



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Ετερόλογη υπερέκφραση και ακινητοποίηση ενζύμων
διάσπασης αρωματικών ενώσεων σε νανοϋλικά:
Νανοβιοτεχνολογικές εφαρμογές**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σταματία Ασημακούλα
Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος, MSc

Ιωάννινα, 2024

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών,
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.
5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Θέματος Διδακτορικής Διατριβής: 6-7-2018

Τίτλος Θέματος: «Ετερόλογη υπερέκφραση και ακινητοποίηση ενζύμων διάσπασης αρωματικών ενώσεων σε νανοϋλικά: Νανοβιοτεχνολογικές εφαρμογές»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 979/6-7-2018

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κούκκου Άννα Ειρήνη	Επιβλέπουσα
Σταμάτης Χαράλαμπος	Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Αφένδρα Αμαλία	Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής

Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1121/14-06-2024

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κούκκου Άννα Ειρήνη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια	Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σταμάτης Χαράλαμπος	Καθηγητής	Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Αφένδρα Αμαλία-Σοφία	Επίκουρη Καθηγήτρια	Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Δούλιας Πασχάλης-Θωμάς	Επίκουρος Καθηγητής	Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Καταπόδης Πέτρος	Αναπληρωτής Καθηγητής	Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Καρπούζας Δημήτριος	Καθηγητής	Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Παυλίδης Ιωάννης	Αναπληρωτής Καθηγητής	Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ημερομηνία παρουσίασης της Διδακτορικής Διατριβής από την κα. Σταματία Ασημακούλα: 02-07-2024.

Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή, η οποία ορίστηκε στη Συνελ. αριθμ. 1121/14-06-2024 σύμφωνα με τις κείμενες διατάξεις, ενέκρινε την εκπονηθείσα διδακτορική διατριβή και πρότεινε την απονομή του τίτλου της Διδάκτορος με βαθμό «**ΑΡΙΣΤΑ**».



ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΤΗΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΤΗΣ
ΣΤΑΜΑΤΙΑΣ ΑΣΗΜΑΚΟΥΛΑ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΥ, MSc

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή, που διορίστηκε με την υπ' αριθμ. αριθμ. 1121/14.06.2024 απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της κας Σταματίας Ασημακούλα, συνήλθε σήμερα στις 02 Ιουλίου 2024 και ώρα 12:00 στην αίθουσα τηλεδιάσκεψης του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής του υποψηφίου με τίτλο: **«Ετερόλογη υπερέκφραση και ακινητοποίηση ενζύμων διάσπασης αρωματικών ενώσεων σε νανοϋλικά: Νανοβιοτεχνολογικές εφαρμογές»**

Μετά την προφορική παρουσίαση της διατριβής, τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής υπέβαλλαν ερωτήσεις προς την υποψήφια. Στη συνέχεια και μετά την αποχώρηση του ακροατηρίου και της υποψήφιας ακολούθησε διεξοδική συζήτηση μεταξύ των μελών της επιτροπής.

Τα μέλη της επιτροπής δήλωσαν ότι **έμειναν απόλυτα ικανοποιημένοι από την προφορική παρουσίαση καθώς και τον όγκο και ποιότητα της ερευνητικής εργασίας.**

Η επιτροπή μετά από ψηφοφορία έκρινε **ομόφωνα** ότι η διατριβή της κας Σ. Ασημακούλα παρουσιάζει εξαιρετική πρωτοτυπία και ότι αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, η δε υποψήφια απέκτησε τόσο τις γνώσεις όσο και την τεχνική κατάρτιση, ώστε να προσεγγίζει με ωριμότητα σύγχρονα ερευνητικά προβλήματα του επιστημονικού της πεδίου.

Μετά από αυτά απεφάσισε **ομόφωνα** να εγκρίνει τη διατριβή με τον βαθμό **ΑΡΙΣΤΑ (10)**



1. Άννα Ειρήνη Κούκκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, ΠΙ, επιβλέπουσα

CHARALAMPOS STAMATIS CHARALAMPOS STAMATIS
02.07.2024 21:06

3. Χαράλαμπος Σταμάτης, Καθηγητής Τμήματος ΒΕΤ, ΠΙ, μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

Paschalis Thomas Doulias Paschalis Thomas Doulias
02.07.2024 19:53

4. Θωμάς-Πασχάλης Δούλιας, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΠΙ

DIMITRIOS Digitally signed
by DIMITRIOS
KARPOUZAS
Date: 2024.07.02
19:21:49 +03'00'
AS

5. Δημήτριος Καρπούζας, Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, ΠΘ

PETROS KATAPODIS PETROS KATAPODIS
02.07.2024 21:54

6. Πέτρος Καταπόδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος ΒΕΤ, ΠΙ

7. Ιωάννης Παυλίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΠΚ



Ioannis Pavlidis
2024.07.02 17:36:05 +03'00'

2

Ψηφιακή Βεβαίωση Εγγράφου

Μπορείτε να ελέγξετε την ιαχύ του εγγράφου
σκανάροντας το QR code ή εισάγοντας τον κωδικό
στο docs.gov.gr/validate



Επιβεβαιώνεται το γνήσιο Υπουργείο
Ψηφιακής Διακυβέρνησης / Verified by the Ministry
of Digital Governance, Hellenic Republic
20240703071623+03'00'

Υπογραφή:
ΑΜΑΛΙΑ ΣΟΦΙΑ ΑΦΕΝΔΡΑ
Πατρώνυμο: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ
ΑΦΜ: 030480801
Ημ. Υπογραφής: 03/07/2024 07:15:59

Κωδικός εγγράφου: wJwA#dpoJ6aCIfj5F1VnQ

Σελίδα: 2/2

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

Tsagogiannis E., **Asimakoula S.**, Drainas A. P., Marinakos O., Boti I. V., Kosma S. I., Koukkou A-I. Elucidation of 4-hydroxybenzoic acid catabolic pathways in *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3. *International journal of Molecular Sciences* **2024**; 25(2), 843. <https://doi.org/10.3390/ijms25020843>.

Asimakoula S., Marinakos O, Tsagogiannis E, Koukkou A-I. Phenol Degradation by *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3. *Microorganisms* **2023**; 11, 524. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020524>

Asimakoula S., Giannakopoulou A, Lappa E, Tsagogiannis E, Primikyri A, Stamatis H, Koukkou A-I. Characterization of Gentisate 1,2-Dioxygenase from *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 and Its Stabilization by Immobilization on Nickel-Functionalized Magnetic Nanoparticles. *Applied Microbiology*. **2022**; 2(1):113-132. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010007>.

Συμμετοχές σε Συνέδρια

10th Conference of Mikrobiokosmos, 30 November-02 December 2023, Larissa, Greece
“Catabolic Sphe3 genes: gears in an *E.coli* *cis*, *cis* muconic acid producing apparatus”.

Stamatia Asimakoula, Styliani Timotheatou, Ioanna Kosma, Anastasia Badeka, Anna Irini Koukkou

13th Conference of Panhellenic Union of Bioscientists, 9-11 December 2022, Aristotle University of Thessaloniki, Greece
“Phenol degradation by free and immobilized *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* cells: a biochemical and transcriptional approach of the metabolic pathway”.

Stamatia Asimakoula, Orfeas Marinakos, Anna Irini Koukkou



Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. Υποψηφίων Διδακτόρων» (Αριθμός Υποτροφίας:1535).

Ευχαριστίες

Ο γραπτός λόγος για την έκφραση συναισθημάτων δεν είναι το δυνατό μου σημείο, προτιμώ την αμεσότητα της χειραψίας, ενός βλέμματος, μιας αγκαλιάς. Ωστόσο, εδώ, θα κάνω μια προσπάθεια να αποδώσω τις θερμές ευχαριστίες μου στους ανθρώπους που -με τον έναν ή τον άλλο τρόπο- συνέβαλαν στην παρούσα εργασία.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διατριβής Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Άννα Ειρήνη Κούκκου, η οποία με εμπιστεύτηκε από τα χρόνια της μεταπτυχιακής μου διατριβής και μέχρι σήμερα έχουμε μια υπέροχη συνεργασία. Με την ήρεμη δύναμη που τη διακρίνει, την αγάπη της για το αντικείμενο της Βιοχημείας και τις καίριες συμβουλές της με ενέπνεε και με βοηθούσε κάθε φορά που η περιέργειά μου για κάποιο νέο ερευνητικό ερώτημα με αποπροσανατόλιζε από το στόχο μου. Για αυτό της οφείλω πολλά ως προς τον τρόπο σκέψης μου σαν ερευνήτρια. Θα ήθελα όμως να τονίσω και πόσο την εκτιμώ σαν άνθρωπο, που δεν το βάζει ποτέ κάτω και αντιμετωπίζει τα πάντα με αποφασιστικότητα και αισιοδοξία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Χαράλαμπο Σταμάτη που δέχτηκε να συν-επιβλέψει τη διατριβή μου. Με είχε συναρπάσει με την αγάπη του για τη Βιοτεχνολογία ως καθηγητής μου στο μεταπτυχιακό και ήθελα η διδακτορική μου διατριβή να εντάσσεται και σε αυτόν τον τομέα. Εκτιμώ το ότι ήταν συνεχώς πρόθυμος να μοιραστεί τις πολύτιμες γνώσεις του και πάντα σε χαλαρό και ευδιάθετο κλίμα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και το τρίτο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής την Επίκουρη Καθηγήτρια Αμαλία Σοφία Αφένδρα, την οποία επίσης γνωρίζω από το μεταπτυχιακό μου και όλα αυτά τα χρόνια δεν υπήρχε φορά που να μην ήταν ανοιχτό το γραφείο και το εργαστήριό της, όποτε χρειάστηκα βοήθεια.

Ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή Πασχάλη Θωμά Δούλια, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Πέτρο Καταπόδη, τον Καθηγητή Δημήτρη Καρπούζα και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Παυλίδη για το χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη του κειμένου, για τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις. Είναι όλοι τους ερευνητές που εκτιμώ και θαυμάζω τη δουλειά τους.

Η εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής είναι μια πορεία δύσκολη, απαιτητική και αρκετά μοναχική, πόσο μάλλον όταν εξελίσσεται στις ιδιαίτερες συνθήκες της πανδημίας. Γίνεται όμως πιο βατή όταν τη μοιράζεσαι με ανθρώπους που εκτιμάς και περνάς όμορφα και εγώ είχα την τύχη να μοιραστώ αυτή την πορεία με τα άτομα που στελέχωσαν παράλληλα με εμένα το εργαστήριο Βιοχημείας στο τμήμα Χημείας, τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ελπινίκη Βανδέρα, τον μεταδιδακτορικό, πλέον, ερευνητή Νώντα Τσαγκογιάννη και τους μεταπτυχιακούς συνεργάτες Σταυρούλα Λέτσιου και Ορφέα Μαρινάκο. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Νώντα, με τον οποίο πορευτήκαμε παράλληλα για τη διεξαγωγή των διατριβών μας, για όλες τις συζητήσεις, τις δημιουργικές διαφωνίες, τα απίθανα γέλια, τα λυτρωτικά κλάματα, για την εμφύχωση στα τελευταία μέτρα και κυρίως για αυτή τη φιλία που αποκόμισα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Σταυρούλα και τον Ορφέα, οι οποίοι έδωσαν μια άλλη νότα στο κλίμα του εργαστηρίου, για την καλή παρέα που είχαμε αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Αλεξάνδρα Πριμηκώρη για την υπέροχη συνεργασία μας στα πειράματα με το NMR, που οδήγησε σε μια πολύ ενδιαφέρουσα πτυχή

αυτής της διατριβής και με έμαθε να ψάχνω τρόπους να πηγαίνω την έρευνά μου ένα βήμα πιο πέρα.

Ευχαριστώ, επίσης, τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, στο Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών για τη θερμή φιλοξενία, την Αρχοντούλα και τον Άγγελο για τη βοήθεια στα πειράματα των ακινητοποιήσεων, και κυρίως τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μιχαέλα Πατήλα για την αγαστή συνεργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ιωάννα Κοσμά για τη βοήθειά της με τις αναλύσεις HPLC, αλλά και για την παρέα της και την υπομονή της στις αγωνιώδεις αναζητήσεις μου για το μέλλον.

Θερμά ευχαριστώ τους φίλους μου Αλεξάνδρα, Κέλυ, Φιλιώ, Μαρία, Άννα, Μαρία, Βαγγέλη, και Νίκο που είναι τόσα χρόνια δίπλα μου και με στηρίζουν, και το Γιώργο και τη Βάσω για την παρέα που είχαμε κατά την παραμονή μου στα Γιάννενα, μου παρείχαν ζεστασιά σε αρκετά μοναχικές περιόδους.

Στο Γιώργο θα πω μέσα από την καρδιά μου το πιο ζεστό ευχαριστώ για όλη του την υπομονή και την κατανόηση, αλλά κυρίως για την ανεξάντλητη υποστήριξη παρά τα αμέτρητα χιλιόμετρα και την κούραση.

Και τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, τη μητέρα μου Γιώτα και τον αδερφό μου Λεωνίδα, που είναι πάντα δίπλα μου, βράχοι όλα αυτά τα χρόνια, τον παππού μου Θανάση, για την αισιοδοξία και τη δίψα για καθετί νέο που μου έχει εμφυσήσει, τους θείους μου, Δώρα και Θοδωρή και το ξαδερφάκι μου Ηλία, που με στηρίζουν πάντα.

Ματίνα, 13-06-2024

Πίνακας Περιεχομένων

Λίστα Εικόνων.....	xx
Λίστα Πινάκων.....	xxvii
Λίστα Συντομογραφιών.....	xxix
Περίληψη	xxxix
Abstract	33
Θεωρητικό Μέρος	35
1 Εισαγωγή στη θεωρία	36
1.1 Περιβαλλοντική ρύπανση	36
1.2 Φαινολικές ενώσεις	37
1.3 Βιοαποδόμηση.....	38
1.3.1 Αερόβια μικροβιακή αποδόμηση και καταβολικά ένζυμα	39
1.3.1.1 Μονοξυγονάσες.....	42
1.3.1.1.1 Φλαβινοπρωτεϊνικές μονοξυγονάσες (FPMOs, Flavoprotein monooxygenases).....	42
1.3.1.2 Διοξυγονάσες.....	44
1.3.2 Πορεία καταβολισμού φαινόλης	47
1.3.3 Πορεία καταβολισμού υδροξυβενζοϊκών οξέων	48
1.3.3.1 2-υδροξυβενζοϊκό οξύ	48
1.3.3.2 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ	48
1.3.3.3 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	50
1.4 Βιοκατάλυση	50
1.4.1 Ακίνητοποίηση βιοκαταλυτών	51
1.4.1.1 Νανοβιοκαταλύτες	54
1.4.1.1.1 Μελέτη νανοβιοκαταλυτών	54
1.4.2 Εφαρμογές βιοκαταλυτών	55
1.5 Το βακτήριο <i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3.....	57
1.5.1 Ένζυμα του Sphe3 που συμμετέχουν στον καταβολισμό αρωματικών ενώσεων	58
Σκοπός.....	60
Πειραματικό Μέρος.....	61
2 Υλικά και Μέθοδοι.....	62
2.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια	62
2.1.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων	63
2.1.1.1 Πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Lysogeny Broth (LB) (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989)	63
2.1.1.2 Θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης για την καλλιέργεια βακτηρίων M9 (Minimal Medium M9, MM M9)	63
2.1.2 Μικροβιακές καλλιέργειες	65
2.1.3 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i>	65

2.2	Αντιβιοτικά	65
2.3	Πριμοδοτικά μόρια (εκκινητές, primers)	65
2.4	Φορείς ακινητοποίησης	67
2.4.1	Συμβατικά υλικά ακινητοποίησης	67
2.4.2	Νανούλικά.....	67
2.5	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA με τη μέθοδο CTAB (mini preparation)	68
2.5.1	Πειραματική πορεία (William et al. 2012)	68
2.5.2	Διαλύματα.....	69
2.6	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	69
2.6.1	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με μεθόδους αλκαλικής λύσης των κυττάρων	69
2.6.1.1	Αρχή της μεθόδου	69
2.6.1.2	Πειραματική πορεία	69
2.6.1.3	Διαλύματα	70
2.6.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) Nucleospin® Plasmid της Macherey-Nagel	70
2.6.2.1	Πειραματική πορεία	70
2.7	Απομόνωση ολικού RNA	71
2.7.1	Πειραματική πορεία.....	71
2.7.2	Κατεργασία απομονωμένου RNA με δεοξυριβονουκλεάση DNase I	72
2.8	Καθαρότητα και ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων.....	73
2.9	Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων	73
2.9.1	Αρχή της μεθόδου (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989).....	73
2.9.2	Πειραματική πορεία.....	74
2.9.3	Διαλύματα.....	75
2.10	Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	76
2.11	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	76
2.11.1	Αρχή της μεθόδου (Mullis et al. 1986)	76
2.11.2	Πειραματική πορεία.....	77
2.12	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).....	78
2.12.1	Αρχή της μεθόδου	78
2.12.2	Πειραματική πορεία.....	79
2.13	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR)...	80
2.13.1	Αρχή της μεθόδου (Bustin et al. 2009).....	80
2.13.2	Τρόποι ανίχνευσης προϊόντων της Real-Time qPCR	82
2.13.3	Ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real-Time qPCR.....	83
2.13.4	Πειραματική πορεία.....	84
2.14	Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	85
2.14.1	Αρχή της μεθόδου (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989)	85
2.14.2	Πειραματική πορεία.....	85
2.15	Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδια.....	86
2.15.1	Αρχή της μεθόδου (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989)	86
2.15.2	Πειραματική πορεία.....	87
2.15.2.1	Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	87

2.15.2.2	Αντίδραση λιγάσης	88
2.16	Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>E.coli</i> με πλασμιδιακό DNA και επιλογή επιθυμητών μετασχηματισμένων κλώνων	89
2.16.1	Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E.coli</i> με εφαρμογή θερμικού σοκ	89
2.16.1.1	Αρχή της μεθόδου (Mandel and Higa 1970).....	89
2.16.1.2	Πειραματική πορεία	89
2.16.1.3	Διαλύματα	89
2.16.2	Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E.coli</i> με επίδραση ιόντων ασβεστίου	90
2.16.2.1	Αρχή της μεθόδου (Chung and Miller 1988)	90
2.16.2.2	Πειραματική πορεία	90
2.16.2.3	Διαλύματα	90
2.16.3	Επιλογή επιθυμητών μετασχηματισμένων κλώνων	90
2.16.4	Διαλύματα	91
2.17	Έλεγχος επιτυχίας της διαδικασίας κλωνοποίησης.....	91
2.17.1	Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες/Περιοριστική ανάλυση	91
2.17.2	Έλεγχος με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	94
2.17.3	Ανάλυση της αλληλουχίας βάσεων της ένθεσης στον πλασμιδιακό φορέα	94
2.18	Υπερέκφραση πρωτεϊνών με το σύστημα pET (pET System Manual, Novagen 2001)	94
2.18.1	Αρχή της μεθόδου	94
2.18.2	Πειραματική πορεία.....	95
2.19	Καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης αγκιστείας Ni²⁺-NTA	95
2.19.1	Αρχή της μεθόδου (Herz et al. 2000).....	95
2.19.2	Πειραματική πορεία.....	95
2.19.3	Διαλύματα	96
2.20	Ανταλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος και συμπύκνωση πρωτεϊνών	97
2.21	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	97
2.21.1	Αρχή της μεθόδου (Bradford 1976).....	97
2.21.2	Πειραματική πορεία.....	97
2.22	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)	97
2.22.1	Αρχή της μεθόδου (Laemmli 1970)	97
2.22.2	Πειραματική πορεία.....	98
2.22.3	Διαλύματα	99
2.23	Μελέτη πρωτεϊνικής δομής με τη χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων	100
2.24	Βιοχημικός χαρακτηρισμός ενζύμων	100
2.24.1	Ενζυμικοί προσδιορισμοί με φωτομέτρηση	100
2.24.1.1	Παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος <i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3.....	100
2.24.1.2	Παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος <i>E. coli</i> BL21.....	100
2.24.1.3	Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος (Feng, Khoo, and Poh 1999).....	101
2.24.1.4	Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης (Mars et al. 1997)	101
2.24.1.5	Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης (Y. Kim et al. 1992)	102
2.24.1.6	Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηριότητας μέσω οξείδωσης του NADPH/NADH.....	102
2.24.1.7	Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Iwagami, Yang, and Davies 2000)	103

2.24.1.8	Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Ono, Nozaki, and Hayaishi 1970)	103
2.24.2	Κινητική σταθερής κατάστασης των ενζύμων ενδιαφέροντος	104
2.24.3	Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης ενζύμων ενδιαφέροντος	104
2.24.4	Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης ενζύμων ενδιαφέροντος	104
2.24.5	Προσδιορισμός θερμοσταθερότητας ενζύμων ενδιαφέροντος	105
2.24.6	Μελέτη της επίδρασης του σιδήρου [Fe(II)/Fe(III)] και του L-ασκορβικού οξέος στη δραστηριότητα των υπό μελέτη ενζύμων	105
2.24.7	Επίδραση μεταλλικών ιόντων και χηλικών παραγόντων στη δραστηριότητα των υπό μελέτη ενζύμων	105
2.24.8	Διατήρηση ενζυμικής δραστηριότητας κατά την αποθήκευση	105
2.24.9	Φασματοσκοπία UV/Vis για μελέτη αναγνώρισης εναλλακτικών υποστρωμάτων	105
2.25	Πρωτόκολλα ακινητοποίησης	106
2.25.1	Ακινητοποίηση κυττάρων σε σφαιρίδια αλγινικού νατρίου (Ziagona, Koukku, and Liakopoulou-Kyriakides 2014)	106
2.25.2	Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμου σε νανοϋλικά (Πατήλα 2016)	107
2.25.3	Ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμου σε νανοϋλικά με τελικές καρβοξυλομάδες (Πατήλα 2016)	107
2.25.4	Ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμου σε νανοϋλικά με τελικές αμινομάδες (Πατήλα 2016)	108
2.25.5	Ακινητοποίηση ενζύμου σε μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου	108
2.25.6	Βελτιστοποίηση ακινητοποίησης ενζύμου σε νανοϋλικά	109
2.26	Χαρακτηρισμός νανοβιοκαταλύτη	109
2.26.1	Απόδοση ακινητοποίησης και ενζυμικοί προσδιορισμοί με τον νανοβιοκαταλύτη	109
2.26.2	Επαναχρησιμοποίηση νανοβιοκαταλύτη	109
2.26.3	Δομικός χαρακτηρισμός του νανοβιοκαταλύτη με Φασματοφωτομετρία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR)	109
2.27	Ανάλυση δειγμάτων με φασματοσκοπία NMR	110
2.27.1	Ταυτοποίηση προϊόντος ενζυμικής αντίδρασης	111
2.27.1.1	1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος	111
2.27.1.2	1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης	111
2.27.1.3	4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος	111
2.27.2	Παρακολούθηση ενζυμικής αντίδρασης σε κυτταρικό επίπεδο (<i>in-cell</i> NMR)	111
2.27.2.1	<i>Sphe3 in-cell</i> NMR	111
2.27.2.2	<i>E.coli</i> BL21 <i>in-cell</i> NMR	112
2.28	Ποσοτικός προσδιορισμός καταβολισμού υποστρώματος/παραγωγής προϊόντος	113
2.28.1	Μέθοδος 4-αμινοαντιπυρίνης (4-AAP)	113
2.28.2	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ..	113
2.28.2.1	Καταβολισμός φαινόλης από κύτταρα <i>Sphe3</i>	113
2.28.2.2	Παραγωγή ccMA από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E. coli</i> BL21	114
Αποτελέσματα και Συζήτηση		116
3 Μελέτη καταβολισμού υδροξυλιωμένων αρωματικών ενώσεων από το <i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3</i> και χαρακτηρισμός ενζύμων που εμπλέκονται		
117		
3.1 Μελέτη της πορείας καταβολισμού της φαινόλης στο <i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3</i>		
117		
3.1.1	Ανάπτυξη του στελέχους <i>Sphe3</i> παρουσία φαινόλης	117

3.1.2	<i>In silico</i> εντοπισμός γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό της φαινόλης	119
3.1.3	Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό της φαινόλης 121	
3.1.4	Ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας σε εκχύλισμα κυττάρων <i>Sphe3</i> αναπτυγμένων παρουσία φαινόλης	122
3.1.5	Καταβολισμός φαινόλης και ταυτοποίηση προϊόντων.....	123
3.2	Μελέτη της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης από το <i>Pseudarthrobacter</i>	
	<i>phenanthrenivorans Sphe3</i>.....	127
3.2.1	Βιοπληροφορική ανάλυση	127
3.2.1.1	Προσδιορισμός πρωτοταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης	127
3.2.1.2	Κατασκευή φυλογενετικού δένδρου.....	128
3.2.1.3	Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης	129
3.2.1.4	Πρόβλεψη τριτοταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης	131
3.2.2	Ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης στα κύτταρα <i>Sphe3</i>	132
3.2.3	Κλωνοποίηση του γονιδίου, ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός του ενζύμου	133
3.2.4	Χαρακτηρισμός της 1,2-CDO του <i>Sphe3</i>	136
3.2.4.1	Επίδραση Fe(II) / Fe(III) στη δραστηριότητα του ενζύμου	136
3.2.4.2	Βέλτιστο pH δράσης	137
3.2.4.3	Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης	138
3.2.4.4	Επίδραση ιόντων μετάλλων και χηλικών παραγόντων στη δραστηριότητα του ενζύμου	139
3.2.4.5	Κινητική σταθερής κατάστασης	140
3.2.4.6	Εναλλακτικά υποστρώματα της 1,2-CDO του <i>Sphe3</i>	141
3.2.4.7	Διατήρηση ενζυμικής δραστηριότητας κατά την αποθήκευση	143
3.2.4.8	Ταυτοποίηση προϊόντος αντίδρασης της 1,2-CDO του <i>Sphe3</i> με φασματοσκοπία NMR.....	144
3.3	Μελέτη της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το γονίδιο <i>Asphe3_36590</i> του	
	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3</i>.....	146
3.3.1	Βιοπληροφορική ανάλυση	146
3.3.1.1	Προσδιορισμός πρωτοταγούς δομής	146
3.3.1.2	Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής	148
3.3.1.3	Πρόβλεψη τριτοταγούς δομής	150
3.3.2	Ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας σε εκχύλισμα κυττάρων <i>Sphe3</i> αναπτυγμένων παρουσία 3- υδροξυβενζοϊκού οξέος.....	151
3.3.3	Κλωνοποίηση του γονιδίου, ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός του ενζύμου	152
3.3.4	Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης 3HB4H του στελέχους <i>Sphe3</i>	155
3.3.4.1	Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων FAD στη δραστηριότητα του ενζύμου	155
3.3.4.2	Βέλτιστο pH δράσης	156
3.3.4.3	Βέλτιστη θερμοκρασία	157
3.3.4.4	Επίδραση ιόντων στη δραστηριότητα του ενζύμου	158
3.3.4.5	Κινητική σταθερής κατάστασης	158
3.3.4.6	Διατήρηση ενζυμικής δραστηριότητας κατά την αποθήκευση	161
3.3.4.7	Εναλλακτικά υποστρώματα της 3HB4H του <i>Sphe3</i>	162
3.3.4.8	Ταυτοποίηση προϊόντος αντίδρασης της 3HB4H του <i>Sphe3</i> με φασματοσκοπία NMR	170
3.3.5	Παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης με την <i>in-cell</i> NMR φασματοσκοπία	174
3.3.5.1	Δοκιμές με τα κύτταρα <i>Sphe3</i>	175
3.3.5.2	Δοκιμές με τα μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E.coli</i> :BL21(DE3)- 3HB4H	175
3.3.6	Μελέτη έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό του 3-HBA	179
3.4	Συμπεράσματα	183
4	Νανοβιοκαταλύτες.....	185
4.1	Ακινητοποίηση ενζύμων.....	185

4.1.1	Πρωτόκολλο για την ακινητοποίηση επιλεγμένων ενζύμων του Sphe3	186
4.1.2	Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ακινητοποίησης	187
4.1.2.1	GDO του Sphe3	187
4.1.2.2	1,2-CDO του Sphe3	188
4.1.2.3	3HB4H του Sphe3	189
4.1.3	Επιβεβαίωση επιτυχούς ακινητοποίησης	190
4.1.3.1	Έλεγχος ενζυμοεξαρτώμενης αντίδρασης.....	190
4.1.3.2	Έλεγχος με Φασματοφωτομετρία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR)	191
4.2	Χαρακτηρισμός νανοβιοκαταλυτών	193
4.2.1	Ταυτοποίηση προϊόντος αντίδρασης με φασματοσκοπία NMR	193
4.2.2	Κινητική σταθερής κατάστασης των ακινητοποιημένων ενζύμων	194
4.2.3	Βέλτιστο pH δράσης.....	196
4.2.4	Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης.....	200
4.2.5	Θερμοσταθερότητα	203
4.2.6	Διατήρηση ενζυμικής δραστηριότητας κατά την αποθήκευση	213
4.2.7	Επαναχρησιμοποίηση	216
4.3	Συμπεράσματα	220
5	Κύτταρα ως βιοκαταλύτες	223
5.1	Ακινητοποίηση κυττάρων Sphe3 και μελέτη του καταβολισμού φαινόλης	223
5.1.1	Βελτιστοποίηση παραμέτρων καταβολισμού φαινόλης-ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα Sphe3	224
5.1.2	Επαναχρησιμοποίηση ακινητοποιημένων κυττάρων	225
5.1.3	Καταβολισμός φαινόλης μετά από αποθήκευση των ακινητοποιημένων κυττάρων	226
5.1.4	Συμπεράσματα.....	227
5.2	Χρήση μετασχηματισμένων κυττάρων <i>E.coli</i> ως βιοκαταλύτες για της παραγωγή cis, cis-μουκονικού οξέος	228
5.2.1	Μελέτη του καταβολισμού της κατεχόλης από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E.coli</i> :BL21(DE3)-1,2-CDO	228
5.2.2	Συμπεράσματα.....	232
	Βιβλιογραφία.....	233
	Παράρτημα	257

Λίστα Εικόνων

Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης	77
Εικόνα 2.2. Βασική αρχή ανίχνευσης φθορισμού σε όργανο PCR πραγματικού χρόνου (Πηγή:BIORAD/applications-technologies/normalization-real-time-pcr-fluorescence-data-with-rox-passive-reference-dye).....	81
Εικόνα 2.3. Σχηματική απεικόνιση της καμπύλης ενίσχυσης ενός δείγματος στην Real-Time qPCR (Πηγή: BIORAD/applications-technologies/qPCR Amplification).....	81
Εικόνα 2.4. Σχηματική απεικόνιση καμπύλης τήξης στην Real-Time qPCR.....	83
Εικόνα 2.5. Σχηματική απεικόνιση του ανασυνδυασμένου φορέα pBlueScript::catA, με την ένθεση υπό τον έλεγχο του T7 εκκινητή (Α) ή του T3 εκκινητή (Β).....	92
Εικόνα 2.6. Εικονικές πέψεις στον ανασυνδυασμένο φορέα pBlueScript::catA. Ladder: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λ DNA-HindIII. Α) Θέσεις 1-4: Εικονικές πέψεις με NdeI (1), SmaI (2), XhoI (3) και διπλή πέψη με BamHI+NdeI (4), όταν η ένθεση βρίσκεται υπό τον έλεγχο του T7 εκκινητή. Β) Θέσεις 1-4:Εικονικές πέψεις με NdeI (1), SmaI (2), XhoI (3) και διπλή πέψη με BamHI+NdeI (4), όταν η ένθεση βρίσκεται υπό τον έλεγχο του T3 εκκινητή.	92
Εικόνα 2.7. Σχηματική απεικόνιση του ανασυνδυασμένου φορέα pBlueScript::36590, με την ένθεση υπό τον έλεγχο του T7 εκκινητή (Α) ή του T3 εκκινητή (Β).....	93
Εικόνα 2.8. Εικονικές πέψεις στον ανασυνδυασμένο φορέα pBlueScript::36590. Ladder: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λ DNA-HindIII. Α) Θέσεις 1-5: Εικονικές πέψεις με BamHI (1), HindIII (2), PstI (3), XhoI (4) και Aval (5), όταν η ένθεση βρίσκεται υπό τον έλεγχο του T7 εκκινητή. Β) Θέσεις 1-5: Εικονικές πέψεις με BamHI (1), HindIII (2), PstI (3), XhoI (4) και Aval (5), όταν η ένθεση βρίσκεται υπό τον έλεγχο του T3 εκκινητή.	93
Εικόνα 3.1. Καμπύλες ανάπτυξης του <i>Srhe3</i> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης. Οι γραμμές με τον κύκλο, τετράγωνο, τρίγωνο, ρόμβο, πολύγωνο και χι αντιπροσωπεύουν τις μετρήσεις της ανάπτυξης του <i>Srhe3</i> παρουσία 300, 500, 750, 1000, 1200 και 1500 mg/L αντίστοιχα. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).....	118
Εικόνα 3.2. Καταβολισμός φαινόλης από το <i>Srhe3</i> , όταν αναπτύσσεται παρουσία 300-1500 mg/L, στους 30 °C μετά πό 6, 12 και 24 h. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).	118
Εικόνα 3.3. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων <i>Asphe3_36590</i> , <i>Asphe3_35170</i> και <i>Asphe3_40510</i> του <i>Srhe3</i> , όταν αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης, ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας. Το mRNA των γονιδίων στόχων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς <i>gyrB</i> . Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν σαν βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm$ SD, N=3).	122
Εικόνα 3.4. Απεικόνιση των αλλαγών της συγκέντρωσης της φαινόλης σε καλλιέργεια των κυττάρων <i>Srhe3</i> σε MM M9 παρουσία 500 mg/L φαινόλης σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (0, 2, 6, 12, 24 και 36 h). Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 30 °C υπό ανάδευση. M9 με ίδια συγκέντρωση φαινόλης χωρίς εμβόλιο κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως control. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm$ SD, N=3) (α). Ανάλυση HPLC δειγμάτων στις 2 h (β), 12 h (γ) και 24 h (δ). Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τις κορυφές που αντιστοιχούν στη φαινόλη, την κατεχόλη και το <i>cis</i> , <i>cis</i> -μουκονικό οξύ (ccMA)...	125
Εικόνα 3.5. Περιοχή στο χρωμόσωμα του <i>Srhe3</i> που εντοπίζεται το <i>catA</i> (3) και τα γειτονικά του γονίδια. Γονίδια που κωδικούνουν για: μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλπροπιονικού οξέος (1), α υπομονάδα της 1,2-διοξυγονάσης του βενζοϊκού οξέος (2), 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης (3), μεταφορέας του βενζοϊκού οξέος (4), πιθανή λιποπρωτεΐνη (5), μεταφορέας νιτρικών/νιτρωδών (6).	127
Εικόνα 3.6. Η πρωτεϊνική αλληλουχία της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του <i>Srhe3</i> , όπως προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο ExPASy translate tool.	128
Εικόνα 3.7. Φυλογενετικό δένδρο της 1,2-CDO του <i>Srhe3</i> . Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 19 αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι ασαφείς θέσεις απομακρύνθηκαν για κάθε ζεύγος αλληλουχιών. Υπάρχουν συνολικά 357 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA7.	128
Εικόνα 3.8. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του <i>Srhe3</i> σύμφωνα με την πλατφόρμα Phyre2.....	129
Εικόνα 3.9 Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της 1,2-CDO του <i>Srhe3</i> με το λογισμικό InterProScan.....	130
Εικόνα 3.10. α) Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής της 1,2 CDO του <i>Srhe3</i> , όπως προκύπτει από τη σύγκριση με την 1,2 CDO του <i>R. oracus</i> 1CP (Confidence: 100%, coverage: 86%, I.D.: 51%, Image coloured by rainbow N → C	

terminus) στο Phyre2 (Modelling Mode: Normal). Model dimensions (Å): X:61.433, Y:40.942, Z:67.828. β) Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής της 1,2 CDO του Sphe3, όπως προκύπτει από την ανάλυση με το ColabFold v1.5.5: AlphaFold2 using MMseqs2 (rank_001_alphafold2_ptm_model_3_seed_000 pLDDT=94.2 pTM=0.89), (Image coloured by rainbow N → C terminus).	131
Εικόνα 3.11. Ομοπαράθεση των 2 πιθανών μοντέλων τρισδιάστατης δομής της 1,2-CDO του Sphe3 με το online εργαλείο CLICK. Με το χρώμα της ώχρας παρουσιάζονται οι δομές που αλληλεπικαλύπτονται στα μοντέλα (αλληλεπικάλυψη δομών 97,27%, Z-Score=18.45), με το πορτοκαλί οι δομές που εντοπίζονται στο μοντέλο της ανάλυσης με το Colabfold και με πράσινο οι δομές που εντοπίζονται στο μοντέλο της ανάλυσης με το Phyre2.	132
Εικόνα 3.12. Πρόβλεψη ενεργού κέντρου στη δομή του ενζύμου 1,2-CDO του Sphe3, όπως προκύπτει από τη σύγκριση με την 1,2 CDO του R. oracus 1CP (σήμανση με κόκκινο), με βάση την ανάλυση focket2 στην πλατφόρμα Phyre2.....	132
Εικόνα 3.13. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου catA. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού θάρους λDNA/HindIII (bp) (New England Biolabs, NEB), 1: προϊόν της αντίδρασης με εκμαγείο το gDNA του Sphe3, 2: αντίδραση PCR χωρίς gDNA (αρνητικός μάρτυρας).	133
Εικόνα 3.14. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων περιοριστικής ανάλυσης του ανασυνδυασμένου φορέα pBlueScript::catA. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού θάρους λDNA- EcoRI-HindIII (Minotech), ο οποίος φαίνεται και στα αριστερά της εικόνας. Θέσεις 1-4: Πέψεις με NdeI (1), SmaI (2), XhoI (3) και διπλή πέψη με BamHI+NdeI (4).	134
Εικόνα 3.15. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων περιοριστικής ανάλυσης του ανασυνδυασμένου φορέα pET29c::catA. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού θάρους λDNA/HindIII (bp) (New England Biolabs, NEB), 1: δείγμα μετά τη διπλή πέψη με τα ένζυμα NdeI και XhoI.	135
Εικόνα 3.16. Πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης με δείγματα από την υπερέκφραση του catA σε διαφορετικούς χρόνους επώασης των BL21 μετά την προσθήκη 1mM IPTG. M: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa) 10–20% Tris-glycine (NEB), 1: δείγμα τη στιγμή της προσθήκης του IPTG, 2: 1h επώαση, 3: 2h επώαση, 4: 3h επώαση και 5: 4h επώαση μετά την προσθήκη του IPTG.	135
Εικόνα 3.17. Πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης με δείγματα από τον καθαρισμό της 1,2-CDO του Sphe3 με τη στήλη αχιστείας Ni ²⁺ -NTA αгарόζης. M: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa) 10–20% Tris-glycine (NEB), 1: crude μετασχηματισμένων BL21 μετά από 4 h επώασης με IPTG, 2-4: flowthrough της στήλης, 5: κλάσμα με χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, 6-9: κλάσματα με αύξουσα συγκέντρωση ιμιδαζολίου στα οποία εντοπίζεται καθαρό το ένζυμο.	136
Εικόνα 3.18. Δραστικότητα της 1,2-CDO του Sphe3 (U·mI ⁻¹) σε διαφορετικά pH και συγκεντρώσεις υποστρώματος, όπου Km=0.03 mM.	138
Εικόνα 3.19. Δραστικότητα της 1,2-CDO του Sphe3 (U·mI ⁻¹) σε διαφορετικές θερμοκρασίες.	139
Εικόνα 3.20. Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής της αντίδρασης της 1,2-CDO του Sphe3. Η αντίδραση ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten, που περιγράφεται από την εξίσωση που φαίνεται στο σχήμα.	141
Εικόνα 3.21. Φάσμα UV-Vis της αντίδρασης της 1,2-CDO του Sphe3 με υπόστρωμα κατεχόλη. Με κόκκινο βέλος επισημαίνεται η αύξηση της απορρόφησης στα 260 nm λόγω του σχηματισμού του cis, cis-μουκονικού οξέος ως προϊόν της αντίδρασης.	142
Εικόνα 3.22. Φάσματα UV-Vis της αντίδρασης της 1,2-CDO του Sphe3 με τις ενώσεις 4-νιτροκατεχόλη, 2,4-δινιτροφαινόλη, βενζοϊκό οξύ και καφεϊκό οξύ ως πιθανά εναλλακτικά υποστρώματα.	143
Εικόνα 3.23. ¹ H NMR φάσμα του cis, cis-muconic acid ως προϊόν αντίδρασης της ελεύθερης 1,2 διοξυγονάσης της κατεχόλης παρουσία 1.2 mM του υποστρώματος της κατεχόλης σε θερμοκρασία δωματίου σε 0.5mL 50m Tris buffer pH 8 90% H ₂ O/10% D ₂ O (number of scans = 64, acquisition time = 4 s, relaxation delay = 1.5 s, total experimental time = 6 min 22 s). Φάσμα αναφοράς για το ccMA: https://hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/2038	145
Εικόνα 3.24. Η πρωτεϊνική αλληλουχία που κωδικοεύεται από το γονίδιο Asphe3_36590, όπως προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο ExpASY translate tool.	146
Εικόνα 3.25. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής του ενζύμου που κωδικοεύεται από το Asphe3_36590 σύμφωνα με την πλατφόρμα Phyre2.	147
Εικόνα 3.26. Η απεικόνιση για τη διαμεμβρανική έλικα της πεπτιδικής αλυσίδας του Asphe3_36590, όπως προέκυψε με την ανάλυση στο Phyre2.	148
Εικόνα 3.27. Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του Asphe3_36590 με το λογισμικό InterProScan.	149
Εικόνα 3.28. Πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής της πεπτιδικής αλληλουχίας του Asphe3_36590, όπως προκύπτει από την ανάλυση SWISS-MODEL στην πλατφόρμα ExpASY, με εκμαγείο τα ένζυμα: 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος του Comamonas testosteroni (α) και 2-μονοξυγονάση της φαινόλης του Trichosporon cutaneum (β). Σε κάθε μοντέλο φαίνεται ο κωδικός του ενζύμου, η σταθερά αξιολόγησης του μοντέλου	

GMQE (1=βέλτιστο) και η ομοιότητα της υπό διερεύνησης αλληλουχίας με αυτή του μοντέλου. (Image coloured by rainbow N → C terminus).	150
Εικόνα 3.29. Πρόβλεψη της δομής του μονομερούς της πεπτιδικής αλληλουχίας του Asphe3_36590, με επισήμανση των αμινοξέων που συμμετέχουν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου 4-υδροξυυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού του <i>C. testosteroni</i> , σύμφωνα με δεδομένα του Catalytic Site Atlas. Με κόκκινο επισημαίνονται τα όμοια αμινοξέα που εντοπίζονται και στα δυο ένζυμα, ενώ με πράσινο το αμινοξύ που εντοπίζεται στην πεπτιδική αλληλουχία του Asphe3_36590. Model dimensions (Å): X:69.945 Y:79.223 Z:67.802.	151
Εικόνα 3.30. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου 3hb4h. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λDNA- EcoRI-HindIII (Minotech), ο οποίος φαίνεται και στα αριστερά της εικόνας, 1: αντίδραση PCR χωρίς gDNA από το στέλεχος Sphe3 (αρνητικός μάρτυρας), 2: προϊόν της αντίδρασης (~1905 bp) με εκμαγείο το gDNA του Sphe3.	152
Εικόνα 3.31. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων περιοριστικής ανάλυσης του ανασυνδυασμένου φορέα pBlueScript::36590. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λDNA- EcoRI-HindIII (Minotech), ο οποίος φαίνεται και στα αριστερά κάθε πηκτώματος. Οι ανασυνδυασμένοι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για την περιοριστική ανάλυση απομονώθηκαν με μεθόδους αλκαλικής λύσης των κυττάρων από διαφορετικές αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων. α) Θέσεις 1-8: Πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο XhoI. β) Θέσεις 1-8: Πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο BamHI. Με βελάκια επισημαίνονται τα αναμενόμενα προϊόντα.	152
Εικόνα 3.32. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων περιοριστικής ανάλυσης του ανασυνδυασμένου φορέα pBlueScript::36590. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λDNA- EcoRI-HindIII (Minotech), ο οποίος φαίνεται και στα αριστερά του πηκτώματος. 1: Πέψη του ανασυνδυασμένου φορέα με το περιοριστικό ένζυμο Aval. 2: Πέψη του pBluescript SK+ με το περιοριστικό ένζυμο Aval. 3: Πέψη του ανασυνδυασμένου φορέα με το περιοριστικό ένζυμο PstI. 4: Πέψη του pBluescript SK+ με το περιοριστικό ένζυμο PstI. 5: Πέψη του ανασυνδυασμένου φορέα με το περιοριστικό ένζυμο HindIII. 6: Πέψη του pBluescript SK+ με το περιοριστικό ένζυμο HindIII.	153
Εικόνα 3.33. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων περιοριστικής ανάλυσης του ανασυνδυασμένου φορέα pET29c::36590. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λDNA- EcoRI-HindIII (Minotech), ο οποίος φαίνεται και στα αριστερά του πηκτώματος. Θέσεις 1-4: Πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο Aval. Θέσεις 5-8: Πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο HindIII. Θέσεις 9-12: Πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο PstI. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένοι φορείς από 4 διαφορετικές αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων. Με βελάκια επισημαίνονται τα δείγματα με τα αναμενόμενα προϊόντα.	153
Εικόνα 3.34. Πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης με δείγματα από την υπερέκφραση του 3hb4h σε διαφορετικούς χρόνους επώασης των BL21 μετά την προσθήκη 1mM IPTG. M: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa) 10–20% Tris-glycine (NEB), 1: δείγμα τη στιγμή της προσθήκης του IPTG, 2: 1h επώαση, 3: 2h επώαση, 4: 3h επώαση και 5: 4h επώαση μετά την προσθήκη του IPTG, 6: δείγμα τη στιγμή της προσθήκης του IPTG, 7: δείγμα, μετά την προσθήκη 1mM IPTG μετά από overnight επώαση στους 16 °C.	154
Εικόνα 3.35. Πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης με δείγματα από τον καθαρισμό της υπό μελέτη πρωτεΐνης 3HB4H του Sphe3 με τη στήλη αχιστείας Ni ²⁺ -NTA αгарόζης. M: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa) 10–20% Tris-glycine (NEB), 1: crude μετασχηματισμένων BL21 μετά από 16 h επώασης με IPTG, 2: flowthrough της στήλης, 3-9: κλάσματα με αύξουσα συγκέντρωση ιμιδαζολίου στα οποία εντοπίζεται καθαρό το ένζυμο.	155
Εικόνα 3.36. Δραστικότητα της 3HB4H του Sphe3 (U·ml ⁻¹) σε διαφορετικά pH και συγκεντρώσεις υποστρώματος, όπου Km=0.03 mM.	156
Εικόνα 3.37. Δραστικότητα της 3HB4H του Sphe3 (U·ml ⁻¹) σε διαφορετικές θερμοκρασίες.	157
Εικόνα 3.38. Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής της αντίδρασης της 3HB4H του Sphe3 με υπόστρωμα το 3-HBA. Η αντίδραση ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten, που περιγράφεται από την εξίσωση που φαίνεται στο σχήμα.	159
Εικόνα 3.39. Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής της αντίδρασης της 3HB4H του Sphe3 με διαφορετικές συγκεντρώσεις του NADH και NADPH ως αναγωγικά ισοδύναμα και σταθερή συγκέντρωση του 3-HBA.	161
Εικόνα 3.40. Φάσμα UV-Vis της αντίδρασης της 3HB4H με υπόστρωμα το 3-HBA (γράφημα κάτω αριστερά) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (μπλε γραμμή: t=0 min, πορτοκαλί γραμμή: t=60 min, γκρι γραμμή: t=90 min, κίτρινη γραμμή: t=120 min). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το υπόστρωμα με το NADH (πάνω γράφημα). Ως επιπλέον μάρτυρας χρησιμοποιείται η αντίδραση με κυτταρικό εκχύλισμα των BL21-χωρίς το υπερεκφρασμένο ένζυμο (γράφημα κάτω δεξιά). Η αλλαγή στο φάσμα της αντίδρασης επισημαίνεται με κόκκινο βέλος και αποδίδεται στη μείωση της απορρόφησης λόγω της οξειδωσης του NADH στα 340 nm, το οποίο αξιοποιείται από το ένζυμο.	163

- Εικόνα 3.41. Φάσμα UV-Vis της αντίδρασης της 3HB4H με υπόστρωμα τη φαινόλη (γράφημα κάτω αριστερά) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (μπλε γραμμή: $t=0$ min, πορτοκαλί γραμμή: $t=60$ min, γκρι γραμμή: $t=90$ min, κίτρινη γραμμή: $t=120$ min). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το υπόστρωμα με το NADH (πάνω γράφημα). Ως επιπλέον μάρτυρας χρησιμοποιείται η αντίδραση με κυτταρικό εκχύλισμα των BL21 χωρίς το υπερεκφρασμένο ένζυμο (γράφημα κάτω δεξιά). Η αλλαγή στο φάσμα της αντίδρασης επισημαίνεται με κόκκινο βέλος και αποδίδεται στη μείωση της απορρόφησης λόγω της οξειδωσης του NADH στα 340 nm, το οποίο αξιοποιείται από το ένζυμο. 164
- Εικόνα 3.42. Φάσματα UV-Vis της αντίδρασης της 3HB4H με υποστρώματα τα: 4-HBA, γεντισικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, σαλικυλικό οξύ και φθαλικό οξύ σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (μπλε γραμμή: $t=0$ min, πορτοκαλί γραμμή: $t=60$ min, γκρι γραμμή: $t=90$ min, κίτρινη γραμμή: $t=120$ min). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το υπόστρωμα με το NADH. Ως επιπλέον μάρτυρας χρησιμοποιείται η αντίδραση με κυτταρικό εκχύλισμα των BL21 χωρίς το υπερεκφρασμένο ένζυμο. Η αλλαγή στο φάσμα της αντίδρασης επισημαίνεται με κόκκινο βέλος και αποδίδεται στη μείωση της απορρόφησης λόγω της οξειδωσης του NADH στα 340 nm, το οποίο αξιοποιείται από το ένζυμο. 167
- Εικόνα 3.43. Φάσματα UV-Vis της αντίδρασης της 3HB4H με υποστρώματα τα: p -κουμαρικό οξύ, ομοπρωτοκατεχοϊκό οξύ, και καφεϊκό οξύ σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (μπλε γραμμή: $t=0$ min, πορτοκαλί γραμμή: $t=60$ min, γκρι γραμμή: $t=90$ min, κίτρινη γραμμή: $t=120$ min). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το υπόστρωμα με το NADH. Ως επιπλέον μάρτυρας χρησιμοποιείται η αντίδραση με κυτταρικό εκχύλισμα των BL21, χωρίς το υπερεκφρασμένο ένζυμο. Δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των φασμάτων των αντιδράσεων που περιέχουν τα ενζυμικά παρασκευάσματα. 169
- Εικόνα 3.44. Έλεγχος ύπαρξης δραστηριότητας υδροξυλάσης του σαλικυλικού οξέος της 3HB4H μέσω χρωματομετρικού προσδιορισμού της μετατροπής του σαλικυλικού οξέος σε κατεχόλη σε υγρές (α) και στερεές καλλιέργειες (β, γ) που χρησιμοποιήθηκαν τα μετασχηματισμένα BL21 με τον ανασυνδυασμένο *pET29c::36590* παρουσία 1 mM σαλικυλικού οξέος. Στα τρυβλία έγινε χρώση με FeCl_3 κατά την οποία το σαλικυλικό οξύ εμφανίζεται ως σκούρο μωβ (β -δεξιά, γ). Δεν παρατηρείται μαύρο χρώμα στα τρυβλία που να υποδεικνύει την ύπαρξη της κατεχόλης. 170
- Εικόνα 3.45. Α. Δομή του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (3-HBA) και Β. δομή του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (PCA)..... 171
- Εικόνα 3.46. ^1H NMR φάσματα της ενζυμικής μετατροπής του 3-HBA (0.3 mM) σε PCA παρουσία της 3HB4H του *Sphe3*, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στο σωληνάκι NMR. Α. 2 μg ενζύμου, Β. 4 μg ενζύμου και C. 20 μg ενζύμου. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl pH 8 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (number of scans = 32, acquisition time = 4 s, relaxation delay = 1.5 s, total experimental time = 3 min). Με αστερίσκο υποδηλώνονται κορυφές που ανήκουν στο FAD, το NADH και το ιμιδαζόλιο..... 171
- Εικόνα 3.47. In situ παρακολούθηση της μετατροπής του 3-HBA (0.3 mM) σε PCA παρουσία της 3HB4H του *Sphe3* μέσα στο σωληνάκι NMR. ^1H NMR φάσματα 5 min (Α), 10 min (Β), 1.5 hr (C), 2.5 hr (D), 10 hr (E) και 14 hr (F) μετά την προσθήκη του 3-OH βενζοϊκού οξέος στο διάλυμα με το ένζυμο. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl pH 8 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (number of scans = 32, acquisition time = 4 s, relaxation delay = 1.5 s, total experimental time = 3 min). Με αστερίσκο υποδηλώνονται κορυφές που ανήκουν στο FAD, το NADH και το ιμιδαζόλιο..... 172
- Εικόνα 3.48. Φάσμα δύο διαστάσεων συσχέτισης ^1H - ^1H TOCSY 2D NMR του πρωτοκατεχοϊκού οξέος ως προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης της 3HB4H παρουσία του 3-HBA (0.3 mM) ως υποστρώματος (number of scans = 16, mixing time = 0.06 s, total experimental time = XXX). 173
- Εικόνα 3.49. Φάσμα δύο διαστάσεων συσχέτισης ^1H - ^{13}C HSQC 2D NMR του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (κόκκινο χρώμα) ως προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης της 3HB4H παρουσία του 3-HBA (0.3 mM) ως υποστρώματος (number of scans = 162, total experimental time = XXX). Με αστερίσκο υποδηλώνονται κορυφές που ανήκουν στο FAD, το NADH και το ιμιδαζόλιο..... 173
- Εικόνα 3.50. ^1H NMR φάσματα της ενζυμικής μετατροπής του 3-HBA (0.3 mM) σε PCA παρουσία (Α) 20 μg του καθαρού ενζύμου 3HB4H in vitro και (Β) 40 μg κυτταρικού εκχυλίσματος των BL21 με υπερεκφρασμένο το ένζυμο. Με αστερίσκο υποδηλώνονται κορυφές που ανήκουν στο FAD, το NADH και το ιμιδαζόλιο. 174
- Εικόνα 3.51. ^1H NMR φάσματα της ενζυμικής μετατροπής του 3-HBA σε PCA (Α) παρουσία του καθαρού ενζύμου 3HB4H in vitro και (Β) σε κυτταρικό επίπεδο μέσα σε ζωντανά BL21 κύτταρα που υπερεκφράζουν την υδροξυλάση. 176
- Εικόνα 3.52. In-cell NMR παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της ενζυμικής αντίδρασης μετατροπής του 3-HBA (0.2 mM) σε PCA παρουσία της 3HB4H σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα. ^1H NMR φάσματα 5 min (Α), 10 min (Β), 20 min (C) και 30 min (D) μετά την έναρξη της αντίδρασης (number of scans = 64, acquisition time = 4 s, relaxation delay = 1.5 s, total experimental time = 6 min)..... 176
- Εικόνα 3.53. In-cell NMR παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης μετατροπής του 3-HBA (0.2 mM) σε PCA παρουσία της 3HB4H σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα BL21. ^1H NMR φάσματα 5 min (Α), 15 min (Β), 35 min (C), 50 min (D), 1hr (E) και 4hr (F) μετά την έναρξη της αντίδρασης. (number of scans = 64, acquisition time = 4 s, relaxation delay = 1.5 s, total experimental time = 6 min). 177

Εικόνα 3.54. In-cell ^1H NMR σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα BL21 με υπερεκφρασμένη την 3HB4H παρουσία 4-HBA και ανίχνευση του PCA ως προϊόν.....	178
Εικόνα 3.55. In-cell ^1H NMR σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα BL21 με υπερεκφρασμένη την 3HB4H παρουσία γεντισικού οξέος.	178
Εικόνα 3.56. In-cell ^1H NMR σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα BL21 με υπερεκφρασμένη την 3HB4H παρουσία φαινόλης.	179
Εικόνα 3.57. Πιθανή πορεία καταβολισμού του 3-HBA στο στέλεχος <i>Srhe3</i> . Με μπλε αναγράφεται η σύντομη ονομασία του γονιδίου κάθε ενζύμου που συμμετέχει στο μονοπάτι και εντοπίζεται στο γονιδίωμα του <i>Srhe3</i>	180
Εικόνα 3.58. Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοτικοποίησης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων του στελέχους <i>Srhe3</i> σε υποστρώματα γλυκόζης και 3-HBA. Το mRNA των γονιδίων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς <i>gyrB</i> . Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης έχουν χρησιμοποιηθεί ως βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.....	181
Εικόνα 4.1. Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου ταυτόχρονης ακινητοποίησης και καθαρισμού του ανασυνδυασμένου ενζύμου με τη χρήση των τροποποιημένων μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4).	187
Εικόνα 4.2. Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ακινητοποίησης της GDO σε σχέση με: την αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού, επώαση 2 h (α) και την παράμετρο του χρόνου επώασης, αναλογία ενζύμου-MNPs 2:1 (β). Οι αντιδράσεις ακινητοποίησης πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C, υπό ανάδευση. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm\text{SD}$, N=3).....	188
Εικόνα 4.3. Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ακινητοποίησης της 1,2-CDO σε σχέση με: την αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού με επώαση για 2 h (α) και την παράμετρο του χρόνου επώασης με τη χρήση του νανοβιοκαταλύτη με αναλογία ενζύμου-MNPs 5:1 (β). Οι αντιδράσεις ακινητοποίησης πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C, υπό ανάδευση. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm\text{SD}$, N=3).	189
Εικόνα 4.4. Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ακινητοποίησης της 3HB4H σε σχέση με: την αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού με επώαση για 2 h (α) και την παράμετρο του χρόνου επώασης με τη χρήση του νανοβιοκαταλύτη με αναλογία ενζύμου-MNPs 1:1 (β). Οι αντιδράσεις ακινητοποίησης πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C, υπό ανάδευση. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm\text{SD}$, N=3).	190
Εικόνα 4.5. Φάσματα FTIR των τροποποιημένων μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4) πριν (μαύρη γραμμή) και μετά (κόκκινη γραμμή) την ακινητοποίηση του ενζύμου GDO του <i>Srhe3</i> . .	192
Εικόνα 4.6. Φάσματα FTIR των τροποποιημένων μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4) πριν (μαύρη γραμμή) και μετά (κόκκινη γραμμή) την ακινητοποίηση του ενζύμου 1,2-CDO του <i>Srhe3</i>	192
Εικόνα 4.7. Φάσματα FTIR των τροποποιημένων μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4) πριν (μαύρη γραμμή) και μετά (κόκκινη γραμμή) την ακινητοποίηση του ενζύμου 3HB4H του <i>Srhe3</i>	193
Εικόνα 4.8. Φάσμα ^1H NMR της ενζυμικής μετατροπής του γεντισικού οξέος (μπλε επισήμανση) σε μηλοπυροσταφυλικό οξύ (κόκκινη επισήμανση) από το νανοβιοκαταλύτη σε 50 mM Tris ρυθμιστικό διάλυμα 90% H_2O και 10% D_2O (number of scans = 64, acquisition time = 4 s, relaxation delay = 1.5 s, total experimental time = 6 min 22 s).....	194
Εικόνα 4.9. Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής της αντίδρασης του νανοβιοκαταλύτη GDO- Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4 (α), 1,2-CDO- Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4 (β) και 3HB4H- Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4 (γ).	195
Εικόνα 4.10. Σύγκριση δραστηριότητας της ελεύθερης GDO (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης GDO (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) σε διάφορα pH. Ο μέσος όρος των υψηλότερων μετρήσεων σε κάθε μορφή του ενζύμου ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm\text{SD}$, N=3).	197
Εικόνα 4.11. Σύγκριση δραστηριότητας της ελεύθερης 1,2-CDO (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης 1,2-CDO (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) σε διάφορα pH. Ο μέσος όρος των υψηλότερων μετρήσεων σε κάθε μορφή του ενζύμου ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm\text{SD}$, N=3).	198
Εικόνα 4.12. Σύγκριση δραστηριότητας της ελεύθερης 3HB4H (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης 3HB4H (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) σε διάφορα pH. Ο μέσος όρος των υψηλότερων μετρήσεων σε κάθε μορφή του ενζύμου ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm\text{SD}$, N=3).	199
Εικόνα 4.13. Σύγκριση δραστηριότητας της ελεύθερης GDO (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης GDO (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) σε διαφορετικές θερμοκρασίες.	200

Εικόνα 4.14. Σύγκριση δραστικότητας της ελεύθερης 1,2-CDO (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης 1,2-CDO (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) σε διαφορετικές θερμοκρασίες.	201
Εικόνα 4.15. Σύγκριση δραστικότητας της ελεύθερης 3HB4H (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης 3HB4H (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) σε διαφορετικές θερμοκρασίες.	203
Εικόνα 4.16. Γραφικές απεικονίσεις της δραστικότητας της ελεύθερης (μπλε χρώμα) και ακινητοποιημένης (κόκκινο χρώμα) GDO μετά από διάφορους χρόνους επώασης στους 30 °C (α), 40 °C (β) και 50 °C (γ). Η δραστικότητα της πρώτης μέτρησης στο χρόνο 0 h ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm SD$, N=3).	205
Εικόνα 4.17. Γραφικές απεικονίσεις της δραστικότητας της ελεύθερης (μπλε χρώμα) και ακινητοποιημένης (κόκκινο χρώμα) 1,2-CDO μετά από διάφορους χρόνους επώασης στους 30 °C (α), 40 °C (β) και 50 °C (γ). Η δραστικότητα της πρώτης μέτρησης στο χρόνο 0 h ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm SD$, N=3).	208
Εικόνα 4.18. Γραφικές απεικονίσεις της δραστικότητας της ελεύθερης (μπλε χρώμα) και ακινητοποιημένης (κόκκινο χρώμα) 3HB4H μετά από διάφορους χρόνους επώασης στους 30 °C (α), 40 °C (β) και 50 °C (γ). Η δραστικότητα της πρώτης μέτρησης στο χρόνο 0 h ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm SD$, N=3).	211
Εικόνα 4.19. Διατήρηση δραστικότητας της ελεύθερης (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) GDO μετά από αποθήκευση στους -20 °C για διάστημα ενός μήνα σε υδατικό διάλυμα (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Η δραστικότητα της πρώτης μέρας αποθήκευσης ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm SD$, N=3).	213
Εικόνα 4.20. Διατήρηση δραστικότητας της ελεύθερης (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) 1,2-CDO μετά από αποθήκευση στους -20 °C για διάστημα ενός μήνα σε υδατικό διάλυμα (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Η δραστικότητα της πρώτης μέρας αποθήκευσης ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm SD$, N=3).	214
Εικόνα 4.21. Διατήρηση δραστικότητας της ελεύθερης (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) 3HB4H μετά από αποθήκευση στους -20 °C για διάστημα ενός μήνα σε υδατικό διάλυμα (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Η δραστικότητα της πρώτης μέρας αποθήκευσης ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm SD$, N=3).	215
Εικόνα 4.22. Διαγραμματική απεικόνιση της δραστικότητας του νανοβιοκαταλύτη GDO-Ni ²⁺ -PDA-Fe ₂ O ₄ κατά την επαναχρησιμοποίησή του. Η δραστικότητα στον πρώτο κύκλο ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm SD$, N=3).	217
Εικόνα 4.23. Διαγραμματική απεικόνιση της δραστικότητας του νανοβιοκαταλύτη 1,2-CDO-Ni ²⁺ -PDA-Fe ₂ O ₄ κατά την επαναχρησιμοποίησή του. Η δραστικότητα στον πρώτο κύκλο ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm SD$, N=3).	218
Εικόνα 4.24. Διαγραμματική απεικόνιση της δραστικότητας του νανοβιοκαταλύτη 3HB4H-Ni ²⁺ -PDA-Fe ₂ O ₄ κατά την επαναχρησιμοποίησή του. Η δραστικότητα στον πρώτο κύκλο ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm SD$, N=3).	219
Εικόνα 5.1. Καταβολισμός 1000 mg/L φαινόλης από ακινητοποιημένα κύτταρα <i>Srhe3</i> , στους 30 °C, εκφρασμένος ως % ικανότητας απομάκρυνσης της φαινόλης μετά από 24, 48, 120, 168 και 192 h. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm SD$, N=3).	224
Εικόνα 5.2. Επίδραση της μεταβολής του pH στην ικανότητα καταβολισμού της φαινόλης από ελεύθερα κύτταρα <i>Srhe3</i> (σήμανση με κύκλους) και ακινητοποιημένα κύτταρα (σήμανση με τετράγωνα). Η απόδοση στο βέλτιστο pH ορίστηκε ως 100% για κάθε περίπτωση. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm SD$, N=3).	225
Εικόνα 5.3. Επίδραση της μεταβολής της θερμοκρασίας στην ικανότητα καταβολισμού της φαινόλης από ελεύθερα κύτταρα <i>Srhe3</i> (σήμανση με κύκλους) και ακινητοποιημένα κύτταρα (σήμανση με τετράγωνα). Η απόδοση στη βέλτιστη θερμοκρασία ορίστηκε ως 100% για κάθε περίπτωση. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm SD$, N=3).	225
Εικόνα 5.4. Κύκλοι επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων κυττάρων <i>Srhe3</i> για τον καταβολισμό της φαινόλης. Η απόδοση του πρώτου κύκλου ορίστηκε στο 100%. Η διάρκεια κάθε κύκλου αντίδρασης ήταν 48 h. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm SD$, N=3).	226
Εικόνα 5.5. Μελέτη της ικανότητας καταβολισμού φαινόλης από ακινητοποιημένα κύτταρα <i>Srhe3</i> μετά από αποθήκευσή τους στους 4 °C για 10, 20 και 30 ημέρες. Η απόδοση καταβολισμού της πρώτης ημέρας ορίστηκε στο 100%. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm SD$, N=3). ...	227
Εικόνα 5.6. Υπερέκφραση της 1,2-CDO του <i>Srhe3</i> σε κύτταρα <i>E.coli</i> , σε θρεπτικό M9 παρουσία γλυκερόλης (1 %) και 100 μM FeCl ₃ . M: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών Unstained Protein Standard, Broad	

<i>Range (10–200 kDa) 10–20% Tris-glycine (NEB), 1, 3: crude μετασχηματισμένων BL21 πριν την επώαση με IPTG. 2, 4: crude μετασχηματισμένων BL21 μετά από 6 h επώασης με IPTG.....</i>	<i>229</i>
<i>Εικόνα 5.7. Παρακολούθηση της ανάπτυξη των μετασχηματισμένων BL21 με βάση την οπτική απορρόφηση και οι αλλαγές στο pH της καλλιέργειας συναρτήσει του χρόνου.....</i>	<i>230</i>
<i>Εικόνα 5.8. Βιομετατροπή κατεχόλης και σχηματισμός ccMA στα μετασχηματισμένα BL21 στα οποία έχει υπερεκφραστεί η 1,2-CDO του Sph3. Στη 1h προστέθηκαν εκ νέου 20 mM κατεχόλης. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 2 επαναλήψεων ($\pm SD$, $N=2$).....</i>	<i>231</i>

Λίστα Πινάκων

Πίνακας 2.1. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.	62
Πίνακας 2.2. Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.	62
Πίνακας 2.3. Πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.	64
Πίνακας 2.4. Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην Real-Time qPCR.	66
Πίνακας 2.5. Ολιγονουκλεοτίδια που σχεδιάστηκαν για τις κλωνοποιήσεις γονιδίων από το <i>Sphe3</i> . Η θέση που αναγνωρίζει το κάθε περιοριστικό ένζυμο επισημαίνεται με υπογράμμιση.	67
Πίνακας 2.6. Σύσταση διαλύματος ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων, TAE.	75
Πίνακας 2.7. Σύσταση διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων ηλεκτροφόρησης, GLB.	75
Πίνακας 2.8. Ενζυμα πολυμερασών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.	77
Πίνακας 2.9. Διαλύματα για την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση.	99
Πίνακας 2.10. Σύσταση πηγμάτων SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης.	99
Πίνακας 2.11. Σύσταση τροποποιημένου θρεπτικού μέσου MM M9.	114
Πίνακας 3.1. Γονίδια που εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του <i>Sphe3</i> στη βάση δεδομένων JGI/IMG και πιθανώς εμπλέκονται στα μονοπάτια της <i>ortho</i> - και <i>meta</i> -σπάσης της κατεχόλης.	120
Πίνακας 3.2. Blastp ανάλυση των ενζύμων που εμπλέκονται στον καταβολισμό της φαινόλης στο <i>Sphe3</i> .	120
Πίνακας 3.3. Επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό της φαινόλης στο <i>Sphe3</i> , όταν αυτό αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης, συγκριτικά με τη γλυκόζη. Η τυπική απόκλιση ($\pm$ SD) προκύπτει από 3 μετρήσεις (N=3).	122
Πίνακας 3.4. Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας από εκχύλισμα κυττάρων <i>Sphe3</i> αναπτυγμένα παρουσία 500 mg/L φαινόλης.	123
Πίνακας 3.5. Χαρακτηριστικά της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του <i>Sphe3</i> από τη βάση δεδομένων JGI/IMG.	127
Πίνακας 3.6. Μεταβολή δραστηριότητας της 1,2-CDO του <i>Sphe3</i> ($U \cdot ml^{-1}$) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου και ασκορβικού οξέος και σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.	136
Πίνακας 3.7. Δραστηριότητα της 1,2-CDO του <i>Sphe3</i> ($U \cdot ml^{-1}$) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος σε εύρος pH 4-12.	137
Πίνακας 3.8. Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της 1,2-CDO του <i>Sphe3</i> ($U \cdot ml^{-1}$).	138
Πίνακας 3.9. Μεταβολή δραστηριότητας (%) της 1,2-CDO του <i>Sphe3</i> για την κατεχόλη μετά από επώαση για 15 και 30 min με διάφορα ιόντα μετάλλων.	139
Πίνακας 3.10. Μεταβολή δραστηριότητας (%) της 1,2-CDO του <i>Sphe3</i> για την κατεχόλη μετά από επώαση με χηλικούς παράγοντες.	140
Πίνακας 3.11. Κινητικές παράμετροι K_m και V_{max} για 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης διαφόρων βακτηριακών στελεχών.	141
Πίνακας 3.12. Δραστηριότητα της 1,2-CDO του <i>Sphe3</i> μετά από αποθήκευση σε διάφορες συνθήκες (θερμοκρασία αποθήκευσης, προσθήκη μέσων συντήρησης) για 2, 7 και 30 ημέρες.	143
Πίνακας 3.13. Χαρακτηριστικά του γονιδίου <i>Asphe3_36590</i> , όπως προκύπτουν από τη βάση δεδομένων JGI/IMG.	146
Πίνακας 3.14. Ενζυμα τα οποία παρουσιάζουν ομολογία με το υπό διερεύνηση ένζυμο, σύμφωνα με την ανάλυση SWISS-MODEL στην πλατφόρμα ExPASy, οι δομές των οποίων αποτελούν μοντέλο πρόβλεψης για την τρισδιάστατη δομή του υπό διερεύνηση ενζύμου.	150
Πίνακας 3.15. Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων FAD στη δραστηριότητα της 3HB4H του <i>Sphe3</i> μετά από επώαση με το καθαρό ένζυμο.	155
Πίνακας 3.16. Δραστηριότητα της 3HB4H του <i>Sphe3</i> ($U \cdot ml^{-1}$).	156
Πίνακας 3.17. Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της 3HB4H του <i>Sphe3</i> ($U \cdot ml^{-1}$).	157
Πίνακας 3.18. Μεταβολή δραστηριότητας (%) της 3HB4H του <i>Sphe3</i> μετά από επώαση για 15 και 30 min, με διάφορα ιόντα μετάλλων.	158
Πίνακας 3.19. Χαρακτηριστικά υδροξυλασών του 3-HBA από διαφορετικά στελέχη.	159
Πίνακας 3.20. Δραστηριότητα της 3HB4H του <i>Sphe3</i> μετά από αποθήκευση σε διάφορες συνθήκες.	161
Πίνακας 3.21. Φωτομετρικοί προσδιορισμοί της δραστηριότητας της 3HB4H σε διάφορα υποστρώματα, μέσω της οξειδωσης του NADH στα 340 nm.	169
Πίνακας 3.22. Γονίδια του <i>Sphe3</i> που πιθανά συμμετέχουν στον καταβολισμό του 3-HBA και επιλέχθηκαν για μεταγραφομική μελέτη.	179
Πίνακας 3.23. Τιμές των επιπέδων μεταγραφής των γονιδίων του <i>Sphe3</i> που εμπλέκονται στον καταβολισμό των 3-HBA και 4-HBA σε σύγκριση με τη γλυκόζη.	181
Πίνακας 4.1. Έλεγχος ενζυμοεξαρτώμενης αντίδρασης με διαφορετικούς όγκους νανοβιοκαταλύτη στην αντίδραση. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).	190

Πίνακας 4.2. Σταθερές εξισώσεων κινητικής της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης μορφής των υπό μελέτη ενζύμων.....	195
Πίνακας 4.3. Τιμές δραστικότητας ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου σε εύρος pH 7-10,5.	197
Πίνακας 4.4. Τιμές δραστικότητας ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου σε εύρος pH 7-10,5.	198
Πίνακας 4.5. Τιμές δραστικότητας ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου σε εύρος pH 7-10,5.	199
Πίνακας 4.6. Τιμές δραστικότητας ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου σε εύρος θερμοκρασιών.	200
Πίνακας 4.7. Τιμές δραστικότητας ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου σε εύρος θερμοκρασιών.	201
Πίνακας 4.8. Τιμές δραστικότητας ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου σε εύρος θερμοκρασιών.	203
Πίνακας 4.9. Τιμές σχετικής δραστικότητας ελεύθερης και ακινητοποιημένης GDO μετά από επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες.....	206
Πίνακας 4.10. Τιμές σχετικής δραστικότητας της ελεύθερης και ακινητοποιημένης 1,2-CDO μετά από επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες.....	209
Πίνακας 4.11. Τιμές σχετικής δραστικότητας ελεύθερης και ακινητοποιημένης 3HB4H μετά από επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες.....	212
Πίνακας 4.12. Τιμές δραστικότητας της ελεύθερης και ακινητοποιημένης GDO κατόπιν αποθήκευσης στους -20 °C για διάστημα ενός μήνα.....	214
Πίνακας 4.13. Τιμές δραστικότητας της ελεύθερης και ακινητοποιημένης 1,2-CDO κατόπιν αποθήκευσης στους -20 °C για διάστημα ενός μήνα.....	215
Πίνακας 4.14. Τιμές δραστικότητας της ελεύθερης και ακινητοποιημένης 3HB4H κατόπιν αποθήκευσης στους -20 °C για διάστημα ενός μήνα.....	215
Πίνακας 4.15. Τιμές σχετικής δραστικότητας του νανοβιοκαταλύτη GDO-Ni ²⁺ -PDA-Fe ₂ O ₄ ανά κύκλο επαναχρησιμοποίησης.....	217
Πίνακας 4.16. Τιμές σχετικής δραστικότητας του νανοβιοκαταλύτη 1,2-CDO-Ni ²⁺ -PDA-Fe ₂ O ₄ ανά κύκλο επαναχρησιμοποίησης.....	218
Πίνακας 4.17. Τιμές σχετικής δραστικότητας του νανοβιοκαταλύτη 3HB4H-Ni ²⁺ -PDA-Fe ₂ O ₄ ανά κύκλο επαναχρησιμοποίησης.....	219
Πίνακας 5.1. Καταλυτική ικανότητα μετατροπής της κατεχόλης (%) των μετασχηματισμένων BL21 στα οποία έχει υπερεκφραστεί η 1,2-CDO του <i>Srhe3</i> , παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων κατεχόλης μετά από επώαση 1h στους 37 °C υπό ανάδευση.	229
Πίνακας 5.2. Προσδιορισμός συγκεντρώσεων κατεχόλης και ccMA στα μετασχηματισμένα BL21 στα οποία έχει υπερεκφραστεί η 1,2-CDO του <i>Srhe3</i> . Στη 1h προστέθηκαν εκ νέου 20 mM κατεχόλης. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 2 επαναλήψεων (±SD, N=2).	231

Λίστα Συντομογραφιών

1,2-CDO	Catechol 1,2-dioxygenase	1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης
2-HBA	2-hydroxybenzoic acid	2-υδροξυβενζοϊκό οξύ
2-HMS	2-hydroxymuconic semialdehyde	2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη
2,3-CDO	Catechol 2,3- dioxygenase	2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης
3-HBA	3-hydroxybenzoic acid	3-υδροξυβενζοϊκό οξύ
3,4-PCD	Protocatechuate 3,4-dioxygenase	3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος
3HB4H	3-hydroxybenzoate 4-hydroxylase	4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος
4,5-PCD	Protocatechuate 4,5-dioxygenase	4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος
4-HBA	4-hydroxybenzoic acid	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ
Amp	Ampicillin	Αμπικιλίνη
BPA	Bisphenol A	Δισφαινόλη Α
D₂O	Deuterium oxide	Βαρύ ύδωρ/οξείδιο του δευτερίου
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
Fe₃O₄	Iron (II, III) oxide	Οξείδια του σιδήρου
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy	Φασματοφωτομετρία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier
FAD	Flavin adenine dinucleotide	Φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
FPMOS	Flavoprotein monooxygenases	Φλαβοπρωτεϊνικές μονοξυγονάσες
GDO	1,2-Gentisate Dioxygenase	1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος
GLB	Gel Loading Buffer	Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης
GO	Graphene oxide	Οξείδιο του γραφενίου
Km	Kanamycin	Καναμυκίνη
KBr	Potassium bromide	Βρωμιούχο κάλιο
LB	Luria Broth/Lysogeny Broth	Πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων
MNPs	Magnetic Nanoparticles	Μαγνητικά Νανοσωματίδια
NAD(P)H	Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)	Νικοτιναμιδο-αδενινο-(φωσφορικό)-δινουκλεοτίδιο
NMR	Nuclear magnetic resonance	Πυρηνικός μαγνητικός Συντονισμός
O.D.	Optical Density	Οπτική πυκνότητα
PAHs	Polycyclic Aromatic	Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες

	Hydrocarbons	
PCA	Protocatechuic acid	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ
PDA	Polydopamine	Πολυντοπαμίνη
PHH	Phenol hydroxylase	Υδροξυλάση της φαινόλης
Rpm	Revolutions per minute	Στροφές ανά λεπτό
SD	Standard Deviation	Τυπική Απόκλιση
dsH₂O	Distilled H ₂ O	Απεσταγμένο H ₂ O
ccMA	<i>cis, cis</i> -mouconic acid	<i>cis, cis</i> -μουκονικό οξύ

Περίληψη

Η σταθερά αυξανόμενη βιομηχανική δραστηριότητα αλλά και η υπέρμετρη αστικοποίηση, αναπόφευκτα οδηγούν στην παραγωγή μεγάλου όγκου αποβλήτων, καθιστώντας την περιβαλλοντική ρύπανση ως ένα από τα κύρια προβλήματα της σύγχρονης εποχής. Ρύποι όπως η φαινόλη και τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, τείνουν να συσσωρεύονται στο περιβάλλον και απειλούν όχι μόνο τα παρακείμενα οικοσυστήματα, αλλά και την ανθρώπινη υγεία.

Μια από τις πιο βιώσιμες προσεγγίσεις για την εξυγίανση των προαναφερθέντων οικοσυστημάτων είναι η απομάκρυνση αυτών των ρύπων με την αξιοποίηση του μεταβολικού μηχανισμού μιας πληθώρας μικροοργανισμών, που αναπτύσσονται στα οικοσυστήματα αυτά χρησιμοποιώντας τους εκάστοτε ρύπους ως πηγές άνθρακα και ενέργειας, μια διαδικασία που ονομάζεται βιοαποδόμηση. Τόσο οι μικροοργανισμοί που επιτελούν διαδικασίες βιοαποδόμησης όσο και τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποδοτικοί βιοκαταλύτες για την απομάκρυνση τέτοιων ρύπων.

Μια από τις μεθόδους που επιστρατεύεται για την ενίσχυση της απόδοσης ενός βιοκαταλύτη είναι η ακινητοποίησή τους σε διάφορα μέσα - παραδοσιακά και πιο σύγχρονα - που προσφέρει σταθερότητα, δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής του και καλύτερο έλεγχο της αντίδρασης.

Το *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, που απομονώθηκε από μια βαριά ρυπασμένη περιοχή της Ηπείρου, είναι ένας μικροοργανισμός που δυνητικά αποτελεί έναν ευέλικτο βιοκαταλύτη καθώς διαθέτει στο γονιδίωμά του τη γενετική πληροφορία για την έκφραση καταβολικών ενζύμων που αναγνωρίζουν και διασπούν ποικιλία αρωματικών ενώσεων.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν, αρχικά, η μελέτη καταβολικών ενζύμων (μονο/διοξυγονασών) του Sphe3, τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποδόμηση αρωματικών ενώσεων με απώτερο στόχο, την ανάπτυξη νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων μέσω της ακινητοποίησης των ενζύμων σε νανοϋλικά.

Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε η πορεία μεταβολισμού της φαινόλης στο Sphe3. Το στέλεχος έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης ως η μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας και μπορεί να μεταβολίσει μέχρι και 1500 mg/L φαινόλης, μέσω της *ortho*-πορείας σχάσης της κατεχόλης, όπως αποδείχθηκε μέσω ταυτοποίησης ενδιάμεσων μεταβολιτών και μεταγραφομικής μελέτης.

Τα κύτταρα Sphe3 ακινητοποιήθηκαν σε αλγινικό νάτριο και ήταν ικανά να καταβολίσουν πλήρως 1000 mg/L φαινόλης σε 192 ώρες, διατήρησαν την ικανότητα αποδόμησης της φαινόλης ακόμη και μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης, ενώ κατέστη εφικτό να επαναχρησιμοποιηθούν για τουλάχιστον πέντε κύκλους διατηρώντας περισσότερο από το 75% της αρχικής ικανότητας καταβολισμού. Τα αποτελέσματα αυτά καθιστούν το στέλεχος Sphe3 καλό υποψήφιο για μελλοντικές εφαρμογές βιοαποδόμησης της φαινόλης.

Για την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών συστημάτων ακινητοποιήθηκαν τα ένζυμα 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης (1,2-CDO), 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (3HB4H), και 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος (GDO) του Sphe3 σε μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου σιδήρου (Fe_2O_4) επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη (PDA) και ενεργοποιημένα με ιόντα νικελίου (Ni^{2+}). Τα ανασυνδυασμένα ένζυμα έφεραν ουρά πολύ-ιστιδίνης, κάτι που επέτρεψε και την απομόνωση του κάθε ενζύμου από το εκάστοτε κυτταρικό εκχύλισμα, ενώ η χρήση των

μαγνητικών νανοσωματιδίων ως φορείς ακινητοποίησης επιτρέπει την εύκολη ανάκτηση του νανοβιοκαταλύτη.

Η ακινητοποίηση της 1,2-CDO οδήγησε στην ανάπτυξη ενός νανοβιοκαταλύτη με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 50 °C και ενισχυμένη ανθεκτικότητα στις θερμοκρασίες 30, 40 και 50 °C. Επιπλέον, μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί μέχρι 7 φορές διατηρώντας τη δραστηρότητά του άνω του 50%. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν το νανοβιοκαταλύτη κατάλληλο για εφαρμογές τόσο στην απορρύπανση, όσο και στη βιομηχανία με στόχο την απομάκρυνση αρωματικών ενώσεων και την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως το *cis*, *cis*-μουκονικό οξύ (ccMA). Το ccMA ταυτοποιήθηκε ως προϊόν της δράσης της 1,2-CDO με την κατεχόλη ως υπόστρωμα μέσω φασματοσκοπίας NMR.

Η συγκεκριμένη ενδιαφέρουσα παρατήρηση οδήγησε στη διερεύνηση της ικανότητας μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) που εκφράζουν την ανασυνδυασμένη 1,2-CDO, να παράγουν ccMA όταν αναπτύσσονται παρουσία κατεχόλης. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε, αποδεικνύοντας ότι το ένζυμο μπορεί να αξιοποιηθεί σε ένα βιοκαταλυτικό σύστημα παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Η ακινητοποίηση της 3HB4H, οδήγησε στην αύξηση της συγγένειας του ενζύμου για το υπόστρωμα 3-HBA και επιπλέον, ο νανοβιοκαταλύτης εμφάνισε ελαφρώς αυξημένη θερμοσταθερότητα κατά την επώασή του στους 30, 40 και 50 °C, σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο. Η ακινητοποίηση φαίνεται να ευνόησε και τη σταθερότητα του ενζύμου κατά την αποθήκευση, αφού παρουσίασε 10-20% αυξημένη δραστηρότητα, σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου, στις 10, 20 και 30 ημέρες αποθήκευσης στους -20 °C. Τέλος, ο νανοβιοκαταλύτης επαναχρησιμοποιήθηκε 3 φορές διατηρώντας τη δραστηρότητα της 3HB4H >40%, ενώ ανιχνεύθηκε δραστηρότητα μέχρι και μετά από 5 κύκλους επαναχρησιμοποίησης. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιήθηκε η ακινητοποίηση μιας 3HB4H και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του αντίστοιχου νανοβιοκαταλύτη. Είναι ακόμη από τις λίγες φορές που το ελεύθερο ένζυμο χαρακτηρίστηκε βιοχημικά, ενώ για πρώτη φορά ταυτοποιείται το πρωτοκατεχοϊκό οξύ ως προϊόν της αντίδρασης με υπόστρωμα 3-HBA, μέσω NMR. Οι πληροφορίες λοιπόν που προκύπτουν σε αυτή την εργασία για τις βέλτιστες συνθήκες δράσης του είναι σαφώς σημαντικές.

Ένα ακόμη ενδιαφέρον και καινοτόμο επίτευγμα της παρούσας εργασίας είναι η χρήση κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) που εκφράζουν την ανασυνδυασμένη 3HB4H για την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της ενζυμικής μετατροπής του 3-HBA σε PCA με την *in-cell* NMR φασματοσκοπία, μέσα στα ζωντανά κύτταρα. Μέσω της διαδικασίας αυτής παρακάμπτονται οι χρονοβόρες και κοστοβόρες διαδικασίες καθαρισμού ενός ενζύμου με σκοπό τη μελέτη των αντιδράσεων που αυτό καταλύει. Επίσης, δίνεται η δυνατότητα μελέτης του εκάστοτε ενζύμου στο φυσιολογικό κυτταρικό περιβάλλον αποκομίζοντας δεδομένα που ανταποκρίνονται περισσότερο στις πραγματικές του ιδιότητες.

Τέλος, η ακινητοποίηση της GDO, ενός εξαιρετικά ασταθούς ενζύμου ως προς τη διατήρηση της δραστηρότητάς του είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της δραστηρότητάς της άνω του 60% μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης του νανοβιοκαταλύτη στους -20 °C. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η επιτυχής ακινητοποίηση της GDO δεν έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία μέχρι τώρα.

Abstract

The steadily increasing industrial activity and excessive urbanization inevitably lead to the release of various pollutants, rendering environmental pollution one of the main problems of the modern era. Pollutants such as phenol and hydroxybenzoic acids tend to accumulate in the environment and threaten not only adjacent ecosystems, but also human health.

Biodegradation is the most sustainable approach for removing such pollutants from the environment. Biodegradation relies on microorganisms, that have the ability to grow in the presence of pollutants and utilize them as sole carbon and energy sources. Microorganisms and their enzymes involved in biodegradation processes can be used as efficient biocatalysts in pollutant removal.

To enhance the performance of a biocatalyst, immobilization methods are employed, which offer stability, reusability and better control of the reaction. *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe 3 isolated from a creosote polluted site in Epirus is a versatile biocatalyst and its' genome harbors genes involved in the degradation of various aromatic compounds.

The present thesis aimed to study Sphe3 catabolic enzymes (mono / dioxygenases), which are able to degrade aromatic compounds and also, develop new biocatalytic systems through enzyme immobilization onto nanomaterials followed by their characterization.

In this context, phenol metabolism in Sphe3 was studied. The strain is capable of efficiently catabolizing up to 1500 mg / L of phenol as the sole source of carbon and energy, mainly via the catechol *ortho*-cleavage route, as indicated by intermediate metabolites' identification and transcriptomic analysis.

The immobilization of Sphe3 cells in alginate seems to protect the cells from the toxic compound, as a complete removal of 1000 mg phenol/L was observed at 192 h, their phenol removal activity was retained even after 30 days of storage and also, alginate-entrapped cells could be reused for five cycles retaining their phenol removal activity over 75%. Considering the reusability and stability of immobilized cells upon storage are crucial coefficients for their applicability in a bioremediation system, *P. phenanthrenivorans* Sphe3 is proved to meet these requirements making it a fine candidate for phenol removal.

To develop the nanobiocatalytic systems the enzymes catechol 1,2-dioxygenase (1,2-CDO), 3-hydroxybenzoic acid 4-hydroxylase (3HB4H) and gentisate 1,2-dioxygenase (GDO) from Sphe3 were immobilized onto nickel-functionalized polydopamine-coated magnetic nanoparticles (Ni^{2+} -PDA-MNPs), achieving at the same time the purification of each enzyme from crude extracts through the His-tag affinity of the recombinant enzyme to the Ni^{2+} -functionalized surface of the carrier. Moreover, the use of MNPs as an immobilization carrier allows the recovery of the nanobiocatalyst simply by applying a magnetic field.

The immobilization of 1,2-CDO led to the development of a nanobiocatalyst with optimal activity at 50 °C and enhanced durability at 30, 40 and 50 °C. In addition, it can be reused up to 7 times maintaining more than 50% of its original activity. These characteristics render the nanobiocatalyst suitable for applications both in bioremediation and in industry aiming at the removal of aromatic compounds and the production of *cis*, *cis*-muconic acid (ccMA),

respectively. *ccMA* was identified as the product of 1,2-CDO when catechol was used as substrate by NMR spectroscopy.

This interesting finding was further investigated by expressing the recombinant Sphe3 1,2-CDO in *E. coli* BL21(DE3) cells and used them for the production of *ccMA*. When transformed *E. coli* BL21(DE3) cells were supplement with catechol, *ccMA* was indeed produced, which proves that the enzyme can be exploited in a biocatalytic system for the production of high added value products.

3HB4H immobilization led to a higher affinity for the substrate 3-hydroxybenzoic acid (3-HBA), while the nanobiocatalyst exhibited slightly increased thermostability when incubated at 30, 40 and 50 °C. The immobilization seems to have also favored the stability of the enzyme upon storage, since it showed 10-20% increased activity compared to the free form of the enzyme at 10, 20 and 30 days of storage at -20 °C. Also, the nanobiocatalyst was reused 3 times maintaining the activity of 3HB4H >40%, while activity was still detected after 5 cycles of reactions. It is of high importance to point out that this is the first time a 3HB4H nanobiocatalyst was developed and biochemically characterized. Moreover, this enzyme has not been biochemically characterized in many microorganisms and the information about 3HB4H from Sphe3 characterization, provided in this work, is clearly important. In addition, this is the first time that protocatechuic acid (PCA) was identified by NMR spectroscopy as the reaction's product when 3-hydroxybenzoic acid (3-HBA) was used as a substrate.

Another interesting and innovative achievement of the present work is the use of *E. coli* BL21(DE3) cells expressing the recombinant Sphe3 3HB4H to monitor in *real-time* the enzymatic conversion of 3-HBA to PCA by *in - cell* NMR spectroscopy, inside living cells. This methodology bypasses the time-consuming and costly procedures of purifying an enzyme in order to study the reactions it catalyzes. Also, it is possible to study the respective enzyme in its natural cellular environment, obtaining more accurate data regarding its real properties.

Last but not least, immobilization of GDO, which is an extremely unstable enzyme unable to retain its activity for long time, resulted in retaining more than 60% of its activity after 30 days of storage at -20 °C. It is important to mention that the successful immobilization of GDO has not been reported again in the literature until now.

Θεωρητικό Μέρος

1

Εισαγωγή στη θεωρία

1.1 Περιβαλλοντική ρύπανση

Η έξαρση της αστικοποίησης και της βιομηχανοποίησης, η αύξηση του καταναλωτισμού με στόχο τη βελτιστοποίηση του βιοτικού επιπέδου, οι μεταφορές και οι γεωργικές πρακτικές αποτελούν ανθρωπογενείς δραστηριότητες που παράγουν μεγάλο όγκο αποβλήτων στο περιβάλλον και καθιστούν την ρύπανση του περιβάλλοντος ένα από τα κύρια προβλήματα της σύγχρονης εποχής (Dvořák et al. 2017; Mishra et al. 2020; A. B. Patel et al. 2020). Οι ρύποι, είτε παράγονται φυσικά είτε τεχνητά, αναφέρονται σε ουσίες που μπορούν να προκαλέσουν περιβαλλοντική ρύπανση όταν υπερβαίνουν τα φυσιολογικά επίπεδα και καταλήγουν να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην ατμόσφαιρα, το νερό ή το έδαφος εάν απορρίπτονται στο περιβάλλον με ρυθμό ταχύτερο από το ρυθμό απομάκρυνσής τους (Padhye 2015; Ravindra, Sokhi, and Van Grieken 2008).

Τα απόβλητα από τις βιομηχανίες συμπεριλαμβανομένων των κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων, του χαρτιού, των πλαστικών, των πετροχημικών, των αγροτικών και των φαρμακευτικών προϊόντων μπορεί να περιέχουν εξαιρετικά τοξικές ουσίες όπως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-PAHs), νιτροαρωματικές ενώσεις, πολυχλωριωμένα διφαινύλια (Polychlorinated Biphenyls-PCBs), το τριχλωροαιθυλένιο (TCE), φθαλικούς εστέρες, τα: βενζόλιο, αιθυλοβενζόλιο, τολουόλιο και ξυλόλιο (Benzene, Toluene, Ethyl benzene, Xylene – BTEX), βαρέα μέταλλα και παρασιτοκτόνα (Okino-Delgado et al. 2019). Αυτοί οι ρύποι είναι εξαιρετικά τοξικοί και καρκινογόνοι από τη φύση τους και οι συσσωρεύσεις αυτών των χημικών ουσιών γίνονται επικίνδυνες για το περιβάλλον και για τη χλωρίδα και την πανίδα που φιλοξενούνται εκεί (Varjani 2017). Η περιβαλλοντική ρύπανση προκαλεί άμεση ζημιά στα οικολογικά συστήματα, όπως η υποβάθμιση των υδάτων, η καταστροφή των δασών και η ερημοποίηση, ή/και έμμεση βλάβη στον άνθρωπο (Sana 2015). Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι τοξικές ουσίες έχουν καταστροφικές συνέπειες για την υγεία και σχετίζονται με μη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου και σωματικές δυσπλασίες, μεταβολικές διαταραχές, ορμονική ανισορροπία κ.λπ., ενώ η μακροχρόνια έκθεση σε αυτές τις τοξικές ουσίες μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές ενδοκρινικές δυσλειτουργίες (Gavrilescu et al. 2015; Gasser et al. 2014).

Συνεπώς, η προστασία του περιβάλλοντος γίνεται όλο και πιο επιτακτική και πρέπει να επιτευχθεί προκειμένου να διασφαλιστούν ασφαλείς και υγιεινές συνθήκες για τη ζωή στη Γη. Δεδομένου ότι η επίτευξη ισορροπίας μεταξύ εκβιομηχάνισης και προστασίας του περιβάλλοντος αποτελεί πρόκληση στις μέρες μας, απαιτούνται μεγάλες προσπάθειες για τον περιορισμό των μελλοντικών εκπομπών ρύπων στο περιβάλλον. Επί του παρόντος, οι ήδη

ρυπασμένες περιοχές ενέχουν τον κίνδυνο εξάπλωσης της ρύπανσης. Ως εκ τούτου, προκειμένου να αποτραπεί η εξάπλωση της ρύπανσης ή να επιτευχθεί η πλήρης αποκατάσταση των ρυπασμένων περιοχών, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι περιβαλλοντικής αποκατάστασης, οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε φυσικές, χημικές και βιολογικές τεχνικές (Ugrina and Jurić 2023; Gan, Lau, and Ng 2009).

Ωστόσο, η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής είναι αρκετά δύσκολη και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση των ρύπων, το λειτουργικό κόστος, η απόδοση, η σκοπιμότητα, η δυνατότητα εφαρμογής καθώς και η τελική επίπτωση στο περιβάλλον. Οι φυσικοχημικές μέθοδοι, όπως στερεοποίηση, διήθηση, αποτέφρωση, χημική οξειδωση και αναγωγή, χημική κατακρήμνιση, φωτοκατάλυση κ. ά., χαρακτηρίζονται από μειωμένη απόδοση, αυξημένο λειτουργικό κόστος, ενώ υπάρχουν περιβαλλοντικοί περιορισμοί και σχηματίζονται ανεπιθύμητα παραπροϊόντα (Mishra et al. 2020; Okino-Delgado et al. 2019). Η βιοαποδόμηση αντιπαρέρχεται τους περιορισμούς που προκύπτουν από τις περισσότερες φυσικοχημικές διεργασίες με την απομάκρυνση πολλών οργανικών ρύπων με μειωμένο κόστος, υπό συνθήκες περιβάλλοντος και ως εκ τούτου έχει γίνει μια δημοφιλής εναλλακτική λύση απομάκρυνσης ρύπων (Tripathi et al. 2021; Bala et al. 2022; Vidali 2001).

1.2 Φαινολικές ενώσεις

Η φαινόλη χρησιμοποιείται συνήθως στην παραγωγή ρητινών, μυκητοκτόνων, συντηρητικών και φαρμακευτικών προϊόντων και είναι απαραίτητη για την κατασκευή συνθετικών ινών και ελαστικών, βαφών και άλλων σημαντικών βιομηχανικών υλικών (Gheni et al. 2018; Sepehr et al. 2019). Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια κατηγορία οργανικών ενώσεων που χαρακτηρίζονται από την παρουσία τουλάχιστον ενός αρωματικού δακτυλίου υποκατεστημένου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια ($-OH$). Τα υδροξύλια αυτά μπορεί να είναι ελεύθερα ή υποκατεστημένα. Οι απλές φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται δομικά από την παρουσία ενός βενζολικού δακτυλίου.

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα παρουσιάζουν δομική ομολογία με τις απλές φαινόλες με το υδροξύλιο να εντοπίζεται σε *ortho*- (*o*), *meta*- (*m*) ή *para*- (*p*) θέση ως προς την καρβοξυλομάδα και αποτελούν το 2, 3 ή 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, αντίστοιχα. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα αποτελούν επίσης περιβαλλοντικούς ρυπαντές λόγω της ευρείας χρήσης τους στην κοσμητική και φαρμακευτική βιομηχανία αλλά και ως συντηρητικά τροφίμων, ενώ παρατηρείται εκτεταμένη συσσώρευσή τους στο περιβάλλον και προκαλούν προβλήματα τόσο στις καλλιέργειες όσο και στην ανθρώπινη υγεία (Prathibha and Sumathi 2008).

Τόσο η φαινόλη όσο και τα υδροξυβενζοϊκά (ή φαινολικά) οξέα συχνά καταλήγουν να συγκεντρώνονται στο περιβάλλον μέσω των αποβλήτων των βιομηχανιών, των ελαιουργείων, αλλά και των διυλιστηρίων χάλυβα και πετρελαίου (Barik et al. 2021; Xu et al. 2021; Gheni et al. 2018; Alkaram, Mukhlis, and Al-Dujaili 2009; Y. Liu et al. 2020). Πολύ συχνά, οι φαινολικές ενώσεις διεισδύουν στο έδαφος και ρυπαίνουν τα παρακείμενα ποτάμια, τις λίμνες, ακόμη και καλλιεργήσιμες εκτάσεις. Η φαινόλη λόγω της υψηλής διαλυτότητάς της στο νερό μπορεί συσσωρεύεται σε υδάτινα περιβάλλοντα και έχει θεωρηθεί ως μια από τις 20 πιο επικίνδυνες χημικές ενώσεις που ενδέχεται να προκαλέσουν μεγάλη οικολογική καταστροφή (Duan et al. 2018). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας οριοθέτησε τη συγκέντρωση της φαινόλης στο πόσιμο νερό σε 1 mg/ml (Nuhoglu and Yalcin 2005) και αποτελεί ρύπο προτεραιότητας και κίνδυνο για την υγεία. Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να εμποδίσουν την ανάπτυξη των φυτών και των ζώων, ενώ η οξεία ή χρόνια έκθεση σε αυτές μπορεί να επηρεάσει

αρνητικά την ανθρώπινη υγεία, με σοβαρές επιπτώσεις στα συστήματα και τις λειτουργίες του σώματος, συμπεριλαμβανομένου του νευρικού, του ανοσοποιητικού και του αναπνευστικού συστήματος, ενώ στα ζωντανά κύτταρα προκαλούν μεταλλαξιγένεση και καρκινογένεση (Dayana Priyadharshini and Bakthavatsalam 2019; Barik et al. 2021).

Δεδομένων των κινδύνων που ενέχει η απελευθέρωση φαινολικών ενώσεων στο περιβάλλον, έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην ανάπτυξη φυσικοχημικών και βιολογικών διεργασιών για την απομάκρυνση αυτών των ενώσεων. Έχουν δοκιμαστεί φυσικοχημικές διεργασίες, όπως η προσρόφηση (Gupta et al. 2014; El-Naas, Alhaija, and Al-Zuhair 2017), η εκχύλιση με διαλύτη (J. Liu et al. 2013) και η ηλεκτροχημική αποτέφρωση (Medel et al. 2012). Ωστόσο, σοβαρά μειονεκτήματα όπως οι απαιτούμενες υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, η χρήση τοξικών χημικών ουσιών, το υπερβολικό κόστος, η αδυναμία πλήρους εξάλειψης των φαινολικών ενώσεων και ενίοτε η δημιουργία δευτερογενών ρύπων μετατόπισαν την προσοχή σε βιολογικές εναλλακτικές λύσεις που ξεπερνούν πολλά από αυτά τα μειονεκτήματα.

Οι φαινολικές ενώσεις όπως η φαινόλη, η χλωροφαινόλη, η νιτροφαινόλη, η αλκυλοφαινόλη και οι κρεζόλες, κ.λπ., αλλά και τα υδροξυβενζοϊκά οξέα μπορούν να αφαιρεθούν αποτελεσματικά από το περιβάλλον από μικροοργανισμούς όπως μύκητες, ζυμομύκητες, μικροφύκη και βακτήρια. Η βιολογική επεξεργασία αυτών των ρύπων είναι πλεονεκτική έναντι άλλων διαθέσιμων μεθόδων αποκατάστασης λόγω της ενεργειακά αποδοτικής, οικονομικής και φιλικής προς το περιβάλλον προσέγγισής τους και της ικανότητάς τους να αποδομούν πλήρως τις φαινολικές ενώσεις σε αβλαβή τελικά προϊόντα (Yi Zhou and Nemat 2018; Barik et al. 2021).

1.3 Βιοαποδόμηση

Η απομάκρυνση των περιβαλλοντικών ρύπων με βιολογικές μεθόδους περιλαμβάνει την αξιοποίηση οργανισμών, όπως φυτά και μικροοργανισμοί για τη μετατροπή των επικίνδυνων οργανικών αποβλήτων, συμπεριλαμβανομένων των ξеноβιοτικών ουσιών σε αβλαβή προϊόντα, συνήθως σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό (Gan, Lau, and Ng 2009; Bamforth and Singleton 2005; Johnsen, Wick, and Harms 2005). Βιοαποδόμηση είναι η μεταβολική διεργασία, η οποία περιλαμβάνει τη διάσπαση μιας οργανικής ένωσης στα ανόργανα συστατικά της (ανοργανοποίηση).

Οι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία, καθώς μετατρέπουν τις οργανικές ενώσεις σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους και λιγότερο πολύπλοκες (βιομετατροπή) με παράλληλη αύξηση της κυτταρικής τους μάζας και τελικά, τις μετατρέπουν σε νερό και διοξείδιο του άνθρακα κατά την αερόβια αποδόμηση, με το οξυγόνο να χρησιμοποιείται ως τελικός δέκτης ηλεκτρονίων και σε μεθάνιο κατά την αναερόβια, με τελικούς δέκτες ηλεκτρονίων ουσίες όπως τα νιτρικά (NO_3^-), τα θειϊκά (SO_4^{2-}) και τα ιόντα σιδήρου (Fe^{3+}) (Haritash and Kaushik 2009; Syed et al. 2021; Gan, Lau, and Ng 2009). Η μικροβιακή βιοαποδόμηση μπορεί να συμβεί και μέσω της διεργασίας του συμμεταβολισμού, κατά την οποία πραγματοποιείται ταυτόχρονη αποδόμηση δύο οργανικών ενώσεων, όπου η αποδόμηση της δεύτερης ένωσης εξαρτάται από την παρουσία της πρώτης, χωρίς να αποτελεί για το μικροοργανισμό πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η διεργασία του συμμεταβολισμού μπορεί να πραγματοποιηθεί υπό αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες (Janke and Fritzsche 1985).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα της βιοαποδόμησης μιας ένωσης είναι τόσο βιοτικοί όσο και αβιοτικοί (Shao-heng Liu et al. 2017):

- οι μικροοργανισμοί: σύσταση πληθυσμών, αλληλεπίδραση μεταξύ πληθυσμών, συγκέντρωση, ενζυμική δραστηριότητα,

- περιβαλλοντικές συνθήκες: σύσταση εδάφους, ιστορικό ρύπανσης, pH, θερμοκρασία, οξυγόνο, επίπεδα αζώτου και φωσφορικών, κατάσταση αερισμού, παρουσία άλλων τοξικών ουσιών, και
- το υπόστρωμα: φυσικοχημικές ιδιότητες, συγκέντρωση, τοξικότητα, βιοδιαθεσιμότητα.

Η παρουσία στο περιβάλλον τόσο φαινολικών ενώσεων, όσο και μονο- και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων αλλά και άλλων αρωματικών ενώσεων προερχόμενων είτε από την αποσύνθεση της βιομάζας, είτε από την εκτεταμένη ρύπανση του περιβάλλοντος, έχει πυροδοτήσει τη γενετική προσαρμογή του μεταβολισμού μικροοργανισμών καθιστώντας τους ικανούς να χρησιμοποιούν τις ενώσεις αυτές ως πηγή άνθρακα και ενέργειας (C. W. Johnson and Beckham 2015).

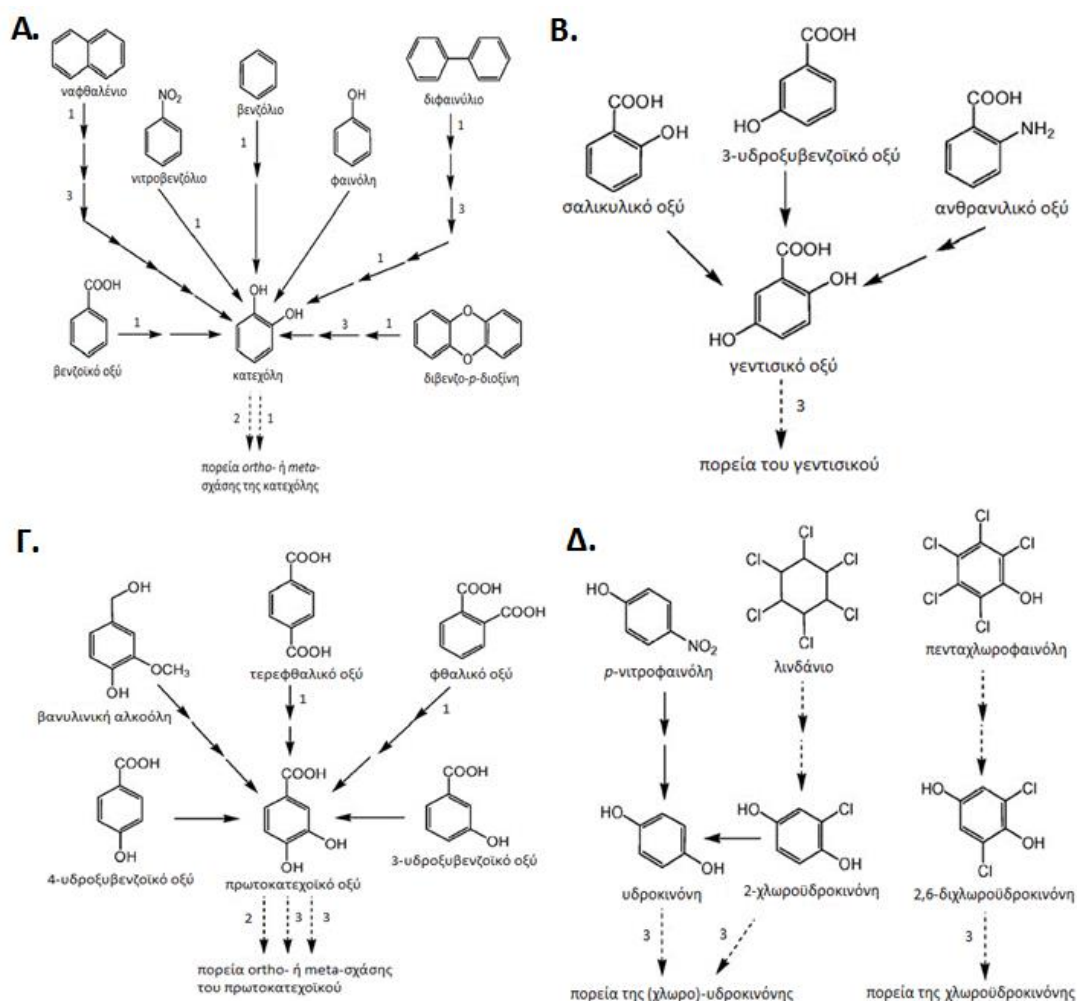
Πληθώρα μικροοργανισμών έχει απομονωθεί και μελετηθεί με την ικανότητα μεταβολισμού φαινολικών ρύπων μεταξύ των οποίων διάφορα βακτηριακά στελέχη που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, and *Ralstonia eutropha* (Panigrahy et al. 2022), ενώ τα πιο αποδοτικά στελέχη ανήκουν στα γένη *Oceanimonas*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* και *Rhodococcus* και έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν φαινολικούς ρύπους μέχρι $1500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (S. Tan et al. 2017; Barik et al. 2021; Wei et al. 2016; N. K. Sahoo, Pakshirajan, and Ghosh 2016; Panigrahy, Barik, and Sahoo 2020).

1.3.1 Αερόβια μικροβιακή αποδόμηση και καταβολικά ένζυμα

Γενικά οι αρωματικοί ρύποι χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα στην βιοαποδόμηση λόγω της εγγενούς θερμοδυναμικής σταθερότητας του φαινολικού δακτυλίου. Ωστόσο ορισμένοι μικροοργανισμοί αναπτύσσουν ένα ευρύ φάσμα καταβολικών ενζυμικών μονοπατιών για τη βιοαποδόμηση των φαινολικών ρύπων.

Η αερόβια μικροβιακή αποδόμηση των ποικίλων αρωματικών ενώσεων έχει μελετηθεί εκτενώς τόσο για την απορρύπανση του περιβάλλοντος όσο και για την αξιοποίησή της στη χημική και φαρμακευτική βιομηχανία. Για παράδειγμα, οι ετερογενείς αρωματικές ενώσεις που προκύπτουν από τον αποπολυμερισμό της λιγνίνης μπορούν στη συνέχεια να αναβαθμιστούν σε υλικά και ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία καθώς και για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Linger et al. 2014).

Κατά κανόνα οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν κάποια χαρακτηριστική καταβολική πορεία για κάθε τύπο αρωματικής ένωσης. Ωστόσο, η αερόβια αποδόμηση των αρωματικών ενώσεων συνήθως διεξάγεται μέσω ενός από τους παρακάτω τέσσερις ενδιάμεσους μεταβολίτες: κατεχόλη, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, γεντισικό οξύ ή υδροκινόνη (Εικόνα 1.1), οι οποίοι προκύπτουν κυρίως από τη δράση ενζύμων οξυγονασών (Vaillancourt, Bolin, and Eltis 2006). Τα κοινά αυτά ενδιάμεσα στη συνέχεια υπόκεινται σε οξυγονολυτική διάσπαση του αρωματικού πυρήνα και τα αλειφατικά προϊόντα που προκύπτουν μεταβολίζονται περαιτέρω μέσω του κεντρικού μεταβολισμού των κυττάρων (Pérez-Pantoja, González, and Pieper 2010)



Εικόνα 1.1. Ενδεικτικές πορείες καταβολισμού αρωματικών ενώσεων που οδηγούν σε έναν από τους τέσσερις ενδιάμεσους μεταβολίτες: **A.** κατεχόλη, **B.** γεντισικό οξύ, **Γ.** πρωτοκατεχοϊκό οξύ και **Δ.** υδροκινόνη. Κάθε βέλος αντιστοιχεί σε ένα βήμα αντίδρασης. Τα διακεκομμένα βέλη αντιστοιχούν σε πολλά βήματα αντίδρασης. Οι αριθμοί υποδεικνύουν τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση. 1: οξυγονάση μη αιμικού σιδήρου τύπου Rieske, 2: ενδοδιολο-διοξυγονάση, 3: εξωδιολο-διοξυγονάση. Προσαρμογή εικόνας από (Vaillancourt et al. 2006).

