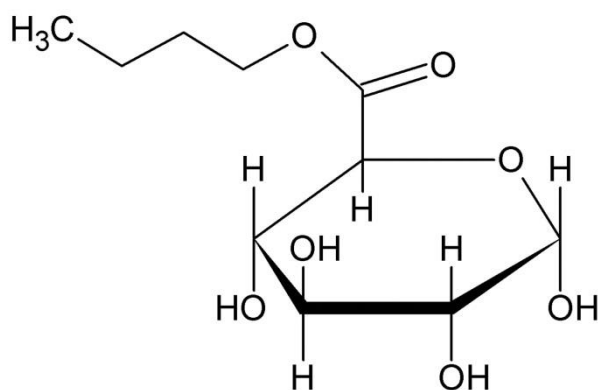


Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο  
Σχολή Χημικών Μηχανικών  
Τομέας IV: Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών  
Διαδικασιών  
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

Διερεύνηση της συνθετικής ικανότητας των  
εστερασών του γλυκουρονικού οξέος σε μη  
συμβατικά συστήματα



Θεόδωρος Σπάθας

Επιβλέπων: Ευάγγελος Τόπακας, Λέκτορας Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2013



# Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου από την Άνοιξη του 2011 ως την Άνοιξη του 2012.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Παύλο Χριστακόπουλο, για την ανάθεση του θέματος και το Λέκτορα Ευάγγελο Τόπακα, υπεύθυνο της εργασίας, για την αδιάλειπτη υποστήριξη, υπομονή, και εμπιστοσύνη του καθ' όλη τη διάρκειά της εκπόνησής της.

Την υποψήφια διδάκτορα Μαριάννα Χαραυγή για τις ακριβείς παρατηρήσεις της και τις σαφείς υποδείξεις κατά την επιμέλεια της συγγραφής της εργασίας.

Τους υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας και ειδικά την Ανθή Καρναούρη, το Λεωνίδα Μάτσακα και το Θωμά Πάσχο για την εργαστηριακή βοήθεια, τη συνεργασία τους και το φιλικό πνεύμα που μου έδειξαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Την οικογένειά μου για την ατόφια στήριξή τους και βοήθεια σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Θεόδωρος Σπάθας,  
Αθήνα 2013



# Περιεχόμενα

## Ευχαριστίες Περίληψη

## Κεφάλαιο 1 Θεωρητικό Μέρος

<b>1.1 Εισαγωγή</b> .....	1
1.1.1 Η ανάγκη για βιωσιμότητα.....	1
1.1.2 Βιομηχανική Βιοτεχνολογία.....	2
1.1.3. Βιοκαύσιμα.....	4
<b>1.2 Πλεονεκτήματα βιοκατάλυσης έναντι χημικών μεθόδων</b> .....	7
<b>1.3 Μικροοργανισμοί</b> .....	9
1.3.1 <i>Sporotrichum thermophile</i> .....	9
1.3.2 <i>Podospora anserina</i> .....	10
<b>1.4. Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος</b> .....	11
1.4.1 Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος από τους μικροοργανισμούς <i>Schizophyllum commune</i> και <i>Hypocrea jecorina</i> .....	12
1.4.2 Συνθετικά υποστρώματα αναγνωρίσιμα από τις εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος των <i>Schizophyllum commune</i> και <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	13
1.4.3 Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος από το μύκητα <i>Sporotrichum thermophile</i> .....	14
1.4.4. Κρυσταλλική δομή της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος StGE2..	15
1.4.5 Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος από το μύκητα <i>Podospora anserina</i> .....	17
<b>1.5 Ενζυμική αποικοδόμηση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας</b> .....	19
1.5.1 Κυτταρικά τοιχώματα.....	19
1.5.2 Δεσμοί μεταξύ λιγνίνης και ημικυτταρινών.....	20
1.5.3 Ενζυμική υδρόλυση δεσμών μεταξύ λιγνίνης και ημικυτταρινών.....	22
<b>1.6 Σύνθεση βιοτασιενεργών εστέρων του D-γλυκουρονικού οξέος με μη συμβατική βιοκατάλυση</b> .....	23
1.6.1 Πλεονεκτήματα βιοκατάλυσης σε μη-συμβατικά μέσα.....	23
1.6.2 Τασιενεργές Ενώσεις και Ιδιότητες.....	25
1.6.3 Βιοτασιενεργά στη βιομηχανία.....	27
1.6.4 Χρήση εστέρων του D-γλυκουρονικού οξέος ως βιοτασιενεργά.....	29
1.6.5 Σύνθεση εστέρων του D-γλυκουρονικού οξέος με λιπάσες.....	31
1.6.5.α. Σύνθεση με βιοκατάλυση από λιπάση B της <i>Candida antarctica</i> σε τριτοταγή βουτανόλη (tert-βουτανόλη).....	31

1.6.5.β. Χαρακτηρισμός νέας ομάδας γλυκουρονικών εστέρων συνθεμένων με λιπάση.....	33
--	----

## Κεφάλαιο 2

### Υλικά και Μέθοδοι

<b>2.1 Υλικά.....</b>	<b>35</b>
2.1.1 Ένζυμα.....	35
2.1.2 Υποστρώματα ενζύμων.....	35
2.1.2.1 D-γλυκουρονικό οξύ.....	35
2.1.2.2 Βενζυλικός εστέρας του γλυκουρονικού οξέος.....	36
2.1.2.3 Αλκοόλες.....	36
2.1.2.4 Ασκορβικό οξύ.....	36
2.1.2.5 Γλυκόζη και Φερουλικό οξύ.....	39
2.1.3 <i>Pichia pastoris</i> .....	40
2.1.4 Θρεπτικά μέσα της <i>Pichia pastoris</i> .....	41
2.1.5 Ρυθμιστικά διαλύματα.....	43
2.1.6 Βαφή για χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	43
2.1.7 Διαλύτες TLC.....	43
2.1.8 Ακετυλοχλωρίδιο.....	43
2.1.9 Όργανα - Συσκευές.....	45
2.1.10 Υλικά και στήλες Χρωματογραφίας.....	46
<b>2.2 Μέθοδοι.....</b>	<b>47</b>
2.2.1 Παραγωγή εστερασών του γλυκουρονικού οξέος.....	47
2.2.1.α. Προκαλλιέργειες κυττάρων <i>Pichia pastoris</i> .....	47
2.2.1.β. Κύριες καλλιέργειες κυττάρων <i>Pichia pastoris</i> .....	47
2.2.1.γ. Διήθηση και συμπύκνωση του υπερκειμένου υγρού της καλλιέργειας.....	48
2.2.1.δ. Εξισορρόπηση υπερκείμενου υγρού καλλιέργειας.....	49
2.2.1.ε. Απομόνωση ανασυνδασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC).....	49
2.2.1.στ. Ηλεκτροφόρηση SDS σε πηκτή παλυακρυλαμίδιου.....	50
2.2.1.ζ. Προσδιορισμός συγκέντρωσης ανασυνδασμένων πρωτεϊνικών μορίων.....	55
2.2.2 Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης.....	56
2.2.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	56
2.2.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός της ενζυμικής υδρόλυσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	58
2.2.2.2.α Οργανολογία.....	59
2.2.2.2.β Φασματόμετρα συστοιχίας φωτοδιόδων.....	60
2.2.2.3 Φασματομετρία μάζας (MS).....	60
2.2.2.3.α Αρχή λειτουργίας.....	61
2.2.2.3.β Οργανολογία.....	61
2.2.3 Ενζυμική υδρόλυση βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος – Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας και κινητικών σταθερών.....	62
2.2.4 Πειράματα ενζυμικής σύνθεσης εστέρων του D-γλυκουρονικού οξέος.....	64

2.2.4.α. Συστήματα μικρογαλακτωμάτων δίχως επιφανειοενεργές ουσίες.....	64
2.2.4.β. Συνθέσεις σε διαλύτη τριτοταγή βουτανόλη (tert-βουτανόλη).....	65
2.2.4.γ. Πειράματα ενζυμικής μετεστεροποίησης.....	66
2.2.4.δ. Ποιοτικός έλεγχος αντιδράσεων – TLC.....	66
2.2.5 Πειράματα καταλυτικής σύνθεσης μεθυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος.....	66
2.2.6 Σύστημα βενζυλικής αλκοόλης .....	67
2.2.7 Απομόνωση προϊόντων από πειράματα ενζυμικής σύνθεσης μέσω συστημάτων μικρογαλακτωμάτων δίχως επιφανειοδραστικές ουσίες.....	67
2.2.7.α Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.....	67
2.2.7.β Εκχύλιση σκόνης της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας με οξικό αιθυλεστέρα. Εξάτμιση σε φούρνο κενού.....	68

### **Κεφάλαιο 3**

#### **Παραγωγή, απομόνωση και προσδιορισμός συγκέντρωσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος**

<b>3.1 Παραγωγή, απομόνωση και προσδιορισμός συγκέντρωσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος.....</b>	<b>71</b>
3.1.1 Παραγωγή και απομόνωση εστερασών του γλυκουρονικού οξέος .....	71
3.1.2 Έλεγχος καθαρότητας των παραγόμενων ενζύμων με SDS-PAGE .....	71
3.1.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και προσδιορισμός μοριακού βάρους των απομονωμένων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος.....	72

