειωμένης θερμοκρασίας επαγωγής, καθώς η αύξηση της κλίμακας θα μπορούσε να αποφέρει υψηλότερα επίπεδα εκφρασμένων πρωτεϊνών αν η θερμοκρασία ήταν υψηλότερη, όμως έτσι θα ενισχυόταν η πρωτεόλυση. Μολαταύτα, στο παραπάνω φάσμα (Σχήμα 30) παρουσιάζεται η κορυφή που αποδίδει το ένζυμο Demetra στα 420 nm, η οποία έχει όμως τη μεγαλύτερη ένταση συγκριτικά με τις αντίστοιχες των προηγούμενων παραγωγών όπου ακολουθήθηκε το συμβατικό και αρχικό τροποποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης (Σχήμα 25 και Σχήμα 26) και είναι συνεπώς περισσότερο ευδιάκριτες. Ακόμη, διακρίνεται στο παραπάνω φάσμα μια επιπλέον κορυφή στα 360 nm αλλά είναι αρκετά δύσκολο να συμπεραθεί η ιδιότητα του ενζύμου που την προκαλεί και δύναται μόνο να υποτεθεί ότι σχετίζεται με την οξειδωμένη μορφή του χαλκού στο

ενεργό κέντρο του ενζύμου όπως έχει παρουσιαστεί σε αντίστοιχον τύπου πρωτεΐνες. Σημειωτέον βέβαια ότι η καλλιέργεια παραγωγής AsqI για τις 3 ημέρες επαγωγής παρουσίασε σχεδόν μηδενική παραγωγή ενζύμου, γεγονός που προέκυψε ίσως από κάποια επιμόλυνση της καλλιέργειας ή κάποια επιπλοκή κατά την επεξεργασία του κυτταρικού υγρού.

Αντίστοιχα τα κλάσματα αυτά ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και προέκυψε εμφανές αποτέλεσμα μόνο για τα δείγματα της Demetra:

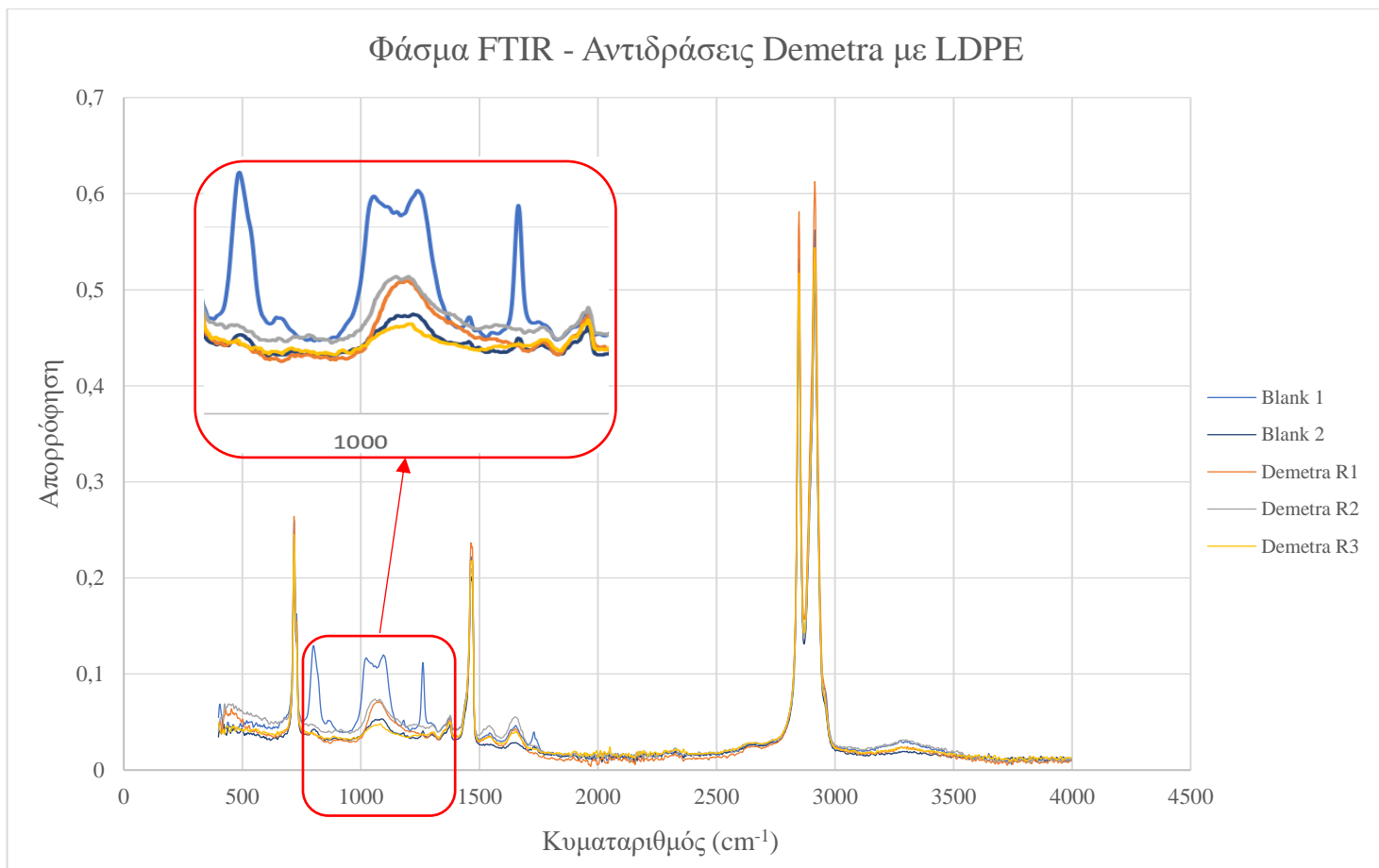


Εικόνα 19. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κλασμάτων 100A, 100B και 100C για μεγαλύτερης κλίμακας παραγωγή του ενζύμου Demetra με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης. (καλλιέργεια 3 ημερών αριστερά του δείκτη και καλλιέργεια 4 ημερών δεξιά του δείκτη).

Στην Εικόνα 19 παρατηρούνται για ακόμη μια φορά οι ίδιες πρωτεϊνικές μπάντες που συνδέονται με την έκφραση του ενζύμου Demetra και βρίσκονται ομοίως σε χαμηλότερο μέγεθος του επιθυμητού που δηλώνει την πιθανή μη ορθή έκφραση του ενζύμου.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση των κλασμάτων 100B των δύο καλλιεργειών της Demetra μέσω υπερδιήθησης σε τελικό όγκο 5 mL και διαπίδυση του συμπυκνωμένου πρωτεϊνικού διαλύματος σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης 20 mM με pH=8. Ύστερα της διαπίδυσης, όπου έχει απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα του διαλυμένου ιμιδαζολίου, εκτελέστηκε δοκιμή δράσης του ενζυμικού διαλύματος σε κατεχόλη. Το αποτέλεσμα της δοκιμής ήταν ότι το ενζυμικό διάλυμα της Demetra είχε μηδενική ενεργότητα στην κατεχόλη.

Πραγματοποιήθηκαν έπειτα αντιδράσεις του ενζυμικού διαλύματος με σκόνη LDPE και προέκυψε το εξής φάσμα FTIR (Σχήμα 31):



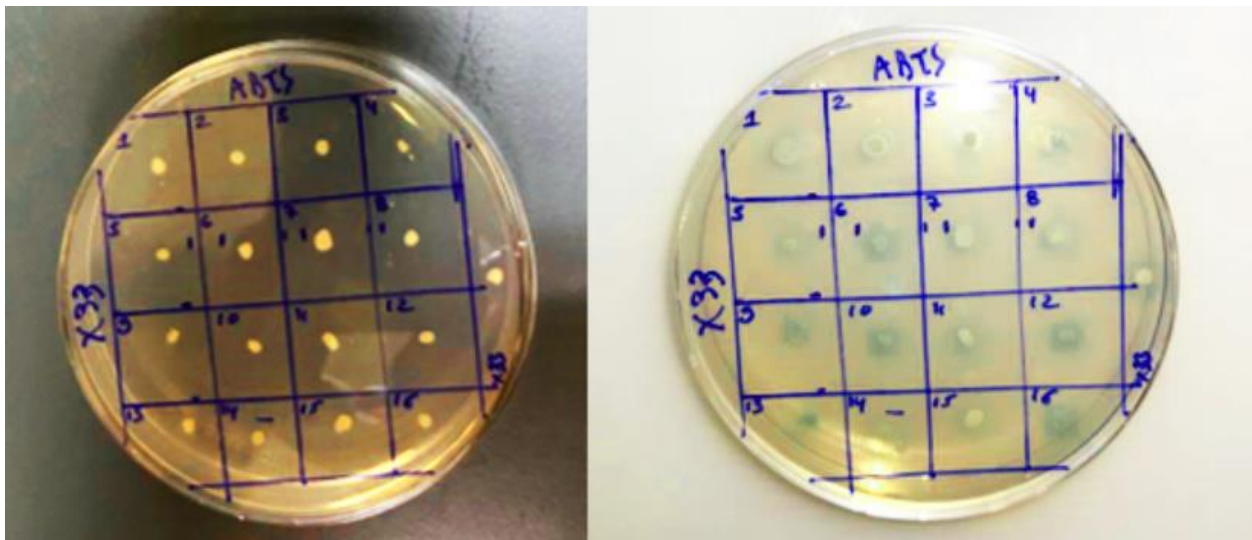
Σχήμα 31. Φάσμα FTIR των πολυμερικού υπολείμματος των αντιδράσεων του ενζύμου Demetra με σκόνη LDPE κατά την εκτεταμένη παραγωγή της με τροποποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης.

Το προκύπτον φάσμα από την ανάλυση των πολυμερικών υπολειμμάτων των αντιδράσεων σε όργανο FTIR διαθέτει σχεδόν πανομοιότυπη μορφή με εκείνο των πρώτων αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν με τα ένζυμα Demetra και AsqI (Σχήμα 27), που εκφράστηκαν ακολουθώντας συμβατικό πρωτόκολλο. Παρουσιάζονται δηλαδή οι τυπικές κορυφές των δεσμών του πολυαιθυλενίου στα 720, 1470, 2850 και 2920 cm⁻¹ όπως και οι χαμηλής έντασης κορυφές στα 800 και 1100 cm⁻¹, οι οποίες εμφανίζονται ομοίως μόνο στα τυφλά δείγματα που δεν περιείχαν το ένζυμο Demetra. Μάλιστα σε αυτήν την περίπτωση είναι περισσότερο ευδιάκριτη η διαφορά μεταξύ των φασμάτων των ενζυμικών δειγμάτων και των τυφλών ως προς τις συγκεκριμένες κορυφές, όπως παρουσιάζεται στη μεγεθυμένη περιοχή του φάσματος. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι υψηλής δυσκολίας η συσχέτιση αυτής της διαφοράς με κάποια γνωστή μορφή τροποποίησης του μορίου του πολυαιθυλενίου και εξαιτίας αυτού δεν μπορεί να καθοριστεί ή επιβεβαιωθεί η δράση του ενζύμου Demetra επί του LDPE. Μολαταύτα, βάσει των παρόντων φασμάτων, αλλά και των προηγούμενων αναλύσεων, παρουσιάζεται μια τροποποίηση του φάσματος του καθαρού LDPE και γι' αυτό δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο δράσης του ενζύμου στο πολυαιθυλένιο.

3.5. Ετερόλογη έκφραση των ενζύμων A55, A57 και A58

3.5.1. Εξέταση μετασχηματισμένων στελεχών

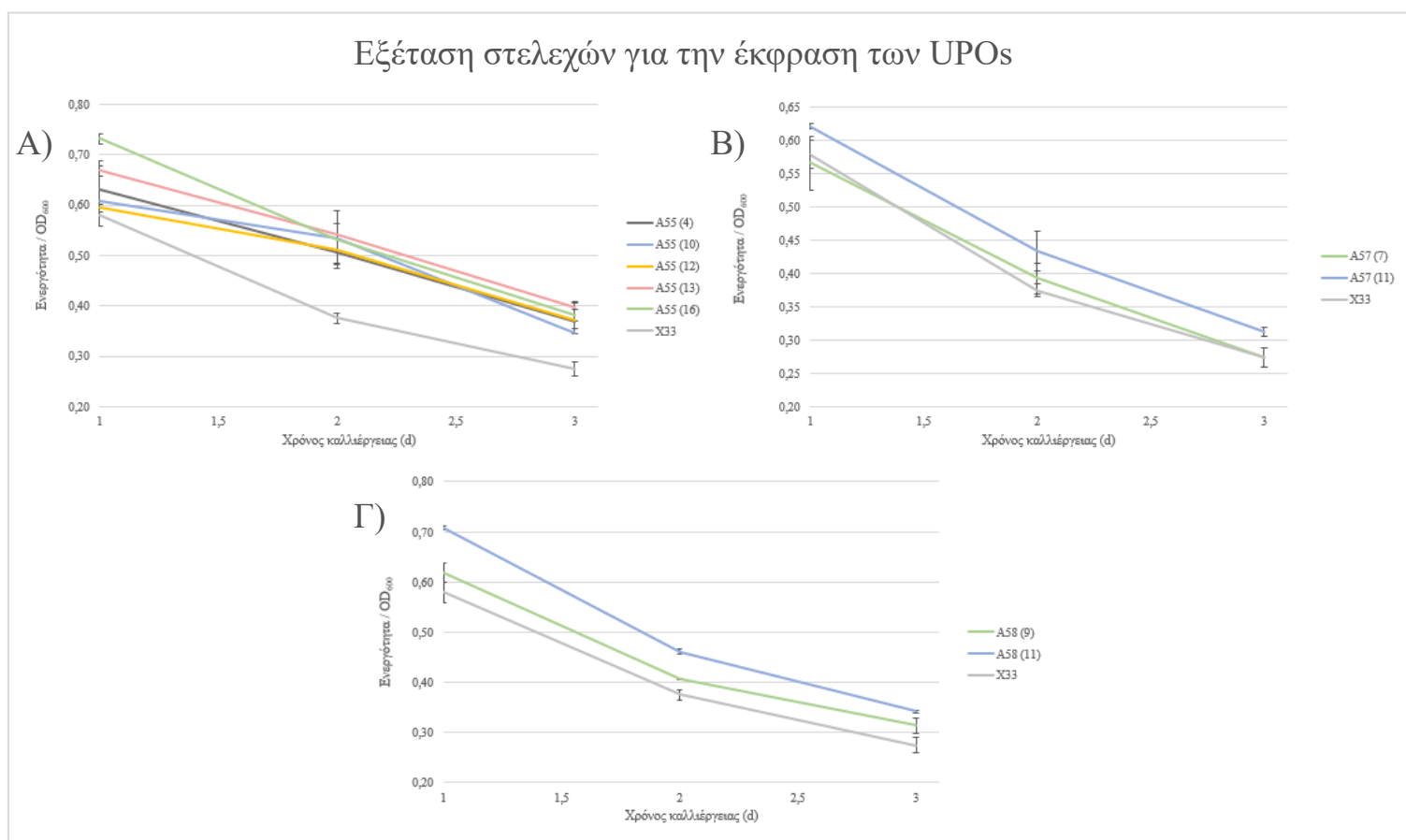
Η εύρεση των αποδοτικότερων μετασχηματισμένων στελεχών για τις UPOs πραγματοποιήθηκε με ταχεία δοκιμή δράσης σε τρυβλία (Plate assay). Συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 16 αποικίες για κάθε ένζυμο, από τις αποικίες που προέκυψαν κατά τον μετασχηματισμό των κυττάρων. Σύμφωνα με τη διαδικασία που περιεγράφηκε στην ενότητα 2.2.9.1 προστέθηκε ποσότητα H_2O_2 στις αποικίες έπειτα των ημερών επώασης τους ώστε να αποδώσουν οξειδωτική δράση τα εκφρασμένα ένζυμα. Συγκεκριμένα, κατά την προσθήκη H_2O_2 άρχισαν να σχηματίζονται πρασινόχροοι άλω γύρω από τις αποικίες των μετασχηματισμένων κυττάρων, με μερικές αποικίες να τις σχηματίζουν πιο γρήγορα και πιο έντονα από τις υπόλοιπες. Με το κριτήριο της έντασης του χρώματος και της διαμέτρου των άλων γύρω από τις αποικίες εντός χρονικού διαστήματος της μίας ώρας από την προσθήκη του H_2O_2 επελέγησαν τα στελέχη για τα οποία παρατηρήθηκε η εντονότερη χρώση. Στην Εικόνα 20 απεικονίζονται δε οι άλω των διαφόρων αποικιών για τα στελέχη του ενζύμου A55 και αντιπαρατίθενται με τη μορφή του τρυβλίου πριν την δράση των ενζύμων στο περιεχόμενο ABTS. Διακρίνονται μάλιστα οι αποικίες 4, 10, 12, 13 και 16 των οποίων οι άλω διαθέτουν εντονότερο χρώμα και μεγαλύτερη διάμετρο σε σχέση με τις υπόλοιπες. Για τα ένζυμα A57 και A58 παραλείπεται ωστόσο η απεικόνιση των τρυβλίων με ABTS καθώς δεν ήταν αρκετά ευδιάκριτη η διαφορά των άλων μεταξύ τους, αν και ελάχιστα αυξημένη ένταση και διάμετρο παρουσίασαν 2 αποικίες για κάθε ένζυμο.



Εικόνα 20. Τρυβλία δοκιμής δράσης του ενζύμου A55 σε ABTS για διάφορα στελέχη: αριστερά οι αποικίες που αναπτύχθηκαν και δεξιά οι ίδιες αποικίες έπειτα από την προσθήκη H_2O_2 .

Έτσι, επιλέχθηκαν 5 αποικίες για το ένζυμο A55 και 2 αποικίες για τα ένζυμα A57 και A58 για να αναπτυχθούν σε καλλιέργειες των 50 mL· για κάθε αποικία παρασκευάστηκαν 2 καλλιέργειες. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών γίνεται με την εφαρμογή ενός συμβατικού πρωτοκόλλου για την έκφραση αιμοπρωτεϊνών, το οποίο περιλαμβάνει την προσθήκη ενός διαλύματος ιχνοστοι-

χείων (TES) σε σύσταση 0,4% v/v και διαλύματος αιμίνης σε τελική συγκέντρωση 10 μ M και η επαγωγή να γίνει στους 27-28 °C για 4~5 μέρες. Κατά την παρούσα μεθοδολογία η επαγωγή των καλλιιεργειών έγινε ωστόσο στους 27 °C για 3 ημέρες, καθώς σκοπός είναι η εύρεση της διαφοράς στην παραγόμενη ποσότητα ενζύμου και όχι η μέγιστη παραγωγή του. Κάθε ημέρα επαγωγής μετρούταν η οπτική πυκνότητα και η ενεργότητα του κυτταρικού υγρού με δοκιμή δράσης σε ABTS. Οι μετρήσεις που προέκυψαν παρουσιάζονται στο Παράρτημα Β, ενώ στο κατωτέρω σχήμα απεικονίζεται η ανηγμένη ενεργότητα των κυτταρικών υγρών και των τριών ενζύμων ως προς την οπτική πυκνότητα ανά τις μέρες επαγωγής:



Σχήμα 32. Διαγραμματική απεικόνιση της ανηγμένης ενεργότητας για τα μετασχηματισμένα στελέχη των UPOs: Α) A55, Β) A57 και Γ) A58, παράλληλα με τα μη μετασχηματισμένα στελέχη X33.

Από τα διαγράμματα του Σχήματος 32 καθίσταται εμφανές το γεγονός ότι τα μετασχηματισμένα στελέχη που αποδίδουν καλύτερη ετερόλογη έκφραση ενζύμου είναι τα 13, 16 για την A55 και το 11 τόσο για την A57 όσο και για την A58. Επίσης, χρειάζεται να σημειωθεί ότι παρουσιάζεται ενεργότητα και στο κυτταρικό υγρό των μη μετασχηματισμένων κυττάρων X33 που σημαίνει ότι το σύστημα-ξενιστής *P. pastoris* εκφράζει εξωκυτταρικά κάποιο ένζυμο (πιθανώς την αλκοολική οξειδάση λόγω επαγωγής με μεθανόλη) που έχει οξειδωτική δράση στο ABTS.

Πραγματοποιήθηκε έπειτα καθαρισμός και απομόνωση των ενζύμων από τις καλλιέργειες για τα στελέχη 13 και 16 της A55, καθότι κρίθηκε ότι απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για τον καθορισμό του αποδοτικότερου στελέχους μεταξύ των δύο, και προέκυψαν οι συγκεντρώσεις και ενεργότητες των χρωματογραφικών κλασμάτων του επόμενου πίνακα (Πίνακας 23). Επίσης, υπολογίζεται η ειδική ενεργότητα ως προς ποσότητα πρωτεΐνης για τα κλάσματα των οποίων βρέθηκε μη μηδενική ενζυμική συγκέντρωση.

Πίνακας 23. Συγκεντρώσεις και ενεργότητες χρωματογραφικών κλασμάτων από τις καλλιέργειες των αποδοτικότερων στελεχών για το ένζυμο A55.

Κλάσμα	Ενζυμική συγκέντρωση (mg/mL)		Ενεργότητα (mU)		Ειδική ενεργότητα (mU/mg)	
	A55 (13)	A55 (16)	A55 (13)	A55 (16)	A55 (13)	A55 (16)
FT	-	-	0,212	0,220	-	-
100A	0,00	0,00	0,045	0,040	-	-
100B	0,30	0,27	0,100	0,086	16,5	16,2
100C	0,14	0,11	0,062	0,051	21,8	22,2

Η διαφορά των δύο στελεχών ως προς την ποσότητα απομονωμένου ενζύμου είναι αρκετά μικρή και δεν διακρίθηκε κάποιο στέλεχος ως σημαντικά αποδοτικότερο του άλλου, παρόλα αυτά επιλέχθηκε το στέλεχος 13, έναντι του 16, ως το βέλτιστο. Μολαταύτα, παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη ενεργότητα εκ των χρωματογραφικών κλασμάτων την διαθέτει το κλάσμα Flowthrough (FT) πράγμα που δηλώνει την ύπαρξη ποσότητας ενζύμου που είτε δεν απομονώθηκε είτε δεν αποτελεί το επιθυμητό ένζυμο, το οποίο αποτελεί και το πιθανότερο σενάριο αφού είναι γνωστό ότι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των οι καλλιεργειών των μη μετασχηματισμένων κυττάρων X33 παρουσιάζει ενεργότητα στο υπόστρωμα ABTS. Οι φασματοφωτομετρήσεις των κλασμάτων έκλουσης στο εύρος 250~700 nm δεν απέδωσαν κάποια εμφανή κορυφή εκτός των 280 nm, καθώς λόγω της δέσμευσης της αίμης από τα εκφρασμένα ένζυμα αναμενόταν κορυφή Soret περίπου στα 410 nm [165].

