

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Παραγωγή πολυ(3-υδροξύ βουτυρικού) εστέρα (PHB) από το
βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* sp. rhDV1 παρουσία
φαινόλης**

Καναβάκη Ηλιάνα

Υπεύθυνος Καθηγητής: Τσιώτης Γεώργιος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2020

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GENERAL POSTGRADUATE PROGRAMM
BIOCHEMISTRY LABORATORY



MASTER THESIS

**Production of poly(3-hydroxybutyrate) ester (PHB) by the
bacterial strain *Pseudomonas* sp. pHDV1 in the presence of
phenol**

Kanavaki Iliana

Master thesis supervisor: Tsiotis Georgios

HERAKLION 2020

Εξεταστική επιτροπή

**Γεώργιος Τσιώτης (Επιβλέπων)
Καθηγητής τμήματος Χημείας, Τομέας Βιοχημείας
Πανεπιστήμιο Κρήτης**

**Δημήτριος Γανωτάκης
Καθηγητής τμήματος Χημείας, Τομέας Βιοχημείας
Πανεπιστήμιο Κρήτης**

**Ιωάννης Παυλίδης
Επίκουρος Καθηγητής τμήματος Χημείας, Τομέας Βιοχημείας
Πανεπιστήμιο Κρήτης**

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την δυνατότητα που μου προσέφερε να ολοκληρώσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές.

Ένα ακόμα ευχαριστώ οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Γεώργιο Τσιώτη για την ανάθεση της εργασίας και κυρίως για την καθοδήγηση, τη στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη των εργαστηρίων του τομέα της βιοχημείας για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα που δημιούργησαν και κυρίως τον Αλέξανδρο Λυρατζάκη και την Ειρήνη Μαθιουδάκη για την πολύτιμη βοήθειά τους σε όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου για την στήριξη και την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Το βακτήριο *Pseudomonas* sp. pHDV1 είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο το οποίο έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης και να τη χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα διασπώντας την μέσω του meta καταβολικού μονοπατιού. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του βακτηρίου αυτού ως προς την ικανότητά του να παράγει πολυ(3-υδροξυβουτυρικό) (PHB) παρουσία φαινόλης. Αρχικά αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης πολυυδροξυαλκανοϊκών (PHA) από τα κύτταρα και στην συνέχεια έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών καλλιέργειας του βακτηρίου διαφοροποιώντας την διάρκεια ανάπτυξης καθώς και την συγκέντρωση της φαινόλης στο θρεπτικό μέσο. Οι βέλτιστες συνθήκες από αυτές που δοκιμάστηκαν βρέθηκαν ότι είναι οι 72 ώρες καλλιέργειας και 600 mg/L συγκέντρωση φαινόλης στο θρεπτικό μέσο.

Μετά την απομόνωση του παραγόμενου στερεού, έγινε προσπάθεια χαρακτηρισμού του με τεχνικές φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR), φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR) και matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI). Η ύπαρξη χαρακτηριστικών κορυφών στα φάσματα IR και NMR καθώς και η παρουσία ιόντων με το μοριακό βάρος του μονομερούς στο φάσμα μάζας, αποτελούν ισχυρές ενδείξεις ότι το πολυυδροξυαλκανοϊκό είναι το πολύ-(3-υδροξυβουτυρικό).

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια για την ταυτοποίηση της συνθάσης πολυ-(R)-υδροξυαλκανοϊκού με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (nLC-MS), καθώς και κινητική μελέτη του ενζύμου στους 24.6 °C και στους 32 °C που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου.

Λέξεις-κλειδιά: *Pseudomonas* sp. pHDV1, φαινόλη, πολυυδροξυαλκανοϊκά, βιοαποικοδόμηση, βιοπολυμερή

Abstract

The bacterium *Pseudomonas* sp. phDV1 is a Gram-negative bacterium that has the ability to grow in the presence of phenol and use it as a carbon source by breaking it down through the meta degradation pathway. The aim of the present study was to study this bacterium in terms of its ability to produce poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) in the presence of phenol. Initially, a protocol for the isolation of polyhydroxyalkanoates (PHA) from cells was developed and then an attempt was made to optimize the culture conditions of the bacterium by varying the duration of growth as well as the concentration of phenol in the medium. The best conditions from those tested were found to be 72 hours of culture and 600 mg/L concentration of phenol in the medium.

After isolating the solid produced, an attempt was made to characterize it by infrared spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) techniques. The presence of characteristic peaks in the IR and NMR spectra as well as the presence of ions with the molecular weight of the monomer in the mass spectrum, are strong indications that the polyhydroxyalkanoate is the poly-(3-hydroxybutyrate).

An attempt was then made to identify poly-(R)-hydroxyalkanoic acid synthase with nLC-MS, as well as kinetic study of the enzyme at 24.6 °C and 32 °C which is the optimal growth temperature of the bacterium.

Keywords: *Pseudomonas* sp phDV1, phenol, polyhydroxyalkanoates, biodegradation biopolymers

ΗΛΙΑΝΑ ΚΑΝΑΒΑΚΗ

Διεύθυνση: Αρχιεπισκόπου Μακαρίου, Ηράκλειο, 71022, Ελλάδα
Τηλ: (+30) 6981609403
Email: ilianakanavaki@gmail.com

Εκπαίδευση

9/2018-σήμερα **Μεταπτυχιακό στο Γενικό Πρόγραμμα** με ειδίκευση στη **Βιοχημεία**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ελλάδα (ECTS 120) **Βαθμός: 8.42 στα 10**
9/2013-6/2018 **Δίπλωμα στη Χημική Μηχανική**, Πολυτεχνική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ), Ελλάδα. (ECTS: 295/300) **Βαθμός: 8.12 στα 10**
2009-2012 Απολυτήριο από το 1^ο Γενικό Λύκειο Ιωαννίνων, Ελλάδα. Βαθμός: 18 & 8/10 στα 20

Ερευνητική Εμπειρία

4/2018-σήμερα **Εργαστήριο Βιοχημείας**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ελλάδα.
Ερευνητική εργασία: Παραγωγή πολύ(3-υδροξυ βουτυρικού) εστέρα (PHB) από το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* sp. pHDV1 παρουσία φαινόλης.
Επιβλέπων: Καθηγητής Γ. Τσιώτης

- Καλλιέργειες του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. pHDV1
- Απομόνωση και χαρακτηρισμός πρωτεϊνών
- Απομόνωση και χαρακτηρισμός πολυυδροξυαλκανοϊκών

11/2017-5/2018 **Εργαστήριο Οργανικής Χημείας**, Πολυτεχνική σχολή ,ΑΠΘ, Ελλάδα.
Ερευνητική εργασία: Οργανική σύνθεση υδραζονών. Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Α. Κόταλη

- Σύνθεση υδραζονών από υδραζίνες και υδραζίδια για σύνθεση ετεροκυκλικών μορίων.
- Απομόνωση και καθαρισμός υδραζονών με ανακρυστάλλωση.
- Έλεγχος καθαρότητας με μέτρηση του σημείου τήξεως και χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.

Εργαστηριακή Εμπειρία

- **Κυτταρικές καλλιέργειες βακτηρίων**
- **UV-Vis** φωτομετρία
- **Τεχνικές ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE, Blue Native PAGE)**
- **Απομόνωση και καθαρισμός μεμβρανικών πρωτεϊνών**
- Γνώση **χημικής σύνθεσης, τεχνικών καθαρισμού και απομόνωσης** (reflux διήθηση υπό κενό, φιλτράρισμα, φυγοκέντριση, ανακρυστάλλωση, εκχύλιση με διαλύτες, TLC και HPLC χρωματογραφία, φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης, μέτρηση σημείου τήξης, IR φασματοσκοπία)
- Βασικές γνώσεις **GC, ICP-MS**

Εργασιακή Εμπειρία

10/2019-12/2019 Εργαστήριο Βιοχημείας, Ηράκλειο
Βοηθός εργαστηρίου

1/2019-5/2019 Εργαστήριο Γενικής Χημείας, Ηράκλειο
Βοηθός εργαστηρίου

6/2017-7/2017 **Γενικό Χημείο του Κράτους**, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα .
Πρακτική-Βοηθός Χημικού

- Ανάλυση σε τρόφιμα και ποτά (γαλακτοκομικά, αλκοολούχα ποτά, κρασί, μύρα, βρώσιμα λάδια κλπ) για παραμέτρους σχετικές με την ασφάλεια και την ποιότητα με χρήση GC/FID, HPLC/UV, HPLC/RID, UV-VIS

Γλώσσες

Ελληνικά μητρική γλώσσα

Αγγλικά Άριστη γνώση: Toefl ibT 103 και CPE από το Πανεπιστήμιο του Michigan

Γερμανικά Βασική γνώση (B2) Κατανόηση της γλώσσας

Συνέδρια/ Σεμινάρια

27-29/4/2018 Summer School on ‘**Natural products:Chemistry, Biological Activities & Technological Applications**’, Thessaloniki, Greece

25-27/5/2017 **11th Conference in Chemical Engineering**, Thessaloniki, Greece

2-4/12/2016 **22nd Hellenic Conference in Chemistry**, Thessaloniki, Greece

Δεξιότητες πληροφορικής

Microsoft office (Word, Excel, PowerPoint, Internet)

Programming Matlab

ILIANA KANAVAKI

Address: Arx. Makariou, Herakleio, 71022, Greece,
Tel: (+30) 6981609403
Email: ilianakanavaki@gmail.com

Education

9/2018-today **Master in Chemistry** specializing in **Biochemistry**, Department of Chemistry, University of Crete, Greece (ECTS 120) **GPA: 8.42 out of 10**
9/2013-6/2018 **Diploma in Chemical Engineering**, Faculty of Engineering, Aristotle University of Thessaloniki (AUTH), Greece. (ECTS: 295/300) **GPA: 8.12 out of 10**
2009-2012 Apolytirio from 1st High School of Ioannina, Greece. Grade: 18 & 8/10 out of 20

Research Experience

4/2018-today **Laboratory of Biochemistry**, Department of Chemistry, University of Crete, Greece.
Research Thesis: Production of poly(3-hydroxybutyrate) ester (PHB) by the bacterial strain *Pseudomonas* sp. phDV1 in the presence of phenol. Supervisor: Prof. G.Tsiotis

- Cell cultivation of *Pseudomonas* sp. phDV1
- Isolation, purification and characterization of proteins
- Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates

11/2017-5/2018 **Laboratory of Organic Chemistry**, School of Chemical Engineering, AUTH, Greece.
Research Thesis: Organic synthesis of hydrazones. Supervisor: Prof. A. Kotali

- Synthesis of hydrazones from hydrazines and hydrazides for further synthesis of heterocyclic compounds.
- Isolation and purification of hydrazones by recrystallization.
- Purity control with melting point measurement and thin layer chromatography.

Laboratory Skills

- **Cell cultures**
- **UV-Vis photometry**
- Protein **electrophoresis** techniques (SDS-PAGE, Blue Native PAGE)
- **Isolation and purification** of membrane proteins
- Calculation of concentrations, stoichiometries, yields and conversions
- Practical knowledge of **chemical synthesis, separation and purification techniques** (reflux, vacuum evaporation, filtration, centrifugation, recrystallization, solvent extraction, TLC and HPLC chromatography, atomic absorption spectroscopy, melting point measurement, IR spectroscopy)
- Basic knowledge of **GC, ICP-MS** instrumental techniques

Work Experience

- 10/2019-12/2019 **Laboratory of Biochemistry**, Herakleio, Greece
Teaching assistant
- 1/2019-5/2019 **Laboratory of General Chemistry**, Herakleio, Greece
Teaching assistant
- 6/2017-7/2017 **General Chemical State Laboratory**, Thessaloniki, Greece.
Internship - Chemist assistant
- Analysis of food and beverages (dairy, alcoholic beverages, wine, beer, edible oils honey etc) for safety and quality parameters using GC/FID, HPLC/UV, HPLC/RID, UV-VIS

Language Skills

- Greek mother tongue
- English Excellent level: Toefl ibT 103 and CPE from the university of Michigan
- German Basic (B2) Comprehend the language

Continuous Training / Seminars

- 27-29/4/2018 Summer School on ‘**Natural products:Chemistry, Biological Activities & Technological Applications**’, Thessaloniki, Greece
- 25-27/5/2017 **11th Conference in Chemical Engineering**, Thessaloniki, Greece
- 2-4/12/2016 **22nd Hellenic Conference in Chemistry**, Thessaloniki, Greece

Computer skills

- Microsoft office (Word, Excel, PowerPoint, Internet)
- Programming Matlab

Πίνακας Περιεχομένων

1	Εισαγωγή	14
1.1	Βιοεξυγίανση	14
1.2	Η φαινόλη ως περιβαλλοντικός ρύπος.....	14
1.3	Αρνητικά κατά Gram βακτήρια	15
1.4	Το βακτηριακό στέλεχος <i>Pseudomonas</i> sp. phDV1	16
1.5	Polyhydroxyalcanoates (PHAs).....	18
1.6	Πολυ(3-υδρόξυ βουτυρικό οξύ)	20
1.6.1	Ιδιότητες.....	20
1.6.2	Εικόνες από ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης.....	20
1.6.3	Σύσταση κυστιδίων PHB	21
1.6.4	Βιοσυνθετικό μονοπάτι.....	22
1.7	Γενετική βάση του σχηματισμού των PHB.....	23
1.8	Συνθάση PHB	25
1.9	Σκοπός της εργασίας.....	26
2	Υλικά και μέθοδοι.....	27
2.1	Υλικά.....	27
3	Μέθοδοι.....	30
3.1	Καλλιέργεια του στελέχους.....	30
3.2	Φασματοσκοπική μέτρηση της συγκέντρωσης των ρύπων.....	30
3.3	Συλλογή των κυττάρων.....	32

3.4	Παρασκευή κυτταρικών εκχυλισμάτων	32
3.5	Απομόνωση PHA από βακτηριακά κύτταρα.....	32
3.6	Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την Bradford	32
3.7	Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο του δικιγχνικού οξέος	33
3.8	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-Tricine/PAGE).....	34
3.9	Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR.....	34
3.10	Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού NMR.....	35
3.11	Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM)	35
3.11.1	Προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων για παρατήρηση στο TEM	35
3.11.2	Προετοιμασία δειγμάτων <i>Pseudomonas</i> sp. pHDV1	36
3.12	Κινητική μελέτη της PHB συνθάσης.....	36
3.13	Nano LC-MS/MS.....	38
4	Αποτελέσματα και συζήτηση.....	39
4.1	Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Pseudomonas</i> sp. pHDV1	39
4.2	Φασματοσκοπία υπερύθρου FT- IR.....	41
4.3	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	43
4.4	Φασματοσκοπία μάζας MALDI/TOF	46
4.5	Παρατήρηση κυττάρων <i>Pseudomonas</i> sp. pHDV1 με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM)	47
4.6	Τεστ κινητικής για την συνθάση του PHB.....	49
4.7	Ταυτοποίηση του εξύμου συνθάση του PHB με nano LC/MS/MS	51

5	Συμπεράσματα	52
5.1	Μελλοντικοί στόχοι	52
6	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι. ΦΑΣΜΑΤΑ IR.....	53
7	Βιβλιογραφία	56

1 Εισαγωγή

1.1 Βιοεξυγίανση

Ο όρος βιοεξυγίανση (bioremediation) αναφέρεται στην χρήση των μικροοργανισμών στην διαδικασία αποικοδόμησης ρυπαντών. Η αυξανόμενη χρήση και σύνθεση χημικών έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση τοξικών ρύπων στο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό οι επιστήμονες άρχισαν να χρησιμοποιούν μικροοργανισμούς για την αποικοδόμηση τοξικών ρύπων με σκοπό ένα πιο υγιές περιβάλλον. (Καραγκούνη-Κύρτσου, 2012) Η μικροβιακή βιοεξυγίανση μπορεί να γίνει *in situ* καθώς με αυτόν τον τρόπο δε δημιουργούνται δευτερογενείς τοξικές ουσίες και επιπλέον το κόστος είναι πολύ χαμηλότερο σε σχέση με χημικές μεθόδους. (Palanivel et al., 2020) Τα πιο συνήθη γένη μικροοργανισμών για τέτοιου είδους διαδικασίες είναι τα *Pseudomonas* και *Bacillus*. (Καραγκούνη-Κύρτσου, 2012)

1.2 Η φαινόλη ως περιβαλλοντικός ρύπος

Οι φαινόλες καθώς και τα παράγωγά τους καταλήγουν συχνά στο περιβάλλον λόγω ανθρώπινης δραστηριότητας καθώς χρησιμοποιούνται σε βαφές, πολυμερή και φάρμακα. (Michałowicz and Duda, 2006) Η ύπαρξή τους στο περιβάλλον μπορεί επίσης να προκύπτει από την αποικοδόμηση διάφορων εντομοκτόνων καθώς και από βιομηχανικά απόβλητα.

Η φαινόλη είναι μια άχρωμη κρυσταλλική ένωση, με χαρακτηριστική οσμή η οποία είναι διαλυτή στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες. (Michałowicz and Duda, 2006) Ο πιο συχνός τρόπος απελευθέρωσής της στο περιβάλλον είναι μέσω υδατικών αποβλήτων από δωλίστηρια. Η συγκέντρωση της φαινόλης στα απόβλητα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος της βιομηχανικής δραστηριότητας όπως φαίνεται από τον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις φαινόλης σε βιομηχανικά απόβλητα

Συγκέντρωση φαινόλης (mg/L)	Βιομηχανικά απόβλητα	Πηγή
1500-5000	λύματα από φούρνους κωκ	Rosfjord et al., 1976
600-2000	βιομηχανία πλαστικών	
200-400	βιομηχανία πετροχημικών	

Η έκθεση στη φαινόλη μπορεί να συμβεί μέσω κάποιων φαρμακευτικών προϊόντων (παστίλιες για το λαιμό ή αλοιφές) καθώς και με την εισπνοή μολυσμένου αέρα ή μέσω της επαφής με το δέρμα στο χώρο εργασίας. Η φαινόλη είναι ιδιαίτερα ερεθιστική για το δέρμα, τα μάτια και τους βλεννογόνους μετά από οξεία (βραχυπρόθεσμη) αναπνοή ή δερματική έκθεση. (EPA, 2002) Μετά την εισαγωγή της στα υδατικά οικοσυστήματα η φαινόλη επηρεάζει αρνητικά τους οργανισμούς που ζουν εκεί (φύκια, πρωτόζωα, σπονδυλωτά και ασπόνδυλα) προκαλώντας μείωση της γονιμότητας και αναστολή της ανάπτυξης. (Babich and Davis, 1981)

Η μικροβιακή αποικοδόμηση της φαινόλης είναι ο κύριος τρόπος βιοεξυγίανσης στα υδάτινα οικοσυστήματα σε μικρές συγκεντρώσεις φαινόλης. Στον Πίνακα 2 αναφέρονται ενδεικτικά κάποια είδη μικροοργανισμών που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά ότι έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν φαινόλη.