### **Κεφάλαιο 4**

#### **Κινητική μελέτη της δράσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος StGE2, PaGE1 και PaGE2**

<b>4.1 Μέθοδος μέτρησης της απελευθέρωσης βενζυλικής αλκοόλης κατά την ενζυμική υδρόλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....</b>	<b>74</b>
4.1.α. Καμπύλη συγκέντρωσης της βενζυλικής αλκοόλης.....	74
4.1.β. Συνθήκες των ενζυμικών υδρολύσεων.....	75
<b>4.2 Αποτελέσματα της κινητικής μελέτης των StGE2, PaGE1, PaGE2.....</b>	<b>76</b>

### **Κεφάλαιο 5**

#### **Διερεύνηση της συνθετικής ικανότητας των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος σε μη συμβατικά συστήματα**

<b>5.1 Διαδικασία διερεύνησης της συνθετικής ικανότητας των γλυκουρονικών εστερασών σε μη συμβατικά συστήματα.....</b>	<b>79</b>
5.1.α. Δοκιμή διαφορετικών αντιδρώντων συστημάτων.....	79
5.1.β. Δοκιμή σύνθεσης με διαφορετικά υποστρώματα. Χημική σύνθεση υποστρώματος - δέκτη για μετεστεροποίηση. ....	81

<b>5.2 Ενζυμική σύνθεση εστέρων του D-γλυκουρονικού οξέος μέσω συστημάτων μικρογαλακτωμάτων δίχως επιφανειενεργές ουσίες.....</b>	<b>81</b>
5.2.1 Πειράματα ενζυμικής βουτυλίωσης και προπυλίωσης.....	81
5.2.2.α. Απομόνωση προϊόντος.....	84
5.2.2.β. Ταυτοποίηση προϊόντος με φασματομετρία μάζας (MS).....	85
5.2.3 Δοκιμή ενζυμικής σύνθεσης εστέρων του γλυκουρονικού οξέος με ένζυμο StGE2 και ως υποστρώματα γλυκόζη και φερουλικό οξύ.....	86
<b>5.3 Ενζυμικές αντιδράσεις σε οργανικό διαλύτη τριτοταγή βουτανόλη (tert-βουτανόλη).....</b>	<b>88</b>
5.3.1 Πειράματα ενζυμικής βουτυλίωσης.....	88
5.3.2 Πειράματα ενζυμικής εστεροποίησης του D-γλυκουρονικού οξέος με ποικιλία υποστρωμάτων.....	89
5.3.3 Πειράματα ενζυμικής βενζυλίωσης του γλυκουρονικού οξέος σε οργανικό διαλύτη tert-βουτανόλη.....	91
<b>5.4 Πειράματα σύνθεσης εστέρων του γλυκουρονικού οξέος μέσω οργανικού διαλύτη βενζυλική αλκοόλη.....</b>	<b>92</b>
<b>5.5 Χημική σύνθεση μεθυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος.....</b>	<b>93</b>
<b>5.6 Πειράματα ενζυμικής μετεστεροποίησης εστέρων του γλυκουρονικού οξέος σε διαλύτη tert-βουτανόλη.....</b>	<b>93</b>

## **Κεφάλαιο 6**

### **Σύνοψη διπλωματικής εργασίας και συμπεράσματα**

<b>6.1 Παραγωγή και απομόνωση εστερασών του γλυκουρονικού οξέος.....</b>	<b>97</b>
<b>6.2 Αντιδράσεις ενζυμικής υδρόλυσης του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος.....</b>	<b>97</b>
<b>6.3 Πειράματα ενζυμικής σύνθεσης εστέρων του γλυκουρονικού οξέος.....</b>	<b>98</b>
6.3.1 Πειράματα ενζυμικής σύνθεσης σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων.....	98
6.3.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση βουτυλικού εστέρα.....	99
6.3.3 Πειράματα ενζυμικής σύνθεσης σε διαλύτη tert-βουτανόλη.....	99
6.3.4 Πειράματα ενζυμικής σύνθεσης βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε διαλύτη βενζυλική αλκοόλη.....	100
6.3.5 Χημική σύνθεση μεθυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος.....	100
6.3.6 Πειράματα ενζυμικής μετεστεροποίησης του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος.....	101
<b>6.4 Μελλοντικές Προκλήσεις.....</b>	<b>102</b>

## **Βιβλιογραφία**





## Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η συνθετική ικανότητα των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος *StGE2* από το θερμοφίλο μύκητα *Sporotrichum thermophile* και *PaGE1* και *PaGE2* από το μεσόφιλο μύκητα *Podospora anserina*.

Οι υπό μελέτη ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες *StGE2*, *PaGE1* και *PaGE2* παράχθηκαν και απομονώθηκαν από μετασχηματισμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *P. pastoris*. Η παραγωγή πραγματοποιήθηκε με υγρές καλλιέργειες των κυττάρων της ζύμης, ενώ η απομόνωση έγινε με στάδια διηθήσεων, συμπύκνωσης και χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) στα 43 kDa για τις *StGE2* και *PaGE2* και στα 63 kDa για την *PaGE1*.

Ακολούθησαν αντιδράσεις σύνθεσης βουτυλικών και προπυλικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων απουσία τασιενεργών με διαλύτες κ-εξάνιο : αλκοόλη-υπόστρωμα : υδατική φάση σε αναλογία 53,4:43,4:3,2 (v/v/v) με τα ένζυμα *StGE2*, *PaGE1* και *PaGE2*. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Ο βουτυλικός εστέρας του γλυκουρονικού οξέος απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας και. Στο ίδιο σύστημα δοκιμάστηκαν αντιδράσεις με υποστρώματα παρόμοια με το γλυκουρονικό οξύ, τη γλυκόζη και το φερουλικό οξύ για την εκλεκτικότητα των ενζύμων. Για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκαν οι εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος για σύνθεση κ-αλκυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος.

Πραγματοποιήθηκαν ακόμη πειράματα ενζυμικής σύνθεσης ποικίλων εστέρων του γλυκουρονικού οξέος από αλκοόλες και άλλα υποστρώματα σε οργανικό διαλύτη tert-βουτανόλη με αναλογία διαλύτη προς υδατική φάση 96,8:3,2 (v/v) καθώς επίσης και αντιδράσεις μετεστεροποίησης του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος και του μεθυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος χρησιμοποιώντας και τις τρεις διαθέσιμες εστεράσες στο ίδιο σύστημα.

Η κινητική μελέτη της δράσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος *StGE2*, *PaGE1* και *PaGE2* στην υδρόλυση του συνθετικού υποστρώματος, βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος, οδήγησε στον υπολογισμό των σταθερών Michaelis-Menten  $K_m$  και  $k_{cat}$ , καθώς και του λόγου  $k_{cat}/K_m$  ο οποίος αποτελεί ένδειξη για την προτίμηση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα. Ο υπολογισμός πραγματοποιήθηκε με ποσοτικό προσδιορισμό της απελευθέρωσης της βενζυλικής αλκοόλης κατά την υδρόλυση των υποστρωμάτων από τις εστεράσες με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Για το σκοπό αυτό καταστρώθηκε αναλυτική μέθοδος HPLC όπου με δοκιμές προέκυψε ο κατάλληλος διαλύτης έκλυσης και έπειτα κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της βενζυλικής αλκοόλης. Από την σύγκριση του λόγου  $k_{cat}/K_m$  μεταξύ των υποστρωμάτων προσδιορίστηκε ότι η *PaGE1* εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια και εξειδίκευση ως προς το βενζυλικό εστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε σχέση με την *StGE2*. Τέλος, συγκρίνοντας την ενεργότητα της *PaGE1* στην υδρόλυση του μεθυλο-4-O-μεθυλο-D-γλυκοπυρανοουροεστέρα, ως προς την ενεργότητα στην υδρόλυση του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος, το ένζυμο είναι πιο συγγενές και έχει μεγαλύτερη εξειδίκευση στο γλυκουρονικό οξύ, αντί στο μεθυλογλυκουρονικό οξύ.

Ο μεθυλεστέρας του γλυκουρονικού οξέος για τη μελέτη της μετεστεροποίησης παρασκευάστηκε χημικά στα πλαίσια της εργασίας χρησιμοποιήθηκε επίσης στα πειράματα συγκρυστάλλωσης του ενζύμου της *StGE2* σε συνεργασία με την ερευνήτρια Δρ. Χρυσίνα Ευαγγελία από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών στη μελέτη για τη διερεύνηση της δράσης του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου.

# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

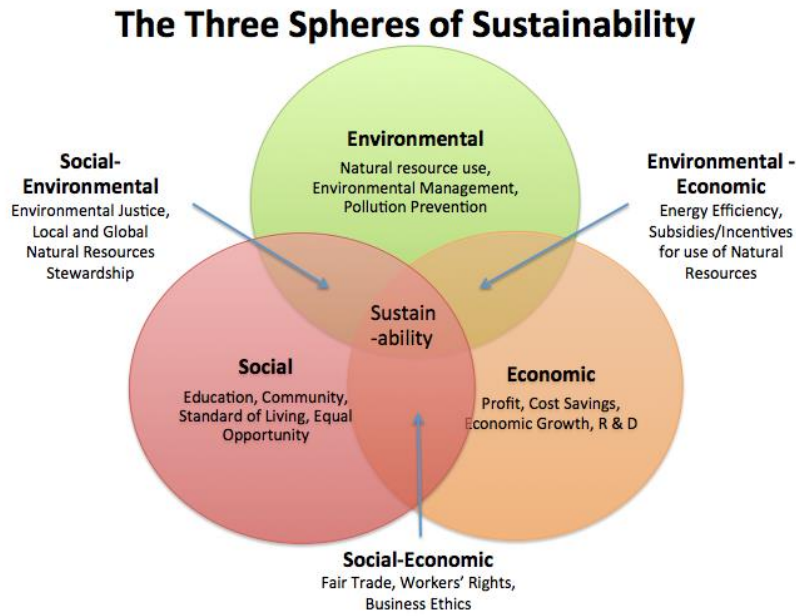
# Κεφάλαιο 1

## Θεωρητικό Μέρος

### 1.1 Εισαγωγή

#### 1.1.1 Η ανάγκη για βιωσιμότητα

Η αειφορία εμφανίζεται την τελευταία 20ετία ως ένα νέο παράδειγμα ανάπτυξης που χτίζεται στην αναγνώριση των περιορισμών των πόρων, την ανάγκη για ισότητα στην ανθρώπινη κοινωνία στις υπάρχουσες και μελλοντικές γενιές και την ανάγκη για τη διατήρηση των φυσικών συστημάτων που υποστηρίζουν τη ζωή. Αναπτυσσόμενη από τις ρίζες της στα τέλη του 20ού αιώνα, έχει εξελιχτεί σε μια σημαντική καθοδηγητική αρχή της ανθρώπινης ανάπτυξης στον 21ο αιώνα. Αυτό το παράδειγμα ανάπτυξης επηρεάζει σημαντικά την επαγγελματική πρακτική των χημικών μηχανικών, συγκεκριμένα στον τρόπο με τον οποίο σχεδιάζουν τις χημικές διεργασίες. Μια πλευρά της αειφόρου ανάπτυξης, θα αποτελεί μια αρκετά σημαντικότερη επικέντρωση στις ανανεώσιμες πρώτες ύλες για πηγές ενέργειας, καθώς επίσης και στις βιολογικής προελεύσεως πρώτες ύλες για καύσιμα, αποθηκευόμενη ενέργεια και χημικά. Αυτές οι εξελίξεις θα αλλάξουν τη δομή των βιομηχανικών διεργασιών, απαιτώντας προσαρμογή στο χωρικό πλαίσιο όπως και ένα ευρύτερο σχέδιο συμπεριλαμβάνοντας λογιστικές εκτιμήσεις στην ανάπτυξη διεργασιών. Η υπευθυνότητα για τον ολικό κύκλο ζωής της βιομηχανικής παραγωγής, η εντατικοποίηση διεργασιών και οι σκέψεις για δίκτυα τεχνολογίας αντί για μεμονωμένα βήματα βελτιστοποίησης μέσα στους κύκλους ζωής και στα δίκτυα τεχνολογιών θα καθορίσει το πλαίσιο στο οποίο οι χημικοί μηχανικοί θα πρέπει να αναπτύξουν το σχεδιασμό. (Narodoslawsky, 2013).



**Εικόνα 1.1** Η αειφορία δημιουργεί και διατηρεί τις συνθήκες κάτω από τις οποίες οι άνθρωποι και η φύση μπορούν να συνυπάρξουν σε αρμονία εκπληρώνοντας τις κοινωνικές, οικονομικές και άλλες απαιτήσεις των τωρινών και των επόμενων γενεών.

### 1.1.2 Βιομηχανική Βιοτεχνολογία

Στο πλαίσιο αυτό, η βιοτεχνολογία έχει προσελκύσει την προσοχή σαν ένα ενδεχομένως σημαντικό εργαλείο στην πραγματοποίηση του παραδείγματος της μετατροπής από παραγωγή βασισμένη στα ορυκτά καύσιμα, σε βιο-βασισμένη παραγωγή. (Woodley J. *et al.*, 2007). Η βιομηχανική βιοτεχνολογία, επίσης γνωστή σαν λευκή βιοτεχνολογία στην Ευρώπη, βασίζεται στη χρήση ολόκληρων κυττάρων ή ενζύμων σαν καταλύτες και τέτοιες διεργασίες χρησιμοποιούνται ήδη για την παραγωγή διάφορων εμπορευματικών και εξειδικευμένων χημικών. Στις μέρες μας, η βιομηχανική βιοτεχνολογία είναι μια μεγάλη παγκόσμια βιομηχανία και οι χημικοί μηχανικοί δεν έχουν μόνο συνεισφέρει σε αυτή την απίστευτη εξέλιξη μέχρι το παρόν, αλλά θα συνδράμουν αυξανόμενα και στο μέλλον επίσης. Οι βιοδιεργασίες είναι ένας τομέας καινοτομίας που οδηγεί όχι μόνο σε βελτιωμένες διεργασίες αλλά και σε ένα εύρος εντελώς καινούριων προϊόντων. Η τεχνολογία του αναασυνδυασμένου DNA περιλαμβάνει εργαλεία που προσφέρουν πρόσβαση σε νέους ξενιστές έκφρασης, υπερέκφραση των γονιδίων, υπερπαραγωγή πρωτεϊνών και τροποποίηση μονοπατιών όπως και το σχεδιασμό πρωτεϊνών με νέες ιδιότητες. Η

βιοκατάλυση έχει στραφεί πιο κοινά στην παραγωγή υψηλής αξίας προϊόντων για χημικές και φαρμακευτικές βιομηχανίες. Η παραγωγή χημικών χρησιμοποιώντας βιομηχανική βιοτεχνολογία, ικανοποιεί συχνά τις αρχές της πράσινης χημείας, ειδικά στην μειωμένη κατανάλωση ενέργειας και παραγωγής αποβλήτων, επιλεκτική κατάλυση και βιοδιασπώμενα προϊόντα. Ακόμα, μπορεί να αντικαταστήσει χημικές συνθέσεις πολλών σταδίων με ένα μόνο βήμα, περιλαμβάνοντας χαμηλή ενεργειακή κατανάλωση και λιγότερη εισροή πρώτων υλών και ακόμα παρέχει τη δυνατότητα για σύνθεση προϊόντων που δεν είναι δυνατόν χημικά. (Narodoslawsky, 2013).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ενζυμική σύνθεση n-αλκυλικών κυρίως εστέρων του γλυκουρονικού οξέος με μη συμβατική βιοκατάλυση. Οι λιπαροί εστέρες που προέρχονται από σάκχαρα που είναι μη ιονικά τασιενεργά, έχουν καλές επιφανειακές ιδιότητες, συμπεριλαμβανόμενης βιοαποικοδομησιμότητας. Αυτό απορρέει από την ύπαρξη δύο συμπληρωματικών ομάδων στο ίδιο μόριο. Χάρη στην έλλειψη γέυσεως, στο μη ερεθισμό του δέρματος και στη μη τοξικότητα, αξιοποιούνται με διαφορετικές χρήσεις στις βιομηχανίες καλλυντικών, τροφίμων και φαρμάκων. Η εφαρμογή τυπικών χημικών διεργασιών για τη σύνθεση λιπαρών εστέρων προερχόμενων από σάκχαρα απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργειας και συνήθως οδηγείται στο σχηματισμό μίγματος προϊόντων (εξαιτίας της παρουσίας πρωτοταγών και δευτεροταγών υδροξυλομάδων των σακχάρων) και μερικές φορές ανεπιθύμητων χρωματισμένων παραπροϊόντων. Η ενζυμική σύνθεση θεωρείται για καιρό μια εναλλακτική μεθοδολογία για των εμπλουτισμό των εστέρων προερχόμενων από σάκχαρα και στις μέρες μας αυτός ο τρόπος προετοιμασίας είναι καλά καταγεγραμμένος. (Piccicuto *et al.* 2001, Cao *et al.*, 1997, Basso *et al.*, 2002).

