



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**ΤΟΜΕΑΣ IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών  
Διαδικασιών**

**Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας**

*ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ*

**«Μελέτη φυτοπαθογόνων μυκητιακών  
στελεχών για την ικανότητά τους να  
αποικοδομούν συνθετικά πολυμερή με  
ταυτόχρονη ταυτοποίηση των ενζύμων που  
εκφράζονται μέσω ομικών αναλύσεων»**

Χαντζή Μαρία

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

Αθήνα

Σεπτέμβριος 2023



*Εις μνήμην της πολυαγαπημένης μου γιαγιάς Βασιλικής*



## Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023 στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (Ε.Μ.Π.), υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή του Ε.Μ.Π. κ. Ευάγγελου Τόπακα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ευάγγελο Τόπακα, για την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της Διπλωματικής Εργασίας. Μου έδωσε τη δυνατότητα, μέσω της ανάθεσης του συγκεκριμένου θέματος, να ασχοληθώ με ένα τόσο επίκαιρο και ενδιαφέρον αντικείμενο, αποκομίζοντας πολύ σημαντικές γνώσεις και εμπειρίες.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Γεώργιο Ταξείδη για τη συνεργασία, την καθοδήγηση και τη συνεχή βοήθεια που μου προσέφερε. Η βοήθεια, η υπομονή και οι συμβουλές του υπήρξαν για μένα πολύτιμα εργαλεία καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης μου.

Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους σε οτιδήποτε χρειάστηκα.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τους φίλους μου, για τη συνεχή υποστήριξη και συμπαράστασή τους, τόσο κατά τη διάρκεια αυτής μου της προσπάθειας, όσο και κατά τη διάρκεια όλων μου των χρόνων φοίτησης στη σχολή.

Μαρία Χαντζή

Αθήνα, Σεπτέμβριος, 2023



## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των ενζύμων που εκφράζονται από μυκητιακά στελέχη και η εφαρμογή τους στην αποικοδόμηση συνθετικών πολυμερών.

Για την επίτευξη αυτού, αρχικά, μελετήθηκαν τρία μυκητιακά στελέχη: *Aspergillus transmontanensis* MM36, *Penicillium citrinum* MM41 και *Tritirachium* sp. Οι μύκητες αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες, παρουσία πηγών άνθρακα που δύνανται να δρουν επαγωγικά στην έκφραση ενζύμων και έπειτα επώαστηκαν με σκόνη πολυαιθυλενίου (PE) για χρονικό διάστημα 5 ημερών. Ο βαθμός αποικοδόμησης του PE εκτιμήθηκε μέσω του προσδιορισμού της ενεργότητας των παραγόμενων ενζύμων με φασματοφωτομετρικές αναλύσεις, αλλά και μέσω της ανίχνευσης τυχόν αλλαγών στο μοριακό αποτύπωμα του PE με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).

Στη συνέχεια, αφού αξιολογήθηκαν τα παραπάνω αποτελέσματα το στέλεχος του *A. transmontanensis* MM36 επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση με σκοπό την ταυτοποίηση των εκκρινόμενων ενζύμων που έχουν την ικανότητα να υποβαθμίζουν το PE. Για τον λόγο αυτόν, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός υγρών καλλιεργειών με σπόρια του στελέχους και στη συνέχεια το εξωκυτταρικό κλάσμα της καλλιέργειας απομονωνόταν κάθε ημέρα με σκοπό την χρήση του ως βιοκαταλύτης για την αποικοδόμηση σκόνης PE. Αποδείχτηκε, πως τη 2<sup>η</sup> και την 3<sup>η</sup> μέρα, παρατηρείται αύξηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης συνοδευόμενη από αλλαγές στα φάσματα FT-IR. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε και πρωτεομική ανάλυση στο εξωκυτταρικό των καλλιεργειών της 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> μέρας.

Επιπρόσθετα, εκτός της αποικοδόμησης του PE, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχες μελέτες για την αποικοδόμηση συνθετικών πολυεστέρων χρησιμοποιώντας τα ένζυμα που εκφράζονται από τα στελέχη του *Sarocladium strictum* IMNT (*Acremonium* sp.) και *Fusarium oxysporum* BPOP18, παρουσία γαλακτώματος πολυουρεθάνης που δρα ως επαγωγέας για την έκφραση ενζύμων με εστερολυτική δράση. Τα εξωκυτταρικά ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτή την περίπτωση ως βιοκαταλύτες για την υδρόλυση αποικοδομήσιμων και μη αποικοδομήσιμων πολυεστέρων και συγκεκριμένα των τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου υψηλής (PET\_cr) και χαμηλής κρυσταλλικότητας (PET\_am) καθώς και PET έπειτα από χρήση (PC-PET), πολυκαπρολακτόνης (PCL), πολυγαλακτικού οξέος (PLA), ηλεκτρικού πολυβουτυλενίου (PBS) και πολυ(3-υδροξυβουτυρικού οξέος) (PHB). Ο βαθμός της αποικοδόμησης υπολογίστηκε με βάση την απώλεια βάρους, τη μείωση του μοριακού βάρους και την ανίχνευση προϊόντων αποικοδόμησης με υγρή χρωματογραφία. Επιπλέον, εξετάστηκε σε αντιδράσεις με τα ίδια πολυμερικά υλικά και η συνεργιστική δράση των ενζύμων που εκφράστηκαν από τα δύο αυτά στελέχη. Από τον υπολογισμό του μοριακού βάρους, συμπεραίνεται ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης των μοριακών βαρών εντοπίστηκαν στην πλειοψηφία των υλικών έπειτα από την ανάμιξη των ενζύμων που εκφράζονται και από τους δύο αυτούς μικροοργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση του μέσου βάρους μοριακού βάρους ( $\bar{M}_w$ ) για το PHB βρέθηκε ίση με 17,9%, για το PBS 28,6% και για το PLA 12,9%. Η μείωση του μέσου αριθμού μοριακού βάρους ( $\bar{M}_n$ ) για το PHB βρέθηκε ίση με 49,7% και για το PLA 42,5%. Ωστόσο, το PCL

εμφάνισε μεγαλύτερη μείωση μέσου αριθμού μοριακού βάρους, ίση με 26,1%, έπειτα από επώαση με το εξωκυτταρικό κλάσμα που εκφράζεται από τον μικροοργανισμό *S. Strictum* IMNT. Από τον έλεγχο της παρουσίας προϊόντων αποικοδόμησης στα δείγματα PET, συμπεραίνεται ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τερεφθαλικού οξέος (TPA) απελευθερώθηκαν, έπειτα από την επώαση των δειγμάτων με τον *S. Strictum* IMNT και συγκεκριμένα η ποσότητα TPA που απελευθερώνεται για το PET\_am είναι ίση με 0,21 µg/mL, για το PET\_cr 0,40 µg/mL και για το PC-PET 0,32 µg/mL.

Επιπλέον, δεδομένου ότι η αποικοδόμηση των συνθετικών πολυμερών είναι βασισμένη στους μηχανισμούς αποικοδόμησης της βιομάζας, πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, η έκφραση μιας θερμοφίλης εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από το *Sporotrichum thermophile* (StGe2) που ανήκει στην ενζυμική βιβλιοθήκη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας του Ε.Μ.Π. Η εστεράση εξετάστηκε ξανά με τους προαναφερθέντες πολυεστέρες υδρόλυσης (PHB, PBS, PLA, PCL) και με την πολυουρεθάνη (PU) με τα συμπυκνωμένα εξωκυτταρικά ένζυμα, για τους οποίους άξιο αναφοράς είναι ότι το PCL είχε πάνω από 50% απώλεια βάρους αλλά και με τα εξής πλαστικά: PET\_am, PET\_cr. Η δράση αυτού του ενζύμου αξιολογήθηκε με τον έλεγχο της παρουσίας προϊόντων αποικοδόμησης στα δείγματα PET, όπου υπήρξε απελευθέρωση μεγάλης συγκέντρωσης μονο-(2-υδροξυαιθυλ)τερεφθαλικού οξέος (MHET) και δευτερευόντως TPA και δι-(2-υδροξυαιθυλ)τερεφθαλικού (BHET). Η ποσότητα των προϊόντων υδρόλυσης του PET, που απελευθερώνεται για το PET\_am είναι ίση με 193,74 µg/mL και για το PET\_cr 42,30 µg/mL.

Τέλος, στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας, υπό το πρίσμα της επαναχρησιμοποίησης των δομικών μονάδων που προκύπτουν από την υδρόλυση των πολυμερών, εξετάστηκε ο βαθμός αποικοδόμησης ενός πολυμερικού μίγματος PET και αμύλου, με τη συνεργιστική δράση των leaf and branch compost cutinase (mutant LCC-ICCG) και εμπορικής αμυλάσης. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η απόδειξη πως τα υδρολύματα των πολυμερών και συγκεκριμένα του PET, για το οποίο μπορεί να επιτευχθεί υψηλό ποσοστό αποικοδόμησης, μπορούν να ζυμωθούν προς νέα προϊόντα προστιθέμενης αξίας. Για τον λόγο αυτόν, τα υδρολύματα στάλθηκαν σε συνεργαζόμενη ομάδα στο Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο του Σάνον, Ιρλανδία (Centre for Polymer Sustainability, PRISM Research Institute, Technological University of the Shannon, Athlone, Ireland), όπου και ζυμώθηκαν προς ναοκυτταρίνη από το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter* sp. αποδεικνύοντας έτσι ότι η ενζυμική αποικοδόμηση συνοδευόμενη από ζύμωση των υδρολυμάτων μπορεί να αποτελέσει μια νέα και οικονομικά βιώσιμη εναλλακτική στην εκμετάλλευση των πλαστικών απορριμμάτων.

Λέξεις-κλειδιά: Αποικοδόμηση, πολυεστέρες, πολυμερή, τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο, *Aspergillus transmontanensis* MM36, *Penicillium citrinum* MM41, *Tritirachium* sp., πολυαιθυλένιο, FT-IR, *Sarocladium strictum* IMNT, *Fusarium oxysporum* BPOP18, StGe2, mutant LCC-ICCG, εμπορική αμυλάση, άμυλο.





## Abstract

The main purpose of the present study was to study the enzymes expressed by fungal strains and their potentials in the degradation of synthetic polymers.

In order to achieve this aim, three fungal strains: *Aspergillus transmontanensis* MM36, *Penicillium citrinum* MM41 and *Tritirachium* sp. were studied. These fungi were grown in liquid cultures in the presence of carbon sources, that can act as inducers during enzyme expression, and then incubated with polyethylene (PE) powder for 5 days. The degree of degradation of PE was estimated by determining the activity of the enzymes produced, via spectrophotometric analysis and also by detecting any changes in the molecular fingerprint of PE, by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR).

Subsequently, after evaluating the above results, the strain *A. transmontanensis* MM36 was selected for further analysis to identify the secreted enzymes that have the ability to degrade PE. For this purpose, inoculation of liquid cultures with spores of the fungus was performed and then the extracellular fraction of the culture was isolated every day for use as a biocatalyst for PE powder degradation. It was shown that on the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> day, an increase in protein concentration and changes in FT-IR spectra were observed. Based on these results, proteomic analysis was also performed on the extracellular medium of the cultures of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> day.

In addition, besides the degradation of PE, corresponding studies were carried out for the degradation of synthetic polyesters using the enzymes expressed by *Sarocladium strictum* (*Acremonium* sp.) IMNT and *Fusarium oxysporum* BPOP18 strains, in the presence of polyurethane emulsion, acting as an inducer for the expression of enzymes with esterolytic activity. Extracellular enzymes were also used in this case as biocatalysts for the hydrolysis of degradable and non-degradable polyesters including: polyethylene terephthalate of high (PET\_cr) and low crystallinity (PET\_am) and post-consumer (PC-PET), polycaprolactone (PCL), polylactic acid (PLA), polybutylene succinate (PBS) and polyhydroxybutyrate (PHB). The degree of degradation was calculated based on weight loss, molecular weight reduction and detection of degradation products by liquid chromatography. In addition, synergism of the enzymes expressed by these two strains was also examined in reactions with the same polymeric materials. It was concluded that the highest rates of molecular weight reduction for all plastics, except PCL, occurred after incubation of the combination of these two microorganisms. More specifically, the decrease of weight average molecular weight ( $\bar{M}_w$ ) for PHB was found to be equal to 17,9%, for PBS 28,6% and for PLA 12,9%. The decrease of number average molecular weight ( $\bar{M}_n$ ) for PHB was found equal to 49,7% and for PLA 42,5%. PCL showed a greater reduction number average molecular weight, equal to 26,1%, after incubation with the extracellular fraction expressed by the microorganism *S. strictum* IMNT. Moreover, it is concluded that the highest concentrations of terephthalic acid (TPA) were released after incubation with *S. strictum* IMNT and in particular the amount of TPA released for PET\_am is equal to 0,21  $\mu\text{g/mL}$ , for PET\_cr 0,40  $\mu\text{g/mL}$  and for PC-PET 0,32  $\mu\text{g/mL}$ .

What is more, since the degradation of synthetic polymers is based on the mechanisms of biomass degradation, the expression of a thermophilic esterase of glucuronic acid from *Sporotrichum thermophile* (*StGe2*), belonging to the enzyme library of the Biotechnology Laboratory of NTUA was carried out in the context of the thesis. The esterase was re-examined with the above mentioned hydrolysis polyesters (PHB, PBS, PLA, PCL) and with polyurethane (PU) with the concentrated extracellular enzymes, for which it is worth mentioning that PCL had more than 50% weight loss, but also in PET\_am, PET\_cr substrates. The activity of this enzyme was evaluated by determining products' degradation in PET samples, where the highest concentration was that of mono-(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET), followed by TPA and bis-(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET). The amount of PET hydrolysis products released for PET\_am is equal to 193,74 µg/mL and for PET\_cr 42,30 µg/mL.

Finally, in the context of the circular economy, in the light of the reuse of the structural compounds resulting from the hydrolysis of polymers, the degree of degradation of a polymeric mixture of PET and starch was investigated by the synergistic action of leaf and branch compost cutinase (mutant LCC-ICCG) and commercial amylase. The aim of this study was to demonstrate that hydrolysates of polymers, in particular PET, for which a high degradation rate can be achieved, can be fermented into new value-added products. To this end, the hydrolysates were sent to a collaborating group to the Technological University of the Shannon, Ireland (Centre for Polymer Sustainability, PRISM Research Institute, Technological University of the Shannon, Athlone, Ireland), where they were fermented into nanocellulose by the bacterial strain *Komagataeibacter* sp., thus demonstrating that enzymatic degradation accompanied by fermentation of the hydrolysates can be a new and economically viable alternative to the exploitation of plastic waste.

Keywords: Degradation, polyesters, polymers, polyethylene terephthalate, *Aspergillus transmontanensis* MM36, *Penicillium citrinum* MM41, *Tritirachium* sp., polyethylene, FT-IR, *Sarocladium strictum* IMNT, *Fusarium oxysporum* BPOP18, *StGe2*, mutant LCC-ICCG, commercial amylase, starch.



# Περιεχόμενα

Περίληψη .....	v
Abstract .....	viii
1. Θεωρητικό μέρος .....	1
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Πλαστικά & Μικροπλαστικά.....	2
1.2.1 Πλαστικά.....	2
1.2.2 Μικροπλαστικά.....	6
1.2.3 Τα προβλήματα που σχετίζονται με τη ρύπανση από τα πλαστικά και οι επιπτώσεις των πλαστικών και των μικροπλαστικών στο περιβάλλον και στον άνθρωπο. ....	7
1.2.4 Στρατηγικές διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων.....	9
1.3 Βιοαποικοδόμηση πλαστικών .....	15
1.3.1 Ο όρος «βιοαποικοδόμηση» και περιγραφή της διαδικασίας.....	15
1.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή αποικοδόμηση των πλαστικών .....	16
1.3.3 Στάδια της διαδικασίας βιοαποικοδόμησης των πλαστικών.....	18
1.3.4 Αβιοτικοί μηχανισμοί αποικοδόμησης πλαστικών .....	20
1.3.4 Βιοπλαστικά, βιολογικής προέλευσης πλαστικά, βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά.....	23
1.4 Μικροοργανισμοί και ένζυμα με δυνατότητα διάσπασης πολυμερικών υλικών .....	25
1.4.1 Αποικοδόμηση πολυμερικών μιγμάτων.....	25
1.4.2 Μικροοργανισμοί με δυνατότητα διάσπασης πολυμερικών υλικών.....	26
1.4.3 Ορισμός, δράση και κατηγορίες ενζύμων.....	27
1.4.4 Ένζυμα που έχουν απομονωθεί από μικροοργανισμούς και εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των συνθετικών πολυμερών .....	29
1.4.4.1 Κουτινάσες.....	29
1.4.4.2 Λιπάσες.....	29
1.4.4.3 Πρωτεάσες .....	30
1.4.4.4 Εστεράσες .....	30
1.4.4.5 Λακκάσες.....	30
1.4.4.6 Υπεροξειδάσες.....	30
1.4.5 Ενζυμική αποικοδόμηση των πλαστικών που καταλαμβάνουν τον μεγαλύτερο όγκο των πλαστικών απορριμμάτων.....	31
1.4.5.1 Αποικοδόμηση PU .....	31
1.4.5.2 Αποικοδόμηση πολυολεφινών .....	32
1.4.5.2.1 Αποικοδόμηση PE.....	33

1.4.5.2.2 Αποικοδόμηση PS.....	33
1.4.5.2.3 Αποικοδόμηση PP.....	34
1.4.5.3 Αποικοδόμηση Πολυεστέρων.....	35
1.4.5.3.1 Αποικοδόμηση αρωματικών πολυεστέρων.....	35
1.4.5.3.1.1 Αποικοδόμηση PET.....	35
1.4.5.3.2 Αποικοδόμηση αλειφατικών πολυεστέρων.....	36
1.4.5.3.2.1 Αποικοδόμηση PCL.....	36
1.4.5.3.2.2 Αποικοδόμηση PBS.....	36
1.4.5.3.2.3 Αποικοδόμηση PHB.....	36
1.4.5.3.2.4 Αποικοδόμηση PLA.....	37
2. Πειραματικό μέρος.....	37
2.1 Υλικά.....	37
2.1.1 Όργανα & Συσκευές.....	37
2.1.2 Θρεπτικά υλικά.....	39
2.1.3 Ρυθμιστικά διαλύματα.....	42
2.2 Μέθοδοι.....	43
2.2.1 Μελέτη της αποικοδόμησης των πλαστικών με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	43
2.2.2 Μελέτη της απώλειας μοριακών βαρών με χρωματογραφία διείσδυσης γέλης (Gel permeation chromatography – GPC).....	46
2.2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ενζύμων.....	48
2.2.3.1 Νόμος Lambert - Beer.....	48
2.2.3.2 Μέθοδος Lowry.....	48
2.2.3.3 Μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford.....	49
2.2.3.4 Μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα υπερκείμενα καλλιιεργειών έπειτα από καταβύθιση των πρωτεϊνών τροποποιώντας το πρωτόκολλο με τη μέθοδο Bradford.....	50
2.2.4 Προσδιορισμός ενεργότητας εκκρινόμενων ενζύμων.....	51
2.2.4.1 Προσδιορισμός ενεργότητας εστερασών.....	51
2.2.4.2 Προσδιορισμός ενεργότητας οξειδωτικών ενζύμων.....	52
2.2.5 Επαγωγή ενζύμων για την αποικοδόμηση του PE από τα στελέχη των μικροοργανισμών <i>Aspergillus transmontanensis</i> MM36, <i>Penicillium citrinum</i> MM41 και <i>Tritirachium</i> sp.....	52
2.2.5.1 Μελέτη του βαθμού αποικοδόμησης της σκόνης PE με χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).....	55

2.2.5.2 Προετοιμασία καλλιιεργειών του στελέχους <i>Aspergillus transmontanensis</i> MM36 με σκοπό την ανάλυση και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται παρουσία αλκανίων μέσω ομικών αναλύσεων .....	55
2.2.6 Ταυτοποίηση μικροοργανισμού <i>Sarocladium strictum</i> IMNT ( <i>Acremonium</i> sp.).....	57
2.2.6.1 Επαγωγή ενζύμων για την αποικοδόμηση πολυεστέρων από τα στελέχη των μικροοργανισμών <i>Sarocladium strictum</i> IMNT και <i>Fusarium oxysporum</i> BPOP18 .....	63
2.2.6.2 Μελέτη της δυνατότητας αποπολυμερισμού του εξωκυτταρικού κλάσματος των <i>Sarocladium strictum</i> IMNT και <i>Fusarium oxysporum</i> BPOP18 σε πολυεστέρες.....	64
2.2.7 Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός του ενζύμου <i>Sporotrichum thermophile</i> ( <i>StGe2</i> ) με σκοπό την ενζυμική αποικοδόμηση διαφόρων πολυεστέρων.....	66
2.2.7.1 Μελέτη δράσης των ενζύμων <i>StGe2</i> σε πολυεστέρες και πολυουρεθάνη .....	69
2.2.8 Μελέτη του βαθμού αποικοδόμησης του μίγματος PET - αμύλου.....	71
2.2.8.1 Ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.....	71
2.2.8.2 Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός του ενζύμου LCC-ICCG mutant.....	71
2.2.8.3 Μελέτη δράσης ενζύμου LCC-ICCG mutant & αμύλασης με υλικά PET & αμύλου διαφορετικής σύστασης .....	73
3. Παρουσίαση και συζήτηση αποτελεσμάτων.....	74
3.1 Αποικοδόμηση PE χρησιμοποιώντας τα εξωκυτταρικά κλάσματα των <i>Aspergillus transmontanensis</i> MM36, <i>Tritirachium</i> sp., <i>Penicillium citrinum</i> MM41 ως βιοκαταλύτες.....	74
3.1.1 Εύρεση της βέλτιστης χρονικής στιγμής για την ανάλυση του εξωκυτταρικού κλάσματος του στελέχους <i>Aspergillus transmontanensis</i> MM36.....	86
3.1.2 Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που εκφράζονται από το στέλεχος <i>Aspergillus transmontanensis</i> MM36 και σχετίζονται με την αποικοδόμηση του PE.....	91
3.2 Ταυτοποίηση του μικροοργανισμού <i>Sarocladium strictum</i> IMNT.....	93
3.2.1 Αξιολόγηση μελέτης δράσης του εξωκυτταρικού κλάσματος των <i>Sarocladium strictum</i> IMNT και <i>Fusarium oxysporum</i> BPOP18 με πολυεστέρες και πολυουρεθάνη.....	93
3.3 Αξιολόγηση της ενζυμικής αποικοδόμησης διάφορων πολυεστέρων και της πολυουρεθάνης, έπειτα από επώαση με το ένζυμο <i>StGe2</i> .....	98
3.4 Αντιδράσεις LCC μετάλλαξη ICCG με εμπορική αμύλαση στο πολυμερικό μίγμα PET/άμυλο... ..	100
4. Μελλοντικές προτάσεις.....	103
Βιβλιογραφία .....	105
Παράρτημα Α : Μεθοδολογία προσδιορισμού ενεργότητας εστερασών στο εστερικό υπόστρωμα pNPB .....	112
Παράρτημα Β : Χρόνοι έκλυσης των προϊόντων υδρόλυσης του PET (TPA, MHET και BHET) .....	112
Παράρτημα Γ : ITS του μικροοργανισμού <i>Sarocladium strictum</i> IMNT.....	113

## Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Χημική δομή PE [14].	3
Εικόνα 2: Χημική δομή PET [15].	3
Εικόνα 3: Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοαποικοδόμηση [56].	17
Εικόνα 4: Στάδια βιοαποικοδόμησης πλαστικών [52].	20
Εικόνα 5: Αβιοτική και βιοτική αποικοδόμηση [2].	22
Εικόνα 6: Τα βιοπλαστικά αποτελούμενα από βιοαποικοδομήσιμα και βιολογικής προέλευσης πλαστικά [60].	25
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση μοντέλου κλειδιού – κλειδαριάς και μοντέλου επαγόμενης προσαρμογής [69].	28
Εικόνα 8: Μικροβιακή αποικοδόμηση της PU [53].	32
Εικόνα 9: Μικροβιακή αποικοδόμηση του PET. Η PETάση, υδρολάση του PET ή ένζυμο που διασπά το PET -BHET -MHET -TPA -EG (αιθυλενογλυκόλη) [53], [89].	44
Εικόνα 10: Η συσκευή της HPLC-GPC.	46
Εικόνα 11: Τα ομογενοποιημένα διαλύματα των καλλιιεργειών MM με τα αλκάνια (αριστερά) και των καλλιιεργειών ελέγχου με το C <sub>16</sub> (δεξιά), έπειτα από τη συσκευή υπερήχων.	53
Εικόνα 12: Συσκευή PCR.	60
Εικόνα 13: Γέλη αγαρόζης.	61
Εικόνα 14: Συσκευή ηλεκτροφόρησης της πρωτεΐνης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.	69
Εικόνα 15: Απεικόνιση πηκτώματος ηλεκτροφόρησης της πρωτεΐνης StGe2 υπό αποδιατακτικές συνθήκες.	99



## Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1: Εφαρμογές εμπορικά σημαντικών πλαστικών [7].....	5
Πίνακας 2: Παραδείγματα συνθετικών, φυσικών πλαστικών και πολυμερικών μειγμάτων και οι μικροοργανισμοί που τα αποικοδομούν [50], [53]. .....	27
Πίνακας 3: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών (mM) του MM.....	40
Πίνακας 4: Η ποσότητα (g) των συστατικών για 1 L διαλύματος MB.....	40
Πίνακας 5: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του θρεπτικού μέσου LB.....	41
Πίνακας 6: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του θρεπτικού μέσου YPD Medium.....	41
Πίνακας 7: Η σύσταση των συστατικών των θρεπτικών μέσων BMGY και BMMY.....	42
Πίνακας 8: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του διαλύματος PBS.....	42
Πίνακας 9: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του διαλύματος Talon buffer.....	43
Πίνακας 10: Συνθήκες HPLC για την ανάλυση δειγμάτων πολυμερών.....	45
Πίνακας 11: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών των υγρών προκαλλιιεργειών και καλλιιεργειών των μυκήτων: <i>Aspergillus transmontanensis</i> MM36, <i>Penicillium citrinum</i> MM41 και <i>Tritirachium</i> sp. ....	54
Πίνακας 12: Η σύσταση των συστατικών της γέλης αγαρόζης.....	60
Πίνακας 13: Οι πρωτεΐνες που έχουν εκφραστεί στις διαφορετικές συνθήκες κατά την πρωτεομική ανάλυση. (LogFC: Αντιστοιχεί στον λογάριθμό του λόγου έκφρασης μεταξύ δυο συνθηκών).....	92
Πίνακας 14: Ποσοστό μείωσης του μοριακού βάρους των πολυμερικών υλικών, έπειτα από επώασή τους με το εξωκυτταρικό κλάσμα ξεχωριστά των <i>Sarocladium strictum</i> IMNT, <i>Fusarium oxysporum</i> BPOP18, αλλά και του συνδυασμού τους.....	95
Πίνακας 15: Συγκέντρωση προϊόντων απελευθέρωσης της υδρόλυσης διαφόρων ειδών δειγμάτων PET (μg/mL), έπειτα από επώαση με εξωκυτταρικά κλάσματα των <i>Sarocladium strictum</i> IMNT, <i>Fusarium oxysporum</i> BPOP18, αλλά και του συνδυασμού τους.....	96
Πίνακας 16: Συγκέντρωση προϊόντων που απελευθερώθηκαν (μg/mL), έπειτα από επώαση των υλικών του PET με την StGe2.....	99
Πίνακας 17: Χρόνοι έκλυσης των προϊόντων υδρόλυσης του PET (TPA, MHET και BHET).....	112



με C <sub>16</sub> , πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C <sub>16</sub> ).....	84
Διάγραμμα 15: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιιεργειας 4 <sup>ης</sup> ημέρας του <i>Penicillium citrinum</i> MM41 (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με C <sub>16</sub> , πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C <sub>16</sub> ).....	85
Διάγραμμα 16: Συγκέντρωση πρωτεΐνης των δειγμάτων των υπερκείμενων των καλλιιεργειών, εμβολιασμένων με σπόρια <i>Aspergillus transmontanensis</i> MM36, 1, 2, 3 και 4 ημερών.....	87
Διάγραμμα 17: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιιεργειας 1 <sup>ης</sup> ημέρας του <i>Aspergillus transmontanensis</i> MM36 (σπόρια) (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με C <sub>16</sub> , πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C <sub>16</sub> ).....	88
Διάγραμμα 18: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιιεργειας 2 <sup>ης</sup> ημέρας του <i>Aspergillus transmontanensis</i> MM36 (σπόρια) (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με C <sub>16</sub> , πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C <sub>16</sub> ).....	88
Διάγραμμα 19: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιιεργειας 3 <sup>ης</sup> ημέρας του <i>Aspergillus transmontanensis</i> MM36 (σπόρια) (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με C <sub>16</sub> , πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C <sub>16</sub> ).....	89
Διάγραμμα 20: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιιεργειας 4 <sup>ης</sup> ημέρας του <i>Aspergillus transmontanensis</i> MM36 (σπόρια) (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με C <sub>16</sub> , πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C <sub>16</sub> ).....	90
Διάγραμμα 21: Εστερική ενεργότητα δειγμάτων του υπερκείμενου των καλλιιεργειών του μικροοργανισμού <i>Sarocladium strictum</i> IMNT συναρτήσει του χρόνου επώασης των καλλιιεργειών. ....	94
Διάγραμμα 22: Εστερική ενεργότητα δειγμάτων του υπερκείμενου των καλλιιεργειών του μικροοργανισμού <i>Fusarium oxysporum</i> BPOP18 συναρτήσει του χρόνου επώασης των καλλιιεργειών... ..	94
Διάγραμμα 23: Η επί τοις εκατό απώλεια βάρους των πολυμερικών υλικών, έπειτα από επώασή τους με την StGe2.....	98
Διάγραμμα 24: Συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων των δειγμάτων που έχουν επωαστεί ξεχωριστά με εμπορική αμυλάση, με LCC και με συνδυασμό αυτών (mg/mL) για τις συστάσεις του PET 0, 5, 10, 30, 40% στους 50 °C. ....	101
Διάγραμμα 25: Προϊόντα απελευθέρωσης της υδρόλυσης διαφόρων ειδών δειγμάτων PET, έπειτα από επώαση με το μίγμα LCC και αμυλάση, σε διάστημα 3 ημερών, στους 50 °C.....	102

# 1. Θεωρητικό μέρος

## 1.1 Εισαγωγή

Τα πλαστικά είναι αναμφισβήτητα “ανώτερα” υλικά, λόγω των εξαιρετικών χαρακτηριστικών τους, όπως είναι το χαμηλό κόστος παραγωγής, το χαμηλό βάρος, η ανθεκτικότητα, η σταθερότητα, οι χαμηλές απαιτήσεις συντήρησης και η ικανότητα επεξεργασίας τους [1]. Τα πλαστικά είναι συνυφασμένα με την ανθρώπινη ζωή, και τείνουν να χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο σε καθημερινή βάση. Λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων τους, χρησιμοποιούνται σε πληθώρα εφαρμογών σε διάφορες βιομηχανίες, εμπορικές και γεωργικές δραστηριότητες. Η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών από το 1950 έως το 2018 εκτιμήθηκε σε 8,3 δισεκατομμύρια τόνους, με την ετήσια παραγωγή να αυξάνεται κατά 5% (185 εκατομμύρια τόνοι) κάθε χρόνο [2]. Ωστόσο, το 76% της συνολικής παραγωγής καταλήγει στα απορρίμματα. Αυτό το 76% των απορριμμάτων διαχωρίζεται, ανάλογα με το είδος του υλικού και τη στρατηγική διάθεσής του, σε 14% αποτεφρωμένα, 14% ανακυκλωμένα και 72% σε χώρους υγειονομικής ταφής ή απελευθερωμένα στο περιβάλλον [3].

Η ευρεία χρήση των πλαστικών καθώς και η δυσκολία αποικοδόμησής τους έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στη συσσώρευσή τους στο περιβάλλον [4]. Αυτή η συσσώρευση σε συνδυασμό με την υπερχειλίση των χώρων υγειονομικής ταφής και τα αυξανόμενα προβλήματα ρύπανσης των υδάτων και του εδάφους, έχουν προκαλέσει στην παγκόσμια κοινότητα μεγάλη ανησυχία για τα πλαστικά [5]. Προκειμένου να ξεπεραστεί το πρόβλημα, γίνονται μελέτες από την ερευνητική κοινότητα, σχετικά με εναλλακτικές λύσεις, φιλικές προς το περιβάλλον, όπως η βιοαποικοδόμηση των πλαστικών με τη χρήση και μικροβίων αλλά και ενζύμων, καθώς και με την ανάπτυξη νέων μιγμάτων, που αποτελούνται από μίγματα πολυμερών αποικοδομήσιμων και μη [6].

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, η παρούσα διπλωματική εργασία αποσκοπεί στη μελέτη ενζύμων, που εκφράζονται από μυκητιακά στελέχη παρουσία επαγωγέων, με σκοπό την αποικοδόμηση πολυμερών, ανθεκτικών στη διάσπαση. Τα ένζυμα που εκφράζονται υπό αυτές τις συνθήκες, δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους να αποπολυμερίζουν τα αντίστοιχα πολυμερή, ενώ πραγματοποιήθηκαν και συνδυασμοί ενζύμων. Η επαγόμενη παραγωγή, απομόνωση και ο έλεγχος της δράσης των ενζύμων στα συνθετικά πολυμερή ακολουθήθηκε από την ανάλυση των ιδιοτήτων των υλικών, καθώς και από τον εντοπισμό προϊόντων αποικοδόμησής τους. Η μελέτη των ιδιοτήτων έγινε με αναλυτικές τεχνικές που περιλάμβαναν κατά κύριο λόγο υγρή χρωματογραφία, φασματοσκοπία υπέρυθρου και χρωματογραφία διείσδυσης πηκτής.

## 1.2 Πλαστικά & Μικροπλαστικά

### 1.2.1 Πλαστικά

Η λέξη «πλαστικό» προέρχεται από την ελληνική λέξη «πλαστικός» και σημαίνει ικανός να μορφοποιηθεί, δηλαδή να τροποποιηθεί σε διαφορετικά σχήματα [7]. Πιο αναλυτικά, τα πλαστικά αποτελούνται από ένα ευρύ φάσμα συνθετικών και ημι-συνθετικών οργανικών ουσιών [4]. Η Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC) ορίζει τα πλαστικά ως γενικό όρο που χρησιμοποιείται σε περίπτωση «πολυμερικού υλικού που πιθανώς να εμπεριέχει άλλες ουσίες για τη βελτίωση της απόδοσης ή/και τη μείωση του κόστους παραγωγής του» [4], [8]. Επίσης, ο όρος «πλαστικά» αναφέρεται συνήθως σε εμπορικά υλικά που περιέχουν εκτός από πολυμερή μακρομόρια και άλλες πρόσθετες ουσίες, όπως σταθεροποιητές, χρωστικές και άλλες χημικές ουσίες που απαιτούνται για την παραγωγή σταθερών εμπορικών υλικών [9]. Από δομικής άποψης τα πλαστικά είναι πολυμερή με μεγάλο μοριακό βάρος. Η βασική διαφορά μεταξύ πολυμερούς και πλαστικού είναι ότι το πολυμερές μπορεί να είναι είτε φυσικό είτε συνθετικό ενώ το πλαστικό είναι συνθετικό πολυμερές, που προέρχεται συνήθως από πετροχημικά και παρουσιάζει υψηλή μοριακή μάζα και πλαστικότητα. Πολυμερή ονομάζονται οι ουσίες ή τα υλικά που αποτελούνται από πολύ μεγάλα μόρια, τα μακρομόρια, τα οποία αποτελούνται από χημικά δομικά στοιχεία γνωστά ως επαναλαμβανόμενες μονάδες ή μονομερή. Τα πολυμερή προκύπτουν από τη χημική αντίδραση πολλών μικρών μορίων, των μονομερών, που ονομάζεται πολυμερισμός [7].

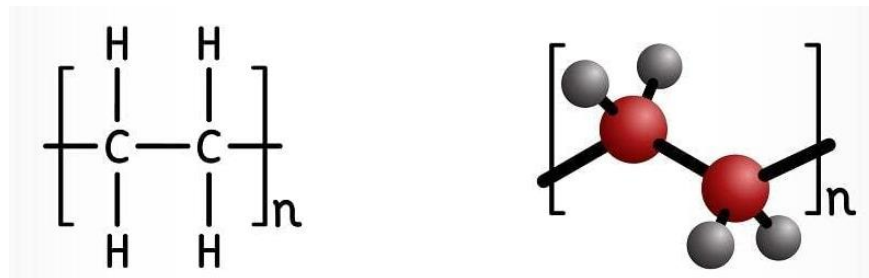
Τα πλαστικά τείνουν να προτιμώνται από πληθώρα βιομηχανιών, όπως τροφίμων, υγείας, υλικών, γεωργίας, διότι είναι εύκαμπτα, φθηνά, ελαφριά και ανθεκτικά στη φθορά και στη διάβρωση από το νερό [10]. Η ιδιότητα που έχουν τα πλαστικά να μορφοποιούνται, συνήθως με την εφαρμογή θερμότητας και πίεσης, συχνά συνδυάζεται με άλλες ειδικές ιδιότητες όπως η χαμηλή πυκνότητα, η χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, και η σκληρότητα. Λόγω αυτού του συνδυασμού, τα πλαστικά μετατρέπονται σε μεγάλη γκάμα προϊόντων. Η μεγαλύτερη εφαρμογή τους είναι ως υλικά συσκευασίας, αλλά χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα άλλων τομέων όπως: κατασκευές [11], υφάσματα, ηλεκτρονικά είδη, ανταλλακτικά μηχανών κ.ά [12], [10].

Μετά από περίοδο παύσης εργασιών, το 2020 λόγω της πανδημίας Covid-19, έναν χρόνο μετά, το 2021, η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών αυξήθηκε σε 390,7 εκατομμύρια τόνους. Το 90,2% της παγκόσμιας παραγωγής είναι πλαστικά των οποίων η κατασκευή τους βασίζεται σε ορυκτά καύσιμα (fossil-based plastics). Επιπρόσθετα, βάσει των δεδομένων του 2021 οι δύο μεγαλύτερες παγκόσμιες αγορές πλαστικών ήταν αυτές της συσκευασίας και των κατασκευών [13].

Από το σύνολο της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών, το 2021, το πολυαιθυλένιο (PE), το πολυπροπυλένιο (PP), το πολυβινυλχλωρίδιο (PVC), το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), η πολυουρεθάνη (PU) και το πολυστερένιο (PS), καταλάμβαναν το μεγαλύτερο ποσοστό με 26,9, 19,3, 12,9, 6,2, 5,5, και 5,3%, επί της συνολικής παραγωγής, αντίστοιχα [13].

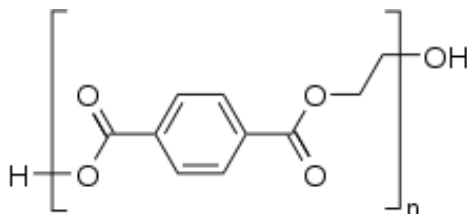
Αυτή η μεγάλη ζήτηση των πλαστικών περιλαμβάνει πολλές μορφές τους, όπως τα θερμοπλαστικά, τα φυσικά πολυμερή, τα τροποποιημένα φυσικά πολυμερή, τα συνθετικά και πιο πρόσφατα τα βιοδιασπώμενα [4].

Τα πλαστικά μπορούν επίσης να χωριστούν σε δύο διαφορετικές κατηγορίες με βάση τη χημική τους σύνθεση. Η μία κατηγορία είναι τα πλαστικά που αποτελούνται από πολυμερή που έχουν μόνο αλειφατικά (γραμμικά) άτομα άνθρακα στις αλυσίδες του σκελετού τους. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν όλα τα πλαστικά που αναφέρονται παραπάνω. Ένα παράδειγμα είναι το PE (Εικόνα 1), το οποίο είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές [7].



Εικόνα 1: Χημική δομή PE [14].

Η άλλη κατηγορία πλαστικών αποτελείται από ετεροατομικά πολυμερή. Αυτές οι ενώσεις περιέχουν εκτός από άτομα άνθρακα και άλλα άτομα όπως οξυγόνο, άζωτο ή θείο στις αλυσίδες του σκελετού τους. Ένα παράδειγμα είναι το PET (Εικόνα 2), το οποίο ανήκει στην ομάδα των θερμοπλαστικών πολυμερών [7].



Εικόνα 2: Χημική δομή PET [15].

Η πλειονότητα των πλαστικών προέρχονται από χημικές ουσίες που βασίζονται σε ορυκτά καύσιμα, όπως το φυσικό αέριο ή το πετρέλαιο (petroleum-based plastics) και έχουν αντικαταστήσει πολλά φυσικά υλικά σε ποικίλες εφαρμογές. Τα περισσότερα πλαστικά με βάση το πετρέλαιο έχουν θεωρηθεί ως ιδιαίτερα ανθεκτικά στην αποικοδόμηση, όταν εκτίθενται στο περιβάλλον [16].

Με βάση τη μηχανική τους συμπεριφορά τα πλαστικά χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα θερμοπλαστικά και τα θερμοσκληρυνόμενα.

Τα θερμοπλαστικά, όπως το PE και το PS, μπορούν να μορφοποιηθούν και να αναδιαμορφωθούν κατ' επανάληψη. Για παράδειγμα, ένα κύπελλο από αφρώδες PS μπορεί να θερμανθεί και να διαμορφωθεί σε κάτι νέο- για παράδειγμα, σε πιάτο [7]. Αυτή η πλαστική ιδιότητα τα καθιστά επίσης μηχανικά ανακυκλώσιμα, γεγονός που αποτελεί μια καλή μέθοδο

διαχείρισης απορριμμάτων [17]. Τα θερμοπλαστικά είναι ρητίνες που είναι στερεές σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά γίνονται μαλακές όταν θερμαίνονται και τελικά γίνονται ρευστές ως αποτέλεσμα της τήξης των κρυστάλλων ή της υπέρβασης της θερμοκρασίας υαλώδους μετάβασης ( $T_g$ ) [18]. Η δομή του πολυμερούς που σχετίζεται με τα θερμοπλαστικά είναι αυτή των μεμονωμένων μορίων που διαχωρίζονται το ένα από το άλλο και ρέουν το ένα δίπλα στο άλλο. Τα μόρια μπορεί να έχουν χαμηλό ή εξαιρετικά υψηλό μοριακό βάρος, και μπορεί να είναι διακλαδισμένα ή γραμμικά στη δομή, αλλά το βασικό χαρακτηριστικό τους είναι η διαχωρισιμότητα και η συνεπακόλουθη κινητικότητα [7]. Επειδή τα θερμοπλαστικά έχουν χαμηλό σημείο τήξης, είναι ιδανικά για εφαρμογές που χρησιμοποιούν ανακυκλωμένα υλικά. Η επεξεργασία τους δεν περιλαμβάνει χημική κατεργασία και μπορούν να τοποθετηθούν σε καλούπι για να κρυσώσουν και να στερεοποιηθούν στο επιθυμητό σχήμα. Όπως προαναφέρθηκε, τα θερμοπλαστικά μπορούν να θερμανθούν εκ νέου, να ανακυκλωθούν και να ξαναδιαμορφωθούν [18]. Ως αποτέλεσμα, τα υλικά αυτά χρησιμοποιούνται σε διεργασίες όπως η εξώθηση, και η θερμοδιαμόρφωση. Τα συνήθη θερμοπλαστικά περιλαμβάνουν το PE, το πολυανθρακικό ή πολυκαρβονικό (PC), το PVC, το PP, το PS και το PET, με το καθένα να έχει ποικίλες ιδιότητες. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές, τα θερμοπλαστικά τείνουν να αντιστέκονται στη συρρίκνωση, ενώ παράλληλα προσφέρουν καλή ελαστικότητα και αντοχή. Χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές όπως εξαρτήματα βιομηχανικών μηχανημάτων και πλαστικές σακούλες για το λιανικό εμπόριο. Τέλος, τα θερμοπλαστικά μπορούν να μαλακώσουν, να παραμορφωθούν και να χάσουν ορισμένες από τις φυσικές τους ιδιότητες εάν εκτεθούν σε υψηλές θερμοκρασίες [18].

Τα θερμοσκληρυνόμενα, από την άλλη πλευρά, δεν μπορούν να επανεπεξεργαστούν μετά από αναθέρμανση, αλλά αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες χωρίς να χάνουν το σχήμα τους, γεγονός που τα καθιστά πιο ανθεκτικά. Είναι συνθετικά υλικά που υπόκεινται σε μια σειρά φυσικοχημικών διεργασιών μετασχηματισμού υπό διαφορετικές θερμικές επεξεργασίες [17]. Κατά την αρχική τους επεξεργασία υφίστανται χημική αντίδραση που οδηγεί σε ένα αδιάλυτο τριδιάστατο δίκτυο. Ο μετασχηματισμός αυτός δεν είναι αναστρέψιμη διαδικασία. Ουσιαστικά, ολόκληρο το τελικό αντικείμενο μετατρέπεται σε ένα μεγάλο μόριο. Για παράδειγμα, το εποξικό πολυμερές που χρησιμοποιείται για την κατασκευή ενός ενισχυμένου με ίνες ελάσματος, που συναντάται στα μπαστούνια του γκολφ, υφίσταται αντίδραση σταυροσύνδεσης, όταν μορφοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία [7]. Αυτοί οι μόνιμοι χημικοί δεσμοί μεταξύ των μονομερών αλυσίδων μέσα στο υλικό (σταυροδεσμοί) που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας σκλήρυνσης, συγκρατούν τα μόρια στη θέση τους και αλλάζουν τη φύση του υλικού, εμποδίζοντάς το να λιώσει και να επανέλθει σε υγρή κατάσταση [18]. Η επακόλουθη εφαρμογή θερμότητας δεν μαλακώνει το υλικό σε σημείο που να μπορεί να επεξεργαστεί εκ νέου και μάλιστα η υπερθέρμανση μπορεί να το διασπάσει. [7]. Η φυσική κατάσταση των θερμοσκληρυνόμενων υλικών μπορεί να μεταβληθεί από υγρή με χαμηλό βαθμό ιξώδους (η κατάστασή τους σε θερμοκρασία δωματίου), σε στερεή με υψηλό σημείο τήξης- αυτό δείχνει ότι διαφορετικά υλικά με κάποια συγκεκριμένα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά μπορούν να σχηματιστούν από θερμοσκληρυνόμενα. Σε γενικές γραμμές, οι θερμοσκληρυνόμενες υπομονάδες ή μονομερή έχουν χαμηλό ιξώδες, το οποίο τους επιτρέπει να τροποποιούνται και τα καθιστά εύκολα στη χρήση για τον καταναλωτή. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιούνται διάφορα

πρόσθετα σε θερμοσκληρυνόμενα για τη μεγιστοποίηση και τη βελτιστοποίηση των επιδόσεών τους, κι έτσι τη χρήση τους σε διάφορες εφαρμογές [17]. Τα κοινά θερμοσκληρυνόμενα περιλαμβάνουν τις εποξειδικές ρητίνες και το πολυιμίδιο τα οποία χρησιμοποιούνται συχνά σε σύνθετα υλικά [18].

Στον Πίνακα 1 παρατίθενται κάποιες εφαρμογές των πιο εμπορικά σημαντικών πλαστικών.

Πίνακας 1: Εφαρμογές εμπορικά σημαντικών πλαστικών [7].

Οικογένεια και τύπος πολυμερών	Τυπικά προϊόντα και εφαρμογές
<b>Θερμοπλαστικά</b>	
<b>Ανθρακική αλυσίδα (Carbon-chain)</b>	
Υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (HDPE)	Μπουκάλια γάλακτος, μόνωση καλωδίων, παιχνίδια
Χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (LDPE)	Συσκευασίες τροφίμων, μεμβράνες, σακούλες, γεωργικό χώμα
PP	Μπουκάλια, δοχεία τροφίμων, παιχνίδια
PS	Σκεύη φαγητού, δοχεία τροφίμων από αφρώδες υλικό
Ακρυλονιτρίλιο βουταδιένιο στυρένιο (ABS)	Κράνη, εξαρτήματα σωλήνων, περιβλήματα συσκευών
PVC	Σωλήνες, αγωγοί, κουφώματα παραθύρων
Πολυμεθακρυλικό μεθύλιο (PMMA)	Ανθεκτικά παράθυρα, φεγγίτες, στέγαστρα
Πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE)	Αντικολλητικά μαγειρικά σκεύη
<b>Ετεροαλυσίδα (Heterochain)</b>	
PET	Διαφανή μπουκάλια, ταινία εγγραφής ήχου (recording tape)
PC	Compact discs (CDs), γυαλιά ασφαλείας, αθλητικά είδη
Πολυακετάλη	Ρουλεμάν, γρανάζια, κεφαλές ντους, φερμουάρ
Πολυαιθεραιθερκετόνη (PEEK)	Ανταλλακτικά μηχανών και αυτοκινήτων
Πολυφαινυλένιο σουλφίδιο (PPS)	Ανταλλακτικά μηχανών, συσκευές, ηλεκτρικός εξοπλισμός
Οξική κυτταρίνη	Φωτογραφικά φιλμς
Νάυλον 6	Ρουλεμάν, τροχαλίες, γρανάζια
<b>Θερμοσκληρυνόμενα</b>	
<b>Ετεροαλυσίδα (Heterochain)</b>	
Πολυεστέρας (ακόρεστος)	Κύτη σκαφών, πάνελ αυτοκινήτων
Εποξεικές ρητίνες	Δάπεδα, εξαρτήματα αεροσκαφών
Φορμαλδεΰδη	Λαβές συσκευών
Ουρία	Πάγκοι, επιτραπέζια σκεύη
PU	Μονώσεις



### 1.2.2 Μικροπλαστικά

Τα τελευταία χρόνια, λόγω της παγκόσμιας οικολογικής κρίσης έχουν αυξηθεί οι έρευνες σχετικά με τις συνέπειες των μικροπλαστικών που απευλευθερώνονται στο περιβάλλον και κάποιες από αυτές επικεντρώνονται στα νανοσωματίδια πολυμερικών υλικών. Αν και οι εγγενείς τεχνικές δυσκολίες, που παρουσιάζονται τόσο στην απομόνωσή όσο και στον ποσοτικό προσδιορισμό αυτών των νανοσωματιδίων, καθιστούν δύσκολη την εύρεσή τους, θεωρείται ότι αποτελούν σημαντική απειλή για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία [4]. Τα μικροπλαστικά, είναι θραύσματα πλαστικών που λόγω του πολύ μικρού μεγέθους τους, γίνονται πολύ εύκολα τροφή σε οργανισμούς που βρίσκονται στη βάση της τροφικής αλυσίδας. Τα μικροπλαστικά αναφέρονται γενικά σε σωματίδια με μέγεθος κόκκου μικρότερο από 5 mm, αν και ένας πρόσφατος ορισμός προτείνει να θεωρούνται θραύσματα μικρότερα από 1 mm [16], [19]. Τα μικροπλαστικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως πρωτογενή ή δευτερογενή πλαστικά, ανάλογα με την πηγή προέλευσή τους [19], [20].

Τα πρωτογενή μικροπλαστικά είναι σκόπια κατασκευασμένα μικροπλαστικά σωματίδια για συγκεκριμένες εφαρμογές (π.χ. μικροσφαιρίδια) [21]. Το χαρακτηριστικό τους είναι ότι εισέρχονται στο περιβάλλον απευθείας μέσω οποιουδήποτε από τα διάφορα κανάλια – για παράδειγμα, χρήση προϊόντων (2%) (π.χ. προϊόντα προσωπικής φροντίδας που εκπλένονται στα συστήματα λυμάτων από τα νοικοκυριά), ακούσια απώλεια από διαρροές κατά την κατασκευή ή τη μεταφορά ή τριβή κατά το πλύσιμο (35%) (π.χ. πλύσιμο ρούχων από συνθετικά υφάσματα), τριβή των ελαστικών κατά τη διάρκεια της οδήγησης (28%) [20]. Εκτιμάται ότι αντιπροσωπεύουν μεταξύ του 15-31% των μικροπλαστικών στους ωκεανούς. Παραδείγματα πρωτογενών μικροπλαστικών περιλαμβάνουν σκόπια προστιθέμενα μικροπλαστικά σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας, για παράδειγμα μικροσφαιρίδια σε απολεπιστικά προσώπου, πλαστικά σφαιρίδια (ή nurdles) που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανική παραγωγή και πλαστικές ίνες που χρησιμοποιούνται σε συνθετικά υφάσματα (π.χ. νάιλον) [22], [23].