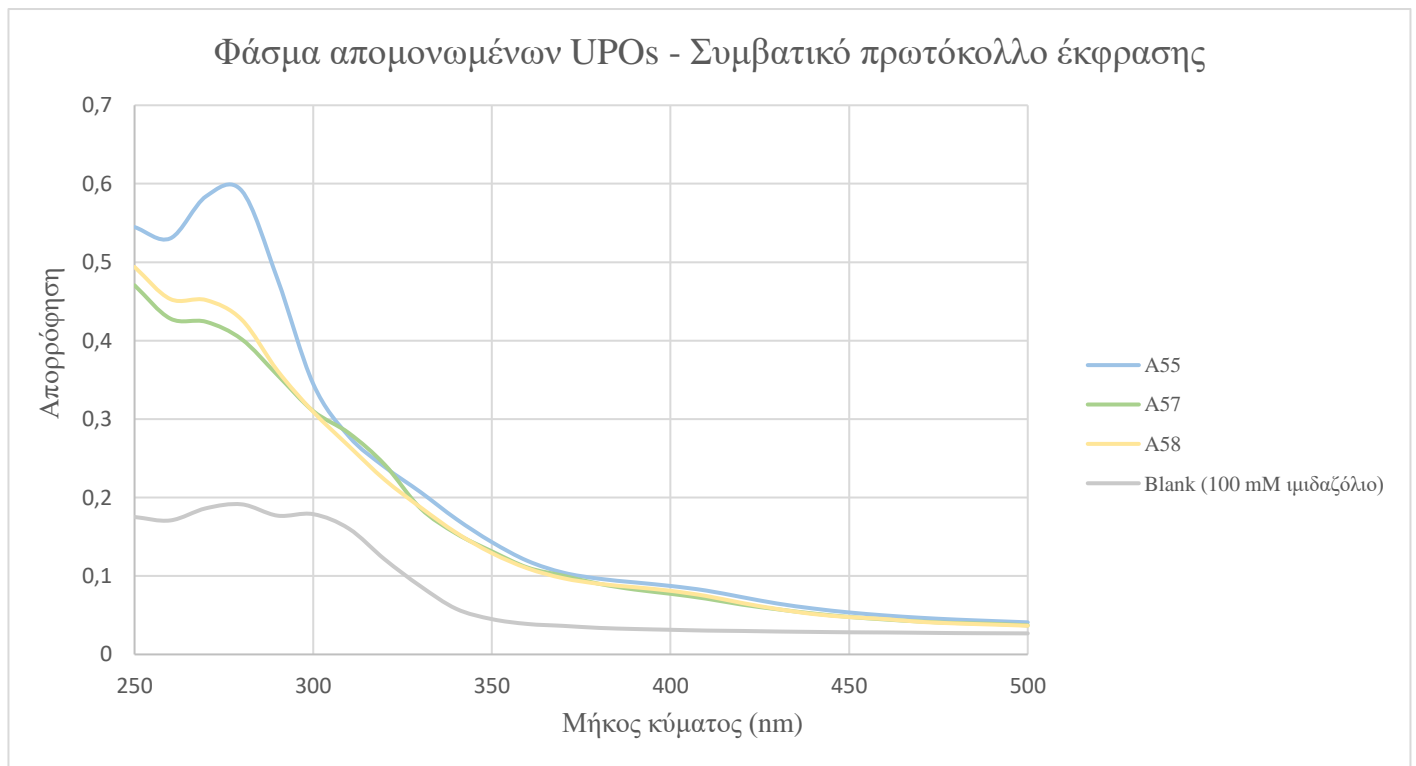
Τα στελέχη αυτά αξιοποιήθηκαν έπειτα για τις μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργειες παραγωγής των UPOs ενώ αποθηκεύτηκαν και σε διάλυμα γλυκερόλης σύμφωνα με τη διαδικασία της ενότητας 2.2.4 για μελλοντική χρήση. Ένα ακόμη συμπέρασμα που μπορεί αναχθεί από τα αποτελέσματα του Σχήματος 32 είναι ότι η υψηλότερη ημερήσια διαφορά της ανηγμένης ενεργότητας για κάθε καλλιέργεια επιτυγχάνεται κατά τη 2^η μέρα επαγωγής ενώ κατά την 3^η μέρα παρατηρείται μειωμένη τιμή αυτής της διαφοράς.

3.5.2. Ετερόλογη έκφραση των UPOs ακολουθώντας συμβατικό πρωτόκολλο

Σύμφωνα με το συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης των ενζύμων και με την ανάπτυξη των στελεχών που επελέγησαν κατά την εξέταση με τον συνδυασμό ενός plate assay και επακόλουθες μικρού μεγέθους καλλιέργειες (το 13 για την A55, το 11 για την A57 και την A58), παρασκευάστηκε 1 καλλιέργεια των 200 mL για κάθε UPO, οπότε συνολικά 3 καλλιέργειες. Αυτές αναπτύχθηκαν κατά το στάδιο της επαγωγής στους 28 °C για 5 μέρες. Μετά το πέρας της ανάπτυξης, απομονώθηκαν τα παραγόμενα ένζυμα με IMAC αφού πρώτα έγιναν εξισορρόπηση των υγρών με προσθήκη. Μετρήθηκαν τότε οι απορροφήσεις και τα φάσματα των κλασμάτων 100B· προέκυψαν έτσι τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 24. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων 100B από έκφραση των UPOs με συμβατικό πρωτόκολλο.

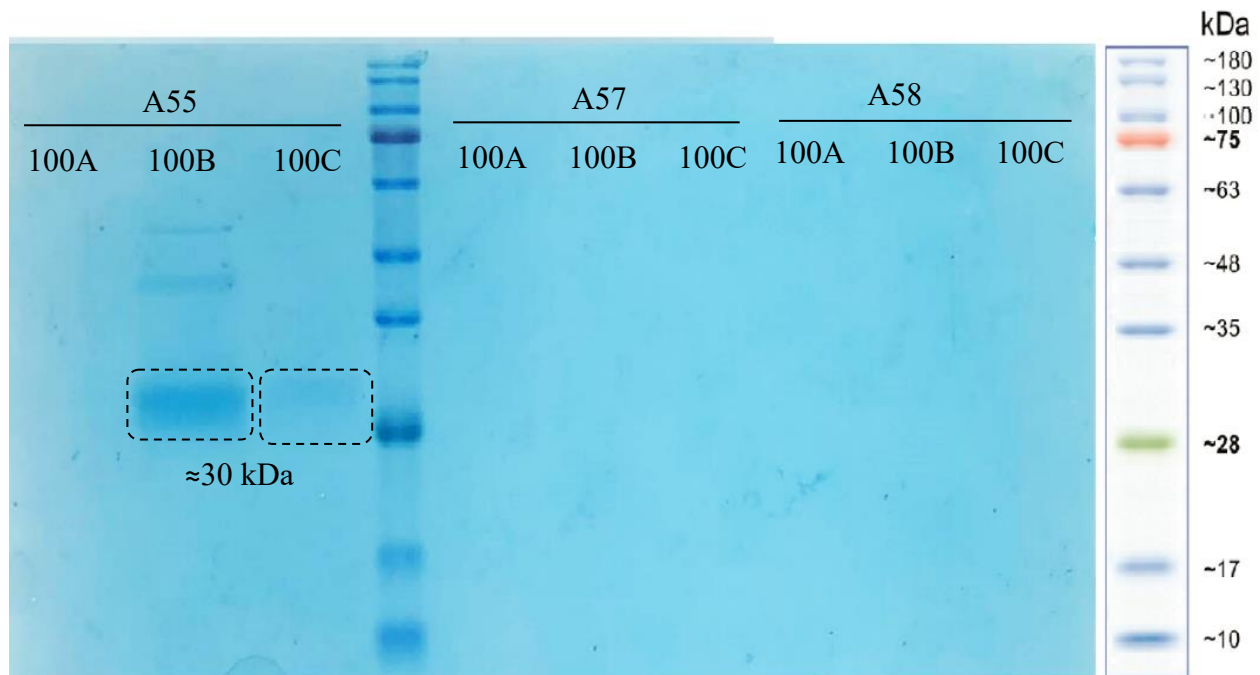
Κλάσμα	Ενζυμική συγκέντρωση (mg/mL)		
	A55	A57	A58
100B	0,83	0,34	0,38



Σχήμα 33. Φάσμα απορρόφησης χρωματογραφικών κλασμάτων 100B, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), από την έκφραση των UPOs με συμβατικό πρωτόκολλο (250-500 nm).

Η μεγαλύτερη ποσότητα απομονωμένου ενζύμου φαίνεται να αντιστοιχεί στην A55, σύμφωνα με τις τιμές του Πίνακα 24. Ωστόσο, τα ανωτέρω φάσματα φανερώνουν την αυξημένη απορρόφηση του ενζύμου A55 αλλά και την παρουσία μιας αρκετά μικρής έντασης κορυφής σε μορφή πλατιάσματος στα 410 nm στα κλάσματα 100B και των τριών ενζύμων (Σχήμα 33). Αυτό είναι αποτέλεσμα της δεσμευμένης αίμης η οποία αποδίδει τη χαρακτηριστική κορυφή Soret στα 410 nm και παρατηρείται επίσης σε λοιπές αιμοπρωτεΐνες· υποδεικνύει δε την ορθή έκφραση των ενζύμων λόγω επιτυχούς δέσμευσης του συμπαραγόντα της αίμης καθώς και τη διατήρηση αυτής καθ' όλη τη διαδικασία του καθαρισμού τους [165].

Έπειτα έγινε ηλεκτροφόρηση των παραπάνω κλασμάτων με SDS-PAGE και ανέκλυσε το ακόλουθο πήκτωμα:



Εικόνα 21. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης χρωματογραφικών κλασμάτων έκλουσης από την παραγωγή των UPOs με συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης (A55 – αριστερά του δείκτη, A57 & A58 – δεξιά του δείκτη).

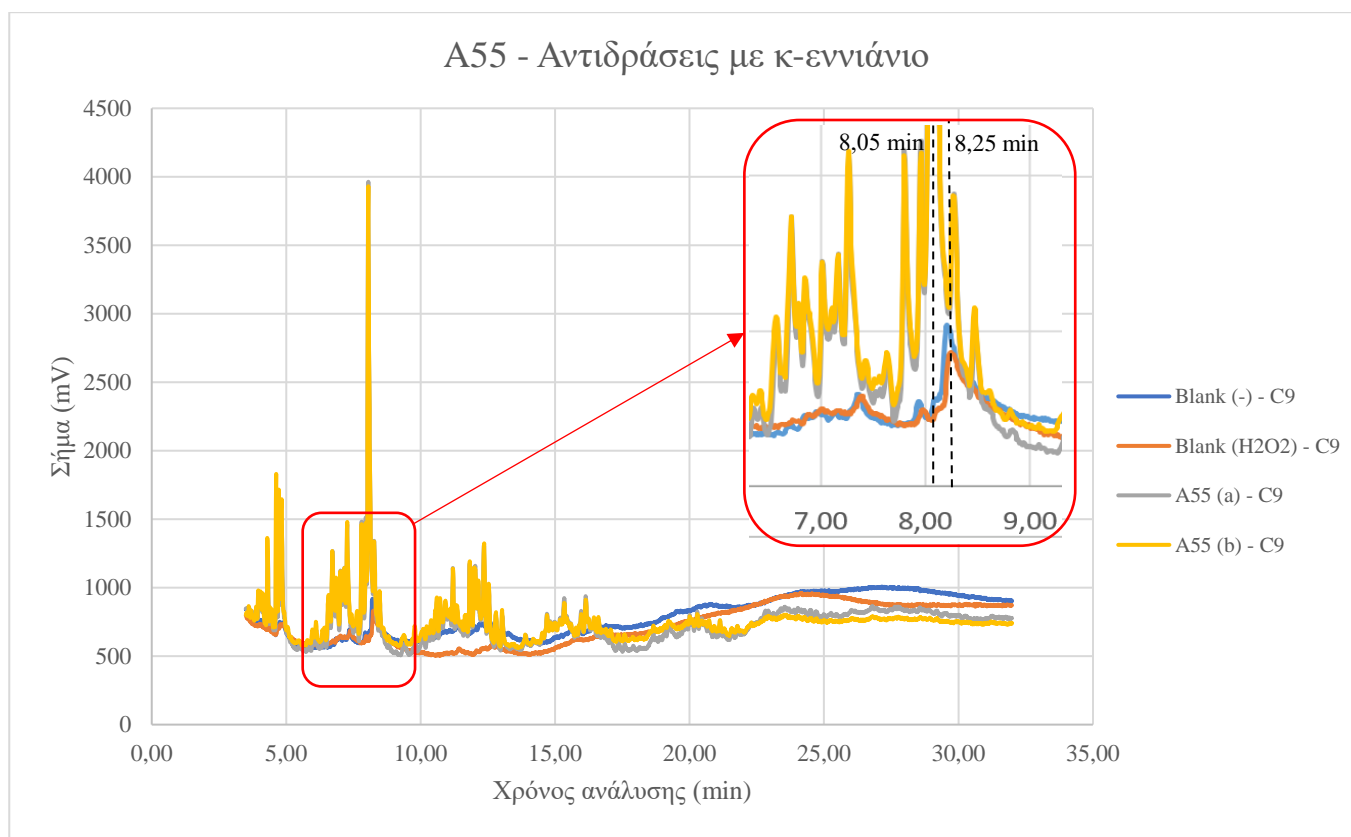
Στην Εικόνα 21 παρατηρούνται πρωτεϊνικές μπάντες μόνο στη θέση των κλασμάτων 100B και 100C της A55 με την εντονότερη μπάντα να βρίσκεται στο 100B. Οι μπάντες βρίσκονται δε σε ύψος που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος των περίπου 30 kDa τιμή που είναι αρκετά κοντά στο μοριακό βάρος της A55 που είναι τα 27,5 kDa με τη διαφορά να μπορεί να εξηγηθεί από πιθανή υπεργλυκοζυλίωση του ενζύμου κατά την έκφραση του από τη ζύμη *P. pastoris*. Επιβεβαιώνεται λοιπόν ότι κατά την ανάπτυξη των καλλιιεργειών της A55 παράχθηκε ορθά το επιθυμητό ένζυμο. Πάνω από τη συγκεκριμένη μπάντα παρατηρούνται βέβαια και ορισμένες άλλες δύο μπάντες υψηλότερα οι οποίες είναι μικρότερης έντασης συγκριτικά της κύριας μπάντας, γεγονός που υποδηλώνει χαμηλότερη πρωτεϊνική συγκέντρωση αυτών οπότε και θεωρούνται αμελητέες ως προς την ποσότητα του ενζύμου A55. Αποτελούν δε πιθανότατα προσμίξεις ή πρωτεϊνικά υπο-

λείμματα κατά την απομόνωση ή ακόμη και άλλες μορφές γλυκοζυλίωσης του επιθυμητού ενζύμου.

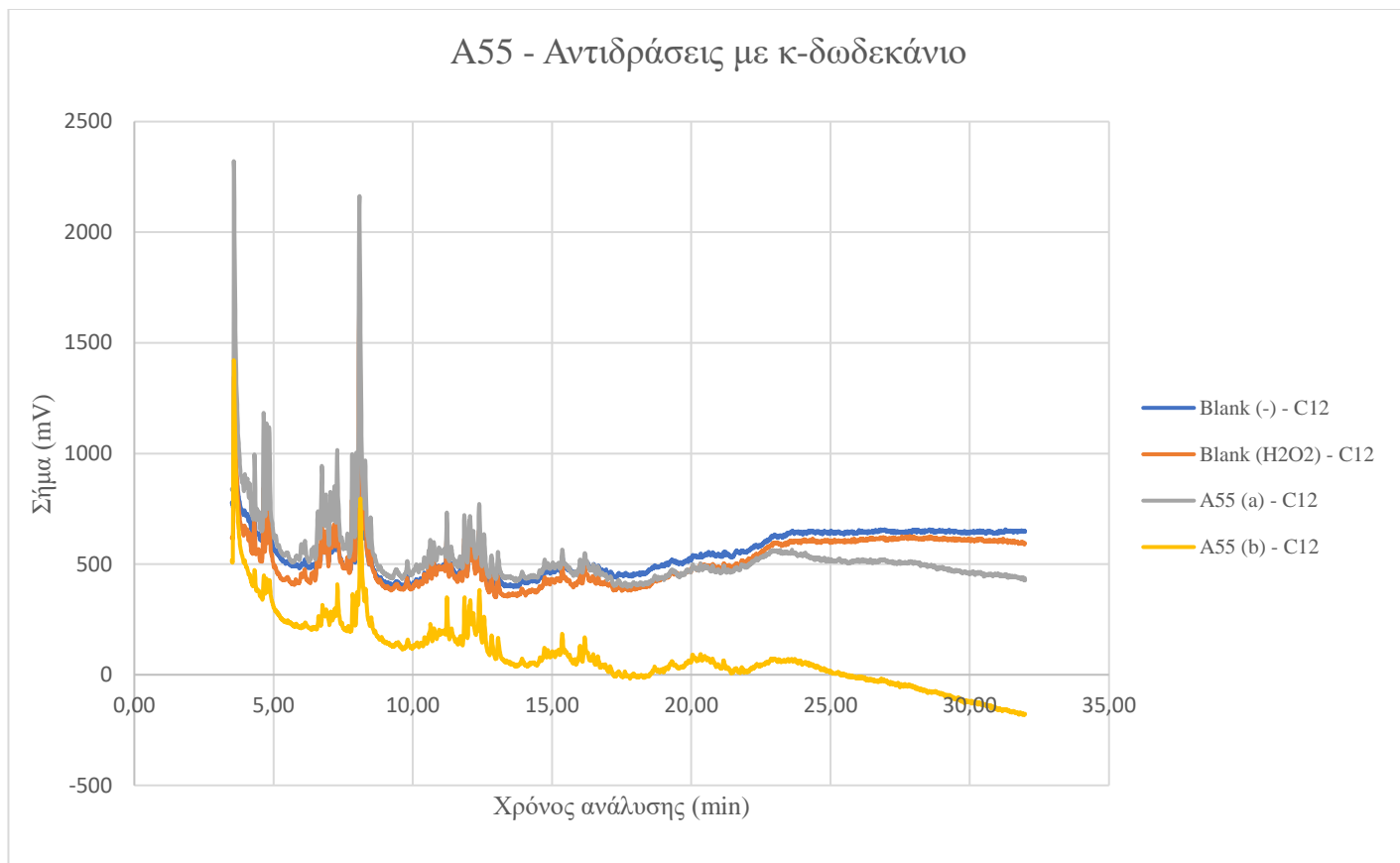
Έχοντας αναγνωρίσει το ένζυμο A55 στα κλάσματα έκλυσης, πραγματοποιήθηκε διαπίδυση του κλάσματος 100B σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 20 mM με pH=8.

3.5.2.1. Αντιδράσεις ενζύμου A55 με αλκάνια

Διερευνήθηκε έπειτα η δράση του παραχθέντος ενζύμου A55 στα αλκάνια κ-εννιάνιο, κ-δωδεκάνιο και κ-εικοσιτετράνιο· ακολουθήθηκε δε η μεθοδολογία που περιεγράφηκε στην ενότητα 2.2.10. Τα δείγματα κ-εννιανίου και κ-δωδεκανίου που παραλήφθηκαν ύστερα της εκχύλισης αναλύθηκαν πρώτα στον αέριο χρωματογράφο με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας GC-17A, SHIMADZU και τα ανακυπτόμενα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά παρακάτω (Σχήμα 34 και Σχήμα 35), όπου έχει αφαιρεθεί το σήμα που αποδίδει ο διαλύτης κ-εξάνιο καθώς είναι αρκετά υψηλό και δεν επιτρέπει εύκολη αναγνώριση των κορυφών λοιπών ουσιών:



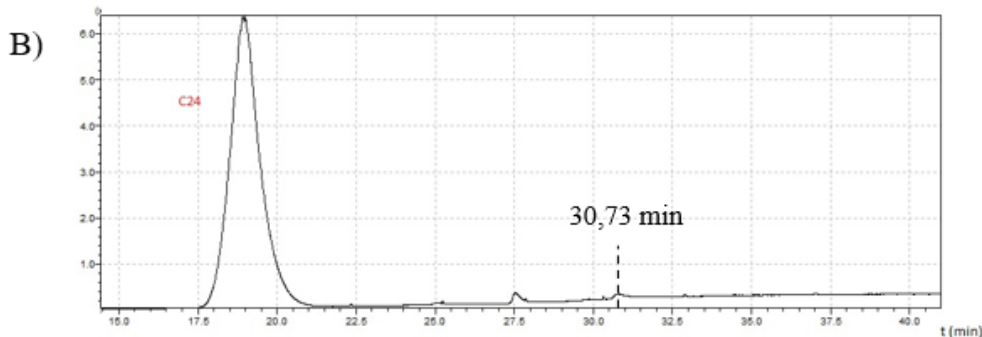
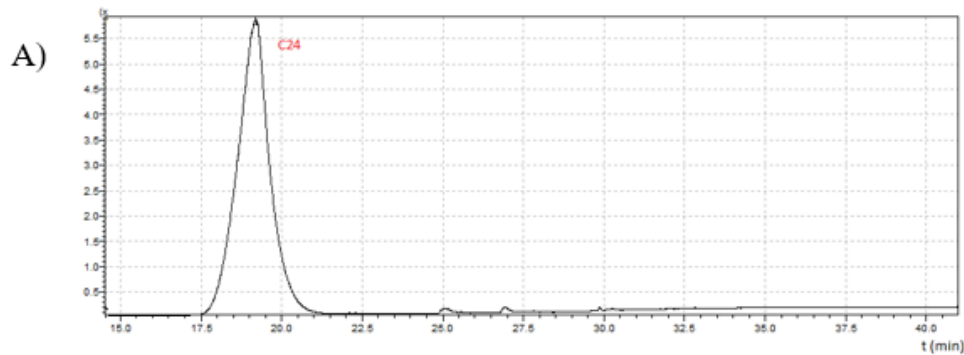
Σχήμα 34. Χρωματογραφήματα ανάλυσης δειγμάτων αντιδράσεων της A55 με κ-εννιάνιο σε GC-FID.



Σχήμα 35. Χρωματογραφήματα ανάλυσης δειγμάτων αντιδράσεων της A55 με κ-δωδεκάνιο σε GC-FID.

Στα ανωτέρω χρωματογραφήματα φαίνεται από τις αναλύσεις των τυφλών δειγμάτων ότι το κ-εννιάνιο και το κ-δωδεκάνιο αποδίδουν κορυφή στα 8,25 και 8,10 min αντίστοιχα. Αξιοσημείωτη παρατήρηση αποτελεί η παρουσία μιας σημαντικής κορυφής στα 8,05 min για τα δείγματα κ-εννιανίου που περιείχαν το ένζυμο A55, πλησίον μιας μικρότερης κορυφής στα 8,25 που αντιστοιχεί στο κ-εννιάνιο, οι οποίες κορυφές είναι πιο ευδιάκριτες στη μεγεθυμένη περιοχή του Σχήματος 34. Η κορυφή των 8,05 min αποτελεί πιθανή ένδειξη μιας ουσίας όμοιας του κ-εννιανίου η οποία είναι αρκετά πιθανό να έχει προκύψει από οξυγόνωση του αλκανίου αυτού από την UPO A55 αλλά είναι αδύνατον να ταυτοποιηθεί από το δεδομένο όργανο. Στο χρωματογράφημα του κ-δωδεκανίου δεν παρατηρείται ωστόσο κάποια διαφορετική κορυφή πέρα από εκείνες των τυφλών δειγμάτων.