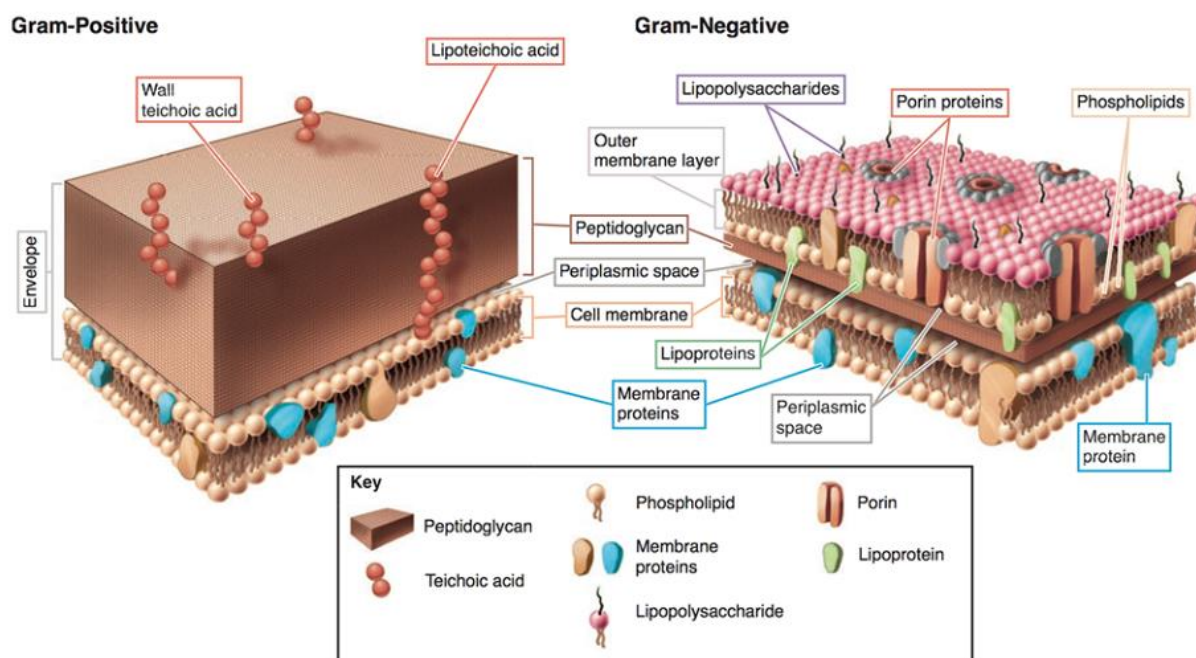
Πίνακας 2: Είδη μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν φαινόλη

Είδος μικροοργανισμού	Επιστημονική ονομασία	Πηγή
Βακτήρια	<i>Pseudomonas putida</i>	Hoak, 1962; Hill and Robinson, 1975; Yang and Humphrey, 1975
	<i>Bacillus stearothermothilus</i>	Buswell, 1975; Buswell and Twomey, 1975)
	<i>Achromobacter</i> strains	Kramer and Doetsch, 1950),
Μύκητες	<i>Nocardia rubra</i>	Hoak, 1962
Ζύμες	<i>Trichosporum cutaneum</i>	Neujahr and Varga, 1970; Yang and Humphrey, 1975)

1.3 Αρνητικά κατά Gram βακτήρια

Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram αρνητικών βακτηρίων διαθέτει ορισμένες ιδιότητες (π.χ. σκληρότητα, ελαστικότητα) και γι' αυτό προστατεύει πολύ αποτελεσματικά το κυτταρικό περιεχόμενο αυτών των βακτηρίων. Το γεγονός αυτό, τους δίνει την δυνατότητα επιβίωσης σε περιβάλλοντα με ακραίες θερμοκρασίες ή pH. Για παράδειγμα, το στέλεχος *Thiobacillus ferrooxidans* αναπτύσσεται σε pH περίπου 1.5. (Beverigde, 1999) Η πολυπλοκότητα του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων είναι μεγαλύτερη καθώς υπάρχει μια εξωτερική μεμβράνη που καλύπτει την πεπτιδογλυκάνη. Η πεπτιδογλυκάνη αντιπροσωπεύει το

5-10% του ξηρού βάρους του τοιχώματος και βρίσκεται ανάμεσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και την εξωτερική μεμβράνη. (Καραγκούνη-Κύρτσου, 2012) Αντίθετα, τα Gram θετικά βακτήρια έχουν παχύτερο στρώμα πεπτιδογλυκάνης που αποτελεί το 50% ή περισσότερο του ξηρού βάρους του κυτταρικού τοιχώματος. (Εικόνα 1)

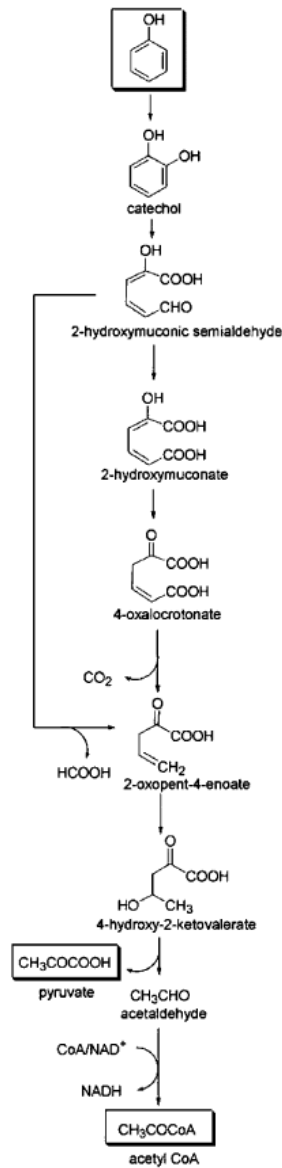


Εικόνα 1: Διαφορές στο κυτταρικό τοίχωμα μεταξύ gram θετικών και gram αρνητικών βακτηρίων (Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie)

1.4 Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* sp. phDV1

Το νέο βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* sp. phDV1 απομονώθηκε στη Δανία, από έδαφος μολυσμένο με απόβλητα διυλιστηρίων. Το στέλεχος αυτό έχει την ικανότητα να αποικοδομεί φαινόλη μέσω του μετα καταβολικού μονοπατιού (Εικόνα 2) και να την χρησιμοποιεί ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. (Tsirogianni et al., 2004) Είναι γνωστό, ότι στελέχη που ανήκουν στο γένος της ψευδομονάδας μπορούν να αναπτύξουν προσαρμοστικούς μηχανισμούς και να έχουν μεγάλη ανθεκτικότητα σε τοξικούς ρύπους όπως είναι η φαινόλη. Με πρωτεομική ανάλυση, έχουν ταυτοποιηθεί τα περισσότερα μεταβολικά ένζυμα του μονοπατιού αποικοδόμησης της φαινόλης. (Tsirogianni et al., 2004, 2005) Το γενετικό υλικό του βακτηρίου αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα με 4,727,682 ζεύγη βάσεων και 4,574 γονίδια σύμφωνα με το NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. Δεν βρέθηκαν πλασμίδια στο συγκεκριμένο στέλεχος.

Φυλογενετική ανάλυση με βάση την αλληλουχία 16S rRNA και ανάλυση του γονιδιώματος έδειξε ότι το στέλεχος *Pseudomonas* sp. rhDV1 παρουσιάζει 99.93% ομοιότητα με το στέλεχος *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. (Xie et al., 2019) Για το λόγο αυτό, το βακτήριο *Pseudomonas* sp. rhDV1 κατατάσσεται στο είδος της *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ως στέλεχος rhDV1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2, το τελικό προϊόν του μεταβολικού μονοπατιού είναι η ακεταλδεΐδη η οποία ενώνεται με ένα μόριο CoA και τελικά σχηματίζεται ένα μόριο ακετύλο-CoA, το οποίο αποτελεί το αρχικό μόριο για το βιοσυνθετικό μονοπάτι των ΡΗΑ.

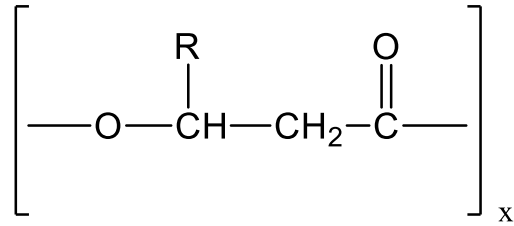


Εικόνα 2: Μετα καταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης (Tsirogianni et al., 2005)

1.5 Polyhydroxyalcanoates (PHAs)

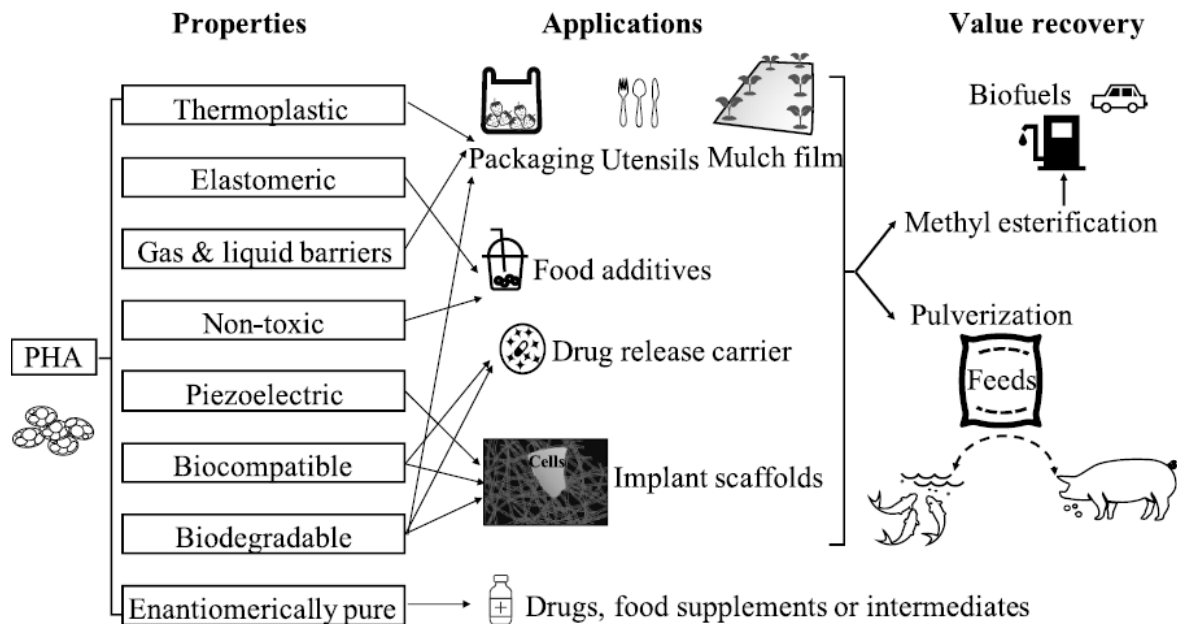
Το πλαστικό έχει γίνει ένα από τα πιο διαδεδομένα υλικά σε όλες τις πτυχές της ζωής, όπως σε αυτοκίνητα, οικιακές συσκευές και υλικά συσκευασίας. Λόγω των περιβαλλοντικών ζητημάτων που προκαλούνται από τη συσσώρευση και αποτέφρωση, τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά (ή βιοπλαστικά) αποτελούν το επίκεντρο πολλών ερευνητικών ομάδων σε όλο τον κόσμο τα τελευταία χρόνια. Για παράδειγμα, τα πολυϋδροξυαλκανοϊκά (PHAs) έχουν μελετηθεί εκτενώς ως εναλλακτική λύση για τα πλαστικά με βάση το πετρέλαιο για χρήση σε φαρμακευτικά προϊόντα, βιοϊατρικά προϊόντα, γεωργία και υλικά συσκευασίας. Αυτοί οι πολυεστέρες συσσωρεύονται από μικροοργανισμούς υπό συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης, όταν ο άνθρακας βρίσκεται σε αφθονία στο θρεπτικό υλικό και άλλα θρεπτικά συστατικά όπως το άζωτο, το θείο, ο φώσφορος ή το οξυγόνο βρίσκονται σε έλλειψη. (Reddy et al., 2003) Τα παραγόμενα PHA χρησιμεύουν ως αποθήκη ενέργειας για το κύτταρο και μπορούν να αποικοδομηθούν με τη βοήθεια του ενζύμου αποπολυμεράση σε διαλυτά στο νερό μονομερή. Το γεγονός ότι ο μικροοργανισμός που παράγει το πολυμερές μπορεί συγχρόνως να το αποικοδομεί, το κάνει περισσότερο φιλικό προς το περιβάλλον. Τα PHA αποικοδομούνται πλήρως σε νερό, διοξείδιο του άνθρακα και μεθάνιο από αναερόβιους μικροοργανισμούς σε διάφορα περιβάλλοντα όπως έδαφος, θαλασσινό νερό, νερό λιμνών και απόβλητα. (Brandl et al., 1988)

Τα PHA είναι πολυεστέρες με γενικό χημικό τύπο που απεικονίζεται στην Εικόνα 3. Μπορούν να χωριστούν σε κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των ανθράκων των μονομερών τους. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα μικρής αλυσίδας PHA (small chain length PHAs ή scl-PHAs) που αποτελούνται από 3-5 άτομα άνθρακα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας είναι τα poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB). Επόμενη κατηγορία είναι τα μεσαίας αλυσίδας (medium chain length PHAs) που περιέχουν 6-14 άτομα άνθρακα όπως για παράδειγμα το poly (3-hydroxyhexanoate). Τέλος, υπάρχουν και τα μακράς αλυσίδας PHA (long chain length PHA) τα οποία περιέχουν πάνω από 14 άτομα άνθρακα και συναντώνται πιο σπάνια. (Rutherford et al., 1995; Singh και Mallick, 2009) Οι ιδιότητες των PHA εξαρτώνται από την σύσταση των μονομερών τους. Τα μικρής αλυσίδας PHA έχουν θερμοπλαστικές ιδιότητες παρόμοιες με του πολυπροπυλενίου, τα μεσαίας αλυσίδας PHA έχουν ελαστικές ιδιότητες παρόμοιες με του καουτσουκ. (Maestro και Sanz, 2017)



Εικόνα 3 Χημική δομή των PHA που παράγονται από βακτήρια. Η ομάδα R ποικίλλει από μεθύλιο (C₁) έως δεκατρίγλιο (C₁₃)

Τα PHA είναι βιοσυμβατά, βιοαποικοδομήσιμα μη τοξικά και έχουν θερμοπλαστικές ιδιότητες. Για το λόγο αυτό μπορούν να αντικαταστήσουν πλήρως τα πλαστικά που παράγονται από το πετρέλαιο (Sabarinathan et al., 2018) και να χρησιμοποιηθούν σε ποικίλλες εφαρμογές όπως για παράδειγμα τα υλικά συσκευασίας, συστήματα χορήγησης φαρμάκων, βιοϊατρική μηχανική κ.α. όπως φαίνονται σχηματικά στην Εικόνα 4. Γενικά τα PHA είναι αποδεκτά από μια αγορά που δίνει έμφαση στην βιωσιμότητα. Παρ' όλα αυτά, λίγα μόνο PHA παράγονται σε μεγάλη κλίμακα. Σε αυτά συμπεριλαμβάνεται το πολυ(3-υδροξύ βουτυρικό) (PHB) και τα συμπολυμερή του. (Zheng et al., 2020)



Εικόνα 4: Ιδιότητες και πιθανές εφαρμογές των PHAs (Zheng et al., 2020)

Τα ΡΗΑ έχουν περιορισμένη εμπορική σημασία κυρίως λόγω του μεγάλου κόστους παραγωγής και της αστάθειας στις θερμο-μηχανικές ιδιότητες που σχετίζονται με την δραστηριότητα της συνθάσης των πολυμερών. Όσον αφορά το μεγάλο κόστος παραγωγής, αυτό σχετίζεται με την υψηλή θερμοκρασία για την αποστείρωση, την αργή ανάπτυξη των μικροοργανισμών, τη μη συνεχή παραγωγή και την πολύπλοκη διαδικασία απομόνωσης των πολυμερών. Για το λόγο αυτό, ανθεκτικοί μικροοργανισμοί σε επιμολύνσεις όπως για παράδειγμα του γένους *Halomonas* sp. έχουν τεθεί ως στόχοι τροποποίησης μέσω της γενετικής μηχανικής για την καλύτερη παραγωγή ΡΗΑ. (Chen et al., 2020)

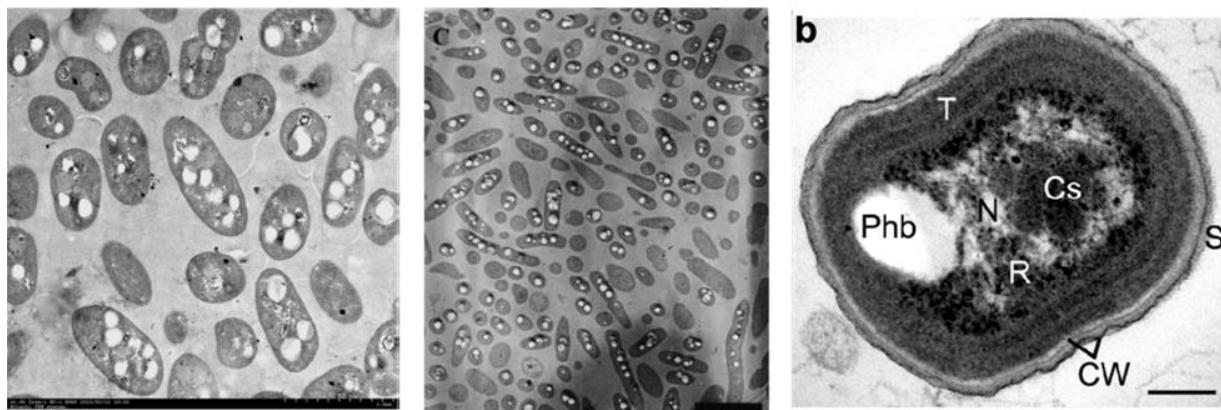
1.6 Πολυ(3-υδροξυ βουτυρικό οξύ)

1.6.1 Ιδιότητες

Το πιο καλά μελετημένο πολυμερές από τα ΡΗΑ είναι το πολυ(3-υδροξυβουτυρικό) (PHB). Το πολυμερές αυτό είναι άκαμπτο και ψαθυρό και έχει μικρή ελαστικότητα. Οι ιδιότητες αυτές απορρέουν από το γεγονός ότι είναι κρυσταλλικό. Το PHB παρουσιάζει κάποιες ιδιότητες παρόμοιες με τα πολυμερή που έχουν ως βάση το πετρέλαιο (π.χ. πολυπροπυλένιο). Για παράδειγμα, έχει υψηλό σημείο τήξης (175 °C) καθώς και υψηλή μηχανική τάση (30-36 MPa). (Bugnicourt, 2014). Όμως, το καθαρό PHB έχει μειωμένη χρήση λόγω των δυσκολιών που σχετίζονται με την επεξεργασία του. Μία από αυτές είναι η θερμική αποικοδόμηση που υφίσταται σε θερμοκρασίες κοντά στο σημείο τήξεως (175 °C) (Chaber et al., 2017)

1.6.2 Εικόνες από ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης

Το PHB μέσα στο κύτταρο δεν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή αλλά εγκλείεται μέσα σε κυστίδια τα οποία είναι δυνατόν να παρατηρηθούν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM). Στην Εικόνα 5 παρουσιάζονται τα κυστίδια PHB διαφορετικών μικροοργανισμών. Παρατηρείται ότι ανεξάρτητα από το είδος του μικροοργανισμού, τα κυστίδια έχουν λευκό χρώμα καθώς είναι διαπερατά από ηλεκτρόνια. Το μέγεθός τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το είδος του μικροοργανισμού, το θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύσσεται και οι τις ώρες ανάπτυξης.

