



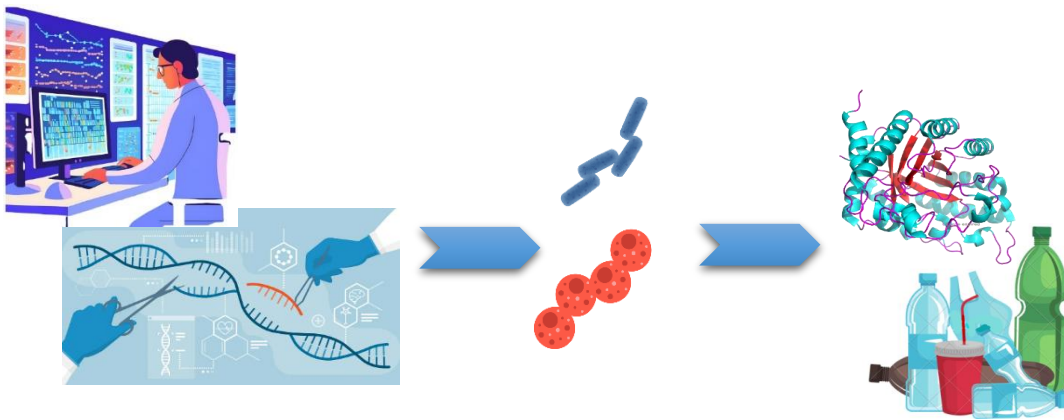
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Έκφραση και εφαρμογή νέων ενζύμων στην αποικοδόμηση συνθετικών πολυμερών



Τέρεντς Νούση

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

Αθήνα
Σεπτέμβριος 2024

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί τον καρπό μιας εντατικής ερευνητικής προσπάθειας, η οποία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Η επιτυχής ολοκλήρωση αυτής της εργασίας δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την πολύτιμη συμβολή πολλών ατόμων και φορέων, στους οποίους οφείλω να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες.

Καταρχάς, επιθυμώ να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Ευάγγελο Τόπακα, αναπληρωτή καθηγητή της σχολής, για την ευκαιρία που μου παρείχε να συμμετάσχω στο εργαστήριο και να εργαστώ υπό την επιστημονική του καθοδήγηση. Η γνώση του στο αντικείμενο της βιοτεχνολογίας και οι πολύτιμες συμβουλές του υπήρξαν καθοριστικοί παράγοντες για την επιτυχία της έρευνας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα και ΕΔΙΠ Ευστράτιο Νικολάιβιτς, για την πολύτιμη συμβολή του στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Η εμπειρία του σε πειραματικές τεχνικές και η υπομονή του στις εξηγήσεις του, διευκόλυναν σημαντικά την κατανόηση των επιστημονικών θεμάτων που αναπτύχθηκαν στην εργασία.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γιώργο Ταξείδη, υποψήφιο διδάκτορα και φίλο, για την υποστήριξη και συνεργασία του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Η φιλική του διάθεση, η υπομονή του και η βαθιά γνώση του αντικειμένου, συνέβαλαν καθοριστικά στην επιτυχία της έρευνας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας για τη βοήθεια και την υποστήριξή τους. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το εργαστήριο τεχνολογίας πολυμερών της σχολής για την παροχή υλικών και εξοπλισμού που απαιτήθηκαν για την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Τέλος, τις μεγαλύτερες ευχαριστίες τις οφείλω στην οικογένειά μου και στους φίλους μου. Η αγάπη, η ενθάρρυνση, η κατανόηση και η υπομονή τους με βοήθησαν να ξεπεράσω τις όποιες δυσκολίες αντιμετώπισα τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και ιδιαίτερα κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας σε ακαδημαϊκό αλλά και σε προσωπικό επίπεδο.

Η εμπειρία της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε μια εξαιρετική ευκαιρία για την απόκτηση θεωρητικών γνώσεων και πρακτικών δεξιοτήτων στον τομέα της βιοτεχνολογίας. Επιπλέον, μου παρείχε την δυνατότητα να αναπτύξω δεξιότητες κριτικής σκέψης, ανάλυσης δεδομένων και επιστημονικής γραφής. Είμαι πεπεισμένος ότι οι γνώσεις και οι εμπειρίες που απέκτησα κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας θα αποτελέσουν πολύτιμο εργαλείο για την μελλοντική μου επαγγελματική σταδιοδρομία.

Τέρεντς Νούση,
Αθήνα, Σεπτέμβριος 2024

Περίληψη

Η σύγχρονη κοινωνία αντιμετωπίζει μια πρωτοφανή κρίση διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων. Η ανεπάρκεια των υφιστάμενων στρατηγικών υποδεικνύει την επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη καινοτόμων λύσεων. Η εξεύρεση νέων ενζύμων ικανών να αποικοδομούν αποτελεσματικά τα πλαστικά αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη κατεύθυνση έρευνας, καθώς η βιοτεχνολογία προσφέρει προηγμένες μεθόδους για την αντιμετώπιση αυτού του περιβαλλοντικού προβλήματος.

Στο πλαίσιο ενίσχυσης την ενζυμικής αποικοδόμησης, στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν επτά νέα ένζυμα. Τα τέσσερα από αυτά, προέρχονται από τον ασκομύκητα *Fusarium oxysporum* BPOP18 εκ των οποίων τα τρία ανήκουν στην κατηγορία των υδρολασών (αμιδάση, πρωτεάση, ενδοπεπτιδάση) και το τέταρτο είναι οξειδωτικής φύσεως (τυροσινάση). Αντίστοιχα, τα υπόλοιπα τρία μελετώμενα ένζυμα έχουν προέλευση από τον νηματοειδή μύκητα *Aspergillus parasiticus* MM36 και χαρακτηρίζονται ως μη εξειδικευμένες υπεροξυγενάσες (UPOs) με τις ονομασίες Astra551984, Astra579462 και Astra585095. Μέσω βιοπληροφορικών εργαλείων (BLAST®), εντοπίστηκαν ομόλογες πρωτεΐνες προκειμένου να εξακριβωθεί η πιθανή τους δράση.

Όλα τα γονίδια των ανωτέρω ενζύμων, συντέθηκαν με χημικό τρόπο και ενσωματώθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pPICZa A. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση στον ξενιστή *P. pastoris* προκειμένου να ακολουθήσει η ετερόλογη έκφραση. Ελέγχθηκαν δύο στελέχη του ξενιστή, ως προς την ικανότητα έκφρασης, το στέλεχος X33 και το SMD1168. Το τελευταίο παρουσίασε εγγενής πρωτεολυτική δράση και απορρίφθηκε. Από τα εξεταζόμενα ένζυμα, μόνο η έκφραση της τυροσινάσης και της αμιδάσης καθίσταται εφικτή. Στο εγχείρημα έκφρασης των UPOs, ναί μεν εκφράστηκαν ένζυμα με οξειδωτική δράση, ωστόσο δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν με τις υπεροξειδάσες ενδιαφέροντος με καμία από τις τεχνικές που δοκιμάστηκαν.

Η αμιδάση απομονώθηκε με την μέθοδο μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας, ενώ η τυροσινάση με χρωματογραφία ιοντικής εναλλαγής. Ο πειραματικός προσδιορισμός των μοριακών βαρών τους με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου, έδειξε ότι η αμιδάση γλυκοζυλιώνεται με αποτέλεσμα να εμφανίζει μοριακό βάρος περίπου ίσο με 48kDa. Αντίστοιχα, η τυροσινάση πρωτεολύεται σε δύο πρωτεϊνικά μέρη των 20kDa και 42kDa, πιθανότατα για να αποκτήσει την ενεργή της μορφή.

Ύστερα, ακολούθησε ο χαρακτηρισμός των εκφραζόμενων ενζύμων. Η τυροσινάση εμφάνισε βέλτιστο pH καταλυτικής δράσης σε τιμή ίση με 8,5 ενώ η αντίστοιχη θερμοκρασία ήταν οι 40°C. Η αμιδάση εμφάνισε βέλτιστο pH την τιμή 4,5, ωστόσο τονίζεται ότι υπήρξε αδυναμία στην εμφάνιση ενεργότητας σε πολλά υποστρώματα γεγονός που οφείλεται να διερευνηθεί περαιτέρω.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος τριών μεταλλάξεων (T, L και DM) της κουτινάσης, του ίδιου μύκητα που έχει χαρακτηριστεί, αλλά και μερικών εμπορικών πρωτεασών ως προς την καταλυτική τους δράση στην πολυουρεθάνη (PU),

προκειμένου να βρεθεί ο κατάλληλος συνεργηστικός συνδυασμός με τα εκφραζόμενα ένζυμα. Από τον έλεγχο αυτό βρέθηκε ότι η κουτινάση φυσικού τύπου και η εμπορική πρωτεάση Savinase 16L (Σαβινάση), Novozymes εμφάνισαν την μεγαλύτερη απόδοση. Ειδικότερα, προσδιορίστηκε μείωση στο βάρος του PU κατά 5,3% και 14,2% από την κουτινάση και την σαβινάση αντίστοιχα. Η συνεργιστική δράση ανέδειξε τον συνδυασμό σαβινάσης και τυροσινάσης ως τον αποδοτικότερο στην αποσύνθεση του PU με μείωση βάρους κατά 6,6%. Ωστόσο, κανένας συνεργητισμός δεν απέδωσε καλύτερα από την μεμονωμένη δράση της σαβινάσης. Όλες οι εφαρμογές στο PU, πραγματοποιήθηκαν στους 35°C για 3 ημέρες και pH 8,0 (με εξαίρεση την αμιδάση που έγινε σε pH 5,0).

Τέλος, όσο αναφορά τα ένζυμα με οξειδωτική δράση, δοκιμάστηκαν ως προς σε πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE) και προσδιορίστηκε με την μέθοδο ATR, ότι πράγματι μεταβάλλεται η δομή του, αφού εμφανίζονται νέες χαρακτηριστικές ομάδες. Η εφαρμογή τους στο πλαστικό έγινε σε pH 6,0 στους 35°C για 3 ημέρες. Η ταυτοποίηση των συγκεκριμένων ενζύμων και η ενδεδειγμένη μελέτη τους κρίνεται απαραίτητη.

Λέξεις - κλειδιά: Πλαστικά, βιοαποικοδόμηση, ετερόλογη έκφραση, πολυουρεθάνη, τυροσινάση, αμιδάση, πολυαιθυλένιο, υπεροξυγενάσες

Abstract

Modern society is facing an unprecedented crisis in the management of plastic waste. The inadequacy of existing strategies highlights the urgent need for innovative solutions. The discovery of new enzymes capable of effectively degrading plastics is a promising research direction, as biotechnology offers advanced methods for addressing this environmental problem.

To enhance enzymatic degradation, this study investigated seven novel enzymes. Four of these were derived from the ascomycete *Fusarium oxysporum* BPOP18, of which three belong to the hydrolase category (amidase, protease, endopeptidase) and the fourth is oxidative in nature (tyrosinase). Similarly, the remaining three studied enzymes originated from the filamentous fungus *Aspergillus parasiticus* MM36 and are characterized as non-specific peroxidases (UPOs) named Astra55, Astra57, and Astra58. Through bioinformatics tools (BLAST®), homologous proteins were identified to ascertain their potential function.

All genes of the aforementioned enzymes were chemically synthesized and integrated into the plasmid vector pPICZa A. Subsequently, electroporation was performed on the host *P. pastoris* to follow heterologous expression. Two strains of the host were tested for expression ability, strain X33 and SMD1168. The latter exhibited intrinsic proteolytic activity and was rejected. Of the enzymes examined, only the expression of tyrosinase and amidase was feasible. In the UPO expression project, host peroxidases were expressed instead of the desired enzymes, which exhibited strong oxidative activity and were not present in the wild type of strain X33.

The amidase was isolated using metal chelate chromatography, while tyrosinase was isolated using ion exchange chromatography. The experimental determination of molecular weights by polyacrylamide gel electrophoresis showed that the amidase is glycosylated, resulting in a molecular weight of approximately 48 kDa. Similarly, tyrosinase is proteolyzed into two protein parts of 20 kDa and 42 kDa, probably to acquire its active form.

Subsequently, the characterization of the expressed enzymes was carried out. Tyrosinase exhibited optimal catalytic activity at pH 8.5, while the corresponding temperature was 40°C. The amidase exhibited an optimal pH of 4.5, however, it is emphasized that there was a failure to show activity on many substrates, a fact that needs to be further investigated.

Next, three mutations (T, L, and DM) of cutinase, from the same fungus that has been characterized, as well as some commercial proteases were tested for their catalytic activity on polyurethane (PU), in order to find the appropriate synergistic combination with the expressed enzymes. From this test, it was found that the wild-type cutinase and the commercial protease Savinase 16L Novozymes, exhibited the highest performance. Specifically, a weight reduction of 5.3% and 14.2% was determined by cutinase and savinase, respectively. The synergistic action revealed the combination of savinase and tyrosinase as the most efficient in the degradation of PU with a weight reduction of 6.6%. However, no synergy performed better than the

individual action of savinase. All applications on PU were carried out at 35°C for 3 days and pH 8.0 (except for amidase which was performed at pH 5.0).

Finally, regarding the unidentified host peroxidases, they were tested for their oxidative activity on low-density polyethylene (LDPE) and it was determined by the ATR method that new functional groups are formatted. Their application to the plastic was carried out at pH 6.0 at 35°C for 3 days. The identification of these specific enzymes and their in-depth study is considered necessary.

Keywords: Plastics, biodegradation, heterologous expression, polyurethane, tyrosinase, amidase, polyethylene, peroxidases

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract	6
Εισαγωγή.....	13
1. Θεωρητικό μέρος	15
1.1 Πλαστικά.....	15
1.1.1 Στοιχεία πολυμερισμού.....	15
1.1.2 Παραγωγή και εφαρμογές των πλαστικών	16
1.1.2.1 Πολυουρεθάνη (PU).....	18
1.1.2.2 Πολυαιθυλένιο (PE)	19
1.1.3 Συσσώρευση πλαστικών στο περιβάλλον και επιπτώσεις.....	20
1.1.4 Διαχείριση αποβλήτων και ανακύκλωση	22
1.1.5 Βιοαποικοδόμηση	25
1.1.6 Βιοπλαστικά	27
1.2 Μικροοργανισμοί.....	29
1.2.1 Ταξινόμηση και ιστορικά στοιχεία.....	30
1.2.2 Κατηγοριοποίηση των κυττάρων.....	31
1.2.3 Βιομηχανική χρήση μικροοργανισμών	34
1.2.4 Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε συστήματα πλαστικών	35
1.2.5 Γενετική τροποποίηση μικροοργανισμών.....	36
1.2.5.1 Γενετική μηχανική και ετερόλογη έκφραση	36
1.2.5.2 Μεταβολική μηχανική	40
1.2.6 Πρότυποι μικροοργανισμοί.....	42
1.2.6.1 Escherichia coli.....	43
1.2.6.2 Pichia pastoris	44
1.3 Ένζυμα.....	45
1.3.1 Ορισμός και γενικά στοιχεία	45
1.3.2 Ονοματολογία και ταξινόμηση	47
1.3.3 Κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων	48
1.3.4 Αξιοποίηση ενζύμων στην διάσπαση των πλαστικών	50
1.3.4.1 Σχεδιασμός μοντέλων και συστημάτων ενζυμικής δράσης	50
1.3.4.2 Ενζυμική αποικοδόμηση πολυουρεθάνης.....	51

1.3.4.3 Ενζυμική κατάλυση πολυαιθυλενίου.....	54
2. Πειραματικό Μέρος	58
2.1 Υλικά.....	58
2.1.1 Πόροι και Χημικά Αντιδραστήρια	58
2.1.2 Όργανα και Συσκευές	59
2.1.3 Φορείς κλωνοποίησης και ετερόλογης έκφρασης των ενζύμων	63
2.1.4 Εκφραζόμενα Ένζυμα	64
2.1.5 Εμπορικά Ένζυμα.....	68
2.1.6 Μηχανική επεξεργασία συνθετικών πολυμερών πριν τις ενζυμικές εφαρμογές	68
2.2 Πειραματικές Τεχνικές και Μέθοδοι	69
2.2.1 Βιοπληροφορική Ανάλυση	70
2.2.2 Μετασχηματισμός των κυττάρων <i>E. coli</i>	71
2.2.2.1 Θρεπτικό μέσο Lurio-Bertani Medium (LB)	71
2.2.2.2 Πρωτόκολλο μετασχηματισμού με θερμικό σοκ (Heat shock).....	72
2.2.3 Προετοιμασία πλασμιδίου για ηλεκτροδιάτρηση	73
2.2.3.1 Διαλογή ανασυνδυασμένων κυττάρων <i>E. coli</i> TOP10 και πολλαπλασιασμός του γονιδίου	73
2.2.3.2 Εξαγωγή των πλασμιδίων από τα κύτταρα του <i>E. coli</i> TOP10.....	74
2.2.3.3 Γραμμικοποίηση πλασμιδίων	75
2.2.3.4 Έλεγχος γραμμικοποίησης πλασμιδίων μέσω ηλεκτροφόρησης σε γέλη αгарόζης.....	76
2.2.3.5 Καθαρισμός προϊόντος γραμμικοποίησης	77
2.2.4 Μετασχηματισμός κυττάρων <i>P. pastoris</i>	78
2.2.4.1 Θρεπτικό μέσο YPD και YPDS.....	78
2.2.4.2 Προετοιμασία και ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων <i>P. pastoris</i>	78
2.2.4.3 Έλεγχος αποικιών σε τρυβλία αгарόζης (Agar plate screening)	81
2.2.5 Ετερόλογη έκφραση κουτινάσης από <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	83
2.2.6 Παραγωγή πρωτεϊνών από <i>P. pastoris</i>	84
2.2.6.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης καλλιεργείων.....	84
2.2.6.2 Ανάπτυξη καλλιεργείων και ετερόλογη έκφραση ενζύμων	87
2.2.7 Καθαρισμός πρωτεϊνικού διαλύματος.....	89
2.2.7.1 Φυγοκέντρηση, Διήθηση υπό κενό και Συμπύκνωση	89
2.2.7.2 Απομόνωση μέσω υγρής χρωματογραφίας	92

2.2.7.3 Αφαλάτωση πρωτεϊνικού διαλύματος	98
2.2.8 Έλεγχος καθαρότητας μέσω ηλεκτροφόρησης σε γέλη πολυακρυλαμιδίου.....	100
2.2.9 Χημικές δοκιμές (assays) υγρών καλλιιεργειών.....	103
2.2.9.1 Ρυθμιστικά διαλύματα αντιδράσεων	104
2.2.9.2 Ενζυμικές αντιδράσεις για τον προσδιορισμό ενεργότητας	104
2.2.10 Υπολογισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.....	108
2.2.11 Αποθήκευση κυττάρων σε γλυκερόλη (Glycerol Stock)	109
2.2.12 Εφαρμογές των εκφραζόμενων ενζύμων	110
2.2.12.1 Αντιδράσεις σε PU	110
2.2.12.2 Αντιδράσεις LDPE.....	110
3. Αποτελέσματα.....	112
3.1 Επιλογή μετασχηματισμένου στελέχους για την έκφραση των νέων ενζύμων.....	112
3.2 <i>In silico</i> βιοχημικός χαρακτηρισμός και πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής	115
3.2.1 Εκφραζόμενα ένζυμα.....	115
3.2.1.1 Αμιδάση	116
3.2.1.2 Τυροσινάση.....	119
3.2.1.3 Πρωτεάση και Ενδοπεπτιδάση	122
3.2.1.4 Υπεροξυγενάσες Astra55, Astra 57 και Astra 58.....	123
3.2.2 Κουτινάση και οι μεταλλάξεις L, T και DM	124
3.2.3 Σαβινάση	128
3.3 Χαρακτηρισμός ενζύμων	129
3.3.1 Αμιδάση.....	129
3.3.1.1 Απομόνωση μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας.....	129
3.3.1.2 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	130
3.3.1.3 Προσδιορισμός βέλτιστου pH καταλυτικής δράσης	132
3.3.2 Τυροσινάση.....	133
3.3.2.1 Απομόνωση μέσω χρωματογραφία ιοντικής εναλλαγής.....	133
3.3.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	134
3.3.2.3 Προσδιορισμός βέλτιστων τιμών pH και θερμοκρασίας.....	136
3.3.2.4 Προσδιορισμός της θερμικής σταθερότητας	137
3.3.3 Πρωτεάση και Ενδοπεπτιδάση	138
3.3.4 Υπεροξυγενάσες - Astra55, Astra57 και Astra58	139

3.3.4.1 Απομόνωση με χρωματογραφία ιοντικής εναλλαγής.....	139
3.3.4.2 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) με χρώση αργύρου (Silver Staining).....	142
3.3.4.3 Πρωτεομική ανάλυση.....	144
3.3.5 Κουτινάση και οι μεταλλάξεις της L,T και DM.....	144
3.4 Επιλογή εμπορικών πρωτεασών με ενεργότητα στο PU.....	145
3.5 Έλεγχος μεταλλάξεων της κουτινάσης του <i>F. oxysporum</i> για την ενίσχυση της δράσης στο PU.....	148
3.6 Σχεδιασμός και δοκιμή ενζυμικού κοκτέιλ για την διάσπαση του PU.....	151
3.7 Κατεργασία του PE με οξειδωτική δράση.....	156
4. Σχολιασμός αποτελεσμάτων και μελλοντικές προτάσεις.....	159
4.1 Ετερόλογη έκφραση των νέων ενζύμων.....	159
4.2 Τριτοταγής δομή εκφραζόμενων ενζύμων.....	160
4.3 Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών κατάλυσης.....	162
4.3.1 Αμιδάση.....	162
4.3.2 Τυροσινάση.....	162
4.4 Δραστικότητα εμπορικών πρωτεασών.....	163
4.5 Έλεγχος μεταλλαγμένων αμινοξέων για την βελτίωση της κουτινάσης του <i>F. oxysporum</i>	164
4.6 Ενζυμική αποικοδόμηση του PU.....	164
4.7 Διερεύνηση οξειδωτικής δράσης στο PE.....	165
Βιβλιογραφία.....	167
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: Πλασμιδιακοί φορείς γονιδίων.....	181
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: Μετατροπή απορρόφησης σε ενζυμική ενεργότητα.....	185
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ: Χημικές δοκιμές και πρωτόκολλα ενεργοποίησης αμιδάσης.....	186
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ: Καμπύλη αναφοράς Bradford.....	189
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ε: Χρώση αργύρου.....	190
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΤ: Χρωματογραφήματα HPLC των δειγμάτων συνεργιτισμού.....	192
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ: Φάσματα οξείδωσης PE των δειγμάτων Crude-57 και Crude-58....	195
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Η: Πρωτεολυτική δράση της σαβινάσης στην τυροσινάση και την κουτινάση.....	197

Εισαγωγή

Η δόμηση και η λειτουργία του σύγχρονου κόσμου βασίζεται στην συνεχής εξέλιξη των υλικών που απαιτούνται σε κάθε έκφανση της ανθρώπινης ζωής. Τα πλαστικά ως υλικό αναφοράς έφεραν την επανάσταση στην ανθρώπινη ζωή λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που κατέχουν. Ειδικότερα, η ευελιξία που παρέχουν, η ανθεκτικότητά στην διάβρωση αλλά και το χαμηλό κόστος παραγωγής τα καθιστούν αναντικατάστατα σε μεγάλο εύρος εφαρμογών, από την συσκευασία τροφίμων μέχρι και την κατασκευή ηλεκτρονικών υπολογιστών. Το πρώτο συνθετικό πολυμερές παρασκευάστηκε το 1907 ενώ η μαζική παραγωγή και η μεγάλη εξέλιξη έγινε εμφανής στα μέσα της δεκαετίας του '50. Από τότε, η παγκόσμια παραγωγή συνεχώς αυξάνεται και μάλιστα με εκθετικούς ρυθμούς. Αξίζει να αναφερθεί ότι η μισή ποσότητα από τα πλαστικά που έχουν παρασκευαστεί γενικότερα, έλαβε χώρα μόλις τα τελευταία 20 χρόνια [1].

Η αλόγιστη χρήση του πλαστικού από τον σύγχρονο άνθρωπο στην καθημερινότητά του οδήγησε σε αυξανόμενη ζήτηση. Οι βιομηχανίες προκειμένου να ανταπεξέλθουν στο ζήτημα αυτό αυξάνουν συνεχώς τις παραγωγές τους με αποτέλεσμα να συντίθενται εκατομμύρια τόνοι πλαστικού κάθε χρόνο. Ωστόσο, δεν αυξάνεται με τον ίδιο ρυθμό και η αντιμετώπιση των πλαστικών αποβλήτων. Το 40% των πλαστικών που χρησιμοποιούνται αποτελούν πλαστικά μιας χρήσης γεγονός που οδηγεί σε μεγάλους όγκους πλαστικών απορριμμάτων [1], [2].

Από το σύνολο των πλαστικών απορριμμάτων ένα σημαντικό ποσοστό καταλήγει σε υδατικά οικοσυστήματα. Η φυσική διάσπαση τους σε μικρότερα κομμάτια, τα λεγόμενα μικροπλαστικά αποτελούν μεγάλο κίνδυνο για την υδρόβια ζωή. Η κατανάλωση των μικροπλαστικών από τους υδρόβιους οργανισμούς επιτρέπει την είσοδό τους, στην τροφική αλυσίδα επηρεάζοντας μακροπρόθεσμα και τον άνθρωπο. Επιπρόσθετα, η ρύπανση στις χερσαίες περιοχές δεν είναι αμελητέα. Πολλά είδη πλαστικών απαιτούν μεγάλες χρονικές περιόδους για να αποσυντεθούν πλήρως, ενώ η διάσπαση τους από φυσικούς παράγοντες απελευθερώνει επιβλαβείς χημικές ουσίες στο έδαφος μολύνοντας έτσι το περιβάλλον και θέτοντας σε κίνδυνο την χλωρίδα και την πανίδα.

Η αντιμετώπιση της ρύπανσης μέσω των συμβατικών τρόπων προσέγγισης όπως η ταφή τους σε υγειονομικούς χώρους ή η αποτέφρωση δεν αποτελεί πανάκεια, καθώς εκείνες εμφανίζουν αρκετούς περιβαλλοντικούς περιορισμούς. Επιπλέον, η ανακύκλωση αν και αρκετά υποσχόμενη μέθοδος για την αντιμετώπιση του προβλήματος, δεν φαίνεται να έχει υιοθετηθεί σε σημαντικό βαθμό από τον σύγχρονο άνθρωπο. Εξάλλου, οι χώρες με την μεγαλύτερη συνεισφορά στην παγκόσμια ρύπανση και επομένως με την μεγαλύτερη επιρροή στο θέμα αυτό, δεν έχουν λάβει τα απαραίτητα μέτρα.

Η αποικοδόμηση των πλαστικών με βιοτεχνολογικές μεθόδους συμπεριλαμβανομένων μικροοργανισμών και ενζύμων αποτελεί μια ανερχόμενη μέθοδος για να ενισχύσει την προσπάθεια μείωσης των ρύπων. Η βιοαποικοδόμηση, όπως αποκαλείται, παρέχει πράσινες μεθόδους διάσπασης των πλαστικών στα

μονομερή τους, τα οποία με την σειρά τους ξανά με βιοτεχνολογικές πρακτικές δύνανται να μετατραπούν σε προϊόντα υψηλής αξίας. Με αυτό τον τρόπο, η βιοτεχνολογία, έχει την δυνατότητα να ενισχύσει την κυκλική οικονομία καθιστώντας οικονομικά συμφέρουσες τις διεργασίες ανακύκλωσης για τις βιομηχανίες. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιείται πλήθος ερευνών προκειμένου να απομονωθούν και να χαρακτηριστούν πλήρως μικροοργανισμοί και τα ένζυμα που εκφράζουν, για την βελτιστοποίηση και την κλιμάκωση των διεργασιών βιοαποικοδόμησης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ερευνάται η ικανότητα καταλυτικής δράσης εφτά ενζύμων μυκητιακής προέλευσης στην διάσπαση πλαστικών, στο πλαίσιο της μελέτης βελτιωμένων διεργασιών βιοαποικοδόμησης. Συγκεκριμένα, γίνεται η προσπάθεια έκφρασης τεσσάρων νέων ενζύμων (τριών υδρολυτικών και ενός οξειδωτικού) από τον μύκητα *Fusarium oxysporum* BPOP18 και εξετάζεται η δράση τους στην διάσπαση της πολυουρεθάνης τόσο μεμονωμένα όσο και συνεργιστικά. Επιπλέον, εγχειρήθηκε η έκφραση και η μελέτη τριών οξειδωτικών ενζύμων από τον μύκητα *Aspergillus parasiticus* MM36 για την επίδρασή τους στο πολυαιθυλένιο.

1. Θεωρητικό μέρος

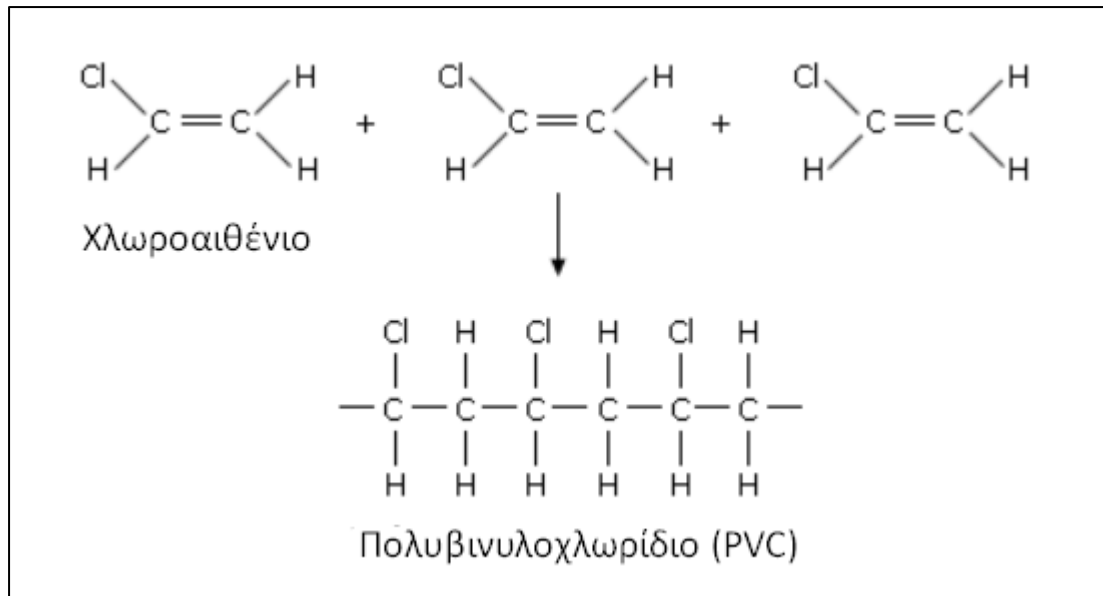
1.1 Πλαστικά

1.1.1 Στοιχεία πολυμερισμού

Το πλαστικό είναι ένα πολυμερικό υλικό που έχει την ιδιότητα να μετασχηματιστεί και να τροποποιηθεί συνήθως με την επίδραση της θερμότητας και της πίεσης. Το υλικό αυτό, χαρακτηρίζεται από χαμηλή πυκνότητα και ηλεκτρική αγωγιμότητα, διαπερατότητα, ενώ επιπλέον παρουσιάζει έντονη σκληρότητα. Τα ιδιαίτερα αυτά χαρακτηριστικά επιτρέπουν την ευρεία χρήση και εφαρμογή τους σε πληθώρα τομέων όπως για παράδειγμα, στην συσκευασία τροφίμων, σε κατασκευές, στις βιομηχανίες και στην ιατρική [3].

Όπως αναφέρθηκε το πλαστικό είναι μια κατηγορία υλικών που απαρτίζεται από μόρια πολυμερικών αλυσίδων. Ως πολυμερές ορίζεται μια χημική ένωση η οποία δομείται από μακρά μόρια, συνήθως μεγάλου μοριακού βάρους. Τα μόρια αυτά σχηματίζονται με επανάληψη δομικών μονάδων, τα οποία είναι πολύ μικρότερα σε μέγεθος από το τελικό προϊόν. Τα πολυμερή κατηγοριοποιούνται σε φυσικά και συνθετικά πολυμερή, ανάλογα με την πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους. Τα πλαστικά, ως συνθετικά πολυμερή, παράγονται από πρώτες ύλες που προέρχονται από το πετρέλαιο, το φυσικό αέριο, τον ορυκτό άνθρακα και το ξύλο [4], [5].

Ο σχηματισμός των μακρών αυτών μορίων επιτυγχάνεται μέσω του πολυμερισμού. Σύμφωνα με αυτόν, μικρά μόρια τα οποία ονομάζονται μονομερή αντιδρούν μεταξύ τους σε μια επαναλαμβανόμενη χημική αντίδραση σχηματίζοντας εν τέλει μακρύτερα μόρια, τα πολυμερή (Εικόνα 1.1). Προκειμένου να δράσουν τα μονομερή χρειάζονται να κατέχουν τουλάχιστον δύο δραστικές θέσεις, όπως για παράδειγμα ένας διπλός δεσμός ή μια χαρακτηριστική ομάδα, ενώ πολλές φορές χρησιμοποιούνται και διεγέρτες που τα ενεργοποιούν. Οι διεγέρτες μπορεί να είναι ελεύθερες ρίζες, ιόντα ή σύμπλοκα [5].

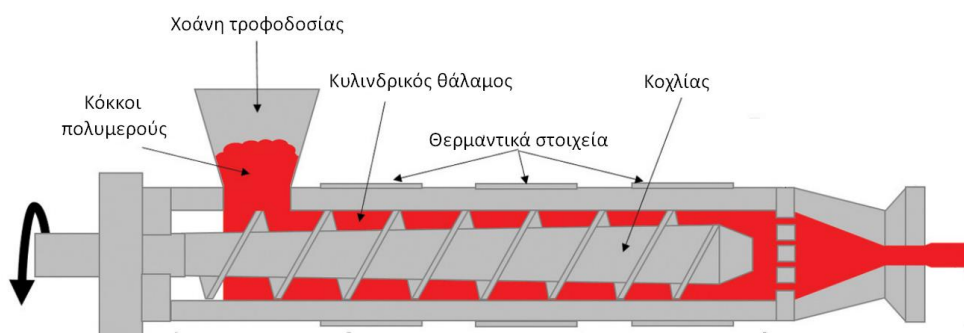


Εικόνα 1.1. Απεικόνιση του πολυμερισμού: Επάνω φαίνονται τα μονομερή όπου ο διπλός δεσμός ανοίγει και σχηματίζει το τελικό πολυμερές (κάτω) [6].

Επιπλέον, τα πλαστικά διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με κριτήριο τους δεσμούς που έχουν σχηματιστεί αλλά και την αντίδρασή τους στην θερμότητα, τα θερμοπλαστικά και τα θερμοσκληρυνόμενα. Η βασική τους διαφορά είναι ότι τα θερμοπλαστικά έχουν χαμηλά σημεία τήξης επιτρέποντας τον ανασχηματισμό τους και την ανακύκλωση τους. Αντίθετα, τα θερμοσκληρυνόμενα παρουσιάζουν μεγάλη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες και αφού επιτευχθεί σκλήρυνση δεν μπορούν να μορφοποιηθούν ξανά [7].

1.1.2 Παραγωγή και εφαρμογές των πλαστικών

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι παραγωγής των πλαστικών προϊόντων. Οι περισσότερες εκ των οποίων περιλαμβάνουν την τεχνική της εκβολής για την μορφοποίηση του πολυμερούς. Το 60% των πλαστικών μορφοποιούνται με την συγκεκριμένη μέθοδο. Η τεχνική αυτή μορφοποίησης ουσιαστικά ξεκινά με την εισαγωγή λεπτών κόκκων ή σκόνης στον εκβολέα ενός ή δύο κοχλιών (Εικόνα 1.2). Μέσα στον εκβολέα το πολυμερές μετατρέπεται σε τήγμα το οποίο αναδεύεται με σκοπό να επιτευχθεί η ομοιομορφία του, με ταυτόχρονη παροχή θερμότητας. Το τηγμένο πολυμερές εξέρχεται από τον εκβολέα και εισέρχεται σε μια δεδομένη μήτρα για την τελική μορφοποίηση [5], [8].



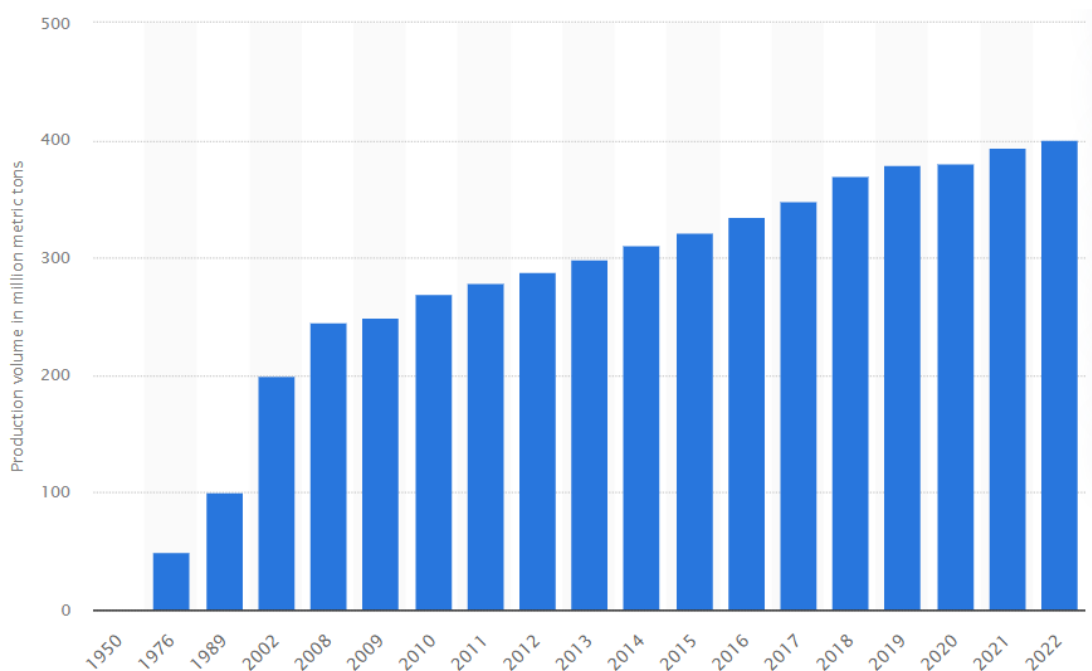
Εικόνα 1.2. Απεικόνιση ενός μονοκόχλιου εκβολέα [9].

Τα πιο συνήθη πλαστικά που παρασκευάζονται παγκοσμίως καθώς και μερικές εφαρμογές τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1 Οι κυριότερες κατηγορίες πλαστικών και μερικές εφαρμογές τους [10], [11].

Είδος πλαστικού	Εφαρμογές
Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET)	Μπουκάλια αναψυκτικού ή φαγητού
Πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE)	Κουτιά γάλακτος, μπουκάλια απορρυπαντικών, παιχνίδια και άκαμπτοι σωλήνες.
Πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC)	Σωλήνες υδραυλικών εγκαταστάσεων, υδρορροές βροχής ιατρικές σωλήνες και μάσκες οξυγόνου.
Πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE)	Πλαστική μεμβράνη, μεμβράνη με φυσαλίδες και σακούλες
Πολυπροπυλένιο (PP)	Καλαμάκια, καπάκια μπουκαλιών,
Πολυστυρένιο (PS)	Πακέτα τροφίμων, μόνωση κτιρίων.
Πολυουρεθάνη (PU)	Κατασκευές, ηλεκτρονικά είδη, συσκευασίες
Όλα τα υπόλοιπα	Γυαλιά οράσεως, ηλεκτρονικά είδη, φωτιστικά και διαφανή πλαστικά μαχαιροπίρουνα.

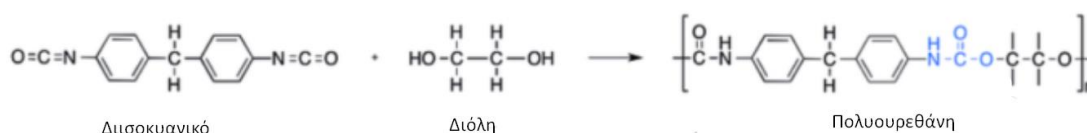
Η ευρεία εφαρμογή που παρουσιάζουν σε διάφορους τομείς, η καθημερινή χρήση οι ιδιότητες που κατέχουν ως υλικά αλλά και η ευκολία στην μαζική τους παραγωγή καθιστούν το πλαστικό αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης κοινωνίας. Η ενσωμάτωση του πλαστικού στον μέσο άνθρωπο αντικατοπτρίζεται και από την ετήσια παγκόσμια παραγωγή η οποία έχει φτάσει τα 400 εκατομμύρια τόνους το 2022. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στα μέσα της δεκαετίας του 80 η παγκόσμια παραγωγή ήταν μόλις 50 εκατομμύρια τόνοι ετησίως (Διάγραμμα 1.1).



Διάγραμμα 1.1. Ετήσια παραγωγή των συνηθέστερων ειδών πλαστικού παγκοσμίως [12].

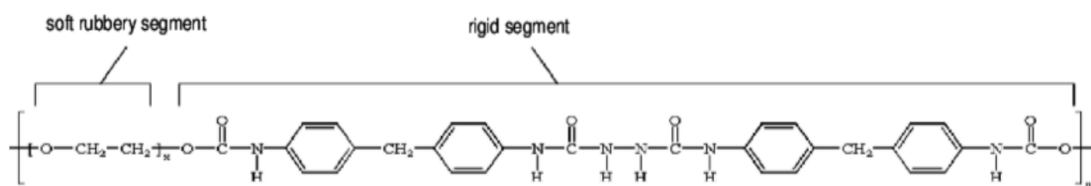
1.1.2.1 Πολυουρεθάνη (PU)

Οι πολυουρεθάνες μπορούν να παρασκευαστούν μέσω αντίδρασης μεταξύ διισοκυανικών, δηλαδή μορίων που περιέχουν δύο ισοκυανικές ομάδες και πολυολών, ήτοι ενώσεις που εμπεριέχουν τουλάχιστον δύο υδροξυλομάδες (Εικόνα 1.3) [13].



Εικόνα 1.3. Αντίδραση σχηματισμού πολυουρεθάνης [13].

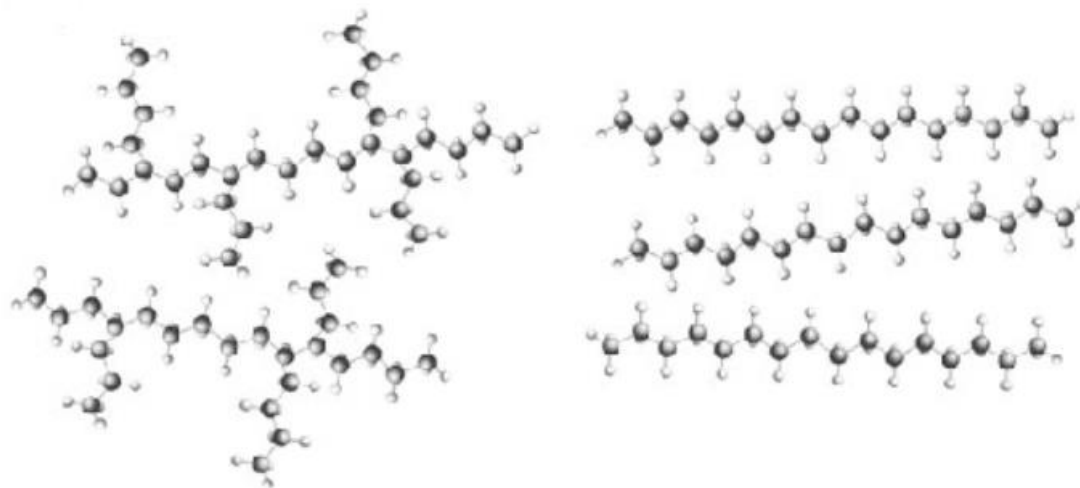
Η πολυουρεθάνη ανήκει στην κατηγορία συμπολυμερών και περιλαμβάνουν ένα «μαλακό» και ένα «σκληρό» τμήμα (Εικόνα 1.4). Το «μαλακό» τμήμα συμπεριλαμβάνει συνήθως μια πολυόλη, πολυαιθέρα ή πολυεστέρα. Στην περίπτωση που περιλαμβάνει πολυαιθέρα αποκαλείται πολυουρεθάνη αιθερικής βάσης (Ether-based PU), ενώ αντίστοιχα αν περιλαμβάνει πολυεστέρα ονομάζεται πολυουρεθάνη εστερικής βάσης (Ester-based PU). Το «μαλακό» τμήμα παρέχει ελαστικότητα ενώ το «σκληρό» τμήμα συνεισφέρει στην αντοχή και εμπεριέχει το διισοκυανικό [14].



Εικόνα 1.4. Απεικόνιση του «μαλακού» και του «σκληρού» τμήματος της πολυουρεθάνης [15].

1.1.2.2 Πολυαιθυλένιο (PE)

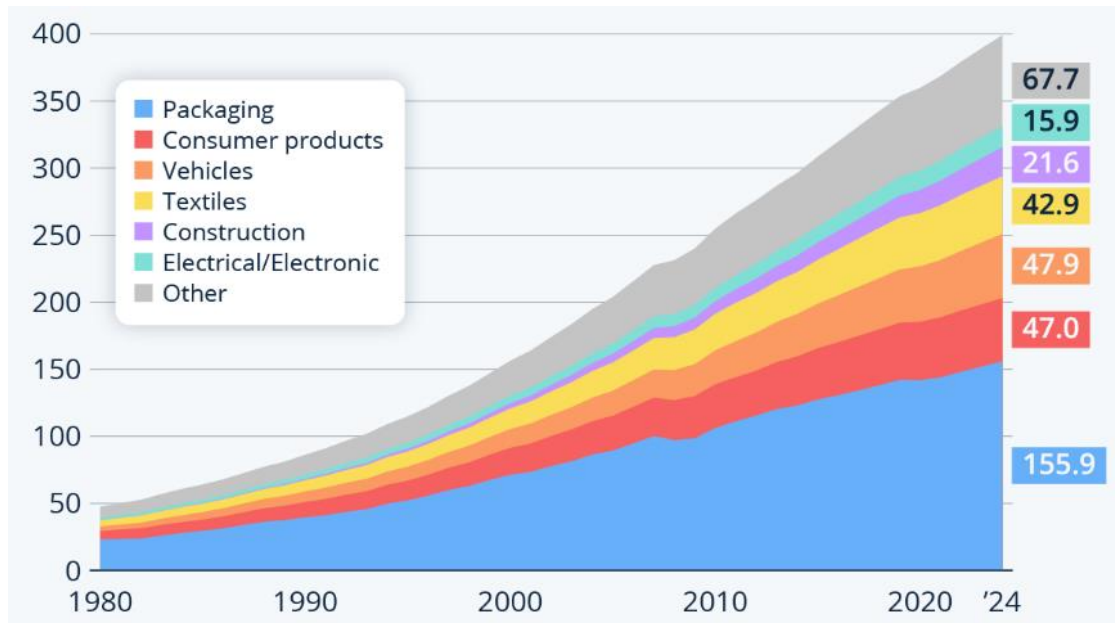
Το αιθυλένιο είναι ένα αρκετά σταθερό μόριο που αποτελείται από δύο άνθρακες ενωμένα με διπλό δεσμό. Το πολυαιθυλένιο, σχηματίζεται όταν παρουσία καταλύτη διασπάται ο διπλός δεσμός και σχηματίζονται απλοί δεσμοί με άτομα άνθρακα άλλων μορίων αιθυλενίου [16]. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες PE, το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) και το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE). Η διαφορά τους έγκειται στην μοριακή τους δομή. Στο HDPE οι πολυμερικές αλυσίδες είναι γραμμικές και στοιβάζονται η μια πάνω στην άλλη, αντίθετα στο LDPE σχηματίζονται διασυνδέσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων δημιουργώντας διακλαδώσεις (Εικόνα 1.5). Οι διακλαδώσεις δεν επιτρέπουν την στενή σύνδεση των μορίων επομένως το πολυμερικό πλέγμα δεν είναι πυκνό όπως στο HDPE [17], [18].



Εικόνα 1.5. Απεικόνιση αλυσίδων LDPE (αριστερά) και HDPE (δεξιά) [19].

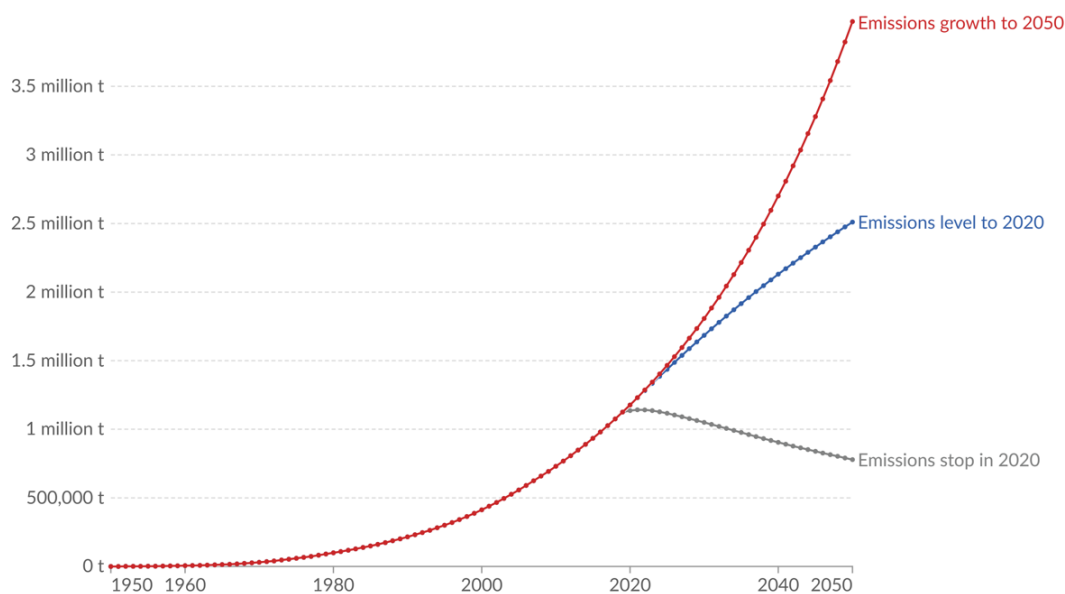
1.1.3 Συσσώρευση πλαστικών στο περιβάλλον και επιπτώσεις

Η μεγάλη αύξηση της παραγωγής πλαστικού ανά τον κόσμο οδηγεί και σε ανάγκες διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων που δημιουργούνται. Περίπου 400 εκατομμύρια πλαστικά απόβλητα εκτιμάται πως θα δημιουργηθούν μέχρι το τέλος του 2024 (Διάγραμμα 1.2) [20].



Διάγραμμα 1.2. Ετήσια πλαστικά απόβλητα παγκοσμίως ανά εφαρμογή σε εκατομμύρια τόνους [20].

Τα υδάτινα περιβάλλοντα της Γης, όπως οι ωκεανοί, τα ποτάμια και οι λίμνες αποτελούν έναν από τους κυριότερους φορείς υποδοχής ενός μεγάλου ποσοστού των πλαστικών αποβλήτων [21]. Ειδικότερα, περίπου 2.000 απορριμματοφόρα πλαστικών αποβλήτων, αδειάζουν το περιεχόμενό τους στους ωκεανούς, τα ποτάμια και τις λίμνες ημερησίως. Επιπλέον, 19 με 23 εκατομμύρια τόνους πλαστικού διαρρέουν στα υδάτινα οικοσυστήματα ετησίως [22]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι σωματίδια συνολικού βάρους τουλάχιστον 1,2 εκατομμυρίων τόνων επιπλέουν ή βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια των ωκεανών (Διάγραμμα 1.3) [22].

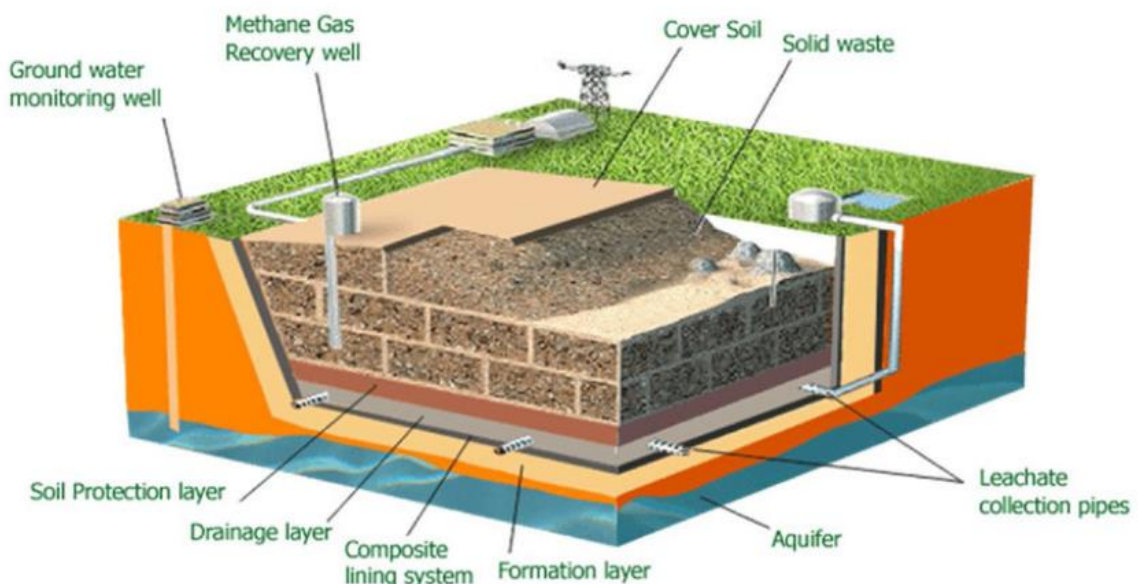


Διάγραμμα 1.3. Πρόβλεψη της ποσότητας των πλαστικών στην επιφάνεια των ωκεανών με τρία διαφορετικά σενάρια: (1) συνέχεια της εκθετικής αύξησης, (2) γραμμική αύξηση από το 2020, (3): τα πλαστικά απορρίμματα σταματούν να απορρίπτονται στους ωκεανούς [23].

Η συσσώρευση πλαστικού στα οικοσυστήματα έχει την δυνατότητα να μεταβάλλει της φυσικές διεργασίες, υποβαθμίζοντας την ικανότητα προσαρμογής των οργανισμών απέναντι στην κλιματική αλλαγή [22]. Στα υδάτινα περιβάλλοντα, μέσω των φυσικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα, τα εύθραυστα κομμάτια πλαστικού διασπώνται σε μικρότερου μεγέθους απόβλητα, τα μικροπλαστικά. Λόγω του μικρού μεγέθους αυτών των σωματιδίων, ζωοπλαγκτόν αλλά και άλλα μικρά θαλάσσια ζώα επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό. Αξίζει να τονιστεί το γεγονός ότι, μέχρι το 2018 βρέθηκε ποσότητα μικροπλαστικών σε περισσότερα από 114 υδρόβια είδη, ενώ μέχρι το 2020 οι επιστήμονες είχαν υπολογίσει ότι τουλάχιστον 14 εκατομμύρια τόνοι μικροπλαστικών υπήρχαν στον πυθμένα του ωκεανού [21]. Μέσω της τροφικής αλυσίδας, τα μικροπλαστικά μεταφέρονται και σε άλλα ζώα, στην ξηρά, ακόμη και στον άνθρωπο. Με βάση το Περιβαλλοντικό Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Environment Programme) βρέθηκαν μικροπλαστικά σε ανθρώπινα σκώτια, νεφρά και πλακούντες εγκύων. Τέλος, η Διεθνής Ένωση για την Διατήρηση της Φύσης (International Union for Conservation of Nature) εξήγαγε το πόρισμα ότι καρκινογόνες χημικές ουσίες που εμπεριέχονται σε πλαστικά προϊόντα μπορούν να καταλήξουν στο νερό βρύσης, γεγονός που συνεπάγεται την πιθανή πρόκληση διαταραχών στην υγεία του ανθρώπου [24].

1.1.4 Διαχείριση αποβλήτων και ανακύκλωση

Ο συμβατικός τρόπος διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων είναι συλλογή τους και η αποθήκευσή τους σε χωματερές. Η μόλυνση των υπόγειων υδάτων και του σχετικού οικοσυστήματος οδήγησε στην κατασκευή των Χώρων Υγειονομικής Ταφής (ΧΥΤΑ). Οι ΧΥΤΑ είναι χώροι ειδικά διαμορφωμένοι για την ασφαλή υποδοχή στερεών αποβλήτων μεταξύ αυτών και του πλαστικού. Η διαμόρφωση του χώρου απαιτεί να έχει χαρακτηριστικά λεκάνης. Έπειτα, η επιφάνεια επικαλύπτεται με μία στρώση από άργιλο προκειμένου επέλθει μόνωση του εδάφους και να αποφευχθεί η ρύπανση των υδροφόρων στρωμάτων. Επιπλέον, τοποθετούνται σωλήνες οι οποίοι έχουν την δυνατότητα να συλλέγουν το στράγγισμα των απορριμμάτων, το οποίο υπόκειται σε βιολογικό καθαρισμό και απορρίπτεται (Εικόνα 1.6). Αφού γίνει η μεταφορά των απορριμμάτων και ο ΧΥΤΑ φτάσει στο τέλος της ζωής του, ο χώρος επικαλύπτεται με χώμα. Κατά την παραμονή των απορριμμάτων στους χώρους πραγματοποιείται σήψη, από όπου παράγεται βιοαέριο, ενώ παράλληλα υπάρχει η δυνατότητα δενδροφύτευσης στην επιφάνεια ενός ΧΥΤΑ συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της χλωρίδας της περιοχής [25]. Η ταφή των πλαστικών απορριμμάτων είναι ο πιο διαδεδομένος τρόπος διαχείρισης παγκοσμίως. Παρόλα αυτά, η συνεχής αυξανόμενη παραγωγή των πλαστικών απαιτεί όλο και περισσότερους ΧΥΤΑ και δεδομένου του όγκου αλλά και των τεχνικών και γεωλογικών χαρακτηριστικών που απαιτούνται (μεγάλο βάθος, απομονωμένο από ανθρώπινους οικισμούς), η συνεχής αποθήκευση των απορριμμάτων σε ΧΥΤΑ καθίσταται πρακτικά αδύνατη.



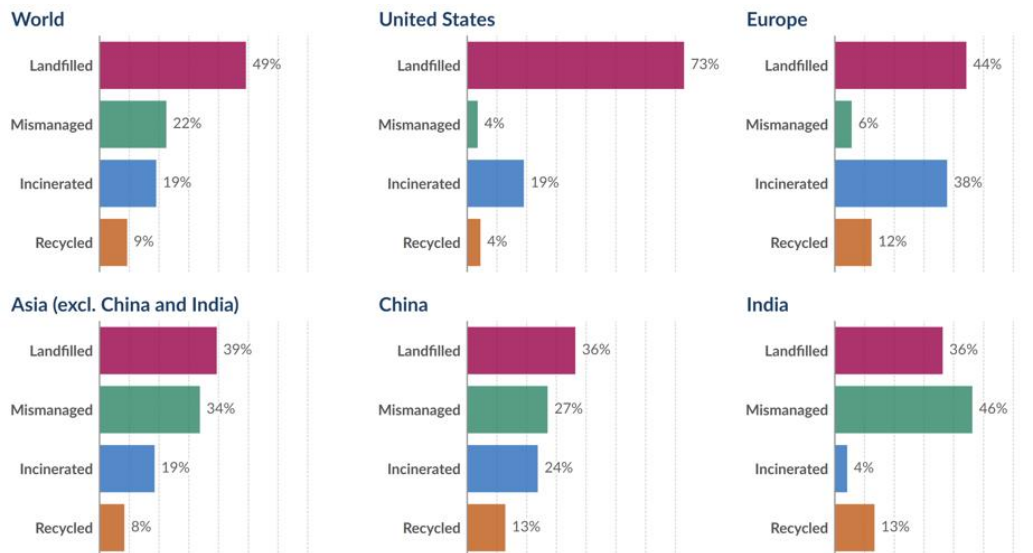
Εικόνα 1.6. Απεικόνιση ενός ΧΥΤΑ [26].

Εναλλακτικά, ένας άλλος τρόπος διαχείρισης των πλαστικών απορριμμάτων είναι η αποτέφρωση. Σε αυτές τις διεργασίες παρέχονται μεγάλα ποσά θερμότητας ώστε να επιτευχθεί πλήρης διάσπαση του πλαστικού. Σε πολλές περιπτώσεις απαιτείται προκατεργασία του πλαστικού για την απομάκρυνση της υγρασίας διευκολύνοντας την διαδικασία της αποτέφρωσης. Επιπλέον πολλές εγκαταστάσεις αποτέφρωσης

χρησιμοποιούν την θερμότητα που απελευθερώνεται για την παραγωγή ατμού και κατ' επέκταση ηλεκτρικής ενέργειας. Ως εκ τούτου η αποτέφρωση σε αυτήν την περίπτωση αποτελεί είδος ανακύκλωσης, για αυτό και πολλές φορές χαρακτηρίζεται ως τεταρτογενής ανακύκλωση [27], [28]. Ωστόσο, η καύση των πλαστικών είναι πολλές φορές οικονομικά ασύμφορη ενώ έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα και άλλων τοξικών ατμοσφαιρικών ρύπων όπως διοξίνες και φουράνες [27].

Η ανακύκλωση των πλαστικών, αποτελεί τον πλέον οικολογικό τρόπο για την αντιμετώπιση της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Επιπλέον, διακρίνεται σε πρωτοταγής, δευτεροταγής και τριτοταγής. Στην πρωτοταγή και την δευτεροταγή η ορθή μέθοδος ανακύκλωσης απαιτεί τον σωστό σχεδιασμό ενός συστήματος διαλογής και ταυτόχρονη ανάπτυξη οικολογικής συνείδησης. Αρχικά, η συλλογή και η διάκριση των πλαστικών απορριμμάτων από τα άλλα είδη αστικών στερεών αποβλήτων αποτελεί στάδιο ύψιστης σημασίας. Στην συνέχεια, τα πλαστικά απόβλητα ταξινομούνται ανά τύπο πολυμερούς και μέσω μηχανικών διεργασιών μετατρέπεται σε κομμάτια μικρότερου μεγέθους. Επιπλέον, ακολουθεί πλύση, για την απομάκρυνση προσκολλημένων αποβλήτων, λείανση και η μετατροπή τους σε σκόνη μέσω μηχανικής καταπόνησης. Η σκόνη πλαστικού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά ως πρώτη ύλη για την μορφοποίηση και την παραγωγή πλαστικών προϊόντων. Η ανάμιξη του ανακυκλωμένου με το αυθεντικό πλαστικό, πολλές φορές οδηγεί σε ένα τελικό προϊόν με υποβαθμισμένες ιδιότητες [25], [29], [30]. Με την πρωτοταγής ανακύκλωση τα πλαστικά που ανακτώνται, απαιτούνται να έχουν την ίδια απόδοση χαρακτηριστικών με τις αυθεντικές πρώτες ύλες, για την τήρηση των προδιαγραφών του τελικού προϊόντος. Αντίθετα, η δευτερογενής ανακύκλωση έχει ως αποτέλεσμα την ανάκτηση των πλαστικών με υποβαθμισμένες ιδιότητες το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη σε συγκεκριμένες εφαρμογές [30]. Η τριτοταγής ανακύκλωση, αναφέρεται στην χημική κατεργασία των απορριμμάτων με σκοπό την ανάκτηση των μονομερών ή και ολιγομερών που απαρτίζουν το πολυμερές. Τα προϊόντα αυτής της διεργασίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παρασκευή νέων χημικών προϊόντων ή και πλαστικών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η γλυκόλυση απορριμμάτων PET σε διόλες και τереφθαλικό διμεθυλεστέρα για να σχηματιστεί εκ νέου πολυμερές PET [28], [31].

Παρά τα οφέλη που παρέχει η ανακύκλωση, όπως η συμβολή της στην καθιέρωση της κυκλικής οικονομίας, η εφαρμογή της είναι ακόμα σε πρωταρχικά επίπεδα.



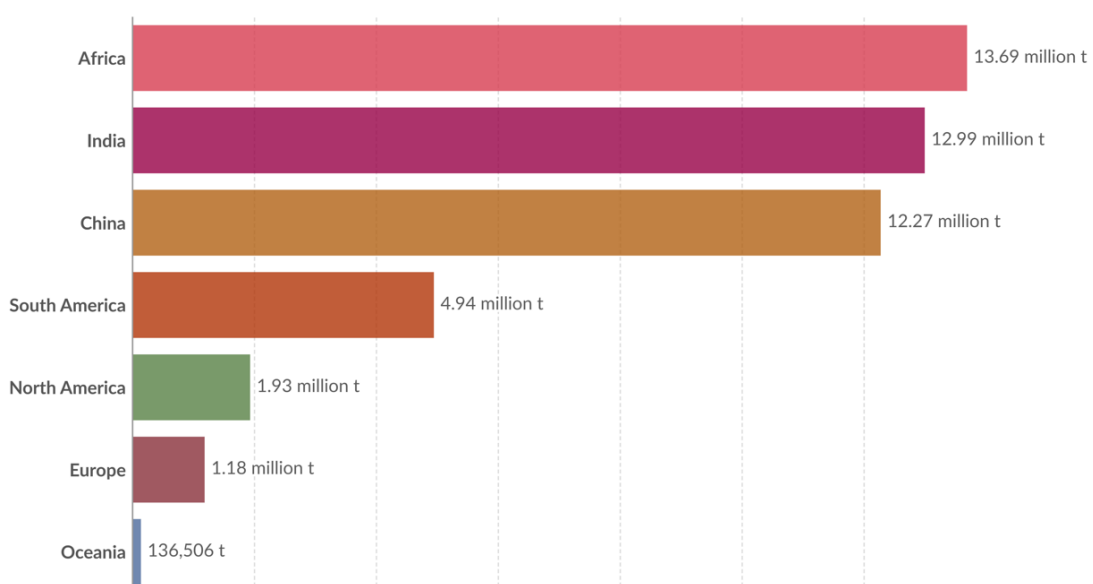
Data source: OECD (2023)

OurWorldInData.org/plastic-pollution | CC BY

Note: Regional aggregates were calculated by Our World in Data and are based on those specified by the OECD¹.

Διάγραμμα 1.4. Ποσοστό πλαστικών αποβλήτων που αποτεφρώνονται, ανακυκλώνονται, ή αποθηκεύονται σε χωματερές ανά περιοχή το 2023 [23].

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1.4, μόλις το 9% των πλαστικών απορριμμάτων παγκοσμίως ανακυκλώθηκε το 2023. Παράλληλα, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το 22% των αποβλήτων διαχειρίζονται με λανθασμένο τρόπο, δηλαδή δεν αποτεφρώνονται, ανακυκλώνονται ή αποθηκεύονται σε χώρους ταφής, που συνεπάγεται την πιθανή διαρροή τους σε υδάτινα περιβάλλοντα. Επιπλέον, τονίζεται ότι η Ευρώπη αποτελεί την μόνη ήπειρο στην οποία επιλέγεται η αποτέφρωση σε τόσο μεγάλο ποσοστό (άνω του 35%). Τέλος, επισημαίνεται ότι οι δράσεις των χωρών με μεγάλο πληθυσμό, ήτοι Ινδία και Κίνα επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την παγκόσμια διαχείριση των πλαστικών απορριμμάτων, όπως φαίνεται και από το παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 1.5).



Διάγραμμα 1.5. Τα πλαστικά απορρίμματα που δεν αποθηκεύονται σε χωματερές, αποτεφρώνονται ή ανακυκλώνονται [23].

1.1.5 Βιοαποικοδόμηση

Η συμβατική διαχείριση των πλαστικών απορριμμάτων εμφανίζει περιορισμούς όπως αναφέρθηκαν προηγουμένως. Παράλληλα η ανακύκλωση, αφενός αποτελεί μια αποτελεσματική λύση για την αντιμετώπιση της ρύπανσης, αφετέρου δεν εφαρμόζεται σε μεγάλο βαθμό ώστε να έχει σημαντικό αντίκτυπο.

Η απελευθέρωση των πλαστικών και των μικροπλαστικών στο περιβάλλον, συνεπάγεται την αποσύνθεσή τους, μέσω φυσικών διεργασιών όπως υδρόλυση, οξείδωση, βιοαποικοδόμηση και φωτοαποικοδόμηση. Μεταξύ αυτών η βιοαποικοδόμηση αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους τρόπους για τον περιορισμό της πλαστικής ρύπανσης [32]. Η μικροβιακή αποικοδόμηση ή αλλιώς βιοαποικοδόμηση είναι η διαδικασία στην οποία πραγματοποιείται μερική ή ολική αποσύνθεση μιας οργανικής χημικής ένωσης, στην συγκεκριμένη περίπτωση τα πολυμερή, με την δράση μικροοργανισμών, παράγοντας CO₂ και H₂O υπό αερόβιες συνθήκες και CO₂, H₂O και CH₄ υπό αναερόβιες συνθήκες [32], [33], [34].

Όπως έχει και προηγουμένως αναφερθεί, οι δεσμοί που απαρτίζουν το πολυμερές είναι υδρόφοβοι, συνήθως δεν αποτελούνται από κάποια λειτουργική ομάδα, ενώ παράλληλα εμφανίζουν κρυσταλλικότητα. Λόγω των προδιαγραφών παραγωγής πλαστικών προϊόντων για αντοχή, η μικροβιακή προσκόλληση και οι ενζυμικές αντιδράσεις αποσύνθεσης δεν ευνοούνται. Η πλήρης αφομοίωση και αποσύνθεση από τους μικροοργανισμούς μπορεί να ενισχυθεί εφόσον τα πλαστικά απορρίμματα υποστούν προκατεργασίες που προσομοιώνουν τις φυσικές συνθήκες αποικοδόμησης των πλαστικών στο περιβάλλον. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται «πράσινη» χημική επεξεργασία, που καθιστούν τα πλαστικά απόβλητα πιο ευνοϊκά υποστρώματα για την δράση των ενζύμων και γενικότερα επιδεκτικά σε βιοκαταλυτικές δραστηριότητες (Εικόνα 1.7). Μερικές από τις προκατεργασίες περιλαμβάνουν μηχανική καταπόνηση, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, υψηλές θερμοκρασίες και χημικές αντιδράσεις [32], [35]. Η βιοαποικοδόμηση μπορεί να περιγραφεί σε τέσσερα στάδια [34]:

1) Φάση αποικισμού

Μικροοργανισμοί όπως βακτήρια και μύκητες σχηματίζουν αποικίες στην επιφάνεια του πλαστικού υλικού και χρησιμοποιούν το πολυμερές ως πηγή άνθρακα και θρεπτικών συστατικών. Οι μικροοργανισμοί μπορεί να βρίσκονται ελεύθεροι στην φύση ή να έχουν προστεθεί εσκεμμένα στο περιβάλλον του πλαστικού για την ενίσχυση της βιοαποικοδόμησης.

2) Έκκριση ενζύμων

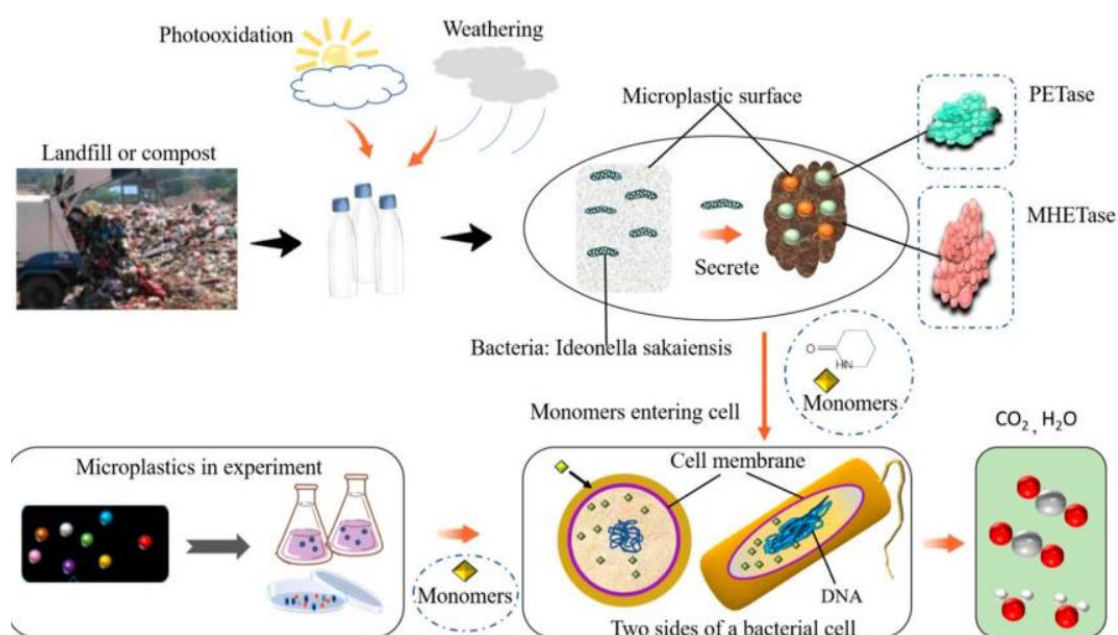
Τα κύτταρα που έχουν πλέον εγκατασταθεί στην επιφάνεια του πλαστικού εκκρίνουν τα κατάλληλα ένζυμα προκειμένου να μεταβολίσουν το πλαστικό και να μπορέσουν να αναπτυχθούν.

3) Απορρόφηση του άνθρακα και αποσύνθεση

Η καταλυτική δράση των ενζύμων έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση των μακρών πολυμερικών αλυσίδων του πλαστικού σε επιμέρους μικρότερα μόρια, δηλαδή σε oligομερή και μονομερή. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να αξιοποιήσουν τα μικρότερα πλαστικά σωματίδια για την αφομοίωση του άνθρακα ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους.

4) Βιοαποικοδόμηση

Στην φάση αυτή, παρατηρείται πλήρης αποικοδόμηση των πλαστικών θραυσμάτων καθώς αξιοποιούνται για τις διάφορες μεταβολικές οδούς των κυττάρων. Ταυτόχρονα, παράγονται διάφορα μεταβολικά προϊόντα ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης (παρουσία ή απουσία οξυγόνου), που μπορούν να ενσωματωθούν σε φυσικούς κύκλους.

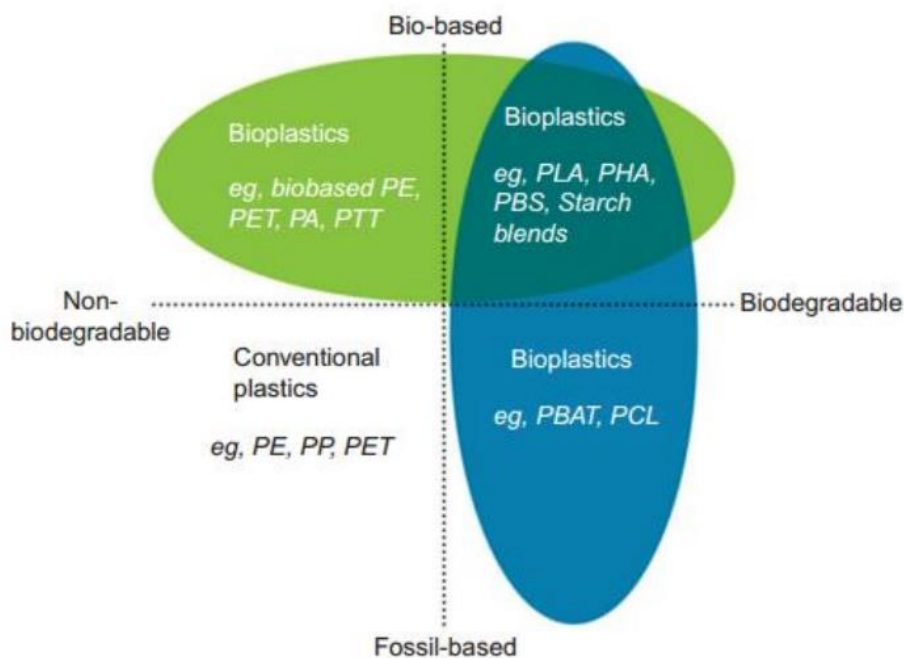


Εικόνα 1.7. Σχηματική αναπαράσταση της αποικοδόμησης πλαστικών μέσω του βακτηρίου *Ideonella sakaiensis* [32].

Η βιοαποικοδόμηση των πλαστικών αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον διεργασία όπου ταυτόχρονα μειώνει τους πλαστικούς ρύπους και περιορίζει τα προβλήματα που δημιουργούνται από την συσσώρευσή τους. Επομένως, η ανακάλυψη μικροβιακών στελεχών ή ακόμη και απομονωμένων ενζύμων που ενισχύουν την αποικοδόμηση του πλαστικού είναι ζήτημα ύψιστης σημασίας.

1.1.6 Βιοπλαστικά

Η προσπάθεια διευκόλυνσης της βιοαποικοδόμησης των πλαστικών οδήγησε στην δημιουργία των βιοπλαστικών. Τα βιοπλαστικά είναι πολυμερή τα οποία παράγονται από φυσικές ή ανανεώσιμες πηγές. Τονίζεται ότι, τα βιοπλαστικά δεν είναι απαραίτητα και βιοδιασπώμενα [36], [37]. Ως βιοδιασπώμενα ορίζονται τα πλαστικά τα οποία αποτελούν ευνοϊκότερο υπόστρωμα για τα εκκρινόμενα ένζυμα από τους μικροοργανισμούς που τα αποικοδομούν. Σημειωτέον ότι, υπάρχουν συμβατικά πολυμερή τα οποία είναι βιοδιασπώμενα (PBAT, PCL), αλλά και βιοπλαστικά τα οποία δεν είναι βιοδιασπώμενα (PET, PE, PA). Η διάκριση αυτή αποτυπώνεται στην Εικόνα 1.8.

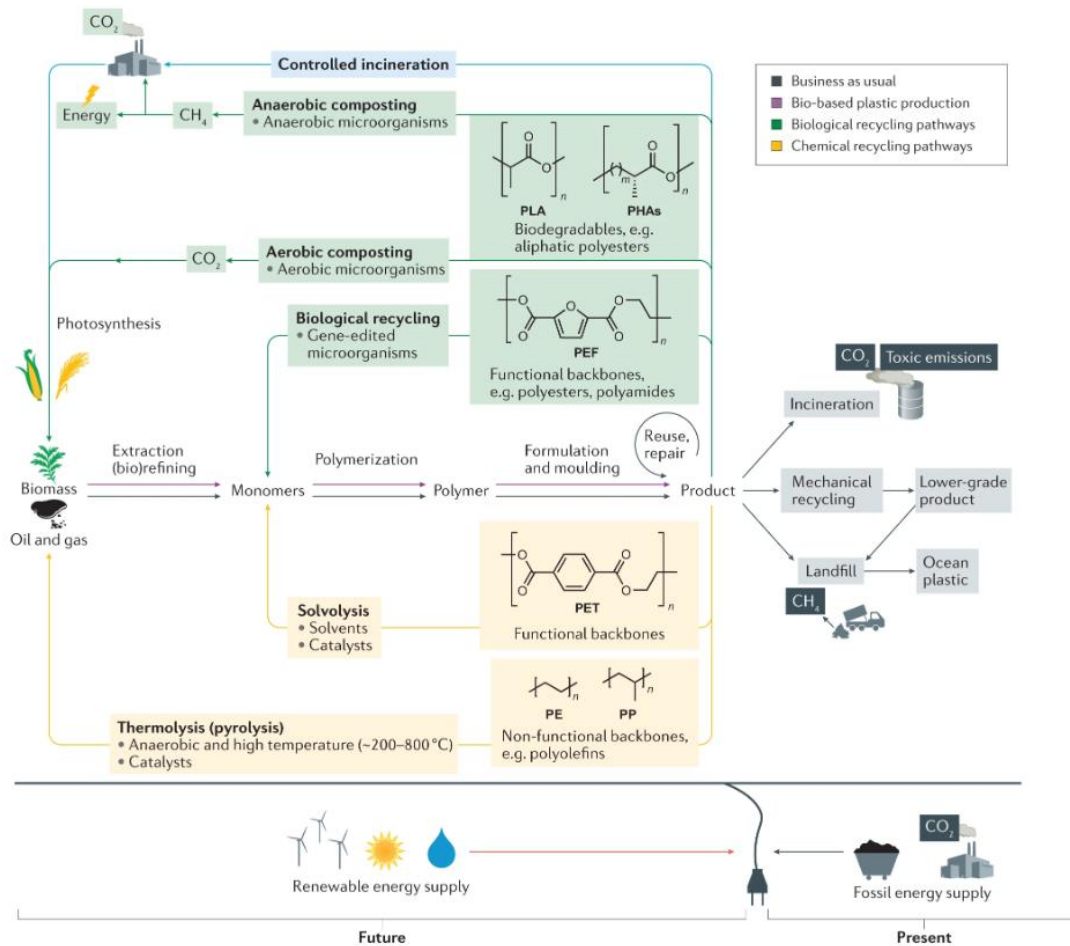


Εικόνα 1.8. Απεικόνιση των σχέσεων μεταξύ βιοπλαστικών, βιοδιασπώμενων, μη βιοδιασπώμενων και πλαστικών με πρώτη ύλη τα ορυκτά καύσιμα [38].