Για την ταυτοποίηση πιθανών προϊόντων από τις αντιδράσεις αλκανίων με το ένζυμο A55 παρασκευάστηκαν νέα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν σε όργανο GC-MS και αντλήθηκαν τα χρωματογραφήματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 36.



Κορυφή στα 30,73 min	
Πιθανότητα	Χημική ένωση
82%	Δεκαπεντανοϊκό οξύ
82%	Δεκαοκτανοϊκό οξύ
81%	Εικοσιτετρανοϊκό οξύ
80%	Εικοσανοϊκό οξύ
80%	Δεκατριανοϊκό οξύ
80%	Δωδεκανοϊκό οξύ

Σχήμα 36. Χρωματογράφημα GC-MS και ταυτοποίηση χημικών ενώσεων (για αξιοπιστία άνω του 80%) από την ανάλυση των δειγμάτων για τις αντιδράσεις με κ-εικοσιτετράνιο των Flowthrough από την έκφραση των UPOs σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο: A) για το τυφλό δείγμα με H₂O₂ και) για το δείγμα του ενζύμου A55.

Η ανάλυση των δειγμάτων σε όργανο GC-MS παρουσίασε αποτελέσματα μόνο για τις αντιδράσεις με το κ-εικοσιτετράνιο και μάλιστα για το ένζυμο A55 με την παρουσία μιας κορυφής στα 30,73 min, η οποία δεν απεικονίζεται στο χρωματογράφημα του τυφλού δείγματος, πέρα της κύριας κορυφής του κ-εικοσιτετρανίου. Η ένταση της κορυφής που προέκυψε ήταν αρκετά χαμηλή, ήταν όμως εφικτό να ταυτοποιηθούν τα πιθανά προϊόντα της δράσης του ενζύμου. Συγκεκριμένα, μέσω της φασματομετρίας μάζας αντλήθηκαν τα ποσοστά αξιοπιστίας για τις ενώσεις της συγκεκριμένης κορυφής, όπου ικανοποιητικό εύρος αξιοπιστίας θεωρήθηκε το άνω του 80%. Πιθανά προϊόντα της ενζυμικής δράσης αποτέλεσαν λοιπόν μερικά λιπαρά οξέα τα οποία διαθέτουν είτε ίδια είτε λιγότερα άτομα άνθρακα από το αρχικό αλκάνιο. Αυτό αποτελεί ένδειξη για την οξυγονωτική και οξειδωτική δράση του ενζύμου στο κ-εικοσιτετράνιο, καθώς είναι αρκετά πιθανό να σχηματίστηκε το αντίστοιχο λιπαρό οξύ (εικοσιτετρανοϊκό οξύ) ή και κάποιο άλλο λιπαρό οξύ το οποίο προέκυψε από τη διάσπαση του αλκανίου και την περαιτέρω οξείδωση του.

3.5.3. Εξέταση συνθηκών ενζυμικής έκφρασης

Επειδή, κατά την παραγωγή των UPOs με συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης, το απομονωμένο ένζυμο A55 παρουσίασε χαμηλή ενώ τα υπόλοιπα δύο σχετικά περιορισμένη έκφραση, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθούν διαδικασίες εξέτασης μερικών συνθηκών έκφρασης όπως παρουσία συμπαραγόντα και χρόνος επαγωγής ώστε να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο έκφρασης και να επιτευχθεί αυξημένη παραγωγή και βελτιωμένη ενεργότητα των ενζύμων.

3.5.3.1. Εξέταση συμπληρωμάτων και συμπαραγόντων

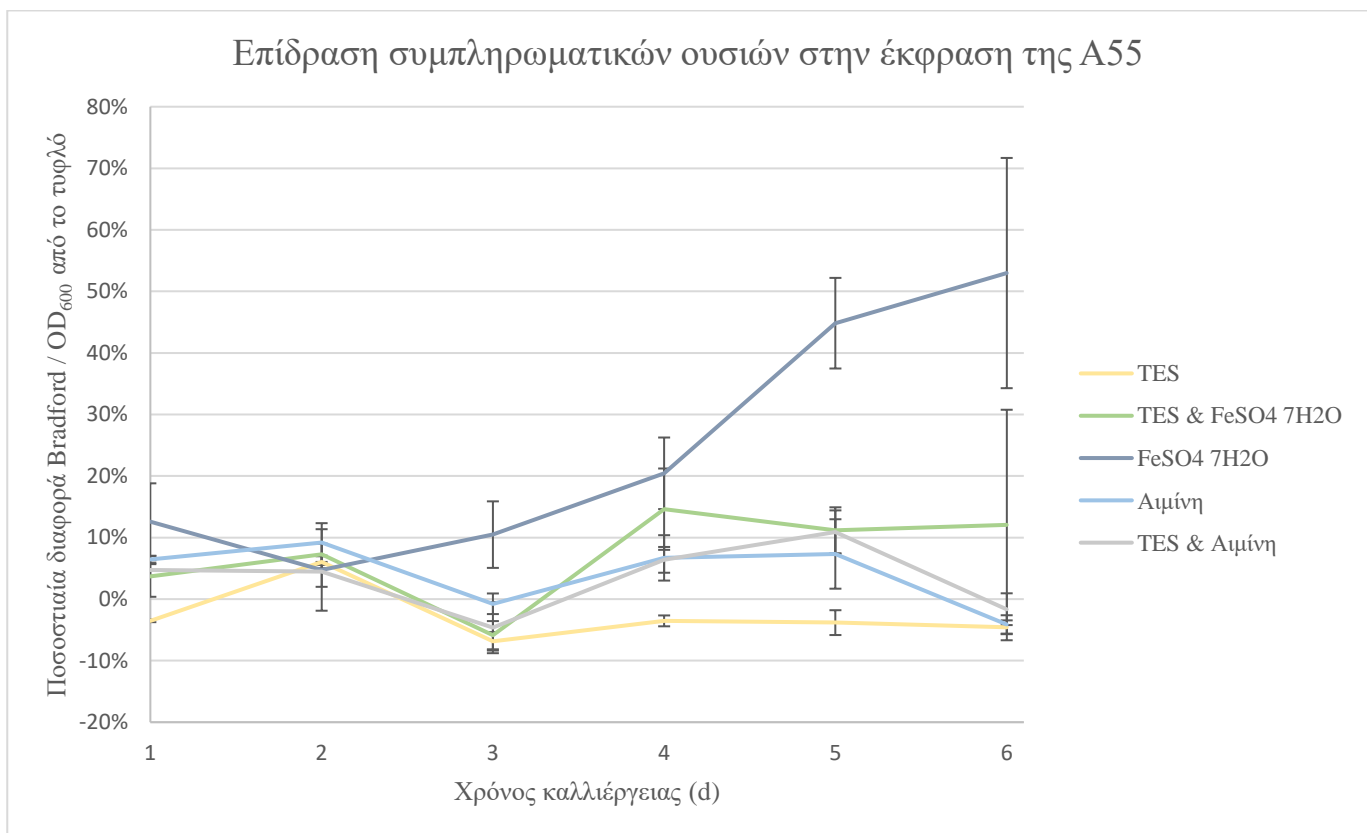
Οι μελετώμενες UPOs απαιτούν ως συμπαραγόντα άτομο σιδήρου το οποίο ωστόσο το αποκτούν δεσμεύοντας ένα μόριο αίμης. Ο συμπαραγόντας είναι καίριος για τη δράση του ενζύμου και για τον περιορισμό επιπλέον σταδίων στη διεργασία προτιμάται η προσθήκη του στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των ξενιστών που εκφράζουν το ένζυμο. Για τη λήψη μορίου αίμης κατά την έκφραση χρησιμοποιείται συνήθως για αντίστοιχα ένζυμα μια πρόδρομη ένωση της αίμης, η αιμίνη. Έρευνες έχουν δείξει ωστόσο ότι η βέλτιστη συγκέντρωση αιμίνης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης για ένζυμα που απαιτούν αίμη είναι τα 10 μM , στο οποίο και βασίζεται το συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε για τις προηγούμενες παραγωγές των ενζύμων αυτών [166]. Για να βρεθούν όμως τα βέλτιστα συμπληρωματικά στοιχεία που απαιτούνται για την έκφραση των UPOs πραγματοποιήθηκε εξέταση διαφόρων συστατικών με την ανάπτυξη μιας συγκεκριμένης αποικίας για την A55. Επειδή λοιπόν απαιτείται άτομο σιδήρου για την ορθή έκφραση δοκιμάστηκε η προσθήκη είτε σκέτου σιδήρου υπό μορφή ένυδρου θεικού σιδήρου είτε σιδήρου από ένα διάλυμα ιχνοστοιχείων (TES) είτε σιδήρου από διάλυμα αιμίνης ή και συνδυασμός των παραπάνω. Τα διάφορα συμπληρώματα που προστέθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 25 ενώ αναπτύχθηκαν 2 καλλιέργειες των 50 mL για κάθε περίπτωση παράλληλα με 2 καλλιέργειες A55 όπου δεν προστέθηκε καμία ουσία:

Πίνακας 25. Διαφορετικές περιπτώσεις συμπληρωματικών διαλυμάτων για την έκφραση του ενζύμου A55.

Αρίθμηση διαφορετικών καλλιεργειών	Ένωση/Διάλυμα	Συγκέντρωση
1	-	-
2	TES	0,4% v/v
3	TES $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4% v/v 0,96 mM
4	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mM
5	Αιμίνη	10 μM

6	TES Αιμίνη	0,4% v/v 10 μM
---	---------------	-------------------

Η επαγωγή των καλλιεργείων πραγματοποιήθηκε στους 27 °C για 6 μέρες και κάθε ημέρα μετρούταν το πρωτεϊνικό περιεχόμενο τους μέσω Bradford. Οι αναλυτικές μετρήσεις που προέκυψαν παρατίθενται στο Παράρτημα Γ, ενώ στο επόμενο σχήμα (Σχήμα 37) απεικονίζονται οι ποσοστιαίες διαφορές των λόγων των απορροφήσεων Bradford διά την οπτική πυκνότητα των καλλιεργείων συγκριτικά με την τιμή του τυφλού, όπου τυφλό δείγμα αποτελεί η καλλιέργεια με μηδενική συγκέντρωση συμπαραγόντων:



Σχήμα 37. Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστιαίων διαφορών Bradford/OD₆₀₀ από την τιμή του τυφλού για διαφορετικά είδη συμπληρωματικών ουσιών στην έκφραση του ενζύμου A55.

Παρατηρείται από το παραπάνω σχήμα ότι η σημαντικά μεγαλύτερη παραγωγή πρωτεΐνης αντιστοιχεί στην ανάπτυξη με προσθήκη ένυδρου θεικού σιδήρου και μάλιστα δίχως την προσθήκη του TES. Από την άλλη σε παρόμοια μεταξύ τους επίπεδα πρωτεΐνης βρίσκονται οι καλλιέργειες που περιέχουν είτε αιμίνη είτε αιμίνη και TES, και είναι δε μεγαλύτερα από τα επίπεδα πρωτεΐνης των τυφλών κατά την 4^η και 5^η μέρα επαγωγής. Παρόλα αυτά πραγματοποιήθηκε επίσης δοκιμή δράσης σε ABTS στα δείγματα των τεσσάρων τελευταίων ημερών επαγωγής για να

διερευνηθεί η ενεργότητα των παραγόμενων ενζύμων και αποδείχθηκε ότι ενεργότητα σε ABTS είχαν μόνο τα ένζυμα από τις καλλιέργειες που περιείχαν αιμίνη, των οποίων η απόλυτη και ανηγμένη ενεργότητα φαίνονται παρακάτω. Στη δεδομένη περίπτωση δεν απαιτήθηκε ο προσδιορισμός της ειδικής ενεργότητας καθώς στόχος ήταν η σύγκριση των διαφορετικών καλλιιεργειών και όχι η ακριβής ποσοτικοποίηση των ιδιοτήτων τους, αν και ανάγεται η απόλυτη ενεργότητα ως προς την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ώστε να συσχετιστεί με τον βαθμό κυτταρικής ανάπτυξης.

Πίνακας 26. Απόλυτες και ανηγμένες ενεργότητες ενζυμικών δειγμάτων προς την οπτική πυκνότητα από τις καλλιέργειες με αιμίνη κατά την εξέταση συμπληρωμάτων έκφρασης.

Πρόσθετη ένωση καλλιέργειας	Ενεργότητα (mU)				Ενεργότητα OD ₆₀₀			
	3 ^ο μέρα	4 ^ο μέρα	5 ^ο μέρα	6 ^ο μέρα	3 ^ο μέρα	4 ^ο μέρα	5 ^ο μέρα	6 ^ο μέρα
Αιμίνη	0,071	0,067	0,032	0,031	0,142	0,114	0,055	0,049
TES & Αιμίνη	0,145	0,105	0,086	0,065	0,284	0,174	0,146	0,103

Φαίνεται λοιπόν ότι η μεγαλύτερη ανηγμένη ενεργότητα αποδίδεται κατά την έκφραση παρουσία αιμίνης και διαλύματος ιχνοστοιχείων (TES), ενώ οι μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας αντιστοιχούν στις λιγότερες ημέρες επαγωγής για το οποίο βέβαια απαιτούνται επιπλέον δεδομένα για να αποφανθεί ο βέλτιστος χρόνος επαγωγής (Πίνακας 26). Επιπροσθέτως, συμπεράθηκε ότι η μέτρηση της ενεργότητας του κυτταρικού υγρού αποτελεί ορθότερη μέθοδο για τον προσδιορισμό των παραγόμενων ενζύμων κατά τις διαδικασίες εξέτασης παραμέτρων έκφρασης και στελεχών καθώς σε αυτήν την περίπτωση οι καλλιέργειες που περιείχαν τη μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης αντιστοίχισαν τελικά σε μηδαμινή δράση σε ABTS στο οποίο μπορούν και δρουν υπό κανονικές συνθήκες ένζυμα όπως οι μελετώμενες UPOs.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε και απομόνωση των ενζύμων από τις καλλιέργειες που περιείχαν αιμίνη και η έκλουση των πρωτεϊνών έγινε με 7 διαδοχικές προσθήκες 2 mL ιμιδαζολίου 100 mM. Οι συγκεντρώσεις των κλασμάτων έκλουσης είναι οι ακόλουθες:

Πίνακας 27. Συγκεντρώσεις χρωματογραφικών κλασμάτων έκλουσης του ενζύμου A55 κατά την εξέταση συμπληρωμάτων έκφρασης.

Κλάσμα	Ενζυμική συγκέντρωση (mg/mL)	
	A55 (Αιμίνη)	A55 (TES & Αιμίνη)
100-1	0,00	0,00

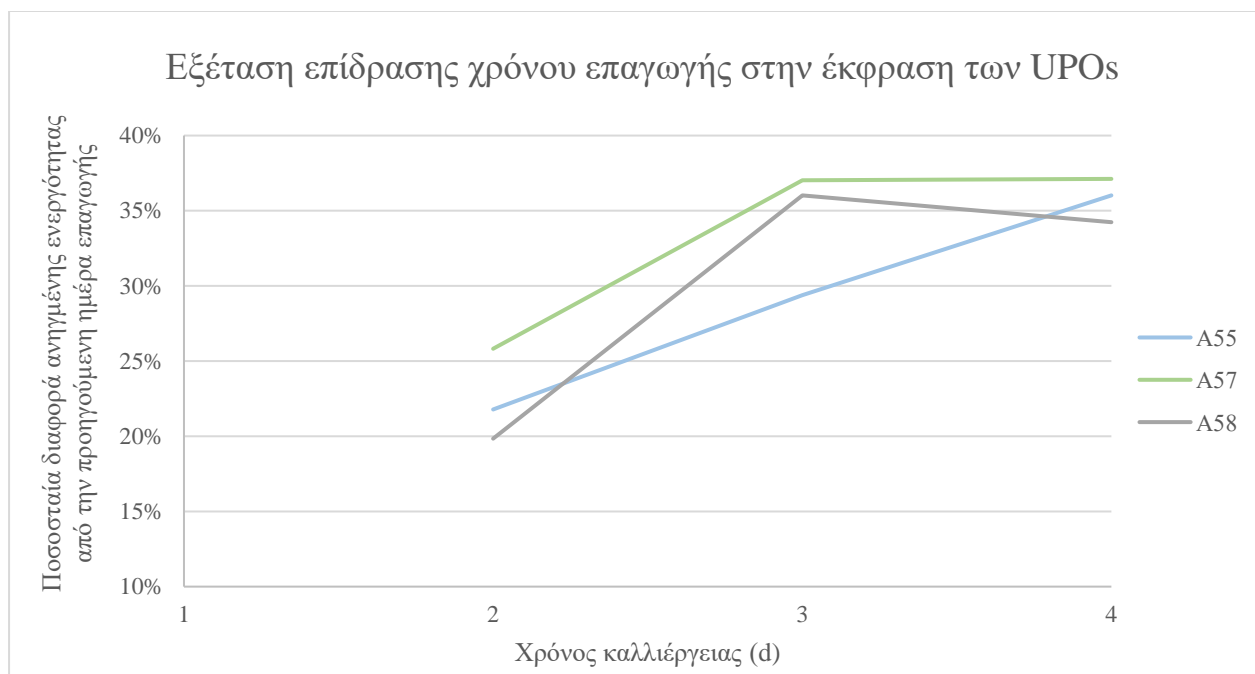
100-2	0,00	0,00
100-3	0,24	0,20
100-4	0,26	0,56
100-5	0,18	0,29
100-6	0,24	0,23
100-7	0,19	0,20

Η μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου φαίνεται να εκλούστηκε κατά το 4^ο κλάσμα ιμιδαζολίου 100 mM, ενώ απομονώθηκε μεγαλύτερη ποσότητα καθ' όλα τα κλάσματα από την καλλιέργεια με TES και αιμίνη σε σχέση με εκείνα της καλλιέργειας που περιείχε μόνο αιμίνη (Πίνακας 27). Αυτό δικαιολογεί εν μέρει και την αυξημένη ενεργότητα που διέθετε το κυτταρικό υγρό της πρώτης. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η έκφραση του A55 είναι καλύτερη παρουσία όχι μόνο αιμίνης αλλά και του διαλύματος ιχνοστοιχείων (TES). Έτσι, φαίνεται ότι το συμβατικό πρωτόκολλο δεν απαιτούσε κάποια μετατροπή ως προς τις προστιθέμενες συμπληρωματικές ουσίες του θρεπτικού μέσου και γι' αυτό οι επόμενες καλλιέργειες για την έκφραση των UPOs πραγματοποιήθηκαν με την ίδια προσθήκη TES και διαλύματος αιμίνης σε τελική συγκέντρωση 10 μ M στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

Τέλος, ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα από τα χρωματογραφικά κλάσματα με τη μεγαλύτερη απορρόφηση (100-4 και 100-5) σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου τα οποία είχαν προηγουμένως συμπυκνωθεί. Ωστόσο, δεν προέκυψε κάποια εμφανής πρωτεϊνική μπάντα στο πήκτωμα ώστε να αναγνωριστεί κάποιο παραγόμενο ένζυμο και γι' αυτό παραλείπεται η απεικόνιση του.

3.5.3.2. Εξέταση χρόνου επαγωγής

Για να περιοριστεί η πιθανή πρωτεόλυση ή απενεργοποίηση των εκφρασμένων ενζύμων και να ελεγχθεί η επίδραση του χρόνου επαγωγής στη δράση τους πραγματοποιήθηκε έλεγχος του βέλτιστου χρόνου με την ανάπτυξη καλλιεργειών των 200 mL για κάθε UPO με θερμοκρασία και χρόνο επαγωγής τους 28 °C και τις 4 ημέρες αντίστοιχα. Κάθε ημέρα επαγωγής πραγματοποιούταν μέτρηση της οπτικής πυκνότητας και ενεργότητας του κυτταρικού υγρού. Συγκεκριμένα, έπειτα του υπολογισμού της ανηγμένης ενεργότητας ως προς την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας υπολογίζεται η ποσοστιαία πτώση της ενζυμικής ανηγμένης ενεργότητας για κάθε ημέρα από την αντίστοιχη τιμή της εκάστοτε προηγούμενης ημέρας επαγωγής. Η αναπαράσταση αυτής της ποσοστιαίας μεταβολής συναρτήσει του χρόνου επαγωγής φαίνεται στο Σχήμα 38.



Σχήμα 38. Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοστιαίας διαφοράς της ανηγμένης ενεργότητας μεταξύ των ημερών επαγωγής κατά την έκφραση των UPOs.

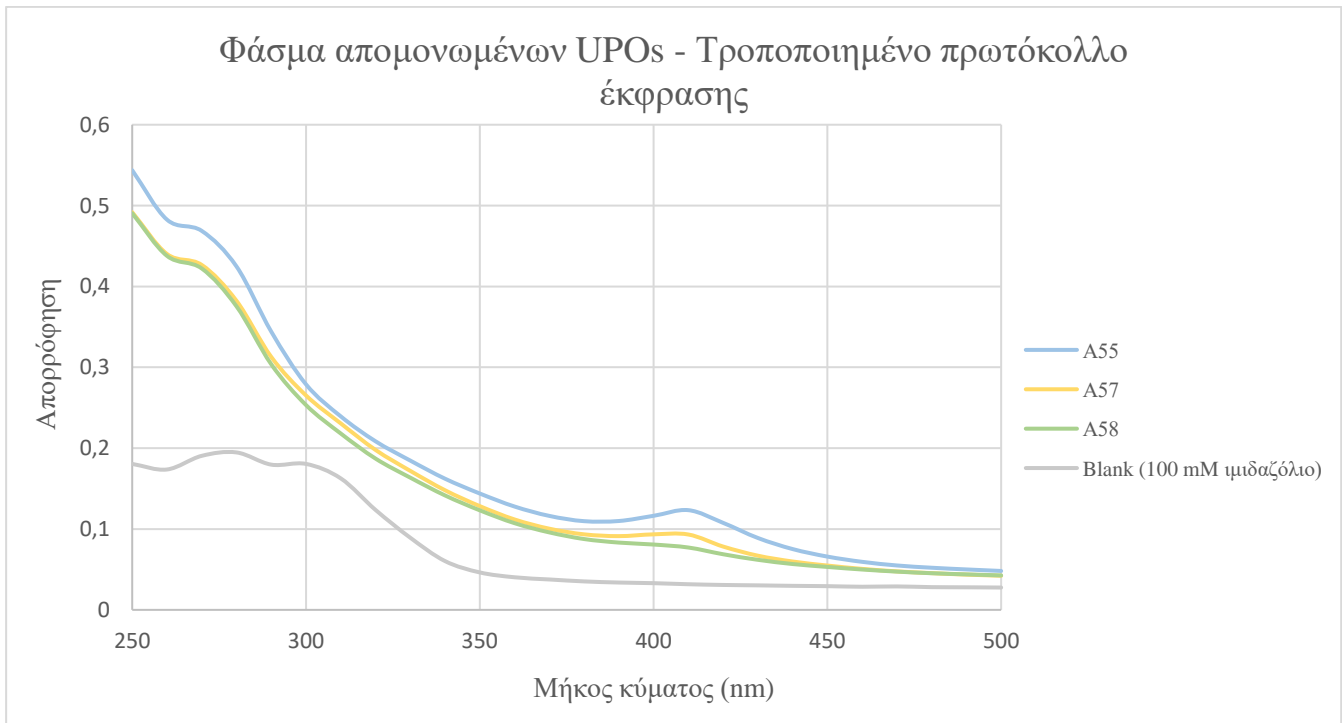
Παρατηρείται ότι η μικρότερη πτώση της ανηγμένης ενεργότητας αντιστοιχεί στη 2^η ημέρα επαγωγής ενώ αυξάνεται κατά τις επόμενες μέρες. Αποφάνθηκε λοιπόν ότι ικανοποιητικός χρόνος επαγωγής των καλλιιεργειών για την έκφραση των UPOs είναι οι δύο ημέρες ούτως ώστε να επιτευχθεί η μικρότερη δυνατή πτώση της ενζυμικής ενεργότητας λόγω της περαιτέρω παρατηρούμενης πτώσης κατά τις επόμενες ημέρες καλλιέργειας, ενώ απορρίφθηκε η εφαρμογή μόνο μιας μέρας επαγωγής, που σύμφωνα με τα παραπάνω παρουσιάζει τη μέγιστη ανηγμένη ενεργότητα, καθότι η παραγόμενη ενζυμική ποσότητα πιθανώς να είναι περιορισμένη.