Ωστόσο, αυτή τη στιγμή, τα προϊόντα που προέρχονται από βιολογικά βασισμένες πρώτες ύλες, αντιπροσωπεύουν μόνο ένα μικρό ποσοστό των εκροών της χημικής βιομηχανίας. Οι προσπάθειες για τη μετατροπή της βασικής πηγής πρώτων υλών της βιομηχανίας από μη ανανεώσιμους σε ανανεώσιμους πόρους έχει πρόσφατα αποκτήσει δυναμική λόγω της επιταχυνόμενης αύξησης στα κόστη των ορυκτών καυσίμων και στην αυξανόμενη ανησυχία για την εξάντληση αυτών των πόρων στο εγγύς μέλλον. (Hatti-Kaul R. *et al.*, 2007)

### 1.1.3 Βιοκαύσιμα

Φιλόδοξοι στόχοι έχουν τεθεί για τα βιοκαύσιμα στα περισσότερα μέρη του πλανήτη, συμπεριλαμβάνοντας και το γραφείο ενέργειας του US Department με ένα σενάριο για κάλυψη του 30% της ζήτησης βενζίνης με βιοκαύσιμα ως το 2030, και η E.E. με ένα όραμα του 10% των καυσίμων μεταφοράς της E.E. να προέρχονται από βιοκαύσιμα το 2020. Σήμερα, ο κύριος στόχος δεν είναι μόνο να αντικατασταθούν τα ορυκτά καύσιμα με οποιοδήποτε βιοκαύσιμο, αλλά να αξιολογηθούν τα όρια εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου. Για αυτό το σκοπό, τα πολιτικά χρονοδιαγράμματα σχετικά με τη χρήση πρώτων υλών λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για την παραγωγή αιθανόλης και άλλων βιοκαυσίμων δημιουργούν προκλήσεις στην εξέλιξη καινοτόμων τεχνολογιών βασισμένων στην επιστήμη. Για την επιτάχυνση της εφαρμογής των βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς στην Ευρώπη, η συνεισφορά των βιοκαυσίμων που παράγονται από απόβλητα, υπολείμματα, μη βρώσιμων κυτταρινούχων και λιγνινοκυτταρινούχων υλικών θα θεωρηθεί σαν να μετράει επί δύο στις εθνικές υποχρεώσεις. (Thompson *et al.*, 2013).

Η προέλευση της δεύτερης γενιάς βιοκαυσίμων αναγνωρίζεται ευρέως ως μια βιώσιμη απάντηση στις αυξανόμενες ανησυχίες γύρω από τα βιοκαύσιμα της πρώτης γενιάς. Ωστόσο, τα διαπιστευτήρια βιωσιμότητας και για τη δεύτερη γενιά επίσης ερευνώνται. Η ιστορία των βιοκαυσίμων έχει περιγραφεί σαν μια ιστορία τύπου «από τα ψηλά στα χαμηλά». Αρχικές απόψεις τύπου κέρατος της Αμάλθειας για τη δυνατότητα των βιοκαυσίμων έχουν αμφισβητηθεί κάτω από το βάρος της αυξανόμενης σκέψης ότι ο ρυθμός ανάπτυξής τους έτρεχε μπροστά από την κατανόηση του εύρους των άμεσων και έμμεσων συνεπειών βιωσιμότητας αυτής της τεχνολογίας. Οι στόχοι για τα βιοκαύσιμα της E.E και του Ηνωμένου Βασιλείου για ανανεώσιμα καύσιμα στον τομέα των συγκοινωνιών έχει περαιτέρω ανάμεικτες αντιλήψεις ενός αδέσμευτου αγώνα δρόμου για βιοκαύσιμα. Οι επικεφαλίδες των M.M.E. για την αύξηση των μεγάλων φυτειών βιοκαυσίμων σε διάφορα μέρη του κόσμου με αυξανόμενες τιμές τροφίμων, ώθησε μια γρήγορη στροφή στη σκέψη για αυτή την τεχνολογία στο δεύτερο μισό της προηγούμενης δεκαετίας. Δεν είναι πια δυνατό να συναντήσουμε τον όρο ενεργειακές καλλιέργειες χωρίς μια αντίληψη της



πιθανής σύγκρουσης με τη χρήση γεωργικής γης για τροφή αποκρυσταλλωμένη με τον όρο «καύσιμα εναντίων τροφίμων». Άλλες κοινωνικές, περιβαλλοντικές, οικονομικές και ηθικές προκλήσεις προκύπτουν ειδικά όσον αφορά τα πρώτης γενιάς βιοκαύσιμα που προέρχονται από καλλιέργειες τροφίμων. (Mohr *et al.*, 2013).

Τα βιοκαύσιμα έχουν κατηγοριοποιηθεί σε πρώτης γενιάς, παραγόμενων κυρίων από καλλιέργειες τροφίμων, όπως δημητριακά, ζαχαροκάλαμα και φυτικά έλαια και δεύτερης γενιάς βιοκαύσιμα, παραγόμενα από λιγνινοκυτταρινούχες ενεργειακές καλλιέργειες, γεωργικά και δασικά υπολείμματα ή παραπροϊόντα όπως άχυρο σίτου και βιομάζα ξύλου. Τα τρίτης γενιάς βιοκαύσιμα, όπως βιοντήζελ από μικροφύκη θεωρούνται ότι βρίσκονται περισσότερο από 25 χρόνια μακριά από εμπορική εφαρμογή. Η αντίθεση στα πρώτης γενιάς βιοκαύσιμα θεωρείται γενικά ότι πρόκειται για την διαμάχη γύρω από τη διατροφική ασφάλεια. Τα δεύτερης γενιάς βιοκαύσιμα, βλέπονται ευρέως σαν μια βιώσιμη απάντηση στην αυξανόμενη διαμάχη γύρω από την πρώτη γενιά και για αυτό ξεχωρίζουν. Όντως, έχει υποτεθεί ότι τα δεύτερης γενιάς βιοκαύσιμα, έχουν δημιουργήσει ελάχιστα ηθικά ή περιβαλλοντικά θέματα. Αλλά, θα διαλύσουν τις διαμάχες καυσίμων εναντίων τροφίμων και ποιες θα είναι οι μελλοντικές προκλήσεις; Με το πρώτο εμπορικής κλίμακας εργοστάσιο παραγωγής κυτταρινικής αιθανόλης με ενζυμική προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας στο Crescentino της Ιταλίας σε λειτουργία από το τέλος του 2012, αυτή η ερώτηση είναι πολύ επίκαιρη. Αντί να αντιμετωπίζουμε τη βιωσιμότητα σαν ένα θέμα ισορροπίας ή εναλλαγής διαφορετικών συστημάτων, μια τέτοια προσέγγιση θα εξέταζε την αλληλεπίδραση των περιβαλλοντικών, οικονομικών και κοινωνικών μεταβλητών, το «ολικό σύστημα». (Thompson *et al.*, 2013).



**Εικόνα 1.2** Crescentino, Ιταλία. Το πρώτο εργοστάσιο παραγωγής κυτταρινικής βιοαιθανόλης με χρήση ενζυμικής προκατεργασίας για τη διάσπαση της λιγνινοκυτταριχούχου βιομάζας.

Οι λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες που δεν ανταγωνίζονται την παραγωγή τροφής μπορούν να παρέχουν περιβαλλοντικά, οικονομικά και στρατηγικά οφέλη για την παραγωγή των βιοκαυσίμων. Το κόστος της παραγωγής βιοτεχνολογικής αιθανόλης βασισμένης σε βιομάζα έχει πρόσφατα μειωθεί σημαντικά, κυρίως χάρη στις εξελίξεις των τεχνικών μετατροπής, με βελτιωμένα ένζυμα και νέα στελέχη ζυμών. Η μετατροπή των κυτταρινούχων συστατικών σε ζυμώσιμα σάκχαρα είναι, ωστόσο, ακόμα το μεγάλο τεχνολογικό και οικονομικό εμπόδιο στην παραγωγή καυσίμων ή άλλων υψηλού όγκου εμπορικών προϊόντων από την κυτταρινούχο βιομάζα. Ειδικά η ενζυμική υδρόλυση, αποτελεί ακόμα ένα μεγάλο παράγοντα κόστους. Οι στόχοι για τη μείωση του κόστους των διεργασιών βιοτεχνικής μετατροπής των λιγνινοκυτταρινών σε αιθανόλη μπορεί να χωριστεί σε τρεις κατηγορίες : το κόστος των ενζύμων, το κόστος των παραγόμενων σακχάρων και το κόστος της παραγωγής αιθανόλης. Οι αποδοτικότητες των ξεχωριστών ενζύμων μπορούν να βελτιωθούν σχεδιάζοντας ένζυμα με βέλτιστες δομές ενεργού κέντρου και ιδιότητες δεσίματος και με υψηλότερη σχετική ενεργότητα, χαμηλότερη παρεμπόδιση προϊόντος και υψηλότερη θερμική σταθερότητα, καθώς επίσης και βελτιστοποιώντας τις διεργασίες παραγωγής. Το κόστος της ενζυμικής υδρόλυσης

εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα, την απόδοση και τα κόστη της προεπεξεργασίας, τη συνεργιστική δράση των κυτταρινασών και των βοηθητικών ενζύμων, όπως και της απαιτούμενης ποσότητας των εξωτερικά προστιθέμενων ενζύμων. Τα κόστη της παραγωγής αιθανόλης επηρεάζονται ακόμη από την απόδοση, τη συγκέντρωση και του ρυθμού παραγωγής αιθανόλης. (Viikari *et al.* 2012). Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η υδρόλυση των εστερικών δεσμών μεταξύ της λιγνίνης και των ημικυτταρινών στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος σε συνθετικό υπόστρωμα που προσομοιάζει αυτούς του δεσμούς.

