ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΟΜΙΚΩΝ ΛΙΘΩΝ ΦΟΥΡΑΝΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΕΛΕΦΙΩΤΗΣ ΣΤΡΑΤΗΔΑΚΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ ΠΑΥΛΙΔΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2020

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

POSTGRADUATE PROGRAM IN CHEMISTRY

ENZYME TECHNOLOGY LABORATORY

Master Thesis

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF BIO-PROCESSES CATALYZED BY TRANSAMINASES FOR THE SYNTHESIS OF BUILDING BLOCKS FOR FURANE POLYMERS

PANAGIOTIS KELEFIOTIS STRATIDAKIS

SUPERVISOR: ASSISTANT PROFESSOR IOANNIS PAVLIDIS

HERAKLION 2020

Στην οικογένεια που είχα και σε
αυτήν που απέκτησα

Εξεταστική Επιτροπή (αλφαβητικά)

Γανωτάκης Δημήτριος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Παυλίδης Ιωάννης

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων)

Σμόνου Ιουλία

Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τον γεμάτο κύκλο των μεταπτυχιακών μου σπουδών και με το τέλος της συγγραφής της μεταπτυχιακής μου διατριβής, δεν θα μπορούσα να μην ανατρέξω σε όλες τις στιγμές και τα πρόσωπα τα οποία αποτέλεσαν την πηγή έμπνευσης, δύναμης και στήριξης καθ' όλη αυτή τη διαδρομή. Ξεκινώντας, θα ήθελα να αναφέρω ότι η συγκεκριμένη προσπάθεια ήταν μια ιδιαίτερη εμπειρία, καθώς ο ίδιος κλήθηκα να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία σε ένα νέο εργαστήριο. Νέο με κάθε έννοια της λέξης, καθώς όχι μόνο έφερε νέα άτομα, ιδέες και όρεξη στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, αλλά και με εμένα σαν πρώτο και μοναδικό μεταπτυχιακό του φοιτητή. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να εμπλουτίσει με λίγο (έως πολύ) παραπάνω ενδιαφέρον τις μοναδικές συνθήκες, τις πάμπολλες εμπειρίες και τα μοναδικά συναισθήματα.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Κληροδότημα Μιχαήλ και Μαρία Μανασσάκη, χωρίς την οικονομική υποστήριξη του οποίου, οι σπουδές μου θα ήταν πολύ πιο δύσκολες, τόσο για εμένα όσο και για την οικογένεια μου.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την υλικοτεχνική υποστήριξη και ιδιαίτερα τον Τομέα Βιοχημείας και τα εργαστήρια του κυρίου Γανωτάκη και κυρίου Τσίωτη, τα οποία αγκάλιασαν τόσο εμένα όσο και το νέο εργαστήριο του τομέα. Πάντα με χαρά και απίστευτη όρεξη όλα τα μέλη του Τομέα Βιοχημείας, στάθηκαν δίπλα μου σε εργαστηριακές και όχι μόνο δυσκολίες, αφιερώνοντας χρόνο, εμπειρία και γνώση να μου λύσουν απορίες, να με μυήσουν στις τεχνικές της βιοχημείας αλλά και να με συμβουλεύσουν. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διδάκτωρ Ελευθερία Βαλσαμή, η οποία με εισήγαγε στις βασικές αρχές τις επιστήμης παρέχοντας μου τα απαραίτητα γνωστικά εφόδια και τις βάσεις που με συνόδευσαν μέχρι και το τέλος του μεταπτυχιακού μου. Με υπομονή και μεράκι με δίδαξε όλες τις τεχνικές οι οποίες και αποτέλεσαν τη βάση του μεταπτυχιακού μου, ενώ παράλληλα μου έμαθε πως να λειτουργώ και να πράττω μέσα σε ένα ερευνητικό εργαστήριο. Μαζί με τον Διδάκτωρ Θεοχάρη Νάζο και την Διδάκτωρ Ειρήνη Μαθιουδάκη, μου προσέφεραν απλόχερα σημαντικές πληροφορίες και συμβουλές ώστε να με προετοιμάσουν για τον ρόλο που έπρεπε να αναλάβω, αλλά και τις απαιτήσεις στις οποίες θα έπρεπε να ανταπεξέλθω. Σχεδόν όλοι οι καθηγητές και τα εργαστήριά τους συντέλεσαν στην πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, αλλά και των λοιπών υποχρεώσεων μου, προσφέροντας μου ένα ιδανικό περιβάλλον εργασίας, χωρίς να έχω συναντήσει όμοιό του, όπου ο κάθε ένας θα αφιέρωνε λίγο από τον πολύτιμο προσωπικό του χρόνο για να βοηθήσει

σε ένα πρόβλημα που πρόκυπτε ή να απαντήσει μια ερώτηση. Σε αυτά τα πλαίσια θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Αναπληρωτή Καθηγητή Απόστολο Σπύρο, για τις άπειρες ώρες που αφιέρωσε απτόητος στο να μας συμβουλεύει για τα φάσματα NMR, καθώς επίσης και τον Διδάκτωρ Μανώλη Σοφιαδή από το εργαστήριο του κυρίου Βασιλικογιαννάκη, ο οποίος έβρισκε πάντα χρόνο στο πρόγραμμα του για συζητήσεις και ανταλλαγές απόψεων οι οποίες αποτέλεσαν κομβικά σημεία στην εξέλιξη του μεταπτυχιακού. Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον Μεταδιδάκτωρ Αλέξη Θεοδώρου από το εργαστήριο της κυρίας Βελόνιας, ο οποίος προσέφερε απλόχερα τον χρόνο και τις γνώσεις του σε πολλά σημεία αυτής της εργασίας.

Καθώς όμως το εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας ήταν το ακαδημαϊκό μου σπίτι, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω ένα ένα όλα τα άτομα με τα οποία μοιράστηκα καθημερινά πολλές ώρες, εμπειρίες και κυρίως καλές στιγμές. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Σακολέβα Θάλεια, με την οποία μοιράστηκα όλα αυτά τα χρόνια κάθε στιγμή και δεν κατάφερα να βρω (ή και να βρει) ησυχία ακόμα και όταν πραγματοποίησε το Erasmus της στην Γερμανία, με συχνές κλήσεις για να μην βγαίνουμε από την ρουτίνα. Παράλληλα, όλοι οι φοιτητές με τους οποίους συνεργάστηκα για την πραγματοποίηση της πτυχιακής τους εργασίας, μου προσέφεραν μια μοναδική ευκαιρία να γνωρίσω μια πλευρά του εργαστηρίου που δεν είχα ξανασυναντήσει, καθώς κλήθηκα να τους συμβουλεύσω κι εγώ με την σειρά μου, και να τους βοηθήσω με την πραγματοποίηση των πειραμάτων τους. Ήταν χαρά μου και τιμή μου να αποτελέσω μέρος και της δικιάς τους εργαστηριακής εμπειρίας, και τους ευχαριστώ από καρδιάς για το ζεστό κλίμα, τις πολύωρες συζητήσεις και τις ιδανικές εργασιακές συνθήκες που προσέφεραν στο εργαστήριο. Ιδιαίτερα θα ήθελα όμως να ευχαριστήσω την Μινοπούλου Δάφνη και την Δημητρακούλη Θάνεια, με τις οποίες συνεργάστηκα στενά και αποτέλεσαν άξιοι συνεργάτες και φίλοι τόσο στις καλές όσο και στις δύσκολες εργαστηριακές μέρες.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω με όλη μου την καρδιά και τα άτομα που μετά το μεταπτυχιακό αυτό τολμώ πλέον να καλώ καλούς μου φίλους. Κοινοί προβληματισμοί, πολύωρες συζητήσεις, ενδιαφέρουσες ανταλλαγές απόψεων που με προβληματίσαν, με καθησύχασαν και με εξέλιξαν ως άτομο, και κυρίως η ατελείωτη γκρίνια, καθολικό χαρακτηριστικό όλων των μεταπτυχιακών φοιτητών, αποτέλεσαν κοινό μας σημείο αναφοράς. Αναφέρομαι στην Χατζηιωαννίδου Στέλλα, τον Παπαματθαιάκη Διονύση, τον Γιώργο Σφενδουράκη και τον Στρατηγάκη Ναπολέων. Οι κοινές εργαστηριακές εμπειρίες, προβληματισμοί, άγχη για το μέλλον αποτέλεσαν βάσεις για γνωριμίες οι οποίες ήταν από τις

μεγαλύτερες ηθικές απολαβές αυτής της εμπειρίας. Παράλληλα αυτοί οι άνθρωποι με έφεραν σε επαφή με νέα ενδιαφέροντα, αλλά αποτέλεσαν και άτομα με τα οποία μπόρεσα να μοιραστώ ιδέες και προβληματισμούς με τόση χημεία, που αποτέλεσε μια αναζωογονητική εμπειρία για εμένα.

Φτάνοντας στο τέλος, δεν θα μπορούσαν να μην αναφερθώ στον υπεύθυνο καθηγητή μου Ιωάννη Παυλίδη. Με έφερε σε επαφή με πτυχές της επιστήμης, της παιδείας, της ηθικής και του εαυτού μου που μέχρι τότε αγνοούσα. Η εμπιστοσύνη που μου επέδειξε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού αυτού, καθώς και η υπομονή που επέδειξε απέναντι στις αδυναμίες μου (κυρίως στη χρονική συνέπεια), αποτέλεσαν το κίνητρο και την έμπνευση τόσο για την μέχρι τώρα πορεία μου, όσο και για τα μελλοντικά μου βήματα.

Όλη αυτή η προσπάθεια θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωθεί χωρίς τη στήριξη της οικογένειάς μου, η οποία επέδειξε την μέγιστη κατανόηση, υπομονή και αγάπη καθ' όλη την πορεία του μεταπτυχιακού. Επίσης, οι φίλοι μου Μάνος, Βασίλης, Δημήτρης, Αδάμ, Χάρης, Δημήτρης, Λάμπρος και Βασίλης αποτελούν κομμάτι μου και στήριγμά μου όλα αυτά τα χρόνια, με το μεταπτυχιακό να μην αποτελεί καμία εξαίρεση. Χωρίς την αγάπη τους και την στήριξή τους τίποτα δεν θα ήταν δυνατό.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ
Παναγιώτης Κελεφιώτης Στρατηδάκης

τηλέφωνο: +30 6989218300 **e-mail**: kelefiotis.p@gmail.com
Διεύθυνση: Μπουμπουλίνας 18, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα, 71305
ORCiD: https://orcid.org/0000-0002-2342-2826

Εκπαίδευση

Απρ 2017 - Παρόν
Μεταπτυχιακές σπουδές στη Χημεία, Κατεύθυνση Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας- Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Σεπτ 2012 - Σεπτ 2017
Προπτυχιακές Σπουδές- Πανεπιστήμιο Κρήτης
Μέσος Όρος 7.01/10

Σεπτ 2009 - Αυγ 2012
Πειραματικό Λύκειο Ηρακλείου, Κρήτη
Απόφοιτος με βαθμό 94.5%

Έρευνα/Εργασιακή Εμπειρία

2018-2019
Βιοκαταλυτική Αμίνωση Φουρανικών Παραγώγων, για την Παραγωγή Βιοπολυμερών Δομικών Λίθων, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Επιστημονικός Υπεύθυνος Ι. Παυλίδης
Χρηματοδότηση: Πανεπιστήμιο Κρήτης- ΕΛΚΕ [ID: 10123]
Επιστημονικός συνεργάτης στο πρόγραμμα

Απρ 2018 – Ιουλ 2020
Μεταπτυχιακές Σπουδές στη Βιοχημεία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Αναπτυξη και βελτιστοποίηση βιοδιεργασιών καταλυόμενων από τρανσαμινάσες για τη σύνθεσηδομικών λίθων φουρανικών πολυμερών.

Μαρτ 2017 – Ιουλ 2017
Πρακτική στο Νοσοκομείο του Όσλο: Oslo's Radiumhospitalet, Νορβηγία (Erasmus Placement)
Συνεργασία με την ερευνητική ομάδα της Vessela N. Kristensen, Cancer Genome Variation. Εκμάθησή εργαστηριακών τεχνικών και μελέτη της θεραπείας του καρκίνου του μαστού μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης.

Σεπτ 2017 - Ιουλ 2017
Εκπόνηση Διπλωματικής Εργασίας στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, στην βελτιστοποίηση της τεχνικής PCR/αξιολόγηση προϊόντος
Πραγματοποίηση της διπλωματικής εργασίας, στην βελτιστοποίηση τεχνικών PCR, και αξιολόγηση- δοκιμή μιας πολυμεράσης παρασκευασμένης στο εργαστήριο, στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB), με την ερευνητική ομάδα της Minotech Biotechnologies.

Ιουλ 2015 – Σεπτ 2015
Πρακτική στην Βιομηχανία- Πλαστικά Κρήτης Α.Ε.: Έλεγχος Ποιότητας/Management
Εργασία στην βιομηχανία, σε έλεγχο ποιότητας, εκμάθησή επίλυσης προβλημάτων, διαχείριση ανατεθειμένων προγραμμάτων και ανθρωπίνου δυναμικού.

Δημοσιεύσεις

P. Kelefiotis-Stratidakis, T. Tyrikos-Ergas, I.V. Pavlidis* (2019) "The challenge of using isopropylamine as amine donor in transaminase catalyzed reactions." Organic and Biomolecular Chemistry, **17**: 1634-1642 DOI: 10.1039/C8OB02342E

Συμμετοχές σε Συνέδρια

70ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας
Συμμετοχή στο συνέδριο με **προφορική παρουσίαση**, με τίτλο: " Enzymatic amination of furanoids for the production of biopolymers" // 29.11-01.12.2019

7ο Πανελλήνιο Forum Νέων Επιστημόνων ΕΕΒΜΒ
Συμμετοχή στο συνέδριο με **αναρτημένη παρουσίαση**, με τίτλο: " Enzymatic amination of furanoids for the production of biopolymers" // 28.11.2019

Διαλέξεις Ωνάση 2019 «Genomic Editing»
Συμμετοχή και κατάθεση εργασίας στις ετήσιες διαλέξεις του Ιδρύματος Ωνάση, στον τομέα της Βιολογίας και της Χημείας. Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο Κρήτης // 8-12.07.2019

21ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Συμμετοχή στο συνέδριο με **προφορική παρουσίαση**, με τίτλο: "Ενζυμική Αμίνωση Φουρανοειδών για την Παραγωγή Βιοπολυμερών" // 15-17.05.2019

BioCat2018- Hamburg, 9th International Congress on Biocatalysis
Συμμετοχή στο συνέδριο με **αναρτημένη παρουσίαση**, με τίτλο: "Exploring the metabolic pathway of *Rhodotorula glutinis* for the valorization of olive mill wastewater." **P. Kelefiotis-Stratidakis**, A. Pentjuss, E. Stalidzans, F.W. Herberg, I.V. Pavlidis* BioCat2018, Hamburg, DE // 26-30.08.2018.

Oslo Epigenetics Mini Symposium 2017
Παρακολούθηση συμποσίου στον τομέα της επιγενετικής και των βλαστοκυττάρων. Όσλο, Νορβηγία// 09.05.2017

Βραβεύσεις

70ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (Νοέμβριος 2019)- Υποτροφία Μετακίνησης
Καφάτος Lab Box- Πρώτο Βραβείο από την Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημών (Δεκέμβριος 2018)- «Αν Πικραθώ από ένα Χαρτί-Γενετικές Διαφορές: Από τον Φαινότυπο στον Γονότυπο»,
Υποτροφία του Κληροδοτήματος "Μαρία Μιχαήλ Μανασσάκη" (Φεβρουάριος 2018-Σεπτέμβριος 2018)- Υποτροφία για το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018, για τις μεταπτυχιακές μου σπουδές, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Υποτροφία Erasmus (Μάρτιος 2017- Ιούλιος 2017) – Oslo's Radiumhospitalet, Νορβηγία (προαναφερθέν)
Υποτροφία Πρακτικής (Ιούλιος 2015 –Σεπτέμβριος 2015) – Πρακτική στα Πλαστικά Κρήτης Α.Ε. (προαναφερθέν)

Γλώσσες

Ελληνικά *(μητρική),* **Αγγλικά** *(C2, Certificate of Proficiency),* **Γαλλικά** *(B1, Delf B1)*

Προσωπικά Ενδιαφέροντα

Μάιος 2018 - Οκτ 2019	**Πρόεδρος μεταπτυχιακών φοιτητών του Τμήματος Χημείας** Εξελέγην σαν εκπρόσωπος των μεταπτυχιακών φοιτητών του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.
Νοε 2018 – Μάιος 2019	**Οργανωτική Επιτροπή για το 21ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Πανεπιστημίο Κρήτης** Μια ομάδα εθελοντών από όλο το Πανεπιστήμιο, συνεργάστηκε με σκοπό την διοργάνωση και διεξαγωγή ενός τριήμερου συνεδρίου, το οποίο έλαβε χώρα στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, με συμμετοχή και παρουσίαση ερευνητικών εργασιών από φοιτητές όλης της Ελλάδας.
Σεπτ 2013 - Μαρ 2017	**Αθλητική Ομάδα Πανεπιστημίου Κρήτης / Αθλητικό Κέντρο Πανεπιστημίου Κρήτης** Οργάνωση των ετήσιων αθλητικών δρώμενων του πανεπιστημίου (μαραθώνιος, τουρνουά μπάσκετ κτλ) και επίβλεψη του Πανεπιστημιακού Γυμναστηρίου.
Σεπτ 2016	**Βραδιά του Ερευνητή/ Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας** Παρουσίαση χημικών πειραμάτων στο ευρύ κοινό, και επεξήγηση της διαδικασίας.
Σεπτ 2015 - Ιουν 2016	**Ομάδα «Λόγος- Αντίλογος»- Πανεπιστήμιο Κρήτης** Δημιουργία της πρώτης ομάδας δημιουργικού λόγου (debate team) στο Ηράκλειο, ως μια προσπάθεια αύξησης της κοινωνικής και πολιτικής συνείδησης καθώς και για την προώθηση της κριτικής σκέψης, των δεξιοτήτων παρουσίασης και την ανάπτυξη δεξιοτήτων διαχείρισης ανθρώπινου δυναμικού.
Σεπτ 2014 - Ιουλ 2016	**Φανουράκειο Ίδρυμα- Child protect service/ Public service** Teaching & after- school activities for hosted children (6 – 12y.o.)

CURICULUM VITAE
Panagiotis Kelefiotis Stratidakis

Phone: +30 6989218300 **e-mail**: kelefiotis.p@gmail.com
Address: 18, Mpoumpoulinas street, Heraklion, Crete, Greece, 71305
ORCiD: https://orcid.org/0000-0002-2342-2826

Education

Apr 2017 - Present	**Master in Chemistry, Specialty in Biochemistry, Chemistry Department - University of Crete**
Sept 2012 - Sept 2017	**Bachelor in Chemistry - University of Crete** *General GPA 7.01/10*
Sept 2009 - Aug 2012	**Experimental Lyceum of Heraklion, Crete** *Graduation with 94.5% score*

Research/Work Experience

2018 - 2019	**Biocatalytic Amination of Furans, for the Production of Biopolymeric Building Blocks, Chemistry Department, University of Crete** Scientific Supervisor: Ioannis V. Pavlidis Funding: University of Crete- S.A.R.G. [ID:10123] Research Associate in the program
Apr 2018 – Jul 2020	**Master Studies in Biochemistry, Chemistry Department, University of Crete** DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF BIO-PROCESSES CATALYZED BY TRANSAMINASES FOR THE SYNTHESIS OF BUILDING BLOCKS FOR FURANE POLYMERS Development and optimization of bio-processes catalyzed by transaminases for the synthesis of building blocks for furane polymers.
Mar 2017 – Jul 2017	**Intern at the Oslo's Radiumhospitalet, Norway (Erasmus Placement)** Studied in the research group of Vessela N. Kristensen, Cancer Genome Variation. Learned lab techniques & studied breast cancer's genome treatments through bioinformatics analysis.
Sept 2017 - Jul 2017	**Bachelor's Thesis in FORTH institute on PCR troubleshooting/product testing** Practiced thesis studies, on troubleshooting PCR technique & product testing of an in - house polymerase in the Institute of Molecular Biology and Biotechnology (IMBB), with the research group of Minotech Biotechnologies.
Jul 2015 – Sept 2015	**Internship in Industry- Plastika Kritis S. A.: Quality Control Tests / Management** Quality control testing in industry, troubleshooting, project & human management.

Publications

P. Kelefiotis-Stratidakis, T. Tyrikos-Ergas, I.V. Pavlidis* (2019) "The challenge of using isopropylamine as amine donor in transaminase catalyzed reactions." Organic and Biomolecular Chemistry, **17**: 1634-1642

Conference Proceedings

70th Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology- National Conference
Participation in the conference with **oral presentation**, titled "Enzymatic amination of furanoids for the production of biopolymers" // 29.11-01.12.2019

7th National Forum for Young Researchers HSBMB
Participation in the conference with **poster**, titled "Enzymatic amination of furanoids for the production of biopolymers" // 28.11.2019

Onasis Lectures 2019 «Genomic Editing»
Attendance of the annual Onasis' Lectures in Biology and Chemistry. Foundation of Research and Technology Institute, Heraklion Crete // 8-12.07.2019

21st Conference of Postgraduate Chemistry Students, University of Crete
Participation in the conference with **oral presentation** titled: "Enzymatic Amination of Furanoids for the Production of Biopolymers" // 15-17.05.2019.

BioCat2018- Hamburg, 9th International Congress on Biocatalysis
Participation with **poster**: **P. Kelefiotis-Stratidakis**, A. Pentjuss, E. Stalidzans, F.W. Herberg, I.V. Pavlidis* Exploring the metabolic pathway of *Rhodotorula glutinis* for the valorization of olive mill wastewater. BioCat2018, Hamburg, DE // 26-30.08.2018.

Oslo Epigenetics Mini Symposium 2017
Attendance of symposium in the field of epigenetics and stem cells. Oslo, Norway// 9.05.2017

Awards

70th HSBMB National Conference (November 2019) - Travelling fund

Kafatos' Lab Box – First award from the Panhellenic Union of Bioscientists (December 2018)-
«Getting bitter by a piece of paper- Gene Variations: From Phenotype to Genotype»

«Maria Manassaki» scholarship (February 2018 - September 2018) - Scholarship for the spring semester of the academic year 2017-2018, for the Master's Program, Chemistry Department, University of Crete

Erasmus scholarship (March 2017- July 2017) – Oslo's Radiumhospitalet, Norway (mentioned above)

Internship scholarship (July 2015 –September 2015) - Internship at *Plastika Kritis S.A.* (mentioned above)

Languages

Greek *(native),* **English** *(C2, Certificate of Proficiency),* **French** *(B1, Delf B1)*

Extracurricular activities

Oct 2019	**Member of the Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology**
May 2017 - Oct 2019	**Chairman of the board of the Chemistry Department's postgraduate students** Voted as representative of the postgraduate students in the Chemistry Department of the University of Crete.
Sept 2013 - Mar 2017	**UoC Athletic Committee/ University of Crete's sports center** Organizing the University's annual sport events (marathons, tournaments, etc) & arranging University's gymnasium
Jan 2018 - present	**Organizing Committee for the 21st Conference of Postgraduate Chemistry Students, University of Crete** Three- day conference in University of Crete, with research presentations of students from all over Greece.
Sept 2016	**Researcher's Night/ FORTH Institute** Demonstrated chemical experiments in public & explained the process.
Sept 2015 - Jun 2016	**Debate team, University of Crete** Established the first debate team in Heraklion as an attempt to raise political awareness
Sept 2014 - Jul 2016	**Fanourakion Institute- Child protect service/ Public service** Teaching & after- school activities for hosted children (6 – 12 y.o.).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας Μεταπτυχιακής Διατριβής ήταν η αμίνωση φουρανικών ενώσεων για την παραγωγή πολυαμιδικών και πολυιμιδικών βιοπολυμερών. Οι φουρανικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα μπορούν να προκύψουν από ενζυμική ή χημική κατεργασία παραπροϊόντων γεωργικών διεργασιών, ακολουθώντας τις αρχές της κυκλικής οικονομίας.

Αρχικά, μελετήθηκε η καταλυτική ενεργότητα 17 ανασυνδυασμένων τρανσαμινασών του εργαστηρίου στη θερμοδυναμικά ευνοούμενη αντίδραση της απαμίνωσης της 5-μεθυλοφουρφουρυλαμίνης και τη φουρφουριλαμίνης, σε δύο pH (7.5 και 9.0), ενώ μελετήθηκε και η αντίδραση απαμίνωσης της 1-φαινυλαιθυλαμίνης ως υπόστρωμα αναφοράς. Οι τρανσαμινάσες από τους οργανισμούς *Vibrio fluvialis*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Chromobacterium violaceum* και *Ruegeria pomeroyi* έδωσαν τα πιο ενθαρυντικά αποτελέσματα. Από τα αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων στις διεργασίες ενδιαφέροντος, αποκλείστηκαν οι τρανσαμινάσες από *R. sphaeroides* και *R. pomeroyi* λόγω χαμηλής σταθερότητας στις συνθήκες αντίδρασης και χαμηλής παραγωγικότητας του προϊόντος ενδιαφέροντος αντίστοιχα. Έτσι, η εργασία επικεντρώθηκε στις τρανσαμινάσες από *V. fluvialis* και *C. violaceum.* Τα ένζυμα που επελέγησαν, καθαρίστηκαν με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας πριν εφαρμοστούν στις επιθυμητές διεργασίες. Συγκεκριμένα, επελέγησαν για την παραγωγή πολυιμιδικού πολυμερούς η φουραν-2,5-δικαρβαλδεΰδη και το 5-φορμυλ-2-φουρανκαρβοξυλικό οξύ για την παραγωγή πολυαμιδίου μετά την αμίνωση. Η αμίνωση της δικαρβαλδεΰδης οδήγησε σε αυθόρμητο σχηματισμό πολυμερούς, πιθανόν λόγω σχηματισμού βάσης κατά Schiff στις αλκαλικές συνθήκες της αντίδρασης. Το πολυμερές αυτό αναλύθηκε μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) καθώς και με φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR). Το 5-φορμυλ-2-φουρανκαρβοξυλικό οξύ επίσης αμινώνεται από τις δύο τρανσαμινάσες με ικανοποιητικά αποτελέσματα και έγινε μία μελέτη βελτιστοποίησης των συνθηκών. Έτσι, βρέθηκε πως οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης αμίνωσης με ισοπροπυλαμίνη ως δότη αμινομάδας είναι pH 9.0 και 400 mM ισοπροπυλαμίνης, συνθήκες στις οποίες η αντίδραση ολοκληρώνεται με απόδοση 100% σε λιγότερο από 30 λεπτά. Συμπερασματικά, οι διεργασίες που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία μπορούν να οδηγήσουν στην δημιουργία καινοτόμων βιοπολυμερών.

Λέξεις κλειδιά: Βιοκατάλυση, Κυκλική Οικονομία, Τρανσαμινάσες, Φουράνιο, Βιοπολυμερή, Ισοπροπυλαμίνη, *Vibrio fluvialis, Chromobacterium violaceum*

ABSTRACT

Aim of this Master's Thesis was the amination of furanoid compounds for the production of polyamide and polyimine biopolymers. The furoanoid compounds which were used in this project can be produced by enzymatic or chemical treatment of by-products of agricultural processes, following the principles of circular economy.

Initially, the catalytic activity of 17 recombinant transaminases from laboratory's toolbox was investigated towards the thermodynamically favored deamination reaction of furfurylamine and 5-methylfurfurylamine in two pH (7.5 and 9.0), while the deamination of 1-phenylethylamine was investigated as a benchmark substrate. Transaminases from *Vibrio fluvialis, Rhodobacter sphaeroides, Chromobacterium violaceum* and *Ruegeria pomeroyi* gave the most promising results. Preliminary results on the processes of interest, transaminases from *R*. *sphaeroides* and *R. pomeroyi* were excluded from further studies, owe to instability issues and low productivity, respectively. Thus, the next experiments were performed with the transaminases from *V. fluvialis* and *C. violaceum.* The selected enzymes were purified, using affinity chromatography before applied to desired reactions. For the polyimide polymer, furan-2,5-dicarvaldehyde was selected, while for the polyamide the 5-formyl-2-furancarboxylic acid, after the amination. Dicarvaldehyde's amination leads to spontaneous polymer formation, possibly due to Schiff base formation at the alkaline reaction conditions. This polymer was analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) as well as by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). 5-Formyl-2-furancarboxylic acid is also aminated efficiently from both transaminases, thus a optimization of reaction conditions was performed. It was found that the optimal reaction conditions with isopropylamine as amine donor was pH 9.0 and 400 mM isopropylamine, conditions under which the reaction is completed with 100 % conversion under 30 min. In conclusion, the bioprocesses developed in this work can lead to the synthesis of innovative biopolymers.

Keywords: Biocatalysis, Circular Economy, Transaminases, Furan, Biopolymers, Isopropylamine, *Vibrio fluvialis, Chromobacterium violaceum*

Συντομογραφίες

TA:	Τρανσαμινάσες
PLP:	Φωσφορική Πυριδοξάλη (Pyridoxal Phosphate)
ChrVio:	*Chromobacterium violaceum*
Vibflu:	*Vibrio fluvialis*
3I5T:	*Rhodobacter sphaeroides*
3HMU:	*Ruegeria pomeroyi*
OD:	Οπτική πυκνότητα καλλιέργειας (Optical Density)
BSA:	Αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin)
HMF:	Υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (Hydroxymethylfurfural)
SDS:	Δωδεκανοθειϊκό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate)
Rpm:	Στροφές ανά λεπτό (Rounds Per Minute)
IPTG:	Ισοπρόπυλο-b-D-θειογαλακτοπυρανοζίτης (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)
Kan:	Καναμυκίνη (Kanamycin)
Amp:	Αμπικιλλίνη (Ampicillin)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ XIX

ABSTRACT XX

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1

1.1. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ 1

1.2. ΈΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΕΣ 4

1.3. ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΩΝ 6

1.4. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ 10

1.5. ΚΥΚΛΙΚΗ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑ 12

1.6. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ 14

1.6.1. Βιοπλαστικά- Βιοπολυμερή 19

1.6.2. Λιγνοκυτταρινούχα Βιομάζα 21

1.6.3. Υδρόλυση Λιγνοκυτταρικής Βιομάζας 23

1.6.4. Παραγωγή Φουρανοϊκών Ενώσεων από Λιγνοκυτταρική Βιομάζα 24

1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ 26

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 29

2.1. ΈΝΖΥΜΑ 29

2.2. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ 31

2.3. ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΛΟΙΠΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ 33

2.4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ 34

2.5. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ 35

2.6. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ LURIA BERTANI 36

2.7. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ LB-SOC 10X 37

2.8. ΧΗΜΕΙΟΔΕΚΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ *E. COLI* 37

2.9. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΧΗΜΕΙΟΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ 38

2.10. STOCK ΓΛΥΚΕΡΙΝΗΣ 39

2.11. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ- ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ 39

2.12. ΣΥΛΛΟΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ 40

2.13. ΛΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΣΩ ΥΠΕΡΗΧΩΝ 41

2.14. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ 42

2.15. ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ 44

2.16. Υπολογισμος Συγκεντρωσης Πρωτεϊνης με τη Μεθοδο Bradford 46
2.17. Φωτομετρικη Μελετη Ενεργοτητας Ενζυμου 48
2.18. Προετοιμασια Δειγματων για Ηλεκτρονικη Μικροσκοπια Σαρωσης 49
2.19. Προετοιμασια Δειγματων για Φασματοσκοπια Πυρηνικου Μαγνητικου Συντονισμου 49
2.20. Προετοιμασια Δειγματων για Φασματοσκοπια Υπεριωδους 49
2.21. Αναλυση Αντιδρασεων με Υγρη Χρωματογραφια Υψηλης Αποδοσης 50

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 53

3.1. Αναπτυξη Φωτομετρικης Αναλυσης Φουρανοειδων 53
3.2. Επιλογη Ενζυμων 57
3.2.1. Υπερέκφραση Πρωτεϊνών 58
3.2.2. Διαλογή Τρανσαμινασών Μέσω Φωτομετρικής Ανάλυσης της Ενεργότητας 61
3.3. Πειραματικος Σχεδιασμος για την Αναπτυξη Βιοδιεργασιων 65
3.4. Αμινωση Φουρανικων Ενωσεων για την Παραγωγη Βιοπολυμερων 68
3.5. Συνθηκες Αντιδρασης και Καθαρισμος Πρωτεϊνης 69
3.6. Συνθεση Πολυιμινικου Πολυμερους 71
3.7. Χαρακτηρισμος του Βιοπολυμερους 75
3.8. Συνθεση Δομικων Λιθων για Πολυαμιδια 78
3.9. Μελετη Βελτιστοποιησης του pH της Αντιδρασης 79
3.10. Μελετη Βελτιστοποισης της Συγκεντρωσης του Δοτη Αμινομαδας της Αντιδρασης 80

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ 83

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 88

I. Αλληλουχιες Γονιδιων Τρανσαμινασων 88
II. Φασματα Πυρηνικου Μαγνητικου Συντονισμου 108

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 112

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ενζυμική Τεχνολογία

Η ενζυμική τεχνολογία ασχολείται πρωτίστως με την παραγωγή, απομόνωση, καθαρισμό και την χρήση ενζύμων, όταν αυτά βρίσκονται σε διάλυμα ή σε ακινητοποιημένη μορφή, προς όφελος της ανθρωπότητας[1]. Είναι ένας διεπιστημονικός τομέας, ο οποίος έχει αναγνωριστεί από τον Οργανισμό Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (Organization for Economic Cooperation and Development- OECD), ως ένα σημαντικό συστατικό για βιώσιμη βιομηχανική ανάπτυξη[2]. Σύμφωνα με το Συνέδριο για την Βιολογική Ποικιλότητα, η βιοτεχνολογία ορίζεται ως “any technological application that uses biological systems, living organisms or derivatives thereof, to make or modify products or processes for specific uses”[3]. Τον τελευταίο καιρό, σε μια προσπάθεια να δοθεί μια πιο ακριβής επεξήγηση σε αυτόν τον αρκετά γενικό ορισμό, μια χρωματική κατηγοριοποίηση υιοθετήθηκε, η οποία κατατάσσει τα είδη της βιοτεχνολογίας σύμφωνα με τον τομέα εφαρμογής τους (**Εικόνα 1.1**).

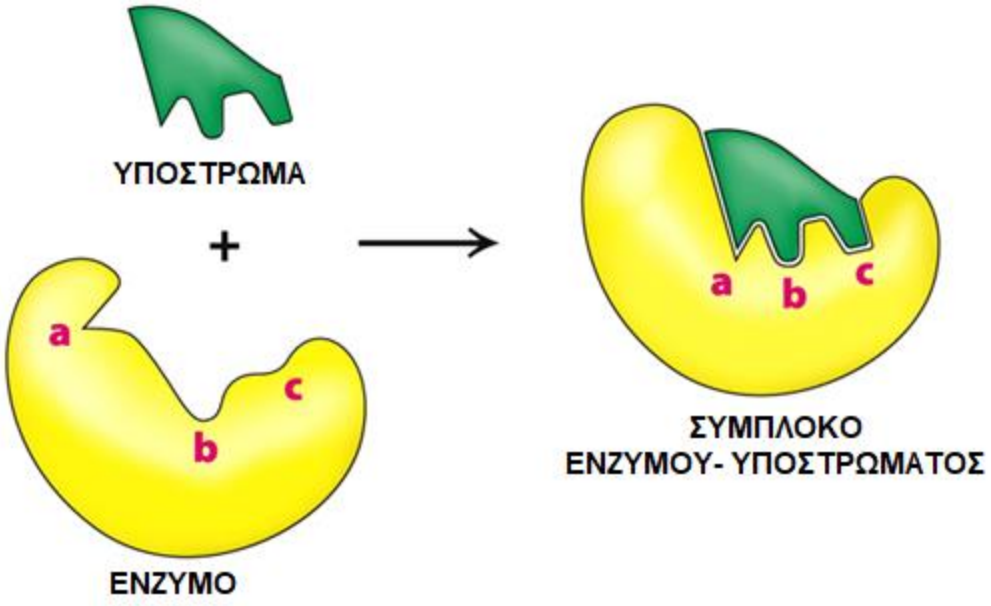
Σε αυτά τα πλαίσια, η λευκή (ή βιομηχανική) βιοτεχνολογία περιγράφει τις εφαρμογές ενζύμων, κυτταρικών παραγώγων ή ακόμα και ολόκληρων μικροοργανισμών σε βιομηχανικές διεργασίες που οδηγούν στη δημιουργία ενός μεγάλου εύρους προϊόντων όπως καύσιμα, συστατικά φαγητών και χημικές ενώσεις[3]. Είναι σημαντικό σε αυτά τα πλαίσια να σημειωθεί, ότι έχει αναπτυχθεί ένα αξιόλογο κοινωνικοπολιτικό ρεύμα υπέρ της βιομηχανικής χρήσης της βιοτεχνολογίας, καθώς η ανάγκη για βιωσιμότητα της βιομηχανίας, και παράλληλα για φιλικές ως προς το περιβάλλον βιομηχανικές διεργασίες, προωθούν την ανάπτυξη και εφαρμογή αυτής της τάσης. Η παγκόσμια ζήτηση για πρώτες ύλες και ενέργεια, μαζί με την μείωση των αποθεμάτων ορυκτών καυσίμων συνεισφέρουν στην ανάπτυξη αυτού του τομέα[4]. Σε αυτό έρχονται να προστεθούν τα δεδομένα που προέβλεπαν ότι το 2010, η βιοτεχνολογία θα ήταν υπεύθυνη για το 10% των πωλήσεων στην αγορά χημικών, κάτι το οποίο μεταφραζόταν σε 125 δισεκατομμύρια δολάρια[5]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, την μερίδα του λέοντος στα προϊόντα βιοτεχνολογίας καταλαμβάνουν φαρμακευτικές εταιρίες, οι οποίες ακολουθούνται από εταιρείες παραγωγής βιο-αιθανόλης και βιο-καυσίμων. Σημαντικό ρόλο στην αγορά της βιομηχανικής ενζυμολογίας παίζει τόσο η Ευρωπαϊκή Ένωση, όσο και η Κίνα, η Ινδία και η Βραζιλία[6,7].

Color Type	Area of Biotech Activities
Red	Health, Medical, Diagnostics
Yellow	Food Biotechnology, Nutrition Science
Blue	Aquaculture, Coastal and Marine Biotech
Green	Agricultural Biotechnology, Environmental Biotechnology – Biofuels, Biofertilizers, Bioremediation, Geomicrobiology
Brown	Arid Zone and Desert Biotechnology
Dark	Bioterrorism, Biowarfare, Biocrimes, Anticrop warfare
Purple	Patents, Publications, Inventions, IPRs
White	Gene-based Bioindustries
Gold	Bioinformatics, Nanobiotechnology
Gray	Classical Fermentation and Bioprocess Technology

Εικόνα 1.1: Χρωματική κατηγοριοποίηση των ειδών της βιοτεχνολογίας σύμφωνα με τον τομέα εφαρμογής τους, στη λεγόμενη «σημαία» της βιοτεχνολογίας.[8]

Τα ένζυμα είναι βιοκαταλύτες οι οποίοι επιταχύνουν το ρυθμό αντίδρασης διαφόρων βιολογικών και χημικών διεργασιών. Οι αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα είναι πιο ανταγωνιστικές σε σύγκριση με τις αντίστοιχες που προκύπτουν από αντίστοιχες χημικές διεργασίες, καθώς οι βιοκαταλύτες θεωρούνται μία φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική προσέγγιση για τη σύνθεση χημικών ενώσεων υψηλής αξίας. Ένα μεγάλο ποσοστό από τα προϊόντα τα οποία προέρχονται από χημική σύνθεση, παράγονται με τη χρήση οργανικών διαλυτών επιζήμιων ως προς το περιβάλλον, χρησιμοποιούνται ακριβοί καταλύτες, οι οποίοι προέρχονται συνήθως από βαρέα μέταλλα, αλλά και απαιτείται υψηλή κατανάλωση ενέργειας,

για την πραγματοποίηση των διεργασιών αυτών[9,10]. Τα ένζυμα εμφανίζουν μια σειρά διακριτών πλεονεκτημάτων συγκριτικά με την χημική κατάλυση. Σε αυτά συγκαταλέγονται η υψηλή παραγωγικότητα, καταλυτική αποδοτικότητα και η εκλεκτικότητα, τόσο ως η ικανότητα διάκρισης μεταξύ όμοιων περιοχών σε μόρια (τοποεκλεκτικότητα), αλλά και μεταξύ οπτικών ισομερών (στερεοεκλεκτικότητα). Η υψηλή εκλεκτικότητα των ενζύμων προέρχεται από την εξειδίκευση πρόσδεσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Καθώς το ένζυμο και το υπόστρωμα αλληλεπιδρούν με ασθενείς αλληλεπιδράσεις οι οποίες απαιτούν κοντινή απόσταση, ένα υπόστρωμα για να εφαρμόσει σε μια περιοχή πρόσδεσης πρέπει να έχει κατάλληλη δομή. Το 1890 ο Emil Fischer πρότεινε την αναλογία του κλειδιού και της κλειδαριάς, το οποίο ήταν το μοντέλο για την αλληλεπίδραση ενζύμου υποστρώματος για αρκετές δεκαετίες. Εντούτοις, είναι πλέον γνωστό ότι τα ένζυμα είναι εύκαμπτα και ότι τα σχήματα των ενεργών κέντρων τροποποιούνται σημαντικά με την πρόσδεση του υποστρώματος, όπως παρουσιάστηκε από τον Koshland το 1958 [11]. Τα ενεργά κέντρα των ενζύμων έχουν σχήμα που είναι συμπληρωματικό ως προς εκείνο του υποστρώματος μόνο μετά την πρόσδεση του υποστρώματος. Αυτή η πορεία της δυναμικής αναγνώρισης ονομάζεται *επαγώμενη προσαρμογή* (**Εικόνα 1.Σφάλμα**! Δεν υπάρχει κείμενο καθορισμένου στυλ στο έγγραφο.**2**).



Εικόνα 1.Σφάλμα! Δεν υπάρχει κείμενο καθορισμένου στυλ στο έγγραφο.**2:** Μοντέλο επαγώμενης προσαρμογής ενζύμου-υποστρώματος[12].

Να σημειωθεί ωστόσο ότι ευρεία εφαρμογή βιοκατάλυσης σε μεγάλη κλίμακα εμφάνιζε περιορισμούς λόγω του περιορισμένου αριθμού εμπορικά διαθέσιμων βιοκαταλυτών. Τα ένζυμα, σπάνια εμφανίζουν ιδανική δράση σαν βιομηχανικοί καταλύτες από φυσικού τους, και πολλές βιοκαταλυτικές διεργασίες εμφανίζουν χαμηλές αποδόσεις. Γι' αυτό το λόγο, υπολογίζεται ότι μόνο 150 βιοκαταλυτικές διεργασίες εφαρμόζονταν μέχρι το 2005 στην βιομηχανία[13]. Οι ταχύτατες εξελίξεις όμως στον τομέα της γενετικής και πρωτεϊνικής μηχανικής έχουν διευκολύνει την εξέλιξη των ενζυμικών ιδιοτήτων και προσέφερε τη δυνατότητα δημιουργίας ενζύμων τα οποία εξυπηρετούν συγκεκριμένες απαιτήσεις για ένα μεγάλο εύρος συνθετικών και βιομηχανικών εφαρμογών[14–16]. Η παγκόσμια αγορά των ενζύμων τα οποία μπορούν να βρουν εφαρμογές στη βιομηχανία ξεπέρασε τα 5 δισεκατομμύρια δολάρια το 2018 και αναμένεται να φτάσει τα 7 δισεκατομμύρια δολάρια μέχρι το 2023[17]. Επιπλέον, ο σχεδιασμός νέων συνθετικών διαδρομών μπορούν να ξεπεράσουν την εγγενή αναποτελεσματικότητα του κινητικού διαχωρισμού, ο οποίος προσέφερε μέγιστη θεωρητική απόδοση μέχρι 50%[18,19]. Αξίζει να σημειωθεί ότι ασύμμετρες αντιδράσεις σύνθεσης μπορούν να προσφέρουν αποδόσεις μέχρι και 100%. Οι νέες δυνατότητες που προκύπτουν από αυτές τις εξελίξεις έχουν ενισχύσει το ρόλο της βιοκατάλυσης στη σύνθεση πληθώρας χειρόμορφων ενώσεων στο μέλλον.

Ένζυμα και Τρανσαμινάσες

Η λέξη 'ένζυμο' χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Γερμανό φυσιολόγο Wilhelm Kühne το 1878, αντικαθιστώντας τον μέχρι τότε χρησιμοποιούμενο όρο ζύμωση (ferment), τον οποίο είχε εισαγάγει ο Louis Pasteur[20]. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα ένζυμα είναι βιολογικοί καταλύτες (γνωστοί και ως βιοκαταλύτες) οι οποίοι επιταχύνουν της βιοχημικές διεργασίες στους ζωντανούς οργανισμούς. Μπορούν επίσης να απομονωθούν από τα κύτταρα και στην συνέχεια να αξιοποιηθούν για την κατάλυση ενός μεγάλου εύρους αντιδράσεων, ακόμα και βιομηχανικού ενδιαφέροντος[21]. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με την εισαγωγή της βιοκατάλυσης στην βιομηχανία, μια σειρά από διεργασίες που περιλαμβάνουν ένζυμα έχει εφαρμοστεί στη βιομηχανία για την παραγωγή αρκετών αγαθών[22–25], χωρίς την απουσία όμως διαφόρων προβλημάτων τα οποία έπρεπε να επιλυθούν. Για να αντιμετωπιστούν τέτοια προβλήματα, διάφορες προσεγγίσεις υιοθετήθηκαν, συμπεριλαμβανομένης της συλλογής και χρήσης ενζύμων από την φύση, τυχαίες μεταλλάξεις αλλά και της ακινητοποίησης των ενζύμων [26,27]. Με το πέρασμα των χρόνων, έχει υπάρξει ραγδαία εξέλιξη μεθόδων μηχανικής των ενζύμων για την βελτιστοποίηση των λειτουργιών και των εφαρμογών τους. Από τη χρήση δομικών πληροφοριών των ενζύμων για την επέκταση του προφίλ υποστρωμάτων που

υποδέχονταν, επομένως και των προϊόντων που προέκυπταν, μέχρι και την κατευθυνόμενη εξέλιξη, η οποία έχει συνεισφέρει σημαντικά στην εξέλιξη των ενζύμων ως βιοκαταλύτες, προσφέροντας τη δυνατότητα σχεδιασμού βιοκαταλυτών κατά παραγγελία, με επιθυμητά χαρακτηριστικά, που εξυπηρετούν την εκάστοτε διεργασία[28–31]. Παραδείγματα εφαρμογών τους στη βιομηχανία τα οποία αξίζει να αναφερθούν περιλαμβάνουν την παραγωγή γλυκαντικών παραγόντων καθώς και την τροποποίηση αντιβιοτικών[32]. Χρήση ενζύμων συναντάμε επίσης σε απορρυπαντικά και πληθώρα καθαριστικών προϊόντων, ενώ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αναλυτικές συσκευές και διεργασίες με εγκληματολογικές, ιατρικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές. Αξιοσημείωτοι βιοκαταλύτες είναι οι λιπάσες (βίοκαύσιμα και φαρμακοβιομηχανία), η θρυψίνη (βιομηχανία δερμάτων), οι ξυλανάσες (βιομηχανία χαρτιού), οι λιποξυγενάσες (βιομηχανία τροφίμων), καθώς και πρωτεάσες και αμυλάσες (βιομηχανία απορρυπαντικών)[33–38].

Τα ένζυμα τα οποία επιλέχθηκαν να μελετηθούν στην παρούσα εργασία είναι οι τρανσαμινάσες. Οι τρανσαμινάσες και οι αντιδράσεις που πραγματοποιούν παρατηρούνται για πρώτη φορά το 1930 από την ερευνητική ομάδα του Needhm[39].Τα ένζυμα αυτά εξειδικεύονται στην μεταφορά μιας αμινομάδας από έναν δότη αμινομάδας σε ένα καρβονυλικό δέκτη και αντιστρόφως, χρησιμοποιώντας το συμπαράγοντα 5′ φωσφορική πυριδοξάλη (pyridoxal-5′-phosphate - PLP). Οι τρανσαμινάσες ή αλλιώς αμινοτρανσφεράσες, πραγματοποιούν αυτή την αντίδραση στα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών, με ιδιαίτερη έμφαση στα ηπατικά κύτταρα, όπου συμμετέχουν τόσο στην αποικοδόμηση, όσο και στη σύνθεση αμινοξέων, στα πλαίσια του μεταβολισμού [40].

Τα τελευταία χρόνια όμως, τα συγκεκριμένα ένζυμα συγκέντρωσαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στα πλαίσια της βιομηχανικής τους εφαρμογής. Το ενδιαφέρον που παρατηρείται έγκειται στη δυνατότητα παραγωγής χημικών προϊόντων με φιλικές προς το περιβάλλον διεργασίες (χαμηλή παραγωγή αποβλήτων, χαμηλή ενεργειακή κατανάλωση καθώς και μειωμένη εκπομπή αερίων θερμοκηπίου)[41]. Συγκεκριμένα, σε αυτή τη μελέτη εστιάζουμε στη δυνατότητα των τρανσαμινασών να συνθέτουν οπτικά ενεργές αμίνες, με υψηλή εκλεκτικότητα και απόδοση κάτω από ήπιες συνθήκες. Οι βιοκαταλύτες αποτελούν μια στρατηγική επιλογή για να επιτευχθεί η παραγωγή οπτικά καθαρών μορίων[42,43]. Η χημική σύνθεση οπτικά καθαρών αμινών είναι μια περίπλοκη χημική διεργασία, η οποία απαιτεί υψηλές πιέσεις καθώς και ακριβούς καταλύτες βαρέων μετάλλων. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η χημική παραγωγή της σιταγλιπτίνης, ένα μόριο το οποίο εμφανίζει αντιδιαβητική δράση. Για την παραγωγή της χρησιμοποιείται πίεση 250 psi, καθώς και μεταλλικός καταλύτης ροδίου[44]. Η χρήση αυτών των συνθηκών όχι μόνο αυξάνει το κόστος παραγωγής, αλλά και την πολυπλοκότητα της διαδικασίας παραγωγής,

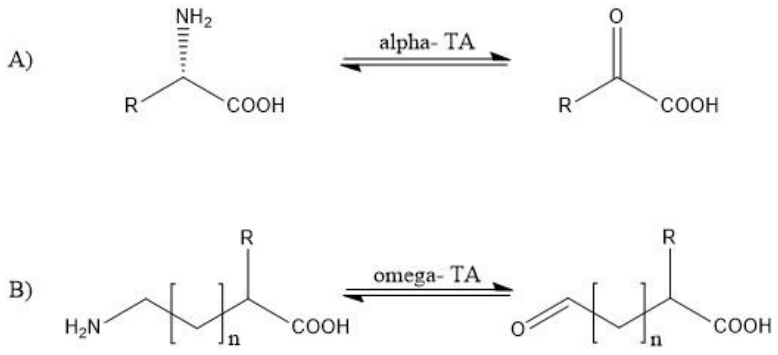
καθώς προστίθενται και άλλα στάδια καθαρισμού για την απομόνωση του τελικού προϊόντος σε καθαρή μορφή, χωρίς ίχνη από τον καταλύτη[10,45]. Επομένως, η εύρεση μιας ενζυμικής οδού για την πραγματοποίηση της σύνθεσης αυτής, χρησιμοποιώντας τρανσαμινάσες, είναι μια ελκυστική εναλλακτική στις παραδοσιακές χημικές μεθόδους, τόσο οικονομικά, όσο και από περιβαλλοντικής απόψεως[44,46].

Οι συνθήκες αντίδρασης στη βιομηχανία διαφέρουν από αυτές της φύσης, επομένως και οι συνθήκες αντίδρασης αλλά και οι τρανσαμινάσες χρειάζονται βελτιστοποίηση πριν την εφαρμογή τους. Μία κοινή πρόκληση της αντίδρασης τρανσαμίνωσης είναι η μη ευνοϊκή θερμοδυναμική ισορροπία της αντίδρασης ασσύμετρης σύνθεσης. Έχουν αναπτυχθεί αρκετά συστήματα για τη μετατόπιση της ισορροπίας της αντίδρασης[47–49]. Οι ω-τρανσαμινάσες (γνωστές και ως τρανσαμινάσες αμινών) συχνά συναντούν και άλλα εμπόδια στην εφαρμογή τους, όπως παρεμπόδιση από το υπόστρωμα και/ή το προϊόν, χαμηλή θερμοσταθερότητα, χαμηλή ανθεκτικότητα σε οργανικούς διαλύτες, ή χαμηλή δραστικότητα σε επιθυμητά υποστρώματα[50]. Μια σειρά μεθόδων για την επίλυση αυτών των θεμάτων έχουν αναφερθεί, όπως ορθολογικός σχεδιασμός αντιδράσεων[49,51–56], πρωτεϊνική μηχανική μέσω κατευθυνόμενης εξέλιξης[57,58], ή συνδυασμός κατευθυνόμενης εξέλιξης και σημειακής μετάλλαξης, κατευθυνόμενη από μοντέλα ομολογίας[44]. Ένα παράδειγμα βιομηχανικής βιοκατάλυσης με τρανσαμινάσες αποτελούν οι διεργασίες της εταιρίας Cambrex Corporation για την παρασκευή πλήθους χειρόμορφων αμινών, όπως αμινοτετραλίνη και μεθυλβενζυλαμίνη, μέσω ασύμμετρης σύνθεσης σε μεγάλη κλίμακα[58,46]. Παράλληλα, οι τρανσαμινάσες έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον της φαρμακοβιομηχανίας, καθώς μπορούν να καταλύσουν την ασύμμετρη σύνθεση οπτικά ενεργών αμινών με εξαιρετική καθαρότητα.

