

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας –
Ιολογίας

Πτυχιακή Εργασία

**Παραγωγή Αδιπικού Οξέος μέσω Γενετικά Τροποποιημένου
Βακτηρίου**

Μπούτου Μαρίνα του Ιωάννη

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Πατεράκη Χρυσάνθη, Επίκουρη Καθηγήτρια

ΛΑΡΙΣΑ 2025

“Παραγωγή Αδипικού Οξέος μέσω Γενετικά Τροποποιημένου Βακτηρίου”

“Production of Adipic Acid via Genetically Modified Bacteria”

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Πατεράκη Χρυσάνθη (επιβλέπουσα): Επίκουρη Καθηγήτρια με γνωστικό αντικείμενο «Μικροβιολογία με έμφαση στη Βιοτεχνολογία», τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Βασιλειάδης Σωτήριος: Επίκουρος Καθηγητής με γνωστικό αντικείμενο «Μοριακή Μικροβιακή Οικολογία-Γονιδιωματική», του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Κουδουνάς Κωνσταντίνος: Επίκουρος Καθηγητής με γνωστικό αντικείμενο «Βιοχημεία», του τμήματος Γεωπονίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, koudounask@agro.auth.gr, 2310 99 8607.

Ευχαριστίες

Με βαθιά εκτίμηση, επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Χρυσάνθη Πατεράκη, καθώς μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τη πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, η καθοδήγηση της καθηγήτριας ήταν αξιοσημείωτα σημαντική για την επιτυχή ολοκλήρωση της εν λόγω εργασίας.

Συμπληρωματικά, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Επίκουρο Καθηγητή κ. Σωτήριο Βασιλειάδη και Επίκουρο Καθηγητή κ. Κουδουνά Κωνσταντίνο, για το χρόνο που αφιέρωσαν εξετάζοντας τη πτυχιακή μου εργασία. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υποψήφια διδάκτορα Έφη Δουλοπούλου και ερευνήτρια Λίζα Ζογμπή για τη βοήθεια τους κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, οι συμβουλές τους φάνηκαν εξαιρετικά χρήσιμες.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη στους γονείς μου, για την ανιδιοτελή και ατέρμονη υποστήριξη τους. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, τους παππούδες μου, τον αδερφό μου, και τους φίλους μου που βρίσκονταν δίπλα μου στις πιο δύσκολες στιγμές.

Περιεχόμενα

Περίληψη	8
Abstract	9
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Αδипικό οξύ	10
1.2 Η παραγωγή αδипικού οξέος στη βιομηχανία σήμερα	10
1.3 Η βιο-παραγωγή του αδипικού οξέος	11
1.3.1 Παραγωγή αδипικού οξέος μέσω χημικών διεργασιών	11
1.3.2 Έμμεση ζύμωση συνδυασμένη με χημική μετατροπή	12
1.3.3 Άμεση ζύμωση	12
1.4 Ο ξενιστής παραγωγής.....	13
1.4.1 <i>Thermobifida fusca</i>	14
1.4.2 <i>Escherichia coli</i>	15
1.4.5 Άλλοι ξενιστές παραγωγής.....	16
1.5 Βιοχημικά μονοπάτια παραγωγής αδипικού οξέος	17
1.5.1 Αντίστροφη οδός αποικοδόμησης του αδипικού οξέος	17
1.5.2 Συνδυασμός β-οξειδωσης ή αντίστροφης β-οξειδωσης, με ω-οξειδωση	18
1.5.3 Οδός του 2-οξοπιμελικού οξέος	19
1.6 Πρώτες ύλες για βιο-παραγωγή αδипικού οξέος.....	20
2. Σκοπός	21
3. Υλικά και Μέθοδοι	22
3.1 <i>Thermobifida fusca</i>	22
3.2 Συνθήκες ανάπτυξης <i>Thermobifida fusca</i> 190th ^T	22
3.2.1 Ανάπτυξη <i>Thermobifida fusca</i> 190th ^T σε προ-καλλιέργεια.....	23
3.2.2 Ανάπτυξη <i>Thermobifida fusca</i> 190th ^T σε κύρια καλλιέργεια	23
3.3 Αναλύσεις στις καλλιέργειες	23
3.3.1 Μέτρηση pH καλλιέργειας	24

3.3.2 Οπτική πυκνότητα, μικροσκοπική παρατήρηση σε πλάκα Neubauer, μέτρηση ξηρού βάρους.....	24
3.3.3 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων (DNS).....	24
3.3.4 Προσδιορισμός ελεύθερου ανόργανου φωσφόρου.....	25
3.3.5 Προσδιορισμός ελεύθερων αμινομάδων.....	25
3.4 Μοριακές τεχνικές.....	25
3.4.1 Απομόνωση γονιδίου <i>Tfu_1647</i>	25
3.4.1.1 Εξαγωγή γενετικού υλικού από βακτηριακό στέλεχος <i>T. fusca</i> 190th ^T	26
3.4.1.2 Σχεδιασμός εκκινητών	26
3.4.1.3 Ενίσχυση και απομόνωση του γονιδίου <i>Tfu_1647</i> μέσω PCR.....	27
3.4.1.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	28
3.4.2 Εισαγωγή γονιδίου <i>Tfu_1647</i> στον πλασμιδιακό φορέα <i>pet28a</i>	28
3.4.2.3 Πέψη πλασμιδίου <i>pet28a</i> και γονιδίου <i>Tfu_1647</i> με ένζυμα περιορισμού	30
3.4.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> DH5a, με γενετικά τροποποιημένο πλασμίδιο <i>pet28a</i>	31
3.5 Εισαγωγή γενετικά τροποποιημένου πλασμιδίου <i>pet28a</i> σε βακτηριακό στέλεχος <i>E. coli</i> BL21	34
3.5.1 Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> BL21	35
3.5.2 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων (competent cells) <i>E. coli</i> BL21	35
3.5.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων (competent cells) <i>E. coli</i> BL21.....	35
3.5.4 Απομόνωση γενετικά τροποποιημένου πλασμιδίου <i>pet28a</i> από κύτταρα <i>E. coli</i> BL21.....	35
3.5.5 Ηλεκτροφόρηση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου <i>pet28a</i>	35
3.5.6 Δημιουργία αποθεμάτων μετασχηματισμένων <i>E. coli</i> BL21 σε cryovials	36
3.6 Έκφραση ανασυνδυασμένου ενζύμου 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλ-CoA αναγωγάση	36
3.6.1 Προετοιμασία καλλιέργειας.....	36
3.6.2 Προσθήκη ισοπροπυλικής β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδης (IPTG)	36

3.6.3 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων.....	37
3.6.5 Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	37
3.7 In vitro παραγωγή αδιπτικού οξέος.....	38
3.7.1 Καλλιέργεια <i>Thermobifida fusca</i> 190th ^T	39
3.7.2 Καλλιέργεια μετασχηματισμένου βακτηρίου <i>E. coli</i> BL21	39
3.7.3 Έκφραση της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης 5-καρβοξυ-2-πεντενόυλο-CoA	39
3.7.4 Ενζυμική αντίδραση.....	39
3.7.5 Προσδιορισμός παραγωγής αδιπτικού οξέος.....	40
4. Αποτελέσματα και Συζήτηση	42
4.1 Ανάπτυξη του <i>Thermobifida fusca</i> 190th ^T σε κωνικές φυάλες.....	42
4.2 Προσδιορισμός ρυθμού ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητα του <i>T. fusca</i> 190th ^T	42
4.2.1 Ρυθμός ανάπτυξης <i>T. fusca</i> 190th ^T	43
4.2.2 Μεταβολική δραστηριότητα <i>T. fusca</i> 190th ^T	44
4.2.3 Προσδιορισμός τιμής pH.....	47
4.3 Γενετική τροποποίηση στελεχών <i>E. coli</i> και έκφραση γονιδίου <i>Tfu_1647</i>	47
4.3.1 Ενίσχυση γονιδίου <i>Tfu_1647</i>	47
4.3.2 Γενετική τροποποίηση κυττάρων <i>E. coli</i> DH5a	48
4.3.3 Ταυτοποίηση γενετικής τροποποίησης πλασμιδιακού φορέας <i>pet28a</i>	50
4.3.4 Εισαγωγή γενετικά τροποποιημένου πλασμιδίου <i>pet28a</i> σε φορέα έκφρασης <i>E. coli</i> BL21	51
4.3.5 Ηλεκτροφόρηση ανασυνδυσασμένου πλασμιδίου <i>pet28a</i>	52
4.3.4 Δημιουργία αποθεμάτων μετασχηματισμένων <i>E. coli</i> BL21 κυττάρων σε <i>cryovials</i>	53
4.3.7 Ανάπτυξη <i>E. coli</i> BL21 και βακτηριακή έκφραση	54
4.3.7.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	54
4.4 In vitro παραγωγή αδιπτικού οξέος.....	56

5. Συζήτηση	58
Βιβλιογραφία	62

Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή εργασία είχε ως στόχο την παραγωγή αδιπικού οξέος από γενετικά τροποποιημένο βακτήριο. Η συγκεκριμένη προσέγγιση καθιστά μια περιβαλλοντικά φιλική μέθοδο, που υπόσχεται την αντικατάσταση των συμβατικών μεθόδων παραγωγής αδιπικού οξέος από πετροχημικά προϊόντα. Το αδιπικό οξύ είναι σημαντικό πρόδρομο μόριο του νάιλον-6,6 ένα πολυμερές πλαστικό.

Για τη διεκπεραίωση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Thermobifida fusca* 190th^T. Η διαδικασία της ζύμωσης, πραγματοποιήθηκε σε εμπλουτισμένο θρεπτικό Hagerdahl-medium και το pH προσαρμόστηκε σε τιμή $7,4 \pm 0,2$.

Το γονίδιο *Tfu_164*, που κωδικοποιεί για το ένζυμο 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλ-CoA αναγωγή (1.3.99.-), αποσπάστηκε από το γονιδίωμα του μικροοργανισμού *Thermobifida fusca* 190th^T, μέσω Αντίδρασης Αλυσιδωτής Πολυμεράσης (PCR). Το γονίδιο ενσωματώθηκε στο πλασμίδιο *pet28a* με τη δράση των περιοριστικών ενζύμων HindIII και SacI-HF. Έπειτα, το γενετικά τροποποιημένο πλασμίδιο εισήχθη στο μικροοργανισμό *Escherichia coli* DH5a για να ενισχυθεί ο πληθυσμός τους.

Στη συνέχεια, το γενετικά τροποποιημένο πλασμίδιο *pet28a* απομονώθηκε από το μικροοργανισμό *Escherichia coli* DH5a, για να μετασχηματιστούν βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* BL21. Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος είναι κατάλληλο για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, μέσω της T7 RNA πολυμεράσης. Τα βακτήρια *Escherichia coli* αναπτύχθηκαν σε LB medium παρουσία ισοπροπυλικής β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδης (IPTG), όπου πάρθηκε δείγμα στις ώρες 0, 1, 2, 4 και 24. Λύμα κυττάρων *Escherichia coli* BL21 που φέρουν το γενετικά τροποποιημένο πλασμίδιο και λύμα κυττάρων *Thermobifida fusca* 190th^T ενοποιήθηκαν με σκοπό να επιτευχθεί η παραγωγή αδιπικού οξέος.

Η παραπάνω μεθοδολογία στηρίχθηκε στη παρουσία των ενζύμων για το αντίστροφο μονοπάτι αποικοδόμησης αδιπικού οξέος (RADP) στο *Thermobifida fusca*. Το μονοπάτι αυτό δεν ευνοείται ενδοκυτταρικά στη φύση επειδή δε παράγεται η 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλ-CoA αναγωγή (1.3.99.-). Σκοπός της εργασίας ήταν να προσδιοριστεί αν είναι δυνατή η παραγωγή αδιπικού οξέος σε λύμα κυττάρων *Thermobifida fusca* παρουσία του ενζύμου 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλ-CoA αναγωγή (1.3.99.-).

Η παρούσα έρευνα θα μπορούσε να αποτελέσει μια αρχική προσέγγιση στην εύρεση μιας περιβαλλοντικά συμβατής μεθόδου για παραγωγή αδιπικού οξέος.

Abstract

This thesis aimed to produce adipic acid from genetically modified bacteria. This approach is an environmentally friendly method, which offers the prospect of replacing conventional methods of producing adipic acid from petrochemicals products. Adipic acid is an important precursor molecule of nylon-6,6, a polymer plastic.

The bacterial strain *Thermobifida fusca* B6 was used for the experiment. The fermentation process was carried out in enriched Hagerdahl-medium and the pH was adjusted to $7,4 \pm 0,2$.

The *Tfu_1647* gene, encoding the enzyme 5-carboxy-2-pentenoyl-CoA reductase (1.3.99.-), was isolated from the genome of the microorganism *Thermobifida fusca* B6, by Polymerase Chain Reaction (PCR). The gene was integrated into the plasmid pet28a by the action of the restriction enzymes HindIII and SacI-HF. Then, the genetically modified plasmid was introduced into the microorganism *Escherichia coli* DH5a to amplify the plasmid population.

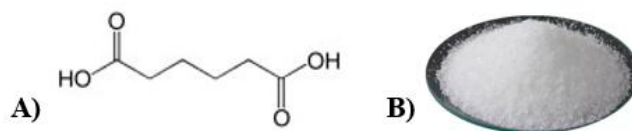
Afterwards, the genetically modified plasmid pet28a was isolated from the microorganism *Escherichia coli* DH5a, to transform *Escherichia coli* BL21 bacterial cells. This bacterial strain is suitable for the expression of recombinant proteins, via T7 RNA polymerase. *Escherichia coli* bacteria were grown in LB medium in the presence of isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG), where a sample was taken at hours 0, 1, 2, 4 and 24. Lysates of *Escherichia coli* BL21 cells carrying the genetically modified plasmid and lysates of *Thermobifida fusca* B6 cells were pooled in order to achieve the production of adipic acid.

The above methodology was based on the presence of enzymes for the reverse adipic acid degradation pathway (RADP) in *Thermobifida fusca*. This pathway is not favored intracellularly in nature because 5-carboxy-2-pentenoyl-CoA reductase (1.3.99.-) is not produced. The aim of the project was to determine whether adipic acid production is possible in *Thermobifida fusca* cell lysate in the presence of the enzyme 5-carboxy-2-pentenoyl-CoA reductase (1.3.99.-).

The above research could be an initial approach to finding an environmentally compatible method for producing adipic acid.

1. Εισαγωγή

1.1 Αδιπικό οξύ

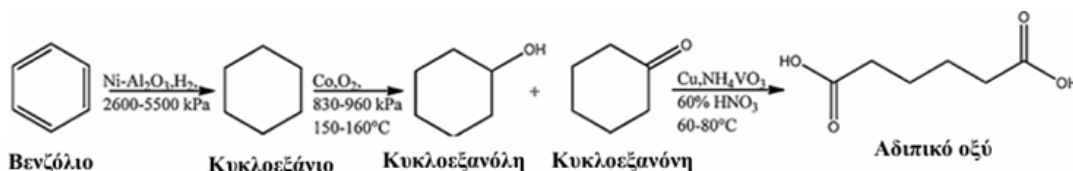


Εικόνα 1: Α) Χημική δομή του αδιπικού οξέος (Goldberg & Rokem, 2009). Β) Αδιπικό οξύ σε μορφή κρυσταλλικής σκόνης.

Το αδιπικό οξύ (**Εικόνα 1**), γνωστό και ως εξανοδιοϊκό οξύ ($C_6H_{10}O_4$), σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Ενέργειας (IEA) είναι το πιο ενδιαφέρον αλειφατικό δικαρβοξυλικό οξύ που υπάρχει στο εμπόριο (Polen et al., 2013; Skoog et al., 2018). Το σημείο τήξης του οξέος είναι οι 152 °C, ενώ το σημείο βρασμού βρίσκεται στους 330 °C, έχει μοριακό βάρος (MW) 146,14 g/mol και εντοπίζεται σε λευκούς, άοσμους κρυστάλλους με οξεία γεύση. Το αδιπικό οξύ είναι ελάχιστα διαλυτό σε νερό, ενώ διαλύεται εύκολα σε οργανικούς διαλύτες όπως αλκοόλες και ακετόνη (Goldberg & Rokem, 2009). Παγκοσμίως παράγονται 3 εκατομμύρια τόνοι αδιπικού οξέος κάθε χρόνο με αγοραία αξία 6 δισεκατομμύρια δολάρια (Skoog et al., 2018)

Το 65% του παραγόμενου αδιπικού οξέος αξιοποιείται για τη παραγωγή ινών και ρητινών νάιλον-6,6. Μια ποσότητα του παραγόμενου αδιπικού οξέος συμμετέχει στη παρασκευή πολυουρεθανών, πλαστικοποιητών, πολυεστέρων αλλά επίσης περιέχεται σε λιπαντικά (Polen et al., 2013). Ένα πολύ μικρό ποσοστό χρησιμοποιείται και στις βιομηχανίες τροφίμων, όπως για παράδειγμα τη παραγωγή baking powder (Kennedy, 2002) και φαρμακευτικών προϊόντων (Skoog et al., 2018), καθώς έχει πολύ χαμηλή τοξικότητα, και φαίνεται να είναι επιβλαβές μόνο σε άτομα με ευαισθησία (Kennedy, 2002).

1.2 Η παραγωγή αδιπικού οξέος στη βιομηχανία σήμερα



Εικόνα 2: Στάδια βιομηχανικής παραγωγής αδιπικού οξέος. Τροποποιημένη εικόνα (Polen et al., 2013).

Σήμερα στη βιομηχανία το μεγαλύτερο ποσοστό αδιπικού οξέος παρασκευάζεται κυρίως από το βενζόλιο (Polen et al., 2013). Το βενζόλιο αποτελεί ένα μη ανανεώσιμο ορυκτό καύσιμο, το οποίο σε αντίθεση με το αδιπικό οξύ είναι πάρα πολύ τοξικό (Polen et al.,

2013;Kennedy, 2002). Το βενζόλιο είναι πτητικό καρκινογόνο, και η χρόνια έκθεση σε αυτό έχει συσχετιστεί με τη μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ) και άλλες ασθένειες του αίματος (Galbraith et al., 2010).

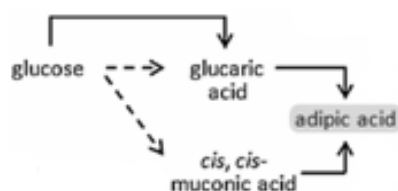
Στην παραγωγική διαδικασία (**Εικόνα 2**), σε πρώτο στάδιο το βενζόλιο ανάγεται σε κυκλοεξάνιο, το οποίο έπειτα μετατρέπεται στο έλαιο ΚΑ, ένα μείγμα κυκλοεξανόλης και κυκλοεξανόνης μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων οξείδωσης (Skoog et al., 2018). Το έλαιο ΚΑ αντιδρά με νιτρικό οξύ και αέρα, παρουσία χαλκού ή βαναδίου ως καταλύτες για να προκύψει το αδιπικό οξύ (Polen et al., 2013). Από την παραπάνω αντίδραση απελευθερώνεται ένα αέριο του θερμοκηπίου, το υποξείδιο του αζώτου (N_2O), το οποίο είναι προσεγγιστικά 300 φορές περισσότερο τοξικό από το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) (Skoog et al., 2018).

Τις τελευταίες δεκαετίες τα επίπεδα των αερίων του θερμοκηπίου έχουν αυξηθεί αισθητά. Μακροπρόθεσμα το φαινόμενο του θερμοκηπίου, μπορεί να οδηγήσει σε υπερθέρμανση του πλανήτη, ακραία καιρικά φαινόμενα και αλλαγή της βιοποικιλότητας. Επομένως, είναι απαραίτητο η παρασκευή χημικών ενώσεων, όπως το αδιπικό οξύ, να στηριχθεί σε ανανεώσιμες πρώτες ύλες βιολογικής προέλευσης (Skoog et al., 2018).

1.3 Η βιο-παραγωγή του αδιπικού οξέος

Η βιο-παραγωγή αδιπικού οξέος βρίσκεται επί του παρόντος σε εξέλιξη, μέσω τριών κύριων αναδυόμενων οδών: 1) με χημικές διεργασίες, 2) με έμμεση ζύμωση συνδυασμένη με χημική μετατροπή και 3) με άμεση ζύμωση. Μέχρι το 2018 οι εταιρίες Rennovia και Verdezyne είχαν επιχειρήσει τη παραγωγή αδιπικού οξέος από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, με παραγόμενη ποσότητα και απόδοση που προσεγγίζουν τις απαιτούμενες προδιαγραφές (Skoog et al., 2018a).

1.3.1 Παραγωγή αδιπικού οξέος μέσω χημικών διεργασιών



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση οδού έμμεσης ζύμωσης. Τροποποιημένη εικόνα (Polen et al., 2013).

Η εταιρία Rennovia παρήγαγε αδιπικό οξύ, από γλυκόζη μέσω μιας χημειοκαταλυτικής αντίδρασης. Αρχικά, η γλυκόζη υποβαλλόταν σε αερόβια οξείδωση προς σχηματισμό

γλυκαρικού οξέος, το οποίο στη συνέχεια μέσω υδροξυαποξυγόνωσης έδινε αδιπικό οξύ (**Εικόνα 3**). Παρόλα αυτά η διαδικασία αποδείχθηκε ιδιαίτερα δαπανηρή (Skoog et al., 2018a).

1.3.2 Έμμεση ζύμωση συνδυασμένη με χημική μετατροπή

Στο πλαίσιο της παραγωγής αδιπικού οξέος μέσω έμμεσης ζύμωσης, τα πρόδρομα μόρια μουκονικού και γλυκαρικού οξέος, παράγονται απευθείας μέσω ζυμωτικής διαδικασίας. Στη συνέχεια οι πρόδρομες ενώσεις, υπόκεινται σε μια αντίδραση χημικής υδρογόνωσης, όπου με καταλύτη το λευκόχρυσο (Pt) δίνουν αδιπικό οξύ (Polen et al., 2013). Αρκετές ερευνητικές ομάδες, έχουν επιχειρήσει να παράγουν μουκονικό οξύ και γλυκαρικό οξύ από ξενιστές παραγωγής.

Σε μια ερευνητική μελέτη χρησιμοποιώντας ως ξενιστή το βακτήριο *Escherichia coli*, δημιουργήθηκε ένα τεχνητό βιοσυνθετικό μονοπάτι μετατροπής του 3-δεϋδροσικιμικού οξέος (DHS) σε μουκονικό οξύ (Polen et al., 2013; Niu et al., 2002). Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος απέδωσε 36,8 g/L μουκονικού οξέος, καταναλώνοντας ως υπόστρωμα γλυκόζη (Polen et al., 2013; Niu et al., 2002). Μια παρόμοια στρατηγική ακολούθησαν μια άλλη ερευνητική ομάδα, όπου κατασκεύασε ένα βιοσυνθετικό μονοπάτι που μετατρέπει το 3-δεϋδροσικιμικό οξύ (DHS) σε 1,56 mg/L μουκονικού οξέος. (Weber et al., 2012). Ως ξενιστή παραγωγής χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae* (Weber et al., 2012).

Για τη παραγωγή γλυκαρικού οξέος μέσω ζύμωσης σε μια έρευνα επιχειρήθηκε η δημιουργία ενός τεχνητού βιοσυνθετικού μονοπατιού στο βακτήριο *E. coli* επιτυγχάνοντας συγκέντρωση 1 g/L γλυκαρικού οξέος, από το ενδιαμέσο μόριο γλυκουρονικό οξύ (Moon et al., 2009). Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η γλυκόζη (Moon et al., 2009; Polen et al., 2013).

1.3.3 Άμεση ζύμωση

Στην οδό άμεσης παραγωγής, το υπόστρωμα μετατρέπεται απευθείας σε αδιπικό οξύ μέσω μιας διαδικασίας ζύμωσης χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς ως ξενιστές παραγωγής (Skoog et al., 2018). Μια τέτοια διαδικασία έχει προταθεί από την εταιρία Verdezyne, η οποία αξιοποιώντας ένα γενετικά τροποποιημένο είδος ζύμης παρήγαγε αδιπικό οξύ, από λιπαρά οξέα (Skoog et al., 2018).

Υπάρχουν πάρα πολλές ερευνητικές μελέτες όπου έχουν χρησιμοποιηθεί γενετικά ή μη τροποποιημένοι μικροοργανισμοί για τη παραγωγή του εξανοδιοϊκού οξέος. Για παράδειγμα

μια ομάδα ερευνητών, αναδημιούργησε το αντίστροφο μονοπάτι αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος (RADP) στο βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BL21 (DE3) (Zhao et al., 2018a). Επιπλέον σε μια διαφορετική προσέγγιση, κατασκευάστηκε το αντίστροφο μονοπάτι του κύκλου της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων στο βακτήριο *E. coli*, με σκοπό την παραγωγή αδιπικού (Babu et al., 2015). Τέλος, δύο ερευνητές επιχείρησαν την παραγωγή αδιπικού οξέος, μετά από προσθήκη του ενζύμου 5-καρβοξυ-2-πεντενύλο-CoA αναγωγάση, σε κυτταρικό λύμα του *Thermobifida fusca* B6 (Deng & Mao, 2015).

Η μέθοδος της έμμεσης ζύμωσης, για την παραγωγή αδιπικού οξέος είναι αρκετά κοστοβόρα, ενώ η απευθείας παραγωγή αδιπικού οξέος μέσω ζύμωσης, έχει αποδειχθεί λιγότερο επιτυχημένη και με μικρότερη απόδοση, με αποτέλεσμα να μην καλύπτει τις ανάγκες της βιομηχανικής παραγωγής (Skoog et al., 2018a; Deng & Mao, 2015). Ωστόσο, η προοπτική της παραγωγής αδιπικού οξέος από σάκχαρα και λιπαρά οξέα ως πρώτες ύλες είναι πολύ ελπιδοφόρα, αν ληφθεί υπόψιν η αφθονία των μακρομορίων αυτών στη φύση και το χαμηλό τους κόστος.