Παρόλα αυτά, τα οφέλη της χρήσης των βιοπλαστικών ποικίλουν με τα κυριότερα από αυτά να αποτελούν την εξοικονόμηση των ορυκτών πηγών, αφού παρασκευάζονται κυρίως από βιομάζα που αναγεννάται κάθε χρόνο. Επιπλέον, μειώνει το αποτύπωμα άνθρακα των βιομηχανιών που παράγουν βιοπλαστικά και συμβάλλει στην καθιέρωση της κυκλικής οικονομίας, καθώς η προέλευση της πρώτης ύλης του πολυμερούς δεν αποτελεί πλέον τα ορυκτά καύσιμα ή το πετρέλαιο [39].

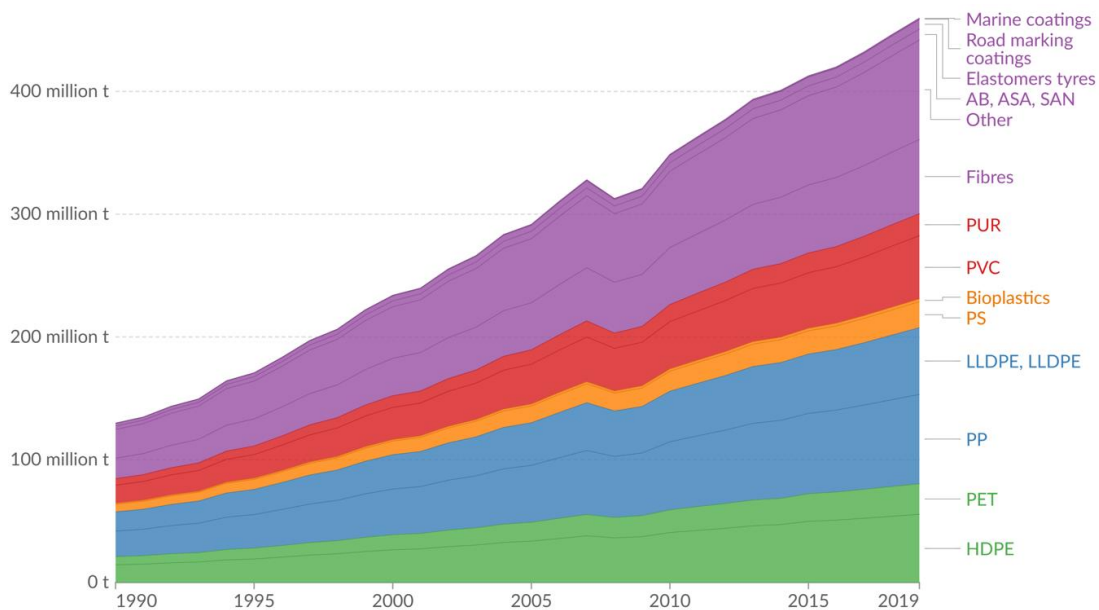
Σε μία ιδανική κυκλική οικονομία, τα πλαστικά απόβλητα μετατρέπονται σε πρώτες ύλες για την παραγωγή νέων προϊόντων, ενώ παράλληλα η ενέργεια που απαιτείται για τις διεργασίες παραγωγής και ανακύκλωσης παρέχεται στο μεγαλύτερο ποσοστό της από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Τα βιοδιασπώμενα βιοπλαστικά απορρίμματα, μπορούν να αποικοδομηθούν μέσω αερόβιων και αναερόβιων ζυμώσεων ή ακόμη και με αποτέφρωση. Το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται από τις παραπάνω διεργασίες αποικοδόμησης (αποτέφρωση και αερόβια ή αναερόβια ζύμωση) δεν συνεισφέρει στις εκπομπές CO₂ καθώς την ίδια στιγμή

ποσότητα CO₂ δεσμεύεται από τις φυσικές πρώτες ύλες των βιοπλαστικών. Αντίθετα τα μη βιοδιασπώμενα βιοπλαστικά, μπορούν να διασπαστούν στα επιμέρους μονομερή ή σε αντίστοιχες πρώτες ύλες μέσω χημικών διεργασιών όπως η πυρόλυση [40]. Όλη η διαδικασία που περιεγράφηκε παραπάνω αποτυπώνεται στην Εικόνα 1.9.



Εικόνα 1.9. Η κυκλική οικονομία του πλαστικού [40].

Η παραγωγή βιοπλαστικών, έχει μεγάλο αντίκτυπο στην κυκλική οικονομία. Η χρήση φυσικών πηγών για την παρασκευή βιοπλαστικών αυξάνει την απόδοση των κυκλικών διεργασιών με μηδενικές εκπομπές CO₂. Ωστόσο, η παραγωγή βιοπλαστικών συγκριτικά με τα συμβατικά πολυμερή παραμένει σε πολύ χαμηλά ποσοστά. Ειδικότερα, μόλις το 0,51% της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικού το 2019 ήταν βιοπλαστικά (Διάγραμμα 1.6).



Διάγραμμα 1.6. Ετήσια παραγωγή πλαστικού ανά πολυμερές, συμπεριλαμβανόμενου και των λιγότερο γνωστών πολυμερών [23].

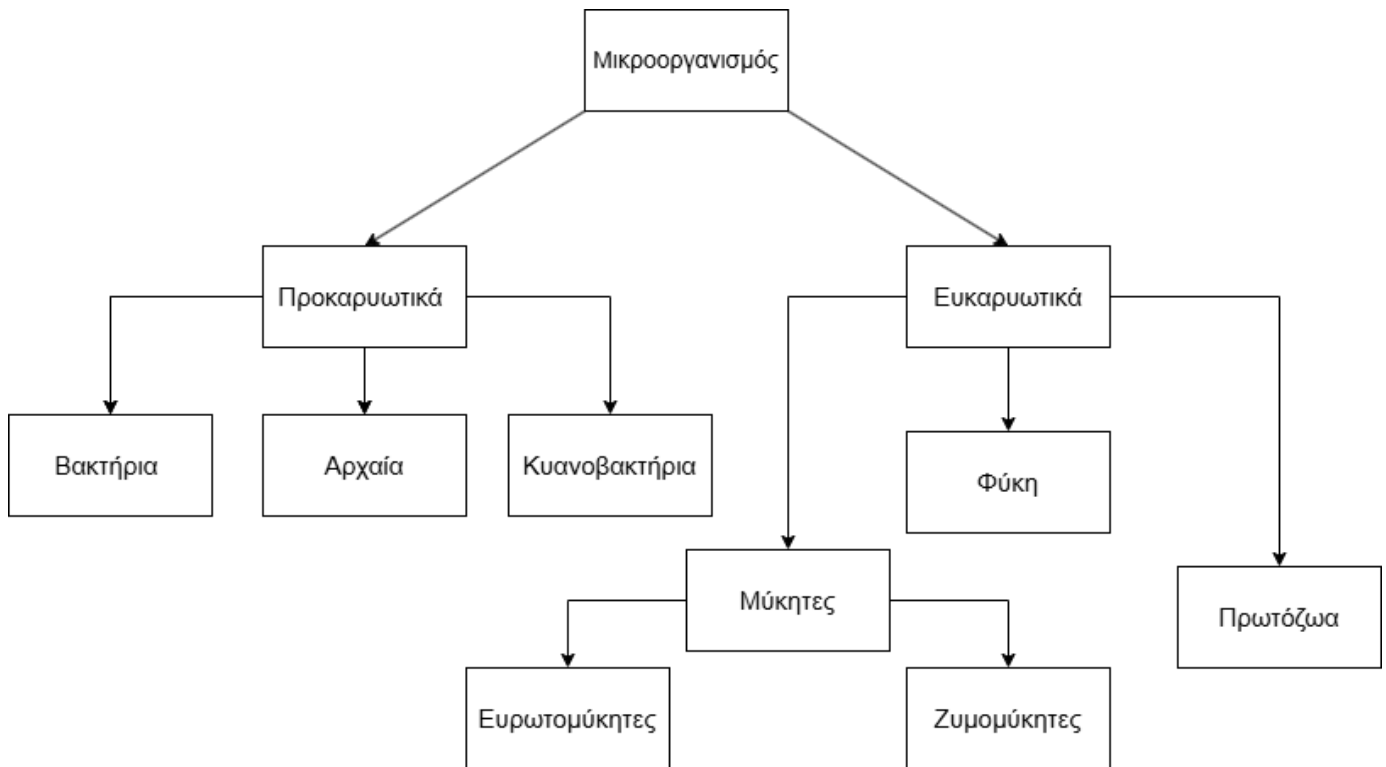
1.2 Μικροοργανισμοί

Η χρήση των μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση του πλαστικού, όπως προαναφέρθηκε αποτελεί μια ωφέλιμη και οικολογικά συμφέρουσα πρακτική. Το συγκεκριμένο πεδίο έρευνας αποκτά ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον καθώς, ο αριθμός των μικροοργανισμών βιοαποικοδόμησης που ταυτοποιούνται και χαρακτηρίζονται συνεχώς αυξάνεται. Μέχρις στιγμής, οι κυριότεροι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς την δράση τους στην αποσύνθεση των πλαστικών είναι οι *Bacillus cereus*, *Pseudomonas*, και *Rhodococcus*. Αντίστοιχα, οι ευκαριωτικοί μικροοργανισμοί στους οποίους έχει εστιαστεί μεγάλος αριθμός ερευνών είναι οι *Fusarium*, *Aspergillus*, και *Penicillium*. Η κατανόηση της φυσιολογίας και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των κυττάρων και γενικότερα των μικροοργανισμών, μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για την ενίσχυση και την εξέλιξη της βιοαποικοδόμησης [40].

Οι ζωντανοί οργανισμοί, διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ως προς την μορφολογία και την λειτουργία τους. Η τεράστια βιοποικιλότητα, είναι αποτέλεσμα της μακροχρόνιας εξέλιξης των ειδών για την προσαρμογή και την επιβίωση τους στις συνεχώς μεταβαλλόμενες συνθήκες του περιβάλλοντός τους. Ωστόσο, όλες οι μορφές ζωής ανάγονται σε μια κοινή βάση, τα κύτταρα. Οι μικρές αυτές μονάδες, αποτελούν πολύπλοκα συστήματα τα οποία αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους μέσω ενός συνδυαστικού δικτύου χημικών και φυσικών φαινομένων συγκροτώντας τις ανώτερες μορφές ζωής.

1.2.1 Ταξινόμηση και ιστορικά στοιχεία

Γενικότερα με τον όρο μικροοργανισμοί ή μικρόβια, ονομάζουμε ζωντανούς οργανισμούς οι οποίοι έχουν μικρό μέγεθος σε βαθμό που δεν είναι ορατοί με γυμνό μάτι [41], [42], [43]. Οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε επιμέρους κατηγορίες, όπως οι μύκητες, τα βακτήρια, τα φύκη και τα πρωτίστα (Εικόνα 1.10). Οι ιοί δεν συγκαταλέγονται ως μικροοργανισμοί διότι δεν πληρούν όλα τα κριτήρια ενός ζωντανού οργανισμού [41].



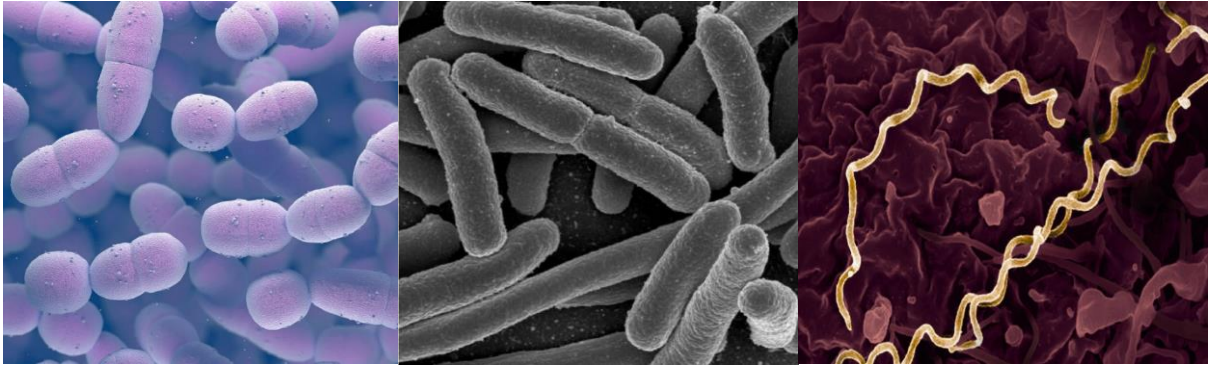
Εικόνα 1.10. Ταξινόμηση των μικροοργανισμών βάσει δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών.

Η μελέτη των μικροοργανισμών έκανε την εμφάνισή της με την ανάπτυξη του μικροσκοπίου. Οι πρώτες παρατηρήσεις και επιστημονικές αναφορές έγιναν στα μέσα του 17^{ου} αιώνα, ωστόσο το ενδιαφέρον για την μελέτη του συγκεκριμένου πεδίου εκείνη την εποχή ήταν ελάχιστο. Τα θεμέλια της μικροβιολογίας, χτίστηκαν στα τέλη του 19^{ου} και στις αρχές του 20^{ου} αιώνα όπου, ανακαλύφθηκαν διαδοχικά παθογόνα βακτήρια, που ήταν κύρια αιτία συγκεκριμένων ασθενειών. Παράλληλα, αναπτύχθηκαν μέθοδοι και τεχνικές για την παρατήρηση και ανάλυση της ποικιλομορφίας και των ιδιοτήτων των μικροβίων. Πλέον, από το 1940 μέχρι και σήμερα, η μικροβιολογία βρίσκεται υπό συνεχή εξέλιξη και έχει σημειώσει σημαντικά βήματα προόδου, καθώς έχουν ταυτοποιηθεί πολλοί ασφαείς και παθογόνοι μικροοργανισμοί. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί σύγχρονοι μέθοδοι ανάλυσης. Τα μικρόβια είναι οι πιο απλές μορφές ζωής και επομένως αποτελούν σημαντικό αντικείμενο μελέτης, καθώς μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς λειτουργίας και επιβίωσής τους [44].

1.2.2 Κατηγοριοποίηση των κυττάρων

Προκαρυωτικοί οργανισμοί

Η ύπαρξη πυρήνα, αποτελεί το βασικότερο κριτήριο για την ταξινόμηση των ζωντανών οργανισμών. Τα κύτταρα τα οποία δεν περιέχουν πυρήνα ονομάζονται προκαρυωτικά. Τα προκαρυωτικά κύτταρα έχουν μορφολογία η οποία μπορεί να είναι σφαιρική, ραβδοειδής ή και σπειροειδής (Εικόνα 1.11) [45].



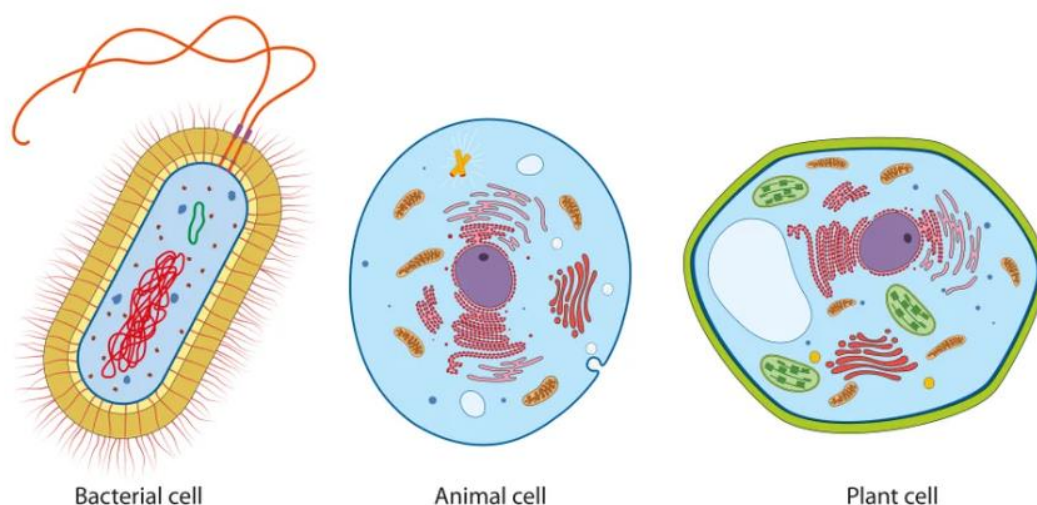
Εικόνα 1.11. Προκαρυωτικά κύτταρα σφαιρικού, ραβδοειδούς και σπειροειδούς σχήματος: *Streptococcus pneumoniae* (αριστερά) [46], *Escherichia coli* (κέντρο) [47], *Treponema pallidum* (δεξιά) [48].

Αυτή η κατηγορία κυττάρων, δεν περιέχει οργανίδια, ενώ αποτελείται από ένα προστατευτικό περίβλημα, το κυτταρικό τοίχωμα. Το τοίχωμα περικλείει την κυτταρική μεμβράνη, η οποία με την σειρά της περιβάλλει έναν χώρο που αποτελείται από το κυτταρόπλασμα, τα ριβοσώματα και το γενετικό υλικό. Μερικά κύτταρα έχουν δύο μεμβράνες οι οποίες βρίσκονται εκατέρωθεν του κυτταρικού τοιχώματος. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάζονται αρνητικοί κατά Gram ενώ αντίθετα, όταν υπάρχει μόνο μια κυτταρική μεμβράνη χαρακτηρίζονται ως θετικοί κατά Gram [49]. Στην κατηγορία αυτή των προκαρυωτικών οργανισμών ανήκουν τα βακτήρια, τα κυανοβακτήρια και τα αρχαία. Τα κυανοβακτήρια, ανήκουν στην οικογένεια των βακτηρίων, ωστόσο διαφοροποιούνται από αυτά, λόγω της ικανότητάς τους να φωτοσυνθέτουν [50]. Η διαφορά των βακτηρίων και των κυανοβακτηρίων με τα αρχαία σε μοριακό επίπεδο είναι σημαντική και η κατηγοριοποίησή τους, έγκειται στις συνθήκες ανάπτυξης τους. Τα αρχαία γενικότερα αναπτύσσονται σε ιδιαίτερα αντίξοες συνθήκες σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο ζωντανό οργανισμό [45].

Ευκαρυωτικοί οργανισμοί

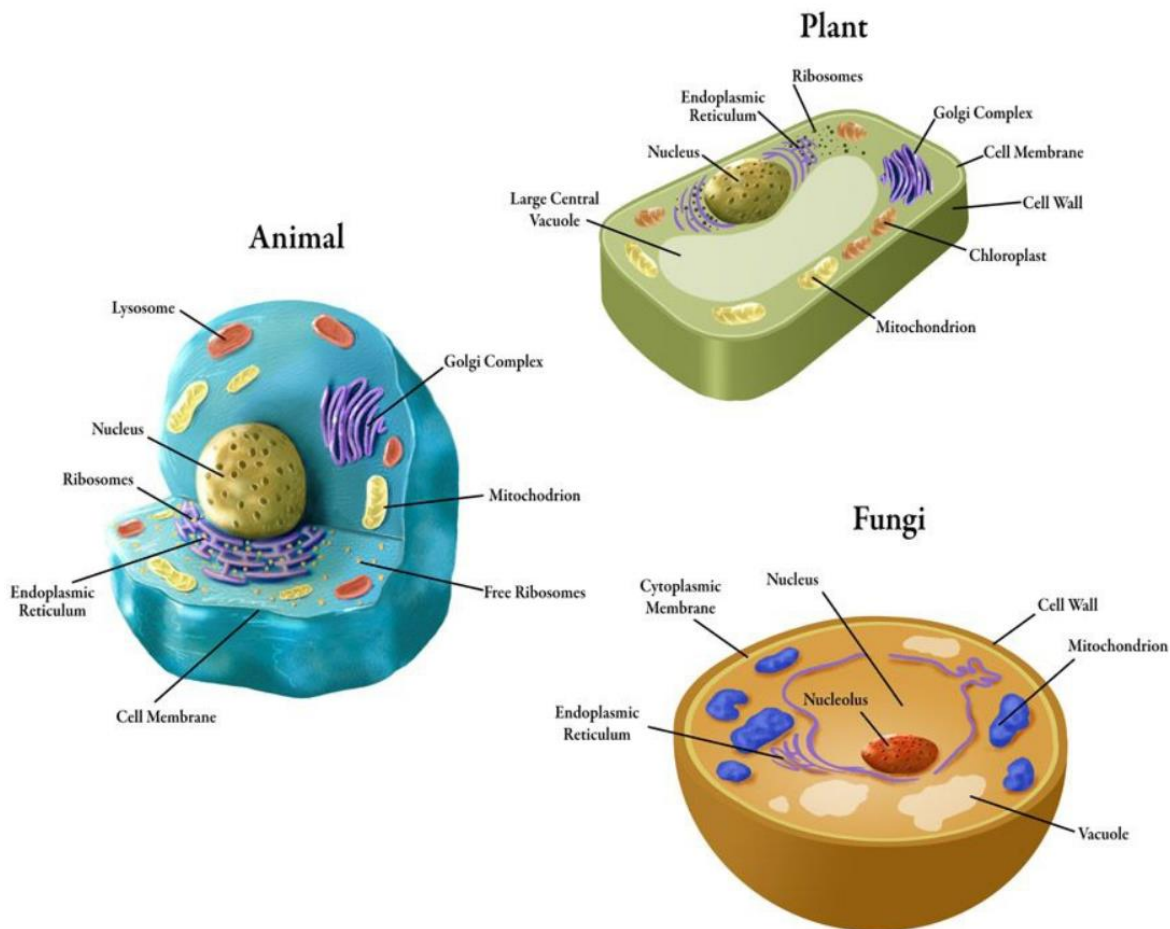
Αντίθετα, η παρουσία οργανωμένου τμήματος που εμπεριέχει το γενετικό υλικό σε ένα κύτταρο, αποτελεί χαρακτηριστικό των ευκαρυωτικών κυττάρων. Γενικότερα, ως συστήματα είναι μεγαλύτερα και περισσότερο περίπλοκα δομικά από τα προκαρυωτικά (Εικόνα 1.12). Καταρχάς, οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί μπορεί να είναι μονοκύτταροι (όπως οι προκαρυωτικοί) ή πολυκύτταροι. Οι πιο σύνθετοι ζωντανοί οργανισμοί αποτελούνται από ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως τα φυτά, τα ζώα και οι μύκητες. Κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο αποτελείται από ένα σύνολο οργανιδίων,

η πλειοψηφία των οποίων περιβάλλεται από μεμβράνες δημιουργώντας επιμέρους κυτταρικά διαμερίσματα [45].



Εικόνα 1.12. Απεικόνιση της δομής των προκαρυωτικών κυττάρων (Βακτήριο) με τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Ζωικό και Φυτικό κύτταρο) [51].

Μερικά από τα σημαντικότερα οργάνδια εκτός του πυρήνα είναι, τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες (στα φυτικά κύτταρα) όπου καλύπτουν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου, το ενδοπλασματικό δίκτυο στο οποίο γίνεται η παραγωγή χρήσιμων ενώσεων και το σύμπλεγμα Golgi στο οποίο λαμβάνει χώρα η τροποποίηση διάφορων χημικών ενώσεων μεταξύ αυτών και οι πρωτεΐνες [45]. Παρά τις θεμελιώδεις ομοιότητες που παρουσιάζουν τα διαφορετικά είδη ευκαρυωτικών κυττάρων, υπάρχουν σημαντικές διαφορές που τους προσδίδει διαφοροποίηση με σκοπό την επιβίωση και την ανάπτυξη τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Εικόνα 1.13).



Εικόνα 1.13. Σύγκριση δομής μεταξύ ζωικού, φυτικού και κυττάρου μύκητα [52].

Ειδικότερα, στα φυτικά κύτταρα παρατηρείται το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο αποτελεί το εξωτερικό σύνορο του κυττάρου. Το περίβλημα αυτό, παρέχει στο κύτταρο σταθερό σχήμα και προστασία από την οσμωτική πίεση [53] και άλλους εξωτερικούς παράγοντες. Επιπλέον, τα φυτικά κύτταρα περιλαμβάνουν και τους χλωροπλάστες. Τα οργανίδια αυτά που απαντώνται μόνο στα φυτικά κύτταρα και σε φύκη έχουν την ιδιότητα να μετατρέπουν την ενέργεια του ηλιακού φωτός για την σύνθεση σακχάρων, προσδίδοντας την ιδιότητα του αυτότροφου οργανισμού [45]. Τέλος, το κενοτόπιο αποτελεί άλλο ένα οργανίδιο που απαντάται μόνο στα φυτικά κύτταρα. Ουσιαστικά, λειτουργούν ως αποθήκες χρήσιμων θρεπτικών ουσιών [45] για την ικανοποίηση μελλοντικών αναγκών του κυττάρου.

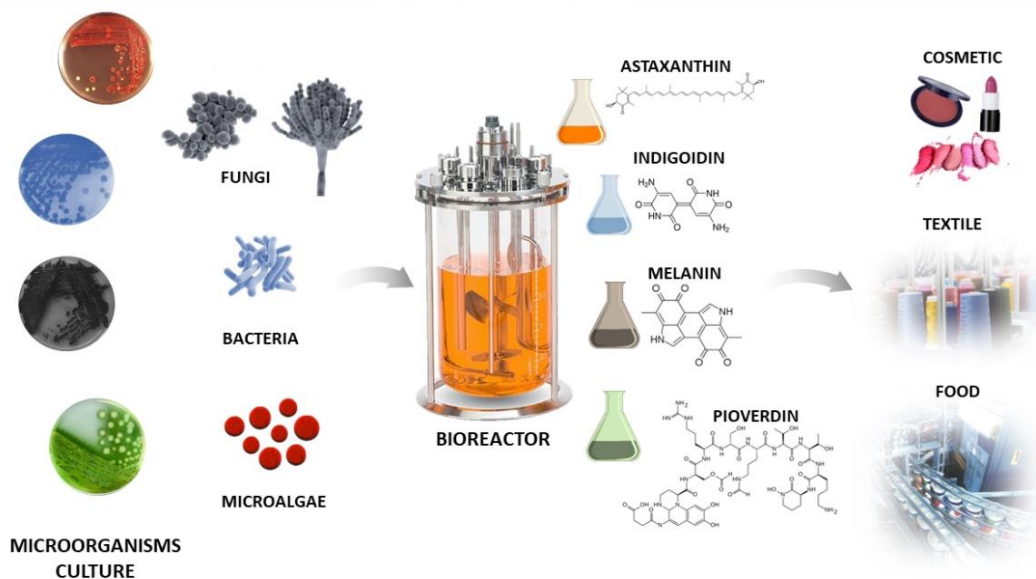
Από την άλλη πλευρά, ένα οργανίδιο που απαντάται μόνο στα ζωικά κύτταρα είναι το λυσόσωμα. Η λειτουργία του λυσοσώματος, είναι κομβική για το κύτταρο, καθώς συντελεί διεργασίες πέψης των θρεπτικών συστατικών που εισάγονται στο κυτταρόπλασμα, αλλά και αποδόμησης ανεπιθύμητων ουσιών οδηγώντας στην απέκκρισή τους [45].

Οι μύκητες στην ευρύτερη έννοια τους είναι ευκαριωτικοί οργανισμοί και παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τα φυτικά κύτταρα. Ωστόσο, η έλλειψη χλωροφύλλης αλλά και ο διαφορετικός τρόπος πρόσληψης θρεπτικών συστατικών, έχει ως αποτέλεσμα την απόκλισή τους από τα φυτά [54].

1.2.3 Βιομηχανική χρήση μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί, ιδιαίτερα αυτοί που έχουν χαρακτηριστεί ως ασφαλείς (Generally Recognized As Safe - GRAS), έχουν αποτελέσει αντικείμενο χρήσης και μελέτης για βιομηχανικές εφαρμογές. Οι βάσεις δεδομένων και η γνώση των ιδιοτήτων τους έχουν επιτρέψει την κλιμάκωση των μικροβιακών διεργασιών. Ειδικότερα, η Βιομηχανική Μικροβιολογία, όπως ονομάζεται ο κλάδος της εφαρμοσμένης μικροβιολογίας, σχετίζεται με την χρήση μικροβίων για την παραγωγή σημαντικών ουσιών. Οι βυθισμένες καλλιέργειες και οι ζυμώσεις στερεάς κατάστασης σε μεγάλους βιοαντιδραστήρες, ακολουθούνται από κατόπιν διεργασίες καθαρισμού και ανάκτηση του τελικού βιοτεχνολογικού προϊόντος. Τα βιοτεχνολογικά προϊόντα μπορεί να είναι αντιβιοτικά και εμβόλια, προϊόντα διατροφής, ένζυμα, αμινοξέα, και άλλες χημικές ουσίες όπως φυσικές χρωστικές και ουσίες με φαρμακευτική δράση [55].

Μερικές φυσικές χρωστικές ουσίες που παράγονται με μικροβιακή ζύμωση είναι η Astaxanthin όπου αποτελεί χρωστική που χρησιμοποιείται σε τρόφιμα με αντιοξειδωτικές ιδιότητες [56], η Indigoidin η οποία είναι μπλε χρωστική με χρήση σε υφάσματα [57], η Melanin που βρίσκει εφαρμογή σε καλλυντικά είδη [58] και η Ploverdin, η οποία είναι μια φωσφορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων για έλεγχο μόλυνσης από βακτήρια (Εικόνα 1.14) [59].



Εικόνα 1.14. Σχηματική αναπαράσταση παραγωγής ουσιών βαφής από μικροοργανισμούς [60].

Επιπλέον, μπορούν να παραχθούν και χρήσιμα προϊόντα που συμβάλλουν στην εδραίωση της κυκλικής οικονομίας και της πράσινης ενέργειας, όπως το βιοαέριο [61]. Το βιοαέριο, παράγεται μέσω αναερόβιας χώνευσης οργανική ύλης, όπως τρόφιμα ή ζωικά απόβλητα. Με άλλα λόγια, οργανικά απόβλητα διοχετεύονται ως πρώτη ύλη στην μικροβιακή ζύμωση απουσίας οξυγόνου και λαμβάνει χώρα ο μεταβολισμός τους. Έτσι, επιτυγχάνεται ταυτόχρονα, επεξεργασία των αποβλήτων και ανεπιθύμητων συστατικών και παραγωγή αγαθών προστιθέμενης αξίας [62].

Οι περισσότερες βιομηχανικές εφαρμογές βασίζονται σε μύκητες και ορισμένα βακτήρια. Εκτός, από την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων, βιομηχανική χρήση των μικροβίων γίνεται και για την παροχή των υπηρεσιών για την αντιμετώπιση της μόλυνσης του περιβάλλοντος. Παραδείγματα τέτοιων διεργασιών είναι η υποβάθμιση και αποτοξίνωση οργανικών και βιομηχανικών ρύπων, ενώ επιπλέον έχουν γίνει και αναφορές χρήσης μικροβίων για τη διαχείριση πετρελαιοκηλίδων [63].

Ο μικροοργανισμός, οφείλει να πληροί συγκεκριμένες προϋποθέσεις προκειμένου να μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την βιομηχανία. Συγκεκριμένα, το μικρόβιο είναι αναγκαίο να [49]:

- 1) έχει δυνατότητα να αναπτύσσεται σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας,
- 2) μπορεί να εμβολιαστεί με σχετική ευκολία για την ανάπτυξη του οργανισμού σε μεγάλη κλίμακα,
- 3) έχει μικρό χρόνο διπλασιασμού και να παράγει το επιθυμητό αποτέλεσμα ή προϊόν σε σχετικό μικρό χρονικό διάστημα,
- 4) μπορεί να αναπτύσσεται σε υγρά μέσα καλλιέργειας όπου υπάρχει μεγάλη διαθεσιμότητα και παρέχεται σε οικονομική τιμή ώστε να καθιστά την βιομηχανία βιώσιμη (χρήση παραπροϊόντων άλλων βιομηχανιών),
- 5) είναι ασφαλής ως προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο, δηλαδή να μην είναι παθογόνος και
- 6) είναι επιδεκτικός σε γενετικές μεταλλάξεις με σκοπό την βελτίωση του στελέχους και επίτευξη μεγαλύτερων αποδόσεων.

1.2.4 Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε συστήματα πλαστικών

Από το σύνολο των μικροοργανισμών, τα βακτήρια και οι μύκητες είναι οι συνηθέστεροι τύποι μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση πλαστικών. Ειδικότερα οι μύκητες, εμφανίζουν μεγαλύτερες αποδόσεις στις διεργασίες αποπολυμερισμού (Πίνακας 1.2). Η μακροχρόνια έκθεση των μυκήτων στα συνθετικά πολυμερή που απελευθερώνονται από τους ανθρώπους ως απόβλητα, είχε ως αποτέλεσμα την μεταβολική εξέλιξη των μυκήτων. Η ανάγκη των μικροοργανισμών να προσαρμοστούν σε τέτοιου είδους περιβάλλοντα, συνεπάγεται την ταχύτερη εξέλιξή τους για την αντιστοίχιση των κατάλληλων καταβολικών οδών προκειμένου να μπορούν να αφομοιώνουν τα πολυμερή ως θρεπτικά μέσα ανάπτυξης [64]. Πρόσφατες μελέτες, έδειξαν ότι ο μύκητας *Fusarium oxysporum* εξέφραζε υδρολυτικά ένζυμα που συνέβαλλαν στην διάσπαση του PET [65].

Αρχικά, οι μύκητες εκκρίνουν κυρίως υδρολυτικά αλλά και οξειδωτικά ένζυμα τα οποία διασπούν το μακρομόριο σε μικρότερα οργανικά μέρη, τα οποία μπορούν να εισχωρήσουν στο εσωτερικό του κυττάρου. Στην συνέχεια, τα κύτταρα δημιουργούν αποικίες στις φθορές του υποβαθμισμένου πλέον υλικό ενισχύοντας την αποσύνθεση του πολυμερούς [64].

Πίνακας 1.2. Μύκητες και τα αντίστοιχα πλαστικά που αποικοδομούν [64].

Μικροοργανισμός	Είδος πλαστικού
<i>Aspergillus terreus</i>	PS
<i>Aspergillus fumigatus</i>	PHA-MPs
<i>Fusarium redolens</i>	PE
<i>Aspergillus flavus G10, Aspergillus tubingensis</i>	PU
<i>Aspergillus sp., Paecilomyces lilacinus, L. theobromae</i>	LDPE & PP

Παρά την εξέλιξη και την συνεχή μελέτη σε αυτόν τον τομέα, οι εφαρμογές έχουν παραμείνει σε εργαστηριακό επίπεδο. Η κλιμάκωση για την εγκατάσταση μιας βιομηχανίας που επιτελεί την βιοαποικοδόμηση των πλαστικών απορριμμάτων αντιμετωπίζει πολλές δυσκολίες όπως το γεγονός ότι τα πλαστικά που παρασκευάζονται χρησιμοποιούν και πρόσθετες ουσίες καθιστώντας τα, διαφορετικά υποστρώματα από τα πλαστικά που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο. Επιπλέον, συνήθως σε ένα περιβάλλον από συνθετικά πολυμερή, αναπτύσσεται ένα σύνολο μικροοργανισμών και η διάσπαση των πολύπλοκων μακρομορίων απαιτεί την συνεργιστική δράση πολλών ενζύμων [64].

1.2.5 Γενετική τροποποίηση μικροοργανισμών

1.2.5.1 Γενετική μηχανική και ετερόλογη έκφραση

Η γενετική μηχανική, είναι το σύνολο των διεργασιών που έχει ως βασικό αποτέλεσμα την μεταβολή του γενετικού υλικού ενός κυττάρου, με σκοπό να το κάνουν να επιτελέσει καινοτόμες λειτουργίες, να αποκτήσει διαφορετικά χαρακτηριστικά και να εκφράσει καινοτόμες ουσίες ή κοινές ουσίες σε μεγαλύτερη απόδοση [49], [66]. Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA, προσφέρει την δυνατότητα συνδυασμού γονιδιωμάτων από συγγενικούς η και ξένους μικροοργανισμούς και την εισαγωγή του καινούριου γονοτύπου σε ένα κύτταρο ξενιστή [67]. Ο ξενιστής, δηλαδή ο μικροοργανισμός στο οποίο εισάγεται το ανασυνδυασμένο DNA, οφείλει να μην είναι παθογόνος και να υπάρχει πλήρης γνώση σχετικά με τις ανάγκες για την ανάπτυξή του. Με την χρήση της συγκεκριμένης τεχνολογίας μπορεί να επιτευχθεί παραγωγή πρωτεϊνών από μικροοργανισμούς οι οποίοι:

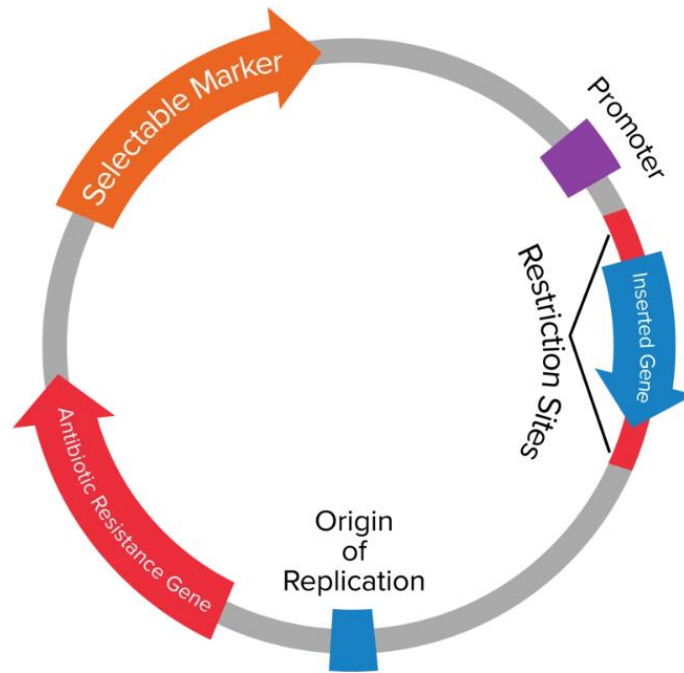
- είναι παθογόνοι και γενικότερα η χρησιμοποίησή τους είναι επικίνδυνη για τον άνθρωπο και το περιβάλλον,
- έχουν μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις και ασύμφορα θρεπτικά μέσα για την καλλιέργειά τους σε μεγάλη κλίμακα
- έχουν μελετηθεί σε μικρό βαθμό σε σχέση με τους μικροοργανισμούς ξενιστές και επομένως η δημιουργία μεγάλων καλλιεργειών χρίζει βελτιστοποίησης πολλών παραμέτρων.

Συνοπτικά, τα κύρια βασικά οφέλη αυτής της τεχνολογίας είναι η έκφραση πρωτεϊνών και μεταβολικών προϊόντων άλλων μικροοργανισμών σε γνωστά μικροβιακά στελέχη και η συνεχής βελτίωση μικροβιακών στελεχών μέσω τεχνητών αλλαγών στο γονιδίωμα του κυττάρου του ξενιστή, που συνεπάγεται μεγαλύτερη και αποδοτικότερη παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα χρήσης της συγκεκριμένης τεχνολογίας, είναι η παραγωγή ανθρώπινης ινσουλίνης από βακτήρια [53].

Τα βασικά στάδια του ανασυνδυασμού του DNA, αρχικά περιλαμβάνουν την λήψη του γονιδίου που αντιστοιχεί στην επιθυμητή πρωτεΐνη από το κύτταρο δότη. Υπό συγκεκριμένες περιπτώσεις, ευνοείται η εξ' ολοκλήρου χημική σύνθεση του πλασμιδίου στο εργαστήριο. Στην συνέχεια το συγκεκριμένο αυτό γονίδιο ενσωματώνεται σε έναν φορέα, συνήθως ένα πλασμίδιο (Εικόνα 1.15) [49].

Τα πλασμίδια είναι μικρά δίκλινα κυκλικά μόρια DNA, τα οποία είναι αυτόνομα και αυτό-αντιγραφόμενα, ενώ επιπλέον είναι εξωχρωματοσωμικά [49]. Αποτελούν τους πλέον χρησιμοποιούμενους φορείς γονιδίου λόγω της ευκολίας και της ευελιξίας στην διαχείρισή τους. Η ενσωμάτωση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα γίνεται με την λειτουργία των περιοριστικών ενδονουκλεασών και των DNA λιγκασών. Τα πρώτα, ουσιαστικά υδρολύουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του πλασμιδίου ανοίγοντας τα κυκλικό μόρια, ενώ τα τελευταία τοποθετούν το ξένο γονίδιο στο σημείο κοπής του πλασμιδίου. Οι βασικότερες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται σε όλα τα είδη πλασμιδίων είναι [68]:

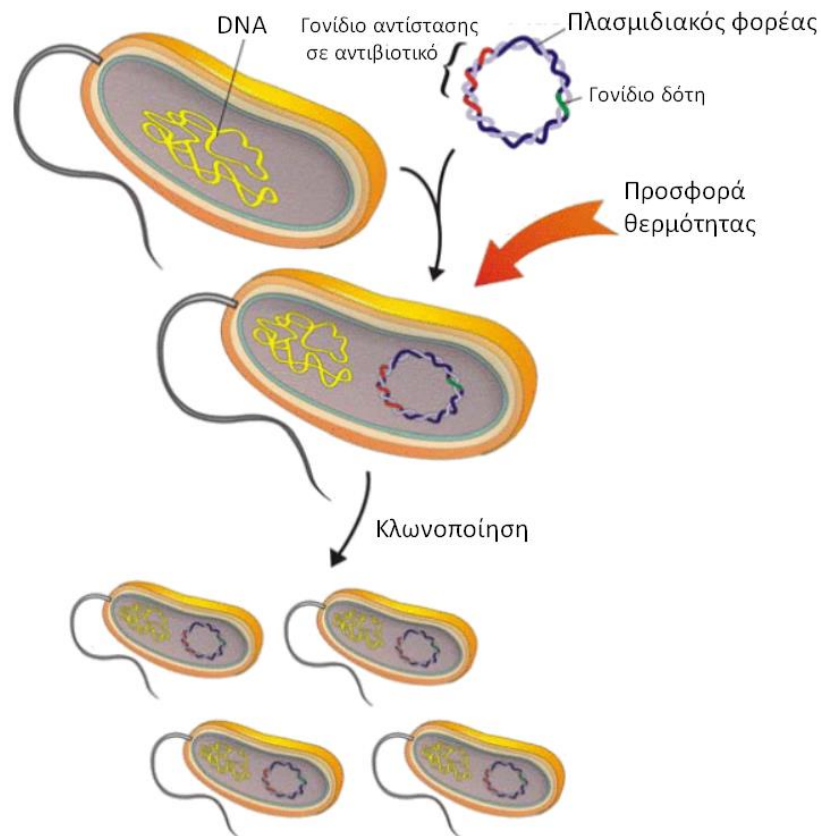
- περιοχή έναρξης αντιγραφής, (Origin of Replication),
- γονίδιο αντίστασης σε αντιβιοτικό (Antibiotic Resistance Gene),
- αλληλουχία αναγνώρισης από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Restriction Sites) στην περιοχή αυτή εισάγεται το ξένο γονίδιο,
- αλληλουχία υποκινητή (Promoter) για την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου,
- περιοχή αναγνώρισης (Selectable Marker), γονίδιο το οποίο επιτρέπει την επιλογή του κυττάρου μέσω εκδήλωσης κάποιου χαρακτηριστικού με αλλαγή στο περιβάλλον του κυττάρου.



Εικόνα 1.15. Απεικόνιση των βασικών περιοχών ενός πλασμιδίου [68].

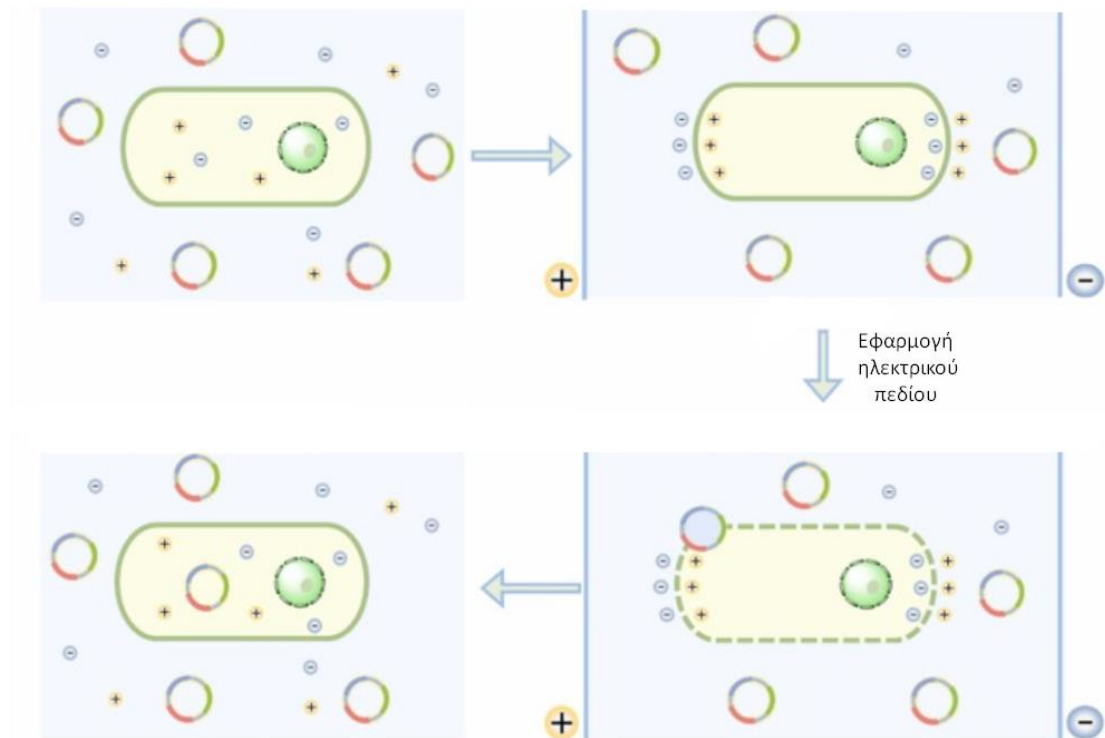
Η ύπαρξη γονιδίων αντίστασης σε αντιβιοτικό και ενός δείκτη επιλογής, είναι κρίσιμα για την επιλογή των ανασυνδυασμένων κυττάρων, δηλαδή των κυττάρων που έχουν το πλασμίδιο, από τα φυσικά κύτταρα.

Έπειτα, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισάγεται μέσω μετασχηματισμού στο κύτταρο ξενιστή. Ο συνηθέστερος τρόπος εισαγωγής του πλασμιδίου είναι μέσω μετασχηματισμού. Ο μετασχηματισμός σε βακτήρια γίνεται με την θερμική καταπόνηση των κυττάρων (Εικόνα 1.16). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα υποβάλλονται σε ξαφνική αύξηση της θερμοκρασίας (στους 42°C). Η απότομη μεταβολή της θερμοκρασίας δημιουργεί πόρους στην κυτταρική μεμβράνη που επιτρέπουν την διέλευση εξωκυτταρικών μορίων, όπως το πλασμίδιο, στο εσωτερικό του κυττάρου [69]. Λόγω της απλότητας της δομής των βακτηριακών κυττάρων και της απουσίας πυρήνα, η παρουσία του πλασμιδίου στον εσωκυττάριο χώρο αρκεί για την έκφραση του επιθυμητού γονιδίου.



Εικόνα 1.16. Σχηματική αναπαράσταση του μετασχηματισμού σε βακτηριακά κύτταρα [70].

Ωστόσο, στην περίπτωση όπου ο μετασχηματισμός γίνεται σε ευκαριωτικό κύτταρο (συνήθως σε μύκητα), ακολουθείται διαφορετική διαδικασία. Η παρουσία κυτταρικού τοιχώματος που περικλείει την κυτταρική μεμβράνη, καθιστά το κύτταρο περισσότερο ανθεκτικό στον σχηματισμό πόρων που προκαλούνται από θερμική κατεργασία. Για τον λόγο αυτό, ο μετασχηματισμός υλοποιείται μέσω της ηλεκτροδιάτρησης (Εικόνα 1.17). Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην θεωρία του Weaver and Chizmadzhev, 1996. Σύμφωνα με αυτήν, η εφαρμογή ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου δημιουργεί διαφορά δυναμικού κατά μήκος της διπλής στιβάδας και μειώνει την ενέργεια που απαιτείται για τον αυθόρμητο σχηματισμό πόρων. Έτσι, η παρουσία των ευκαριωτικών κυττάρων και των πλασμιδιακών φορέων σε κοινό χώρο όπου υπάρχει ηλεκτρικό πεδίο, έχει ως συνέπεια την διάνοιξη πόρων στην κυτταρική μεμβράνη και ταυτόχρονα την κίνηση των πλασμιδίων από την κάθοδο στην άνοδο (δεδομένου ότι τα μόρια DNA είναι αρνητικά φορτισμένα). Η διαπερατότητα της μεμβράνης για σύντομο χρονικό διάστημα και η κίνηση των πλασμιδίων, επιτρέπει εν τέλει την εισαγωγή του ξένου γονιδίου στον ξενιστή [71].



Εικόνα 1.17. Απεικόνιση της ηλεκτροδιάτρησης [72].

Το επόμενο στάδιο, αποτελεί την κλωνοποίηση του ξενιστή (άρα και του γονιδίου) σε καλλιέργειες και την έκφρασή του με τελικό σκοπό την παραγωγή του ζητούμενου βιοτεχνολογικού προϊόντος.

1.2.5.2 Μεταβολική μηχανική

Η επεξεργασία του γενετικού υλικού για την επίτευξη μεγαλύτερης απόδοσης κατά την παραγωγή κάποιου προϊόντος ονομάζεται μεταβολική μηχανική και ουσιαστικά αποτελεί παρακλάδι της γενετικής μηχανικής. Ο κλάδος αυτός σχετίζεται με την βελτιστοποίηση γενετικών και ρυθμιστικών διεργασιών και περιλαμβάνει τον στοχευμένο χειρισμό των μεταβολικών οδών ενός οργανισμού. Οι κυτταρικές δραστηριότητες και άρα τα μεταβολικά μονοπάτια τίθενται υπό επεξεργασία χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένο DNA και άλλες γενετικές τεχνικές. Η δυνατότητα ανακατεύθυνσης μεταβολικών οδών στοχεύει την αυξημένη παραγωγή μεταβολιτών η ακόμη και στον σχηματισμό καινοτόμων μεταβολιτών [73].

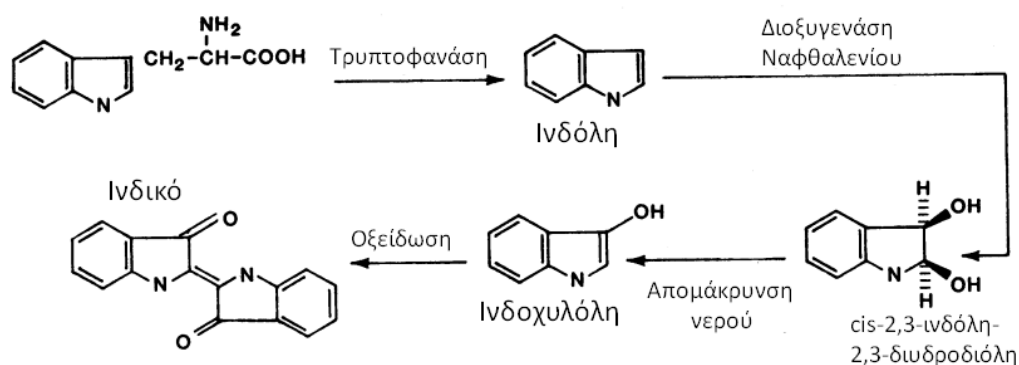
Επιπλέον, η χρήση εργαλείων γενετικής μηχανικής παρέχει τις εξής δυνατότητες:

- επιτρέπει σε έναν μικροοργανισμό να ακολουθήσει ολοκληρωτικά ένα μονοπάτι,
- να ενισχύσει ένα ήδη υπάρχον μεταβολικό μονοπάτι ή
- να απενεργοποιήσει εξ' ολοκλήρου ένα ανεπιθύμητο μεταβολικό μονοπάτι.

Η μεθοδολογία αυτή επιδιώκει την παραγωγή ειδικών χημικών ουσιών, την χρήση διαφορετικών θρεπτικών μέσω και την αποικοδόμηση αποβλήτων [49].

Πρακτικά ένα μεταβολικό μονοπάτι είναι μια σειρά από βιοχημικές αντιδράσεις στις οποίες επιτυγχάνεται ο μετασχηματισμός των υποστρωμάτων (συνήθως συστατικά του θρεπτικού μέσου) σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες. Μερικά από τα στάδια των αντιδράσεων που επιτελούνται είναι καθοριστικά, δηλαδή καθορίζουν τον ρυθμό του μονοπατιού. Η εισαγωγή ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση ενζύμων που οδηγεί σε αυξανόμενη μετατροπή του υποστρώματος μιας αντίδρασης. Η κατανάλωση του υποστρώματος, διαταράσσει την ισορροπία και αλλάζει τις ροές των πρόδρομων ενώσεων προς άλλους μεταβολικούς δρόμους [74].

Χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταβολικής μηχανικής είναι ο σχηματισμός ενός νέου μεταβολικού μονοπατιού στο βακτηριακό κύτταρο *E.coli* για την βιοσύνθεση του ινδικού από την τρυπτοφάνη (Εικόνα 1.18). Συγκεκριμένα, η τρυπτοφάνη μετατρέπεται σε ινδόλη μέσω της τρυπτοφανάσης, ενός ενζύμου του *E.coli*. Στην συνέχεια, μέσω της καταλυτικής δράσης της ξένης πρωτεΐνης διοξυγενάση του ναφθαλενίου, η ινδόλη μετατρέπεται εν τέλει σε ινδικό. Το γονίδιο για την έκφραση της διοξυγενάσης του ναφθαλενίου έχει ληφθεί από τον *Pseudomonas putida* PpG7 και έχει μετασχηματιστεί στον ξενιστή. Έτσι, με την έκφραση ενός ξένου ενζύμου, δημιουργήθηκε ένα νέο μεταβολικό μονοπάτι [74].



Εικόνα 1.18. Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεση ινδικού από ανασυνδυασμένα κύτταρα *E.coli* [74].

Η ταχεία και εκθετική ετήσια ανάπτυξη της παραγωγής πλαστικών σε συνδυασμό με τον μεγάλο κύκλο ζωής αλλά και των περιορισμένων συμβατικών τρόπων διαχείρισης, συνεπάγεται την συσσώρευση μεγάλου όγκου απορριμμάτων. Επιπλέον, η χρησιμοποίηση αυθεντικών χημικών αντί ανανεώσιμων ή φυσικών πρώτων υλών προτιμάται ακόμα από τις περισσότερες βιομηχανίες, διότι είναι περισσότερο κερδοφόρα στρατηγική. Η χρήση της δεδομένης τεχνολογίας μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στην ανάπτυξη μεταβολικών μονοπατιών για την βιοαποικοδόμηση των πλαστικών.

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια, οι μικροοργανισμοί έχουν την δυνατότητα να αποικοδομούν τα πλαστικά μέσω ενζύμων και στην συνέχεια να αφομοιώνουν τα μικρότερα μόρια μέσω μεταβολικών μονοπατιών που εξέλιξαν με την μακρά παρουσία τους σε περιβάλλοντα βασισμένα στο πλαστικό. Συνεπώς, δημιουργείται η ανάγκη για τον σχεδιασμό μικροοργανισμών και μεταβολικών

μονοπατιών μέσω γενετικής και μεταβολικής μηχανικής, που να μπορούν να μετατρέπουν τα oligομερή και τα μονομερή προϊόντα, που προκύπτουν από την βιοαποικοδόμηση των πλαστικών, σε νέα προϊόντα προστιθέμενης αξίας.

Μάλιστα πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η στρατηγική αυτή είναι πρακτικά εφικτή. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η αξιοποίηση των μονομερών του PET, δηλαδή του τереφθαλικού οξέος και της αιθυλενογλυκόλης ως πρώτες ύλες για την παραγωγή νέων προϊόντων. Αρχικά το PET που αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πλαστικά παγκοσμίως αποσυντίθεται και τα μονομερή απομονώνονται. Στην συνέχεια, γενετικά τροποποιημένο *Escherichia coli* χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη σε μέσο που περιείχε τα μονομερή του πλαστικού. Μέσω της μεταβολικής μηχανικής και της ετερόλογης έκφρασης, αναπτύχθηκαν μεταβολικά μονοπάτια όπου μετατρέπουν το τереφθαλικό οξύ σε αρωματικές ενώσεις όπως γαλλικό οξύ, πυρογαλλόλη, κατεχόλη και βανιλικό οξύ όπου βρίσκουν εφαρμογές στην παρασκευή φαρμακευτικών προϊόντων, στα καλλυντικά και ως μονομερή για την σύνθεση άλλων πολυμερών [75]. Έτσι, η παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας έχει την δυνατότητα να ενισχύσει την βιωσιμότητα διεργασιών ανακύκλωσης και βιοαποικοδόμησης.

1.2.6 Πρότυποι μικροοργανισμοί

Η επιλογή του κύτταρου ξενιστή για την έκφραση πρωτεϊνών και την παραγωγή χημικών ουσιών είναι περίπλοκη διαδικασία που απαιτεί ενδελεχή σχεδιασμό, λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις παραμέτρους που αφορούν τόσο τα τεχνικά χαρακτηριστικά της ανάντη και της κατάντη διεργασίας, όσο και την φύση του τελικού προϊόντος. Για παράδειγμα, η χρήση βακτηρίου απαιτεί προκατεργασία για την λύση των κυττάρων, με χημικό ή φυσικό τρόπο, για την εξαγωγή της πρωτεΐνης γεγονός που αυξάνει το λειτουργικό κόστος [49].

Από την άλλη πλευρά, εάν είναι απαραίτητες οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του προϊόντος, ή το γονίδιο αποτελείται και από ιντρόνια τότε ως ξενιστής είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί ένας ευκαρυωτικός οργανισμός. Επιπλέον, η χρήση του είδους του κυττάρου ξενιστή εξαρτάται και από τον κλάδο τον οποίο αφορά. Για παράδειγμα εάν το προϊόν βρίσκει εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων, η επιλογή οφείλει να τηρεί τα κριτήρια GRAS (Generally Regarded As Safe) της FDA (Food and Drug Administration) [49].

1.2.6.1 *Escherichia coli*

Το *E. coli* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο, και αποτελεί έναν από τους δημοφιλέστερους μικροοργανισμούς λόγω των γνώσεων που υπάρχουν για βιοχημικά χαρακτηριστικά του και την φυσιολογία του. Επιπρόσθετα, είναι επιδεκτικό και εύχρηστο σε γενετικές τροποποιήσεις. Το *E. coli* έχει μικρό χρόνο διπλασιασμού (περίπου μισή ώρα), είναι ασφαλές και απαιτεί διαθέσιμο και οικονομικό θρεπτικό μέσο ενώ οι συνθήκες ανάπτυξης δεν απαιτούν μεγάλους ενεργειακούς πόρους. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 37°C.

Ο συγκεκριμένος ξενιστής έχει χρησιμοποιηθεί από την βιομηχανία για την παραγωγή πολλών χημικών ουσιών και ετερόλογων πρωτεϊνών (Πίνακας 1.3). Ειδικότερα, στην ευρωπαϊκή και αμερικανική αγορά το 34% των ετερόλογων πρωτεϊνών εκφράζεται μέσω του *E. coli*. Αξίζει να σημειωθεί επιπλέον, ότι έχουν αλληλουχηθεί τα γονιδιώματα 484 στελεχών του συγκεκριμένου βακτηρίου, υπογραμμίζοντας την σημασία του για την σύγχρονη βιομηχανία. Μερικά από τα προϊόντα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα [76].

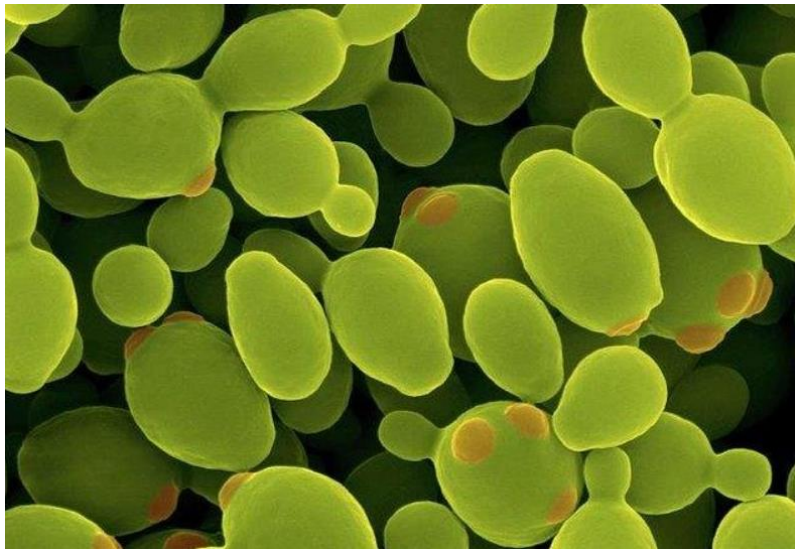
Πίνακας 1.3. Προϊόντα που παράγονται με ξενιστή το *E. coli* [76].

Προϊόν	Εφαρμογή	Στέλεχος
peonidin 3-O-glucoside	Αντιοξειδωτικές ιδιότητες, χρωστική σε τρόφιμα	BL21 Star (DE3)
valerenadiene	Φαρμακευτικές χρήσεις	BL21(DE3)
Vanillin	Βελτιωτικά οσμής και γεύσης	MG1655(DE3)
Violacein	Αντιβιοτικό, αντιμυκητιακό, αντικαρκινικό	BL21star
Succinic acid	Χημική πρώτη ύλη	C derivative
Styrene	Παραγωγή πλαστικών	ATCC 31884

Τέλος, λόγω της ευελιξίας που παρουσιάζει σαν μικροοργανισμός, έχει την δυνατότητα να αναπτυχθεί και με εναλλακτικές πηγές άνθρακα εκτός της γλυκόζης και της σακχαρόζης. Τέτοιες πηγές αποτελούν η ξυλόζη, η γλυκερόλη και πρωτεϊνούχα απόβλητα [76]. Συνοψίζοντας, το συγκεκριμένο βακτήριο παρουσιάζει υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης, ωστόσο όντας προκαρυωτικός οργανισμός δεν γλυκοζυλιώνει τις πρωτεΐνες ενώ παρουσιάζει ενδοκυτταρική έκφραση.

1.2.6.2 *Pichia pastoris*

Η *P. pastoris* (Εικόνα 1.19) είναι ένας μεθυλοτροφικός ζυμομύκητας και επομένως ευκαρυωτικός οργανισμός. Ο συγκεκριμένος ξενιστής έχει μεγάλη δημοτικότητα και ευρεία χρήση, λόγω του χαμηλού κόστους του συστήματος έκφρασης. Επιπλέον, είναι δυνατή η παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων πρωτεϊνών και η γλυκοζυλίωση παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με εκείνη των θηλαστικών κυττάρων. Η σύνθεση της πρωτεΐνης ακολουθείται από την κατάλληλη αναδίπλωση στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την εξωκυτταρική απέκκριση. Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται βέλτιστα σε χαμηλή θερμοκρασία (27°C), επομένως δεν παρουσιάζει μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις, ενώ ο χρόνος διπλασιασμού του είναι 2-3 ώρες. Τα θρεπτικά μέσα που απαιτούνται για την ανάπτυξή του, βρίσκονται σε αφθονία, ενώ έχει την δυνατότητα να αξιοποιήσει ως μόνη πηγή άνθρακα την μεθανόλη [77].



Εικόνα 1.19. Απεικόνιση από ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης από το μύκητα *P. pastoris* [78].

Για τον μεταβολισμό της μεθανόλης, ο μύκητας εκφράζει ένζυμα και ειδικότερα την οξειδάση της αλκοόλης (ΑΟΧ). Όταν τα κύτταρα αντιλαμβάνονται την παρουσία μεθανόλης, εκφράζονται δύο γονίδια τα ΑΟΧ1 και ΑΟΧ2 τα οποία εκφράζουν την απαραίτητη οξειδάση σε μεγάλες ποσότητες. Η συνεισφορά του γονιδίου ΑΟΧ1 για την έκφραση του ενζύμου είναι σημαντικά μεγαλύτερη. Στην περίπτωση όπου με γενετική τροποποίηση εξαλειφθεί το συγκεκριμένο γονίδιο, η παραγωγή της οξειδάσης μειώνεται δραστικά όπως και ο μεταβολισμός της πηγής άνθρακα και κατ' επέκταση και η ανάπτυξη του κυττάρου. Το κύτταρο αυτό λέγεται ότι παρουσιάζει φαινότυπο Mut^s λόγω της αργής του ανάπτυξης σε μεθανόλη. Στην περίπτωση που υπάρχουν και τα δύο γονίδια, τότε παρατηρείται ταχεία ανάπτυξη και ο φαινότυπος του χαρακτηρίζεται Mut^+ . Αντίστοιχα, η απομάκρυνση και των δύο γονιδίων έχει ως συνέπεια την αδυναμία ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε μεθανόλη. Συνεπάγεται, ότι ανάλογα με τις ανάγκες του συστήματος, ο ξενιστής μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί προκειμένου να ρυθμίζονται οι ρυθμοί ανάπτυξής του, γεγονός που αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα [79].

Επιπρόσθετα, ο συγκεκριμένος ξενιστής έχει σχετικά γρήγορους ρυθμούς έκφρασης έτσι, τα πρωτεϊνικά προϊόντα μπορούν να παραχθούν σε μεγάλη κλίμακα από μικρούς όγκους καλλιέργειας (Πίνακας 1.4). Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας είναι ότι η ετερόλογη έκφραση απαιτεί μεγάλες ποσότητες πλασμιδίων, η καλλιέργεια τους σε μεγάλη κλίμακα παρουσιάζει μεγάλες απαιτήσεις σε οξυγόνο και γενικότερα ο έλεγχος του συνολικού συστήματος παρουσιάζει πολλούς παραμέτρους. Παρακάτω παρουσιάζονται μερικά από τα πολλά βιοτεχνολογικά προϊόντα που παράγονται μέσω του συγκεκριμένου ξενιστή [49], [79].

Πίνακας 1.4. Προϊόντα που παράγονται με ξενιστή τον *P. pastoris* [79].

Προϊόν	Εφαρμογή	Στέλεχος
Lycopene and β -carotene	Συμπλήρωμα ζωοτροφών	X-33
Apidaecin	Αντιβακτηριακή χρήση	SMD1168
Class I chitinase	Αντιμυκητιακή χρήση	KM71H
Human serum albumin	Στοιχείο του πλάσματος στο αίμα	GS115

1.3 Ένζυμα

1.3.1 Ορισμός και γενικά στοιχεία

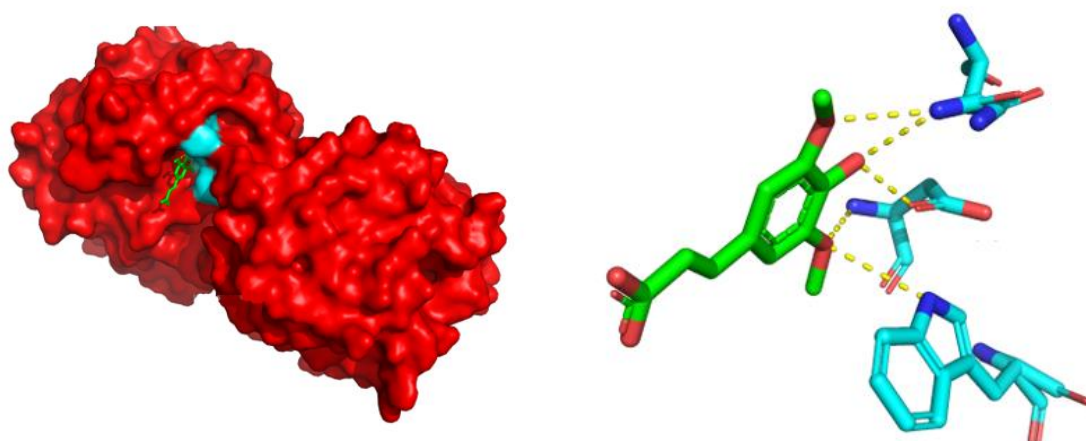
Τα ένζυμα αποτελούν πρωτεϊνικά μόρια, έχουν μεγάλο μοριακό βάρος (συνήθως μεγαλύτερο των 15kDa) και δρουν ως βιολογικοί καταλύτες. Η βασική τους λειτουργία είναι η κατάλυση βιοχημικών αντιδράσεων. Έτσι, επιτυγχάνεται το σημείο ισορροπίας μιας βιοχημικής αντίδρασης σε μικρότερο χρονικό διάστημα από ότι θα γινόταν απουσία ενζύμου (Πίνακας 1.5). Το κυριότερο χαρακτηριστικό της δράσης του είναι ότι, δεν επηρεάζει την φύση της αντίδρασης, δηλαδή το σημείο χημικής ισορροπίας, ούτε αλλοιώνεται ή καταναλώνεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Οποιαδήποτε αλλαγή λαμβάνει χώρα στο μόριο του ενζύμου είναι παροδική και το ένζυμο επανέρχεται στην αρχική του μορφή με το πέρας της αντίδρασης. Επί της ουσίας σε μοριακό επίπεδο το ένζυμο μειώνει την ενέργεια ενεργοποίησης των μορίων του υποστρώματος παρέχοντας την δυνατότητα σε περισσότερα μόρια να ξεπεράσουν το ενεργειακό φράγμα και να επιτελέσουν χημική μετατροπή [80].

Πίνακας 1.5. Επίδραση του ενζύμου στον ρυθμό της αντίδρασης [81].

Ένζυμο	Ρυθμός αντίδρασης απουσίας ενζύμου $k_{\text{noncatalyzed}} (s^{-1})$	Ρυθμός αντίδρασης παρουσία ενζύμου, $k_{\text{catalyzed}} (s^{-1})$
Ανθρακική ανυδράση	$1,3 \times 10^{-1}$	1×10^6
Σταφυλοκκοκική νουκλεάση	$1,7 \times 10^{-13}$	95
Ισομεράση των φωσφορικών τριοζών	$4,3 \times 10^{-6}$	4.300
Νουκλεοζιδάση της AMP	$1,0 \times 10^{-11}$	60

Η δράση του ενζύμου οφείλεται αποκλειστικά στην δομή του. Η τρισδιάστατη αναδίπλωση μετά την πρωτεϊνοσύνθεση, μέσω των αλληλεπιδράσεων που πραγματοποιούνται μεταξύ των αμινοξέων περιέχει έναν ειδικά διαμορφωμένο χώρο, το ενεργό κέντρο. Το ενεργό κέντρο, αποτελείται από μια ομάδα αμινοξέων που αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και δεν είναι απαραίτητα διαδοχικά στην αμινοξική αλληλουχία. Το υπόστρωμα, δηλαδή η χημική ένωση η οποία υπόκειται σε μετατροπή μέσω του ενζύμου, προσδένεται στο ενεργό κέντρο του αντιστρεπτά (Εικόνα 1.20).

Η δράση στο καταλυτικό κέντρο, σε πολλά ένζυμα, εξαρτάται και από την παρουσία μη πρωτεϊνικών παραγόντων, που ονομάζονται συμπαραγόντες. Οι συμπαραγόντες, μπορεί να είναι μεταλλικά ιόντα όπως Cu^{2+} , Mg^{2+} και Fe^{2+} , ή οργανικά μόρια όπως NAD και CoA ή ακόμα και βιταμίνες. Τα ένζυμα τα οποία απαιτούν συμπαραγόντα για την δράση τους ονομάζονται αποένζυμα και το συνολικό σύστημα, χαρακτηρίζεται ως ολόενζυμο. Επιπλέον, όταν η σύνδεση του συμπαραγόντα είναι με το ένζυμο είναι ομοιοπολικής φύσεως τότε χαρακτηρίζεται ως προσθετική ομάδα, ενώ όταν η σύνδεση είναι ασθενής αναφέρεται ως συνένζυμο [53], [80],



Εικόνα 1.20. Απεικόνιση μιας εστεράσης του φερολικού οξέος. Αριστερά διακρίνεται η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου (κόκκινο χρώμα), το ενεργό κέντρο (γαλάζιο) και το υπόστρωμα, σιναπικό οξύ (πράσινο χρώμα). Δεξιά απεικονίζεται το σιναπικό οξύ και οι αλληλεπιδράσεις του με αμινοξέα που απαρτίζουν το ενεργό κέντρο με την σειρά από πάνω προς τα κάτω: ασπαρτικό οξύ, τρυπτοφάνη και ασπαραγίνη.

1.3.2 Ονοματολογία και ταξινόμηση

Η ονομασία των ενζύμων γενικότερα δεν ακολουθεί πάντα συγκεκριμένους κανόνες. Στην πλειοψηφία των ενζύμων έχει αποδοθεί εμπειρική ονομασία με βάση την δράση τους και το υπόστρωμα το οποίο καταλύουν. Γενικότερα επικρατούν οι εξής εμπειρικοί κανόνες [80]:

- Προστίθεται η κατάληξη -άση και ειδικότερα όταν η κατάληξη αυτή προστίθεται στην ονομασία του υποστρώματος υποδεικνύει ότι η δράση του ενζύμου είναι υδρολυτική, όπως για παράδειγμα αμυλάση, νουκλεάση και λακτάση.
- Η ονομασία μερικών ενζύμων έχει δύο μέρη: το πρώτο είναι το όνομα του υποστρώματος και το δεύτερο η δράση την οποία επιτελεί με την κατάληξη -άση, όπως για παράδειγμα το ένζυμο γαλακτική αφρουδογονάση.
- Τα ένζυμα τα οποία υδρολύουν πρωτεΐνες, είναι δηλαδή πρωτεολυτικά συνήθως παίρνουν την κατάληξη -ίνη.
- Η ονομασία μερικών ενζύμων είναι πιο ειδικευμένη και λαμβάνεται από την χημική ομάδα στην οποία δρουν, όπως για παράδειγμα το ένζυμο φωσφατάση το οποίο δρα σε κάποια σε μια φωσφορική ομάδα.
- Επιπλέον, σπανίως το όνομα του ενζύμου λαμβάνεται και από την προέλευση του, όπως η παπαΐνη που προέρχεται από το φυτό *Carica papaya*.

Οι εμπειρικοί αυτοί κανόνες ονομασίας των ενζύμων παρουσιάζουν περιορισμό στην εφαρμογή τους, λόγω του μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών που ανακαλύπτονται με την πάροδο του χρόνου. Η επίσημη ονομασία των ενζύμων γίνεται από την φύση της αντίδρασης την οποία καταλύουν και προσδίδεται στο ένζυμο ένας μοναδικός αριθμός (Enzyme Code ή EC). Ο αριθμός αποτελείται από 4 ψηφία, όπου το καθένα αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη πληροφορία για το ένζυμο (Πίνακας 1.6) [80].

Το πρώτο ψηφίο αντιστοιχεί στο είδος της αντίδρασης που καταλύει, το δεύτερο στην χημική ομάδα στην οποία δρα, το τρίτο στο χημικό δεσμό και το τέταρτο αποτελεί τον σειριακό αριθμό του ενζύμου. Ειδικότερα, ο πρώτος αριθμός μπορεί να λάβει τιμές από 1 έως 6.

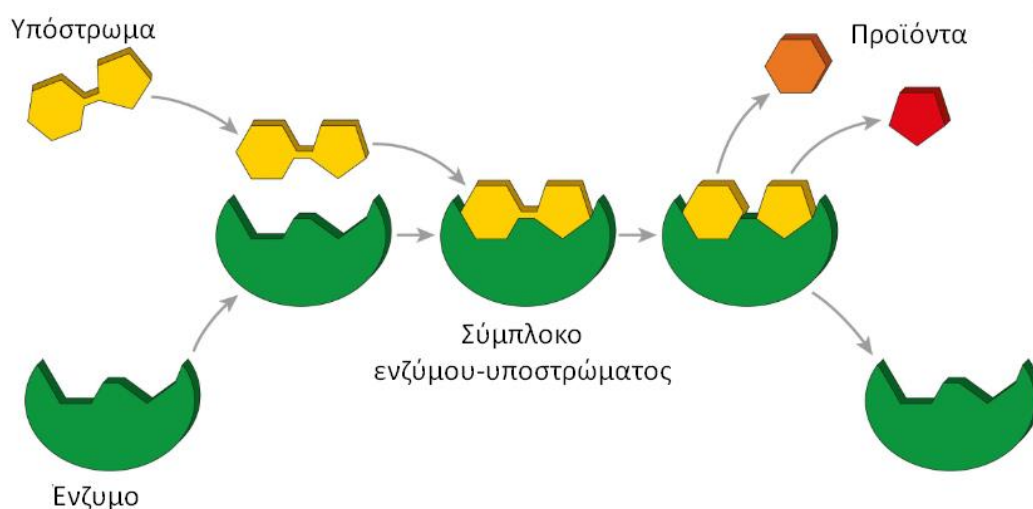
Πίνακας 1.6. Σημασία του πρώτου ψηφίου στον κωδικό αριθμό του ενζύμου (EC).

Ψηφίο	Κατηγορία	Είδος αντίδρασης
1	Οξειδοοξειδοκτάσες	Οξειδοαναγωγικές
2	Τρανσφεράσες	Μεταφορά ατόμου ή χημικών ομάδων
3	Υδρολάσες	Λύση δεσμού με την παρουσία νερού
4	Λυάσες	Λύση δεσμού απουσία νερού
5	Ισομεράσες	Αντιδράσεις ισομερίωσης
6	Λιγάσες	Συνένωση μορίων, παρουσία ATP.

Τα υπόλοιπα ψηφία προσφέρουν μεγαλύτερη εξειδίκευση στον χαρακτηρισμό του ενζύμου, τα εύρη τους είναι μεγαλύτερα και οι συνδυασμοί περισσότεροι σύνθετοι.