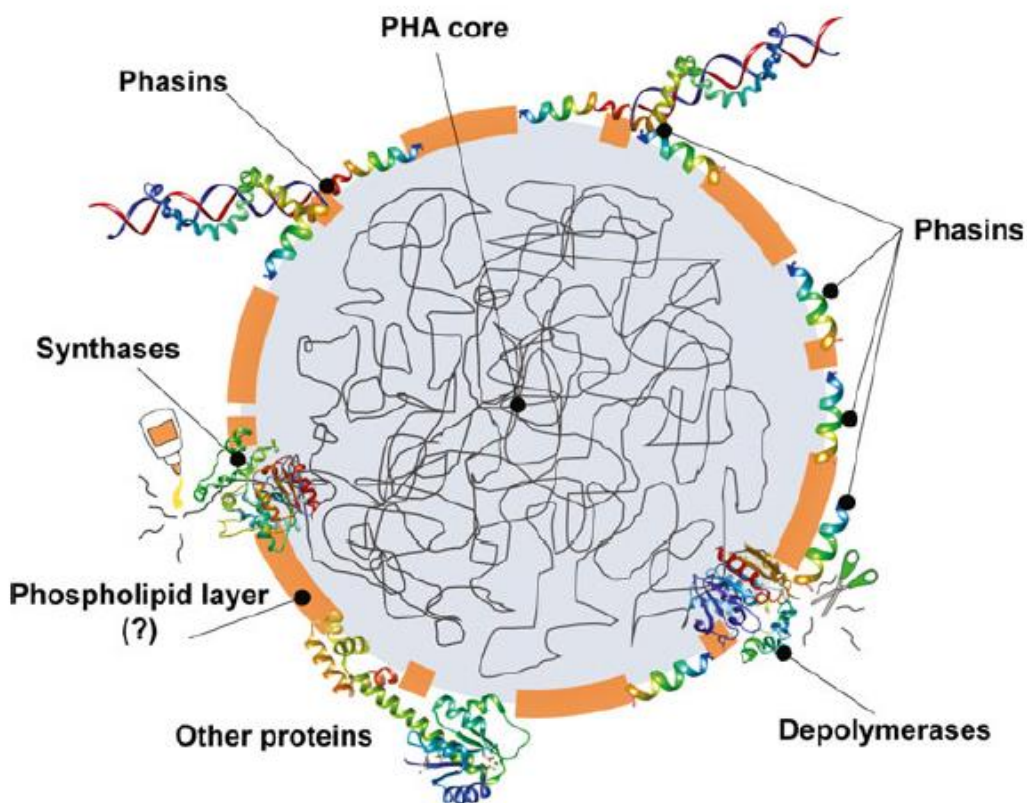


Εικόνα 5: Εικόνες κυστιδίων PHB όπως παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, Από αριστερά: κυστίδια PHB του βακτηρίου *Pseudomonas mandelii* CBS-1 (Li et al., 2013), κυστίδια PHB του βακτηρίου *Ralstonia eutropha* (Tian et al., 2005), κυστίδια PHB του κυανοβακτηρίου 1Dp66E-1 (Koksharova et al., 2013)

1.6.3 Σύσταση κυστιδίων PHB

Τα PHB κυστίδια αποτελούνται από πολυεστέρες, πρωτεΐνες και λιπίδια. (Shrivastav et al., 2013) Για παράδειγμα, η ανάλυση των κυστιδίων του οργανισμού *Bacillus megaterium*, έδειξε ότι αποτελούνται από 97.7% από πολυεστέρες, 1.87% από πρωτεΐνες και 0.46% από λιπίδια ή φωσφολιπίδια. (Griebel et al., 1968)

Το πρωτεϊνικό τους περίβλημα αποτελείται από διάφορα ένζυμα τα οποία σχετίζονται με τον μεταβολισμό των PHB (συνθάσες, αποπολυμεράσες και υδροξυλάσες), καθώς και από μια ομάδα πρωτεϊνών τις φαζίνες (phasins), (Εικόνα 6) οι οποίες έχουν αμφίφιλο χαρακτήρα και προστατεύουν το υδρόφοβο πολυμερές από το κυτταρόπλασμα. (Maestro και Sanz, 2017) Οι πρωτεΐνες αυτές συμβάλλουν στην δομή του κυστιδίου και τον μεταβολισμό των PHB. Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, διαθέτουν έναν υδρόφοβο τομέα που συνδέεται με τα PHB καθώς και έναν υδρόφιλο/αμφίφιλο που βρίσκεται εκτεθειμένος στο κυτταρόπλασμα. (Potter και Steinbuechel, 2005)



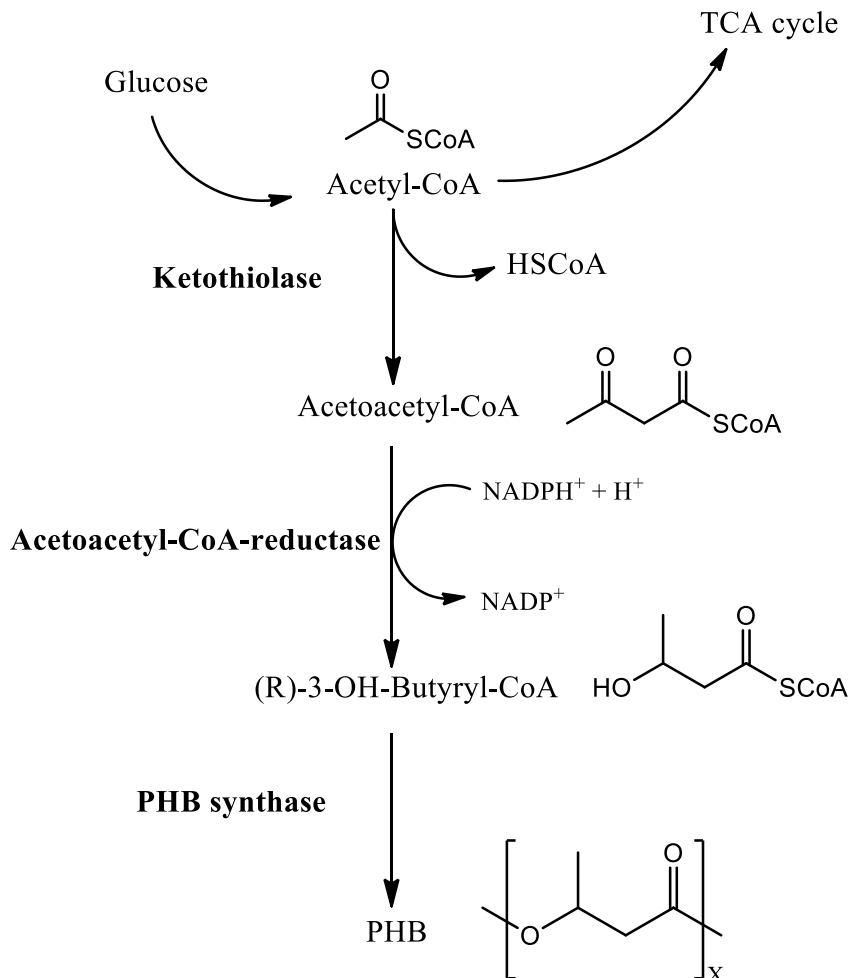
Εικόνα 6: Δομή του κυστιδίου PHB (Maestro και Sanz, 2017)

Η πρωτεΐνη PhaF είναι η κύρια πρωτεΐνη αυτής της κατηγορίας στο είδος *Pseudomonas*. Δομικά, αποτελείται από δύο διαφορετικά μέρη, το N-τερματικό άκρο με το οποίο προσδένεται με τα PHA και το C-τερματικό άκρο το οποίο είναι θετικά φορτισμένο. Λειτουργικά, παίζει ρόλο στην σταθεροποίηση του κυστιδίου καθώς και στην τοποθέτηση του κυστιδίου στο κέντρο του κυττάρου εξασφαλίζοντας έτσι ίση κατανομή κυστιδίων μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων.

1.6.4 Βιοσυνθετικό μονοπάτι

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι που παρατίθεται παρακάτω ανήκει στον μικροοργανισμό *Ralstonia eutropha* ένα Gram θετικό βακτήριο το οποίο έχει μελετηθεί εκτενώς για την δημιουργία PHB. Το μονοπάτι αυτό είναι κοινό για ένα πλήθος από βακτήρια. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7, τρία ένζυμα καταλύουν τον σχηματισμό PHB στα βακτήρια. Το πρώτο ένζυμο, η β-κετοθειολάση (β-ketothiolase) καταλύει τον σχηματισμό ενός δεσμού άνθρακα-άνθρακα μεταξύ δύο μορίων ακετύλου συνενζύμου A. Στη συνέχεια η αναγωγή ανάγει το ακετοακέτυλο συνένζυμο A το

οποίο σχηματίστηκε στην πρώτη αντίδραση. Τέλος το PHB παράγεται από τον πολυμερισμό των (R)-3-υδροξυβουτυριλ-CoA με τη βοήθεια του ενζύμου συνθάση του PHB και εγκλείεται σε κυστίδια.

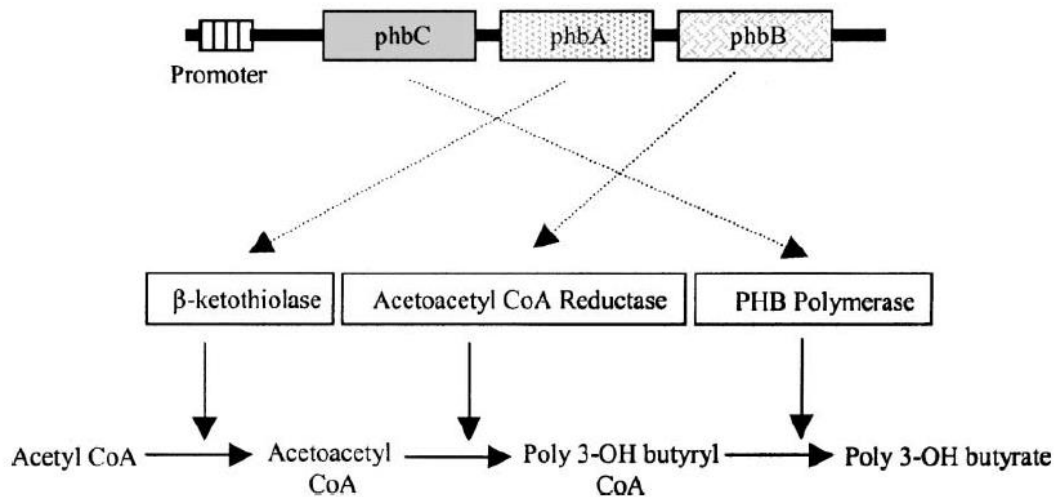


Εικόνα 7: Μονοπάτι σύνθεσης PHB από τον οργανισμό *R. eutropha* (Shrivastav et al., 2013)

1.7 Γενετική βάση του σχηματισμού των PHB

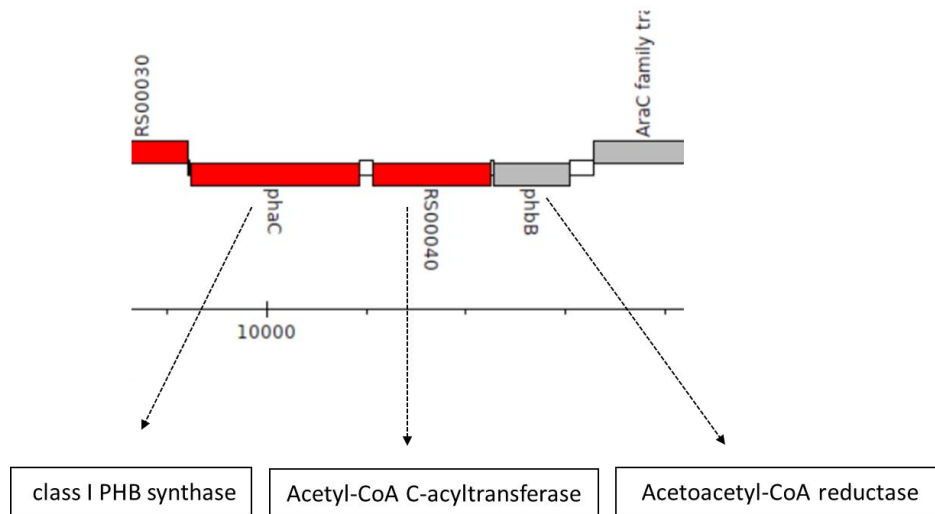
Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τα ένζυμα του βιοσυνθετικού μονοπατιού των PHB συνήθως είναι οργανωμένα στο *phbCAB* οπερόνιο το οποίο απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 8. Το γονίδιο *phbA* κωδικοποιεί την β-κετοθειολάση, το γονίδιο *phbB* είναι υπεύθυνο για την αναγωγή του οξαλοξικού-CoA και τέλος το γονίδιο *phbC* κωδικοποιεί την PHB συνθάση (Reddy et al., 2003). Τα *pha* γονίδια δεν είναι οργανωμένα με τον ίδιο τρόπο σε όλους τους μικροοργανισμούς. Για παράδειγμα, στα είδη *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas acidophila*, και *Ralstonia eutropha*, τα γονίδια αυτά βρίσκονται δίπλα το ένα στο άλλο στο

γονιδίωμα αλλά όχι με την ίδια σειρά. (Reddy et al., 2003) Το κύριο ένζυμο για την διάσπαση των PHB στα μονομερή τους είναι η PHB αποπολυμεράση (PHB depolymerase). Στους μικροοργανισμούς *P. oleovorans* και *Pseudomonas aeruginosa* το γονίδιο της PHB αποπολυμεράσης βρίσκεται ανάμεσα στα δύο γονίδια της PHB συνθάσης. (Hein et al., 1998)



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση του *phbCAB* (Reddy et al., 2003)

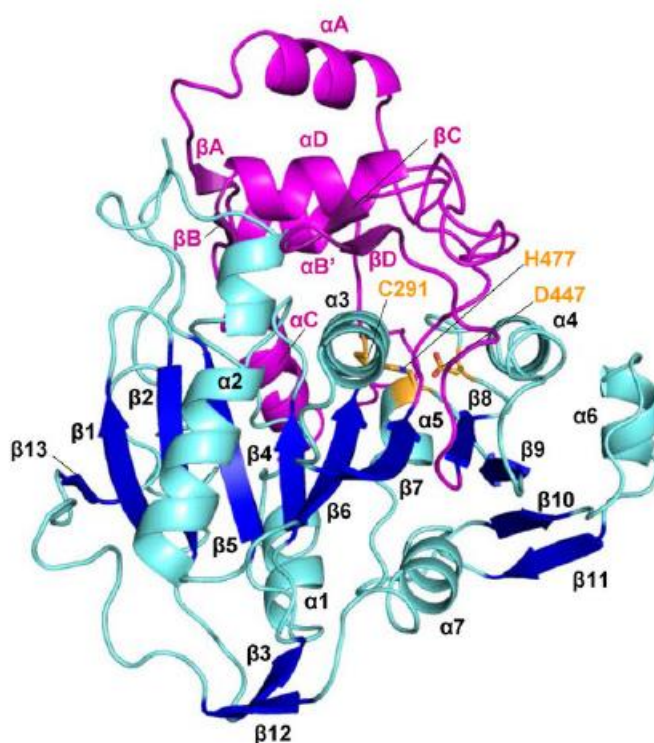
Στην *Pseudomonas* sp. phDV1 η οργάνωση των γονιδίων είναι παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται στα βακτηριακά στελέχη της *Pseudomonas* (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Οργάνωση γονιδίων του βιοσυνθετικού μονοπατιού των PHB στην *Pseudomonas* sp. phDv1

1.8 Συνθάση PHB

Η PHB συνθάση είναι ένα καθοριστικό ένζυμο για την σύνθεση των PHB. Για το λόγο αυτό, συγκεντρώνει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Περισσότερα από 59 γονίδια από 45 διαφορετικά είδη βακτηρίων που κωδικοποιούν το συγκεκριμένο ένζυμο έχουν κλωνοποιηθεί και μελετηθεί. (Sheu et al., 2009) Ανάλογα με την ειδικότητα ως προς το υπόστρωμα και τη δομή των υπομονάδων τους, τα ένζυμα αυτά μπορούν να χριστούν σε τρεις κατηγορίες. Η κατηγορία I (class I), αποτελείται συνήθως από ένα ομοδιμερές. Στην Εικόνα 10, απεικονίζεται η PHB συνθάση του βακτηρίου *Chromobacterium* sp. USM2 που ανήκει στην κατηγορία I.