1.4 Ο ξενιστής παραγωγής

Οι μικροοργανισμοί που θεωρούνται κατάλληλοι ως ξενιστές παραγωγής για τη δημιουργία αδιπικού οξέος, πρέπει να πληρούν ορισμένα απαραίτητα κριτήρια. Αρχικά, είναι απαραίτητο ο ξενιστής παραγωγής να αποδίδει μεγάλες ποσότητες αδιπικού οξέος, με υψηλούς ρυθμούς και απόδοση (Skoog et al., 2018). Για να διασφαλιστεί μια οικονομικά εφικτή παραγωγή, θα πρέπει η ποσότητα αδιπικού οξέος, ο ρυθμός παραγωγής και η απόδοση να κυμαίνονται σε μια εμβέλεια 50-100 g/L, 1-3 g/Lh και > 0,5 g/g, αντίστοιχα (Skoog et al., 2018).

Ο ξενιστής παραγωγής θα πρέπει να ανέχεται το αδιπικό οξύ σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, είναι πιο προσιτό ο μικροοργανισμός να ανέχεται όξινες συνθήκες ανάπτυξης, κατά προτίμηση κοντά στο pKa του αδιπικού οξέος ώστε να μειώνεται το κόστος παραγωγής (Skoog et al., 2018; Karlsson et al., 2017). Αν το αδιπικό οξύ έχει pKa 4,4, τότε το προτεινόμενο pH ζύμωσης είναι προσεγγιστικά 4. Για να μειωθεί το κόστος ανάπτυξης του ξενιστή παραγωγής σε βιομηχανική κλίμακα, θα πρέπει να αναπαράγεται σε ένα φθινό θρεπτικό μέσο και ταυτόχρονα να είναι ανεκτικός στους αναστολείς που μπορεί να περιέχονται στο μέσο ανάπτυξης (Skoog et al., 2018).

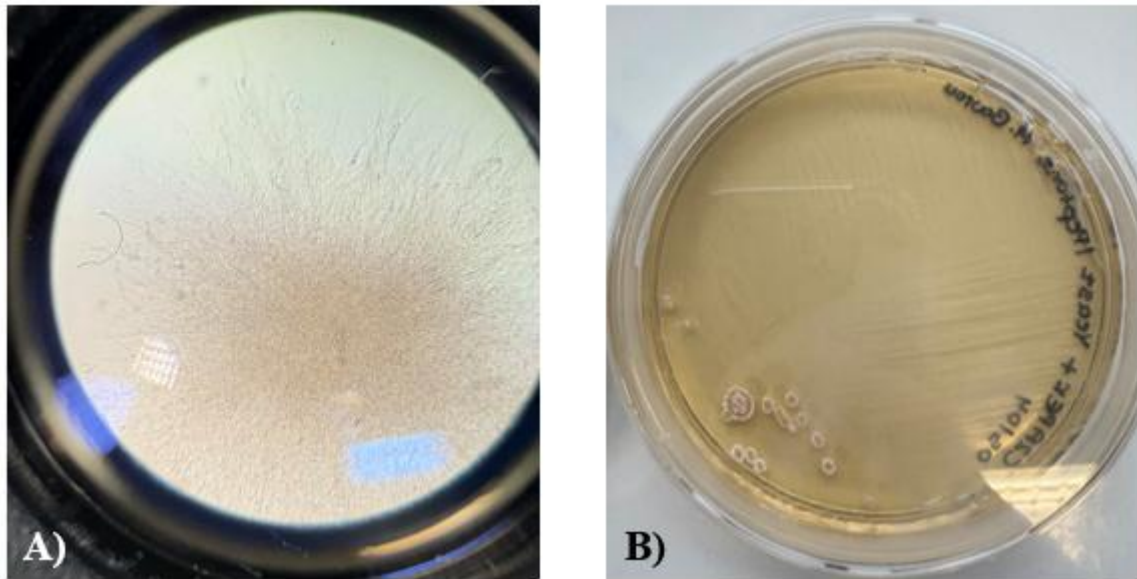
Μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπιστεί στη φύση κάποιος μικροοργανισμός που να παράγει ενδογενώς αδιπικό οξύ. Εντούτοις, στο βακτήριο *Thermobifida fusca* έχει εντοπιστεί το μονοπάτι αντίστροφης οδού αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος (RADP), το οποίο παρουσιάζει σημαντικές προοπτικές ως βιοχημικό μονοπάτι. Παρόλο που ο φυσικός ξενιστής φέρει όλα τα εφόδια γενετικής για να παραχθεί το επιθυμητό δικαρβοξυλικό οξύ, υπάρχει ο κίνδυνος να παραχθούν πολύ χαμηλές ποσότητες του οξέος ή να μην είναι ανθεκτικός σε αυτό (Skoog et al., 2018). Επιπλέον, είναι συχνό φαινόμενο να απαιτείται ένα ακριβό και σύνθετο μέσο ανάπτυξης για τη καλλιέργεια του φυσικού ξενιστή (Skoog et al., 2018). Για αυτό το λόγο, πολλές ερευνητικές ομάδες δημιούργησαν από την αρχή ετερόλογα μονοπάτια παραγωγής του αδιπικού οξέος, σε γενετικά τροποποιημένα βακτήρια. Κάποιοι από τους πιο καλά χαρακτηρισμένους μικροοργανισμούς που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αδιπικού οξέος είναι το βακτήριο *Thermobifida fusca* και το βακτήριο *Escherichia coli*.

1.4.1 *Thermobifida fusca*

Το βακτήριο *Thermobifida fusca*, παλαιότερα γνωστός ως *Thermomonospora fusca*, είναι ένα αερόβιο, μερικώς θερμοφίλο, νηματώδες Gram-θετικό βακτήριο του εδάφους (Lykidis et al., 2007; Deng & Mao, 2015). Ο μικροοργανισμός χαρακτηρίζεται ως κύριος αποικοδομητής των τοιχωμάτων στα φυτικά κύτταρα, καθώς μπορεί να μεταβολίσει τα σημαντικότερα πολυμερή των κυτταρικών τοιχωμάτων (Lykidis et al., 2007). Το βακτήριο *T. fusca* παράγει σπόρια που μπορεί να προκαλέσουν αλλεργίες όπως το Farmer's lung (Van Den Bogart et al., 1993), μια πνευμονίτιδα που οφείλεται στην εισπνοή βιολογικής σκόνης.

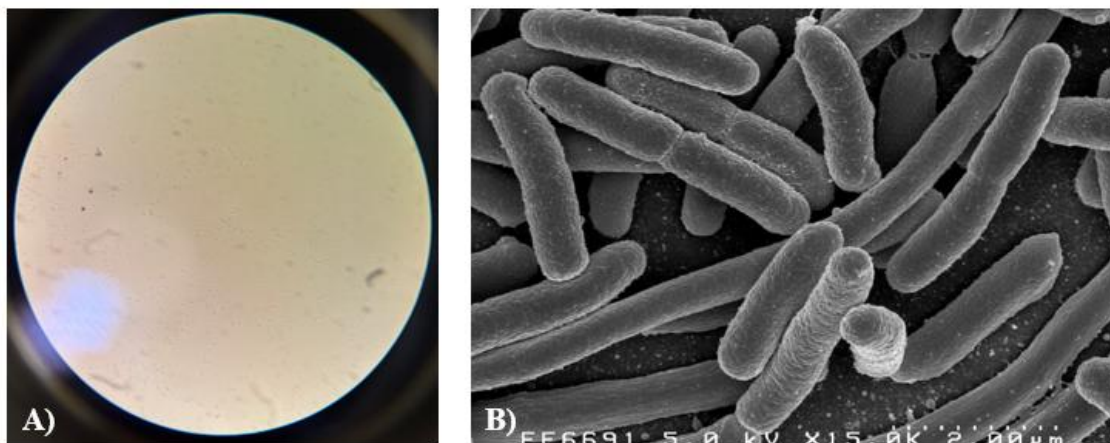
Το *T. fusca* ανήκει στο φύλο Actinobacteria και η πρώτη απομόνωση του βακτηρίου έγινε από υπολείμματα αποσυντεθημένου ξύλου (Lykidis et al., 2007). Το γονιδίωμα του απαρτίζεται από ένα μοναδικό κυκλικό μόριο DNA 3.642.249 bp, που πιθανολογείται ότι φέρει περίπου 3.117 κωδικές περιοχές εκ των οποίων γνωστή λειτουργία έχει το 68%. Από τα 830 γνωστά γονίδια μόνο τα 106 είναι μοναδικά στο *T. fusca* (Lykidis et al., 2007). Το *T. fusca* είναι το μοναδικό μικρόβιο που έχει βρεθεί να φέρει εκ φύσεως οδό για τη παραγωγή αδιπικού οξέος, αν και δε το συνθέτει ενεργά (Skoog et al., 2018; Deng & Mao, 2015).

Σε εργαστηριακές συνθήκες ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται βέλτιστα στους 50-55 °C. Το *T. fusca* σε στερεές καλλιέργειες σχηματίζει λευκές, γκρι και καφετί αποικίες με ξηρή υφή (**Εικόνα 4**). Η ανάπτυξη του είναι αρκετά αργή σε σχέση με τα ευρέως γνωστά βακτήρια, όπως το *E. coli*.



Εικόνα 4: Α) Παρατήρηση *Thermobifida fusca* 190th^T σε οπτικό μικροσκόπιο, μεγέθυνση X40. Β) Παρατήρηση αποικιών *Thermobifida fusca* 190th^T σε στερεή καλλιέργεια.

1.4.2 *Escherichia coli*



Εικόνα 5: Α) Παρατήρηση *E. coli* BL21 σε οπτικό μικροσκόπιο, μεγέθυνση X40. Β) Παρατήρηση *E. coli* από ηλεκτρονική μικροσκοπία (<https://education.nationalgeographic.org/resource/escherichia-coli-e-coli/>).

Το *Escherichia coli*, παλαιότερα γνωστό ως *Bacillus coli communis*, ανακαλύφθηκε πρώτη φορά το 1885 από τον Theodor Eschrich στο ανθρώπινο έντερο (Pontrelli et al., 2018; Dunne et al., n.d.). Το *E. coli* είναι ένα Gram-αρνητικό, με ραβδοειδές σχήμα, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο (Pontrelli et al., 2018), που συναντάται στο εντερικό μικροβίωμα του ανθρώπου (Martinson & Walk, 2020). Ο μικροοργανισμός έχει βασικό ρόλο στην αποξυγόνωση του περιβάλλοντος κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού, ώστε να ευνοείται η ανάπτυξη άλλων αναερόβιων βακτηρίων, συμμετέχει στην παραγωγή της βιταμίνης Κ στα βρέφη και έχει ρόλο στην ανθεκτικότητα του εντέρου (Martinson & Walk, 2020).

Το *Escherichia coli* αποτελεί ένα θεμελιώδη οργανισμό στους τομείς της βιολογίας. Αυτό οφείλεται στο γρήγορο ρυθμό πολλαπλασιασμού, στην εύκολη προσαρμογή του σε νέα περιβάλλοντα, στην ήδη υπάρχουσα γνώση για τη βιοχημεία και τη φυσιολογία του μικροοργανισμού και στη διαθεσιμότητα των εργαλείων που χρησιμοποιούνται για τη γενετική του τροποποίηση (Dunne et al., n.d.; Pontrelli et al., 2018). Επιπλέον, το *E. coli* αναπτύσσεται βέλτιστα στους 37 °C, και ουδέτερο pH. Υπάρχουν πάρα πολλά διαφορετικά στελέχη *E. coli* που μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά, όσον αφορά το γονιδίωμα τους. Για παράδειγμα, φέρουν ένα μοναδικό κυκλικό χρωμόσωμα αποτελούμενο από περίπου 5,5 bp και κωδικοποιούν για τουλάχιστον 4.000 πρωτεΐνες (Dunne et al., n.d.).

Κάποια από τα πιο διαδεδομένα εργαστηριακά στελέχη *E. coli* είναι το BL21 και το DH5a. Το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BL21 είναι ιδανικό για την υψηλή έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μέσω της T7 RNA πολυμεράσης, καθώς υστερεί των γονιδίων *lon* και *ompT* που κωδικοποιούν για πρωτεάσες (Meyer & R., 2012). Το βακτηριακό στέλεχος DH5a χρησιμοποιείται ευρέως για το πολλαπλασιασμό πλασμιδίων μέσα στο κύτταρο, λόγω έλλειψης των γονιδίων *recA* και *endA* που μπορεί να οδηγήσουν σε αλλοίωση της γενετικής πληροφορίας ή καταστροφή του DNA (Meyer & R., 2012). Αυτά τα βακτηριακά στελέχη θεωρούνται μη παθογόνα για το ανθρώπινο είδος, προσφέροντας το πλεονέκτημα του ασφαλούς εργαστηριακού χειρισμού (Pontrelli et al., 2018).

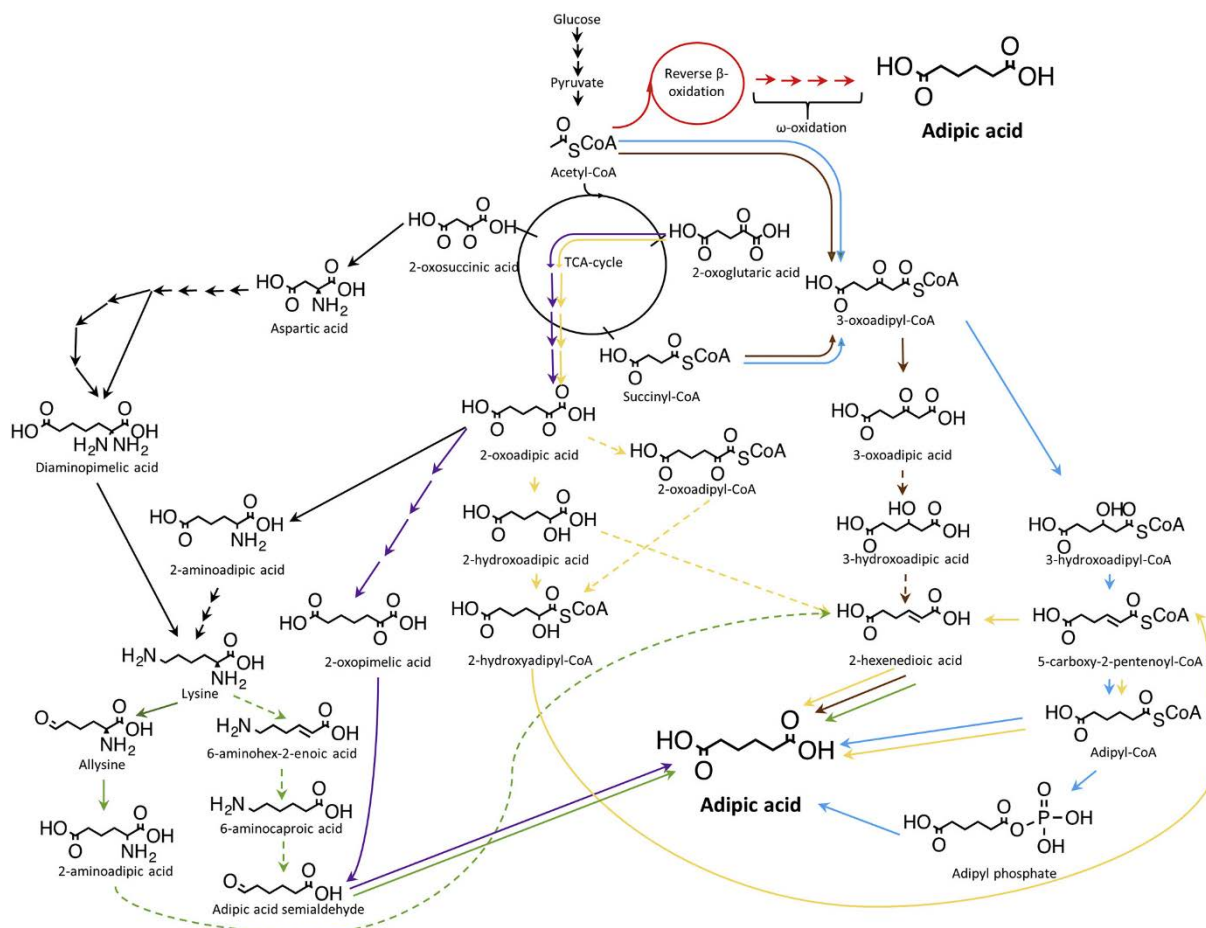
Παρ' όλα αυτά η χρήση του *E. coli* ως ξενιστή παραγωγής δεν φέρει μόνο πλεονεκτήματα. Το βακτήριο δε μπορεί να αναπτυχθεί σε ακραίες τιμές pH ή υψηλές συνθήκες αλατότητας, ενώ σε θερμοκρασία ανώτερη των 45 °C πεθαίνει.

1.4.5 Άλλοι ξενιστές παραγωγής

Σε μια ερευνητική μελέτη, επιλεγμένοι μικροοργανισμοί όπως, ζύμες, νηματώδης μύκητες και βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν για να διαπιστωθεί η ανθεκτικότητά τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αδιπικού οξέος (Karlsson et al., 2017). Οι μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν μεταξύ άλλων ήταν το *Escherichia coli*, το *Saccharomyces cerevisiae* και το *Candida viswanathii* (Karlsson et al., 2017). Οι παραπάνω μικροοργανισμοί είναι γενικότερα διαδεδομένοι ως ξενιστές παραγωγής στη βιομηχανία για διάφορες ενώσεις. Στόχος της έρευνας ήταν να αποσαφηνιστεί, ποιος από τους οργανισμούς είναι καλύτερος ξενιστής παραγωγής για το αδιπικό οξύ, με βάση την ανεκτικότητα τους σε υψηλές συγκεντρώσεις του οξέος (Karlsson et al., 2017). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το *C. viswanathii* είχε τη

μεγαλύτερη ανεκτικότητα στο αδιπικό οξύ ακόμα και σε συγκέντρωση αδιπικού οξέος 684 mM (Karlsson et al., 2017).

1.5 Βιοχημικά μονοπάτια παραγωγής αδιπικού οξέος



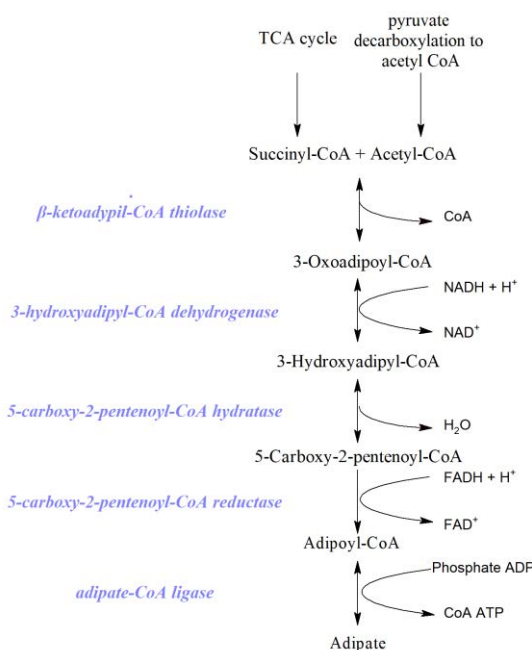
Εικόνα 6: Επισκόπηση των μεταβολικών οδών για την άμεση παραγωγή αδιπικού οξέος. Με μπλε χρώμα αναπαρίσταται η αντίστροφη οδός αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος (RADP). Με κόκκινο χρώμα αναπαρίσταται το μονοπάτι β – οξείδωσης, το αντίστροφο μονοπάτι β – οξείδωσης, και το μονοπάτι ω – οξείδωσης. Με μωβ χρώμα αναπαρίσταται το μονοπάτι του 2-οξοπιμελικού οξέος (Skoog et al., 2018).

Υπάρχουν τρία κύρια βιοχημικά μονοπάτια, για την άμεση παραγωγή αδιπικού οξέος (**Εικόνα 6**): η αντίστροφη οδός αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος (RADP), ο συνδυασμός β-οξείδωσης ή αντίστροφης β-οξείδωσης με ω-οξείδωση και η οδός του 2-οξοπιμελικού οξέος (Skoog et al., 2018).

1.5.1 Αντίστροφη οδός αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος

Τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μονοπάτι αντίστροφης αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος (RADP), είναι με σειρά δράσης (**Εικόνα 7**): η β-κετοαδίπυλο-CoA θειολάση (*Tfu_0875*), η 3-υδροξυ-αδίπυλ-CoA αφυδρογονάση (*Tfu_2399*), η 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλ-CoA

υδρατάση (*Tfu_0067*), 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλ-CoA αναγωγάση (*Tfu_1647*) και η αδιπικό-CoA λιγάση (*Tfu_2576/7*), (Zhao et al., 2018). Η παραπάνω οδός έχει εντοπιστεί ενδογενώς σε στελέχη του βακτηρίου *T. fusca* (Deng & Mao, 2015). Εντούτοις, δεν έχει παρατηρηθεί παραγωγή αδιπικού οξέος στη φύση, καθώς το κρίσιμο στάδιο που καταλύει η 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλ-CoA αναγωγάση, για παραγωγή αδιπύλο-CoA, αποτελεί παρεμποδιστικό παράγοντα (Skoog et al., 2018).



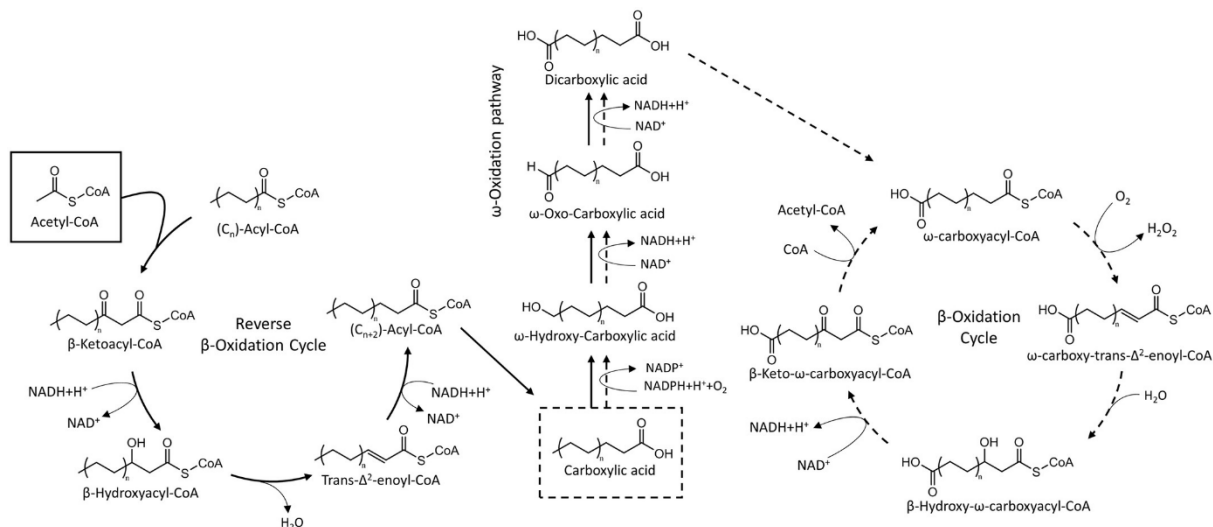
Εικόνα 7: Ένζυμα που συμμετέχουν στο αντίστροφο μονοπάτι αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος.

Διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν αξιοποιήσει το εν λόγω βιοχημικό μονοπάτι, για τη παραγωγή αδιπικού οξέος είτε σε γενετικώς τροποποιημένα κύτταρα *E. coli* (Zhao et al., 2018), είτε στο φυσικό ξενιστή *T. fusca* (Deng & Mao, 2015). Η οδός αντίστροφης αποικοδόμησης του αδιπικού (RADP), διαφαίνεται ιδιαίτερα ελπιδοφόρα καθώς η μέγιστη θεωρητική απόδοση του μονοπατίου είναι 0,92 mol αδιπικού οξέος / mol γλυκόζης (2/2003 Schilling FOREIGN PATENT DOCUMENTS, 2007).

1.5.2 Συνδυασμός β-οξειδωσης ή αντίστροφης β-οξειδωσης, με ω-οξειδωση

Η οδός β-οξειδωσης, συνιστά το κύριο βιοχημικό μονοπάτι αποικοδόμησης των λιπαρών οξέων (**Εικόνα 8**). Σε κάθε κύκλο β-οξειδωσης απελευθερώνονται δύο άτομα άνθρακα υπό τη μορφή ακετύλο-CoA. Στη συνέχεια, το βιοχημικό μονοπάτι της αντίστροφης β-οξειδωσης, οδηγεί στη μετατροπή του πρόδρομου μορίου ακετύλο-CoA, προς ένα καρβοξυλικό οξύ (Skoog et al., 2018). Το καρβοξυλικό οξύ εισέρχεται στην οδό ω-οξειδωσης, και

μετατρέπεται σε ένα δικαρβοξυλικό οξύ (Skoog et al., 2018). Το καρβοξυλικό οξύ, που εισέρχεται στο κύκλο ω-οξείδωσης για να δώσει αδιπτικό οξύ είναι το καπροϊκό οξύ ($C_6H_{12}O_2$).



Εικόνα 8: Συνδυασμός β-οξείδωσης ή αντίστροφης β-οξείδωσης, με ω-οξείδωση, προς σχηματισμό δικαρβοξυλικών οξέων.