3.5.4. Ετερόλογη έκφραση των UPOs ακολουθώντας βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο έκφρασης

Έπειτα της βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου έκφρασης πραγματοποιήθηκε παραγωγή των UPOs με την ανάπτυξη καλλιιεργειών οι οποίες επάχθηκαν στους 28 °C για 2 ημέρες. Ύστερα λοιπόν της απαραίτητης κατιούσας διεργασίας για την παραλαβή των καθαρών ενζύμων, λήφθηκαν οι συγκεντρώσεις και τα φάσματα των χρωματογραφικών κλασμάτων έκλουσης, τα οποία φαίνονται παρακάτω παράλληλα με την υπολογισμένη ειδική ενεργότητα:

Πίνακας 28. Συγκεντρώσεις και ενεργότητες χρωματογραφικών κλασμάτων 100B από την έκφραση των UPOs με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο.

Κλάσμα	Ενζυμική συγκέντρωση (mg/mL)			Ειδική ενεργότητα (mU/mg)		
	A55	A57	A58	A55	A57	A58
100B	0,58	0,39	0,37	14,49	15,97	8,21

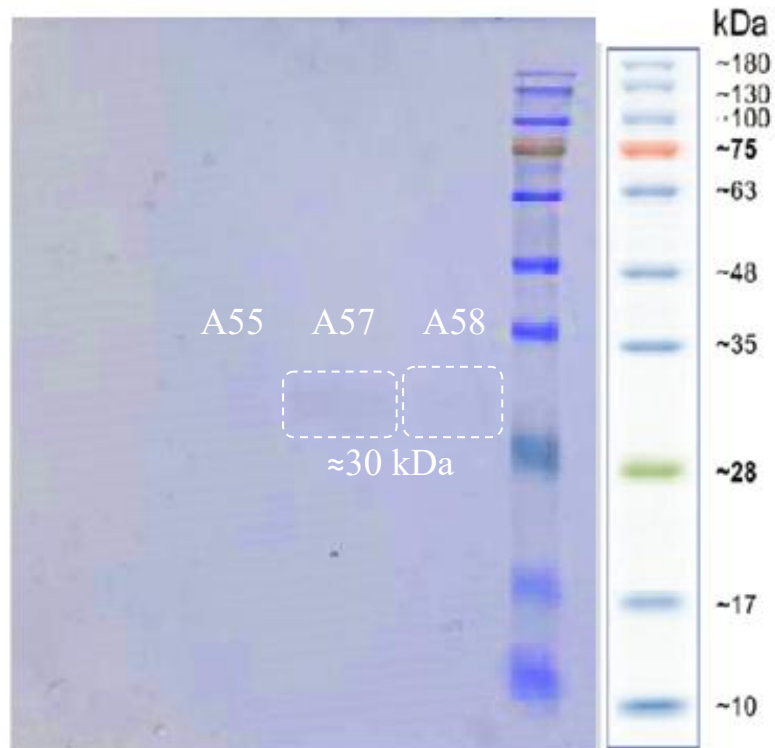


Σχήμα 39. Φάσμα απορρόφησης χρωματογραφικών κλασμάτων 100B, καθώς και του τυφλού δείγματος (Blank), από την έκφραση των UPOs με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο (250-500 nm).

Από τη δεδομένη ενζυμική παραγωγή παρατηρείται λοιπόν ότι απομονώθηκε μεγαλύτερη ενζυμική ποσότητα συγκριτικά με προηγούμενες απόπειρες, με εξαίρεση την παραγωγή με το συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης (3.5.2) όπου η ενζυμική συγκέντρωση των κλασμάτων 100B ήταν

επί το πλείστον υψηλότερη αλλά είχαν υποβληθεί οι καλλιέργειες σε μεγαλύτερο χρόνο επαγωγής (Πίνακας 24). Ωστόσο, η ενεργότητα των κλασμάτων 100B αυτής της παραγωγής είναι υψηλότερη από όσα διαλύματα καθαρών τέτοιων ενζύμων έχουν μετρηθεί έως τώρα. Συμπληρωματικά, στο Σχήμα 39 παρουσιάζονται περισσότερο ευδιάκριτες κορυφές στα 410 nm επί των ανωτέρω φασμάτων για τα κλάσματα 100B, γεγονός που επιβεβαιώνει την ορθή και πιο εκτεταμένη δέσμευση της αίμης.

Έπειτα από την διαδικασία IMAC ηλεκτροφορήθηκαν τα κλάσματα 100B τα οποία είχαν προηγουμένως συμπυκνωθεί. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που προέκυψε τελικώς φαίνεται κατωτέρω στην Εικόνα 22 .



Εικόνα 22. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κλασμάτων 100B από την έκφραση των UPOs με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο.

Στο πήκτωμα εμφανίζονται δύο αγνές πρωτεϊνικές μπάντες στο ύψος που αντιστοιχεί περίπου στα 30 kDa, μία στη θέση του δείγματος της A57 και μία στη θέση του δείγματος της A58. Επειδή τα ένζυμα αυτά διαθέτουν μοριακό βάρος περίπου στα 30 kDa μπορεί να γίνει η διαπίστωση ότι τα ένζυμα που εκφράστηκαν και απομονώθηκαν κατά την τελευταία παραγωγή αποτελούν τα επιθυμητά ένζυμα με ορθό σχηματισμό· για την A55 δεν μπορεί να γίνει ωστόσο η ίδια διαπίστωση καθώς δεν εμφανίστηκε κάποια πρωτεϊνική μπάντα στη θέση του αντίστοιχου δείγματος της.

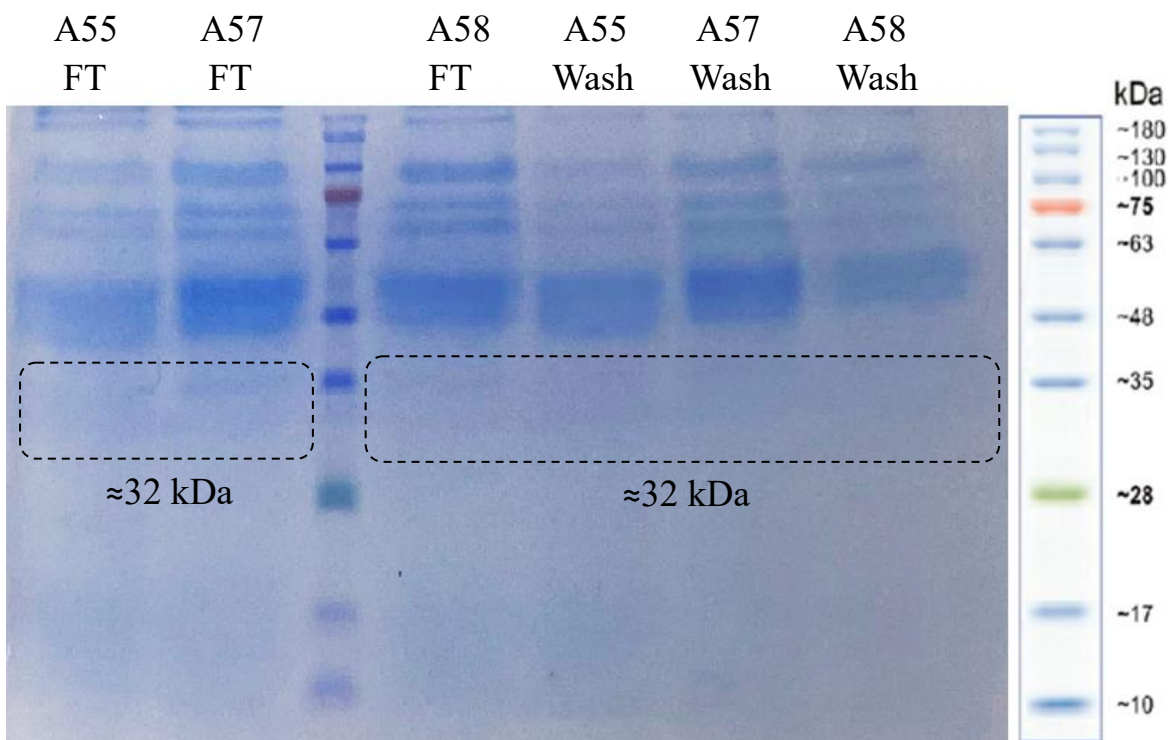
3.5.5. Ετερόλογη έκφραση των UPOs σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες

Αφού πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου έκφρασης και εφόσον έχει επιβεβαιωθεί η ορθή έκφραση των ενζύμων μέσω των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου, πραγματοποιήθηκε παραγωγή σε καλλιέργειες των 500 mL, μία για κάθε ένζυμο, με τη χρήση του βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου.

Ωστόσο, η απομόνωση των ενζύμων οδήγησε σε κλάσματα έκλυσης με σχεδόν μηδενική συγκέντρωση ενζύμου και έπειτα της εξέτασης των ενεργοτήτων των διαφόρων χρωματογραφικών κλασμάτων, όπου ενεργότητα παρουσίασαν μόνο τα κλάσματα Flowthrough (FT) και Wash όπως φαίνεται στον Πίνακα 29, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μόνο για τα κλάσματα που απέδωσαν ενεργότητα για να διερευνηθεί η παρουσία των επιθυμητών ενζύμων εντός αυτών αλλά και το ενδεχόμενο αποτυχίας της απομόνωσης μέσω IMAC. Παρακάτω παρατίθεται το πήκτωμα που ανέκυψε έπειτα της διαδικασίας SDS-PAGE (Εικόνα 23).

Πίνακας 29. Ενεργότητες των χρωματογραφικών κλασμάτων από την έκφραση των UPOs σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο.

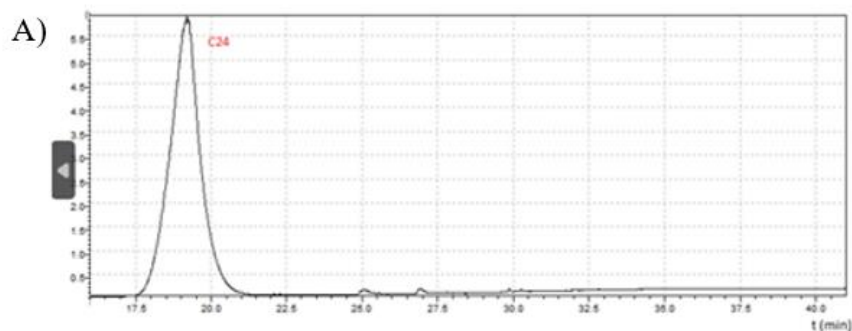
Κλάσμα	Ενεργότητα (mU)		
	A55	A57	A58
FT	0,871	0,934	1,19
Wash	0,691	0,896	1,00
10 mM	0,00	0,00	0,00
100A	0,00	0,00	0,00
100B	0,00	0,00	0,00
100C	0,00	0,00	0,00



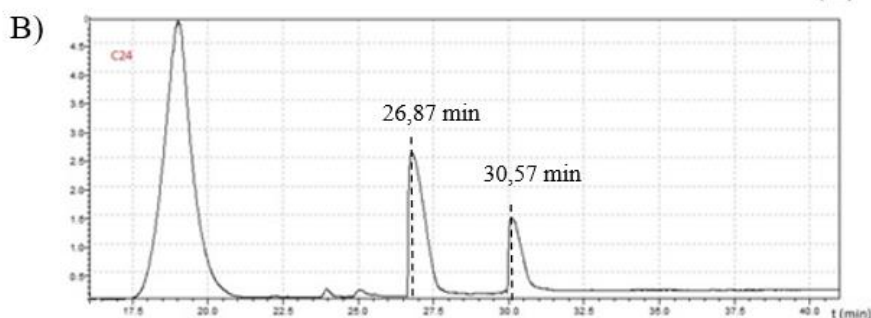
Εικόνα 23. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κλασμάτων Flowthrough και Wash για την έκφραση των UPOs σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο.

Στο πήκτωμα της Εικόνας 23 απεικονίζονται οι διάφορες πρωτεϊνικές μπάντες που αντιστοιχούν ως επί το πλείστον στις πρωτεΐνες που εκφράζουν εξωκυτταρικά τα κύτταρα *P. pastoris* X33. Όμως, παρουσιάζονται παράλληλα πρωτεϊνικές μπάντες στο ύψος που αντιστοιχεί περίπου στα 30-32 kDa, τιμή που προσεγγίζει το πραγματικό μοριακό βάρος των UPOs. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει είτε την παρουσία πρωτεϊνών τις οποίες εκφράζουν τα κύτταρα της ζύμης και διαθέτουν παρεμφερές μοριακό βάρος είτε την αποτυχία της απομόνωσης των εκφρασμένων ενζύμων κατά τη διαδικασία IMAC εξαιτίας κάποιας πιθανής επιπλοκής.

Για περαιτέρω διερεύνηση της έκφρασης του ενζυμικού περιεχομένου των κλασμάτων Flowthrough πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με τα αλκάνια κ-εννιάνιο, κ-δωδεκάνιο και κ-εικοσιτετράνιο, μέσω των οποίων θα καταδειχθεί η δράση των πρωτεϊνικών αυτών διαλυμάτων σε αλειφατικά υποστρώματα. Από την ανάλυση των δειγμάτων σε όργανο GC-MS προέκυψαν ουσιαστικά αποτελέσματα για το κ-εικοσιτετράνιο από το δείγμα για το ένζυμο A58, όπου παρακάτω παρουσιάζονται το αντίστοιχο χρωματογράφημα μαζί με εκείνο του τυφλού δείγματος (τα σύνολο των χρωματογραφημάτων παρατίθεται στο Παράρτημα Δ):



Κορυφή στα 26,87 min	
Πιθανότητα	Χημική ένωση
86%	Δεκαπεντανοϊκό οξύ
86%	Δεκατετρανοϊκό οξύ
86%	Δεκαοκτανοϊκό οξύ
86%	Δεκαεπτανοϊκό οξύ
85%	Δεκαεξανοϊκό οξύ
85%	Εικοσανοϊκό οξύ



Κορυφή στα 30,57 min	
Πιθανότητα	Χημική ένωση
88%	Δεκαοκτανοϊκό οξύ
85%	Εικοσανοϊκό οξύ
85%	Δεκαπεντανοϊκό οξύ
85%	Δεκαεπτανοϊκό οξύ

Σχήμα 40. Χρωματογράφημα GC-MS και ταυτοποίηση χημικών ενώσεων (για αξιοπιστία άνω του 85%) από την ανάλυση των δειγμάτων για τις αντιδράσεις με κ-εικοσιτετρανίου των Flowthrough από την έκφραση των UPOs σε μεγάλη κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο: A) για το τυφλό δείγμα με H₂O₂ και) για το δείγμα του ενζύμου A58.

Από τα ανωτέρω χρωματογραφήματα του Σχήματος 40 γίνεται ευδιάκριτη η δράση των δειγμάτων με το Flowthrough του ενζύμου A58 καθότι ανέκυψαν δύο σημαντικής έντασης κορυφές στα 26,87 min και 30,57 min, οι οποίες δεν παρουσιάζονται στο χρωματογράφημα του τυφλού δείγματος: η δεύτερη κορυφή είχε προκύψει μάλιστα κατά την αντίδραση του ενζύμου A55 σε προηγούμενες αναλύσεις που διεξήχθησαν (Σχήμα 36) αλλά σε αρκετά χαμηλότερη ένταση. Μέσω φασματομετρίας μάζας ανιχνεύτηκαν οι ενώσεις που απέδωσαν αυτές τις κορυφές, όπου προέκυψαν ποσοστά αξιοπιστίας για την ταυτοποίηση διάφορων ενώσεων και παρουσιάζονται εκείνες που διαθέτουν ποσοστό μεγαλύτερο του 85%. Τα παραπάνω αποτελούν λοιπόν ισχυρές ενδείξεις για τη δράση του ενζυμικού διαλύματος επί του κ-εικοσιτετρανίου, καθώς από τα πιθανά προϊόντα συμπεραίνεται ότι πραγματοποιήθηκε οξυγόνωση και περαιτέρω οξείδωση του αλκανίου και πιθανώς να επιτεύχθηκε διάσπαση του σε μικρότερου μοριακού βάρους μόρια.

4. Συμπεράσματα μελέτης, εμπόδια και μελλοντικές προτάσεις

4.1. Συζήτηση αποτελεσμάτων και συμπεράσματα

Κατά την παρούσα διπλωματική εργασία αποπειράθηκε η ανακάλυψη, έκφραση και βελτιστοποίηση έκφρασης ορισμένων καινοτόμων οξειδωτικών ενζύμων, μέσω των οποίων να επιτευχθεί βιοαποικοδόμηση ή τροποποίηση πολυολεφινικών πλαστικών και δη του πολυαιθυλενίου. Οι υπολογιστικές και πειραματικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν αποτέλεσαν βάση για την άντληση αξιοσημείωτων συμπερασμάτων.

4.1.1. Δομή μελετώμενων ενζύμων

Η βιοπληροφορική ανάλυση των αμινοξικών ακολουθιών των επιλεγμένων ενζύμων επέτρεψε την βαθύτερη κατανόηση της δομής και των ιδιοτήτων τους. Συγκεκριμένα, προέκυψαν διαφορετικά συμπεράσματα για κάθε κατηγορία ενζύμων:

- **Μη ειδικές υπεροξυγενάσες (UPOs):** για τις UPOs A55, A57 και A58, οι οποίες επιλέχθηκαν αρχικά για την γνωστή τους δράση σε αλειφατικά υποστρώματα, έγινε κατανοητή η δομή τους και η ομολογία τους με λοιπές UPOs. Συγκεκριμένα, παρουσίασαν υψηλή ομολογία τόσο μεταξύ τους όσο και με αντίστοιχης κατηγορίας υπεροξυγενάσες, ενώ από τη δομική σύγκριση τους με ένα τέτοιο κρυσταλλογραφημένο ένζυμο βρέθηκε η θεωρητική θέση του ενεργού τους κέντρου ενώ αποδείχθηκε και η δυνατότητα τους να δεσμεύουν το μόριο της αίμης. Αυτή η δυνατότητα πηγάζει από την ύπαρξη των ίδιων αμινοξέων στα ένζυμα A57, A58 με τα αμινοξέα που ενώνονται με την αίμη στην κρυσταλλογραφημένη υπεροξυγενάση. Η A55 ωστόσο διέφερε ως προς μερικά αμινοξέα που αλληλεπιδρούσαν με την αίμη, αν και διέθετε τη συνήθη αλληλουχία των UPOs όπου προσδέεται η αίμη, γεγονός που αποτελεί ένδειξη πως το συγκεκριμένο ένζυμο αλληλεπιδρά πιθανώς με ελαφρώς διαφορετικό τρόπο με τον συμπαράγοντα αυτόν.
- **Μεταλλοένζυμα Demetra και AsqI:** με εφιαλτήριο την επιλογή της αναγνωρισμένης ΡΕάσης Demetra για περαιτέρω μελέτη, επιλέχθηκε το ένζυμο AsqI ως ομόλογο της για να μελετηθεί επίσης για τη δράση του σε πολυαιθυλένιο. Η ομολογία του επιβεβαιώθηκε δευτερευόντως και από την ανάλυση και ευθυγράμμιση των τρισδιάστατων δομών τους. Η παράλληλη σύγκριση τους με μια κρυσταλλογραφημένη αιμοκυανίνη συνέβαλλε στην εύρεση και επιβεβαίωση της θεωρητικής θέσης του ενεργού κέντρου των ενζύμων, αν και στην AsqI αντιστοιχούσε και στη θέση του δεσμευμένου ατόμου ψευδαργύρου. Τα δεσμευμένα άτομα χαλκού της αιμοκυανίνης συμπίπταν χωροταξικά με τη θέση του ψευδαργύρου και βάσει αυτών των θέσεων αντλήθηκαν συμπεράσματα για τη θέση και τη φύση του ενεργού κέντρου της Demetra. Η απουσία όμως του συνήθη και αναμενόμενου αριθμού μορίων ιστιδινών στη θεωρητική περιοχή του ενεργού κέντρου, αλλά και στο υπόλοιπο πρωτεϊνικό μόριο, κατέστησε δύσκολη την εύρεση του τρόπου δέσμευσης των ατόμων χαλκού από το

ένζυμο αυτό. Ειδικότερα, δεν βρέθηκε κάποια άλλη περιοχή στην οποία υπήρχαν κοντινά μόρια ιστιδίνης που θα επέτρεπαν τη δέσμευση, ωστόσο βρέθηκαν πλήθος μορίων τυροσίνης και μόνο ένα μόριο ιστιδίνης στο υποτιθέμενο ενεργό κέντρο του. Οι θέσεις των τυροσινών προσέγγιζαν σε σημαντικό βαθμό τις θέσεις των ιστιδινών των άλλων πρωτεϊνών και είναι πιθανό τα άτομα χαλκού να μπορούν να προσδένονται στο ένζυμο μέσω αλληλεπιδράσεων με τα μόρια τυροσίνης· έχει αποδειχθεί άλλωστε ότι μόρια τυροσίνης μπορούν να συμβάλλουν στη δέσμευση ιόντων μετάλλων και δη χαλκού [167], [168]. Επομένως, προκύπτει το ερώτημα του τρόπου με τον οποίο δεσμεύονται τα άτομα χαλκού στο πρωτεϊνικό μόριο του ενζύμου Demetra, που για να απαντηθεί απαιτούνται εκτεταμένη πειραματική διερεύνηση και χαρακτηρισμός του μορίου αυτού. Βέβαια η δέσμευση του χαλκού από το ένζυμο Demetra επιβεβαιώθηκε από τα διεξαγόμενα πειράματα καθότι στα φάσματα απορρόφησης παρουσιαζόταν κορυφή στα 420 nm, ενδεικτική της ένωσης πρωτεϊνών με άτομα χαλκού, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 30.