Ομαδοποίηση και Δομή Τρανσαμινασών

Αρκετά ένζυμα απαιτούν μη πρωτεϊνικά συστατικά για την καταλυτική τους δράση[59]. Τα συστατικά αυτά ονομάζονται συμπαράγοντες, τα οποία μπορούν να είναι ιόντα ή μικρές οργανικές ενώσεις. Η φωσφορική πυριδοξάλη (pyridoxal-5′-phosphate – PLP, βιταμίνη B6) αποτελεί ένα συμπαράγοντα που χρησιμοποιείται από πλήθος ενζύμων με διαφορετική βιολογική δράση [60–64]. Οι τρανσαμινάσες κατηγοριοποιούνται ως PLP εξαρτώμενα ένζυμα. Η κατηγοριοποίηση αυτή τις κατατάσσει σε μια από τις πιο λειτουργικά ποικιλόμορφες ομάδες, καθώς σε αυτήν την κατηγορία ενζύμων περιέχονται περισσότερες από 140 αξιοσημείωτες ενζυμικές δραστικότητες σύμφωνα με την Επιτροπή Ενζυμων (Enzyme Commission)[65].

Οι τρανσαμινάσες ανάλογα με την εκλεκτικότητα που εμφανίζουν απέναντι στα υποστρώματα ενδιαφέροντος, κατατάσσονται σε διαφορετικές ομάδες. Σε ένα πρώτο επίπεδο διαχωρίζονται ως α- ή ω-τρανσαμινάσες. Η κατηγοριοποίηση αυτή βασίζεται στη δομή του υποστρώματος. Στις περιπτώσεις των α-τρανσαμινασών (α-ΤΑ), για την ενζυμική δραστικότητα είναι απαραίτητη η παρουσία μιας καρβοξυλικής ομάδας στην α θέση σε σχέση με την αμίνη ή κετόνη [66]. Οι ω-τρανσαμινάσες (ω-ΤΑ) δύνανται να καταλύσουν αντιδράσεις στις οποίες η καρβοξυλική ομάδα βρίσκεται σε ω-θέση, ή δεν υπάρχει καθόλου. Στην **Εικόνα 1.3**, παρουσιάζονται ενδεικτικές δομές υποστρωμάτων για α-ΤΑ και ω-ΤΑ. Ενώσεις στις οποίες παρατηρείται απουσία καρβοξυλομάδας, όπως για παράδειγμα αμίνες ή κετόνες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα από μια υποκατηγορία των ω-τρανσαμινασών καθιστώντας τα ένζυμα αυτά πιθανούς βιοκαταλύτες για τη σύνθεση χειρόμορφων αμινών[50,66,67]. Η υποκατηγορία αυτή είναι οι αμινοτρανσφεράσες αμινών (ΑΤΑ), οι οποίες εμφανίζουν εξαιρετική στερεοεκλεκτικότητα ενώ αξιοποιούνται σε αντιδράσεις ασύμμετρης σύνθεσης. Η αξιοποίηση των ω-ΤΑ για σύνθεση χειρόμορφων ενώσεων, έχει συγκεντρώσει το επιστημονικό ενδιαφέρον όσον αναφορά στη βιοκατάλυση, καθώς μπορούν να χρησιμοποιήσουν σαν δότη αμινομάδας φθηνές αμίνες, όπως η ισοπροπυλαμίνη, για την παραγωγή οπτικά ενεργών αμινών υψηλής καθαρότητας.

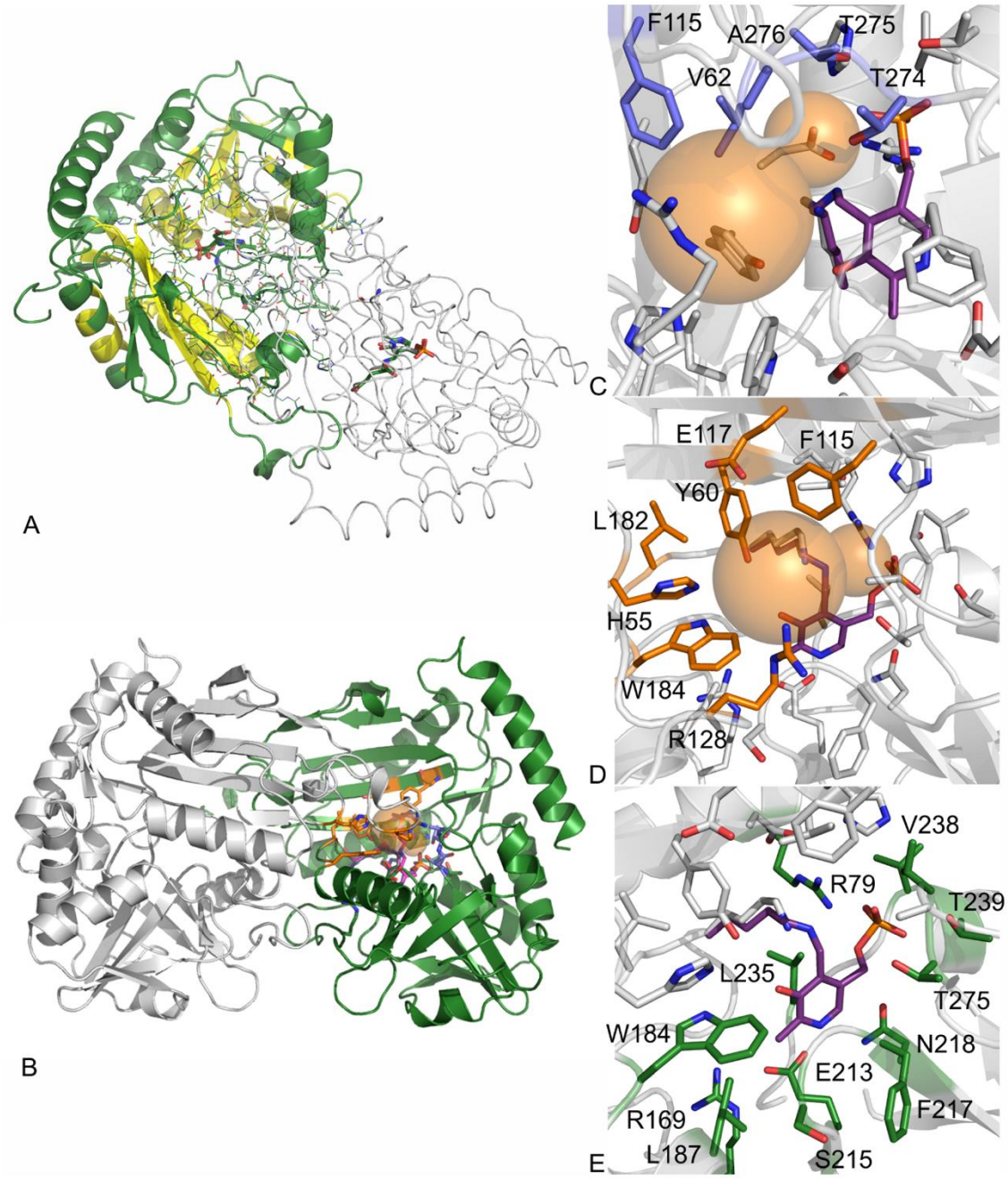


Εικόνα 1.3: Ενδεικτικά υποστρώματα και προϊόντα τρανσαμίνωσης από (Α) μια α-τρανσαμινάση και (Β) μια ω-τρανσαμινάση[39]

Άλλη μια ομαδοποίηση που συναντάται αφορά στον τρόπο αναδίπλωσης των τρανσαμινασών στο χώρο. Οι τρανσαμινάσες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν από την ευρύτερη ομάδα των PLP-εξαρτώμενων ενζύμων στις υποκατηγορίες τύπων αναδίπλωσης (folding types) I και IV. Ο τύπος I ονομάζεται επίσης υπεροικογένεια των τρανσαμινασών

ασπαραγινικού οξέος και σε αυτόν υπάγονται 21 οικογένειες ενζύμων. Η συγκεκριμένη υποκατηγορία εμπεριέχει τις περισσότερες τρανσαμινάσες που παρουσιάζουν εκλεκτικότητα ως προς υποστρώματα (*S*)-στερεοχημείας και για αυτό καλούνται και (*S*)-εκλεκτικές τρανσαμινάσες. Αντίθετα ο τύπος αναδίπλωσης IV αναφέρεται και ως υπεροικογένεια της D-αλανίνης και σε αυτήν υπάγονται οι (*R*)-εκλεκτικές τρανσαμινάσες[68].

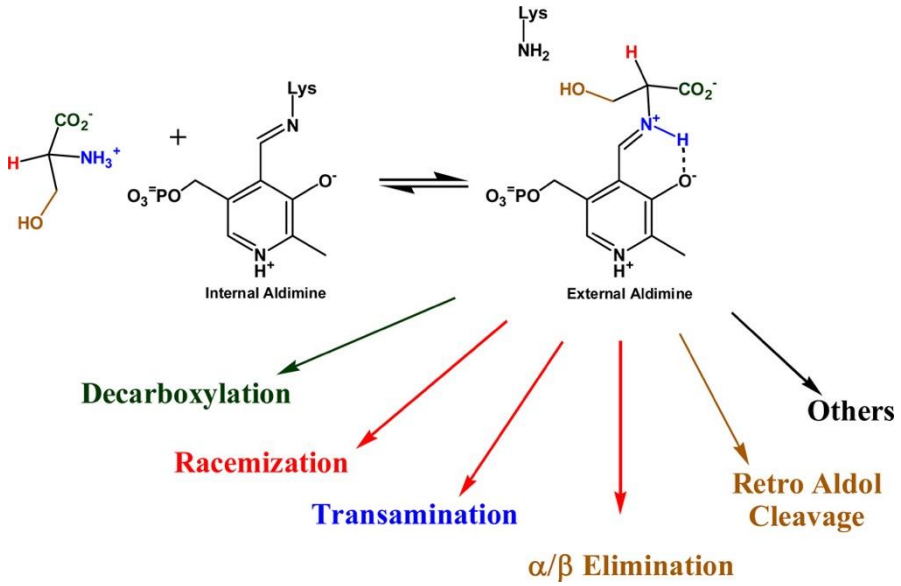
Οι δομές που εμφανίζουν τα ένζυμα που ανήκουν στις κατηγορίες αναδίπλωσης I και IV, εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα. Εμφανίζονται ως ομοδιμερή, με κάθε διμερές να διαθέτει δύο ενεργά κέντρα. Αυτά εντοπίζονται στη διεπιφάνεια που δημιουργείται μεταξύ των μονομερών, και το κάθε μονομερές συνεισφέρει στη δημιουργία του κάθε ενεργού κέντρου[69]. Τα ενεργά κέντρα φέρουν μια μεγάλη και μια μικρή θέση δέσμευσης του υποστρώματος. Στην μεγάλη θέση πρόσδεσης (O-side ή big binding pocket) μπορούν να εισέλθουν ογκώδεις υποκαταστάτες του υποστρώματος, ενώ σε αυτήν τη θέση γίνεται και η δέσμευση του συμπαρόγοντα PLP, μιας και εκεί βρίσκεται το κατάλοιπο της λυσίνης που λαμβάνει ενεργά μέρος στον καταλυτικό μηχανισμό δράσης. Στην μικρή θέση πρόσδεσης (P-side ή small binding pocket), μπορούν να εισέλθουν μικρού όγκου υποκαταστάτες, όπως πρωτόνια, μέθυλο και αιθυλ-ομάδες[70]. Αυτή η διαφοροποίηση των δύο θέσεων πρόσδεσης είναι υπεύθυνη για την εξειδίκευση των ενζύμων για (*R*)- ή (*S*)-αντιδρώντα. Τόσο η διμερής μορφή μιας τρανσαμινάσης, η μεσοεπιφάνεια αυτής καθώς και η μικρή και μεγάλη θέση πρόσδεσης φαίνονται στην εικόνα **Εικόνα 1.4**.



Εικόνα 1.4: Τρισδιάστατη δομή της ω-ΤΑ από τον οργανισμό *Aspergillus terreus* (PDB ID: 4CE5). Α) Γενική δομή μιας διμερούς ω-ΤΑ η οποία αποτελείται από την α υπομονάδα (πράσινο/κίτρινο) και τη β υπομονάδα (γκρι). Η κίτρινη περιοχή αντιπροσωπεύει την συντηρημένη περιοχή, Β) Γενική δομή διμερούς ω-ΤΑ με απεικόνιση των θέσεων δέσμευσης (binding pocket) ως πορτοκαλί σφαίρες, C) Απεικόνιση μικρής θέσης δέσμευσης (πορτοκαλί σφαίρες) καθώς και των αμινοξέων γύρω από αυτήν (μπλε), D) Απεικόνιση μεγάλης θέσης δέσμευσης (πορτοκαλί σφαίρες) καθώς και των αμινοξέων γύρω από αυτήν (πορτοκαλί), Ε) Αλληλεπίδραση αμινοξέων (πράσινο) με το μόριο του PLP (μωβ)[70].

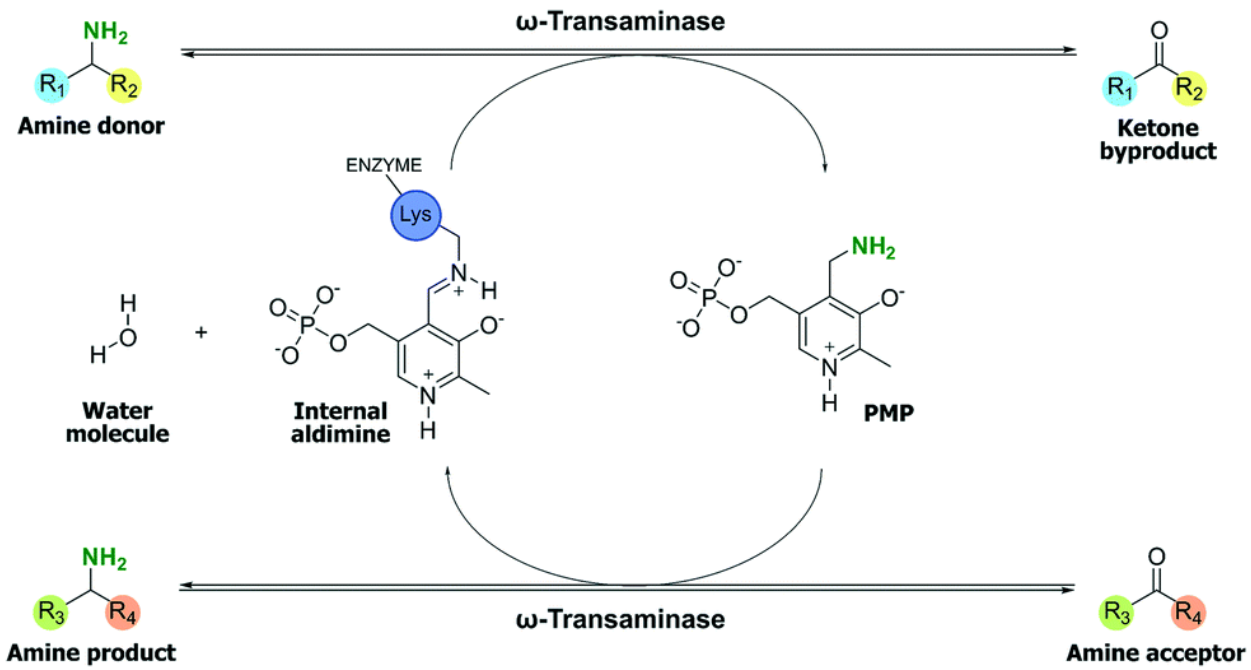
Καταλυτικός Μηχανισμός

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων χρησιμοποιεί PLP ως συμπαράγοντα. Πέρα από την τρανσαμίνωση, οι καταλυόμενες αντιδράσεις περιλαμβάνουν ρακεμοποίηση, αποκαρβοξυλίωση καθώς και ρετρο-αλδολική αντιδράση, όπως και φαίνεται στην **Εικόνα 1.5**.



Εικόνα 1.5: Ενδεικτικές αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από ένζυμα εξαρτώμενα από PLP[71].

Τα βασικά στάδια για την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης στις τρανσαμινάσες παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.6**. Το PLP προσδένεται ως βάση Schiff σε ένα κατάλοιπο λυσίνης του ενζύμου, σχηματίζοντας εσωτερική αλδιμίνη. Στη συνέχεια, αντιδρά με τον δότη αμινομάδας, το οποίο οδηγεί στο σχηματισμό της κετόνης, με την κατανάλωση ενός μορίου νερού. Η εσωτερική αλδιμίνη και το μόριο νερού αναγεννούνται με την αμίνωση του δέκτη αμινο-ομάδας.

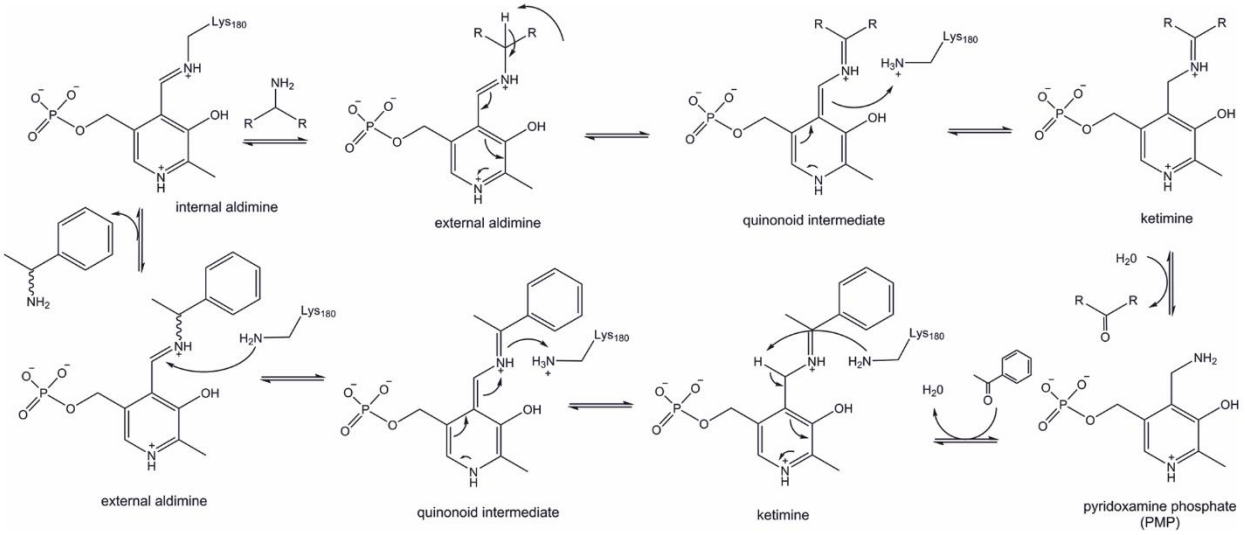


Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση ενός πλήρους καταλυτικού κύκλου τρανσαμίνωσης, όπου ένας δότης αμινομάδας μεταφέρει μέσω μιας ω-τρανσαμινάσης την αμινομάδα σε έναν δέκτη[72].

Αναλυτικότερα, για τον μηχανισμό, αξίζει να σημειωθεί πως οι τρανσαμινάσες μεταφέρουν αμινομάδες σε υποστρώματα με καρβονυλομάδες, μέσω ενός ping-pong καταλυτικού μηχανισμού (**Εικόνα 1.7**), ο οποίος περιλαμβάνει δύο ημίσειες αντιδράσεις[73]. Πιο συγκεκριμένα, στην αρχική κατάσταση, η ομάδα αλδεΰδης του PLP σχηματίζει μία εσωτερική αλδιμίνη με την ε-αμινομάδα της πλευρικής ομάδας της καταλυτικής λυσίνης του ενζύμου. Η α-αμινομάδα του δότη αμινομάδας εκτοπίζει την ε-αμινομάδα του κατάλοιπου λυσίνης της δραστικής θέσης, σχηματίζοντας έτσι μια εξωτερική αλδιμίνη. Σημειώνεται ότι η εξωτερική αλδιμίνη μεταξύ του υποστρώματος και της PLP παραμένει ισχυρά προσδεδεμένη στο ένζυμο μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Παράλληλα, η πρωτονίωση του αζώτου οδηγεί σε δημιουργία θετικού φορτίου, το οποίο σταθεροποιείται μέσω αλληλεπίδρασης με την φαινολική ομάδα του συμπαράγοντα. Η εξωτερική αλδιμίνη μπορεί να χάσει ένα πρωτόνιο από τον α-άνθρακα του υποστρώματος για να γίνει ένα κινοειδές ενδιάμεσο, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να δράσει ως πυρηνόφιλο. Αυτό το βήμα είναι και το ενεργειακά και στερικά πιο απαιτητικό, καθώς το μόριο είναι επίπεδο. Η επαναπρωτονίωση του ενδιαμέσου στον άνθρακα της αλδεϋδικής ομάδας του PLP έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας κετιμίνης. Σε αυτό το σημείο με υδρόλυση της κετιμίνης απελευθερώνεται μία κετόνη ή αλδεΰδη, ενώ ο

συμπαράγοντας βρίσκεται στη μορφή της φωσφορικής πυριδοξαμίνης (PMP), μετά τη μεταφορά της αμινομάδας του δότη στο μόριο του PLP. Η καρβονυλο-ομάδα του απαμινωμένου προϊόντος που τελικά απελευθερώνεται έχει προκύψει από το μόριο νερού το οποίο προσβάλλει την κετιμίνη.

Στο δεύτερο μέρος του μηχανισμού, πραγματοποιείται μια αντιστροφή της παραπάνω πορείας. Ένα καρβονυλικό υπόστρωμα (δέκτης αμινομάδας) αντιδρά με το σύμπλοκο ενζύμου-PMP, για τη παραγωγή μίας αμίνης ή ενός αμινοξέος, και την αναγέννηση του συμπλόκου ενζύμου- PLP[74]. Με την επιστροφή του συμπαράγοντα στην αρχική του μορφή ολοκληρώνεται ο καταλυτικός κύκλος και το ένζυμο είναι έτοιμο για να ξεκινήσει ένα νέο κύκλο. Αυτή η δυνατότητα ανακύκλωσης του PLP καθιστά τις συγκεκριμένες ενζυμικές αντιδράσεις ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες, καθώς δεν απαιτείται η αναγέννηση του συμπαράγοντα, όπως συμβαίνει συχνά με πολλά άλλα ένζυμα που απαιτούν συμπαράγοντες (NADH, NADPH, SAM κ.ά.) [75,76].



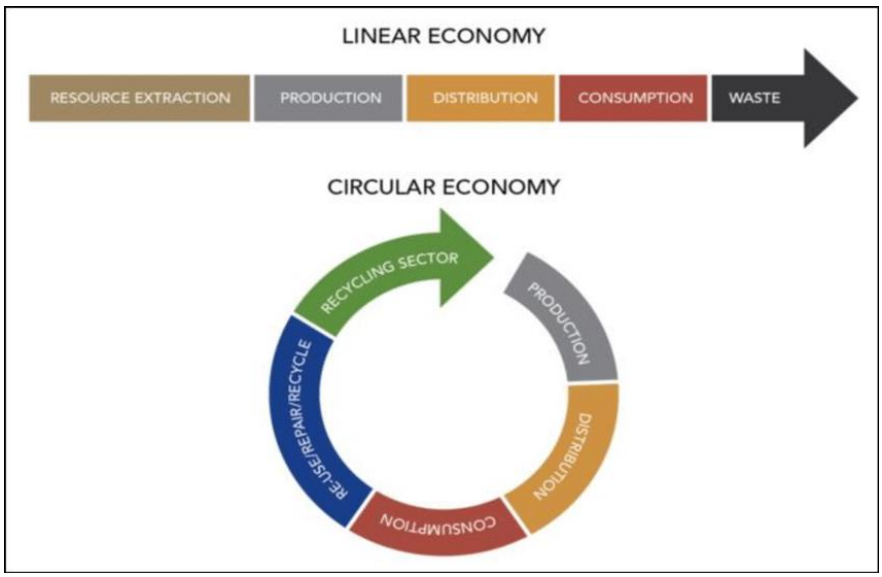
Εικόνα 1.7: Λεπτομερής απεικόνιση του καταλυτικού μηχανισμού τρανσαμίνωσης. Ως δέκτης αμινομάδας από το PMP χρησιμοποιείται η ακετοφαινόνη [70].

Κυκλική Οικονομία

Η βιοοικονομία αποτελεί μια προσέγγιση υπό την οποία η παραγωγή, ανάπτυξη αλλά και αναζωογόννηση του οικονομικού συστήματος βασίζεται σε μια ισορροπημένη χρήση

ανανεώσιμων βιολογικών πηγών[77], η οποία τα τελευταία χρόνια συγκεντρώνει παγκόσμιο ενδιαφέρον. Βασική αρχή της βιοοικονομίας αποτελεί η σύνδεση μεταξύ βιοτεχνολογίας και οικονομίας, αλλά και επιστήμης, βιομηχανίας και κοινωνίας[78]. Η βιοτεχνολογία αποτελεί τον πυρήνα της βιοοικονομίας, καθώς η ίδια είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις βασικές αρχές της βιοοικονομίας ώστε να επιτευχθεί μια αρμονία μεταξύ οικονομικού συστήματος και οικοσυστήματος. Σε αυτά τα πλαίσια, η Ευρωπαϊκή Ένωση ενισχύοντας την απόφαση του 2015 για ένα πλάνο κυκλικής οικονομίας, συμπεριέλαβε τα πλαστικά σε αυτό το πλάνο, ως ένα πεδίο υψηλής προτεραιότητας[79,77].

Η κυκλική οικονομία αναφέρεται σαν εναλλακτική της παραδοσιακής γραμμικής οικονομίας, η οποία χαρακτηρίζεται από τη λογική «παραγωγή- κατανάλωση- απόρριψη» (**Εικόνα 1.8**). Η κυκλική οικονομία στοχεύει στην ελαχιστοποίηση των αποβλήτων και τη διατήρηση της αξίας των προϊόντων, υλικών και πρώτων υλών της οικονομίας για όσο το δυνατόν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αυτό είναι εφικτό.



Εικόνα 1.Σφάλμα! Δεν υπάρχει κείμενο καθορισμένου στυλ στο έγγραφο.**8:** Γραφική σύγκριση της γραμμικής (επάνω) και κυκλικής (κάτω) οικονομίας. Η γραμμική οικονομία, ξεκινάει από την συλλογή πόρων και καταλήγει στην παραγωγή αποβλήτων, ενώ αντίθετα η κυκλική οικονομία αξιοποιώντας την ανακύκλωση, καταφέρνει να ελαχιστοποιεί τα απόβλητά της, και να οδηγείται στην εκ νέου παραγωγή αγαθών[80].

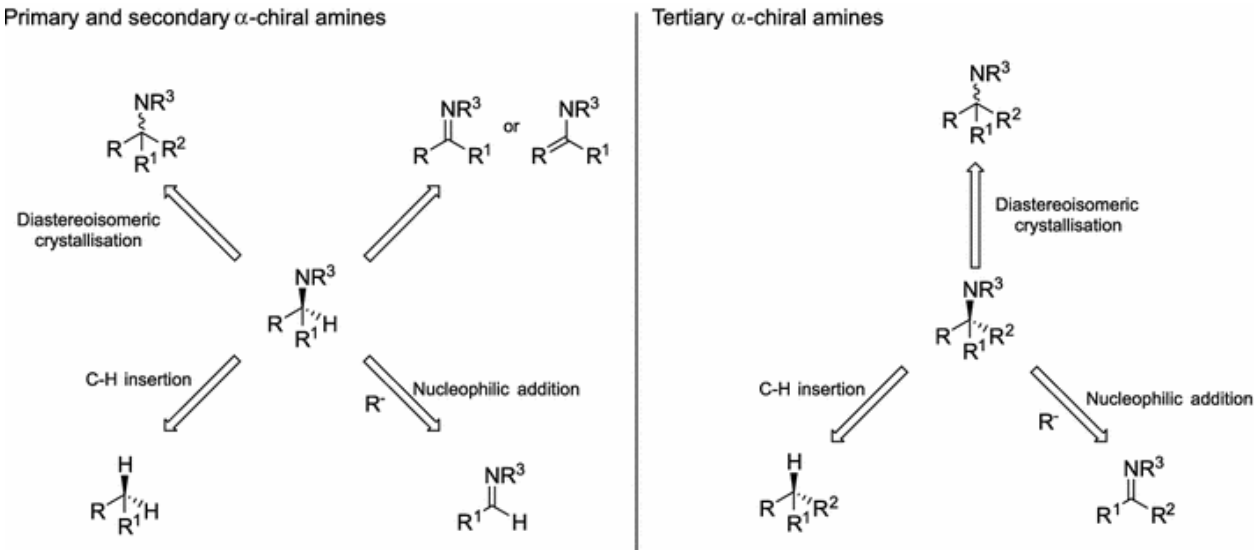
Με βάση την κυκλική οικονομία, η αξία των αρχικών υλών και κατ' επέκταση των υλικών και των προϊόντων που παράγονται, παραμένει στην αγορά για το μέγιστο δυνατό χρονικό διάστημα, ελαχιστοποιώντας έτσι την κατανάλωση των διαθέσιμων πόρων. Η κυκλική (κλειστή) ροή υλικών, καθώς και η χρήση ακατέργαστων πόρων και ενέργειας, μέσω μιας σειράς επιπέδων, μπορεί να περιγράψει τη λογική στην οργάνωση ενός κυκλικού οικονομικού συστήματος[81]. Η κυκλική οικονομία στηρίζεται στη βασική αρχή των «3R» (reduce, reuse and recycle- μείωση, επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση), όπου τονίζεται ο ισχυρός δεσμός μεταξύ περιβάλλοντος και οικονομίας, καθώς και η ελαχιστοποίηση της χρήσης βασικών πόρων[82]. Η λογική της κυκλικής οικονομίας δεν αποτελεί μια νέα έννοια η οποία αναδύθηκε από τις πρόσφατες εξελίξεις της οικονομίας και της αναγκαιότητας για φιλικές προς το περιβάλλον βιομηχανίες και κοινωνίες. Αποτελεί μια έννοια η οποία προϋπήρχε καθ' όλη την ιστορία της ανθρωπότητας. Πριν την βιομηχανική επανάσταση, όπου η παραγωγή των αγαθών και των προϊόντων γινόταν μέσω χειρωνακτικής εργασίας, η λογική της σπατάλης αλλά και της μη επαναχρησιμοποίησης ήταν αδιανόητη. Με την άφιξη της βιομηχανικής επανάστασης, η εμφάνιση των αναλώσιμων προϊόντων, των οποίων ο μοναδικός λόγος ύπαρξης ήταν για να απορριφθούν τελικά μετά τη χρήση τους, οδήγησε στη γραμμική καταναλωτική συμπεριφορά, καθώς και στην εφήμερη αντίληψη στη χρήση πραγμάτων. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να εμφανιστούν προβλήματα περιβαλλοντικής μόλυνσής, αλλά και υγειονομικής ταφής, παράλληλα με τη μείωση των διαθέσιμων ορυκτών πόρων[84].

Η ενζυμική τεχνολογία μπορεί να συνεισφέρει στην ανάπτυξη και εγκαθίδρυση του μοντέλου της κυκλικής οικονομίας σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας. Μια κοινωνία η οποία επιδιώκει ένα μέλλον με μειωμένη χρήση άνθρακα ο οποίος προέρχεται από ορυκτούς πόρους, στρέφεται προς την εκμετάλλευση της βιομάζας, σε συνδυασμό με τη διαθέσιμη βιοτεχνολογία.

Εφαρμογές Τρανσαμινασών στη Βιοκατάλυση

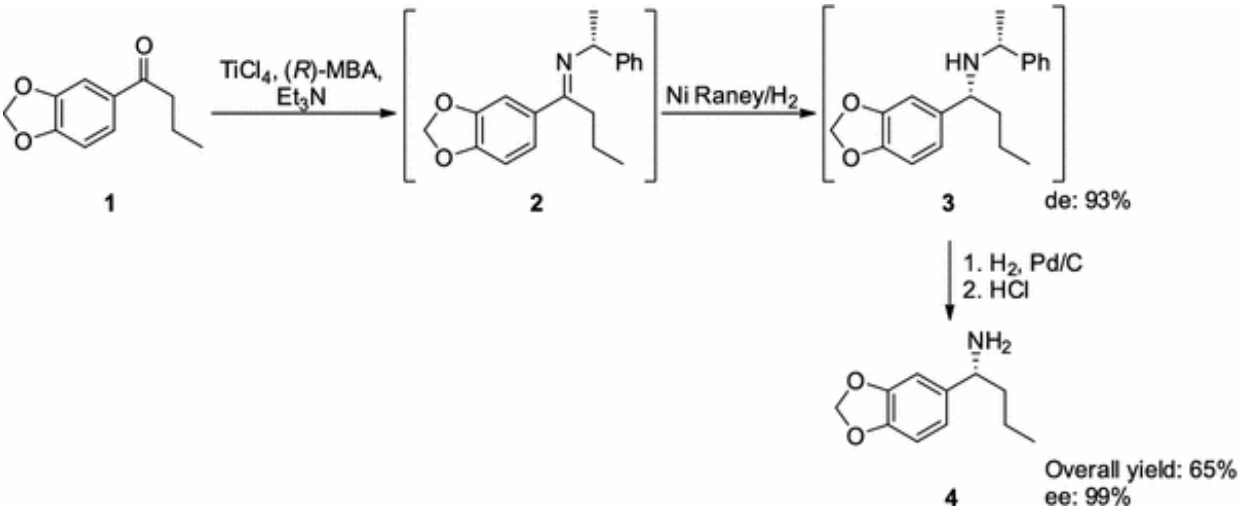
Η βιοκατάλυση εμφανίζει μια ραγδαία ανάπτυξη στις εφαρμογές της στην οργανική σύνθεση, αυξάνοντας παράλληλα τη ζήτηση για νέα και βελτιστοποιημένα ένζυμα για τις συγκεκριμένες διεργασίες. Οι τρανσαμινάσες, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αποτελούν ένζυμα υψηλού ενδιαφέροντος, τόσο για την φαρμακοβιομηχανία όσο και για τη βιομηχανία χημικών. Αυτό το ενδιαφέρον στηρίζεται στη δυνατότητα των τρανσαμινασών να παράγουν χειρόμορφες αμίνες από προ-χειρόμορφες ενώσεις[50,85].

Οι τρανσαμινάσες παρουσιάζουν μια σειρά πλεονεκτημάτων όπως αναφέρθηκε, σε σχέση με τη συμβατική χημική σύνθεση χειρόμορφων αμινών, όπως η υψηλή στερεοεκλεκτικότητα, καθώς και η δυνατότητα δράσης υπό ήπιες συνθήκες, η αντικατάσταση τοξικών μεταλλικών καταλυτών, καθώς και η μείωση της χρήσης πτητικών οργανικών διαλυτών στη χημική βιομηχανία. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα χημικής σύνθεσης χειρόμορφων αμινών παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.9**, στα οποία η χρήση μεταλλικών καταλυτών είναι απαραίτητη[86–88]. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η σύνθεση οπτικά καθαρών χειρόμορφων αμινών μέσω υδρογόνωσης των αντίστοιχων ιμινών, με χρήση μεταλλικού καταλύτη. Οι καταλύτες αυτοί είναι μέταλλα μετάπτωσης όπως ρόδιο (Rh),ρουθήνιο (Ru), ιρίδιο (Ir) και το τιτάνιο (Ti), με το Ir να βρίσκει τις πιο πολλές εφαρμογές, αλλά η υψηλή του τιμή να μην το καθιστά ακατάλληλο για ευρεία χρήση σε βιομηχανικό επίπεδο.



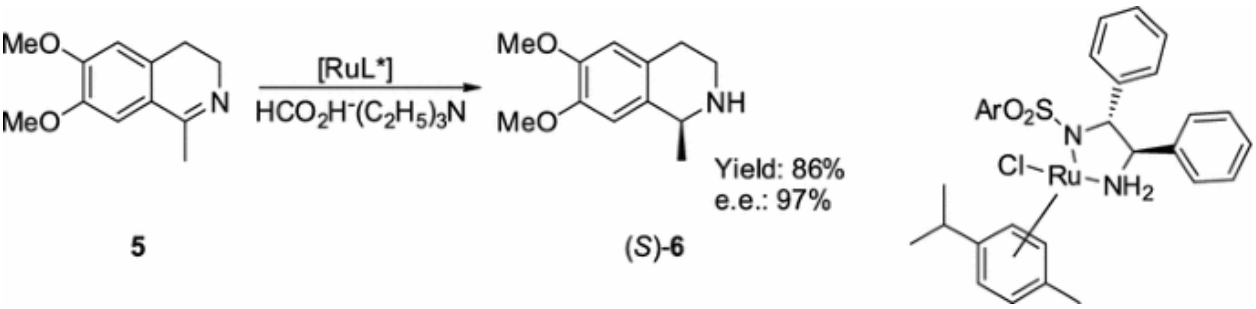
Εικόνα 1.9: Παραδείγματα ασύμμετρης σύνθεσης α- αμινών. Κλασσικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη διαστερεοϊσομερική κρυστάλλωση, εναντιοεκλεκτική αναγωγή ιμινών σε εναμίνες, C–H προσθήκη και πυρηνόφιλη προσθήκη[85].

Αξιοσημείωτες αναφορές αποτελούν η σύνθεση του αναστολέα της ελαστάσης των λευκοκυττάρων (δομή 4, **Σχήμα 1.1**), με χρήση καταλύτη Ti και νικελίου (Ni)[89].



Σχήμα 1.1: Σύνθεση του αναστολέα της ελαστάσης των λευκοκυττάρων, με χρήση καταλύτη νικελίου για τη εναντιοεκλεκτική αναγωγή της βάσης Schiff[85].

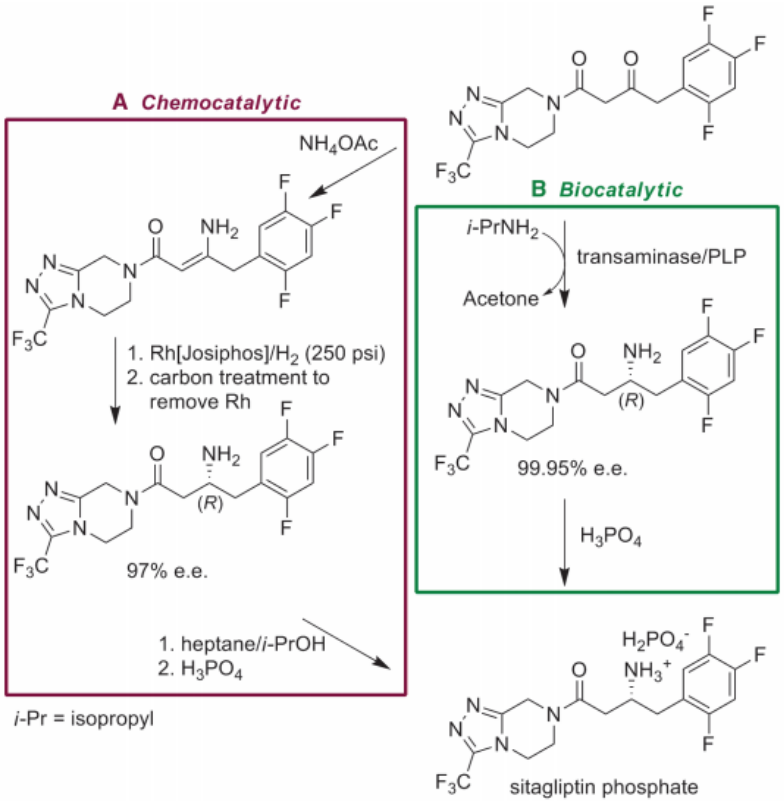
Ένα ακόμα παράδειγμα είναι η σύνθεση της (*S*)-salsolidine (δομή 6, **Σχήμα 1.2**), ένας αναστολέας της μεθυλοτρανσφεράσης της κατεχόλης, που χρησιμοποιείται σε ασθενείς που πάσχουν από Alzheimer[90]. Για άλλη μια φορά γίνεται χρήση καταλύτη Ru, και η σύνθεση μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο σε υδατικό όσο και σε οργανικό μέσο.



Σχήμα 1.2: Σύνθεση της ένωσης (*S*)-salsolidine, με χρήση καταλύτη ρουθηνίου[85].

Ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα εφαρμογής των τρανσαμινασών στη φαρμακευτική βιομηχανία, αποτελεί η παραγωγή του αντιδιαβητικού φαρμάκου (*S*)-σιταγλιπτίνη, η οποία κυκλοφορεί στην αγορά με το εμπορικό όνομα Januvia[44]. Η εταιρία Merck σε συνεργασία με την Codexis αξιοποίησαν έναν συνδυασμό βιοπληροφορικής μελέτης και

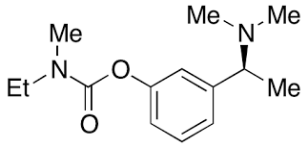
κατευθυνόμενης εξέλιξης για την τροποποίηση των θέσεων πρόσδεσης του ενζύμου, δημιουργώντας το πρώτο ένζυμο που μπορούσε να αμινώσει το κετονικό υπόστρωμα ενδιαφέροντος, την προσιταγλιπτίνη, ενώ παράλληλα βελτίωσε την ενεργότητα και τη σταθερότητα του ενζύμου στις συνθήκες που απαιτούνταν για τη διεργασία. Η βιοδιεργασία που αναπτύχθηκε με το βελτιωμένο ένζυμο που προέκυψε ύστερα από την εισαγωγή 27 μεταλλάξεων εμφάνισε αύξηση απόδοσης 10-13% σε σχέση με την χημική διεργασία, αύξηση της παραγωγικότητας κατά 53% και μείωση των συνολικών αποβλήτων κατά 19%. Παράλληλα, η απομάκρυνση του μεταλλικού καταλύτη ροδίου, καθώς και του δαπανηρού εξοπλισμού δημιουργίας συνθηκών υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας, συνεισέφερε περαιτέρω στα πλεονεκτήματα που εμφάνιζε η βιοδιεργασία σε σχέση με τη συμβατική χημική σύνθεση. Στην **Εικόνα 1.10** παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ της χημικής και βιοκαταλυτικής σύνθεσης της σιταγλιπτίνης.



Εικόνα 1.10: Σύγκριση μεταξύ της χημικής (A) και της βιοκαταλυτικής (B) μεθόδου σύνθεσης σιταγλιπτίνης. Η χημική σύνθεση σιταγλιπτίνης περιλαμβάνει το σχηματισμό εναμίνης, ο οποίος ακολουθείται από ασύμμετρη υδρογόνωση σε πίεση 250 psi. Χρησιμοποιείται χειρόμορφος καταλύτης ροδίου, και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή σιταγλιπτίνης με οπτική καθαρότητα 97% ee. Το προϊόν που προκύπτει από τη χημική σύνθεση περιέχει κατάλοιπα ροδίου, τα οποία πρέπει να

απομακρυνθούν. Για αυτό, γίνεται επανακρυστάλλωση και σχηματισμός φωσφορικού άλατος. Μέσω της βιοκαταλυτικής οδού, με αμίνωση της προσιταγλιπτίνης, προκύπτει η οπτικά καθαρή σιταγλιπτίνη (99.95% ee)[44].

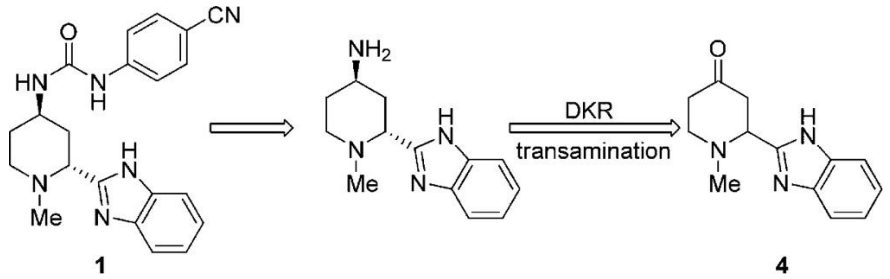
Μια ακόμα εφαρμογή αποτελεί η χρήση μιας από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες τρανσαμινάσες, του (*S*)-εκλεκτικού ενζύμου από τον οργανισμό *Vibrio fluvialis* (VibFlu). Πολλές από τις γνώσεις που διαθέτει η επιστημονική κοινότητα σήμερα για τη λειτουργία γενικά των τρανσαμινασών οφείλονται σε μελέτες στις οποίες συμπεριλαμβανόταν η VibFlu. Η δομή στην οποία αναφέρθηκε η διπλή περιοχή θέση πρόσδεσης των τρανσαμινασών, προτάθηκε βάσει μελέτης στο συγκεκριμένο ένζυμο[91,92]. Η VibFlu έχει χρησιμοποιηθεί για σύνθεση πληθώρας φαρμακευτικών ενδιαμέσων, συμπεριλαμβανομένης και της (*S*)-ριβαστιγμίνης (**Εικόνα 1.111**)[93]. Το συγκεκριμένο φάρμακο χορηγείται στη νόσο του Alzheimer, καθώς και σε περιπτώσεις άνοιας οι οποίες συνδέονται με τη νόσο Parkinson. Ένα επιπλέον παράδειγμα αποτελεί η τρανσαμινάση από *Bacillus megaterium* SC6394 (Bm-TAm) η οποία χρησιμοποιήθηκε από τη φαρμακοβιομηχανία για τη σύνθεση της (*R*)-*sec*-βουτυλαμίνης και της (*R*)-1-κυκλοπροπυλαιθυλαμίνης, ενώσεις οι οποίες αποτελούν σημαντικά ενδιάμεσα για τον ανταγωνιστή του παράγοντα απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRF-1)[94], ο οποίος χρησιμοποιείται κατά τη θεραπεία της κατάθλιψης καθώς και της αγχώδους διαταραχής.



Εικόνα 1.11: Χημική δομή της (*S*)-ριβαστιγμίνης

Αξίζει να σημειωθεί και η εφαρμογη δυναμικού κινητικού διαχωρισμού (dynamic kinetic resolution) στην ασύμμετρη σύνθεση, σε μια διεργασία η οποία αναπτύχθηκε από την εταιρία Pfizer (**Εικόνα 1.12**). Σε αυτή τη διεργασία, η εμπορικά διαθέσιμη τρανσαμινάση ATA-036 χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ενός ενδιαμέσου, το οποίο στη συνέχεια θα αξιοποιούνταν ως αναστολέας στο σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog, μια τεχνική η οποία αποτελεί θεραπευτική μέθοδο για ένα μεγάλο εύρος ανθρώπινων καρκίνων. Παρ' όλες τις θετικές ενδείξεις που είχε προσφέρει η μελέτη του συγκεκριμένου αναστολέα, η παραγωγή του με κλασική χημική σύνθεση εμφάνιζε δυσκολίες τόσο στην παραγωγή μεγάλης κλίμακας, όσο και στην ασφάλεια των διεργασιών. Η χρήση της ATA-036 προσέφερε μια εναλλακτική προσέγγιση απέναντι στην κλασική χημική σύνθεση. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με απόδοση της τάξης

του 85%, καθώς και πολύ υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα για την επιθυμητή (2*R*,4*R*)-αμίνη, με τιμή >99% ee[95].



Εικόνα 1.12: Συνοπτικά, η ασύμμετρη σύνθεση του αναστολέα 1 του σηματοδοτικού μονοπατιού Hedgehog. Για την παραγωγή του ήταν απαραίτητη η δημιουργία δύο στερεογονικών κέντρων στον δακτύλιο πιπεριδίνης. Αυτό επετεύχθη μέσω δυναμικού κινητικού διαχωρισμού κατά την ενζυμική τρανσαμίνωση της 4-πιπεριδίνη καταλυόμενης από την ATA-036 (**4**).

Τέλος, ένα από τα πρόσφατα παραδείγματα στον τομέα των υλικών αποτελεί η προσέγγιση του Kroutil και της ερευνητικής του ομάδας[96] στο σχεδιασμό ενός τεχνητού οργανισμού, στα πλαίσια ενός βιοκαταλυτικού συστήματος[97], ο οποίος θα είχε τη δυνατότητα να φέρει μια σειρά ένζυμα, τα οποία θα του έδιναν τη δυνατότητα να παράγει το δομικό λίθο του νάιλον-6, το ε-αμινοκαπροϊκό οξύ. Ανάμεσα στα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μετατροπή της κυκλοεξανόλης στο ε-αμινοκαπροϊκό οξύ, χρησιμοποιήθηκαν και μια σειρά τρανσαμινάσες, για την παραγωγή του 6-αμινοεξανοϊκού οξέος, το οποίο αποτελούσε τμήμα της ενζυμικής διεργασίας.

Όλες οι παραπάνω εφαρμογές αποτελούν ανταγωνιστικά παραδείγματα απέναντι στην παραδοσιακή χημεία με πολλά πλεονεκτήματα. Λαμβάνοντας υπόψιν το αυξανόμενο ενδιαφέρον που συναντάται στον τομέα των υλικών για νέα, οικονομικά πολυμερή και βιοπλαστικά, σε συνδυασμό με την ανάγκη για νέες, φιλικές προς το περιβάλλον διεργασίες και προϊόντα, παρατηρείται μια αυξανόμενη τάση μελέτης των τρανσαμινασών σε αυτό το πεδίο.

1.3.1. Βιοπλαστικά- Βιοπολυμερή

Τα πολυμερή (πλαστικά) έχουν παίξει ένα βασικό ρόλο στην ανάπτυξη της σύγχρονης κοινωνίας. Χάριν στο χαμηλό κόστος παραγωγής τους, αλλά και στις πολλαπλές ιδιότητές τους ως υλικά, αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι μιας πληθώρας διαφορετικών τομέων, όπως η συσκευασία αγαθών, οι κατασκευές, τα ηλεκτρονικά αγαθά αλλά και η γεωργία[98]. Τα πολυμερή τα οποία παράγονται από ορυκτούς πόρους κυριαρχούν στην βιομηχανία, σε ποσοστό 99% για το 2015, και η παραγωγή τους ξεπέρασε τα 400 εκατομμύρια τόνους για το ίδιο έτος[99]. Για την

παραγωγή αυτή, χρησιμοποιήθηκε το 6% της παγκόσμιας παραγωγής πετρελαίου, ποσοστό το οποίο αναμένεται να ανέλθει στο 20% μέχρι το 2050[100–102]. Είναι πλέον ξεκάθαρο ότι η παραγωγή πολυμερών δε μπορεί να βασίζεται στα εξαντλούμενα αποθέματα ορυκτών[103]. Στους παραπάνω προβληματισμούς έρχονται να προστεθούν αυξανόμενες περιβαλλοντικές ανησυχίες, καθώς η Ευρωπαϊκή Επιτροπή αναγνώρισε το πλαστικά σαν υλικό υψηλής προτεραιότητας, με στόχο να καταστούν όλες οι πλαστικές συσκευασίες ανακυκλώσιμες μέχρι το 2030, καθώς η μόλυνση από πλαστικά υλικά και συσκευασίες, αναγνωρίζεται ως ένας οικολογικός κίνδυνος. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η θαλάσσια μόλυνση η οποία οφείλεται σε πλαστικά κατάλοιπα, λόγω της υψηλής χημικής ανθεκτικότητας των πλαστικών, καθώς επίσης και τη μετάβασή τους σε μικροπλαστικά, τα οποία μπορεί να καταναλωθούν ακόμα και από μικροοργανισμούς, όπως το ζωοπλαγκτόν[104–106]. Για να αντιμετωπίσει αυτούς τους προβληματισμούς, η βιομηχανία των βιοπολυμερών έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη λύση.

Ως βιοπολυμερή μπορούν να χαρακτηριστούν τα πολυμερή τα οποία παράγονται με βιοτεχνολογικές διεργασίες, είναι βιοδιασπώμενα ή και τα δύο. Η κατάταξη των βιοπολυμερών μπορεί να γίνει σε τρεις βασικές κατηγορίες: 1) τα φυσικά πολυμερή, 2) τα πολυμερή τα οποία προκύπτουν από μικροβιακές/ενζυμικές διεργασίες και 3) τα συνθετικά πολυμερή τα οποία στηρίζονται σε φυσικά παραγόμενα μονομερή[107,108]. Επομένως τα βιοπολυμερή μπορούν να συλλεχθούν από φυσικές πηγές, να βιοσυντεθούν από ζώντες οργανισμούς ή ακόμα και να συντεθούν χημικά από βιολογικά υλικά[109]. Έχει παρουσιαστεί ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση βιοπολυμερών ως συσκευασίες, σε ιατρικές εφαρμογές, σε αγροτικές δραστηριότητες και άλλους τομείς. Διαφορετικοί τύποι υδρογονανθράκων (άμυλο και κυτταρίνη), όπως και άλλοι πολυσακχαρίτες έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της βιομηχανίας για παραγωγή βιοπολυμερών, λόγω της δυνατότητας τους για επαναχρησιμοποίηση, βιοσυμβατότητα, μη ρυπογόνα χαρακτηριστικά και σχετικά χαμηλό κόστος[110]. Παράλληλα, ένας ακόμα αξιοσημείωτος παράγοντας είναι η δυνατότητα σύνθεσης βιοπολυμερών από τα μη βρώσιμα τμήματα βιομάζας, ελαχιστοποιώντας έτσι το ρίσκο έλλειψης τροφής για μικρές, οικονομικά αδύναμες κοινότητες, κυρίως σε αναπτυσσόμενες περιοχές. Παράλληλα αυτό συνεισφέρει στην αρχή της κυκλικής οικονομίας, αξιοποιώντας τμήματα βιομάζας τα οποία θα απομακρύνονταν ως απόβλητα. Η αύξηση της χρήσης βιοπολυμερών έχει δημιουργήσει μεγάλες προσδοκίες, και η παγκόσμια αγορά βιοπολυμερών αναμένεται να φτάσει αξίες μέχρι και 10 δις εκατομμύρια δολάρια μέχρι το 2021, με μια αύξηση της τάξης του 17% στο διάστημα 2017-2021. Η δυτική Ευρώπη καλύπτει το μεγαλύτερο τμήμα αυτής της αγοράς, με ποσοστό της τάξεως του 41.5%[111].