Εικόνα 10: Απεικόνιση της συνθάσης του PHB του βακτηρίου *Chromobacterium* sp. USM2. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Cys291, His477 and Asp447) απεικονίζεται με πορτοκαλί χρώμα (Chek et al., 2017)

Σύμφωνα με την βάση δεδομένων Uniprot, και την *Pseudomonas* Genus database (www.pseudomonas.com) στο γενετικό υλικό της *Pseudomonas* sp. phDV1, υπάρχουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν συνθάσες και από τις δύο κατηγορίες όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: PHB συνθάση του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. phDV1 (Uniprot, *Pseudomonas* Genus DB)

Γονίδιο	Μήκος γονιδίου (b.p.)	Όνομα πρωτεΐνης	Μάζα (Da)	Συντεταγμένες
phaC	1701	Class I poly (R)-hydroxyalcanoic acid synthase	63.912	9229..10929(-)
phaC	1683	Class II poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase	62.702	485986..487668(-)

Μετά από πρωτεομική μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την *Pseudomonas* sp. phDV1 βρέθηκε ότι το ένζυμο συνθάση του πολυ-(R)-υδροξυαλκανοϊκού υπερεκφράζεται όταν το βακτήριο αναπτύσσεται παρουσία της παρα και μετα κρεσόλης σε σχέση με το ηλεκτρικό οξύ. (Lyrtzakakis et al., 2020)

1.9 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου απομόνωσης του πολυ(3-υδροξυβουτυρικού) (PHA) καθώς και ο χαρακτηρισμός του με φασματοσκοπία υπερύθρου, φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού και MALDI/TOF. Επιπλέον, ήταν σκόπιμο να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. phDV1 (χρόνος ανάπτυξης και συγκέντρωση πηγής άνθρακα) ώστε να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή PHA. Τέλος, σκοπός της εργασίας ήταν η ταυτοποίηση του ενζύμου συνθάση των PHA καθώς η κινητική μελέτη αυτού.

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

Θρεπτικό υλικό LB

Tryptone 10 g/L

Yeast extract 5 g/L

NaCl 10 g/L

Ρύθμιση του pH=7.2 με NaOH

Διάλυμα 5x M9 άλατα

Na₂HPO₄ 37.61 g/L

KH₂PO₄ 15.00 g/L

NaCl 2.50 g/L

NH₄Cl 5.00 g/L

Θειικά άλατα (R-Salts)

MgSO₄·7H₂O 10% w/v

FeSO₄·7H₂O 1% w/v

Θρεπτικό M₉R

5 x M9 άλατα 200 mL/L

Θειικά άλατα 7 mL/L

1 M MgSO₄ 2 mL/L

1 M CaCl₂ 0,1 mL/L

dH₂O 800 mL/L

Πηγές άνθρακα για τις καλλιέργειες της *Pseudomonas* sp. pHDV1

Διάλυμα φαινόλης 0.5 M

Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος 0.5 M

Διάλυμα φωσφορικών αλάτων

Stock solution A: NaH_2PO_4 0.2 M

Stock solution B: Na_2HPO_4 0.2 M

Για pH 7.2 απαιτούνται 28.0 mL A και 72 mL B και αραίωση με απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 200 mL

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS/PAGE

Ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο (AB-mix- 49,5% T, 3% C)

48% w/v Ακρυλαμίδιο

1,5% w/v Δισακρυλαμίδιο

Πηκτή διαχωρισμού 30 mL (12%)

Γλυκερόλη 3 g

Gel Buffer 3x 10 mL

ABmix 6 mL

Προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι τελικό όγκο 30 mL

APS (10%) 150 μL

TEMED 15 μL

Πηκτή επιστοιβαζής 12 mL (4%)

Gel Buffer 3x 4 mL

AB_{mix} 1 mL

Προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι τελικό όγκο 12 mL

APS (10%) 90 μL

TEMED 9 μL

Ρυθμιστικό διάλυμα Καθόδου (10X)

1 M Tris

1 M Tricine

SDS 1% w/v

pH = 8.25

Ρυθμιστικό διάλυμα Ανόδου (10X)

1M Tris

pH = 8.9 (ρύθμιση με HCl)

Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (Sample Buffer)

SDS 12% w/v

Glycerol 10% w/v

Mercaptoethanol 6%

Serva blue G 0,05%

Tris-HCl 150 mM, pH = 7

Διαλύματα χρώσης/αποχρωματισμού πηκτών

Χρώση Coomassie Brilliant Blue G-250*

0,03% w/v Coomassie brilliant Blue G-250

25% v/v Μεθανόλη

5% v/v Οξικό οξύ

Διάλυμα αποχρωματισμού

5% v/v Μεθανόλη

7% v/v Οξικό οξύ

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της κινητικής της PHB συνθάσης

Διάλυμα για την πλύση των κυττάρων

25 mM Tris

Ρύθμιση του pH=7.5 με HCl

Διάλυμα για την παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος (Tris-glycerol buffer)

25 mM Tris-HCl buffer pH 7.5

γλυκερίνη 5% v/v

Stock solution 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB): 20 mM σε DMSO

Stock solution DL-3-hydroxybutyryl-CoA: 50 mM σε 25 mM Tris-HCl Buffer pH 7.5

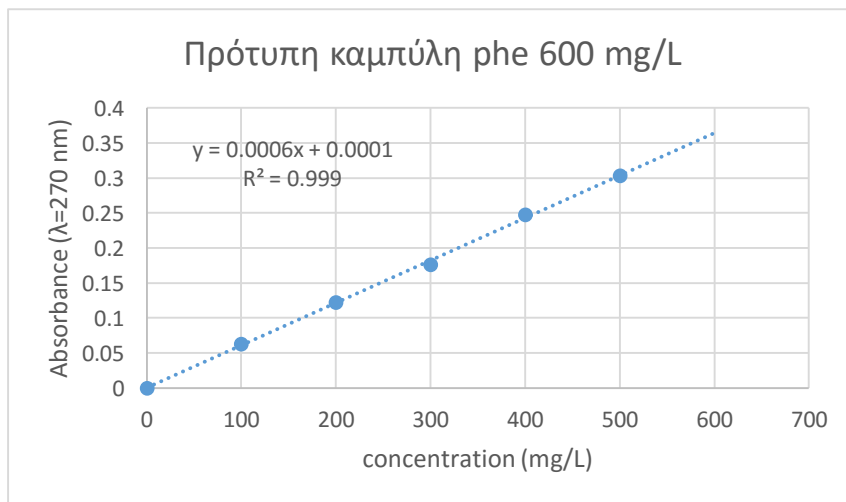
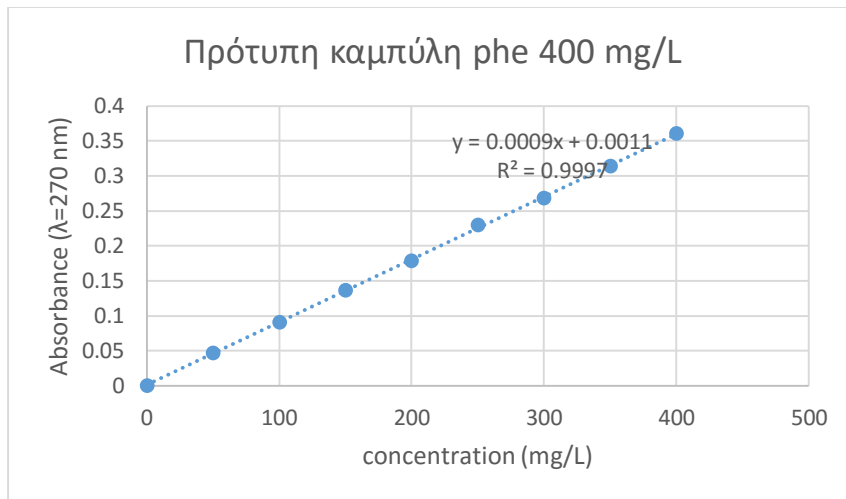
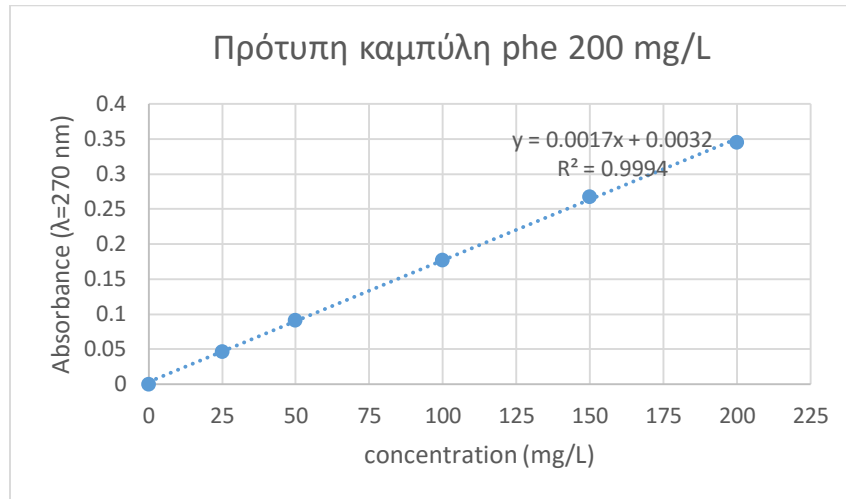
3 Μέθοδοι

3.1 Καλλιέργεια του στελέχους

Το βακτήριο *Pseudomonas* sp. rhDV1 καλλιεργήθηκε σύμφωνα με την ακόλουθη μεθοδολογία. Αρχικά, μια αποικία του βακτηρίου από τρυβλίο Petri με θρεπτικό μέσο lysogeny broth (LB) μεταφέρθηκε σε 20 mL LB και τοποθετήθηκε σε επωαστήρα σε 200 rpm και 32 °C. Μετά από 12 ώρες, η οπτική πυκνότητα (OD) της προκαλλιέργειας σε μήκος κύματος $\lambda=600$ nm ήταν περίπου 2. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Perkin Elmer Lambda 20. Στη συνέχεια, απαιτούμενη ποσότητα της προκαλλιέργειας μεταφέρεται στην κύρια καλλιέργεια ώστε να ισχύει η αραιώση 1:100. Η κύρια καλλιέργεια περιείχε φαινόλη ως πηγή άνθρακα σε συγκεντρώσεις 200 mg/L, 400 mg/L ή 600 mg/L. Οι καλλιέργειες επωάζονταν συνήθως για 72 ώρες στις ίδιες συνθήκες με της προκαλλιέργειας. Για κάθε συγκέντρωση φαινόλης οι καλλιέργειες πραγματοποιούνταν σε διπλές.

3.2 Φασματοσκοπική μέτρηση της συγκέντρωσης των ρύπων

Σε κάθε καλλιέργεια, η αρχική συγκέντρωση της φαινόλης έπρεπε να διατηρείται σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Για το λόγο αυτό, κάθε 3 ώρες γινόταν αναπλήρωση της ποσότητας της φαινόλης που είχε καταναλωθεί από τα βακτήρια. Για να γίνει αυτό, 1 mL από κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρούνταν σε 9000 xg για 3 λεπτά. Στη συνέχεια συλλέγονταν το υπερκείμενο και αραιωνόταν με νερό σε τελικό όγκο 1 mL και σε αναλογία 1:4 για τη συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L, 1:9 για την φαινόλη 400 mg/L και 1:14 για την φαινόλη 600 mg/L. Μετά από φασματοσκοπική μέτρηση σε μήκος κύματος $\lambda=270$ nm σε Multiscan Sky Microplate και από τις πρότυπες καμπύλες (Εικόνα 11), υπολογιζόταν ο όγκος της φαινόλης που έπρεπε να προστεθεί σε κάθε καλλιέργεια ώστε η συγκέντρωση του ρύπου να παραμένει σταθερή και ίδια με την αρχική.



Εικόνα 11: Πρότυπες καμπύλες φαινόλης

3.3 Συλλογή των κυττάρων

Η συλλογή των κυττάρων γινόταν σε 72 ώρες καλλιέργειας ($OD_{600} \sim 1.8$) με φυγοκέντριση στα 6000 g για 10 λεπτά στους 4 °C. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων ($NaHPO_4/NaH_2PO_4$ pH 7.2). Στη συνέχεια τα κύτταρα φυλάσσονται στους -20 °C.

3.4 Παρασκευή κυτταρικών εκχυλισμάτων

Αρχικά καλλιεργούνται τα κύτταρα της *Pseudomonas* sp. pHDV1 σε θρεπτικό μέσο M9 και με συγκεντρώσεις φαινόλης 200 mg/L, 400 mg/L και 600 mg/L για 72 ώρες. Επιπλέον, έγιναν καλλιέργειες με συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L και διαβαθμισμένη συγκέντρωση αζώτου για 96 ώρες. Στην πρώτη καλλιέργεια προστέθηκε η κανονική ποσότητα αζώτου σε μορφή χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) που υπάρχει στο θρεπτικό υλικό M9. Στη δεύτερη και τρίτη καλλιέργεια το άζωτο ήταν 16 φορές λιγότερο (χαμηλή συγκέντρωση αζώτου) και διπλάσιο (υψηλή συγκέντρωση αζώτου) αντίστοιχα. Μετά τη φυγοκέντριση των καλλιεργειών στα 6000 xg για 10 λεπτά, τα κύτταρα πλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων ($NaHPO_4/NaH_2PO_4$ pH 7.2). Στη συνέχεια γίνεται επανέωρηση των κυττάρων σε διάλυμα 5% v/v γλυκερίνης 25 mM Tris-HCl pH 7.5 με αναλογία 1 g κυττάρων ανά 5 mL διάλυμα. Ακολουθεί σπάσιμο κυττάρων με υπερήχους (20 κύκλοι, cycle 1, amplitude 30). Το αιώρημα φυγοκεντρείται στις 13000 xg για 20 λεπτά και στη συνέχεια το υπερκείμενο καταψύχεται στους -20 °C.

3.5 Απομόνωση PHA από βακτηριακά κύτταρα

Αρχικά τα βακτηριακά κύτταρα επώζονται σε χλωροφόρμιο στους 60 °C για 15 λεπτά σε αναλογία μάζα κυττάρων/όγκος χλωροφορμίου 1:3. Στη συνέχεια ακολουθεί vortex για 10 λεπτά προκειμένου να σπάσουν τα κύτταρα. Το υπερκείμενο συλλέγεται και προστίθεται τετραπλάσιος όγκος παγωμένης μεθανόλης (-20 °C) με αποτέλεσμα το σχηματισμό λευκού ιζήματος. Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 6000 g για 20 λεπτά και στη συνέχεια απόχυση του υπερκείμενου και ξήρανση του λευκού στερεού.

3.6 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την Bradford

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα δείγμα. (Kruger, 2009) Η αρχή της μεθόδου αυτής είναι ότι το μέγιστο της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250 μετατοπίζεται από τα 465 nm στα

595 nm όταν συνδέεται με κάποια πρωτεΐνη σε όξινες συνθήκες. Υδρόφοβες και ιονικές αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν την ανιονική μορφή της χρώσης προκαλώντας έτσι μια ορατή αλλαγή χρώματος από καφέ σε μπλε. Η αύξηση της απορρόφησης στα 595 nm είναι ανάλογη του συμπλόκου χρώσης-πρωτεΐνης και συνεπώς ανάλογη της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Προκειμένου να μετρηθεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε άγνωστα δείγματα, είναι αναγκαίο να κατασκευαστεί αρχικά μια πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης BSA που απομονώθηκε από ορό βοδιού. Πιο συγκεκριμένα, σε ένα μικροπλακίδιο 96 θέσεων τοποθετούνται σε διπλέτες από 1 μL έως 10 μL πρωτεΐνη BSA 1 mg/mL που αραιώνεται σε τελικό όγκο 210 μL . Σε κάθε δείγμα το διάλυμα Bradford είναι 200 μL και ο υπόλοιπος όγκος είναι ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 8.3. Μετά από επώαση 5 λεπτών πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm και στη συνέχεια αφαιρείται το τυφλό δείγμα (blank) το οποίο περιέχει μόνο 10 μL ρυθμιστικό και 200 μL διάλυμα Bradford. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση των άγνωστων δειγμάτων προκύπτει από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης που έχει γραμμική μορφή.

3.7 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο του δικιγχονικού οξέος

Η μέθοδος προσδιορισμού οξέος με δικιγχονικό οξύ (bicinchoninic acid, BCA) χρησιμοποιείται και αυτή για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα δείγμα. Σε σχέση με την μέθοδο Bradford έχει το πλεονέκτημα ότι είναι συμβατή με δείγματα που περιέχουν μέχρι 5% απορρυπαντικά καθώς και ότι επηρεάζεται λιγότερο από διαφορές στη σύσταση μεταξύ των πρωτεϊνών και άρα παρέχει μεγαλύτερη ομοιομορφία. (ThermoScientific) Η μέθοδος αυτή συνδυάζει δύο βήματα. Στο πρώτο, γίνεται η αναγωγή του κατιόντος Cu^{+2} σε Cu^{+1} από πρωτεΐνες σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Στη συνέχεια, δύο μόρια δικιγχονικού οξέος και ένα ιόν Cu^{+1} σχηματίζουν ένα μωβ σύμπλοκο το οποίο μετρείται φωτομετρικά στα 562 nm. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αρχικά παρασκευάστηκε το διάλυμα BCA το αποτελείται από BCA Protein Assay Reagent A και BCA Protein Assay Reagent B σε αναλογία 50:1. Στη συνέχεια στα πηγάδια του πλακιδίου τοποθετούνται από 1 έως 10 μL BSA 1 mg/mL σε διπλέτες και από 10 έως 1 μL 25 mM Tris/HCl διάλυμα γλυκερίνης pH 7.5 και 200 μL διάλυμα BCA ώστε κάθε πηγάδι να έχει 210 μL . Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση σε πλακίδιο στους 37 $^{\circ}\text{C}$ για 30 λεπτά και μετά μέτρηση στα 562 nm. Η πρότυπη καμπύλη που προκύπτει έχει γραμμική μορφή και με βάση αυτή γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των άγνωστων δειγμάτων. Οι τιμές των απορροφήσεων

των άγνωστων δειγμάτων θα πρέπει να βρίσκονται εντός των ορίων της πρότυπης. Διαφορετικά, πραγματοποιούνται οι κατάλληλες αραιώσεις.

3.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-Tricine/PAGE)

Με την μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Αρχικά παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού η οποία καλύπτει περίπου το 70% του gel της ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια προστίθεται περίπου 1 mL κορεσμένη με νερό 1-βουτανόλη ώστε να δημιουργηθεί μια λεία επιφάνεια κατά τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Μετά την σταθεροποίηση της πηκτής διαχωρισμού τοποθετείται η πηκτή επιστοίβασης και το 'χτενάκι' προκειμένου να σχηματιστούν τα πηγάδια όπου θα μπουν τα δείγματα. Όταν πολυμεριστεί η πηκτή διαχωρισμού, η γέλη είναι έτοιμη προς χρήση. Από το κάθε δείγμα τοποθετούνται 20 μ L με ειδική βελόνα στο κάθε ένα πηγάδι. Η ηλεκτροφόρηση αρχικά ξεκινά στα 20 mA και όταν το μέτωπο της χρωστικής περάσει την πηκτή επιστοίβασης, η ένταση του ρεύματος αυξάνεται στα 40 mA. Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε δείκτης μοριακών βαρών η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Σύσταση πρωτεϊνικού δείκτη μοριακών βαρών

Πρωτεΐνη	Μοριακό βάρος (kDa)
Phosphorylase b	97400
Serum albumin	66200
Ovalbumin	45000
Carbonic anhydrase	31000
Trypsin inhibitor	21500
Lysozyme	14400

3.9 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR

Για τον χαρακτηρισμό του βιοπολυμερούς χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Φάσματα υπερύθρου του ξηρού στερεού ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Thermo-Electron Nicolet 6700 FT-IR με 128 scans στην περιοχή των 400 μέχρι 4000 cm^{-1} .