Σε μια ερευνητική προσέγγιση, όπου ως ξενιστής παραγωγής αξιοποιήθηκε το βακτήριο *E. coli*, το ακέτυλο-CoA επιμηκύνθηκε προς καπροϊκό οξύ μέσω της οδού αντίστροφης β-οξείδωσης (Clomburg et al., 2015; Skoog et al., 2018). Μέσω ενός ανασυνδυασμένου μονοπατιού ω-οξείδωσης το καπροϊκό οξύ μετατράπηκε σε αδιπτικό οξύ (Clomburg et al., 2015; Skoog et al., 2018). Από την άλλη μεριά η εταιρία Verdezyne στηρίχτηκε στην παραγωγή αδιπτικού οξέος, μέσω του μονοπατιού β-οξείδωσης (Skoog et al., 2018). Η οξείδωση των λιπαρών οξέων, οδηγεί στην παραγωγή δικαρβοξυλικών προϊόντων τα οποία μεταβολίζονται από το μονοπάτι β-οξείδωσης. Η χρήση μιας εξειδικευμένης ισομορφής του ενζύμου άκυλο-CoA οξειδάσης, που δεν εμφανίζει συγγένεια για το αδιπτικό οξύ και καταλύει το πρώτο βήμα στο κύκλο β-οξείδωσης, επιτρέπει τη μαζική παραγωγή του εξανοδιοϊκού οξέος σε συγκέντρωση 50 g/L (Beardslee & Picataggio, 2012; Skoog et al., 2018).

1.5.3 Οδός του 2-οξοπιμελικού οξέος

Ένα καινοτόμο βιοσυνθετικό μονοπάτι για τη παραγωγή αδιπτικού οξέος, είναι η οδός του 2-οξοπιμελικού οξέος (Skoog et al., 2018). Σε σχετική ερευνητική μελέτη, επιχειρήθηκε η κατασκευή μιας ετερογενούς οδού του 2-οξοπιμελικού οξέος με σκοπό τη παραγωγή 6-αμινοκαπροϊκού οξέος, ως κύριου μεταβολικού προϊόντος (Skoog et al., 2018; Turk et al., 2016). Αρχικά, το 2-οξογλουταρικό μετατράπηκε σε 2-οξοαδιπτικό οξύ, το οποίο έπειτα επιμηκύνθηκε προς 2-οξοπιμελικό οξύ (Turk et al., 2016). Στην πορεία, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι το ανασυνδυασμένο βιοχημικό μονοπάτι, οδηγούσε απροσδόκητα σε

παραγωγή αδιπικού οξέος μέσω ενός ενδογενούς ενζύμου άγνωστης ταυτότητας (Skoog et al., 2018; Turk et al., 2016). Ο υψηλότερος ρυθμός οξείδωσης από το άγνωστο ένζυμο, σε σχέση με την ετερογενή αμινοτρανσφεράση, είχε ως αποτέλεσμα την υπεροχή της οδού προς το αδιπικό οξύ έναντι της παραγωγής 6-αμινοκαπροϊκού οξέος (Turk et al., 2016). Το συγκεκριμένο μονοπάτι απέδωσε 0,3 g/L αδιπικό οξύ, αποτελώντας μια ελκυστική και υποσχόμενη μέθοδο για τη μελλοντική βιο-παραγωγή αδιπικού οξέος.

1.6 Πρώτες ύλες για βιο-παραγωγή αδιπικού οξέος

Για την ανάπτυξη μιας βιο-οικονομίας είναι αναγκαία η αποτελεσματική παραγωγή και αξιοποίηση της βιομάζας (Skoog et al., 2018). Σημαντικό είναι η πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται σε μια βιο-οικονομία, και καταναλώνεται από τους ξενιστές παραγωγής να παράγεται με βιώσιμο τρόπο (Skoog et al., 2018). Μεταξύ άλλων για τη παραγωγή αδιπικού οξέος η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη είναι η γλυκόζη (Deng & Mao, 2015; Deng et al., 2016). Ο καταβολισμός της γλυκόζης, αποδίδει τα 2 πρόδρομα μόρια ακετύλο-CoA και ηλεκτρυλο-CoA, που χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή αδιπικού οξέος.

Σε μια μελέτη, οι ερευνητές επιδίωξαν την παραγωγή αδιπικού, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη γλυκερόλη (Zhao et al., 2018; Deng et al., 2016). Η γλυκερόλη μεταβολίζεται ενδοκυτταρικά και εισέρχεται στο μονοπάτι της γλυκόλυσης, αποδίδοντας ακετύλο-CoA και ηλεκτρυλο-CoA (Zhao et al., 2018). Σε έρευνες όπου η παραγωγή αδιπικού οξέος, στηρίζεται στο μονοπάτι β-οξείδωσης, αντίστροφης β-οξείδωσης ή ω-οξείδωσης, ως πρώτη ύλη αξιοποιούνται λιπαρά οξέα (Beardslee & Picataggio, 2012; Clomburg et al., 2015).

Όλες οι πρώτες ύλες, που έχουν αναφερθεί υπάρχουν σε αφθονία στη φύση, μπορούν εν δυνάμει να παραχθούν με βιώσιμο τρόπο, όμως είναι σημαντικό η πρώτη ύλη που θα χρησιμοποιηθεί σε μια βιο-οικονομία να αποφέρει, χαμηλό κόστος παραγωγής του προϊόντος.

2. Σκοπός

Εξαιτίας του ανυπέρβλητου προβλήματος της εκπομπής αερίων του θερμοκηπίου, τη συνεχή διόγκωση της τρύπας του όζοντος και την επερχόμενη αλλαγή του παγκόσμιου κλίματος είναι απαραίτητη η μεταβίβαση της κοινωνίας σε μια βιο-οικονομία. Η συνεχής ζήτηση για δημιουργία του πολύτιμου αδιπικού οξέος, απαιτεί τη μετάβαση σε μια παραγωγή στηριζόμενη σε πρόδρομα μόρια βιολογικής προέλευσης, ώστε να περιοριστεί η προαναφερόμενη κατάσταση. Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποσκοπεί στη παραγωγή αδιπικού οξέος από έναν ξενιστή παραγωγής, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη γλυκόζη. Παρ' όλο που οι προϋποθέσεις για τη παραγωγή του δικαρβοξυλικού οξέος, δεν πληρούν τα κριτήρια για βιομηχανική και μαζική παραγωγή, η παρούσα ερευνητική μελέτη θα μπορούσε να αποτελέσει το έναυσμα για νέες καινοτόμες πιο συμβατές προσεγγίσεις.

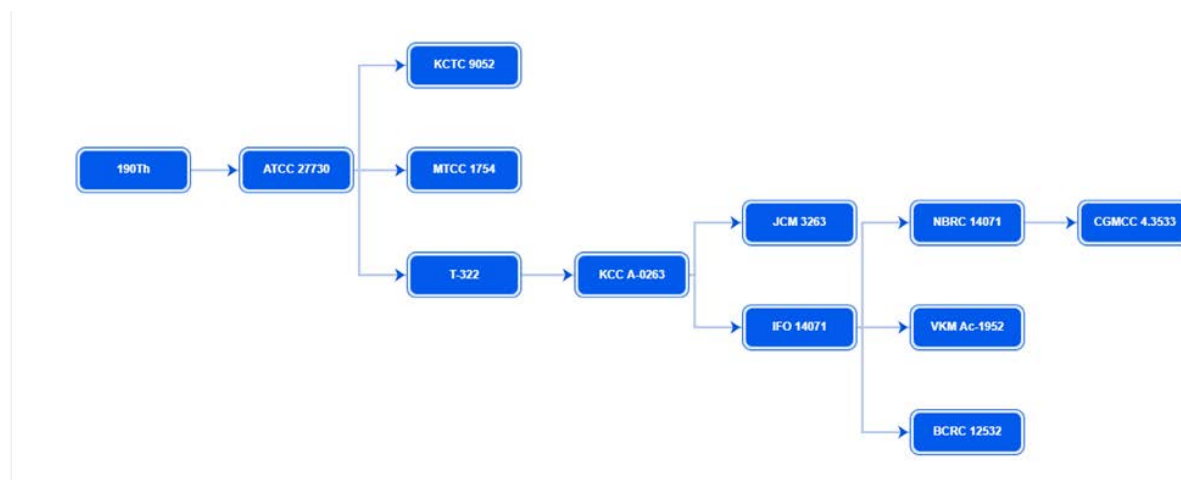
Στη παρούσα διπλωματική εργασία, ως ξενιστής παραγωγής αδιπικού οξέος χρησιμοποιήθηκε λύμα κυττάρων του *Thermobifida fusca*. Η επιλογή, αυτή στηρίχθηκε στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός περιλαμβάνει ενδογενώς ένα μονοπάτι για την παραγωγή αδιπικού οξέος, άρα η διαδικασία είναι λιγότερη δαπανηρή και χρονοβόρα. Για να προσπελαστεί ο περιορισμός του μονοπατιού από το ένζυμο της 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλ-CoA αναγωγάσης, το γονίδιο *Tfu_1647* απομονώθηκε από το *T. fusca*, και εισήχθη στο *E. coli* DH5a μέσω του πλασμιδίου *ret28a*. Το στέλεχος *E. coli* DH5a χρησιμοποιείται παγκοσμίως για το πολλαπλασιασμό πλασμιδιακών φορέων μέσα στο κύτταρο, λόγω έλλειψης της ενδονουκλεάσης I και ρεκομπινασών.

Μετά το πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού DNA, ο γενετικά τροποποιημένος φορέας εισήχθη στο στέλεχος *E. coli* BL21 για παραγωγή της πρωτεΐνης. Το στέλεχος BL21 είναι ιδανικό για την υψηλή έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, λόγω της έλλειψης πρωτεασών. Το κυτταρικό λύμα του *E. coli* BL21 ενοποιήθηκε με το κυτταρικό λύμα του *T. fusca* προς σχηματισμό αδιπικού οξέος. Η επιλογή του *E. coli* ως μέσο για γενετική τροποποίηση ήταν επιτηδευμένη, καθώς αποτελεί το πλέον κατάλληλό εργαλείο γενετικής μηχανικής.

Το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης, σε συνδυασμό με υφιστάμενες και ανερχόμενες πειραματικές προσεγγίσεις, αναμένεται να συμβάλλουν στην ανακάλυψη μιας μεθόδου μαζικής παραγωγής αδιπικού οξέος που θα μπορούσε να καλύψει τις ανάγκες της αγοράς, χωρίς να αφήνει περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Η επιλεγόμενη στρατηγική θα μπορούσε να αποτελέσει ένα καθοριστικό βήμα για την εκπόνηση καινούριων ερευνών, που θα στηρίζονται σε πιο οικονομικές και λιγότερο πολύπλοκες λύσεις.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 *Thermobifida fusca*



Εικόνα 9: Στελέχη του *Thermobifida fusca*.

Για τη πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Thermobifida fusca* 190th^T, όπου προμηθεύτηκε από την NRRL με κωδικό NRRL B-8184. Ο μικροοργανισμός συναντάται επίσης, με τους κωδικούς: ATCC 27730, DSM 43792, IFO 14071, JCM 3263, NCIB 11185, CIP 105594, HAMBI 1548, HAMBI 483, NRRL B-8184, VKM Ac-1952. Η αποθήκευση των μικροοργανισμών έγινε στους -80 °C, σε cryovial που περιείχαν ανεπτυγμένη καλλιέργεια του μικροοργανισμού και γλυκερόλη, σε αναλογία 1:2.

3.2 Συνθήκες ανάπτυξης *Thermobifida fusca* 190th^T

Η ανάπτυξη του *Thermobifida fusca* 190th^T έγινε σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο ATCC medium: 2382 Hagerdahl medium, και pH 7,4 ± 0,2. Για τον εμβολιασμό της κύριας καλλιέργειας και την επακόλουθη ανάπτυξη του μικροοργανισμού, είναι απαραίτητη η δημιουργία προ-καλλιέργειας που θα χρησιμοποιηθεί ως εμβόλιο. Συγκεκριμένα, η προκαλλιέργεια περιείχε 5 g/L γλυκόζη και η κύρια καλλιέργεια 20 g/L γλυκόζη. Η δημιουργία της κύριας καλλιέργειας, συμβάλλει στην ενίσχυση του πληθυσμού του μικροοργανισμού σε συνθήκες πραγματικής ζύμωσης ώστε να διαπιστωθεί η ταχύτητα ανάπτυξης του τελευταίου.

Τα υπόλοιπα συστατικά της προκαλλιέργειας και της κύριας καλλιέργειας ήταν: 1,5 g/L NaCl, 3,1 g/L (NH₄)₂SO₄, 9,1 g/L Na₂HPO₄, 0,9 g/L KH₂PO₄, 0,05 g/L EDTA, 0,2 g/L MgSO₄·7H₂O, 0,008 g/L ZnSO₄·7H₂O, 0,02 g/L FeSO₄·7H₂O, 0,0152 g/L MnSO₄·H₂O, 0,0264 g/L CaCl₂·2H₂O, 1 mg/L βιοτίνη, 1 mg/L θειαμίνη, 2 g/L εκχύλισμα ζύμης και 5 g/L πεπτόνη.

Η αποστείρωση των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο, στους 121 °C για 20 min. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν και αποστειρώθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές φιάλες, ώστε να αποφευχθούν οι αντιδράσεις Maillard: 1) 1,5 g/L NaCl, 3,1 g/L (NH₄)₂SO₄, 9,1 g/L Na₂HPO₄, 0,9 g/L KH₂PO₄, 2) EDTA, 0,2 g/L MgSO₄·7H₂O, 0,008 g/L ZnSO₄·7H₂O, 0,02 g/L FeSO₄·7H₂O, 0,0152 g/L MnSO₄·H₂O, 0,0264 g/L CaCl₂·2H₂O, 3) 2 g/L εκχύλισμα ζύμης και 5 g/L πεπτόνη, 4) γλυκόζη. Το διάλυμα βιταμινών δεν υποβλήθηκε σε αποστείρωση στον αυτόκαυστο, για να μην αλλοιωθούν τα μόρια. Αντιθέτως, προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό μέσω αποστειρωμένου φίλτρου. Η παρασκευή του θρεπτικού μέσου πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet).

3.2.1 Ανάπτυξη *Thermobifida fusca* 190th^T σε προ-καλλιέργεια

Η ανάπτυξη του *T. fusca* 190th^T στη προ-καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε για 24 h, μέσα στον αναδευτήρα επώασης, σε κωνικές φιάλες, υπό αποστειρωμένες συνθήκες. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 50 °C, αριθμό στροφών 180 rpm, και συνολικό όγκο καλλιέργειας 50 mL.

3.2.2 Ανάπτυξη *Thermobifida fusca* 190th^T σε κύρια καλλιέργεια

Η ανάπτυξη του *T. fusca* 190th^T στη κύρια καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε για 97 h, μέσα στον αναδευτήρα επώασης, σε κωνικές φιάλες, υπό αποστειρωμένες συνθήκες. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 50 °C, αριθμό στροφών 180 rpm, και συνολικό όγκο καλλιέργειας 50 mL. Για την εξακρίβωση της ορθότητας των αποτελεσμάτων, δημιουργήθηκαν 4 βιολογικές επαναλήψεις.

3.3 Αναλύσεις στις καλλιέργειες

Για το προσδιορισμού του ρυθμού ανάπτυξης του *T. fusca* 190th^T, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, πραγματοποιούνταν δειγματοληψία όπου συλλέγονταν 2 mL καλλιέργειας, υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet). Τα δείγματα που απομονώθηκαν, υποβλήθηκαν σε διαδοχικές αναλυτικές διαδικασίες ώστε να προσδιοριστούν, η ταχύτητα ανάπτυξης και η μεταβολική δραστηριότητα του οργανισμού.

3.3.1 Μέτρηση pH καλλιέργειας

Ο προσδιορισμός του pH, πραγματοποιήθηκε μέσω μετρητή pH (Hanna HI98100 – Checker Plus pH). Δεδομένου ότι η βέλτιστη ανάπτυξη του *T. fusca* παρατηρείται σε $\text{pH} = 7,4 \pm 0,2$, η πτώση της τιμής αυτής ήταν ενδεικτική παραγωγής καρβοξυλικών οξέων.

Η μέτρηση της τιμής pH πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet), σε διαδοχικά δείγματα καλλιέργειας 500 μL , ώστε να αποφευχθούν ανεπιθύμητες επιμολύνσεις. Η προσαρμογή του pH πραγματοποιήθηκε με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος 2 mM NaOH και διαλύματος 1 mM HCl.

3.3.2 Οπτική πυκνότητα, μικροσκοπική παρατήρηση σε πλάκα Neubauer, μέτρηση ξηρού βάρους

Η θολερότητα των δειγμάτων προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 660 nm. Η συσκευή που αξιοποιήθηκε για τη μέτρηση της θολερότητας στις καλλιέργειες ήταν το Φασματοφωτόμετρο Ορατού Φάσματος 721G.

Πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση ποσότητας 10-20 μL κάθε δείγματος σε πλάκα Neubauer (Reichert Bright-Line™ Hemocytometer, Neubauer Improved, Buffalo, NY, USA) για τη καταμέτρηση των pellets. Ειδικότερα, τα δείγματα που συλλέχθηκαν στο τέλος της ζύμωσης, εξετάστηκαν σε microplate 6 θέσεων, προκειμένου να εκτιμηθεί ο πληθυσμός των pellets που ήταν επαρκώς μεγάλα ώστε να καταμετρηθούν μικροσκοπικά.

Ακολούθησε προσδιορισμός του ξηρού βάρους της παραγόμενης βιομάζας, χρησιμοποιώντας 1.500 μL από κάθε δείγμα. Τα δείγματα υποβάλλονταν σε στροφές 12.000 rpm, για 5 min, σε θερμοκρασία δωματίου.

Για να υπολογιστεί ο ρυθμός κατανάλωσης των θρεπτικών συστατικών από μέσο καλλιέργειας, το υπερκείμενο των δειγμάτων μετά από κάθε φυγοκέντρηση συλλέγονταν και αποθηκευόταν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για περαιτέρω αναλύσεις.

3.3.3 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων (DNS)

Για το προσδιορισμό των αναγωγικών σακχάρων εφαρμόστηκε η χρωματομετρική μέθοδος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (3,5-Dinitrosalicylic Acid Assay / DNS). Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος από τις ελεύθερες αλδεϋδικές ή κετονικές ομάδες των σακχάρων, με αποτέλεσμα την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος που

απορροφά σε μήκος κύματος 540 nm (Detns et al., n.d.). Το υπερκείμενο κάθε δείγματος αραιώθηκε με dH₂O σε αναλογία 1:20, και η συγκέντρωση υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης $2,125 \cdot x - 0,0157$, που προκύπτει από πρότυπη καμπύλη με τη γλυκόζη ως πρότυπη ουσία σε συγκεντρώσεις 0,1 g/L, 0,5 g/L, 0,75 g/L, 1 g/L, 2 g/L. Η συσκευή που αξιοποιήθηκε για τη μέτρηση της μεταβολής του χρώματος ήταν το Φασματοφωτόμετρο Ορατού Φάσματος 721G.

3.3.4 Προσδιορισμός ελεύθερου ανόργανου φωσφόρου

Για τη ποσοτικοποίηση του ελεύθερου ανόργανου φωσφόρου, εφαρμόστηκε χρωματομετρική μέθοδος. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην αλληλεπίδραση του φωσφόρου με μολυβδενικό αμμώνιο, προς σχηματισμό ενός μπλε συμπλόκου που απορροφά σε μήκος κύματος 730 nm (Harland & Hraland, 1980). Το υπερκείμενο κάθε δείγματος αραιώθηκε με dH₂O σε αναλογία 1:500 και η συγκέντρωση υπολογίστηκε βάση της εξίσωσης $7,5993 \cdot x - 0,1205$, που προκύπτει από πρότυπη καμπύλη με το K₂HPO₄ ως πρότυπη ουσία σε συγκεντρώσεις 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2,5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L.

3.3.5 Προσδιορισμός ελεύθερων αμινομάδων

Για το προσδιορισμό των ελεύθερων αμινομάδων εφαρμόστηκε η χρωματομετρική μέθοδος Free Amino Nitrogen (FAN). Οι ελεύθερες αμινομάδες αλληλεπιδρούν με χημικό αντιδραστήριο που φέρει νινυδρίνη, προς σχηματισμό ενός μωβ συμπλόκου που απορροφά σε μήκος κύματος 570 nm (Lie, 1973). Το υπερκείμενο κάθε δείγματος αραιώθηκε με dH₂O σε αναλογία 1:200 και η συγκέντρωση υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση $4,909 \cdot x - 0,0719$, που προκύπτει από πρότυπη καμπύλη με τη γλυκίνη ως πρότυπη ουσία σε συγκεντρώσεις 0,2 mg/L FAN, 0,5 mg/L FAN, 1 mg/L FAN, 1,5 mg/L FAN, 2 mg/L FAN.

3.4 Μοριακές τεχνικές

3.4.1 Απομόνωση γονιδίου *Tfu_1647*

Το περιοριστικό βήμα στο μονοπάτι αντίστροφης αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος (RADP) είναι η αντίδραση που καταλύει το ένζυμο 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλο-CoA αναγωγάση (1.3.99.-), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *Tfu_1647*. Η απομόνωση της αλληλουχίας του γονιδίου πραγματοποιήθηκε από το ίδιο το γονιδίωμα του *T. fusca* 190th^T.

3.4.1.1 Εξαγωγή γενετικού υλικού από βακτηριακό στέλεχος *T. fusca* 190th^T

Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης του *T. fusca* 190th^T, είχε επέλθει η μέγιστη αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού. Η παραχθείσα βιομάζα, από τις 4 βιολογικές επαναλήψεις, υποβλήθηκε σε 3 διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (4.000 rpm, 12 min, 4 °C). Μετά από κάθε φυγοκέντρωση το υπερκείμενο απορρίπτονταν και τα κύτταρα *T. fusca* 190th^T, επαναδιαλύονταν σε 5 mL και 1 mL διαλύματος NaCl 150 mM, αντίστοιχα. Το τελικό ίζημα των κυττάρων διαλύθηκε σε 500μL Trizol, για να επιτευχθεί ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών. Ακολούθησε φυγοκέντρωση (12.000 rpm, 12 min, 4 °C), και συλλογή του υπερκείμενου. Μετά από 5 min επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 100 μL χλωροφόρμιο, και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε εκ νέου για συλλογή του υπερκείμενου (12.000 rpm, 5 min, 4 °C).

Ο καθαρισμός του DNA πραγματοποιήθηκε με διαδοχικές πλύσεις σε διάλυμα ισοπροπανόλης και διάλυμα αιθανόλης 75%. Στο τέλος, το DNA αναραιώθηκε σε 50μL ddH₂O. Η ποσοτικοποίηση του DNA πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά (Quawell Q3000 UV-Vis Micro-Volume Spectrophotometer). Το γενετικό υλικό διατηρήθηκε σε θερμοκρασία -20 °C, για να προστατευτεί από τυχόν αλλοιώσεις.

3.4.1.2 Σχεδιασμός εκκινήτων

Ο σχεδιασμός των εκκινήτων για την ενίσχυση και απομόνωση του γονιδίου βασίστηκε, στην αρχειοθετημένη αλληλουχία της βάσης δεδομένων NCBI: [Thermobifida fusca NBRC 14071 = JCM 3263 strain NBRC 14071, whole geno - Nucleotide - NCBI](#). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία παραιτηθείτε παρακάτω υπό μορφή FASTA:

```
5'ATGAGTGACTTCGACCTCTACCGGCCCCACCGAGGAGCACGAAGCCCTCCGCGAAGCCATCCGCTCCGTCGCT
GAAGACAAGATCGCCCCGCACGCGGCCGACGTCGACGAGCAGTCCCCTCCGCGAGGAGGCCATCGAGGCGC
TGCGCGCCAGCGACTTCCACGCTCCCCACGTCGCGGAGGAGTACGGCGGTGTTGGCGCAGACGCGCTGGCGAC
CTGCATCGTCATTGAGGAGATCGCCCCGGGTGTGCGCCTCCTCTTCCCTCATCCCCGCGGTCAACAAGCTCGGCTC
GATGCCGCTGATCCTCTCCGGATCTGACGAGGTGAAGCAGCGCTACCTGCCCGAAGTGGCATCTGGCGAGGCGA
TGTTCTCTTACGGGCTCTCCGAGCGCGAGGCGGGATCCGACACCGCGAGCATGCGCACCCGTGCCGTCCGCGAC
GGCGACGACTGGATCCTCAACGGCCAGAAGTCGTGGATCACGAACGCCGGAATCTCCAAGTACTACACGGTGTAT
GGCGGTACCCGACCCGACGGGCCGCGCGGACGCAACATCAGCGCTTTCGTCTGTCACATCGACGATCCCGGG
TTCTCTTTTGAGAAACCGGAACGCAAGCTCGGCATCAAAGGTTGCCCCACGCGCGAACTGATCTTCGACAATGT
CCGTATCCCCGGCGACCGCCTGGTGGGCAAGGTCGGGGAAGGACTGCGTACCGCGCTGCGCACCCCTCGACCAC
ACCCGCGTCACCATTTGGCGCCCAGGCTGTGGGCATCGCCAGGGGGCGCTCGACTACGCCCTGGGCTATGTCAA
GGAGCGCAAGCAGTTCGGCAAGGCCATCGCCGACTTCCAAGGCATCCAGTTCATGCTCGCCGACATGGCCATGA
AGCTGGAAGCGGCCCGCCAGATGGTTTACGTCGCTGCCGCCAAGTCCGAGCGCGACGACGCCGACCTCTCCTTC
TACGGTGCCGCGCTAAATGCTTCGCCTCGGATGTGGCAATGGAGATCACCCTGACGCGGTGCAACTACTCGG
CGGCTACGGCTACACCCGGGACTACCCGGTTCGAGCGGATGATGCGCGACGCCAAGATCACCCAGATCTACGAGG
GCACCAACCAGATCCAGCGGGTGGTCATGGCCCCGGCAGCTCTTGAAGAAGTGA3'
```

Οι μαρκαρισμένες περιοχές αναπαριστούν κατά σειρά τα σημεία υβριδισμού του πρόσθιου και ανάστροφου εκκινήτη, αντίστοιχα.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών στηρίχθηκε σε τρία βασικά κριτήρια (*Πίνακας 1*). Πρωτίστως, η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m) ήταν προσεγγιστικά 62-65 °C. Όσο υψηλότερο είναι το T_m , τόσο πιο ισχυρή είναι η σύνδεση του εκκινητή με το συμπληρωματικό DNA. Οι εκκινητές που προέκυψαν δεν υβριδίζουν σε άλλο σημείο (BLAST) στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού και δε σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους ή με τον εαυτό τους (OligoAnalyzer™: Primer analysis tool). Εκατέρωθεν της αλληλουχίας κάθε εκκινητή ενσωματώθηκε μια αλληλουχία αναγνώρισης από ένζυμο περιορισμού, και ορισμένα νουκλεοτίδια που χρησιμεύουν ως σημεία πρόσδεσης για την DNA πολυμεράση.