## 1.2 Πλεονεκτήματα βιοκατάλυσης έναντι χημικών μεθόδων

Στο πλαίσιο της αειφορίας μπορούν να συνδράμουν οι βιοκαταλύτες που είναι ικανοί να καταλύουν ένα αυξανόμενο εύρος αντιδράσεων. Αυτό το εύρος μεταφράζεται σε έναν αυξανόμενο αριθμό εφαρμογών των βιοκαταλυτών σε βιομηχανική κλίμακα. Όλο και πιο συχνά, οι βιοκαταλύτες συνδυάζονται με χημικούς καταλύτες ή χρησιμοποιούνται σε ένα δίκτυο αντιδράσεων στο κύτταρο.

Πρόοδοι σε τόσο στη χημική κατάλυση όσο και στη βιοκατάλυση είναι καθοριστικοί παράγοντες για τη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος των χημικών διεργασιών και αυτών που βασίζονται στο πετρέλαιο. Στον τομέα της χημικής κατάλυσης (δηλαδή με τη χρήση καταλυτών μη βιολογικής προέλευσης) η αρχή της περιβαλλοντικής κατάλυσης είναι καλά εδραιωμένη και έχει γίνει αποδεκτή εδώ και δεκαετίες: στη δεκαετία του '60 και του '70 γνώρισε μεγάλη άνθηση, παράγοντας εξαιρετική έρευνα σχετικά με το πώς να μειώσει καταλυτικά τα ποσά των ρύπων στα καύσιμα που παράγονται από το πετρέλαιο, και στη δεκαετία του '80 και του '90, παρατηρήθηκε αυξανόμενο ενδιαφέρον για την κατάλυση και το περιβάλλον σε πολλά επιστημονικά σενάρια. Σήμερα, σημαντικοί επιστήμονες εκφράζουν σοβαρές επιφυλάξεις για τους μακροπρόθεσμους κινδύνους στην υγεία και για τα προβλήματα με τις καιρικές συνθήκες (συμπεριλαμβανομένης της υπερθέρμανσης του πλανήτη και της ρύπανσης), που παραδοσιακά έχουν συνδεθεί με χημικές διεργασίες και «βρώμικα καύσιμα». Επιπλέον, η βιοκατάλυση, είτε με τη

χρήση μικροοργανισμών ολόκληρων είτε απλών ενζύμων (γνωστή ως λευκή βιοτεχνολογία), εμπλέκεται σε πολλούς τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας από την άποψη των:

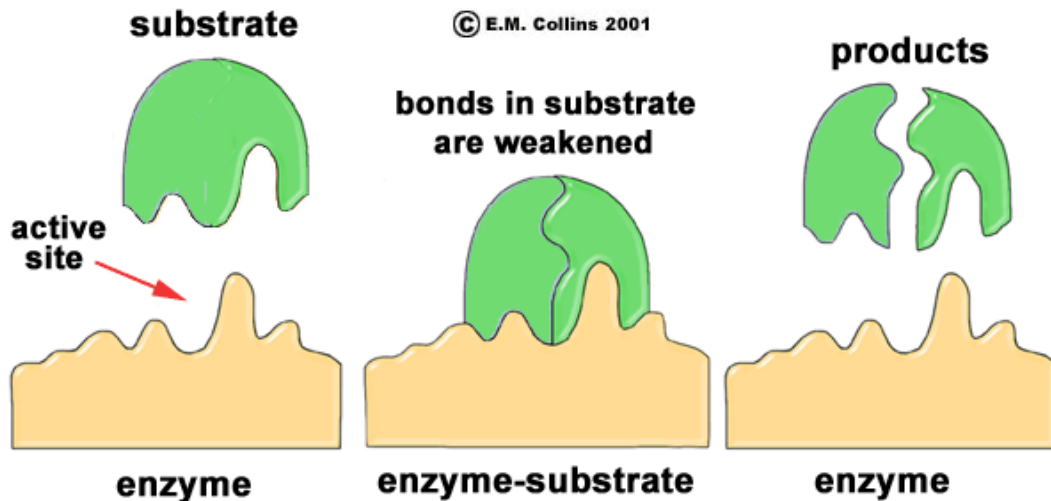
- φιλικών προς το περιβάλλον διεργασιών
- περιορισμένων ευκαιριών για την παραγωγή ενέργειας από ανανεώσιμες και καθαρές πηγές
- αντικατάστασης πολλών αντιδραστηρίων που είναι εχθρικά ή ακόμη και τοξικά για το περιβάλλον για τα παρόντα οικολογικά πρότυπα των κοινωνιών μας.

Σε αυτό το πλαίσιο, βιοκατάλυση συμμετέχει πλήρως στην έννοια της «πράσινης χημείας» που εισήχθη στη δεκαετία του '90, και η επίδρασή της στη βιωσιμότητα είναι πλέον διαδεδομένη πέρα από κάθε αμφισβήτηση.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα στη χρήση ενζύμων σε αυτές τις διεργασίες είναι οι ευνοϊκές και μοναδικές ιδιότητες, η βιοαποδομησιμότητά τους, και η υψηλή χημικό, τοπο- και στεροεκλεκτικότητά τους, οδηγώντας σε χαμηλή παραγωγή παραπροϊόντων, όλα από τα οποία επιτρέπουν την προοδευτική εφαρμογή τους.

Ειδικότερα, το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της χρήσης ενζύμων στη βιοκατάλυση είναι η αξεπέραστη εκλεκτικότητά τους. Έτσι, ενώ χρησιμοποιούνται επωφελώς για να αυξήσουν τη χημική εκλεκτικότητα ή τοπο-εκλεκτικότητα μιας αντίδρασης, το μεγαλύτερο πλεονέκτημά τους βρίσκεται στη διαφοροποίηση μεταξύ εναντιομερών υποστρωμάτων, ένα ζευγάρι υποστρωμάτων με ελεύθερη ενθαλπία κατά Gibbs περίπου 1-3 kJ/mol. Με τα ένζυμα, εναντιοεκλεκτικότητες πάνω από 99% μπορούν να επιτευχθούν σε βάση ρουτίνας, αν και όχι σε κάθε περίπτωση.

Ένα σημαντικό παράδειγμα βιοτεχνολογικής αξιοποίησης της εναντιοεκλεκτικότητας αυτής είναι η χρήση βιοκαταλυτών στη σύνθεση πολύπλοκων φαρμακευτικών ενδιάμεσων, γεγονός που μειώνει την ανάγκη για επιπλέον τοξικολογικούς ελέγχους των ενδιάμεσων αυτών προϊόντων με καθαρότητα κάτω του 99% του περιεχομένου τους. (Faber, 2011)



Εικόνα 1.3 Αναπαράσταση εκλεκτικότητας ενζύμων

Εξάλλου, το γεγονός ότι τα ένζυμα είναι ενεργά σε ήπιες, σχεδόν δωματίου συνθήκες θερμοκρασίας και pH και κατά προτίμηση σε υδατικά μέσα συχνά λαμβάνεται ως ένα επιπλέον πλεονέκτημα. Στόχοι για βιομηχανικές διεργασίες όπως «αιεφόρος ανάπτυξη», «πράσινη χημεία», ή «φιλική προς το περιβάλλον παραγωγή», μια συνεχώς αυξανόμενη βασική συνθήκη για τη βιομηχανική δραστηριότητα σε ένα μεγάλο μέρος του κόσμου, θα ήταν πιο δύσκολο να επιτευχθούν χωρίς τη διαθεσιμότητα βιοκαταλυτών που ανέχονται και απαιτούν τέτοιες συνθήκες.