Οι μικροοργανισμοί διαθέτουν ένζυμα που συμμετέχουν σε μεταβολικές πορείες αποδόμησης των ρύπων για τις ενεργειακές τους ανάγκες μετατρέποντάς τους σε λιγότερο επιβλαβή προϊόντα μέσω των παραπάνω κοινών μεταβολικών ενδιάμεσων. Στις περιπτώσεις που η χρήση ολόκληρων μικροοργανισμών για την απομάκρυνση οργανικών ενώσεων από το περιβάλλον παρεμποδίζεται ή καθίσταται χρονοβόρα (Dangi et al. 2019), η χρήση ενζυμικών παρασκευασμάτων μπορεί να είναι περισσότερο αποδοτική (Okino-Delgado et al. 2019). Η απομάκρυνση των περιβαλλοντικών ρύπων που βασίζεται σε καθαρό ή μερικώς καθαρισμένο ένζυμο δεν εξαρτάται από την ικανότητα ανάπτυξης ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού στο ρυπασμένο περιβάλλον, αλλά από την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου που εκκρίνεται από τον μικροοργανισμό (Rugabber and Talley 2006). Η χρήση ενζύμων έχει προταθεί ως εναλλακτική προσέγγιση λόγω των γρήγορων και πολύ εξειδικευμένων αντιδράσεων με υποστρώματα αρωματικών ενώσεων (S. J. Kim et al. 2012), με τις βακτηριακές μονο/διοξυγονάσεις να αποτελούν τα κύρια ένζυμα που μετέχουν στην αποκατάσταση εδαφών και υδάτων (Kadirvelu et al. 2018). Επιπλέον, σε σύγκριση με τους μικροοργανισμούς, τα ένζυμα είναι πιο εξειδικευμένα για το υπόστρωμά τους, ενώ τα τοξικά παραπροϊόντα που μπορεί να παραχθούν από τα κύτταρα δεν σχηματίζονται κατά την ενζυμική δράση (Sharma, Dangi, and Shukla 2018).

Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον καταβολισμό των αρωματικών ενώσεων συνήθως εντοπίζονται σε συστάδες που απαρτίζονται από τα καταβολικά γονίδια που κωδικεύουν για τα καταβολικά ένζυμα, γονίδια που κωδικεύουν για πρωτεΐνες μεταφορείς υπεύθυνες για την πρόσληψη και μεταφορά των αρωματικών ενώσεων εντός των κυττάρων και ρυθμιστικά γονίδια που ρυθμίζουν την έκφραση των παραπάνω γονιδίων. Καταβολικά γονίδια εντοπίζονται τόσο στα χρωμοσώματα όσο και στα πλασμίδια των μικροοργανισμών. Η παρουσία καταβολικών γονιδίων στα πλασμίδια δίνει στα βακτήρια το πλεονέκτημα της διευκολυνόμενης οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς των γονιδίων αυτών μέσα στον πληθυσμό, με αποτέλεσμα τη γρήγορη προσαρμογή τους παρουσία νέων ξενοβιοτικών ενώσεων στα οικοσυστήματα όπου διαβιούν (Cao, Nagarajan, and Loh 2009).

Τα ένζυμα που εμπλέκονται σε διεργασίες βιοαποδόμησης ανήκουν κυρίως στις κατηγορίες των οξειδοαναγωγασών (οξυγονάσες, λακάσες και υπεροξειδάσες) και των υδρολάσων (λιπάσες, κυτταρινάσες, φωσφοτριεστεράσες) (Sharma, Dangi, and Shukla 2018) (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1. Ένζυμα που συμμετέχουν σε διεργασίες βιοαποδόμησης.

Κατηγορία ενζύμου	Ένζυμα	Λειτουργία	Βιβλιογραφική αναφορά
Οξειδορεδουκτάσες (Οξειδοαναγωγάσες)	Οξυγονάσες (Μονοξυγονάσες και διοξυγονάσες)	Κατάλυση οξείδωσης αρωματικών ενώσεων με την ενσωμάτωση ενός ή δύο ατόμων οξυγόνου καθιστώντας τις ενώσεις επιρρεπείς σε περαιτέρω μετασχηματισμό και ανοργανοποίηση.	(Chakraborty et al. 2014)
	Λακάσες	Cu-εξαρτώμενες οξειδάσες που χρησιμοποιούν ένα μοριακό οξυγόνο ως οξειδωτικό και οξειδώνουν φαινολικούς δακτυλίους προς φαινοξικές ρίζες.	(Shraddha et al. 2011)
	Υπεροξειδάσες	Καταλύουν αντιδράσεις αφυδρογόνωσης διαφόρων υποστρωμάτων χρησιμοποιώντας το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H ₂ O ₂) ως δέκτη ηλεκτρονίων. Με την οξείδωση των οργανικών ενώσεων παράγονται δραστικές ελεύθερες ρίζες.	(Bansal and Kanwar 2013)
Υδρολάσες	Λιπάσες	Διάσπαση της τριγλυκερόλης σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα και χρησιμοποιείται ευρέως για επεξεργασία λυμάτων, διάσπαση	(Mehta, Bodh, and Gupta 2017)

		πολυαρωματικών υδρογονανθράκων κ.λπ.	
	Κυτταρινάσες	Διάσπαση πολύπλοκων κυτταρινικών υλικών σε απλά σάκχαρα και χρησιμοποιούνται συνήθως για την επεξεργασία γεωργικών καταλοίπων, όπως απορρίμματα βαμβακιού ή άχυρα ρυζιού.	(Behera et al. 2017)
	Φωσφοτρίεστεράσες	Υδρόλυση των φωσφοτρίεστερων, των κύριων συστατικών των οργανοφωσφορικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως στα φυτοφάρμακα και προκαλούν σοβαρή δηλητηρίαση και θάνατο.	(Santillan et al. 2016)

Οξειδορεδουκτάσες ή οξειδοαναγωγάσες ονομάζονται τα ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες πραγματοποιείται οξείδωση ενός μορίου-δότη και αναγωγή ενός μορίου-δέκτη. Οι όροι δότης και δέκτης αναφέρονται στη μεταφορά αναγωγικών ισοδυνάμων από το υπόστρωμα-δότη στο δέκτη με οποιαδήποτε μορφή, π.χ. άτομα υδρογόνου, ηλεκτρόνια ή υδρίδια. Τέτοια ένζυμα, συνήθως, χρησιμοποιούν ως δέκτες αναγωγικών ισοδυνάμων διάφορα συνένζυμα (π.χ. NAD^+ , NADP^+), προσθετικές ομάδες (π.χ. FAD), κυτοχρώματα (π.χ. P450), ιόντα σιδήρου (Fe^{3+}), χαλκού (Cu^{2+}) και μοριακό οξυγόνο (Κλώνης 2018).

Οξυγονάση είναι η οξειδορεδουκτάση που καταλύει την εισαγωγή μοριακού οξυγόνου (O_2) είτε σε ένα δότη είτε σε ζεύγος δοτών αναγωγικών ισοδυνάμων. Πιο συγκεκριμένα, όταν και τα δύο άτομα του οξυγόνου εισάγονται στον δότη αναγωγικών ισοδυνάμων, το ένζυμο ονομάζεται διοξυγονάση, ενώ όταν εισάγεται μόνο το ένα άτομο οξυγόνου, ονομάζεται μονοξυγονάση. Στην περίπτωση που το άτομο οξυγόνου εισάγεται ως υδροξύλιο, τότε το ένζυμο ονομάζεται υδροξυλάση.

1.3.1.1 Μονοξυγονάσες

Οι μονοξυγονάσες χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες, στις φλαβινο-εξαρτώμενες (ή φλαβινοπρωτεϊνικές) μονοξυγονάσες και στις P450 μονοξυγονάσες. Οι τελευταίες είναι οξυγονάσες που περιέχουν αίμη και απαντούν σε ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς.

1.3.1.1.1 Φλαβινοπρωτεϊνικές μονοξυγονάσες (FPMOs, Flavoprotein monooxygenases)

Οι φλαβινοπρωτεϊνικές μονοξυγονάσες ανήκουν στις οξειδοαναγωγάσες και χρησιμοποιούν, ως προσθετική ομάδα είτε φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο (FMN) ή φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD), για την ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου. Η διαδικασία αυτή, συνήθως, πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας ενός ενδιάμεσου μεταξύ της ανηγμένης φλαβίνης και του μοριακού οξυγόνου. Ως αποτέλεσμα, ενσωματώνεται ένα άτομο οξυγόνου σε κάποιο

υπόστρωμα, ενώ το δεύτερο ανάγεται σε μόριο νερού. Η ταξινόμηση των φλαβινο-εξαρτώμενων μονοξυγονασών βασίζεται στα δομικά χαρακτηριστικά των ενζύμων, σε κοινά μοτίβα των πρωτεϊνικών τους αλληλουχιών, στους δότες ηλεκτρονίων και στον τύπο της αντίδρασης που επιτελούν και περιλαμβάνει 8 κατηγορίες (van Berkel, Kamerbeek, and Fraaije 2006; Huijbers et al. 2014; Paul et al. 2021).

Στην κατηγορία Α εντάσσονται οι FPMOs που κωδικεύονται από ένα γονίδιο, περιέχουν το χαρακτηριστικό μοτίβο αναδίπλωσης κατά Rossmann με δομή ββα για την πρόσδεση του FAD και χρησιμοποιούν NAD(P)H ως δότη ηλεκτρονίων. Οι μονοξυγονάσες που ανήκουν σε αυτή την ομάδα, εμπλέκονται κυρίως στη μικροβιακή αποδόμηση (πολυ)αρωματικών υδρογονανθράκων και στη βιοσύνθεση φυσικών προϊόντων (Monterisino et al. 2011). Επιπλέον, τα ένζυμα της ομάδας Α δρουν κυρίως ως υδροξυλάσες οξυγονώνοντας ένα ηλεκτρονιακά πλούσιο αρωματικό υπόστρωμα, από το οποίο αποσπάται ένα πρωτόνιο ή κάποια ομάδα και σχηματίζεται ένα υδροξυλιωμένο αρωματικό μόριο ως τελικό προϊόν. Αντιπροσωπευτικό ένζυμο αυτής της κατηγορίας είναι η 3-υδροξυλάση του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (Entsch and Van Berkel 1995), η οποία καταλύει την *ortho*-υδροξυλίωση του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος σε 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (πρωτοκατεχοϊκό οξύ).

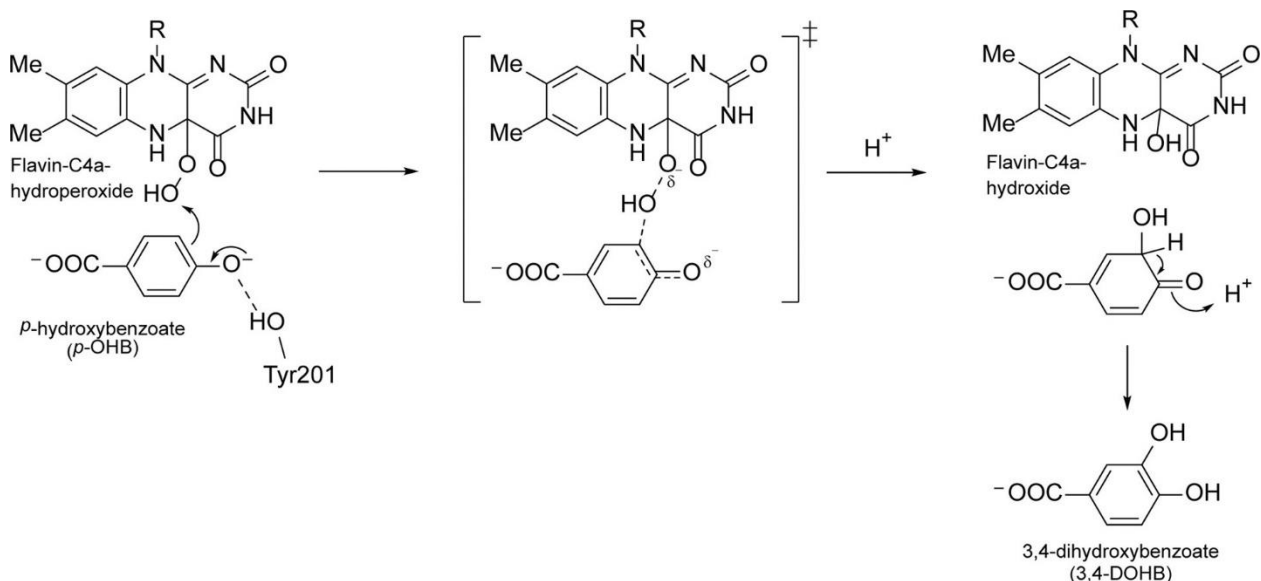
Στην κατηγορία Β ανήκουν οι FPMOs που επίσης κωδικεύονται από ένα γονίδιο, περιέχουν δύο μοτίβα αναδίπλωσης κατά Rossmann με δομή ββα για την πρόσδεση του FAD και του NAD(P)H, αντίστοιχα. Σε αντίθεση με τα ένζυμα της Α ομάδας, αυτές οι μονοξυγονάσες διατηρούν ισχυρά δεσμευμένο το συνένζυμο κατά τη διάρκεια της κατάλυσης, ενώ το υπόστρωμα δεσμεύεται αφού σχηματιστεί η υπεροξειδο-φλαβίνη. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει 4 υποκατηγορίες μονοξυγονασών: τις Baeyer-Villiger μονοξυγονάσες (BVMOs), τις μονοξυγονάσες που περιέχουν φλαβίνη (FMOs), τις μονοξυγονάσες που πραγματοποιούν N-υδροξυλιώσεις (NHMOs) και τις μονοξυγονάσες YUCCAs. Η πρώτη μονοξυγονάση αυτής της κατηγορίας της οποίας διευκρινίστηκε η δομή είναι η μονοξυγονάση της φαινυλακετόνης, η οποία καταλύει την εναντιοεκλεκτική οξειδωση Baeyer-Villiger της φαινυλακετόνης σε οξικό βενζυλεστέρα (Malito et al. 2004).

Η κατηγορία C περιλαμβάνει τις FPMOs που κωδικεύονται από πολλαπλά γονίδια και χρησιμοποιούν FMN ως προσθετική ομάδα. Χαρακτηρίζονται από το μοτίβο αναδίπλωσης βαρελιού TIM και η δράση τους εξαρτάται από μια ρεδοκτάση, η οποία χρησιμοποιεί NAD(P)H ως συνένζυμο, καθώς τα ίδια τα ένζυμα δεν έχουν τη δυνατότητα αναγωγής. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ενζύμου της κατηγορίας C αποτελεί η βακτηριακή λουσιφεράση (Vervoort et al. 1986).

Όσον αφορά στις κατηγορίες D, E και F, οι FPMOs κωδικοποιούνται από δύο γονίδια, ένα για την μονοξυγονάση και ένα για την ρεδοκτάση. Στην κατηγορία D ανήκουν οι FPMOs με παρόμοια δομή αναδίπλωσης της ακυλο-CoA αφυδρογονάσης, οι οποίες χρησιμοποιούν ως προσθετική ομάδα ανηγμένο FMN ή FAD και καταλύουν αρωματικές υδροξυλιώσεις ή N-υδροξυλιώσεις. Το χαρακτηριστικό ένζυμο αυτής της κατηγορίας είναι η 3-υδροξυλάση του 4-υδροξυ-φαινυλ-οξικού οξέος. Οι κατηγορίες E και F περιλαμβάνουν εποξειδάσες και αλογονάσες, αντίστοιχα, ενώ παρουσιάζουν παρόμοια δομή με τις μονοξυγονάσες της κατηγορίας Α, αλλά διαφέρουν στο καρβοξυτελικό άκρο.

Οι κατηγορίες G και H περιλαμβάνουν FPMOs ενός συστατικού. Δεν απαιτούν NAD(P)H και ανάγουν τη φλαβίνη μέσω της οξειδωσης των υποστρωμάτων. Καταλύουν κυρίως αντιδράσεις οξειδωτικής απαμίνωσης και οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης.

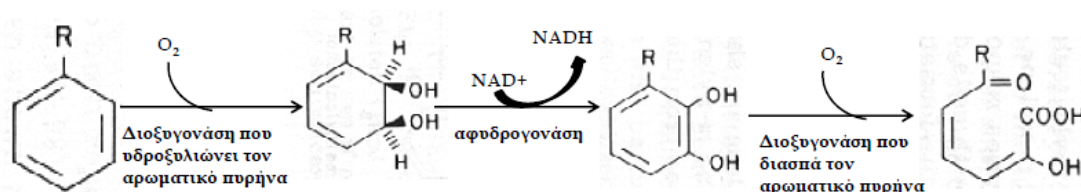
Ο καταλυτικός μηχανισμός δράσης αυτού του τύπου των ενζύμων βασίζεται στην επανοξείδωση της ανηγμένης φλαβίνης και ακολουθεί η περιγραφή του, με το παράδειγμα δράσης της FAD-εξαρτώμενης υδροξυλάσης του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (Εικόνα 1.2). Κατά την έναρξη της αντίδρασης η προσθετική ομάδα FAD βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή ώστε να αντιδράσει με το διοξυγόνο και, τελικά, σχηματίζει δύο ρίζες, σουπεροξειδίο και φλαβινο-ημικινόνη. Ακολουθεί σύζευξη προς σχηματισμό υπεροξειδο-φλαβίνης, η οποία δρα ως ηλεκτρονιόφιλη ένωση και προσβάλλει το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ σε *ορθο*-(*ο*-)θέση ως προς το φαινολικό υδροξύλιο, η οποία θέση είναι η πλέον επιδεκτική. Η υδροξυ-φλαβίνη χάνει το υδροξύλιο και ένα πρωτόνιο και σχηματίζεται οξειδωμένη φλαβίνη. Τελικά, η φλαβίνη ανάγεται εκ νέου σε FADH₂ από υδρίδιο που λαμβάνει ένα πρωτόνιο από το NADPH.



Εικόνα 1.2. Πιθανός καταλυτικός μηχανισμός για την υδροξυλίωση του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (*p*-hydroxybenzoate, *p*-OHB) από την αντίστοιχη υδροξυλάση (*para*-hydroxybenzoate hydroxylase, PHBH) προς σχηματισμό του προϊόντος 3,4-διυδροξυ-βενζοϊκό οξύ (3,4-dihydroxybenzoate, 3,4-DOHB) μέσω της οξείδωσης της ανηγμένης φλαβίνης (Thibodeaux, Chang, and Liu 2019).

1.3.1.2 Διοξυγονάσεις

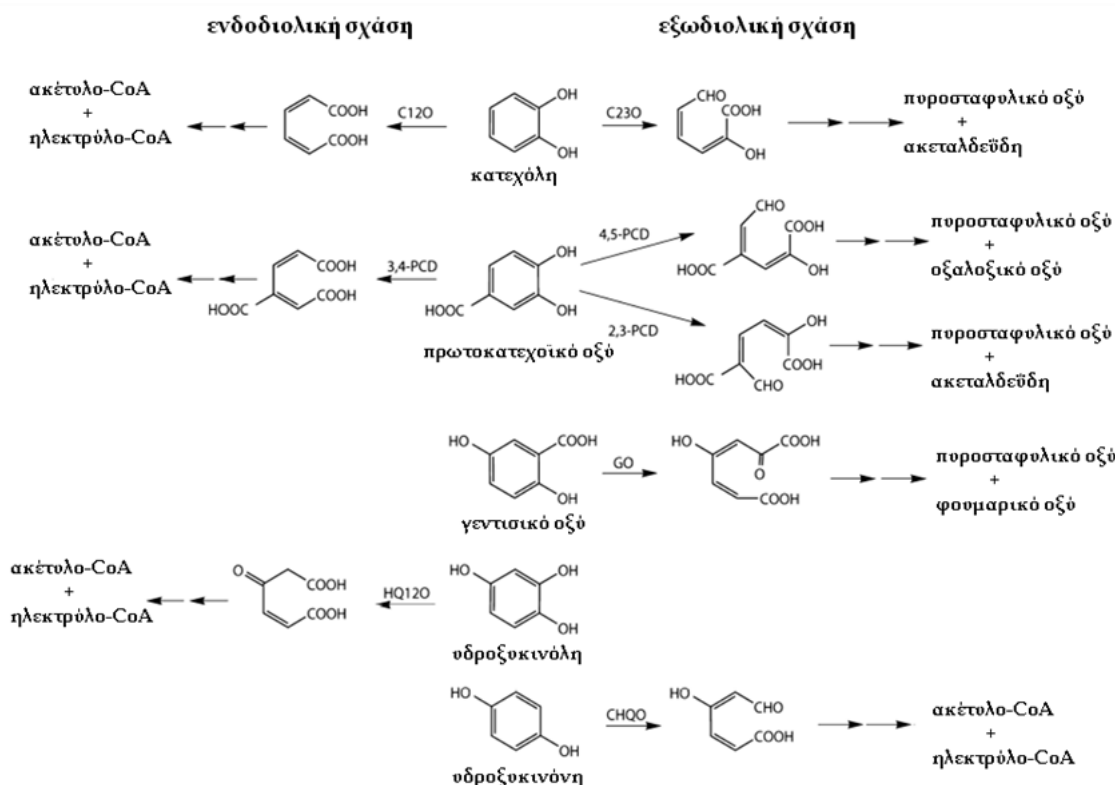
Οι διοξυγονάσεις είναι μεταλλοένζυμα με μη-αιμικό σίδηρο στο ενεργό κέντρο και ονομάζονται διοξυγονάσεις τύπου Rieske μη-αιμικού σιδήρου (Harayama, Kok, and Neidle 1992). Βρίσκουν ευρεία εφαρμογή, τόσο στη βιοαποκατάσταση του περιβάλλοντος όσο και σε βιομηχανικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Nisha, Karthick, and Gobi 2012) χάρη στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν, όπως η ικανότητα οξείδωσης ποικίλων αρωματικών υποστρωμάτων, μη απαίτηση για συμπαραγόντες και μη χρήση του άμεσα διαθέσιμου οξυγόνου ως δέκτη ηλεκτρονίων. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τις διοξυγονάσεις υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα και τις διοξυγονάσεις σχάσης του αρωματικού πυρήνα (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3. Δράση διοξυγονασών κατά την αερόβια αποδόμηση.

Οι διοξυγονάσες υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα εισάγουν και τα δύο άτομα του διοξυγόνου στο ίδιο μόριο υποστρώματος (δότη ηλεκτρονίων) με τη μορφή υδροξυλίων χωρίς να πραγματοποιείται ρήξη του υποστρώματος. Το αρωματικό υπόστρωμα υφίσταται οξειδωτική μετατροπή στην αντίστοιχη κυκλική *cis*-διυδροδιόλη. Οι διοξυγονάσες που επιτελούν αυτή την αντίδραση αναφέρονται και ως διυδροξυλικές διοξυγονάσες (dihydroxylating dioxygenases) και, τυπικά, αποτελούνται από τρεις υπομονάδες (ρεδουκτάσης, φερρεδοξίνης και οξυγονάσης) και η δράση τους απαιτεί NAD(P)H ως αναγωγική πηγή. Δύο ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH στην υπομονάδα ρεδουκτάσης, η οποία φέρει σύμπλοκα FeS (φερρεδοξίνο-ρεδουκτάση) ή ομάδα FAD (φλαβίνο-ρεδουκτάση). Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται με δύο μονο-ηλεκτρονιακές αντιδράσεις στα σύμπλοκα FeS ώστε να παραχθεί η *cis*-διυδροδιόλη. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι διοξυγονάσες του ναφθαλενίου και διφαινυλίου και αρκετές διοξυγονάσες (πολυ)αρωματικών ενώσεων.

Οι διοξυγονάσες σχάσης του αρωματικού πυρήνα πραγματοποιούν ρήξη του δακτυλίου ενός *cis*-διυδροξυ-αρωματικού υποστρώματος. Εάν η ρήξη του δακτυλίου πραγματοποιείται μεταξύ των *cis*-υδροξυλίων, το ένζυμο είναι μια *ενδοδιολο*-διοξυγονάση (*intradiol*-dioxygenase), ενώ αν πραγματοποιείται εξωτερικά των υδροξυλίων, το ένζυμο είναι μια *εξωδιολο*-διοξυγονάση (*extradiol*-dioxygenase) (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4. Διοξυγονάσες σχάσης αρωματικού πυρήνα με διάφορα αρωματικά υποστρώματα.

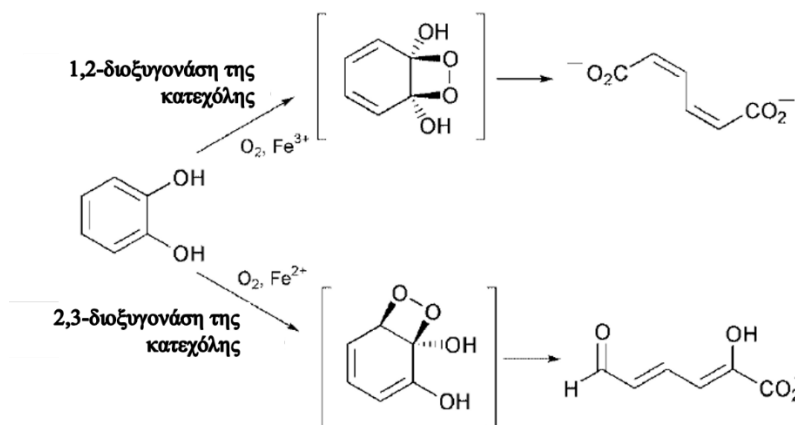
Οι *ενδοδιολο*- και *εξωδιολο*-διοξυγονάσες διαφέρουν επίσης και ως προς την οξειδωτική κατάσταση του μετάλλου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Thacharodi et al. 2023). Οι *ενδοδιολο*-διοξυγονάσες χρησιμοποιούν μη-αιμικό Fe(III) για τη διάσπαση του αρωματικού πυρήνα, η οποία γίνεται στην *ortho*-θέση, δηλαδή μεταξύ των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων του δακτυλίου και σχηματίζονται δικαρβοξυλικά οξέα. Αντιθέτως, οι *εξωδιολο*-διοξυγονάσες χρησιμοποιούν μη-αιμικό Fe(II) για τη διάσπαση του αρωματικού πυρήνα, η οποία γίνεται σε *meta*-θέση, δηλαδή παρακείμενα των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων του δακτυλίου και σχηματίζονται καρβοξυλικά οξέα που φέρουν μια αλδεϋδομάδα (Vaillancourt,

Bolin, and Eltis 2006; Guzik, Hupert-Kocurek, and Wojcieszysk 2013). Υπάρχουν αναφορές για *εξωδιολο*-διοξυγονάσεις που χρησιμοποιούν Mn(II) αντί μη-αιμικού Fe(II) (Que and Reynolds 2000; Hatta et al. 2003; Miyazawa 2004).

Γενικά, οι *εξωδιολο*-διοξυγονάσεις φαίνεται να είναι πιο ευέλικτα ένζυμα ως προς την επιλογή των υποστρωμάτων σε σχέση με τις *ενδοδιολο*-διοξυγονάσεις, που η δράση τους προϋποθέτει την ύπαρξη γειτονικών υδροξυλομάδων. Ίσως η αυξημένη αυτή ευελιξία να οφείλεται στο γεγονός ότι οι *ενδοδιολο*-διοξυγονάσεις χρειάζονται παρακείμενα υδροξύλια για να δράσουν ενώ οι *εξωδιολο*-διοξυγονάσεις δεν υπόκεινται σε αυτή την απαίτηση. Οι *εξωδιολο*-διοξυγονάσεις συμμετέχουν, λοιπόν, σε περισσότερες βιολογικές πορείες, συμπεριλαμβανομένων βιοσυνθετικών πορειών και πορειών καταβολισμού αρωματικών αμινοξέων. Τα υποστρώματα των *εξωδιολο*-διοξυγονασών μπορεί να είναι υδροξυλιωμένα σε *para*-θέση ή/και να περιέχουν μια καρβοξυλομάδα ή αμινομάδα στη θέση της δεύτερης υδροξυλομάδας (Vaillancourt, Bolin, and Eltis 2006). Επιπλέον, οι *εξωδιολο*-διοξυγονάσεις κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες εξελικτικά ανεξάρτητων οικογενειών (Vaillancourt, Bolin, and Eltis 2006):

- **Τύπου I:** Ανήκουν στην υπεροικογένεια πρωτεϊνών που αποτελούν χηλικούς παράγοντες γειτονικών οξυγόνων (vicinal oxygen chelate superfamily, VOC). Περιλαμβάνουν ένζυμα με μια ή με δυο επικράτειες, όπως η 1,2-διοξυγονάση του διϋδροξυδιφαινυλίου.
- **Τύπου II:** Οι διοξυγονάσεις αυτές αποτελούνται από μια ή δύο διαφορετικές υπομονάδες (PCAD-Memo υπεροικογένεια), όπως η διοξυγονάση του γαλλικού και η 4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος.
- **Τύπου III:** Πρόκειται για διοξυγονάσεις που ανήκουν στην *cupin* υπεροικογένεια. Η ομάδα τύπου III περιλαμβάνει ένζυμα με χαρακτηριστική δομή β -βαρελίου, η οποία περιέχει δύο συντηρημένα χαρακτηριστικά μοτίβα. Η δομή β -βαρελίου προκύπτει από έξι αντιπαράλληλα β -πτυχωτά φύλλα, όπου τα δύο πρώτα αποτελούν το πρώτο συντηρημένο μοτίβο και τα δύο τελευταία το δεύτερο. Ένζυμα που ανήκουν στην ομάδα τύπου III των *εξωδιολο*-διοξυγονασών είναι η διοξυγονάση του γεντισικού οξέος και η διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος.

Παρά τις διαφορές τους, οι *ενδοδιολο*- και οι *εξωδιολο*-διοξυγονάσεις φαίνεται να μοιράζονται έναν κοινό, σε γενικές γραμμές, καταλυτικό μηχανισμό. Ακολουθεί η περιγραφή του μηχανισμού κατάλυσης με υπόστρωμα την αρωματική ένωση της κατεχόλης (Εικόνα 1.5). Ο μηχανισμός διάσπασης ενός *cis*-διυδροξυλιωμένου δακτυλίου περιλαμβάνει τη δέσμευση του διοξυγόνου στον ανηγμένο σίδηρο του ενζύμου που προσβάλλει τον άνθρακα του ενός αρωματικού υδροξυλίου, σχηματίζοντας ανιόν υπεροξειδο-κατεχόλης, το οποίο οδηγεί σε ρήξη και αναδιάταξη του δακτυλίου, σχηματίζοντας είτε δικαρβοξυλικό προϊόν (*ενδοδιολο*-ρήξη) είτε προϊόν με καρβοξυλική και αλδεϋδική ομάδα (*εξωδιολο*-ρήξη). Η *εξωδιολο*-ρήξη μπορεί να ακολουθεί και διαφορετικές πορείες σχηματισμού προϊόντων, με βάση τη θέση του υπό ρήξη δεσμού στο υπόστρωμα (Κλώνης 2018).

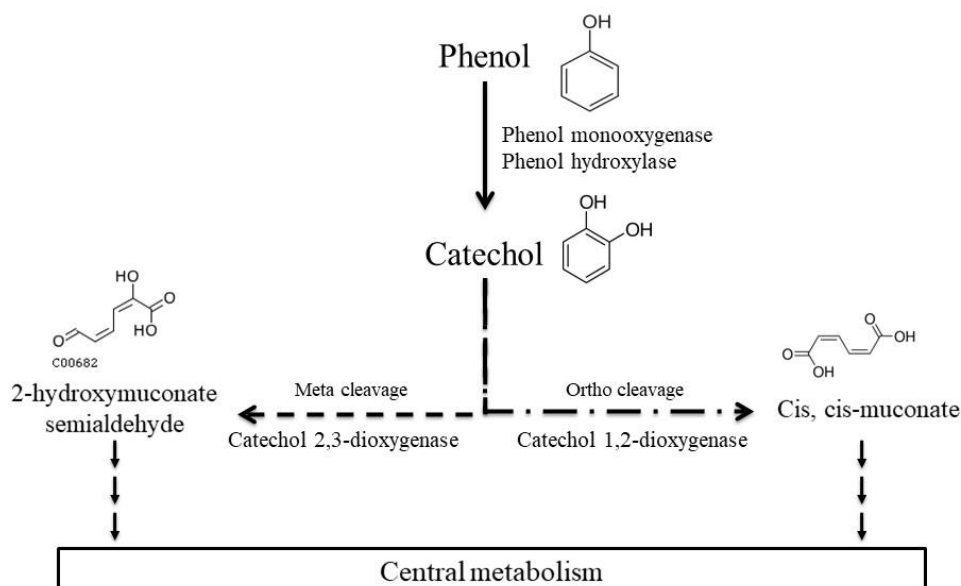


Εικόνα 1.5. Καταλυτικός μηχανισμός διάσπασης του *cis*-διυδροξυλιωμένου δακτυλίου της κατεχόλης από το ένζυμο διοξυγονάση της κατεχόλης. Η δραστηριότητα της ενδοδιολο-διοξυγονάσης περιγράφεται από τη δράση της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης, ενώ αυτή της εξωδιολο-διοξυγονάσης περιγράφεται από τη δράση της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης. Προσαρμογή εικόνας από (T. D. H. H. Bugg and Lin 2001).

1.3.2 Πορεία καταβολισμού φαινόλης

Υπό αερόβιες συνθήκες, η διάσπαση της φαινόλης πραγματοποιείται μέσω του σχηματισμού της κατεχόλης, η οποία προκύπτει από τη δράση της υδροξυλάσης της φαινόλης. Η κατεχόλη είναι ένας γενικός μεταβολίτης που σχηματίζεται από την ενζυμική δράση των υδροξυλασών πριν από τη σχάση του δακτυλίου των φαινολικών ενώσεων, η οποία πραγματοποιείται με την αξιοποίηση του μοριακού οξυγόνου. Συγκεκριμένα, ο αρωματικός δακτύλιος της κατεχόλης υπόκειται είτε σε *ortho*-σχάση με τη δράση της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης, είτε σε *meta*-σχάση με τη δράση της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης (Εικόνα 1.6) (A. Patel et al. 2017; Roell et al. 2019; Filipowicz et al. 2020). Η πορεία καταβολισμού μέσω της *ortho*- ή της *meta*-σχάσης εξαρτάται όχι μόνο από τον τύπο του υποστρώματος, αλλά και από τη συγκέντρωσή του στον μικροοργανισμό. Για παράδειγμα, στο στέλεχος *Pseudomonas putida* σε χαμηλές συγκεντρώσεις βενζοϊκού οξέος ($200\text{--}300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) η κατεχόλη υπόκειται σε *ortho*-σχάση, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος πραγματοποιούνται και οι δύο σχάσεις (A. Patel et al. 2017).

Όσον αφορά στις υδροξυλάσεις της φαινόλης, είναι φλαβινο-εξαρτώμενες μονοξυγονάσες που αξιοποιούν το NAD(P)H ως δότη ηλεκτρονίων για να ενεργοποιήσουν το οξυγόνο και να το εισάγουν στο υπόστρωμα μέσω του ενδιάμεσου της υπεροξειδο-φλαβίνης (Moonen et al. 2002). Μέχρι τώρα, έχουν αναγνωριστεί τρεις τύποι υδροξυλασών της φαινόλης: ενός συστατικού (single-component) (Kukor and Olsen 1992; I. C. Kim and Oriel 1995; Kalin et al. 1992; Putrinš et al. 2007), δύο συστατικών (two-components) (Kirchner et al. 2003; Omokoko et al. 2008) ή πολλών συστατικών (multi-component) (Arai et al. 1998; Nordlund, Powlowski, and Shingler 1990; Ehrt, Schirmer, and Hillen 1995).



Εικόνα 1.6. Βιοαποδόμηση της φαινόλης μέσω της κατεχόλης με τη δράση της υδροξυλάσης της φαινόλης (phenol monooxygenase/hydroxylase) και περαιτέρω καταβολισμός της κατεχόλης, είτε μέσω meta-σχάσης προς 2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη με τη δράση της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης, είτε μέσω ortho-σχάσης προς cis, cis-μουκονικό οξύ με τη δράση της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης (Lallement et al. 2018).

1.3.3 Πορεία καταβολισμού υδροξυβενζοϊκών οξέων

Έχουν αναφερθεί διάφοροι μικροοργανισμοί και είδη, όπως *Streptomyces* και *Pseudomonas* που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα υδροξυβενζοϊκά οξέα ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας (Prathibha and Sumathi 2008).

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα υφίστανται μια υδροξυλίωση του αρωματικού τους δακτυλίου από μονοξυγονάσες (ή υδροξυλάσες) προς κοινά μεταβολικά ενδιάμεσα όπως το PCA, το γεντισικό και η κατεχόλη, και ανάλογα με τον μικροοργανισμό ακολουθούνται διαφορετικά μονοπάτια για τον καταβολισμό των ενδιάμεσων αυτών μεταβολιτών (Westphal, Tischler, and van Berkel 2021; Romero-Silva et al. 2013).

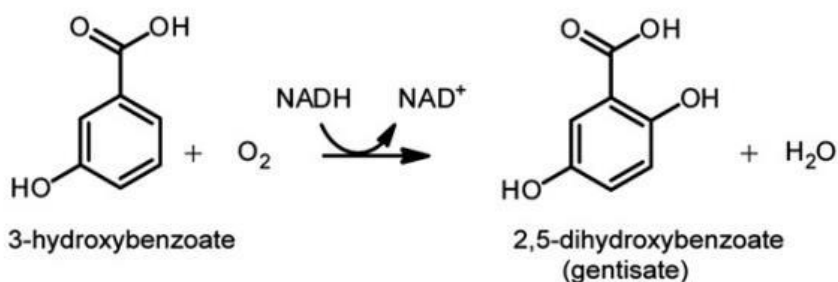
1.3.3.1 2-υδροξυβενζοϊκό οξύ

Η πορεία καταβολισμού του 2-υδροξυβενζοϊκού οξέος (2-HBA, σαλικυλικό οξύ) πραγματοποιείται είτε μέσω της κατεχόλης, είτε μέσω του γεντισικού οξέος, με τη δράση της υδροξυλάσης του σαλικυλικού οξέος ή της 5-υδροξυλάσης του σαλικυλικού οξέος αντίστοιχα, ανάλογα τον μικροοργανισμό (Ishiyama, Vujaklija, and Davies 2004). Η πορεία καταβολισμού του 2-HBA μέσω του γεντισικού οξέος είναι πιο σπάνια σε σχέση με αυτήν μέσω της κατεχόλης, ενώ υπάρχουν και αναφορές για την παρουσία και των δύο μονοπατιών μεταβολισμού του 2-HBA σε στελέχη του γένους *Streptomyces* (Grund, Knorr, and Eichenlaub 1990). Οι μύκητες μεταβολίζουν το 2-HBA μέσω πυροκατεχοϊκού οξέος, ενώ στο στέλεχος *Pseudaminobacter salicylatoxidans* BN12 παρατηρήθηκε μια απευθείας σχάση του σαλικυλικού μέσω μιας αντίδρασης 1,2-σχάσης του δακτυλίου, προς 2-οξο-3,5-διενεδιοϊκό οξύ (Hintner et al. 2001)

1.3.3.2 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ

Το 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ (3-HBA, *m*-υδροξυβενζοϊκό οξύ) καταβολίζεται κυρίως μέσω της οδού του γεντισικού οξέος και, σπανιότερα, μέσω του PCA. Πιο συγκεκριμένα, το 3-HBA μετατρέπεται σε γεντισικό οξύ μέσω της 6-υδροξυλάσης του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (3HB6H), που καταλύει την υδροξυλίωση του σε *para*-θέση ως προς το υδροξύλιο (X. Chen et

al. 2018). Η 3HB6H είναι ένα διμερές, που ανήκει στην οικογένεια των φλαβινο-εξαρτώμενων μονοξυγονασών και η αντίδραση που καταλύει χαρακτηρίζεται από δύο επιμέρους ημιαντιδράσεις οξειδωσης και αναγωγής του φλαβινοειδούς συμπαράγοντα. Σε γενικές γραμμές, το υπόστρωμα 3-HBA προσδένεται στο ένζυμο και ακολουθεί η πρόσδεση του NADH το οποίο και ανάγει τον συμπαράγοντα FAD προς FADH. Το NAD⁺ απελευθερώνεται και μέσω του FADH πραγματοποιείται η υδροξυλίωση του 3-HBA προς γεντισικό (Εικόνα 1.7) (MonTERSINO and Van Berkel 2012).

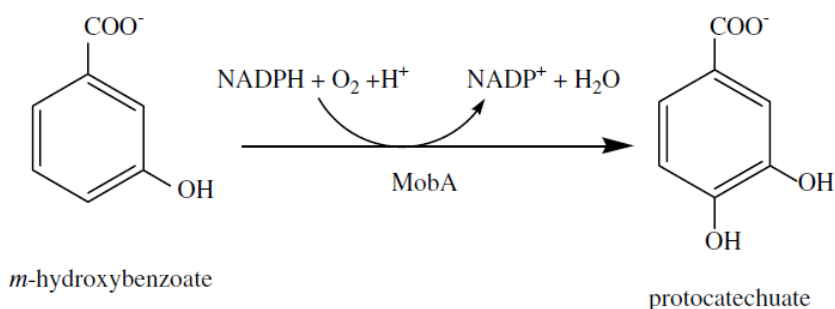


Εικόνα 1.7. Υδροξυλίωση του 3-HBA από την 3HB6H σε para-θέση ως προς το υδροξύλιο, προς σχηματισμό του γεντισικού οξέος (MonTERSINO & Van Berkel, 2012).

Στη συνέχεια, το γεντισικό οξύ υφίσταται περαιτέρω σχάση προς μηλοπυροσταφυλικό οξύ ώστε να εισέρθει στον βασικό μεταβολισμό του κυττάρου.

Έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί 3HB6H από διάφορα βακτηριακά στελέχη, όπως *Burkholderia cepacia* (L. H. Wang et al. 1987), *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Y.-F. Yang et al. 2010), *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 (Park et al. 2007), *Rhodococcus jostii* RHA1 (MonTERSINO and Van Berkel 2012), *Micrococcus* sp. (Rajasekharan, Rajasekharan, and Vaidyanathan 1990), *Klebsiella pneumoniae* M5a1 (Suarez et al. 1995), *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867 (Gao et al. 2005) και από το αλόφιλο *Martelella* sp AD-3 (X. Chen et al. 2018).

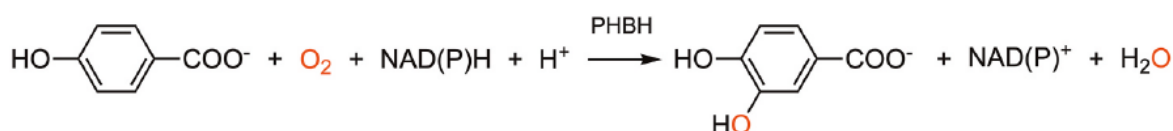
Επιπλέον, το 3-HBA μπορεί να μεταβολιστεί και μέσω σχηματισμού του PCA, όπου μια 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (3HB4H) καταλύει την υδροξυλίωση του σε *ortho*-θέση ως προς το υδροξύλιο, προς PCA (Εικόνα 1.8). Η πορεία αυτή φαίνεται να είναι αρκετά πιο σπάνια, καθώς μέχρι στιγμής έχει μελετηθεί μόνο η 3HB4H από το στέλεχος *Comamonas testosteroni* (Michalover and Ribbons 1973; Hiromoto et al. 2006). Αυτές οι υδροξυλάσες φέρουν μεγάλη αμινοξική ομολογία με τις υδροξυλάσες της φαινόλης και του 4-HBA (Michalover and Ribbons 1973; Hiromoto et al. 2006; Chang and Zylstra 2008).



Εικόνα 1.8. Υδροξυλίωση του 3-HBA από την 3HB4H (MobA) σε ortho-θέση ως προς το υδροξύλιο, προς σχηματισμό του PCA στο στέλεχος *Comamonas testosteroni*. (Chang & Zylstra, 2008).

1.3.3.3 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ

Το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (4-HBA, *p*-υδροξυβενζοϊκό οξύ) συνηθέστερα καταβολίζεται μέσω PCA (Εικόνα 1.9). Η υδροξυλίωση του 4-HBA προς PCA καταλύεται από την 3-υδροξυλάση του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (4HB3H), η οποία ανήκει στην τάξη Α φλαβινο-εξαρτώμενων μονοξυγονασών, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Η 4HB3H καταλύει την υδροξυλίωση του σε *ortho*-θέση ως προς το υδροξύλιο, προς PCA.



Εικόνα 1.9. Υδροξυλίωση του 4-HBA από την 4HB3H σε *ortho*-θέση ως προς το υδροξύλιο, προς σχηματισμό του PCA (Westphal, Tischler, and van Berkel 2021).

Αυτά τα ένζυμα απαντώνται συνηθέστερα στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων και αρκετά πιο σπάνια (10%) στο φύλο των Ακτινοβακτηρίων. Ελάχιστες τέτοιες υδροξυλάσες απαντώνται σε άλλες επικράτειες οργανισμών (Westphal et al. 2018). Φυλογενετική ανάλυση των υδροξυλασών που περιέχουν FAD και είναι εξαρτώμενες από τον αναγωγικό παράγοντα NAD(P)H έδειξε ότι οι βακτηριακές 4HB3H έχουν μεγάλη εξελικτική απόσταση από τα αντίστοιχα ένζυμα που απαντώνται στις ζύμες, τα οποία βρίσκονται αρκετά κοντά εξελικτικά με άλλες *ortho*-υδροξυλάσες όπως η υδροξυλάση της φαινόλης (PHHY) του *Trichosporon cutaneum*, η υδροξυλάση της υδροκινόνης (HQH) του *C. parapsilosis* αλλά και η 3HB4H του *C. testosteroni* στην οποία έγινε αναφορά προηγουμένως (Westphal, Tischler, and van Berkel 2021).

1.4 Βιοκατάλυση

Η βιοκατάλυση περιλαμβάνει τη χρήση των καταλυτών της φύσης, κύτταρα ή ένζυμα, σε ελεύθερη ή ακινητοποιημένη μορφή, με σκοπό την παραγωγή μορίων που παρασκευάζονται, συνήθως, μέσω χημικών αντιδράσεων. Αυτό το ερευνητικό πεδίο αναπτύχθηκε γρήγορα και γνώρισε τρία διαφορετικά κύματα, προχωρώντας από τη χρήση ακατέργαστου κυτταρικού εκχυλίσματος σε καθαρισμένα ένζυμα και στη συνέχεια σε συστήματα ανασυνδυασμένων ενζύμων (Yi et al. 2021).

Το πρώτο κύμα βιοκατάλυσης ξεκίνησε περισσότερο από έναν αιώνα πριν, όταν οι επιστήμονες συνειδητοποίησαν ότι κάποια συστατικά ζωντανών κυττάρων -τα οποία σήμερα γνωρίζουμε ως ένζυμα- μπορούσαν να πραγματοποιήσουν σημαντικές χημικές μετατροπές. Ωστόσο, υπήρχαν κάποια ζητήματα σε αυτές τις διεργασίες, όπως η περιορισμένη διαθεσιμότητα και η χαμηλή σταθερότητα των βιοκαταλυτών. Αυτά τα ζητήματα αντιμετωπίστηκαν με επιτυχία με κλασικές μεθόδους επιλογής των μικροοργανισμών και των ενζύμων, αλλά και ακινητοποίησης των βιοκαταλυτών, που διευκόλυνε την επαναχρησιμοποίησή τους, ενίσχυσε τη σταθερότητα και μείωσε το κόστος χρήσης τους. Κατά το δεύτερο κύμα βιοκατάλυσης, πριν το τέλος του 20^{ου} αιώνα, η μελέτη των ενζύμων και των υποστρωμάτων και η απαρχή της χρήσης τεχνολογιών πρωτεϊνικής μηχανικής - συμπεριλαμβανομένων των χημικών τροποποιήσεων και της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης - επέτρεψαν την δημιουργία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών και τη χρήση ακόμη και μη φυσικών ενώσεων ως υποστρώματα των ενζύμων. Δημιουργήθηκαν έτσι εξελιγμένα ένζυμα που εισήγαγαν τη βιοκατάλυση στον τομέα των

φαρμακευτικών προϊόντων και της παραγωγής χημικών ενώσεων. Το τρίτο κύμα βιοκατάλυσης ξεκίνησε προς το τέλος του 20^{ου} αιώνα, με την εφαρμογή των προηγμένων μεθόδων μοριακής βιολογίας για την *in vitro* τροποποίηση των βιοκαταλυτών μέσω της κατευθυνόμενη εξέλιξης, τον έλεγχο των ήδη υπάρχοντων μεταβολικών μονοπατιών ή τη δημιουργία νέων συνθετικών (Poppe and Vértessy 2018).

Πλέον, βρίσκεται σε εξέλιξη το τέταρτο κύμα βιοκατάλυσης, το οποίο χαρακτηρίζεται από προηγμένα εργαλεία μοριακής γενετικής, μεταγονιδιωματικής και βιοπληροφορικής, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά για την ανακάλυψη νέων ενζύμων, βιοκαταλυτικών αντιδράσεων και ενζυμικών συνθετικών μονοπατιών. Η μηχανική μάθηση (Machine Learning, ML), η οποία έχει εισέλθει πρόσφατα στην εποχή της βαθιάς μάθησης (Deep Learning), διεύρυνε τη νοημοσύνη της ανάλυσης δεδομένων και την κατασκευή δικτύων στην επεξεργασία μεγάλου όγκου δεδομένων και επέκτεινε την εφαρμογή τους στη γονιδιωματική, την πρωτεομική και τη μεταβολομική. Επιπλέον, η ML μπορεί κατευθύνει τον ορθολογικό σχεδιασμό και την πρωτεϊνική μηχανική για τη δημιουργία τεχνητά εξελιγμένων ενζύμων (K. K. Yang, Wu, and Arnold 2019; Qu et al. 2020).

Η βιοκατάλυση έχει, πλέον, καθιερωθεί τόσο σε μεγάλη κλίμακα, όπως στη βιομηχανική παραγωγή, αλλά και σε μικρότερη, όπως στη σύνθεση μορίων για ερευνητικούς σκοπούς. Σε επίπεδο βιομηχανικών διεργασιών εφαρμόζεται για τη σύνθεση χημικών ενώσεων και αντιδραστηρίων υψηλής καθαρότητας, για την παραγωγή φαρμακευτικών ενώσεων, τροφίμων, καλλυντικών κ.ά. Ωστόσο, υπάρχει ακόμα ερευνητικό έδαφος που πρέπει να καλυφθεί, όπως η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός νέων ενζύμων, η μελέτη του εύρους αναγνώρισης εναλλακτικών (φυσικών και μη) υποστρωμάτων από υπάρχοντες βιοκαταλύτες ή η ανάπτυξη μεθόδων ακινητοποίησης των βιοκαταλυτών για τη βελτιστοποίηση της απόδοσής τους υπό τις επιθυμητές συνθήκες.

1.4.1 Ακίνητοποίηση βιοκαταλυτών

Η βιοκατάλυση έχει γίνει ευρέως αποδεκτή σε διάφορους οικονομικούς τομείς, λόγω της εξειδίκευσης του υποστρώματος και των χαρακτηριστικών της πράσινης χημείας με τα οποία οι αντιδράσεις μετατροπής πραγματοποιούνται υπό ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας, πίεσης και pH (Datta, Christena, and Rajaram 2013). Αποτελεί μια ενεργειακά αποδοτική και βιώσιμη τεχνική που παράγει ελάχιστα απόβλητα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ποικίλες επιστημονικές και βιομηχανικές εφαρμογές. Ωστόσο, η χρήση της βιοκατάλυσης υπόκειται στους περιορισμούς του μεγάλου χρόνου λειτουργίας των βιομηχανικών διεργασιών, της σταθερότητας, της δύσκολης ανάκτησης και της επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη. Αυτά τα προβλήματα μπορούν να ξεπεραστούν μέσω της τεχνικής της ακινητοποίησης (Sheldon and van Pelt 2013).

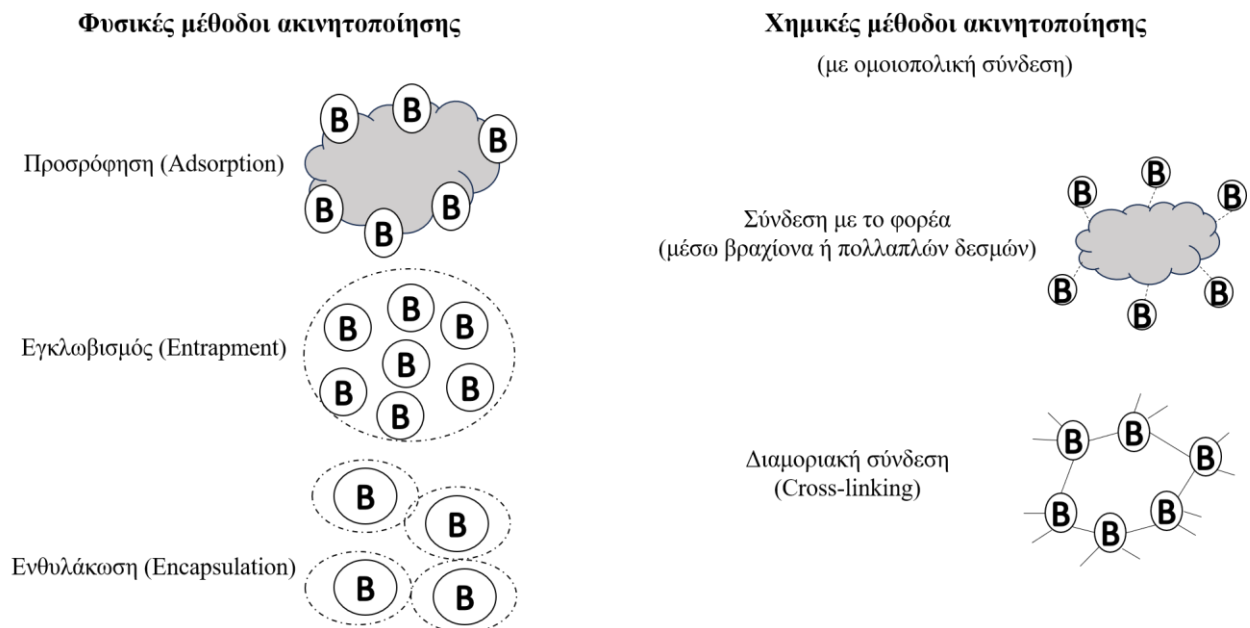
Ως ακινητοποίηση (immobilization) ενός βιοκαταλύτη (ενζύμου, πολυενζυμικού συστήματος, κυττάρου) ορίζεται ο περιορισμός του σε μια τεχνητή στερεά φάση, ώστε το βιοκαταλυτικό σύστημα να παραμένει καταλυτικά ενεργό και σταθερό και να μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί. Η ακινητοποίηση γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπεται η αμφίδρομη μεταφορά μάζας (π.χ. υποστρώματος, προϊόντος, οξυγόνου) μεταξύ του βιοκαταλύτη (στερεά φάση) και της υγρής φάσης. Τα πλεονεκτήματα των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών περιλαμβάνουν την επαναχρησιμοποίηση, τη σταθεροποίηση, τον εύκολο έλεγχο της αντίδρασης με προσθήκη ή αφαίρεση του βιοκαταλύτη και την εύκολη ανάκτηση προϊόντων με απλούστερη διεργασία καθαρισμού τους.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη βιοκαταλυτών είναι ο τύπος της αντίδρασης που θα πραγματοποιηθεί (αν η αντίδραση γίνεται με ένζυμα ευαίσθητα σε οξυγόνο καλύτερα να διεξάγεται εντός κυττάρου, αν η αντίδραση διεξάγεται σε ένα βήμα ή αποτελείται από διαδοχικές αντιδράσεις), η ανακύκλωση του συμπαραγόντα, η κλίμακα της αντίδρασης (ποσότητα καθαρού ενζύμου, όγκος αντίδρασης με ολόκληρα κύτταρα) και το κόστος της ανάπτυξης του βιοκαταλύτη.

Η ακινητοποίηση των ενζύμων σε διάφορους φορείς μπορεί να βελτιώσει τη σταθερότητά τους έναντι μετουσιωτικών παραγόντων, ενώ τα ακινητοποιημένα ένζυμα μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν και ο διαχωρισμός τους από το προϊόν της αντίδρασης καθίσταται πιο εύκολος, μειώνοντας έτσι το κόστος της ανάκτησής τους (Kalogeris et al. 2006; Mohamad et al. 2015).

Μια γενική διαδικασία ακινητοποίησης, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί αξιόπιστα για όλα τα ένζυμα με προβλέψιμο αποτέλεσμα, δυστυχώς δεν είναι διαθέσιμη. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι για να είναι επιτυχής η διαδικασία, πρέπει να υπάρχει ευνοϊκή αλληλεπίδραση μεταξύ του φορέα και του ενζύμου. Και τα δύο πρέπει να είναι σταθερά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ακινητοποίησης (ο φορέας πρέπει να είναι ιδιαίτερα σταθερός, τόσο χημικά όσο και μηχανικά) και πρέπει να έχουν μεγάλη επιφάνεια διαθέσιμη για αλληλεπίδραση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση πολύ μικρών σωματιδίων ή πολύ πορώδους υλικού (με διάσταση πόρων κατάλληλη για την αποφυγή φαινομένων διάχυσης). Μια άλλη πιθανότητα είναι ο φορέας να ενθυλακώσει το ένζυμο. Η ακινητοποίηση των βιοκαταλυτών σε φορείς επιτυγχάνεται με χημικές και φυσικές μεθόδους ή με συνδυασμό αυτών (Romero-Fernández and Paradisi 2019). Κάθε μέθοδος έχει διαφορετικές παραλλαγές, ωστόσο μια συμβατική ταξινόμηση περιγράφεται στην Εικόνα 1.10.

Μέθοδοι ακινητοποίησης



Εικόνα 1.10. Σχηματική ταξινόμηση των μεθόδων ακινητοποίησης βιοκαταλυτών.

Στις φυσικές μεθόδους ακινητοποίησης, ο βιοκαταλύτης προσροφάται στην επιφάνεια του φορέα, εγκλωβίζεται σε μη υδατοδιαλυτές πηκτές πολυμερών, ενθυλακώνεται σε ημιπερατές μεμβράνες ή κάψουλες, ή περιορίζεται σε λιποσώματα. Από την άλλη, οι χημικές μέθοδοι

περιλαμβάνουν τη σύνδεση μέσω ομοιοπολικών δεσμών είτε του φορέα με το βιοκαταλύτη, είτε μεταξύ των μορίων του βιοκαταλύτη (Romero-Fernández and Paradisi 2019).

Επιπλέον, η μέθοδος της ακινητοποίησης ενζύμων μέσω αντιδράσεων συγγένειας κερδίζει συνεχώς έδαφος στη βιοκατάλυση χωρίς κύτταρα (cell-free biocatalysis) καθώς είναι μια ήπια και ευέλικτη προσέγγιση. Σε αυτή την περίπτωση, ένα ένζυμο τροποποιείται γενετικά ώστε να φέρει μια πρωτεΐνη συγγένειας ή ένα πεπτίδιο-επίτοπο (peptide-tag) τοποθετημένα μακριά από το ενεργό κέντρο, συνήθως σε κάποιο από τα άκρα της πεπτιδικής αλληλουχίας του ενζύμου, για να αποτραπεί η όποια δομική και λειτουργική βλάβη που μπορεί να συμβεί κατά την ισχυρή σύνδεση του επισημασμένου ενζύμου στον φορέα που φέρει το συμπληρωματικό πρόσδεμα συγγένειας (Barbosa et al. 2015). Συνεπώς, η ακινητοποίηση ενζύμου μέσω αντιδράσεων συγγένειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ταυτόχρονα και για καθαρισμό πρωτεΐνης (Planchestainer et al. 2017; You and Zhang 2013). Ένας επίτοπος συγγένειας που χρησιμοποιείται συχνά είναι ο επίτοπος πολυ-ιστιδίνης (His-tag) η οποία συνδέεται επιλεκτικά σε ενεργοποιημένους-με δισθενή κατιόντα-φορείς π.χ. νιτριλοτριξικό οξύ (Ni-NTA) (Planchestainer et al. 2017; Rocha-Martín et al. 2012).

Όσον αφορά στην ακινητοποίηση ολόκληρων μικροβιακών κυττάρων, αυτή η τεχνολογία έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε διάφορους τομείς, όπως οι βιομηχανίες τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων ή στην περιβαλλοντική απορρύπανση, κυρίως λόγω του χαμηλού κόστους και της αποτελεσματικότητάς τους (Trelles and Lapponi 2017; Guzik, Hupert-Kocurek, and Wojcieszynska 2014). Η επιλογή της μεθόδου ακινητοποίησης ολόκληρων κυττάρων δεν διαφέρει ως προς τα κριτήρια με τα αντίστοιχα που εφαρμόζονται για τα ένζυμα. Πρέπει, δηλαδή, η μέθοδος να είναι οικονομική, απλή και να εξασφαλίζει καταλυτική δραστηριότητα και σταθερότητα στις συνθήκες εφαρμογής. Παρόλα αυτά, στην περίπτωση των κυττάρων πρέπει να εξασφαλίζεται και η βιωσιμότητά τους. Συνεπώς, στις μεθόδους ακινητοποίησης κυττάρων αποφεύγεται η χρήση τοξικών αντιδραστηρίων και πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα αποστείρωσης του φορέα πριν την ακινητοποίηση για αποφυγή επιμολύνσεων. Επιπλέον, προτιμώνται οι τεχνικές που περιλαμβάνουν τη χρήση πηκτωμάτων πολυμερών (όπως το αλγινικό ασβέστιο), γιατί είναι απλές, οικονομικές και επιτρέπουν την ελεύθερη μετακίνηση των υποστρωμάτων, των προϊόντων και των αερίων εξασφαλίζοντας τη μέγιστη απόδοση του βιοκαταλυτικού συστήματος.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης ακινητοποιημένων κυττάρων σε σχέση με τη χρήση ακινητοποιημένων ενζύμων για την επίτευξη επιθυμητών βιομετατροπών, περιλαμβάνουν την αποφυγή της επίπονης διαδικασίας απομόνωσης του ενζύμου και συνεπώς, τη μείωση του συνολικού κόστους. Επιπλέον, τα κύτταρα είναι ικανά να καταλύουν πιο πολύπλοκες αντιδράσεις, λόγω του βιοχημικού δικτύου του μεταβολισμού τους. Και τέλος, σε αντιδράσεις που απαιτείται αναγέννηση των συνενζύμων, όπως σε κάποια οξειδοαναγωγικά ένζυμα, τα ακινητοποιημένα ένζυμα υστερούν σε σύγκριση με τα ακινητοποιημένα κύτταρα που διαθέτουν την ικανότητα αναγέννησης των συνενζύμων. Τα μειονεκτήματα της χρήσης ακινητοποιημένων κυττάρων περιλαμβάνουν τη μικρή καταλυτική δραστηριότητα ανά μονάδα βάρους, την διεξαγωγή μη επιθυμητών αντιδράσεων λόγω της ύπαρξης επιπλέον ενζύμων που μπορεί να αναγνωρίζουν το ίδιο υπόστρωμα και τέλος, τη δυσκολία ανάκτησης των επιθυμητών προϊόντων από το διάλυμα της καλλιέργειας των κυττάρων.

1.4.1.1 *Νανοβιοκαταλύτες*

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η νανοβιοτεχνολογία, η οποία συνδυάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της νανοτεχνολογίας και της βιοτεχνολογίας, αποτέλεσε ένα αναδυόμενο πεδίο για το σχεδιασμό καινοτόμων νανοσυστημάτων με πιθανές εφαρμογές σε βιοαισθητήρες, βιοενέργεια, βιο-απεικόνιση και βιοκατάλυση (Madan Lal Verma, Barrow, and Puri 2013). Η ανάπτυξη νέων νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων μέσω της ακινητοποίησης των ενζύμων σε υλικά νανοκλίμακας προσελκύει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον για εφαρμογές σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς. Τα νανοδομικά υλικά είναι σωματίδια με διάσταση μικρότερη από 100 nm σε μέγεθος και συνήθως είναι σφαιρικά, ενώ μπορεί να έχουν και το σχήμα ράβδου ή δίσκου. Επίσης, μπορεί να είναι συμπαγή ή κοίλα και παρασκευάζονται από μεγάλη ποικιλία υλικών. Τα νανοδομικά υλικά, όπως οι νανοϊνες (nanofibres), οι νανοσωλήνες άνθρακα (nanotubes) και τα νανοσωματίδια (nanoparticles), επιδεικνύουν μεγάλη αποτελεσματικότητα στη διαχείριση του νανοπεριβάλλοντος και συνεπώς στις καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων.

Τα ένζυμα μπορούν να ακινητοποιηθούν σε διάφορα νανοϋλικά με τη χρήση συμβατικών μεθόδων, όπως η φυσική προσρόφηση ή η σύνδεση μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Η ακινητοποίηση των ενζύμων μέσω φυσικής προσρόφησης αυξάνει την αποτελεσματικότητα της ακινητοποίησης χωρίς να διαταράσσει την επιφάνεια του νανοϋλικού, συνήθως διατηρείται η καταλυτική ενεργότητα, αλλά πολλές φορές παρατηρείται σταδιακή αποκόλληση του ενζύμου από την επιφάνεια του υλικού (πρωτεϊνική διαρροή) (Patila, Pavlidis, et al. 2016). Από την άλλη πλευρά, η ομοιοπολική ακινητοποίηση μειώνει σημαντικά την αποκόλληση του ενζύμου οδηγώντας στη δημιουργία ενός ισχυρού νανοβιοκαταλύτη, όμως οι ομοιοπολικοί δεσμοί που σχηματίζονται μπορεί να επηρεάσουν την καταλυτική ενεργότητα του (Pavlidis et al. 2012). Ταυτόχρονα, επειδή ένζυμα, όπως οι διοξυγονάσες, μπορεί να εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση και στερεοεκλεκτικότητα, η ακινητοποίησή τους ενδέχεται να προκαλέσει αλλαγές στη δομή τους, με αποτέλεσμα την καλύτερη αξιοποίηση της καταλυτικής τους δράσης. Η φύση του ενζύμου είναι ένας παράγοντας που θα πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψιν για την αξιολόγηση της έκτασης των δομικών αλλαγών και της αλλαγής της καταλυτικής συμπεριφοράς.

Ένα από τα πλεονεκτήματα των νανοϋλικών είναι η μεγάλη επιφάνεια που προσφέρουν ως φορείς για την ακινητοποίηση μεγαλύτερου ενζυμικού φορτίου και κατά συνέπεια, μεγαλύτερης καταλυτικής ενζυμικής δραστηριότητας σε σχέση με ακινητοποιημένα ένζυμα σε συμβατικά υλικά. Επιπλέον, οι μαγνητικές ιδιότητες των νανοϋλικών, η δυνατότητα τροποποίησης της επιφάνειάς τους και η ομοιόμορφη κατανομή του μεγέθους τους οδήγησαν σε βελτιωμένες ενζυμικές ιδιότητες των νανοβιοκαταλυτών, σχετικά με την ενζυμική σταθερότητα και τη δραστηριότητα.

1.4.1.1.1 *Μελέτη νανοβιοκαταλυτών*

Μόλις δημιουργηθεί ο νανοβιοκαταλύτης, το επόμενο βήμα αποτελεί ο χαρακτηρισμός του. Ανεξάρτητα από την επιλεγμένη μέθοδο ακινητοποίησης, τα καταλυτικά και τα δομικά χαρακτηριστικά του ενζύμου θα επηρεαστούν, καθώς η μορφολογία, η γεωμετρία και η χημεία της επιφάνειας του νανο-φορέα καθορίζουν τη δομή, τον προσανατολισμό και επομένως τη δραστηριότητα και τη σταθερότητα του ενζύμου στην επιφάνειά του. Έτσι, ορισμένες παράμετροι, όπως η απόδοση της ακινητοποίησης, η δραστηριότητα και η σταθερότητα του νανοβιοκαταλύτη, αλλά και η πιθανότητα διαρροής ενζύμου από το σύστημα πρέπει να προσδιορίζονται μετά τη διαδικασία ακινητοποίησης (Boudrant, Woodley, and Fernandez-Lafuente 2020).

Για το χαρακτηρισμό της καταλυτικής ικανότητας του νανοβιοκαταλύτη μελετώνται συγκεκριμένες παράμετροι, όπως η ταχύτητα της αντίδρασης και η καταλυτική σταθερά του ενζύμου, οι οποίες συγκρίνονται με αυτές του ελεύθερου ενζύμου ώστε να σχηματιστεί μια εικόνα για την επίδραση της ακινητοποίησης στο ένζυμο. Αλλαγές στις κινητικές παραμέτρους του ενζύμου οφείλονται κυρίως σε αλλαγές της διαμόρφωσης στη δομή του ενζύμου που προκαλεί η αλληλεπίδραση με το φορέα, σε φαινόμενα διάχυσης ή/και σε στεροεχημικές παρεμποδίσεις (Sannino et al. 2020).

Επιπλέον, ο νανοβιοκαταλύτης μελετάται και ως προς τη σταθερότητά του έναντι αλλαγών στο pH και τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος ή έναντι οργανικών διαλυτών. Η σταθερότητα του νανοβιοκαταλύτη εξαρτάται από τις βελτιστοποιημένες αλληλεπιδράσεις ενζύμου-νανοϋλικού. Συχνά προσδιορίζεται και η σταθερότητα του νανοβιοκαταλύτη κατά την αποθήκευση για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και σε διάφορες συνθήκες. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται πάντα στη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, δηλαδή στην ικανότητα του νανοβιοκαταλύτη να χρησιμοποιείται σε πολλούς διαδοχικούς καταλυτικούς κύκλους χωρίς ακραία απώλεια της δραστηριότητάς του. Η επαναχρησιμοποίηση είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά που καθιστούν τα ένζυμα υποσχόμενες εναλλακτικές σε μεγάλης κλίμακας βιομηχανικές βιομετατροπές, καθώς η ικανότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων να ανακυκλώνονται μετά την αντίδραση, οδηγεί σε σημαντική μείωση του λειτουργικού κόστους των διεργασιών (Gkantzou et al. 2021).

Η επιφανειακή μορφολογία του νανοβιοκαταλύτη, μαζί με τις δομικές τροποποιήσεις μετά την ακινητοποίηση, μπορούν να απεικονιστούν με πολλαπλές μικροσκοπικές και φασματοσκοπικές τεχνικές. Μικροσκοπία με ανάλυση νανοκλίμακας, όπως η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM), η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) και η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης ή διαπερατότητας (Transmission Electron Microscopy, TEM) εφαρμόζονται για την επιβεβαίωση της επιτυχούς ακινητοποίησης των ενζύμων στα νανοϋλικά, καθώς και για τον προσδιορισμό των μορφολογικών χαρακτηριστικών των αναπτυγμένων νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων, όπως η επιφάνεια, το μέγεθος σωματιδίων και η κατανομή (öztürk et al. 2016; Miao et al. 2018). Επιπλέον, η ανάλυση με περίθλαση ακτίνων X (XRD) μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη δομή του νανοσυστήματος, ενώ ο κυκλικός διχρωσμός (CD), ως ειδική φασματοσκοπική τεχνική για βιομόρια, είναι ένας ακριβής τρόπος αξιολόγησης των αλλαγών στη δευτεροταγή δομή μιας πρωτεΐνης πριν και μετά την ακινητοποίηση (Patila et al. 2013).

1.4.2 Εφαρμογές βιοκαταλυτών

Η ολοκλήρωση της ανάπτυξης και του χαρακτηρισμού ενός ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη, παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για πιθανές εφαρμογές του. Η ακινητοποίηση ενζύμων στα νανοϋλικά λαμβάνει συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον στον τομέα της βιοκατάλυσης και βρίσκει εφαρμογή στις βιομηχανίες τροφίμων, κλωστοϋφαντουργίας, απορρυπαντικών και βυρσοδεψίας, αλλά και στην παραγωγή βιοκαυσίμων, βιοαισθητήρων και επιπλέον, αξιοποιούνται σε βιοϊατρικές εφαρμογές (Razzaghi et al. 2022).

Την τελευταία δεκαετία, αρκετοί νανοβιοκαταλύτες έχουν αναπτυχθεί για εφαρμογή σε διεργασίες βιοαποδόμησης. Είναι γνωστό ότι η περιβαλλοντική ρύπανση αποτελεί ένα από τα πιο δύσκολα ζητήματα της εποχής μας. Η φαινόλη και τα παράγωγά της εναποτίθενται σε μεγάλο βαθμό στα φυσικά περιβάλλοντα με επιβλαβείς επιπτώσεις στους ζωντανούς οργανισμούς. Η ανάπτυξη διεργασιών με τη χρήση ενζύμων για την απομάκρυνση ρύπων έχει

αναδειχθεί ως βιώσιμη και αποτελεσματική προσέγγιση, καθώς το μικρό μέγεθος των ενζύμων, σε σύγκριση με τα μικροβιακά κύτταρα, τους επιτρέπει να έρχονται σε επαφή με ρύπους πιο εύκολα, διευκολύνοντας τη γρήγορη και αποδοτική μετατροπή του ρύπου σε λιγότερο επιβλαβή ένωση (L. Kumar and Bharadvaja 2019).

Έτσι, μια πληθώρα οξειδωτικών ενζύμων έχει ακινητοποιηθεί σε διάφορα νανοϋλικά ώστε να αναπτυχθούν νανοβιοκαταλυτικά συστήματα, τα οποία έχουν μεγάλες προοπτικές στην επεξεργασία λυμάτων και την αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων. Για παράδειγμα, η λακάση και υπεροξειδάση χρένου έχουν ακινητοποιηθεί σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα για την απομάκρυνση φαινολικών ενώσεων (Huang et al. 2017; Patila, Kouloumpis, et al. 2016), και η 1,2-διοξυγονάση της υδροξυκινόλης σε αντίστοιχα νανοϋλικά για την αποδόμηση αρωματικών υδρογονανθράκων (Suma, Kang, and Kim 2016). Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται περισσότερα παραδείγματα ενζύμων που ακινητοποιήθηκαν σε ποικίλους τύπους νανοϋλικών και βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορες διεργασίες απομάκρυνσης ρύπων.

Πίνακας 1.2. Παραδείγματα ενζύμων ακινητοποιημένων σε διάφορα νανοϋλικά για διεργασίες απομάκρυνσης ρύπων.

Ένζυμο	Τύπος νανοϋλικού	Εφαρμογή	Βιβλιογραφική Αναφορά
1,2-διοξυγονάση της χλωροκατεχόλης	Νανοφίλμς σε συνδυασμό με πολυαμίδια	Βιοαισθητήρας για την ανίχνευση κατεχολικών ενώσεων	(Zucolotto et al. 2006)
1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης	Νανospόγγοι	Διάσπαση κατεχόλης	(Di Nardo et al. 2009)
Λακάση	Νανωσολήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων	Απομάκρυνση της δισφαινόλης A (BPA) από νερό	(Dai et al. 2016)
Λακάση	Νανωσωματίδια χιτοζάνης, ενεργοποιημένα με Cu(II)	Απομάκρυνση φαινολικών ενώσεων	(Alver and Metin 2017)
Υπεροξειδάση του χρένου	Νανωσολήνες άνθρακα/Fe ₃ O ₄	Απομάκρυνση φαινολικών ενώσεων	(Chuang Zhang and Cai 2019)
Λακάση	Ανόργανα υβριδικά νανωσωματίδια	Απομάκρυνση της δισφαινόλης A από νερό	(Fu, Xing, and Ge 2019)
Λακάση, υπεροξειδάση, διοξυγονάση	Νανωσωματίδια μαγνητίτη χιτοζάνης	Διάσπαση τοξικών βαφών (Cibacron Red FN-R)	(Fetyan et al. 2017)
Λακάση	Νανωσωματίδια οξειδίου του σιδήρου	Διάσπαση της δισφαινόλης A	(S. K. S. Patel et al. 2021)
Λακάση	Νανωσωματίδια οξειδίου του τιτανίου	Βιομετατροπή αποβλήτων από φαρμακευτικές βιομηχανίες	(García-Morales et al. 2018)
Υπεροξειδάση του χρένου	Νανογέλη	Απομάκρυνση φαινολικών ενώσεων από απόβλητα	(Shan Liu et al. 2020)
Λακάση	Μεσοπορώδη νανωσφαιρίδια άνθρακα	Απομάκρυνση αντιβιοτικών από απόβλητα	(Shao et al. 2019)
Υπεροξειδάση	Νανοπούδρα οξειδίου	Προσρόφηση κυανού του	(Ciğeroğlu,

του χρένου	γραφενίου	μεθυλενίου από υδατικά διαλύματα	Haşimoğlu, and Özdemir 2021)
Λακάση	Νανοϊνες πολυαμιδίου	Βιοαποδόμηση επιβλαβών χημικών	(Maryskova et al. 2019)
Υπεροξειδάση του χρένου	Νανοςωματίδια οξειδίου του σιδήρου και χρυσού σε φύλλα γραφενίου, ενεργοποιημένα με κιτρικό οξύ	Απομάκρυνση 4-χλωροφαινόλης από απόβλητα	(Sarno and Iuliano 2020)
Υπεροξειδάση του χρένου	Νανοςύνθετα οξειδίων σιδήρου-νανοδιαμαντιών	Βιοαποδόμηση φαινόλης	(A. Li et al. 2020)
Λακάση	Νανοϊνες πολυαμιδίου-χιτοζάνης	Απομάκρυνση της δισφαινόλης Α και της α-αιθινυλοιστραδιόλης	(Maryskova et al. 2019)
Λακάση	Υπερμαγνητικοί νανοςωλήνες ορυκτού αργίλου, ενεργοποιημένοι με χιτοζάνη	Διάσπαση χρωστικών	(Kadam et al. 2018)
Λακάση	Νανοϋλικά οξειδίων μετάλλων	Διάσπαση χρωστικών	(Rani, Shanker, and Chaurasia 2017)

1.5 Το βακτήριο *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3

Το στέλεχος *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 απομονώθηκε από χώμα ρυπασμένο με κρεοζωτέλαιο προερχόμενο από την περιοχή της Περιβλέπτου (12 χιλιόμετρα βόρεια της πόλης των Ιωαννίνων), όπου μια βιομηχανία επεξεργασίας ξύλου λειτουργούσε για περισσότερο από 30 χρόνια (Kallimanis et al. 2007).

Το *P. phenanthrenivorans* Sphe3 κατατάσσεται ταξινομικά στο φύλο των Ακτινοβακτηρίων (Actinobacteria), τα οποία είναι θετικά κατά Gram βακτήρια, μη κινητικά, με χαρακτηριστικό την υψηλή περιεκτικότητα σε G+C και κατέχει τη δυνατότητα της εναλλαγής μορφής από ραβδίο σε κόκκο.

Το γονιδίωμα του Sphe3 αποτελείται από ένα χρωμόσωμα μήκους 4.250.414 bp και δύο πλασμίδια, ένα μεγάλο, μεγέθους 190.450 bp (pASPHE301) και ένα μικρό, μεγέθους 94.456 bp (pASPHE302). Από τα 4.288 γονίδια, τα 4.212 κωδικεύουν πρωτεΐνες, τα 76 RNA, ενώ αναγνωρίστηκαν και 77 ψευδογονίδια. Το 73,8% των γονιδίων που κωδικεύουν πρωτεΐνες φαίνεται να επιτελούν γνωστές λειτουργίες, ενώ τα υπόλοιπα έχουν επισημανθεί ως «υποθετικές πρωτεΐνες» (Kallimanis et al. 2011).

Το Sphe3 υφίσταται μεταβολές στη σταθερότητα και στη διαπερατότητα της κυτταρικής του μεμβράνης ως αποτέλεσμα περιβαλλοντικών ερεθισμάτων με σκοπό την καλύτερη δυνατή αξιοποίηση υποστρωμάτων ως πηγές άνθρακα και ενέργειας. Κατά την ανάπτυξή του στο υπόστρωμα φαινανθρένιο ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, παρατηρήθηκαν αλλαγές στη σύσταση φωσφολιπιδίων και λιπαρών οξέων της μεμβράνης του σε σύγκριση με κύτταρα Sphe3 που αναπτύσσονται σε γλυκόζη. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με μελέτες που έχουν δείξει ότι η σύσταση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων μεταβάλλεται

προκειμένου, τα βακτήρια να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν παρουσία οργανικών διαλυτών και άλλων στρεσογόνων παραγόντων (Kallimanis et al. 2007).

Το στέλεχος *Sphe3* έχει την ικανότητα να αποδομεί διάφορες αρωματικές ενώσεις, μεταξύ των οποίων το φαινανθρένιο, τους ενδιάμεσους μεταβολίτες του καταβολισμού του φαινανθρενίου, φθαλικό και πρωτοκατεχοϊκό οξύ, αλλά και το γεντισικό και το βενζοϊκό οξύ (Vandera et al. 2015; Tsagogiannis et al. 2021; Ασημακούλα 2017; Φανίτσος 2020). Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματικός βιοκαταλύτης για την απομάκρυνση του εξασθενούς χρωμίου (Ziagona, Koukku, and Liakopoulou-Kyriakides 2014). Αποτελεί δηλαδή έναν ευέλικτο βιοκαταλύτη που διαθέτει ποικιλία καταβολικών ενζύμων για την αναγνώριση και αξιοποίηση διαφορετικών αρωματικών υποστρωμάτων.

1.5.1 Ένζυμα του *Sphe3* που συμμετέχουν στον καταβολισμό αρωματικών ενώσεων

Μελέτες *in silico* στο γονιδίωμα του στελέχους *Sphe3* έχουν καταδείξει την ύπαρξη γονιδίων που κωδικεύουν για διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης και σχάσης του αρωματικού πυρήνα, για μονοξυγονάσες αρωματικών ενώσεων, καθώς και για ένζυμα που εμπλέκονται στις κατώτερες πορείες του μεταβολισμού αυτών, ώστε τα μεταβολικά ενδιάμεσα (κατεχόλη, γεντισικό και πρωτοκατεχοϊκό οξύ) να εισέλθουν στον κεντρικό μεταβολισμό των κυττάρων. Τα τελευταία χρόνια, έχει εξακριβωθεί η συμμετοχή των γονιδίων αυτών σε μεταβολικά μονοπάτια του *Sphe3* με πρωτεομική και μεταγραφομική ανάλυση, ενώ επιπλέον έχει πραγματοποιηθεί ο χαρακτηρισμός κάποιων καταβολικών ενζύμων του στελέχους (Vandera et al. 2012, 2015; Ασημακούλα 2017; Tsagogiannis et al. 2021; Λάππα 2019). Η ύπαρξη γονιδίων που κωδικεύουν ένζυμα οξυγονασών που θεωρητικά εμπλέκονται σε διαφορετικές καταβολικές πορείες και εντοπίζονται στα πλασμίδια και στο χρωμόσωμα του στελέχους *Sphe3*, κεντρίζει το ερευνητικό μας ενδιαφέρον για την ανάπτυξη και μελέτη νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων.

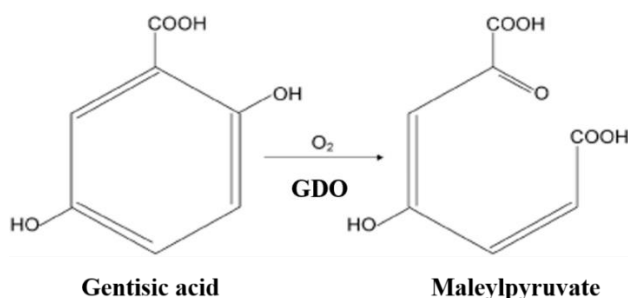
Πιο συγκεκριμένα, στο *Sphe3* έχει μελετηθεί εκτενώς ο καταβολισμός του φαινανθρενίου, ο οποίος ακολουθεί την πορεία του *ο*-φθαλικού οξέος, που σημαίνει ότι το βακτήριο μεταβολίζει το φαινανθρένιο μέσω του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Αξίζει να αναφερθεί ότι το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσιάζει το ιδιαίτερο πλεονέκτημα να φέρει στο γονιδιώμα του δύο γονίδια που κωδικεύουν τις 3,4- και 4,5-διοξυγονάσες σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, κάτι που δεν έχει αναφερθεί για άλλο βακτήριο. Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός και των δύο αυτών διοξυγονασών έχει ολοκληρωθεί πρόσφατα (Τσαγκογιάννης 2023).

Επιπλέον, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και η κατεχόλη ταυτοποιήθηκαν ως ενδιάμεσοι μεταβολίτες στην πορεία καταβολισμού του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος από το *Sphe3*. Ειδικότερα, ο καταβολισμός του 4HB στο *Sphe3* προχωράει μέσω του PCA και πιο συγκεκριμένα μέσω της 3,4- και της 4,5-σχάσης του. Φαίνεται, ακόμη, ότι το PCA υφίσταται και αποκαρβοξυλίωση προς κατεχόλη, η οποία στη συνέχεια διασπάται μέσω της 1,2- και της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης (Τσαγκογιάννης 2023; Tsagogiannis et al. 2024).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το *Sphe3* έχει τη δυνατότητα να μεταβολίζει και το βενζοϊκό οξύ. Γενικά, η αερόβια βιοαποδόμηση του βενζοϊκού οξέος διεξάγεται μέσω διαφόρων πορειών με το σχηματισμό του γεντισικού οξέος (2,5-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ), του πρωτοκατεχοϊκού οξέος ή/και της κατεχόλης ως ενδιάμεσοι μεταβολίτες (van Gorcom et al. 1990; Chang and Zylstra 2008). Μεταγραφομική ανάλυση στο *Sphe3*, όταν αναπτύσσεται παρουσία του βενζοϊκού οξέος ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας, έδειξε την ισχυρή επαγωγή του γονιδίου που φέρεται να κωδικεύει την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης (1,2-CDO),

ενώ σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα επάγονται και οι δύο διοξυγονάσεις του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και σχεδόν καθόλου η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος (Ασημακούλα 2017). Μιας και η *ortho*-σχάση της κατεχόλης έχει αναφερθεί ως η επικρατέστερη πορεία καταβολισμού του βενζοϊκού οξέος (Urszula et al. 2009), τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν την υπόθεση ότι πρόκειται για μια 1,2-CDO. Ως γνωστόν, η *ortho*-σχάση της κατεχόλης οδηγεί στο σχηματισμό του *cis*, *cis*-μουκονικού οξέος, το οποίο είναι γνωστό για τη βιομηχανική του σημασία ως πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση ενός ευρέος φάσματος οικονομικά πολύτιμων πολυμερών και μπορεί να μετατραπεί σε αδιπικό οξύ και τερεφθαλικό, τα οποία αποτελούν τις κύριες χημικές πλατφόρμες για την παραγωγή βιοπλαστικών και πολυεστέρων, συμπεριλαμβανομένων πολυαιθυλενίου, τερεφθαλικού και νάιλον 6,6 (Choi et al. 2020). Συνεπώς, όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν στο ότι στο Sphe3 εκφράζεται η 1,2-CDO, ο λειτουργικός χαρακτηρισμός της οποίας αποτελεί έναν από τους στόχους της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, πρόσφατα πειράματα μεταγραφομικής ανάλυση στο στέλεχος Sphe3 όταν αναπτύσσεται παρουσία γεντισικού οξέος έδειξαν επαγωγή της έκφρασης του πιθανού γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος (Ασημακούλα 2017). Επομένως, προκειμένου να αποδειχθεί πειραματικά η λειτουργία του γονιδίου αυτού, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίησή του και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός του, που επιβεβαίωσαν ότι πράγματι κωδικεύει μια πρωτεΐνη με δραστικότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος (1,2-gentisate dioxygenase, GDO) (Λάππα 2019). Η GDO του Sphe3 ανήκει στην *cupin* υπερικογένεια των εξωδιολο-διοξυγονάσεων, που διακρίνονται από το χαρακτηριστικό μοτίβο 2 ομόλογων β -βαρελίων (*bicupins*) και συνήθως απαντώνται σε ομοτετραμερή (J. Chen et al. 2008). Οι GDOs καταλύουν τη ρήξη του αρωματικού δακτυλίου του γεντισικού οξέος εισάγοντας δύο άτομα του μοριακού οξυγόνου μεταξύ της καρβοξυλομάδας και της προσκείμενης υδροξυλομάδας οδηγώντας στο σχηματισμό του μηλοπυροσταφυλικού οξέος (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11. Η μετατροπή του γεντισικού οξέος σε μηλοπυροσταφυλικό οξύ, που καταλύεται από τη 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος.

Στο πλαίσιο μελέτης της GDO του Sphe3, το ένζυμο χαρακτηρίστηκε ως ασταθές και ευαίσθητο αφού δεν μπόρεσε να διατηρήσει την δραστικότητά του για ικανοποιητικό χρονικό διάστημα. Η προσέγγιση της σταθεροποίησης της GDO μέσω ακινητοποίησης σε κατάλληλους φορείς είναι ένα από τα αντικείμενα μελέτης της παρούσας εργασίας

Σκοπός

Τα μικροβιακά ένζυμα έχουν σημαντική συνεισφορά τόσο στη βιολογική απομάκρυνση περιβαλλοντικών ρύπων, όσο και στην ανάπτυξη βιομηχανικών βιοδιεργασιών (απορρυπαντικά, υφάσματα, φαρμακευτικά προϊόντα, χημικά, τρόφιμα και ποτά, βιοκαύσιμα, ζωοτροφές κ.α). Υπάρχει ανάγκη για νέα, βελτιωμένα ή / και πιο ευέλικτα ένζυμα προκειμένου να αναπτυχθούν καινοτόμες, και οικονομικά ανταγωνιστικές διαδικασίες παραγωγής. Η μικροβιακή ποικιλομορφία και οι σύγχρονες μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται για την ανακάλυψη νέων μικροβιακών ενζύμων των οποίων οι καταλυτικές ιδιότητες μπορούν να βελτιωθούν / τροποποιηθούν με διαφορετικές στρατηγικές, όπως η ακινητοποίηση. Τα περισσότερα βιομηχανικά ένζυμα είναι ανασυνδυασμένες μορφές ενζύμων που παράγονται σε βακτήρια και μύκητες (Adrio and Demain 2014). Στις μέρες μας, πολλά ένζυμα μεταξύ αυτών και μονο/διοξυγονάσες χρησιμοποιούνται στη βιοαποδόμηση, αλλά και σε βιομηχανικές διεργασίες (Singh et al. 2017). Η άμεση εφαρμογή των ενζύμων στη διαδικασία περιβαλλοντικής απορρύπανσης δεν ενδείκνυται λόγω απώλειας ενζυμικής δραστηριότητας και χαμηλής σταθερότητας ως αποτέλεσμα απενεργοποίησης ενζύμων ή μετουσίωσης πρωτεϊνών, αιφνίδιων αλλαγών στο περιβάλλον, φραγής του ενεργού κέντρου και δυσκολίας στην ένωση ενζύμου-υποστρώματος (Alemzadeh and Nejati 2009). Η ακινητοποίηση ενζύμων αντιπαρέχεται αυτά τα προβλήματα και προσδίδει στο ένζυμο σταθερότητα και ανθεκτικότητα στις συνθήκες που διεξάγεται η αντίδραση, ενώ μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί και να αποθηκευτεί για περαιτέρω χρήση.

Η ικανότητα του Sphe3 να αναπτύσσεται παρουσία διάφορων αρωματικών ενώσεων το καθιστά ένα ευέλικτο καταβολικά βακτηριακό στέλεχος που αποτελεί όχι μόνο αντικείμενο μελέτης λόγω των πολλαπλών μεταβολικών μονοπατιών που διαθέτει, αλλά και πηγή εξόρυξης καταβολικών ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτά τα μονοπάτια. Λόγω του ότι οι οξυγονάσες είναι ασταθή και ευαίσθητα ένζυμα έναντι περιβαλλοντικών και χημικών παραγόντων (Guzik et al. 2014), η ακινητοποίησή τους σε νανοϋλικά με τροποποιημένη χημικά την επιφάνειά τους, επιτρέπει τον ορθολογικό έλεγχο του μικροπεριβάλλοντος των ενζύμων και συνεπώς, τον έλεγχο και τη βελτιστοποίηση των καταλυτικών ιδιοτήτων τους.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι, πρώτον, ο χαρακτηρισμός νέων καταβολικών ενζύμων από το εδαφοβακτήριο *P. phenanthrenivorans* Sphe3, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ικανότητα αποδόμησης αρωματικών ενώσεων και κατά δεύτερον, η ανάπτυξη νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων μέσω της ακινητοποίησης των ενζύμων αυτών σε νανοϋλικά, μελετώντας τη σχέση δομής-λειτουργίας των ακινητοποιημένων ενζύμων με τα νανοϋλικά.

Αυτή η εργασία διαρθρώνεται σε τρία διακριτά μέρη, τα οποία περιλαμβάνουν την εισαγωγή στο ερευνητικό πεδίο της διατριβής, τα υλικά και τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για το πειραματικό μέρος και τα πειραματικά αποτελέσματα που διανθίζονται από τη συζήτηση και πιο συγκεκριμένα, περιλαμβάνουν την μελέτη της πορείας του καταβολισμού της φαινόλης στο στέλεχος Sphe3, τη διευκρίνιση του ρόλου των ενζύμων που πιθανώς εμπλέκονται σε αυτή την πορεία καταβολισμού, την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών συστημάτων με την ακινητοποίηση των μελετημένων ενζύμων του Sphe3 σε νανοϋλικά, αλλά και ολόκληρων των κυττάρων Sphe3, ανοίγοντας το δρόμο για πιθανές εφαρμογές απομάκρυνσης ρύπων ή/και παραγωγής υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντων.

Πειραματικό Μέρος

2

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Τα βακτηριακά στελέχη *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* και *Escherichia coli* καθώς και οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 2.1. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Βακτηριακό στέλεχος	Χαρακτηριστικά	Βιβλιογραφική αναφορά/Εταιρεία
<i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3	Άγριος τύπος	Kallimanis <i>et al.</i> , 2009
<i>E.coli</i> DH5a	F ⁻ , φ80dlacZΔM 15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>rK</i> ⁻ , <i>mK</i> ⁻), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Hanahan, 1983
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	F- <i>omp T hsdS_B</i> (<i>r_B-mB</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen

Πίνακας 2.2. Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Πλασμίδιο	Ανθεκτικότητα (αντιβιοτικό)	Περιγραφή	Μέγεθος (bp)	Βιβλιογραφική αναφορά/Εταιρεία
pBlueScript SK(+)	Αμπικιλίνη (Amp ^r)	Φορέας κλωνοποίησης	2958	Agilent Technologies
pET29c(+)	Καναμυκίνη (Km ^r)	Φορέας υπερέκφρασης	5372	Novagen
pET29c(+>:: <i>gtdA</i>	Km ^r	Ανασυνδυασμένος φορέας υπερέκφρασης	6484	Λάππα, 2019
pBlueScript:: <i>cata</i>	Amp ^r	Ανασυνδυασμένος φορέας κλωνοποίησης	3940	Παρούσα εργασία
pBlueScript::35690	Amp ^r	Ανασυνδυασμένος φορέας	4889	Παρούσα εργασία

		κλωνοποίησης		
pET29c(+): <i>catA</i>	Km ^r	Ανασυνδυασμένος φορέας υπερέκφρασης	6118	Παρούσα εργασία
pET29c(+):36590	Km ^r	Ανασυνδυασμένος φορέας υπερέκφρασης	7154	Παρούσα εργασία

2.1.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων

2.1.1.1 Πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *Lysogeny Broth (LB)* (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989)

Για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *Lysogeny Broth (LB)*, το οποίο συχνά συναντάται και ως *Luria Broth*, με την εξής σύσταση:

Χημικές ενώσεις	Συγκέντρωση (% w/v)
Τρυπτόνη (Tryptone)	1
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	0.5
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	1
Διάλυμα NaOH 1N	Κατάλληλη ποσότητα για ρύθμιση pH 7.5

Το πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηριακών καλλιιεργειών είναι έτοιμο για χρήση κατόπιν αποστείρωσης (121 °C για 20 min). Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης προστίθεται επιπλέον 2% w/v άγαρ. Το άγαρ είναι πολυσακχαρίτης που δεν πολυμερίζεται μέχρι τους 45 °C.

2.1.1.2 Θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης για την καλλιέργεια βακτηρίων *M9* (*Minimal Medium M9, MM M9*)

Για την παρασκευή 100 ml *MM M9*, αποστειρώνονται 75-78 ml απιονισμένου H₂O και όταν η θερμοκρασία μειωθεί στους 50 °C, προστίθενται τα παρακάτω διαλύματα, τα οποία έχουν και αυτά αποστειρωθεί.

Διαλύματα	Συγκέντρωση (% v/v)
Διάλυμα αλάτων 5x M9	20
Διάλυμα MgSO ₄ 0.1M	2
Διάλυμα CaCl ₂ 0.01M	1
Διάλυμα ιχνοστοιχείων 100x	1
Πηγή άνθρακα	Κατάλληλη ποσότητα ανάλογα με τις απαιτήσεις και τις αντοχές του στελέχους σε κάθε υπόστρωμα

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας καθορισμένης χημικής σύστασης *MM M9*, αποστειρώνεται νερό με άγαρ (2 gr άγαρ με 75-78 ml ύδατος για 100 ml θρεπτικού μέσου) και αφού πέσει η θερμοκρασία στους 50 °C, προστίθενται τα υπόλοιπα διαλύματα.

Κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος τοποθετείται σε τρυβλίο και αφού σταθεροποιηθεί, το τρυβλίο ψεκάζεται με κατάλληλη ποσότητα της επιλεγμένης πηγής άνθρακα.

Ακολουθεί η σύσταση υδατικού διαλύματος 5x M9 σε όγκο 1 λίτρου:

Χημικές ενώσεις	Ποσότητα (gr)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	64 (ή $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 42.5g)
KH_2PO_4	15
NaCl	2.5
NH_4Cl	5

Παρακάτω φαίνεται η σύσταση διαλύματος ιχνοστοιχείων όγκου 100 ml:

Χημικές ενώσεις	Ποσότητα (mg)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6.25
KI	10
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	40
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40
H_3BO_3	50
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	16
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20

Το διάλυμα των ιχνοστοιχείων αποστειρώνεται με φίλτρο νιτρικής κυτταρίνης με μέγεθος πόρων 0.45 μm .

Πίνακας 2.3. Πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Βακτηριακό στέλεχος	Πηγή άνθρακα	Τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια	Πειραματική προσέγγιση
Sphe3	Γλυκόζη	400 mg/L	Real-Time qPCR
	Φαινόλη	300-1500 mg/L	Καμπύλες ανάπτυξης, Real-Time qPCR
	3-υδροξυβενζοϊκό οξύ	5 mM	Real-Time qPCR
	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	5 mM	Real-Time qPCR
BL21-pET29c::catA	Γλυκερόλη	1%	Υπερέκφραση της 1,2 διοξυγονάσης της κατεχόλης
	Κατεχόλη	10-100 mM	Παραγωγή μουκονικού οξέος
BL21-	3-υδροξυβενζοϊκό	2-5 mM	Παρακολούθηση ενζυμικής αντίδρασης

pET29c::36590	οξύ		στο NMR
---------------	-----	--	---------

2.1.2 Μικροβιακές καλλιέργειες

Η ανάπτυξη των βακτηρίων *Sph*3 και *E. coli* στα στερεά θρεπτικά μέσα καλλιέργειας (τρυβλία Petri) πραγματοποιείται με επώαση στους 30 °C και 37 °C αντίστοιχα, ενώ οι υγρές καλλιέργειες (κωνικές φιάλες επιλεγμένου όγκου) τοποθετούνται στις ίδιες θερμοκρασίες, υπό συνεχή ανάδευση (250 rpm). Οι καλλιέργειες υγρές ή στερεές εμβολιάζονται με κυτταρικό εναιώρημα γνωστής συγκέντρωσης. Η κυτταρική συγκέντρωση υπολογίζεται με τη μέθοδο της οπτικής απορρόφησης στα 600 nm (O.D._{600nm}).

Ο εμβολιασμός των θρεπτικών μέσων ανάπτυξης πραγματοποιείται πάντα σε άσηπτες συνθήκες. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες που περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς πραγματοποιούνται μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ενώ πριν τη χρήση του θαλάμου πραγματοποιείται αποστείρωση του χώρου εργασίας με λάμπα UV και μετά την ολοκλήρωση των εργασιών ο χώρος απολυμαίνεται με διάλυμα χλωρίνης.

Για την κατασκευή καμπύλης ανάπτυξης του βακτηρίου *Sph*3 παρουσία φαινόλης (300-1500 mg/L) η οπτική απορρόφηση του αρχικού εμβολίου κυττάρων ήταν 0,05 και ανά δύο ώρες καταγραφόταν η οπτική απορρόφηση δείγματος της καλλιέργειας.

2.1.3 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων *E. coli*

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Σε 5 ml LB εμβολιάζεται μονή αποικία από τρυβλίο LA, το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 14-16 h.
- Από τη βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρονται 1260 μl σε κρυογονικό φιαλίδιο (cryogenic vial) και προστίθενται 540 μl αποστειρωμένου διαλύματος 100% γλυκερόλης. Ακολουθεί έντονη ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα (vortex) για ομοιόμορφη διασπορά της γλυκερόλης.
- Τέλος, τα βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύονται στους -80 °C.

Η αποθήκευση στους -80 °C με γλυκερόλη αποτρέπει τη δημιουργία κρυστάλλων του νερού στο θρεπτικό μέσο, το οποίο μπορεί να θανατώσει τα κύτταρα.

2.2 Αντιβιοτικά

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα αμικιλίνης (Amp) και καναμυκίνης (Km) με τελική συγκέντρωση 100 μg/ml και 50 μg/ml στα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης.

Τα αντιβιοτικά προστίθενται μετά την αποστείρωση των θρεπτικών μέσων ανάπτυξης και όταν η θερμοκρασία αυτών έχει μειωθεί στους 45-50 °C. Η αποστείρωση των υδατικών διαλυμάτων των αντιβιοτικών γίνεται με διήθηση μέσω αποστειρωμένων φίλτρων μεγέθους πόρων 0.45 μm.

2.3 Πριμοδοτικά μόρια (εκκινητές, primers)

Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε το γονιδίωμα του στελέχους *Sph*3, το οποίο είναι κατατεθειμένο στην βάση δεδομένων του JGI/IMG (<https://img.jgi.doe.gov/>) και σχεδιάστηκαν πριμοδοτικά μόρια για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων, που πιθανώς

κωδικεύουν ένζυμα που εμπλέκονται σε καταβολικά μονοπάτια, με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR). Οι εκκινητές για την Real-Time qPCR σχεδιάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Primer3 Input (<https://primer3.ut.ee/>) και η σύνθεσή τους έγινε από την εταιρεία Eurofins Genomics, Γερμανία.

Πίνακας 2.4. Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην Real-Time qPCR.

Γονίδιο στόχος (Locus Tag, JGI- IMG)	Πιθανό ένζυμο	Ονομασία ολιγονουκ λεοτιδίου	Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίου (5'→3')	Βιβλιογραφία
Asphe3 _35170	1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης	cat12cr _{for}	AAACGGATACCCGGAA AGAG	Ασημακούλα, ΜΔΕ, 2017
		cat12cr _{rev}	GGGCGTTGTACTCCTCG TAG	
Asphe3 _40510	2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης	cat23lp _{for}	AGCCAGTTCCACCACG ATAT	Μαρινάκος, ΜΔΕ, εν εξελίξει
		cat23lp _{rev}	CAATACTGGTTTCCGCC GAC	
Asphe3 _36590	Φαινολική υδροξυλάση	phe _{for}	GTCACCGACTTCCCCGA TAT	Παρούσα εργασία
		phe _{rev}	ATCTGCTCGATGGTGGT GTT	
Asphe3 _39840	1,2-διοξυγονάση του γεντισικού	gent12lp _{for}	GGTGACTTCCTGCTCAC TCC	Ασημακούλα, ΜΔΕ, 2017
		gent12lp _{rev}	ATATCAGGGGTGGCTTC GTC	
Asphe3 _38860	β υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού	pca34β _{for}	CGTACCCATGGAAGAA CCAC	Ασημακούλα, ΜΔΕ, 2017
		pca34β _{rev}	GGTCAGGATGATGTCC CAGT	
Asphe3 _42380	4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού	pca45αβ _{for}	ACACCTCGGCACTATTC ACC	Ασημακούλα, ΜΔΕ, 2017
		pca45αβ _{rev}	CGTTGTACACCAGGAT GACG	
Asphe3 _00060	Γυράση β	gyrβ _{for}	GGCTAACGACAATACA GATA	Vandera <i>et al.</i> , 2015
		gyrβ _{rev}	ACCACTTCATAAACAA	

			GGT	
--	--	--	-----	--

Επιπλέον, σχεδιάστηκαν εκκινητές για την κλωνοποίηση γονιδίων του Sphe3 σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, ώστε να μελετηθούν τα αντίστοιχα ένζυμα.

Πίνακας 2.5. Ολιγονουκλεοτίδια που σχεδιάστηκαν για τις κλωνοποιήσεις γονιδίων από το Sphe3. Η θέση που αναγνωρίζει το κάθε περιοριστικό ένζυμο επισημαίνεται με υπογράμμιση.

Γονίδιο στόχος (Locus Tag, JGI- IMG)	Πιθανό ένζυμο	Ονομασία	Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίου (5'→3')	Ένζυμο περιορισ- τικής ανάλυσης	Βιβλιογ- ραφία
Asphe3 _35170	1,2 διοξυγον- άση της κατεχόλ- ης	catApET _{for}	GTGGACACCC <u>CATATG</u> ACTGAGACC	NdeI	Παρούσα εργασία
		catApET _{rev}	CTCAGCAGCAACT <u>CTCGAG</u> CTTAATTG	XhoI	
Asphe3 _36590	Υδροξυλ- άση της φαινόλης	36590pET _{for}	AAGTGAGGATT <u>CATATG</u> CAGTTC	NdeI	Παρούσα εργασία
		36590pET _{rev}	ACAGGACA <u>AAGCTT</u> GACCGTCAG	HindIII	

2.4 Φορείς ακινητοποίησης

2.4.1 Συμβατικά υλικά ακινητοποίησης

Ως φορέας ακινητοποίησης των Sphe3 κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αλγινικό νάτριο (Alginic acid sodium salt from brown algae, Sigma), ενώ πραγματοποιήθηκαν και δοκιμές ακινητοποίησης ανασυνδυασμένων ενζύμων από το Sphe3 σε σφαιρίδια χιτοζάνης (Chitosan, Sigma).

2.4.2 Νανοϋλικά

Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν διάφορα νανοϋλικά ως φορείς ακινητοποίησης ανασυνδυασμένων ενζύμων από το Sphe3. Τα νανοϋλικά που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών και στο εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του τμήματος Μηχανικών και Επιστήμης Υλικών και ήταν τα εξής:

Οξείδιο του γραφενίου	GO
Τροποποιημένο οξείδιο του γραφενίου με τελικές καρβοξυλομάδες	GO-COOH
Τροποποιημένο οξείδιο του γραφενίου με	GO-NH ₂

τελικές αμινομάδες	
Μαγνητικά νανოსωματίδια οξειδίου σιδήρου με χιτοζάνη	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PDA}$
Μαγνητικά νανოსωματίδια οξειδίου σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και νικέλιο	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PDA-Ni}^{2+}$

2.5 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA με τη μέθοδο CTAB (mini preparation)

Η απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα κύτταρα *Sphe3* πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο των William *et al.*, 2012.

2.5.1 Πειραματική πορεία (William *et al.* 2012)

1. 1.5 ml καλλιέργειας, που βρίσκεται στο τέλος της εκθετικής ή στην αρχή της στατικής φάσης, φυγοκεντρείται για 5 min στα $10.000 \times g$ και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
2. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 740 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.
3. Ακολουθεί προσθήκη 20 μl διαλύματος λυσοζύμης (100 mg/ml) με καλή ανάδευση και επώαση για 12 h στους 37°C .
4. Προσθήκη 40 μl διαλύματος SDS 10% με καλή και ήπια ανάδευση.
5. Προσθήκη 4 μl διαλύματος προνάσης (20 mg/ml) με καλή ανάδευση και επώαση για 12 h στους 37°C .
6. Προσθήκη 100 μl διαλύματος 5 M NaCl και καλή ανάδευση με πιπετάρισμα.
7. Προσθήκη 100 μl διαλύματος CTAB/NaCl (προθερμασμένο στους 65°C) με καλή ανάδευση.
8. Επώαση για 10 min στους 65°C .
9. Προσθήκη 500 μl διαλύματος χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) με καλή ανάδευση.
10. Φυγοκέντρηση για 10 min στα $12.000 \times g$ σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία συλλογή της υδατικής φάσης και μεταφορά αυτής σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι.
11. Προσθήκη 500 μl διαλύματος φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) με καλή ανάδευση.
12. Φυγοκέντρηση για 10 min στα $12.000 \times g$ σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία συλλογή της υδατικής φάσης και μεταφορά αυτής σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι. Σε αυτό το σημείο μετράμε τον όγκο της υδατικής φάσης.
13. Προσθήκη παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) σε ποσότητα ίση με το 0.6 του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
14. Φυγοκέντρηση για 15 min στα $12.000 \times g$ σε θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.
15. Έκπλυση του ιζήματος με αιθανόλη 70% και φυγοκέντρηση για 15 min στα $12.000 \times g$ σε θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.

16. Πραγματοποιείται απομάκρυνση υπολειμμάτων υπερκειμένου με εξάτμιση μέχρι ξηρού σε SpeedVac.
17. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 20 μ l διαλύματος TE/RNase [99 μ l TE + 1 μ l RNase (10 mg/ml)] και επώαση στους 37 °C για 20 min.
18. Φυλάσσεται στους -20 °C για περαιτέρω χρήση.

2.5.2 Διαλύματα

Διάλυμα CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)/NaCl: : 4.1 gr NaCl διαλύονται σε 80 ml H₂O και προστίθενται αργά 10 gr CTAB με ταυτόχρονη θέρμανση (65 °C) και πολύ ήπια ανάδευση. Η διαδικασία αυτή διαρκεί περισσότερο από 3 ώρες μέχρι την πλήρη διάλυση του CTAB. Τέλος, προστίθεται H₂O μέχρι τελικού όγκου 100 ml και το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο.

Ρυθμιστικό διάλυμα TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH:8.0.

2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

2.6.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με μεθόδους αλκαλικής λύσης των κυττάρων

2.6.1.1 Αρχή της μεθόδου

Οι μέθοδοι αλκαλικής λύσεως για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA στηρίζονται στο εξής: Σε υψηλό pH οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δυο αλυσίδες του DNA διασπώνται (μετουσίωση). Όταν κατά την ουδετεροποίηση το πλασμιδιακό DNA επανουσιώνεται, το χρωμοσωμικό παραμένει μετουσιωμένο, διευκολύνοντας έτσι την επιλεκτική απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

2.6.1.2 Πειραματική πορεία

Η παρούσα μέθοδος είναι μια παραλλαγή της μεθόδου απομόνωσης DNA σε μεγάλη κλίμακα προσαρμοσμένη σε μικρούς όγκους καλλιέργειας και ακολουθεί την εξής πειραματική διαδικασία:

1. Από καλλιέργεια 1.5 ml τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 12.000 × g για 3 min.
2. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 100 μ l διαλύματος I και το εναιώρημα επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 min.
3. Στη συνέχεια προστίθενται στο παραπάνω εναιώρημα 200 μ l διαλύματος II και το μίγμα επωάζεται σε μίγμα πάγου-νερού (0 °C) για 10 min.
4. Ακολουθεί προσθήκη 150 μ l διαλύματος III, ήπια ανάδευση και επώαση σε μίγμα πάγου-νερού (0 °C) για 5 min.
5. Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται στα 12.000 × g, για 10 min, στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Στη συνέχεια συλλέγονται 400 μ l από το υπερκείμενο σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι στο οποίο προστίθενται 320 μ l ψυχρής (-20 °C) ισοπροπανόλης και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 min.
7. Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται στα 12.000 × g, για 10 min, στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.

8. Ακολουθεί συλλογή του ιζήματος, ξήρανση και επαναιώρηση σε 300 μ l TE.
9. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθενται 30 μ l CH₃COOK 3M, pH 5.5 και 800 μ l ψυχρής (-20 °C) αιθανόλης και το μίγμα επωάζεται στους -80 °C για 30 min.
10. Το μίγμα φυγοκεντρείται στα 12.000 $\times$ g, για 10 min στους 4 °C, το ίζημα συλλέγεται, εκπλένεται με 70% αιθανόλη, ξηραίνεται και επαναιωρείται στον κατάλληλο όγκο νερού ή διαλύματος TE.

2.6.1.3 Διαλύματα

Διάλυμα I: 50 mM γλυκόζης
25 mM Tris (τρις-υδροξυ-αμινομεθάνιο)-HCl pH=8
10 mM EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
5 mg/ml λυσοζύμης

Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

Διάλυμα II: 0.2 N NaOH
1% SDS (δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο)

Το διάλυμα παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση του.

Διάλυμα III: 3M CH₃COOK pH 5.5
Διάλυμα TE: 10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA pH 8

2.6.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) Nucleospin® Plasmid της Macherey-Nagel

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η αυτοματοποιημένη μέθοδος (kit) Nucleospin Plasmid της Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.6.2.1 Πειραματική πορεία

Συνοπτικά, το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Καλλιέργεια και συλλογή των κυττάρων

Φυγοκέντρηση καλλιέργειας κυττάρων 1-5 ml για 30 s σε 11.000 $\times$ g και απομάκρυνση του υπερκειμένου.

2. Κυτταρική λύση

Προσθήκη 250 μ l διαλύματος A1 και επαναιώρηση των κυττάρων με χρήση περιστροφικού αναδευτήρα (vortex). Προσθήκη 250 μ l διαλύματος A2. Ήπια ανάδευση για 6-8 φορές (χωρίς χρήση περιστροφικού αναδευτήρα) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Προσθήκη 300 μ l διαλύματος A3 και ήπια ανάδευση για 6-8 φορές. Φυγοκέντρηση για 10 min σε 11.000 $\times$ g σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Δέσμευση του DNA

Τοποθέτηση του υπερκείμενου σε στήλη NucleoSpin Plasmid και φυγοκέντρηση για 1 min σε $11.000 \times g$. Απομάκρυνση του υπερκειμένου.