4.1.2. Ετερόλογη έκφραση μελετώμενων ενζύμων

4.1.2.1. Πρωτόκολλο έκφρασης

Για την έκφραση των μελετώμενων ενζύμων εφαρμόστηκε αρχικά ένα συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης τόσο για τις μη ειδικές υπεροξυγενάσες όσο και για τα μεταλλοένζυμα. Μολαταύτα οι πρώτες απόπειρες έκφρασης τους έδειξαν την ανάγκη για τροποποίηση αυτών των πρωτοκόλλων έκφρασης. Ειδικότερα, με την εξέταση τόσο συνθηκών έκφρασης όπως θερμοκρασία και χρόνος επαγωγής όσο και συγκεντρώσεις διαφόρων συμπληρωματικών ουσιών και συμπαραγόμενων βρέθηκαν ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση και έχρηζαν τροποποίησης:

- **Μη ειδικές υπεροξυγενάσες (UPOs):** η έκφραση τους ήταν η βέλτιστη για χρόνο επαγωγής ίσο με 2 ημέρες, όπου δεν παραγόταν η μέγιστη ποσότητα πρωτεΐνης αλλά η ενεργότητα των παραγόμενων ενζύμων αποκτούσε τη μέγιστη τιμή. Επίσης, επιβεβαιώθηκε ότι η βέλτιστη δράση των εκφρασμένων ενζύμων επιτυγχάνεται με την προσθήκη όχι μόνο αιμίνης σε συγκέντρωση 10 μM αλλά και διαλύματος ιχνοστοιχείων, καθώς μεταξύ διαφόρων περιπτώσεων αυτή η περίπτωση απέδωσε τη μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας· όμως το αρχικό συμβατικό πρωτόκολλο περιελάμβανε τις ίδιες προσθήκες συμπληρωματικών ουσιών, οπότε δεν απαιτήθηκε αλλαγή του ως προς αυτό. Βέβαια χρειάζεται να σημειωθεί ότι η δοκιμή προσθήκης FeSO_4 σε συγκέντρωση 1 mM για την έκφραση των μελετώμενων UPOs απέφερε παραγωγή ενζύμων τα οποία δεν παρουσίασαν ενεργότητα σε ABTS, παρόλο που η δράση των ενζύμων οφείλεται στη αναγωγή του σιδήρου στο ενεργό τους κέντρο. Εξήγηση της παραπάνω διαπίστωσης μπορεί να αποτελεί η μη επιτυχής πρόσδεση του καθαρού σιδήρου και η δυνατότητα των ενζύμων αυτών να προσδένονται μόνο με μόριο αίμης, το οποίο περιέχει το απαιτούμενο άτομο σιδήρου. Συγκρίνοντας, έπειτα, βιβλιογραφικώς τα χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα έκφρασης με πρωτόκολλα για την έκφραση λοιπών UPOs προέκυψαν ορισμένες ομοιότητες. Στο σύστημα-ξενιστή *P. pastoris* έχουν εκφραστεί UPOs σε θρεπτικό μέσο BMMY παρουσία αιμογλοβίνης (5 μM) και θεικού

μαγνησίου (3 mM) ή διαλύματος μεταλλικών ιχνοστοιχείων με επαγωγή στους 28 °C για 3 ημέρες [169], [170]. Κατά την παρούσα πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε αιμίνη σε συγκέντρωση 10 μ M και διάλυμα ιχνοστοιχείων, όπου η παρουσία και των δύο φάνηκε να συνδέεται με βελτιωμένη ενεργότητα των ενζύμων, ενώ ο χρόνος επαγωγής βρέθηκε βέλτιστος αντίστοιχο αριθμό ημερών με τα ανωτέρω βιβλιογραφικά ευρήματα. Θεωρήθηκε, επίσης, ότι η χρήση της αιμίνης παρέχει αμεσότερα τον συμπαράγοντα αίμη σε αντίθεση με την αιμογλοβίνη στην οποία βρίσκεται δεσμευμένη η αίμη. Η διαθεσιμότητα της αίμης αποτελεί μάλιστα περιοριστικό στάδιο στην παραγωγή αιμοπρωτεϊνών, ωστόσο έρευνες έχουν δείξει ότι, μεταξύ διάφορων μεθόδων παροχής του μορίου αυτού, η προσθήκη αιμίνης στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας αποφέρει την αποδοτικότερη βελτίωση της παραγωγής αιμοπρωτεϊνών [171]–[173].

- **Μεταλλοένζυμα Demetra και AsqI:** η έκφραση αυτών ήταν ατελής καθώς το ένζυμο AsqI δεν φάνηκε να εκφράζεται ενώ το Demetra εκφραζόταν αλλά πιθανώς πρωτεολυμένο. Μάλιστα, δεν παρουσίασαν ενεργότητα στα δοκιμασμένα υποστρώματα καθιστώντας αδύνατο τον πλήρη προσδιορισμό των παραγόμενων ενζύμων. Η δοκιμή διαφόρων θερμοκρασιών και χρόνων έκφρασης δεν απέφερε κάποιο επιθυμητό αποτέλεσμα ώστε να κριθεί εμποικοδομητική μια αλλαγή του πρωτοκόλλου· η μείωση των τιμών των συνθηκών αυτών που δοκιμάστηκε συνδεόταν μόνο με μειωμένη ποσότητα των παραγόμενων πρωτεϊνών. Ωστόσο, η εξέταση διαφορετικών συγκεντρώσεων συμπαράγοντα (θεικού χαλκού) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η παραγόμενη ποσότητα αυξήθηκε για συγκέντρωση θεικού χαλκού 75 μ M, βάσει του οποίου μπορεί να τροποποιηθεί το συμβατικό πρωτόκολλο που απαιτούσε συγκέντρωση θεικού χαλκού 25 μ M.

4.1.2.2. Ταυτοποίηση και καθαρότητα απομονωμένων ενζύμων

Η αναγνώριση και ταυτοποίηση των απομονωμένων ενζύμων ήταν εφικτό να πραγματοποιηθεί δίχως αμφιβολία μόνο για ένζυμα A55, A57 και A58. Η κύρια μέθοδος ταυτοποίησης στηρίζεται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου της μεθόδου SDS-PAGE, όπου ανά τις διάφορες παραγωγές των ενζύμων αυτών ανέκυψαν πρωτεϊνικές μπάντες και για τα τρία ένζυμα (Εικόνα 21 και Εικόνα 22) που αντιστοιχούσαν στο αναμενόμενο μοριακό βάρος των περίπου 30 kDa, καθώς τα μοριακά βάρη των A55, A57 και A58 είναι 27,5, 26,8 και 30,3 kDa αντίστοιχα. Ωστόσο, οι πρωτεϊνικές μπάντες που αντιστοιχούσαν στα ανωτέρω ένζυμα, βρίσκονταν ως επί το πλείστον τουλάχιστον στο ύψος των 30 kDa και όχι χαμηλότερα, γεγονός που ίσως συνδέεται με πιθανή γλυκοζυλίωση από τα κύτταρα του συστήματος ετερόλογης έκφρασης *P. pastoris*. Ακόμη η παρουσία ενεργότητας σε ABTS (σύνηθες υπόστρωμα για την εξέταση της δράσης μη ειδικών υπεροξυγενασών) των πρωτεϊνικών διαλυμάτων που απέδωσαν τις ανωτέρω μπάντες αποτέλεσε ένα επιπλέον στοιχείο για να επιβεβαιωθεί ότι απομονώθηκαν τα επιθυμητά ένζυμα [170], [174]. Η ανωτέρω διαπίστωση που συμπληρώνεται από την εμφανή παρουσία της χαρακτηριστικής κορυφής Soret στα 410 nm στα φάσματα απορρόφησης των 2 κύριων αποπειρών παραγωγής των UPOs (Σχήμα 33 και Σχήμα 39), ενδεικτική της δέσμευσης του μορίου της αίμης από αιμοπρω-

τεΐνες [165]. Όμως στο πρωτεϊνικό διάλυμα όπου αναγνωρίστηκε το ένζυμο A55 παρουσιάστηκαν περαιτέρω πρωτεϊνικές μπάντες μεγαλύτερου μοριακού βάρους οι οποίες συνεπάγονται την παρουσία πρωτεϊνικών προσμίξεων ώστε να μην μπορεί να χαρακτηριστεί καθαρό το συγκεκριμένο διάλυμα, ενώ για το ένζυμο αυτό δεν ανέκυψε κάποια οπτικώς ανιχνεύσιμη μπάντα στις επόμενες παραγωγές των UPOs, όπου παρουσιάστηκαν μπάντες για τις A57 και A58.

Καθ' όλες τις παραγωγές των μεταλλοενζύμων βέβαια δεν ανέκυψε κάποια ανιχνεύσιμη πρωτεϊνική μπάντα κατά την ηλεκτροφόρηση των διαλυμάτων απομόνωσης του ενζύμου AsqI και ούτε παρουσίαζαν αυτά τα διαλύματα ενεργότητα στο υπόστρωμα κατεχόλης που δοκιμάστηκε. Επομένως, δεν έγινε δυνατό να επιβεβαιωθεί η επιτυχής έκφραση του συγκεκριμένου ενζύμου. Αντίθετα, για το ένζυμο Demetra ανέκυπταν, έπειτα από κάθε παραγωγή και απομόνωση, απλωμένες πρωτεϊνικές μπάντες σε ύψος που αντιστοιχούσε σε μοριακό βάρος 40~55 kDa, όπως φαίνεται ενδεικτικά στην Εικόνα 17. Θα ήταν αρκετά δύσκολο να αναγνωριστούν και να συσχετιστούν αυτές οι πρωτεϊνικές μπάντες με το επιθυμητό ένζυμο Demetra αν δεν πραγματοποιούνταν απομόνωση μέσω IMAC κατά την οποία λαμβάνονται αποκλειστικά οι πρωτεΐνες που διαθέτουν ετικέτα ιστιδίνης και αν δεν προέκυπτε απορρόφηση του αντίστοιχου πρωτεϊνικού διαλύματος στα 420 nm. Η απορρόφηση στα 420 nm έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τις περιοχές σύνδεσης χαλκού τύπου 3, οι οποίες αναμένεται να υπάρχουν στο μόριο της Demetra λόγω της ομολογίας τους με χαλκοπρωτεΐνες τύπου 3 όπως οι αιμοκυανίνες, ενώ τα αντίστοιχα ενζυμικά διαλύματα διέθεταν μια κιτρινωπή χρώση λόγω της δέσμευσης του χαλκού που βρισκόταν στη μη οξειδωμένη μορφή του [175], [176]. Επίσης, παρατηρήθηκαν κορυφές στα 360 nm, τις οποίες ερευνητές έχουν συσχετίσει με τις οξυαιμοκυανίνες και την ανάπτυξη υπεροξειδικής γέφυρας μεταξύ των 2 ατόμων χαλκού που περιέχουν, ωστόσο ανέκυπταν παράλληλα κορυφές απορρόφησης και στα 600 nm, οι οποίες δεν παρατηρήθηκαν στα φάσματα των πρωτεϊνικών διαλυμάτων της Demetra [177]. Μολαταύτα, η απουσία σημαντικού αριθμού ιστιδινών από το μόριο της Demetra πιθανώς οδηγεί σε δέσμευση μικρότερου αριθμού ατόμων χαλκού και σε άγνωστες αλληλεπιδράσεις με ορισμένα αμινοξέα, χαρακτηριστικό το οποίο μπορεί να αποτελεί τον λόγο δημιουργίας των προαναφερόμενων κορυφών κατά τη φασματοφωτομετρία. Ωστόσο, δεν παύουν να ανακύπτουν ερωτήματα σχετικά με τον τρόπο δέσμευσης του χαλκού από το ένζυμο Demetra, τον αριθμό ατόμων χαλκού που δεσμεύει και τις αλληλεπιδράσεις που δημιουργούν που δημιουργούν τις προαναφερόμενες κορυφές απορρόφησης, καθώς οι ανωτέρω υποθέσεις δεν μπορούν να τα απαντήσουν με ακρίβεια. Ο προσδιορισμός των ιδιοτήτων του ενζύμου, που θα απαντήσουν σε αυτά τα ερωτήματα, χρήζει λοιπόν περαιτέρω βιοπληροφορικής και πειραματικής διερεύνησης. Ο χρωματισμός δε του διαλύματος λόγω του χαλκού ήταν συνήθως οπτικά εμφανής. Τελικώς, συμπεράθηκε για το ένζυμο Demetra ότι πραγματοποιούνταν μη ορθή έκφραση του από το σύστημα-ξενιστή *P. pastoris* πιθανώς λόγω είτε κάποιου βαθμού πρωτεόλυσης από τα κύτταρα είτε εσφαλμένης μεταγραφής και μετάφρασης του γονιδίου έκφρασης. Ωστόσο, επί των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου όπου ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα του ενζύμου Demetra, παρατηρήθηκαν ορισμένες φορές περαιτέρω πρωτεϊνικές μπάντες σε χαμηλότερο ύψος που αντιστοιχούσαν σε μοριακό βάρος περίπου 10 kDa και 20 kDa (Εικόνα 16, Εικόνα 17 και Εικόνα 18). Εκ πρώτης όψεως οι μπάντες αυτές θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως αποτέλεσμα προσμίξεων,

όμως η επαναλαμβανόμενη παρουσία τους κατά την πλειονότητα των αποπειρών έκφρασης του ενζύμου οδήγησε στη διαπίστωση ότι αποτελούν αποτέλεσμα της πρωτεόλυσης του ενζύμου λαμβάνοντας υπόψη και την ατελή έκφραση του.

4.1.3. Δράση μελετώμενων ενζύμων σε αλειφατικά υποστρώματα ή PE

Στόχος της παρούσας διπλωματικής είναι η εύρεση ενζύμων τα οποία θα μπορέσουν να αποικοδομήσουν ή να τροποποιήσουν τις πολυμερικές αλυσίδες πολυολεφινών. Προς τούτο δοκιμάστηκε η δράση των εξεταζόμενων ενζύμων σε υποστρώματα που είτε διέθεταν παρεμφερή δομή με την αλυσίδα πολυολεφινών είτε αποτελούσαν τα ίδια συνθετικές πολυολεφίνες. Βέβαια το ένζυμο AsqI δεν δοκιμάστηκε σε κάποιο υπόστρωμα πέρα της κατεχόλης καθώς ούτε επιβεβαιώθηκε η ορθή έκφραση του ούτε επιτεύχθηκε εκτεταμένη παραγωγή λειτουργικού ενζύμου, οπότε δεν κρίθηκε σημαντική η περαιτέρω εξέταση της δράσης του.

Η δράση των μη ειδικών υπεροξυγενασών δοκιμάστηκε σε αλκάνια όπως το κ-εννιάνιο, το κ-δωδεκάνιο και το κ-εικοσιτετράνιο, των οποίων οι αλειφατικοί δεσμοί προσομοιάζουν ικανοποιητικά τους δεσμούς των πολυμερικών αλυσίδων των πολυολεφινών, αφού πρώτα είχε παρατηρηθεί η οξειδωτική τους δράση σε ABTS. Το κύριο αποτέλεσμα προέκυψε από το ένζυμο A55 το οποίο φάνηκε να επιδρά στο κ-εννιάνιο κατά την ανάλυση των δειγμάτων σε όργανο GC-FID, παράγοντας μια ουσία παρεμφερή στο αλκάνιο αυτό δίχως όμως να μπορεί να ταυτοποιηθεί. Περαιτέρω αναλύσεις των δειγμάτων σε όργανο GC-MS έδειξαν την τροποποίηση του κ-εικοσιτετρανίου από τα ένζυμα A55 και A58 προς την παραγωγή είτε του αντίστοιχου είτε μικρότερης ανθρακικής αλυσίδας λιπαρού οξέος, γεγονός που φανερώνει τη δράση των UPOs επί των ακριανών ομάδων των υποστρωμάτων τις οποίες προσβάλλουν όπως είναι τα μεθύλια των αλκανίων. Τα ανωτέρω συνάδουν με την δράση που έχει παρατηρηθεί βιβλιογραφικά από διάφορες άλλες UPOs σε μακριάς αλυσίδας αλκάνια και συγκεκριμένα στα ακριανά άτομα άνθρακα των ενώσεων αυτών [162], [178]. Ωστόσο, απαιτείται διερεύνηση των ακριβών τροποποιήσεων που πραγματοποιούνται από τα μελετώμενα ένζυμα, ενώ παραμένει άγνωστο αν μπορούν να προσβάλλουν εσωτερικά άτομα άνθρακα των αλκανίων ή και να διασπάσουν τα αλκάνια σε μικρότερα μόρια. Συνεπώς, φαίνεται να επιβεβαιώνεται η ικανότητα των ενζύμων αυτών για οξυγόνωση αλκανίων, γεγονός επακόλουθο και από την κατηγοριοποίηση τους ως μη ειδικές υπεροξυγενάσες. Στο ενδεχόμενο εξακρίβωσης της ικανότητας αυτής μέσω περαιτέρω πειραματικών τεχνικών θα μπορέσουν οι συγκεκριμένες UPOs να συμβάλλουν ίσως σε μια τροποποίηση των αλυσίδων πολυολεφινών όπως το πολυαιθυλένιο ώστε είτε να διασπαστεί το πολυμερές είτε να καταστεί πιο ευάλωτο σε μηχανισμούς βιοαποικοδόμησης από άλλα ένζυμα ή ζωντανούς οργανισμούς. Επιπλέον, εξίσου σημαντική είναι και η επιβεβαιωμένη δράση λοιπών UPOs για την επεξεργασία και αποικοδόμηση λιπαρών οξέων, γεγονός που σημαίνει ότι τα μελετώμενα ένζυμα είναι πιθανώς ικανά να πραγματοποιήσουν και την περαιτέρω επεξεργασία των προϊόντων που παράγουν από την τροποποίηση αλειφατικών υποστρωμάτων [130], [131].

Η ικανότητα των ενζύμων Demetra και AsqI για βιοαποικοδόμηση του πολυαιθυλενίου δοκιμάστηκε σε κοκκοποιημένο πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας. Η δράση των ενζύμων δοκιμάστηκε σε υπόστρωμα κατεχόλης στο οποίο δεν παρατηρήθηκε βέβαια κάποια ενεργότητα. Η α-

πουσία αυτή δράσης δεν είναι γνωστό αν οφείλεται σε μη ορθή έκφραση των ενζύμων ή σε μη συμβατότητα με το δεδομένο υπόστρωμα και να απαιτείται η αναζήτηση εξέταση λοιπών πιθανών υποστρωμάτων, γεγονός που οδηγεί στην ανάγκη για περαιτέρω πειραματική διερεύνηση ώστε να αντληθεί ένα ακριβές συμπέρασμα. Ωστόσο, παρόλο που δεν παρατηρήθηκε οξειδωτική δράση του ενζύμου Demetra σε κατεχόλη, αποπειράθηκε η δράση του σε πολυαιθυλένιο καθώς είχε αποδειχθεί ότι το ένζυμο που εκφραζόταν -ακόμη και δίχως να διαθέτει το αναμενόμενο μοριακό βάρος- δέσμευε άτομα χαλκού, τα οποία γενικά βρίσκονται στο ενεργό κέντρο των χαλκο-ενζύμων τύπου 3 όπως η Demetra. Οι αναλύσεις λοιπών των δειγμάτων δοκιμής της δράσης του ενζύμου είχαν ως αποτελέσματα ορισμένα φάσματα FTIR (Σχήμα 27) στα οποία απεικονίζονταν οι κορυφές των κύριων δεσμών του πολυαιθυλενίου τόσο στα τυφλά όσο και στα ενζυμικά δείγματα. Μολαταύτα, στα φάσματα των ενζυμικών δειγμάτων απουσίαζε μια μικρής έντασης κορυφή που πιθανώς να συνδέεται με παραμορφώσεις μέσω σείσης, οι οποίες παραμορφώσεις εμφανίζονται σε φάσματα FTIR καθαρού πολυαιθυλενίου. Από τα παραπάνω τίθεται το ερώτημα για τον τρόπο δράσης του ενζύμου στο πολυαιθυλένιο ή ακόμη και για το αν παρουσίασε το ένζυμο, στη μορφή στην οποία εκφράστηκε, όντως κάποια δράση στο πλαστικό αυτό. Αποτελεί παρόλα αυτά πιθανό ενδεχόμενο να πραγματοποιήθηκε κάποια τροποποίηση του πολυαιθυλενίου από το ένζυμο Demetra, το οποίο παρόλα αυτά δεν βρίσκεται στην πλήρη και ορθή πρωτεϊνική του μορφή. Τα ανωτέρω συμπεράσματα φανερώνουν ίσως την αποικοδομητική δράση του ενζύμου στο πολυαιθυλένιο στην περίπτωση που αυτό παραχθεί ορθώς κατά την ετερόλογη έκφραση.

4.1.4. Γενικά συμπεράσματα

Συμπερασματικά, έπειτα της βελτιστοποίησης της παραγωγής των μη ειδικών υπεροξυγενασών με την εύρεση του βέλτιστου χρόνου επαγωγής και των κατάλληλων συμπαραγόντων και της επιβεβαίωσης της ορθής έκφρασης τους, υποσχόμενη δράση παρουσίασαν οι μη ειδικές υπεροξυγενάσες A55 και A58 επί ολεφινών και συγκεκριμένα παρουσιάστηκαν ενδείξεις της αναμενόμενης οξυγόνωσης του ακριανού μεθυλίου των αλκανίων, γεγονός που θέτει το ερώτημα για την περαιτέρω δράση των ενζύμων αυτών στην πολυμερική αλυσίδα του πολυαιθυλενίου και λοιπών πολυολεφινών. Η λειτουργία αυτή των UPOs στην επεξεργασία των ακριανών ομάδων των αλειφατικών υποστρωμάτων τα έχει καταστήσει ως πιθανά μέσα είτε για τη δημιουργία υδρολύσιμων ομάδων στις αλυσίδες των πολυολεφινών, το οποίο αποτελεί το βραδύτερο στάδιο κατά την βιοαποικοδόμηση τους, είτε για την επεξεργασία και αποικοδόμηση των μικρότερων παραπροϊόντων των πολυολεφινών όπως αλκάνια, αλκοόλες και λιπαρά οξέα. Μένει λοιπόν να διερευνηθεί ο βέλτιστος ρόλος των αναφερόμενων ενζύμων στη βιοαποικοδόμηση των πολυολεφινών.