3.10 Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού NMR

Τα φάσματα ^1H NMR 1D και 2D COSY ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker AMX-500. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε 5 mm ^1H -probe ενώ ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) σε ποσότητα 1 mL. Η ανάλυση των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό TopSpin.

3.11 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (transmission electron microscopy-TEM) είναι ένα από τα βασικά εργαλεία μελέτης στον τομέα των υλικών και της βιολογίας. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η μεγάλη διακριτική ικανότητα (η μεγαλύτερη που έχει επιτευχθεί είναι 1.2 Å), καθώς και η παροχή μιας άμεσης και ολοκληρωμένης εικόνας του δείγματος. (Κυριακίδης και Μπίνας, 2014)

3.11.1 Προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων για παρατήρηση στο TEM

Συνήθως, η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα

α. Μονιμοποίηση: στοχεύει στην ακινητοποίηση (νέκρωση) όλων των βιολογικών διαδικασιών του κυττάρου και μπορεί να επιτευχθεί με χημικούς και φυσικούς τρόπους. Οι χημικοί τρόποι, που είναι και πιο συνηθισμένοι, περιλαμβάνουν επεξεργασία του δείγματος με ενώσεις όπως οι αλδεΐδες (φορμαλδεΐδη, παραφορμαλδεΐδη ή γλουτεραλδεΐδη ή μείγματά τους) ή και άλλες ενώσεις όπως η ακρολεΐνη, το τετροξείδιο του οσμίου, το υπερμαγκανικό κάλιο κ.α διαλυμένα σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα. Οι φυσικοί τρόποι μονιμοποίησης περιλαμβάνουν την ψύξη του δείγματος με υγρό άζωτο ή Freon.

β. Αφυδάτωση. Σ' αυτό το στάδιο γίνεται αντικατάσταση του νερού του μονιμοποιημένου δείγματος με αιθυλική αλκοόλη ή ακετόνη.

γ. Εμπότιση-Εγκλειση. Προκειμένου να μπορέσει το δείγμα να κοπεί σε λεπτές τομές, θα πρέπει το μέσο αφυδάτωσης να αντικατασταθεί με το μέσο εγκλεισης το οποίο πολυμερίζεται και σταθεροποιείται όταν εκτεθεί σε υψηλή θερμοκρασία (70 $^{\circ}\text{C}$) ή όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τα μέσα εγκλεισης αποτελούν συνήθως εποξικές ή άλλες ρυτίνες.

δ. Τμήση. Με την βοήθεια του υπερμικροτόμου το βιολογικό δείγμα κόβεται σε πολύ λεπτές τομές πάχους 50-100 nm και στη συνέχεια τοποθετούνται σε ειδικά πλέγματα (grids) που συνήθως έχουν πάχος 3 nm και είναι κατασκευασμένα από άνθρακα, νικέλιο, χαλκό ή χρυσό.

ε. Χρώση. Περιλαμβάνει τον 'χρωματισμό' των κυττάρων με ενώσεις όπως οξικό ουρανύλιο, κιτρικός μόλυβδος και υπερμαγγανικό κάλλιο οι οποίες δεσμεύονται εκλεκτικά από διάφορα συστατικά του κυττάρου και σκεδάζουν διαφορετικά τα ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα να δίνουν την απαιτούμενη αντίθεση (contrast).

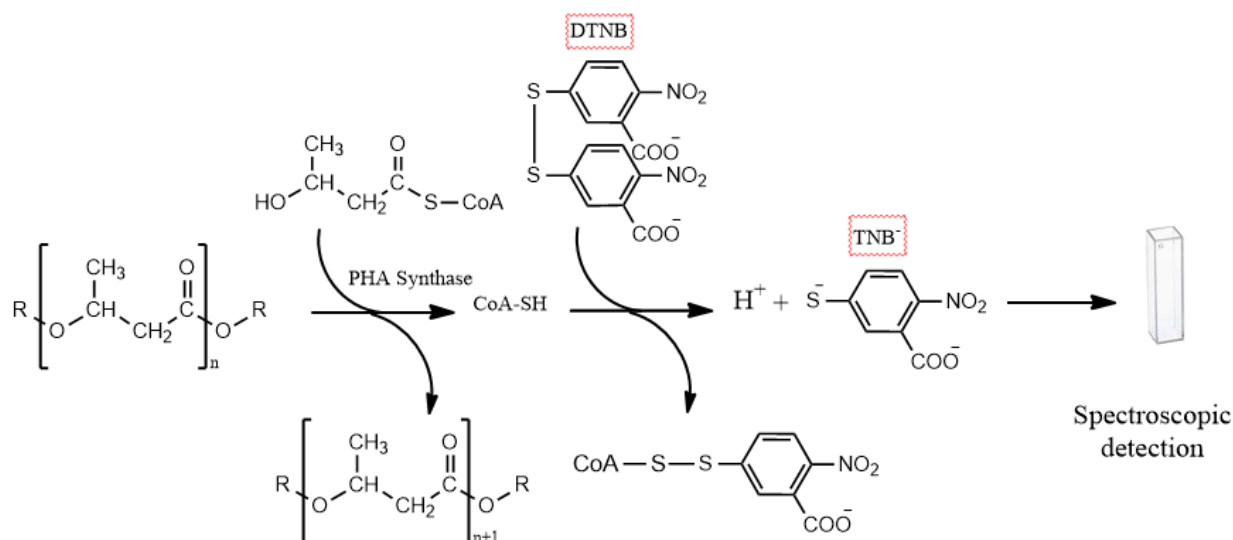
3.11.2 Προετοιμασία δειγμάτων *Pseudomonas* sp. pHDV1

Η μορφολογία των κυττάρων *Pseudomonas* sp. pHDV1 παρατηρήθηκε με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης. Τα βακτηριακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συγκεντρώσεις φαινόλης 200 mg/L, 400 mg/L και 600 mg/L για 72 ώρες. Δείγμα 6 mL από κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 4% γλουτεραλδεΐδη (GDA), και 2 mM CaCl₂ σε 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 (SCB) με ολονύκτια επώαση στους 4 °C. Ακολούθησε αφυδάτωση των κυττάρων με 30, 50, 70, 85, 95, 100% v/v αιθανόλη. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε Durcupan A/M epoxy resin (Sigma-Aldrich) και πολυμερίστηκαν στους 70 °C για 48 h. Οι τομές 70-100 nm έγιναν με την χρήση LKB 2088 Ultratome®V, ακολούθησε χρώση με 2% uranyl acetate και η τελική παρατήρηση έγινε με μικροσκόπιο JEM-2100 Electron Microscope στα 80 kV.

3.12 Κινητική μελέτη της PHB συνθάσης

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της PHB συνθάσης έγινε σύμφωνα με την μέθοδο των Valentin and Steinbüchel που απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 12. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την § 3.4. Στο κάθε 'πηγάδι' του μικροπλακιδίου 96 θέσεων τοποθετήθηκαν 0.3 g πρωτεΐνης, 1.5 mM DL-3-hydroxybutyryl-CoA και 0.5 mM DTNB. Ο τελικός όγκος ήταν 200 μL. Σύμφωνα με τις παραπάνω συγκεντρώσεις και τις πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις του κάθε δείγματος που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 προστέθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον

Πίνακας 6. Οι μετρήσεις έγιναν σε φωτόμετρο μικροπλακών σε μήκος κύματος $\lambda=412$ nm. Η ένωση που απορροφά σε αυτό το μήκος κύματος είναι η 2-nitro-5-sulfidobenzoate (TNB) με μοριακό συντελεστή απορρόφησης $\epsilon= 29.63 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Από την απορρόφηση αυτή, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του ενζύμου συνθάση του PHB σύμφωνα με τον νόμο των Lambert-Beer. Για τα δείγματα που προήλθαν από καλλιέργειες με συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L, 400 mg/L και 600 mg/L πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 412 nm σε θερμοκρασία 22 °C και 32 °C ενώ για τα δείγματα με την διαβαθμισμένη συγκέντρωση αζώτου (κανονική, υψηλότερη και χαμηλότερη) πραγματοποιήθηκε επιπλέον κινητική μελέτη για 10 λεπτά στους 24.6 °C και 32 °C. Οι μετρήσεις λαμβάνονταν ανά 6 δευτερόλεπτα.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της κινητικής μελέτης του ενζύμου συνθάση των PHB

Πίνακας 5: Πρωτεϊνική συγκέντρωση κυτταρικών εκχυλισμάτων *Pseudomonas* sp. pHDV1 με διαβαθμισμένη συγκέντρωση φαινόλης και αζώτου

Συγκέντρωση φαινόλης στην καλλιέργεια (mg/L) 72 ώρες ανάπτυξη	Πρωτεϊνική συγκέντρωση (mg/mL)	Συγκέντρωση αζώτου σε 200 mg/L φαινόλη 96 ώρες ανάπτυξη	Πρωτεϊνική συγκέντρωση (mg/mL)
200	4.02	χαμηλή	5.62
400	6.08	κανονική	12.95
600	3.61	υψηλή	12.31

Πίνακας 6: Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητική μελέτη της συνθάσης του PHB

Συγκέντρωση φαινόλης (mg/L)	Κυτταρικό εκχύλισμα (μL)	Glycerol buffer (μL)	Συγκέντρωση αζώτου	Κυτταρικό εκχύλισμα (μL)	Glycerol buffer (μL)
200	75	144	χαμηλή	53	136
400	49	140	κανονική	23	166
600	83	106	υψηλή	24	165
control	-	189	control	-	189

Σε όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν 6 μL DL-3-hydroxybutyryl-CoA και 5 μL (DTNB)

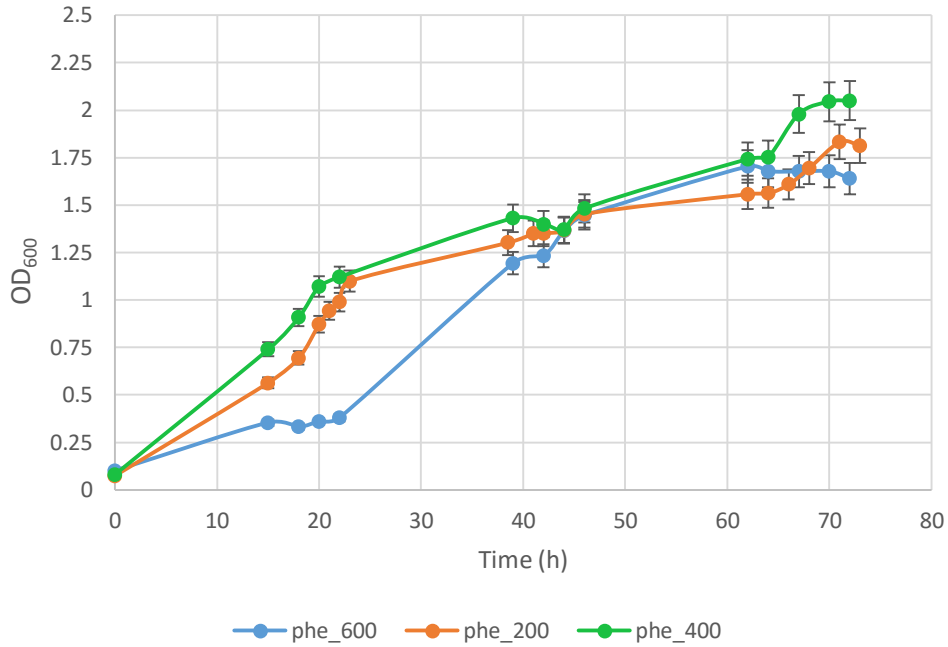
3.13 Nano LC-MS/MS

Στον τομέα της πρωτεομικής, ο συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας με την φασματοσκοπία μάζας έχει αποτελέσει ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση πρωτεϊνών. Τα βασικά στάδια της μεθόδου αυτής είναι: α) πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών β) διαχωρισμός των πεπτιδίων με στήλη αντίστροφης φάσης (RF) γ) ανάλυση με φασματομετρία μάζας δ) ερμηνεία των αποτελεσμάτων με βάση την βιοπληροφορική. (Kocher et al., 2012) Πιο συγκεκριμένα, αρχικά τα πρωτεϊνικά δείγματα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια γίνεται πέψη των πρωτεϊνών συνήθως με θρυψίνη. Τα πεπτίδια διαχωρίζονται σε μια στήλη C18 αντίστροφης φάσης με την χρήση κατάλληλων οργανικών διαλυτών όπως για παράδειγμα το ακετονιτρίλιο, το φορμικό οξύ και το TFE (Trifluoroethanol). Ακολουθεί η ανάλυση με φασματομετρία μάζας και στη συνέχεια πραγματοποιείται η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

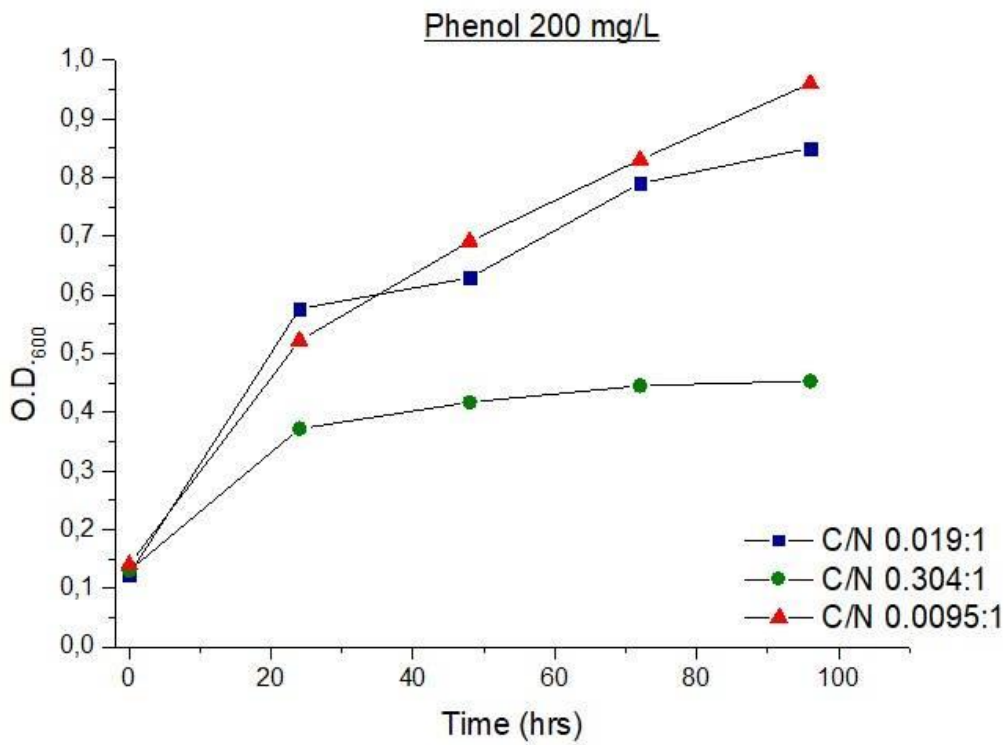
4 Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. pHDV1

Το βακτήριο *Pseudomonas* sp. pHDV1 καλλιεργήθηκε σύμφωνα με την μεθοδολογία που περιγράφεται στην ενότητα § 3.1 για 72 ώρες. Η οπτική πυκνότητα (OD_{600}) μετρούνταν ανά δύο ώρες κατά την διάρκεια της ημέρας και η ανατροφοδότηση με διάλυμα φαινόλης γινόταν κάθε 4 ώρες σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφηκε στην ενότητα § 3.2. Η καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτες. Από την Εικόνα 13 παρατηρείται ότι οι καλλιέργειες με φαινόλη 200 mg/L και 400 mg/L παρουσιάζουν εκθετική φάση ανάπτυξης μέχρι τις 20 ώρες καλλιέργειας. Η ύπαρξη εκθετικής φάσης μέχρι τις 20 ώρες καλλιέργειας και με μέγιστη οπτική πυκνότητα $OD_{600} = 1.3$ παρατηρήθηκε σε καμπύλη ανάπτυξης με συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L που πραγματοποιήθηκε με την ίδια μεθοδολογία. (Βαλσαμίδης, 2019) Από την Εικόνα 13 επίσης παρατηρείται ότι στην συγκέντρωση φαινόλης 600 mg/L, τα κύτταρα βρίσκονται σε λανθάνουσα φάση μέχρι τις 22 ώρες. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στον μεγαλύτερο χρόνο που απαιτείται για την προσαρμογή του βακτηρίου στην υψηλή συγκέντρωση της φαινόλης. Η μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα ($OD_{600} = 2.045$) παρατηρήθηκε στην συγκέντρωση φαινόλης 400 mg/L στις 70 ώρες καλλιέργειας. Στην Εικόνα 14 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. pHDV1 που πραγματοποιήθηκαν για 96 ώρες με διαβαθμισμένη συγκέντρωση αζώτου. Η συγκέντρωση του αζώτου επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων. Η καλλιέργεια με την υψηλότερη συγκέντρωση αζώτου παρουσίασε την μεγαλύτερη ανάπτυξη ($OD_{600} = 1$). Η μείωση του αζώτου στο θρεπτικό μέσο ανέστειλε την ανάπτυξη του βακτηρίου καθώς τα κύτταρα της καλλιέργειας αυτής παρουσίασαν την μικρότερη ανάπτυξη και παρέμειναν στην στατική φάση σε όλη την διάρκεια της καλλιέργειας.