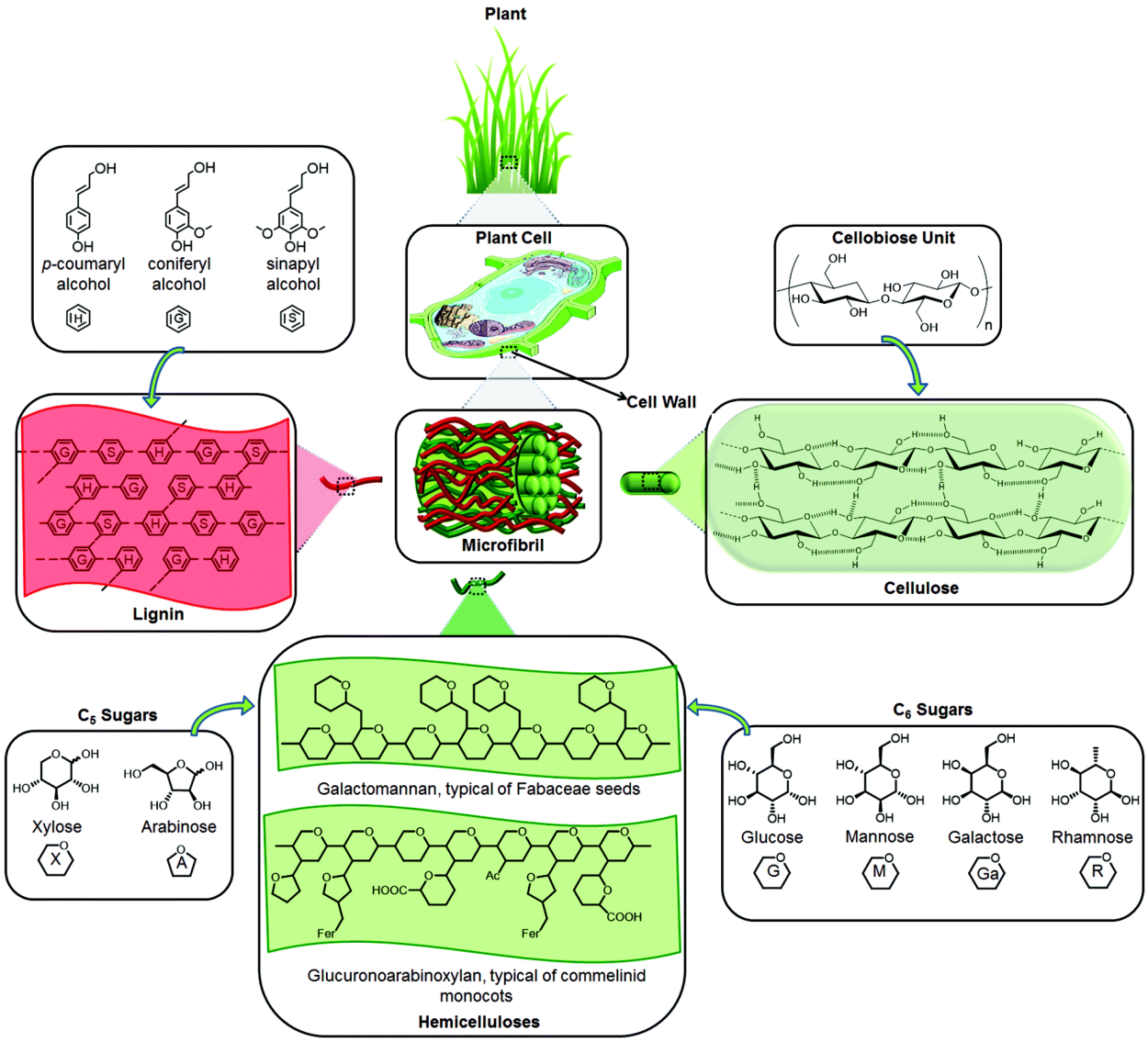
1.3.2. Λιγνοκυτταρινούχα Βιομάζα

Η βιομάζα καθώς και τα παράγωγά της προέρχονται από το διαθέσιμο ατμοσφαιρικό CO_2, μαζί με νερό και ηλιακή ενέργεια, μέσω της φωτοσύνθεσης. Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα είναι η πιο άφθονη και ανανεώσιμη μορφή βιομάζας στη γη, προέρχεται από φυτά, και αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) καθώς και αρωματικά πολυμερή (λιγνίνη). Η εκμετάλλευση της λιγνοκυτταρικής βιομάζας έχει προβλεφθεί ως μια άφθονη ανανεώσιμη πηγή, ουδέτερη από άνθρακα, η οποία μπορεί να μειώσει τις εκπομπές του CO_2, καθώς και την ατμοσφαιρική ρύπανση. Είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση για τον περιορισμό της χρήσης του αργού πετρελαίου, που μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων, βιομορίων και βιοϋλικών[112]. Επιπλέον, το κύριο συστατικό της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, η κυτταρίνη, θεωρείται ότι είναι ο ισχυρότερος δυνητικός υποψήφιος για την αντικατάσταση των πολυμερών με βάση το πετρέλαιο[113,114], λόγω των φιλικών προς το περιβάλλον ιδιοτήτων της, όπως η ανανεωσιμότητα, η βιοσυμβατότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα.

Οι λιγνοκυτταρινικές πρώτες ύλες εμφανίζουν ένα βασικό πλεονέκτημα απέναντι σε άλλες βιομάζες αντίστοιχου τύπου, καθώς μπορούν να απομονωθούν από το μη βρώσιμο τμήμα του εκάστοτε φυτού, επομένως η αξιοποίησή τους δεν επηρεάζει τη παγκόσμια διαθεσιμότητα τροφής[115]. Επίσης, τα δασικά, γεωργικά και αγροβιομηχανικά λιγνοκυτταρικά απόβλητα συσσωρεύονται κάθε χρόνο σε μεγάλες ποσότητες. Η απομάκρυνση αυτών των αποβλήτων είτε ως λίπασμα ή στον χώρο υγειονομικής ταφής μπορεί να προκαλέσει σοβαρά περιβαλλοντικά ζητήματα. Ωστόσο, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας[116]. Από οικονομικής άποψης, η λιγνοκυτταρίκη βιομάζα μπορεί να παραχθεί γρήγορα και με χαμηλότερο κόστος σε σχέση με άλλες γεωργικές πρώτες ύλες οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή βιοκαυσίμων όπως το άμυλο αραβοσίτου, η σόγια και το ζαχαροκάλαμο. Είναι επίσης σημαντικά φθηνότερη από το αργό πετρέλαιο.

Η λιγνοκυτταρίνη έχει εξελιχθεί ώστε να μπορεί να αντισταθεί στην αποδόμηση. Αυτή η εγγενής ιδιότητα των λιγνοκυτταρικών υλικών τα καθιστά ανθεκτικά στην ενζυμική και χημική αποδόμηση[114]. Παρόλο που τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά είναι διαθέσιμα σε μεγάλες ποσότητες και συνήθως σε χαμηλές τιμές, πρόκληση αποτελεί η μετατροπή της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας σε χημικές ενώσεις προστιθέμενης αξίας, με υψηλά ποσοστά σε εκλεκτικότητα και απόδοση, με χαμηλό οικονομικό κόστος[117]. Τα βασικά πολυμερή της λιγνοκυτταρικής βιομάζας είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Μαζί με τα βασικά

πολυμερή, συνυπάρχουν και άλλες ενώσεις που φέρουν ακετυλομάδες, μέταλλα και φαινολικούς υποκαταστάτες. Η δομή της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας αλλά και των συστατικών της φαίνεται στην **Εικόνα 1.13**.



Εικόνα 1.13:Τα βασικά συστατικά και η δομή της λιγνοκυτταρίνης. Το GI, αντιπροσωπεύει το γλυκουρονικό οξύ, ενώ το Fer αντιπροσωπεύει την εστεροποίηση με το φερουλικό οξύ, το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό των ξυλανών σε διάφορα είδη γρασιδιού[118].

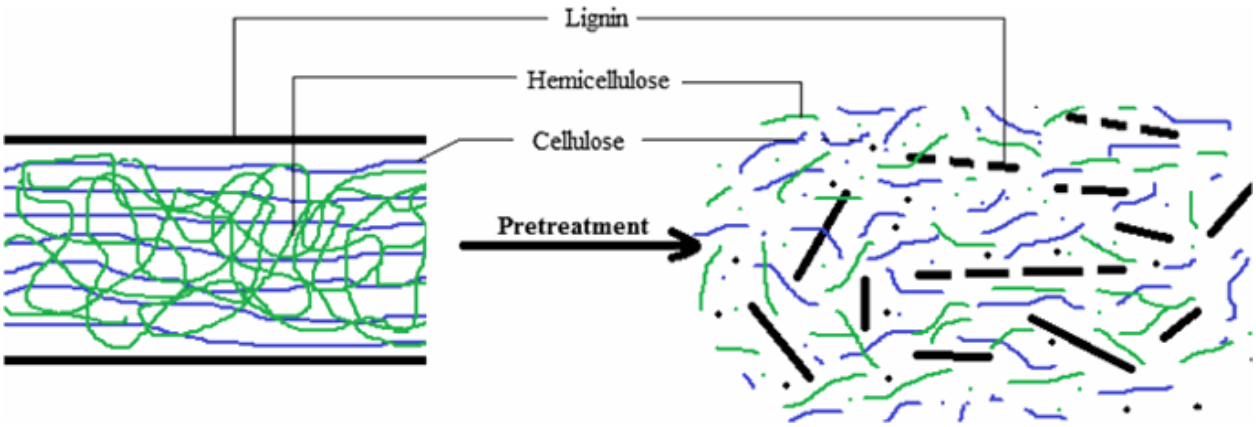
Η λιγνοκυτταρίνη εμφανίζει μια αρκετά περίπλοκη διαμόρφωση, λαμβάνοντας υπ' όψη τα συστατικά που την αποτελούν και τις δομές τους. Οι αλληλεπιδράσεις των τριών πολυμερών είναι έντονες και ποικίλες, και ενώ το κάθε ένα ξεχωριστά συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα προς

την αποδόμηση που παρουσιάζει η λιγνοκυτταρίνη, οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις συνεισφέρουν τα μέγιστα στην εν λόγω ανθεκτικότητα. Η κυτταρίνη με την ημικυτταρίνη συνδέονται στενά μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου[119]. Αντίθετα, η λιγνίνη με την ημικυτταρίνη συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο[120,121]. Γενικά, η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες μέσα στα κυτταρικά τοιχώματα. Η δομή αλλά και η ποσότητα αυτών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων, εμφανίζει μεγάλη ποικιλία, ανάλογα με το είδος, τον ιστό αλλά και το στάδιο ανάπτυξης του εκάστοτε φυτού. Σε γενικές γραμμές, η λιγνοκυτταρική βιομάζα αποτελείται από 35-50% κυτταρίνη, 20-35% ημικυτταρίνη και 10-25% λιγνίνη[118].

1.3.3. Υδρόλυση Λιγνοκυτταρικής Βιομάζας

Βασικό κριτήριο για την αξιοποίηση της λιγνοκυτταρικής βιομάζας είναι η διάσπασή της στα τρία βασικά συστατικά της. Διάφορες μέθοδοι έχουν δοκιμαστεί, αυξάνοντας το τελικό κόστος της διεργασίας και καθιστώντας την ασύμφορη. Η διαδικασία διάσπασης της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης σε μικρότερα θραύσματα, ώστε να είναι ευκολότερη η επεξεργασία, καλείται προεργασία (**Εικόνα 1.14**). Η προεργασία μπορεί να είναι είτε μια φυσική διεργασία, όπως το άλεσμα, θραύση, ή χρήση υπερήχων για τη διάσπαση τη βιομάζας, μπορεί όμως να είναι και μια χημική προεργασία, όπου οξέα, βάσεις ή μια οξειδωτική καύση διασπούν τα μεγάλα πολυμερή σε μικρότερα, σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα. Για τον λόγο αυτό, οι χημικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται σε αρκετές βιομηχανίες. Παρ' όλα αυτά αξίζει να σημειωθεί ότι απαιτούνται υψηλά ποσά ενέργειας, καθιστώντας το κόστος αυτών των διεργασιών ιδιαίτερα υψηλό, ενώ παράλληλα εμφανίζουν κίνδυνο μόλυνσης του περιβάλλοντος λόγω των χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται[122]. Αντιθέτως, η βιολογική προεργασία, εμφανίζει μια ευρεία εφαρμογή, με αυξανόμενο ενδιαφέρον από την βιομηχανία, καθώς τα ποσά ενέργειας που χρειάζονται είναι ιδιαίτερα χαμηλά, δεν απαιτείται η χρήση ισχυρών χημικών ουσιών, δεν αποτελούν κίνδυνο για μόλυνση του περιβάλλοντος και εμφανίζουν υψηλές αποδόσεις. Η βιολογική προεργασία περιλαμβάνει τη χρήση μικροοργανισμών, οι οποίοι αλλάζουν ή αποικοδομούν την λιγνοκυτταρίνη εξωκυτταρικά, με την έκκριση υδρολυτικών ενζύμων (υδρολάσες, κυτταρινάσες, ξυλανάσες κ.ά.), καθώς και λιγνινολυτικά ένζυμα, για τον αποπολυμερισμό της λιγνίνης. Με αυτόν τον τρόπο η δομή του κυτταρικού τοιχώματος ανοίγει, καθιστώντας επιτρεπτή την υδρόλυση των βιοπολυμερών. Στη βιολογική προεργασία, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη συνήθως υδρολύονται σε μονομερή σάκχαρα χρησιμοποιώντας κυτταρολυτικούς και ημικυτταρολυτικούς μικροοργανισμούς[123]. Οι βιοδιεργασίες αυτές μπορεί να

εμφανίζουν μεγαλύτερους χρόνους ολοκλήρωσης της διεργασίας και να είναι δυσκολότερος ο ακριβής έλεγχος της διεργασίας σε κάθε στάδιο, αλλά σε περιπτώσεις όπου ο χρόνος δεν είναι βασική μέριμνα, η βιολογική προεργασία είναι μια οικονομικά συμφέρουσα οικολογική διεργασία[124,125]. Μέχρι τώρα η προεργασία μέσω βιολογικών μεθόδων δεν έχει ερευνηθεί εις βάθος, λόγω του χαμηλού ενδιαφέροντος που έχει επιδείξει η βιομηχανία. Παρ' όλα αυτά, διάφορες ερευνητικές ομάδες πραγματοποιούν μελέτες πάνω στο συγκεκριμένο πεδίο, καθώς αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο τομέα[126].

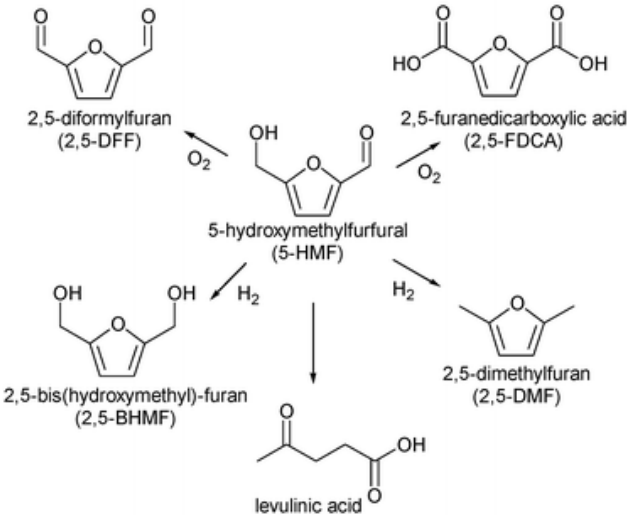


Εικόνα 1.14: Εικονική απεικόνιση προεργασίας της λιγνοκυτταρικής βιομάζας

1.3.4. Παραγωγή Φουρανοϊκών Ενώσεων από Λιγνοκυτταρική Βιομάζα

Μετά την προεργασία που έχει σαν αποτέλεσμα τον αποπολυμερισμό της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης παράγεται γλυκόζη, η οποία μπορεί να αποτελέσει βάση για την παραγωγή πολλών χημικών προστιθέμενης αξίας. Η γλυκόζη μπορεί αξιοποιηθεί από βιοδιυλιστήρια για την παραγωγή βιοκαυσίμων, βιοχημικών ουσιών και βιοπολυμερών. Από τη γλυκόζη ή και τη φρουκτόζη επίσης, μπορεί να παραχθεί η υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF)[127,128]. Αναλυτικότερα, η HMF μπορεί να παραχθεί από υδρόλυση της φρουκτόζης παρουσία διαλυτού ή στερεού όξινου καταλύτη, ακόμα και από γλυκόζη ή και πολυσακχαρίτες μέσω πιο περίπλοκων καταλυτικών συστημάτων[129–132], συνδυάζοντας έτσι τη λογική της κυκλικής οικονομίας, για την παραγωγή ενός πολύ σημαντικού φουρανικού παραγώγου. Η HMF μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα από τα πιο ενδιαφέροντα φουρανικά παράγωγα, καθώς μπορεί πολύ

εύκολα να μετατραπεί σε διάφορες άλλες 2,5-διϋποκατεστημένες φουρανικές ενώσεις, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1.15**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε..

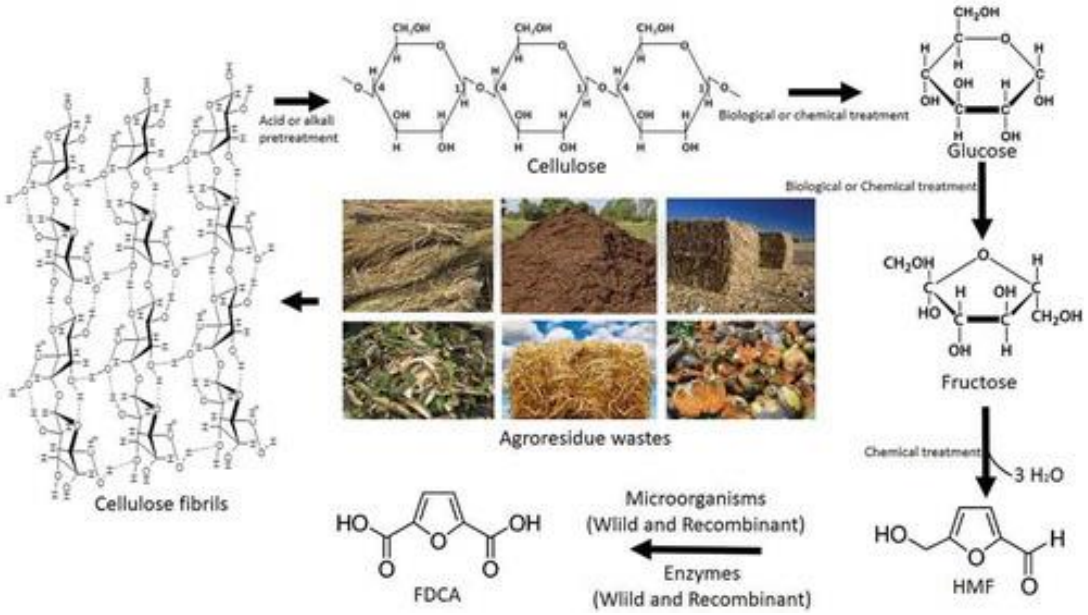


Εικόνα 1.15: Βασικά παράγωγα της HMF[133].

Τα παράγωγα της HMF παρουσιάζουν υψηλό ενδιαφέρον στον τομέα των ανανεώσιμων χημικών ενδιαμέσων, καθώς εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλές δυνατότητες στην αγορά[132]. Άξιο αναφοράς είναι το παράδειγμα της εταιρίας Avantium, η οποία ανέπτυξε ένα μπουκάλι το οποίο έχει παρασκευαστεί από 100% βιοπαραγώμενο πολυαιθυλενο-φουρανοϊκό άλας (PEF)[134]. Από το ίδιο υλικό έχει επίσης παρασκευάσει ίνες και φιλμ, υπό την ονομασία YXY, στα οποία χρησιμοποιήθηκε 2,5-φουρανοδικαρβοξυλικό οξύ (2,5-FDCA) το οποίο προήλθε αποκλειστικά από φυτική ζάχαρη. Η HMF εμφανίζει πολλές δυνατότητες ώστε τα παράγωγά της να αποτελέσουν δομικούς λίθους για μια σειρά πολυμερών. Μια ολοκληρωμένη απεικόνιση της παραγωγής HMF από γλυκόζη και στη συνέχεια 2,5-FDCA, με αρχικό υλικό λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.16**.

Η αρωματική φύση του φουρανικού δακτυλίου επιτρέπει τη σύνθεση συζευγμένων πολυμερών, ιδιαιτέρως για εφαρμογές στην οπτικοηλεκτρονική. Παράλληλα, οι περαιτέρω προσπάθειες για τη σύνθεση, τον χαρακτηρισμό και τις φυσικές ιδιότητες των φουρανικών πολυμερών τα οποία προέρχονται από την HMF, συνεχίζουν να αναπτύσσονται[135]. Νέες έρευνες αναπτύσσονται για μια σειρά φουρανικών μονομερών και τις δυνατότητές τους για πολυμερισμό[136], δίνοντας έτσι ένα ξεκάθαρο μήνυμα ότι τα πολυμερή τα οποία παράγονται

μέσω βιοδιεργασιών και η παραγωγή τους στηρίζεται στις αρχές της κυκλικής οικονομίας. Έτσι, έχουν δικαιολογημένα κεντρίσει το ενδιαφέρον όχι μόνο της ερευνητικής κοινότητας, αλλά πλέον και η βιομηχανία στρέφει το βλέμμα της σε αυτά.



Εικόνα 1.16: Σχηματική απεικόνιση της συνολικής διεργασίας για την παραγωγή του βασικού φουρανικού παραγώγου HMF, με αφετηρία λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα[137].

Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της εσωτερικής συλλογής τρανσαμινασών που διέθετε το εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας σε αντιδράσεις αμίνωσης φουρανικών ενώσεων, και στη συνέχεια η χρήση φουρανικών υποστρωμάτων για την παραγωγή βιοπολυμερών με χρήση επιλεγμένων τρανσαμινασών.

Σε πρώτο στάδιο στόχος ήταν η ανάπτυξη μιας φωτομετρικής μεθόδου μέσω της οποίας θα πραγματοποιούνταν η συγκριτική μελέτη για τις διαθέσιμες τρανσαμινάσες σε σχέση με φουρανικά υποστρώματα ενδιαφέροντος. Σκοπός ήταν να αξιοποιηθούν τυχόν διαφορές στην απορρόφηση που θα εμφανίζονταν μεταξύ των αντιδρώντων και των προϊόντων. Μετά την ανάπτυξη της φωτομετρικής μεθόδου, και με την αξιοποίησή της, θα πραγματοποιούνταν η αξιολόγηση των τρανσαμινασών απέναντι στα διαθέσιμα φουρανικά υποστρώματα, και η επιλογή των ενζύμων τα οποία θα εμφάνιζαν τα πιο θετικά αποτελέσματα.

Τέλος οι τρανσαμινάσες οι οποίες θα παρουσίαζαν τα πιο υποσχόμενα αποτελέσματα, θα χρησιμοποιούνταν για την αμίνωση δύο επιλεγμένων φουρανικών υποστρωμάτων, για να εξεταστούν για τη δυνατότητα παραγωγής βιοπολυμερών. Τα προς μελέτη υποστρώματα οδηγούν δυνητικά σε πολυιμιδικά και πολυαμιδικά προϊόντα. Σκοπός ήταν να ερευνηθούν διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης για το κάθε υπόστρωμα με τις επιλεγμένες τρανσαμινάσες. Αυτό οδήγησε στον καλύτερο σχεδιασμό της βιοδιεργασίας, μέσω της αξιολόγησης των δυνατοτήτων των συγκεκριμένων ενζύμων για την παραγωγή βιοπολυμερών, καθώς και στη βελτιστοποίηση για μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας, ώστε να είναι ανταγωνιστική η διεργασία για βιομηχανική εφαρμογή.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σύνοψη πειραματικών μεθόδων: Στην παρούσα εργασία τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν συμπεριέλαβαν τη μελέτη 17 τρανσαμινασών αμινών, των οποίων τα γονίδια ήταν διαθέσιμα στη συλλογή του εργαστηρίου. Τα γονίδια, ήδη κλωνοποιημένα σε πλασμίδια έκφρασης, χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό χημειοδεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* BL21(DE3). Στην συνέχεια, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό Luria Bertani (LB), και οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος υπερεκφράστηκαν με τη χρήση του κατάλληλου επαγωγέα. Ακολούθως, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, και πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με τη χρήση υπέρηχων για την απελευθέρωση των πρωτεϊνών του κυταροπλάσματος. Τέλος, το υπερκείμενο συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των κυτταρικών θραυσμάτων. Οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος καθαρίστηκαν σε κολώνα συγγένειας και τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης και του καθαρισμού ελέγχθησαν με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Τα ένζυμα τα οποία συλλέχθηκαν μετά τον καθαρισμό, χρησιμοποιήθηκαν για ενζυμικές αντιδράσεις, τα προϊόντα των οποίων ελέγχθηκαν με μια σειρά αναλυτικών μεθόδων.

Όλα τα θρεπτικά μέσα και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 20-30 min. Όλα τα πειράματα παρασκευής καλλιεργειών διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood), ο οποίος είχε προηγουμένως απολυμανθεί με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και αιθανόλη. Τα πειράματα έλαβαν χώρα παρουσία φλόγας.

Ένζυμα

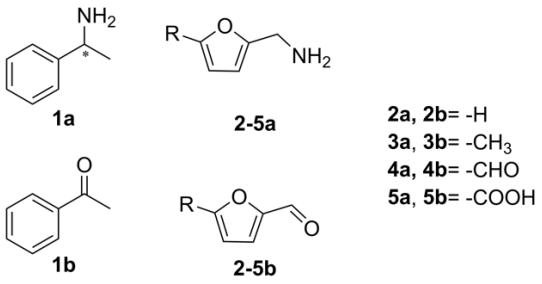
Δεκαεπτά τρανσαμινάσες της συλλογής του εργαστηρίου μελετήθηκαν σε πρώτη φάση για τη διαλογή εκείνων που θα έδιναν τα περισσότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα, για τη χρήση τους στα επόμενα στάδια της μελέτης. Τα ένζυμα παρουσιάζονται στον **Πίνακας 2.1**, ενώ οι αλληλουχίες των γονιδίων και των ενζύμων στο **Παράρτημα Ι**.

Πίνακας 2.1: Οι τρανσαμινάσες αμινών (TA) που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, 15 με (S) εκλεκτικότητα και 3 με (R) εκλεκτικότητα. Αναφέρεται ο οργανισμός προέλευσης, το πλασμίδιο στο οποίο ήταν κλωνοποιημένο το γονίδιο ενδιαφέροντος, το οποίο είναι υπεύθυνο για τον επαγωγέα με τον οποίον επιτυγχάνεται η υπερέκφραση της κάθε TA, καθώς και το αντιβιοτικό διαλογής.

Είδος	**Όνομα**	**Οργανισμός προέλευσης**	**Πλασμίδιο**	**Επαγωγέας**	**Διαλογή**
(*S*)-TA	3FCR_WT	*Ruegeria sp.* TM1040	pET22b	IPTG	Amp
	3FCR_DM	*Ruegeria sp*. TM1040	pET22b	IPTG	Amp
	3FCR_4M_ L382M_G429A	*Ruegeria sp*. TM1040	pET22b	IPTG	Amp
	3FCR_5M	*Ruegeria sp*. TM1040	pET22b	IPTG	Amp
	ATA-3	*Oceanicola granulosus*	pET22b	IPTG	Amp
	ATA-5	*Xanthobacteraceae*	pET22b	IPTG	Amp
	ATA-6	*Rhodobacteraceae* HTCC2150	pET22b	IPTG	Amp
	ATA-7	*Martelella mediterranea* DSM 17316	pET22b	IPTG	Amp
	ATA-8	*Rugeria pomeroyi* DSS-3	pET22b	IPTG	Amp
	ATA-9	*Sagittula stellata* E-37	pET22b	IPTG	Amp
	Vibflu	*Vibrio fluvialis*	pET24b	IPTG	Kan
	3I5T	*Rhodobacter sphaeroides*	pET22b	IPTG	Amp
	3HMU	*Ruegeria pomeroyi*	pET22b	IPTG	Amp
	ChrVio	*Chromobacterium violaceum*	pET28b	IPTG	Kan
(*R*)-TA	JanSp	*Jannaschia sp.*	pET22b	IPTG	Amp
	GamPro	*Gamma-proteobacterium*	pGASTON	Rhamnose	Amp
	LabAle	*Labrenzia alexandrii*	pGASTON	Rhamnose	Amp

2.1. Υποστρώματα

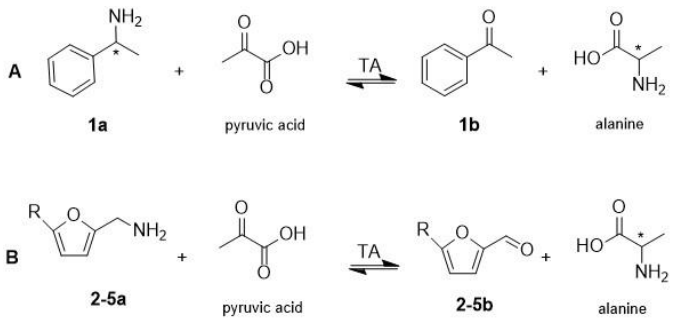
Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα υποστρώματα που παρουσιάζονται στο **Σχήμα 2.1**:



Σχήμα 2.1: Οι αμίνες ενδιαφέροντος: 1-φαινυλαιθυλαμίνη (1-PEA, **1a**), φουρφουρυλαμίνη (**2a**), 5-μεθυλο-φουρφουρυλαμίνη (**3a**), 5-αμινοφουραν-2-καρβαλδεΰδη (**4a**) και 5-αμινομεθυλ-φουραν-2-καρβοξυλικό οξύ (**5a**), οι οποίες παράγονται από την αμίνωση των αντίστοιχων κετονών/αλδεϋδών: ακετοφαινόνη (**1b**), φουρφουράλη (**2b**), 5-μεθυλοφουρφουράλη (**3b**), φουραν-2,5-δικαρβαλδεύδη (**4b**) και 5-φορμυλφουραν-2-καρβοξυλικό οξύ (**5b**).

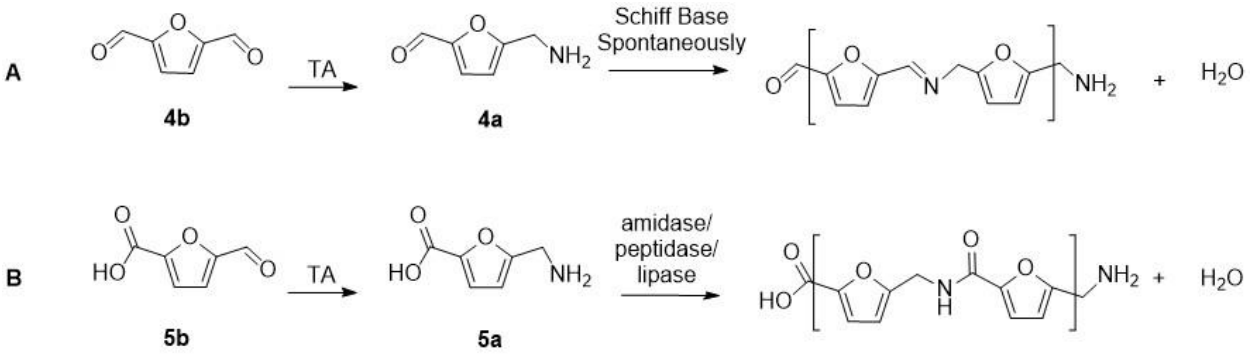
Η σύνθεση των ενώσεων **2a, 2b, 3a** και **3b** πραγματοποιήθηκε από μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του κ. Γ. Βασιλικογιαννάκη, (Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης), ενώ η ταυτοποίηση της δομής τους πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Τα φάσματα NMR παρατίθενται στο **Παράρτημα ΙΙ** που συνοδεύει την παρούσα εργασία. Η 1-φαινυλαιθυλαμίνη (98%) (**1a**) και η ακετοφαινόνη (99%) (**1b**) αγοράστηκαν από την εταιρία Alfa Aesar. Οι ενώσεις **4b** και **5b** αγοράστηκαν από τις εταιρίες TCI και Sigma Aldrich αντίστοιχα.

Η αμίνη **1a** χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα αναφοράς, λόγω της επιβεβαιωμένης βιβλιογραφικά αποδοχής της ως υπόστρωμα από όλες τις τρανσαμινάσες ενδιαφέροντος, και της δυνατότητας φωτομετρικής παρακολούθησης της ενζυμικής δραστικότητας μέσω της μετατροπής της αμίνης **1a** στην κετόνη **1b**[138–140], όπως παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2.2Α**. Στην παρούσα εργασία αναπτύχτηκε πρωτόκολλο φωτομετρικού ελέγχου ενεργότητας των τρανσαμινασών με φουρανοειδή υποστρώματα χρησιμοποιώντας τις αμίνες **2a** και **3a** με δέκτη της αμινο-ομάδας τους το πυροσταφυλικό οξύ (**Σχήμα 2.2Β**).



Σχήμα 2.2: A: Μετατροπή του **1a** στο **1b**, αντίδραση αναφοράς στην οποία βασίζεται και η φωτομετρική μέθοδος μέτρησης ενεργότητας κατά Schätzle et al.[141] **B**: Μετατροπή των φουρανικών αμινών στις αντίστοιχες αλδεΰδες. Η ανάπτυξη του φωτομετρικού πρωτοκόλλου μέτρησης έγινε με τις αμίνες **2a** και **3a**.

Τα υποστρώματα **4b** και **5b** επιλέχθηκαν με σκοπό την αντίδρασή τους με επιλεγμένες τρανσαμινάσες και τη σύνθεση πολυμερών, αξιοποιώντας ως δότη αμινομάδας την ισοπροπυλαμίνη (IPA). Οι αντιδράσεις που σχεδιάστηκαν παρουσιάζονται στο **Σχήμα 2.3**.



Σχήμα 2.3: Αντιδράσεις που σχεδιάστηκαν για την παραγωγή βιοπολυμερών με πρώτο στάδιο την τρανσαμίνωση των αλδεϋδών **4b** και **5b**. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε βασικό pH, επομένως στην περίπτωση **A**, ευνοείται η αυθόρμητη δημιουργία βάσης Schiff για την σύνθεση ιμινικού πολυμερούς. Στην περίπτωση **B**, η αμίνη που συντίθεται, μπορεί να χρησιμοποιηθεί από ένα δεύτερο ένζυμο για να οδηγήσει στη σύνθεση πολυαμιδίων.

Διαλύτες και Λοιπά Αντιδραστήρια

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO), από την εταιρία Sigma Aldrich καθώς επίσης και απιονισμένο νερό του εργαστηρίου Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Χημείας. Παράλληλα για τη μελέτη οργανικών ενώσεων μέσω της τεχνικής NMR, χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (Chloroform-d_1 + Ag) από την εταιρία Deutero.

Για την παρασκευή των θρεπτικών μέσων χρησιμοποιήθηκε χλωριούχο νάτριο (NaCl), από την εταιρία Riedel- de Haën καθώς και εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) και πεπτόνη από καζεΐνη (Peptone from casein) από τις CONDA lab και SERVA αντίστοιχα.

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η καναμυκίνη (Kanamycin) και αμπικιλλίνη (Ampicillin) από την Sigma-Aldrich, και οι επαγωγείς ισοπρόπυλο-b-D-θειογαλακτοπυρανοζίτης (IPTG), SERVA και μονοϋδρίτης της L-(+)-ραμνόζης 99%, Alfa Aesar.

Κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, μια πληθώρα αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε, για την παρασκευή τόσο των ρυθμιστικών διαλυμάτων ανόδου και καθόδου, όσο και για την προετοιμασία της πηκτής και την χρώση αυτής. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ακρυλαμίδιο (Acrylamide), δις-ακρυλαμίδιο (Bis-acrylamide), τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), βάση trizma (Tris), γλυκερίνη, θειικό δωδεκύλιο νάτριο (SDS), υπερθειικό αμμώνιο (APS) και 1-βουτανόλη, από την εταιρία Sigma Aldrich. Επίσης χρησιμοποιήθηκε 2,2,2-τριχλωροαιθανόλη 99% (TCE) από την Alfa Aesar. Το TCE χρησιμοποιήθηκε για χρώση και παρατήρηση των πρωτεϊνών σε τράπεζα UV μετά την ηλεκτροφόρηση. Προστίθεται κατά την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού, και επιτρέπει την άμεση παρατήρηση της πηκτής χωρίς την διαδικασία χρώσης και αποχρωματισμού. Επίσης, η χρωστική Serva Blue G, της εταιρίας SERVA καθώς και μερκαπτοαιθανόλη από την Fluka Biochemika.

Για την ρύθμιση του pH χρησιμοποιήθηκε υδροξείδιο του νατρίου καθώς και υδροχλωρικό οξύ από την εταιρία Sigma Aldrich, σε υδατικά διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων (0.05-10 M).

Παράλληλα, μια σειρά αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή διαφόρων ρυθμιστικών διαλυμάτων, όπως 2-[4-(2-υδροεξυαιθυλο)πιπεραζιν-1-ϋλο] αιθανοσουλφονικό οξύ (HEPES), από την εταιρία Carl ROTH, καθώς και N-κυκλοεξυλο-2-αμινοαιθανοθειικό οξύ (CHES), από την BDH Chemicals Ltd και φωσφορικό κάλιο και μονόξινο φωσφορικό κάλιο από την Carl Roth. Άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της

ενζυμικής αντίδρασης ήταν άλας νατρίου του πυροσταφυλικού οξέος (pyruvate acid-Na salt) από τη SERVA καθώς και μονοϋδρίτης της 5-φωσφορικής πυριδοξάλης 98% (PLP) από την Alfa Aesar.

Παρασκευή Ρυθμιστικών Διαλυμάτων

Ως ρυθμιστικό ορίζεται ένα υδατικό διάλυμα το οποίο αποτελείται από ασθενές οξύ και το συζυγές του άλας ή από ασθενή βάση και το συζυγές της άλας, και έχει την ιδιότητα να διατηρεί σταθερό το pH του παρά την προσθήκη μικρής αλλά υπολογίσιμης ποσότητας ισχυρού οξέος ή βάσης. Μια πληθώρα ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη, καθώς αποτελούσαν το μέσο πραγματοποίησης της ενζυμικής αντίδρασης. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ρυθμιστικά διαλύματα:

Α) Για τον φωτομετρικό προσδιορισμό:

- HEPES (50 mM, pH 7.5) με ή χωρίς PLP 0.1 mM
- CHES (50 mM, pH 9.0) με ή χωρίς PLP 0.1 mM

Β) Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες:

- Βάση Trizma (Tris) -HCl 150 mM, pH 7.5
- Tris-HCl 3 M, pH 8.45
- Διάλυμα ανόδου (10x): Tris 1 M, pH 8.9

Γ) Για την πραγματοποίηση των ενζυμικών αντιδράσεων, για την παραγωγή πολυμερών:

- Potassium Phosphate (50 mM, pH 7.0)
- Potassium Phosphate (50 mM, pH 8.0)
- CHES (50 mM, pH 9.0)

Η παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με διάλυση της απαιτούμενης ποσότητας άλατος (HEPES/CHES/Tris/Potassium Phosphate) σε ποσότητα απιονισμένου νερού και ρύθμιση του pH με κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματα HCl (12 M, 6 M, 1 M και 0,1 M) για μείωση του pH, ή NaOH (10 M, 1 M και 0.1 M) για αύξηση του pH αντίστοιχα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συμπλήρωση του όγκου του διαλύματος με

απιονισμένο νερό μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Στην περίπτωση των διαλυμάτων για την πραγματοποίηση ενζυμικών αντιδράσεων (κατηγορία Γ) με ισοπροπυλαμίνη (IPA), δεδομένου ότι η IPA λειτουργεί ως βάση και επηρεάζει σημαντικά το pH, παρήχθησαν τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα με 1 M IPA, και για να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση IPA αναμιγνυόταν κατάλληλες ποσότητες από αυτό το stock διάλυμα στο αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να επέλθει η κατάλληλη αραίωση.

Κατασκευή Πρότυπης Καμπύλης Αναφοράς

Για την ανάπτυξη μίας φωτομετρικής μεθόδου με τις φουρανοειδείς ενώσεις, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε το εύρος των τιμών που αναμένουμε από τις μετρήσεις, καθώς και τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης, ώστε να μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Καθώς η αρχική ενεργότητα των ενζύμων τυπικά μετράται έως 5-10 % απόδοση, δημιουργήθηκαν αντίστοιχες πρότυπες καμπύλες αναφοράς για κάθε ζεύγος αμίνης-κετόνης/αλδεΰδης. Οι μετρήσεις έγιναν σε ρυθμιστικά διαλύματα HEPES και CHES (βλ. «Πρωτόκολλο παρασκευής ρυθμιστικών διαλυμάτων») με διαφορετική αναλογία για τα ζεύγη των ενώσεων **1**, **2**, **3.** Καθώς η ουσία που απορροφά στο αντίστοιχο μήκος κύματος είναι η καρβονυλική ένωση η οποία προέρχεται από την απαμίνωση της αντίστοιχης αμίνης (**Σχήμα 2.2**), και εφόσον η αρχική συγκέντρωση της αμίνης στις μετρήσεις σχεδιάζεται να είναι 1 mM, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις έως συγκεντρώσεις 0.1 M της καρβονυλικής ένωσης ενδιαφέροντος (10% απόδοση). Επιπλέον, τα δείγματα μετρήθηκαν σε φωτόμετρο μικροπλακών 96 θέσεων, με τελικό όγκο 200 μL (μήκος διαδρομής: 0,627 cm), όπως και στις σχεδιαζόμενες αντιδράσεις. Για την υποβοήθηση της διαλυτοποίησης των αρωματικών και φουρανοειδών υποστρωμάτων, χρησιμοποιήθηκε σε κάθε δείγμα 5% (v/v) DMSO. Για αυτό δημιουργήθηκαν 20x πυκνότερα δείγματα αντιδρώντων σε DMSO, ώστε πάντα να προστίθεται η ίδια ποσότητα οργανικού διαλύτη στο ρυθμιστικό διάλυμα. Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στον όγκο των 200 μL παρουσιάζονται στον **Πίνακας 2.2**.

Σημειώνεται ότι τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο κατασκευής προτύπων καμπυλών των ενώσεων **2b** και **3b** ήταν HEPES (50 mM, pH 7.5) με 0.1 mM PLP, και CHES (50 mM, pH 9.0) με 0.1 mM PLP. Αντιθέτως, στην περίπτωση της ένωσης **1b** χρησιμοποιήθηκε HEPES και CHES απουσία PLP λόγω της παρατηρούμενης αυξημένης απορρόφησης του τελευταίου στα 245 nm.

Πίνακας 2.2: Συγκέντρωση των καρβονυλικών ενώσεων **1b**, **2b** και **3b** για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Η αναλογία ρυθμιστικού διαλύματος-πυκνού διαλύματος ήταν 19:1, ώστε στο τελικό διάλυμα να υπάρχει 5% συνδιαλύτης, και διατηρήθηκε σταθερή σε όλες.

C_{final} **1-3b (mM)**	**C πυκνού διαλύματος σε DMSO (mM)**
0.000	0.00
0.005	0.04
0.01	0.2
0.02	0.4
0.03	0.6
0.04	0.8
0.06	1.2
0.08	1.6
0.1	2.0

Παρασκευη Θρεπτικού Υλικού Luria Bertani

Το θρεπτικό υλικό Luria Bertani (LB), αποτελεί ένα μέσο για την ανάπτυξη και καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων. Παρασκευάζεται σύμφωνα με τον **Πίνακας 2.3**. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 20 min. Τα αντιβιοτικά για την διαλογή προστίθενται από αποστειρωμένα πυκνά διαλύματα 1000x (100 mg/mL αμπικιλλίνης ή 50 mg/mL καναμυκίνης), υπό στείρες συνθήκες, μετά την αποστείρωση και αφού η θερμοκρασία έχει πέσει κάτω από τους 60 °C (**Πίνακας 2.7**).

Πίνακας 2.3: Συστατικά και συγκεντρώσεις για την παρασκευή θρεπτικού υλικού LB. Τα υλικά διαλύονται σε απιονισμένο νερό. * Άγαρ προστίθεται για θρεπτικό υλικό LB που επιστρώνεται σε τρυβλία Petri.

Συστατικά	**Συγκέντρωση (w/v)**
Εκχύλισμα Ζύμης	0.5 %
Τρυπτόνη	1.0 %
Χλωριούχο Νάτριο	1.0 %
Άγαρ *	1.5 %

Παρασκευή LB-soc 10χ

Το LB-SOC είναι ένα βακτηριακό θρεπτικό μέσο πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και πρόσθετη γλυκόζη. Η αναγέννηση κυττάρων *E. coli* σε αυτό το θρεπτικό υλικό μετά από το σοκ του μετασχηματισμού έχει σαν αποτέλεσμα υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης και αντίστοιχα υψηλότερα ποσοστά επιτυχούς μετασχηματισμού. Τα υλικά που απαιτούνται για την παρασκευή των αλάτων SOC παρουσιάζονται στον **Πίνακας 2.4**, τα οποία διαλυτοποιούνται σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB. Μετά την παρασκευή του, το διάλυμα υπέστη αποστείρωση με φίλτρο 0.2 μm. Ύστερα, κάτω από στείρες συνθήκες, το διάλυμα SOC 10x αραιώνεται σε LB (π.χ. 1 mL διαλύματος αλάτων SOC, προστίθενται σε 9 mL θρεπτικού μέσου LB).

Πίνακας 2.4: Συστατικά και συγκεντρώσεις για την παρασκευή διαλύματος SOC 10x.

Component	**Molarity (mM)**
Χλωριούχο Κάλιο (KCl)	25
Χλωριούχο Μαγνήσιο ($MgCl_2$)	100
Θειικό Μαγνήσιο ($MgSO_4$)	100
Γλυκόζη	200

Χημειοδεκτικα Κυτταρα *E. coli*

Τα δεκτικά κύτταρα είναι κύτταρα τα οποία έχουν την δυνατότητα να δεχτούν ένα επιθυμητό πλασμίδιο με κατάλληλο χειρισμό. Για την παραγωγή χημειοδεκτικών κυττάρων απαιτούνται τα διαλύματα RF1 (

Πίνακας 2.5) και RF2 (**Πίνακας 2.6**).

Πίνακας 2.5: Συστατικά και συγκεντρώσεις διαλύματος RF1. Μετά την προετοιμασία του διαλύματος, το pH ρυθμίζεται στο 5.8 με χρήση διαλύματος CH_3COOH (0.2 M). Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρα 0.2 μm.

Συστατικό	**Συγκέντρωση (mM)**
Χλωριούχο Ρουβίδιο (RbCl)	100
Χλωριούχο Μαγγάνιο ($MnCl_2$)	50
Οξικό Κάλιο (CH_3COOK)	30
Χλωριούχο Ασβέστιο ($CaCl_2$)	10
Γλυκερίνη	15% (v/v)

Πίνακας 2.6: Συστατικά και συγκεντρώσεις διαλύματος RF2. Μετά την προετοιμασία του διαλύματος, το pH ρυθμίζεται στο 7.0 με χρήση διαλύματος NaOH. Ακολούθως, το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρα 0.2 μm.

Συστατικό	**Συγκέντρωση (mM)**
Χλωριούχο Ρουβίδιο (RbCl)	10
3-μορφολινοπροπάνιο- 1- σουλφονικό οξύ (MOPS)	10
Χλωριούχο Ασβέστιο ($CaCl_2$)	75
Γλυκερίνη	15% (v/v)

Τέσσερα mL υγρού θρεπτικού υλικού LB εμβολιάστηκαν με ~50 μL από το δείγμα γλυκερίνης της επιθυμητής κυτταρικής σειράς και επωάστηκαν ολονυκτίως (14-16 ώρες) στους 37 °C, με ανάδευση στα 270 rpm (Infors HT Minitron/Multitron). Την επόμενη ημέρα, 1 mL από την καλλιέργεια του επιθυμητού στελέχους, μεταφέρθηκε σε 100 mL υγρού θρεπτικού υλικού LB, και η νέα καλλιέργεια αναπτύχθηκε στους 37 °C για περίπου 4 h, έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600 nm (OD_{600}) να φτάσει σε εύρος τιμών OD_{600} = 0.3-0.5. Η οπτική πυκνότητα στο συγκεκριμένο μήκος κύματος σχετίζεται με την θολερότητα, και αποτελεί μια ένδειξη για την πορεία ανάπτυξης των κυττάρων. Η καλλιέργεια επωάστηκε σε πάγο για 15 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 20 min σε 3112x*g*, και θερμοκρασία 4 °C. Στο τέλος της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 20 mL διαλύματος RF1. Τα κύτταρα επανατοποθετήθηκαν σε πάγο για 15 min. Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλήφθηκε, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε ξανά, και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 mL διαλύματος RF2. Τέλος, το διάλυμα επωάστηκε σε παγόλουτρο για 15 min, και στη συνέχεια το διάλυμα με τα δεκτικά κύτταρα μοιράστηκε σε φιαλίδια Eppendorf χωρητικότητας 1.5 mL με ποσότητα διαλύματος 50 μL στο κάθε ένα. Τα φιαλίδια καταψύχθηκαν με υγρό άζωτο ή μείγμα ξηρού πάγου- αιθανόλης άμεσα κατά τον διαμοιρασμό τους και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80 °C.

Πρωτόκολλο Μετασχηματισμού Χημειοδεκτικών Κυττάρων

Το πρωτόκολλο του μετασχηματισμού χρησιμοποιείται για να εισαχθούν επιθυμητά πλασμίδια σε δεκτικά κύτταρα. Παράλληλα με τις επιθυμητές ιδιότητες, τα πλασμίδια προσφέρουν στα μετασχηματισμένα κύτταρα και αντοχή σε επιλεγμένα αντιβιοτικά, πράγμα που βοηθάει στην μετέπειτα επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Αρχικά, τα δεκτικά κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πάγο για 10 min. Ένα μL, το οποίο περιέχει ποσότητα 1 pg-100 ng πλασμιδιακού DNA, προστέθηκε στο μείγμα των κυττάρων και ανακινήθηκε ελαφρώς. Το μείγμα τοποθετήθηκε σε πάγο για 30 min. Ακολούθησε θερμικό σοκ για 30 s στους 42 °C και το διάλυμα επανατοποθετήθηκε αμέσως σε πάγο για 2 min. Στη συνέχεια, 1 mL LB-SOC προστέθηκε στο δείγμα. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C υπό ισχυρή ανάδευση για τουλάχιστον 60 min. Τέλος, το κυτταρικό μείγμα αναδεύεται, και 50-100 μL επιστρώθηκαν σε τρυβλίο Petri με στερεό θρεπτικό μέσο LB και το επιλεγμένο αντιβιοτικό (**Πίνακας 2.1** και **Πίνακας 2.7**). Το τρυβλίο αναπτύχθηκε στους 37 °C ολονυκτίως και μετά αποθηκεύτηκε στους +4 °C έως και για ένα μήνα.

Stock Γλυκερίνης

Μετά την πραγματοποίηση κάθε επιτυχημένου μετασχηματισμού, παρασκευάστηκαν προκαλλιέργειες από μονοκλωνικές αποικίες και αναπτύχθηκαν ολονύκτια σύμφωνα με τις συνθήκες που παρουσιάζονται στην **Παράγραφο 0**. Την επόμενη ημέρα, παρασκευάστηκε το δείγμα κυττάρων σε γλυκερίνη (stock γλυκερίνης) με προσθήκη 1 mL καλλιέργειας σε 1 mL υδατικού διαλύματος γλυκερίνης 60% v/v, κάτω από στείρες συνθήκες. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι την χρήση τους.

Καλλιέργεια Κυττάρων- Υπερέκφραση Πρωτεϊνών

Η καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων απαιτεί 2 εργαστηριακές ημέρες. Αρχικά παρασκευάστηκε προκαλλιέργεια σε 5 mL θρεπτικού μέσου LB, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο αντιβιοτικό για το εκάστοτε στέλεχος. Για το βήμα αυτό, λήφθηκε μονοκλωνική αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli*, ή 10 μL από αποθηκευμένα κύτταρα σε stock γλυκερίνης, υπό στείρες συνθήκες. Η θερμοκρασία που αναπτύχθηκε η προκαλλιέργεια ήταν 30 °C για 16 h, με ανάδευση σε 270 rpm.

Την επόμενη ημέρα, μεταφέρθηκε όγκος από την προκαλλιέργεια σε φρέσκο υγρό θρεπτικό LB, και η ποσότητα που μεταφέρθηκε ήταν ίση με το 1% του τελικού όγκου της καλλιέργειας. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε υπό στείρες συνθήκες. Η υγρή καλλιέργεια αναπτύχθηκε στους 37 °C, υπό συνεχή ανάδευση 270 rpm, έως ότου η οπτική πυκνότητα έφτασε το εύρος OD_{600}= 0.6-0.8. Μόλις επιτεύχθηκε η επιθυμητή οπτική πυκνότητα, η υγρή καλλιέργεια αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στην συνέχεια τοποθετήθηκε ο

κατάλληλος επαγωγέας για το κάθε στέλεχος (**Πίνακας 2.1** και **Πίνακας 2.7**). Ακολούθησε περαιτέρω επώαση της καλλιέργειας στους 20 °C, για 16-18 h, υπό ανάδευση 270 rpm. Οι συγκεντρώσεις από τα stock αντιβιοτικών και επαγωγέων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι τελικές του συγκεντρώσεις στις υγρές καλλιέργειές παρουσιάζονται στον **Πίνακας 2.7**.