Πίνακας 1: Στον πίνακα φαίνονται τα χαρακτηριστικά του πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή αντίστοιχα. Οι νουκλεοτιδικές περιοχές που είναι μαρκαρισμένες με μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στα επιπλέον νουκλεοτίδια που αγκυροβολεί η DNA-πολυμεράση. Οι νουκλεοτιδικές περιοχές που είναι μαρκαρισμένες με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στις περιοχές αγγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων. Οι νουκλεοτιδικές περιοχές που είναι μαρκαρισμένες με πράσινο χρώμα αντιστοιχούν στα σημεία υβριδισμού με το υπόστρωμα DNA. Ο πρόσθιος εκκινητής αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιορισμού SacI-HF και ο ανάστροφος εκκινητής από το ένζυμο περιορισμού Hind-III.

	Νουκλεοτιδική αλληλουχία (5'→3')	T_m (°C)	Ένζυμο περιορισμού
Πρόσθιος εκκινητής (Forward primer)	CCTTCCGAGCTCATGAGTGACTTCGACC TCTACC	62	SacI-HF
Ανάστροφος εκκινητής (Reverse primer)	CCTTCCAAGCTTTCACCTTCTCAAGAGC TGCC	65	HindIII

3.4.1.3 Ενίσχυση και απομόνωση του γονιδίου *Tfu_1647* μέσω PCR

Η απομόνωση και η επακόλουθη ενίσχυση του γονιδίου *Tfu_1647*, πραγματοποιήθηκαν μέσω Αντίδρασης Αλυσιδωτής Πολυμεράσης (PCR). Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε στο MiniAmp™ Plus Thermal Cycler, με τη χρήση του διαλύματος Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs). Το διάλυμα περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την εκτέλεση της αντίδρασης PCR, συμπεριλαμβανομένων των NTPs, του buffer, των ιόντων Mg^{2+} , καθώς και το ένζυμο Q5 DNA πολυμεράση, το οποίο διακρίνεται για την υψηλή πιστότητά του (*Πίνακας 2*).

Πίνακας 2: Οι αναλογίες των συστατικών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Συστατικά	25 (μL) RXN	50 (μL) RXN	Τελική Συγκέντρωση
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	1,25 (μL)	2,5 (μL)	0,5 (μM)

Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	1,25 (μL)	2,5 (μL)	0,5 (μM)
Υπόστρωμα DNA	-	-	<1.000 ng
Q5-Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	12,5 (μL)	25 (μL)	1 X
ddH ₂ O	έως 25 (μL)	έως 50 (μL)	

Η αντίδραση διήρκησε συνολικά 35 κύκλους. Πριν την έναρξη των κύκλων της αντίδρασης ξεκίνησε η αρχική αποδιάταξη (Initial Denaturation) στους 98 °C για 30 sec. Κάθε κύκλος της αντίδρασης PCR περιλάμβανε τα εξής στάδια: αποδιάταξη (Denaturation) στους 98 °C για 10 sec, υβριδοποίηση (Annealing) στους 65 °C για 30 sec και επιμήκυνση (Extension) στους 72 °C για 30 sec. Με το τέλος των κύκλων αντιγραφής ακολούθησε η τελική επιμήκυνση (Final Extension) στους 72 °C για 2 min και τέλος αποθήκευση στους 4 °C.

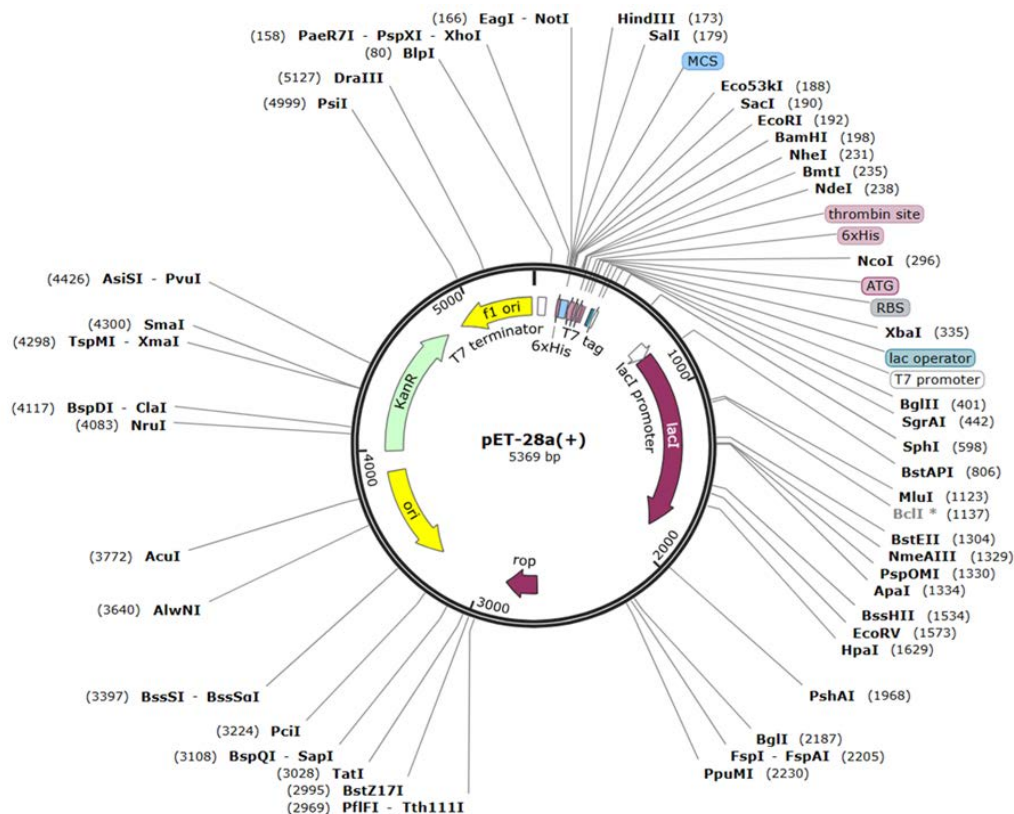
3.4.1.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς απομόνωσης και ενίσχυσης του γονιδίου *Tfu_1647* μέσω της αντίδρασης PCR, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης. Δεδομένου, ότι το γονίδιο *Tfu_1647* έχει συνολικό μήκος 1.158 bp, τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε πηκτή όγκου 50 mL με περιεκτικότητα αгарόζης 0,5%. Στο διάλυμα προστέθηκαν 5μL SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), για την οπτική ανίχνευση των ζωνών DNA. Στο τζελ έτρεξαν 15 μL από το κάθε δείγμα, που είχαν αναμιχθεί πρωτύτερα με BlueJuice™ Gel Loading Buffer, σε αναλογία 1:10. Ως μοριακή κλίμακα αναφοράς για τη σύγκριση και την ταυτοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε για 30 λεπτά υπό τάση +90 V, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GelAnalyzer 23.1.

3.4.2 Εισαγωγή γονιδίου *Tfu_1647* στον πλασμιδιακό φορέα *pet28a*

Ως φορέας κλωνοποίησης για τη έκφραση του γονιδίου *Tfu_1647*, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο *pet28a*. Το πλασμίδιο *pet28a* (**Εικόνα 10**) αποτελεί ένα από τους πιο διαδεδομένους φορείς, για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (Shilling et al., 2020). Δύο από τα κύρια προτερήματα που προσφέρει το πλασμίδιο, είναι η παρουσία του T7 υποκινητή, που επιτρέπει την υψηλή έκφραση πρωτεϊνών μέσω της T7 RNA πολυμεράση και δεύτερον η ύπαρξη ενός γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη, (Shilling et al., 2020).

Επιπλέον, ο υποκινητής T7 επιτρέπει την ελεγχόμενη έκφραση του ανασυνδυασμένου γονιδίου μετά τη προσθήκη ισοπροπυλικής β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδης (IPTG).



Εικόνα 10: Γενετικός χάρτης πλασμιδιακού φορέα pet28a

3.4.2.1 Καθαρισμός γονιδίου *Tfu_1647*

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης DNA, η φθορίζουσα ζώνη που αντιστοιχούσε στο ενισχυμένο τμήμα του γονιδίου *Tfu_1647* αποκόπηκε από τη πηκτή. Το τμήμα της πηκτής που περιείχε το γονίδιο στόχο τοποθετήθηκε σε Eppendorf (2 mL), για να ακολουθήσει μέτρηση του βάρους του στο ζυγό. Το δείγμα καθαρίστηκε με το PureLink™ Quick Gel Extraction Kit. Η ποσοτικοποίηση του γονιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά (Quawell Q3000 UV-Vis Micro-Volume Spectrophotometer).

3.4.2.2 Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδίου pet28a

Το πλασμίδιο pet28a απομονώθηκε από βακτηριακές αποικίες *E. coli* DH5a σε στερεή καλλιέργεια, που περιείχαν το κυκλικό μόριο DNA. Οι αποικίες ανακαλλιιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB medium 20 mL (10g/L πεπτόνη, 5g/L εκχύλισμα ζύμης, 5g/L NaCl), εμπλουτισμένο με 50 mg/L καναμυκίνη. Η αποστείρωση του θρεπτικού μέσου, πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο, στους 121 °C για 20 min. Το αντιβιοτικό καναμυκίνη δεν υποβλήθηκε σε αποστείρωση στον αυτόκαυστο, για να μην αλλοιωθεί. Αντιθέτως, προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό μέσω αποστειρωμένου φίλτρου. Η παρασκευή του θρεπτικού μέσου και ο

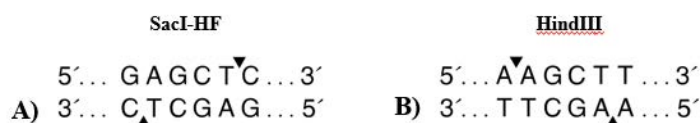
εμβολιασμός της καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet). Δημιουργήθηκαν 4 βιολογικές επαναλήψεις.

Η ανάπτυξη του στελέχους *E. coli* DH5a πραγματοποιήθηκε για 16 h, μέσα στον αναδευτήρα επώασης, σε κωνικές φιάλες, υπό αποστειρωμένες συνθήκες. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C και αριθμό στροφών 180 rpm. Μετά το πέρας των 16 h ακολούθησε η εξαγωγή του πλασμιδίου pet28a, μέσω του Isolate II Plasmid Mini Kit BIOLINE. Η ποσοτικοποίηση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά (Quawell Q3000 UV-Vis Micro-Volume Spectrophotometer).

3.4.2.3 Πέψη πλασμιδίου pet28a και γονιδίου *Tfu_1647* με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τη πέψη του πλασμιδίου pet28a και του ενισχυμένου γονιδίου *Tfu_1647*, ήταν κατά σειρά το SacI-HF® (New England, Biolabs) και το HindIII (New England Biolabs). Το περιοριστικό ένζυμο SacI-HF αναγνωρίζει μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων στον πρόσθιο εκκινητή (**Εικόνα 11**), ενώ διασπά το πλασμίδιο pet28a στη θέση 190 bp (**Εικόνα 10**). Το ένζυμο εμφανίζει μέγιστη δραστικότητα στο ρυθμιστικό διάλυμα rCutSmart (New England Biolabs) και μπορεί να δράσει για 5-15 min στους 37 °C. Το ένζυμο απενεργοποιείται σε θερμοκρασία 65 °C για 20 min.

Το ένζυμο περιορισμού Hind-III αναγνωρίζει μια αλληλουχία στον ανάστροφο εκκινητή (**Εικόνα 11**), ενώ διασπά το πλασμίδιο pet28a στη θέση 173 bp (**Εικόνα 10**). Το ένζυμο εμφανίζει μέγιστη δραστικότητα στο ρυθμιστικό διάλυμα r2.1 (New England Biolabs) και μπορεί να δράσει για 60 min στους 37 °C. Το ένζυμο απενεργοποιείται σε θερμοκρασία 80 °C, για 20 min.



Εικόνα 11: A) DNA αλληλουχία αναγνώρισης από ένζυμο περιορισμού SacI-HF. B) Αλληλουχία αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού HindIII.

Για να ολοκληρωθεί η πέψη του πλασμιδίου pet28a και το γονιδίου *Tfu_1647* με τα ένζυμα περιορισμού, σχεδιάστηκε ένα πρωτόκολλο που ευνοούσε τη ταυτόχρονη λειτουργία και των δύο ενζύμων. Η πέψη των δύο υποστρωμάτων DNA, πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37 °C για 60 min, ενώ η απενεργοποίηση των ενζύμων έλαβε χώρα στους 80 °C για 20 min. Τα ένζυμα SacI-HF και HindIII επώαστηκαν, εξίσου στο ρυθμιστικό διάλυμα rCutSmart (New England Biolabs), (**Πίνακας 3**). Η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε σε

τελικό όγκο 50 μL . Η εναλλαγή της θερμοκρασίας, για την επώαση και την απενεργοποίηση των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή (MiniAmp™ Plus Thermal Cycler).

Πίνακας 3: Οι αναλογίες των συστατικών αντίδρασης ενζύμων περιορισμού.

Συστατικά	Προτεινόμενες ποσότητες	Πειραματικός Σχεδιασμός
DNA	1 (μg)	20 ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
10X NE buffer	5 (μL)	rCutSmart
Ένζυμα περιορισμού	2 (μL)	2 (μL) HindIII + 1 (μL) SacI-HF
ddH₂O	έως 50 (μL)	έως 50 (μL)

3.4.2.4 Αντίδραση T4-DNA λιγάσης

Τα δείγματα του πλασμιδίου pet28a και του γονιδίου *Tfu_1647* που υπέστησαν πέψη με τα ένζυμα περιορισμού SacI-HF και HindIII, υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε αντίδραση σύνδεσης για να ενωθούν τα μονόκλωνα άκρα τους. Το ένζυμο που πραγματοποίησε τη κατάλυση της αντίδρασης ήταν η T4 DNA λιγάση (New England Biolabs), (**Πίνακας 4**). Η αντίδραση έλαβε χώρα όλη νύχτα σε θερμοκρασία 16 °C και το ένζυμο T4 DNA λιγάση απενεργοποιήθηκε με επώαση για 10 min στους 65 °C, μέσω θερμικού κυκλοποιητή (MiniAmp™ Plus Thermal Cycler).

Πίνακας 4: Αναλογίες των συστατικών αντίδρασης σύνδεσης, από τη T4 DNA λιγάση.

Συστατικά	Ποσότητες
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10X)	2 μL
Φορέας DNA (4kb)	50 ng (0,020 pmol)
Ένθεμα DNA (1kb)	37,5 ng (0,060 pmol)
ddH₂O	to 50 (μL)
T4 DNA Λιγάση	1 (μL)
Τελικός Όγκος	50 (μL)

3.4.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a, με γενετικά τροποποιημένο πλασμίδιο pet28a

Το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* DH5a είναι κατάλληλο για το πολλαπλασιασμό του γενετικά τροποποιημένου πλασμιδίου pet28a, λόγω έλλειψης των γονιδίων *recA1* και *endA1* (Meyer & R., 2012).

3.4.3.1 Καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* DH5a

Βακτήρια *E. coli* DH5a από cryovial εμβολιάστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB medium 50 mL (10g/L πεπτόνη, 5g/L εκχύλισμα ζύμης, 5g/L NaCl), υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet), (Κεφάλαιο 3.4.2.2). Η αποστείρωση του θρεπτικού μέσου, πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο, στους 121 °C για 20 min. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε επωαστήρα ανάδευσης στους 37 °C, σε στροφές 180 rpm, υπό αποστειρωμένες συνθήκες για 16 h,

3.4.3.2 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a

Μετά το πέρας 16 h, ποσότητα 1 mL βακτηριακής καλλιέργειας *E. coli* DH5a εμβολιάστηκε σε 100 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB (10 g/L πεπτόνη, 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 5 g/L NaCl), σε κωνική φιάλη με baffles (250 mL). Η ανάπτυξη διεκόπη, όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας έφτασε $A = 0,375-0,400$, με μέτρηση σε μήκος κύματος 660 nm. Έπειτα, 50 mL της καλλιέργειας τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια φυγοκέντρωσης (50 mL), υπό αποστειρωμένες συνθήκες, και φυγοκεντρήθηκαν για 7 min, σε στροφές 3.000 rpm και θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 10 mL ψυχρού διαλύματος CaCl_2 . Ακολούθησε, δεύτερη φυγοκέντρωση (5 min, 2.500 rpm, 4 °C), απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 10 mL ψυχρού διαλύματος CaCl_2 . Τα βακτηριακά κύτταρα επώαστηκαν στο πάγο για 30 min. Στη τελευταία, φυγοκέντρωση (5 min, 2.500 rpm, 4 °C) το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα αιωρήθηκαν σε 2 mL ψυχρού διαλύματος CaCl_2 . Η παραπάνω διαδικασία, πλην των φυγοκεντρήσεων πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet).

3.4.3.3 Εισαγωγή γενετικά τροποποιημένου πλασμιδίου *pet28a* σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a

Ποσότητα 50μL δεκτικών κυττάρων (competent cells) *E. coli* DH5a τοποθετήθηκαν σε erppendorf (2 mL) και αναμείχθηκαν με 1-10 ng του γενετικά τροποποιημένου πλασμιδίου. Δημιουργήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις του πειράματος, όσες και οι αντιδράσεις σύνδεσης. Το μείγμα επώαστηκε σε πάγο για χρονικό διάστημα 10 min, και στη συνέχεια τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ (2 min, 42 °C). Το μείγμα επανατοποθετήθηκε σε πάγο για 2 min, και στη συνέχεια προστέθηκαν 950 μL προ-θερμασμένου θρεπτικού μέσου LB (10 g/L πεπτόνη, 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 5 g/L NaCl). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 1 h, σε θερμοκρασία 37 °C. Κατόπιν, ακολούθησε φυγοκέντρωση (1 min, 12.000 g) και το κυτταρικό ίζημα συλλέχθηκε ώστε να γίνει επίστρωση σε τριβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB, εμπλουτισμένο με 50 mg/L

καναμυκίνη, υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τριβλία επωάστηκαν για 12 h στους 37 °C. Η παραπάνω διαδικασία, πλην των επώσεων στους 37 °C πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet).

3.4.3.4 Απομόνωση ενισχυμένου πληθυσμού γενετικά τροποποιημένων πλασμιδίων *pet28a*, από *E. coli* DH5a

Μετά από 12 h τα τριβλία κάθε βιολογικής επανάληψης, επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να καθυστερήσει η ανάπτυξη νέων αποικιών. Στη συνέχεια, επιλεγμένες αποικίες ενοφθαλμίστηκαν, σε 20 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB (10 g/L πεπτόνη, 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 5 g/L NaCl), εμπλουτισμένο με 50 mg/L καναμυκίνη σε ασηπτικές συνθήκες (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet). Ο μικροοργανισμός επωάστηκε σε αναδευτήρα επώσεως στους 37 °C, σε στροφές 180 rpm, για χρονικό διάστημα 16 h. Κατόπιν, το γενετικά τροποποιημένο πλασμίδιο *pet28a* απομονώθηκε από τα *E. coli* DH5a κύτταρα, μέσω του Isolate II Plasmid Mini Kit BIOLINE. Η ποσοτικοποίηση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά (Quawell Q3000 UV-Vis Micro-Volume Spectrophotometer).

3.4.3.5 Ταυτοποίηση επιτυχίας γενετικής τροποποίησης πλασμιδίου *pet28a*



Εικόνα 12: DNA αλληλουχία αναγνώρισης από ένζυμο περιορισμού NdeI.

Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα του ανασυνδυασμένου φορέα *pet28a* υποβλήθηκαν σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο NdeI (New England Biolabs), προκειμένου τα μόρια να γίνουν γραμμικά. Το περιοριστικό ένζυμο NdeI, αναγνωρίζει μια παλίνδρομη αλληλουχία DNA, στο πλασμίδιο *pet28a* (**Εικόνα 12**) και κόβει το φορέα στη θέση 238 bp (**Εικόνα 10**). Σημαντικό πλεονέκτημα, του ενζύμου είναι ότι δεν αναγνωρίζει αλληλουχίες μέσα στη περιοχή του γονιδίου *Tfu_1647*. Η πέψη πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο αντίδρασης 50 µL (**Πίνακας 5**), στους 37 °C για χρονικό διάστημα 1 h. Η απενεργοποίηση του ενζύμου έλαβε χώρα σε θερμοκρασία 65 °C, για 20 min. Η εναλλαγή στη θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή (MiniAmp™ Plus Thermal Cycler).

Τα γραμμικά δείγματα πλασμιδιακού DNA, διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση DNA για να εξακριβωθεί η επιτυχία της ένθεσης. Δεδομένου, ότι το συνολικό μήκος του πλασμιδιακού φορέα *pet28a* είναι 5.369 bp και αντίστοιχα, το συνολικό μήκος του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα *pet28a* είναι 6.887 bp η πηκτή είχε περιεκτικότητα

αγαρόζης 1% και συνολικό όγκο 50 mL. Στο διάλυμα προστέθηκαν 5 µL SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), για την οπτική ανίχνευση των ζωνών DNA. Από κάθε δείγμα φορτώθηκαν 15 µL, που είχαν αναμιχθεί με BlueJuice™ Gel Loading Buffer, σε αναλογία 1:10. Ως μοριακή κλίμακα αναφοράς για τη σύγκριση και την ταυτοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), και ένα μη τροποποιημένο πλασμίδιο *pet28a*. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε για 30 λεπτά, υπό τάση +90 V, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό GelAnalyzer 23.1.

Πίνακας 5: Αναλογίες των συστατικών αντίδρασης, του ενζύμου περιορισμού NdeI.

Συστατικά	Ποσότητες
DNA	1 (µg)
10X NE buffer	5 (µL)
Ένζυμο περιορισμού NdeI	1 (µL)
ddH ₂ O	to 50 (µL)

Επιπλέον, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 3.4.1.3**. Σκοπός, ήταν να διασταυρωθεί περαιτέρω η επιτυχία ένθεσης του γονιδίου στόχου. Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα προϊόντα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης (1%), για 30 min, υπό τάση +90 V και ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Ως μοριακή κλίμακα αναφοράς για τη σύγκριση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), και η ενισχυμένη αλληλουχία του γονιδίου *Tfu_1647*. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GelAnalyzer 23.1.

3.5 Εισαγωγή γενετικά τροποποιημένου πλασμιδίου *pet28a* σε βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BL21

Οι επιτυχημένες επαναλήψεις των γενετικά τροποποιημένων πλασμιδίων, που ενσωμάτωσαν το γονίδιο *Tfu_1647*, εισήχθησαν στο βακτηριακό φορέα έκφρασης *E. coli* BL21. Το συγκεκριμένο στέλεχος αποτελεί ιδανικό μέσο έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, καθώς υστερεί των γονιδίων *lon* και *ompT* και επιτυγχάνει την παραγωγή υψηλών τάξεων της πρωτεΐνης στόχου μέσω της T7 RNA πολυμεράσης (Meyer & R., 2012).

3.5.1 Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων *E. coli* BL21

Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21 από cryovial εμβολιάστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB medium 50 mL (10g/L πεπτόνη, 5g/L εκχύλισμα ζύμης, 5g/L NaCl), υπό αποστειρωμένες συνθήκες (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet). Η αποστείρωση του θρεπτικού μέσου, πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο, στους 121°C για 20 min. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C, σε στροφές 180 rpm, για χρονικό διάστημα 16 ωρών.

3.5.2 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων (competent cells) *E. coli* BL21

Για τη δημιουργία δεκτικών κυττάρων (competent cells) *E. coli* BL21, εκτελέστηκε το πειραματικό πρωτόκολλο που περιγράφηκε στο **Κεφάλαιο 3.4.3.2**.

3.5.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων (competent cells) *E. coli* BL21

Για την εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pet28a σε δεκτικά κύτταρα (competent cells) *E. coli* BL21, εφαρμόστηκε ο πειραματικός σχεδιασμός που αναλύθηκε στη **Κεφάλαιο 3.4.3.3**.

3.5.4 Απομόνωση γενετικά τροποποιημένου πλασμιδίου pet28a από κύτταρα *E. coli* BL21

Μετά από 12 h τα τριβλία επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να καθυστερήσει η ανάπτυξη νέων αποικιών. Στη συνέχεια, οι αποικίες που αναπτύχθηκαν ενοφθαλμίστηκαν σε 50 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB (10g/L πεπτόνη, 5g/L εκχύλισμα ζύμης, 5g/L NaCl), εμπλουτισμένο με 50 mg/L καναμυκίνη σε ασηπτικές συνθήκες (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet). Ο μικροοργανισμός επώαστηκε σε αναδευτήρα επώασης, στους 37 °C, σε στροφές 180 rpm, για χρονικό διάστημα 16 h. Κατόπιν, το γενετικά τροποποιημένο πλασμίδιο pet28a απομονώθηκε από τα κύτταρα *E. coli* BL21 κύτταρα, μέσω του Isolate II Plasmid Mini Kit BIOLINE. Δημιουργήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις.