Από την άλλη, τα δευτερογενή μικροπλαστικά δημιουργούνται από τον θρυμματισμό και την αποικοδόμηση των μακροπλαστικών ή μεγαλύτερων θραυσμάτων, συμπεριλαμβανομένων των ινών από συνθετικά υφάσματα [21]. Αυτό συμβαίνει συνήθως όταν τα μεγαλύτερα πλαστικά υφίστανται αποσάθρωση, μέσω της έκθεσης, για παράδειγμα, στη δράση των κυμάτων, στην τριβή από τον άνεμο και στην υπερϊώδη ακτινοβολία από το ηλιακό φως [22], [23]. Η αποικοδόμηση προκαλεί μείωση της δομικής ακεραιότητας του πολυμερούς με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό του στα μικροσκοπικά αυτά πλαστικά σωματίδια. Αποτελούν το 69-81% των μικροπλαστικών που βρίσκονται στους ωκεανούς και προέρχονται από την αποικοδόμηση μεγαλύτερων πλαστικών αντικειμένων, όπως πλαστικές σακούλες, μπουκάλια ή δίχτυα αλιείας [20].

Μια τέτοια διάκριση είναι ενδεχομένως σημαντική για τη μελέτη της ατμοσφαιρικής μεταφοράς λόγω της διαφοράς στο σχήμα που μπορεί να επηρεάσει την αεροδυναμική του και, επομένως, τη μεταφορά του. Οι ερευνητές θεωρούν ότι τα μικροπλαστικά συναντώνται σε όλα τα περιβάλλοντα, χερσαία και υδάτινα, ανά τον κόσμο. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα

μικροπλαστικά εισέρχονται στο περιβάλλον σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής τους πλαστικού προϊόντος – από τους παραγωγούς έως τη διαχείριση των αποβλήτων, με δυνατότητα τροφικής μεταφοράς και έκθεσης της ανθρώπινης υγείας [21].

Όσον αφορά στα αστικά περιβάλλοντα, η ίδια η αστικοποίηση είναι ένας σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στην απελευθέρωση μικροπλαστικών σε αυτά. Καθώς οι πόλεις μεγαλώνουν και αναπτύσσονται, καταναλώνονται και απορρίπτονται περισσότερα πλαστικά προϊόντα, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα ρύπανσης από τα πλαστικά. Παρόλο που οι έρευνες σχετικά με τα αερομεταφερόμενα μικροπλαστικά (AMPs) στις αστικές περιοχές είναι λίγες, πρόσφατα ευρήματα έχουν δείξει υψηλή συγκέντρωσή τους στον αέρα κατοικημένων περιοχών. Για τους εσωτερικούς χώρους, την κυριότερη πηγή αερομεταφερόμενων μικροπλαστικών αποτελούν τα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα, ενώ για τη ρύπανση της εξωτερικής ατμόσφαιρας των πόλεων, φαίνεται να ευθύνονται τα πλαστικά σωματίδια που σχετίζονται με την κυκλοφορία των μέσων μεταφοράς [24]. Η τοπική μετεωρολογική κατάσταση, η αστική τοπογραφία και τα φυσικά χαρακτηριστικά των πλαστικών σωματιδίων επηρεάζουν τη συμπεριφορά και την κατανομή των αερομεταφερόμενων μικροπλαστικών. Κατά κύριο λόγο τα αερομεταφερόμενα πλαστικά σωματίδια εισέρχονται στο σώμα μας μέσω της εισπνοής και μπορούν να προκαλέσουν πολλά προβλήματα στο αναπνευστικό σύστημα. Έτσι, η κατανόηση και η διερεύνηση αυτών των επιπτώσεων είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών για τη μείωση των επιπτώσεών τους στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον.

### 1.2.3 Τα προβλήματα που σχετίζονται με τη ρύπανση από τα πλαστικά και οι επιπτώσεις των πλαστικών και των μικροπλαστικών στο περιβάλλον και στον άνθρωπο.

Οι ολοένα και αυξανόμενες ανάγκες του καταναλωτικού κοινού για αγαθά, των οποίων οι συσκευασίες είναι φτιαγμένες από πλαστικά ή και τα ίδια τα αγαθά παράγονται από πλαστικά, καθώς και η μη ανακύκλωση τους, έχει οδηγήσει στην ανεξέλεγκτη απόρριψη υλικών και προϊόντων από πλαστικό. Τα πλαστικά αυτά αν δεν επαναχρησιμοποιούνται ή αποτεφρώνονται, θάβονται σε χώρους υγειονομικής ταφής ή στο φυσικό περιβάλλον. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η οικοτοξικότητα, λόγω της απελευθέρωσης πλαστικοποιητών, πρόσθετων και συμπολυμερών [12]. Η υψηλή ανθεκτικότητα πολλών συνθετικών πλαστικών έχει ως αποτέλεσμα τη μακροχρόνια παραμονή τους στο περιβάλλον κι έτσι η αυξανόμενη ποσότητα πλαστικών αποβλήτων που καταλήγουν σε χώρους υγειονομικής ταφής και στους ωκεανούς έχει γίνει παγκόσμιο πρόβλημα [16]. Η αντικατάσταση των πλαστικών δεν θα έχει απαραίτητα θετικό αντίκτυπο στο περιβάλλον, καθώς τα εναλλακτικά υλικά συσκευασίας, όπως τα γυάλινα ή μεταλλικά δοχεία, είναι πολύ βαρύτερα και αυξάνουν τις εκπομπές CO<sub>2</sub> κατά τη μεταφορά [23], [25].

Η πλαστική ρύπανση είναι η συσσώρευση συνθετικών πλαστικών προϊόντων στο περιβάλλον σε σημείο που να δημιουργούν προβλήματα στην άγρια ζωή, στο φυσικό περιβάλλον, καθώς και στους ανθρώπινους πληθυσμούς. Το 1907 η εφεύρεση του Βακελίτη έφερε επανάσταση στα

υλικά εισάγοντας στο παγκόσμιο εμπόριο πραγματικές συνθετικές πλαστικές ρητίνες. Μέχρι το τέλος του 20ού αιώνα, τα πλαστικά είχαν βρεθεί να είναι από τους πιο σημαντικούς ρυπαντές σε πολλά περιβάλλοντα πάνω στη γη, από το Έβερест μέχρι τον βυθό της θάλασσας. Φυσικά πολυμερή όπως το καουτσούκ και το μετάξι υπάρχουν σε αφθονία, αλλά τα "πλαστικά" της φύσης δεν έχουν ενοχοποιηθεί για τη ρύπανση του περιβάλλοντος, επειδή δεν παραμένουν στο περιβάλλον [26]. Σήμερα, ωστόσο, ο μέσος καταναλωτής έρχεται καθημερινά σε επαφή με κάθε είδους πλαστικά υλικά που έχουν αναπτυχθεί ειδικά για να νικήσουν τις φυσικές διαδικασίες αποσύνθεσης, υλικά που προέρχονται κυρίως από ορυκτά καύσιμα. Δεδομένου ότι τα συνθετικά πλαστικά είναι σε μεγάλο βαθμό μη βιοδιασπώμενα, τείνουν να παραμένουν στο φυσικό περιβάλλον, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, πολλά ελαφριά πλαστικά προϊόντα μιας χρήσης και υλικά συσκευασίας, τα οποία αντιπροσωπεύουν περίπου το 50% του συνόλου των πλαστικών που παράγονται, δεν εναποτίθενται σε κάδους για την επακόλουθη απομάκρυνσή τους σε χώρους υγειονομικής ταφής, κέντρα ανακύκλωσης ή αποτεφρωτήρες. Πολλοί καταναλωτές, απορρίπτουν τα πλαστικά τους απορρίμματα και, όχι μόνο, στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα παγκοσμίως να υπάρχουν μέρη με συσσωρευμένες πλαστικές συσκευασίες. Σε αυτό το αποτέλεσμα έχει συμβάλει και η υπερχείλιση των δομών περισυλλογής. Σε σύγκριση με τα υλικά που χρησιμοποιούνταν ευρέως στο πρώτο μισό του 20<sup>ου</sup> αιώνα, όπως το γυαλί, το χαρτί, ο σίδηρος και το αλουμίνιο, τα πλαστικά έχουν χαμηλό ποσοστό ανάκτησης. Δηλαδή, είναι σχετικά αναποτελεσματική η επαναχρησιμοποίησή τους ως ανακυκλωμένο θραύσμα στην παραγωγική διαδικασία, διότι αντιμετωπίζονται σημαντικές δυσκολίες κατά την επεξεργασία τους λόγω των χαρακτηριστικών τους, όπως το χαμηλό σημείο τήξης, το οποίο εμποδίζει την απομάκρυνση των ρύπων κατά τη θέρμανση και την επανεπεξεργασία. Τα ποσοστά ανακύκλωσης ποικίλλουν από χώρα σε χώρα, παραμένοντας όμως αρκετά χαμηλά και μόνο οι χώρες της Βόρειας Ευρώπης επιτυγχάνουν ποσοστά μεγαλύτερα από 50% [27].

Η διαδικασία αποικοδόμησης των πλαστικών αποβλήτων που προκαλούν σοβαρές περιβαλλοντικές ζημιές αναμένεται να είναι σημαντικά διαφορετική σε χώρους υγειονομικής ταφής, σε χερσαία και θαλάσσια περιβάλλοντα. Έχει αποδειχθεί ότι οι επικίνδυνες χημικές ουσίες που απελευθερώνονται από τα πλαστικά απόβλητα στους χώρους υγειονομικής ταφής μπορούν να μολύνουν το έδαφος [28]. Επιπλέον, μία ποσότητα πλαστικών αποβλήτων εισέρχεται και στο θαλάσσιο περιβάλλον. Υπολογίζεται ότι έως και 12 εκατομμύρια τόνοι πλαστικών που παράγονται από τις παράκτιες χώρες παγκοσμίως εισήλθαν στους ωκεανούς το 2010 και η ποσότητα αυτή αναμένεται να αυξάνεται σταθερά. Η ρύπανση από τα πλαστικά έχει θανατηφόρες επιπτώσεις στα θαλάσσια θηλαστικά είτε επειδή τα τρώνε είτε επειδή παγιδεύονται σε αυτά [16].

Τα αστικά στερεά απόβλητα υπολογίζονται κάτω από το 10-12% των πλαστικών υπολειμμάτων που καίγονται. Μετά τη διαδικασία καύσης, τα αέρια απελευθερώνονται στο περιβάλλον, γεγονός που αυξάνει την ατμοσφαιρική ρύπανση και προκαλεί φαινόμενα θερμοκηπίου. Οι ουσίες που απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα είναι φουράνια, υδράργυρος, διοξίνες και πολυχλωριωμένα διφαινύλια. Άμεσα μέτρα και εφαρμογές απαιτούνται για την αντιμετώπιση και τη σωστή διαχείρισή τους, τα οποία μπορούν να προστατεύσουν το περιβάλλον [17].

Τα μικροπλαστικά έχει αποδειχθεί ότι έχουν ακόμη σοβαρότερες επιπτώσεις στα θαλάσσια οικοσυστήματα, διότι εισέρχονται στις τροφικές αλυσίδες όταν προσλαμβάνονται από τα θαλάσσια ζώα [16], [29]. Το πρόβλημα με τα μικροπλαστικά είναι ότι, όπως και τα πλαστικά αντικείμενα κάθε μεγέθους, δεν διασπώνται εύκολα σε αβλαβή μόρια. Τα πλαστικά μπορεί να χρειαστούν εκατοντάδες ή χιλιάδες χρόνια για να αποσυντεθούν και στο μεταξύ, είναι καταστροφικά για το περιβάλλον. Στις παραλίες τα μικροπλαστικά είναι ορατά ως μικροσκοπικά πολύχρωμα πλαστικά κομμάτια στην άμμο, από την άλλη στους ωκεανούς συχνά καταναλώνονται από θαλάσσια ζώα. Ένα μέρος της περιβαλλοντικής ρύπανσης προέρχεται από τα απορρίμματα, αλλά ένα μεγάλο μέρος της οφείλεται στα φυσικά φαινόμενα, όπως είναι οι καταιγίδες και οι άνεμοι αλλά και οι αποχετεύσεις, τα οποία μεταφέρουν τα πλαστικά -τόσο τα άθικτα αντικείμενα όσο και τα μικροπλαστικά- στους ωκεανούς [30]. Τα πλαστικά μιας χρήσης αποτελούν την κύρια πηγή δευτερογενών πλαστικών στο περιβάλλον. Τα μικροπλαστικά έχουν ανιχνευθεί σε θαλάσσιους οργανισμούς από το πλαγκτόν έως τις φάλαινες, σε εμπορικά θαλασσινά, ακόμη και στο πόσιμο νερό [31]. Είναι ανησυχητικό ότι οι συνήθειες εγκαταστάσεις επεξεργασίας νερού δεν μπορούν να αφαιρέσουν όλα τα ίχνη μικροπλαστικών. Η ικανότητά τους να συνδέονται με τις επιβλαβείς χημικές ουσίες πριν καταποθούν από τους θαλάσσιους οργανισμούς, αυξάνει ακόμα περισσότερο την περιπλοκότητα που έχει η διαδικασία αφαίρεσής τους από τα ύδατα [23].

#### 1.2.4 Στρατηγικές διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων

Η παραγωγή των πλαστικών αποβλήτων είναι γρήγορη και η διάθεσή τους υψηλή λόγω της βιομηχανικής ανάπτυξης και της αύξησης του πληθυσμού στον κόσμο.

Τα πλαστικά απόβλητα παράγονται γρήγορα και εκτίθενται με υψηλό ρυθμό λόγω της βιομηχανικής ανάπτυξης και της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού. Τόσο τα βιοδιασπώμενα όσο και τα μη διασπώμενα απόβλητα παράγονται σε μεγάλο βαθμό από ανθρωπογενείς δραστηριότητες (βιομηχανική ανάπτυξη, κοινωνικοοικονομική ανάπτυξη) [32]. Οι κοινότητες και οι τοπικές αρχές έχουν θεσπίσει διάφορα μέτρα και περιβαλλοντικούς κανόνες της νομοθεσίας για την ασφάλεια, που μπορούν να καθοδηγήσουν τον πληθυσμό για την απόρριψη των πλαστικών αποβλήτων μετά τη χρήση τους. Αρκετές από αυτές τις στρατηγικές διαχείρισης αποβλήτων είναι επιστημονικά τεκμηριωμένες, όπως η ανακύκλωση, η αποτέφρωση, η πυρόλυση και οι χώροι υγειονομικής ταφής. Αυτές οι μέθοδοι έχουν καθιερωθεί για να υπάρχει καθαρό περιβάλλον και καλή διάθεση των πλαστικών αποβλήτων [17]. Το 2019, που η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών ανερχόταν στους 370 εκατομμύρια τόνους, μόνο το 9% ανακυκλώθηκε, το 12% αποτεφρώθηκε, ενώ το υπόλοιπο 79% απορρίφθηκε στο περιβάλλον ή σε χώρους υγειονομικής ταφής, μετά το τέλος της διάρκειας ζωής τους [33], [34].

#### ΧΥΤΑ

Το μεγαλύτερο ποσοστό των πλαστικών απορριμμάτων καταλήγει σε χωματερές. Ο χώρος υγειονομικής ταφής είναι ένα οικολογικό σύστημα, όπου οι εισροές είναι στερεά απόβλητα και

νερό, και οι έξοδοι είναι τα αέρια που παράγονται από την κοινή δράση βιολογικών, χημικών και φυσικών διεργασιών. Οι χώροι υγειονομικής ταφής αναφέρονται σε όλους τους χώρους και στις περιοχές όπου απορρίπτονται όλα τα πλαστικά απόβλητα μιας χρήσης, πριν θαφτούν κάτω από την επιφάνεια της γης [17], [35].

Ο τυπικός χώρος υγειονομικής ταφής αστικών στερεών αποβλήτων (ΑΣΑ) εκτελεί πέντε φάσεις επεξεργασίας αποβλήτων: (1) αρχική προσαρμογή (αερόβια βιοαποικοδόμηση), (2) μετάβαση (από αερόβιες σε αναερόβιες συνθήκες), (3) σχηματισμός οξέων (υδρόλυση), (4) ζύμωση μεθανίου (μεθανογένεση) και (5) τελικά ωρίμανση και σταθεροποίηση των στερεών αποβλήτων. Μετά την υγειονομική ταφή, τα πλαστικά υφίστανται αερόβια βιοαποικοδόμηση (σε αρχικό στάδιο), αλλά σύντομα γίνεται η μετάβαση σε αναερόβιες συνθήκες [36]. Τα περισσότερα πολυμερή και πλαστικά στους χώρους υγειονομικής ταφής παραμένουν αμετάβλητα ή μπορεί να αποικοδομηθούν μέσω κάποιας βιοτικής ή αβιοτικής διαδικασίας σε θραύσματα που είτε παραμένουν όπως παράγονται είτε βιοδιασπώνται σε αέρια προϊόντα και νερό. Τα αέρια προϊόντα είναι διοξείδιο του άνθρακα σε αερόβια περιβάλλοντα και ένα μείγμα διοξειδίου του άνθρακα, μεθανίου και πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) σε αναερόβια [35].

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απόρριψης, είναι απαραίτητο να εφαρμόζονται πολλά προληπτικά μέτρα για την αποφυγή δευτερογενών επιπτώσεων, όπως μόλυνση των υπόγειων υδάτων και υποβάθμιση του εδάφους που μπορεί να προκύψουν από κακή επεξεργασία. Οι στόχοι της διευθέτησης των χώρων υγειονομικής ταφής είναι η παροχή ενός ασφαλέστερου χώρου διάθεσης πλαστικών αποβλήτων για την προστασία του περιβάλλοντος, δηλαδή των υδάτων και του εναέριου χώρου. Απαιτεί να γίνει πολλή δουλειά στην εκάστοτε κοινότητα που διαθέτει τη χωματερή, όπως το σκάψιμο μιας μεγάλης τρύπας ή η απόρριψη σε μεγάλο βάθος, η τοποθέτηση των αποβλήτων σε αυτήν και η αναμονή μέχρι να αποσυντεθούν. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται πολύ αργά, καθώς μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από έναν χρόνο [37]. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των χώρων υγειονομικής ταφής, κάθε οργανικό μόριο περνάει από τη διαδικασία της βιοαποικοδόμησης και της αποσύνθεσης. Οι πλαστικές σακούλες και άλλα απόβλητα πολυμερών μεγάλου μήκους μπορούν να χρειαστούν περίπου δέκα έως εκατό χρόνια για να αποικοδομηθούν κατά την επεξεργασία σε χώρους υγειονομικής ταφής. Τα διάφορα πλαστικά απόβλητα μπορεί να χρειαστούν μεγάλο χρονικό διάστημα αποικοδόμησης λόγω των ειδικών βιοχημικών ιδιοτήτων τους και των περιβαλλοντικών ή κλιματικών συνθηκών όπως το ηλιακό φως, ο άνεμος και η αλλαγή του κλίματος [38]. Ως εκ τούτου, η πρώτη επιλογή για τη διαχείριση όλων των πλαστικών προϊόντων πρέπει να είναι η επαναχρησιμοποίηση ή η ανακύκλωση. Οι χώροι υγειονομικής ταφής αποτελούν μία εξαιρετική πηγή ενέργειας λόγω του διοξειδίου του άνθρακα και του παραγόμενου αέριου μεθανίου κατά τη διαδικασία της βιοαποικοδόμησης. Επιπλέον, πρόκειται για μια οικονομικά αποδοτική μέθοδο διαχείρισης πλαστικών αποβλήτων. Παρόλο που η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κατά κόρον για την επεξεργασία πλαστικών αποβλήτων, έχει κάποια μειονεκτήματα, όπως το ότι είναι εν μέρει υπεύθυνη για την κλιματική αλλαγή, μολύνει το έδαφος και το νερό και επηρεάζει την άγρια ζωή [17], [39].

### Καύση – Αποτέφρωση

Η μέθοδος αποτέφρωσης αποβλήτων αναφέρεται στην καύση των αποβλήτων με οξυγόνο, η οποία είναι χημικά γνωστή ως πλήρης καύση που απελευθερώνει μόρια νερού και διοξείδιο του άνθρακα στην ατμόσφαιρα. Τα απόβλητα που παράγονται μετά την αποτέφρωση αποτελούνται από διάφορες πτητικές χημικές ουσίες, τέφρα και μικρή ποσότητα υδροχλωρικού οξέος. Η καύση των οργανικών μορίων μπορεί να παράγει ενέργεια η οποία είναι γνωστή ως καύσιμο. Τα καύσιμα μπορούν να παρουσιαστούν σε διαφορετικές φυσικές καταστάσεις όπως υγρή, στερεή και αέρια που χρησιμοποιούνται από οχήματα και αεροπλάνα [17].

Αυτή η μέθοδος έχει αρκετά πλεονεκτήματα, εκτός από την παραγωγή ενέργειας. Έχει τεράστια συμβολή στην ελαχιστοποίηση των αποβλήτων και την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας από τα απόβλητα, η οποία είναι άκρως απαραίτητη στη σύγχρονη βιομηχανία. Η αποτέφρωση των αποβλήτων έχει παίξει κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή ανανεώσιμης ενέργειας από πόρους βιομάζας. Η αποτέφρωση, συμπεριλαμβανομένης της ανάκτησης θερμότητας, χρησιμοποιήθηκε σε όλο τον κόσμο και περισσότερες από τετρακόσιες πενήντα φορές στην Ευρώπη. Παρά τη μείωση των αποβλήτων που παράγονται από διάφορα εργοστάσια, κάθε άτομο στην Ευρωπαϊκή Ένωση παράγει γενικά 481 kg αστικών αποβλήτων. Συνολικά, το 26% των αποβλήτων ανακυκλώθηκε, το 15% κομποστοποιήθηκε, το 31% απορρίφθηκε σε χώρους υγειονομικής ταφής και το 26% αποτεφρώθηκε. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν πως η ευρωπαϊκή κυβέρνηση έχει προχωρήσει στη συχνότερη χρήση των μεθόδων ανακύκλωσης και αποτέφρωσης στην επεξεργασία αποβλήτων σε σύγκριση με την περίοδο μεταξύ 1995 και 2013, όπου τα αποτεφρωμένα και ανακυκλωμένα απόβλητα ήταν 18% και 43% αντίστοιχα. Κάποια από τα οφέλη της αποτέφρωσης είναι τα εξής: η μείωση της ποσότητας των αποβλήτων στο οικοσύστημα, η παραγωγή θερμότητας και ενέργειας που απαιτούνται σε διάφορες δραστηριότητες, η μείωση της ρύπανσης της ατμόσφαιρας και η εξοικονόμηση χρημάτων όσον αφορά στους φόρους μεταφοράς των αποβλήτων. Επιπλέον, μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε εποχή ή καιρικές συνθήκες και αποτρέπει την παραγωγή αέριου μεθανίου [17]. Οι εξελιγμένοι αποτεφρωτήρες που καίνε πλαστικό και άλλα αστικά απόβλητα μπορούν να παράγουν αρκετή θερμότητα και ατμό για να παράγουν ηλεκτρική ενέργεια για το τοπικό δίκτυο. Η Ευρωπαϊκή Ένωση, η οποία περιορίζει την υγειονομική ταφή των οργανικών αποβλήτων, καίει ήδη σχεδόν το 42% των απορριμμάτων της- οι ΗΠΑ καίνε το 12,5%. Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Συμβούλιο Ενέργειας, ένα διαπιστευμένο από τον ΟΗΕ δίκτυο, που εκπροσωπεί μια σειρά ενεργειακών πηγών και τεχνολογιών, ο τομέας της παραγωγής ενέργειας από απορρίμματα είναι πιθανό να γνωρίσει σταθερή ανάπτυξη τα επόμενα χρόνια, ιδίως στην περιοχή της Ασίας και του Ειρηνικού. Στην Κίνα λειτουργούν ήδη περίπου 300 μονάδες παραγωγής ενέργειας από απορρίμματα, ενώ εκατοντάδες βρίσκονται υπό κατασκευή [40].

Προφανώς η αποτέφρωση ως χημική διεργασία έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα όπως όλες οι διεργασίες άλλωστε. Ορισμένα από τα μειονεκτήματα της διαδικασίας αποτέφρωσης περιλαμβάνουν την ακριβή εγκατάσταση σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους διαχείρισης αποβλήτων και την απελευθέρωση τέφρας, η οποία μπορεί να βλάψει τους ανθρώπους και το περιβάλλον [17]. Μία λύση για τη μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης που προκαλούν τα επιβλαβή καυσαέρια που απελευθερώνονται κατά την καύση των πλαστικών είναι η προσθήκη,

στην εγκατάσταση της αποτέφρωσης, εξοπλισμού φιλτραρίσματος καυσαερίων και παρακολούθησης των εκπεμπόμενων αερίων καύσης [41]. Έρευνες έχουν δείξει ότι ναι μεν η αποτέφρωση μπορεί να εξαλείψει οριστικά τα πλαστικά απόβλητα, αλλά στην τέφρα του πυθμένα των αποτεφρωτήρων, ένα στερεό υπόλειμμα, παραμένει άκαυστο υλικό. Σε αυτή την τέφρα παράγονται εκατοντάδες έως και χιλιάδες μικροπλαστικά σωματίδια, τα οποία απελευθερώνονται στο περιβάλλον και το μολύνουν [42].

### Ανακύκλωση

Είναι απαραίτητο να γίνεται προσπάθεια μείωσης όλων εκείνων των δραστηριοτήτων που προκαλούν κάποια περιβαλλοντική ζημιά. Γι' αυτόν τον λόγο θα πρέπει να δοθεί μεγαλύτερη έμφαση στην ανακύκλωση, ως μια φιλική προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο λύση για την αυξημένη ποσότητα πλαστικών απορριμμάτων [41].

Η ανακύκλωση αναφέρεται στη μέθοδο διαχείρισης αποβλήτων που συλλέγει απόβλητα και τα μετατρέπει σε πρώτες ύλες που μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία άλλων προϊόντων [43]. Είναι επίσης γνωστή ως «ανανέωση ή επαναχρησιμοποίηση» για την αποτροπή των βλαβερών επιπτώσεων στην κοινωνία και την προστασία του περιβάλλοντος [17].

Τα πλαστικά είναι μη βιοδιασπώμενα. Έχουν τη δυνατότητα όταν λιώνουν να μετατρέπονται σε άλλα προϊόντα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στα ακόλουθα έξι στάδια: συλλογή των πλαστικών απορριμμάτων, διαλογή ή ταξινόμηση των πλαστικών σε κατηγορίες, πλύσιμο, τεμαχισμός και αλλαγή μεγέθους, αναγνώριση και διαχωρισμός των πλαστικών και ανάμιξη [17].

Υπάρχουν διάφορα οφέλη από την ανακύκλωση πλαστικών αποβλήτων. Ένα από τα πλεονεκτήματα είναι η προστασία της ανθρώπινης ζωής μέσω της μείωσης της εκπομπής του διοξειδίου του άνθρακα και άλλων βλαβερών αερίων στην ατμόσφαιρα, τα οποία μπορεί να προκύψουν κατά την αποτέφρωση ή την καύση των αποβλήτων [43]. Η ανακύκλωση μειώνει τη ρύπανση σε όλο το οικοσύστημα, απαιτεί λιγότερη ενέργεια και συμβάλλει στη διατήρηση της ισορροπίας της φύσης. Επιπρόσθετα, εξοικονομεί τον ταχέως εξαντλούμενο χώρο των ΧΥΤΑ και αυξάνει τη ζήτηση για κατανάλωση ορυκτών καυσίμων. Επιπλέον, προωθεί έναν βιώσιμο τρόπο ζωής [17].

Αν και η ανακύκλωση έχει διάφορα οφέλη για την παγκόσμια κοινότητα έχει και ορισμένα μειονεκτήματα, τα οποία όμως είναι ελεγχόμενα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ανακύκλωσης, ορισμένες χημικές ουσίες απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Καθώς η διαδικασία απαιτεί θερμότητα για την τήξη των πλαστικών, παράγει θείο, άνθρακα και άλλα αέρια που εκπέμπονται στο περιβάλλον. Αυτά τα αέρια μπορούν να προκαλέσουν υπερθέρμανση του πλανήτη, φαινόμενο του θερμοκηπίου και όξινη βροχή, φαινόμενα τα οποία βλάπτουν σημαντικά το περιβάλλον με διάφορους τρόπους. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα υγείας για τον πληθυσμό που διασχίζει τη ζώνη ανακύκλωσης πλαστικών [17], [44].

Μετά τη διαδικασία ανακύκλωσης των πλαστικών, τα απόβλητα διαχωρίζονται για να συνεχίσουν σε δεύτερο κύκλο ανακύκλωσης. Τα περισσότερα πλαστικά απόβλητα δεν

επιδέχονται δεύτερο κύκλο ανακύκλωσης. Αυτό σημαίνει ότι καταλήγουν σε χώρους υγειονομικής ταφής [17].

Η παραγωγή πλαστικού αναμένεται να διπλασιαστεί τα επόμενα 20 χρόνια, σύμφωνα με έκθεση που εξέδωσε το Παγκόσμιο Οικονομικό Φόρουμ. Τα ποσοστά ανακύκλωσης πλαστικών, εν τω μεταξύ, κυμαίνονται γύρω στο 30% στην Ευρώπη, μόλις στο 9% στις ΗΠΑ και είναι μηδενικά ή σχεδόν μηδενικά σε μεγάλο μέρος του αναπτυσσόμενου κόσμου [40]. Όσον αφορά στην τρέχουσα νομοθετική ενθάρρυνση για την ανακύκλωση, μια νομικά δεσμευτική οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) αναφέρει ότι οι πλαστικές συσκευασίες πρέπει να είναι ανακυκλώσιμες με οικονομικά αποδοτικό τρόπο ή επαναχρησιμοποιήσιμες έως το 2030 και στοχεύει να καταστήσει την ανακύκλωση κερδοφόρα για τις επιχειρήσεις. Τέτοιες νομικές κινητήριες δυνάμεις θα ωθήσουν τους κυβερνητικούς φορείς καθώς και τη βιομηχανία να ασχοληθούν με την ανακύκλωση πλαστικού, ιδανικά με τρόπο που να είναι κυκλικός. Πολλές πρωτοβουλίες βρίσκονται σε εξέλιξη, συμπεριλαμβανομένων των εθνικών και ευρωπαϊκών συμφώνων για τα πλαστικά, της Συμμαχίας για το τέλος των πλαστικών αποβλήτων και της Πλαστικής Οικονομίας του ιδρύματος Ellen MacArthur [3], που ζητούν μείωση της χρήσης πλαστικών, αυξημένη επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση για την αντιμετώπιση των παγκόσμιων προκλήσεων και τη μετάβαση στην κυκλική οικονομία των πλαστικών [25].

Η ανακύκλωση κατηγοριοποιείται στις παρακάτω κατηγορίες. Η μηχανική ανακύκλωση είναι η πιο κοινή μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανακύκλωση πλαστικών όπως το PET και το HDPE. Το PET και το HDPE χρησιμοποιούνται συνήθως για την κατασκευή μπουκαλιών ή δοχείων αναψυκτικών και είναι σχετικά εύκολο να ανακυκλωθούν. Η μηχανική ανακύκλωση αναφέρεται στην επεξεργασία των πλαστικών απορριμμάτων σε δευτερογενή πρώτη ύλη ή προϊόντα χωρίς σημαντική αλλαγή της χημικής δομής του υλικού. Κατ' αρχάς, όλοι οι τύποι θερμοπλαστικών μπορούν να ανακυκλωθούν μηχανικά με ελάχιστη ή καθόλου επίδραση στην ποιότητα. Η μηχανική ανακύκλωση αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή ανακύκλωσης και αντιπροσωπεύει την πλειονότητα της δραστηριότητας στην Ευρώπη [45].

Η χημική ανακύκλωση είναι μια αναπτυσσόμενη μέθοδος ανακύκλωσης και προσφέρει μεγαλύτερες ευκαιρίες για επεκτασιμότητα. Η χημική ανακύκλωση καλύπτει ένα σύνολο τεχνολογιών (πυρόλυση, αεριοποίηση, υδροπυρόλυση, αποπολυμερισμός) που αλλάζουν τη χημική δομή των πλαστικών απορριμμάτων. Οι μεγάλες αλυσίδες υδρογονανθράκων, από τις οποίες αποτελούνται τα πλαστικά, διασπώνται σε μικρότερα κλάσματα υδρογονανθράκων ή μονομερή χρησιμοποιώντας χημικές, θερμικές ή καταλυτικές διαδικασίες. Αυτά τα μικρότερα μόρια είναι έτοιμα να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για νέες χημικές αντιδράσεις για την παραγωγή νέων ανακυκλωμένων πλαστικών και άλλων χημικών ουσιών. Είναι μια συμπληρωματική τεχνολογία με σημαντικές δυνατότητες [45].

Η ανακύκλωση διάλυσης είναι μια διαδικασία καθαρισμού μέσω της οποίας το πολυμερές που υπάρχει σε ένα μικτό απόβλητο πλαστικού διαλύεται επιλεκτικά σε έναν διαλύτη, επιτρέποντάς του να διαχωριστεί από τα απόβλητα και να ανακτηθεί σε καθαρή μορφή χωρίς να αλλάξει η χημική του φύση. Υπάρχουν ήδη αρκετά βιομηχανικά παραδείγματα τέτοιας τεχνολογίας και



ισχύουν για διαφορετικά πολυμερή, όπως το PVC, το PS, το νάιλον ή το PP, για τον διαχωρισμό τους από τα μικτά απόβλητα πολλαπλών υλικών [45].

Ως οργανική ανακύκλωση ορίζεται η ελεγχόμενη μικροβιολογική επεξεργασία βιοαποδομήσιμων πλαστικών απορριμμάτων υπό αερόβιες συνθήκες (κομποστοποίηση) ή αναερόβιες συνθήκες (βιοαερίωση). Ισχύει για συγκεκριμένα πολυμερή που μπορούν να μετατραπούν, υπό τη δράση μικροοργανισμών, σε σταθεροποιημένα οργανικά υπολείμματα, διοξείδιο του άνθρακα, μεθάνιο και νερό [45].

### Πυρόλυση

Η πυρόλυση αναφέρεται στη διαδικασία μετατροπής αερίων και λιπαρών ελαίων για την ανάκτηση ακατέργαστων πετροχημικών και λήψη υδρογονανθράκων. Χρησιμοποιείται ακόμη και για την ανάκτηση ακατέργαστων πετροχημικών και την παραγωγή ανανεώσιμης ενέργειας από πλαστικά απόβλητα [46]. Πιο αναλυτικά, κατά την πυρόλυση τα πλαστικά τεμαχίζονται και λιώνουν. Η θερμότητα διασπά τα πλαστικά πολυμερή σε μικρότερους υδρογονάνθρακες, οι οποίοι μπορούν να μετατραπούν σε καύσιμο ντίζελ και ακόμη και σε άλλα πετροχημικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων νέων πλαστικών. Επτά σχετικά μικρές μονάδες πυρόλυσης λειτουργούν σήμερα στις ΗΠΑ, ορισμένες ακόμη σε φάση δοκιμής και η τεχνολογία φαίνεται να επεκτείνεται παγκοσμίως, με εγκαταστάσεις στην Ευρώπη, την Κίνα, την Ινδία, την Ινδονησία και τις Φιλιππίνες. Το Αμερικανικό Συμβούλιο Χημείας εκτιμά ότι οι ΗΠΑ θα μπορούσαν να συντηρήσουν 600 μονάδες πυρόλυσης που διαχειρίζονται 30 τόνους πλαστικών την ημέρα, δηλαδή συνολικά περίπου 6,5 εκατομμύρια τόνους ετησίως - κάτι λιγότερο από το ένα πέμπτο των 34,5 εκατομμυρίων τόνων πλαστικών απορριμμάτων που παράγει σήμερα η χώρα. Η πυρόλυση μπορεί να διαχειριστεί τις μεμβράνες, τις σακούλες και τα πολυστρωματικά υλικά που οι περισσότεροι μηχανικοί ανακυκλωτές δεν μπορούν και επιπλέον δεν παράγει επιβλαβείς ρύπους, εκτός από μία ελάχιστη ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα [40].

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, μόνο το βιογενές κλάσμα των αστικών στερεών αποβλήτων θεωρείται ανανεώσιμο. Όμως, ανεξάρτητα από τον τρόπο με τον οποίο η ΕΕ μετρά τον άνθρακα, η καύση των πλαστικών για καύσιμο στους αποτεφρωτήρες, μαζί με τα υπόλοιπα απόβλητα, φαίνεται να αντιβαίνει στην υιοθέτηση, το 2015, από την Ευρωπαϊκή Ένωση των στόχων της "κυκλικής οικονομίας", οι οποίοι αποσκοπούν στη διατήρηση των πόρων σε χρήση για όσο το δυνατόν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και απαιτούν όλες οι πλαστικές συσκευασίες να είναι επαναχρησιμοποιήσιμες, ανακυκλώσιμες ή κομποστοποιήσιμες έως το 2030. Η διαδικασία παραγωγής πλαστικών από ορυκτά καύσιμα που εξάγονται από το έδαφος, και στη συνέχεια η καύση αυτών των πλαστικών για ενέργεια είναι σαφές ότι δεν πρόκειται για κύκλο. Αλλά η πυρόλυση μπορεί να θεωρηθεί μέρος της κυκλικής οικονομίας εάν τα προϊόντα της χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη για νέα υλικά υψηλής ποιότητας, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών πλαστικών [40].

## 1.3 Βιοαποικοδόμηση πλαστικών

### 1.3.3 Ο όρος «βιοαποικοδόμηση» και περιγραφή της διαδικασίας

Δεδομένου ότι τα πολυμερικά υλικά δεν αποσυντίθενται εύκολα και λαμβάνοντας υπόψη την αφθονία τους στο περιβάλλον, η συσσώρευση πλαστικών σε χώρους υγειονομικής ταφής και ωκεανούς αυξάνεται, εδώ και δεκαετίες, συνεχώς. Τα περισσότερα από τα πλαστικά απόβλητα εισέρχονται στο νερό το οποίο καταναλώνεται από τη θαλάσσια πανίδα, κι έτσι καταστρέφεται ο βιότοπός τους [47]. Το υψίστης σημασίας περιβαλλοντικό αυτό πρόβλημα προσπαθεί να λύσει ή για αρχή να μειώσει η επιστημονική κοινότητα και πιο συγκεκριμένα ο κλάδος της βιοτεχνολογίας ανακαλύπτοντας και εφαρμόζοντας καινοτόμες μεθόδους. Μία από αυτές είναι η βιοαποικοδόμηση των πλαστικών με χρήση ενζύμων [12].

Η βιοαποικοδόμηση αναφέρεται στη διαδικασία διάσπασης της οργανικής ύλης ή ουσιών σε μικρότερες και απλούστερες ουσίες μέσω της δράσης ζώντων μικροοργανισμών. Είναι μία διαδικασία που συμβαίνει με τη βοήθεια μικροοργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες και μαγιά. Αυτοί οι μικροοργανισμοί παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κατάλυση της διαδικασίας της βιοαποικοδόμησης [48], [49]. Πιο αναλυτικά, είναι η μετατροπή βιοχημικών ουσιών σε ενώσεις από μικροοργανισμούς. Τα πολυμερή και ιδιαίτερα τα πλαστικά είναι δυνητικά υποστρώματα για τους ετερότροφους μικροοργανισμούς [50]. Κατά τη διάρκεια της βιοαποικοδόμησης των πλαστικών η παρουσία των μικροοργανισμών στην επιφάνεια του πλαστικού οδηγεί στη μείωση του μοριακού βάρους των πλαστικών και έπειτα, το πολυμερές μετατρέπεται στα μονομερή του, στη συνέχεια τα μονομερή διασπώνται σε διοξείδιο του άνθρακα, νερό και μεθάνιο, διαδικασία η οποία είναι γνωστή ως ανοργανοποίηση. Ορισμένα πολυμερή είναι πολύ μεγάλα και είναι δύσκολη η διέλευση από την κυτταρική μεμβράνη, επομένως πρώτα αποπολυμερίζονται σε μικρότερα μονομερή και στη συνέχεια μπορούν να απορροφηθούν από τους μικροοργανισμούς [47]. Ο ορισμός κατά IUPAC χαρακτηρίζει τη βιοαποικοδόμηση ως τη «διάσπαση μιας ουσίας που καταλύεται από ένζυμα *in vitro* ή *in vivo*» [51].

Για τους σκοπούς της αξιολόγησης της επικινδυνότητας, η βιοαποικοδόμηση μπορεί να διακριθεί σε 1) πρωτογενή, η οποία περιλαμβάνει τη μεταβολή της χημικής δομής μιας ουσίας με αποτέλεσμα την απώλεια μιας συγκεκριμένης ιδιότητας, 2) περιβαλλοντικά αποδεκτή, που αναφέρεται σε βιοαποικοδόμηση στο βαθμό που αφαιρούνται οι ανεπιθύμητες ιδιότητες της ένωσης. Αυτό συχνά αντιστοιχεί στην πρωτογενή βιοαποικοδόμηση, αλλά εξαρτάται από τις συνθήκες υπό τις οποίες τα προϊόντα απορρίπτονται στο περιβάλλον και 3) τελική ή απόλυτη, η οποία περιλαμβάνει την πλήρη διάσπαση της ένωσης σε πλήρως οξειδωμένα ή ανηγμένα απλά μόρια (όπως διοξείδιο του άνθρακα/μεθάνιο, νιτρικό/αμμώνιο και νερό). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα προϊόντα βιοαποδόμησης μπορεί να είναι πιο επιβλαβή από την ουσία που αποικοδομείται. Η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία (αερόβια) ή απουσία (αναερόβια) οξυγόνου [52].

Μικροοργανισμοί όπως βακτήρια και μύκητες συμμετέχουν στην αποικοδόμηση τόσο των φυσικών όσο και των συνθετικών πλαστικών. Υπάρχουν πολλοί τρόποι αποικοδόμησης των

πλαστικών, ένας τρόπος είναι η ενζυμική η οποία περιλαμβάνει δύο στάδια: προσρόφιση ενζύμων στην επιφάνεια του πολυμερούς, ακολουθούμενη από υδροϋπεροξειδωση / υδρόλυση των δεσμών [53]. Κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης, τα εξωκυτταρικά ένζυμα που εκκρίνουν οι μικροοργανισμοί για τη βιοαποικοδόμηση αποικοδομούν το πολυμερές σε μικρότερα μόρια, π.χ. ολιγομερή, διμερή και μονομερή. Τα ένζυμα που εκκρίνονται από μικροοργανισμούς για τη βιοαποικοδόμηση των πλαστικών είναι κυρίως λιπάσες, πρωτεϊνάσες κ, αφυδρογονάσες κ.ά. [47].

Μία μέθοδος διαλογής των μικροοργανισμών για να αποφανθεί ποιοι από αυτούς έχουν την ικανότητα να διασπούν πλαστικά είναι ο σχηματισμός ζωνών διαύγασης κατά τον οποίο ένα πολυμερές διεισδύει ως λεπτά σωματίδια μέσα στο συνθετικό μέσο άγαρ. Η τεχνική με τα τρυβλία άγαρ (agar plates) που περιέχουν γαλακτώματα εμπορικών πολυμερών είναι αυτή που χρησιμοποιείται κυρίως για τη διαλογή, κατά την οποία όταν τα τρυβλία με το άγαρ έρχονται σε επαφή με τον εκάστοτε μικροοργανισμό θα υπάρχει σχηματισμός ζωνών διαύγασης γύρω από τα πλαστικά. Οι μικροοργανισμοί εκκρίνουν εξωκυτταρικά ένζυμα τα οποία διαχέονται μέσω του άγαρ και αποικοδομούν τα πλαστικά σε υδατοδιαλυτά διαλύματα. Τα πολυμερή πολυ(3-υδροξυβουτυρικό οξύ) (PHB) και πολυκαπρολακτόνη (PCL), για παράδειγμα αποικοδομούνται με αυτή τη μέθοδο. Το ένζυμο που αποικοδομεί το PHB εκφράζεται από θετικά κατά gram και αρνητικά κατά gram βακτήρια *streptomyces* και μύκητες. Το PHB, το PCL, το ηλεκτρικό πολυβουτυλένιο (PBS) μπορούν να αποικοδομηθούν από 39 βακτηριακά στελέχη της κατηγορίας *Firmicutes* και *Proteobacteria* [6].

### 1.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή αποικοδόμηση των πλαστικών

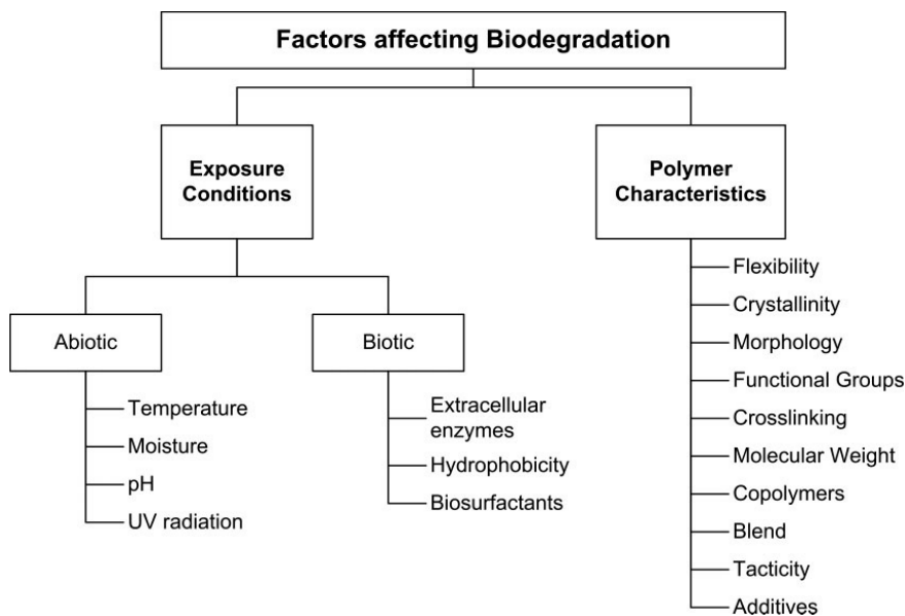
Η αποικοδόμηση των πλαστικών διαφοροποιείται και επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες που περιλαμβάνουν χαρακτηριστικά των πλαστικών, όπως την κινητικότητα, την κρυσταλλικότητα, το μοριακό βάρος, το σχήμα και το μέγεθος, τη χημική δομή, το είδος των λειτουργικών ομάδων και τις πρόσθετες ουσίες που προστίθενται στα πολυμερή [47], [53].

Τα πολυμερή είναι μεγάλα μόρια που έχουν τόσο κρυσταλλική περιοχή όσο και άμορφες περιοχές, όπου οι τελευταίες παρέχουν στα πολυμερή ευελιξία. Τα πολυμερή υψηλής κρυσταλλικότητας, όπως το PE (95%), είναι άκαμπτα με χαμηλή ικανότητα να αντιστέκονται στις κρούσεις. Τα πλαστικά με βάση το PET διαθέτουν υψηλό βαθμό κρυσταλλικότητας (30-50%), ο οποίος είναι ένας από τους κύριους λόγους για τον χαμηλό ρυθμό μικροβιακής αποικοδόμησής τους, μέσω του οποίου προβλέπεται ότι θα χρειαστούν περισσότερα από 50 χρόνια για την πλήρη αποικοδόμησή τους στο φυσικό περιβάλλον και εκατοντάδες χρόνια αν απορριφθούν στους ωκεανούς, λόγω της χαμηλότερης θερμοκρασίας και της διαθεσιμότητας οξυγόνου [53].

Η ποικιλομορφία των μικροοργανισμών που αποικοδομούν το πλαστικό ποικίλλει ανάλογα με πολλούς παράγοντες, όπως οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η θερμοκρασία, το pH, η υπεριώδης ακτινοβολία, κ.λπ. Η περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό είναι απαραίτητη για την

ενεργοποίηση των μικροβίων [54]. Οι άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποικοδόμηση είναι η θερμοκρασία, το pH και η υπεριώδης ακτινοβολία. Η ικανότητα αποικοδόμησης των ενζύμων μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Έτσι, τα πολυμερή που έχουν υψηλό σημείο τήξης έχουν λιγότερες πιθανότητες να αποικοδομηθούν. Ο ρυθμός της υδρολυτικής αντίδρασης επηρεάζεται από τη μεταβολή του pH. Η μεταβολή του pH επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροβίων και επηρεάζει τον ρυθμό αποικοδόμησης [47].

Κατά την έκθεση των πλαστικών στο περιβάλλον, αβιοτικοί και βιοτικοί παράγοντες οδηγούν στη διάσπασή τους, ο ρυθμός της οποίας επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από κάποια χαρακτηριστικά των πλαστικών, όπως η υδροφοβικότητα, η πολυπλοκότητα της δομής και η σύνθεσή τους. Μελέτες, βασισμένες στους παραπάνω παράγοντες προβλέπουν ότι ο χρόνος ημιζωής των πολυμερών μπορεί να κυμαίνεται από μήνες έως εκατομμύρια χρόνια [55]. Η φυσική μακροχρόνια διαδικασία αποικοδόμησης των πλαστικών είναι η εξής: ξεκινάει η βιοδιάσπαση του πολυμερούς, μέσω της οποίας απελευθερώνονται μικρότερες μονάδες, οι οποίες εν συνεχεία χρησιμοποιούνται από διάφορους μικροοργανισμούς ως πηγή ενέργειας ή αζώτου. Αυτού του είδους οι μικροοργανισμοί περιλαμβάνουν αρκετά βακτήρια, μικροφύκη αλλά και πολυάριθμους μύκητες που, μέσω του ενζυμικού μηχανισμού τους, αποικοδομούν τη φυτική βιομάζα [12]. Στην *Εικόνα 3* παρουσιάζονται ονομαστικά οι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοαποικοδόμηση.



*Εικόνα 3: Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοαποικοδόμηση [56].*

### 1.3.3 Στάδια της διαδικασίας βιοαποικοδόμησης των πλαστικών

Ο όρος «βιοαποικοδόμηση» μπορεί να είναι παραπλανητικός, καθώς όλα τα πλαστικά, συμπεριλαμβανομένων των συμβατικών, θα υποστούν τελικά βιοαποικοδόμηση. Ωστόσο, το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη διαδικασία αυτή είναι ένας κρίσιμος παράγοντας, ο οποίος κυμαίνεται από λίγες ημέρες έως χιλιάδες χρόνια. Ιδανικά, θα πρέπει να συμβαίνει με φυσικό τρόπο, χωρίς ανθρώπινη παρέμβαση. Η διαδικασία της βιοαποικοδόμησης των πολυμερών κατηγοριοποιείται σε τέσσερα στάδια: βιο-φθορά, βιο-κατακερματισμός, αφομοίωση και ανοργανοποίηση (Εικόνα 4). Η διαδικασία μπορεί να σταματήσει σε οποιοδήποτε στάδιο, ωστόσο η βιοαποικοδόμηση των πλαστικών επιβεβαιώνεται μόνο μετά την ολοκλήρωση της ανοργανοποίησης [52].