Πίνακας 2.7: Συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών και των επαγωγέων που χρησιμοποιήθηκαν.

Συστατικό	**Συγκέντρωση πυκνού διαλύματος (Stock)**	**Τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια**
Καναμυκίνη	50 mg/mL	50 μg/mL
Αμπικιλίνη	100 mg/mL	100 μg/μL
IPTG	0.1 M	0.2 mM
Μονοϋδρίτης της L-(+)-ραμνόζης	20 % w/v	0.2 % w/v

Συλλογή Βακτηριακών Κυττάρων

Μετά το πέρας του χρόνου επαγωγής (**Παράγραφος 0**), πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταρικής ανάπτυξης μέσω μέτρησης της τιμής OD_{600}. Αρχικά, σε σωληνάριο τύπου Falcon 50 mL, μεταφέρθηκε όγκος καλλιέργειας που αντιστοιχεί σε κυτταρική πυκνότητα ίση με $10/OD_{600}$, και φυγοκεντρήθηκε σε υπερφυγόκεντρο (Hereaus Biofuge Fresco), σε 9000 rpm για 10 min και θερμοκρασία 20 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.5, 50 mM) και επαναλήφθηκε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Ακολούθησε απόχυση του υπερκειμένου και αποθήκευση του κυτταρικού ιζήματος στους -20 °C. Το δείγμα αυτό της βιομάζας χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση.

Η υπόλοιπη ποσότητα της υγρής καλλιέργειας, ομοίως μοιράζεται σε ίσους όγκους σε δοχεία κατάλληλα της υπερφυγοκέντρου (Hereaus Biofuge Fresco). Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 9.000 rpm, για 10 min σε θερμοκρασία 20 °C, και απόχυση του υπερκειμένου. Το κυτταρικό ίζημα απομονώνεται και αποθηκεύεται στους -20 °C.

Λύση Βακτηριακών Κυττάρων Μέσω Υπερήχων

Για τη λύση των βακτηριακών κυττάρων με σκοπό τη συλλογή της επιθυμητής κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης, τα αποθηκευμένα κυτταρικά ιζήματα τόσο των 10/OD_{600} (**Παράγραφος 0**), όσο και των υγρών καλλιεργειών, επαναιωρήθηκαν σε φιαλίδιο Eppendorf 1.5 mL, και falcon 50 mL αντίστοιχα. Το ίζημα το οποίο προερχόταν από το 10/$OD_{600,}$ διαλυτοποιήθηκε σε 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ή HEPES (50 mM, pH 8.0) με 0.1 mM PLP, ενώ το ίζημα της υγρής καλλιέργειας 500 mL, σε 5- 10 mL των αντίστοιχων φωσφορικών διαλυμάτων. Η διάσπαση του ιζήματος πραγματοποιήθηκε με συσκευή υπερήχων που έφερε βελόνα (**Εικόνα 2.17**). Ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο διαλυτοποιείται το κυτταρικό ίζημα προτιμάται να είναι σε χαμηλές τιμές σε σχέση με το στερεό, για την καλύτερη λύση των κυττάρων.

Οι παράμετροι λειτουργίας της συσκευής υπερήχων για ένταση και συχνότητα ρυθμίστηκαν αντίστοιχα σε τιμές 60% και 0.6. Ανάλογα την ποσότητα του κυτταρικού ιζήματος προς λύση, επιλεγόταν και αντίστοιχου μεγέθους βελόνα. Ενδεικτικά σε ποσότητες μέχρι ~1 g κυτταρικού ιζήματος, χρησιμοποιούταν βελόνα μεσαίου μεγέθους. Η λύση των κυττάρων διαρκούσε ένα λεπτό, με το φιαλίδιο Eppendorf ή το falcon να είναι εμβαπτισμένο σε παγόλουτρο. Ακολούθως, η συσκευή απενεργοποιήθηκε και το δείγμα παρέμενε σε πάγο για δύο λεπτά για τη μείωση της θερμοκρασίας του. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιούνταν τρεις φορές για κάθε κυτταρικό ίζημα. Η βελόνα πριν την αρχική χρήση, αλλά και στις ενδιάμεσες λύσεις, απολυμάνθηκε με αιθανόλη 70%. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε φυγόκεντρο Hereaus Biofuge Fresco για 10 min σε συνθήκες 4 °C, 13000 rpm. Στη συνέχεια το υπερκείμενο, στο οποίο περιέχονται οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος, μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο Eppendorf και αποθηκεύτηκε στους 4 °C. Στην περίπτωση του ιζήματος, το οποίο προερχόταν από μεγάλους όγκους, η φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε στην υπερφυγόκεντρο Hereaus Biofuge Fresco, στα 9.000 rpm, για 10 min σε θερμοκρασία 12 °C. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε απόχυση και εκ νέου συλλογή του υπερκειμένου σε falcon 50 mL, το οποίο αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

Εικόνα 2.17: Πειραματική διάταξη της συσκευής υπερήχων που φέρει βελόνα (sonicator).

Καθαρισμός Πρωτεΐνης

Για τον καθαρισμό των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας, καθώς όλα τα ένζυμα στα οποία πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με τη συγκεκριμένη μέθοδο, διέθεταν στο αμινο- ή καρβοξυ-τελικό άκρο έξι ιστιδίνες (6His-tag). Ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της πλευρικής αλυσίδας της ιστιδίνης έχει την ικανότητα να δρα ως δότης ηλεκτρονίων προς το μεταλλοϊόν-δέκτη ηλεκτρονίων, το Ni^{+2} (ή Co^{+2}), που είναι ακινητοποιημένο στη στήλη. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε είτε με βαρυτική ροή (gravity flow) σε στήλες με ελεύθερα σωματίδια Ni-NTA από την εταιρία QIAGEN, είτε σε σύστημα γρήγορης υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC), μοντέλο ÄKTA start (εργαστήριο κ. Βελώνια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών), με προ-πακεταρισμένη κολώνα Ni-NTA.

Κατά τον καθαρισμό με κολώνα Ni-NTA με φυσική ροή, μια κολώνα όγκου 20 mL η οποία περιείχε ~2 mL υλικό διαχωρισμού εκπλύθηκε με dH_2O και στη συνέχεια με 3 πλύσεις των 5 mL από το διάλυμα λύσης των κυττάρων, για εξισσορόπηση (διάλυμα HEPES 50 mM, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.1 mM PLP και 10 mM ιμιδαζόλιο). Το υπερκείμενο το οποίο περιέχει την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη διερχόνταν πρώτα από φίλτρο 0.2 nm για προστασία της στήλης, και έπειτα εισαγόταν στην κολώνα για τον διαχωρισμό της από τις λοιπές πρωτεΐνες. Οι τρανσαμινάσες λόγω του PLP που έχουν δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο εμφανίζουν ένα έντονο

κίτρινο χρώμα, το οποίο ανιχνεύεται οπτικά και ο χρήστης μπορεί να παρακολουθήσει τη δέσμευση της πρωτεΐνης στη στήλη και την επακόλουθη έκλουση. Ακολουθεί πλύση της κολώνας με 10 mL διάλυμα έκπλυσης (διάλυμα HEPES 50 mM, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.1 mM PLP και 25 mM ιμιδαζόλιο) και τέλος έκλουση της πρωτεΐνης με 7 πλύσεις από 1.5 mL διαλύματος έκλουσης (διάλυμα HEPES 50 mM, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.1 mM PLP και 300 mM ιμιδαζόλιο). Κατά την έκλουση συλλέχθηκαν 4 κλάσματα του 1.5 mL με έντονο κίτρινο χρώμα, τα οποία περιείχαν την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη. Από το δείγμα της καθαρισμένης πρωτεΐνης, το δείγμα των μη προσδεδεμένων πρωτεϊνών από την φόρτωση της στήλης (flow-through) και το δείγμα ξεπλύματος της στήλης συλλέγονταν 40 μL για την παρακολούθηση της πορείας του καθαρισμού, μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Μετά το πέρας του καθαρισμού, η κολώνα ξεπλύθηκε αρχικά με διάλυμα έκλουσης, έπειτα με απιονισμένο νερό και αποθηκεύεται σε διάλυμα αιθανόλης 20%.

Τα 4 κλάσματα με το τελικό έκλουσμα συμπυκνώθηκαν και τοποθετήθηκαν σε φυγοκεντρικά φίλτρα τύπου amicon με μεμβράνη πόρων ανάλογα με την πρωτεΐνη προς καθαρισμό. Τα φίλτρα συμπληρώθηκαν αρχικά με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα για ενεργοποίηση των μεμβρανών. Στην περίπτωση των τρανσαμινασών, χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα τα οποία επέτρεπαν τη διέλευση μορίων μικρότερων των 30 KDa. Όλες οι τρανσαμινάσες τις εσωτερικής συλλογής του εργαστηρίου διέθεταν μέγεθος μεταξύ 33- 53 KDa, το οποίο εξασφάλιζε την παραμονή τους στο εσωτερικό τμήμα του φίλτρου. Πραγματοποιήθηκαν φυγοκεντρήσεις στην υπερφυγόκεντρο Hereaus Biofuge Fresco, στα 6.500 rpm, για 10 min σε θερμοκρασία 12 °C με σκοπό τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε όγκο 1-2 mL. Κατά τη διάρκεια των φυγοκεντρήσεων, φροντίζεται να μην αδειάσει εντελώς το φίλτρο από το διάλυμα. Μετά τη συμπύκνωσή της πρωτεΐνης, ακολούθησαν άλλες 3 εκπλύσεις μέσω φυγοκέντρησης στις ίδιες συνθήκες, με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM, με 0.1 mM PLP, 10 mL η κάθε μια, για την απομάκρυνση των αλάτων. Δείγμα 40 μL κρατήθηκε για την ηλεκτροφόρηση και η υπόλοιπη καθαρή πρωτεΐνη αποθηκεύτηκε στους 4 °C για άμεση χρήση ή σε διάλυμα γλυκερίνης τελικής συγκέντρωσης 30% v/v στους -20 °C για μεγαλύτερο χρόνο αποθήκευσης. Για την αποθήκευσή του, το φίλτρο εκπλύθηκε, πληρώθηκε με υδατικό διάλυμα 20% αιθανόλης, και αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

Για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρήση της συσκευής ÄKTA παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά διαλύματα: Α) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 8.0) με 300 mM NaCl, Β) διάλυμα (Α) με προσθήκη 300 mM ιμιδαζόλιο και Γ) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 8.0) με προσθήκη 0.1 mM PLP. Όλα τα διαλύματα φιλτραρίστηκαν πριν από τη χρήση

τους. Οι κολώνες για τον καθαρισμό (HisTrap™ FF, GE Healthcare) είχαν όγκο 5 mL, ενώ για την αφαλάτωση χρησιμοποιήθηκαν 3 κολώνες HisTrap™ desalting (GE Healthcare) των 5 mL σε σειρά. Για τον καθαρισμό, έγινε εξισορρόπηση του συστήματος με 5 όγκους κολώνας με ροή 3 mL/min μείγματος των διαλυμάτων Α και Β σε αναλογία 95%:5%, προστέθηκε το δείγμα με χαμηλότερη ροή (1.5 mL/min). Ακολούθησε πλύση της στήλης με 8 όγκους κολώνας, αυξάνοντας τον διαλύτη Β σε 10% με ροή 3.0 mL/min. Για το στάδιο της έκλουσης, όπου η κινητή φάση ήταν 100% Β, χρησιμοποιήθηκαν 3 όγκοι κολώνας με ροή 1.5 mL/min. Έπειτα, συλλέχθησαν τα δείγματα που είχαν την καθαρισμένη πρωτεΐνη, το σύστημα ξεπλύθηκε με τον διαλύτη Γ, προσδέθηκε η στήλη για την αφαλάτωση και εξισορροπήθηκε με το διάλυμα Γ. Με ροή 3 mL/min έγινε η αφαλάτωση με 100% διάλυμα Γ (ισοκρατική έκλουση), για 3 όγκους κολώνας. Τα δείγματα που είχαν την αφαλατωμένη πρωτεΐνη συλλέχθησαν. Οι στήλες ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και μετά με 20% αιθανόλη, και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο (+4 °C).

Αποδιατακτική Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Πηκτή Πολυακρυλαμιδίου

Για τον έλεγχο της έκφρασης των τρανσαμινασών χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακριλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)[142]. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου εντός της πηκτής πολυακριλαμιδίου, οι πρωτεΐνες οι οποίες έχουν αποδιαταχθεί και φορτιστεί αρνητικά, κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες διαμέσου τις πηκτής, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα των διαχωρισμό τους με βάση το μέγεθος των πρωτεϊνών. Η επιτυχημένη έκφραση των πρωτεϊνών ανιχνεύεται από την ύπαρξη μπαντών στο αναμενόμενο ύψος του πηκτώματος, σύμφωνα με πρότυπα μόρια γνωστού μοριακού βάρους (marker). Ο marker που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Serva Unstained Protein Marker 6-200 kDa. Η πηκτή παρασκευάστηκε από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και τις διακλαδώσεις των αλυσίδων που δημιουργούνται (cross-linking), σύμφωνα με τον **Πίνακας 2.8.** Η ένωση Η N,N,N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη (TEMED) δρα ως ενεργοποιητής και το υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) ως καταλύτης, και για αυτό οι δύο αυτές ενώσεις προστέθηκαν στο τέλος της ανάμειξης και μόνο όταν ήταν έτοιμη η συσκευή για το πήξιμο των πηκτωμάτων, καθώς ξεκινά αμέσως ο πολυμερισμός. Αρχικά παρασκευάστηκε η πηκτή διαχωρισμού που καταλαμβάνει τον μεγαλύτερο χώρο. Όταν εκχύθηκε στη συσκευή, προστέθηκε μικρή ποσότητα 1-βουτανόλης για να σπάσει τυχόν φυσαλίδες αέρα και να δημιουργήσει ένα επίπεδο μέτωπο στο πήκτωμα. Μετά τον πολυμερισμό (~40 min), αφαιρέθηκε ο οργανικός διαλύτης, και

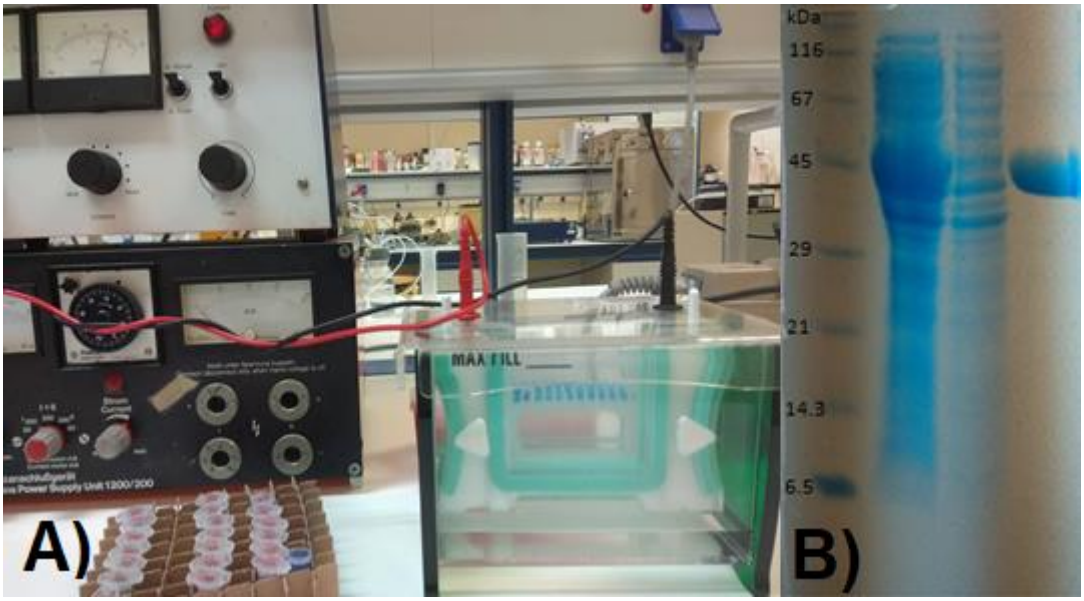
προστέθηκε η πηκτή επιστοίβαξης. Με την είσοδο της «χτένας» για το σχηματισμό των θέσεων των δειγμάτων αποφεύγεται ο εγκλωβισμός φυσαλίδων.

Πίνακας 2.8: Συστατικά για την παρασκευή 3 πηκτών ηλεκτροφόρησης περιεκτικότητας 12% σε πολυακρυλαμίδιο. * Η χρήση του TCE είναι προαιρετική.

Συστατικό	**Πηκτή Διαχωρισμού**	**Πηκτή Επιστοίβαξης**
Περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδιο	**12%**	**4%**
Γλυκερίνη	3 g	-
Ρυθμιστικό διάλυμα (Tris-HCl 3 M,pH 8,45, 0,3% SDS)	10 mL	4 mL
Τριχλωροαιθυλένιο (TCE)*	240 μL	-
Μείγμα ακρυλαμιδίου 30% (Ακρυλαμίδιο/Δις-ακρυλαμίδιο)	7.2 mL	1 mL
TEMED	15 μL	9 μL
Διάλυμα APS 10% (w/v)	150 μL	90 μL
H_2O απιονισμένο	Συμπλήρωση όγκου έως τα 30 mL	Συμπλήρωση όγκου έως τα 12 mL

Τα δείγματα τα οποία ηλεκτροφορούνταν ήταν οι ποσότητες 10/OD_{600}, οι οποίες είχαν απομονωθεί καθ' όλα τα στάδια καλλιέργειας των κυττάρων καθώς επίσης και οι ποσότητες των 40 μL οι οποίες απομονώθηκαν κατά τα διάφορα στάδια του καθαρισμού. Τα 30 μL του δείγματος αναμειγνυόνταν με 15 μL sample buffer (αναλογία 2:1), το οποίο αποτελείται από 12% SDS, 10% γλυκερίνη, 6% μερκαπτοαιθανόλη, 0,05% χρωστική (Serva Blue G) καθώς και 150 mM Tris- HCl. Μετά την ανάμειξη του δείγματος με το sample buffer ακολουθεί επώαση στους 95 °C για 5 min. Τα δείγματα, αλλά και ο δείκτης (marker) φορτώθηκαν στην πηκτή ηλεκτροφόρησης, ενώ ήταν εμβαπτισμένη στο διάλυμα καθόδου (10x: 1 M Tris, 1% w/w SDS, pH 8.25), ενώ στο εξωτερικό μέρος των πηκτών βρισκόταν το διάλυμα ανόδου (10x: Tris (1 M, pH 8,9)). Η ένταση στη συσκευή ηλεκτροφόρησης ορίζεται στα 25 mA ανά πηκτή, και αφήνεται να τρέξει για περίπου 1 h. Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε επώαση της πηκτής για 20 min, σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (45% v/v), οξικό οξύ (7% v/v) και Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.25-1 % w/v). Για τον αποχρωματισμό της πηκτής ακολουθεί εμβάπτιση αυτής σε υδατικό διάλυμα, το οποίο περιέχει μεθανόλη (40% v/v), και οξικό οξύ (7% v/v) για 1 h. Η παρατήρηση πραγματοποιείται σε φωτιζόμενη τράπεζα. Εναλλακτικά η διαδικασία της χρώσης και του αποχρωματισμού μπορεί να παραληφθεί, καθώς με την προσθήκη του TCE

στην πηκτή διαχωρισμού, δίνεται η δυνατότητα παρατήρησης των πρωτεϊνών σε τράπεζα υπεριώδους φωτός, ύστερα από διέγερση για 5 min περίπου. Στην **Εικόνα 2.2** παρουσιάζεται η οργανολογία και ένα ενδεικτικό πήκτωμα.



Εικόνα 2.2: Α) Διάταξη της ηλεκτροφορητικής συσκευής όπου διακρίνονται το τροφοδοτικό, καθώς και η συσκευή ηλεκτροφόρησης με πηκτή η οποία φέρει δείγματα. Β) πήκτωμα όπου φαίνεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών και η υπερέκφραση και καθαρισμός της τρανσαμινασης από τον οργανισμό *Vibrio fluvialis* στα 45 kDa περίπου.

Υπολογισμός Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης με τη Μέθοδο Bradford

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomasie Brilliant Blue G- 250, για χρωματική αλλαγή, μετά την αλληλεπίδρασή της σε όξινο περιβάλλον με πρωτεΐνες. Η ελεύθερη κατιοντική χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη–χρωστική (ανιοντική) είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595 nm[143]. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για πρωτεϊνικά δείγματα συγκέντρωσης από 0,04 mg/mL έως 0,20 mg/mL. Χρησιμοποιείται ευρέως γιατί είναι ευαίσθητη, γρήγορη και σχετικά ακριβής.

Το διάλυμα Bradford παρασκευάστηκε με διάλυση χρωστικής Brilliant Blue G- 250 σε 50 mL αιθανόλης, 100 mL 85% φωσφορικού οξέος και 100 mL dH_2O υπό ισχυρή μαγνητική ανάδευση. Ακολούθως, η χρώση αραιώθηκε σε dH_2O με αναλογία 1:10, και υπέστη

φιλτράρισμα με διηθητικό χαρτί. Το διάλυμα αυτό μπορεί να αποθηκευτεί σε σκοτεινό δοχείο και σε θερμοκρασία δωματίου και να χρησιμοποιηθεί έπειτα από ισχυρή ανάδευση.

Για κάθε μέτρηση πρωτεϊνών άγνωστης συγκέντρωσης, παρασκευάζεται με το ίδιο διάλυμα και μια πρότυπη καμπύλη με χρήση πρωτεΐνης αλβουμίνης από ορό μόσχου (BSA) γνωστής συγκέντρωσης. Καθώς οι μετρήσεις γίνονται σε φωτόμετρο μικροπλακιδίων 96 θέσεων (Thermo Scientific Multiscan Sky), τα δείγματα για την πρότυπη καμπύλη παρασκευάστηκαν με ανάμιξη 125 μL χρωστικής Bradford και 15 μL του αντίστοιχου πρότυπου δείγματος BSA. Η διαρρύθμιση στο μικροπλακίδιο των μετρήσεων παρουσιάζεται στον **Πίνακας 2.9**.

Πίνακας 2.9: Όγκοι και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο Bradford. Στο άγνωστο δείγμα μπορεί να χρειαστεί αραίωση ώστε η συγκέντρωση να είναι στα όρια της πρότυπης καμπύλης.

Α/Α δείγματος	**Αντιδραστήριο Bradford (μL)**	**Πρωτεϊνικό διάλυμα (mL)**	**Συγκέντρωσή BSA στο διάλυμα (mg/mL)**
1	125	15	0
2	125	15	0.1
3	125	15	0.2
4	125	15	0.3
5	125	15	0.4
6	125	15	0.6
7	125	15	0.8
8	125	15	1
9	125	15	X

Στο δείγμα 1 δεν προστέθηκε πρωτεΐνη, και οι μετρήσεις αυτές αποτέλεσαν το τυφλό δείγμα, του οποίου η απορρόφηση οφείλεται στην χρωστική Coomasie Brilliant Blue G-250. Αντίστοιχα, η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του διαλύματος του αγνώστου παρουσιάζεται στο κελί 9. Τα άγνωστα διαλύματα των πρωτεϊνών προς προσδιορισμό αραιώθηκαν κατάλληλα, ώστε η απορρόφησή τους να βρίσκεται εντός του εύρους της πρότυπης καμπύλης. Μετά από καλή ανάμειξη, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 595 nm. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

Φωτομετρική Μελέτη Ενεργότητας Ενζύμου

Για την πραγματοποίηση της φωτομετρικής μελέτης ενεργότητας του ενζύμου, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φωτόμετρο Thermo Scientific Multiscan Sky σε UV μικροπλακίδιο 96 θέσεων. Η αντίδραση πραγματοποιούταν σύμφωνα με το **Σχήμα 2.2** σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις, παρουσία τελικής συγκέντρωσης 1 mM αμίνης και 2 mM πυροσταφυλικού οξέος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 200 μL (μήκος διαδρομής 0.627 cm), στους 30ºC για 5 min, σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (50 mM, pH 7.5, 0.1 mM PLP). Η προσθήκη PLP στο ρυθμιστικό διάλυμα εξαρτιόταν από τη φύση της πρωτεΐνης προς μελέτη. Αν η πρωτεΐνη δεν είχε υποστεί καθαρισμό, τότε γινόταν προσθήκη PLP στο υπερκείμενο ώστε να δεσμευτεί από την πρωτεΐνη για την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Αντίθετα αν η μέτρηση γινόταν σε πρωτεΐνη η οποία είχε καθαριστεί, το ένζυμο μετά τον καθαρισμό προστίθονταν σε διάλυμα το οποίο έφερε PLP ώστε να γίνει η απαραίτητη δεύσμευση του συμπαράγοντα. Έτσι δεν ήταν αναγκαία η επιπλέον προσθήκη συμπαράγοντα στην φωτομετρική μελέτη, η οποία μπορεί να είχε αρνητική επίδραση στις ακόλουθες μετρήσεις. Όλα τα στοιχεία της μέτρησης τοποθετήθηκαν στο μικροπλακίδιο με χρήση πολυπιπέτας, καθώς η ταυτόχρονη προσθήκη τους ήταν σημαντική για την πορεία της αντίδρασης. Παράλληλα μειώθηκαν σημαντικά οι χρήσεις της πιπέτας κατά τη διάρκεια της μέτρησης, μειώνοντας έτσι και το σφάλμα του χρήστη. Τελευταίο συστατικό, το οποίο και εκκινούσε την αντίδραση, ήταν η προσθήκη 2 μL ενζυμικού διαλύματος. Τα υποστρώματα **2a** και **3a** χρησιμοποιήθηκαν για τη διαλογή της εσωτερικής βιβλιοθήκης η οποία μελέτη πραγματοποιήθηκε με υπερκείμενο από σπασμένα κύτταρα (μη καθαρισμένη πρωτεΐνη). Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε και DMSO, ως συνδιαλύτης για τη διαλυτοποίηση της αμίνης, με τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 5 % (πυκνό διάλυμα αμίνης, 20 mM σε DMSO). Το υπόστρωμα **1a** χρησιμοποιήθηκε και με υπερκείμενο, και με καθαρισμένη πρωτεΐνη, ως υπόστρωμα αναφοράς. Οι μετρήσεις για τις τρεις αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικό μήκος κύματος, ανάλογα με το μέγιστο απορρόφησης του αντίστοιχου προϊόντος: **1b** 245 nm, **2b** 277 nm και **3b** 292 nm.

Μέσω της επεξεργασίας των φωτομετρικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της ογκομετρικής ενζυμικής ενεργότητας όγκου (U/mL). Ο υπολογισμός πραγματοποιήθηκε αξιοποιώντας τις κλίσεις των προτύπων καμπυλών για καθένα από τα υποστρώματα σύμφωνα με την **Εξίσωση 2.1**.

$$\text{U/mL} = \frac{\text{Κλίση ενζυμικού δείγματος}\left(\frac{\Delta A}{s}\right)}{\text{Κλίση πρότυπης καμπύλης}\left(\frac{\Delta A}{mM}\right)} \cdot \frac{60\ s}{1\ \text{min}} * DF \quad \textbf{(Εξίσωση 2.1)}$$

όπου ΔΑ η μεταβολή στην τιμή της απορρόφησης και DF ο παράγοντας αραίωσης (dilution factor) που ορίζεται:

$$DF = \text{Παράγοντας αραίωσης πριν την μέτρηση} \cdot \frac{\text{Όγκος διαλύματος ενζύμου } (\mu L)}{\text{Όγκος αντίδρασης } (\mu L)}$$

Προετοιμασία Δειγμάτων για Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

Για την παρατήρηση του πολυιμινικού πολυμερούς χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy - SEM). Μετά από πλύσεις με απιονισμένο νερό στο στερεό δείγμα για απομάκρυνση τυχόν ακαθαρσιών, το πολυμερές επικολλήθηκε σε ύαλο με χρήση αγώγιμης ταινίας άνθρακα (carbon tape) και επικαλύφθηκαν με πάχος 10 nm χρυσό με χρήση ενός Sputter Coater (SCD 050) της BAL-TEC προκειμένου να γίνουν ηλεκτρικά αγώγιμα. Η παρατήρηση στο SEM πραγματοποιήθηκε σε διαφορά δυναμικού δέσμης ηλεκτρονίων 20 kV. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Προετοιμασία Δειγμάτων για Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Για τον προσδιορισμό ή την ταυτοποίηση ένωσης ενδιαφέροντος χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR). Από την ουσία που έπρεπε να προσδιοριστεί, ~2 mg αυτής διαλύονταν σε 1 mL κατάλληλου δευτεριωμένου διαλύτη, και στην συνέχεια εισάγονταν σε κατάλληλο σωλήνα NMR τύπου Wilmad 5 mm. Τα φάσματα ^{1}HNMR ελήφθησαν σε φασματόμετρα Bruker DPX- 300 και AMX-500 του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Προετοιμασία Δειγμάτων για Φασματοσκοπία Υπεριώδους

Για την μελέτη του πολυιμιδίου που σχηματίστηκε κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία υπεριώδους (Infrared spectroscopy, IR spectroscopy) (**Εικόνα 2.3**). Χρησιμοποιήθηκαν 128 scans για κάθε δείγμα. Αρχικά, πραγματοποιείται μέτρηση χωρίς δείγμα η οποία γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και λειτουργεί ως τυφλό, για τον μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου. Ακολούθως, το στερεό δείγμα

τοποθετήθηκε σε κατάλληλη οπή με αποστειρωμένη σπάτουλα, και πραγματοποιήθηκε μέτρηση. Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν Thermo-Electron Nicolet 6700 FT-IR με μέθοδο εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (attenuated total reflection- ATR) του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Εικόνα 2.3: Thermo-Electron Nicolet 6700 FT-IR με μέθοδο εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (attenuated total reflection- ATR)

Ανάλυση Αντιδράσεων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Για τη μελέτη της αντίδρασης που φαίνεται στο **Σχήμα 2.3**, επιλέχθηκε η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Ο διαχωρισμός των ουσιών επιτεύχθηκε με τη στήλη LICHROSPHER RP18-5 (25 cm, 4,6 mm, 5 μm) σε θερμοκρασία δωματίου (20 °C κατά μέσο όρο). Χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική μέθοδος, με κινητή φάση μείγμα MeOH HPLC grade και υπερκάθαρο H_2O το οποίο είχε φιλτραριστεί, με αναλογία 85:15 (v/v) με ροή 1mL/min. Η πίεση του συστήματος κάτω από αυτές τις συνθήκες ήταν 74 bar.

Η προετοιμασία του δείγματος προς ανάλυση ξεκινούσε από τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης με προσθήκη 160 μL MeOH HPLC grade σε 40 μL δείγματος. Το μείγμα αναδευόταν και στην συνέχεια φυγοκεντρούταν ώστε να απομακρυνθεί η πρωτεΐνη, η οποία είχε αποδιαταχθεί. Το υπερκείμενο συλλεγόταν για ανάλυση. Ο όγκος που χρησιμοποιούνταν σε κάθε ένεση δείγματος ήταν 10 μL. Οι χρόνοι έκλουσης ενδεικτικά ήταν για το **5b** στα 2.2 min, ενώ για το **5a**, στα 2.7 min**.** Το PLP εκλουόταν στα 2.4 min. Για κάθε δείγμα

πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, για τη μείωση του σφάλματος και την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας. Ο ανιχνευτής είχε οριστεί στα 245 nm και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, δεδομένου ότι στο συγκεκριμένο μήκος κύματος το υπόστρωμα και το προϊόν της αντίδρασης είχαν τον ίδιο συντελεστή μοριακής απόσβεσης, έγινε ως εξής:

$$Απόδοση\ (\%) = \frac{Εμβαδόν\ Κορυφής\ Αμίνης}{(Εμβαδόν\ Κορυφής\ Αμίνης + Εμβαδόν\ Κορυφής\ Αλδεΰδης)}$$ (**Εξίσωση 2.2**)

Όπου το εμβαδόν εκπροσωπούσε τη συγκέντρωση της εκάστοτε χημικής ένωσης, και υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος LabSolutions, το οποίο και αποτελούσε το λογισμικό της συσκευής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

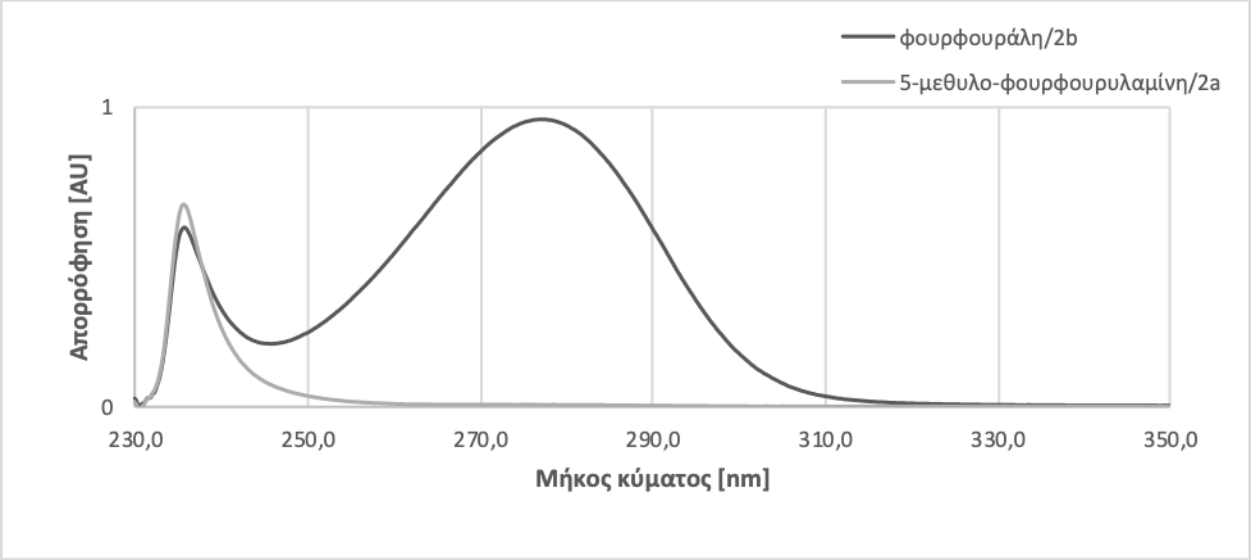
3.1. Ανάπτυξη Φωτομετρικής Ανάλυσης Φουρανοειδών

Βασικός παράγοντας για τη διαλογή των ενζύμων που υπήρχαν στο εργαστήριο για την αμίνωση φουρανοειδών ήταν η ενεργότητά τους με την συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων. Για να είναι εφικτή η ολοκλήρωση της διαλογής της βιβλιοθήκης σε εύλογο χρονικό διάστημα, σημαντικό ήταν να αναπτύξουμε μία γρήγορη φωτομετρική μέθοδο για την παρακολούθηση της αντίδρασης τρανσαμίνωσης για τα επιλεγμένα υποστρώματα. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η δυνατότητα φωτομετρικού προσδιορισμού της ακετοφαινόνης (**1b**), μέσω της διαφοροποίησης η οποία παρατηρείται στην απορρόφηση μεταξύ 1-φαινυλαιθυλαμίνης (**1a**) και ακετοφαινόνης (**1b**).[141] Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στην αντίθετη κατεύθυνση από αυτή που ενδιαφέρει συνθετικά, καθώς ο κινητικός διαχωρισμός του **1a** ευνοείται θερμοδυναμικά και ολοκληρώνεται σε ορισμένα λεπτά, σε σχέση με την ασύμμετρη σύνθεση του, η οποία απαιτεί συγκεκριμένες παραμέτρους για να μετατοπιστεί η ισορροπία και αρκετές ώρες για να ολοκληρωθεί. Έτσι, η αντίδραση της απαμίνωσης του **1a**, αν και δεν είναι η επιθυμητή κατεύθυνση, μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί φωτομετρικά. Η ενεργότητα που παρατηρείται στον κινητικό διαχωρισμό αντιστοιχίζεται με αυτή που επιδεικνύει και στην ασύμμετρη σύνθεση, καθώς το ένζυμο μπορεί να υποδεχτεί τόσο την αμίνη όσο και το προϊόν. Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, και δεδομένου ότι η διαφορά στο φάσμα του **1a** από το **1b** οφείλεται στο φαινόμενο συντονισμού μεταξύ της καρβονυλο-ομάδας και του φαινολικού δακτυλίου, η εγγύτητα της αλδεΰδης στον φουρανικό δακτύλιο μπορεί να οδηγήσει σε αντίστοιχα φαινόμενα και άρα να επιτρέψει τον φωτομετρικό προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου στην παραγωγή ή κατανάλωση της αντίστοιχης ένωσης (**Σχήμα 3.1**).

Σχήμα 3.1: Δομές συντονισμού φουρανικού δακτυλίου, όπου R: -H (**2b**),-CH_3 (**3b**)

Για την διαπίστωση αυτής της υπόθεσης χρησιμοποιήθηκαν τα διαθέσιμα ζεύγη ενώσεων φουρφουρυλαμίνης (**2a**) - φουρφουράλης (**2b**) και 5-μεθυλο-φουρφουρυλαμίνης (**3a**) -

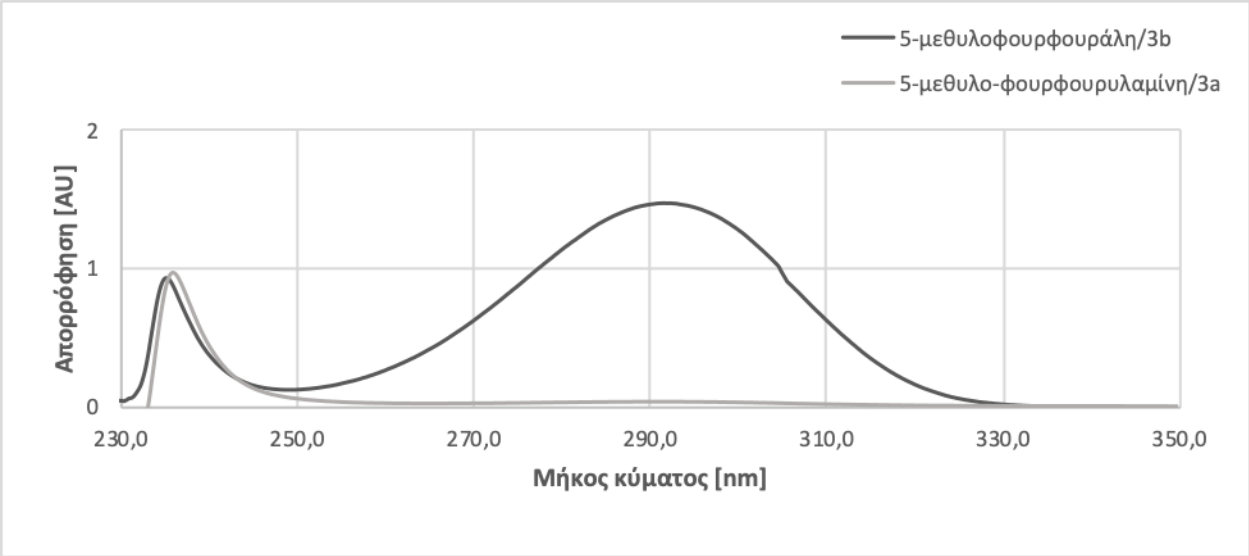
5-μεθυλο-φουρφουράλης (**3b**). Οι συγκεκριμένες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν ως ανάλογα των ενώσεων **3** και **4**, αλλά επελέγησαν γιατί υπήρχαν διαθέσιμες τόσο οι αλδεΰδες όσο και οι αμίνες για τα απαραίτητα πειράματα. Για κάθε ένα από τα φουρανοειδή παρασκευάστηκε διάλυμα με τελική συγκέντρωση 0.05 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 50 mM, pH 7.5 (950 μL ρυθμιστικό διάλυμα, 50 μL διαλύματος 1 mM της ένωσης σε DMSO). Για το κάθε δείγμα λήφθηκε μέτρηση στο εύρος 230- 350 nm, με χρήση κυψελίδας χαλαζία, σε φασματοφωτόμετρο τύπου Shimadzu UV-2700. Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα που λήφθηκαν για τα δύο ζεύγη υποστρωμάτων, όπου παρατηρείται μια διακριτή κορυφή του υποστρώματος της αλδεΰδης η οποία διαφοροποιείται από το σήμα της αμίνης (**Διάγραμμα 3.1** και **Διάγραμμα 3.2**).



Διάγραμμα 3.1: Φάσμα απορρόφησης για το ζεύγος ενώσεων **2a-2b**. Το μέγιστο απορρόφησης για την αλδεΰδη (**2b**) παρατηρήθηκε σε μήκος κύματος 277 nm.

Η υπόθεση επιβεβαιώθηκε, καθώς πέραν της κορυφής στα ~235 nm που οφείλεται στον φουρανικό δακτύλιο, οι αλδεΰδες παρουσιάζουν και δεύτερη κορυφή απορρόφησης σε υψηλότερα μήκη κύματος, λόγω του συντονισμού του δεσμού τους. Η μέγιστη απορρόφηση για τη φουρφουράλη (**2b**) εμφανίζεται στα 277 nm, ενώ για την 5-μεθυλο-φουρφουράλη (**3b**) στα 292 nm. Με βάση αυτή την παρατήρηση, αναπτύχθηκε πρωτόκολλο φωτομετρικού ελέγχου της αντίδρασης τρανσαμίνωσης, με την παρακολούθηση της παραγωγής του προϊόντος (αλδεΰδη)

στο μήκος κύματος που εμφάνιζε τη μέγιστη απορρόφηση, ενώ η αντίστοιχη αμίνη είχε ελάχιστη απορρόφηση.



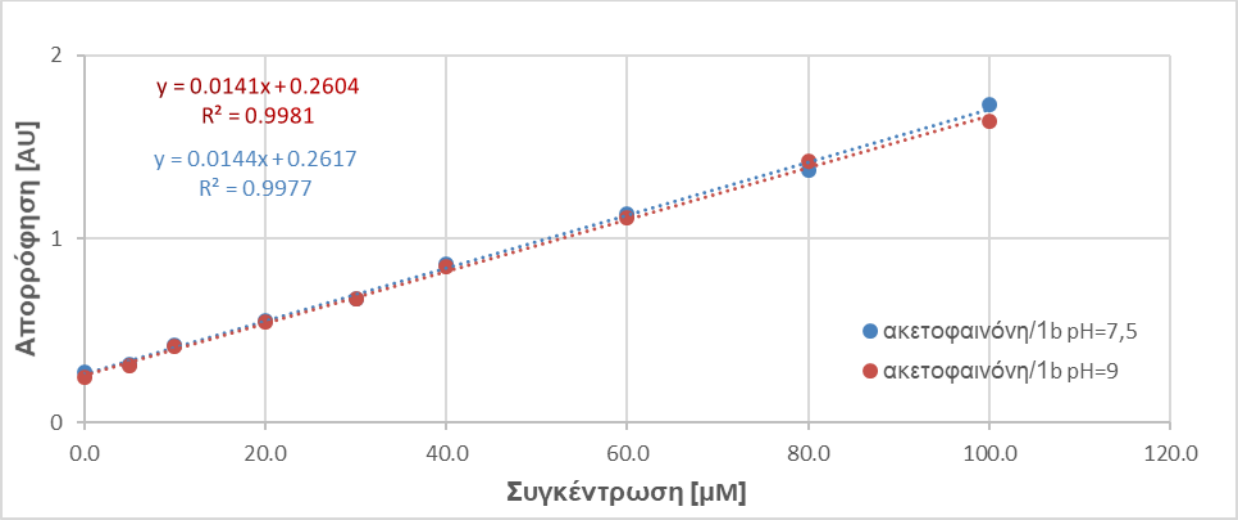
Διάγραμμα 3.2: Φάσμα απορρόφησης για το ζεύγος ενώσεων **3a-3b**. Το μέγιστο απορρόφησης για την αλδεΰδη (**3b**) παρατηρήθηκε σε μήκος κύματος 292 nm.

Στα συγκεκριμένα μήκη κύματος κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες για τις αλδεΰδες **2b** και **3b** με ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (50 mM, pH 7.5) και CHES (50 mM, pH 9.0) αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μέχρι 0.1 mM, συγκέντρωση αλδεΰδης που αντιστοιχεί σε 10% απόδοση στην αντίδραση, σύμφωνα με τις συνθήκες της αντίδρασης. Καθώς η 1-φαινυλαιθυλαμίνη (**1a**) χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα αναφοράς (benchmark) στις ίδιες συγκεντρώσεις για να συγκριθεί η ενεργότητα με αυτή που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία[144], κατασκευάστηκε πρότυπη και για την ακετοφαινόνη (**1b**) στα ίδια διαλύματα, στα 245 nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα **Διαγράμματα 3.3-3.5**. Όπως φαίνεται οι συντελεστές μοριακής απόσβεσης (ε), κατά τον νόμο Beer-Lambert, δε διαφοροποιούνται σημαντικά με την διαφορετική τιμή του pH, ενώ υπάρχει γραμμική απόκριση μέχρι τη συγκέντρωση 0.1 mM. Οι τιμές που υπολογίστηκαν είναι οι εξής:

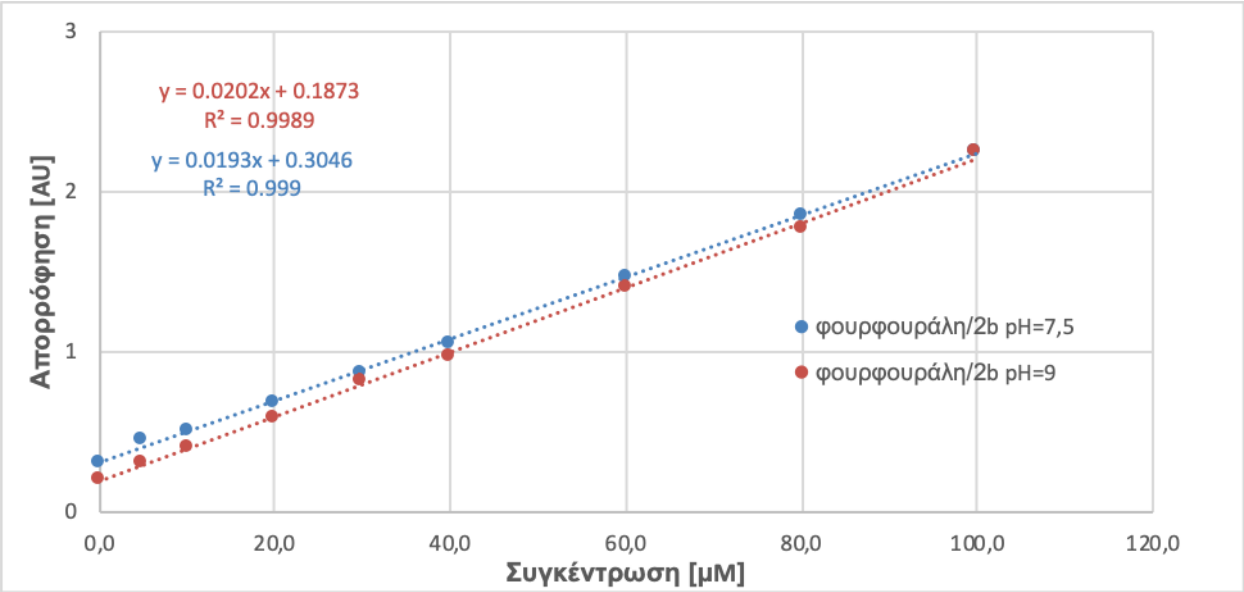
1b: 14436.4 M^{-1} σε pH 7.5 και 14142.4 M^{-1} σε pH 9.0

2b: 19272.2 M^{-1} σε pH 7.5 και 20221.7 M^{-1} σε pH 9.0

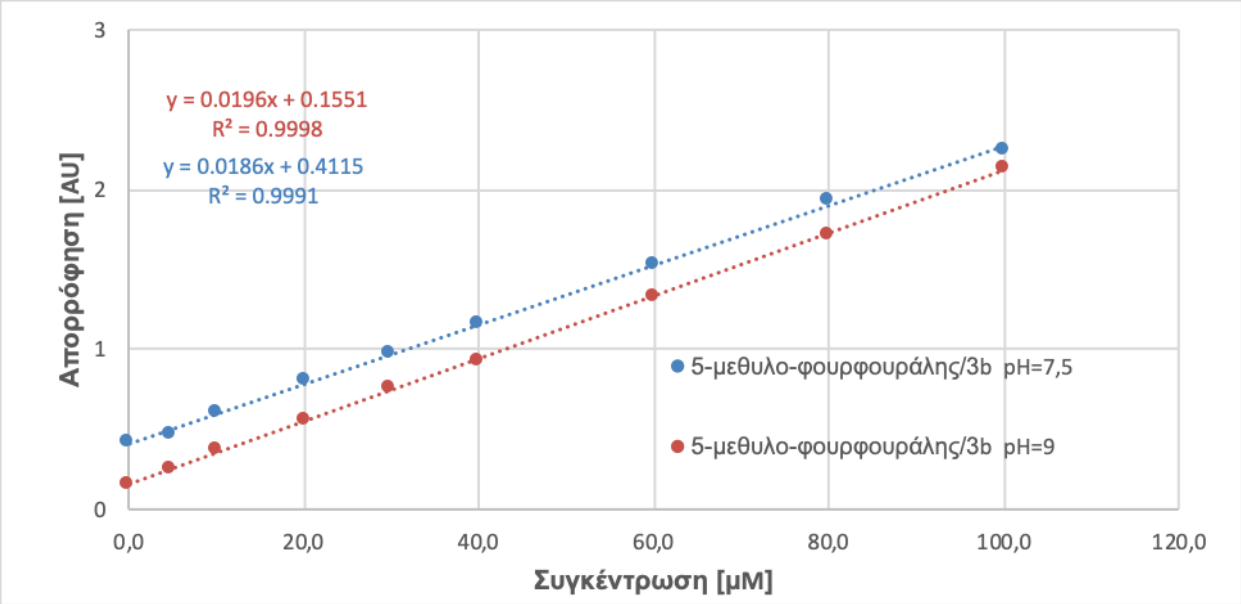
3b: 14436.4 M^{-1} σε pH 7.5 και 14142.4 M^{-1} σε pH 9.0



Διάγραμμα 3.3: Πρότυπη καμπύλη ακετοφαινόνης (**1b**) σε pH 7.5 και 9.0. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε μικροπλακίδιο 96 θέσεων με 200 μL που αντιστοιχεί σε μήκος διαδρομής 0.627 nm.



Διάγραμμα 3.4: Πρότυπη καμπύλη φουρφουράλης (**2b**) σε pH 7.5 και 9.0. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε μικροπλακίδιο 96 θέσεων με 200 μL που αντιστοιχεί σε μήκος διαδρομής 0.627 nm.



Διάγραμμα 3.5: Πρότυπη καμπύλη 5-μεθυλο-φουρφουράλης (**3b**) σε pH 7.5 και 9.0. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε μικροπλακίδιο 96 θέσεων με 200 μL που αντιστοιχεί σε μήκος διαδρομής 0.627 nm.

Επιλογή Ενζύμων

Έχοντας πλέον μια γρήγορη ποσοτική μέθοδο παρακολούθησης της ενζυμικής ενεργότητας, ακολούθησε η επιλογή των πιο λειτουργικών ενζύμων από την εσωτερική συλλογή τρανσαμινασών του εργαστηρίου. Δύο ήταν οι παράμετροι στις οποίες θα εξετάζονταν τα ένζυμα:

- Η καλή υπερέκφραση των τρανσαμινασών, για να έχουμε ικανή ποσότητα για το σχεδιασμό της βιοδιεργασίας.
- Η μελέτη της ενεργότητας των ενζύμων, ώστε να επιλεγούν τα ένζυμα με τη μεγαλύτερη δραστικότητα για φουρανοειδείς ενώσεις.

Οι τρανσαμινάσες με τα βέλτιστα χαρακτηριστικά και στις δύο παραμέτρους επελέγησαν για το σχεδιασμό της βιοδιεργασίας, καθώς μια τρανσαμινάση η οποία εμφανίζει υψηλή κινητικότητα στα επιλεγμένα υποστρώματα, αλλά δεν εκφράζεται σε ικανοποιητικές ποσότητες δε θα προσφερόταν για μελέτες σε μεγαλύτερη κλίμακα, ή για βιομηχανική εφαρμογή. Αντίστοιχα, μια τρανσαμινάση η οποία μπορεί να εκφράζεται ισχυρά αλλά να μην εμφανίζει

υψηλή κινητικότητα, θα ήταν εξίσου δυσλειτουργική, καθώς θα απαιτούσε σημαντικές ποσότητες αυτής, για να παράξει προϊόντα σε ικανοποιητική ποσότητα.