3.5.5 Ηλεκτροφόρηση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pet28a

Για να εξακριβωθεί η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pet28a στο στέλεχος *E. coli* BL21, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση DNA των βιολογικών επαναλήψεων σε πηκτή αгарόζης (1%), όγκου 30mL. Στο διάλυμα προστέθηκαν 5 μL SYBRTM Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), για την οπτική ανίχνευση ζωνών DNA. Από κάθε βιολογική επανάληψη φορτώθηκαν 15 μL, που είχαν αναμειχθεί με BlueJuiceTM Gel Loading Buffer σε αναλογία 1:10. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε για 30 λεπτά υπό τάση +90 V, σε ρυθμιστικό διάλυμα

TAE. Ως μοριακή κλίμακα αναφοράς για τη σύγκριση και την ταυτοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), και ένα μη τροποποιημένο πλασμίδιο *pet28a*. Όλα τα δείγματα φορτώθηκαν σε κυκλική μορφή στη πηκτή. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό GelAnalyzer 23.1.

3.5.6 Δημιουργία αποθεμάτων μετασχηματισμένων *E. coli* BL21 σε cryovials

Η αποθήκευση του μετασχηματισμένου βακτηρίου *E. coli* BL21 έγινε στους - 80°C, σε cryovial που περιείχαν ανεπτυγμένη καλλιέργεια του μικροοργανισμού και γλυκερόλη, σε αναλογία 1:2. Η δημιουργία cryovials πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet).

3.6 Έκφραση ανασυνδυασμένου ενζύμου 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλ-CoA αναγωγάση

3.6.1 Προετοιμασία καλλιέργειας

Μετά την ολοκλήρωση των 16 h, ποσότητα 1 mL από κάθε υγρή βακτηριακή καλλιέργεια, των βιολογικών επαναλήψεων, εμβολιάστηκε σε κωνικές φιάλες με baffles (250 mL), που περιείχαν 100 mL θρεπτικού μέσου LB (10 g/L πεπτόνη, 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 5 g/L NaCl), εμπλουτισμένο με 50 mg/L αντιβιοτικού καναμυκίνη. Η αποστείρωση του θρεπτικού μέσου, πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο, στους 121 °C, για 20 min. Το αντιβιοτικό καναμυκίνη δεν υποβλήθηκε σε αποστείρωση στον αυτόκαυστο, για να μην αλλοιωθεί. Αντιθέτως, προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό μέσω αποστειρωμένου φίλτρου. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet). Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C και στροφές 180 rpm, μέχρι η οπτική πυκνότητα κάθε καλλιέργειας, σε μήκος κύματος 660 nm, να προσεγγίζει τις τιμές A = 0,500-0,600.

3.6.2 Προσθήκη ισοπροπυλικής β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδης (IPTG)

Όταν η οπτική πυκνότητα κάθε καλλιέργειας προσέγγισε την επιθυμητή τιμή, σε όλες τις επαναλήψεις προστέθηκε ισοπροπυλική β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδα (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Η προσθήκη έγινε σε αποστειρωμένες συνθήκες στο θάλαμο νηματικής ροής (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet), μέσω αποστειρωμένου φίλτρου. Το IPTG είναι δομικό ανάλογο του διασακχαρίτη λακτόζη, που επιτρέπει την έκφραση γονιδίων που υπόκεινται σε ρύθμιση της έκφρασης τους από τον υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης.

Το IPTG συνδέεται στο καταστολέα του οπερονίου, χωρίς να αποσυντίθεται από το ίδιο το κύτταρο, εξασφαλίζοντας την ελεγχόμενη έκφραση του γονιδίου στόχου.

3.6.3 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Η επώαση για τις καλλιέργειες των *E. coli* BL21 συνεχίστηκε για χρονικό διάστημα 24h, μετά τη προσθήκη του IPTG. Σε τακτά χρονικά διαστήματα συλλέχθηκαν 2 mL καλλιέργειας από κάθε επανάληψη, υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet). Από όλες τις καλλιέργειες, κάθε χρονική στιγμή απομονώθηκαν 2 δείγματα, τα οποία ακολούθησαν διαφορετικές εξεργασίες. Τα δείγματα της ομάδας Α θερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο 100 °C, για 10 min, ώστε να ανασταλούν όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις. Τα δείγματα της ομάδας Β υποβλήθηκαν αρχικά σε φυγοκέντρηση για 1 min, σε στροφές 1.000 g, ώστε τα κύτταρα να κατακρημνιστούν ως ίζημα. Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το κυτταρικό ίζημα θερμάνθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες.

3.6.5 Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Για να εξακριβωθεί η χρονική στιγμή έκφρασης της πρωτεΐνης, όλα τα δείγματα της επανάληψης 1 φορτώθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Ποσότητα 25 µL από κάθε δείγμα, υποβλήθηκε σε διάρρηξη των κυττάρων μέσω υπερήχων, για 6 κύκλους χρονικής διάρκειας 15 sec, σε ένταση 60% fmp1 και υπό θερμοκρασία 4°C. Κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 1 min σε στροφές 11.000 g και θερμάνθηκε στους 100 °C, για 5 min. Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν στο πάγο. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών στα δείγματα, εξετάστηκε μέσω της φασματοφωτομετρικής μεθόδου Bradford. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης χρωστικής απορροφά σε μήκος κύματος 595 nm.

Ο εξοπλισμός για τη πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών ήταν το PROTEAN II xi Cell for 2-D Electrophoresis (BIO-RAD). Η σύσταση των ρυθμιστικών διαλυμάτων, των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της πηκτής ηλεκτροφόρησης και η περιεκτικότητα της σε πολυακρυλαμίδιο, είναι αποτέλεσμα του μοριακού βάρους της 5-καρβοξυ-πεντενοϋλο-CoA αναγωγάσης, με τιμή 44,29 kDa (**Πίνακας 6**). Για να γίνει εμφανής η παρουσία των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών όλα τα δείγματα χρωματίστηκαν με χρωστική. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεϊνική κλίμακα αναφοράς BlueStar Prestained Protein Marker (Cat. No. MWP03, Nippon Genetics Europe GmbH) με πρωτεΐνες, για να γίνει η σύγκριση. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε υπό τάση +150 V, για χρονικό διάστημα 1 h.

Πίνακας 6: Σύσταση διαλυμάτων για τη δημιουργία πηκτής ηλεκτροφόρησης και του ρυθμιστικού διαλύματος.

Πηκτή προ-συγκέντρωσης (Stacking gel) 4%	
Συστατικά	Ποσότητα (mL)
1.5 M Tris-HCl, pH 6.8	7,2
10% (w/v) SDS stock	0,4
Acrylamide/Bis (30% stock)	2,68
10% ammonium persulfate, της ίδια μέρας	0,2
TEMED	0,02
dH ₂ O	9
Συνολικός όγκος	20
Πηκτή διαχωρισμού (Separating gel) 10%	
Συστατικά	Ποσότητα (mL)
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	12,5
10% (w/v) SDS stock	1
Acrylamide/Bis (30% stock)	16,5
10% ammonium persulfate, της ίδιας ημέρας	0,5
TEMED	0,05
dH ₂ O	19
Συνολικός όγκος	50
Electrode (Running) Buffer, pH 8.3	
Συστατικά	Ποσότητα (g/L)
Tris base	3
Glycine	14,4
SDS	1

Μετά την απομόνωση της πηκτής, ακολούθησε χρώση μέσω χρωστικής που περιλάμβανε: 100 mL μεθανόλη, 20 mL οξικό οξύ, 80 mL dH₂O και 0,2 g Coomassie Brilliant Blue G-250. Η χρώση έλαβε χώρα, όλη νύχτα αεροστεγώς και υπό κίνηση, για να μην αφυδατωθούν οι πηκτές. Τις επόμενες μέρες, ακολούθησε ο αποχρωματισμός της πηκτής μέσω διαδοχικών πλύσεων με τα διαλύματα destain 1 (100 mL μεθανόλη, 20 mL οξικό οξύ, 80 mL ddH₂O) και destain 2 (14 mL μεθανόλη, 2 0mL οξικό οξύ, 166mL ddH₂O). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω του λογισμικού GelAnalyzer 23.1.

3.7 In vitro παραγωγή αδιπικού οξέος

Η in vitro παραγωγή αδιπικού οξέος πραγματοποιήθηκε από τον συνδυασμό κυτταρικού λύματος του βακτηρίου *T. fusca* 190th και του μετασχηματισμένου βακτηρίου *E. coli* BL21, που εκφράζει την 5-καρβόξυ-πεντενούλο-CoA αναγωγή. Η στρατηγική αυτή στηρίζεται στο ενδογενές μονοπάτι αντίστροφης αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος (RADP) στο *T. fusca*, προσπελάζοντας το εμπόδιο της 5-καρβοξυ-πεντενοϋλο-CoA αναγωγής για σχηματισμό του αδίπυλο-CoA, μέσω υπερπαραγωγής του ενζύμου.

3.7.1 Καλλιέργεια *Thermobifida fusca* 190th^T

Για να επιτευχθεί η παραγωγή αδιπικού οξέος *in vitro*, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη της μέγιστης ποσότητας βιομάζας του *Thermobifida fusca* 190th^T. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού στις ίδιες συνθήκες που περιεγράφηκαν στο **Κεφάλαιο 3.2**. Για το παραπάνω πειραματικό πρωτόκολλο δημιουργήθηκαν 6 πειραματικές επαναλήψεις. Ο προσδιορισμός της χρονικής στιγμής όπου επέρχεται η μέγιστη βακτηριακή ανάπτυξη προσδιορίστηκε μέσω των αναλύσεων στο **Κεφάλαιο 3.3**.

3.7.2 Καλλιέργεια μετασχηματισμένου βακτηρίου *E. coli* BL21

Σε χρονικό διάστημα 16 h, πριν από τη χρονική στιγμή μέγιστης ανάπτυξης του *T. fusca* 190th^T, ξεκίνησε η ανάπτυξη του μετασχηματισμένου βακτηρίου *E. coli* BL21, που έφερε το γονίδιο *Tfu_1647*. Ποσότητα 1 mL του μικροοργανισμού από cryovial εμβολιάστηκε σε κωνικές φιάλες, που περιείχαν 50 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB medium (10g/L πεπτόνη, 5g/L εκχύλισμα ζύμης, 5g/L NaCl), εμπλουτισμένο με 50 mg/L αντιβιοτικού καναμυκίνη. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (BioAir AURA Mini Vertical Laminar Flow Cabinet). Η αποστείρωση του θρεπτικού μέσου, πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο, στους 121 °C για 20 min. Το αντιβιοτικό καναμυκίνη δεν υποβλήθηκε σε αποστείρωση στον αυτόκαυστο, για να μην αλλοιωθεί. Αντιθέτως, προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό μέσω αποστειρωμένου φίλτρου. Δημιουργήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις.

3.7.3 Έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης 5-καρβοξυ-2-πεντενόυλο-CoA

Μετά το χρονικό διάστημα των 16 ωρών, ποσότητα 1 mL καλλιέργειας *E. coli* BL21 από κάθε επανάληψη, εμβολιάστηκε σε κωνική φιάλη με baffles (250 mL), όπως περιγράφηκε στο **Κεφάλαιο 3.6**. Μετά το χρονικό διάστημα 2 h από τη προσθήκη του IPTG, σταμάτησε η καλλιέργεια του βακτηρίου *E. coli*.

3.7.4 Ενζυμική αντίδραση

Μετά το τερματισμό της ανάπτυξης του *T. fusca* 190th^T και του μετασχηματισμένου *E. coli* BL21, ξεκίνησε η επεξεργασία των κυττάρων για την *in vitro* παραγωγή αδιπικού οξέος. Σε τέσσερα αποστειρωμένα φιαλίδια falcon (50 ml), αναμείχθηκαν οι βιομάζες από διαφορετικές επαναλήψεις καλλιέργειας του *T. fusca* 190th^T. Το ίδιο πρωτόκολλο ακολουθήθηκε και για τις καλλιέργειες του *E. coli* BL21.

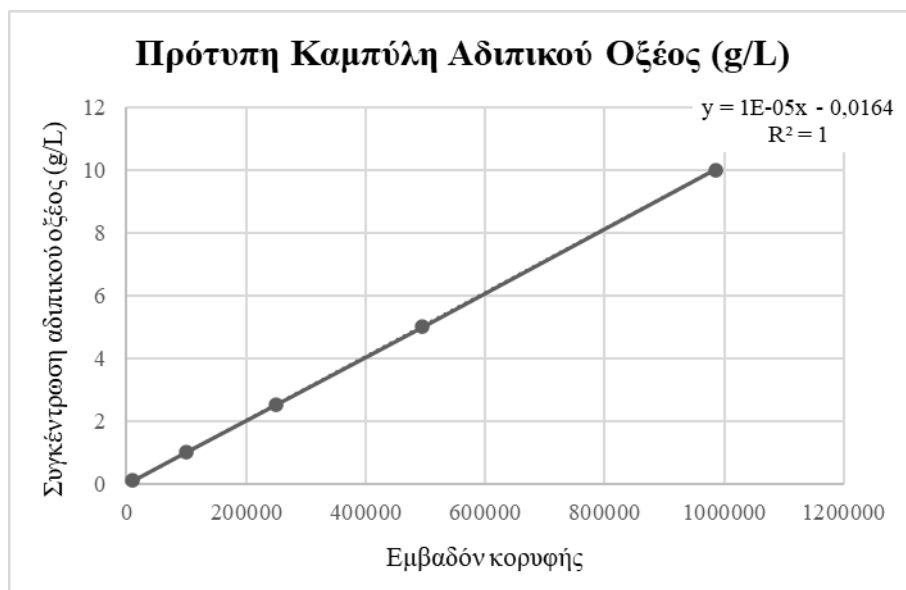
Όλα τα δείγματα στα φιαλίδια falcon υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση για 5 min, σε στροφές 9.000 rpm και θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα για 3 επαναλήψεις του *T. fusca* και 3 επαναλήψεις του *E. coli*, επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 5 mL PBS pH 7,4 συμπυκνωμένο X10. Μια επανάληψη των κυττάρων *T. fusca* και μια επανάληψη του *E. coli*, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 5 mL μη συμπυκνωμένου PBS pH 7,4. Η διαδικασία της εναλλαγής, φυγοκέντρησης και πλύσεων επαναλήφθηκε 2 φορές, στις ίδιες συνθήκες. Στη τελευταία πλύση τα κύτταρα διαλύθηκαν σε 5 mL PBS pH 7,4, με τον ίδιο τρόπο που περιεγράφηκε νωρίτερα.

Τα δείγματα και για τις δύο καλλιέργειες επεξεργάστηκαν με υπερήχους, ώστε να απελευθερωθούν τα ενδοκυτταρικά συστατικά, όπως οι πρωτεΐνες. Κάθε φιαλίδιο falcon υποβλήθηκε σε 6 κύκλους υπερήχων για 15 sec, σε ένταση 60% fmpI και υπό θερμοκρασία 4 °C. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών στα δείγματα, εξετάστηκε μέσω της φασματοφωτομετρικής μεθόδου Bradford. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης χρωστικής απορροφά σε μήκος κύματος 595 nm.

Ακολούθησε ανάμειξη των δύο διακριτών κυτταρικών λυμάτων σε διαφορετικές αναλογίες. Τα κύτταρα *T. fusca* και *E. coli* που διαλύθηκαν σε 5 mL PBS pH 7,4 συμπυκνωμένο X10 αναμείχθηκαν σε αναλογίες: 1) 500 μ L *T. fusca* και 100 μ L *E. coli*, 2) 4,4 mL H₂O, 500 μ L *T. fusca* και 100 μ L *E. coli*, 3) 200 μ L *T. fusca* και 200 μ L *E. coli*, 4) 200 μ L *T. fusca* και 200 μ L *E. coli*, σε 3,6 mL H₂O. Ενώ, τα κύτταρα *T. fusca* και *E. coli* που διαλύθηκαν σε 5 mL μη συμπυκνωμένου PBS pH 7,4 αναμείχθηκαν σε αναλογίες: 5) 500 μ L *T. fusca* και 100 μ L *E. coli*, σε 500 μ L PBS pH 7,4, 6) 500 μ L *T. fusca* και 100 μ L *E. coli*, 7) 200 μ L *T. fusca* και 200 μ L *E. coli*, σε 500 μ L PBS pH 7,4, 8) 200 μ L *T. fusca* και 200 μ L *E. coli*. Για να ολοκληρωθεί η αντίδραση τα διαλύματα επώαστηκαν όλη νύχτα στους 50 °C, υπό ήπια ανάδευση.

3.7.5 Προσδιορισμός παραγωγής αδιπικού οξέος

Η ταυτοποίηση της παραγωγής αδιπικού οξέος επιτεύχθηκε μέσω της μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography / HPLC). Τα διαλύματα ενζυμικής αντίδρασης (10 μ L δείγμα με κατάλληλη αραιώση) αναλύθηκαν με HPLC Rigas, στη στήλη Aminex HPX-87H Column, με ροή 0,6 mL/min, σε κινητή φάση 10 mM H₂SO₄, στους 60 °C, και ανιχνευτή PDA. Η συγκέντρωση του παραγόμενου αδιπικού οξέος υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης, που προκύπτει από πρότυπη καμπύλη (**Γράφημα 1**) με το αδιπικό οξύ ως πρότυπη ουσία σε συγκεντρώσεις 0,1 g/L, 1 g/L, 2,5 g/L, 5 g/L, 10 g/L.

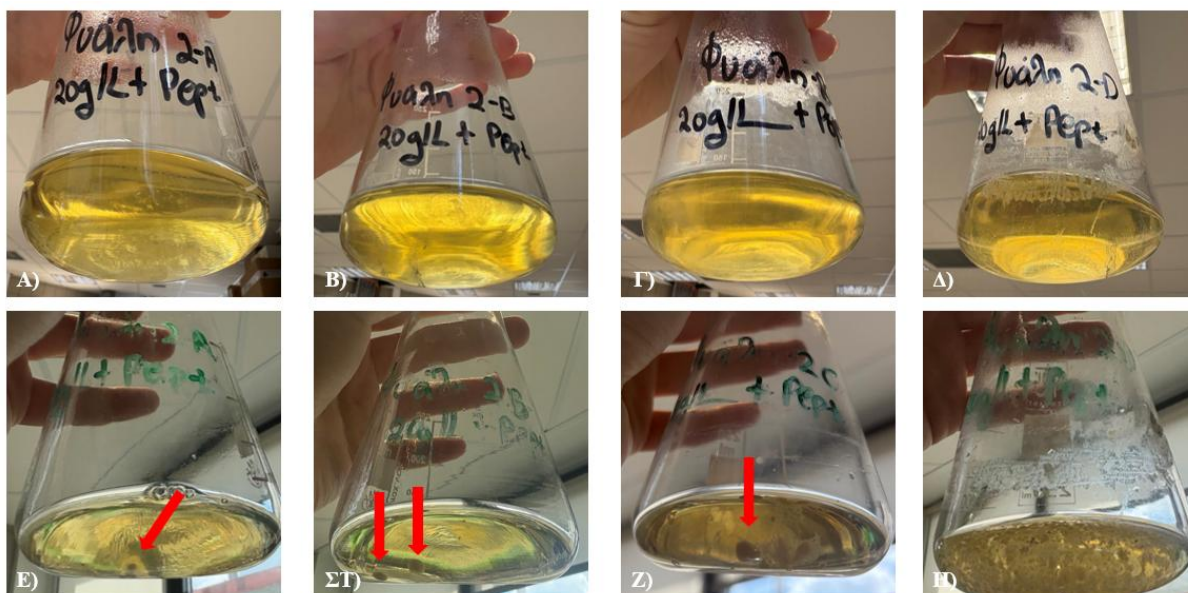


Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη αδипικού οξέος, και σχετιζόμενη εξίσωση. Άξονας y, συγκέντρωση αδипικού οξέος. Άξονας x, εμβαδόν κορυφής της HPLC.

4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Ανάπτυξη του *Thermobifida fusca* 190th^T σε κωνικές φιάλες

Η ανάπτυξη του *Thermobifida fusca* 190th^T σε κωνικές φιάλες μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης σε 97 h, ήταν ορατή με γυμνό μάτι. Η παρατήρηση των τεσσάρων επαναλήψεων καλλιέργειας τις χρονικές στιγμές T0 και T97, μαρτυρούν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (*Εικόνα 13*).



Εικόνα 13: Σύγκριση βακτηριακής ανάπτυξης *Thermobifida fusca* τη χρονική στιγμή T0 και τη χρονική στιγμή T97. Α) Ανάπτυξη τη χρονική στιγμή T0 – επανάληψη Α. Β) Ανάπτυξη τη χρονική στιγμή T0 – επανάληψη Β. Γ) Ανάπτυξη τη χρονική στιγμή T0 – επανάληψη Γ. Δ) Ανάπτυξη τη χρονική στιγμή T0 – επανάληψη Δ. Ε) Ανάπτυξη τη χρονική στιγμή T97 – επανάληψη Α. ΣΤ) Ανάπτυξη τη χρονική στιγμή T97 – επανάληψη Β. Ζ) Ανάπτυξη τη χρονική στιγμή T97 – επανάληψη Γ. Η) Ανάπτυξη τη χρονική στιγμή T97 – επανάληψη Δ. Με κόκκινα βέλη αναπαρίστανται τα συσσωματώματα pellets.

Καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού δεν ήταν ομοιόμορφη μέσα στις κωνικές φιάλες, αλλά δημιουργούνταν μεγάλα συσσωματώματα από pellets (*Εικόνα 13*). Τη χρονική στιγμή T53 της ζύμωσης, στην επανάληψη D το μεγάλο pellet, έσπασε δημιουργώντας πολλά μικρότερα pellets, που οδήγησαν στην ενίσχυση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού (*Εικόνα 13*).

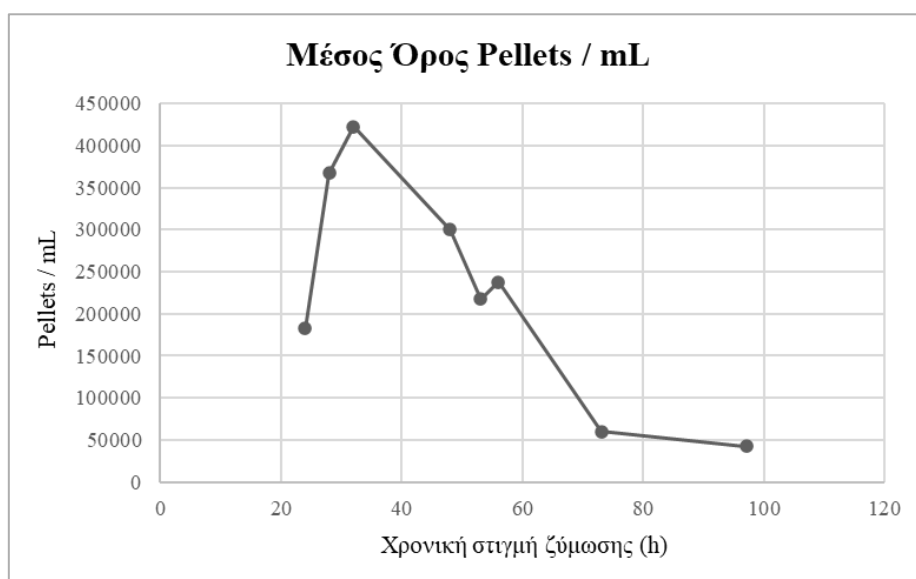
4.2 Προσδιορισμός ρυθμού ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητα του *T. fusca* 190th^T

Για το προσδιορισμό του ρυθμού ανάπτυξης του *T. fusca* 190th^T και της μεταβολικής του δραστηριότητας απομονώθηκαν 2 mL καλλιέργειας τις χρονικές στιγμές T0, T5, T24, T27, T31, T48, T53, T56, T73 και T97, όπως περιγράφηκε στο **Κεφάλαιο 3.3**.

4.2.1 Ρυθμός ανάπτυξης *T. fusca* 190th^T

Η ταχύτητα ανάπτυξης του *Thermobifida fusca* 190th^T προσδιορίστηκε μέσω τριών μεθόδων: μέτρηση οπτικής πυκνότητας, μικροσκοπική παρατήρηση pellets σε πλάκα Neubauer και μέτρηση του ξηρού βάρους. Όλα τα δείγματα, υποβλήθηκαν στις ίδιες αναλύσεις όπως περιγράφηκε στο **Κεφάλαιο 3.3.2**. Για κάθε χρονική στιγμή της ζύμωσης, συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα από όλες τις βιολογικές επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε συνάρτηση με το χρόνο. Η επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Microsoft Excel, και τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν σε διαγράμματα (**Γράφημα 2, Γράφημα 3**).