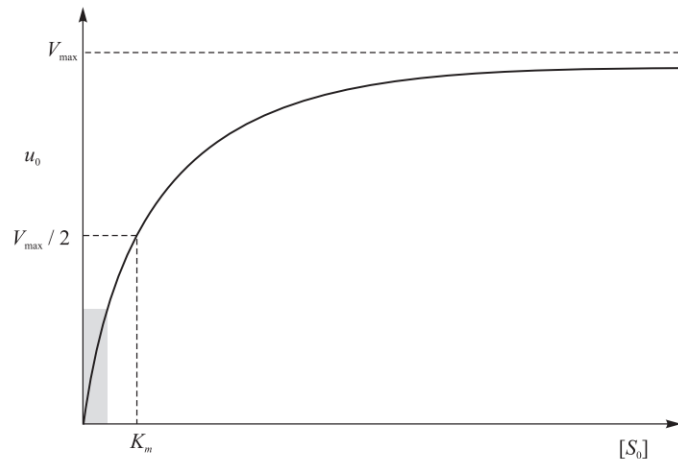
1.3.3 Κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων

Σε μοριακό επίπεδο το υπόστρωμα και το ένζυμο σχηματίζουν σύμπλοκο. Το υπόστρωμα προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αντιστρεπτά με ασθενείς δυνάμεις van der Waals ή και με δεσμούς υδρογόνου. Το μοντέλο το οποίο μπορεί να περιγράψει την συγκεκριμένη διαδικασία είναι το μοντέλο «κλειδιού-κλειδαριάς» (Εικόνα 1.21). Σύμφωνα με αυτό το ενεργό κέντρο του ενζύμου υποδέχεται εκλεκτικά το υπόστρωμα. Η εκλεκτικότητα που εμφανίζεται στις χημικές αντιδράσεις είναι μεγάλη.



Εικόνα 1.21 Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου κλειδιού - κλειδαριάς [82].

Οι ενζυμικές αντιδράσεις στην απλή τους μορφή ακολουθούνε κινητική κορεσμού (Εικόνα 1.22). Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι, σε μια δεδομένη στιγμή της ενζυμικής αντίδρασης υπάρχει περιορισμένος αριθμός ελεύθερων ενεργών κέντρων στα οποία μπορεί να προσδεθεί το υπόστρωμα. Συνεπώς για μεγάλες συγκεντρώσεις υποστρώματος, το ένζυμο δεν μπορεί να δράσει και συνεπώς χαρακτηρίζεται κορεσμένο, ενώ η ταχύτητα της χημικής αντίδρασης δεν μπορεί να επιταχυνθεί περαιτέρω και αποκτά μια σταθερή τιμή. Αντίθετα, μια απλή χημική αντίδραση η ταχύτητα της είναι ανάλογη των συγκεντρώσεων των αντιδρώντων.



Εικόνα 1.22. Τυπικό διάγραμμα ρυθμού αντίδρασης-συγκέντρωσης υποστρώματος για κινητική κορεσμού [80].

Σε αυτού του είδους την κινητική διακρίνονται τρεις φάσεις [80]:

1) Φάση έναρξης

Στην φάση αυτή αρχίζει η αλληλεπίδραση του υποστρώματος με το ένζυμο σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο.

2) Φάση σταθεροποίησης

Το σύστημα των αντιδρώντων συστατικών βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία και η συγκέντρωση των συστατικών μεταβάλλεται γραμμικά με τον χρόνο.

3) Μη γραμμική φάση

Αποτελεί το κύριο τμήμα της ενζυμικής αντίδρασης καθώς, ακόμη και αν η δραστηριότητα του ενζύμου παραμένει αμετάβλητη, η συγκέντρωση του υποστρώματος μειώνεται και η αντίδραση πλησιάζει στο σημείο ισορροπίας της.

Η ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες και έτσι η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων περιπλέκεται. Για παράδειγμα, χημικές ουσίες που βρίσκονται στο περιβάλλοντα χώρο, το υπόστρωμα σε μεγάλες συγκεντρώσεις, ακόμα και τα προϊόντα της αντίδρασης μπορεί να επηρεάσουν δραστικά την ταχύτητα. Η αναστολή του ενζύμου κυρίως επιτυγχάνεται όταν το ενεργό κέντρο έχει καταληφθεί ή δεν μπορεί πλέον να δράσει και καταλύσει την βιοχημική αντίδραση [80].

Εκτός αυτού, η ενζυμική αντίδραση μπορεί να επηρεαστεί και από φυσικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία. Θερμοκρασίες μεγαλύτερες από την βέλτιστη δεν επιτρέπουν στην πρόσδεση των μορίων στο ενεργό κέντρο λόγω αυξημένης κινητικής ενέργειας ενώ μπορεί ταυτόχρονα να αλλοιώνεται και η τριτοταγής δομή του ενζύμου. Το pH, αποτελεί επίσης έναν φυσικό παράγοντα επιρροής της δράσης του ενζύμου, καθώς ακραίες τιμές προκαλούν μετουσίωση της πρωτεϊνικής του δομής [80].

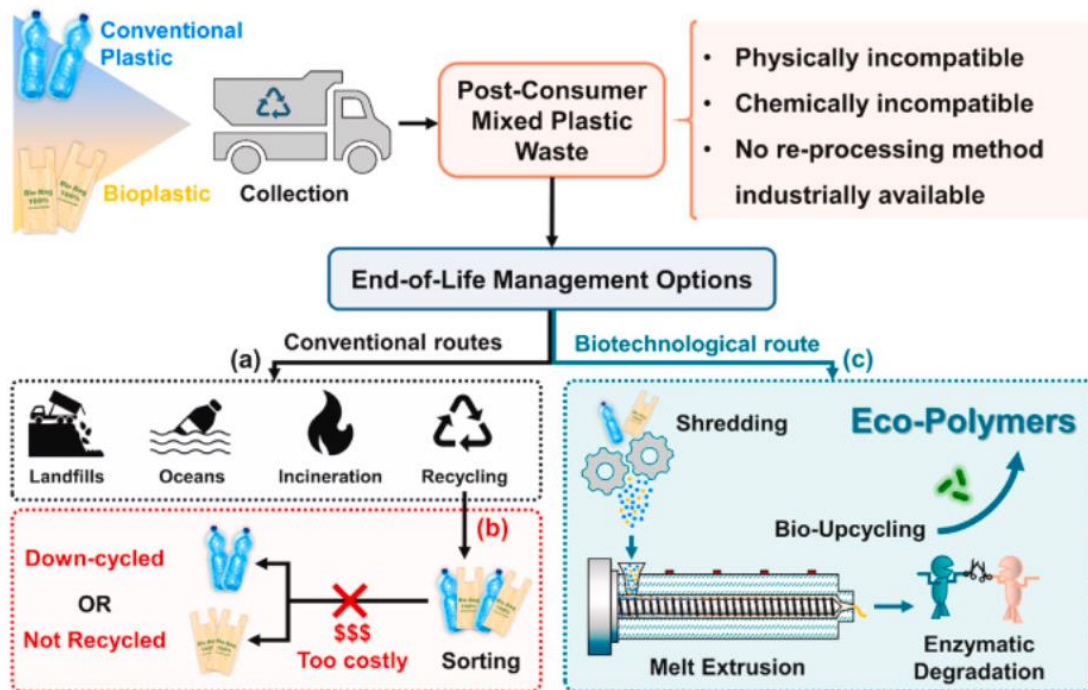
1.3.4 Αξιοποίηση ενζύμων στην διάσπαση των πλαστικών

1.3.4.1 Σχεδιασμός μοντέλων και συστημάτων ενζυμικής δράσης

Η εκμετάλλευση των ενζύμων για την διάσπαση του πλαστικού αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας και μελέτης. Δεδομένου, του θετικού οικολογικού αποτυπώματος των βιοπλαστικών, η παραγωγή και η καθιέρωση αυτών σε καθημερινές εφαρμογές αποτελεί στρατηγική με θετικό αντίκτυπο στην αντιμετώπιση των πλαστικών απορριμμάτων. Στην διαλογή των πλαστικών αποβλήτων, σε αρκετές περιπτώσεις γίνεται φυσική ανάμειξη των συνθετικών πλαστικών και των βιοπλαστικών. Η διαχείριση των αποβλήτων αυτών, ακολουθεί είτε συμβατικούς τρόπους, είτε μεθόδους ανακύκλωσης. Ωστόσο, η ανακύκλωση αντιμετωπίζει πολλούς περιορισμούς, όπως η έλλειψη χώρου για τις εγκαταστάσεις ανακύκλωσης και η έλλειψη νομοθεσίας.

Η εστίαση πλέον έχει στραφεί μεθόδους βιοαποικοδόμησης και ειδικότερα στην απομόνωση των συγκεκριμένων ενζύμων τα οποία καταλύουν την διάσπαση των πολυμερών. Η χρήση μόνο ενζυμικών διαλυμάτων παρά ολόκληρων καλλιεργειών ενός ή περισσότερων βακτηρίων και μυκήτων αποτελεί μία πιο οικονομικά και λειτουργικά βιώσιμη λύση στην μείωση των απορριμμάτων. Για παράδειγμα, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η κατεργασία των μειγμάτων πλαστικού με την συνεργιστική δράση υδρολυτικών ενζύμων παρουσίασε σημαντική απόδοση στην αποσύνθεσή τους (Εικόνα 1.23). Ειδικότερα, μια κουτινάση που απομονώθηκε από κομπόστ φύλλων και κλαδιών και μια εμπορική αμυλάση, έδρασαν στο μείγμα πλαστικών PET-TPS (Thermoplastic starch). Το αποτέλεσμα της δράσης αυτής, ήταν η απελευθέρωση σακχάρων και τερεφθαλικού οξέος (TPA), ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε η αξιοποίηση των υδρολυμάτων που προέκυψαν, για την παραγωγή βακτηριακής νανοκυτταρίνης (BNC) [83].

Με τη διεργασία αυτή, αποδεικνύεται ξανά ότι η εκμετάλλευση των πολυμερών μετά τη χρήση τους, μπορεί να οδηγήσει σε προϊόντα υψηλής αξίας, δεδομένου ότι η νανοκυτταρίνη βρίσκει σημαντικές ιατρικές εφαρμογές όπως η ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων [84]. Αντίστοιχα το TPA που αποτελεί το κύριο προϊόν αποσύνθεσης μπορεί να απομονωθεί και να χρησιμοποιηθεί ως μονομερές για την σύνθεση αυθεντικού PET, προσφέροντας την δυνατότητα απαλλαγής από πρώτες ύλες με προέλευση τα ορυκτά καύσιμα [83].



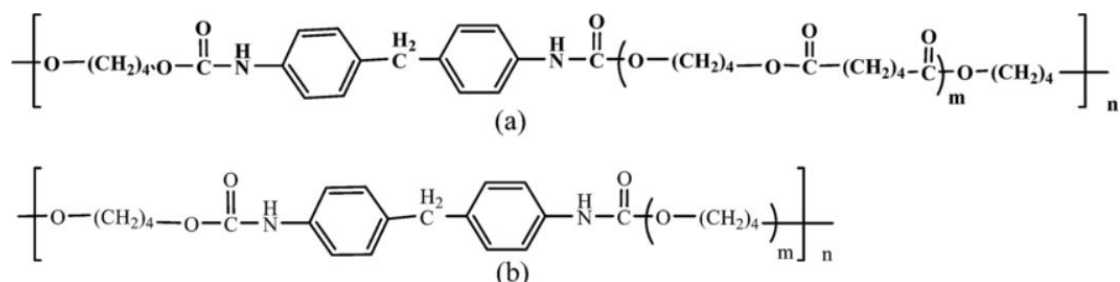
Εικόνα 1.23. Σχηματική απεικόνιση της πορείας των μειγμάτων συνθετικών και βιο - πλαστικών μέχρι το τέλος ζωής τους [83].

Η απομόνωση και η αξιοποίηση τέτοιων ενζύμων είναι ζωτικής σημασίας στην προσπάθεια της σύγχρονης κοινωνίας για την προστασία του περιβάλλοντος. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα ενζυμικά συστήματα αποικοδόμησης πλαστικού παρουσιάζουν περισσότερα πλεονεκτήματα από την ανάπτυξη ολόκληρων μικροβιακών καλλιεργειών. Το σημαντικότερο από αυτά είναι η ευκολότερη ρύθμιση διεργασιών και κλιμάκωση. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν ευνοϊκό το έδαφος για τον σχεδιασμό βιομηχανιών που εστιάζουν στην ενζυμική αποικοδόμηση πλαστικού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εταιρεία Carbios [85] με έδρα την Γαλλία, η οποία δραστηριοποιείται στον σχεδιασμό και την ανάπτυξη καινοτόμων ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις αποσύνθεσης πλαστικών. Η κερδοφορία της οφείλεται στην εμπορική πώληση ενζύμων και στην παραχώρηση αδειών, ανοίγοντας τον δρόμο στην επίτευξη ταυτόχρονης βιωσιμότητας και προώθησης της κυκλικής οικονομίας μέσω της ενζυμικής αποσύνθεσης πλαστικού.

1.3.4.2 Ενζυμική αποικοδόμηση πολυουρεθάνης

Η ανθεκτικότητα της πολυουρεθάνης (Polyurethane ή PU), αποτελεί παράγοντα της περιβαλλοντικής μόλυνσης. Εκ φύσεως το πολυμερές, περιλαμβάνει στο μόριο του διαφόρων ειδών δεσμούς. Για παράδειγμα περιλαμβάνει τον πεπτιδικό δεσμό και τον εστερικό δεσμό, όπου έχει έντονη παρουσία και στο PU εστερικής βάσης (Εικόνα 1.24). Επιπλέον, μπορεί να προσομοιάσει και τον δεσμό της ουρίας και

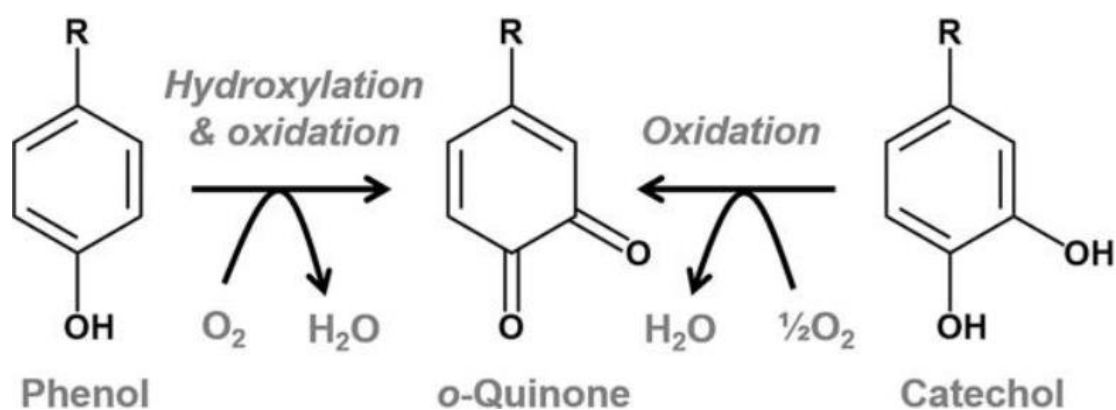
συνεπώς να αποτελέσει υπόστρωμα για ένζυμα που υδρολύουν τον αντίστοιχο δεσμό.



Εικόνα 1.24. Επαναλαμβανόμενες μονάδες PU εστερικής βάσης (α) και αιθερικής βάσης (β) [86].

Γενικότερα, χρησιμοποιούνται διάφορα ένζυμα για την αποικοδόμηση του PU, τα οποία μπορεί να είναι εμπορικά, να παρασκευάζονται δηλαδή σε μεγάλη κλίμακα ή ένζυμα καινοτόμα που παράγονται ετερόλογα σε εργαστηριακή κλίμακα. Οι κατηγορίες ενζύμων οι οποίες σχετίζονται με την διάσπαση τη πολυουρεθάνης είναι οι οξειδορεδουκτάσες και οι υδρολάσες. Στην πρώτη κατηγορία έχουν γίνει αναφορές για επιτυχή αποικοδόμηση μέσω οξειδωτικών ενζύμων όπως μια υπεροξειδάση στην κατηγορία EC 1.11.1.7 και μια λακκάση EC 1.10.3.2, όπου και τα δύο είναι μυκητιακής προέλευσης [87]. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εκφράστηκε μια τυροσινάση, ένζυμο με οξειδωτική δράση, στον ξενιστή *P. pastoris*.

Η τυροσινάση είναι μια μονοοξυγενάση που περιλαμβάνει δισθενή χαλκό ως συμπράγοντα και καταλύει την μετατροπή φαινολικών ομάδων και της κατεχόλης στις αντίστοιχες όρθο – κινόνες μέσω υδροξυλίωσης (Εικόνα 1.25) [88].



Εικόνα 1.25. Καταλυτική δράση της τυροσινάσης [88].

Η χρήση της τυροσινάσης, στην αποικοδόμηση του PU, μπορεί να συνεισφέρει στην μετατροπή των φαινολικών δακτυλίων στην κινόνη η οποία είναι περισσότερη δραστική χημική μορφή [89].

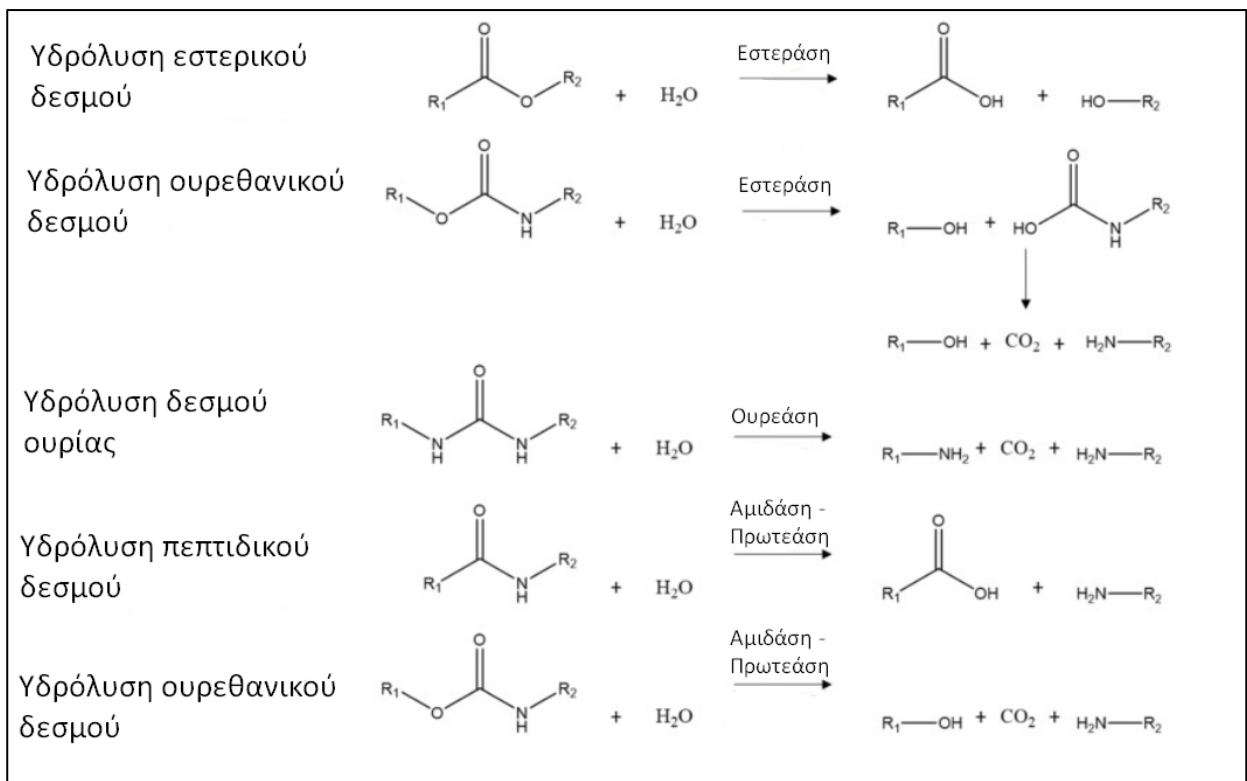
Η πιο συνήθης εφαρμογή αποικοδόμησης του PU είναι με υδρολυτικά ένζυμα, δηλαδή έχουν την δυνατότητα να λύουν δεσμούς παρουσία νερού. Ειδικότερα,

ένζυμα όπως οι εστεράσες που υδρολύουν εστερικούς δεσμούς βρίσκουν ευρεία εφαρμογή. Το αποτέλεσμα της υδρόλυσης είναι ο σχηματισμός ενός καρβοξυλικού οξέος και μιας αλκοόλης. Οι εστεράσες ιδίως χρησιμοποιούνται για την εστερικής βάσης πολυουρεθάνη, αλλά εστερικοί δεσμοί εμφανίζονται και στα δύο είδη PU. Στην παρούσα μελέτη, υλοποιήθηκε η ετερόλογη έκφραση της κουτινάσης, που ανήκει στην οικογένεια των εστερασών [89].

Επιπρόσθετα, η ουρεάση είναι ένα από τα ένζυμα που μπορούν να συμβάλλουν στην αποικοδόμηση, λόγω της ικανότητάς τους να υδρολύουν τον δεσμό της ουρίας, ο οποίος μπορεί να προσομοιαστεί από το μόριο του πολυμερούς. Η υδρόλυση της ουρίας έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δύο μορίων αμίνης [89], [90].

Τέλος η αμιδάση και η πρωτεάση είναι υδρολυτικά ένζυμα τα οποία καταλύουν πεπτιδικούς δεσμούς. Το αποτέλεσμα της κατάλυσης είναι η απελευθέρωση ενός καρβοξυλικού οξέος και μιας αμίνης. Τα συγκεκριμένα ένζυμα έχουν δείξει ενεργότητα και στον ουρεθανικό δεσμό, παρέχοντας ως προϊόν μια αμίνη, ένα μόριο αλκοόλης και διοξείδιο του άνθρακα, δεδομένου ότι ο ουρεθανικός και ο πεπτιδικός δεσμός παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες ως προς την δομή τους. Η κύρια διαφορά μεταξύ τους είναι ότι ενώ οι πρωτεάσες καταλύουν μόνο την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών των πρωτεϊνών, οι αμιδάσες μπορούν να δράσουν γενικότερα στον δεσμό άνθρακα-αζώτου και ειδικότερα σε γραμμικά αμίδια [91], [92]. Μερικά παραδείγματα πρωτεασών που εμφάνισαν δράση στο PU είναι η παπαΐνη, η βρωμελίνη και η χυμοθρυψίνη [89], [90].

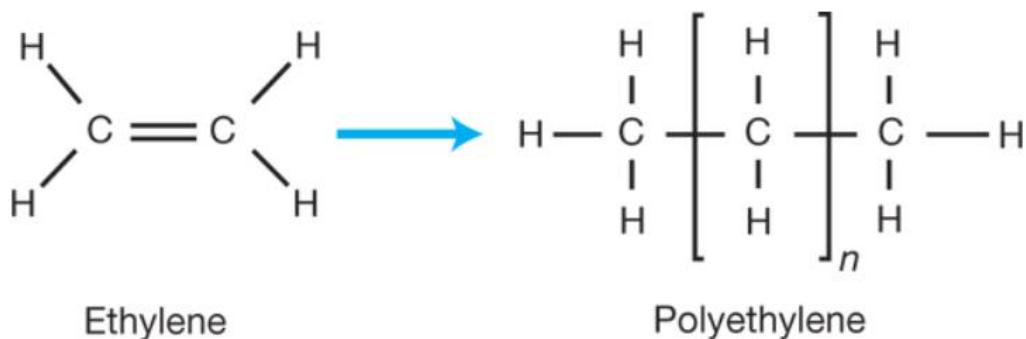
Συνεπώς, η ενζυμική αποικοδόμηση του PU είναι μια σύνθετη διεργασία όπου απαιτεί την δράση πολλών και διαφορετικών ενζύμων (Εικόνα 1.26). Στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, έγινε η προσπάθεια έκφρασης τριών υδρολυτικών ενζύμων: της αμιδάσης, της πρωτεάσης και της ενδοπεπτιδάσης και μιας οξυγενάσης, της τυροσινάση από τον μικροοργανισμό *F. oxysporum* BPOP18.



Εικόνα 1.26. Αντιδράσεις των αναφερόμενων υδρολυτικών ενζύμων [89]

1.3.4.3 Ενζυμική κατάλυση πολυαιθυλενίου

Το πολυαιθυλένιο (PE), είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό πολυμερές. Η επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα του είναι το αιθυλένιο, επομένως η παρουσία του δεσμού μεταξύ άνθρακα και υδρογόνου είναι έντονο στοιχείο του μορίου (Εικόνα 1.27). Το πολυμερές μπορεί να είναι γραμμικό ή διακλαδισμένο μόριο και χαρακτηρίζεται από έντονη υδροφοβικότητα ενώ παράλληλα είναι και μη πολικό [93].



Εικόνα 1.27. Πολυμερισμός του αιθυλενίου [16].

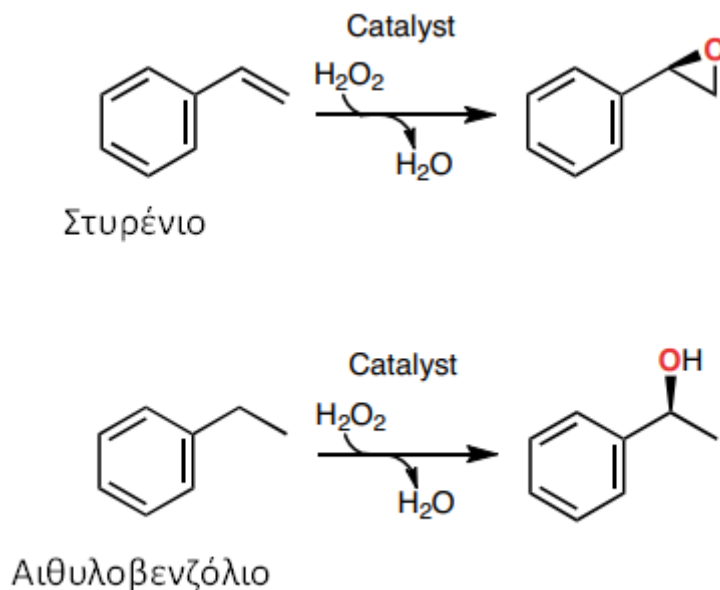
Τα δομικά στοιχεία του πολυμερούς καθιστούν την ενζυμική του βιοαποικοδόμηση ιδιαίτερα δύσκολη. Η ικανότητα των υδρολυτικών ενζύμων είναι

αμφιλεγόμενη καθώς το PE περιέχει οξειδωτικούς δεσμούς και όχι υδρολυόμενους. Για τον λόγο αυτό απαιτείται η προκατεργασία του πλαστικού απόβλητου. Η προκατεργασία, πραγματοποιείται με την οξείδωση μερικών σημείων στην μακρά αλυσίδα του άνθρακα μέσω υπερϊώδης και θερμικής ακτινοβολίας. Μέσω της διαδικασίας αυτής εισάγονται λειτουργικές ομάδες στους αδρανείς δεσμούς C-H και C-C. Έτσι, οι δεσμοί αυτοί ενεργοποιούνται και καθιστούν την διάσπαση του πολυμερούς ευνοϊκότερη για τα ένζυμα για την περαιτέρω επεξεργασία τους. Το ανθρακικό άκρο της πολυμερικής αλυσίδας είναι περισσότερο επιδεκτικό προς οξείδωση μέσω υδροξυλίωσης λόγω στερεοχημικής διάταξης στον χώρο και της εύκολης πρόσβασης του ενζύμου προς αυτό [94].

Έρευνες πάνω στην ενζυμική αποικοδόμηση του PE, κάνουν αναφορά σε συγκεκριμένα ένζυμα που εμφανίζουν οξειδωτική δραστηριότητα και ανήκουν στην κατηγορία των οξειδορεδουκτασών. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται ότι, η οξείδωση του πολυμερούς είναι εφικτή μέσω των ενζύμων αποφεύγοντας φυσικές και χημικές διεργασίες [95]. Μετά την οξείδωση, η κατεργασία με άλλα ένζυμα είναι απαραίτητη. Μερικά γνωστά οξειδωτικά ένζυμα είναι [94] οι λακκάσες, υπεροξειδάσες του μαγγανίου και οι υδροξυλάσες των αλκανίων.

Οι υπεροξειδάσες γενικότερα είναι μια ομάδα οξειδωτικών ενζύμων βακτηριακής και μυκητιακής προέλευσης που καταλύουν την οξείδωση οργανικών και ανόργανων ενώσεων μέσω της αναγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν μεγάλο δυναμικό οξείδωσης και συνήθως φέρουν το μόριο αιμίνης ως συμπαραγοντα [96]. Έτσι μπορούν να βρουν εφαρμογή στην ενζυμική οξείδωση του PE.

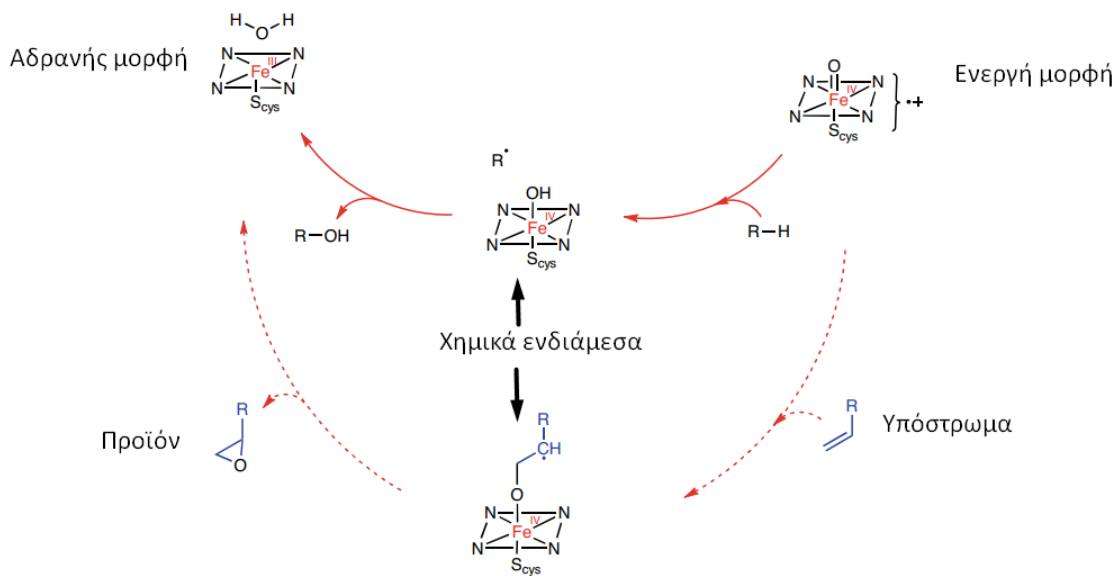
Οι υπεροξυγενάσες ανήκουν όπως και οι υπεροξειδάσες στην κατηγορία οξειδωτικών ενζύμων. Η ιδιαιτερότητα των συγκεκριμένων ενζύμων, έγκειται στην επιλεκτική προσθήκη οξυγόνου σε οργανικά μόρια, χρησιμοποιώντας ως πηγή οξυγόνου το H_2O_2 (Εικόνα 1.28). Τα ένζυμα που καταλύουν την προσθήκη ενός μόνο ατόμου οξυγόνου ονομάζονται μονοξυγενάσες, ενώ η προσθήκη δύο ατόμων οξυγόνου καταλύεται από τις διοξυγενάσες. Επιπλέον, όταν ο δότης του οξυγόνου είναι ένα μόριο οξυγόνου (O_2) τότε τα ένζυμα χαρακτηρίζονται ως οξυγενάσες [97].



Εικόνα 1.28. Παραδείγματα καταλυτική δράσης υπεροξυγενασών: εποξείδωση του στυρενίου (πάνω), υδροξυλίωση του αιθυλοβενζολίου (κάτω) [97].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν αόριστες υπεροξυγενάσες (Unspecific Peroxygenases ή UPOs), λόγω της υψηλότερης απόδοσης που εμφάνισαν συγκριτικά με παρόμοια ένζυμα. Ο χαρακτηρισμός «Unspecific» αποδίδεται στο γεγονός ότι δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση σε κάποιο υπόστρωμα [97].

Οι UPOs, διαθέτουν ενεργό κέντρο με όξινα και βασικά αμινοξικά κατάλοιπα, το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με την αιμίνη και συγκεκριμένα σχηματίζονται ιοντικοί δεσμοί με τον σίδηρο που περιέχει. Στο σύμπλοκο αυτό του ενεργού κέντρου προσδένεται το H₂O₂ και πραγματοποιείται ετερολυτική σχάση του δεσμού O-O. Το αποτέλεσμα αυτής της σχάσης είναι η απελευθέρωση ενός μορίου νερού και η ενεργοποίηση του ενζύμου. Το ένζυμο πλέον μπορεί να υποδεχθεί το υπόστρωμα και να καταλύσει την προσθήκη του οξυγόνου που έλαβε σε κάποιο οργανικό μόριο, όπως για παράδειγμα το PE. Εναλλακτικά, απουσία υποστρώματος, απελευθερώνει το άτομο οξυγόνου που έχει λάβει από το H₂O₂ και επιστρέφει στην αρχική του μορφή (Εικόνα 1.29).



Εικόνα 1.29. Καταλυτικός μηχανισμός των UPOs [97].

Όπως γίνεται αντιληπτό, οι UPOs μπορούν να συμβάλλουν στην οξείδωση και την ενεργοποίηση των αδρανών δεσμών C-C και C-H στο PE. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκαν μέσω ετερόλογης έκφρασης οι UPOs Asptra551984 Asptra579462 και Asptra585095 από τον νηματοειδή μύκητα *Aspergillus parasiticus* του στελέχους MM36.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Υλικά

2.1.1 Πόροι και Χημικά Αντιδραστήρια

Η υλοποίηση της παρούσας μελέτης έγινε εφικτή μέσω των διαθέσιμων πόρων του εργαστηρίου. Η προμήθεια των χημικών αντιδραστηρίων έγινε από τις εταιρείες:

- Sigma-Aldrich
- LAB-SCAN
- AppliChem
- Fisher Scientific

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

Επιπλέον, τα κοινά πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά σκεύη και δοχεία είναι κατασκευής των παρακάτω εταιριών:

- Greiner-Bio One
- Sterilin Limited
- Eppendorf
- SCHOTT AG
- Whatman
- Millipore
- ISOLAB
- SARSTEDT

Τέλος, οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν παραγωγή των εταιρειών:

- Sigma-Aldrich
- Amicon, Millipore
- Cellophane, Bio-Rad

2.1.2 Όργανα και Συσκευές

Η μελέτη των εξεταζόμενων ενζύμων, από την εισαγωγή του πλασμιδίου μέχρι και την διεργασία απομόνωσης, υλοποιήθηκε χάρις την χρήση εξειδικευμένου εργαστηριακού εξοπλισμού. Στην συνέχεια, παρατίθεται μια εκτενής καταγραφή του εργαστηριακού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε (Πίνακες 2.1-2.5).

Πίνακας 2.1. Εργαστηριακός εξοπλισμός γενικής χρήσης.

Γενικής χρήσης	
Είδος Εξοπλισμού	Μοντέλο/Εταιρεία
Ζυγοί μεγάλης ακρίβειας	ABS και ADJ, Kern & Sohn GmbH
Αναδευτήρας δίνης (Vortex)	RSLAB-6PRO
Ζυγοί	Mark 2060 και Mark 4065, BEL ENGINEERING
Θερμαινόμενη και μαγνητική πλάκα ανάδευσης	Model 692, Nahita Blue, Auxilab S.L.
Όργανο μέτρησης pH	MW151 MAX, Milwaukee
Στήλη ρητίνης παραγωγής απιονισμένου νερού	Filterdyn
Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού	Labqua HPLC, Biosan
Συσκευή παραγωγής θρυμματισμένου πάγου	Fiocchi Scientific Refrigerators
Υπερκατάψυξη	-86C FREEZER, Forma Scientific

Πίνακας 2.2. Εξοπλισμός επώασης και εργασιών υπό στείρες συνθήκες.

Επώασης και αποστείρωσης	
Είδος Εξοπλισμού	Μοντέλο/Εταιρεία
Επωαστήρες με δυνατότητα ανάδευσης και ελεγχόμενης θέρμανσης	ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co
Επωαστήρες με δυνατότητα ανάδευσης και ελεγχόμενης θέρμανσης για Eppendorf	Thermomixer Comfort, Eppendorf
Φούρνος επώασης τρυβλίων	UNIFLOW UV 1200
Αυτόκαυστο για αποστείρωση μέσω κύκλων ατμού	Labo Autoclave, SANYO
Αποστειρωμένος χώρος εργασίας	WT Binder, TOTTLINGEN/Germany

Πίνακας 2.3. Αναλυτική περιγραφή των φυγόκεντρων που χρησιμοποιήθηκαν.

Φυγόκεντροι	
Είδος Εξοπλισμού	Μοντέλο/Εταιρεία
Ψυχόμενη φυγόκεντρος για Eppendorf	Centrifuge 4239R, ALC INTERNATIONAL
Ψυχόμενη φυγόκεντρος με αποσπώμενη κεφαλή και δυνατότητα υποδοχής πολλαπλών υποδοχέων	ROTANTA 460R, Hetlich ZENTRIFUGEN
Φυγόκεντρος Eppendorf	zentrifuge 3200, EPPENDORF

Πίνακας 2.4. Αναλυτική περιγραφή των φωτόμετρων που χρησιμοποιήθηκαν.

Φωτόμετρα	
Είδος Εξοπλισμού	Μοντέλο/Εταιρεία
Φωτόμετρο για 96-well microplates (1)	SpectraMax 250, Molecular Devices
Φωτόμετρο για 96-well microplates (2)	SpectraMax ABS Plus, Molecular Devices
Φωτόμετρο με υποδοχή κυψελίδας	S-20 Spectrophotometer, BOECO Germany

Πίνακας 2.5. Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε γέλη πολυακρυλαμιδίου

Ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου και σε γέλη αγαρόζης	
Είδος Εξοπλισμού	Μοντέλο/Εταιρεία
Ηλεκτρολυτικό κελί ηλεκτροφόρησης γέλης πολυακρυλαμιδίου	Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad
Συσκευή εφαρμογής διαφοράς δυναμικού	Microcomputer Electrophoresis Power Supply E863, CONSORT
Κελί ηλεκτροφόρησης πηκτής αγαρόζης	Easigel H1-Set, Scie-Plas
Γυαλιά, καλούπια και περιφερειακά εξαρτήματα για τον σχηματισμό της γέλης	Biorad

Επιπλέον για τον μετασχηματισμό των κυττάρων *P.pastoris* χρησιμοποιήθηκε το κελί ηλεκτροδιάτρησης MicroPulser της Bio-Rad

Στην συνέχεια, παρατίθεται μια εκτενής καταγραφή του εργαστηριακού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε κατά την διεξαγωγή των διεργασιών φιλτραρίσματος και υπερδιήθησης (Πίνακες 2.6, 2.7).

Πίνακας 2.6. Εξοπλισμός για την διήθηση και την συμπύκνωση των πρωτεϊνικών διαλυμάτων.

Διήθησης και συμπύκνωσης	
Είδος Εξοπλισμού	Μοντέλο/Εταιρεία
Συσκευή διήθησης υπό κενό	PALL
Κελί αναδευόμενης υπερδιήθησης	Amicon Stirred Cell 8400, Merck Millipore

Επιπρόσθετα, παρακάτω παρουσιάζεται η λεπτομερής καταγραφή του εργαστηριακού εξοπλισμού που επιλέχθηκε για την απομόνωση της υπό μελέτης πρωτεΐνης καθώς και για την ανάλυση των αποτελεσμάτων από την εφαρμογή αυτών σε υποστρώματα όπως το πολυουρεθάνιο (PU).

Πίνακας 2.7. Εξοπλισμός για την απομόνωση πρωτεϊνών και την ανάλυση ενζυμικών προϊόντων.

Απομόνωση πρωτεϊνών και ανάλυση ενζυμικών προϊόντων	
Είδος Εξοπλισμού	Μοντέλο/Εταιρεία
Στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με ακινητοποιημένα ιόντα κοβαλτίου	TALON®, Bio-Rad, Clontech
Στήλη χρωματογραφίας ανιοντικής εναλλαγής	Q Sepharose High Performance, GE Healthcare
Στήλη χρωματογραφίας κατιοντικής εναλλαγής	SP Sepharose High Performance, GE Healthcare
Περισταλτική αντλία ενσωματωμένη με ανιχνευτή UV (280nm)	Econo Gradient, BioRad (H.Π.Α.)
Συλλέκτης κλασμάτων	Waters, Millipore
Όργανο χρωματογραφίας διείσδυσης γέλης GPC	Agilent
Όργανο χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC	Agilent

Τέλος, αξιοποιήθηκαν και πιο κοινά εργαστηριακά σκεύη και όργανα όπως:

- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ποτήρια ζέσεως
- Κωνικές φιάλες
- Σπαθίδες
- Μαγνητικοί αναδευτήρες

- Γυάλινα μπουκάλια αποστείρωσης
- Πλαστικά δοχεία Falcon των 15 και 50mL
- Eppendorf των 1,5mL, 2,0mL και PCR
- Μεμβράνες διαπίδυσης
- Γυάλινα χωνιά
- Πλαστικές βάσεις για ζύγιση
- Αυτόματες πιπέτες ακρίβειας 0,01mL (PCR), 0,1mL, 1mL και 5mL
- Πιπέτες Pasteur
- Πολυπιπέτα με 8 υποδοχείς (tips) και ακρίβεια 0,1mL
- 96-well Microplate
- Τρυβλία Petri
- Θερμοστατούμενα Υδατόλουτρα
- Φούρνος ξήρανσης στους 60°C και 100°C
- Συσκευή ξήρανσης υπό κενό
- Συσκευή λυοφιλίωσης
- Συσκευή υπερήχων

2.1.3 Φορείς κλωνοποίησης και ετερόλογης έκφρασης των ενζύμων

Τα γονίδια των νέων ενζύμων που εκφράστηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν ενσωματωμένα με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA στον πλασμιδιακό φορέα pPICZα A. Η λήψη των γονιδίων για την έκφραση των υπεροξυγενασών έγινε από τον μύκητα *Aspergillus parasiticus* του στελέχους MM36. Αντίστοιχα, τα γονίδια έκφρασης της πρωτεάσης, της ενδοπεπτιδάσης, της τυροσινάσης και της αμιδάσης παραλήφθηκαν από τον μύκητα *Fusarium oxysporum* BPOP18. Παράλληλα, στο πλαίσιο εφαρμογών συνεργητισμού, εκφράστηκε και ένα ήδη μελετημένο ένζυμο, μια κουτινάση (*FoCut5a*). Το γονίδιο προέρχεται και αυτό από τον *F. oxysporum* και ενσωματώθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET-22b(+) [98].

Escherichia coli

Η δημοτικότητα του συγκεκριμένου βακτηρίου, έγκειται στο βάθος κατανόησης και γνώσης τόσο του γενότυπου όσο και του φαινότυπου, αλλά και γενικότερα της φυσιολογίας του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Παρουσιάζει υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης (χρόνος διπλασιασμού περίπου κάθε 0,5h) ενώ ο σχηματισμός βυθισμένης καλλιέργειας απαιτεί διαθέσιμα και φθηνά θρεπτικά συστατικά [49]. Επιπλέον, το *E.coli* ανήκει στην κατηγορία των Gram-αρνητικών μικροοργανισμών και χαρακτηρίζεται ως δυνητικά αναερόβιο βακτήριο. Παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη σε θερμοκρασία 37°C [99]. Όντας προκαρυωτικός οργανισμός, η δομή του πυρήνα είναι απλούστερη και επομένως ο μετασχηματισμός υπό θερμική καταπόνηση είναι μια διεργασία υψηλής απόδοσης.

Ο πολλαπλασιασμός των γονιδίων των νέων ενζύμων επιλέχθηκε να γίνει με το στέλεχος TOP10, Invitrogen™. Το στέλεχος TOP10 κατασκευάστηκε με σκοπό την μεγαλύτερη απόδοση στον μετασχηματισμό των κυττάρων αφού είναι δεκτικά (competent) στο θερμικό σοκ. Επιπρόσθετα, ενδείκνυται για την ιδιαίτερη σταθερότητα κατά την αντιγραφή του γενετικού τους υλικού, παράγοντας πολλά αντίγραφα πλασμιδίου [100].

Επιπλέον, η ετερόλογη έκφραση της κουτινάσης πραγματοποιήθηκε στο στέλεχος BL21(DE3), Novagen®. Το παράγωγο DE3 του στελέχους BL21 εξυπηρετεί υψηλότερες αποδόσεις στην έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών, ενώ είναι κατάλληλο και για διεργασίες μετασχηματισμού [101]. Το πλεονέκτημα που διαθέτει, έγκειται στα γενετικά του χαρακτηριστικά γνωρίσματα όπως η έλλειψη ίδιας πρωτεολυτικής δράσης καθώς και η παρουσία του γονιδίου T7 RNA πολυμεράσης το οποίο ελέγχεται από τον επαγόμενο υποκινητή *lacUV5* το οποίο προέρχεται από τον βακτηριοφάγο λ [101], [102].

Pichia pastoris

Ως φορέας έκφρασης των γονιδίων των νέων ενζύμων, αξιοποιήθηκε ο μεθυλότροφος ζυμομύκητας *Pichia pastoris*. Η θερμοκρασία μέγιστης κυτταρικής ανάπτυξης είναι οι 28-30°C για υγρές καλλιέργειες, ενώ ο χρόνος διπλασιασμού είναι προσεγγιστικά οι δύο ώρες. Η χρήση του συγκεκριμένου μύκητα ως πλατφόρμα έκφρασης οφείλεται στα πολλά πλεονεκτήματα που έχει, όπως η ικανότητα ορθής αναδίπλωσης της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά και η εξωκυτταρική απέκκριση ετερόλογων πρωτεϊνών, στο περιβάλλον του κυττάρου. Λόγω της φύσης του ευκαριωτικού πυρήνα, η διείσδυση του πλασμιδιακού φορέα στο γενετικό υλικό του κυττάρου εμφανίζει μεγαλύτερα εμπόδια συγκριτικά με το *E.coli* [79].

Ακόμη, αξιοποιήθηκαν τα στελέχη X33 και SMD1168. Το πρώτο είναι φυσικού τύπου (wild type) και παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς τα ετερόλογα πλασμίδια που περιέχουν γονίδιο αντίστασης στο αντιβιοτικό Ζεοσίνη. Ο φαινότυπος του είναι Mut⁺, δηλαδή περιέχει και τα δύο γονίδια AOX1 και AOX2 που εκφράζουν δύο αλκοολικές οξειδάσες με σκοπό τον μεταβολισμό της μεθανόλης [103]. Αντίθετα, το στέλεχος SMD1168 έχει γενότυπο *per4* [104], δηλαδή στο γονιδίωμα του συγκεκριμένου στελέχους, έχει απομακρυνθεί το γονίδιο *per4* το οποίο εκφράζει ένα πρωτεολυτικό ένζυμο. Με άλλα λόγια, το στέλεχος αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την έκφραση ενζύμων που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην πρωτεολυτική δράση του κυττάρου. Ο φαινότυπος είναι και σε αυτήν την περίπτωση Mut⁺, ευνοώντας την ανάπτυξη σε περιβάλλον παρουσίας μεθανόλης [103], [104], [105].

2.1.4 Εκφραζόμενα Ένζυμα

Τα νέα ένζυμα τα οποία επιλέχθηκαν να μελετηθούν, εκφράστηκαν στα δύο στελέχη του *P.pastoris* (X33 και SMD1168) και διακρίνονται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες ως προς την φύση της καταλυτικής του δράσης. Σε όλα τα ένζυμα που αναλύονται, έγινε βιοπληροφορική ανάλυση και ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με

άλλες πρωτεΐνες από τις βάσεις δεδομένων NR και Swissprot. Με βάση το ποσοστό ομολογίας αλλά και της τιμής e-value που υποδεικνύει την τυχαιότητα των όμοιων αμινοξέων μεταξύ των δύο αλληλουχιών, προέκυψαν συμπεράσματα ως προς τα λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά.

Στην πρώτη κατηγορία, είναι τέσσερα ένζυμα τα γονίδια των οποίων παραλήφθηκαν από τον ασκομύκητα *F. oxysporum* του στελέχους BPOP18. Οι κωδικές ταυτότητες, η περιγραφική τους ονομασία αλλά και οι αμινοξικές αλληλουχίες τους παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 2.8-2.11).

Πίνακας 2.8. Αναλυτικές πληροφορίες για την Αμιδάση.

Κωδική ταυτότητα	g011422-R1
Περιγραφή/Ονομασία	Amidohydrolase (Αμιδάση)
Αμινοξική Αλληλουχία:	
MLIHLFVANCLFISQVLRVTSNNVCSSKPDSPMPNGSWDSHLHVLPVRFPPPIPGSYE FGTYTAWDATIEETRLSCSHMVLIQPSVYGNNTLLIDTLKAFGNRALGVVFDVANTS AAQLQEWNDLGVVRGRLNFQSTGDAPPAKELRDMMQRYADAIRPFSWVLQIYIAMKDIPT IEPVIPTLGVKVIDHLGHPDIPKSNNGSGTALDPHTLSGFDSMLRLLKGGNTWVKVSAVY RLSQAPGPLYTDLDPIILEFSKAAPSRLVYASDWPHTRFEGLDIKPWTSHLLDLTGDRTE LRNKLFRDNAQELWIGNETASNSAMLHHHHHH	

Πίνακας 2.9. Αναλυτικές πληροφορίες για την Ενδοπεπτιδάση.

Κωδική ταυτότητα	g015794-R1
Περιγραφή/Ονομασία	Glutamyl-Endopeptidase (Ενδοπεπτιδάση)
Αμινοξική Αλληλουχία:	
MSASTAQPIFGRWSLASVDDKPAVNKLEIGAAADNVESALADDSRKPVLSADIRPGGKYYSIV KLQIKFEKQLSSDTRWAQGTGWLIADNLVVTAGHCAFHDHTYNGKAAKIRAYIGYNGKGSIGQ PDVQFRQGRKMVTTKEWITSDINRANDVSLILLEKPFNNVVPINYNPTVAFKDWNLGVVGY PADRTLNDPEGAQMYEMFKATTCDSLKTSLNMLEYTISSGAGQSGSPVLIDGQNTSIGHAVY GLGTKNSASVIRGRYGNYYKGMVDAVGSTEAPVTTVNGVEYIKTTQPEDAIDEPAGDEESF WDTFNNVNVNIGAKIGSTVLQVGTPLGPIGAPVAAVAGTALSVIGKLTSGKTEDAFDDELGPPA PTTADYKYHASRAILGEAALQTFMKMGPRQTHKYDMISKMQARYKETRHLVPKVAKLIVPAITE PALRIAVDSQAGENAPKTYPTMPSTEDALDSSAQPFVDGLLKTQVQNGEQEDFFGFLSGIAN TAANVVSTAGPIINAVGSIASAIGGAEDSFEPDSGDLSPHVEVLCHRALLGDAALHALMSVPA KDIQEEGFFGDLVNTVKNIGSTVIKVAPTVIKTVTPIVQSLVGAMNQSETGNSLGQDTQVRVT PLLPESILEPKKIKQIQLPKQEDGLAWEDEHHHHHH	

Πίνακας 2.10. Αναλυτικές πληροφορίες για την Πρωτεάση.

Κωδική ταυτότητα	g003039-R1
Περιγραφή/Όνομασία	Secreted Aspartic Protease (Πρωτεάση)
<p>Αμινοξική Αλληλουχία:</p> <p>MCQDRYLLSAPCGHSHKHEETWICKRAKSFSGILKLLRKKCEPVSVIAIVIDWCPACKV AFERIVDTIGAHVPVYNNFWDPRMLDRYWSIKSGNQRVREVDPKKEIGPVAFKSYDKIPYH KVRTGPNTAKRKEDSWELRALQAEVRRLPVCVWIEDYEHEPVETLEDQLNLCKVSLVET KKKAYNHGLVQSTRARVSSASQFSTLFSLLPIDFSTMRTFTLLASLAVGVSAGTVSAPIV KQRFHHESSLHKRDTLSLAALNNITGGGYAEFQVGTGPGQNISFQLDTGSSDTWLNSET DLCNSRTKQETIGPCMTTFKPKDSRTYELVDRDGFDTYLDTRSISGDYFNDTVTIDGKS IKQQRGLGLASESVRPTGLMGLGFSANVVANGTYPTIVENMVSQGLIDRAAFSLWLNLSA EQGTILFGGLDTKKFVGKLATLPLLPDPSTLNLTHFTVAFEGFEVKTPKGQEIKVDSLK DTTAILDSGATVCLLPEAQVEPIYKAFNVLSVEDVAIPFVDCAYGKDKGKGVSFDFKFDG KTISVPMSEMVINAFDPKQEIFDDPQVSSYFNDWDSVCMFGISPVSYGLTGGVTLGDT FLRSAYVVYDLANEQLGIAEANHNTDESNIKELKEKDTKFPDVTGVEGTSSEEDDNAAG HVSPASMTLVIVAAGIALTLHHHHHH</p>	

Πίνακας 2.11. Αναλυτικές πληροφορίες για την Τυροσινάση.

Κωδική ταυτότητα	g003332-R1
Περιγραφή/Όνομασία	Polyphenol Oxidase (Τυροσινάση)
<p>Αμινοξική Αλληλουχία:</p> <p>MLGKFLVAALAVVGGVNPVEAQQQNIQVFTGVPVTGGAAVPARKNINDMQKAGGPAWDLY MRAVRSMYDAKETDWKSYFQVGGIHKPFIQWNGGGGRSGNGWPGYCPHGESIFLTWHR PYVLLYEQILVEHAKRLANLYPSKYRQYVDAANSLRAAYWDWALDGIPAILTQQNVNVKVP NGSGLKTINMKNPLYTYNFPKDALNNKYGSWDEHRVRIYHCPAPDSFPSSANKLLRQRP YKQWVYDVMTRPTTFNQFASTGANGASLEQIHNAIHWDAASCAGQFLATEFSGFDPLFWLH HVNVDRWLWAYWQAMHPSQSTFTGSYSGGARYSTPQGTRITPSSPLNPFYRSRGNFHTSDT VKSIGFGYTYAGLEYWHMSASQLSNSAKTTINRLYGSGSSRRRDVEERGLIEERAGANT TRYFANVQLDVTEVERPAQVNVVYVSGKLVGGLVVMRQPAEGIIHGFSADQAADAPQLLA ACSPTKVADAVTSGLQVEIVKLDGSKIDISTVPSLKLSDDDVAYTPPAEEDDLPVYGT TPR TQPAKAVALTNAKALKAVSACANKLPSFNPPVHHHHHH</p>	

Στην δεύτερη κατηγορία ενζύμων που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι τρεις μη ειδικές υπεροξειγενάσες (Unspecific Peroxidases-UPOs), δηλαδή οξειδωτικά ένζυμα που απαιτούν ως συμπράγοντα την αίμη. Τα γονίδια που εκφράζουν τα συγκεκριμένα ένζυμα προέρχονται από τον νηματοειδή μύκητα

Aspergillus parasiticus του στελέχους MM36. Τα στοιχεία για τα το κάθε ένζυμο παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακες 2.12-2.14).

Πίνακας 2.12. Αναλυτικές πληροφορίες για την υπεροξυγενάση Astra551984.

Κωδική ταυτότητα	Astra551984
Όνομασία	Astra55
Αμινοξική Αλληλουχία:	
EFDPGGHEFRAPGPFDSRSPCPGLNALANHGYPDRDGKNDYEMINKAAQAAYNFESGFYID AVNMVFEFNISTTNRPNETFHLRDLARHDTIEADGSLTRNDIYFGDDLHFDATVWEPVAKDL GLDHYRDVDSFVTVDTAAKATQNRVGLAMSANPQFNASELWKQFQYGTALYLLTLWDNDH NAVPKPWVKALMGEDRIPYKEGYTKGNVTKT GKRIQAMNKAVRDAVGLKSVDHHHHHH	

Πίνακας 2.13. Αναλυτικές πληροφορίες για την υπεροξυγενάση Astra579462

Κωδική ταυτότητα	Astra579462
Όνομασία	Astra57
Αμινοξική Αλληλουχία:	
EFQKIPWSPPGDDVRSPCPVLNALANHDILQHDGKDITQQDTVRAMDALHVDEELSNTLF AAALKTNLTPNATTFSLDDLHNNIEHDGSLSRGDFYFGDNHFSNQTLFDQVKSZYWTEPLIDL HLGAKARLAGVNRSKATNPTFDLSGFRFRSYAQTATYILVFGDKVSGTVNKTWIEYLFKERLP IELGWEKRENPISTSDLDSMIERVMEATKEIE NSQEMVDHHHHHH	

Πίνακας 2.14. Αναλυτικές πληροφορίες για την υπεροξυγενάση Astra585095.

Κωδική ταυτότητα	Astra585095
Όνομασία	Astra58
Αμινοξική Αλληλουχία:	
EFRLPTEGQLSNRRQASIPAGHPPVHWKPAGPGDVRAPCPMLNTLANHGYPHDGKNITEE HTIRALKVALNIEEELSQYLFQEALTTNPAENATTFSLNDSRHNILEHDASLSRLDHYFGDNHD FNQKIFDQTRSYWPDVVISVQAAANAREARVKASNATNPTFALSELGLAFGYGETAAYIIILGN KTTGLVNRSWVEYLFENERLPSELGWVKREDPISLSDLENMLQQVFNATGNSEETKLDMIKR GDFHIGRRSVDHHHHHH	

Για διευκόλυνση την ανάλυση των τριών αυτών ενζύμων, από εδώ και στο εξής θα αποκαλούνται με τις ονομασίες Astra55, Astra57 και Astra58.

Όλα τα παραπάνω ένζυμα εκφράζονται από γονίδια τα οποία προέρχονται από ευκαριωτικούς οργανισμούς, ήτοι υπόκεινται στις απαραίτητες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και την αναγκαία επεξεργασία των ιντρονίων από τα μετασχηματιζόμενα mRNA. Για τον λόγο αυτό η πλατφόρμα έκφρασης επιλέχθηκε

να είναι ευκαριωτικός οργανισμός. Τέλος, σημειώνεται πως όλα τα γονίδια συντέθηκαν χημικά από την εταιρεία την εταιρεία GenScript.

2.1.5 Εμπορικά Ένζυμα

Στο πλαίσιο των εφαρμογών και των μελετών συνεργιτισμού με τα εκφραζόμενα ένζυμα χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *Savinase*[®] 16L (Σαβινάση) της Novozymes. Η συγκέντρωση του εμπορικού προϊόντος όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο Bradford είναι 7,0mg/mL.

Η σαβινάση είναι μία σουμπτιλίσίνη (Protease Subtilisin) [106], δηλαδή ένα πρωτεολυτικό ένζυμο με προέλευση τον προκαρυωτικό μικροοργανισμό *Bacillus subtilis* [107], ένα θετικό κατά gram βακτήριο [108]. Οι σουμπτιλίσίνες, αποτελούν μέρος μιας ευρύτερης οικογένειας πρωτεολυτικών ενζύμων που έχουν το αμινοξύ σερίνη στο καταλυτικό τους κέντρο και υδρολύουν τον πεπτιδικό δεσμό μιας πρωτεΐνης μέσω πυρηνόφιλης αλληλεπίδρασης [109].

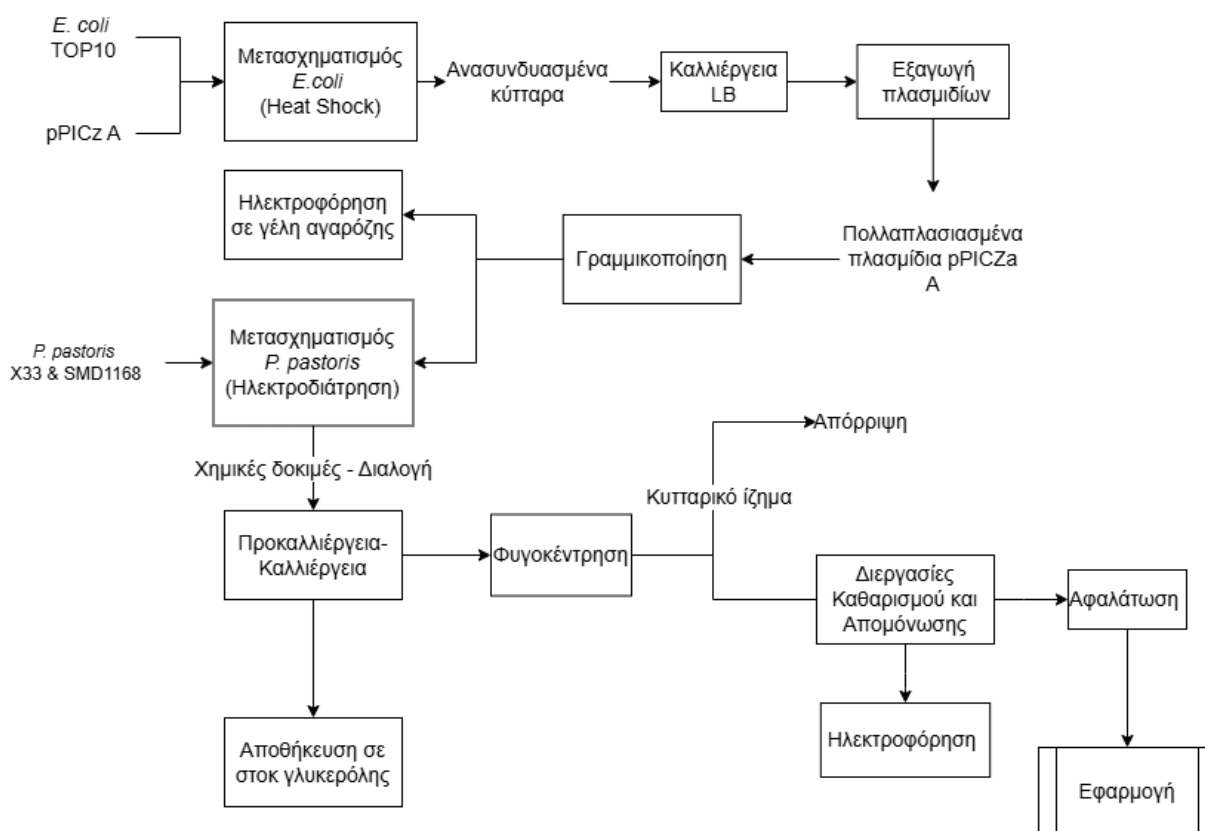
2.1.6 Μηχανική επεξεργασία συνθετικών πολυμερών πριν τις ενζυμικές εφαρμογές

Όλα τα εμπορικά πολυμερικά υλικά που αναφέρονται στην ενότητα προμηθεύτηκαν σε μορφή σφαιριδίων (pellets) και πριν την κατεργασία τους από τα διάφορα ένζυμα αλέστηκαν σε σκόνη (μέγεθος σωματιδίων <500 μm) μέσω της συσκευής Pulverisette 14 (Fritsch Corp., Idar-Oberstein, Germany) [110].

Η μελέτη της δραστηριότητας των εκφραζόμενων ενζύμων (αμιδάση, πρωτεάση, τυροσινάση και ενδοπεπτιδάση) καθώς και ο συνεργητισμός τους με την κουτινάση και το εμπορικό ενζυμικό προϊόν σαβινάση υλοποιήθηκε στην πολυουρεθάνη (Polyurethane - PU). Ειδικότερα, πρόκειται για αιθερικής βάσης θερμοπλαστική πολυουρεθάνη (Laripur 7560), η οποία προμηθεύτηκε από την εταιρεία Coim group (Milano, Italy). Επιπλέον, έγινε και ο έλεγχος της καταλυτικής τους δράσης στην αλειφατική διασπορά πολυεστέρα - πολυουρεθάνης Impranil[®] DLN-SD η προμήθεια της οποίας έγινε από το Covestro Solution Center (Γερμανία) [110]. Αντίστοιχα, οι υπεροξυγενάσες (Astra55, Astra57 και Astra58) δοκιμάστηκαν σε σκόνη πολυαιθυλενίου (Polyethylene - PE) η οποία παραλήφθηκε από την εταιρεία Exxon Mobil (U.S.A).

2.2 Πειραματικές Τεχνικές και Μέθοδοι

Ο πειραματικός σχεδιασμός για την έκφραση των νέων ενζύμων αποτελείται από μια σειρά διεργασιών που απαιτούνται για την παραλαβή του τελικού βιοτεχνολογικού προϊόντος και την εφαρμογή του. Το γονίδιο των εκφραζόμενων ενζύμων είναι ενσωματωμένο στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pPICZα A. Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας έκφρασης φέρει αντίσταση στο αντιβιοτικό Ζεοσίνη, ενώ εμπεριέχει εξειδικευμένα γονίδια που ενισχύουν την κλωνοποίηση σε προκαρυωτικό και την ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικό οργανισμό (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α). Το σύνολο των διαδικασιών απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα ροής (Εικόνα 2.1) και αναλύονται διεξοδικά στα παρακάτω κεφάλαια.



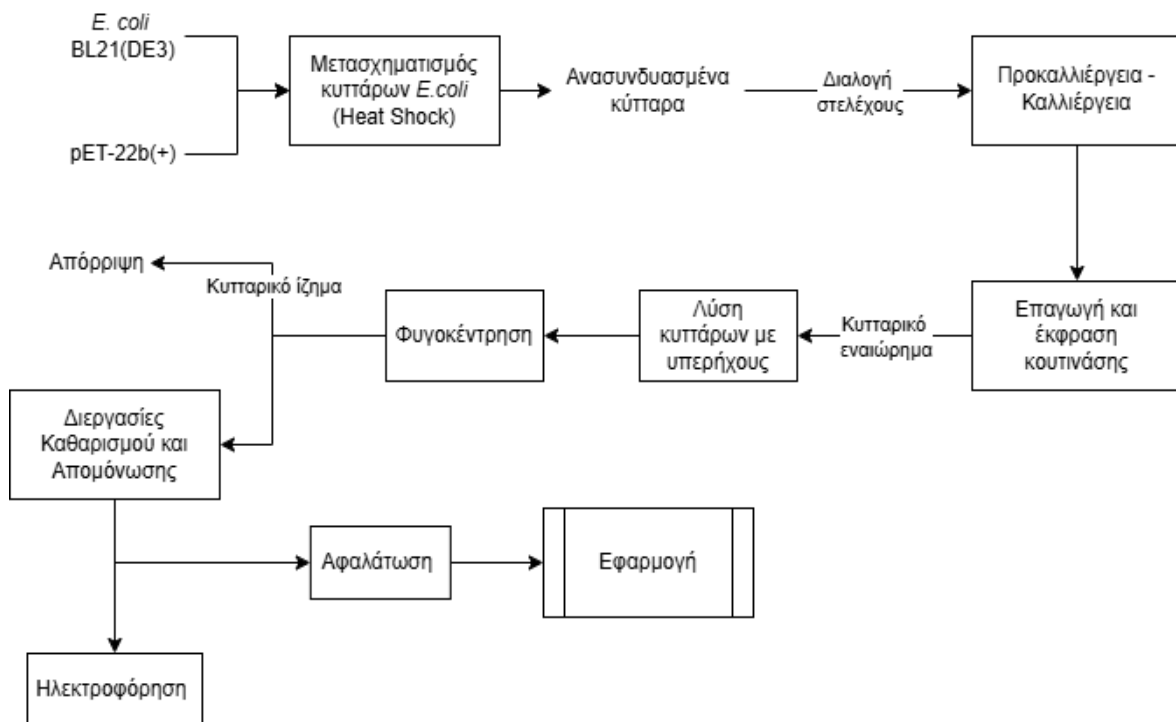
Εικόνα 2.1. Διάγραμμα ροής του πειραματικού σχεδιασμού έκφρασης των νέων ενζύμων.

Αντίστοιχα, για την έκφραση της ήδη χαρακτηρισμένης κουτινάσης [98] το σύνολο των διεργασιών που εφαρμόστηκαν παρουσιάζονται σχηματικά στο παρακάτω διάγραμμα ροής (Εικόνα 2.2). Η διαδικασία περιέχει τις ίδιες βασικές αρχές με την έκφραση των νέων ενζύμων. Οι κύριες διαφορές είναι:

- Η έκφραση της πρωτεΐνης γίνεται στο *E.coli* BL21(DE3) και όχι σε ευκαρυωτικό μύκητα όπως ο *P. pastoris*, επομένως δεν υφίστανται ηλεκτροδιάτρηση.
- Πραγματοποιείται επαγωγή της έκφρασης.
- Δεδομένου, η έκφραση της κουτινάσης γίνεται σε προκαρυωτικό οργανισμό και επομένως εσωκυτταρικά απαιτείται η λύση των κυττάρων με υπερήχους.

- Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης είναι ο pET-22b(+) που φέρει αντίσταση το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α).

Οι κατάντη διεργασίες, όπως και προηγουμένως ακολουθούν σε γενικές γραμμές την ίδια ροή, δηλαδή καθαρισμός (φυγοκέντρηση, διήθηση υπό κενό), συμπύκνωση (με υπερδιήθηση), απομόνωση (με μεταλλοχηλική χρωματογραφία σε στήλη Talon®). Η διαδικασία ολοκληρώνεται με ηλεκτροφόρηση και αφαλάτωση (με στήλη PD-10) για την παραλαβή του τελικού βιοτεχνολογικού προϊόντος.



Εικόνα 2.2. Διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας έκφρασης της κουτινάσης.

2.2.1 Βιοπληροφορική Ανάλυση

Πρωταρχικό βήμα για την κατανόηση των χαρακτηριστικών και της καταλυτικής δράσης των μελετώμενων ενζύμων είναι η βιοπληροφορική τους ανάλυση. Δεδομένης της αμινοξικής τους αλληλουχίας και την χρήση εξειδικευμένων λογισμικών είναι δυνατή η εύρεση χρήσιμων πληροφοριών. Ειδικότερα, η εφαρμογή ProtParam του λογισμικού Expassy, Swiss Institute of Bioinformatics [111], εξάγει ως αποτέλεσμα τις εξής φυσικοχημικές ιδιότητες του ενζύμου:

1. Μοριακό βάρος
2. Θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο
3. Γραμμομοριακή απορροφητικότητα στα 280nm

Η υπολογιστική ανάλυση στηρίζεται στις βάσεις δεδομένων και στην ανάλυση πρωτεϊνών με παρόμοια αλληλουχία.

Επιπλέον, ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία που αξιοποιήθηκαν είναι Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) και συγκεκριμένα το BLASTp που αφορά πρωτεΐνες, του National Center for Biotechnology Information (NCBI) [112]. Ο αλγόριθμος, έχει την δυνατότητα να ευθυγραμμίσει την αλληλουχία της πρωτεΐνης με αλληλουχίες άλλων γνωστών πρωτεϊνών που αντλεί από μεγάλες βάσεις δεδομένων. Η αρχή της λειτουργίας, έγκειται στο γεγονός ότι όσο μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας εμφανίζουν και ταυτόχρονα μικρότερο e-value, τόσο πιθανότερο είναι οι δύο υπό σύγκριση πρωτεΐνες να εμφανίζουν παρόμοιες βιοχημικές και λειτουργικές συμπεριφορές. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται μια εκτίμηση της συμπεριφοράς της μελετώμενης πρωτεΐνης *in silico* προσφέροντας μια κατεύθυνση στον πειραματικό σχεδιασμό.

Τέλος, η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών, υλοποιήθηκε με την χρήση του αλγορίθμου AlphaFold της DeepMind [113], [114].

2.2.2 Μετασχηματισμός των κυττάρων *E.coli*

Η εισαγωγή του πλασμιδιακού φορέα του γονιδίου στα κύτταρα του *E.coli* αποτέλεσε την αρχή των πειραματικών σχεδιασμών. Στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν μετασχηματισμοί στα στελέχη TOP10 και BL21(DE3), για τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου, ώστε να προκύψει ύστερα από εξαγωγή μεγαλύτερη ποσότητα για εργασία και για την ετερόλογη έκφραση της κουτινάσης αντίστοιχα.

2.2.2.1 Θρεπτικό μέσο Lurio-Bertani Medium (LB)

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκτέλεση του μετασχηματισμού ήταν το Low Salt Lurio-Bertani Medium (LB) (Πίνακας 2.15).

Πίνακας 2.15 Θρεπτικό μέσο LB για την ανάπτυξη κυττάρων *E. coli*

Συστατικό	Συγκέντρωση
Άλας Χλωριούχου Νατρίου (NaCl)	1% w/v
Τρυπτόνη (Tryptone)	1% w/v
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract)	0,5% w/v
Αγαρόζη (Plant Base Agar)*	1,5% w/v
Ζεοσίνη (Zeocin) 100 mg/mL**	25 µg/mL
Αμπικιλίνη (Ampicillin) 100 mg/mL***	100 µg/mL

*Η αγαρόζη προστίθεται μόνο για τον σχηματισμό στερεών καλλιιεργειών.

**Η Ζεοσίνη χρησιμοποιήθηκε για την άμεση επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* TOP10 για τον πολλαπλασιασμό του επιθυμητού γονιδίου.

***Η Αμπικιλίνη ήταν το κριτήριο επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* BL21(DE3) για την έκφραση της κουτινάσης.

Αρχικά γίνεται η διάλυση του άλας, της τρυπτόνης και του εκχυλίσματος ζύμης σε απιονισμένο νερό (dH₂O) και ρυθμίζεται το pH του υδατικού διαλύματος σε 7,5 με προσθήκη NaOH 1N. Για τον σχηματισμό στερεών καλλιιεργειών σε τρυβλία Petri προστίθεται στο θρεπτικό μέσο άγαρ στην ανάλογη συγκέντρωση. Η αποστείρωση του θρεπτικού γίνεται σε αυτόκλειστο στους 121°C για 20 λεπτά (ή στους 109°C για 40 λεπτά). Σημειώνεται ότι, το αντιβιοτικό (Ζεοσίνη ή Αμπικιλίνη ανάλογα το πλασμίδιο) προστίθεται αφού η θερμοκρασία του θρεπτικού μειωθεί επαρκώς ώστε να μην υποστεί αποικοδόμηση.

2.2.2.2 Πρωτόκολλο μετασχηματισμού με θερμικό σοκ (Heat shock)

Αρχικά, παρασκευάζεται ποσότητα θρεπτικού μέσου LB (βλ. Πίνακας 2.15) για τον σχηματισμό υγρών και στερεών καλλιιεργειών. Η αναλογία παρασκευής της υγρής καλλιιεργείας είναι 300μL LB ανά 100μL ανασυνδυασμένων κυττάρων. Ο σκοπός των υγρών καλλιιεργειών είναι η άμεση ανάρρωση των κυττάρων ύστερα από την θερμική καταπόνηση που υπόκεινται.

Οι στερεές καλλιιεργείες προορίζονται για την παρασκευή τρυβλίων (25mL θρεπτικού ανά τρυβλίο) στα οποία θα αναπτυχθούν και θα επιλεγθούν τα ανασυνδυασμένα κύτταρα. Κατά την ψύξη του αποστειρωμένου πλέον LB, προστέθηκε και το απαραίτητο αντιβιοτικό ανάλογα με το πλασμίδιο που επιλέχθηκε για τον μετασχηματισμό. Η προσθήκη έγινε προτού λάβει χώρα ο σχηματισμός του πηκτώματος.

1^ο Βήμα

Παραλαβή κυττάρων *E.coli* από την υπερκατάψυξη (~ - 80°C) και ανάμειξη με το διάλυμα του πλασμιδίου που ήταν αποθηκευμένο στην κατάψυξη. Η αναλογία ανάμειξης είναι 1μL πλασμιδίου ανά 100μL κυτταρικού αιωρήματος. Η μεταφορά έγινε μέσω αυτόματων πιπετών σε ένα Eppendorf των 1,5mL.

2^ο Βήμα

Επώαση του Eppendorf σε πάγο για 30 λεπτά.

3^ο Βήμα

Εφαρμογή της θερμικής καταπόνησης των κυττάρων (Heat shock). Μεταφορά του Eppendorf σε προθερμασμένο επωαστήρα στους 42°C χωρίς ανάδευση για 1 λεπτό και 20 δευτερόλεπτα. Μέσω αυτής της διαδικασίας ανοίγουν οι πόροι της κυτταρικής μεμβράνης και εισέρχεται το πλασμίδιο στο γονιδίωμα του κυττάρου. Η αυστηρή τήρηση της χρονικής διάρκειας είναι κρίσιμη για την υψηλή απόδοση του μετασχηματισμού.

4^ο Βήμα

Ταχεία μεταφορά του Eppendorf σε πάγο, για την ακαριαία μείωση της θερμοκρασίας.

5^ο Βήμα

Υπό ασηπτικές συνθήκες (εργασία κοντά στην φλόγα υγραερίου ή κατά την λειτουργία ροής φιλτραρισμένου αέρα), στο περιεχόμενο του Eppendorf μεταφέρεται η πρώτη παρτίδα LB που παρασκευάστηκε. Σκοπός αποτελεί η ανάρρωση των ταλαιπωρημένων κυττάρων ύστερα από την επίπονη θερμική διεργασία.

6^ο Βήμα

Επώαση του περιεχομένου του Eppendorf για 1 ώρα στους 37°C με ήπια ανάδευση (400rpm).

7^ο Βήμα

Μεταφορά και κατανομή σε τρυβλία LB το οποίο περιέχει το αντιβιοτικό επιλογής και επώαση σε φούρνο στους 37°C.

Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* γίνεται με τον εντοπισμό των αποικιών που έχουν επιβιώσει την επίδραση του αντιβιοτικού στα τρυβλία Petri και έχουν αναπτυχθεί σε άγαρ θρεπτικού μέσου. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται ως υψηλής απόδοσης και για την εξοικονόμηση της ποσότητας των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκε αναλογία 0,8μL ανά 100μL κυτταρικού αιωρήματος.

2.2.3 Προετοιμασία πλασμιδίου για ηλεκτροδιάτρηση

Λόγω της φύσης του ευκαρυωτικού κυττάρου απαιτούνται ορισμένες προκατεργασίες του πλασμιδίου προκειμένου να επέλθει τελικά ο μετασχηματισμός. Αρχικά, απαιτείται η κλωνοποίηση του πλασμιδίου, καθώς το εμπορικό προϊόν παρέχεται σε μικρή ποσότητα που δεν επαρκεί για την μελέτη των ενζύμων. Έπειτα, ακολουθεί η παραλαβή του πολλαπλασιασμένου γονιδίου και η γραμμικοποίηση του με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τέλος, τα κύτταρα *P. pastoris* προετοιμάζονται για την ηλεκτροδιάτρηση και την υποδοχή του πλασμιδίου.

2.2.3.1 Διαλογή ανασυνδυασμένων κυττάρων *E.coli* TOP10 και πολλαπλασιασμός του γονιδίου

Ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου, απαιτεί αρχικά την επιλογή των αποικιών που σχηματίστηκαν στις στερεές καλλιέργειες ύστερα από το θερμικό σοκ των κυττάρων *E.coli* (Κεφ. 2.2.2.2). Η επιβίωση τους στο άγαρ με την Ζεοσίνη υποδεικνύει ότι έχει πραγματοποιηθεί επιτυχής μεταφορά του πλασμιδίου και επομένως του γονιδίου στο κύτταρο.

Αρχικά, παρασκευάζονται 5mL από το θρεπτικό LB (Πίνακας 2.15) ανά εξεταζόμενο γονίδιο, χωρίς την προσθήκη αγαρόζης, για τον σχηματισμό υγρών καλλιεργειών και αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο για 20 λεπτά στους 121°C. Έπειτα, με την ψύξη του θρεπτικού προστίθεται η Ζεοσίνη (συγκέντρωσης στοκ 100mg/mL) και κατανέμεται ο όγκος σε επιμέρους πλαστικούς περιέκτες Falcon των

50mL. Στην συνέχεια από τα τρυβλία Petri των μετασηματισμένων κυττάρων *E. coli*, επιλέγεται μια μεμονωμένη αποικία από το κάθε γονίδιο και εμβολιάζονται οι περιέκτες με το θρεπτικό. Τέλος, οι περιέκτες τοποθετούνται στους κατάλληλους επωαστήρες, στους οποίους τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στους 180rpm. Κατά την επώαση, επιτυγχάνεται κλωνοποίηση των κυττάρων και επομένως πολλαπλασιασμός του γονιδίου.