1. Βιο-φθορά: Η πρώτη ένδειξη της έναρξης της βιοαποικοδόμησης είναι η βιο-φθορά, κατά την οποία η συνεργατική δράση διαφόρων μικροοργανισμών ή/και αβιοτικών παραγόντων (καιρικές συνθήκες, υπεριώδης ακτινοβολία UV, θερμοκρασία, ατμοσφαιρικοί ρύποι, ατμοσφαιρικό οξυγόνο) κατακερματίζει τα μακροϋλικά σε μικρά θραύσματα [53]. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται στην επιφάνεια και στο εσωτερικό του πλαστικού, δημιουργώντας ένα μικροβιακό φιλμ. Η βιο-φθορά είναι μια επιφανειακή υποβάθμιση που μπορεί να εντοπιστεί με γυμνό μάτι και είναι υπεύθυνη για την τροποποίηση των μηχανικών, φυσικών και χημικών ιδιοτήτων του υλικού [57]. Η μεγάλη διαφορά μεταξύ της βιοαποικοδόμησης και της βιο-φθοράς είναι ότι η πρώτη επιβεβαιώνεται μόνο με τη βιο-φθορά, ενώ η δεύτερη παρατηρείται ήδη από την απώλεια βάρους και τις παραμορφώσεις (ρωγμές, τραχύτητα, γρατζουνιές, οπές,) οι οποίες δημιουργούνται από τις νηματοειδείς δομές, που σχηματίζουν οι αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί, οι οποίες εισχωρούν στους πόρους του πολυμερούς και τους διευρύνουν [52].
2. Βιο-κατακερματισμός: Το δεύτερο στάδιο είναι ο βιο-κατακερματισμός ή βιοδιάσπαση, ένα στάδιο κατά το οποίο καταλυτικοί παράγοντες (π.χ. ένζυμα) παράγονται από τους μικροοργανισμούς, μειώνοντας σταδιακά το μοριακό βάρος των πολυμερών. Τη στιγμή εκείνη, τα πολυμερή διασπώνται μέχρι την παραγωγή μικρών μορίων (διμερή και μονομερή), μέσω ενζυμικής υδρόλυσης ή/και οξείδωσης και απελευθερώνονται ενδιάμεσα προϊόντα [53]. Ο όρος βιοκατακερματισμός ή, σε ορισμένες περιπτώσεις ο αποπολυμερισμός, θα πρέπει να χρησιμοποιείται για καταστάσεις όπου η μείωση του μεγέθους των μακρομορίων πραγματοποιείται χωρίς αλλαγή της χημικής σύνθεσης ή της δομής της μονάδας του μονομερούς [52].
3. Αφομοίωση: Η αφομοίωση είναι το τρίτο στάδιο και λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα όταν τα μικρά μόρια (ολιγομερή και μονομερή), που παράγονται κατά τον βιο-κατακερματισμό, προσλαμβάνονται και μεταβολίζονται από βακτήρια ή μύκητες, δηλαδή από τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται πάνω στο πλαστικό [53]. Επομένως, η αφομοίωση συμβαίνει όταν οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα πολυμερή ως πηγές άνθρακα/αζώτου, μετατρέποντας CO<sub>2</sub> ή CH<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub> ή νιτρικά σε δομικά στοιχεία των κυττάρων. Αυτή η διαδικασία μπορεί να συμβεί μέσω των τριών κλασικών καταβολικών

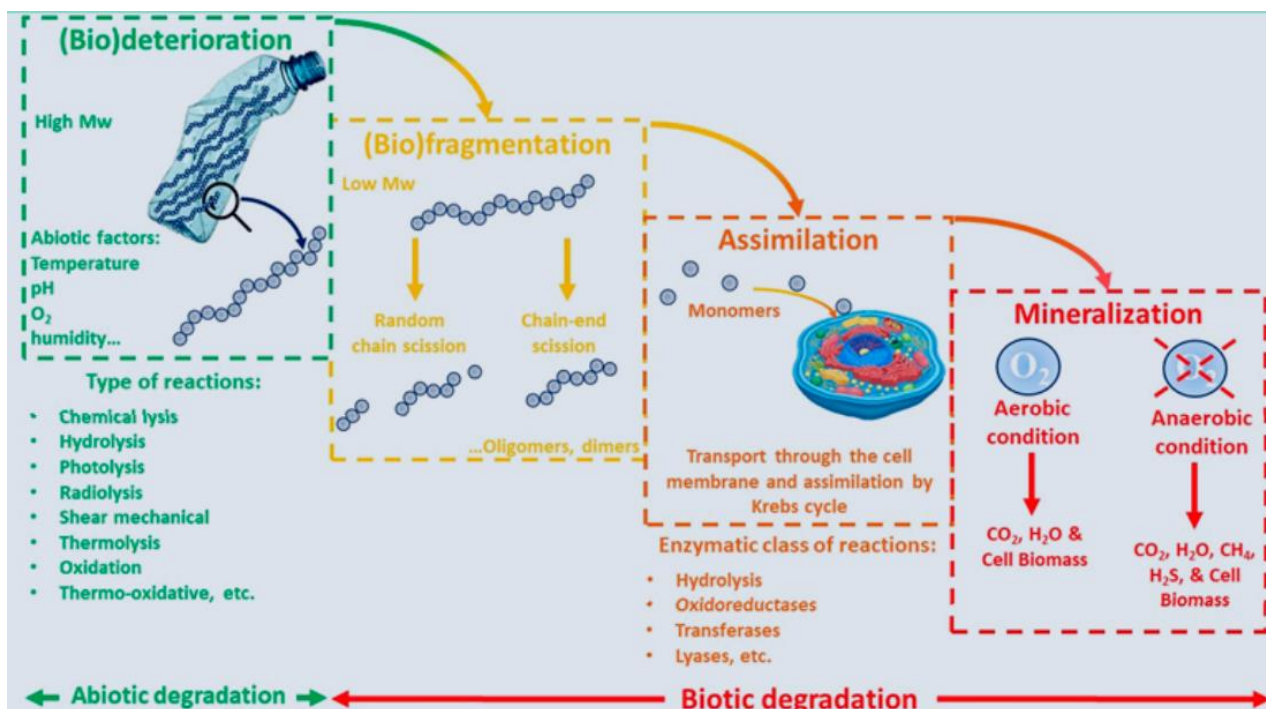
οδών: αερόβια αναπνοή, αναερόβια αναπνοή και/ή ζύμωση, η οποία είναι η μόνη περίπτωση κατά την οποία θραύσματα πολυμερικών υλικών απορροφώνται στο εσωτερικό των μικροβιακών κυττάρων. Η απορρόφηση αυτή είναι υπεύθυνη για την παραγωγή ενέργειας, μέσω της παραγωγής τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), με στόχο το σχηματισμό δομικών στοιχείων των κυττάρων. Αυτό επιτρέπει στους μικροοργανισμούς να αναπτύσσονται, να πολλαπλασιάζονται και να καταναλώνουν νέα ενεργειακά υποστρώματα από το περιβάλλον [52].

4. **Ανοργανοποίηση:** Το τελικό στάδιο, η ανοργανοποίηση, λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα με την αφομοίωση, κατά τη διάρκεια της οποίας το οργανικό υλικό μετατρέπεται σε ανόργανα συστατικά μέσω της απέκκρισης μεταβολιτών και απλών μορίων που μπορούν να απορροφηθούν τόσο από το περιβάλλον όσο και από τους μικροοργανισμούς. Πιο αναλυτικά η ανοργανοποίηση αναφέρεται στη μεταφορά των προϊόντων υδρόλυσης εντός του κυτταρικού τοιχώματος, στην ενδοκυτταρική μετατροπή των προϊόντων υδρόλυσης σε μικροβιακή βιομάζα με τη συνακόλουθη απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα και νερού που απεκκρίνονται από το κύτταρο [53]. Στη διαδικασία της βιοαποδόμησης συμμετέχουν συνήθως διαφορετικοί μικροοργανισμοί με σύνθετες αλληλεπιδράσεις και συμβίωση, γεγονός που καθιστά δύσκολη την προσομοίωσή της σε φυσικό περιβάλλον, στο εργαστήριο. Για παράδειγμα, ορισμένοι μικροοργανισμοί διασπών κυρίως πολυμερή και παράγουν CO<sub>2</sub> (ανοργανοποίηση), άλλοι ανάγουν το πολυμερές στα συστατικά του μονομερή, ενώ άλλοι χρησιμοποιούν τα αποβαλλόμενα υπολείμματα ως πηγή ενέργειας. Με την πολυπλοκότητα των μεταβολικών οδών και την παραγωγή νέων προϊόντων, είναι αξιοσημείωτο ότι κατά την αερόβια βιοαποικοδόμηση παράγονται 53εCO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της δραστηριότητας σε αυτό το στάδιο. Σε αντίθεση με τις αερόβιες διεργασίες, οι οποίες παράγουν CO<sub>2</sub>, η αναερόβια διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τόσο CO<sub>2</sub> όσο και CH<sub>4</sub>. Επομένως, η ανοργανοποίηση είναι το μόνο στάδιο που μπορεί να υποδείξει τη βιοαποικοδόμηση του υλικού και πρέπει να εκτιμηθεί μέσω τυποποιημένων αναπνευστικών μεθόδων, όπως η μέτρηση της εξέλιξης των αερίων που αναφέρθηκαν παραπάνω για αναερόβια περιβάλλοντα ή της κατανάλωσης οξυγόνου για αερόβια περιβάλλοντα, όπως στο πρότυπο ISO 14852 [52].

Ένα παράδειγμα αερόβιας βιοαποικοδόμησης, η οποία ακολουθεί τα παραπάνω στάδια του γενικού μηχανισμού είναι αυτή του PE από βακτήρια.

- (1) Βιο-φθορά, η οποία ορίζεται ως ο σχηματισμός καρβονυλο-ομάδων από τη δράση οξειδωτικών ενζύμων που απελευθερώνονται από μικροοργανισμούς ή που προκαλούνται από εξωτερικούς παράγοντες, όπως το ηλιακό φως (υπεριώδης ακτινοβολία). Η επακόλουθη οξείδωση μειώνει τον αριθμό των καρβονυλικών ομάδων και παράγει καρβοξυλικά οξέα.
- (2) Βιο-κατακερματισμός, ο οποίος περιλαμβάνει υδρόλυση και/ή κατακερματισμό των ανθρακικών αλυσίδων του πολυμερούς και την απελευθέρωση ενδιάμεσων προϊόντων, με τη μεσολάβηση ενζύμων που παράγονται από μικροοργανισμούς.
- (3) Αφομοίωση, κατά την οποία μικρά θραύσματα υδρογονανθράκων που απελευθερώνονται από τον βιο-κατακερματισμό προσλαμβάνονται και μεταβολίζονται από βακτήρια ή μύκητες.

(4) Ανοργανοποίηση, η οποία περιλαμβάνει: μεταφορά των προϊόντων υδρόλυσης εντός του κυτταρικού τοιχώματος, ενδοκυτταρική μετατροπή των προϊόντων υδρόλυσης σε μικροβιακή βιομάζα με τη συνακόλουθη απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα και νερού που απεκκρίνονται από το κύτταρο. Αν και αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν κάνει αναφορά για τη βιο-φθορά και τον βιο-κατακερματισμό, μελέτες σχετικά με την αφομοίωση και την πλήρη ανοργανοποίηση του PE είναι πολύ περιορισμένες [53].



Εικόνα 4: Στάδια βιοαποικοδόμησης πλαστικών [52].

### 1.3.4 Αβιοτικοί μηχανισμοί αποικοδόμησης πλαστικών

Τα πλαστικά απόβλητα μπορούν να υποστούν επεξεργασία μέσω φυσικοχημικής αποδόμησης (αβιοτικής) και βιοαποδόμησης, η οποία αρχικά διασπά τις φυσικές δυνάμεις των πολυμερών υλικών. Η φωτοαποικοδόμηση, η θερμοοξειδωτική αποδόμηση, η υδρολυτική αποδόμηση και η βιοαποικοδόμηση έχουν αναφερθεί ως οι κύριοι μηχανισμοί για την υποβάθμιση του πλαστικού στο περιβάλλον. Στη φύση, η αποικοδόμηση του πλαστικού ξεκινά με τη φωτοαποικοδόμηση, ακολουθούμενη από τη διαδικασία υδρόλυσης και θερμοοξειδωτικής. Αυτές οι διαδικασίες οδηγούν το πλαστικό απόβλητο σε διάσπαση σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (MW), οι οποίες μπορεί στη συνέχεια να μεταβολιστούν με μικροβιακή δραστηριότητα. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία είναι πολύ αργή, και μπορεί να χρειαστούν αιώνες για να ολοκληρωθεί [2].

## Φυσικοχημική αποικοδόμηση

Η αβιοτική αποικοδόμηση του πλαστικού συμβαίνει φυσικά. Αυτή η διαδικασία κατακερματισμού προκαλεί το σχηματισμό πλαστικών υπολειμμάτων. Φυσικά, η επίδραση της φωτο-οξειδωσης και της διαδικασίας υδρόλυσης δημιουργεί ένα εύθραυστο υλικό στο οποίο μπορεί εύκολα να προκύψει μηχανική υποβάθμιση που οδηγεί στο σχηματισμό μικρο- και νανο-πλαστικών θραυσμάτων. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια του χημικού κατακερματισμού, το μοριακό βάρος του πολυμερούς μειώνεται, σε αντίθεση με τον μηχανικό κατακερματισμό, όπου δεν υπάρχει αλλαγή στο μοριακό βάρος. Αυτή η διαδικασία επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων του μήκους αλυσίδας του πολυμερούς, των ενδομοριακών δυνάμεων μεταξύ των αλυσίδων των πολυμερών, της μηχανικής σταθερότητας, της κρυσταλλικότητας του πολυμερούς και το βάρος [2].

### 1. Φωτοαποικοδόμηση

Η φωτοαποικοδόμηση θεωρείται ως η πιο σημαντική οδός αβιοτικής αποδόμησης σε αερόβια περιβάλλοντα. Η φωτοοξειδωση προκαλεί οξυγόνωση της επιφάνειας του πλαστικού η οποία αυξάνει την υδροφιλία του πολυμερούς και ενισχύει το σχηματισμό μικροβιακής βιομεμβράνης στην επιφάνειά του. Τα πολυμερή PE, PP και PS είναι ευαίσθητα στην έναρξη φωτο-οξειδωτικής αποικοδόμησης. Ο μηχανισμός της πλαστικής φωτοαποικοδόμησης περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια: έναρξη-εκκίνηση, διάδοση και τερματισμός. Κατά το στάδιο εκκίνησης, οι χημικοί δεσμοί της αλυσίδας του πολυμερούς σπάνε από το φως ή τη θερμότητα για να παράξουν ελεύθερες ρίζες. Ωστόσο, τα πολυμερή πρέπει να περιέχουν ακόρεστες χρωμοφόρες ομάδες που απορροφούν φωτεινή ενέργεια. Αρκετοί τύποι πλαστικών, όπως PE και PP δεν περιέχουν ακόρεστους διπλούς δεσμούς στην πολυμερή βασική αλυσίδα τους, επομένως αυτές οι ενώσεις αναμένεται να είναι ανθεκτικές σε φωτοαποδόμηση. Ωστόσο, κάποιες δομικές ανωμαλίες μπορούν να επιτρέψουν την εμφάνιση του βήματος έναρξης της φωτοαποικοδόμησης. Ακολούθως, κατά το στάδιο της διάδοσης οι ρίζες του πολυμερούς αντιδρούν με το οξυγόνο και σχηματίζουν υπεροξειδικές ρίζες. Εκτός από τον σχηματισμό υδρουπεροξειδίων, λαμβάνουν χώρα περαιτέρω σύνθετες ριζικές αντιδράσεις και οδηγούν σε αυτοοξειδωση. Η διάδοση οδηγεί τελικά σε σπάσιμο ή σταυροσύνδεση της αλυσίδας. Ο τερματισμός της αντίδρασης εμφανίζεται όταν σχηματίζονται αδρανή προϊόντα από το συνδυασμό δύο ριζών. Επομένως, λόγω οξειδωσης, πραγματοποιείται σπάσιμο τυχαίας αλυσίδας για την παραγωγή λειτουργικών ομάδων που περιέχουν οξυγόνο όπως ενώσεις ολεφίνης, κετόνης και αλδεΐδης. Εξαιτίας της παρουσίας ακόρεστων διπλών δεσμών, αυτές οι ενώσεις θεωρούνται πιο ευαίσθητες σε αποικοδόμηση που προκαλείται από φωτοεκκίνηση. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε μείωση του μοριακού βάρους των πλαστικών. Επομένως, το εμβαδόν της επιφάνειας των παραγόμενων ενώσεων αυξάνεται, καθιστώντας τα πιο ευαίσθητα στη διαδικασία κατακερματισμού [2].

### 2. Υδρόλυση

Η υδρόλυση του πλαστικού αντιπροσωπεύει ένα από τα κύρια βήματα της αβιοτικής αποδόμησης. Η υδρόλυση επιταχύνεται από την παρουσία καταλυτών, όπως ιόντων που απελευθερώνονται μέσω αυτής της αντίδρασης. Ο ρυθμός υδρόλυσης εξαρτάται από την

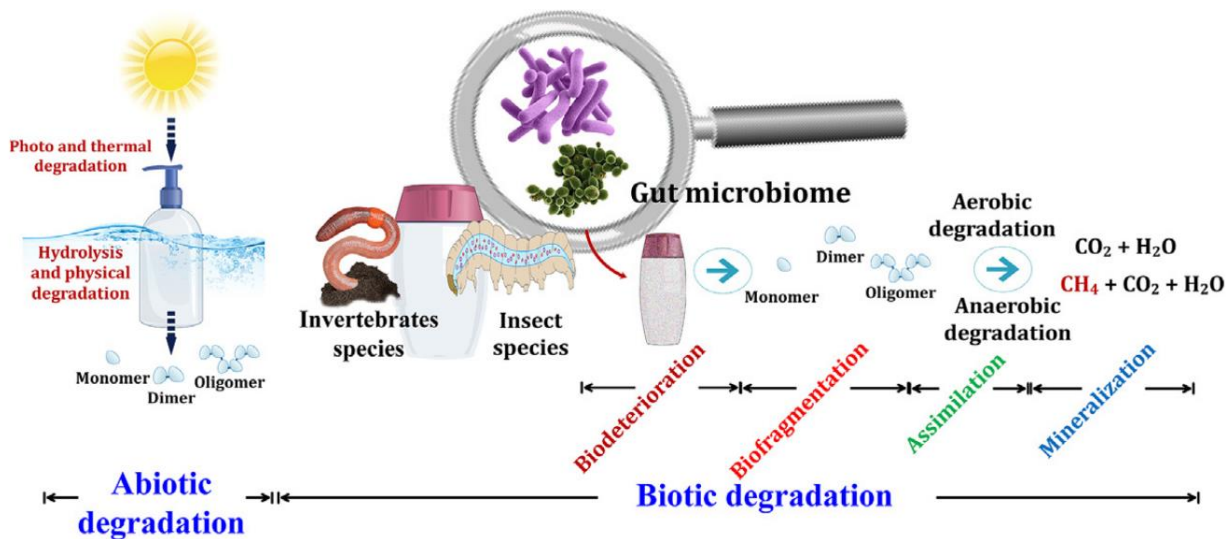


ευαισθησία των χημικών δεσμών του πολυμερούς στο νερό και τη συγκέντρωσή του μέσα στο υλικό. Επίσης, ο ρυθμός διάχυσης του νερού στο πολυμερικό υλικό είναι κρίσιμος παράγοντας. Κατά την υδρόλυση, το νερό αντιδρά με το πολυμερές προκαλώντας φυσικοχημικές αλλαγές και αυτή η διαδικασία καταλύεται χημικά ή βιολογικά. Επίσης, υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό υδρόλυσης, συμπεριλαμβανομένων των μοριακών βαρών των πολυμερών, όπου ο ρυθμός της υδρόλυσης μειώνεται αυξάνοντας το μοριακό βάρος. Ομοίως, ο ρυθμός της αντίδρασης επηρεάζεται από την κινητικότητα των μορίων και την υδροφοβικότητα ή την υδροφιλία [2].

### 3. Θερμική αποικοδόμηση

Η θερμική αποικοδόμηση του πλαστικού μπορεί να πραγματοποιηθεί σε υψηλές θερμοκρασίες, συνήθως υψηλότερες από 100 °C, ανάλογα με το είδος και τα χαρακτηριστικά του πλαστικού. Τα αντιοξειδωτικά πρόσθετα που ενσωματώνονται μέσω της κατασκευής πλαστικών αποτρέπουν τη θερμική οξείδωση σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αντίθετα, η αποδόμηση λόγω θερμικής οξείδωσης επιταχύνεται από το στρες και την έκθεση σε άλλες αντιδραστικές ενώσεις, όπως το όζον. Γενικά, η αντοχή στην αποικοδόμηση εξαρτάται από τη χημική σύνθεση του πολυμερούς, με το PP, το PVC και το πολυβουταδιένιο (PBD) να είναι αρκετά επιρρεπή σε θερμική υποβάθμιση. Αντίθετα, πολυμερή όπως η πολυσουλφόνη, η πολυαιθερική κετόνη και οι πολυσιλοξάνες είναι θερμικά ανθεκτικά λόγω των ισχυρών δεσμών στη βασική τους αλυσίδα [2].

Στην *Εικόνα 5* παρουσιάζεται η διαδικασία της αβιοτικής και βιοτικής αποικοδόμησης.



Εικόνα 5: Αβιοτική και βιοτική αποικοδόμηση [2].

#### 1.3.4 Βιοπλαστικά, βιολογικής προέλευσης πλαστικά, βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά

Τα πλαστικά με βιολογική βάση παρουσιάζουν μια ανάπτυξη στην αγορά και διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών και ως εκ τούτου έχουν γίνει όλο και πιο δημοφιλή στην έρευνα. Ο περιορισμένη διάθεση των ορυκτών πόρων καθώς και η απειλή των περιβαλλοντικών ζητημάτων οδήγησαν στην ανάπτυξη μιας καινοτόμου βιο-οικονομίας και επίσης προκάλεσαν τη στροφή από τα πλαστικά με βάση τα ορυκτά στα πλαστικά με βιολογική βάση [58].

Συχνά τα βιοδιασπώμενα πλαστικά μπερδεύονται με τα βιοπλαστικά. Η διαφορά ανάμεσα σε αυτά τα δυο είδη είναι ότι τα βιοπλαστικά προέρχονται αποκλειστικά και μόνο από ανανεώσιμες πηγές, όπως η λιγνίνη, η κυτταρίνη και το άμυλο, ενώ δεν είναι πάντα βιοδιασπώμενα. Τα βιοπλαστικά αποτελούνται είτε από βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά (δηλαδή πλαστικά που παράγονται από βιολογικά συστήματα, όπως μικροοργανισμούς, φυτά και ζώα) είτε από πλαστικά βιολογικής προέλευσης (δηλαδή πλαστικά που συντίθενται χημικά από βιολογικά υλικά, όπως σάκχαρα, άμυλο, φυσικά λίπη ή έλαια κ.λ.π.) [59]. Η αλληλεξάρτηση μεταξύ των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών και τα πλαστικών με βιολογική βάση φαίνονται παρακάτω στην *Εικόνα 6*. Το PCL, και το PBS έχουν βάση το πετρέλαιο, αλλά μπορούν να αποικοδομηθούν από μικροοργανισμούς. Από την άλλη πλευρά, παράγονται μίγματα PHB, πολυγαλακτικού οξέος (PLA) και αμύλου από βιομάζα ή ανανεώσιμες πηγές, και επομένως είναι βιοαποδομήσιμα. Παρά το γεγονός ότι το PE μπορεί να παραχθεί από βιομάζα ή ανανεώσιμες πηγές, είναι μη βιοδιασπώμενο [60].

- Βιολογικής προέλευσης πλαστικά

Τα «βιολογικής προέλευσης πλαστικά» είναι αυτά τα οποία προκύπτουν εν μέρει ή ολικώς από ενώσεις, οι οποίες προέρχονται από βιολογικές ανανεώσιμες πηγές, όπως τα φυτά, οι μικροοργανισμοί και η βιομάζα [61]. Ένα παράδειγμα βιολογικής προέλευσης πλαστικού είναι το PHB.

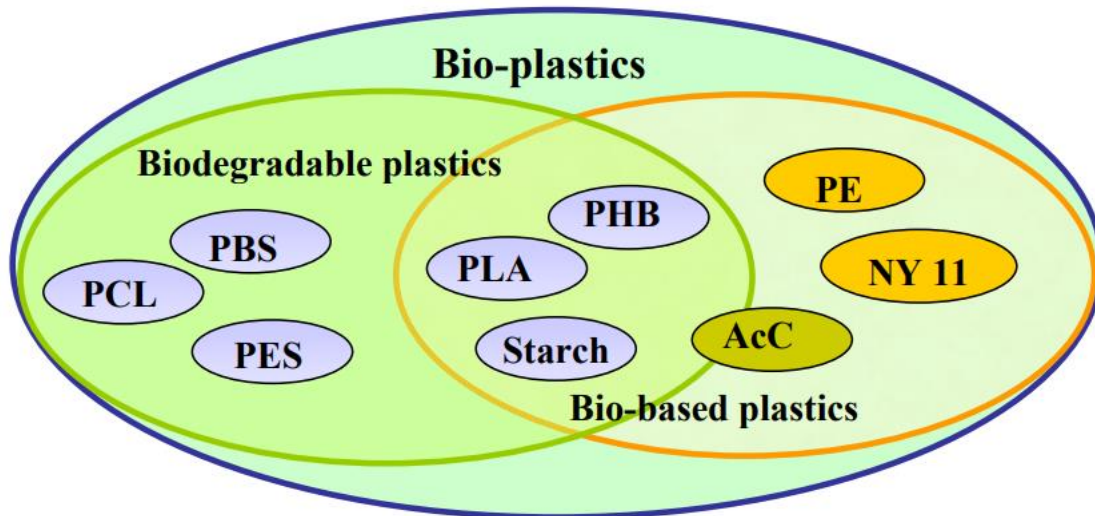
- Βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά

Τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά ορίζονται ως "αποικοδομήσιμα πλαστικά στα οποία η αποικοδόμηση προκύπτει από τη δράση φυσικών μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες και φύκια" και αποτελούν εναλλακτική λύση των πολυμερών με βάση το πετρέλαιο (παραδοσιακά πλαστικά). Τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή μπορούν επίσης να ταξινομηθούν ως υλικά σχεδιασμένα να εκτελούν για ένα πεπερασμένο χρονικό διάστημα, υποβάλλοντας μια ελεγχόμενη διαδικασία αποικοδόμησης σε ενώσεις που μπορούν να μεταβολίζονται από μικροοργανισμούς [52]. Μπορούν επίσης να περιγραφούν ως υλικά των οποίων οι χημικές και φυσικές ιδιότητες επιδεινώνονται και αποσυντίθενται πλήρως όταν εκτίθενται σε μικροοργανισμούς και σε αερόβιες και αναερόβιες διεργασίες [62]. Σύμφωνα με την IUPAC, τα υλικά αυτά είναι "πολυμερή που είναι ευαίσθητα στην αποικοδόμηση από βιολογική δραστηριότητα (δηλαδή, η βιοαποικοδόμηση προχωρά όχι μόνο με την καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων, αλλά και με μια ευρεία ποικιλία βιολογικών δραστηριοτήτων), με την αποικοδόμηση να συνοδεύεται από μείωση της μοριακής τους μάζας" [52].

Κανένα από τα βασικά πλαστικά δεν αποικοδομείται γρήγορα στο περιβάλλον. Παρόλα αυτά, ορισμένοι επιστήμονες και περιβαλλοντολόγοι θεωρούν τα βιοδιασπώμενα και φωτοδιασπώμενα πλαστικά ως λύση στο πρόβλημα των απορριμμάτων. Ορισμένα "βιοπλαστικά" έχουν αναπτυχθεί, αλλά δεν έχουν επιτύχει σε μεγάλη κλίμακα κυρίως λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής και των προβλημάτων σταθερότητας κατά την επεξεργασία και τη χρήση τους [7].

Από την άλλη πλευρά, οι πλαστικοί δακτύλιοι που συγκρατούν τα κουτάκια αναψυκτικών και μπύρας σε εξάδες αποτελούν μια εφαρμογή όπου η φωτοαποικοδόμηση έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά. Ένα συμπολυμερές αιθυλενίου με μονοξείδιο του άνθρακα περιέχει κετονικές ομάδες που απορροφούν αρκετή ενέργεια από το ηλιακό φως για να προκαλέσουν εκτεταμένη διάσπαση της πολυμερικής αλυσίδας. Το φωτοδιασπώμενο πλαστικό, που μοιάζει πολύ στην εμφάνιση και τις ιδιότητες με το LDPE, αποσυντίθεται σε σκόνη μέσα σε λίγους μήνες έκθεσης σε ηλιακή ακτινοβολία [7].

Η ανάπτυξη των βιοδιασπώμενων πλαστικών αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση συγκριτικά με τα αντίστοιχα πλαστικά που παράγονται από πετροχημικά [63]. Λόγω της μικρότερης ανθεκτικότητάς τους και της έλλειψης συμβατότητας με τον υπάρχοντα εξοπλισμό, η κλίμακα παραγωγής και χρήσης των βιοδιασπώμενων πλαστικών είναι, ωστόσο, ακόμη πολύ περιορισμένη [64]. Επιπλέον, δεν ανήκουν όλα τα πλαστικά που προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές, στα «βιοπλαστικά», που είναι εύκολα βιοδιασπώμενα. Μπορεί κι αυτά να παραμείνουν στο περιβάλλον για σημαντικό χρονικό διάστημα ανάλογα με τους τοπικούς αβιοτικούς παράγοντες που διευκολύνουν τη διάσπασή τους και την επακόλουθη βιοαποικοδόμησή τους [16]. Οι βιομηχανίες έχουν αρχίσει να κατασκευάζουν βιοδιασπώμενα πλαστικά χρησιμοποιώντας πρόσθετα όπως προ-οξειδωτικά και άμυλο, κ.λπ. Οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν ταχεία δράση στα θερμοσκληρυνόμενα πλαστικά όπως η πολυουρεθάνη και ορισμένοι οργανισμοί έχουν διαχωριστεί ή απομονωθεί για να χρησιμοποιούν την πολυουρεθάνη ως μοναδική πηγή άνθρακα και αζώτου [47].



Εικόνα 6: Τα βιοπλαστικά αποτελούμενα από βιοαποικοδομήσιμα και βιολογικής προέλευσης πλαστικά [60].

Μία άλλη κατηγοριοποίηση των πλαστικών είναι με κριτήριο την πηγή προέλευσής τους και τη δυνατότητα βιοαποικοδόμησής τους. Έτσι χωρίζονται ως εξής [26, 65]:

- Πετροχημικής προέλευσης, μη βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά, για παράδειγμα: PE, PP, PS, PET, PVC, PUR.
- Πετροχημικής προέλευσης, βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά, για παράδειγμα: PCL, τереφθαλικό αδιπικό πολυβουτυλένιο (PBAT).
- Βιολογικής προέλευσης, μη βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά, για παράδειγμα:  
Βιολογικής προέλευσης PET, PE, PP, PUR.
- Βιολογικής προέλευσης, βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά, για παράδειγμα: PBS, PLA.

## 1.4 Μικροοργανισμοί και ένζυμα με δυνατότητα διάσπασης πολυμερικών υλικών

### 1.4.1 Αποικοδόμηση πολυμερικών μιγμάτων

Επειδή τα πολυμερή με βάση τα ορυκτά καύσιμα (fossil-based) είναι ανθεκτικά, έχουν μεγάλους χρόνους αποικοδόμησης στο περιβάλλον. Για τον λόγο αυτόν μία νέα προσέγγιση είναι να αναμιγνύονται πλαστικά με μεγάλους χρόνους αποικοδόμησης μαζί με φυσικά πολυμερή, για να αυξηθεί η βιοαποικοδομησιμότητα.

Τα πολυμερικά μίγματα είναι μίγματα δύο ή περισσότερων πολυμερών που έχουν αναμειχθεί μεταξύ τους για να δημιουργήσουν ένα νέο υλικό με διαφορετικές φυσικές ιδιότητες. Συνήθως, αναμιγνύεται ένα πλαστικό με καλές μηχανικές και θερμικές ιδιότητες, όπως τα θερμοπλαστικά

και οι πολυεστέρες, με ένα φυσικό πολυμερές, όπως το άμυλο και η λιγνίνη, με σκοπό τον σχηματισμό ενός νέου πολυμερούς, το οποίο θα αποικοδομείται πιο εύκολα [66].

Ο ρυθμός και ο βαθμός αποικοδόμησης των μιγμάτων πολυμερών ελέγχεται αρχικά από το πιο εύκολα αποικοδομήσιμο συστατικό. Η αρχική διαδικασία αποικοδόμησης επηρεάζει τη δομική ακεραιότητα του πολυμερούς και αυξάνει σημαντικά την επιφάνεια για ενζυμική δράση στη λιγότερο επηρεασμένη περιοχή. Στη συνέχεια ενισχύεται η έκθεση του εναπομείναντος πολυμερούς σε μικρόβια και εκκρινόμενα ένζυμα αποικοδόμησης [50].

Πιο συγκεκριμένα, η ανάμειξη των πλαστικών με ορισμένους τύπους φυσικών πολυμερών, όπως το άμυλο, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τη βιοαποικοδόμησή τους. Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος βρίσκεται σε αφθονία στη φύση και αποτελεί ένα φθινό υλικό, το οποίο διασπάται σε μεγάλο βαθμό από υδρολυτικά ένζυμα. Ο μηχανισμός για την ενισχυμένη βιοαποικοδόμηση έχει συνδεθεί με την ταχεία ενζυματική υδρόλυση του αμύλου καθιστώντας έτσι το πολυμερές πορώδες και ευαίσθητο τόσο σε βιοτική όσο και σε αβιοτική αποικοδόμηση [53].

#### 1.4.2 Μικροοργανισμοί με δυνατότητα διάσπασης πολυμερικών υλικών

Ο τομέας της βιοτεχνολογίας έχει σημειώσει αλματώδη ανάπτυξη όσον αφορά στην εύρεση μικροοργανισμών (Πίνακας 2) οι οποίοι, διαθέτοντας τα κατάλληλα ένζυμα, χρησιμοποιούν τα πολυμερή ως πηγή ενέργειας. Κάποια παραδείγματα μυκήτων, οι οποίοι συμβάλλουν στην αποικοδόμηση των πολυμερών είναι τα εξής: *Rhodococcus ruber*, *Fusarium solani*, *Cladosporium* sp. και *Penicillium simplicissimum* YK [12].

Παράλληλα εκτός από τους μύκητες (π.χ. *Aspergillus niger*, *Aspergillus glaucus*, *Trichoderma*), βακτηριακά στελέχη έχουν επίσης ανακαλυφθεί να αποικοδομούν πολυμερή. Τα στελέχη αυτά ανήκουν στα *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*. Τα ίδια τα πολυμερή από μόνα τους δεν μπορούν να εισέλθουν στο κύτταρο λόγω του μεγέθους τους και επομένως οι μικροοργανισμοί εκφράζουν εξωκυτταρικά ένζυμα που διασπούν τις μεγάλες μοριακού βάρους αλυσίδες σε μικρότερες δομικές μονάδες. Τα εξωκυτταρικά ένζυμα που εμπλέκονται είναι πολύ μεγάλα για να διεισδύσουν βαθιά μέσα στο πολυμερικό υλικό, δρώντας μόνο στην επιφάνεια του πολυμερούς, και κατά συνέπεια, η βιοαποικοδόμηση των πλαστικών είναι συνήθως μια διαδικασία επιφανειακής διάβρωσης [35].

Τα πολυμερή που συντίθενται από πετροχημικά, όπως το PE, το PET, η PUR, το PS, το PP και το PVC, είναι εξαιρετικά ανθεκτικά στις φυσικές μεθόδους αποικοδόμησης. Έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί ορισμένοι μικροοργανισμοί με την ικανότητα να αποικοδομούν τα πετροπολυμερή σε *in vitro* συνθήκες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα ένζυμα που εκφράζονται από αυτά τα μικρόβια έχουν κλωνοποιηθεί και αλληλουχηθεί [53].

Πίνακας 2: Παραδείγματα συνθετικών, φυσικών πλαστικών και πολυμερικών μειγμάτων και οι μικροοργανισμοί που τα αποικοδομούν [50], [53].

Συνθετικό πολυμερές	Μικροοργανισμός	Φυσικό πολυμερές	Μικροοργανισμός	
PE	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	PHB	<i>Pseudomonas lemoignei</i>	
	<i>Rhodococcus ruber</i>		<i>Streptomyces</i> sp. SNG9	
	<i>Penicillium simplicissimum</i> YK		<i>Alcaligenes faecalis</i>	
PUR	<i>Comamonas acidovorans</i> TB-35		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	
	<i>Curvularia senegalensis</i>		<i>Fusarium solani</i>	
	<i>Fusarium solani</i>		<i>Caenibacterium thermophilum</i>	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>		<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	
PBS	<i>Cladosporium</i> sp.		PLA	<i>Fusarium moniliforme</i>
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>			<i>Penicillium Roquefort</i>
	<i>Amycolatopsis</i> sp. HT-6			<i>Amycolatopsis</i> sp.
	<i>Micrrobispora rosea</i>	<i>Bacillus brevis</i>		
	<i>Excellospora japonica</i>	<i>Rhizopus delemer</i>		
	<i>E. viridilutea</i>	Πολυμερικά μείγματα		
	<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	Άμυλο/PE	<i>Aspergillus niger</i>	
<i>Caenibacterium thermophilum</i>	<i>Penicillium funiculosm</i>			
PCL	<i>Clostridium botulinum</i>	Άμυλο/πολυεστέρας	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	
	<i>Fusarium solani</i>		<i>Streptomyces</i>	
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	

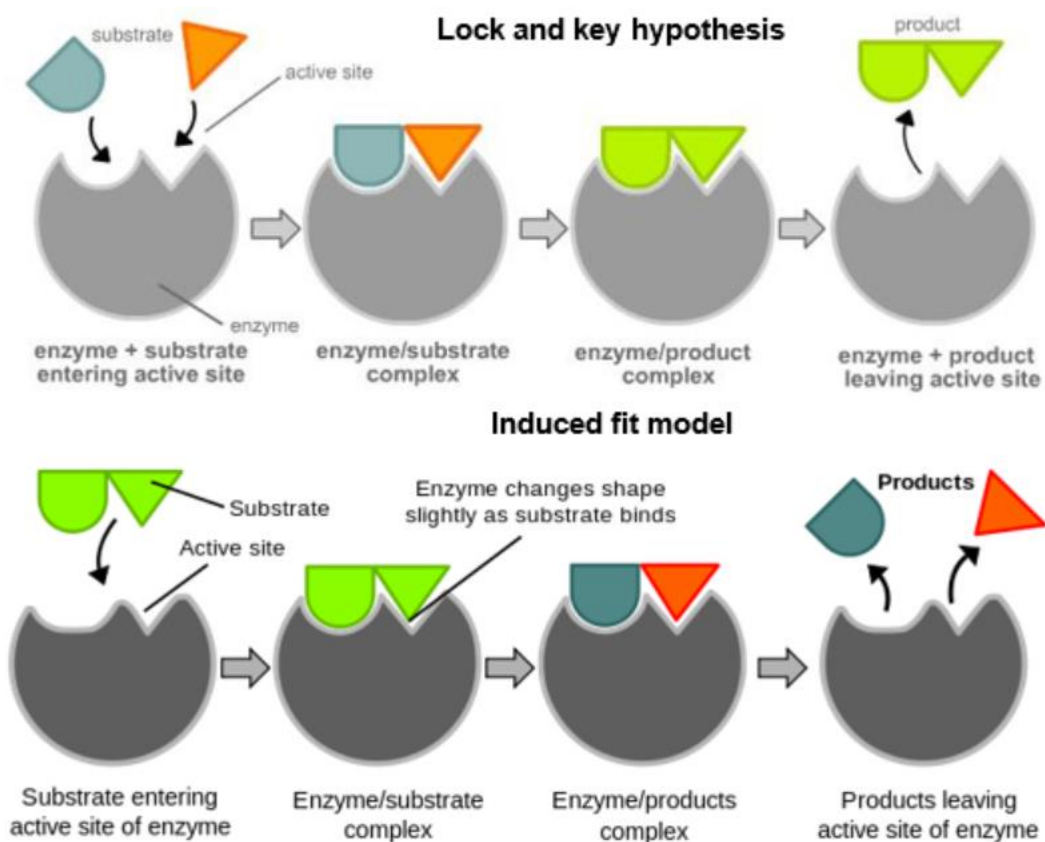
### 1.4.3 Ορισμός, δράση και κατηγορίες ενζύμων

Ως «ένζυμο» ορίζεται ένα μακρομόριο, κυρίως πρωτεΐνη, το οποίο λειτουργεί ως βιοκαταλύτης αυξάνοντας την ταχύτητα των χημικών αντιδράσεων έως και εκατομμύρια φορές [67]. Συχνά, ένα ένζυμο καταλύει μόνο έναν τύπο αντίδρασης (εξειδίκευση αντίδρασης) και λειτουργεί μόνο με έναν τύπο υποστρώματος (εξειδίκευση υποστρώματος). Τα μόρια του υποστρώματος προσβάλλονται στην ίδια θέση (εκλεκτικότητα θέσης) και μόνο ένα ή κατά προτίμηση ένα από τα εναντιομερή των χειρόμορφων υποστρωμάτων ή των ρακεμικών ενώσεων προσβάλλεται (εναντιοεκλεκτικότητα). Ορισμένα ένζυμα, όπως οι λιπάσες ή οι κουτινάσες, είναι σε θέση να λειτουργούν ως βιοκαταλύτες σε ένα εύρος ουσιών που δεν αποτελούν ειδικά υποστρώματα.

Τα ένζυμα διαθέτουν ένα ειδικά διαμορφωμένο μέρος που ονομάζεται ενεργό κέντρο πάνω στο οποίο δεσμεύεται συμπληρωματικά το υπόστρωμα της καταλυόμενης αντίδρασης. Υπάρχουν δύο θεωρίες σχετικά με τον τρόπο δέσμευσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του

ενζύμου (Εικόνα 7). Το μοντέλο κλειδιού – κλειδαριάς ορίζει ότι το μέγεθος, το σχήμα και η χημεία του υποστρώματος (κλειδί) είναι συμπληρωματικά, δηλαδή ταιριάζουν τέλεια, με το μέγεθος, το σχήμα και τη χημεία του ενεργού κέντρου του ενζύμου (κλειδαριά). Το δεύτερο μοντέλο του μηχανισμού δράσης των ενζύμων είναι το μοντέλο της επαγόμενης προσαρμογής και ορίζει ότι το υπόστρωμα και το ένζυμο δεν είναι από την αρχή συμπληρωματικά, αλλά το ένζυμο έχει τη δυνατότητα να προσαρμόζει τη δομή του, έτσι ώστε να «ταιριάζει» με το υπόστρωμα [68].

Στην περίπτωση ενζυμικής αποικοδόμησης πολυμερών, το ένζυμο μπορεί να διασπάσει δεσμούς μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μονάδων της αλυσίδας περισσότερο ή λιγότερο τυχαία (ενδο-δράση) ή από το άκρο της αλυσίδας (εξω-δράση) [48].



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση μοντέλου κλειδιού – κλειδαριάς και μοντέλου επαγόμενης προσαρμογής [69].

Ανάλογα την αντίδραση που καταλύουν, τα ένζυμα χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

- ❖ Οξειδοαναγωγάσες: Ένζυμα τα οποία καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις [70].
- ❖ Τρανφεράσες: Ένζυμα τα οποία καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς ομάδων [71].

- ❖ Υδρολάσες: Ένζυμα τα οποία καταλύουν την υδρόλυση δεσμών [72].
- ❖ Λυάσες: Ένζυμα τα οποία καταλύουν τη μη υδρολυτική απόσπαση ομάδων από υποστρώματα, δημιουργώντας διπλό δεσμό ή την προσθήκη ομάδων σε διπλό δεσμό [73].
- ❖ Ισομεράσες: Ένζυμα τα οποία καταλύουν το φαινόμενο της ισομερείωσης [74].
- ❖ Λιγάσες: Ένζυμα τα οποία καταλύουν τη σύνθεση δεσμών [75].

Κάθε κατηγορία από τις παραπάνω χωρίζεται σε υποκατηγορίες, ανάλογα με το είδος της αντίδρασης.

#### 1.4.4 Ένζυμα που έχουν απομονωθεί από μικροοργανισμούς και εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των συνθετικών πολυμερών

##### 1.4.4.1 Κουτινάσες

Οι κουτινάσες είναι μία υποκατηγορία των εστερασών ενζύμων που αναγνωρίζονται από την ικανότητά τους να υδρολύουν πολυεστέρες με μεγάλη μοριακή μάζα. Πρόκειται για α/β υδρολάσες ή υδρολάσες καρβοξυλικών εστέρων οι οποίες παρατηρήθηκαν σε φυτοπαθογόνους μύκητες, όπως για παράδειγμα στον *Fusarium solani pisi*. Κουτινάσες παράγονται από τους *Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus oryzae* και *Humicola insolens*. Οι δραστηριότητες της κουτινάσης *Fusarium solani pisi* (FsC) και της κουτινάσης *Humicola insolens* (HiC) αποδείχθηκαν ικανές να αποικοδομήσουν μεμβράνη PET (film) χαμηλής κρυσταλλικότητας. Με το πείραμα αυτό, παρατηρήθηκε μάλιστα απώλεια βάρους ίση με 97%, εντός 96 ωρών [76]. Οι PET-υδρολάσες ανήκουν στην ομάδα των κουτινασών δίνοντας ελπιδοφόρα αποτελέσματα στη βιοαποικοδόμηση του PET [77].

##### 1.4.4.2 Λιπάσες

Οι λιπάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των λιπιδίων και αποτελούν κι αυτές μία υποκατηγορία των εστερασών. Ακολουθούν κάποια είδη μυκήτων που είναι γνωστό ότι παράγουν λιπάσες και εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των πολυεστέρων: *Rhizopus delemer*, *Candida antarctica*, *Termomyces lanuginosus*, *Candida rugosa* [77].



#### 1.4.4.3 Πρωτεάσες

Παρότι οι πρωτεάσες διασπών πρωτεΐνες σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες μέσω της υδρόλυσης, και η διαδικασία αυτή ονομάζεται πρωτεόλυση, έχουν βρεθεί να διασπών τις μεγάλες πεπτιδικές αλυσίδες σε μικρά πεπτίδια. Μερικά παραδείγματα των πιο σημαντικών ειδών μυκήτων που παράγουν πρωτεάσες για την αποικοδόμηση των πολυμερών είναι: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Raecilomyces*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phaenarochoete*, *Pestalotiopsis*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Teramoascus*, *Termomyces* [77].

#### 1.4.4.4 Εστεράσες

Οι εστεράσες είναι υδρολάσες, που διασπών τους εστέρες σε αλκοόλες και οξέα με την προσθήκη μορίων νερού. Οι εστεράσες που παράγονται τόσο από βακτήρια όσο και από μύκητες, εμπλέκονται επίσης στην αποικοδόμηση των πλαστικών. Για παράδειγμα, οι μύκητες: *Comamonas acidovorans*, *Purpureocillium lilacinum*, *Curvularia senegalensis*, *Aspergillus favus*, *Aspergillus tubingensis*, *Xericulopsis graminea*, και *Penicillium griseofulvum* παράγουν εστεράσες που είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση των πλαστικών [77].

#### 1.4.4.5 Λακκάσες

Οι λακκάσες είναι οξειδάσες χαλκού (MCOs) που καταλύουν την οξείδωση φαινολικών ενώσεων. Χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο ως επαγωγέας και παράγουν νερό και άλλα υποπροϊόντα. Η ιδιαίτερη ικανότητά τους είναι ότι οξειδώνουν τη λιγνίνη, οπότε και εμπλέκονται στην αποικοδόμησή της. Περιλαμβάνονται επίσης στην οξείδωση του πολυαιθυλενίου. Μερικά είδη μυκήτων που παράγουν λακκάσες είναι τα εξής: *Cochliobolus* sp., *Bjerkandera adusta* TBB-03, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Streptomyces*, *P. Ostreatus*, *T. Pubescens*, ενδεχομένως και *Penicillium* [77].

#### 1.4.4.6 Υπεροξειδάσες

Οι υπεροξειδάσες ή αλλιώς καταλάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των οξειδοαναγωγασών, οι οποίες καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης-αναγωγής, με τη δράση ελεύθερων ριζών σε ενώσεις για τη δημιουργία οξειδωμένων και πολυμερισμένων ενώσεων. Οι υπεροξειδάσες των μυκήτων θεωρούνται περισσότερο αποτελεσματικές στη μετατροπή της λιγνίνης. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει την υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP), την υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) και την VP, η οποία θεωρείται υβρίδιο τόσο της υπεροξειδάσης της λιγνίνης όσο και της υπεροξειδάσης του μαγγανίου με κοινά χαρακτηριστικά

και ευρεία προτίμηση υποστρώματος. Ακολουθούν κάποια είδη μυκήτων που είναι γνωστό ότι παράγουν υπεροξειδάσες και εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των πλαστικών: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, S22, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus favus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium graminearum* [77].

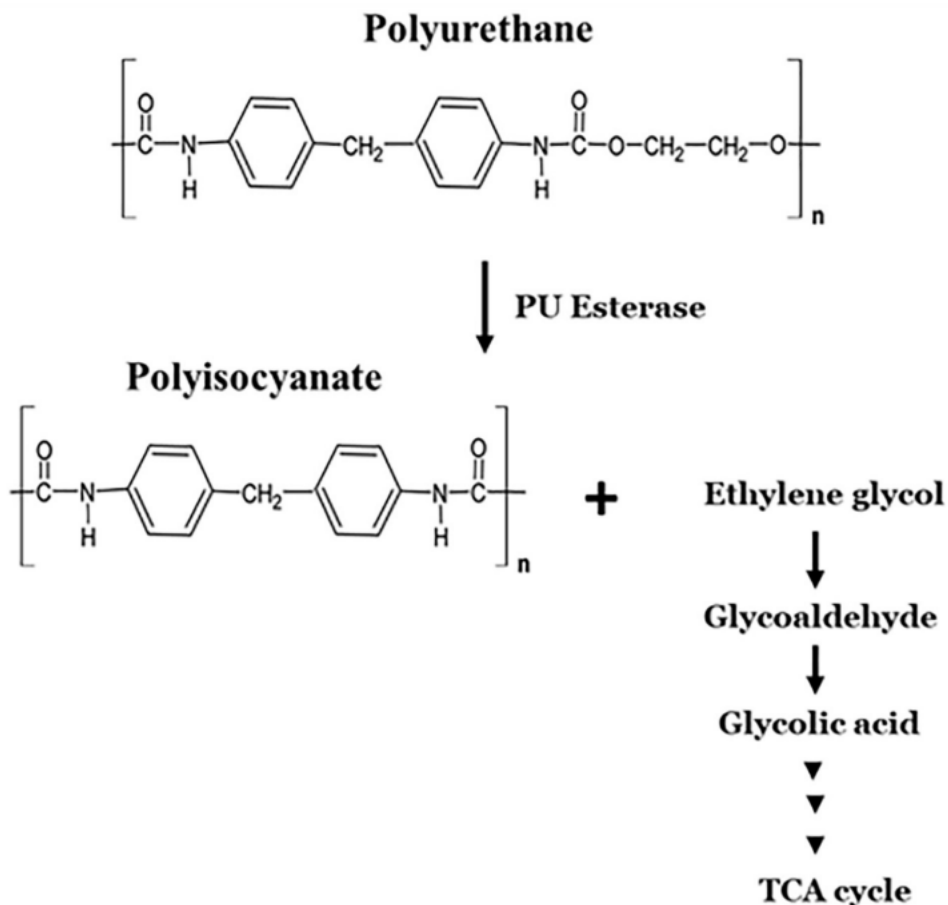
#### 1.4.5 Ενζυμική αποικοδόμηση των πλαστικών που καταλαμβάνουν τον μεγαλύτερο όγκο των πλαστικών απορριμμάτων

##### 1.4.5.1 Αποικοδόμηση PU

Οι πολυουρεθάνες (PUs) είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα συνθετικά πολυμερή. Το πολυμερές αυτό αποτελείται από οργανικές μονάδες συνδεδεμένες μεταξύ τους με ουρεθανικούς δεσμούς. Οι περισσότερες PUs είναι θερμοσκληρυνόμενα πολυμερή. Οι PUs είναι δύο τύπων: α) PU τύπου εστέρα (ES-PU) και β) PU τύπου αιθέρα (ET-PU). Οι εφαρμογές των PUs περιλαμβάνουν την παραγωγή προϊόντων από καουτσούκ, δερμάτων, συγκολλητικών ουσιών κ.λπ. Έχει διαπιστωθεί ότι η πιθανότητα προσβολής από μύκητες είναι μικρότερη σε PU τύπου πολυαιθέρα σε σύγκριση με την PUR τύπου πολυεστέρα. Αποδείχθηκε ότι ο *Comamonas acidovorans starin* TB-35 μπορεί να αποικοδομήσει το ES-PU που παρασκευάζεται από αδιπικό πολυδιαιθυλένιο (Mn= 2.500 και 2.690). Το ES-PU υδρολύεται από το αποικοδομητικό ένζυμο από τον *C. acidovorans* TB-35 με την απελευθέρωση διαιθυλενογλυκόλης και αδιπικού οξέος. Διαπιστώνεται ότι η PU δεν μπορεί να αποικοδομηθεί πλήρως από κανένα μικρόβιο [47]. Η διαδικασία της μικροβιακής αποικοδόμησης της PU, παρουσία PU εστεράσης, παρουσιάζεται παρακάτω στην *Εικόνα 8*. Οι PUs έχουν επίσης εφαρμογές ως μικροπλαστικά στην ιατρική (π.χ. καθετήρες) και βιομηχανικά προϊόντα (ιδίως ως αφροί και οικιακά αναλώσιμα). Οι PUs βρίσκουν επίσης χρήση σε συγκολλητικές ουσίες, μόνωση, παλτά, ελαστικά, σφουγγάρια, χρώματα και ίνες. Μόνο λίγα μικροβιακά στελέχη έχουν αναφερθεί να αποικοδομούν αποτελεσματικά την PU [78]. Βιοδιασπάται μέσω υδρολυτικής διάσπασης του ουρεθανικού δεσμού. Λίγοι μύκητες και βακτηριακά είδη έχει αποδειχθεί ότι αποικοδομούν τον πολυεστέρα PU μέσω ενζυμικής υδρόλυσης των εστερικών δεσμών. Μύκητες που απομονώνονται από το έδαφος όπως: *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* sp., *Curvularia senegalensis*, και *Fusarium solani*, *P. Aeruginosa*, *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter calcoaceticus* και *Bacillus subtilis* αναφέρθηκαν ότι αποικοδομούν την πολυουρεθάνη, ενώ διάφορα βακτηριακά στελέχη ήταν σε θέση να την χρησιμοποιήσουν ως πηγή άνθρακα, αζώτου και ενέργειας για την ανάπτυξή τους [53].