## 1.3 Μικροοργανισμοί

Σε αυτή την παράγραφο περιγράφονται συνοπτικά μερικά χαρακτηριστικά για τους μικροοργανισμούς από τους οποίους απομονώθηκαν τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη διπλωματική εργασία

### 1.3.1 *Sporotrichum thermophile*

Οι θερμόφιλοι μύκητες είναι τα κύρια συστατικά της μικροχλωρίδας που αναπτύσσονται σε μάζες του φυτικού υλικού, σε σωρούς των γεωργικών και δασοκομικών προϊόντων, κακώς και σε άλλες συγκεντρώσεις οργανικής ύλης, όπου το ζεστό, υγρό, και αερόβιο περιβάλλον παρέχουν τις ιδανικές συνθήκες για την

ανάπτυξής τους. Αποτελούν τους μόνους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που μπορούν να πολλαπλασιάζονται σε θερμοκρασία πάνω από 45 °C και γι' αυτό το λόγο αποτελούν πολύτιμα εργαλεία για πειραματικές διεργασίες που γίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, συχνά απομονωμένο από το χώμα και από αυτοθερμαινόμενο κομπόστ, ο *Sporotrichum thermophile* αναπτύσσεται καλύτερα μεταξύ 45 °C και 50 °C. Αυτός ο μύκητας είναι ένας ιδιαίτερα ικανός αποικοδομητής της κυτταρίνης. Ο ρυθμός ανάπτυξής του στην αδιάλυτη κυτταρίνη είναι παρόμοιος με το ρυθμό ανάπτυξής του στη γλυκόζη. Δεδομένου ότι οι υψηλές θερμοκρασίες βοηθούν στη διαλυτοποίηση ορισμένων στοιχείων της λιγνοκυτταρινούχου πρώτης ύλης και στη μείωση του ιξώδους των πολτών της βιομάζας, τα θερμοφιλικά ένζυμα ενδέχεται να παρουσιάζουν πλεονεκτήματα στις διεργασίες. Θα έχουν επίσης πλεονεκτήματα λόγω της σταθερότητάς του κατά τη διάρκεια των διεργασιών και αύξηση του ρυθμού κατάλυσης σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Το *Sporotrichum thermophile* είναι μια εξαιρετική πηγή γονιδίων που κωδικοποιούν εξωκυτταρικά θερμόφιλα ένζυμα. Ένζυμα και κοκτέιλ ενζύμων που προέρχονται από το είδος αυτό θα βοηθήσουν στην ανάπτυξη προηγμένων τεχνολογιών για καύσιμα που προέρχονται από βιομάζα και στον τομέα των χημικών προϊόντων και σε πολλές άλλες βιομηχανίες.

(Berka *et al.*, 2011)

Η ερευνητική κοινότητα που ενδιαφέρεται για μύκητες εξτρεμόφιλους περιλαμβάνει πάνω από 200 ομάδες και κυρίως περιλαμβάνει τους μεγάλους παρασκευαστές ενζύμων. Η συντριπτική πλειονότητα των ερευνητών που εργάζονται σε εξτρεμόφιλους μύκητες ενδιαφέρονται για εκκρινόμενα ένζυμα που είναι ενεργά και σταθερά σε υψηλή θερμοκρασία και υψηλό pH για βιομηχανικές εφαρμογές. Δομικοί βιολόγοι επίσης ενδιαφέρονται να εργαστούν με θερμοσταθερές πρωτεΐνες από θερμόφιλους μύκητες. (Yeoman C.J. *et al.*, 2010).

### 1.3.2 *Podospora anserina*

Η *Podospora anserina* είναι ένας νηματοειδής μύκητας που ανήκει στην κατηγορία των ασκομυκήτων. Είναι επίσης γνωστή ως *Pleurage anserine*. Η *Podospora anserina* ζει από και μέσα στην κοπριά των φυτοφάγων ζώων. Παρατηρείται συχνά κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Η ακριβής γεωγραφική

κατανομή αυτού του μύκητα είναι άγνωστη. Γνωρίζουμε ότι βρίσκεται συνήθως στη Δυτική Ευρώπη και φαίνεται να είναι παρούσα σε όλο τον κόσμο.

Πολλά είδη μυκήτων έχουν εξελιχθεί μέσω στρατηγικών φυσικής επιλογής που τους επιτρέπουν να χρησιμοποιούν τη νεκρή φυτική ύλη σαν πηγή άνθρακα και πηγή ενέργειας. Οι μύκητες παράγουν και εξάγουν από τα κύτταρα πολλά ένζυμα που τους επιτρέπουν να αποικοδομούν τα φυτικά πολυμερή (όπως η κυτταρίνη ή λιγνίνη). Τα απελευθερωμένα θρεπτικά συστατικά μεταφέρονται στη συνέχεια στο κύτταρο του μύκητα με πολύ αποτελεσματικά συστήματα μεταφορών. Μια τέτοια στρατηγική διατροφής ονομάζεται σαπροφυτισμός. Η *P.anserina* είναι ένας τέτοιος σαπροφυτικός μύκητας που έχει ειδικευτεί να ανακτά τα θρεπτικά συστατικά του από υλικά που δεν έχουν πλήρως χωνευτεί από τα φυτοφάγα σπονδυλωτά. Η κύρια λειτουργία του είναι επομένως να βοηθήσει να ανακυκλωθεί ο άνθρακας που έχει ενσωματωθεί στο ιδιαίτερα ανθεκτικό υλικό των φυτών. (Espagne *et al.*, 2008)

## 1.4 Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος

Οι εστεράσες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ανήκουν στις υδατανθρακικές εστεράσες και ήταν η ανασυνδυσασμένη γλυκουρονική εστεράση από το *Sporotrichum thermophile*, η StGE2 (*Sporotrichum thermophile* Glucuronoyl Esterase 2) και από το *Podospira anserina* οι PaGE1 και PaGE2 (*Podospira anserina* Glucuronoyl Esterase 1 και 2 αντίστοιχα).

Οι υδατανθρακικές εστεράσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση εστερικών δεσμών σε υποκατεστημένα σάκχαρα. Καθώς οι εστέρες προκύπτουν από την αντίδραση ενός μορίου αλκοόλης και ενός μορίου καρβοξυλικού οξέος, οι υδατανθρακικές εστεράσες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο τάξεις ως προς τη συνεισφορά του σακχάρου στον εστερικό δεσμό. Στην πρώτη κατηγορία το σάκχαρο συμπεριφέρεται ως οξύ, όπως στην περίπτωση των μεθυλεστέρων της πηκτίνης, ενώ στη δεύτερη το σάκχαρο συμπεριφέρεται ως αλκοόλη με παράδειγμα τις εστεράσες του οξικού οξέος και του φερουλικού οξέος.

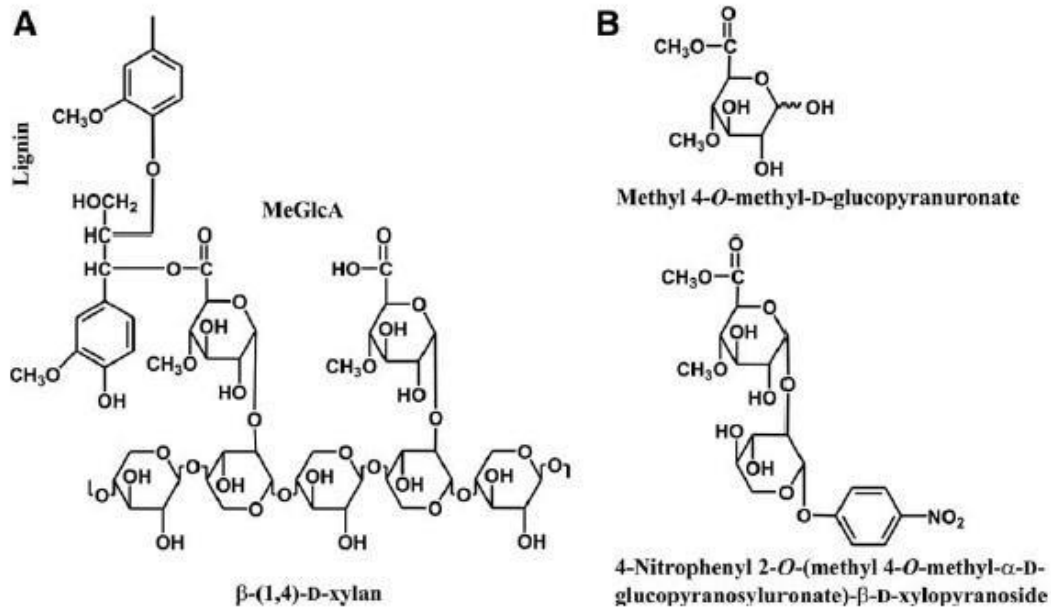
Με βάση τις ομοιότητες που εμφανίζουν σε σχέση με τα δομικά χαρακτηριστικά τους, οι υδατανθρακικές εστεράσες έχουν ταξινομηθεί σε 16 οικογένειες (CE – Carbohydrate Esterases families, CAZy database, Cantarel et al. 2009). Η κατηγοριοποίηση αυτή έγινε με μελέτη της δομής των εστερασών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ανάλυσης των υδροφοβικών ομάδων και την ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων. (Coutinho & Henrissat, 1999).

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στις εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος της οικογένειας 15 και πιο συγκεκριμένα στις *StGE2*, από το *Sporotricum thermophile*, και *PaGE1*, *PaGE2* από το *Podospira anserina*.

#### 1.4.1 Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος από τους μικροοργανισμούς *Schizophyllum commune* και *Hypocrea jecorina*

Το 2006 αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Špráňíková S. και Biely P η ύπαρξη μιας εστεράσης από το μύκητα *Schizophyllum commune* που πιθανόν να προσβάλλει τους δεσμούς μεταξύ των αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης και της καρβοξυλικής ομάδας των μονάδων MeGlcA ή GlcA, ενώ η πρώτη ακολουθία αμινοξέων που αναφέρθηκε ήταν από την εστεράση Cip2\_GE του μύκητα *Hypocrea jecorina* (Li et al., 2007). Το καινούριο ένζυμο που ονομάστηκε εστεράση του γλυκουρονικού οξέος (glucuronoyl esterase) έχει αναγνωριστεί για δύο λόγους. Ο ένας είναι η ικανότητά του να υδρολύει μεθυλεστέρες ελεύθερου ή γλυκοζιδικά συνδεδεμένου MeGlcA και ο δεύτερος η αδυναμία του να προσβάλλει υποστρώματα άλλων ημικυτταρινολυτικών εστερασών (Špráňíková S. & Biely P., 2006). Επομένως ένα ένζυμο με τέτοια μοναδική εκλεκτικότητα θα μπορούσε να παρουσιάζει υψηλό ενδιαφέρον στην ενζυμική υδρόλυση των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων και στη βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας γενικότερα. Ως αποτέλεσμα του της απομόνωσης και του χαρακτηρισμού του νέου αυτού ενζύμου δημιουργήθηκε μια νέα οικογένεια εστερασών, η 15 (CE15) (Špráňíková S., 2007).





