

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της ρύθμισης της βιοσύνθεσης των PHAs στο θερμόφιλο βακτήριο *T. thermophilus* και συγκεκριμένα εξετάστηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων στη παραγωγή του πολυμερούς. Με στόχο τη μείωση του κόστους παραγωγής των PHAs χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια το τυρόγαλα, ένα φτηνό βιομηχανικό παραπροϊόν ως πηγή άνθρακα. Στη συνέχεια καθарίστηκε η εξωκυττάρια PHB αποπολυμεράση του *T. thermophilus*. Οι φυσικοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου μελετήθηκαν ενώ ταυτοποιήθηκε και το γονίδιο που το κωδικοποιεί. Όπως επίσης αποδείχθηκε το *T. thermophilus* έχει την ικανότητα να κινείται με τη βοήθεια μαστιγίων. Τόσο η μονομερής πρωτεΐνη φλαγγελίνη, όσο και τα μαστίγια απομονώθηκαν και μελετήθηκαν οι ιδιότητές τους.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας αυτής, μελετήθηκε η ρύθμιση παραγωγής των PHAs στο βακτήριο *T. thermophilus* HB8. Τα PHAs είναι αποθηκευτικά υλικά ενέργειας και άνθρακα τα οποία συντίθενται από πολλούς μικροοργανισμούς όταν βρεθούν σε κατάσταση μεταβολικού στρες, όταν δηλαδή παρατηρείται έλλειψη ενός απαραίτητου συστατικού για την ανάπτυξη του κυττάρου, κυρίως αζώτου ή φωσφόρου, ενώ παράλληλα είναι διαθέσιμη σε περίσσεια κάποια πηγή άνθρακα. Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των φωσφορικών στη παραγωγή του PHA στο *T. thermophilus*, σε θρεπτικά μέσα ανάπτυξης τα οποία περιείχαν γλυκονικό νάτριο ως πηγή άνθρακα και περίσσεια αμμωνιακών ιόντων. Καθώς η αρχική συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων στο μέσο ανάπτυξης αυξανόταν από τα 0 στα 25 mM παρατηρήθηκε αύξηση τόσο του παραγόμενου PHA όσο και της δραστηρότητας του υπεύθυνου ενζύμου για την βιοσύνθεσή του, δηλαδή της PHA συνθάσης, το οποίο εντοπίζεται κυρίως στους κόκκους του πολυμερούς. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φωσφορικών ιόντων είχαν αρνητική επίδραση τόσο στη δραστηρότητα της PHA συνθάσης όσο και στη συσσώρευση του πολυμερούς. Στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι η χρονική στιγμή στην οποία θα σημειωθεί η έλλειψη των θρεπτικών συστατικών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη παραγωγή του πολυμερούς. Όταν στο θρεπτικό μέσο προστεθήκαν φωσφορικά ιόντα σε αρχική συγκέντρωση 25 mM, η έλλειψή τους παρατηρήθηκε με την έναρξη της στατικής φάσης ανάπτυξης και ενώ η τιμή της βιομάζας ήταν αρκετά υψηλή. Λόγω του ότι

στην καλλιέργεια αυτή υπήρχε ικανοποιητικός αριθμός κυττάρων για την παραγωγή του PHA, στη περίπτωση αυτή καταγράφηκε η μεγαλύτερη τιμή συγκέντρωσης πολυμερούς 392 mg/l, ενώ καταλάμβανε ήδη το 40% του συνολικού βάρους των κυττάρων μετά από 24 ώρες ανάπτυξης. Η ταχύτερη κατανάλωση μικρότερων αρχικών συγκεντρώσεων φωσφορικών ιόντων είχε ως αποτέλεσμα και τη χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας και PHA. Επιπρόσθετα αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση του ATP είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση του παραγόμενου πολυμερούς. Για το λόγο αυτό, ο συνεχής σχηματισμός ATP στη καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων 50 mM είχε ως αποτέλεσμα τη μικρότερη παραγωγή πολυμερούς.

Το παραγόμενο PHA μοριακού βάρους περίπου 280.000, διαπιστώθηκε ότι ήταν ετεροπολυμερές, το οποίο αποτελούνται κυρίως από το 3-υδροξυδεκανοϊκό (3HD) σε ποσοστό 61%. Σε μικρότερο ποσοστό ανιχνεύθηκαν τα μονομερή 3-υδροξυβουτυρικό (3HB, 5mol%), 3-υδροξυβαλερικό (3HV, 8mol%) και 3-υδροξυοκτανοϊκό (3HO, 25 mol%). Τα σημεία τήξεως και υαλώδους μεταπτώσεως βρέθηκαν περίπου ίσα με 175,6 °C και 70 °C αντίστοιχα, ενώ το ποσοστό κρυσταλλικότητας ήταν περίπου 40%.

Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε και η ικανότητα του *T. thermophilus* να αξιοποιεί την λακτόζη που περιέχεται στο τυρόγαλα για την παραγωγή PHA σε συνθήκες περιορισμού αζώτου. Όπως αποδείχθηκε, το *T. thermophilus* έχει την ικανότητα να καταβολίζει τόσο τη γλυκόζη όσο και τη γαλακτόζη, δηλαδή τα προϊόντα υδρόλυσης της λακτόζης, για τη παραγωγή PHA. Στη καλλιέργεια η οποία περιείχε τυρόγαλα σε συγκέντρωση 24% v/v η συσσώρευση του πολυμερούς ανήλθε στο 35% του συνολικού βάρους των κυττάρων μετά από 24 ώρες ανάπτυξης. Ακολούθως, εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων στην παραγωγή του PHA. Η προσθήκη φωσφορικών ιόντων στο μέσο ανάπτυξης σε συγκέντρωση 50 mM είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της βιοσύνθεσης του πολυμερούς. Χρησιμοποιώντας το τυρόγαλα ως πηγή άνθρακα, το PHA που εκχυλίστηκε από τα κύτταρα του *T. thermophilus* είχε μοριακό βάρος 15.000, και ήταν ένα ασυνήθιστο ετεροπολυμερές το οποίο περιείχε το μικρής ανθρακικής αλυσίδας 3-υδροξυβαλερικό (3HV, 38 mol%) και τα μεσαίας ανθρακικής αλυσίδας, 3-υδροξυεπτανοϊκό (3HHp, 9,9 mol%), 3-υδροξυεννεανοϊκό (3HN, 16,6 mol%) και 3-υδροξυενδεκανοϊκό (3HU, 35,4 mol%).