Κατά τη διάρκεια ερευνών για εύρεση πιθανών βακτηρίων και μυκήτων που μπορούν να αποικοδομήσουν τη PU (screening tests), γίνεται χρήση μιας διαδικασίας, η οποία περιλαμβάνει τη χρήση του Impranil DNL, ένα εμπορικό γαλάκτωμα/εναιώρημα ES-PU. Το ES-PU αποικοδομείται πιο εύκολα, οπότε η προαναφερθείσα τεχνική με το Impranil θεωρείται γρήγορη και επιτυχημένη για την ανίχνευση μικροοργανισμών με δυνατότητα αποικοδόμησης PU. Ωστόσο το πρόβλημα αυτής της μεθόδου είναι ότι με την υδρόλυση των υποστρωμάτων από τα

ένζυμα που εκφράζονται με την παρουσία του Impranil, δεν είναι σίγουρο ότι αποικοδομούνται οι ουρεθάνιοι δεσμοί, διότι σύμφωνα με αναφορές, η υδρόλυση των ES-PU είναι κυρίως αποτέλεσμα της διάσπασης του εστερικού δεσμού και όχι του ουρεθάνιου. Οπότε είναι σημαντικό να ανακαλυφθούν ένζυμα, τα οποία διασπούν επιλεκτικά μόνο τον ουρεθάνιο δεσμό, διότι μόνο αυτός ο δεσμός είναι κοινός σε όλες τις διαφορετικές δομές του PU. Συνεπώς, είναι αντιληπτό ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν υδρολάσες που αναγνωρίζουν μόνο τον εστερικό δεσμό των ES-PU, για τη διάσπαση μιγμάτων PU, διότι αυτές οι υδρολάσες δεν θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άλλες δομές PU, οι οποίες δεν θα διαθέτουν εστερικούς δεσμούς [12].



Εικόνα 8: Μικροβιακή αποικοδόμηση της PU [53].

#### 1.4.5.2 Αποικοδόμηση πολυολεφινών

Οι συνθετικές πολυολεφίνες είναι αδρανή υλικά των οποίων η κύρια αλυσίδα αποτελείται μόνο από μεγάλες αλυσίδες άνθρακα. Η χαρακτηριστική δομή τους καθιστά τις πολυολεφίνες μη ευαίσθητες στην αποικοδόμηση από μικροοργανισμούς [50]. Ωστόσο, μία ολοκληρωμένη μελέτη της βιοαποικοδόμησης των πολυολεφινών έδειξε ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί θα

μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν πολυολεφίνες με χαμηλό μοριακό βάρος [79]. Η βιοαποικοδόμηση ακολουθεί πάντα τη φωτοαποικοδόμηση και τη χημική αποδόμηση [50].

#### 1.4.5.2.1 Αποικοδόμηση PE

Το PE αποτελείται από μια γραμμική αλυσίδα ανθράκων που συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Το PE έχει συνήθως ημικρυσταλλική δομή και είναι εξαιρετικά ανθεκτικό στη βιοαποικοδόμηση. Με βάση τις διαφορετικές διεργασίες κατασκευής και στη συνέχεια τις διαφορετικές διατάξεις των γραμμικών αλυσίδων, το PE μπορεί να έχει διαφορετικές ιδιότητες και κρυσταλλικές δομές. Κάποια τέτοια παραδείγματα είναι τα εξής: πολυαιθυλένιο χαμηλού μοριακού βάρους (LMWPE), γραμμικό πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LLDPE), πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE) και πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) [53].

Κατά τη διαλογή για εύρεση πιθανών μυκητιακών στελεχών που αποικοδομούν το PE (screening tests), γίνεται χρήση μιας διαδικασίας, η οποία περιλαμβάνει θρεπτικά ανάπτυξης σε τρυβλία άγαρ, χρησιμοποιώντας φιλμ ή σκόνη PE, μερικές φορές ακολουθούμενα από αποικοδόμηση του πολυμερούς σε υγρές καλλιέργειες. Βέβαια, το αρνητικό αυτής της τεχνικής είναι ότι είναι χρονοβόρα, μπορεί να διαρκέσει εβδομάδες ή ακόμα και μήνες. Κάποια είδη μυκήτων, τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί ως αποικοδομητές του πολυμερούς PE είναι τα *Fusarium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* και *Penicillium*. Αυτοί οι μύκητες παράγουν οξειδοαναγωγικά λιγνινολυτικά ένζυμα και, ως εκ τούτου, χρησιμοποιούν το πολυμερές ως πηγή άνθρακα. Παρόλο που τα βακτηριακά στελέχη έχουν συνδεθεί περισσότερο με την αποικοδόμηση του PE, η αποικοδόμηση της οργανικής ύλης στο περιβάλλον προκαλείται κυρίως από είδη μυκήτων, τα οποία είναι οι κύριοι συντελεστές, όχι μόνο στη λιγνοκυτταρίνη, αλλά και στη διάσπαση των συνθετικών πολυμερών [12].

Η πιθανή αποικοδόμηση του PE έχει συνδεθεί με έναν εκπληκτικά μεγάλο αριθμό βακτηριακών γενών. Μεταξύ αυτών ήταν αρνητικά κατά Gram είδη που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Ralstonia* και *Stenotrophomonas*, αλλά και πολλά θετικά κατά Gram είδη (π.χ. *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Bacillus* κ.ά.) [80].

#### 1.4.5.2.2 Αποικοδόμηση PS

Το PS είναι πλαστικό με τη μεγαλύτερη παγκόσμια παραγωγή και κατασκευάζεται σε μεγάλο βαθμό για υλικά συσκευασίας τροφίμων και σκεύη μιας χρήσης. Όπως το άλλα συνθετικά πλαστικά, το PS χρησιμοποιείται ευρέως λόγω των καλών του μηχανικών ιδιοτήτων και του σχετικά χαμηλού κόστους παραγωγής του. Το PS χρησιμοποιείται συνήθως στον αφρό συσκευασίας, στα δοχεία τροφίμων, δομικά υλικά (μόνωση), ποτήρια μίας χρήσης, πιάτα και μαχαιροπήρουνα. Το 2013 παρήχθησαν περίπου 21 εκατομμύρια τόνοι PS. Είναι εξαιρετικά

σταθερό πολυμερές με υψηλό μοριακό βάρος και ισχυρό υδρόφοβο χαρακτήρα, γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα ανθεκτικό στη βιοαποικοδόμηση. Ο κορμός άνθρακα-άνθρακα στο PS είναι εξαιρετικά ανθεκτικός στην ενζυμική διάσπαση με οξειδοαναγωγική διαδικασία [53]. Έχουν γίνει πολλές αναφορές στη βιβλιογραφία για αποικοδόμηση του PS. Καθαρά στελέχη του ακτινομύκητα, *Rhodococcus ruber*, έχουν αποδειχθεί ότι αποικοδομούν τρεις μορφές PS. Επιπλέον, αρκετοί ερευνητές έχουν δείξει ότι ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης των αφρών και των φιλμ PS μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση των μειγμάτων πολυμερούς-αμύλου, το οποίο επιταχύνει τις δομικές μοριακές αλλαγές. Κάποια είδη μυκήτων, τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί ως αποικοδομητές του πολυμερούς PS είναι τα: *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas putida* CA-3, *Curvularia* sp. [81], *Abortiporus biennis* [82].

#### 1.4.5.2.3 Αποικοδόμηση PP

Το πολυπροπυλένιο (PP) είναι επίσης το πιο διαδεδομένο γραμμικό πολυμερές μεταξύ των συνθετικών πολυμερών. Το πολυμερές αυτό πρωτοεμφανίστηκε και συντέθηκε από τους *J. Paul Hogan* και *Robert L. Banks* το 1951, με προπυλένιο ως μονομερές. Καταλύτες μεταλλοκενίου έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεσή του. Οι ιδιότητές του είναι παρόμοιες με το πολυαιθυλένιο, αλλά είναι ελαφρώς σκληρότερο και πιο ανθεκτικό στη θερμότητα και έχει υψηλή χημική αντοχή. Το PP είναι το δεύτερο πιο ευρέως παραγόμενο πλαστικό (μετά το PE) και χρησιμοποιείται συχνά στις συσκευασίες. Αυτά τα πλαστικά βρίσκουν μια σειρά από εφαρμογές, όπως: τα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα, εργαστηριακός εξοπλισμός και εξαρτήματα αυτοκινήτων. Τα PP ομαδοποιούνται ως πολυολεφίνες μαζί με το PE, που ορίζονται ως αδρανή υλικά τα οποία δεν είναι επιρρεπή σε μικροβιακή προσβολή λόγω των υδρόφοβων βασικών αλυσίδων που αποτελούνται από μεγάλες αλυσίδες άνθρακα, υψηλού μοριακού βάρους (από 10.000 έως 40.000 g/mol) και λόγω των προστιθέμενων αντιοξειδωτικών και σταθεροποιητών κατά την παρασκευή τους, τα οποία αποτρέπουν τις πολυολεφίνες από την ατμοσφαιρική οξείδωση. Ωστόσο, η αντικατάσταση του υδρογόνου από μεθύλιο στη θέση β το καθιστά πιο ανθεκτικό στη μικροβιακή αποδόμηση [53]. Οι βιβλιογραφικές πηγές που αναφέρονται στην αποικοδόμηση του PP, με βάση την απώλεια βάρους, είναι ελάχιστες και αναφέρονται σε βακτηριακά στελέχη [80], όπως *Enterobacteriaceae* και αρνητικά κατά gram bacilli [83].

### 1.4.5.3 Αποικοδόμηση Πολυεστέρων

#### 1.4.5.3.1 Αποικοδόμηση αρωματικών πολυεστέρων

##### 1.4.5.3.1.1 Αποικοδόμηση PET

Το PET είναι ένα από τα σημαντικότερα συνθετικά πετροπλαστικά που παράγεται σε πολύ μεγάλες ποσότητες παγκοσμίως. Το 2013, η παγκόσμια παραγωγή του ανερχόταν σε 56 εκατομμύρια τόνους. Το PET αποτελείται από αρωματικούς πολυεστέρες με υψηλές θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης ( $T_g$ ) περίπου 75-80°C στον αέρα. Ωστόσο, η  $T_g$  μειώνεται στους 60-65°C σε υδατικό διάλυμα. Σε θερμοκρασίες πάνω από την  $T_g$ , η οι άμορφες περιοχές του PET γίνονται εύκαμπτες και πιο προσιτές σε μικροβιακή αποικοδόμηση ή/και ενζυμική προσβολή. Με την πολυμερική αποικοδόμηση, παρατηρήθηκε μείωση της  $T_g$  ως αποτέλεσμα της μείωσης του μέσου μήκους της αλυσίδας, λόγω της υψηλότερης κινητικότητας των μικρότερων αλυσίδων. Το PET χρησιμοποιείται σε μια ευρεία ποικιλία εφαρμογών, όπως στην κατασκευή φιαλών, δοχείων, υφαντικών ινών και ταινιών. Τα πολυμερή PET διαφέρουν ως προς την κρυσταλλικότητα με βάση τη χρήση τους. Ενώ, το μεγαλύτερο μέρος του PET που χρησιμοποιείται για την κατασκευή κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων και φιαλών έχει υψηλή κρυσταλλικότητα (30-40%), το PET που χρησιμοποιείται για τη συσκευασία έχει μικρότερη κρυσταλλικότητα (περίπου 8%). Το εμπορικά διαθέσιμο PET χαμηλής κρυσταλλικότητας (PET-GF) έχει περίπου 6-7% κρυσταλλικότητα [53]. Ορισμένα βακτήρια που βρέθηκαν να αποδομούν το PET είναι μέλη του θετικού κατά gram βακτηριακού φύλου *Actinobacteria* και ένζυμα από τα γένη *Thermobifida*, *Saccharomonospora* και *Thermomonospora*, η *Ideonella sakaiensis* [84], ο *Acinetobacter baumannii*, ο *Streptomyces* sp. και δύο νέα θαλάσσια απομονωμένα βακτήρια: *Thioclava* sp. BHET2 και *Bacillus* sp. BHET2 [85]. Εκτός από τις υδρολύσεις PET των ακτινοβακτηρίων, οι μυκητιακές κουτινάσες έδειξαν δραστηριότητα σε PET υποστρώματα. Τα σημαντικότερα παραδείγματα είναι οι κουτινάσες των φυλών *Fusarium* και *Humicola*. Χρησιμοποιώντας μια *in silico* προσέγγιση εξόρυξης γονιδιώματος, μια κουτινάση από την *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (PpCutA) και μια υποτιθέμενη λιπάση από την *Pseudomonas pelagia* (PpelaLip) ταυτοποιήθηκαν ως πιθανά ένζυμα που δρουν στους πολυεστέρες γενικά. Περαιτέρω πειράματα με τη χρήση ανασυνδυασμένων ενζύμων των PpCutA και PpelaLip επαλήθευσαν την υδρολυτική δραστηριότητα και των δύο ενζύμων σε διάφορους τύπους πολυεστέρων [84].

### 1.4.5.3.2 Αποικοδόμηση αλειφατικών πολυεστέρων

#### 1.4.5.3.2.1 Αποικοδόμηση PCL

Η πολυκαπρολακτόνη (PCL) είναι βιοδιασπώμενος πολυεστέρας. Έχει χαμηλό σημείο τήξης, περίπου 60°C. Η θερμοκρασία ναλώδους μετάπτωσης είναι περίπου -60°C. Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) της  $\epsilon$ -καπρολακτόνης παράγει PCL. Έχει παρατηρηθεί ότι η PCL αποικοδομείται από τους αερόβιους και αναερόβιους μικροοργανισμούς που υπάρχουν ευρέως στα οικοσυστήματα. Το στέλεχος 26-1 του *Penicillium* sp. που απομονώθηκε από το έδαφος χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της αποικοδόμησης της PCL υψηλού μοριακού βάρους. Έπειτα από έρευνες, διαπιστώθηκε ότι η PCL αποικοδομήθηκε πλήρως σε 12 ημέρες. Οι ακόρεστοι αλειφατικοί και αλικυκλικοί πολυεστέρες αποικοδομούνται ή απορροφώνται από τα ένζυμα αλλά όχι οι αρωματικοί πολυεστέρες. Το στέλεχος *Aspergillus* sp. ST-01 που βρέθηκε στο έδαφος είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση του PCL. Οι *Aspergillus flavus* και *Penicillium funiculosum* επέδειξαν πολύ γρήγορη αποικοδόμηση του PCL στην άμορφη περιοχή. Έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα μυκητοειδή φυτοπαθογόνα μπορούν να αποικοδομήσουν την PCL. Ένα νέο μικροβιακό είδος που ανήκει στο γένος *Clostridium* μπορεί να αποικοδομήσει την PCL υπό αναερόβιες συνθήκες. Ορισμένοι άλλοι μικροοργανισμοί που βρέθηκαν να αποδομούν την PCL είναι οι *Pseudomonas*, *Bacillus licheniformis* και *Mucor miehei* [47].

#### 1.4.5.3.2.2 Αποικοδόμηση PBS

Το PBS είναι αλειφατικός συνθετικός πολυεστέρας. Οι ιδιότητές του είναι συγκρίσιμες με αυτές του πολυπροπυλενίου. Έχει υψηλό σημείο τήξης που κυμαίνεται από 112 έως 114°C. Σχηματίζεται από δικαρβοξυλικά οξέα, π.χ. το γλυκόξινο και το αδιπικό οξύ. Οι μικροοργανισμοί που αποικοδομούν το PBS είναι πολύ ευρέως διαδεδομένοι στο περιβάλλον. Ο *Amycolatopsis* sp. HT-6 είναι υπεύθυνος για την αποικοδόμηση του PBS. Αυτός ο μικροοργανισμός αποικοδομεί επίσης το PHB και το PCL. Μετά από πειράματα, σε τρυβλία με άγαρ που περιείχαν γαλακτωματοποιημένο PBS σχηματίστηκε μια ζώνη διαύγασης από τους μικροοργανισμούς *Microbispora rosea*, *Excellispora japonica* και *E. viridilutea*. Διαπιστώθηκε ότι ο *Microbispora rosea* μπορεί να αποικοδομήσει το 50% της μεμβράνης PBS μετά από οκτώ ημέρες [47].

#### 1.4.5.3.2.3 Αποικοδόμηση PHB

Το PHB είναι ένα φυσικό πολυμερές που σχηματίζεται από βακτήρια για την αποθήκευση άνθρακα και ενέργειας. Είναι βιοδιασπώμενο τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Έχει διαπιστωθεί ότι μικροοργανισμοί από τα είδη *Bacillus*, *Pseudomonas* και *Streptomyces*

αποικοδομούν το PHB. Υπολογίζεται ότι το 0,5-9,6% του συνόλου των μικροοργανισμών είναι μικροοργανισμοί που αποδομούν το PHB. Διαπιστώθηκε ότι για την ανακύκλωση των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών, μία από τις καλύτερες τεχνολογίες είναι η κομποστοποίηση σε υψηλή θερμοκρασία. Οι θερμόφιλοι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της κομποστοποίησης. Αυτό δείχνει ότι οι μικροοργανισμοί που μπορούν να αποικοδομήσουν τους πολυεστέρες σε υψηλές θερμοκρασίες είναι ζωτικής σημασίας. Ο ακτινομύκητας έχει υψηλότερη δραστηριότητα ποικοδόμησης του PHB σε σύγκριση με εκείνη των στελεχών *Streptomyces*. Μετά, από πείραμα αποδείχτηκε ότι έπειτα από πέντε ημέρες καλλιέργειας στους 50°C, ο *Aspergillus* sp. αποικοδόμησε το 90% μεμβράνης PHB. Μικροοργανισμοί όπως οι *Alcaligenes faecalis*, *Schlegelella* και *Thermodepolymerans* είναι επίσης υπεύθυνοι για την αποικοδόμηση των πλαστικών [47].

#### 1.4.5.3.2.4 Αποικοδόμηση PLA

Το PLA είναι ένα βιοδιασπώμενο πλαστικό. Συντίθεται με ζύμωση από ανανεώσιμες πηγές. Μπορεί επίσης να παραχθεί από τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου του λακτιδίου με τη βοήθεια καταλύτη. Οι μικροοργανισμοί αποικοδόμησης του PLA δεν είναι ευρέως διαδεδομένοι στο περιβάλλον. Εξαιτίας αυτού, η πιθανότητα προσβολής του PLA από τους μικροοργανισμούς είναι μικρότερη σε σύγκριση με άλλα πλαστικά. Αναφέρθηκε ότι το PLA αποικοδομείται με τη χρήση του *Amycolatopsis* sp. Διαπιστώθηκε ότι υλικά όπως η ελαστίνη και η ζελατίνη μπορούν να διεγείρουν τη σύνθεση ενζύμων από μικροοργανισμούς που αποικοδομούν το PLA. Διερευνάται η αποικοδόμηση του PLA με τη βοήθεια της πρωτεϊνάσης K (proteinase k), της βρωμελίνης και της προνάσης. Η πρωτεϊνάση K μπορεί να αποικοδομήσει την L-PLA και την DL-PLA αλλά, ωστόσο, δεν είναι σε θέση να αποικοδομήσει την D-PLA. Αναφέρεται επίσης ότι ορισμένα ένζυμα τύπου εστεράσης, όπως η λιπάση *Rhizopus delemar*, μπορούν να επιταχύνουν την αποικοδόμηση των oligομερών του PLA [47].

## 2. Πειραματικό μέρος

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1 Όργανα & Συσκευές

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε τυπικός εργαστηριακός εξοπλισμός, όπως ποτήρια ζέσεως, ογκομετρικοί κύλινδροι, κωνικές φιάλες, μπουκάλια αποστείρωσης, σπαθίδες, γυάλινοι ράβδοι, μαγνητικοί αναδευτήρες, δοχεία ζύγισης, δοκιμαστικοί σωλήνες, πιπέτες διαφορετικών όγκων και tips πιπετών, πιπέτες Pasteur, vials, τρυβλία Petri, σύριγγες και φίλτρα



σύριγγας, δοχεία Eppendorf (1,5 mL και 2 mL) και πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες με πάμα όγκων 30 mL και 50 mL.

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

- Αναλυτικός ζυγός KERN ADJ 100-4 (Max 120 g, d=0.0001 g), KERN & SOHN GmbH, Γερμανία
- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO, Η.Π.Α.
- Σύστημα παραγωγής απιονισμένου νερού
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Merck Millipore, Η.Π.Α.
- Ανακινούμενος επωαστήρας ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co LTD
- Αναδευτήρας Vortex-2-Genie, Fischer Scientific, Η.Π.Α.
- Φυγόκεντρος Eppendorf zentrifuge 3200, Γερμανία
- Φυγόκεντρος δοκιμαστικών σωλήνων Vortex Mixer LVM-202, LabTech
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Centrifuge 4239R, ALC INTERNATIONAL
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος 3K30, SIGMA
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος ROTANTA 460R, Hetlich ZENTRIFUGEN
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος J2-21 Centrifuge, BECKMAN
- Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο, ΚΟΝΙΔΑΡΗΣ
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Γερμανία
- Συσκευή συμπίκνωσης Amicon chamber 8400, μεμβράνες Biomax 10 kDa, Millipore, Billerica, MA
- Συσκευή υπερήχων Vibra-Cell Processor VC 400, Sonics and Materials, Η.Π.Α
- Συσκευή φωτομέτρησης microplate SPECTRA MAX 250, Molecular Devices
- Συσκευή φωτομέτρησης microplate SPECTRA MAX 250, Molecular Devices
- Φωτόμετρο SPECTROstar Nano Microplate Reader, BMG Labtech, Γερμανία
- Στήλη υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης HPLC column S 5 ODS2, SPHERISORB

- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας διείσδυσης γέλης LC 1260 Infinity II (Agilent, Καλιφόρνια, ΗΠΑ), και στήλες PLgel 5 μm, Agilent Technologie & δύο PLgel MIXED-D 5 μm (300 × 7,5 mm) (Agilent Technologies)
- Στήλη βαρύτητας, Biorad, Η.Π.Α. με ρητίνη TalonR ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου, Clontech, Η.Π.Α.
- Θερμαινόμενη πλάκα Model 692, nahita blue
- Πλάκα μαγνητικής ανάδευσης VELP SCIENTIFICA
- Μετρητής pH 537, WTW, Γερμανία
- Φούρνος επώασης τρυβλίων WT binder 7200, TOTTLINGEN, Germany
- Υπερκατάψυξη -86C FREEZER, forma scientific

### 2.1.2 Θρεπτικά υλικά

Για την καλλιέργεια και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών παρουσία πολυμερών και ολιγομερών παρασκευάζονται θρεπτικά μέσα, τα οποία είναι πλούσια σε ανόργανα άλατα όπως παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3). Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό αυτές τις συνθήκες δύναται να εξασφαλίσει την προσαρμογή τους στις δύσκολες αυτές πηγές άνθρακα επιτυγχάνοντας έτσι την έκφραση ενζύμων που σχετίζονται με την αποικοδόμησή τους.

- ❖ Θρεπτικό μέσο πλούσιο σε ανόργανα άλατα (Mineral Medium-MM)

Το Mineral Medium (MM) χρησιμοποιείται για τους μύκητες που έχουν απομονωθεί από χερσαία περιβάλλοντα, όπως ο *Aspergillus* sp. και ο *Penicillium* sp.

Πίνακας 3: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών (mM) του MM.

Συστατικά	Συγκέντρωση (mM)
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	12
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	250
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	147
ZnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	14
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	12
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	12
CaCl <sub>2</sub>	10
CuCl <sub>2</sub>	11
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12
HCl	1,8
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	19
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,6

Αναλόγως τον όγκο του θρεπτικού υλικού, ο οποίος έχει να κάνει με το πλήθος των καλλιιεργειών, υπολογίζονται τα moles των αλατιών και εν συνεχεία η μάζα τους. Αφού ζυγιστούν, προστίθενται το ανάλογο απιονισμένο νερό και αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο στους 121°C για 20 min.

❖ Θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια θαλάσσιων μυκήτων (Marine Broth-MB)

Το Marine Broth χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια και την ανάπτυξη των θαλάσσιων μυκήτων που μελετήθηκαν και συγκεκριμένα του *Tritirachium* sp.

Πίνακας 4: Η ποσότητα (g) των συστατικών για 1 L διαλύματος MB.

Συστατικά	Μάζα (g) για 1 L MB
FeCl <sub>3</sub>	0.067
NaCl	19.45
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	18.8
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.24
CaCl <sub>2</sub>	1.8
KCl	0.55
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.16
KBr	0.08
SrCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.057
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.022
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.0016
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.01

Για 1 L Marine Broth διαλύονται πρώτα τα ιχνοστοιχεία FeCl<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KBr, SrCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O σε υπερκάθαρο νερό. Αυτά τα αλάτια διαλύονται και αποστειρώνονται (στους 121°C για 20 min) ξεχωριστά για την αποφυγή καταβύθισής τους. Τα υπόλοιπα 5 συστατικά, όπως αυτά αναγράφονται στον Πίνακα 4, διαλύονται όλα μαζί σε υπερκάθαρο νερό και αφού το διάλυμα αναδευτεί ρυθμίζεται το pH του ίσο με pH=7,9 και μπαίνει για αποστείρωση στους 121°C για 20 min.

Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε η παραπάνω διαδικασία παρασκευής του θρεπτικού μέσου MB για τις καλλιέργειες και για τη διατήρηση των στελεχών, για τις οποίες γίνονται τακτές ανακαλλιέργειες σε τρυβλία, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό αντιδραστήριο: Marine Broth (Dehydrated Culture Media) for microbiology, PanReac, AppliChem, ITW Reagents).

- ❖ Θρεπτικό Luria-Bertani (LB) για την ανάπτυξη των βακτηρίων *Escherichia coli*

Πίνακας 5: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του θρεπτικού μέσου LB.

Συστατικά	Συγκέντρωση (% w/v)
Τρυπτόνη (tryptone)	1
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	0,5
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	1
Άγαρ	1,5

Αφού ζυγιστούν τα τρία πρώτα συστατικά (τρυπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, χλωριούχο νάτριο), προστίθενται τα επιθυμητά mL απιονισμένου νερού. Το διάλυμα αναδεύεται και το pH του ρυθμίζεται ίσο με 7,4, με προσθήκη πυκνού HCl, 12 M. Στην περίπτωση προετοιμασίας τρυβλίων η ανάλογη ποσότητα άγαρ προστίθεται, μετά τη ρύθμιση του pH, πριν την αποστείρωση στους 121°C για 20 min, όπως αυτή αναγράφεται στον Πίνακα 5.

- ❖ Θρεπτικό Yeast-Pepone-Dextrose (YPD) για την καλλιέργεια των μυκητιακών στελεχών

Το YPD είναι ένα θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών σε τρυβλία. Σε αυτό το θρεπτικό πραγματοποιούνταν περιοδικές ανακαλλιέργειες των μυκήτων με σκοπό τη διατήρηση του στελέχους αλλά και την προετοιμασία υγιούς εμβολίου.

Πίνακας 6: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του θρεπτικού μέσου YPD Medium.

Συστατικά	Συγκέντρωση (% w/v)
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	1
Πεπτόνη (peptone from meat)	2
Γλυκόζη (dextrose glucose)	2
Άγαρ	2

Τα συστατικά που αναφέρονται στον Πίνακα 6 ζυγίζονται και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού και το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο στους 109°C για 40 min. Επιλέγεται χαμηλότερη θερμοκρασία αποστείρωσης, διότι το διάλυμα περιέχει γλυκόζη, η οποία σε υψηλότερη θερμοκρασία καραμελώνει. Μετά την αποστείρωση, το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και χρησιμοποιείται για το στρώσιμο των τρυβλίων. Αφού στερεοποιηθεί το θρεπτικό στο τρυβλίο, αυτά είναι έτοιμα για χρήση.

❖ Θρεπτικό μέσο για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε κύτταρα ζύμης *Pichia pastoris*

Τα θρεπτικά μέσα, των οποίων τα συστατικά και η σύστασή τους αναφέρονται στον Πίνακα 7, χρησιμοποιούνται για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών από τη μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris* [86], και ονομάζονται BMGY (Buffered Glycerol – complex Medium) και BMMY (Buffered Methanol – complex Medium).

Πίνακας 7: Η σύσταση των συστατικών των θρεπτικών μέσων BMGY και BMMY.

Συστατικά	Σύσταση BMGY	Σύσταση BMMY
Yeast	1% w/v	1% w/v
Peptone	2% w/v	2% w/v
Potassium phosphate buffer, 1 M, pH=6	10% v/v	10% v/v
Yeast Nitrogen Base (YNB), 3,4% w/v + Ammonium sulfate 10% w/v	10% v/v	10% v/v
Biotin	0.2% v/v	0.2% v/v
Glycerol 10% w/v	10% v/v	-
MetOH	-	0.5% v/v
CuSO <sub>4</sub> (μόνο για μεταλλο-ένζυμα)	-	0.1% v/v

### 2.1.3 Ρυθμιστικά διαλύματα

❖ Διάλυμα ενυδάτωσης PBS

Το διάλυμα PBS είναι ένα ισοτονικό διάλυμα αλάτων που αποτρέπει τη διάρρηξη των μεμβρανών του κυττάρου λόγω οσμωτικής πίεσης.

Πίνακας 8: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του διαλύματος PBS.

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,42
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24

Τα συστατικά του Πίνακα 8 ζυγίζονται, διαλύονται σε κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού και το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 °C για 20 min.

- ❖ Talon buffer για την απομόνωση και καθαρισμό των πρωτεϊνών που έχουν εκφραστεί ετερόλογα.

Πίνακας 9: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του διαλύματος Talon buffer.

Συστατικά	Συγκέντρωση (mM)
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	300
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris-base)	50

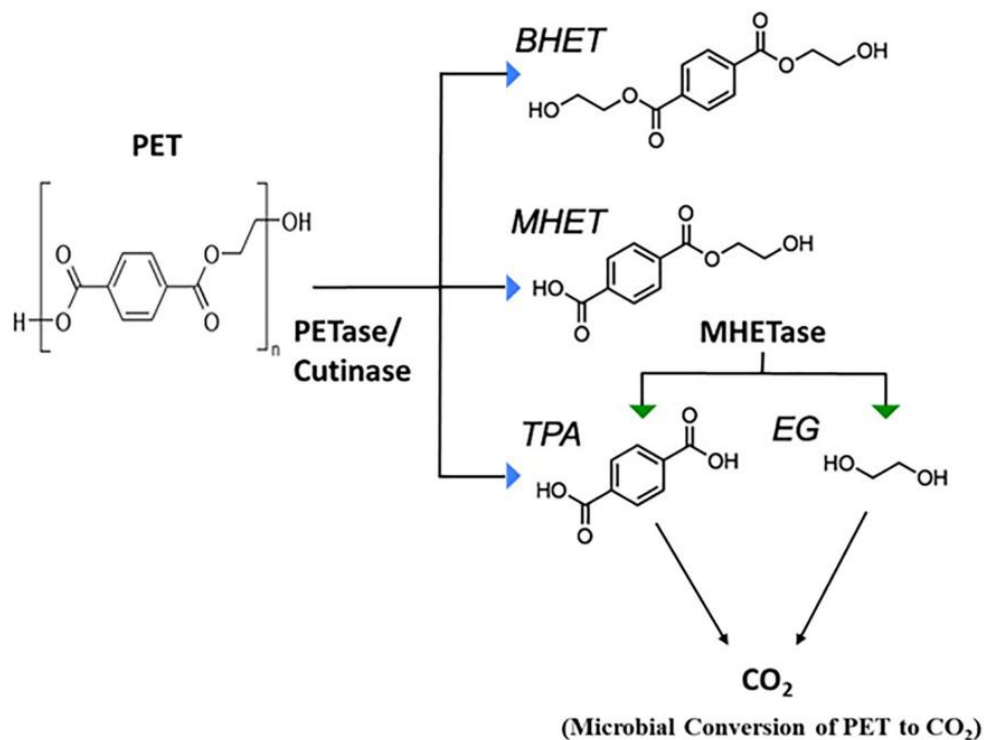
Το Talon buffer είναι το διάλυμα που χρησιμοποιείται για την εξισορρόπηση και την απομόνωση όλων των πρωτεϊνών που έχουν εκφραστεί ετερόλογα από βακτηριακά κύτταρα ή κύτταρα ζύμης. Μόλις ζυγιστούν τα δύο υλικά, τα οποία αναφέρονται στον Πίνακα 9, προστίθεται περίπου το 70% της επιθυμητής συνολικής ποσότητας απιονισμένου νερού, αναδεύεται και ρυθμίζεται σε pH=8 με πυκνό HCl. Τέλος, προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι το διάλυμα να φτάσει τον τελικό του όγκο.

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1 Μελέτη της αποικοδόμησης των πλαστικών με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Η HPLC αποτελεί μία ποιοτική μέθοδο της αναλυτικής χημείας, με την οποία διαχωρίζονται, ταυτοποιούνται και ποσοτικοποιούνται τα συστατικά ενός μίγματος χρησιμοποιώντας τη συνδυαστική δράση μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. [87]

Το πολυμερές που αναλύθηκε με αυτή τη μέθοδο είναι το PET. Τα προϊόντα της υδρόλυσης του PET, τα οποία φαίνονται στην Εικόνα 9, είναι τα εξής: TPA (τερεφθαλικό οξύ) MHET (μονο-(2-υδροξυαιθυλ)τερεφθαλικό οξύ) και BHET (δι-(2-υδροξυαιθυλ)τερεφθαλικό) [88] και φέρουν αύξοντες χρόνους έκλουσης, διότι το BHET είναι πιο υδροφοβικό, έχοντας δύο μόρια αιθυλενογλυκόλης, συγκριτικά με το MHET, το οποίο με τη σειρά του έχει ένα μόριο αιθυλενογλυκόλης, πάντα συγκριτικά με το TPA.



Εικόνα 9: Μικροβιακή αποικοδόμηση του PET. Η PETάση, υδρολάση του PET ή ένζυμο που διασπά το PET -BHET -MHET -TPA -EG (αιθυλενογλυκόλη) [53], [89].

### Περιγραφή εξοπλισμού και μέθοδος ανάλυσης

Η διάταξη της HPLC 1260 Infinity II του οίκου Agilent (Agilent Technologies, Germany), (Εικόνα 10) αποτελείται από απασερωτή, αντλία, σύστημα διαλυτών, αυτόματο δειγματολήπτη, εναλλάκτη θερμότητας, και έναν ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Το σύστημα παροχής κινητής φάσης αποτελείται από μία αντλία υψηλής πίεσης. Η θερμοκρασία της κινητής φάσης ρυθμίζεται μέσω εναλλάκτη θερμότητας διατηρώντας έτσι σταθερή τη θερμοκρασία κατά μήκος της στήλης. Για να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων το σύστημα των καλωδίων της HPLC καθαρίζεται με τον εκάστοτε διαλύτη της ανάλυσης πριν από κάθε μέτρηση.

Στα πειράματα που διεξήχθησαν στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική ροή, που σημαίνει ότι η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση. Η ανάλυση τους πραγματοποιήθηκε με τη C-18 στήλη αντίστροφης φάσης NUCLEOSIL 100-5 (Macherey-Nagel, Germany), (250/4.6 mm). Στην προκειμένη περίπτωση ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι υδρόφιλος και αποτελείται από: 60% υπερκάθαρο νερό, 20% ακετονιτρίλιο (ACN) και 20% υδατικό διάλυμα θεικού οξέος H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96% w/w) σε τελική συγκέντρωση 10 mM. Έπειτα από την εξισορρόπηση όλου του συστήματος και της σταθεροποίησης της πίεσης, ρυθμίζονται οι εξής συνθήκες (Πίνακας 10): όγκος ένεσης δείγματος 20 μL, ροή 0,8 mL/min, χρόνος ανάλυσης στα 15 min, θερμοκρασία ανάλυσης στους 38 °C, και το μήκος κύματος στον ανιχνευτή UV

ρυθμίστηκε στα 241 nm καθώς σε αυτό το εύρος απορροφούν οι αρωματικοί δακτύλιοι, στο ειδικά παρεχόμενο λογισμικό. Μέσω του ίδιου λογισμικού επετεύχθη η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των κορυφών του χρωματογραφήματος. Η ταυτοποίηση των ενώσεων βασίστηκε στον χρόνο έκλουσής τους, βάσει των αντίστοιχων χρόνων έκλυσης των πρότυπων διαλυμάτων.

Πίνακας 10: Συνθήκες HPLC για την ανάλυση δειγμάτων πολυμερών.

Είδος δείγματος	Όγκος ένεσης	Κινητή φάση	Ροή κινητής φάσης	Χρόνος ανάλυσης δείγματος	Μήκος κύματος ανιχνευτή	Θερμοκρασία φούρνου	Μέθοδος
PET (άμορφο και κρυσταλλικό), PC-PET & μίγματα PET με άμυλο	20 $\mu$ L	60% υπερκάθαρο νερό, 20% ακετονιτρίλιο (ACN, HPLC grade), 20% διάλυμα θειϊκού οξέος 10 mM, 96% w/w H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,8 mL/min	15 min	241 nm	38 °C	Ισοκρατική

#### Προετοιμασία δειγμάτων για την HPLC

Με τη μέθοδο HPLC αναλύονται τα υπερκείμενα των αντιδράσεων με PET, για τον εντοπισμό προϊόντων υδρόλυσης σε διαφορετικά υλικά PET (άμορφο, κρυσταλλικό, PC-PET (Post consumed PET, PET έπειτα από χρήση), μίγματα PET-αμύλου). Στα υπερκείμενα των δειγμάτων προστίθεται διάλυμα HCl : H<sub>2</sub>O (1:1) σε συγκέντρωσης 0,1% v/v, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η δράση των ενζύμων και να τερματιστούν οι αντιδράσεις, καθώς και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε συγκέντρωση 5% v/v, προκειμένου να διευκολυνθεί η διάλυση πιθανόν αδιάλυτων προϊόντων στα τελικά δείγματα. Τέλος, ορισμένη ποσότητα των δειγμάτων, τοποθετήθηκαν σε vials και μεταφέρθηκαν στον δειγματολήπτη της HPLC, προς ανάλυση.





Εικόνα 10: Η συσκευή της HPLC-GPC.

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

Η χρωματογραφία διείσδυσης γέλης ή αλλιώς χρωματογραφία πηκτώματος (GPC) είναι ένα είδος υγρής χρωματογραφίας και αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού των μακρομοριακών αλυσίδων των πολυμερών βάσει του μεγέθους τους. Μέσω της GPC προσδιορίζονται τα μέσα μοριακά βάρη των πολυμερικών δειγμάτων καθώς και η κατανομή του μοριακού βάρους (μοριακή διασπορά), καταλήγοντας σε συμπεράσματα για τις ιδιότητες εκάστοτε υλικού μετά την ενζυμική κατεργασία.

Συγκεκριμένα με το πέρας της ανάλυσης υπολογίζεται το μέσο αριθμού μοριακό βάρος ( $\bar{M}_n$ ), το οποίο υποδηλώνει τον μέσο όρο του μοριακού βάρους όλων των μορίων που αποτελούν το δείγμα του πολυμερούς, το μέσο βάρους μοριακό βάρος ( $\bar{M}_w$ ), το οποίο υποδηλώνει το μέσο μοριακό βάρος του δείγματος που εξαρτάται από την μάζα του πολυμερούς που βρίσκεται σε μια περιοχή μοριακών βαρών, το μόριο με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος ( $\bar{M}_p$ ) καθώς και ο δείκτης διασποράς των μοριακών βαρών (PD), του δείγματος, ο οποίος αποτελεί τον λόγο των παραπάνω μέσω μοριακών βαρών ( $PD = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$ ) και εκφράζει την ανομοιογένεια του δείγματος (ισχύει πάντα  $PD > 1$ ) [90].

### Περιγραφή εξοπλισμού και μέθοδος ανάλυσης

Η GPC 1260 Infinity II του οίκου Agilent (Agilent Technologies, Germany), (Εικόνα 10) ως εργαστηριακός εξοπλισμός αποτελείται από τα εξής: απαερωτή, δειγματολήπτη, εναλλάκτη, στήλες και έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector-RID) (Agilent 1260 Infinity II) (G7162A). Ο απαερωτής απαερώνει τον εκάστοτε διαλύτη και με τον αυτόματο δειγματολήπτη το δείγμα αναμιγνύεται με την κινητή φάση. Στη συνέχεια, η κινητή φάση με το δείγμα θερμαίνονται σε εναλλάκτη, για να έχουν την ίδια θερμοκρασία με αυτή των στηλών με το δείγμα να αναλύεται από μία στήλη προστασίας (PLgel 5  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies) και δύο PLgel MIXED-D 5  $\mu\text{m}$  (300  $\times$  7,5 mm) (Agilent Technologies) συνδεδεμένες σε σειρά. Για να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων το σύστημα της GPC καθαρίζεται με τον εκάστοτε διαλύτη της ανάλυσης πριν από κάθε μέτρηση.

Στις μετρήσεις που πραγματοποιούνται για τα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιείται ο RID ανιχνευτής, ο οποίος υπολογίζει τα επιθυμητά μεγέθη μέσω της μέτρησης της διαφοράς του δείκτη διάθλασης μεταξύ της καθαρής κινητής φάσης και της κινητής φάσης που εμπεριέχει την προς ανάλυση ουσία. Στην παρούσα εργασία, ο όγκος των δειγμάτων ήταν 100  $\mu\text{L}$ . Αφού εξισορροπηθεί όλο το σύστημα με τον διαλύτη και σταθεροποιηθεί η πίεση, τοποθετούνται τα δείγματα και ρυθμίζεται η ροή στο 1,0 mL/min, ο χρόνος ανάλυσης στα 30 min και η θερμοκρασία στους 40  $^{\circ}\text{C}$ , στο παρεχόμενο λογισμικό. Μέσω του ίδιου λογισμικού επετεύχθη η ποσοτικοποίηση των παραλαμβανόμενων κορυφών του χρωματογραφήματος, η οποία βασίστηκε σε πρότυπη καμπύλη αναφοράς μέσω των μοριακών βαρών γνωστών σε πρότυπα δείγματα πολυστυρένιο (PS vial, Agilent Technologies).

### Προετοιμασία δειγμάτων για την GPC

Με τη μέθοδο της GPC αναλύονται τα μοριακά βάρη των πολυμερών μετά την κατεργασία τους, αφού πρώτα έχουν διαλυθεί σε κατάλληλη ποσότητα οργανικού διαλύτη, αναλόγως το είδος του πολυμερικού δείγματος, δηλαδή είτε χλωροφορμίου ( $\text{CHCl}_3$ ), είτε τετραϋδροφουρανίου (THF), προς τελική συγκέντρωση 2 mg σκόνης πολυμερούς/mL οργανικού διαλύτη. Τα πολυμερή που αναλύθηκαν ήταν τα εξής: PBS, PHB, PLA, PCL, με διαλύτη 100% Χλωροφόρμιο ( $\geq 99,8\%$  purity, Fisher Chemical, U.K.), και PU, PS, με διαλύτη 100% Τετραϋδροφουράνιο (THF  $\geq 99,9\%$  purity, Macron Fine Chemicals, Poland). Στη συνέχεια, τα φιαλίδια μεταφέρονται στο λουτρό υπερήχων (sonic bath), προκειμένου να διαλυθεί τελείως η σκόνη των πολυμερών στον εκάστοτε οργανικό διαλύτη. Έπειτα, ποσότητα των διαλυμάτων αυτών τοποθετούνται σε vials, αφού φιλτραριστούν με τη χρήση φίλτρων πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE) (0,22  $\mu\text{m}$ ). Τέλος, τα vials αυτά μεταφέρονται στον δειγματολήπτη, προς ανάλυση.

## 2.2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ενζύμων

### 2.2.3.1 Νόμος Lambert - Beer

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

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C$$

Όπου, A: η απορρόφηση

$\varepsilon$ : ο συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας ( $\frac{1}{M \cdot cm}$ ), ο οποίος υπολογίζεται με το εργαλείο ExPASy ProtParam [91].

b: το μήκος της κυψελίδας ή στα συγκεκριμένα πειράματα, το πάχος του κελιού του microplate (cm). Είναι γνωστό από κατασκευής και ίσο με 0,67 cm.

C: η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ( $\frac{mol}{L}$ )

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

$$A = \frac{\varepsilon \cdot b \cdot C}{MW} \Rightarrow C = \frac{A \cdot MW}{\varepsilon \cdot b}$$

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

### 2.2.3.2 Μέθοδος Lowry

Άλλη μία μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών μέσω της μέτρησης της απορρόφησης των δειγμάτων είναι η μέθοδος Lowry. Προκειμένου να μειωθούν οι όγκοι των αντιδραστηρίων τροποποιήθηκε το αρχικό πρωτόκολλο [92]. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Παρασκευάζονται τα εξής διαλύματα: ένα διάλυμα Α, το οποίο περιλαμβάνει 1,56% w/v  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  διαλυμένο σε υπερκάρθρο νερό, ένα διάλυμα Β, το οποίο περιλαμβάνει 2,5% w/v  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , ένα διάλυμα Γ 0,2 M NaOH, ένα διάλυμα Δ, το οποίο περιλαμβάνει 2% w/v  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ένα διάλυμα Ε, το οποίο περιλαμβάνει 4,9 mL διαλύματος C, 4,9 mL διαλύματος D, 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος Α και 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος Β. Σε ένα erpendorf, προστίθενται 250  $\mu\text{L}$  διαλύματος Ε και 50  $\mu\text{L}$  δείγματος, αναδεύονται σε vortex και επωάζονται στον πάγκο για 10 min. Τέλος, παρασκευάζεται και ένα διάλυμα F, το οποίο περιλαμβάνει 1 mL αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Μόλις τελειώσει ο χρόνος επώασης, προστίθενται στο erpendorf 25  $\mu\text{L}$  διαλύματος F, αναδεύονται σε vortex και επωάζονται στον πάγκο για 30 min. Έπειτα, αφού τοποθετηθούν 250  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα του erpendorf σε ένα κελί (πηγάδι) της πλάκας 96 στρωγγυλών πηγαδιών (96-well plate), πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στο φωτόμετρο, στα 750 nm, η οποία μετατρέπεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης με βάση τη καμπύλη αναφοράς με BSA (Bovine Serum Albumin, αντιδραστήριο: Albumin bovine Fraction V, pH=7,0, standard grade, lyophil, SERVA) διάλυμα σε Lowry.

### 2.2.3.3 Μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford

Άλλη μία μέθοδος μέτρησης του πρωτεϊνικού περιεχομένου μέσω της μέτρησης της απορρόφησης των δειγμάτων είναι η μέθοδος Bradford. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Για την κατασκευή καμπύλη αναφοράς με πρότυπα ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- ✓ Προετοιμασία προτύπων (standards, BSA, 10 mg/mL) σε αραιώσεις από 8,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  έως 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  με διπλά δείγματα.
- ✓ Τοποθέτηση 240  $\mu\text{L}$  από κάθε πρότυπο, σε ξεχωριστά κελιά του 96-well plate.
- ✓ Προσθήκη και ανάμιξη 10  $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου Bradford στο κάθε κελί,
- ✓ Μέτρηση απορρόφησης στα 595 nm.

Για τα δείγματα ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- ✓ Κατάλληλη αραιώση των δειγμάτων.
- ✓ Τοποθέτηση 240  $\mu\text{L}$  από κάθε δείγμα, σε ξεχωριστά κελιά του 96-well plate.
- ✓ Προσθήκη και ανάμιξη 10  $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου Bradford στο κάθε κελί,
- ✓ Μέτρηση απορρόφησης στα 595 nm.

#### 2.2.3.4 Μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα υπερκείμενα καλλιεργειών έπειτα από καταβύθιση των πρωτεϊνών τροποποιώντας το πρωτόκολλο με τη μέθοδο Bradford

Άλλη μία μέθοδος μέτρησης του πρωτεϊνικού περιεχομένου στα υπερκείμενα καλλιεργειών μέσω της μέτρησης της απορρόφησης των δειγμάτων είναι με καταβύθιση των πρωτεϊνών (τροποποιημένο πρωτόκολλο της μεθόδου Bradford). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Αντιδραστήρια που απαιτούνται:

- KPh: 500 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7,4,  $M_w=136,1 \text{ g/mol}=3,4025 \text{ g/50 mL}$
- $\text{CaCl}_2$ : 250 mM Calcium Chloride,  $M_w=110,0 \text{ g/mol}=1,3750 \text{ g/50 mL}$
- EtOH: Pure Ethanol (analytical grade)
- $\text{H}_2\text{O}$ : Filtered Milipore water

Για τα δείγματα ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- ✓ Εισαγωγή 200  $\mu\text{L}$  δείγματος σε ένα eppendorf
- ✓ Προσθήκη 20  $\mu\text{L}$  KPh
- ✓ Ελαφριά ανάδευση με αναστροφή του eppendorf 3 φορές
- ✓ Προσθήκη 20  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$
- ✓ Ελαφριά ανάδευση με αναστροφή του eppendorf 3 φορές
- ✓ Προσθήκη 0,5 mL EtOH
- ✓ Ανάδευση με vortex
- ✓ Φυγοκέντριση για 1 min με μέγιστη ταχύτητα
- ✓ Απόρριψη του υπερκειμένου
- ✓ Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου Bradford
- ✓ Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min
- ✓ Προσθήκη 800  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$
- ✓ Ανάδευση με vortex
- ✓ Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  του διαλύματος του eppendorf σε κελί στο 96-well plate
- ✓ Μέτρηση στα 595 nm

Για την κατασκευή καμπύλη αναφοράς με πρότυπα ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- ✓ Προετοιμασία προτύπων BSA 0,1 – 0,005 mg/mL.

- ✓ Ακολουθούν τα ίδια ακριβώς βήματα με τα δείγματα.

## 2.2.4 Προσδιορισμός ενεργότητας εκκρινόμενων ενζύμων

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

### 2.2.4.1 Προσδιορισμός ενεργότητας εστερασών

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των εστερασών, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα ο εστέρας του 4-νιτροφαινόλης βουτυρικού οξέος (p-nitrophenyl butyrate, pNPB). Το pNPB όταν αντιδράσει με τις εστεράσες υδρολύεται, απελευθερώνοντας δύο προϊόντα, το βουτυρικό οξύ και την 4-νιτροφαινόλη (pNP), η οποία απορροφά σε μήκος κύματος 410 nm. Η απορρόφηση που θα βρεθεί μπορεί στη συνέχεια να αναχθεί σε ενεργότητα ενζύμου με τη χρήση κατάλληλης μεθόδου προσδιορισμού που αναφέρεται στο *Παράρτημα Α*.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: αρχικά, σε ένα πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται ρυθμιστικό διάλυμα citrate – phosphate, pH = 6 και συγκέντρωσης C = 100 mM και pNPB (υπόστρωμα) με τελική συγκέντρωση στην αντίδραση ίση με 1 mM. Για την προετοιμασία του υποστρώματος, παρασκευάζεται διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης pNPB σε DMSO (20 mM) και λαμβάνεται η κατάλληλη ποσότητα ώστε η αναλογία DMSO στην αντίδραση να μην είναι μεγαλύτερη από 5% v/v. Λίγο πριν τοποθετηθεί το 96-well plate στο φωτόμετρο, στο πρώτο κελί, που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα και το διάλυμα pNPB προστίθεται το δείγμα. Είναι απαραίτητο να ρυθμιστούν στο φωτόμετρο, η θερμοκρασία στους 35 °C και ο χρόνος επώασης στα 15 min. Τέλος, εισάγεται το 96-well plate στον ειδικό θάλαμο της συσκευής του φωτομέτρου για επώαση. Μετά το πέρας του χρόνου λαμβάνεται η μέτρηση της απορρόφησης, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ενεργότητα του ενζύμου, με τη βοήθεια του νόμου Lambert – Beer.