2.2.3.2 Εξαγωγή των πλασμιδίων από τα κύτταρα του *E.coli* TOP10

Η απομόνωση των πλασμιδίων και των συνολικά 7 νέων ενζύμων που μελετώνται, υλοποιήθηκε μέσω του Plasmid Extraction Kit, «NucleoSpin® Plasmid MACHERY-NAGEL. Το πακέτο αυτό, περιλαμβάνει τα απαραίτητα αντιδραστήρια καθώς και συνοδεύεται με το πρωτόκολλο χρήσης. Τα στάδια απομόνωσης αναλύονται εκτενώς επακολούθως.

- 1) Μεταφορά 1,5mL από την κάθε υγρή καλλιέργεια (που αντιστοιχεί στην εκάστοτε πρωτεΐνη) σε Eppendorf των 1,5mL και φυγοκέντρηση με 11.000 x g για 30 δευτερόλεπτα. Έπειτα, γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού με ιδιαίτερη προσοχή να μην παρασυρθούν τα κύτταρα.
- 2) Ακολουθεί η χημική λύση των κυττάρων με κατεργασία ρυθμιστικών διαλυμάτων του kit με τις κωδικές ονομασίες A1, A2, A3, A4, AW και AE.
 - a. Αρχικά γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων με προσθήκη 250μL από το A1, το οποίο συμπεριλαμβάνει την RNAάση, και ανάδευση σε αναδευτήρα σχηματισμού δίνης (Vortex).
 - b. Προσθήκη 250μL ρυθμιστικού διαλύματος κυτταρικής λύσης A2 το οποίο περιέχει και υδροξείδιο του νατρίου 0,5-2,0%. Ανακίνηση του περιέκτη 6-8 φορές. Η προσθήκη του διαλύματος συνεπάγεται την χρώση του περιεχόμενου με ένα βαθύ μπλε χρώμα
 - c. Προσθήκη 300μL ρυθμιστικού διαλύματος ουδετεροποίησης A3 το οποίο περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη (Guanidine hydrochloride) σε συγκέντρωση 36-50%. Ακολουθεί ανακίνηση του περιέκτη 6-8 φορές, στο τέλος της οποίας πραγματοποιείται αποχρωματισμός.
- 3) Φυγοκέντρηση 11.000 x g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για την απομάκρυνση των προϊόντων λύσης του κυττάρου.
- 4) Σε Eppendorf των 2,0mL εφαρμόζεται υποδοχέας ο οποίος περιέχει ρητίνη. Ειδικότερα, τοποθετείται η στήλη NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) και προστίθεται στον υποδοχέα στήλης το υπερκείμενο υγρό από το στάδιο 3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000 x g και απόχυση του υγρού που διαπέρασε την ρητίνη. Μέσω αυτής της διαδικασίας το DNA που βρισκόταν στο υπερκείμενο υγρό του βήματος 3, δένεται στην ρητίνη.

- 5) Ακολουθεί η κατεργασία της ρητίνης με προσθήκη 500μL προθερμασμένου στους 50°C ρυθμιστικού διαλύματος AW και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000 x g. Η προσθήκη του διαλύματος αυτού, είναι προαιρετική αλλά βελτιώνει την απόδοση της εξαγωγής.
- 6) Προσθήκη 600μL ρυθμιστικού διαλύματος A4 στο οποίο έχει προστεθεί και αιθανόλη. Στην συνέχεια το Eppendorf με την στήλη ρητίνης, φυγοκεντρείται στους 11.000 x g για 1 λεπτό και απομακρύνεται το υγρό διαπέρασμα (Flow Through) της μεμβράνης.
- 7) Στην συνέχεια επιτυγχάνεται η ξήρανση της ρητίνης με απλή φυγοκέντρηση στα 11.000 x g για 2 λεπτά.
- 8) Τέλος, τα μόρια DNA που έχουν προσδεθεί στην ρητίνη εκλούνται με την προσθήκη 50μL από το ρυθμιστικό διάλυμα AE (5mM Tris/HCl, pH=8,5). Μετέπειτα, λαμβάνει χώρα επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000 x g ώστε το υγρό διάλυμα μαζί με το DNA να διαπεράσει την ρητίνη. Σημειώνεται, πως η στήλη ρητίνης μεταφέρεται και εφαρμόζεται σε καινούριο Eppendorf των 1,5mL προκειμένου να παραληφθεί το τελικό προϊόν σε καθαρό περιέκτη.

Το αποτέλεσμα της διεργασίας αυτής είναι η παραλαβή 50μL πλασμιδίων από το κάθε γονίδιο. Το προϊόν εξαγωγής αποθηκεύεται στην κατάψυξη.

2.2.3.3 Γραμμικοποίηση πλασμιδίων

Η εισαγωγή των πλασμιδίων στο γονιδίωμα της *P. pastoris* προϋποθέτει αρχικά την γραμμικοποίηση τους (πέψη). Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με την χρήση περιοριστικών ενζύμων και πιο συγκεκριμένα με τις ενδονουκλεάσες. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία στο κυκλικό μόριο DNA την οποία υδρολύουν.

Η προέλευσή τους είναι βακτηριακή, καθώς εκφράζονται από τα βακτήρια για να προστατευτούν από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως οι βακτηριοφάγοι. Πρακτικά τα ένζυμα αυτά, υδρολύουν το DNA του φάγου, ενώ το γονιδίωμα του ίδιου του βακτηρίου δεν επηρεάζεται από την δράση των ενζύμων, λόγω της μεθυλίωσης που πραγματοποιείται στις αλληλουχίες αναγνώρισης από τις ενδονουκλεάσες [115].

Αρχικά παραλαμβάνονται 40μL από το πλασμίδιο που επιδιώκεται να γραμμικοποιηθεί σε ένα PCR Eppendorf. Ύστερα, προστίθενται σε αυτό: 2,5μL υπερκάθαρου νερού (mQ H₂O), 5μL από το ρυθμιστικό διάλυμα για την δράση του περιοριστικού ενζύμου και 2,5μL από το την ενδονουκλεάση. Ως περιοριστικά ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα SacI και PmeI. Η ανάμειξη των παραπάνω, ακολουθείται από επώαση στους 37°C για 4 ώρες.

Το τελικό προϊόν, δηλαδή τα γραμμικά πλέον πλασμίδια, αποθηκεύονται για την ηλεκτροδιάτρηση, δηλαδή τον μετασχηματισμό των κυττάρων *P.pastoris*. Τονίζεται πως στα μέσα της πέψης (2 ώρες) πραγματοποιείται διαγνωστικός έλεγχος της διεργασίας με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης.

2.2.3.4 Έλεγχος γραμμικοποίησης πλασμιδίων μέσω ηλεκτροφόρησης σε γέλη αγαρόζης

Η παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης προϋποθέτει τον σχηματισμό του διαλύματος TBE. Η πλήρης σύσταση του συγκεκριμένου διαλύματος παρουσιάζεται παρακάτω (Πίνακας 2.16).

Πίνακας 2.16. Σύσταση διαλύματος TBE.

Συστατικό	Συγκέντρωση
Tris	0,1M
Βορικό οξύ (Boric acid)	0,1M
Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA)	0,2mM

Στο διάλυμα αυτό διαλύεται αγαρόζη (Plant Based Agar) σε συγκέντρωση 1% w/v. Η διάλυση απαιτεί θέρμανση και το πήκτωμα σχηματίζεται με την ψύξη του διαλύματος.

Η απόδοση της πέψης είναι κρίσιμο στάδιο στον πειραματικό σχεδιασμό για την ετερόλογη έκφραση μια πρωτεΐνης σε ευκαριωτικό ξενιστή καθώς ο αριθμός των κυττάρων στα οποία θα γίνει η σωστή εισαγωγή του πλασμιδίου ισοδυναμεί με την ποσότητα της πρωτεΐνης που θα εκφραστεί. Με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης μπορεί εξαχθεί συμπέρασμα για την απόδοση της γραμμικοποίησης. Αυτό ισχύει διότι, η ύπαρξη δύο μπαντών ανά δείγμα υποδεικνύει ότι υπάρχουν ακόμα κυκλικά μόρια DNA τα οποία δεν γραμμικοποιήθηκαν.

Σχηματισμός πηκτώματος αγαρόζης

Το πρώτο στάδιο στην διαδικασία ελέγχου αποτελεί η παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση απαιτεί 55mL TBE. Εφόσον η θερμοκρασία του διαλύματος μειωθεί αισθητά προστίθενται 4μL της χρωστικής ουσίας Midori Green η οποία έχει την ιδιότητα του φθορισμού και επιτρέπει τον εντοπισμό των μορίων DNA στη γέλη.

Παράλληλα στήνεται η διάταξη οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αποχύνεται το τελικό διάλυμα στο κελί προτού υποστεί πλήρης ψύξη και σχηματισμός της γέλης. Επιπλέον, τοποθετείται το ειδικό καλούπι στην μία άκρη της γέλης, προκειμένου να σχηματιστούν οι υποδοχείς των δειγμάτων ηλεκτροφόρησης.

Προετοιμασία και φόρτωση δειγμάτων

Επόμενο βήμα, αποτελεί η προετοιμασία των δειγμάτων γενετικού υλικού προς ηλεκτροφόρηση. Λαμβάνονται 5μL από το προϊόν της διαδικασίας της πέψης που προκύπτει ύστερα από δύο ώρες δράσης των ενζύμων και προστίθεται σε ένα PCR Eppendorf μαζί με 1,5μL πυκνού ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer 10x) και 8,5μL mQ H₂O.

Εν συνεχεία, αφού έχει επιτευχθεί πλήρης ψύξη της γέλης, αφαιρείται το καλούπι και τα δείγματα φορτώνονται στους υποδοχείς. Μεταξύ των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση, τοποθετείται και ένα δείγμα αναφοράς που περιέχει γνωστά ζεύγη βάσεων FastGene 1kb DNA Marker Plus, NIPPON Genetics EUROPE.

Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

Το κελί ηλεκτροφόρησης τίθεται σε λειτουργία με την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων στους κατάλληλους υποδοχείς και εφαρμόζεται τάση 55mV για μία ώρα. Στο διάστημα αυτό, τα μόρια DNA, εφόσον είναι γραμμικά, κινούνται διαμέσου των πόρων του πηκτώματος λόγω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο (άνοδο).

Με το πέρασμα της μίας ώρας το κελί με το πήκτωμα μεταφέρονται σε ειδική βάση η οποία εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Η χρωστική ουσία Midori Green η οποία έχει προσδεθεί με τα μόρια DNA φωσφορίζει και με αντιστοιχία με το δείγμα αναφοράς, επιβεβαιώνεται ο αριθμός των ζευγών βάσεων του πλασμιδίου.

2.2.3.5 Καθαρισμός προϊόντος γραμμικοποίησης

Η ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) είναι μια διαδικασία ιδιαίτερα επίπονη για τα κύτταρα. Το προϊόν γραμμικοποίησης είναι απαραίτητο να υποστεί αφαλάτωση, διότι η ύπαρξη αλάτων συνεπάγεται σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας κατά την διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος αυξάνοντας τις πιθανότητες κυτταρικού θανάτου. Η αφαλάτωση υλοποιήθηκε μέσω του PCR clean-up kit [116], το οποίο περιείχε τα απαραίτητα ρυθμιστικά διαλύματα με τις κωδικές ονομασίες NT1 και NT3 καθώς, το πρωτόκολλο χρήσης καθώς και στήλες ρητίνης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column που εφαρμόζονται σε Eppendorf των 2,0mL.

- Προσθήκη 50μL από το διάλυμα γραμμικοποιημένων πλασμιδίων σε ένα Eppendorf μαζί με 100μL από το ρυθμιστικό διάλυμα NT1 (αναλογία όγκων 1:2)
- Τοποθέτηση του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column σε Eppendorf των 2,0mL και φόρτωση του παραπάνω διαλύματος. Φυγοκέντρηση στα 11.000 x g για 30 δευτερόλεπτα και απομάκρυνση του διαπεράσματος.
- Προσθήκη στην στήλη 700μL από το ρυθμιστικό διάλυμα NT3 και φυγοκέντρηση στα 11.000 x g για 30 δευτερόλεπτα ακολουθούμενη από απομάκρυνση του διαπεράσματος.
- Ξήρανση της στήλης με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες χωρίς την προσθήκη κάπου διαλύματος.
- Τέλος, γίνεται η έκλυση του DNA με 30μL dH₂O αντί με ρυθμιστικό διάλυμα NE όπως αναγράφεται στο συμβατικό πρωτόκολλο ώστε να υπάρχει πλήρης απουσία αλάτων στο τελικό προϊόν.

2.2.4 Μετασχηματισμός κυττάρων *P. pastoris*

2.2.4.1 Θρεπτικό μέσο YPD και YPDS

Το μέσο YPD (Yeast extract Peptone Dextrose Medium) είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη της βιομάζας και την ασφαλή αποθήκευση (Πίνακας 2.17). Στην περίπτωση που συμπεριλαμβάνεται και η σορβιτόλη, το μέσο ονομάζεται YPDS. Η αποστείρωση του θρεπτικού μέσου πραγματοποιείται στους 109°C για 40 λεπτά καθώς η παρουσία γλυκόζης (δεξτρόζης) σε υψηλότερη θερμοκρασία συνεπάγεται καραμελλοποίηση.

Πίνακας 2.17. Σύσταση του θρεπτικού μέσου YPD/YPDS.

Συστατικό	Συγκέντρωση
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract)	1% w/v
Πεπτόνη (Peptone)	2% w/v
Δεξτρόζη (Dextrose)	2% w/v
Αγαρόζη (Plant Base Agar)*	2% w/v
Ζεοσίνη (Zeocin) 100 mg/mL**	100 µg/mL
Σορβιτόλη (Sorbitol)***	1 M

*Η αγαρόζη προστίθεται αποκλειστικά για τον σχηματισμό στερεών καλλιέργειών

**Η προσθήκη της Ζεοσίνης πραγματοποιείται μόνο για την επιλογή των μετασχηματισμένων στελεχών, μετά την ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων

*** Η σορβιτόλη χρησιμοποιείται για την επώαση των κυττάρων ύστερα από την ηλεκτροδιάτρηση.

Η διεργασία ηλεκτροδιάτρησης, είναι ικανή να προκαλέσει ωσμωτική πίεση στα κύτταρα, καθώς το πλασμίδιο εισάγεται μέσω πόρων στη μεμβράνη της. Η κατεργασία με σορβιτόλη είναι κρίσιμη για την ορθή εισαγωγή του πλασμιδίου, καθώς αποτελεί μια πολυόλη και εκτός από το γεγονός ότι συνεισφέρει ως μια ακόμη πηγή άνθρακα για τον μεταβολισμό των κυττάρων, μπορεί να συσσωρευτεί σε αυτά και να δημιουργήσει μια υψηλότερη ωσμωτική πίεση από το περιβάλλον της. Αυτό βοηθά στην προστασία των κυττάρων από την αφυδάτωση, μειώνοντας τον κίνδυνο κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον, αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, σταθεροποιώντας τη δομή και μειώνοντας τη διαπερατότητά της, ώστε μετά το πέρας της διεργασίας να μην διαρρεύσει γενετικό υλικό [117].

2.2.4.2 Προετοιμασία και ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων *P. pastoris*

Πρωταρχικό βήμα αποτελεί η ανάπτυξη των κυττάρων του μύκητα σε υγρή καλλιέργεια. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, προετοιμάζονται τρυβλία YPD χωρίς την προσθήκη αντιβιοτικού. Έπειτα, παραλαμβάνονται τα κύτταρα και των δύο στελεχών (X33 και SMD1168) από την υπερκατάψυξη. Υπό στείρες συνθήκες,

δεδομένη ποσότητα από τα κυτταρικά αιωρήματα (~50μL) διασπείρεται στα τρυβλία και ακολουθεί η επώαση τους, στους 27°C για 48 ώρες.

Έπειτα, γίνεται η προετοιμασία των υγρών θρεπτικών μέσων YPD για τον σχηματισμό των προκαλλιιεργειών και των καλλιιεργειών. Τα διαλύματα του θρεπτικού αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο και κατανέμονται σε κωνικές φιάλες των 250mL στον αποστειρωμένο χώρο εργασίας με την κάθε προκαλλιιεργεία να έχει όγκο 50mL. Ο όγκος του θρεπτικού στον οποίο αναπτύσσονται τα κύτταρα προς τον συνολικό όγκο της φιάλης οφείλει να έχει αναλογία τουλάχιστον 1:4. Ο λόγος οφείλεται στην αερόβια ανάπτυξη που εμφανίζει ο μύκητας *P. pastoris*. Ο εμβολιασμός των προκαλλιιεργειών γίνεται με την χρήση ενός ρύγχους πιπέτας με την οποία παραλαμβάνεται σημαντική ποσότητα από τα τρυβλία που επωάστηκαν. Το ρύγχος αφήνεται στην κωνική φιάλη και μεταφέρεται σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 27°C με ανάδευση 180rpm για 24 ώρες.

Μετά το πέρας της μιας ημέρας, σειρά έχει η κλιμάκωση και ο σχηματισμός της καλλιιεργείας. Σε μεγάλες κωνικές του 1L κατανέμεται θρεπτικό μέσο όγκου 250mL. Το εμβόλιο από τις προκαλλιιεργείες στην φάση της προετοιμασίας των κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση έχει όγκο 10mL, δηλαδή το 5% v/v του θρεπτικού μέσου της καλλιιεργείας. Τονίζεται ωστόσο, ότι ο όγκος του εμβολίου για ανάπτυξη των κυττάρων και έκφραση πρωτεϊνών ακολουθεί διαφορετική μεθοδολογία η οποία αναλύεται σε μεταγενέστερη ενότητα. Μετά τον εμβολιασμό οι φιάλες μεταφέρονται για επώαση στους 27°C υπό ανακίνηση σε ρυθμό 180rpm.

Ο σκοπός της ανάπτυξης είναι η αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας τόσο, ώστε να είναι εφικτή η προετοιμασία για ηλεκτροδιάτρηση. Αρχικά λαμβάνεται δείγμα από την καλλιιεργεία, την χρονική στιγμή που αρχίζει η επώαση (t_0) και φωτομετρείται στα 600nm, δηλαδή προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα (OD_{600}). Ως τυφλή μέτρηση λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό που προκύπτει αφού τα κύτταρα έχουν καταβυθιστεί στον πάτο μετά από φυγοκέντρηση. Ο στόχος είναι η αύξηση του OD_{600} μέχρι η τιμή να είναι στο εύρος 1,3-1,5 δεδομένου ότι την χρονική στιγμή t_0 είναι περίπου 0,3-0,4. Κατά την μέτρηση γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων.

Εν συνεχεία ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Επιλέγεται η καλλιιεργεία με την κατάλληλη οπτική πυκνότητα και το περιεχόμενο της διαμοιράζεται στα δύο (2x125mL), σε ειδικά δοχεία που ενσωματώνονται στην ψυχόμενη φυγόκεντρο και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C στις 5.000 x g για 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και προστίθεται σε κάθε δοχείο 125mL mQ H₂O το οποίο έχει ψυχθεί, ώστε να μην προκαλέσει μεγάλες μεταβολές στην θερμοκρασία των κυττάρων. Στο mQ H₂O γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων με καλή ανάδευση και το νέο διάλυμα φυγοκεντρείται ξανά στις 5.000 x g για 5 λεπτά στους 4°C.
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται, με την προσθήκη 62,5mL mQ H₂O σε κάθε δοχείο. Λαμβάνει χώρα επαναιώρηση των κυττάρων, ένωση του περιεχομένου σε ένα δοχείο και φυγοκέντρηση στις 5.000 x g για 5 λεπτά στους 4°C.

- Ακολούθως, απορρίπτεται το υπερκείμενο και γίνεται η επαναιώρηση κυττάρων σε 12mL ψυχρού διαλύματος σορβιτόλης συγκέντρωσης 1M, μεταφορά του περιεχομένου σε Falcon των 50mL και ξανά φυγοκέντρηση στις 5.000 x g για 5 λεπτά στους 4°C.
- Τέλος, απορρίπτεται το υπερκείμενο διάλυμα και προστίθενται μόλις 600μL σορβιτόλης 1M με το διάλυμα κυττάρων να έχει τελικό όγκο προσεγγιστικά 1,5mL.

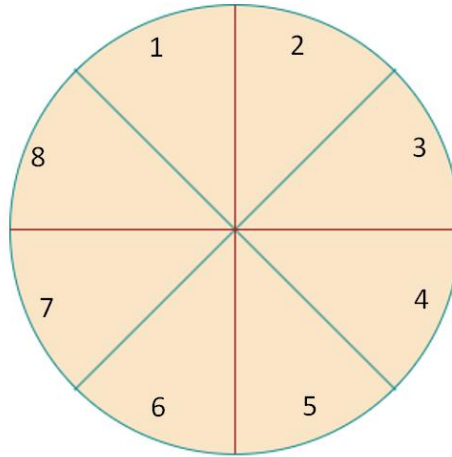
Τα κύτταρα πλέον έχουν ως περιβάλλον πυκνό διάλυμα σορβιτόλης η οποία σταθεροποιεί την δομή τους και τα κάνει επιδεκτικά για την ηλεκτροδιάτρηση. Ύστερα από την προετοιμασία, είναι αναγκαίο να γίνει άμεση χρήση των κυττάρων. Η διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης πραγματοποιείται για την εισαγωγή των γονιδίων και των 7 εξεταζόμενων ενζύμων στα δύο στελέχη X33 και SMD1168. Αφού έχει γίνει η αποστείρωση όλων των υλικών και εργαλείων που χρησιμοποιούνται, είτε σε αυτόκαυστο είτε με κατεργασία σε διάλυμα αιθανόλης 70% ξεκινά ο μετασχηματισμός.

- I. Σε ένα αποστειρωμένο Eppendorf των 1,5mL υπό ασηπτικές συνθήκες μεταφέρονται 80μL των επιδεκτικών κυττάρων και αναμειγνύονται με 40μL γραμμικοποιημένου και αφαλατωμένου πλασμιδίου που φέρει το εκάστοτε γονίδιο. Το περιεχόμενο αναδεύεται ήπια και επωάζεται σε πάγο για 5 λεπτά.
- II. Σε μια κυβέτα, μεταφέρεται όλη η ποσότητα του μείγματος πλασμιδίου - κυττάρων και τοποθετείται στον υποδοχέα της συσκευής ηλεκτροδιάτρησης MicroPulser, Bio-Rad. Ακαριαία γίνεται η εφαρμογή τάσης για την διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος μέσω ρύθμισης της συσκευής και μετά τον χαρακτηριστικό ήχο που σηματοδοτεί το τέλος του προγράμματος προστίθεται στην κυβέτα 1mL ψυχής σορβιτόλης συγκέντρωσης 1M. Το συγκεκριμένο στάδιο είναι αναγκαίο να γίνει με μεγάλη ταχύτητα διότι η στρεσογόνες συνθήκες, είναι δυνατό να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο και γενικότερα μικρή απόδοση στον μετασχηματισμό.
- III. Το διάλυμα της κυβέτας μεταφέρεται σε Falcon των 15mL και αυτό επωάζεται όρθιο χωρίς ανάδευση στους 30°C για 2 ώρες.
- IV. Κατά την διάρκεια της επώασης παρασκευάζονται τρυβλία YPDS με το αντιβιοτικό Ζεοσίνη. Ύστερα, το κυτταρικό διάλυμα απλώνεται σε στείρες συνθήκες στα τρυβλία και αφήνονται να επωαστούν μέχρι και 10 ημέρες.

Στις πρώτες 3 μέρες επώασης παρατηρήθηκαν τα τρυβλία ως προς την ανάπτυξη αποικιών. Σε αντίθεση με την κλασική επώαση, δεν παρατηρήθηκε η υφή του μύκητα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο μικρό ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων είτε λόγω του ηλεκτρικού ρεύματος, είτε λόγω της αποτυχίας εισαγωγής του πλασμιδίου και επομένως της αδυναμίας αντίστασης στο αντιβιοτικό. Οι πρώτες αποικίες σημειώνονται καθώς θεωρούνται ότι σε εκείνες πέτυχε ο μετασχηματισμός με την μεγαλύτερη βεβαιότητα.

Επόμενο βήμα, αποτελεί η ανακαλλιέργεια σε καινούρια τρυβλία YPD με Ζεοσίνη. Η ανακαλλιέργεια υλοποιείται με σκοπό να επιβεβαιωθεί ότι, οι αποικίες

που παρατηρήθηκαν, αναπτύχθηκαν λόγω του θρεπτικού μέσου και όχι λόγω των υπολειμμάτων των νεκρών κυττάρων που δεν επιβίωσαν από τον μετασχηματισμό. Έτσι, παρασκευάζονται τρυβλία YPD παρουσία Ζεοσίνης και στο κάλυμμα του τρυβλίου σχεδιάζονται 8 περιοχές με την μορφή πίτας (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση του τρυβλίου YPD με τις οχτώ διακριτές περιοχές.

Οι αποικίες που σημειώθηκαν από τα τρυβλία μαζί με κάποιες άλλες που επιλέχθηκαν, μεταφέρθηκαν σε κάθε επιμέρους περιοχή με παλινδρομικές κινήσεις ώστε τα κύτταρα τις αποικίας να εξαπλωθούν σε όλο το κομμάτι της πίτας. Για κάθε γονίδιο, δηλαδή για κάθε ένζυμο, μεταφέρθηκαν όπου ήταν εφικτό περίπου οχτώ αποικίες.

2.2.4.3 Έλεγχος αποικιών σε τρυβλία αγαρόζης (Agar plate screening)

Ο έλεγχος των αποικιών γίνεται με σκοπό να εξακριβωθεί αν, αφενός έχει ληφθεί το γονίδιο και επομένως γίνεται η ορθή έκφραση του επιθυμητού ενζύμου και αφετέρου για να διερευνηθεί ποια από όλες τις αποικίες του κάθε ενζύμου παρουσιάζει οπτικά την μεγαλύτερη απόδοση, δηλαδή την μεγαλύτερη έκφραση ενζύμου. Η σάρωση των αποικιών πραγματοποιήθηκε με τον σχηματισμό τρυβλίων αγαρόζης με το κατάλληλο υπόστρωμα (plate agar screening).

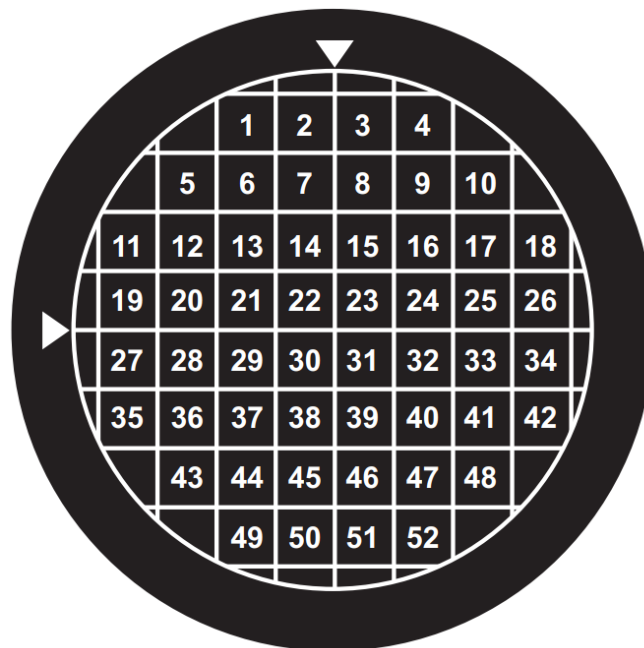
Η σάρωση μέσω των τρυβλίων αγαρόζης έγινε μόνο με τα ένζυμα του *F. oxysporum* (αμιδάση, τυροσινάση, πρωτεάση, ενδοπεπτιδάση) και στα δύο στελέχη του μύκητα και βασίστηκε στον χαρακτηρισμό της καταλυτικής δράσης του ενζύμου. Αρχικά παρασκευάζονται τρυβλία, που αποτελούνται από 10% v/v YNB, 0,5% μεθανόλη και 0,2% Βιοτίνη (και 0,1% v/v CuSO_4 στην περίπτωση της τυροσινάσης), με την διάλυση της αγαρόζης και του κατάλληλου υποστρώματος. Κάθε τρυβλίο απαιτεί 25mL διαλύματος αγαρόζης.

- Για την αμιδάση, το υπόστρωμα που επιλέχθηκε ήταν η ουρία σε τελική συγκέντρωση 20g/L σε συνδυασμό με 0,012g/L δείκτη ερυθρό της φαινόλης (phenol red). Η ενζυμική αντίδραση της ουρίας έχει ως αποτέλεσμα την

απελευθέρωση ιόντων αμμωνίου (NH_4^+) με αποτέλεσμα την μεταβολή του pH και συνεπώς της αλλαγής του χρώματος στην περιοχή δράσης προς το ιώδες.

- Για την τυροσινάση η 4-χλωροκατεχόλη η οποία βρισκόταν σε τελική συγκέντρωση 2mM. Η δραστηριότητα του ενζύμου αποτυπώνεται με τον αποχρωματισμό του τρυβλίου.
- Η ενδοπεπτιδάση και η πρωτεάση δοκιμάστηκαν σε αποβουτυρωμένο γάλα (skimmed milk) συγκέντρωσης 1% w/v. Η καταλυτική δράση εμφανίζεται με την διαύγαση του τρυβλίου.
- Επιπλέον παρασκευάστηκαν και τρυβλία τα οποία περιείχαν γλυκόζη σε συγκέντρωση 2% w/v και σε αυτά μεταφέρθηκαν όλες οι αποικίες όλων των ενζύμων με σκοπό να διερευνηθεί η ικανότητα ανάπτυξης της αποικίας.

Σημειώνεται, πως σε κάθε έλεγχο, μεταφέρθηκαν και αποικίες μη μετασχηματισμένων κυττάρων X33 και SMD 1168 προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η όποια ανταπόκριση της αποικίας στο υπόστρωμα οφείλεται στην έκφραση των νέων ενζύμων και όχι στην καταλυτική δράση των ενζύμων του ξενιστή. Ο σχηματισμός των τρυβλίων ολοκληρώνεται με τον σχεδιασμό στο εξωτερικό μέρος του καλύμματος, ενός πλέγματος βαθμολόγησης (Scoring Templates). Πρακτικά σχεδιάζεται ένα πλέγμα με βαθμονομημένα επιμέρους τετράγωνα (Εικόνα 2.4). Σε κάθε τετράγωνο μεταφέρεται σε στείρες συνθήκες η αποικία από το κάθε εξεταζόμενο ένζυμο.



Εικόνα 2.4. Πλέγμα βαθμολόγησης αποδοτικότητας των εξεταζόμενων αποικιών [105].

Η αποικία που θα εμφανίσει την μεγαλύτερη μεταβολή στο υπόστρωμα, άρα και την μεγαλύτερη δραστηριότητα είναι αυτή που επιλέγεται για καλλιέργεια μεγαλύτερης κλίμακας και έκφραση της πρωτεΐνης.

2.2.5 Ετερόλογη έκφραση κουτινάσης από *E. coli* BL21(DE3)

Αρχικά παρασκευάζεται το θρεπτικό μέσο LB (Πίνακας 2.15) και αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 λεπτά με σκοπό να σχηματιστεί η προκαλλιέργεια. Στην συνέχεια, το μέσο διαμοιράζεται στους περιέκτες που επρόκειτο να εμβολιαστούν. Από τα τρυβλία LB παρουσία Αμπικικιλίνης στα οποία έχουν αναπτυχθεί τα ανασυνδυασμένα κύτταρα του *E. coli*, λαμβάνεται μια αποικία και μεταφέρεται στον περιέκτη (Falcon ή κωνική φιάλη, ανάλογα με τον όγκο που έχει επιλεχθεί) με το θρεπτικό μέσο. Στην συνέχεια, ο περιέκτης μεταφέρεται σε επωαστήρα με τους κατάλληλους υποδοχείς και λαμβάνει χώρα επώαση για 24 ώρες στους 37°C με 180rpm.

Μετάπειτα, παρασκευάζεται ξανά το θρεπτικό μέσο LB σε μεγαλύτερη ποσότητα για τον σχηματισμό των καλλιέργειών και υπό ασηπτικές συνθήκες λαμβάνει χώρα ο εμβολιασμός. Το εμβόλιο είναι συνήθως το 1% v/v της καλλιέργειας. Κατά τον εμβολιασμό, γίνεται πλήρης μεταφορά του όγκου της προκαλλιέργειας διευκολύνοντας την εργασία του εμβολιασμού και ταυτόχρονα παρέχοντας τον κατάλληλο χώρο για τον απαραίτητο αερισμό. Ακολουθεί επώαση στους 37°C με 180rpm για 16 ώρες.

Οι καλλιέργειες LB που παρασκευάστηκαν επωάζονται στους 33°C και όχι στους 37°C που αποτελεί την βέλτιστη θερμοκρασία επώασης. Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης, προϋποθέτει επαρκή κυτταρική ανάπτυξη, επομένως η κυτταρική καλλιέργεια επωάζεται μέχρις ότου, η οπτική πυκνότητα αυτής να είναι $OD_{600} \approx 0,6$ (διάρκεια επώασης 2-3 ώρες). Το επόμενο βήμα στην διαδικασία, αποτελεί η ψύξη των καλλιέργειών στους 15°C. Η μείωση της θερμοκρασίας γίνεται σταδιακά για να αποφευχθεί ο τραυματισμός των κυττάρων. Στην συνέχεια εφαρμόζεται το στάδιο της επαγωγής. Πραγματοποιείται προσθήκη του επαγωγέα IPTG με τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια 0,2mM. Οι καλλιέργειες μετά την προσθήκη παραμένουν σε αυτήν την θερμοκρασία για 16-18 ώρες.

Η ψύξη των καλλιέργειών, έχει σκοπό την καθυστέρηση της ανάπτυξης των κυττάρων, ώστε η έκφραση της κουτινάσης να συμβεί στον μέγιστο κυτταρικό πληθυσμό. Ουσιαστικά, έκφραση της κουτινάσης γίνεται πριν τα κύτταρα φτάσουν στην φάση στασιμότητας.

2.2.6 Παραγωγή πρωτεϊνών από *P. pastoris*

2.2.6.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης καλλιέργειών

Η ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων ενζύμων έγινε κατά την ανάπτυξη των κυττάρων του ζυμομύκητα *P. pastoris* σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα τα οποία προάγουν την παραγωγή των πρωτεϊνών. Για τον σκοπό αυτό, το θρεπτικό μέσο στο οποίο έγινε η ανάπτυξη της προκαλλιέργειας είναι το Buffered Glycerol-complex Medium (BMGY), ενώ για την καλλιέργεια το Buffered Methanol-complex Medium (BMMY). Ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των κυττάρων στην προκαλλιέργεια είναι η γλυκερόλη (Πίνακας 2.18) ενώ στην καλλιέργεια είναι η μεθανόλη (Πίνακας 2.19).

Πίνακας 2.18. Σύσταση θρεπτικού μέσου προκαλλιέργειας BMGY.

Συστατικό	Συγκέντρωση
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract)	1% w/v
Πεπτόνη (Peptone)	2% w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (Buffer solution $K_2HPO_4 - KH_2PO_4$) 1M pH=6,0	10% v/v
Διάλυμα YNB (Yeast Nitrogen Base without Amino Acids) 13,4% w/v (aq)	10% v/v
Διάλυμα γλυκερόλης 10% w/v (aq)	10% v/v
Διάλυμα Βιοτίνης (Biotin) 0,02% w/v (aq)	0,2% v/v

Το BMGY αποτελεί χρήσιμο θρεπτικό μέσο για τον σχηματισμό της προκαλλιέργειας διότι προσφέρει σταθερό pH κατά τις φάσεις ανάπτυξης, ενώ μειώνεται η πρωτεολυτική δραστηριότητα. Παράλληλα, γίνεται μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας χαρακτηριστικό που αποτελεί πλεονέκτημα για την ελάττωση της λανθάνουσας φάσης μέσω εμβολιασμού στην καλλιέργεια. Τα επιμέρους συστατικά του συγκεκριμένου μέσου προσφέρουν τις απαραίτητες πηγές αζώτου και άνθρακα, καθώς και την βιοτίνη η οποία είναι γνωστή και ως βιταμίνη B7. Η συγκεκριμένη βιταμίνη είναι ένα απαραίτητο θρεπτικό συστατικό που παίζει ζωτικό ρόλο στην σύνθεση DNA και RNA. Επιπλέον η βιοτίνη παίζει σημαντικό ρόλο και στην ορθή λειτουργία ενζύμων καθώς αποτελεί συμπράγοντα για πολλά ένζυμα που εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως ο μεταβολισμός των λιπών, των υδατανθράκων και των αμινοξέων. Τέλος, κατά την ανάπτυξη βιομάζας του ζυμομύκητα *P. pastoris*, δημιουργείται ένα όξινο περιβάλλον (pH<2) το οποίο μπορεί να είναι ανεπιθύμητο για την πρωτεΐνη-στόχο. Η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος συμβάλει στην σταθεροποίηση του pH.

Πίνακας 2.19. Σύσταση θρεπτικού μέσου προκαλλιέργειας BMMY.

Συστατικό	Συγκέντρωση
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract)	1% w/v
Πεπτόνη (Peptone)	2% w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (Buffer solution $K_2HPO_4 - KH_2PO_4$) 1M pH=6,0	10% v/v
Διάλυμα YNB (Yeast Nitrogen Base without Amino Acids) 13,4% w/v (aq)	10% v/v
Διάλυμα Βιοτίνης (Biotine) 0,02% w/v (aq)	0,2% v/v
Μεθανόλη (Methanol)	0,5 % v/v
Διάλυμα Ιχνοστοιχείων (Trace Elements Solution) (aq)*	0,4% v/v
Διάλυμα αιμίνης (Hemin solution) 2mM σε Dimethyl sulfoxide (DMSO)*	0,5% v/v
Διάλυμα θειικού χαλκού 25mM ($CuSO_4$ Solution) (aq)*	0,1 % v/v

*Τα συστατικά αυτά προστίθενται στο θρεπτικό μέσο ανάλογα με το ένζυμο που επιδιώκεται να εκφραστεί. Συγκεκριμένα το διάλυμα ιχνοστοιχείων και αίμης προστίθεται για την έκφραση των υπεροξυγενασών, ενώ ο χαλκός για την έκφραση της τυροσινάσης.

Το BMMY αντίστοιχα με το BMGY αποτελεί ένα σύνολο από συστατικά τα οποία προσδίδουν στο μέσο ανάπτυξης σταθερό pH και μειωμένη πρωτεολυτική δραστηριότητα. Ωστόσο, σε αντίθεση με το θρεπτικό της προκαλλιέργειας, το BMMY επικεντρώνεται κυρίως στο να παρέχει τα απαραίτητα εφόδια για την έκφραση, μεταξύ άλλων, της ετερόλογης πρωτεΐνης. Επιπλέον, πέρα από τα συστατικά που αναλύθηκαν και στο BMGY, συμπεριλαμβάνονται διαλύματα ιχνοστοιχείων, και συμπαραγοντες, χημικές ενώσεις οι οποίες είναι απαραίτητες για την λειτουργία των καταλυτικών κέντρων των εκφραζόμενων ενζύμων.

Για τα οξειδωτικά ένζυμα και ειδικότερα για τις υπεροξυγενάσες που μελετήθηκαν, η εμφάνιση της καταλυτικής δράσης απαιτεί το διάλυμα αιμίνης. Η αιμίνη αποτελεί ένα μόριο το οποίο παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με την γνωστή αίμη. Η αίμη αποτελεί την κύρια προσθετική ομάδα στην αιμογλοβίνη, η οποία μεταφέρει οξυγόνο από τους πνεύμονες στους ιστούς. Ωστόσο, η αιμίνη, εμπλέκεται στη μεταφορά οξυγόνου σε ορισμένα ένζυμα. Η μεταφορά οξυγόνου με την μορφή υπεροξειδίου αποτελεί βασικό στάδιο στην καταλυτική δράση των συγκεκριμένων ενζύμων. Ουσιαστικά, η αιμίνη δρα ως συμπαραγοντας στην λειτουργία του ενζύμου.

Επιπρόσθετα, τα μεταλλοένζυμα, προκειμένου να αποκτήσουν την μορφή των ολοενζύμων, απαιτούν την παρουσία κάποιου μετάλλου. Τα ένζυμα τέτοιου είδους που μελετήθηκαν και δοκιμάστηκαν σε εφαρμογές είναι η τυροσινάση κατά την έκφραση της οποίας προστέθηκε διάλυμα θειικού χαλκού.

Η σύσταση του διαλύματος των μετάλλων και των ιχνοστοιχείων (TES) που αποτελεί μέρος της σύστασης του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας BMMY, παρουσιάζεται παρακάτω (Πίνακας 2.20).

Πίνακας 2.20. Σύσταση διαλύματος Trace Elements Solution

Συστατικό	Συγκέντρωση
CuSO ₄ ·5H ₂ O	24,00 mM
NaI	0,53 mM
MnSO ₄ ·2H ₂ O	19,87 mM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10,00 mM
ZnCl ₂	10,00 mM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,83 mM
H ₃ BO ₃	0,32 mM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,10 mM
H ₂ SO ₄ 96% w/w	0,1% v/v

Ο έλεγχος της έκφρασης των πρωτεολυτικών ενζύμων, της πρωτεάσης και της ενδοπεπτιδάσης, δοκιμάστηκε σε δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά BMGY και BMMY ενώ σχηματίστηκε και το θρεπτικό μέσο Minimal Glycerol Medium (MGY), του οποίου η σύσταση αναγράφεται παρακάτω (Πίνακας 2.21).

Πίνακας 2.21. Σύσταση του θρεπτικού μέσου MGY.

Συστατικό	Συγκέντρωση
Διάλυμα YNB (Yeast Nitrogen Base without Amino Acids) 13,4% w/v (aq)	10% v/v
Διάλυμα γλυκερόλης 10% w/v (aq)	10% v/v
Διάλυμα Βιοτίνης (Biotin) 0,02% w/v (aq)	0,2% v/v

Η σύσταση του μέσου συμβάλλει στην προώθηση της παραγωγής βιομάζας προκειμένου να γίνει η κλιμάκωση σε μεγαλύτερους όγκους. Αξίζει να σημειωθεί, πως για την έκφραση πρωτεϊνών που συμπεριλαμβάνουν στην αμινοξική τους αλληλουχία μια ουρά ιστιδίνης (his4 strains), το μέσο περιέχει επιπλέον διάλυμα ιστιδίνης. Η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε θρεπτικό Minimal Methanol (MM) (Πίνακας 2.22).

Πίνακας 2.22. Σύσταση του θρεπτικού μέσου MM.

Συστατικό	Συγκέντρωση
Διάλυμα YNB (Yeast Nitrogen Base without Amino Acids) 13,4% w/v (aq)	10% v/v
Μεθανόλη	0,5% v/v
Διάλυμα Βιοτίνης (Biotin) 0,02% w/v (aq)	0,2% v/v

Το συγκεκριμένο μέσο δεν περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα με αποτέλεσμα το pH της καλλιέργειας κατά την ζύμωση να μειωθεί σε σημαντικό βαθμό ($\text{pH} < 2$). Η σύσταση του μέσου στοχεύει στην έκφραση πρωτεϊνών παρά στην ανάπτυξη της βιομάζας. Η αναλυτική σύσταση του διαλύματος YNB που χρησιμοποιήθηκε στα προηγούμενα θρεπτικά μέσα παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.23).

Πίνακας 2.23. Σύσταση του YNB 13,4% w/v (aq).

Συστατικό	Συγκέντρωση
Εκχύλισμα ζύμης αζωτούχας βάσης χωρίς αμινοξέα (Yeast Nitrogen Base without Amino Acids)	3,4% w/v
Θειικό αμμώνιο (Ammonium Sulfate)	10% w/v

2.2.6.2 Ανάπτυξη καλλιεργείων και ετερόλογη έκφραση ενζύμων

Στην περίπτωση που η ανάπτυξη καλλιεργείων γίνεται από κύτταρα σε στοκ γλυκερόλης, τότε η διαδικασία ξεκινά με την παρασκευή στερεών καλλιεργείων YPD (Πίνακας 2.17). Το αρχικά υγρό διάλυμα αποστειρώνεται και προτού φτάσει σε θερμοκρασίες σχηματισμού του πηκτώματος ($35\text{-}40^\circ\text{C}$), απλώνεται σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και αφήνεται να ψυχθεί εξ' ολοκλήρου σε αποστειρωμένο χώρο. Μόλις στερεοποιηθεί τελείως το πήκτωμα λαμβάνει χώρα ο εμβολιασμός. Λαμβάνεται δηλαδή ποσότητα κυτταρικού αιωρήματος (περίπου 50μL), απλώνεται σε όλη την επιφάνεια του και στην συνέχεια επωάζεται σε φούρνο στους 27°C για τουλάχιστον 24 ώρες.

Στην περίπτωση που επρόκειτο να εμβολιαστούν μετασχηματισμένα κύτταρα, στο άγαρ (από στοκ γλυκερόλης ή από ανακαλλιέργεια), προστίθεται και η Ζεοσίνη αφότου, το αποστειρωμένο διάλλειμα ψυχθεί αρκετά ($50\text{-}60^\circ\text{C}$). ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση του μορίου.

Παράλληλα, παρασκευάζεται το θρεπτικό μέσο BMGY (Πίνακας 2.18) και τοποθετείται για αποστείρωση μαζί με όλα τα απαραίτητα σκεύη (κωνικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι, Falcons και ρύγχη πιπετών). Σημειωτέων, ότι τα επιμέρους συστατικά, δηλαδή το διάλυμα γλυκερόλης, το εκχύλισμα ζύμης μαζί με την πεπτόνη, το YNB καθώς και το απαραίτητο ρυθμιστικό διάλυμα αποστειρώνονται ξεχωριστά και αναμειγνύονται μετά την αποστείρωση υπό ασηπτικές συνθήκες. Έπειτα, παραλαμβάνονται τα τρυβλία YPD (παρουσία Ζεοσίνης) από τον φούρνο επώασης. Ο εμβολιασμός γίνεται με την παραλαβή ποσότητας κυττάρων από την επιφάνεια του πηκτώματος. Τα κύτταρα μεταφέρονται στο εσωτερικό του περιέκτη με την προκαλλιέργεια και ανακινείται ελαφρώς προκειμένου τα κύτταρα να διασκορπιστούν στο μέσο. Στην συνέχεια όλοι οι περιέκτες πλαστικοί (Falcons) ή γυάλινοι (κωνικές φιάλες), ανάλογα με τον όγκο που έχει αποφασιστεί να παρασκευαστεί, τοποθετούνται σε επωαστήρα με ανακινούμενη βάση με

κατάλληλους υποδοχείς για τους περιέκτες. Οι συνθήκες επώασης είναι 27°C με ανάδευση 180rpm και χρονική διάρκεια 24 ώρες.

Σειρά έχει η παρασκευή του θρεπτικού μέσου των καλλιιεργειών BMMY (Πίνακας 2.19). Όπως και προηγουμένως τα επιμέρους συστατικά χωρίζονται (το εκχύλισμα ζύμης και η πεπτόνη τοποθετούνται μαζί) και αποστειρώνονται. Αφού κατανεμηθεί το μέσο στους περιέκτες των καλλιιεργειών προστίθεται και το διάλυμα που περιέχει τον συμπαράγοντα ή τα μέταλλα, για όποιο ένζυμο είναι απαραίτητο. Για παράδειγμα στην καλλιέργεια έκφρασης της τυροσινάσης που είναι οξειδωτικό ένζυμο προστίθεται το διάλυμα θειικού χαλκού, ενώ στις υπεροξυγενάσες προστίθεται διάλυμα αιμίνης (πρόδρομο μόριο της αίμης) και διάλυμα ιχνοστοιχείων. Η βιοτίνη που χρησιμοποιείται και στα δύο μέσα αποθηκεύεται σε ψυγείο και αποστειρώνεται με την διαπέραση διαμέσου αποστειρωμένου φίλτρου.

Ακολουθεί ο εμβολιασμός των καλλιιεργειών, ο οποίος διαφέρει από τις βακτηριακές καλλιέργειες. Σε αντίθεση με τα βακτήρια, στα οποία όλος ο όγκος των προκαλλιιεργειών προστίθεται στις βυθισμένες καλλιέργειες, είναι απαραίτητο να υπολογιστεί ο όγκος του εμβολίου. Ο σκοπός της προκαλλιέργειας είναι η αποφυγή της λανθάνουσας φάσης, δηλαδή της χρονικής διάρκειας που απαιτείται προκειμένου να προσαρμοστούν τα κύτταρα στο νέο τους περιβάλλον (BMGY→BMMY). Το εμβόλιο είναι αναγκαίο να είναι τόσο, ώστε να ελαττωθεί η λανθάνουσα φάση αλλά ταυτόχρονα, να υπάρχει περιθώριο για περαιτέρω ανάπτυξη και επομένως έκφραση πρωτεϊνών. Ο όγκος του προσδιορίζεται από την οπτική πυκνότητα OD_{600} . Η μεθοδολογία υποδεικνύει ότι στην καλλιέργεια, την στιγμή του εμβολιασμού οφείλεται να είναι $OD_{600} = 1$. Επομένως, δεδομένου ότι η οπτική πυκνότητα είναι ανάλογη της κυτταρικής πυκνότητας, ο όγκος που λαμβάνεται από την προκαλλιέργεια προσδιορίζεται από τον νόμο της αραιώσης.

$$V_1 = \frac{(OD_{600})_2 \cdot V_2}{\alpha \cdot (OD_{600})_1} \text{ (Εξίσωση 1),}$$

όπου $(OD_{600})_2$ η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας, V_2 ο όγκος της καλλιέργειας, α ο συντελεστής αραιώσης και $(OD_{600})_1$ η αραιωμένη οπτική πυκνότητα των προκαλλιιεργειών. Έτσι, λαμβάνονται δείγματα από τις προκαλλιέργειες και αραιώνονται 40 φορές με dH_2O . Τα αραιωμένα δείγματα μεταφέρονται στην κυβέτα και φωτομετρούνται χρησιμοποιώντας ως «τυφλό» δείγμα dH_2O . Ανάλογα με την τιμή της απορρόφησης, υπολογίζεται και το αντίστοιχο εμβόλιο.

Τα εμβόλια, μεταφέρονται σε Falcons συνήθως των 50mL και φυγοκεντρούνται στους 4500rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Ύστερα, απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό, που ουσιαστικά αποτελείται κυρίως από το θρεπτικό μέσο BMGY. Στα Falcons όπου τώρα εμπεριέχουν μόνο τα κύτταρα, προστίθεται ποσότητα από το BMMY αρκετή ώστε να είναι εύκολη η ανακίνηση τους προκειμένου να επαναιωρηθούν. Τέλος, το κυτταρικό αιώρημα αποχύνεται στις κωνικές φιάλες στις οποίες έχει διαμεριστεί το μέσο και οι φιάλες μεταφέρονται προς επώαση στους 27°C, με ανάδευση 180rpm για 4-5 μέρες. Σημειώνεται ότι, λόγω της φύσης της *P. pastoris* είναι απαραίτητο να προστίθεται κάθε 24 ώρες 0,5% v/v μεθανόλη (φαινότυπος Mut⁺), ώστε να γίνεται η επαγωγή των ετερόλογων πρωτεϊνών.

2.2.7 Καθαρισμός πρωτεϊνικού διαλύματος

2.2.7.1 Φυγοκέντρηση, Διήθηση υπό κενό και Συμπύκνωση

Η παραγωγή της πρωτεΐνης από την αποδοτικότερη αποικία ακολουθείται από την κατιούσα διεργασία. Με τον όρο κατιούσα υπονοείται η συνολική κατεργασία που είναι απαραίτητο να υλοποιηθεί προκειμένου να αποκτηθεί το ένζυμο στην καθαρή του μορφή [80]. Η έκφραση των νέων μελετώμενων πρωτεϊνών είναι εξωκυτταρική, επομένως δεν απαιτείται προκατεργασία και λύση των κυττάρων. Τα στάδια του καθαρισμού του βιοτεχνολογικού προϊόντος είναι : (α) Φυγοκέντρηση, (β) Διήθηση υπό κενό, (γ) Συμπύκνωση και (δ) Απομόνωση. Το στάδιο της απομόνωσης αναλύεται εκτενώς στην επόμενη ενότητα.

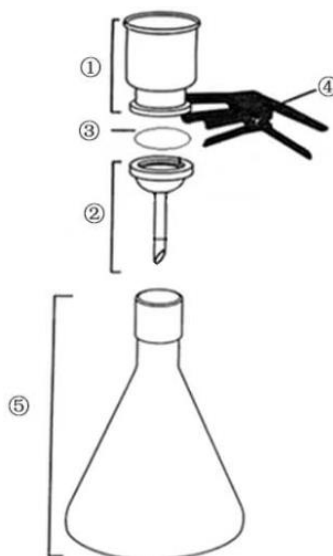
- **Φυγοκέντρηση**

Η φυγοκέντρηση, βασίζεται στις διαφορές πυκνότητας των σωματιδίων και αποτελεί συνήθη τεχνική για τον αποδοτικό διαχωρισμό μεταξύ στερεού και υγρού σε ένα αιώρημα [80]. Τα κυτταρικά ελαιωρήματα των καλλιιεργειών, που έχουν φτάσει στο τέλος της διάρκειας της ζύμωσής τους, μοιράζονται ισοβαρώς σε μεγάλα δοχεία φυγοκέντρου. Ακολουθεί η τοποθέτησή τους στην ψυχόμενη φυγόκεντρο και έναρξη λειτουργίας για 20 λεπτά στις 4.500rpm στους 4°C. Η χαμηλή θερμοκρασία είναι κρίσιμη παράμετρος για την διατήρηση της δραστηριότητας του ενζύμου καθ' όλη την διάρκεια της κατιούσας επεξεργασίας. Οι φυγοκεντρικές δυνάμεις που ασκούνται, εξαναγκάζουν τα κύτταρα, τα κυτταρικά θραύσματα και τα συσσωματώματα να καταβυθιστούν στο πυθμένα του δοχείου [80]. Το ίζημα που δημιουργείται είναι ισχυρά προσκολλημένο στον πυθμένα, ενώ το διαυγές πλέον υπερκείμενο υγρό, αποτελείται από μικρότερα σωματίδια που δεν κατάφεραν να κατακαθίσουν στον πυθμένα, από μεταβολικά προϊόντα, θρεπτικά συστατικά που δεν καταναλώθηκαν και από πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων και αυτή που μελετάται. Το υγρό προϊόν της διεργασίας μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και αποθηκεύεται σε πάγο.

- **Διήθηση υπό κενό**

Επόμενο βήμα αποτελεί η διήθηση του υπερκείμενου υγρού. Η διεργασία υποβάλλεται σε συνθήκες κενού προκειμένου να είναι ταχύτερη και αποδοτικότερη. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην σχετική διαφορά μεγέθους μεταξύ των πόρων του στερεού ηθμού και των σωματιδίων που βρίσκονται στο διάλυμα. Ο ρόλος του στερεού ηθμού επιτελείται από ένα διηθητικό χαρτί και μεμβράνες διαφορετικού μεγέθους πόρων. Αρχικά, εφαρμόζεται σε μια ειδικά διαμορφωμένη φιάλη η αντλία κενού και η διάταξη χωνιού στην οποία υποδέχεται το διηθούμενο υγρό. Η αντλία τίθεται σε λειτουργία, διαμορφώνοντας στο εσωτερικό της φιάλης συνθήκες κενού. Το υγρό αποχύνεται στον υποδοχέα στον οποίο έχει εφαρμοστεί ο αντίστοιχος ηθμός. Η ροή του υγρού είναι τέτοια ώστε να αποφεύγεται η υπέρβαση του όγκου του οποίου μπορεί να επεξεργαστεί στην μονάδα του χρόνου. Λόγω της διαφοράς πίεσης που έχει σχηματιστεί, το υγρό εξαναγκάζεται να διαπεράσει τους πόρους και να εισέλθει στην κωνική φιάλη. Τα σωματίδια με μέγεθος μεγαλύτερο από το όριο των

πόρων της μεμβράνης δεν είναι ικανά να την διαπεράσουν και συγκρατούνται σε αυτήν. Η διάταξη της διήθησης απεικονίζεται στην Εικόνα 2.5.



Εικόνα 2.5. Τυπική μορφή συσκευής διήθησης υπό κενό: (1) Χωνί εισαγωγής υγρού, (2) Κεφαλή συστήματος χωνιού, (3) Μεμβράνη, (4) Σφιγκτήρας, (5) Κωνική φιάλη [118].

Ως ηθμοί χρησιμοποιούνται με την σειρά: απλό διηθητικό χαρτί και μεμβράνες διαμέτρου πόρων 1,2 μm , 0,8 μm , 0,45 μm και 0,22 μm . Όλες οι μεμβράνες είχαν ονομαστική διάμετρο 47mm, που εφάρμοζε κατάλληλα στην κεφαλή του χωνιού. Σημειώνεται ότι, μικρή απόδοση στην φυγοκέντρωση συνεπάγεται καθυστέρηση της ολοκλήρωσης της διήθησης, καθώς μεγάλα σωματίδια μπλοκάρουν τους πόρους της μεμβράνης.

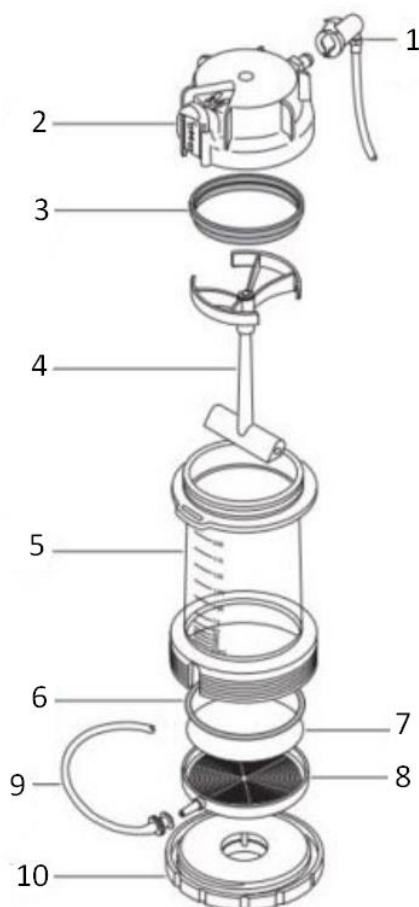
- **Συμπύκνωση**

Το τελικό προϊόν από την διεργασία της διήθησης είναι ένα διάλυμα απαλλαγμένο από σωματίδια. Ωστόσο η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι σε χαμηλά επίπεδα. Ο συνολικός όγκος του υγρού απαρτίζεται από πολλές διαφορετικές ενώσεις και ακαθαρσίες. Η διεργασία της συμπύκνωσης, αποσκοπεί πρωταρχικά στην αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και ταυτόχρονα στην μείωση του όγκου του ολικού συστήματος προς επεξεργασία. Η συμπύκνωση έγινε με (α) Υπερδιήθηση και (β) Φυγοκέντρωση. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην σχετική διαφορά του μοριακού βάρους των μορίων που αποτελούν το διάλυμα με τους πόρους της μεμβράνης. Πρακτικά η αρχή είναι ίδια με την διήθηση, ωστόσο οι σχετικές διαφορές πλέον είναι σε μοριακό επίπεδο.

Συμπύκνωση με Υπερδιήθηση

Η υπερδιήθηση λαμβάνει χώρα σε αναδευόμενο κελί συμπύκνωσης Amicon (Εικόνα 2.6). Το κελί αποτελείται από την βάση την οποία έχει ενσωματωθεί η μεμβράνη και το σύστημα μονώνεται με ειδικό λάστιχο. Επιπλέον, η βάση κάτω από τη μεμβράνη εμπεριέχει μια έξοδο για την απόρριψη του διερχόμενου υγρού. Διαμέσου του κελιού τοποθετείται αναδευτήρας ο οποίος έχει μαγνητική απόκριση.

Το κελί κλείνει με την εφαρμογή της κεφαλής, η οποία έχει την δυνατότητα πρόσδεσης με αντλία.



Εικόνα 2.6. Αναδευόμενο κελί συμπύκνωσης Amicon: (1) Σωληνάριο σύνδεσης με αντλία, (2) Κεφαλή, (3) Λάστιχο μόνωσης, (4) Μαγνητικός αναδευτήρας, (5) Κελί συμπύκνωσης, (6) Λάστιχο μόνωσης βάσης, (7) Μεμβράνη, (8) Βάση στήριξης μεμβράνης, (9) Σωληνάριο ροής εξόδου, (10) Βάση του κελύφους [119].

Αρχικά προστίθεται 150mL dH₂O και αφήνεται να διαπεραστεί. Η αντλία τίθεται σε λειτουργία και δημιουργεί συνθήκες υψηλής πίεσης στο εσωτερικού του κελύφους. Η ανάγκη εκτόνωσης του συστήματος υποχρεώνει το υγρό να διέλθει διαμέσου της μεμβράνης και να απορριφθεί το διαπέρασμα από την μοναδική έξοδο στον πυθμένα της βάσης. Έπειτα, το πρωτεϊνικό διάλυμα προς συμπύκνωση εισέρχεται στο κελί υποδοχής. Όσα μόρια έχουν μοριακό βάρος μεγαλύτερο από το Molecular Weight Cut-Off ή MWCO της μεμβράνης που επιλέχθηκε, συγκρατούνται από αυτήν, ενώ τα μικρότερα μόρια την διαπερνούν. Χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη μεμβρανών οι οποίες κατείχαν όριο μοριακού βάρους διαπέρασης 10kDa και 30kDa. Έτσι, οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος, συγκρατούνται στο κελί ενώ τα μικρότερα μόρια διαπερνούν την μεμβράνη και απορρίπτονται. Στο σημείο αυτό τονίζεται, ότι καθ' όλη την διάρκεια λειτουργίας ολόκληρο το κελί βρισκόταν καλυμμένο με πάγο για την προστασία του πρωτεϊνικού προϊόντος. Το τελικό προϊόν, είναι ένα πρωτεϊνικό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης, ελάχιστου όγκου περίπου 40mL (όσος είναι ο «νεκρός» όγκος του κελύφους συμπύκνωσης). Το διάλυμα αυτό εμπεριέχει την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος

αλλά και άλλες πρωτεΐνες που έχουν εκκριθεί από τα κύτταρα με παρόμοιο ή μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Τέλος, ακολουθεί η πλύση της μεμβράνης με προσθήκη για διαπέραση μέσω αυτής, 150mL 0,1N NaOH και 150mL dH₂O. Η μεμβράνη παραλαμβάνεται προσεκτικά από την βάση και αποθηκεύεται σε διάλυμα αιθανόλης 20% v/v στους 4°C.

Συμπύκνωση με Φυγοκέντρηση

Η μέθοδος αυτή, εφαρμόζεται στην περίπτωση που τα δείγματα προς συμπύκνωση είναι μικρού όγκου (<20mL). Πραγματοποιείται σε στήλες οι οποίες περιλαμβάνουν μεμβράνες με MWCO 3kDa μέγιστης χωρητικότητας 6mL Vivaspin®. Αρχικά, προστίθενται 3mL dH₂O και φυγοκεντρείται στις 4000rpm για 10 λεπτά στην ψυχόμενη φυγόκεντρο. Αφού διαπεραστεί όλη η ποσότητα από την μεμβράνη, προστίθεται το πρωτεϊνικό δείγμα και φυγοκεντρείται στις 4000rpm στους 4°C. Ο χρόνος φυγοκέντρησης, ποικίλει ανάλογα με την έκταση της επιθυμητής συμπύκνωσης. Ενδεικτικά, γίνεται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά και ελέγχεται ο όγκος του συμπυκνώματος. Στην περίπτωση που δεν έχει φτάσει το επιθυμητό επίπεδο, φυγοκεντρείται ξανά. Η φυγόκεντρος δύναμη αποτελεί την κινητήρια ώθηση, ώστε το υγρό να διαπεράσει την μεμβράνη και συγκρατηθούν μόρια με μεγαλύτερο MWCO. Τέλος, η στήλη ξεπλένεται με 3mL με διαπέραση διαλύματος 2% SDS και 3mL dH₂O διαδοχικά και αποθηκεύεται σε διάλυμα αιθανόλης 20% v/v.

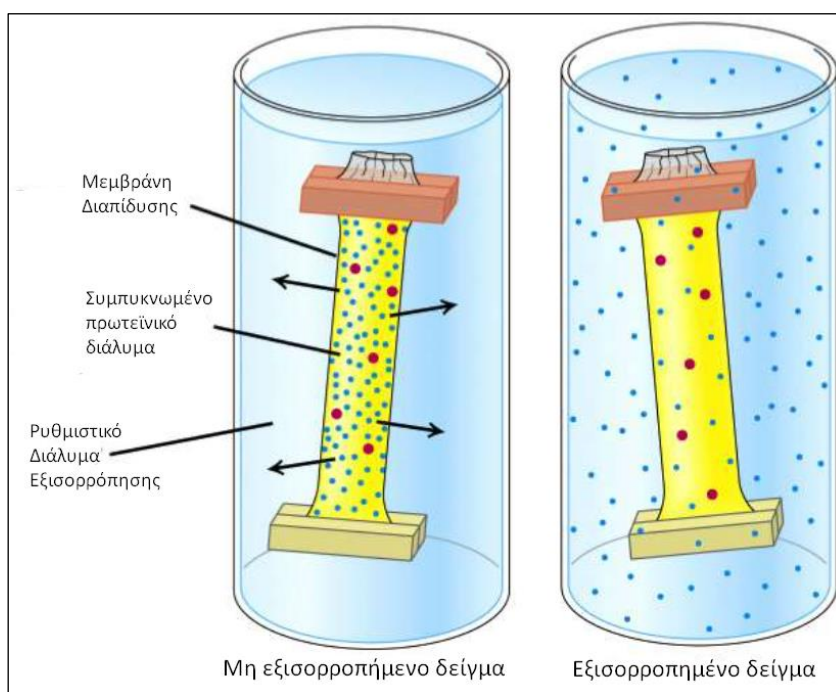
2.2.7.2 Απομόνωση μέσω υγρής χρωματογραφίας

Οι διεργασίες απομόνωσης, έχουν ως απώτερο σκοπό την παραλαβή μόνο του εξεταζόμενου ενζύμου από ένα πολύπλοκο σύστημα διάφορων πρωτεϊνών του ξενιστή, που έχουν εκφραστεί κατά την διάρκεια της ζύμωσης ή και ακόμη από πρωτεΐνες που περιλαμβάνονταν στο θρεπτικό μέσο που δεν καταναλώθηκε πλήρως. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μοριακό βάρος ίσο ή και μεγαλύτερο από την πρωτεΐνη στόχο και ως εκ τούτου δεν απομακρύνθηκαν από τις προηγούμενες μεθόδους καθαρισμού.

Η μέθοδος απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η υγρή χρωματογραφία και ειδικότερα η μεταλλοχηλική χρωματογραφία και η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Πρωταρχικό βήμα αποτελεί η εξισορρόπηση τόσο του πρωτεϊνικού δείγματος όσο και της στήλης. Με τον όρο εξισορρόπηση, εννοείται η μετάβαση σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα κοινό για την στήλη και την πρωτεΐνη. Η αναγωγή σε μια κοινή βάση ευνοεί την αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης και των μορίων που αποτελούν την στατική φάση στην στήλη. Η αποδοτικότερη αλληλεπίδραση, συνεπάγεται και ισχυρότερη πρόσδεση στην ρητίνη (στατική φάση) και επομένως καλύτερος διαχωρισμός.

Εξισορρόπηση δείγματος (Dialysis)

Η εξισορρόπηση του δείγματος προς καθαρισμό πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο διαπίδυσης. Το περιβάλλον της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος είναι το ρυθμιστικό διάλυμα της καλλιέργειας και στην συγκεκριμένη περίπτωση αποτελεί το K_2HPO_4 - KH_2PO_4 pH=6,0 συγκέντρωσης 1M, ενώ επιπλέον περιβάλλεται και από άλλα διαλυτά συστατικά. Η διαδικασία περιλαμβάνει την εμφύσηση ημιδιαπερατών μεμβρανών με την πρωτεΐνη στόχο σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα (Εικόνα 2.7). Οι μεμβράνες αυτές έχουν ένα εύρος MWCO από 14kDa έως 1kDa και χρησιμοποιείται η κατάλληλη ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης. Η αρχή της λειτουργίας βασίζεται στην διαφορά συγκέντρωσης των επιμέρους συστατικών μεταξύ του ρυθμιστικού διαλύματος και του δείγματος. Η διαφορά αυτή δημιουργεί ροή των συστατικών και των μορίων του ρυθμιστικού από και προς την μεμβράνη μέχρις ότου να επέλθει ισορροπία [120].



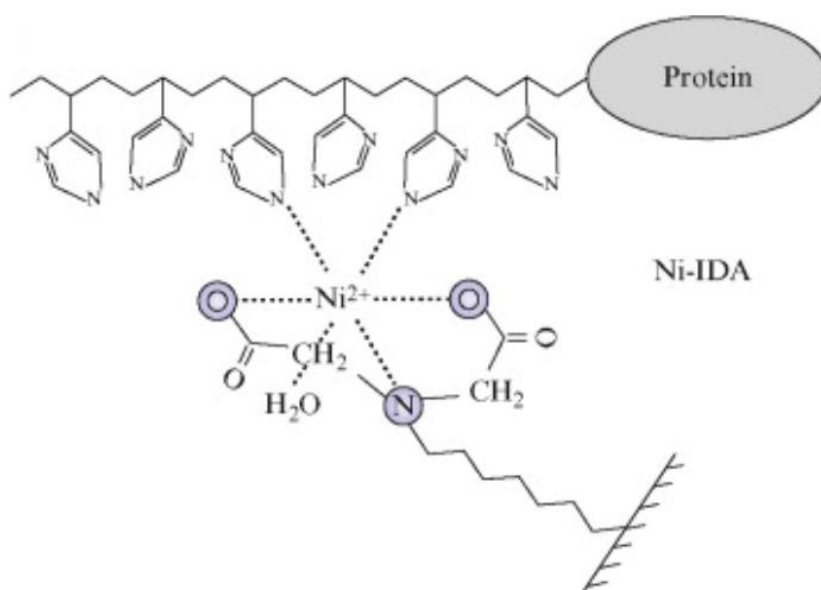
Εικόνα 2.7. Εξισορρόπηση του δείγματος μέσω διαπίδυσης [121].

Προετοιμάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης, του οποίου ο όγκος είναι τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερος από τον όγκο του πρωτεϊνικού δείγματος που υπόκεινται σε εξισορρόπηση. Για παράδειγμα ο συνήθης όγκος πρωτεϊνικού διαλύματος ύστερα από την συμπύκνωση με υπερδιήθηση είναι 50mL. Επομένως, το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης είναι απαραίτητο να έχει όγκο 5L και πάνω. Το είδος του ρυθμιστικού διαλύματος διαφέρει ανάλογα με το ένζυμο που απομονώνεται κάθε φορά. Αρχικά, το συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό διάλυμα, αποχύνεται στο εσωτερικό της μεμβράνης η οποία σφραγίζεται στις άκρες τις με κλείστρα. Η μεμβράνη με το δείγμα αφήνεται για 24 ώρες στο δοχείο με το διάλυμα εξισορρόπησης. Με το πέρας της δράσης, η μεμβράνη αποσύρεται από το διάλυμα προσεκτικά και το εξισορροπημένο πλέον δείγμα αποθηκεύεται σε ένα Falcon των

50mL σε πάγο. Η εξισορρόπηση της στήλης είναι μέρος του πρωτοκόλλου λειτουργείας της και γίνεται λίγο πριν φορτωθεί το δείγμα για απομόνωση.

Μεταλλοχηλική χρωματογραφία

Η χρωματογραφία αυτή (Immobilized metal-ion affinity chromatography ή IMAC) βασίζεται στην ιδιότητα αμινοξικών καταλοίπων μιας πρωτεΐνης να δρουν ως δότες ηλεκτρονίων προς κατιόντα μετάλλων της 1^η ομάδας των μεταβατικών στοιχείων (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} και Ca^{2+}). Τα συγκεκριμένα ιόντα μετάλλων, σχηματίζουν χηλικό σύμπλοκο με ενώσεις οι οποίες είναι συνδεδεμένες ομοιοπολικά στην στατική φάση (Εικόνα 2.8). Το ένζυμο συγκρατείται ισχυρά μέσω δεσμών με καρβοξυλικά οξυγόνα και άζωτα ενώ οι υπόλοιπες θέσεις του μετάλλου είναι κατειλημμένες από μόρια νερού. Τα κατάλληλα αμινοξέα, αλληλοεπιδρούν με τα μόρια νερού και δεσμεύονται, εξαναγκάζοντας το ένζυμο σε προσρόφηση [80]. Μέσω γενετικής τροποποίησης του εκφραζόμενου ενζύμου είναι δυνατή η προθήκη αμινοξικής αλληλουχίας 6 ιστιδινών (His-tags ή His6 tag), οι οποίες επιτρέπουν την συγκράτηση του ενζύμου από την στήλη. Οι άλλες πρωτεΐνες που δεν περιέχουν την συγκεκριμένη αλληλουχία, αδυνατούν να δεσμευτούν και απομακρύνονται με την κινούμενη φάση.



Εικόνα 2.8. Απεικόνιση αλληλεπίδρασης της ουράς των 6 ιστιδινών (πάνω) με το Ni^{2+} , το οποίο είναι ακινητοποιημένο στην στήλη μέσω της χηλικής ένωσης IDA [122].

Στην παρούσα μελέτη η συγκεκριμένη τεχνική πραγματοποιήθηκε με στήλες Talon®, οι οποίες έχουν ακινητοποιημένα ιόντα κοβαλτίου. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1. Απιονισμένο Νερό (dH_2O).
2. Διάλυμα Talon (Πίνακας 2.24).
3. Διάλυμα Ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 5, 10 και 100mM σε Talon.
4. Διάλυμα αιθανόλης (aq) 20% v/v

Πίνακας 2.24. Σύσταση του διαλύματος Talon

Συστατικό	Συγκέντρωση
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	20mM
NaCl	300mM
HCl (aq)	Προσθήκη στάγδην μέχρι pH=8,0

Τα βήματα της διεργασίας αναλύονται παρακάτω.

- Προσθήκη ενός όγκου της στήλης (Column Volume ή CV) dH₂O
- Προσθήκη 5 CV διαλύματος Talon, για την εξισορρόπηση της στήλης
- Προσθήκη του πρωτεϊνικού δείγματος στην στήλη, συλλογή του διαπεράσματος (Flow Through ή FT)
- Προσθήκη 3 CV διαλύματος Talon για την απομάκρυνση μη εκλεκτικά δεσμευμένων πρωτεϊνών (Wash)
- Προσθήκη διαδοχικά 1 CV διαλύματος 5mM και 10mM ιμιδαζολίου. Στο στάδιο αυτό, απομακρύνονται οι πρωτεΐνες με που έχουν προσδεθεί λόγω των αμινοξέων τους αλλά όχι τόσο ισχυρά όσο το ένζυμο με το His6 tag
- Έκλυση της πρωτεΐνης στόχος με προσθήκη 1mL 100mM ιμιδαζολίου. Συλλογή των κλασμάτων 1mL σε Eppendorf των 1,5mL.
- Πλύση της στήλης με 4 CV dH₂O και αποθήκευση σε διάλυμα αιθανόλης 20% v/v.

Σημειώνεται ότι για την έκλυση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται διάλυμα ιμιδαζολίου σε Talon, καθώς η δομή της συγκεκριμένης ένωσης συναγωνίζεται τον τρόπο σύνδεσης των αμινοξέων ιστιδίνης. Η συγκέντρωση των επιμέρους κλασμάτων που συλλέχθηκαν προσδιορίζεται με την φωτομέτρηση δείγματος αυτών σε 96-well UV plate στα 280nm.

Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου βασίζεται στις ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων (πλευρικές ομάδες των αμινοξέων) και της στατικής φάσης της στήλης. Αναλυτικότερα, με βάση το pH του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο εξισορροπείται, το ένζυμο έχει αρνητικό φορτίο αν pH>pI και θετικό φορτίο όταν pH<pI, όπου pI το ισοηλεκτρικό σημείο. Αντίστοιχα, η στήλη φέρει φορτισμένες ομάδες, οι οποίες είναι χημικώς συνδεδεμένες στην στατική φάση της. Σε κατάσταση αδράνειας, οι φορτισμένες αυτές ομάδες είναι εξουδετερωμένες με αντισταθμιστικά ιόντα όπως Na⁺ και Cl⁻. Με την φόρτωση του δείγματος, το ένζυμο αντικαθιστά τα ιόντα και συνδέεται αντιστρεπτά με τις φορτισμένες ομάδες της στήλης. Η έκλυση της πρωτεΐνης, γίνεται με την παροχή διαλύματος των ίδιων αντισταθμιστικών ιόντων, μεγάλης ιοντικής ισχύος [80].

Η διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιείται με την παρουσία αντλίας και η συλλογή του προϊόντος γίνεται σε αυτόματο κλασματοσυλλέκτη. Σε αντίθεση με την μεταλλοχηλική χρωματογραφία όπου η προσθήκη των διαλυμάτων γινόταν χειροκίνητα με τις πιπέτες, εδώ τα διαλύματα μεταφέρονται σε ποτήρια ζέσεως και παραλαμβάνονται από την αντλία. Η ροή των υγρών καταλήγει στον θάλαμο ανάμειξης (εφόσον υπάρχει ανάμειξη) και στην συνέχεια οδηγείται στην στήλη. Η εκροή της στήλης καταλήγει στον ανιχνευτή UV και μετά το διερχόμενο υγρό είτε συλλέγεται σε κωνική φιάλη, είτε οδεύει προς τον αυτόματο κλασματοσυλλέκτη. Η δέσμευση των αρνητικά φορτισμένων ενζύμων έγινε σε στήλη Q Sepharose ενώ των θετικά φορτισμένων σε στήλη SP Sepharose. Για την έκλυση των ενζύμων που απομονώθηκαν με αυτήν την μέθοδο, απαιτήθηκε η βελτιστοποίηση των παραμέτρων καθώς δεν εκλύονται όλες οι πρωτεΐνες με το ίδιο πρωτόκολλο. Γενικότερα ωστόσο τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα K_2HPO_4 - KH_2PO_4 50mM σε pH 7,0 για την απομόνωση της τυροσινάσης και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50mM σε pH 7,5 για τις Astra55, Astra57 και Astra58
2. Διάλυμα NaCl (aq) συγκέντρωσης 1M.
3. Διάλυμα αιθανόλης (aq) 20% v/v.