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας μελετήθηκε η παραγωγή της PHB αποπολυμεράσης από το *T. thermophilus*. Η ικανότητα του βακτηρίου να αναπτύσσεται και να αποικοδομεί εξωκυττάρια το PHB διαπιστώθηκε αρχικά σε τρυβλία τα οποία περιείχαν τροποποιημένο μέσο ανάπτυξης και PHB ως πηγή άνθρακα. Οι διαυγείς ζώνες γύρω από τις αποικίες του *T. thermophilus* αποτελούν ένδειξη της έκκρισης μίας τουλάχιστον PHB αποπολυμεράσης. Η εξωκυττάρια PHB αποπολυμεράση με μοριακή μάζα 42 kDa καθарίστηκε με χρωματογραφία αγκιστείας μέχρι ομοιογένειας, ενώ για την αύξηση της απόδοσης της παραλαβής του ενζύμου αυτού αναπτύχθηκε ένα καινούργιο χρωματογραφικό υλικό επικαλύπτοντας σφαιρίδια πυριτίου με επικάλυψη σκόνη κρυσταλικού PHB. Το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την εξωκυττάρια PHB αποπολυμεράσης ταυτοποιήθηκε ως το TTHA0199 του *T. thermophilus* HB8. Η αμινοξική ακολουθία του προϊόντος του γονιδίου TTHA0199 παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με εξωκυττάρια PHB αποπολυμεράσες άλλων στελεχών. Παράλληλα στην αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο TTHA0199, ταυτοποιήθηκε η καταλυτική τριάδα αμινοξέων S₂₀₃, E₃₂₉, και H₄₂₅ και το “κουτί λιπάσης” (GX₁SX₂G) το οποίο είναι χαρακτηριστικό για τις PHB αποπολυμεράσες και για άλλες υδρολάσες σερίνης. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και συγκέντρωσης υποστρώματος για τη δραστηριότητα του ενζύμου. Όπως αποδείχθηκε στη συνέχεια, η εξωκυττάρια PHB αποπολυμεράση λειτουργεί ως μία εξω-υδρολάση καθώς το μονομερές 3-υδροξυβουτυρικό ανιχνεύτηκε ως μοναδικό προϊόν κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αποικοδόμησης του PHB.

Στο τελευταίο μέρος της παρούσας διατριβής, μελετήθηκε η ικανότητα του *T. thermophilus* να παράγει μαστίγια και να κινείται σε χαμηλού ή υψηλού ιξώδους μέσα ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, παρά το γεγονός ότι το *T. thermophilus* έχει την ικανότητα να κολυμπάει σε υγρές ή ημίρρευστες καλλιέργειες, δεν διαθέτει την ικανότητα της μεταναστευτικής κίνησης όταν μεταφέρεται σε στερεά μέσα ανάπτυξης. Η παραγωγή των μαστιγίων βρέθηκε ότι επάγεται σε συνθήκες περιορισμού θρεπτικών συστατικών και πηγής άνθρακα. Η μονομερής πρωτεΐνη φλαγγελίνη όπως επίσης και τα μαστίγια, απομονώθηκαν από υγρές καλλιέργειες τροποποιημένου μέσου ανάπτυξης που περιείχαν γλυκονικό νάτριο ως πηγή άνθρακα ή από πλούσιο μέσο ανάπτυξης. Με πειράματα ανοσοαποτύπωσης αποδείχθηκε ότι η φλαγγελίνη του *T. thermophilus* είναι μια πρωτεΐνη με μοριακή μάζα 62 kDa η οποία ανιχνεύεται τόσο ενδοκυττάρια όσο και εξωκυττάρια υποδηλώνοντας ότι ο

σχηματισμός της, ως υδατοδιαλυτό μονομερές, αρχίζει στο κυτταρόπλασμα. Η φλαγγελίνη του *T. thermophilus* αποδείχθηκε ότι είναι γλυκοσυλιωμένη και η αντίδραση της με το ένζυμο N-γλυκοσιδάση F, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση, σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης, μίας πρωτεΐνης στα 60 kDa. Τα αμινοξικά άκρα της φλαγγελίνης ήταν επιρρεπή έναντι πρωτεολυτικών ενζύμων, καθώς όταν αντέδρασε με το ένζυμο τρυψίνη είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αρχικά ενός θραύσματος στα 51 kDa και στη συνέχεια ενός δεύτερου, σταθερότερου στα 32 kDa. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, και τα δύο θραύσματα ανιχνεύονταν με το αντίσωμα έναντι της φλαγγελίνης. Η ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας του N-τελικού άκρου της εξωκυττάριας φλαγγελίνης του *T. thermophilus* φανέρωσε 100% ομοιότητα της περιοχής αυτής με τις φλαγγελίνες της οικογένειας του *Bacillus* sp. και πολύ μεγάλη ομοιότητα με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του *Thermotoga maritima*.