4. Έκπλυση και ξήρανση της στήλης

Προσθήκη 600 μ l A4 και φυγοκέντρηση για 1 min σε $11.000 \times g$. Προσθήκη 500 μ l προθερμασμένου διαλύματος AW (50 °C) και φυγοκέντρηση για 1 min σε $11.000 \times g$.

5. Έκλυση του πλασμιδιακού DNA.

Προσθήκη 50 μ l διαλύματος AE σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και φυγοκέντρηση σε $11.000 \times g$ για 1 min. Το πλασμιδιακό DNA φυλάσσεται στους -20 °C για περαιτέρω χρήση.

2.7 Απομόνωση ολικού RNA

Πριν την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης RNA πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της επιφάνειας εργασίας με διάλυμα απολύμανσης RNaseZap™ (ThermoFisher Scientific) για την εξάλειψη ριβονουκλεασών (RNases), οι οποίες ακόμα και σε ελάχιστες ποσότητες είναι ικανές να καταστρέψουν το RNA.

2.7.1 Πειραματική πορεία

Για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα Sphe3 χρησιμοποιήθηκε η αυτοματοποιημένη μέθοδος (kit) Nucleospin® RNA της Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, αλλά με μικρές τροποποιήσεις στο στάδιο προετοιμασίας των δειγμάτων. Η διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο (0 °C) και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Προετοιμασία δειγμάτων

25 ml καλλιέργειας φυγοκεντρώνται για 15 min στα $11.000 \times g$ στους 4 °C και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 100 μ l ρυθμιστικού διαλύματος TE το οποίο περιέχει λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 10 mg/ml. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex και επώαση για 1 h στους 37 °C.

2. Λύση κυττάρων

Στο εναιώρημα των κυττάρων προστίθενται 350 μ l ρυθμιστικού διαλύματος RA1 και 3.5 μ l β -μερκαπτοαιθανόλη, με καλή ανάδευση (vortex).

3. Φιλτράρισμα του εναιωρήματος

Το μίγμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη Nucleospin® Filter Column, η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωληνάκι συλλογής (2 ml). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $11.000 \times g$ για 1 min, με την οποία επιτυγχάνεται φιλτράρισμα του μίγματος μέσω της στήλης και μείωση του ιξώδους και της θολερότητας του.

4. Ρύθμιση των συνθηκών δέσμευσης του RNA

Στο διαυγές πλέον μίγμα προστίθενται 350 μ l αιθανόλη 70% με καλή ανάδευση.

5. Δέσμευση του RNA

Μετά από καλή ανάδευση με πιπετάρισμα, το εναίωρημα μεταφέρεται στην ειδική στήλη Nucleospin® RNA II Column η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωληνάκι συλλογής και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 s στα $11.000 \times g$. Το υγρό απορρίπτεται και η ειδική στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι συλλογής.

6. Αφαλάτωση της μεμβράνης της στήλης

Προστίθενται στη στήλη 350 μ l ρυθμιστικό διάλυμα αφαλάτωσης της μεμβράνης (MDB, Membrane Desalting Buffer) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα $11.000 \times g$. Το υγρό απορρίπτεται.

7. Απομάκρυνση του γενωμικού DNA

Στη στήλη προστίθενται 95 μ l DNase reaction mixture και ακολουθεί επώαση για 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

8. Έκπλυση και ξήρανση της μεμβράνης

Πρώτη έκπλυση: Προστίθενται 200 μ l ρυθμιστικό διάλυμα RA2 στη στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 s στα $11.000 \times g$. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι συλλογής.

Δεύτερη έκπλυση: Προστίθενται 600 μ l ρυθμιστικό διάλυμα RA3 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 s στα $11.000 \times g$. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι συλλογής.

Τρίτη έκπλυση: Προστίθενται 250 μ l ρυθμιστικό διάλυμα RA3 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 min στα $11.000 \times g$. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι συλλογής τύπου erpendorf απαλλαγμένο από νουκλεάσες.

9. Έκλωση του ολικού RNA

Προστίθενται στη στήλη 60 μ l νερού, απαλλαγμένου από ριβονουκλεάσες, και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα $11.000 \times g$ και συλλογή του εκλούμενου RNA.

2.7.2 Κατεργασία απομονωμένου RNA με δεοξυριβονουκλεάση DNase I

Το ένζυμο DNase I είναι μια ενδονουκλεάση η οποία είναι ικανή να καταλύει σε τυχαίες θέσεις, την αποδόμηση τόσο των δίκλωνων όσο και των μονόκλωνων μορίων DNA, οδηγώντας σε ολιγονουκλεοτίδια με 5'- φωσφορικά άκρα. Μετά την απομόνωση ολικού RNA, πραγματοποιείται πάντα κατεργασία με το ένζυμο DNase I, για την απομάκρυνση κάθε υπολείμματος DNA.

Η κατεργασία με το ένζυμο DNase I, περιλαμβάνει τα εξής στάδια :

1. Προετοιμασία αντιδρώντος μίγματος

Ολικό RNA	20-50 μ g
10 x ρυθμιστικό διάλυμα DNase I	5 μ l
DNase I (TaKaRa BIO, Japan)	10 units
Αναστολέας RNAσών	20 units

ddH₂O (απαλλαγμένο από RNases) έως 50 µl

2. Επώαση για 20-30 min στους 37 °C.
3. Προσθήκη 50 µl ddH₂O (απαλλαγμένο από RNases) και 100 µl διαλύματος φαινόλης: χλωροφορμίου (1:1) ακολουθούμενη από ανάδευση.
4. Φυγοκέντρηση για 5 min στα 10.000 × g.
5. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι. Προσθήκη 100 µl χλωροφορμίου ακολουθούμενη από ανάδευση.
6. Φυγοκέντρηση για 5 min στα 10.000 × g.
7. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι. Προσθήκη 10 µl 3M CH₃COONa και 250 µl παγωμένης αιθανόλης 100% ακολουθούμενη από ανάδευση. Παραμονή για 20 min στους -80 °C.
8. Φυγοκέντρηση για 10 min στα 12.000 g στους 4 °C και απόχυση του υπερκείμενου.
9. Έκπλυση του ιζήματος με παγωμένη αιθανόλη 70%. Φυγοκέντρηση για 5 min στα 12.000 × g στους 4 °C και απόχυση του υπερκείμενου.
10. Ξήρανση του ιζήματος.
11. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 50 µl ddH₂O (απαλλαγμένο από RNases).

2.8 Καθαρότητα και ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων

Μετά από κατάλληλες αραιώσεις του υπό μελέτη δείγματος λαμβάνεται μια μέτρηση απορρόφησης στα 260 nm και μια στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται θεωρώντας ότι: OD₂₆₀=1 αντιστοιχεί σε 50 µg δίκλωνου DNA/ml διαλύματος, ενώ η συγκέντρωση του RNA υπολογίζεται θεωρώντας ότι: OD₂₆₀=1 αντιστοιχεί σε 40 µg RNA/ml διαλύματος. Τα διαλύματα του DNA και του RNA είναι καθαρά όταν ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ είναι περίπου 1.8 (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989).

Εναλλακτικά, γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας του DNA και του RNA με τη χρήση Q3000 UV Spectrophotometer Q3000 (Wavelength: 260nm, 280nm, 380nm) (Quawell).

2.9 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

2.9.1 Αρχή της μεθόδου (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989)

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης αποτελεί μια ηλεκτροχημική μέθοδο διαχωρισμού, καθαρισμού και απομόνωσης τμημάτων νουκλεϊκών οξέων. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων στο πήκτωμα και το DNA (ή το RNA) λόγω του αρνητικού του φορτίου

κινείται προς το θετικό πόλο στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Οι εξής παράγοντες επηρεάζουν τη μετακίνηση του DNA στο πήκτωμα αгарόζης:

- i. **Το μέγεθος του τμήματος DNA.** Τα μικρότερα μόρια DNA κινούνται ταχύτερα, καθώς συναντούν μικρότερη αντίσταση στους πόρους του πηκτώματος. Αντίθετα, τα μεγαλύτερα μόρια DNA κινούνται βραδύτερα. Συνεπώς τα μικρότερα μόρια εντοπίζονται προς το κάτω μέρος του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα προς το επάνω μέρος του πηκτώματος. Για να υπολογίσουμε το μέγεθος του τμήματος DNA που ηλεκτροφορείται, τοποθετούμε πάντα στο πήκτωμα, εκτός από τα δείγματά μας, και έναν μάρτυρα με τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους.
- ii. **Η διαμόρφωση του DNA.** Τα μόρια του DNA μπορεί να έχουν τρεις διαμορφώσεις: 1. Κυκλικά μόρια (form-I: πλασμίδια, βακτηριακό ή ιϊκό DNA), κυκλικά μόρια με εγκοπές (form-II: πλασμίδια που έχουν εγκοπές στη μία αλυσίδα) ή ευθύγραμμα μόρια (form-III: είναι συνήθως όλα τα μόρια που έχουν υποστεί πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες). Μόρια DNA ίδιου μεγέθους, αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης, έχουν διαφορετική κινητικότητα, με τα υπερελικωμένα μόρια να κινούνται ταχύτερα και να ακολουθούν τα ανοιχτά κυκλικά και τα ευθύγραμμα μόρια DNA (Grinsted and Bennett 1988). Τα γραμμικά μόρια DNA μετακινούνται στο πήκτωμα αντιστρόφως ανάλογα του δεκαδικού λογαρίθμου του μεγέθους τους.
- iii. **Η συγκέντρωση της αгарόζης.** Η κινητικότητα του DNA σε σχέση με τη συγκέντρωση της αгарόζης δίνεται από τον τύπο: $\log \mu = \log \mu_0 - k_r \cdot t$, όπου μ είναι η κινητικότητα του DNA, μ_0 η ελεύθερη κινητικότητα του DNA, k_r ο συντελεστής καθυστέρησης και t η συγκέντρωση της αгарόζης.
- iv. **Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.** Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί σταθερό το pH και περιέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Απουσία ιόντων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται ελάχιστα μέσα στο πήκτωμα. Τα συνήθη διαλύματα ηλεκτροφόρησης είναι το TBE και το TAE και χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση 1x.
- v. **Η τάση πεδίου.** Ο καλύτερος διαχωρισμός μορίων επιτυγχάνεται σε τάση ≤ 5 Volt/cm.

Για να απεικονιστούν οι ζώνες των μορίων DNA στο πήκτωμα αгарόζης είναι απαραίτητη μια ουσία που να καθιστά ορατά τα μόρια του DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι μια χρωστική που έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα γι' αυτόν τον σκοπό. Παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή του RNA) μέσω σχηματισμού δεσμών Van Der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία 302-366 nm. Ο φθορισμός του συμπλόκου EtBr-DNA είναι 20-30 φορές ισχυρότερος από αυτόν του ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου. Η χρωστική προστίθεται στο πήκτωμα κατά την παρασκευή του σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0,5 µg/ml. Η χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή γιατί η ουσία έχει μεταλλαξιγόνο και τερατογόνο δράση. Τα γάντια και τα πηκτώματα που περιέχουν βρωμιούχο αιθίδιο απορρίπτονται σε κάδους με σήμανση για τοξικά απόβλητα και υφίστανται κατάλληλη επεξεργασία εξουδετέρωσης.

2.9.2 Πειραματική πορεία

6. Σε κωνική φιάλη των 250 ml ζυγίζονται 0,8-2 gr αгарόζης (ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση του πηκτώματος). Στην κωνική φιάλη προστίθενται 150 ml

διαλύματος Tris Acetate Acid/EDTA (TAE) και τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων όπου αφήνεται μέχρι να διαλυθεί εντελώς η αгарόζη και το διάλυμα να γίνει διαυγές.

7. Η κωνική φιάλη ψύχεται στους 45-55 °C και προστίθεται στο διάλυμα κατάλληλος όγκος βρωμιούχου αιθιδίου, ώστε η τελική του συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 0,5 µg/ml.
8. Η ρευστή αгарόζη αποχύνεται στο εκμαγείο (tray), το οποίο περιέχει «χτενάκια», με προσοχή έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Τα «χτενάκια» με την απομάκρυνσή τους, αφού σταθεροποιηθεί το πήκτωμα, θα δημιουργήσουν τις θέσεις υποδοχής (πηγαδάκια) των δειγμάτων.
9. Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, προετοιμάζονται κατάλληλα. Προστίθεται σε καθένα από αυτά κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης, Gel Loading Buffer (GLB) σε αναλογία 5:1 δείγμα-GLB. Το διάλυμα GLB περιέχει γλυκερόλη, η παρουσία της οποίας διασφαλίζει ότι τα δείγματα έχουν πυκνότητα μεγαλύτερη του υδατικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης και μπορούν να καθιζάνουν στις θέσεις υποδοχής. Το διάλυμα αυτό περιέχει και δύο αρνητικά φορτισμένες χρωστικές (μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανού του ξυλενίου), των οποίων η μετακίνηση στο πήκτωμα αгарόζης είναι ενδεικτική της πορείας των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση.
10. Το πήκτωμα αгарόζης τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα TAE σε ποσότητα ώστε να υπερκαλύψει το πήκτωμα κατά περίπου 1 mm. Κατά την πλήρωση με TAE της συσκευής ηλεκτροφόρησης εξασφαλίζεται ότι δεν έχει παγιδευτεί αέρας στο εσωτερικό των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων.
11. Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής του πηκτώματος με πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου και εφαρμόζεται τάση 2-5 Volt/cm.
12. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα EtBr-DNA, τα οποία εμφανίζονται σαν πορτοκαλόχρωμες ζώνες. Η φωτογράφιση του πηκτώματος γίνεται στο σύστημα Gel Doc EZ Gel Documentation System της BIO-RAD.

2.9.3 Διαλύματα

Πίνακας 2.6. Σύσταση διαλύματος ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων, TAE.

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων TAE (Tris-acetate):	0.04 M Tris-acetate
	0.001 M EDTA pH=8.0

Το διάλυμα παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 50 φορές μεγαλύτερη (50x) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το τελικό διάλυμα (1x) παρασκευάζεται λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με κατάλληλη αραίωση του διαλύματος 50x.

Πίνακας 2.7. Σύσταση διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων ηλεκτροφόρησης, GLB.

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (GLB):	0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης
	0.25% κυανού του ξυλενίου
	30% γλυκερόλη

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4° C.

2.10 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η απομόνωση πραγματοποιείται με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Extract II της Macherey – Nagel και ακολουθείται το πρωτόκολλο με τις οδηγίες του κατασκευαστή:

1. Το δείγμα φορτώνεται σε πήκτωμα αγαρόζης και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση. Η ζώνη DNA που πρόκειται να καθαριστεί, αποκόβεται από το πήκτωμα αγαρόζης, ζυγίζεται ($1\text{ g} = 1\text{ ml}$) και τοποθετείται σε πλαστικό αποστειρωμένο σωληνάκι.
2. Για κάθε 100 mg αγαρόζης προστίθενται 200 μl διάλυμα NT.
3. Το δείγμα επωάζεται στους 50 °C μέχρι να διαλυθεί πλήρως το μείγμα, ενώ αναδεύεται ανά 2-3 min.
4. Το μείγμα τοποθετείται σε στήλη Nucleospin Extract II και φυγοκεντρείται για 1 min σε $11.000 \times g$. Το υπερκείμενο αποχύνεται.
5. Προστίθενται 600 μl διάλυμα NT3 ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 min σε $11.000 \times g$ και γίνεται απόχυση υπερκείμενου.
6. Γίνεται φυγοκέντρωση για 2 min σε 11.000 g για απομάκρυνση υπολειμμάτων των διαλυμάτων από τη στήλη.
7. Προστίθενται 15-50 μl διάλυμα NE, ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και τέλος φυγοκέντρωση για 1 min σε $11.000 \times g$.

2.11 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

2.11.1 Αρχή της μεθόδου (Mullis et al. 1986)

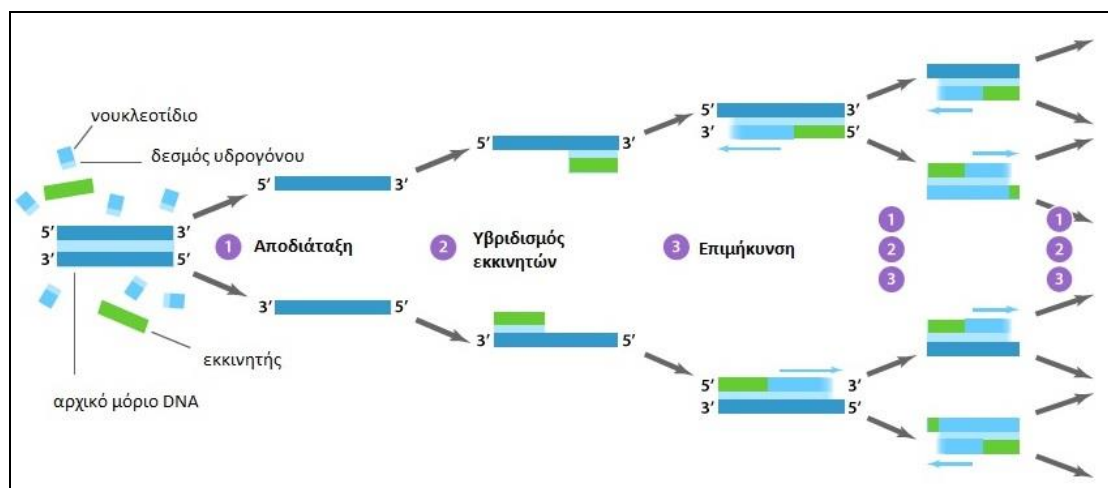
Η τεχνική της PCR προσφέρει με έναν απλό τρόπο την κλωνοποίηση μιας επιθυμητής αλληλουχίας, χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση ζωντανών κυττάρων εκμεταλλευόμενη κάποια χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου.

Για να ξεκινήσει η DNA πολυμεράση τη σύνθεση απαιτείται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA. Οι δύο κλώνοι ενός μορίου DNA θα πρέπει να διαχωριστούν και ένα ολιγονουκλεοτίδιο να υβριδιστεί σε ένα σημείο του ενός κλώνου, έτσι θα αρχίσει η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου από το σημείο που υβριδίστηκε το ολιγονουκλεοτίδιο-εκκινητής (primer).

Επομένως, ένα οποιοδήποτε τμήμα του δίκλωνου DNA μπορεί να πολλαπλασιαστεί επιλέγοντας δυο εκκινητές που υβριδίζουν εκατέρωθεν της επιθυμητής αλληλουχίας, έτσι ώστε ο καθένας να είναι συμπληρωματικός με τον έναν κλώνο και οι δύο μαζί να καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος.

Για να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν πρέπει ο κύκλος αντιγραφής του DNA να επαναληφθεί πολλές φορές. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- i. Διαχωρισμός των δύο κλώνων με θέρμανση του αντιδρώντος μίγματος περίπου στους 95 °C.
- ii. Μείωση της αρχικής θερμοκρασίας του μίγματος για να υβριδίσουν οι εκκινητές με τους δύο κλώνους. Η ακριβής θερμοκρασία και ο απαιτούμενος χρόνος ψύξης ποικίλουν ανάλογα με το μέγεθος της αλληλουχίας-στόχου.
- iii. Λαμβάνει χώρα η σύνθεση του DNA, με άνοδο της θερμοκρασίας συνήθως στους 72 °C.



Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

2.11.2 Πειραματική πορεία

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιούνται σε τελικό όγκο 25 ή 50 μl . Η σύσταση και οι συνθήκες της αντίδρασης προτείνονται από τον κατασκευαστή της εκάστοτε πολυμεράσης, ενώ εντέλει καθορίζονται ύστερα από βελτιστοποιήσεις στο πρωτόκολλο και με βάση τη θερμοκρασία υβριδισμού (T_m) των εκκινητών που χρησιμοποιούνται σε κάθε αντίδραση. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται στον θερμοκυκλοποιητή GS1 Thermal Cyclers (G-Storm).

Πίνακας 2.8. Ένζυμα πολυμερασών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Πολυμεράση	Εταιρεία	Σκοπός
KapaTaq PCR Kit	KapaBiosystems, Roche	Έλεγχος εκκινητών για την qPCR
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	ThermoFisher Scientific	Κλωνοποίηση γονιδίων
KapaHiFi PCR Kit	KapaBiosystems, Roche	Κλωνοποίηση γονιδίων
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit	KapaBiosystems, Roche	qPCR

Ακολουθεί η σύσταση αντίδρασης με το ένζυμο Phusion για την ενίσχυση του γονιδίου Asphe3_35170:

Συστατικά	Αντίδραση όγκου 50 μl
PCR-grade water	33.5 μl
5X KAPA HF Buffer	10 μl
10 mM KAPA dNTP Mix	1 μl
10 μM #catAfor	2 μl
10 μM #catArev	2 μl
Εκμαγείο DNA (10 – 100 ng)	1 μl

1 U/μL KAPA HiFi	0.5 μl
------------------	--------

Παρακάτω φαίνονται οι συνθήκες του προγράμματος που χρησιμοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή για την ενίσχυση του γονιδίου Asphe3_35170 με το ένζυμο Phusion:

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
1	98	3 min	1
2	98	30 sec	30
3	58	30 sec	
4	72	1 min	
5	72	10 min	1
6	10	παραμονή	

Ακολουθεί η σύσταση της αντίδρασης με το ένζυμο KapaHiFi για την ενίσχυση του γονιδίου Asphe3_36590:

Συστατικά	Αντίδραση όγκου 25 μl
PCR-grade water	16.25 μl
5X KAPA HiFi Buffer	5 μl
10 mM KAPA dNTP Mix	0.75 μl
10 μM #36590for	0.75 μl
10 μM #36590rev	0.75 μl
Εκμαγείο DNA (10 – 100 ng)	1 μl
1 U/μL KAPA HiFi	0.5 μl

Παρακάτω φαίνονται οι συνθήκες του προγράμματος που χρησιμοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή για την ενίσχυση του γονιδίου Asphe3_36590 με το ένζυμο KapaHiFi:

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
1	95	5 min	1
2	98	20 sec	30
3	64	15 sec	
4	72	2 min	
5	72	5 min	1
6	10	παραμονή	

2.12 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

2.12.1 Αρχή της μεθόδου

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης το RNA λειτουργεί σαν εκμαγείο για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA) με τη βοήθεια

του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια RNA-κατευθυνόμενη DNA πολυμεράση. Σε αυτή την περίπτωση οι γενετικές πληροφορίες μεταβιβάζονται από το RNA στο DNA, το αντίστροφο από την κανονική κατεύθυνση της μεταφοράς πληροφοριών (από αυτό πήρε και το όνομά του το ένζυμο που καταλύει αυτό το βήμα).

Η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει μια αλυσίδα συμπληρωματική του εκμαγείου RNA, αν της δοθεί ένας εκκινητής που να περιέχει ένα ελεύθερο 3'-OH άκρο και διαθέτει βάσεις συμπληρωματικές του RNA. Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αυτό το ένζυμο για να συνθέσουμε DNA από mRNA δίνοντας έναν ολιγο-dT ως εκκινητή, γιατί αυτός σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την αλληλουχία mRNA. Η υπόλοιπη αλυσίδα cDNA συντίθεται παρουσία των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοζιτών. Το RNA αυτού του υβριδίου RNA-DNA υδρολύεται εν συνεχεία σε υψηλότερο pH. Το 3' άκρο του DNA που σχηματίστηκε δημιουργεί μια κάμψη φουρκέτας και εκκινεί τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA.

2.12.2 Πειραματική πορεία

Για την μετατροπή του RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε η αυτοματοποιημένη μέθοδος PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa), που εκτός από τη σύνθεση του cDNA προσφέρει την αντίδραση εξάλειψης υπολειμάτων γενωμικού DNA.

Αν και τα δείγματα RNA μπορούν να επεξεργαστούν με DNase I (σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο προσεγγίσεις εξάλειψης του DNA), στη συνέχεια η DNase I πρέπει να απενεργοποιηθεί και να εξαλειφθεί, κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αποδόμηση ή απώλεια του RNA.

Η σύνθεση του cDNA από RNA μπορεί να επιτευχθεί χωρίς απώλεια σε μια γρήγορη αντίδραση διάρκειας μικρότερης από 20 min. Το γενωμικό DNA εξαλείφεται με προσθήκη του gDNA Eraser, το οποίο έχει ισχυρή δραστηριότητα αποδόμησης του DNA, για 2 min στους 42 °C. Στη συνέχεια προστίθεται ένα αντιδραστήριο της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης, που περιλαμβάνει ένα συστατικό που αναστέλλει εντελώς την αποδόμηση του DNA και η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης λαμβάνει χώρα για 20 min.

Η προετοιμασία των διαλυμάτων πραγματοποιείται στον πάγο. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

➤ Αντίδραση εξάλειψης γενωμικού DNA

<Για κάθε αντίδραση>	
Αντιδραστήριο	Ποσότητα
5x gDNA Eraser ρυθμιστικό διάλυμα	2.0 µl
gDNA Eraser	1.0 µl
συνολικό RNA	*1
PCR-grade water	*2
Συνολικός όγκος	10.0 µl

*1: μέχρι 1 µg συνολικού RNA για ανάλυση qPCR με χρήση χρωστικής SYBR® Green και μέχρι 2 µg συνολικού RNA για ανάλυση qPCR με χρήση ιχνηθετών Taqman® Probe,

μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης συνολικού όγκου 20 µl.

*²: συμπληρώνεται μέχρι την πλήρωση του συνολικού όγκου.

Ακολουθεί επώαση στους 42 °C για 2 min.

➤ Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης

<Για κάθε αντίδραση>	
Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Διάλυμα αντίδρασης από το βήμα 1	10.0 µl
5x PrimeScript ρυθμιστικό διάλυμα 2 (για Real Time)	4.0 µl
PrimeScript RT μίγμα ενζύμων I	1.0 µl
RT μίγμα εκκινητών	1.0 µl
PCR-grade water	4.0 µl
Συνολικός όγκος	20.0 µl

Ακολουθεί επώαση στους 42 °C για 20 min και αμέσως επώαση στους 85 °C για 5 sec. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20 °C.

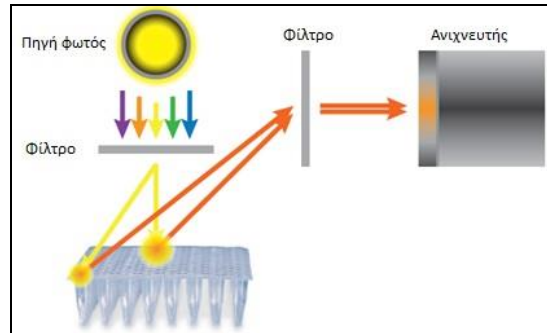
2.13 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR)

2.13.1 Αρχή της μεθόδου (Bustin et al. 2009)

Στις αντιδράσεις ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR) προσδιορίζουμε την ποσότητα του PCR προϊόντος στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης, σε αντίθεση με τη συμβατική PCR αντίδραση στην οποία η ποσοτικοποίηση γίνεται στο τελικό προϊόν μετά από συγκεκριμένο αριθμό κύκλων.

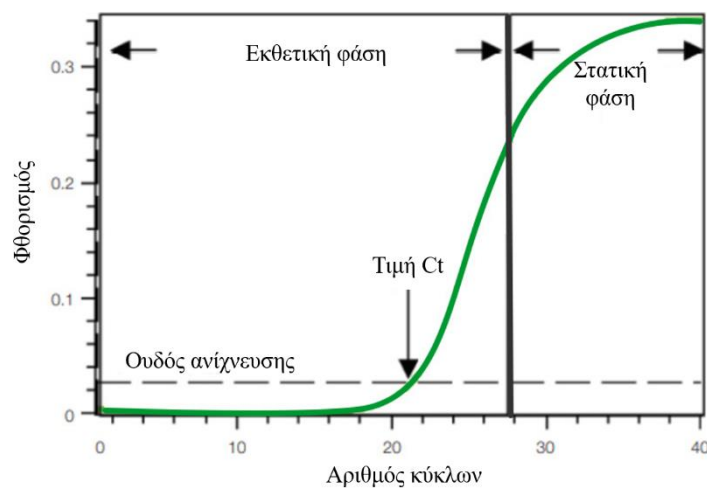
Στη δε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR), το RNA μεταγράφεται σε cDNA το οποίο εν συνεχεία χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για την Real-Time qPCR αντίδραση. Στην qRT-PCR γίνεται ποσοτική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας που υβριδίζεται με το γονίδιο στόχο.

Τα όργανα που χρησιμοποιούνται σε αυτή την τεχνική συνδυάζουν τη λειτουργία θερμοκυκλοποιητή για την ενίσχυση του DNA, οπτικού συστήματος για τη διέγερση των φθορίζουσών ουσιών και την ανίχνευση του εκπεμπόμενου φθορισμού και διαθέτουν κατάλληλο λογισμικό για τη συλλογή και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2. Βασική αρχή ανίχνευσης φθορισμού σε όργανο PCR πραγματικού χρόνου (Πηγή: BIORAD/applications-technologies/normalization-real-time-pcr-fluorescence-data-with-rox-passive-reference-dye).

Ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της Real-Time qPCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot) (Εικόνα 2.3), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.



Εικόνα 2.3. Σχηματική απεικόνιση της καμπύλης ενίσχυσης ενός δείγματος στην Real-Time qPCR (Πηγή: BIORAD/applications-technologies/qPCR Amplification).

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (στατική φάση, plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεων τους.

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (ουδός ανίχνευσης, threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.

2.13.2 Τρόποι ανίχνευσης προϊόντων της Real-Time qPCR

Η χρήση μιας φθορίζουσας ουσίας επιτρέπει τον διαρκή έλεγχο της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας ειδικούς θερμοκυκλοποιητές εξοπλισμένους με μονάδες ανίχνευσης φθορισμού. Ο μετρούμενος φθορισμός αντανακλά την ποσότητα του πολλαπλασιασμένου προϊόντος σε κάθε κύκλο. Η ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης qPCR γίνεται είτε με την ανίχνευση μιας φθορίζουσας ουσίας που δεσμεύεται μη ειδικά σε δίκλωνα μόρια DNA, είτε με χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών οι οποίοι υβριδοποιούνται με μια εσωτερική αλληλουχία του μορίου-στόχου.

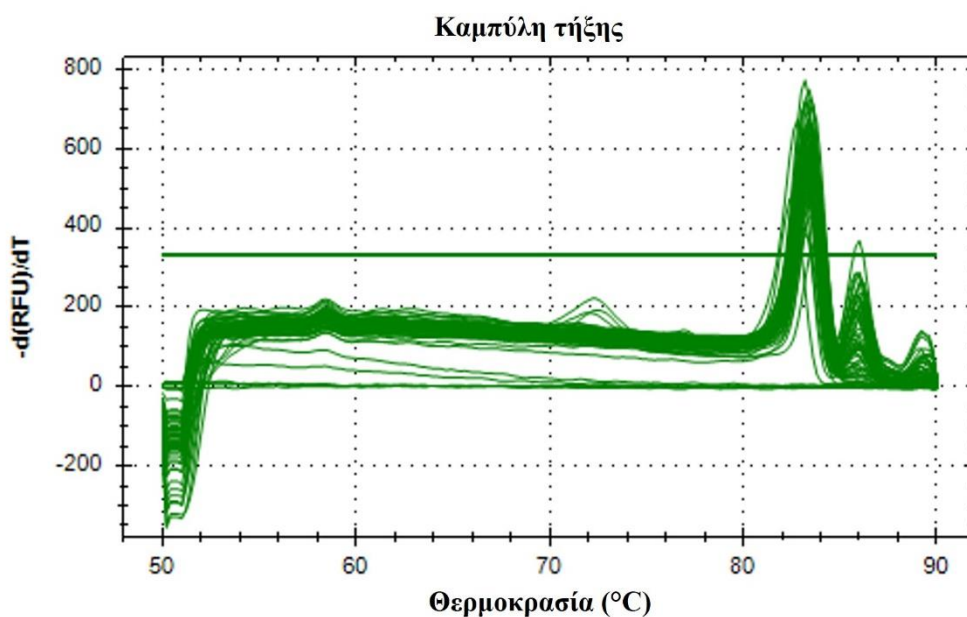
Σε αυτή την εργασία, χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης η χρωστική SYBR Green I μια φθορίζουσα ουσία που προσδένεται χωρίς διάκριση σε δίκλωνα μόρια DNA. Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Σημειώνεται ότι η SYBR Green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Το πλεονέκτημα του SYBR Green I είναι η απλότητά του. Η δράση του είναι παρόμοια με εκείνη του βρωμιούχου αιθιδίου, με τη διαφορά ότι το SYBR Green I δεν παρεμποδίζει τις DNA πολυμεράσες, οπότε μπορεί να προστεθεί απευθείας στο μίγμα της αντίδρασης PCR. Το SYBR Green I έχει χαμηλότερο background φθορισμό απ' ότι το βρωμιούχο αιθίδιο, μπορεί να ανιχνεύσει χαμηλότερες συγκεντρώσεις δίκλωνου DNA και δεν είναι τοξικό.

Στα πλεονεκτήματα του SYBR Green I συγκαταλέγονται ο απλός σχεδιασμός, η ικανότητα γρήγορης μελέτης πολλών γονιδίων, το χαμηλό κόστος, η δυνατότητα ανάλυσης καμπύλης τήξης (melting curve) η οποία επιτρέπει να εκτιμήσουμε την εξειδίκευση της αντίδρασης πολλαπλασιασμού.

Το βασικότερο μειονέκτημα στη χρήση φθορίζουσών ουσιών μη ειδικής δέσμευσης σε δίκλωνα μόρια DNA είναι ότι μπορούν να εκπέμπουν παρουσία οποιουδήποτε δίκλωνου DNA, ακόμα και ανεπιθύμητων προϊόντων ή διμερών των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR. Με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζεται η σύνθεση και ανίχνευση των συγκεκριμένων προϊόντων στόχων και κατά συνέπεια αλλοιώνεται η πρότυπη καμπύλη. Πάραυτα, ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών όπως επίσης και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών.

Σε αντιδράσεις που έχει χρησιμοποιηθεί η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I, είναι απαραίτητη η ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve analysis). Η μελέτη της καμπύλης τήξης μετά το πέρας της αντίδρασης επιτρέπει να διακριθούν τα προϊόντα της αντίδρασης και να αναλυθεί η εξειδίκευσή της, χωρίς να χρειαστεί ανάλυση των προϊόντων σε πήκτωμα αгарόζης. Η αρχή της ανάλυσης αυτής είναι ότι η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά από

χαμηλή τιμή (κατά την οποία όλες οι αλληλουχίες είναι υβριδοποιημένες) σε υψηλή, προκαλώντας διαχωρισμό των αλυσίδων. Καθώς το DNA αποδιατάσσεται, το SYBR Green I απελευθερώνεται και παρατηρείται μείωση του φθορισμού. Στη θερμοκρασία τήξης δύο είναι οι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο: το μέγεθος του δίκλωνου DNA και το περιεχόμενο σε κατάλοιπα GC. Όσο υψηλότερο είναι το περιεχόμενο σε GC κατάλοιπα και όσο μεγαλύτερο το μέγεθος της αλυσίδας, τόσο υψηλότερη θα είναι η θερμοκρασία τήξης. Συγκρίνοντας τις θερμοκρασίες τήξης των αναμενόμενων προϊόντων, η παρουσία ενός μη ειδικού προϊόντος ή σχηματισμού διμερών από τους εκκινητές ανιχνεύεται εύκολα. Η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται από το λογισμικό του οργάνου βάση των δεδομένων της καμπύλης τήξης, από την αρνητική πρώτη παράγωγο της αλλαγής του φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία ($-dF/dT$).



Εικόνα 2.4. Σχηματική απεικόνιση καμπύλης τήξης στην Real-Time qPCR.

2.13.3 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real-Time qPCR

Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της Real-Time qPCR: η απόλυτη και η σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης.

Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιούνται πρότυπες καμπύλες για τον προσδιορισμό του αριθμού των αντιγράφων ή της συγκέντρωσης ενός δείγματος. Διαδοχικές αραιώσεις δείγματος γνωστής ποσότητας συσχετίζονται γραμμικά με τις τιμές Ct. Το δείγμα μπορεί να είναι: ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA, γονιδιωματικό DNA, προϊόν PCR ή και cDNA που να περιέχει το γονίδιο στόχο. Καθίσταται έτσι εφικτός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης αγνώστων δειγμάτων με βάση τις Ct τιμές τους. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση η απόδοση της ενίσχυσης (amplification efficiency) θα πρέπει να είναι ίδια τόσο στα δείγματα όσο και στα πρότυπα.

Η απόδοση μιας αντίδρασης qPCR μπορεί να υπολογιστεί από την πρότυπη καμπύλη. Τυπικά μια πρότυπη καμπύλη δεν είναι παρά η γραμμική εξάρτηση $Ct=f(\log \text{ ng DNA/cDNA/copies κλπ})$, οπότε και η κλίση αυτής της εξάρτησης σχετίζεται με την απόδοση της αντίδρασης PCR. Όσο πιο κοντά είναι οι αποδόσεις των αντιδράσεων των δειγμάτων και των προτύπων,

τόσο πιο ακριβής είναι και η ποσοτικοποίηση. Για ένα γράφημα όπου στον y άξονα έχουμε την τιμή Ct και στον x άξονα την τιμή log (ng DNA/cDNA/copies κλπ) ισχύει: Απόδοση PCR (E)=[(10^{-1/κλίση})-1]x100%.

Στη σχετική ποσοτικοποίηση υπολογίζεται ο λόγος της ποσότητας ενός μορίου στόχου σε δείγμα προς την αντίστοιχη ποσότητα σε ένα δείγμα αναφοράς, το οποίο συχνά καλείται και βαθμονομητής (calibrator). Τα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση αναφέρονται σαν σχετικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Κατά τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων με την qRT-PCR είναι απαραίτητη η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων προκειμένου να διορθωθούν διάφορες μεταβλητές όπως η ποσότητα νουκλεϊκών οξέων στο δείγμα, μεταβλητότητα του φθορισμού του οργάνου, η διακύμανση των αποδόσεων της αντίδρασης καθώς και η ποιότητα και καθαρότητα του δείγματος. Η κανονικοποίηση γίνεται με βάση ένα γονίδιο που χρησιμοποιείται σαν γονίδιο αναφοράς (reference gene). Ένα γονίδιο αναφοράς θα πρέπει να έχει σταθερή έκφραση σε όλα τα δείγματα και τις πειραματικές συνθήκες που εξετάζεται. Σαν γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται συνηθέστερα γονίδια κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes) όπως για παράδειγμα τα γονίδια των: GAPDH, 18S ή 16S rRNA, β-ακτίνης, γυράσης, κ.ά. Βέβαια η έκφραση ακόμα και των γονιδίων κυτταρικής οικονομίας ποικίλλει σε κάποιο βαθμό και προτείνεται η εξέταση της σταθερότητας της έκφρασης διαφόρων γονιδίων για κάθε πείραμα.

2.13.4 Πειραματική πορεία

Μετά την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα του στελέχους Sphe3, που αναπτύχθηκαν παρουσία διαφόρων πηγών άνθρακα (γλυκόζη, φαινόλη, 3- και 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ) και συλλέχθηκαν στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης και τη σύνθεση cDNA ακολούθησε η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος κάτω από τις προαναφερθείσες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων.

Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε σε πλακέτες με 96 πηγαδάκια (PCR-Platten Low Profile 96 well, Kisker, Germany) και σε όργανο CFX96 Real-Time PCR (Bio Rad). Σαν χρωστική χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR® FAST qPCR kit Master Mix (2x) Universal, με την ιδιότητα να δεσμεύεται σε δίκλωνα μόρια DNA. Μια τυπική σύσταση της αντίδρασης σε τελικό όγκο 20μl περιέχει 19μl SYBR Green Master mix το οποίο περιέχει και τη DNA πολυμεράση KAPA SYBR™, 200nM από τον κάθε εκκινητή και τέλος 1μl από το προϊόν της αντίστροφης μεταγραφής σε διαφορετικές αραιώσεις. Η εξειδίκευση των εκκινητών καθώς και οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης προσδιορίστηκαν αρχικά με συμβατική αντίδραση PCR. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή ήταν το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Μετουσίωση	95	3 min	1
Μετουσίωση	95	10 sec	40
Αναδιάταξη	58	20 sec	
Επιμήκυνση	72	30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72	1 min	1
Καμπύλη τήξης	50-90	Ανάγνωση κάθε 0.2	1

		°C για 2 sec	
Επώαση	4	παραμονή	-

Το κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν έτσι ώστε να εξασφαλισθεί ακρίβεια και να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της qPCR. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για τυχόν μολύνσεις με μια αντίδραση χωρίς εκμαγείο για κάθε χρησιμοποιούμενο ζεύγος εκκινητών. Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το γονίδιο της γυράσης β (*gyrB*), λόγω της σταθερής του έκφρασης στις εξεταζόμενες συνθήκες. Η ποσότητα σε mRNA κάθε αγνώστου δείγματος κανονικοποιήθηκε με το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς. Οι πρότυπες καμπύλες σχεδιάστηκαν με κάθε χρησιμοποιούμενο ζεύγος εκκινητών χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις 5, 2, 1, 0.5, 0.2 και 0.1 ng ολικού RNA από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε γλυκόζη και αποτελούν το βαθμονομητή (M. R. Johnson et al. 2000). Οι αποδόσεις των αντιδράσεων προσδιορίστηκαν από τις κλίσεις των προτύπων καμπυλών (Corbella and Puyet 2003; Pfaffl 2001). Τα αποτελέσματα της qRT-PCR αναλύθηκαν με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης. Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με δείγμα βαθμονομητή, το υπόστρωμα γλυκόζης, και η ποσότητά τους υπολογίστηκε σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς, τη γυράση β (*gyrB*). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ο λόγος της συγκέντρωσης του γονιδίου στόχου προς το βαθμονομητή με το λόγο της συγκέντρωσης του γονιδίου στόχου προς το γονίδιο αναφοράς (Applied Biosystems 1997).

2.14 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

2.14.1 Αρχή της μεθόδου (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989)

Για την ανάλυση DNA και την κλωνοποίηση γονιδίων χρησιμοποιούνται οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, βακτηριακά ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες ζευγών βάσεων του DNA (συνήθως 4 έως 6) και διασπούν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που συγκρατούν δύο γειτονικές βάσεις και στις δυο αλυσίδες συμμετρικά εντός της περιοχής αναγνώρισης. Τα μεγέθη των τμημάτων του DNA που προκύπτουν μετά τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών υπολογίζονται συγκρίνοντας τις αποστάσεις που διανύουν σε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης με τις αποστάσεις πρότυπων ζωνών DNA γνωστού μεγέθους. Κάθε περιοριστικό ένζυμο έχει βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και σύστασης ρυθμιστικού διαλύματος στις οποίες δρα και οι οποίες δίνονται από τις παρασκευαστικές εταιρίες. Η συγκέντρωση των περισσότερων ενδονουκλεασών εκφράζεται σε Unit/μl, όπου 1 Unit ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πέψη 1μg DNA του φάγου λ σε 1ώρα, υπό τις κατάλληλες συνθήκες δράσεως του εκάστοτε ενζύμου.

2.14.2 Πειραματική πορεία

Όλα τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι της εταιρείας TaKaRa. Κάθε αντίδραση πέψης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10-20 μl, μέσα σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι με τα παρακάτω:

Σύσταση αντίδρασης πέψης	Όγκος (Τελική συγκέντρωση)
Δείγμα DNA	1-2 μl (0.5-1.0 μg)

Ένζυμο περιοριστικής ενδονουκλεάσης	1 μ l (2-10 U/ μ l)
10x ρυθμιστικό διάλυμα περιοριστικής ενδονουκλεάσης	Προσαρμόζεται (1x)
Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό (ds H ₂ O)	Έως τελικό όγκο αντίδρασης

Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του επιλεγμένου περιοριστικού ενζύμου για 1-2 ώρες. Στην περίπτωση διπλής πέψης χρησιμοποιείται το προτεινόμενο από την εταιρεία ρυθμιστικό διάλυμα και μεταξύ των δύο βέλτιστων θερμοκρασιών επιλέγεται η χαμηλότερη. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος EDTA σε τελική συγκέντρωση 10 mM. Ορισμένα περιοριστικά ένζυμα απενεργοποιούνται με επώαση στους 65 °C. Σε περίπτωση μερικής πέψης οι παραπάνω συνθήκες της αντίδρασης τροποποιούνται μειώνοντας αφενός το χρόνο της αντίδρασης σε 1-15 min και αφετέρου, τη συγκέντρωση του περιοριστικού ενζύμου 10 έως 100 φορές.

2.15 Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδια

2.15.1 Αρχή της μεθόδου (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989)

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA πρέπει να:

- Φέρουν τουλάχιστον ένα γονίδιο, το οποίο διευκολύνει την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων (συνήθως ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό).
- Μπορούν να μεταφέρονται εύκολα στα κύτταρα ξενιστές τους (μετασχηματισμός ή βακτηριακή σύζευξη).
- Είναι ικανά να αντιγράφονται αυτόνομα μέσα στα κύτταρα δέκτες.
- Περιέχουν ένα μεγάλο εύρος μονών θέσεων περιορισμού, οι οποίες αναγνωρίζονται από διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Αυτές οι θέσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κλωνοποίηση διαφόρων μορίων DNA. Μερικές από τις θέσεις αυτές βρίσκονται εντός των αλληλουχιών γονιδίων που κωδικοποιούν ενζυμικά συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης (γονίδια αναφοράς). Ένα κοινό τέτοιο σύστημα αποτελεί τμήμα του οπερονίου της λακτόζης. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει τον προαγωγό του οπερονίου και τμήμα του γονιδίου *lacZ*, το οποίο κωδικεύει ένα πεπτίδιο του αμινοτελικού άκρου 146 αμινοξέων του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση. Ως κύτταρα δέκτες χρησιμοποιούνται στελέχη του βακτηρίου *E. coli* που περιέχουν το λειτουργικό τμήμα του γονιδίου *lacZ* που κωδικοποιεί την περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου του ενζύμου. Τα δυο αυτά ατελή πολυπεπτιδικά μόρια της β-γαλακτοζιδάσης που παράγονται από την έκφραση των αντίστοιχων αλληλουχιών του πλασμιδιακού φορέα και του χρωμοσώματος του ξενιστή, μπορούν να αλληλοσυμπληρώνονται και να προκύπτει η λειτουργική πρωτεΐνη (α-συμπλήρωση) (Ullmann et al., 1967). Εντός της αλληλουχίας του αμινοτελικού τμήματος του γονιδίου *lacZ* του πλασμιδίου έχει ανασυνδυαστεί κατάλληλα μια περιοχή που φέρει πολλές θέσεις κλωνοποίησης και καλείται πολυσυνδέτης (multilinker). Ο πολυσυνδέτης δεν επηρεάζει την ικανότητα του αμινοτελικού πεπτιδίου να συμπληρώνει το μεταλλαγμένο στέλεχος του βακτηρίου *E. coli* ως προς τη δραστηριότητα της β-γαλακτοζιδάσης. Εισαγωγή ενός ξένου τμήματος DNA σε αυτή

την περιοχή έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή του μηνύματος για την παραγωγή του συμπληρωματικού πεπτιδίου του αμινοτελικού άκρου της β-γαλακτοζιδάσης και επομένως την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Η ανίχνευση της μη λειτουργικής β-γαλακτοζιδάσης και επομένως η διάκριση μεταξύ ανασυνδυασμένων και μη πλασμιδίων γίνεται με τη χρησιμοποίηση δυο ουσιών, της X-gal και του ισοπροπυλοθειο-β-D-γαλακτοζίτη (IPTG). Η πρώτη αποτελεί ένα χρωμογόνο υπόστρωμα της αντίδρασης της β-γαλακτοζιδάσης, η διάσπαση του οποίου δίνει μπλε χρώμα στις αποικίες. Η δεύτερη δρα ως επαγωγός της μεταγραφής του γονιδίου *lacZ*. Έτσι, οι βακτηριακές αποικίες που περιέχουν ανασυνδυασμένα ή μη πλασμίδια διακρίνονται εύκολα σε στερεό θρεπτικό μέσο επιλογής, ως λευκές ή μπλε αποικίες αντίστοιχα.

- v. Διατηρούνται σταθερά μέσα στα κύτταρα – ξενιστές. Τα πλασμίδια πρέπει να φέρουν κατάλληλη περιοχή έναρξης αντιγραφής (replicon), την οποία αναγνωρίζει το σύστημα αντιγραφής των κυττάρων ξενιστών τα οποία χρησιμοποιούνται.

2.15.2 Πειραματική πορεία

Η κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

2.15.2.1 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Γίνεται πέψη του πλασμιδιακού φορέα και του επιλεγμένου τμήματος DNA το οποίο πρόκειται να κλωνοποιηθεί με την κατάλληλη ή τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Όταν ο πλασμιδιακός φορέας και το DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί υπόκεινται σε μονή πέψη (πέψη με μία περιοριστική ενδονουκλεάση), πρέπει να γίνεται κατεργασία του φορέα με αλκαλική φωσφατάση ώστε να αποφευχθεί η επανακυκλοποίηση του. Η αλκαλική φωσφατάση δεν επιτρέπει την επανακυκλοποίηση του πλασμιδιακού φορέα γιατί αποφωσφορυλιώνει τα 5'-P άκρα του. Όταν ο πλασμιδιακός φορέας και το DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί υπόκεινται σε διπλή πέψη (πέψη με δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες), δεν χρειάζεται η κατεργασία του φορέα με αλκαλική φωσφατάση γιατί δεν υπάρχει κίνδυνος επανακυκλοποίησης του.

Η κατεργασία με την αλκαλική φωσφατάση γίνεται ως εξής:

1. Μετά την πέψη του πλασμιδιακού DNA γίνεται καταβύθιση του και επαναιώρηση του σε 100 μl TrisHCl pH 7.5.
2. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθενται 11 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος και 1 μl αλκαλικής φωσφατάσης.
3. Το διάλυμα επωάζεται στους 37 °C για 1 h.
4. Στο παραπάνω μίγμα προστίθενται δυο όγκοι φαινόλης : χλωροφορμίου, 1:1, για την απομάκρυνση της αλκαλικής φωσφατάσης. Το μίγμα ανακινείται και φυγοκεντρείται στα $12.000 \times g$ για 10 min στους 0 °C.
5. Η υδατική φάση (πάνω), μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και προστίθενται 2 όγκοι ψυχρής αιθανόλης. Το διάλυμα αφήνεται στους -80 °C για 30 min.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $12.000 \times g$ για 10 min στους 0 °C.
7. Το ίζημα εκπλένεται με 200 μl αιθανόλης 70% και φυγοκεντρείται στα $12.000 \times g$ για 10 min στους 0 °C.
8. Γίνεται ξήρανση του ιζήματος και επαναιώρησή του σε 10 μl αποστειρωμένου dsH_2O .

Αν η πέψη του πλασμιδιακού φορέα ή του DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί δημιουργεί απότομα άκρα τότε η κλωνοποίηση δεν είναι τόσο αποτελεσματική όσο στην περίπτωση των κολλωδών άκρων.

Σε περίπτωση που η πέψη του ενός τμήματος DNA δημιουργεί απότομα άκρα και του άλλου κολλώδη, μπορούν να δημιουργηθούν απότομα άκρα στο τμήμα του DNA που έχει κολλώδη άκρα χρησιμοποιώντας την T₄ DNA πολυμεράση.

Η T₄ DNA πολυμεράση χρησιμοποιείται για να φέρει στα 5' ή 3' προεξέχοντα άκρα σημασμένα ή μη σημασμένα νουκλεοτίδια (dNTPs) και ακολουθείται η εξής πειραματική διαδικασία:

1. Σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι προστίθενται:

Γραμμικό DNA επαναιωρημένο σε dsH ₂ O	35 μl
BSA	5 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα T ₄ DNA πολυμεράσης	5 μl
10mM dNTPs (από το καθένα)	1 μl
T ₄ DNA πολυμεράση	1 μl

2. Το παραπάνω μίγμα τοποθετείται στους 37 °C για 1 h.
3. Η αντίδραση της πολυμεράσης σταματάει με την προσθήκη 1 μl EDTA 0.5 M και 50 μl TE.
4. Γίνεται καταβύθιση του DNA και έκπλυσή του με 70% αιθανόλη.
5. Το DNA επαναιωρείται σε 15 μl dsH₂O.

2.15.2.2 Αντίδραση λιγάσης

Σε αυτό το στάδιο γίνεται η σύνδεση (ligation) των δυο ευθύγραμμων μορίων με την επίδραση της λιγάσης. Αυτό το ένζυμο καταλύει το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στα 5' και 3' φωσφορικά άκρα του τμήματος στόχου και του φορέα. Η ιδανική αναλογία μορίων ένθεσης-φορέα είναι 2:1 (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989). Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

1. Σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι προστίθενται:

Ευθύγραμμος γραμμικός φορέας	6-8 μl (0.2 μg)
Ευθύγραμμο τμήμα DNA προς κλωνοποίηση (ένθεση)	6-8 μl (0.8 μg)
10X ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	2 μl
T ₄ DNA λιγάση	1-2 μl
PCR-grade water	Έως 20 μl

2. Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 16 °C για την περίπτωση κολλωδών άκρων ή στους 25 °C για την περίπτωση απότομων άκρων για τουλάχιστον 18 h.

Ακολουθεί ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

2.16 Μετασχηματισμός του βακτηρίου *E.coli* με πλασμιδιακό DNA και επιλογή επιθυμητών μετασχηματισμένων κλώνων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο πρωτόκολλα μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων *E.coli* με ανασυνδυασμένο ή μη, πλασμιδιακό DNA.

2.16.1 Μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli* με εφαρμογή θερμικού σοκ

2.16.1.1 Αρχή της μεθόδου (Mandel and Higa 1970)

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην παρατήρηση των Mandel & Higa ότι βακτήρια που είχαν υποστεί κατεργασία με παγωμένο διάλυμα CaCl_2 και, στη συνέχεια, θερμάνθηκαν για σύντομο χρονικό διάστημα, ήταν ικανά να επιμολυνθούν με DNA του βακτηριοφάγου λ.

2.16.1.2 Πειραματική πορεία

1. Εμβολιασμός μονής αποικίας του στελέχους *E.coli* σε 5 ml LB και επώαση για 14-16 h, στους 37 °C, υπό ανάδευση (250 rpm).
2. Μεταφορά 100 μl από την αρχική καλλιέργεια σε καλλιέργεια 100 ml. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C, υπό ανάδευση (250 rpm) μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει τις 0.35 μονάδες ($\text{O.D.}_{600\text{nm}}=0.35$).
3. Επώαση της καλλιέργειας στον πάγο για 15 min.
4. Φυγοκέντρηση στα $2700 \times g$, για 10 min, στους 4 °C. Απομάκρυνση του υπερκλειμένου.
5. Επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 30 ml διαλύματος TB.
6. Φυγοκέντρηση στα $2700 \times g$, για 10 min, στους 4 °C. Απομάκρυνση του υπερκλειμένου.
7. Ήπια επαναιώρηση σε 4 ml TB.
8. Προσθήκη 10-15% γλυκερόλης και διαμοιρασμός των κυττάρων ανά 200 μl σε αποστειρωμένα μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια.

Τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας για μετασχηματισμό ή να αποθηκευτούν στους -80 °C για διάστημα έως δύο μήνες.

Ο μετασχηματισμός με τη χρήση των ανωτέρω επιδεκτικών βακτηρίων γίνεται ως εξής:

- Τα κύτταρα μεταφέρονται από τους -80 °C σε πάγο μέχρι να ξεπαγώσουν.
- Προστίθεται σε αυτά κατάλληλη ποσότητα πλασμιδιακού DNA και ακολουθεί επώαση για 30 min στον πάγο.
- Το εναιώρημα τοποθετείται στους 45 °C για 45 sec (θερμικό σοκ, heat shock).
- Στο εναιώρημα προστίθεται 1 ml LB και τα κύτταρα επώάζονται στους 37 °C για 1 h, ώστε να αναρρώσουν και να αντιγραφεί και εκφραστεί το πλασμιδιακό DNA.
- Ακολουθεί εμβολιασμός 0.1 ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα τρυβλία μπορεί να περιέχουν και IPTG ή Xgal, αν είναι απαραίτητο.

2.16.1.3 Διαλύματα

TB: 50 mM CaCl_2

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

Το διάλυμα αποστειρώνεται με τη χρήση φίλτρου 0.22 μm.

2.16.2 Μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli* με επίδραση ιόντων ασβεστίου

2.16.2.1 Αρχή της μεθόδου (Chung and Miller 1988)

Η μέθοδος στηρίζεται στο πρωτόκολλο των Chung & Miller και περιλαμβάνει την πρόσληψη πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα, τα οποία έχουν καταστεί επιδεκτικά μετά από επίδραση με ιόντα ασβεστίου.

2.16.2.2 Πειραματική πορεία

Η πειραματική πορεία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας των *E. coli* σε 20 ml LB, μέχρι οπτικής πυκνότητας (O.D.): 0.3-0.6 στα 600 nm.
2. 1 ml από την παραπάνω καλλιέργεια τοποθετείται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και φυγοκεντρείται στα $12.000 \times g$ για ένα min.
3. Το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης απορρίπτεται και ακολουθεί επαναιώρηση των κυττάρων σε 100 µl TSB.
4. Επώαση για 10 min σε μίγμα νερού-πάγου (0 °C).
5. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πλασμιδιακού DNA.
6. Επώαση για 5-30 min σε μίγμα νερού-πάγου (0 °C).
7. Στο παραπάνω ελαιώρημα προστίθενται 900 µl TSB + 20mM γλυκόζη.
8. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C υπό ανάδευση για 1h, έτσι ώστε τα κύτταρα να αναρρώσουν και να τους δοθεί χρόνος να αντιγράψουν και να εκφράσουν το πλασμιδιακό DNA.
9. Μετά την ανάρρωση των κυττάρων, γίνεται εμβολιασμός 0.1 ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων (προσθήκη IPTG ή Xgal, αν είναι απαραίτητο).

2.16.2.3 Διαλύματα

TSB: Luria Broth pH 6.1

10% PEG 3.350

5% DMSO

10mM MgCl₂

10mM MgSO₄

2.16.3 Επιλογή επιθυμητών μετασχηματισμένων κλώνων

Σε αυτό το στάδιο γίνεται η επιλογή των αποικιών που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Σε αυτή την εργασία η επιλογή των αποικιών με τον ανασυνδυασμένο φορέα pBlueScriptSK(+) έγινε με την ανίχνευση της δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης απουσία του οποίου οι μετασυσζευγμένες αποικίες παραμένουν λευκές.

1. Ετοιμάζονται τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο και το κατάλληλο αντιβιοτικό.
2. Επιστρώνεται όλη η επιφάνεια του στερεού θρεπτικού μέσου των τρυβλίων με 20 µl διαλύματος X-gal και 8 µl διαλύματος IPTG.
3. Τα τρυβλία τοποθετούνται στους 37 °C για μια ώρα ώστε να απορροφηθούν πλήρως τα υγρά από την επιφάνεια του άγαρ.

4. Μετά τον μετασχηματισμό του βακτηρίου *E. coli* με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και τον εμβολιασμό στα τρυβλία με το θρεπτικό μέσο επιλογής από κατάλληλη αραιώση ώστε να προκύψουν αποικίες προς επιλογή ανά τρυβλίο, τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για μια νύχτα.
5. Την επομένη μέρα τα τρυβλία μεταφέρονται στους 4 °C για 3-4 ώρες, ώστε να γίνει πιο έντονο το μπλε χρώμα των μη ανασυνδυασμένων αποικιών.
6. Στη συνέχεια επιλέγονται οι λευκές αποικίες, οι οποίες περιέχουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και ελέγχονται με απομόνωση και ανάλυση του περιέχοντος πλασμιδιακού DNA.

2.16.4 Διαλύματα

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)	100 mg/ml σε διμεθυλοφορμαμίδιο Το διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως στους -20 °C.
IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside)	2 g IPTG σε 10 ml τελικό όγκο ds H ₂ O Το διάλυμα διηθείται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45 μm. Φυλάσσεται στους -20 °C.

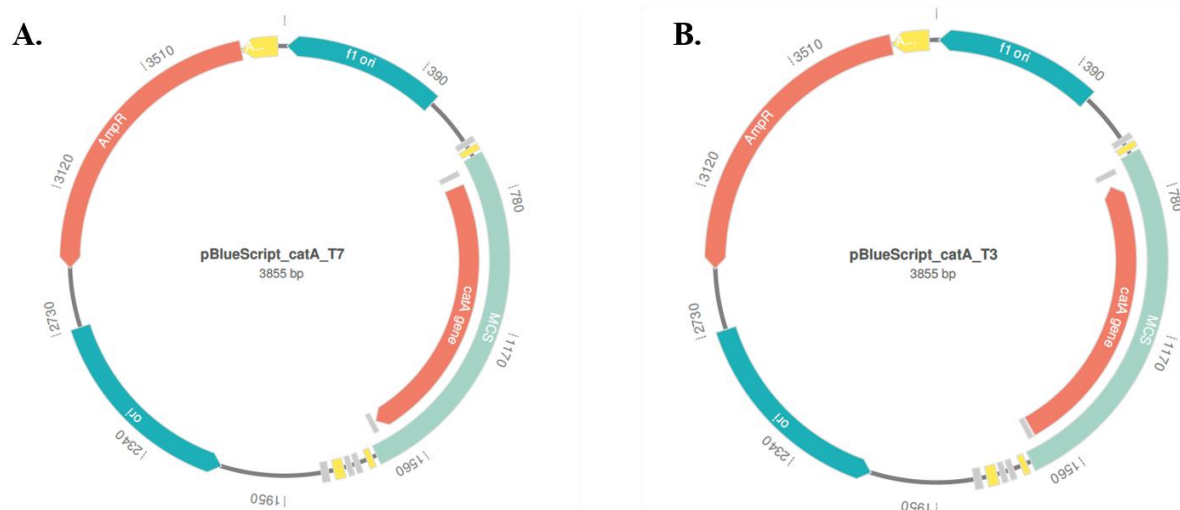
2.17 Έλεγχος επιτυχίας της διαδικασίας κλωνοποίησης

Μετά τον μετασχηματισμό, επιλέγονται οι θετικές αποικίες, εμβολιάζονται σε 5 ml θρεπτικού μέσου ανάπτυξης LB, το οποίο περιέχει και το κατάλληλο αντιβιοτικό και επωάζονται στους 37 °C για 14-16 h, υπό ανάδευση. Ακολουθεί απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (Παράγραφος 2.6).

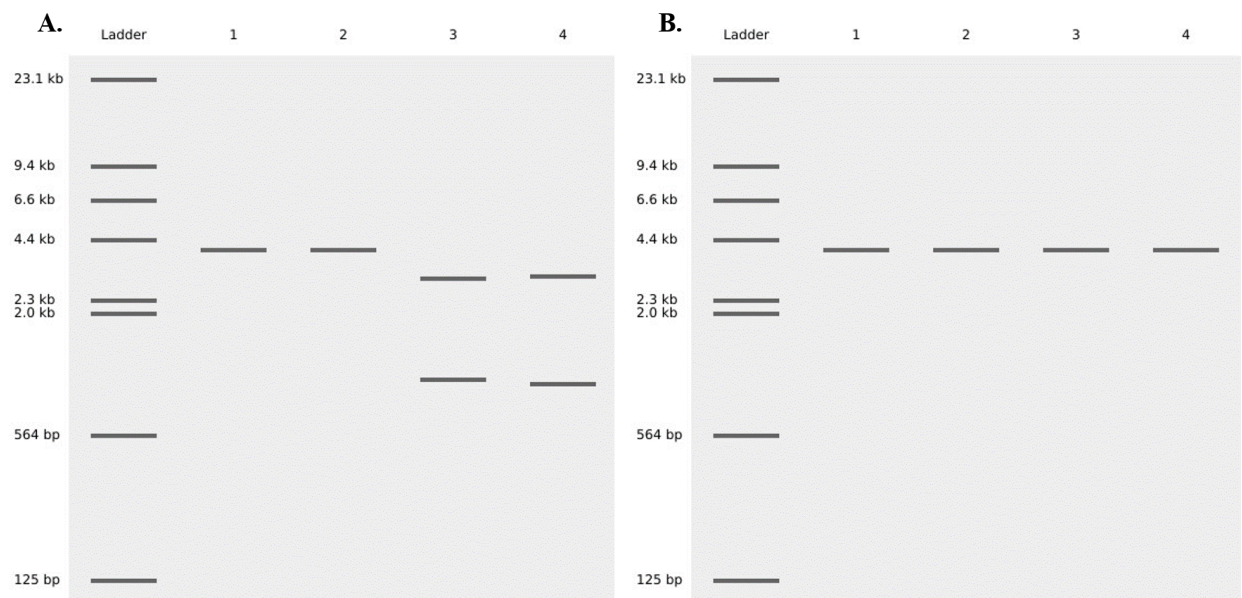
2.17.1 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες/Περιοριστική ανάλυση

Η κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript SK(+) βασίζεται στην πέψη του με την περιοριστική ενδονουκλεάση SmaI, η οποία δημιουργεί απότομα άκρα, συνεπώς η κάθε ένθεση μπορεί να κλωνοποιηθεί υπό τον έλεγχο είτε του T7, είτε του T3 εκκινητών του φορέα. Ανάλογα με τον προσανατολισμό της ένθεσης αναμένονται και διαφορετικά τμήματα με την πέψη με διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα ή συνδυασμό τους.

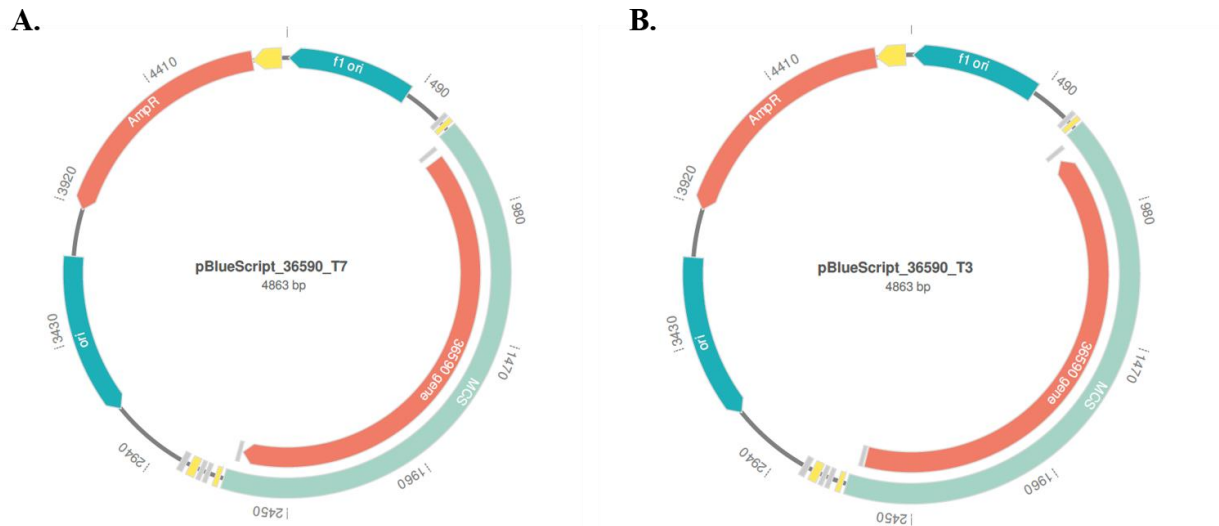
Για το σχεδιασμό των πέψεων με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αλληλουχίας κάθε γονιδίου-ένθεσης στην πλατφόρμα Sequence Manipulation Suite: Restriction Summary (https://www.bioinformatics.org/sms2/rest_summary.html). Η κατασκευή των εικονικών πλασμιδίων έγινε μέσω της πλατφόρμας GenScript (<https://www.genscript.com/gensmart-design/>) και οι εικονικές πέψεις πραγματοποιήθηκαν στην πλατφόρμα Benchling (<https://www.benchling.com>). Παρακάτω παρατίθενται εικονικά ανασυνδυασμένα πλασμίδια και τα αναμενόμενα κατά περίπτωση τμήματα που προκύπτουν από τις πέψεις.



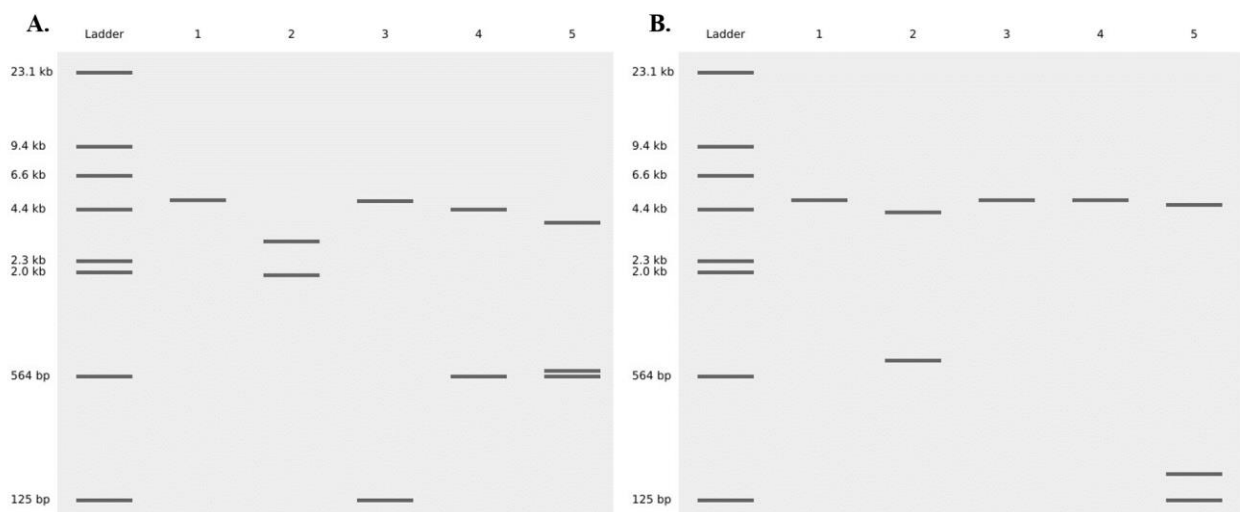
Εικόνα 2.5. Σχηματική απεικόνιση του ανασυνδυασμένου φορέα *pBlueScript::catA*, με την ένθεση υπό τον έλεγχο του T7 εκκινητή (Α) ή του T3 εκκινητή (Β).



Εικόνα 2.6. Εικονικές πέψεις στον ανασυνδυασμένο φορέα *pBlueScript::catA*. *Ladder*: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λ DNA-*HindIII*. Α) Θέσεις 1-4: Εικονικές πέψεις με *NdeI* (1), *SmaI* (2), *XhoI* (3) και διπλή πέψη με *BamHI*+*NdeI* (4), όταν η ένθεση βρίσκεται υπό τον έλεγχο του T7 εκκινητή. Β) Θέσεις 1-4: Εικονικές πέψεις με *NdeI* (1), *SmaI* (2), *XhoI* (3) και διπλή πέψη με *BamHI*+*NdeI* (4), όταν η ένθεση βρίσκεται υπό τον έλεγχο του T3 εκκινητή.



Εικόνα 2.7. Σχηματική απεικόνιση του ανασυνδυασμένου φορέα pBlueScript::36590, με την ένθεση υπό τον έλεγχο του T7 εκκινητή (A) ή του T3 εκκινητή (B).



Εικόνα 2.8. Εικονικές πέψεις στον ανασυνδυασμένο φορέα pBlueScript::36590. Ladder: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λ DNA-HindIII. A) Θέσεις 1-5: Εικονικές πέψεις με BamHI (1), HindIII (2), PstI (3), XhoI (4) και AvalI (5), όταν η ένθεση βρίσκεται υπό τον έλεγχο του T7 εκκινητή. B) Θέσεις 1-5: Εικονικές πέψεις με BamHI (1), HindIII (2), PstI (3), XhoI (4) και AvalI (5), όταν η ένθεση βρίσκεται υπό τον έλεγχο του T3 εκκινητή.

Με βάση τον παραπάνω σχεδιασμό, ακολουθούν πέψεις με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα ανά περίπτωση, ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής κλωνοποίηση της ένθεσης στο φορέα. Τα τμήματα DNA που προκύπτουν από τις πέψεις φορτώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση για αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Με αντίστοιχη λογική σχεδιάστηκαν πέψεις με περιοριστικά ένζυμα για τους ανασυνδυασμένους φορείς υπερέκφρασης pET29c::catA και pET29c::36590.

Για τον pET29c::catA χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα NdeI και XhoI σε διπλή πέψη μετά την οποία αναμένονται δύο τμήματα DNA μεγέθους 5233 bp και 885 bp.

Για τον ανασυνδυασμένο pET29c::36590 σχεδιάστηκαν τρεις διαφορετικές πέψεις με τα ένζυμα *AvaI*, *HindIII* και *PstI*. Από την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *AvaI* αναμένονται 4 προϊόντα μεγέθους 605, 806, 1200 και 4505 bp. Από την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *HindIII* αναμένεται η ευθυγράμμιση του ανασυνδυασμένου φορέα, δηλαδή ένα προϊόν μεγέθους 7154 bp. Και τέλος, από την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *PstI* αναμένεται επίσης ένα προϊόν μεγέθους 7154 bp.

2.17.2 Έλεγχος με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Το πλασμιδιακό DNA που έχει απομονωθεί μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ειδικούς εκκινητές για την ενίσχυση της αλληλουχίας που κλωνοποιήθηκε ή μέρος αυτής. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης για αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

2.17.3 Ανάλυση της αλληλουχίας βάσεων της ένθεσης στον πλασμιδιακό φορέα

Τέλος, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια αποστέλλονται για αλληλούχιση (sequencing) της περιοχής ένθεσης με τη χρήση εκκινητών εκατέρωθεν της αλληλουχίας προς ανάλυση. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Eurofins Gemonics, στη Γερμανία. Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν έγινε με τη χρήση των προγραμμάτων Chromas (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>) και MEGA7 (S. Kumar, Stecher, and Tamura 2016) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα blastn του ηλεκτρονικού προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) για την εύρεση ομοιοτήτων της κλωνοποιημένης αλληλουχίας με άλλες κατατεθειμένες σε τράπεζες δεδομένων.

2.18 Υπερέκφραση πρωτεϊνών με το σύστημα pET (pET System Manual, Novagen 2001)

2.18.1 Αρχή της μεθόδου

Το σύστημα pET είναι ένα από τα πιο ισχυρά συστήματα που έχουν αναπτυχθεί για την κλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο βακτήριο *E. coli*. Τα στοχευόμενα γονίδια κλωνοποιούνται στους φορείς pET κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού του βακτηριοφάγου T7. Η έκφραση επάγεται με την προσθήκη T7 RNA πολυμεράσης στα κύτταρα του ξενιστή. Η T7 RNA πολυμεράση είναι τόσο επιλεκτική και δραστική που σχεδόν όλη η ενέργεια του κυττάρου χρησιμοποιείται τελικά για την έκφραση του στοχευόμενου γονιδίου. Ένα χαρακτηριστικό είναι ότι λίγη ώρα μετά την επαγωγή παράγεται σχεδόν το 50% της επιθυμητής πρωτεΐνης. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα του συστήματος είναι η ικανότητα να διατηρεί τα στοχευόμενα γονίδια ουσιαστικά μη αντιγραφόμενα σε μη επαγόμενη κατάσταση. Τα υπό έκφραση γονίδια μεταφέρονται αρχικά σε ξενιστές οι οποίοι δεν περιέχουν το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης, μειώνοντας έτσι την πλασμιδιακή αστάθεια που οφείλεται στην παραγωγή πρωτεϊνών οι οποίες πιθανόν να είναι τοξικές για τα κύτταρα του ξενιστή. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε ξενιστές έκφρασης οι οποίοι περιέχουν ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης κάτω από τον έλεγχο του προαγωγού *lacUV5* και η έκφραση επάγεται με την προσθήκη IPTG.

2.18.2 Πειραματική πορεία

Η διαδικασία που ακολουθείται για την υπερέκφραση των πρωτεϊνών είναι η ακόλουθη:

- Κλωνοποίηση γονιδίων στον κατάλληλο φορέα υπερέκφρασης. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET29c(+) και κατασκευάστηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.
- Μετασχηματισμός με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο των ξενιστών BL21(DE3).
- Επιλογή μονής αποικίας και εμβολιασμός της σε 5 ml L.B. με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Επώαση στους 37 °C.
- Εμβολιασμός κατάλληλης ποσότητας σε επιθυμητό όγκο θρεπτικού μέσου ανάπτυξης και επώαση μέχρι οπτικής πυκνότητας (O.D.)_{600nm} = 0.4-0.6.
- Προσθήκη IPTG (τελική συγκέντρωση 1 mM).
- Λαμβάνονται δείγματα του 1 ml σε χρόνους: 0 min, 1 h, 2 h, 3 h και 4 h. Ακολουθεί φυγοκέντρωση και επαναιώρηση του ιζήματος σε 1x διαλύματος φορτώσεως όγκου αναλόγου της οπτικής πυκνότητας του δείγματος (120 µl/ 0.6 O.D. 600nm). Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20 °C ή πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, αφού τα δείγματα επωαστούν στους 95 °C για 5 min και φυγοκεντρηθούν.
- Στο βέλτιστο χρονικό διάστημα μετά την προσθήκη του IPTG πραγματοποιείται φυγοκέντρωση του συνολικού όγκου του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης για συλλογή των βακτηριακών κυττάρων στα οποία έχει υπερεκφραστεί το γονίδιο στόχος.

2.19 Καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης αγκιστείας Ni^{2+} -NTA

2.19.1 Αρχή της μεθόδου (Herz et al. 2000)

Η στήλη Ni^{2+} -NTA ανήκει σε μια ειδική κατηγορία στηλών χρωματογραφίας αγκιστείας, που ονομάζεται IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography). Το νιτρίλοτριοξικό οξύ (NTA) έχει την ικανότητα να δεσμεύει το ιόν νικελίου με το NTA πολύ καλύτερα από άλλες χηλικές ενώσεις. Επιπρόσθετα, οι στήλες νικελίου με το NTA δεσμεύουν 100-1000 φορές περισσότερο αποτελεσματικά πρωτεΐνες με ουρά έξι ιστιδινών από ότι ανάλογες στήλες ιμινοδιοξικού οξέος (IDA, η πρώτη ένωση που χρησιμοποιήθηκε για τέτοιου είδους χρωματογραφίες).

2.19.2 Πειραματική πορεία

(I) Επαγωγή καλλιέργειας

1. Επώαση 20 ml καλλιέργειας μετασχηματισμένων BL21 στους 37 °C υπό ανάδευση για 16-18 h.
2. Εμβολιασμός 1:20 σε 2 L θρεπτικού μέσου ανάπτυξης και επώαση στους 37 °C υπό γρήγορη ανάδευση έως O.D. (600 nm) ~ 0.6.
3. Λαμβάνεται δείγμα 1 ml (μη επαγόμενος μάρτυρας) φυγοκεντρείται και επαναιωρείται σε 1x διαλύματος φορτώσεως ανάλογα με την οπτική πυκνότητα του δείγματος (120 µl / 0.6 O.D. 600 nm). Το δείγμα τοποθετείται στους -20 °C, έως ότου χρησιμοποιηθεί.
4. Επαγωγή της καλλιέργειας με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM.
5. Επώαση της καλλιέργειας για: 4 h υπό ανάδευση στους 37 °C για την υπερέκφραση του γονιδίου της γεντισικής διοξυγονάσης, 3 h υπό ανάδευση στους 37 °C για την υπερέκφραση του γονιδίου της διοξυγονάσης της κατεχόλης και 16-18 h υπό ανάδευση στους 16 °C για την υπερέκφραση του γονιδίου Asphe3_36590.

6. Λαμβάνεται δείγμα 1 ml (επαγόμενος μάρτυρας) φυγοκεντρείται και επαναιωρείται σε 1x διαλύματος φορτώσεως ανάλογα με την οπτική πυκνότητα του δείγματος (120 μ l/0.6 O.D. 600 nm). Το δείγμα τοποθετείται στους -20°C , έως ότου χρησιμοποιηθεί.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε $5500 \times g/4^{\circ}\text{C}/20 \text{ min}$.

Στο στάδιο αυτό το ίζημα μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

(II) Λύση των BL21 κυττάρων μετά την υπερέκφραση

1. Τα κύτταρα που αποθηκεύτηκαν στους -20°C αφήνονται για 15 min σε πάγο για να ξεπαγώσουν και στη συνέχεια επαναιωρούνται σε 5 ml διαλύματος A ανά γραμμάριο κυττάρων.
2. Γίνεται λύση των κυττάρων με υπερήχους (sonication). Χρησιμοποιούνται 8 παλμοί των 10 sec στα 300 W, με περίοδο ψύξης μεταξύ των παλμών 10 sec.
3. Φυγοκέντρηση $6000 \times g/4^{\circ}\text{C}/20 \text{ min}$.
4. Συλλογή του υπερκειμένου για εφαρμογή σε στήλη Ni^{2+} -NTA.

(III) Χρωματογραφία

1. Εξισορρόπηση της στήλης με διάλυμα A με ροή 2 ml/min.
2. Πέρασμα από τη στήλη όλου του υπερκειμένου, ώστε να δεσμευτούν οι πρωτεΐνες που φέρουν ουρά ιστιδίνης και να φύγουν οι μη δεσμευμένες.
3. Ακολουθεί πλύση της στήλης με 20 ml διαλύματος A.
4. Η έκλουση των πρωτεϊνών έγινε αρχικά με 20 ml διαλύματος B με δημιουργία πυκνοτήτων βαθμίδωσης ιμιδαζολίου (20-100 mM).
5. Ακολουθεί έκλουση με 120 ml διαλύματος Γ με δημιουργία πυκνοτήτων βαθμίδωσης ιμιδαζολίου (100-500 mM).

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που συλλέγονται υπόκεινται σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ενζυμικούς προσδιορισμούς και τα πρωτεϊνικά πηγμένα σε χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250.

2.19.3 Διαλύματα

Διάλυμα A: 100 mM Tris-HCl pH 8.0

500 mM NaCl

20 mM ιμιδαζόλιο

0.3 mM PMSF

Διάλυμα B: 100 mM Tris-HCl pH 8.0

500 mM NaCl

20 mM (B_{20}) και 100 mM (B_{100}) ιμιδαζόλιο

Διάλυμα Γ: 100 mM Tris-HCl pH 8.0

500 mM NaCl

100 mM (C_{100}) και 500 mM (C_{500}) ιμιδαζόλιο

2.20 Ανταλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος και συμπύκνωση πρωτεϊνών

Για την ανταλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος καθώς και τη συμπύκνωση -όπου αυτό ήταν απαραίτητο- των καθαρισμένων ενζύμων, χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές φυγοκεντρικού φίλτρου Amicon® Ultra-4 10K (Merck Millipore Ltd.) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.21 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

2.21.1 Αρχή της μεθόδου (Bradford 1976)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford στηρίζεται στην αλλαγή του χρώματος κατά τη σύνδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595 nm.

2.21.2 Πειραματική πορεία

Αρχικά, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης στα 595 nm με βάση τη συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος αλβουμίνης βόειου ορού BSA (1 mg/ml) σε 2.5 ml διαλύματος Bradford αραιωμένο 1:5 (0-25 µg πρωτεΐνης). Το μίγμα παραμένει για 60 s και ακολουθεί φωτομέτρηση. Στη συνέχεια, προστίθεται ποσότητα ως 40 µl δείγματος σε 2.5 ml αραιωμένου διαλύματος Bradford, παραμένει για 60 s και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 595 nm. Όλες οι μετρήσεις των δειγμάτων γίνονται εις τριπλούν.

2.22 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

2.22.1 Αρχή της μεθόδου (Laemmli 1970)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων παρέχει πληροφορίες για την κατανομή πρωτεϊνών σε διάφορα εκχυλίσματα, την ποσότητα των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα, καθώς και το μοριακό βάρος ενός πρωτεϊνικού μορίου. Σχεδόν όλες οι αναλυτικές ηλεκτροφορήσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδης (bis). Τα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι τα πλέον κατάλληλα για ηλεκτροφόρηση καθώς αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και bis. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου και bis, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Έτσι σχηματίζεται ένα πλέγμα, με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται αφενός ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμίδης και bis και, αφετέρου, ανάλογα με τη σχετική συγκέντρωση της bis ως προς το ακρυλαμίδιο. Πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες οι οποίες διασφαλίζουν αφενός μεν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες, αφετέρου δε την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων. Συνήθως, χρησιμοποιείται το ισχυρά ιονικό απορρυπαντικό SDS σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα και την υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα. Επιπλέον, η προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης στα δείγματα διασφαλίζει το μη σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτίδια προσδένονται με το SDS και έτσι φορτίζονται αρνητικά. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Η πρόσδεση με το SDS είναι σχεδόν πάντα ανάλογη με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και είναι ανεξάρτητη με την αλληλουχία του, έτσι τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου σύμφωνα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου. Οι μικρότερες πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ οι μεγαλύτερες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης. Χρησιμοποιώντας ειδικούς μάρτυρες γνωστών μοριακών βαρών μπορούμε να εκτιμήσουμε το μοριακό βάρος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Μετατροπές όμως του πολυπεπτιδικού σκελετού, όπως N- ή O- γλυκοζυλιώσεις έχουν μια σημαντική επίδραση στο μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και πιθανόν το μοριακό βάρος που υπολογίζεται να μην ανταποκρίνεται στην πραγματική μάζα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Στις περισσότερες των περιπτώσεων, η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής, δηλαδή επιτελείται σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα επιστοίβαξης (Stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (Separating gel) το οποίο βρίσκεται ακριβώς κάτω από το πήκτωμα επιστοίβαξης. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Laemmli, το πήκτωμα επιστοίβαξης δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά τις συγκεντρώνει σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το πήκτωμα τοποθετείται στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x) διαφορετικού pH και ιονικής ισχύος από αυτό που χρησιμοποιείται για να παρασκευαστεί το πήκτωμα προστίθεται τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, σε άμεση επαφή με το πήκτωμα. Ακολούθως, εφαρμόζεται ρεύμα σταθερής έντασης με τη χρήση τροφοδοτικού και με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδρομής (που κρίνεται από την παρακολούθηση του διαλύματος φόρτωσης) οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα εμφανίζονται με εφαρμογή του διαλύματος χρώσης (Staining solution).

2.22.2 Πειραματική πορεία

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο SDS-PAGE είναι η ακόλουθη:

- Στήνεται κατάλληλα η συσκευή που θα χρησιμοποιηθεί (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, BIORAD) και τοποθετείται σε ειδική δεξαμενή.
- Η δεξαμενή γεμίζεται με 1 L περίπου 1x SDS-PAGE ρυθμιστικό διάλυμα, προσέχοντας η στάθμη του να βρίσκεται 1-2 cm πάνω από τη επιφάνεια των πηγμάτων.
- Προετοιμασία των δειγμάτων με επαναιώρηση τους σε 1x διαλύματος φόρτωσης και φόρτωσή τους στο πήκτωμα.

- Η δεξαμενή καλύπτεται και η όλη διάταξη λειτουργεί περίπου στα 120-150 Volts μέχρι η ζώνη της χρωστικής διατρέξει κατά μήκος το πήκτωμα.
- Το πήκτωμα τοποθετείται σε δοχείο στο οποίο υπάρχει διάλυμα χρώσης (Staining solution) και βάφεται για 1 h περίπου σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Ακολούθως, το πήκτωμα ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό και τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει το διάλυμα αποχρωματισμού και παραμένει για τουλάχιστον 2 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Τέλος, ακολουθεί ξήρανση του πηκτώματος και αποτύπωσή του.

2.22.3 Διαλύματα

Πίνακας 2.9. Διαλύματα για την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση.

1x διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων:	50mM Tris pH 6.8 2% SDS 0.1% μπλε βρωμοφαινόλης 10% γλυκερόλη 5% 2-μερκαπτοαιθανόλη
10x διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1L):	144 g γλυκίνη (250 mM pH 8.3) 20 g Tris base (25 mM) 50 ml SDS 10%
Διάλυμα χρώσης (Staining solution) (100 ml):	0.1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 40 ml ds H ₂ O 50 ml μεθανόλη 10 ml οξικό οξύ
Διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution):	10% μεθανόλη ή αιθανόλη 10% οξικό οξύ

Πίνακας 2.10. Σύνθεση πηγμάτων SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης.

Πήκτωμα διαχωρισμού (Separation gel)	8%	10%	12%	15%	Πήκτωμα επιστοίβαξης (Stacking gel) (5%)
Ακρυλαμίδιο:bis (29:1)	2.67 ml	3.33ml	4 ml	5 ml	0.85 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	1.3 ml 0.5 M Tris pH 6.8
dsH ₂ O	4.75 ml	4.09 ml	3.2 ml	2.2 ml	2.8 ml
10 % SDS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	50 μl

10% APS	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	20 μ l
TEMED	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	5 μ l

2.23 Μελέτη πρωτεϊνικής δομής με τη χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων

Με βάση τις αμινοξικές αλληλουχίες των γονιδίων Asphe3_35170 και Asphe3_36590 εντοπίστηκαν πρωτεϊνικές αλληλουχίες ομόλογες με κάθε μια από αυτές, με τη βοήθεια της πλατφόρμας blastp του ηλεκτρονικού προγράμματος BLAST και της βάσης δεδομένων UniProt (Bateman et al. 2023). Ακολούθησε ομοπαράθεση (alignment) των αλληλουχιών με τη χρήση του προγράμματος ClustalOmega (Madeira et al. 2022) και κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα για κάθε αλληλουχία με τη χρήση του προγράμματος MEGA7.

Επιπλέον, αξιοποιήθηκε η βάση δεδομένων InterPro (Paysan-Lafosse et al. 2023) και το λογισμικό InterProScan για την ταξινόμηση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών σε οικογένειες και τον εντοπισμό λειτουργικών περιοχών και συντηρημένων αμινοξέων.

Για την πρόβλεψη της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής των υπό μελέτη ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν τα διαδικτυακά προγράμματα Phyre2 (Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0) (Kelley et al. 2015) και ColabFold (ColabFold v1.5.5: AlphaFold2 using MMseqs2) (Mirdita et al. 2022).

2.24 Βιοχημικός χαρακτηρισμός ενζύμων

2.24.1 Ενζυμικοί προσδιορισμοί με φωτομέτρηση

Όλες οι αντιδράσεις για τον προσδιορισμό ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία όγκου 1 ml και πάχους 1 cm. Όλες οι μετρήσεις έγιναν στο φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης Shimadzu UV-1201.

2.24.1.1 Παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος *P. phenanthrenivorans* Sphe3

Καλλιέργεια κυττάρων Sphe3 (500 ml) φυγοκεντρείται στα 6000 $\times$ g για 20 min στους 4 °C και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε κατάλληλο όγκο (τελικός όγκος: 2 ml) διαλύματος 10 mM Tris-HCl pH 7,5 με 1mM DTT. Το κυτταρικό αιώρημα τοποθετείται σε σωληνάρια που περιέχουν, μέχρι τα 2/3 του όγκου τους, σφαιρίδια ζirkονίου διαμέτρου 0,1 mm και ακολουθεί σπάσιμο των κυττάρων σε Mini-Bead Beater για 1 min (5 φορές), με ενδιάμεση παραμονή στον πάγο για τουλάχιστον 1 min. Τέλος, το κυτταρικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται στα 12000 $\times$ g για 20 min στους 4 °C. Το καθαρό εκχύλισμα συλλέγεται σε σωληνάκια τύπου eppendorf.

2.24.1.2 Παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος *E. coli* BL21

Καλλιέργεια κυττάρων BL21 (500-1000 ml) φυγοκεντρείται στα 6000 $\times$ g για 20 min στους 4 °C και στη συνέχεια, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 5 ml/g Διαλύματος A (Παράγραφος 2.19.3). Το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται σε σωληνάρια των 13 ml και ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπερήχους (8 παλμοί για 10 sec στα 300 W, με περίοδο ψύξης μεταξύ των παλμών 10 sec). Τέλος, το κυτταρικό εκχύλισμα συλλέγεται σε σωληνάκια τύπου eppendorf.

2.24.1.3 Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος (Feng, Khoo, and Poh 1999)

Η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη του ενζύμου/κυτταρικού εκχύλισματος στον τελικό όγκο της αντίδρασης και καταγράφεται η αύξηση της απορρόφησης στα 330 nm, που οφείλεται στο σχηματισμό μηλοπυροσταφυλικού οξέος από γεντισικό οξύ ($\epsilon_{330} = 10800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Είδος Αντιδραστηρίου		Συγκέντρωση στο διάλυμα της αντίδρασης (mM)
Ρυθμιστικό διάλυμα	Tris-HCl, pH=8	50
Υπόστρωμα	Γεντισικό οξύ (υδατικό διάλυμα)	0,3
Ενζυμικό παρασκεύασμα	Καθαρό ένζυμο/Κυτταρικό εκχύλισμα	0,05-0,5 mg
Ολικός όγκος αντίδρασης		1000 μl

2.24.1.4 Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης (Mars et al. 1997)

Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζύμου στο διάλυμα και καταγράφεται η αύξηση της απορρόφησης στα 260 nm, που οφείλεται στο σχηματισμό του προϊόντος *cis,cis*-μουκονικού οξέος ($\epsilon_{260} = 16800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Όταν χρησιμοποιείται ως δείγμα κυτταρικό εκχύλισμα, πριν την αντίδραση το κυτταρικό εκχύλισμα επώαζεται με τα υπόλοιπα διαλύματα (εκτός του υποστρώματος) για 10 min ώστε να χάσει την ενεργότητα 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης που μπορεί να παρουσιάζει και η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του υποστρώματος.

Είδος Αντιδραστηρίου		Συγκέντρωση στο διάλυμα της αντίδρασης (mM)
Ρυθμιστικό διάλυμα	Tris-HCl, pH=8	50
	Na ₂ EDTA *	1,3
	H ₂ O ₂ *	2,6
Υπόστρωμα	Κατεχόλη	0,3
Ενζυμικό παρασκεύασμα	Καθαρό ένζυμο/Κυτταρικό εκχύλισμα	0,05-0,5 mg
Ολικός όγκος αντίδρασης		1000 μl

* προσθήκη για απαλοιφή ενεργότητας της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης.

2.24.1.5 Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηρότητας της της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης (Y. Kim et al. 1992)

Η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη του ενζύμου/κυτταρικού εκχυλίσματος. Παρακολουθείται η αύξηση της απορρόφησης στα 375 nm που οφείλεται στο σχηματισμό της 2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης (2-HMS) ($\epsilon_{375} = 14700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), που αποτελεί το προϊόν της αντίδρασης.

Είδος Αντιδραστηρίου		Συγκέντρωση στο διάλυμα της αντίδρασης (mM)
Ρυθμιστικό διάλυμα	Tris-HCl, pH=8	50
Υπόστρωμα	Κατεχόλη	0,3
Ενζυμικό παρασκεύασμα	Καθαρό ένζυμο/Κυτταρικό εκχύλισμα	0,05-0,5 mg
Ολικός όγκος αντίδρασης		1000 μl

2.24.1.6 Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηρότητας μέσω οξείδωσης του NADPH/NADH

Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία συμπαραγόντων στο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει το διαφορετικό κατά περίπτωση υπόστρωμα και ξεκινά με την προσθήκη του ενζύμου. Παρακολουθείται η οξείδωση του NADPH/NADH ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) και καταγράφεται η μείωση της απορρόφησης στα 340 nm.

Είδος Αντιδραστηρίου		Συγκέντρωση στο διάλυμα της αντίδρασης (mM)	Βιβλιογραφικές αναφορές
Ρυθμιστικό διάλυμα	Tris-HCl, pH=8	50	
Συνένζυμο	NADPH/NADH	0,2	
Προσθετική ομάδα	FAD*	0,25	
Υπόστρωμα	Φαινόλη	0,01-1	(Kukor and Olsen 1992; Ali, Fernandez-Lafuente, and Cowan 1998; Xu et al. 2021)
	3-υδροξυβενζοϊκό οξύ	0,03-0,3	(Mulla et al. 2016)

	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	0,03-0,3	(Westphal, Tischler, and van Berkel 2021)
	Σαλικυλικό οξύ	0,03-0,3	(Lubbers et al. 2021)
	2,3-διυδροξυβενζοϊκό οξύ	0,03-0,3	(MonTERSINO and Van Berkel 2012)
Ενζυμικό παρασκεύασμα	Καθαρό ένζυμο/Κυτταρικό εκχύλισμα	0,05-0,5 mg	
Ολικός όγκος αντίδρασης		1000 μl	

*Προσθήκη στο καθαρό ένζυμο.

2.24.1.7 Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστικότητας της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Iwagami, Yang, and Davies 2000)

Το ρυθμιστικό διάλυμα μαζί με το ένζυμο (ή το κυτταρικό εκχύλισμα) τοποθετείται στη γυάλινη κυψελίδα χαλαζία και επωάζεται για 1 min στους 25 °C. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζύμου. Καταγράφεται η μείωση της απορρόφησης στα 290 nm που οφείλεται στην κατανάλωση του υποστρώματος PCA. Η αντίδραση που πραγματοποιείται από το ένζυμο είναι η μετατροπή του PCA σε 3-καρβοξυ-*cis,cis*-μουκονικό οξύ. Χρησιμοποιείται ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης $\epsilon_{290} = 2300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, που αντιπροσωπεύει τη διαφορά μεταξύ του συντελεστή του πρωτοκατεχοϊκού οξέος ($\epsilon_{\lambda 290} = 3890 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) και του προϊόντος της αντίδρασης 3-καρβοξυ-*cis,cis*-μουκονικού οξέος ($\epsilon_{\lambda 290} = 1590 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Wojcieszynska et al. 2011).

Είδος Αντιδραστηρίου		Όγκος στο διάλυμα της αντίδρασης (μ l)
Ρυθμιστικό διάλυμα	Tris-HCl, 50mM, pH=8,5	850
Υπόστρωμα	3mM PCA σε 50mM Tris-HCl pH=8,5	100
Ενζυμικό παρασκεύασμα	Καθαρό ένζυμο/Κυτταρικό εκχύλισμα	50
Ολικός όγκος αντίδρασης		1000

2.24.1.8 Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστικότητας της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Ono, Nozaki, and Hayaishi 1970)

Η ενζυμική δραστικότητα μετράται ως γραμμική μεταβολή (αύξηση) της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου από τον σχηματισμό της 2-υδροξυ-4-καρβοξυμouκονικής

ημιαλδεΐδης στα 410 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού φωτός και για χρονικό διάστημα 60 sec ($\epsilon_{410} = 11200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Είδος Αντιδραστηρίου		Όγκος στο διάλυμα της αντίδρασης (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα	Γλυκίνη-NaOH, 100mM, pH=9,5	880
Υπόστρωμα	3mM PCA σε 10mM Γλυκίνη-NaOH pH=9,5	100
Ενζυμικό παρασκεύασμα	Καθαρό ένζυμο/Κυτταρικό εκχύλισμα	20
Ολικός όγκος αντίδρασης		1000

2.24.2 Κινητική σταθερής κατάστασης των ενζύμων ενδιαφέροντος

Για να προσδιοριστεί η κινητική σταθερής κατάστασης των υπό μελέτη ενζύμων, καθώς και το μοντέλο κινητικής που αυτά ακολουθούν, μετρήθηκε η ταχύτητα της κάθε ενζυμικής αντίδρασης υπό διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος σύμφωνα με τον κατάλληλο ενζυμικό προσδιορισμό, όπως περιγράφεται παραπάνω.

2.24.3 Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης ενζύμων ενδιαφέροντος

Με βάση τους φωτομετρικούς ενζυμικούς προσδιορισμούς της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης και της 4-υδροξυλάσης του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος προσδιορίστηκε το βέλτιστο pH δράσης του κάθε ενζύμου. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

Τιμές pH	Ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM)
4, 5, 5,5, 6	Ηλεκτρικό οξύ-NaOH
6,5	Κιτρικό οξύ-NaOH
7, 7,5, 8, 8,5	Tris-HCl /Φωσφορικών-NaOH
9, 9,5, 10, 10,5	Γλυκίνη-NaOH
11, 11,5, 12	Όξινο φωσφορικό δινάτριο-NaOH

2.24.4 Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης ενζύμων ενδιαφέροντος

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του κάθε ενζύμου προσδιορίστηκε με τη διεξαγωγή του αντίστοιχου ενζυμικού προσδιορισμού σε φωτόμετρο μετά από επώαση του ρυθμιστικού διαλύματος σε θερμοκρασίες 5-85 °C, ανά 5 °C και η κάθε αντίδραση ξεκινούσε με την προσθήκη του ενζύμου.

2.24.5 Προσδιορισμός θερμοσταθερότητας ενζύμων ενδιαφέροντος

Τα υπό μελέτη ένζυμα επωάζονται στους 30, 40 και 50 °C για διάστημα 24 h και καταγράφεται η μεταβολή της δραστηριότητάς τους στις χρονικές στιγμές 0, 1, 3, 6, 9, 12 και 24 h, με βάση τον φωτομετρικό ενζυμικό προσδιορισμό του κάθε ενζύμου.

2.24.6 Μελέτη της επίδρασης του σιδήρου [Fe(II)/Fe(III)] και του L-ασκορβικού οξέος στη δραστηριότητα των υπό μελέτη ενζύμων

Η δραστηριότητα του κάθε ενζύμου προσδιορίζεται μετά από επώαση του καθαρού ενζύμου με διάφορες συγκεντρώσεις Fe(II)/Fe(III)+L-ασκορβικού οξέως (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 και 1 mM) για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0, 10, 20, 30 και 60 min).

2.24.7 Επίδραση μεταλλικών ιόντων και χηλικών παραγόντων στη δραστηριότητα των υπό μελέτη ενζύμων

Η δραστηριότητα του κάθε ενζύμου προσδιορίζεται μετά από επώαση (15 και 30 min) του καθαρού ενζύμου με 1 mM των παρακάτω μεταλλικών ιόντων: CaCl₂, ZnSO₄, CoCl₂, KCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MnSO₄, NiCl₂, AgNO₃, BaCl₃, MgCl₂ και ZnCl₂, και μετά από επώαση με τους χηλικούς παράγοντες ο-φαινανθρολίνη (o-phen), EDTA και 2,2'-διπυριδίνη (bipy), σε διάφορες συγκεντρώσεις (0,005-0,1 mM).

2.24.8 Διατήρηση ενζυμικής δραστηριότητας κατά την αποθήκευση

Το κάθε ένζυμο αποθηκεύεται μετά τον καθαρισμό του σε διαφορετικές θερμοκρασίες: 4, -20 και -80 °C και με την παρουσία διαφορετικών μέσων: 10% γλυκερόλη, 1% DMSO, 10% DMSO και 10% αιθανόλη. Ύστερα από διαφορετικά χρονικά διαστήματα (10, 20, 30 μέρες) πραγματοποιείται ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηριότητας.

2.24.9 Φασματοσκοπία UV/Vis για μελέτη αναγνώρισης εναλλακτικών υποστρωμάτων

Ο έλεγχος της αναγνώρισης εναλλακτικών υποστρωμάτων από την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης και από την 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος πραγματοποιήθηκε μέσω της παρακολούθησης των αλλαγών στο φάσμα απορρόφησης της κάθε αντίδρασης σε μήκη κύματος 230 - 450 nm.

Οι αντιδράσεις ετοιμάστηκαν σε σωληνάκια του 1,5 ml με την εξής σύσταση:

1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης		4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος	
Σύσταση αντίδρασης	Συγκέντρωση στην αντίδραση	Σύσταση αντίδρασης	Συγκέντρωση στην αντίδραση
Καθαρό ένζυμο	25-100 µg	Καθαρό ένζυμο (επωασμένο με 0.1 mM FAD)	25-100 µg
Υπόστρωμα	0.03 mM	Υπόστρωμα	0.03 mM
Ρυθμιστικό διάλυμα TrisHCl 50 mM, pH 8.0	Έως τελικό όγκο 1 ml	NADH	0.2 mM
		Ρυθμιστικό διάλυμα TrisHCl 50 mM, pH 8.5	Έως τελικό όγκο 1 ml

Για τη λήψη φάσματος απορρόφησης μεταφέρθηκαν 200 μl από κάθε αντίδραση σε καθορισμένες θέσεις σε μικροπλάκα 96 θέσεων (Costar UV-Transparent Microplates), η οποία τοποθετήθηκε στον αυτοματοποιημένο μετρητή Infinite® 200 PRO της TECAN.

Η λήψη μετρήσεων έγινε σε μήκη κύματος 230 - 450 nm με βήμα τα 5 nm και σε διάφορους χρόνους (στις 1, 6 και 24 h για την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης και στα 0-15 min, ανά 3 min και 0-120 min, ανά 30 min για την 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος).

Επιπλέον, καταγράφηκαν φάσματα απουσία ενζύμου στην κάθε αντίδραση, αλλά και απουσία συμπαραγόντων στην περίπτωση της 4-υδροξυλάσης, για να αποκλειστούν τυχόν μεταβολές που δεν οφείλονται στο ένζυμο.

Τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν ως εναλλακτικά για την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης ήταν τα ακόλουθα: κατεχόλη, p-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-αμινοβενζοϊκό οξύ, 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ, υδροκινόννη, 2,4,6-τριχλωροφαινόλη, 2,4-δινιτροφαινόλη, 4-νιτροκατεχόλη, πυρογαλλόλη, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ, γαλλικό οξύ, 3-O-μεθυλγαλλικό οξύ, βανιλίνη, βενζοϊκό οξύ, 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ, p-κρεζόλη, φθαλικό οξύ και γεντισικό οξύ.

Για την 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος δοκιμάστηκαν τα εξής υποστρώματα: 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, σαλικυλικό οξύ, γεντισικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, 2,3-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, φαινόλη, καφεϊκό οξύ, γεντισικό οξύ, DOPAC, p-κουμαρικό οξύ, φθαλικό οξύ.

2.25 Πρωτόκολλα ακινητοποίησης

2.25.1 Ακινητοποίηση κυττάρων σε σφαιρίδια αλγινικού νατρίου (Ziagova, Koukkou, and Liakopoulou-Kyriakides 2014)

Η ακινητοποίηση κυττάρων με τη χρήση αλγινικού νατρίου βασίζεται στη διαλυτοποίηση του πολυμερούς με αύξηση της θερμοκρασίας και στην ανάμιξή του με εναιώρημα κυττάρων, ενώ το μίγμα πηκτωματοποιείται σε υδατικό διάλυμα άλατος (CaCl_2). Ο εγκλωβισμός των κυττάρων Sph3 σε σφαιρίδια αλγινικού νατρίου περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Κύτταρα Sph3 συλλέγονται στο μέσω της εκθετικής φάσης ανάπτυξής τους από καλλιέργεια σε LB και ξεπλένονται με 0,9% NaCl.
2. Κατάλληλη ποσότητα χρησιμοποιείται για επίστρωση τρυβλίου LA, ώστε να μετρηθούν οι αποικίες που σχηματίζονται.
3. Όγκος που αντιστοιχεί σε 3×10^8 CFUs μεταφέρεται σε 10 ml αποστειρωμένου διαλύματος 4% w/v αλγινικού νατρίου και ακολουθεί ήπια ανάδευση.
4. Το μίγμα αποχύνεται στάγδην μέσω σύριγγας ινσουλίνης σε 50 ml φιλτραρισμένου διαλύματος 3% w/v CaCl_2 , το οποίο βρίσκεται υπό ανάδευση.
5. Ακολουθεί ο αυθόρμητος σχηματισμός σφαιριδίων αλγινικού νατρίου που περιέχουν τα κύτταρα Sph3
6. Το διάλυμα επώαζεται για 16-18 h στους 4 °C υπό ανάδευση, για την σταθεροποίηση των σφαιριδίων.
7. Τέλος, τα σφαιρίδια ξεπλένονται με 0,9% NaCl για τρεις φορές και είναι έτοιμα για περαιτέρω χρήση.

2.25.2 Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμου σε νανοϋλικά (Πατήλα 2016)

Το πρωτόκολλο μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Ζυγίζονται 3 mg νανοϋλικού.
2. Μεταφέρεται η ποσότητα του νανοϋλικού σε σωληνάκι, όπου προστίθενται 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος TrisHCl 50 mM, pH 8.
3. Ακολουθεί επαναιώρηση με υπερήχους για 30 min.
4. Προσθέτω 1 ml ενζυμικού παρασκευάσματος σε τελική συγκέντρωση 3 mg/ml.
5. Ακολουθεί επώαση για 1 h υπό ανάδευση στους 30 °C.
6. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα $4000 \times g$ για 15 min στους 4 °C.
7. Αφαιρείται το υπερκείμενο, το οποίο φυλάσσεται για προσδιορισμούς πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και ενζυμικής δραστηριότητας.
8. Το ίζημα επαναιωρείται σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος και η φυγοκέντρωση επαναλαμβάνεται.
9. Αποχύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος και μεταφέρεται όλος ο όγκος σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι.
10. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα $12000 \times g$ για 10 min στους 4 °C.
11. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα τοποθετείται προς ξήρανση, είτε παρουσία silica gel, είτε σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού, SpeedVac, στους 4 °C.

Δοκιμάστηκαν τα νανοϋλικά: οξειδίο του γραφενίου, τροποποιημένο οξειδίο του γραφενίου και μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου σιδήρου επικαλυμμένα με χιτοζάνη (σε αυτή την περίπτωση ζυγίζονται 4 mg υλικού, τα οποία επαναιωρούνται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος).

2.25.3 Ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμου σε νανοϋλικά με τελικές καρβοξυλομάδες (Πατήλα 2016)

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. 3 mg νανοϋλικού διασπείρονται σε 5 ml απιονισμένου νερού με την εφαρμογή υπερήχων για 30 min.
2. Ακολουθεί η προσθήκη 1,2 ml EDC (από αρχικό διάλυμα 10 mg/mL) και 2.3 mL NHS (από αρχικό διάλυμα 50 mg/mL).
3. Πραγματοποιείται επώαση για 1 h υπό ανάδευση στους 30 °C, ώστε να ενεργοποιηθούν οι τελικές καρβοξυλομάδες του υλικού.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα $4000 \times g$ για 15 min.
5. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος HEPES. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση εκ νέου.
6. Ακολουθούν τουλάχιστον 2 πλύσεις του νανοϋλικού με HEPES ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια EDC και NHS.
7. Το νανοϋλικό επαναδιασπείρεται σε 6 ml HEPES με εφαρμογή υπερήχων και στη συνέχεια, προστίθεται 1 mL πυκνού ενζυμικού διαλύματος σε τελική συγκέντρωση 3 mg/mL και αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού 1:1 σε τελικό όγκο 7 ml.
8. Το μίγμα επωάζεται για 1 h υπό ανάδευση στους 30 °C, ώστε να ακινητοποιηθεί το ένζυμο στην επιφάνεια του νανοϋλικού.

Στη συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω για τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση (βήμα 6 και έπειτα).

2.25.4 Ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμου σε νανοϋλικά με τελικές αμινομάδες (Πατήλα 2016)

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. 3 mg νανοϋλικού διασπείρονται σε 9,13 ml απιονισμένου νερού με την εφαρμογή υπερήχων για 30 min.
2. Ακολουθεί η προσθήκη 0,11 ml Tween 20 και 1,76 ml γλουτεραλδεΐδης.
3. Πραγματοποιείται επώαση για 1 h υπό ανάδευση στους 30 °C, ώστε να ενεργοποιηθούν οι τελικές αμινομάδες του υλικού.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $6000 \times g$ για 15 min.
5. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση εκ νέου.
6. Ακολουθούν τουλάχιστον 2 πλύσεις του νανοϋλικού με ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια Tween 20 και γλουτεραλδεΐδης.
7. Το νανοϋλικό επαναδιασπείρεται σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος με εφαρμογή υπερήχων και στη συνέχεια, προστίθεται 1 mL πυκνού ενζυμικού διαλύματος σε τελική συγκέντρωση 3 mg/mL και αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού 1:1 σε τελικό όγκο 6 ml.
8. Το μίγμα επώάζεται για 1 h υπό ανάδευση στους 30 °C, ώστε να ακινητοποιηθεί το ένζυμο στην επιφάνεια του νανοϋλικού.

Στη συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω για τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση (βήμα 6 και έπειτα).

Δοκιμάστηκαν τα νανοϋλικά: οξείδιο του γραφενίου, τροποποιημένο οξείδιο του γραφενίου και μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου σιδήρου επικαλυμμένα με χιτοζάνη (σε αυτή την περίπτωση ζυγίζονται 4 mg υλικού).

2.25.5 Ακινητοποίηση ενζύμου σε μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου

Η ακινητοποίηση ενζύμου σε νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη και ιόντα νικελίου αποτελεί μια μη ομοιοπολική μέθοδο ακινητοποίησης που βασίζεται στην ανάπτυξη δεσμών συγγένειας και προσομοιάζει τη μέθοδο καθαρισμού πρωτεϊνών με εφαρμογή στήλης υγρής χρωματογραφίας. Πιο συγκεκριμένα, ο σχεδιασμός της κλωνοποίησης του γονιδίου ενδιαφέροντος περιλαμβάνει την προσθήκη ενός επίτοπου 6 ιστιδινών (6x His-tag) στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο του αντίστοιχου ενζύμου κατά την υπερέκφραση, μέσω του οποίου το ένζυμο μπορεί να απομονωθεί από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του κυτταρικού εκχυλίσματος μέσω στήλης υγρής χρωματογραφίας φορτισμένη με ιόντα νικελίου, λόγω του χηλικού συμπλόκου που σχηματίζει το νικέλιο με το ιμιδαζόλιο των ιστιδινών. Το πρωτόκολλο βασίστηκε σε αυτό του Yang *et al.*, 2015 με κάποιες τροποποιήσεις και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Σε 1 mg νανοϋλικού προστίθεται ενζυμικό παρασκεύασμα επιθυμητής συγκέντρωσης σε τελικό όγκο 1 ml.
2. Πραγματοποιείται επώαση για κατάλληλο χρονικό διάστημα υπό ανάδευση (650 rpm) στους 25 °C.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $4000 \times g$ για 4 min, στους 4 °C.

4. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και φυλάσσεται για μελέτες προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών και ενζυμικής δραστηριότητας.
5. Προστίθεται στο ίζημα 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος, το δείγμα επαναιωρείται με υπερήχους και ακολουθεί ξανά φυγοκέντρωση στα $3000 \times g$ για 3 min, στους 4 °C.
6. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το δείγμα επαναιωρείται σε 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος. Αυτό αποτελεί το τελικό διάλυμα μελέτης του νανοβιοκαταλύτη.

2.25.6 Βελτιστοποίηση ακινητοποίησης ενζύμου σε νανοϋλικά

Στα πρωτόκολλα ακινητοποίησης ενζύμου δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις ενζυμικού παρασκευάσματος, ενώ η συγκέντρωση του νανοϋλικού διατηρούταν σταθερή. Οι αναλογίες νανοϋλικού-ενζύμου που δοκιμάστηκαν ήταν οι εξής: 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:10. Άλλη παράμετρος που εξετάστηκε ήταν ο χρόνος επώασης νανοϋλικού-ενζύμου (30, 60, 120 min).

2.26 Χαρακτηρισμός νανοβιοκαταλύτη

2.26.1 Απόδοση ακινητοποίησης και ενζυμικοί προσδιορισμοί με τον νανοβιοκαταλύτη

Η επιτυχής ακινητοποίηση επαληθεύεται με προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του νανοβιοκαταλύτη σε σχέση με την αρχική δραστηριότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος και τη δραστηριότητα που έχει το υπερκείμενο της ακινητοποίησης και εκφράζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Απόδοση ακινητοποίησης (\%)} = \left[\frac{\text{ενζυμική δραστηριότητα στο αρχικό ενζυμικό παρασκεύασμα} - \text{ενζυμική δραστηριότητα στο υπερκείμενο της ακινητοποίησης}}{\text{ενζυμική δραστηριότητα στο αρχικό ενζυμικό παρασκεύασμα}} \right] * 100$$

Επιπλέον, ελέγχεται αν η αντίδραση είναι ενζυμοεξαρτώμενη μεταβάλλοντας την ποσότητα του νανοβιοκαταλύτη που χρησιμοποιείται για τον ενζυμικό προσδιορισμό.

Ο χαρακτηρισμός της κινητικής σταθερής κατάστασης του νανοβιοκαταλύτη, του pH και της θερμοκρασίας βέλτιστης δραστηριότητας, της θερμοσταθερότητας και της διατήρησης της ενζυμικής δραστηριότητας κατά την αποθήκευση διεξήχθησαν όπως περιγράφεται προηγουμένως και για την ελεύθερη μορφή του ενζύμου (Παράγραφος 2.23).

2.26.2 Επαναχρησιμοποίηση νανοβιοκαταλύτη

Η μελέτη ικανότητας επαναχρησιμοποίησης των νανοβιοκαταλυτών σε επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας με φωτομέτρηση, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.24.1. Μετά από κάθε κύκλο αντίδρασης, το ακινητοποιημένο ένζυμο διαχωρίζεται μέσω φυγοκέντρωσης στα $12000 \times g$ ή με την εφαρμογή ισχυρού μαγνητικού πεδίου και ξεπλένεται τρεις φορές με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η ενζυμική ενεργότητα στον πρώτο κύκλο ορίζεται ως 100% και η ενζυμική ενεργότητα σε κάθε επόμενο κύκλο υπολογίστηκε ως προς αυτόν.

2.26.3 Δομικός χαρακτηρισμός του νανοβιοκαταλύτη με Φασματοφωτομετρία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Με τη μέθοδο FTIR μπορεί να εξακριβωθεί η επιτυχία της ακινητοποίησης του ενζύμου πάνω στο νανοϋλικό, καθώς με την εφαρμογή της παρέχονται πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της

ακτινοβολίας με την ύλη μετρώντας απορρόφηση, καθώς κάθε μόριο απορροφά σε συγκεκριμένη ακτινοβολία στην περιοχή του υπεριώδους. Από την ανάλυση των πρωτεϊνών με τη συγκεκριμένη μέθοδο προκύπτει ένα χαρακτηριστικό φάσμα λόγω των δονήσεων των δεσμών της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Στο φάσμα απορρόφησης υπερίθρου εντοπίζονται εννέα κορυφές για τον πεπτιδικό δεσμό, οι οποίες ονομάζονται αμιδικές (Amide) κορυφές (I-VII, A και B) και οφείλονται σε διαφορετικές δονητικές καταστάσεις και σε διαφορετικούς δεσμούς (Barth 2007). Για τη μελέτη της δομής των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται κυρίως οι αμιδικές κορυφές I, II και III.

Κορυφή	Περιοχή (cm ⁻¹)	Δεσμοί
Amide I	1600-1700	Δονήσεις έκτασης C=O
Amide II	1500-1600	Δονήσεις κάμψης N-H Δονήσεις έκτασης C-N
Amide III	1200-1350	Δονήσεις κάμψης N-H Δονήσεις έκτασης C-N

Τα φάσματα υπερίθρου από δείγματα ενζύμων και νανοβιοκαταλυτών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία λήφθηκαν στο φασματοφωτόμετρο υπερίθρου FTIR-8400 (Shimadzu, Tokyo, Japan) του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, το οποίο είναι εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θεϊκής τριγλυκίνης (DTGS) και δέχεται υποδοχή για κρύσταλλο ψευδαργύρου-σεληνίου για μέτρηση υγρών δειγμάτων με την τεχνική εξασθένησης ολικής ανάκλασης (ATR).

Για τη λήψη φασμάτων υπερίθρου υγρών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα των καθαρών ενζύμων σε ρυθμιστικό διάλυμα TrisHCl (50 mM, pH 8). Το διάλυμα τοποθετήθηκε στον κρύσταλλο ψευδαργύρου-σεληνιδίου έτσι ώστε να καλύπτει όλη την επιφάνειά του. Τα φάσματα μετρήθηκαν σε εύρος 4000-400 cm⁻¹ σε θερμοκρασία δωματίου. Ο μηδενισμός έγινε με τον αέρα. Σε κάθε περίπτωση η απορρόφηση δεν ξεπέρασε τις 1.5 μονάδες.

Για τη λήψη φασμάτων υπερίθρου στερεών δειγμάτων μελετήθηκαν τα ακινητοποιημένα ένζυμα, καθώς και οι φορείς ακινητοποίησης. Αρχικά τα δείγματα φυγοκεντρούνται και ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου και έπειτα ξήρανση με την χρήση φυγοκεντρικού συμπυκνωτή κενού, SpeedVac, στους 4 °C. Ζυγίζονται περίπου 200 mg του KBr μαζί με 2-3 mg του δείγματος και το μίγμα κονιορτοποιείται σε γουδί. Τα στερεά δείγματα προετοιμάζονται ως πιεσμένα δισκία KBr εντός ειδικής μήτρας μέσω υδραυλικής πρέσας. Τα φάσματα των δισκίων καταγράφονται σε εύρος 4000-400 cm⁻¹ σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία silica gel για την αφύγρανση της ατμόσφαιρας του θαλάμου στο οποίο βρίσκεται το δείγμα. Κάθε φάσμα προκύπτει από τη μέση τιμή 32 σαρώσεων με ανάλυση 8 cm⁻¹. Ο μηδενισμός έγινε με τον αέρα. Σε κάθε περίπτωση η απορρόφηση δεν ξεπέρασε τις 1.5 μονάδες.

2.27 Ανάλυση δειγμάτων με φασματοσκοπία NMR

Πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων μιας διάστασης (1D ¹H-NMR) και δύο διαστάσεων (2D, ¹H -¹³C-HSQC/HMBC) σε φασματογράφο NMR Bruker AV-500 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Γερμανία) του Κέντρου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του τμήματος

Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η ανάλυση και επεξεργασία των φασμάτων έγινε, με τη χρήση του λογισμικού TopSpin 3.2. Τα πειράματα με την 4-υδροξυυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος και τα in-cell NMR φάσματα λήφθηκαν μετά την αναβάθμιση του φασματογράφου σε Bruker NEO 500MHz και η ανάλυσή τους έγινε με το λογισμικό TopSpin 4.07. Όλα τα δείγματα ετοιμάστηκαν σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με τελικό όγκο 500 μ l και περιείχαν 90% H_2O / 10% D_2O . Τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε 5 mm σωληνάκια NMR (Norell® Standard Series™).

2.27.1 Ταυτοποίηση προϊόντος ενζυμικής αντίδρασης

Με τη χρήση 1D και 2D NMR φασματοσκοπίας ταυτοποιήθηκαν τα προϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων που μελετήθηκαν σε αυτή τη διατριβή.

2.27.1.1 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος

Η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος μελετήθηκε στην ακινητοποιημένη μορφή της σε αντίδραση με υπόστρωμα το γεντισικό οξύ για την ταυτοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης. Η σύσταση της αντίδρασης περιγράφηκε προηγουμένως (Παράγραφος 2.24.1.3), με την διαφορά ότι στην περίπτωση του ναοβιοκαταλύτη χρησιμοποιήθηκαν 40 μ l. Η αντίδραση (συνολικού όγκου 1 ml) αφέθηκε για 12 h στους 4 °C, από την οποία 450 μ l αναμίχθηκαν με 50 μ l D_2O και μεταφέρθηκαν σε σωληνάκι NMR.

2.27.1.2 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης

Η 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης μελετήθηκε στην ελεύθερη μορφή της σε αντίδραση με υπόστρωμα την κατεχόλη για την ταυτοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης. Η σύσταση της αντίδρασης περιγράφηκε προηγουμένως (Παράγραφος 2.24.1.4). Η αντίδραση (συνολικού όγκου 1 ml) αφέθηκε για 16-18 h στους 4 °C, από την οποία 450 μ l αναμίχθηκαν με 50 μ l D_2O και μεταφέρθηκαν σε σωληνάκι NMR.

2.27.1.3 4-υδροξυυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος

Η 4-υδροξυυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος μελετήθηκε τόσο σε μορφή κυτταρικού εκχυλίσματος, όσο και στην καθαρή μορφή της σε αντίδραση με υπόστρωμα το 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ (3-HBA) για την ταυτοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης. Η σύσταση της αντίδρασης περιγράφηκε προηγουμένως (Παράγραφος 2.24.1.6). Η αντίδραση (συνολικού όγκου 1 ml) αφέθηκε για 16-18 h στους 4 °C, από την οποία 450 μ l αναμίχθηκαν με 50 μ l D_2O και μεταφέρθηκαν σε σωληνάκι NMR.

2.27.2 Παρακολούθηση ενζυμικής αντίδρασης σε κυτταρικό επίπεδο (in-cell NMR)

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής διερευνήθηκε η δυνατότητα παρακολούθησης της ενζυμικής αντίδρασης της 4-υδροξυυλάσης του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος σε κυτταρικό επίπεδο μέσα σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα με τη μεθοδολογία in-cell NMR. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τόσο τα κύτταρα Sphe3, όσο και τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* BL21-pET29c::36590 ως προς την ικανότητα μετατροπής του 3-HBA σε PCA.

2.27.2.1 Sphe3 in-cell NMR

Μονή αποικία του στελέχους Sphe3 εμβολιάστηκε σε 5 ml LB (προκαλλιέργεια) και επωάστηκε για 16-18 h στους 30 °C, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, κατάλληλη ποσότητα της προκαλλιέργειας εμβολιάστηκε σε 100 ml LB και τα κύτταρα επωάστηκαν στους 30 °C υπό

ανάδευση, μέχρι το μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση ($6000 \times g$ για 15 min στους $4^\circ C$) και ακολούθησαν τρεις πλύσεις με MM M9. Μέρος των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως έχει για τα πειράματα στο NMR.

Μέρος των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο σε καλλιέργεια 100 ml MM M9 με 5 mM 3-HBA και τα κύτταρα συλλέχθηκαν στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης με φυγοκέντρηση ($6000 \times g$ για 15 min στους $4^\circ C$) και ακολούθησαν τρεις πλύσεις με MM M9. Στόχος της καλλιέργειας των *Sphe3* στο 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ ήταν η επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου της 4-υδροξυλάσης του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος, για μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης στο NMR.

Για την επιβεβαίωση της δραστηριότητας της 4-υδροξυλάσης του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος στα *Sphe3*, πραγματοποιήθηκε απομόνωση ακατέργαστου κυτταρικού εκχυλίσματος από κύτταρα *Sphe3* αναπτυγμένα σε MM M9 παρουσία 5 mM 3-HBA με μηχανική λύση:

1. Συλλογή καλλιέργειας κυττάρων *Sphe3* στην εκθετική φάση ανάπτυξης (O.D.=1) και φυγοκέντρηση $6000 \times g/15 \text{ min}/4^\circ C$.
2. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml διαλύματος Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) και διαλύματος DTT (1 mM).
3. Τοποθέτηση του κυτταρικού αιωρήματος σε σωληνάρια που περιέχουν κατά τα 2/3 του όγκου τους σφαιρίδια ζirkονίου διαμέτρου 0,1 mm.
4. Λύση των κυττάρων σε σφαιρόμυλο για 10 min, με εναλλαγές θραύσης-διατήρησης σε πάγο ανά 1 min.
5. Φυγοκέντρηση $12000 \times g/20 \text{ min}/4^\circ C$. Συλλογή υπερκλειμένου και πραγματοποίηση ενζυμικών προσδιορισμών (φωτομετρικά και με φασματοσκοπία NMR).

2.27.2.2 *E.coli* BL21 in-cell NMR

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* BL21-pET29c::36590 χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση του ενζύμου της 4-υδροξυλάσης του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος και τα κύτταρα συλλέχθηκαν 16-18 h μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης (βλ. Παράγραφος 2.18) με φυγοκέντρηση ($6000 \times g$ για 15 min στους $4^\circ C$) και πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις με MM M9.

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στο NMR με διάφορες συγκεντρώσεις του 3-HBA (1-5 mM) και δοκιμάστηκε η αναγνώριση άλλων υποστρωμάτων (4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, γεντισικό οξύ, φαινόλη).

Επιπλέον, μελετήθηκε ο καταβολισμός του 3-HBA σε σχέση με το χρόνο, τόσο σε συμβατική καλλιέργεια των μετασχηματισμένων BL21 σε επωαστικό θάλαμο υπό ανάδευση στους $37^\circ C$, όσο και στο σωληνάκι NMR με συνθήκες που προσομοιάζουν αυτές του επωαστικού θαλάμου.

Για την επιβεβαίωση της δραστηριότητας της 4-υδροξυλάσης του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος μετά την υπερέκφραση του ενζύμου στα κύτταρα BL21 πραγματοποιήθηκε φωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Παράγραφος 2.24.1.6), τόσο με καθαρό ένζυμο, όσο και με κυτταρικό εκχύλισμα που περιείχε υπερεκφρασμένο το ένζυμο. Οι ενζυμικές αντιδράσεις μελετήθηκαν και με φασματοσκοπία NMR.

2.28 Ποσοτικός προσδιορισμός καταβολισμού υποστρώματος/παραγωγής προϊόντος

2.28.1 Μέθοδος 4-αμινοαντιπυρίνης (4-AAP)

Για τη μελέτη του ρυθμού καταβολισμού της φαινόλης από κύτταρα Sphe3, ελεύθερα και ακινητοποιημένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της 4-AAP. Η χρήση της 4-αμινοαντιπυρίνης για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Emerson το 1943 (Emerson 1943). Η αντίδραση συνίστατο στην ανάμειξη της φαινολικής ένωσης, της 4-αμινοαντιπυρίνης και ενός αλκαλικού οξειδωτικού (σιδηροκυανιούχο κάλιο) σε διάλυμα υψηλού pH με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας ένωσης κινόνης κόκκινου χρώματος που απορροφά στα 510 nm.

Η ανάπτυξη των κυττάρων Sphe3 (30, 100 ml) πραγματοποιήθηκε σε MM M9 παρουσία 300-1500 mg/L φαινόλης. Η λήψη δειγμάτων για τον προσδιορισμό της φαινόλης πραγματοποιήθηκε παράλληλα με τη λήψη δειγμάτων για τις καμπύλες ανάπτυξης. Στην περίπτωση των ακινητοποιημένων κυττάρων, η μελέτη του καταβολισμού της φαινόλης έγινε σε MM M9 χωρίς φωσφορικά για να διατηρηθεί η ακεραιότητα των σφαιριδίων αλγινικού νατρίου και η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 και 196 h. Σε κάθε δείγμα του 1 ml απομακρύνθηκαν τα κύτταρα με φυγοκέντρηση ($11000 \times g$ - 5 min) και φιλτράρισμα (0,22 μ m). Η σύσταση της αντίδρασης προσδιορισμού της φαινόλης σε κάθε καλλιέργεια με τη μέθοδο της 4-AAP είχε ως εξής (Al-Tarawneh et al. 2022):

Σύσταση αντίδρασης

2% 4-αμινοαντιπυρίνη

8% σιδηροκυανιούχο κάλιο ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$)

2N υδροξείδιο του αμμωνίου (NH_4OH)

Αναλογία αντιδραστηρίων 1:1:2

Προσαρμογή pH $7,9 \pm 0,1$

100 μ l δείγματος από την καλλιέργεια + 900 μ l dsH_2O + 100 μ l του μίγματος των αντιδραστηρίων

Αραίωση με 9 ml dsH_2O

Επώαση για 15 min

Φωτομέτρηση στα 510 nm

Ο υπολογισμός της φαινόλης στις καλλιέργειες έγινε με αναγωγή των μετρήσεων των οπτικών απορροφήσεων των δειγμάτων στην εξίσωση της πρότυπης καμπύλης, που κατασκευάστηκε με δείγματα φαινόλης γνωστών συγκεντρώσεων.

2.28.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

2.28.2.1 Καταβολισμός φαινόλης από κύτταρα Sphe3

Για τη μελέτη του καταβολισμού του υποστρώματος της φαινόλης από τα κύτταρα Sphe3, ελεύθερα και ακινητοποιημένα, χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), στο σύστημα Shimadzu VP HPLC with LC-10AT, SCL-10A, FCV-10AL, GT-104 and SPD-10AV

UV/Vis Detector του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Χρησιμοποιήθηκε η στήλη μBondapak C18 ($3.9 \times 300 \text{ mm} \times 10 \text{ }\mu\text{m}$) ως στατική φάση, ενώ η κινητή φάση είχε την εξής σύσταση: Ακετονιτρίλιο (Merck, Darmstadt, Germany) (A) + 0,1% οξικό οξύ σε υπερκάθαρο νερό (B). Η έκλουση γίνεται με βαθμίδωση του διαλύτη B: από 80-50% για 0–30 min, 50% για 5 min (30–35 min), και αύξηση στο 80% μέχρι τα 40 min (36–40 min), με ρυθμό ροής 1 mL/min, στους 27 °C. Οι ενώσεις ανιχνεύονται στα 280 nm. Η ταυτοποίηση της φαινόλης, της κατεχόλης και του μουκονικού οξέος στις καλλιέργειες του *Srhe3* επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση με HPLC των αντίστοιχων πρότυπων ενώσεων. Η ποσοτικοποίηση έγινε με αναγωγή στις πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν με γνωστές συγκεντρώσεις των πρότυπων ενώσεων. Αναλύσεις έγιναν σε τρία βιολογικά δείγματα και κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε τόσο σε υδατικά δείγματα (1 ml δείγματος κατευθείαν από την καλλιέργεια), όσο και με δείγματα αραιωμένα σε μεθανόλη (εκχύλιση του συνολικού όγκου της καλλιέργειας).

Κάθε υδατικό δείγμα του 1 ml από τις καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκε ($11000 \times g$ - 5 min) και φιλτραρίστηκε (0,22 μm) για την απομάκρυνση των κυττάρων.

Για την εκχύλιση όλης της καλλιέργειας:

- Φυγοκέντρωση της καλλιέργειας (30 ml) για απομάκρυνση κυττάρων.
- Μεταφορά σε ποτήρι ζέσεως και οξίνιση με HCl μέχρι pH=2.
- Μεταφορά ίσου όγκου καλλιέργειας-οξικού αιθυλεστέρα σε χοάνη και καλή ανάδευση.
- Αφού ισορροπήσουν οι φάσεις (υδατική και οργανική), απομακρύνω την υδατική φάση.
- Συλλογή της οργανικής φάσης που περιέχει τους μεταβολίτες.
- Προσθήκη θειϊκού νατρίου στο εκχύλισμα για απομάκρυνση υπολειμμάτων της υδατικής φάσης.
- Μεταφορά του εκχυλίσματος με τη χρήση πτυχωτού ηθμού σε σφαιρική φιάλη.
- Εξάτμιση του οργανικού διαλύτη με περιστροφικό συμπυκνωτή (flash evaporator).
- Το υπόλειμμα αραιώνεται σε 1 ml μεθανόλης.

Για τις αναλύσεις στο HPLC κάθε δείγμα (υδατικό ή μεθανολικό) αραιώθηκε με μεθανόλη σε αναλογία 1:1 και φιλτραρίστηκε με φίλτρο 0,45 μm . Οι διαλύτες ήταν καθαρότητας HPLC και το νερό που χρησιμοποιήθηκε από στήλη παραγωγής υπερκάθολου νερού.

2.28.2.2 Παραγωγή ccMA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21

Μετασχηματισμένα κύτταρα BL21 με τον ανασυνδυασμένο φορέα υπερέκφρασης pET29c::catA εμβολιάστηκαν σε τροποποιημένο θρεπτικό μέσο MM M9 (pH=7,5) (Πίνακας 2.11) που περιείχε ως μοναδική πηγή άνθρακα γλυκερόλη (1%) και 100 μM FeCl₃.

Πίνακας 2.11. Σύσταση τροποποιημένου θρεπτικού μέσου MM M9.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (g/L)
K ₂ HPO ₄	1,8
KH ₂ PO ₄	1,2

NH ₄ Cl	4
MgSO ₄	0,2
NaCl	0,1

Ετοιμάστηκαν τρεις καλλιέργειες και η κάθε καλλιέργεια (100 ml) επώαστηκε για 6 h στους 37 °C υπό ανάδευση, έως O.D.₆₀₀ = 0,6. Η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της CDO12 πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 0,2 mM IPTG και 0,2% λακτόζης για επιπλέον 6 h στους 30 °C. Στη συνέχεια, σε κάθε καλλιέργεια προστέθηκε κατεχόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (10-50 mM) και ακολούθησε επώαση για 1 h στους 37 °C υπό ανάδευση. Με το πέρας της επώασης, οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν για της απομάκρυνση των κυττάρων και το υπερκείμενό τους χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό κατεχόλης με τη μέθοδο της 4-AAP, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Παράγραφος 2.28.1).

Για τον προσδιορισμό παραγωγής του ccMA, σε καλλιέργεια 100 ml μετά από υπερέκφραση πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 mM κατεχόλης, με ανανέωση της προσθήκης μετά από 1 h και εκ νέου δειγματοληψία στις 3 h. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από την καλλιέργεια για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης των βακτηρίων, του pH της καλλιέργειας, μείωσης της κατεχόλης και αύξησης του ccMA. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και φιλτράρισμα στα δείγματα για απομάκρυνση των κυττάρων.

Η ανάλυση έγινε στο χρωματογραφικό σύστημα HPLC εφοδιασμένο με ανιχνευτή ορατού – υπεριώδους UV-DAD (Agilent, model LC 1100 series, Agilent Co., Palo Alto, CA, USA) του εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης (RP) Eclipse XDB C18 (Merck; 150 mm x 4,5 mm x 5 μm) σε θερμοκρασία δωματίου. Το μουκονικό οξύ και η κατεχόλη ταυτοποιήθηκαν στα 280 nm. Τα δείγματα και τα πρότυπα προς ανάλυση παρασκευάστηκαν την ίδια ημέρα και κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν (n = 2). Το σύστημα έκλουσης ήταν (Α) υδατικό διάλυμα 0,1% (w/v) οξικού οξέος και (Β) ακετονιτρίλιο HPLC (Merck, Darmstadt, Γερμανία, με ροή 1 mL/min. Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης του διαλύτη Α ήταν το ακόλουθο: από 80-50% για 0–30 min, 50% για 5 min (30–35 min), και αύξηση στο 80% μέχρι τα 40 min (36–40 min).

Η ταυτοποίηση της κατεχόλης και του μουκονικού οξέος στις καλλιέργειες επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση με HPLC των αντίστοιχων πρότυπων ενώσεων και η ποσοτικοποίηση έγινε με αναγωγή στις πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν με γνωστές συγκεντρώσεις των πρότυπων ενώσεων. Αναλύσεις έγιναν σε τρία βιολογικά δείγματα και κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε υδατικά δείγματα (1 ml δείγματος κατευθείαν από την καλλιέργεια) και σε δείγματα αραιωμένα σε μεθανόλη (εκχύλιση του συνολικού όγκου της καλλιέργειας), όπως αναφέρεται και προηγουμένως (Παράγραφος 2.28.2.1).

Αποτελέσματα και Συζήτηση

3

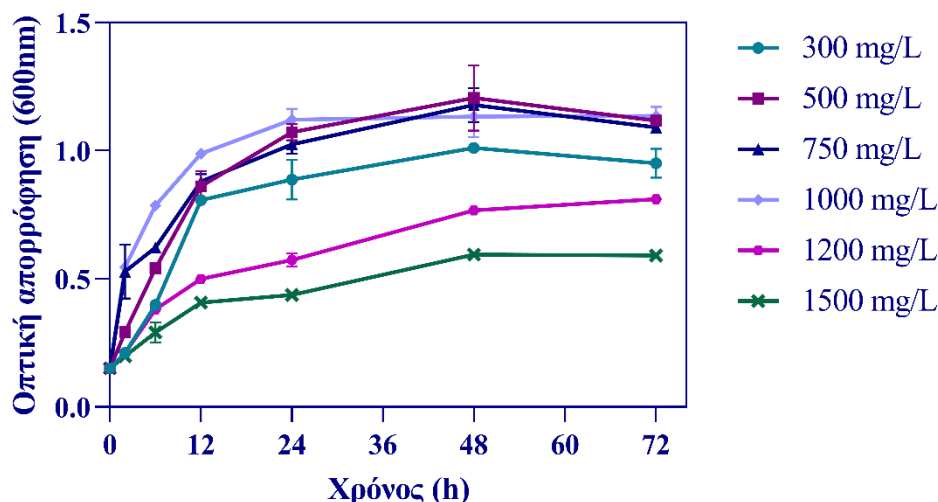
*Μελέτη καταβολισμού υδροξυλιωμένων αρωματικών ενώσεων από το *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 και χαρακτηρισμός ενζύμων που εμπλέκονται*

*3.1 Μελέτη της πορείας καταβολισμού της φαινόλης στο *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3*

*3.1.1 Ανάπτυξη του στελέχους *Sphe3* παρουσία φαινόλης*

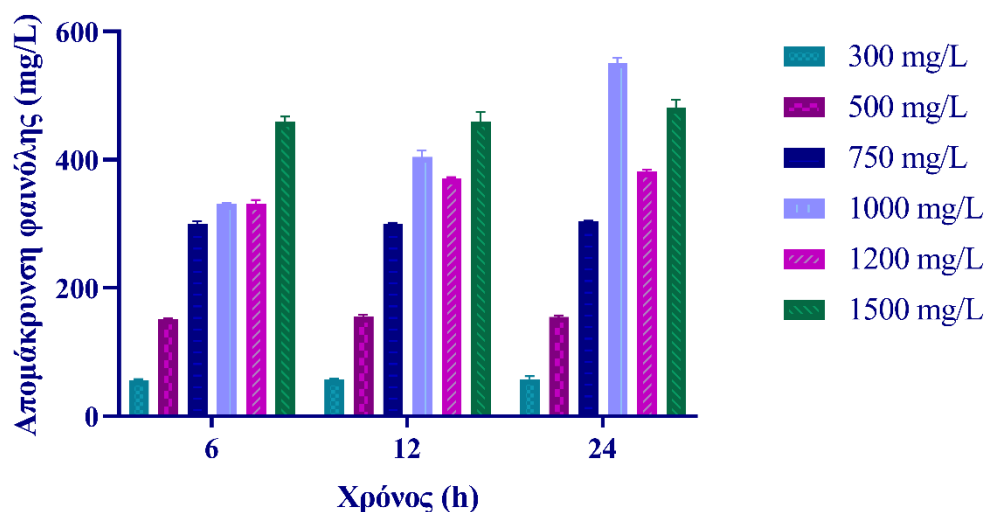
Τόσο η αερόβια όσο και η αναερόβια βιοαποδόμηση της φαινόλης έχει μελετηθεί σε διάφορα βακτήρια (Chandana Lakshmi and Sridevi 2009; Tomei et al. 2021). Γενικά η αερόβια βιοαποδόμηση χαρακτηρίζεται από υψηλότερη αποδοτικότητα και χαμηλότερο κόστος, που οφείλονται στη γρήγορη ανάπτυξη των μικροοργανισμών και στην ικανότητά τους για την πλήρη ανοργανοποίηση των ξενοβιοτικών ουσιών (Al-Khalid and El-Naas 2012). Αρκετά χαρακτηριστικά στελέχη που χρησιμοποιούν τον αερόβιο καταβολισμό των φαινολών ανήκουν στα γένη *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* και *Kocuria* (Y. Liu et al. 2020; Barik et al. 2021; Ahamad and Kunhi 2011; L. Wu et al. 2018), ενώ τα στελέχη που καταβολίζουν φαινόλη και ανήκουν στο γένος *Arthrobacter* είναι λίγα (Karigar et al. 2006; F. Li et al. 2016; G. L. Y. Lee et al. 2022; Margesin, Bergauer, and Gander 2004; P. Wang, Qu, and Zhou 2009).

Το στέλεχος *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται παρουσία διαφόρων αρωματικών ενώσεων, όπως το φαινανθρένιο, το βενζοϊκό οξύ, το γεντισικό οξύ κ.ά. (Kallimanis et al. 2009; Vandera et al. 2012; Ασημακούλα 2017). Στην παρούσα εργασία, βρέθηκε ότι το Sphe3 είναι επίσης ικανό να αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας σε συγκεντρώσεις μέχρι 1500 mg/L (Εικόνα 3.1), ενώ δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη παρουσία 2000 mg/L φαινόλης.



Εικόνα 3.1. Καμπύλες ανάπτυξης του *Sphe3* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης. Οι γραμμές με τον κύκλο, τετράγωνο, τρίγωνο, ρόμβο, πολύγωνο και χι αντιπροσωπεύουν τις μετρήσεις της ανάπτυξης του *Sphe3* παρουσία 300, 500, 750, 1000, 1200 και 1500 mg/L αντίστοιχα. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Στις καμπύλες ανάπτυξης παρατηρείται ότι τα κύτταρα του *Sphe3* μπαίνουν χωρίς καθυστέρηση στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους μεταξύ 0 και 12 h στο ελάχιστο θρεπτικό μέσο M9 παρουσία φαινόλης σε συγκέντρωση μέχρι 1000 mg/L, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινόλης (1200-1500 mg/L) παρατηρείται μια καθυστέρηση στην ανάπτυξη του στελέχους. Η μικρότερη ανάπτυξη του *Sphe3* στα 300 mg/L φαινόλης οφείλεται πιθανώς στην περιορισμένη διαθεσιμότητα της πηγής άνθρακα, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις φαινόλης (πάνω από 1000 mg/L) είναι πιθανό να δημιουργούν τοξικό περιβάλλον για τα κύτταρα *Sphe3*.



Εικόνα 3.2. Καταβολισμός φαινόλης από το *Sphe3*, όταν αναπτύσσεται παρουσία 300-1500 mg/L, στους 30 °C μετά από 6, 12 και 24 h. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Γενικά, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της βακτηριακής ανάπτυξης και του καταβολισμού της φαινόλης (Xu et al. 2021). Παρόμοιες παρατηρήσεις καλύτερης ανάπτυξης και ικανότητας

απομάκρυνσης του υποστρώματος μέχρι μια συγκέντρωση πάνω από την οποία υπάρχει μείωση της ανάπτυξης και της ικανότητας απομάκρυνσης του υποστρώματος, υποδεικνύοντας αναστολή (ή παρεμπόδιση) της μικροβιακής ανάπτυξης λόγω υποστρώματος, έχουν αναφερθεί και προηγουμένως στα στελέχη *Pseudomonas putida* BCRC 14365, *Acinetobacter radioresistens* APH1 και *Curtobacterium flaccumfacien* (Y. Liu et al. 2020; Y. H. Lin and Cheng 2020; Khleifat et al. 2022).

Όπως ήταν αναμενόμενο, η ανάπτυξη του στελέχους Sphe3 σχετίζεται με τον καταβολισμό της φαινόλης από τα κύτταρα. Η μεγαλύτερη ανάπτυξη των κυττάρων Sphe3, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3.1, συμβαδίζει με τη μείωση στη συγκέντρωση φαινόλης, υποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα Sphe3 αξιοποιούν τη φαινόλη ως πηγή άνθρακα. Στην Εικόνα 3.2 απεικονίζεται η ικανότητα καταβολισμού της φαινόλης από το Sphe3, όπως υπολογίζεται με μέτρηση της υπολειπόμενης φαινόλης στο μέσο καλλιέργειας με τη μέθοδο της 4-αμινοαντιπυρίνης (4-AAP) (Παράγραφος 2.28.1). Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη απομάκρυνση φαινόλης παρατηρήθηκε μετά την επώαση του Sphe3 με 1000 mg/L φαινόλης για 24 h, όπου απομακρύνθηκαν 551 mg/L φαινόλης, ενώ για τις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 300, 500, 750, 1200 και 1500 mg/L μετά από 24 h απομακρύνθηκαν 105, 170, 305, 381 και 540 mg/L φαινόλης, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα καταβολισμού της φαινόλης από το Sphe3 συνάδουν με τα αποτελέσματα της ανάπτυξης του στελέχους, κατά την οποία η βιομάζα του Sphe3 είναι υψηλότερη στις 24 h παρουσία 1000 mg/L φαινόλης (Εικόνα 3.1). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στη συγκέντρωση της υπολειπόμενης φαινόλης σε οποιαδήποτε καλλιέργεια μετά από 24 ώρες, όταν τα κύτταρα φαινόταν να έχουν εισέλθει στη στατική φάση. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στη συγκέντρωση της φαινόλης σε καλλιέργειες με κύτταρα αδρανοποιημένα με θερμότητα, αποδίδοντας τη μείωση στη συγκέντρωση του υποστρώματος στην ικανότητα του στελέχους Sphe3 να καταβολίζει τη φαινόλη.

Ο καταβολισμός της φαινόλης από στελέχη του γένους *Arthrobacter* έχει αναφερθεί και προηγουμένως. Συγκεκριμένα, το ψυχρόφιλο στέλεχος *Arthrobacter* sp. έχει την ικανότητα να καταβολίζει 400 mg/L φαινόλης σε 72 h (Margesin, Bergauer, and Gander 2004), ενώ κύτταρα *Arthrobacter citreus* απομάκρυναν 471 mg/L φαινόλης σε 24 h (Karigar et al. 2006). Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της παρούσας εργασίας αναφέρονται για το στέλεχος *Arthrobacter* με Accession No. KT369868, το οποίο μετά από 24 h απομάκρυνε το 80% των 500 mg/L φαινόλης (F. Li et al. 2016).

3.1.2 *In silico* εντοπισμός γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό της φαινόλης

Η αερόβια βιοαποδόμηση της φαινόλης ξεκινά με την εισαγωγή ενός ατόμου οξυγόνου, με τη μορφή υδροξυλομάδας, από το ένζυμο υδροξυλάση της φαινόλης προς μετατροπή της σε κατεχόλη, η οποία στη συνέχεια διασπάται από την 1,2- (ortho-) ή την 2,3- (meta-σχάση) διοξυγονάση της κατεχόλης (Roell et al. 2019). Προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό της φαινόλης, πραγματοποιήθηκε *in silico* μελέτη του γονιδιώματος του στελέχους Sphe3, όπου εντοπίστηκαν γονίδια που πιθανώς εμπλέκονται στον αερόβιο καταβολισμό της φαινόλης. Συγκεκριμένα, το γονιδίωμα του Sphe3 περιλαμβάνει τα γονίδια Asphe3_36590, Asphe3_35170 και Asphe3_40510, που πιθανώς κωδικεύουν την 2-μονοξυγονάση της φαινόλης (PHH), την 1,2- και την 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης (1,2-CDO και 2,3-CDO), αντίστοιχα. Επιπλέον, εντοπίστηκαν

γονίδια που ανήκουν στο μονοπάτι της *ortho*-σχάσης της κατεχόλης (Πίνακας 3.1), ενώ εκτός του γονιδίου Asphe3_40510 δεν εντοπίστηκε άλλο γονίδιο που θα μπορούσε να συμμετάσχει στο μονοπάτι της *meta*-σχάσης της κατεχόλης.

Πίνακας 3.1. Γονίδια που εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του *Sphe3* στη βάση δεδομένων JGI/IMG και πιθανώς εμπλέκονται στα μονοπάτια της *ortho*- και *meta*-σχάσης της κατεχόλης.

Locus Tag γονιδίου	Τοποθεσία στο γονιδίωμα του Sphe3	Όνομα προϊόντος	Πορεία διάσπασης κατεχόλης
Asphe3_35170	Χρωμόσωμα	catechol 1,2-dioxygenase	<i>ortho</i> -σχάση κατεχόλης
Asphe3_35110		muconolactone delta- isomerase	
Asphe3_38830		3-oxoadipate enol-lactonase	
Asphe3_38800		3-oxoadipate CoA- transferase alpha subunit	
Asphe3_16280, Asphe3_38810		acetyl-CoA acetyltransferase	
Asphe3_40510	Μεγάλο πλασμίδιο pASPHE301	catechol 2,3-dioxygenase	<i>meta</i> -σχάση κατεχόλης

Από τη βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο γονιδίωμα του *Sphe3*, προέκυψαν γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα, όπως δέλτα-ισομεράση της μουκονολακτόνης, 3-οξοαδιπική ενολλακτονάση και 3-οξοαδιπική CoA-τρανσφεράση, που συμμετέχουν στην πορεία της *ortho*-σχάσης της κατεχόλης, όπως έχει αναφερθεί και αλλού (Nešvera, Rucká, and Pátek 2015).

Ακολούθησε ανάλυση ομολογίας blastp των αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων Asphe3_36590, Asphe3_35170 και Asphe3_40510 (Πίνακας 3.2), σύμφωνα με την οποία η αμινοξική αλληλουχία του Asphe3_36590 παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα (>84%) με ένζυμα υδροξυλάσης της φαινόλης από άλλα στελέχη *Arthrobacter* (οι οποίες όμως δεν έχουν ταυτοποιηθεί πειραματικά), η αμινοξική αλληλουχία του Asphe3_35170 παρουσιάζει εξαιρετικά μεγάλη ομοιότητα (>91%) με 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης και η αμινοξική αλληλουχία του Asphe3_40510 φέρει μια σχετικά χαμηλή ομοιότητα με 2,3-διοξυγονάσες της κατεχόλης (38-56%).

Πίνακας 3.2. Blastp ανάλυση των ενζύμων που εμπλέκονται στον καταβολισμό της φαινόλης στο *Sphe3*.

Γονίδι α του Sphe3	Ένζυμο	Μικροοργανισμός	Query Coverage (%)	Per. Identi- ty (%)	Μέγεθος (aa)	Accession No.
Asphe3_36590	Υδροξυλάση της φαινόλης (PHH)	<i>Arthrobacter</i> sp. NtRootA9	99	87.12	635	BCW20813. 1

		<i>Arthrobacter</i> sp. OY3WO11	100	87.42	636	OAE03256.1
		<i>Arthrobacter</i> sp. PvP023	98	86.51	638	MBP113475 6.1
		<i>Arthrobacter</i> sp. Leaf137	99	85.90	632	KQQ83477.1
		<i>Arthrobacter</i> sp. OV608	100	86.79	636	SER24611.1
		<i>Arthrobacter</i> sp. OV608	100	84.80	638	SER22274.1
		<i>Arthrobacter</i> sp. StoSoilB22	99	84.29	644	BCW63098. 1
Asphe3 _35170	1,2- διοξυγονάση της κατεχόλης (1,2-CDO)	<i>Arthrobacter</i> sp. BB- 1	100	92.62	298	TNB68529.1
		<i>Arthrobacter</i> sp. SPG23	100	92.28	298	WP_043481 025.1
		<i>Arthrobacter</i> sp. PAMC25564	100	91.61	298	WP_136321 068.1
		<i>Pseudarthrobacter</i> sp. GA104	100	91.95	298	MUU73784. 1
Asphe3 _40510	2,3- διοξυγονάση της κατεχόλης (2,3-CDO)	<i>Rhodococcus</i> <i>wratlaviensis</i> IFP 2016	100	56.46	293	ELB89778.1
		<i>Geobacillus</i> <i>genomosp.</i> 3	100	46.26	296	BAD08308.1
		<i>Hydrogenibacillus</i> <i>schlegelii</i>	100	45.64	298	PTQ51344.1
		<i>Pseudaminobacter</i> <i>salicylatoxidans</i>	100	38.61	301	PWJ76351.1

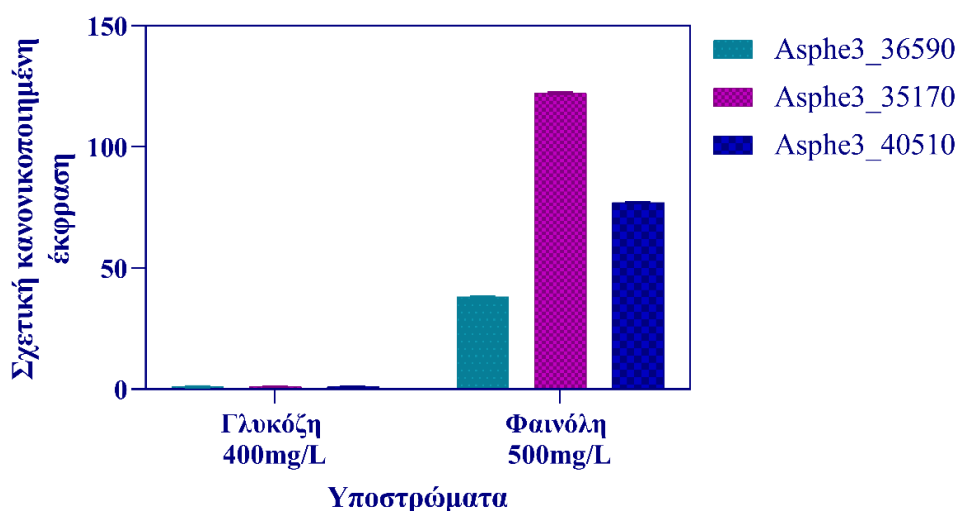
3.1.3 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό της φαινόλης

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των παραπάνω γονιδίων στον καταβολισμό της φαινόλης στο Sphe3, μελετήθηκαν τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων Asphe3_36590, Asphe3_35170 και Asphe3_40510 με RT-qPCR όταν το στέλεχος αναπτύχθηκε παρουσία 500 mg/L φαινόλης. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.3 και στην Εικόνα 3.3, επάγεται η μεταγραφή και των τριών γονιδίων στα κύτταρα Sphe3 που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινόλης. Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη επαγωγή παρατηρήθηκε για το γονίδιο

Asphe3_35170 με αύξηση περίπου 125 φορές στα επίπεδα μεταγραφής του σε σχέση με τα επίπεδα μεταγραφής του όταν το στέλεχος αναπτύχθηκε παρουσία γλυκόζης, ενώ τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων Asphe3_36590 και Asphe3_40510 επάχθηκαν 38 και 77 φορές αντίστοιχα, παρουσία φαινόλης σε σχέση με τη γλυκόζη. Η επαγωγή της μεταγραφής των παραπάνω γονιδίων όταν το Sphe3 αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης, υποδηλώνει την συμμετοχή τους στον καταβολισμό της από το Sphe3.

Πίνακας 3.3. Επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό της φαινόλης στο Sphe3, όταν αυτό αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης, συγκριτικά με τη γλυκόζη. Η τυπική απόκλιση ($\pm SD$) προκύπτει από 3 μετρήσεις ($N=3$).

Γονίδια	Υποστρώματα (Συγκέντρωση)	
	Γλυκόζη $\pm SD$ (400 mg/L)	Φαινόλη $\pm SD$ (500 mg/L)
Asphe3_36590	1 $\pm 0,37$	38,14 $\pm 0,35$
Asphe3_35170	1 $\pm 0,23$	122,2 $\pm 0,38$
Asphe3_40510	1 $\pm 0,20$	77,01 $\pm 0,31$



Εικόνα 3.3. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων Asphe3_36590, Asphe3_35170 και Asphe3_40510 του Sphe3, όταν αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης, ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας. Το mRNA των γονιδίων στόχων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς gyrβ. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν σαν βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm SD$, $N=3$).

3.1.4 Ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας σε εκχύλισμα κυττάρων Sphe3 αναπτυγμένων παρουσία φαινόλης

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η ύπαρξη ενζυμικής δραστηριότητας των PHH, 1,2-CDO και 2,3-CDO σε ακατέργαστο εκχύλισμα κυττάρων Sphe3, τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία 500 mg/L φαινόλης. Μετρήθηκε ειδική δραστηριότητα 0,09 U·mg⁻¹ για την PHH με υπόστρωμα τη

φαινόλη και $0,18 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ για την 1,2-CDO με υπόστρωμα κατεχόλη. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι δεν ανιχνεύθηκε δραστηριότητα για την 2,3-CDO.

Πίνακας 3.4. Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας από εκχύλισμα κυττάρων *Srhe3* αναπτυγμένα παρουσία 500 mg/L φαινόλης.

Ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας	Ενζυμική δραστηριότητα ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
PHH	0,09
1,2-CDO	0,18
2,3-CDO	-

Τα αποτελέσματα στον Πίνακα 3.4 δείχνουν ότι ο καταβολισμός της κατεχόλης που προκύπτει από την υδροξυλίωση της φαινόλης προχωράει μέσω της *ortho*-σχάσης στο στέλεχος *Srhe3*, καθώς ανιχνεύθηκε δραστηριότητα της 1,2-CDO και όχι της 2,3-CDO. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε κυτταρικά εκχυλίσματα του στελέχους *Acinetobacter lwoffii* NL1, στα οποία εντοπίστηκε δραστηριότητα $0,13$ and $1,48 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ PHH και 1,2-CDO αντίστοιχα, ενώ δεν ανιχνεύθηκε δραστηριότητα για την 2,3-CDO (Xu et al. 2021). Σε πρόσφατη μελέτη επίσης ανιχνεύθηκε δραστηριότητα για την 1,2-CDO σε κυτταρικά εκχυλίσματα από το στέλεχος *Rhodococcus opacus* 1CP, το οποίο φαίνεται να καταβολίζει τη φαινόλη μέσω της *ortho*-σχάσης της κατεχόλης (Emelyanova and Solyanikova 2020). Επίσης, μελετώντας τον καταβολισμό της φαινόλης στο μεσόφιλο στέλεχος *Pseudomonas putida* και στο ψυχρόφιλο *Arthrobacter* sp., οι Margesin, Bergauer και Gander κατάφεραν να εντοπίσουν δραστηριότητα και για τις δυο διοξυγονάσεις της κατεχόλης και στα δυο βακτήρια, αλλά η δραστηριότητα της 1,2-CDO ήταν μεγαλύτερη έναντι της 2,3-CDO, καταλήγοντας ότι η φαινόλη στα στελέχη αυτά διασπάται μέσω της *ortho*-σχάσης της κατεχόλης (Margesin, Bergauer, and Gander 2004).

3.1.5 Καταβολισμός φαινόλης και ταυτοποίηση προϊόντων

Η μελέτη του καταβολισμού της φαινόλης από το στέλεχος *Srhe3* πραγματοποιήθηκε ύστερα από εμβολιασμό $3 \times 10^8 \text{ CFUs} \cdot \text{mL}^{-1}$ κυττάρων *Srhe3* σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης M9 που περιείχε 500 mg/L φαινόλης υπό ανάδευση στους 30°C και λήψη δειγμάτων στις 0, 2, 6, 12, 24 και 36 h για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της φαινόλης και ταυτοποίηση των μεταβολιτών της πορείας καταβολισμού της.

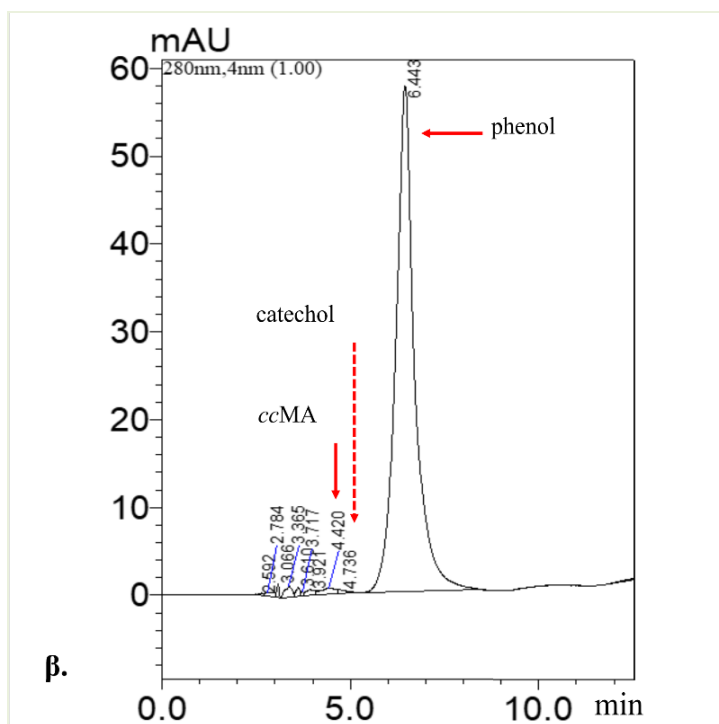
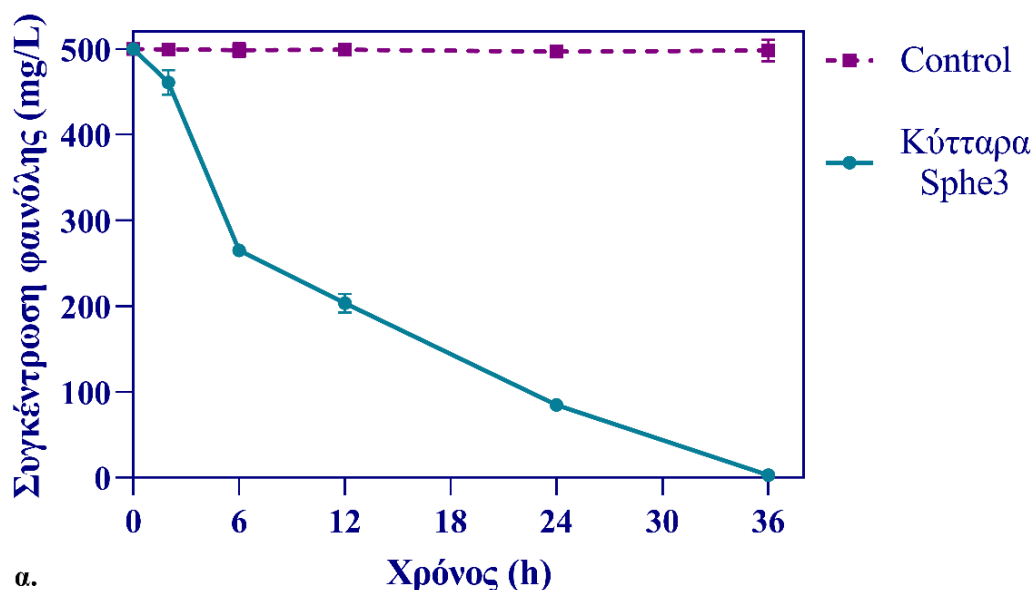
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4 (α), η συγκέντρωση της φαινόλης στην καλλιέργεια μειώνεται μέσα σε 24 h από τα 500 στα 79 mg/L , ενώ δεν ανιχνεύεται φαινόλη μετά από 36 h. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο αντίστοιχου όγκου παρουσία 500 mg/L φαινόλης, υπό τις ίδιες συνθήκες (θερμοκρασία επώασης και ανάδευση).

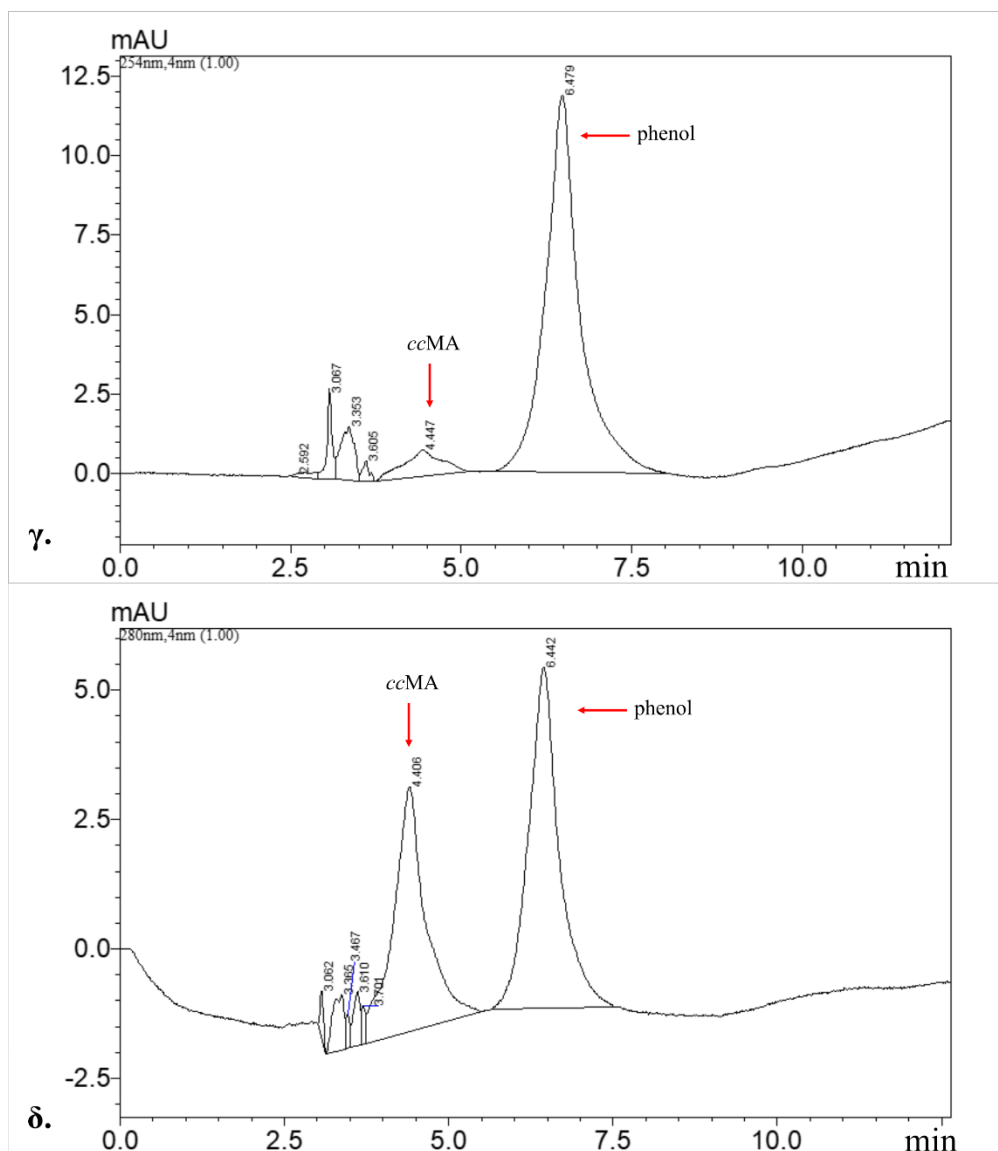
Η ταυτοποίηση των ενδιάμεσων μεταβολιτών της πορείας καταβολισμού της φαινόλης στο *Srhe3* πραγματοποιήθηκε με σύγκριση του χρόνου κατακράτησης (retention time, RT) και του φάσματος απορρόφησης (λ_{max}) των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στη στήλη του HPLC με τα αντίστοιχα γνωστών πρότυπων ενώσεων.

Κατά τη βιομετατροπή της φαινόλης (RT $6,4 \text{ min}$, λ_{max} 270 nm) ανιχνεύθηκε κατεχόλη (RT $4,7 \text{ min}$, λ_{max} 275 nm) και *cis*, *cis*-μουκονικό οξύ μετά από 2 h επώασης της καλλιέργειας, τα

οποία αποτελούν ενδιάμεσους μεταβολίτες της πορείας καταβολισμού της φαινόλης μέσω της *ortho*-σχάσης της κατεχόλης. Παράλληλα με τη μείωση της συγκέντρωσης της φαινόλης παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση του *cis*, *cis*-μουκονικού οξέος (ccMA) (Εικόνα 3.4 - β, γ, δ).

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για τον καταβολισμό της φαινόλης από το στέλεχος *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250, σύμφωνα με τα οποία η κατεχόλη ανιχνεύθηκε στην αρχή της καλλιέργειας και δεν εντοπίστηκε στη συνέχεια, ενώ η συγκέντρωση του ccMA αυξήθηκε στα αρχικά στάδια της διάσπασης της φαινόλης και σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα κατά την επώαση της καλλιέργειας (Paller, Hommel, and Kleber 1995).





Εικόνα 3.4. Απεικόνιση των αλλαγών της συγκέντρωσης της φαινόλης σε καλλιέργεια των κυττάρων *Sphe3* σε MM M9 παρουσία 500 mg/L φαινόλης σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (0, 2, 6, 12, 24 και 36 h). Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 30 °C υπό ανάδευση. M9 με ίδια συγκέντρωση φαινόλης χωρίς εμβόλιο κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως control. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm$ SD, N=3) (α). Ανάλυση HPLC δειγμάτων στις 2 h (β), 12 h (γ) και 24 h (δ). Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τις κορυφές που αντιστοιχούν στη φαινόλη, την κατεχόλη και το *cis, cis*-μουκονικό οξύ (ccMA).

Με βάση τη *in silico* μελέτη του γονιδιώματος του *Sphe3* αλλά και τη μεταγραφομική μελέτη των γονιδίων του *Sphe3* που εμπλέκονται στην πορεία καταβολισμού της φαινόλης σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε φαινόλη ως τη μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, υποδεικνύεται η παρουσία των πορειών τόσο της *ortho*- όσο και της *meta*-σχάσης της κατεχόλης στο συγκεκριμένο στέλεχος.

Ωστόσο, το μονοπάτι της *meta*-σχάσης της κατεχόλης πιθανώς είναι ατελές στο *Sphe3*, καθώς δεν ανιχνεύτηκε ενζυμική δραστηριότητα 2,3-CDO σε κυτταρικά εκχυλίσματα, αλλά και η βιοπληροφορική ανάλυση δεν εντόπισε γονίδια με υψηλή ομολογία που να εμπλέκονται καθοδικά στη συγκεκριμένη πορεία καταβολισμού. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα ευρήματα της HPLC ανάλυσης κατά την οποία εντοπίστηκε, εκτός από την κατεχόλη, το

ccMA, που αποτελεί ενδιάμεσο μεταβολίτη της *ortho*-σχάσης της κατεχόλης. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν αναφερθεί για το *Sulfolobus solfataricus* 98/2, στο οποίο ενώ και τα δύο μονοπάτια φαίνονται ενεργά παρουσία φαινόλης, η σχάση του αρωματικού δακτυλίου φαίνεται να πραγματοποιείται κυρίως μέσω της *meta*-πορείας (Comte et al. 2013).

Στο Sphe3, δεδομένου ότι η μεταγραφή του Asphe3_40510 αυξάνεται παρουσία φαινόλης, αλλά δεν ανιχνεύθηκε δραστηριότητα 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης, το αντίστοιχο ένζυμο φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο στον καταβολισμό της φαινόλης, ο οποίος δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.

Διαφορετικές αρωματικές ενώσεις και/ή διαφορετικές συγκεντρώσεις των αρωματικών ενώσεων μπορούν να ενεργοποιήσουν διαφορετικές μεταβολικές πορείες στους μικροοργανισμούς (L. Wu et al. 2018; Cao and Loh 2008). Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η *P. putida* που διαθέτει την ευελιξία να διασπά την κατεχόλη μέσω της *meta*-σχάσης σε υψηλές συγκεντρώσεις βενζοϊκού οξέος (>300 mg/L), ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ($\leq$ 200 mg/L) του ίδιου υποστρώματος αξιοποιείται η πορεία της *ortho*-σχάσης της κατεχόλης (Loh and Chua 2002).

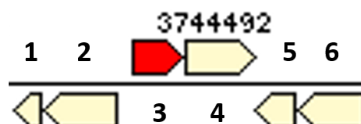
Σε άλλες μελέτες καταβολισμού της φαινόλης σε στελέχη *Arthrobacter*, οι Lee και συνεργάτες πρότειναν την *ortho*-πορεία για τον μεταβολισμό της φαινόλης σε ψυχρόφιλα στελέχη *Arthrobacter* sp., με βάση τα αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης και των ενζυμικών προσδιορισμών για τις διοξυγονάσεις της κατεχόλης (G. L. Y. Lee et al. 2022). Αντιθέτως, οι Karigar και συνεργάτες κατέληξαν ότι η διάσπαση της φαινόλης στο στέλεχος *A. citreus* πραγματοποιείται μέσω της *meta*-σχάσης της κατεχόλης με βάση τα αποτελέσματα δραστηριότητας των ενζύμων υδροξυλάση της φαινόλης και διοξυγονασών της κατεχόλης, αλλά και ταυτοποίηση ενδιάμεσων μεταβολιτών (Karigar et al. 2006).

3.2 Μελέτη της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης από το *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3

3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Το γονίδιο Asphe3_35170 που κωδικεύει για την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης στο στέλεχος *P. phenanthrenivorans* Sphe3 και είναι υπεύθυνο για την *ortho*-σχάση της κατεχόλης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα του στελέχους.

P. phenanthrenivorans Sphe3:CP002379



Εικόνα 3.5. Περιοχή στο χρωμόσωμα του Sphe3 που εντοπίζεται το *catA* (3) και τα γειτονικά του γονίδια. Γονίδια που κωδικεύουν για: μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλπροπιονικού οξέος (1), α υπομονάδα της 1,2-διοξυγονάσης του βενζοϊκού οξέος (2), 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης (3), μεταφορέας του βενζοϊκού οξέος (4), πιθανή λιποπρωτεΐνη (5), μεταφορέας νιτρικών/νιτρωδών (6).

Πίνακας 3.5. Χαρακτηριστικά της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του Sphe3 από τη βάση δεδομένων JGI/IMG.

Πληροφορίες γονιδίου	
ID	650468101
Locus Tag	Asphe3_35170
Ονομασία	1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης (catechol 1,2-dioxygenase)
Μέγεθος γονιδίου	885bp
Σύντομη ονομασία γονιδίου	<i>catA</i>
Πληροφορίες πρωτεΐνης	
Μέγεθος πρωτεΐνης	294aa
GenBank Accession	ADX74618

3.2.1.1 Προσδιορισμός πρωτοταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης

Με τη βοήθεια του αλγορίθμου ExPASy translate tool προσδιορίστηκε η πρωτεϊνική αλληλουχία της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης (1,2-CDO) με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου Asphe3_35170 από τη βάση δεδομένων JGI/IMG (Παράρτημα, Εικόνα Π1).

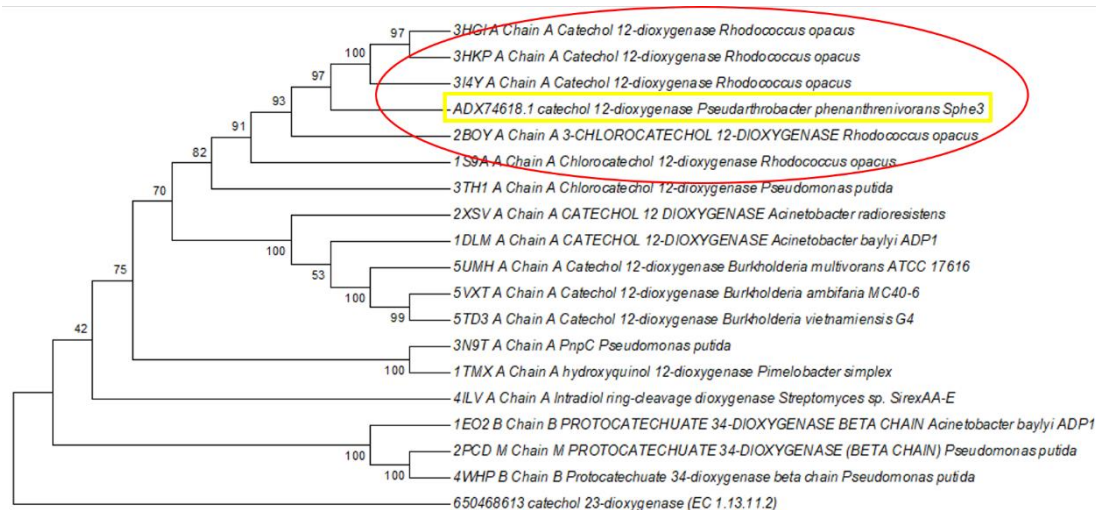
```
>650468101 ADX74618 catechol 1,2-dioxygenase
[Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3: CP002379]
MTETQTDTRKENEGTAVEAGSKATERFTASGKLSQLDVPKERVSLLAGALIKAANDI
VVEHQVNTYEEYNALKAWLIKVGTDGEWPLFLDVWLEHTVEDVNSQDRPGTKGTIEGP
YYVPGSPELATPATVEMRDDEEGTPLRFTGRFTGTGEGNPIQDAQVEIWHADAAGFYS
QYAPGLPEWLFRA TVKADQDGRFEINTMRPAPYQIPTDGACGQLINAAGWHAWRPAH
IHIKVSAPGYQPVNTQQLYFPGDPHNADDIASAVKPELMLDPRPRTDGGAGEEVVYDY
VLAKEGQIK
```

Εικόνα 3.6. Η πρωτεϊνική αλληλουχία της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του Sphe3, όπως προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο ExPASy translate tool.

Το γονίδιο Asphe3_35170 (*catA*) αποτελείται από 885 ζεύγη βάσεων και η αντίστοιχη πρωτεϊνική αλληλουχία αποτελείται από 294 αμινοξέα, τα οποία αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος 32351,01 Da σύμφωνα με την πρόβλεψη του αλγορίθμου Compute MW/pI του ExPASy server. Με τον ίδιο αλγόριθμο υπολογίστηκε και το θεωρητικό pI της πρωτεΐνης 4,72. Το βάρος αναφέρεται στο μονομερές και όχι στο ένζυμο καθώς η τεταρτοταγής του δομή δεν είναι γνωστή.

3.2.1.2 Κατασκευή φυλογενετικού δένδρου

Με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA 7 κατασκευάστηκε φυλογενετικό δένδρο για την 1,2-CDO του Sphe3 με πρωτεϊνικές αλληλουχίες, όπως προέκυψαν από την blastp ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 17 αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων Protein Data Base, η οποία περιέχει πληροφορίες σχετικά με πειραματικά καθορισμένες δομές πρωτεϊνών, και παρουσιάζουν ομολογία ομοιότητας από 33-53% με την αμινοξική αλληλουχία της 1,2-CDO του Sphe3.



Εικόνα 3.7. Φυλογενετικό δένδρο της 1,2-CDO του Sphe3. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 19 αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι ασαφείς θέσεις απομακρύνθηκαν για κάθε ζεύγος αλληλουχιών. Υπάρχουν συνολικά 357 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA7.

Όπως παρατηρείται και από το φυλογενετικό δένδρο, η 1,2-CDO του Sphe3 βρίσκεται εξελικτικά κοντά με 1,2-διοξυγονάσες της κατεχόλης και της χλωροκατεχόλης στελεχών του γένους *Rhodococcus opacus*, με τις οποίες εμφανίζει και τη μεγαλύτερη αμινοξική ομολογία

(53%). Επίσης, φαίνεται να υπάρχει εξελικτική σχέση με τις 3,4-διοξυγονάσες του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (3,4-PCD) των στελεχών *Acinetobacter baylyi* ADP1 και *Pseudomonas putida* (αμινοξική ομολογία 33%), μια παρατήρηση που σχετίζεται με το μηχανισμό που δρουν αυτές οι ενδοδιολο-διοξυγονάσες (Guzik, Hupert-Kocurek, and Wojcieszysk 2013).

3.2.1.3 Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης

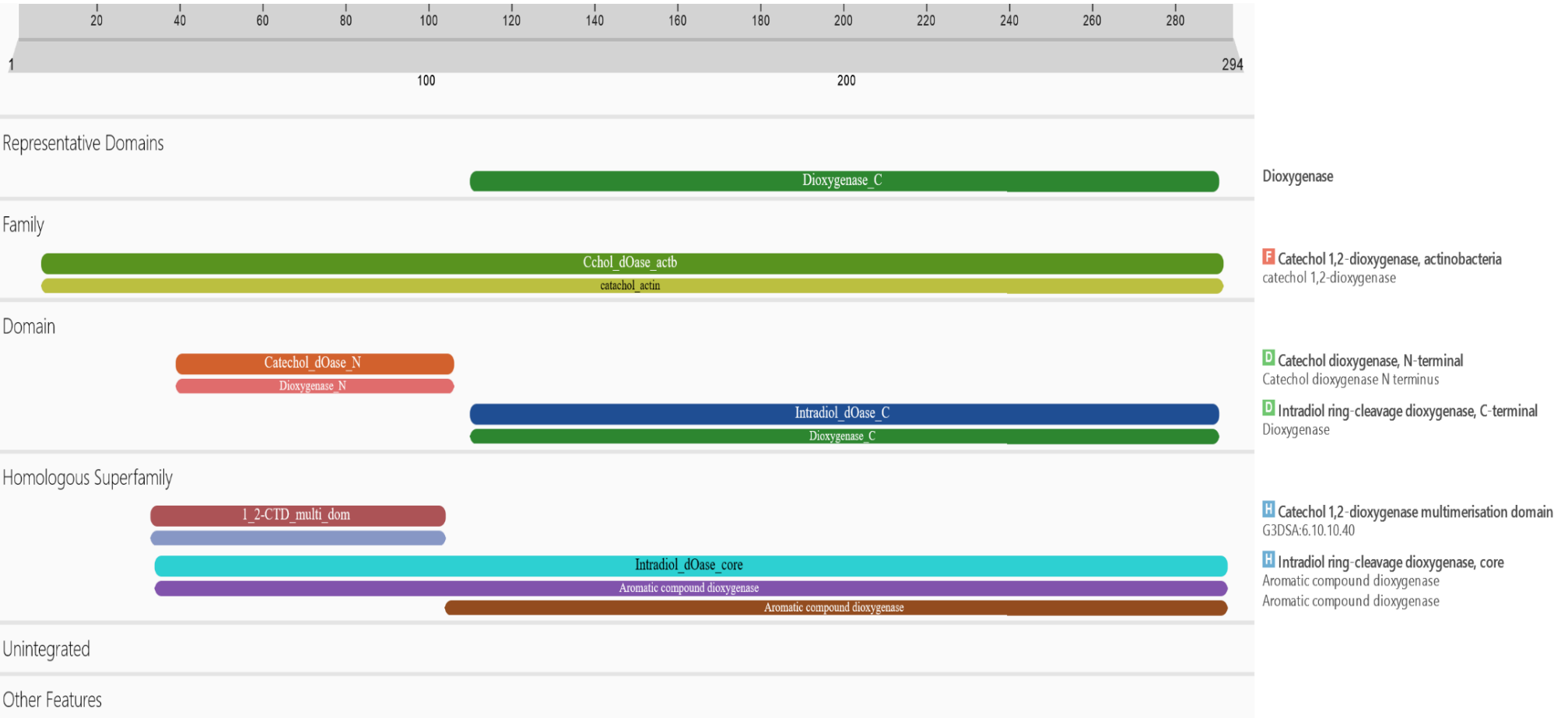
Η πεπτιδική αλυσίδα της 1,2-CDO του Sphe3, σύμφωνα με την πρόβλεψη της διαδικτυακής πλατφόρμας Phyre2 (Modelling Mode:Normal), αποτελείται από α-έλικες σε ποσοστό 17% και από β-πτυχωτά φύλλα σε ποσοστό 22%.



Εικόνα 3.8. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του Sphe3 σύμφωνα με την πλατφόρμα Phyre2.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό InterProScan για την ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της 1,2-CDO του Sphe3. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, η 1,2-CDO περιλαμβάνει περιοχές που εντάσσουν το ένζυμο στην οικογένεια των 1,2-διοξυγονάσων της κατεχόλης.

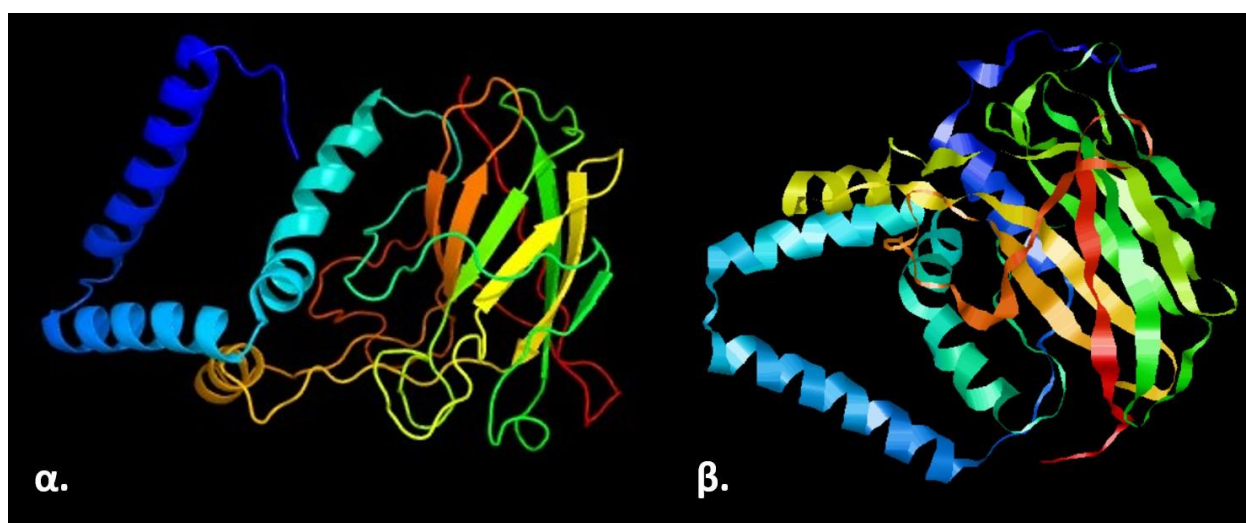
Εντοπίζεται μια περιοχή (*Dioxygenase_C*) που αντιπροσωπεύει την περιοχή του C-τελικού άκρου και είναι κοινή για αρκετές ενδοδιολικές διοξυγονάσες. Επιπλέον, διαθέτει μια περιοχή (*Cchol_dOase_actb*) κοινή για τις 1,2-διοξυγονάσες της κατεχόλης των ακτινοβακτηρίων, οι οποίες είναι εξελικτικά πιο κοντά με τις 1,2-διοξυγονάσες της χλωροκατεχόλης, απ' ό,τι με τις 1,2-διοξυγονάσες της κατεχόλης των πρωτοβακτηρίων. Επιπλέον, εντοπίζεται μια περιοχή (*Catechol_dOase_N*) που αντιπροσωπεύει την περιοχή του N-τελικού άκρου στις 1,2-διοξυγονάσες της κατεχόλης, της χλωροκατεχόλης και της υδροξυκινόλης, περιλαμβάνει και μια περιοχή πολυμερισμού (*1_2-CTD_multi_dom*) και βρίσκεται πάντα δίπλα από την περιοχή της διοξυγονάσης (*Intradiol_dOase_core*)



Εικόνα 3.9 Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της 1,2-CDO του Sphe3 με το λογισμικό InterProScan.

3.2.1.4 Πρόβλεψη τριτοταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης

Σύμφωνα με την ανάλυση στην πλατφόρμα Phyre2 (Modelling Mode:Normal), η 1,2-CDO του Sphe3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα (53%) με την 1,2-CDO του στελέχους *Rhodococcus opacus* 1CP σε σύμπλοκο με την 4-χλωροκατεχόλη (PDB ref: 3HJ8), της οποίας διατίθεται η κρυσταλλική δομή. Η πιστότητα ομολογίας μεταξύ των δύο αλληλουχιών είναι η μέγιστη (Confidence 100%), ενώ έχουν 86% αλληλεπικάλυψη. Η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της 1,2-CDO του Sphe3, όπως προκύπτει από τη σύγκριση με την 1,2-CDO του *R. opacus* 1CP παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.10 α. Η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της 1,2-CDO του Sphe3 πραγματοποιήθηκε επιπλέον χρησιμοποιώντας την online πλατφόρμα ColabFold. Ο αλγόριθμος χρησιμοποίησε 13 κατατεθειμένες δομές πρωτεϊνών με μεγάλη ομολογία με την 1,2-CDO του Sphe3 και πρότεινε 5 μοντέλα για την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου με πιο αξιόπιστο το μοντέλο της Εικόνα 3.10 β.



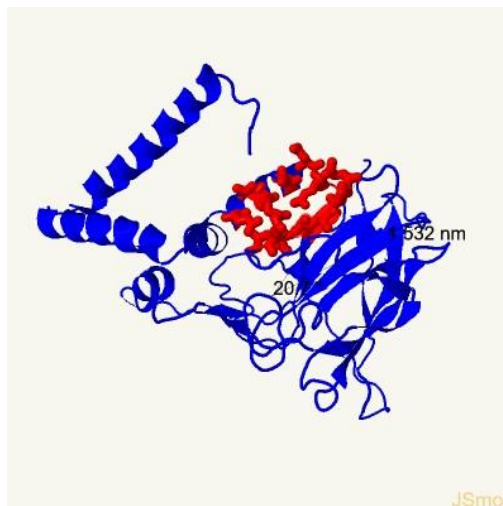
Εικόνα 3.10. α) Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής της 1,2 CDO του Sphe3, όπως προκύπτει από τη σύγκριση με την 1,2 CDO του *R. opacus* 1CP (Confidence: 100%, coverage: 86%, I.D.: 51%, Image coloured by rainbow N → C terminus) στο Phyre2 (Modelling Mode: Normal). Model dimensions (Å): X:61.433, Y:40.942, Z:67.828. β) Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής της 1,2 CDO του Sphe3, όπως προκύπτει από την ανάλυση με το ColabFold v1.5.5: AlphaFold2 using MMseqs2 (rank_001_alphafold2_ptm_model_3_seed_000 pLDDT=94.2 pTM=0.89), (Image coloured by rainbow N → C terminus).

Οι τρισδιάστατες δομές που προέκυψαν από το Phyre2 και το Colabfold ομοπαράτέθηκαν η μια πάνω στην άλλη με τη βοήθεια του online εργαλείου CLICK (Topology Independent Comparison of Biomolecular 3D Structures). Και τα δύο μοντέλα εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στη δομή με ποσοστό αλληλεπικάλυψης >97% (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11. Ομοπαράθεση των 2 πιθανών μοντέλων τρισδιάστατης δομής της 1,2-CDO του *Sphe3* με το online εργαλείο *CLICK*. Με το χρώμα της ώχρας παρουσιάζονται οι δομές που αλληλεπικαλύπτονται στα μοντέλα (αλληλεπικάλυψη δομών 97,27%, Z-Score=18.45), με το πορτοκαλί οι δομές που εντοπίζονται στο μοντέλο της ανάλυσης με το *Colabfold* και με πράσινο οι δομές που εντοπίζονται στο μοντέλο της ανάλυσης με το *Phyre2*.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση του ενεργού κέντρου του ενζύμου με τη χρήση του προγράμματος *froocket2* της πλατφόρμας *Phyre2*, το οποίο ανιχνεύει τις μεγάλες εσοχές στην τρισδιάστατη διαμόρφωση του πρωτεϊνικού μορίου, που συχνά αποτελούν το ενεργό κέντρο του μορίου.



Εικόνα 3.12. Πρόβλεψη ενεργού κέντρου στη δομή του ενζύμου 1,2-CDO του *Sphe3*, όπως προκύπτει από τη σύγκριση με την 1,2 CDO του *R. oracus 1CP* (σήμανση με κόκκινο), με βάση την ανάλυση *froocket2* στην πλατφόρμα *Phyre2*.

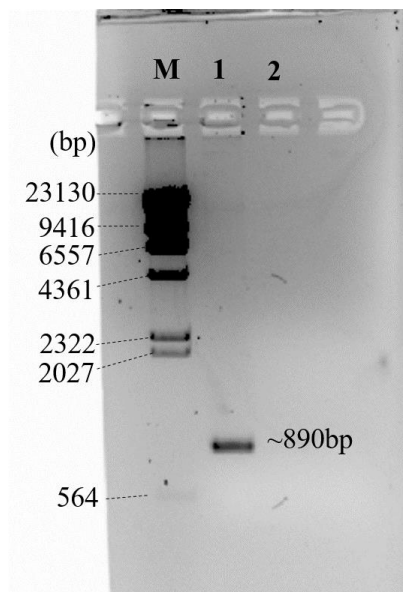
3.2.2 Ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης στα κύτταρα *Sphe3*

Το βακτηριακό στέλεχος *Sphe3* δεν αναπτύσσεται παρουσία κατεχόλης (Ασημακούλα 2017), ωστόσο, η μεταγραφή του *catA* επάγεται όταν το *Sphe3* αναπτύσσεται παρουσία 500 mg/L φαινόλης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Παράγραφος 3.1.3). Για την ακρίβεια,

ανιχνεύθηκε η ενζυμική δραστικότητα της 1,2-CDO σε εκχύλισμα κυττάρων *Sph3* και η ειδική δραστικότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε ως 0,18 U·mg⁻¹. Ως 1 U (Unit) ορίζεται ο σχηματισμός 1 μmol προϊόντος *cis*, *cis*-μουκονικού οξέος σε 1 min.

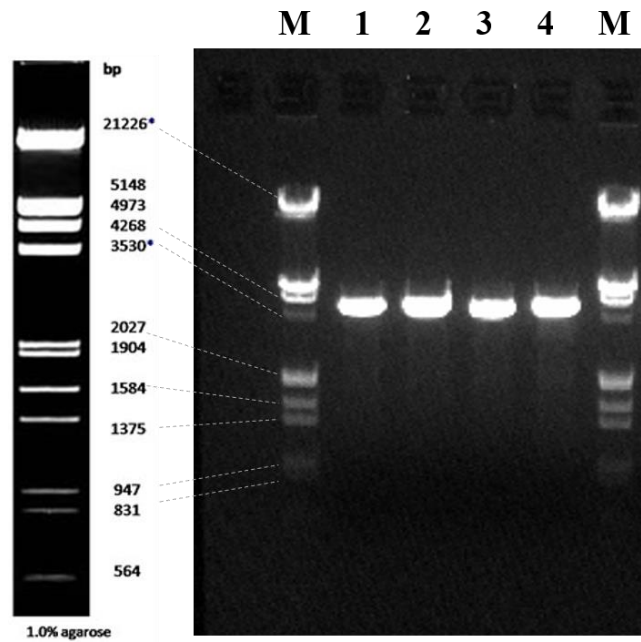
3.2.3 Κλωνοποίηση του γονιδίου, ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός του ενζύμου

Το γονίδιο *catA* απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *Sph3*, όπως αναφέρεται προηγουμένως (Παράγραφος 2.15). Η έντονη ζώνη που αντιστοιχεί στο γονίδιο *catA* (Εικόνα 3.13) κόπηκε και απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης για περαιτέρω κλωνοποίηση στον φορέα pBlueScript SK(+).



Εικόνα 3.13. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου *catA*. **M:** μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λDNA/*HindIII* (bp) (New England Biolabs, NEB), **1:** προϊόν της αντίδρασης με εκμαγείο το *gDNA* του *Sph3*, **2:** αντίδραση PCR χωρίς *gDNA* (αρνητικός μάρτυρας).

Η ορθή κλωνοποίηση του γονιδίου στον φορέα pBlueScript SK(+) επιβεβαιώθηκε με περιοριστική ανάλυση στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Η εικόνα των αποτελεσμάτων των πέψεων συμφωνεί με την πρόβλεψη των εικονικών πέψεων που σχεδιάστηκαν για το γονίδιο *catA* 2.17.1). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το προϊόν που προκύπτει από κάθε πέψη είναι ~3800 bp, που σημαίνει ότι η ένθεση βρίσκεται υπό τον έλεγχο του T3 εκκινητή του φορέα (Εικόνα 2.6 B).

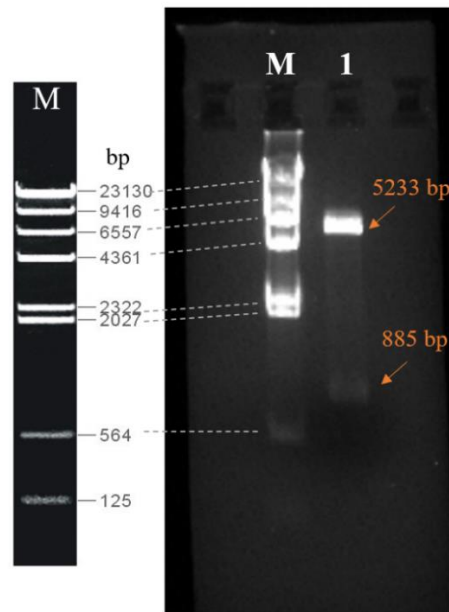


Εικόνα 3.14. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων περιοριστικής ανάλυσης του ανασυνδυασμένου φορέα pBlueScript::catA. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λDNA- EcoRI-HindIII (Minotech), ο οποίος φαίνεται και στα αριστερά της εικόνας. Θέσεις 1-4: Πέψεις με *NdeI* (1), *SmaI* (2), *XhoI* (3) και διπλή πέψη με *BamHI*+*NdeI* (4).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση της ένθεσης στον φορέα pBlueScript::catA, τα αποτελέσματα της οποίας επιβεβαίωσαν την ταυτότητα του γονιδίου.

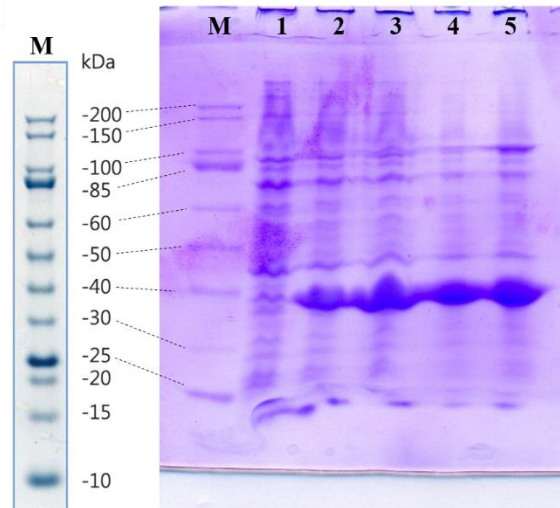
Στη συνέχεια, το γονίδιο *catA* κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pET29c(+) και πραγματοποιήθηκε περιοριστική ανάλυση για την επιβεβαίωση της κλωνοποίησης (Παράγραφος 2.17.1).

Ο ανασυνδυασμένος φορέας pET29c::catA έχει μέγεθος 6118 bp. Η διπλή πέψη με τα ένζυμα *NdeI* και *XhoI* έχει τα αναμενόμενα αποτελέσματα, δύο τμήματα DNA μεγέθους 5233 bp και 885 bp (Εικόνα 3.15), επιβεβαιώνοντας την επιτυχή κλωνοποίηση της ένθεσης στον φορέα υπερέκφρασης.



Εικόνα 3.15. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων περιοριστικής ανάλυσης του ανασυνδυασμένου φορέα pET29c::catA. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λDNA/HindIII (bp) (New England Biolabs, NEB), 1: δείγμα μετά τη διπλή πέψη με τα ένζυμα NdeI και XhoI.

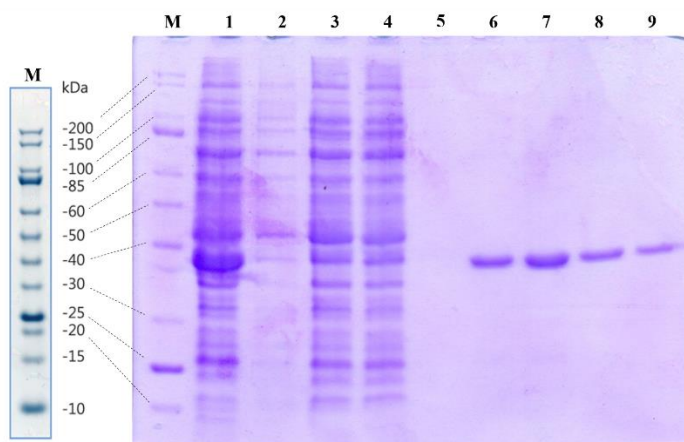
Με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET29c::catA μετασχηματίστηκαν κύτταρα *E.coli* BL21, τα οποία καλλιεργήθηκαν υπό κατάλληλες συνθήκες παρουσία IPTG ώστε να επαχθεί η υπερέκφραση του υπό μελέτη γονιδίου.



Εικόνα 3.16. Πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης με δείγματα από την υπερέκφραση του catA σε διαφορετικούς χρόνους επώασης των BL21 μετά την προσθήκη 1mM IPTG. M: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa) 10–20% Tris-glycine (NEB), 1: δείγμα τη στιγμή της προσθήκης του IPTG, 2: 1h επώαση, 3: 2h επώαση, 4: 3h επώαση και 5: 4h επώαση μετά την προσθήκη του IPTG.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η μεγαλύτερη ποσότητα υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης προκύπτει μετά από 4 h επώασης με IPTG. Σε επόμενη φάση, τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21 καλλιεργήθηκαν σε 1000 ml θρεπτικού υλικού LB. Μετά τη λύση των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της 1,2 CDO του Sphe3 με στήλη αγκιστείας Ni²⁺-NTA αгарόζης.

Κατά τη διαδικασία του καθαρισμού, συλλέχθηκαν δείγματα, στα οποία πραγματοποιήθηκε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών για να επιβεβαιωθεί η παρουσία καθαρού ενζύμου στα κλάσματα που χρησιμοποιήθηκαν τελικά για το βιοχημικό χαρακτηρισμό της 1,2-CDO του *Sphe3*.



Εικόνα 3.17. Πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης με δείγματα από τον καθαρισμό της 1,2-CDO του *Sphe3* με τη στήλη αγκιστείας Ni^{2+} -NTA αραρόζης. *M*: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών *Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa) 10–20% Tris-glycine (NEB)*, 1: *crude μετασχηματισμένων BL21 μετά από 4 h επώασης με IPTG*, 2-4: *flowthrough της στήλης*, 5: *κλάσμα με χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου*, 6-9: *κλάσματα με αύξουσα συγκέντρωση ιμιδαζολίου στα οποία εντοπίζεται καθαρό το ένζυμο*.

Το κλάσμα C1 (Εικόνα 3.17, πηγαδάκι 7) τοποθετήθηκε σε συσκευή φυγοκεντρικού φίλτρου Amicon® Ultra-4 10K για αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος ώστε να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο από το περιβάλλον του ενζύμου και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του ενζύμου κατά Bradford σε 1,74 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.2.4 Χαρακτηρισμός της 1,2-CDO του *Sphe3*

3.2.4.1 Επίδραση Fe(II) / Fe(III) στη δραστικότητα του ενζύμου

Το καθαρό ένζυμο επώαστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου [Fe(II) / Fe(III)] και L-ασκορβικού οξέος και για διαφορετικούς χρόνους επώασης και προσδιορίστηκε η ειδική δραστικότητα του ενζύμου.

Πίνακας 3.6. Μεταβολή δραστικότητας της 1,2-CDO του *Sphe3* ($\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου και ασκορβικού οξέος και σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.

Fe(II)/L-Asc	[C](mM)		0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
	[time](min)	0	1,257	2,021	2,124	1,906	1,868	1,843	1,831
		10	1,256	1,930	2,182	1,932	1,955	1,977	1,857
		20	1,249	1,683	2,108	1,877	1,845	1,953	1,889
		30	1,221	1,961	1,832	1,911	1,808	1,847	1,810
		60	1,151	1,848	1,974	1,856	1,916	1,956	1,904
Fe(III)/L-Asc	[C](mM)		0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
	[time](min)	0	1,443	1,729	1,832	1,739	1,667	1,775	1,764
		10	1,410	1,788	1,862	1,749	1,695	1,775	1,771
		20	1,409	1,779	1,798	1,740	1,701	1,758	1,761
		30	1,392	1,765	1,772	1,691	1,682	1,716	1,769
		60	1,388	1,727	1,800	1,709	1,638	1,740	1,779

Παρατηρείται ότι η δραστηριότητα του καθαρού ενζύμου ενισχύεται παρουσία ιόντων σιδήρου. Είναι γνωστό ότι οι 1,2-CDOs είναι μεταλλοένζυμα που περιέχουν μη-αιμικό σίδηρο (III) στο ενεργό τους κέντρο για να πραγματοποιηθεί η ενδοδιολο-ρήξη του δακτυλίου της κατεχόλης, ενώ οι 2,3-CDOs που επιτελούν την εξωδιολο-ρήξη του δακτυλίου της κατεχόλης απαιτούν Fe(II) ως συμπράγοντα (T. D. H. Bugg 2003).

Ωστόσο, αν και η 1,2-CDO του Sphe3 είναι υπεύθυνη για την *ortho*-σχάση της κατεχόλης φαίνεται ότι η δραστηριότητά της ενισχύεται τόσο από το Fe(II), όσο και από το Fe(III). Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο εμφανίζει την υψηλότερη δραστηριότητά του όταν επώάζεται σε συγκέντρωση 0.2 mM Fe(II) και L-ασκορβικού οξέος μετά από 10 min. Η προτίμηση σε δισθενή σίδηρο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες ενδοδιολικές διοξυγονάσεις, όπως στην 1,2-CDO του *Alcaligenes xylosoxidans* Y234 (Yeom and Yoo 1997) και στην 3,4-PCD του *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 (Guzik et al. 2013).

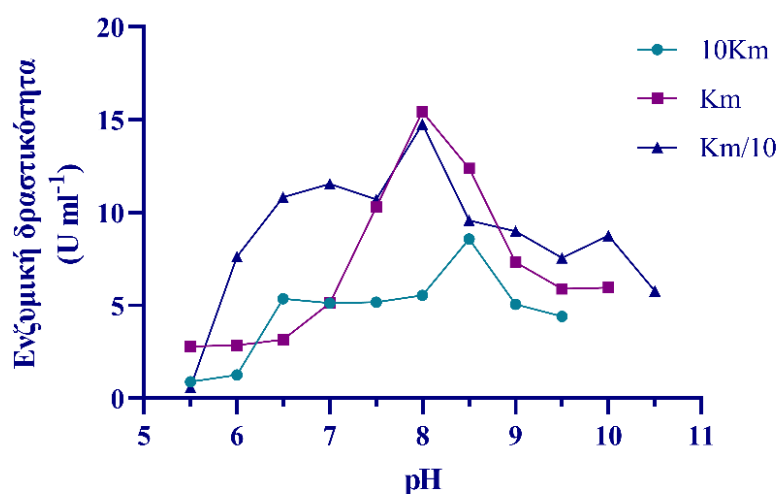
3.2.4.2 Βέλτιστο pH δράσης

Ακολούθησε ο προσδιορισμός του βέλτιστου pH δράσης της 1,2-CDO του Sphe3, με τη χρήση των διαλυμάτων που αναφέρονται στην Παράγραφο 2.24.3. Το βέλτιστο pH για το καθαρό ένζυμο της 1,2-CDO προσδιορίστηκε με βάση τη δραστηριότητα της 1,2-CDO του Sphe3 ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$) που προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 260 nm, μετά από επώαση του ενζύμου σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος στα διαφορετικά pH. Οι δοκιμές έγιναν μετά από επώαση του ενζύμου με 0.2 mM Fe(II)/(L)-Asc για 10 min.

Πίνακας 3.7. Δραστηριότητα της 1,2-CDO του Sphe3 ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος σε εύρος pH 4-12.

	Συγκέντρωση υποστρώματος*		
pH	10Km	Km	Km/10
4	-	-	-
5	-	-	-
5,5	0,893	2,798	0,595
6	1,250	2,857	7,619
6,5	5,357	3,155	10,833
7	5,119	5,119	11,548
7,5	5,179	10,298	10,714
8	5,536	15,417	14,762
8,5	8,571	12,381	9,583
9	5,060	7,321	8,988
9,5	4,405	5,893	7,560
10	-	5,952	8,750
10,5	-	-	5,774
11	-	-	-
11,5	-	-	-
12	-	-	-

*Km=0.03 mM



Εικόνα 3.18. Δραστηριότητα της 1,2-CDO του *Sphe3* ($\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) σε διαφορετικά pH και συγκεντρώσεις υποστρώματος, όπου $K_m=0.03 \text{ mM}$.

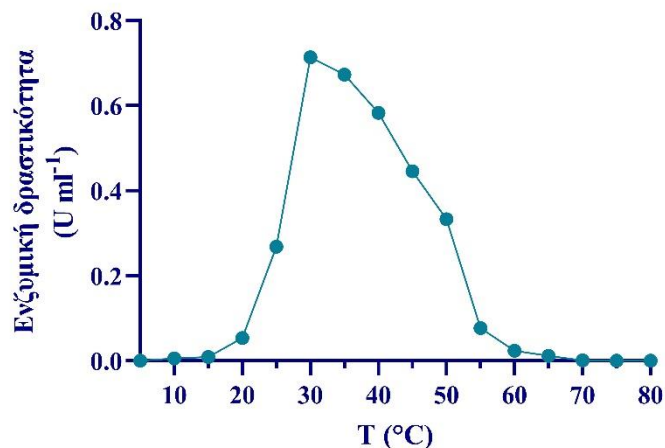
Όπως παρατηρείται (Πίνακας 3.7), το ένζυμο λειτουργεί καλύτερα σε πιο ουδέτερα pH και παρουσιάζει τη βέλτιστη δραστηριότητά του σε pH 8. Η δραστηριότητα φαίνεται να διατηρείται στο εύρος pH 6,5-9. Σε πιο όξινο και πιο αλκαλικό περιβάλλον η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται ή δεν εντοπίζεται. Η 1,2-CDO του *Sphe3* παρουσιάζει σταθερότητα σε πιο όξινα pH σε αντίθεση με τις 1,2-CDOs του *Arthrobacter* sp. BA-517 που είναι πιο σταθερές σε pH 7,4-10 (Murakami et al. 1998).

3.2.4.3 Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου 1,2-CDO του *Sphe3*. Οι δοκιμές έγιναν μετά από επώαση του ενζύμου με 0.2 mM Fe(II)/L-Asc για 10 min.

Πίνακας 3.8. Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της 1,2-CDO του *Sphe3* ($\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Θερμοκρασία (°C)	Ενζυμική δραστηριότητα ($\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Θερμοκρασία (°C)	Ενζυμική δραστηριότητα ($\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$)
5	0	45	0,446
10	0,006	50	0,333
15	0,009	55	0,077
20	0,054	60	0,024
25	0,268	65	0,012
30	0,714	70	0,001
35	0,673	75	0
40	0,583	80	0



Εικόνα 3.19. Δραστηριότητα της 1,2-CDO του *Sphe3* (U·ml⁻¹) σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Όπως προκύπτει από τα ανωτέρω, η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου 1,2-CDO του *Sphe3* είναι οι 30 °C. Σύμφωνα με άλλες μελέτες, οι 1,2-CDOs χωρίζονται σε δύο κατηγορίες με βάση τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης: στις θερμόφιλες και στις μεσόφιλες με βέλτιστη θερμοκρασία τους 50-55 °C (Gou et al. 2009; Giedraityte and Kalėdienė 2009) και τους 30-35 °C (J. Lin and Milase 2015; Guzik et al. 2011), αντίστοιχα. Εξάιρεση αποτελεί η 1,2-CDO του *Rhodococcus ruber* OA1 που δρα βέλτιστα στους 25 °C, αν και το στέλεχος συγκαταλέγεται στα μεσόφιλα βακτήρια. Η παρατήρηση αυτή αποδίδεται στο σχετικά πιο χαμηλής θερμοκρασίας περιβάλλον από το οποίο απομονώθηκε αρχικά το βακτήριο *R. ruber* OA1 (Z. Wang et al. 2017).

3.2.4.4 Επίδραση ιόντων μετάλλων και χηλικών παραγόντων στη δραστηριότητα του ενζύμου

Το ενζυμικό παρασκεύασμα επωάστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ιόντων μετάλλων για 15 και 30 min, όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο 2.24.7.

Πίνακας 3.9. Μεταβολή δραστηριότητας (%) της 1,2-CDO του *Sphe3* για την κατεχόλη μετά από επώαση για 15 και 30 min με διάφορα ιόντα μετάλλων.

	15 min	30 min
Ιόντα μετάλλων (1 mM)	Δραστηριότητα ενζύμου (%)	
- (καθαρό ένζυμο)	100	100
Ca ²⁺	104	82
Zn ²⁺	52	22
Co ²⁺	96	93
K ⁺	104	115
Cu ²⁺	26	11
Mn ²⁺	108	93
Ni ²⁺	100	96

Η δραστηριότητα του ενζύμου αναστέλλεται έντονα από τα ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν καταγραφεί για τα 2 από τα 4 ισοένζυμα 1,2-διοξυγονασών της κατεχόλης του *Arthrobacter* sp. BA-5-17 μετά την επώαση με ιόντα χαλκού (Murakami et al. 1998), η δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του *Alcaligenes xylosoxidans* Y234 αναστέλλεται εντελώς μετά από επώαση με ιόντα χαλκού (Yeom and Yoo 1997), ενώ ισχυρή ανασταλτική δράση είχαν τα ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου για την 1,2-CDO του *Sphingomonas xenophaga* QYY (Gou et al. 2009). Η συμπεριφορά των βακτηριακών ενζύμων, προερχόμενα από στελέχη που έχουν απομονωθεί από διάφορες περιοχές, ποικίλει παρουσία διαφορετικών μετάλλων. Η διαφορετική αυτή απόκριση υποδεικνύει ότι η δομή των ενζύμων επηρεάζεται ανάλογα με τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που έχει δεχτεί το κάθε στέλεχος. Όσον αφορά στην 1,2-CDO του Sphe3, κανένα από τα υπόλοιπα ιόντα μετάλλων που δοκιμάστηκαν δεν προκάλεσε σημαντική μείωση της δραστηριότητας.

Επιπλέον, η 1,2-CDO του Sphe3 επώαστηκε για 30 min με διάφορες συγκεντρώσεις *o*-phen, EDTA και bipy και αξιολογήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου.

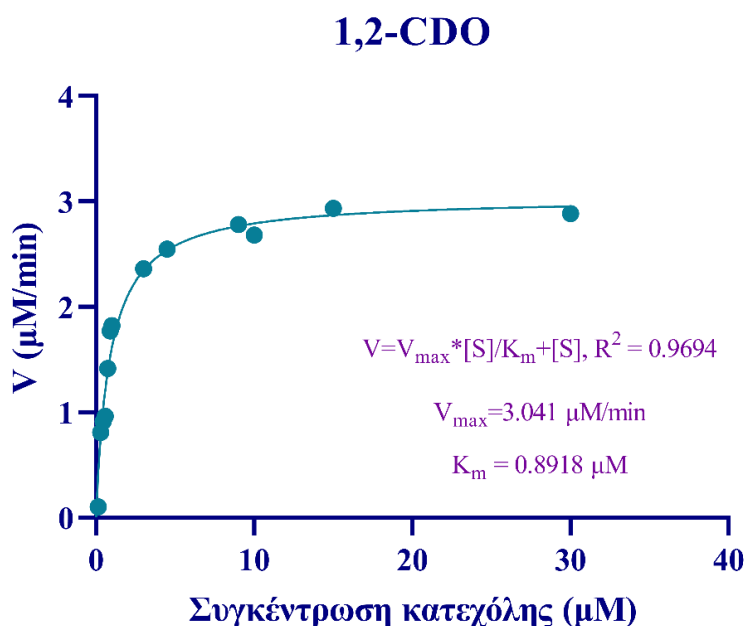
Πίνακας 3.10. Μεταβολή δραστηριότητας (%) της 1,2-CDO του Sphe3 για την κατεχόλη μετά από επώαση με χηλικούς παράγοντες.

Συγκέντρωση (mM)	Δραστηριότητα ενζύμου (%)		
	<i>o</i> -phen	EDTA	bipy
0	100	100	100
0,005	93	86	91
0,01	79	95	92
0,015	73	96	94
0,02	49	91	92
0,025	34	63	100
0,03	23	25	98
0,04	81	7	97
0,05	87	2	99
0,06	94	2	97

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.10 δείχνουν ισχυρή ανασταλτική δράση του EDTA σε συγκέντρωση πάνω από 0,03 mM.

3.2.4.5 Κινητική σταθερής κατάστασης

Η αντίδραση που πραγματοποιείται από την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης του στελέχους Sphe3, φαίνεται να ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten, η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{max} * [S] / ([S] + K_m)$. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.20, η ταχύτητα της αντίδρασης μεταβάλλεται συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Αφότου πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές δοκιμές κατά τις οποίες μελετήθηκε η μεταβολή της ταχύτητας στη μονάδα χρόνου του ενός λεπτού σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος της κατεχόλης, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism 9.0.0 για τον προσδιορισμό των: $V_{max} = 3,041 \mu\text{M}/\text{min}$ και $K_m = 0.8918 \mu\text{M}$, ενώ υπολογίστηκε και η ειδική δραστηριότητα του κλάσματος C1 ως $1,789 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$.



Εικόνα 3.20. Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής της αντίδρασης της 1,2-CDO του *Sphe3*. Η αντίδραση ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten, που περιγράφεται από την εξίσωση που φαίνεται στο σχήμα.

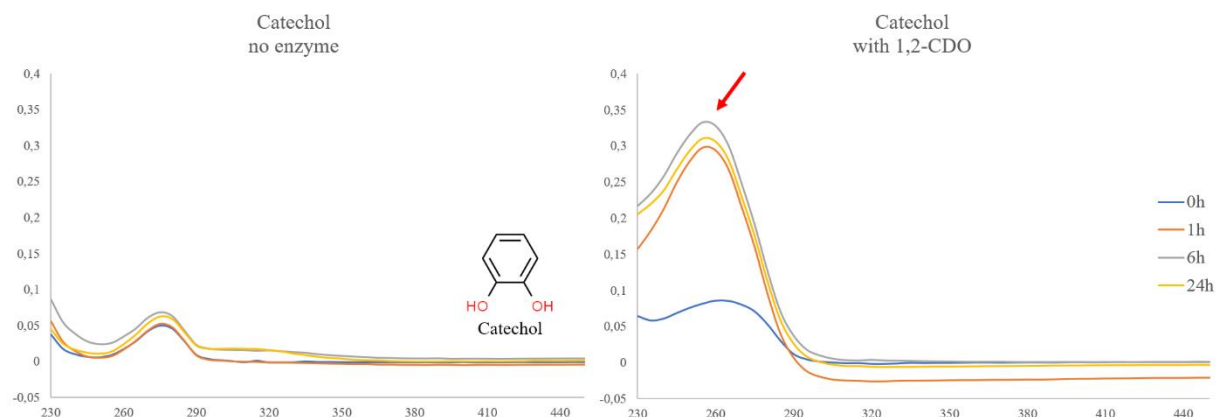
Παρόμοιες τιμές K_m των 1,2-CDOs άλλων βακτηριακών στελεχών, που υποδηλώνουν υψηλή συγγένεια με την κατεχόλη ως υπόστρωμα έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες, όπως φαίνεται παρακάτω:

Πίνακας 3.11. Κινητικές παράμετροι K_m και $V_{\max}$ για 1,2-διοξυγονάσες της κατεχόλης διαφόρων βακτηριακών στελεχών.

Βακτηριακό στέλεχος	K_m (μM)	$V_{\max}$ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	0,8918	1,789	Αυτή η εργασία
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	1,1	19	(Strachan, Freer, and Fewson 1998)
<i>Rhodococcus opacus</i>	1,4	22,6	(Shumkova et al. 2009)
<i>Acinetobacter</i> sp. DS002	1,58	2	(Pandeeti and Siddavattam 2011)
<i>Acinetobacter</i> sp. Y64	17,53	1,95	(J. Lin and Milase 2015)
<i>Pseudomonas putida</i> ND6	0,019	1,434	(Zhao, Chen, and Cai 2007)

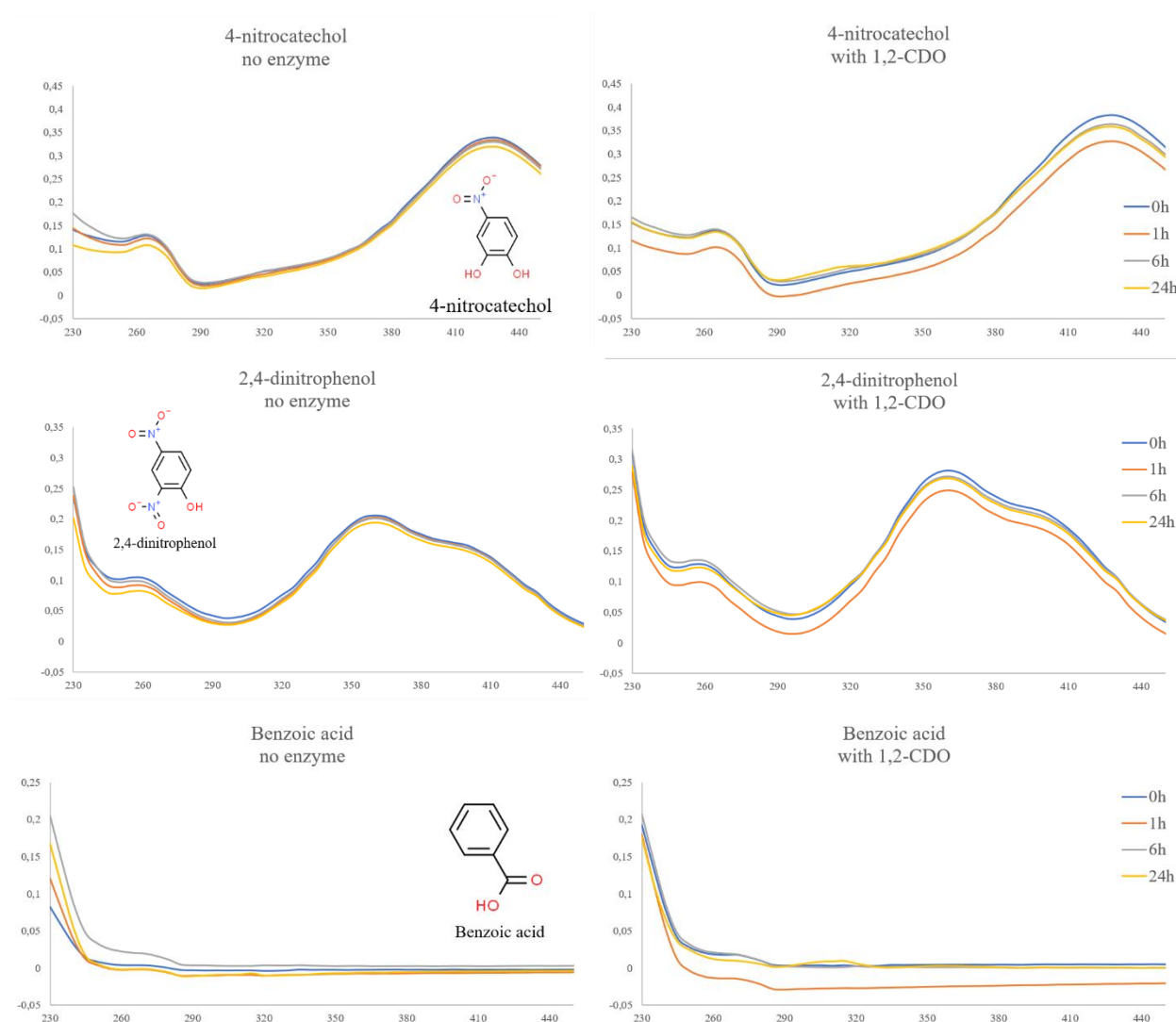
3.2.4.6 Εναλλακτικά υποστρώματα της 1,2-CDO του *Sphe3*

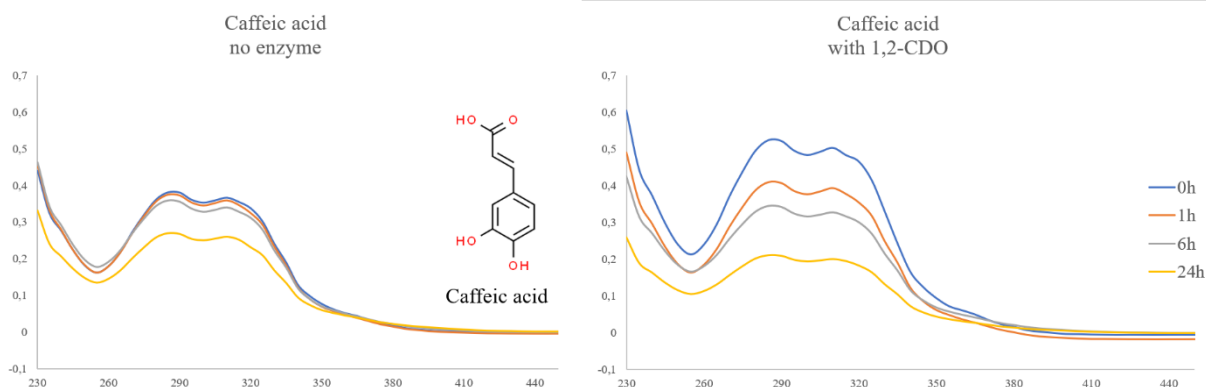
Διερευνήθηκε, επιπλέον, η ικανότητα του ενζύμου να αναγνωρίζει άλλα υποστρώματα εκτός της κατεχόλης με παρακολούθηση των μεταβολών στα φάσματα των αντιδράσεων μέσω UV-Vis φασματοσκοπίας.