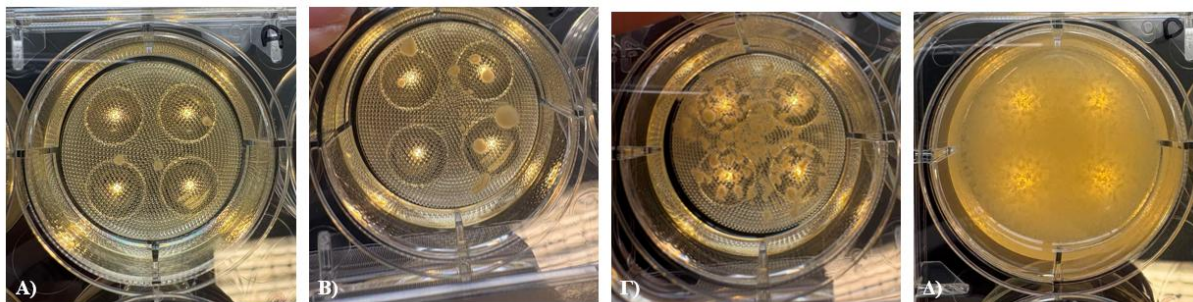
Λόγω μη ομοιόμορφης ανάπτυξης του μικροοργανισμού στη πλειονότητα των βιολογικών επαναλήψεων δε παρατηρήθηκε, θολερότητα στις καλλιέργειες. Οι τιμές εκτός του αναμενόμενου εύρους, δεν επιτρέπουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων σε γράφημα. Όμως, η θόλωση του θρεπτικού μέσου είναι δείκτης μικροβιακής ανάπτυξης. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα και της οπτικής παρατήρησης των καλλιεργειών (**Εικόνα 13**) προκύπτει το συμπέρασμα πως η μικροβιακή ανάπτυξη ήταν εμφανής, ωστόσο η μη ομοιόμορφη ανάπτυξη του μικροοργανισμού δεν επέτρεπε τη θόλωση του θρεπτικού μέσου.



Γράφημα 2: Γράφημα μέσου όρου συγκέντρωσης pellets προς χρονική διάρκεια ζύμωσης.

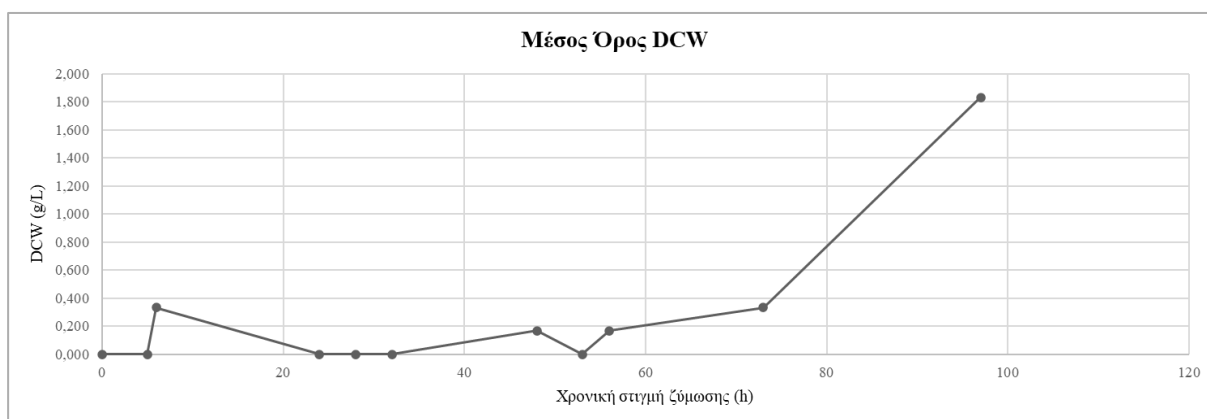
Μέσω της μικροσκοπικής παρατήρησης των pellets σε πλάκα Neubauer, γίνεται ο εντοπισμός των μικρών σε μέγεθος pellets. Στο διάγραμμα αναπαράστασης των αποτελεσμάτων από τις 4 βιολογικές επαναλήψεις (**Γράφημα 2**), φαίνεται ότι τη χρονική στιγμή T31 εντοπίζεται μεγαλύτερος αριθμός μικροσκοπικών pellet. Στη συνέχεια, ο αριθμός των ελεύθερων μικροσκοπικών pellet μειώνεται. Αυτό οφείλεται, στη συγχώνευση των pellets, σε μεγαλύτερα κυτταρικά συσσωματώματα. Στο τέλος της διαδικασίας ζύμωσης, δηλαδή τη

χρονική στιγμή T97, ποσότητα 5 mL καλλιέργειας από κάθε βιολογική επανάληψη μελετήθηκε σε microplate 6 θέσεων (**Εικόνα 14**). Τη χρονική T97, σε όλες τις βιολογικές επαναλήψεις παρατηρούνται συσσωματώματα pellet (**Εικόνα 14**). Τη μεγαλύτερη ανάπτυξη εμφάνισε η επανάληψη D (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14: Φωτογραφία ανάπτυξης μεγάλων pellet, τη χρονική στιγμή T97. Α) επανάληψη Α. Β) επανάληψη Β. Γ) επανάληψη Γ. Δ) επανάληψη Δ.

Στο διάγραμμα αναπαράστασης των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων, για τη συγκέντρωση της ξηρής βιομάζας (**Γράφημα 3**), φαίνεται εμφανώς πως η αύξηση της βιομάζας ξεκίνησε τη χρονική στιγμή T31. Η μέγιστη μεταβολή στη ποσότητα της ξηρής βιομάζας, παρατηρήθηκε μετά τη χρονική T53, όπου συνέβη η ρήξη του ευμεγέθους pellet, στην επανάληψη D. Τα αποτελέσματα του διαγράμματος μέσου όρου συγκέντρωσης του ξηρού βάρους (**Γράφημα 3**), συμφωνούν με τα αποτελέσματα του διαγράμματος μέσου όρου συγκέντρωσης του αριθμού μικροσκοπικών pellet (**Γράφημα 2**), καθώς αποδεικνύεται ότι η εμφανής ανάπτυξη βιομάζας ξεκίνησε μετά τη χρονική στιγμή T31.

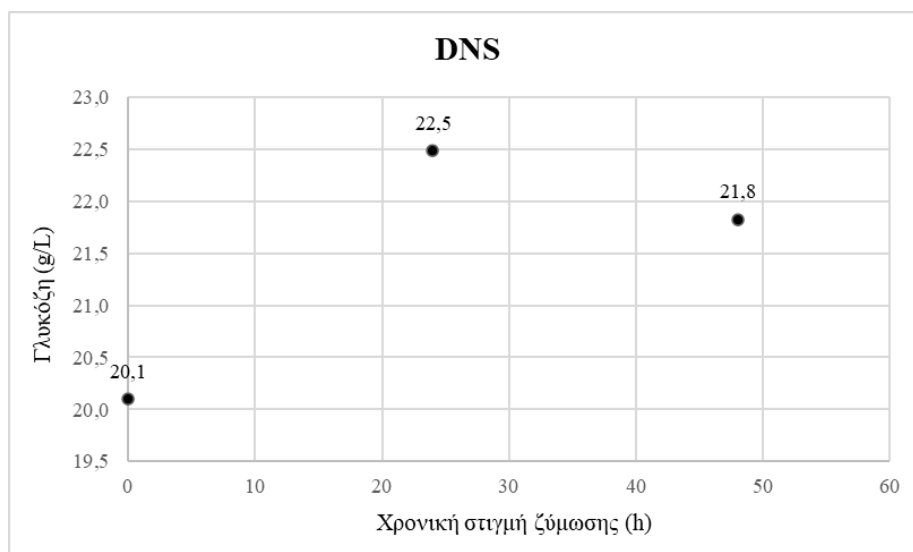


Γράφημα 3: Διάγραμμα μέσου όρου ξηρού βάρους προς χρονική διάρκεια ζύμωσης.

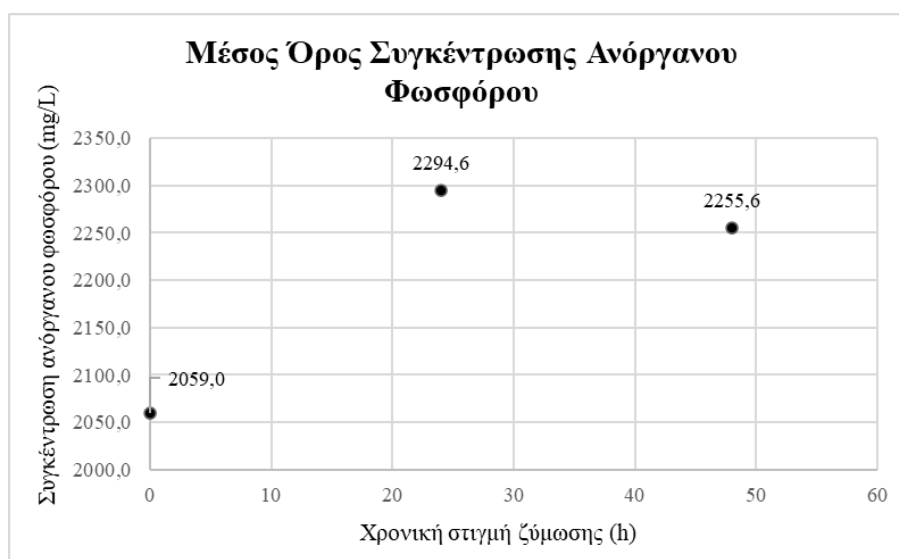
4.2.2 Μεταβολική δραστηριότητα *T. fusca* 190th^T

Η μεταβολική δραστηριότητα του *T. fusca* 190th^T, δηλαδή η ικανότητα του μικροοργανισμού να καταναλώνει θρεπτικά συστατικά και αντίστοιχα να παράγει προϊόντα του μεταβολισμού, προσδιορίστηκε μέσω της μέτρησης των ελεύθερων αναγωγικών σακχάρων

(DNS), του προσδιορισμού του ελεύθερου ανόργανου φωσφόρου και των ελεύθερων αμινομάδων (FAN). Στις παραπάνω αναλύσεις μελετήθηκαν μόνο τα δείγματα T0, T24 και T48.



Γράφημα 4: Το γράφημα αναπαριστά των μέσο όρο αποτελεσμάτων, από τις τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις, για τη συγκέντρωση ελεύθερων αναγωγικών σακχάρων στο θρεπτικό μέσο.



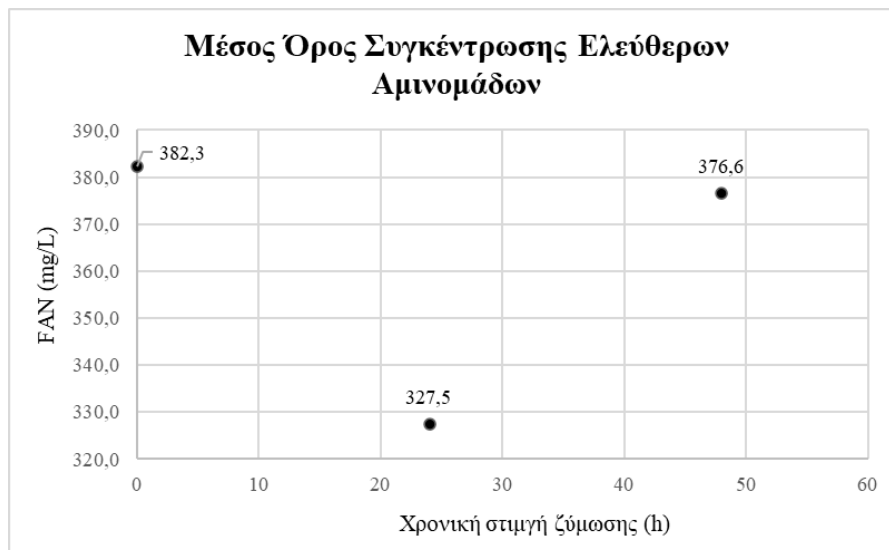
Γράφημα 5: Το γράφημα αναπαριστά των μέσο όρο αποτελεσμάτων, από τις τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις, για τη συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου στο θρεπτικό μέσο.

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης έγινε σύμφωνα με την εξίσωση $2,125 \cdot x - 0,0157$, όπως περιγράφηκε στο **Κεφάλαιο 3.3.3**. Η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης που προστέθηκε στο εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ATCC medium: 2382 Hagerdahl medium, είναι 20 g/L. Παρ' όλα αυτά παρατηρείται ότι τη χρονική στιγμή T24 η συγκέντρωση τη γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης έχει αυξηθεί (**Γράφημα 4**). Το φαινόμενο αυτό πιθανολογείται, πως προκύπτει από τη συμπύκνωση του θρεπτικού μέσου, λόγω εξάτμισης του νερού. Η εξάτμιση του νερού είναι ένα αναμενόμενο γεγονός, δεδομένου ότι ο *Thermobifida fusca*, αναπτύσσεται βέλτιστα σε θερμοκρασία 50 °C. Τη χρονική στιγμή T48, η συγκέντρωση τη γλυκόζης έχει μειωθεί

συγκριτικά με τη χρονική στιγμή T24, όμως πάλι το θρεπτικό μέσο είναι συμπυκνωμένο (*Γράφημα 5*).

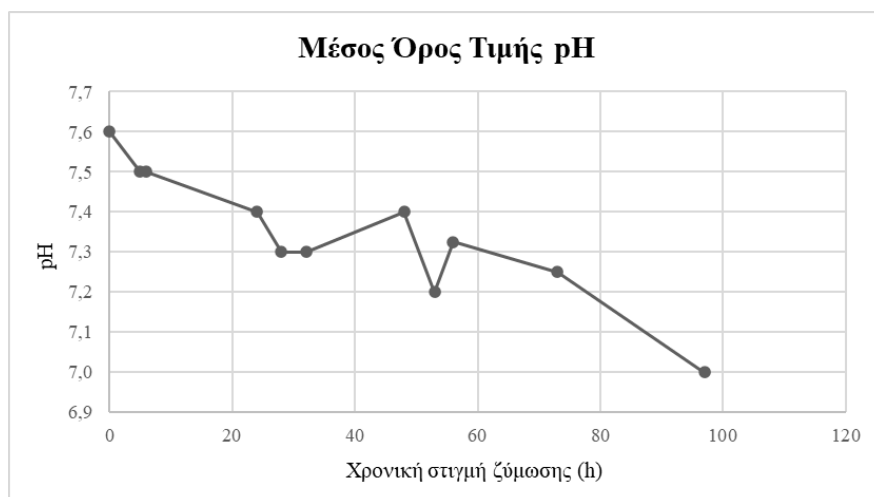
Ο προσδιορισμός του ανόργανου φωσφόρου έγινε σύμφωνα με την εξίσωση $7,5993 \cdot x - 0,1205$, όπως περιγράφηκε στο *Κεφάλαιο 3.3.4*. Η αρχική συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου στο θρεπτικό μέσο είναι περίπου 2.191 mg/L, και προέρχεται από τα συστατικά Na_2HPO_4 και KH_2PO_4 . Παρατηρείται ότι τη χρονική στιγμή T24 η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου στο μέσο ανάπτυξης έχει αυξηθεί (*Γράφημα 5*). Το φαινόμενο αυτό πιθανολογείται, πως προκύπτει από τη συμπύκνωση του θρεπτικού μέσου, λόγω εξάτμισης του νερού. Τη χρονική στιγμή T48, η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου έχει μειωθεί συγκριτικά με τη χρονική στιγμή T24, όμως πάλι το θρεπτικό μέσο είναι συμπυκνωμένο (*Γράφημα 5*).

Ο προσδιορισμός των ελεύθερων αμινομάδων έγινε σύμφωνα με την εξίσωση $4,909 \cdot x - 0,0719$, όπως περιγράφηκε στο *Κεφάλαιο 3.3.5*. Η αρχική συγκέντρωση ελεύθερων αμινομάδων στο θρεπτικό μέσο είναι περίπου 400 mg/L FAN, και προέρχεται από το εκχύλισμα ζύμης και την πεπτόνη. Παρατηρείται ότι τη χρονική στιγμή T24 η συγκέντρωση των ελεύθερων αμινομάδων στο μέσο ανάπτυξης μειώνεται αισθητά (*Γράφημα 6*). Τη χρονική στιγμή T48, η συγκέντρωση του ελεύθερων αμινομάδων έχει αυξηθεί συγκριτικά με τη χρονική στιγμή T24, άρα το θρεπτικό μέσο είναι συμπυκνωμένο, λόγω εξάτμισης (*Γράφημα 6*).



Γράφημα 6: Το γράφημα αναπαριστά των μέσο όρο αποτελεσμάτων, από τις τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις, για τη συγκέντρωση ελεύθερων αμινομάδων στο θρεπτικό μέσο.

4.2.3 Προσδιορισμός τιμής pH



Γράφημα 7: Μέσος όρος τιμής pH, για όλες τις βιολογικές επαναλήψεις

Μεταξύ άλλων η πτώση της τιμής του pH, είναι ένδειξη παραγωγής καρβοξυλικών οξέων από το μικροοργανισμό. Γενικότερα, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού ήταν συνδεδεμένη με την πτώση της τιμής του pH στη καλλιέργεια, λόγω αυξημένης παραγωγής καρβοξυλικών οξέων (**Γράφημα 7**). Η μεγαλύτερη πτώση στη τιμή του pH, παρατηρήθηκε τη χρονική στιγμή T97. Παρ' όλα αυτά οι αυξομειώσεις που παρατηρούνται στις τιμές του pH (**Γράφημα 7**), οφείλονται στη προσθήκη διαλύματος NaOH 2mM, για τη ρύθμιση του περιβάλλοντος στο βέλτιστο pH ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

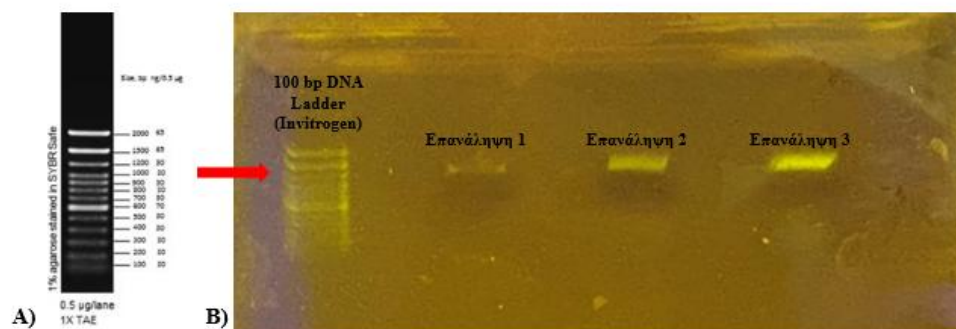
4.3 Γενετική τροποποίηση στελεχών *E. coli* και έκφραση γονιδίου *Tfu_1647*

4.3.1 Ενίσχυση γονιδίου *Tfu_1647*

Το γονίδιο *Tfu_1647*, απομονώθηκε από το πλήρες γονιδίωμα του *Thermobifida fusca* 19th^T και ενισχύθηκε μέσω αντίδρασης PCR. Τα δείγματα της αντίδρασης φορτώθηκαν και διαχωρίστηκαν σε πηκτή αгарόζης, ώστε να απομονωθεί το τμήμα DNA του γονιδίου (**Εικόνα 15**). Όλες οι επαναλήψεις έδωσαν ενίσχυση του γονιδίου (**Εικόνα 15**). Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας του γονιδίου που ενισχύθηκε, επομένως τη μεγαλύτερη ενίσχυση εμφάνισε η επανάληψη 3 (**Εικόνα 15**).

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό GelAnalyzer 23.1, χρησιμοποιώντας ως μοριακή κλίμακα αναφοράς το 100bp DNA Ladder (Invitrogen). Αποδείχθηκε ότι φθορίζουσες ζώνες αντιστοιχούν σε τμήματα DNA μήκους 1.158 bp, όπως το επιθυμητό γονίδιο. Επομένως η απομόνωση του γονιδίου *Tfu_1647* ήταν επιτυχής.

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του γονιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε, για όλες τις επαναλήψεις. Εντούτοις, για την γενετική τροποποίηση του πλασμιδίου αξιοποιήθηκε αποκλειστικά η επανάληψη 3, λόγω υψηλής συγκέντρωσης 11,5 ng/μL και καθαρότητας $A_{260}/A_{280} = 1,69$.



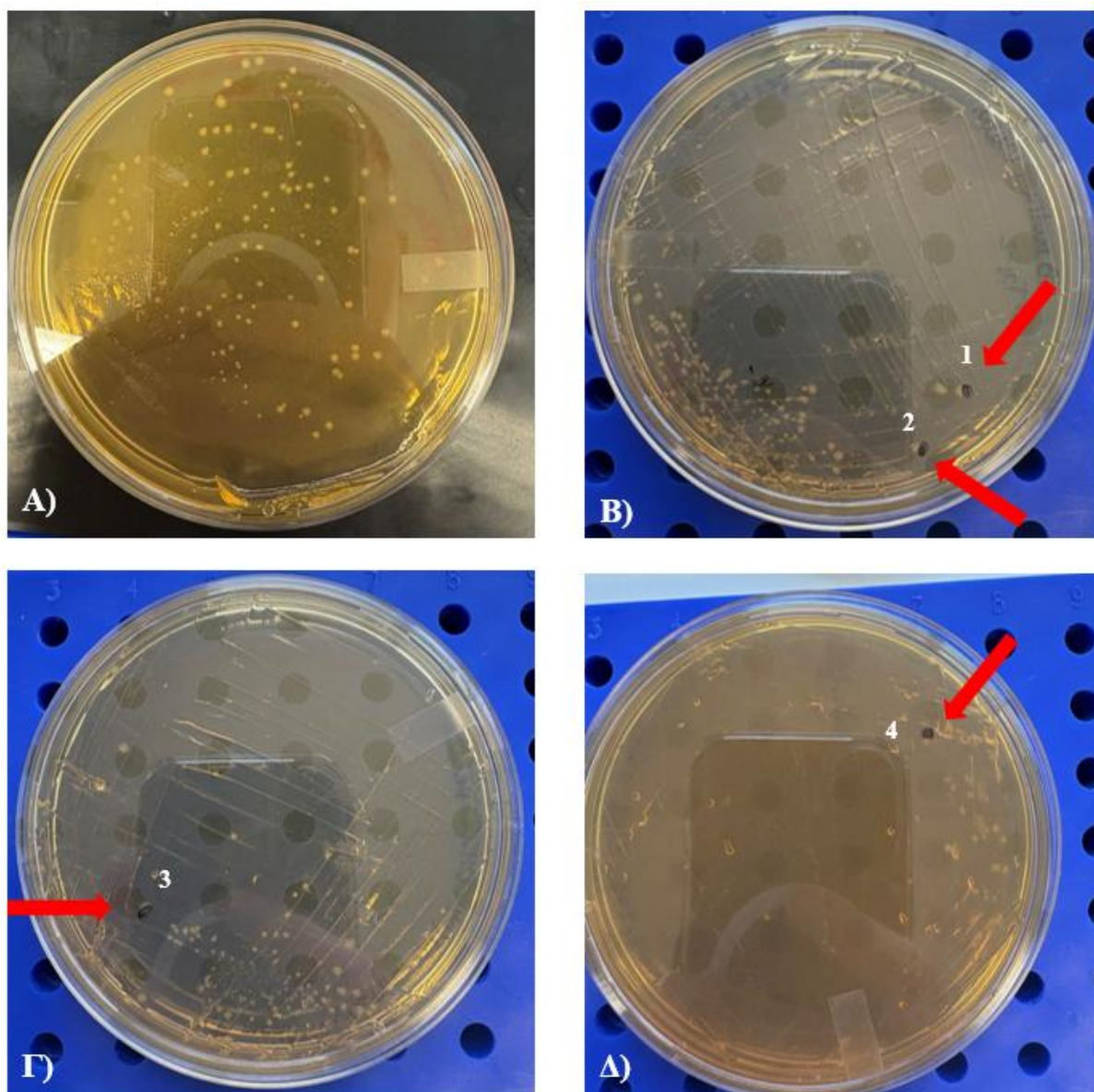
Εικόνα 15: Α) Μοριακή κλίμακα αναφοράς, γνωστού μήκους τμημάτων DNA, από το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Β) Αποτελέσματα ενίσχυσης γονιδίου *Tfu_1647*, μέσω αντίδρασης PCR. Το βέλος αντιστοιχεί στη ζώνη 1.200bp της κλίμακας αναφοράς.

4.3.2 Γενετική τροποποίηση κυττάρων *E. coli* DH5a

Ακολούθησε η εισαγωγή του γονιδίου *Tfu_1647*, στο πλασμιδιακό φορέα pet28a όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 3.4.2. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης της T4 DNA λιγάσης, τα εν δυνάμει γενετικώς τροποποιημένα πλασμίδια εισήχθησαν σε δεκτικά κύτταρα (competent cells) *E. coli* DH5a. Το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* DH5a είναι κατάλληλος ξενιστής για την αναπαραγωγή και το πολλαπλασιασμό των κυκλικών μορίων DNA, λόγω έλλειψης των γονιδίων *recA1* και *endA1* που μπορεί να οδηγήσουν σε αλλοίωση της γενετικής πληροφορίας ή καταστροφή του DNA.

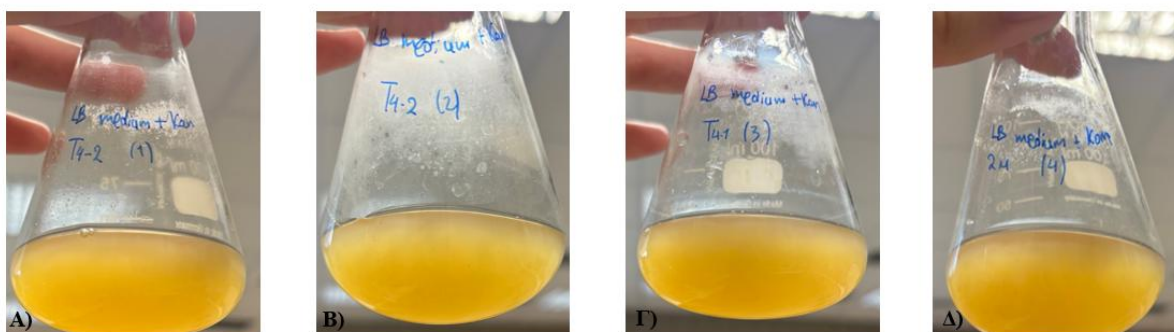
Η δημιουργία δεκτικών κυττάρων (competent cells) *E. coli* DH5a και ο μετασχηματισμός τους με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιγράφηκαν στο **Κεφάλαιο 3.4.3.2** και **Κεφάλαιο 3.4.3.3**, αντίστοιχα. Τα κύτταρα *E. coli* DH5a που δέχθηκαν το πλασμίδιο επώαστηκαν για 12 h στους 37 °C (**Εικόνα 16**) και στη συνέχεια, ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για να επιβραδυνθεί ο χρόνος ανάπτυξης των βακτηρίων. Παρατηρήθηκε ότι η ανάπτυξη των βακτηρίων που είχαν δεχθεί εν δυνάμει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, εμφάνισαν λιγότερες αποικίες σε σχέση με ο τριβλίο «control», που περιείχε κύτταρα *E. coli* DH5a μετασχηματισμένα με σκέτο πλασμίδιο pet28a (**Εικόνα 16**).