Ενώ, τα βήματα που εφαρμόστηκαν αναλύονται παρακάτω:

- Ρυθμίζεται η ροή άντλησης από το ρυθμιστικό διάλυμα στην τιμή 1mL/min.
- Εισροή του διαλύματος μέχρι να έχουν διαπεραστεί από την στήλη 5 CV, προκειμένου να επιτευχθεί εξισορρόπηση.
- Γίνεται άντληση όλου του δείγματος με σκοπό την φόρτωσή του με ρυθμό 1mL/min (παραλαβή FT).
- Άντληση από την δεξαμενή 1 CV ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης με σκοπό την απομάκρυνση μη εκλεκτικά δεσμευμένων πρωτεϊνών (Wash)
- Ξεκινά η έκλυση της πρωτεΐνης με το πρόγραμμα που έχει ρυθμιστεί. Ενσωματώνεται στην αντλία το σωληνάριο άντλησης του ρυθμιστικού διαλύματος και του διαλύματος NaCl 1M, το οποίο έχει διαλυθεί στο ίδιο το ρυθμιστικό διάλυμα. Η αντλία λαμβάνει ποσότητα και από τις δύο δεξαμενές και τα διαλύματα αναμειγνύονται στο βαθμό που έχει ρυθμιστεί προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή ιοντική ισχύς. Τα προγράμματα συνήθως περιλαμβάνουν τρία διαδοχικά στάδια, βαθμιδωτής ανάπτυξης συγκέντρωσης άλατος με διαφορετικό βήμα και ένα ισοκρατικό βήμα σε υψηλή συγκέντρωση. Τα βήματα που εφαρμόστηκαν είναι
 - 0-150mM για 15 λεπτά,
 - 150-500mM για 20 λεπτά,
 - 500-1000mM για 35 λεπτά και
 - 1000mM για 10 λεπτά.

Έτσι επιτυγχάνεται με την σειρά: (1) απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών που έχουν δεσμευτεί ασθενώς, (2) έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης, (3) απομάκρυνση ακαθαρσιών και τέλος (4) εξουδετέρωση των φορτισμένων ομάδων της στήλης.

- Ακολουθεί το πλύσιμο της στήλης με 4 CV dH₂O και αποθήκευση σε αιθανόλη 20% v/v.

Σημειώνεται ότι, η βελτιστοποίηση του προγράμματος συνεπάγεται και την ανάλογη τροποποίηση των παραπάνω σταδίων. Η βελτιστοποίηση για την κάθε πρωτεΐνη, βασίστηκε στα σήματα του ανιχνευτή στα 280nm, που ήταν ενσωματωμένος μεταξύ του κλασματοσυλλέκτη και της αντλίας (Εικόνα 2.9). Επιπλέον, ο εντοπισμός του κλάσματος, στο οποίο έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη γίνεται με χημική δοκιμή στο κατάλληλο υπόστρωμα όλων των κλασμάτων και την εύρεση της μεγαλύτερης ανταπόκρισης.



Εικόνα 2.9. Ανιχνευτής UV (αριστερά), Μονάδα ρύθμισης του προγράμματος της περισταλτικής αντλίας (δεξιά).

2.2.7.3 Αφαλάτωση πρωτεϊνικού διαλύματος

Η παραλαβή του τελικού βιοτεχνολογικού προϊόντος, περιλαμβάνει την απομάκρυνση των αλάτων που εμπεριέχονται στο διάλυμα της πρωτεΐνης (Buffer Exchange). Τα άλατα προέρχονται από τις διεργασίες απομόνωσης (Ιμιδαζόλιο και NaCl), όπου χρησιμοποιήθηκαν για την έκλυση. Η διαδικασία της αφαλάτωσης πραγματοποιήθηκε με τρεις τρόπους: (α) βαρυτικά με στήλες PD-10, (β) με φυγοκέντρηση και (γ) με μεμβράνες διαπίδυσης.

Στήλες PD-10

Οι στήλες αφαλάτωσης PD-10 αποτελούνται από μια μήτρα ρητίνης (Sephadex G-25), η οποία επιτρέπει τον ταχύτατο διαχωρισμό μορίων που διαφέρουν σημαντικά στο μοριακό τους βάρος. Με άλλα λόγια, η λειτουργία της στήλης βασίζεται στην διαφορά του μοριακού βάρους μεταξύ των διαχωριζόμενων μορίων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην ρητίνη ενώ τα μόρια του άλατος την διαπερνούν και απορρίπτονται. Στην συνέχεια εκλύονται με το ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης του ενζύμου [123]. Το πρωτόκολλο λειτουργείας αναλύεται παρακάτω.

1^ο Βήμα

Απομάκρυνση του διαλύματος αποθήκευσης της στήλης και προσθήκη με αυτόματη πιπέτα 4 CV dH₂O

2^ο Βήμα

Προσθήκη 5 CV από το ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης του ενζύμου, στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται η εξισορρόπηση της στήλης.

3^ο Βήμα

Προσθήκη μέγιστου όγκου δείγματος 2,5mL. Στην περίπτωση που το δείγμα είναι μικρότερου όγκου, συμπληρώνεται με το ρυθμιστικό διάλυμα με το οποίο εξισορροπήθηκε η στήλη. Το υγρό που διαπερνά, όπου αποτελείται από άλατα, απορρίπτεται.

4^ο Βήμα

Τέλος, προστίθεται 3,5mL από το ρυθμιστικό διάλυμα με το οποίο εξισορροπήθηκε η στήλη. Λόγω της εξισορρόπησης που πραγματοποιήθηκε, ευνοείται η αλληλεπίδραση στατικής και κινητής φάσης, συμπαρασύροντας την δεσμευμένη πρωτεΐνη. Η αφαλατωμένη πλέον πρωτεΐνη συλλέγεται σε Eppendorf των 1,5mL.

Αφαλάτωση με φυγοκέντρηση

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την μεταφορά του ενζυμικού διαλύματος σε μια στήλη Vivaspin® που περιλαμβάνουν μεμβράνες με MWCO 3kDa μέγιστης χωρητικότητας 6mL. Ουσιαστικά, επιτυγχάνεται συμπύκνωση του διαλύματος, καθώς μέσω της φυγοκέντρησης διαπερνούν την μεμβράνη τα άλατα ενώ το ένζυμο συγκρατείται στο συμπύκνωμα. Στην συνέχεια, η στήλη ξαναγεμίζεται με το

ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης. Έτσι επιτυγχάνεται αραίωση του άλατος στο αρχικό διάλυμα ενζύμου και σταδιακή εναλλαγή του διαλύματος. Με αλληπάλληλους κύκλους φυγοκέντρησης η απόδοση της διεργασίας αυξάνεται σημαντικά.

Χρήση μεμβρανών διαπίδυσης

Η μέθοδος αυτή, χρησιμοποιείται κυρίως όταν το δείγμα προς αφαλάτωση είναι αρκετά μεγάλου όγκου (>20mL). Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι ίδια με την εξισορρόπηση του πρωτεϊνικού διαλύματος προς απομόνωση που αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 2.2.7.2. Το δείγμα εισέρχεται στο εσωτερικό της μεμβράνης και το σύστημα εμβαπτίζεται σε δοχείο που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα της πρωτεΐνης. Η διαφορά συγκέντρωσης του άλατος μεταξύ του δείγματος και του περιβάλλοντος ρυθμιστικού διαλύματος, προκαλεί την ροή των αλάτων προς το εξωτερικό της μεμβράνης προκειμένου να επέλθει η ισορροπία. Δεδομένου ότι, ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος του δοχείου είναι τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερος, το άλας διασπείρεται σε όλο το σύστημα και η συγκέντρωση του μειώνεται. Αντίθετα, η πρωτεΐνη δεν μπορεί να διαπεράσει το MWCO της μεμβράνης και συγκρατείται. Η παραμονή του δείγματος στο ρυθμιστικό διάλυμα είναι 24 ώρες, προκειμένου η πρωτεΐνη να είναι απαλλαγμένη από τα άλατα.

2.2.8 Έλεγχος καθαρότητας μέσω ηλεκτροφόρησης σε γέλη πολυακρυλαμιδίου

Ο έλεγχος της καθαρότητας των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν, αλλά και ο προσεγγιστικός προσδιορισμό του μοριακού τους βάρους, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis ή SDS-PAGE). Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών παρασκευάστηκαν τα παρακάτω πηκτώματα (Πίνακας 2.25).

Πίνακας 2.25. Σύσταση των πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης.

Πάχος της γέλης 1,5 mm	Γέλη στοίβαξης (Stacking Gel)	Γέλη διαχωρισμού ή ανάλυσης (Resolving Gel)		
	4%	7,5%	10%	12,5%
Απιονισμένο νερό (dH ₂ O)	1,5mL	2,9mL	2,3mL	1,7mL
0,75 M Tris/SDS 0,2% (pH 8,8)	-	4,7mL	4,7mL	4,7mL
0,25 M Tris/SDS 0,2% (pH 6,8)	1,9mL	-	-	-
40% bis-acrylamide	0,38mL	1,76mL	2,35mL	2,94mL
Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED)	7,5μL	10μL	10μL	10μL
Υπερθειικό Αμμώνιο (APS) 10% w/v	25μL	50μL	50μL	50μL

Σημειώνεται, ότι για το Resolving Gel χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον η συγκέντρωση 12,5% ώστε η πυκνότητα πόρων της γέλης να είναι μεγαλύτερη. Αυτό εξυπηρετεί στην καλύτερη διαχωριστική ικανότητα. Για την προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων και την φόρτωσή τους στο ηλεκτρολυτικό κελί χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα που παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 2.26).

Πίνακας 2.26. Σύσταση διαλυμάτων φόρτωσης και δειγματοληψίας.

Συστατικό	Συγκέντρωση	
	SDS Running Buffer 10x (aq)	SDS Sample Buffer (aq)
Tris	250 mM	-
Glycine	1,92 M	-
SDS	1% w/v	10% w/v
Tris-HCl	-	312,5 mM
Glycerol	-	50% v/v
β-mercaptoethanol	-	25% v/v
bromophenol blue	-	0,025% w/v

Τέλος, ο εντοπισμός των πρωτεϊνών μέσα στην γέλη έγινε μέσω των διαλυμάτων χρώσης και αποχρωματισμού (Πίνακας 2.27).

Πίνακας 2.27. Σύσταση διαλυμάτων χρώσης και αποχρωματισμού.

Συστατικό	Συγκέντρωση	
	Coomasie Brilliant Blue (CBB) Stain Solution (aq)	Destain Solution (aq)
CBB G250	0,25% w/v	-
Methanol	40% v/v	20% v/v
Acetic Acid	10% v/v	10% v/v

Η ταυτοποίηση του τελικού βιοτεχνολογικού προϊόντος, γίνεται με την ηλεκτροφόρηση του καθαρού πλέον ενζύμου σε γέλη πολυακρυλαμίδιου. Αρχικά στήνεται η διάταξη η οποία στηρίζει την ένωση των γιάλυνων πλακών για τον σχηματισμό της γέλης (Εικόνα 2.10), ενώ ταυτόχρονα παρασκευάζονται τα διαλύματα επιστοίβασης (Stacking) και ανάλυσης (Resolving) χωρίς την προσθήκη των αντιδραστηρίων έναρξης πολυμερισμού APS και TEMED (Πίνακας 2.25). Έπειτα, γίνεται η έναρξη του πολυμερισμού στο διάλυμα Resolving και αποχύνεται στο διαχωριστικό κενό μεταξύ των δύο γυαλιών μέχρι την ένδειξη που υποδεικνύει η διάταξη. Παράλληλα, γίνεται και η προσθήκη dH₂O ώστε να αποφευχθεί η διόγκωση του πηκτώματος. Μετά το πέρας περίπου 15 λεπτών, γίνεται η έναρξη του πολυμερισμού και στο διάλυμα επιστοίβασης και αποχύνεται μέχρι την κορυφή των πλακών (ενώ προηγουμένως έχει απορριφθεί το dH₂O). Στο ύψος της κορυφής τοποθετείται και το ειδικό καλούπι που επιτρέπει την υποδοχή των δειγμάτων προς

ηλεκτροφόρηση. Ύστερα από επιπλέον 15 λεπτά τα δύο στρώματα γέλης έχουν πήξει επαρκώς και το σύστημα των δύο πλακών μεταφέρεται στο ηλεκτρολυτικό κελί.

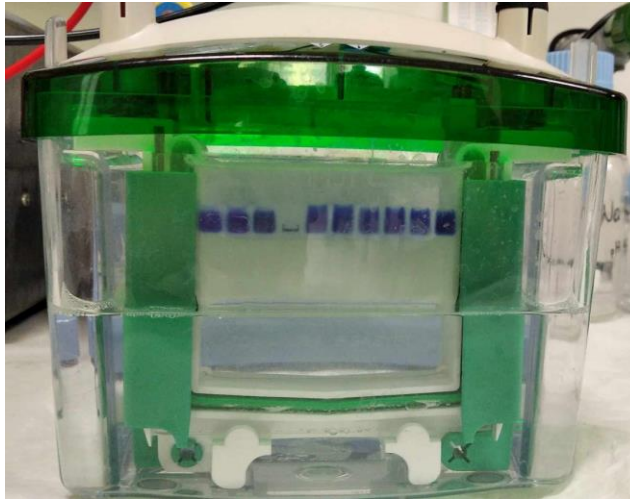


Εικόνα 2.10. Διάταξη στήριξης των δύο γυάλινων πλακών και καλούπι σχηματισμού υποδοχών δείγματος (αριστερά). Το διάκενο έχει συμπληρωθεί μέχρι την κορυφή με τα διαλύματα.

Ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση. Σε Eppendorfs των 1,5mL προστίθεται 40μL από το δείγμα και 10μL από το Sample Buffer (Πίνακας 2.26). Τα Eppendorfs επωάζονται για 5 λεπτά στους 100°C σε θερμαντική πλάκα. Κατά την επώαση, οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται και περικλείονται από την ένωση SDS η οποία έχει αρνητικό φορτίο. Με αυτόν τον τρόπο, η πρωτεΐνη παρασύρεται προς την άνοδο από τις δυνάμεις του ηλεκτρικού πεδίου και διαχέεται διαμέσου των πόρων της γέλης.

Η γέλη που σχηματίστηκε μεταφέρεται σε ειδικό υποδοχέα, το οποίο προσαρμόζεται καταλλήλως στο εσωτερικό του ηλεκτρολυτικού κελιού. Ο υποδοχέας, δέχεται επιπλέον ένα γυαλί («dummy glass») που επιτελεί υποστηρικτικό ρόλο στην διάταξη. Έπειτα, στο κελί αποχύνεται το διάλυμα Running Buffer (Πίνακας 2.26), μέχρι την ένδειξη του κελιού. Στην συνέχεια απομακρύνεται το καλούπι και μεταφέρεται στους υποδοχείς που δημιουργήθηκαν, 50μL από τα δείγματα καθώς και 3,5μL από το δείγμα αναφοράς μοριακών βαρών (Protein Marker). Η κεφαλή μαζί με τα ηλεκτρόδια κλείνει και, εφαρμόζεται τάση 50V για 30 λεπτά προκειμένου να εισχωρήσουν αρχικά οι πρωτεΐνες στην πρώτη στρώση γέλης (Stacking gel). Ύστερα, εφαρμόζεται τάση 100V για 1,5 ώρα ή μέχρι να φύγει το μπλε μέτωπο SDS από την γέλη (Εικόνα 2.11).

Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η γέλη παραλαμβάνεται από το κελί και οι πλάκες που την επικάλυπταν απομακρύνονται. Η καθαρή πλέον γέλη εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης (Πίνακας 2.27) και αφήνεται υπό ήπια ανάδευση (60rpm) για 1 ώρα. Μετέπειτα, το διάλυμα χρώσης απομακρύνεται και προστίθεται διάλυμα απομάκρυνσης της χρώσης (Πίνακας 2.27) και αφήνεται και αυτό υπό ανάδευση για 24 ώρες, όπου και παραλαμβάνεται το τελικό προϊόν ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 2.11. Ηλεκτρολυτικό κελί στο εσωτερικό του οποίου διακρίνονται η γέλη και τα δείγματα που επρόκειτο να ηλεκτροφορηθούν (με μικρή ποσότητα απεικονίζεται το δείγμα αναφοράς)

2.2.9 Χημικές δοκιμές (assays) υγρών καλλιεργείων

Οι χημικές δοκιμές αποτελούν μέθοδο προσδιορισμού ενεργότητας των ενζύμων. Η μέθοδος αυτή βρήκε πολλές εφαρμογές ζωτικής σημασίας στην παρούσα μελέτη. Ειδικότερα, με την υλοποίηση χημικών δοκιμών πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος των υγρών καλλιεργείων, ως προς την δυνατότητα έκφρασης της ετερόλογης πρωτεΐνης και επομένως την επιλογή της αποτελεσματικότερης αποικίας. Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια παραλλαγή του ελέγχου με τρυβλία αγαρόζης (Κεφ.2.2.4.3), κατά την οποία γίνεται λήψη δείγματος από υγρή καλλιέργεια κάθε 24 ώρες μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 5.000 x g για 1 λεπτό και το υπερκείμενο ακατέργαστο υγρό που περιέχει το ένζυμο εξετάστηκε σε χημικές δοκιμές ως προς την ενεργότητά του. Επιπρόσθετα, με τις χημικές δοκιμές καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός των ενεργών κλασμάτων από τις διεργασίες απομόνωσης αλλά και ο χαρακτηρισμός των εκφραζόμενων ενζύμων για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης και σταθερότητας.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ενεργότητας πραγματοποιείται με την μετατροπή των μονάδων απορρόφησης, από την εκάστοτε μεταβολή που προκαλεί το ένζυμο σε δεδομένο υπόστρωμα, σε μονάδες ενζυμικής ενεργότητας (Units). Η πλήρης μεθοδολογία μετατροπής απορρόφησης σε ενεργότητα αναλύεται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.

2.2.9.1 Ρυθμιστικά διαλύματα αντιδράσεων

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν είχαν συγκεντρώσεις 25, 50 και 100mM, ωστόσο κατά κύριο λόγο γινόταν χρήση διαλυμάτων 50mM (Πίνακας 2.28).

Πίνακας 2.28. Σύσταση και εφαρμογές ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Ρυθμιστικό Διάλυμα	Citrate Phosphate (CpI)	Sodium Phosphate (NaPi)	Potassium Phosphate (KPi)	Tris-HCl
Σύσταση	C ₆ H ₈ O ₇ K ₂ HPO ₄	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	C ₄ H ₁₁ NO ₃ HCl (aq)
Εύρος τιμών pH	2,5-6,0	6,0-8,0	6,0-8,0	8,0-10,0

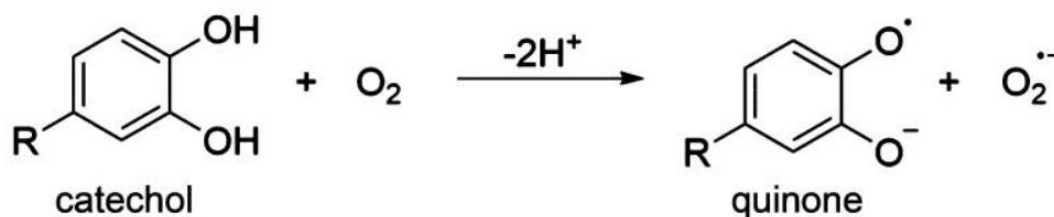
Σημειώνεται πως η προσθήκη του HCl στα διαλύματα Tris-HCl γίνεται σε μικρούς όγκους από ένα διάλυμα υδροχλωρίου συγκέντρωσης 1M, υπό συνεχή ανάδευση και έλεγχο του pH για την επίτευξη της επιθυμητής τιμής.

2.2.9.2 Ενζυμικές αντιδράσεις για τον προσδιορισμό ενεργότητας

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ενεργότητα των ενζύμων, είναι αναγκαίο να προκαλέσουν κάποια εύκολα ανιχνεύσιμη μεταβολή σε εκλεκτό υπόστρωμα. Η φύση των νέων ενζύμων που μελετώνται στην παρούσα εργασία είναι τέτοια που απαιτεί δοκιμές σε διαφορετικά υποστρώματα. Επιπλέον τονίζεται πως, είναι απαραίτητη η μετατροπή των μονάδων απορρόφησης σε μονάδες ενεργότητας (mUnits) ή και ακόμα ανηγμένες μονάδες ενεργότητας (mUnits/mg ενζύμου) με σκοπό την αποτύπωση της δραστικότητάς τους σε μια κοινή αναγνωρισμένη βάση.

- **Τυροσινάση**

Η δοκιμή ενζυμικής δραστικότητας έγινε στην κατεχόλη, ένα οργανικό μόριο το οποίο οξειδώνεται σε κινόνη (Εικόνα 2.12) [124].



Εικόνα 2.12 Αντίδραση οξείδωσης της κατεχόλης στην κινόνη [124].

Η τυροσινάση, όντας οξειδωτικό ένζυμο έχει την ικανότητα να επιταχύνει την οξειδωτική μετατροπή της κατεχόλης. Η αντίδραση γίνεται με σύσταση που αναγράφεται παρακάτω (Πίνακας 2.29).

Πίνακας 2.29. Σύσταση της χημικής δοκιμής σε κατεχόλη.

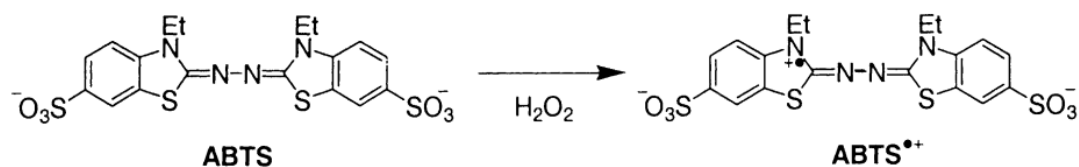
Συστατικό	Συγκέντρωση στην αντίδραση
Κατεχόλη 40mM	4mM
Ρυθμιστικό διάλυμα KPi pH=7,5 50mM	40mM

Η κίνηση που απελευθερώνεται εκπέμπει ακτινοβολία στα 420nm. Έτσι, η αντίδραση γίνεται σε 96-well plate και επωάζεται για 10 λεπτά με το φωτόμετρο να ρυθμίζεται έτσι, ώστε να λαμβάνει μετρήσεις απορρόφησης ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Με αυτόν τον τρόπο εξάγεται μια μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης στην μονάδα του χρόνου (v_{max}) του κάθε well. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός πως με την πάροδο του χρόνου θα απελευθερώνεται όλο και μεγαλύτερη ποσότητα κίνησης. Εάν η συγκέντρωση του ενζύμου στην ποσότητα που προστέθηκε είναι μεγαλύτερη (που συνεπάγεται αποδοτικότερη έκφραση από τα κύτταρα της αποικίας), τότε η κίνηση που απελευθερώνεται στη μονάδα του χρόνου θα είναι επίσης μεγαλύτερη και κατ' επέκταση θα εμφανίζει μεγαλύτερη v_{max} . Επιπλέον, το «τυφλό» δείγμα δεν περιλαμβάνει το ένζυμο, αλλά συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα K_2HPO_4 - KH_2PO_4 pH=7,5 50mM. Κάθε well έχει όγκο 250μL επομένως συνοπτικά η αντίδραση περιλαμβάνει:

- (α) 200μL K_2HPO_4 - KH_2PO_4 pH=7,5 50mM
- (β) 25μL Κατεχόλη 40mM
- (γ) 25μL Πρωτεϊνικό δείγμα

- **Υπεροξυγενάσες Astra55, Astra57 και Astra58**

Η αρχή της λειτουργίας του ελέγχου είναι ίδια με την τυροσινάση. Το υπόστρωμα που επιλέχθηκε για τον έλεγχο των UPOs είναι το 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ή εν συντομία το ABTS. Το μόριο αυτό οξειδώνεται προς την αντίστοιχη ρίζα - κατιόν παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου και οξειδωτικών ενζύμων (Εικόνα 2.13) [125].



Εικόνα 2.13. Αντίδραση οξειδωσης του ABTS προς την αντίστοιχη ρίζα του [125].

Το προϊόν της αντίδρασης παρουσιάζει ένα έντονο πρασινωπό χρώμα, το οποίο απορροφά έντονα στα 420nm. Έτσι, προετοιμάζεται η αντίδραση σε 96-well plate με τα εκφραζόμενα ένζυμα με τα συστατικά του Πίνακα 2.30.

Πίνακας 2.30. Σύσταση χημικής δοκιμής σε ABTS

Συστατικό	Συγκέντρωση στην αντίδραση
ABTS 20mM	2mM
H ₂ O ₂ 200mM	2mM
Ρυθμιστικό διάλυμα CPl pH=4,5 50mM	39,5mM

Το φωτόμετρο ρυθμίζεται ξανά ώστε να προσδιορίσει κινητική της αντίδρασης, δηλαδή την v_{max} και το φωτόμετρο επωάζεται για 10 λεπτά. Ειδικότερα, δεδομένου ότι το κάθε well έχει όγκο 250μL, οι ποσότητες που προστίθενται είναι:

- (α) 197,5μL Citrate Phosphate pH=4,5 50mM
- (β) 25μL ABTS 40mM
- (γ) 2,5μL H₂O₂ 200mM
- (δ) 25μL Πρωτεϊνικό δείγμα

Σημειώνεται, πως το «τυφλό» δείγμα αποτελούνταν από τα ίδια συστατικά με την τροποποίηση να αποτελεί η προσθήκη 25μL ρυθμιστικού διαλύματος Citrate Phosphate pH=4,5 50mM αντί του πρωτεϊνικού δείγματος.

- **Αμιδάση, Ενδοπεπτιδάση, Πρωτεάση**

Οι χημικές δοκιμές που εφαρμόστηκαν ήταν περισσότερες της μιας, λόγω της δυσκολίας που εμφάνισαν στην εκδήλωση ενεργότητας. Συγκεκριμένα οι αντιδράσεις που υλοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

- 1) Ένα από τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν για τον προσδιορισμό ενεργότητας ήταν η καζεΐνη. Αρχικά σκόνη καζεΐνης διαλύεται σε NaOH 0,01N, ρυθμιστικό διάλυμα NaPi 50mM pH 7,0 και dH₂O σε αναλογία όγκων 5:4:1 αντίστοιχα, προκειμένου να παρασκευαστεί τελικό διάλυμα καζεΐνης συγκέντρωσης 1% w/v. Η παρασκευή του διαλύματος απαιτεί συνεχής ανάδευση με δίνη (Vortex) για περίπου 15 λεπτά με ταυτόχρονη θέρμανση στους 50°C. Έπειτα, το εξεταζόμενο ένζυμο προστίθεται σε Eppendorf των 1,5mL μαζί με το διάλυμα καζεΐνης και επωάζεται για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη τριχλωροξικού οξέος (TCA) 10% v/v. Το «τυφλό» δείγμα αποτελείται ακριβώς από τα ίδια συστατικά, ωστόσο προστίθεται πρώτα το TCA, ώστε το ένζυμο να απενεργοποιηθεί ακαριαία. Στην συνέχεια όλα τα δείγματα φυγοκεντρώνται και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε 96-well UV plate προκειμένου να φωτομετρηθεί στα 280nm. Η αρχή στην οποία βασίζεται η συγκεκριμένη χημική δοκιμή, είναι στην υδρόλυση της καζεΐνης από τα πρωτεολυτικά ένζυμα σε επιμέρους υδατοδιαλυτά ολιγοπεπτίδια. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση, τόσο μεγαλύτερη και η συγκέντρωση των ολιγοπεπτιδίων και επομένως τόσο μεγαλύτερη η δραστικότητα των ενζύμων [126].

- 2) Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και ως υπόστρωμα το Impranil® DLN-SD. Σε Eppendorfs των 1,5mL προστίθεται 400μL από το ρυθμιστικό διάλυμα NaPi 50mM pH 7. Στην συνέχεια προστίθεται 50μL από το γαλάκτωμα Impranil® DLN-SD, ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1% v/v. Τέλος προστίθεται 50μL από το εξεταζόμενο ένζυμο και το Eppendorf επωάζεται στους 30°C με ανάδευση 1300rpm. Τα δείγματα αναφοράς αποτελούνται από 450μL ρυθμιστικού διαλύματος και 50μL Impranil® DLN-SD τελικής συγκέντρωσης 1% v/v. Μετά από 24 ώρες η επώαση σταματά και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 600nm. Τα ένζυμα, εφόσον είναι δραστικά υδρολύουν του ουρεθανικούς δεσμούς του γαλακτώματος και, το διάλυμα διαυγάζει. Μικρότερη απορρόφηση υποδεικνύει μεγαλύτερη δραστικότητα.

Αξίζει να σημειωθεί, πως για τον προσδιορισμό ενζυμικής ενεργότητας της αμιδάσης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές και με άλλα υποστρώματα όπως με p-Nitrophenyl Acetate (pNPA), p-Nitroacetanilide (pNAA), αιθαναμίδιο και το υπόστρωμα L-BAPNA, ενώ επιπλέον ελέγχθηκαν και πρωτόκολλα ενεργοποίησης της καταλυτικής δράσης του ενζύμου (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ).

2.2.10 Υπολογισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Στα δείγματα που λαμβάνονταν καθημερινά για την υλοποίηση των χημικών δοκιμών, ταυτόχρονα, προσδιοριζόταν και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που έχει εκφραστεί με τις παρακάτω μεθόδους.

- Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι γρήγορη και ευαίσθητη και μέσω αυτής προσδιορίζεται η συγκέντρωση πρωτεϊνών με μεγάλη επαναληψιμότητα. Το διάλυμα Bradford έχει ως κύρια βάση την χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία έχει κίτρινο χρώμα στην ελεύθερη μορφή της και έχει αρνητικό φορτίο. Ωστόσο, παρουσία κάποιας πρωτεΐνης, το αρνητικό φορτίο αλληλεπιδρά με τα θετικά κατάλοιπα που απαρτίζουν την πρωτεΐνη και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο το οποίο παρουσιάζει ένα έντονο μπλε χρώμα. Το σύμπλοκο έχει μέγιστη απορρόφηση στα 595nm [127]. Η μέτρηση γίνεται σε 96-well plate αναμειγνύοντας 240μL από το διάλυμα Bradford και 10 μL από το δείγμα. Επιπλέον, παρέχεται καμπύλη βαθμονόμησης που προσδιορίζεται από τον παρασκευαστή του διαλύματος με δοκιμές σε μια πρωτεΐνη αναφοράς, συνήθως χρησιμοποιείται η Bovine Serum Albumin ή αλλιώς BSA (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ). Με βάση αυτήν και την απορρόφηση που παρουσιάζει το πρωτεϊνικό δείγμα είναι εφικτός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης. Ως «τυφλή» μέτρηση ορίστηκε το δείγμα από καλλιέργεια μη ανασυνδυασμένων κυττάρων. Η διαφορά που παρατηρήθηκε, με τα εξεταζόμενα δείγματα, αντιστοιχεί στην ετερόλογη πρωτεΐνη.

- Νόμος Lambert-Beer

Εναλλακτικά, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα, μπορεί να προσεγγιστεί και από την εξίσωση Lambert-Beer λυμένη ως προς την συγκέντρωση, δηλαδή:

$$C = \frac{A_{280}}{\epsilon \cdot b},$$

όπου C η συγκέντρωση σε M, A_{280} , η απορρόφηση του δείγματος στα 280nm, ϵ ο συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας σε $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ και b το μήκος του well ίσο με 0,67cm. Ο προσδιορισμός γίνεται με την προσθήκη σε 96-well UV plate 250μL πρωτεϊνικού διαλύματος όπου και ακολουθεί μέτρηση στα 280nm. Η επιλογή του συγκεκριμένου μήκους κύματος, έγκειται στην απορρόφηση που παρουσιάζεται από τον πεπτιδικό δεσμό αλλά και από χαρακτηριστικές ομάδες αμινοξέων.

2.2.11 Αποθήκευση κυττάρων σε γλυκερόλη (Glycerol Stock)

Η αποθήκευση των μετασχηματισμένων κυττάρων, αποτελεί κρίσιμο βήμα καθώς προσφέρει διαθεσιμότητα κυττάρων που φέρουν το επιθυμητό γονίδιο, παραβλέποντας τις μεθοδολογίες μετασχηματισμού και εξοικονομώντας χρόνο και ενέργεια. Η αποθήκευση γίνεται παρουσία γλυκερόλης, διότι αποσταθεροποιεί τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των μορίων του νερού, αποτρέποντας έτσι το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου κατά την κατάψυξη προσφέροντας προστασία στα κύτταρα [128].

Έτσι, η διαδικασία αποθήκευσης έχει ως πρωταρχικό βήμα την παρασκευή θρεπτικού μέσου YPD (Πίνακας 2.17). Έπειτα, το μέσο αφού έχει διαμεριστεί σε κατάλληλο περιέκτη υπό ασηπτικές συνθήκες εμβολιάζεται με τις αποικίες των μετασχηματισμένων κυττάρων από τα τρυβλία YPD με Ζεοσίνη που είχαν παρασκευαστεί και αποθηκευτεί σε ψύκτη. Ακολούθησε επώαση στους 27°C με 180rpm για 24 ώρες [105].

Στην συνέχεια παρασκευάζεται θρεπτικό μέσο YPD και υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 10% w/v στις απαραίτητες ποσότητες και αποστειρώνονται. Η αποστείρωση γίνεται στους 109°C για 40 λεπτά, λόγω της παρουσίας γλυκόζης (Dextrose). Έπειτα, δημιουργείται το μέσο αποθήκευσης το οποίο ουσιαστικά αποτελείται από το μέσο YPD με την προσθήκη του υδατικού διαλύματος γλυκερόλης σε τελική συγκέντρωση 15% v/v.

Το στοκ γλυκερόλης σύμφωνα με το πρωτόκολλο είναι απαραίτητο να έχει $OD_{600} = 50 - 100$, δηλαδή απαιτείται μεγάλη κυτταρική πυκνότητα. Χρησιμοποιήθηκε η τιμή 100 ως το όριο θολερότητας και δεδομένου αυτής υπολογίστηκε ο όγκος που οφείλεται να ληφθεί από τις καλλιέργειες του YPD που επώαστηκαν. Η μεθοδολογία είναι παρόμοια με αυτήν που ακολουθείται στο Κεφάλαιο 2.2.6.2 όπου αναλύεται η τεχνική του εμβολιασμού των κυττάρων *P. pastoris* γενικότερα [105]. Ο όγκος, που υπολογίστηκε με την μέθοδο εμβολιασμού, συλλέγεται σε Falcons των 50mL. Τα Falcons φυγοκεντρώνονται στις 4500rpm για 20 λεπτά στην ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4°C. Το υπερκείμενο υγρό (καθαρό YPD), απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται με το μέσο αποθήκευσης (YPD + Γλυκερόλη 15%). Στην συνέχεια τα κυτταρικά εναιωρήματα κατανέμονται σε Eppendorfs των 1,5mL και μεταφέρονται στην υπερκατάψυξη όπου και αποθηκεύονται στους -80°C. Η αποθήκευσή τους σε αυτές τις συνθήκες μπορεί να είναι από μήνες μέχρι και χρόνια, ωστόσο συνίστανται να πραγματοποιείται μηνιαίος έλεγχος για την δυνατότητα και την απόδοση ετερόλογης έκφρασης των κυττάρων.

2.2.12 Εφαρμογές των εκφραζόμενων ενζύμων

2.2.12.1 Αντιδράσεις σε PU

Η εφαρμογή σε υπόστρωμα PU, αφορά τα ένζυμα του *F. oxysporum*, την κουτινάση και το εμπορικό ένζυμο σαβινάση. Αρχικά καταστρώνεται ο σχεδιασμός των αντιδράσεων. Η δράση των ενζύμων εξετάζεται τόσο μεμονωμένα όσο και συνδυαστικά. Αναλυτικότερα τα δείγματα προετοιμάστηκαν εις τριπλούν και χρησιμοποιήθηκαν και έξι δείγματα ως αναφορά, για κάθε ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Σε Eppendorf των 1,5mL ζυγίζονται 5mg ($\pm 0,2$ mg) σκόνης σε αναλυτικό ζυγό.
2. Σε κάθε Eppendorf προστίθενται 450 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 50mM pH 8 ή Crp 50mM pH=5, ανάλογα με το ένζυμο που δρούσε. Στα δείγματα αναφοράς προστίθενται 500 μ L από το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα.
3. Προσθήκη 50 μ L ενζύμου στα δείγματα (εκτός των δειγμάτων αναφοράς). Η τελική συγκέντρωση του ενζύμου στην αντίδραση είναι 1mg/mL, επομένως γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις.
4. Επάωση όλων των δειγμάτων για 3 ημέρες στους 35°C με ανάδευση 1000rpm. Κάθε 24 ώρες γίνεται η προσθήκη της μισής ποσότητας ενζύμου για την αντιστάθμιση της απενεργοποίησης που υφίσταται.
5. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 10.000rpm για 5 λεπτά και απομάκρυνση υγρού και ξήρανση του στερεού PU σε ειδικό φούρνο υπό κενό.
6. Ζύγιση της συνολικής μάζας PU που απέμεινε, σύγκριση με αρχική μάζα.
7. Διαλυτοποίηση της σκόνης PU σε τετραϋδροφουράνιο (THF) σε αναλογία 2,5mg PU/mL.
8. Επάωση των οργανικών διαλυμάτων στους 30°C με ήπια ανακίνηση στους 400rpm για πλήρη διαλυτοποίηση του στερεού.
9. Εισαγωγή του υγρού σε ειδικά φιαλίδια (vials) και μεταφορά προς ανάλυση στην HPLC, Agilent και στην GPC, Agilent

Πραγματοποιούνται δύο επίπεδα ελέγχου, τόσο στην συνολική μάζα του στερεού, στη περίπτωση που κατά την δράση του ενζύμου παράγονται υδατοδιαλυτά προϊόντα και επομένως αποικοδομείται, όσο και στην μοριακή δομή του πολυμερούς στην περίπτωση κάποιας χημικής τροποποίησης (HPLC) ή της διαφοράς στο μοριακό βάρος αυτού (GPC).

2.2.12.2 Αντιδράσεις LDPE

Οι αντιδράσεις με σκόνη PE έγιναν με τις υπεροξυγενάσες. Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα έγιναν με τρεις επαναλήψεις για κάθε ένζυμο και για τα δείγματα αναφοράς. Τα δείγματα αναφοράς ήταν τριών ειδών: (α) παρουσία μόνο υποστρώματος, (β) παρουσία υποστρώματος και H₂O₂ και (γ) παρουσία υποστρώματος και BSA. Με το (β) πραγματοποιείται ο έλεγχος της εγγενούς δράσης

του ενζύμου χωρίς την παρουσία H_2O_2 , ενώ με το (γ) γίνεται ο έλεγχος της επιφανειακής πρόσδεσης του ενζύμου στο PE. Τα βήματα που εφαρμόστηκαν για τον σχεδιασμό των αντιδράσεων είναι τα παρακάτω:

1. Ζυγίζονται σε Eppendorfs των 1,5mL, 5mg ($\pm 0,2$ mg) σκόνης PE σε αναλυτικό ζυγό.
2. Προστίθενται τα αντιδραστήρια στα δείγματα, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.31. Σύσταση αντιδράσεων υπεροξυγενασών σε PE

Δείγμα	Σύσταση (Τελικός όγκος 500μL)
PE + Ένζυμο	<ul style="list-style-type: none"> • 460μL NaPi 50mM pH 6 • 40μL ενζύμου με τελική συγκέντρωση 0,01mg/mL
PE + Ένζυμο + H_2O_2	<ul style="list-style-type: none"> • 455μL NaPi 50mM pH 6 • 40μL ενζύμου με τελική συγκέντρωση 0,01mg/mL • 5μL H_2O_2 με τελική συγκέντρωση 2 mM

3. Αντίστοιχα, τα δείγματα αναφοράς παρασκευάζονται ως εξής:

Πίνακας 2.32. Σύσταση δειγμάτων αναφοράς των εφαρμογών σε PE

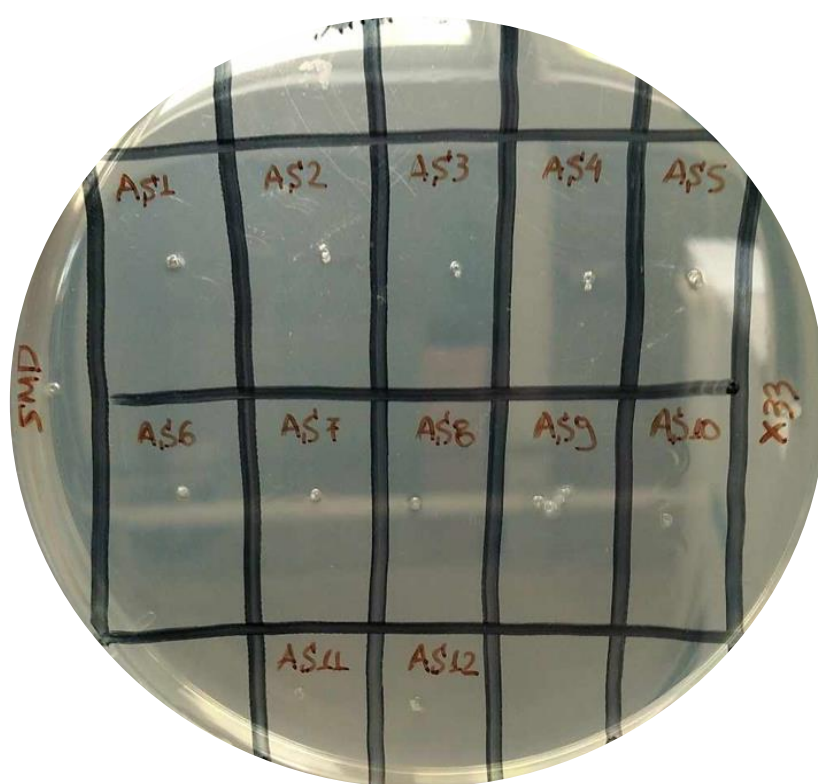
Δείγμα αναφοράς	Σύσταση (Τελικός όγκος 500μL)
PE	<ul style="list-style-type: none"> • 500μL NaPi 50mM pH 6
PE + H_2O_2	<ul style="list-style-type: none"> • 495μL NaPi 50mM pH 6 • 5μL H_2O_2 με τελική συγκέντρωση 2 mM
PE + BSA	<ul style="list-style-type: none"> • 460μL NaPi 50mM pH 6 • 40μL BSA με τελική συγκέντρωση 0,01mg/mL

4. Πραγματοποιείται επώαση όλων των δειγμάτων για 3 ημέρες στους 35°C με ανάδευση 1000rpm. Επιπλέον προστίθεται η μισή ποσότητα ενζύμου σε κάθε δείγμα για την αντιστάθμιση της απενεργοποίησης που υφίσταται.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000rpm για 5 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου. Τα στερεά υπολείμματα ξηραίνονται σε φούρνο στους 60°C για μία ημέρα.
6. Ζύγιση των τελικών μαζών όλων των δειγμάτων και σύγκριση με τις αρχικές τιμές.
7. Ανάλυση της σκόνης PE όλων των δειγμάτων με την μέθοδο ATR για την παρατήρηση μοριακών τροποποιήσεων του πλαστικού.

3. Αποτελέσματα

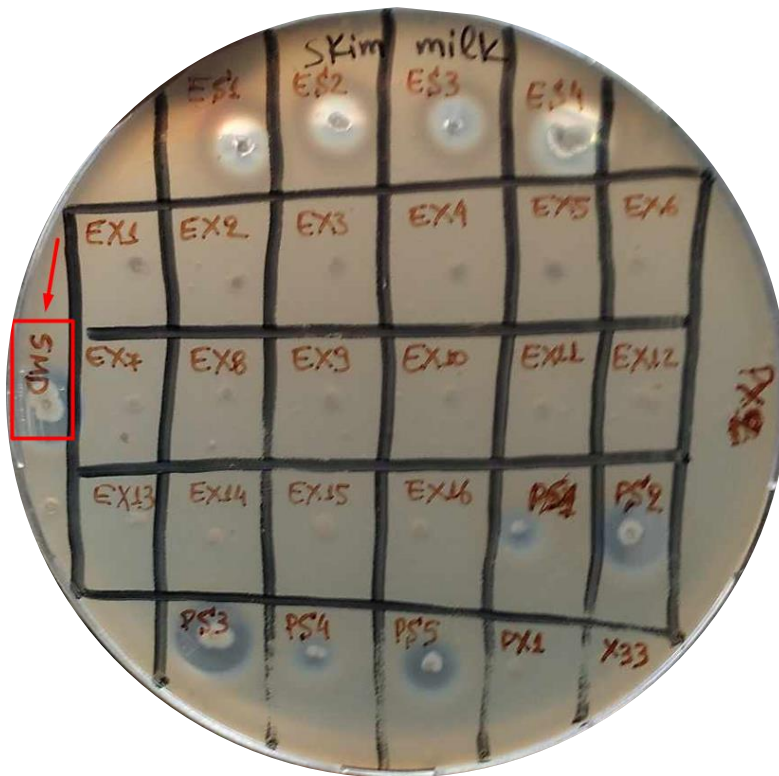
3.1 Επιλογή μετασχηματισμένου στελέχους για την έκφραση των νέων ενζύμων

Η έκφραση των νέων ενζύμων του μύκητα *F. oxysporum* πραγματοποιήθηκε στον ξενιστή *P. pastoris* και συγκεκριμένα στα στελέχη X33 και SMD1168. Προκειμένου να επιλεγθεί το αποδοτικότερο στέλεχος πραγματοποιήθηκε αρχικά σάρωση αποικιών σε τρυβλία αγαρόζης, για κάθε εκφραζόμενο ένζυμο. Στον έλεγχο έκφρασης της αμιδάσης, από το στέλεχος SMD1168 δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στο τρυβλίο, γεγονός που συνεπάγεται την αδυναμία έκφρασης του ενζύμου (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Δοκιμή αποικιών αμιδάσης από το στέλεχος SMD1168 σε ουρία.

Αντίστοιχα, το τρυβλίο αγαρόζης στο οποίο ελέγχθηκε η αποδοτικότητα των διαφόρων αποικιών ως προς την έκφραση της πρωτεάσης και της ενδοπεπτιδάσης ήταν εμπλουτισμένο με αποβουτυρωμένο γάλα (skimmed milk). Οι αποικίες που φέραν το γονίδιο των συγκεκριμένων ενζύμων από το στέλεχος X33, αλλά και το μη μετασχηματισμένο στέλεχος δεν προκάλεσαν καμία αλλαγή στο άγαρ. Αντίθετα ορισμένες αποικίες του στελέχους SMD1168 φάνηκαν να διαυγάζουν το πήκτωμα. Ωστόσο, το ίδιο συνέβη και στην αποικία που αντιστοιχούσε στο μη μετασχηματισμένο στέλεχος (Εικόνα 3.2).

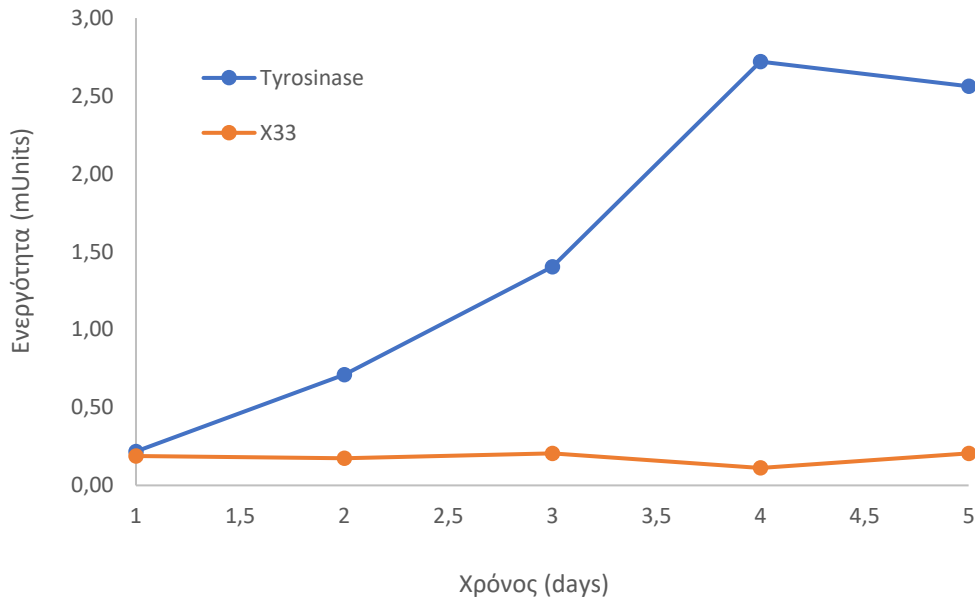


Εικόνα 3.2 Δοκιμή αποικιών πρωτεάσης και ενδοπεπτιδάσης από το στέλεχος SMD1168 και X33 σε ουρία.

Η πρωτεολυτική ικανότητα του μη μετασχηματισμένου στελέχους SMD1168, οφείλεται πιθανόν σε επιμόλυνση του στοκ γλυκερόλης από το οποίο ξεκίνησε η διαδικασία μετασχηματισμού. Η πρωτεολυτική δράση, συνεπάγεται τόσο την αδυναμία επιλογής αποδοτικής αποικίας, όσο και τον κίνδυνο πρωτεόλυσης των εκφραζόμενων ενζύμων. Για τον λόγο αυτό, η ετερόλογη έκφραση και η παραγωγή των εξεταζόμενων ενζύμων επιλέχθηκε να γίνει μόνο στο στέλεχος X33. Αξίζει να σημειωθεί, ότι πραγματοποιήθηκε έλεγχος και της τυροσινάσης και από τα δύο στελέχη σε τρυβλίο αγαρόζης, το οποίο εντούτοις δεν απέφερε κάποια εμφανή οπτική μεταβολή.

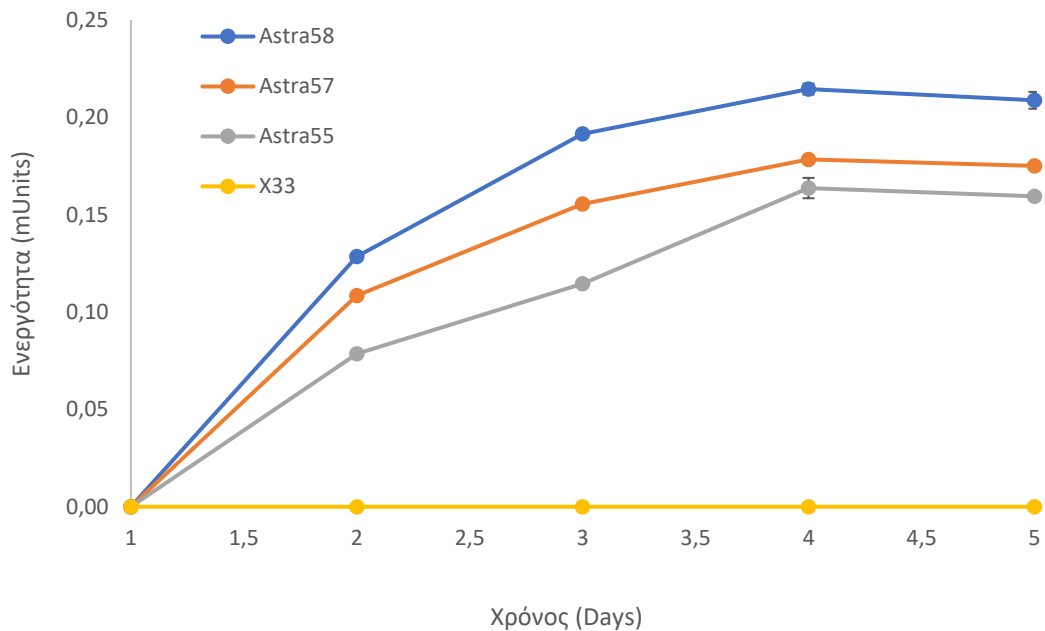
Εν τέλει, η επιλογή των αποικιών που εξέφρασαν τα μελετώμενα ένζυμα έγινε τυχαία, και η βελτιστοποίηση της έκφρασης πραγματοποιήθηκε σε δεύτερο χρόνο, έπειτα από μεταβολή κρίσιμων παραμέτρων σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας. Οι βέλτιστες συνθήκες επιλέχθηκαν με βάση την εκφραζόμενη ενεργότητα μετρούμενη στα φυσικά υποστρώματα (Κεφ.2.2.9). Ωστόσο αυτό καθίσταται εφικτό μόνο στην περίπτωση της καλλιέργειας της τυροσινάσης καθώς οι καλλιέργειες της αμιδάσης, της ενδοπεπτιδάσης και της πρωτεάσης δεν εμφάνισαν ενεργότητα στα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν.

Η παρτίδα βυθισμένης καλλιέργειας σχετιζόμενη με την έκφραση της τυροσινάσης ελέγχθηκε καθημερινά ως προς την ενεργότητα στη οξείδωση της κατεχόλης, σε σύγκριση με την καλλιέργεια μη ανασυνδυασμένων κυττάρων του ξενιστή. Από τον έλεγχο αυτό βρέθηκε ότι η μέγιστη ενεργότητα της καλλιέργειας παρουσιάζεται κατά την 4^η ημέρα ζύμωσης (Διάγραμμα 3.1).



Διάγραμμα 3.1 Βέλτιστος χρόνος κυτταρικής ανάπτυξης για την έκφραση της τυροσινάσης.

Όσο αναφορά τις υπεροξυγενάσες του *A. parasiticus*, η έκφραση πραγματοποιήθηκε μόνο στο στέλεχος X33 για τους λόγους που προαναφέρθηκαν. Η διαλογή των αποτελεσματικότερων αποικιών πραγματοποιήθηκε όπως και προηγουμένως με βελτιστοποίηση της χρονικής διάρκειας της ζύμωσης μέσω ελέγχου της ολόκληρης της καλλιέργειας σε υπόστρωμα ABTS.



Διάγραμμα 3.2 Βέλτιστος χρόνος κυτταρικής ανάπτυξης για την έκφραση της τυροσινάσης.

Όπως, παρατηρείται από το Διάγραμμα 3.2, η 4^η μέρα καλλιέργειας εμφανίζει την μεγαλύτερη ενεργότητα και κατ' επέκταση έκφραση ενζύμου.

3.2 *In silico* βιοχημικός χαρακτηρισμός και πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής

3.2.1 Εκφραζόμενα ένζυμα

Με βάση την γνωστή αμινοξική αλληλουχία των ενζύμων που μελετήθηκαν με ετερόλογη έκφραση, προσδιορίστηκαν βιοπληροφορικά στην εφαρμογή ProtParam του λογισμικού Expassy, Swiss Institute of Bioinformatics, το μοριακό βάρος και η γραμμομοριακή απορροφητικότητα στα 280nm. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε και η πρόβλεψη του θεωρητικού ισοηλεκτρικού σημείου (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1. Βιοπληροφορικά αποτελέσματα των εκφραζόμενων ενζύμων.

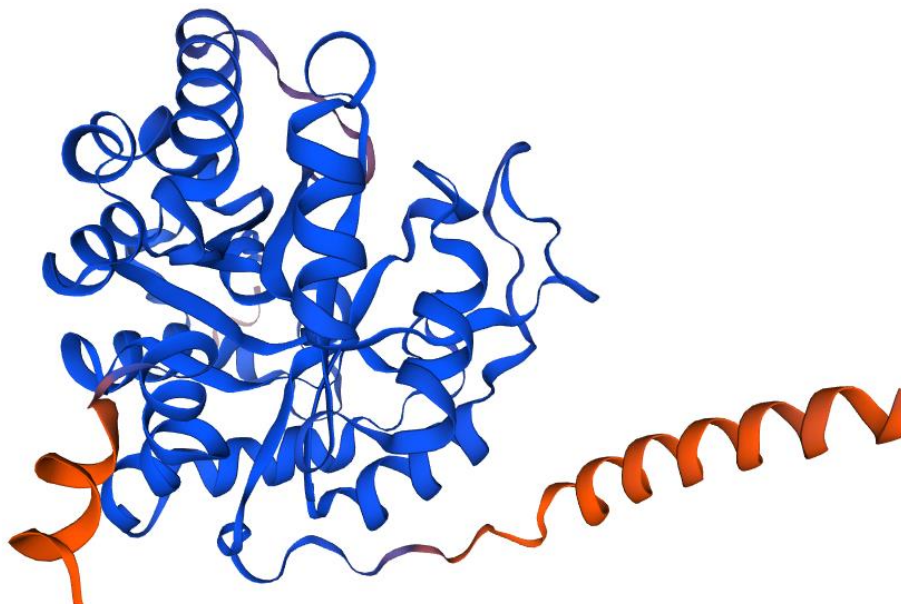
Ένζυμο	Μοριακό βάρος (kDa)	Συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Ισοηλεκτρικό σημείο pI
Αμιδάση	37,0	56045	6,18
Τυροσινάση	63,7	118970	9,16
Πρωτεάση	75,9	78560	5,57
Ενδοπεπτιδάση	71,1	66935	5,34
Astra55	27,5	38390	5,87
Astra57	26,8	27450	5,19
Astra58	30,3	32430	5,87

Επιπλέον, με την αξιοποίηση του SWISS-MODEL, Expassy και του αλγορίθμου AlphaFold της DeepMind, καθίσταται δυνατή η πρόβλεψη των τρισδιάστατων δομών των εξεταζόμενων ενζύμων καθώς και η σύγκριση τους με ένζυμα των οποίων η δομή τους έχει προσδιοριστεί πειραματικά με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή της αλληλουχίας του ενζύμου στον λογάριθμό BLAST της NCBI προκειμένου να βρεθούν από τις βάσεις δεδομένων οι πρωτεΐνες με το μεγαλύτερο ποσοστό επικάλυψης και ταυτόχρονα το μικρότερο E-value. Στην συνέχεια οι πρωτεΐνες με τα κατάλληλα δεδομένα αναζητήθηκαν στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων της RSCB, με σκοπό να εντοπιστεί η τρισδιάστατη δομή τους εφόσον έχουν κρυσταλλογραφηθεί. Ο σκοπός αυτής της ανάλυσης είναι η οπτικοποίηση του υπό εξέταση ενζύμου και η σύγκριση της προβλεπόμενης δομής του, με την δομή μιας πρωτεΐνης που εμφανίζει σημαντικό ποσοστό ομολογίας. Στην περίπτωση που η γνωστή πρωτεΐνη έχει κρυσταλλογραφηθεί μαζί με το υπόστρωμα που καταλύει, αναδεικνύεται μέσω της ευθυγράμμισης των δύο αλληλουχιών η πιθανή θέση του ενεργού κέντρου στο εκάστοτε εξεταζόμενο ένζυμο.

3.2.1.1 Αμιδάση

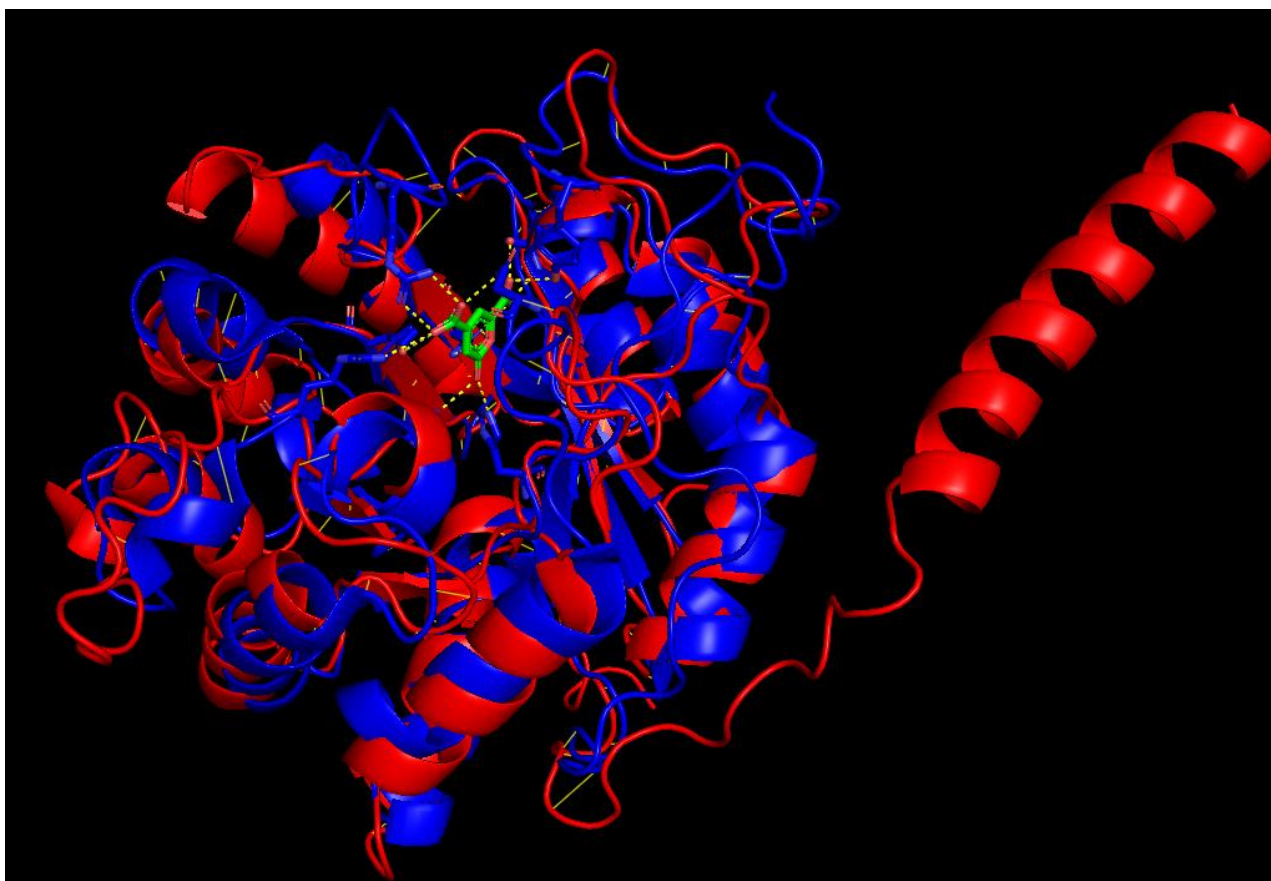
Η τρισδιάστατη δομή της αμιδάσης, όπως προσδιορίστηκε από το SWISS-MODEL, Exrassy και του αλγορίθμου AlphaFold της DeepMind απεικονίζεται στην Εικόνα 3.3.



Εικόνα 3.3. Απεικόνιση της προβλεπόμενης τρισδιάστατης δομής της αμιδάσης.

Με μπλε χρώμα αποτυπώνονται οι περιοχές στις οποίες ο αλγόριθμος παρουσιάζει μεγάλο βαθμό εμπιστοσύνης ως προς την διαμόρφωση της αμινοξικής αλληλουχίας στον χώρο, ενώ με ελαφρώς πορτοκαλί χρώμα αποτελούν τις περιοχές στις οποίες ο βαθμός αξιοπιστίας είναι αρκετά χαμηλός (<0,50) και επομένως ενδέχεται να παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις.

Ύστερα, έγινε αναζήτηση για την εύρεση ενζύμου με μεγάλο ποσοστό ομολογίας που ταυτόχρονα η δομή της έχει κρυσταλλογραφηθεί μαζί με το υπόστρωμα που καταλύει με σκοπό να αναδειχθεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το ένζυμο που πληροί τα παραπάνω κριτήρια είναι η 2-πυρονο-4,6-δικαρβοξυλική υδρολάση του αερόβιου και αρνητικού κατά gram βακτηρίου *Sphingomonas raucimobilis*, το οποίο βρέθηκε μέσω της βάσης δεδομένων Swissprot. Το συγκεκριμένο ένζυμο ανήκει στην μεγάλη οικογένεια των αμιδο-υδρολασών και το υπόστρωμα το οποίο καταλύει είναι το 2-πυρονο-4,6-δικαρβοξυλικό οξύ [129].

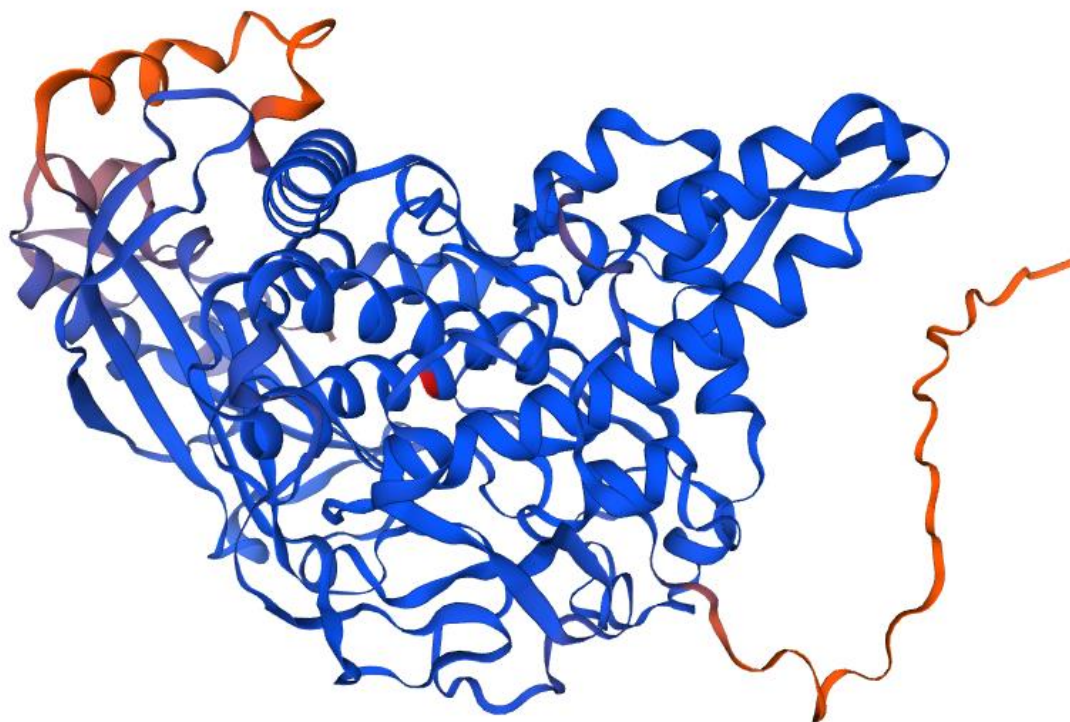


Εικόνα 3.4. Απεικόνιση της αμιδάσης (κόκκινο χρώμα) και της 2-πυρονο-4,6-δικαρβοξυλική υδρολάσης (μπλε χρώμα) ύστερα από ευθυγράμμιση των αλληλουχιών τους μαζί με το υπόστρωμα (πράσινο χρώμα) και τους δεσμούς που σχηματίζει με τα αμινοξέα (κίτρινες διακεκομμένες γραμμές).

Η συγκεκριμένη υδρολάση, εμφανίζει ποσοστό ομολογίας 25,46% με E-value $7e-23$ (που υποδεικνύει ότι η πιθανότητα οι όποιες ομοιότητες υπάρχουν να είναι τυχαίες είναι πολύ μικρή) και όπως φαίνεται και από την Εικόνα 3.4, η δομή είναι παρόμοια σε πολλές περιοχές ενώ οι α -έλικες παρουσιάζουν αλληλοεπικάλυψη. Επιπρόσθετα, από την αλληλούχιση και τις αλληλεπιδράσεις του υποστρώματος με την υδρολάση εντοπίστηκαν τα αντίστοιχα αμινοξέα της αμιδάσης και όπως φαίνεται από την Εικόνα 3.5 παρουσιάζονται αρκετές ομοιότητες.

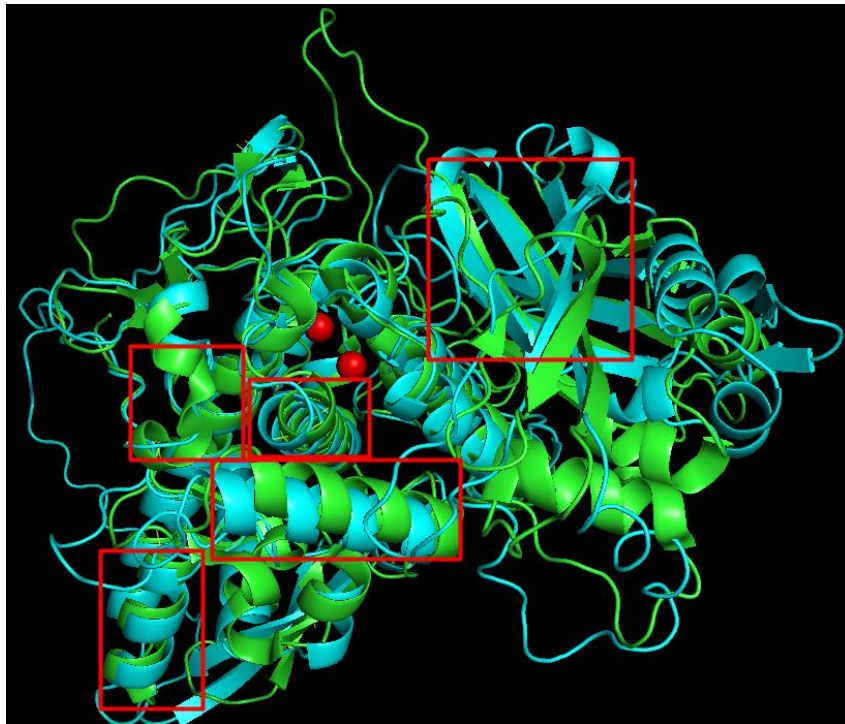
3.2.1.2 Τυροσινάση

Η δομή της τυροσινάσης αποτελείται από περίπλοκη αναδίπλωση με α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα. Όπως και προηγουμένως οι αμινοξικές αλληλουχίες με πορτοκαλί χρώμα δεν παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό αξιοπιστίας από τον αλγόριθμό (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7. Προβλεπόμενη δομή της τυροσινάσης.

Επιπρόσθετα μέσω της ευθυγράμμισης της αλληλουχίας βρέθηκε από την βάση δεδομένων Swissprot, η πρωτεΐνη τυροσινάση του μύκητα *Agaricus bisporus* H97 η παρουσιάζει ποσοστό ομοιότητας 31,50% με E-value ίσο με $1e-47$. Επιπλέον, το συγκεκριμένο ένζυμο παρουσιάζει μοριακό βάρος ίσο με 63,5kDa που είναι πολύ κοντά σε αυτό της εξεταζόμενης τυροσινάσης (63,7kDa).



Εικόνα 3.8. Απεικόνιση της δομής της εξεταζόμενης τυροσινάσης (γαλάζιο χρώμα), της τυροσινάσης του *Agaricus bisporus* H97 (πράσινο χρώμα) καθώς και τα ιόντα χαλκού (κόκκινες σφαίρες) τα οποία λειτουργούν ως συμπαραγοντες στην κρυσταλλογραφημένη τυροσινάση.

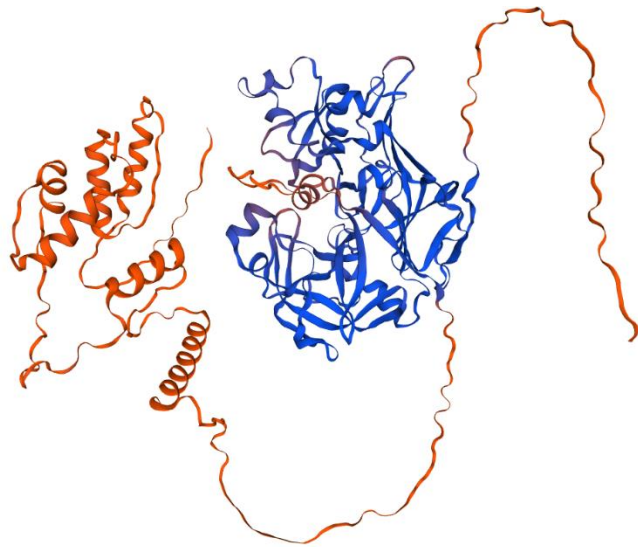
Στην Εικόνα 3.8, με κόκκινα κουτιά έχουν αποτυπωθεί μερικές από τις δομικές ομοιότητες μεταξύ των δύο δομών. Επιπρόσθετα, στην τυροσινάση του *A. bisporus* H97, δύο ιόντα χαλκού που λειτουργούν ως συμπαραγοντες και αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα His56, Cys79, His81, His90 το ένα και His250, His254, Phe278 και His282 το δεύτερο [130]. Μέσω της αλληλούχισης βρέθηκαν τα αντίστοιχα αμινοξέα στην εξεταζόμενη τυροσινάση, αναδεικνύοντας έτσι τον ενδεχόμενο τρόπο αλληλεπίδρασης με τον συγκεκριμένο συμπαραγοντα (Εικόνα 3.9).

Query	34	TGGAAVPARKNINDMQKAGGPAWDLVYMRVRSMYDAKETDWKSYFQVGGI H G K P F I Q W N G	93
Sbjct	9	TGG--VKNRLDIVDFVR-DEKFFTLVIRALQAIQDKQSDYSSFFQLSGI H G L P F T P W A K	65
Query	94	GGGRSGNGWP-GY C H G E S I F L T W H R P Y V L L Y E Q I L V E H A K R L A N L Y P S K Y R K Q Y V D A A N	152
Sbjct	66	PKDTPVTPYESG Y C H S Q V L F P T W H R V Y V S I Y E Q I L Q E A A K G I A K K F - T V H K K E W A Q A A E	124
Query	153	SLRAAYWDWALDGIPAILTQQNVNVKVPNGSGLKKTINMKNPLYTYNF-PKDALNNKYGSW	211
Sbjct	125	DLRQPYWDTGFALVPPDEI I K L E Q V K I T N Y D G T K - I T V R N P I L R Y S F H P I D P S F N G Y P N F	183
Query	212	DD-EHRVRIYHCPAPDSFPSSANKL-LRQRPYKQWVYDVMTRPTTFNQFASTG---ANG	265
Sbjct	184	DTWKTTVRNPDADKKENIPALIGKLDLEADSTREKTYNMLKFANWEAFSNHGEFDDTHA	243
Query	266	ASLEQTHIAI H --WDASCAGQFLATEFSGFDPI F N L H H / N V D R L W A Y W Q A M H P S Q S T F T	322
Sbjct	244	NSLEAVHDDI H G F V G R G A I R G H M T H A L F A A F D P I F N L H S N V D R H L S L W Q A L Y P G V W V T Q	303
Query	323	GSYSGGARYSTPQGTRITPSSPLNPFYRSRGNFHTSDTVKSIKGFYTYAGLEYWHMSAS	382
Sbjct	304	GPEREGSMGFAP-GTELNKDSALEPFYETEDKPWTSVPLTDTALLNYSYPDFDKVKGGTP	362
Query	383	QL-SNSAKTTINRLYGS G S S R 402	
Sbjct	363	DLVRDYINDHIDRRYGIKKSE 383	

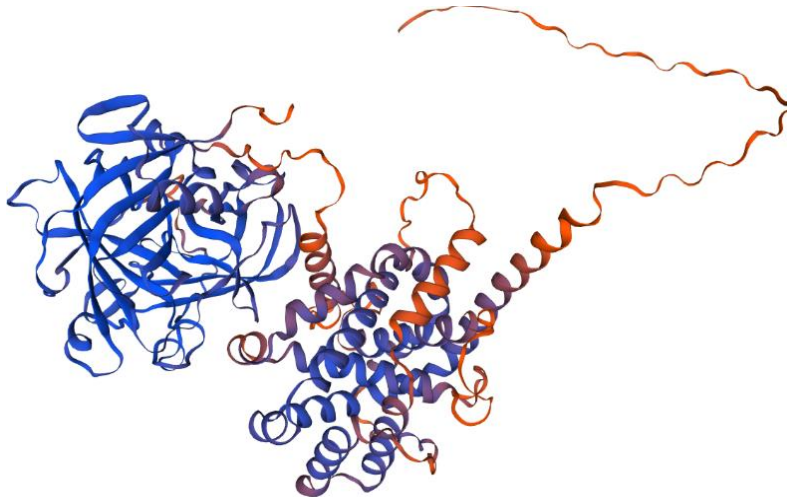
Εικόνα 3.9. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών της εξεταζόμενης τυροσινάσης (πάνω) και της τυροσινάσης του *A. bisporus* H97 (κάτω), με κόκκινα παρουσιάζονται τα αμινοξέα τα οποία προσδέονται το ένα ιόν χαλκού ενώ μπλε τα αμινοξέα που προσδέονται το δεύτερο.

Γίνεται αντιληπτό, ότι υπάρχει επικάλυψη των αμινοξέων ενδιαφέροντος στις δύο αλληλουχίας, αλλά ταυτόχρονα υπάρχει και πλήρης ομοιότητα μεταξύ των αμινοξέων. Έτσι, ενδέχεται η αλληλεπίδραση του συμπάραγοντα ιόντος χαλκού στην δράση της εξεταζόμενης τυροσινάσης να γίνεται από τα αντίστοιχα σημειωμένα αμινοξέα.

3.2.1.3 Πρωτεάση και Ενδοπεπτιδάση



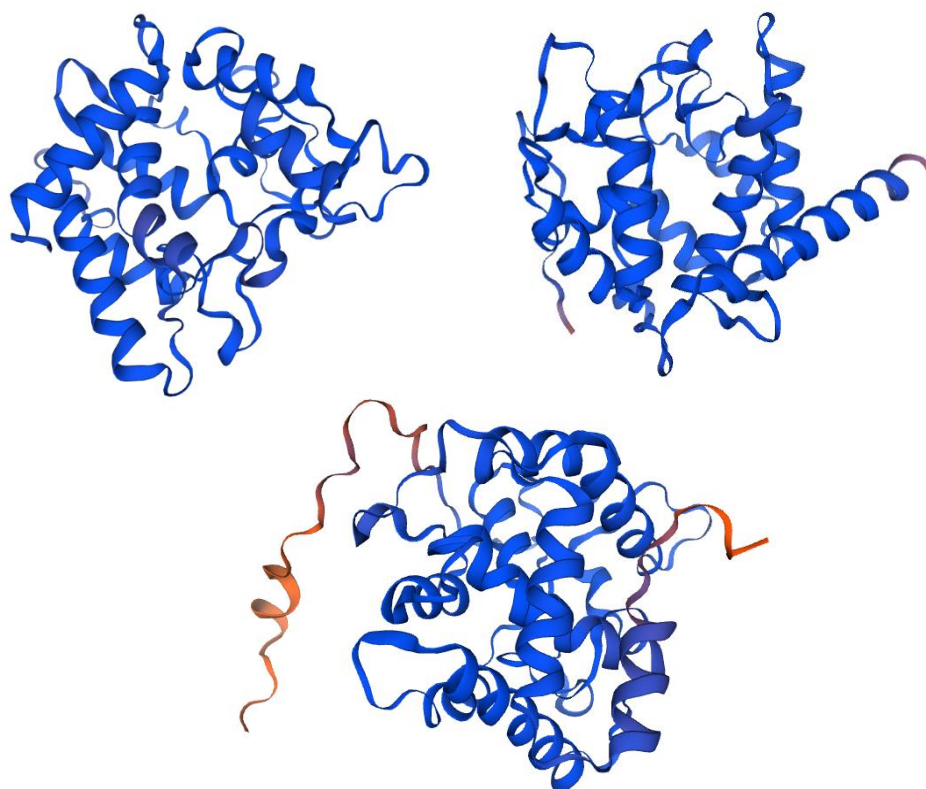
Εικόνα 3.10. Τρισδιάστατη απεικόνιση της πρωτεάσης



Εικόνα 3.11. Τρισδιάστατη απεικόνιση της ενδοπεπτιδάσης

Η πρόβλεψη της δομής της πρωτεάσης συνεπάγεται με μια κεντρική δομή από β-πτυχωτά φύλλα μεγάλης αξιοπιστίας. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα προηγούμενα ένζυμα, υπάρχουν μεγαλύτερες περιοχές χαμηλής αξιοπιστίας (πορτοκαλί χρώμα) που υποδεικνύουν την δυσκολία του αλγορίθμου να απεικονίσει ένα μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης (Εικόνα 3.10). Αντίθετα, η πρόβλεψη της ενδοπεπτιδάσης παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, ενώ διακρίνονται και δύο διαφορετικές πρωτεϊνικές περιοχές, με την πρώτη να αποτελείται κυρίως από β-πτυχωτά φύλλα και την δεύτερη από α-έλικες (Εικόνα 3.11). Παρόλα αυτά, οι πρωτεΐνες αυτές έχουν επιμέρους περιοχές (domains) όπως φαίνεται ξεκάθαρα από τις παραπάνω εικόνες. Από τις δύο αυτές δομές, ενδέχεται να εμπεριέχει το ενεργό κέντρο και άρα να έχει την πρωτεολυτική δράση, ενώ η άλλη περιοχή να παίζει υποστηρικτικό ρόλο στην κατάλυση. Η συμπεριφορά αυτή είναι συχνή για πρωτεΐνες με διακριτές δομές.