Εικόνα 3.21. Φάσμα UV-Vis της αντίδρασης της 1,2-CDO του *Srhe3* με υπόστρωμα κατεχόλη. Με κόκκινο βέλος επισημαίνεται η αύξηση της απορρόφησης στα 260 nm λόγω του σχηματισμού του *cis*, *cis*-μονοκινικού οξέος ως προϊόν της αντίδρασης.

Ενδεικτικά παρουσιάζονται κάποια φάσματα της αντίδρασης του ενζύμου με διάφορες ενώσεις ως πιθανά υποστρώματα, καθώς παρατηρούνται μικρές αλλαγές στα φάσματα με την πάροδο του χρόνου, ενώ τα φάσματα στα οποία δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή περιλαμβάνονται στο Παράρτημα (Εικόνα Π2).





Εικόνα 3.22. Φάσματα UV-Vis της αντίδρασης της 1,2-CDO του *Sphe3* με τις ενώσεις 4-νιτροκατεχόλη, 2,4-δινιτροφαινόλη, βενζοϊκό οξύ και καφεϊκό οξύ ως πιθανά εναλλακτικά υποστρώματα.

Οι μικρές διαφορές που παρατηρούνται στα φάσματα των αντιδράσεων της 1,2-CDO με την 4-νιτροκατεχόλη, την 2,3-δινιτροφαινόλη και το βενζοϊκό χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Πιο έντονη φαίνεται η αλλαγή στο φάσμα της αντίδρασης της 1,2-CDO με το καφεϊκό οξύ και πιθανώς το υπόστρωμα αναγνωρίζεται από το ένζυμο.

Πρόσφατα, πραγματοποιήθηκε σημειακή μετάλλαξη στην 3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (3,4-PCD) του *Sphe3* με στόχο την απόκτηση δραστηριότητας 1,2-CDO, με βάση το γεγονός ότι οι ενδοδιολο-διοξυγονάσες 3,4-PCD και 1,2-CDO φαίνεται να έχουν κοινή εξελικτική προέλευση (Guzik, Hupert-Kocurek, and Wojcieszysk 2013). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεταλλαγμένη 3,4-PCD εκτός της κατεχόλης βρέθηκε να αναγνωρίζει και το καφεϊκό οξύ ως υπόστρωμα (Τσαγκογιάννης 2023).

3.2.4.7 Διατήρηση ενζυμικής δραστηριότητας κατά την αποθήκευση

Η διατήρηση της δραστηριότητας της 1,2-CDO του *Sphe3* μελετήθηκε ύστερα από αποθήκευση σε διαφορετικά μέσα συντήρησης (10% γλυκερόλη, 1% DMSO, 10% DMSO και 10% αιθανόλη) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες (4, -20 και -80 °C), για χρονική περίοδο 30 ημερών. Για τις μετρήσεις το ενζυμικό παρασκεύασμα επωάστηκε για 30 min με 0.2 mM Fe(II)/(L)-Asc.

Πίνακας 3.12. Δραστηριότητα της 1,2-CDO του *Sphe3* μετά από αποθήκευση σε διάφορες συνθήκες (θερμοκρασία αποθήκευσης, προσθήκη μέσων συντήρησης) για 2, 7 και 30 ημέρες.

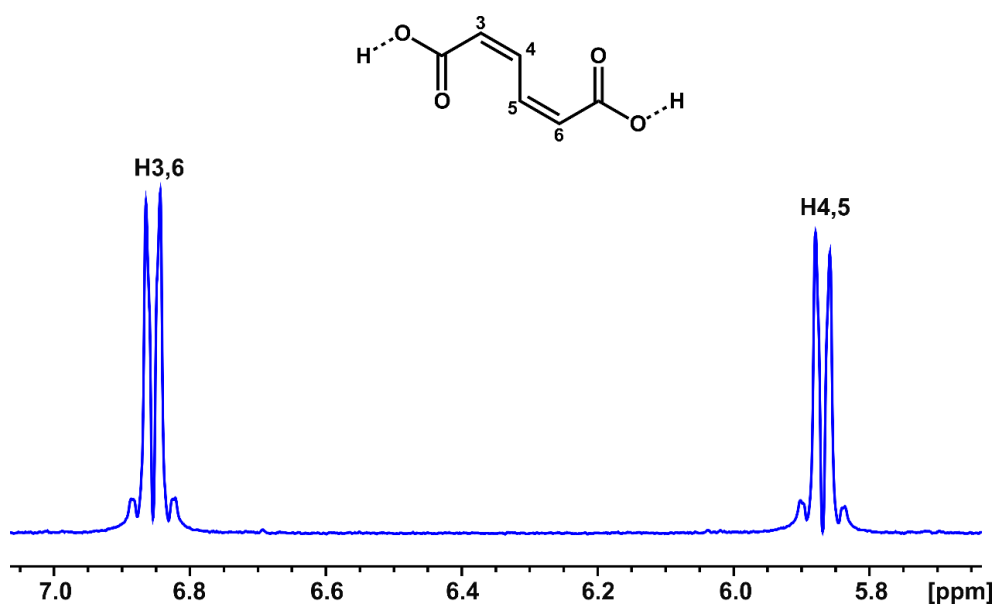
4 °C	Δραστηριότητα ενζύμου (%) μετά από:		
Μέσα διατήρησης	48 h	7 d	30 d
Καθαρό ένζυμο	98	95	84
10% αιθανόλη	45	15	9
1% DMSO	47	24	12
10% DMSO	40	22	11
10% γλυκερόλη	85	80	75
-20 °C	Δραστηριότητα ενζύμου (%) μετά από:		
Μέσα	48 h	7 d	30 d

διατήρησης			
Καθαρό ένζυμο	50	27	16
10% αιθανόλη	38	17	16
1% DMSO	41	34	23
10% DMSO	35	22	10
10% γλυκερόλη	48	39	22
-80 °C	Δραστικότητα ενζύμου (%) μετά από:		
Μέσα διατήρησης	48 h	7 d	30 d
Καθαρό ένζυμο	48	25	12
10% αιθανόλη	70	43	22
1% DMSO	33	35	23
10% DMSO	60	33	13
10% γλυκερόλη	55	41	34

Το ένζυμο φαίνεται να διατηρεί τη δραστικότητά του όταν επωάζεται χωρίς κάποιο μέσο συντήρησης στους 4 °C, καθώς μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης διατηρεί το 84% της καταλυτικής του ιδιότητας. Οι χαμηλές θερμοκρασίες (-20 °C και -80 °C) φαίνεται να επηρεάζουν τη σταθερότητα του καθαρού ενζύμου, ενώ η προσθήκη γλυκερόλης βοηθά πιο πολύ σε σχέση με τα άλλα μέσα στη διατήρηση της δραστικότητας της 1,2-CDO του Sphe3 στις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης.

3.2.4.8 Ταυτοποίηση προϊόντος αντίδρασης της 1,2-CDO του Sphe3 με φασματοσκοπία NMR

Στην Εικόνα 3.23 απεικονίζεται το 1D ¹H NMR φάσμα της αντίδρασης του καθαρού ενζύμου 1,2-CDO του Sphe3 με 1.2 mM κατεχόλης ως υπόστρωμα. Στο φάσμα διακρίνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του προϊόντος της αντίδρασης, το *cis*, *cis*-μουκονικό οξύ (μπλε σήμανση). Το φάσμα 1D ¹H NMR του προϊόντος *cis*, *cis*-μουκονικό οξύ παρουσιάζει δυο χαρακτηριστικές διπλές κορυφές στα 5,97 ppm η οποία αποδίδεται στα πρωτόνια H4 και H5 και στα 6,97 ppm που αποδίδεται στα πρωτόνια H3 και H6. Το υπόστρωμα έχει καταναλωθεί μετά από 12 ώρες αντίδρασης και δεν ανιχνεύεται.



Εικόνα 3.23. ¹H NMR φάσμα του *cis*, *cis*-muconic acid ως προϊόν αντίδρασης της ελεύθερης 1,2 διοξυγονάσης της κατεχόλης παρουσία 1.2 mM του υποστρώματος της κατεχόλης σε θερμοκρασία δωματίου σε 0.5mL 50m Tris buffer pH 8 90% H₂O/10% D₂O (number of scans = 64, acquisition time = 4 s, relaxation delay = 1.5 s, total experimental time = 6 min 22 s). Φάσμα αναφοράς για το ccMA: https://hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/2038.

3.3 Μελέτη της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το γονίδιο *Asphe3_36590* του *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* *Sphe3*

3.3.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Όπως αναφέρθηκε στην Παράγραφο 3.1.2, υπάρχουν ενδείξεις ότι το γονίδιο *Asphe3_36590* εμπλέκεται στον καταβολισμό της φαινόλης και πιθανώς κωδικεύει μια φαινολική υδροξυλάση. Το γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου και παρακάτω αναφέρονται ορισμένες πληροφορίες για αυτό, όπως προκύπτουν από τη βάση δεδομένων JGI/IMG.

Πίνακας 3.13. Χαρακτηριστικά του γονιδίου *Asphe3_36590*, όπως προκύπτουν από τη βάση δεδομένων JGI/IMG.

Πληροφορίες γονιδίου	
ID	650468243
Locus Tag	<i>Asphe3_36590</i>
Ονομασία	2-polyprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase-like oxidoreductase
Μέγεθος γονιδίου	1905bp
Πληροφορίες πρωτεΐνης	
Μέγεθος πρωτεΐνης	634aa
GenBank Accession	ADX74760

3.3.1.1 Προσδιορισμός πρωτοταγούς δομής

Με τη βοήθεια του αλγορίθμου ExPASy translate tool προσδιορίστηκε η πρωτεϊνική αλληλουχία του γονιδίου *Asphe3_36590* με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία (Παράρτημα, Εικόνα Π3).

```
>650468243 ADX74760 2-polyprenyl-6-methoxyphenol
hydroxylase-like oxidoreductase [Pseudarthrobacter
phenanthrenivorans Sphe3: CP002379]
MQFH HHG YVSGDPRVKPAAGVG VNRPADLPDEVDVLIVGTGPAGMLAAAQ
LSQFPNITTRIIE RRPGLAIGQADGIQARSVETFQAFGFAERITAEAYR
ITEMAFWKPD PADHTRIVRAARAVDD EMGISEFPHLIVNQARVLDYFAEY
AANSPSRLTPDYGYEFRGLEVGEGEYPVTVTLAHASGAEEGKERVVRKY
VIGADGARSKVREAIGCHLAGDAANHAWGMDVLAVTDFPDIRTKCAIQG
EKGSILLIPREGGFLFRMYVDLGEVDPNNKGAVRNTTIEQIIHKANEILH
PYTLDVRNVAWHSVYEVGHRLTDRFDDVLPEDRGTRTPRVFITGDACHTH
SAKAGQGMNVSMQDGFNLAWKLGHVLEGRSPESLLSTYSEERQVVAKNLI
DFDKEWSTMMAKKPEEF EHPDLEDFYVSTAEFPAGFMTQYTPSLVTGSS
AHQDLATGFPVGKRFKSAPVMRVGDTNPNVHLGHHATADGRWRIYVFADAP
LPGTGSAADKFAEWLANSPE SPLAATPSDADPDADFVVKVYQQPHTAVD
INAVPAVFKPQVGPFKLTDYEKVYATDPNADIFELRGLDRGGVVVVVRPD
QYVAHVLP LTTATAELAGFFGPLLKGQESGQPLTV
```

Εικόνα 3.24. Η πρωτεϊνική αλληλουχία που κωδικεύεται από το γονίδιο *Asphe3_36590*, όπως προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο ExPASy translate tool.

Το γονίδιο *Asphe3_36590* αποτελείται από 1905 ζεύγη βάσεων και η αντίστοιχη πρωτεϊνική αλληλουχία αποτελείται από 634 αμινοξέα, τα οποία αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος

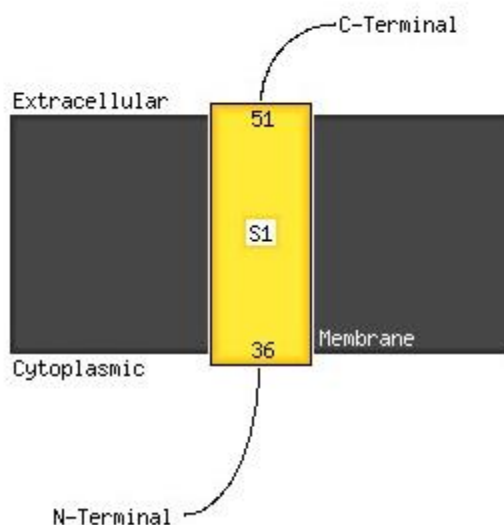


Εικόνα 3.25. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής του ενζύμου που κωδικεύεται από το *Asphe3_36590* σύμφωνα με την πλατφόρμα *Phyre2*.

69368,13 Da σύμφωνα με την πρόβλεψη του αλγορίθμου Compute MW/pI του ExpASy server. Με τον ίδιο αλγόριθμο υπολογίστηκε και το θεωρητικό pI της πρωτεΐνης 5,42. Το μοριακό βάρος αναφέρεται στο μονομερές και όχι στο ένζυμο καθώς η τεταρτοταγής του δομή δεν είναι γνωστή.

3.3.1.2 Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής

Η πεπτιδική αλυσίδα του Asphe3_36590, σύμφωνα με την πρόβλεψη της διαδικτυακής πλατφόρμας Phyre2 (Modelling Mode:Normal), αποτελείται από α-έλικες σε ποσοστό 17% και από β-πτυχωτά φύλλα σε ποσοστό 23%, ενώ 3% της δομής του ενζύμου έχει τη διαμόρφωση διαμεμβρανικής έλικας (Εικόνα 3.25, Εικόνα 3.26).

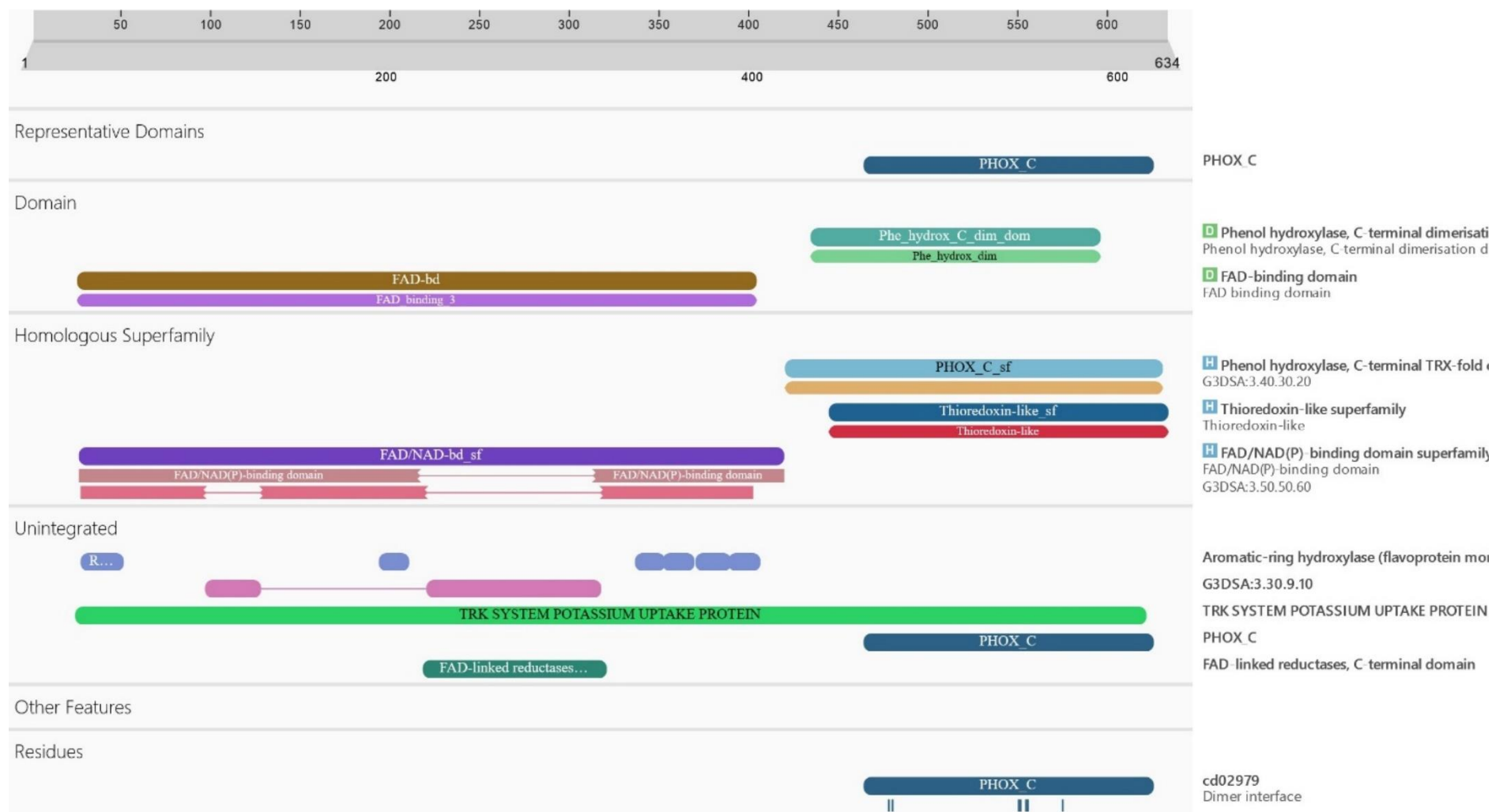


Εικόνα 3.26. Η απεικόνιση για τη διαμεμβρανική έλικα της πεπτιδικής αλυσίδας του Asphe3_36590, όπως προέκυψε με την ανάλυση στο Phyre2.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό InterProScan για την ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του Asphe3_36590. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, η πεπτιδική αλυσίδα του Asphe3_36590 περιλαμβάνει δύο χαρακτηριστικές περιοχές.

Αρχικά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.27 εντοπίζεται η περιοχή πρόσδεσης του φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου/FAD (σύντομη ονομασία: *FAD/NAD-bd_sf*), η οποία περιλαμβάνει και θέση πρόσδεσης για το NADH. Η χαρακτηριστική αυτή δομή απαντάται στις οξειδοοδονκτάσες τάξης I και II και στις μονοξυγονάσες εξαρτώμενες από φλαβινο-προσθετικές ομάδες (Mascotti et al. 2016; Bailleul et al. 2023).

Επιπλέον, εντοπίζεται μια περιοχή (σύντομη ονομασία: *Phe_hydrox_C_dim_dom*), η οποία αποτελεί την περιοχή αλληλεπίδρασης δύο υπομονάδων για το διμερισμό του ενζύμου. Η περιοχή αυτή συναντάται στις υδροξυλάσες της φαινόλης, οι οποίες είναι διμερή ένζυμα που υδροξυλιώνουν τη φαινόλη σε κατεχόλη και τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από τρεις χαρακτηριστικές περιοχές: οι δυο πρώτες σχηματίζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου και η τρίτη αποτελεί την περιοχή αλληλεπίδρασης δύο υπομονάδων για το διμερισμό του ενζύμου (Enroth et al. 1998). Η 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος του στελέχους *Comamonas testosteroni* περιλαμβάνει επίσης αυτή την περιοχή για τον διμερισμό των ενζύμων (Chang and Zylstra 2008).



Εικόνα 3.27. Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του Asphe3_36590 με το λογισμικό InterProScan.

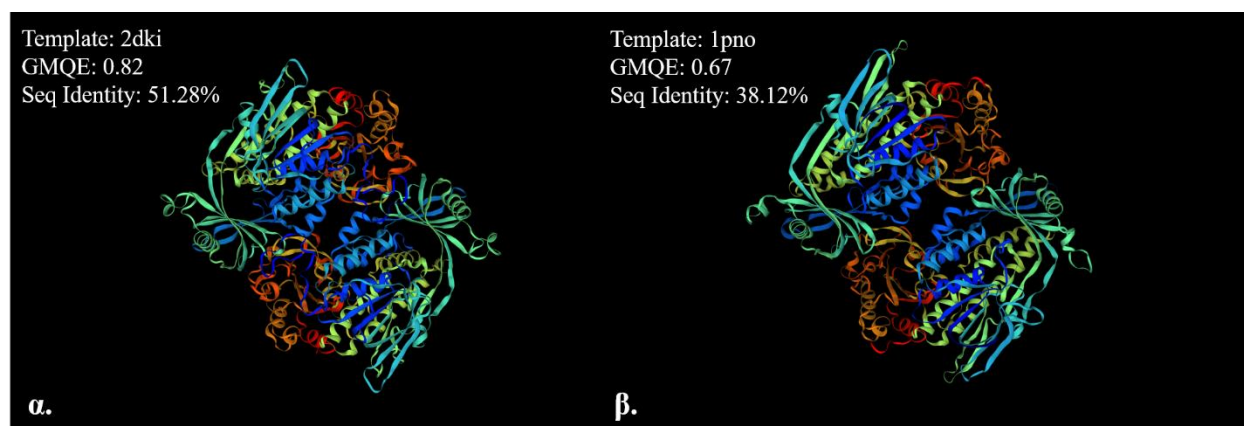
3.3.1.3 Πρόβλεψη τριτοταγούς δομής

Σύμφωνα με την ανάλυση SWISS-MODEL στην πλατφόρμα ExprASy η δομή του υπό μελέτη ενζύμου προβλέφθηκε με βάση τη μεγάλη ομοιότητα με τα ένζυμα 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (3HB4H) και 2-μονοξυγονάση της φαινόλης, των οποίων η κρυσταλλική δομή είναι γνωστή.

Πίνακας 3.14. Ένζυμα τα οποία παρουσιάζουν ομολογία με το υπό διερεύνηση ένζυμο, σύμφωνα με την ανάλυση SWISS-MODEL στην πλατφόρμα ExprASy, οι δομές των οποίων αποτελούν μοντέλο πρόβλεψης για την τρισδιάστατη δομή του υπό διερεύνηση ενζύμου.

Accession code	Sequence Identity (%)	Biounit Oligo State	Description
2dki.1	52.28	homo-dimer	3-Hydroxybenzoate 4-Hydroxylase Crystal structure of 3-hydroxybenzoate hydroxylase from <i>Comamonas testosteroni</i> , under pressure of xenon gas (12 atm)
1pn0.1	38.12	homo-dimer	Phenol 2-monooxygenase Phenol hydroxylase from <i>Trichosporon cutaneum</i>

Σύμφωνα με τα μοντέλα που προκύπτουν, η τρισδιάστατη δομή της πεπτιδικής αλληλουχίας του Asphe3_36590 βασίζεται στην ομολογία που παρουσιάζει με την 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (ομολογία 52,5%) του στελέχους *Comamonas testosteroni* και τη 2-μονοξυγονάση της φαινόλης (ομολογία 38,12%) του στελέχους *Trichosporon cutaneum*. Και τα δύο αυτά ένζυμα σχηματίζουν ομοδιμερή.

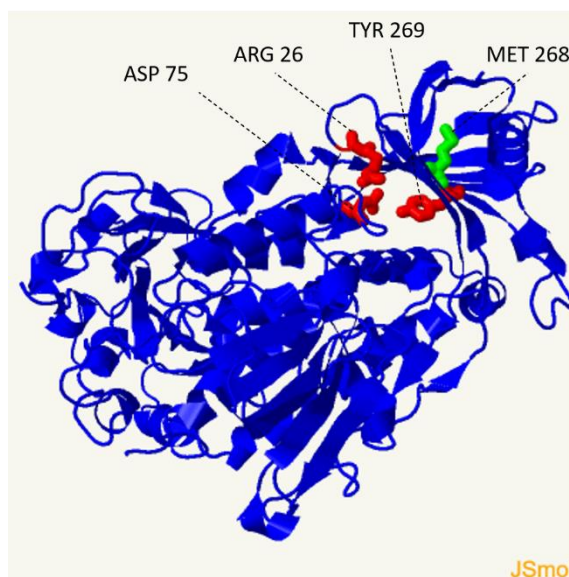


Εικόνα 3.28. Πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής της πεπτιδικής αλληλουχίας του Asphe3_36590, όπως προκύπτει από την ανάλυση SWISS-MODEL στην πλατφόρμα ExprASy, με εκμαγείο τα ένζυμα: 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος του *Comamonas testosteroni* (α) και 2-μονοξυγονάση της φαινόλης του *Trichosporon cutaneum* (β). Σε κάθε μοντέλο φαίνεται ο κωδικός του ενζύμου, η σταθερά αξιολόγησης του μοντέλου GMQE (1=βέλτιστο) και η ομοιότητα της υπό διερεύνησης αλληλουχίας με αυτή του μοντέλου. (Image coloured by rainbow N → C terminus).

Γενικά, η συνολική αναδίπλωση των φλαβινο-εξαρτώμενων μονοξυγονασών ενός συστατικού (single component flavin-dependent monooxygenase) περιλαμβάνει τρεις διακριτές περιοχές: την περιοχή που προσδένει το FAD, την περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος και την περιοχή που αλληλεπιδρούν οι υπομονάδες για σχηματισμού ενός

διμερούς (Chenprakhon, Wongnate, and Chaiyen 2019). Τα αποτελέσματα της πρόβλεψης της δευτεροταγούς δομής σε συνδυασμό με την πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής του ενζύμου που κωδικεύεται από το Asphe3_36590 στο στέλεχος Sphe3, προτείνουν την κατηγοριοποίηση του ενζύμου ως μια 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός αμινοξέων που συμμετέχουν στο ενεργό κέντρο της 4-υδροξυλάσης του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος του *Comamonas testosteroni*, με τη χρήση του εργαλείου Catalytic Site Atlas μέσω της πλατφόρμας Phyre2 και βρέθηκαν οι ομοιότητες και οι διαφορές μεταξύ του υπό μελέτη ενζύμου του Sphe3 και της 4-υδροξυλάσης του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος του *C. testosteroni*, το μονομερές της οποίας χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3.29.



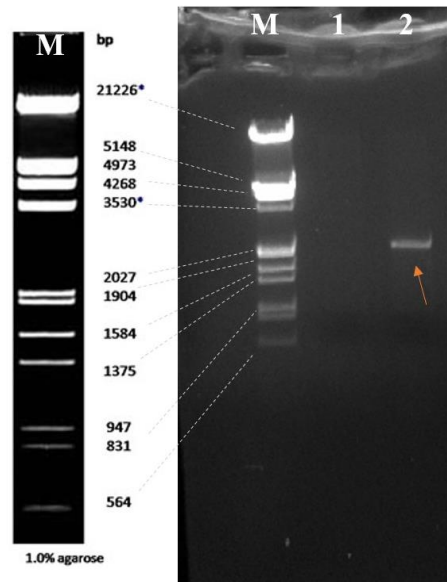
Εικόνα 3.29. Πρόβλεψη της δομής του μονομερούς της πεπτιδικής αλληλουχίας του Asphe3_36590, με επισημάνση των αμινοξέων που συμμετέχουν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού του *C. testosteroni*, σύμφωνα με δεδομένα του Catalytic Site Atlas. Με κόκκινο επισημαίνονται τα όμοια αμινοξέα που εντοπίζονται και στα δυο ένζυμα, ενώ με πράσινο το αμινοξύ που εντοπίζεται στην πεπτιδική αλληλουχία του Asphe3_36590. Model dimensions (Å): X:69.945 Y:79.223 Z:67.802.

3.3.2 Ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας σε εκχύλισμα κυττάρων Sphe3 αναπτυγμένων παρουσία 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη ενεργότητας του ενζύμου 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος στο Sphe3 πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του βακτηρίου Sphe3 σε 500 ml MM M9 παρουσία 5 mM 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (3-HBA) μέχρι το μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, ακολούθησε συλλογή και λύση των κυττάρων με μηχανικό τρόπο και προσδιορισμός δραστηριότητας της 4-υδροξυλάσης του 3-HBA (Παράγραφος 2.24.1.6). Στο κυτταρικό εκχύλισμα εντοπίστηκε δραστηριότητα της 4-υδροξυλάσης του 3-HBA, η οποία υπολογίστηκε 0,23 U·mg⁻¹. Η δραστηριότητα για την 4-υδροξυλάση του 3-HBA είναι σαφώς μεγαλύτερη από τη δραστηριότητα που υπολογίστηκε για την υδροξυλάση της φαινόλης (0,09 U·mg⁻¹), όταν τα κύτταρα του Sphe3 αναπτύσσονται παρουσία 500 mg/L φαινόλης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Παράγραφος 3.1.4).

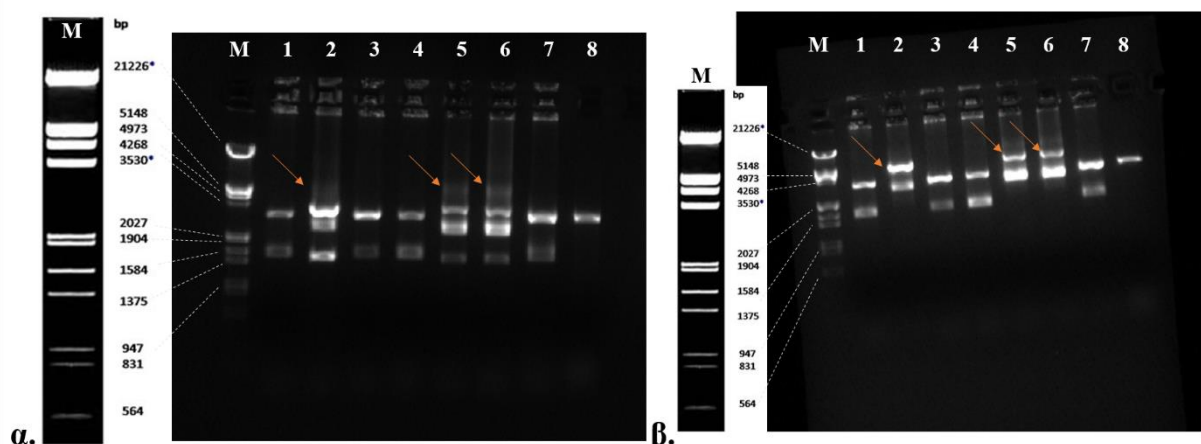
3.3.3 Κλωνοποίηση του γονιδίου, ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός του ενζύμου

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί και πειραματικά η βιοπληροφορική πρόβλεψη της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το γονίδιο *Asphe3_36590* (*3hb4h*), πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της περιοχής αυτής και η ζώνη που αντιστοιχεί στο γονίδιο *3hb4h* (Εικόνα 3.30) κόπηκε και απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης για περαιτέρω κλωνοποίηση στον φορέα pBlueScript SK(+).



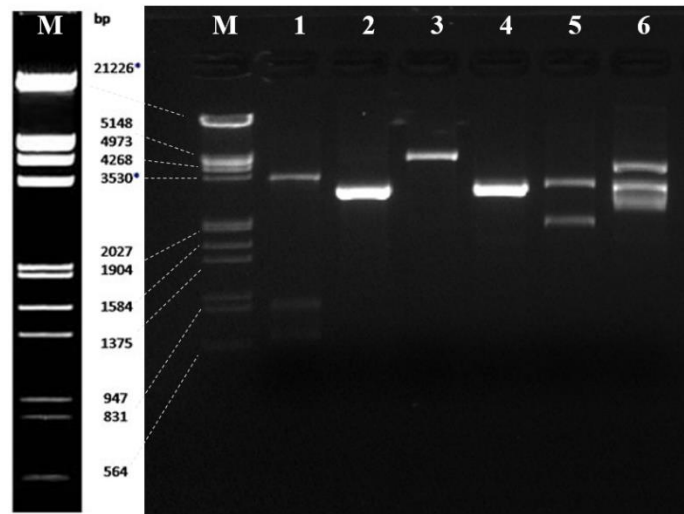
Εικόνα 3.30. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου *3hb4h*. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λDNA- *EcoRI-HindIII* (Minotech), ο οποίος φαίνεται και στα αριστερά της εικόνας, 1: αντίδραση PCR χωρίς gDNA από το στέλεχος *Sphe3* (αρνητικός μάρτυρας), 2: προϊόν της αντίδρασης (~1905 bp) με εκμαγείο το gDNA του *Sphe3*.

Η ορθή κλωνοποίηση του γονιδίου στον φορέα pBlueScript SK(+) επιβεβαιώθηκε με περιοριστική ανάλυση στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Η εικόνα των αποτελεσμάτων των πέψεων (Εικόνα 3.31, Εικόνα 3.32) συμφωνεί με την πρόβλεψη των εικονικών πέψεων που σχεδιάστηκαν για το γονίδιο *Asphe3_36590* (Παράγραφος 2.17.1). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ένθεση βρίσκεται υπό τον έλεγχο του T7 εκκινήτη του φορέα Εικόνα 2.8 Α.



Εικόνα 3.31. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων περιοριστικής ανάλυσης του ανασυνδυασμένου φορέα pBlueScript::36590. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λDNA- *EcoRI-HindIII* (Minotech), ο οποίος φαίνεται και στα αριστερά κάθε πηκτώματος. Οι ανασυνδυασμένοι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για την περιοριστική ανάλυση απομονώθηκαν με μεθόδους αλκαλικής λύσης των κυττάρων από

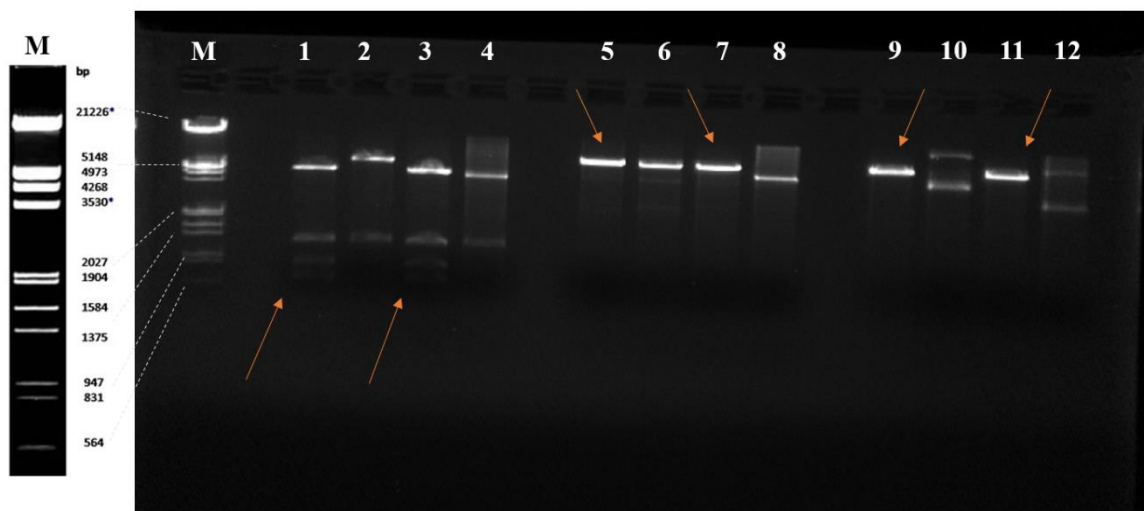
διαφορετικές αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων. α) Θέσεις 1-8: Πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο *XhoI*. β) Θέσεις 1-8: Πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο *BamHI*. Με βελάκια επισημαίνονται τα αναμενόμενα προϊόντα.



Εικόνα 3.32. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων περιοριστικής ανάλυσης του ανασυνδυασμένου φορέα *pBlueScript::36590*. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λDNA- *EcoRI-HindIII* (Minotech), ο οποίος φαίνεται και στα αριστερά του πηκτώματος. 1: Πέψη του ανασυνδυασμένου φορέα με το περιοριστικό ένζυμο *AvaI*. 2: Πέψη του *pBluescript SK+* με το περιοριστικό ένζυμο *AvaI*. 3: Πέψη του ανασυνδυασμένου φορέα με το περιοριστικό ένζυμο *PstI*. 4: Πέψη του *pBluescript SK+* με το περιοριστικό ένζυμο *PstI*. 5: Πέψη του ανασυνδυασμένου φορέα με το περιοριστικό ένζυμο *HindIII*. 6: Πέψη του *pBluescript SK+* με το περιοριστικό ένζυμο *HindIII*.

Επιπλέον, ο ανασυνδυασμένος φορέας φορέα *pBlueScript::36590* στάλθηκε για αλληλούχηση της ένθεσης, τα αποτελέσματα της οποίας επιβεβαίωσαν την ταυτότητα του γονιδίου.

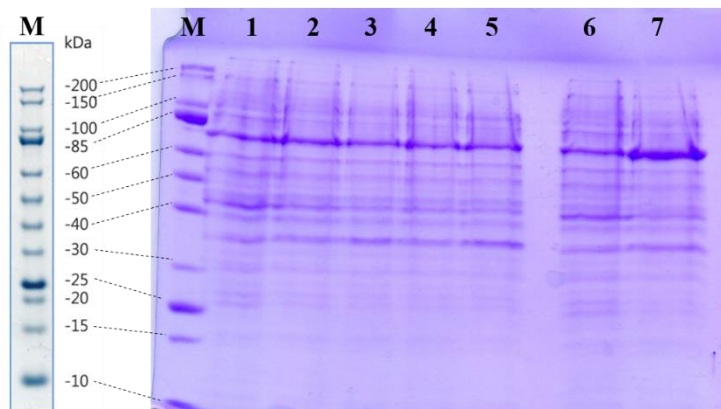
Στη συνέχεια, το γονίδιο *3hb4h* κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης *pET29c(+)* και πραγματοποιήθηκαν πέψεις με περιοριστικά ένζυμα για την επιβεβαίωση της κλωνοποίησης. Οι πέψεις που πραγματοποιήθηκαν με τα ένζυμα *AvaI*, *HindIII* και *PstI* (Εικόνα 3.33) έχουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα (Παράγραφος 2.17.1), επιβεβαιώνοντας την εισαγωγή του γονιδίου στον φορέα υπερέκφρασης.



Εικόνα 3.33. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων περιοριστικής ανάλυσης του ανασυνδυασμένου φορέα *pET29c::36590*. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λDNA- *EcoRI-HindIII* (Minotech), ο οποίος

φαίνεται και στα αριστερά του πηκτώματος. Θέσεις 1-4: Πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο *AvaI*. Θέσεις 5-8: Πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο *HindIII*. Θέσεις 9-12: Πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο *PstI*. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένοι φορείς από 4 διαφορετικές αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων. Με βελάκια επισημαίνονται τα δείγματα με τα αναμενόμενα προϊόντα.

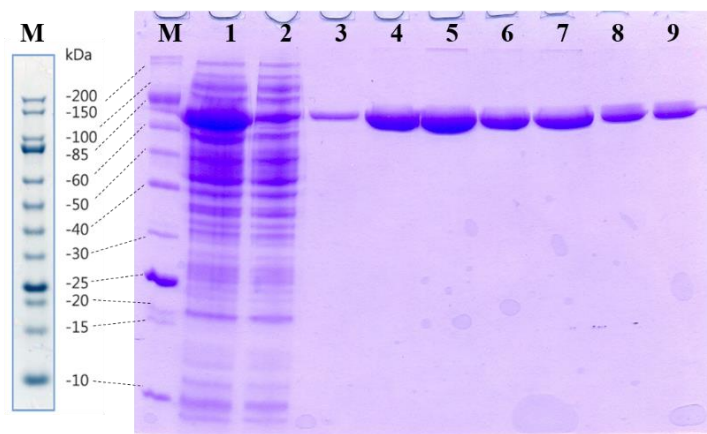
Με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET29c::3hb4h μετασχηματίστηκαν κύτταρα *E.coli* BL21, τα οποία καλλιεργήθηκαν υπό κατάλληλες συνθήκες παρουσία IPTG ώστε να επαχθεί η υπερέκφραση του υπό μελέτη γονιδίου.



Εικόνα 3.34. Πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης με δείγματα από την υπερέκφραση του 3hb4h σε διαφορετικούς χρόνους επώασης των BL21 μετά την προσθήκη 1mM IPTG. M: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa) 10–20% Tris-glycine (NEB), 1: δείγμα τη στιγμή της προσθήκης του IPTG, 2: 1h επώαση, 3: 2h επώαση, 4: 3h επώαση και 5: 4h επώαση μετά την προσθήκη του IPTG, 6: δείγμα τη στιγμή της προσθήκης του IPTG, 7: δείγμα, μετά την προσθήκη 1mM IPTG μετά από overnight επώαση στους 16 °C.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η μεγαλύτερη ποσότητα υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης προκύπτει μετά από 16 h επώασης στους 16 °C μετά την προσθήκη 1 mM IPTG (Εικόνα 3.34, πηγαδάκι 7), όπου ανιχνεύεται ζώνη ~70 kDa, δηλαδή όσο έχει υπολογιστεί το μοριακό βάρος του μονομερούς του ενζύμου. Σε επόμενη φάση, τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21 καλλιεργήθηκαν σε 1000 ml θρεπτικού υλικού LB και πραγματοποιήθηκε επαγωγή της υπερέκφρασης με επώαση με IPTG σύμφωνα με τα παραπάνω και συλλογή των κυττάρων. Μετά τη λύση των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του ενζύμου με στήλη αγκιστείας Ni²⁺-NTA αгарόζης.

Κατά τη διαδικασία του καθαρισμού, συλλέχθηκαν δείγματα από τα κλάσματα της στήλης στα οποία πραγματοποιήθηκε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών για να επιβεβαιωθεί η παρουσία καθαρού ενζύμου στα κλάσματα που χρησιμοποιήθηκαν τελικά για το βιοχημικό χαρακτηρισμό.



Εικόνα 3.35. Πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης με δείγματα από τον καθαρισμό της υπό μελέτη πρωτεΐνης 3HB4H του *Sphe3* με τη στήλη αχιστείας Ni^{2+} -NTA αгарόζης. M: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa) 10–20% Tris-glycine (NEB), 1: crude μετασχηματισμένων BL21 μετά από 16 h επώασης με IPTG, 2: flowthrough της στήλης, 3–9: κλάσματα με αύξουσα συγκέντρωση ιμιδαζολίου στα οποία εντοπίζεται καθαρό το ένζυμο.

Το κλάσμα C2 (Εικόνα 3.35Εικόνα 3.17, πηγαδάκι 5) τοποθετήθηκε σε συσκευή φυγοκεντρικού φίλτρου Amicon® Ultra-4 10K για αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος ώστε να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο από το περιβάλλον του ενζύμου και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του ενζύμου κατά Bradford σε 5,16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Αξίζει να σημειωθεί ότι κανένα κλάσμα που περιείχε το καθαρό ένζυμο δεν είχε δραστηριότητα, μέχρι αυτό να επωαστεί με FAD, επιβεβαιώνοντας τις *in silico* προβλέψεις ότι πρόκειται για μια μονοξυγονάση εξαρτώμενη από φλαβινο-προσθετική ομάδα, η οποία φαίνεται να χάνει το FAD κατά τη διαδικασία της απομόνωσης του ενζύμου.

3.3.4 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης 3HB4H του στελέχους *Sphe3*

3.3.4.1 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων FAD στη δραστηριότητα του ενζύμου

Το κλάσμα C2 που περιέχει το καθαρό ένζυμο επώαστηκε με διαφορετικές συγκεντρώσεις FAD και μετρήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα με υπόστρωμα το 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Πίνακας 3.15).

Πίνακας 3.15. Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων FAD στη δραστηριότητα της 3HB4H του *Sphe3* μετά από επώαση με το καθαρό ένζυμο.

Συγκέντρωση FAD (mM)	Ειδική ενζυμική δραστηριότητα ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)
0,01	0
0,04	0
0,05	0
0,09	0,657
0,1	0,798
0,15	0,823
0,25	0,882
0,5	0,673
1	0,614

Παρατηρείται ότι η προσθήκη εξωγενούς FAD στην υπερεκφρασμένη 3HB4H επαναφέρει τη δραστηριότητα του καθαρού ενζύμου, που φαίνεται να χάνει το φλαβινοειδή συμπαράγοντα κατά την απομόνωσή του. Το ίδιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες φλαβινο-εξαρτώμενες μονοξυγονάσες κατά τον καθαρισμό τους (Park et al. 2007; Suarez et al. 1995; L. H. Wang et al. 1987). Στη συνέχεια, διερευνήθηκε φωτομετρικά η ύπαρξη δραστηριότητας του ενζύμου 3HB4H με υπόστρωμα τη φαινόλη παρουσία 0,2 mM NADH όπως περιγράφεται στη Παράγραφο 2.24.1.6.

Με έκπληξη διαπιστώθηκε ότι δεν εμφανίστηκε μετρήσιμη ενεργότητα του καθαρού ενζύμου έναντι του υποστρώματος της φαινόλης. Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, σε εκχύλισμα κυττάρων *Sphe3* αναπτυγμένων παρουσία φαινόλης εντοπίστηκε δραστηριότητα 2-μονοξυγονάσης της φαινόλης, και επίσης προσδιορίστηκε μικρή επαγωγή του γονιδίου *Asphe3_36590* το οποίο κωδικεύει το ένζυμο 3HB4H όταν το στέλεχος *Sphe3* αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης. Η μη μετρήσιμη όμως δραστηριότητα υδροξυλάσης της φαινόλης σε αντίθεση με τη μετρήσιμη δραστηριότητα της 4-υδροξυλάσης του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος στο καθαρό ένζυμο επιβεβαιώνει τη πρόβλεψη της βιοπληροφορικής ανάλυσης ότι το γονίδιο *Asphe3_36590* κωδικεύει την 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος.

3.3.4.2 Βέλτιστο pH δράσης

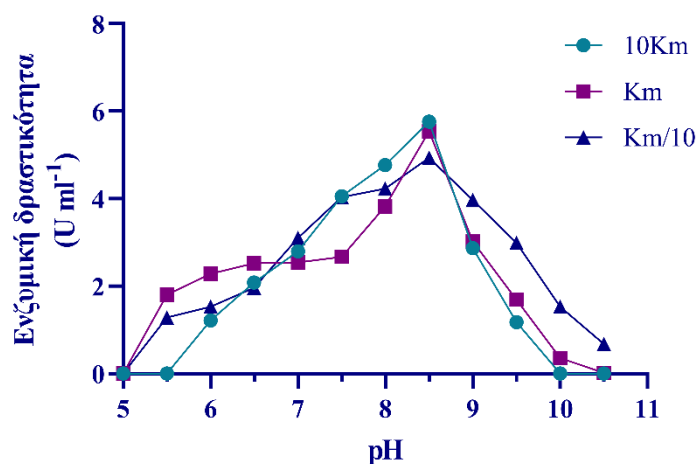
Ακολούθησε ο προσδιορισμός του βέλτιστου pH δράσης της 3HB4H του *Sphe3*. Το βέλτιστο pH προσδιορίστηκε αξιολογώντας τη δραστηριότητα του καθαρού ενζύμου φωτομετρικά με βάση την οξείδωση του NADH στα 340 nm μετά από επώαση του ενζύμου σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος στα διαφορετικά pH.

Πίνακας 3.16. Δραστηριότητα της 3HB4H του *Sphe3* ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)

σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος σε εύρος pH 5-10,5.

	Συγκέντρωση υποστρώματος*		
pH	10Km	Km	Km/10
5	-	-	-
5,5	-	1,800	1,286
6	1,213	2,282	1,527
6,5	2,081	2,524	1,961
7	2,797	2,540	3,102
7,5	4,059	2,668	4,035
8	4,766	3,826	4,228
8,5	5,763	5,546	4,935
9	2,869	3,022	3,971
9,5	1,173	1,688	2,990
10	-	0,353	1,527
10,5	-	0,016	0,675

*Km=0.03 mM



Εικόνα 3.36. Δραστηριότητα της 3HB4H του *Sphe3* ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) σε διαφορετικά pH και συγκεντρώσεις υποστρώματος, όπου Km=0.03 mM.

Όπως παρατηρείται (Πίνακας 3.16), το ένζυμο παρουσιάζει τη βέλτιστη δραστηριότητά του σε pH=8,5 με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl. Η δραστηριότητα φαίνεται να διατηρείται μέχρι και

την τιμή pH 10. Για τιμές pH μεγαλύτερες του 10 η δραστηριότητα μειώνεται ή δεν εντοπίζεται.

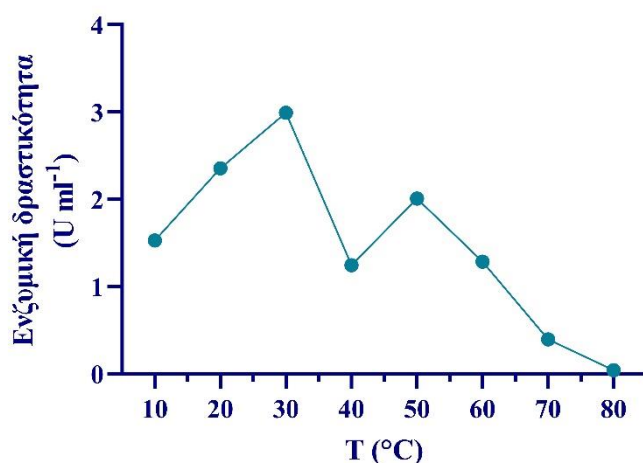
Σε παρόμοια pH δρουν βέλτιστα οι 6-υδροξυλάσες του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (3HB6H) των στελεχών *Micrococcus* sp. (Rajasekharan, Rajasekharan, and Vaidyanathan 1990) και *Martellella* sp. AD-3 (X. Chen et al. 2018) όπου βέλτιστο pH=8, η 3HB6H του στελέχους *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 δρα σε βέλτιστο pH=8,4 (Park et al. 2007), ενώ η μόνη αναφορά που βρέθηκε για 3HB4H είναι του στελέχους *Comamonas testosteroni*, η οποία δρα βέλτιστα σε pH=7,3 (R. . Chen et al. 1998).

3.3.4.3 Βέλτιστη θερμοκρασία

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου 3HB4H του *Sphe3*.

Πίνακας 3.17. Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της 3HB4H του *Sphe3* (U·ml⁻¹).

Θερμοκρασία (°C)	Ενζυμική δραστηριότητα (U·ml ⁻¹)
10	1,53
20	2,35
30	2,99
40	1,25
50	2,01
60	1,28
70	0,39
80	0,04



Εικόνα 3.37. Δραστηριότητα της 3HB4H του *Sphe3* (U·ml⁻¹) σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Όπως προκύπτει από τα ανωτέρω, η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της 3HB4H του *Sphe3* είναι οι 30 °C.

Αντίστοιχα βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 30 °C παρουσιάζει η 3HB6H του στελέχους *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, η οποία μετά τους 50 °C χάνει εντελώς τη

δραστικότητά της και αυτό πιθανώς εξηγείται από το ότι το στέλεχος χαρακτηρίζεται ως ψυχρόφιλο με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 20 °C (Park et al. 2007).

3.3.4.4 Επίδραση ιόντων στη δραστικότητα του ενζύμου

Το ενζυμικό παρασκεύασμα επώαστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μεταλλικών ιόντων για 15 και 30 min.

Πίνακας 3.18. Μεταβολή δραστικότητας (%) της 3HB4H του *Sphe3* μετά από επώαση για 15 και 30 min, με διάφορα ιόντα μετάλλων.

	15 min	30 min
Ιόντα μετάλλων (1 mM)	Δραστικότητα (%)	
- (καθαρό ένζυμο)	100	100
Ag⁺	0	0
Ba²⁺	0	0
Ca²⁺	0	0
Co²⁺	87	133
Fe²⁺	80	0
Mg²⁺	60	47
Mn²⁺	60	0
Zn²⁺	20	0

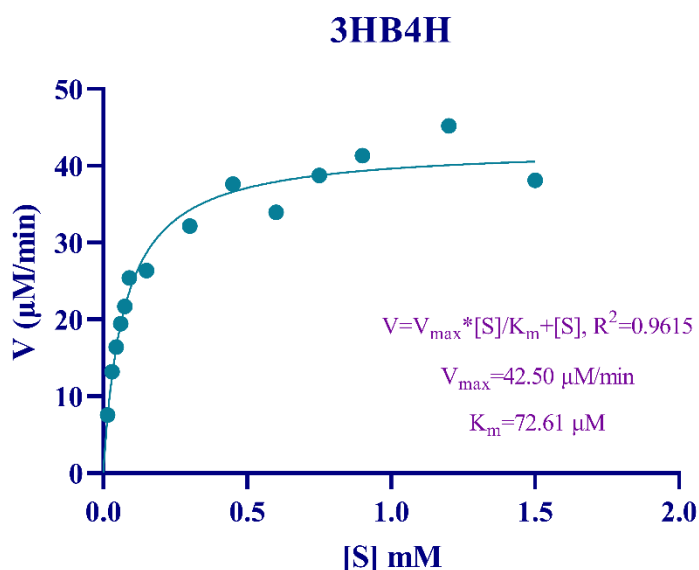
Αρχικά, η παρουσία ιόντων μετάλλων δεν απαιτείται για τη δραστικότητα της 3HB4H του *Sphe3*. Ωστόσο, όπως παρατηρείται παραπάνω (Πίνακας 3.18) τα ιόντα αργύρου, βαρίου και ασβεστίου αναστέλλουν τη δραστικότητα του ενζύμου από τα πρώτα 15 min, ενώ και τα υπόλοιπα ιόντα μετάλλων αναστέλλουν τη δραστικότητα του ενζύμου, πλην του κοβαλτίου μετά από επώαση 30 min.

Παρομοίως, η δραστικότητα της 3HB6H του στελέχους *Klebsiella pneumoniae* αναστέλλεται μετά από επώαση με Fe²⁺ (Suarez et al. 1995) όπως και η δραστικότητα της 3HB6H του στελέχους *Martellella* sp. AD-3 μετά από επώαση με Mg²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ και Co²⁺ (X. Chen et al. 2018). Αντιθέτως, στην περίπτωση της 3HB4H του *Sphe3* η επώαση με Co²⁺ φαίνεται να ενισχύει τη δραστικότητά της μετά από μισή ώρα επώασης.

3.3.4.5 Κινητική σταθερής κατάστασης

Η αντίδραση που πραγματοποιείται από την 3HB4H του στελέχους *Sphe3*, φαίνεται να ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten, η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{max} * [S]/([S] + K_m)$. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.38, η ταχύτητα της αντίδρασης μεταβάλλεται συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 9.0.0, διαπιστώθηκε ότι το υπό μελέτη ένζυμο ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten, αφότου πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές δοκιμές, κατά τις οποίες μελετήθηκε η μεταβολή της ταχύτητας στη μονάδα χρόνου του ενός λεπτού, σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος 3-HBA. Ακολούθως, υπολογίστηκαν τα: $V_{max} = 42,5$

μM/min και $K_m = 0,0726$ mM και η ειδική δραστηριότητα του κλάσματος C2 ως 0,82 U/mg (δραστηριότητα ίση με 1 Unit ορίζεται η μετατροπή 1 μmol of NADH σε NAD^+ ανά min σε θερμοκρασία δωματίου).



Εικόνα 3.38. Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής της αντίδρασης της 3HB4H του *Sphe3* με υπόστρωμα το 3-HBA. Η αντίδραση ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten, που περιγράφεται από την εξίσωση που φαίνεται στο σχήμα.

Όπως φαίνεται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.19, όλες οι υδροξυλάσες του 3-HBA χρειάζονται το FAD ως προσθετική ομάδα, ενώ οι τιμές των K_m για το υπόστρωμα κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα.

Πίνακας 3.19. Χαρακτηριστικά υδροξυλασών του 3-HBA από διαφορετικά στελέχη.

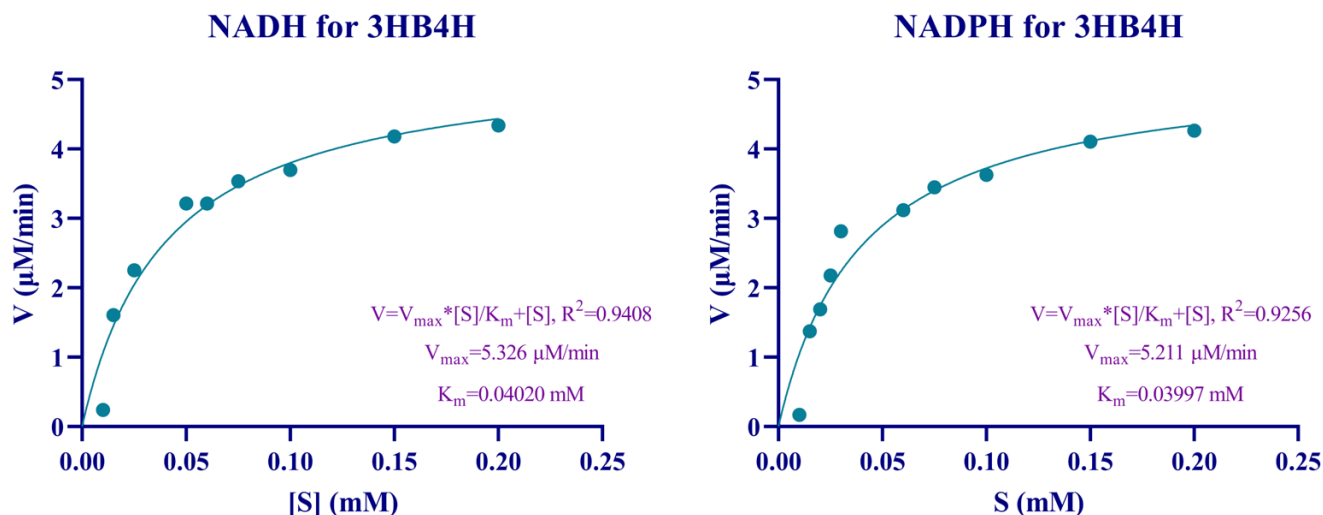
Ένζυμο	Μικροβιακό στέλεχος	FA D	NADH/ NADPH	K_m (μM) για το 3-HBA	K_m (μM) για το NADH/NADP H	Βιβλιογραφική αναφορά
3HB4H	<i>P. phenanthrenivorans Sphe3</i>	+	NADH/ NADPH	72,6	40,2 (NADH) / 40 (NADPH)	Παρούσα εργασία
	<i>C. testosteroni</i>	+	NADPH	30	3000 (NADH) / 70 (NADPH)	(Michalover and Ribbons 1973; Hiromoto et al. 2006)
	<i>A. niger</i> *	+	NADPH	190**	200**	(Premkumar et al. 1969)
3HB6H	<i>B. cepacia</i>	+	NADH/ NADPH	40	162 (NADH) / 168 (NADPH)	(L. H. Wang et al. 1987)

	<i>Micrococcus sp.</i>	+	NADH	63	95	(Rajasekharan, Rajasekharan, and Vaidyanathan 1990)
	<i>K. pneumoniae M5a1</i>	+	NADH	-	-	(Suarez et al. 1995)
	<i>P. alcaligenes NCIMB 9867</i>	+	NADH	79	112 (NADH) / 225 (NADPH)	(Gao et al. 2005)
	<i>P. naphthalenivorans CJ2</i>	+	NADH	64,9	493	(Park et al. 2007)
	<i>C. glutamicum ATCC 13032</i>	+	NADH	53,4	-	(Y.-F. Yang et al. 2010)
	<i>R. jostii RHA1</i>	+	NADH	46	48	(MonTERSINO and Van Berkel 2012)
	<i>Martellella sp. AD-3</i>	+	NADH	104,1	72,6	(X. Chen et al. 2018)

* *Aspergillus niger*: μύκητας

** Μερικώς καθαρισμένο ένζυμο-κυτταρικό εκχύλισμα

Επίσης, οι 3HB6H φαίνεται να έχουν μια προτίμηση στο NADH, ενώ οι 3HB4H στο NADPH. Η 3HB4H του *C. testosteroni* παρουσιάζει μια εξειδίκευση για το NADPH με $K_m=70 \mu M$, ενώ για το NADH το K_m της υπολογίστηκε $300 \mu M$ (Michalover and Ribbons 1973). Παρομοίως, η 3HB6H του *P. alcaligenes NCIMB 9867* παρουσίασε $K_m=112 \mu M$ για το NADH και $K_m=225 \mu M$ για το NADPH, δείχνοντας μια σαφή προτίμηση στο NADH (Gao et al. 2005).



Εικόνα 3.39. Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής της αντίδρασης της 3HB4H του *Sphe3* με διαφορετικές συγκεντρώσεις του NADH και NADPH ως αναγωγικά ισοδύναμα και σταθερή συγκέντρωση του 3-HBA.

Η 3HB4H του *Sphe3* φαίνεται να χρησιμοποιεί και τα δύο συνένζυμα NADH και NADPH, εμφανίζοντας παρόμοιες τιμές K_m και $V_{\max}$ έναντι αυτών των συνενζύμων παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 3-HBA (Εικόνα 3.39). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την 3HB6H από το στέλεχος *P. ceracia* (L. H. Wang et al. 1987).

3.3.4.6 Διατήρηση ενζυμικής δραστηριότητας κατά την αποθήκευση

Η διατήρηση της δραστηριότητας της 3HB4H του *Sphe3* μελετήθηκε ύστερα από αποθήκευση σε διαφορετικά μέσα συντήρησης (10% γλυκερόλη, 1% DMSO, 10% DMSO και 10% αιθανόλη) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες (4, -20 και -80 °C), για χρονική περίοδο 30 ημερών. Μετά την αποθήκευση και πριν τους ενζυμικούς προσδιορισμούς, το ενζυμικό παρασκεύασμα επώαστηκε για 30 min με 0.25 mM FAD.

Πίνακας 3.20. Δραστηριότητα της 3HB4H του *Sphe3* μετά από αποθήκευση σε διάφορες συνθήκες.

4 °C	Δραστηριότητα ενζύμου (%) μετά από:		
Μέσα διατήρησης	48 h	7 d	30 d
Καθαρό ένζυμο	98	95	90
10% αιθανόλη	40	11	3
1% DMSO	41	27	10
10% DMSO	39	22	9
10% γλυκερόλη	89	79	61
-20 °C	Δραστηριότητα ενζύμου (%) μετά από:		
Μέσα διατήρησης	48 h	7 d	30 d
Καθαρό ένζυμο	70	59	32

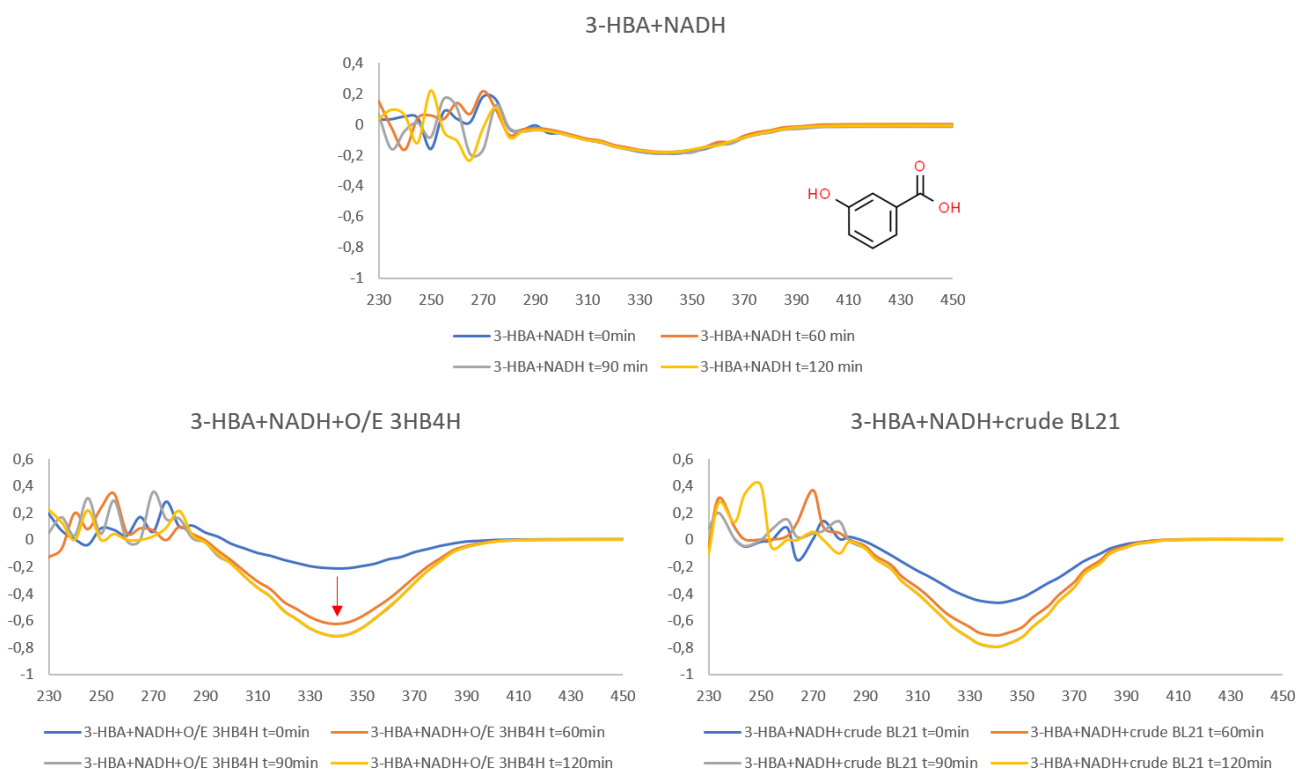
10% αιθανόλη	35	9	2
1% DMSO	38	19	8
10% DMSO	29	10	0
10% γλυκερόλη	58	49	28
-80 °C	Δραστικότητα ενζύμου (%) μετά από:		
Μέσα διατήρησης	48 h	7 d	30 d
Καθαρό ένζυμο	43	12	6
10% αιθανόλη	39	24	1
1% DMSO	44	34	2
10% DMSO	39	19	0
10% γλυκερόλη	55	43	31

Το ένζυμο φαίνεται να διατηρεί τη δραστικότητά του όταν αποθηκεύεται χωρίς κάποιο μέσο συντήρησης στους 4 °C, καθώς μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης διατηρεί το 90% της καταλυτικής του ιδιότητας. Οι χαμηλές θερμοκρασίες (-20 °C και -80 °C) φαίνεται να επηρεάζουν τη σταθερότητα του καθαρού ενζύμου, ενώ η προσθήκη γλυκερόλης στο περιβάλλον του βοηθά πιο πολύ σε σχέση με τα άλλα μέσα στη διατήρηση της δραστικότητας της 3HB4H του *Sphe3* στις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης.

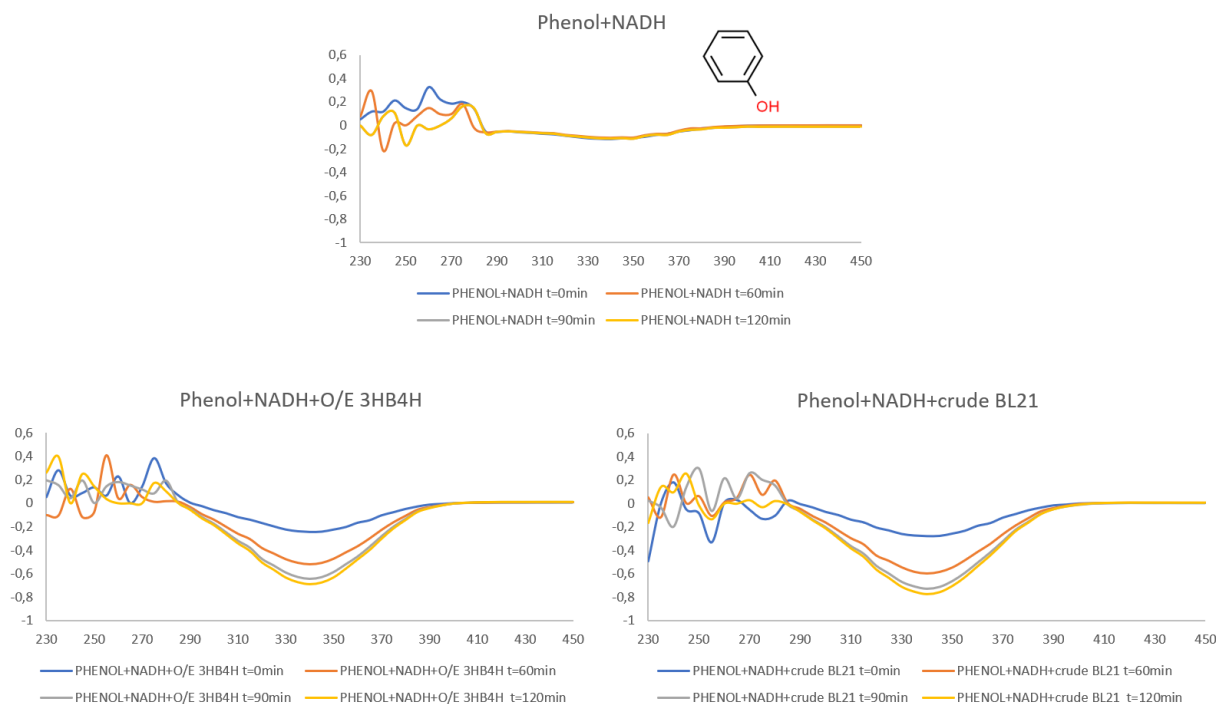
3.3.4.7 Εναλλακτικά υποστρώματα της 3HB4H του *Sphe3*

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η ικανότητα του ενζύμου να αναγνωρίζει άλλα υποστρώματα εκτός του 3-HBA με παρακολούθηση των μεταβολών στα φάσματα των αντιδράσεων μέσω UV-Vis φασματοσκοπίας. Χρησιμοποιήθηκε κυτταρικό εκχύλισμα των κυττάρων BL21 με υπερεκφρασμένο το υπό μελέτη ένζυμο και η αντίδραση περιλάμβανε NADH, ώστε να παρατηρηθούν αλλαγές στο φάσμα λόγω της οξειδωσής του στα 340 nm. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα μόνο με το υπόστρωμα και το NADH, ενώ ως επιπλέον μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το κυτταρικό εκχύλισμα των κυττάρων BL21 στη θέση του υπερεκφρασμένου ενζύμου στην αντίδραση.

Αρχικά, παρουσιάζεται το φάσμα της αντίδρασης με υπόστρωμα το 3-HBA και με κόκκινο βέλος επισημαίνεται η αλλαγή που παρατηρείται στην απορρόφηση στα 340 nm, που οφείλεται στην αξιοποίηση του NADH για την οξείδωση του υποστρώματος από το ένζυμο (Εικόνα 3.40), ενώ στο φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης του ενζύμου με υπόστρωμα τη φαινόλη δεν εντοπίζεται καμία αλλαγή (Εικόνα 3.41).

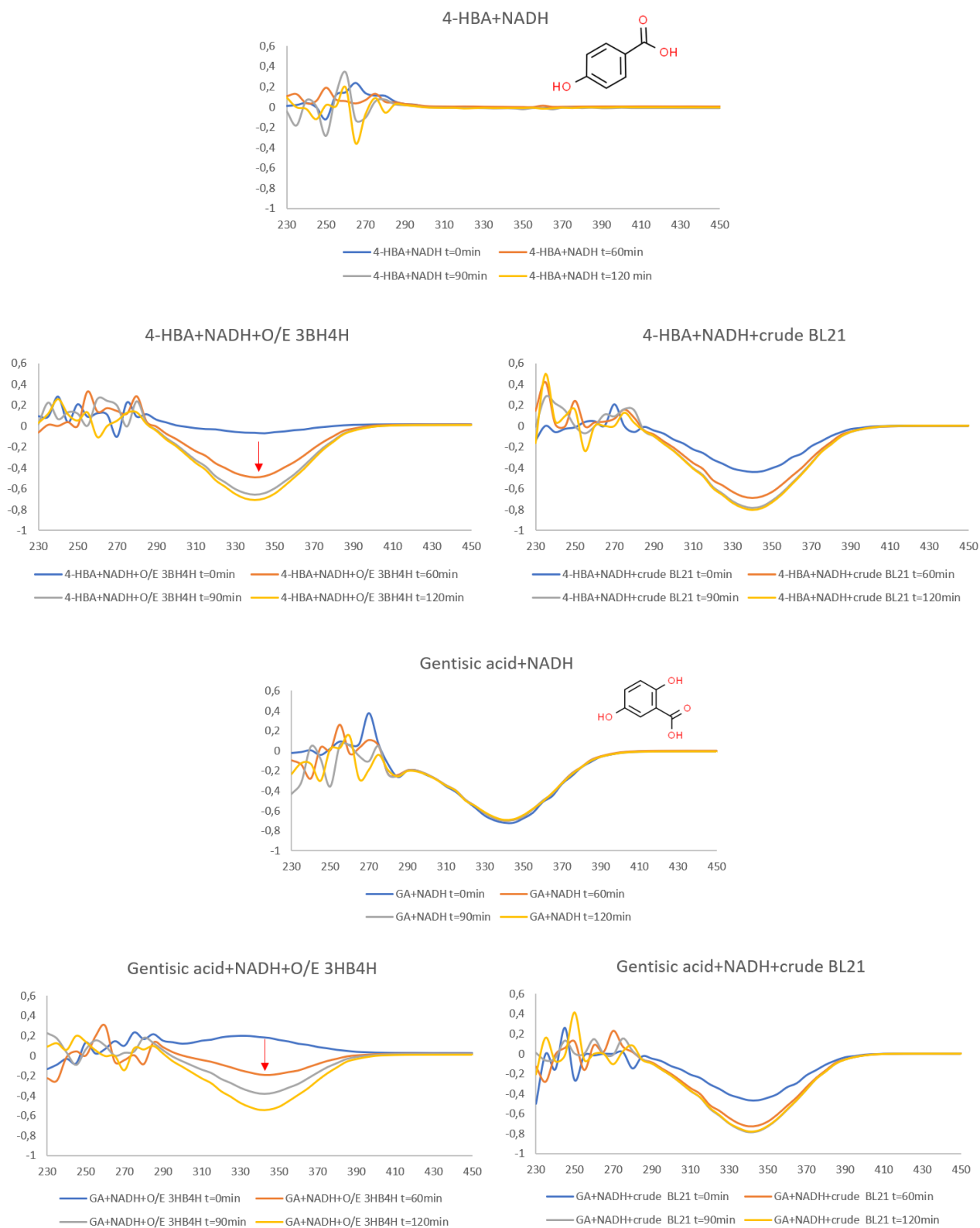


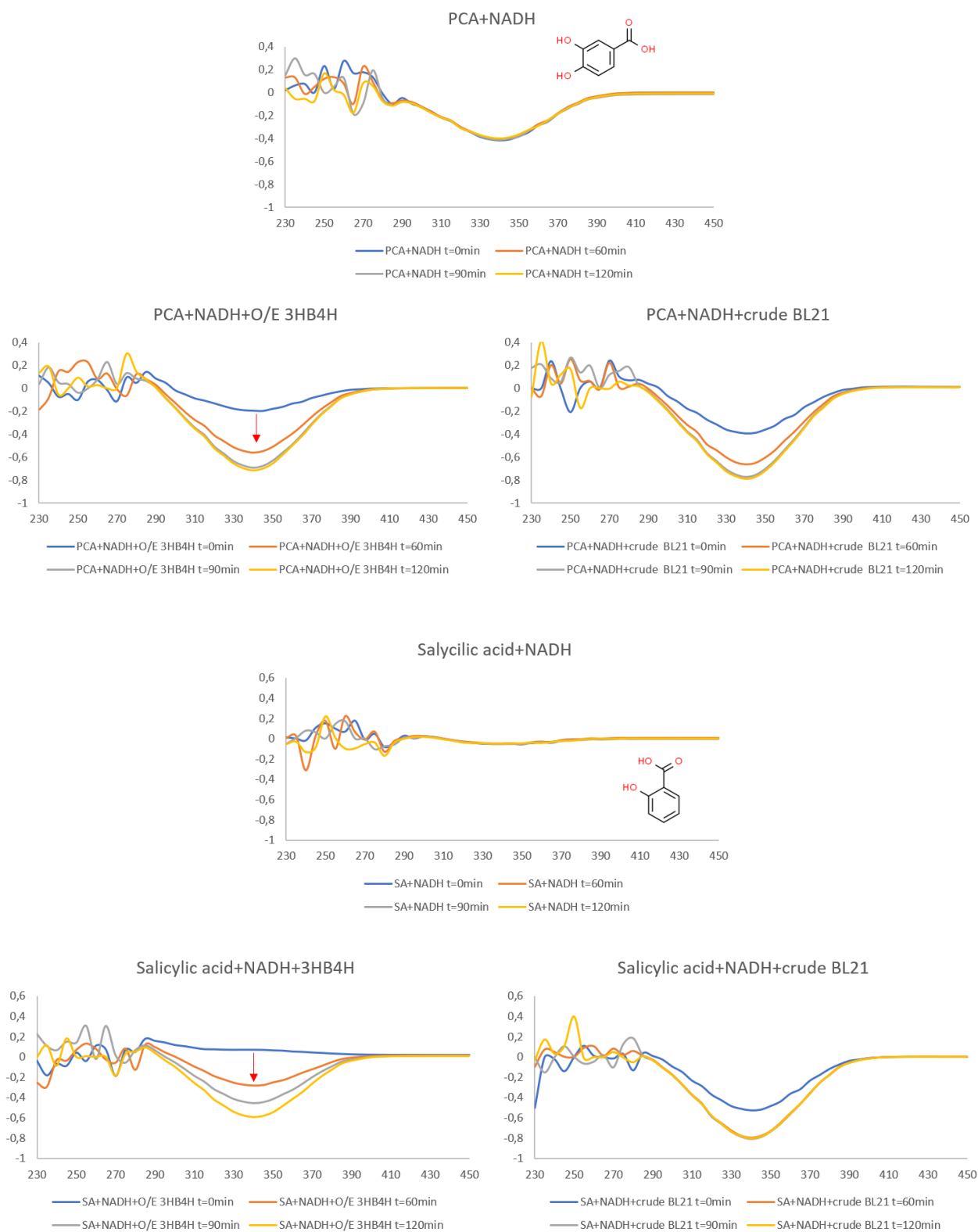
Εικόνα 3.40. Φάσμα UV-Vis της αντίδρασης της 3HB4H με υπόστρωμα το 3-HBA (γράφημα κάτω αριστερά) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (μπλε γραμμή: $t=0$ min, πορτοκαλί γραμμή: $t=60$ min, γκρι γραμμή: $t=90$ min, κίτρινη γραμμή: $t=120$ min). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το υπόστρωμα με το NADH (πάνω γράφημα). Ως επιπλέον μάρτυρας χρησιμοποιείται η αντίδραση με κυτταρικό εκχύλισμα των BL21-χωρίς το υπερεκφρασμένο ένζυμο (γράφημα κάτω δεξιά). Η αλλαγή στο φάσμα της αντίδρασης επισημαίνεται με κόκκινο βέλος και αποδίδεται στη μείωση της απορρόφησης λόγω της οξείδωσης του NADH στα 340 nm, το οποίο αξιοποιείται από το ένζυμο.

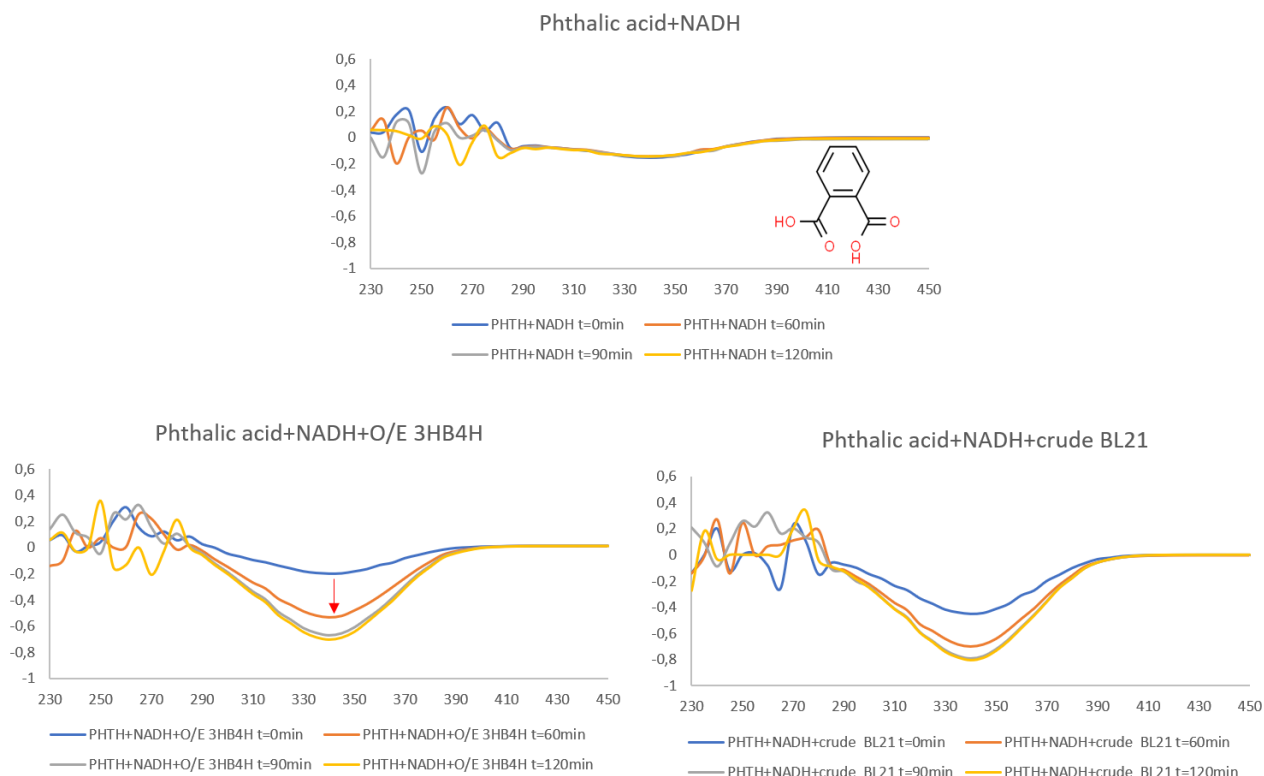


Εικόνα 3.41. Φάσμα UV-Vis της αντίδρασης της 3HB4H με υπόστρωμα τη φαινόλη (γράφημα κάτω αριστερά) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (μπλε γραμμή: $t=0$ min, πορτοκαλί γραμμή: $t=60$ min, γκρι γραμμή: $t=90$ min, κίτρινη γραμμή: $t=120$ min). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το υπόστρωμα με το NADH (πάνω γράφημα). Ως επιπλέον μάρτυρας χρησιμοποιείται η αντίδραση με κυτταρικό εκχύλισμα των BL21 χωρίς το υπερεκφρασμένο ένζυμο (γράφημα κάτω δεξιά). Η αλλαγή στο φάσμα της αντίδρασης επισημαίνεται με κόκκινο βέλος και αποδίδεται στη μείωση της απορρόφησης λόγω της οξείδωσης του NADH στα 340 nm, το οποίο αξιοποιείται από το ένζυμο.

Ακολουθούν φάσματα UV-Vis στα οποία εντοπίζονται αλλαγές λόγω της μείωσης της απορρόφησης στα 340 nm.

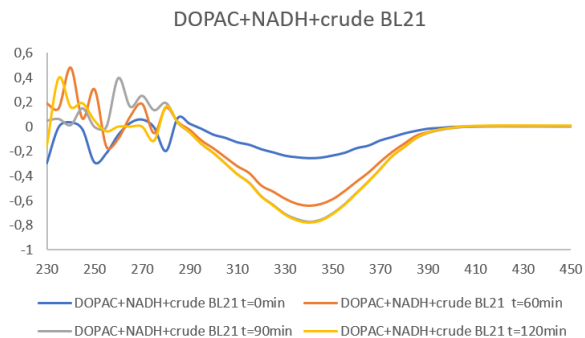
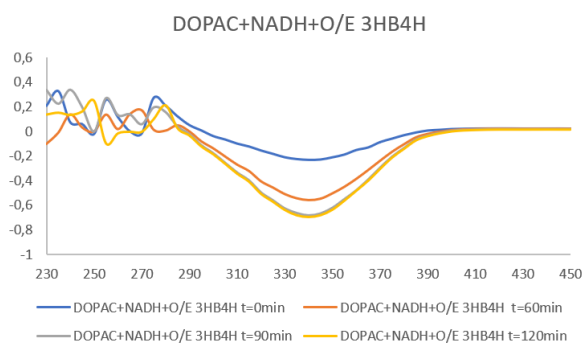
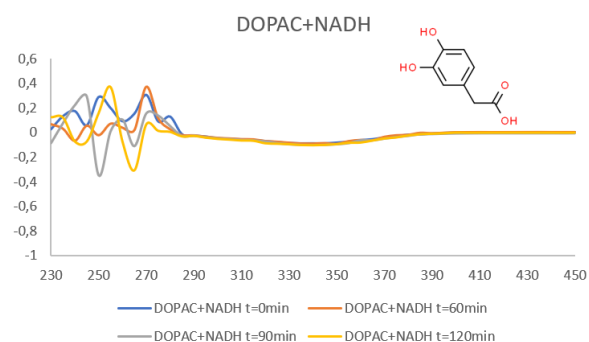
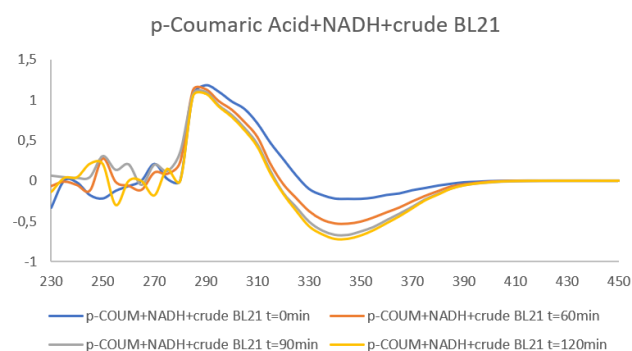
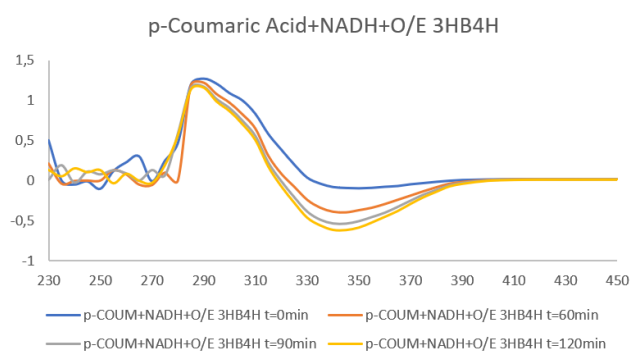
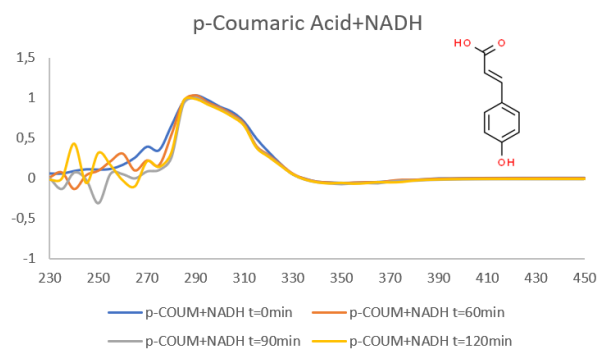


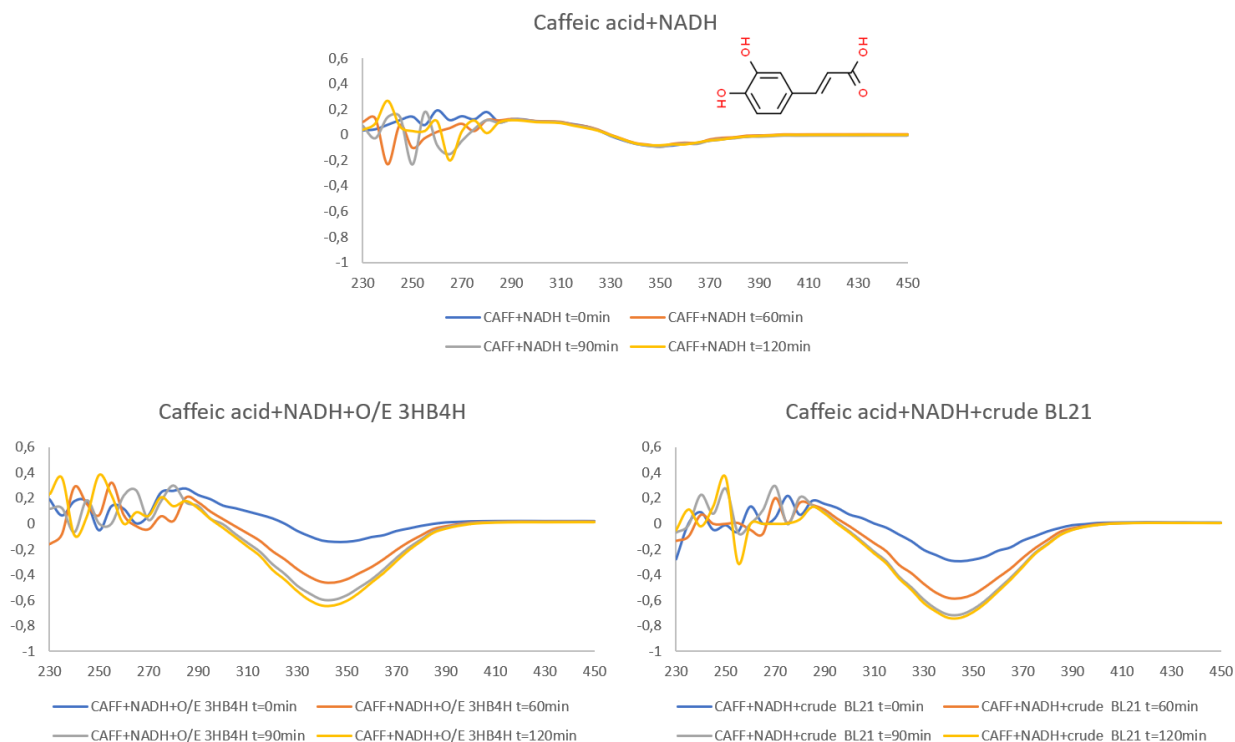




Εικόνα 3.42. Φάσματα UV-Vis της αντίδρασης της 3HB4H με υποστρώματα τα: 4-HBA, γεντισικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, σαλικυλικό οξύ και φθαλικό οξύ σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (μπλε γραμμή: $t=0$ min, πορτοκαλί γραμμή: $t=60$ min, γκρι γραμμή: $t=90$ min, κίτρινη γραμμή: $t=120$ min). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το υπόστρωμα με το NADH. Ως επιπλέον μάρτυρας χρησιμοποιείται η αντίδραση με κυτταρικό εκχύλισμα των BL21 χωρίς το υπερεκφρασμένο ένζυμο. Η αλλαγή στο φάσμα της αντίδρασης επισημαίνεται με κόκκινο βέλος και αποδίδεται στη μείωση της απορρόφησης λόγω της οξείδωσης του NADH στα 340 nm, το οποίο αξιοποιείται από το ένζυμο.

Επιπλέον, δοκιμάστηκαν ως πιθανά υποστρώματα οι εξής αρωματικές ενώσεις: *p*-κουμαρικό οξύ, ομοπρωτοκατεχοϊκό οξύ (DOPAC) και το καφεϊκό οξύ. Όμως στα φάσματα των αντιδράσεων που περιέχουν τα ενζυμικά παρασκευάσματα δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές που μπορούν να αποδοθούν μόνο στο υπερεκφρασμένο ένζυμο.





Εικόνα 3.43. Φάσματα UV-Vis της αντίδρασης της 3HB4H με υποστρώματα τα: *p*-κουμαρικό οξύ, ομοπρωτοκατεχοϊκό οξύ, και καφεϊκό οξύ σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (μπλε γραμμή: $t=0$ min, πορτοκαλί γραμμή: $t=60$ min, γκρι γραμμή: $t=90$ min, κίτρινη γραμμή: $t=120$ min). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το υπόστρωμα με το NADH. Ως επιπλέον μάρτυρας χρησιμοποιείται η αντίδραση με κυτταρικό εκχύλισμα των BL21, χωρίς το υπερεκφρασμένο ένζυμο. Δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των φασμάτων των αντιδράσεων που περιέχουν τα ενζυμικά παρασκευάσματα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν φωτομετρικοί προσδιορισμοί για τον υπολογισμό της δραστηριότητας του ενζύμου με τα υποστρώματα (4-HBA, γεντισικό οξύ, PCA, σαλικυλικό και φθαλικό οξύ) στα οποία εντοπίστηκαν αλλαγές στα φάσματα απορρόφησης των αντιδράσεών τους. Χρησιμοποιήθηκε το καθαρό ένζυμο, το οποίο επώαστηκε με 0,25 mM FAD και η αντίδραση περιείχε: 0,2 mM NADH και 0,3 mM κάθε υποστρώματος.

Πίνακας 3.21. Φωτομετρικοί προσδιορισμοί της δραστηριότητας της 3HB4H σε διάφορα υποστρώματα, μέσω της οξειδωσης του NADH στα 340 nm.

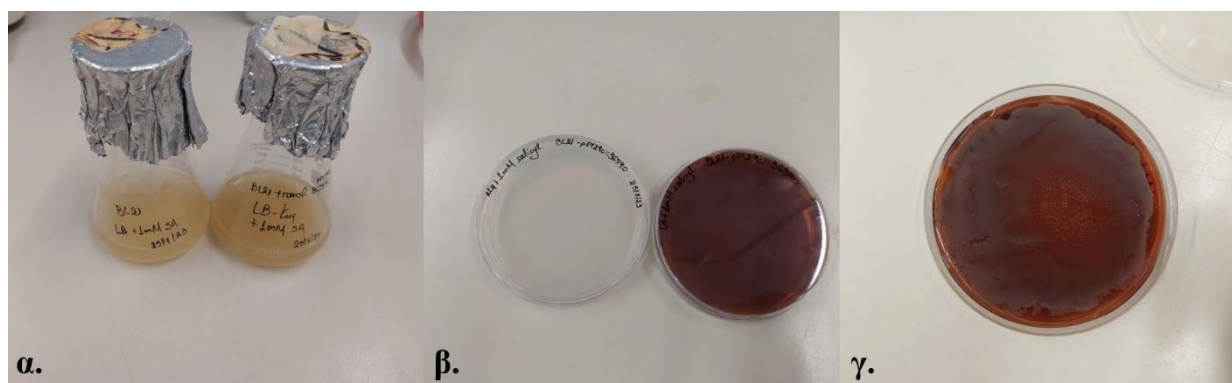
Υποστρώματα	Ενζυμική δραστηριότητα (U·mL ⁻¹)
3-HBA	0,74
4-HBA	0,08
Γεντισικό οξύ	0,02
PCA	0
Σαλικυλικό οξύ	0
Φθαλικό οξύ	0

Λόγω του ότι δεν παρατηρήθηκε δραστηριότητα υδροξυλάσης του σαλικυλικού οξέος (2-υδροξυβενζοϊκό οξύ) της 3HB4H, ακολούθησε η διερεύνηση της ύπαρξης δραστηριότητας

και μέσω χρωματομετρικού προσδιορισμού της μετατροπής του σαλικυλικού οξέος σε κατεχόλη σε υγρές και στερεές καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν τα μετασχηματισμένα BL21 με τον ανασυνδυασμένο pET29c::36590.

Μετά από επώαση δυο ημερών στο θρεπτικό μέσο που περιέχει 1 mM σαλικυλικό οξύ, σε περίπτωση ύπαρξης δραστηριότητας υδροξυλάσης του σαλικυλικού οξέος αναμένεται η αλλαγή χρώματος από κίτρινο σε καφέ στις υγρές καλλιέργειες ενώ στις στερεές η εμφάνιση μαύρου χρώματος μετά από χρώση με FeCl_3 για την κατεχόλη και σκούρο μωβ για το σαλικυλικό οξύ.

Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του χρώματος στις υγρές καλλιέργειες, ούτε στις στερεές καλλιέργειες μετά από χρώση με FeCl_3 , που θα μαρτυρούσαν το σχηματισμό κατεχόλης. Συνεπώς, τα αποτελέσματα του φωτομετρικού και του χρωματομετρικού προσδιορισμού υποδεικνύουν ότι το ένζυμο 3HB4H δεν αναγνωρίζει το σαλικυλικό οξύ ως υπόστρωμα.

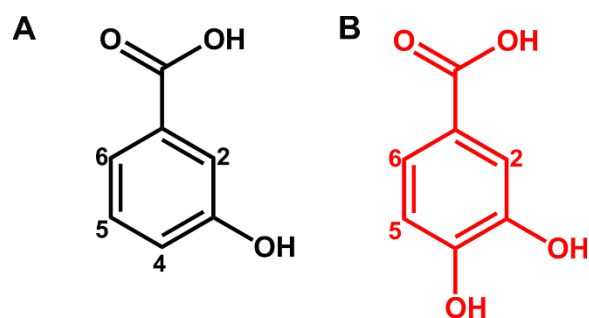


Εικόνα 3.44. Έλεγχος ύπαρξης δραστηριότητας υδροξυλάσης του σαλικυλικού οξέος της 3HB4H μέσω χρωματομετρικού προσδιορισμού της μετατροπής του σαλικυλικού οξέος σε κατεχόλη σε υγρές (α) και στερεές καλλιέργειες (β,γ) που χρησιμοποιήθηκαν τα μετασχηματισμένα BL21 με τον ανασυνδυασμένο pET29c::36590 παρουσία 1 mM σαλικυλικού οξέος. Στα τρυβλία έγινε χρώση με FeCl_3 κατά την οποία το σαλικυλικό οξύ εμφανίζεται ως σκούρο μωβ (β-δεξιά, γ). Δεν παρατηρείται μαύρο χρώμα στα τρυβλία που να υποδεικνύει την ύπαρξη της κατεχόλης.

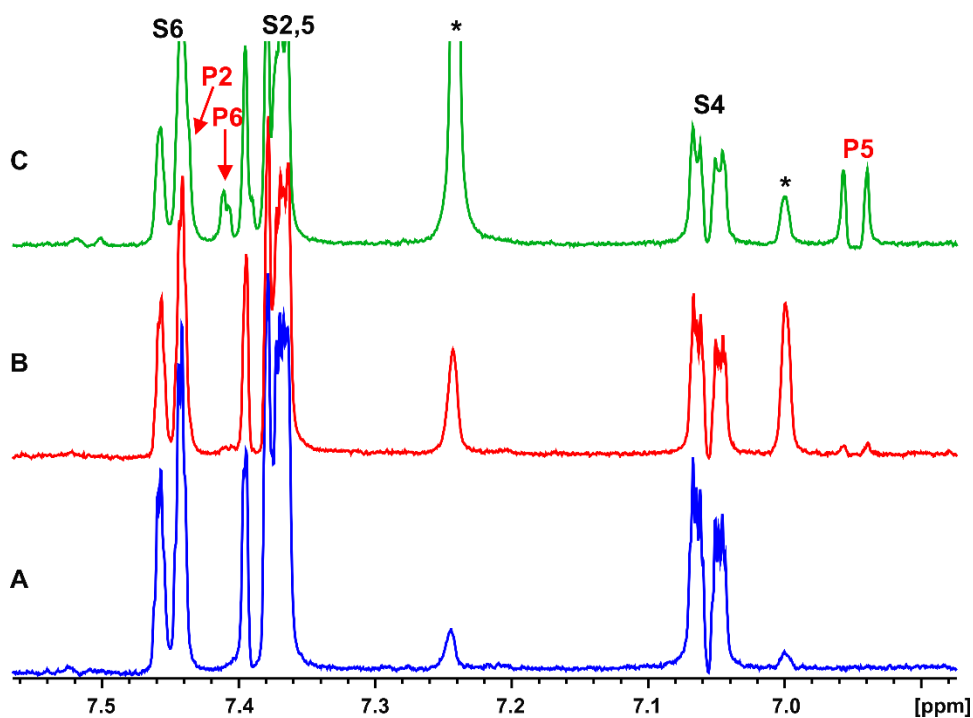
Αξίζει να σημειωθεί ότι η 3HB6H του *C. glutamicum* ATCC 13032 με $K_m=53,4 \mu\text{M}$ για το 3-HBA δεν αναγνωρίζει ως εναλλακτικά υποστρώματα τα 4-HBA, σαλικυλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό και βενζοϊκό οξύ (Y.-F. Yang et al. 2010). Ομοίως, η 3HB6H του *Micrococcus* sp. με $K_m=63 \mu\text{M}$ για το 3-HBA δεν αναγνώρισε τα 4-HBA, σαλικυλικό οξύ, πυροκατεχοϊκό και πρωτοκατεχοϊκό οξύ ως εναλλακτικά υποστρώματα (Rajasekharan, Rajasekharan, and Vaidyanathan 1990). Ωστόσο, η 3HB4H του *C. testosteroni* με $K_m=30 \mu\text{M}$ για το 3-HBA αναφέρεται ότι αναγνωρίζει ως εναλλακτικά υποστρώματα το 2,3-, 2,5-, 3,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, το 3-υδροξυανθρανιλικό οξύ και το 2-φλουορο-5- και 4-φλουορο-3-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Michalover and Ribbons 1973). Το ένζυμο 3HB4H του Sphe3 με $K_m=72.6 \mu\text{M}$ για το 3-HBA, φαίνεται να αναγνωρίζει ως εναλλακτικά υποστρώματα το 4-HBA και το γεντισικό οξύ.

3.3.4.8 Ταυτοποίηση προϊόντος αντίδρασης της 3HB4H του Sphe3 με φασματοσκοπία NMR

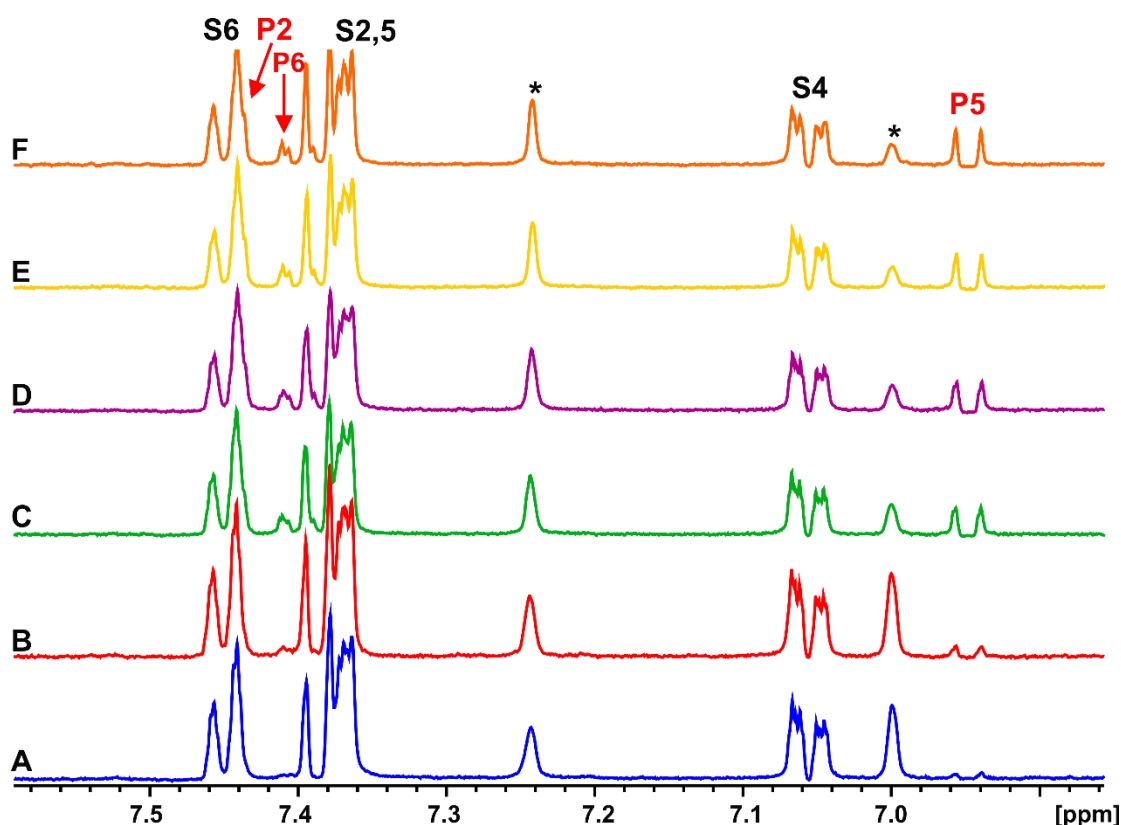
Στην Εικόνα 3.46 απεικονίζεται το 1D ^1H NMR φάσμα της αντίδρασης της 3HB4H του Sphe3 με 0.3 mM 3-HBA ως υπόστρωμα. Ως προϊόν της αντίδρασης ταυτοποιήθηκε το πρωτοκατεχοϊκό οξύ. Οι δομές του 3-HBA και του PCA παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.45.



Εικόνα 3.45. Α. Δομή του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (3-HBA) και Β. δομή του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (PCA).

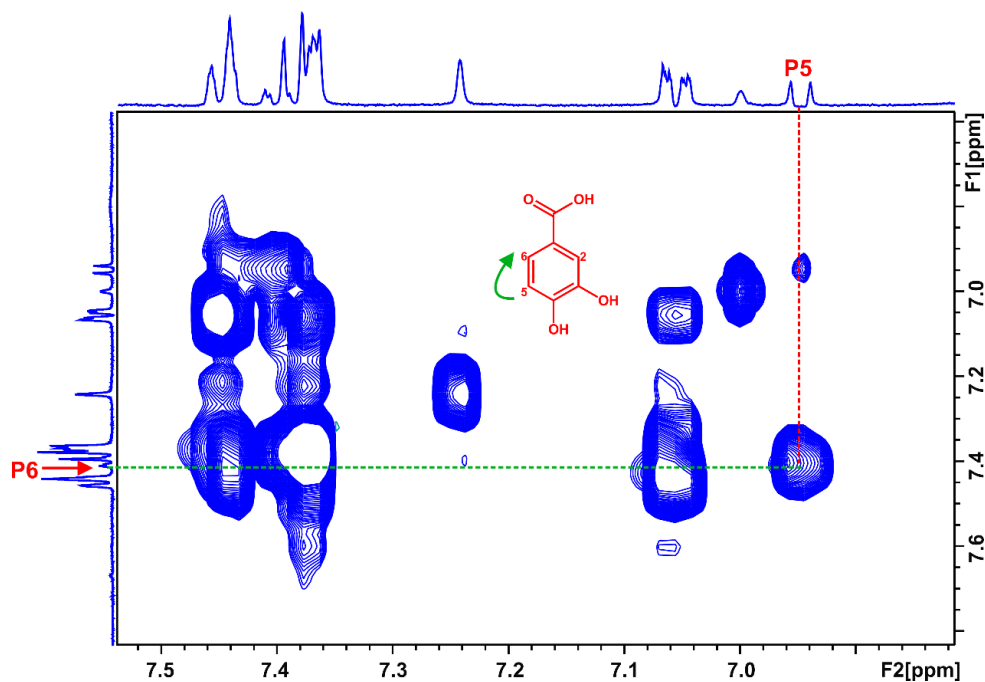


Εικόνα 3.46. ^1H NMR φάσματα της ενζυμικής μετατροπής του 3-HBA (0.3 mM) σε PCA παρουσία της 3HB4H του SphE3, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στο σωληνάκι NMR. Α. 2 μg ενζύμου, Β. 4 μg ενζύμου και C. 20 μg ενζύμου. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl pH 8 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (number of scans = 32, acquisition time = 4 s, relaxation delay = 1.5 s, total experimental time = 3 min). Με αστερίσκο υποδηλώνονται κορυφές που ανήκουν στο FAD, το NADH και το ιμιδαζόλιο.

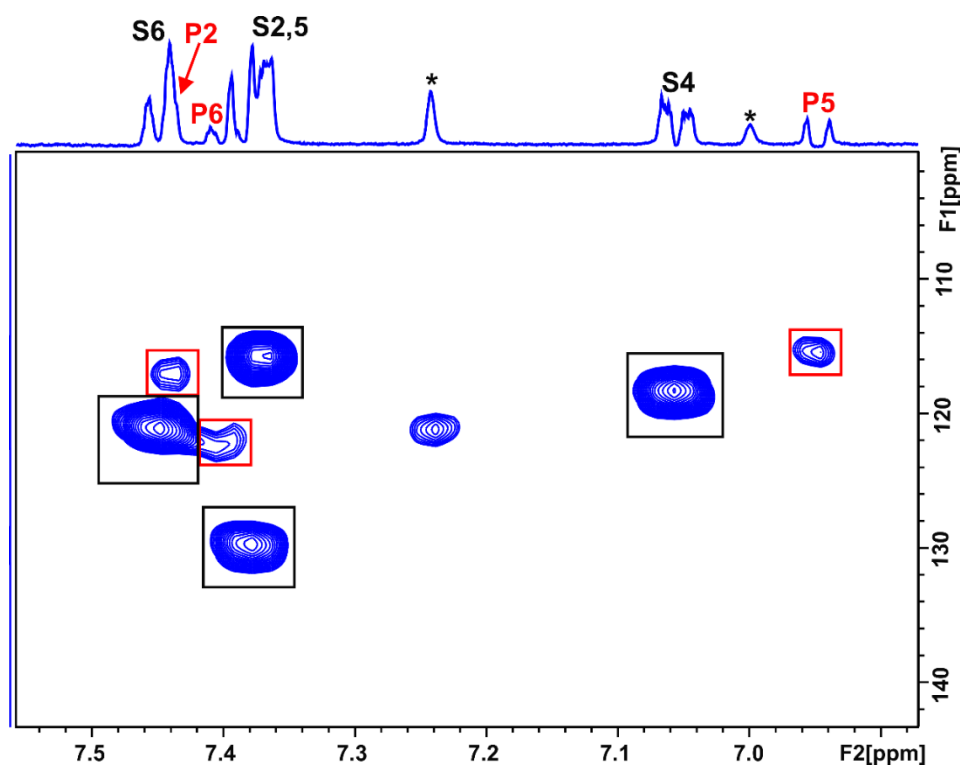


Εικόνα 3.47. *In situ* παρακολούθηση της μετατροπής του 3-HBA (0.3 mM) σε PCA παρουσία της 3HB4H του Sph3 μέσα στο σωληνάκι NMR. ^1H NMR φάσματα 5 min (A), 10 min (B), 1.5 hr (C), 2.5 hr (D), 10 hr (E) και 14 hr (F) μετά την προσθήκη του 3-OH βενζοϊκού οξέος στο διάλυμα με το ένζυμο. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl pH 8 90% H_2O /10% D_2O (number of scans = 32, acquisition time = 4 s, relaxation delay = 1.5 s, total experimental time = 3 min). Με αστερίσκο υποδηλώνονται κορυφές που ανήκουν στο FAD, το NADH και το ιμιδαζόλιο.

Η ταυτοποίηση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος ως προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης της 3HB4H του Sph3 παρουσία του υποστρώματος 3-HBA, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δυσδιάστατης φασματοσκοπίας NMR. Για το σκοπό αυτό λήφθηκαν φάσματα συσχέτισης ^1H - ^1H TOCSY 2D NMR, συσχέτισης ^1H - ^{13}C HSQC 2D NMR (Εικόνα 3.49) και συσχέτισης ^1H - ^{13}C σε απόσταση 2-4 δεσμών HMBC 2D NMR. Στο φάσμα ^1H - ^1H TOCSY NMR (Εικόνα 3.48) παρατηρήθηκε η χαρακτηριστική διασταυρούμενη κορυφή συσχέτισης του πρωτονίου H5 και του πρωτονίου H6 του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια διασταυρούμενη κορυφή με το πρωτόνιο H2 λόγω αλληλεπικάλυψης με τα πρωτόνια του υποστρώματος. Τα 2D NMR φάσματα συσχέτισης ^1H - ^{13}C HSQC και HMBC επέτρεψαν την πλήρη ταυτοποίηση των χημικών μετατοπίσεων του άνθρακα για το προϊόν της αντίδρασης. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 147.6 ppm, 117.22 ppm, 143.4 ppm, 128.7 ppm, 115.3 ppm και 122.16 ppm αποδίδονται στους άνθρακες C1, C2, C3, C4, C5 και C6 αντίστοιχα.



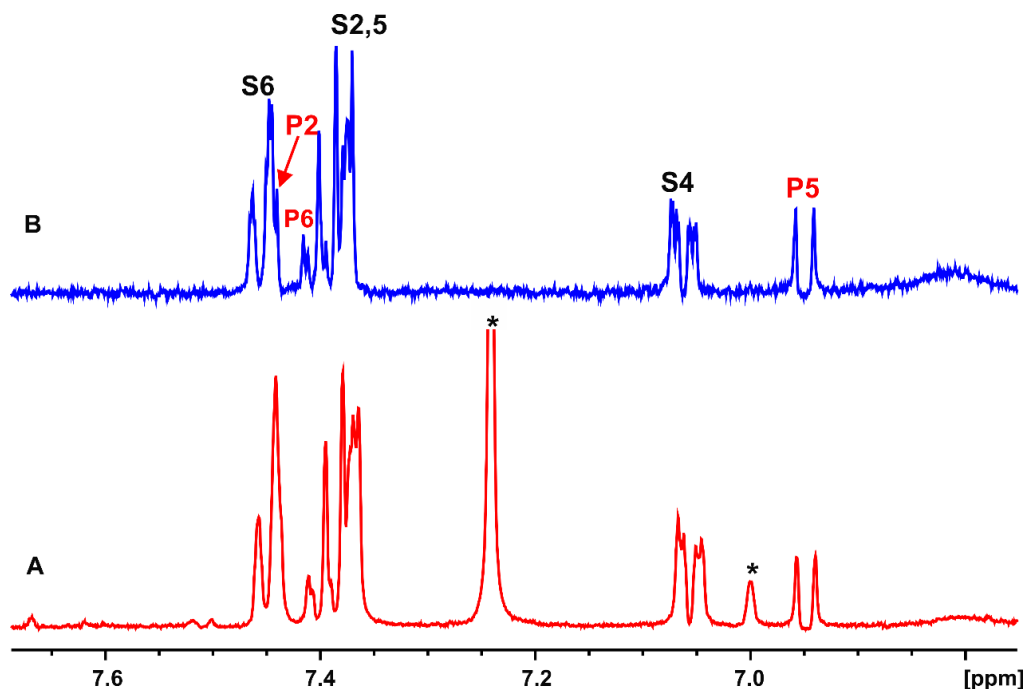
Εικόνα 3.48. Φάσμα δύο διαστάσεων συσχέτισης ^1H - ^1H TOCSY 2D NMR του πρωτοκατεχοϊκού οξέος ως προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης της 3HB4H παρουσία του 3-HBA (0.3 mM) ως υποστρώματος (number of scans =16, mixing time = 0.06 s, total experimental time = XXX).