#### 2.2.4.2 Προσδιορισμός ενεργότητας οξειδωτικών ενζύμων

Ένας τρόπος προσδιορισμού της ενεργότητας των οξειδωτικών ενζύμων είναι η μέτρηση της απορρόφησης μετά από προσθήκη του αντιδραστήριου (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). Το ABTS αποτελεί ένα φωτοευαίσθητο υπόστρωμα, το οποίο παρουσία οξειδωτικών ενζύμων οξειδώνεται, αποκτά ένα πράσινο χρώμα και απορροφά στα 420 nm.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: αρχικά σε ένα πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται ρυθμιστικό διάλυμα citrate – phosphate, pH = 4 και συγκέντρωσης C = 100 mM και αντιδραστήριο ABTS, το οποίο παραλαμβάνεται από διάλυμα ABTS υψηλής συγκέντρωσης 20 mM και η τελική του συγκέντρωση στην αντίδραση είναι ίση με 2 mM. Το ρυθμιστικό διάλυμα και το ABTS αναδεύονται και με μία πιπέτα τοποθετούνται σε ένα κελί του 96-well plate. Στη συνέχεια, σε ένα διπλανό κελί τοποθετείται το δείγμα και λίγο πριν τοποθετηθεί το 96-well plate στο φωτόμετρο, στο κελί του ρυθμιστικού διαλύματος προστίθενται διαδοχικά το αντιδραστήριο και το δείγμα. Είναι απαραίτητο να ρυθμιστούν στο φωτόμετρο, η θερμοκρασία στους 35 °C και ο χρόνος επώασης στα 15 min. Τέλος, εισάγεται το 96-well plate στον ειδικό θάλαμο της συσκευής του φωτομέτρου για επώαση. Μετά το πέρας του χρόνου λαμβάνεται η μέτρηση της απορρόφησης, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ενεργότητα του ενζύμου, με τη βοήθεια του νόμου Lambert – Beer.

#### 2.2.5 Επαγωγή ενζύμων για την αποικοδόμηση του PE από τα στελέχη των μικροοργανισμών *Aspergillus transmontanensis* MM36, *Penicillium citrinum* MM41 και *Tritirachium* sp.

Τα τρία μυκητιακά στελέχη ενδιαφέροντος ανακαλλιεργούνται σε τρυβλία με YPD για τους *Aspergillus transmontanensis* MM36, *Penicillium citrinum* MM41 και Marine Broth για τον *Tritirachium* sp.

Αρχικά παρασκευάζονται υγρές προκαλλιέργειες των 10 mL για τα τρία μυκητιακά στελέχη. Για τους δύο χερσαίους μύκητες (*Aspergillus transmontanensis* MM36, *Penicillium citrinum* MM41) οι υγρές προκαλλιέργειες έχουν ως βάση το θρεπτικό μέσο MM (Πίνακας 3), με κάποιες προσθήκες. Οι προκαλλιέργειες (Πίνακας 11) περιλαμβάνουν: 9,5 mL διάλυμα MM, 0,5 mL δεκαεξάνιο (C<sub>16</sub>, n-Hexadecane, 99%, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>, Alfa Aesar) και 0,1% v/v Tween 20. Το αντιδραστήριο Tween 20 χρησιμοποιείται για την ομογενοποίηση των δύο φάσεων του διαλύματος. Όσον αφορά στον θαλάσσιο μύκητα (*Tritirachium* sp.), οι υγρές προκαλλιέργειες έχουν ως βάση το θρεπτικό μέσο MB (Πίνακας 4) και περιλαμβάνουν: 9,5 mL MB, 0,5 mL C<sub>16</sub> και 0,1% v/v Tween 20. Όλες οι προκαλλιέργειες εμβολιάζονται με ένα κομμάτι τρυβλίου διαστάσεων 1 cm × 1 cm στο οποίο κάθε στέλεχος είχε μεγαλώσει επαρκώς. Οι υγρές προκαλλιέργειες επωάζονται στους 27 °C, υπό ανάδευση (180 rpm), για 3 ημέρες.

Στη συνέχεια, παρασκευάζονται υγρές καλλιέργειες των 50 mL για τα τρία μυκητιακά στελέχη, οι οποίες περιέχουν τα ίδια συστατικά, της ίδιας συγκέντρωσης, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 11, με τη διαφορά ότι οι καλλιέργειες περιέχουν τα εξής τρία αλκάνια: C<sub>24</sub>H<sub>50</sub> 80 g/L C<sub>16</sub>, C<sub>28</sub>H<sub>58</sub>

80 g/L  $C_{16}$  και  $C_{36}H_{74}$  40 g/L  $C_{16}$ , τα οποία λόγω της δομής τους λειτουργούν ως επαγωγείς για την έκφραση ενζύμων που θα μπορούσαν να αποικοδομήσουν το PE. Η διαδικασία είναι η ακόλουθη: παρασκευάζεται και αποστειρώνεται επιθυμητή ποσότητα MM και MB, όπως έχει περιγραφεί, και στη συνέχεια αναμιγνύονται τα τρία αλκάνια στο  $C_{16}$  (5% v/v) στην ανάλογες συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια το διάλυμα των αλκανίων στο  $C_{16}$  αναμιγνύεται με την υδατική φάση του θρεπτικού και οι δυο φάσεις ομογενοποιούνται στη συσκευή υπερήχων υπό τις εξής συνθήκες: 40% amplitude, για 6 min, 40 s on, 20 s off (Εικόνα 11). Αυτές οι καλλιέργειες εμβολιάζονται με τις προκαλλιέργειες. Λόγω της χρήσης του  $C_{16}$  για την ομογενοποίηση των αλκανίων μακράς αλυσίδας, οι καλλιέργειες μόνο με  $C_{16}$  αποτελούν τις καλλιέργειες ελέγχου (control) εκείνων που περιέχουν και τα αλκάνια και το  $C_{16}$ . Οι υγρές καλλιέργειες επωάζονται στους 27 °C, υπό ανάδευση (180 rpm), για συνολικά 4 ημέρες και το θρεπτικό μέσο απομονώνεται κάθε 24 ώρες.



*Εικόνα 11: Τα ομογενοποιημένα διαλύματα των καλλιιεργειών MM με τα αλκάνια (αριστερά) και των καλλιιεργειών ελέγχου με το  $C_{16}$  (δεξιά), έπειτα από τη συσκευή υπερήχων.*



Πίνακας 11: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών των υγρών προκαλλιέργειών και καλλιέργειών των μυκήτων: *Aspergillus transmontanensis* MM36, *Penicillium citrinum* MM41 και *Tritirachium sp.*

	<i>Aspergillus transmontanensis</i> MM36, <i>Penicillium citrinum</i> MM41	<i>Tritirachium sp.</i>
Υγρές προκαλλιέργειες (10 mL)	95% v/v MM	95% v/v MB
	5% v/v C <sub>16</sub>	5% v/v C <sub>16</sub>
	0,1% v/v Tween 20	0,1% v/v Tween 20
Υγρές καλλιέργειες (50 mL)	95% v/v MM	95% v/v MB
	5% v/v C <sub>16</sub>	5% v/v C <sub>16</sub>
	0,1% v/v Tween 20	0,1% v/v Tween 20
	C <sub>24</sub> , C <sub>28</sub> , C <sub>36</sub>	C <sub>24</sub> , C <sub>28</sub> , C <sub>36</sub>

Έπειτα από την απομόνωση του εξωκυτταρικού κλάσματος κάθε 24 ώρες, όπως αναφέρεται παραπάνω, ακολουθεί διήθηση υπό κενό των καλλιέργειών, αφού πρώτα εκείνες τοποθετηθούν σε παγόλουτρο. Η διήθηση των καλλιέργειών πραγματοποιείται με διηθητικό χαρτί και έπειτα με φίλτρα πορώδους 0,45 μm και 0,22 μm. Στη συνέχεια, στις φιλτραρισμένες καλλιέργειες γίνεται προσδιορισμός της ενεργότητας για οξειδωτικά ένζυμα με τη χρήση υποστρώματος ABTS, ενώ μετράται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford με το τροποποιημένο πρωτόκολλο (Ενότητα 2.2.3.4). Τέλος, το εξωκυτταρικό μεταφέρεται σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες όγκου 50 mL, προστίθενται 50 mg ±0,1 mg σκόνης PE και επωάζονται στους 27 °C, υπό ανάδευση (180 rpm), για 5 ημέρες.

Μετά το πέρας της της κατεργασίας της σκόνης PE, τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 20 min στα 2500 rpm. Έπειτα, το υπερκείμενό τους απορρίπτεται και η σκόνη του πολυμερούς εκπλένεται μία φορά με επιφανειοδραστικό διάλυμα και ύστερα δύο φορές με απιονισμένο νερό. Πιο αναλυτικά, το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), συγκέντρωσης 2% w/v είναι επιφανειοδραστικό μέσο, αποδιατακτικό για τις πρωτεΐνες. Προστίθενται 2 mL στο δείγμα και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντριση για 5 min στα 2500 rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται πάλι και προστίθενται 10 mL απιονισμένο νερό και φυγοκεντρείται, ακολουθώντας τη διαδικασία με το νερό για δεύτερη φορά. Τέλος, τα δείγματα φυλάσσονται στην κατάψυξη μέχρι να παγώσουν και έπειτα μεταφέρονται στη συσκευή λυοφιλοποίησης (freezdry) για περίπου 24 ώρες.

### 2.2.5.1 Μελέτη του βαθμού αποικοδόμησης της σκόνης PE με χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Η αποικοδόμηση του PE εκτιμήθηκε με τη μέθοδο φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), με στόχο την ανίχνευση τυχόν αλλαγών στο μοριακό αποτύπωμα του PE. Το φάσμα FT-IR καταγράφηκε από ένα ALPHA II Compact FT-IR Φασματόμετρο (Bruker, Γερμανία) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ATR με κρύσταλλο διαμαντιού, ενώ το λογισμικό OPUS 8,5 χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του καταγεγραμμένου φάσματος, το οποίο ελήφθη ως 16 σαρώσεις στο εύρος 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Η ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών κορυφών του PE πραγματοποιήθηκε με βάση δονητικές ζώνες και συγκρίνοντας τα φάσματα IR με πρότυπα της βιβλιοθήκης του λογισμικού.

### 2.2.5.2 Προετοιμασία καλλιιεργειών του στελέχους *Aspergillus transmontanensis* MM36 με σκοπό την ανάλυση και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται παρουσία αλκανίων μέσω ομικών αναλύσεων

Προκειμένου να υπάρχει συγκρίσιμη ανάπτυξη μεταξύ των καλλιιεργειών του μύκητα και πιο ακριβείς μετρήσεις στη μέθοδο FT-IR, παρασκευάστηκαν καλλιιεργειες, οι οποίες εμβολιάστηκαν με σπόρια του *Aspergillus transmontanensis* MM36.

Αρχικά, προετοιμάστηκαν και εμβολιάστηκαν τρυβλία με θρεπτικό YPD . Η διαδικασία συλλογής των σπορίων είναι η εξής: προστίθενται στο τρυβλίο με τον ανεπτυγμένο μύκητα, 3 mL PBS και στη συνέχεια, με τη βοήθεια μιας πιπέτας μαζεύονται και μεταφέρονται σε αποστειρωμένα eppendorfs. Στη συνέχεια, προστίθενται άλλα 3 mL PBS, τα οποία απλώνονται καλά και μεταφέρονται κι αυτά σε eppendorfs. Στα διαλύματα των eppendorfs πραγματοποιούνται αραιώσεις (1:10, 1:20, 1:50 και 1:100) και τοποθετούνται 10  $\mu\text{L}$  από την κάθε αραιώση (2 δείγματα από κάθε αραιώση) στην πλάκα του μικροσκοπίου, προκειμένου να μετρηθούν τα σπόρια και να βρεθεί η συγκέντρωσή τους ( $\frac{\text{spores}}{\text{mL}}$ ). Εν τέλει, επιλέγεται η αραιώση στην οποία διακρίνονται πιο καθαρά τα σπόρια και η ποσότητά τους είναι σημαντική.

#### Υπολογισμός συγκέντρωσης των σπορίων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των σπορίων γίνεται με βάση τη μέθοδο Neubauer [93]. Πρέπει να βρεθεί στο μικροσκόπιο ένα τετράγωνο με 25 μικρά τετραγώνια μέσα του. Μόλις γίνει ορατό, μετριοούνται προσεκτικά τα σπόρια του εκάστοτε μύκητα, και αθροίζονται. Είναι γνωστό ότι για τις διαστάσεις του τετραγώνου ισχύει:  $Depth = 0,1 \text{ mm}$ . Επομένως, ο όγκος θα είναι ίσος με:  $V = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$ . Συμπερασματικά η συγκέντρωση των σπορίων των μυκήτων θα είναι ίση με:  $\frac{\text{spores}}{\text{mL}} = \frac{\text{αριθμός σπορίων}}{10^{-4}} \cdot \text{αραιώση}$ .

## Διαδικασία

Τα σπόρια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια, για να εμβολιαστούν προκαλλιέργειες MM με γλυκόζη (2 % w/v). Στις προκαλλιέργειες με τον *Aspergillus transmontanensis* MM36 των 10 mL (MM + γλυκόζη), προστέθηκε η ανάλογη ποσότητα σπορίων, ούτως ώστε στην προκαλλιέργεια η συγκέντρωση τους να είναι ίση με  $6,5 \cdot 10^6 \frac{\text{spores}}{\text{mL}}$ .

Όλες οι προκαλλιέργειες επωάζονται στους 28 °C, υπό ανάδευση (180 rpm) για 2 ημέρες. Μετά το πέρας των 2 ημερών, πριν εμβολιαστούν στις καλλιέργειες, οι προκαλλιέργειες φυγοκεντρώνονται στην ψυχόμενη φυγόκεντρο, για 5 min, στα 4500 rpm, το υπερκείμενό τους απορρίπτεται και εκπλένονται με διάλυμα PBS ή με MM (10 mL), προκειμένου να απομακρυνθεί η γλυκόζη. Έπειτα, αναδεύονται για να επαναιωρηθούν, φυγοκεντρώνονται πάλι και το υπερκείμενό του απορρίπτεται.

Έπειτα, παρασκευάζονται υγρές καλλιέργειες των 50 mL οι οποίες περιλαμβάνουν ό,τι και οι καλλιέργειες του *Aspergillus transmontanensis* MM36 που έχουν περιγραφεί παραπάνω. Συνοπτικά, αναμιγνύονται θρεπτικό MM, C<sub>16</sub>, αλκάνια μακράς αλύσου στην παραπάνω αναλογία και 0,1% v/v Tween 20. Οι καλλιέργειες αυτές αφού γίνουν γαλακτώματα με τη βοήθεια των υπερήχων, επωάζονται στους 27 °C, υπό ανάδευση (180 rpm), για 4 ημέρες και το εξωκυτταρικό κλάσμα απομονώνεται κάθε 24 ώρες. Έπειτα, φιλτράρονται με τη χρήση διηθητικού χαρτιού και φίλτρου πορώδους 0,45 μm. Στη συνέχεια, στις φιλτραρισμένες καλλιέργειες, οι οποίες έχουν μεταφερθεί σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες με πάμα όγκου 50 mL προστίθενται 50 mg ± 0,1 mg σκόνης PE και επωάζονται στους 27 °C, υπό ανάδευση (180 rpm), για 5 ημέρες. Από τις φιλτραρισμένες καλλιέργειες, λαμβάνεται δείγμα και μετράται το πρωτεϊνικό περιεχόμενο με τη μέθοδο της καταβύθισης.

Μετά το πέρας της επώασης των φιλτραρισμένων καλλιεργείων μαζί με τα 50 mg σκόνης PE, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 20 min στα 2500 rpm (συνθήκες της ψυχόμενης φυγοκέντρου). Έπειτα, το υπερκείμενό τους απορρίπτεται και το δείγμα εκπλένεται πρώτα μία φορά με διάλυμα SDS και ύστερα δύο φορές με απιονισμένο νερό, όπως αναφέρεται παραπάνω. Είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες από την επιφάνεια του πολυμερούς, διότι μετά, στη μέτρηση του FT-IR πρέπει να αναγνωριστούν μόνο οι ομάδες του PE και όχι εκείνες των πρωτεϊνών. Τέλος, τα δείγματα του PE φυλάσσονται στην κατάψυξη μέχρι να παγώσουν και έπειτα μεταφέρονται στη συσκευή λυοφιλοποίησης για περίπου 24 ώρες.

Έπειτα από την κατεργασία του PE με τα εξωκυτταρικά κλάσματα καλλιεργείων και την ανάλυση του φάσματός τους με FT-IR επαναλαμβάνεται η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω με σκοπό την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που εκφράζονται υπό αυτές τις συνθήκες. Συνοπτικά προετοιμάζονται προκαλλιέργειες του στελέχους *Aspergillus transmontanensis* MM36 σε γλυκόζη εμβολιάζοντάς τες με  $6,5 \cdot 10^6 \frac{\text{spores}}{\text{mL}}$  και με τη βιομάζα που προκύπτει εμβολιάζονται καλλιέργειες όγκου 50 mL MM εμπλουτισμένες οι μισές μόνο με C<sub>16</sub> και οι υπόλοιπες με C<sub>16</sub> και με το μίγμα των αλκανίων στην προαναφερθείσα αναλογία.

Η απομόνωση του εξωκυτταρικού κλάσματος και της βιομάζας στη βέλτιστη χρονική στιγμή, όπως αυτές επιλέχθηκαν με βάση τα φάσματα FT-IR έγινε με τη χρήση αποστειρωμένων διηθητικών χαρτιών υπό συνθήκες πλήρους αποστείρωσης, διότι τα δείγματα πρέπει να έχουν την καλύτερη δυνατή ποιότητα για την επερχόμενη μεταγραφομική και την πρωτεομική ανάλυση. Πιο αναλυτικά, όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 20 min. Μετά από κάθε δείγμα, όλα τα σκεύη ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό. Μετά τη συλλογή της βιομάζας και του εξωκυτταρικού υγρού, καθένα από αυτά μεταφέρθηκαν σε δύο διαφορετικούς αποστειρωμένους πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες με πώμα όγκου 50 mL, και τάχιστα καταψύχθηκαν χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο. Ιδιαίτερα για την περίπτωση της βιομάζας, από την οποία απομονώθηκε και αλληλουχήθηκε το RNA από εξωτερικούς συνεργάτες (Novogene, Cambridge, UK) η άμεση κατάψυξη είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς τα κύτταρα της βιομάζας έχουν RNAάσες, ένζυμα που πρέπει να απενεργοποιηθούν καθώς είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του mRNA σε νουκλεοτίδια. Αντίστοιχα, για το υγρό εξωκυτταρικό κλάσμα, έπειτα από την κατάψυξη του, πραγματοποιήθηκε η ξήρανση των δειγμάτων σε συσκευή λυοφιλίωσης, και ακολούθως εκείνα στάλθηκαν σε εξειδικευμένη εταιρία με σκοπό την αλληλούχιση των πρωτεϊνών που επάγονται (VIB Proteomics Core, Belgium).

Συγκεκριμένα, για την αλληλούχιση των πρωτεϊνών, για την οποία θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο LC-MS/MS όπως αυτή περιγράφεται στις εξής βιβλιογραφικές πηγές: [12], [82].

#### 2.2.6 Ταυτοποίηση μικροοργανισμού *Sarocladium strictum* IMNT (*Acremonium* sp.)

Για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού *Sarocladium strictum* IMNT, παρασκευάστηκαν δύο υγρές καλλιέργειες YPD των 50 mL, προστίθενται τρία κομμάτια, διαστάσεων 1 cm × 1 cm από τρυβλίο YPD στο οποίο είχε αναπτυχθεί επαρκώς ο μικροοργανισμός. Οι καλλιέργειες επώαζονται για 4 μέρες στους 27 °C, υπό ανάδευση (180 rpm). Μετά το πέρας της επώασης, οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται στην ψυχόμενη φυγόκεντρο, για 5 min, στα 4500 rpm, στους 4 °C, το υπερκείμενό τους απορρίπτεται και προστίθενται περίπου 25 mL υπερκάθαρο νερό. Αναδεύονται με vortex για επαναιώρηση, φυγοκεντρώνται πάλι υπό τις ίδιες συνθήκες, το υπερκείμενό τους απορρίπτεται και το ίζημα φυλάσσεται στην κατάψυξη.

Έπειτα, η κατεψυγμένη βιομάζα του μικροοργανισμού, έγινε κονιορτοποιήθηκε σε γουδί με τη βοήθεια υγρού αζώτου και ποσότητα σκόνης βιομάζας του *Sarocladium strictum* IMNT (180 mg) μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο erpendorf για την απομόνωση του DNA.

#### Απομόνωση DNA

Ακολουθήθηκαν τα βήματα του kit απομόνωσης DNA (DNA, RNA and protein purification, Genomic DNA from plant, NucleoSpin, Plant II Midi):

1. Ομογενοποίηση δείγματος

- ✓ Απομόνωση 180 mg βιομάζας *Sarocladium strictum* IMNT σε eppendorf (1,5 mL)
- 2. Λύση κυττάρων, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα PL1
  - ✓ Προσθήκη 720 µL ρυθμιστικού διαλύματος PL1 και ανάδευση με vortex
  - ✓ Προσθήκη 18 µL διαλύματος RNάσης A και ήπια ανάδευση πάνω – κάτω το eppendorf
  - ✓ Επώαση για 10 min στους 65 °C, σε thermomixer, χωρίς ανάδευση
- 3. Φιλτράρισμα
  - ✓ Τοποθέτηση δείγματος μέσα σε μικρό φίλτρο, το οποίο είναι μέσα σε καινούργιο eppendorf (2 mL), φυγοκέντριση για 2 min στα 11.000 rpm. Το flowthrough συλλέγεται, και το φιλτράκι απορρίπτεται.
- 4. Ρύθμιση/προσαρμογή συνθηκών πρόσδεσης του DNA
  - ✓ Προσθήκη 810 µL ρυθμιστικού διαλύματος PC και ανάδευση σε vortex
- 5. Δέσμευση DNA
  - ✓ Τοποθέτηση δείγματος μέσα σε μικρή στήλη, η οποία είναι μέσα σε καινούργιο eppendorf (2 mL), φυγοκέντριση για 1 min στα 11.000 rpm και απόρριψη flowthrough.
- 6. Έκπλυση και στέγνωμα silica μεμβράνης
  - ✓ Προσθήκη 720 µL ρυθμιστικού διαλύματος PW1 και φυγοκέντριση για 1 min στα 11.000 rpm και απόρριψη flowthrough.
  - ✓ Προσθήκη 1260 µL ρυθμιστικού διαλύματος PW2 και φυγοκέντριση για 1 min στα 11.000 rpm και απόρριψη flowthrough.
  - ✓ Προσθήκη 360 µL ρυθμιστικού διαλύματος PW2 και φυγοκέντριση για 2 min στα 11.000 rpm και απόρριψη flowthrough.
- 7. Έκλυση DNA
  - ✓ Τοποθέτηση της στήλης με το δείγμα σε ένα καινούργιο eppendorf (1,5 mL), προσθήκη με πιπετάρισμα 50 µL ρυθμιστικού διαλύματος PE, πάνω στη μεμβράνη και επώαση στήλης για 5 min στους 65 °C, σε thermomixer χωρίς ανάδευση. Μετά, φυγοκέντριση για 1 min στα 11.000 rpm, για την έκλυση του DNA. Η πρώτη αυτή έκλυση αποθηκεύεται στο eppendorf (elution 1).
  - ✓ Το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνεται και αποθηκεύεται και η δεύτερη έκλυση του DNA σε διαφορετικό eppendorf (elution 2).

Μετά το τέλος της διαδικασίας συλλέγεται το DNA σε δύο eppendorfs (δύο τελικές εκλούσεις) και φυλάσσεται στην κατάψυξη.

## PCR

Από την πρώτη έκλυση του DNA, που είναι πιο πυκνή, λαμβάνεται ποσότητα και πραγματοποιείται η μέθοδος PCR.

Αρχικά παρασκευάζεται ένα Master mix 50  $\mu\text{L}$ . Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

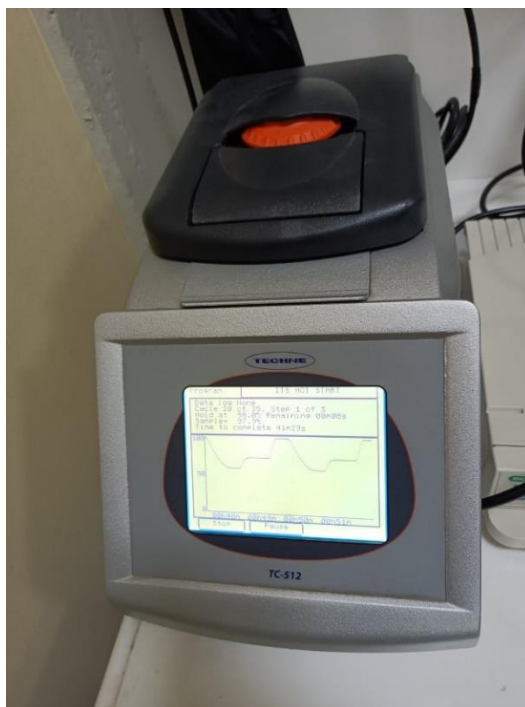
- ✓ Προσθήκη σε erppendorf PCR 25  $\mu\text{L}$  υπερκάθαρο αποστειρωμένο νερό.
- ✓ Προσθήκη 7  $\mu\text{L}$  από το γενωμικό DNA (elution 1), αφού έχει γίνει spin down.
- ✓ Προσθήκη 5  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος.
- ✓ Προσθήκη 5  $\mu\text{L}$  dNTPs.
- ✓ Προσθήκη 3  $\mu\text{L}$   $\text{MgSO}_4$ .
- ✓ Προσθήκη 2  $\mu\text{L}$  από τον κάθε Primer, 5  $\mu\text{M}$  (ITS-1, ITS-4), όπου ITS: Internal Transcribed Spacer, αφού έχει γίνει spin down.
- ✓ Προσθήκη 1  $\mu\text{L}$  από την πολυμεράση KOD HotStart, αφού έχει γίνει spin down.

Ο Primer ITS-1 διαβάζει forward και ο Primer ITS-4 backward και είναι χαρακτηριστικό των μυκητών.

Μόλις τελειώσει η διαδικασία, το erppendorf τοποθετείται στην PCR (*Εικόνα 12*), με το πρόγραμμα όπως αναφέρεται στις συνθήκες PCR.

### Συνθήκες PCR (ανάλογα με την πολυμεράση)

- ✓ Ενεργοποίηση πολυμεράσης: 2 min στους 95  $^{\circ}\text{C}$ , μετά ξεκινάνε οι κύκλοι, 35 στο σύνολο.
- ✓ Denaturation: 20 s στους 95  $^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Annealing: 10 s στους 59  $^{\circ}\text{C}$ , έχει σχέση με τους Primers.
- ✓ Extension: 35 s στους 70  $^{\circ}\text{C}$ , (οι πολυμεράσες έχουν δύο βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας. Τη βέλτιστη θερμοκρασία που κάνει την αντιγραφή και τη βέλτιστη που κάνει τη διόρθωση).
- ✓ Final extension: 1 min στους 70  $^{\circ}\text{C}$  και έναρξη προγράμματος  $V=55\text{ V}$ .



Εικόνα 12: Συσκευή PCR.

## Γέλη αγαρόζης

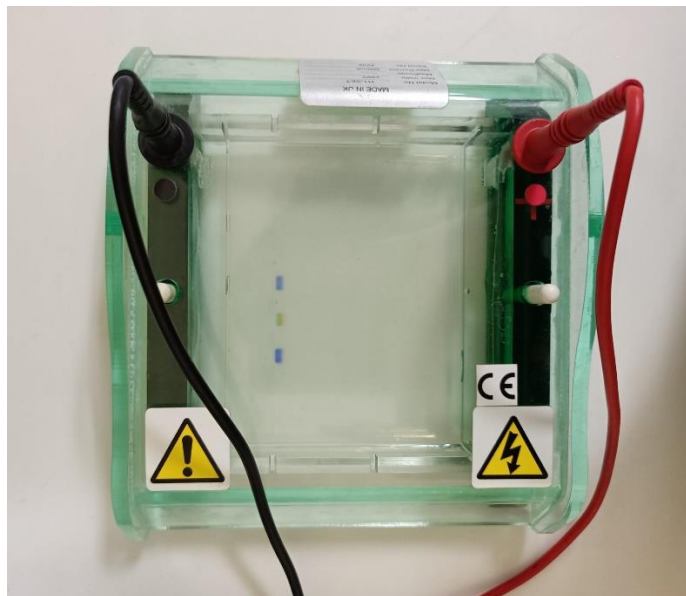
Πίνακας 12: Η σύσταση των συστατικών της γέλης αγαρόζης.

Συστατικά	Σύσταση
Αγαρόζη (Agarose low EEO, Agarose Standard)	1% w/v σε TBE*
Midori green	4-6 $\mu$ L στα 100 ml TBE*
Loading buffer 10 $\times$	2,5 $\mu$ L στα 25 $\mu$ L δείγματος

\*Το TBE (Tris - Boric acid - EDTA) buffer 1 $\times$  χρησιμοποιείται, διότι διατηρεί: στρωτή ροή, σταθερή τη ροή του ρεύματος, και σταθερό το pH και τη συγκέντρωση των ιόντων.

Αρχικά, σε μία κωνική φιάλη ζυγίζονται 0,5 g αγαρόζης (Agarose low EEO (Agarose Standard)) και διαλύονται σε 50 mL TBE. Ακολουθεί βρασμός του διαλύματος, έως ότου γίνει διαυγές και αφήνεται να κρυώσει. Έπειτα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 12, προστίθενται 4  $\mu$ L αντιδραστήριου Midori green και τοποθετείται προσεκτικά στην ειδική πλάκα των γελών (μαζί με τα δύο πλακίδια και το χτενάκι για τον σχηματισμό των κελιών), όπου και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Το αντιδραστήριο Midori green συμπλοκοποιείται με το DNA και κάτω από τη λάμπα UV φθορίζει. Μετά την πήξη της γέλης, προσέχοντας πάλι τα πλακίδια που προστατεύουν τα ηλεκτρόδια από τη γέλη, προστίθεται ποσότητα TBE. Έπειτα, αφαιρείται το χτενάκι και σε κάθε σχηματισμένο κελί, τοποθετούνται 25  $\mu$ L δείγματος, τα οποία περιλαμβάνουν 22,5  $\mu$ L δείγματος (προϊόν PCR) και 2,5  $\mu$ L loading buffer. Ανάμεσα από τα

δείγματα, σε ένα κελί προστίθεται και 4,5  $\mu\text{L}$  ladder. Μόλις τρέξει η γέλη (Εικόνα 13), η μπάντα που φαίνεται πιο έντονα στο UV, κόβεται και τοποθετείται σε προζυγισμένο eppendorf, έτσι ώστε να υπολογιστεί η μάζα της μπάντας. Ακολουθεί η απομόνωση του DNA με kit PCR-clean, στην κατηγορία PCR extraction. Η μπάντα που κόπηκε και χρησιμοποιήθηκε παρακάτω ήταν περίπου 550-600 bp, 40 mg.



Εικόνα 13: Γέλη αгарόζης.

### Απομόνωση DNA από γέλη αгарόζης

Ακολουθήθηκαν τα βήματα του kit απομόνωσης Gel and PCR Clean-up, NucleoSpin:

#### 1. Εξαγωγή μπάντας DNA και διαλυτοποίησή της

- ✓ Εξαγωγή μπάντας DNA από γέλη αгарόζης (40 mg) και τοποθέτησή της σε eppendorf (1,5 mL).
- ✓ Προσθήκη 80  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος NTI.
- ✓ Επώαση για 5-10 min στους 50  $^{\circ}\text{C}$  σε thermomixer και ανάδευση του eppendorf σε vortex κάθε 2-3 min, μέχρι η μπάντα να διαλυτοποιηθεί τελείως.

#### 2. Δέσμευση DNA

- ✓ Τοποθέτηση του δείγματος σε στήλη, η οποία είναι μέσα σε καινούργιο eppendorf (2 mL), φυγοκέντριση για 30 s στα 11.000 rpm, απόρριψη του flowthrough και τοποθέτηση της στήλης πίσω στο παλιό eppendorf.

#### 3. Έκπλυση και στέγνωμα silica μεμβράνης



- ✓ Προσθήκη 700  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στη στήλη η οποία είναι μέσα σε καινούργιο erpendorf (2 mL), φυγοκέντριση για 30 s στα 11.000 rpm, απόρριψη του flowthrough και τοποθέτηση της στήλης πίσω στο παλιό erpendorf.

#### 4. Στέγνωμα silica μεμβράνης

- ✓ Φυγοκέντριση για 1 min στα 11.000 rpm για να φύγε τελείως το ρυθμιστικό διάλυμα NT3

#### 5. Έκλουση DNA

- ✓ Τοποθέτηση της στήλης σε καινούργιο erpendorf (1,5 mL), προσθήκη 15-30  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος NE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min.
- ✓ Φυγοκέντριση για 1 min στα 11.000 rpm.

#### Ligation - PCR blunt

Αρχικά παρασκευάζεται ένα Master mix. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

- ✓ Προσθήκη σε erpendorf PCR 5  $\mu\text{L}$  προϊόντος PCR (ITS elution 1)
- ✓ Προσθήκη 2  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος (5 $\times$ , T4 DNA Ligase Buffer)
- ✓ Προσθήκη 1  $\mu\text{L}$  απιονισμένου νερού
- ✓ Προσθήκη 1  $\mu\text{L}$  λιγάσης (ExpressLink T4 DNA Ligase)
- ✓ Προσθήκη 1  $\mu\text{L}$  πλασμιδίου (PCR Blunt vector)
- ✓ Spin down
- ✓ Επώαση για 2,5 h στους 16  $^{\circ}\text{C}$ .

Μετά, το απομονωμένο DNA μπαίνει σε πλασμίδιο (ligation).

#### Transformation των βακτηρίων Top10 με το ITS DNA

Σε 100  $\mu\text{L}$  κυττάρων:

- ✓ Προσθήκη σε erpendorf 5  $\mu\text{L}$  από το ligation mix
- ✓ Επώαση στον πάγο για 30 min
- ✓ Heat shock στους 42  $^{\circ}\text{C}$  για 1 min & 20 s, χωρίς ανάδευση
- ✓ Μεταφορά αμέσως σε παγόλουτρο
- ✓ Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  LB σε συνθήκες αποστείρωσης
- ✓ Επώαση για 1 h στους 37  $^{\circ}\text{C}$  σε thermomixer

- ✓ Τοποθέτηση 100  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα σε τρυβλίο LB, το οποίο περιέχει αντιβιοτικό καναμυκίνη
- ✓ Επώαση σε φουρνάκι στους 30 °C overnight

Στη συνέχεια, εμβολιάζονται καλλιέργειες LB των 5 mL με αποικίες από το τρυβλίο, οι οποίες επωάζονται στους 37 °C, στα 180 rpm για 1 ημέρα.

Ακολουθεί απομόνωση των πλασμιδίων (γενετικού υλικού) με kit (high copy plasmid) για κάθε μία καλλιέργεια.

Χρειάζεται έπειτα να ελεγχθεί ποια πλασμίδια έχουν λάβει το πλασμίδιο (ITS), οπότε ακολουθεί η διαδικασία της χώνευσης (digestion), για κάθε μία καλλιέργεια.

- ✓ Προσθήκη 5  $\mu\text{L}$  πλασμιδίου
- ✓ Προσθήκη 1  $\mu\text{L}$  περιοριστικού ενζύμου EcoRI
- ✓ Προσθήκη 2  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος
- ✓ Προσθήκη 12  $\mu\text{L}$  απιονισμένου νερού
- ✓ Επώαση στους 37 °C, overnight, χωρίς ανάδευση

Έπειτα, πραγματοποιείται γέλη αгарόζης και PCR στα πλασμίδια και φαίνεται μια μπάντα ίδιων βάσεων με του γενετικού υλικού (ITS). Τέλος, περίπου 17  $\mu\text{L}$  του DNA των πλασμιδίων φυλάσσονται σε erpendorfs και στέλνονται για ταυτοποίηση. Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση ήταν οι εξής: M13rev-29 (reverse) με ακολουθία CAGGAAACAGCTATGACC και M13uni-21 (forward) με ακολουθία TGTA AAAACGACGGCCAGT.

#### 2.2.6.1 Επαγωγή ενζύμων για την αποικοδόμηση πολυεστέρων από τα στελέχη των μικροοργανισμών *Sarocladium strictum* IMNT και *Fusarium oxysporum* BPOP18

Οι δύο μικροοργανισμοί ενδιαφέροντος *Sarocladium strictum* IMNT και *Fusarium oxysporum* BPOP18 φυλάσσονται στην υπερκατάψυξη (-80 °C) με stock γλυκερόλης, διότι η γλυκερόλη είναι κρυοπροστατευτικό, έτσι ώστε να μην διαρρηχθούν, και ανακαλλιεργούνται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο YPD, τα οποία επωάζονται σε επωαστήρα χωρίς ανάδευση στους 30 °C.

Από προηγούμενες βιβλιογραφικές πηγές είναι γνωστό ότι το γαλάκτωμα πολυουρεθάνης με εστερική δομή μπορεί να επάγει και ένζυμα με εστερική δράση [12]. Για τον λόγο αυτό, παρασκευάζονται υγρές προκαλλιέργειες των 10 mL για τους δύο μικροοργανισμούς, οι οποίες αποτελούνται από MM (Πίνακας 3) και Impranil DLN-SD σε συγκέντρωση 0,4% v/v, οι οποίες και εμβολιάζονται με ένα κομμάτι διαστάσεων 1 cm  $\times$  1 cm τρυβλίου YPD στο οποίο ο εκάστοτε μικροοργανισμός είχε μεγαλώσει επαρκώς. Οι προκαλλιέργειες επωάζονται στους 27 °C, υπό ανάδευση (180 rpm), για 3 ημέρες.

Στη συνέχεια, παρασκευάζονται υγρές καλλιέργειες των 50 mL, οι οποίες αποτελούνται από το ίδιο θρεπτικό μέσο και εμβολιάζονται με τις προκαλλιέργειες. Οι καλλιέργειες ακολούθως επωάζονται στους 27 °C, υπό ανάδευση (180 rpm), και κάθε μέρα, λαμβάνεται δείγμα, φυγοκεντρείται και μετράται η εστερική του δράση με τη βοήθεια του υποστρώματος pNPB, προκειμένου να βρεθεί η χρονική στιγμή με τη μέγιστη ενεργότητα. Όταν επιλεγεί η κατάλληλη χρονική στιγμή για κάθε στέλεχος οι καλλιέργειες τερματίζονται, μεταφέρονται σε παγόλουτρο, και φιλτράρονται (διήθηση υπό κενό), πρώτα με διηθητικό χαρτί και έπειτα με φίλτρα πορώδους 0,45 μm και 0,22 μm. Ακολουθεί συμπύκνωση των φιλτραρισμένων καλλιεργειών με τη χρήση της συσκευής υπερσυμπύκνωσης, Amicon (μέγεθος αποκλεισμού: 10 kDa, θάλαμος Amicon 8400 με μεμβράνη Diaflo PM10, Millipore, Billerica, MA) , έως ότου ο όγκος να γίνει ίσος περίπου με 10 mL. Στη συνέχεια, το συμπυκνωμένο διάλυμα υπόκειται σε μια διαδικασία αφαλάτωσης μέσω μεμβρανών διαπίδυσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι: Tris – HCl, 20 mM, pH=7. Η μεμβράνη που περιέχει το δείγμα αφήνεται για 17-20 h στους 4 °C έτσι ώστε να γίνει η αφαλάτωση και η πρωτεΐνη να εξισορροπηθεί στο διάλυμα επιλογής. Μετά από το απαραίτητο χρονικό διάστημα παραμονής στους 4 °C, η μεμβράνη ανοίγεται και το περιεχόμενό της αποθηκεύεται σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες με πάμα όγκου 30 mL, αφού πρώτα μετρηθεί η εστερική του ενεργότητα, με pNPB (Ενότητα 2.2.4.1), και η συγκέντρωση πρωτεΐνης, με τη μέθοδο Lowry (Ενότητα 2.2.3.2).

#### 2.2.6.2 Μελέτη της δυνατότητας αποπολυμερισμού του εξωκυτταρικού κλάσματος των *Sarocladium strictum* IMNT και *Fusarium oxysporum* BPOP18 σε πολυεστέρες

Για τη μελέτη της δράσης των ενζύμων *Sarocladium strictum* IMNT και *Fusarium oxysporum* BPOP18 πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με πολυμερικά υλικά: PHB, PLA, PCL, PBS, PU, PETam, PETcr, και PC (Post Consumer) – PET. Τα υλικά αυτά βρίσκονται σε μορφή σκόνης κι έχουν κοκκομετρία μικρότερη από 500 nm.

##### Αντιδράσεις ενζύμων με πολυμερικά υλικά

Προκειμένου να επιτευχθεί η συγκεκριμένη συγκέντρωση σε κάθε ένζυμο, πραγματοποιήθηκε αραιώση με το εκάστοτε ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης.

Όσον αφορά στην πειραματική διαδικασία, αρχικά ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό 5 mg  $\pm$  0,1 mg από κάθε πολυμερική σκόνη και τοποθετήθηκαν σε eppendorf (1,5 mL). Για κάθε υλικό πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις (triplicates) και δύο δείγματα ελέγχου (controls), όπου αντί για ένζυμο, προστέθηκε αντίστοιχη ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος αποθήκευσης του κάθε ενζύμου. Επισημαίνεται πως ο όγκος των αντιδράσεων και των controls είναι ίσος με 250 μL.

Στη συνέχεια, στα eppendorfs, για τον *Sarocladium strictum* IMNT στις αντιδράσεις προστέθηκαν ρυθμιστικό διάλυμα sodium phosphate buffer, 100 mM, pH=7 και ποσότητα ενζύμου, από αρχική συγκέντρωση ενζύμου 0,18 mg/mL, προκειμένου στις αντιδράσεις η

συγκέντρωσή του να είναι ίση με 0,0135 mg/mL ή αλλιώς οι αντιδράσεις να περιέχουν 0,00336531 mg ενζύμου.

Για τον *Fusarium oxysporum* BPOP18 στις αντιδράσεις προστέθηκαν ρυθμιστικό διάλυμα sodium phosphate buffer, 100 mM, pH=7 και ποσότητα ενζύμου, από αρχική συγκέντρωση ενζύμου 0,10 mg/mL προκειμένου στις αντιδράσεις η συγκέντρωσή του να είναι ίση με αυτή του *Sarocladium strictum* IMNT, δηλαδή ίση με 0,0135 mg/mL ή αλλιώς οι αντιδράσεις να περιέχουν 0,00336531 mg ενζύμου.

Όπως αναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκε και συνδυασμός των εξωκυτταρικών κλασμάτων των *Sarocladium strictum* IMNT και *Fusarium oxysporum* BPOP18, στις αντιδράσεις με τα πλαστικά. Στις αντιδράσεις λοιπόν, προστέθηκαν ρυθμιστικό διάλυμα sodium phosphate buffer, 100 mM, pH=7, και οι μισές ποσότητες των ενζύμων (*Fusarium oxysporum* BPOP18, και *Sarocladium strictum* IMNT) σε σχέση με τις ξεχωριστές τους αντιδράσεις με ίδιες συγκεντρώσεις στις αντιδράσεις, δηλαδή η ποσότητα των ενζύμων στις αντιδράσεις ήταν ίση με 0,00336531 mg.

Στις αντιδράσεις ελέγχου και των δύο ενζύμων αλλά και του συνδυασμού τους, προστέθηκαν Tris – HCl και ρυθμιστικό διάλυμα sodium phosphate buffer, 100 mM, pH=7. Ακολούθως, τα erpendorfs τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενους επωαστήρες erpendorf (thermomixers). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση 1300 rpm, στους 30 °C και για χρονικό διάστημα 3 ημερών. Ανά 24 ώρες πραγματοποιούνταν ανανέωση του ενζύμου και στην αντίδραση γινόταν προσθήκη επιπλέον της μισής ποσότητας ενζυμικού διαλύματος. Η ανανέωση του ενζύμου, εξυπηρετούσε στην αντικατάσταση ποσοτήτων ενζύμου που ήταν πιθανό να έχουν απενεργοποιηθεί λόγω των συνθηκών της αντίδρασης. Μετά το πέρας των 3 ημερών, οι αντιδράσεις σταμάτησαν και τα εναπομείναντα πολυμερικά υλικά οδηγήθηκαν προς επεξεργασία και ανάλυση.

#### Απώλεια μάζας των πολυμερικών υλικών

Πιο συγκεκριμένα με το πέρας των αντιδράσεων, τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C, για 10 min στα 10.000 rpm. Στη συνέχεια, το υπερκείμενό τους απορρίπτεται (εκτός των αντιδράσεων με PET, το οποίο φυλάσσεται σε erpendorf), χρησιμοποιώντας πιπέτα Pasteur, με μεγάλη προσοχή ώστε να μην παρασυρθούν μαζί με το υγρό και κομμάτια σκόνης και προστίθενται περίπου 300 μL υπερκάθαρο νερό, το διάλυμα αναδεύεται σε vortex και φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν αμέσως παραπάνω. Η διαδικασία αυτή με το υπερκάθαρο νερό επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά. Τέλος, αφού απορριφθεί και το τελευταίο υπερκείμενο από τα δείγματα, τα erpendorfs φυλάσσονται στην κατάψυξη μέχρι να παγώσουν και έπειτα τοποθετούνται στη συσκευή λυοφιλοποίησης, με θάλαμο κενού ALPHA 1-4 της εταιρίας Braun Biotech International, για περίπου 24 ώρες, προκειμένου να απομακρυνθεί η υγρασία από τα δείγματα. Αφού ολοκληρώθηκε η ξήρανση, τα erpendorfs με τη σκόνη που είχε απομείνει ζυγίστηκαν και έτσι υπολογίστηκε η απώλεια μάζας του πολυμερικού υλικού. Τέλος, οι σκόνες ακολουθούν την πορεία της προετοιμασίας των δειγμάτων είτε για HPLC είτε για GPC.

### 2.2.7 Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός του ενζύμου *Sporotrichum thermophile* (StGe2) με σκοπό την ενζυμική αποικοδόμηση διαφόρων πολυεστέρων

Αρχικά, παρασκευάζονται υγρές προκαλλιέργειες BMGY των 50 mL (Πίνακας 7), οι οποίες επωάζονται στους 30 °C υπό ελαφριά ανάδευση (180 rpm). Οι προκαλλιέργειες αυτές έχουν εμβολιαστεί με μετασηματισμένα κύτταρα που περιέχουν την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος κι έχουν αναπτυχθεί σε τρυβλίο YPD. Έπειτα από περίπου μια ημέρα, λαμβάνεται δείγμα από τις κωνικές φιάλες (1mL), το οποίο αραιώνεται (1:50) με απιονισμένο νερό και μετράται η απορρόφηση που έχει στα 600 nm (OD<sub>600</sub>), η οποία είναι αντιπροσωπευτική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Στη συνέχεια, καθώς το γινόμενο του όγκου με την απορρόφηση θεωρείται σταθερό, υπολογίζεται ο όγκος της προκαλλιέργειας που χρειάζεται έτσι ώστε η καλλιέργεια να έχει OD<sub>600</sub> ίσο με 1. Ο απαραίτητος όγκος συλλέγεται σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες με πώμα όγκου 30 mL και φυγοκεντρείται για περίπου 15 min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται, καθώς δεν περιέχει κύτταρα και το ίζημα επαναιωρείται με προσθήκη μικρή ποσότητας θρεπτικού και ήπια ανακίνηση. Τα επαναιωρημένα κύτταρα προστίθενται στις καλλιέργειες BMMY των 500 mL, οι οποίες αφήνονται για επώαση στους 30 °C και προστίθενται σε αυτές κάθε μέρα 0,5% v/v μεθανόλη.

Μετά από 6 ημέρες οι υγρές καλλιέργειες τερματίζονται και οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε παγόλoutτρο και διηθούνται υπό κενό, χρησιμοποιώντας διαδοχικά απλό διηθητικό χαρτί και φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,45 μm και 0,22 μm.

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

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

#### Εξισορρόπηση - dialysis

Στη συνέχεια, το συμπυκνωμένο διάλυμα υπόκειται σε μια διαδικασία αφαλάτωσης μέσω μεμβρανών διαπίδυσης, ή αλλιώς dialysis. Κατά τη διαδικασία αυτή, το ενζυμικό διάλυμα εξισορροπείται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο θα διευκολύνει στη συνέχεια την απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Πιο αναλυτικά, η αφαλάτωση μέσω μεμβρανών

διαπίδυσης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού κατά την οποία με τη βοήθεια μιας ημιπερατής μεμβράνης πραγματοποιείται μετακίνηση επιλεκτικών μορίων βάσει του μοριακού τους βάρους. Η διέλευση των μορίων από τη μεμβράνη βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης και διαρκεί έως ότου να αποκατασταθεί ισορροπία ανάμεσα στο αρχικό και το επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα.

Η μεμβράνη που χρησιμοποιείται είναι κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane w. 25mm), εμποτισμένη με αζίδιο (τοξικό), και πριν ξεκινήσει η διαδικασία της εξισορρόπησης, κόβεται σε μήκος ανάλογο της ποσότητας του ενζυμικού διαλύματος και τοποθετείται σε ένα ποτήρι ζέσεως με βρασμένο υπερκάθαρο νερό για 30 min, προκειμένου να ενυδατωθεί. Στη συνέχεια, το ένα άκρο της μεμβράνης σφραγίζεται με πλαστικό σφιγκτήρα, ενώ στο άλλο άκρο δημιουργείται με προσοχή ένα μικρό άνοιγμα μέσα από το οποίο η μεμβράνη πληρώνεται με το ενζυμικό διάλυμα. Έπειτα, σφραγίζεται και το δεύτερο άκρο και η μεμβράνη τοποθετείται σε περιέκτη που περιέχει το επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα σε όγκο εκατονταπλάσιο από τον όγκο του ενζυμικού διαλύματος. Για την *StGe2* το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι: 10× Tallon buffer. Ο περιέκτης αφήνεται για 17-20 h στους 4 °C έτσι ώστε να γίνει η αφαλάτωση και η πρωτεΐνη να εξισορροπηθεί στο διάλυμα επιλογής. Μετά από το απαραίτητο χρονικό διάστημα παραμονής στους 4 °C, η μεμβράνη ανοίγεται και το περιεχόμενό της αποθηκεύεται σε πλαστικά falcons (30 mL). Η *StGe2* απομονώνεται και καθαρίζεται από τα ανεπιθύμητα συστατικά του διαλύματος με υγρή χρωματογραφία Talon, η οποία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

#### Ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου από αποδιατακτικές συνθήκες (*Εικόνα 14*) είναι μία μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι πρωτεΐνες διατρέχουν τη σχηματιζόμενη γέλη με διαφορετικό ρυθμό, ο οποίος εξαρτάται από το μέγεθος, τη δομή και το φορτίο τους. Οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους διατρέχουν τη γέλη πολυακρυλαμιδίου ταχύτερα λόγω της μικρότερης αντίστασης από αυτή και επειδή διαπερνούν πιο εύκολα τους πόρους της.

Τα δύο κύρια αντιδραστήρια της διαδικασίας είναι το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) και η 2-μερκαπτοαιθανόλη. Η χρήση αυτών των αντιδραστηρίων εξαλείφει σε μεγάλο βαθμό την επίδραση της δομής και του φορτίου και οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται αποκλειστικά με βάση το μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Το SDS είναι ένα απορρυπαντικό, που έχει την ικανότητα να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και να τους επιδίδει αρνητικό φορτίο. Συνδέεται με την πρωτεϊνική βασική αλυσίδα σε σταθερή μοριακή αναλογία. Παρουσία SDS και της 2-μερκαπτοαιθανόλης, ενός αναγωγικού παράγοντα που διασπά δισουλφιδικούς δεσμούς, κρίσιμους για τη σωστή αναδίπλωση, οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται σε γραμμικές αλυσίδες με αρνητικό φορτίο, ανάλογο του μήκους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Το πολυακρυλαμίδιο σχηματίζει μία μήτρα που μοιάζει με πλέγμα και είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών τυπικού μεγέθους. Η αντοχή του πηκτώματος επιτρέπει τον εύκολο

χειρισμό. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πρωτεϊνών επεξεργασμένων με SDS επιτρέπει στους ερευνητές να διαχωρίζουν πρωτεΐνες με βάση το μήκος τους με εύκολο, φθηνό και σχετικά ακριβή τρόπο [94].