Τουναντίον, η μη ορθή έκφραση των μεταλλοενζύμων Demetra και AsqI παρόλες τις απόπειρες για βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου έκφρασης, καθιστά απαραίτητη την περαιτέρω διερεύνηση των αιτιών αυτού του αποτελέσματος μέσω των οποίων είναι δυνατό να αντληθούν χρήσιμες πληροφορίες για την κατανόηση του τρόπου λειτουργίας των συγκεκριμένων ενζύμων. Η εύρεση νέων ενζύμων που θα μπορέσουν να συμμετέχουν στη βιοαποικοδόμηση πολυολεφινών είναι ύψιστης σημασίας για την επίλυση του σύγχρονου περιβαλλοντικού κινδύνου της συσσώ-

ρευσης πλαστικών αποβλήτων. Το ένζυμο Demetra μπορεί να αποτελέσει πιθανώς ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο προς αυτόν τον σκοπό και παράλληλα σύγχρονες πρωτεομικές και γενομικές αναλύσεις μπορούν να προσφέρουν πληροφορίες για περαιτέρω ένζυμα με παρόμοια δράση. Επίσης, από τις ιδιότητες των διαφόρων ενζύμων που μελετήθηκαν χρήσιμη ίσως αποτελέσει η μελέτη της συνεργιστικής δράσης μεταξύ μιας ορθώς εκφρασμένης Demetra και των UPOs, η οποία μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη βέλτιστη μέθοδο βιοαποικοδόμησης πολυολεφινών.

4.2. Μελλοντικές προτάσεις

Η μελέτη της βιοαποικοδόμησης πολυολεφινών και δη του πολυαιθυλενίου και η ανακάλυψη ενζύμων ικανών να συνδράμουν σε αυτή τη διεργασία, αποτελεί σημαντικό βήμα για την ανάπτυξη βιώσιμων διεργασιών αποικοδόμησης των ολοένα αυξανόμενων πλαστικών αποβλήτων σε βιομηχανική κλίμακα. Όμως, για να προσφέρει η παρούσα μελέτη εποικοδομητικά και χρήσιμα αποτελέσματα προς αυτό τον σκοπό, επιβάλλεται η υλοποίηση επιπλέον πειραμάτων που θα στοχεύουν αρχικά στην βελτίωση της έκφρασης και της δράσης των ενζύμων και σε επόμενη φάση στην αποδοτική ενσωμάτωσή τους σε βιομηχανικές διεργασίες. Παρακάτω παρατίθενται ορισμένες μελλοντικές προτάσεις που μπορούν να συμβάλλουν στην επίτευξη των στόχων της μελέτης:

- Περαιτέρω βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου έκφρασης των ενζύμων με την εξέταση παραγόντων όπως η θερμοκρασία (UPOs) και η συγκέντρωση μεθανόλης.
- Δοκιμή προσθήκης διαφόρων συμπληρωματικών στοιχείων στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κατά την έκφραση των μεταλλοενζύμων Demetra και AsqI για την επίτευξη της ορθής έκφρασης τους. Επί παραδείγματι, μπορεί να δοκιμαστεί η προσθήκη παρεμποδιστών των πρωτεασών της *P. pastoris* για να αποφευχθεί μια πιθανή πρωτεόλυση τους αμέσως μετά την έκφραση.
- Πραγματοποίηση πειραμάτων για την περαιτέρω εξέταση της δράσης της Demetra τόσο στο πολυαιθυλένιο όσο και σε λοιπές πολυολεφίνες.
- Σε περίπτωση ορθής έκφρασης της AsqI να πραγματοποιηθεί απομάκρυνση του δεσμευμένου χαλκού με EDTA και αντικατάσταση του με άτομα ψευδαργύρου, τα οποία αποδίδουν τη μέγιστη ενεργότητα στο ένζυμο. Ύστερα αυτού και βάσει της ομολογίας της με το ένζυμο Demetra προτείνεται η εξέταση της δράσης της σε πολυαιθυλένιο ή λοιπές πολυολεφίνες.
- Υλοποίηση επιπλέον πειραμάτων για την εξέταση της δράσης των UPOs σε αλειφατικά υποστρώματα όπως αλκάνια και λιπαρά οξέα, όπου αν επιβεβαιωθεί ότι δρουν αποτελεσματικά να εξεταστεί η περαιτέρω δράση τους σε πολυολεφίνες.
- Δοκιμή τροποποιημένου πρωτοκόλλου απομόνωσης των ενζύμων μέσω IMAC (για παράδειγμα με τη μεταβολή των όγκων των κλασμάτων έκλυσης των ενζύμων 100A, 100B

και 100C) είτε ακόμη και διαφορετικού είδους χρωματογραφίας όπως η χρωματογραφία μοριακής διήθησης ή ιοντοανταλλαγής.

- Πλήρης βιοχημικός χαρακτηρισμός των μελετώμενων ενζύμων που θα περιλαμβάνει την εύρεση των τιμών θερμοκρασίας και pH στις οποίες τα ένζυμα έχουν τη μέγιστη δράση ή τη μέγιστη σταθερότητα. Έτσι, θα κατανοηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης του και θα προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης για τις οποίες επιτυγχάνουν τα ένζυμα τη μέγιστη απόδοση.
- Εκτέλεση διαδικασίας κρυσταλλογραφίας του ενζύμου Demetra αλλά και των ενζύμων A55, A57, A58 για την πραγματική απεικόνιση των τρισδιάστατων δομών τους και την εύρεση του ενεργού τους κέντρου. Κατ' αυτόν τον τρόπο θα ανακύψουν χρήσιμες πληροφορίες για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους αλλά και του τρόπου δέσμευσης των συμπαραγόντων τους.
- Μελέτη της πιθανής συνεργιστικής δράσης των UPOs με την Demetra ή και με άλλα ένζυμα που βιοαποικοδομούν πολυολεφίνες.
- Υλοποίηση στοχευμένων μεταλλάξεων μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης στα μελετώμενα ένζυμα για τη βελτίωση των συνθηκών και του βαθμού δράσης τους.

Βιβλιογραφία

- [1] B. Singh and N. Sharma, “Mechanistic implications of plastic degradation,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 93, no. 3, pp. 561–584, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008.
- [2] A. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, and S. Ahmed, “Biological degradation of plastics: A comprehensive review,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, no. 3, pp. 246–265, May 2008, doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.
- [3] K. Zhang *et al.*, “Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review,” *Environ. Pollut.*, vol. 274, p. 116554, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.envpol.2021.116554.
- [4] “Plastic pollution facts and information,” *Environment*, Jun. 07, 2019. <https://www.nationalgeographic.com/environment/article/plastic-pollution> (accessed Jul. 17, 2023).
- [5] A. Chamas *et al.*, “Degradation Rates of Plastics in the Environment,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 8, no. 9, pp. 3494–3511, Mar. 2020, doi: 10.1021/acssuschemeng.9b06635.
- [6] D. M. El-Sherif *et al.*, “Environmental risk, toxicity, and biodegradation of polyethylene: a review,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 29, no. 54, pp. 81166–81182, Nov. 2022, doi: 10.1007/s11356-022-23382-1.
- [7] A. L. Andrady, “The plastic in microplastics: A review,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 119, no. 1, pp. 12–22, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.01.082.
- [8] A. L. Andrady, “Microplastics in the marine environment,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 62, no. 8, pp. 1596–1605, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.
- [9] R. C. Hale, M. E. Seeley, M. J. La Guardia, L. Mai, and E. Y. Zeng, “A Global Perspective on Microplastics,” *J. Geophys. Res. Oceans*, vol. 125, no. 1, p. e2018JC014719, 2020, doi: 10.1029/2018JC014719.
- [10] A. D. Vethaak and J. Legler, “Microplastics and human health,” *Science*, vol. 371, no. 6530, pp. 672–674, Feb. 2021, doi: 10.1126/science.abe5041.
- [11] J. Hopewell, R. Dvorak, and E. Kosior, “Plastics recycling: challenges and opportunities,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 364, no. 1526, pp. 2115–2126, Jul. 2009, doi: 10.1098/rstb.2008.0311.
- [12] I. Tsuchimoto and Y. Kajikawa, “Recycling of Plastic Waste: A Systematic Review Using Bibliometric Analysis,” *Sustainability*, vol. 14, no. 24, Art. no. 24, Jan. 2022, doi: 10.3390/su142416340.
- [13] M. Vert *et al.*, “Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 84, no. 2, pp. 377–410, Jan. 2012, doi: 10.1351/PAC-REC-10-12-04.
- [14] J. P. da Costa, P. S. M. Santos, A. C. Duarte, and T. Rocha-Santos, “(Nano)plastics in the environment – Sources, fates and effects,” *Sci. Total Environ.*, vol. 566–567, pp. 15–26, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.041.

- [15] R. J. Crawford and P. J. Martin, *Plastics Engineering*. Butterworth-Heinemann, 2020.
- [16] H. Dodiuk, *Handbook of Thermoset Plastics*. William Andrew, 2021.
- [17] M. Alauddin, I. A. Choudhury, M. A. El Baradie, and M. S. J. Hashmi, “Plastics and their machining: A review,” *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 54, no. 1, pp. 40–46, Oct. 1995, doi: 10.1016/0924-0136(95)01917-0.
- [18] J. A. Brydson, *Plastics Materials*. Elsevier, 1999.
- [19] A. L. Andrady and M. A. Neal, “Applications and societal benefits of plastics,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 364, no. 1526, pp. 1977–1984, Jul. 2009, doi: 10.1098/rstb.2008.0304.
- [20] A. W. Birley, R. J. Heath, and M. J. Scott, “Introduction,” in *Plastics Materials: Properties and Applications*, A. W. Birley, R. J. Heath, and M. J. Scott, Eds., Boston, MA: Springer US, 1988, pp. 1–22. doi: 10.1007/978-1-4615-3664-2_1.
- [21] S. A. Pradeep, R. K. Iyer, H. Kazan, and S. Pilla, “30 - Automotive Applications of Plastics: Past, Present, and Future,” in *Applied Plastics Engineering Handbook (Second Edition)*, M. Kutz, Ed., in Plastics Design Library. William Andrew Publishing, 2017, pp. 651–673. doi: 10.1016/B978-0-323-39040-8.00031-6.
- [22] V. Goodship, “Plastic Recycling,” *Sci. Prog.*, vol. 90, no. 4, pp. 245–268, Oct. 2007, doi: 10.3184/003685007X228748.
- [23] “The global threat from plastic pollution | Science.” <https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.abg5433> (accessed Jul. 23, 2023).
- [24] S. B. Borrelle *et al.*, “Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution,” *Science*, vol. 369, no. 6510, pp. 1515–1518, Sep. 2020, doi: 10.1126/science.aba3656.
- [25] J. S. Chandra Singh and S. A. Gupta, “A Review on Waste Plastic Utilization and Biodegradation,” *J. Sci. Res.*, vol. 65, no. 02, pp. 13–16, 2021, doi: 10.37398/JSR.2021.650203.
- [26] M. F. Fava, “Plastic pollution in the ocean: data, facts, consequences,” *Ocean Literacy Portal*, May 09, 2022. <https://oceanliteracy.unesco.org/plastic-pollution-ocean/> (accessed Jul. 23, 2023).
- [27] R. C. Thompson, C. J. Moore, F. S. vom Saal, and S. H. Swan, “Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 364, no. 1526, pp. 2153–2166, Jul. 2009, doi: 10.1098/rstb.2009.0053.
- [28] R. U. Halden, “Plastics and Health Risks,” *Annu. Rev. Public Health*, vol. 31, no. 1, pp. 179–194, 2010, doi: 10.1146/annurev.publhealth.012809.103714.
- [29] B. Boots, C. W. Russell, and D. S. Green, “Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and Below Ground,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 53, no. 19, pp. 11496–11506, Oct. 2019, doi: 10.1021/acs.est.9b03304.
- [30] T. Galloway and T. Galloway, “Micro-and Nano-plastics and Human Health,” in *Marine Anthropogenic Litter*, 2015, pp. 343–366. doi: 10.1007/978-3-319-16510-3_13.
- [31] “Plastic waste and recycling in the EU: facts and figures | News | European Parliament,” Dec. 19, 2018.

<https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/society/20181212STO21610/plastic-waste-and-recycling-in-the-eu-facts-and-figures> (accessed Jul. 24, 2023).

- [32] J. Oehlmann *et al.*, “A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wild-life,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 364, no. 1526, pp. 2047–2062, Jul. 2009, doi: 10.1098/rstb.2008.0242.
- [33] C. I. Idumah and I. C. Nwuzor, “Novel trends in plastic waste management,” *SN Appl. Sci.*, vol. 1, no. 11, p. 1402, Oct. 2019, doi: 10.1007/s42452-019-1468-2.
- [34] M. M. Fisher, “Plastics Recycling,” in *Plastics and the Environment*, John Wiley & Sons, Ltd, 2003, pp. 563–627. doi: 10.1002/0471721557.ch14.
- [35] K. S. Rebeiz and A. P. Craft, “Plastic waste management in construction: technological and institutional issues,” *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 15, no. 3, pp. 245–257, Dec. 1995, doi: 10.1016/0921-3449(95)00034-8.
- [36] P. M. Subramanian, “Plastics recycling and waste management in the US,” *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 28, no. 3, pp. 253–263, Feb. 2000, doi: 10.1016/S0921-3449(99)00049-X.
- [37] O. Horodytska, A. Cabanes, and A. Fullana, “Plastic Waste Management: Current Status and Weaknesses,” in *Plastics in the Aquatic Environment - Part I: Current Status and Challenges*, F. Stock, G. Reifferscheid, N. Brennholt, and E. Kostianaia, Eds., in *The Handbook of Environmental Chemistry*. Cham: Springer International Publishing, 2022, pp. 289–306. doi: 10.1007/698_2019_408.
- [38] J. Siddiqui and G. Pandey, “A Review of Plastic Waste Management Strategies,” *Int. Res. J. Environ. Sci.*, vol. 2, no. 12, pp. 84–88, Dec. 2013.
- [39] Γ. Λυμπεράτος, “Υγειονομική Ταφή Απορριμμάτων.” 2022.
- [40] A. J. Coury, “2.4.2 - Chemical and Biochemical Degradation of Polymers Intended to Be Biostable,” in *Biomaterials Science (Fourth Edition)*, W. R. Wagner, S. E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, and M. J. Yaszemski, Eds., Academic Press, 2020, pp. 919–940. doi: 10.1016/B978-0-12-816137-1.00062-3.
- [41] J. F. Rabek, “Chapter 4 Oxidative Degradation of Polymers,” in *Comprehensive Chemical Kinetics*, C. H. Bamford and C. F. H. Tipper, Eds., in *Degradation of Polymers*, vol. 14. Elsevier, 1975, pp. 425–538. doi: 10.1016/S0069-8040(08)70336-4.
- [42] J.-R. Kim, J.-H. Van, D.-W. Park, and M.-H. Lee, “Calytic Degradation of Mixed Plastics Using Natural Clinoptilolite Catalyst,” *React. Kinet. Catal. Lett.*, vol. 81, no. 1, pp. 73–81, Jan. 2004, doi: 10.1023/B:REAC.0000016519.59458.08.
- [43] A. Karaduman, “Pyrolysis of Polystyrene Plastic Wastes with Some Organic Compounds for Enhancing Styrene Yield,” *Energy Sources*, vol. 24, no. 7, pp. 667–674, Jul. 2002, doi: 10.1080/00908310290086590.
- [44] G. Geuskens, “Chapter 3 Photodegradation of Polymers,” in *Comprehensive Chemical Kinetics*, Elsevier, 1975, pp. 333–424. doi: 10.1016/S0069-8040(08)70335-2.
- [45] N. Grassie and G. Scott, *Polymer Degradation and Stabilisation*. CUP Archive, 1988.

- [46] C. David, "Chapter 1 Thermal Degradation of Polymers," in *Comprehensive Chemical Kinetics*, Elsevier, 1975, pp. 1–173. doi: 10.1016/S0069-8040(08)70333-9.
- [47] S. Kliem, M. Kreutzbruck, and C. Bonten, "Review on the Biological Degradation of Polymers in Various Environments," *Materials*, vol. 13, no. 20, Art. no. 20, Jan. 2020, doi: 10.3390/ma13204586.
- [48] T. Ahmed *et al.*, "Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 25, no. 8, pp. 7287–7298, Mar. 2018, doi: 10.1007/s11356-018-1234-9.
- [49] S. Ghatge, Y. Yang, J.-H. Ahn, and H.-G. Hur, "Biodegradation of polyethylene: a brief review," *Appl. Biol. Chem.*, vol. 63, no. 1, p. 27, May 2020, doi: 10.1186/s13765-020-00511-3.
- [50] Y. Tokiwa, B. P. Calabria, C. U. Ugwu, and S. Aiba, "Biodegradability of Plastics," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 9, Art. no. 9, Sep. 2009, doi: 10.3390/ijms10093722.
- [51] X.-G. Yang, P.-P. Wen, Y.-F. Yang, P.-P. Jia, W.-G. Li, and D.-S. Pei, "Plastic biodegradation by in vitro environmental microorganisms and in vivo gut microorganisms of insects," *Front. Microbiol.*, vol. 13, p. 1001750, Jan. 2023, doi: 10.3389/fmicb.2022.1001750.
- [52] N. Mohanan, Z. Montazer, P. K. Sharma, and D. B. Levin, "Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics," *Front. Microbiol.*, vol. 11, 2020, Accessed: Jul. 26, 2023. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.580709>
- [53] L. Hou *et al.*, "Biodegradability of polyethylene mulching film by two *Pseudomonas* bacteria and their potential degradation mechanism," *Chemosphere*, vol. 286, p. 131758, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131758.
- [54] N. Zhang, M. Ding, and Y. Yuan, "Current Advances in Biodegradation of Polyolefins," *Microorganisms*, vol. 10, no. 8, p. 1537, Jul. 2022, doi: 10.3390/microorganisms10081537.
- [55] N. Lucas, C. Bienaime, C. Belloy, M. Queneudec, F. Silvestre, and J.-E. Nava-Saucedo, "Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review," *Chemosphere*, vol. 73, no. 4, pp. 429–442, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.064.
- [56] A.-C. Albertsson, S. O. Andersson, and S. Karlsson, "The mechanism of biodegradation of polyethylene," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 18, no. 1, pp. 73–87, Jan. 1987, doi: 10.1016/0141-3910(87)90084-X.
- [57] Z. Montazer, M. B. Habibi Najafi, and D. B. Levin, "Microbial degradation of low-density polyethylene and synthesis of polyhydroxyalkanoate polymers," *Can. J. Microbiol.*, vol. 65, no. 3, pp. 224–234, Mar. 2019, doi: 10.1139/cjm-2018-0335.
- [58] Y. Zhang, J. N. Pedersen, B. E. Eser, and Z. Guo, "Biodegradation of polyethylene and polystyrene: From microbial deterioration to enzyme discovery," *Biotechnol. Adv.*, vol. 60, p. 107991, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.biotechadv.2022.107991.
- [59] A. Amobonye, P. Bhagwat, S. Singh, and S. Pillai, "Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes," *Sci. Total Environ.*, vol. 759, 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143536.

- [60] S. K. Kale, A. G. Deshmukh, M. S. Dudhare, and V. B. Patil, “Microbial degradation of plastic: a review,” 2015.
- [61] H. J. Hueck, “The biodeterioration of materials—an appraisal,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 48, no. 1, pp. 5–11, Jan. 2001, doi: 10.1016/S0964-8305(01)00061-0.
- [62] J. H. Walsh, “Ecological considerations of biodeterioration,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 48, no. 1, pp. 16–25, Jan. 2001, doi: 10.1016/S0964-8305(01)00063-4.
- [63] S. Bonhomme, A. Cuer, A.-M. Delort, J. Lemaire, M. Sancelme, and G. Scott, “Environmental biodegradation of polyethylene,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 81, no. 3, pp. 441–452, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0141-3910(03)00129-0.
- [64] M. Shima, “Biodegradation of plastics,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 12, no. 3, pp. 242–247, Jun. 2001, doi: 10.1016/S0958-1669(00)00206-8.
- [65] R. Wei, T. Tiso, J. Bertling, K. O’Connor, L. M. Blank, and U. T. Bornscheuer, “Possibilities and limitations of biotechnological plastic degradation and recycling,” *Nat. Catal.*, vol. 3, no. 11, Art. no. 11, Nov. 2020, doi: 10.1038/s41929-020-00521-w.
- [66] J. E. Potts, R. A. Clendinning, W. B. Ackart, and W. D. Niegisch, “The Biodegradability of Synthetic Polymers,” in *Polymers and Ecological Problems*, J. Guillet, Ed., in Polymer Science and Technology. Boston, MA: Springer US, 1973, pp. 61–79. doi: 10.1007/978-1-4684-0871-3_4.
- [67] Z. Lin *et al.*, “Current progress on plastic/microplastic degradation: Fact influences and mechanism,” *Environ. Pollut.*, vol. 304, p. 119159, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.envpol.2022.119159.
- [68] R. Wei and W. Zimmermann, “Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 10, no. 6, pp. 1308–1322, Nov. 2017, doi: 10.1111/1751-7915.12710.
- [69] T. Kijchavengkul and R. Auras, “Compostability of polymers,” *Polym. Int.*, vol. 57, no. 6, pp. 793–804, 2008, doi: 10.1002/pi.2420.
- [70] S. Grima, V. Bellon-Maurel, P. Feuilloley, and F. Silvestre, “Aerobic Biodegradation of Polymers in Solid-State Conditions: A Review of Environmental and Physicochemical Parameter Settings in Laboratory Simulations,” *J. Polym. Environ.*, vol. 8, no. 4, pp. 183–195, Oct. 2000, doi: 10.1023/A:1015297727244.
- [71] Č. Novotný *et al.*, “Deterioration of irradiation/high-temperature pretreated, linear low-density polyethylene (LLDPE) by *Bacillus amyloliquefaciens*,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 132, pp. 259–267, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.ibiod.2018.04.014.
- [72] S. Sheik, K. R. Chandrashekar, K. Swaroop, and H. M. Somashekarappa, “Biodegradation of gamma irradiated low density polyethylene and polypropylene by endophytic fungi,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 105, pp. 21–29, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.ibiod.2015.08.006.
- [73] A. Sivan, “New perspectives in plastic biodegradation,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 22, no. 3, pp. 422–426, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.copbio.2011.01.013.