Εικόνα 3.49. Φάσμα δύο διαστάσεων συσχέτισης ^1H - ^{13}C HSQC 2D NMR του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (κόκκινο χρώμα) ως προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης της 3HB4H παρουσία του 3-HBA (0.3 mM) ως υποστρώματος (number of scans =162, total experimental time = XXX). Με αστερίσκο υποδηλώνονται κορυφές που ανήκουν στο FAD, το NADH και το ιμιδαζόλιο.

Επιπλέον, κατέστη εφικτό να ληφθεί ^1H NMR φάσμα της μετατροπής του 3-HBA (0.3 mM) σε PCA όταν στην αντίδραση χρησιμοποιείται κυτταρικό εκχύλισμα (crude) των BL21-ελεύθερο κυττάρων με υπερεκφρασμένο το ένζυμο (Εικόνα 3.50 B), αντί για το

καθαρισμένο. Παρατηρείται ότι στο φάσμα της αντίδρασης με το καθαρό ένζυμο εντοπίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στο FAD, που προστέθηκε εξωγενώς, και στο ιμιδαζόλιο (Εικόνα 3.50 A).



Εικόνα 3.50. ¹H NMR φάσματα της ενζυμικής μετατροπής του 3-HBA (0.3 mM) σε PCA παρουσία (A) 20 μ g του καθαρού ενζύμου 3HB4H *in vitro* και (B) 40 μ g κυτταρικού εκχυλίσματος των BL21 με υπερεκφρασμένο το ένζυμο. Με αστερίσκο υποδηλώνονται κορυφές που ανήκουν στο FAD, το NADH και το ιμιδαζόλιο.

3.3.5 Παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης με την *in-cell* NMR φασματοσκοπία

Αν και η *in vitro* παρακολούθηση των ενζυμικών αντιδράσεων μπορεί να απεικονίσει αξιόπιστα τις *in vivo* διεργασίες έως ένα βαθμό, τα βιολογικά συστήματα εξακολουθούν να είναι εξαιρετικά πολύπλοκα (García-Contreras et al. 2012). Οι μελέτες ενζυμικών αντιδράσεων που επιτελούνται από καθαρισμένα ένζυμα σε κάποιο διάλυμα, συχνά αποτυγχάνουν να αποδώσουν την πραγματική φύση του κυτταρικού περιβάλλοντος λόγω του πολύπλοκου δικτύου μακρομορίων που ασκούν ταυτόχρονα διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες σε κυτταρικό επίπεδο.

Η φασματοσκοπία *in-cell* NMR αποτελεί μια ισχυρή μέθοδο για τη μελέτη της κινητικής και της συγγένειας μικρών μορίων μέσα στο κύτταρο, επιτρέποντας την *real-time* παρακολούθηση ακόμα και μέσα σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα (Luchinat and Banci 2018, 2022). Αυτή η μεθοδολογία επιτρέπει τη μελέτη ενός μορίου-στόχου διατηρώντας παράλληλα το φυσιολογικό περιβάλλον του υπό έρευνα συστήματος, είναι μη καταστροφική, λειτουργεί στις φυσιολογικές θερμοκρασίες του συστήματος και μπορεί να παρακολουθεί φαινόμενα που εξαρτώνται από το χρόνο σε πολλαπλές χρονικές κλίμακες.

Πρόσφατα, κατέστη εφικτή η μελέτη της αλληλεπίδρασης ενός μικρού μορίου με έναν ενδοκυτταρικό στόχο, την Bcl-2, σε ζωντανά ανθρώπινα κύτταρα, διευρύνοντας έτσι το εύρος των εφαρμογών του NMR ως προς τη μελέτη κάποιου προσδέτη στο φυσιολογικό του περιβάλλον εντός κυττάρου (Primikyri et al. 2018). Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η παρακολούθηση μικρών μορίων σε ζωντανά κύτταρα είναι εφικτή, γιατί αποφεύγονται

παράγοντες που εκτός κυττάρου μπορεί και να εμποδίζουν το NMR, όπως το μέγεθος πρωτεΐνης ή η σήμανση με ισότοπα (Primikyri et al. 2018).

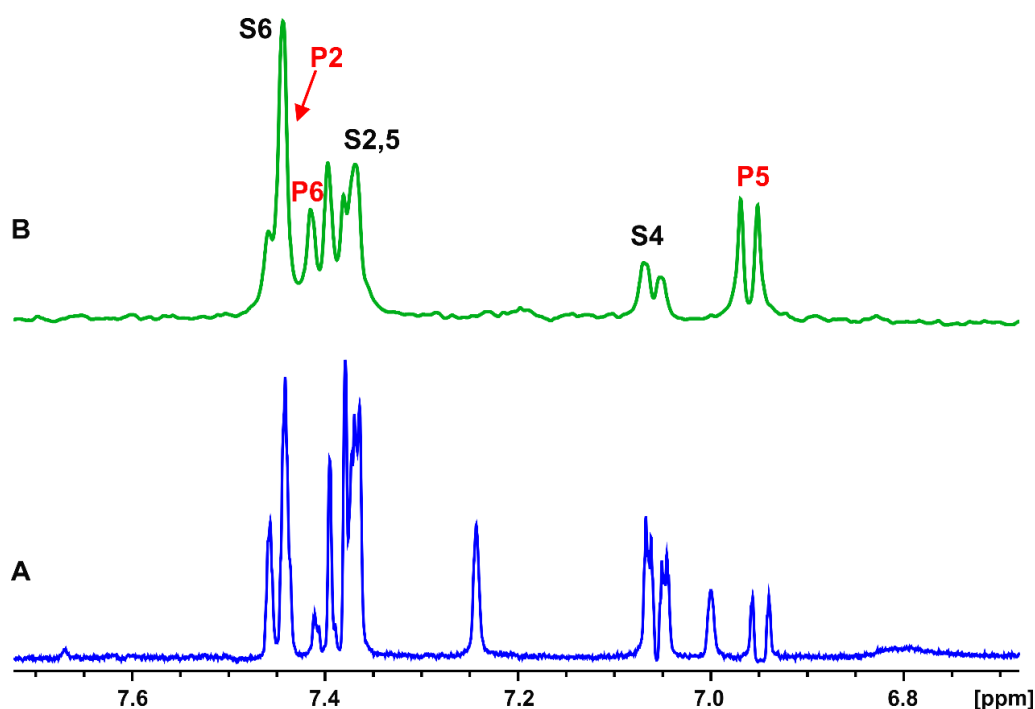
Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε η φασματοσκοπία *in-cell* NMR για τη μελέτη της δράσης της 3HB4H του Sphe3 στο φυσιολογικό της περιβάλλον, δηλαδή εντός κυττάρου. Για το λόγο αυτό, δοκιμάστηκαν ως κυτταρικό σύστημα αρχικά, τα Sphe3 και στη συνέχεια, τα BL21 με υπερεκφρασμένο το ένζυμο. Μελετήθηκαν οι αλλαγές στην ένταση των χαρακτηριστικών συντονισμών των πρωτονίων του υποστρώματος και των προϊόντων, οι οποίες καταγράφηκαν σε σχέση με τον χρόνο *in vivo*.

3.3.5.1 Δοκιμές με τα κύτταρα *Sphe3*

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με κυτταρικό εκχύλισμα κυττάρων Sphe3 και υπόστρωμα 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, Παράγραφος 2.27.2.1. Δεν κατέστη εφικτή η λήψη φάσματος στο NMR, που να ανιχνεύεται το προϊόν της αντίδρασης, πιθανώς λόγω χαμηλής συγκέντρωσης της 3HB4H στο κυτταρικό εκχύλισμα των Sphe3.

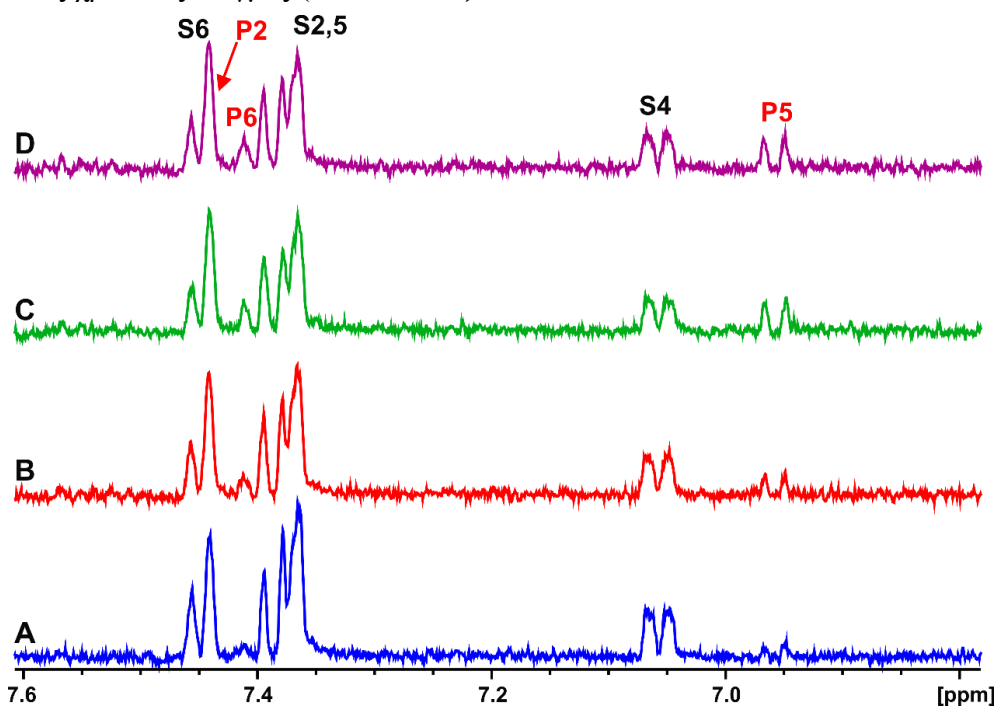
3.3.5.2 Δοκιμές με τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli:BL21(DE3)- 3HB4H*

Στο παρακάτω πείραμα (Εικόνα 3.51), κύτταρα *E.coli* BL21-pET29c::36590, τα οποία έχουν συλλεχθεί μετά από επαγωγή της υπερέκφρασης με IPTG, επωάστηκαν με 3 mM υποστρώματος 3-HBA για 5 h και στη συνέχεια λήφθηκε φάσμα ^1H NMR όπου διαπιστώθηκε η μετατροπή του 3-HBA σε PCA μέσα σε ζωντανά κύτταρα, σε μία αναλογία 1:1.7. Το φάσμα αυτό έχει εξαιρετική ποιότητα και ανάλυση δεδομένου του μεγάλου αριθμού των κυττάρων, ενώ σε φάσμα control που πραγματοποιήθηκε μόνο με τα κύτταρα δεν υπήρχε καμία κορυφή στην περιοχή άνω των 5 ppm και συνεπώς δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη με τα πρωτονιακά σήματα του υποστρώματος και του προϊόντος.



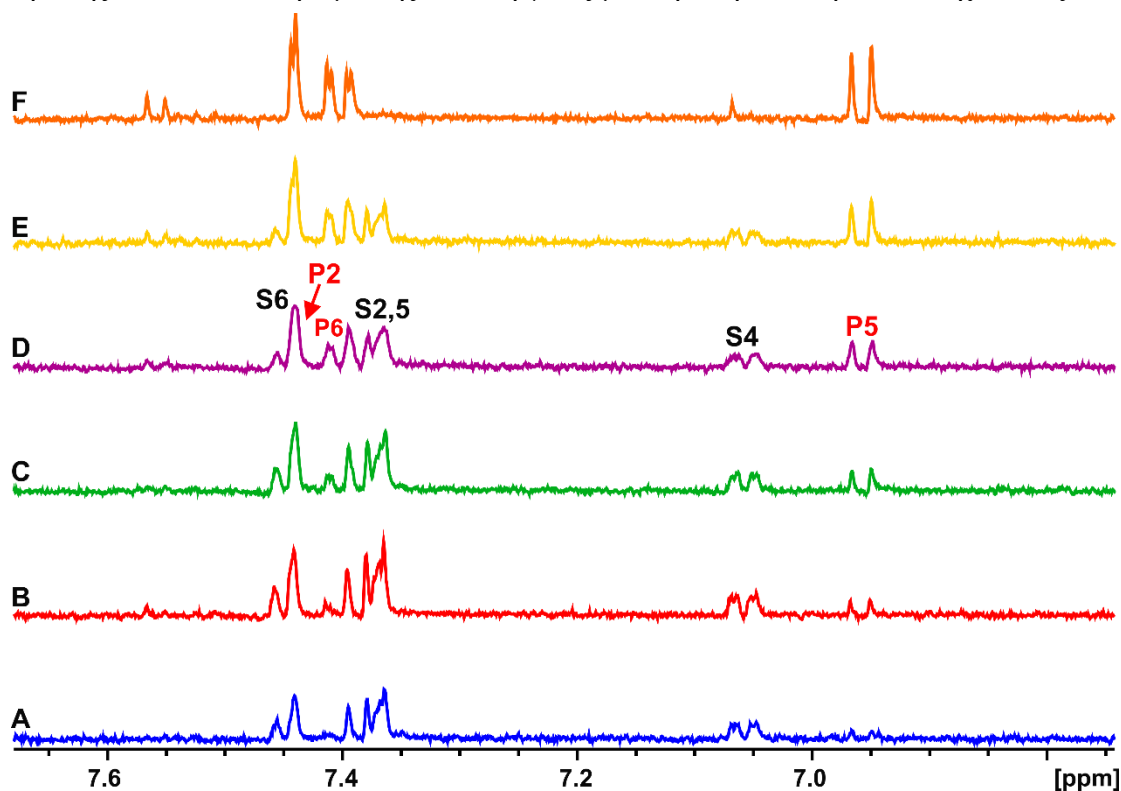
Εικόνα 3.51. ^1H NMR φάσματα της ενζυμικής μετατροπής του 3-HBA σε PCA (A) παρουσία του καθαρού ενζύμου 3HB4H *in vitro* και (B) σε κυτταρικό επίπεδο μέσα σε ζωντανά BL21 κύτταρα που υπερεκφράζουν την υδροξυλάση.

Ακολούθησε παρακολούθηση της αντίδρασης μετατροπής του 3-HBA σε PCA από την 3HB4H σε πραγματικό χρόνο μέσα σε ζωντανά κύτταρα BL21. Παρακάτω παρουσιάζονται τα ^1H NMR φάσματα της αντίδρασης που πραγματοποιήθηκε σε σωληνάκι NMR σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (Εικόνα 3.52).



Εικόνα 3.52. In-cell NMR παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της ενζυμικής αντίδρασης μετατροπής του 3-HBA (0.2 mM) σε PCA παρουσία της 3HB4H σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα. ^1H NMR φάσματα 5 min (A), 10 min (B), 20 min (C) και 30 min (D) μετά την έναρξη της αντίδρασης (number of scans = 64, acquisition time = 4 s, relaxation delay = 1.5 s, total experimental time = 6 min).

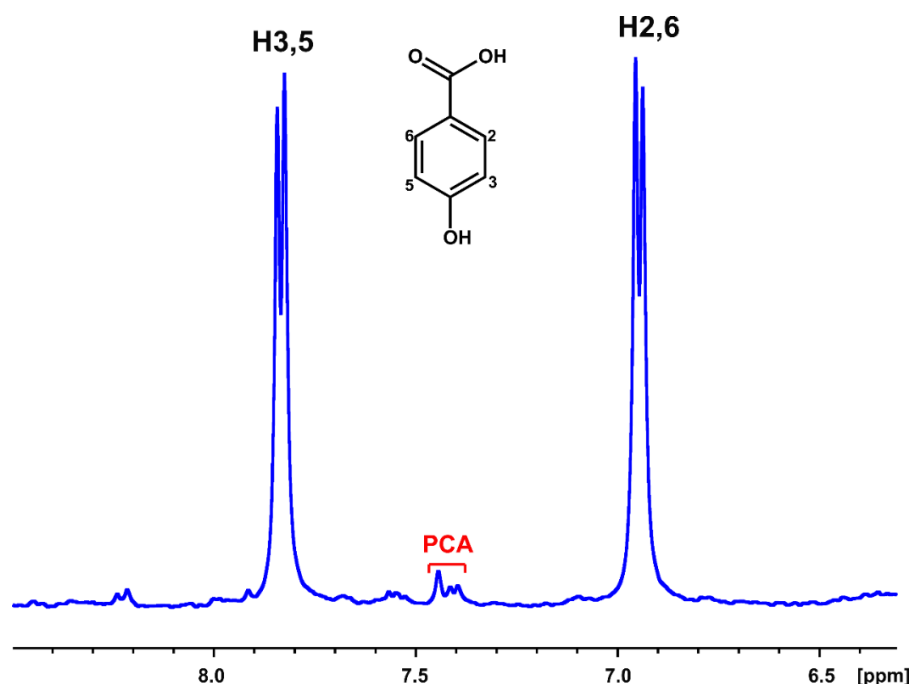
Στη συνέχεια, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με καλλιέργεια των BL21 παρουσία 3-HBA ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας, σε κωνική φιάλη η οποία επώαστηκε στους 37 °C υπό ανάδευση, και σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (Εικόνα 3.53) ελήφθησαν δείγματα με ζωντανά BL21 κύτταρα για τα οποία στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απευθείας μελέτη με ^1H NMR φασματοσκοπία. Είναι χαρακτηριστικό ότι 4 ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης όλο το υπόστρωμα της καλλιέργειας μετατράπηκε σε πρωτοκατεχοϊκό οξύ.



Εικόνα 3.53. In-cell NMR παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης μετατροπής του 3-HBA (0.2 mM) σε PCA παρουσία της 3HB4H σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα BL21. ^1H NMR φάσματα 5 min (A), 15 min (B), 35 min (C), 50 min (D), 1hr (E) και 4hr (F) μετά την έναρξη της αντίδρασης. (number of scans = 64, acquisition time = 4 s, relaxation delay = 1.5 s, total experimental time = 6 min).

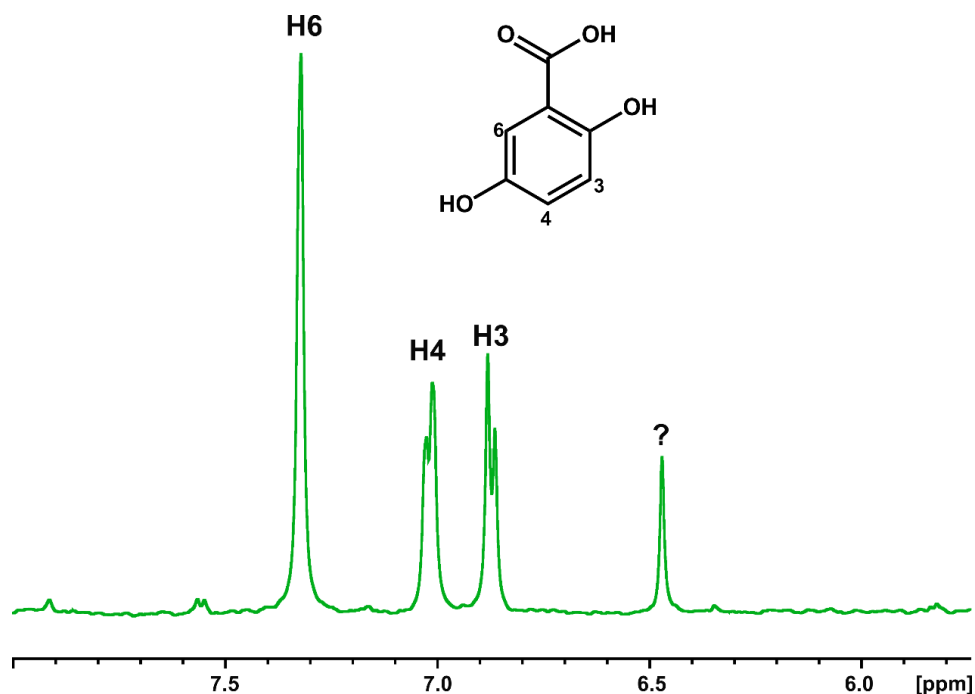
Μετά την επίτευξη της παρακολούθησης της ενζυμικής αντίδρασης μέσα στο κύτταρο, δοκιμάστηκε και η αναγνώριση εναλλακτικών υποστρωμάτων από την υπερεκφρασμένη 3HB4H του Sphe3.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το 4-HBA ως υπόστρωμα και αναγνωρίστηκε ως προϊόν της αντίδρασης το PCA (Εικόνα 3.54), αν και σε αρκετά χαμηλή συγκέντρωση, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα των φασμάτων απορρόφησης και των φωτομετρικών προσδιορισμών ότι το ένζυμο αναγνωρίζει εκτός του 3-HBA, και το 4-HBA.



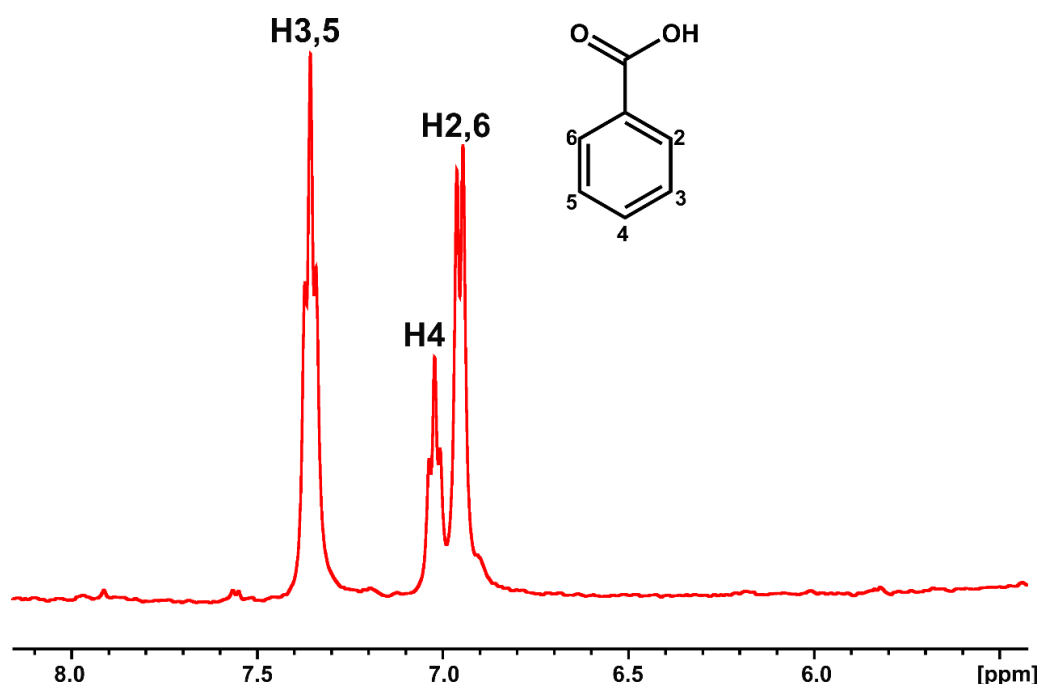
Εικόνα 3.54. In-cell ^1H NMR σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα BL21 με υπερεκφρασμένη την 3HB4H παρουσία 4-HBA και ανίχνευση του PCA ως προϊόν.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το γεντισικό οξύ ως εναλλακτικό υπόστρωμα της 4-υδροξυλάσης του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος σε κύτταρα BL21 στα οποία έχει υπερεκφραστεί το ένζυμο. Εντοπίζεται το υπόστρωμα καθώς και μια μη ταυτοποιημένη κορυφή (Εικόνα 3.55).



Εικόνα 3.55. In-cell ^1H NMR σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα BL21 με υπερεκφρασμένη την 3HB4H παρουσία γεντισικού οξέος.

Τέλος, δοκιμάστηκε και η φαινόλη ως εναλλακτικό υπόστρωμα του ενζύμου της 3HB4H για παρακολούθηση μέσα σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα, όμως στο ^1H NMR φάσμα ανιχνεύτηκαν μόνο οι κορυφές που αντιστοιχούν στη φαινόλη (Εικόνα 3.56).



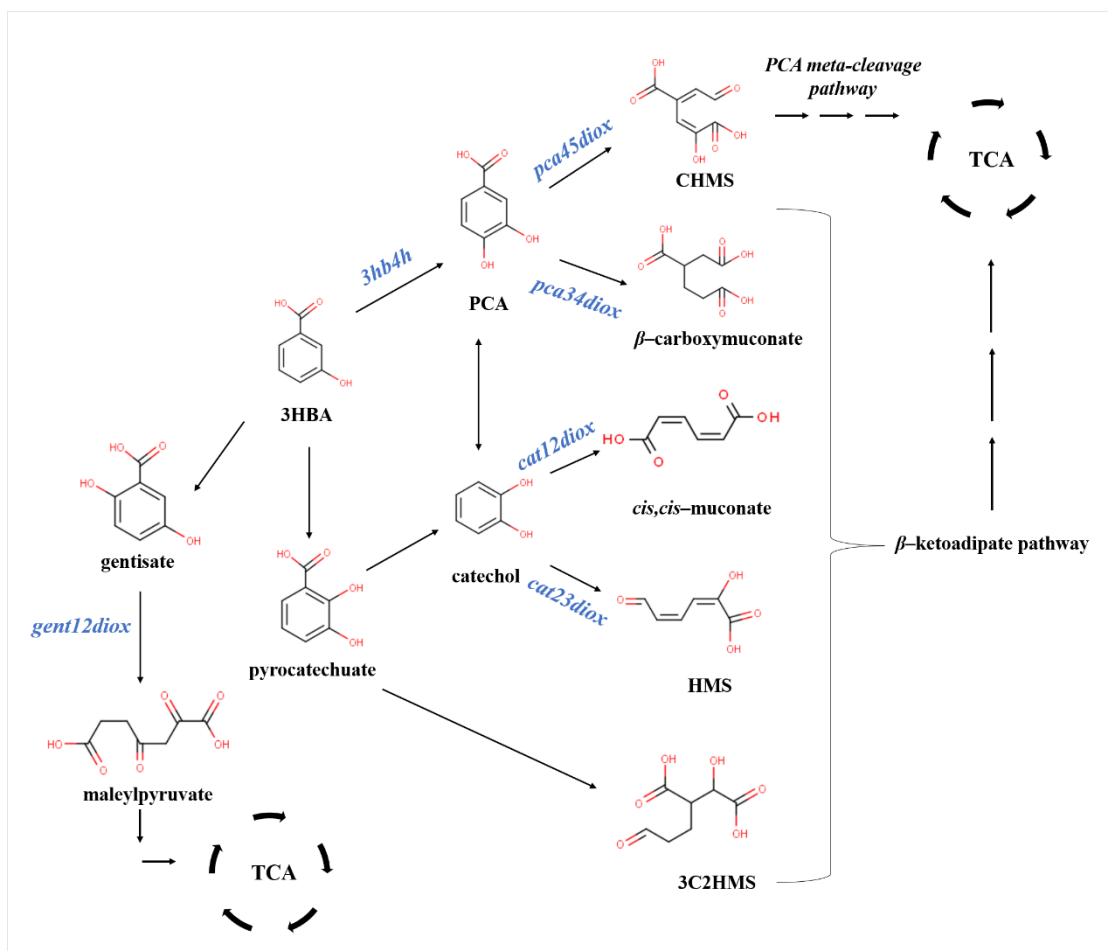
Εικόνα 3.56. In-cell ^1H NMR σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα BL21 με υπερεκφρασμένη την 3HB4H παρουσία φαινόλης.

3.3.6 Μελέτη έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό του 3-HBA

Στη συνέχεια και αφού το προϊόν του γονιδίου Asphe3_36590 έδειξε να έχει την ενεργότητα της 3HB4H και όχι της PHH, πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης του γονιδίου αυτού σε κύτταρα που αναπτύσσονται παρουσία 3-HBA προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συμμετοχή του στον καταβολισμό του 3-HBA από τα κύτταρα Sphe3. Παράλληλα, επειδή στο γονιδίωμα του Sphe3 εντοπίζονται και άλλα γονίδια που δυνητικά συμμετέχουν στον καταβολισμό του 3-HBA καθώς αυτός εξελίσσεται μέσω κοινών κατεχολικών καταβολικών ενδιάμεσων: του PCA, του γεντισικού οξέος και της κατεχόλης, πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης και αυτών των γονιδίων (Πίνακας 3.22, Εικόνα 3.57).

Πίνακας 3.22. Γονίδια του Sphe3 που πιθανά συμμετέχουν στον καταβολισμό του 3-HBA και επιλέχθηκαν για μεταγραφομική μελέτη.

Γονίδια του Sphe3 (JGI/IMG)	Ένζυμο	Σύντομη ονομασία γονιδίου
Asphe3_36590	3HB4H	<i>3hb4h</i>
Asphe3_35170	1,2-CDO	<i>cat12diox</i>
Asphe3_40510	2,3-CDO	<i>cat23diox</i>
Asphe3_38860	3,4-PCD	<i>pca34diox</i>
Asphe3_42380	4,5-PCD	<i>pca45diox</i>
Asphe3_39840	1,2-GDO	<i>gent12diox</i>

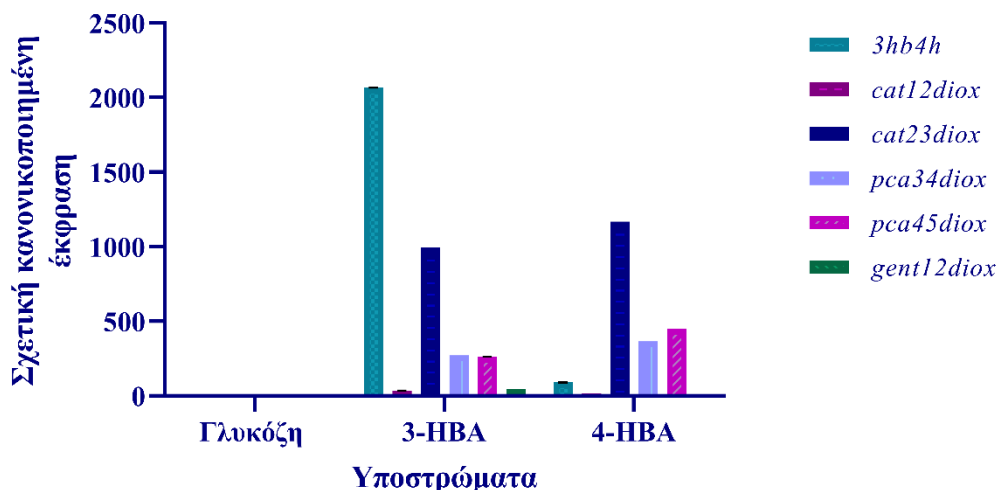


Εικόνα 3.57. Πιθανή πορεία καταβολισμού του 3-HBA στο στέλεχος *Sphe3*. Με μπλε αναγράφεται η σύντομη ονομασία του γονιδίου κάθε ενζύμου που συμμετέχει στο μονοπάτι και εντοπίζεται στο γονιδίωμα του *Sphe3*.

Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα *Sphe3* αναπτύχθηκαν παρουσία γλυκόζης (400 gr/L) ή 3-HBA (5 mM), ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας, μέχρι το μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης και απομονώθηκε το RNA των κυττάρων. Αφού αξιολογήθηκε η ποιότητα και η ποσότητά του (Παράρτημα Εικόνα Π4), τα δείγματα μετατράπηκαν σε cDNA και ακολούθησε Real-Time qPCR για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων.

Επίσης, επειδή το ένζυμο 3HB4H εμφάνισε χαμηλή δραστηριότητα και έναντι του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθούν τα επίπεδα της μεταγραφής του αντίστοιχου γονιδίου *Asphe3_36590* καθώς και των άλλων γονιδίων που κωδικεύουν ένζυμα της μεταβολικής πορείας του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος στο *Sphe3* και παρουσία του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος ως μοναδικής πηγής άνθρακα, προκειμένου να διερευνηθεί η στοχευμένη ή μη επαγωγή των γονιδίων.

Τα επίπεδα του mRNA για τα επιλεγμένα γονίδια προσδιορίστηκαν σε σχέση με την ποσότητα mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB* και κάθε δείγμα κανονικοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αυτού. Κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες με χρήση εκμαγείου ολικού RNA καθορισμένης συγκέντρωσης (5, 2, 1, 0,5, 0,2 και 0,1 ng) από κύτταρα ανεπτυγμένα σε γλυκόζη, το οποίο ενισχύθηκε με τη χρήση κατάλληλου για κάθε γονίδιο ζεύγους πριμοδοτικών μορίων. Οι πρότυπες καμπύλες των γονιδίων περιλαμβάνονται στο (Παράρτημα Εικόνα Π5).



Εικόνα 3.58. Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοτικοποίησης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων του στελέχους *Sphe3* σε υποστρώματα γλυκόζης και 3-HBA. Το mRNA των γονιδίων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υποστρώμα γλυκόζης έχουν χρησιμοποιηθεί ως βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τοπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

Πίνακας 3.23. Τιμές των επιπέδων μεταγραφής των γονιδίων του *Sphe3* που εμπλέκονται στον καταβολισμό των 3-HBA και 4-HBA σε σύγκριση με τη γλυκόζη.

Υποστρώματα	Γονίδια του <i>Sphe3</i>					
	<i>3hb4h</i>	<i>cat12diox</i>	<i>cat23diox</i>	<i>pca34diox</i>	<i>pca45diox</i>	<i>gent12diox</i>
Γλυκόζη	1±0,52	1±0,47	1±0,48	1±0,50	1±0,48	1±0,47
3-HBA	2066±0,2	35±0,18	993±0,13	272±0,18	262±0,14	46±0,19
4-HBA	90±0,24	15±0,08	1167±0,15	365±0,2	448±0,16	5±0,11

Τα αποτελέσματα της μεταγραφομικής ανάλυσης των επιλεγμένων γονιδίων παρουσιάζουν ισχυρή επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου *3hb4h* (πάνω από 2000 φορές), όταν το *Sphe3* αναπτύσσεται παρουσία του 3-HBA ως μοναδικής πηγής άνθρακα έναντι της γλυκόζης (Πίνακας 3.23), που υπογραμμίζει την άμεση εμπλοκή του αντίστοιχου ενζύμου στον καταβολισμό του 3-HBA. Η μετρήσιμη δραστηριότητα της 3HB4H (Παράγραφος 3.3.2) σε συνδυασμό με την επαγωγή της έκφρασης αποδεικνύουν ότι στο *Sphe3* το PCA αποτελεί ενδιάμεσο μεταβολίτη του καταβολισμού του 3-HBA, όπως έχει αναφερθεί και για το *Comamonas testosteroni* GZ39 (Chang and Zylstra 2008). Επίσης εμφανίζεται επαγωγή της μεταγραφής των δύο γονιδίων που εμπλέκονται στη *ortho*- και *meta*-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (*pca34diox* και *pca45diox* αντίστοιχα). Συγκεκριμένα, τα γονίδια *pca34diox* και *pca45diox*, που κωδικεύουν την 3,4- και 4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος αντίστοιχα, παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης (Πίνακας 3.23), δηλαδή φαίνεται να είναι εξίσου ενεργές και οι δύο πορείες σχάσης του PCA. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που παρατηρείται ταυτόχρονη επαγωγή της πορείας της 3,4- και της 4,5-σχάσης του PCA κατά τον καταβολισμό του 3-HBA από βακτήρια, καθώς το στέλεχος *Sphe3* έχει την ιδιαιτερότητα να περιλαμβάνει τις γενετικές πληροφορίες και για τα

δύο ένζυμα στο γονιδίωμά του. Η επαγωγή της *ortho*-σχάσης του PCA στην πορεία καταβολισμού του 3-HBA έχει αναφερθεί μόλις άλλη μία φορά, στο στέλεχος *Bacillus* sp. OS13 (Mulla et al. 2016), ενώ υπάρχουν λίγες αναφορές για την εξέλιξη του καταβολισμού του 3-HBA μέσω της *meta*-σχάσης του PCA, κυρίως σε στελέχη *Comamonas testosteroni* (Ni et al. 2013; Michalover and Ribbons 1973; Yoshida et al. 2007).

Ο καταβολισμός του 3-HBA μπορεί επίσης να διεξαχθεί και μέσω του 2,3-διυδροξυβενζοϊκού οξέος (πυροκατεχοϊκού οξέος) και της κατεχόλης όπως έχει αναφερθεί για στο στέλεχος *Pseudomonas putida* BS893 (Staronoytov et al. 1985).

Στο *Sphe3* δεν εντοπίζονται γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του 2,3-διυδροξυβενζοϊκού οξέος, ενώ φαίνεται να υπάρχει σημαντική επαγωγή στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης (~993 φορές) με τη *meta*-σχάση της κατεχόλης να προτιμάται έναντι της *ortho*-σχάσης για τον καταβολισμό του 3-HBA. Η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων σχάσης της κατεχόλης χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, καθώς η κατεχόλη μπορεί να προκύψει ως ενδιάμεσος μεταβολίτης του καταβολισμού του 3-HBA μέσω αποκαρβοξυλίωσης είτε του PCA είτε του πυροκατεχοϊκού οξέος από κάποια αποκαρβοξυλάση και στο *Sphe3* δεν έχει εντοπιστεί ένζυμο με αυτή τη δραστηριότητα μέχρι στιγμής.

Η πιο μελετημένη πορεία καταβολισμού του 3-HBA πραγματοποιείται με τη δράση μιας 6-υδροξυλάσης του 3-HBA (3HB6H) που υδροξυλιώνει το 3-HBA προς γεντισικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια εισέρχεται στον βασικό μεταβολισμό του κυττάρου μέσω της δράσης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος. Η μετατροπή του 3-HBA προς γεντισικό οξύ έχει αναφερθεί σε διάφορα στελέχη: *Klebsiella pneumoniae* (Suarez et al. 1995), *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867 (Gao et al. 2005), *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 (Park et al. 2007), *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Y.-F. Yang et al. 2010), *Rhodococcus jostii* RHA1 (Montersino and Van Berkel 2012), *Martelella* sp. AD-3 (X. Chen et al. 2018). Στο στέλεχος *Sphe3* φαίνεται να επάγεται επίσης αν και σε μικρότερο βαθμό η μεταγραφή του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος, (~46 φορές περισσότερο όταν το στέλεχος αναπτύσσεται παρουσία 3-HBA σε σχέση με τη γλυκόζη) υποδηλώνοντας ότι η πορεία καταβολισμού του 3-HBA στο *Sphe3* μέσω του γεντισικού οξέος πιθανώς είναι ενεργή, αλλά όχι σε σημαντικό βαθμό και σίγουρα δεν είναι η επικρατέστερη.

Όσον αφορά στην έκφραση του γονιδίου *Asphe3_36590* (*3hb4h*) όταν το *Sphe3* αναπτύσσεται παρουσία του 4-HBA ως μοναδική πηγή άνθρακα σημειώνεται μια μικρή επαγωγή (90 φορές) σε σχέση με την έκφρασή του στη γλυκόζη, αλλά σε σύγκριση με την αντίστοιχη μελέτη στο 3-HBA, η επαγωγή είναι ελάχιστη (Πίνακας 3.23). Επίσης, τα γονίδια καταβολισμού της κατεχόλης επάγονται παρουσία του 4-HBA με ισχυρότερη την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης (~1200 φορές) υποδηλώνοντας ότι η *meta*-σχάση της κατεχόλης προτιμάται έναντι της *ortho*-σχάσης και για τον καταβολισμό του 4-HBA. Επιπλέον, σημαντική επαγωγή στην έκφρασή τους παρουσιάζουν και τα δύο γονίδια καταβολισμού του PCA, που υποδηλώνει την εμπλοκή τους στο μεταβολισμό του 4-HBA μέσω στο *Sphe3*.

Συνεπώς, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα το γονίδιο *Asphe3_36590* φαίνεται να κατέχει κύριο ρόλο στον καταβολισμό του 3-HBA στο *Sphe3*, ενώ δεν φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στον καταβολισμό του 4-HBA, όπως υποδηλώνεται και από τα

αποτελέσματα των φωτομετρικών προσδιορισμών της δραστηριότητας του ενζύμου (Πίνακας 3.21), από τα φάσματα UV/Vis των αντιδράσεων (Εικόνα 3.42) και από τα φάσματα στο NMR (Εικόνα 3.54).

3.4 Συμπεράσματα

Το στέλεχος *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 είναι ικανό να καταβολίζει τη φαινόλη σε συγκέντρωση μέχρι και 1500 mg/L αξιοποιώντας τη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η βιοπληροφορική ανάλυση στο γονιδίωμα του Sphe3 κατέληξε στον εντοπισμό γονιδίων που κωδικεύουν ένζυμα που δυνητικά συμμετέχουν στην πορεία καταβολισμού της φαινόλης, όπως η υδροξυλάση της φαινόλης (Asphe3_36590) και οι 1,2- και 2,3-διοξυγονάσες της κατεχόλης (Asphe3_35170 και Asphe3_40510 αντίστοιχα). Εντοπίστηκαν επίσης γονίδια που αντιστοιχούν σε ένζυμα της πορείας *ortho*-σχάσης της κατεχόλης, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν γονίδια που να συμμετέχουν στην πορεία της *meta*-σχάσης της κατεχόλης, εκτός του γονιδίου για την 2,3-CDO.

Η μεταγραφή και των τριών γονιδίων (Asphe3_36590, Asphe3_35170, Asphe3_40510) επάγεται όταν το στέλεχος αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης (500 mg/L), με πιο σημαντική επαγωγή αυτή του γονιδίου της 1,2-CDO.

Ενζυμικό παρασκεύασμα κυττάρων Sphe3 αναπτυγμένα παρουσία 500 mg/L φαινόλης δεν εμφάνισε δραστηριότητα της 2,3- CDO. Με HPLC ανάλυση ταυτοποιήθηκε η κατεχόλη ως προϊόν του καταβολισμού της φαινόλης από τα κύτταρα Sphe3, ενώ ταυτοποιήθηκε και το ccMA ως ενδιάμεσος μεταβολίτης, ο οποίος αποτελεί το προϊόν της διάσπασης της κατεχόλης από την 1,2- CDO. Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω ευρημάτων επιβεβαιώνει την επικράτηση της πορείας *ortho*-σχάσης της κατεχόλης για το μεταβολισμό της φαινόλης στο Sphe3.

Η 1,2-CDO του Sphe3 εμφάνισε βέλτιστα pH και θερμοκρασία δράσης 8 και 30 °C, αντίστοιχα. Σε αντίθεση με την πληθώρα των ενδοδιολικών διοξυγονασών της κατεχόλης των οποίων η δράση ενισχύεται από Fe(III), η δραστηριότητα της 1,2-CDO του Sphe3 ενισχύεται και από το Fe(II) και μάλιστα πιο πολύ σε σχέση με τον Fe(III). Επιπλέον, η δραστηριότητα του ενζύμου αναστέλλεται έντονα από τα ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου, αλλά και από το EDTA. Η 1,2-CDO ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten με $V_{\max} = 3,041 \mu\text{M}/\text{min}$ και $K_m = 0.8918 \mu\text{M}$ για το υπόστρωμα της κατεχόλης. Το ένζυμο πιθανώς αναγνωρίζει ως εναλλακτικά υποστρώματα το καφεϊκό οξύ, την 4-νιτροκατεχόλη, τη 2,4-δινιτροφαινόλη και το βενζοϊκό οξύ, αλλά αυτή η παρατήρηση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Επιπλέον, η 1,2-CDO μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα σταθερό ένζυμο καθώς διατηρεί πάνω από το 80% της δραστηριότητάς του ακόμη και μετά από ένα μήνα αποθήκευσης στους 4 °C, χωρίς την ανάγκη επώασης με κάποιο μέσο συντήρησης. Τέλος, ταυτοποιήθηκε το *cis*, *cis*-μουκονικό οξύ ως προϊόν της δράσης του καθαρού ενζύμου παρουσία κατεχόλης με φασματοσκοπία NMR.

Η ολοκλήρωση του χαρακτηρισμού του ενζύμου που κωδικεύεται από το γονίδιο Asphe3_35690 έδειξε ότι πρόκειται για μια 3HB4H και όχι μια PHH, όπως είχε προβλεφθεί στο πλαίσιο διερεύνησης του καταβολισμού της φαινόλης στο Sphe3. Ανήκει στις μονοξυγονάσες εξαρτώμενες από φλαβινο-προσθετικές ομάδες και περιλαμβάνει θέσεις πρόσδεσης για το FAD και το NADH, αλλά και μια περιοχή αλληλεπίδρασης δύο

υπομονάδων για το διμερισμό του ενζύμου, η οποία συναντάται κυρίως στις υδροξυλάσες της φαινόλης, αλλά έχει εντοπιστεί και σε μια 3HB4H του στελέχους *Comamonas testosteroni*. Το καθαρό ένζυμο 3HB4H απαιτεί την προσθήκη εξωγενούς FAD ώστε να είναι δραστικό και δεν αναγνωρίζει ως υπόστρωμα τη φαινόλη. Η 3HB4H του Sphe3 έχει βέλτιστα pH και θερμοκρασία δράσης 8,5 και 30 °C, αντίστοιχα. Η δραστικότητα του ενζύμου 3HB4H αναστέλλεται από διάφορα ιόντα μετάλλων (Ag^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}), ενώ τα ιόντα κοβαλτίου ενισχύουν τη δραστικότητά του. Επιπλέον, η 3HB4H του Sphe3 ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten με $V_{\max} = 42,5 \mu\text{M}/\text{min}$ και $K_m = 0,0726 \text{ mM}$ για το υπόστρωμα 3-HBA. Η 3HB4H του Sphe3 αποτελεί ένα σταθερό ένζυμο, που διατηρεί τη δραστικότητά του στο 90% ακόμη και μετά από ένα μήνα αποθήκευσης, όταν επωάζεται χωρίς κάποιο μέσο συντήρησης στους 4 °C, μετά τον καθαρισμό του. Το PCA αναγνωρίστηκε ως προϊόν της αντίδρασης της 3HB4H με υπόστρωμα το 3-HBA με φασματοσκοπία NMR, ενώ το ένζυμο φαίνεται να αναγνωρίζει ως εναλλακτικά υποστρώματα το 4-HBA και το γεντισικό οξύ.

Τέλος, ένα σημαντικό επίτευγμα που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή είναι η εφαρμογή της *in-cell* NMR φασματοσκοπίας για την παρακολούθηση της ενζυμικής μετατροπής του 3-HBA σε PCA από το ένζυμο 3HB4H μέσα σε ζωντανά κύτταρα *E.coli* BL21, μετασχηματισμένα με τον ανασυνδυασμένο φορέα που φέρει το γονίδιο Asphe3_35690.

4

Νανοβιοκαταλύτες

4.1 Ακίνητοποίηση ενζύμων

Το βακτήριο *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 διαθέτει πληθώρα ενζύμων που εμπλέκονται σε πορείες καταβολισμού διαφόρων αρωματικών ενώσεων, πολλές εκ των οποίων είναι ρύποι του περιβάλλοντος. Τέτοια ένζυμα είναι οι μονοξυγονάσες και οι διοξυγονάσες, οι οποίες δρουν κυρίως σε αρωματικά υποστρώματα εισάγοντας ένα ή δύο άτομα οξυγόνου, αντίστοιχα, στον αρωματικό δακτύλιο του υποστρώματος. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στη βιοεξυγίανση του ρυπασμένου περιβάλλοντος, αλλά και να χρησιμοποιηθούν σε τεχνολογικές εφαρμογές στη βιομηχανία με στόχο την παραγωγή επιθυμητών ενώσεων. Ωστόσο, τα ένζυμα αυτά χαρακτηρίζονται από χαμηλή σταθερότητα και ευαισθησία στην οξείδωση, με αποτέλεσμα την εύκολη απενεργοποίησή τους.

Δεύτερος στόχος της διδακτορικής διατριβής, όπως έχει αναφερθεί, είναι η ακίνητοποίηση ενζύμων που προέρχονται από το βακτήριο *P. phenanthrenivorans* Sphe3 σε νανοδομικά υλικά, προκειμένου να αυξηθεί η σταθερότητά τους και να αποτελέσουν νέα βιοκαταλυτικά συστήματα. Επίσης, με την ακίνητοποίηση αναμένεται η βελτίωση του ελέγχου της ενζυμικής αντίδρασης με προσθήκη ή απομάκρυνση του βιοκαταλύτη, η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη και ο εύκολος διαχωρισμός του από το μίγμα της αντίδρασης.

Τα ένζυμα που επιλέχθηκαν για ακίνητοποίηση είναι η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος (GDO), η 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης (1,2-CDO) και η 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (3HB4H) του βακτηρίου *P. phenanthrenivorans* Sphe3. Και τα τρία ένζυμα εμπλέκονται σε καταβολικές αντιδράσεις διαφόρων αρωματικών ενώσεων (1.3.2, 1.3.3, 1.5.1).

Η GDO του Sphe3 έχει ετερόλογα υπερεκφραστεί και χαρακτηριστεί βιοχημικά στο εργαστήριό μας, στο πλαίσιο της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης της κας Λάππα Ειρήνης. Αποτελεί ένα εξαιρετικά ευαίσθητο και ασταθές ένζυμο, το οποίο χάνει τη δραστηριότητά του σε λίγες ώρες (Λάππα 2019). Οι GDOs συνήθως απαντώνται σε ομοτετραμερή και η απενεργοποίηση της GDO του Sphe3 μπορεί να οφείλεται σε διάσταση των υπομονάδων της στο διάλυμα, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες περιπτώσεις (Bilal et al. 2019; Rodrigues et al. 2021). Για την υπερέκφραση του ενζύμου GDO, το γονίδιο *Asphe3_39840 (gtdA)* που κωδικεύει για το ένζυμο στο στέλεχος Sphe3 κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο φορέα υπερέκφρασης και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET29c(+):*gtdA* (6484 bp) χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό κυττάρων *Escherichia coli* BL21(DE3). Το ένζυμο απομονώθηκε από το εκχύλισμα των κυττάρων BL21 με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης αχιστείας Ni^{2+} -NTA. Στην Εικόνα Π7 (Παράρτημα) παρουσιάζονται τα πηκτώματα SDS PAGE μετά την υπερέκφραση του ενζύμου και την απομόνωσή του.

Η 1,2-CDO υπερεκφράστηκε ετερόλογα και χαρακτηρίστηκε βιοχημικά στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής (Κεφάλαιο 3). Οι 1,2-CDOs οδηγούν στον σχηματισμό του υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντος *cis*, *cis*-μουκονικού οξέος (ccMA) (Xie et al. 2014; Choi et al. 2020).

Η 3HB4H, επίσης, υπερεκφράστηκε ετερόλογα και χαρακτηρίστηκε βιοχημικά στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής (Κεφάλαιο 3). Η ακινητοποίηση της 3HB4H δεν έχει πραγματοποιηθεί ξανά και ελάχιστα στοιχεία είναι διαθέσιμα για τέτοιου είδους βιοκαταλύτες. Για παράδειγμα, οι Stefanakis και συνεργάτες μελέτησαν την 3-μονοξυγονάση του 2-υδροξυ-διφαινυλίου (HrbA), η οποία εμπλέκεται στη μικροβιακή αποδόμηση του 2-υδροξυ- και του 2,2-διυδροξυ-διφαινυλίου, και αναφέρουν την επιτυχή ακινητοποίησή της σε τροποποιημένο διοξείδιο του πυριτίου (silica), ωστόσο αν και προχώρησαν σε δομική μελέτη του βιοκαταλύτη, δεν αναφέρουν το βιοχημικό χαρακτηρισμό του (Stefanakis et al. 2010). Επιπλέον, σχετικά με την ακινητοποίηση μονοξυγονασών, οι περισσότερες μελέτες αφορούν κυρίως στις μονοξυγονάσες Baeyer–Villiger, (Atia 2005; Cassimjee et al. 2014; Delgove et al. 2019; Takagi et al. 2022) ή σε μεταλλο-εξαρτώμενες μονοξυγονάσες, όπως τα κυτοχρώματα P450 (C. Y. Tan et al. 2016; Bahrami et al. 2017; Awad and Mohamed 2019), αλλά τα υποστρώματα που μελετούν δεν περιέχουν αρωματικούς δακτύλιους.

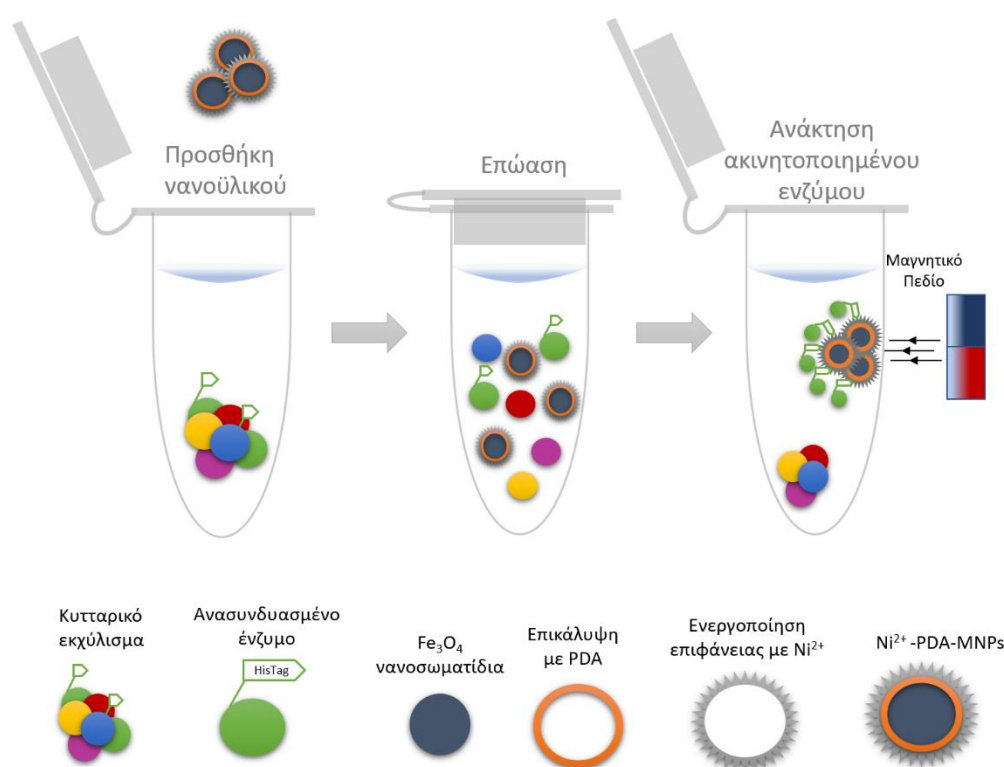
4.1.1 Πρωτόκολλο για την ακινητοποίηση επιλεγμένων ενζύμων του *Sphe3*

Τα πρωτόκολλα ακινητοποίησης σε νανοϋλικά που δοκιμάστηκαν για τα ένζυμα GDO, 1,2-CDO και 3HB4H αναφέρονται στα Υλικά και Μέθοδοι (Παράγραφοι 2.25.2-2.25.5). Στην ακινητοποίηση χρησιμοποιήθηκε τόσο κυτταρικό εκχύλισμα ελεύθερο κυττάρων με υπερεκφρασμένο το υπό μελέτη ένζυμο, όσο και καθαρό ένζυμο.

Στην αρχή χρησιμοποιήθηκαν ως υλικά ακινητοποίησης το γραφένιο, τα οξείδια του γραφενίου, τα τροποποιημένα οξείδια του γραφενίου και τα μαγνητικά νανοσωματίδια σιδήρου επικαλυμμένα με χιτοζάνη και καθαρισμένο ένζυμο, αλλά σε καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις δεν εντοπίστηκε ενζυμική δραστηριότητα στο νανοβιοκαταλύτη, συνεπώς οι δοκιμές ακινητοποίησης σε αυτά τα νανοϋλικά κρίθηκαν ανεπιτυχείς.

Στη συνέχεια επιλέχθηκαν για την ακινητοποίηση των ενζύμων τα μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου σιδήρου (Fe_2O_4) επικαλυμμένα με πολυντοπαμίνη (PDA) και ενεργοποιημένα με ιόντα νικελίου (Ni^{2+}). Η χρήση των συγκεκριμένων νανοϋλικών στοχεύει στην ταυτόχρονη ακινητοποίηση και απομόνωση του υπό μελέτη ενζύμου από το κυτταρικό εκχύλισμα ελεύθερο κυττάρων (cell free crude extract) των BL21 αξιοποιώντας την ουρά ιστιδινών (His-tag) του ανασυνδυασμένου ενζύμου μέσω της συγγένειας που παρουσιάζει το άζωτο του ημιδαζολίου της ιστιδίνης με το νικέλιο στην επιφάνεια του νανοϋλικού. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι απλή, γρήγορη και οικονομική, καθώς δεν απαιτείται εκ των προτέρων καθαρισμός του ενζύμου. Στην Εικόνα 4.1 παρουσιάζεται σχηματικά η διαδικασία ακινητοποίησης των ανασυνδυασμένων ενζύμων που φέρουν His-tag, πάνω στα τροποποιημένα μαγνητικά νανοσωματίδια (Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4). Η ίδια πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για την ακινητοποίηση των ετερόλογα εκφρασμένων ενζύμων GDO, 1,2-CDO και 3HB4H του *Sphe3* και για κάθε ένζυμο πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου ακινητοποίησης ως προς την αναλογία ενζυμικού παρασκευάσματος και νανοϋλικού, καθώς και τον χρόνο επώασης της ακινητοποίησης.

Η μέθοδος ταυτόχρονης ακινητοποίησης και απομόνωσης ενός ενζύμου είτε από κυτταρικό εκχύλισμα ελεύθερο κυττάρων ή υπερκείμενο κυτταρικής καλλιέργειας έχει εφαρμοστεί και σε άλλες περιπτώσεις: μια τρυσανμινάση που έφερε His-tag (J. Yang et al. 2015), μια σημασμένη με ουρά ιστιδίνης φθορίζουσα πρωτεΐνη (Ha et al. 2013), μια εξωκυττάρια λιπάση με επίτοπο ιστιδινών του στελέχους *Thermomyces lanuginosus* (Vahidi et al. 2015), ενώ έχει αξιοποιηθεί και για την συν-ακινητοποίηση δυο υπομονάδων υδροξυλάσης και μονοξυγονάσης, ώστε να δημιουργηθεί ένα δι-ενζυμικό καταλυτικό σύστημα (HpaBC) (Liao et al. 2020). Πιο πρόσφατα, αναφέρθηκε η απομόνωση μιας ανασυνδυασμένης αφυδρογονάσης της γλυκόζης με His-tag που πραγματοποιήθηκε με την ακινητοποίησή της σε μαγνητικά νανοσωματίδια NiFe_2O_4 , εκτελώντας τη διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης πιο εύκολα και απλά σε μόλις ένα βήμα (L. Zhou et al. 2021).



Εικόνα 4.1. Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου ταυτόχρονης ακινητοποίησης και καθαρισμού του ανασυνδυασμένου ενζύμου με τη χρήση των τροποποιημένων μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4).

4.1.2 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ακινητοποίησης

Για την ακινητοποίηση των επιλεγμένων ενζύμων χρησιμοποιήθηκε κυτταρικό εκχύλισμα ελεύθερο κυττάρων με υπερεκφρασμένο κάθε φορά το υπό μελέτη ένζυμο και ακολούθησε βελτιστοποίηση των παραμέτρων ακινητοποίησης του κάθε ενζύμου αρχικά ως προς την αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού και στη συνέχεια ως προς το χρόνο επώασης.

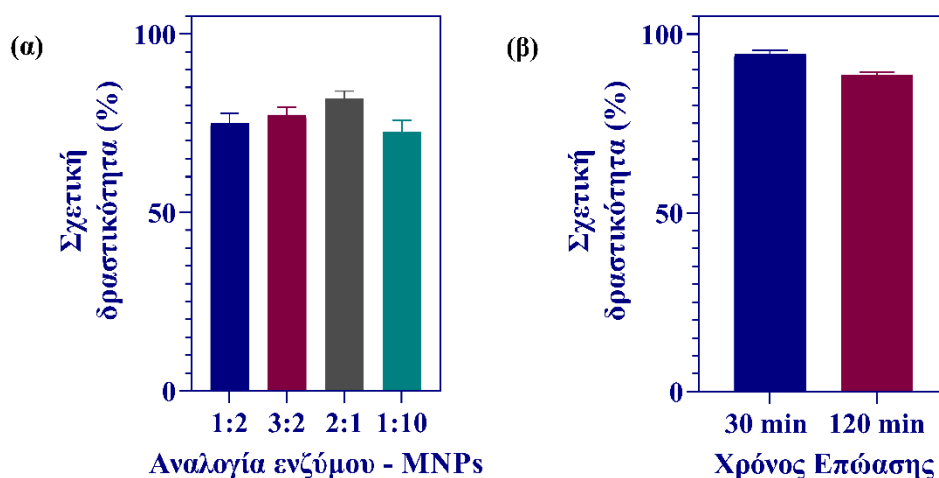
4.1.2.1 GDO του Sphe3

Για τη μελέτη της επίδρασης της αναλογίας ενζύμου-νανοϋλικού στην αποτελεσματικότητα του νανοβιοκαταλύτη GDO- Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4 πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων με

τις εξής αναλογίες κυτταρικού εκχυλίσματος-νανοϋλικού 1:2, 3:2, 2:1 και 1:10 (Εικόνα 4.2 α). Η συγκέντρωση του ενζύμου προσδιορίστηκε ως σύνολο πρωτεϊνών στο κυτταρικό εκχύλισμα των BL21 μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης. Μετά από 2 ώρες επώασης της ακινητοποίησης, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του νανοβιοκαταλύτη με τη χρήση μαγνήτη και έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας μέσω της παρακολούθησης σε φασματοφωτόμετρο της αντίδρασης μετατροπής του υποστρώματος του γεντισικού οξέος σε μηλοπυροσταφυλικό οξύ στα 330 nm.

Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 4.2 α, υπάρχει μικρή διαφορά στην απόδοση της δραστηριότητας του κάθε νανοβιοκαταλύτη, ενώ η αύξηση της ποσότητας του νανοϋλικού οδήγησε στην αύξηση της σχετικής δραστηριότητας του νανοβιοκαταλύτη και πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη σχετική δραστηριότητα παρατηρήθηκε στην αναλογία 2:1 κυτταρικού εκχυλίσματος-νανοϋλικού, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τις επόμενες μελέτες.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου επώασης του ενζύμου-νανοϋλικού (30 λεπτά και 2 ώρες) (Εικόνα 4.2 β). Παρατηρείται πως ο χρόνος επώασης της ακινητοποίησης δεν επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου. Συνεπώς, επιλέχθηκε ο χρόνος των 30 λεπτών ως βέλτιστος χρόνος επώασης της ακινητοποίησης καθιστώντας τη διαδικασία αφενός αποτελεσματική και αφετέρου όχι τόσο χρονοβόρα έναντι της επώασης των 2 ωρών.



Εικόνα 4.2. Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ακινητοποίησης της GDO σε σχέση με: την αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού, επώαση 2 h (α) και την παράμετρο του χρόνου επώασης, αναλογία ενζύμου-MNPs 2:1 (β). Οι αντιδράσεις ακινητοποίησης πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C, υπό ανάδευση. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Συνοψίζοντας, οι συνθήκες ακινητοποίησης της GDO στα τροποποιημένα νανοσωματίδια διαμορφώθηκαν ως εξής: αναλογία 2:1 κυτταρικού εκχυλίσματος-νανοϋλικού και 30 min επώασης στους 25 °C.

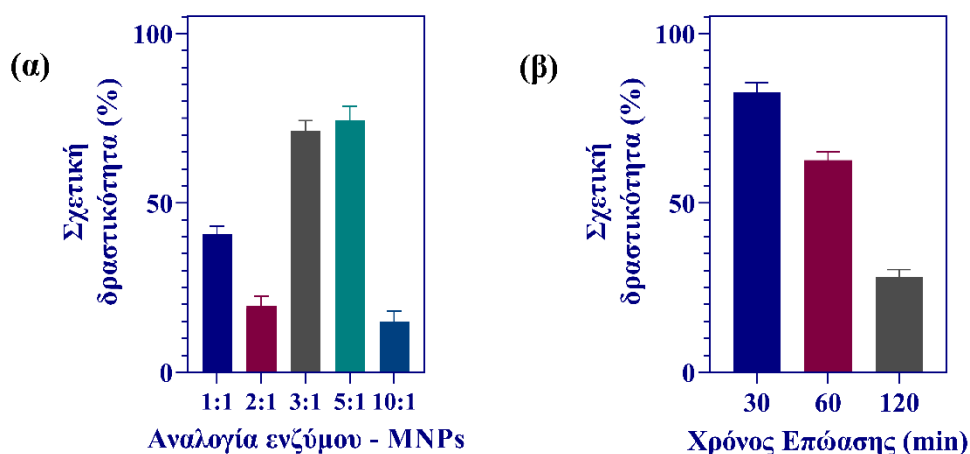
4.1.2.2 1,2-CDO του Sphe3

Για τη μελέτη της αναλογίας ενζύμου-νανοϋλικού στην αποτελεσματικότητα του νανοβιοκαταλύτη 1,2-CDO-Ni²⁺-PDA-Fe₂O₄ δοκιμάστηκαν οι εξής αναλογίες κυτταρικού εκχυλίσματος-νανοϋλικού 1:1, 1:2, 3:1, 5:1 και 10:1 (Εικόνα 4.3 α). Μετά από 2 ώρες

επώασης της ακινητοποίησης, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του νανοβιοκαταλύτη με τη χρήση μαγνήτη και έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας μέσω της παρακολούθησης σε φασματοφωτόμετρο της αντίδρασης μετατροπής του υποστρώματος της κατεχόλης σε *cis*, *cis*-μουκονικό οξύ στα 260 nm.

Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 4.3 α, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην απόδοση της δραστηριότητας του κάθε νανοβιοκαταλύτη, με χαμηλότερη απόδοση του νανοβιοκαταλύτη με αναλογία 10:1 κυτταρικού εκχυλίσματος-νανοϋλικού, που πιθανώς οφείλεται στην πλήρωση της επιφάνειας του φορέα από τη μεγάλη συγκέντρωση ενζύμου, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες περιπτώσεις (Bilal et al. 2018; Giannakopoulou et al. 2021). Την καλύτερη απόδοση στη δραστηριότητα παρουσίασε ο νανοβιοκαταλύτης με αναλογία 5:1 κυτταρικού εκχυλίσματος-νανοϋλικού και αμέσως μετά ο νανοβιοκαταλύτης με αναλογία 3:1. Ο νανοβιοκαταλύτης με αναλογία 5:1 κυτταρικού εκχυλίσματος-νανοϋλικού χρησιμοποιήθηκε για τους επόμενους προσδιορισμούς.

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο χρόνος επώασης του ενζύμου-νανοϋλικού στα 30 και 60 λεπτά και στις 2 ώρες (Εικόνα 4.3 β), στους 25 °C. Παρατηρείται πως ο χρόνος επώασης της ακινητοποίησης επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου. Συνεπώς, επιλέχθηκε ο χρόνος των 30 λεπτών ως βέλτιστος χρόνος επώασης της ακινητοποίησης.



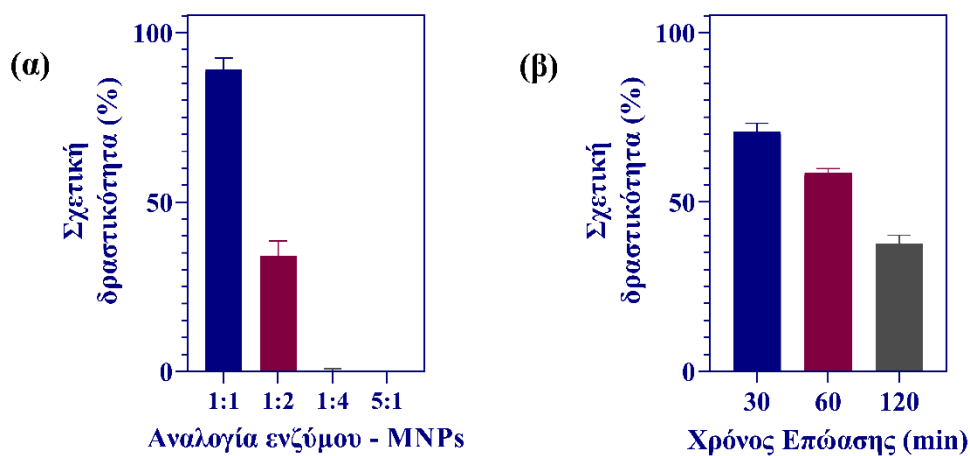
Εικόνα 4.3. Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ακινητοποίησης της 1,2-CDO σε σχέση με: την αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού με επώαση για 2 h (α) και την παράμετρο του χρόνου επώασης με τη χρήση του νανοβιοκαταλύτη με αναλογία ενζύμου-MNPs 5:1 (β). Οι αντιδράσεις ακινητοποίησης πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C, υπό ανάδευση. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Συνοψίζοντας, οι συνθήκες ακινητοποίησης της 1,2-CDO στα τροποποιημένα νανοσωματίδια διαμορφώθηκαν ως εξής: αναλογία 5:1 κυτταρικού εκχυλίσματος-νανοϋλικού και 30 min επώασης στους 25 °C.

4.1.2.3 3HB4H του Sphe3

Για τη μελέτη της αναλογίας ενζύμου-νανοϋλικού στην αποτελεσματικότητα του νανοβιοκαταλύτη πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων με τις εξής αναλογίες

κυτταρικού εκχυλίσματος-νανοϋλικού 1:1, 1:2, 1:4, 5:1 (Εικόνα 4.4 α), ενώ για το χρόνο επώασης δοκιμάστηκαν τα 30, 60 και 120 min (Εικόνα 4.4 β).



Εικόνα 4.4. Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ακινητοποίησης της 3HB4H σε σχέση με: την αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού με επώαση για 2 h (α) και την παράμετρο του χρόνου επώασης με τη χρήση του νανοβιοκαταλύτη με αναλογία ενζύμου-MNPs 1:1 (β). Οι αντιδράσεις ακινητοποίησης πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C, υπό ανάδευση. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Συνοψίζοντας, οι συνθήκες ακινητοποίησης λοιπόν διαμορφώθηκαν ως εξής: αναλογία 1:1 κυτταρικού εκχυλίσματος-νανοϋλικού και 30 min επώασης στους 25 °C.

4.1.3 Επιβεβαίωση επιτυχούς ακινητοποίησης

4.1.3.1 Έλεγχος ενζυμοεξαρτώμενης αντίδρασης

Προς επιβεβαίωση της ακινητοποίησης του κάθε ενζύμου πάνω στα νανοσωματίδια ελέγχθηκε η συσχέτιση της ποσότητας του νανοβιοκαταλύτη με την ταχύτητα της αντίδρασης.

Όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί, για κάθε ένζυμο η ταχύτητα της αντίδρασης φαίνεται να αυξάνεται με την αύξηση της ποσότητας του νανοβιοκαταλύτη που οφείλεται στην ποσότητα ενζύμου που έχει ακινητοποιηθεί πάνω στο νανοϋλικό.

Πίνακας 4.1. Έλεγχος ενζυμοεξαρτώμενης αντίδρασης με διαφορετικούς όγκους νανοβιοκαταλύτη στην αντίδραση. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

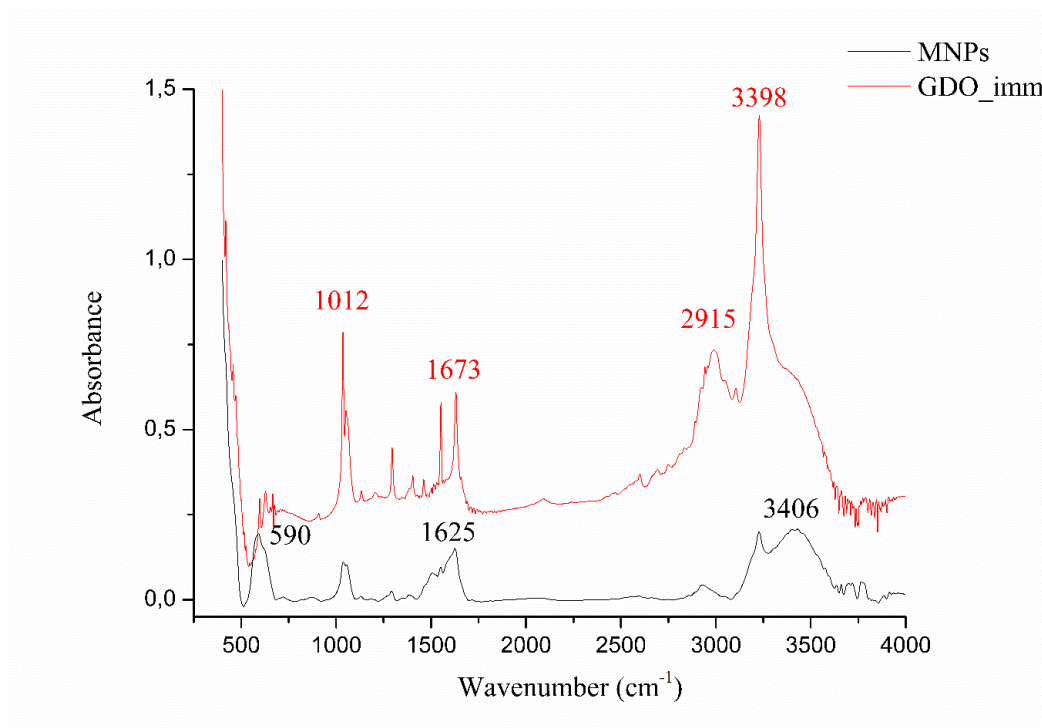
	Ταχύτητα αντίδρασης (mM/min)	
GDO		
Όγκος νανοβιοκαταλύτη (μl)	M.O. (N=3)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD)
20	0,0004	0,0002
40	0,0010	0,0003
80	0,0020	0,0005

1,2-CDO		
Όγκος νανοβιοκαταλύτη (μl)	M.O. (N=3)	Τυπική Απόκλιση (±SD)
20	0,0010	0,0005
40	0,0019	0,0008
80	0,0037	0,0008
3HB4H		
Όγκος νανοβιοκαταλύτη (μl)	M.O. (N=3)	Τυπική Απόκλιση (±SD)
20	0,0008	0,0002
40	0,0035	0,0006
100	0,0113	0,0007

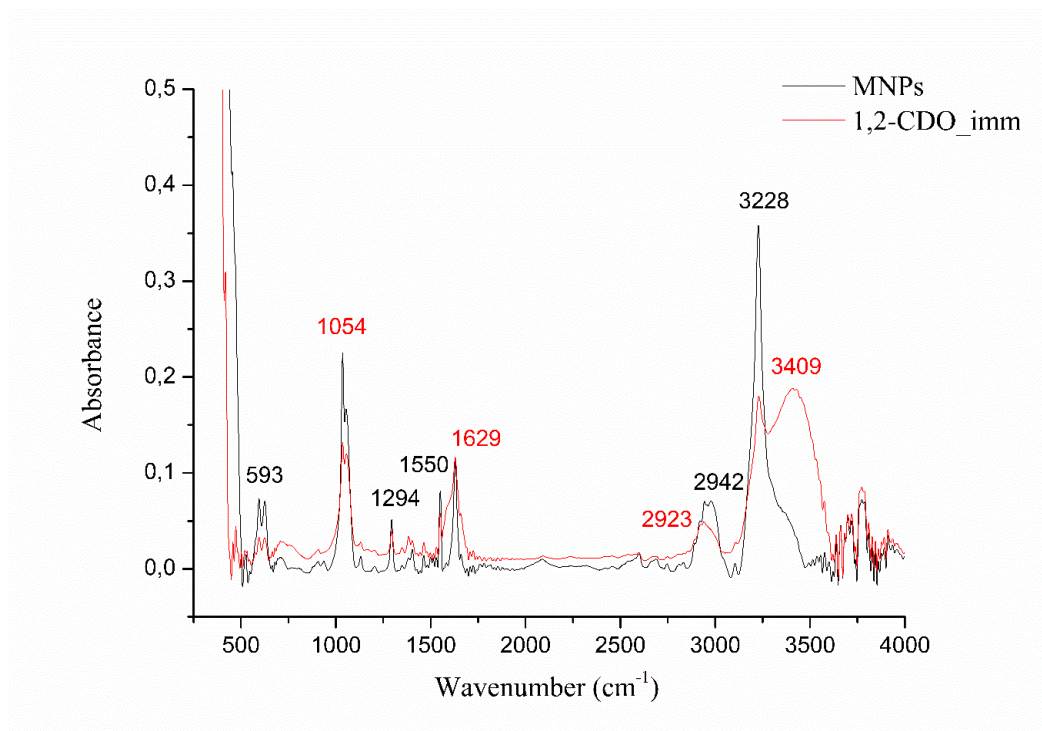
4.1.3.2 Έλεγχος με Φασματοφωτομετρία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Η επιτυχής ακινητοποίηση του κάθε ενζύμου στα μαγνητικά νανοσωματίδια επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με ανάλυση FTIR. Οι Εικόνες 4.5-4.7 απεικονίζουν τα φάσματα των τροποποιημένων μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4) πριν (μαύρη γραμμή) και μετά (κόκκινη γραμμή) την ακινητοποίηση των ενζύμων GDO, 1,2-CDO και 3HB4H του Sphe3.

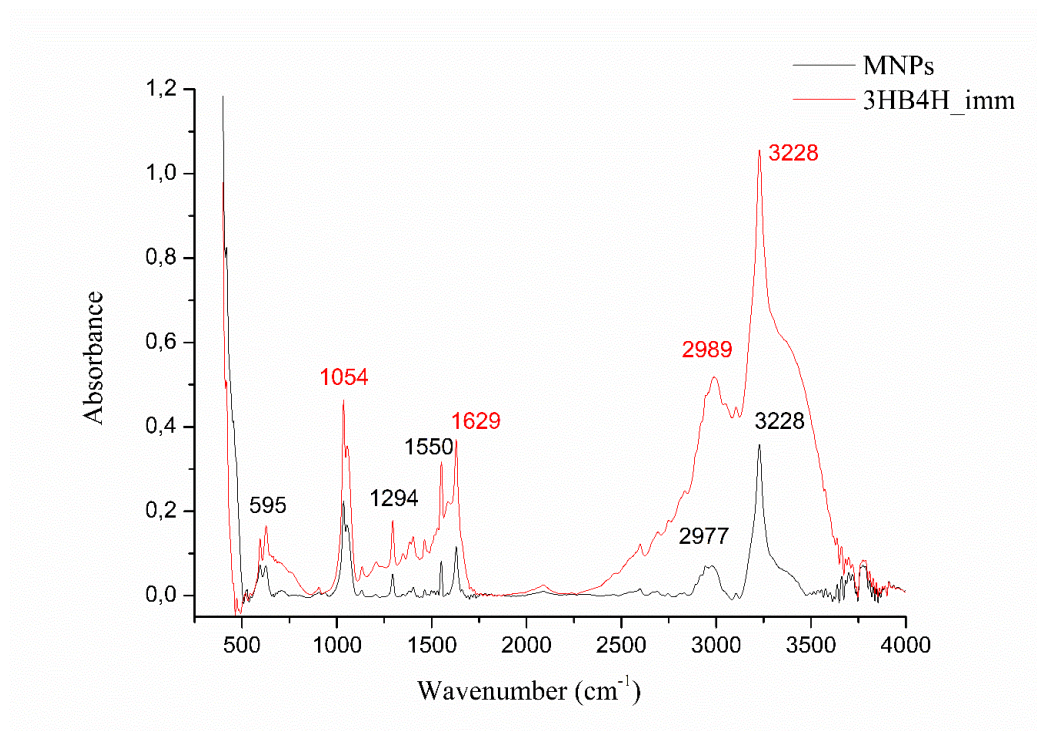
Η εμφάνιση κορυφών στην περιοχή των $1200\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ αντιστοιχούν στις ειδικές απορροφήσεις της αμιδικής ομάδας (Amide I, II, III) και υποδηλώνουν την ύπαρξη της μονάδας H-N-C-O (Pathmamanoharan et al. 1996; Ji et al. 2020).



Εικόνα 4.5. Φάσματα FTIR των τροποποιημένων μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4) πριν (μαύρη γραμμή) και μετά (κόκκινη γραμμή) την ακινητοποίηση του ενζύμου GDO του *Sphe3*.



Εικόνα 4.6. Φάσματα FTIR των τροποποιημένων μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4) πριν (μαύρη γραμμή) και μετά (κόκκινη γραμμή) την ακινητοποίηση του ενζύμου 1,2-CDO του *Sphe3*.



Εικόνα 4.7. Φάσματα FTIR των τροποποιημένων μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4) πριν (μαύρη γραμμή) και μετά (κόκκινη γραμμή) την ακινητοποίηση του ενζύμου 3HB4H του *Sphe3*.

Στο φάσμα FTIR των νανοσωματιδίων εντοπίζεται μια κορυφή, περίπου στα 590 cm^{-1} (Εικόνες 4.5-4.7), που αντιστοιχεί στη δόνηση του δεσμού Fe-O και αντιπροσωπεύει το μαγνητισμό των νανοσωματιδίων. Πριν την ακινητοποίηση του ενζύμου, η κορυφή περίπου στα 3400 cm^{-1} αντιπροσωπεύει τις ομάδες -OH της επιφάνειας των νανοϋλικών (Sahu et al. 2011; B. Sahoo, Sahu, and Pramanik 2011). Οι κορυφές στα ~ 1300 και 1600 cm^{-1} αποδίδονται στους δεσμούς P=O και C=O, αντίστοιχα (Ozyilmaz, Bayrakci, and Yilmaz 2016). Στο φάσμα FTIR των τροποποιημένων μαγνητικών νανοσωματιδίων μετά την ακινητοποίηση του κάθε ενζύμου εντοπίζεται μια διακριτή κορυφή στα $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$, που αντιπροσωπεύει τη δόνηση της κάμψης του δεσμού C-N, και δύο κορυφές στα ~ 2900 και 3300 cm^{-1} , που αποδίδονται στους δεσμούς N-H και C-H της δομής του ενζύμου, αντίστοιχα (Barth 2007). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης FTIR προτείνουν την επιτυχή ακινητοποίηση κάθε ενζύμου στα μαγνητικά νανοσωματίδια.

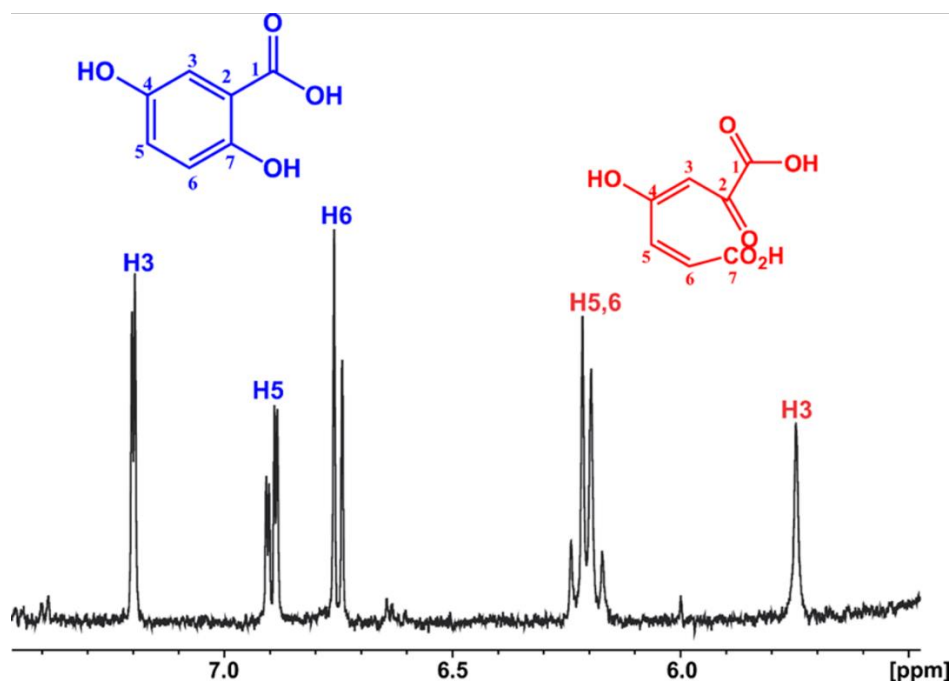
4.2 Χαρακτηρισμός νανοβιοκαταλυτών

4.2.1 Ταυτοποίηση προϊόντος αντίδρασης με φασματοσκοπία NMR

Η ταυτοποίηση των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης των ελεύθερων ενζύμων 1,2-CDO και 3HB4H πραγματοποιήθηκε με NMR, στο πλαίσιο του χαρακτηρισμού των ενζύμων, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Το ένζυμο GDO του *Sphe3* είχε χαρακτηριστεί στο πλαίσιο προηγούμενης μεταπτυχιακής εργασίας, όπως έχει αναφερθεί και δεν είχαν ταυτοποιηθεί τα προϊόντα αντίδρασης. Επομένως για την ολοκλήρωση του χαρακτηρισμού του ενζύμου πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά ταυτοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης της GDO του *Sphe3* με NMR, χρησιμοποιώντας την ακινητοποιημένη μορφή του ενζύμου με υπόστρωμα το γεντισικό οξύ.

Στην Εικόνα 4.8 απεικονίζεται το 1D ^1H NMR φάσμα της αντίδρασης του νανοβιοκαταλύτη GDO- Ni^{2+} -PDA- Fe_2O_4 με 300 μM γεντισικό οξύ ως υπόστρωμα. Στο φάσμα διακρίνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του γεντισικού οξέος (μπλε σήμανση) και του προϊόντος της αντίδρασης, το μηλοπυροσταφυλικό οξύ (κόκκινη σήμανση). Το φάσμα 1D ^1H NMR του προϊόντος μηλοπυροσταφυλικό οξύ παρουσιάζει μια χαρακτηριστική κορυφή στα 5,75 ppm η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο H3 και μια τετραπλή κορυφή στα 6,21 ppm που αποδίδεται στα πρωτόνια H5 και H6, τα οποία αλληλεπικαλύπτονται. Η αναλογία υποστρώματος-προϊόντος μετά από 12 ώρες αντίδρασης ήταν 1:1.



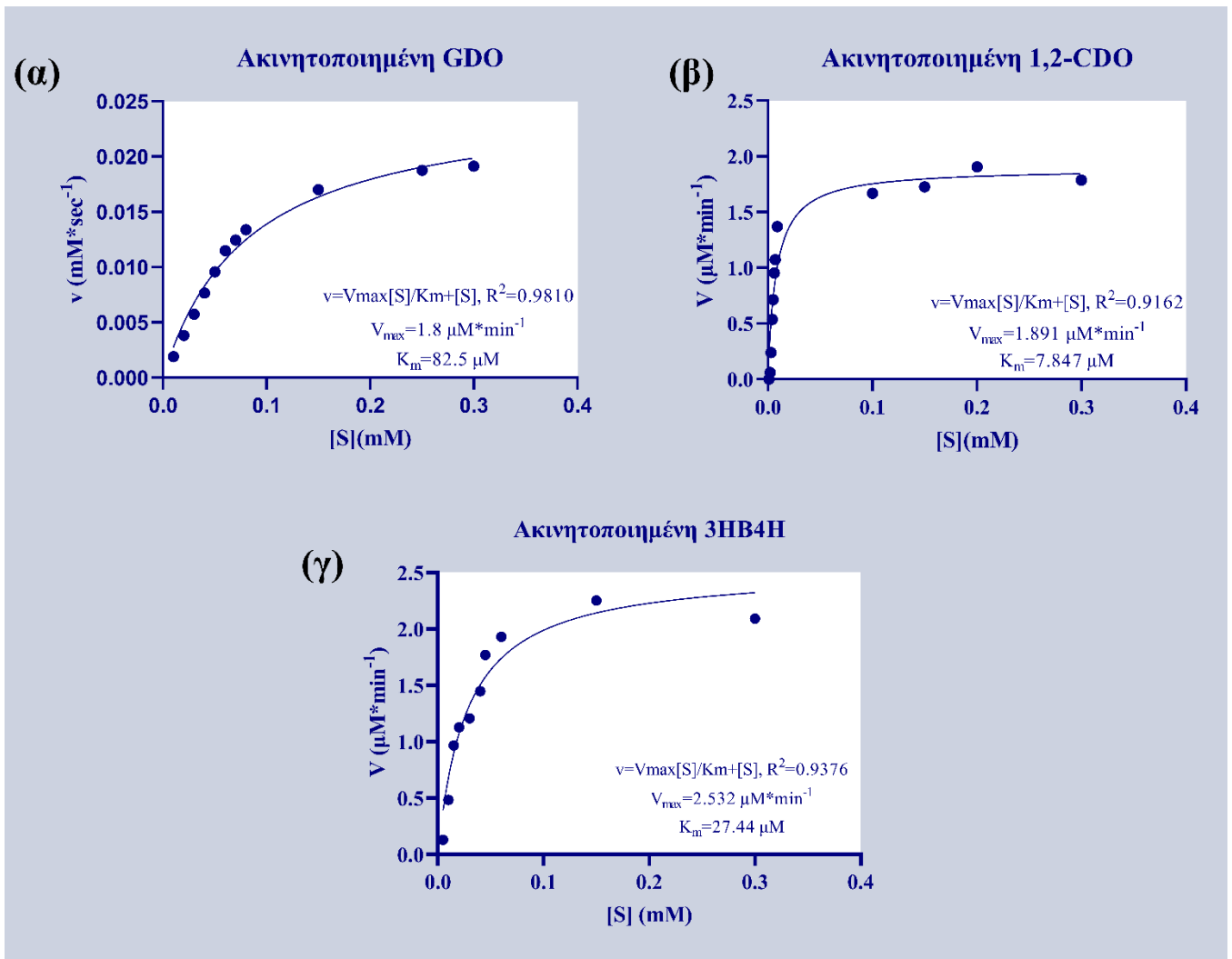
Εικόνα 4.8. Φάσμα ^1H NMR της ενζυμικής μετατροπής του γεντισικού οξέος (μπλε επισήμανση) σε μηλοπυροσταφυλικό οξύ (κόκκινη επισήμανση) από το νανοβιοκαταλύτη σε 50 mM Tris ρυθμιστικό διάλυμα 90% H_2O και 10% D_2O (number of scans = 64, acquisition time = 4 s, relaxation delay = 1.5 s, total experimental time = 6 min 22 s).

Ακολούθησε η μελέτη των ακινητοποιημένων ενζύμων στα μαγνητικά νανοσωματίδια που περιλαμβάνει το χαρακτηρισμό της κινητικής της αντίδρασης των ενζύμων μετά την ακινητοποίησή τους, τον εντοπισμό της βέλτιστης δραστηριότητας σε εύρος θερμοκρασιών και pH, τη σταθερότητα των νανοβιοκαταλυτών τόσο μετά από επώασή τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, όσο και μετά την αποθήκευσή τους και τέλος, την αξιολόγηση της ικανότητας επαναχρησιμοποίησής τους.

4.2.2 Κινητική σταθερής κατάστασης των ακινητοποιημένων ενζύμων

Η ταχύτητα της κάθε ενζυμικής αντίδρασης καταγράφηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος ώστε να προσδιοριστεί το μοντέλο που ακολουθεί η κινητική του κάθε νανοβιοκαταλύτη. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 40 μl νανοβιοκαταλύτη.

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται από τις ακινητοποιημένες GDO, 1,2-CDO και 3HB4H φαίνεται να ακολουθούν κινητική Michaelis-Menten, η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{\text{max}} * [S] / ([S] + K_m)$ (Εικόνα 4.9).



Εικόνα 4.9. Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής της αντίδρασης του νανοβιοκαταλύτη GDO-Ni^{2+} - $\text{PDA-Fe}_2\text{O}_4$ (α), $1,2\text{-CDO-Ni}^{2+}$ - $\text{PDA-Fe}_2\text{O}_4$ (β) και 3HB4H-Ni^{2+} - $\text{PDA-Fe}_2\text{O}_4$ (γ).

Οι σταθερές των εξισώσεων για τα ελεύθερα και τα ακίνητοποιημένα ένζυμα παρουσιάζονται, για λόγους σύγκρισης, στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2. Σταθερές εξισώσεων κινητικής της ελεύθερης και της ακίνητοποιημένης μορφής των υπό μελέτη ενζύμων.

Ένζυμο	K_m (μM)	$V_{\max}$ ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$)
Ελεύθερη GDO*	$25,9 \pm 4,4$	$72 \times 10^3 \pm 6$
Ακίνητοποιημένη GDO	$82,5 \pm 14,2$	$1,8 \times 10^3 \pm 0,02$
Ελεύθερη 1,2-CDO	$0,8918 \pm 0,11$	$3,041 \pm 0,25$
Ακίνητοποιημένη 1,2-CDO	$7,847 \pm 0,94$	$1,891 \pm 0,91$
Ελεύθερη 3HB4H	$72,61 \pm 4,5$	$42,5 \pm 3,5$
Ακίνητοποιημένη 3HB4H	$27,44 \pm 6,7$	$2,532 \pm 1,3$

* Τα αποτελέσματα για το χαρακτηρισμό του ελεύθερου ενζύμου προέρχονται από τη ΜΔΕ της κας Λάππα (Λάππα, ΜΔΕ, 2019).

Τα ακινητοποιημένα ένζυμα GDO και 1,2-CDO εμφανίζουν αυξημένη τιμή K_m , κάτι που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου (Giannakopoulou et al. 2019) και πιθανώς οφείλεται σε αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης μετά την ακινητοποίηση που μειώνουν την ευκαμψία του μορίου και, επομένως, πιθανώς επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του υποστρώματος με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την 1,2-CDO του *Acinetobacter radioresistens* S13, της οποίας το K_m για την κατεχόλη αυξήθηκε 8 φορές όταν το ένζυμο ακινητοποιήθηκε σε νανοσπόγγους (Di Nardo et al. 2009). Επίσης, το K_m για την κατεχόλη της 3,4-PCD του *Rhizobium* sp. LMB-1 σχεδόν τριπλασιάστηκε, αφού ακινητοποιήθηκε σε νανοσωματίδια Fe_2O_4 (L.-S. Zhang et al. 2017). Επιπλέον, πρόσφατα οι Jiao και συνεργάτες παρατήρησαν αύξηση στο K_m μετά την ακινητοποίηση μιας ανασυνδυασμένης ανθρώπινης καρβονικής ανυδράσης (hCa II) σε τροποποιημένες νανοράβδους με νικέλιο (Jiao et al. 2020).

Οι V_{max} για τις ακινητοποιημένες GDO και 1,2-CDO είναι μικρότερες σε σχέση με την ελεύθερη μορφή των ενζύμων και αυτό πιθανώς οφείλεται σε παρεμπόδιση του υποστρώματος από στερικές αλληλεπιδράσεις μετά την αλλαγή της διαμόρφωσης στο ένζυμο κατά την ακινητοποίηση. Αντίστοιχες μεταβολές στις V_{max} έχουν αναφερθεί ξανά για τις διαφορετικές περιπτώσεις ακινητοποίησης μιας καταλάσης και μιας διοξυγονάσης σε νανοσωλήνες άνθρακα (Suma et al. 2016; Chengdong Zhang, Luo, and Chen 2013). Επιπλέον, έχει αναφερθεί η ακινητοποίηση της ανασυνδυασμένης αφυδρογονάσης της γλυκόζης με His-tag (GluDH) πάνω σε μαγνητικά νανοσωματίδια $NiFe_2O_4$, της οποίας η V_{max} της μειώθηκε 6,7 φορές σε σύγκριση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου (L. Zhou et al. 2021). Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την 1,2-CDO του *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, η οποία μετά την ακινητοποίησή της παρουσίασε μειωμένη V_{max} (S. H. Lee et al. 2013; Suma et al. 2016).

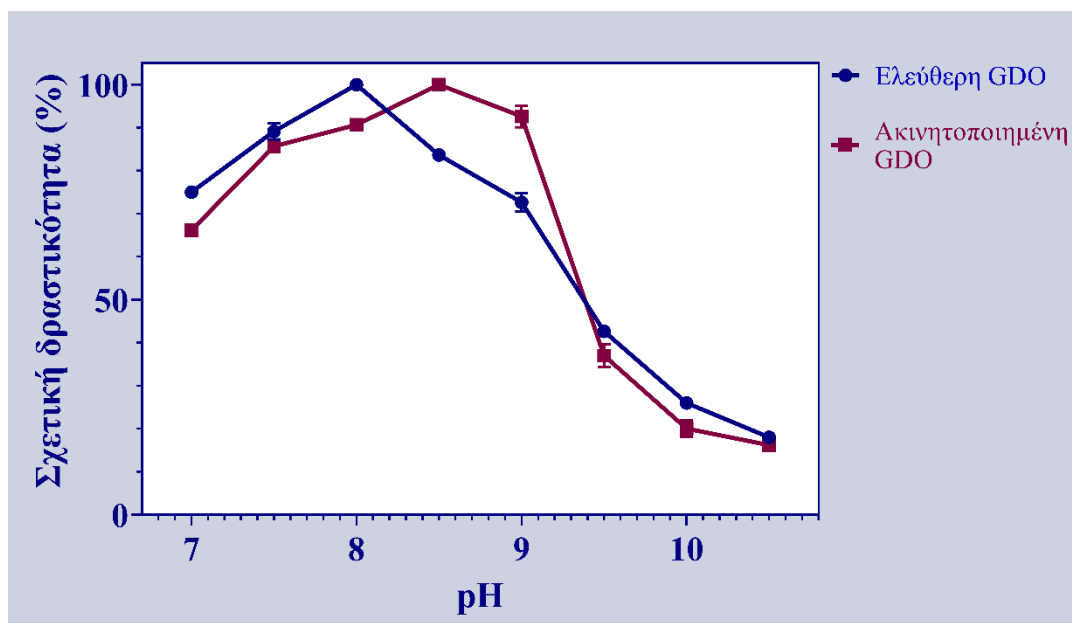
Η μείωση της V_{max} και η αύξηση του K_m για τις διοξυγονάσεις που ακινητοποιήθηκαν υποδεικνύουν την απώλεια της μέγιστης δραστηριότητας καθώς και μείωση της συγγένειας του ενζύμου για την πρόσδεση του υποστρώματος μετά την ακινητοποίηση.

Σε αντίθεση με τις ακινητοποιήσεις των παραπάνω διοξυγονασών του Sphe3, το K_m της 3HB4H μειώνεται μετά την ακινητοποίησή της, που υποδηλώνει την αύξηση της συγγένειας για το υπόστρωμα 3-HBA. Η V_{max} για την ακινητοποιημένη 3HB4H μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου, όπως παρατηρήθηκε και στις ακινητοποιήσεις των διοξυγονασών του Sphe3, που πιθανώς οφείλεται σε αλλαγές στη διαμόρφωση του ενζύμου μετά την ακινητοποίηση που περιορίζουν την πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

4.2.3 Βέλτιστο pH δράσης

Το βέλτιστο pH για τη δραστηριότητα του κάθε νανοβιοκαταλύτη προσδιορίστηκε μετά από δοκιμές σε εύρος pH 7-11, καθώς σε πιο όξινα pH δίσταται το σύμπλοκο His-tag- Ni^{2+} λόγω της πρωτονίωσης του δακτυλίου του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.10, το βέλτιστο pH για τη δραστηριότητα της ακινητοποιημένης GDO έχει μετατοπιστεί από το 8, που ήταν το βέλτιστο για την ελεύθερη μορφή του ενζύμου, στο 8.5.



Εικόνα 4.10. Σύγκριση δραστηριότητας της ελεύθερης GDO (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακίνητοποιημένης GDO (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) σε διάφορα pH. Ο μέσος όρος των υψηλότερων μετρήσεων σε κάθε μορφή του ενζύμου ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Πίνακας 4.3. Τιμές δραστηριότητας ελεύθερου και ακίνητοποιημένου ενζύμου σε εύρος pH 7-10,5.

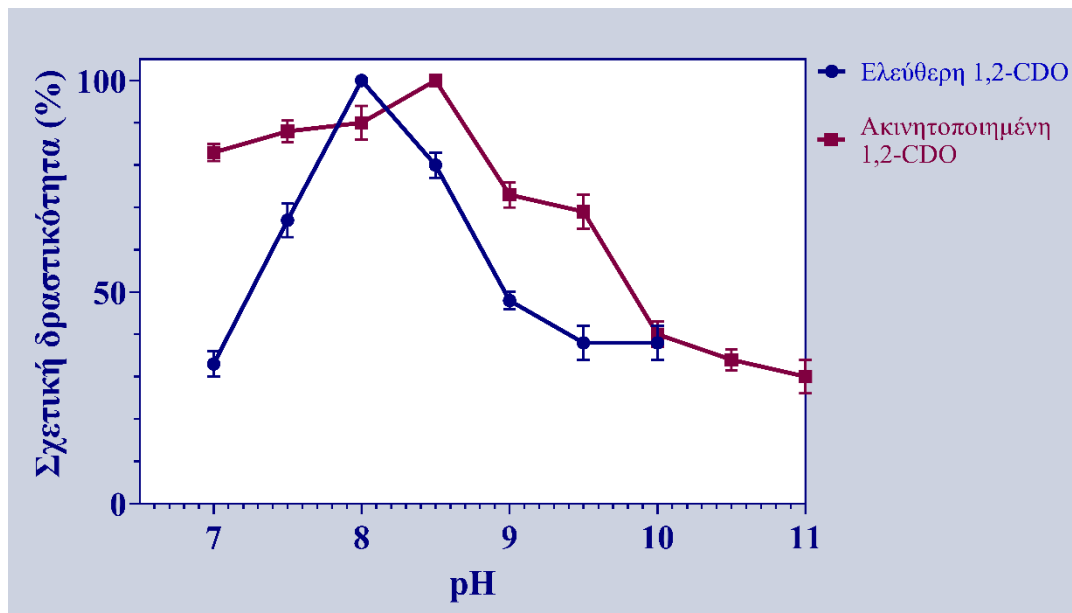
pH	Ελεύθερη GDO*		Ακίνητοποιημένη GDO	
	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
7.0	75	1	66	1,3
7.5	89	1,8	86	1,5
8.0	100	Δ/A^{**}	91	1,5
8.5	84	1,5	100	Δ/A^{**}
9.0	73	2,1	93	2,5
9.5	43	0,6	37	2,6
10.0	26	1	20	2
10.5	18	1	16	0,8

* Τα αποτελέσματα για το χαρακτηρισμό του ελεύθερου ενζύμου προέρχονται από τη ΜΔΕ της κας Λάππα (Λάππα, ΜΔΕ, 2019).

** Δ/A : Δεν Αντιστοιχεί.

Ομοίως, το βέλτιστο pH για τη δραστηριότητα της ακίνητοποιημένης 1,2-CDO έχει μετατοπιστεί από το 8, που ήταν το βέλτιστο για την ελεύθερη μορφή του ενζύμου, στο 8.5 (Εικόνα 4.11). Τέτοιες μετατοπίσεις του βέλτιστου pH δράσης ενός ενζύμου προς πιο αλκαλικές τιμές έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες ακινητοποίησης 1,2-διοξυγονασών της κατεχόλης. Η 1,2-CDO του *A. radioresistens* S13 στην ελεύθερη μορφή της έχει βέλτιστο

pH δράσης το 8,5, ενώ η ακινητοποιημένη της μορφή το 9,5 (Di Nardo et al. 2009) και αντίστοιχα, στην περίπτωση της 1,2-CDO του *A. chlorophenolicus* A6 το pH μετατοπίζεται από το 7 στο 8 μετά την ακινητοποίηση (Suma et al. 2016). Επίσης, η ακινητοποίηση της 3,4-PCD της *Pseudomonas* sp. σε νανοσωλήνες άνθρακα είχε σαν αποτέλεσμα τη βελτίωση της δραστηριότητας του ενζύμου σε πιο αλκαλικά περιβάλλοντα και μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο (Das, Hamid, and Annuar 2016).



Εικόνα 4.11. Σύγκριση δραστηριότητας της ελεύθερης 1,2-CDO (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης 1,2-CDO (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) σε διάφορα pH. Ο μέσος όρος των υψηλότερων μετρήσεων σε κάθε μορφή του ενζύμου ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

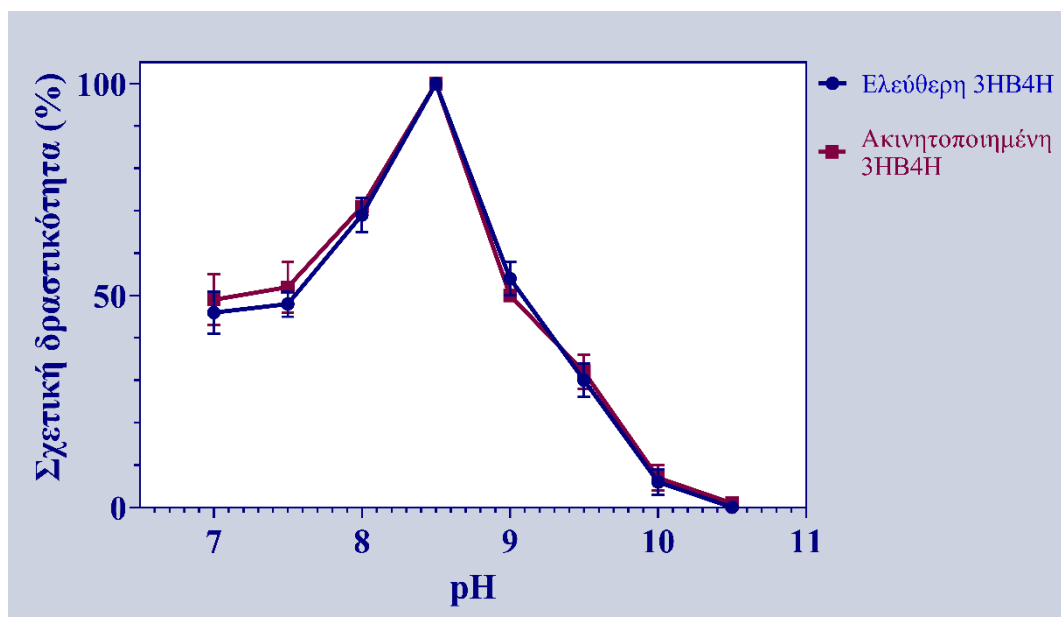
Πίνακας 4.4. Τιμές δραστηριότητας ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου σε εύρος pH 7-10,5.

pH	Ελεύθερη 1,2-CDO		Ακινητοποιημένη 1,2-CDO	
	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
7.0	33	3	83	2
7.5	67	4	88	3
8.0	100	Δ/A^*	90	4
8.5	80	3	100	Δ/A^*
9.0	48	2	73	3
9.5	38	4	69	4
10.0	38	4	40	3
10.5	-	Δ/A^*	34	3
11.0	-	Δ/A^*	30	4

*Δ/Α: Δεν Αντιστοιχεί.

Επιπλέον, η δραστηριότητα του νανοβιοκαταλύτη 1,2-CDO-Ni²⁺-PDA-Fe₂O₄ στις διάφορες τιμές pH σε σχέση με την ελεύθερη διοξυγονάση είναι σημαντικά αυξημένη, αλλά εξίσου σημαντική είναι η διατήρηση της δραστηριότητας στις τιμές pH (>10) που το ελεύθερο ένζυμο αδυνατεί να δράσει. Παρόμοια αποτελέσματα για διατήρηση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά την ακινητοποίησή του σε μεγαλύτερο εύρος pH έχουν αναφερθεί και στην περίπτωση της 1,2-CDO του *A. chlorophenolicus* A6 (S. H. Lee et al. 2013).

Αντιθέτως, το βέλτιστο pH για τη δραστηριότητα της ακινητοποιημένης 3HB4H δεν μεταβάλλεται και δεν σημειώνονται σημαντικές αλλαγές στο προφίλ δράσης του ακινητοποιημένου ενζύμου σε σχέση με το ελεύθερο (Εικόνα 4.12).



Εικόνα 4.12. Σύγκριση δραστηριότητας της ελεύθερης 3HB4H (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης 3HB4H (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) σε διάφορα pH. Ο μέσος όρος των υψηλότερων μετρήσεων σε κάθε μορφή του ενζύμου ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Πίνακας 4.5. Τιμές δραστηριότητας ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου σε εύρος pH 7-10,5.

pH	Ελεύθερη 3HB4H		Ακινητοποιημένη 3HB4H	
	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
7.0	46	5	49	6
7.5	48	3	52	6
8.0	69	4	71	2
8.5	100	Δ/Α *	100	Δ/Α *
9.0	54	4	50	1
9.5	30	4	32	4

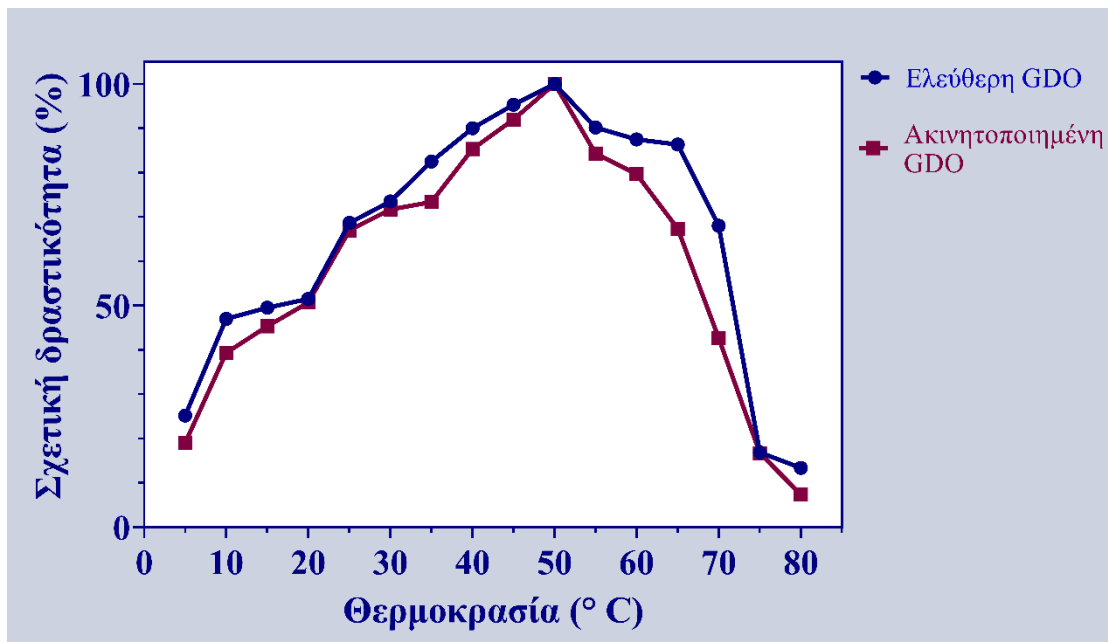
10.0	6	3	7	3
10.5	0	Δ/Α*	1	1

*Δ/Α: Δεν Αντιστοιχεί.

4.2.4 Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης

Η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δραστηριότητα του κάθε νανοβιοκαταλύτη προσδιορίστηκε σε εύρος θερμοκρασιών 5-80 °C.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.13 και οι δύο μορφές του ενζύμου GDO παρουσιάζουν τη βέλτιστη δραστηριότητά τους στους 50 °C.



Εικόνα 4.13. Σύγκριση δραστηριότητας της ελεύθερης GDO (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακίνητοποιημένης GDO (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Πίνακας 4.6. Τιμές δραστηριότητας ελεύθερου και ακίνητοποιημένου ενζύμου σε εύρος θερμοκρασιών.

Θερμοκρασία (°C)	Ελεύθερη GDO*		Ακίνητοποιημένη GDO	
	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση (±SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση (±SD, N=3)
5	25	1,0	19	2
10	47	0,5	39	1,6
15	50	0,6	45	1,5
20	52	0,5	51	2,2
25	69	0,8	67	1
30	74	0,6	72	1,5
35	83	0,5	73	1,4
40	90	1	85	0,7
45	95	1,5	92	1

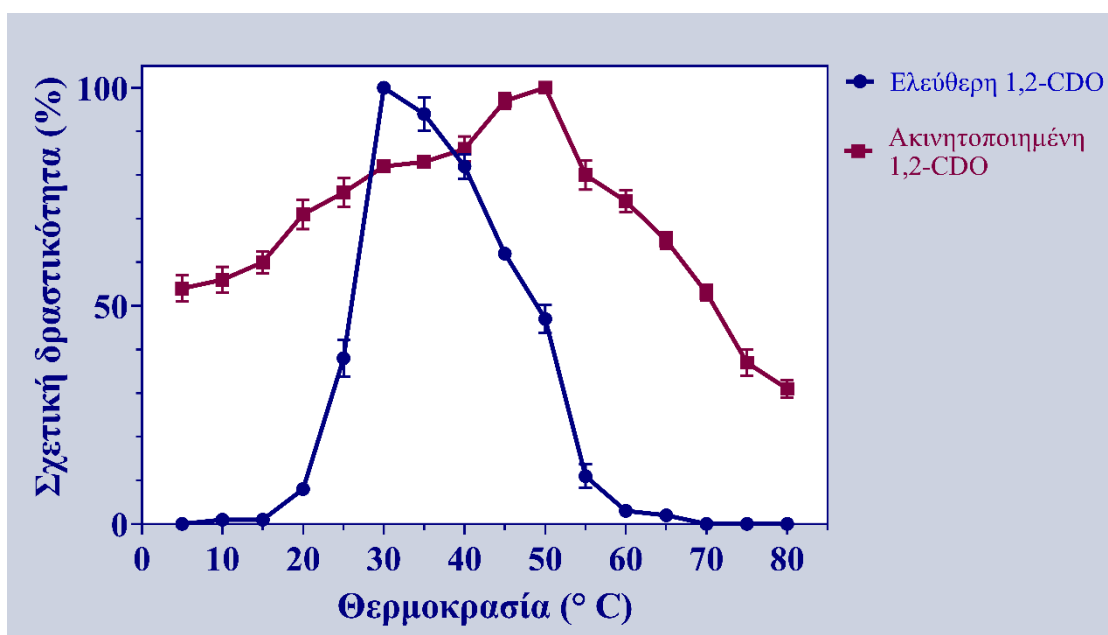
50	100	Δ/A^{**}	100	Δ/A^{**}
55	90	0,8	84	3,1
60	88	0,5	80	2,1
65	86	1,6	67	1,9
70	68	0,5	43	1,3
75	17	0,9	17	1,5
80	13	1,7	7	1,5

* Τα αποτελέσματα για το χαρακτηρισμού του ελεύθερου ενζύμου προέρχονται από τη ΜΔΕ της κας Λάππα (Λάππα, ΜΔΕ, 2019).