Ορισμένες βακτηριακές αποικίες από κάθε επανάληψη επιλέχθηκαν τυχαίος (**Εικόνα 16**), για να εμβολιαστούν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB medium, εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό καναμυκίνη.



Εικόνα 16: Φωτογραφίες από τριβλία με ανάπτυξη μετασχηματισμένων βακτηρίων *E. coli* DH5a. Α) Τριβλίο «control», φέρει βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί μόνο με το πλασμίδιο *pet28a*, που δε φέρει το γονίδιο στόχο. Β) Τριβλίο, φέρει βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pet28a* (επανάληψη Α) Γ) Τριβλίο, φέρει βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pet28a* (επανάληψη Β). Δ) Τριβλίο, φέρει βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pet28a* (επανάληψη Δ). Τα σημεία που δείχνονται με βέλος αντιστοιχούν στις επιλεγμένες αποικίες, για εμβολιασμό.

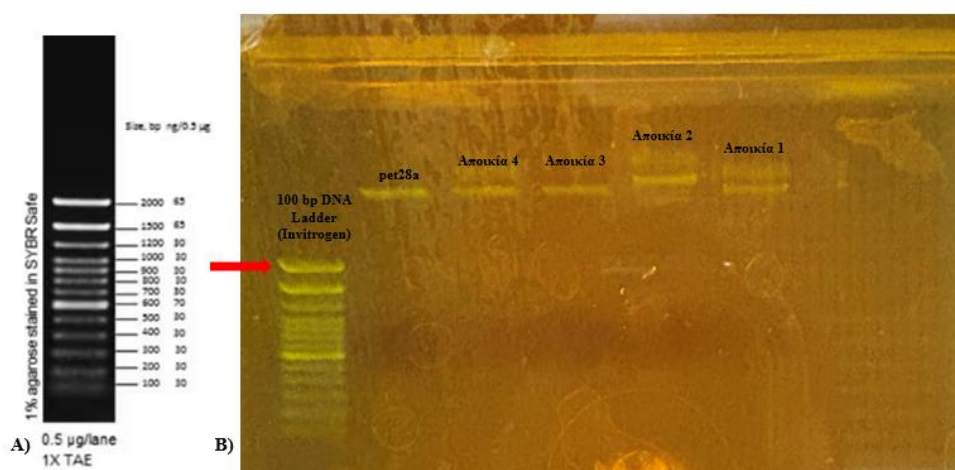
Μετά από επώαση 16 h στους 37 °C, όλες οι υγρές καλλιέργειες που εμβολιάστηκαν από τις αποικίες των μετασχηματισμένων *E. coli* DH5a, έδωσαν ανάπτυξη (**Εικόνα 17**). Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδίου *pet28a*, από όλες τις καλλιέργειες, για να ταυτοποιηθεί σε ποια επανάληψη έγινε η εισαγωγή του γονιδίου στόχου.



Εικόνα 17: Ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας *E. coli* DH5a, από εμβολιασμό αποικιών. Α) Υγρή καλλιέργεια αποικίας 1. Β) Υγρή καλλιέργεια αποικίας 2. Γ) Υγρή καλλιέργεια αποικίας 3. Δ) Υγρή καλλιέργεια αποικίας 4.

4.3.3 Ταυτοποίηση γενετικής τροποποίησης πλασμιδιακού φορέα *pet28a*

Όλα τα δείγματα πλασμιδιακού DNA και των 4 αποικιών υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το περιοριστικό ένζυμο *NdeI*, προκειμένου τα μόρια να γίνουν γραμμικά και να είναι πιο εύκολη η κίνηση τους κατά μήκος της πηκτής αгарόζης (**Εικόνα 18**).

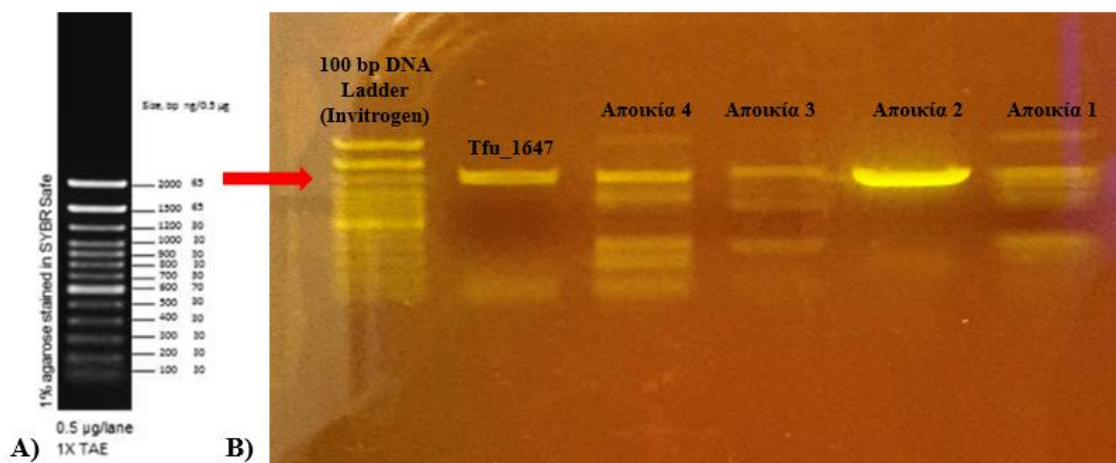


Εικόνα 18: Α) Μοριακή κλίμακα αναφοράς, γνωστού μήκους τμημάτων DNA, από το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Β) Αποτελέσματα ταυτοποίησης ενσωμάτωσης γονιδίου *Tfu_1647*, σε πλασμιδιακό φορέα *pet28a*. Το βέλος αντιστοιχεί στη ζώνη 2.000 bp της κλίμακας αναφοράς..

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό GelAnalyzer 23.1, χρησιμοποιώντας ως μοριακή κλίμακα αναφοράς το 100bp DNA Ladder (Invitrogen). Ταυτόχρονα, στη πηκτή αгарόζης φορτώθηκε και ένα δείγμα μη τροποποιημένου πλασμιδίου *pet28a*, το οποίο είναι γνωστό ότι φέρει 5.369 bp. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το GelAnalyzer 23.1 έδειξαν πως, σύμφωνα με τη μοριακή κλίμακα αναφοράς το πλασμίδιο «control» βρίσκεται πράγματι κοντά στο ύψους των 5.369bp. Επιπλέον, τα πλασμίδια που απομονώθηκαν από τις αποικίες 4, 3 και 1 είχαν επίσης, ίδιο μέγεθος με το πλασμίδιο «control» άρα δεν είχε ενσωματωθεί το γονίδιο στόχος. Αντιθέτως, το πλασμίδιο που απομονώθηκε από την αποικία 2, σύμφωνα με το

GelAnalyzer 23.1, ήταν προσεγγιστικά 1.500 bp μεγαλύτερο σε μέγεθος από τα υπόλοιπα. Επομένως, προκύπτει το συμπέρασμα ότι πιθανότατα το γονίδιο στόχος ενσωματώθηκε.

Για να ενισχυθεί η πιστότητα των αποτελεσμάτων, όλα τα δείγματα πλασμιδίων υποβλήθηκαν σε αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR), μέσω των εκκινήτων που σχεδιάστηκαν για το γονίδιο στόχο στο **Κεφάλαιο 3.4.1.2**. Αν οι εκκινήτες υβριδίσουν πάνω στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pet28a*, τότε θα ενισχυθεί η αλληλουχία του γονιδίου *Tfu_1647* και θα μπορεί να παρατηρηθεί μέσω ηλεκτροφόρησης DNA.



Εικόνα 19: Α) Μοριακή κλίμακα αναφοράς, γνωστού μήκους τμημάτων DNA, από το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Β) Αποτελέσματα ταυτοποίησης ενσωμάτωσης γονιδίου *Tfu_1647*, σε πλασμιδιακό φορέα *pet28a*. Το βέλος αντιστοιχεί στη ζώνη 1.200 bp της κλίμακας αναφοράς.

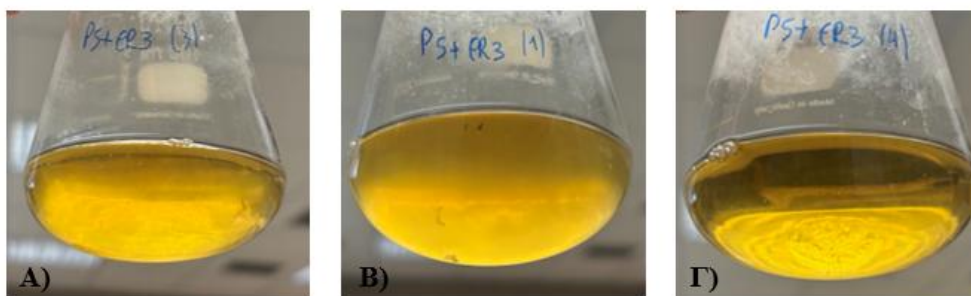
Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό GelAnalyzer 23.1, χρησιμοποιώντας ως μοριακή κλίμακα αναφοράς το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Ταυτόχρονα, στη πηκτή αγαρόζης φορτώθηκε και ένα δείγμα του γονιδίου *Tfu_1647*, το οποίο είναι γνωστό ότι φέρει 1.518 bp (**Εικόνα 19**). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το GelAnalyzer 23.1 έδειξαν πως, σύμφωνα με τη μοριακή κλίμακα αναφοράς το γονίδιο «control» βρίσκεται πράγματι κοντά στο ύψους των 1.518 bp. Σύμφωνα με το GelAnalyzer 23.1 μια μπάντα στο ύψος των 1.200 bp, εμφανίζεται σε όλες τις επαναλήψεις (**Εικόνα 19**). Ωστόσο, η πιο έντονη ζώνη στη πηκτή, στο ύψος των 1.518 bp, εντοπίζεται στο πλασμίδιο που απομονώθηκε από την αποικία 2 (**Εικόνα 19**). Στις υπόλοιπες, επαναλήψεις διακρίνονται ζώνες τμημάτων DNA, διαφορετικών μεγεθών οι οποίες είναι δύσκολο να ταυτοποιηθεί η προέλευση τους (**Εικόνα 19**).

4.3.4 Εισαγωγή γενετικά τροποποιημένου πλασμιδίου *pet28a* σε φορέα έκφρασης *E. coli* BL21

Το γενετικά τροποποιημένο πλασμίδιο *pet28a* που απομονώθηκε από την υγρή καλλιέργεια, της αποικίας 2, στη συνέχεια εισήχθη σε δεκτικά κύτταρα (competent cells) *E.*

coli BL21. Η δημιουργία δεκτικών κυττάρων (competent cells) *E. coli* BL21 και ο μετασχηματισμός τους με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιγράφηκαν στο **Κεφάλαιο 3.5.1** και **Κεφάλαιο 3.5.2**, αντίστοιχα. Το συγκεκριμένο στέλεχος αποτελεί ιδανικό μέσο έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, καθώς υστερεί των γονιδίων *lon* και *ompT* που κωδικοποιούν για πρωτεάσες και επιτυγχάνει τη παραγωγή υψηλών τάξεων της πρωτεΐνης στόχου μέσω της T7 RNA πολυμεράσης.

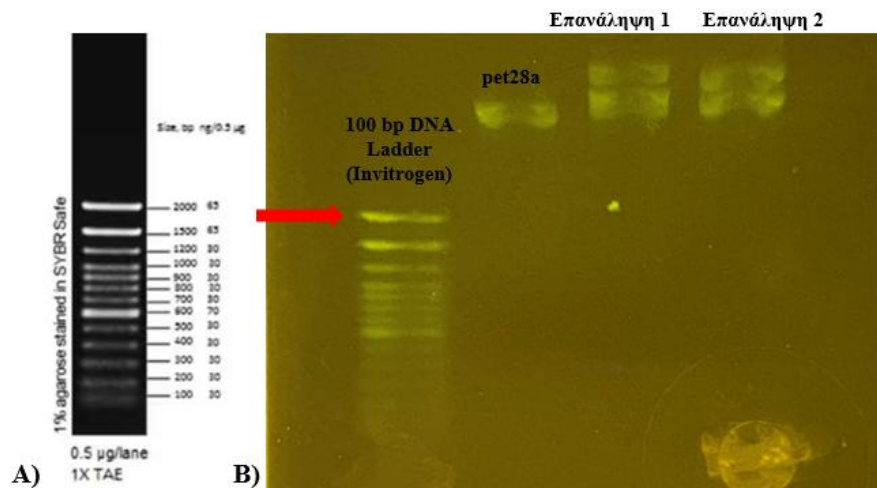
Τα κύτταρα *E. coli* BL21 που δέχθηκαν το πλασμίδιο επωάστηκαν σε τριβλία για 12 h στους 37 °C. Σε κάθε βιολογική επανάληψη αναπτύχθηκε μια μοναδική αποικία, η οποία εμβολιάστηκε σε υγρή καλλιέργεια θρεπτικού μέσου LB medium, εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό καναμυκίνη. Παρ' όλα αυτά ανάπτυξη έδωσαν μόνο οι 2 από τις 3 βιολογικές επαναλήψεις (**Εικόνα 20**). Η τρίτη βιολογική επανάληψη δε συμπεριλήφθηκε στα επόμενα πειράματα.



Εικόνα 20: Ανάπτυξη υγρής καλλιέργειας *E. coli* BL21, από εμβολιασμό αποικιών. Α) Υγρή καλλιέργεια επανάληψη 1. Β) Υγρή καλλιέργεια επανάληψη 2. Γ) Υγρή καλλιέργεια επανάληψη 3.

4.3.5 Ηλεκτροφόρηση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *pet28a*

Πριν την έναρξη της έκφρασης της 5-καρβοξυ-πεντενοϋλο-CoA αναγωγάσης, το πλασμίδιο *pet28a* απομονώθηκε από τα κύτταρα, για να ταυτοποιηθεί η πρόσληψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Πριν τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης τα δείγματα που φορτώθηκαν στη πηκτή δεν είχαν επεξεργαστεί με το ένζυμο περιορισμού NdeI.



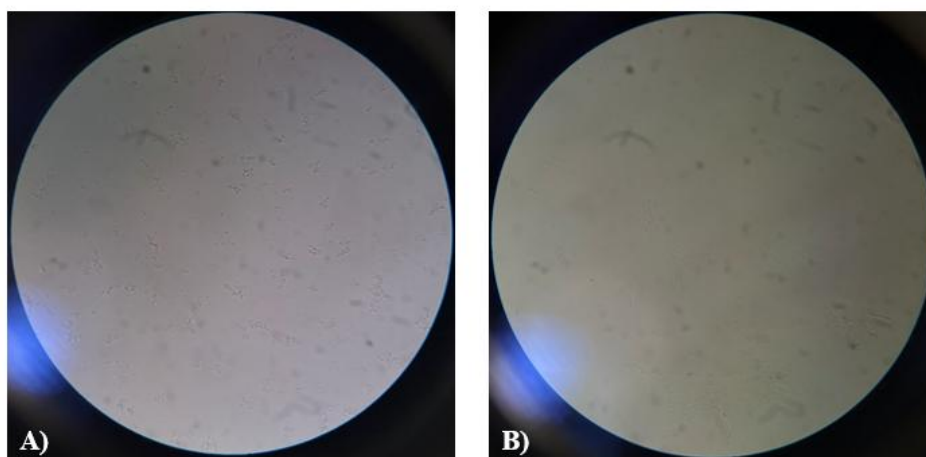
Εικόνα 21: Α) Μοριακή κλίμακα αναφοράς, γνωστού μήκους τμημάτων DNA, από το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), Β) Αποτελέσματα ταυτοποίησης ενσωμάτωσης γονιδίου *Tfu_1647*, σε πλασμιδιακό φορέα *pet28a*. Το βέλος αντιστοιχεί στη ζώνη 2.000 bp της κλίμακας αναφοράς.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό GelAnalyzer 23.1, χρησιμοποιώντας ως μοριακή κλίμακα αναφοράς το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Ταυτόχρονα, στη πηκτή αγαρόζης φορτώθηκε και ένα δείγμα μη γενετικά τροποποιημένου πλασμιδίου *pet28a*, το οποίο είναι γνωστό ότι έχει μήκος 5.369 bp. Επειδή τα δείγματα και το πλασμίδιο «control» δεν έγιναν γραμμικά μέσω της δράσης του ενζύμου περιορισμού *NdeI*, οι φθορίζουσες ζώνες που εμφανίστηκαν στη πηκτή ηλεκτροφόρησης είχαν ασυνήθιστη μορφολογία (**Εικόνα 21**). Επιπλέον, το ύψος των ζωνών στα δείγματα είναι μεγαλύτερο από το φυσιολογικό, καθώς τα κυκλικά μόρια είναι δύσκολο να τρέξουν, μεταξύ των πόρων της πηκτής.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το GelAnalyzer 23.1 έδειξαν πως, σύμφωνα με τη μοριακή κλίμακα αναφοράς το πλασμίδιο «control» βρίσκεται λίγο υψηλότερα από το ύψος των 5.000 bp. Παρ' όλα αυτά καθώς το ίδιο δείγμα έτρεξε ως control, σε προηγούμενες ηλεκτροφορήσεις DNA (**Εικόνα 18**), είναι γνωστό ότι αντιστοιχεί στο σωστό πλασμίδιο. Αντίστοιχα, τα δύο δείγματα πλασμιδίων που φορτώθηκαν στη πηκτή, βρίσκονταν 1.518 bp, υψηλότερα από το δείγμα «control», (**Εικόνα 21**). Επομένως τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21, δέχθηκαν εξίσου ένα γενετικά τροποποιημένο πλασμίδιο.

4.3.4 Δημιουργία αποθεμάτων μετασχηματισμένων *E. coli* BL21 κυττάρων σε cryovials.

Πριν τη δημιουργία cryovials, για την αποθήκευση του γενετικά τροποποιημένου μικροοργανισμού *E. coli* BL21, δείγματα από τις δύο καλλιέργειες που εμφάνισαν ανάπτυξη παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο, για να προσδιοριστούν πιθανές επιμολύνσεις από δευτερογενής μικροοργανισμούς.



Εικόνα 22: Μικροσκοπική παρατήρηση καλλιέργειας κυττάρων *E. coli* BL21. Α) επανάληψη 1. Β) επανάληψη 2.

Το *E. coli* στο μικροσκόπιο εμφανίζεται σε ραβδοειδής μικροσκοπικές δομές, που μπορεί να κινούνται ανεξάρτητα ή σε μικρά συσσωματώματα. Δε παρατηρήθηκαν διαφορετικές μικροβιακές μορφολογίες που θα μπορούσαν να αποτελούν επιμόλυνση της καλλιέργειας, σε καμία από τις δύο επαναλήψεις (**Εικόνα 22**).

Η αποθήκευση του μετασχηματισμένου μικροοργανισμού επιτρέπει την απευθείας χρήση του σε μεταγενέστερα πειράματα, χωρίς να είναι απαραίτητη η εισαγωγή του πλασμιδίου σε δεκτικά κύτταρα (competent cells) *E. coli* BL21.

4.3.7 Ανάπτυξη *E. coli* BL21 και βακτηριακή έκφραση

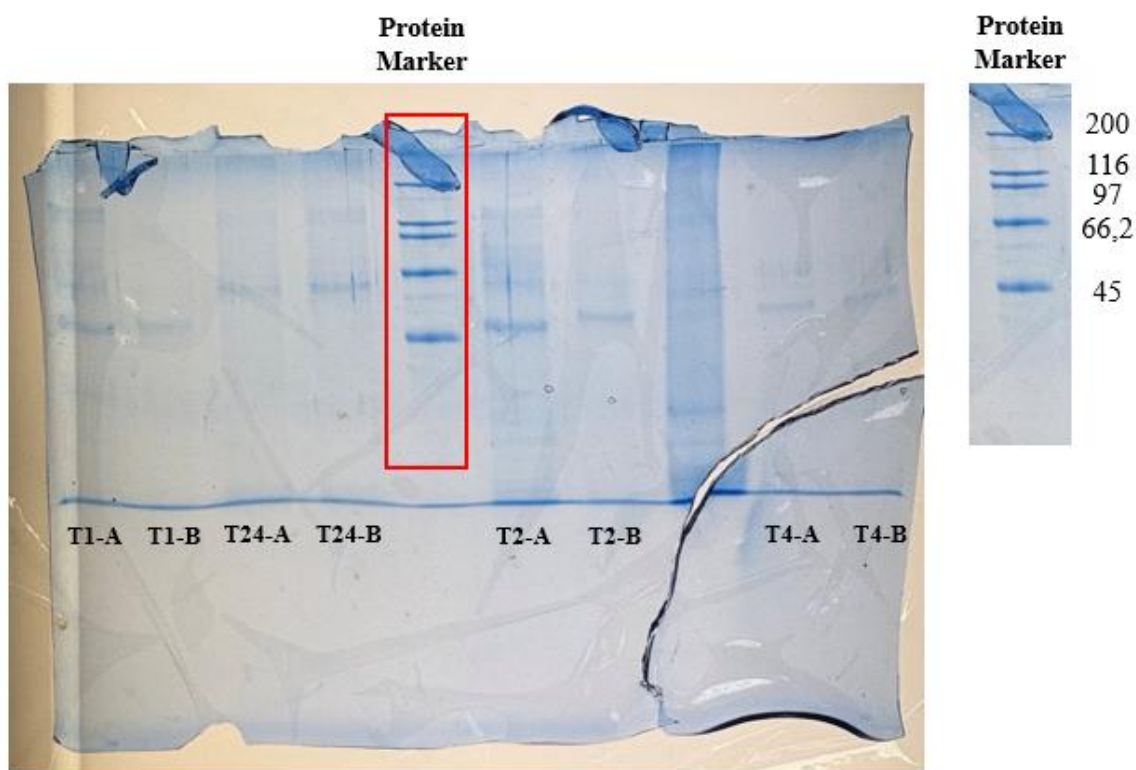
Ποσότητα 1 mL καλλιέργειας από τις κωνικές φιάλες που περιείχαν το μετασχηματισμένο *E. coli* BL21, εμβολιάστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB medium εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό καναμυκίνη σε κωνικές φιάλες με baffles. Μετά τη προσθήκη IPTG, για να προσδιοριστεί η έκφραση της πρωτεΐνης απομονώθηκαν 2 mL καλλιέργειας τις χρονικές στιγμές T0, T1, T2, T4, T24, όπως περιγράφηκε στο **Κεφάλαιο 3.6.3**. Για κάθε καλλιέργεια είχαν απομονωθεί δύο δείγματα, τα οποία επεξεργάστηκαν με διαφορετική μεθοδολογία.

Η φασματοφωτομετρική μέθοδος Bradford απέδειξε, ότι πράγματι υπάρχει έκφραση πρωτεϊνών, στα απομονωμένα δείγματα του στελέχους *E. coli* BL21.

4.3.7.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Αφού επιβεβαιώθηκε η έκφραση πρωτεϊνών, στη συνέχεια τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE), όπως περιγράφηκε στο **Κεφάλαιο 3.6.5**. Στην SDS-PAGE οι προς εξέταση πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο και μετακινούνται προς το

ηλεκτρόδιο της καθόδου με βάση το μοριακού τους βάρος. Οι μεγάλοι μοριακού βάρους πρωτεΐνες κινούνται πιο αργά από τις μικρότερες πρωτεΐνες, γιατί είναι πιο δύσκολο να κινηθούν μεταξύ των πόρων της πηκτής.



Εικόνα 23: Κλίμακα αναφοράς, γνωστού μοριακού βάρους πρωτεϊνών, από BlueStar Prestained Protein Marker (Cat. No. MWP03, Nippon Genetics Europe GmbH) Β) Αποτελέσματα ταυτοποίησης χρονικής έκφρασης 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλο-CoA. Το βέλος αντιστοιχεί στη ζώνη 48 kDa της κλίμακας αναφοράς.

Η ερμηνεία της πηκτής ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε από το λογισμικό GelAnalyzer 23.1. Στη πηκτή πολυακρυλαμίδιου φορτώθηκε και η πρωτεϊνική κλίμακα αναφοράς, BlueStar Prestained Protein Marker (Cat. No. MWP03, Nippon Genetics Europe GmbH) που περιλαμβάνει πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους για να ολοκληρωθεί η σύγκριση με τις πρωτεΐνες προς μελέτη. Το ένζυμο 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλο-CoA αναγωγάση βρίσκεται στο ύψος των 44,29 kDa.