3.2.1.4 Υπεροξυγενάσες Astra55, Astra 57 και Astra 58

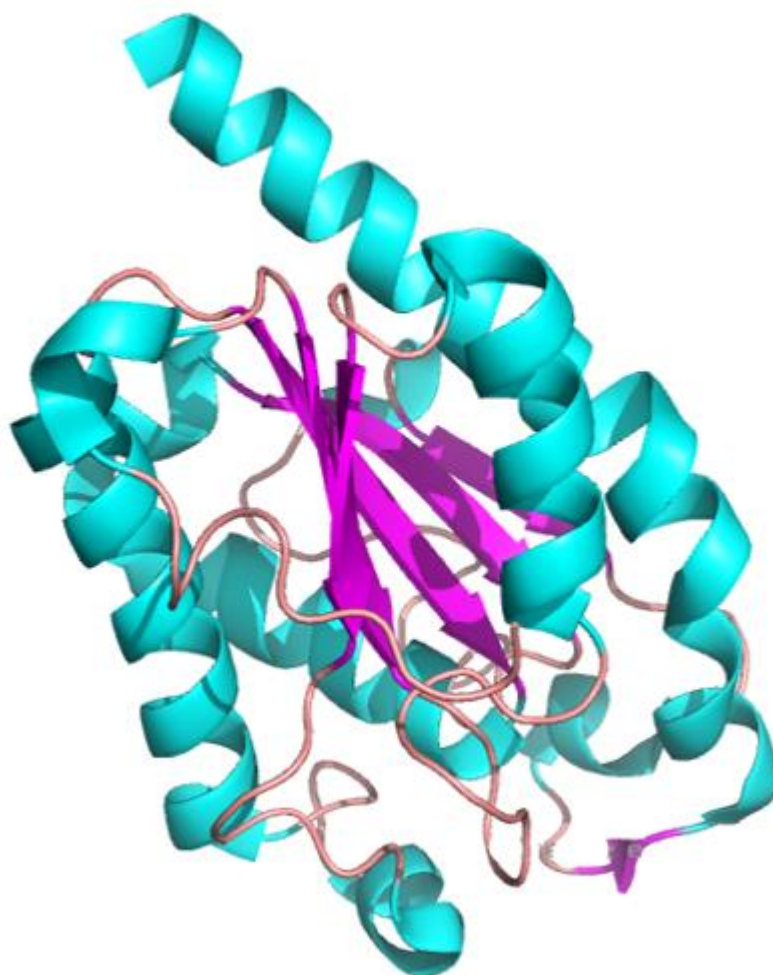


Εικόνα 3.12. Απεικόνιση της δομής των υπεροξυγενασών Astra55 (πάνω αριστερά), Astra57 (πάνω δεξιά) και Astra58 (κάτω).

Η πρόβλεψη των δομών Astra55 και Astra57 έγινε με μεγάλη ακρίβεια ενώ αντίθετα η δομή της Astra58 παρά τον μεγάλο βαθμό εμπιστοσύνης στο προτεινόμενο μοντέλο, υπάρχουν μερικές αμινοξικές αλληλουχίες τις οποίες ο αλγόριθμος τις παρουσιάζει με μικρή αξιοπιστία (<0,50). Είναι τρία ένζυμα με σχετικά μικρό μοριακό βάρος, όπου όπως φαίνεται από την Εικόνα 3.12, αποτελούνται αποκλειστικά από α-έλικες στην διαμόρφωσή τους. Επιπλέον, εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους, αφού η Astra57 με την Astra58 έχουν 58,11% ποσοστό ομοιότητας αμινοξέων ενώ, η Astra55 εμφανίζει προσεγγιστικά ομολογία της τάξης του 33,48% και 35,44% με τις Astra57 και Astra58 αντίστοιχα. Τα δεδομένα αυτά, δείχνουν ότι οι υπεροξυγενάσες είναι ομόλογες, επομένως αναμένεται να έχουν παρόμοια λειτουργικά χαρακτηριστικά αλλά και καταλυτικό μηχανισμό.

3.2.2 Κουτινάση και οι μεταλλάξεις L, T και DM

Η κουτινάση του *F. oxysporum* μελετήθηκε ως προς τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της και την καταλυτική της λειτουργία, ενώ παράλληλα έχει προσδιοριστεί πειραματικά και η τριτοταγής δομή της με κρυσταλλογραφία και χρήση ακτινών Χ [98].



Εικόνα 3.13. Τριτοταγή δομή της κουτινάσης του *F. oxysporum*.

Η δομή της αποτελείται από α-έλικες που περικλείουν β-πτυχωτά φύλλα στο εσωτερικό της δομής (Εικόνα 3.13). Επιπλέον, έχει προσδιοριστεί στην ίδια έρευνα [98] και το ενεργό κέντρο του ενζύμου, το οποίο αποτελείται από την καταλυτική τριάδα σερίνης (S121), ασπαρτικού οξέος (D176) και ιστιδίνης (H189).

Στην παρούσα έρευνα εξετάστηκε η επιρροή που ενδέχεται να έχουν τρεις μεταλλάξεις στην καταλυτική δράση του ενζύμου. Οι μεταλλάξεις αφορούσαν επιλεγμένα αμινοξέα στην αλληλουχία που επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα την καταλυτική δράση. Οι ονομασίες των μεταλλάξεων λήφθηκαν από το είδος του αμινοξέος που μεταλλάσσεται, με εξαίρεση την DM η οποία αναφέρεται στην μετάλλαξη δύο αμινοξέων.

- Double Mutant (DM)

Όπως προαναφέρθηκε, στην συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκαν αλλαγές σε δύο αμινοξέα. Συγκεκριμένα, η λευκίνη (L84) και η ασπαραγίνη (N87) μεταλλάχθηκαν σε αλανίνη (A84) και αλανίνη (A87) αντίστοιχα (Εικόνες 3.14, 3.15). Η αλλαγή αυτή αποσκοπεί στην μείωση των στερικών παρεμποδίσεων που ενδέχεται να υφίσταται από τα αμινοξέα του WT.

```

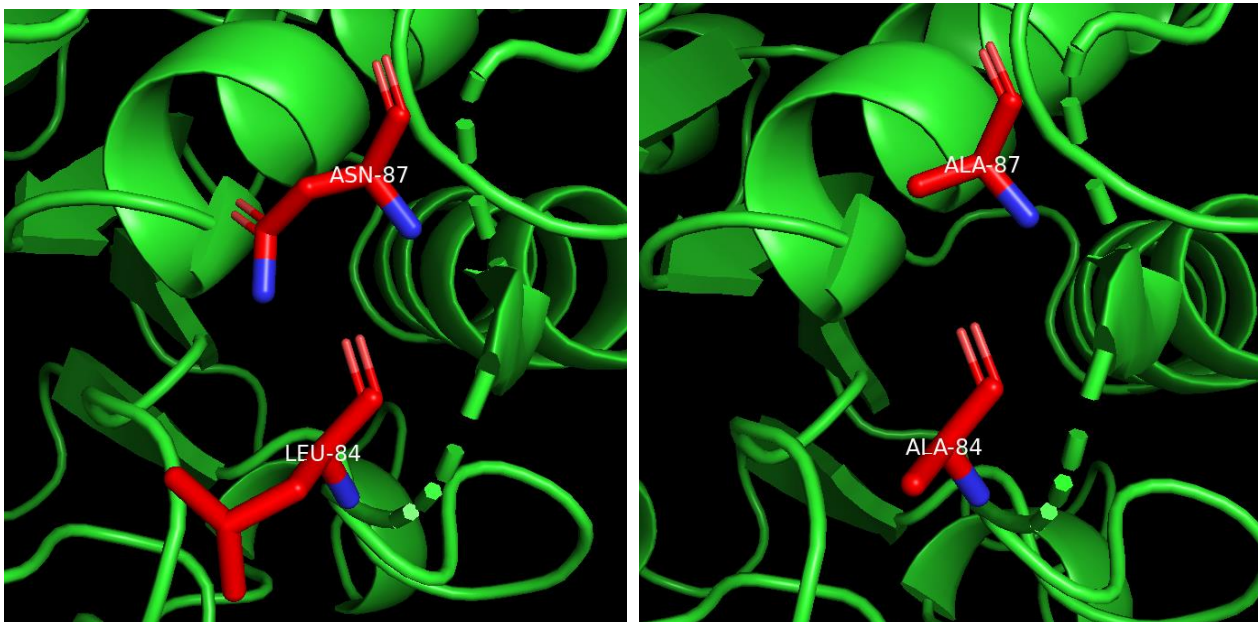
Query 1 MDLPAGQDAAALEARQLGGSITRNDLANGNSGSCPGVIFYARGSTESGNLGLGPRVAS 60
Sbjct 1 MDLPAGQDAAALEARQLGGSITRNDLANGNSGSCPGVIFYARGSTESGNLGLGPRVAS 60

Query 61 KLEAKYGKNGVWVWIQGVGGAYRATLSDNALPRGTSSAAIREMLGHFSDANQKCPDAVLIAG 120
Sbjct 61 KLEAKYGKNGVWVWIQGVGGAYRATLSDNALPRGTSSAAIREMLGHFSDANQKCPDAVLIAG 120

Query 121 GYSQGAALAAASVTDVDAGIREKIAGAVLFGYTKNLQNRGKIPSYPEDRTKVCNTGDLV 180
Sbjct 121 GYSQGAALAAASVTDVDAGIREKIAGAVLFGYTKNLQNRGKIPSYPEDRTKVCNTGDLV 180

Query 181 CTGSLIVAAPHLAYQSAASGAAPFLIQKADAAGAAALEHHHHHH 225
Sbjct 181 CTGSLIVAAPHLAYQSAASGAAPFLIQKADAAGAAALEHHHHHH 225
  
```

Εικόνα 3.14. Ευθυγράμμιση αλληλουχιών κουτινάσης του WT (πάνω) και του DM (κάτω). Με κόκκινο απεικονίζονται τα αμινοξέα που άλλαξαν στην αλληλουχία.



Εικόνα 3.15. Μετάλλαξη των αμινοξέων από την WT (αριστερά) στην DM (δεξιά).

Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 3.15, με την συγκεκριμένη μετάλλαξη, μειώνεται ο όγκος των συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων.

- Μετάλλαξη L

Η μετάλλαξη L, ακολουθεί την ίδια αρχή με την DM, καθώς αφορά την αλλαγή του αμινοξέος λευκίνης (L185) σε αλανίνη (A185). Ωστόσο, το αμινοξύ αυτό βρίσκεται σε διαφορετική θέση στην δομή του ενζύμου συγκριτικά με την διπλή μετάλλαξη (Εικόνες 3.16, 3.17). Ο στόχος της συγκεκριμένης μετάλλαξης είναι ξανά η ελάττωση των στερεικών παρεμποδίσεων.

```

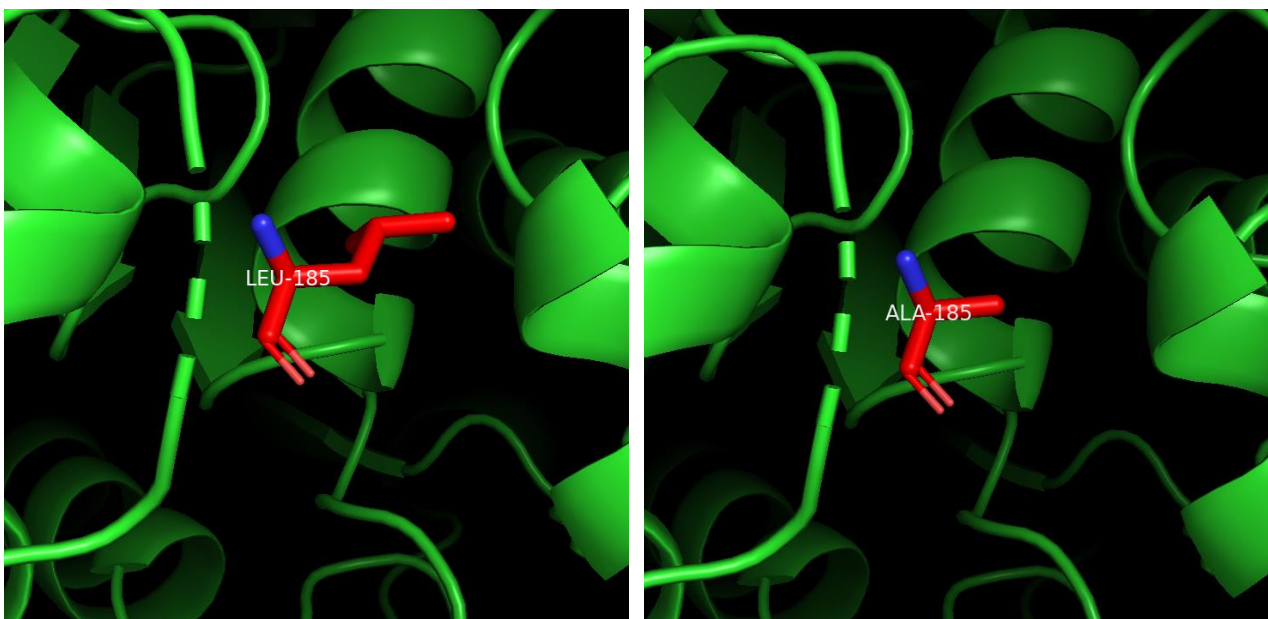
Query 1 MDLPAGQDAAALEARQLGGSITRNDLANGNSGSCPGVIFIYARGSTESGNLGLTLPGRVAS 60
Sbjct 1 MDLPAGQDAAALEARQLGGSITRNDLANGNSGSCPGVIFIYARGSTESGNLGLTLPGRVAS 60

Query 61 KLEAKYGKNGVWIQGVGGAYRATLGDNALPRGTSSAAIREMLGHFSDANQKCPDAVL IAG 120
Sbjct 61 KLEAKYGKNGVWIQGVGGAYRATLGDNALPRGTSSAAIREMLGHFSDANQKCPDAVL IAG 120

Query 121 GYSQGAALAAASVTDVDAGIREKIAGAVLFGYTKNLQNRGKIPSY PEDRTKVFCNTGDLV 180
Sbjct 121 GYSQGAALAAASVTDVDAGIREKIAGAVLFGYTKNLQNRGKIPSY PEDRTKVFCNTGDLV 180

Query 181 CTGSAITVAAPHLAYQSAASGAAPFLIQKADAAGAAALEHHHHHH 225
Sbjct 181 CTGSAITVAAPHLAYQSAASGAAPFLIQKADAAGAAALEHHHHHH 225
  
```

Εικόνα 3.176. Ευθυγράμμιση αλληλουχιών κουτινάσης του WT (πάνω) και της L (κάτω). Με μπλε απεικονίζονται τα αμινοξέα που άλλαξαν στην αλληλουχία.



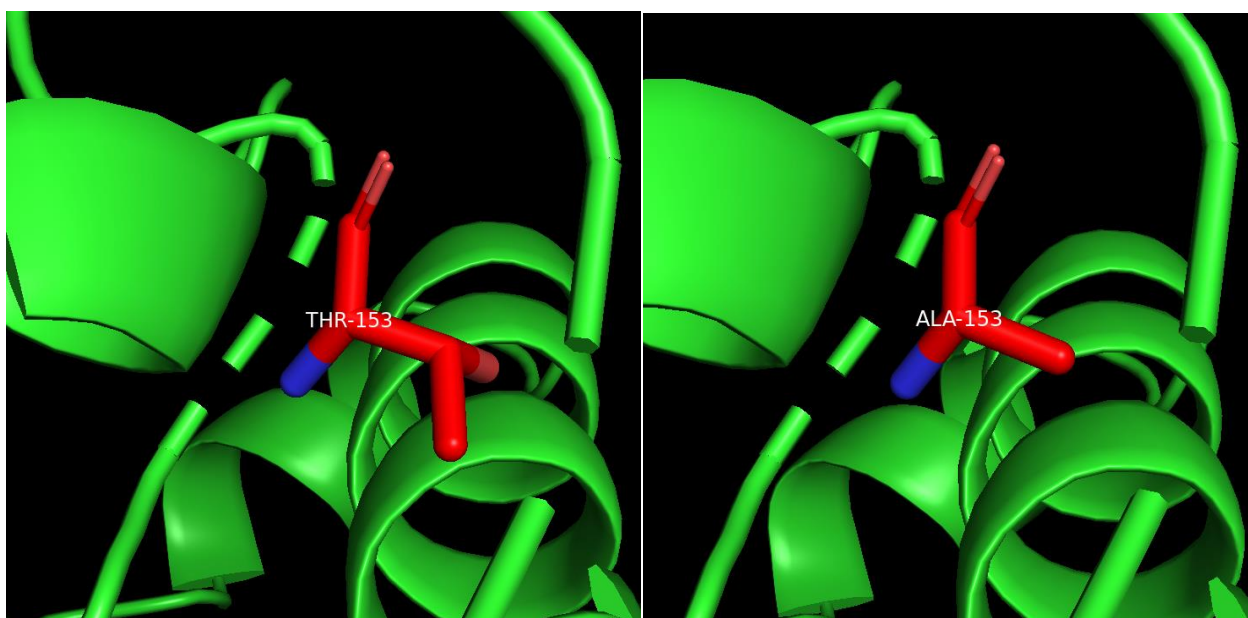
Εικόνα 3.167. Μετάλλαξη του αμινοξέος από την WT (αριστερά) στην L (δεξιά).

- Μετάλλαξη T

Η τελευταία μετάλλαξη που πραγματοποιήθηκε ήταν στο αμινοξύ θρεονίνη (T153) σε αλανίνη (A153) με σκοπό ξανά την μείωση της πιθανής στερεοχημικής παρεμπόδισης λόγω ογκώδους πλευρικής ομάδας του αμινοξέος (Εικόνες 3.18, 3.19).

Query	1	MDLPAGQDAAALEARQLGGSTRNDLANGNSGSCPGVIFYIYARGSTESGNLGLTLPVAVS	60
Sbjct	1	MDLPAGQDAAALEARQLGGSTRNDLANGNSGSCPGVIFYIYARGSTESGNLGLTLPVAVS	60
Query	61	KLEAKYKNGVWIQVGGAYRATLGDNALPRGTSSAAIREMLGHFSDANQKCPDAVLIAG	120
Sbjct	61	KLEAKYKNGVWIQVGGAYRATLGDNALPRGTSSAAIREMLGHFSDANQKCPDAVLIAG	120
Query	121	GYSQGAALAAASVTDVDAGIREKIAGAVLFGYTHNLQNRGKIPSYPEDRTKVCNTGDLV	180
Sbjct	121	GYSQGAALAAASVTDVDAGIREKIAGAVLFGYHNLQNRGKIPSYPEDRTKVCNTGDLV	180
Query	181	CTGSLIVAAPHLAYQSAASGAAPFLIQKADAAGAAALEHHHHHH	225
Sbjct	181	CTGSLIVAAPHLAYQSAASGAAPFLIQKADAAGAAALEHHHHHH	225

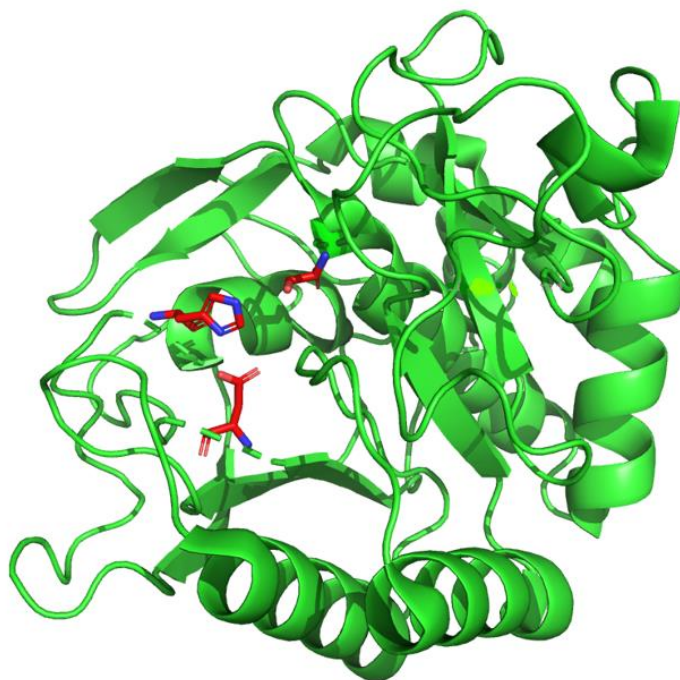
Εικόνα 3.18. Ευθυγράμμιση αλληλουχιών κουτινάσης του WT (πάνω) και της T (κάτω). Με πράσινο απεικονίζονται τα αμινοξέα που άλλαξαν στην αλληλουχία.



Εικόνα 3.19. Μετάλλαξη του αμινοξέος από την WT (αριστερά) στην T (δεξιά).

3.2.3 Σαβινάση

Η τριτοταγής δομή της σαβινάσης περιλαμβάνει μια περιοχή (domain inhibitor I9) η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης, ωστόσο δρα ως παρεμποδιστικός παράγοντας καθώς δεν επιτρέπει την αλληλεπίδραση του υποστρώματος με το ενεργό κέντρο [131].



Εικόνα 3.20 Τριτοταγής δομή μιας συμπτλισίνης (πράσινο χρώμα) και η καταλυτική τριάδα Asp32 - His64 - Ser221 (κόκκινο χρώμα) [132].

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου απαρτίζεται από την τριάδα αμινοξέων ασπαρτικού οξέος - Asp32, ιστιδίνης - His64 και σερίνης - Ser221 (Εικόνα 3.20) [109], [133] και δρα μόνο όταν ενεργοποιηθεί το ένζυμο με την απομάκρυνση της παρεμποδιστικής περιοχής του [131].

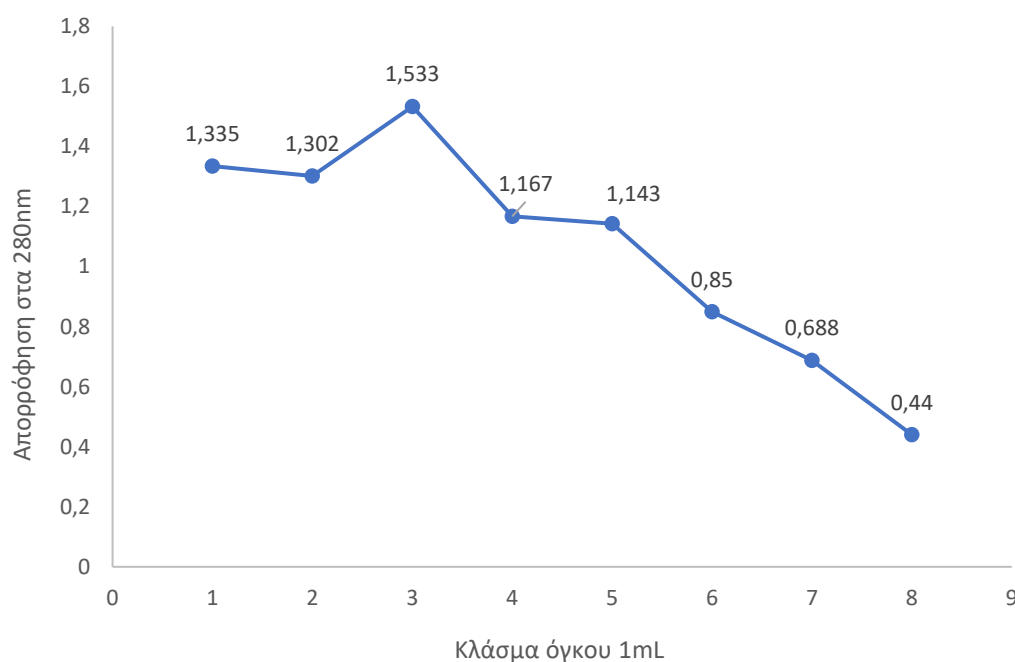
3.3 Χαρακτηρισμός ενζύμων

Στα επτά νέα ένζυμα που μελετήθηκαν και εκφράστηκαν ετερόλογα στον ξενιστή *P. pastoris* πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός και η απομόνωσή τους με σκοπό τον πειραματικό προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης τους, δηλαδή βέλτιστες συνθήκες pH και θερμοκρασίας. Ακόμη, ελέγχθηκε και η σταθερότητα σε διάφορες θερμοκρασίες.

3.3.1 Αμιδάση

3.3.1.1 Απομόνωση μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας

Η απομόνωση της αμιδάσης πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας με την στήλη Talon από ακατέργαστο πρωτεϊνικό διάλυμα το οποίο παράχθηκε από καλλιέργεια όγκου 1L (Διάγραμμα 3.3).



Διάγραμμα 3.3. Απορρόφηση στα 280 nm της αμιδάσης κατά την έκλουση της πρωτεΐνης με 100 mM ιμιδαζόλιο

Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με 100mM ιμιδαζόλιο διαλυμένο σε Talon. Κάθε κλάσμα είχε τελικό όγκο 1mL. Όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα 3.3 το ένζυμο φαίνεται να απομακρύνεται από την στήλη σε ένα αρκετά πλατύ εύρος κλασμάτων με αρκετά μεγάλη απορρόφηση. Επιπλέον, γίνεται αντιληπτό ότι κατά το 3^ο βήμα έκλουσης λαμβάνεται η περισσότερη ποσότητα ενζύμου. Με την εξίσωση του Lambert-Beer και τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας (Πίνακας 3.1), υπολογίστηκε η συγκέντρωση των κλασμάτων αυτών και αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.2).

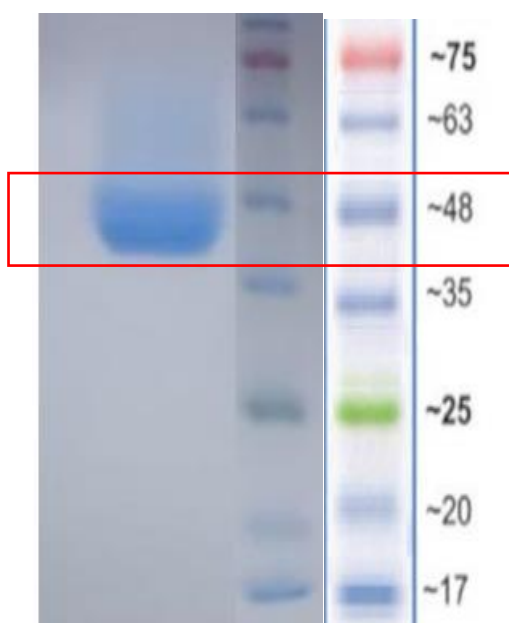
Πίνακας 3.2. Συγκέντρωση απομονωμένης αμιδάσης ανά κλάσμα.

Αριθμός κλάσματος όγκου 1mL	Συγκέντρωση (mg/mL)
1	1,38
2	1,34
3	1,58
4	1,20
5	1,18
6	0,88
7	0,71
8	0,45

Παρατηρήθηκε μεγάλη ενζυμική συγκέντρωση σε κάθε κλάσμα, γεγονός που αναδεικνύει την ικανότητα του ξενιστή να εκφράσει την συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

3.3.1.2 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

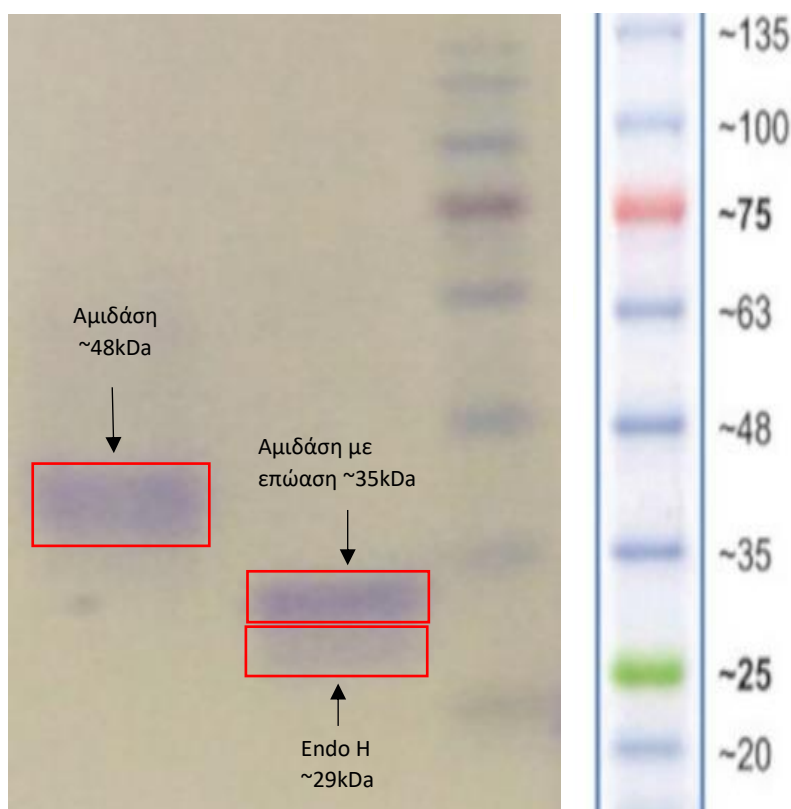
Ύστερα, από την εκτέλεση του συμβατικού πρωτοκόλλου απομόνωσης μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας, ακολούθησε η ταυτοποίηση της απομονωμένης αμιδάσης μέσω του μοριακού βάρους. Σύμφωνα με τον βιοπληροφορικό υπολογισμό το μοριακό βάρος της αμιδάσης είναι 36.980Da ή 37kDa. Ο έλεγχος επιτεύχθηκε μέσω της ηλεκτροφόρησης σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (Εικόνα 3.21).



Εικόνα 3.21. Πήκωμα πολυακρυλαμιδίου αμιδάσης. Απεικονίζεται το 3^ο κλάσμα έκλουσης με την υψηλότερη πρωτεϊνική συγκέντρωση.

Στην ηλεκτροφόρηση ελέγχθηκαν δείγματα από όλα τα κλάσματα που συλλέχθηκαν με το συμβατικό πρωτόκολλο απομόνωσης μέσω μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας. Συγκεκριμένα το διαπέρασμα (Flow Through), το κλάσμα πλύσης (Wash) και τα κλάσματα των 5mM και 10mM ιμιδαζολίου δεν εμφάνισαν καμία μπάντα στο πήκτωμα. Τέλος, το 3^ο κλάσμα από την διαδικασία της έκλουσης εμφανίζει ιδιαίτερα πυκνή μπάντα, γεγονός που επιβεβαιώνουν την ύπαρξη πρωτεΐνης σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση.

Ωστόσο, παρατηρήθηκε απόκλιση από την θεωρητικά αναμενόμενη συμπεριφορά. Συγκεκριμένα η μπάντα βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος περίπου ίσο με 48kDa, δηλαδή 11kDa περισσότερο από το αναμενόμενο. Επομένως, ενδέχεται η αμιδάση να γλυκοζυλιώνεται κατά την έκφραση. Ο έλεγχος της παραπάνω υπόθεσης, ελέγχθηκε με την επώαση της αμιδάσης με μια γλυκοζιδάση, την Endo H, που καταλύει την λύση ολιγοσακχαριτών από πρωτεΐνες. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για μία ώρα, αφού πρώτα είχε προηγηθεί η μετουσίωση της αμιδάσης στους 100°C, προκειμένου να αναχθεί στην πρωτοταγή δομή της και να ευνοηθεί η αντίδραση απογλυκοζιλίωσης.



Εικόνα 3.22. Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αμιδάσης χωρίς επώαση (αριστερά) και με επώαση με την Endo H (δεξιά).

Το μοριακό βάρος της Endo H είναι 29kDa, το οποίο μπορεί προσεγγιστικά να ταυτοποιηθεί από την αχνή μπάντα στην δεύτερη στήλη του πηκτώματος (Εικόνα 3.22). Αντίστοιχα, ακριβώς πάνω από αυτήν, εντοπίστηκε μια δεύτερη μπάντα αρκετά πιο έντονη κοντά στο επίπεδο των 35kDa που αντιστοιχεί στην απογλυκοζιλωμένη

αμιδάση. Το μοριακό αυτό βάρος είναι πολύ κοντά στο αναμενόμενο (37kDa). Στην πρώτη στήλη παρατίθεται δείγμα αμιδάσης που παραλήφθηκε από την απομόνωση χωρίς την επώαση με την Endo H. Συνεπάγεται λοιπόν ότι, η επίδραση της Endo H είναι εμφανής, ενώ επιβεβαιώνεται έτσι και το φαινόμενο της γλυκοζυλίωσης που υπόκειται η αμιδάση από τον ξενιστή κατά την έκφρασή της.

3.3.1.3 Προσδιορισμός βέλτιστου pH καταλυτικής δράσης

Προκειμένου η αμιδάση να χρησιμοποιηθεί για την εφαρμογή της στο ΡU, απαραίτητη προϋπόθεση ήταν να προσδιοριστεί το βέλτιστο pH δράσης. Για τον σκοπό αυτό δοκιμάστηκε η δράση του σε διάφορα υποστρώματα. Ειδικότερα, τα υποστρώματα τα οποία ελέγχθηκαν είναι:

- Καζεΐνη,
- p-Nitrophenyl Acetate (pNPA),
- p-Nitroacetanilide (pNAA),
- Αιθαναμίδιο
- L-BAPNA
- Impranil DLN-SD

Με εξαίρεση το Impranil, το οποίο εμφάνισε τεχνικές δυσκολίες λόγω της φύσης του υποστρώματος στην μέτρηση της απορρόφησης, σε κανένα άλλο υπόστρωμα δεν εμφανίστηκε ενζυμική δραστηριότητα. Επιπρόσθετα, δοκιμάστηκαν και πρωτόκολλα ενεργοποίησης αδρανών μορφών ενζύμων. Τα πρωτόκολλα περιλάμβαναν επώαση σε pH 3,0 για ένα λεπτό στους 0°C ή επώαση σε pH 4,5 με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου παρουσία διθειοθρεϊτόλη (DTT) για μία ώρα στους 37°C. Παρόλα αυτά, δεν ανιχνεύτηκε οποιαδήποτε καταλυτική δράση, παρά την μεγάλη πρωτεϊνική συγκέντρωση των κλασμάτων απομόνωσης. Συνεπώς ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε στο αιώρημα Impranil DLN-SD. Η δράση του ενζύμου μεταφράστηκε ως την ικανότητα διαύγασης του αιωρήματος, δηλαδή την μείωση στην οπτική πυκνότητα του αιωρήματος (OD_{600nm}), από τα δείγματα αναφοράς (απουσίας ενζύμου).

Πίνακας 3.3. Βέλτιστο pH αμιδάσης

pH	Ποσοστιαία σχετική ενεργότητα	Σφάλμα
CPi - 3,5	0%	0%
CPi - 4,0	45%	3%
CPi - 4,5	100%	3%
CPi - 5,0	81%	6%
CPi - 6,0	56%	5%
NaPi - 6,0	39%	3%

Έτσι, διαπιστώθηκε ότι το βέλτιστο pH δράσης της αμιδάσης είναι το 4,5 σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού - φωσφορικού άλατος (CpI) (Πίνακας 3.3). Η δραστηριότητα του ενζύμου δοκιμάστηκε και βασικότερα pH ($\geq 7,0$), ωστόσο παρατηρήθηκε αμελητέα ενεργότητα με μεγάλα σφάλματα. Τονίζεται πως το Impranil DLN-SD, λόγω της φύσης του υποστρώματος εμφάνιζε αρκετές δυσκολίες ως προς την μέτρηση της διάλυσης καθώς μετά το πέρας της επώασης με την αμιδάση σχηματίζε κροκιδώματα. Για την μέτρηση, ήταν απαραίτητη η διάσπαση των κροκιδωμάτων με ισχυρή ανάδευση σε Vortex. Το γεγονός αυτό, ενδεχόμενως να έχει κάποια επιρροή στην επαναληψιμότητα του πειράματος.

3.3.2 Τυροσινάση

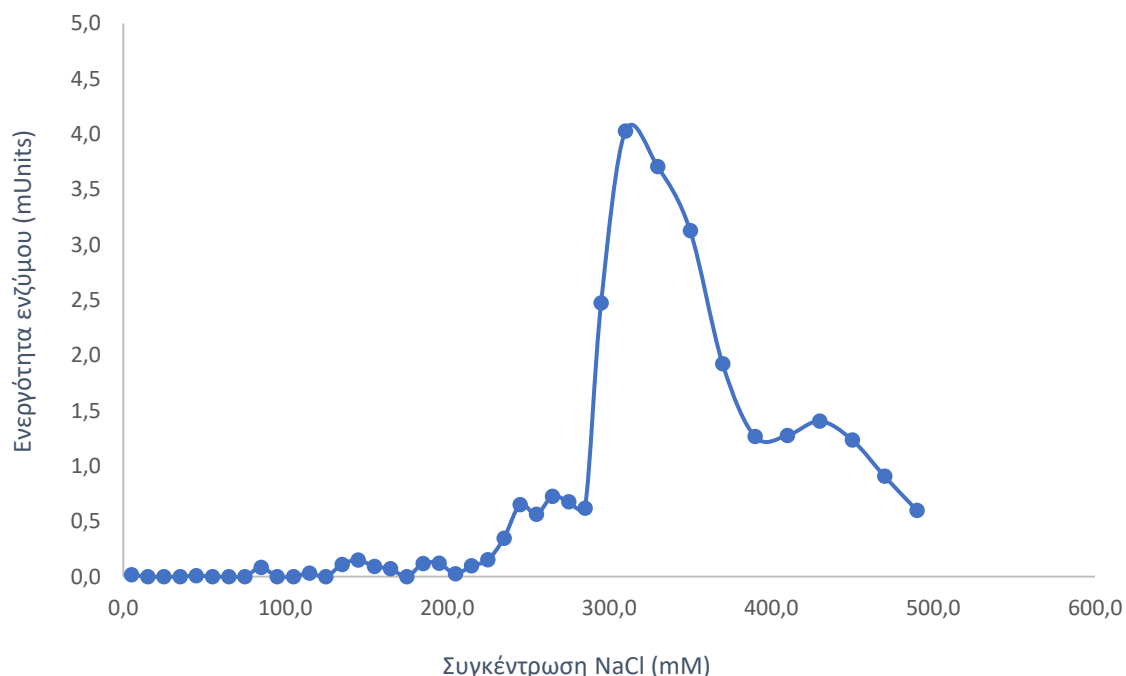
3.3.2.1 Απομόνωση μέσω χρωματογραφία ιοντικής εναλλαγής

Η απομόνωση της τυροσινάσης πραγματοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα KPi 50mM και pH 7,2. Δεδομένου, ότι το θεωρητικό RI, όπως υπολογίστηκε με βιοπληροφορικές μεθόδους είναι 9,2, στο δεδομένο ρυθμιστικό διάλυμα το ένζυμο είναι θετικά φορτισμένο. Προκειμένου να δεσμευτεί στην στήλη και να υπάρχει μεγάλη απόδοση στην διεργασία απομόνωσης χρησιμοποιήθηκε στήλη SP Sepharose High Performance, GE HealthCare, η οποία είναι αρνητικά φορτισμένη. Η έκλυση έγινε βαθμιδωτά (gradient) με διάλυμα άλατος NaCl. Το πρόγραμμα έκλυσης αποτελούνταν από δύο φάσεις (Πίνακας 3.4). Συνολικά, συλλέχθηκαν 40 κλάσματα κατά την διάρκεια της έκλυσης συνολικού όγκου 80mL.

Πίνακας 3.4. Χαρακτηριστικά προγράμματος έκλυσης τυροσινάσης

Δεδομένα Χρωματογραφίας		Φάση A (0mM→300mM)		Φάση B (300mM→500mM)	
Ροή	1 mL/min	Χρόνος	60 min	Χρόνος	20 min
Όγκος ανά σωλήνα	2 mL	Βήμα	5 mM/min	Βήμα	10 mM/min
Χρόνος ανά σωλήνα	2 min	Όγκος	60 mL	Όγκος	20 mL

Όλα τα κλάσματα που συλλέχθηκαν, υποβλήθηκαν σε χημική δοκιμή (assay) με κατεχόλη σε ρυθμιστικό διάλυμα KPi 50mM, pH 7,0. Τα κλάσματα που παρουσίασαν την μεγαλύτερη ενεργότητα σε mUnits ήταν αυτά με την μεγαλύτερη συγκέντρωση τυροσινάσης.

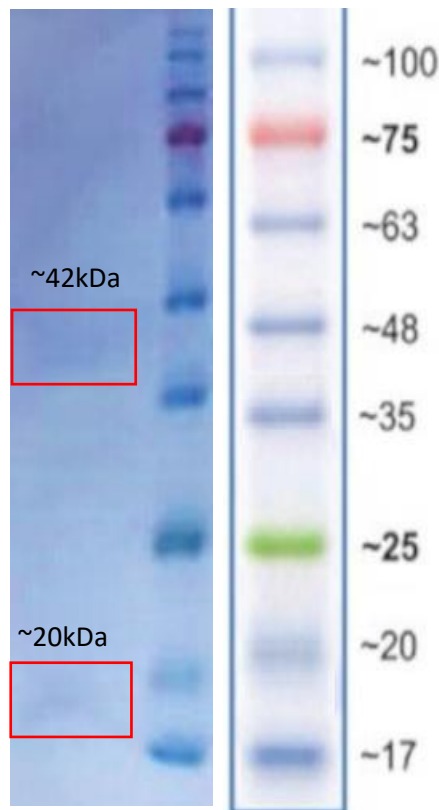


Διάγραμμα 3.4. Ενεργότητα των κλασμάτων που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό της τυροσινάσης.

Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 3.4, είναι εμφανές ότι η τυροσινάση εκλούεται στην αρχή της δεύτερης φάσης και συγκεκριμένα στο εύρος 300mM-400mM συγκέντρωσης άλατος. Οι περιοχές εκατέρωθεν της κορυφής αντιστοιχούν στην έκλυση πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν ισχυρή από την στήλη και ταυτόχρονα δεν παρουσιάζουν δράση στην κατεχόλη, επομένως δεν έχουν σχέση με την τυροσινάση. Αξίζει να σημειωθεί πως, η αφαλάτωση και γενικότερα η διαδικασία εναλλαγής ρυθμιστικού διαλύματος προκαλεί σημαντική μείωση στην ενεργότητα του ενζύμου. Προσδιορίστηκε πειραματικά, ότι η αφαλάτωση κλάσματος τυροσινάσης 150mM, προκάλεσε ελάττωση της δραστηριότητας κατά 88%.

3.3.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Εκτός από την δράση των απομονωμένων κλασμάτων στην κατεχόλη, το ένζυμο που απομονώθηκε ταυτοποιήθηκε και μέσω του μοριακού βάρους. Το υπολογισμένο μοριακό βάρος της τυροσινάσης, δεδομένου της γνωστής της αμινοξικής της αλληλουχίας είναι 64kDa.



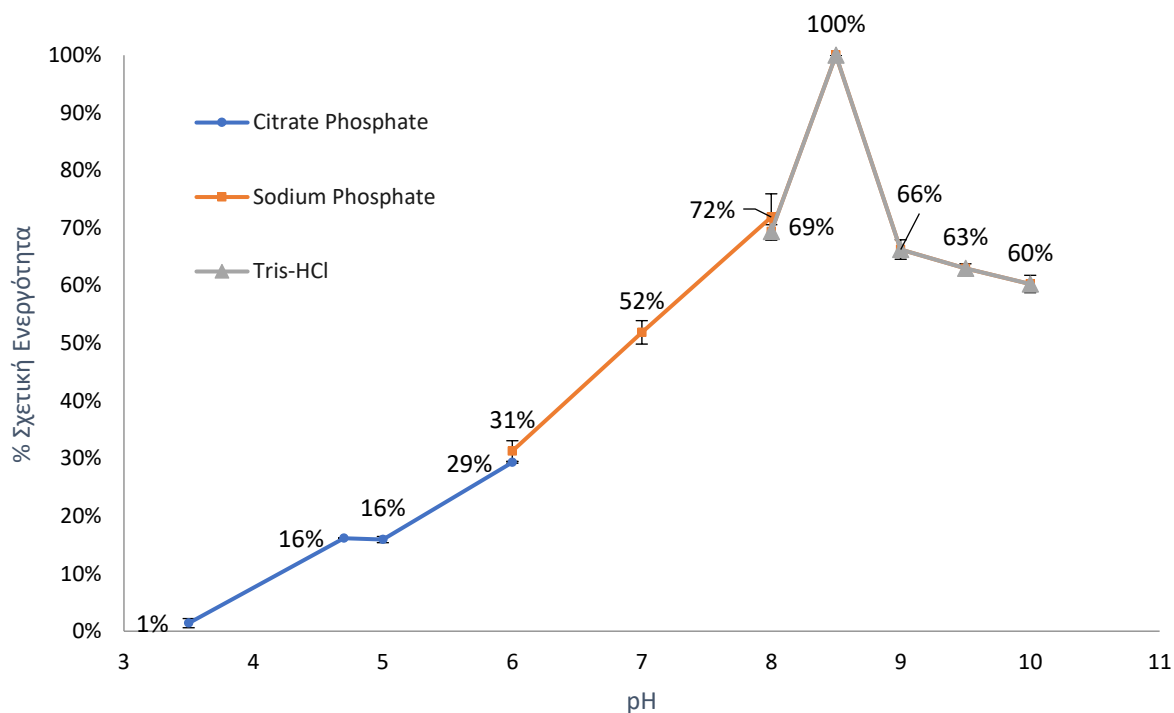
Εικόνα 3.23. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης τυροσινάσης.

Οι μπάντες που εντοπίστηκαν από την ηλεκτροφόρηση ήταν αρκετά αχνές, γεγονός που δικαιολογείται και από την χαμηλή πρωτεϊνική συγκέντρωση του δείγματος (Εικόνα 3.23). Σημειωτέον, ότι τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση, λήφθηκαν από το κλάσμα με την μεγαλύτερη ενεργότητα κατά τη διαδικασία της απομόνωσης (βλ. Διάγραμμα 3.4) έπειτα από συμπύκνωση. Το συμπυκνωμένο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είχε τρεις φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση από το αρχικό κλάσμα. Το στοιχείο αυτό ενδέχεται να υποδεικνύει ότι η έκφραση της τυροσινάσης με το συμβατικό πρωτόκολλο ανάπτυξης της καλλιέργειας δεν είναι αρκετά μεγάλη, ή ότι ο βαθμός ανάκτησης από την απομόνωση είναι χαμηλός.

Επιπρόσθετα, εντοπίστηκαν δύο μπάντες, από τις οποίες καμία δεν αντιστοιχεί στο επιθυμητό μοριακό βάρος. Ωστόσο, το άθροισμα των μοριακών βαρών που εντοπιστήκαν δίνει ως αποτέλεσμα προσεγγιστικά τα 62kDa που είναι σχεδόν ίδιο με το θεωρητικό μοριακό βάρος της τυροσινάσης (64kDa). Δεδομένου, ότι το SDS-PAGE αποτελεί μια περισσότερο ποιοτική παρά ποσοστική μέθοδο, η διαφορά αυτή συχνά παρατηρείται. Συνεπώς, από την εμφάνιση δυο μπαντών, συμπεραίνεται ότι η τυροσινάση πρωτεολύεται και διασπάται σε δύο διαφορετικές δομές άνισου μοριακού βάρους. Το φαινόμενο της πρωτεόλυσης για την ενεργοποίηση του ενζύμου παρατηρείται και στην τυροσινάση του *A. bisporus* H97 [134] με την οποία εμφανίζουν μεγάλη ομολογία και σχολιάζεται σε επόμενο κεφάλαιο (Κεφ. 4.2).

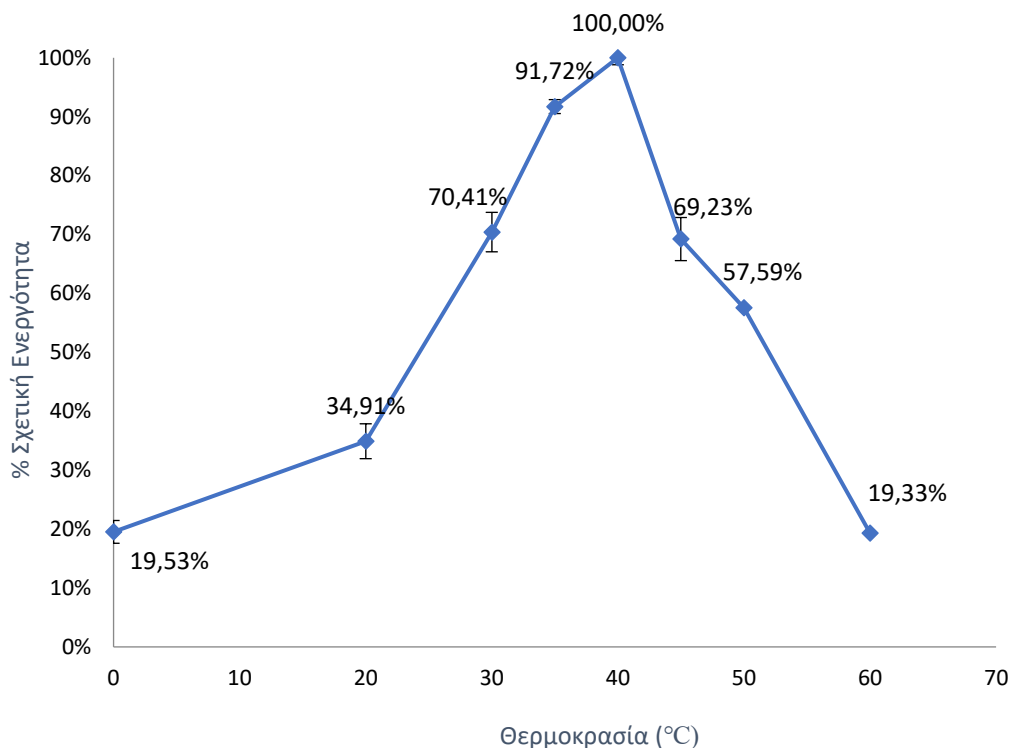
3.3.2.3 Προσδιορισμός βέλτιστων τιμών pH και θερμοκρασίας

Η εύρεση της βέλτιστης τιμής pH, πραγματοποιήθηκε με χημικές δοκιμές σε κατεχόλη σε ένας εύρος τιμών 3,5-10,0. Μέσω των χημικών δοκιμών προσδιορίστηκε η σχετική ενεργότητα, δηλαδή ο λόγος της ενεργότητας του κάθε δείγματος στην εκάστοτε τιμή pH, προς την μέγιστη εμφανιζόμενη ενεργότητα.



Διάγραμμα 3.5. Βέλτιστο pH δράσης της τυροσινάσης

Η σειρά των χημικών δοκιμών έδειξε, ότι η άριστη τιμή pH είναι η τιμή 8,5 σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50mM (Διάγραμμα 3.5). Επιπλέον, τονίζεται ότι οι χημικές δοκιμές έγιναν με τριπλή επανάληψη ενώ ταυτόχρονα τα σφάλματα είναι χαμηλά, γεγονός που σημαίνει ότι το πείραμα παρουσιάζει επαναληψιμότητα. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η σχετική ενεργότητα παραμένει πρακτικά αμετάβλητη κατά την αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος. Αντίστοιχα, με την ίδια χημική δοκιμή σε κατεχόλη προσδιορίστηκε η τιμή της θερμοκρασίας στην οποία φαίνεται η μέγιστη καταλυτική δράση (Διάγραμμα 3.6).

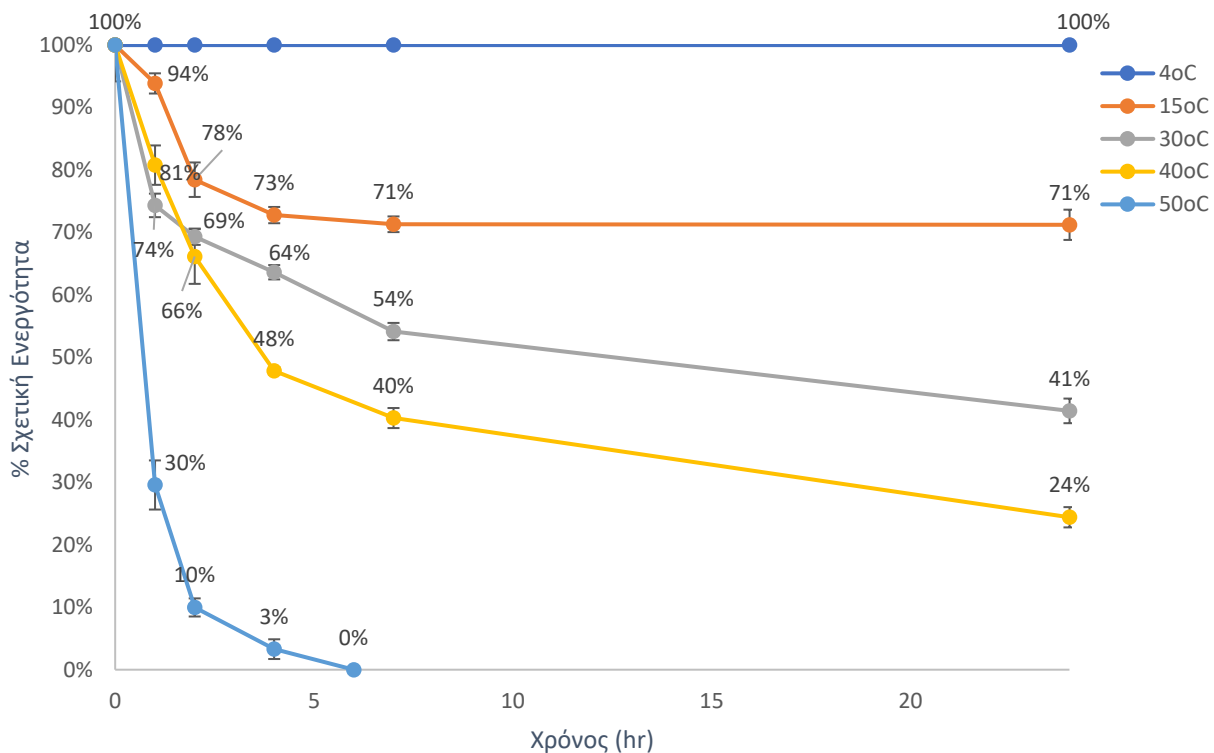


Διάγραμμα 3.6. Βέλτιστη θερμοκρασία καταλυτικής δράσης της τυροσινάσης.

Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι η θερμοκρασία στην οποία η τυροσινάση εμφανίζει την μέγιστη καταλυτική της δράση είναι οι 40°C. Η πτώση της ενεργότητας σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες οφείλεται στην απενεργοποίηση του ενζύμου λόγω μετουσίωσης.

3.3.2.4 Προσδιορισμός της θερμικής σταθερότητας

Οι χρονικές απαιτήσεις των εφαρμογών της τυροσινάσης προϋποθέτουν και τον πειραματικό προσδιορισμό της αντοχής του ενζύμου σε διάφορες θερμοκρασίες. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε ο ανωτέρω έλεγχος, με την παραμονή του ενζύμου σε θερμοκρασίες από 4°C έως και τους 50°C και την μετέπειτα εξέταση της δραστηότητάς τους σε κατεχόλη. Το χρονικό διάστημα μελέτης της σταθερότητας ήταν οι 24 ώρες (Διάγραμμα 3.7).



Διάγραμμα 3.7 Σταθερότητα της τυροσινάσης σε διάφορες θερμοκρασίες

Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η θερμοκρασία των 4°C, δηλαδή η θερμοκρασία αποθήκευσης του ενζύμου σε ψύκτη. Όπως ήταν αναμενόμενο η αύξηση της θερμοκρασίας παραμονής, μειώνει την δραστικότητα του ενζύμου καθώς υφίστανται μετουσίωση. Επιπλέον, παρατηρείται σε όλες τις θερμοκρασίες (με εξαίρεση των 50°C) η τάση προς σταθεροποίηση της σχετικής ενεργότητας, ύστερα από την απότομη μείωση που λαμβάνει χώρα στις πρώτες 4 ώρες. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι, η ενεργότητα παρέμεινε αμετάβλητη στους 15°C στο χρονικό διάστημα 6-24 ώρες, ενώ στις πρώτες 4 παρατηρήθηκε μείωση της τάξης των 22%.

3.3.3 Πρωτεάση και Ενδοπεπτιδάση

Τα ακατέργαστα υγρά των καλλιεργειών παραλήφθηκαν και εξετάστηκαν στην διάσπαση της καζεΐνης, pNPA και pNPB, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε καμία ενεργότητα. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν όλες οι μέθοδοι καθαρισμού των ακατέργαστων πρωτεϊνικών διαλυμάτων συμπεριλαμβανομένου και της μεταλλοχηλική χρωματογραφίας. Όλα τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE και δεν παρατηρήθηκε μπάντα.

Έτσι, έγινε ο έλεγχος των συνθηκών ανάπτυξης της καλλιέργειας του ξενιστή εξετάζοντας την αλλαγή του θρεπτικού μέσου, την προσθήκη μετάλλου ως συμπράγοντα καθώς και διαφορετικές συγκεντρώσεις μεθανόλης στην καλλιέργεια. Συνοπτικά οι συνθήκες που εξετάστηκαν για την έκφραση των ενζύμων αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.5).

Πίνακας 3.5. Εξεταζόμενες συνθήκες για την έκφραση των ενζύμων.

BMMY		MM	
Συγκέντρωση Μετάλλου	Συγκέντρωση Μεθανόλης (v/v)	Συγκέντρωση Μετάλλου	Συγκέντρωση Μεθανόλης (v/v)
-	0,5%	-	0,5%
-	1%	-	1%
1mM CaCl ₂	1%	1mM CaCl ₂	1%
1mM MgCl ₂	1%	1mM MgCl ₂	1%

Ο έλεγχος έγινε λαμβάνοντας δείγμα κάθε 24 ώρες, καθ' όλη την διάρκεια της καλλιέργειας. Τα ακατέργαστα δείγματα εξετάστηκαν για την ικανότητα τους να υδρολύουν το υπόστρωμα της καζεΐνης, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική ενεργότητα. Συνεπώς, η έκφραση των συγκεκριμένων ενζύμων δεν καθίσταται δυνατή μέσω των χρησιμοποιούμενων τεχνικών και μεθόδων.

3.3.4 Υπεροξυγενάσες - Astra55, Astra57 και Astra58

3.3.4.1 Απομόνωση με χρωματογραφία ιοντικής εναλλαγής.

Η απομόνωση των υπεροξυγενασών έγινε με την ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50mM με pH 7,5. Δεδομένου ότι, το θεωρητικό pI όπως υπολογίστηκε βιοπληροφορικά και των τριών ενζύμων είναι στο διάστημα 5,0-6,0, στο pH απομόνωσης τα ένζυμα είναι αρνητικά φορτισμένα. Επομένως χρησιμοποιήθηκε η θετικά φορτισμένη στήλη ρητίνης Q Sepharose High Performance, GE HealthCare. Τα πρωτεϊνικά διαλύματα προέρχονται από κυτταρική καλλιέργεια όγκου 1L.

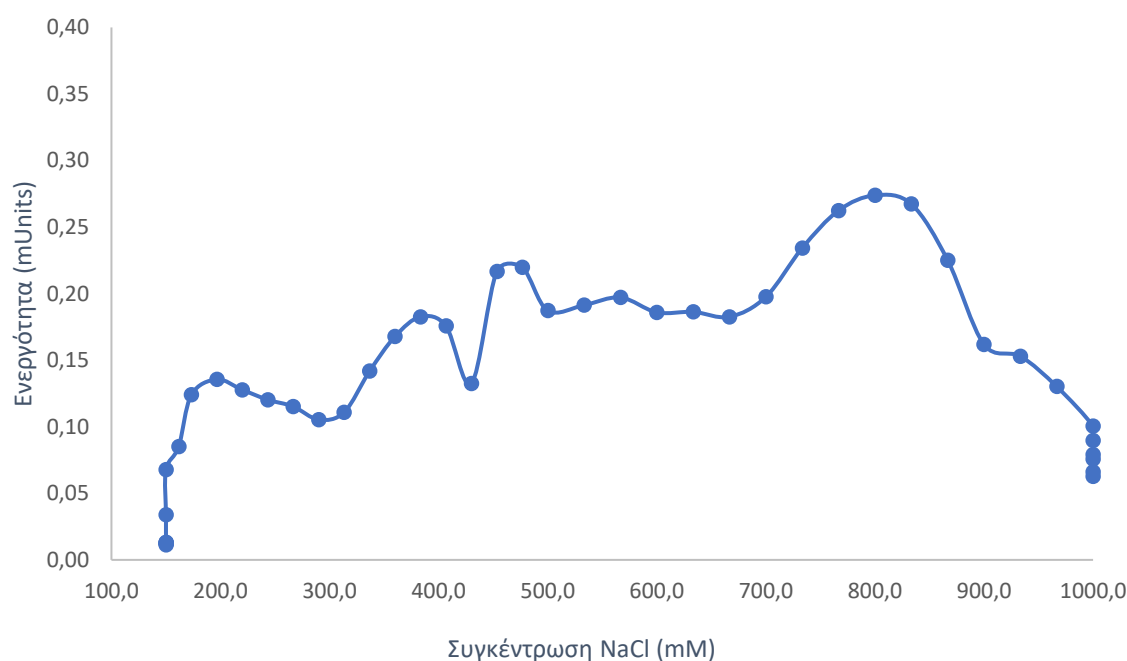
Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου απομόνωσης

Αρχικά, ήταν απαραίτητο να εφαρμοστούν διάφορα πρωτόκολλα προκειμένου να διερευνηθεί το κατάλληλο πρόγραμμα έκλουσης. Όλα τα προγράμματα που αναλύονται παρακάτω εφαρμόστηκαν και στα τρία ένζυμα. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της απομόνωσης του ενζύμου Astra55. Το πρώτο πρόγραμμα έκλουσης που ακολουθήθηκε αποτελείται τέσσερις φάσεις, δύο ισοκρατικές για την ταχύτατη απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών και δύο βαθμιδωτές στις περιοχές στις οποίες αναμενόταν να εκλουστεί το ένζυμο (Πίνακας 3.6). Η ροή στην αντλία ήταν 1mL/min.

Πίνακας 3.6. Χαρακτηριστικά του 1^{ου} προγράμματος απομόνωσης της Astra55

	Φάση Α (150mM)	Φάση Β (150mM→500mM)	Φάση Γ (500mM→1000mM)	Φάση Δ (1000mM)
Χρόνος	16min	30min	30min	10min
Βήμα	0,0mM/min	11,7mM/min	16,7mM/min	0,0mM/min

Με σκοπό να προσδιοριστεί σε ποιο κλάσμα έχει συσσωρευθεί το ένζυμο και άρα με ποια συγκέντρωση άλατος απομακρύνεται από την στήλη, γίνεται χημική δοκιμή όλων των κλασμάτων με το υπόστρωμα ABTS. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Διάγραμμα 3.8.



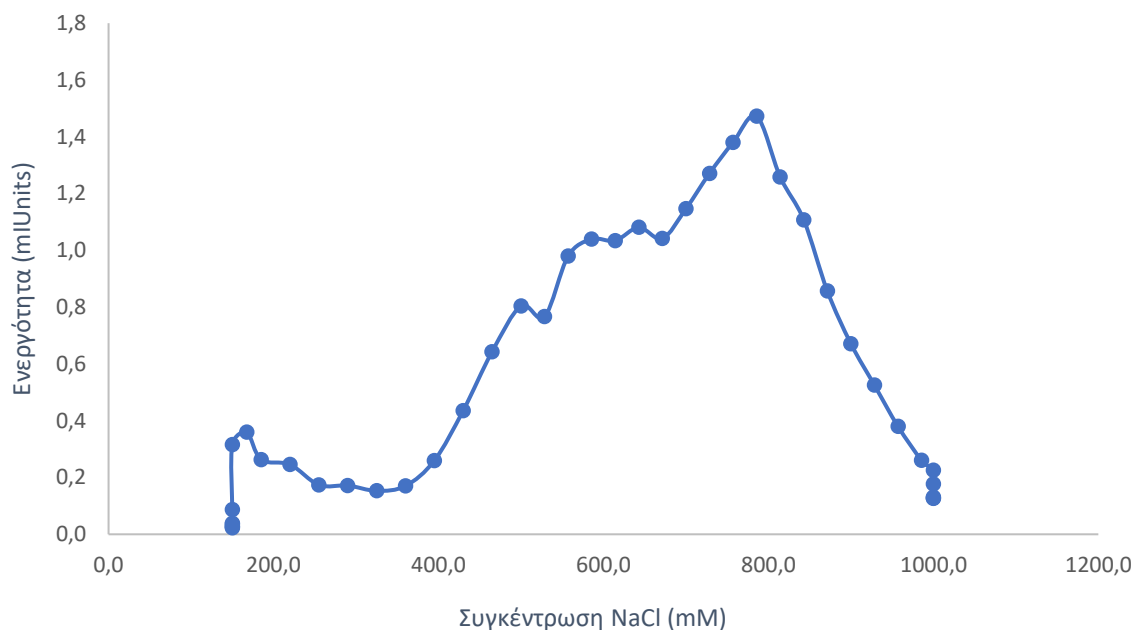
Διάγραμμα 3.8. Ενεργότητα των κλασμάτων απομόνωσης Astra55 από το 1^ο πρόγραμμα έκλουσης

Το πλάτος της καμπύλης είναι αρκετά μεγάλο, ενώ επιπλέον παρατηρήθηκαν αρκετές διακυμάνσεις ενεργότητας μεταξύ των κλασμάτων. Παρ' όλα αυτά η μέγιστη ενεργότητα φαίνεται να παρατηρείται στην περιοχή των 800mM η οποία αποτελεί συγκέντρωση άλατος που χαρακτηρίζεται ως αρκετά υψηλή.

Παρόμοια, κατά την δεύτερη προσπάθεια υλοποιήθηκε παρόμοιο πρόγραμμα απομόνωσης με διαφορετικές χρονικές διάρκειες (Πίνακας 3.7).

Πίνακας 3.7 Χαρακτηριστικά του 2^{ου} προγράμματος απομόνωσης της Astra55

	Φάση Α (150mM)	Φάση Β (150mM→500mM)	Φάση Γ (500mM→1000mM)	Φάση Δ (1000mM)
Χρόνος	15min	20min	35min	10min
Βήμα	0,0mM/min	17,5mM/min	14,3mM/min	0,0mM/min



Διάγραμμα 3.9. Ενεργότητα των κλασμάτων απομόνωσης Astra55 από το 2^ο πρόγραμμα έκλουσης

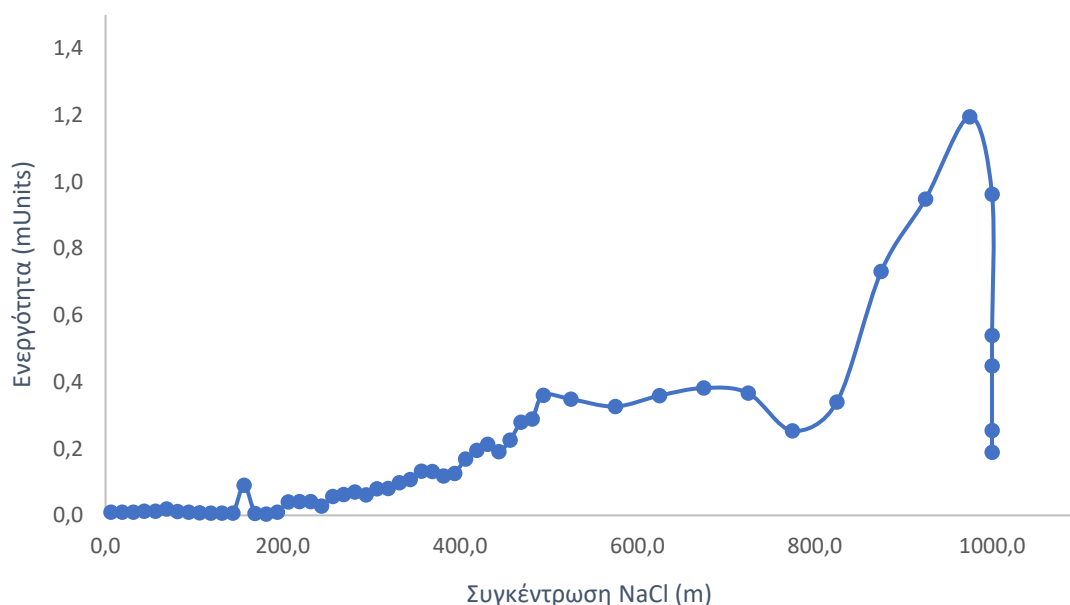
Το πλάτος της καμπύλης παραμένει μεγάλο (Διάγραμμα 3.9), γεγονός που υποδεικνύει ότι παρασύρθηκαν και άλλες πρωτεΐνες οι οποίες εμφανίζουν ενεργότητα στο ABTS. Όπως και προηγουμένως η μέγιστη απόκριση στην χημική δοκιμή εμφανίζεται στα 800mM.

Τέλος, επιλέχθηκε να εφαρμοστεί ένα τροποποιημένο πρόγραμμα τριών φάσεων, δυο βαθμιδωτών και μιας ισοκρατικής (Πίνακας 3.8).

Πίνακας 3.8. Χαρακτηριστικά του 3^{ου} προγράμματος απομόνωσης της Astra55

	Φάση Α (0→500mM)	Φάση Β (500mM→1000mM)	Φάση Γ (1000mM)
Χρόνος	80min	20min	10min
Βήμα	6,3mM/min	25mM/min	0,0mM/min

Σε αντίθεση με τα προηγούμενα προγράμματα, η βαθμίδωση της συγκέντρωσης του άλατος γίνεται με μεγαλύτερο ρυθμό (βήμα) μεταβάλλοντας σημαντικά την ιοντική ισχύς του διαλύματος.



Διάγραμμα 3.10. Ενεργότητα των κλασμάτων απομόνωσης.

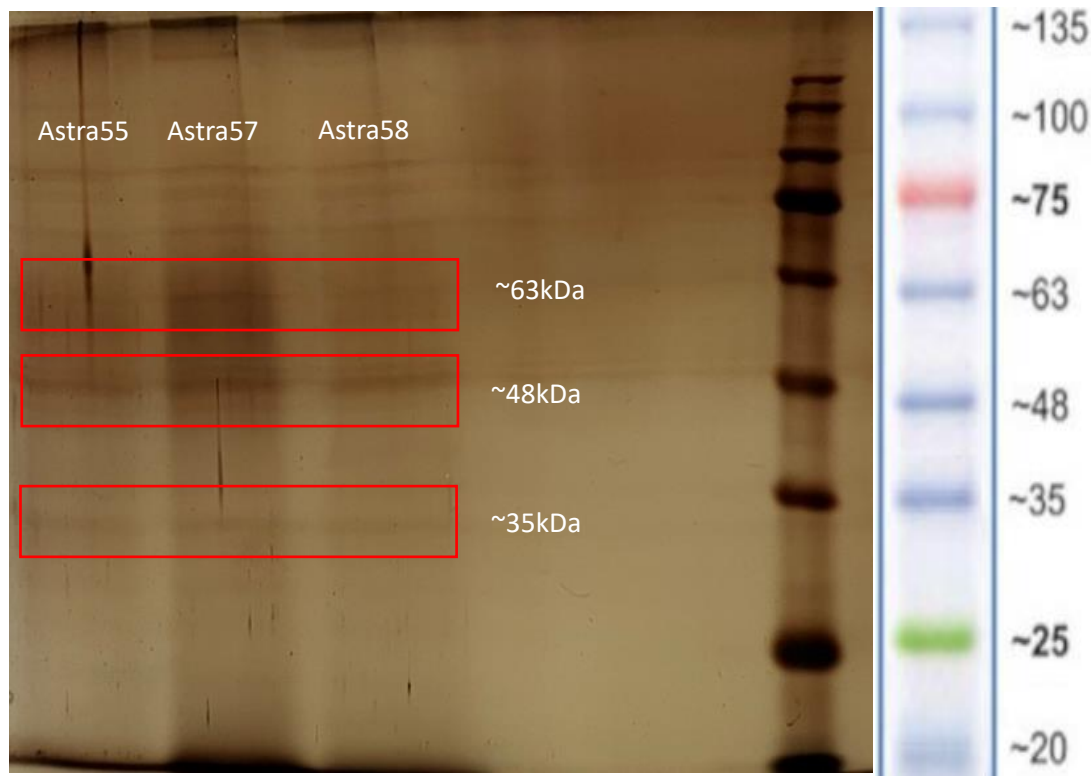
Η καμπύλη απομόνωσης του Διαγράμματος 3.10, έχει μικρότερο πλάτος συγκριτικά με τα προηγούμενα ένζυμα. Ωστόσο, η μέγιστη ενεργότητα στο ABTS παρατηρήθηκε σε κλάσματα τα οποία συλλέχθηκαν με συγκέντρωση άλατος κοντά στο 1M. Η ανάλυση και των τριών διαγραμμάτων απομόνωσης των υπεροξυγενασών και με τα τρία πρωτόκολλα, έδειξε ότι η έκλυση των ενζύμων γίνεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος (>800mM). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ισχυρή πρόσδεση του ενζύμου στην στήλη, καθώς απαιτείται διάλυμα μεγάλης ιοντικής ισχύος για να το ανταγωνιστεί.

Επιπρόσθετα και στις τρεις περιπτώσεις παρατηρείται σημαντική ενεργότητα στα κλάσματα που συλλέγονται στο εύρος 400mM-800mM, που ενδέχεται να αντιστοιχεί σε ένζυμα που εκφράζονται από τον ξενιστή και έχουν ενεργότητα στο ABTS παρουσία H_2O_2 . Προκειμένου να εξακριβωθεί η ταυτότητα των εξεταζόμενων ενζύμων ακολούθησαν περαιτέρω μέθοδοι ανάλυσης.

3.3.4.2 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) με χρώση αργύρου (Silver Staining)

Ο πειραματικός προσδιορισμός του μοριακού βάρους και των τριών υπεροξυγενασών πραγματοποιήθηκε αρχικά με την κλασική χρώση με την Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καμία μπάντα, ακόμη και μετά την συμπύκνωση των κλασμάτων απομόνωσης. Επομένως, εφαρμόστηκε η χρώση του πηκτώματος με άργυρο καθώς επιτρέπει την ανίχνευση

μικρότερων πρωτεϊνών και έχει μεγαλύτερη ευαισθησία [135], [136]. Τα διαλύματα χρώσης αργύρου που χρησιμοποιήθηκαν αναλύονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ε. Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρησης, αντιστοιχούν στα κλάσματα της απομόνωσης που εμφάνισαν την μεγαλύτερη ενεργότητα στο ABTS. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.24).



Εικόνα 3.24. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης με χρώση αργύρου

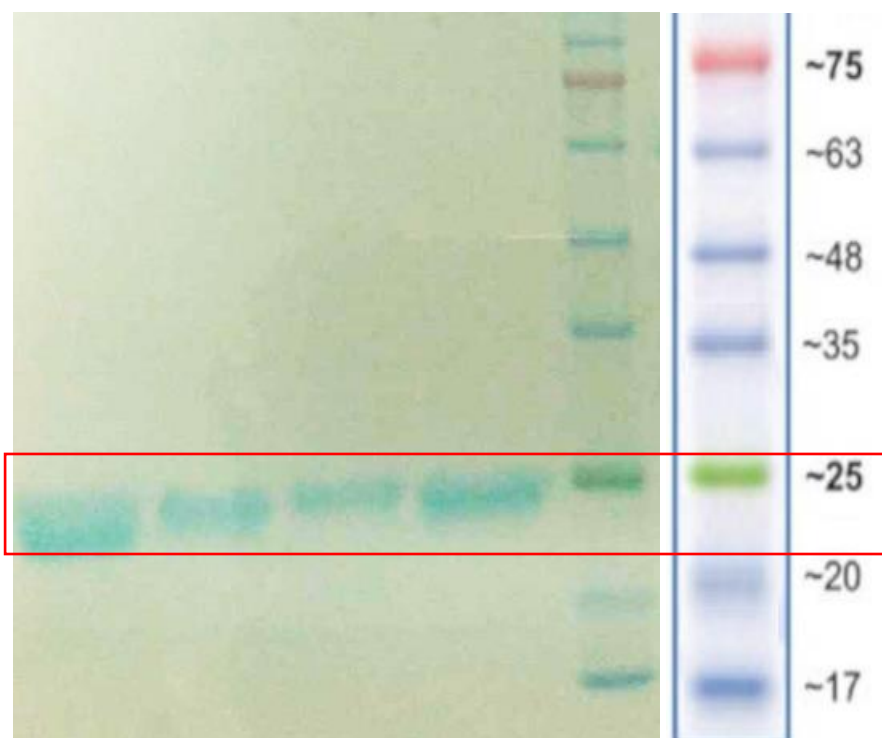
Η χρώση του πηκτώματος με διάλυμα αργύρου είχε ως αποτέλεσμα το ελαφρώς καφέ χρώμα. Από την ηλεκτροφόρηση παρατηρήθηκαν αρχικά ότι υπήρχαν πολλές μπάντες και στα τρία ένζυμα και μάλιστα όλες στο ίδιο μεταξύ τους επίπεδο. Επιπλέον, σε όλα τα δείγματα παρατηρήθηκαν τρεις έντονες περιοχές στο ύψος των 63kDa, 48kDa και 35kDa ενώ υπενθυμίζεται ότι, τα μοριακά βάρη των UPOs είναι στο εύρος των 25-30kDa. Επομένως εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα κλάσματα που παραλήφθηκαν από την μέθοδο της απομόνωσης περιέχουν πολλές πρωτεΐνες που έχουν εκφταστεί από τον ξενιστή. Επιπρόσθετα, η απουσία έντονης μπάντας στο αναμενόμενο μοριακό βάρος ενδέχεται να σημαίνει ότι τα επιθυμητά ένζυμα δεν εμπεριέχονται στα κλάσματα που ηλεκτροφορήθηκαν. Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι η μέθοδος απομόνωσης είχε χαμηλή αποτελεσματικότητα, αφού δεν κατάφερε να συλλεχθεί μία μόνο πρωτεΐνη, ενώ παράλληλα διακαιολογούνται και οι διακυμάνσεις της ενεργότητας μεταξύ των κλασμάτων.

3.3.4.3 Πρωτεομική ανάλυση

Η συμπεριφορά των κλασμάτων απομόνωσης ως προς την ενεργότητά τους στο ABTS, καθώς και η παρουσία πολλών μπαντών στο SDS-PAGE, συνεπάγεται την ύπαρξη πολλών πρωτεϊνών. Δεδομένου ότι, μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών δεν διαπιστώθηκε οι ταυτότητες των Astra55, Astra57 και Astra58, ακολούθησε η πρωτεομική ανάλυση των κλασμάτων με την μεγαλύτερη ενεργότητα που προέκυψαν έπειτα από τον καθαρισμό. Από την ανάλυση προσδιορίστηκε ότι, τα ένζυμα που συλλέχθηκαν στα κλάσματα απομόνωσης και ταυτόχρονα παρουσίασαν μεγάλη απόκριση στην κατάλυση του ABTS είναι οξειδωτικά ένζυμα του ξενιστή *P. pastoris*. Συνεπώς, η ετερόλογη έκφραση των Astra55, Astra57 και Astra58 του *A. parasiticus* δεν πραγματοποιήθηκε με επιτυχία.