** Δ/A : Δεν Αντιστοιχεί.

Η ακινητοποίηση του ενζύμου GDO δεν φαίνεται να επηρέασε τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται για τη β-γλυκοσιδάση (BGL) του στελέχους *Aspergillus niger* με το προφίλ της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου να παραμένει αμετάβλητο πριν και μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου σε τροποποιημένα μαγνητικά νανοσωματίδια (Madan L. Verma et al. 2013).

Μετά την ακινητοποίηση της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του Sphe3, η βέλτιστη δραστηριότητα του νανοβιοκαταλύτη 1,2-CDO-Ni²⁺-PDA-Fe₂O₄ εντοπίζεται στους 50 °C.



Εικόνα 4.14. Σύγκριση δραστηριότητας της ελεύθερης 1,2-CDO (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης 1,2-CDO (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Πίνακας 4.7. Τιμές δραστηριότητας ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου σε εύρος θερμοκρασιών.

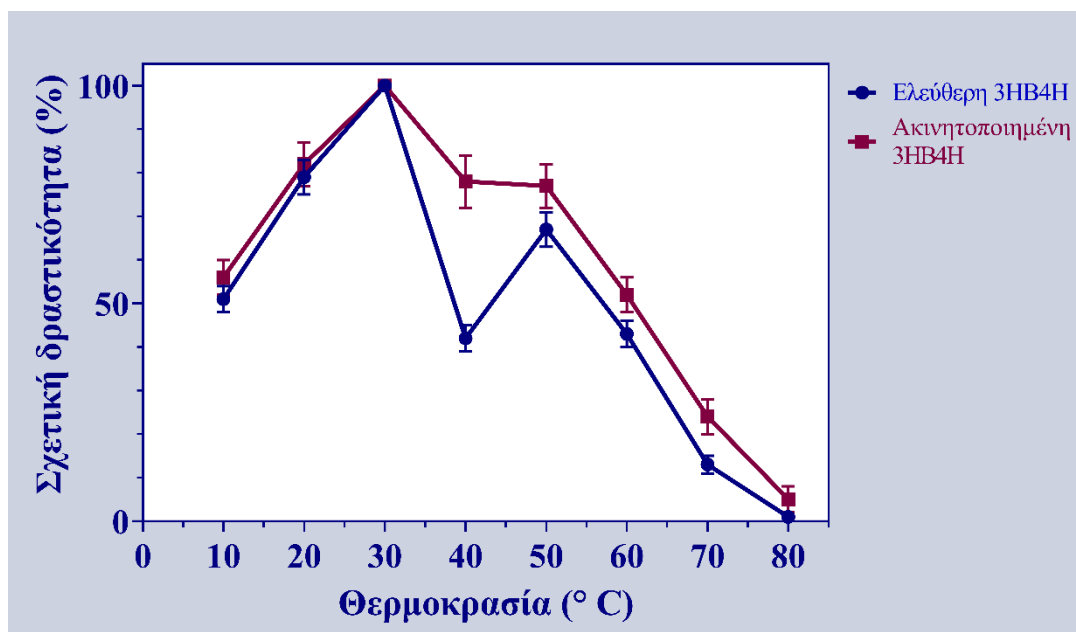
Θερμοκρασία (° C)	Ελεύθερη 1,2-CDO		Ακίνητοποιημένη 1,2-CDO	
	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)

5	0	0	54	3
10	1	0,8	56	3
15	1	0,3	60	2,5
20	8	1,1	71	3,4
25	38	4,3	76	3,3
30	100	Δ/Α*	82	1,2
35	94	3,8	83	1,5
40	82	2,8	86	2,9
45	62	1,1	97	1,8
50	47	3,2	100	Δ/Α*
55	11	2,7	80	3,4
60	3	1,3	74	2,5
65	2	0,9	65	1,9
70	0	0	53	1,8
75	0	0	37	3,1
80	0	0	31	2

*Δ/Α: Δεν Αντιστοιχεί.

Η ακινητοποίηση του ενζύμου 1,2-CDO του *Sphe3* φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του, η οποία είναι στους 30 °C για την ελεύθερη μορφή του ενζύμου και μετατοπίζεται στους 50 °C μετά την ακινητοποίηση. Την ίδια παρατήρηση έκαναν και οι Di Nardo και συνεργάτες, όταν μετά την ακινητοποίηση της 1,2-CDO του *A. chlorophenolicus* A6 η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου μετατοπίστηκε από τους 30 στους 50 °C (Di Nardo et al. 2009). Οι Silva και συνεργάτες μελέτησαν τη δραστικότητα της 1,2-CDO του *Mycobacterium fortuitum* σε κυτταρικό εκχύλισμα ελεύθερο κυττάρων και βρήκαν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι στους 25 °C, ενώ μετά την ακινητοποίηση της 1,2-CDO η μέγιστη ενζυμική δραστικότητα σημειώθηκε στους 45 °C (Silva et al. 2013). Παρομοίως, κατά τη μελέτη ακινητοποίησης μιας 3,3,4-PCD σε νανοσωλήνες άνθρακα παρατηρήθηκε η μετατόπιση της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου από τους 55 °C στους 60 °C (Das, Hamid, and Annuar 2016).

Μετά την ακινητοποίηση της 3HB4H, η βέλτιστη δραστικότητα του νανοβιοκαταλύτη 3HB4H-Ni²⁺-PDA-Fe₂O₄ είναι στους 50 °C. Η ακινητοποίηση του ενζύμου 3HB4H δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του, η οποία είναι στους 30 °C για την ελεύθερη μορφή του ενζύμου και παραμένει η ίδια και μετά την ακινητοποίηση.



Εικόνα 4.15. Σύγκριση δραστηρότητας της ελεύθερης 3HB4H (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακίνητοποιημένης 3HB4H (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Πίνακας 4.8. Τιμές δραστηρότητας ελεύθερου και ακίνητοποιημένου ενζύμου σε εύρος θερμοκρασιών.

Θερμοκρασία (° C)	Ελεύθερη 3HB4H		Ακίνητοποιημένη 3HB4H	
	Σχετική δραστηρότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηρότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
10	51	3	56	4
20	79	4	82	5
30	100	Δ/A^*	100	Δ/A^*
40	42	3	78	6
50	67	4	77	5
60	43	3	52	4
70	13	2	24	4
80	1	0,9	5	3

* Δ/A : Δεν Αντιστοιχεί.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί κατά την συν-ακίνητοποίηση σε τροποποιημένα μαγνητικά νανοσωματίδια (Ni-NTA/H₂N-SiO₂@Fe₃O₄) των δύο συστατικών, HraB και HraC, μιας υδροξυλάσης μονοοξυγονάσης, η οποία αναγνωρίζει ως υπόστρωμα το 3,4-διϋδροξυφαινυλοξικό οξύ και παρουσιάζει βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 20 °C, όπως και στην ελεύθερη κατάστασή της (Liao et al. 2020).

4.2.5 Θερμοσταθερότητα

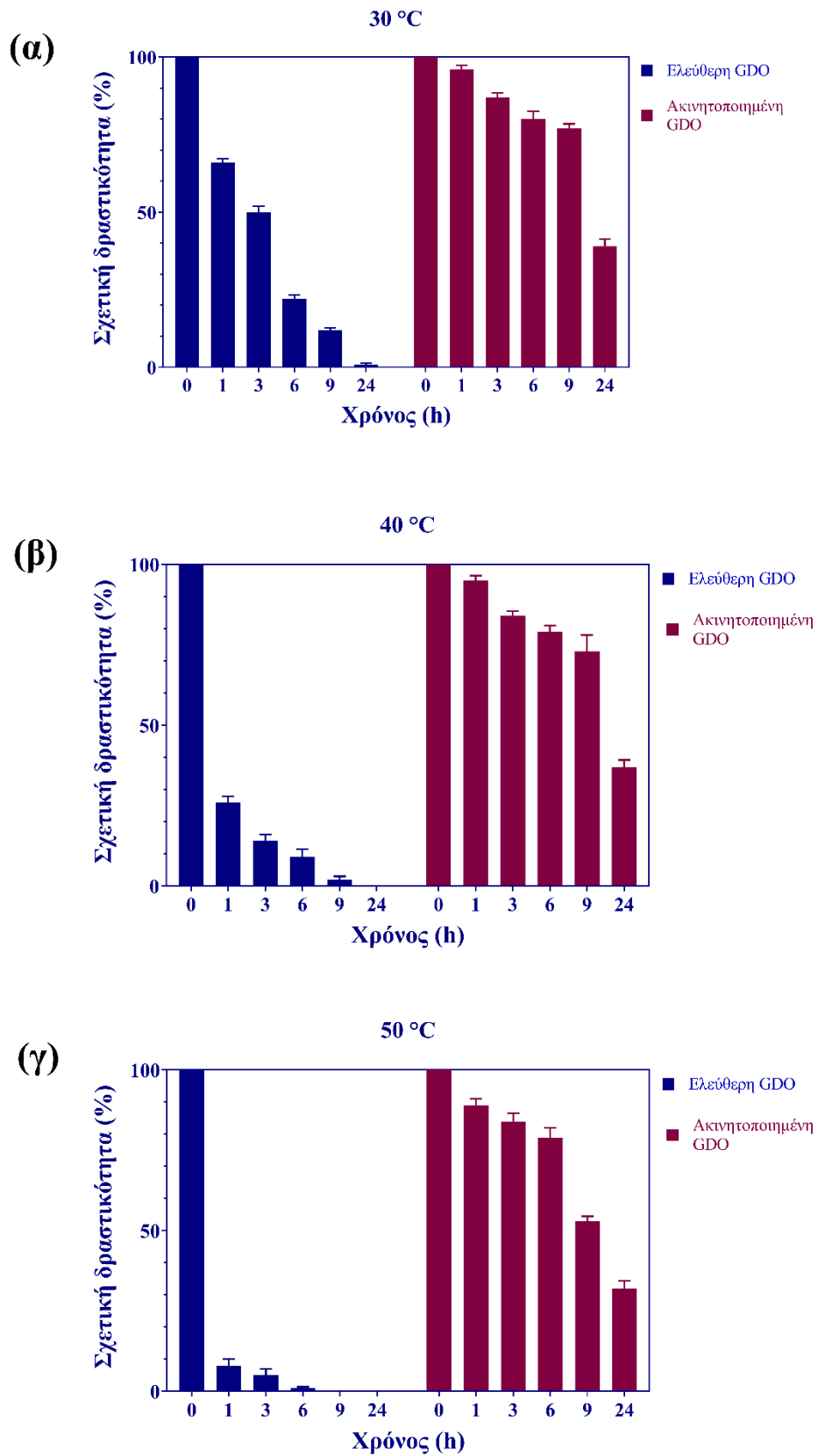
Ένα από τα μεγάλα πλεονεκτήματα της ακίνητοποίησης ενός ενζύμου σε κάποιον φορέα είναι η σταθερότητα που μπορεί να αποκτήσει σε ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος ώστε να

αναπτυχθεί ένας βιοκαταλύτης με ενισχυμένα χαρακτηριστικά και πιθανή εφαρμογή στη βιομηχανία. Η ενίσχυση της θερμοσταθερότητας ενός βιοκαταλύτη μετά την ακινητοποίηση αποτελεί σημαντικό επίτευγμα, καθώς υποδηλώνει την ανθεκτικότητά του στην μετουσίωση του πρωτεϊνικού μορίου κατά τη διάρκεια διαφόρων επώασεων (Gkantzou et al. 2021).

Με στόχο τη μελέτη της σταθερότητας του κάθε νανοβιοκαταλύτη σε διαφορετικές θερμοκρασίες πραγματοποιήθηκε επώαση του ελεύθερου ενζύμου και του ακινητοποιημένου σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (30 °C, 40 °C και 50 °C) και υπολογίστηκε η σχετική δραστηριότητα (%) σε διάφορα χρονικά διαστήματα (0, 1, 3, 6, 9 και 24 h).

Αρχικά, η ελεύθερη GDO μετά από επώαση 3 ωρών στους 30 °C χάνει το μισό της αρχικής δραστηριότητάς της, ενώ μετά από 24 ώρες έχει χάσει πάνω από το 99% της αρχικής της δραστηριότητας. Στους 40 °C χάνει σχεδόν το 75% της δραστηριότητάς της εντός μιας ώρας, ενώ στο ίδιο χρονικό διάστημα στους 50 °C χάνει το 92% της δραστηριότητάς της (Εικόνα 4.16).

Και ενώ η τάση μείωσης της ενζυμικής δραστηριότητας παρατηρείται και στο ακινητοποιημένο ένζυμο μετά από επώασή του σε αυξανόμενες θερμοκρασίες, είναι εντυπωσιακή η διαφορά στα ποσοστά μείωσης σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο. Ειδικότερα, ο νανοβιοκαταλύτης μετά από 3 h επώασης στους 30 °C διατηρεί το 85% της αρχικής του δραστηριότητας και παραμένει υψηλότερη του 50% μετά από 9 h επώασης, ενώ διατηρεί το 39% της αρχικής δραστηριότητας μετά από επώαση 24 ωρών. Αντίστοιχες τιμές παρατηρήθηκαν για το ακινητοποιημένο ένζυμο στους 40 °C και 50 °C, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.9).



Εικόνα 4.16. Γραφικές απεικονίσεις της δραστηριότητας της ελεύθερης (μπλε χρώμα) και ακίνητοποιημένης (κόκκινο χρώμα) GDO μετά από διάφορους χρόνους επώασης στους 30 °C (α), 40 °C (β) και 50 °C (γ). Η

δραστικότητα της πρώτης μέτρησης στο χρόνο 0 h ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Πίνακας 4.9. Τιμές σχετικής δραστηριότητας ελεύθερης και ακινητοποιημένης GDO μετά από επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

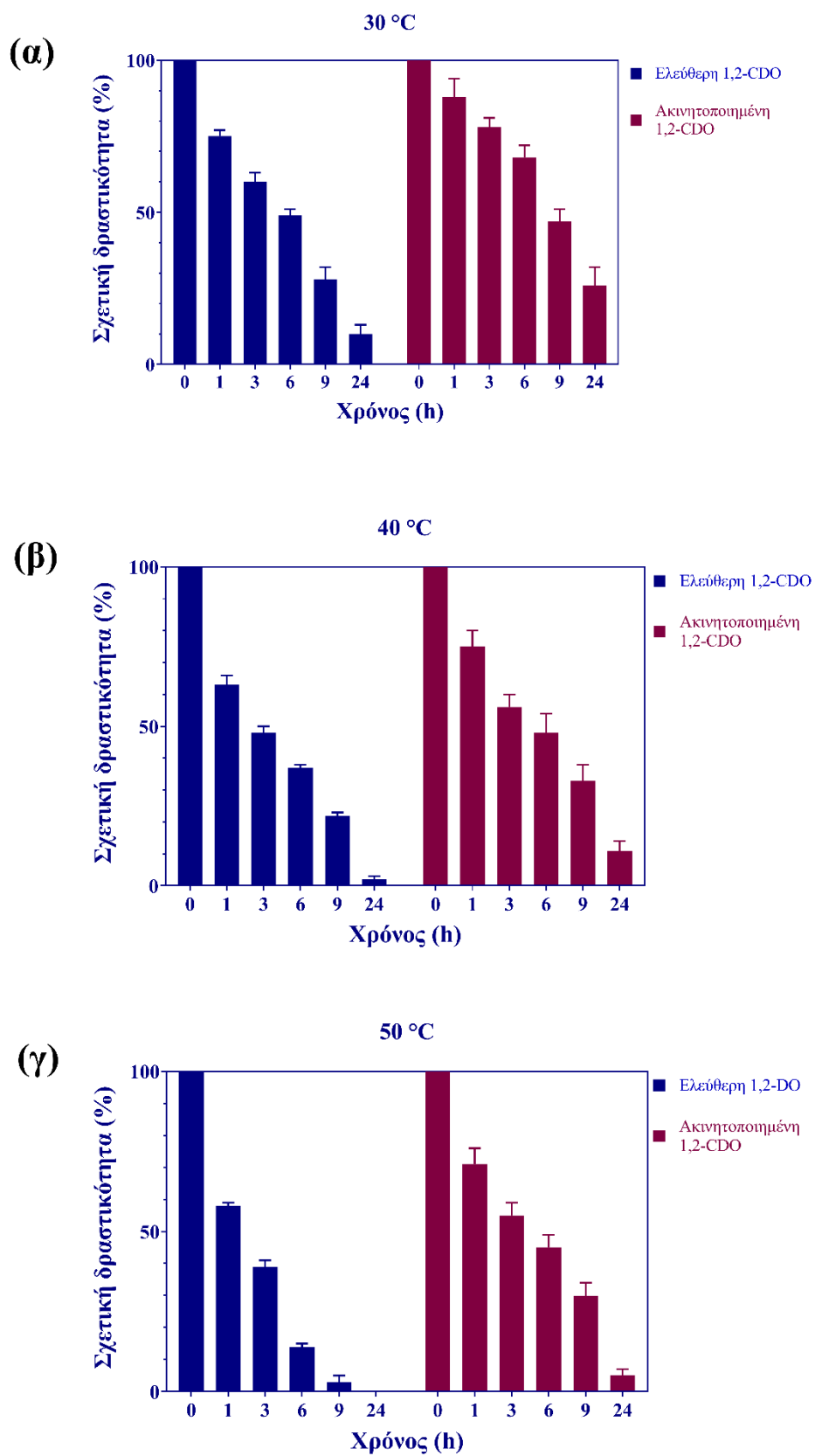
30 °C				
	Ελεύθερη GDO*		Ακινητοποιημένη GDO	
Χρόνος (h)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
0	100	Δ/A^{**}	100	Δ/A^{**}
1	66	1,2	96	1,3
3	50	2	87	1,4
6	22	1,3	80	2,5
9	12	0,75	77	1,5
24	0,95	0,35	39	2,3
40 °C				
	Ελεύθερη GDO*		Ακινητοποιημένη GDO	
Χρόνος (h)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
0	100	Δ/A^{**}	100	Δ/A^{**}
1	26	1,9	95	1,5
3	14	2	84	1,5
6	9	2,5	79	2
9	2	1	73	5
24	0	Δ/A^{**}	37	2,2
50 °C				
	Ελεύθερη GDO*		Ακινητοποιημένη GDO	
Χρόνος (h)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
0	100	Δ/A^{**}	100	Δ/A^{**}
1	8	2	89	2
3	5	2	84	2,5
6	1	0,4	79	3
9	0	Δ/A^{**}	53	1,5
24	0	Δ/A^{**}	32	2,4

* Τα αποτελέσματα για το χαρακτηρισμό του ελεύθερου ενζύμου προέρχονται από τη ΜΔΕ της κας Λάππα (Λάππα, ΜΔΕ, 2019).

**Δ/Α: Δεν Αντιστοιχεί.

Με δεδομένο ότι η πλειοψηφία των μελετημένων GDOs από Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτηριακά στελέχη είναι τετραμερή (Subbotina et al. 2021; Adams et al. 2006), το σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταξύ της ουράς ιστιδινών και νικελίου του νανοϋλικού πιθανώς καθιστά την πρωτεΐνη λιγότερο επιρρεπή σε αλλαγές διαμόρφωσης, προστατεύοντας το ένζυμο από θερμική μετουσίωση (Rodrigues et al. 2021; Fernandez-Lafuente 2009). Η χρήση νανοσωματιδίων πολυτοπαμίνης ενεργοποιημένων με νικέλιο για την ακινητοποίηση της ω -τρανσαμινάσης BJ110, αύξησε σημαντικά τη θερμοσταθερότητα του ενζύμου, αλλά και την σταθερότητά του σε διαφορετικά pH (J. Yang et al. 2015). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται για την 3,4-PCD, η οποία μετά την ακινητοποίηση της σε νανοσωλήνες άνθρακα παρουσίασε αυξημένη θερμοσταθερότητα σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου (Das, Hamid, and Annuar 2016). Η ίδια παρατήρηση έγινε για την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης, από τους Di Nardo και συνεργάτες, με τη θερμοανθεκτικότητα του ενζύμου να αυξάνεται τρεις φορές όταν βρίσκεται σε ακινητοποιημένη μορφή σε σχέση με την ελεύθερη κατάστασή του (Di Nardo et al. 2009).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η θερμοσταθερότητα της ακινητοποιημένης 1,2-CDO του Sphe3. Ο αναπτυγμένος νανοβιοκαταλύτης παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα στη δράση του στις διάφορες θερμοκρασίες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.17 και στον Πίνακα 4.10.



Εικόνα 4.17. Γραφικές απεικονίσεις της δραστηριότητας της ελεύθερης (μπλε χρώμα) και ακίνητοποιημένης (κόκκινο χρώμα) 1,2-CDO μετά από διάφορους χρόνους επώασης στους 30 °C (α), 40 °C (β) και 50 °C (γ). Η

δραστικότητα της πρώτης μέτρησης στο χρόνο 0 h ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Πίνακας 4.10. Τιμές σχετικής δραστηριότητας της ελεύθερης και ακινητοποιημένης 1,2-CDO μετά από επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

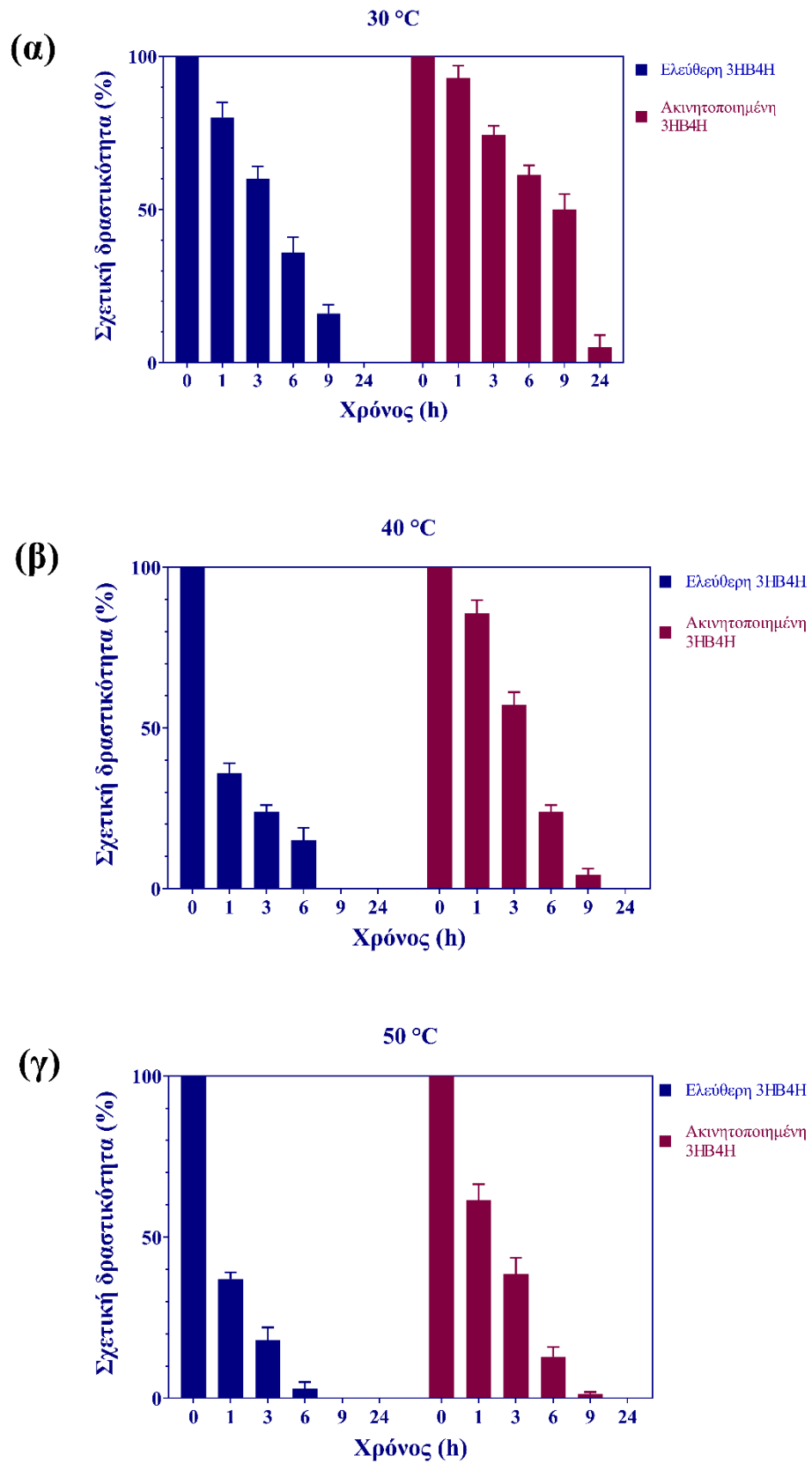
30 °C				
	Ελεύθερη 1,2-CDO		Ακινητοποιημένη 1,2-CDO	
Χρόνος (h)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
0	100	Δ/A^*	100	Δ/A^*
1	75	2	88	6
3	60	3	78	3
6	49	2	68	4
9	28	4	47	4
24	10	3	26	6
40 °C				
	Ελεύθερη 1,2-CDO		Ακινητοποιημένη 1,2-CDO	
Χρόνος (h)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
0	100	Δ/A^*	100	Δ/A^*
1	63	3	75	5
3	48	2	56	4
6	37	1	48	6
9	22	1	33	5
24	2	1	11	3
50 °C				
	Ελεύθερη 1,2-CDO		Ακινητοποιημένη 1,2-CDO	
Χρόνος (h)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
0	100	Δ/A^*	100	Δ/A^*
1	58	1	71	5
3	39	2	55	4
6	14	1	45	4
9	3	2	30	4
24	0	0	5	2

**Δ/Α: Δεν Αντιστοιχεί.*

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα για την ακινητοποίηση της GDO του Sphe3 και με τις άλλες μελέτες που αναφέρονται πιο πάνω (Di Nardo et al. 2009; Das, Hamid, and Annuar 2016), προτείνουν ότι η ακινητοποίηση μέσω συγγένειας των ενζύμων με επίτοπο ιστιδινών θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη ισχυρών βιοκαταλυτών, που παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα έναντι της μετουσίωσης σε περιβάλλοντα με υψηλές θερμοκρασίες. Ειδικά, όσον αφορά στα ένζυμα διοξυγονασών που τυπικά χαρακτηρίζονται από χαμηλή θερμική σταθερότητα, η ακινητοποίηση σε κατάλληλους φορείς αποτελεί έναν από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους ενίσχυσης της σταθερότητάς τους και, επομένως, διεύρυνσης των εφαρμογών τους.

Επιπλέον, μελετήθηκε η θερμοσταθερότητα της ακινητοποιημένης 3HB4H. Όπως παρατηρείται (Εικόνα 4.18, Πίνακας 4.11), αν και το ελεύθερο ένζυμο φαίνεται να παρουσιάζει μια σχετικά καλή θερμοσταθερότητα και στις 3 θερμοκρασίες, η ακινητοποίησή του ενισχύει τη σταθερότητά του. Για παράδειγμα, στους 30 °C στις 9 h επώασης η δραστηριότητα του ελεύθερου ενζύμου έχει πέσει περίπου στο 15%, ενώ ο νανοβιοκαταλύτης τη διατηρεί στο 50%. Στην ίδια θερμοκρασία μετά από επώαση 24 h δεν εντοπίζεται δραστηριότητα για το ελεύθερο ένζυμο, ενώ στις αντίστοιχες συνθήκες η ακινητοποίηση της 3HB4H στα νανοσωματίδια φαίνεται να συμβάλλει -αν και σε χαμηλό ποσοστό- στη διατήρηση της δραστηριότητάς.

Χαρακτηριστική διαφορά στην απόδοση ελεύθερου-ακινητοποιημένου ενζύμου παρατηρείται μετά από επώαση 1 h στους 40 °C, όπου η ελεύθερη 3HB4H χάνει περίπου το 65% της δραστηριότητάς της, ενώ η ακινητοποιημένη 3HB4H χάνει μόλις το 25%. Αντίστοιχα αποτελέσματα σημειώθηκαν μετά από επώαση 1 h για τους 50 °C όπου το ελεύθερο ένζυμο χάνει περίπου το 65% της δραστηριότητάς της, ενώ η ακινητοποιημένη 3HB4H χάνει το 40%.



Εικόνα 4.18. Γραφικές απεικονίσεις της δραστηριότητας της ελεύθερης (μπλε χρώμα) και ακίνητοποιημένης (κόκκινο χρώμα) 3HB4H μετά από διάφορους χρόνους επώασης στους 30 °C (α), 40 °C (β) και 50 °C (γ). Η

δραστικότητα της πρώτης μέτρησης στο χρόνο 0 h ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Πίνακας 4.11. Τιμές σχετικής δραστηριότητας ελεύθερης και ακινητοποιημένης 3HB4H μετά από επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

30 °C				
	Ελεύθερη 3HB4H		Ακινητοποιημένη 3HB4H	
Χρόνος (h)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
0	100	Δ/A^*	100	Δ/A^*
1	80	5	93	4
3	60	4	74	3
6	36	5	61	3
9	16	3	50	5
24	0	Δ/A^*	5	4
40 °C				
	Ελεύθερη 3HB4H		Ακινητοποιημένη 3HB4H	
Χρόνος (h)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
0	100	Δ/A^*	100	Δ/A^*
1	36	3	86	4
3	24	2	57	4
6	15	4	24	2
9	0	Δ/A^*	4	2
24	0	Δ/A^*	0	Δ/A^*
50 °C				
	Ελεύθερη 3HB4H		Ακινητοποιημένη 3HB4H	
Χρόνος (h)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστηριότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
0	100	Δ/A^*	100	Δ/A^*
1	37	2	61	5
3	18	4	39	5
6	3	2	13	3
9	0	Δ/A^*	1	0,5
24	0	Δ/A^*	0	Δ/A^*

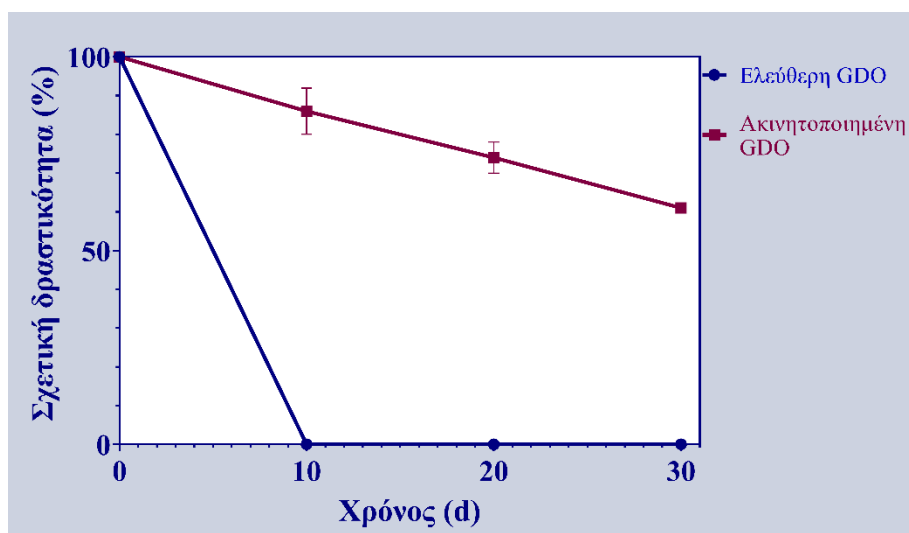
*Δ/Α: Δεν Αντιστοιχεί.

Παρόμοια αποτελέσματα για τέτοιου τύπου ένζυμα έχουν αναφερθεί για την φλαβινοεξαρτώμενη μονοξυγονάση της φαινυλακετόνης (PAMO) μετά από ακινητοποίηση του αποενζύμου σε αгарόζη τροποποιημένη με FAD, δηλαδή παρατηρήθηκε ενίσχυση της σταθερότητας του ενζύμου στους 60 °C μετά από επώαση 1 h, ενώ η ελεύθερη PAMO στις ίδιες συνθήκες έχασε εντελώς τη δραστηρότητά της (Krzek et al. 2016).

4.2.6 Διατήρηση ενζυμικής δραστηρότητας κατά την αποθήκευση

Η σταθερότητα αποθήκευσης ενός ενζύμου αναφέρεται στη διατήρηση των καταλυτικών του ιδιοτήτων το χρονικό διάστημα μεταξύ της παραγωγής του και της χρήσης του. Η αδρανοποίηση ενζύμων ή η μετουσίωση των πρωτεϊνών, οι περιβαλλοντικές αλλαγές, η μη πρόσβαση των υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και η μείωση του σχηματισμού συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος έχουν ως αποτέλεσμα απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας και χαμηλή σταθερότητα, καθιστώντας την άμεση εφαρμογή των ενζύμων στις διαδικασίες βιοαποκατάστασης αναποτελεσματική (Alemzadeh and Nejati 2009; Schnell and Hanson 2007).

Γενικά, οι 1,2-διοξυγονάσες του γεντισικού οξέος χαρακτηρίζονται ως ασταθή ένζυμα, διότι οι καταλυτικές τους ιδιότητες δεν διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την παραγωγή τους (Suárez, Ferrer, & Martín, 1996; Werwath, Arfmann, Pieper, Timmis, & Wittich, 1998; Λάπα, ΜΔΕ, 2019). Στο πλαίσιο προσδιορισμού των ιδιοτήτων του νανοβιοκαταλύτη GDO-Ni²⁺-PDA-Fe₂O₄ μελετήθηκε και η διατήρηση της καταλυτικής ικανότητας του ενζύμου κατά την αποθήκευσή του στους -20 °C σε χρονικό διάστημα ενός μήνα.



Εικόνα 4.19. Διατήρηση δραστηριότητας της ελεύθερης (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) GDO μετά από αποθήκευση στους -20 °C για διάστημα ενός μήνα σε υδατικό διάλυμα (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Η δραστηριότητα της πρώτης μέρας αποθήκευσης ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Πίνακας 4.12. Τιμές δραστικότητας της ελεύθερης και ακινητοποιημένης GDO κατόπιν αποθήκευσης στους -20°C για διάστημα ενός μήνα.

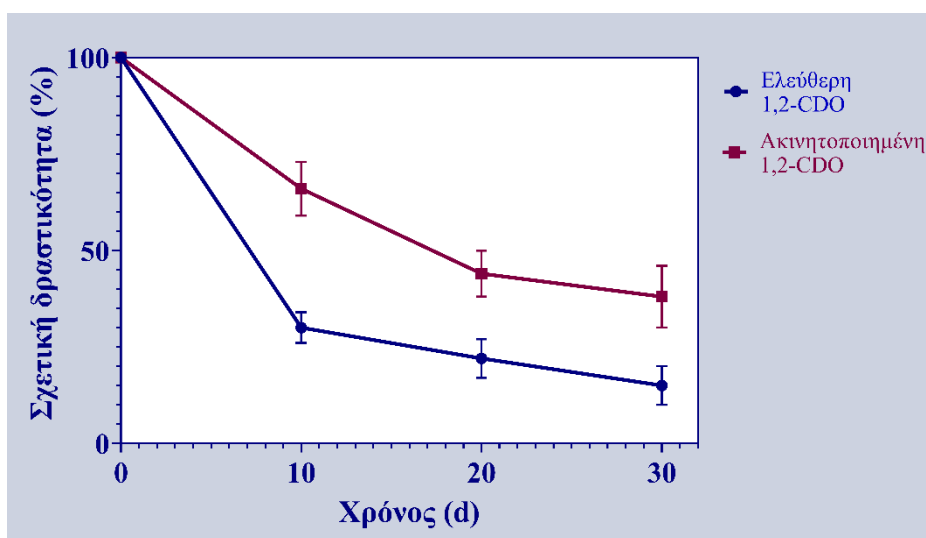
Χρόνος (d)	Ελεύθερη GDO*		Ακινητοποιημένη GDO	
	Σχετική δραστικότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm\text{SD}$, N=3)	Σχετική δραστικότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm\text{SD}$, N=3)
0	100	Δ/A^{**}	100	Δ/A^{**}
10	0	Δ/A^{**}	86	6
20	0	Δ/A^{**}	74	4
30	0	Δ/A^{**}	61	1

* Τα αποτελέσματα για το χαρακτηρισμό του ελεύθερου ενζύμου προέρχονται από τη ΜΔΕ της κας Λάππα (Λάππα, ΜΔΕ, 2019).

** Δ/A : Δεν Αντιστοιχεί.

Παρατηρείται ότι η ελεύθερη GDO χάνει τη δραστικότητά της κατά την αποθήκευση εντός 10 ημερών (Εικόνα 4.19, Πίνακας 4.12). Αντιθέτως, το ακινητοποιημένο ένζυμο διατηρεί δραστικότητα μεγαλύτερη του 60% σε σχέση με την πρώτη μέτρηση (100%), ακόμα και μετά από ένα μήνα αποθήκευσης στους -20°C .

Στην περίπτωση της 1,2-CDO του Sphe3, η ενζυμική δραστικότητα του ελεύθερου ενζύμου κατά την αποθήκευση στους -20°C μειώνεται σημαντικά μετά από 30 ημέρες, ενώ η ακινητοποίηση του ενζύμου φαίνεται να προσδίδει μια ενίσχυση στη σταθερότητά του (Εικόνα 4.20, Πίνακας 4.13).



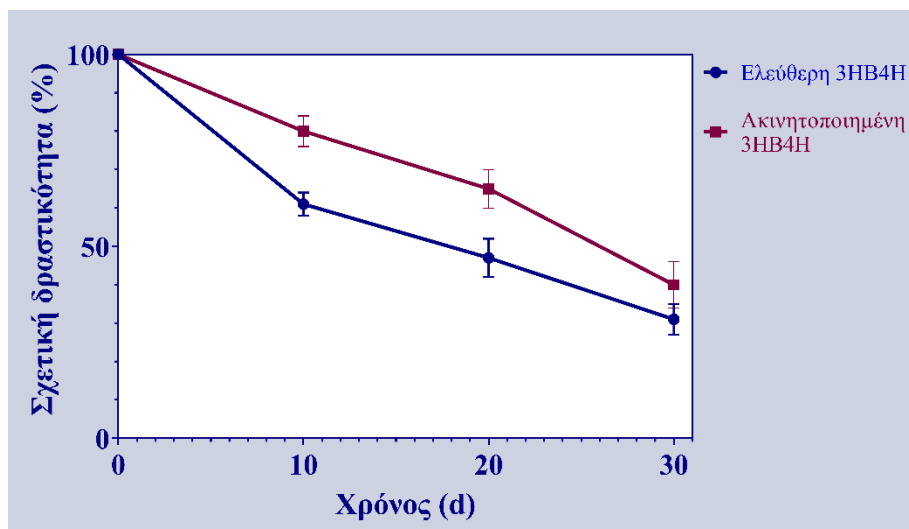
Εικόνα 4.20. Διατήρηση δραστικότητας της ελεύθερης (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) 1,2-CDO μετά από αποθήκευση στους -20°C για διάστημα ενός μήνα σε υδατικό διάλυμα (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Η δραστικότητα της πρώτης μέρας αποθήκευσης ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm\text{SD}$, N=3).

Πίνακας 4.13. Τιμές δραστικότητας της ελεύθερης και ακινητοποιημένης 1,2-CDO κατόπιν αποθήκευσης στους -20 °C για διάστημα ενός μήνα.

Χρόνος (d)	Ελεύθερη 1,2-CDO		Ακινητοποιημένη 1,2-CDO	
	Σχετική δραστικότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστικότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
0	100	Δ/Δ^*	100	Δ/Δ^*
10	30	4	66	7
20	22	5	44	6
30	15	5	38	8

* Δ/Δ : Δεν Αντιστοιχεί.

Η 3HB4H του Sph6, στην ελεύθερη μορφή της, διατηρεί τη δραστικότητά της μετά από αποθήκευση στους -20 °C για διάστημα ενός μήνα, μετά από καθαρισμό και χωρίς την προσθήκη FAD κατά την αποθήκευση, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (3.3.4.6). Ελέγχθηκε λοιπόν, εάν η ακινητοποίησή της ενισχύει τη σταθερότητά της κατά την αποθήκευση σε σχέση με την ελεύθερη 3HB4H.



Εικόνα 4.21. Διατήρηση δραστικότητας της ελεύθερης (μπλε γραμμή, στρογγυλά σύμβολα) και της ακινητοποιημένης (κόκκινη γραμμή, τετράγωνα σύμβολα) 3HB4H μετά από αποθήκευση στους -20 °C για διάστημα ενός μήνα σε υδατικό διάλυμα (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Η δραστικότητα της πρώτης μέρας αποθήκευσης ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Πίνακας 4.14. Τιμές δραστικότητας της ελεύθερης και ακινητοποιημένης 3HB4H κατόπιν αποθήκευσης στους -20 °C για διάστημα ενός μήνα.

Χρόνος (d)	Ελεύθερη 3HB4H		Ακινητοποιημένη 3HB4H	
	Σχετική δραστικότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)	Σχετική δραστικότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
0	100	Δ/Δ^*	100	Δ/Δ^*

10	61	3	80	4
20	47	5	65	5
30	31	4	40	6

*Δ/Α: Δεν Αντιστοιχεί.

Παρατηρείται μια σημαντική διαφορά στην απόδοση της δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης και της 4-υδροξυλάσης του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος μεταξύ των δύο μορφών τους, ελεύθερη και ακινητοποιημένη, που υποδηλώνει ότι κατά την ακινητοποίησή τους το κάθε ένζυμο γίνεται πιο ανθεκτικό στις αλλαγές της διαμόρφωσής του, που πιθανώς επηρεάζουν την απόδοσή του κατά την αποθήκευση στους -20°C .

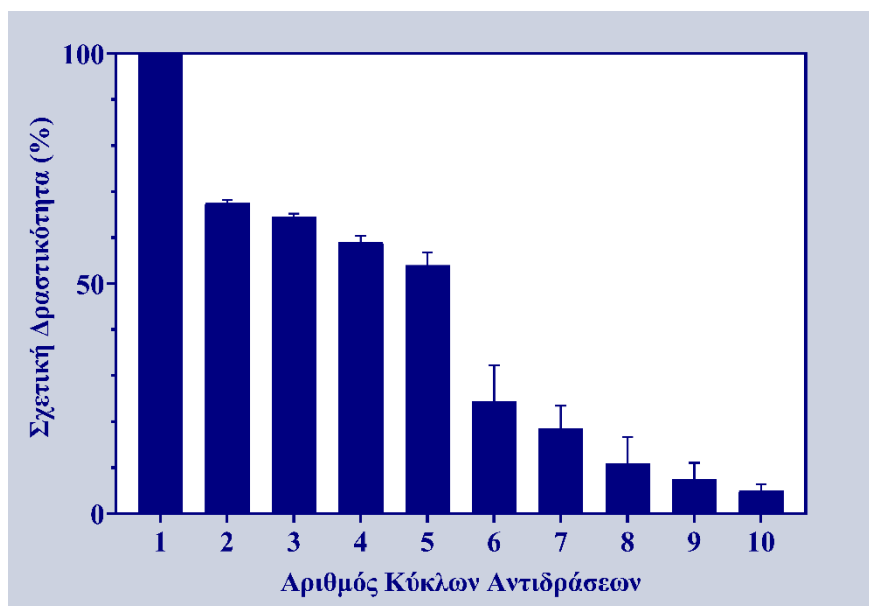
Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν οι Liao και συνεργάτες, οι οποίοι παρατήρησαν μεγαλύτερη σταθερότητα στην ακινητοποιημένη μορφή της HraBC μετά από αποθήκευσή της στους 4°C , σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο (Liao et al. 2020). Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει στο παρελθόν για διοξυγονάσες της κατεχόλης, οι οποίες διατήρησαν τις καταλυτικές τους ιδιότητες μετά από ακινητοποίησή τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με την ελεύθερη μορφή τους (Kalogeris et al. 2006; Wojcieszynska et al. 2012). Αξίζει να αναφερθεί ότι η ακινητοποίηση της καρβονικής ανυδράσης II, σημασμένης με His-tag, σε τροποποιημένες νανοράβδους με νικέλιο συντέλεσε στην διατήρηση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 40% μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης, ενώ το ελεύθερο ένζυμο στο ίδιο χρονικό διάστημα έχασε το 91% της αρχικής δραστηριότητάς του (Jiao et al. 2020).

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η ακινητοποίηση μέσω συγγένειας των πρωτεϊνών που φέρουν His-tag σε νανοϋλικά με νικέλιο στην επιφάνειά τους μπορεί να επιφέρει σταθερότητα στη δράση του μορίου παρέχοντας μηχανική προστασία έναντι της μετουσίωσης για μεγάλο χρονικό διάστημα αποθήκευσης.

4.2.7 Επαναχρησιμοποίηση

Τέλος, για τη μελέτη της επαναχρησιμοποίησης κάθε νανοβιοκαταλύτη πραγματοποιήθηκε ανάκτηση του ακινητοποιημένου ενζύμου με μαγνητικό διαχωρισμό από το διάλυμα της αντίδρασης μετά από κάθε κύκλο αντίδρασης. Ακολουθούσε προσεκτική έκπλυση του νανοβιοκαταλύτη και εκ νέου προσθήκη του σε νέα παρτίδα αντίδρασης.

Στην περίπτωση της GDO, το ακινητοποιημένο ένζυμο μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί μέχρι 5 φορές διατηρώντας τη δραστηριότητά του άνω του 50%, όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 4.22). Από τον 6^ο κύκλο επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλύτη η δραστηριότητα μειώνεται σημαντικά και συνεχίζει να ανιχνεύεται μέχρι τον 10^ο κύκλο, ενώ στον 11^ο δεν υπάρχει πλέον ενζυμική δραστηριότητα (Πίνακας 4.15).



Εικόνα 4.22. Διαγραμματική απεικόνιση της δραστικότητας του νανοβιοκαταλύτη $GDO-Ni^{2+}-PDA-Fe_2O_4$ κατά την επαναχρησιμοποίησή του. Η δραστικότητα στον πρώτο κύκλο ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm SD$, $N=3$).

Πίνακας 4.15. Τιμές σχετικής δραστικότητας του νανοβιοκαταλύτη $GDO-Ni^{2+}-PDA-Fe_2O_4$ ανά κύκλο επαναχρησιμοποίησης.

Κύκλοι επαναχρησιμοποίησης νανοβιοκαταλύτη	Σχετική δραστικότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm SD$, $N=3$)
1	100	Δ/A *
2	68	0,8
3	65	0,7
4	59	1,4
5	55	2,1
6	28	2,8
7	21	1,4
8	14	1,5
9	10	0,7
10	6	2,2
11	0	Δ/A *

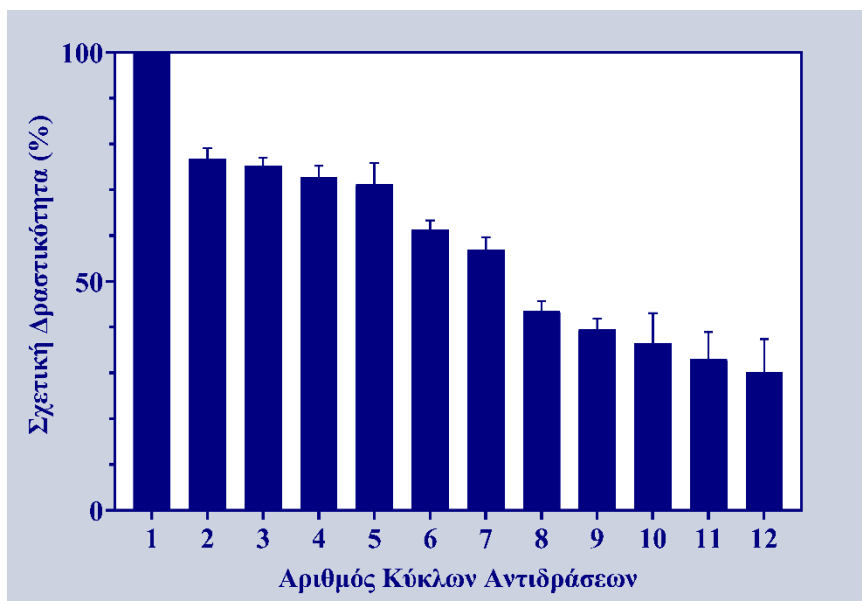
* Δ/A : Δεν Αντιστοιχεί

Η μείωση στην δραστικότητα του νανοβιοκαταλύτη που παρατηρείται με την επαναχρησιμοποίησή του μπορεί να αποδοθεί σε αλλαγές της διαμόρφωσης του ακινητοποιημένου ενζύμου (Chatzikonstantinou et al. 2019) ή σε μηχανική φθορά του νανοβιοκαταλύτη κατά την επαναλαμβανόμενη χρήση του (Giannakopoulou et al. 2019).

Προς το παρόν δεν υπάρχουν δεδομένα επαναχρησιμοποίησης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος από καμία άλλη μελέτη. Ωστόσο, ακινητοποιήσεις παρόμοιων ενζύμων σε

διάφορους φορείς έχουν παρόμοια αποτελέσματα ως προς την επαναχρησιμοποίησή τους, δηλαδή η δραστικότητα του βιοκαταλύτη φθίνει με την αύξηση των κύκλων χρήσης (Das, Hamid, and Annuar 2016; Liao et al. 2020; Yang Zhou et al. 2017; Madan L. Verma et al. 2013; Darwesh, Matter, and Eida 2019).

Όσον αφορά στην 1,2-CDO, το ακινητοποιημένο ένζυμο μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί μέχρι 7 φορές διατηρώντας τη δραστικότητά του άνω του 50% (Εικόνα 4.23). Από τον 8^ο κύκλο επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλύτη η δραστικότητα μειώνεται, ενώ συνεχίζει να ανιχνεύεται μέχρι τον 12^ο κύκλο με σχετική δραστικότητα περίπου >30%.



Εικόνα 4.23. Διαγραμματική απεικόνιση της δραστικότητας του νανοβιοκαταλύτη 1,2-CDO-Ni²⁺-PDA-Fe₂O₄ κατά την επαναχρησιμοποίησή του. Η δραστικότητα στον πρώτο κύκλο ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων ($\pm$ SD, N=3).

Πίνακας 4.16. Τιμές σχετικής δραστικότητας του νανοβιοκαταλύτη 1,2-CDO-Ni²⁺-PDA-Fe₂O₄ ανά κύκλο επαναχρησιμοποίησης.

Κύκλοι επαναχρησιμοποίησης νανοβιοκαταλύτη	Σχετική δραστικότητα (%)	Τυπική Απόκλιση ($\pm$ SD, N=3)
1	100	Δ/A^*
2	77	2
3	75	2
4	73	2
5	71	5
6	61	2
7	57	3
8	44	2
9	40	2

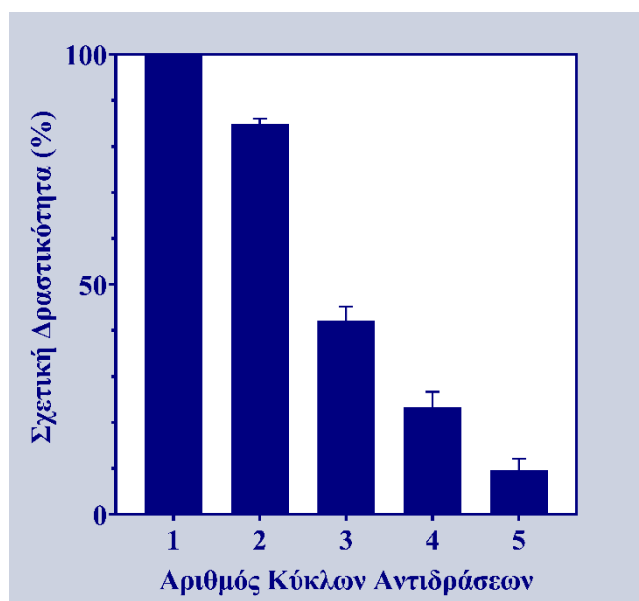
10	37	6
11	33	6
12	30	7

*Δ/Α: Δεν Αντιστοιχεί.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την επαναχρησιμοποίηση της ακινητοποιημένης 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του στελέχους *Pseudomonas putida*, η οποία μετά την ακινητοποίησή της σε σφαιρίδια αλγινικού νατρίου, κατέστη εφικτό να χρησιμοποιηθεί για 5 διαδοχικούς κύκλους με διατήρηση >70% της αρχικής της δραστηρότητας (Kalogeris et al. 2006). Παρομοίως, οι Suma και συνεργάτες χρησιμοποίησαν την ακινητοποιημένη 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης μέχρι και 7 φορές με διατήρηση της δραστηρότητάς της >40% (Suma et al. 2016).

Αντιθέτως, σημαντικότερη απόδοση για την επαναχρησιμοποίηση της ακινητοποιημένης-σε-νανοσπόγγους 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης έχει αναφερθεί από τους Di Nardo και συνεργάτες, οι οποίοι παρατήρησαν ότι ο νανοβιοκαταλύτης μπόρεσε να επαναχρησιμοποιηθεί μέχρι και 50 φορές διατηρώντας το 50% της αρχικής του δραστηρότητας (Di Nardo et al. 2009).

Τέλος, αξιολογήθηκε η επαναχρησιμοποίηση της 3HB4H και όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 4.24) το ακινητοποιημένο ένζυμο διατήρησε τη δραστηρότητά του >40% για 3 κύκλους αντιδράσεων, ενώ δραστηρότητα ανιχνεύθηκε μέχρι και τους 5 κύκλους επαναχρησιμοποίησης.



Εικόνα 4.24. Διαγραμματική απεικόνιση της δραστηρότητας του νανοβιοκαταλύτη 3HB4H-Ni²⁺-PDA-Fe₂O₄ κατά την επαναχρησιμοποίησή του. Η δραστηρότητα στον πρώτο κύκλο ορίστηκε ως 100%. Οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από μετρήσεις 3 διαφορετικών πειραμάτων (±SD, N=3).

Πίνακας 4.17. Τιμές σχετικής δραστηρότητας του νανοβιοκαταλύτη 3HB4H-Ni²⁺-PDA-Fe₂O₄ ανά κύκλο επαναχρησιμοποίησης.

Κύκλοι επαναχρησιμοποίησης	Σχετική δραστηρότητα	Τυπική Απόκλιση (±SD,
----------------------------	----------------------	-----------------------

νανοβιοκαταλύτη	(%)	N=3)
1	100	Δ/Α*
2	85	2
3	42	4
4	24	5
5	10	2
6	-	Δ/Α*

*Δ/Α: Δεν Αντιστοιχεί

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την ακινητοποιημένη μονοξυγονάση της φαινυλακετόνης (PAMO), δηλαδή κατέστη εφικτό να επαναχρησιμοποιηθεί 3 φορές διατηρώντας >50% της αρχικής της δραστηρότητας, ενώ από τον πρώτο κύκλο επαναχρησιμοποίησής της χάνει περίπου το 13% (Krzek et al. 2016). Αντιθέτως, η ακινητοποιημένη υδροξυλάση του 3,4-διϋδροξυφαινυλοξικού οξέος (HpaBC) σε τροποποιημένα μαγνητικά νανοσωματίδια επαναχρησιμοποιήθηκε για 7 κύκλους διατηρώντας >60% της αρχικής της δραστηρότητας (Liao et al. 2020).

4.3 Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκαν τρεις λειτουργικοί νανοβιοκαταλύτες ύστερα από ακινητοποίηση των καταβολικών ενζύμων 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος, 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης και 4-υδροξυλάση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (GDO, 1,2-CDO και 3HB4H, αντίστοιχα) του βακτηριακού στελέχους *P. phenanthrenivorans* Sphe3 και επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός τους.

Ως φορείς ακινητοποίησης δοκιμάστηκαν διάφορα νανοϋλικά (γραφένιο, οξείδια του γραφενίου, τροποποιημένα οξείδια του γραφενίου και μαγνητικά νανοσωματίδια σιδήρου επικαλυμμένα με χιτοζάνη) τα οποία δεν οδήγησαν σε επιτυχή ακινητοποίηση των ενζύμων. Τελικά, ως η πλέον αποτελεσματική αποδείχθηκε η μέθοδος ταυτόχρονης ακινητοποίησης και απομόνωσης ενός ενζύμου από κυτταρικό εκχύλισμα ελεύθερο κυττάρων πάνω σε μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου σιδήρου (Fe₂O₄) επικαλυμμένα με πολυτοπαμίνη (PDA) και ενεργοποιημένα με ιόντα νικελίου (Ni²⁺), αξιοποιώντας την ουρά ιστιδινών (His-tag) του κάθε ανασυνδυασμένου ενζύμου μέσω της συγγένειας που παρουσιάζει με το νικέλιο. Τα πολυάριθμα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης σε μαγνητικά νανοσωματίδια μέσω της συγγένειας νικελίου-His-tag χαρακτηρίζονται από υψηλές αποδόσεις και αποτελεσματικότητα της συνολικής διαδικασίας, η οποία προσφέρει σημαντικές δυνατότητες για το σχεδιασμό νέων βιοκαταλυτών για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Επιπλέον, λόγω του μαγνητικού πυρήνα των Ni²⁺-PDA-MNPs, ο βιοκαταλύτης μπορούσε να διαχωριστεί αποτελεσματικά από την αντίδραση με τη χρήση μαγνήτη, διευκολύνοντας την επαναχρησιμοποίησή του.

Για κάθε ένζυμο πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου ακινητοποίησης ως προς την αναλογία ενζυμικού παρασκευάσματος και νανοϋλικού και τον χρόνο επώασης της ακινητοποίησης. Η επιβεβαίωση της ακινητοποίησης του κάθε ενζύμου πάνω στα

νανοσωματίδια ελέγχθηκε και με τη συσχέτιση του όγκου του κάθε νανοβιοκαταλύτη με την ενζυμική δραστηριότητα με φωτομετρικούς προσδιορισμούς και με φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Συνεπώς, επιτεύχθηκε η ακινητοποίηση του κάθε ενζύμου παράλληλα με την απομόνωσή του από το εκάστοτε κυτταρικό εκχύλισμα, ακολουθώντας ένα σχετικά απλό και οικονομικό πρωτόκολλο, ενώ η χρήση των μαγνητικών νανοσωματιδίων ως φορέα ακινητοποίησης επιτρέπει την ανάκτηση του νανοβιοκαταλύτη με την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου.

Όσον αφορά στην ακινητοποίηση της GDO του *Srhe3*, οι συνθήκες ακινητοποίησης καθορίστηκαν στα 30 min επώασης και χρήση ενζύμου:νανοϋλικού σε αναλογία 2:1. Μετά την ακινητοποίησή του το ένζυμο διατήρησε σημαντική καταλυτική δραστηριότητα για τους πέντε πρώτους διαδοχικούς κύκλους αντίδρασης. Επίσης, μετά από σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο, ο νανοβιοκαταλύτης παρουσίασε καλύτερη σταθερότητα σε θερμοκρασίες 30-50 °C. Είναι γνωστό ότι η GDO είναι ένα εξαιρετικά ασταθές ένζυμο ως προς τη διατήρηση της δραστηριότητάς του και το ίδιο ισχύει για την GDO του *Srhe3*. Η ακινητοποίηση της GDO σε αυτή την εργασία είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της δραστηριότητάς της άνω του 60% μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης του νανοβιοκαταλύτη στους -20 °C. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκε το προϊόν της αντίδρασης του νανοβιοκαταλύτη με ¹H NMR. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ακινητοποίηση της GDO δεν έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία μέχρι τώρα.

Όσον αφορά στην ακινητοποίηση της 1,2-CDO, οι συνθήκες ακινητοποίησης καθορίστηκαν στα 30 min επώασης και χρήση ενζύμου:νανοϋλικού σε αναλογία 5:1. Η 1,2-CDO έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης σε πολλούς μικροοργανισμούς, διότι η κατεχόμενη αποτελεί έναν από τους πιο συχνούς ενδιάμεσους μεταβολίτες σε πορείες καταβολισμού αρωματικών ενώσεων και επίσης, οδηγεί στην παραγωγή του *cis*, *cis*-μουκονικού οξέος, ενός προϊόντος υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η ακινητοποίηση αυτού του ενζύμου οδήγησε στην ανάπτυξη ενός νανοβιοκαταλύτη με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 50°C και ενισχυμένη ανθεκτικότητα στις θερμοκρασίες 30, 40 και 50 °C. Επιπλέον, παρουσιάζει δραστηριότητα σε τιμές pH 7-11 και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί μέχρι 7 φορές διατηρώντας τη δραστηριότητά του άνω του 50%. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν το νανοβιοκαταλύτη κατάλληλο για εφαρμογές τόσο στην απορρύπανση όσο και στη βιομηχανία με στόχο την απομάκρυνση αρωματικών ρυπαντών και την παραγωγή του μουκονικού οξέος, αντίστοιχα.

Όσον αφορά στην ακινητοποίηση της 3HB4H, οι συνθήκες ακινητοποίησης καθορίστηκαν στα 30 min επώασης και χρήση ενζύμου:νανοϋλικού σε αναλογία 1:1. Το ένζυμο αυτό δεν έχει μελετηθεί σε πολλούς μικροοργανισμούς και η δράση του οδηγεί στην παραγωγή ενός σημαντικού ενδιάμεσου μεταβολίτη σε διάφορες καταβολικές πορείες, του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιήθηκε η ακινητοποίηση μιας 3HB4H και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του νανοβιοκαταλύτη, ενώ οι βιβλιογραφικές αναφορές σε ένζυμα της ίδιας οικογένειας είναι περιορισμένες. Μετά την ακινητοποίηση της 3HB4H, αυξήθηκε η συγγένεια για το υπόστρωμα 3-HBA, ενώ δεν επηρεάστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του ακινητοποιημένου ενζύμου όσον αφορά στο pH και τη θερμοκρασία, που παρέμειναν ίδιες όπως και στο ελεύθερο ένζυμο, 8,5 και 30 °C αντίστοιχα. Επιπλέον, η ακινητοποιημένη 3HB4H εμφάνισε ελαφρώς αυξημένη

θερμοσταθερότητα κατά την επώαση του νανοβιοκαταλύτη στους 30, 40 και 50 °C. Η ακινητοποίηση φαίνεται να ευνόησε και τη σταθερότητα του ενζύμου κατά την αποθήκευση, αφού παρουσίασε 10-20% αυξημένη δραστητικότητα σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου στις 10, 20 και 30 ημέρες αποθήκευσης στους -20 °C. Τέλος, ο νανοβιοκαταλύτης επαναχρησιμοποιήθηκε 3 φορές διατηρώντας τη δραστητικότητα της 3HB4H >40%, ενώ ανιχνεύθηκε δραστητικότητα μέχρι και μετά από 5 κύκλους επαναχρησιμοποίησης.

5

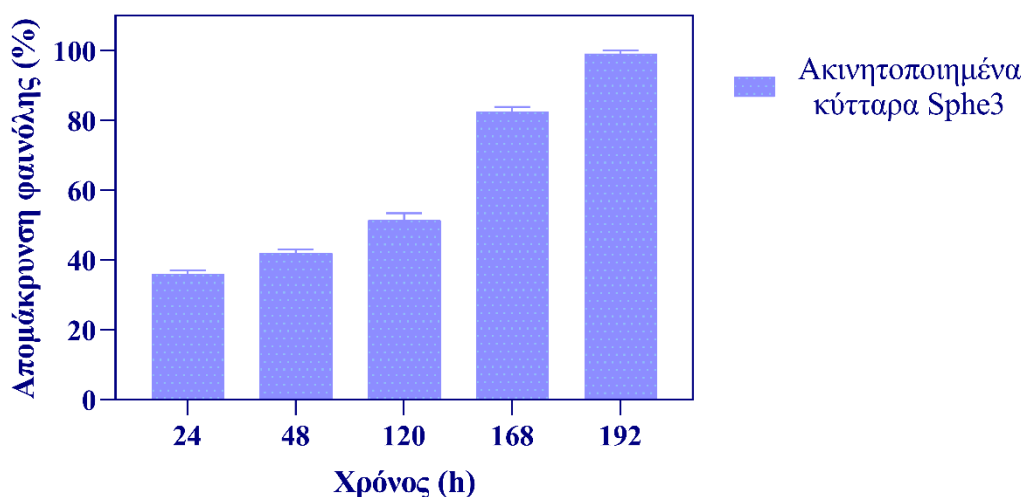
Κύτταρα ως βιοκαταλύτες

5.1 Ακίνητοποίηση κυττάρων *Sphe3* και μελέτη του καταβολισμού φαινόλης

Η ικανότητα του στελέχους *Sphe3* να καταβολίζει τη φαινόλη το καθιστά ιδανικό υποψήφιο για τεχνολογικές εφαρμογές απομάκρυνσης της φαινόλης από ρυπασμένο περιβάλλον και σαν επόμενος στόχος της παρούσας διατριβής τέθηκε η μελέτη της ακίνητοποίησης κυττάρων *Sphe3* και ο καταβολισμός της φαινόλης από αυτά.

Τα κύτταρα ακίνητοποιήθηκαν σε αλγινικό νάτριο, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο των Υλικών και Μεθόδων (Παράγραφος 2.25.1) και η συγκέντρωση της φαινόλης που επιλέχθηκε ήταν τα 1000 mg/L, στην οποία φάνηκε ότι τα ελεύθερα κύτταρα *Sphe3* παρουσιάζουν τη βέλτιστη ικανότητα καταβολισμού. Ως θρεπτικό μέσο ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το MM M9 χωρίς την προσθήκη φωσφορικών αλάτων και το αρχικό εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε για την ακίνητοποίηση των κυττάρων ήταν 3×10^8 CFUs·mL⁻¹.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.1, τα ακίνητοποιημένα κύτταρα *Sphe3* απομακρύνουν το 36% των 1000 mg/L φαινόλης μετά από 24 h. Σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα, τα ακίνητοποιημένα *Sphe3* απομακρύνουν με πιο αργό ρυθμό τη φαινόλη από το θρεπτικό μέσο για τις πρώτες 24 h της επώασης. Ωστόσο, μετά από 192 h επώασης τα ακίνητοποιημένα *Sphe3* απομακρύνουν όλη τη φαινόλη από το μέσο ανάπτυξης. Η καθυστέρηση θα μπορούσε να αποδοθεί στον χωροταξικό περιορισμό της βακτηριακής ανάπτυξης των εγκλωβισμένων κυττάρων *Sphe3* μέσα στα σφαιρίδια αλγινικού νατρίου (Basak, Bhunia, and Dey 2014) ή/και στην έλλειψη φωσφορικών αλάτων στο ελάχιστο θρεπτικό μέσο, που καταλήγει να καθυστερεί τη βακτηριακή ανάπτυξη. Σε αντίθεση με τα ελεύθερα κύτταρα του βακτηρίου, τα εγκλωβισμένα *Sphe3* προστατεύονται από την τοξικότητα της φαινόλης και καταβολίζουν όλη την ποσότητα μετά από 192 h, ενώ τα ελεύθερα κύτταρα καταβολίζουν το 50% των 1000 mg/L φαινόλης στις 24 h (Εικόνα 5.2), όπου και μπαίνουν στη στατική φάση ανάπτυξής τους (Εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1. Καταβολισμός 1000 mg/L φαινόλης από ακίνητοποιημένα κύτταρα *Sphe3*, στους 30 °C, εκφρασμένος ως % ικανότητας απομάκρυνσης της φαινόλης μετά από 24, 48, 120, 168 και 192 h. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm$ SD, N=3).

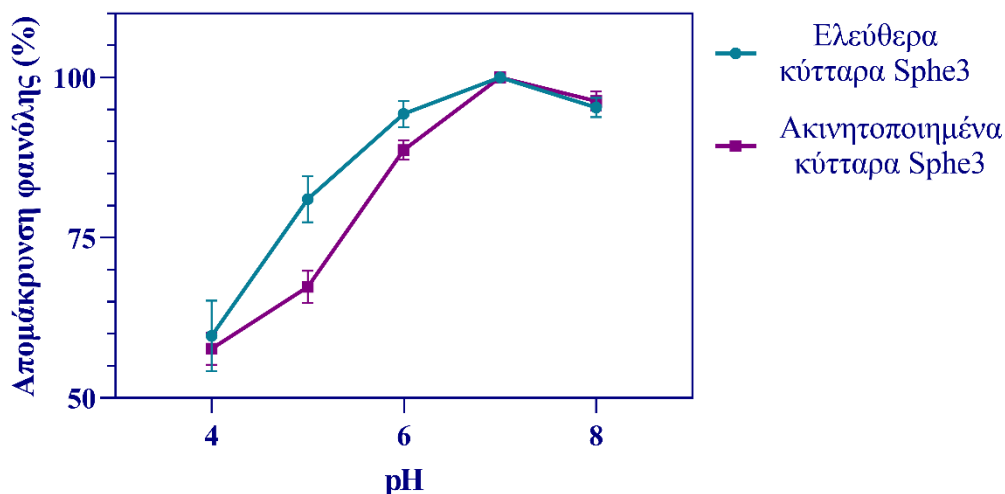
Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία για στελέχη ικανά να καταβολίζουν τη φαινόλη. Ακίνητοποιημένα κύτταρα του στελέχους *Bacillus* sp. SAS19 παρουσίασαν μικρότερη ικανότητα διάσπασης της φαινόλης σε σχέση με τα αντίστοιχα ελεύθερα (Ke et al. 2018), όπως και τα ακίνητοποιημένα κύτταρα *Pseudomonas putida* BCRC 14365 που βρέθηκαν να καταβολίζουν τη φαινόλη με ρυθμό ελαφρώς χαμηλότερη σε σύγκριση με την ελεύθερη μορφή κυττάρων του στελέχους (Y. H. Lin and Cheng 2020). Επιπροσθέτως, ακίνητοποιημένα κύτταρα του στελέχους *Acinetobacter* sp. PD12 παρουσίασαν χαμηλότερο ειδικό ρυθμό αποικοδόμησης σε συγκεντρώσεις φαινόλης κάτω από 300 mg/L σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ελεύθερα κύτταρα (Y. Wang et al. 2007).

Όσον αφορά σε στελέχη του γένους *Arthrobacter*, οι Karigar και συνεργάτες επίσης δεν παρατήρησαν καμία διαφορά στο προφίλ καταβολισμού της φαινόλης από ελεύθερα και ακίνητοποιημένα (σε άγαρ ή αλγινικό νάτριο) κύτταρα *Arthrobacter citreus* (Karigar et al. 2006). Πιο συγκεκριμένα, και οι δύο μορφές κυττάρων *A. citreus*, ελεύθερα και ακίνητοποιημένα, κατάφεραν να καταβολίσουν 22 mM φαινόλης σε 8 ημέρες. Αντιθέτως, τα ακίνητοποιημένα κύτταρα *Arthrobacter* sp. Υπερτερούν στον καταβολισμό της φαινόλης όσον αφορά στο ρυθμό αποικοδόμησης και ανθεκτικότητας στην τοξικότητα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ελεύθερα κύτταρα (Mohanty 2012).

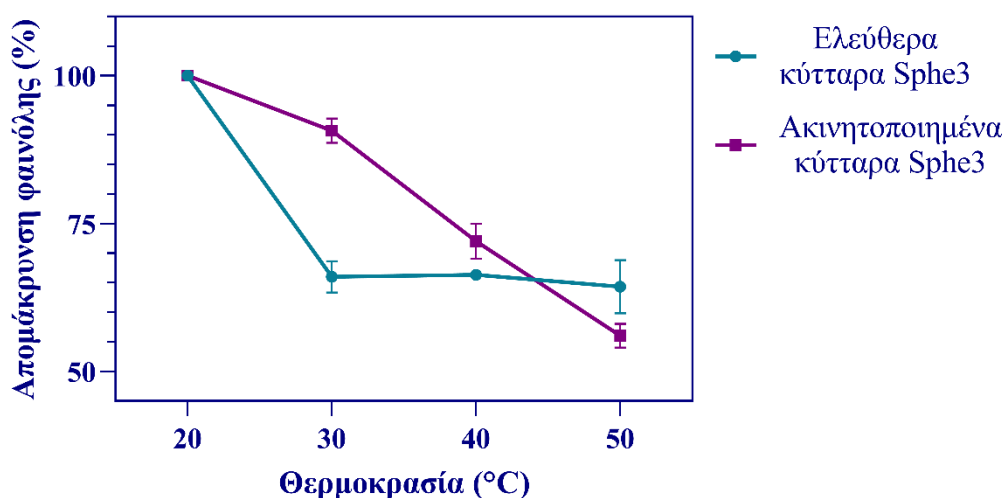
5.1.1 Βελτιστοποίηση παραμέτρων καταβολισμού φαινόλης-ελεύθερα και ακίνητοποιημένα κύτταρα *Sphe3*

Ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης των παραμέτρων pH και θερμοκρασίας στον καταβολισμό της φαινόλης από κύτταρα *Sphe3*, ελεύθερα και ακίνητοποιημένα. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι και οι δύο μορφές κυττάρων διατήρησαν την ικανότητα απομάκρυνσης της φαινόλης από το θρεπτικό μέσο άνω του 50% στο εύρος pH 4-8, με βέλτιστη τιμή pH=7 (Εικόνα 5.2). Στη συνέχεια, η επίδραση της θερμοκρασίας στον καταβολισμό της φαινόλης ελέγχθηκε στο εύρος θερμοκρασιών 20-50 °C, όπου διαπιστώθηκε ότι τόσο τα ελεύθερα όσο και τα ακίνητοποιημένα κύτταρα *Sphe3* διατήρησαν την ικανότητα καταβολισμού της

φαινόλης άνω του 55% σε όλες τις θερμοκρασίες, με βέλτιστη θερμοκρασία τους 20 °C (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.2. Επίδραση της μεταβολής του pH στην ικανότητα καταβολισμού της φαινόλης από ελεύθερα κύτταρα Sph3 (σήμανση με κύκλους) και ακίνητοποιημένα κύτταρα (σήμανση με τετράγωνα). Η απόδοση στο βέλτιστο pH ορίστηκε ως 100% για κάθε περίπτωση. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm$ SD, N=3).

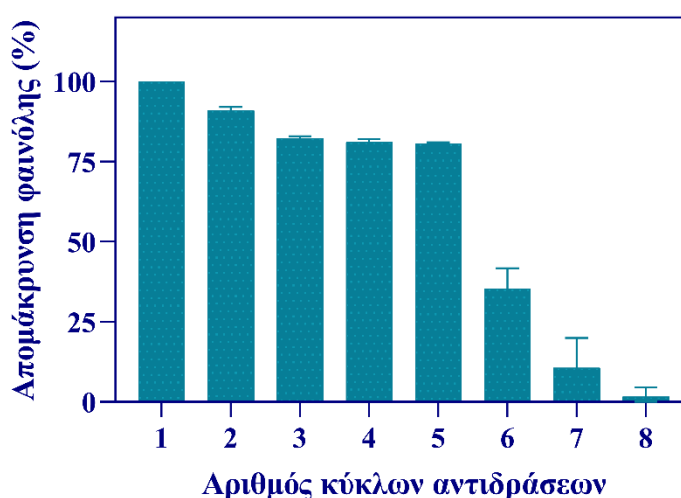


Εικόνα 5.3. Επίδραση της μεταβολής της θερμοκρασίας στην ικανότητα καταβολισμού της φαινόλης από ελεύθερα κύτταρα Sph3 (σήμανση με κύκλους) και ακίνητοποιημένα κύτταρα (σήμανση με τετράγωνα). Η απόδοση στη βέλτιστη θερμοκρασία ορίστηκε ως 100% για κάθε περίπτωση. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm$ SD, N=3).

5.1.2 Επαναχρησιμοποίηση ακίνητοποιημένων κυττάρων

Δεδομένου ότι η επαναχρησιμοποίηση αποτελεί ένα από τα σημαντικά πλεονεκτήματα της εφαρμογής των ακίνητοποιημένων βιοκαταλυτών αλλά και ένα κρίσιμο παράγοντα για περαιτέρω εφαρμογές βιοαποδόμησης, παρτίδα κυττάρων Sph3 εγκλωβισμένων σε αλγινικό νάτριο χρησιμοποιήθηκε για αρκετούς κύκλους και αξιολογήθηκε η ικανότητά της να απομακρύνει τη φαινόλη από το θρεπτικό μέσο.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.4, τα ακινητοποιημένα *Sphe3* διατήρησαν την ικανότητα καταβολισμού της φαινόλης άνω του 75% μέχρι και την 5^η φορά επαναχρησιμοποίησής τους, ενώ από την 6^η φορά και έπειτα η αποδοτικότητα του συστήματος ως προς την απομάκρυνση της φαινόλης έφθινε σημαντικά. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαρροή των κυττάρων από τα σφαιρίδια λόγω των επαναλαμβανόμενων πλύσεων στο τέλος κάθε κύκλου χρήσης, όπως έχει παρατηρηθεί ξανά κατά τη χρήση εγκλωβισμένων *Sphe3* κυττάρων (Ziagona, Koukkou, and Liakopoulou-Kyriakides 2014). Ένας ακόμη λόγος της μείωσης της ικανότητας απομάκρυνσης της φαινόλης μετά από κάποιους κύκλους επαναχρησιμοποίησης από τα ακινητοποιημένα *Sphe3* θα μπορούσε να αποτελεί η προσρόφηση πιθανών προϊόντων αντίδρασης στο μέσο της ακινητοποίησης, επηρεάζοντας έτσι τη μηχανική του σταθερότητα, μειώνοντας επομένως την καταλυτική δραστηριότητα των εμπλεκόμενων ενζύμων (Paisio et al. 2016).



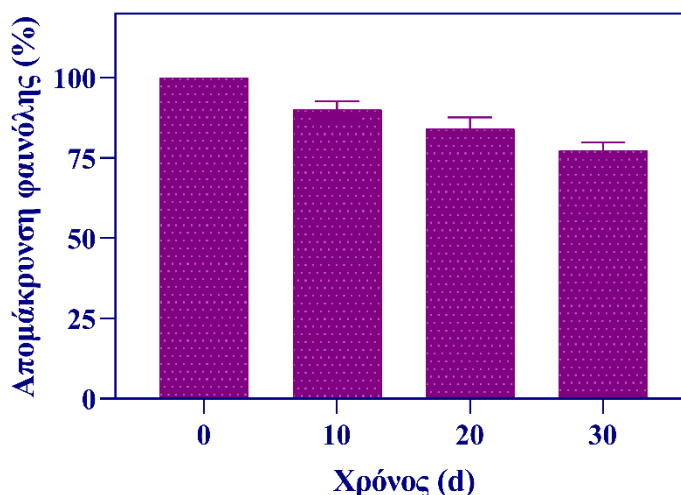
Εικόνα 5.4. Κύκλοι επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων κυττάρων *Sphe3* για τον καταβολισμό της φαινόλης. Η απόδοση του πρώτου κύκλου ορίστηκε στο 100%. Η διάρκεια κάθε κύκλου αντίδρασης ήταν 48 h. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm$ SD, N=3).

Παρομοίως, αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει σταθερότητα ή μείωση στην απόδοση του καταβολισμού της φαινόλης όταν αυξάνονται οι κύκλοι επαναχρησιμοποίησης. Το στέλεχος *Debaryomyces* sp., το οποίο ακινητοποιήθηκε σε σφαιρίδια Ca-αλγινικού νατρίου που περιείχαν νανο-Fe₃O₄ βρέθηκε να διατηρεί την ικανότητα καταβολισμού της φαινόλης για 10 κύκλους επαναχρησιμοποίησης (Jiang et al. 2017). Επιπλέον, η ικανότητα καταβολισμού της φαινόλης από ακινητοποιημένα κύτταρα του στελέχους *Candida tropicalis* PHB σε αλγινικό νάτριο έπεσε στο 78% μετά από 5 κύκλους επαναχρησιμοποίησης, ενώ μετά από 10 κύκλους έφτασε το 3,74% (Basak, Bhunia, and Dey 2014). Κύτταρα του στελέχους *Bacillus licheniformis* SL10 εγκλωβίστηκαν σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος και μετά από 5 κύκλους χρήσης η ικανότητα απομάκρυνσης της φαινόλης από το θρεπτικό μέσο έπεσε στο 40% (Chris Felshia et al. 2017).

5.1.3 Καταβολισμός φαινόλης μετά από αποθήκευση των ακινητοποιημένων κυττάρων

Μια ακόμη σημαντική παράμετρος της χρήσης των ακινητοποιημένων κυττάρων είναι η διατήρηση της ικανότητας απομάκρυνσης της φαινόλης κατά την αποθήκευση του

βιοκαταλύτη. Τα ακινητοποιημένα κύτταρα *Sphe3* αποθηκεύτηκαν στους 4 °C για χρονικό διάστημα ενός μήνα και ανά 10 ημέρες αξιολογούνταν η απόδοσή τους ως προς την απομάκρυνση της φαινόλης. Η ικανότητα καταβολισμού της φαινόλης μετρήθηκε μετά από επώαση 48 h σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 1000 mg/L φαινόλης. Παρατηρήθηκε ότι μετά από 30 ημέρες, τα αποθηκευμένα ακινητοποιημένα κύτταρα διατήρησαν άνω του 70% της αρχικής ικανότητας διάσπασης της φαινόλης (Εικόνα 5.5).



Εικόνα 5.5. Μελέτη της ικανότητας καταβολισμού φαινόλης από ακινητοποιημένα κύτταρα *Sphe3* μετά από αποθήκευσή τους στους 4 °C για 10, 20 και 30 ημέρες. Η απόδοση καταβολισμού της πρώτη ημέρα ορίστηκε στο 100%. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ($\pm$ SD, N=3).

Πρόσφατα, οι Nandy και συνεργάτες παρατήρησαν ότι τα εγκλωβισμένα κύτταρα *Pseudomonas oleovorans* ICTN13, μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης στους 4 °C, ήταν ικανά να απομακρύνουν τη φαινόλη μετά από 24 h διατηρώντας τη μισή από την αρχική καταλυτική τους ικανότητα (Nandy et al. 2021), ενώ μετά την πάροδο του ενός μήνα η απόδοσή τους μειώθηκε σημαντικά. Επιπλέον, οι Banerjee και Ghosal μελέτησαν την ικανότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων *Bacillus cereus* AKG1 MTCC9817 και AKG2 MTCC 9818 ως προς την απομάκρυνση της φαινόλης μετά από αποθήκευση 30 ημερών και δεν παρατήρησαν καμία αλλαγή στην απόδοσή τους (Banerjee and Ghoshal 2011).

5.1.4 Συμπεράσματα

Η ακινητοποίηση των κυττάρων *Sphe3* σε σφαιρίδια αλγινικού νατρίου φαίνεται να προστατεύει τα κύτταρα από την τοξική επίδραση της φαινόλης, καθώς μετά από 192 h απομακρύνουν 1000 mg/L φαινόλης, ενώ αν και τα ελεύθερα κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποδοτικότητα στην απομάκρυνση της φαινόλης τις πρώτες 24 h, δεν μπορούν να απομακρύνουν πάνω από 50% της συνολικής φαινόλης από την καλλιέργεια. Επιπλέον, όταν τα εγκλωβισμένα κύτταρα επαναχρησιμοποιήθηκαν για 5 κύκλους και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C για ένα μήνα διατήρησαν την ικανότητα απομάκρυνσης της φαινόλης άνω του 75% και άνω του 70%, αντίστοιχα. Η επιτυχής χρήση των ακινητοποιημένων κυττάρων *Sphe3* μέχρι και 5 κύκλους για την απομάκρυνση της φαινόλης είναι ένα πρώτο σημαντικό βήμα για τη μείωση του λειτουργικού κόστους σε πιθανές βιομηχανικές εφαρμογές.

Λαμβάνοντας υπόψιν τη σημασία της επαναχρησιμοποίησης και της σταθερότητας κατά την αποθήκευση των ακινητοποιημένων κυττάρων για πιθανή εφαρμογή σε συστήματα βιοαποκατάστασης, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καθιστούν το στέλεχος *Sphe3* καλό υποψήφιο για μελλοντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές βιοαποδόμησης της φαινόλης.

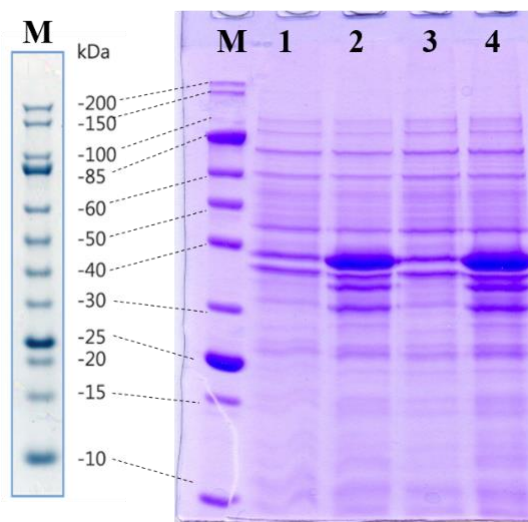
5.2 Χρήση μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* ως βιοκαταλύτες για της παραγωγή *cis*, *cis*-μουκονικού οξέος

Το *cis*, *cis*-μουκονικό οξύ (*ccMA*) είναι ένα προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας που συγκεντρώνει αυξανόμενο ενδιαφέρον λόγω των πιθανών εφαρμογών του στην βιομηχανία. Η λειτουργικά ενεργή δομή διπλού οξέος και ο ανοιχτός δακτύλιος του βενζολίου του *ccMA* ευνοούν την τέλεση πολλαπλών χημικών αντιδράσεων, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό πολυάριθμων συνθετικών πολυμερών και φαρμακευτικών ουσιών. Κυρίως, το *ccMA* χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για την παραγωγή εμπορικά σημαντικών χημικών ουσιών όπως το αδιπικό οξύ, το τερεφθαλικό οξύ και το τριμελλιτικό οξύ, τα οποία αξιοποιούνται για την παραγωγή νάιλον, πολυεστέρα PET, ρητινών κ.ά. (Choi et al. 2020; Aravind et al. 2021). Ως εναλλακτική λύση στις παραδοσιακές χημικές διεργασίες, έχει μελετηθεί η παραγωγή *ccMA* από μικροοργανισμούς είτε αξιοποιώντας την ικανότητά τους να καταβολίζουν αρωματικά υποστρώματα, είτε μέσω *de novo* συνθετικών μονοπατιών (Xie et al. 2014). Η 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης συμμετέχει στον καταβολισμό διαφόρων αρωματικών ενώσεων και στην παραγωγή *ccMA* μέσω της ενδοδιολο-σχάσης της κατεχόλης (*intradiol cleavage*) με ένα πιο «πράσινο» και «καθαρό» τρόπο σε σχέση με τη χημική σύνθεση του *ccMA* (Aravind et al. 2021).

Στόχος, λοιπόν, της παρούσας μελέτης ήταν η αξιοποίηση του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του *Sphe3* για την παραγωγή *ccMA* από μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* BL21.

5.2.1 Μελέτη του καταβολισμού της κατεχόλης από μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli*:BL21(DE3)-1,2-CDO

Χρησιμοποιήθηκαν μετασχηματισμένα κύτταρα BL21 με τον ανασυνδυασμένο φορέα υπερέκφρασης pET29c::*catA* για την υπερέκφραση της 1,2-CDO, όπως περιγράφεται νωρίτερα (Παράγραφος 2.28.2.2). Η επιτυχής υπερέκφραση επιβεβαιώθηκε με SDS-PAGE δειγμάτων της καλλιέργειας (Εικόνα 5.6).



Εικόνα 5.6. Υπερέκφραση της 1,2-CDO του *Sphe3* σε κύτταρα *E.coli*, σε θρεπτικό M9 παρουσία γλυκερόλης (1%) και 100 μM FeCl_3 . M: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa) 10–20% Tris-glycine (NEB), 1, 3: crude μετασχηματισμένων BL21 πριν την επώαση με IPTG. 2, 4: crude μετασχηματισμένων BL21 μετά από 6 h επώασης με IPTG.

Μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης με το IPTG, προστέθηκε κατεχόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (10-50 mM) σε κάθε καλλιέργεια και ακολούθησε επώαση για 1 h στους 37 °C. Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν και στο υπερκείμενο προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της εναπομείνουσας κατεχόλης με τη μέθοδο 4-AAP (Παράγραφος 2.28.1). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα BL21 χωρίς τον ανασυνδυασμένο φορέα.

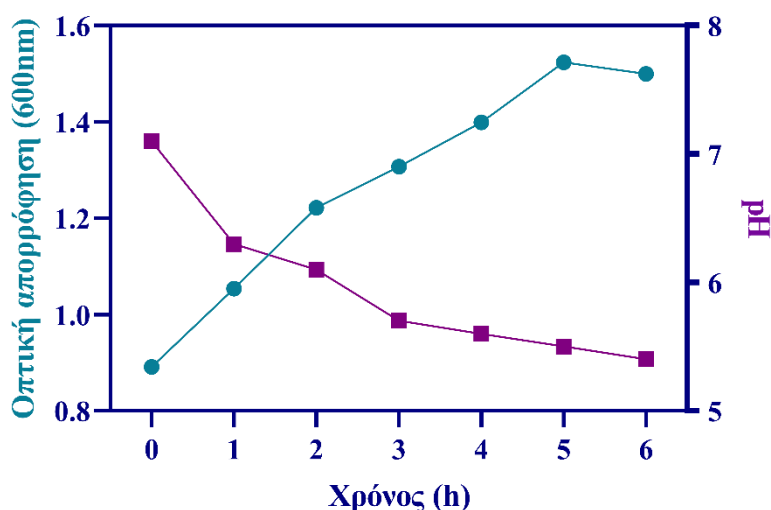
Πίνακας 5.1. Καταλυτική ικανότητα μετατροπής της κατεχόλης (%) των μετασχηματισμένων BL21 στα οποία έχει υπερεκφραστεί η 1,2-CDO του *Sphe3*, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων κατεχόλης μετά από επώαση 1h στους 37 °C υπό ανάδευση.

Συγκέντρωση κατεχόλης (mM)	Καταλυτική ικανότητα μετατροπής της κατεχόλης (%)
10	58 $\pm$ 4
20	52 $\pm$ 1
30	45 $\pm$ 4
40	39 $\pm$ 4
50	19 $\pm$ 2

Στη 1 h επώασης με την κατεχόλη τα κύτταρα φαίνεται να αποδίδουν καλύτερα στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, ενώ όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της κατεχόλης τόσο μειώνεται η ικανότητα των κυττάρων να την μεταβολίσουν (Πίνακας 5.1).

Σε αντίθεση με αυτά τα αποτελέσματα, οι Aravind και συνεργάτες σε μια αντίστοιχη μελέτη καταβολισμού διαφόρων συγκεντρώσεων της κατεχόλης από μετασχηματισμένα BL21 με το γονίδιο για την 1,2-CDO του *Paracoccus* sp. MKU1 παρατήρησαν υψηλή ικανότητα μετατροπής (57%) ακόμη και 50 mM κατεχόλης στη 1 h επώασης στους 35 ° C (Aravind et al. 2021). Παρομοίως, μετασχηματισμένα BL21 με το γονίδιο για την 1,2-CDO της

Pseudomonas putida mt-2 είναι ικανά να μεταβολίσουν μέχρι 50 mM κατεχόλης, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υποστρώματος (60-100 mM) η καταλυτική ικανότητα μειώνεται σημαντικά και η παραγωγή ccMA ουσιαστικά σταματάει (Kaneko, Ishii, and Kirimura 2011). Ακολούθησε καλλιέργεια των μετασχηματισμένων BL21 ($O.D_{600} = 0,6$) με το γονίδιο για την 1,2-CDO του Sphe3 παρουσία 20 mM κατεχόλης και καταγράφηκαν η οπτική απορρόφηση και οι αλλαγές στο pH της καλλιέργειας ανά 1 h για διάστημα 6 h (Εικόνα 5.7). Η ανάπτυξη των BL21 αυξάνεται μέχρι τις 5h και φθίνει στη συνέχεια. Το pH γίνεται πιο όξινο με την πάροδο του χρόνου ξεκινώντας από 7,2 και καταλήγει σε 5,4 στις 6 h, το οποίο υποδηλώνει την παραγωγή του ccMA ως προϊόν της μετατροπής της κατεχόλης. Η μείωση του pH κατά τη διάρκεια της επώασης μπορεί να αναστείλει την αποτελεσματικότητα της καταλυτικής ικανότητας των κυττάρων. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται για το προφίλ ανάπτυξης των μετασχηματισμένων BL21 με το γονίδιο για την 1,2-CDO τόσο της *P. putida* mt-2, όσο και του *Paracoccus* sp. MKU1 (Aravind et al. 2021; Kaneko, Ishii, and Kirimura 2011).

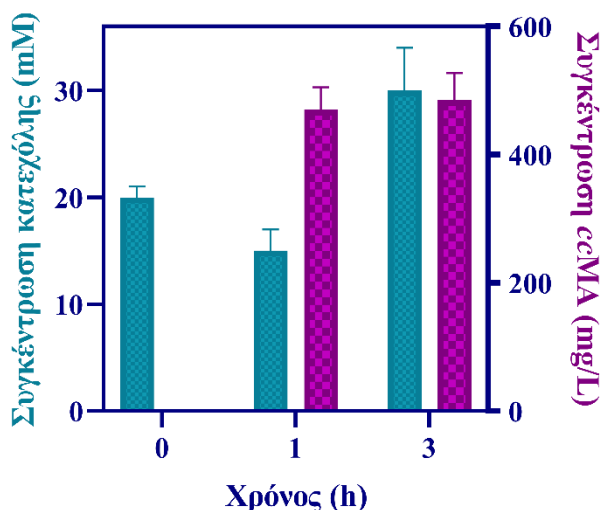


Εικόνα 5.7. Παρακολούθηση της ανάπτυξης των μετασχηματισμένων BL21 με βάση την οπτική απορρόφηση και οι αλλαγές στο pH της καλλιέργειας συναρτήσει του χρόνου.

Στη συνέχεια, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η σταδιακή προσθήκη της κατεχόλης είχε επίδραση στην ικανότητα μετασχηματισμού της σε ccMA, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια 100 ml των μετασχηματισμένων BL21 ($O.D_{600} = 6$) στα οποία έχει υπερεκφραστεί η 1,2-CDO του Sphe3 παρουσία 20 mM κατεχόλης και μετά από 1 h επώασης στους 37 °C, υπό ανάδευση (180 rpm) λήφθηκε δείγμα προς ανάλυση και προστέθηκαν εκ νέου 20 mM κατεχόλης. Ακολούθησε επώαση για ακόμα 2 h και νέα δειγματοληψία. Τα δείγματα από αυτή την καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν για ποσοτικοποίηση της κατεχόλης και του ccMA με HPLC ανάλυση, με βάση τις αντίστοιχες πρότυπες καμπύλες (Εικόνα Π6, Παράρτημα).

Μετά τη 1 h επώασης η συγκέντρωση της κατεχόλης μειώθηκε περίπου στα 15 mM, ενώ παράχθηκαν 0,47 gr/L ccMA (Πίνακας 5.2). Αφού προστέθηκαν ακόμα 20 mM κατεχόλης ακολούθησε επώαση 2 h και η κατεχόλη προσδιορίστηκε στα 30 mM και το ccMA στα 0,49 gr/L. Παρατηρείται ότι τα κύτταρα αδυνατούν να συνεχίσουν να μετατρέπουν την κατεχόλη σε ccMA.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα παραπάνω αποτελούν προκαταρκτικά πειράματα και στόχο είχαν να αποδείξουν τη δυνατότητα σύνθεσης του ccMA με βιολογικό τρόπο αξιοποιώντας την ανασυνδυασμένη 1,2-CDO του *Sphe3*. Σε αυτά τα πειράματα δεν πραγματοποιήθηκαν βελτιστοποιήσεις σε σχέση με τις συνθήκες της καλλιέργειας, όπως η θερμοκρασία, η ταχύτητα ανάδευσης ή την παροχή θρεπτικών στην καλλιέργεια.



Εικόνα 5.8. Βιομετατροπή κατεχόλης και σχηματισμός ccMA στα μετασχηματισμένα BL21 στα οποία έχει υπερεκφραστεί η 1,2-CDO του *Sphe3*. Στη 1h προστέθηκαν εκ νέου 20 mM κατεχόλης. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 2 επαναλήψεων ($\pm$ SD, N=2).

Πίνακας 5.2. Προσδιορισμός συγκεντρώσεων κατεχόλης και ccMA στα μετασχηματισμένα BL21 στα οποία έχει υπερεκφραστεί η 1,2-CDO του *Sphe3*. Στη 1h προστέθηκαν εκ νέου 20 mM κατεχόλης. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 2 επαναλήψεων ($\pm$ SD, N=2).

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση κατεχόλης (mM)	Συγκέντρωση ccMA (mg/L)
0	20 ± 1	0
1	15 ± 2	470 ± 35
1	+ 20 mM κατεχόλης	
3	30 ± 4	485 ± 142

Η θερμοκρασία έχει αποδειχτεί να παίζει βασικό ρόλο στην μετατροπή της κατεχόλης σε ccMA και εξαρτάται τόσο από το είδος των κυττάρων της καλλιέργειας, όσο και από τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ανασυνδυασμένου ενζύμου. Για τα ανάλογα πειράματα οι Kaneko και συνεργάτες αναφέρουν ως βέλτιστη θερμοκρασία τους 20 °C (Kaneko, Ishii, and Kirimura 2011), ενώ οι Aravind και συνεργάτες αναφέρουν τους 30 °C, που είναι και η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου που μελέτησαν (Aravind et al. 2021). Επιπλέον, η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης της καλλιέργειας είναι σημαντική σε σχέση με την παροχή οξυγόνου στην καλλιέργεια και έχει αναφερθεί ότι ταχύτητες ανάδευσης >180 rpm είναι απαραίτητες για παραγωγή του ccMA με ρυθμό μεγαλύτερο του 1.5mM·min⁻¹

(Kaneko, Ishii, and Kirimura 2011). Τέλος, πρέπει να ληφθεί υπόψιν και η παροχή στην καλλιέργεια ιόντων μετάλλων που ενισχύουν τη δραστικότητα του ενζύμου, όπως Fe(II) και Fe(III). Για παράδειγμα, η παραγωγή του ccMA από το *Sphingobacterium* sp. GCG αυξήθηκε κατά 75-100% με την προσθήκη διαλύματος EDTA-FeCl₃ στην καλλιέργεια, καθώς η 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης του στελέχους περιέχει 2 ιόντα Fe(III) στο ενεργό της κέντρο (C. M. Wu et al. 2004).

5.2.2 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, επιβεβαιώθηκε ότι κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) που εκφράζουν την ανασυνδυασμένη 1,2-CDO του Sphe3 μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας για την παραγωγή ccMA από κατεχόλη, αποφεύγοντας έτσι τη διαδικασία καθαρισμού του ενζύμου ή την ανάκτηση κυτταρικού εκχυλίσματος *E. coli* ελεύθερο κυττάρων με υπερεκφρασμένο το ένζυμο. Η χρήση κυττάρων για την παραγωγή ccMA δεν απαιτεί επιπρόσθετη προετοιμασία, όπως λύση των κυττάρων, ενώ το ένζυμο παραμένει προστατευμένο εντός του κυττάρου.

Προέχει, ωστόσο, η βελτιστοποίηση των παραμέτρων (θερμοκρασία, ταχύτητα ανάδευσης, παροχή συμπαραγόντων του ενζύμου) της καλλιέργειας των κυττάρων που φέρουν το υπερεκφρασμένο ένζυμο με στόχο την αύξηση της παραγωγής του ccMA.

Βιβλιογραφία

- Adams, Melanie A, Vinay K Singh, Bernd O Keller, and Zongchao Jia. 2006. “Structural and Biochemical Characterization of Gentisate 1,2-Dioxygenase from *Escherichia coli* O157:H7.” *Molecular Microbiology* 61 (6): 1469–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05334.x>.
- Adrio, Jose L., and Arnold L. Demain. 2014. “Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes.” *Biomolecules* 4 (1): 117–39. <https://doi.org/10.3390/biom4010117>.
- Ahamad, P. Y.Aneez, and A. A.Mohammad Kunhi. 2011. “Enhanced Degradation of Phenol by *Pseudomonas* sp. CP4 Entrapped in Agar and Calcium Alginate Beads in Batch and Continuous Processes.” *Biodegradation* 22 (2): 253–65. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9392-6>.
- Al-Khalid, Taghreed, and Muftah H. El-Naas. 2012. “Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review.” *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.569872>.
- Al-Tarawneh, Amjad, Khaled M. Khleifat, Ibrahim N. Tarawneh, Kholoud Shiyyab, Tayel El-Hasan, Anna Rosa Sprocati, Chiara Alisi, Flavia Tasso, and Moath Alqaraleh. 2022. “Phenol Biodegradation by Plant Growth Promoting Bacterium, *S. Odorifera*: Kinetic Modeling and Process Optimization.” *Archives of Microbiology* 204 (1). <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02691-y>.
- Alemzadeh, I., and S. Nejati. 2009. “Phenols Removal by Immobilized Horseradish Peroxidase.” *Journal of Hazardous Materials* 166 (2–3): 1082–86. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.026>.
- Ali, Saiqa, Roberto Fernandez-Lafuente, and Don A. Cowan. 1998. “Meta-Pathway Degradation of Phenolics by Thermophilic *Bacilli*.” *Enzyme and Microbial Technology* 23 (7–8): 462–68. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00072-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00072-6).
- Alkaram, Uday F., Abduljabar A. Mukhlis, and Ammar H. Al-Dujaili. 2009. “The Removal of Phenol from Aqueous Solutions by Adsorption Using Surfactant-Modified Bentonite and Kaolinite.” *Journal of Hazardous Materials* 169 (1–3): 324–32. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.153>.
- Alver, Erol, and Ayşegül Ülkü Metin. 2017. “Chitosan Based Metal-Chelated Copolymer Nanoparticles: Laccase Immobilization and Phenol Degradation Studies.” *International Biodeterioration and Biodegradation* 125 (November): 235–42. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.07.012>.
- Applied Biosystems. 1997. *Relative Quantitation of Gene Expression. ABI Prism 7700 Sequence Detection System. Applied Biosystems User Bulletin 2*. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwuj_7fUwMH7AhVGsKQKHUNBAu8QFnoECBcQAQ&url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2Fcms_040980.pdf&usg=AOvVaw2jmjbEhqJD1VD714pbB01C.
- Arai, Hiroyuki, Saiko Akahira, Tohru Ohishi, Michihisa Maeda, and Toshiaki Kudo. 1998. “Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to Utilize Phenol: Organization and Regulation of the Genes Involved in Phenol Degradation.” *Microbiology* 144 (10): 2895–2903. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-10-2895/CITE/REFWORKS>.
- Aravind, Manikka Kubendran, Perumal Varalakshmi, Swamidoss Abraham John, and Balasubramaniam Ashokkumar. 2021. “Catechol 1,2-Dioxygenase From *Paracoccus* sp. MKU1—A Greener and Cleaner Bio-Machinery for Cis, Cis-Muconic Acid Production by Recombinant *E. coli*.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9 (November):

1069. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.703399>.
- Atia, K.S. 2005. “Co-Immobilization of Cyclohexanone Monooxygenase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase onto Polyethylenimine-Porous Agarose Polymeric Composite Using γ Irradiation to Use in Biotechnological Processes.” *Radiation Physics and Chemistry* 73 (2): 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2004.07.005>.
- Awad, Gamal, and Elham Farouk Mohamed. 2019. “Immobilization of P450 BM3 Monooxygenase on Hollow Nanosphere Composite: Application for Degradation of Organic Gases Pollutants under Solar Radiation Lamp.” *Applied Catalysis B: Environmental* 253 (September): 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.04.045>.
- Bahrami, Atieh, Thierry Vincent, Alain Garnier, Faïçal Larachi, John Boukouvalas, and Maria C. Iliuta. 2017. “Noncovalent Immobilization of Optimized Bacterial Cytochrome P450 BM3 on Functionalized Magnetic Nanoparticles.” *Industrial and Engineering Chemistry Research* 56 (39): 10981–89. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b02872>.
- Bailleul, Gautier, Guang Yang, Callum R. Nicoll, Andrea Mattevi, Marco W. Fraaije, and Maria Laura Mascotti. 2023. “Evolution of Enzyme Functionality in the Flavin-Containing Monooxygenases.” *Nature Communications* 14 (1): 1042–1042. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36756-x>.
- Bala, Saroj, Diksha Garg, Banjagere Veerabhadrapa Thirumalesh, Minaxi Sharma, Kandi Sridhar, Baskaran Stephen Inbaraj, and Manikant Tripathi. 2022. “Recent Strategies for Bioremediation of Emerging Pollutants: A Review for a Green and Sustainable Environment.” *Toxics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/toxics10080484>.
- Bamforth, Selina M, and Ian Singleton. 2005. “Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Current Knowledge and Future Directions.” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 80 (7): 723–36. <https://doi.org/10.1002/jctb.1276>.
- Banerjee, Aditi, and Alope K. Ghoshal. 2011. “Phenol Degradation Performance by Isolated *Bacillus cereus* Immobilized in Alginate.” *International Biodeterioration and Biodegradation* 65 (7): 1052–60. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.04.011>.
- Bansal, Neelam, and Shamsheer S. Kanwar. 2013. “Peroxidase(s) in Environment Protection.” *The Scientific World Journal* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/714639>.
- Barbosa, Oveimar, Claudia Ortiz, Ángel Berenguer-Murcia, Rodrigo Torres, Rafael C. Rodrigues, and Roberto Fernandez-Lafuente. 2015. “Strategies for the One-Step Immobilization-Purification of Enzymes as Industrial Biocatalysts.” *Biotechnology Advances*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>.
- Barik, Manas, Chidananda Prasad Das, Akshaya Kumar Verma, Sabuj Sahoo, and Naresh Kumar Sahoo. 2021. “Metabolic Profiling of Phenol Biodegradation by an Indigenous *Rhodococcus pyridinivorans* Strain PDB9T N-1 Isolated from Paper Pulp Wastewater.” *International Biodeterioration and Biodegradation* 158 (March): 105168. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105168>.
- Barth, Andreas. 2007. “Infrared Spectroscopy of Proteins.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767 (9): 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>.
- Basak, Bikram, Biswanath Bhunia, and Apurba Dey. 2014. “Studies on the Potential Use of Sugarcane Bagasse as Carrier Matrix for Immobilization of *Candida tropicalis* PHB5 for Phenol Biodegradation.” *International Biodeterioration and Biodegradation* 93 (September): 107–17. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.05.012>.
- Bateman, Alex, Maria Jesus Martin, Sandra Orchard, Michele Magrane, Shadab Ahmad, Emanuele Alpi, Emily H. Bowler-Barnett, et al. 2023. “UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023.” *Nucleic Acids Research* 51 (D1): D523–31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>.