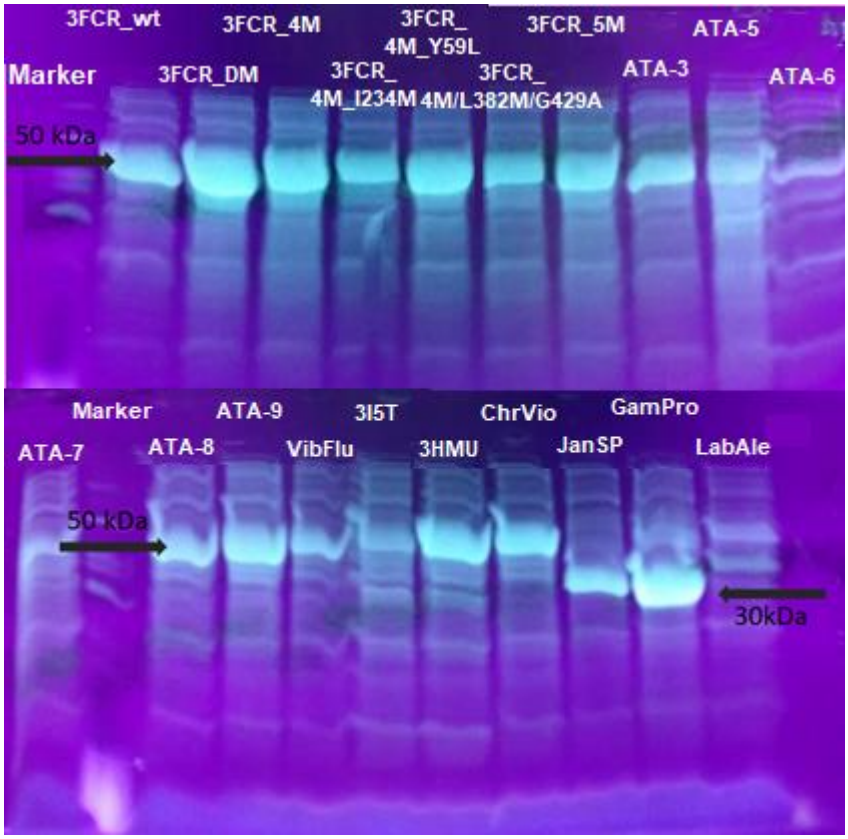
2.1.1. Υπερέκφραση Πρωτεϊνών

Τα γονίδια των τρανσαμινασών ενδιαφέροντος βρίσκονταν κλωνοποιημένα σε πλασμίδια, τα οποία είχαν εισαχθεί ήδη σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3), για την ορθόλογη υπερέκφραση των γονιδίων και την επακόλουθη πρωτεϊνοσύνθεση. Η υπερέκφραση των γονιδίων ενδιαφέροντος ελέγχθηκε με παρατήρηση των μπαντών των ενζύμων ενδιαφέροντος σε πηκτή ηλεκτροφόρησης κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, συγκρίνοντας το αναμενόμενο μοριακό βάρος του κάθε ενζύμου (**Πίνακας 3.10**) με τον μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών (marker). Να σημειωθεί ότι οι (*S*)-εκλεκτικές τρανσαμινάσες που ανήκουν στον τύπο αναδίπλωσης (folding types) I παρουσιάζουν μοριακό βάρος ~50 kDa, ενώ οι (*R*)-εκλεκτικές που ανήκουν στην κατηγορία αναδίπλωσης IV ~34 kDa. Αυτό οφείλεται στην μικρή ομολογία μεταξύ των δύο κατηγοριών, που φαίνεται πως εξελίχθηκαν ξεχωριστά. Η ένταση της εκάστοτε μπάντας τρανσαμινάσης αποτέλεσε πληροφορία για την ποσότητα της πρωτεΐνης που παράγεται, αφού είχε γίνει κανονικοποίηση του αριθμού των κυττάρων που συλλέχθηκαν (10/OD) κατά τη δειγματοληψία.

Πίνακας 3.10: Το αναμενόμενο μοριακό βάρος των τρανσαμινασών ενδιαφέροντος (μαζί με τις σηματοδοτικές αλληλουχίες για τον καθαρισμό).

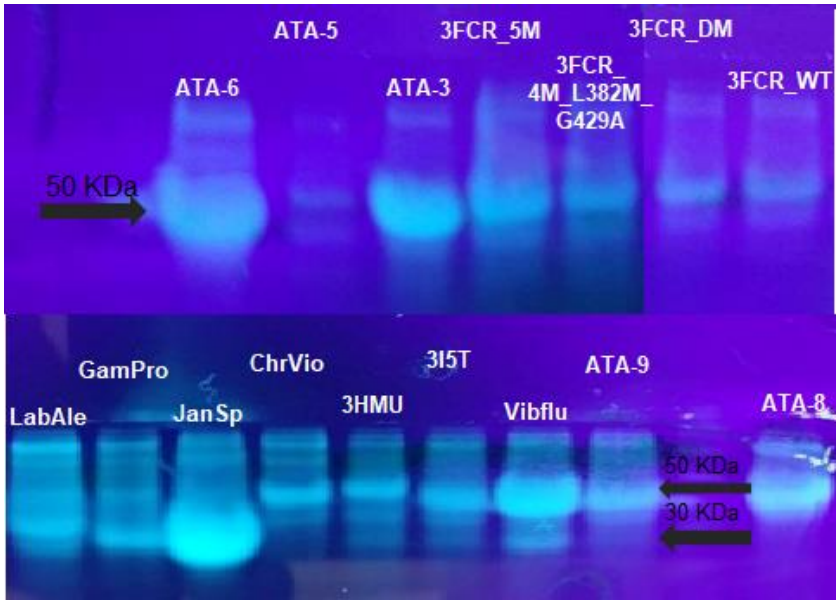
Ένζυμο	**Αναμενόμενο Μ.Β. (kDa)**	**Ένζυμο**	**Αναμενόμενο Μ.Β. (kDa)**
3FCR_WT	50.7	ATA-9	50.1
3FCR_DM	50.7	Vibflu	52.7
3FCR_4M/L382M/G429A	50.7	3I5T	51.4
3FCR_5M	50.7	3HMU	51.8
ATA-3	50.2	ChrVio	53.5
ATA-5	51.3	JanSp	33.9
ATA-6	49.9	GamPro	33.8
ATA-7	50.5	LabAle	35.2
ATA-8	50.4		

Στις πηκτές πολυακρυλαμιδίου φορτώθηκαν τόσο τα δείγματα υπερκείμενου υγρού μετά τη θραύση των κυττάρων, που περιέχουν την κυτταροπλασματικά διαλυτή πρωτεΐνη, αλλά και τα δείγματα του ιζήματος που καθίζησε μετά την φυγοκέντρηση, τα οποία περιέχουν αδιάλυτες πρωτεΐνες, δείγμα μη σωστής αναδίπλωσης. Αυτή η προσέγγιση μας δίνει την δυνατότητα να ελέγξουμε κατά πόσο η υπερέκφραση λειτούργησε, ακόμα και αν η πρωτεΐνη δεν είναι σε διαλυτή μορφή. Από τα δείγματα που αναλύθηκαν, φαίνεται πως η πρωτεΐνη εμφανίζεται κατά κύριο λόγο στο υπερκείμενο, παρουσιάζοντας μία έντονη μπάντα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (**Εικόνα 3.**). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης φαίνεται μεγαλύτερη για την 3FCR_DM, ATA-9, ChrVio,3HMU και GamPro. Στον αντίποδα, οι τρανσαμινάσες ATA-6, ATA-7, 3I5T, και LabAle δεν δίνουν τόσο ισχυρή μπάντα. Να σημειωθεί πως η διαφοροποίηση της ποσότητας της πρωτεΐνης σε ορισμένες διαδρομές οφείλεται στον τρόπο διαχείρισης των δειγμάτων από τον χρήστη.



Εικόνα 3.1: Κανονικοποιημένα δείγματα διαλυτών πρωτεϊνών (υπερκείμενο) από το πείραμα υπερέκφρασης τρανσαμινασών. Τα δείγματα έτρεξαν σε πηκτώματα πολυακριλαμιδίου 12%, ενώ η εμφάνιση των μπαντών και η φωτογράφηση έγινε με διέγερση υπό υπεριώδες φως. Με βέλος υποδεικνύεται η περιοχή ύψους που αναμένεται η εμφάνιση σήματος για τις τρανσαμινάσες.

Σε σύγκριση με τα δείγματα του ιζήματος (**Εικόνα 3.2**), φαίνεται πως η ATA-6 εκφράζεται κυρίως σε αδιάλυτη μορφή, ενώ στην περίπτωση της LabAle φαίνεται πως η υπερέκφραση δεν ήταν επιτυχής, καθώς σε κανένα από τα δύο δείγματα δεν παρουσιάζεται έντονη μπάντα κοντά στα 35 kDa, που είναι το αναμενόμενο μοριακό βάρος. Στο δείγμα του ιζήματος φαίνεται μία μπάντα που μπορεί να είναι η πρωτεΐνη, αλλά ελλείψει μπάντας στο υπερκείμενο φαίνεται πως η υπερέκφραση δεν λειτούργησε όπως θα έπρεπε στην προκειμένη περίπτωση, πιθανόν λόγω ανεπιτυχούς δράσης του χρησιμοποιούμενου επαγωγέα κατά τη καλλιέργεια.



Εικόνα 3.2: Κανονικοποιημένα δείγματα αδιάλυτων πρωτεϊνών (ίζημα) από το πείραμα υπερέκφρασης τρανσαμινασών. Τα δείγματα έτρεξαν σε πηκτώματα πολυακριλαμιδίου 12%, ενώ η εμφάνιση των μπαντών και η φωτογράφηση έγινε με διέγερση του TCE υπό υπεριώδες φως. Με βέλος υποδεικνύεται η περιοχή ύψους που αναμένεται η εμφάνιση σήματος για τις τρανσαμινάσες.

2.1.2. Διαλογή Τρανσαμινασών Μέσω Φωτομετρικής Ανάλυσης της Ενεργότητας

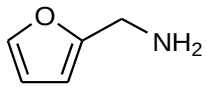
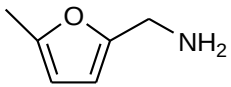
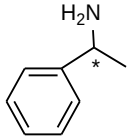
Έχοντας λάβει θετικά αποτελέσματα για την υπερέκφραση των περισσότερων επιλεγμένων ενζύμων, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της ενζυμικής τους ενεργότητας μέσω φωτομετρικής παρακολούθησης της πορείας της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα τις αμίνες **1a**, **2a** και **3a**. Ως ενζυμικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε ποσότητα από το υπερκείμενο του κανονικοποιημένου δείγματος 10/OD_{600}. Οι αντιδράσεις παρακολουθήθηκαν στα αντίστοιχα μήκη κύματος και πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της ενεργότητας σύμφωνα με την **Εξίσωση 2.1** όπως παρουσιάζεται στην **Παράγραφο 2.17**.

Στον **Πίνακα 3.2** παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της μελέτης ενεργότητας των 17 ενζύμων για τα τρία υποστρώματα.

Αρχικά, θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι VibFlu και ChrVio είναι από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τρανσαμινάσες, λόγω της υψηλής ενεργότητας τους ως προς την φαινυλαιθυλαμίνη (**1a**)[145–147], κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε και στις μετρήσεις μας. Η ερευνητική ομάδα της Helen C. Hailes[148] χρησιμοποίησε διάφορες τρανσαμινάσες, συμπεριλαμβανομένου

και της ChrVio επίσης με φουρανικές αλδεΰδες, για την σύνθεση αμινωμένων φουρανίων, συγκρίνοντας παράλληλα διαφορετικούς δότες αμινομάδας. Οι τρανσαμινάσες που αναφέρονται με τους κωδικούς της PDB (3HMU, 3FCR, 3I5T) εμφανίζουν ομοιότητα στη διαμόρφωση του ενεργού τους κέντρου. Μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης για σύγκριση μοτίβων στις αλληλουχίες διάφορων PLP εξαρτώμενων ενζύμων[149], παρατηρήθηκε η δυνατότητα ομαδοποίησης αυτών των 3 τρανσαμινασών, καθώς έδειχναν να διαφέρουν σε σχέση με άλλες τρανσαμινάσες σε σημαντικά αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία συναντώνται στο ενεργό κέντρο και συμβάλουν στον κατάλληλο προσανατολισμό του υποστρώματος. Χαρακτηριστικά, οι τρανσαμινάσες 3HMU και 3I5T, μπορούν επίσης να χαρακτηριστούν και ως υψηλής ενεργότητας τρανσαμινάσες, απέναντι σε χαρακτηριστικά υποστρώματα για τρανσαμινάσες, σε σχέση με τις άλλες τρανσαμινάσες που έφεραν όμοια χαρακτηριστικά. Αυτό επαληθεύεται και από τα αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης της ενεργότητας των τρανσαμινασών, καθώς μεταξύ 3HMU, 3FCR και 3I5T, η 3FCR, εμφανίζει τη χαμηλότερη ενεργότητα[150]. Οι τρανσαμινάσες 3FCR, πέραν του αγρίου τύπου (3FCR_wt), είχαν αναπτυχθεί σε μια εργασία που αφορά στην ανάπτυξη τρανσαμινασών που μπορούν να δεχτούν ογκώδη υποστρώματα, και οι ATA-3 έως ATA-9 είναι ομόλογες τρανσαμινάσες (έως 70%) της 3FCR_4M[140]. Τέλος, οι τρεις (*R*)-εκλεκτικές τρανσαμινάσες προέκυψαν από την βιοπληροφορική μελέτη της οικογένειας τρανσαμινασών από τον Prof. Matthias Höhne, και ήταν ανάμεσα στις πρώτες (*R*)-εκλεκτικές τρανσαμινάσες που αναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία[151].

Πίνακας 3.2: Ογκομετρική ενεργότητα (U/mL) των 17 τρανσαμινασών που μελετήθηκαν έναντι των ενώσων **1a**, **2a** και **3a**. Οι μετρήσεις έγιναν τουλάχιστον εις τριπλούν. Για το υπόστρωμα **1a** χρησιμοποιήθηκε οπτικά ενεργή αμίνη της προτίμησης της κάθε τρανσαμινάσης.

Ένζυμο	 **2a**		 **3a**		 **1a**	
	pH 7,5	pH 9,0	pH 7,5	pH 9,0	pH 7,5	pH 9,0
3FCR_wt	0 [a]	0,002±0,001	0,003±0,001	0,019±0,001	0,002±0,001	- [b]
3FCR_DM	0,015±0,002	0,080±0,003	0,142±0,007	0,083±0,003	- [b]	- [b]
3FCR_4M/L382M/G429A	0 [a]	0 [a]	0,006± 0,001	0,088±0,003	0 [a]	0,139±0,002
3FCR_5M	0 [a]	0,188±0,011	0,129±0,012	0,67±0,05	0,289± 0,002	3,422± 0,022[c]
ATA-3	0 [a]	0 [a]	0,051±0,002	0,185±0,006	0 [a]	0,253±0,016
ATA-5	0,038±0,002	0,164±0,022	0,254±0,024	0,512±0,042	0,096±0,014	0,444±0,026
ATA-6	0,041±0,008	0,134±0,027	0,302±0,012	1,284±0,028	0,194±0,03	1,341±0,043
ATA-7	0,021±0,001	0,120±0,012	0,179±0,004	1,430±0,065	0,336±0,002	1,768±0,063
ATA-8	0,006±0,003	0,088±0,011	0,038±0,002	0,254±0,020	0,076± 0,004	3,14±0,11
ATA-9	0,023±0,012	0,055±0,003	0,069±0,007	0,488±0,028	0,112±0,015	3,298±0,078
VibFlu	0,093±0,012	0,770±0,022	0,323±0,012	1,918±0,056	0,719±0,031	3,929±0,078
3I5T	0,146±0,030	0,480±0,022	0,538±0,019	2,003±0,045	0,204±0,026	1,747±0,135
3HMU	0,086±0,012	0,909±0,038	0,573±0,020	3,988±0,075	0,590±0,016	8,5±0,6
ChrVio	0,285±0,012	1,641±0,044	0,790±0,001	3,468±0,199	1,162±0,015	2,96±0,27
JanSp	0,010±0,002	0,023±0,001	0,030±0,004	0,169±0,023	0,071±0,019	0,971±0,036
LabAle	0,052±0,005	0,279±0,012	0,137±0,012	0,715±0,023	0,680±0,031	1,742±0,102
GamPro	0 [a]	0,029±0,009	0 [a]	0,195±0,001	0,051±0,047	0,974±0,054

[a] Ανενεργό ή κάτω από το όριο ανίχνευσης, [b] Δε μετρήθηκε, [c] Εκτός γραμμικού εύρους.

Αναφορικά με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις, μπορούν να εξαχθούν δύο συμπεράσματα. Αρχικά, παρατηρήθηκε μία αυξημένη ενζυμική ενεργότητα στο pH 9.0 σε σχέση με το pH 7.5. Αυτό είναι κάτι το οποίο έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία,[140] όπως για παράδειγμα συμβαίνει στην περίπτωση μεταλλαγμένου ενζύμου από τον οργανισμό *Arthrobacter sp*.[152,153]. Ωστόσο, οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες επιλέγουν να εργάζονται στο pH 7.5 καθώς οι περισσότερες συχνά χρησιμοποιούμενες τρανσαμινάσες εμφανίζουν υψηλότερη σταθερότητα σε αυτό το pH, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη παραγωγικότητα σε βιοδιεργασίες με αυξημένη διάρκεια.[139]. Συνεπώς η ενεργότητα και η σταθερότητα του ενζύμου φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιλογή των βέλτιστων συνθηκών για τη διεργασία.

Μεταξύ των δύο φουρανικών αμινών, η 5-μεθυλο-υποκατεστημένη αμίνη **3a** φαίνεται να προτιμάται από τα περισσότερα ένζυμα έναντι της **2a**. Αν και περίεργο, δεδομένου ότι το **2a** είναι μικρότερο σαν υπόστρωμα, μια αιτιολόγηση αυτής της συμπεριφοράς μπορεί να συνδεθεί με το ενεργό κέντρο των τρανσαμινασών. Όπως αναφέρεται και στην **Παράγραφο 1.3**, το ενεργό κέντρο των γνωστών τρανσαμινασών αγρίου τύπου, διαμορφώνεται από την ύπαρξη μιας μικρής και μιας μεγάλης περιοχής πρόσδεσης[140]. Στην μεγάλη θέση πρόσδεσης μπορεί να προσδεθεί ένας βενζολικός δακτύλιος, όπως στην περίπτωση του **1a**. Καθώς ο φουρανικός δακτύλιος είναι μικρότερος, είναι πιθανόν ο μεθυλο-υποκαταστάτης του **3a** να υποβοηθά την καλύτερη σταθεροποίηση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο, σε σχέση με τον μη υποκατεστημένο φουρανικό δακτύλιο του **2a**.

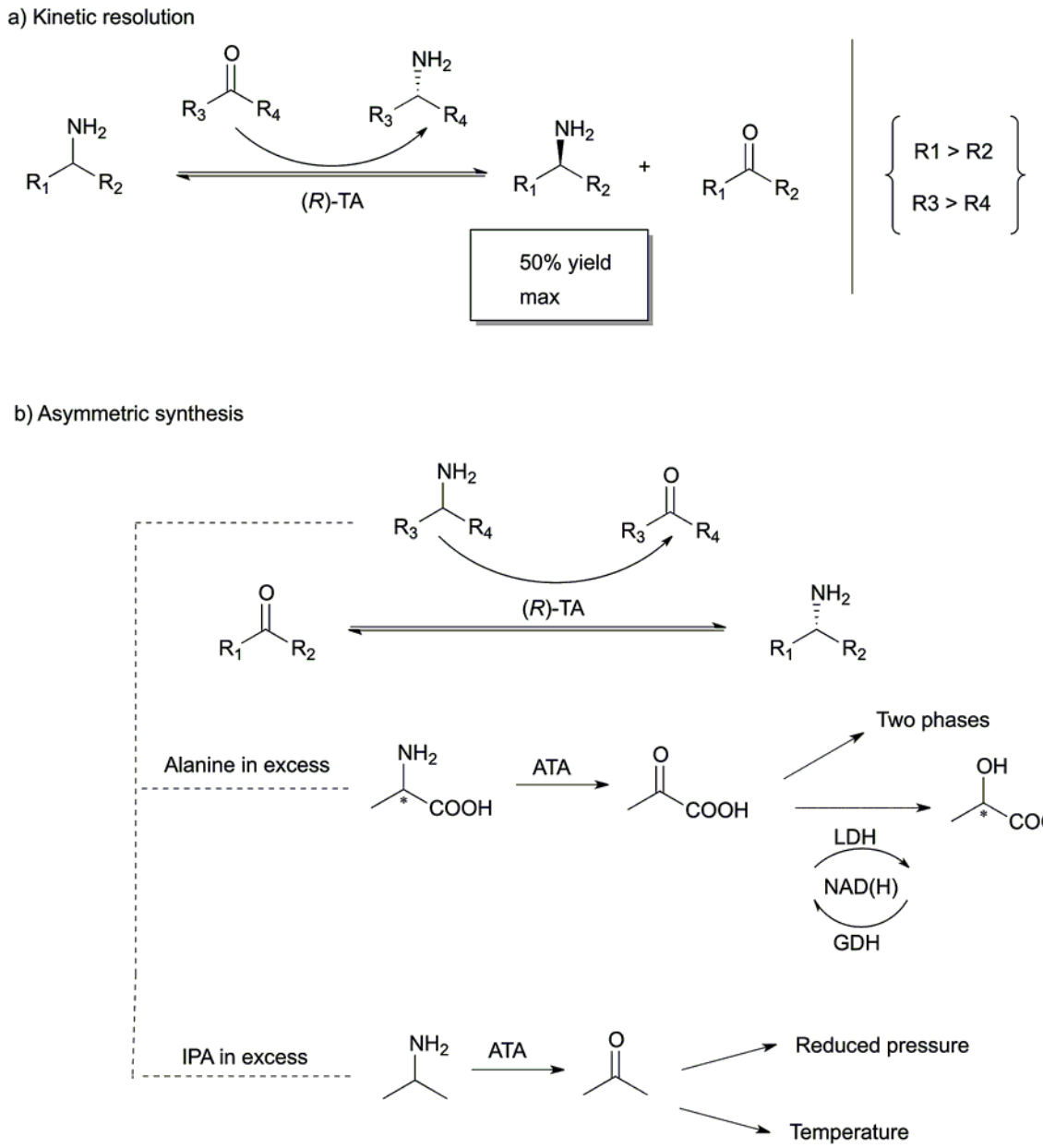
Μετά από ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του **Πίνακα 3.2**, ξεχώρισαν 4 ένζυμα με τις υψηλότερες ενεργότητες. Τα ένζυμα αυτά ήταν από τους οργανισμούς *Rhodobacter sphaeroides* (3I5T), *Ruegeria pomeroyi* (3HMU), *Vibrio fluvialis* (VibFlu) και *Chromobacterium violaceum* (ChrVio), τα οποία εμφάνιζαν ιδιαίτερα υψηλή δραστικότητα έναντι της αμίνης **3a** και στις δυο επιλεγμένες τιμές pH. Σημειώνεται ότι η ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων των 3I5T και 3HMU ανερχόταν μόλις σε ποσοστό 35%. Λαμβάνοντας αυτά τα αποτελέσματα υπόψη, αλλά και σε συνδυασμό με αναφορές στη βιβλιογραφία[148] και μια σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων με την αλδεΰδη **4b**, επιλέχθηκαν τα ένζυμα με τα οποία πραγματοποιήθηκαν τα επόμενα πειράματα με τις ενώσεις **4** και **5**. Τα ένζυμα αυτά ήταν το *Chromobacterium violaceum* (ChrVio) καθώς και το *Vibrio fluvialis* (VibFlu). Το ένζυμο από *Rhodobacter sphaeroides* (3I5T) απορρίφθηκε λόγω της χαμηλής του σταθερότητας, ακόμα και σε θερμοκρασία δωματίου[141,154], καθώς και το ένζυμο από τη *Ruegeria pomeroyi* (3HMU), λόγω χαμηλών αποδόσεων σε δοκιμές με τα υποστρώματα ενδιαφέροντος.

Πειραματικός Σχεδιασμός για την Ανάπτυξη Βιοδιεργασιών

Η αξιοποίηση της ασύμμετρης σύνθεσης χειρόμορφων αμινών από προχειρόμορφες ή μεσοχειρόμορφες ενώσεις μέσω ενζυμικής αμίνωσης από τρανσαμινάσες έχει αναδειχτεί ως μία ενδιαφέρουσα εναλλακτική συνθετική μέθοδος έναντι της οργανικής κλασικής σύνθεσης[44,140]. Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, η ενεργότητα και η σταθερότητα των ενζύμων είναι δύο σημαντικοί παράγοντες που επιδρούν στον σχεδιασμό των βιοδιεργασιών. Εξίσου σημαντικό στις αντιδράσεις που σχεδιάζονται με τρανσαμινάσες, είναι η επιλογή του δότη αμινομάδας. Καθώς η ασύμμετρη σύνθεση δεν ευνοείται θερμοδυναμικά, η επιλογή του δότη αμινομάδας έχει απασχολήσει τις ερευνητικές ομάδες του πεδίου. Για αυτό το λόγο, στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας έγινε μία μετα-ανάλυση σχετικά με τα συστήματα που χρησιμοποιούνται για την μετατόπιση της θερμοδυναμικής ισσοροπίας[139].

Οι πιο συνήθεις δότες αμινομάδας που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία είναι η αλανίνη και η ισοπροπυλαμίνη (**Σχήμα 3.2**). Το σύνολο της αντίδρασης δεν ευνοείται θερμοδυναμικά και για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι μετατόπισης της ισορροπίας της αντίδρασης προς την επιθυμητή κατεύθυνση, όπου οι δότες αμινομάδας παρέχονται σε περίσσεια. Η ισοπροπυλαμίνη (IPA) πιο συγκεκριμένα, είναι μια μη χειρόμορφη αμίνη με χαμηλό κόστος[155]. Η έλλειψη χειρομορφίας, δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί τόσο από (*R*)- όσο και από (S)-εκλεκτικές τρανσαμινάσες, κάτι που αυξάνει το κόστος σε περιπτώσεις χειρόμορφων ένώσεων (π.χ. αλανίνη), οι οποίες πρέπει να δωθούν σε οπτικά καθαρή μορφή. Η απομάκρυνση του παραπροϊόντος (ακετόνη) για την μετατόπιση της χημικής ισορροπίας προς την επιθυμητή κατεύθυνση μπορεί να γίνει πολύ εύκολα και αποδοτικά, καθώς η δημιουργούμενη ακετόνη μπορεί να εξατμιστεί εύκολα, αλλάζοντας τις συνθήκες τις αντίδρασης (είτε με ελαφριά αύξηση της θερμοκρασίας, είτε με μείωση της πίεσης) [49]. Στην περίπτωση όπου ως δότης αμινομάδας χρησιμοποιηθεί η αλανίνη, το παραπροϊόν που δημιουργείται (πυροσταφυλικό οξύ) μπορεί να απομακρυνθεί ενζυμικά, με προσθήκη αφυδρογονασών ή αποκαρβοξυλασών, οι οποίες θα απομακρύνουν το παραπροϊόν, καθιστώντας το συμπαράγοντα διαθέσιμο για επαναχρησιμοποίηση. Τέλος, η χρήση IPA δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού των προϊόντων και των υποστρωμάτων σε δύο διαφορετικές φάσεις, διαμέσου υποστηριζόμενης υγρής μεμβράνης (supported liquid membrane)[156]. Παρ' ότι έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για τη δυνατότητα αξιοποίησης της IPA ως δότη αμινομάδας από τις τρανσαμινάσες για ασύμμετρη σύνθεση, δεν υπάρχουν συστηματικές καταγραφές ενζύμων ικανά να την αξιοποιήσουν. Όλα τα παραπάνω έθεσαν τη θεωρητική βάση για το

σχεδιασμό των πειραμάτων που θα λάμβαναν χώρα με τα ένζυμα από τους οργανισμούς *Chromobacterium violaceum* και *Vibrio fluvialis*.



Σχήμα 3.2: a) Κινητικός διαχωρισμός ρακεμικής αμίνης όπου η μέγιστη θεωρητική απόδοση είναι 50%. b) Ασύμμετρη σύνθεση μίας χειρόμορφης αμίνης, στην οποία αξιοποιείται ως δότης αμινομάδας η αλανίνη ή η IPA. Καθώς η συγκεκριμένη αντίδραση δεν ευνοείται θερμοδυναμικά, ο δότης αμινομάδας παρέχεται σε περίσσεια, ενώ υπάρχουν προσεγγίσεις αφαίρεσης του παραπροϊόντος (πυροσταφυλικό οξύ ή ακετόνη)[139].

Παρά το μικρό μέγεθος της IPA, οι τρανσαμινάσες αγρίου τύπου (Wild Type, wt), συνήθως δεν μπορούν να την χρησιμοποιήσουν ως δότη αμινομάδας, είτε λόγω χαμηλής σταθερότητας (συνήθως απαιτείται 1 M IPA, που είναι περίπου 7-8% (v/v) στην τελική αντίδραση), είτε λόγω χαμηλής συγγένειας. Σε κάθε περίπτωση, για να αναπτυχθούν βιοδιεργασίες με τρανσαμινάσες και IPA, απαιτείται συνήθως πρωτεϊνική μηχανική[138,157] Αξίζει να σημειωθεί όμως, ότι οι WT τρανσαμινάσες από τους οργανισμούς *Chromobacterium violaceum,* και *Burkholderia. vietnamiensis* επέδειξαν την ικανότητα τους στη χρήση IPA, κάτι το οποίο δεν συνηθίζεται, όπως προαναφέρθηκε, σε τρανσαμινάσες αγρίου τύπου. Και τα δύο ένζυμα εμφάνισαν αυξημένη αποτελεσματικότητα σε συγκεκριμένες περιπτώσεις όταν ο δότης αμινομάδας αντικαταστάθηκε από αλανίνη σε IPA, αλλά και με διαφορετικούς δότες αμινομάδας, συμπεριλαμβανομένης και της φαινυλαιθυλαμίνης (PEA)[158–160]. Αντίστοιχα, για τις τρανσαμινάσες οι οποίες ανήκουν στην ομάδα αναδίπλωσης τύπου IV, βιβλιογραφικά παρουσιάζονται μόνο 5 ένζυμα που μπορούν να αξιοποιήσουν IPA σαν δότη αμινομάδας, και αυτό οφείλεται στο ότι μέχρι το 2010, οι (*R*)-εκλεκτικές τρανσαμινάσες δεν ήταν ευρέως διαθέσιμες[44,151]. Αξιοσημείωτο είναι το ότι σε αυτήν την ομάδα, υπάρχουν ένζυμα αγρίου τύπου τα οποία δρουν ικανοποιητικά με την IPA, όπως οι τρανσαμινάσες από τους οργανισμούς *Aspergillus fumigatus* και *Capronia semiimmersa*[154,161,162].

Παράλληλα, οι συνθήκες οι οποίες παρατηρήθηκαν να διαφοροποιούνται και να επηρεάζουν την απόδοση των προς μελέτη τρανσαμινασών ήταν η συγκέντρωση της διαθέσιμης IPA, η θερμοκρασία πραγματοποίησης της αντίδρασης, καθώς επίσης και η πίεση και το pH της αντίδρασης. Η διαθέσιμη ποσότητα IPA καθορίζει τη διαθεσιμότητα του δότη αμινομάδας, επηρεάζοντας έτσι την συχνότητα δέσμευσής του στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, και τελικά της πραγματοποίησης της τρανσαμίνωσης. Αυτό αποτέλεσε ένα πρώτο σημείο ελέγχου για τις επιλεγμένες τρανσαμινάσες, στη διαδικασία προσδιορισμού και βελτιστοποίησης της ενζυμικής αντίδρασης. Παράλληλα, η διαφοροποίηση στη θερμοκρασία και στην πίεση της αντίδρασης παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς επηρεάζει το ρυθμό απομάκρυνσης της ακετόνης, επομένως και την απόδοση της αντίδρασης. Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι υπάρχει μια λεπτή ισορροπία μεταξύ της βέλτιστης λειτουργίας δράσης του εκάστοτε ενζύμου και της βέλτιστης θερμοκρασίας απομάκρυνσης της ακετόνης. Καθώς μια αντίδραση τρανσαμίνωσης μπορεί να διαρκέσει από ελάχιστες ώρες μέχρι κάποιες ημέρες, είναι σημαντικό το ένζυμο να έχει ικανοποιητική θερμική σταθερότητα στη συγκεκριμένη θερμοκρασία. Για το λόγο αυτό, μια εναλλακτική που προτείνεται είναι ο έλεγχος της πίεσης[158,163], ώστε να μην επηρεάζεται η λειτουργία των ενζύμων, αλλά παράλληλα να ευνοείται η απομάκρυνση της ακετόνης. Σε κάθε συνθήκη, πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν και η σταθερότητα του υποστρώματος που

χρησιμοποιείται, καθώς ασταθή υποστρώματα σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας ή πίεσης μπορεί να εμφανίζουν χαμηλή σταθερότητα ή να ισομεριωθούν.

Παράλληλα, η τιμή του pH στο οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση έχει σημαντικό ρόλο, καθώς δεν έχει διευκρινιστεί στη βιβλιογραφία ποιο είναι το βέλτιστο pH λειτουργίας των τρανσαμινασών. Ένας παράγοντας στον οποίο οφείλονται τα διαφορετικά αποτελέσματα είναι η χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού της ενεργότητας. Οι φωτομετρικές μετρήσεις δίνουν βέλτιστο pH σε υψηλότερες τιμές, όπως και στην δική μας περίπτωση στην προηγούμενη παράγραφο. Παρόλα αυτά, οι συγκεκριμένες μέθοδοι δεν υπολογίζουν την σταθερότητα του ενζύμου. Έτσι, άλλες μέθοδοι, όπως ανάλυση ύστερα από μερικές ώρες μέσω χρωματογραφίας (GC ή HPLC) δείχνουν ότι η καλύτερη παραγωγικότητα συναντάται σε χαμηλότερο pH όπως 7.5 ή 8.0. Αξίζει να σημειωθεί ότι η προσθήκη περίσσειας PLP μπορεί να συνεισφέρει στην σταθεροποίηση των τρανσαμινασών. Με αυτά τα δεδομένα, οι επιλεγμένες τρανσαμινάσες μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία σε συγκεντρώσεις IPA 100 mM, 200 mM και 400 mM και σε τιμές pH 7.0, 8.0 και 9.0. Σε όλες τις μελέτες, υπήρχε δειγματοληψία ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να παρατηρηθεί η παραγωγικότητα του ενζύμου στην έκαστη μελετούμενη συνθήκη.

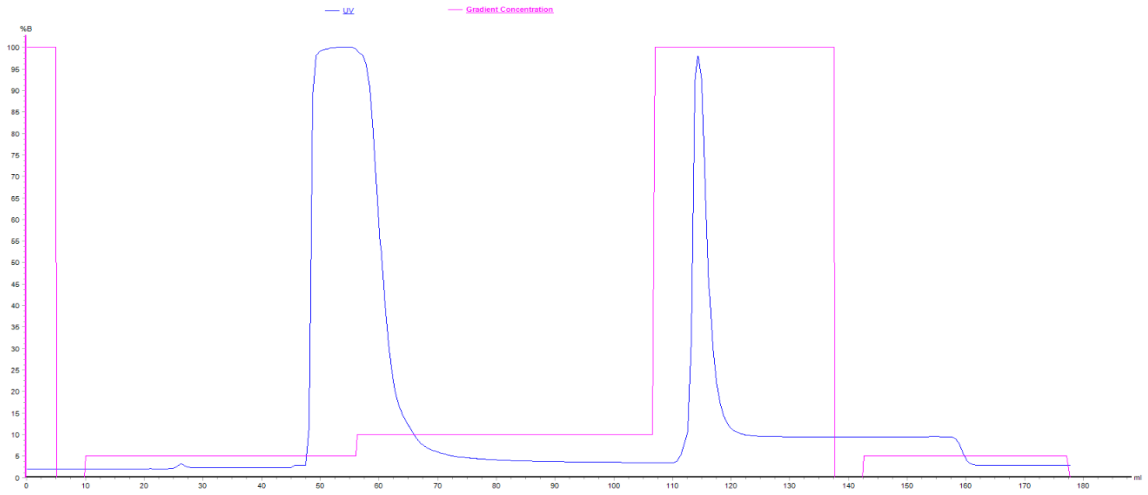
Αμίνωση Φουρανικών Ενώσεων για την Παραγωγή Βιοπολυμερών

Έχοντας τις παραπάνω παρατηρήσεις για τις συνθήκες αντίδρασης των τρανσαμινασών χρησιμοποιώντας IPA ως δότη αμινομάδας, και έχοντας επιλέξει τα ένζυμα από τους οργανισμούς *Chromobacterium violaceum* και *Vibrio fluvialis*, προχωρήσαμε σε πρώτο στάδιο στην πραγματοποίηση αντιδράσεων με βάση φουρανικά υποστρώματα. Τα φουράνια έχουν μικρότερο μέγεθος (5μελής δακτύλιος) σε σχέση με τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνταν στις περισσότερες μελέτες (π.χ. το υπόστρωμα αναφοράς φέρει 6μελή δακτύλιο), και όπως φάνηκε και από τα πειράματα διαλογής, οι τρανσαμινάσες που επιλέχθησαν μπορούν να τα μετατρέψουν με έναν αρκετά γρήγορο καταλυτικό ρυθμό. Τα υποστρώματα που επιλέχτηκαν για τις διεργασίες παραγωγής βιοπολυμερών ήταν τα **4b** και **5b**, σύμφωνα με τις αντιδράσεις που αναφέρθηκαν στην **Κεφάλαιο 2** (**Σχήμα 2.3**, σελίδα 30). Στο παρόν κεφάλαιο θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων αντιδράσεων, καθώς και η μελέτη βελτιστοποίησης των συνθηκών αντίδρασης.

Συνθήκες Αντίδρασης και Καθαρισμός Πρωτεΐνης

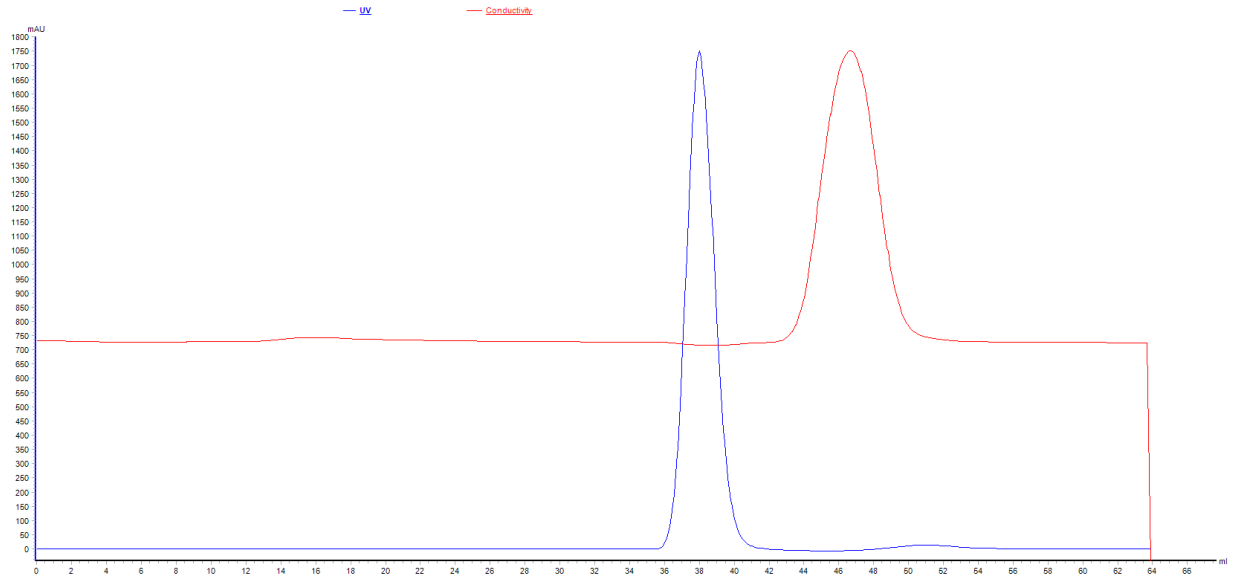
Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τις παρακάτω συνθήκες, εκτός και αν αναφέρεται κάτι διαφορετικό. Σε τελικό όγκο 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (50 mM, pH 8.0) παρουσία 0.1 mM PLP και συγκεκριμένης συγκέντρωσης IPA, χρησιμοποιήθηκαν 2 mg υποστρώματος (**4b** ή **5b**) και 0.7 mg καθαρισμένης τρανσαμινάσης ChrVio ή VibFlu. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε θερμοαναδευτήρα, στους 37 °C για 24 h, σε 600 rpm. Δείγματα λήφθηκαν προς ανάλυση και σε ενδιάμεσους χρόνους. Για τις διαφορετικές τιμές pH, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.0), και ρυθμιστικό διάλυμα CHES (50 mM, pH 9.0)

Ο καθαρισμός των ενζύμων προτιμήθηκε, τόσο για την αποφυγή παραπροϊόντων από άλλα κυτταροπλασματικά ένζυμα, όσο και για την ευκολία καθαρισμού του τελικού προϊόντος. Ο καθαρισμός των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την **Παράγραφο 2.14**. Ενδεικτικά στην **Εικόνα 3.3** φαίνεται το γράφημα κολωνας HisTrap™, καθ' όλη τη διάρκεια του καθαρισμού της ChrVio. Η ανίχνευση των εκλουώμενων πρωτεϊνών, γίνεται μέσω ανιχνευτή UV, στα 280 nm. Παρατηρώντας την αύξηση του ποσοστού διαλύματος B, το οποίο είναι αναλογικό με την αύξηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου, μπορούν να διακριθούν τα στάδια του καθαρισμού (εξισορρόπηση, φόρτωμα στήλης, πλύση και τελικά έκλουση πρωτεϊνών).



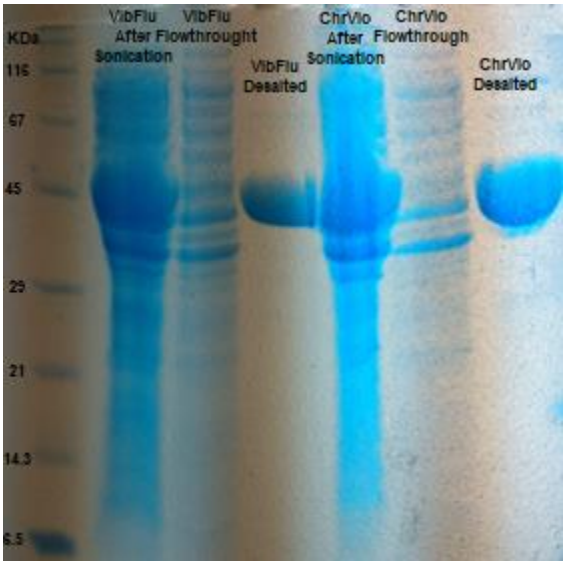
Εικόνα 3.3: Γράφημα κολώνας καθαρισμού HisTrap™. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η καμπύλη η οποία οφείλεται στην απορρόφηση που εμφανίζουν οι πρωτεΐνες στα 280 nm, ενώ η μωβ καμπύλη παρουσιάζει την μεταβολή του ποσοστού του διαλύματος B. Η πρώτη έντονη μπλε καμπύλη οφείλεται στο σύνολο των πρωτεϊνών οι οποίες δεν συγκρατήθηκαν στην κολώνα. Με την αύξηση της ποσότητας ιμιδαζολίου, μέσω αύξησης του ποσοστού του διαλύματος B, παρατηρείται και μια δεύτερη έντονη μπλε κορυφή, η οποία οφείλεται στην έκλουση της επιθυμητής πρωτείνης.

Στην **Εικόνα 3.4**, παρουσιάζεται το χρωματογράφημα της αφαλάτωσης των κλασμάτων της καθαρισμένης πρωτεΐνης, η οποία πραγματοποιήθηκε με 3 κολώνες 5 mL HiTrap™ desalting σε σειρά. Τα κλάσματα της καθαρισμένης πρωτεΐνης συλλέχθηκαν, για την απομάκρυνση των αλάτων που περιέχονται σε αυτά. Η κόκκινη καμπύλη παρουσιάζει τη μεταβολή της αγωγιμότητας (conductivity) που οφείλεται στα άλατα. Σε συνδυασμό με την μπλε καμπύλη, στην οποία παρακολουθείται μέσω UV στα 280 nm η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, ελέγχθηκε ο διαχωρισμός αυτών των δύο καμπυλών, με σκοπό την απομάκρυνση των αλάτων τα οποία προήλθαν από τα ρυθμιστικά διαλύματα, και τη συλλογή της καθαρισμένης πρωτεΐνης, απουσία αλάτων, όπως και συνέβη.



Εικόνα 3.4: Γράφημα κολώνας HiTrap™ desalting. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η καμπύλη η οποία οφείλεται στην απορρόφηση που εμφανίζουν οι πρωτεΐνες στα 280 nm, ενώ η κόκκινη καμπύλη παρουσιάζει την μεταβολή της αγωγιμότητας. Ο διαχωρισμός των δύο καμπυλών είχε σαν αποτέλεσμα τη συλλογή της καθαρισμένης πρωτεΐνης απουσία αλάτων.

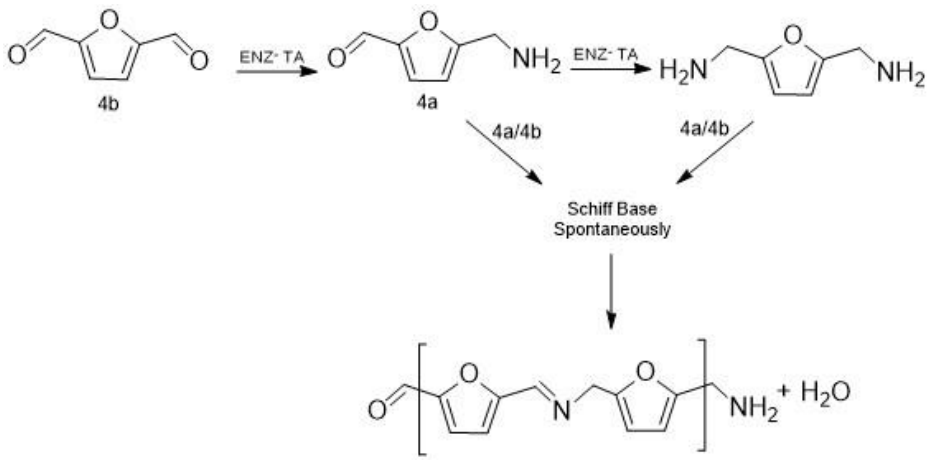
Στην **Εικόνα 3.5** παρουσιάζεται ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου από πείραμα SDS-PAGE, στο οποίο φαίνονται καθαρισμένες οι πρωτεΐνες ChrVio και VibFlu.



Εικόνα 3.5: Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12% από SDS-PAGE για την επιβεβαίωση του καθαρισμού των τρανσαμινασών. Τα δείγματα με σειρά από τα αριστερά προς τα δεξιά: (1) δείκτης μοριακών βαρών (2) υπερκείμενο από σπάσιμο κυττάρων με υπερέκφραση της VibFlu (3) δείγμα μη προσδεδεμένων πρωτεϊνών στη στήλη νικελίου (4) αφαλατωμένη VibFlu (5-7) Τα αντίστοιχα δείγματα για την ChrVio.

Σύνθεση Πολυιμινικού Πολυμερούς

Η παραγωγή του πολυιμινικού πολυμερούς από την διαλδεΰδη **4b** πραγματοποιήθηκε αρχικά σύμφωνα με τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν, με τις τρανσαμινάσες ChrVio και VibFlu. Καθώς παρατηρήθηκε όμως η δημιουργία πολυμερούς, ο όγκος της αντίδρασης αυξήθηκε στα 2 mL, διατηρώντας σταθερές τις συγκεντρώσεις, ώστε να παραχθεί μεγαλύτερη ποσότητα προϊόντος για περαιτέρω μελέτη. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιούνταν η αμίνωση του φουρανικού υποστρώματος, και η δημιουργία του **4a**. Αν και η υπόθεση μας ήταν πως θα έπρεπε να απομονωθεί η μονο-αμίνη και να μεταφερθεί σε άλλο σύστημα για τον ολιγο/πολυ-μερισμό της, διαπιστώθηκε ότι αυθόρμητα ακολουθούσε δημιουργία ιμιδικού δεσμού μεταξύ αλδεϋδομάδας και αμίνης των μονομερών, μέσω βάσης κατά Schiff. Ο ολιγομερισμός μπορεί να λάμβανε χώρα τόσο μεταξύ μονομερών **4a**, αλλά και από την προσθήκη **4b** σε ελεύθερη αμίνη, ή διαμίνης σε ελεύθερη αλδεΰδη (**Σχήμα 3.3**).



Σχήμα 3.3: Σχηματική απεικόνιση των αντιδράσεων που μπορούν να οδηγήσουν σε σχηματισμό πολυμερούς.

Έτσι, όλα τα πιθανά προϊόντα μπορούν να οδηγήσουν σε ολιγομερισμό στο ελαφρώς αλκαλικό pH της ενζυμικής αντίδρασης. Η πορεία της αντίδρασης είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός έντονου εναιωρήματος, ορατού με γυμνό μάτι (**Εικόνα 3.6)**, ύστερα από περίπου 12 h αντίδρασης, και του οποίου η παραγωγή φαινόταν να σταματάει στις 24 h. Για τη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη δοκιμάστηκε και η τρανσαμινάση 3HMU, η οποία δεν παρήγαγε στερεό πολυμερές. Παράλληλα, για τις τρανσαμινάσες ChrVio και VibFlu, η παραγωγή πολυμερούς δοκιμάστηκε και σε τιμές pH 7 και 9. Παρατηρήθηκε μια διαφοροποίηση στη δημιουργία του στερεού, με γρηγορότερο σχηματισμό αυτού στο pH 9. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι υπήρχε έντονος αποχρωματισμός της αντίδρασης, από το κίτρινο χρώμα που της προσδίδει το PLP, γι'αυτό τον λόγο έγινε προσθήκη επιπλέον ποσότητας PLP στις 6 και 12 h αντίδρασης, ώστε τα ένζυμα να διατηρήσουν την καταλυτική τους δράση.

Εικόνα 3.6: Αντίδραση αμίνωσης του **4b** καταλυόμενη από την τρανσαμινάση ChrVio στους 37 °C, στις 260 rpm στον αναδευτήρα επώασης Microtron (Infors,HT) ύστερα από 24 h επώασης. Παρατηρείται θολερότητα στο εναιώρημα μικρών σωματιδίων που δημιουργούνται από τον αναμενόμενο πολυμερισμό.

Μετά το πέρας 24 h, ακολούθησε συλλογή του πολυμερούς, με σκοπό τον καθαρισμό του, αλλά και την απομόνωση της μέγιστης δυνατής ποσότητας αυτού. Τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν με χρήση φυγοκέντρου Biofuge Fresco Heraeus για 10 min, σε 12000 rpm, με αποτέλεσμα το στερεό να κατακαθίσε. Με έκχυση απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, το οποίο επανατοποθετήθηκε στον θερμικό αναδευτήρα στις ίδιες συνθήκες, για ακόμα 24 h, ώστε να επιβεβαιωθεί η ολοκλήρωση της αντίδρασης με τη μη εμφάνιση περαιτέρω προϊόντος, όπως και συνέβη. Το στερεό το οποίο είχε συλλεχθεί, επαναιωρήθηκε με απιονισμένο νερό, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν επιμολύνσεις (μετουσιωμένη πρωτεΐνη, άλατα) οι οποίες μπορεί να έχουν εγκλωβιστεί σε αυτό. Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση του νερού αυτή την φορά. Τέλος το στερεό τοποθετήθηκε μαζί με το δοχείο του σε ξηραντικό φούρνο. Επιλέχθηκε ήπια θερμοκρασία 40 °C και το στερεό ξηράνθηκε για 48 h.

Η αδυναμία διάλυσης του προκύπτοντος εναιωρήματος σε δευτεριωμένο οργανικό διαλύτη (Τριφθοραιθανικό οξύ, διμεθυλοσουλφοξείδιο, χλωροφόρμιο, ακετόνη, αιθανόλη) για την ανάλυσή και ταυτοποίησή του μέσω φασματοσκοπίας NMR, αποτέλεσε ένα σημαντικό εμπόδιο στο χαρακτηρισμό του προϊόντος. Για το λόγο αυτό, και πριν προχωρήσουμε σε πιο έμμεσες μεθόδους χαρακτηρισμού, σχεδιάστηκε μια σειρά πειραμάτων, με σκοπό τον αποκλεισμό πιθανών σεναρίων δημιουργίας του αιωρήματος, δια της είς άτοπον απαγωγής. Πραγματοποιήθηκαν τρείς διαφορετικές αντιδράσεις- έλεγχοι, στις συνθήκες που αναφέρθηκαν στην **Παράγραφο 0**.

- Υπόθεση #1 - χημική (μη ενζυμική) κατάλυση: Στο συγκεκριμένο έλεγχο μελετήθηκε η περίπτωση η αντίδραση που οδηγεί στο προϊόν που δημιουργεί το εναιώρημα να μην καταλύεται από την τρανσαμινάση, αλλά να γίνεται αυθόρμητα αυτοοργάνωση του υποστρώματος, ή να καταλύεται η αμίνωση χημικά από το PLP. Πραγματοποιήθηκε η αντίδραση με τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν στην **Παράγραφο 3.5** απουσία ενζύμου. Ο όγκος αντί του ενζύμου (200 μL στο 1 mL), συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (50 mM, pH 8.0, PLP 0.1 mM). Στόχος ήταν η παρατήρηση αν το PLP έχει τη δυνατότητα να αμινώσει το υπόστρωμα **4b**, και να συνθέσει έτσι με χημική κατάλυση κάποιο ολιγομερές. Σε αυτό τον έλεγχο δεν παρατηρήθηκε δημιουργία αιωρήματος, αποδεικνύοντας ότι η αντίδραση είναι ενζυμική.

- Υπόθεση #2 – Απενεργοποίηση ενζύμου: Στο συγκεκριμένο έλεγχο μελετήθηκε η περίπτωση το εναιώρημα να είναι αποδιαταγμένη πρωτεΐνη (λόγω μακράς επώασης σε θερμοκρασία 37 °C και υψηλής συγκέντρωσης IPA), αν και τα σφαιρίδια που προέκυπταν είχαν σφαιρική διαμόρφωση και όχι ινώδη, όπως οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες. Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση, δοκιμάστηκε η αντίδραση κάτω από τις ίδιες συνθήκες και για τα δύο ένζυμα, με μόνη διαφοροποίηση στο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε, καθώς το υπόστρωμα **4b** αντικαταστάθηκε από το υπόστρωμα **5b**. Το υπόστρωμα **5b** ομοιάζει με το **4b**, και θα μπορούσε να προσβάλει το ένζυμο με την αλδεΰδη, αλλά δεν μπορεί να πολυμεριστεί. Ύστερα από 24 h επώασης κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δε δημιουργήθηκε εναιώρημα, κάτι που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι (i) η δημιουργία του προκύπτοντος εναιωρήματος εξαρτάται από το υπόστρωμα **4b**, και (ii) και οι δύο χρησιμοποιούμενες τρανσαμινάσες παραμένουν σταθερές στις επιλεγμένες συνθήκες για το χρονικό περιθώριο της αντίδρασης, χωρίς να διαταράσσεται η δομή τους.