- [74] P. H. Jones, D. Prasad, M. Heskins, M. H. Morgan, and J. E. Guillet, "Biodegradability of photodegraded polymers. I. Development of experimental procedures," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 8, no. 10, pp. 919–923, Oct. 1974, doi: 10.1021/es60095a010.
- [75] A. A. Shah, S. Kato, N. Shintani, N. R. Kamini, and T. Nakajima-Kambe, "Microbial degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic co-polyesters," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 8, pp. 3437–3447, Apr. 2014, doi: 10.1007/s00253-014-5558-1.
- [76] W. Muhamad, R. Othman, RI. Shaharuddin, and MS. Irani, "Microorganism as Plastic Biodegradation Agent towards Sustainable Environment," *Adv. Environ. Biol.*, vol. 9, no. 13, pp. 8–13, 2015.
- [77] J. Ru, Y. Huo, and Y. Yang, "Microbial Degradation and Valorization of Plastic Wastes," *Front. Microbiol.*, vol. 11, 2020, Accessed: Jul. 17, 2023. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00442>
- [78] S. Kinoshita, S. Kageyama, K. Iba, Y. Yamada, and H. Okada, "Utilization of a Cyclic Dimer and Linear Oligomers of ϵ -Aminocaproic Acid by *Achromobacter guttatus* KI 72," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 39, no. 6, pp. 1219–1223, Jun. 1975, doi: 10.1080/00021369.1975.10861757.
- [79] N. Priyanka and T. Archana, "Biodegradability of Polythene and Plastic By The Help of Microorganism: A Way for Brighter Future," *J. Environ. Anal. Toxicol.*, vol. 01, no. 02, 2011, doi: 10.4172/2161-0525.1000111.
- [80] S. Liaqat, "Microbial ecology: A new perspective of plastic degradation," *Pure Appl. Biol.*, vol. 9, no. 4, Dec. 2020, doi: 10.19045/bspab.2020.90228.
- [81] I. Taniguchi, S. Yoshida, K. Hiraga, K. Miyamoto, Y. Kimura, and K. Oda, "Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects," *ACS Catal.*, vol. 9, no. 5, pp. 4089–4105, May 2019, doi: 10.1021/acscatal.8b05171.
- [82] M. S. Anwar *et al.*, "Response of indigenously developed bacterial consortia in progressive degradation of polyvinyl chloride," *Protoplasma*, vol. 253, no. 4, pp. 1023–1032, Jul. 2016, doi: 10.1007/s00709-015-0855-9.
- [83] M. S. Anwar, H. Negi, M. G. H. Zaidi, S. Gupta, and R. Goel, "Biodeterioration studies of thermoplastics in nature using indigenous bacterial consortium," *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 56, pp. 475–484, Jun. 2013, doi: 10.1590/S1516-89132013000300016.
- [84] P. K. Roy, S. Titus, P. Surekha, E. Tulsi, C. Deshmukh, and C. Rajagopal, "Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 93, no. 10, pp. 1917–1922, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2008.07.016.
- [85] S. Skariyachan, A. A. Patil, A. Shankar, M. Manjunath, N. Bachappanavar, and S. Kiran, "Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 149, pp. 52–68, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.01.018.
- [86] C. MR. LeMoine, H. C. Grove, C. M. Smith, and B. J. Cassone, "A Very Hungry Caterpillar: Polyethylene Metabolism and Lipid Homeostasis in Larvae of the Greater Wax Moth

- (*Galleria mellonella*),” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 54, no. 22, pp. 14706–14715, Nov. 2020, doi: 10.1021/acs.est.0c04386.
- [87] V. Khyade, “Review On Biodegradation of Plastic Through Waxworm (Order: Lepidoptera; Family: Pyralidae),” *Int. Acad. J. Econ.*, vol. 05, pp. 84–91, Jun. 2018, doi: 10.9756/IAJE/V5I1/1810008.
- [88] A. Chalup *et al.*, “First report of the lesser wax moth *Achroia grisella* F. (Lepidoptera: Pyralidae) consuming polyethylene (silo-bag) in northwestern Argentina,” *J. Apic. Res.*, vol. 57, no. 4, pp. 569–571, Aug. 2018, doi: 10.1080/00218839.2018.1484614.
- [89] S. Jiang, T. Su, J. Zhao, and Z. Wang, “Biodegradation of Polystyrene by *Tenebrio molitor*, *Galleria mellonella*, and *Zophobas atratus* Larvae and Comparison of Their Degradation Effects,” *Polymers*, vol. 13, no. 20, Art. no. 20, Jan. 2021, doi: 10.3390/polym13203539.
- [90] Y. Lou *et al.*, “Biodegradation of Polyethylene and Polystyrene by Greater Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella* L.) and the Effect of Co-diet Supplementation on the Core Gut Microbiome,” *Environ. Sci. Technol.*, Feb. 2020, doi: 10.1021/acs.est.9b07044.
- [91] S.-S. Yang *et al.*, “Biodegradation of polystyrene wastes in yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus): Factors affecting biodegradation rates and the ability of polystyrene-fed larvae to complete their life cycle,” *Chemosphere*, vol. 191, pp. 979–989, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.117.
- [92] S. S. Kesti and S. C.T., “The Role of Insects and Microorganisms in Plastic Biodegradation A Comprehensive Review,” *Int. J. Sci. Res. Biol. Sci.*, vol. 5, no. 6, pp. 75–79, Jan. 2019, doi: 10.26438/ijrsrbs/v5i6.7579.
- [93] J. M. Ruiz Barrionuevo *et al.*, “The Bacterial and Fungal Gut Microbiota of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L. Consuming Polyethylene and Polystyrene,” *Front. Microbiol.*, vol. 13, p. 918861, Jul. 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.918861.
- [94] Janice D. De Leon *et al.*, “Gut Bacteria of *Achroia grisella* (Lesser Wax Moth) Larvae as Biological Agent for Polyethylene Degradation,” *Philipp. Sci. J.*, vol. 54, no. 1, 2021, Accessed: Aug. 27, 2023. [Online]. Available: <https://www.ejournals.ph/article.php?id=19382>
- [95] S. S. Saikia, B. K. Borah, G. Baruah, Rokozeno, and M. K. Deka, “Characterization of the gut microbes of greater wax moth (*Galleria mellonella* Linnaeus) shows presence of potential polymer degraders,” *Folia Microbiol. (Praha)*, vol. 67, no. 1, pp. 133–141, Feb. 2022, doi: 10.1007/s12223-021-00925-6.
- [96] B. J. Cassone, H. C. Grove, O. Elebute, S. M. P. Villanueva, and C. M. R. LeMoine, “Role of the intestinal microbiome in low-density polyethylene degradation by caterpillar larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*,” *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 287, no. 1922, p. 20200112, Mar. 2020, doi: 10.1098/rspb.2020.0112.
- [97] P. Billen, S. Spatari, and S. Tavernier, “Biodegradation of polyethylene by macroorganisms such as mealworms and greater wax moth larvae: technological application potential”.
- [98] B. J. Cassone, H. C. Grove, N. Kurchaba, P. Geronimo, and C. M. R. LeMoine, “Fat on plastic: Metabolic consequences of an LDPE diet in the fat body of the greater wax moth

- larvae (*Galleria mellonella*),” *J. Hazard. Mater.*, vol. 425, p. 127862, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127862.
- [99] A. Réjasse, J. Waeytens, A. Deniset-Besseau, N. Crapart, C. Nielsen-Leroux, and C. Sandt, “Plastic biodegradation: Do *Galleria mellonella* Larvae Bioassimilate Polyethylene? A Spectral Histology Approach Using Isotopic Labeling and Infrared Microspectroscopy,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 56, no. 1, pp. 525–534, Jan. 2022, doi: 10.1021/acs.est.1c03417.
- [100] C. A. Kwadha, G. O. Ong’amo, P. N. Ndegwa, S. K. Raina, and A. T. Fombong, “The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*,” *Insects*, vol. 8, no. 2, Art. no. 2, Jun. 2017, doi: 10.3390/insects8020061.
- [101] P. Bombelli, C. J. Howe, and F. Bertocchini, “Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*,” *Curr. Biol.*, vol. 27, no. 8, pp. R292–R293, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.cub.2017.02.060.
- [102] M. Maia and F. M. Nunes, “Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis,” *Food Chem.*, vol. 136, no. 2, pp. 961–968, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.003.
- [103] A. Sanluis-Verdes *et al.*, “Wax worm saliva and the enzymes therein are the key to polyethylene degradation by *Galleria mellonella*,” *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, Art. no. 1, Oct. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-33127-w.
- [104] “Protein - Enzymes, Structure, Function | Britannica.” <https://www.britannica.com/science/protein/Enzymes> (accessed Aug. 08, 2023).
- [105] J. B. van Beilen and Z. Li, “Enzyme technology: an overview,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 13, no. 4, pp. 338–344, Aug. 2002, doi: 10.1016/S0958-1669(02)00334-8.
- [106] “Enzymes: Function, definition, and examples,” Jan. 11, 2018. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/319704> (accessed Aug. 08, 2023).
- [107] “Biological Catalysts - Enzymes | A-Level Biology Revision Notes,” Feb. 14, 2019. <https://alevelbiology.co.uk/notes/biological-catalysts-enzymes/> (accessed Aug. 08, 2023).
- [108] Lakna, “What is the Difference Between Induced Fit and Lock and Key,” *Pediaa.Com*, Nov. 27, 2019. <https://pediaa.com/what-is-the-difference-between-induced-fit-and-lock-and-key/> (accessed Aug. 08, 2023).
- [109] L. Porto de Souza Vandenberghe *et al.*, “Chapter 2 - Classification of enzymes and catalytic properties,” in *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, S. P. Singh, A. Pandey, R. R. Singhania, C. Larroche, and Z. Li, Eds., Elsevier, 2020, pp. 11–30. doi: 10.1016/B978-0-12-819820-9.00002-8.
- [110] J. Jin, J. Arciszewski, K. Auclair, and Z. Jia, “Enzymatic polyethylene biorecycling: Confronting challenges and shaping the future,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 460, p. 132449, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.132449.
- [111] “Polyethylene Biodegradation by Enzymes: Progress and Hurdles by Jin Jin, Jane Arciszewski, Karine Auclair, Zongchao Jia :: SSRN.” https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4435398 (accessed Aug. 09, 2023).

- [112] “Oxidase and Oxygenase - Creative Diagnostics.” <https://www.creative-diagnostics.com/oxidase-and-oxygenase.htm> (accessed Aug. 09, 2023).
- [113] R. L. Sinsabaugh, “Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil,” *Soil Biol. Biochem.*, vol. 42, no. 3, pp. 391–404, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.soilbio.2009.10.014.
- [114] Y. Li, Y. Wang, H. Jiang, and J. Deng, “Crystal structure of *Manduca sexta* prophenoloxidase provides insights into the mechanism of type 3 copper enzymes,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 40, pp. 17002–17006, Oct. 2009, doi: 10.1073/pnas.0906095106.
- [115] M. Goldfeder, M. Kanteev, S. Isaschar-Ovdat, N. Adir, and A. Fishman, “Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins,” *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, p. 4505, Jul. 2014, doi: 10.1038/ncomms5505.
- [116] W. H. Telfer, P. S. Keim, and J. H. Law, “Arylphorin, a new protein from *Hyalophora cecropia*: Comparisons with calliphorin and manducin,” *Insect Biochem.*, vol. 13, no. 6, pp. 601–613, Jan. 1983, doi: 10.1016/0020-1790(83)90034-3.
- [117] H. D. Ellerton, N. F. Ellerton, and H. A. Robinson, “Hemocyanin—a current perspective,” *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 41, pp. 143–247, Jan. 1983, doi: 10.1016/0079-6107(83)90028-7.
- [118] P. E. M. Siegbahn, “The catalytic cycle of catechol oxidase,” *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 9, no. 5, pp. 577–590, Jul. 2004, doi: 10.1007/s00775-004-0551-2.
- [119] J. Pütter, “Peroxidases,” in *Methods of Enzymatic Analysis*, Elsevier, 1974, pp. 685–690. doi: 10.1016/B978-0-12-091302-2.50033-5.
- [120] E. Santacruz-Juárez, R. E. Buendia-Corona, R. E. Ramírez, and C. Sánchez, “Fungal enzymes for the degradation of polyethylene: Molecular docking simulation and biodegradation pathway proposal,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 411, p. 125118, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.125118.
- [121] M. Hamid and Khalil-ur-Rehman, “Potential applications of peroxidases,” *Food Chem.*, vol. 115, no. 4, pp. 1177–1186, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.035.
- [122] “5.7: Oxygenases,” *Chemistry LibreTexts*, Sep. 13, 2016. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Book3A_Bioinorganic_Chemistry_\(Bertini_et_al.\)/05%3A_Dioxygen_Reactions/5.07%3A_Oxygenases](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Book3A_Bioinorganic_Chemistry_(Bertini_et_al.)/05%3A_Dioxygen_Reactions/5.07%3A_Oxygenases) (accessed Aug. 10, 2023).
- [123] Y. Wang, D. Lan, R. Durrani, and F. Hollmann, “Peroxygenases en route to becoming dream catalysts. What are the opportunities and challenges?,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 37, pp. 1–9, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.cbpa.2016.10.007.
- [124] S. Bormann, A. Gomez Baraibar, Y. Ni, D. Holtmann, and F. Hollmann, “Specific oxyfunctionalisations catalysed by peroxygenases: opportunities, challenges and solutions,” *Catal. Sci. Technol.*, vol. 5, no. 4, pp. 2038–2052, 2015, doi: 10.1039/C4CY01477D.
- [125] D. T. Monterrey, A. Menés-Rubio, M. Keser, D. Gonzalez-Perez, and M. Alcalde, “Unspecific peroxygenases: The pot of gold at the end of the oxyfunctionalization rainbow?,” *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 41, p. 100786, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.cogsc.2023.100786.

- [126] P. R. Rich and A. Maréchal, “8.5 Electron Transfer Chains: Structures, Mechanisms and Energy Coupling,” in *Comprehensive Biophysics*, E. H. Egelman, Ed., Amsterdam: Elsevier, 2012, pp. 72–93. doi: 10.1016/B978-0-12-374920-8.00806-7.
- [127] G. Grogan, “Hemoprotein Catalyzed Oxygenations: P450s, UPOs, and Progress toward Scalable Reactions,” *JACS Au*, vol. 1, no. 9, pp. 1312–1329, Jul. 2021, doi: 10.1021/jacsau.1c00251.
- [128] M. Hobisch, D. Holtmann, P. Gomez de Santos, M. Alcalde, F. Hollmann, and S. Kara, “Recent developments in the use of peroxygenases – Exploring their high potential in selective oxyfunctionalisations,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 51, p. 107615, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107615.
- [129] M. Hofrichter and R. Ullrich, “Oxidations catalyzed by fungal peroxygenases,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 19, pp. 116–125, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.cbpa.2014.01.015.
- [130] A. Olmedo, R. Ullrich, M. Hofrichter, J. C. del Río, Á. T. Martínez, and A. Gutiérrez, “Novel Fatty Acid Chain-Shortening by Fungal Peroxygenases Yielding 2C-Shorter Dicarboxylic Acids,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 4, Art. no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/antiox11040744.
- [131] Y. Wu *et al.*, “Peroxygenase-Promoted Enzymatic Cascades for the Valorisation of Fatty Acids,” *ChemCatChem*, vol. 15, no. 11, p. e202300411, 2023, doi: 10.1002/cctc.202300411.
- [132] M. L. Shuler and F. Kargi, *Bioprocess engineering: basic concepts*, 2nd ed. in Prentice-Hall international series in the physical and chemical engineering sciences. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2002.
- [133] K. Bose, Ed., *Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. doi: 10.1007/978-981-16-4987-5.
- [134] V. Juturu and J. C. Wu, “Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications,” *ChemBioChem*, vol. 19, no. 1, pp. 7–21, 2018, doi: 10.1002/cbic.201700460.
- [135] M. Karbalaee, S. A. Rezaee, and H. Farsiani, “*Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 235, no. 9, pp. 5867–5881, 2020, doi: 10.1002/jcp.29583.
- [136] G. Potvin, A. Ahmad, and Z. Zhang, “Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 64, pp. 91–105, May 2012, doi: 10.1016/j.bej.2010.07.017.
- [137] J. L. Cereghino and J. M. Cregg, “Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 45–66, 2000, doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x.
- [138] M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, and H. Schwab, “Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 12, pp. 5301–5317, Jun. 2014, doi: 10.1007/s00253-014-5732-5.

- [139] H. Kestra, E. Zondervan, and W. Brilman, “The Infinity Reactor: A new conceptual design for a more cost-efficient CO₂ to methanol route,” in *Computer Aided Chemical Engineering*, A. C. Kokossis, M. C. Georgiadis, and E. Pistikopoulos, Eds., in 33 European Symposium on Computer Aided Process Engineering, vol. 52. Elsevier, 2023, pp. 2309–2316. doi: 10.1016/B978-0-443-15274-0.50368-1.
- [140] B. Byrne, “*Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 32, pp. 9–17, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.sbi.2015.01.005.
- [141] Z. Yang and Z. Zhang, “Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 36, no. 1, pp. 182–195, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.11.002.
- [142] R. Daly and M. T. W. Hearn, “Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production,” *J. Mol. Recognit.*, vol. 18, no. 2, pp. 119–138, 2005, doi: 10.1002/jmr.687.
- [143] G. P. L. Cereghino, A. J. Sunga, J. L. Cereghino, and J. M. Cregg, “Expression of Foreign Genes in the yeast *Pichia pastoris*,” in *Genetic Engineering: Principles and Methods: Principles and Methods*, J. K. Setlow, Ed., in Genetic Engineering. Boston, MA: Springer US, 2001, pp. 157–169. doi: 10.1007/0-306-47572-3_9.
- [144] J. M. Cregg, T. S. Vedvick, and W. C. Raschke, “Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*,” *Bio/Technology*, vol. 11, no. 8, Art. no. 8, Aug. 1993, doi: 10.1038/nbt0893-905.
- [145] P. Li *et al.*, “Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 142, no. 2, pp. 105–124, Aug. 2007, doi: 10.1007/s12010-007-0003-x.
- [146] S. Dutta, J. Mohapatra, and A. K. Ghosh, “Molecular characterization of *Antheraea mylitta* arylphorin gene and its encoded protein,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 692, p. 108540, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.abb.2020.108540.
- [147] A. L. Hughes, “Evolution of the arthropod prophenoloxidase/hexamerin protein family,” *Immunogenetics*, vol. 49, no. 2, pp. 106–114, Feb. 1999, doi: 10.1007/s002510050469.
- [148] S. Kishimoto *et al.*, “Enzymatic one-step ring contraction for quinolone biosynthesis,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Art. no. 1, Jul. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-05221-5.
- [149] *pPICZα A, B, and C: Pichia expression vectors for selection on ZeocinTM and purification of secreted, recombinant proteins*. Life Technologies Corporation, 2010. [Online]. Available: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf
- [150] G. B. LLC, “pPICZ A Sequence and Map.” https://www.snapgene.com/plasmids/yeast_plasmids/ppicz_A (accessed Aug. 17, 2023).
- [151] “National Center of Biotechnology Information - Standard Protein BLAST.” https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (accessed Sep. 07, 2023).
- [152] “Expasy - ProtParam tool.” <https://web.expasy.org/protparam/> (accessed Sep. 07, 2023).
- [153] I. Κλωνής, *Ενζυμική Βιοτεχνολογία*, 4th ed. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2020.

- [154] E. Τόπακας, “Απομόνωση βιοτεχνολογικών προϊόντων.” 2022. [Online]. Available: https://helios.ntua.gr/2022-23/pluginfile.php/185493/mod_resource/content/0/3.%20%CE%91%CF%80%CE%BF%CE%BC%CF%8C%CE%BD%CF%89%CF%83%CE%B7%20%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CF%84%CE%B5%CF%87%CE%BD%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%B9%CE%BA%CF%8E%CE%BD%20%CF%80%CF%81%CE%BF%CF%8A%CF%8C%CE%BD%CF%84%CF%89%CE%BD.pdf
- [155] X. Αντωνέλου and I. Παπασιδέρη, “ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ-ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ.” Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ. [Online]. Available: <http://multimedia.biol.uoa.gr/%CE%97%CE%BB%CE%B5%CE%BA%CF%84%CF%81%CE%BF%CF%86%CF%8C%CF%81%CE%B7%CF%83%CE%B7%20%CE%A0%CF%81%CF%89%CF%84%CE%B5%CE%B9%CE%BD%CF%8E%CE%BD.pdf>
- [156] “The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).” <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/sds-page.html> (accessed Aug. 24, 2023).
- [157] K. Nienhaus and G. U. Nienhaus, “Probing Heme Protein-Ligand Interactions by UV/Visible Absorption Spectroscopy,” in *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications*, G. Ulrich Nienhaus, Ed., in *Methods in Molecular Biology*, vol. 305. Totowa, NJ: Humana Press, 2005, pp. 215–241. doi: 10.1385/1-59259-912-5:215.
- [158] N. E. Labrou, Ed., *Protein Downstream Processing: Design, Development, and Application of High and Low-Resolution Methods*, vol. 2178. in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2178. New York, NY: Springer US, 2021. doi: 10.1007/978-1-0716-0775-6.
- [159] R. Pinnataip and B. P. Lee, “Oxidation Chemistry of Catechol Utilized in Designing Stimuli-Responsive Adhesives and Antipathogenic Biomaterials,” *ACS Omega*, vol. 6, no. 8, pp. 5113–5118, Feb. 2021, doi: 10.1021/acsomega.1c00006.
- [160] G. Taxeidis *et al.*, “Triggering and identifying the polyurethane and polyethylene-degrading machinery of filamentous fungi secretomes,” *Environ. Pollut.*, vol. 325, p. 121460, May 2023, doi: 10.1016/j.envpol.2023.121460.
- [161] W. R. Pearson, “An Introduction to Sequence Similarity (‘Homology’) Searching,” *Curr. Protoc. Bioinforma. Ed. Board Andreas Baxevanis Al*, vol. 0 3, p. 10.1002/0471250953.bi0301s42, Jun. 2013, doi: 10.1002/0471250953.bi0301s42.
- [162] A. Olmedo *et al.*, “From Alkanes to Carboxylic Acids: Terminal Oxygenation by a Fungal Peroxygenase,” *Angew. Chem.*, vol. 128, no. 40, pp. 12436–12439, 2016, doi: 10.1002/ange.201605430.
- [163] M. Hofrichter *et al.*, “Fungal Peroxygenases: A Phylogenetically Old Superfamily of Heme Enzymes with Promiscuity for Oxygen Transfer Reactions,” in *Grand Challenges in Fungal Biotechnology*, H. Nevalainen, Ed., in *Grand Challenges in Biology and Biotechnology*. Cham: Springer International Publishing, 2020, pp. 369–403. doi: 10.1007/978-3-030-29541-7_14.
- [164] J. V. Gulmine, P. R. Janissek, H. M. Heise, and L. Akcelrud, “Polyethylene characterization by FTIR,” *Polym. Test.*, vol. 21, no. 5, pp. 557–563, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0142-9418(01)00124-6.