**Εικόνα 1.4** (A) Εστερικός δεσμός μεταξύ μονάδων MeGlcA της γλυκουρονοξυλάνης και αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης. (B) Δομές δύο συνθετικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος (Šráníková S., 2006).

#### 1.4.2 Συνθετικά υποστρώματα αναγνωρίσιμα από τις εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος των *Schizophyllum commune* και *Phanerochaete chrysosporium*

Το 2007 βρέθηκε από τον Peter Biely και τους συνεργάτες ότι η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος είναι ικανή να υδρολύει δύο συνθετικές ενώσεις οι οποίες μιμούνται τους εστερικούς δεσμούς που υπάρχουν στα συμπλέγματα λιγνίνης-υδατάνθρακα, τους εστέρες του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού και D-γλυκουρονικού οξέος με την 3-(4-μεθοξυφαινυλ)προπυλική αλκοόλη. Κατά τη σύγκριση μεταξύ των κινητικών της υδρόλυσης των μεθυλεστέρων και της υδρόλυσης των 3-(4-μεθοξυφαινυλ)προπυλεστέρων φάνηκε ότι η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος αναγνωρίζει το τμήμα του ουρονικού οξέος των υποστρωμάτων περισσότερο από την αλκοόλη. Επομένως η καταλυτική ενεργότητα της εστεράσης ήταν αρκετά υψηλότερη στους εστέρες του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος σε σχέση με αυτούς του D-γλυκουρονικού (Šráníková S., 2007).

### 1.4.3 Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος από το μύκητα *Sporotrichum thermophile*

Το κυτταρινολυτικό σύστημα του θερμόφιλου μύκητα *Sporotrichum thermophile* περιέχει μια πρόσφατα ανακαλυφθείσα εστεράση η οποία πιθανόν υδρολύει τον εστερικό δεσμό μεταξύ του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και των αλκοολών της λιγνίνης. Το πρώτο παράδειγμα καθαρισμού και ταυτοποίησης εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από το *S. thermophile* έγινε το 2009 (Vafiadi et al., 2009).

Η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος με την ονομασία StGE1 αφού καθαρίστηκε σε βαθμό ομοιογένειας με μοριακή μάζα 58 kDa, βρέθηκε ότι έχει ισοηλεκτρικό σημείο pI 6.7. Η ενζυμική δραστηριότητα είναι μέγιστη σε pH 6.0 και θερμοκρασία 60 °C, ενώ στους 70 °C το 85 % της μέγιστης δραστηριότητας χάνεται. (Vafiadi et al., 2009).

Η υπερέκφραση ανασυνδυασμένων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος (GEs) είναι απαραίτητη για τη διερεύνηση των βιοτεχνολογικών τους δυνατοτήτων και πιθανώς για τη διευκρίνηση του φυσιολογικού τους ρόλου στην αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Για αυτό το σκοπό έχουν μελετηθεί διάφορα συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών για την ετερόλογη έκφραση εστερασών του γλυκουρονικού οξέος. Η μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*, ως ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης, αποτελεί ένα προτιμητέο σύστημα έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών με πολλά πλεονεκτήματα όπως η επεξεργασία πρωτεϊνών, η πρωτεϊνική αναδίπλωση και η μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Επίσης σημαντικό είναι το γεγονός ότι η ζύμη δύναται να αναπτυχθεί σε μέσα χαμηλού κόστους, καθιστώντας την έναν σημαντικό υποψήφιο για τη βιομηχανική βιοτεχνολογία.

Οι αλληλουχίες του γονιδιώματος γίνονται ταχύτατα μια πηγή πληροφοριών που μπορεί να παρέχει στοιχεία για πρωτοποριακή έρευνα. Έτσι, λοιπόν, το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος, StGE2, από το *S. thermophile*, εκφράστηκε στη ζύμη *P. pastoris*. Το μοριακό βάρος της StGE2 προσδιορίστηκε με SDS-PAGE 43 kDa. Η StGE2 έχει βέλτιστο pH 7 και βέλτιστη

θερμοκρασία 55 °C. Το ανασυνδυασμένο ένζυμο επιδεικνύει σημαντική σταθερότητα σε ευρύ φάσμα θερμοκρασιών μέχρι 50 °C και σε εύρος pH από 4 έως 11 μετά από 24 ώρες επώασης. Η προαναφερθείσα σταθερή συμπεριφορά, καθιστά το ένζυμο ισχυρό υποψήφιο για μελλοντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπου απαιτείται καταλυτική σταθερότητα (Torakas et al., 2010).

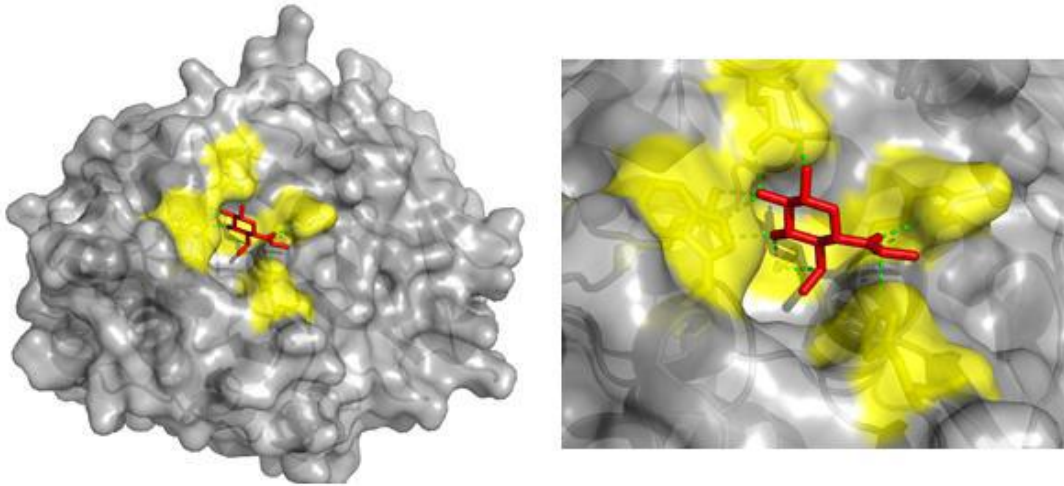
#### 1.4.4 Κρυσταλλική δομή της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος *StGE2*

Παρακάτω φαίνεται η πρωτοταγής δομή της *StGE2*.

SMAPMNHIFERQDTCVSDNYPTVNSAKLPDPFTTASGEKVTTKDQFECRRAEINKI  
 LQQYELGEYPGPPDSVEASLSGNSITVRVTVGSKSISFSASIRKPSGAGPFPAIIGI  
 GGASIPIPSNVATITFNNDEFGAQMGSGRGQKGFYDLFGRDHSAGSLTAWAWGVDR  
 LIDGLEQVGAQASGIDTKRLGVTGCSRNGKGAFITGALVDRIALTIPQESGAGGAAC  
 WRISDQQKAAGANIQTAAQIITENPWFSRNFDPHVNSITSVPODHLLAALIVPRGL  
 AVFENNIDWLGPVSTTGCMAGRLIYKAYGVPNNMGFSLVGGHNHCQFPSSQNQDLN  
 SYINYFLLGQSPSGVEHSDVNVNVAEWAPWGAGAPTLALEQKLISEEDLNSAVDHH  
HHHH