### Διαδικασία

Προετοιμασία γέλης πολυακρυλαμιδίου:

Αρχικά, παρασκευάζεται η γέλη πολυακρυλαμιδίου, η οποία περιλαμβάνει τα εξής:

- ✓ 3,4 mL απιονισμένο νερό, 9,4 mL διάλυμα Tris/SDS 0,75 M, 5,88 mL bis-acrylamide, 20 μL αντιδραστήριο TEMED και 100 μL APS 10%. Αυτή η γέλη ονομάζεται resolving gel.

Ανάλογα με το resolving gel παρασκευάζεται μια δεύτερη γέλη, η οποία περιέχει τα εξής:

- ✓ 3 mL απιονισμένο νερό, 3,8 mL Tris/SDS 0,25 M, 0,6 mL bisacrylamide, 15 μL TEMED και 50 μL APS 10%. Αυτή η γέλη ονομάζεται stacking gel.

Στη συνέχεια, το resolving gel προστίθεται στο μεσοδιάστημα ενός ζεύγους ορθογώνιων γυάλινων πλακών, ως διαχωριστικό πήκτωμα. Έπειτα, επικαλύπτεται με νερό για να αποφευχθεί η επαφή με τον αέρα (οξυγόνο), ο οποίος αναστέλλει τον πολυμερισμό. Αφού το resolving gel αφηθεί για περίπου μισή ώρα να πολυμεριστεί, ώστε να σταθεροποιηθεί και να σχηματιστεί πηκτή, αφαιρείται το νερό και η γυάλινη πλάκα συμπληρώνεται με stacking gel, ενώ στην κορυφή της τοποθετείται ένα χτενάκι, το οποίο είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό πηγαδιών, δηλαδή θέσεων στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα και αφήνεται να πολυμεριστεί. Στη συνέχεια, οι πλάκες μεταφέρονται σε ειδική συσκευή, η οποία διαθέτει ένα σύρμα για την επιβολή του δυναμικού. Το χτενάκι αφαιρείται και το εσωτερικό της συσκευής πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα SDS running buffer, το οποίο αποτελείται από διαλύματα Tris 250 mM, γλυκίνης 1,92M και SDS 1% και είναι ρυθμισμένο σε pH = 8,3.

Προετοιμασία δειγμάτων:

Σε 40 μL δείγμα προστίθενται 10 μL SDS loading buffer (20%) και ακολουθεί ο βρασμός τους για 5 min. Το SDS loading buffer περιέχει :

- ✓ 312,5 mM Tris-HCl ρυθμισμένο σε pH = 6,8, 10% SDS, 50% γλυκερόλη, 25% β-μερκαπτεθανόλη και 0.025% μπλε της βρωμοφαινόλης.

Έπειτα, τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικά σχηματισμένες θέσεις του πήγματος. Επιπλέον, σε μια θέση του gel προστίθενται 3,5 μL πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, το οποίο λειτουργεί ως οδηγός (ladder) για την ταυτοποίηση του μοριακού βάρους των δειγμάτων. Τέλος, η συσκευή κλείνει, άρα και το κύκλωμα κλείνει και εφαρμόζεται δυναμικό με τη βοήθεια ηλεκτροδίων για να ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση. Αρχικά, η τάση που επιβάλλεται είναι 50 V για περίπου μισή ώρα, προκειμένου τα δείγματα να διαπεράσουν το stacking gel και να ευθυγραμμιστούν στην αρχή του resolving gel. Ακολούθως, η τάση αυξάνεται στα 100 V, μέχρι το δείγμα οδηγός να φτάσει στη βάση της πηκτής, για περίπου 2,5 – 3 ώρες.

Όταν τελειώσει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αφαιρείται από τη συσκευή και τοποθετείται σε ειδικό περιέκτη μαζί με διάλυμα χρώσης και στη συνέχεια σε συσκευή ήπιας ανάδευσης για 1 ώρα. Έπειτα, το χρωστικό διάλυμα αφαιρείται και στον περιέκτη προστίθεται υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού και ο περιέκτης αφήνεται για περίπου 20 ώρες σε ήπια ανάδευση. Το διάλυμα χρωματισμού αποτελείται από:

- ✓ 0,25% μπλε βαφή Comassie Brilliant Blue (CBB), 40% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ διαλυμένα σε νερό.

Το διάλυμα αποχρωματισμού περιέχει:

- ✓ 20% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ διαλυμένα σε νερό.

Μετά τις 20 ώρες η πηκτή έχει αποχρωματιστεί πλήρως εκτός από τα τμήματα στα οποία βρίσκονται οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, καθώς αυτές συνδέονται ομοιοπολικά με το διάλυμα χρώσης. Έτσι, οι πρωτεϊνικές ζώνες που ξεχωρίζουν συγκρίνονται με τις αντίστοιχες του πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών και επιβεβαιώνεται το μοριακό βάρος και επομένως και η ταυτότητα των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν.



Εικόνα 14: Συσκευή ηλεκτροφόρησης της πρωτεΐνης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

#### 2.2.7.1 Μελέτη δράσης των ενζύμων *StGe2* σε πολυεστέρες και πολυουρεθάνη

Για τη μελέτη της δράσης του ενζύμου *StGe2* πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με πολυμερικά υλικά (PHB, PLA, PCL, PBS, PU, PETam, PETcr). Τα υλικά αυτά βρίσκονται σε μορφή σκόνης κι έχουν κοκκομετρία μικρότερη από 500 nm.



### Αντιδράσεις ενζύμων με πολυμερικά υλικά

Προκειμένου να επιτευχθεί η συγκεκριμένη συγκέντρωση ενζύμου, πραγματοποιήθηκε αραίωση με το εκάστοτε ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης.

Όσον αφορά στην πειραματική διαδικασία, αρχικά ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό  $5 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$  από κάθε πολυμερική σκόνη (PHB, PLA, PCL, PBS, PU, PETam, PETcr) και τοποθετήθηκαν σε erpendorf (1,5 mL). Για κάθε πλαστικό πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις (triplicates) και δύο τυφλά δείγματα (controls), όπου αντί για ένζυμο, προστέθηκε αντίστοιχη ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος αποθήκευσης του κάθε ενζύμου. Επισημαίνεται πως ο όγκος των αντιδράσεων και των controls είναι ίσος με 500  $\mu\text{L}$ . Στη συνέχεια, στα erpendorfs, στις αντιδράσεις προστέθηκαν ρυθμιστικό διάλυμα sodium phosphate buffer, 100 mM, pH=7 και ποσότητα ενζύμου, συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ . Στα controls προστέθηκαν αντίστοιχες ποσότητες Tris – HCl και ρυθμιστικό διάλυμα sodium phosphate buffer, 100 mM, pH=7. Ακολούθως, τα erpendorfs τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενους επωαστήρες erpendorf ρυθμισμένους στην κατάλληλη θερμοκρασία για κάθε ένζυμο. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση 1300 rpm, στους 50 °C και για χρονικό διάστημα 3 ημερών. Ανά 24 ώρες πραγματοποιούταν ανανέωση του ενζύμου και στην αντίδραση γινόταν προσθήκη επιπλέον της μισής ποσότητας ενζυμικού διαλύματος. Η ανανέωση του ενζύμου, εξυπηρετούσε στην αντικατάσταση ποσοτήτων ενζύμου που ήταν πιθανό να έχουν απενεργοποιηθεί λόγω των συνθηκών της αντίδρασης. Μετά το πέρας των 3 ημερών, οι αντιδράσεις σταμάτησαν και τα εναπομείναντα πολυμερικά υλικά οδηγήθηκαν προς επεξεργασία και ανάλυση.

### Απώλεια μάζας των πολυμερικών υλικών

Μόλις τα δείγματα βγουν από το thermomixer, φυγοκεντρούνται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C, για 10 min στα 10.000 rpm. Στη συνέχεια, το υπερκείμενό τους απορρίπτεται (εκτός των αντιδράσεων με PET, το οποίο φυλάσσεται σε erpendorf) και προστίθενται περίπου 300  $\mu\text{L}$  υπερκάθαρο νερό (έκπλυση), το διάλυμα αναδεύεται σε vortex και φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η διαδικασία αυτή της έκπλυσης με υπερκάθαρο νερό επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά. Τέλος, αφού απορριφθεί και το τελευταίο υπερκείμενο από τα δείγματα, τα erpendorfs φυλάσσονται στην κατάψυξη μέχρι να παγώσουν και έπειτα τοποθετούνται στη συσκευή λυοφιλοποίησης, με θάλαμο κενού ALPHA 1-4 της εταιρίας Braun Biotech International, για περίπου 24 ώρες, προκειμένου να απομακρυνθεί η υγρασία από τα δείγματα. Αφού ολοκληρώθηκε η ξήρανση, τα erpendorfs με τη σκόνη που είχε απομείνει ζυγίστηκαν και έτσι υπολογίστηκε η απώλεια μάζας του πολυμερικού υλικού. Τέλος, οι σκόνες ακολουθούν την πορεία της προετοιμασίας των δειγμάτων είτε για HPLC είτε για GPC.

## 2.2.8 Μελέτη του βαθμού αποικοδόμησης του μίγματος PET - αμύλου

### 2.2.8.1 Ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος

Το ένζυμο leaf and branch compost cutinase (LCC-ICCG mutant) εκφράστηκε σε κύτταρα *Escherichia coli* BL21, χρησιμοποιώντας τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET26b(+) (GenScript Biotech B.V. Netherlands) Πιο αναλυτικά, το γονίδιο που εκφράζει το γονίδιο ενδιαφέροντος εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+), ο οποίος ακολούθως με θερμικό σοκ (heat shock), εισήχθη σε βακτήρια *E.Coli* BL21, όπου και πραγματοποιείται ο μετασχηματισμός (transformation). Έπειτα, τα βακτήρια αναπτύσσονται σε τρυβλία αγαρόζης, σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνη (kanamycin, 50 µg/mL) για 24 ώρες στους 37 °C.

### 2.2.8.2 Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός του ενζύμου LCC-ICCG mutant

Αρχικά, για την παραγωγή της LCC-ICCG mutant παρασκευάζονται προκαλλιέργειες LB των 5 mL με αντιβιοτικό καναμυκίνη σε συγκέντρωση 50 µg/mL, στις οποίες τοποθετείται από ένα tip με αποικία κυττάρων από τα τρυβλία αγαρόζης με LB, στα οποία αναπτύχθηκαν τα βακτήρια. Οι προκαλλιέργειες επωάζονται για 24 h στους 37 °C. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται καλλιέργεια LB των 500 mL με ανάλογη προσθήκη καναμυκίνης, στην οποία προστίθεται μία επωασμένη προκαλλιέργεια. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37 °C μέχρι η απορρόφηση στα 600 nm (OD600) να φτάσει στο 0,6 (περίπου 3 h), οπότε και μειώνεται η θερμοκρασία επώασης στους 12 °C για περίπου 1 h και έπειτα επάγεται με 0,2 mM β-D-1-θειογαλακτοπυρανοζίδιο (IPTG) στους 14 °C για 16 ώρες. Ακολούθως, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 15 min στις 14000 στροφές, απορρίπτεται το υπερκείμενο και συλλέγονται τα κύτταρά της, τα οποία επαναιωρούνται σε διάλυμα Talon buffer 1× (εξισορρόπηση - dialysis), βοηθώντας με δυνατή ανάδευση μέσω vortex και τέλος φυλάσσονται σε μεγάλα falcons (50 mL) στην κατάψυξη. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος απομονώνεται και καθαρίζεται από τα ανεπιθύμητα συστατικά του διαλύματος με υγρή χρωματογραφία Talon.

#### IMAC Talon

Η IMAC Talon είναι μία χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography - IMAC) με μία στήλη TalonR και χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό διαλυμάτων πρωτεϊνών και την απομόνωσή τους. Με αυτή τη στήλη χρωματογραφίας ο διαχωρισμός των συστατικών του διαλύματος στηρίζεται σε ειδικές χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του διαλύματος και της στατικής φάσης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η επιθυμητή πρωτεΐνη (LCC) διαθέτει στο ένα άκρο της μια ουρά ιστιδινών, η οποία συνδέεται με τα ακινητοποιημένα ιόντα κοβαλτίου (συγγένεια) από τα οποία αποτελείται η ρητίνη Talon που πληρώνει τη στήλη χρωματογραφίας TalonR. Με αυτό τον τρόπο, η πρωτεΐνη

δεσμεύεται στη στήλη χρωματογραφίας, δηλαδή δημιουργείται σύμπλοκο μεταξύ της ρητίνης της στήλης και της ετερόλογης πρωτεΐνης, και για να αποδεσμευτεί θα πρέπει από τη στήλη να περάσει ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος, το οποίο δρα ανταγωνιστικά με τις ιστιδίνες όσον αφορά στην πρόσδεσή τους στη ρητίνη. Ένα τέτοιο ρυθμιστικό διάλυμα είναι το διάλυμα ιμιδαζολίου ( $\text{CH}_2\text{NCH}$ ), καθώς τα μόρια του ιμιδαζολίου αλληλεπιδρούν πιο έντονα με τα ιόντα κοβαλτίου της ρητίνης αντικαθιστώντας την πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα αυτή να απελευθερώνεται και να παραλαμβάνεται με την κινητή φάση.

Περιγραφή βημάτων διαδικασίας:

- ✓ Ξέπλυμα της στήλης από τον διαλύτη αποθήκευσης (αιθανόλη 20%), αφού πρώτα αυτός τρέξει, με απιονισμένο νερό, δύο φορές.
- ✓ Εξισορρόπηση της στήλης με το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζυμικού διαλύματος (Talon buffer 1×), τρεις φορές. Σημειώνεται πως το ρυθμιστικό διάλυμα είναι το ίδιο με του dialysis.
- ✓ Προσθήκη του εξισορροπημένου σε Tallon ενζυμικού διαλύματος στη στήλη και συλλογή του εκπλύματος (flowthrough) σε falcon. Από το στάδιο αυτό και μετά συλλέγονται όλα τα κλάσματα έκπλυσης σε falcons, τα οποία αποθηκεύονται σε παγόλυτρο.
- ✓ Έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα Talon όγκου 10 mL (wash). Σε αυτό το στάδιο, η κινητή φάση παρασέρνει όλες τις πρωτεΐνες που δεν έχουν δεσμευτεί στη ρητίνη.
- ✓ Έκπλυση της στήλης με διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 5 mM και όγκου 7 mL. Σε αυτό το στάδιο εκλούνται οι πρωτεΐνες που είναι ασθενώς συνδεδεμένες με τη ρητίνη.
- ✓ Έκπλυση της στήλης με διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 10 mM και όγκου 7 mL. Σε αυτό το στάδιο εκλούνται οι πρωτεΐνες που είναι πιο ισχυρά συνδεδεμένες με τη ρητίνη.
- ✓ Έκπλυση της στήλης με διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 100 mM και όγκου 6 mL (sample A). Σε αυτό το στάδιο αποδεσμεύεται και εκλούεται η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, καθώς το διάλυμα ιμιδαζολίου υψηλής συγκέντρωσης δρα ανταγωνιστικά με την πρωτεΐνη για την αλληλεπίδραση με τα ιόντα κοβαλτίου της στήλης.
- ✓ Έκπλυση της στήλης και πάλι με διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 100 mM και όγκου 6 mL (sample B). Σε αυτό το στάδιο εκλούεται με την κινητή φάση και η υπόλοιπη ποσότητα της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος που πιθανώς να μην εκλούστηκε στο προηγούμενο βήμα.
- ✓ Τα κλάσματα έκπλυσης φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 280 nm, όπου ανιχνεύονται οι πεπτιδικοί δεσμοί, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι έχει εκλουστεί όλη η ποσότητα της πρωτεΐνης, αλλά και να προσδιοριστούν τα κλάσματα στα οποία βρίσκεται. Ως control χρησιμοποιείται το διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 100 mM. Με βάση τον

νόμο Lambert – Beer, και τη μέθοδο που έχει αναλυθεί στην ενότητα «Προσδιορισμός συγκέντρωσης ενζύμων», υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

- ✓ Έκπλυση της στήλης από το διάλυμα ιμιδαζολίου με απιονισμένο νερό, τρεις φορές.
- ✓ Έκπλυση της στήλης με αιθανόλη 20% και αποθήκευσή της στο διάλυμα αυτό.

Σημειώνεται ότι τα διαλύματα ιμιδαζολίου που χρησιμοποιούνται στην παραπάνω διαδικασία διαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα Talon. Επίσης χρειάζεται να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο να μη στεγνώσει/αφυδατωθεί η ρητίνη της στήλης κατά τη διάρκεια των παραπάνω βημάτων.

### 2.2.8.3 Μελέτη δράσης ενζύμου LCC-ICCG mutant & αμύλασης με υλικά PET & αμύλου διαφορετικής σύστασης

Για τη μελέτη της δράσης της LCC-ICCG mutant (αποικοδομεί το PET) σε συνεργασία με την εμπορική αμύλαση (Iiquozyme) (αποικοδομεί το άμυλο), πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις των ενζύμων αυτών με ένα νέο πολυμερικό μίγμα που αποτελείται από PET (συνθετικό πολυμερές) και άμυλο (φυσικό πολυμερές), σε ποσοστά 0, 5, 10, 30 και 40%, στις θερμοκρασίες 50 και 70 °C. Ο τελικός όγκος των αντιδράσεων ήταν 1 mL. Οι αντιδράσεις που έγιναν χρησιμοποιώντας μόνο το ένζυμο LCC-ICCG mutant είχαν τελική ποσότητα 60 μg ενζύμου, αυτές που πραγματοποιήθηκαν μόνο με εμπορική αμύλαση είχαν τελική ποσότητα 30 μg αμύλασης και αυτές που πραγματοποιήθηκαν και με LCC-ICCG mutant και με αμύλαση, είχαν αντίστοιχα 60 μg και 30 μg αντίστοιχα, σε ρυθμιστικό διάλυμα citrate – phosphate, pH=7 και συγκέντρωσης 100 mM. Οι αντιδράσεις διήρκεσαν 72 ώρες σε ανάδευση 1200 rpm, σε θερμαινόμενο και ανακινούμενο επωαστήριο erpendorf. Κάθε 24 ώρες, ποσότητα ενζύμου ίση με τη μισή της αρχικής προστίθεται στις αντιδράσεις, έτσι ώστε να διατηρηθούν σταθερές οι μονάδες ενεργότητας του ενζύμου, ενώ στα controls προστίθεται ίση ποσότητα από το διάλυμα εξισορρόπησης. Οι σκόνες του PET με άμυλο σε όλα τα ποσοστά και σε όλες τις θερμοκρασίες (αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με όλους τους συνδυασμούς ποσοστών – θερμοκρασιών) ήταν 10 mg, ζυγισμένα σε erpendorfs (1,5 mL). Τα controls ήταν δύο (duplicates) και οι αντιδράσεις τρεις (triplicates). Μετά το πέρας των 72 h, οι αντιδράσεις τερματίζουν, φυγοκεντρώνται για περίπου 10 min στις 12.000 στροφές και το υπερκείμενό τους φυλάσσεται για να χρησιμοποιηθεί στην HPLC.

Τελικά, ο βαθμός αποικοδόμησης αυτού του πολυμερικού μίγματος προσδιορίστηκε μελετώντας την απώλεια βάρους των δειγμάτων και εντοπίζοντας τα προϊόντα αποικοδόμησης του PET με HPLC, εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε παραπάνω. Άλλη μια ένδειξη της αποικοδόμησης των δειγμάτων του PET με το άμυλο είναι η παρουσία αναγωγικών σακχάρων στο διάλυμα της αντίδρασης. Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος όταν αποδομηθεί απελευθερώνει μόρια γλυκόζης (δομική μονάδα αμύλου), τα οποία ανήκουν στα αναγωγικά σάκχαρα, καθώς ο ανωμερής άνθρακας της γλυκόζης είναι απευθείας συνδεδεμένος με μια υδροξυλομάδα. Ο εντοπισμός αυτών των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας το δινιτροσαλικυλικό οξύ (dinitrosalicylic acid – DNS). Το DNS είναι μια

αρωματική ένωση με κίτρινο χρώμα, η οποία αντιδρά με αναγωγικά μόρια και σχηματίζει την ένωση 3-αμινο-5- νιτροσαλικυλικό οξύ, η οποία απορροφά έντονα στα 540 nm.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι αναλυτικά η εξής: αρχικά σε ένα erpendorf (1,5 mL) προστίθενται 100  $\mu$ L δείγματος και 100  $\mu$ L αντιδραστηρίου DNS και αναδεύονται στο vortex. Ακολουθεί βράσιμο του διαλύματος για 5 min και άμεση τοποθέτησή του σε παγόλουτρο. Στη συνέχεια, προστίθενται 800  $\mu$ L υπερκάθαρο νερό και αναδεύεται σε vortex. Από το τελικό διάλυμα, μεταφέρονται 250  $\mu$ L σε 96-well plate και ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης του στα 540 nm, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων στο δείγμα.

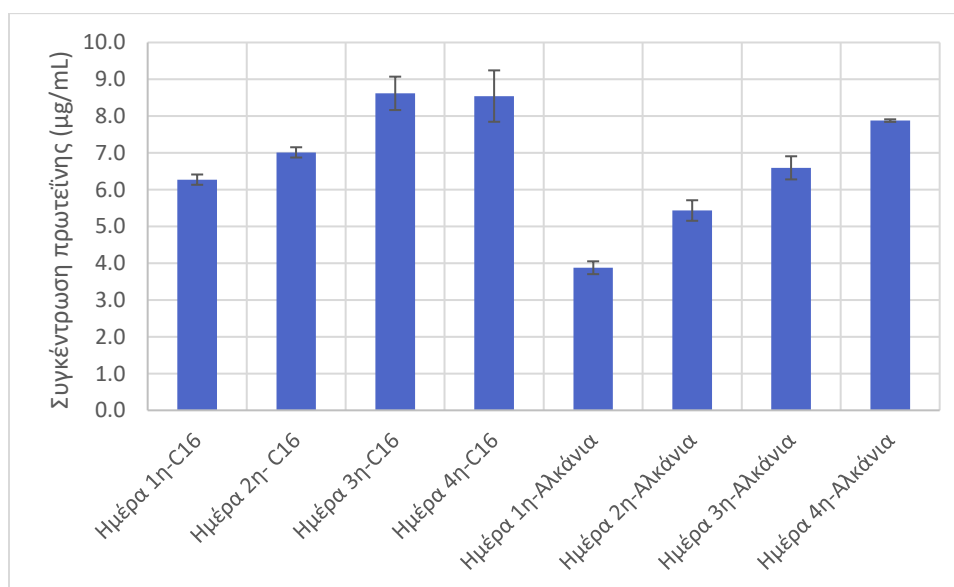
### 3. Παρουσίαση και συζήτηση αποτελεσμάτων

#### 3.1 Αποικοδόμηση PE χρησιμοποιώντας τα εξωκυτταρικά κλάσματα των *Aspergillus transmontanensis* MM36, *Tritirachium* sp., *Penicillium citrinum* MM41 ως βιοκαταλύτες

Τα τρία μυκητιακά στελέχη εμβολιάστηκαν σε υγρές καλλιέργειες, αναπτύχθηκαν και στη συνέχεια, τα υπερκείμενά τους επώαστηκαν με σκόνη PE. Τα δείγματα μόνο με το C<sub>16</sub>, θεωρήθηκαν ως συνθήκη ελέγχου εκείνων που περιλάμβαναν το C<sub>16</sub> και τους επαγωγείς.

##### ❖ *Aspergillus transmontanensis* MM36

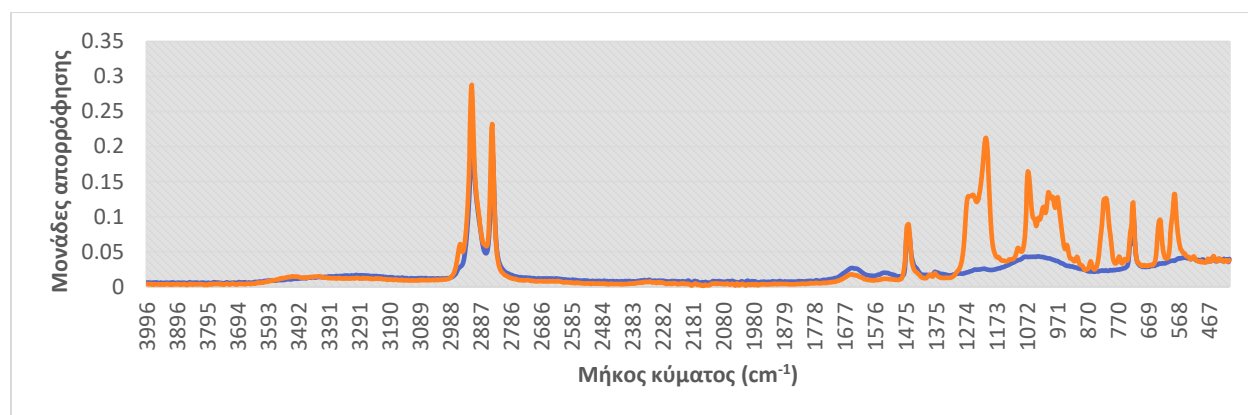
Με το αντιδραστήριο Bradford μετρήθηκε η ποσότητα της πρωτεΐνης των δειγμάτων, πριν αυτά επωαστούν με σκόνη PE. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 1: Συγκέντρωση πρωτεΐνης των δειγμάτων των υπερκείμενων των καλλιεργειών του *Aspergillus transmontanensis* MM36, 1, 2, 3, 4 ημερών.

Στο Διάγραμμα 1, παρατηρείται ότι την 3<sup>η</sup> και την 4<sup>η</sup> μέρα τα δείγματα, τα οποία προέρχονται από τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών του *Aspergillus transmontanensis* MM36 έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Αυτό ισχύει και για τις καλλιιεργειες ελέγχου (C<sub>16</sub>) και για τις καλλιιεργειες εμπλουτισμένες με αλκάνια, με τις μέγιστες τιμές που καταγράφηκαν να προσεγγίζουν τα 8,6 μg/mL (3<sup>η</sup> μέρα) και 7,9 μg/mL (4<sup>η</sup> μέρα) αντίστοιχα.

Τα δείγματα με τη σκόνη PE, τα οποία επώαστηκαν με τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών των μυκήτων, μετρήθηκαν με τη μέθοδο FT-IR, για να εκτιμηθεί η αποικοδόμηση του PE, μέσω της ανίχνευσης τυχόν αλλαγών στο μοριακό του αποτύπωμα. Τα φάσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω.



Διάγραμμα 2: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιιεργειας 1<sup>ης</sup> ημέρας του *Aspergillus transmontanensis* MM36 (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Ακολουθεί γενική περιγραφή των κορυφών των φασμάτων του PE, που παρατηρούνται παρακάτω.

Καθώς η τεχνική του FT-IR είναι μία ποιοτική μέθοδος, υπολογίζονται οι λόγοι μεταξύ των χαρακτηριστικών κορυφών του PE και νέων κορυφών, στις διαφορετικές συνθήκες, ούτως ώστε να γίνει έμμεσα σύγκριση και υπολογισμός του βαθμού αποικοδόμησης του υλικού.

Οι 4 χαρακτηριστικές κορυφές του PE εντοπίζονται στα 2916 και 2850 cm<sup>-1</sup>, οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις των ομάδων CH<sub>3</sub> και CH<sub>2</sub>, αντίστοιχα, και η παρουσία τους είναι χαρακτηριστική στα αλκάνια. Τα φάσματα της σκόνης PE, έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο της καλλιιεργειας των μυκήτων που αναπτύσσονται σε διάλυμα MM με αλκάνια, διαφέρουν σημαντικά σε σύγκριση με τα φάσματα του υλικού, έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο των μυκήτων που αναπτύχθηκαν σε MM μόνο με C<sub>16</sub>. Πιο συγκεκριμένα η παρακολουθούμενη απορρόφηση στα 3200 cm<sup>-1</sup> (3090-3650 cm<sup>-1</sup>) επιβεβαιώνει την παρουσία οξειδωμένων τμημάτων που περιέχουν ομάδες -OH, τα οποία αποτελούν τυπικά προϊόντα αποικοδόμησης για τις πολυολεφίνες. Ο δεσμός C-O απορροφά στα 1072 έως 1300 cm<sup>-1</sup> και υποδεικνύει βιολογική φθορά, η οποία αποτελεί το πρώτο βήμα του μηχανισμού αποικοδόμησης του PE. Πιο συγκεκριμένα η κορυφή στα 1208 cm<sup>-1</sup> αντιστοιχεί στον δεσμό C-O που οφείλεται στον σχηματισμό ακυλικών ομάδων, ενώ οι κορυφές στα 1092 και 1070 cm<sup>-1</sup> αποδίδονται στις

σηματιζόμενες αλκοξυ-ομάδες. Ο σχηματισμός των αλκοξυ-ομάδων μπορεί να σχετίζεται με υδροξυλίωση, παρέχοντας έτσι στοιχεία για την οξειδωτική αποικοδόμηση του PE. Εκτός αυτού, ο σχηματισμός C-O θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί στη σταθεροποίηση αν και τα υδρουπεροξειδία, τα οποία είναι προϊόντα της οξειδωτικής αποικοδόμησης του PE, διασπώνται οδηγώντας στον σχηματισμό ομάδων υδροξυλίου και καρβονυλικών ομάδων ή ριζών. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της βιολογικής υποβάθμισης του PE, οι καρβονυλικές ομάδες ( $1715-1740\text{ cm}^{-1}$ ) αναμένεται επίσης να σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της βιολογικής φθοράς κυρίως λόγω οξείδωσης από αβιοτικούς παράγοντες (π.χ. φυσική και χημική επεξεργασία). Η έντονη ένταση απορρόφησης του διπλού δεσμού C=C στα  $1651$  και  $818\text{ cm}^{-1}$  που παρακολουθείται κυρίως στα φάσματα MM με αλκάνια, σχετίζεται επίσης με τη βιολογική φθορά του PE και υποδηλώνει τη διάσπαση της αλυσίδας. Η διάσπαση της αλυσίδας μέσω του σχηματισμού βινυλικών άκρων ( $\text{H}_2\text{C}=\text{C}-$ ) παρατηρείται επίσης για τη σκόνη PE που έχει υποστεί επεξεργασία στα  $919\text{ cm}^{-1}$ . Η επεξεργασία του LDPE με υπερκείμενα καλλιεργειών μυκήτων, που προκαλείται από την καλλιέργειά τους σε μέσο ανάπτυξης MM με αλκάνια, οδήγησε σε σημαντικά διαφορετικά φάσματα, παρέχοντας μια ισχυρή ένδειξη των τροποποιήσεων της μοριακής δομής, που αποδίδονται στη βιολογική φθορά του PE και υποδηλώνει τη διάσπαση της αλυσίδας [12].

Υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων:

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916\text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465\text{ cm}^{-1}} = 3,2$$

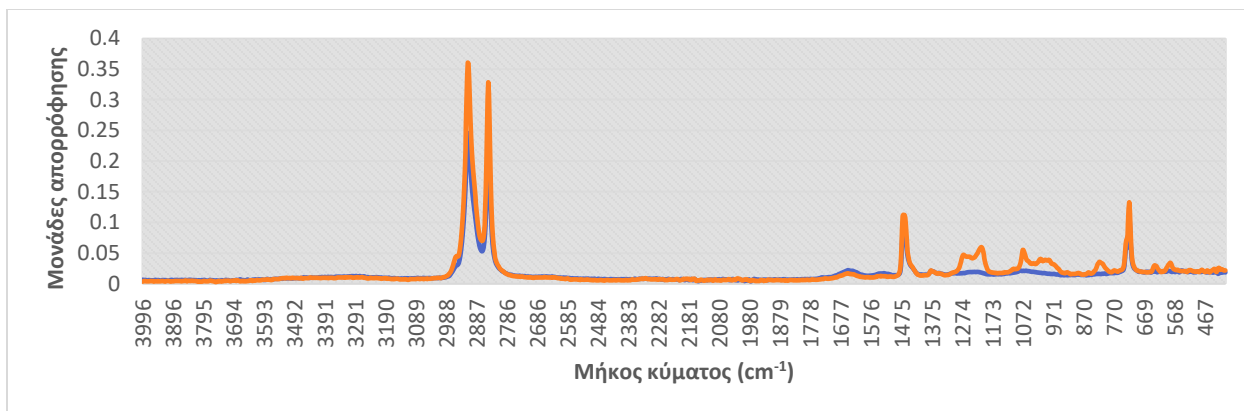
$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916\text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465\text{ cm}^{-1}} = 2,7$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916\text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1208\text{ cm}^{-1}} = 1,4$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916\text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1208\text{ cm}^{-1}} = 8,2$$

Οι λόγοι αυτοί επιλέχθηκαν, γιατί αντιστοιχούν σε χαρακτηριστικές κορυφές του PE και σε κορυφές που μπορεί να συνδέονται με τροποποίηση.

Στο Διάγραμμα 2 φαίνεται πως τα δείγματα, ενώ έχουν την ίδια τάση, έχουν αρκετές διαφορετικές κορυφές μεταξύ τους, αλλά παρατηρείται και διαφορετική ένταση σε κάποιες κορυφές, ενδείξεις τροποποίησης του PE. Το δείγμα που προέρχεται από καλλιέργειες μυκήτων που περιείχαν  $C_{16}$  και αλκάνια, έχει περισσότερες κορυφές και μεγαλύτερης έντασης, γεγονός το οποίο είναι εμφανές και από τους λόγους των κορυφών. Βέβαια η χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης της 1<sup>ης</sup> μέρας δε συνάδει με την εικόνα του φάσματος.



Διάγραμμα 3: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 2<sup>ης</sup> ημέρας του *Aspergillus transmontanensis* MM36 (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων:

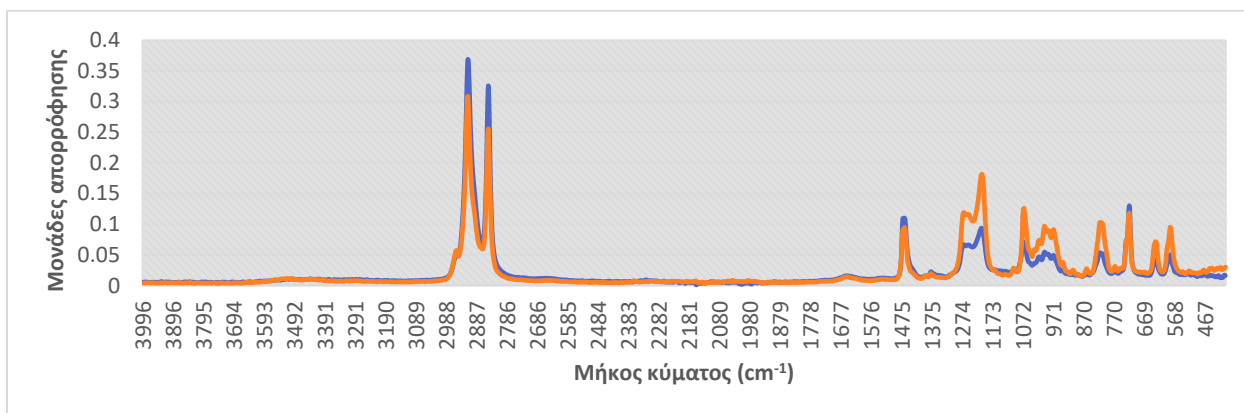
$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 3,2$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 2,8$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1210 \text{ cm}^{-1}} = 6,0$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1210 \text{ cm}^{-1}} = 13,3$$

Στο Διάγραμμα 3 φαίνεται πως τα δείγματα έχουν κάποιες διαφορετικές κορυφές μεταξύ τους, εξίσου σημαντικές με της 1<sup>ης</sup> μέρας, αλλά παρατηρείται και διαφορετική ένταση σε κάποιες κορυφές, ενδείξεις τροποποίησης του PE. Το δείγμα που προέρχεται από καλλιέργειες μυκήτων που περιείχαν C<sub>16</sub> και αλκάνια, έχει περισσότερες κορυφές και μεγαλύτερης έντασης, γεγονός το οποίο είναι εμφανές και από τους λόγους των κορυφών.



Διάγραμμα 4: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 3<sup>ης</sup> ημέρας του *Aspergillus transmontanensis* MM36 (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων:

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 3,3$$

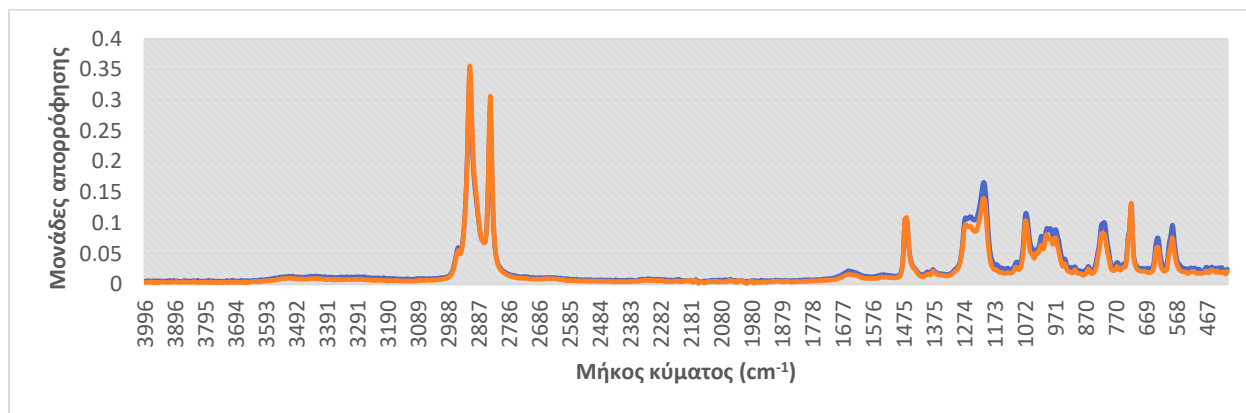
$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 3,2$$



$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1210 \text{ cm}^{-1}} = 3,9$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1210 \text{ cm}^{-1}} = 1,7$$

Στο Διάγραμμα 4 φαίνεται πως τα δείγματα έχουν κάποιες μικρές διαφορετικές κορυφές μεταξύ τους, αλλά παρατηρείται και διαφορετική ένταση σε κάποιες κορυφές, ενδείξεις τροποποίησης του PE, γεγονός το οποίο είναι εμφανές και από τους λόγους των κορυφών.



Διάγραμμα 5: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 4<sup>ης</sup> ημέρας του *Aspergillus transmontanensis* MM36 (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων:

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 3,2$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 3,3$$

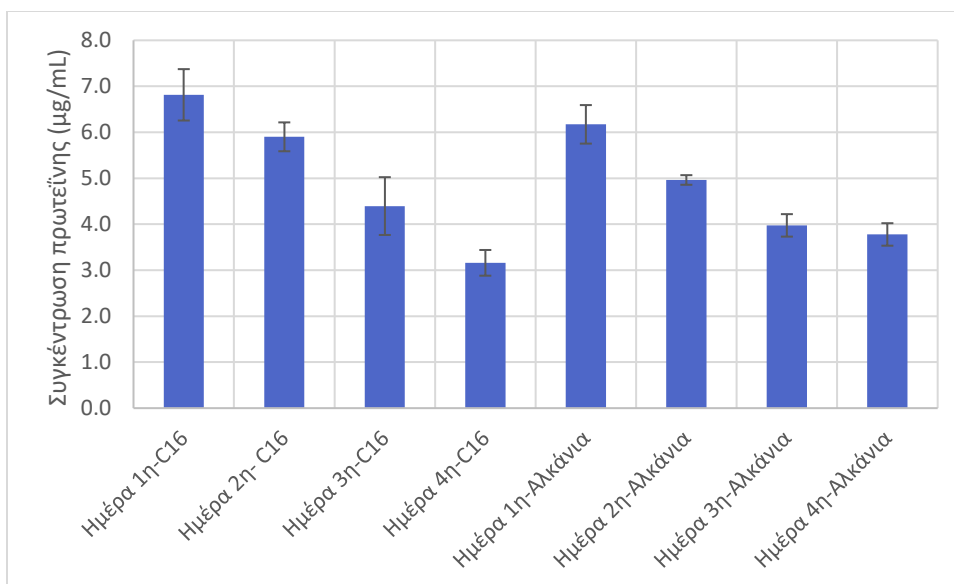
$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1207 \text{ cm}^{-1}} = 2,1$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1207 \text{ cm}^{-1}} = 2,5$$

Στο Διάγραμμα 5 φαίνεται πως τα δείγματα έχουν κάποιες μικρές διαφορετικές κορυφές μεταξύ τους, αλλά παρατηρείται και διαφορετική ένταση σε κάποιες κορυφές, ενδείξεις τροποποίησης του PE. Παρατηρούνται βέβαια λιγότερες διαφορές συγκριτικά με τις προηγούμενες μέρες, κάτι το οποίο φαίνεται και από τη μικρότερη διαφορά που έχουν οι λόγοι των δειγμάτων μεταξύ τους.

#### ❖ *Tritirachium* sp.

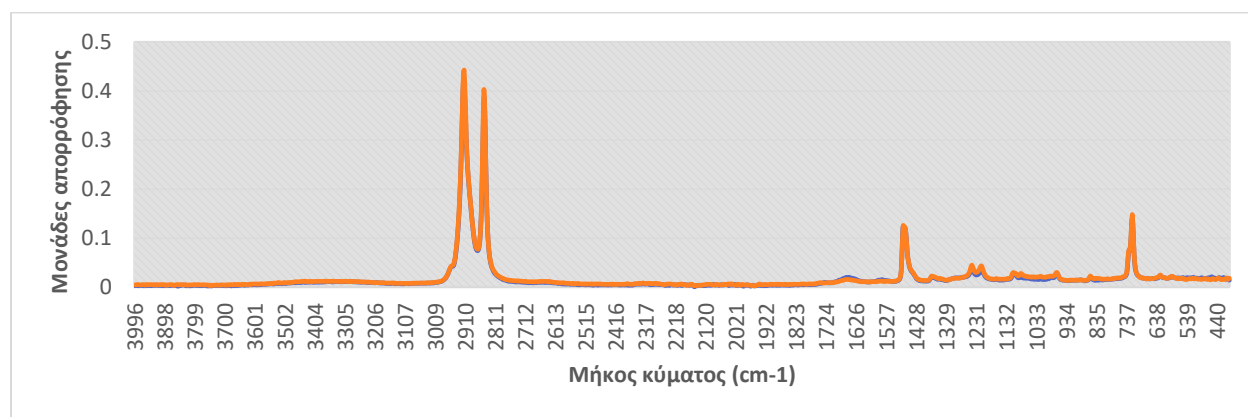
Με το αντιδραστήριο Bradford μετρήθηκε η ποσότητα της πρωτεΐνης των δειγμάτων, πριν αυτά επωαστούν με σκόνη PE. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση πρωτεΐνης των δειγμάτων των υπερκείμενων των καλλιεργειών του *Tritirachium sp.*, 1, 2, 3, 4 ημερών.

Στο Διάγραμμα 6, παρατηρείται ότι την 1<sup>η</sup> και τη 2<sup>η</sup> μέρα τα δείγματα, τα οποία προέρχονται από τα υπερκείμενα των καλλιεργειών του *Tritirachium sp.*, έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Αυτό ισχύει και για τις καλλιέργειες ελέγχου (C<sub>16</sub>) και για τις καλλιέργειες εμπλουτισμένες με αλκάνια, προσεγγίζοντας τα 7,2 µg/mL (1<sup>η</sup> μέρα) και 5,9 µg/mL (2<sup>η</sup> μέρα) αντίστοιχα.

Τα δείγματα με τη σκόνη PE, τα οποία επώαστηκαν με τα υπερκείμενα των καλλιεργειών των μυκήτων, μετρήθηκαν με τη μέθοδο FT-IR, για να εκτιμηθεί η αποικοδόμηση του PE, μέσω της ανίχνευσης τυχόν αλλαγών στο μοριακό του αποτύπωμα. Τα φάσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω.



Διάγραμμα 7: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 1<sup>ης</sup> ημέρας του *Tritirachium sp.* (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Στο Διάγραμμα 7 φαίνεται πως τα δείγματα δεν παρουσιάζουν σχεδόν καμία διαφορά μεταξύ τους, γι' αυτόν τον λόγο υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων.

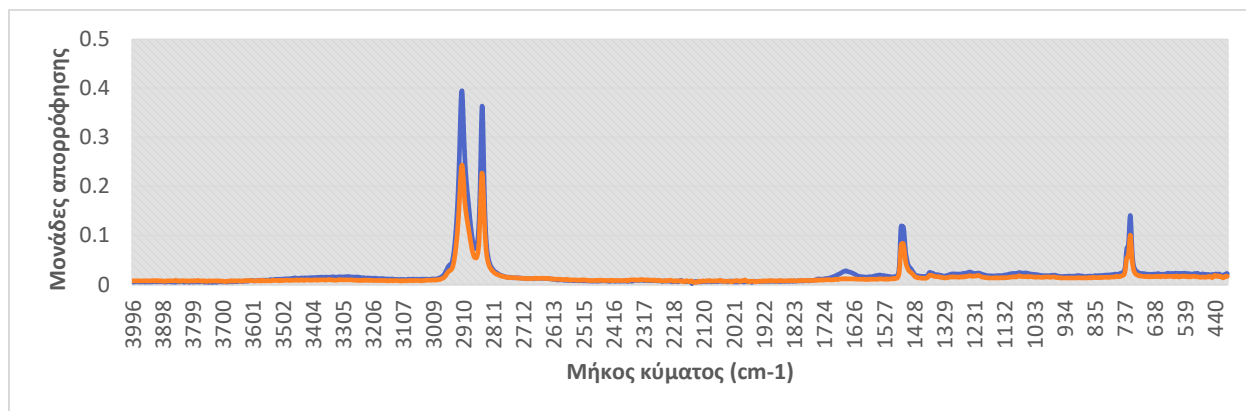
$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1471 \text{ cm}^{-1}} = 3,4$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1471 \text{ cm}^{-1}} = 3,5$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1245 \text{ cm}^{-1}} = 10,7$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1245 \text{ cm}^{-1}} = 9,8$$

Από τους παραπάνω λόγους, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα φάσματα είναι σχεδόν ίδια μεταξύ τους, εκτός από κάποιες μικρές κορυφές που έχουν διαφορετική ένταση.



Διάγραμμα 8: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιεργειας 2<sup>ης</sup> ημέρας του *Tritirachium sp.* (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων:

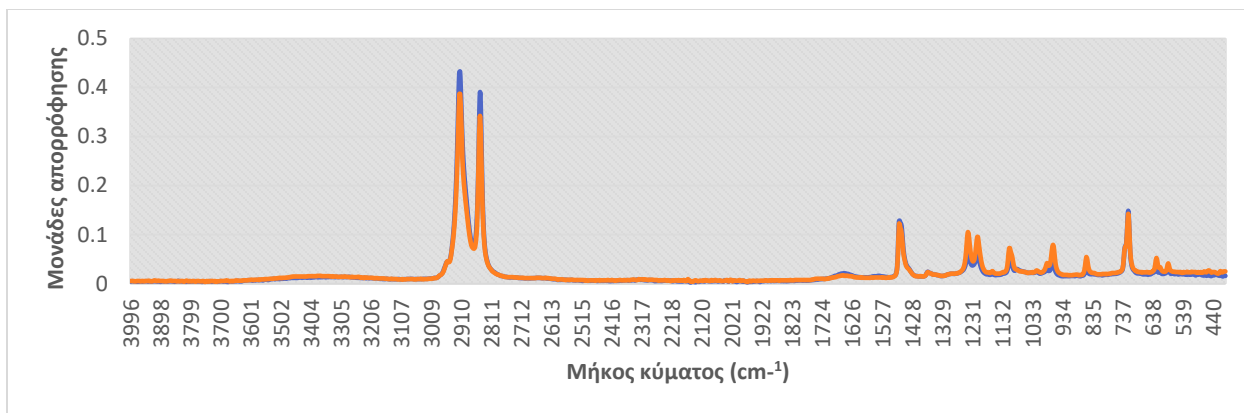
$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1471 \text{ cm}^{-1}} = 3,3$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1471 \text{ cm}^{-1}} = 3,0$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1245 \text{ cm}^{-1}} = 15,3$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1245 \text{ cm}^{-1}} = 13,2$$

Στο Διάγραμμα 8 φαίνεται πως τα δείγματα έχουν μικρές διαφορές μεταξύ τους, αλλά παρατηρείται και διαφορετική ένταση σε κάποιες κορυφές, ενδείξεις τροποποίησης του PE. Αρκετά λιγότερες συγκριτικά με τον *Aspergillus transmontanensis* MM36. Το δείγμα που προέρχεται από το υπερκείμενο των καλλιεργειών ελέγχου έχει κορυφές μεγαλύτερης έντασης, γεγονός το οποίο είναι εμφανές και από τους λόγους των κορυφών.



Διάγραμμα 9: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 3<sup>ης</sup> ημέρας του *Tritirachium sp.* (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Στο Διάγραμμα 9 φαίνεται πως τα δείγματα έχουν κάποιες διαφορετικής έντασης κορυφές μεταξύ τους, ένδειξη τροποποίησης του PE. Το δείγμα που προέρχεται από καλλιέργειες μυκήτων που περιείχαν μόνο C<sub>16</sub>, έχει κορυφές μεγαλύτερης έντασης. Παρουσιάζουν λιγότερες διαφορές συγκριτικά με τη 2<sup>η</sup> μέρα. Λόγω των μικρών διαφορών υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων.

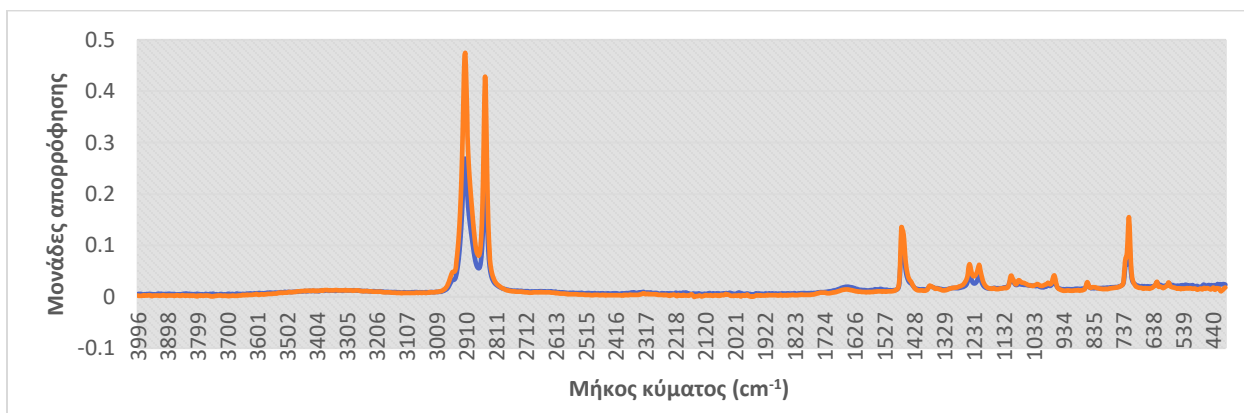
$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1471 \text{ cm}^{-1}} = 3,4$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1471 \text{ cm}^{-1}} = 3,1$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1214 \text{ cm}^{-1}} = 6,9$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1214 \text{ cm}^{-1}} = 3,7$$

Από τους παραπάνω λόγους, ειδικότερα από τον δεύτερο, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι κορυφές στα φάσματα, εν τέλει έχουν αρκετά διαφορετικές εντάσεις μεταξύ τους.



Διάγραμμα 10: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 4<sup>ης</sup> ημέρας του *Tritirachium sp.* (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Στο Διάγραμμα 10 φαίνεται πως τα δείγματα παρουσιάζουν διαφορετική ένταση σε κάποιες κορυφές, ενδείξεις τροποποίησης του PE. Το δείγμα που προέρχεται από καλλιέργειες μυκήτων

που περιείχαν C<sub>16</sub> και αλκάνια, έχει μεγαλύτερης έντασης κορυφές. Υπάρχουν αρκετά λιγότερες διαφορές συγκριτικά με την 3<sup>η</sup> μέρα αλλά και με τον *Aspergillus transmontanensis* MM36. Λόγω των μικρών διαφορών υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων.