- Υπόθεση #3 – Μοριακή διασύνδεση πρωτεϊνών μέσω της διαλδεΰδης **4b**: Στο συγκεκριμένο έλεγχο μελετήθηκε η υπόθεση το εναιώρημα να είναι ένα πολυμερές από πρωτεΐνες που διασυνδέονται ομοιοπολικά μέσω της διαλδεΰδης **4b**, με αντίστοιχο τρόπο όπως δημιουργούνται τα cross linked enzyme aggregates (CLEAs)[164]. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης, χρησιμοποιήθηκε μια διαφορετική πρωτεΐνη, για να ελεγχθεί η πιθανή δημιουργία ιμιδικών δεσμών επιφανειακών αμινών του ενζύμου (π.χ. πλευρικές ομάδες λυσίνης) με τις αλδεΰδες του υποστρώματος. Η αντίδραση έλαβε χώρα κάτω από τις ίδιες συνθήκες, με μόνη διαφορά την αντικατάσταση της χρησιμοποιούμενης τρανσαμινάσης από αλβουμίνη από βόειο ορό (bovine serum albumin, BSA), η οποία δεν παρουσιάζει ενζυμική δραστικότητα, και συγκεκριμένα ως τρανσαμινάση. Από έλεγχο της τρισδιάστατης δομής της

επιβεβαιώθηκε πως διαθέτει αρκετές επιφανειακές λυσίνες ώστε να μπορέσει να δημιουργήσει CLEAs. Τα αποτελέσματα και του τρίτου ελέγχου ήταν αρνητικά, χωρίς το σχηματισμό εναιωρήματος, αποκλείοντας έτσι το σχηματισμό δικτύου πρωτεϊνών διασυνδεδεμένων με την διαλδεΰδη **4b**.

Τα πειράματα αυτά επιβεβαίωσαν ότι το προκύπτον εναιώρημα είναι προϊόν ενζυμικής αμίνωσης του υποστρώματος **4b** από τις τρανσαμινάσες ChrVio ή VibFlu.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι παράλληλα με το σχεδιασμό και την πραγματοποίηση των παραπάνω πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε και μια σύντομη βιβλιογραφική μελέτη για αντίστοιχες πειραματικές διεργασίες. Ενδιαφέρον παρουσίασε μια μελέτη της Prof. Helen C. Hailes και της ομάδας της[148], στην οποία πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχες μελέτες σε έναν αριθμό φουρανίων με σκοπό τη σύνθεση φουρφουριλαμινών μέσω τρανσαμινασών. Ανάμεσα στα φουράνια που χρησιμοποιήθηκαν συμπεριλαμβάνονταν οι ενώσεις **4b** και **5b**. Παράλληλα, μια από τις τρανσαμινάσες που χρησιμοποιήθηκε από την ομάδα ήταν και η τρανσαμινάση η οποία προέρχεται από τον οργανισμό *Chromobacterium violaceum*. Στην μελέτη τους όμως δεν υπήρχε κάποια ανάλυση για το σχηματισμό του πολυμερούς, πέραν της πεποίθησής τους ότι οι περίπλοκες πολυμερικές διαμορφώσεις οφείλονταν σε ιμινικούς δεσμούς.

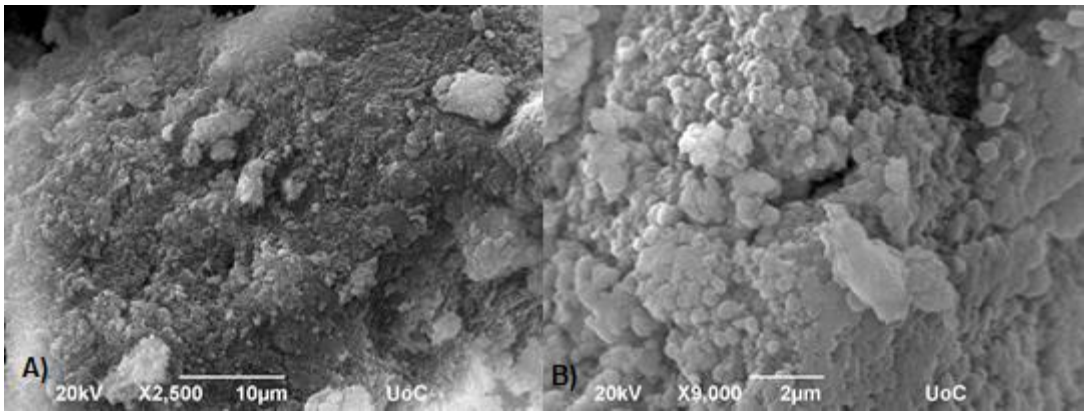
Χαρακτηρισμός του Βιοπολυμερούς

Το εναιώρημα απομονώθηκε με φυγοκέντρηση και, πέραν των προσπαθειών μελέτης με NMR, όπου ο προσδιορισμός της χημικής του σύνθεσης δεν ήταν δυνατός, ακολούθησαν δύο διαφορετικές τεχνικές ανάλυσης για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό της φύσης του πολυμερούς. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε μικροσκοπία ηλεκτρονικής σάρωσης (SEM), και ακολούθησε και χαρακτηρισμός μέσω φασματοσκοπίας IR.

<u>Μικροσκοπία ηλεκτρονικής σάρωσης</u>: Το παραγόμενο πολυμερές, απομονώθηκε, πλύθηκε και ξηράνθηκε. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία παρασκευής δείγματος για SEM, όπως αναφέρεται στη **Παράγραφο 2.18**. Η **Εικόνα 3.7** παρουσιάζει εικόνες της επιφάνειας του απομονωμένου προϊόντος. Σε αυτές φαίνεται μεγάλη πυκνότητα προϊόντος, και διακρίνονται κάποια σημεία όπου υπάρχουν μικρότερα συσσωματώματα. Εστιάζοντας σε μια τέτοια νησίδα με μεγέθυνση x9000, παρατηρείται το δομικό υλικό αυτής. Φαίνεται πως οι υπομονάδες που συνθέτουν το μακροσκοπικό υλικό έχουν σφαιρικό σχήμα, και δημιουργούν συμπαγεί συσσωματώματα. Οι δομές αυτές ομοιάζουν ιδιαιτέρως με δομές νανοσωματιδίων τα οποία είναι συνήθως επικαλυμμένα με πολυμερή, βρίσκοντας πολλές εφαρμογές τόσο στη χορήγηση

φαρμάκων[165] όσο και στην δημιουργία υλικών[166–168]. Σε αυτά τα παραδείγματα, τα νανοσωματίδια προσφέρουν μια επιφάνεια πρόσδεσης στα πολυμερή, το οποίο έχει και σαν αποτέλεσμα το χαρακτηριστικό σφαιρικό σχήμα που λαμβάνουν. Τα συσσωματώματα που παρατηρούνται από τις ενζυμικές αντιδράσεις, δεν εμφανίζουν τον αυστηρά σφαιρικό χαρακτήρα των επικαλυμμένων σωματιδίων, καθώς όπως φαίνεται και στη **Εικόνα 3.7B**, η σφαιρική τους διαμόρφωση δεν είναι απόλυτη.

Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στη δημιουργία δύο υποθέσεων. Αρχικά, τα πολυμερή θα μπορούσαν να σχηματίσουν τέτοιες δομές, μέσω αυτοοργάνωσης τους[169], με τέτοιο τρόπο ώστε να λάβουν αυτή τη σφαιρική διαμόρφωση, είτε στη λογική των επικαλυμμένων σωματιδίων, να εγκλωβίσουν δηλαδή μια ουσία και γύρω από αυτήν να οργανωθούν σφαιρικά. Μια τέτοια ουσία θα μπορούσε να ήταν το PLP, το οποίο υπάρχει σε περίσσεια και όπως αναφέρθηκε και παραπάνω εμφάνιζε έντονη κατανάλωση. Ο συμπαράγοντας, λόγω της φωτοευαισθησίας του και γενικά της αστάθειας του κάτω από τις συνθήκες της αντίδρασης, παρότι μηχανιστικά αναγεννάτε, φαίνεται πως καταναλώνεται πιο γρήγορα, κάτι που ενισχύει την υπόθεση ότι είτε εγκλωβίζεται στο προϊόν, είτε δρα ως εκκινητής πολυμερισμού, διαθέτοντας ο ίδιος μία αλδεϋδομάδα. Και στις δύο υποθέσεις, ο σφαιρικός σχηματισμός δεν είναι απόλυτος, καθώς δεν υπάρχει κάποια συμπαγής σφαιρική ένωση/ουσία γύρω από την οποία να σχηματιστεί μια τέλεια σφαίρα.

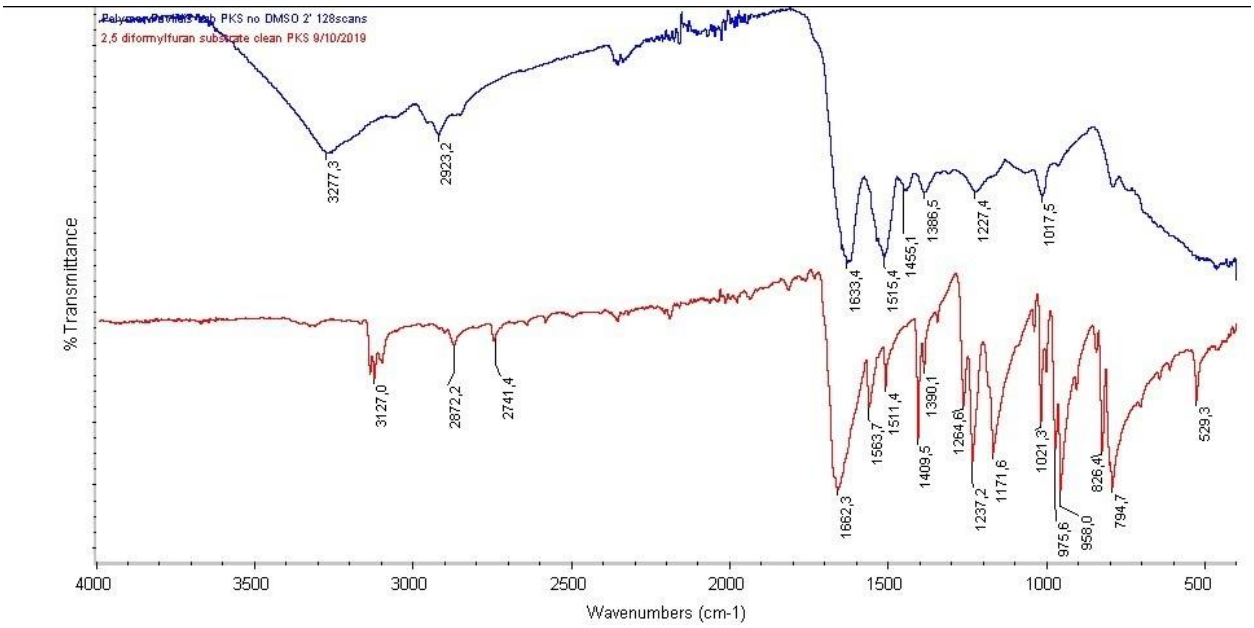


Εικόνα 3.7: A)Η επιφάνεια του απομονωμένου προϊόντος αντίδρασης αμίνωσης της διαλδεΰδης **4b** από τρανσαμινάσες, σε εστίαση 2500 φορές B) σε εστίαση 9000 φορές, όπως φαίνεται σε μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης.

- <u>Φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό Fourier:</u> Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μελέτη μέσω φασματοσκοπίας IR, για τον εντοπισμό των υπαρχόντων δεσμών μέσα στο προϊόν που έχει απομονωθεί, ως ένας έμμεσος χαρακτηρισμός του υλικού. Στόχο αποτελούσε η παρατήρηση του διπλού δεσμού μεταξύ άνθρακα και αζώτου, ο οποίος δεν υπάρχει στα υλικά της αντίδρασης, αλλά που θα έπρεπε να δημιουργηθεί εφόσον δημιουργούταν η βάση κατά Schiff, η οποία θα υποδήλωνε τη δημιουργία του πολυμερούς.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο ιμινικός δεσμός εντοπίζεται στα 1700 με 1600 cm^{-1}, όπου παρατηρείται η δόνηση έκτασης μεταξύ διπλού δεσμού άνθρακα- αζώτου[170,171]. Παράλληλα, αναμένεται απουσία ή μείωση του σήματος του διπλού δεσμού μεταξύ οξυγόνου και άνθρακα, λόγω κατανάλωσης της αλδεΰδης. Η ένωση **4b** είναι μια ακόρεστη διαλδεΰδη όπου η δόνηση έκτασης του διπλού δεσμού άνθρακα-οξυγόνου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, παρατηρείται μεταξύ 1700-1660 cm^{-1}[172]. Στην **Εικόνα 3.8** με την μπλε γραμμή εμφανίζεται η διαπερατότητα που οφείλεται στο απομονωμένο προϊόν, ενώ με κόκκινη οι τιμές διαπερατότητας της ένωσης **4b**. Αρχικά για την ένωση **4b**, παρατηρήθηκε η κορυφή στα 1662.3 cm^{-1} η οποία οφείλεται στο διπλό δεσμό μεταξύ άνθρακα και οξυγόνου της αλδεΰδης. Παράλληλα εντοπίζεται η διπλή κορυφή στα 2877.2 και 2741.4 cm^{-1} όπου αντιστοιχεί στο δεσμό άνθρακα υδρογόνου της αλδεΰδης. Σημαντική ένδειξη για την παραγωγή του πολυιμιδίου αποτέλεσε η απουσία των παραπάνω χαρακτηριστικών κορυφών της αλδεΰδης, σε συνδυασμό με την εμφάνιση της κορυφής στα 1633.4 cm^{-1} στο φάσμα του προϊόντος που σχετίζεται με δόνηση έκτασης, και αποτελεί σημαντική ένδειξη παρουσίας ιμινικού δεσμού.

Ταυτόχρονα παρατηρήθηκαν και μια σειρά κορυφών χαρακτηριστικές για το PLP. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα[173], το PLP εμφανίζει μια ευρεία περιοχή με κορυφή στα 3200 cm^{-1}, καθώς επίσης και ο απλός και ο διπλός δεσμός φωσφόρου οξυγόνου εμφανίζουν από μια δόνηση έκτασης, στα 1036 και 1224 cm^{-1} αντίστοιχα. Στο φάσμα του προϊόντος, μπορούμε να εντοπίσουμε όλες αυτές τις κορυφές, με την ευρεία κορυφή στα 3277 cm^{-1}, τον απλό δεσμό φωσφόρου οξυγόνου στα 1017 cm^{-1}, και τον διπλό δεσμό στα 1227 cm^{-1}.

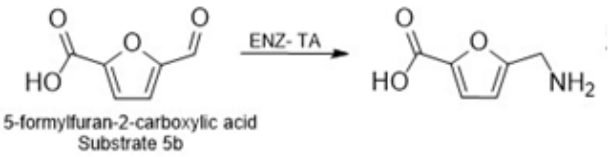


Εικόνα 3.8: Φάσματα IR του απομονωμένου προϊόντος (μπλε) και της διαλδεΰδης **4b** (κόκκινο).

Οι παραπάνω τεχνικές έδωσαν επιπλέον στοιχεία που υποστηρίζουν την υπόθεση αυθόρμητου πολυμερισμού μέσω βάσης Schiff στο διάλυμα της αντίδρασης. Επίσης δίνουν μια πιθανή αιτιολόγηση για τον τρόπο οργάνωσης των πολυμερών στο χώρο, αλλά και την γρήγορη κατανάλωση του PLP στο διάλυμα της αντίδρασης. Παρ' όλα αυτά, θα πρέπει να επισημανθεί ότι δεν αποτελούν καταληκτικά στοιχεία για τον προσδιορισμό του βιοπολυμερούς και το προϊόν θα πρέπει να χαρακτηριστεί με κατάλληλες τεχνικές.

Σύνθεση Δομικών Λίθων για Πολυαμιδια

Στο δεύτερο σκέλος των πειραματικών διεργασιών ερευνήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης των τρανσαμινασών ChrVio και VibFlu, με το υπόστρωμα **5b (Σχήμα 3.4)**. Η ένωση **5a** αργότερα μπορεί να πολυμεριστεί σε συστήματα οργανικών διαλυτών με χρήση αμιδασών ή της λιπάσης Β από *Candida antarctica* για τη δημιουργία πολυαμιδικών βιοπολυμερών.



Σχήμα 3.4: Ενζυμική αντίδραση αμίνωσης της ένωσης **5b**, για την παραγωγή της ένωσης **5a**, με χρήση των τρανσαμινασών από τους οργανισμούς *Chromobacterium violaceum* και *Vibrio fluvialis*.

Λαμβάνοντας τα δεδομένα από την **Παράγραφο 0,** μελετήθηκαν δύο διαφορετικές παράμετροι για την πραγματοποίηση της αντίδρασης: (α) η συγκέντρωση IPA και (β) το pH της αντίδρασης. Η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε και για τις δύο τρανσαμινάσες, ενώ έγινε δειγματοληψία σε τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να παρακολουθηθεί η απόδοση σε σχέση με το χρόνο, και πώς οι διαφορετικές συνθήκες επηρεάζουν τη λειτουργία της εκάστοτε τρανσαμινάσης. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Η προετοιμασία των δειγμάτων, οι συνθήκες ανάλυσης καθώς και ο υπολογισμός της απόδοσης των ενζυμικών αντιδράσεων παρουσιάζονται αναλυτικά στην **Παράγραφο 2.21**. Ενδεικτικό χρωματογράφημα με το πρώτυπο διάλυμα που αναλύθηκε μέσω HPLC, παρουσιάζεται στο **Παράρτημα III**.

Μελέτη Βελτιστοποίησης του pH της Αντίδρασης

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, οι τρανσαμινάσες δείχνουν να λειτουργούν καλύτερα σε υψηλότερες τιμές pH, αλλά ταυτόχρονα η σταθερότητα τους είναι περιορισμένη σε αυτά τα αλκαλικά περιβάλλοντα. Οι δύο τρανσαμινάσες που έχουν επιλεγεί έχουν σχετικά καλή σταθερότητα[149], παρόλα αυτά σε μία διεργασία πρέπει να μελετηθεί η συνολική αποδοτικότητα του συστήματος. Στη συγκεκριμένη αντίδραση μελετήθηκαν 3 διαφορετικές τιμές pH, με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM) για pH 7.0 και 8.0, ενώ για pH 9.0 χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα CHES 50 mM. Οι συνθήκες για κάθε αντίδραση ήταν 200 mM IPA, 0.1 mM PLP, με 2 mg από το υπόστρωμα **5b,** και 37 °C. Για κάθε αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε ίση ποσότητα (0.7 mg) από την κάθε πρωτεΐνη. Για κάθε τιμή έγινε δειγματοληψία στις 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h και 24 h, αλλά αναλύθηκαν μόνο τα απαραίτητα δείγματα. Ο υπολογισμός της απόδοσης έγινε βάση του τύπου που **Εξίσωσης 2.2**, που παρουσιάζεται στην **Παράγραφο 2.21**.

Στον **Πίνακα 3.3** παρουσιάζεται η απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων σε διαφορετικές τιμές pH. Όπως παρατηρείται στον πίνακα, το pH 9.0 είναι το καταλληλότερο για την αντίδραση, και φαίνεται πως οι τρανσαμινάσες δρουν αρκετά γρήγορα, ώστε να μη δημιουργείται πρόβλημα από τη σταθερότητα τους. Στο συγκεκριμένο pH αναλύθηκαν δείγματα έως και 1 h και ακόμα και τότε παρατηρήθηκε 100% απόδοση. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για το pH 9.0 χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό ρυθμιστικό άλας (CHES), αλλά αυτό από μόνο του δε δικαιολογεί τη σημαντική αύξηση της ενεργότητας. Σημαντικό ίσως είναι ότι η αμίνη βρίσκεται πιο κοντά στην τιμή pKa (10.6) και έτσι ένα ποσοστό της αμίνης βρίσκεται σε μη πρωτονιωμένη μορφή και πιθανόν να είναι πιο δραστική σε αυτή τη μορφή[72,174]. Παρόλα αυτά, χρειάζονται περισσότερα πειράματα για να υποστηρίξουν μία τέτοια υπόθεση.

Πίνακας 3.3: Η απόδοση (%) των δύο τρανσαμινασών στην αμίνωση της ένωσης **5b** στους 37 °C, 600 rpm, με χρήση 200 mM IPA ως δότη αμινομάδας και 0.1 mM PLP σε διαφορετικά pH. Τα αποτελέσματα είναι από τρεις ανεξάρτητες τεχνικές επαναλήψεις.

	VibFlu		ChrVio	
	5 h	24 h	5 h	24 h
pH 7.0	2.1 ± 0.4 %	33 ± 1 %	4.1 ± 0.1 %	40 ± 10 %
pH 8.0	10.5 ± 1.5 %	60 ± 4 %	15 ± 1 %	72 ± 9 %
pH 9.0	100 %	100 %	100 %	100 %

Μελέτη Βελτιστοποίησης της Συγκέντρωσης του Δότη Αμινομάδας της Αντίδρασης

Όπως συζητήθηκε και προηγουμένως, και με βάση τη βιβλιογραφική μεταανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας, η συγκέντρωση του δοτη αμινομάδας επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της αντίδρασης[145,158,159,175–177]. Μελετήθηκαν 3 διαφορετικές τιμές συγκέντρωση IPA: 100 mM, 200 mM και 400 mM, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 8.0) παρουσία 0.1 mM PLP, με 2 mg από το υπόστρωμα **5b** στους 37 °C. Για κάθε αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε ίση ποσότητα (0.7 mg) από την κάθε πρωτεΐνη. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία στις 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h και 24 h για κάθε αντίδραση. Στις μετρήσεις των αποδόσεων για το συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος της **Εξίσωσης 2.2**, που παρουσιάζεται στην **Παράγραφο 2.21**.

Στον **Πίνακα 3.4** παρουσιάζεται η απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων σε διαφορετικές τιμές συγκεντρώσεως IPA. Όπως παρατηρείται στον πίνακα, η συγκέντρωση των 200 mM IPA παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Ήδη οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα 30 min, δείχνουν πολύ υψηλές αποδόσεις που στις 5 h έχουν φτάσει ήδη 100% απόδοση. Παράλληλα παρατηρείται μια σημαντική διαφορά στην απόδοση που εμφανίζουν τα δύο ένζυμα, ιδιαίτερα σε χαμηλές συγκεντρώσεις IPA, όπου η ChrVio φαίνεται να εμφανίζει καλύτερη απόδοση σε σχέση με την VibFlu, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία, με την ChrVio να είναι πιο αποδοτική. Να σημειωθεί ότι οι αποδόσεις είναι σημαντικά διαφορετικές από αυτές του προηγούμενου πίνακα, αλλά για αυτή την απόκλιση μπορεί να ευθύνεται η σταθερότητα του καθαρισμένου ενζύμου, καθώς τα πειράματα δεν έγιναν την ίδια ημέρα, αλλά και πιθανές αποκλίσεις του pH, καθώς η IPA δρα ως βάση και η ρύθμιση του ρυθμιστικού διαλύματος στην επιθυμητή τιμή γίνεται μετά την προσθήκη της, παρόλα αυτά μπορεί η τελική τιμή να απέχει από την επιθυμητή. Για αυτούς τους λόγους δεν ενδείκνυται η σύγκριση των δύο πινάκων και θα πρέπει να μελετηθούν ως ανεξάρτητα πειράματα.

Πίνακας 3.4: Η απόδοση (%) των δύο τρανσαμινασών στην αμίνωση της ένωσης **5b** στους 37 °C, 600 rpm, σε pH 8.0 και 0.1 mM PLP σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPA. Τα αποτελέσματα είναι από τρεις ανεξάρτητες τεχνικές επαναλήψεις.

	VibFlu		ChrVio	
	30 min	3 h	30 min	3 h
100 mM IPA	18 ± 3 %	91 ± 6 %	61 ± 8 %	98 ± 1 %
200 mM IPA	98 ± 1 %	100 %	97 ± 1 %	100 %
400 mM IPA	100 %	100 %	100 %	100 %

3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη της σύνθεσης φουρανικών δομικών λίθων πολυμερών μέσω ενζυμικής τρανσαμίνωσης. Σκοπός της μελέτης ήταν η ανεύρεση βιοδιεργασιών για την πραγματοποίηση της επιθυμητής αντίδρασης, αλλά και η βελτιστοποίηση των συνθηκών, υπό τις οποίες πραγματοποιείται αυτή η διεργασία. Οι ουσίες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν φουρανικές αλδεΰδες, οι οποίες μέσω βιοκατάλυσης θα μετατρέπονταν σε αμινικά προϊόντα.

Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*. Τα πλασμίδια που έφεραν το γονίδιο της εκάστοτε τρανσαμινάσης, παράλληλα έφεραν και ένα γονίδιο το οποίο προσέδιδε ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό. Ο επιτυχημένος μετασχηματισμός των *E. coli* ελέγχθηκε μέσω ανάπτυξης αυτών σε στερεό θρεπτικό υλικό, το οποίο περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολούθησε καλλιέργεια και υπερέκφραση των τραμσαμινασών, οι οποίες στη συνέχεια συλλέχθηκαν μέσω εκχύλισης υπό την επίδραση υπερήχων. Η πραγματοποίηση της υπερέκφρασης εξακριβώθηκε ποιοτικά με τη μέθοδο της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, όπου η παρατήρηση των χαρακτηριστικών για το εκάστοτε ένζυμο ταινιών, επιβεβαίωσε την επιτυχία της διαδικασίας. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη μιας γρήγορης φωτομετρικής μεθόδου, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων αλδεϋδών/κετονών από τις αντίστοιχες αμίνες, και αντίστοιχα τον προσδιορισμό της ταχύτητας της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου στηρίχθηκε στη διαφοροποίηση του φάσματος που εμφανίζεται μεταξύ αλδεΰδης/κετόνης και της αντίστοιχης αμίνης στην απορρόφηση τους, στο φάσμα υπεριώδους, λόγω του φαινομένου του συντονισμού μεταξύ της καρβονυλομάδας και του φουρανικού δακτυλίου, επιτρέποντας έτσι τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου μέσω της παραγωγής ή της κατανάλωσης της αντίστοιχης ένωσης. Χρησιμοποιήθηκαν 2 ζεύγη φουρανικών ενώσεων οι οποίες αποτελούνταν από τις αλδεΰδες και τις αντίστοιχες αμίνες τους, οι οποίες ήταν οι φουρφουρυλαμίνη (**2a**) - φουρφουράλη (**2b**) και 5-μεθυλο-φουρφουρυλαμίνη (**3a**) - 5-μεθυλο-φουρφουράλη (**3b**). Ως υπόστρωμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η κετόνη ακετοφαινόνη (**1b**), με την αμίνη της, 1-φαινυλαιθυλαμίνη (**1a**). Η επιλογή των παραπάνω ενώσεων, και κυρίως των ζευγών **2a**- **2b** και **3a**- **3b**, έγινε καθώς ήταν διαθέσιμη τόσο η αμίνη όσο και η αλδεΰδη, απαραίτητη προϋπόθεση για την λήψη φασμάτων και την ανάπτυξη της τεχνικής. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν επιβεβαίωσαν αυτή την υπόθεση, τοποθετώντας τη διαφοροποίηση απορρόφησης στα 277 nm στο ζεύγος **2a**-**2b**, και στα 292 nm για το ζεύγος **3a**- **3b**. Αυτή η μέθοδος κατέστησε δυνατή την γρήγορη και αξιόπιστη αξιολόγηση της αντίδρασης, επιτρέποντας να γίνει μια

διαλογή της διαθέσιμης βιβλιοθήκης ενζύμων σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα, καθώς η κάθε μέτρηση χρειαζόταν περίπου 5 min.

Οι δεκαεπτά τρανσαμινάσες που μελετήθηκαν απέναντι στα 3 ζεύγη κετόνης/αλδεΰδης-αμίνης, μελετήθηκαν συγκριτικά στο υπερκείμενο σπασμένων κυττάρων (χωρίς καθαρισμό) μέσω της ογκομετρικής τους ενεργότητας (U/mL). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες, για τη σχετική ενεργότητα των ενζύμων. Παράλληλα, μια σημαντική πληροφορία που προκύπτει, αφορά στον μηχανισμό της αντίδρασης των τρανσαμινασών, και προκύπτει μεταξύ της σύγκρισης των ζευγών **2a**- **2b** και **3a**- **3b**. Όπως φαίνεται, τα ένζυμα στο υπόστρωμα **3a**, το οποίο φέρει ένα μέθυλο υποκαταστάτη στην θέση 5 του δακτυλίου, παρουσιάζουν καλύτερες ταχύτητες σε σχέση με το **2a**, το οποίο δεν έχει κάποιον υποκαταστάση στη συγκεκριμένη θέση. Αυτό, σε συνδυασμό με την μελέτη του μηχανισμού της τρανσαμίνωσης, αλλά και τη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου των ενζύμων, παραπέμπει σε μια περαιτέρω σταθεροποίηση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο, το οποίο μπορεί να οφείλεται στον μεθυλο-υποκαταστάτη. Συμπερασματικά, με την φωτομετρική μέθοδο επελέγησαν οι 4 πιο δραστικές τρανσαμινάσες, οι οποίες προέρχονταν από τους οργανισμούς *Rhodobacter sphaeroides* (3I5T), *Ruegeria pomeroyi* (3HMU), *Vibrio fluvialis* (VibFlu) και *Chromobacterium violaceum* (ChrVio). Με περαιτέρω μελέτη, τα ένζυμα 3HMU και 3I5T απορρίφθηκαν λόγω χαμηλής απόδοσης σε δοκιμές με τα υποστρώματα ενδιαφέροντος και λόγω χαμηλής σταθερότητας ακόμη και σε θερμοκρασίες δωματίου, αντίστοιχα.

Στο δεύτερο τμήμα της μελέτης ακολούθησε η πραγματοποίηση ενζυμικών αντιδράσεων με τις επιλεγμένες τρανσαμινάσες, χρησιμοποιώντας φουρανικά υποστρώματα ενδιαφέροντος. Τα υποστρώματα που επιλέχθηκαν γι' αυτό το στάδιο της τρανσαμίνωσης ήταν οι φουραν-2,5-δικαρβαλδεΰδη (**4b**) και 5-φορμυλφουραν-2-καρβοξυλικό οξύ (**5b**). Τα ένζυμα ChrVio και VibFlu παρουσίασαν τον σχηματισμό εναιωρήματος στο διάλυμα αντίδρασης με την αλδεΰδη **4b**. Στο στερεό που απομονώθηκε μέσω φυγοκέντρησης, πραγματοποιήθηκαν πλύσεις με απιονισμένο νερό με σκοπό την απομάκρυνση εγκλωβισμένων αλάτων ή/και μετουσιωμένης πρωτεΐνης και στη συνέχεια ακολούθησε ξήρανση σε ήπια θερμοκρασία. Σκοπός ήταν η μελέτη του στερεού που δημιουργήθηκε, και ο προσδιορισμός του ιμινικού δεσμού, ο οποίος σύμφωνα με την αρχική υπόθεση, μέσω αυθόρμητου σχηματισμού βάσης Schiff θα μπορούσε να ευθύνεται για τη δημιουργία ενός πολυιμινικού πολυμερούς. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (SEM), όπου παρατηρήθηκε μια σφαιρική συμμετρία στις δομές και τα συσσωματώματα που σχημάτιζε το πολυμερές, η οποία

ομοίαζε με δομές που λαμβάνουν σφαιρικά νανοσωματίδια τα οποία είναι επικαλυμμένα με βιοπολυμερή. Μια τέτοια δομή θα μπορούσε να οφείλεται είτε σε αυτοοργάνωση των παραγόμενων πολυμερών σε σφαιρική διαρρύθμιση, είτε σε σύνδεση με μια ουσία στα στάδια του ολιγομερούς, και στη συνέχεια την οργάνωση του παραγώμενου πολυμερούς γύρω από αυτήν. Οι οπτικές παρατηρήσεις σε σύγκριση με άλλες ερευνητικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, οδήγησε στην παρατήρηση ότι τα παραγόμενα συσσωματώματα αποτελούνται από σφαιρικές διαμορφώσεις λιγότερο συμπαγείς από αντίστοιχες δομές οι οποίες φέρουν στο εσωτερικό τους στερεό πυρήνα. Αυτό σε συνδυασμό με τον έντονο αποχρωματισμό του διαλύματος κατά την πορεία της ενζυμικής αντίδρασης, κάτι το οποίο παρέπεμπε στην κατανάλωση του συμπαράγοντα της αντίδρασης PLP, αποτέλεσε μια ένδειξη για πιθανή δέσμευση αυτού στο ένα άκρο της πολυμερικής αλυσίδας, και οργάνωση αυτής γύρω από αυτό το κέντρο πολυμερισμού. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μελέτη μέσω φασματοσκοπίας FTIR, για τον προσδιορισμό χαρακτηριστικών δεσμών, οι οποίοι θα μπορούσαν να προσφέρουν περαιτέρω πληροφορίες για τη δομή του πολυμερούς. Βασικός στόχος ήταν ο εντοπισμός του ιμινικού δεσμού μεταξύ 1700 με 1600 cm^{-1}. Η ύπαρξη μιας κορυφής στα 1662.3 cm^{-1}, αποτέλεσε μια ένδειξη για τη φύση του πολυμερούς. Παράλληλα παρατηρήθηκαν και χαρακτηριστικές κορυφές για το PLP στα 1017 cm^{-1} και στα 1227 cm^{-1}, οι οποίες θα μπορούσαν να οφείλονται αντίστοιχα στον απλό δεσμό φωσφόρου οξυγόνου και στον διπλό. Τέλος, ελέγχθηκε μια σειρά υποθέσεων, μέσω αντιδράσεων, για να επιβεβαιωθεί η φύση του πολυμερούς. Δοκιμάστηκε η επανάληψη του πειράματος απουσία ενζύμου, διατηρώντας όλες τις υπόλοιπες συνθήκες της αντίδρασης, για την διαπίστωση αν το παραγώμενο προϊόν προερχόταν από χημική ή ενζυμική δράση. Τα αρνητικά αποτελέσματα, απέδειξαν ότι η αντίδραση είναι ενζυμική, παρά την παρουσία PLP στο διάλυμα. Στη δεύτερη υπόθεση, το υπόστρωμα **4b** αντικαταστάθηκε από το υπόστρωμα **5b**, για να διαπιστωθεί αν το παρατηρούμενο στερεό οφειλόταν σε τυχόν μετουσίωση της πρωτεΐνης, λόγω μακράς επώασης σε υψηλή θερμοκρασία. Για άλλη μια φορά, τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά, δηλώνοντας ότι η παραγωγή του προϊόντος οφείλεται σε ενζυμική δράση με το υπόστρωμα **4b- 5b** συγκεκριμένα. Τέλος, η τρανσαμινάση αντικαταστάθηκε από BSA, μία πρωτεΐνη η οποία δεν παρουσιάζει ενζυμική δραστικότητα ως τρανσαμινάση, για τον έλεγχο μοριακής διασύνδεσης των πρωτεϊνών μέσω της διαλδεΰδης, για δημιουργία cross linked enzyme aggregates (CLEAs). Για ακόμα μια φορά δεν παρατηρήθηκε δημιουργία στερεού. Αυτές οι ενδείξεις συγκλίνουν στο ότι η δημιουργία του πολυμερούς είναι μια ενζυμική αντίδραση, εξαρτώμενη από δράση τρανσαμινάσης, με το υπόστρωμα **4b**. Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις αποτελούν ενδείξεις για τη φύση του πολυμερούς, χωρίς όμως να είναι καταληκτικές.

Τέλος, ερευνήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης των τρανσαμινασών ChrVio και VibFlu, με το υπόστρωμα **5b**. Σκοπός ήταν η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, της οποίας το προϊόν (**5a**), θα μπορούσε να αποτελέσει δομικό λίθο για τη δημιουργία πολυαμιδικών βιοπολυμερών, με χρήση κατάλληλων ενζύμων, όπως αμιδάσες ή λιπάσες. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν, ήταν η διαφοροποίηση του pH σε τιμές 7.0, 8.0 και 9.0, αλλά και οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του δότη αμινομάδας, IPA (100 mM, 200 mM και 400 mM). Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε μέσω της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε 3 τεχνικές επαναλήψεις το κάθε ένα, και πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε διάφορα χρονικά διαστήματα, κατά την πορεία της ενζυμικής αντίδρασης, για την αξιολόγηση της αντίδρασης και σε σχέση με τον χρόνο. Οι χρονικές τιμές στις οποίες πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία ήταν στις 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h και 24 h. Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, παρατηρήθηκε ότι η τρανσαμινάση ChrVio εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα σε σχέση με την VibFlu, κάτι το οποίο είχε αναφερθεί και σε άλλες ερευνητικές εργασίες. Παράλληλα, ως βέλτιστες συνθήκες δράσης τόσο για την VibFlu, όσο και για την ChrVio, βρέθηκαν το pH 9.0 και η συγκέντρωση IPA στα 400 mM. Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των αποδόσεων σε συγκέντρωση IPA για τιμές 200 mM και 400 mM, ήταν πολύ μικρή, υποδεικνύοντας ότι η περίσσεια IPA που χρησιμοποιείται με τα 200 mM επαρκεί για να μετακινήσει τη θερμοδυναμική ισοροπία προς την επιθυμητή κατεύθυνση.

Παρότι ελήφθησαν μια σειρά αποτελεσμάτων, και εγκαθιδρύθηκαν και μια σειρά μεθόδων σημαντικές για την μελέτη όμοιων αντιδράσεων, υπάρχουν μια σειρά παραμέτρων που πρέπει να ερευνηθούν περαιτέρω στο μέλλον. Επίσης, κάποια στάδια της μελέτης αξίζει να επανεξεταστούν υπό διαφορετικές συνθήκες, ώστε να δώσουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τα διαθέσιμα αποτελέσματα. Στα πλαίσια της φωτομετρικής μελέτης που αναπτύχθηκε, κάποια ένζυμα δεν επέδειξαν ενεργότητα. Οι μετρήσεις αυτές θα μπορούσαν να επαναληφθούν για την αποφυγή παράβλεψης κάποιου σημαντικού βιοκαταλύτη. Παράλληλα, στο κομμάτι της σύνθεσης του πολυιμινικού πολυμερούς, υπάρχουν αρκετές παράμετροι προς μελέτη, για μια πιο ολοκληρωμένη και καλά τεκμηριωμένη εικόνα. Αρχικά, η μελέτη του πολυμερούς μέσω φασματοσκοπίας μαγνητικού συντονισμού (NMR) θα προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για τη σύστασή του, καθώς επίσης θα προσδιορίσει και τυχόν ουσίες οι οποίες μπορεί να εγκλωβίζονται στο εσωτερικό των συσσωματωμάτων. Η αδυναμία εύρεσης του κατάλληλου δευτεριωμένου διαλύτη για τη διαλυτοποίηση του πολυμερούς, παρά την χρήση αρκετών διαθέσιμων, εμπόδισε τον προσδιορισμό του υλικού με αυτή την τεχνική στη συγκεκριμένη μελέτη. Εν συνεχεία, περαιτέρω χαρακτηρισμός των μηχανικών ιδιοτήτων του πολυμερούς,

μέσω θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (thermogravimetric analysis- TGA) και δυναμική μηχανική ανάλυση (dynamic mechanical analysis- DMA) θα πρέπει να ακολουθήσει, για τον χαρακτηρισμό του υλικού. Επιπλέον, αξίζει να μελετηθεί η δυνατότητα σύνθεσης του πολυμερούς σε διαφορετικά συστήματα, όπως παρουσία οργανικού διαλύτη, όπου η διαθεσιμότητα του PLP θα είναι περιορισμένη, ενώ παράλληλα, τυχόν δημιουργία του στερεού σε ένα τέτοιο περιβάλλον, να διευκολύνει ταυτόχρονα τη διαλυτοποίησή του για μελέτη μέσω NMR. Όσον αφορά τη σύνθεση των δομικών λίθων από φουράνια, η μελέτη διαφορετικών συνθηκών για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, όπως η μελέτη της θερμοκρασίας, θα προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες τόσο για τη σύνθεση του πολυμερούς, αλλά ταυτόχρονα θα ενισχύσει και τη μελέτη για τη λειτουργία των ενζύμων, προτείνοντας εναλλακτικές συνθήκες δράσης, καθώς οι περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές εστιάζουν σε ένα συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών δράσης των συγκεκριμένων ενζύμων. Παράλληλα, επανάληψη των αντιδράσεων σε διαφορετικές συνθήκες pH και συγκέντρωσης IPA, και ανάλυση αυτών, με σκοπό τον προσδιορισμό της εμφανιζόμενης απόκλισης. Σημαντικό είναι επίσης να γίνουν μελέτες με φουρανοειδή που προκύπτουν από τη βιομάζα και όχι με εμπορικά διαθέσιμα, καθώς τυχόν προσμίξεις μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση του ενζύμου, και την ποιότητα του τελικού προϊόντος που προκύπτει. Τέλος η πραγματοποίηση της αντίδρασης σε μεγαλύτερη κλίμακα θα είχε θετικό αντίκτυπο σε κάθε περίπτωση, καθώς θα αυξανόταν το διαθέσιμο προϊόν προς μελέτη.

4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

I. Αλληλουχίες Γονιδίων Τρανσαμινασών

Παρακάτω παρατίθενται οι αλληλουχίες για κάθε γονίδιο που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και η μετάφραση αυτού. Κάθε σειρά αποτελείται από 60 χαρακτήρες. Με κεφαλαίους χαρακτήρες παρουσιάζεται η αμινοξική ακολουθία, ενώ με πεζούς χαρακτήρες η ακολουθία του γενετικού υλικού (DNA).

3FCR_4M_I234M_pET22 1395 bp

```
atgctgaaaa acgaccaact ggaccaatgg gaccgtgata acttcttcca cccgtcaacg
cacctggcgc aacatgcccg tggcgaatca gctaaccgtg tgatcaaaac cgcgtcgggc
gtttttattg aagatcgcga cggtacgaaa ctgctggatg ctttcgcggg cctgtggtgc
gttaatgtcg gctacggtcg tcaggaaatt gccgaagcaa tcgctgatca agcgcgcgaa
ctggcctatt accatagctt cgtgggccac ggtaccgaag cttctatcac gctggcgaaa
atgattctgg atcgtgcccc gaaaaacatg agtaaagttt actttggtct gggcggttcc
gacgcaaacg aaaccaatgt caaactgatc tggtattaca acaatattct gggccgcccg
gagaaaaaga aaattatcag tcgttggcgc ggttttcatg gcagtggtct ggttaccggc
tccctgacgg gtctggaact gtttcataaa aaattcgatc tgccggtgga acaggttatt
cacaccgaag ccccgtatta ctttcgtcgc gaagacctga accagacgga agaacaattc
gtcgcacact gtgtggctga actggaagcg ctgatcgaac gtgaaggcgc ggataccatt
gcggccttca tcggcgaacc gattctgggt gcgggcggta tggtgccgcc gccggccggt
tattgggaag caatccagac cgtcctgaat aaacatgata ttctgctggt tgcggacgaa
gtggttaccg gctttggtcg cctgggcacg atgttcggtt ctgatcacta tggcctggaa
ccggacatta tcaccatcgc gaaaggtctg acgtcagcgt acgccccgct gagcggttct
attgtgtcgg ataaagtctg gaaagtgctg gaacagggca ccgacgaaaa cggtccgatc
ggccatggtt ggacgtatag cgcacacccg attggtgcag ctgcaggtgt tgcaaatctg
aaactgctgg atgaactgaa cctggttagc aatgccggcg aagtcggtgc ctacctgaac
gcaaccatgg cagaagctct gtcccaacat gctaatgttg gcgatgtccg tggcgaaggt
ctgctgtgcg cggtggaatt tgttaaagat cgtgacagcc gcacgttttt cgatgccgca
gacaaaatcg gtccgcagat ttctgcgaaa ctgctggaac aagataaaat tatcgcgcgt
gccatgccgc agggcgacat tctgggtttt gccccgccgt tctgtctgac ccgcgcagaa
gctgatcaag tcgtggaagg tacgctgcgc gctgtcaaag ccgttctggg ttcacatcac
catcaccacc actaa
```

3FCR_4M_I234M_pET22 translation 464 aa

```
MLKNDQLDQW DRDNFFHPST HLAQHARGES ANRVIKTASG VFIEDRDGTK LLDAFAGLWC
VNVGYGRQEI AEAIADQARE LAYYHSFVGH GTEASITLAK MILDRAPKNM SKVYFGLGGS
DANETNVKLI WYYNNILGRP EKKKIISRWR GFHGSGLVTG SLTGLELFHK KFDLPVEQVI
HTEAPYYFRR EDLNQTEEQF VAHCVAELEA LIEREGADTI AAFIGEPILG AGGMVPPPAG
YWEAIQTVLN KHDILLVADE VVTGFGRLGT MFGSDHYGLE PDIITIAKGL TSAYAPLSGS
IVSDKVWKVL EQGTDENGPI GHGWTYSAHP IGAAAGVANL KLLDELNLVS NAGEVGAYLN
ATMAEALSQH ANVGDVRGEG LLCAVEFVKD RDSRTFFDAA DKIGPQISAK LLEQDKIIAR
AMPQGDILGF APPFCLTRAE ADQVVEGTLR AVKAVLGSHH HHHH
```

3FCR_4M_L382M_G429A_pET22 1395 bp DNA

```
atgctgaaaa acgaccaact ggaccaatgg gaccgtgata acttcttcca cccgtcaacg
cacctggcgc aacatgcccg tggcgaatca gctaaccgtg tgatcaaaac cgcgtcgggc
gtttttattg aagatcgcga cggtacgaaa ctgctggatg ctttcgcggg cctgtggtgc
gttaatgtcg gctacggtcg tcaggaaatt gccgaagcaa tcgctgatca agcgcgcgaa
ctggcctatt accatagctt cgtgggccac ggtaccgaag cttctatcac gctggcgaaa
atgattctgg atcgtgcccc gaaaaacatg agtaaagttt actttggtct gggcggttcc
gacgcaaacg aaaccaatgt caaactgatc tggtattaca acaatattct gggccgcccg
gagaaaaaga aaattatcag tcgttggcgc ggttttcatg gcagtggtct ggttaccggc
tccctgacgg gtctggaact gtttcataaa aaattcgatc tgccggtgga acaggttatt
cacaccgaag ccccgtatta ctttcgtcgc gaagacctga accagacgga agaacaattc
gtcgcacact gtgtggctga actggaagcg ctgatcgaac gtgaaggcgc ggataccatt
gcggccttca tcggcgaacc gattctgggt gcgggcggta ttgtgccgcc gccggccggt
tattgggaag caatccagac cgtcctgaat aaacatgata ttctgctggt tgcggacgaa
gtggttaccg gctttggtcg cctgggcacg atgttcggtt ctgatcacta tggcctggaa
ccggacatta tcaccatcgc gaaaggtctg acgtcagcgt acgccccgct gagcggttct
attgtgtcgg ataaagtctg gaaagtgctg gaacagggca ccgacgaaaa cggtccgatc
ggccatggtt ggacgtatag cgcacacccg attggtgcag ctgcaggtgt tgcaaatctg
aaactgctgg atgaactgaa cctggttagc aatgccggcg aagtcggtgc ctacctgaac
gcaaccatgg cagaagctct gtcccaacat gctaatgttg gcgatgtccg tggcgaaggt
ctgatgtgcg cggtggaatt tgttaaagat cgtgacagcc gcacgttttt cgatgccgca
gacaaaatcg gtccgcagat ttctgcgaaa ctgctggaac aagataaaat tatcgcgcgt
gccatgccgc agggcgacat tctggctttt gccccgccgt tctgtctgac ccgcgcagaa
gctgatcaag tcgtggaagg tacgctgcgc gctgtcaaag ccgttctggg ttcacatcac
catcaccacc actaa
```

3FCR_4M_L382M_G429A_pET22 translation 464 aa

```
MLKNDQLDQW DRDNFFHPST HLAQHARGES ANRVIKTASG VFIEDRDGTK LLDAFAGLWC
VNVGYGRQEI AEAIADQARE LAYYHSFVGH GTEASITLAK MILDRAPKNM SKVYFGLGGS
DANETNVKLI WYYNNILGRP EKKKIISRWR GFHGSGLVTG SLTGLELFHK KFDLPVEQVI
HTEAPYYFRR EDLNQTEEQF VAHCVAELEA LIEREGADTI AAFIGEPILG AGGIVPPPAG
YWEAIQTVLN KHDILLVADE VVTGFGRLGT MFGSDHYGLE PDIITIAKGL TSAYAPLSGS
IVSDKVWKVL EQGTDENGPI GHGWTYSAHP IGAAAGVANL KLLDELNLVS NAGEVGAYLN
ATMAEALSQH ANVGDVRGEG LMCAVEFVKD RDSRTFFDAA DKIGPQISAK LLEQDKIIAR
AMPQGDILAF APPFCLTRAE ADQVVEGTLR AVKAVLGSHH HHHH
```

3FCR_4M_pET22 1395 bp DNA

```
atgctgaaaa acgaccaact ggaccaatgg gaccgtgata acttcttcca cccgtcaacg
cacctggcgc aacatgcccg tggcgaatca gctaaccgtg tgatcaaaac cgcgtcgggc
gtttttattg aagatcgcga cggtacgaaa ctgctggatg ctttcgcggg cctgtggtgc
gttaatgtcg gctacggtcg tcaggaaatt gccgaagcaa tcgctgatca agcgcgcgaa
ctggcctatt accatagctt cgtgggccac ggtaccgaag cttctatcac gctggcgaaa
atgattctgg atcgtgcccc gaaaaacatg agtaaagttt actttggtct gggcggttcc
gacgcaaacg aaaccaatgt caaactgatc tggtattaca acaatattct gggccgcccg
gagaaaaaga aaattatcag tcgttggcgc ggttttcatg gcagtggtct ggttaccggc
tccctgacgg gtctggaact gtttcataaa aaattcgatc tgccggtgga acaggttatt
cacaccgaag ccccgtatta ctttcgtcgc gaagacctga accagacgga agaacaattc
gtcgcacact gtgtggctga actggaagcg ctgatcgaac gtgaaggcgc ggataccatt
gcggccttca tcggcgaacc gattctgggt gcgggcggta ttgtgccgcc gccggccggt
tattgggaag caatccagac cgtcctgaat aaacatgata ttctgctggt tgcggacgaa
gtggttaccg gctttggtcg cctgggcacg atgttcggtt ctgatcacta tggcctggaa
ccggacatta tcaccatcgc gaaaggtctg acgtcagcgt acgccccgct gagcggttct
attgtgtcgg ataaagtctg gaaagtgctg gaacagggca ccgacgaaaa cggtccgatc
ggccatggtt ggacgtatag cgcacacccg attggtgcag ctgcaggtgt tgcaaatctg
aaactgctgg atgaactgaa cctggttagc aatgccggcg aagtcggtgc ctacctgaac
gcaaccatgg cagaagctct gtcccaacat gctaatgttg gcgatgtccg tggcgaaggt
ctgctgtgcg cggtggaatt tgttaaagat cgtgacagcc gcacgttttt cgatgccgca
gacaaaatcg gtccgcagat ttctgcgaaa ctgctggaac aagataaaat tatcgcgcgt
gccatgccgc agggcgacat tctgggtttt gccccgccgt tctgtctgac ccgcgcagaa
gctgatcaag tcgtggaagg tacgctgcgc gctgtcaaag ccgttctggg ttcacatcac
catcaccacc actaa
```

LOCUS **3FCR_4M_pET22** translation 464 aa

```
MLKNDQLDQW DRDNFFHPST HLAQHARGES ANRVIKTASG VFIEDRDGTK LLDAFAGLWC
VNVGYGRQEI AEAIADQARE LAYYHSFVGH GTEASITLAK MILDRAPKNM SKVYFGLGGS
DANETNVKLI WYYNNILGRP EKKKIISRWR GFHGSGLVTG SLTGLELFHK KFDLPVEQVI
HTEAPYYFRR EDLNQTEEQF VAHCVAELEA LIEREGADTI AAFIGEPILG AGGIVPPPAG
YWEAIQTVLN KHDILLVADE VVTGFGRLGT MFGSDHYGLE PDIITIAKGL TSAYAPLSGS
IVSDKVWKVL EQGTDENGPI GHGWTYSAHP IGAAAGVANL KLLDELNLVS NAGEVGAYLN
ATMAEALSQH ANVGDVRGEG LLCAVEFVKD RDSRTFFDAA DKIGPQISAK LLEQDKIIAR
AMPQGDILGF APPFCLTRAE ADQVVEGTLR AVKAVLGSHH HHHH
```