3.3.5 Κουτινάση και οι μεταλλάξεις της L,T και DM

Η κουτινάση, έχει χαρακτηριστεί πλήρως τόσο, ως προς την καταλυτική της δράση και την τρισδιάστατη δομή της όσο και ως προς τις βέλτιστες συνθήκες καταλυτικής δράσης. Στην συγκεκριμένη έρευνα, η κουτινάση εκφράστηκε για την μελέτη και την σύγκριση τριών μεταλλάξεων συγκριτικά με το φυσικό τύπο (Wild Type - WT). Ύστερα από την έκφραση του WT αλλά και των μεταλλάξεων της, τα ένζυμα απομονώθηκαν με υγρή χρωματογραφία μεταλλοχηλικής συγγένειας, με την στήλη Talon. Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν κατά την έκλυση ελέγχθηκαν ως προς την καθαρότητά τους και την ορθή έκφραση τους μέσω SDS-PAGE (Εικόνα 3.25).



Εικόνα 3.25. Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου στο οποίο απεικονίζεται από αριστερά προς τα δεξιά τα δείγματα WT, L, T και DM

Το θεωρητικό μοριακό βάρος της WT είναι 23kDa. Οι μεταλλάξεις L,T και DM αφορούν αλλαγές σε επιμέρους αμινοξέα, επομένως η αλλαγή στο μοριακό βάρος είναι πολύ μικρή της τάξεως των μερικών δεκάδων Daltons. Όπως φαίνεται από την Εικόνα 3.25, οι μπάντες των δειγμάτων είναι λίγο κάτω από την τιμή των 25kDa, γεγονός που επιβεβαιώνει τον θεωρητικό υπολογισμό του μοριακού βάρους.

3.4 Επιλογή εμπορικών πρωτεασών με ενεργότητα στο PU

Δεδομένου ότι η ετερόλογη έκφραση της πρωτεάσης και της ενδοπεπτιδάσης από το μύκητα *F. oxysporum* BPOP18, δεν απέδωσε θετικά αποτελέσματα, επιλέχθηκαν εμπορικές πρωτεάσες της ενζυμικής βιβλιοθήκης του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας ΕΜΠ, με σκοπό τον έλεγχο της δράσης τους σε σκόνη PU. Οι τέσσερις εμπορικές πρωτεάσες που δοκιμάστηκαν διακρίνονται σε αλκαλόφιλες (Σαβινάση και Αλκαλάση) και οξεόφιλες (Πρωτεάσες του *Aspergillus saitoi* και του *Aspergillus oryzae*) και παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.9).

Πίνακας 3.9. Εμπορικά ένζυμα στην εφαρμογή τους στο PU

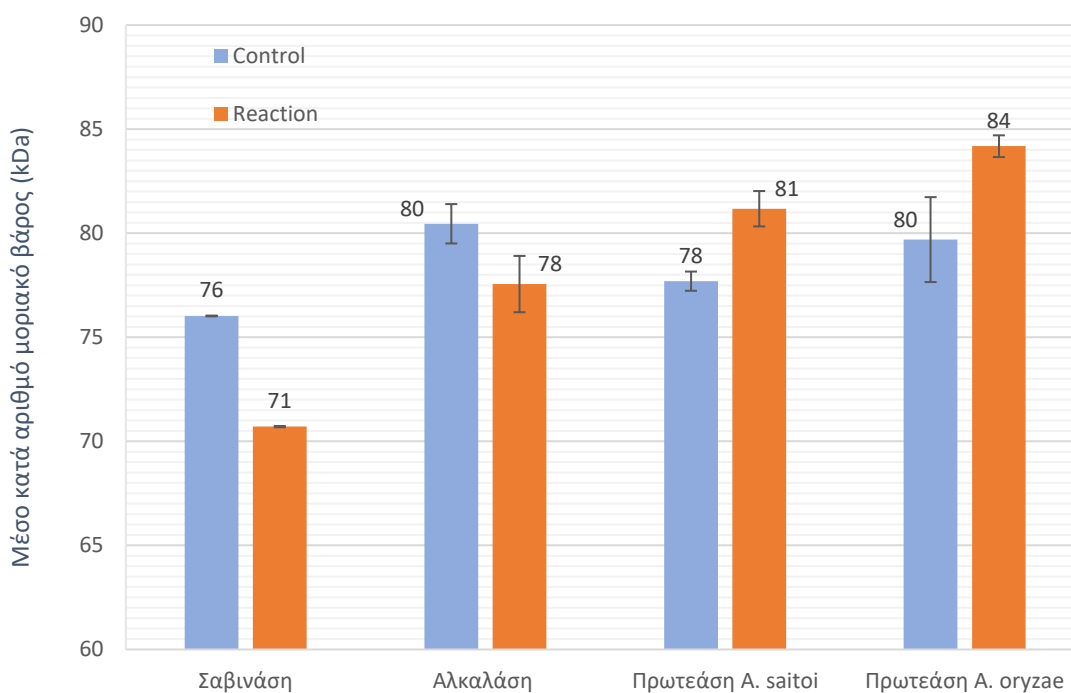
Ένζυμο
Σαβινάση (Savinase® 16L της Novozymes)
Αλκαλάση (Alcalase® 2.4 L FG)
Πρωτεάση του <i>Aspergillus saitoi</i>
Πρωτεάση του <i>Aspergillus oryzae</i>

Η εφαρμογή των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με τον τρόπο που περιγράφεται στο πειραματικό μέρος (Κεφ. 2.2.5.1). Τα ρυθμιστικά διαλύματα που επιλέχθηκαν για την αντίδραση της σαβινάσης και της αλκαλάσης ήταν Tris-HCl 50mM pH 8,0, ενώ για την αντίδραση των πρωτεασών του *A. saitoi* και *A. oryzae* χρησιμοποιήθηκε Cpi 50mM pH 4,0. Σημειώνεται ότι, οι οξεόφιλες πρωτεάσες ήταν σε στερεή μορφή. Αντίθετα, οι αλκαλόφιλες πρωτεάσες ήταν σε υγρή μορφή και η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε με την μέθοδο Bradford. Οι συγκεντρώσεις όλων των εμπορικών πρωτεασών στην αντίδραση ήταν 1mg/mL

Οι μετρήσεις του βάρους της σκόνης PU μετά το τέλος της αντίδρασης, έδειξαν ότι, μόνο η σαβινάση είχε επίδραση στην διάσπαση του πλαστικού. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε $14,3\% \pm 2,0\%$ μείωση του συνολικού βάρους. Σημειώνεται ότι, στο δείγμα αναφοράς παρατηρήθηκε μείωση της τάξης του $3,0\% \pm 1,0\%$, που υποδεικνύει ότι ακόμα και με τα περιβαλλοντικά σφάλματα, η καθαρή μείωση της σαβινάσης ήταν σημαντική. Αντίθετα στα υπόλοιπα ένζυμα δεν παρατηρήθηκε απώλεια βάρους ή

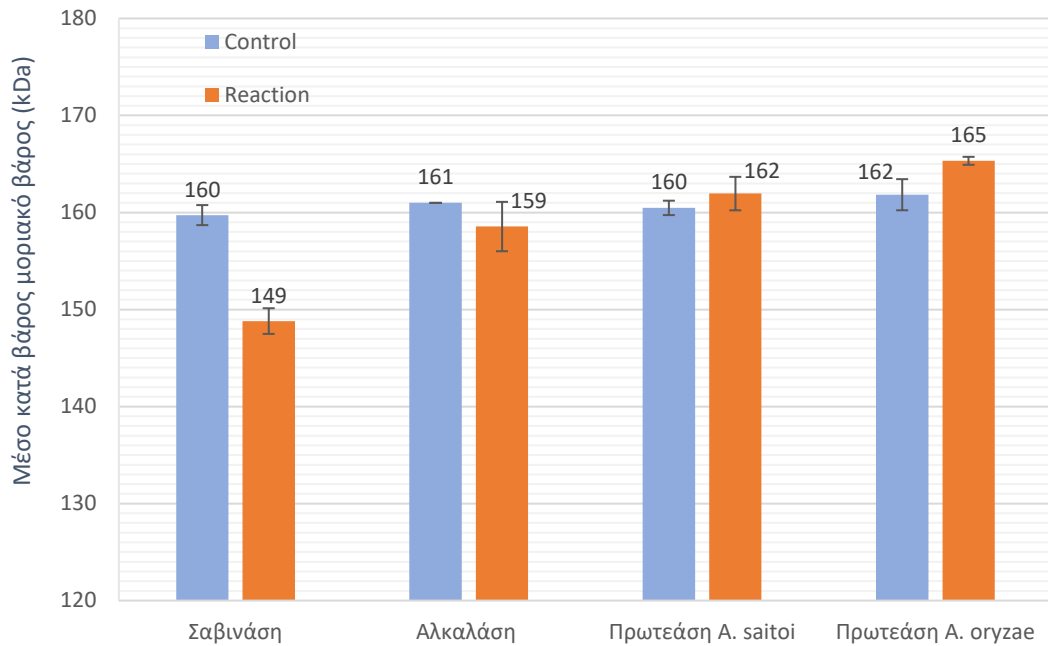
υπήρξε αμελητέα απώλεια βάρους με σημαντικά σφάλματα. Η μείωση του βάρους, συνεπάγεται ότι η σαβινάση διασπά τις πολυμερικές αλυσίδες και τα απελευθερώνει μόρια που είναι υδατοδιαλύτα μεταφέρονται στην υφρή φάση του ρυθμιστικού διαλύματος. Τα πιθανά προϊόντα μπορεί να είναι αμίνες ή ακόμη και διοξείδιο του άνθρακα το οποίο απελευθερώνεται ως αέριο (βλ. Κεφ. 511.3.4.2).

Μέσω της ανάλυσης των δειγμάτων της αντίδρασης στην GPC προσδιορήστηκε και η επίδραση των ενζύμων στο μοριακό βάρος του πλαστικού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.11-3.13.



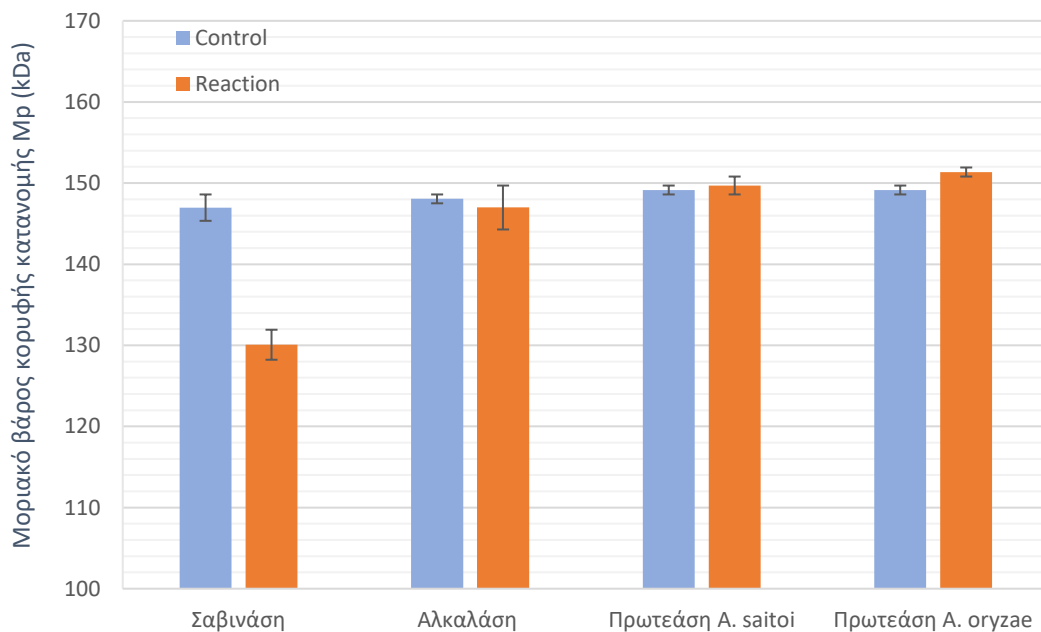
Διάγραμμα 3.11. Μέσο κατά αριθμό μοριακού βάρους (M_n) έπειτα από την κατεργασία του PU με εμπορικές πρωτεάσες

Λόγω του γεγονότος ότι, η αντίδραση αφορά πολυμερικό υλικό, υπάρχει μια κατανομή των μοριακών βαρών των πολυμερικών αλυσίδων που απαρτίζουν το υλικό. Ο μέσος κατά αριθμό μοριακό βάρος M_n , είναι ουσιαστικά ο αριθμητικός μέσος όρος μοριακών βαρών στο δείγμα του PU. Το μέγεθος αυτό εστιάξει περισσότερο στα μόρια με μικρότερο μοριακό βάρος. Όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα 3.11, η σαβινάση παρουσιάζει την μεγαλύτερη επίδραση με μείωση της τάξης του 6,6% σε σύγκριση με το δείγμα αναφοράς (control). Επίσης εμφανίζεται μια μη αμελητέα μείωση και από την αλκαλάση, ενώ οι δύο οξεόφιλες πρωτεάσες δεν φαίνεται να έχουν κάποια επίδραση στο πολυμερές.



Διάγραμμα 3.12. Μέσο κατά βάρους μοριακού βάρους (Mw) έπειτα από την κατεργασία του PU με εμπορικές πρωτεάσες

Επιπρόσθετα και στο μέσο κατά βάρους μοριακό βάρους Mw, φαίνεται η σαβινάση να εμφανίζει την μεγαλύτερη επίδραση με μείωση κατά 6,9%. Το Mw υπενθυμίζεται ότι αποτελεί τον σταθμισμένο μέσο όρο των μοριακών βαρών των μορίων σε ένα δείγμα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση κανένα άλλο ένζυμο δεν σημείωσε σημαντική διαφορά.



Διάγραμμα 3.13. Πιθανότερο μοριακό βάρους στο δείγμα (Mp) έπειτα από την κατεργασία με εμπορικές πρωτεάσες

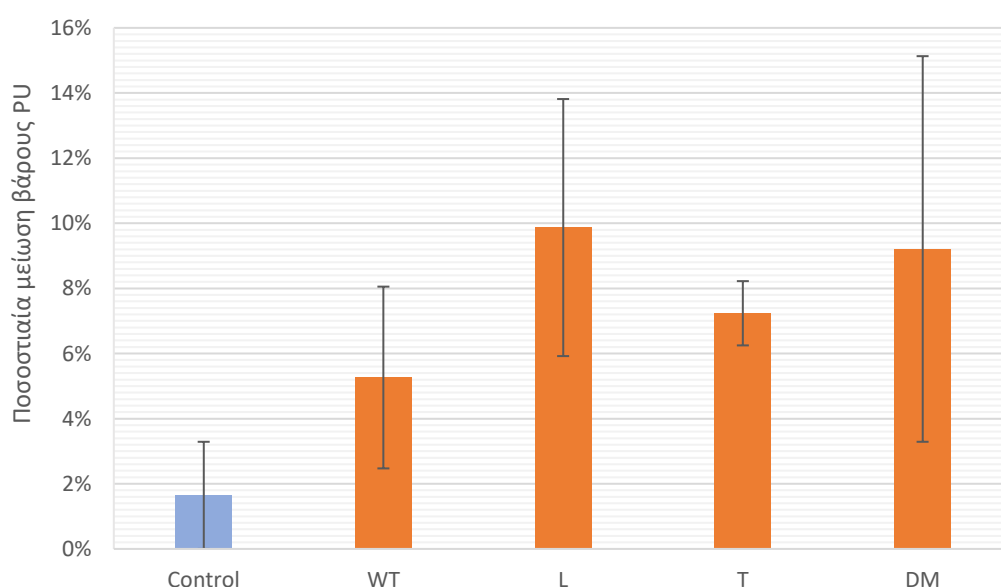
Τέλος, στην μέτρηση του περισσότερου πιθανού μοριακού βάρους Mr, για ακόμη μια φορά η σαβινάση εμφανίζει την μεγαλύτερη επίδραση με μείωση της τάξης των 11,6%. Αντίθετα τα υπόλοιπα ένζυμα, φάνηκαν να μην εμφανίζουν κάποια μοριακή τροποποίηση στο πολυμερές.

Συνεπώς, ύστερα από τις παραπάνω αναλύσεις είναι φανερό ότι η σαβινάση παρουσιάζει την μεγαλύτερη επίδραση στο PU τόσο στο συνολικό βάρος όσο και σε μοριακό επίπεδο. Έτσι, από τα ένζυμα που εξετάστηκαν, επιλέχθηκε η σαβινάση για τον συνεργητισμό με τα εκφραζόμενα ένζυμα (αμιδάση, τυροσινάση και κουτινάση).

3.5 Έλεγχος μεταλλάξεων της κουτινάσης του *F. oxysporum* για την ενίσχυση της δράσης στο PU

Στο πλαίσιο της εφαρμογής της κουτινάσης του *F. oxysporum* ελέγχθηκαν τέσσερις μεταλλάξεις της στην αμινοξική αλληλουχία για ενδεχόμενη βελτιωμένη καταλυτική δράση. Οι μεταλλάξεις που ελέγχθηκαν αφορούν αλλαγές στην αμινοξική τους αλληλουχία. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή τους στο PU όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.12.1, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50mM pH 8,0 καθώς όπως αναφέρεται και στην μελέτη [98] παρουσιάζει βέλτιστο pH δράσης σε αυτήν την τιμή.

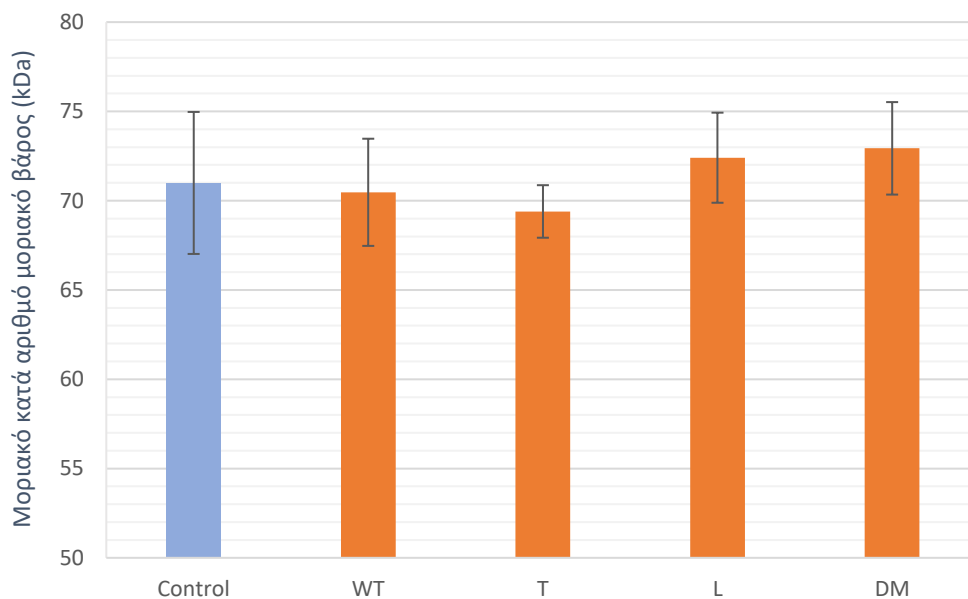
Συνεπώς, δοκιμάστηκε η δράση του φυσικού τύπου (Wild Type) της κουτινάσης, καθώς και οι μεταλλάξεις L, T και DM στην διάσπαση του PU. Με αρχικό βάρος του πολυμερούς τα 5mg και τις συγκεντρώσεις των ενζύμων στο 1mg/mL παρατηρήθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα (Διαγράμματα 3.14-3.16).



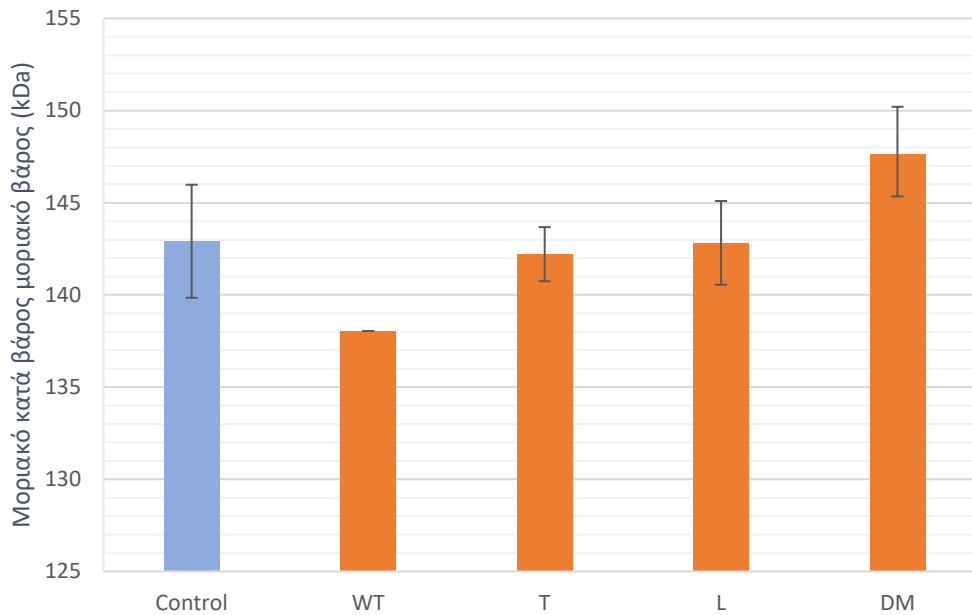
Διάγραμμα 3.14. Ποσοστιαία μείωση του βάρους του PU υπό την επίδραση του φυσικού τύπου και των μεταλλάξεων της κουτινάσης.

Η ποσοστιαία μείωση στο δείγμα αναφοράς (control), οφείλεται στο πειραματικό σφάλμα που προκύπτει από την απόρριψη του υπερκείμενου υγρού στην προετοιμασία των δειγμάτων για ζύγιση. Επιπλέον, παρά το την υψηλή ποσοστιαία μείωση στις μεταλλάξεις L και DM, υπάρχει αμφιβολία ως προς την αξιοπιστία λόγω υψηλού σφάλματος. Αντίστοιχα, ο φυσικός τύπος και η μετάλλαξη T εμφανίζουν επίσης αρκετά μεγάλη επίδραση με σημαντικά σφάλματα.

Ακολούθησε περαιτέρω εξέταση, με την ανάλυση των δειγμάτων μέσω της μεθόδου GPC για την διερεύνηση στην επίδραση των μεγεθών M_n και M_w .



Διάγραμμα 3.15. Μέσο κατά αριθμό μοριακού βάρους (M_n) υπό την επίδραση του φυσικού τύπου και των μεταλλάξεων της κουτινάσης.



Διάγραμμα 3.16. Μέσο κατά βάρος μοριακό βάρος (Mw) υπό την επίδραση του φυσικού τύπου και των μεταλλάξεων της κουτινάσης.

Η μελέτη των παραπάνω διαγραμμάτων έδειξε ότι η επίδραση των εξεταζόμενων ενζύμων είχε αμελητέα επίδραση στο μέσο κατά αριθμό μοριακό βάρος σε σύγκριση με το δείγμα αναφοράς. Η δράση του φυσικού τύπου φάνηκε να προκαλεί 1,4% μείωση ενώ η μετάλλαξη τύπου T παρουσίασε διπλάσια απόδοση με μείωση κατά 2,8%.

Αντίθετα, στο μέσο κατά βάρος μοριακό βάρος, παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση του φυσικού τύπου καθώς υπήρξε μείωση της τάξης του 3,4% με ταυτόχρονη μεγάλη αξιοπιστία. Στο συγκεκριμένο μέγεθος η μετάλλαξη T εμφάνισε δράση που προκάλεσε μείωση μόλις κατά 0,70%.

Τα στοιχεία που εξάχθηκαν από την συγκεκριμένη ανάλυση υποδεικνύουν ότι η κουτινάση φυσικού τύπου είναι συνολικά, λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα μετρούμενα μεγέθη και την αξιοπιστία τους, το πλέον κατάλληλο στέλεχος για την εφαρμογή σε ΡΥ. Αντίθετα η μετάλλαξη T, ενώ παρουσίασε σημαντική απώλεια ελάττωση στο βάρος των δειγμάτων, φάνηκε να παρουσιάζει επίδραση μόνο στο Mn. Τέλος, αποδείχθηκε πως οι μεταλλάξεις L και DM δεν παρουσιάζουν κάποια βελτίωση στην καταλυτική δράση, τουλάχιστον με το ΡΥ ως υπόστρωμα αφού απέδωσαν χαμηλά σε όλες τις αναλύσεις.

3.6 Σχεδιασμός και δοκιμή ενζυμικού κοκτέιλ για την διάσπαση του PU

Οι εκτενείς αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για την δράση επιλεγμένων εμπορικών πρωτεασών αλλά και τεσσάρων μεταλλάξεων της κουτινάσης του *F. oxysporum*, οδήγησαν στην επιλογή της σαβινάσης και του φυσικού τύπου κουτινάσης για την εφαρμογή τους στην διάσπαση 5mg του PU μαζί με τα νέα ένζυμα. Συνοπτικά τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη της δράσης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.10).

Πίνακας 3.10. Ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την συνεργιστική δράση στην διάσπαση του PU.

Ένζυμο	Οργανισμός	Φορέας έκφρασης
Αμιδάση	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. pastoris</i> X33
Τυροσινάση	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. pastoris</i> X33
Κουτινάση	<i>F. oxysporum</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
Σαβινάση	<i>B. subtilis</i>	-

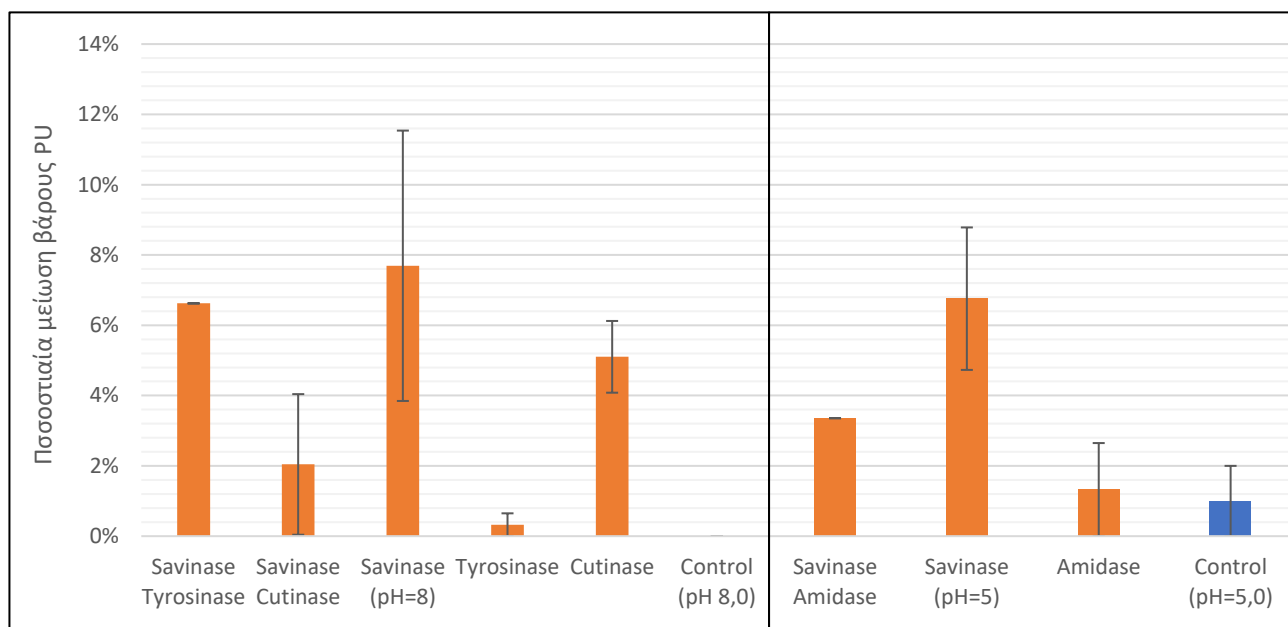
Δεδομένου της μεγάλης δράσης που παρατηρήθηκε στην διάσπαση του PU από την σαβινάση, επιλέχθηκε οι συνδυασμοί των ενζύμων να γίνουν με βάση την εμπορική πρωτεάση. Συγκεκριμένα, ο σχεδιασμός του πειράματος περιλαμβάνει πέντε αντιδράσεις με την μεμονωμένη δράση των επιμέρους ενζύμων και τρεις αντιδράσεις με διπλό συνεργητισμό με το ένα από τα δύο ένζυμα να είναι η σαβινάση (Πίνακας 3.11). Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. Οι εφαρμογές έγιναν σε δύο τιμές pH: 5,0 Cpi 50mM και 8,0 Tris-HCl 50mM. Οι τιμές αυτές επιλέχθηκαν με κριτήριο την άριστη δράση των εξεταζόμενων ενζύμων στην μεμονωμένη τους δράση. Για παράδειγμα, στον συνδυασμό σαβινάσης και αμιδάσης επιλέχθηκε η τιμή pH 5,0 καθώς η σαβινάση εμφανίζει ένα μεγάλο εύρος τιμών στο οποίο έχει υψηλή ενεργότητα [106], ενώ η αμιδάση βρέθηκε ότι παρουσιάζει μεγάλη ενεργότητα στην περιοχή κοντά στην τιμή 5,0 (βλ. Πίνακα 3.3).

Πίνακας 3.11. Σχεδιασμός των αντιδράσεων στην δράση διάσπασης του PU

Αριθμός ενζύμων στην αντίδραση	Ένζυμο στην αντίδραση
1	1) Αμιδάση σε pH 5,0 2) Τυροσινάση σε pH 8,0 3) Κουτινάση σε pH 8,0 4) Σαβινάση σε pH 5,0 5) Σαβινάση σε pH 8,0
2	1) Σαβινάση & Αμιδάση σε pH 5,0 2) Σαβινάση & Τυροσινάση σε pH 8,0 3) Σαβινάση & Κουτινάση σε pH 8,0

Επίσης προετοιμάστηκαν και δύο δείγματα αναφοράς σε pH 5,0 και pH 8,0. Η υλοποίηση των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.12.1. Σε όλες τις συνθήκες, οι τελικές συγκεντρώσεις των ενζύμων ήταν 10μg/mL για την τυροσινάση και 100μg/mL για όλα τα υπόλοιπα. Επισημαίνεται ότι, η συγκέντρωση της τυροσινάσης είναι 10 φορές μικρότερη από τα υπόλοιπα ένζυμα. Η τυροσινάση ως οξειδωτικό ένζυμο, αναμένεται να δημιουργήσει νέες ομάδες στο μόριο του PU, οι οποίες θα ευνοήσουν την δράση των υπόλοιπων ενζύμων. Επομένως, η μελέτη γίνεται με μικρότερη συγκέντρωση συγκριτικά με τα υπόλοιπα ένζυμα, αφού η δράση της, στην διάσπαση είναι επικουρική και όχι κύρια

Οι αναλύσεις των δειγμάτων γίνονται με τις μετρήσεις του βάρους των σφαιριδίων PU και μέθοδοι GPC και HPLC, για τον προσδιορισμό της ενδεχόμενης μεταβολής της μοριακής δομής του PU και την ταυτοποίηση των προϊόντων που απελευθερώνονται αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα από τις μειώσεις βάρους του PU που προκλήθηκαν από τους συνεργητισμούς αλλά και από τα μεμονωμένα ένζυμα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.17.



Διάγραμμα 3.17. Ποσοστιαία μείωση του βάρους του PU λόγω της συνεργητισμού σε pH=8 (αριστερά) και pH=5 (δεξιά).

Συνεργιστική δράση σαβινάσης - κουτινάσης

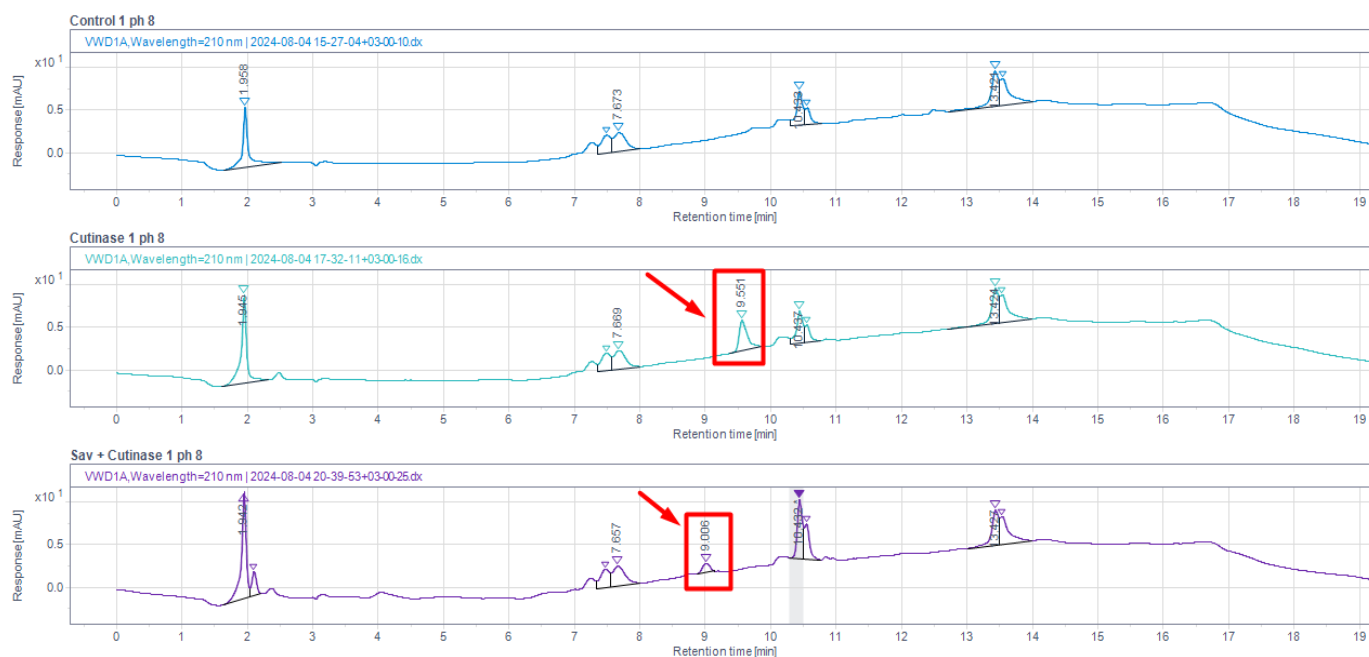
Από την μελέτη του ραβδογράμματος (Διάγραμμα 3.17), παρατηρείται ότι ακόμη και σε μικρότερη συγκέντρωση από την μεμονωμένη ανάλυση της (Κεφ. 3.4), η σαβινάση εμφανίζει σημαντική διάσπαση του PU κατά $7,7\% \pm 3,8\%$. Παρόμοια η κουτινάση φυσικού τύπου παρουσιάζει ελάττωση κατά $5,1\% \pm 1,0\%$, ποσοστό το οποίο επαληθεύεται και από τις μετρήσεις που είχαν γίνει σε προγενέστερη ανάλυση (Κεφ. 3.5). Παρόλα αυτά, ο συνεργητισμός των δύο ενζύμων (σαβινάσης και κουτινάσης) δεν ήταν αποδοτικός καθώς εμφάνισε μικρότερη επίδραση από εκείνη των μεμονωμένων ενζύμων.

Πίνακας 3.12. Αποτελέσματα ανάλυσης GPC στον συνεργητισμό σαβινάσης - κουτινάσης.

Ένζυμα	Ποσοστό μείωσης Mn	Ποσοστό μείωσης Mw
Σαβινάση - Κουτινάση	2,0% ± 0,5%	2,1% ± 0,0%
Σαβινάση	2,0% ± 0,3%	2,1% ± 0,6%
Κουτινάση	0,7% ± 0,1%	1,0% ± 0,6%

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την μέθοδο GPC (Πίνακας 3.12), έδειξαν ότι πραγματοποιήθηκε μείωση στα μοριακά βάρη Mn και Mw της τάξης του 2,0% στην συνεργιστική δράση. Ωστόσο, η ίδια μείωση παρατηρήθηκε και στην μεμονωμένη δράση της σαβινάσης, επομένως ο συνδυασμός των δύο ενζύμων δεν επιφέρει κάποιος ενισχυμένο αποτέλεσμα. Αντίθετα, η κουτινάση παρουσίασε την χαμηλότερη απόδοση με μείωση κοντά στο 1%.

Η ανάλυση του χρωματογραφήματος της HPLC (Εικόνα 3.26) των συγκεκριμένων δειγμάτων, έδειξε μία νέα κορυφή στα δείγματα στα οποία έδρασε ο συνδυασμός της σαβινάσης και της κουτινάσης αλλά και στο δείγμα όπου υπήρχε μόνο η κουτινάση στα 9-9,5 λεπτά. Μάλιστα η νέα αυτή κορυφή, ήταν περίπου τρεις φορές περισσότερο έντονη στο δείγμα της κουτινάσης από ότι της συνεργιστικής δράσης, υποδεικνύοντας ότι το προϊόν που αντιστοιχεί σε αυτήν παράγεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Η νέα κορυφή αποτελεί ένδειξη παραγωγής κάποιου νέου προϊόντος, το οποίο ανιχνεύθηκε στα 210nm. Αντίθετα το δείγμα της σαβινάσης έδειξε τις ίδιες κορυφές απορρόφησης με το δείγμα αναφοράς.



Εικόνα 3.26. Χρωματογράφημα HPLC του συνεργητισμού σαβινάσης – κουτινάσης. Απεικονίζονται από πάνω προς τα κάτω τα δείγματα Control (pH 8), Cutinase και Savinase - Cutinase

Συνεργιστική δράση σαβινάσης - τυροσινάσης

Όπως έχει αναλυθεί προηγουμένως, η τυροσινάση όντας οξειδωτικό ένζυμο δεν αναμένεται να δράσει στο πολυμερές προκαλώντας του απώλεια βάρους. Η δράση των οξειδωτικών ενζύμων έγκειται στην υποβοήθηση της διάσπασης από υδρολυτικά ένζυμα μετατρέποντας τις χαρακτηριστικές ομάδες του πολυμερούς σε περισσότερο ευνοϊκά υποστρώματα. Έτσι, όπως αναμενόταν η μείωση του βάρους (Διάγραμμα 3.17) αποκλειστικά λόγω της επίδρασης της τυροσινάσης ήταν αμελητέα. Η συνεργιστική δράση των ενζύμων είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση κατά $6,6\% \pm 0,0\%$ του βάρους του PU, ενώ η μείωση από την σαβινάση, όπως προαναφέρθηκε ήταν $7,7\% \pm 3,8\%$, τιμή που χαρακτηρίζεται από αρκετά μεγάλη αβεβαιότητα. Συνεπώς, ο συνεργητισμός της σαβινάσης με την κουτινάση ενδέχεται να αποδίδει καλύτερα από τα επιμέρους ένζυμα.

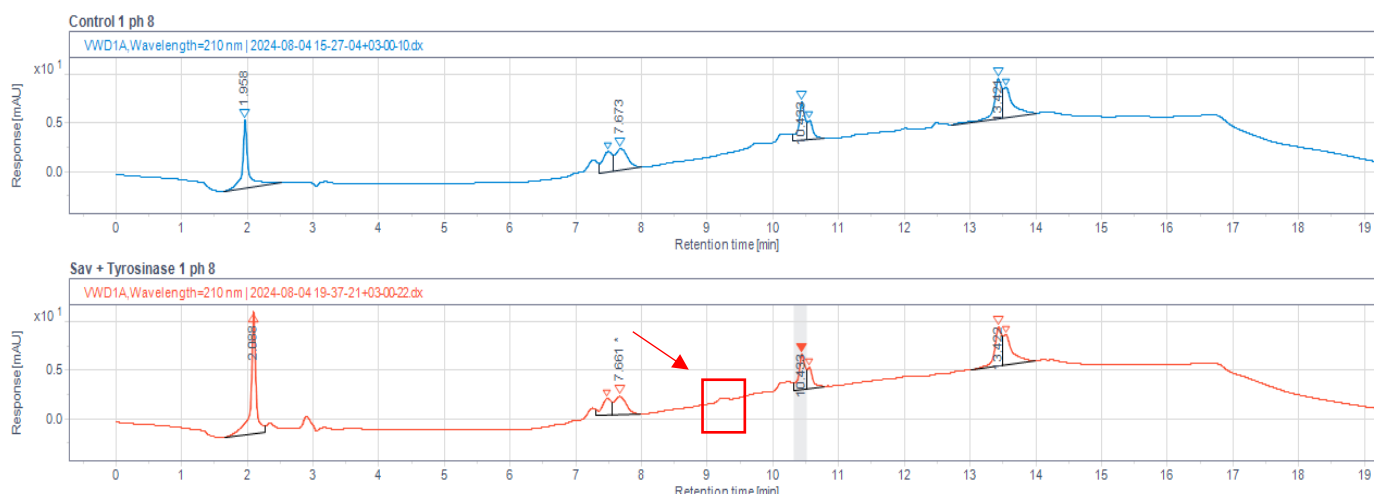
Πίνακας 3.13. Αποτελέσματα ανάλυσης GPC στον συνεργητισμό σαβινάσης - τυροσινάσης.

Ένζυμα	Ποσοστό μείωσης Mn	Ποσοστό μείωσης Mw
Σαβινάση - Τυροσινάση	$3,9\% \pm 0,7\%$	$0,4\% \pm 0,1\%$
Σαβινάση	$2,0\% \pm 0,3\%$	$2,1\% \pm 0,6\%$
Τυροσινάση	$0,1\% \pm 0,1\%$	$0,4\% \pm 0,6\%$

Η ανάλυση της κατανομής των μοριακών βαρών (Πίνακας 3.13) της σκόνης του PU, έδειξε ενισχυμένη ελάττωση του μέσου κατά αριθμού μοριακού βάρους με την συνεργιστική δράση των ενζύμων από ότι παρουσίασαν τα ένζυμα αυτά ξεχωριστά. Ειδικότερα, ο συνδυασμός σαβινάσης και τυροσινάσης εμφάνισε διπλάσια απόδοση από ότι η σαβινάση. Η επίδραση της τυροσινάσης όπως και στο συνολικό βάρος ήταν αμελητέα και στα δύο μεγέθη (Mn και Mw). Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζεται στο γεγονός ότι, η δράση της σαβινάσης προκάλεσε μείωση της τάξης του 2,1% στο Mw, ενώ ο συνεργητισμός σαβινάσης και τυροσινάσης μόλις 0,4%. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο συνεργητισμός των ενζύμων παρουσιάζουν βελτιωμένη απόδοση στα μικρότερα μόρια πολυμερούς γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στον μηχανισμό δράσης. Αντίθετα, την μεγαλύτερη επίδραση στα μεγαλύτερα μόρια πολυμερούς φαίνεται να την εμφανίζει αποκλειστικά η σαβινάση.

Η ανάλυση μέσω HPLC (Εικόνα 3.27), έδειξε μια νέα κορυφή στα 9,5 λεπτά στην αντίδραση του συνεργητισμού, δηλαδή στον ίδιο χρόνο που εμφανίστηκε η νέα κορυφή στον συνεργητισμό σαβινάσης – κουτινάσης και στην μεμονωμένη δράση της κουτινάσης, αλλά με μικρότερη ένταση. Η πιο αδύναμη ανίχνευση της νέας κορυφής υπονοεί και την μικρότερη ποσότητα απελευθέρωσης. Έτσι, συμπεραίνεται ότι και σε αυτήν την περίπτωση παράγεται ένα προϊόν κατά την διάσπαση του πολυμερούς και μάλιστα το ίδιο με αυτό του συνεργητισμού της σαβινάσης με την κουτινάση. Στην συγκεκριμένη περίπτωση τα δείγματα με την επιμέρους δράση της σαβινάσης και της

τυροσινάσης δεν εμφάνισαν αυτήν την νέα κορυφή ή κάποια άλλη και το χρωματογράφημα ήταν παρόμοιο με του δείγματος αναφοράς.



Εικόνα 3.27. Χρωματογράφημα HPLC του συνεργισμού σαβινάσης – τυροσινάσης. Απεικονίζονται από πάνω προς τα κάτω τα δείγματα Control (pH 8) και Savinase – Tyrosinase.

Συνεργιστική δράση σαβινάσης - αμιδάσης

Ο τελευταίος συνδυασμός που δοκιμάστηκε και μοναδικός που πραγματοποιήθηκε σε pH 5,0 ήταν μεταξύ της σαβινάσης και της αμιδάσης. Τα αποτελέσματα από την μέτρηση της απώλειας βάρους του PU (Διάγραμμα 3.17) έδειξαν μείωση κατά $3,4\% \pm 0,0\%$ με την δράση του συνεργισμού. Αντίστοιχα παρατηρήθηκε μείωση και από την δράση της σαβινάσης σε ποσοστό $6,8\% \pm 2,0\%$ ενώ από την αμιδάση υπήρχε αμελητέα μεταβολή. Η απώλεια βάρους του δείγματος αναφοράς είναι στο 1% και οφείλεται στο πειραματικό σφάλμα που περιλαμβάνεται στην απομάκρυνση του υδρολύματος της αντίδρασης αμέσως πριν τα δείγματα μεταφερθούν για ξήρανση. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ακόμη σε χαμηλότερη τιμή pH η σαβινάση εμφανίζει μεγάλη δραστηριότητα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η συνεργιστική δράση δεν είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της διάσπασης που πραγματοποιείται από τα επιμέρους ένζυμα και συγκεκριμένα την σαβινάση.

Η ανάλυση των δειγμάτων με την μέθοδο GPC οδήγησε στα αποτελέσματα του Πίνακα 3.14.

Πίνακας 3.14 Αποτελέσματα ανάλυσης GPC στον συνεργισμό σαβινάσης – αμιδάσης.

Ένζυμα	Ποσοστό μείωσης Mn	Ποσοστό μείωσης Mw
Σαβινάση - Αμιδάση	$4,4\% \pm 1,0\%$	$2,4\% \pm 1,1\%$
Σαβινάση	$3,5\% \pm 0,1\%$	$1,5\% \pm 0,3\%$
Αμιδάση	$0,6\% \pm 0,2\%$	$0,2\% \pm 0,2\%$

Σε μοριακό επίπεδο, φαίνεται πως ο συνδυασμός αμιδάσης και σαβινάσης προκαλεί μεγαλύτερες μεταβολές από ότι τα επιμέρους ένζυμα. Η αμιδάση πρακτικά δεν εμφανίζει επίδραση στα μοριακά βάρη του πολυμερούς. Αντίθετα, ακόμη και σε pH που είναι αρκετά μακριά από την άριστη δραστηριότητα (pH_{opt} 8,0), η σαβινάση ασκεί σημαντική επίδραση στα μόρια του PU με 3,5% μείωση στο Mn και 1,5% μείωση στο Mw. Η ενισχυμένη επίδραση που παρατηρείται στην μείωση των μοριακών βαρών σε αντίθεση με το συνολικό βάρος του PU, συνίσταται ότι τα ένζυμα διασπούν πράγματι το πολυμερές, ωστόσο τα διασπώμενα προϊόντα παραμένουν αδιάλυτα στο νερό.

Το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώνεται και από την ανάλυση HPLC, καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία νέα κορυφή σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς, το οποίο υποδηλώνει ότι δεν απελευθερώθηκε κάποιο υδατοδιαλυτό προϊόν κατά την διάσπαση του πολυμερούς, όπως συνέβη στους προηγούμενους δύο συνεργητισμούς.

Τα αποτελέσματα HPLC όλων των δειγμάτων και των τριών συνεργητισμών παρατίθενται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΤ.

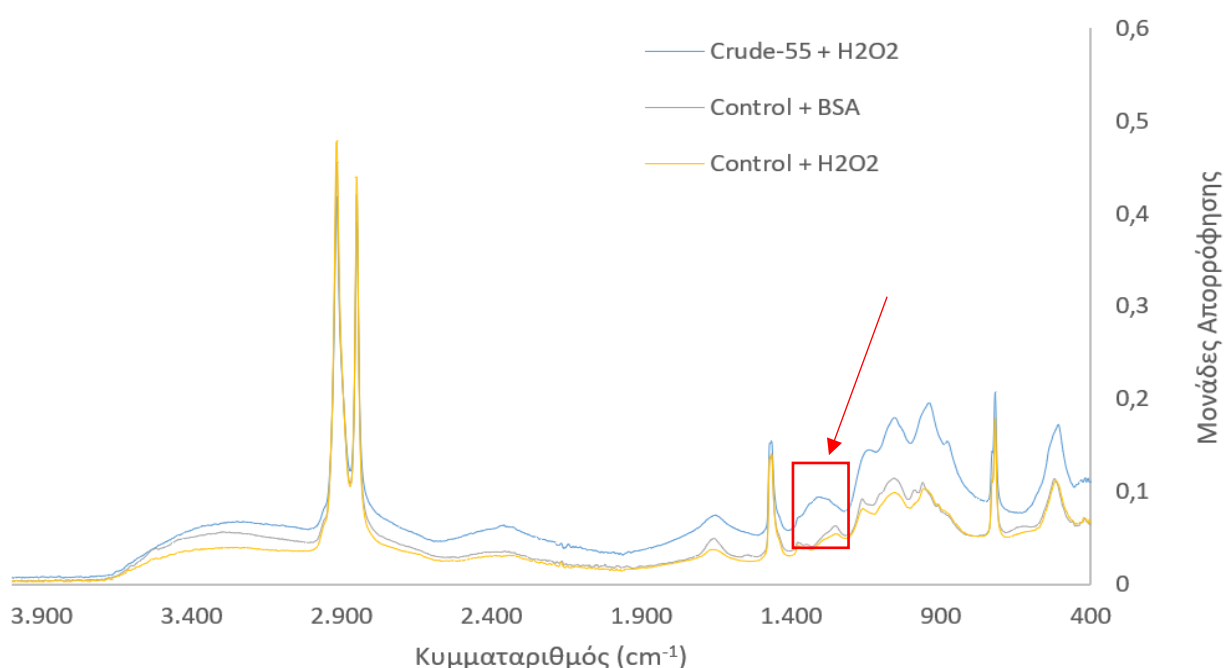
3.7 Κατεργασία του PE με οξειδωτική δράση

Ύστερα από τις μεθόδους απομόνωσης και την πρωτεομική ανάλυση, επιβεβαιώθηκε ότι οι υπεροξυγενάσες του *A. parasiticus* δεν καθίσταται δυνατό να εκφραστούν. Ωστόσο το ακατέργαστο πρωτεϊνικό διάλυμα του *P. pastoris* που παραλήφθηκε από τις διεργασίες απομόνωσης, εμφάνισε ιδιαίτερα υψηλή οξειδωτική ενεργότητα στο ABTS. Επομένως, κατά την καλλιέργεια των μετασχηματισμένων κυττάρων με τα γονίδια των Astra55, Astra57 και Astra58, εκφράστηκαν ένζυμα με ισχυρή οξειδωτική δράση. Τα ένζυμα αυτά, τα οποία δεν ταυτοποιήθηκαν, δοκιμάστηκαν σε υπόστρωμα πολυαιθυλένιο προκειμένου να ελεγχθεί το ενδεχόμενο εμφάνισης δράσης σε αυτό.

Η αναμενόμενη δράση των οξειδωτικών ενζύμων είναι η οξείδωση των μορίων του πολυμερούς προκειμένου να μετατραπούν τα αδρανή μακρά μόρια, σε περισσότερο δραστικά. Η αύξηση της δραστηριότητας των μορίων, μπορεί να ευνοήσει άλλα ένζυμα, κυρίως υδρολυτικά να προσδεθούν στο πλαστικό και να το διασπάσουν.

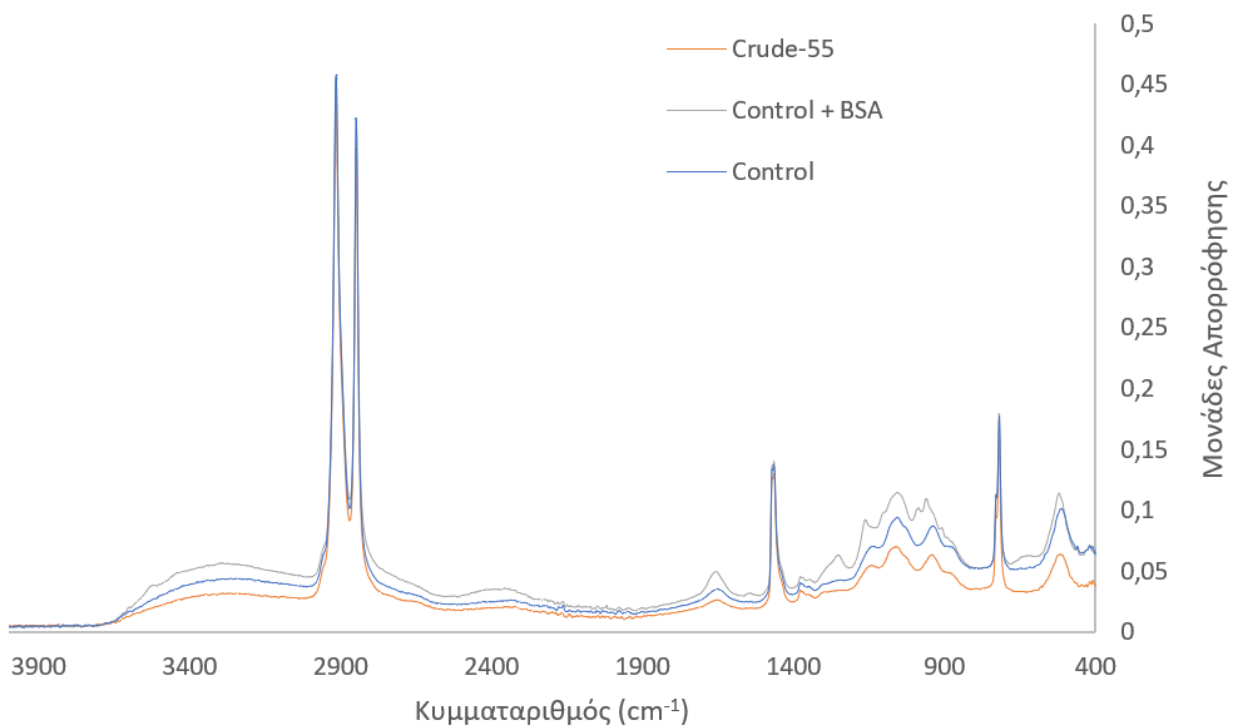
Επομένως ο έλεγχος της δράσης του ακατέργαστου διαλύματος έγινε με την μέθοδο ATR (Attenuated Total Reflectance). Η προετοιμασία των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.12.2. Η ανάλυση των δειγμάτων με αυτήν την μέθοδο προϋποθέτει, την απομάκρυνση της υδατικής φάσης και την ξήρανση του εναπομένοντος στερεού PE. Το στερεό ακτινοβολείται με υπέρυθρη ακτινοβολία η οποία αντανακλάται μεταξύ των σφαιριδίων PU και καταλήγει σε ανιχνευτή FTIR. Η απορρόφηση μέρους της ακτινοβολίας μεταφράζεται με κορυφές κάθε μία από την οποία αντιστοιχεί σε μια χαρακτηριστική ομάδα. Στην περίπτωση που υπάρχουν νέες κορυφές σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς, συνεπάγεται την ύπαρξη νέων χαρακτηριστικών ομάδων στα εξεταζόμενα και

επομένως την δράση του ενζύμου. Για την διευκόλυνση στην ονοματολογία των δειγμάτων, από εδώ και στο εξής το ακατέργαστο πρωτεϊνικό διάλυμα που έχει προέλθει από την καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων με το γονίδιο Astra55, ονομάζεται Crude-55 κ.ο.κ.



Διάγραμμα 3.18. Φάσμα ATR του δείγματος Crude-55 παρουσία H₂O₂.

Η ανάλυση των φασμάτων που προέκυψαν, έδειξε ότι παρατηρήθηκαν πράγματι νέες πιο έντονες κορυφές στο δείγμα Crude-55 παρουσία H₂O₂ σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς. Οι κορυφές αυτές, υποδηλώνουν πως μέσω της δράσης του ενζύμου, προκλήθηκε οξείδωση στο μόριο του PE και ενδέχεται να άλλαξε την μοριακή του δομή. Η ταύτιση των γραφημάτων των δύο δειγμάτων αναφοράς επισημαίνει πως το ένζυμο δεν προσδένεται στην επιφάνεια του πολυμερούς, επομένως η δράση του ενζύμου δεν παρεμποδίζεται από το συγκεκριμένο φαινόμενο.



Διάγραμμα 3.19. Φάσμα ATR του δείγματος Crude-55 απουσία H_2O_2 .

Αντίθετα, στο φάσμα του δείγματος Crude-55 απουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου, δεν παρατηρήθηκε καμία νέα κορυφή καθώς και οι τρεις καμπύλες ταυτίζονται σε όλο το εύρος του φάσματος. Η σύγκριση των δύο φασμάτων του Crude-55, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η παρουσία του υπεροξειδίου είναι απαραίτητη για την δράση του ενζύμου. Το γεγονός που επαληθεύεται και από τον μηχανισμό δράσης των υπεροξυγενασών και γενικότερα των οξειδωτικών ενζύμων που περιεγράφηκε στο Κεφάλαιο 1.3.4.3.

Τα φάσματα που εξάχθηκαν από τα υπόλοιπα δείγματα, δηλαδή τα Crude-57 και Crude-58, παρουσία και απουσία H_2O_2 , δεν έδειξαν καμία διαφορά με τα δείγματα αναφοράς. Συνεπώς, συμπεραίνεται πως στα δείγματα αυτά, τα οξειδωτικά ένζυμα δεν είναι ικανά να μεταβάλλουν το φάσμα του πολυμερούς όπως τα ένζυμα του Crude-55 που προκάλεσαν την οξείδωση του PE. Η διαφορετική έκφραση ενζύμων από τον ίδιο ξενιστή και στις ίδιες συνθήκες μπορεί αν αποδοθεί στην διεργασία μετασχηματισμού, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Τα φάσματα των υπόλοιπων δειγμάτων παρατίθενται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ.

4. Σχολιασμός αποτελεσμάτων και μελλοντικές προτάσεις

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε το εγχείρημα της ετερόλογης έκφρασης νέων ενζύμων τόσο υδρολυτικών, όσο και οξειδωτικών από δύο μύκητες, τον *F. oxysporum* και τον *A. parasiticus*. Τα ένζυμα δε του πρώτου δοκιμάστηκαν στην διάσπαση του PU ενώ του δεύτερου ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους για την οξείδωση του PE.

4.1 Ετερόλογη έκφραση των νέων ενζύμων

Αμιδάση

Από το σύνολο των ενζύμων του *F. oxysporum*, καθίσταται δυνατή η έκφραση μόνο δύο εξ' αυτών, της αμιδάση και της τυροσινάση. Η αμιδάση εκφράστηκε με επιτυχία καθώς συλλέχθηκαν κλάσματα με μεγάλη συγκέντρωση κατά την απομόνωση τα οποία ταυτοποιήθηκαν μέσω αντιστοίχισης του θεωρητικού μοριακού βάρους με εκείνο που βρέθηκε από την μέθοδο SDS-PAGE. Ωστόσο, τα κλάσματα αμιδάσης δεν εμφάνισαν ενεργότητα σε υποστρώματα με έντονη παρουσία αμιδικού δεσμού όπως καζεΐνη, p-Nitrophenyl Acetate (pNPA), p-Nitroacetanilide (pNAA), αιθαναμίδιο και το υπόστρωμα L-BAPNA (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ). Παρατηρήθηκε ωστόσο, έντονη δραστηριότητα στο Impranil DLN-SD με το οποίο και χαρακτηρίστηκε. Επιπλέον, η απουσία ενεργότητας σε τόσα διαφορετικά υποστρώματα οδήγησε στην υλοποίηση τεχνικών ενεργοποίησης του ενζύμου, προκειμένου να ελεγχθεί εάν έχει εκφραστεί στην αδρανή του μορφή από τον ξενιστή και δυσχεραίνεται η εκδήλωση δραστηριότητας. Η ενεργοποίηση δοκιμάστηκε με δύο τρόπους: επώαση στην χαμηλή τιμή pH 3,0 για ένα λεπτό στους 0°C και επώαση σε pH 4,5 με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου παρουσία διθειοθρεϊτόλης (DTT) για μία ώρα στους 37°C (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ). Ωστόσο, ακόμα και με τις μεθόδους ενεργοποίησης δεν παρουσιάστηκε ενεργότητα του ενζύμου. Μελέτη επάνω στην εύρεση τρόπου ενεργοποίησης της αμιδάσης κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να αξιοποιηθεί η δράση του ενζύμου.

Τυροσινάση

Αντίθετα, η ετερόλογη έκφραση της τυροσινάσης πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Η καθαρότητα των παραληφθέντων κλασμάτων καθώς και η ενεργότητα που εμφανίστηκε σε υπόστρωμα κατεχόλης, επέτρεψε τον πλήρη χαρακτηρισμό του ενζύμου και την εφαρμογή στην πολυουρεθάνη.

Πρωτεάση και Ενδοπεπτιδάση

Η καλλιέργεια του ξενιστή με τα γονίδια της πρωτεάσης και της ενδοπεπτιδάσης, έγινε με την εφαρμογή συμβατικών πρωτοκόλλων ανάπτυξης. Ωστόσο κατά την προσπάθεια απομόνωσης των συγκεκριμένων ενζύμων, βρέθηκε ότι τα κλάσματα δεν εμφάνισαν καμία ενεργότητα σε πρωτεϊνικά υποστρώματα όπως η καζεΐνη, το rNPA και το Impranil. Εκτός αυτού, ο έλεγχος των δειγμάτων των κλασμάτων με SDS-PAGE, δεν έδειξε καμία μπάντα. Συνεπώς, η μελέτη των συγκεκριμένων ενζύμων χρίζει βελτιστοποίησης διαφόρων παραμέτρων, όπως οι συνθήκες μετασχηματισμού και ανάπτυξης του ξενιστή καθώς και οι παράγοντες που επηρεάζουν τις κατάντη διεργασίες.

Υπεροξυγενάσες Astra55, Astra57 και Astra 58

Η έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών και οι κατάντη διεργασίες με χρωματογραφία ιοντικής εναλλαγής, έδωσαν κλάσματα τα οποία εμφάνισαν υψηλή οξειδωτική ενεργότητα στο ABTS. Ωστόσο, η μέθοδος SDS-PAGE με χρώση αργύρου για μεγαλύτερη ευαισθησία, έδειξε πως είχαν παραληφθεί πολλά ένζυμα με διαφορετικό μοριακό βάρος από το αναμενόμενο. Επιπλέον, η πρωτεομική ανάλυση του υδρολύματος της κυτταρικής καλλιέργειας επιβεβαίωσε το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης, καθώς δεν βρέθηκαν στα ακατέργαστα πρωτεϊνικά διαλύματα των καλλιέργειών καμία από τις εξεταζόμενες υπεροξυγενάσες. Συνεπώς, τα ένζυμα ενδιαφέροντος δεν κατάφεραν να εκφραστούν, ωστόσο η ισχυρή οξειδωτική δράση των ενζύμων του ξενιστή μπορούν να αποτελέσουν ένα νέο αντικείμενο έρευνας για την ταυτοποίησή και τον χαρακτηρισμό τους, καθώς και τις συνθήκες έκφρασης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι η ίδια οξειδωτική δράση δεν εμφανίστηκε στην καλλιέργεια μη μετασχηματισμένων κυττάρων *P. pastoris* X33, επομένως συμπεραίνεται πως εκφράζονται νέα οξειδωτικά ένζυμα από τον ξενιστή με την διαδικασία μετασχηματισμού.

4.2 Τριτοταγής δομή εκφραζόμενων ενζύμων

Η βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, είχε ως αποτέλεσμα τον υπολογισμό σημαντικών χαρακτηριστικών των ενζύμων για την πειραματική μελέτη τους, όπως το μοριακό βάρος, το ισοηλεκτρικό σημείο και τον συντελεστή γραμμομοριακής απορροφητικότητας στα 280nm. Επιπρόσθετα, έγινε η πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής των ενζύμων.

Αμιδάση

Συγκεκριμένα, η αμιδάση δεν εμφανίζει ιδιαίτερα πολύπλοκη δομή, καθώς η αναδίπλωσή της συνίσταται μόνο από α -έλικες. Επιπρόσθετα, μέσω της ευθυγράμμισης της αλληλουχίας της με πρωτεΐνες από την βάση δεδομένων Swiss-Prot βρέθηκε η πρωτεΐνη 2-πυρονο-4,6-δικαρβοξυλική υδρολάση του *Sphingomonas raucimobilis*, με την οποία εμφάνισε μεγάλο ποσοστό ομολογίας. Το ένζυμο αυτό έχει κρυσταλλογραφηθεί σε μαζί με το υπόστρωμα που καταλύει. Επομένως, η

ευθυγράμμιση των αλληλουχιών οδήγησε στον εντοπισμό του ενεργού κέντρου της αμιδάσης. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι το ενεργό κέντρο της 2-πυρονο-4,6-δικαρβοξυλικής υδρολάσης αποτελείται από 8 αμινοξέα, τα 4 από τα οποία είναι κοινά με τα αντίστοιχα της αμιδάσης. Έτσι, η συμπεριφορά της αμιδάσης μπορεί να εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με το εν λόγω ένζυμο ως προς τον τρόπο καταλυτικής δράσης και ενεργοποίησης.

Τυροσινάση

Αντίθετα, η τυροσινάση είναι πρωτεΐνη με σημαντικά μεγαλύτερο μοριακό βάρος και η δομή της όπως προσδιορίστηκε αλγοριθμικά, εμφανίζει μεγάλο βαθμό πολύπλοκης αναδίπλωσης με την παρουσία τόσο α-ελίκων όσο και β-πτυχωτών φύλλων. Παρουσίασε σημαντικό ποσοστό ομολογίας με την τυροσινάση του μύκητα *Agaricus bisporus* H97 η δομή της οποίας έχει προσδιοριστεί πειραματικά. Όπως αναφέρθηκε και στην βιοπληροφορική ανάλυση η τυροσινάση του *A. Bisporus*, εκφράζεται σε μια αδρανής μορφή, αρχικά από τον ξενιστή, με αριθμό αμινοξέων παρόμοιο με εκείνο της τυροσινάσης. Ωστόσο, το ένζυμο αυτό υδρολύεται και αποκτά την ενεργή μορφή του η οποία εμφανίζει δραστικότητα. Η ενεργή μορφή του ενζύμου έχει μειωμένο μοριακό βάρος κατά 33% σε σχέση με την αρχική αδρανή του μορφή [134]. Συνεπάγεται, λοιπόν πως λόγω του μεγάλου ποσοστού ομολογίας και η τυροσινάση του *F. oxysporum* ενδέχεται να παρουσιάζει αντίστοιχη συμπεριφορά και έτσι να δικαιολογείται η παρουσία δύο μπαντών στην ηλεκτροφόρηση με συνολικό μοριακό βάρος, ίδιο με το αναμενόμενο. Επιπλέον, εντοπίστηκαν τα συγκεκριμένα αμινοξέα τα οποία αλληλοεπιδρούν με τα δισθενή κατιόντα μετάλλου στην τυροσινάση του *A. Bisporus*. Μέσω της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών, εντοπίστηκαν τα αντίστοιχα αμινοξέα στην εξεταζόμενη τυροσινάση τα οποία είναι όλα κοινά. Τα αμινοξέα αυτά ενδέχεται να αποτελούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η πλήρης ταύτιση των αμινοξέων αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο ενζύμων, αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι τα δύο αυτά ένζυμα έχουν όμοιο μηχανισμό κατάλυσης. Η περεταίρω μελέτη των δύο ενζύμων μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση και άλλων χρήσιμων χαρακτηριστικών για την τυροσινάση του *F. oxysporum*.

Πρωτεάση και ενδοπεπτιδάση

Η δομή της πρωτεάσης δεν καθίσταται εφικτό να γίνει η πρόβλεψη με μεγάλη αξιοπιστία καθώς υπήρχε μια μεγάλη περιοχή στην οποία ο αλγόριθμος εμφάνισε μικρό βαθμό εμπιστοσύνης. Ωστόσο, φαίνεται να είναι ένα αρκετά πολύπλοκο ένζυμο όσο αναφορά τον συνδυασμό μεταξύ ελίκων και φύλλων που σχηματίζονται. Από την άλλη πλευρά, η δομή της ενδοπεπτιδάσης, προσδιορίστηκε με μεγαλύτερη ασφάλεια. Η δομή της παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς, διακρίνεται σε δύο επιμέρους δομές. Η μια εκ των οποίων αποτελείται αποκλειστικά από α-έλικες ενώ η δεύτερη κυρίως από β-πτυχωτά φύλλα. Ενδέχεται, οι δύο αυτές διακριτές υποδομές, να παίζουν διαφορετικό ρόλο στον καταλυτικό μηχανισμό δράσης του ενζύμου.

Υπεροξυγενάσες Astra55, Astra57 και Astra 58

Τέλος, οι τρεις υπεροξυγενάσες Astra55, Astra57 και Astra58 είναι τρία μικρά σχετικά ένζυμα των οποίων η δευτεροταγής δομή τους απαρτίζεται μόνο από α-έλικες. Εμφανίζουν σημαντικό ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους γεγονός που υποδηλώνει ότι έχουν παρόμοια δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά.

4.3 Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών κατάλυσης

4.3.1 Αμιδάση

Ο έλεγχος της καταλυτικής δραστηριότητας της αμιδάσης πραγματοποιήθηκε με το υπόστρωμα Impranil DLN-SD, που αποτελεί αιώρημα PU, μετρώντας την μείωση της οπτικής πυκνότητας OD₆₀₀ των δειγμάτων. Το βέλτιστο pH καταλυτικής δράσης βρέθηκε να είναι το 4,5. Σημειωτέων, ότι παρατηρήθηκε σημαντική πτώση της ενεργότητας για τιμές pH από 6,0 και πάνω, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανόν η αμιδάση να χάνει την δραστική της ικανότητα σε αλκαλικές τιμές. Επιπλέον, η μεγάλη μείωση που παρατηρείται σε τιμή pH 6,0 μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι είναι πολύ κοντά στο θεωρητικό ισοηλεκτρικό της σημείο (pH 6,18).

4.3.2 Τυροσινάση

Ο πειραματικός προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών καταλυτικής δράσης της τυροσινάσης, πραγματοποιήθηκε μέσω της οξείδωσης της κατεχόλης και μέτρηση των δειγμάτων στα 420nm. Οι βέλτιστες συνθήκες δράσης σε pH και θερμοκρασία έδειξαν, ότι το ένζυμο δρα σε ελαφρώς αλκαλικά pH και σχετικά ήπιες θερμοκρασίες. Προσδιορίστηκε πειραματικά, ότι άριστη τιμή pH είναι η 8,5, ενώ η θερμοκρασία στην οποία παρουσίασε την μέγιστη ενεργότητα είναι αυτή των 40°C. Τα δεδομένα αυτά είναι σε συμφωνία με βέλτιστες τιμές με τυροσινάσες από άλλους οργανισμούς. Για παράδειγμα:

- Η τυροσινάση του κοινού μανιταριού, του μύκητα *A. bisporus* με την οποία η εξεταζόμενη τυροσινάση εμφανίζει μεγάλο ποσοστό ομολογίας (31,50%), εμφανίζει βέλτιστη τιμή pH τους 7,0 και θερμοκρασία τους 35°C [137].
- Η τυροσινάση του *Ipomoea batatas* εμφανίζει βέλτιστη τιμή pH 8,0, [137], [138].
- Αντίστοιχα, οι τυροσινάσες του βακτηρίου *Bacillus megaterium* και του μύκητα *Lentinula boryana* εμφάνισαν μέγιστη ενεργότητα σε θερμοκρασία ίση με 40°C, [137].

Όσο αναφορά την σταθερότητα του ενζύμου, σημειώνεται ότι σε ουδέτερο pH 7,0 και θερμοκρασία ψύξης, δηλαδή στους 4°C, μπορεί να διατηρηθεί μέχρι και 3 εβδομάδες χωρίς να χάσει την δραστηριότητα του. Επίσης, εμφάνισε μεγάλη σταθερότητα σε θερμοκρασία 15°C αφού μετά την παραμονή σε αυτήν θερμοκρασία για μία ημέρα

διατήρησε ακόμα μέχρι και το 71% της ενεργότητας του. Σε πιο θερμές θερμοκρασίες η απενεργοποίηση του ενζύμου ήταν πιο αισθητή. Σε θερμοκρασία των 30°C, μετά από 24 ώρες κατάφερε να αποδώσει κατά το 41% της μέγιστης ενεργότητας, ενώ στους 40°C, που αποτελεί την βέλτιστη θερμοκρασία, κατάφερε να διατηρήσει μόλις το 24%. Η εξεταζόμενη τυροσινάση μπορεί να χαρακτηριστεί σε γενικές γραμμές αρκετά σταθερή με την μεταβολή της θερμοκρασίας. Συγκριτικά, αναφέρεται ότι η τυροσινάση του *Streptomyces cyaneofuscatus* έχασε το 60% της ενεργότητας του στους 45°C ακαριαία, ενώ η τυροσινάση του *F. oxysporum* χάνει το αντίστοιχο ποσοστό ύστερα από 7 ώρες σε αυτήν θερμοκρασία [139]. Αντίστοιχα, η δραστηριότητα της τυροσινάσης του *Rhizoglyphus sanguineus* CCT-4518 μειώθηκε κατά το ήμισυ μετά από επώαση 15 λεπτών στους 50°C, ενώ η εξεταζόμενη τυροσινάση στην ίδια θερμοκρασία παρουσίασε ακόμα ενεργότητα κοντά στο 30% της μέγιστης μετά από μία ώρα επώασης [140].

Αξίζει να σημειωθεί, πως και η κουτινάση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία από τον ίδιο μύκητα *F. oxysporum* εμφανίζει μέγιστη ενεργότητα σε τιμή pH 8,0 και στους 40°C [98] που είναι πανομοιότυπες συνθήκες με αυτές της τυροσινάσης. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι οι βέλτιστες τιμές συσχετίζονται με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες απομονώθηκαν τα ένζυμα [110].

4.4 Δραστηριότητα εμπορικών πρωτεασών

Ο έλεγχος μεταξύ τεσσάρων εμπορικών πρωτεασών (Σαβινάση, Αλκαλάση, πρωτεάση του *A. saitoi* του *A. oryzae*), ως προς την δραστηριότητά τους στην διάσπαση του PU πολυμερούς, ανέδειξε την σαβινάση ως το ένζυμο με την μεγαλύτερη ενεργότητα. Συγκεκριμένα, εμφάνισε 14,3% μείωση του συνολικού βάρους του πλαστικού ύστερα από 3 μέρες επώασης. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση κατά 6,6% και 6,9% στα Mn και Mw αντίστοιχα.

Άλλες εμπορικές πρωτεάσες εμφάνισαν επίσης ενεργότητα στο PU. Για παράδειγμα η δεκαήμερη κατεργασία ενός νέου βιοαποικοδομήσιμου πλαστικού PU που απαρτίζεται από τριαιθυλενογλυκόλη (TEG) και δισοκυανικό 1,6-εξαμεθυλένιο (HMDI) με παπαΐνη και α-χυμοθρυψίνη, οδήγησε σε μείωση του Mw κατά 30% [141]. Τα ένζυμα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε εφαρμογές διάσπασης PU. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι σε πολυουρεθάνες που παρασκευάστηκαν από δισοκυανική λυσίνη (LDI) και 1,4-βουτανοδιόλη (BD), η δραστηριότητα επιλεγμένων εμπορικών πρωτεασών είναι ιδιαίτερα υψηλή. Ειδικότερα, η παπαΐνη προκάλεσε αποσύνθεση στο συγκεκριμένο πολυμερές κατά 26%, η βρωμελίνη κατά 31% και η πρωτεΐνάση K κατά 9,1% μετά από 7 ημέρες κατεργασία. Το ποσοστό αποσύνθεσης του PU που απαρτίζεται από LDI και από άλλες διόλες (αιθυλενογλυκόλη και διαιθυλενογλυκόλη) από τα συγκεκριμένα ένζυμα είναι ακόμα μεγαλύτερο [142].

Συνεπώς, η σαβινάση αποδείχθηκε ότι ανήκει στην κατηγορία των εμπορικών πρωτεασών με σημαντική ενεργότητα στην διάσπαση του PU, όπως η παπαΐνη και η βρωμελίνη. Η αποσύνθεση που προκάλεσε η σαβινάση (14,3%) με σημαντικά

λιγότερο χρόνο κατεργασίας από την παπαΐνης και την βρωμελίνη (3 αντί για 7 ημέρες), την καθιστούν ως ένα ένζυμο με μεγάλο ενδιαφέρον για την αποικοδόμηση των πλαστικών και συγκεκριμένα του PU. Η μελλοντική χρήση, ή ακόμη και συνεργητισμός των παραπάνω, με ετερόλογες πρωτεΐνες για την διάσπαση του PU, αποτελεί σπουδαίο αντικείμενο έρευνας με μεγάλες προοπτικές.

4.5 Έλεγχος μεταλλαγμένων αμινοξέων για την βελτίωση της κουτινάσης του *F. oxysporum*

Η κουτινάση του *F. oxysporum* η οποία έχει εκφραστεί και χαρακτηριστεί [98], υπέστη σε μεταλλαγή επιλεγμένων αμινοξέων προκειμένου να ελεγχθεί το ενδεχόμενο βελτίωσης της καταλυτικής της δράσης. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η μετάλλαξη του L185 σε A185 (μετάλλαξη L), του αμινοξέος T183 σε A183 (μετάλλαξη T) και οι ταυτόχρονες μεταλλάξεις των αμινοξέων L84 και N87 σε δύο αμινοξέα αλανίνης A84 και A87 αντίστοιχα (DM). Η καταλυτική τους δράση συγκρίθηκε με το φυσικό τύπο κουτινάσης (WT). Όλες οι μεταλλάξεις συσχετίζονταν με την μείωση των στερικών παρεμποδίσεων από τα αμινοξέα του φυσικού τύπου. Όσο αναφορά την διάσπαση και την μείωση του συνολικού βάρους του πολυμερούς, οι μεταλλάξεις απέδωσαν υψηλότερα από ότι το WT, ωστόσο μόνο η μετάλλαξη T παρουσίασε μεγάλη αξιοπιστία. Παρόλα αυτά, στην ανάλυση του μοριακού βάρους το φυσικό στέλεχος έδειξε μεγαλύτερη επίδραση, προκαλώντας μείωση μέχρι και 3,4% στο Mw. Συνολικά, η κουτινάση φυσικού τύπου έδειξε σημαντικά στοιχεία για την ικανότητα στην διάσπαση του PU, με την μετάλλαξη T να ακολουθεί. Συνεπώς, οι μεταλλάξεις των αμινοξέων δεν παρουσίασαν επίδραση στη δομή ή αλλαγή στην αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Η περεταίρω μελέτη της μετάλλαξης T, καθώς και η εφαρμογή νέων μεταλλάξεων αποτελούν σημαντικό βήμα προς την ενίσχυση της καταλυτικής δράσης του συγκεκριμένου ενζύμου.

4.6 Ενζυμική αποικοδόμηση του PU

Στην προσπάθεια που έγινε για την διερεύνηση της ικανότητας των νέων ενζύμων να διασπάσουν το PU, δοκιμάστηκαν συνεργητισμοί ενζύμων μεταξύ της σαβινάσης και της κουτινάσης, τυροσινάσης και αμιδάσης. Από τους τρεις συνεργητισμούς που υλοποιήθηκαν, ο συνδυασμός σαβινάσης και τυροσινάσης ήταν ο περισσότερο αποδοτικός. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί, καθώς η τυροσινάση ως οξειδωτικό ένζυμο, μετατρέπει τις αδρανείς ομάδες του πολυμερούς σε ευνοϊκότερα υποστρώματα. Έτσι, η δράση της τυροσινάσης, υποβοηθά την υδρόλυση των δεσμών του πολυμερούς. Τονίζεται ότι, ο συνεργητισμός αυτός εμφάνισε σχεδόν ίδιο βαθμό αποικοδόμησης με την σαβινάση (6,6% και 7,7% αντίστοιχα), ωστόσο ο βαθμός της τελευταίας είχε σημαντική αβεβαιότητα.