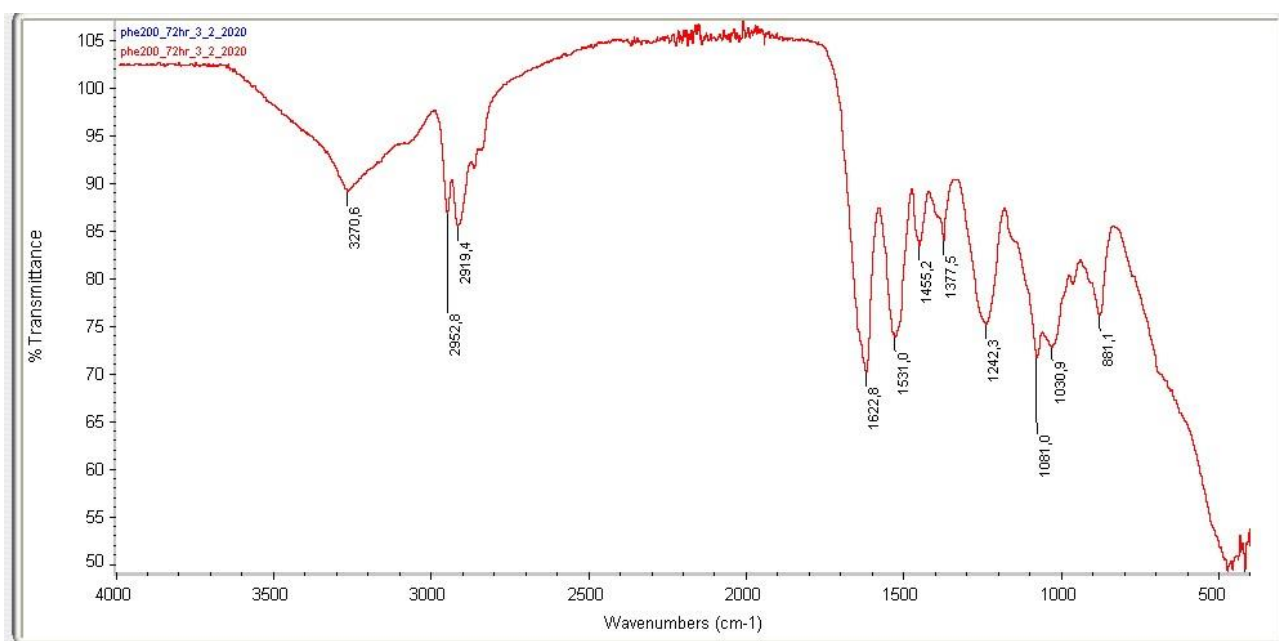
Εικόνα 13: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. rhDV1 σε συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L, 400 mg/L και 600 mg/L



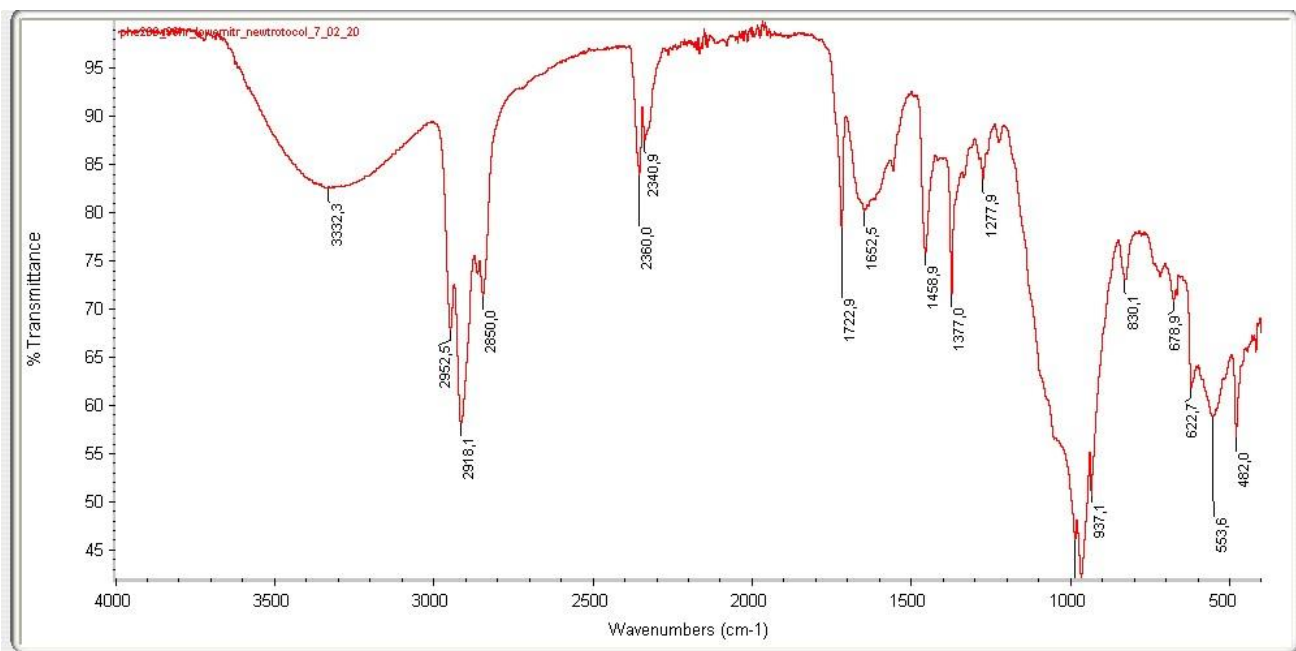
Εικόνα 14 : Καμπύλες ανάπτυξης για καλλιέργειες με διαβαθμισμένη συγκέντρωση αζώτου (Κότσιρα, 2020)

4.2 Φασματοσκοπία υπερόθρου FT- IR

Για τον χαρακτηρισμό του παραγόμενου προϊόντος χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία υπερόθρου FT-IR. Συνολικά ελήφθησαν τέσσερα φάσματα FT-IR από δείγματα που προήλθαν από καλλιέργειες κυττάρων με συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L 72 και 96 ωρών καθώς και από καλλιέργειες με φαινόλη 400 mg/L και 600 mg/L 72 ωρών. Στις εικόνες 15 και 16 παρουσιάζονται τα φάσματα των συγκεντρώσεων 200 mg/L για 72 και 96 ώρες. Τα υπόλοιπα φάσματα βρίσκονται στο Παράρτημα Ι.



Εικόνα 15: Φάσμα IR από δείγμα που απομονώθηκε από κύτταρα *Pseudomonas* sp. rhDV1 που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινόλης 200 mg/L μετά από 72 ώρες καλλιέργειας



Εικόνα 16: Φάσμα IR από δείγμα που απομονώθηκε από κύτταρα *Pseudomonas* sp. rhDV1 που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινόλης 200 mg/L μετά από 96 ώρες καλλιέργειας

Πίνακας 7: Ανάθεση κορυφών στο φάσμα υπερύθρου του παραγόμενου προϊόντος από κύτταρα *Pseudomonas* sp. rhDV1 που αναπτύχθηκαν σε φαινόλη 200 mg/L 72 και 96 ώρες

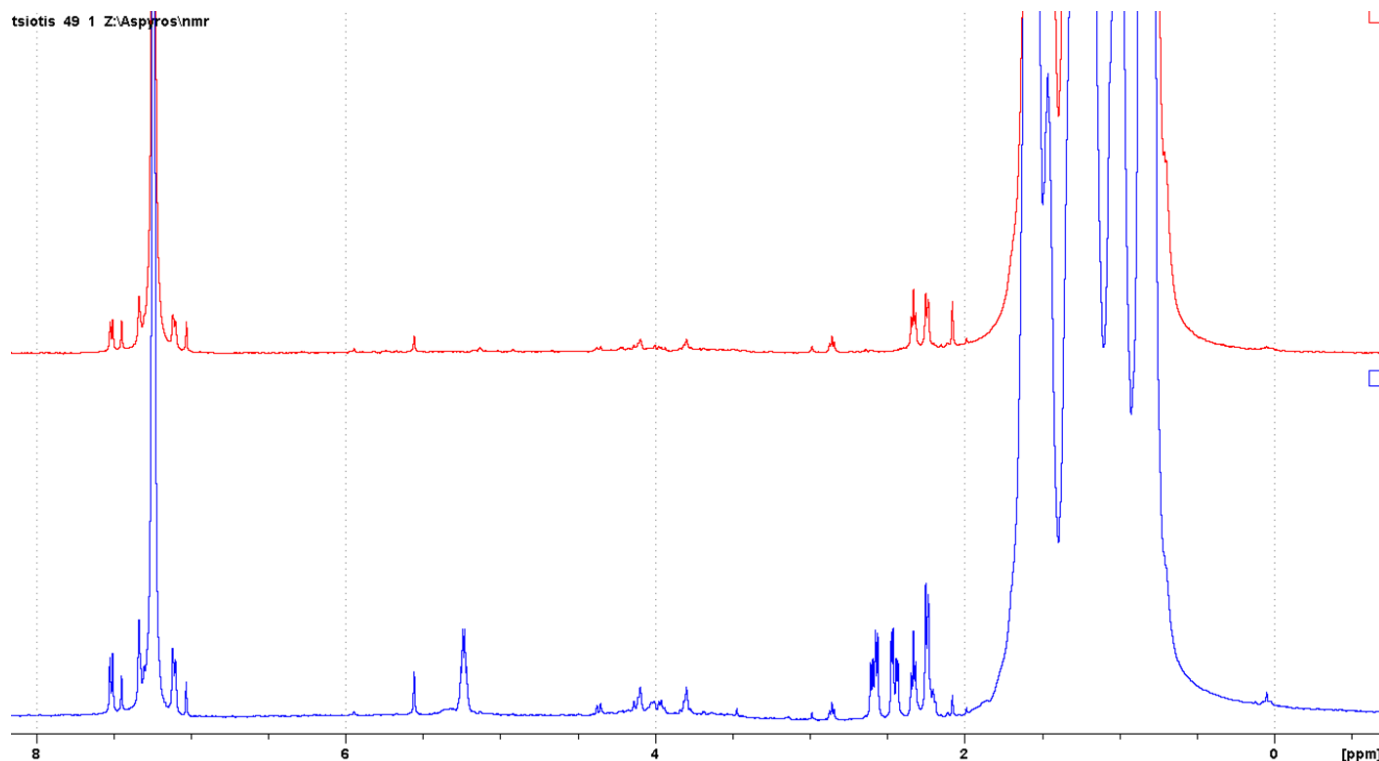
Κορυφές που παρατηρήθηκαν στο δείγμα από φαινόλη 200 mg/L 72 hr (cm ⁻¹)	Κορυφές που παρατηρήθηκαν στο δείγμα από φαινόλη 200 mg/L 96 hr (cm ⁻¹)	Κορυφές στη βιβλιογραφία (cm ⁻¹)	Λειτουργική ομάδα που αντιστοιχούν	Βιβλιογραφική πηγή
3270.6	3332.3	3434 3442	-OH	Sabarinathan et al., 2018 Hassan et al., 2016
2952.8	2952.5	2929 2935	-CH	Sabarinathan et al., 2018 Hassan et al., 2016
-	1722.9	1722	-C=O	Sabarinathan et al, 2018
1452.2	1452.2	1413	-CH ₂	Sabarinathan et al., 2018
1377.5	1377.5	1381	-CH ₃	Sabarinathan et al., 2018

Το φάσμα που ελήφθη από δείγμα που προήλθε από καλλιέργεια με φαινόλης 600 mg/L παρουσίασε χαρακτηριστικές κορυφές στα 3290.0, 2920.2, 1721.5, 1454.9 και 1377.4 cm^{-1} που αντιστοιχούν στις ομάδες -OH, -CH, -C=O, -CH₂, -CH₃ αντίστοιχα. Ομοίως, το φάσμα του στερεού που απομονώθηκε από κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινόλης 400 mg/L παρουσίασε χαρακτηριστικές κορυφές στα 3274.0, 2951.4, 1456.9 και 1376.3 cm^{-1} που αντιστοιχούν στις ομάδες -OH, -CH, -CH₂, και -CH₃ αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά τα δείγματα από καλλιέργειες με φαινόλη 600 mg/L για 72 ώρες και 200 mg/L για 96 ώρες παρουσίασαν όλες τις χαρακτηριστικές κορυφές που απαιτούνται για την ταυτοποίηση των PHB σύμφωνα με την βιβλιογραφία. (Sabarinathan et al., 2018, Hassan et al., 2016). Τα άλλα δύο δείγματα παρουσιάζουν όλες τις χαρακτηριστικές κορυφές που απαιτούνται για την ταυτοποίηση του PHB πλην της χαρακτηριστικής κορυφής του καρβονυλίου. Η χαρακτηριστική ευρεία κορυφή για την υδροξυλομάδα που βρίσκεται στα 3434 cm^{-1} (Sabarinathan et al., 2018) επικαλύπτεται από την παρουσία υγρασίας στο δείγμα. Σε όλα τα φάσματα υπάρχουν επιπλέον κορυφές από τις αναμενόμενες που οφείλονται σε προσμείξεις (π.χ λιπίδια) που λόγω της παρόμοιας χημικής τους δομής με τα PHB δεν μπορούν να απομακρυνθούν με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο απομόνωσης. Για το λόγο αυτό έγινε προσπάθεια διήθησης του υπερκείμενου με φίλτρο Whatman® Syringe filter 25 mm ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κυτταρικά υπολείμματα που μπορεί να διαλύθηκαν στο χλωροφόρμιο κατά την διαδικασία θραύσης των κυττάρων με vortex όπως περιεγράφηκε στην § 3.5.

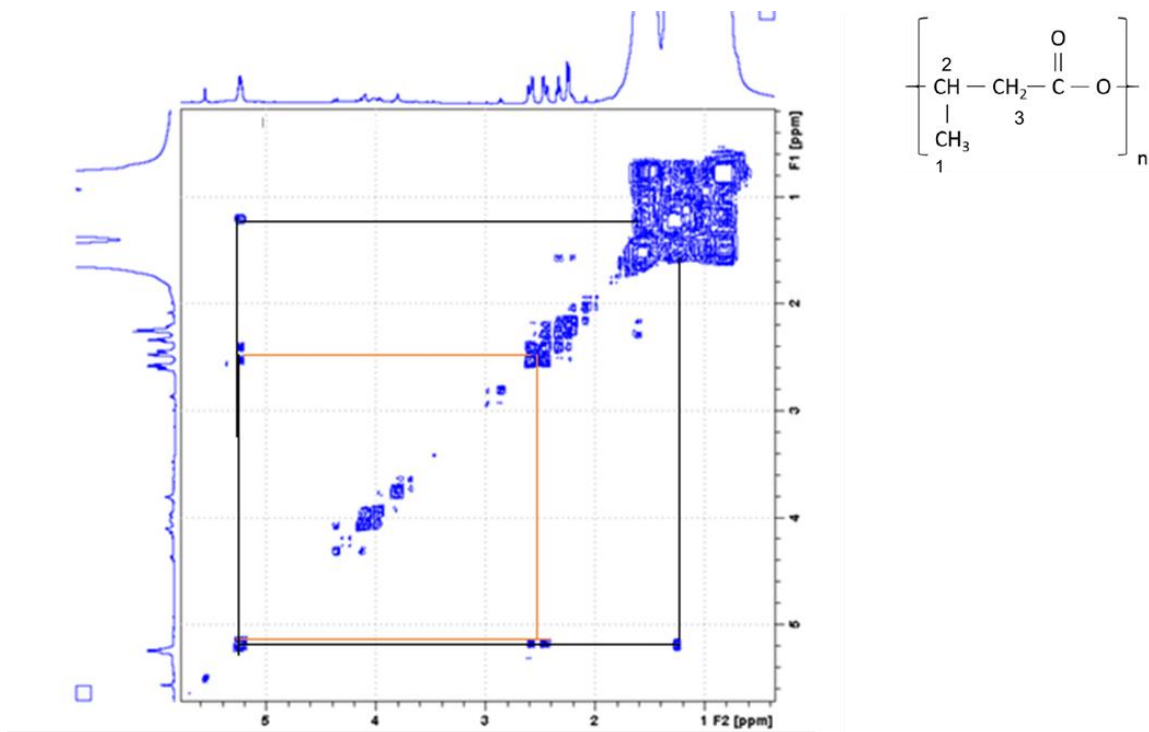
4.3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Για τον χαρακτηρισμό του παραγόμενου προϊόντος ελήφθησαν φάσματα ¹H NMR με τον τρόπο που παρουσιάστηκε στην § 3.10. Στην Εικόνα 17 παρουσιάζονται τα φάσματα από δείγματα που απομονώθηκαν από καλλιέργειες με φαινόλη 200 mg/L και 600 mg/L που αναπτύχθηκαν για 48 ώρες.



Εικόνα 17: Φάσμα NMR από δείγματα που απομονώθηκαν από κύτταρα *Pseudomonas* sp. rhDV1 που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινόλης 200 mg/L (πάνω) και 600 mg/L (κάτω) μετά από 48 ώρες καλλιέργειας

Στο φάσμα ^1H NMR της Εικόνας 14 σε συγκέντρωση φαινόλης 600 mg/L παρατηρήθηκαν οι κορυφές στα $\delta=5.23$ ppm (πολλαπλή) και $\delta=2.50$ ppm (διπλή) οι οποίες αντιστοιχούν στις κορυφές $\delta=5.2$ ppm (πολλαπλή) και $\delta=2.5$ ppm (διπλή) της βιβλιογραφίας. (Verlinden et al., 2011, De Rooy et al., 2007) που αντιστοιχούν στις ομάδες $-\text{CH}$ και $-\text{CH}_2$ αντίστοιχα. Η κορυφή του $-\text{CH}_3$ στα $\delta=1.2$ ppm (διπλή) αλληλεπικαλύπτεται από τα σήματα που προκύπτουν από προσμείξεις όπως τα λιπαρά οξέα. Για το λόγο αυτό, ελήφθη το φάσμα 2D που παρουσιάζεται στην Εικόνα 18, στο οποίο φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων. Στο φάσμα της συγκέντρωσης 200 mg/L δεν παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές και για το λόγο αυτό το δείγμα χρησιμοποιείται ως blank.