3FCR_4M_Y59L_pET22 1395 bp DNA

```
atgctgaaaa acgaccaact ggaccaatgg gaccgtgata acttcttcca cccgtcaacg
cacctggcgc aacatgcccg tggcgaatca gctaaccgtg tgatcaaaac cgcgtcgggc
gtttttattg aagatcgcga cggtacgaaa ctgctggatg ctttcgcggg cctgttgtgc
gttaatgtcg gctacggtcg tcaggaaatt gccgaagcaa tcgctgatca agcgcgcgaa
ctggcctatt accatagctt cgtgggccac ggtaccgaag cttctatcac gctggcgaaa
atgattctgg atcgtgcccc gaaaaacatg agtaaagttt actttggtct gggcggttcc
gacgcaaacg aaaccaatgt caaactgatc tggtattaca acaatattct gggccgcccg
gagaaaaaga aaattatcag tcgttggcgc ggttttcatg gcagtggtct ggttaccggc
tccctgacgg gtctggaact gtttcataaa aaattcgatc tgccggtgga acaggttatt
cacaccgaag ccccgtatta ctttcgtcgc gaagacctga accagacgga agaacaattc
gtcgcacact gtgtggctga actggaagcg ctgatcgaac gtgaaggcgc ggataccatt
gcggccttca tcggcgaacc gattctgggt gcgggcggta ttgtgccgcc gccggccggt
tattgggaag caatccagac cgtcctgaat aaacatgata ttctgctggt tgcggacgaa
gtggttaccg gctttggtcg cctgggcacg atgttcggtt ctgatcacta tggcctggaa
ccggacatta tcaccatcgc gaaaggtctg acgtcagcgt acgccccgct gagcggttct
attgtgtcgg ataaagtctg gaaagtgctg gaacagggca ccgacgaaaa cggtccgatc
ggccatggtt ggacgtatag cgcacacccg attggtgcag ctgcaggtgt tgcaaatctg
aaactgctgg atgaactgaa cctggttagc aatgccggcg aagtcggtgc ctacctgaac
gcaaccatgg cagaagctct gtcccaacat gctaatgttg gcgatgtccg tggcgaaggt
ctgctgtgcg cggtggaatt tgttaaagat cgtgacagcc gcacgttttt cgatgccgca
gacaaaatcg gtccgcagat ttctgcgaaa ctgctggaac aagataaaat tatcgcgcgt
gccatgccgc agggcgacat tctgggtttt gccccgccgt tctgtctgac ccgcgcagaa
gctgatcaag tcgtggaagg tacgctgcgc gctgtcaaag ccgttctggg ttcacatcac
catcaccacc actaa
```

3FCR_4M_Y59L_pET22 translation 464 aa

```
MLKNDQLDQW DRDNFFHPST HLAQHARGES ANRVIKTASG VFIEDRDGTK LLDAFAGLLC
VNVGYGRQEI AEAIADQARE LAYYHSFVGH GTEASITLAK MILDRAPKNM SKVYFGLGGS
DANETNVKLI WYYNNILGRP EKKKIISRWR GFHGSGLVTG SLTGLELFHK KFDLPVEQVI
HTEAPYYFRR EDLNQTEEQF VAHCVAELEA LIEREGADTI AAFIGEPILG AGGIVPPPAG
YWEAIQTVLN KHDILLVADE VVTGFGRLGT MFGSDHYGLE PDIITIAKGL TSAYAPLSGS
IVSDKVWKVL EQGTDENGPI GHGWTYSAHP IGAAAGVANL KLLDELNLVS NAGEVGAYLN
ATMAEALSQH ANVGDVRGEG LLCAVEFVKD RDSRTFFDAA DKIGPQISAK LLEQDKIIAR
AMPQGDILGF APPFCLTRAE ADQVVEGTLR AVKAVLGSHH HHHH
```

3FCR_5M_pET22 1395 bp DNA

```
atgctgaaaa acgaccaact ggaccaatgg gaccgtgata acttcttcca cccgtcaacg
cacctggcgc aacatgcccg tggcgaatca gctaaccgtg tgatcaaaac cgcgtcgggc
gtttttattg aagatcgcga cggtacgaaa ctgctggatg ctttcgcggg cctgtggtgc
gttaatgtcg gctacggtcg tcaggaaatt gccgaagcaa tcgctgatca agcgcgcgaa
ctggcctatt accatagctt cgtgggccac ggtaccgaag cttctatcac gctggcgaaa
atgattctgg atcgtgcccc gaaaaacatg agtaaagttt actttggtct gggcggttcc
gacgcaaacg aaaccaatgt caaactgatc tggtattaca acaatattct gggccgcccg
gagaaaaaga aaattatcag tcgttggcgc ggttttcatg gcagtggtct ggttaccggc
tccctgacgg gtctggaact gtttcataaa aaattcgatc tgccggtgga acaggttatt
cacaccgaag ccccgtatta ctttcgtcgc gaagacctga accagacgga agaacaattc
gtcgcacact gtgtggctga actggaagcg ctgatcgaac gtgaaggcgc ggataccatt
gcggccttca tcggcgaacc gattctgggt gcgggcggta ttgtgccgcc gccggccggt
tattgggaag caatccagac cgtcctgaat aaacatgata ttctgctggt tgcggacgaa
gtggttaccg gctttggtcg cctgggcacg atgttcggtt ctgatcacta tggcctggaa
ccggacatta tcaccatcgc gaaaggtctg acgtcagcgt acgccccgct gagcggttct
attgtgtcgg ataaagtctg gaaagtgctg gaacagggca ccgacgaaaa cggtccgatc
ggccatggtt ggacgtatag cgcacacccg attggtgcag ctgcaggtgt tgcaaatctg
aaactgctgg atgaactgaa cctggttagc aatgccggcg aagtcggtgc ctacctgaac
gcaaccatgg cagaagctct gtcccaacat gctaatgttg gcgatgtccg tggcgaaggt
ctgctgtgcg cggtggaatt tgttaaagat cgtgacagcc gcacgttttt cgatgccgca
gacaaaatcg gtccgcagat ttctgcgaaa ctgctggaac aagataaaat tatcgcgcgt
gccatgcatc agggcgacat tctgggtttt gccccgccgt tctgtctgac ccgcgcagaa
gctgatcaag tcgtggaagg tacgctgcgc gctgtcaaag ccgttctggg ttcacatcac
catcaccacc actaa
```

3FCR_5M_pET22 translation 464 aa

```
MLKNDQLDQW DRDNFFHPST HLAQHARGES ANRVIKTASG VFIEDRDGTK LLDAFAGLWC
VNVGYGRQEI AEAIADQARE LAYYHSFVGH GTEASITLAK MILDRAPKNM SKVYFGLGGS
DANETNVKLI WYYNNILGRP EKKKIISRWR GFHGSGLVTG SLTGLELFHK KFDLPVEQVI
HTEAPYYFRR EDLNQTEEQF VAHCVAELEA LIEREGADTI AAFIGEPILG AGGIVPPPAG
YWEAIQTVLN KHDILLVADE VVTGFGRLGT MFGSDHYGLE PDIITIAKGL TSAYAPLSGS
IVSDKVWKVL EQGTDENGPI GHGWTYSAHP IGAAAGVANL KLLDELNLVS NAGEVGAYLN
ATMAEALSQH ANVGDVRGEG LLCAVEFVKD RDSRTFFDAA DKIGPQISAK LLEQDKIIAR
AMHQGDILGF APPFCLTRAE ADQVVEGTLR AVKAVLGSHH HHHH
```

3FCR_DM_pET22 1395 bp DNA

```
atgctgaaaa acgaccaact ggaccaatgg gaccgtgata acttcttcca cccgtcaacg
cacctggcgc aacatgcccg tggcgaatca gctaaccgtg tgatcaaaac cgcgtcgggc
gtttttattg aagatcgcga cggtacgaaa ctgctggatg ctttcgcggg cctgtggtgc
gttaatgtcg gctacggtcg tcaggaaatt gccgaagcaa tcgctgatca agcgcgcgaa
ctggcctatt accatagcta tgtgggccac ggtaccgaag cttctatcac gctggcgaaa
atgattctgg atcgtgcccc gaaaaacatg agtaaagttt actttggtct gggcggttcc
gacgcaaacg aaaccaatgt caaactgatc tggtattaca acaatattct gggccgcccg
gagaaaaaga aaattatcag tcgttggcgc ggttatcatg gcagtggtct ggttaccggc
tccctgacgg gtctggaact gtttcataaa aaattcgatc tgccggtgga acaggttatt
cacaccgaag ccccgtatta ctttcgtcgc gaagacctga accagacgga agaacaattc
gtcgcacact gtgtggctga actggaagcg ctgatcgaac gtgaaggcgc ggataccatt
gcggccttca tcggcgaacc gattctgggt gcgggcggta ttgtgccgcc gccggccggt
tattgggaag caatccagac cgtcctgaat aaacatgata ttctgctggt tgcggacgaa
gtggttaccg gctttggtcg cctgggcacg atgttcggtt ctgatcacta tggcctggaa
ccggacatta tcaccatcgc gaaaggtctg acgtcagcgt acgccccgct gagcggttct
attgtgtcgg ataaagtctg gaaagtgctg gaacagggca ccgacgaaaa cggtccgatc
ggccatggtt ggacgtatag cgcacacccg attggtgcag ctgcaggtgt tgcaaatctg
aaactgctgg atgaactgaa cctggttagc aatgccggcg aagtcggtgc ctacctgaac
gcaaccatgg cagaagctct gtcccaacat gctaatgttg gcgatgtccg tggcgaaggt
ctgctgtgcg cggtggaatt tgttaaagat cgtgacagcc gcacgttttt cgatgccgca
gacaaaatcg gtccgcagat ttctgcgaaa ctgctggaac aagataaaat tatcgcgcgt
gccatgccgc agggcgacat tctgggtttt gccccgccgt tctgtctgac ccgcgcagaa
gctgatcaag tcgtggaagg tacgctgcgc gctgtcaaag ccgttctggg ttcacatcac
catcaccacc actaa
```

3FCR_DM_pET22 translation 464 aa

```
MLKNDQLDQW DRDNFFHPST HLAQHARGES ANRVIKTASG VFIEDRDGTK LLDAFAGLWC
VNVGYGRQEI AEAIADQARE LAYYHSYVGH GTEASITLAK MILDRAPKNM SKVYFGLGGS
DANETNVKLI WYYNNILGRP EKKKIISRWR GYHGSGLVTG SLTGLELFHK KFDLPVEQVI
HTEAPYYFRR EDLNQTEEQF VAHCVAELEA LIEREGADTI AAFIGEPILG AGGIVPPPAG
YWEAIQTVLN KHDILLVADE VVTGFGRLGT MFGSDHYGLE PDIITIAKGL TSAYAPLSGS
IVSDKVWKVL EQGTDENGPI GHGWTYSAHP IGAAAGVANL KLLDELNLVS NAGEVGAYLN
ATMAEALSQH ANVGDVRGEG LLCAVEFVKD RDSRTFFDAA DKIGPQISAK LLEQDKIIAR
AMPQGDILGF APPFCLTRAE ADQVVEGTLR AVKAVLGSHH HHHH
```

3FCR_WT_pET22 1395 bp DNA

```
atgctgaaaa acgaccaact ggaccaatgg gaccgtgata acttcttcca cccgtcaacg
cacctggcgc aacatgcccg tggcgaatca gctaaccgtg tgatcaaaac cgcgtcgggc
gtttttattg aagatcgcga cggtacgaaa ctgctggatg ctttcgcggg cctgtattgc
gttaatgtcg gctacggtcg tcaggaaatt gccgaagcaa tcgctgatca agcgcgcgaa
ctggcctatt accatagcta tgtgggccac ggtaccgaag cttctatcac gctggcgaaa
atgattctgg atcgtgcccc gaaaaacatg agtaaagttt actttggtct gggcggttcc
gacgcaaacg aaaccaatgt caaactgatc tggtattaca acaatattct gggccgcccg
gagaaaaaga aaattatcag tcgttggcgc ggttatcatg gcagtggtct ggttaccggc
tccctgacgg gtctggaact gtttcataaa aaattcgatc tgccggtgga acaggttatt
cacaccgaag ccccgtatta ctttcgtcgc gaagacctga accagacgga agaacaattc
gtcgcacact gtgtggctga actggaagcg ctgatcgaac gtgaaggcgc ggataccatt
gcggccttca tcggcgaacc gattctgggt acgggcggta ttgtgccgcc gccggccggt
tattgggaag caatccagac cgtcctgaat aaacatgata ttctgctggt tgcggacgaa
gtggttaccg gctttggtcg cctgggcacg atgttcggtt ctgatcacta tggcctggaa
ccggacatta tcaccatcgc gaaaggtctg acgtcagcgt acgccccgct gagcggttct
attgtgtcgg ataaagtctg gaaagtgctg gaacagggca ccgacgaaaa cggtccgatc
ggccatggtt ggacgtatag cgcacacccg attggtgcag ctgcaggtgt tgcaaatctg
aaactgctgg atgaactgaa cctggttagc aatgccggcg aagtcggtgc ctacctgaac
gcaaccatgg cagaagctct gtcccaacat gctaatgttg gcgatgtccg tggcgaaggt
ctgctgtgcg cggtggaatt tgttaaagat cgtgacagcc gcacgttttt cgatgccgca
gacaaaatcg gtccgcagat ttctgcgaaa ctgctggaac aagataaaat tatcgcgcgt
gccatgccgc agggcgacat tctgggtttt gccccgccgt tctgtctgac ccgcgcagaa
gctgatcaag tcgtggaagg tacgctgcgc gctgtcaaag ccgttctggg ttcacatcac
catcaccacc actaa
```

3FCR_WT_pET22 translation 464 aa

```
MLKNDQLDQW DRDNFFHPST HLAQHARGES ANRVIKTASG VFIEDRDGTK LLDAFAGLYC
VNVGYGRQEI AEAIADQARE LAYYHSYVGH GTEASITLAK MILDRAPKNM SKVYFGLGGS
DANETNVKLI WYYNNILGRP EKKKIISRWR GYHGSGLVTG SLTGLELFHK KFDLPVEQVI
HTEAPYYFRR EDLNQTEEQF VAHCVAELEA LIEREGADTI AAFIGEPILG TGGIVPPPAG
YWEAIQTVLN KHDILLVADE VVTGFGRLGT MFGSDHYGLE PDIITIAKGL TSAYAPLSGS
IVSDKVWKVL EQGTDENGPI GHGWTYSAHP IGAAAGVANL KLLDELNLVS NAGEVGAYLN
ATMAEALSQH ANVGDVRGEG LLCAVEFVKD RDSRTFFDAA DKIGPQISAK LLEQDKIIAR
AMPQGDILGF APPFCLTRAE ADQVVEGTLR AVKAVLGSHH HHHH
```

3HMU_pET22 1422 bp DNA

```
atgagcctgg cgaccattac gaaccacatg ccgacggcgg aactgcaagc cctggatgct
gcccaccacc tgcacccgtt tagcgcaaac aatgcactgg gtgaagaagg cacccgtgtt
attacgcgtg ctcgcggtgt ctggctgaac gatagcgaag gcgaagaaat tctggacgcc
atggcaggtc tgtggtgcgt caatatcggt tatggtcgtg atgaactggc agaagtggca
gcacgtcaga tgcgtgaact gccgtattac aacacctttt tcaaaaccac gcatgttccg
gctattgcgc tggcccaaaa actggcagaa ctggctccgg gcgatctgaa tcacgtgttt
ttcgccggcg gtggcagcga agcaaacgac accaatatcc gtatggtgcg cacgtattgg
cagaacaaag gtcaaccgga aaaaaccgtt attatcagcc gtaaaaatgc gtaccatggc
tctacggtcg caagctctgc actgggtggc atggctggta tgcacgcgca gtctggcctg
attccggatg tgcatcacat caaccaaccg aattggtggg ccgaaggtgg cgatatggac
ccggaagaat ttggtctggc acgtgctcgc gaactggaag aagcaattct ggaactgggt
gaaaaccgtg tggcagcttt cattgctgaa ccggttcagg gtgcgggtgg cgtgatcgtt
gcaccggatt catattggcc ggaaattcaa cgcatctgcg ataaatacga cattctgctg
atcgcggacg aagttatttg tggttttggc cgtaccggta attggttcgg cacccagacg
atgggtatcc gcccgcatat tatgacgatc gcaaaaggtc tgagttccgg ctatgctccg
attggtggct caatcgtgtg tgatgaagtc gcacacgtga ttggcaaaga cgaatttaac
catggttata cctactcggg tcacccggtg gcagcagcag ttgcactgga aaatctgcgt
attctggaag aagaaaacat cctggatcat gttcgcaatg tcgctgcgcc gtatctgaaa
gaaaaatggg aagcactgac cgaccacccg ctggtcggtg aagccaaaat tgtgggcatg
atggcatcca tcgctctgac cccgaacaaa gcgtcacgcg ccaaatttgc atcggaaccg
ggtacgattg gctacatctg ccgtgaacgc tgtttcgcga acaatctgat tatgcgtcat
gtcggcgatc gcatgattat cagtccgccg ctggtgatta ccccggccga aatcgatgaa
atgttcgttc gtatccgcaa atccctggac gaagcgcagg ccgaaattga aaaacagggt
ctgatgaaat ctgaaggtag tcaccaccac caccaccact aa
```

3HMU_pET22 translation 473 aa

```
MSLATITNHM PTAELQALDA AHHLHPFSAN NALGEEGTRV ITRARGVWLN DSEGEEILDA
MAGLWCVNIG YGRDELAEVA ARQMRELPYY NTFFKTTHVP AIALAQKLAE LAPGDLNHVF
FAGGGSEAND TNIRMVRTYW QNKGQPEKTV IISRKNAYHG STVASSALGG MAGMHAQSGL
IPDVHHINQP NWWAEGGDMD PEEFGLARAR ELEEAILELG ENRVAAFIAE PVQGAGGVIV
APDSYWPEIQ RICDKYDILL IADEVICGFG RTGNWFGTQT MGIRPHIMTI AKGLSSGYAP
IGGSIVCDEV AHVIGKDEFN HGYTYSGHPV AAAVALENLR ILEEENILDH VRNVAAPYLK
EKWEALTDHP LVGEAKIVGM MASIALTPNK ASRAKFASEP GTIGYICRER CFANNLIMRH
VGDRMIISPP LVITPAEIDE MFVRIRKSLD EAQAEIEKQG LMKSEGSHHH HHH
```

3I5T_pET22 1434 bp DNA

```
atgagcctgc gtaatgatgc aacgaatgcc gcgggtgctg tcggtgctgc gatgcgtgac
catatcctgc tgccggccca agaaatggcg aaactgggca aatctgccca gccggttctg
acccatgcgg aaggcattta tgtccacacg gaagacggtc gtcgcctgat cgatggtccg
gcaggcatgt ggtgcgctca agtgggttac ggtcgtcgcg aaattgttga tgcaatggct
catcaagcaa tggttctgcc gtatgcttct ccgtggtaca tggcaaccag tccggcagca
cgtctggcag aaaaaattgc taccctgacg ccgggtgacc tgaaccgtat ctttttcacc
acgggcggta gtaccgcagt ggattccgca ctgcgttttt cagaattcta taacaatgtc
ctgggtcgcc cgcagaaaaa acgtattatc gtgcgctatg atggctacca tggtagcacc
gcactgacgg cagcttgtac cggtcgtacg ggtaactggc cgaattttga tattgcccaa
gaccgcatct ccttcctgag ctctccgaac ccgcgtcacg ctggcaatcg ctcacaggaa
gcatttctgg atgacctggt tcaagaattc gaagaccgta ttgaatctct gggtccggat
accatcgcgg cctttctggc ggaaccgatt ctggccagtg gcggtgtgat tatcccgccg
gcaggttatc atgctcgttt taaagcgatt tgcgaaaaac acgacattct gtacatctcg
gatgaagtgg ttaccggctt cggtcgctgt ggcgaatggt ttgcgagcga aaaagttttc
ggtgtcgtgc cggatattat cacctttgca aaaggcgtta cgtcgggtta tgtcccgctg
ggcggtctgg caatcagcga agcggtgctg gcccgtattt ccggcgaaaa cgccaaaggt
tcatggttca ccaacggcta tacgtactcc aatcagccgg ttgcatgcgc agctgcactg
gcaaatatcg aactgatgga acgtgaaggt attgtcgacc aagcccgcga aatggcagat
tactttgccg cagctctggc atctctgcgt gatctgccgg gtgtggcaga aacccgcagt
gttggcctgg tcggttgcgt gcagtgtctg ctggacccga cccgtgctga cggtacggcg
gaagataaag cctttacgct gaaaatcgac gaacgttgct tcgaactggg cctgattgtc
cgtccgctgg gtgatctgtg tgtgatctcg ccgccgctga ttatcagccg tgcccagatt
gatgaaatgg tggcaattat gcgccaagct atcaccgaag ttagcgcggc ccacggcctg
acggcgaaag aaccggctgc tgtcgaaggt agtcaccacc accaccacca ctga
```

3I5T_pET22 translation 477 aa

```
MSLRNDATNA AGAVGAAMRD HILLPAQEMA KLGKSAQPVL THAEGIYVHT EDGRRLIDGP
AGMWCAQVGY GRREIVDAMA HQAMVLPYAS PWYMATSPAA RLAEKIATLT PGDLNRIFFT
TGGSTAVDSA LRFSEFYNNV LGRPQKKRII VRYDGYHGST ALTAACTGRT GNWPNFDIAQ
DRISFLSSPN PRHAGNRSQE AFLDDLVQEF EDRIESLGPD TIAAFLAEPI LASGGVIIPP
AGYHARFKAI CEKHDILYIS DEVVTGFGRC GEWFASEKVF GVVPDIITFA KGVTSGYVPL
GGLAISEAVL ARISGENAKG SWFTNGYTYS NQPVACAAAL ANIELMEREG IVDQAREMAD
YFAAALASLR DLPGVAETRS VGLVGCVQCL LDPTRADGTA EDKAFTLKID ERCFELGLIV
RPLGDLCVIS PPLIISRAQI DEMVAIMRQA ITEVSAAHGL TAKEPAAVEG SHHHHHH
```

ATA-3_pET22_-_ATA-3 1392 bp DNA

```
atgctgaaaa acgacccgct ggaacaatgg gaccgtgatc actttctgca cccgtcaacg
cacctggctg aatttgctcg tggtaatgtt gcgcatcgta ttgtcagtgg cggtgaaggc
tcccacatcg ttgatcgtaa cggtacccgc ctgctggacg gctttgcagg tctgtggtgc
gtgaatgttg gctacggtcg tcgcgaaatt gccgatgcaa tcgctaaaca ggcgcgtgaa
ctgtcatatt accattcgtt cgtcggccac ggtaccgaag cttccgtgac gctggcgcac
atgattctgg aacgcgcgcc ggccaacatg tccaaagtgt ttttcggcct gggcggttca
gatgcgaacg aaacgaacat caaactgatc tggtacatga acaacatcct gggccgtccg
ggcaaaaaga aaattatctc tcgttggcgc ggttttcatg gcagtggtct gatgagcggc
tctctgaccg gtctgccgct gtttcataaa gccttcgatc tgccgctggc accgattctg
cacacggaag ccccgtatta ctatcgtcgc ccgaatgcag acatgtcaga agaagcattt
tcggcttggt gtgcgagcga actggaagcc atgattcagc gtgaaggtcc ggataccatc
gcagcattct gggctgaacc ggtgctgggt gcgggcggta ttgtgccgcc gccggaaggt
tactgggcag ctatccaaga agtgctggat cgtcatgaca ttctgctggt cgccgatgaa
gtgatcaccg gctttggtcg cctgggcacg atgttcggtt ctgatcacta cggtatgaaa
ccggacgtga ttaccatcgc aaaaggcctg acgtcggcgt atgcgccgct gagtggttcc
gttctgagcg aaaaagtttg gaaagtcctg gaacaaggca ccgatgaaat gggtgctatt
ggccatggtt ggacgtatag cgcacacccg atcggtgcag cagcaggtgt cgccaacctg
aaactgattg atgaactggg cctgatcgac aatgctgcgg aagttggcgc ccatctgcgt
gccggtatgc gcgatgcgct gggcgaacac ccgaacgtgg gtgacattcg cggcgagggt
atgctgtgcg ccgtggaact ggttagcgat cgtgaatcta aagaaggctt tgacccgtct
cgcaaagtca ccgtgaacgc ggttgcccat ctgatggaaa atggcgtcat tggtcgtgcc
atgccgcaca gtgaaaccat cggttttgca ccgccgttct gtctgacgcg cgatgaagct
gacgaaattg tggcaaaaac ggcagcagcg gtcaaagcag ttctgggctc gcaccatcac
catcaccatt aa
```

ATA-3_pET22_-_ATA-3 translation 463 aa

```
MLKNDPLEQW DRDHFLHPST HLAEFARGNV AHRIVSGGEG SHIVDRNGTR LLDGFAGLWC
VNVGYGRREI ADAIAKQARE LSYYHSFVGH GTEASVTLAH MILERAPANM SKVFFGLGGS
DANETNIKLI WYMNNILGRP GKKKIISRWR GFHGSGLMSG SLTGLPLFHK AFDLPLAPIL
HTEAPYYYRR PNADMSEEAF SAWCASELEA MIQREGPDTI AAFWAEPVLG AGGIVPPPEG
YWAAIQEVLD RHDILLVADE VITGFGRLGT MFGSDHYGMK PDVITIAKGL TSAYAPLSGS
VLSEKVWKVL EQGTDEMGAI GHGWTYSAHP IGAAAGVANL KLIDELGLID NAAEVGAHLR
AGMRDALGEH PNVGDIRGEG MLCAVELVSD RESKEGFDPS RKVTVNAVAH LMENGVIGRA
MPHSETIGFA PPFCLTRDEA DEIVAKTAAA VKAVLGSHHH HHH
```

ATA-5_pET22_-_ATA-5 1416 bp DNA

```
atgctggacc acccggcacc ggcaagcaac gccttcgata gctgggaccg cgaccacttc
tttcatccgt caacgcacat gggccaacat gcgcgtggcg aaaccccgaa ccgcattatc
acgggcgccg aaggtgtcta tattgtggat cgtgaaggtc gtcgcagcct ggacgcgttt
ggcggtctgt ggtgcgttaa tgtcggctac ggtcgcagta aaattaccga tgctatcgcg
gaacaggcct ccaaactggc atattaccat gccttcgcag gccacggtag cgaaccgtct
attcgtctgg cgcgcatggt tatcgaacgt gctccggcgg gcatgagtcg cgtgtttttc
ggcctgagtg gttccgatgc caacgaaacc aacatcaaac tggtgtggta catcaacaac
gttctgggtc gtccgcagaa aaagaaaatt atctctcgtt ggcgcggctt tcatggcagc
ggtgttatga ccggttctct gacgggcctg gccggttttc ataaactgtt cgatctgccg
cgcgctccga ttctgcacac cgaagcgccg tattactttc gtcgcgaaga ccgttcaatg
tcggaagaac agttctccca acactgtgca gatcgcctgg aagaaatgat cctgaccgaa
ggcgctgaca cgattgcggc cttcatcggt gaaccggtcc tgggtgccgg cggtattgtg
ccgccgccgg caggttattg gccgaaaatc caggctgtgc tgaaaaaata cgatattatg
ctgatcgccg acgaagtggt taccggcttt ggtcgtctgg gcagtatgtt cggttccgat
cactatggca ttgaaccgga cctgattacc atcgcaaaag gcctgacgtc agcctacgca
ccgctgtcag gtgtgattgt ttcggaaaaa gtttggcgcg tcctggaaca aggctcggat
gaatttggtc cgatcggcca tggttggacc tatagctctc acccgctgtg cacggcagct
ggcgtcgcaa acctggaact ggtggatgaa ctggacctgg ttaccaacgc tcgtgaaacg
ggtgcgtact tcaatgcggc cctgaaagat gcgctgagcg gccatcgtca cgtgggtgaa
gttcgcggcg aaggtctgct ggcagctgtc gaactggtgc gtgaccgcga tgaccgtacc
tttttcgaag cgtctgaaaa agttggtccg cgtgtcgcag cagcaatgct ggaacgtggt
gttattgctc gcgcgatgcc gcagggcgat atcctgggtt ttgcaccgcc gctgtgtctg
acgcgcgaag aagccgatat tgtcgtggac gcaacccgtg gcgcagtgga agcggtgtgt
gctaccctgg gctcgcatca tcatcatcat cactaa
```

ATA-5_pET22_-_ATA-5 translation 471 aa

```
MLDHPAPASN AFDSWDRDHF FHPSTHMGQH ARGETPNRII TGAEGVYIVD REGRRSLDAF
GGLWCVNVGY GRSKITDAIA EQASKLAYYH AFAGHGSEPS IRLARMVIER APAGMSRVFF
GLSGSDANET NIKLVWYINN VLGRPQKKKI ISRWRGFHGS GVMTGSLTGL AGFHKLFDLP
RAPILHTEAP YYFRREDRSM SEEQFSQHCA DRLEEMILTE GADTIAAFIG EPVLGAGGIV
PPPAGYWPKI QAVLKKYDIM LIADEVVTGF GRLGSMFGSD HYGIEPDLIT IAKGLTSAYA
PLSGVIVSEK VWRVLEQGSD EFGPIGHGWT YSSHPLCTAA GVANLELVDE LDLVTNARET
GAYFNAALKD ALSGHRHVGE VRGEGLLAAV ELVRDRDDRT FFEASEKVGP RVAAAMLERG
VIARAMPQGD ILGFAPPLCL TREEADIVVD ATRGAVEAVC ATLGSHHHHH H
```

ATA-6_pET22_-_ATA-6 1395 bp DNA

```
atgctgcgta acgaccaact ggctgaatgg gaccgtgaaa acttcttcca tgcctcgacc
cacctggctg cacatgcccg tggcgacacc ccgacgcgta ttatcaccgg cggtgaaggc
gtgtatatcc aggatcgcga cggtgccaaa attctggatg gctttgcagg tctgtggtgc
gttaacgtcg gctacggtcg tcgcgaaatt acggacgcga tcgcggccca agttagtgaa
ctgtcctatt accatgcctt tgcaggccac ggtaccgaag ctagtgtcac gctggcgaaa
atggtgctgg atcgtgcacc ggacaatatg agtaaagtct atttcggcct gggcggttcc
gatgcgaacg aaaccaacat caaactgatc tggtactaca acaacattct gggtcgcccg
gagaaaaaga aaattatctc ccgttggcgc ggcttccatg gctcaggtct gatgaccggt
tcgctgacgg gcctgggtct gtttcatgcg aaattcgatc tgccgatgga cggcgttctg
cacaccgaag ctccgcatta tctgcaccgt gcggatcgca accagacgga agaacaattt
agtgcctact gtgcagctaa actggaagaa atgattctgg cagaaggccc ggataccatt
gcggccttca tcggcgaacc gattctgggt gccggcggta tcgtgccgcc gccgaaaggt
tattgggcag ctattcaggc agtgctgcgt aaatacgata tcctgctggt tgtggacgaa
gtcgtgaccg gctttggtcg cctgggcacg atgttcggtt ctgaacatta tggcctgaaa
gctgatctga ttaccatcgc gaaaggcctg acgtcagctt acgcgccgct gagcggttct
attgttagca agaaaatgtg ggccgtcctg gaaaaaggca ccgatgaaaa cggtgctttt
ggccatggtt ggacgtatag cgcacacccg atcggtgcag cagcaggtgt ggcgaacctg
aaactgatcg atgacctggg cctgattgcc aatgcaagcg aaaccggtgc ctacctgaaa
tctgcactgc aggctgcgct gggtgatcac ccgaatgtgg ccgaaattcg tggcgagggt
atgctggccg cagttgaatt ttgcgctgat cgcgatgacc tgaaacaatt cgacaccagc
gcaacgattg gtccgcgtct ggctgcagaa ctgctgaccc gtggcgttat cggtcgtgca
atgccgcagt ctgataccat cggttttgca ccgccgctgt gtattacgcg cgcagaagtg
gaccaaatcg ttgctgcgat gaaaggcgct gttgacgctg ttctgccggc ttcccaccac
caccaccacc actaa
```

ATA-6_pET22_-_ATA-6 translation 464 aa

```
MLRNDQLAEW DRENFFHAST HLAAHARGDT PTRIITGGEG VYIQDRDGAK ILDGFAGLWC
VNVGYGRREI TDAIAAQVSE LSYYHAFAGH GTEASVTLAK MVLDRAPDNM SKVYFGLGGS
DANETNIKLI WYYNNILGRP EKKKIISRWR GFHGSGLMTG SLTGLGLFHA KFDLPMDGVL
HTEAPHYLHR ADRNQTEEQF SAYCAAKLEE MILAEGPDTI AAFIGEPILG AGGIVPPPKG
YWAAIQAVLR KYDILLVVDE VVTGFGRLGT MFGSEHYGLK ADLITIAKGL TSAYAPLSGS
IVSKKMWAVL EKGTDENGAF GHGWTYSAHP IGAAAGVANL KLIDDLGLIA NASETGAYLK
SALQAALGDH PNVAEIRGEG MLAAVEFCAD RDDLKQFDTS ATIGPRLAAE LLTRGVIGRA
MPQSDTIGFA PPLCITRAEV DQIVAAMKGA VDAVLPASHH HHHH
```

ATA-7_pET22_extraction 1389 bp DNA

```
ctgaccaacg accaactgga ccgctttgac cgcgaaaact tctttcatcc gagcacccat
ctggcccaac atgcccgtgg cgaaagcccg tctcgtattg ttaaaaccgc gaaaggcgtc
tttatcgaag atcgcgacgg caacaaactg ctggatggtt tcggcggtct gtggtgcgtc
aatgtgggct acggtcagga aagcattatc gaagcgattg ccgaacaagc aaaagaactg
gcttattacc atgcatttgc tggccacggt accgaagcga gcattaacct ggccaaaatg
gtcatcgatc gtgcaccgga ccacatgtct aaagtgtatt tcggcctgag tggttccgat
gcgaacgaaa cgaacatcaa actgatctgg tactacaaca acatcctggg tcgcccggag
aaaaagaaaa ttatcagccg ttggcgcggc tttcacggca gtggtctgat gaccggttcc
ctgacgggtc tggcaggttt tcagcgtaaa ttcgatctgc cgctggaacg cgtgtttcat
accacggcac cgtattacta tcgtcgcaaa gatctggcga tgtctgaagc cgacttcgtc
gcacactgtg tggctgaact ggaaatgcgt attgaacgcg aaggcgcgga taccattgcg
gcctttatcg gtgaaccggt gctgggtgcc ggcggtattg tgccgccgcc ggaaggttat
tggaaagcga tcagcgccgt gctggaaaaa catgatattc tgctgatcgc ggacgaagtg
gttaccggct ttggtcgtct gggctcaatg ttcggttcgg atcactacgg cctgaaaccg
gacctgatta ccatcgccaa aggcctgacg agtgcgtatg ccccgctgag cggtacgatt
gtttctgata aagtttggaa agtcctggaa cagggcaccg acgaaaacgg tccgattggc
catggttgga cgtactccgc acacccgatc ggtgcagctg cgggtgttgc caacctgaaa
ctgattgatg aactgggcct ggtcaaaaat gccgcagaaa ccggtgcata tctgcgtgct
gcgatgaaag atgctctgtc agaccatccg cacgttggtg atatccgcgg cgagggtatg
ctgatggccg tggaatttgt taaagatcgt gaatcacgca cgttctacga cccgtcggaa
aaagtgggcc cgaatctggc cgcagctctg atttcggaag gtgttatcgc acgtgctatg
ccggaaggcg atattctggg ttatgcaccg ccgctgtgcc tgacccgcga agaagctgac
caaatcgtcg ccgcaacgaa aaaagcagtc atcgcagttc tgggctctca ccaccatcat
catcattaa
```

ATA-7_pET22_extraction translation 462 aa

```
MTNDQLDRFD RENFFHPSTH LAQHARGESP SRIVKTAKGV FIEDRDGNKL LDGFGGLWCV
NVGYGQESII EAIAEQAKEL AYYHAFAGHG TEASINLAKM VIDRAPDHMS KVYFGLSGSD
ANETNIKLIW YYNNILGRPE KKKIISRWRG FHGSGLMTGS LTGLAGFQRK FDLPLERVFH
TTAPYYYRRK DLAMSEADFV AHCVAELEMR IEREGADTIA AFIGEPVLGA GGIVPPPEGY
WKAISAVLEK HDILLIADEV VTGFGRLGSM FGSDHYGLKP DLITIAKGLT SAYAPLSGTI
VSDKVWKVLE QGTDENGPIG HGWTYSAHPI GAAAGVANLK LIDELGLVKN AAETGAYLRA
AMKDALSDHP HVGDIRGEGM LMAVEFVKDR ESRTFYDPSE KVGPNLAAAL ISEGVIARAM
PEGDILGYAP PLCLTREEAD QIVAATKKAV IAVLGSHHHH HH
```

ATA-8_pET22_extraction 1392 bp DNA

```
ctgaaaaatg accaactgga ccaatgggat cgtgaaaact tcttccaccc gagtacgcac
ctggctcaac atgcccgtgg cgactcagca aaccgtgtga ttaaaaccgc ttcgggcgtt
tttatcgaag atcgcgacgg taacaaactg ctggatgcct tcgcaggcct gtggtgcgtc
aatgtgggct atggtcgtca ggaaattgct gatgcgatcg ccgaccaagc acgcgaactg
gcttattacc atagctttgt gggccacggt accgaagcgt ctattacgct ggccaaaatg
atcctggatc gtgcaccggc taacatgagt aaagtgtact tcggtctggg cggttccgac
gcgaacgaaa ccaacgttaa actgatttgg tactacaaca acatcctggg ccgcccggag
aaaaagaaaa ttatcagtcg ttggcgcggt tttcatggca gtggtctggt gaccggctcc
ctgacgggtc tggaactgtt tcataaaaaa ttcgatctgc cggttaatca ggtcattcac
accgaagccc cgtattactt tcgtcgcgca gatccggacc agtccgaagc gcaattcgtt
gcccactgtg cggccgaact ggaagcgctg attgaacgtg aaggcgccga tacgattgca
gctttcatcg gtgaaccggt cctgggtgca ggcggtattg tgccgccgcc ggcaggttat
tgggaagcaa tccaggccgt gctgcgtaaa catgatattc tgctgatcgc ggacgaagtg
gttaccggct ttggtcgcct gggcacgatg ttcggttctg atcactatgg cattgaagcg
gacattatca ccatcgccaa aggtctgacg tcagcgtacg ccccgctgag cggttctatt
atctcggata aagtgtggaa agttctggaa cagggcaccg acgaaaacgg tccgattggc
catggttgga cgtatagcgc acacccgatc ggtgcagcag caggtgttgc aaatctgaaa
ctgattgatc gcctgaacct ggtccaaaat gcgggcgaaa ccggtgcata cctgaacgct
accatgacgg aagcactggc tggccatccg aatgtcggtg aagtgcgtgg cgccggtatg
ctgtgcgctg ttgaatttgt caaagataaa gacagccgcc tgtttttcga tgctgcggac
aaaattggtc cgcagatctc tgcgaaactg ctggaacaag ataaagtcat tgcacgtgca
atgccgcagg gtgacatcct gggttttgca ccgccgttct gtctgagtcg cgcagaagct
gatcaagttg ttgacgctac cctgcgtgcc gttcgtaccg tgctgggctc acaccatcat
caccatcact aa
```

ATA-8_pET22_extraction translation 463 aa

```
MKNDQLDQWD RENFFHPSTH LAQHARGDSA NRVIKTASGV FIEDRDGNKL LDAFAGLWCV
NVGYGRQEIA DAIADQAREL AYYHSFVGHG TEASITLAKM ILDRAPANMS KVYFGLGGSD
ANETNVKLIW YYNNILGRPE KKKIISRWRG FHGSGLVTGS LTGLELFHKK FDLPVNQVIH
TEAPYYFRRA DPDQSEAQFV AHCAAELEAL IEREGADTIA AFIGEPVLGA GGIVPPPAGY
WEAIQAVLRK HDILLIADEV VTGFGRLGTM FGSDHYGIEA DIITIAKGLT SAYAPLSGSI
ISDKVWKVLE QGTDENGPIG HGWTYSAHPI GAAAGVANLK LIDRLNLVQN AGETGAYLNA
TMTEALAGHP NVGEVRGAGM LCAVEFVKDK DSRLFFDAAD KIGPQISAKL LEQDKVIARA
MPQGDILGFA PPFCLSRAEA DQVVDATLRA VRTVLGSHHH HHH
```

ATA-9_pET22_extraction 1389 bp DNA

```
ctgacgaacg accaactgtc tcaatgggat cgcgaaaact tcttccaccc gagtacgcac
ctggcacaac acgcacgcgg cgaaaccgcg acgcgtgtga ttaccacggg ccagggttgc
catatcgaag atcgcgacgg caccaaactg ctggatgcct ttgcaggtct gtggtgtgtc
aacgtgggct atggtcgcac ggaaattgct gacgcgatcg cggcccaagc taaagaactg
gcgtattacc atgcctttgt cggccacggt accgaagcat caattacgct gtcgaaaatg
atcctggatc gcgccccggc acacatgagt aaagtgtact tcggcctgag cggttctgac
gccaacgaaa ccaacatcaa actgatctgg tactacaaca acattctggg ccgtccggag
aaaaagaaaa ttatcagccg ttggcgcggt tttcacggct caggtctgat gaccggctcg
ctgacgggtc tggaactgtt tcataaaaaa ttcgatctgc cgctggcgca agtgattcac
accgaagccc cgtattactt tcgtcgcccg gatctggcca tgagtgaaga agccttctcc
gcatattgcg cagctgaact ggaacaactg atcgaacgcg aaggcgcaga taccattgcg
gccttcatcg gtgaaccggt gctgggtgcg ggcggtattg tgccgccgcc gaaaggttac
tgggaagcca ttcagccgat cctggaaaaa catgatatcc tgctggttgc ggacgaagtg
gttaccggct ttggtcgtct gggcacgatg ttcggtagcg atcactatgg cctgaaaccg
gacctgatta ccatcgccaa aggtctgacg tctgcttacg cgccgctgag tggctccatt
gtcggtgata aaatgtggaa agtgctggaa caaggcaccg acgaaaacgg tccgattggc
catggttgga cgtattctgc acacccgatc ggtgcagctg cgggtgttgc taatctgaaa
ctgattgatg acatgaacct ggtcgccaat gcaggcgaaa ccggtgcgca ttttcgtaaa
gcaatgacgg atgctctggg cgaccacgca aaagttggtg atattcgcgg cgagggtatg
ctgtgcgctg ttgaactggt cgatgacaaa gataatcgta ccttttcga cccgagccag
aaagtgggcg cgcaaatcgc tagcgcgctg ctgtctaaag gtgttattgc ccgtgcaatg
ccgcagggcg atatcctggg tttcgcaccg ccgctgtgtc tgaccccggc tgaagcagaa
gaagtcgcga ccaaaaccgg cgaagcagtc cgtgacgttc tgggcagcca ccaccatcat
catcattaa
```

ATA-9_pET22_extraction translation 462 aa

```
MTNDQLSQWD RENFFHPSTH LAQHARGETA TRVITTGQGC HIEDRDGTKL LDAFAGLWCV
NVGYGRTEIA DAIAAQAKEL AYYHAFVGHG TEASITLSKM ILDRAPAHMS KVYFGLSGSD
ANETNIKLIW YYNNILGRPE KKKIISRWRG FHGSGLMTGS LTGLELFHKK FDLPLAQVIH
TEAPYYFRRP DLAMSEEAFS AYCAAELEQL IEREGADTIA AFIGEPVLGA GGIVPPPKGY
WEAIQPILEK HDILLVADEV VTGFGRLGTM FGSDHYGLKP DLITIAKGLT SAYAPLSGSI
VGDKMWKVLE QGTDENGPIG HGWTYSAHPI GAAAGVANLK LIDDMNLVAN AGETGAHFRK
AMTDALGDHA KVGDIRGEGM LCAVELVDDK DNRTFFDPSQ KVGAQIASAL LSKGVIARAM
PQGDILGFAP PLCLTPAEAE EVATKTGEAV RDVLGSHHHH HH
```

ChrVio_pET28_-_Cvi 1446 bp DNA

```
atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat
atggctagcc agaaacagcg taccacctct cagtggcgtg aactggatgc agcacatcat
ctgcatccgt ttaccgatac cgcaagcctg aatcaggcag gtgcacgtgt tatgacccgt
ggtgaaggtg tttatctgtg ggatagcgaa ggcaacaaaa ttattgatgg tatggcaggt
ctgtggtgtg ttaatgttgg ttatggtcgc aaagattttg cagaagcagc acgtcgtcag
atggaagaac tgccgtttta taataccttt tttaaaacca cccatccggc agttgttgaa
ctgagcagcc tgctggccga agttacaccg gcaggttttg atcgtgtgtt ttataccaat
agcggtagcg aaagcgttga taccatgatt cgcatggttc gtcgttattg ggatgttcag
ggcaaaccgg aaaaaaaaac cctgatcggt cgttggaatg gttatcatgg tagcaccatt
ggtggtgcca gcctgggtgg tatgaaatat atgcatgaac agggtgatct gccgattccg
ggtatggcac atattgaaca gccgtggtgg tataaacatg gcaaagatat gacaccggat
gaatttggtg ttgttgcagc acgttggctg gaagaaaaaa ttctggaaat tggtgccgat
aaagttgcag catttgtggg tgaaccgatt cagggtgcag gtggtgttat tgttccgcct
gcaacctatt ggcctgaaat tgaacgtatc tgccgcaaat atgatgttct gctggttgcc
gatgaagtta tttgtggttt tggtcgtacc ggtgaatggt ttggtcatca gcattttggt
tttcagccgg acctgtttac cgcagccaaa ggcttatctt ctggctatct gccgattggt
gcagtttttg ttggtaaacg tgttgcagaa ggtctgattg caggcggtga ttttaatcat
ggctttacct atagcggtca tccggtttgt gcagcagttg cacatgcaaa tgttgcagca
ctgcgtgatg aaggtattgt tcagcgcgtg aaagatgata ttggtccgta tatgcagaaa
cgttggcgtg aaacctttag ccgttttgaa catgttgatg atgttcgtgg tgttggtatg
gttcaggcat ttaccctggt gaaaaacaaa gcaaaacgcg aactgtttcc ggattttggt
gaaattggca ccctgtgccg tgatattttt tttcgcaata atctgattat gcgtgcctgt
ggtgatcaca ttgttagcgc accgcctctg gtgatgaccc gtgccgaagt tgatgaaatg
ctggccgttg cagaacgctg tctggaagaa tttgaacaga ccctgaaagc acgtggtctg
gcctaa
```

ChrVio_pET28_-_Cvi translation 481 aa

```
MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASQKQRTTS QWRELDAAHH LHPFTDTASL NQAGARVMTR
GEGVYLWDSE GNKIIDGMAG LWCVNVGYGR KDFAEAARRQ MEELPFYNTF FKTTHPAVVE
LSSLLAEVTP AGFDRVFYTN SGSESVDTMI RMVRRYWDVQ GKPEKKTLIG RWNGYHGSTI
GGASLGGMKY MHEQGDLPIP GMAHIEQPWW YKHGKDMTPD EFGVVAARWL EEKILEIGAD
KVAAFVGEPI QGAGGVIVPP ATYWPEIERI CRKYDVLLVA DEVICGFGRT GEWFGHQHFG
FQPDLFTAAK GLSSGYLPIG AVFVGKRVAE GLIAGGDFNH GFTYSGHPVC AAVAHANVAA
LRDEGIVQRV KDDIGPYMQK RWRETFSRFE HVDDVRGVGM VQAFTLVKNK AKRELFPDFG
EIGTLCRDIF FRNNLIMRAC GDHIVSAPPL VMTRAEVDEM LAVAERCLEE FEQTLKARGL
A
```

GamPro_pGASTON_-_GamPro 906 bp DNA

```
atgtccgatg aaccgattat ttatattaat ggcgattatc tgccgctgag ccaggcacgt
gtttctccgg ttgatcaggg ttttctgctg ggtgatggtg tttttgatgt tgttagcgcc
tggaaaggca atatttttaa actggatgcc catctggatc gtttttttga tagcattcag
gcagcacgtc tgaatcatga tatgagccgt gatgcatgga aagaagccat tattgaaacc
acccgtcgta atggtctgga tgatgccagc attcgtttta ttgttacccg tggtgaaccg
aaaggtgttg ttgcagatcc gcgtgatttt aaaccgacct gtattgtttg ggttgcaccg
tatatttttc tggccgatga agaaaaacgt cgtaatggca ttcgtctgat gattagcgca
acccgtggtt ttccggcaga taccctggac cctcgttata aatgtctgga tcgtctgcat
agccagctga ttcgtctgga agcactggaa gccggttatg atgatgcact gtggctggat
catagcggtc atgttagcga aagcgcagca agcaacctgt ttattgtgaa aaatggcgtt
ctgtataccc cgagcgcagg tattctgcgt ggtattaccc gtgataccat tctggaactg
gcaaccgaac tggatattcc gtggaaagaa cgtcagctga gcgcatttga tgtttatatt
gccgatgaag tgtttacctg ttctaccgca ggcggtgcac tgccggttcg tgaagttgca
ggtcgtacca ttcgtggcac cacaccgggt ccgattaccc aggcaattga taatgcatat
tgggcaatgc gtgaaaccga tcgttatgca acaccgctgt caggatccca tcatcatcat
catcat
```

GamPro_pGASTON_-_GamPro translation 302 aa

```
MSDEPIIYIN GDYLPLSQAR VSPVDQGFLL GDGVFDVVSA WKGNIFKLDA HLDRFFDSIQ
AARLNHDMSR DAWKEAIIET TRRNGLDDAS IRFIVTRGEP KGVVADPRDF KPTCIVWVAP
YIFLADEEKR RNGIRLMISA TRGFPADTLD PRYKCLDRLH SQLIRLEALE AGYDDALWLD
HSGHVSESAA SNLFIVKNGV LYTPSAGILR GITRDTILEL ATELDIPWKE RQLSAFDVYI
ADEVFTCSTA GGALPVREVA GRTIRGTTPG PITQAIDNAY WAMRETDRYA TPLSGSHHHH
HH
```

JanSp_pET22_-_JanSp 924 bp DNA

```
atgaacgatc tgagtaatgg tgcggcctgg atgggcagcc gcattatccc gattgcggaa
gcagcgatcc cggtgaccga ttggggtctg acgcatagcg atattgccta tgatgtggtt
ccggtttggc gtggcggctt tttccgtctg gatgattacg tggcacgttt catggcgtct
gttggtgccc tgcgcatgga tatcggccgt gatggtgatg gcgtgaaaac cgcactgacc
cgcatggttg cggcaagcgg tctgcgtgat tcttatgtgg caatggttgc cgcacgtggt
cgtaatccgg ttccgggttc tcgtgatccg cgtgattgcg caaatcattt ttatgcgtgg
tgtgtgccgt acgttcacat tgtgaaaccg gaaatcgcgg aacgcggtac ctctgtgtgg
attgcgaaac gtacgcgtcg catcccggcc gatagtgtgg atccgaccgt taaaaactac
cactggggcg atttcacggg cggtctgttc gaagcaaaag ataaaggttt cgaaaccgtg
ctgctgctgg atcatgcggg ccacgttacc gaaggtccgg gctttaatgc gttcgccctg
tttggtgatc gcattgtgac cagtgatcat ggtgttctgc acggcatcac ccgtcgcacg
gtgctggaaa tggcagcgga agcgggcctg accgttgaaa cgcgtccgct gccgctggat
gaattcctgg aagcggatga agtgtttctg agctctagtg gcggtggcgt tattccggtg
gcacgtgttg ataaccgtgt gttcagcaat gatgccgcag gtccggttgc actggatctg
cgtcgccgtt attttgattg gattacccgc gccgaacatc gtacggatat cgcatactca
ggatcccatc atcatcatca tcat
```

JanSp_pET22_-_JanSp translation 308 aa

```
MNDLSNGAAW MGSRIIPIAE AAIPVTDWGL THSDIAYDVV PVWRGGFFRL DDYVARFMAS
VGALRMDIGR DGDGVKTALT RMVAASGLRD SYVAMVAARG RNPVPGSRDP RDCANHFYAW
CVPYVHIVKP EIAERGTSVW IAKRTRRIPA DSVDPTVKNY HWGDFTGGLF EAKDKGFETV
LLLDHAGHVT EGPGFNAFAL FGDRIVTSDH GVLHGITRRT VLEMAAEAGL TVETRPLPLD
EFLEADEVFL SSSGGGVIPV ARVDNRVFSN DAAGPVALDL RRRYFDWITR AEHRTDIAYS
GSHHHHHH
```

LabAle_pGASTON_-_LabAle 960 bp DNA

```
atgagcagca ccgttgatgt tcgtgttacc attagcgatc tgagcaatgg tgcagcatgg
atgggtggtc gtctgatgcc gattagcgaa gcagcactgc cggttaccga ttggggtctg
attcatagcg atattaccta tgatgttgtt ccggttctgg atggtgcatt ttttcgtctg
ccgcattatc tggcacgttt tcgtcgtagc atggatgaac tgcgtctgga ccctggtctg
tctgatgaag aaatggaaga tgcactgcaa agcctggttg cagcaaccgg tctgcgtaaa
gcctatgttg caatggttac cagccgtggt gttaatcagg ttccgggtag ccgtgatccg
cgtgattgta aaaatcagtt ttttgcctgg tgtgttccgt atgttcatgt tattcgtccg
gaaattgcag aacgtggtgc ccatgttcat attgccaaaa ccgtgcatcg tatttctccg
ggtagcgtta atccgaaagt gaaaaattat cattggggtg attttaccaa aggtctgttt
gaagccaaag atcatggtgc agaaaccgtt attctgctgg atgatgatgg taatgttacc
gaaggtccgg gttttaatgt ttttgccgtg aaaggtcgta ccctggttac cgcagaaagc
ggtgttctgg aaggtattag ccgtcagacc gttctggata ttgcagcaga acagggtctg
gaaattgaaa ttcgtgcact ggcactgagc gaatttttg aatccgatga agtgtttatt
accacctctg gtggtggtgt tgcaccggtt acccgtgttg atgatcgcat ttttagcaat
gatgcaccgg gtccgattac caccgcactg cataaagcat atttcgaatg ggcagcacgt
ccggataatc gtaccgaaat tagctatcgt gattcaggat cccatcatca tcatcatcat
```