Οι υπόλοιποι δύο συνεργητισμοί καθίσταται λιγότερο επιτυχής, καθώς αποδείχθηκε πως η μεμονωμένη δράση των ενζύμων που απαρτίζουν τον κάθε συνδυασμό ήταν περισσότερο αποτελεσματική. Ύστερα από διερεύνηση, βρέθηκε ότι η σαβινάση ως πρωτεάση, υδρολύει και απενεργοποιεί την δραστικότητα των υπόλοιπων ενζύμων σε μεγάλο βαθμό. Ειδικότερα, προσδιορίστηκε πειραματικά ότι ύστερα από επώαση της κουτινάσης και της τυροσινάσης για 24 ώρες με την σαβινάση, έλαβε χώρα η μείωση κατά 85% και 100% αντίστοιχα (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Η). Τα δεδομένα αυτά, υποδηλώνουν ότι τα ένζυμα των συνεργητισμών, κατά την επώαση τους με το πλαστικό, υφίστανται πλήρης απενεργοποίηση στην πρώτη κιόλας ημέρα επώασης. Συνεπώς, αποτελεί φυσικό επακόλουθο το γεγονός ότι η καταλυτική δράση του συνεργητισμού είναι ίση ή μικρότερη των επιμέρους ενζύμων όπως και βρέθηκε και επιπλέον ότι η όποια δράση των συνεργητισμών πιθανόν να οφείλεται κυρίως στην δράση της σαβινάσης.

Τέλος, προτείνεται οι μελλοντικές μελέτες επί του θέματος να συμπεριλαμβάνουν μερικές τροποποιήσεις στον σχεδιασμό συνεργητισμού για την ενζυμική αποικοδόμηση του PU. Τα σημαντικότερα σημεία που συνίσταται να δοθεί προσοχή αποτελούν:

- Η διαδοχική κατεργασία του PU, με εναλλαγή των ενζύμων που συμμετέχουν στην αντίδραση. Αναλυτικότερα, η χρήση πρωτεασών και ειδικότερα της σαβινάσης οφείλεται να υλοποιηθεί ξεχωριστά από τα υπόλοιπα μελετώμενα ένζυμα για να αποφευχθεί το φαινόμενο της πρωτεόλυσης.
- Η ανάλυση των δειγμάτων, κρίνεται απαραίτητο να συνδυαστεί με ανάλυση LC-MS για την ταυτοποίηση των πιθανόν προϊόντων του PU όπως δισοκυανικό τολουόλιο (TDI) και δισοκυανικό μεθυλενοδιφαινυλεστέρα (MDI).

4.7 Διερεύνηση οξειδωτικής δράσης στο PE

Οι υπεροξυγενάσες Astra55, Astra57 και Astra58, δεν κατάφεραν να εκφραστούν καθώς ύστερα από πρωτεομική ανάλυση, δεν ταυτοποιήθηκαν στο σύνολο των εκφραζόμενων πρωτεϊνών. Ωστόσο, από την διαδικασία ετερόλογης έκφρασης των συγκεκριμένων ενζύμων, απομονώθηκαν άλλα οξειδωτικά ένζυμα του μύκητα *P. pastoris* τα οποία εμφάνισαν υψηλή οξειδωτική ενεργότητα παρουσία H_2O_2 . Η ταυτότητα των συγκεκριμένων ενζύμων παραμένει άγνωστη, ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι η ίδια οξειδωτική ενεργότητα δεν παρατηρείται από το ακατέργαστο πρωτεϊνικό διάλυμα των μη ανασυνδυασμένων κυττάρων *P. pastoris* X33. Τα ένζυμα αυτά, δοκιμάστηκαν για την ενδεχόμενη οξειδωτική τους δράση στο αδρανές και μακρύ μόριο του πολυαιθυλενίου. Ύστερα, από ανάλυση ATR, προσδιορίστηκε ότι μόνο το ακατέργαστο πρωτεϊνικό διάλυμα των ανασυνδυασμένων κυττάρων με το γονίδιο του Astra55, εμφάνισε οξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκε νέες και πιο έντονες κορυφές στο φάσμα του πολυμερούς κατά την δράση του των οξειδωτικών ενζύμων παρουσία H_2O_2 .

Στο ανωτέρω αντικείμενο έρευνας, οφείλεται να διερευνηθούν οι συνθήκες κάτω από τις οποίες είναι δυνατή η έκφραση των ζητούμενων ενζύμων. Η εύρεση των παραγόντων και των συνθηκών που σχετίζονται με την ανάπτυξη της καλλιέργειας του ξενιστή αποτελεί στάδιο ζωτικής σημασίας το συγκεκριμένο εγχείρημα. Επιπρόσθετα, η ταυτοποίηση των ενζύμων του ξενιστή που εμφάνισαν οξειδωτική δράση στο ΡΕ, καθώς και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες εκφράζονται οφείλεται να μελετηθούν διεξοδικά προκειμένου να αξιοποιηθούν στο έπακρο οι οξειδωτικές δυνατότητες των συγκεκριμένων ενζύμων.

Βιβλιογραφία

- [1] L. Parker, «National Geographic,» 15 Σεπτέμβρης 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.nationalgeographic.com/environment/article/plastic-pollution>. [Πρόσβαση 23 Σεπτέμβρης 2024].
- [2] Plastic Soup Foundation, «Cause of plastic pollution,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.plasticsoupfoundation.org/en/plastic-problem/plastic-soup/cause-plastic-pollution/>. [Πρόσβαση 25 Σεπτεμβρίου 2024].
- [3] F. Rodriguez, «Encyclopedia Britannica,» 4 Σεπτέμβρης 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.britannica.com/science/plastic>. [Πρόσβαση 25 Σεπτέμβρης 2024].
- [4] «Science History Institute,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencehistory.org/education/classroom-activities/role-playing-games/case-of-plastics/history-and-future-of-plastics/>. [Πρόσβαση 25 Σεπτέμβρης 2024].
- [5] Π. Ταραντίλη, «Πολυμερισμός,» σε *Σημειώσεις του μαθήματος "Μηχανική Πολυμερών"*, Αθήνα, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2015, pp. 1-4.
- [6] «IGCSE & IAL Chemistry,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://igcseandialchemistry.com/addition-polymers/>. [Πρόσβαση 25 Σεπτεμβρίου 2024].
- [7] «BYJU'S,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://byjus.com/chemistry/difference-between-thermoplastic-and-thermosetting-plastic/>. [Πρόσβαση 25 Σεπτεμβρίου 2024].
- [8] «D W Plastics,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.dwplastics.co.uk/manufacturing-processes-for-plastics/>. [Πρόσβαση 25 Σεπτεμβρίου 2024].
- [9] Jena M. McCollum και I. S. Delgado, «ScienceDirect,» 2020. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821966-9.00010-9>. [Πρόσβαση 25 Σεπτεμβρίου 2024].
- [10] Plastic Oceans, «Plastic Oceans,» 2 Φεβρουαρίου 2021. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://plasticoceans.org/7-types-of-plastic/>. [Πρόσβαση 25 Σεπτεμβρίου 2024].
- [11] «American Chemistry Council, Inc,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.americanchemistry.com/industry-groups/center-for-the->

- polyurethanes-industry-cpi/applications-benefits/polyurethane-applications. [Πρόσβαση 25 Σεπτεμβρίου 2024].
- [12] Statista Research Department, « Statista,» 28 Ιουνίου 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>. [Πρόσβαση 26 Σεπτεμβρίου 2024].
- [13] «BYJU'S,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://byjus.com/chemistry/polyurethane/>. [Πρόσβαση 26 Σεπτεμβρίου 2024].
- [14] L. Jiang, . Z. Ren, W. Zhao, W. Liu, H. Liu και C. Zhu, «The Royal Society Publishing,» 25 Ιουλίου 2018. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsos.180536>. [Πρόσβαση 25 Σεπτεμβρίου 2024].
- [15] N. Jamaluddin, «ReaserachGate,» Δεκεμβρίου 2016. [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Hard-and-soft-segments-of-TPU_fig2_299398966. [Πρόσβαση 24 Σεπτεμβρίου 2024].
- [16] «AIChE The Global Home of Chemical Engineers,» Σεπτεμβρίου 2015. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.aiche.org/resources/publications/cep/2015/september/making-plastics-monomer-polymer>. [Πρόσβαση 20 Σεπτεμβρίου 2024].
- [17] SyBridge Technologies, «SyBridge Technology,» 27 Μαΐου 2021. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://sybridge.com/know-your-materials-ldpe-and-hdpe/#top>. [Πρόσβαση 25 Σεπτεμβρίου 2024].
- [18] «Essentra Components,» 28 Δεκεμβρίου 2022. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.essentracomponents.com/en-gb/news/manufacturing/injection-moulding/what-s-the-difference-between-ldpe-and-hdpe>. [Πρόσβαση 18 Αυγούστου 2024].
- [19] S. V. Boriskina, «ResearchGate,» Σεπτεμβρίου 2019. [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.researchgate.net/figure/a-Simple-molecular-structure-of-polyethylene-includes-no-ionic-bonds-or-polar-groups_fig2_335915455. [Πρόσβαση 20 Σεπτεμβρίου 2024].
- [20] M. F. Melo, «Statista,» 7 Ιουνίου 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.statista.com/chart/32385/global-plastic-waste-production-by-application/>. [Πρόσβαση 18 Σεπτεμβρίου 2024].
- [21] C. Moore, «Encyclopedia Britannica,» 28 Σεπτεμβρίου 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.britannica.com/science/plastic-pollution/Plastic-pollution-in-oceans-and-on-land>. [Πρόσβαση 10 Σεπτεμβρίου 2024].

- [22] «UN environment programme,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.unep.org/plastic-pollution>. [Πρόσβαση 22 Σεπτεμβρίου 2024].
- [23] H. Ritchie, V. Samborska και M. Roser, «Our World in Data,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://ourworldindata.org/plastic-pollution?insight=most-ocean-plastics-today-come-from-middle-income-countries#key-insights>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [24] «United States Environmental Protection Agency,» 23 Απριλίου 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.epa.gov/plastics/impacts-plastic-pollution>. [Πρόσβαση 20 Σεπτεμβρίου 2024].
- [25] G. M. Masrers and W. Ela, "Διαχείριση στερεών αποβλήτων και ανάκτηση πόρων," in *Εισαγωγή στην Περιβαλλοντική Μηχανική και Επιστήμη*, Κλειδάριθμός, 2018, pp. 702-707.
- [26] S. C. Khoo, «ResearchGate,» Δεκέμβρης 2018. [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-overview-of-a-sanitary-landfill-for-municipal-solid-waste-Millis-2017_fig3_329957631. [Πρόσβαση 20 Σεπτεμβρίου 2024].
- [27] «Plastic Solutions Review,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://plasticsolutionsreview.com/incineration/>. [Πρόσβαση 15 Σεπτεμβρίου 2024].
- [28] S. Dam, «AZO Materials,» 21 Ιουνίου 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=22798>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [29] «RecycleNow,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.recyclenow.com/how-to-recycle/plastic-recycling>. [Πρόσβαση 25 Σεπτεμβρίου 2024].
- [30] D. A. Merrington, «ScienceDirect,» 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978143773514710011X>. [Πρόσβαση 25 Σεπτεμβρίου 2024].
- [31] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://boroughofambler.com/download/trash__recycling/PRIMARY-SECONDARY-TERTIARY-RECYCLING-ARTICLE.pdf. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [32] Z. Cai, «National Center for Biotechnology Information,» 26 Ιουνίου 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10386651/>. [Πρόσβαση 25 Σεπτεμβρίου 2024].

- [33] S. Bahl, «ScienceDirect,» 2021. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214785320345508>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [34] «AIMPLAS,» 27 Ιουνίου 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214785320345508>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [35] E. Nikolaivits, «Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,» 22 Ιουνίου 2021. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2021.696040/full>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [36] M. Carnevali, «Acids (VFAs) and bioplastic (PHA) recovery,» σε *Clean Energy and Resource Recovery, Wastewater Treatment Plants as Biorefineries*, 2022, pp. 245-254.
- [37] «European Commission,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://environment.ec.europa.eu/topics/plastics/biobased-biodegradable-and-compostable-plastics_en. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [38] «Renewable Carbon,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://renewable-carbon.eu/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [39] «DBI Plastics A/S,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.dbiplastics.com/about-dbi/benefits-of-bioplastics>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [40] J.-G. Rosenboom, «Nature Reviews Materials,» 2022. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41578-021-00407-8>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [41] «University of Bergen,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.uib.no/en/geobio/56846/what-are-microorganisms>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [42] S. M. Abdel-Aziz, M. M. Abo Elsoud και A. A. Anise, «Microbial Biosynthesis: A Repertory of Vital Natural Products,» σε *Food Biosynthesis*, 2017, pp. 25-54.
- [43] «National Center for Biotechnology Information,» 5 Απριλίου 2022. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279387/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [44] R. M. Pelczar και M. Pelczar, «Encyclopedia Britannica,» 1 Σεπτεμβρίου 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available:

- <https://www.britannica.com/science/microbiology#ref48787>. [Πρόσβαση 18 Σεπτεμβρίου 2024].
- [45] B. Alberts και K. Hopkin, «Κύτταρα: Οι Θεμελιώδεις Μονάδες της Ζωής,» σε *Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας*, Λευκωσία, Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, Broken Hill Ltd, 2021.
- [46] A. Jacot, «Infectious Disease Advisor,» 22 Σεπτεμβρίου 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/ddi/streptococcus-pneumoniae/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [47] «National Geographic,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://education.nationalgeographic.org/resource/escherichia-coli-e-coli/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [48] «National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID),» 29 Αυγούστου 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.niaid.nih.gov/news-events/niaid-syphilis-research>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [49] M. L. Shuler και F. Kargi, *Μηχανική Βιοδιεργασιών*, Αθήνα: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ε.Μ.Π., 2005.
- [50] A. Yannarell και A. Kent, «Bacteria, Distribution and Community Structure,» σε *Encyclopedia of Inland Waters*, 2009, pp. 201-210.
- [51] S. Udairuwala, «ScienceABC,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.scienceabc.com/pure-sciences/what-are-cells-made-of.html>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [52] S. McCarthy. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://slideplayer.com/slide/6252887/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [53] Γ. Λυμπεράτος, *Εισαγωγή στην Βιοχημική Μηχανική*, Αθήνα: Τζιόλα, 2021.
- [54] V. Ahmadjian, «Encyclopedia Britannica,» 3 Σεπτεμβρίου 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.britannica.com/science/fungus>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [55] S. M. Abdel-Aziz, «Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms,» σε *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, 2019, pp. 107-125.
- [56] G. Bjørklund, «National Center for Biotechnology Information,» 23 Οκτωβρίου 2022. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9655540/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].

- [57] «ChemBk,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.chembk.com/en/chem/Indigoidin>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [58] «Cleveland Clinic,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://my.clevelandclinic.org/health/body/22615-melanin>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [59] R. Codd, «Siderophores and iron transport,» σε *Comprehensive Inorganic Chemistry III*, 2023, pp. 3-29.
- [60] J. V. d. O. Barreto, «MDPI,» 4 Δεκεμβρίου 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/12/2920>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [61] «BBC,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.bbc.co.uk/bitesize/guides/zwh9q6f/revision/3>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [62] National Grid Group, «National Grid,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.google.gr/search?q=nationalgrid&btnK=%CE%91%CE%BD%CE%B1%CE%B6%CE%AE%CF%84%CE%B7%CF%83%CE%B7+Google&sxsrf=APwXEdesLaLi516AtxeY4WIVRH5KRL6byQ%3A1680458426894&source=hp&ei=uslpZNmNNOGOxc8Pxa-S-Ac&iflsig=AOEireoAAAAAZCnQygD8qhJ_vUFd7csbuv7RLBa612V. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [63] D. A. Osho, «Mohanlal Sukhadia University,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.mlsu.ac.in/econtents/1243_Industrial%20Micro%20Overview.pdf. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [64] E. J. Okal, «ScienceDirect,» 1 Σεπτεμβρίου 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651323007066#sec0015>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [65] G. Taxeidis, «ScienceDirect,» 1 Σεπτεμβρίου 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749124010613?via%3Dihub>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [66] «National Institutes of Health (NIH),» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Genetic-Engineering>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [67] «National Institutes of Health (NIH),» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Recombinant-DNA-Technology>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].

- [68] M. R. Monroe, 14 Απριλίου 2020. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-what-is-a-plasmid>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [69] [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://app.jove.com/v/5059/bacterial-transformation-the-heat-shock-method>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [70] S. Li και . L. M. Anderson, σε *DNA transformation by local heat shock*, 2007, pp. 533-536.
- [71] J. Fernández-Romero, «Fluorescence | Food Applications,» σε *Encyclopedia of Analytical Science*, 2019, pp. 281-291.
- [72] Y. Zhang, «ScienceDirect,» Σεπτεμβρίου 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927796X24000512>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [73] P. E. V. Paul, «Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms,» σε *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 2019, pp. 107-125.
- [74] B. D. Ensley, «Expression of Naphthalene Oxidation Genes in Escherichia coli Results in the Biosynthesis of Indigo,» *Science*, pp. 167-169.
- [75] H. T. Kim, «Biological Valorization of Poly(ethylene terephthalate) Monomers for Upcycling Waste PET,» *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 19 Νοεμβρίου 2019.
- [76] S. Pontrelli, «ScienceDirect,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1096717618300740#s0155>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [77] C. Batt, «Pichia pastoris,» σε *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2014, pp. 42-46.
- [78] M. Reddy, «ResearchGate,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Pichia-pastoris-source-figmorg_fig2_352562413. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [79] M. Karbalaeei, «National Institutes of Health (NIH),» 14 Φεβρουαρίου 2020. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.google.gr/search?q=%CE%9D%CE%99%CE%97&btnK=%CE%91%CE%BD%CE%B1%CE%B6%CE%AE%CF%84%CE%B7%CF%83%CE%B7+Google&sxsrf=APwXEdesLaLi516AtxeY4WIVRH5KRL6byQ%3A1680458426894&source=hp&ei=uslpZNmNNOGOxc8Pxa-S->

Ac&iflsig=AOEireoAAAAAZCnQygD8qhJ_vUFd7csbuv7RL. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].

- [80] Ι. Κλώνης, *Ενζυμική Βιοτεχνολογία*, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2022.
- [81] A. Radzicka, «A Proficient Enzyme,» *Science*, pp. 90-93, 6 Ιανουαρίου 1995.
- [82] [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.istockphoto.com/vector/lock-and-key-model-gm1256291609-367788792>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [83] J. A. Araujo, «ScienceDirect,» 1 Μαρτίου 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652624004724>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [84] F. Barja, «National Institutes of Health (NIH),» 2021. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8383174/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [85] «Carbios,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.carbios.com/en/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [86] N. Mahajan, «ResearchGate,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Repeating-units-of-polyester-a-and-polyether-b-types-polyurethanes_fig1_276516850. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [87] L. Ignat, «ScienceDirect,» Ιούλιος 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669011000707?fr=RR-2&ref=pdf_download&rr=8caef06c0f1838cb. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [88] Y. Matoba, «National Institutes of Health (NIH),» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.google.gr/search?q=NIH&btnK=%CE%91%CE%BD%CE%B1%CE%B6%CE%AE%CF%84%CE%B7%CF%83%CE%B7+Google&sxsrf=APwXEdesLaLi516AtxeY4WIVRH5KRL6byQ%3A1680458426894&source=hp&ei=uslpZNMNNOGOxc8Pxa-S-Ac&iflsig=AOEireoAAAAAZCnQygD8qhJ_vUFd7csbuv7RLBa612VZ&ved=0ah. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [89] A. Magnin, «ScienceDirect,» 2020. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975019301570#s0025>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].

- [90] A. Magnin, «ScienceDirect,» 2021. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687920303773#s0025>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [91] J. Singh, «Industrial enzymes: Basic information, assay, and applications,» σε *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*, 2023, pp. 295-309.
- [92] S. A. Saghir, «Fate of chemicals following exposure III: Metabolism (biotransformation),» σε *Encyclopedia of Toxicology (Fourth Edition)*, 2024, pp. 635-668.
- [93] «Encyclopedia Britannica,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.britannica.com/science/polyethylene>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [94] H. Raoufi, «ResearchGate,» Σεπτέμβρης 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.researchgate.net/publication/373983620_Enzymatic_Degradation_of_Polyethylene_and_Polyethylene_Terephthalate_A_Mini_Review. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [95] N. Zhang, «MDPI,» 29 Ιουλίου 2022. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/8/1537>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [96] J. Everse, «Heme Proteins,» σε *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2013, pp. 532-538.
- [97] M.-C. Sigmund, «Current state and future perspectives of engineered and artificial peroxygenases for the oxyfunctionalization of organic molecules,» *Nature Catalysis*, pp. 690-702, 16 Σεπτεμβρίου 2020.
- [98] M. Dimarogona, «Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with,» *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 2308-2317, Νοέμβρης 2015.
- [99] M. S. Son, «National Institutes of Health (NIH),» Ιανουάριος 2021. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8006063/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [100] «ThermoFisher Scientific,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/competent-cells-strains/top10-competent-cells.html>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].

- [101] H. Jeong, «National Institutes of Health (NIH),» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4395058/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [102] P. R. Chakravarty, «Gold Biotechnology,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://goldbio.com/articles/article/what-are-e-coli-expression-strains>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [103] J. Zha, «MDPI,» 23 Αυγούστου 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.mdpi.com/2309-608X/9/10/1027#B27-jof-09-01027>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [104] M. Ahmad, «Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production,» *SpringerLink*, p. 5301–5317, 18 Απριλίου 2014.
- [105] Invitrogen, *EasySelect Pichia Expression Kit*, 2010.
- [106] Novozymes, *Savinase® 16 L SAFETY DATA SHEET*, 2007.
- [107] M. Ottesen, «The subtilisins,» *Methods in Enzymology*, pp. 199-215, 1970.
- [108] J. Errington, «National Institutes of Health (NIH),» 11 Μαΐου 2020. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7376258/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [109] M. Philipp, «Kinetics of subtilisin and thiolsubtilisin,» *Springer*, p. pages 5–32, Μάρτιος 1983.
- [110] G. Taxeidis, «Triggering and identifying the polyurethane and polyethylene-degrading,» *Environmental Pollution*, 2023.
- [111] «Expasy,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://web.expasy.org/protparam/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [112] «National Center for Biotechnology Information,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [113] J. Jumper, «Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold,» *Nature*, p. 583–589, 15 Ιουλίου 2021.
- [114] «SwissModel,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://swissmodel.expasy.org/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].

- [115] G. Papanikolaou, «Kallipos,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/649>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [116] Takar Blo USA, Inc, *PCR clean-up Gel extraction User manual*, 2017.
- [117] M. Suga, «Oxford Academic,» 2 Αυγούστου 2003. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://academic.oup.com/femsle/article/225/2/235/547892?login=false>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [118] [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://gr.toptiontech.com/photochemical-reactor/solvent-filtering-system/1000ml-vacuum-filtration-apparatus-membrane.html>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [119] [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sigmaaldrich.cn/CN/zh/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-concentration-and-buffer-exchange/amicon-stirred-cells>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [120] G. Batley, «ScienceDirect,» 2005. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977007135>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [121] «Protein Purification Methods,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://comis.med.uvm.edu/vic/coursefiles/MD540/MD540-Protein_Methods_Learning_Module_10400_593281210/Protein-methods/Protein_Methods4.html. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [122] H. Block, «Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review,» σε *Methods in Enzymology*, 2009, pp. 439-473.
- [123] GE HealthCare, *PD-10 Desalting Column*.
- [124] R. Pinnataip, «National Institutes of Health (NIH),» 19 Φεβρουαρίου 2021. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7931183/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [125] E. N. Kadnikova, «ScienceDirect,» 13 Σεπτέμβριου 2002. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117702000577>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [126] «Peptidase Activity Assays Using Protein,» σε *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc, 2002.
- [127] Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.chemistry.uoc.gr>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].

- [128] C. M. Koh, «Storage of Bacteria and Yeast,» σε *Methods in Enzymology*, 2013, pp. 5-21.
- [129] V. Malashkevich, «RCSB PDB,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.rcsb.org/structure/4DI8>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [130] SWISSMODEL, [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://swissmodel.expasy.org/templates/4oua.2>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [131] «EMBL-EBI,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR010259/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [132] R. Bott, «RCSB PDB,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.rcsb.org/structure/1st2>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [133] S. ESCHENBURG, «Crystal structure of subtilisin DY, a random mutant of subtilisin Carlsberg,» *European Journal of Biochemistry*, p. 3092318, 13 Ιουλίου 1998.
- [134] S. G. Mauracher. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://journals.iucr.org/d/issues/2014/09/00/mn5061/index.html>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [135] J. M. Kavran, «Silver Staining of SDS-polyacrylamide Gel,» σε *Methods in Enzymology*, 2014, pp. 169-176.
- [136] R. Salwan και V. Sharma , «Analytical techniques in molecular biology-proteomics,» σε *Laboratory Methods in Microbiology and Molecular Biology*, 2023, pp. 125-134.
- [137] K. U. Zaidi, «National Institutes of Health (NIH),» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4150416/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [138] C. Eicken, «Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center,» *FebsPress*, 15 Οκτωβρίου 1998.
- [139] Z. Li, «National Institutes of Health (NIH),» 23 Ιουλίου 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10358999/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [140] L. T. Duarte, «National Institutes of Health (NIH),» 1 Ιουνίου 2012. [Ηλεκτρονικό]. Available:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768971/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [141] V. Tournier, «Enzymes' Power for Plastics Degradation,» 2023, pp. 5612-5701.
- [142] N. Yamamoto, «Enzymatic hydrolysis of lysine diisocyanate based polyurethanes and segmented polyurethane ureas by various proteases,» σε *Reactive and Functional Polymers*, 2007, pp. 1338-1345.
- [143] «DNASU,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://dnasu.org/DNASU/GetVectorDetail.do?vectorid=526>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [144] «SnapGene,» Novagen, [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.snapgene.com/plasmids/yeast_plasmids/pPICZ_A. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [145] L. Tian, 25 Μαΐου 2021. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.molecularcloud.org/p/what-is-bleor>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [146] «SnapGene,» Novagen, [Ηλεκτρονικό]. Available: [https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_\(novagen\)/pET-22b\(%2B\)](https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-22b(%2B)). [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [147] F. Ganske, BMG LABTECH, Απριλίου 2009. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.bmglabtech.com/en/application-notes/enzyme-kinetic-measurements-performed-on-a-bmg-labtech-microplate-reader/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [148] [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.bmglabtech.com/en/application-notes/enzyme-kinetic-measurements-performed-on-a-bmg-labtech-microplate-reader/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [149] T. Bayer, «Structural Elucidation of a Metagenomic Urethanase and Its». *Angewandte Chemie*.
- [150] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.brainkart.com/article/Acid-Amides_41391/. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].
- [151] G. W. Black, «A high-throughput screening method for determining the substrate scope of nitrilases,» *Royal Society of Chemistry*, 19 Δεκεμβρίου 2014.
- [152] S. Li, «National Institutes of Health (NIH),» 16 Ιανουαρίου 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6270008/>. [Πρόσβαση 29 Σεπτεμβρίου 2024].

- [153] A. Gorelik, «Molecular mechanism of activation of the immunoregulatory amidase NAAA,» 13 Σεπτεμβρίου 2018.
- [154] R. Meijers, «The Crystal Structure of Glutamyl Endopeptidase from *Bacillus intermedius* Reveals a Structural Link between Zymogen Activation and Charge Compensation,» *ACS Publications*, 14 Φεβρουαρίου 2004.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: Πλασμιδιακοί φορείς γονιδίων

Πλασμίδιο pPICZa A

Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά των γονιδίων των νέων ενζύμων, είναι ο pPICZa A. Ο συγκεκριμένος φορέας αν και είναι κατάλληλος να χρησιμοποιηθεί και σε άλλα στελέχη της *P.pastoris*, συνιστάνται η χρήση του στο στέλεχος X33. Το πλασμίδιο περιέχει διάφορα γονίδια τα οποία εξυπηρετούν τις ανάγκες της ετερόλογης έκφρασης σε έναν ξενιστή. Αναλυτικότερα, αποτελείται από 3329 ζεύγη βάσεων (base pair -bp) και διακρίνονται οι εξής περιοχές βάσεων [105], [143], [144]:

1-941bp: 5' AOX1 → Αποτελεί την νουκλεοτιδική αλληλουχία του επαγόμενου υποκινητή για την ετερόλογη έκφραση. Παρουσία μεθανόλης, γίνεται η επαγωγή έκφρασης του συγκεκριμένου υποκινητή καθώς εκφράζονται από αυτόν ένζυμα στον γενότυπο του ξενιστή που μεταβολίζουν την μεθανόλη. Ο υποκινητής επιτρέπει υψηλές αποδόσεις έκφρασης ετερόλογης πρωτεΐνης.

932-1011bp: Multiple Cloning Site → Αποτελούν τις αλληλουχίες οι οποίες δρουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Ουσιαστικά επιτρέπουν την εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου στον φορέα από το DNA του δότη.

1012-1041bp: C-Terminal *myc* epitope tag → Η μεταγραφή και η μετάφραση αυτής της αλληλουχίας προσδίδει στο τέλος της έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου μια χαρακτηριστική σειρά αμινοξέων (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn) που επιτρέπει την διευκόλυνση της απομόνωσής τους.

1057-1074bp: C-Terminal polyhistidine (6xHis) tag → Παρόμοια με παραπάνω προστίθεται μια «ουρά» έξι αμινοξέων ιστιδίνης στην εκφραζόμενη πρωτεΐνη που ενισχύει την διεργασία καθαρισμού.

1153-1399bp: AOX1 Transcription Terminator (TT) → Η αλληλουχία χαρακτηρίζεται από το σήμα τερματισμού της μεταγραφής αλλά και της πολυαδενυλίωσης που αυξάνει την σταθερότητα του σχηματιζόμενου mRNA και αποτελεί σήμα απέκκρισης (signal peptide) της ετερόλογης πρωτεΐνης στο εξωκυτταρικό περιβάλλον.

1439-1825bp: TEF1 Promoter → Αποτελεί το γονίδιο του υποκινητή, πάνω στην οποία προσδένεται η RNA πολυμεράση για την έκφραση του γονιδίου *Sh ble* το οποίο προσφέρει αντίσταση στο αντιβιοτικό ζεοσίνη. Ο υποκινητής αυτός προέρχεται από τον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

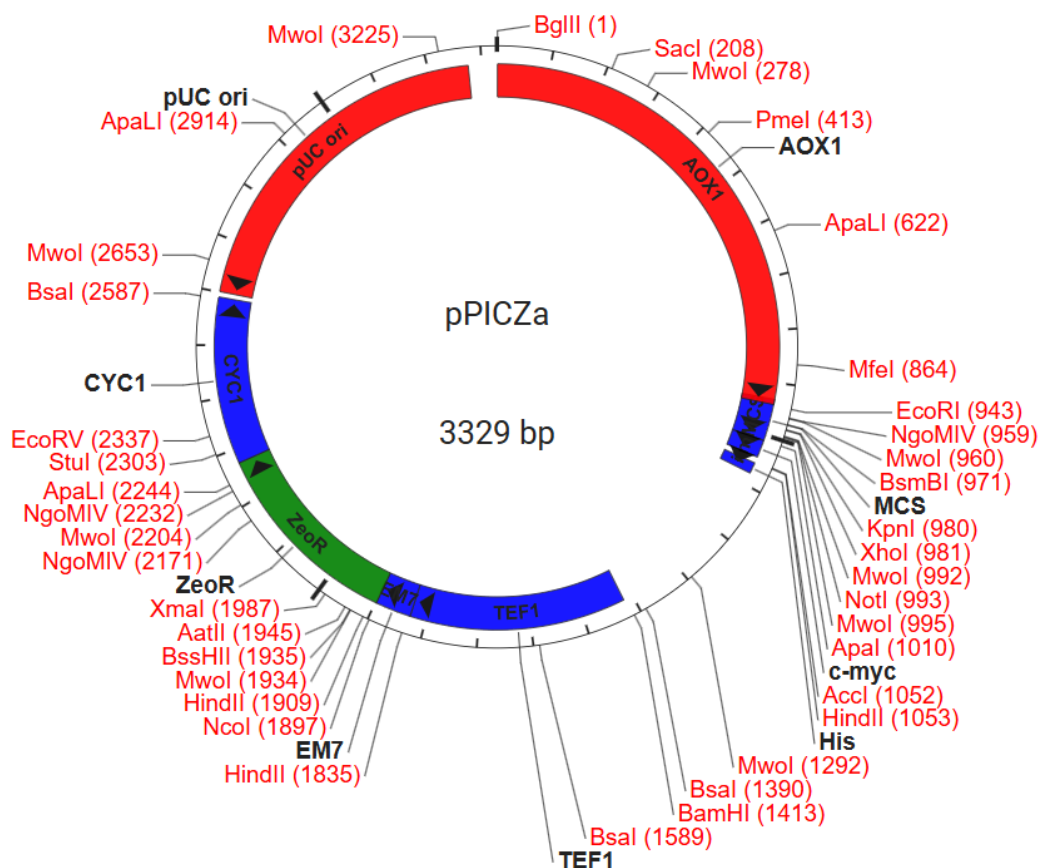
1833-1880bp: EM7 (synthetic prokaryotic promoter) → Ο υποκινητής για την έκφραση του γονιδίου *Sh ble* στο *E.coli*.

1899-2273bp: BleoR ή *Sh ble* gene (*Streptoalloteichus hindustanus ble* gene) → Η αλληλουχία έκφρασης της πρωτεΐνης η οποία καταστέλλει την δράση της ζεοσίνης και επιτρέπει την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων παρουσία αυτής [145].

2339-2586bp: CYC1 Transcription termination region → Αλληλουχία τερματισμού του γονιδίου *Sh ble* που επιτρέπει και αποδοτική επεξεργασία του mRNA για αυξημένη σταθερότητα.

2661-3249bp: ρUC origin → Αλληλουχία που κωδικοποιεί και καθιστά δυνατή την αποδοτική αντιγραφή και συντήρηση του πλασμιδίου στο *E.coli*.

Επιπλέον υπάρχουν μερικές ενδιάμεσες σειρές βάσεων που αναγνωρίζονται από συγκεκριμένα περιοριστικά ένζυμα όπως τα *Sac I*, *Pme I* και *BstX I* που τέμνουν την δεοξυριβονουκλεοτιδική αλυσίδα στην πριν τον AOX1 υποκινητή, καθιστώντας δυνατή την γραμμικοποίηση του πλασμιδίου, φάση απαραίτητη για την εισαγωγή του στο γονιδίωμα της *P. pastoris*. Οι περιοχές που επισημάνθηκαν αναδεικνύονται αναλυτικά στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Πλασμιδιακός φορέας pPICZa A και οι επιμέρους περιοχές του [143].

Πλασμίδιο pET-22b(+)

Τέλος, η έκφραση της κουτινάσης στο *E.coli* BL21, γίνεται μέσω του πλασμιδιακού φορέα pET-22(+) [98]. Ο φορέας αποτελείται από 5493bp και οι λειτουργίες των κυριότερων περιοχών του αναλύονται εκτενώς ακολούθως [146].

26-73bp: T7 terminator → Σηματοδοτεί την τερματική αλληλουχία για την T7 RNA πολυμεράση η οποία κωδικοποιεί την κουτινάση ή γενικότερα το επιθυμητό γονίδιο.

140-157bp: 6xHis → Νουκλεοτιδική αλληλουχία η οποία προσθέτει στην άκρη της πρωτεΐνης μια «ουρά» έξι αμινοξέων ιστιδίνης, υποβοηθώντας την αναγνώριση της από τις τεχνικές απομόνωσης, όπως την χρωματογραφία ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου.

158-225bp: Multiple Cloning Site → Η περιοχή αυτή απαρτίζεται από τις αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες και τις λιγάσες και ουσιαστικά σε αυτήν εισάγεται το επιθυμητό γονίδιο από το DNA του δότη.

224-279bp: *pelB* signal sequence → Κωδικοποιεί το πεπτίδιο-οδηγός για έκκριση της πρωτεΐνης

298-303bp: Ribosome binding site → Η αλληλουχία στην οποία προσδένεται το ριβόσωμα για την μετάφραση του mRNA που θα προκύψει.

334-358: *lac* operator → Η συγκεκριμένη αλληλουχία αποτελεί το οπερόνιο της λακτόζης, στο απουσία λακτόζης ή ισοπρόπυλο-1-β-D-θειογαλακτοπυρανόζης (Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside – IPTG) προσδένεται μια πρωτεΐνη καταστολέας και δεν είναι δυνατή ή έκφραση του γονιδίου. Παρουσία αυτών των μορίων η T7 RNA πολυμεράση εκφράζει ανεμπόδιστα την ετερόλογη πρωτεΐνη.

359-377: T7 promoter → Η T7 RNA πολυμεράση αναγνωρίζει αυτήν την αλληλουχία για την έναρξη της μεταγραφής.

686-783: *lacI* promoter → Αλληλουχία του υποκινητή για την έκφραση της πρωτεΐνης καταστολέας.

764-1846: *lacI* → Το γονίδιο έκφρασης της πρωτεΐνης καταστολέας το οποίο εκφράζεται μόνο απουσία λακτόζης ή IPTG και προσδένεται το οπερόνιο της λακτόζης.

2655-2846: Repressor of primer (Rop) → Ρυθμιστική πρωτεΐνη για την αντιγραφή του πλασμιδίου στον βακτηριακό ξενιστή.

3276-3864: Origin of replication (*ori*) → Σηματοδοτεί την αλληλουχία έναρξης αντιγραφής του πλασμιδιακού φορέα.

4035-4895: AmpR → Το γονίδιο αυτό αντιστοιχεί στην έκφραση της β-λακταμάσης, η οποία καταστέλλει την λειτουργία του αντιβιοτικού Αμπικιλίνη (Ampicillin).

4896-5000: AmpR promoter → Υποκινητής για την έκφραση της β-λακταμάσης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: Μετατροπή απορρόφησης σε ενζυμική ενεργότητα

Οι χημικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας, βασίζονται στις μεταβολές που προκαλούνται στα μόρια του υποστρώματος. Οι μεταβολές συνεπάγονται συνήθως την απορρόφηση του δείγματος, που υφίσταται την μεταβολή, σε κάποιο μήκος κύματος. Η κοινή βάση μέτρησης της δραστηριότητας ενός ενζύμου, είναι η μονάδα ενεργότητας (Units). Η μετατροπή των μονάδων που εξάγει το φωτόμετρο προς μονάδες ενεργότητας αναλύεται παρακάτω.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του φωτόμετρου εξάγονται με το μέγεθος v_{max} που ουσιαστικά αποτυπώνει την συνολική μεταβολή στην απορρόφηση της ακτινοβολίας στην μονάδα του χρόνου, δηλαδή

$$[v_{max}] = \frac{dAbs}{dt} \rightarrow \frac{mUnits_{απορρόφησης}}{min} \text{ (Εξίσωση 1),}$$

Η εξίσωση Lambert-Beer συνδέει την απορρόφηση ενός δείγματος με την συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί την απορρόφηση αυτή. Εάν λυθεί ως προς την συγκέντρωση δίνει:

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot b} \text{ (Εξίσωση 2),}$$

όπου C η συγκέντρωση του υποστρώματος σε M, A απορρόφηση σε $Units_{απορρόφησης}$, ϵ ο συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας σε $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ και b το μήκος της κυψελίδας σε cm. Συνδυάζοντας τις Εξισώσεις 1 και 2 και πολλαπλασιάζοντας και τα δύο μέλη της εξίσωσης με τον όγκο της αντίδρασης $V_{reaction}$, προκύπτει ότι:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{\left(\frac{dAbs}{dt}\right) \cdot V_{reaction}}{1000 \cdot \epsilon \cdot b} \Rightarrow Units_{ενζύμου} = \frac{v_{max} \cdot V_{reaction}}{1000 \cdot \epsilon \cdot b}$$

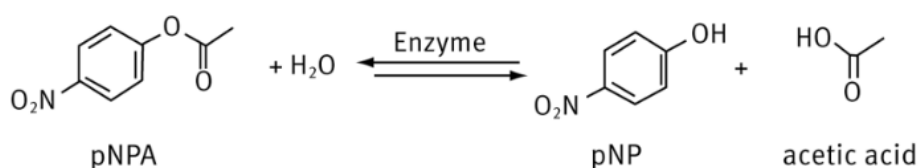
Η παραπάνω εξίσωση έχει μονάδες mol/min, που εξ' ορισμού είναι οι μονάδες ενζυμικής ενεργότητας, δηλαδή τα moles του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν στην μονάδα του χρόνου, υπό δεδομένες συνθήκες θερμοκρασίας και pH. Σημειώνεται, ότι ο συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας αφορά το υπόστρωμα και όχι το ένζυμο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ: Χημικές δοκιμές και πρωτόκολλα ενεργοποίησης αμιδάσης

Η δυσκολία εκδήλωσης ενεργότητας της αμιδάσης, οδήγησε την εφαρμογή χημικών δοκιμών με διάφορα υποστρώματα, τα οποία αναλύονται παρακάτω.

- pNPA

Η χημική δοκιμή βασίζεται στην υδρόλυση του pNPA (Εικόνα 3) και απορρόφηση του προϊόντος υδρόλυσης (παρα-νιτροφαινόλη ή pNP) στα 410nm.



Εικόνα 3. Ενζυμική υδρόλυση του pNPA [147].

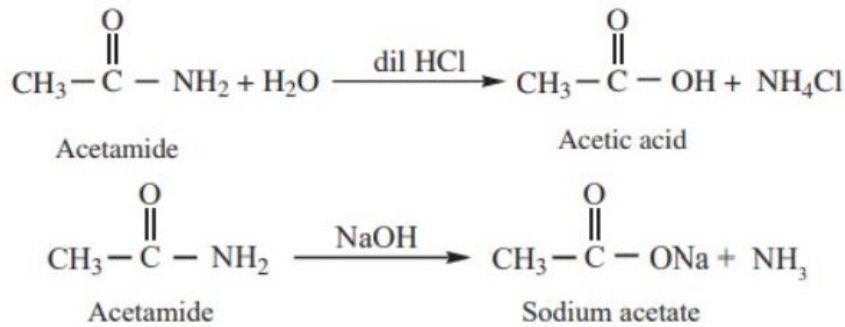
Αρχικά, προετοιμάζεται στοκ του υποστρώματος συγκέντρωσης 10mM σε DMSO. Η αντίδραση συνίσταται από ανάμειξη ρυθμιστικού διαλύματος NaPi ή CPi σε pH 6,0 συγκέντρωσης 50mM, με το διάλυμα υποστρώματος pNPA. Η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος στην αντίδραση είναι 1mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 250μL. Στην συνέχεια μεταφέρεται σε 96-well plate και προστίθεται σε αυτό το ενζυμικό δείγμα. Το δείγμα αναφοράς ακολουθεί την ίδια συνταγή με την διαφορά ότι αντί για ένζυμο, προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος. Το plate επωάζεται στους 35°C για 10 λεπτά και λαμβάνεται συνεχής απορρόφηση στα 410nm [148].

- pNAA

Η δοκιμή αυτού του υποστρώματος, βασίζεται αντίστοιχα στην υδρόλυση του pNAA σε παρά νιτροανιλίνη ή pNA, η οποία απορροφά στα 390nm. Η αντίδραση ήταν τελικού όγκου 250μL και αποτελούνται από συγκέντρωση υποστρώματος 0,1mM και προσθήκη 10% v/v DMSO ως συνδιαλύτης. Το μείγμα αντίδρασης συμπληρώνεται από ρυθμιστικό διάλυμα NaPi ή CPi σε pH 6,0 συγκέντρωσης 50mM. Έπειτα, πραγματοποιείται η μεταφορά τους σε 96-well plate για την προσθήκη του ενζύμου και την έναρξη της αντίδρασης. Για τα δείγματα αναφοράς, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα, αντί για το πρωτεϊνικό δείγμα. Η επώαση λαμβάνει χώρα στους 35°C για 10 λεπτά με συνεχής λήψη απορρόφησης στα 390nm [149].

- Αιθαναμίδιο ή ακεταμίδιο

Τα προϊόντα υδρόλυσης του ακεταμιδίου, διαφέρουν ανάλογα με το pH της αντίδρασης (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Υδρόλυση του ακεταμιδίου [150].

Σε όξινα pH όπως φαίνεται και από την Εικόνα 4, παράγεται οξικό οξύ και χλωριούχο αμμώνιο, ενώ σε αλκαλικό pH, παράγεται οξικό νάτριο και αμμωνία. Σε κάθε περίπτωση, παράγεται άμεσα ή έμμεσα (μέσω ιοντισμού του NH_4Cl στο υδατικό διάλυμα). Η χημική δοκιμή, της επίδρασης του ενζύμου στην υδρόλυση του ακεταμιδίου βασίζεται στην ανίχνευση της απελευθερωμένης αμμωνίας μέσω αντίδρασης αυτής με το αντιδραστήριο ο-φθαλδεΐδη (o-phthalaldehyde ή OPA). Η αμμωνία αντιδρά με το OPA και σχηματίζεται ένα χρωμοφόρο σύμπλοκο που απορροφά στα 675nm.

Αρχικά, προσδιορίζεται η απορρόφηση δειγμάτων αναφοράς με γνωστή συγκέντρωση NH_4Cl , στο εύρος 1-12mM, προκειμένου να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί το αποτέλεσμα της ενζυμικής αντίδρασης. Έπειτα, σε Eppendorf των 1,5mL προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης. Ελέγχθηκαν τέσσερις τιμές pH προκειμένου να καλυφθεί όλο το εύρος από τις όξινες μέχρι τις αλκαλικές τιμές. Τα ρυθμιστικά διαλύματα ήταν CPi 50mM σε pH 3,0 και 5,0, KPi 50mM σε pH 7,0 και Tris-HCl 50mM σε pH 9,0. Η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος στην αντίδραση είναι 2mM. Επιπλέον στο Eppendorf προστίθεται και το ένζυμο σε τελικό όγκο αντίδρασης τα 500μL και η αντίδραση ξεκινά με επώαση στους 35°C για 24 ώρες. Το αντιδραστήριο OPA, παρασκευάζεται με την διάλυση του OPA σε μεθανόλη και την επακόλουθη αραιώση 1:100 σε ρυθμιστικό διάλυμα τετραβορικού νατρίου 15 mM, pH 9.5. Στην συνέχεια τα διαλύματα που περιλαμβάνουν τις ενζυμικές αντιδράσεις, αναμειγνύονται με το αντιδραστήριο OPA και αραιώνονται περαιτέρω με DMSO. Στο τελικό μείγμα προστίθεται διάλυμα TCA 10% v/v και φωτομετρείται στα 675nm. Η απορρόφηση συγκρίνεται με τα δείγματα αναφοράς και λαμβάνεται το αντίστοιχο συμπέρασμα [151].

- L-BAPNA (N_α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride)

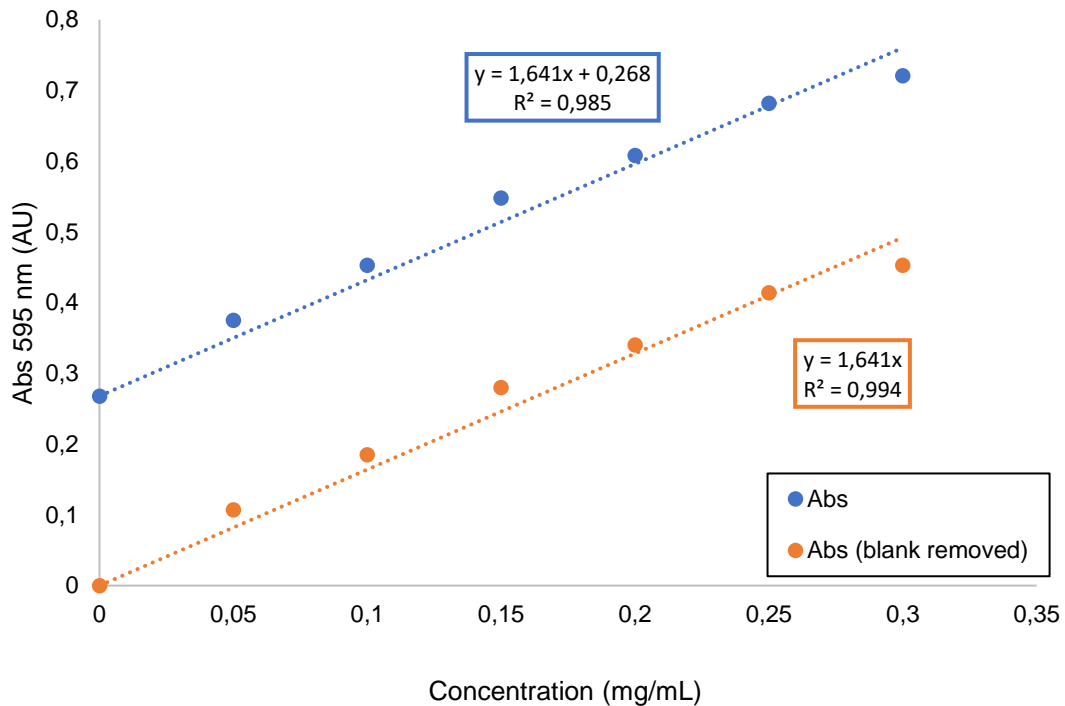
Το σύστημα αντίδραση πάνω στο οποίο βασίστηκε η συγκεκριμένη χημική δοκιμή συνίσταται από ρυθμιστικό διάλυμα KPi 50mM σε pH 6,0 ή 7,0 και από το υπόστρωμα το οποίο βρίσκεται σε τελική συγκέντρωση στην αντίδραση 10mM. Σε αυτό προστίθεται και το ενζυμικό δείγμα ώστε ο τελικός όγκος αντίδρασης να είναι 250μL. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 96-well microplate με επώαση τους 30°C για 10 λεπτά και συνεχής λήψη απορρόφησης του δείγματος στα 390nm για την ανίχνευση του απελευθερωμένου pNA [152].

Τέλος δοκιμάστηκαν και πρωτόκολλα ενεργοποίησης του ενζύμου προτού εφαρμοστούν στα προαναφερθέντα υποστρώματα. Τα πρωτόκολλα ενεργοποίησης που ελέγχθηκαν ήταν δύο:

- Επώαση του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 50 mM pH 4,5 και 100 mM NaCl με 5 mM DTT για 1 ώρα στους 37 °C. Στην συνέχεια ακολούθησε χημική δοκιμή σε 2mM pNPA όπως αναφέρεται και παραπάνω, με την διαφορά ότι στην ενζυμική αντίδραση υπήρχε και 1mM DTT και ότι το μείγμα επώαστηκε για μισή ώρα στους 37°C. Το προϊόν προσδιορίστηκε με απορρόφηση του pNP στα 347nm [153].
- Επώαση του ενζύμου σε pH 3,0 για ένα λεπτό στους 0°C [154] και εφαρμογή του σε κάποιο από το προαναφερθέντα υποστρώματα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ: Καμπύλη αναφοράς Bradford

Η καμπύλη αναφοράς Bradford (Διάγραμμα 1) συνδέει την απορρόφηση του συμπλόκου Bradford με την πρωτεΐνη στα 595nm με την συγκέντρωση της εν λόγω πρωτεΐνης. Με βάση αυτή πραγματοποιήθηκαν οι υπολογισμοί προσδιορισμού πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.



Διάγραμμα 1. Καμπύλη αναφοράς του διαλύματος Bradford.

Η καμπύλη βαθμονόμησης που προσδιορίζεται από τον παρασκευαστή του διαλύματος με δοκιμές σε μια πρωτεΐνη αναφοράς, συνήθως χρησιμοποιείται η Bovine Serum Albumin ή αλλιώς BSA.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ε: Χρώση αργύρου

Η χρώση αργύρου, πραγματοποιείται συχνά στα μεταλλοένζυμα και γενικότερα σε ηλεκτροφορήσεις όπου απαιτείται μεγάλη ευαισθησία. Τα ένζυμα UPOs είχαν μοριακά βάρη στο εύρος 25-30kDa, επομένως είναι σχετικά μικρές σε μέγεθος πρωτεΐνες. Η εκτέλεση της χρώσης προϋποθέτει την παρασκευή έξι υδατικών διαλυμάτων (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Σύσταση των διαλυμάτων που απαιτούνται για την χρώση αργύρου

Κωδική ονομασία	Συστατικό	Συγκέντρωση (v/v)
S1	Αιθανόλη (C ₂ H ₆ O)	50%
	Οξικό οξύ (C ₂ H ₄ O ₂)	12%
S2	Αιθανόλη (C ₂ H ₆ O)	50%
S3	Αιθανόλη (C ₂ H ₆ O)	30%
S4	Υδροθειώδες νάτριο (Na ₂ S ₂ O ₄)	0,02%
S5	Νιτρικός άργυρος (AgNO ₃)	0,2%
	Φορμαλδεΐδη (CH ₂ O)	0,075%
S6	Ανθρακικό νάτριο (Na ₂ CO ₃)	6%
	Φορμαλδεΐδη (CH ₂ O)	0,05%
	Υδροθειώδες νάτριο (Na ₂ S ₂ O ₄)	0,02%

Τα στάδια που ακολουθούνται για την ανάπτυξη της χρώσης αργύρου είναι τα εξής:

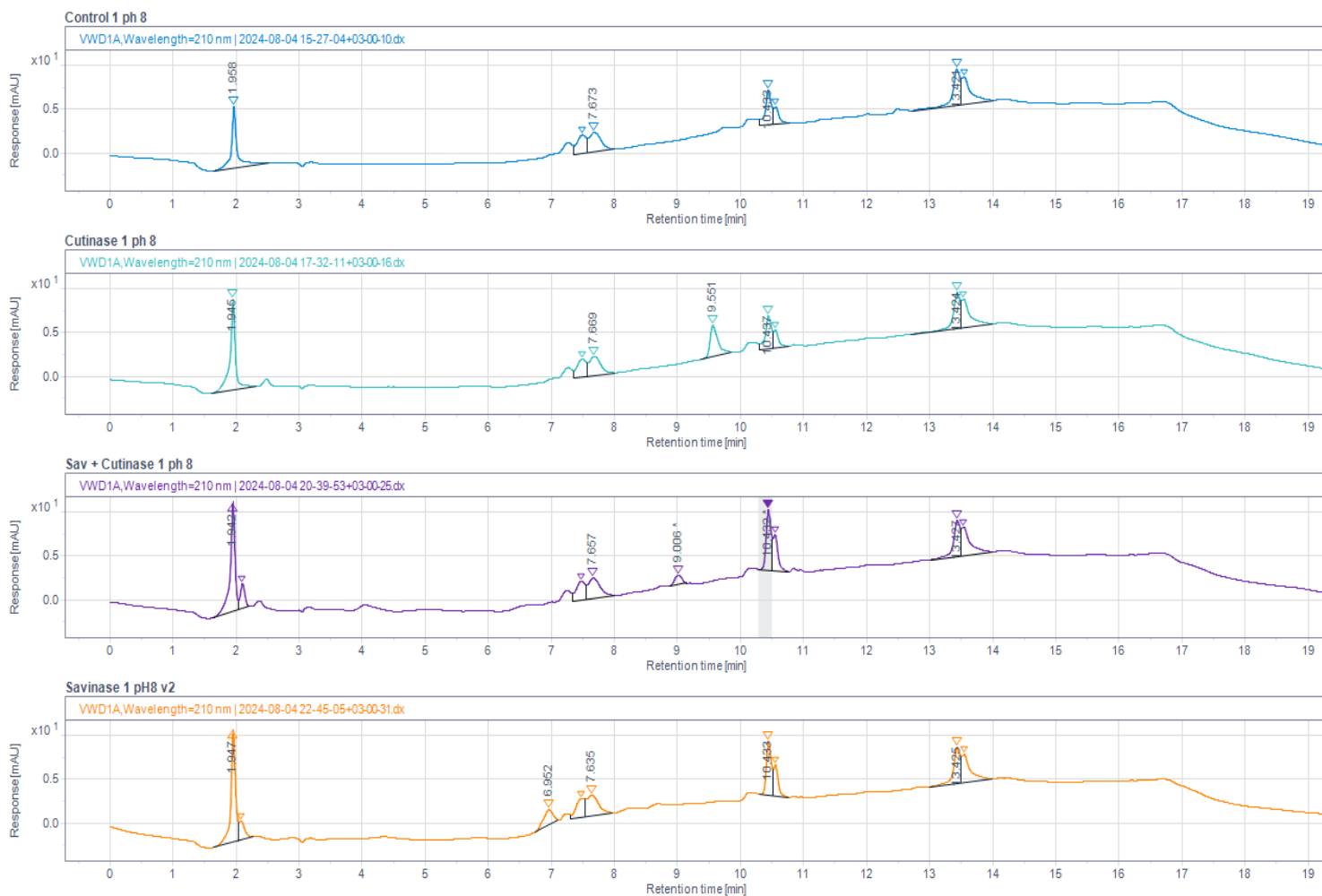
- 1) Στο δοχείο που εμπεριέχεται η γέλη που έχει ήδη ηλεκτροφορηθεί, αποχύνεται το διάλυμα S1 και αφήνεται υπό ήπια ανάδευση (περίπου 60rpm) για 90 λεπτά.
- 2) Έπειτα, ακολουθεί η απόρριψη του προηγούμενου διαλύματος και η απομάκρυνση του οξικού οξέος από την γέλη με δύο πλύσεις με το διάλυμα S2 επί 20 λεπτά η καθεμία σε ήπια ανάδευση. Ακολουθεί, η προσθήκη του διαλύματος S3 που ουσιαστικά είναι μια πιο αραιή μορφή του S2, και η παραμονή της γέλης σε αυτό για μισή ώρα με ήπια ανάδευση. Τέλος, όλα τα διαλύματα που βρίσκονται στο δοχείο απορρίπτονται, η γέλη ξεπλένεται με απιονισμένο νερό.
- 3) Στην συνέχεια, γίνεται η προσθήκη του διαλύματος S4 και αναδεύεται ήπια. Με το πέρασμα μερικών λεπτών, το διάλυμα απορρίπτεται και η γέλη ξεπλένεται με dH₂O τρεις φορές.

- 4) Ύστερα, προστίθενται 25mL από το διάλυμα S5 και αφήνεται σε ήπια ανάδευση για 20 λεπτά. Στο στάδιο αυτό γίνεται η εισαγωγή του αργύρου στην γέλη. Ακολουθούν δύο πλύσεις με dH₂O και παραμονή της γέλης στο νερό για 20 λεπτά στην κάθε μία πλύση.

- 5) Στο βήμα αυτό, αναπτύσσεται η χρώση, με την προσθήκη 50mL από το διάλυμα S6. Σημειώνεται, ότι η κατά την διαδικασία αυτή η γέλη αρχίζει σταδιακά να χρωματίζεται και να εμφανίζονται οι συμπλοκοποιημένες πρωτεΐνες. Τονίζεται, ότι η χρώση είναι μια διαδικασία συνεχώς μεταβαλλόμενη σε μικρό χρονικό διάστημα. Ειδικότερα, στην περίπτωση που δεν τερματιστεί, η γέλη αποκτά ολοένα και πιο έντονο χρώμα με αποτέλεσμα οι μπάντες να μην είναι πλέον διακριτές. Προκειμένου να ληφθούν τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, προστίθεται απιονισμένο νερό, το οποίο καθυστερεί την διαδικασία της χρώσης. Στο σημείο όπου οι μπάντες έχουν αποκτήσει την καλύτερη δυνατή αποτύπωσή τους στην γέλη, η χρώση μπορεί να τερματιστεί με προσθήκη διαλύματος S1 και παραμονή σε αυτό για 10 λεπτά.

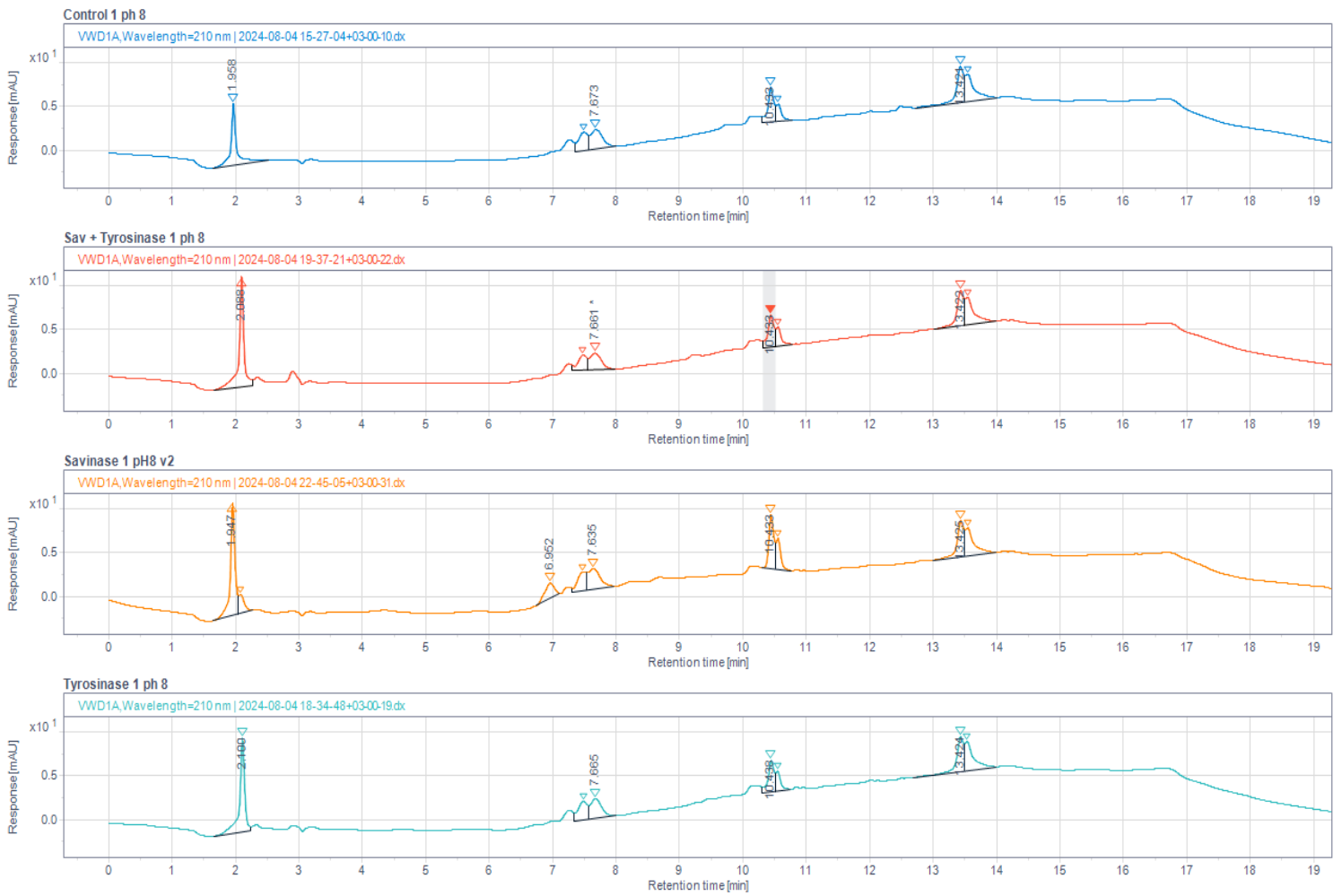
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΤ: Χρωματογραφήματα HPLC των δειγμάτων συνεργιτισμού

- Συνεργιτισμός Σαβινάσης - Κουτινάσης



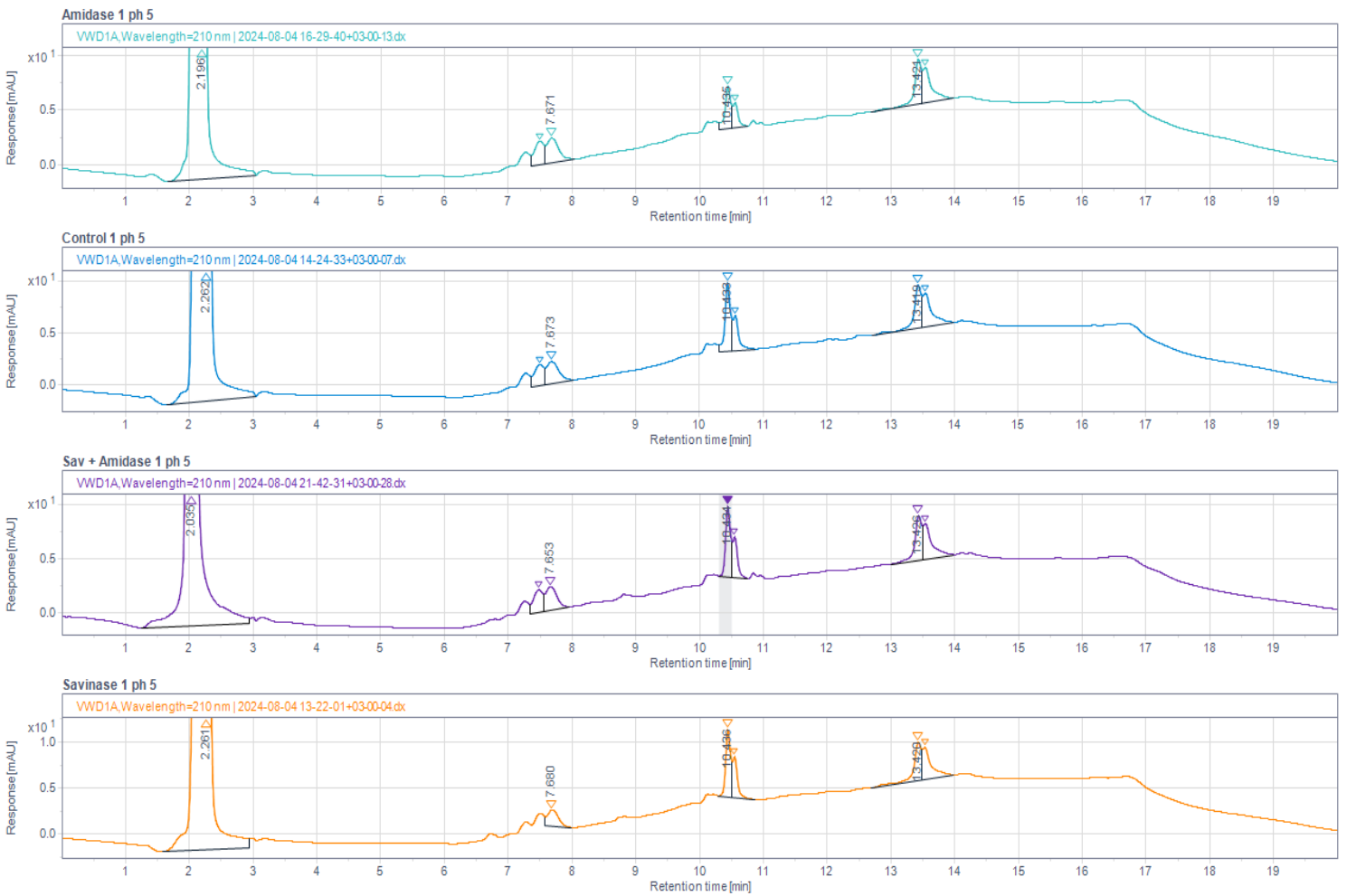
Εικόνα 5. Χρωματογράφημα HPLC του συνεργιτισμού σαβινάσης – κουτινάσης. Απεικονίζονται από πάνω προς τα κάτω τα δείγματα Control (pH 8), Cutinase, Savinase - Cutinase και Savinase (pH 8)

- Συνεργατισμός Σαβινάσης - Τυροσινάσης



Εικόνα 6. Χρωματογράφημα HPLC του συνεργατισμού σαβινάσης – τυροσινάσης. Απεικονίζονται από πάνω προς τα κάτω τα δείγματα Control (pH 8), Savinase - Tyrosinase, Savinase (pH 8) και Tyrosinase

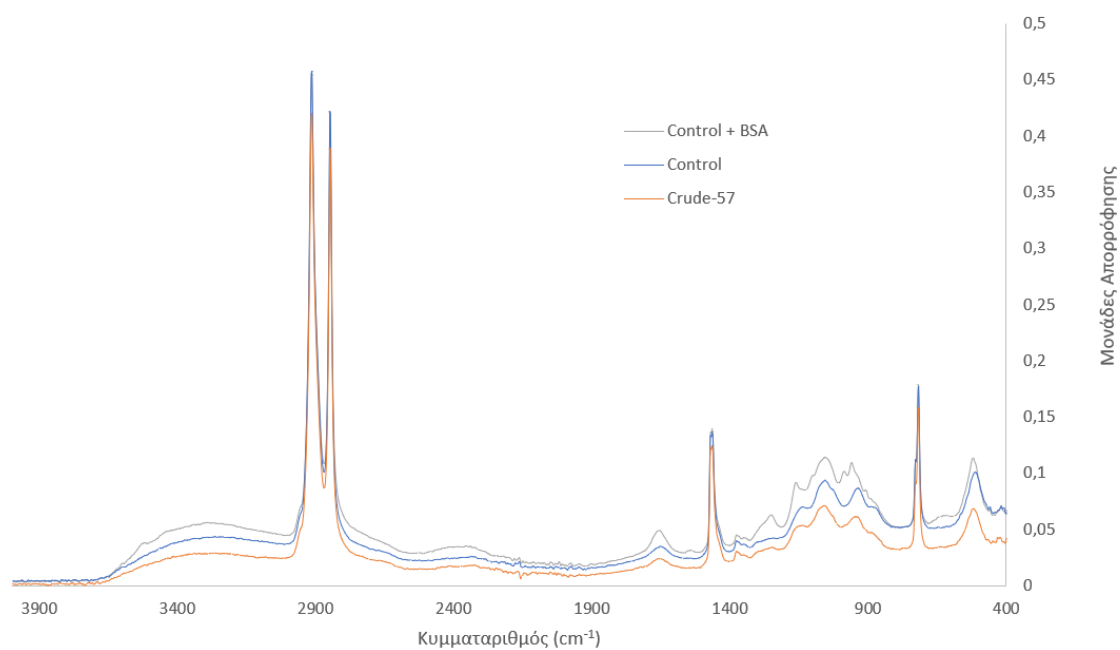
- Συνεργητισμός Σαβινάσης - Αμιδάσης



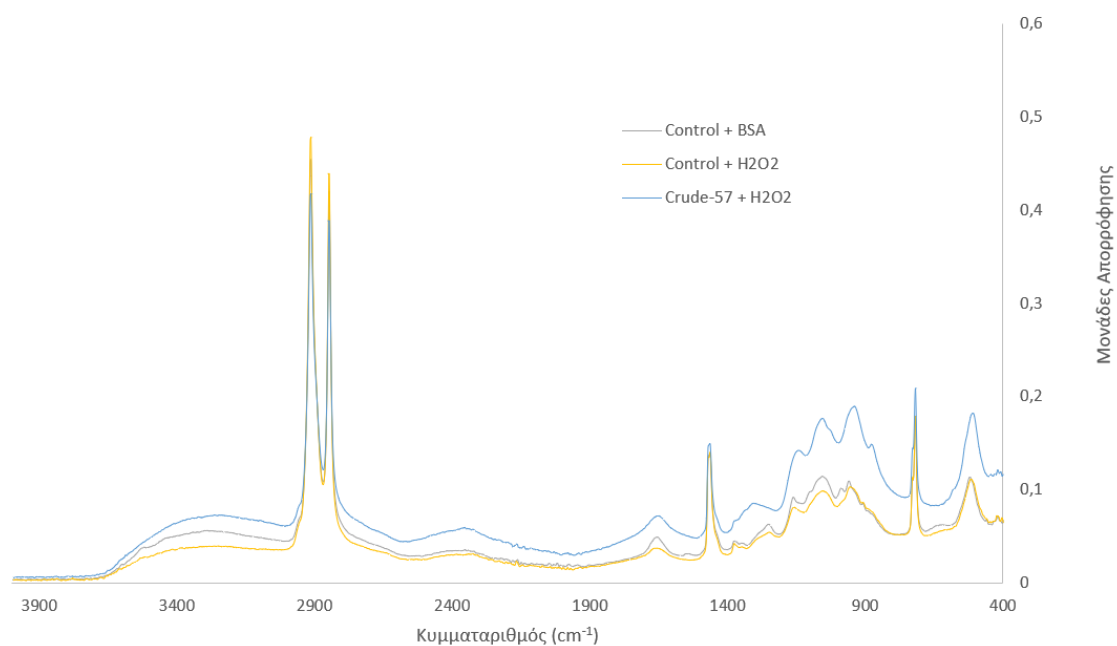
Εικόνα 7. Χρωματογράφημα HPLC του συνεργητισμού σαβινάσης – αμιδάση. Απεικονίζονται από πάνω προς τα κάτω τα δείγματα Amidase, Control (pH 5), Savinase – Amidase και Savinase (pH 5)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ: Φάσματα οξείδωσης ΡΕ των δειγμάτων Crude-57 και Crude-58

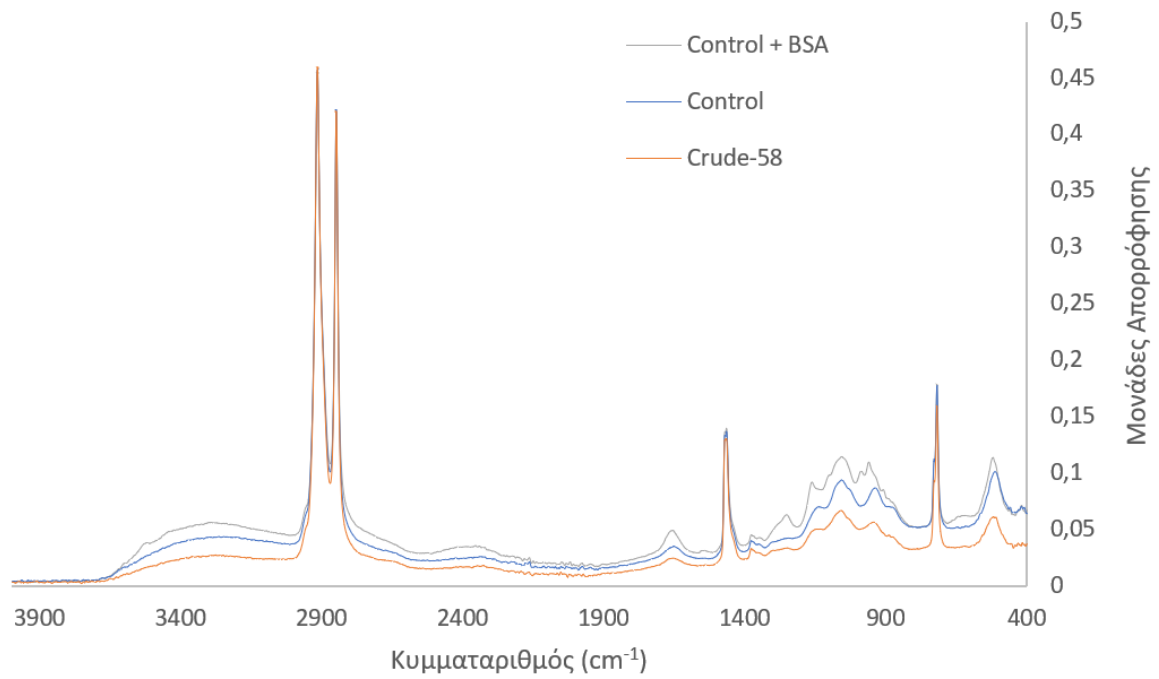
Τα φάσματα ανάλυσης των δειγμάτων Crude-57 με και χωρίς υπεροξείδιο παρουσιάζονται παρακάτω.



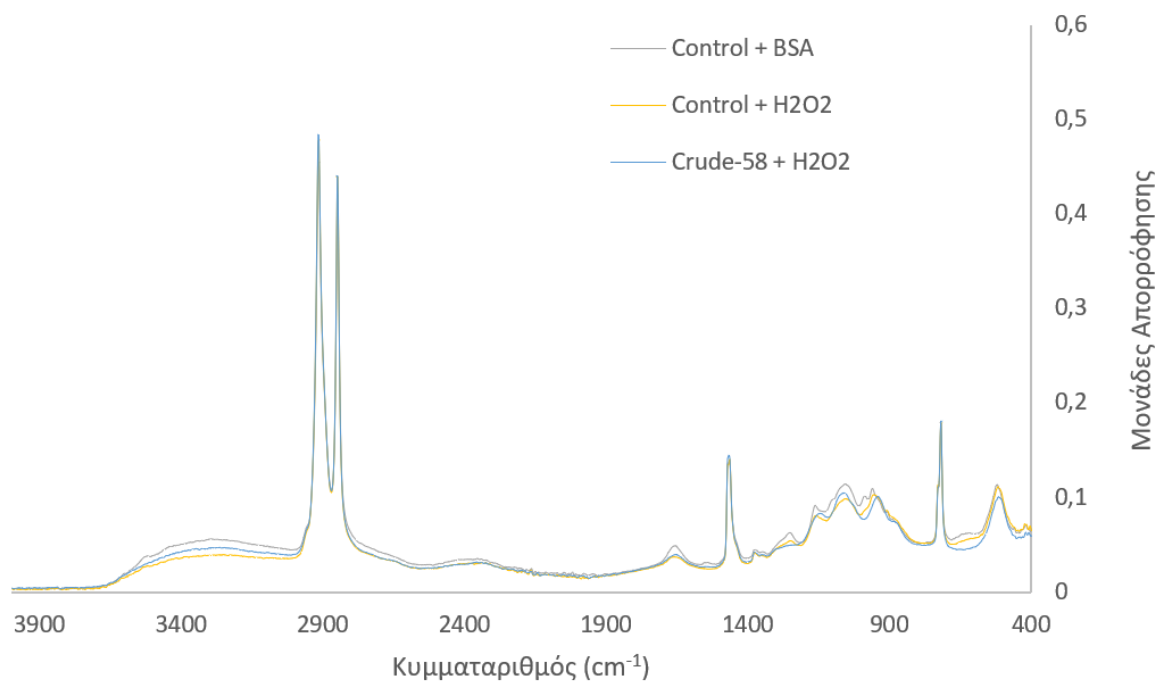
Διάγραμμα 2. Φάσμα ATR του δείγματος Crude-5 απουσία H₂O₂.



Διάγραμμα 3. Φάσμα ATR του δείγματος Crude-57 παρουσία H₂O₂.



Διάγραμμα 4. Φάσμα ATR του δείγματος Crude-58 απουσία H₂O₂.



Διάγραμμα 5. Φάσμα ATR του δείγματος Crude-58 παρουσία H₂O₂.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Η: Πρωτεολυτική δράση της σαβινάσης στην τυροσινάση και την κουτινάση

Η σαβινάση ως πρωτεολυτικό ένζυμο, υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς. Προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο πρωτεόλυσης των ενζύμων του συνεργιτισμού από την σαβινάση, σε Eppendorf των 1,5mL προστέθηκε ενζυμικό διάλυμα σαβινάσης συγκέντρωσης 1mg/mL. Έπειτα, έγινε η προσθήκη ξεχωριστά κουτινάσης και τυροσινάσης συγκέντρωσης 1mg/mL και 0,01mg/mL. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 35°C για 24 ώρες υπό ήπια ανάδευση στα 400rpm. Στην συνέχεια, η επώαση τερματίζεται και εξετάζεται η μείωση στην ενεργότητα των ενζύμων με βάση την τιμή που είχαν πριν επωαστούν με την σαβινάση (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Μείωση της απορρόφησης στις χημικές δοκιμές με τα κατάλληλα υποστρώματα της κουτινάσης και της τυροσινάσης, ύστερα από την δράση της σαβινάσης

	Κουτινάση	Τυροσινάση
Απορρόφηση (V_{max}) Πριν την επώαση	113,87 mUnits _{abs}	0,97 mUnits _{abs}
Απορρόφηση (V_{max}) Μετά την επώαση	17,42 mUnits _{abs}	0,00 mUnits _{abs}
Ποσοστιαία διαφορά	85%	100%