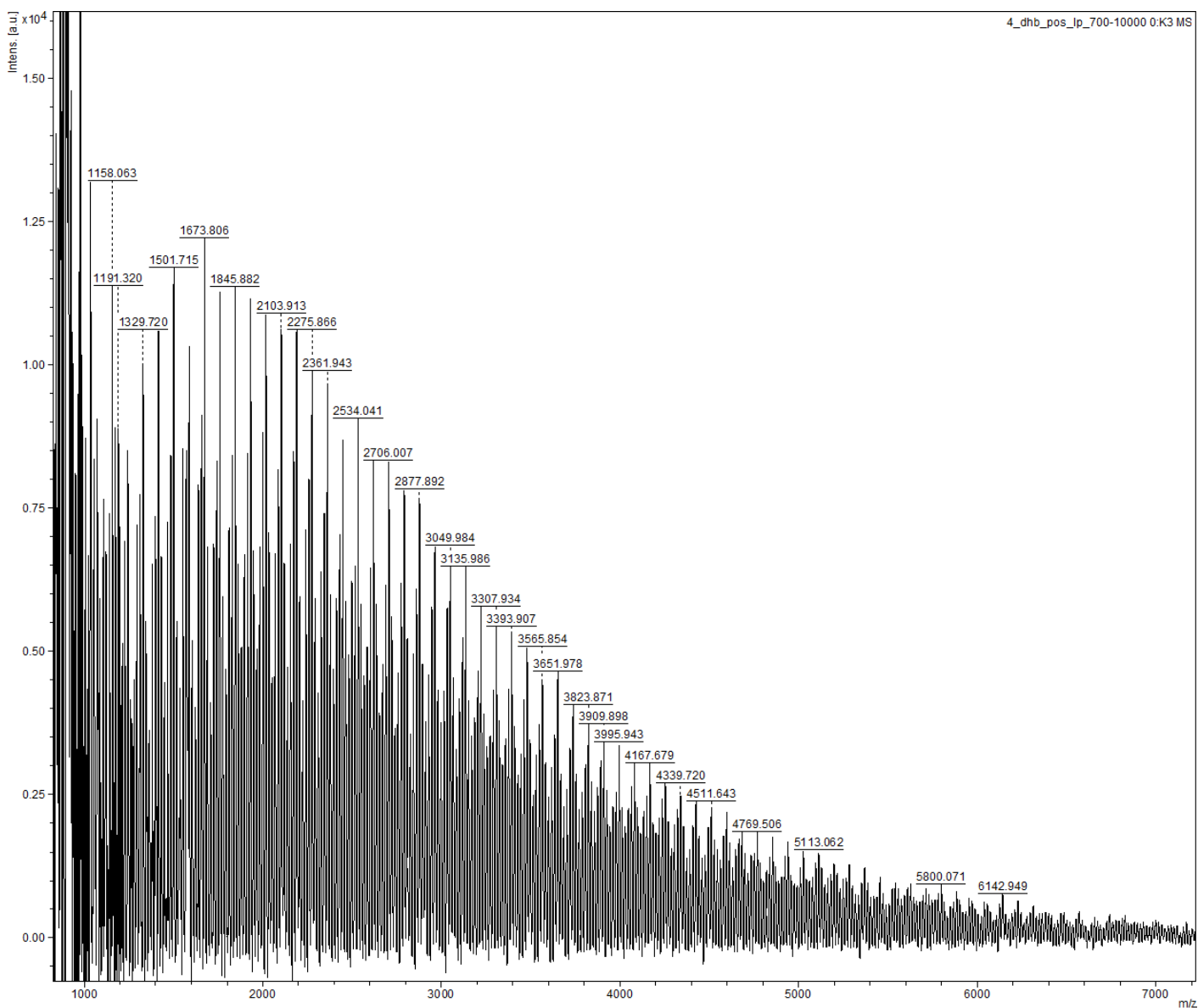


Εικόνα 18: Φάσμα NMR COSY από δείγμα που απομονώθηκε από *Pseudomonas* sp. pHDV1 που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινόλης 600 mg/L μετά από 48 ώρες καλλιέργειας

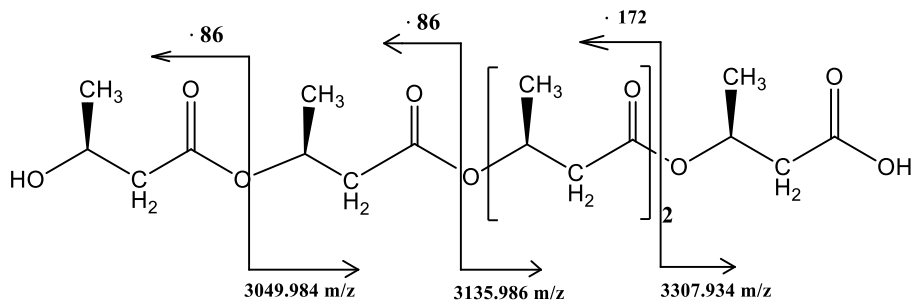
Παρατηρείται ότι το φάσμα COSY δείχνει ένα ξεχωριστό σύνολο σημείων σε μια διαγώνιο, με κάθε σημείο να αντιστοιχεί στην ίδια κορυφή σε κάθε άξονα συντεταγμένων. Τα σημεία της διαγωνίου χρησιμεύουν μόνο ως σημεία αναφοράς. Τα πρωτόνια της μεθυλομάδας (-CH₃) (1) αλληλεπιδρούν με τα πρωτόνια (2) και τα πρωτόνια (2) αλληλεπιδρούν με τα πρωτόνια (3) όπως φαίνεται και από τους άξονες που σχεδιάστηκαν.

4.4 Φασματοσκοπία μάζας MALDI/TOF

Μια από τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό του προϊόντος που απομονώθηκε από κύτταρα *Pseudomonas* sp. rhDV1 όπως περιεγράφηκε στην § 3.5 ήταν η φασματοσκοπία μάζας matrix-assisted MALDI-TOF. Το στερεό που απομονώθηκε συγκρυσταλλώθηκε με μήτρα 2,5-Dihydrobenzoic acid (DHB).



Εικόνα 19: Φάσμα MALDI από δείγμα που απομονώθηκε από *Pseudomonas* sp. rhDV1 που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινόλης 200 mg/L μετά από 72 ώρες καλλιέργειας

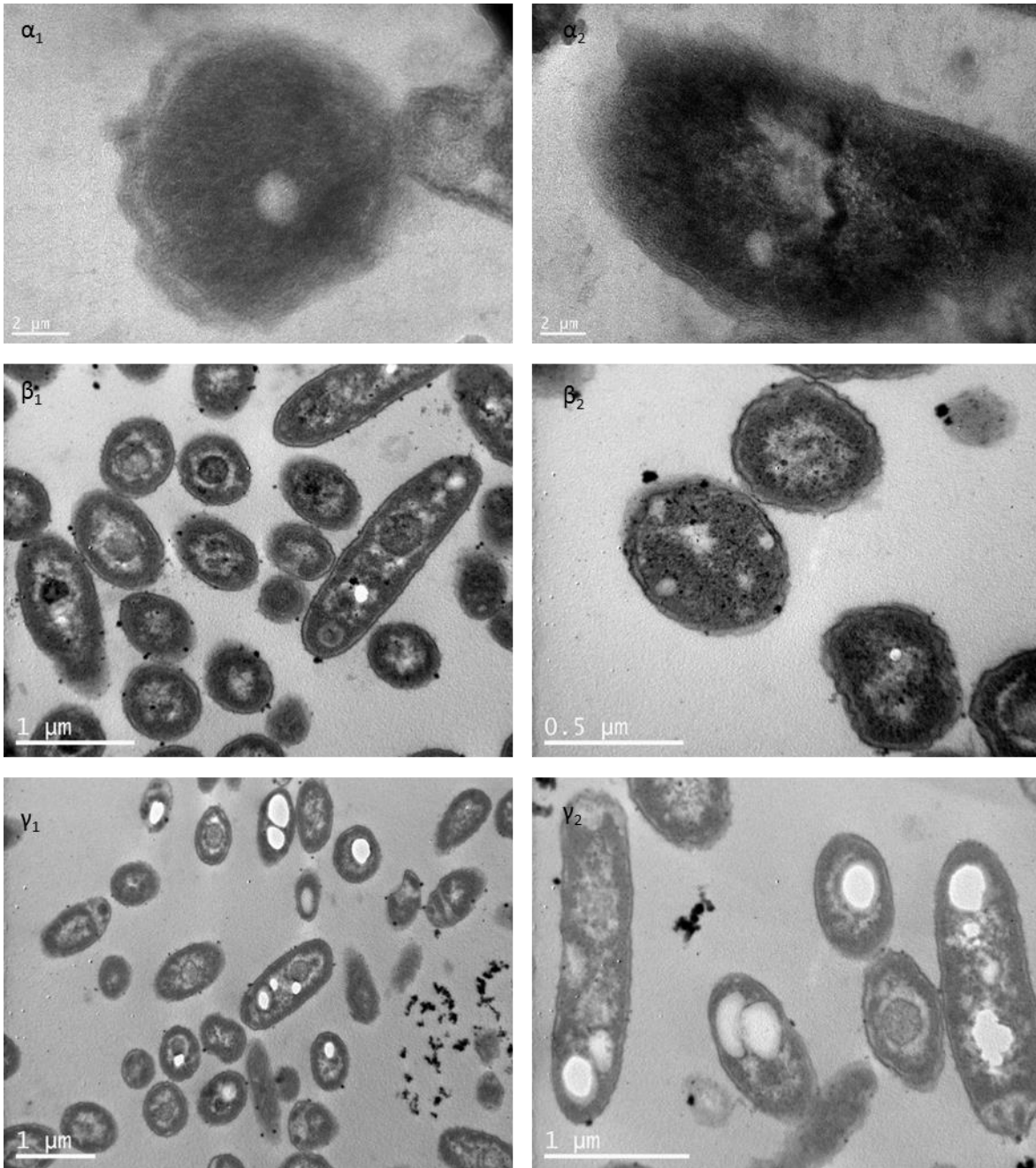


Εικόνα 20: Θραυσματοποίηση του PHB

Από την Εικόνα 19 παρατηρείται ότι στο φάσμα υπάρχουν επαναλαμβανόμενα μοτίβα κορυφών το οποίο είναι ένδειξη ύπαρξης πολυμερούς. Κάθε κορυφή διαφέρει από την προηγούμενή της κατά 86 μονάδες μάζας που είναι το μοριακό βάρος του μονομερούς στο PHB όπως φαίνεται στην Εικόνα 20.

4.5 Παρατήρηση κυττάρων *Pseudomonas* sp. pHDV1 με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM)

Για την μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων της *Pseudomonas* sp. pHDV1, χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης. Τα δείγματα που αναλύθηκαν προέρχονταν από καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν για 72 ώρες με συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L, 400 mg/L και 600 mg/L. Στην Εικόνα 21 παρουσιάζονται οι εικόνες που ελήφθησαν από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης.



Εικόνα 21: Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM) από κύτταρα *Pseudomonas* sp. rhDV1 που αναπτύχθηκαν για 72 ώρες (α_1, α_2): συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L (β_1, β_2): συγκέντρωση φαινόλης 400 mg/L (γ_1, γ_2): συγκέντρωση φαινόλης 600 mg/L

Στις εικόνες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης παρατηρούνται λευκά σφαιρικά κυστίδια τα οποία είναι παρόμοια με τα κυστίδια PHB που παρατηρήθηκαν βιβλιογραφικά σε άλλους οργανισμούς. (Εικόνα 5). Η συγκέντρωση της φαινόλης στο θρεπτικό μέσο επηρεάζει το πλήθος τους και το μέγεθός τους μέσα στο κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν 1 με 2 κυστίδια

ανά κύτταρο σε καλλιέργεια με συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L. Συνολικά εξετάστηκαν περίπου 85 κύτταρα από εικόνες TEM. Σε συγκέντρωση φαινόλης 400 mg/L τα κυστίδια ανά κύτταρο αυξάνονται με μέγιστο αριθμό 4 ανά κύτταρο σε συνολικό δείγμα περίπου 170 κυττάρων. Σε συγκέντρωση φαινόλης 600 mg/L ο αριθμός των κυστιδίων ανά κύτταρο είναι παρόμοιος με αυτόν στην συγκέντρωση των 400 mg/L. Όσον αφορά το μέγεθος, τα κυστίδια των κυττάρων της καλλιέργειας με φαινόλη 200 mg/L έχουν μέση διάμετρο $0.74 \pm 0.32 \mu\text{m}$. Για τις καλλιέργειες με φαινόλη 400 mg/L και 600 mg/L η μέση διάμετρος είναι $0.10 \pm 0.10 \mu\text{m}$ και $0.20 \pm 0.16 \mu\text{m}$ αντίστοιχα με όρια εμπιστοσύνης 95%. Κυστίδια με παρόμοιο μέγεθος έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά για το στέλεχος *Pseudomonas mandelii* CBS-1. (Rongpeng et al., 2013)

4.6 Τεστ κινητικής για την συνθάση του PHB

Το τεστ πραγματοποιήθηκε για κυτταρικά εκχυλίσματα από καλλιέργειες με συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L, 400 mg/L και 600 mg/L 72 ωρών καθώς και για καλλιέργειες με συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L 96 ωρών με κανονική, μειωμένη και αυξημένη συγκέντρωση αζώτου στο θρεπτικό μέσο M9. Τα αποτελέσματα μετά από μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος $\lambda=412 \text{ nm}$ της ένωσης 2-νιτρο-5-σουλφοβενζοϊκού σύμφωνα με την μέθοδο που παρουσιάστηκε στην § 3.12 παρουσιάζονται στους Πίνακες 8 και 9.

Πίνακας 8: Μετρήσεις απορρόφησης στα κυτταρικά εκχυλίσματα *Pseudomonas* sp. pHDV1 με διαβαθμισμένη συγκέντρωση φαινόλης

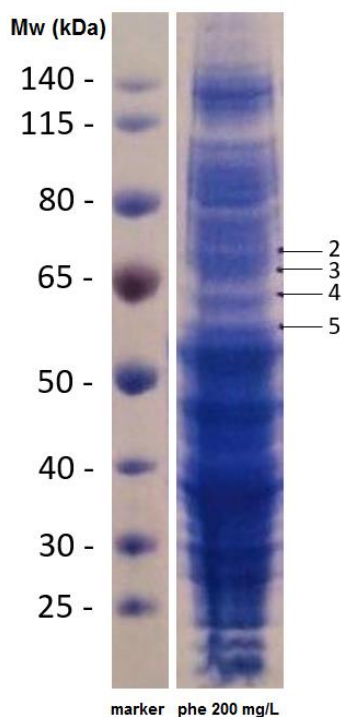
Συγκέντρωση φαινόλης (mg/L) 72 ώρες	Απορρόφηση σε μήκος κύματος $\lambda=412 \text{ nm}$ 22 °C	Συγκέντρωση PHB συνθάσης (mM)	Απορρόφηση σε μήκος κύματος $\lambda=412 \text{ nm}$ 32 °C
200	0.366	0.020	0.499
400	0.181	0.010	0.426
600	0.396	0.021	0.708

Πίνακας 9: Μετρήσεις απορρόφησης στα κυτταρικά εκχυλίσματα *Pseudomonas* sp. pHDV1 με διαβαθμισμένη συγκέντρωση αζώτου

Συγκέντρωση αζώτου σε 200 mg/L φαινόλη 96 ώρες	Απορρόφηση σε μήκος κύματος λ=412 nm 24.6 °C	Συγκέντρωση PHB συνθάσης (mM)	Απορρόφηση σε μήκος κύματος λ=412 nm 32 °C
χαμηλή	0.737	0.040	1.698
κανονική	0.560	0.030	1.131
υψηλή	0.703	0.038	1.563

Οι συγκεντρώσεις της PHB συνθάσης υπολογίστηκαν με βάση τον νόμο των Lambert-Beer ($\epsilon=29.63 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) Από τα δεδομένα των Πινάκων 8 και 9 παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της φαινόλης και του αζώτου καθώς και οι ώρες καλλιέργειας επηρεάζουν την έκφραση του ενζύμου της PHB συνθάσης στα κύτταρα. Επίσης, το δείγμα που προέρχεται από καλλιέργεια με συγκέντρωση φαινόλης 600 mg/L παρουσιάζει την μεγαλύτερη απορρόφηση τόσο στους 22 °C όσο και στους 32 °C. Επιπλέον από τους Πίνακες 8 και 9 παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης και συνεπώς της ενεργότητας του ενζύμου στους 32 °C που είναι η θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. pHDV1. Από τον Πίνακα 9 φαίνεται ότι το δείγμα από την καλλιέργεια με την μικρότερη συγκέντρωση αζώτου παρουσιάζει την μεγαλύτερη απορρόφηση και στις δύο θερμοκρασίες και την μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμου. Η παρατήρηση αυτή, συμφωνεί με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Sharma and Dhingra, 2015) σύμφωνα με τα οποία ο λόγος C/N=16/1 είναι ο βέλτιστος για την παραγωγή PHB στο βακτήριο *Pseudochrobactrum asaccharolyticum*.