LabAle_pGASTON_-_LabAle translation 320 aa

```
MSSTVDVRVT ISDLSNGAAW MGGRLMPISE AALPVTDWGL IHSDITYDVV PVLDGAFFRL
PHYLARFRRS MDELRLDPGL SDEEMEDALQ SLVAATGLRK AYVAMVTSRG VNQVPGSRDP
RDCKNQFFAW CVPYVHVIRP EIAERGAHVH IAKTVHRISP GSVNPKVKNY HWGDFTKGLF
EAKDHGAETV ILLDDDGNVT EGPGFNVFAV KGRTLVTAES GVLEGISRQT VLDIAAEQGL
EIEIRALALS EFFESDEVFI TTSGGGVAPV TRVDDRIFSN DAPGPITTAL HKAYFEWAAR
PDNRTEISYR DSGSHHHHHH
```

Vibflu_pET24_-_Vfl_TA_wild_type 1431 bp DNA

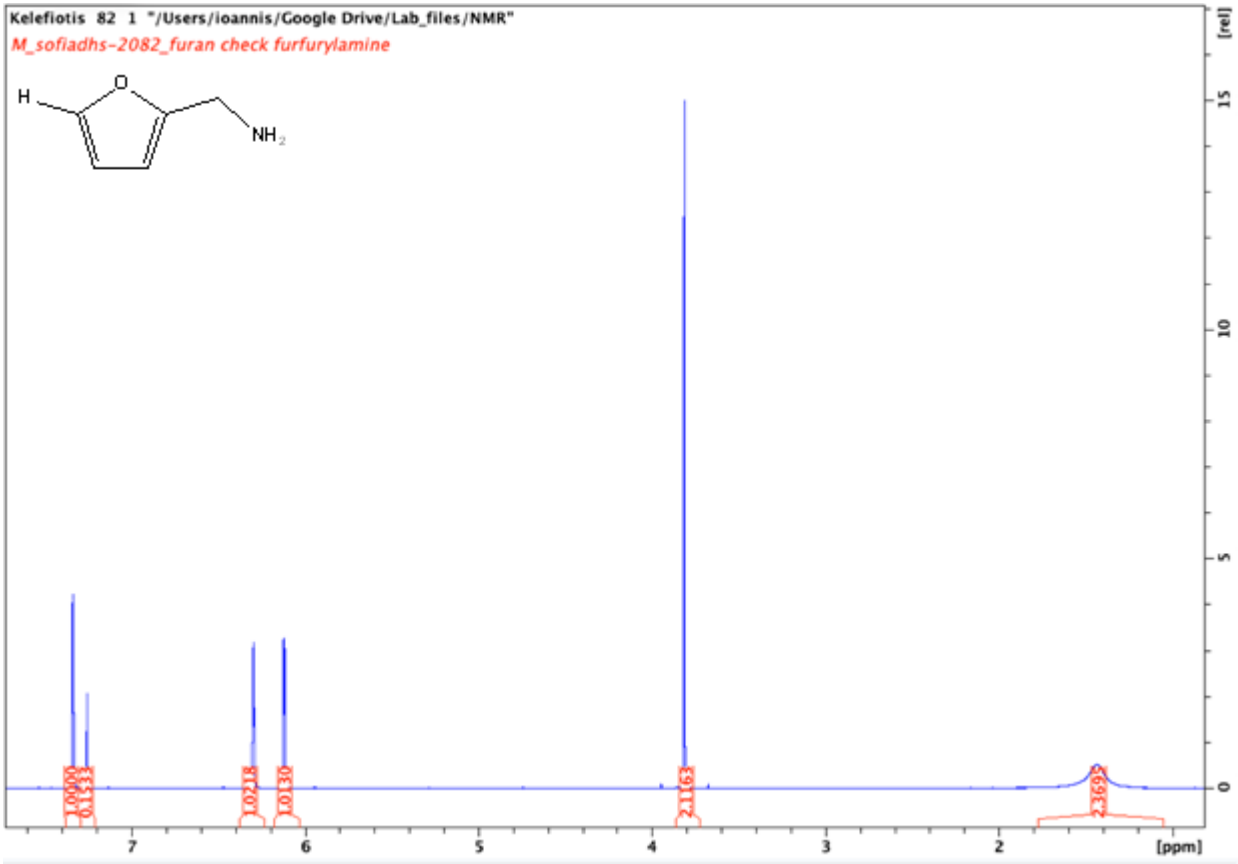
```
atgaacaaac cgcaaagctg ggaagcccgg gccgagacct attcgctcta tggtttcacc
gacatgcctt cgctgcatca gcgcggcacg gtcgtcgtga cccatggcga gggaccctat
atcgtcgatg tgaatggccg gcgttatctg gacgccaact cgggcctgtg gaacatggtc
gcgggctttg accacaaggg gctgatcgac gccgccaagg cccaatacga gcgttttccc
ggttatcacg cctttttcgg ccgcatgtcc gatcagacgg taatgctgtc ggaaaagctg
gtcgaggtgt cgccctttga ttcgggccgg gtgttctata caaactcggg gtccgaggcg
aatgacacca tggtcaagat gctatggttc ctgcatgcag ccgagggcaa accgcaaaag
cgcaagatcc tgacccgctg gaacgcctat cacggcgtga ccgccgtttc ggccagcatg
accggcaagc cctataattc ggtctttggc ctgccgctgc cgggctttgt gcatctgacc
tgcccgcatt actggcgcta tggcgaagag ggcgaaaccg aagagcagtt cgtcgcccgc
ctcgcccgcg agctggagga aacgatccag cgcgagggcg ccgacaccat cgccggtttc
tttgccgaac cggtgatggg cgcgggcggc gtgattcccc cggccaaggg gtatttccag
gcgatcctgc caatcctgcg caaatatgac atcccggtca tctcggacga ggtgatctgc
ggtttcggac gcaccggtaa cacctggggc tgcgtgacct atgactttac acccgatgca
atcatctcgt ccaagaatct tacagcgggc tttttcccca tgggggcggt gatccttggc
ccggaacttt ccaaacggct ggaaaccgca atcgaggcga tcgaggaatt cccccatggc
tttaccgcct cgggccatcc ggtcggctgt gctattgcgc tgaaagcaat cgacgtggtg
atgaatgaag ggctggctga gaacgtccgc cgccttgccc cccgtttcga ggaaaggctg
aaacatatcg ccgagcgccc gaacatcggt gaatatcgcg gcatcggctt catgtgggcg
ctggaggctg tcaaggacaa ggcaagcaag acgccgttcg acggcaacct gtcggtcagc
gagcgtatcg ccaatacctg caccgatctg gggctgattt gccggccgct tggtcagtcc
gtcgtccttt gtccgccctt tatcctgacc gaggcgcaga tggatgagat gttcgataaa
ctcgaaaaag cccttgataa ggtctttgcc gaggttgccc tgacggatcc gaattcgagc
tccgtcgaca agcttgcggc cgcactcgag caccaccacc accaccactg a
```

Vibflu_pET24_-_Vfl_TA_wild_type translation 476 aa

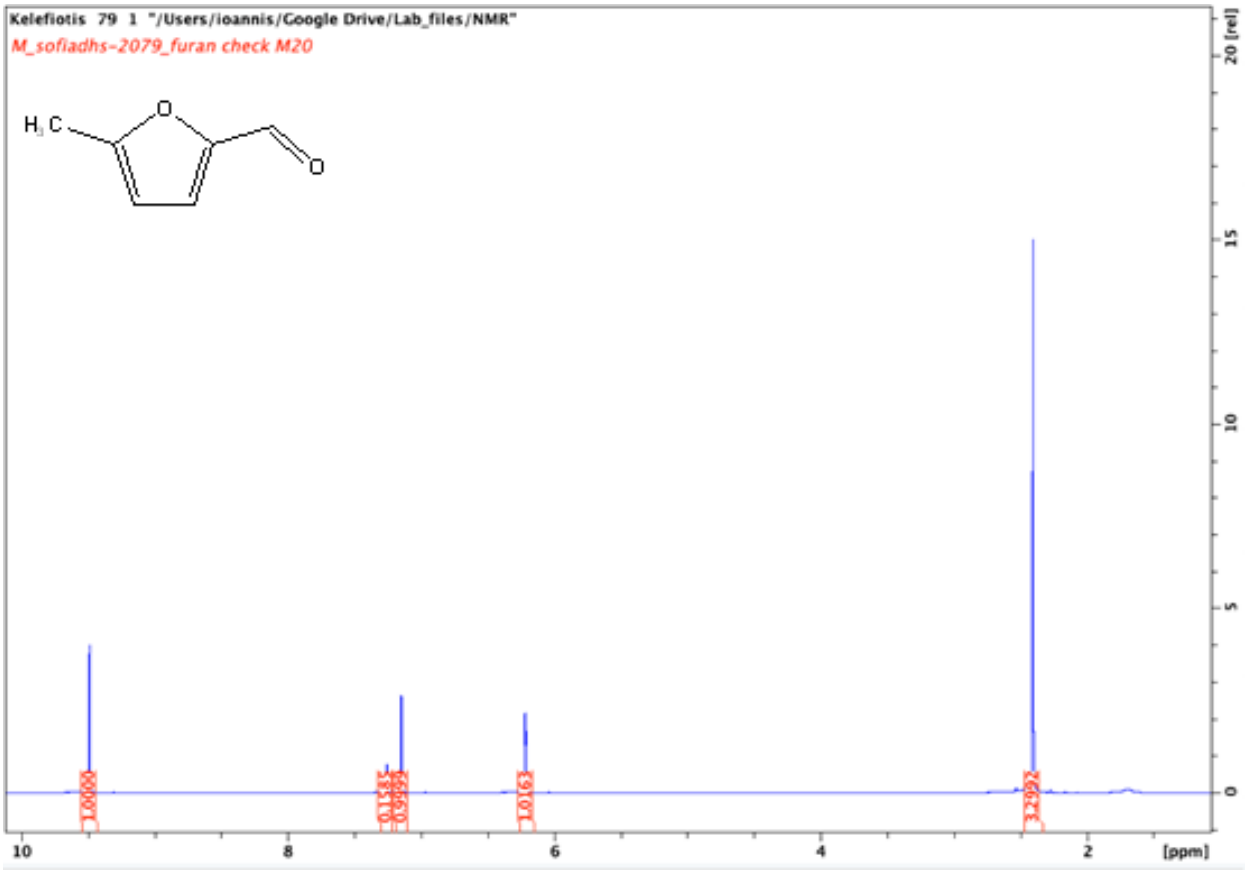
```
MNKPQSWEAR AETYSLYGFT DMPSLHQRGT VVVTHGEGPY IVDVNGRRYL DANSGLWNMV
AGFDHKGLID AAKAQYERFP GYHAFFGRMS DQTVMLSEKL VEVSPFDSGR VFYTNSGSEA
NDTMVKMLWF LHAAEGKPQK RKILTRWNAY HGVTAVSASM TGKPYNSVFG LPLPGFVHLT
CPHYWRYGEE GETEEQFVAR LARELEETIQ REGADTIAGF FAEPVMGAGG VIPPAKGYFQ
AILPILRKYD IPVISDEVIC GFGRTGNTWG CVTYDFTPDA IISSKNLTAG FFPMGAVILG
PELSKRLETA IEAIEEFPHG FTASGHPVGC AIALKAIDVV MNEGLAENVR RLAPRFEERL
KHIAERPNIG EYRGIGFMWA LEAVKDKASK TPFDGNLSVS ERIANTCTDL GLICRPLGQS
VVLCPPFILT EAQMDEMFDK LEKALDKVFA EVALTDPNSS SVDKLAAALE HHHHHH
```

II. Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

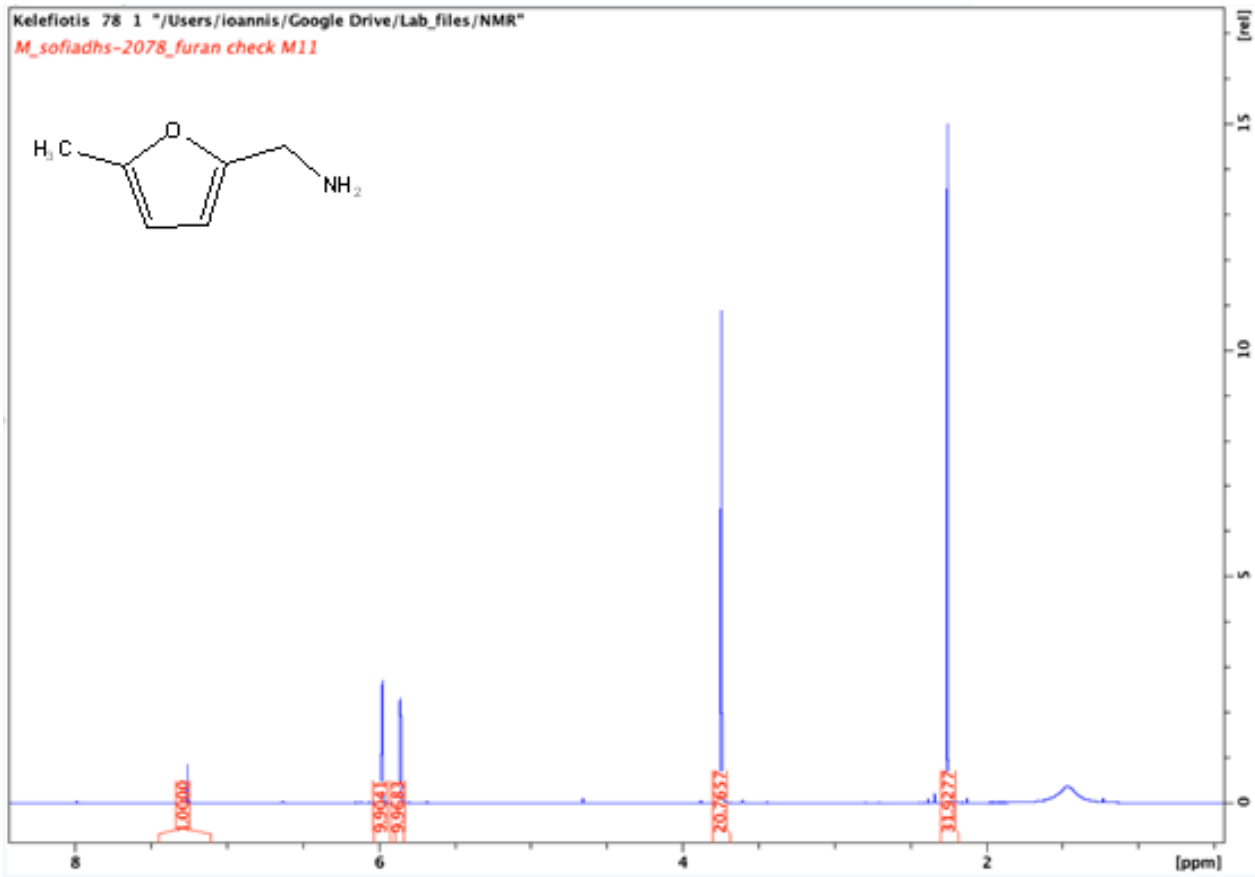
Παρακάτω (εικόνες 1-3) παρατίθενται τα ληφθέντα φάσματα NMR των ενώσεων που ορισμένων ενώσεων που περιεγράφηκαν στην ενότητα 2.1.2. Τα συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα επέτρεψαν την ταυτοποίηση των ενώσεων ενδιαφέροντος.



Εικόνα II.1: Φάσμα πρωτονίου της ένωσης φουρφουρυλαμίνη.



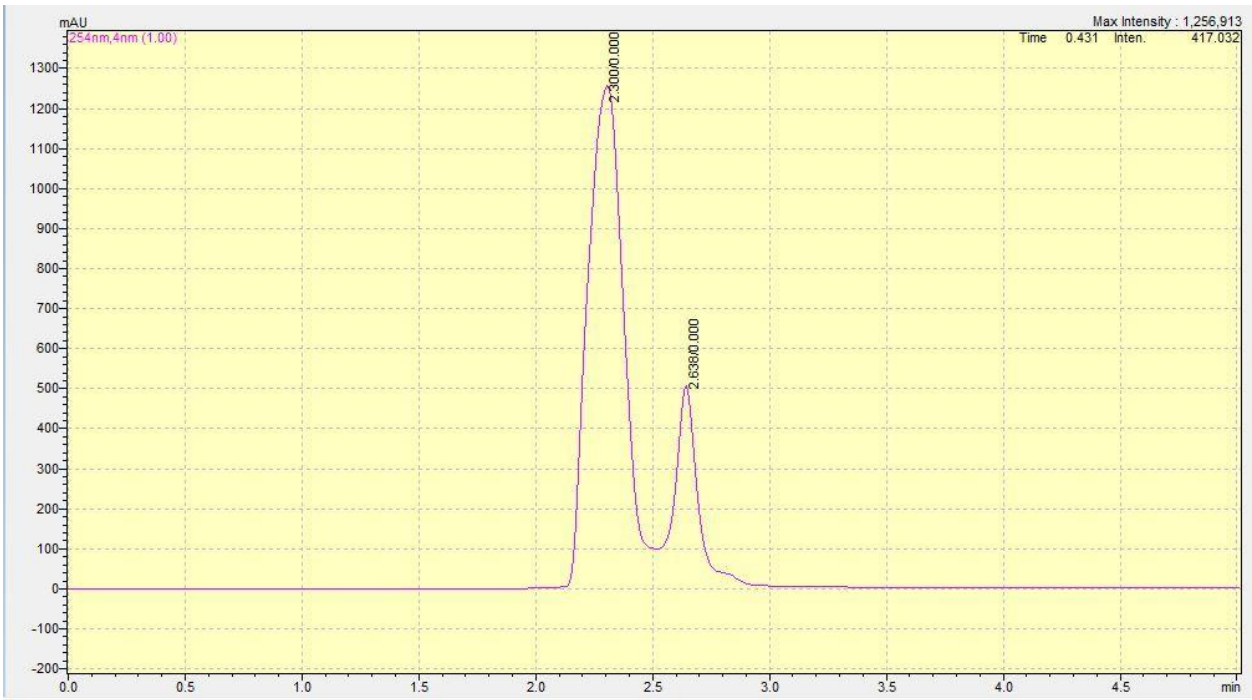
Εικόνα ΙΙ.2: Φάσμα πρωτονίου της ένωσης 5-μεθυλοφουρφουράλη.



Εικόνα ΙΙ.3: Φάσμα πρωτονίου της ένωσης 5-μεθυλο-φουροφυρυλαμίνη.

III. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Παρακάτω παρουσιάζεται ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα, βάση του οποίου πραγματοποιήθηκε η μελέτη παραγωγής του προϊόντος **5b**. Οι κορυφές στα 2.3 και 2.6 min ανήκουν στο αντιδρών PLP και το **5a** αντίστοιχα. Η μείωση της κορυφής στα 2.6 min και η εμφάνηση μιας νέας κορυφής στα 2.8 min παρουσιάζει την κατανάλωση του **5a** και την παραγωγή του **5b**.



Εικόνα III.1: Διάγραμμα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, όπου στα 2.3 min παρουσιάζεται η κορυφή του υποστρώματος και στα 2.63 min η κορυφή του συμπαράγοντα PLP.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *M. F. Chaplin and C. Bucke, "Enzyme Technology," Cambridge University Press, Cambridge, 1990. - References - Scientific Research Publishing*.

2. Godfrey, T. & West, S. *Industrial enzymology*. (Stockton Press, 1996).

3. Heux, S., Meynial-Salles, I., O'Donohue, M. J. & Dumon, C. White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. *Biotechnology Advances* vol. 33 1653–1670 (2015).

4. Soetaert, W. & Vandamme, E. The impact of industrial biotechnology. *Biotechnology Journal* vol. 1 756–769 (2006).

5. Chemical news for chemistry and chemical engineering - chemeurope.com. https://www.chemeurope.com/en/news/ - as seen: 10.07.2020.

6. Industrial Biotechnology: Development and Adoption By the U.S. Chemical and Biofuel Industries – BIO. https://archive.bio.org/articles/industrial-biotechnology-development-and-adoption-us-chemical-and-biofuel-industries - as seen: 10.07.2020.

7. Lorenz, P. & Zinke, H. White biotechnology: Differences in US and EU approaches? *Trends Biotechnol.* **23**, 570–574 (2005).

8. De la Vega, I., Requena, J. & Fernández-Gómez, R. The colors of biotechnology in Venezuela: A bibliometric analysis. *Technol. Soc.* **42**, 123–134 (2015).

9. Mackenzie, A. K., Naas, A. E., Kracun, S. K., Schückel, J., Fangel, J. U., Agger, J. W., Willats, W. G. T., Eijsink, V. G. H. & Pope, P. B. A polysaccharide utilization locus from an uncultured Bacteroidetes phylotype suggests ecological adaptation and substrate versatility. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 187–195 (2015).

10. Hansen, K. B., Hsiao, Y., Xu, F., Rivera, N., Clausen, A., Kubryk, M., Krska, S., Rosner, T., Simmons, B., Balsells, J., Ikemoto, N., Sun, Y., Spindler, F., Malan, C., Grabowski, E. J. J. & Armstrong, J. D. Highly efficient asymmetric synthesis of sitagliptin. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 8798–8804 (2009).

11. Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **44**, 98–104 (1958).

12. Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L., Biochemistry. vol. 5 257. (2002, W. H. Freeman and Company).

13. Panke, S. & Wubbolts, M. Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. *Current Opinion in Chemical Biology* vol. 9 188–194 (2005).

14. Jäckel, C. & Hilvert, D. Biocatalysts by evolution. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 21 753–759 (2010).

15. Reetz, M. T. Laboratory evolution of stereoselective enzymes: A prolific source of catalysts for asymmetric reactions. *Angewandte Chemie - International Edition* vol. 50 138–174 (2011).

16. Lutz, S. Reengineering enzymes. *Science* vol. 329 285–287 (2010).

17. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html - as seen: 10.07.2020.

18. Wohlgemuth, R. Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells. *Current Opinion in Microbiology* vol. 13 283–292 (2010).

19. Turner, N. J. Deracemisation methods. *Current Opinion in Chemical Biology* vol. 14 115–121 (2010).

20. Alfred H. Free, Analytical applications of immobilized enzymes *Ann Clin Lab Sci*, vol. 7. **6**, 479-485, (1977).

21. Robinson, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* **59**, 1–41 (2015).

22. Brugging, A., Roos, E. C. & De Vroom, E. Penicillin acylase in the industrial production of β-lactam antibiotics. *Org. Process Res. Dev.* **2**, 128–133 (1998).

23. Estell, D. A., Graycar, T. P. & Wells, J. A. Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *J. Biol. Chem.* **260**, 6518–6521 (1985).

24. Jensen, V. J. & Rugh, S. Industrial-Scale Production and Application of Immobilized Glucose Isomerase. *Methods Enzymol.* **136**, 356–370 (1987).

25. Sedlaczek, L. & Smith, L. L. Biotransformations of steroids. *Crit. Rev. Biotechnol.* **7**, 187–236 (1988).

26. Dinçer, A. & Telefoncu, A. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **45**, 10–14 (2007).

27. Elleuche, S., Schröder, C., Sahm, K. & Antranikian, G. Extremozymes-biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 29 116–123 (2014).

28. Griengl, H., Schwab, H. & Fechter, M. The Synthesis of Chiral Cyanohydrins by Oxynitrilases. *Trends Biotechnol.* **18**, 252–256 (2000).

29. Hills, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 601–607 (2003).

30. Nagasawa, T., Nakamura, T. & Yamada, H. Production of acrylic acid and methacrylic acid using Rhodococcus rhodochrous J1 nitrilase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 322–324 (1990).

31. Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C. & Robins, K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**, 185–194 (2012).

32. Singh, R. S., Singhania, R. R., Pandey, A., Larroche, C.. Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Technology. *Elsevier*, 235-237 (2019).

33. Bhavsar, K., Gujar, P., Shah, P., Kumar, V. R. & Khire, J. M. Combinatorial approach of statistical optimization and mutagenesis for improved production of acidic phytase by Aspergillus niger NCIM 563 under submerged fermentation condition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 673–679 (2013).

34. Plagemann, I., Zelena, K., Arendt, P., Ringel, P. D., Krings, U. & Berger, R. G. LOXPsa1, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **87**, 99–104 (2013).

35. Yang, H., Liu, L., Li, J., Du, G. & Chen, J. Heterologous expression, biochemical characterization, and overproduction of alkaline α-amylase from Bacillus alcalophilus in Bacillus subtilis. *Microb. Cell Fact.* **10**, 77 (2011).

36. Khatri, V., Hébert-Ouellet, Y., Meddeb-Mouelhi, F. & Beauregard, M. Specific tracking of xylan using fluorescent-tagged carbohydrate-binding module 15 as molecular probe. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 1–13 (2016).

37. Rebello, S., Jose, L., Sindhu, R. & Aneesh, E. M. Molecular advancements in the development of thermostable phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 101 2677–2689 (2017).

38. Rai, A. K., Sanjukta, S., Chourasia, R., Bhat, I., Bhardwaj, P. K. & Sahoo, D. Production of bioactive hydrolysate using protease, B-glucosidase and A-amylase of Bacillus spp. isolated from kinema. *Bioresour. Technol.* **235**, 358–365 (2017).

39. Patil, M. D., Grogan, G., Bommarius, A. & Yun, H. Recent advances in ω-transaminase-mediated biocatalysis for the enantioselective synthesis of chiral amines. *Catalysts* vol. 8 254 (2018).

40. Engelking, L., Textbook of Veterinary Physiological Chemistry. *Elsevier*, **3**, 165-166 (2014).

41. Tang, W. L. & Zhao, H. Industrial biotechnology: Tools and applications. *Biotechnol. J.* **4**, 1725–1739 (2009).

42. Woodley, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends in Biotechnology* vol. 26 321–327 (2008).

43. Morris, R. E. & Bu, X. Induction of chiral porous solids containing only achiral building blocks. *Nature Chemistry* vol. 2 353–361 (2010).

44. Savile, C. K., Janey, J. M., Mundorff, E. C., Moore, J. C., Tam, S., Jarvis, W. R., Colbeck, J. C., Krebber, A., Fleitz, F. J., Brands, J., Devine, P. N., Huisman, G. W. & Hughes, G. J. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. *Science (80-.).* **329**, 305–309 (2010).

45. Simon, R. C., Mutti, F. G. & Kroutil, W. Biocatalytic synthesis of enantiopure building blocks for pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technologies* vol. 10 e37–e44 (2013).

46. PharmaChem, K. L.- & 2007, undefined. How to make biocatalytic processes for production of chiral amines more profitable and productive.

47. Höhne, M. & Bornscheuer, U. T. Biocatalytic routes to optically active amines. *ChemCatChem* **1**, 42–51 (2009).

48. Koszelewski, D., Tauber, K., Faber, K. & Kroutil, W. ω-Transaminases for the synthesis of non-racemic α-chiral primary amines. *Trends in Biotechnology* vol. 28 324–332 (2010).

49. Cassimjee, K. E., Branneby, C., Abedi, V., Wells, A. & Berglund, P. Transaminations with isopropyl amine: Equilibrium displacement with yeast alcohol dehydrogenase coupled to in situ cofactor regeneration. *Chem. Commun.* **46**, 5569–5571 (2010).

50. Kelly, S. A., Pohle, S., Wharry, S., Mix, S., Allen, C. C. R., Moody, T. S. & Gilmore, B. F. Application of ω-Transaminases in the Pharmaceutical Industry. *Chemical Reviews* vol. 118 349–367 (2018).

51. Koszelewski, D., Lavandera, I., Clay, D., Guebitz, G. M., Rozzell, D. & Kroutil, W. Formal asymmetric biocatalytic reductive amination. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 9337–9340 (2008).

52. Shin, J. & Kim, B. Kinetic modeling of ω-transamination for enzymatic kinetic resolution of α-methylbenzylamine. *Biotechnol. Bioeng.* **60**, 534–540 (1998).

53. Yun, H., Cho, B.-K. & Kim, B.-G. Kinetic resolution of (R,S)-sec-butylamine using omega-transaminase fromVibrio fluvialis JS17 under reduced pressure. *Biotechnol. Bioeng.* **87**, 772–778 (2004).

54. YUN, H. & KIM, B.-G. Asymmetric Synthesis of (*S*)-α-Methylbenzylamine by Recombinant *Escherichia coli* Co-Expressing Omega-Transaminase and Acetolactate Synthase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 3030–3033 (2008).

55. Truppo, M. D., Turner, N. J. & Rozzell, J. D. Efficient kinetic resolution of racemic amines using a transaminase in combination with an amino acid oxidase. *Chem. Commun.* **0**, 2127–2129 (2009).

56. Truppo, M. D. & Turner, N. J. Micro-scale process development of transaminase catalysed reactions. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 1280–1283 (2010).

57. Matcham, G., Bhatia, M., Lang, W., Lewis, C., Nelson, R., Wang, A., Wu, W. Enzyme and Reaction Engineering in Biocatalysis: Synthesis of (S) -Methoxyisopropylamine (= (S)-1-Methoxypropan-2-amine). *Swiss Chemical Society* vol. 53, **12**, 584-589 (1999)

58. Martin, A. R., DiSanto, R., Plotnikov, I., Kamat, S., Shonnard, D. & Pannuri, S. Improved activity and thermostability of (S)-aminotransferase by error-prone polymerase chain reaction for the production of a chiral amine. *Biochem. Eng. J.* **37**, 246–255 (2007).

59. Webb, E. C. Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the

Nomenclature and Classification of Enzymes. *Enzym. Nomencl. 1992. Recomm. Nomencl. Comm. Int. Union Biochem. Mol. Biol. Nomencl. Classif. Enzym.* (1992).

60. John, R. A. Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular* vol. 1248 81–96 (1995).

61. Jansonius, J. N. Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 759–769 (1998).

62. Mehta, P. K. & Christen, P. The Molecular Evolution of Pyridoxal-5′-Phosphate-Dependent Enzymes. in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* vol. 74 129–184 (John Wiley and Sons Inc., 2006).

63. Schneider, G., Käck, H. & Lindqvist, Y. The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. *Structure* vol. 8 R1–R6 (2000).

64. Christen, P. & Mehta, P. K. From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5-phosphate-dependent enzymes. *Chem. Rec.* **1**, 436–447 (2001).

65. Percudani, R. & Peracchi, A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep.* **4**, 850–854 (2003).

66. Mathew, S. & Yun, H. ω-Transaminases for the production of optically pure amines and unnatural amino acids. *ACS Catalysis* vol. 2 993–1001 (2012).

67. Szmejda, K., Florczak, T., Jodłowska, I., Turkiewicz, M. Extremophilic and modified aminotransferases as a versatile tool for the synthesis of optically pure building blocks for pharmaceutical industry - *Biotechnology and Food Science* vol. 81, 23-24 (2017)

68. Grishin, N. V., Phillips, M. A. & Goldsmith, E. J. Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. *Protein Sci.* **4**, 1291–1304 (1995).

69. Eliot, A. C. & Kirsch, J. F. Pyridoxal Phosphate Enzymes: Mechanistic, Structural, and Evolutionary Considerations. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 383–415 (2004).

70. Łyskowski, A., Gruber, C., Steinkellner, G., Schürmann, M., Schwab, H., Gruber, K. & Steiner, K. Crystal Structure of an (R)-Selective ω-Transaminase from *Aspergillus terreus*. *PLoS One* **9**, e87350 (2014).

71. Toney, M. D. Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* vol. 1814 1407–1418 (2011).

72. Rocha, J. F., Pina, A. F., Sousa, S. F. & Cerqueira, N. M. F. S. A. PLP-dependent enzymes as important biocatalysts for the pharmaceutical, chemical and food industries: A structural and mechanistic perspective. *Catalysis Science and Technology* vol. 9 4864–4876 (2019).

73. Silverman R. B., Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions, Revised Edition, *Academic Press*, 385-386 (2002)

74. Berg M. Tymoczko J. L. Gregory J. Jr., Stryer L., ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 450-452 (2017).

75. Kara, S., Schrittwieser, J. H., Hollmann, F. & Ansorge-Schumacher, M. B. Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 98 1517–1529 (2014).

76. Liu, W. & Wang, P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnology Advances* vol. 25 369–384 (2007).

77. Aguilar, A., Twardowski, T. & Wohlgemuth, R. Bioeconomy for Sustainable Development. *Biotechnol. J.* **14**, 1800638 (2019).

78. European Commission, *B-1049 Brussels*, A sustainable Bioeconomy for Europe: strengthening the connection between economy, society and the environment Updated Bioeconomy Strategy (2018) https://ec.europa.eu/research/bioeconomy/pdf/ec_bioeconomy_strategy_2018.pdf - as seen: 10.07.2020.

79. A EUROPEAN STRATEGY FOR PLASTICS IN A CIRCULAR ECONOMY https://ec.europa.eu/environment/circular-economy/pdf/plastics-strategy-brochure.pdf - as seen: 10.07.2020.

80. Sustainable development from waste recyclables: Accounting approach. https://www.researchgate.net/publication/328466652_Sustainable_development_from_waste_recyclables_Accounting_approach - as seen: 10.07.2020.

81. Yuan, Z., Bi, J. & Moriguichi, Y. The circular economy: A new development strategy in China. *Journal of Industrial Ecology* vol. 10 4–8 (2006).

82. Lieder, M. & Rashid, A. Towards circular economy implementation: A comprehensive review in context of manufacturing industry. *Journal of Cleaner Production* vol. 115 36–51

(2016).

83. Ghisellini, P., Cialani, C. & Ulgiati, S. A review on circular economy: The expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. *J. Clean. Prod.* **114**, 11–32 (2016).

84. Ghislieri, D. & Turner, N. J. Biocatalytic approaches to the synthesis of enantiomerically pure chiral amines. *Top. Catal.* **57**, 284–300 (2014).

85. Guizzetti, S., Benaglia, M., Cozzi, F. & Annunziata, R. Chiral Lewis base promoted trichlorosilane reduction of ketimines. An enantioselective organocatalytic synthesis of chiral amines. *Tetrahedron* **65**, 6354–6363 (2009).

86. Cimarelli, C. & Palmieri, G. Asymmetric reduction of enantiopure imines with zinc borohydride: Stereoselective synthesis of chiral amines. *Tetrahedron Asymmetry* **11**, 2555–2563 (2000).

87. James, B. R. Synthesis of chiral amines catalyzed homogeneously by metal complexes. *Catal. Today* **37**, 209–221 (1997).

88. Storace, L., Anzalone, L., Confalone, P. N., Davis, W. P., Fortunak, J. M., Giangiordano, M., Haley, J. J., Kamholz, K., Li, H. Y., Ma, P., Nugent, W. A., Parsons, R. L., Sheeran, P. J., Silverman, C. E., Waltermire, R. E. & Wood, C. C. An efficient large-scale process for the human leukocyte elastase inhibitor, DMP 777. *Org. Process Res. Dev.* **6**, 54–63 (2002).

89. Nugent, T. C. & El-Shazly, M. Corrigendum: Chiral Amine Synthesis - Recent Developments and Trends for Enamide Reduction, Reductive Amination, and Imine Reduction. *Adv. Synth. Catal.* **353**, 804–804 (2011).

90. Bräse, S., Baumann, T., Dahmen, S. & Vogt, H. Enantioselective catalytic syntheses of α-branched chiral amines. *Chemical Communications* 1881–1890 (2007).

91. Shin, J. & Kim, B. Asymmetric synthesis of chiral amines with ω-transaminase. *Biotechnol. Bioeng.* **65**, 206–211 (1999).

92. Shin, J. S. & Kim, B. G. Exploring the active site of amine:pyruvate aminotransferase on the basis of the substrate structure-reactivity relationship: How the enzyme controls substrate specificity and stereoselectivity. *J. Org. Chem.* **67**, 2848–2853 (2002).

93. Fuchs, M., Koszelewski, D., Tauber, K., Kroutil, W. & Faber, K. Chemoenzymatic asymmetric total synthesis of (S)-Rivastigmine using ω-transaminases. *Chem. Commun.* **46**, 5500–5502 (2010).

94. Hanson, R. L., Davis, B. L., Chen, Y., Goldberg, S. L., Parker, W. L., Tully, T. P., Montana, M. A. & Patel, R. N. Preparation of (R)-amines from racemic amines with an (S)-amine transaminase from *Bacillus megaterium*. *Adv. Synth. Catal.* **350**, 1367–1375 (2008).

95. Peng, Z., Wong, J. W., Hansen, E. C., Puchlopek-Dermenci, A. L. A. & Clarke, H. J. Development of a concise, asymmetric synthesis of a smoothened receptor (smo) inhibitor: Enzymatic transamination of a 4-piperidinone with dynamic kinetic resolution. *Org. Lett.* **16**, 860–863 (2014).

96. Sattler, J. H., Fuchs, M., Mutti, F. G., Grischek, B., Engel, P., Pfeffer, J., Woodley, J. M. & Kroutil, W. Introducing an In Situ Capping Strategy in Systems Biocatalysis To Access 6-Aminohexanoic acid. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, 14153–14157 (2014).

97. Abu, R., Gundersen, M. T. & Woodley, J. M. Thermodynamic Calculations for Systems Biocatalysis. in *Computer Aided Chemical Engineering* vol. 37 233–238 (Elsevier B.V., 2015).

98. PlasticsEurope, Plastics- the Facts 2018. https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/619-plastics-facts-2018 - as seen: 10.07.2020.

99. Geyer, R., Jambeck, J. R. & Law, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* **3**, e1700782 (2017).

100. Thompson, R. C., Moore, C. J., vom Saal, F. S. & Swan, S. H. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **364**, 2153–2166 (2009).

101. Zhu, Y., Romain, C. & Williams, C. K. Sustainable polymers from renewable resources. *Nature* vol. 540 354–362 (2016).

102. The New Plastics Economy: Rethinking the future of plastics. https://www.ellenmacarthurfoundation.org/publications/the-new-plastics-economy-rethinking-the-future-of-plastics - as seen: 10.07.2020.

103. Rabnawaz, M., Wyman, I., Auras, R. & Cheng, S. A roadmap towards green packaging: The current status and future outlook for polyesters in the packaging industry. *Green Chemistry* vol. 19 4737–4753 (2017).

104. Rochman, C. M., Browne, M. A., Underwood, A. J., Van Franeker, J. A., Thompson, R. C. & Amaral-Zettler, L. A. The ecological impacts of marine debris: Unraveling the demonstrated evidence from what is perceived. *Ecology* **97**, 302–312 (2016).

105. Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J. & Galloway, T. S. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 6646–6655 (2013).

106. Schmidt, C., Krauth, T. & Wagner, S. Export of Plastic Debris by Rivers into the Sea. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 12246–12253 (2017).

107. Vilela, C., Sousa, A. F., Fonseca, A. C., Serra, A. C., Coelho, J. F. J., Freire, C. S. R. & Silvestre, A. J. D. The quest for sustainable polyesters-insights into the future. *Polymer Chemistry* vol. 5 3119–3141 (2014).

108. Lambert, S. & Wagner, M. Environmental performance of bio-based and biodegradable plastics: The road ahead. *Chemical Society Reviews* vol. 46 6855–6871 (2017).

109. Jha, A. & Kumar, A. Biobased technologies for the efficient extraction of biopolymers from waste biomass. *Bioprocess and Biosystems Engineering* vol. 42 1893–1901 (2019).

110. Mellinas, C., Ramos, M., Jiménez, A. & Garrigós, M. C. Recent trends in the use of pectin from agro-waste residues as a natural-based biopolymer for food packaging applications. *Materials* vol. 13 673 (2020).

111. Chandel, A. K., Garlapati, V. K., Singh, A. K., Antunes, F. A. F. & da Silva, S. S. The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology* vol. 264 370–381 (2018).

112. Mäki-Arvela, P., Anugwom, I., Virtanen, P., Sjöholm, R. & Mikkola, J. P. Dissolution of lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids-A review. *Industrial Crops and Products* vol. 32 175–201 (2010).

113. Sun, N., Rodríguez, H., Rahman, M. & Rogers, R. D. Where are ionic liquid strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass, *Chem. Commun.* **47**, 1405–1421 (2011).

114. Barakat, A., de Vries, H. & Rouau, X. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review. *Bioresource Technology* vol. 134 362–373 (2013).

115. Sun, Y. & Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.* **83**, 1–11 (2002).

116. Taherzadeh, M. J. & Karimi, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 9 1621–1651 (2008).

117. Alonso, D. M., Wettstein, S. G. & Dumesic, J. A. Gamma-valerolactone, a sustainable platform molecule derived from lignocellulosic biomass. *Green Chemistry* vol. 15 584–595 (2013).

118. Isikgor, F. H. & Becer, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.* **6**, 4497–4559 (2015).

119. Lee, C., Dazen, K., Kafle, K., Moore, A., Johnson, D. K., Park, S. & Kim, S. H. Correlations of apparent cellulose crystallinity determined by XRD, NMR, IR, Raman, and SFG methods. *Adv. Polym. Sci.* **271**, 115–131 (2015).

120. Tarasov, D., Leitch, M. & Fatehi, P. Lignin-carbohydrate complexes: Properties, applications, analyses, and methods of extraction: A review. *Biotechnology for Biofuels* vol. 11 1–28 (2018).

121. Giummarella, N., Pu, Y., Ragauskas, A. J. & Lawoko, M. A critical review on the analysis of lignin carbohydrate bonds. *Green Chem.* **21**, 1573–1595 (2019).

122. Sharma, H. K., Xu, C. & Qin, W. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. *Waste and Biomass Valorization* vol. 10 235–251 (2019).

123. Pe´rezpe´rez, J., Munõz-Dorado, A. J., De La, T., Ae, R. & Martı´nezmartı´nez, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* vol. 5, 53–63 (2002).

124. Wan, C. & Li, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances* vol. 30 1447–1457 (2012).

125. Ginley D., Cahen D., Fundamentals of Materials for Energy and Environmental Sustainability, *Cambridge University Press*, vol. 1, 82 (2011)

126. Biundo, A., Subagia, R., Maurer, M., Ribitsch, D., Syrén, P. O. & Guebitz, G. M. Switched reaction specificity in polyesterases towards amide bond hydrolysis by enzyme engineering. *RSC Adv.* **9**, 36217–36226 (2019).

127. Li, W., Zhang, T., Xin, H., Su, M., Ma, L., Jameel, H., Chang, H. M. & Pei, G. P - Hydroxybenzenesulfonic acid-formaldehyde solid acid resin for the conversion of fructose and glucose to 5-hydroxymethylfurfural. *RSC Adv.* **7**, 27682–27688 (2017).

128. Zhu, S., Wang, J. & Fan, W. Graphene-based catalysis for biomass conversion. *Catal. Sci. Technol.* **5**, 3845–3858 (2015).

129. Climent, M. J., Corma, A. & Iborra, S. Converting carbohydrates to bulk chemicals and fine chemicals over heterogeneous catalysts. *Green Chem.* **13**, 520–540 (2011).

130. Zakrzewska, M. E., Bogel-Łukasik, E. & Bogel-Łukasik, R. Ionic liquid-mediated formation of 5-hydroxymethylfurfural-A promising biomass-derived building block. *Chem. Rev.* **111**, 397–417 (2011).

131. Moreau, C., Belgacem, M. N. & Gandini, A. Recent catalytic advances in the chemistry of substituted furans from carbohydrates and in the ensuing polymers. *Top. Catal.* **27**, 11–30 (2004).

132. Tong, X., Ma, Y. & Li, Y. Biomass into chemicals: Conversion of sugars to furan derivatives by catalytic processes. *Applied Catalysis A: General* vol. 385 1–13 (2010).

133. Gallezot, P. Conversion of biomass to selected chemical products. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1538–1558 (2012).

134. YXY - Avantium. https://www.avantium.com/technologies/yxy/ - as seen: 10.07.2020.

135. Amarasekara, A. S. 5-Hydroxymethylfurfural Based Polymers. in *Renewable Polymers* 381–428 (John Wiley & Sons, Inc., 2011).

136. Gandini, A. Furan Monomers and their Polymers: Synthesis, Properties and Applications. in *Biopolymers - New Materials for Sustainable Films and Coatings* 179–209 (John Wiley & Sons, Ltd, 2011).

137. Rajesh, R. O., Godan, T. K., Sindhu, R., Pandey, A. & Binod, P. Bioengineering

advancements, innovations and challenges on green synthesis of 2, 5-furan dicarboxylic acid. *Bioengineered* **11**, 19–38 (2020).

138. Weiß, M. S., Pavlidis, I. V., Spurr, P., Hanlon, S. P., Wirz, B., Iding, H. & Bornscheuer, U. T. Protein-engineering of an amine transaminase for the stereoselective synthesis of a pharmaceutically relevant bicyclic amine. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 10249–10254 (2016).

139. Kelefiotis-Stratidakis, P., Tyrikos-Ergas, T. & Pavlidis, I. V. The challenge of using isopropylamine as an amine donor in transaminase catalysed reactions. *Organic and Biomolecular Chemistry* vol. 17 1634–1642 (2019).

140. Pavlidis, I. V., Weiß, M. S., Genz, M., Spurr, P., Hanlon, S. P., Wirz, B., Iding, H. & Bornscheuer, U. T. Identification of (S)-selective transaminases for the asymmetric synthesis of bulky chiral amines. *Nat. Chem.* **8**, 1076–1082 (2016).

141. Schätzle, S., Höhne, M., Redestad, E., Robins, K. & Bornscheuer, U. T. Rapid and sensitive kinetic assay for characterization of ω-transaminases. *Anal. Chem.* **81**, 8244–8248 (2009).

142. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).

143. Walker, J. M. & Kruger, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. in *Basic Protein and Peptide Protocols* 9–16 (Humana Press, 2003).

144. Schätzle, S., Höhne, M., Redestad, E., Robins, K. & Bornscheuer, U. T. Rapid and sensitive kinetic assay for characterization of ω-transaminases. *Anal. Chem.* **81**, 8244–8248 (2009).

145. Kaulmann, U., Smithies, K., Smith, M. E. B., Hailes, H. C. & Ward, J. M. Substrate spectrum of ω-transaminase from *Chromobacterium violaceum* DSM30191 and its potential for biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.* **41**, 628–637 (2007).

146. Cassimjee, K. E., Manta, B. & Himo, F. A quantum chemical study of the ω-transaminase reaction mechanism. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 8453–8464 (2015).

147. Cassimjee, K. E., Humble, M. S., Miceli, V., Colomina, C. G. & Berglund, P. Active site quantification of an Ω-Transaminase by performing a half transamination reaction. *ACS Catal.* **1**, 1051–1055 (2011).

148. Dunbabin, A., Subrizi, F., Ward, J. M., Sheppard, T. D. & Hailes, H. C. Furfurylamines from biomass: Transaminase catalysed upgrading of furfurals. *Green Chem.* **19**, 397–404 (2017).

149. Steffen-Munsberg, F., Vickers, C., Thontowi, A., Schätzle, S., Tumlirsch, T., Svedendahl Humble, M., Land, H., Berglund, P., Bornscheuer, U. T. & Höhne, M. Connecting Unexplored Protein Crystal Structures to Enzymatic Function. *ChemCatChem* **5**, 150–153 (2013).

150. Steffen-Munsberg, F., Vickers, C., Kohls, H., Land, H., Mallin, H., Nobili, A., Skalden, L., van den Bergh, T., Joosten, H. J., Berglund, P., Höhne, M. & Bornscheuer, U. T. Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications. *Biotechnology Advances* vol. 33 566–604 (2015).

151. Höhne, M., Schätzle, S., Jochens, H., Robins, K. & Bornscheuer, U. T. Rational assignment of key motifs for function guides in silico enzyme identification. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 807–813 (2010).

152. Park, E. S., Dong, J. Y. & Shin, J. S. ω-Transaminase-catalyzed asymmetric synthesis of unnatural amino acids using isopropylamine as an amino donor. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 6929–6933 (2013).

153. Mutti, F. G., Fuchs, C. S., Pressnitz, D., Sattler, J. H. & Kroutil, W. Stereoselectivity of Four (R)-Selective Transaminases for the Asymmetric Amination of Ketones. *Adv. Synth. Catal.* **353**, 3227–3233 (2011).

154. Mallin, H., Höhne, M. & Bornscheuer, U. T. Immobilization of (R)- and (S)-amine transaminases on chitosan support and their application for amine synthesis using isopropylamine as donor. *J. Biotechnol.* **191**, 32–37 (2014).

155. Tufvesson, P., Nordblad, M., Krühne, U., Schürmann, M., Vogel, A., Wohlgemuth, R. & Woodley, J. M. Economic Considerations for Selecting an Amine Donor in Biocatalytic Transamination. *Org. Process Res. Dev.* **19**, 652–660 (2015).

156. Rehn, G., Adlercreutz, P. & Grey, C. Supported liquid membrane as a novel tool for driving the equilibrium of ω-transaminase catalyzed asymmetric synthesis. *J. Biotechnol.* **179**, 50–55 (2014).

157. Dawood, A. W. H., Weiß, M. S., Schulz, C., Pavlidis, I. V., Iding, H., de Souza, R. O. M.

A. & Bornscheuer, U. T. Isopropylamine as Amine Donor in Transaminase-Catalyzed Reactions: Better Acceptance through Reaction and Enzyme Engineering. *ChemCatChem* **10**, 3943–3949 (2018).

158. Halim, M., Rios-Solis, L., Micheletti, M., Ward, J. M. & Lye, G. J. Microscale methods to rapidly evaluate bioprocess options for increasing bioconversion yields: Application to the ω-transaminase synthesis of chiral amines. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **37**, 931–941 (2014).

159. Richter, N., Simon, R. C., Lechner, H., Kroutil, W., Ward, J. M. & Hailes, H. C. ω-Transaminases for the amination of functionalised cyclic ketones. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 8843–8851 (2015).

160. Jiang, J., Chen, X., Feng, J., Wu, Q. & Zhu, D. Substrate profile of an ω-transaminase from Burkholderia vietnamiensis and its potential for the production of optically pure amines and unnatural amino acids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **100**, 32–39 (2014).

161. Dawood, A. W. H., de Souza, R. O. M. A. & Bornscheuer, U. T. Asymmetric Synthesis of Chiral Halogenated Amines using Amine Transaminases. *ChemCatChem* **10**, 951–955 (2018).

162. Iglesias, C., Panizza, P. & Rodriguez Giordano, S. Identification, expression and characterization of an R-ω-transaminase from Capronia semiimmersa. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 5677–5687 (2017).

163. Han, S.-W., Park, E.-S., Dong, J.-Y. & Shin, J.-S. Mechanism-Guided Engineering of ω-Transaminase to Accelerate Reductive Amination of Ketones. *Adv. Synth. Catal.* **357**, 1732–1740 (2015).

164. Sheldon, R. A. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. *Org. Process Res. Dev.* **15**, 213–223 (2011).

165. Khodashenas, B., Ardjmand, M., Baei, M. S., Rad, A. S. & Akbarzadeh, A. Conjugation of pectin biopolymer with Au-nanoparticles as a drug delivery system: Experimental and DFT studies. *Appl. Organomet. Chem.* **34**, (2020).

166. Karimzadeh, M., Eslampanah-Seyyedi, E. & Behniafar, H. Poly(tetramethylene oxide)-coated silica nanoparticles incorporated into poly(4,4′-oxydiphenylene-pyromellitimide) matrix. *Mater. Manuf. Process.* **33**, 1093–1099 (2018).

167. Verma, M. L., Dhanya, B. S., Sukriti, Rani, V., Thakur, M., Jeslin, J. & Kushwaha, R. Carbohydrate and protein based biopolymeric nanoparticles: Current status and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules* vol. 154 390–412 (2020).

168. Christy, P. N., Basha, S. K., Kumari, V. S., Bashir, A. K. H., Maaza, M., Kaviyarasu, K., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A. & Ignacimuthu, S. Biopolymeric nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications – A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* vol. 55 101452 (2020).

169. Belluati, A., Craciun, I., Meyer, C. E., Rigo, S. & Palivan, C. G. Enzymatic reactions in polymeric compartments: nanotechnology meets nature. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 60 53–62 (2019).

170. IR Spectrum Table & Chart | Sigma-Aldrich. https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html - as seen: 10.07.2020.

171. Marin, L., Simionescu, B. & Barboiu, M. Imino-chitosan biodynamers. *Chem. Commun.* **48**, 8778–8780 (2012).

172. IR: aldehydes. https://orgchemboulder.com/Spectroscopy/irtutor/aldehydesir.shtml - as seen: 10.07.2020.

173. Bartl, F., Urjasz, H. & Brzezinski, B. *MOLECULAR STRUCTURE FT-IR study of pyridoxal phosphate*. *Journal of Molecular Structure* vol. 441 (1998).

174. Cassimjee, K. E., Manta, B. & Himo, F. A quantum chemical study of the ω-transaminase reaction mechanism. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 8453–8464 (2015).

175. Weiß, M. S., Pavlidis, I. V., Spurr, P., Hanlon, S. P., Wirz, B., Iding, H. & Bornscheuer, U. T. Amine Transaminase Engineering for Spatially Bulky Substrate Acceptance. *ChemBioChem* **18**, 1022–1026 (2017).

176. Dourado, D. F. A. R., Pohle, S., Carvalho, A. T. P., Dheeman, D. S., Caswell, J. M., Skvortsov, T., Miskelly, I., Brown, R. T., Quinn, D. J., Allen, C. C. R., Kulakov, L., Huang, M. & Moody, T. S. Rational design of a (S)-selective-transaminase for asymmetric synthesis of (1S)-1-(1,1'-biphenyl-2-yl) ethanamine. *ACS Catal.* **6**, 7749–7759 (2016).

177. Smith, M. E. B., Chen, B. H., Hibbert, E. G., Kaulmann, U., Smithies, K., Galman, J. L., Baganz, F., Dalby, P. A., Hailes, H. C., Lye, G. J., Ward, J. M., Woodley, J. M. &

Micheletti, M. A multidisciplinary approach toward the rapid and preparative-scale biocatalytic synthesis of chiral amino alcohols: A concise transketolase-/ ω-transaminase-mediated synthesis of (25,35)-2-aminopentane-1,3-diol. *Org. Process Res. Dev.* **14**, 99–107 (2010).