- [165] M. Hofrichter, H. Kellner, M. J. Pecyna, and R. Ullrich, “Fungal Unspecific Peroxygenases: Heme-Thiolate Proteins That Combine Peroxidase and Cytochrome P450 Properties,” in *Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450*, E. G. Hrycay and S. M. Bandiera, Eds., in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 341–368. doi: 10.1007/978-3-319-16009-2_13.
- [166] F. W. Krainer *et al.*, “Optimizing cofactor availability for the production of recombinant heme peroxidase in *Pichia pastoris*,” *Microb. Cell Factories*, vol. 14, no. 1, p. 4, Dec. 2015, doi: 10.1186/s12934-014-0187-z.
- [167] E. A. Permyakov, “Metal Binding Proteins,” *Encyclopedia*, vol. 1, no. 1, Art. no. 1, Mar. 2021, doi: 10.3390/encyclopedia1010024.
- [168] G. S. BALDWIN, M. F. BAILEY, B. P. SHEHAN, I. SIMS, and R. S. NORTON, “Tyrosine Modification Enhances Metal Ion Binding,” *Biochem. J.*, vol. 416, no. 1, pp. 77–84, Nov. 2008, doi: 10.1042/BJ20081059.
- [169] P. Molina-Espeja, S. Ma, D. M. Mate, R. Ludwig, and M. Alcalde, “Tandem-yeast expression system for engineering and producing unspecific peroxygenase,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 73–74, pp. 29–33, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.03.004.
- [170] L. Rotilio *et al.*, “Structural and Biochemical Studies Enlighten the Unspecific Peroxygenase from *Hypoxyylon* sp. EC38 as an Efficient Oxidative Biocatalyst,” *ACS Catal.*, vol. 11, no. 18, pp. 11511–11525, Sep. 2021, doi: 10.1021/acscatal.1c03065.
- [171] S. de Weert and B. C. Lokman, “Heterologous Expression of Peroxidases,” in *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*, E. Torres and M. Ayala, Eds., Berlin, Heidelberg: Springer, 2010, pp. 315–333. doi: 10.1007/978-3-642-12627-7_12.
- [172] S. Macauley-Patrick, M. L. Fazenda, B. McNeil, and L. M. Harvey, “Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system,” *Yeast*, vol. 22, no. 4, pp. 249–270, 2005, doi: 10.1002/yea.1208.
- [173] F. Jiang, P. Kongsaree, K. Schilke, C. Lajoie, and C. Kelly, “Effects of pH and Temperature on Recombinant Manganese Peroxidase Production and Stability,” in *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, W. S. Adney, J. D. McMillan, J. Mielenz, and K. T. Klasson, Eds., in *ABAB Symposium*. Totowa, NJ: Humana Press, 2008, pp. 135–147. doi: 10.1007/978-1-60327-526-2_16.
- [174] P. Molina-Espeja, E. Garcia-Ruiz, D. Gonzalez-Perez, R. Ullrich, M. Hofrichter, and M. Alcalde, “Directed Evolution of Unspecific Peroxygenase from *Agrocybe aegerita*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 11, pp. 3496–3507, Jun. 2014, doi: 10.1128/AEM.00490-14.
- [175] “Fluorescence associated with the type 3 copper center of laccase,” *FEBS Lett.*, vol. 156, no. 1, pp. 23–28, May 1983, doi: 10.1016/0014-5793(83)80240-3.
- [176] M. Bacci, M. G. Baldecchi, P. Fabeni, R. Linari, and G. P. Pazzi, “Emission spectra from copper proteins containing type-3 centres,” *Biophys. Chem.*, vol. 17, no. 2, pp. 125–130, Mar. 1983, doi: 10.1016/0301-4622(83)80006-4.

- [177] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, and T. E. Machonkin, "Multicopper Oxidases and Oxygenases," *Chem. Rev.*, vol. 96, no. 7, pp. 2563–2606, Jan. 1996, doi: 10.1021/cr950046o.
- [178] E. D. Babot, J. C. del Río, L. Kalum, A. T. Martínez, and A. Gutiérrez, "Oxygenation of aliphatic compounds by a recombinant peroxygenase from *Coprinopsis cinerea*," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 110, no. 9, pp. 2323–2332, 2013, doi: 10.1002/bit.24904.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: Μεθοδολογία προσδιορισμού ενεργότητας οξειδωτικών ενζύμων στο υπόστρωμα ABTS

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας μέσω της οξείδωσης του ABTS στηρίζεται στον νόμο Lambert-Beer που έχει αναφερθεί στην ενότητα 2.2.8.2.2 λαμβάνοντας υπόψη τον ορισμό του 1 Unit ως η ποσότητα του ενζύμου που οξειδώνει 1 μmol ABTS προς την οξειδωμένη του μορφή $\text{ABTS}^{\cdot+}$ σε ένα λεπτό. Απαιτείται πρώτα ωστόσο μετατροπή της κλίσης της καμπύλης μεταβολής της απορρόφησης στα 420 nm, σε κανονικό μέγεθος απορρόφησης. Αυτό υλοποιείται με τον επόμενο τύπο:

$$\text{ABS}_{420 \text{ nm}} = \frac{V_{\max}}{1000} \text{ min}^{-1}$$

όπου: V_{\max} η κλίση της γραμμικής καμπύλης μεταβολής της απορρόφησης στα 420 nm.

Δύναται πλέον να υπολογιστεί η ενζυμική ενεργότητα σύμφωνα με τα παρακάτω:

$$\text{ABS}_{420 \text{ nm}} = C_{\text{ABTS}} \cdot \epsilon_{\text{ABTS}} \cdot b_{\text{κυψελίδας}} \xrightarrow{C = \frac{n}{V}}$$

$$\text{Ενεργότητα [U]} = \frac{V_{\text{δείγματος}} \cdot \text{ABS}_{420 \text{ nm}}}{\epsilon_{\text{ABTS}} \cdot b_{\text{κυψελίδας}}}$$

όπου:

- $V_{\text{δείγματος}}$: ο όγκος του διαλύματος αντίδρασης εντός του κελιού του Microplate κατά τη φωτομέτρηση (250 μL ή 0,00025 L),
- ϵ_{ABTS} : ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του ABTS (36000 $\frac{1}{\text{M}\cdot\text{cm}}$),
- $b_{\text{κυψελίδας}}$: το βάθος του κελιού του Microplate (0,67 cm).

Εφόσον είναι γνωστή η πρωτεϊνική συγκέντρωση του μετρούμενου ως προς την ενεργότητα διαλύματος μπορεί να υπολογιστεί η ειδική ενεργότητα ως προς την πρωτεϊνική ποσότητα σε

$\frac{\text{Units}}{\text{mg πρωτεΐνης}}$ ως ακολούθως:

$$\text{Ειδική ενεργότητα} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right] = \frac{V_{\text{δείγματος}} \cdot \text{ABS}_{420 \text{ nm}}}{\epsilon_{\text{ABTS}} \cdot b_{\text{κυψελίδας}} \cdot V_{\text{πρωτεΐνης}} \cdot C_{\text{πρωτεΐνης}}} \cdot 10^6$$

όπου:

- $V_{\text{πρωτεΐνης}}$: ο προστιθέμενος όγκος πρωτεϊνικού διαλύματος στο διάλυμα αντίδρασης εντός του κελιού του Microplate
- $C_{\text{πρωτεΐνης}}$: η συγκέντρωση του προστιθέμενου πρωτεϊνικού διαλύματος σε $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: Αποτελέσματα εξέτασης μετασχηματισμένων στελεχών των μελετώμενων ενζύμων

Οι μετρήσεις από την εξέταση των μετασχηματισμένων στελεχών για την έκφραση των μελετώμενων ενζύμων παρατίθενται στους επόμενους πίνακες και έχει υπολογιστεί ο λόγος είτε των απορροφήσεων Bradford είτε των ενεργιοτήτων προς την οπτική πυκνότητα κάθε καλλιέργειας όπως και η ποσοστιαία διαφορά του μεγέθους αυτού με την τιμή του τυφλού, δηλαδή της καλλιέργειας των μη μετασχηματισμένων X33:

Πίνακας 30. Αποτελέσματα μετρήσεων εξέτασης στελεχών για AsqI και Demetra κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών.

Ένζυμο		1η μέρα				2η μέρα			
		OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το X33	OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το X33
X33	-	0,322	0,428	2,66	0%	0,519	0,465	1,79	0%
AsqI	1	0,312	0,477	3,06	15%	0,464	0,477	2,06	15%
	2	0,278	0,444	3,19	20%	0,497	0,479	1,93	8%
Demetra	1	0,323	0,444	2,75	3%	0,415	0,468	2,26	26%
	2	0,294	0,448	3,05	15%	0,518	0,495	1,91	7%
	3	0,322	0,439	2,73	3%	0,440	0,507	2,31	29%

Πίνακας 31. Αποτελέσματα μετρήσεων εξέτασης στελεχών για AsqI και Demetra κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών (Συνέχεια).

Ένζυμο		3 ^η μέρα				4 ^η μέρα				5 ^η μέρα			
		OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το X33	OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το X33	OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το X33
X33	-	0,600	0,486	1,62	0%	0,642	0,488	1,52	0%	0,635	0,49	1,54	0%
AsqI	1	0,564	0,473	1,68	4%	0,609	0,530	1,74	14%	0,641	0,588	1,83	19%
	2	0,638	0,502	1,57	-3%	0,702	0,518	1,48	-3%	0,702	0,513	1,46	-5%
Demetra	1	0,536	0,512	1,91	18%	0,691	0,531	1,54	1%	0,691	0,532	1,54	0%
	2	0,580	0,476	1,64	1%	0,622	0,490	1,58	4%	0,666	0,534	1,60	4%
	3	0,506	0,475	1,88	16%	0,530	0,494	1,86	23%	0,552	0,512	1,86	20%

Πίνακας 32. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας και ενεργότητας για τις καλλιέργειες της εξέτασης μετασχηματισμένων στελεχών καθ' όλες τις μέρες επαγωγής.

Ένζυμο	Στέλεχος	OD ₆₀₀			Ενεργότητα (mU)			Ενεργότητα OD ₆₀₀		
		1 ^η μέρα	2 ^η μέρα	1 ^η μέρα	2 ^η μέρα	3 ^η μέρα	3 ^η μέρα	1 ^η μέρα	2 ^η μέρα	3 ^η μέρα
X33	α	0,317	0,471	0,584	0,18	0,18	0,15	0,56	0,39	0,26
	β	0,323	0,489	0,567	0,19	0,18	0,16	0,60	0,37	0,29
A55	4α	0,286	0,417	0,510	0,17	0,20	0,18	0,59	0,48	0,34
	4β	0,269	0,396	0,473	0,18	0,21	0,19	0,68	0,53	0,39
	10α	0,302	0,615	0,722	0,18	0,15	0,13	0,59	0,25	0,18
	10β	0,298	0,428	0,501	0,18	0,23	0,17	0,61	0,53	0,35
	12α	0,362	0,471	0,559	0,15	0,10	0,03	0,43	0,21	0,05
	12β	0,289	0,432	0,545	0,17	0,22	0,20	0,59	0,51	0,37
	13α	0,286	0,420	0,514	0,19	0,22	0,21	0,65	0,52	0,40
	13β	0,279	0,409	0,530	0,19	0,23	0,21	0,69	0,56	0,39
	16α	0,263	0,383	0,494	0,19	0,23	0,20	0,72	0,59	0,41
	16β	0,273	0,451	0,518	0,20	0,21	0,18	0,74	0,47	0,36
A57	7α	0,318	0,460	0,556	0,17	0,17	0,14	0,53	0,37	0,26
	7β	0,317	0,484	0,556	0,19	0,20	0,16	0,61	0,42	0,29
	11α	0,291	0,447	0,541	0,18	0,21	0,17	0,62	0,46	0,32
	11β	0,295	0,464	0,566	0,18	0,19	0,17	0,63	0,40	0,31
A58	9α	0,301	0,481	0,548	0,19	0,20	0,18	0,64	0,41	0,33
	9β	0,300	0,474	0,569	0,18	0,19	0,17	0,60	0,40	0,30
	11a	0,289	0,461	0,562	19,64	0,20	0,22	0,19	0,70	0,47
	11b	0,288	0,457	0,536	19,78	0,20	0,21	0,18	0,71	0,46

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ: Αποτελέσματα εξέτασης συγκέντρωσης συμπαράγοντων έκφρασης για τα ένζυμα A55 και AsqI

Οι μετρήσεις από την εξέταση επίδρασης προσθήκης και συγκέντρωσης συμπαράγοντων για την έκφραση των ενζύμων A55 και AsqI παρατίθενται στους επόμενους πίνακες όπου έχει υπολογιστεί ο λόγος των απορροφήσεων Bradford προς την οπτική πυκνότητα κάθε καλλιέργειας όπως και η ποσοστιαία διαφορά του μεγέθους αυτού με την τιμή του τυφλού (ως τυφλό θεωρείται η καλλιέργεια με μηδενική συγκέντρωση συμπαράγοντων).

Πίνακας 33. Αποτελέσματα μετρήσεων εξέτασης συγκέντρωσης συμπαράγοντα για την AsqI κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών.

Συγκέντρωση CuSO ₄		1 ^η μέρα				2 ^η μέρα				3 ^η μέρα			
		OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το τυφλό	OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το τυφλό	OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το τυφλό
0 μM	1	0,313	0,353	2,256	-	0,430	0,334	1,553	-	0,532	0,319	1,199	-
	2	0,289	0,355	2,457	-	0,417	0,344	1,650	-	0,518	0,339	1,309	-
25 μM	1	0,316	0,338	2,139	-9%	0,435	0,361	1,660	4%	0,563	0,336	1,194	-5%
	2	0,321	0,346	2,156	-9%	0,452	0,341	1,509	-6%	0,571	0,331	1,159	-8%
50 μM	1	0,338	0,337	1,994	-15%	0,454	0,349	1,537	-4%	0,563	0,333	1,183	-6%
	2	0,307	0,340	2,215	-6%	0,474	0,336	1,418	-11%	0,589	0,338	1,148	-8%
75 μM	1	0,318	0,361	2,270	-4%	0,435	0,347	1,595	0%	0,541	0,329	1,216	-3%
	2	0,515	0,353	1,371	-42%	0,456	0,346	1,518	-5%	0,586	0,323	1,102	-12%
100 μM	1	0,303	0,366	2,416	3%	0,448	0,353	1,576	-2%	0,558	0,333	1,194	-5%
	2	0,334	0,365	2,186	-7%	0,491	0,355	1,446	-10%	0,634	0,341	1,076	-14%

Πίνακας 34. Αποτελέσματα μετρήσεων εξέτασης συγκέντρωσης συμπαράγοντα για την AsqI κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών (Συνέχεια).

Συγκέντρωση CuSO ₄		4 ^η μέρα				5 ^η μέρα				6 ^η μέρα			
		OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το τυφλό	OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το τυφλό	OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το τυφλό
0 μM	1	0,621	0,325	1,047	-	0,723	0,329	0,910	-	0,616	0,388	1,260	-
	2	0,638	0,372	1,166	-	0,655	0,334	1,020	-	0,648	0,472	1,457	-
25 μM	1	0,670	0,336	1,003	-9%	0,676	0,337	0,997	3%	0,739	0,409	1,107	-19%
	2	0,657	0,334	1,017	-8%	0,657	0,328	0,998	3%	0,704	0,394	1,119	-18%
50 μM	1	0,653	0,342	1,047	-5%	0,626	0,323	1,032	7%	0,698	0,396	1,135	-16%
	2	0,727	0,345	0,949	-14%	0,644	0,333	1,034	7%	0,751	0,433	1,153	-15%
75 μM	1	0,669	0,344	1,028	-7%	0,618	0,334	1,081	12%	0,654	0,422	1,291	-5%
	2	0,660	0,344	1,042	-6%	0,666	0,342	1,027	6%	0,798	0,456	1,143	-16%
100 μM	1	0,619	0,352	1,137	3%	0,659	0,336	1,020	6%	0,668	0,421	1,260	-7%

2	0,754	0,359	0,952	-14%	0,775	0,34	0,877	-9%	0,808	0,418	1,035	-24%
---	-------	-------	-------	------	-------	------	-------	-----	-------	-------	-------	------

Πίνακας 35. Αποτελέσματα μετρήσεων εξέτασης συμπληρωμάτων για την A55 κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών.

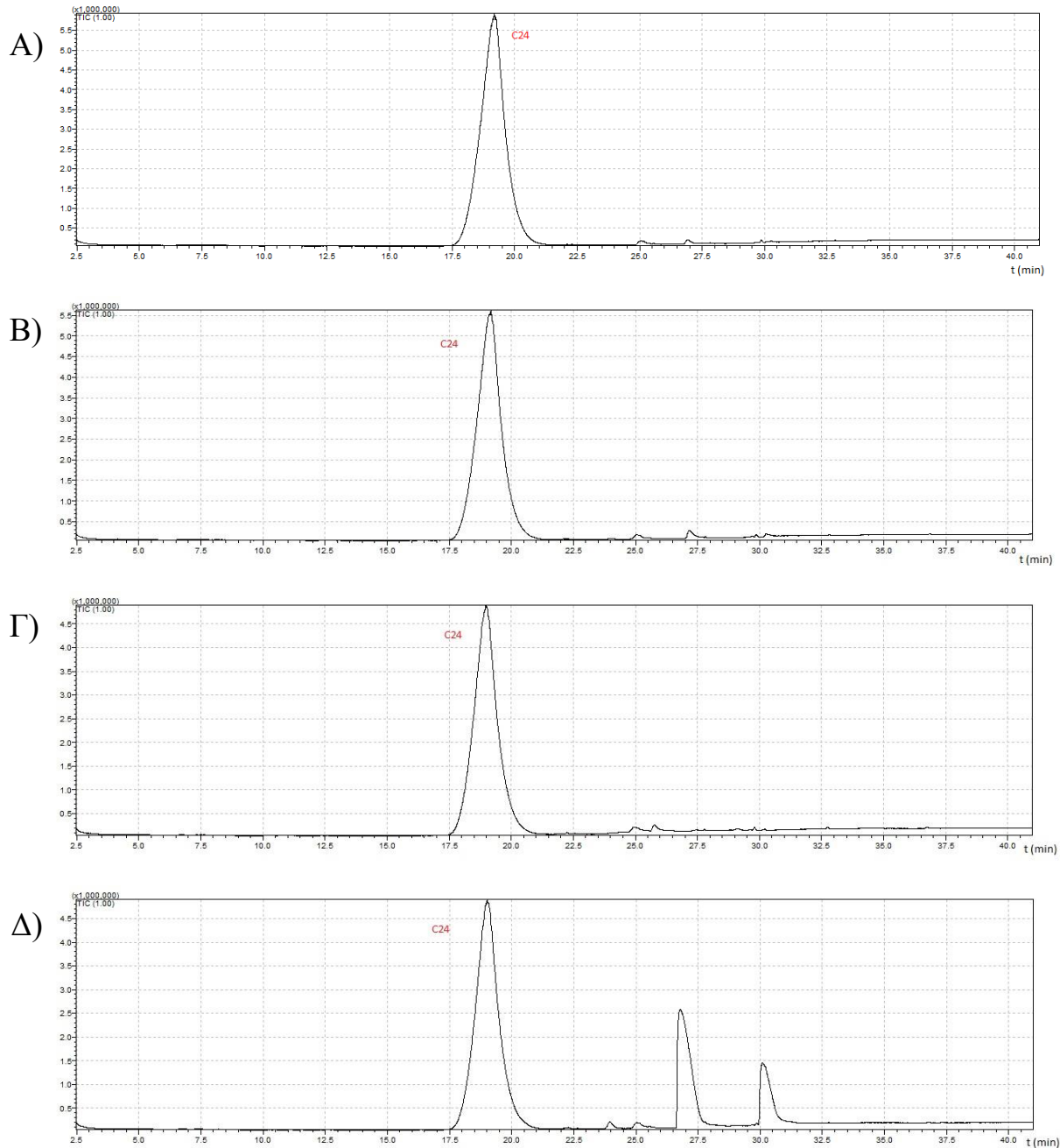
Πρόσθετη ένωση		1 ^η μέρα				2 ^η μέρα				3 ^η μέρα			
		OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το τυφλό	OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το τυφλό	OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το τυφλό
-	1	0,265	0,364	2,747	-	0,390	0,317	1,626	-	0,497	0,332	1,336	-
	2	0,261	0,333	2,552	-	0,369	0,324	1,756	-	0,463	0,338	1,460	-
TES	1	0,269	0,343	2,550	-4%	0,390	0,353	1,810	7%	0,537	0,344	1,281	-8%
	2	0,285	0,365	2,561	-3%	0,410	0,364	1,776	5%	0,523	0,346	1,323	-5%
TES & FeSO ₄ ·7H ₂ O	1	0,256	0,363	2,836	7%	0,370	0,341	1,843	9%	0,543	0,366	1,348	-4%
	2	0,276	0,367	2,659	0%	0,381	0,340	1,785	6%	0,500	0,321	1,284	-8%
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1	0,230	0,362	3,148	19%	0,434	0,360	1,659	-2%	0,531	0,39	1,469	5%
	2	0,245	0,345	2,816	6%	0,393	0,370	1,883	11%	0,479	0,388	1,620	16%
Αιμίνη	1	0,261	0,366	2,805	6%	0,396	0,355	1,793	6%	0,499	0,352	1,411	1%
	2	0,261	0,370	2,835	7%	0,378	0,359	1,899	12%	0,500	0,341	1,364	-2%
TES & Αιμίνη	1	0,280	0,385	2,750	4%	0,397	0,359	1,809	7%	0,493	0,343	1,391	0%
	2	0,275	0,385	2,800	6%	0,414	0,357	1,725	2%	0,527	0,336	1,275	-9%

Πίνακας 36. Αποτελέσματα μετρήσεων εξέτασης συμπληρωμάτων για την A55 κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών (Συνέχεια).

Πρόσθετη ένωση		4 ^η μέρα				5 ^η μέρα				6 ^η μέρα			
		OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το τυφλό	OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το τυφλό	OD ₆₀₀	Bradford	$\frac{\text{Bradford}}{\text{OD}_{600}}$	Διαφορά από το τυφλό
-	1	0,597	0,335	1,122	-	0,638	0,34	1,066	-	0,645	0,393	1,219	-
	2	0,604	0,340	1,126	-	0,567	0,342	1,206	-	0,596	0,434	1,456	-
TES	1	0,658	0,360	1,094	-3%	0,645	0,345	1,070	-6%	0,666	0,420	1,261	-6%
	2	0,659	0,354	1,074	-4%	0,649	0,362	1,116	-2%	0,666	0,430	1,291	-3%
TES & FeSO ₄ ·7H ₂ O	1	0,684	0,466	1,363	21%	0,720	0,47	1,306	15%	0,717	0,627	1,749	31%
	2	0,570	0,346	1,214	8%	0,567	0,346	1,220	7%	0,641	0,400	1,248	-7%
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1	0,683	0,440	1,288	15%	0,648	0,506	1,562	37%	0,627	0,563	1,796	34%
	2	0,606	0,430	1,419	26%	0,583	0,504	1,729	52%	0,547	0,628	2,296	72%
Αιμίνη	1	0,608	0,352	1,158	3%	0,575	0,369	1,283	13%	0,625	0,407	1,302	-3%
	2	0,569	0,353	1,241	10%	0,573	0,331	1,155	2%	0,640	0,404	1,263	-6%
TES & Αιμίνη	1	0,604	0,354	1,172	4%	0,597	0,388	1,300	14%	0,637	0,430	1,350	1%
	2	0,602	0,367	1,219	8%	0,582	0,355	1,220	7%	0,637	0,408	1,281	-4%

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ: Χρωματογραφήματα GC-MS για τις αντιδράσεις των UPOs με αλκάνια

Στα κατωτέρω σχήματα απεικονίζονται τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων των αντιδράσεων των Flowthrough των UPOs με το κ-εικοσιτετράνιο, από την έκφραση των ενζύμων σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο.



Σχήμα 41. Χρωματογράφηματα GC-MS από την ανάλυση των δειγμάτων για τις αντιδράσεις με κ-εικοσιτετράνιο των Flowthrough από την έκφραση των UPOs σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο: Α) για το τυφλό δείγμα με H₂O₂, Β) για την A55, Γ) για την A57 και Δ) για την A58.