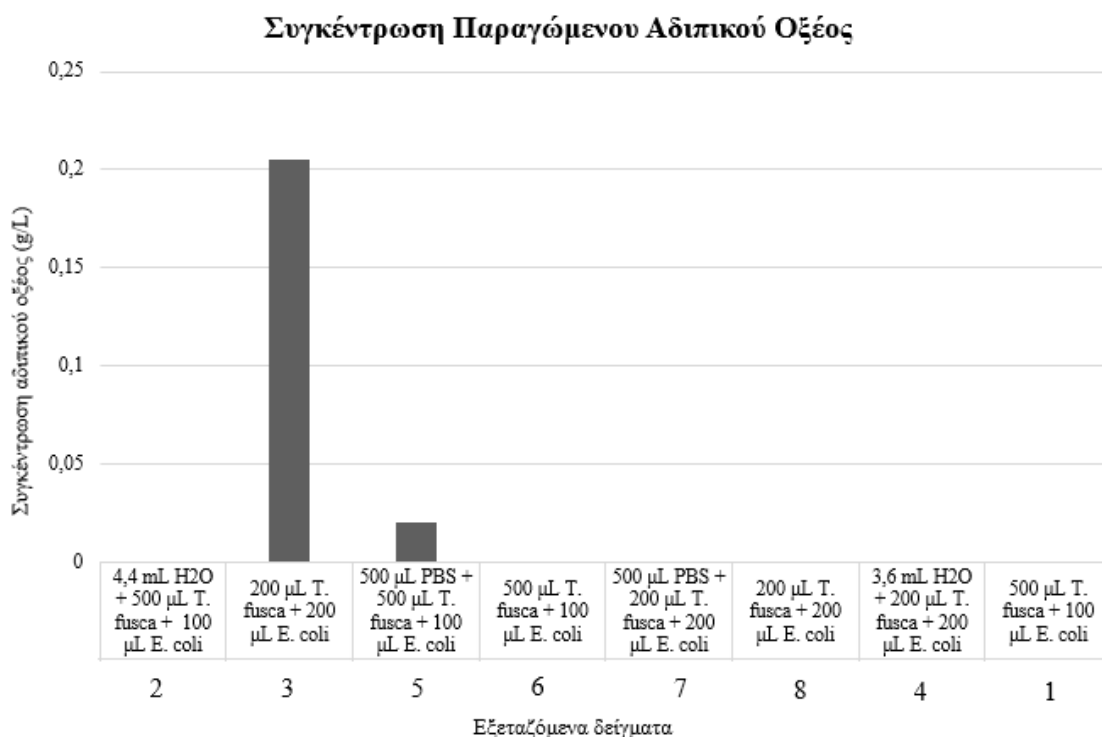
Στη πηκτή φορτώθηκαν αποκλειστικά τα δείγματα από την επανάληψη 1 της καλλιέργειας *E. coli* BL21. Για τις χρονικές στιγμές T1, T2, T4 και T24 εξετάστηκαν τόσο τα δείγματα της ομάδας Α όσο τα δείγματα της ομάδας Β. (**Εικόνα 23**). Σύμφωνα με, το GelAnalyzer 23.1, τα περισσότερα δείγματα εμφάνισαν έκφραση μιας πρωτεΐνης στο ύψος των 45 kDa (**Εικόνα 23**). Άρα, η έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μέσου του πλασμιδιακού φορέα pet28a ήταν επιτυχής.

Η ένταση του φθορισμού στη πηκτή είναι ανάλογη, της ποσότητας της πρωτεΐνης στο δείγμα. Μετά τη χρονική στιγμή T4, η έκφραση της 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλο-CoA

αναγωγής φθίνει, καθώς ο φθορισμός των ζωνών είναι λιγότερο έντονος (**Εικόνα 23**). Επίσης, τη χρονική στιγμή T24 έχει σταματήσει η έκφραση της πρωτεΐνης (**Εικόνα 23**). Αυτό, οφείλεται σε κορεσμό του συστήματος έκφρασης. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκε ότι οι διαφορετικές μέθοδοι επεξεργασίας των κυττάρων για την απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών μορίων, στα δείγματα της ομάδας A και B, δεν είχε σημαντικές επιπτώσεις. Η μόνη επανάληψη που εμφάνισε μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης στην ομάδα B, ήταν τη χρονική στιγμή T4 (**Εικόνα 23**).

4.4 In vitro παραγωγή αδιπικού οξέος

Η in vitro παραγωγή αδιπικού οξέος επιτεύχθηκε μέσω της συνένωσης λύματος κυττάρων *Thermobifida fusca* και *E. coli* BL21, όπως περιγράφηκε στο **Κεφάλαιο 3.7**. Ο προσδιορισμός παραγωγής αδιπικού οξέος in vitro, επιτεύχθηκε μέσω τη μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Ανάλυσης (HPLC). Η εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη αδιπικού οξέος (**Γράφημα 1**), χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αδιπικού οξέος, στα διαφορετικά διαλύματα ενζυμικής αντίδρασης.



Γράφημα 8: Γράφημα παραγόμενης συγκέντρωσης αδιπικού οξέος, σε διαφορετικά διαλύματα.

Η παραγωγή αδιπικού οξέος παρατηρήθηκε για τα δείγματα που περιείχαν: 3) 200 μL *T. fusca* και 200 μL *E. coli*, αλλά τα κύτταρα είχαν διαλυθεί σε συμποκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS X10, 5) 500 μL *T. fusca* και 100 μL *E. coli*, διαλυμένα σε 500 μL μη

συμπυκνωμένου PBS. Οι υπόλοιπες επαναλήψεις δεν εμφάνισαν παραγωγή αδιπικού οξέος, ή το εμβαδόν κορυφής ήταν πολύ μικρό για να προκύψει πραγματική τιμή από την εξίσωση πρότυπης καμπύλης (επανάληψη 6 και επανάληψη 7), (**Γράφημα 1**).

Η μεγαλύτερη ποσότητα αδιπικού οξέος που παράχθηκε από 20 g/L γλυκόζης, ήταν 0,2 g/L από την ενζυμική αντίδραση 200 μ L *T. fusca* και 200 μ L *E. coli*, από κύτταρα που είχαν διαλυθεί σε συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS X10 (**Γράφημα 8**). Επομένως, η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS 7,4 δεν είναι περιοριστική για τη πραγματοποίηση της αντίδρασης.

5. Συζήτηση

Επί του παρόντος η παραγωγή αδιπικού οξέος από το βενζόλιο, αφήνει μεγάλο περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Επομένως, η παραγωγή αδιπικού οξέος μέσω μιας περιβαλλοντικά φιλικής διεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα κρίνεται απαραίτητη. Στη παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε η παραγωγή αδιπικού οξέος *in vitro*, από λύμα κυττάρων του *T. fusca* 190th^T παρουσία του ενζύμου 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλο-CoA αναγωγάση.

Η επιλογή του *T. fusca* 190th^T, ως ξενιστή παραγωγής στηρίχθηκε στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός περιλαμβάνει ενδογενώς ένα μονοπάτι για τη παραγωγή αδιπικού οξέος, άρα η διαδικασία είναι λιγότερη δαπανηρή και χρονοβόρα. Για να προσπελαστεί η περιορισμός του μονοπατιού από το ένζυμο της 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλ-CoA αναγωγάσης, το γονίδιο *Tfu_1647* απομονώθηκε το *T. fusca*, και εισήχθη στο *E. coli* DH5a μέσω του πλασμιδίου *pet28a*.

Μετά το πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού DNA, ο γενετικά τροποποιημένος φορέας εισήχθη στο στέλεχος *E. coli* BL21 για παραγωγή της πρωτεΐνης. Το κυτταρικό λύμα του *E. coli* BL21 ενοποιήθηκε με το κυτταρικό λύμα του *T. fusca* προς σχηματισμό αδιπικού οξέος. Η επιλογή του *E. coli* ως μέσο για γενετική τροποποίηση ήταν επιτηδευμένη, καθώς αποτελεί το πλέον κατάλληλο εργαλείο γενετικής μηχανικής. Η μέγιστη ποσότητα αδιπικού οξέος που παράχθηκε από 20 g/L γλυκόζη, ήταν 0,2 g/L αδιπικό οξύ.

Αντίστοιχες μελέτες που στηρίχθηκαν στο βιοχημικό μονοπάτι αντίστροφης αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος (RADP), είναι των Deng και Mao που πραγματοποίησαν μια παρόμοια πειραματική προσέγγιση αποδίδοντας τη μέγιστη ποσότητα αδιπικού οξέος που έχει παραχθεί μέχρι σήμερα 2,23 g/L από 50 g/L γλυκόζη (Deng & Mao, 2015). Σκοπός της έρευνας των Deng και Mao ήταν, να επιβεβαιωθεί ότι η παραγωγή αδιπικού οξέος οφείλεται στο αντίστροφο μονοπάτι αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος (RADP) και το ρυθμιστικό σημείο του μονοπατιού είναι η αντίδραση που καταλύεται από την 5-καρβοξυ-2-πεντενοϋλο-CoA αναγωγάση (Deng & Mao, 2015). Οι ερευνητές επιχείρησαν τη παραγωγή αδιπικού οξέος σε κυτταρικό λύμα των βακτηριακών στελεχών *T. fusca* B6 και *T. fusca* wild type (Deng & Mao, 2015).

Η ανάπτυξη του *T. fusca* WT πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο Hagerdahl medium, όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα όπως, γλυκόζη και καλαμποκάλευρο. Το στέλεχος *T. fusca* B6, καλλιεργήθηκε σε Hagerdahl medium που είχε εμπλουτιστεί με 50 mg/L καναμυκίνη (Deng & Mao, 2015).

Ποσότητα προκαλλιέργειας 50 mL των *T. fusca* WT και *T. fusca* B6 αντίστοιχα, επώαστηκε για 24 h, σε 2000 στροφές/min. Στη συνέχεια, 200 µL κάθε προκαλλιέργειας εμβολιάστηκαν σε 5 L θρεπτικού μέσου σε βιοαντιδραστήρα. Ο βιοαντιδραστήρας έφερε baffles και αναδευτήρα, που επέτρεπε την ομοιόμορφη ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Η ανάπτυξη διήρκησε 42-68 h, χωρίς αερισμό σε θερμοκρασία 55 °C. Η παραγόμενη βιομάζα για τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε γλυκόζη προσδιορίστηκε από τη συγκέντρωση του ξηρού βάρους (Deng & Mao, 2015). Αντίθετα, στη παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *T. fusca* 190th^T και η ανάπτυξη έγινε αποκλειστικά, παρουσία γλυκόζης, σε κωνικές φιάλες υπό ανάδευση. Επιπλέον, η παραγόμενη βιομάζα προσδιορίστηκε μέσω μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, τη μικροσκοπική παρατήρηση pellets σε πλάκα Neubauer και τη μέτρηση του ξηρού βάρους.

Στην έρευνα των Deng και Mao, η ενίσχυση του γονιδίου *Tfu_1647* πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδραση PCR (Deng & Mao, 2015). Στη συνέχεια το πλασμίδιο *pet28a* και το γονίδιο στόχος *Tfu_1647* επώαστηκαν, με τα ένζυμα περιορισμού *Bam*HI και *Not*I (New England Biolabs), (Deng & Mao, 2015). Τα παραπάνω ένζυμα περιορισμού κόβουν το πλασμίδιο *pet28a* στις θέσεις 198 bp και 166 bp αντίστοιχα. Αντιθέτως, στη παρούσα πτυχιακή εργασία αξιοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού *Sac*I-HF και *Hind*III (New England Biolabs), που κόβουν το πλασμίδιο *pet28a* στις θέσεις 190 bp και 173 bp, αντίστοιχα. Η αντίδραση σύνδεσης των μονόκλωνων άκρων του πλασμιδίου και του γονιδίου πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στη παρούσα μελέτη (Deng & Mao, 2015).

Ο πολλαπλασιασμός του πλασμιδίου έγινε μέσω του βακτηριακού στελέχους *E. coli* DH5a. Στη συνέχεια, η έκφραση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε στο βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BL21, μετά τη προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mmol/L. Η προσθήκη του IPTG, πραγματοποιήθηκε όταν η θολερότητα της καλλιέργειας ήταν $A = 0,300 - 0,400$ και η επαγωγή διήρκησε συνολικά μόνο 6 ώρες (Deng & Mao, 2015). Αντιθέτως, στη παρούσα πτυχιακή εργασία το IPTG προστέθηκε στις καλλιέργειες σε υψηλότερη τιμή θολερότητας $A = 0,500 - 0,600$ και η επώαση διήρκησε μια ολόκληρη μέρα.

Μετά τη ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών των στελεχών *T. fusca* B6 και *T. fusca* WT, οι ερευνητές Deng και Mao ακολούθησαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Το κυτταρικό λύμα του *T. fusca* WT επώαστηκε αρχικά μόνο με ηλεκτρύλο-CoA και άκετυλο-CoA σε συγκέντρωση 10 mg/L (Deng & Mao, 2015). Σε μια διαφορετική επανάληψη, το κυτταρικό λύμα του *T. fusca* WT επώαστηκε με ηλεκτρύλο-CoA και άκετυλο-CoA σε συγκέντρωση 10 mg/L, και διαφορετικές συγκεντρώσεις της 5-καρβοξυ-πεντενοϋλο-CoA αναγωγάσης. Η τελευταία στρατηγική επαναλήφθηκε για το βακτηριακό στέλεχος *T. fusca* B6 (Deng & Mao,

2015). Η αντίδραση έλαβε χώρα για 12 h στους 50 °C. Η ανίχνευση του παραγόμενου αδιπικού οξέος πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου HPLC (Deng & Mao, 2015).

Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν πως η έκφραση των γονιδίων της οδού αντίστροφης αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος (RADP) δεν είναι σταθερή, μεταξύ των διαφορετικών στελεχών *T. fusca*. Το στέλεχος *T. fusca* B6 παρήγαγε μέγιστη ποσότητα 2,23 g/L αδιπικό οξύ από 50 g/L γλυκόζη. Το στέλεχος *T. fusca* WT που επωάστηκε με το ρυθμιστικό ένζυμο, απέδωσε πολύ μικρή ποσότητα αδιπικού οξέος, ενώ απουσία του ενζύμου δε παράχθηκε καθόλου αδιπικό οξύ (Deng & Mao, 2015). Στη παρούσα μελέτη, η παραγωγή αδιπικού οξέος δεν επιτεύχθηκε με τη προσθήκη ηλεκτρώλιο-CoA και ακέτυλο-CoA, αντιθέτως στηρίχθηκε στην παραγωγή των πρόδρομων μορίων από το καταβολισμό της γλυκόζης. Αυτό ίσως εξηγεί γιατί η συγκέντρωση του αδιπικού οξέος δεν κατόρθωσε να αυξηθεί περαιτέρω.

Σε μια άλλη μελέτη, το αντίστροφο μονοπάτι αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος (RADP), αναδημιουργήθηκε στο βακτήριο *E. coli* επιτυγχάνοντας παραγωγή 68 g/L αδιπικού οξέος, πρωτοφανής τιμή για το συγκεκριμένο βακτηριακό είδος (Zhao et al., 2018). Άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν επιχειρήσει τη παραγωγή αδιπικού οξέος μέσω άλλων βιοχημικών μονοπατιών, επιτυγχάνοντας διαφορετικά επίπεδα και αποδόσεις παραγωγής αδιπικού οξέος (Πίνακας 7). Για παράδειγμα σε μια ερευνητική προσέγγιση, όπου ως ξενιστής παραγωγής αξιοποιήθηκε το βακτήριο *E. coli*, το ακέτυλο-CoA επιμηκύνθηκε προς καπροϊκό οξύ μέσω της οδού αντίστροφης β-οξειδωσης (Clomburg et al., 2015). Μέσω ενός ανασυνδυασμένου μονοπατιού ω-οξειδωσης το καπροϊκό οξύ μετατράπηκε σε αδιπικό οξύ (Clomburg et al., 2015). Επιπλέον, η εταιρία Verdezyne στηρίχθηκε στη παραγωγή αδιπικού οξέος, μέσω του μονοπατιού β-οξειδωσης (Skoog et al., 2018). Η οξείδωση των λιπαρών οξέων, οδηγεί στη παραγωγή δικαρβοξυλικών προϊόντων τα οποία μεταβολίζονται από το μονοπάτι β-οξειδωσης. Η χρήση μιας εξειδικευμένης ισομορφής του ενζύμου άκυλο-CoA οξειδάσης, που δεν εμφανίζει συγγένεια για το αδιπικό οξύ και καταλύει το πρώτο βήμα στο κύκλο β-οξειδωσης, επιτρέπει τη μαζική παραγωγή του εξανοδιοϊκού οξέος σε συγκέντρωση 50 g/L (Beardslee & Picataggio, 2012;

Η χρήση μικροοργανισμών ως εργοστάσια για την παραγωγή αδιπικού οξέος, αποτελεί μια ανερχόμενη δελεαστική πρόταση, λόγω του φθηνού κόστους της βιομάζας. Επί του παρόντος είναι αναγκαίο να δοκιμαστούν νέα υποστρώματα ως πηγή άνθρακα, εκτός της γλυκόζης για τη παραγωγή του αδιπικού οξέος. Σε ορισμένες μελέτες αποπειράθηκε η χρήση γλυκερόλης, καλαμποκάλευρου ακόμα και λιπαρών οξέων (Deng & Mao, 2015; Zhao et al., 2018; Beardslee & Picataggio, 2012). Στόχος είναι να βρεθούν φθηνότερα υλικά που να μπορούν να υποστηρίξουν υψηλή παραγωγή του οξέος.

Επιπλέον, σημαντική είναι η βελτιστοποίηση στη λειτουργία και την έκφραση των ενζύμων που συμμετέχουν στο βιοχημικό μονοπάτι αντίστροφης αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος, ώστε να επιτευχθεί η αποκλειστική παραγωγή αδιπικού οξέος, χωρίς να χάνεται πηγή άνθρακα σε δευτερογενή μεταβολικά μονοπάτια. Η παραπάνω προσέγγιση μπορεί να απαιτεί και παρεμβολή της λειτουργίας διαφορετικών ενδοκυτταρικών μονοπατιών, μέσω των εργαλείων της γενετικής μηχανικής.

Η παρούσα διπλωματική εργασία θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως μια θεμελιώδης προσέγγιση στην παραγωγή αδιπικού οξέος από μικροβιακούς ξενιστές παραγωγής. Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να αξιοποιήσουν το πειραματικό σχεδιασμό και να βελτιώσουν την απόδοση παραγωγής του αδιπικού οξέος. Η περαιτέρω διερεύνηση εναλλακτικών μικροοργανισμών, η γενετική τους βελτιστοποίηση καθώς και η ολοκλήρωση βιοδιεργασιών μεγάλης κλίμακας, θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο μελλοντικής έρευνας, οδηγώντας σε πρακτικές εφαρμογές στην πράσινη βιομηχανία.

Πίνακας 7: Ερευνητικές μελέτες, που αποσκοπούν στη βιο-παραγωγή αδιπικού οξέος.

Βιοχημικό Μονοπάτι	Ποσότητα παραγόμενου αδιπικού οξέος (g/L)	Υπόστρωμα	Ξενιστής Παραγωγής	Βιβλιογραφία
Αντίστροφο μονοπάτι αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος	0,2	Γλυκόζη	<i>T. fusca</i>	Παρούσα εργασία
Αντίστροφο μονοπάτι αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος	2,23	Γλυκόζη	<i>T. fusca</i>	(Deng & Mao, 2015)
Αντίστροφος μονοπάτι αποικοδόμησης του αδιπικού οξέος	68	Γλυκερόλη	<i>E. coli</i>	(Zhao et al., 2018)
Αντίστροφο μονοπάτι β-οξείδωσης και ω-οξείδωση	0,17	Γλυκερόλη	<i>E. coli</i>	(Clomburg et al., 2015)
ω-οξείδωση συνδυασμένη με β-οξείδωση	50	Λιπαρά οξέα	<i>Candida spp.</i>	(Beardslee & Picataggio, 2012)
Μονοπάτι 2-οξοπιμελικού οξέος	0,3	Γλυκόζη	<i>E. coli</i>	(2/2003 Schilling FOREIGN PATENT DOCUMENTS, 2007)

Βιβλιογραφία

- 2/2003 Schilling FOREIGN PATENT DOCUMENTS. (2007).
- Babu, T., Yun, E. J., Kim, S., Kim, D. H., Liu, K. H., Kim, S. R., & Kim, K. H. (2015). Engineering *Escherichia coli* for the production of adipic acid through the reversed β -oxidation pathway. *Process Biochemistry*, 50(12), 2066–2071. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.09.018>
- Beardslee, T., & Picataggio, S. (2012). Bio-based adipic acid from renewable oils. *Lipid Technology*, 24(10), 223–225. <https://doi.org/10.1002/lite.201200230>
- Clomburg, J. M., Blankschien, M. D., Vick, J. E., Chou, A., Kim, S., & Gonzalez, R. (2015). Integrated engineering of β -oxidation reversal and ω -oxidation pathways for the synthesis of medium chain ω -functionalized carboxylic acids. *Metabolic Engineering*, 28, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.01.007>
- Deng, Y., Ma, L., & Mao, Y. (2016). Biological production of adipic acid from renewable substrates: Current and future methods. In *Biochemical Engineering Journal* (Vol. 105, pp. 16–26). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.08.015>
- Deng, Y., & Mao, Y. (2015). Production of adipic acid by the native-occurring pathway in *Thermobifida fusca* B6. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 1057–1063. <https://doi.org/10.1111/jam.12905>
- Detns, R. C., Taken, S., Co, F. S., Smith, F., Co, C., & Titrim-, F. (n.d.). *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. III.*
- Dunne, K. A., Chaudhuri, R. R., Rossiter, A. E., Beriotto, I., Browning, D. F., Squire, D., Cunningham, A. F., Cole, J. A., Loman, N., & Henderson, I. R. (n.d.). *Sequencing a piece of history: complete genome sequence of the original Escherichia coli strain.* <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.4235762>
- Galbraith, D., Gross, S. A., & Paustenbach, D. (2010). Benzene and human health: A historical review and appraisal of associations with various diseases. In *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 40, Issue SUPPL. 2, pp. 1–46). <https://doi.org/10.3109/10408444.2010.508162>
- Goldberg, I., & Rokem, J. S. (2009). Organic and Fatty Acid Production, Microbial. In *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 421–442). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00156-5>
- Harland, B. F., & Hraland, J. (1980). Fermentative reduction of Phytate in Rye, White , and Whole Wheat Breads. In *Cereal Chemistry*.

- Karlsson, E., Mapelli, V., & Olsson, L. (2017). Adipic acid tolerance screening for potential adipic acid production hosts. *Microbial Cell Factories*, 16(1).
<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0636-6>
- Kennedy, G. L. (2002). Toxicity of adipic acid. *Drug and Chemical Toxicology*, 25(2), 191–202. <https://doi.org/10.1081/DCT-120003259>
- Lie, S. (1973). THE EBC-NINHYDRIN METHOD FOR DETERMINATION OF FREE ALPHA AMINO NITROGEN. *Journal of the Institute of Brewing*.
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03495.x>
- Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N., Anderson, I., Land, M., DiBartolo, G., Martinez, M., Lapidus, A., Lucas, S., Copeland, A., Richardson, P., Wilson, D. B., & Kyrpides, N. (2007). Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2477–2486.
<https://doi.org/10.1128/JB.01899-06>
- Martinson, J. N. V., & Walk, S. T. (2020). Escherichia coli Residency in the Gut of Healthy Human Adults . *EcoSal Plus*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0003-2020>
- Meyer, H.-P., & R., D. (2012). Microbial Expression Systems and Manufacturing from a Market and Economic Perspective. In *Innovations in Biotechnology*. InTech.
<https://doi.org/10.5772/29417>
- Moon, T. S., Yoon, S. H., Lanza, A. M., Roy-Mayhew, J. D., & Jones Prather, K. L. (2009). Production of glucaric acid from a synthetic pathway in recombinant Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 589–595.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00973-08>
- Niu, W., Draths, K. M., & Frost, J. W. (2002). Benzene-free synthesis of adipic acid. *Biotechnology Progress*, 18(2), 201–211. <https://doi.org/10.1021/bp010179x>
- Polen, T., Spelberg, M., & Bott, M. (2013). Toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 167, Issue 2, pp. 75–84). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.008>
- Pontrelli, S., Chiu, T. Y., Lan, E. I., Chen, F. Y. H., Chang, P., & Liao, J. C. (2018). Escherichia coli as a host for metabolic engineering. In *Metabolic Engineering* (Vol. 50, pp. 16–46). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.008>
- Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in Escherichia coli. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0939-8>

- Skoog, E., Shin, J. H., Saez-Jimenez, V., Mapelli, V., & Olsson, L. (2018). Biobased adipic acid – The challenge of developing the production host. In *Biotechnology Advances* (Vol. 36, Issue 8, pp. 2248–2263). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.012>
- Turk, S. C. H. J., Kloosterman, W. P., Ninaber, D. K., Kolen, K. P. A. M., Knutova, J., Suij, E., Schürmann, M., Raemakers-Franken, P. C., Müller, M., De Wildeman, S. M. A., Raamsdonk, L. M., Van Der Pol, R., Wu, L., Temudo, M. F., Van Der Hoeven, R. A. M., Akeroyd, M., Van Der Stoel, R. E., Noorman, H. J., Bovenberg, R. A. L., & Trefzer, A. C. (2016). Metabolic Engineering toward Sustainable Production of Nylon-6. *ACS Synthetic Biology*, 5(1), 65–73. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00129>
- Van Den Bogart, H. G. G., Van Den Ende, G., Van Loon, P. C. C., & Van Griensven, L. J. L. D. (1993). Mushroom worker's lung: Serologic reactions to thermophilic actinomycetes present in the air of compost tunnels. In *Mycopathologia* (Vol. 122).
- Weber, C., Brückner, C., Weinreb, S., Lehr, C., Essl, C., & Boles, E. (2012). Biosynthesis of cis,cis-muconic acid and its aromatic precursors, catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8421–8430. <https://doi.org/10.1128/AEM.01983-12>
- Zhao, M., Huang, D., Zhang, X., Koffas, M. A. G., Zhou, J., & Deng, Y. (2018). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing adipic acid through the reverse adipate-degradation pathway. *Metabolic Engineering*, 47, 254–262.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.002>