- Behera, B. C., B. K. Sethi, R. R. Mishra, S. K. Dutta, and H. N. Thatoi. 2017. "Microbial Cellulases – Diversity & Biotechnology with Reference to Mangrove Environment: A Review." *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. Academy of Scientific Research and Technology, Egypt. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>.
- Berkel, W. J.H. van, N. M. Kamerbeek, and M. W. Fraaije. 2006. "Flavoprotein Monooxygenases, a Diverse Class of Oxidative Biocatalysts." *Journal of Biotechnology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.044>.
- Bilal, Muhammad, Muhammad Asgher, Hairong Cheng, Yunjun Yan, and Hafiz M. N. Iqbal. 2019. "Multi-Point Enzyme Immobilization, Surface Chemistry, and Novel Platforms: A Paradigm Shift in Biocatalyst Design." *Critical Reviews in Biotechnology* 39 (2): 202–19. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1531822>.
- Bilal, Muhammad, Yuping Zhao, Tahir Rasheed, and Hafiz M.N. Iqbal. 2018. "Magnetic Nanoparticles as Versatile Carriers for Enzymes Immobilization: A Review." *International Journal of Biological Macromolecules* 120 (December): 2530–44. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.09.025>.
- Boudrant, Joseph, John M. Woodley, and Roberto Fernandez-Lafuente. 2020. "Parameters Necessary to Define an Immobilized Enzyme Preparation." *Process Biochemistry* 90 (March): 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>.
- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72 (1–2): 248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Bugg, Timothy D.H. 2003. "Dioxygenase Enzymes: Catalytic Mechanisms and Chemical Models." *Tetrahedron*. Pergamon. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00944-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00944-X).
- Bugg, Timothy D.H. H., and Gang Lin. 2001. "Solving the Riddle of the Intradiol and Extradiol Catechol Dioxygenases: How Do Enzymes Control Hydroperoxide Rearrangements?" *Chemical Communications*, no. 11 (January): 941–52. <https://doi.org/10.1039/b100484k>.
- Bustin, Stephen A., Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Cao, Bin, and Kai-Chee Loh. 2008. "Catabolic Pathways and Cellular Responses of *Pseudomonas putida* P8 during Growth on Benzoate with a Proteomics Approach." *Biotechnology and Bioengineering* 101 (6): 1297–1312. <https://doi.org/10.1002/bit.21997>.
- Cao, Bin, Karthiga Nagarajan, and Kai-Chee Loh. 2009. "Biodegradation of Aromatic Compounds: Current Status and Opportunities for Biomolecular Approaches." *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (2): 207–28. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2192-4>.
- Cassimjee, K. E., M. Kadow, Y. Wikmark, M. Svedendahl Humble, M. L. Rothstein, D. M. Rothstein, and J. E. Bäckvall. 2014. "A General Protein Purification and Immobilization Method on Controlled Porosity Glass: Biocatalytic Applications." *Chemical Communications* 50 (65): 9134–37. <https://doi.org/10.1039/c4cc02605e>.
- Chakraborty, Joydeep, Tanmoy Jana, Sudipto Saha, and Tapan K. Dutta. 2014. "Ring-Hydroxylating Oxygenase Database: A Database of Bacterial Aromatic Ring-Hydroxylating Oxygenases in the Management of Bioremediation and Biocatalysis of Aromatic Compounds." *Environmental Microbiology Reports* 6 (5): 519–23. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12182>.
- Chandana Lakshmi, M. V.V., and V. Sridevi. 2009. "A Review on Biodegradation of Phenol

- from Industrial Effluents.” *Journal of Industrial Pollution Control*. Research and Reviews. <https://www.icontrolpollution.com/articles/a-review-on-biodegradation-of-phenol-fromindustrial-effluents-.php?aid=37440&view=mobile>.
- Chang, Hung Kuang, and Gerben J. Zylstra. 2008. “Examination and Expansion of the Substrate Range of m-Hydroxybenzoate Hydroxylase.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371 (1): 149–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.032>.
- Chatzikonstantinou, Alexandra V., Elena Gkantou, Eleni Thomou, Nikolaos Chalmes, Kyriaki Marina Lyra, Vasiliki G. Kontogianni, Konstantinos Spyrou, Michaela Patila, Dimitrios Gournis, and Haralambos Stamatis. 2019. “Enzymatic Conversion of Oleuropein to Hydroxytyrosol Using Immobilized β -Glucosidase on Porous Carbon Cuboids.” *Nanomaterials* 2019, Vol. 9, Page 1166 9 (8): 1166. <https://doi.org/10.3390/NANO9081166>.
- Chen, Jia, Wei Li, Mingzhu Wang, Guangyu Zhu, Dongqi Liu, Fei Sun, Ning Hao, Xuemei Li, Zihao Rao, and Xuejun C. Zhang. 2008. “Crystal Structure and Mutagenic Analysis of GDOsp, a Gentisate 1,2-Dioxygenase from *Silicibacter pomeroyi*.” *Protein Science* 17 (8): 1362–73. <https://doi.org/10.1110/ps.035881.108>.
- Chen, R., H.; Oki, R.P.; Scott, H.; Yamaguchi, M.; Kusunoki, Y.; Matsuura, H.; Chaen, A.; Tsugita, and K. Hosokawa. 1998. “Crystallization and Further Characterization of Meta-Hydroxybenzoate 4-Hydroxylase from *Comamonas testosteroni*.” *Research Communications in Biochemistry and Cell and Molecular Biology* 2: 253–74. <https://www.brenda-enzymes.org/literature.php?e=1.14.13.23&r=390048>.
- Chen, Xin, Hongzhi Tang, Yongdi Liu, Ping Xu, Yong Xue, Kuangfei Lin, and Changzheng Cui. 2018. “Purification and Initial Characterization of 3-Hydroxybenzoate 6-Hydroxylase from a Halophilic *Marteella* Strain AD-3.” *Frontiers in Microbiology* 9 (JUL): 335024. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01335>.
- Chenprakhon, Pirom, Thanyaporn Wongnate, and Pimchai Chaiyen. 2019. “Monooxygenation of Aromatic Compounds by Flavin-dependent Monooxygenases.” *Protein Science* 28 (1): 8–29. <https://doi.org/10.1002/pro.3525>.
- Choi, Sisun, Han-Na Lee, Eunhwi Park, Sang-Jong Lee, and Eung-Soo Kim. 2020. “Recent Advances in Microbial Production of *cis,cis*-Muconic Acid.” *Biomolecules* 10 (9): 1238. <https://doi.org/10.3390/biom10091238>.
- Chris Felshia, S., N. Aswin Karthick, R. Thilagam, A. Chandralekha, K.S.M.S. Raghavarao, and A. Gnanamani. 2017. “Efficacy of Free and Encapsulated *Bacillus Licheniformis* Strain SL10 on Degradation of Phenol: A Comparative Study of Degradation Kinetics.” *Journal of Environmental Management* 197 (July): 373–83. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.005>.
- Chung, C.T., and Roger H. Miller. 1988. “A Rapid and Convenient Method for the Preparation and Storage of Competent Bacterial Cells.” *Nucleic Acids Research* 16 (8): 3580–3580. <https://doi.org/10.1093/nar/16.8.3580>.
- Ciğeroğlu, Zeynep, Aydın Haşimoğlu, and Oğuz Kaan Özdemir. 2021. “Synthesis, Characterization and an Application of Graphene Oxide Nanopowder: Methylene Blue Adsorption and Comparison between Experimental Data and Literature Data.” *Journal of Dispersion Science and Technology* 42 (5): 771–83. <https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1710526>.
- Comte, Alexia, Pierre Christen, Sylvain Davidson, Matthieu Pophillat, Jean Lorquin, Richard Auria, Gwenola Simon, and Laurence Casalot. 2013. “Biochemical, Transcriptional and Translational Evidences of the Phenol-Meta-Degradation Pathway by the Hyperthermophilic *Sulfolobus solfataricus* 98/2.” *PLoS ONE* 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082397>.
- Corbella, M E, and A Puyet. 2003. “Real-Time Reverse Transcription-PCR Analysis of

- Expression of Halobenzoate and Salicylate Catabolism-Associated Operons in Two Strains of *Pseudomonas aeruginosa*.” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 2269–75.
- Dai, Yunrong, Jun Yao, Yonghui Song, Xiaoling Liu, Siyu Wang, and Yu Yuan. 2016. “Enhanced Performance of Immobilized Laccase in Electrospun Fibrous Membranes by Carbon Nanotubes Modification and Its Application for Bisphenol A Removal from Water.” *Journal of Hazardous Materials* 317 (November): 485–93. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.06.017>.
- Dangi, Arun Kumar, Babita Sharma, Russell T. Hill, and Pratyosh Shukla. 2019. “Bioremediation through Microbes: Systems Biology and Metabolic Engineering Approach.” *Critical Reviews in Biotechnology*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1500997>.
- Darwesh, Osama M., Ibrahim A. Matter, and Mohamed F. Eida. 2019. “Development of Peroxidase Enzyme Immobilized Magnetic Nanoparticles for Bioremediation of Textile Wastewater Dye.” *Journal of Environmental Chemical Engineering* 7 (1): 102805. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.11.049>.
- Das, Rasel, Sharifah Bee Abd Hamid, and Mohamad Suffian Mohamad Annuar. 2016. “Highly Efficient and Stable Novel NanoBiohybrid Catalyst to Avert 3,4-Dihydroxybenzoic Acid Pollutant in Water.” *Scientific Reports* 6 (1): 33572. <https://doi.org/10.1038/srep33572>.
- Datta, Sumitra, L. Rene Christena, and Yamuna Rani Sriramulu Rajaram. 2013. “Enzyme Immobilization: An Overview on Techniques and Support Materials.” *3 Biotech* 3 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.
- Dayana Priyadarshini, S., and A. K. Bakthavatsalam. 2019. “A Comparative Study on Growth and Degradation Behavior of *C. pyrenoidosa* on Synthetic Phenol and Phenolic Wastewater of a Coal Gasification Plant.” *Journal of Environmental Chemical Engineering* 7 (3): 103079. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103079>.
- Delgove, Marie A.F., Daniela Valencia, Jordi Solé, Katrien V. Bernaerts, Stefaan M.A. De Wildeman, Marina Guillén, and Gregorio Álvaro. 2019. “High Performing Immobilized Baeyer-Villiger Monooxygenase and Glucose Dehydrogenase for the Synthesis of ϵ -Caprolactone Derivative.” *Applied Catalysis A: General* 572 (February): 134–41. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2018.12.036>.
- Duan, Weiyan, Fanping Meng, Hongwu Cui, Yufei Lin, Guoshan Wang, and Jiangyue Wu. 2018. “Ecotoxicity of Phenol and Cresols to Aquatic Organisms: A Review.” *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Ecotoxicol Environ Saf. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.089>.
- Dvořák, Pavel, Pablo I. Nikel, Jiří Damborský, and Víctor de Lorenzo. 2017. “Bioremediation 3.0: Engineering Pollutant-Removing Bacteria in the Times of Systemic Biology.” *Biotechnology Advances*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.08.001>.
- Ehrt, Sabine, Falck Schirmer, and Wolfgang Hillen. 1995. “Genetic Organization, Nucleotide Sequence and Regulation of Expression of Genes Encoding Phenol Hydroxylase and Catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250.” *Molecular Microbiology* 18 (1): 13–20. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18010013.x.
- El-Naas, Muftah H., Manal A. Alhaija, and Sulaiman Al-Zuhair. 2017. “Evaluation of an Activated Carbon Packed Bed for the Adsorption of Phenols from Petroleum Refinery Wastewater.” *Environmental Science and Pollution Research* 24 (8): 7511–20. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8469-8>.
- Emelyanova, E V, and I. P. Solyanikova. 2020. “Evaluation of Phenol-Degradation Activity

- of *Rhodococcus opacus* 1CP Using Immobilized and Intact Cells.” *International Journal of Environmental Science and Technology* 17 (4): 2279–94. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02609-8>.
- Emerson, Edgar. 1943. “The Condensation of Aminoantipyrine. II. A New Color Test for Phenolic Compounds.” *Journal of Organic Chemistry* 8 (5): 417–28. https://doi.org/10.1021/JO01193A004/ASSET/JO01193A004.FP.PNG_V03.
- Enroth, Cristofer, Halina Neujahr, Gunter Schneider, and Ylva Lindqvist. 1998. “The Crystal Structure of Phenol Hydroxylase in Complex with FAD and Phenol Provides Evidence for a Concerted Conformational Change in the Enzyme and Its Cofactor during Catalysis.” *Structure* 6 (5): 605–17. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00062-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00062-8).
- Entsch, Barbie, and Willem J. H. Van Berkel. 1995. “Structure and Mechanism of *para*-hydroxybenzoate Hydroxylase.” *The FASEB Journal* 9 (7): 476–83. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.7.7737455>.
- Feng, Yongmei, Hoon Eng Khoo, and Chit Laa Poh. 1999. “Purification and Characterization of Gentisate 1,2-Dioxygenases from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 and *Pseudomonas putida* NCIB 9869.” *Applied and Environmental Microbiology* 65 (3): 946–50. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.946-950.1999>.
- Fernandez-Lafuente, Roberto. 2009. “Stabilization of Multimeric Enzymes: Strategies to Prevent Subunit Dissociation.” *Enzyme and Microbial Technology* 45 (6–7): 405–18. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2009.08.009>.
- Fetyan, Nashwa, A Azeiz, I Ismail, and T Salem. 2017. “Biodegradation of Cibacron Redazo Dye and Industrial Textile Effluent by *Pseudomonas aeruginosa* Immobilized on Chitosan-Fe₂O₃ Composite.” *Journal of Advances in Biology & Biotechnology* 12 (2): 1–15. <https://doi.org/10.9734/jabb/2017/31332>.
- Filipowicz, Natalia, Malwina Momotko, Grzegorz Boczkaj, and Hubert Cieśliński. 2020. “Determination of Phenol Biodegradation Pathways in Three Psychrotolerant Yeasts, *Candida subhashii* A011, *Candida oregonensis* B021 and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L012, Isolated from Rucianka Peatland.” *Enzyme and Microbial Technology* 141 (November): 109663. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109663>.
- Fu, Meihua, Jinfeng Xing, and Zhiqiang Ge. 2019. “Preparation of Laccase-Loaded Magnetic Nanoflowers and Their Recycling for Efficient Degradation of Bisphenol A.” *Science of the Total Environment* 651 (February): 2857–65. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.145>.
- Gan, S, E.V. Lau, and H.K. Ng. 2009. “Remediation of Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).” *Journal of Hazardous Materials* 172 (2–3): 532–49. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.118>.
- Gao, Xiaoli, Chew Ling Tan, Chew Chieng Yeo, and Chit Laa Poh. 2005. “Molecular and Biochemical Characterization of the XlnD-Encoded 3-Hydroxybenzoate 6-Hydroxylase Involved in the Degradation of 2,5-Xylenol via the Gentisate Pathway in *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867.” *Journal of Bacteriology* 187 (22): 7696–7702. <https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7696-7702.2005>.
- García-Contreras, Rodolfo, Paul Vos, Hans V. Westerhoff, and Fred C. Boogerd. 2012. “Why in Vivo May Not Equal in Vitro - New Effectors Revealed by Measurement of Enzymatic Activities under the Same in Vivo-like Assay Conditions.” *FEBS Journal* 279 (22): 4145–59. <https://doi.org/10.1111/febs.12007>.
- García-Morales, Raul, Alejandra García-García, Carolina Orona-Navar, Johann F. Osma, K. D.P. Nigam, and Nancy Ornelas-Soto. 2018. “Biotransformation of Emerging Pollutants in Groundwater by Laccase from *P. sanguineus* CS43 Immobilized onto Titania Nanoparticles.” *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6 (1): 710–17. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.12.006>.

- Gasser, Christoph A., Liang Yu, Jan Svojitka, Thomas Wintgens, Erik M. Ammann, Patrick Shahgaldian, Philippe F.X. Corvini, and Gregor Hommes. 2014. “Advanced Enzymatic Elimination of Phenolic Contaminants in Wastewater: A Nano Approach at Field Scale.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (7): 3305–16. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5414-8>.
- Gavrilescu, Maria, Kateřina Demnerová, Jens Aamand, Spiros Agathos, and Fabio Fava. 2015. “Emerging Pollutants in the Environment: Present and Future Challenges in Biomonitoring, Ecological Risks and Bioremediation.” *New Biotechnology* 32 (1): 147–56. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.01.001>.
- Gheni, Saba A., Safaa M.R. Ahmed, Ahmed N. Abdulla, and Wadood T. Mohammed. 2018. “Catalytic Wet Air Oxidation and Neural Network Modeling of High Concentration of Phenol Compounds in Wastewater.” *Environmental Processes* 5 (3): 593–610. <https://doi.org/10.1007/s40710-018-0323-6>.
- Giannakopoulou, Archontoula, Alexandra V. Chatzikonstantinou, Nikolaos Chalmpe, Georgia Tsapara, Dimitrios Gournis, Angeliki C. Polydera, and Haralambos Stamatis. 2021. “Development of a Novel Bi-Enzymatic Nanobiocatalyst for the Efficient Bioconversion of Oleuropein to Hydroxytyrosol.” *Catalysts* 11 (6): 749. <https://doi.org/10.3390/catal11060749>.
- Giannakopoulou, Archontoula, Michaela Patila, Konstantinos Spyrou, Nikolaos Chalmpe, Dimitra Zarafeta, Georgios Skretas, Dimitrios Gournis, and Haralambos Stamatis. 2019. “Development of a Four-Enzyme Magnetic Nanobiocatalyst for Multi-Step Cascade Reactions.” *Catalysts* 9 (12). <https://doi.org/10.3390/catal9120995>.
- Giedraityte, Gražina, and Lilija Kalėdienė. 2009. “Catechol 1,2-Dioxygenase from α -Naphthol Degrading Thermophilic *Geobacillus* sp. Strain: Purification and Properties.” *Central European Journal of Biology* 4 (1): 68–73. <https://doi.org/10.2478/s11535-008-0049-y>.
- Gkantzou, Elena, Alexandra V. Chatzikonstantinou, Renia Fotiadou, Archontoula Giannakopoulou, Michaela Patila, and Haralambos Stamatis. 2021. “Trends in the Development of Innovative Nanobiocatalysts and Their Application in Biocatalytic Transformations.” *Biotechnology Advances* 51 (November): 107738. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107738>.
- Gorcom, R F van, J G Boschloo, A Kuijvenhoven, J Lange, A J van Vark, C J Bos, J A van Balken, P H Pouwels, and C A van den Hondel. 1990. “Isolation and Molecular Characterisation of the Benzoate-*Para*-Hydroxylase Gene (BphA) of *Aspergillus Niger*: A Member of a New Gene Family of the Cytochrome P450 Superfamily.” *Molecular & General Genetics : MGG* 223 (2): 192–97.
- Gou, Min, Yuanyuan Qu, Jiti Zhou, Ang Li, and M. Salah Uddin. 2009. “Characterization of Catechol 1,2-Dioxygenase from Cell Extracts of *Sphingomonas xenophaga* QYY.” *Science in China, Series B: Chemistry* 52 (5): 615–20. <https://doi.org/10.1007/s11426-008-0149-6>.
- Grinsted, J., and P. M. Bennett. 1988. “5 Preparation and Electrophoresis of Plasmid DNA.” *Methods in Microbiology* 21 (C): 129–42. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70072-2](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70072-2).
- Grund, E., C. Knorr, and R. Eichenlaub. 1990. “Catabolism of Benzoate and Monohydroxylated Benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* spp.” *Applied and Environmental Microbiology* 56 (5): 1459–64. <https://doi.org/10.1128/aem.56.5.1459-1464.1990>.
- Gupta, Vinod Kumar, Arunima Nayak, Shilpi Agarwal, and Inderjeet Tyagi. 2014. “Potential of Activated Carbon from Waste Rubber Tire for the Adsorption of Phenolics: Effect of Pre-Treatment Conditions.” *Journal of Colloid and Interface Science* 417 (March): 420–

30. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.11.067>.
- Guzik, Urszula, Izabela Greń, Katarzyna Hupert-Kocurek, and Danuta Wojcieszynska. 2011. "Catechol 1,2-Dioxygenase from the New Aromatic Compounds - Degrading *Pseudomonas putida* Strain N6." *International Biodeterioration and Biodegradation* 65 (3): 504–12. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.02.001>.
- Guzik, Urszula, Katarzyna Hupert-Kocurek, Marta Krysiak, and Danuta Wojcieszynska. 2014. "Degradation Potential of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase from Crude Extract of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain KB2 Immobilized in Calcium Alginate Hydrogels and on Glyoxyl Agarose." *BioMed Research International* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/138768>.
- Guzik, Urszula, Katarzyna Hupert-Kocurek, Karina Salek, and Danuta Wojcieszynska. 2013. "Influence of Metal Ions on Bioremediation Activity of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* KB2." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29 (2): 267–73. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1178-z>.
- Guzik, Urszula, Katarzyna Hupert-Kocurek, and Danuta Wojcieszynska. 2014. "Immobilization as a Strategy for Improving Enzyme Properties-Application to Oxidoreductases." *Molecules* 19 (7): 8995–9018. <https://doi.org/10.3390/molecules19078995>.
- Guzik, Urszula, Katarzyna Hupert-Kocurek, and Danuta Wojcieszynska. 2013. "Intradiol Dioxygenases — The Key Enzymes in Xenobiotics Degradation." In *Biodegradation of Hazardous and Special Products*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/56205>.
- Ha, Eun Ju, Bong Soo Kim, Eun Kyoung Park, Ki Won Song, Sun Gu Lee, Seong Soo A. An, and Hyun jong Paik. 2013. "Site-Specific Reversible Immobilization and Purification of His-Tagged Protein on Poly(2-Acetamidoacrylic Acid) Hydrogel Beads." *Polymers for Advanced Technologies* 24 (1): 75–80. <https://doi.org/10.1002/pat.3052>.
- Hanahan, Douglas. 1983. "Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids." *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557–80. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8).
- Harayama, S, M Kok, and E L Neidle. 1992. "Functional and Evolutionary Relationships Among Diverse Oxygenases." *Annual Review of Microbiology* 46 (1): 565–601. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.003025>.
- Haritash, A. K., and C. P. Kaushik. 2009. "Biodegradation Aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review." *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>.
- Hatta, Takashi, Gouri Mukerjee-Dhar, Jiri Damborsky, Hohzoh Kiyohara, and Kazuhide Kimbara. 2003. "Characterization of a Novel Thermostable Mn(II)-Dependent 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase from a Polychlorinated Biphenyl- and Naphthalene-Degrading *Bacillus* sp. JF8." *Journal of Biological Chemistry* 278 (24): 21483–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210240200>.
- Herz, Stefan, Juraithip Wungsintaweekul, Christoph A. Schuhr, Stefan Hecht, Holger Lüttgen, Sylvia Sagner, Monika Fellermeier, et al. 2000. "Biosynthesis of Terpenoids: YgbB Protein Converts 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol 2-Phosphate to 2C-Methyl-D-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphate." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (6): 2486–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.040554697>.
- Hintner, J. P., C. Lechner, U. Riegert, A. E. Kuhm, T. Storm, T. Reemtsma, and A. Stolz. 2001. "Direct Ring Fission of Salicylate by a Salicylate 1,2-Dioxygenase Activity from *Pseudaminobacter salicylatoxidans*." *Journal of Bacteriology* 183 (23): 6936–42. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6936-6942.2001>.

- Hiromoto, Takeshi, Shinsuke Fujiwara, Keiichi Hosokawa, and Hiroshi Yamaguchi. 2006. "Crystal Structure of 3-Hydroxybenzoate Hydroxylase from *Comamonas testosteroni* Has a Large Tunnel for Substrate and Oxygen Access to the Active Site." *Journal of Molecular Biology* 364 (5): 878–96. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.031>.
- Huang, Xiaofei, Xiaojiong Bao, Yalan Liu, Zhengke Wang, and Qiaoling Hu. 2017. "Catechol-Functional Chitosan/Silver Nanoparticle Composite as a Highly Effective Antibacterial Agent with Species-Specific Mechanisms." *Scientific Reports* 7 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02008-4>.
- Huijbers, Mieke M.E., Stefania Montersino, Adrie H. Westphal, Dirk Tischler, and Willem J.H. Van Berkel. 2014. "Flavin Dependent Monooxygenases." *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.005>.
- Ishiyama, Daisuke, Dusica Vujaklija, and Julian Davies. 2004. "Novel Pathway of Salicylate Degradation by *Streptomyces* sp. Strain WA46." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3): 1297–1306. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1297-1306.2004>.
- Iwagami, Sakura G., Keqian Yang, and Julian Davies. 2000. "Characterization of the Protocatechuic Acid Catabolic Gene Cluster from *Streptomyces* sp. Strain 2065." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4): 1499–1508. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1499-1508.2000>.
- Janke, D, and W Fritsche. 1985. "Nature and Significance of Microbial Cometabolism of Xenobiotics." *Journal of Basic Microbiology* 25 (9): 603–19.
- Ji, Yan, Xiaoliang Yang, Zhi Ji, Linhui Zhu, Nana Ma, Dejun Chen, Xianbin Jia, Junming Tang, and Yilin Cao. 2020. "DFT-Calculated IR Spectrum Amide I, II, and III Band Contributions of N -Methylacetamide Fine Components." *ACS Omega* 5 (15): 8572–78. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04421>.
- Jiang, Yu, Tao Deng, Yu Shang, Kai Yang, and Hongyu Wang. 2017. "Biodegradation of Phenol by Entrapped Cell of *Debaryomyces* sp. with Nano-Fe₃O₄ under Hypersaline Conditions." *International Biodeterioration & Biodegradation* 123 (September): 37–45. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2017.05.029>.
- Jiao, Mengzhao, Jie He, Shanshan Sun, Frank Vriesekoop, Qipeng Yuan, Yanhui Liu, and Hao Liang. 2020. "Fast Immobilization of Human Carbonic Anhydrase II on Ni-Based Metal-Organic Framework Nanorods with High Catalytic Performance." *Catalysts* 10 (4): 401. <https://doi.org/10.3390/catal10040401>.
- Johnsen, Anders R, Lukas Y Wick, and Hauke Harms. 2005. "Principles of Microbial PAH-Degradation in Soil." *Environmental Pollution* 133 (1): 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.015>.
- Johnson, Christopher W., and Gregg T. Beckham. 2015. "Aromatic Catabolic Pathway Selection for Optimal Production of Pyruvate and Lactate from Lignin." *Metabolic Engineering* 28: 240–47. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.01.005>.
- Johnson, Martin R, Kangsheng Wang, Jeffrey B Smith, Martin J Heslin, and Robert B Diasio. 2000. "Quantitation of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Expression by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction." *Analytical Biochemistry* 278 (2): 175–84. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4461>.
- Kadam, Avinash A., Jiseon Jang, Seung Cheol Jee, Jung Suk Sung, and Dae Sung Lee. 2018. "Chitosan-Functionalized Supermagnetic Halloysite Nanotubes for Covalent Laccase Immobilization." *Carbohydrate Polymers* 194 (August): 208–16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.046>.
- Kadirvelu, K., Arivalagan Pugazhendhi, Smita S. Kumar, Desika Prabakar, Chinnannan Karthik, Rijuta Ganesh Saratale, and Jaya Mary Jacob. 2018. "Biological Approaches to Tackle Heavy Metal Pollution: A Survey of Literature." *Journal of Environmental Management* 217: 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.077>.

- Kalin, M., H. Y. Neujahr, R. N. Weissmahr, T. Sejlitz, R. Johl, A. Fiechter, and J. Reiser. 1992. "Phenol Hydroxylase from *Trichosporon Cutaneum*: Gene Cloning, Sequence Analysis, and Functional Expression in *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology* 174 (22): 7112–20. <https://doi.org/10.1128/jb.174.22.7112-7120.1992>.
- Kallimanis, A., K. Kavakiotis, A. Perisynakis, C. Sproer, R. Pukall, C. Drinas, A. I. Koukkou, et al. 2009. "*Arthrobacter phenanthrenivorans* Sp. Nov., to Accommodate the Phenanthrene-Degrading Bacterium *Arthrobacter* Sp. Strain Sphe3." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (2): 275–79. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000984-0>.
- Kallimanis, Aristeidis, Stathis Frillingos, Constantin Drinas, and Anna Irini Koukkou. 2007. "Taxonomic Identification, Phenanthrene Uptake Activity, and Membrane Lipid Alterations of the PAH Degrading *Arthrobacter* sp. Strain Sphe3." *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (3): 709–17. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1036-3>.
- Kallimanis, Aristeidis, Kurt M. Labutti, Alla Lapidus, Alicia Clum, Athanasios Lykidis, Kostantinos Mavromatis, Ioanna Pagani, et al. 2011. "Complete Genome Sequence of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Type Strain (Sphe3)." *Standards in Genomic Sciences* 4 (2): 123–30. <https://doi.org/10.4056/sigs.1393494>.
- Kalogeris, E., Y. Sanakis, D. Mamma, P. Christakopoulos, D. Kekos, and H. Stamatis. 2006. "Properties of Catechol 1,2-Dioxygenase from *Pseudomonas putida* Immobilized in Calcium Alginate Hydrogels." *Enzyme and Microbial Technology* 39 (5): 1113–21. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2006.02.026>.
- Kaneko, Aya, Yoshitaka Ishii, and Kohtaro Kirimura. 2011. "High-Yield Production of *cis,cis*-Muconic Acid from Catechol in Aqueous Solution by Biocatalyst." *Chemistry Letters* 40 (4): 381–83. <https://doi.org/10.1246/cl.2011.381>.
- Karigar, Chandrakant, Aravind Mahesh, Manjunath Nagenahalli, and Dae Jin Yun. 2006. "Phenol Degradation by Immobilized Cells of *Arthrobacter citreus*." *Biodegradation* 17 (1): 47–55. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-3048-y>.
- Ke, Qian, Yunge Zhang, Xilin Wu, Xiaomei Su, Yuyang Wang, Hongjun Lin, Rongwu Mei, et al. 2018. "Sustainable Biodegradation of Phenol by Immobilized *Bacillus* sp. SAS19 with Porous Carbonaceous Gels as Carriers." *Journal of Environmental Management* 222 (September): 185–89. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.061>.
- Kelley, Lawrence A., Stefans Mezulis, Christopher M. Yates, Mark N. Wass, and Michael J.E. Sternberg. 2015. "The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis." *Nature Protocols* 10 (6): 845–58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
- Khleifat, Khaled, Mousa Magharbeh, Moath Alqaraleh, Mutaz Al-Sarayrah, Ibrahim Alfarayeh, Yaseen Al Qaisi, Ahmad Alsarayreh, and Mohammad Alkafaween. 2022. "Biodegradation Modeling of Phenol Using *Curtobacterium flaccumfaciens* as Plant-Growth-Promoting Bacteria." *Heliyon* 8 (9). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10490>.
- Kim, In Cheol, and P. J. Oriel. 1995. "Characterization of the *Bacillus stearothermophilus* BR219 Phenol Hydroxylase Gene." *Applied and Environmental Microbiology* 61 (4): 1252–56. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1252-1256.1995>.
- Kim, Seong Jae, Jaekyeong Song, Ohgew Kweon, Ricky D. Holland, Dae Wi Kim, Jongnam Kim, Li Rong Yu, and Carl E. Cerniglia. 2012. "Functional Robustness of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolic Network Examined in a NidA Aromatic Ring-Hydroxylating Oxygenase Mutant of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (10): 3715–23. <https://doi.org/10.1128/AEM.07798-11>.
- Kim, Youngsoo, Bongsoo Choi, Jeongrai Lee, Hogil Chang, and Kyung Rak Min. 1992. "Characterization of Catechol 2,3-Dioxygenases." *Biochemical and Biophysical*

- Research Communications* 183 (1): 77–82. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)91611-S](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)91611-S).
- Kirchner, Ulrike, Adrie H. Westphal, Rudolf Müller, and Willem J.H. Van Berkel. 2003. “Phenol Hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7, a Two-Protein Component Monooxygenase with a Dual Role for FAD.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (48): 47545–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307397200>.
- Krzek, Marzena, Hugo L. van Beek, Hjalmar P. Permentier, Rainer Bischoff, and Marco W. Fraaije. 2016. “Covalent Immobilization of a Flavoprotein Monooxygenase via Its Flavin Cofactor.” *Enzyme and Microbial Technology* 82 (January): 138–43. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.09.006>.
- Kukor, J. J., and R. H. Olsen. 1992. “Complete Nucleotide Sequence of TbuD, the Gene Encoding Phenol/Cresol Hydroxylase from *Pseudomonas pickettii* PKO1, and Functional Analysis of the Encoded Enzyme.” *Journal of Bacteriology* 174 (20): 6518–26. <https://doi.org/10.1128/jb.174.20.6518-6526.1992>.
- Kumar, Lakhan, and Navneeta Bharadvaja. 2019. “Enzymatic Bioremediation: A Smart Tool to Fight Environmental Pollutants.” In *Smart Bioremediation Technologies: Microbial Enzymes*, 99–118. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818307-6.00006-8>.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, and Koichiro Tamura. 2016. “MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets.” *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Laemmli, U. K. 1970. “Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.” *Nature* 227 (5259): 680–85. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lallement, Audrey, Ludovic Besaury, Elise Tixier, Martine Sancelme, Pierre Amato, Virginie Vinatier, Isabelle Canet, et al. 2018. “Potential for Phenol Biodegradation in Cloud Waters.” *Biogeosciences* 15 (18): 5733–44. <https://doi.org/10.5194/bg-15-5733-2018>.
- Lee, Gillian Li Yin, Nur Nadhirah Zakaria, Hiroyuki Futamata, Kenshi Suzuki, Azham Zulkharnain, Noor Azmi Shaharuddin, Peter Convey, Khadijah Nabilah Mohd Zahri, and Siti Aqlima Ahmad. 2022. “Metabolic Pathway of Phenol Degradation of a Cold-Adapted Antarctic Bacteria, *Arthrobacter* sp.” *Catalysts* 12 (11): 1422. <https://doi.org/10.3390/catal12111422>.
- Lee, Seok H., Sun H. Lee, Song J. Ryu, Christina S. Kang, Yanasinee Suma, and Han S. Kim. 2013. “Effective Biochemical Decomposition of Chlorinated Aromatic Hydrocarbons with a Biocatalyst Immobilized on a Natural Enzyme Support.” *Bioresource Technology* 141: 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.159>.
- Li, Anxia, Xiaoxin Yang, Binglong Yu, and Xiulan Cai. 2020. “Immobilization of Horseradish Peroxidase on Polyglycerol-Functionalized Magnetic Fe₃O₄/Nanodiamond Nanocomposites and Its Application in Phenol Biodegradation.” *Research on Chemical Intermediates* 46 (1): 101–18. <https://doi.org/10.1007/s11164-019-03937-7>.
- Li, Fei, Wenjun Song, Jiping Wei, Chongji Liu, and Chunhua Yu. 2016. “Comparative Proteomic Analysis of Phenol Degradation Process by *Arthrobacter*.” *International Biodeterioration and Biodegradation* 110 (May): 189–98. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.03.023>.
- Liao, Junya, Shanshan Han, Xianglai Li, Jie He, Francesco Secundo, and Hao Liang. 2020. “Co-Immobilization of Two-Component Hydroxylase Monooxygenase by Functionalized Magnetic Nanoparticles for Preserving High Catalytic Activity and Enhancing Enzyme Stability.” *International Journal of Biological Macromolecules* 164 (December): 3163–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.182>.
- Lin, J., and R. N. Milase. 2015. “Purification and Characterization of Catechol 1,2-Dioxygenase from *Acinetobacter* sp. Y64 Strain and *Escherichia coli* Transformants.”

- Protein Journal* 34 (6): 421–33. <https://doi.org/10.1007/s10930-015-9637-7>.
- Lin, Yen Hui, and Yu Siang Cheng. 2020. “Phenol Degradation Kinetics by Free and Immobilized *Pseudomonas putida* BCRC 14365 in Batch and Continuous-Flow Bioreactors.” *Processes* 2020, Vol. 8, Page 721 8 (6): 721. <https://doi.org/10.3390/PR8060721>.
- Linger, J. G., D. R. Vardon, M. T. Guarnieri, E. M. Karp, G. B. Hunsinger, M. A. Franden, C. W. Johnson, et al. 2014. “Lignin Valorization through Integrated Biological Funneling and Chemical Catalysis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (33): 12013–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410657111>.
- Liu, Junteng, Jing Xie, Zhongqi Ren, and Weidong Zhang. 2013. “Solvent Extraction of Phenol with Cumene from Wastewater.” *Desalination and Water Treatment* 51 (19–21): 3826–31. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.796993>.
- Liu, Shan, Biyan Huang, Guiqin Zheng, Peng Zhang, Juying Li, Bo Yang, Yantao Chen, and Li Liang. 2020. “Nanocapsulation of Horseradish Peroxidase (HRP) Enhances Enzymatic Performance in Removing Phenolic Compounds.” *International Journal of Biological Macromolecules* 150 (May): 814–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.043>.
- Liu, Shao-heng, Guang-ming Zeng, Qiu-ya Niu, Yang Liu, Lu Zhou, Lu-hua Jiang, Xiao-fei Tan, Piao Xu, Chen Zhang, and Min Cheng. 2017. “Bioresource Technology Bioremediation Mechanisms of Combined Pollution of PAHs and Heavy Metals by Bacteria and Fungi: A Mini Review.” *Bioresource Technology* 224: 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.095>.
- Liu, Yifan, Weiwei Wang, Syed Bilal Shah, Giulio Zanaroli, Ping Xu, and Hongzhi Tang. 2020. “Phenol Biodegradation by *Acinetobacter radioresistens* APH1 and Its Application in Soil Bioremediation.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 104 (1): 427–37. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10271-w>.
- Loh, Kai Chee, and Shao Siong Chua. 2002. “Ortho Pathway of Benzoate Degradation in *Pseudomonas putida*: Induction of Meta Pathway at High Substrate Concentrations.” *Enzyme and Microbial Technology* 30 (5): 620–26. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00016-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00016-9).
- Lubbers, Ronnie J.M., Adiphol Dilokpimol, Jaap Visser, Kristiina S. Hildén, Miia R. Mäkelä, and Ronald P. de Vries. 2021. “Discovery and Functional Analysis of a Salicylic Acid Hydroxylase from *Aspergillus niger*.” *Applied and Environmental Microbiology* 87 (6): 1–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.02701-20>.
- Luchinat, Enrico, and Lucia Banci. 2018. “In-Cell NMR in Human Cells: Direct Protein Expression Allows Structural Studies of Protein Folding and Maturation.” *Accounts of Chemical Research* 51 (6): 1550–57. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00147>.
- . 2022. “In-Cell NMR: From Target Structure and Dynamics to Drug Screening.” *Current Opinion in Structural Biology* 74 (June): 102374. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102374>.
- Madeira, Fábio, Matt Pearce, Adrian R.N. Tivey, Prasad Basutkar, Joon Lee, Ossama Edbali, Nandana Madhusoodanan, Anton Kolesnikov, and Rodrigo Lopez. 2022. “Search and Sequence Analysis Tools Services from EMBL-EBI in 2022.” *Nucleic Acids Research* 50 (W1): W276–79. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>.
- Malito, Enrico, Andrea Alfieri, Marco W. Fraaije, and Andrea Mattevi. 2004. “Crystal Structure of a Baeyer-Villiger Monooxygenase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (36): 13157–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404538101>.
- Mandel, M., and A. Higa. 1970. “Calcium-Dependent Bacteriophage DNA Infection.” *Journal of Molecular Biology* 53 (1): 159–62. <https://doi.org/10.1016/0022->

- 2836(70)90051-3.
- Margesin, Rosa, Philipp Bergauer, and Silvia Gander. 2004. "Degradation of Phenol and Toxicity of Phenolic Compounds: A Comparison of Cold-Tolerant *Arthrobacter* sp. and Mesophilic *Pseudomonas putida*." *Extremophiles* 8 (3): 201–7. <https://doi.org/10.1007/s00792-004-0378-3>.
- Mars, A. E., T. Kasberg, S. R. Kaschabek, M H van Agteren, D. B. Janssen, and W. Reineke. 1997. "Microbial Degradation of Chloroaromatics: Use of the *Meta*-Cleavage Pathway for Mineralization of Chlorobenzene." *Journal of Bacteriology* 179 (14): 4530–37. <https://doi.org/10.1128/jb.179.14.4530-4537.1997>.
- Maryskova, Milena, Miroslava Rysova, Vit Novotny, and Alena Sevcu. 2019. "Polyamide-Laccase Nanofiber Membrane for Degradation of Endocrine-Disrupting Bisphenol A, 17 α -Ethinylestradiol, and Triclosan." *Polymers* 11 (10): 1560. <https://doi.org/10.3390/polym11101560>.
- Mascotti, Maria Laura, Maximiliano Juri Ayub, Nicholas Furnham, Janet M. Thornton, and Roman A. Laskowski. 2016. "Chopping and Changing: The Evolution of the Flavin-Dependent Monooxygenases." *Journal of Molecular Biology* 428 (15): 3131–46. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.003>.
- Medel, Alejandro, Erika Bustos, Karen Esquivel, Luis A. Godínez, and Yunny Meas. 2012. "Electrochemical Incineration of Phenolic Compounds from the Hydrocarbon Industry Using Boron-Doped Diamond Electrodes." *International Journal of Photoenergy* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/681875>.
- Mehta, Akshita, Urgyn Bodh, and Reena Gupta. 2017. "Fungal Lipases: A Review." *Journal of Biotech Research* 8 (1): 58–77.
- Miao, Changlin, Lingmei Yang, Zhongming Wang, Wen Luo, Huiwen Li, Pengmei Lv, and Zhenhong Yuan. 2018. "Lipase Immobilization on Amino-Silane Modified Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles as Biocatalyst for Biodiesel Production." *Fuel* 224 (July): 774–82. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.149>.
- Michalover, John L., and D. W. Ribbons. 1973. "3-Hydroxybenzoate 4-Hydroxylase from *Pseudomonas testosteroni*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 55 (3): 888–96. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(73\)91227-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)91227-8).
- Mirdita, Milot, Konstantin Schütze, Yoshitaka Moriwaki, Lim Heo, Sergey Ovchinnikov, and Martin Steinegger. 2022. "ColabFold: Making Protein Folding Accessible to All." *Nature Methods* 19 (6): 679–82. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>.
- Mishra, Bishwambhar, Sunita Varjani, Dinesh Chand Agrawal, Sanjeeb Kumar Mandal, Huu Hao Ngo, Mohammad J. Taherzadeh, Jo Shu Chang, Siming You, and Wenshan Guo. 2020. "Engineering Biocatalytic Material for the Remediation of Pollutants: A Comprehensive Review." *Environmental Technology and Innovation* 20: 101063. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101063>.
- Miyazawa, Daisuke. 2004. "Genes for Mn(II)-Dependent NahC and Fe(II)-Dependent NahH Located in Close Proximity in the Thermophilic Naphthalene and PCB Degradar, *Bacillus* sp. JF8: Cloning and Characterization." *Microbiology* 150 (4): 993–1004. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26858-0>.
- Mohamad, Nur Royhaila, Nur Haziqah Che Marzuki, Nor Aziah Buang, Fahrul Huyop, and Roswanira Abdul Wahab. 2015. "An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques for Immobilized Enzymes." *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 29 (2): 205–20. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.
- Mohanty, Satya Sundar. 2012. "Microbial Degradation of Phenol: A Comparative Study." National Institute of Technology, Rourkela, India. <http://ethesis.nitrkl.ac.in/4431/>.
- Montersino, Stefania, and Willem J.H. Van Berkel. 2012. "Functional Annotation and

- Characterization of 3-Hydroxybenzoate 6-Hydroxylase from *Rhodococcus jostii* RHA1.” *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1824 (3): 433–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.12.003>.
- Monterisino, Stefania, Dirk Tischler, George T. Gassner, and Willem J.H. Van Berkel. 2011. “Catalytic and Structural Features of Flavoprotein Hydroxylases and Epoxidases.” *Advanced Synthesis and Catalysis*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100384>.
- Moonen, Mariëlle J.H., Marco W Fraaije, Ivonne M.C.M. Rietjens, Colja Laane, and Willem J.H. Van Berkel. 2002. “Flavoenzyme-Catalyzed Oxygenations and Oxidations of Phenolic Compounds.” *Advanced Synthesis and Catalysis* 344 (10): 1023–35. [https://doi.org/10.1002/1615-4169\(200212\)344:10<1023::AID-ADSC1023>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1615-4169(200212)344:10<1023::AID-ADSC1023>3.0.CO;2-T).
- Mulla, Sikandar I., Manjunatha Bangeppagari, Gurumurthy D. Mahadevan, Syed Ali Musstjab Akber Shah Eqani, Dayanand B. Sajjan, Preeti N. Tallur, Veena B. Megadi, and Harichandra Z. Ninnekar. 2016. “Biodegradation of 3-Chlorobenzoate and 3-Hydroxybenzoate by Polyurethane Foam Immobilized Cells of *Bacillus* sp. OS13.” *Journal of Environmental Chemical Engineering* 4 (2): 1423–31. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.02.027>.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. “Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction.” *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (1): 263–73. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>.
- Murakami, S., C. L. Wang, A. Naito, R. Shinke, and K. Aoki. 1998. “Purification and Characterization of Four Catechol 1,2-Dioxygenase Isozymes from the Benzamide-Assimilating Bacterium *Arthrobacter* Species BA-5-17.” *Microbiological Research* 153 (2): 163–71. [https://doi.org/10.1016/s0944-5013\(98\)80036-0](https://doi.org/10.1016/s0944-5013(98)80036-0).
- Nandy, Sampurna, Upasana Arora, Pranay Tarar, Signe Viggør, Merike Jõesaar, Maia Kivisaar, and Atya Kapley. 2021. “Monitoring the Growth, Survival and Phenol Utilization of the Fluorescent-Tagged *Pseudomonas oleovorans* Immobilized and Free Cells.” *Bioresource Technology* 338 (October): 125568. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125568>.
- Nardo, Giovanna Di, Carlo Roggero, Simona Campolongo, Francesca Valetti, Francesco Trotta, and Gianfranco Gilardi. 2009. “Catalytic Properties of Catechol 1,2-Dioxygenase from *Acinetobacter radioresistens* S13 Immobilized on Nanosponges.” *Dalton Transactions* 2 (33): 6507. <https://doi.org/10.1039/b903105g>.
- Nešvera, Jan, Lenka Rucká, and Miroslav Pátek. 2015. “Catabolism of Phenol and Its Derivatives in Bacteria: Genes, Their Regulation, and Use in the Biodegradation of Toxic Pollutants.” *Advances in Applied Microbiology* 93 (January): 107–60. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.06.002>.
- Ni, Bin, Yun Zhang, Dong Wei Chen, Bao Jun Wang, and Shuang Jiang Liu. 2013. “Assimilation of Aromatic Compounds by *Comamonas testosteroni*: Characterization and Spreadability of Protocatechuate 4,5-Cleavage Pathway in Bacteria.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (13): 6031–41. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4402-8>.
- Nisha, S, S Arun Karthick, and N Gobi. 2012. “A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme.” *Chemical Science Reiew and Letters* 1 (3): 148–55. http://www.researchgate.net/publication/233882011_A_Review_on_Methods_Application_and_Properties_of_Immobilized_Enzyme/file/9fcfd50c832620efe1.pdf.
- Nordlund, I., J. Powlowski, and V. Shingler. 1990. “Complete Nucleotide Sequence and Polypeptide Analysis of Multicomponent Phenol Hydroxylase from *Pseudomonas* sp. Strain CF600.” *Journal of Bacteriology* 172 (12): 6826–33.

- <https://doi.org/10.1128/jb.172.12.6826-6833.1990>.
- Nuhoglu, Alper, and Beste Yalcin. 2005. "Modelling of Phenol Removal in a Batch Reactor." *Process Biochemistry* 40 (3–4): 1233–39. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2004.04.003>.
- Okino-Delgado, Clarissa Hamaio, Mirella Rossitto Zanutto-Elgui, Débora Zanoni do Prado, Milene Stefani Pereira, and Luciana Francisco Fleuri. 2019. "Enzymatic Bioremediation: Current Status, Challenges of Obtaining Process, and Applications." In , 79–101. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7462-3_4.
- Omokoko, Bastian, Uwe K. Jäntges, Martin Zimmermann, Monika Reiss, and Winfried Hartmeier. 2008. "Isolation of the Phe-Operon from *G. stearothermophilus* Comprising the Phenol Degradative *meta*-Pathway Genes and a Novel Transcriptional Regulator." *BMC Microbiology* 8 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-197>.
- Ono, Katsuhiko, Mitsuhiro Nozaki, and Osamu Hayaishi. 1970. "Purification and Some Properties of Protocatechuate 4,5-Dioxygenase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 220 (2): 224–38. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(70\)90008-2](https://doi.org/10.1016/0005-2744(70)90008-2).
- öztürk, Hale, Eric Pollet, Vincent Phalip, Yüksel Güvenilir, and Luc Avérous. 2016. "Nanoclays for Lipase Immobilization: Biocatalyst Characterization and Activity in Polyester Synthesis." *Polymers* 8 (12): 416. <https://doi.org/10.3390/polym8120416>.
- Ozyilmaz, Elif, Mevlut Bayrakci, and Mustafa Yilmaz. 2016. "Improvement of Catalytic Activity of *Candida rugosa* Lipase in the Presence of Calix[4]Arene Bearing Iminodicarboxylic/Phosphonic Acid Complexes Modified Iron Oxide Nanoparticles." *Bioorganic Chemistry* 65 (April): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.12.001>.
- Padhye, Lokesh P. 2015. "Fate of Environmental Pollutants." *Water Environment Research* 87 (10): 1595–1610. <https://doi.org/10.2175/106143015X14338845156308>.
- Paisio, Cintia E., Melina A. Talano, Paola S. González, Cynthia Magallanes-Noguera, Marcela Kurina-Sanz, and Elizabeth Agostini. 2016. "Biotechnological Tools to Improve Bioremediation of Phenol by *Acinetobacter* sp. RTE1.4." *Environmental Technology (United Kingdom)* 37 (18): 2379–90. <https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1150352>.
- Paller, Gerhard, Rolf K. Hommel, and Hans-Peter -P Kleber. 1995. "Phenol Degradation by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250." *Journal of Basic Microbiology* 35 (5): 325–35. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620350508>.
- Pandeeti, Emmanuel Vijay Paul, and Dayananda Siddavattam. 2011. "Purification and Characterization of Catechol 1,2-Dioxygenase from *Acinetobacter* sp. DS002 and Cloning, Sequencing of Partial CatA Gene." *Indian Journal of Microbiology* 51 (3): 312–18. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0123-4>.
- Panigrahy, Namita, Manas Barik, and Naresh K. Sahoo. 2020. "Kinetics of Phenol Biodegradation by an Indigenous *Pseudomonas citronellolis* NS1 Isolated from Coke Oven Wastewater." *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste* 24 (3): 04020019. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)hz.2153-5515.0000502](https://doi.org/10.1061/(asce)hz.2153-5515.0000502).
- Panigrahy, Namita, Ankita Priyadarshini, Mitali Madhusmita Sahoo, Akshaya Kumar Verma, Achlesh Daverey, and Naresh Kumar Sahoo. 2022. "A Comprehensive Review on Eco-Toxicity and Biodegradation of Phenolics: Recent Progress and Future Outlook." *Environmental Technology and Innovation*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102423>.
- Park, Minjeong, Yeji Jeon, Hee Jang Ho, Hyun Su Ro, Woojun Park, Eugene L. Madsen, and Ok Jeon Che. 2007. "Molecular and Biochemical Characterization of 3-Hydroxybenzoate 6-Hydroxylase from *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16): 5146–52. <https://doi.org/10.1128/AEM.00782-07>.

- Patel, Alok, Km Sartaj, Neha Arora, Vikas Pruthi, and Parul A. Pruthi. 2017. “Biodegradation of Phenol via *meta* Cleavage Pathway Triggers de Novo TAG Biosynthesis Pathway in Oleaginous Yeast.” *Journal of Hazardous Materials* 340 (October): 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.07.013>.
- Patel, Avani Bharatkumar, Shabnam Shaikh, Kunal R. Jain, Chirayu Desai, and Datta Madamwar. 2020. “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches.” *Frontiers in Microbiology* 11 (November). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562813>.
- Patel, Sanjay K.S., Rahul K. Gupta, Sang Yong Kim, In Won Kim, Vipin C. Kalia, and Jung Kul Lee. 2021. “*Rhus vernicifera* Laccase Immobilization on Magnetic Nanoparticles to Improve Stability and Its Potential Application in Bisphenol A Degradation.” *Indian Journal of Microbiology* 61 (1): 45–54. <https://doi.org/10.1007/S12088-020-00912-4/FIGURES/7>.
- Pathmamanoharan, Chellappah, Peter Wijkens, David M. Grove, and Albert P. Philipse. 1996. “Paramagnetic Silica Particles: Synthesis and Grafting of a Silane Coupling Agent Containing Nickel Ions onto Colloidal Silica Particles.” *Langmuir* 12 (18): 4372–77. <https://doi.org/10.1021/la960350s>.
- Patila, Michaela, Antonios Kouloumpis, Dimitrios Gournis, Petra Rudolf, and Haralambos Stamatis. 2016. “Laccase-Functionalized Graphene Oxide Assemblies as Efficient Nanobiocatalysts for Oxidation Reactions.” *Sensors (Switzerland)* 16 (3): 1–14. <https://doi.org/10.3390/s16030287>.
- Patila, Michaela, Ioannis V. Pavlidis, Evmorfia K. Diamanti, Petros Katapodis, Dimitrios Gournis, and Haralampos Stamatis. 2013. “Enhancement of Cytochrome c Catalytic Behaviour by Affecting the Heme Environment Using Functionalized Carbon-Based Nanomaterials.” *Process Biochemistry* 48 (7): 1010–17. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.021>.
- Patila, Michaela, Ioannis V. Pavlidis, Antonios Kouloumpis, Konstantinos Dimos, Konstantinos Spyrou, Petros Katapodis, Dimitrios Gournis, and Haralambos Stamatis. 2016. “Graphene Oxide Derivatives with Variable Alkyl Chain Length and Terminal Functional Groups as Supports for Stabilization of Cytochrome C.” *International Journal of Biological Macromolecules* 84: 227–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.023>.
- Paul, Caroline E., Daniel Eggerichs, Adrie H. Westphal, Dirk Tischler, and Willem J.H. van Berkel. 2021. “Flavoprotein Monooxygenases: Versatile Biocatalysts.” *Biotechnology Advances*. Biotechnol Adv. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107712>.
- Pavlidis, Ioannis V., Torge Vorhaben, Theodoros Tsoufis, Petra Rudolf, Uwe T. Bornscheuer, Dimitrios Gournis, and Haralambos Stamatis. 2012. “Development of Effective Nanobiocatalytic Systems through the Immobilization of Hydrolases on Functionalized Carbon-Based Nanomaterials.” *Bioresource Technology* 115: 164–71. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.007>.
- Paysan-Lafosse, Typhaine, Matthias Blum, Sara Chuguransky, Tiago Grego, Beatriz Lázaro Pinto, Gustavo A. Salazar, Maxwell L. Bileschi, et al. 2023. “InterPro in 2022.” *Nucleic Acids Research* 51 (D1): D418–27. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>.
- Pérez-Pantoja, D, B González, and D H Pieper. 2010. “Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons.” In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, edited by Kenneth N Timmis, 799–837. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_60.
- Pfaffl, M W. 2001. “A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR.” *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45.
- Planchestainer, Matteo, Martina Letizia Contente, Jennifer Cassidy, Francesco Molinari,

- Lucia Tamborini, and Francesca Paradisi. 2017. “Continuous Flow Biocatalysis: Production and in-Line Purification of Amines by Immobilised Transaminase from *Halomonas Elongata*.” *Green Chemistry* 19 (2): 372–75. <https://doi.org/10.1039/c6gc01780k>.
- Poppe, László, and Beáta G. Vértessy. 2018. “The Fourth Wave of Biocatalysis Emerges—The 13 Th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations.” In *ChemBioChem*, 19:284–87. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700687>.
- Prathibha, K., and Suresh Sumathi. 2008. “Biodegradation of Mixture Containing Monohydroxybenzoate Isomers by *Acinetobacter calcoaceticus*.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (6): 813–23. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9545-x>.
- Premkumar, R., P. V. Rao, N. S. Sreeleela, and C. S. Vaidyanathan. 1969. “M-Hydroxybenzoic Acid 4-Hydroxylase from *Aspergillus niger*.” *Canadian Journal of Biochemistry* 47 (8): 825–27. <https://doi.org/10.1139/o69-129>.
- Primikyri, Alexandra, Nisar Sayyad, Giacomo Quilici, Eirinaios I. Vrettos, Kyungeun Lim, Seung Wook Chi, Giovanna Musco, Ioannis P. Gerothanassis, and Andreas G. Tzakos. 2018. “Probing the Interaction of a Quercetin Bioconjugate with Bcl-2 in Living Human Cancer Cells with in-Cell NMR Spectroscopy.” *FEBS Letters* 592 (20): 3367–79. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13250>.
- Putrinš, Marta, Andres Tover, Radi Tegova, Ülle Saks, and Maia Kivisaar. 2007. “Study of Factors Which Negatively Affect Expression of the Phenol Degradation Operon PheBA in *Pseudomonas putida*.” *Microbiology* 153 (6): 1860–71. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003681-0>.
- Qu, Ge, Aitao Li, Carlos G. Acevedo-Rocha, Zhoutong Sun, and Manfred T. Reetz. 2020. “The Crucial Role of Methodology Development in Directed Evolution of Selective Enzymes.” *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 59 (32): 13204–31. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201901491>.
- Que, L Jr, and M F Reynolds. 2000. “Manganese(II)-Dependent Extradiol-Cleaving Catechol Dioxygenases.” *Metal Ions in Biological Systems* 37: 505–25.
- Rajasekharan, Sumathi, Ram Rajasekharan, and C. S. Vaidyanathan. 1990. “Substrate-Mediated Purification and Characterization of a 3-Hydroxybenzoic Acid-6-Hydroxylase from *Micrococcus*.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 278 (1): 21–25. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90225-N](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90225-N).
- Rani, Manviri, Uma Shanker, and Amit K. Chaurasia. 2017. “Catalytic Potential of Laccase Immobilized on Transition Metal Oxides Nanomaterials: Degradation of Alizarin Red S Dye.” *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5 (3): 2730–39. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.05.026>.
- Ravindra, Khaiwal, Ranjeet Sokhi, and René Van Grieken. 2008. “Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Source Attribution, Emission Factors and Regulation.” *Atmospheric Environment* 42 (13): 2895–2921. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>.
- Razzaghi, Mozghan, Ahmad Homaei, Fabio Vianello, Taha Azad, Tanvi Sharma, Ashok Kumar Nadda, Roberto Stevanato, Muhammad Bilal, and Hafiz M.N. Iqbal. 2022. “Industrial Applications of Immobilized Nano-Biocatalysts.” *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02647-y>.
- Rocha-Martín, Javier, Blanca de Las Rivas, Rosario Muñoz, José M. Guisán, and Fernando López-Gallego. 2012. “Rational Co-Immobilization of Bi-Enzyme Cascades on Porous Supports and Their Applications in Bio-Redox Reactions with In Situ Recycling of Soluble Cofactors.” *ChemCatChem* 4 (9): 1279–88.

- <https://doi.org/10.1002/CCTC.201200146>.
- Rodrigues, Rafael C., Ángel Berenguer-Murcia, Diego Carballares, Roberto Morellon-Sterling, and Roberto Fernandez-Lafuente. 2021. “Stabilization of Enzymes via Immobilization: Multipoint Covalent Attachment and Other Stabilization Strategies.” *Biotechnology Advances* 52 (November): 107821. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107821>.
- Roell, Garrett W., Rhiannon R. Carr, T. Campbell, Zeyu Shang, William R. Henson, Jeffrey J. Czajka, Hector García Martín, et al. 2019. “A Concerted Systems Biology Analysis of Phenol Metabolism in *Rhodococcus opacus* PD630.” *Metabolic Engineering* 55 (September): 120–30. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.06.013>.
- Romero-Fernández, María, and Francesca Paradisi. 2019. “General Overview on Immobilization Techniques of Enzymes for Biocatalysis.” In *Catalyst Immobilization: Methods and Applications*, 409–35. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527817290.ch12>.
- Romero-Silva, María José, Valentina Méndez, Loreine Agulló, Michael Seeger, Valentina Me, and Loreine Agullo. 2013. “Genomic and Functional Analyses of the Gentisate and Protocatechuate Ring-Cleavage Pathways and Related 3-Hydroxybenzoate and 4-Hydroxybenzoate Peripheral Pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400.” Edited by Valerie de Crécy-Lagard. *PLoS ONE* 8 (2): e56038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056038>.
- Rugabber, Timothy P., and Jeffrey W. Talley. 2006. “Enhancing Bioremediation with Enzymatic Processes: A Review.” *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* 10 (2): 73–85. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)1090-025X\(2006\)10:2\(73\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)1090-025X(2006)10:2(73)).
- Sahoo, Banalata, Sumanta Kumar Sahu, and Panchanan Pramanik. 2011. “A Novel Method for the Immobilization of Urease on Phosphonate Grafted Iron Oxide Nanoparticle.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 69 (3–4): 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.01.001>.
- Sahoo, Naresh K., Kannan Pakshirajan, and Pranab K. Ghosh. 2016. “Evaluation of 4-Chlorophenol Biodegradation by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 in an Upflow Packed Bed Reactor.” *Advanced Science Letters* 22 (2): 519–23. <https://doi.org/10.1166/asl.2016.6843>.
- Sahu, Sumanta Kumar, Arindam Chakrabarty, Dipsikha Bhattacharya, Sudip K. Ghosh, and Panchanan Pramanik. 2011. “Single Step Surface Modification of Highly Stable Magnetic Nanoparticles for Purification of His-Tag Proteins.” *Journal of Nanoparticle Research* 13 (6): 2475–84. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0140-y>.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. “Molecular Cloning: A Laboratory Manual.” *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, no. Ed. 2.
- Sana, Barindra. 2015. “Bioresources for Control of Environmental Pollution.” *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 147: 137–83. https://doi.org/10.1007/10_2014_276.
- Sannino, Filomena, Aniello Costantini, Francesco Ruffo, Antonio Aronne, Virginia Venezia, and Valeria Califano. 2020. “Covalent Immobilization of β -Glucosidase into Mesoporous Silica Nanoparticles from Anhydrous Acetone Enhances Its Catalytic Performance.” *Nanomaterials* 10 (1): 108. <https://doi.org/10.3390/nano10010108>.
- Santillan, Julia Y., Lucas A. Dettorre, Elizabeth S. Lewkowicz, and Adolfo M. Iribarren. 2016. “New and Highly Active Microbial Phosphotriesterase Sources.” *FEMS Microbiology Letters*. FEMS Microbiol Lett. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw276>.
- Sarno, Maria, and Mariagrazia Iuliano. 2020. “New Nano-Biocatalyst for 4-Chlorophenols Removal from Wastewater.” In *Materials Today: Proceedings*, 20:74–81. Elsevier.

- <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.09.016>.
- Schnell, Santiago, and Sonya M. Hanson. 2007. "A Test for Measuring the Effects of Enzyme Inactivation." *Biophysical Chemistry* 125 (2–3): 269–74. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.08.010>.
- Sepehr, Shadi, Bahar Shahnava, Ahmad Asoodeh, and Mohsen Karrabi. 2019. "Biodegradation of Phenol by Cold-Tolerant Bacteria Isolated from Alpine Soils of Binaloud Mountains in Iran." *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 54 (4): 367–79. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1553818>.
- Shao, Binbin, Zhifeng Liu, Guangming Zeng, Yang Liu, Xin Yang, Chengyun Zhou, Ming Chen, Yujie Liu, Yilin Jiang, and Ming Yan. 2019. "Immobilization of Laccase on Hollow Mesoporous Carbon Nanospheres: Noteworthy Immobilization, Excellent Stability and Efficacious for Antibiotic Contaminants Removal." *Journal of Hazardous Materials* 362 (January): 318–26. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.069>.
- Sharma, Babita, Arun Kumar Dangi, and Pratyosh Shukla. 2018. "Contemporary Enzyme Based Technologies for Bioremediation: A Review." *Journal of Environmental Management* 210 (March): 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.075>.
- Sheldon, Roger A., and Sander van Pelt. 2013. "Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How." *Chemical Society Reviews* 42 (15): 6223–35. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>.
- Shraddha, Ravi Shekher, Simran Sehgal, Mohit Kamthania, and Ajay Kumar. 2011. "Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications." *Enzyme Research* 2011 (1): 217861. <https://doi.org/10.4061/2011/217861>.
- Shumkova, E. S., I. P. Solianikova, E. G. Plotnikova, and L. A. Golovleva. 2009. "Phenol Degradation by *Rhodococcus opacus* Strain 1G." *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia* 45 (1): 51–57. <https://doi.org/10.1134/S0003683809010086/METRICS>.
- Silva, A. S., R. J.S. Jacques, R. Andreazza, F. M. Bento, L. F.W. Roesch, and F. A.O. Camargo. 2013. "Properties of Catechol 1, 2-Dioxygenase in the Cell Free Extract and Immobilized Extract of *Mycobacterium fortuitum*." *Brazilian Journal of Microbiology* 44 (1): 291–97. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000100043>.
- Singh, Pardeep, Rajat Jain, Neha Srivastava, Anwesha Borthakur, D B Pal, Rishikesh Singh, Sugosh Madhav, Pratap Srivastava, and Dhanesh Tiwary. 2017. "Technology Current and Emerging Trends in Bioremediation of Petrochemical Waste : A Review." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 47 (3): 155–201. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1318616>.
- Starovoytov, I. I., S. A. Selifonov, M. Yu Nefedova, and V. M. Adanin. 1985. "A New Pathway for Bacterial Catabolism of 3-Hydroxybenzoic Acid." *FEMS Microbiology Letters* 28 (2): 183–86. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1985.TB00788.X>.
- Stefanakis, Dimitrios, Asimina Margellou, Aimilia Psarouli, Nikolaos Chaniotakis, and Demetrios F. Ghanotakis. 2010. "Immobilization of Glucose Oxidase and 2-Hydroxybiphenyl 3-Monooxygenase in Mesoporous Silica: Characterization Studies and Construction of an Amperometric Glucose Biosensor." *Analytical Letters* 43 (16): 2582–97. <https://doi.org/10.1080/00032711003725664>.
- Strachan, Philip D., Andrew A. Freer, and Charles A. Fewson. 1998. "Purification and Characterization of Catechol 1,2-Dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and Cloning and Sequencing of Its CatA Gene." *Biochemical Journal* 333 (3): 741–47. <https://doi.org/10.1042/bj3330741>.
- Suárez, M, E Ferrer, and M Martín. 1996. "Purification and Biochemical Characterization of Gentisate 1,2-Dioxygenase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1." *FEMS Microbiology Letters* 143 (1): 89–95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08466.x>.

- Suarez, Monica, Estrella Ferrer, Amando Garrido-Pertierra, and Margarita Marta-n. 1995. “Purification and Characterization of the 3-Hydroxybenzoate-6-Hydroxylase from *Klebsiella pneumoniae*.” *FEMS Microbiology Letters* 126 (3): 283–90. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07431.x>.
- Subbotina, Natalya M., Alexey M. Chernykh, Anton I. Taranov, Anna D. Shebanova, Olga V. Moiseeva, Marta Ferraroni, and Marina P. Kolomytseva. 2021. “Gentisate 1,2-Dioxygenase from the Gram-Positive Bacteria *Rhodococcus opacus* 1CP: Identical Active Sites vs. Different Substrate Selectivities.” *Biochimie* 180 (January): 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.10.016>.
- Suma, Yanasinee, Christina S. Kang, and Han S. Kim. 2016. “Noncovalent and Covalent Immobilization of Oxygenase on Single-Walled Carbon Nanotube for Enzymatic Decomposition of Aromatic Hydrocarbon Intermediates.” *Environmental Science and Pollution Research* 23 (2): 1015–24. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4168-5>.
- Suma, Yanasinee, Heejun Lim, Oh Sung Kwean, Suyeon Cho, Junwon Yang, Yohan Kim, Christina S. Kang, and Han S. Kim. 2016. “Enzymatic Degradation of Aromatic Hydrocarbon Intermediates Using a Recombinant Dioxygenase Immobilized onto Surfactant-Activated Carbon Nanotube.” *Bioresource Technology* 210 (June): 117–22. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.018>.
- Syed, Zainab, Monika Sogani, Aman Dongre, Anu Kumar, Kumar Sonu, Gopesh Sharma, and Akhilendra Bhushan Gupta. 2021. “Bioelectrochemical Systems for Environmental Remediation of Estrogens: A Review and Way Forward.” *Science of the Total Environment*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146544>.
- Takagi, Michio, Kotchakorn T.sriwong, Ayaka Masuda, Nozomi Kawaguchi, Shusuke Fukui, Lan Huong Le Viet, Dai-ichiro Kato, et al. 2022. “Immobilization of Baeyer–Villiger Monooxygenase from Acetone Grown *Fusarium* sp.” *Biotechnology Letters* 44 (3): 461–71. <https://doi.org/10.1007/s10529-022-03224-3>.
- Tan, Cheau Yuan, Hidehiko Hirakawa, Risa Suzuki, Tomoaki Haga, Fumiya Iwata, and Teruyuki Nagamune. 2016. “Immobilization of a Bacterial Cytochrome P450 Monooxygenase System on a Solid Support.” *Angewandte Chemie* 128 (48): 15226–30. <https://doi.org/10.1002/ange.201608033>.
- Tan, Songwen, Xuncai Chen, Chunzhi Cui, Yang Hou, Weiguo Li, and Hong You. 2017. “Biodegradation of Saline Phenolic Wastewater in a Biological Contact Oxidation Reactor with Immobilized Cells of *Oceanimonas* Sp.” *Biotechnology Letters* 39 (1): 91–96. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2226-9>.
- Thacharodi, Aswin, Saqib Hassan, Tripti Singh, Ramkrishna Mandal, Jeganathan Chinnadurai, Hilal Ahmad Khan, Mir Ashiq Hussain, Kathirvel Brindhadevi, and Arivalagan Pugazhendhi. 2023. “Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: An Updated Microbiological Review.” *Chemosphere* 328 (July): 138498. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138498>.
- Thibodeaux, Christopher J., Wei chen Chang, and Hung wen Liu. 2019. “Unraveling Flavoenzyme Reaction Mechanisms Using Flavin Analogues and Linear Free Energy Relationships.” In *Methods in Enzymology*, 620:167–88. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.03.010>.
- Tomei, M. Concetta, Domenica Mosca Angelucci, Elisa Clagnan, and Lorenzo Brusetti. 2021. “Anaerobic Biodegradation of Phenol in Wastewater Treatment: Achievements and Limits.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11182-5>.
- Trelles, Jorge Abel, and Maria Jose Laponi. 2017. “Immobilization Techniques Applied to the Development of Biocatalysts for the Synthesis of Nucleoside Analogue Derivatives.” *Current Pharmaceutical Design* 23 (45): 6879–97.

- <https://doi.org/10.2174/1381612824666171204102204>.
- Tripathi, Manikant, Durgesh Narain Singh, Nivedita Prasad, and Rajeeva Gaur. 2021. “Advanced Bioremediation Strategies for Mitigation of Chromium and Organics Pollution in Tannery.” In *Rhizobiont in Bioremediation of Hazardous Waste*, 195–215. Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0602-1_10.
- Tsagogiannis, Epameinondas, Stamatia Asimakoula, Alexandros P. Drainas, Orfeas Marinakos, Vasiliki I. Boti, Ioanna S. Kosma, and Anna-Irini Koukkou. 2024. “Elucidation of 4-Hydroxybenzoic Acid Catabolic Pathways in *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3.” *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 843 25 (2): 843. <https://doi.org/10.3390/IJMS25020843>.
- Tsagogiannis, Epameinondas, Elpiniki Vandera, Alexandra Primikyri, Stamatia Asimakoula, Andreas G. Tzakos, Ioannis P. Gerothanassis, and Anna-Irini Koukkou. 2021. “Characterization of Protocatechuate 4,5-Dioxygenase from *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 and In Situ Reaction Monitoring in the NMR Tube.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (17): 9647. <https://doi.org/10.3390/ijms22179647>.
- Ugrina, Marin, and Antonija Jurić. 2023. “Current Trends and Future Perspectives in the Remediation of Polluted Water, Soil and Air—A Review.” *Processes*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/pr11123270>.
- Urszula, Guzik, Greń Izabela, Wojcieszynska Danuta, and Łabużek Sylwia. 2009. “Isolation and Characterization of a Novel Strain of *Stenotrophomonas maltophilia* Possessing Various Dioxygenases for Monocyclic Hydrocarbon Degradation.” *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (2): 285–91. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200014>.
- Vahidi, Akbar K., Yi Yang, Thao P.N. Ngo, and Zhi Li. 2015. “Simple and Efficient Immobilization of Extracellular His-Tagged Enzyme Directly from Cell Culture Supernatant as Active and Recyclable Nanobiocatalyst: High-Performance Production of Biodiesel from Waste Grease.” *ACS Catalysis* 5 (6): 3157–61. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00550>.
- Vaillancourt, Frédéric H., Jeffrey T. Bolin, and Lindsay D. Eltis. 2006. “The Ins and Outs of Ring-Cleaving Dioxygenases.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 41 (4): 241–67. <https://doi.org/10.1080/10409230600817422>.
- Vandera, Elpiniki, Konstantinos Kavakiotis, Aristeidis Kallimanis, Nikos C. Kyrpides, Constantin Drainas, and Anna-irini Koukkou. 2012. “Heterologous Expression and Characterization of Two 1-Hydroxy-2-Naphthoic Acid Dioxygenases from *Arthrobacter phenanthrenivorans*.” *Applied and Environmental Microbiology* 78 (3): 621–27. <https://doi.org/10.1128/AEM.07137-11>.
- Vandera, Elpiniki, Martina Samiotaki, Maria Parapouli, George Panayotou, and Anna Irini Koukkou. 2015. “Comparative Proteomic Analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 on Phenanthrene, Phthalate and Glucose.” *Journal of Proteomics* 113 (January): 73–89. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.08.018>.
- Varjani, Sunita J. 2017. “Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons.” *Bioresource Technology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>.
- Verma, Madan L., Rajneesh Chaudhary, Takuya Tsuzuki, Colin J. Barrow, and Munish Puri. 2013. “Immobilization of β -Glucosidase on a Magnetic Nanoparticle Improves Thermostability: Application in Cellobiose Hydrolysis.” *Bioresource Technology* 135 (May): 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.047>.
- Verma, Madan Lal, Colin J. Barrow, and Munish Puri. 2013. “Nanobiotechnology as a Novel Paradigm for Enzyme Immobilisation and Stabilisation with Potential Applications in Biodiesel Production.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (1): 23–39. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4535-9>.

- Vervoort, Jacques, Franz Muller, Willy A.M. van den Berg, Chrit T.W. Moonen, and John Lee. 1986. "Identifications of the True Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of the Stable Intermediate II in Bacterial Luciferase." *Biochemistry* 25 (24): 8062–67. <https://doi.org/10.1021/bi00372a040>.
- Vidali, M. 2001. "Bioremediation. An Overview." *Pure and Applied Chemistry* 73 (7): 1163–72. <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>.
- Wang, Lee Ho, Riyad Y. Hamzah, Yimin Yu, and Shiao Chun Tu. 1987. "Pseudomonas Cepacia 3-Hydroxybenzoate 6-Hydroxylase: Induction, Purification, and Characterization." *Biochemistry* 26 (4): 1099–1104. <https://doi.org/10.1021/BI00378A017>.
- Wang, Ping, Yuanyuan Qu, and Jiti Zhou. 2009. "Biodegradation of Mixed Phenolic Compounds under High Salt Conditions and Salinity Fluctuations by *Arthrobacter* sp. W1." In *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159:623–33. Springer. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8494-7>.
- Wang, Ying, Ye Tian, Bin Han, Hua-bing Zhao, Jian-nan Bi, and Bao-li Cai. 2007. "Biodegradation of Phenol by Free and Immobilized *Acinetobacter* sp. Strain PD12." *Journal of Environmental Sciences (China)* 19 (2): 222–25. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(07\)60036-9](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(07)60036-9).
- Wang, Zhenglong, Ying Sun, Yaru Shi, Wenteng Song, and Chunyang Zhang. 2017. "Cloning, Expression and Characterization of a Mesophilic Catechol 1,2-Dioxygenase from *Rhodococcus ruber* OA1." *Biotechnology* 16 (1): 10–18. <https://doi.org/10.3923/biotech.2017.10.18>.
- Wei, Xi, Tetyana Gilevska, Felix Wetzig, Conrad Dorer, Hans Hermann Richnow, and Carsten Vogt. 2016. "Characterization of Phenol and Cresol Biodegradation by Compound-Specific Stable Isotope Analysis." *Environmental Pollution* 210 (March): 166–73. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.005>.
- Werwath, Jörn, Hans Adolf Arfmann, Dietmar H. Pieper, Kenneth N. Timmis, and Rolf Michael Wittich. 1998. "Biochemical and Genetic Characterization of a Gentisate 1,2-Dioxygenase from *Sphingomonas* sp. Strain RW5." *Journal of Bacteriology* 180 (16): 4171–76. <https://doi.org/10.1128/jb.180.16.4171-4176.1998>.
- Westphal, Adrie H., Dirk Tischler, and Willem J H van Berkel. 2021. "Natural Diversity of FAD-Dependent 4-Hydroxybenzoate Hydroxylases." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 702 (May): 108820. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108820>.
- Westphal, Adrie H., Dirk Tischler, Florian Heinke, Sarah Hofmann, Janosch A.D. Gröning, Dirk Labudde, and Willem J.H. Van Berkel. 2018. "Pyridine Nucleotide Coenzyme Specificity of *p*-Hydroxybenzoate Hydroxylase and Related Flavoprotein Monooxygenases." *Frontiers in Microbiology* 9 (March): 423363. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03050>.
- William, S., Helene Feil, A. Copeland, Feil Helene, A. Copeland, Helene Feil, and A. Copeland. 2012. *Bacterial DNA Isolation CTAB Protocol Bacterial Genomic DNA Isolation Using CTAB. Doe Joint Genome Institute*. <http://my.jgi.doe.gov/general/protocols/JGI-Bacterial-DNA-isolation-CTAB-Protocol-2012.pdf>.
- Wojcieszynska, Danuta, Urszula Guzik, Izabela Greń, Magdalena Perkosz, and Katarzyna Hupert-Kocurek. 2011. "Induction of Aromatic Ring: Cleavage Dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* Strain KB2 in Cometabolic Systems." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (4): 805–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0520-6>.
- Wojcieszynska, Danuta, Katarzyna Hupert-Kocurek, Anna Jankowska, and Urszula Guzik. 2012. "Properties of Catechol 2,3-Dioxygenase from Crude Extract of

- Stenotrophomonas maltophilia* Strain KB2 Immobilized in Calcium Alginate Hydrogels.” *Biochemical Engineering Journal* 66 (July): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.04.008>.
- Wu, Chun Ming, Tsung Huei Lee, Sung Nung Lee, Yung An Lee, and Jiumn Yih Wu. 2004. “Microbial Synthesis of Cis,Cis-Muconic Acid by *Sphingobacterium* sp. GCG Generated from Effluent of a Styrene Monomer (SM) Production Plant.” In *Enzyme and Microbial Technology*, 35:598–604. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.08.012>.
- Wu, Leyang, Daniel C. Ali, Peng Liu, Cheng Peng, Jingxin Zhai, Ying Wang, and Boping Ye. 2018. “Degradation of Phenol via *ortho*-Pathway by Kocuria Sp. Strain TIBETAN4 Isolated from the Soils around Qinghai Lake in China.” *PLOS ONE* 13 (6): e0199572. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0199572>.
- Xie, Neng Zhong, Hong Liang, Ri Bo Huang, and Ping Xu. 2014. “Biotechnological Production of Muconic Acid: Current Status and Future Prospects.” *Biotechnology Advances* 32 (3): 615–22. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.001>.
- Xu, Nan, Chong Qiu, Qiyuan Yang, Yunzeng Zhang, Mingqi Wang, Chao Ye, and Minliang Guo. 2021. “Analysis of Phenol Biodegradation in Antibiotic and Heavy Metal Resistant *Acinetobacter Lwoffii* NL1.” *Frontiers in Microbiology* 12 (September): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.725755>.
- Yang, Jianbing, Kefeng Ni, Dongzhi Wei, and Yuhong Ren. 2015. “One-Step Purification and Immobilization of His-Tagged Protein via Ni²⁺-Functionalized Fe₃O₄@polydopamine Magnetic Nanoparticles.” *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 20 (5): 901–7. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0136-7>.
- Yang, Kevin K., Zachary Wu, and Frances H. Arnold. 2019. “Machine-Learning-Guided Directed Evolution for Protein Engineering.” *Nature Methods* 16 (8): 687–94. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0496-6>.
- Yang, Yi-Fan, Jun-Jie Zhang, Song-He Wang, and Ning-Yi Zhou. 2010. “Purification and Characterization of the Ncgl2923-Encoded 3-Hydroxybenzoate 6-Hydroxylase from *Corynebacterium glutamicum* Introduction *.” *Journal of Basic Microbiology* 50: 599–604. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000053>.
- Yeom, Sung Ho, and Young Je Yoo. 1997. “Overcoming the Inhibition Effects of Metal Ions in the Degradation of Benzene and Toluene by *Alcaligenes xylosoxidans* Y234.” *Korean Journal of Chemical Engineering* 14 (3): 204–8. <https://doi.org/10.1007/BF02706096>.
- Yi, Dong, Thomas Bayer, Christoffel P.S. Badenhorst, Shuke Wu, Mark Doerr, Matthias Höhne, and Uwe T. Bornscheuer. 2021. “Recent Trends in Biocatalysis.” *Chemical Society Reviews* 50 (14): 8003–49. <https://doi.org/10.1039/D0CS01575J>.
- Yoshida, Mariko, Takeshi Hiromoto, Keiichi Hosokawa, Hiroshi Yamaguchi, and Shinsuke Fujiwara. 2007. “Ligand Specificity of MobR, a Transcriptional Regulator for the 3-Hydroxybenzoate Hydroxylase Gene of *Comamonas testosteroni* KH122-3s.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362 (2): 275–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.190>.
- You, Chun, and Y. H.Percival Zhang. 2013. “Self-Assembly of Synthetic Metabolons through Synthetic Protein Scaffolds: One-Step Purification, Co-Immobilization, and Substrate Channeling.” *ACS Synthetic Biology* 2 (2): 102–10. <https://doi.org/10.1021/sb300068g>.
- Zhang, Chengdong, Shuiming Luo, and Wei Chen. 2013. “Activity of Catalase Adsorbed to Carbon Nanotubes: Effects of Carbon Nanotube Surface Properties.” *Talanta* 113 (September): 142–47. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.027>.
- Zhang, Chuang, and Xiulan Cai. 2019. “Immobilization of Horseradish Peroxidase on Fe₃O₄/Nanotubes Composites for Biocatalysis-Degradation of Phenol.” *Composite*

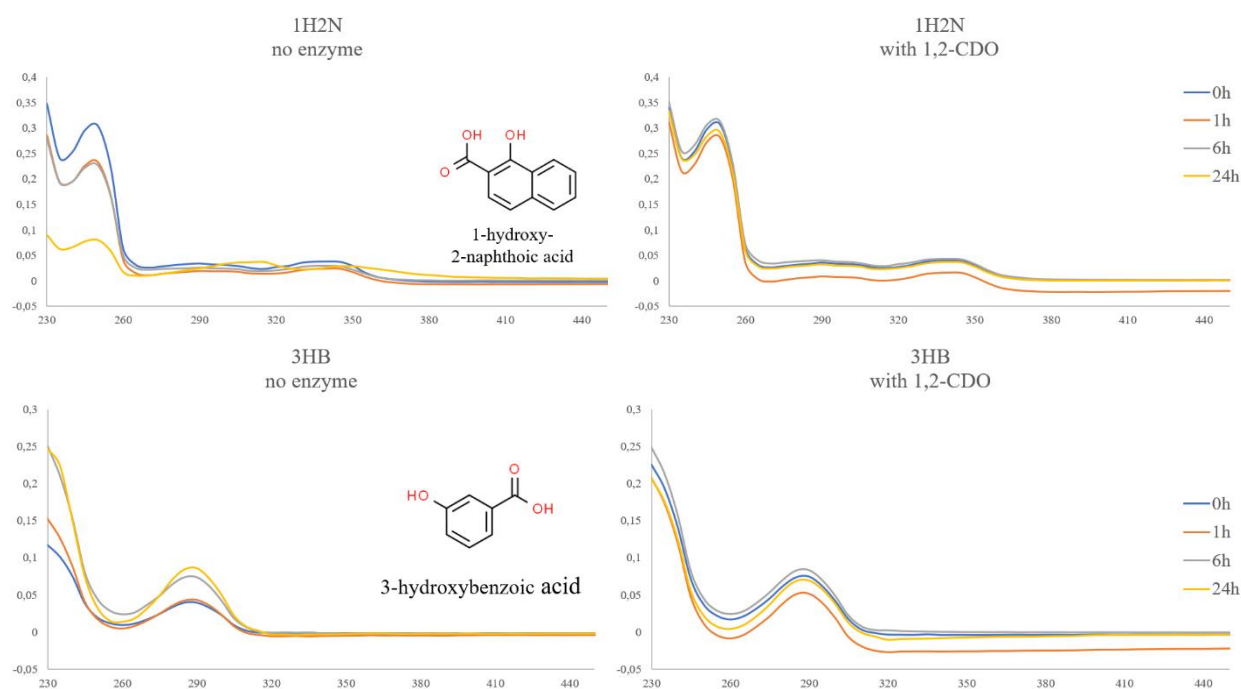
- Interfaces*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/09276440.2018.1504265>.
- Zhang, Li-Shuang, Yue Fang, Ying Zhou, and Bang-Ce Ye. 2017. “Improvement of the Stabilization and Activity of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase Isolated from *Rhizobium* sp. LMB-1 and Immobilized on Fe₃O₄ Nanoparticles.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 183 (3): 1035–48. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2481-9>.
- Zhao, Hua-bing, Wei Chen, and Bao-li Cai. 2007. “Cloning and expression of *catA* gene from *Pseudomonas putida* ND6 and study on the catechol cleavage pathway.” *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* 47 (3): 387–91.
- Zhou, Li-Jian, Rui-Fang Li, Xue-Yong Li, and Ye-Wang Zhang. 2021. “One-step Selective Affinity Purification and Immobilization of His-tagged Enzyme by Recyclable Magnetic Nanoparticles.” *Engineering in Life Sciences* 21 (6): 364–73. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000093>.
- Zhou, Yang, Shaofei Yuan, Qian Liu, Dandan Yan, Yun Wang, Li Gao, Juan Han, and Haifeng Shi. 2017. “Synchronized Purification and Immobilization of His-Tagged β -Glucosidase via Fe₃O₄/PMG Core/Shell Magnetic Nanoparticles.” *Scientific Reports* 7 (1): 41741. <https://doi.org/10.1038/srep41741>.
- Zhou, Yi, and Mehdi Nemati. 2018. “Treatment of Waters Contaminated by Phenol and Cresols in Circulating Packed Bed Bioreactors—Biodegradation and Toxicity Evaluations.” *Water, Air, and Soil Pollution* 229 (9): 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3949-0>.
- Ziagova, M. G., A. I. Koukkou, and M. Liakopoulou-Kyriakides. 2014. “Optimization of Cultural Conditions of *Arthrobacter* sp. Sphe3 for Growth-Associated Chromate(VI) Reduction in Free and Immobilized Cell Systems.” *Chemosphere* 95: 535–40. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.112>.
- Zucolotto, Valtencir, Andressa P.A. Pinto, Tathiana Tumolo, Marli L. Moraes, Maurício S. Baptista, Antonio Riul, Ana Paula U. Araújo, and Osvaldo N. Oliveira. 2006. “Catechol Biosensing Using a Nanostructured Layer-by-Layer Film Containing Cl-Catechol 1,2-Dioxygenase.” *Biosensors and Bioelectronics* 21 (7): 1320–26. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.06.001>.
- Ασημακούλα, Σταματία. 2017. “Μελέτη Της Μεταγραφής Γονιδίων Που Εμπλέκονται Σε Καταβολικές Πορείες Αποδόμησης Αρωματικών Ενώσεων Από Το Βακτήριο *Arthrobacter phenanthrenivorans*, Sphe3.” Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Κλώνης, Ιωάννης. 2018. *Ενζυμολογία*. Εκδόσεις EMBPYO.
- Λάππα, Ειρήνη. 2019. “Κλωνοποίηση, Υπερέκφραση Και Χαρακτηρισμός Της 1,2-Διοξυγονάσης Του Γεντισικού Οξέος Από Το *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3.” Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Πατήλα, Βασιλική-Μιχαέλα. 2016. “Ανάπτυξη Νέων Βιοκαταλυτικών Συστημάτων Μέσω Της Ακινητοποίησης Ενζύμων Σε Νανοδομικά Υλικά.” Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Τσαγκογιάννης, Επαμεινώνδας. 2023. “Λειτουργικός Χαρακτηρισμός Διοξυγονασών Σχάσης Που Μετέχουν Στον Μεταβολισμό Του Πρωτοκατεχοϊκού Οξέος Στο Εδαφοβακτήριο *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3: Συμβολή Τους Στον Μεταβολισμό Υδροξυβενζοϊκών Οξέων.” Ioannina.
- Φανίτσιος, Χρήστος. 2020. “Μελέτη Αποδόμησης Αρωματικών Ενώσεων Από Το *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 Μέσω Μεταβολομικής Ανάλυσης: Διερεύνηση Του Ρόλου Της 1,2-Βενζοϊκής Διοξυγονάσης Μέσω Ενζυμικής Και Μεταγραφωματικής Ανάλυσης.” Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Παράρτημα

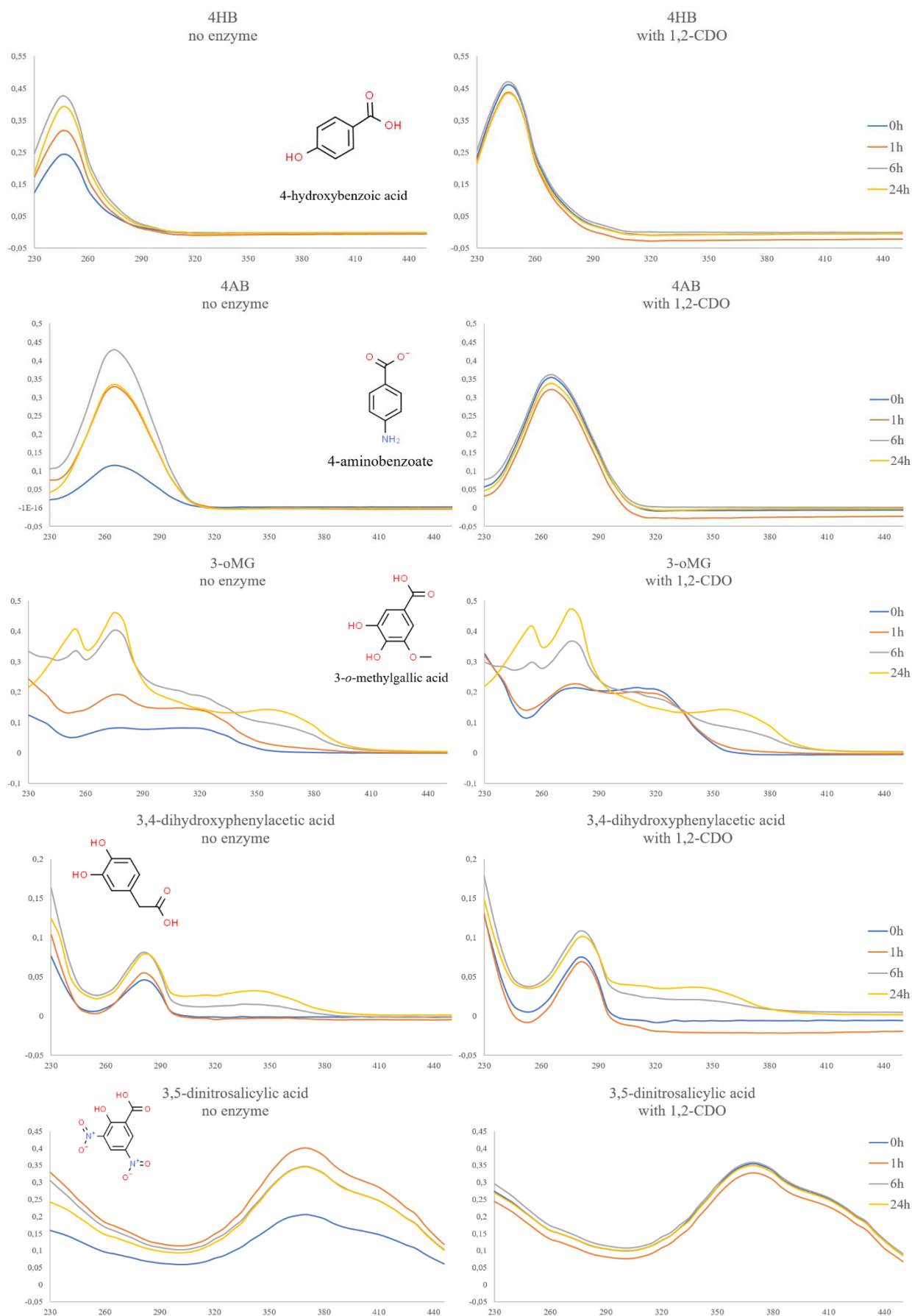
>650468101 catechol 1,2-dioxygenase [*Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3: CP002379] (+)strand

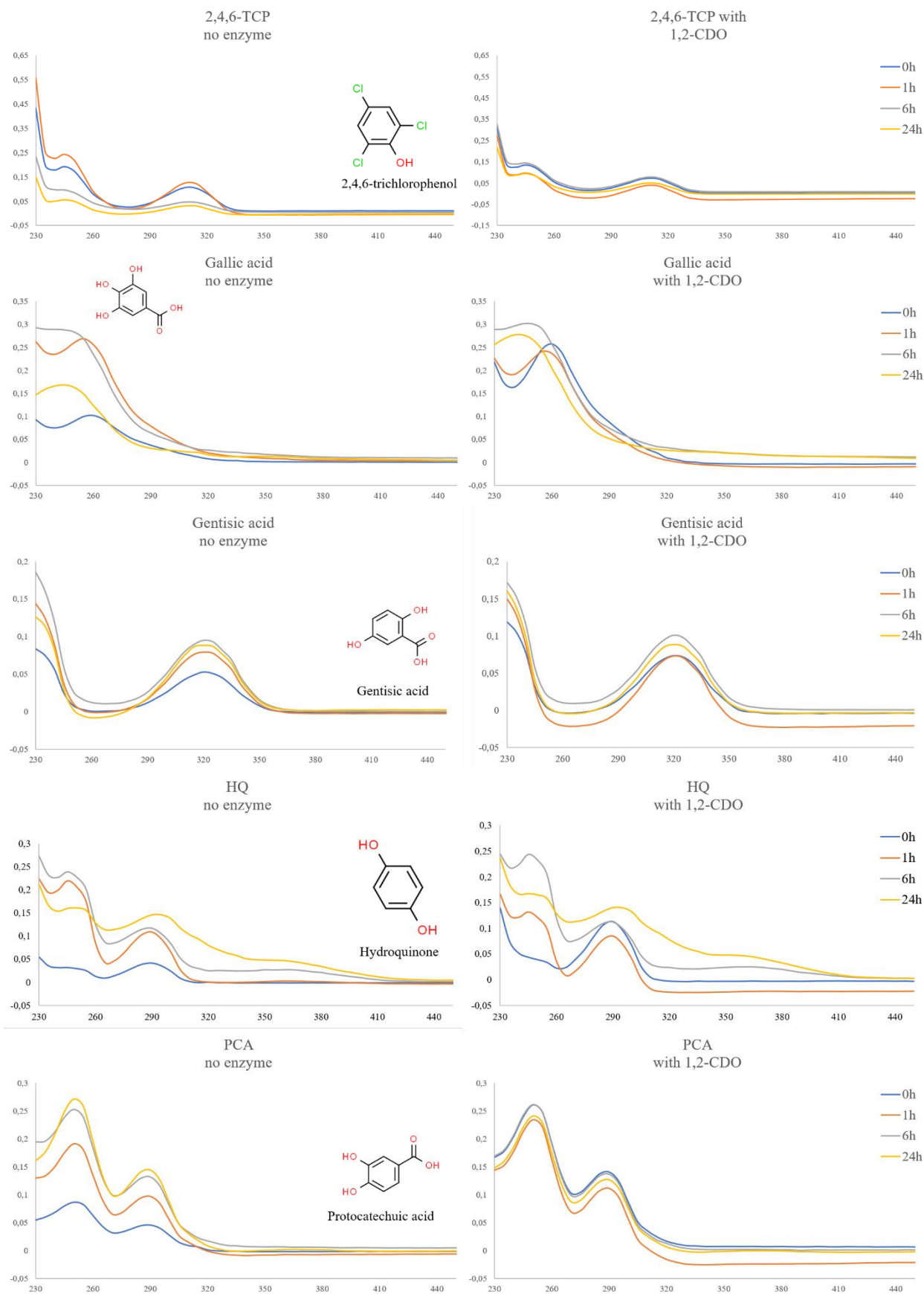
ATGACTGAGACCCAAACGGATACCCGGAAGAGAACGAGGGCACGGCCGTTGAAGCC
GGCTCGAAGGCTACGGAGCGCTTCACAGCTTCCGGCAAGCTCTCGCAGCTGGATGTG
CCGAAGGAACGGGTGAGCCTCCTGGCCGGCGCATTTGATCAAGGCCGCCAACGACATC
GTGGTGGAGCACCAGGTACCTACGAGGAGTACAACGCCCTCAAAGCCTGGCTGATC
AAGGTGGGCACGGACGGCGAATGGCCGTTGTTTCCTCGACGTGTGGCTGGAGCACACG
GTGGAAGACGTCAACTCCCAGGACCGTCCCGGCACCAAGGGCACCATTGAAGGGCCG
TACTACGTGCCGGGTTTCGCCGGAACTCGCCACCCCGGCCACTGTTGAAATGCGCGAC
GACGAGGAGGGCACGCCGCTGCGTTTCACCGGCCGTTTCACCGGCACCGAGGGCAAC
CCCATCCAGGACGCCCAGGTGGAAATCTGGCACGCGGACGCCCGAGGGTTTTACTCC
CAGTACGCACCGGGCCTGCCCGAATGGCTTTTCCGCGCCACCGTCAAGGCGGACCAG
GACGGCCGCTTCGAGATCAACACCATGCGCCCCGCTCCGTACCAGATCCCCACGGAC
GGTGCCTGCGGCCAGCTGATCAATGCTGCGGGCTGGCACGCATGGCGCCCCGGCCCAC
ATCCACATCAAGGTTTCCGCGCCCGGCTACCAGCCCGTCACGCAGCAGCTCTACTTC
CCGGGCGATCCCCACAACGCCGACGACATCGCATCGGCAGTCAAGCCTGAACTGATG
CTGGACCCCCGTCCCCGCACGGATGGTGGAGCCGGCGAAGAAGTGGTCTATGACTAC
GTCCTCGCCAAGGAAGGACAAATTAAGTAG

Εικόνα Π1. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *Asphe3_35170* από τη βάση δεδομένων JGI/IMG

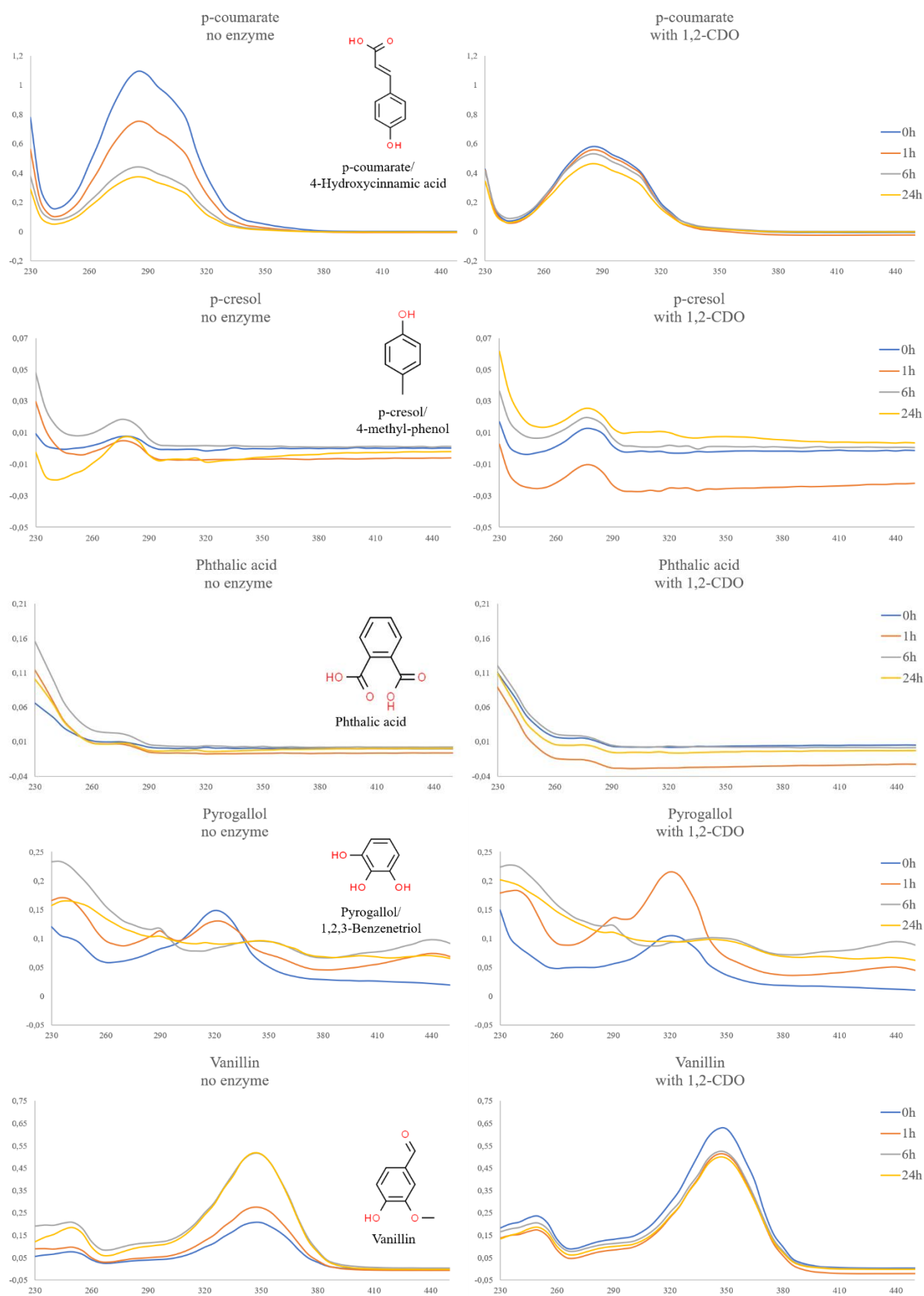


Παράρτημα





Παράρτημα

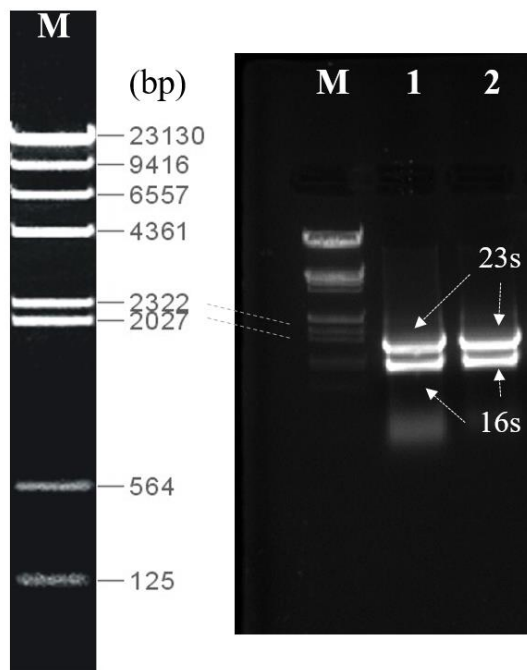


Εικόνα Π2. Φάσματα UV/Vis αντιδράσεων της 1,2-CDO του *Sph3* με διάφορες αρωματικές ενώσεις ως εναλλακτικά υποστρώματα.

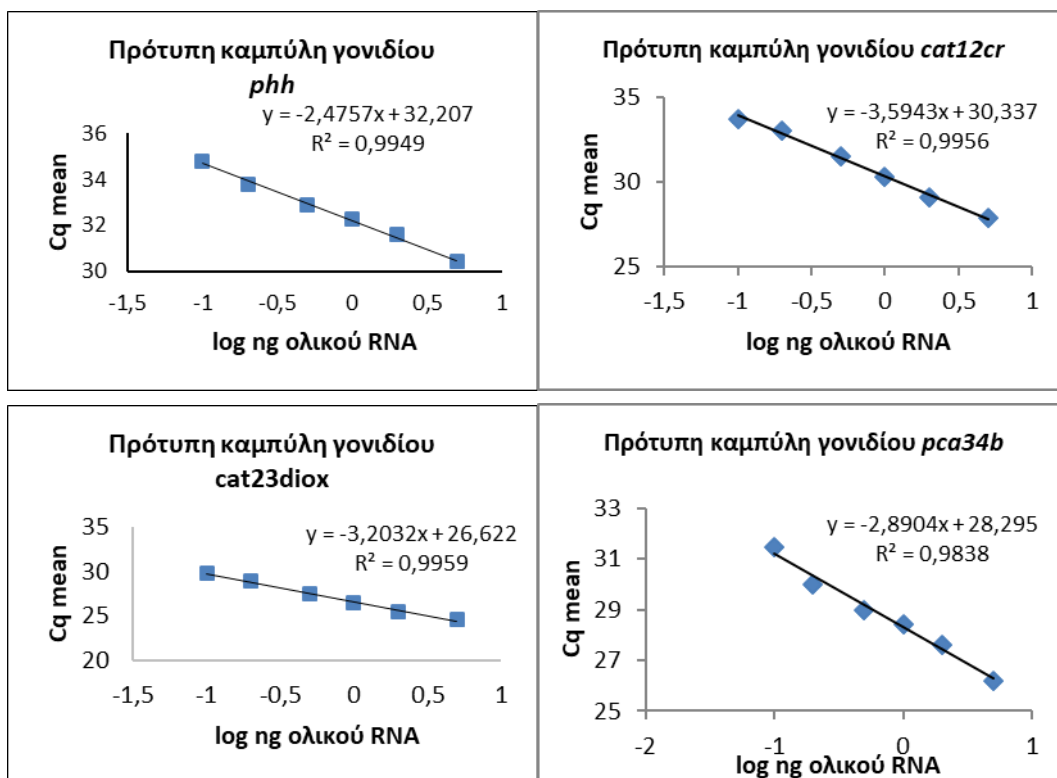
>650468243 2-polyprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase-like oxidoreductase [Pseudarthrobacter phenanthrene vorans Sph3: CP002379] (-)strand

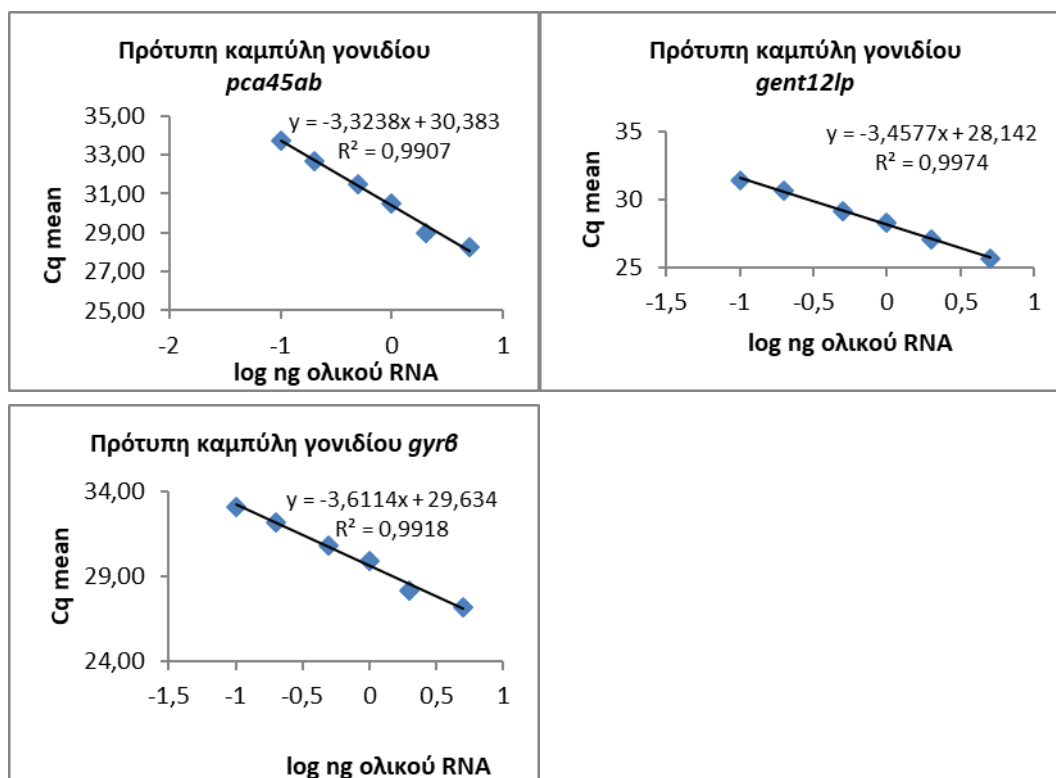
GTG CAGTTCCACCACCACGGTTACGTATCAGGCGACCCGCGGGTCAAGCC
TGCAGCAGGGGTAGGCGTCAACCGCCCTGCCGACCTCCCGGACGAAGTTG
ACGTGCTGATTGTGGGCACCGGACCTGCCGGCATGCTCGCCGCCGCCAG
CTTTCACAATTCCCGAACATCACCACCCGCATCATTGAACGGCGGCCCGG
CCGGCTGGCCATCGGGCAGGCGGACGGCATCCAGGCGCGCAGTGTGGAGA
CCTTCCAGGCCCTTCGGCTTCGCTGAAAGGATCACCGCCGAGGCGTACCGG
ATCACCGAAATGGCATTCCTGGAAGCCGGACCCCGCAGACCATAACCCGCAT
TGTCCGGGCGGCCCCGCGCTGTGGACGACGAGATGGGCATCAGTGAGTTTC
CGCACCTGATCGTCAACCAGGCACGCGTCTTGACTACTTCGCCGAATAC
GCAGCGAACTCGCCCTCCCGATTGACACCGGACTACGGCTACGAGTTCCG
CGGCCTCGAGGTGGGTGAGGGCGAGTATCCGGTCACCGTCACACTGGCCC
ATGCCTCCGGCGCCGAGGAGGGGAAGGAGCGGGTGGTCCGTGCTAAATAC
GTCATCGGTGCGGATGGTGCCCGCAGTAAGGTGCGGGAGGCGATCGGCTG
CCACCTTGCCGGCGACGCCGCAAACCATGCCTGGGGCGTCATGGACGTGC
TGGCAGTCACCGACTTCCCCGATATCCGCACCAAATGCGCCATCCAGGGC
GAGAAGGGCAGCATCCTGCTCATTCCGCGCGAAGGCGGCTTCCTTTTCCG
CATGTACGTAGACCTGGGGGAAGTGGACCCAAACAACAAGGGAGCGGTCC
GCAACACCACCATCGAGCAGATCATCCACAAGGCCAACGAGATCCTGCAC
CCCTACACGCTGGATGTGCGGAATGTTGCGTGGCACAGCGTCTACGAGGT
GGGGCACCGGCTGACGGACAGGTTGACGACGCTGCTGCCGGAGGACCGCG
GCACGCGGACTCCGCGGGTGTTCATCACCGGGGACGCCTGCCATACCCAC
AGCGCCAAGGCCGGCCAGGGCATGAACGTCTCCATGCAGGACGGCTTCAA
CCTGGCCTGGAAGCTCGGGCACGTGCTGGAGGGCCGACCCCGAGAGCC
TGCTGTCCACCTACTCCGAGGAACGCCAGGTGGTGGCCAAGAACCTGATC
GACTTCGATAAGGAATGGTCCACCATGATGGCCAAGAAGCCAGAAGAGTT
CGAACACCCCTCGGACCTGGAGGACTTCTACGTACGACCCGACAGATTCC
CCGCCGGCTTCATGACCCAGTACACGCCCTCGCTGGTCACCGGAAGCTCC
GCCCACCAGGACCTGGCCACGGGCTTCCCCGTGGGCAAGCGCTTCAAGTC
CGCGCCCGTCATGCGGGTGGGCGACACCAACCCCGTCCACCTGGGCCACC
ACGCTACGGCCGACGGCCGCTGGCGGATCTACGTCTTTGCCGACGCTCCA
CTCCCAGGGACCGGCTCAGCCGCCGACAAATTCGCCGAGTGGCTCGCGAA
CTCGCCGGAATCGCCGCTGGCCGCGACGCCGTGCGACGCTGATCCGGACG
CCTGGTTCGACGTGAAGGTGGTCTACCAGCAGCCGCACACGGCCGTTGAC
ATCAACGCGGTTCCGGCGGTGTTCAAGCCGACGGTGGGCCCGTTCAAGCT
GACCGACTACGAGAAGGTCTACGCCACCGACCCCAACGCGGACATCTTCG
AGCTGCGCGGCCCTGGACCGCGGCGGCGTGGTGGTGGTCCGCCAGAC
CAGTACGTGGCGCACGTCTCCCACTCACGGCGACAGCGGAAGTGGCGGG
GTTCTTCGGGCCCCCTCCTGAAGGGCCAGGAGTCAGGTACGCCGCTGACGG
TC**TGA**

Εικόνα Π3. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *Asphe3_36590* από τη βάση δεδομένων JGI/IMG.

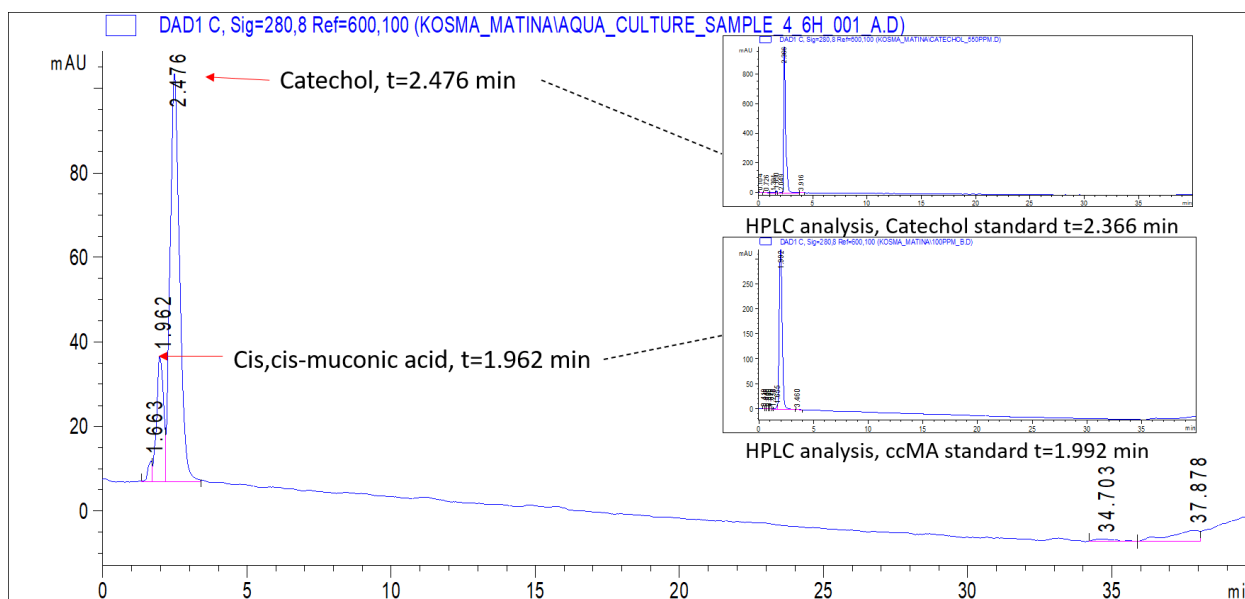


Εικόνα Π4. Πήκτωμα αгарόζης από ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA. M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους λDNA/HindIII (bp) (New England Biolabs, NEB), 1: δείγμα RNA από καλλιέργεια κυττάρων *Sphe3* σε MM M9 παρουσία 400 mg/L γλυκόζης, 2: δείγμα RNA από καλλιέργεια κυττάρων *Sphe3* σε MM M9 παρουσία 5 mM 3-HBA.

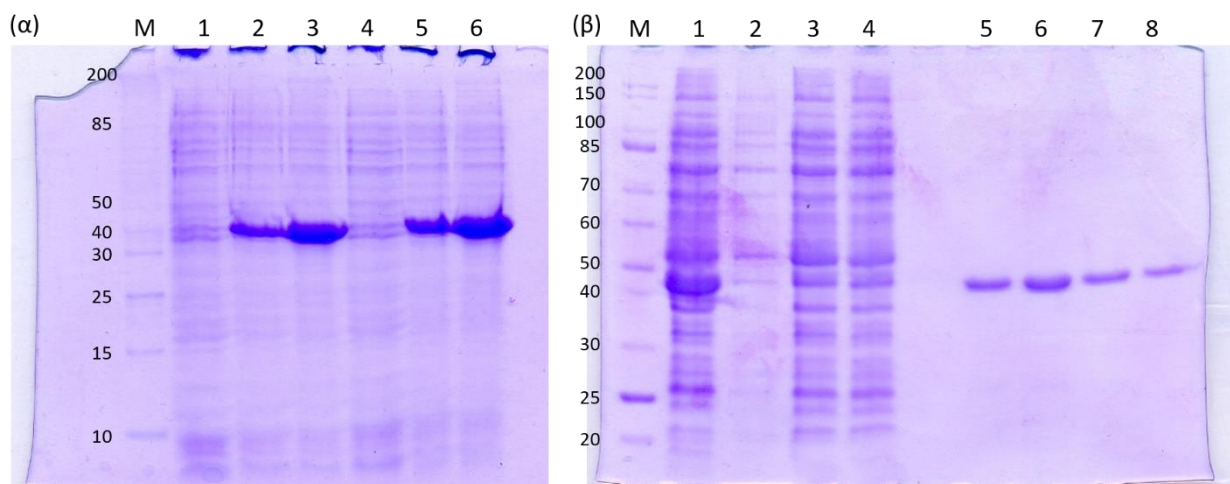




Εικόνα Π5. Πρότυπες καμπύλες των γονιδίων του *Sphe3* για τα πειράματα της Real-Time qPCR. Κάτω από τις εξισώσεις των ευθειών φαίνονται οι παράγοντες συσχέτισης ($0.9907 < R^2 < 0.9974$).



Εικόνα Π6. Ανάλυση HPLC δειγμάτων καλλιέργειας μετασχηματισμένων *BL21* με υπερεκφρασμένο το ένζυμο 1,2-CDO του *Sphe3*, που μετατρέπουν την κατεχόλη σε ccMA.



Εικόνα Π7. Πηκτώματα SDS ηλεκτροφόρησης από ετερόλογη υπερέκφραση (α) και καθαρισμό (β) της GDO. α) M: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους FastGene Unstained Protein Marker (10-200 kDa) της NIPPON Genetics, 1, 4: πριν την προσθήκη IPTG, 2, 5: 1h μετά την προσθήκη IPTG, 3, 6: 3h μετά την προσθήκη IPTG. β) M: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους Unstained Protein Standard, Broad Range (10-200 kDa) της NEW ENGLAND BioLabs, 1: κυτταρικό εκχύλισμα ελεύθερο κυττάρων από υπερέκφραση *E. coli* BL21/ pET29c::gtdA, 2: κυτταρικό εκχύλισμα μετά την εφαρμογή στη στήλη αγγιστείας, 3, 4, 5 και 6: κλάσματα καθαρισμένου ενζύμου με διαφορετικές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (100, 120, 140 και 160 mM αντίστοιχα).