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1471 \text{ cm}^{-1}} = 3,0$$

$$\text{Alk}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1471 \text{ cm}^{-1}} = 3,5$$

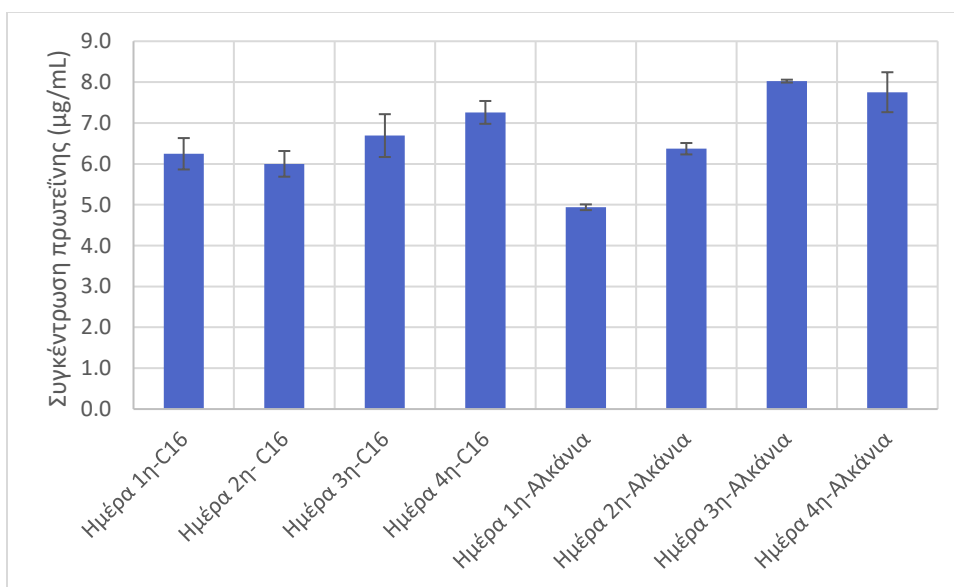
$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1214 \text{ cm}^{-1}} = 6,1$$

$$\text{Alk}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1214 \text{ cm}^{-1}} = 7,5$$

Από τους παραπάνω λόγους, ειδικότερα από τον δεύτερο, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι κορυφές στα φάσματα, εν τέλει έχουν αρκετά διαφορετικές εντάσεις μεταξύ τους.

#### ❖ *Penicillium citrinum* MM41

Με το αντιδραστήριο Bradford μετρήθηκε η ποσότητα της πρωτεΐνης των δειγμάτων, πριν αυτά επωαστούν με σκόνη PE. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.

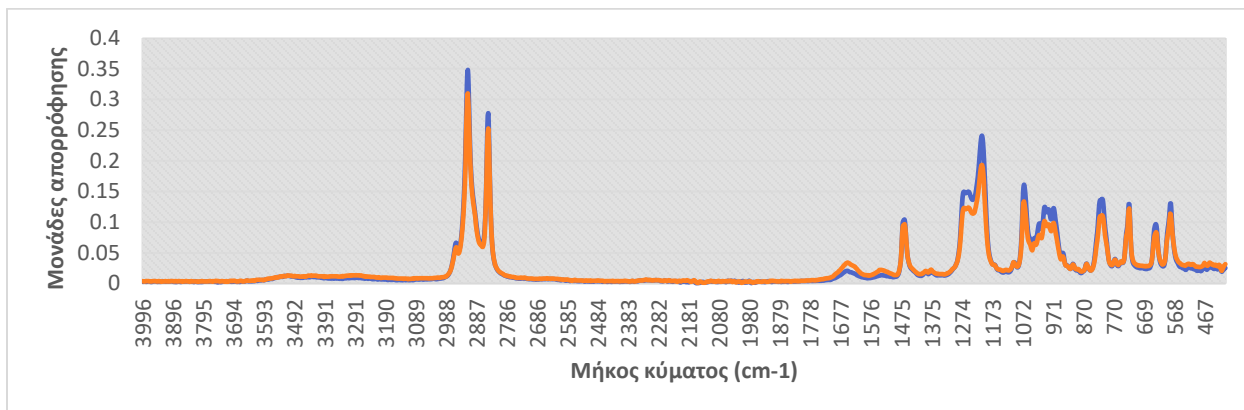


Διάγραμμα 11: Συγκέντρωση πρωτεΐνης των δειγμάτων των υπερκείμενων των καλλιεργιών του *Penicillium citrinum* MM41, 1, 2, 3, 4 ημερών.

Στο Διάγραμμα 11, παρατηρείται ότι την 3<sup>η</sup> και την 4<sup>η</sup> μέρα τα υπερκείμενα δείγματα, τα οποία προέρχονται από την καλλιέργεια του *Penicillium citrinum* MM41, έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, αλλά με πολύ μικρή διαφορά συγκριτικά με την 1<sup>η</sup> και τη 2<sup>η</sup> ημέρα. Αυτό ισχύει και για τις καλλιέργειες ελέγχου (C<sub>16</sub>) και για τις καλλιέργειες εμπλουτισμένες με αλκάνια, προσεγγίζοντας τα 7,3 μg/mL (4<sup>η</sup> μέρα) και 8,0 μg/mL (3<sup>η</sup> μέρα) αντίστοιχα.

Τα δείγματα με τη σκόνη PE, τα οποία επώαστηκαν με τα υπερκείμενα των καλλιεργιών των μυκήτων, μετρήθηκαν με τη μέθοδο FT-IR, για να εκτιμηθεί η αποικοδόμηση του PE, μέσω της

ανίχνευσης τυχόν αλλαγών στο μοριακό του αποτύπωμα. Τα φάσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω.



Διάγραμμα 12: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 1<sup>ης</sup> ημέρας του *Penicillium citrinum* MM41 (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων:

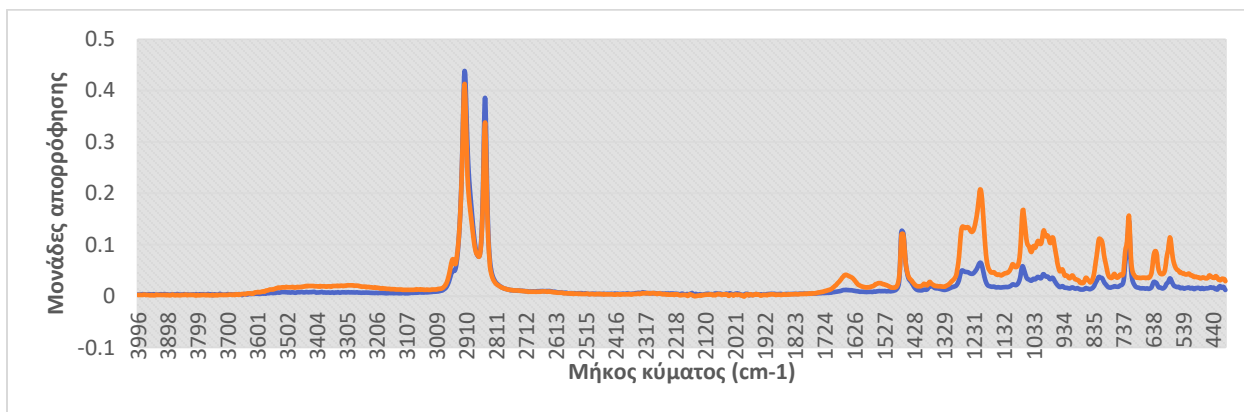
$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 3,3$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 3,2$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1207 \text{ cm}^{-1}} = 1,4$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1207 \text{ cm}^{-1}} = 1,6$$

Στο Διάγραμμα 12 φαίνεται πως τα δείγματα έχουν μεγάλης έντασης κορυφές και θυμίζουν τα δείγματα του *Aspergillus transmontanensis* MM36. Μεταξύ τους τα δείγματα έχουν τις ίδιες κορυφές με διαφορετική ένταση. Το δείγμα που προέρχεται από καλλιέργειες μυκήτων που περιείχαν μόνο C<sub>16</sub>, έχει κορυφές μεγαλύτερης έντασης.



Διάγραμμα 13: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 2<sup>ης</sup> ημέρας του *Penicillium citrinum* MM41 (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων:

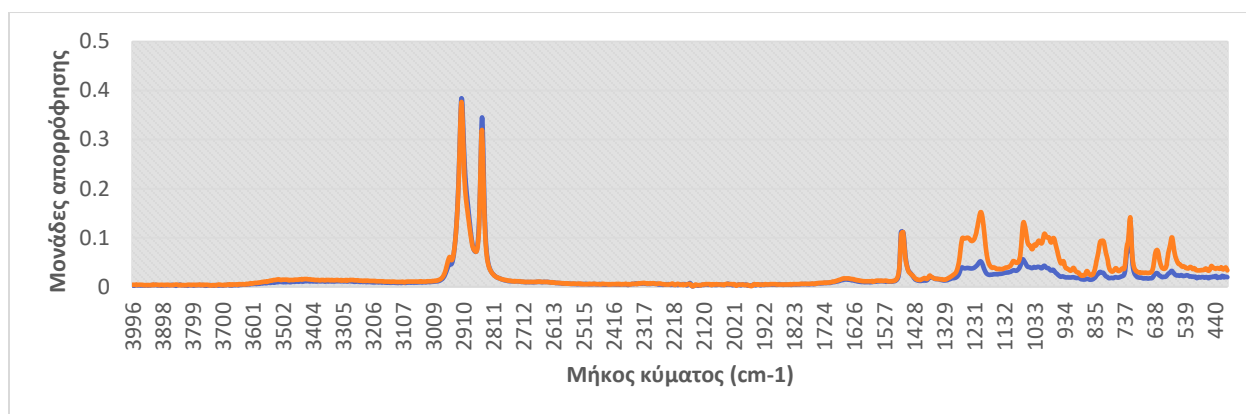
$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 3,5$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 3,4$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1207 \text{ cm}^{-1}} = 6,8$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1207 \text{ cm}^{-1}} = 2,0$$

Στο Διάγραμμα 13 φαίνεται πως τα δείγματα έχουν κάποιες μικρές διαφορετικές κορυφές μεταξύ τους, αλλά παρατηρείται και διαφορετική ένταση σε κάποιες κορυφές, ενδείξεις τροποποίησης του PE. Το δείγμα που προέρχεται από καλλιέργειες μυκήτων που περιείχαν C<sub>16</sub> και αλκάνια, έχει αρκετά μεγαλύτερης έντασης κορυφές, γεγονός το οποίο είναι εμφανές και από τους λόγους των κορυφών.



Διάγραμμα 14: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 3<sup>ης</sup> ημέρας του *Penicillium citrinum* MM41 (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων:

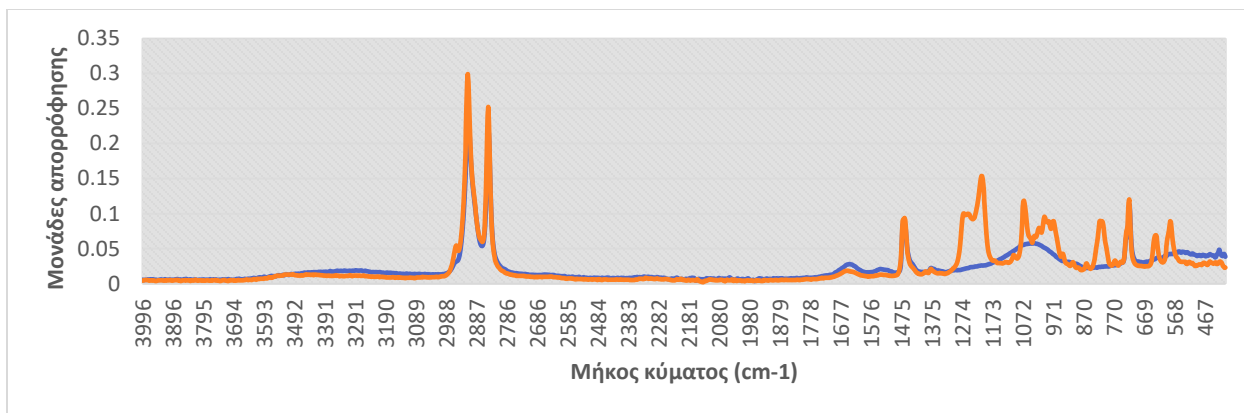
$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 3,4$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 3,4$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1207 \text{ cm}^{-1}} = 7,5$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1207 \text{ cm}^{-1}} = 2,5$$

Στο Διάγραμμα 14 φαίνεται πως τα δείγματα έχουν κάποιες μικρές διαφορετικές κορυφές μεταξύ τους, αλλά παρατηρείται και διαφορετική ένταση σε κάποιες κορυφές, ενδείξεις τροποποίησης του PE. Το δείγμα που προέρχεται από καλλιέργειες μυκήτων που περιείχαν C<sub>16</sub> και αλκάνια, έχει αρκετά μεγαλύτερης έντασης κορυφές, γεγονός το οποίο είναι εμφανές και από τους λόγους των κορυφών.



Διάγραμμα 15: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 4<sup>ης</sup> ημέρας του *Penicillium citrinum* MM41 (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργιών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργιών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων:

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 2,7$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1465 \text{ cm}^{-1}} = 3,2$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1207 \text{ cm}^{-1}} = 8,9$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2916 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1207 \text{ cm}^{-1}} = 1,9$$

Στο Διάγραμμα 15 φαίνεται πως τα δείγματα έχουν αρκετές διαφορετικές κορυφές μεταξύ τους, αλλά παρατηρείται και διαφορετική ένταση σε κάποιες κορυφές, ενδείξεις τροποποίησης του PE. Το δείγμα που προέρχεται από καλλιέργειες μυκήτων που περιείχαν C<sub>16</sub> και αλκάνια, έχει περισσότερες κορυφές και μεγαλύτερης έντασης, γεγονός το οποίο είναι εμφανές και από τους λόγους των κορυφών. Την 4<sup>η</sup> μέρα παρουσιάζουν σίγουρα τις περισσότερες διαφορές, συγκριτικά με τις προηγούμενες μέρες, γεγονός που συνάδει και με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, που έχει δηλαδή τη μεγαλύτερη την 4<sup>η</sup> μέρα.

Έχοντας μελετήσει όλα τα παραπάνω διαγράμματα και φάσματα ανακεφαλαιώνονται και συμπεραίνονται τα παρακάτω.

Και για τα τρία μυκητιακά στελέχη *Aspergillus transmontanensis* MM36, *Tritirachium* sp., *Penicillium citrinum* MM41 παρασκευάστηκαν καλλιέργειες και με το C<sub>16</sub>, που είχε τον ρόλο του control και με C<sub>16</sub> μαζί με αλκάνια. Οι υγρές καλλιέργειές τους τερματίζονταν κάθε 24 ώρες για 4 ημέρες.

Έπειτα από επώαση 4 ημερών της σκόνης PE με τα υπερκείμενα των καλλιεργιών, από τους μύκητες *Aspergillus transmontanensis* MM36, *Tritirachium* sp., και *Penicillium citrinum* MM41, παρατηρήθηκε τροποποίηση του πλαστικού και πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα του FT-IR έδειξαν αλλαγές στο μοριακό αποτύπωμα του PE. Επιπλέον, μέσω του προσδιορισμού της απορρόφησης, μέσω φασματοφωτομερίας με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Bradford, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης όσο περνούσαν οι ώρες. Η αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου και η ύπαρξη διαφορετικών κορυφών ή μεγαλύτερης έντασης μεταξύ των control και των δειγμάτων, αποτελούν σημαντικές ενδείξεις τροποποίησης του PE.



Σημειώνεται πως στην περίπτωση των αλκανίων η τροποποίηση είναι πιο γρήγορη χρονικά συγκριτικά με τα δείγματα που κατεργάζονται από τα εξωκυτταρικά κλάσματα των καλλιιεργειών με C<sub>16</sub>. Επίσης, όσον αφορά στα φάσματα του *Penicillium citrinum* MM41, ήδη από την 1<sup>η</sup> μέρα φαίνονται τα δύο φάσματα του C<sub>16</sub> και των αλκανίων να είναι παραπλήσια. Επομένως, πιθανώς εκφράζονται τα ίδια ένζυμα και άρα το C<sub>16</sub> να λειτουργεί κι αυτό σαν επαγωγέας. Άρα, αυτό θα δημιουργούσε πρόβλημα στην πραγματοποίηση μιας συγκριτικής μελέτης και στον εντοπισμό των πρωτεϊνών που υπερεκφράζονται παρουσία αλκανίων. Από την άλλη όσον αφορά στον *Aspergillus transmontanensis* MM36, η τροποποίηση του PE είναι πιο εκτενής, γιατί δημιουργούνται πολλές διαφορετικές κορυφές, σε σύγκριση με τον *Tritirachium* sp. που στα φάσματά του παρατηρούνται λίγες κορυφές χαμηλής έντασης.

Τροποποίηση του PE έχει παρατηρηθεί και από άλλους μύκητες, όπως είναι οι *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* και *Aspergillus oryzae*, οι οποίοι καλλιιεργήθηκαν μαζί (consortium) και μετά από επώαση 55 ημερών με το πλαστικό προκάλεσαν απώλεια βάρους 26,15% και αλλαγές στα φάσματα του FT-IR. Φαίνεται ότι η δράση των συγκεκριμένων μυκήτων της παρούσας διπλωματικής είναι καλύτερη από χρονικής άποψης αυτής των μυκήτων που έχουν μελετηθεί, καθώς σε αρκετά μικρότερο χρονικό διάστημα επιτυγχάνει παρόμοια αποτελέσματα υποβάθμισης του πλαστικού, όσον αφορά στα φάσματα του FT-IR [95]. Γενικότερα, παρατηρήθηκε πως η συγκέντρωση πρωτεΐνης δε συνάδει πάντα με την εικόνα των φασμάτων, δηλαδή υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης δε σημαίνει απαραίτητα και αλλαγές στο μοριακό αποτύπωμα του PE. Αυτό, δηλαδή η ύπαρξη μικρής συνεισφοράς στην αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, συμβαίνει λόγω της έκφρασης και πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό, καθώς επίσης και λόγω του θανάτου και κατ' επέκταση της λύσης των κυττάρων, που συνεπάγεται την απελευθέρωση εσωκυτταρικών πρωτεϊνών στο θρεπτικό της καλλιέργειας.

### 3.1.1 Εύρεση της βέλτιστης χρονικής στιγμής για την ανάλυση του εξωκυτταρικού κλάσματος του στελέχους *Aspergillus transmontanensis* MM36

Με βάση την συγκριτική ανάλυση που παρουσιάστηκε παραπάνω, επιλέχθηκε ο μικροοργανισμός *Aspergillus transmontanensis* MM36 για περαιτέρω ανάλυση μέσω πρωτεομικών τεχνικών, ούτως ώστε να ταυτοποιηθούν τα ένζυμα που εκφράζονται σε συνθήκες παρουσίας αλκανίων, διότι στα φάσματά του φαίνονται πιο έντονες αλλαγές στο PE. Επίσης για τη συγκεκριμένη αρκετά ευαίσθητη ανάλυση επιλέχθηκε ο εμβολιασμός με σπόρια, για να είναι εφικτό οι καλλιέργειες του ίδιου μύκητα να έχουν το ίδιο αρχικό εμβόλιο ώστε τα αποτελέσματα να είναι επαναλήψιμα, και συγκρίσιμα μεταξύ τους.

Η συγκέντρωση των σπορίων των τριών μυκήτων ήταν οι εξής:

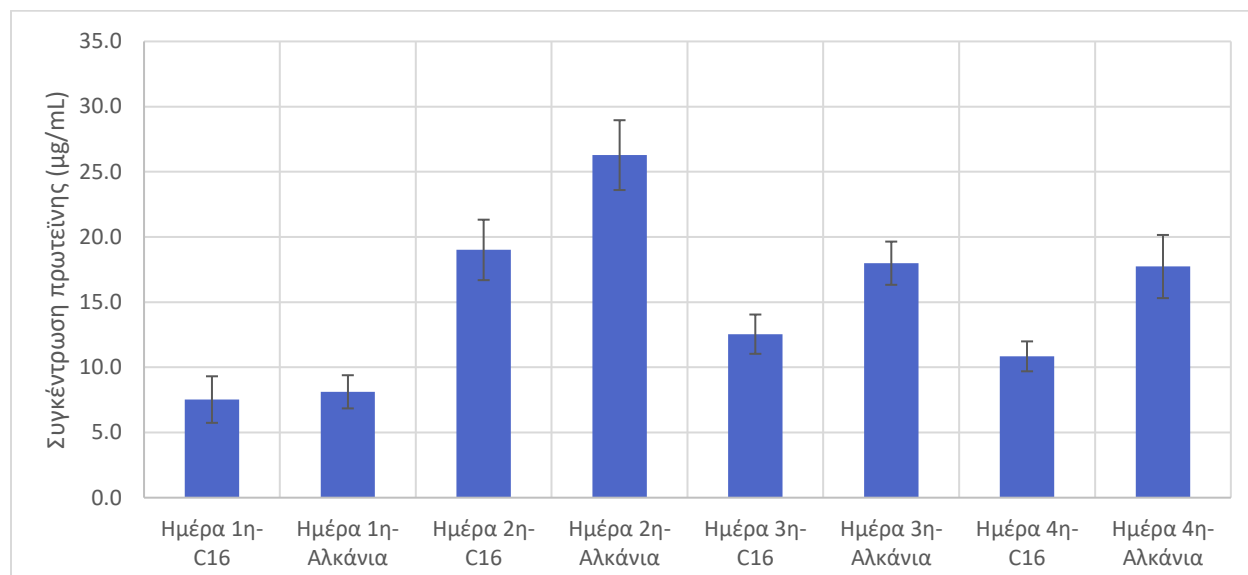
*Aspergillus transmontanensis* MM36:  $1,3 \cdot 10^7 \frac{\text{spores}}{\text{mL}}$ , με αραιώση 1:10 και  $5 \cdot 10^7 \frac{\text{spores}}{\text{mL}}$ , με αραιώση 1:50

*Penicillium citrinum* MM41:  $0,98 \cdot 10^7 \frac{\text{spores}}{\text{mL}}$ , με αραιώση 1:10

*Tritirachium* sp.:  $7,6 \cdot 10^6 \frac{\text{spores}}{\text{mL}}$ , με αραιώση 1:5

Πριν πραγματοποιηθεί η διαδικασία για την πρωτεομική ανάλυση, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τα σπόρια του *Aspergillus transmontanensis* MM36, δηλαδή παρασκευάστηκαν υγρές καλλιέργειες, οι οποίες εμβολιάστηκαν με σπόρια και έπειτα το υπερκείμενό τους επώαστηκε με σκόνη ΡΕ, με σκοπό την εύρεση της κατάλληλης χρονικής στιγμής τερματισμού των καλλιεργειών, δηλαδή την εύρεση της ημέρας με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης και τις περισσότερες αλλαγές στα φάσματα FT-IR.

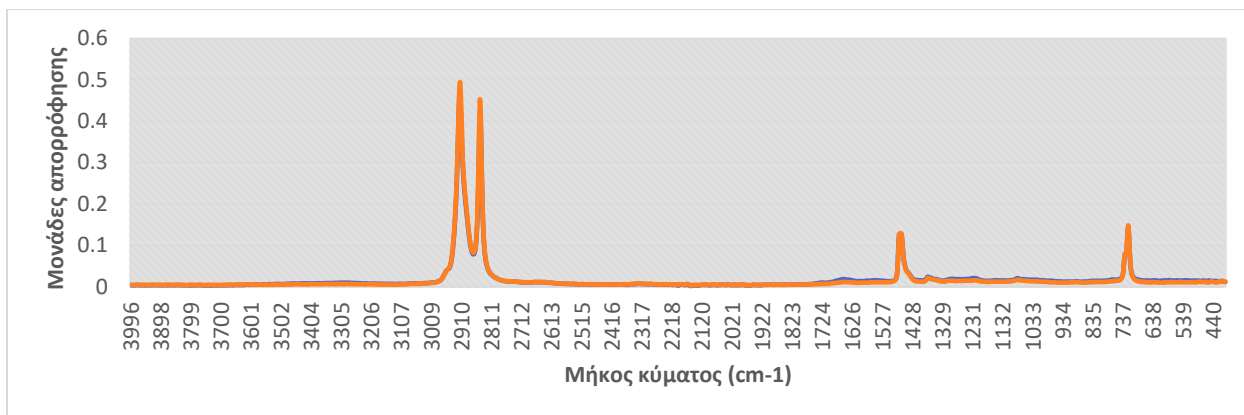
Με τη μέθοδο καταβύθισης (Bradford, 595 nm) μετρήθηκε η ποσότητα της πρωτεΐνης των υπερκείμενων δειγμάτων, πριν αυτά επωαστούν με σκόνη ΡΕ. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 16: Συγκέντρωση πρωτεΐνης των δειγμάτων των υπερκείμενων των καλλιεργειών, εμβολιασμένων με σπόρια *Aspergillus transmontanensis* MM36, 1, 2, 3 και 4 ημερών.

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 16, η 2<sup>η</sup> μέρα είχε την υψηλότερη πρωτεϊνική συγκέντρωση, ίση με 26,3 μg/mL στα δείγματα των υπερκείμενων των εμβολιασμένων καλλιεργειών με σπόρια, που περιείχαν και C<sub>16</sub> και αλκάνια.

Τα δείγματα με τη σκόνη ΡΕ, τα οποία επώαστηκαν με τα υπερκείμενα των καλλιεργειών, εμβολιασμένων με σπόρια *Aspergillus transmontanensis* MM36, μετρήθηκαν με τη μέθοδο FT-IR, για να εκτιμηθεί η τροποποίηση του ΡΕ, μέσω της ανίχνευσης τυχόν αλλαγών στο μοριακό του αποτύπωμα. Τα φάσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω.



Διάγραμμα 17: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 1<sup>ης</sup> ημέρας του *Aspergillus transmontanensis* MM36 (σπόρια) (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με το διάλυμα αλκαλίων σε C<sub>16</sub>).

Στο Διάγραμμα 17 φαίνεται πως τα δείγματα έχουν σχεδόν τα ίδια φάσματα. Λόγω των μικρών διαφορών υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων.

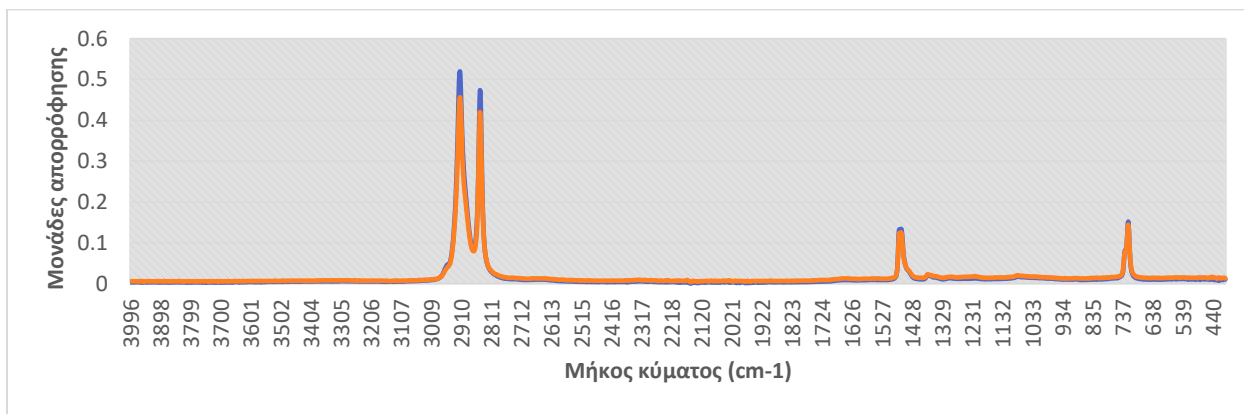
$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1469 \text{ cm}^{-1}} = 3,7$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1469 \text{ cm}^{-1}} = 3,8$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 718 \text{ cm}^{-1}} = 3,2$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 718 \text{ cm}^{-1}} = 3,3$$

Από τους παραπάνω λόγους, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα φάσματα είναι σχεδόν ίδια μεταξύ τους, εκτός από κάποιες μικρές κορυφές που έχουν διαφορετική ένταση.



Διάγραμμα 18: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 2<sup>ης</sup> ημέρας του *Aspergillus transmontanensis* MM36 (σπόρια) (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με το διάλυμα αλκαλίων σε C<sub>16</sub>).

Στο Διάγραμμα 18 φαίνεται πως τα δείγματα έχουν κάποιες κορυφές διαφορετικής έντασης μεταξύ τους. Οι διαφορές φαίνονται περισσότερο συγκριτικά με την 1<sup>η</sup> μέρα, ένδειξη τροποποίησης του PE. Λόγω των μικρών διαφορών υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων.

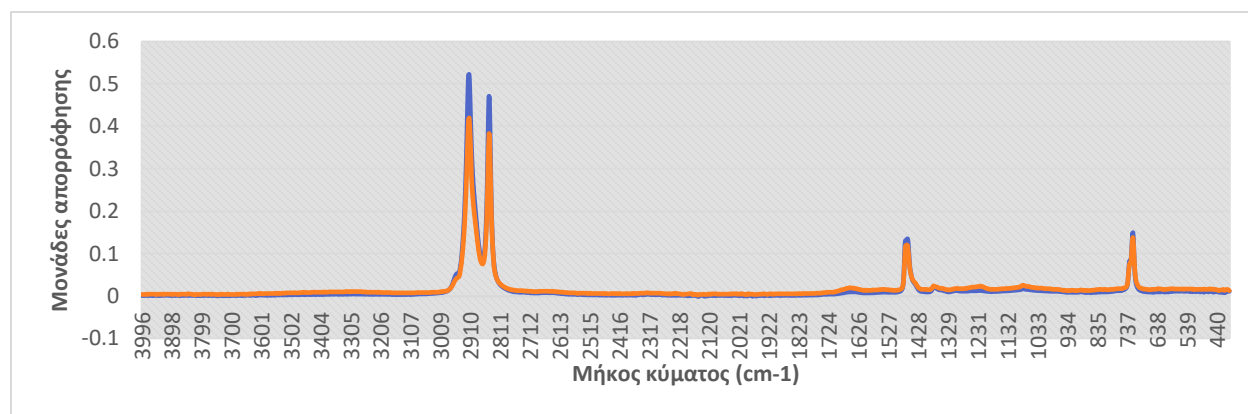
$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1469 \text{ cm}^{-1}} = 3,9$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1469 \text{ cm}^{-1}} = 3,7$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 718 \text{ cm}^{-1}} = 3,4$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 718 \text{ cm}^{-1}} = 3,2$$

Από τους παραπάνω λόγους, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα φάσματα είναι σχεδόν ίδια μεταξύ τους, εκτός από κάποιες μικρές κορυφές που έχουν διαφορετική ένταση.



Διάγραμμα 19: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 3<sup>ης</sup> ημέρας του *Aspergillus transmontanensis* MM36 (σπόρια) (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Στο *Διάγραμμα 19* φαίνεται πως τα δείγματα έχουν κάποιες κορυφές διαφορετικής έντασης μεταξύ τους, ένδειξη τροποποίησης του PE. Η 3<sup>η</sup> μέρα φαίνεται να παρουσιάζει τις μεγαλύτερες διαφορές ανάμεσα στα δείγματα, αλλά και συγκριτικά με την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> μέρα. Λόγω των μικρών διαφορών υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων.

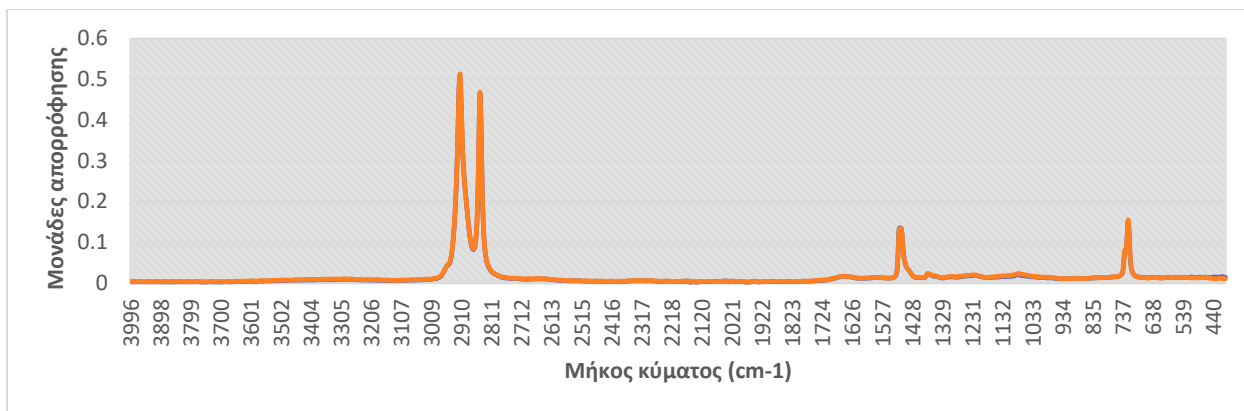
$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1469 \text{ cm}^{-1}} = 4,0$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1469 \text{ cm}^{-1}} = 3,5$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 718 \text{ cm}^{-1}} = 3,5$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 718 \text{ cm}^{-1}} = 3,0$$

Από τους παραπάνω λόγους, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι κορυφές στα φάσματα, εν τέλει έχουν αρκετά διαφορετικές εντάσεις μεταξύ τους.



Διάγραμμα 20: Φάσμα FT-IR σκόνης PE έπειτα από κατεργασία με το υπερκείμενο καλλιέργειας 4<sup>ης</sup> ημέρας του *Aspergillus transmontanensis* MM36 (σπόρια) (μπλε γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με C<sub>16</sub>, πορτοκαλί γραμμή: κατεργασία με το υπερκείμενο των καλλιεργειών με το διάλυμα αλκανίων σε C<sub>16</sub>).

Στο Διάγραμμα 20 φαίνεται πως τα δείγματα είναι σχεδόν πανομοιότυπα, ένδειξη μη αποικοδόμησης του PE. Λόγω των μικρών διαφορών υπολογίστηκε και ο λόγος των απορροφήσεων 4 κορυφών των 2 δειγμάτων.

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1469 \text{ cm}^{-1}} = 3,7$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 1469 \text{ cm}^{-1}} = 3,8$$

$$C_{16}: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 718 \text{ cm}^{-1}} = 3,3$$

$$Alk: \frac{\text{Απορρόφηση στα } 2914 \text{ cm}^{-1}}{\text{Απορρόφηση στα } 718 \text{ cm}^{-1}} = 3,3$$

Από τους παραπάνω λόγους, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα φάσματα είναι σχεδόν ίδια μεταξύ τους, εκτός από κάποιες μικρές κορυφές που έχουν διαφορετική ένταση.

Η εικόνα των φασμάτων του πειράματος των σπορίων δεν μπορεί να συγκριθεί με την εικόνα των φασμάτων του προηγούμενου πειράματος, διότι η βάση είναι διαφορετική, δηλαδή έχουν διαφορετικό αρχικό εμβόλιο, το οποίο μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με το ποσοστό αποικοδόμησης.

Έχοντας μελετήσει όλα τα παραπάνω διαγράμματα και φάσματα ανακεφαλαιώνονται και συμπεραίνονται τα παρακάτω.

Με βάση τα παραπάνω φάσματα αλλά και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο, φαίνεται ότι μεγαλύτερες αλλαγές στο μοριακό αποτύπωμα του PE, αλλά και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης ανιχνεύονται τη 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> μέρα, οπότε αυτές ήταν οι μέρες τερματισμού των καλλιεργειών που επιλέχθηκαν για την πρωτεομική ανάλυση.

Έπειτα από επώαση 5 ημερών της σκόνης PE, με σπόρια του μύκητα *Aspergillus transmontanensis* MM36, παρατηρήθηκε τροποποίηση του πλαστικού και πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα του FT-IR έδειξαν αλλαγές στο μοριακό αποτύπωμα του PE. Επιπλέον, μέσω του προσδιορισμού της απορρόφησης, μέσω φασματοφωτομερίας με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Bradford, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης όσο περνούσαν οι ώρες. Η αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου και η ύπαρξη διαφορετικών κορυφών ή μεγαλύτερης

έντασης μεταξύ των control και των δειγμάτων, αποτελούν σημαντικές ενδείξεις τροποποίησης του PE. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε τη 2<sup>η</sup> μέρα και για τα control (C<sub>16</sub>), αλλά και για τα δείγματα C<sub>16</sub> και αλκάνια και ήταν ίση με 19,0 και 26,3 µg/mL αντίστοιχα. Ενώ οι μεγαλύτερες αλλαγές στα φάσματα παρουσιάστηκαν τη 2<sup>η</sup> και την 3<sup>η</sup> μέρα. Τροποποίηση του PE, μέσω καλλιέργειών με εμβολιασμό σπορίων έχει παρατηρηθεί και από άλλους μύκητες, όπως είναι ένα στέλεχος του *Penicillium simplicissimum*, ΥΚ, το οποίο μετά από επώαση αρκετά μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος των 1 και 3 μηνών με το πλαστικό προκάλεσαν απώλεια βάρους και αλλαγές στα φάσματα του FT-IR [96].

### 3.1.2 Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που εκφράζονται από το στέλεχος *Aspergillus transmontanensis* MM36 και σχετίζονται με την αποικοδόμηση του PE

Υπάρχουν ενδείξεις ότι πραγματοποιήθηκε τροποποίηση σε μικρό βαθμό τη 2<sup>η</sup> μέρα στην περίπτωση των αλκανίων, οι οποίες ενδείξεις όμως είναι εντονότερες την 3<sup>η</sup> μέρα και γι' αυτό επιλέγονται τα αλκάνια αυτών των δύο ημερών και αυθαίρετα επιλέγεται σαν συνθήκη ελέγχου (control) το C<sub>16</sub> της 3<sup>ης</sup> μέρας.

Άρα για πρωτεομική ανάλυση στάλθηκαν συνολικά εννέα δείγματα του *Aspergillus transmontanensis* MM36: της δεύτερης μέρας (48 h) με τα C<sub>16</sub> + αλκάνια (3 δείγματα), της δεύτερης μέρας (48 h) μόνο με το C<sub>16</sub> (3 δείγματα) και της τρίτης μέρας (72 h) με τα C<sub>16</sub> + αλκάνια (3 δείγματα).

Η στατιστική επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης έγινε από την εταιρία VIB Proteomics Core (Belgium) καθώς και από το προσωπικό της μονάδας βιοπληροφορικής του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας. Η πρωτεομική ανάλυση είχε σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση συνολικά 369 πρωτεϊνών, όπως φαίνεται στον Πίνακα 17. Πολλές από αυτές δεν μπορούσαν να συνδεθούν με ήδη γνωστές αλληλουχίες και χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης (μονάδα βιοπληροφορικής εργαστηρίου βιοτεχνολογίας).

Πιο αναλυτικά, στην πρωτεομική ανάλυση έχουν ταυτοποιηθεί πολλές πρωτεΐνες από τις οποίες έχει αναγνωριστεί μια περιοχή γνωστή και ως FAD (flavin adenine dinucleotide (FAD) domain). Το FAD domain αποτελεί έναν συμπράγοντα των ενζύμων που συμβάλλει στην αφυδρογόνωση των μεταβολιτών, στη μεταφορά των ηλεκτρονίων από και προς τα ενεργά κέντρα των ενζύμων, καθώς και στην ενεργοποίηση του οξυγόνου σε αντιδράσεις οξειδωσης και υδροξυλίωσης [97]. Ωστόσο, στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί πως τα ένζυμα με FAD domain, συναντώνται κυρίως στα μιτοχόνδρια αφού συμμετέχουν στον μεταβολισμό των κυττάρων στον κύκλο του Krebs [98]. Μια πιθανή εξήγηση για την ανίχνευση τέτοιων ενζύμων στο εξωκυτταρικό κλάσμα θα μπορούσε να αποτελεί η λύση των κυττάρων λόγω ολοκλήρωσης του κύκλου ζωής τους και επομένως η απελευθέρωση εσωκυτταρικών πρωτεϊνών στο υγρό της καλλιέργειας. Μια άλλη εκδοχή που δικαιολογεί την ταυτοποίηση τέτοιων ενζύμων βασίζεται στην αδυναμία των βιοπληροφορικών εργαλείων που ήδη χρησιμοποιήθηκαν να χαρακτηρίσουν τις πρωτεΐνες, επομένως επιπλέον ανάλυση σε βιοπληροφορικό επίπεδο θα ήταν απαραίτητη. Παρόλα αυτά,

εκτός των FAD-domain πρωτεϊνών, με υψηλά επίπεδα έκφρασης την 3<sup>η</sup> ημέρα έχουν επίσης ταυτοποιηθεί χαλκοένζυμα και υπεροξειδάσες που θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν την οξείδωση των αλκανίων και συνεπώς την τροποποίηση του PE. Τέλος, ο εντοπισμός αφυδρογονασών δικαιολογεί την ικανότητα του μικροοργανισμού να τροποποιεί και να αφομοιώνει τα αλκάνια σύμφωνα με τα στάδια που παρουσιάστηκαν παραπάνω.

Πίνακας 13: Οι πρωτεΐνες που έχουν εκφραστεί στις διαφορετικές συνθήκες κατά την πρωτομική ανάλυση. (LogFC: Αντιστοιχεί στον λογάριθμο του λόγου έκφρασης μεταξύ δυο συνθηκών)

logFC_Ημέρα 2 <sup>η</sup> -Αλκάνια vs Ημέρα 3 <sup>η</sup> - Αλκάνια	logFC_Ημέρα 3 <sup>η</sup> -Αλκάνια vs Ημέρα 3 <sup>η</sup> - Αλκάνια C <sub>16</sub>	logFC_Ημέρα 2 <sup>η</sup> - Αλκάνια vs Ημέρα 3 <sup>η</sup> - C <sub>16</sub>	Όνομα πρωτεΐνης
-4.5	7.4	2.9	FAD-binding PCMH-type domain-containing protein
-4.74	6.90	2.16	Multicopper oxidase-domain-containing protein
-3.94	5.74	1.80	FAD-binding PCMH-type domain-containing protein
-5.34	5.70	0.36	Superoxide dismutase
-4.87	5.36	0.49	Peroxidase
-3.39	5.21	1.82	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
-2.54	5.11	2.57	FAD-binding domain-containing protein
-4.13	4.82	0.70	Superoxide dismutase
-4.74	4.76	0.03	FAD-binding PCMH-type domain-containing protein
-3.72	4.67	0.95	FAD-binding PCMH-type domain-containing protein
-1.77	4.60	2.83	FAD-binding PCMH-type domain-containing protein
-3.91	4.57	0.66	Alcohol dehydrogenase 1
-4.51	4.04	-0.47	Catalase
-2.59	4.01	1.42	Catalase
-3.08	3.96	0.88	FAD dependent oxidoreductase-domain-containing protein
-4.05	3.84	-0.21	FAD binding domain-containing protein
-2.07	3.28	1.21	Multicopper oxidase-domain-containing protein
-5.05	2.99	-2.06	Oxidoreductase, molybdopterin-binding domain-containing protein
-2.83	2.73	-0.11	Catalase-domain-containing protein
-5.32	2.53	-2.79	Aldehyde dehydrogenase domain-containing protein
-4.53	2.44	-2.09	Aldehyde/histidinol dehydrogenase

## 3.2 Ταυτοποίηση του μικροοργανισμού *Sarocladium strictum* IMNT

Ο μικροοργανισμός που θα μελετηθεί παρακάτω ταυτοποιήθηκε ως *Sarocladium strictum* IMNT (ITS στο Παράρτημα Γ). Ταυτοποιήθηκε με 99,8% ποσοστό identity και 99% coverage. Για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό έχουν γίνει πολλές αναφορές για αποικοδόμηση βιομάζας [99], όχι όμως για πλαστικά.

### 3.2.1 Αξιολόγηση μελέτης δράσης του εξωκυτταρικού κλάσματος των *Sarocladium strictum* IMNT και *Fusarium oxysporum* BPOP18 με πολυεστέρες και πολυουρεθάνη

Οι μικροοργανισμοί *Sarocladium strictum* IMNT και *Fusarium oxysporum* BPOP18, αφού αναπτύχθηκαν, ξεχωριστά, μέσω καλλιεργειών εισήχθησαν σε αντιδράσεις ξεχωριστά αλλά και μαζί με τα πλαστικά: PHB, PBS, PLA, PCL, PU, PET\_cr, PET\_am, PC-PET.

Η μελέτη της δράσης των μικροοργανισμών *Sarocladium strictum* IMNT και *Fusarium oxysporum* BPOP18 αξιολογήθηκε με τη μέτρηση της μεταβολής της μάζας και των μοριακών βαρών των υλικών, αλλά και με τον έλεγχο της παρουσίας προϊόντων αποικοδόμησης στα δείγματα PET.

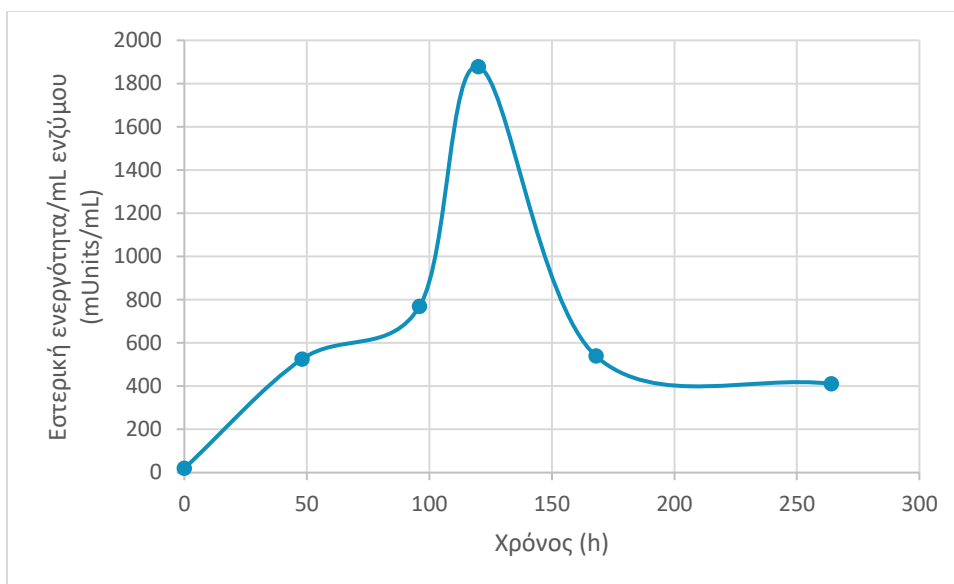
#### Απώλεια βάρους

Η μέτρηση απώλειας βάρους ενός υλικού αποτελεί μία πρώτη ένδειξη της βιοαποικοδόμησής του, χωρίς ωστόσο να παρέχει ακριβή συσχέτιση με τον βαθμό υποβάθμισης. Ωστόσο, κάποια πλαστικά δεν παρουσιάζουν μείωση στο βάρος τους, ή παρουσιάζουν μείωση και τα control τους. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε σφάλματα κατά τη μέτρηση των βαρών ή και κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας κυρίως στο ξέπλυμα, διότι τα πολυμερικά υλικά, λόγω της φύσης και της δομής τους δεν καταβυθίζονται.

#### Μέτρηση εστερικής ενεργότητας

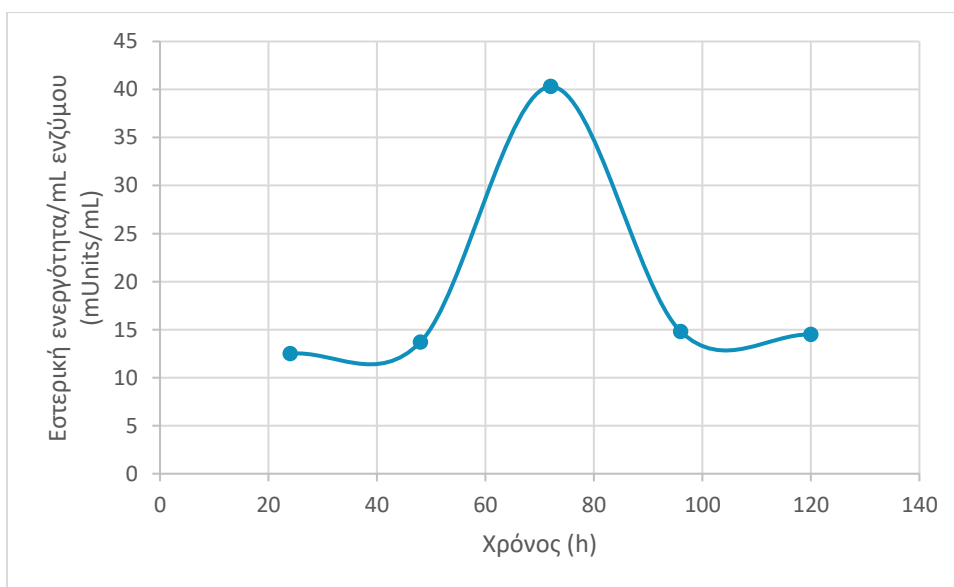
Αφού λαμβάνεται κάθε 24 ώρες δείγμα από το υπερκείμενο των καλλιεργειών των δύο μικροοργανισμών, φυγοκεντρείται και μετράται η εστερική του δράση με τη βοήθεια του υποστρώματος pNPB, προκειμένου να βρεθεί η χρονική στιγμή με τη μέγιστη ενεργότητα κι έτσι η βέλτιστη χρονική στιγμή για τη διακοπή της επώασης των καλλιεργειών.





Διάγραμμα 21: Εστερική ενεργότητα δειγμάτων του υπερκείμενου των καλλιιεργειών του μικροοργανισμού *Sarocladium strictum* IMNT συναρτήσει του χρόνου επώασης των καλλιιεργειών.

Με βάση το Διάγραμμα 21, η μέγιστη εστερική ενεργότητα των δειγμάτων από το υπερκείμενο των καλλιιεργειών του μικροοργανισμού *Sarocladium strictum* IMNT παρουσιάζεται την 5<sup>η</sup> μέρα (120 h) και είναι ίση με  $1,87 \frac{\text{Units}}{\text{mL}}$ .



Διάγραμμα 22: Εστερική ενεργότητα δειγμάτων του υπερκείμενου των καλλιιεργειών του μικροοργανισμού *Fusarium oxysporum* BPOP18 συναρτήσει του χρόνου επώασης των καλλιιεργειών.

Με βάση το Διάγραμμα 22, η μέγιστη εστερική ενεργότητα των δειγμάτων από το υπερκείμενο των καλλιιεργειών του μικροοργανισμού *Fusarium oxysporum* BPOP18 παρουσιάζεται την 3<sup>η</sup> μέρα (72 h) και είναι ίση με  $0,04 \frac{\text{Units}}{\text{mL}}$ .

## Αποτελέσματα GPC

Εκτός από τη μέτρηση της ενεργότητας των παραγόμενων ενζύμων, για τον έλεγχο της τροποποίησης των πλαστικών (PHB, PBS, PCL, PLA, PU) από τους μικροοργανισμούς, εξετάζεται και η μεταβολή των μοριακών βαρών των δειγμάτων. Έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της GPC προέκυψαν τα ακόλουθα διαγράμματα. Μέσω του λογισμικού της GPC επετεύχθη η ποσοτικοποίηση των παραλαμβανόμενων κορυφών του χρωματογραφήματος, η οποία βασίστηκε σε πρότυπη καμπύλη αναφοράς μέσω των μοριακών βαρών γνωστών πολυμερικών δειγμάτων. Όσον αφορά στη συζήτηση των αποτελεσμάτων της βιοαποικοδομητικής δράσης ενζύμων σε ένα δείγμα πολυμερικού υλικού, μείωση του μέσου αριθμού μοριακού βάρους ( $\bar{M}_n$ ), υποδηλώνει διάσπαση πολλών μακρομορίων πολλών μοριακών βαρών ενώ μείωση του μέσου βάρους μοριακού βάρους ( $\bar{M}_w$ ) υποδηλώνει διάσπαση μακρομορίων μεγάλου μοριακού βάρους.

Πίνακας 14: Ποσοστό μείωσης του μοριακού βάρους των πολυμερικών υλικών, έπειτα από επώασή τους με το εξωκυτταρικό κλάσμα ξεχωριστά των *Sarocladium strictum* IMNT, *Fusarium oxysporum* BPOP18, αλλά και του συνδυασμού τους.

Υλικά	<i>Sarocladium strictum</i> IMNT		<i>Fusarium oxysporum</i> BPOP18		Συνδυασμός μικροοργανισμών	
	%Μείωση $\bar{M}_n$	%Μείωση $\bar{M}_w$	%Μείωση $\bar{M}_n$	%Μείωση $\bar{M}_w$	%Μείωση $\bar{M}_n$	%Μείωση $\bar{M}_w$
PHB	0	0	0	0	49,7 ± 3,6	17,9 ± 1,8
PBS	0	5,3 ± 0,9	8.4 ± 0.8	0	0	28,6 ± 0,6
PCL	26,1 ± 2,5	8,5 ± 0,9	2.5 ± 0.3	0	0	8,6 ± 1,4
PLA	14,3 ± 1,7	13,5 ± 0,5	4.2 ± 0.5	0	42,5 ± 6,7	12,9 ± 1,3
PU	0	0	0	0	9,3 ± 0,9	5,2 ± 0,8

Όσον αφορά στον μικροοργανισμό *Fusarium oxysporum* BPOP18, το μέσου βάρους μοριακό βάρος δεν είχε μείωση για κανένα από τα 4 πλαστικά, για αυτό και δεν προστέθηκε το αντίστοιχο διάγραμμα. Για το μέσου αριθμού μοριακό βάρος παρατηρείται ότι υπάρχει μικρή μείωση για τα πλαστικά: PBS, PCL, PLA, αλλά όχι για το PHB.