4.7 Ταυτοποίηση του εζύμου συνθάση του PHB με nano LC/MS/MS



Εικόνα 22: Gel SDS-PAGE για την ταυτοποίηση της PHB συνθάσης με nano LC/MS

Στην Εικόνα 22 απεικονίζεται το gel SDS-PAGE για την ταυτοποίηση της PHB συνθάσης. Οι πρωτεϊνικές μπάντες που κόπηκαν και αναλύθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στην § 3.13 αριθμούνται στην Εικόνα 22. Οι λωρίδες κόπηκαν στην περιοχή των μοριακών βαρών που αναμένεται να βρίσκεται η συνθάση σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα. (Πίνακας 3) Το πρωτεϊνικό δείγμα προέρχεται από καλλιέργεια με συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L που αναπτύχθηκε για 72 ώρες. Σύμφωνα με τα δεδομένα του nLC-MS το ένζυμο συνθάση του πολυ-(R)-υδρόξυαλκανοϊκού ταυτοποιήθηκε σε όλες τις λωρίδες με 6 έως 15 μοναδικά πεπτίδια. Με μεγαλύτερη πιστότητα (μεγαλύτερο coverage και περισσότερα πεπτίδια) ταυτοποιήθηκε στην λωρίδα 5 με 15 μοναδικά πεπτίδια και 38 κάλυψη σε μοριακό βάρος 63.9 kDa που είναι το ίδιο με το βιβλιογραφικό (Πίνακας 3)

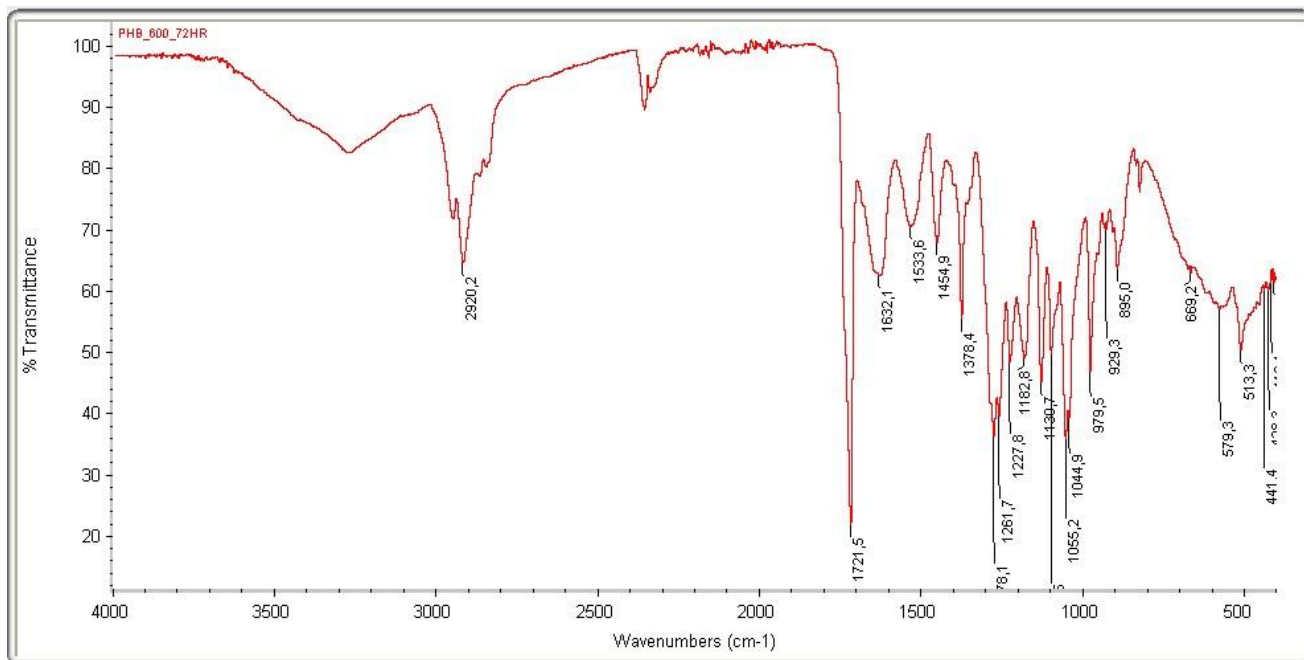
5 Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας αναπτύχθηκε μια αποδοτική μέθοδος απομόνωσης PHA από βακτηριακά κύτταρα *Pseudomonas* sp. rhDV1 που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινόλης. Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης του πολύ(3-υδροξυ βουτυρικού) εστέρα (PHB) με FT-IR, NMR και matrix-assisted MALDI/TOF. Ισχυρές ενδείξεις για την ύπαρξη του PHB υπάρχουν στα δείγματα που απομονώθηκαν από καλλιέργειες με συγκέντρωση φαινόλης 200 mg/L καθώς και 600 mg/L. Τα δείγματα αυτά εμφάνισαν τις αναμενόμενες χαρακτηριστικές κορυφές στα φάσματα FT-IR, και MALDI-TOF (200 mg/L) και στο NMR 1D και 2D (600 mg/L). Οι ώρες ανάπτυξης των κυττάρων που δοκιμάστηκαν ήταν 48, 72 και 96 από τις οποίες οι 72 επιλέχθηκαν ως βέλτιστες για την παραγωγή του προϊόντος. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η μορφολογία των κυττάρων με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης όπου παρατηρήθηκαν κυστίδια παρόμοιου μεγέθους με τα κυστίδια που εγκλείουν PHB σε στελέχη της ψευδομονάδας. Επιπλέον, με την χρήση nLC/MS ταυτοποιήθηκε το τελευταίο ένζυμο του βιοσυνθετικού μονοπατιού των PHB, η συνθάση του πολυ-(R)-υδροξυαλκανοϊκού, σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από καλλιέργεια με φαινόλη συγκέντρωσης 200 mg/L που αναπτύχθηκε για 72 ώρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κινητικής του ενζύμου, υπάρχει ενεργό ένζυμο σε όλα τα κυτταρικά εκχυλίσματα σε συγκέντρωση που επηρεάζεται από την συγκέντρωση της φαινόλης, του αζώτου και τις ώρες ανάπτυξης της καλλιέργειας.

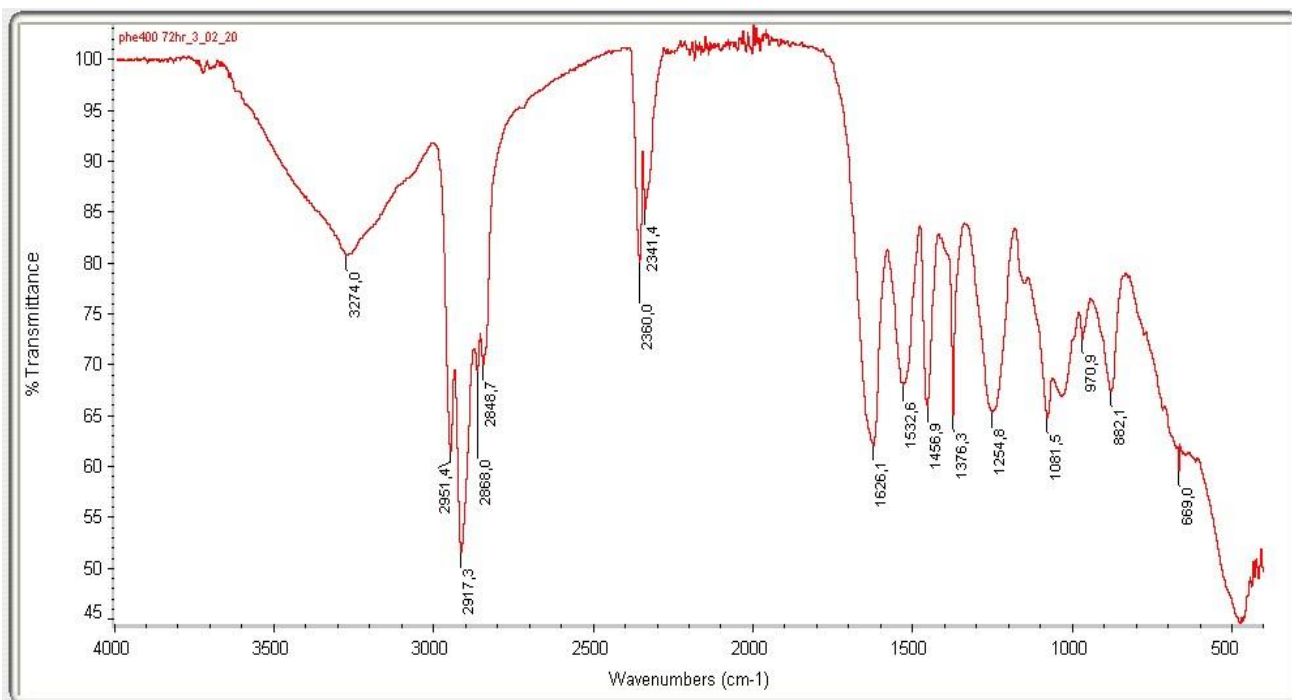
5.1 Μελλοντικοί στόχοι

Στους μελλοντικούς στόχους περιλαμβάνεται η καλλιέργεια του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. rhDV1 σε διαφορετικές πηγές άνθρακα όπως για παράδειγμα η ορθο, μετα και παρα κρεσόλη καθώς και τα απόβλητα ελαιουργείου (κασιόγαρος) και τυροκομείου (τυρόγαλα) ώστε να μελετηθεί η επίδραση του υποστρώματος στην παραγωγή PHA και την ενεργότητα της συνθάσης. Η πρωτεομική μελέτη του βακτηρίου σε διαφορετικές πηγές άνθρακα και σε διαφορετικές φάσεις της κυτταρικής ανάπτυξης θα συμβάλλει στην κατανόηση των μηχανισμών του κυττάρων και ιδιαίτερα αυτών που διέπουν την παραγωγή PHA. Επιπλέον στόχος είναι η βελτιστοποίηση της παραγωγής PHA με χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας όπως για παράδειγμα η αποσιώπηση του γονιδίου της αποπολυμεράσης.

6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι. ΦΑΣΜΑΤΑ IR



Εικόνα Π1: Φάσμα IR από δείγμα που απομονώθηκε από κύτταρα *Pseudomonas* sp. rhDV1 που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινόλης 600 mg/L μετά από 72 ώρες καλλιέργειας



Εικόνα Π2: Φάσμα IR από δείγμα που απομονώθηκε από κύτταρα *Pseudomonas* sp. rhDV1 που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινόλης 400 mg/L μετά από 72 ώρες καλλιέργειας

Πίνακας Π1: Ανάθεση κορυφών στο φάσμα υπερύθρου του παραγόμενου προϊόντος από κύτταρα *Pseudomonas* sp. rhDV1 που αναπτύχθηκαν σε φαινόλη 400 mg/L για 72 ώρες

Συνθήκες καλλιέργειας	Κορυφές που παρατηρήθηκαν (cm ⁻¹)	Κορυφές στη βιβλιογραφία (cm ⁻¹)	Λειτουργική ομάδα που αντιστοιχούν	Βιβλιογραφική πηγή
Φαινόλη 400 mg/L 72 h	3274.0	3434	-OH	Sabarinathan et al., 2018
		3442		Hassan et al., 2016
	2951.4	2929	-CH	Sabarinathan et al., 2018
		2935		Hassan et al., 2016
	1622.8			
1456.9	1413	-CH ₂	Sabarinathan et al., 2018	
1376.3	1381	-CH ₃	Sabarinathan et al., 2018	

Πίνακας Π2: Ανάθεση κορυφών στο φάσμα υπερύθρου του παραγόμενου προϊόντος από κύτταρα *Pseudomonas* sp. rhDV1 που αναπτύχθηκαν σε φαινόλη 600 mg/L για 72 ώρες

Συνθήκες καλλιέργειας	Κορυφές (cm ⁻¹) που παρατηρήθηκαν	Κορυφές στη βιβλιογραφία (cm ⁻¹)	Λειτουργική ομάδα που αντιστοιχούν	Βιβλιογραφική πηγή
Φαινόλη 600 mg/L 72 h	3290	3434	-OH	Sabarinathan et al., 2018
		3442		Hassan et al., 2016
	2920.2	2929	-CH	Sabarinathan et al., 2018
		2935		Hassan et al., 2016
	1721.5	1722	-C=O	Sabarinathan et al., 2018
1454.9	1413	-CH ₂	Sabarinathan et al., 2018	
1377.4	1381	-CH ₃	Sabarinathan et al., 2018	

7 Βιβλιογραφία

- Babich H and Davis D. L., 1981. Phenol: A review of Environmental and Health risks. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1, 90-109
- Beveridge T., 1999. Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*. 181(16), 4725-4733
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., & Fuller, R. C. 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of Poly(β -Hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(8), 1977-1982.
- Bugnicourt E., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging, *eXPRESS Polym. Lett.*, 8(11), 791–808.
- Buswell, J. A. 1975. Metabolism of phenol and cresols by *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 124, 1077-1083.
- Buswell, J. A., and Twomey, D. G. 1975. Utilization of phenol and cresols by *Bacillus sferothermophilus*, strain PH24. *J. Gen. Microbial.* 87, 377-379.
- Chaber, P., Kwiecień, M., Zięba, M., Sobota, M., & Adamus, G. 2017. The heterogeneous selective reduction of PHB as a useful method for preparation of oligodiols and surface modification. *RSC Advances*, 7(56), 35096-35104
- Chek, M.F., Kim, S., Mori, T. *et al.* 2017. Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Sci. Rep.*, 7, 5312
- Chen, G.-Q., Chen, X.-Y., Wu, F.-Q., & Chen, J.-C. 2020. Polyhydroxyalkanoates (PHA) toward cost competitiveness and functionality. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(1), 1-7.
- De Rooy SL, Wahyuni ET, Wiratni SS, Ismail J. 2007. Purification and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) in *Cupriavidus necator*. *Indo. J. Chem.* 7, 243–248
- Hassan MA, Bakhiet EK, Ali SG, Hussien HR. 2016. Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Bacillus* sp. isolated from Egypt. *J. App. Pharm Sci.* 6 (04), 046-051.
- Hein, S., Iran, H., Steinbuchel, A., 1998. *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* 170, 162–170.
- Hill, G. A., and Robinson, C. W. 1975. Substrate inhibition kinetics: Phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotech. Bioeng.* 17, 1599-1615.
- Hoak, R. D. 1962. Recovery and identification of organisms in water. *Int. J. Air Water Pollut.* 6, 521-538

- Kocher, T., Pichler, P., Swart, R., & Mechtler, K. 2012. Analysis of protein mixtures from whole-cell extracts by single-run nanoLC-MS/MS using ultralong gradients. *Nat. Protoc*, 7(5), 882-890.
- Koksharova, O. A., Kravzova, T. R., Lazebnaya, I. V., Gorelova, O. A., Baulina, O. I., Lazebny, O. E., Lobakova, E. S. 2013. Molecular identification and ultrastructural and phylogenetic studies of cyanobacteria from association with the white sea hydroid *Dynamena pumila* (L., 1758). *Biomed Res Int*.
- Kramer, N., And Doetsch, R. N. 1950. The growth of phenol-utilizing bacteria on aromatic carbon sources. *Arch. Biochem*. 26, 401-405.
- Kruger N.J. 2009. The Bradford Method For Protein Quantitation. In: Walker J.M. (eds) The Protein Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ
- Li et al.: 2013. Psychrotrophic *Pseudomonas mandelii* CBS-1 produces high levels of poly- β -hydroxybutyrate. *SpringerPlus*. 2, 335.
- Lyratzakis A., Valsamidis G., Nikolaki A., Ruppert F., Langer J.D. and Tsiotis G., 2020., Proteomic characterization of the *Pseudomonas* sp. strain phDV1 response to monocyclic aromatic compounds, *Proteomics*. (under revision)
- Maestro, B., & Sanz, J. M., 2017. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microb Biotechnol*, 10(6), 1323-1337.
- Michałowicz J, and Duda W. 2007. Phenols-Sources and Toxicity. *Polish J. of Environ. Stud.*, 16 (3), 347-362
- Neujahr, H. Y., And Varga, J. M. 1970. Degradation of phenols by intact cells and cell-free preparations of *Trichosporon cutaneum*. *Eur. J. Biochem*. 13, 37-44.
- Palanivel, T. M., Sivakumar, N., Al-Ansari, A., & Victor, R. 2020. Bioremediation of copper by active cells of *Pseudomonas stutzeri* LA3 isolated from an abandoned copper mine soil. *J Environ Manage*, 253, 109706.
- Potter, M., and Steinbuchel, A., 2005. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromol*. 6, 552–560.
- R. Griebel, Z. Smith, and J.M.Merrick, 1968. “Metabolism of Poly- β -hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly- β -hydroxybutyrate granules from bacillus megaterium,” *Biochemistry*. 7(10), 3676–3681
- Reddy C.S.K., Ghai R., Rashmi, Kalia V.C., 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 87, 137-146
- Rongpeng Li., Yuji J., Xinfeng W., Jingjing Y., Yuan G., Xiaoli Zi., Xia Z., Haofeng G., and Nan Hu. 2013, Psychrotrophic *Pseudomonas mandelii* CBS-1 produces high levels of poly- β -hydroxybutyrate, *Springer Plus*. 2(235), 2-7

Rutherford, D.R., Hammar, W.J. and Gaddam, B.N. 1995. Poly(beta-hydroxyorganoate) pressure sensitive adhesive compositions. Patent EP0775178. Minnesota Mining and Manufacturing Company.

Sabarinathan, D., Chandrika, S. P., Venkatraman, P., Easwaran, M., Sureka, C. S., & Preethi, K. 2018. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Pseudomonas plecoglossicida* and its application towards cancer detection. *Informatics in Medicine Unlocked*. 11, 61-67.

Sharma M., and Dhingra H., 2015. Isolation and culture conditions optimization for PHB Production by *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* . *IJSR*. 4(10)

Sheu, D.S., Lai, Y.W., Chang, R.C., Chen, W.M., 2009. Detection of polyhydroxyalkanoate synthase activity on a polyacrylamide gel. *Anal. Biochem*. 393, 62–66.

Shrivastav, Anupama & Kim, Hae-Yeong & Kim, Young-Rok. 2013. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed research international*. 2013, 1-12

Singh, A.K., and Mallick, N., 2009. SCL-LCL-PHA copolymerproduction by a local isolate, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. *Biotechnol J*. 4, 703–711.

Chaber P., Kwiechien, M., Zieba, M., Sobota, M. & Adamus, G. 2017. The heterogeneous selective reduction of PHB as a useful method for preparation of oligodiols and surface modification. *RSC Advances*, 7,

Tian, J., Sinskey, A. J., & Stubbe, J. 2005. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. *J Bacteriol*, 187(11), 3814-3824

Tsirogianni I, Aivaliotis M, Karas M, Tsiotis G. 2004. Mass spectrometric mapping of the enzymes involved in the phenol degradation of an indigenous soil pseudomonad. *Biochem Biophys Acta*. 1700,117–23.

Tsirogianni, E.; Aivaliotis, M.; Karas, M.; Tsiotis, G. 2005. Detection and Characterisation of Catechol 2,3-Dioxygenase in an Indigenous Soil Pseudomonad by MALDI-TOF MS Using a Column Separation. *Biodegradation*. 16(2), 181–186

U.S. Environmental Protection Agency. 2002. *Toxicological review of phenol* Washington D.C.: EPA

Valentin, H. E., and A. Steinbuchel. 1994. Application of enzymatically synthesized short-chain-length hydroxy fatty acid coenzyme A thioesters for assay of polyhydroxyalkanoic acid synthases. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 40, 699–709

Verlinden RA, Hill DJ, Kenward MA, Williams CD, Piotrowska-Seget Z, Radecka IK 2011 Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express* 1, 11–19

Xie H, Valsamidis G, Mathioudaki E, Tsiotis G. 2019. Complete genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain phDV1, an isolate capable of efficient degradation of aromatic hydrocarbons. *Microbiol Resour Announc.* 8(2),

Yang, R. D., and Humphrey, A. E. (1975). Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. *Biotech. Bioeng.* 17, 1211-1235.

Zheng, Y., Chen, J. C., Ma, Y. M., & Chen, G. Q. 2020. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metab Eng.* 58, 82-93.

Βαλσαμίδης Ι. 2019. Μελέτη της αποικοδόμησης μεθυλοφαινόλων από το βακτήριο *Pseudomonas* sp. phDV1 μεταπτυχιακή εργασία Πανεπιστήμιο Κρήτης

Καραγκούνη-Κύρτσου Α. 2012. *Γενική Μικροβιολογία*. Αθήνα:Σταμούλης

Κότσιρα Δ., 2020. Απομόνωση πολύ υδροξυαλκανοϊκών από το βακτήριο *Pseudomonas* sp. phDV1 διπλωματική εργασία Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κυριακίδης Γ., και Μπίνας Β. 2014. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία. Έκδοση: 1.0. Ηράκλειο 2014. as seen on 03.10.2020