Όσον αφορά στον μικροοργανισμό *Sarocladium strictum* IMNT, το μέσου βάρους μοριακό βάρος παρουσίασε μία μικρή μείωση στα τα πλαστικά: PBS, PCL, PLA, ενώ στο PHB όχι. Για το μέσου αριθμού μοριακό βάρος παρατηρείται ότι υπάρχει μείωση για τα πλαστικά: PCL, PLA, αλλά όχι για τα PHB, PBS.

Εξετάζοντας τον Πίνακα 13, προκύπτει ότι τα δείγματα παρουσιάζουν σημαντικές μειώσεις και στα μέσου βάρους και στα μέσου αριθμού μοριακά τους βάρη, έπειτα από επώαση του συνεργητισμού των δύο μικροοργανισμών. Τα πλαστικά PBS και PCL δεν παρουσίασαν κάποια μείωση του μέσου αριθμού μοριακού βάρους.

## Αποτελέσματα HPLC

Μέσω λογισμικού της HPLC επετεύχθη και η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παραλαμβανόμενων κορυφών του χρωματογραφήματος. Η ταυτοποίηση των ενώσεων βασίστηκε στον χρόνο έκλουσής τους, βάσει αντίστοιχων χρόνων πρότυπων διαλυμάτων. Για τον έλεγχο της τροποποίησης των πλαστικών (PET\_cr, PET\_am, και PC-PET) από τους μικροοργανισμούς, εξετάζεται και η υδρόλυση των προϊόντων του PET. Έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της HPLC προέκυψε ο ακόλουθος πίνακας.

Πίνακας 15: Συγκέντρωση προϊόντων απελευθέρωσης της υδρόλυσης διαφόρων ειδών δειγμάτων PET (μg/mL), έπειτα από επώαση με εξωκυτταρικά κλάσματα των *Sarocladium strictum* IMNT, *Fusarium oxysporum* BPOP18, αλλά και του συνδυασμού τους.

Υλικά	Συγκέντρωση προϊόντων που απελευθερώθηκαν μετά από τις αντιδράσεις (μg/mL)					
	<i>Sarocladium strictum</i> IMNT		<i>Fusarium oxysporum</i> BPOP18		Συνδυασμός μικροοργανισμών	
	TPA	MHET	TPA	MHET	TPA	MHET
PET_am control	0,07 ± 0,01	0	0,07 ± 0,01	0	0,05 ± 0,01	0
PET_am	0,21 ± 0,01	0	0,15 ± 0,03	0	0,14 ± 0,02	0
PET_cr control	0,08 ± 0,02	0	0,08 ± 0,03	0	0,08 ± 0,01	0
PET_cr	0,40 ± 0,20	0	0,18 ± 0,08	0	0,15 ± 0,01	0
PC-PET control	0,16 ± 0,02	0	0,10 ± 0,02	0	0,10 ± 0,02	0
PC-PET	0,25 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0	0,21 ± 0,00	0,07 ± 0,01

Από τον Πίνακα 14, φαίνεται ότι όσον αφορά στον μικροοργανισμό *Sarocladium strictum* IMNT, απελευθέρωση MHET σημειώθηκε μόνο στο δείγμα PC-PET. Γενικότερα, υπήρχε απελευθέρωση σχετικά μεγάλης συγκέντρωσης TPA, για όλα τα δείγματα. Επίσης, φαίνεται ότι όσον αφορά στον μικροοργανισμό *Fusarium oxysporum* BPOP18 δεν υπήρξε απελευθέρωση MHET, αλλά υπήρχε απελευθέρωση σχετικά μεγάλης συγκέντρωσης TPA. Τέλος, στην τελευταία στήλη, φαίνεται ότι όσον αφορά στον συνδυασμό των μικροοργανισμών, απελευθέρωση MHET σημειώθηκε μόνο στο δείγμα PC-PET. Γενικότερα, υπήρχε απελευθέρωση σχετικά μεγάλης συγκέντρωσης TPA, για όλα τα δείγματα.

Οι μικροοργανισμοί *Sarocladium strictum* IMNT και *Fusarium oxysporum* BPOP18, αφού αναπτύχθηκαν, ξεχωριστά, μέσω καλλιιεργειών, εισήχθησαν σε αντιδράσεις ξεχωριστά αλλά και μαζί με τα πλαστικά: PHB, PBS, PLA, PCL, PET\_cr, PET\_am, PC-PET.

Έπειτα από επώαση 3 ημερών των σκονών των παραπάνω πολυμερών, με τους μικροοργανισμούς *Sarocladium strictum* IMNT και *Fusarium oxysporum* BPOP18, αλλά και με τον συνδυασμό τους, παρατηρήθηκε τροποποίηση των πλαστικών και πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της GPC, για τα PHB, PBS, PLA, PCL, έδειξαν μείωση στο μέσου αριθμού μοριακό βάρος και στο μέσου βάρους μοριακό βάρος. Πιο αναλυτικά, υπήρξε μείωση του μέσου

αριθμού μοριακού βάρους (Mn) του PBS, έπειτα από επώαση με τον μικροοργανισμό *Fusarium oxysporum* BPOP18, ίση με 8,4%. Αντίστοιχα, του PCL ήταν 2,5% και του PLA 4,2%, ενώ με αυτόν τον μικροοργανισμό δεν παρουσίασε μείωση το PHB. Επιπλέον όσον αφορά το μέσου βάρους μοριακό βάρος (Mw) δεν υπήρξε κάποια μείωση σε κανένα από τα πλαστικά. Για το μέσου αριθμού μοριακού βάρους, έπειτα από επώαση με τον μικροοργανισμό *Sarocladium strictum* IMNT, σημαντική μείωση παρουσίασαν μόνο τα PCL και PLA ίση με 26,1% και 14,3% αντίστοιχα. Για το μέσου βάρους μοριακό βάρος, έπειτα από επώαση με τον ίδιο μικροοργανισμό, το PLA παρουσίασε τη μεγαλύτερη μείωση, ίση με 13,5%, το PCL 8,5%, το PBS 5,3%, ενώ το PHB μηδενική. Τέλος, όσον αφορά στον συνδυασμό των δύο μικροοργανισμών, η μείωση του μέσου βάρους μοριακού βάρους για το PHB βρέθηκε ίση με 17,9%, για το PBS 28,6%, για το PCL 8,6% και για το PLA 12,9%. Η μείωση του μέσου αριθμού μοριακού βάρους για το PHB βρέθηκε ίση με 49,7%, για το PLA 42,5%, ενώ για τα PBS και PCL μηδενικές.

Επομένως από τα παραπάνω αποτελέσματα της GPC, συμπεραίνεται ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης των μοριακών βαρών για όλα τα πλαστικά, εκτός του PCL, παρουσιάστηκαν μετά την επώαση του συνδυασμού των δύο αυτών μικροοργανισμών. Το PCL εμφάνισε μεγαλύτερη μείωση μέσου αριθμού μοριακού βάρους με τον *Sarocladium strictum* IMNT. Ο μικροοργανισμός *Fusarium oxysporum* BPOP18 έχει αναφερθεί ότι είναι πολύ σημαντικός για την τροποποίηση του PE, καθώς προκαλεί έντονα φαινόμενα οξειδωσης και αλλαγές στη μορφολογία του φιλμ PE [100].

Η μελέτη της δράσης των μικροοργανισμών *Sarocladium strictum* IMNT και *Fusarium oxysporum* BPOP18 αξιολογήθηκε και με τον έλεγχο της παρουσίας προϊόντων αποικοδόμησης στα δείγματα PET, όπου υπήρξε απελευθέρωση σχετικά μεγάλης συγκέντρωσης TPA, το οποίο αποτελεί βασικό προϊόν τροποποίησης του PET. Όσον αφορά στον μικροοργανισμό *Fusarium oxysporum* BPOP18, η ποσότητα TPA που απελευθερώνεται για το PET\_am είναι ίση με 0,15 μg/mL, για το PET\_cr 0,18 μg/mL και για το PC-PET 0,15 μg/mL. Για τον *Sarocladium strictum* IMNT, η ποσότητα TPA που απελευθερώνεται για το PET\_am είναι ίση με 0,21 μg/mL, για το PET\_cr 0,40 μg/mL και για το PC-PET 0,32 μg/mL. Για το τελευταίο δείγμα η συγκέντρωση αφορά και το TPA και το MHET. Τέλος, όσον αφορά στον συνδυασμό τους, η ποσότητα TPA που απελευθερώνεται για το PET\_am είναι ίση με 0,14 μg/mL, για το PET\_cr 0,15 μg/mL και για το PC-PET 0,28 μg/mL. Για το τελευταίο δείγμα η συγκέντρωση αφορά και το TPA και το MHET.

Επομένως, από τα αποτελέσματα της HPLC συμπεραίνεται ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις TPA απελευθερώθηκαν, έπειτα από την επώαση των δειγμάτων PET με τον μικροοργανισμό *Sarocladium strictum* IMNT. Για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό έχουν γίνει πολλές αναφορές στη βιβλιογραφία για αποικοδόμηση βιομάζας [101], [102], ελάχιστες όμως για πλαστικά. Οπότε, η τροποποίηση πλαστικών με αυτόν τον μικροοργανισμό, αλλά και με τον συνδυασμό του με άλλον αποτελεί κάτι καινούργιο.

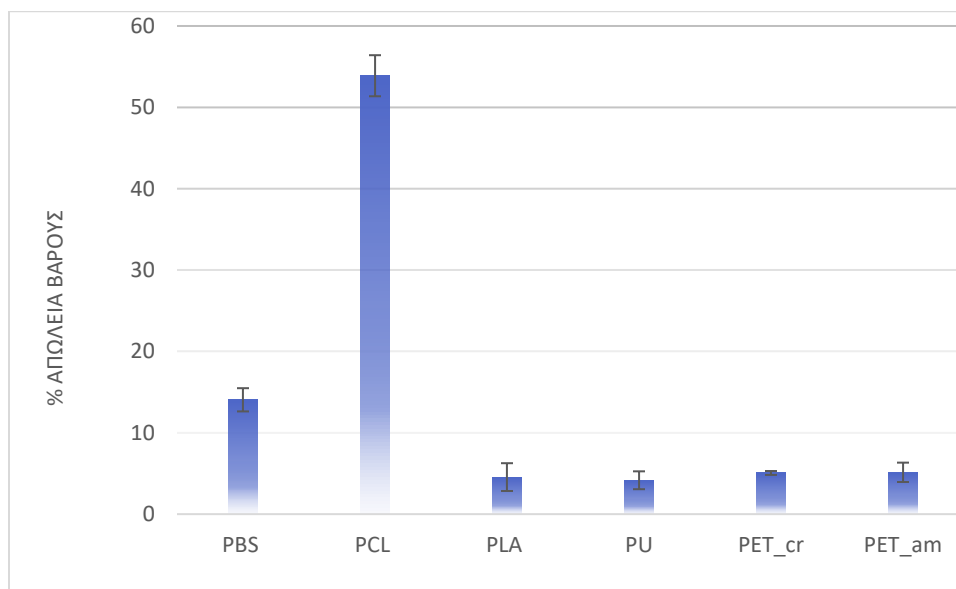
### 3.3 Αξιολόγηση της ενζυμικής αποικοδόμησης διάφορων πολυεστέρων και της πολυουρεθάνης, έπειτα από επώαση με το ένζυμο *StGe2*

Η *StGe2*, αφού καλλιεργήθηκε, εισήχθησε σε αντιδράσεις με τα πλαστικά: PHB, PBS, PLA, PCL και PET\_am, PET\_cr,

Η μελέτη της δράσης της αξιολογήθηκε με τη μέτρηση της μεταβολής της μάζας και των μοριακών βαρών των υλικών, αλλά και με τον έλεγχο της παρουσίας προϊόντων αποικοδόμησης στα δείγματα PET.

#### Απώλεια μάζας

Η μέτρηση απώλειας βάρους ενός υλικού (Διάγραμμα 28) αποτελεί μία πρώτη ένδειξη της βιοαποικοδόμησής του, χωρίς ωστόσο να παρέχει ακριβή συσχέτιση με τον βαθμό υποβάθμισης. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις βάρους είχαν μεγάλο σφάλμα, καθώς υπήρξαν αρκετές απώλειες κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, κυρίως στο ξέπλυμα, διότι τα πολυμερικά υλικά, λόγω της φύσης και της δομής τους δεν καταβυθίζονται.



Διάγραμμα 23: Η επί τοις εκατό απώλεια βάρους των πολυμερικών υλικών, έπειτα από επώασή τους με την *StGe2*.

Με βάση το Διάγραμμα 28 παρατηρείται ότι το PCL είχε πάνω από 50% απώλεια βάρους.

#### Αποτελέσματα HPLC

Μέσω λογισμικού της HPLC επετεύχθη και η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παραλαμβανόμενων κορυφών του χρωματογραφήματος. Η ταυτοποίηση των ενώσεων βασίστηκε στον χρόνο έκλουσής τους, βάσει αντίστοιχων χρόνων πρότυπων διαλυμάτων. Για τον έλεγχο της αποικοδόμησης των πλαστικών (PET\_cr, PET\_am) από την *StGe2*, εξετάζεται και η υδρόλυση των προϊόντων του PET. Έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της HPLC προέκυψε ο ακόλουθος πίνακας (Πίνακας 15).

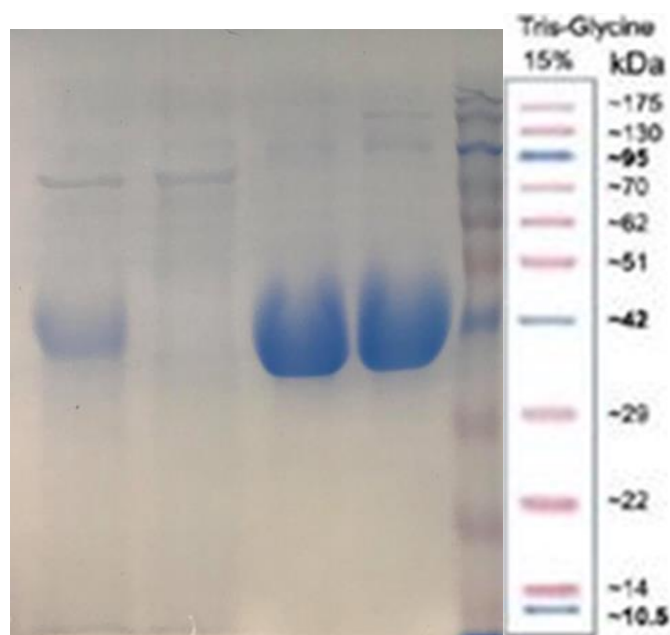
Πίνακας 16: Συγκέντρωση προϊόντων που απελευθερώθηκαν (μg/mL), έπειτα από επώαση των υλικών του PET με την StGe2.

Υλικά	Συγκέντρωση προϊόντων που απελευθερώθηκαν μετά από τις αντιδράσεις (μg/mL)		
	TPA	MHET	BHET
PET_am control	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,16	0,00 ± 0,00
PET_am	27,67 ± 1,78	144,85 ± 9,67	21,22 ± 2,51
PET_cr control	0,18 ± 0,00	0,21 ± 0,21	0,00 ± 0,00
PET_cr	6,91 ± 0,92	31,61 ± 4,31	3,78 ± 0,41

Σημειώνεται πως περίπου το 75% των προϊόντων που απελευθερώθηκαν και για τα δύο υλικά ήταν MHET. Από τον Πίνακα 16, παρατηρείται ότι ειδικά για το PET άμορφο υπάρχει μεγάλη απελευθέρωση προϊόντων κατά την υδρόλυση του PET.

#### Καθαρότητα και απομόνωση StGe2

Η StGe2 έπειτα από τον καθαρισμό της με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) με τη στήλη TalonR, ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η εμφάνιση μόνο μίας μπάντας στη γέλη του δείγματος του ενζύμου (Εικόνα 15), αποδεικνύει την επιτυχία της καθαρότητας της πρωτεΐνης στο ενζυμικό διάλυμα. Το μοριακό της βάρος βρέθηκε ίσο με 43 kDa.



Εικόνα 15: Απεικόνιση πηκτώματος ηλεκτροφόρησης της πρωτεΐνης StGe2 υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

### Δράση της StGe2 σε πλαστικά

Η μελέτη της δράσης αυτού του ενζύμου αξιολογήθηκε με τον έλεγχο της παρουσίας προϊόντων αποικοδόμησης στα δείγματα PET, όπου υπήρξε απελευθέρωση σχετικά μεγάλης συγκέντρωσης MHET και δευτερευόντως TPA και BHET. Η ποσότητα των προϊόντων υδρόλυσης του PET, που απελευθερώνεται για το PET\_am είναι ίση με 193,74 μg/mL, για το PET\_cr 42,30 μg/mL. Σημειώνεται πως περίπου το 75% των προϊόντων που απελευθερώθηκαν και για τα δύο υλικά ήταν MHET και παρατηρείται ότι ειδικά για το PET άμορφο υπάρχει μεγάλη απελευθέρωση προϊόντων κατά την υδρόλυσή του.

Από την άλλη, η μελέτη της επώασης των σκονών PHB, PBS, PLA, PCL και PU με την StGe2, δεν έδειξε σημάδια τροποποίησης των συγκεκριμένων πλαστικών.

### 3.4 Αντιδράσεις LCC μετάλλαξη ICCG με εμπορική αμυλάση στο πολυμερικό μίγμα PET/άμυλο

Σε έρευνες έχει αναφερθεί η βιοαποικοδόμηση δειγμάτων μείγματος LDPE-αμύλου από υδατικό διάλυμα α-αμυλάσης. Διαπιστώθηκε ότι η αμυλάση είχε συνεργιστική συμπεριφορά και υδρολύει το πρωτογενές υπόστρωμα (άμυλο) καθώς παρατηρήθηκε ότι και μόρια PE απελευθερώνονται, γιατί αποκολλήθηκαν από το πλέγμα του υλικού, λόγω της υδρόλυσης του αμύλου. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη υδρόφιλου αμύλου στο υδρόφοβο PE ενισχύει τη βιοαποικοδομησιμότητα και των δύο πολυμερών [66]. Για αυτό αποφασίστηκε να εξεταστεί το μίγμα mutant LCC-ICCG και αμυλάση.

Το μίγμα mutant LCC-ICCG και αμυλάση εισήχθησε σε αντιδράσεις με το πολυμερικό μίγμα PET και άμυλο σε διάφορα ποσοστά στους 50 °C.

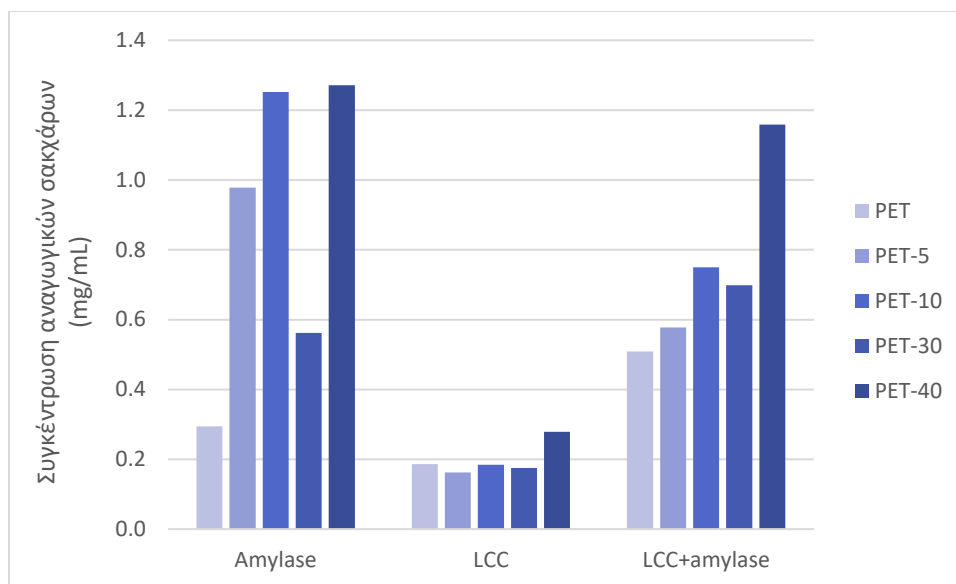
Η μελέτη της δράσης της αξιολογήθηκε με τη μέτρηση της μεταβολής της μάζας και με τον έλεγχο της παρουσίας προϊόντων αποικοδόμησης στα δείγματα PET. Παράλληλα, μετρήθηκαν και οι συγκεντρώσεις των αναγωγικών σακχάρων των δειγμάτων.

#### Απώλεια μάζας

Η μέτρηση απώλειας βάρους ενός υλικού αποτελεί μία πρώτη ένδειξη της βιοαποικοδόμησης του, χωρίς ωστόσο να παρέχει ακριβή συσχέτιση με τον βαθμό υποβάθμισης. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις βάρους είχαν μεγάλο σφάλμα, καθώς υπήρξαν αρκετές απώλειες κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, διότι τα πολυμερικά υλικά, λόγω της φύσης και της δομής τους δεν καταβυθίζονται.

#### Συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων

Μετρήθηκε η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων (mg/mL), με DNS.



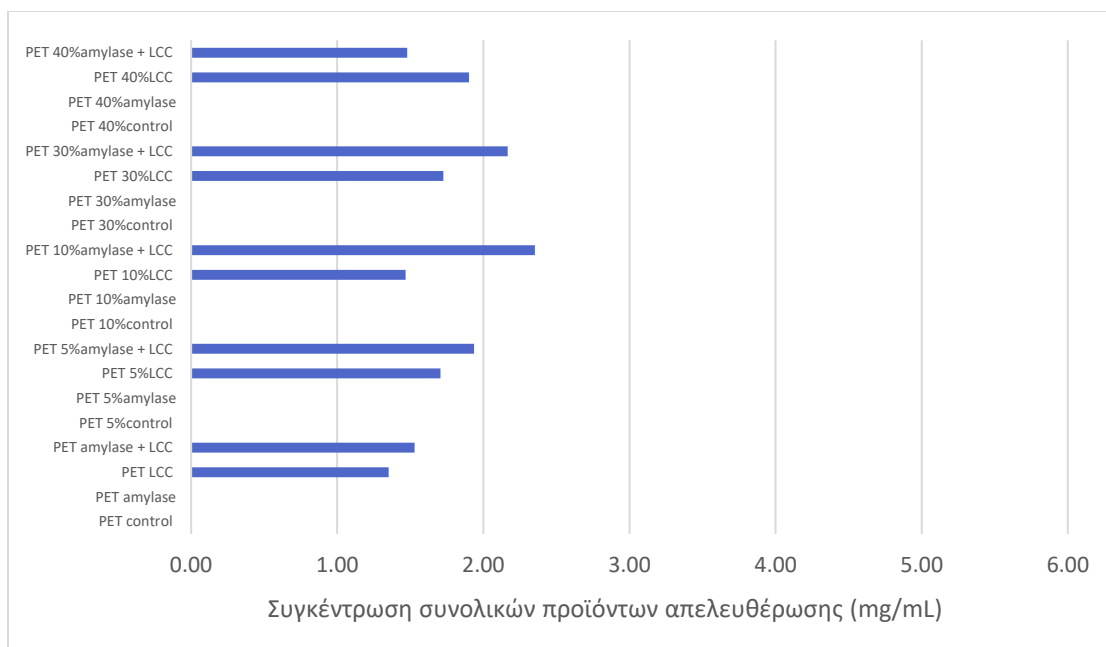
Διάγραμμα 24: Συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων των δειγμάτων που έχουν επωαστεί ξεχωριστά με εμπορική αμυλάση, με LCC και με συνδυασμό αυτών (mg/mL) για τις συστάσεις του PET 0, 5, 10, 30, 40% στους 50 °C.

Από το Διάγραμμα 24 φαίνεται ότι στους 50 °C δρα περισσότερο η αμυλάση, διότι έχει βέλτιστη θερμοκρασία στους 55 °C στο πολυμερικό μίγμα, η LCC ελάχιστα και η LCC σε συνδυασμό με την αμυλάση περισσότερο για το δείγμα PET 40%.

#### Αποτελέσματα HPLC

Μέσω λογισμικού της HPLC επετεύχθη και η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παραλαμβανόμενων κορυφών του χρωματογραφήματος. Η ταυτοποίηση των ενώσεων βασίστηκε στον χρόνο έκλουσής τους, βάσει αντίστοιχων χρόνων πρότυπων διαλυμάτων. Για τον έλεγχο της τροποποίησης του πολυμερικού μίγματος PET και άμυλο από την LCC και την αμυλάση, εξετάζεται και η υδρόλυση των προϊόντων του PET. Έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της HPLC προέκυψαν τα ακόλουθα διαγράμματα.





Διάγραμμα 25: Προϊόντα απελευθέρωσης της υδρόλυσης διαφόρων ειδών δειγμάτων PET, έπειτα από επόαση με το μίγμα LCC και αμύλαση, σε διάστημα 3 ημερών, στους 50 °C.

Από το Διάγραμμα 25 φαίνεται ότι μεγαλύτερη συγκέντρωση προϊόντων που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση του PET, υπάρχει στο πολυμερικό μίγμα PET 10%, στους 50°C.

Η μελέτη της δράσης αυτού του ενζύμου αξιολογήθηκε με τον έλεγχο της παρουσίας προϊόντων αποικοδόμησης στα δείγματα PET, όπου υπήρξε απελευθέρωση σχετικά μικρής βέβαια συγκέντρωσης αυτών. Φαίνεται ότι μεγαλύτερη συγκέντρωση προϊόντων που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση του PET, υπάρχει στο πολυμερικό μίγμα PET 10%, στους 50°C.

Συμπεραίνεται ότι όσο αυξάνεται το ποσοστό του αμύλου, τόσο αυξάνεται και ο βαθμός αποικοδόμησης του νέου αυτού πολυμερούς, διότι μειώνεται η κρυσταλλικότητα του υλικού.

Σε συνέχεια του πειράματος αυτού, σε συνεργασία με το Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο του Σάνον, Ιρλανδία (Centre for Polymer Sustainability, PRISM Research Institute, Technological University of the Shannon, Athlone, Ireland) έγινε ζύμωση των υδρολυμάτων του PET και πραγματοποιήθηκε σύνθεση της ναοκυτταρίνης από το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter* sp.

#### 4. Μελλοντικές προτάσεις

Η μελέτη της βιοαποικοδόμησης των πολυμερών από τα διάφορα είδη μικροοργανισμών, στοχεύει στην εξέλιξή της, έτσι ώστε να γίνουν προσπάθειες δημιουργίας βιώσιμων διεργασιών διάσπασης των συμβατικών πλαστικών, με τελικό σκοπό τη μείωση της συσσώρευσής τους στο περιβάλλον. Για την καλύτερη αξιοποίηση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, απαιτείται η πραγματοποίηση περαιτέρω πειραμάτων που αφορούν στη δράση των μικροοργανισμών.

Πιο συγκεκριμένα, προτείνεται η μελέτη της συνκαλλιέργειας των μυκήτων *Aspergillus transmontanensis* MM36, *Penicillium citrinum* MM41 και επώασή τους είτε με σκόνη PE είτε με φιλμ PE, με σκοπό την εύρεση καλύτερης ή/και γρηγορότερης τροποποίησής του. Επιπλέον, προτείνεται να εκφραστούν ετερόλογα τα ένζυμα που βρέθηκαν με την πρωτεομική ανάλυση του υπερκείμενου των καλλιεργειών του *Aspergillus transmontanensis* MM36. Αξίζει να αναλυθούν ακόμα πρωτεομικά και τα άλλα στελέχη (*Penicillium citrinum* MM41, *Tritirachium* sp.), γιατί μπορεί να είναι διαφορετικός ο μηχανισμός της αποικοδόμησης.

Προτείνεται επίσης, η δοκιμή συνκαλλιέργειας των μικροοργανισμών *Sarocladium strictum* IMNT και *Fusarium oxysporum* BPOP18, και όχι μόνο ο συνδυασμός τους στις αντιδράσεις και έπειτα η επώασή τους με διάφορους πολυεστέρες. Θα μπορούσε επίσης να γίνει πρωτεομική ανάλυση του *Sarocladium strictum* IMNT, προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα ένζυμα που εκφράζονται.

Όσον αφορά στην *StGe2*, θα μπορούσαν να γίνουν δομικές μελέτες και μεταλλάξεις, ούτως ώστε να έχει καλύτερη τροποποίησης στο PET και στους άλλους πολυεστέρες.

Εφόσον ο βαθμός αποικοδόμησης των πολυμερικών μιγμάτων είναι καλύτερος, αξίζει να βελτιωθούν οι ιδιότητές τους, έτσι ώστε να δημιουργηθούν νέα προϊόντα με καλές μηχανικές ιδιότητες που θα μπορούν να διατεθούν με ασφάλεια στο εμπόριο και να αντικαταστήσουν συσκευασίες που είναι κατασκευασμένες από μη βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά.

Μία επιπλέον πρόταση είναι η προσπάθεια κλιμάκωσης των πειραμάτων των αντιδράσεων με τη χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων ενζύμων και πολυμερών, σε συνδυασμό με την οικονομική μελέτη των διαδικασιών, με μακροπρόθεσμο στόχο, εφόσον τα αποτελέσματα το επιτρέψουν, την εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα.



## Βιβλιογραφία

- [1] R. C. Thompson, C. J. Moore, F. S. vom Saal, S. H. Swan, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **2009**, 364 (1526), 2153–2166. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0053>.
- [2] S. S. Ali, T. Elsamahy, E. Koutra, M. Kornaros, M. El-Sheekh, E. A. Abdelkarim, D. Zhu, J. Sun, *Science of The Total Environment*. **2021**, 771, 144719. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.144719>.
- [3] “Ellen MacArthur Foundation and McKinsey Center for Business and Environment, 2015. Growth Within: A Circular Economy Vision for a Competitive Europe (<https://tinyurl.com/jec5ykg>).,” **n.d.**
- [4] J. P. da Costa, P. S. M. Santos, A. C. Duarte, T. Rocha-Santos, *Science of The Total Environment*. **2016**, 566–567, 15–26. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.05.041>.
- [5] A. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, S. Ahmed, *Biotechnol Adv*. **2008**, 26 (3), 246–265. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2007.12.005>.
- [6] S. Bahl, J. Dolma, J. J. Singh, S. Sehgal, *Mater Today Proc*. **2021**, 39, 31–34. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2020.06.096>.
- [7] “Plastic | Composition, History, Uses, Types, & Facts | Britannica,” <https://www.britannica.com/science/plastic> (Accessed on July 26, 2023), **n.d.**
- [8] M. Vert, Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, F. Schué, *Pure and Applied Chemistry*. **2012**, 84 (2), 377–410. DOI: <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>.
- [9] N. Mills, M. Jenkins, S. Kukureka, *Plastics*. **2020**, 1–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102499-7.00001-1>.
- [10] T. Narancic, K. E. O’Connor, *Microbiology (N Y)*. **2019**, 165 (2), 129–137. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000749>.
- [11] “Plastics in Buildings and Construction - ScienceDirect,” <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323390408000304> (Accessed on August 12, 2023), **n.d.**
- [12] G. Taxeidis, E. Nikolaivits, R. Siaperas, C. Gkountela, S. Vouyiouka, B. Pantelic, J. Nikodinovic-Runic, E. Topakas, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121460>.

- [13] “PlasticsEurope, 2022. – Plastics the Facts 2022 an Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data. PlasticsEurope, Brussels, Belgium. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>. ,” **n.d.**
- [14] “‘Polyethylene (PE): Structure, Properties, and Applications’, Xometry, [Online], Available: <https://www.xometry.com/resources/materials/polyethylene/>,” **n.d.**
- [15] F. M. Lamberti, L. A. Román-Ramírez, J. Wood, *J Polym Environ.* **2020**, *28* (10), 2551–2571. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01795-8>.
- [16] R. Wei, W. Zimmermann, *Microb Biotechnol.* **2017**, *10* (6), 1308–1322. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12710>.
- [17] N. Evode, S. A. Qamar, M. Bilal, D. Barceló, H. M. N. Iqbal, *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering.* **2021**, *4*, 100142. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CSCEE.2021.100142>.
- [18] “‘TWI-GLOBAL: Thermoset vs thermoplastic’. [Online]. Available: <https://www.twi-global.com/technical-knowledge/faqs/thermoset-vs-thermoplastic#>,” **n.d.**
- [19] C. G. Avio, S. Gorbi, F. Regoli, *Mar Environ Res.* **2017**, *128*, 2–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.MARENRES.2016.05.012>.
- [20] “‘Microplastics: sources, effects and solutions | News | European Parliament.’ [Online]. Available: <https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/society/20181116STO19217/microplasticsources-effects-and-solutions>. [Accessed: 25-Jul-2021].,” **n.d.**
- [21] Y. Zhang, S. Kang, S. Allen, D. Allen, T. Gao, M. Sillanpää, *Earth Sci Rev.* **2020**, *203*, 103118. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.EARSCIREV.2020.103118>.
- [22] “Rogers, Kara. ‘microplastics’. Encyclopedia Britannica, 5 Apr. 2022, <https://www.britannica.com/technology/microplastic>. Accessed 17 August 2023.,” **n.d.**
- [23] “‘Microplastics’, National Geographic Society. [Online]. Available: <https://education.nationalgeographic.org/resource/microplastics/>. [Accessed: 20-May-2022].,” **n.d.**
- [24] A. Jahandari, *Journal of Hazardous Materials Advances.* **2023**, *12*, 100346. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.HAZADV.2023.100346>.
- [25] I. Vollmer, M. J. F. Jenks, M. C. P. Roelands, R. J. White, T. Harmelen, P. Wild, G. P. Laan, F. Meirer, J. T. F. Keurentjes, B. M. Weckhuysen, *Angewandte Chemie International Edition.* **2020**, *59* (36), 15402–15423. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201915651>.
- [26] “J. da Pinto Costa, T. Rocha-santos, A. C. Duarte, D. of Chemistry, and U. of Aveiro, “The environmental impacts of plastics and micro-plastics use, waste and pollution: EU

and national measures Policy Department for Citizens' Rights and Constitutional Affairs Directorate-General for Internal Policies PE.”,” **n.d.**

- [27] “Moore, Charles. ‘plastic pollution’. Encyclopedia Britannica, 8 Aug. 2023, <https://www.britannica.com/science/plastic-pollution>. Accessed 27 August 2023.”, **n.d.**
- [28] S. S. Ali, T. Elsamahy, E. Koutra, M. Kornaros, M. El-Sheekh, E. A. Abdelkarim, D. Zhu, J. Sun, *Science of The Total Environment*. **2021**, 771, 144719. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.144719>.
- [29] Y. Lee, J. Cho, J. Sohn, C. Kim, *Yonsei Med J*. **2023**, 64 (5), 301. DOI: <https://doi.org/10.3349/ymj.2023.0048>.
- [30] X. Mao, Y. Xu, Z. Cheng, Y. Yang, Z. Guan, L. Jiang, K. Tang, *Frontiers in Bioscience-Landmark*. **2022**, 27 (2), 046. DOI: <https://doi.org/10.31083/j.fbl2702046>.
- [31] M. Cole, P. Lindeque, C. Halsband, T. S. Galloway, *Mar Pollut Bull*. **2011**, 62 (12), 2588–2597. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2011.09.025>.
- [32] N. Ferronato, V. Torretta, *Int J Environ Res Public Health*. **2019**, 16 (6), 1060. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph16061060>.
- [33] R. Kumar, A. Verma, A. Shome, R. Sinha, S. Sinha, P. K. Jha, R. Kumar, P. Kumar, Shubham, S. Das, et al., *Sustainability*. **2021**, 13 (17), 9963. DOI: <https://doi.org/10.3390/su13179963>.
- [34] R. Geyer, J. R. Jambeck, K. L. Law, *Sci Adv*. **2017**, 3 (7). DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- [35] I. Wojnowska-Baryła, K. Bernat, M. Zaborowska, *Int J Environ Res Public Health*. **2022**, 19 (20), 13223. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph192013223>.
- [36] T. Ishigaki, W. Sugano, A. Nakanishi, M. Tateda, M. Ike, M. Fujita, *Chemosphere*. **2004**, 54 (3), 225–233. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00750-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00750-1).
- [37] C. Zhou, W. Fang, W. Xu, A. Cao, R. Wang, *J Clean Prod*. **2014**, 80, 80–86. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2014.05.083>.
- [38] C. Zhou, W. Fang, W. Xu, A. Cao, R. Wang, *J Clean Prod*. **2014**, 80, 80–86. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2014.05.083>.
- [39] M. Kedzierski, D. Frère, G. Le Maguer, S. Bruzard, *Science of The Total Environment*. **2020**, 740, 139985. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.139985>.
- [40] “National Geographic, Elizabeth Route: Is burning plastic waste a good idea?”. Published: March 12, 2019. [Online]. Available: <https://www.nationalgeographic.com/environment/article/should-we-burn-plastic-waste>,” **n.d.**

- [41] Á. Nagy, R. Kuti, *Academic and Applied Research in Military and Public Management Science*. **2016**, *15* (3), 231–237. DOI: <https://doi.org/10.32565/aarms.2016.3.3>.
- [42] Z. Yang, F. Lü, H. Zhang, W. Wang, L. Shao, J. Ye, P. He, *J Hazard Mater*. **2021**, *401*, 123429. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.123429>.
- [43] M. C. Krueger, H. Harms, D. Schlosser, *Appl Microbiol Biotechnol*. **2015**, *99* (21), 8857–8874. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6879-4>.
- [44] I. S. Oberoi, P. Rajkumar, S. Das, *Mater Today Proc*. **2021**, *46*, 7875–7880. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2021.02.562>.
- [45] “‘Recycling technologies. Plastics Europe’. [Online]. Available: <https://plasticseurope.org/sustainability/circularity/recycling/recycling-technologies/>,” **n.d.**
- [46] M. Kedzierski, D. Frère, G. Le Maguer, S. Bruzard, *Science of The Total Environment*. **2020**, *740*, 139985. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.139985>.
- [47] S. Bahl, J. Dolma, J. J. Singh, S. Sehgal, *Mater Today Proc*. **2021**, *39*, 31–34. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2020.06.096>.
- [48] M. Vert, Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, F. Schué, *Pure and Applied Chemistry*. **2012**, *84* (2), 377–410. DOI: <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>.
- [49] “‘Biodegradation’, Stahl company, [Online]. Available: <https://www.stahl.com/beyond-chemistry-from-a-to-z/what-is-biodegradation/>,” **n.d.**
- [50] A. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, S. Ahmed, *Biotechnol Adv*. **2008**, *26* (3), 246–265. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2007.12.005>.
- [51] In *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, International Union Of Pure And Applied Chemistry (IUPAC), Research Triangle Park, NC **2014**.
- [52] R. R. A. Silva, C. S. Marques, T. R. Arruda, S. C. Teixeira, T. V. de Oliveira, *Macromol*. **2023**, *3* (2), 371–399. DOI: <https://doi.org/10.3390/macromol3020023>.
- [53] N. Mohanan, Z. Montazer, P. K. Sharma, D. B. Levin, *Front Microbiol*. **2020**, *11*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580709>.
- [54] V. M. Pathak, Navneet, *Bioresour Bioprocess*. **2017**, *4* (1), 15. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0145-9>.
- [55] A. Chamas, H. Moon, J. Zheng, Y. Qiu, T. Tabassum, J. H. Jang, M. Abu-Omar, S. L. Scott, S. Suh, *ACS Sustain Chem Eng*. **2020**, *8* (9), 3494–3511. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>.
- [56] T. Kijchavengkul, R. Auras, *Polym Int*. **2008**, *57* (6), 793–804. DOI: <https://doi.org/10.1002/pi.2420>.

- [57] Shilpa, N. Basak, S. S. Meena, *Front Environ Sci Eng.* **2022**, *16* (12), 161. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11783-022-1596-6>.
- [58] S. Spierling, E. Knüpfper, H. Behnsen, M. Mudersbach, H. Krieg, S. Springer, S. Albrecht, C. Herrmann, H. J. Endres, *J Clean Prod.* **2018**, *185*, 476–491. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.03.014>.
- [59] M. Fliieger, M. Kantorová, A. Prell, T. Řezanka, J. Votruba, *Folia Microbiol (Praha).* **2003**, *48* (1), 27–44. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02931273>.
- [60] Y. Tokiwa, B. Calabia, C. Ugwu, S. Aiba, *Int J Mol Sci.* **2009**, *10* (9), 3722–3742. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>.
- [61] “‘bioplastic | Definition & Facts | Britannica.’ [Online]. Available: <https://www.britannica.com/technology/bioplastic>. [Accessed: 28-Aug-2021].,” **n.d.**
- [62] M. Shen, B. Song, G. Zeng, Y. Zhang, W. Huang, X. Wen, W. Tang, *Environmental Pollution.* **2020**, *263*, 114469. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114469>.
- [63] S. SINHARAY, M. BOUSMINA, *Prog Mater Sci.* **2005**, *50* (8), 962–1079. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2005.05.002>.
- [64] R. Wei, W. Zimmermann, *Microb Biotechnol.* **2017**, *10* (6), 1308–1322. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12710>.
- [65] “‘Definition of bioplastics.’ [Online]. Available: <http://natureplast.eu/en/the-bioplastics-market/>,” **n.d.**
- [66] M. Karimi, D. Biria, *Sci Rep.* **2019**, *9* (1), 2612. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39366-0>.
- [67] “‘enzyme | Definition, Mechanisms, & Nomenclature | Britannica.’ [Online]. Available: <https://www.britannica.com/science/enzyme.>,” **n.d.**
- [68] P. K. Robinson, *Essays Biochem.* **2015**, *59*, 1–41. DOI: <https://doi.org/10.1042/bse0590001>.
- [69] “‘Biological Catalysts - Enzymes | A-Level Biology Revision Notes.’ <https://alevelbiology.co.uk/notes/biological-catalysts-enzymes/> (accessed Sep. 01, 2022).,” **n.d.**
- [70] G. Hommes, C. A. Gasser, E. M. Ammann, P. F.-X. Corvini, *Anal Chem.* **2013**, *85* (1), 283–291. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac302716j>.
- [71] “‘transferase | enzyme | Britannica.’ <https://www.britannica.com/science/transferase>,” **n.d.**
- [72] E. Shukla, A. D. Bendre, S. M. Gaikwad, **2022**.
- [73] “‘Lyase | Keywords | UniProt.’ <https://www.uniprot.org/keywords/KW-0456> ,” **n.d.**



- [74] “‘isomerase | enzyme | Britannica.’ <https://www.britannica.com/science/isomerase>,” **n.d.**
- [75] “‘ligase | biochemistry | Britannica.’ <https://www.britannica.com/science/ligase> ,” **n.d.**
- [76] Å. M. Ronkvist, W. Xie, W. Lu, R. A. Gross, *Macromolecules*. **2009**, *42* (14), 5128–5138. DOI: <https://doi.org/10.1021/ma9005318>.
- [77] M. Srikanth, T. S. R. S. Sandeep, K. Sucharitha, S. Godi, *Bioresour Bioprocess*. **2022**, *9* (1), 42. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00532-4>.
- [78] A. Magnin, E. Pollet, V. Phalip, L. Avérous, *Biotechnol Adv*. **2020**, *39*, 107457. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.107457>.
- [79] K. Yamada-Onodera, H. Mukumoto, Y. Katsuyaya, A. Saiganji, Y. Tani, *Polym Degrad Stab*. **2001**, *72* (2), 323–327. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(01\)00027-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(01)00027-1).
- [80] D. Danso, J. Chow, W. R. Streit, *Appl Environ Microbiol*. **2019**, *85* (19). DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01095-19>.
- [81] N. Mohanan, Z. Montazer, P. K. Sharma, D. B. Levin, *Front Microbiol*. **2020**, *11*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580709>.
- [82] A. Zerva, R. Siaperas, G. Taxeidis, M. Kyriakidi, S. Vouyiouka, G. I. Zervakis, E. Topakas, *Chemosphere*. **2023**, *312*, 137338. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137338>.
- [83] I. Cacciari, P. Quatrini, G. Zirletta, E. Mincione, V. Vinciguerra, P. Lupattelli, G. Giovannozzi Sermanni, *Appl Environ Microbiol*. **1993**, *59* (11), 3695–3700. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.59.11.3695-3700.1993>.
- [84] D. Danso, J. Chow, W. R. Streit, *Appl Environ Microbiol*. **2019**, *85* (19). DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01095-19>.
- [85] Shilpa, N. Basak, S. S. Meena, *Front Environ Sci Eng*. **2022**, *16* (12), 161. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11783-022-1596-6>.
- [86] C. A. Batt, *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. **2014**, 42–46. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00254-8>.
- [87] B. L. Reuhs, **2017**.
- [88] E. de Q. Eugenio, I. S. P. Campisano, A. M. de Castro, M. A. Z. Coelho, M. A. P. Langone, *J Polym Environ*. **2022**, *30* (4), 1627–1637. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02301-4>.
- [89] H. P. Austin, M. D. Allen, B. S. Donohoe, N. A. Rorrer, F. L. Kearns, R. L. Silveira, B. C. Pollard, G. Dominick, R. Duman, K. El Omari, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2018**, *115* (19). DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1718804115>.

- [90] “‘Polymer Molecular Weight Distribution and Definitions of MW Averages’, Agilent Technologies, [Online], Available: <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-7890EN.pdf>,” **n.d.**
- [91] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, A. Bairoch, in *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa, NJ **2005**.
- [92] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL, *Journal of Biological Chemistry*. **1951**, *193* (1), 265–275. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- [93] “‘Neubauer Haemocytometry’, EMS Technical Data Sheets. [Online]. Available: <https://www.emsdiasum.com/docs/technical/datasheet/68052-14>,” **n.d.**
- [94] A. B. Nowakowski, W. J. Wobig, D. H. Petering, *Metallomics*. **2014**, *6* (5), 1068–1078. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4MT00033A>.
- [95] G. C. DSouza, R. S. Sheriff, V. Ullanat, A. Shrikrishna, A. V. Joshi, L. Hiremath, K. Entoori, *Heliyon*. **2021**, *7* (5), e07008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07008>.
- [96] K. Yamada-Onodera, H. Mukumoto, Y. Katsuyaya, A. Saiganji, Y. Tani, *Polym Degrad Stab*. **2001**, *72* (2), 323–327. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(01\)00027-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(01)00027-1).
- [97] M. W. Fraaije, A. Mattevi, *Trends Biochem Sci*. **2000**, *25* (3), 126–132. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01533-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01533-9).
- [98] W.-D. Lienhart, V. Gudipati, P. Macheroux, *Arch Biochem Biophys*. **2013**, *535* (2), 150–162. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.02.015>.
- [99] L. Cortes-Tolalpa, J. Norder, J. D. van Elsas, J. Falcao Salles, *Appl Microbiol Biotechnol*. **2018**, *102* (6), 2913–2927. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8714-6>.
- [100] F. Spina, M. L. Tummino, A. Poli, V. Prigione, V. Ilieva, P. Cocconcelli, E. Puglisi, P. Bracco, M. Zanetti, G. C. Varese, *Environmental Pollution*. **2021**, *274*, 116548. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116548>.
- [101] L. Cortes-Tolalpa, J. Norder, J. D. van Elsas, J. Falcao Salles, *Appl Microbiol Biotechnol*. **2018**, *102* (6), 2913–2927. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8714-6>.
- [102] A. S. A. El-Sayed, A. H. Moustafa, H. A. Hussein, A. A. El-Sheikh, S. N. El-Shafey, N. A. M. Fathy, G. A. Enan, *Biocatal Agric Biotechnol*. **2020**, *24*, 101524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101524>.

## Παράρτημα Α : Μεθοδολογία προσδιορισμού ενεργότητας εστερασών στο εστερικό υπόστρωμα pNPB

Από τις φωτομετρήσεις στα 410 nm, για τον προσδιορισμό της εστερικής δράσης, προκύπτουν κάποια αριθμητικά αποτελέσματα, τα οποία είναι οι κλίσεις των διαγραμμάτων απορρόφησης – χρόνου, το λεγόμενο  $V_{max}$ . Σύμφωνα με το φωτόμετρο που χρησιμοποιείται στα πειράματα (SPECTROstar Nano Microplate Reader, BMG Labtech - Γερμανία) η σχέση της απορρόφησης με το  $V_{max}$  είναι η εξής:

$$A = \frac{V_{max}}{1000}$$

Οπότε με αντικατάσταση της απορρόφησης στον νόμο Lambert – Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C_{pNP} \Rightarrow \frac{V}{1000} = \varepsilon \cdot b \cdot C_{pNP} \Rightarrow C_{pNP} = \frac{V}{1000 \cdot \varepsilon \cdot b} \Rightarrow$$
$$\frac{n_{pNP}}{V_{reaction}} = \frac{V}{1000 \cdot a} \Rightarrow n_{pNP} = \frac{0,25 \cdot V}{a \cdot 1000} = Units \Rightarrow$$
$$\frac{Units}{mL_{\varepsilon\nu\zeta\upsilon\mu\omicron\nu}} = \frac{V \cdot 0,25}{0,02 \cdot 1000 \cdot a}$$

Όπου,  $V_{reaction} = 0,25 \text{ mL}$

$$b = 0,67 \text{ cm}$$

$$a = \varepsilon \cdot b$$

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

Οι χρόνοι έκλυσης των προϊόντων υδρόλυσης του PET παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και προσδιορίστηκαν μέσω ανάλυσης προτύπων δειγμάτων με HPLC.

Πίνακας 17: Χρόνοι έκλυσης των προϊόντων υδρόλυσης του PET (TPA, MHET και BHET).

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

## Παράρτημα Γ : ITS του μικροοργανισμού *Sarocladium strictum* IMNT

- ITS ακολουθία του *Sarocladium strictum* IMNT με forward primer: M13uni-21

TAGGGGCGAATGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCA  
GAATTCAGGTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCAGAGTGCCCTAGGCTCTCCAA  
CCCATTGTGAACATACCTATCGTTCCTCGGCGGGCTCAGCGCGCGGTGCCTCCGGGCTCCG  
GGCGTCCGCCGGGGACAACCAAACCTCTGATTTTATTGTGAATCTCTGAGGGGGCGAAAGCCCC  
AAAACAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAAC  
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG  
CACATTGCGCCCCGCCGGCACTCCGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCAGG  
ACCCCTTTTCGGGGGGGACCTGGTGCTGGGGATCAGCGGCCTCCGGGCCCTGTCCCCAAA  
TTGAGTGGCGGTGCGCGCCGAGCCTCCCCTGCGTAGTAGCACACCTCGCACCGGAGAGCGGC  
TCGGCCACGCCGTGAAACCCCAATTTTTTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG  
CTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGACCTGAATTCAGCACACTGGCGGGCCGTTACTA  
GTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGAATGCATAGCTTGTGAGTATTCTAACGCGTCACCTAAA  
TAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCC  
ACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA  
CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCCGGGAAACCTGTGCGTCCAGCTG  
CATTAAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGARGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTT  
CCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCM  
AAGGCGGTAATA

- ITS ακολουθία του *Sarocladium strictum* IMNT με reverse primer: M13rev-29

CCCSWRCWTTWWGGTGMGCGTTAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGC  
TCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCAGGTCCGTAGGTGAACCTGCGGA  
GGATCATTACCAGAGTGCCCTAGGCTCTCAAACCCATTGTGAACATACCTATCGTTCCTC  
GGCGGGCTCAGCGCGCGGTGCCTCCGGGCTCCGGGCGTCCGCCGGGGACAACCAAACCTCTG  
ATTTTATTGTGAATCTCTGAGGGGGCGAAAGCCCCGAAAACAAAATGAATCAAACTTTCAACA  
ACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT  
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCGGCACTCCGGCGGG  
CATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCAGGACCCCTTTCGGGGGGGACCTGGTGCTGG  
GGATCAGCGGCCTCCGGGCCCTGTCCCCAAATTGAGTGGCGGTGCGCGCCGAGCCTCCCC  
TGCGTAGTAGCACACCTCGCACCGGAGAGCGGCTCGGCCACGCRTGAAACCCCAATTTTT  
TAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAG  
GACCTGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCC  
AATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG  
GAAAACCCCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCG  
TAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTATACGTACGGC  
AGTTTAAGGTTTACACCTATAAAAGAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGT  
GATATTATTGACACGCGGGGCGACCGAWGGTGATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTC  
MGATAAAGTCTCCCGTGAACCTT