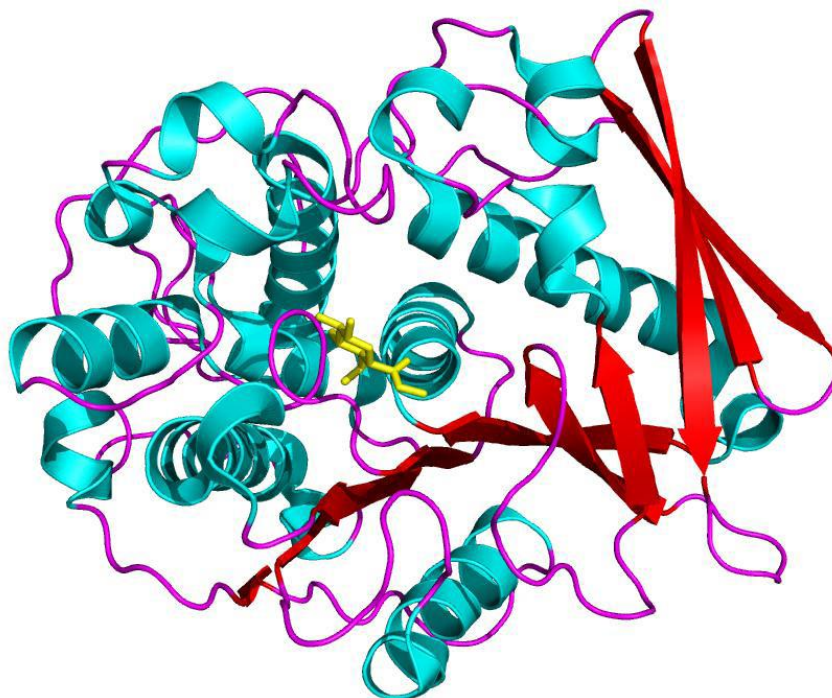
Το 2012, οι Μαριάννα Χαραυγή *et al* προσδιόρισαν τις κρυσταλλικές δομές της ανασυνδυασμένης, θερμόφιλης εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος και τις μορφές της με υπόστρωμα και χωρίς, της εστεράσης με σημειακή μετάλλαξη, S213A, σε ανάλυση 1.55, 1.9 και 2.35 Å αντίστοιχα. Η *StGE2* βρέθηκε πως είναι μέλος της υπερικογένειας των α/β υδρολασών και ότι η συνολική της δομή ακολουθεί την τριστρωματική αναδίπλωση αβα-σάντουιτς με τοπολογία Rossmann. Τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί, ένας εκ των οποίων βρίσκεται στην είσοδο της καταλυτικής τσέπης (catalytic pocket), συμβάλλουν στην ακαμψία της δομής και στην αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου. Η χαρτογράφηση του ενεργού κέντρου χρησιμοποιώντας το μέθυλ 4-O-μεθυλ-β-D-γλυκουκυρανοζιτικό υποστρωματικό ανάλογο, αποκάλυψε ότι τα κατάλοιπα των καταλυτικών τριάδων Ser213, Glu236 και His346, συμμετέχουν σε μια σταθερή, έτοιμη για πυρηνόφιλη προσβολή διαμόρφωση.

Αυτό συντονίζεται μερικώς από τα σκέλη S6, S7 και S9 του β-φύλλου, τα οποία οδηγούν την His346 και τις ομόλογες τριάδες της σε ένα προσανατολισμό ο οποίος καθιστά δυνατή την αναγνώριση του υποστρώματος. Η σύνθετη δομή, αποκαλύπτει επίσης την έμφυτη ευκαμψία των καταλοίπων που σχηματίζουν την τσέπη, όπως του Glu267, το οποίο αλλάζει την διαμόρφωση της πλευρικής του αλυσίδας έτσι ώστε να δεχτεί το υποστρωματικό ανάλογο (Charavgi et al., 2012).



**Εικόνα 1.5** Χωροπληρωτικό μοντέλο της *StGE2* με το υπόστρωμα

Η *StGE2* και η *Cip2\_GE* (Pokkuluri et al., 2011) είναι οι μόνες χαρακτηρισμένες εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος για τις οποίες έχει προσδιορισθεί η τρισδιάστατη δομή τους μέχρι σήμερα. Η άμεση σύγκριση των δύο ενζύμων, φέρνει στο φως τους βιοχημικούς και δομικούς παράγοντες που καθιστούν την *StGE2* ως προτιμότερο στόχο για περαιτέρω διερεύνηση όσον αφορά πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές σε σχέση με τη *Cip2\_GE*. Οι παράγοντες περιλαμβάνουν τη θερμοφιλικότητα της *StGE2*, την προσβασιμότητα των καταλοίπων των καταλυτικών τριάδων και τη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου για την αναγνώριση υποστρώματος καθώς και την μονομερική μορφή της τόσο στην κρυσταλλική της μορφή όσο και σε διάλυμα (Charavgi et al., 2012).



Εικόνα 1.6 Εστεράση του γλυκουρονικού οξέος από *S.thermophile* (StGE2)

#### 1.4.5 Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος από το μύκητα *Podospora anserina*

Το 2011 ανακαλύφθηκαν από τον Jean – Guy Berrin και την ομάδα του στο ινστιτούτο INRA της Μασσαλίας δύο καινούριες εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος από το μύκητα *Podospora anserina*, η PaGE1 και η PaGE2 αντίστοιχα.

Η PaGE1 ανήκει στην οικογένεια υδατανθρακικών εστερασών 15. Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε ετερόλογα στην *P.Pastoris*. Στην επόμενη σελίδα, απεικονίζονται οι πρωτοταγείς δομές των εστερασών PaGE1 και PaGE2.

***PaGE1***

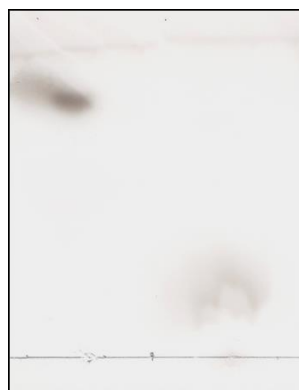
SMQQRQSLWGQ CGGSGWSGPT LCVDGAWCNP QNQWYHQCI P  
 GSGPTTAQPQ VPTTTARPTT TLVTSVVSST TSPSGPVVTN PPVNPGTCPN TPSGLGTPVA  
 NQLNDPFTFH NGNKVTSKAD WACRQREISE LLQRYELGTL PPKPSSVTAS FSGSTLSISV  
 SEGGKSISFT VSINNRPSGA GHPAIINFG TFGASLPVPA GVATINFNND DIAQQQGGSS  
 RGRGKFYDLY GSSHSAGALT AWAWGVSRIV DALELTQAQT GIDPTRLGVT GCSRNGKGAI  
 VAGALEPRIA LTLPQESGAG GSGCWRIATW QKNNGQNVQD STQIVQENVW FSPNFNSYVN  
 NVNQLPFDHH LLAGLIAPRA LYVMENVME WLKISTYGC MGIARKQWEA LGALDNFGYS  
 QVGGNSHCSF PSSQQGSELN AFIEKFLLKR SGGNTNIFRS TQTHSSFNLN NWSPWAVPSL  
 N EQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

***PaGE2***

SMAPANEIFERQTCSVQANYPTQNNSKLPDPFTSASGQKITTKADFECRQEEIISKIMQQYEFVYPPPP  
 DSVTGTMSGNNIQVRVTVGSKSITFSAGIRKPSGSGFPFAIIGVGGASIPISVATITFGNDAFGAQS  
 MGRGRGQFYDLFGSSHSAGSLTAWAWGIDRLIDALEKTPAAGIDTTRLGVTGSRNGKGAFVAGAFV  
 IALTIPQESGAGGAACWRISDQKSSGANIQTASQIIGEQPWFSKNFDAHVRSSTNI PQDHHFLAAMIV  
 RGLAVFENNIDWLGPVSTTGCMRAGRQIYKAYGVPNNMGFSLIGGHNHCQFPSQNSELNQYINYFLLKS  
 GTAPGSVERSTSNANTDAWYPWAASAPTLS EQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

Οι Jean – Guy Berrin *et al.* προσδιόρισαν βιοχημικά την *PaGE1* με τα πειράματά τους. Το θεωρητικό της μοριακό βάρος ήταν 51,4 kDA, αλλά το πειραματικό 63 kDA, που έδωσε υποψίες για γλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης. Επίσης, το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο ήταν pH=7, αλλά στην πράξη υπάρχουν δύο ισοφορμικά σημεία, pH=7,6 και pH=8,2 αντίστοιχα.

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ενεργότητας έδειξε ότι το ένζυμο διαθέτει ενεργότητα μεθυλογλυκουρονικής εστεράσης με βέλτιστο pH=7 για υδρόλυση και βέλτιστη θερμοκρασία 37 °C. Ακόμα υπολογίστηκαν και οι κινητικές παράμετροι που δίνονται στον Πίνακα 1.1 και συγκρίνονται με τις αντίστοιχες άλλων εστέρων του γλυκουρονικού οξέος. Τέλος, στην Εικόνα 1.7, δίνεται το TLC από την υδρόλυση του 4-O-μεθυλογλυκοκυρονουροεστέρα που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την κινητική μελέτη του ενζύμου.



**Εικόνα 1.7** TLC από την υδρόλυση του μεθυλο-4-O-μεθυλο-D-γλυκοκυρανοεστέρη. Στα αριστερά βλέπουμε το control με  $R_f=0,81$  και δεξιά την ενζυμική αντίδραση με  $R_f=0,2$ . Ο διαλύτης ήταν 1-βουτανόλη, αιθανόλη και νερό (10:5:2 v/v). Η αντίδραση έλαβε χώρα σε μία ώρα στους 37 °C.

Enzyme	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ U.mg <sup>-1</sup>	$k_{cat}$ s <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ mM.s <sup>-1</sup>	Référence
ScGE	0,31	4,4	3,2	10,3	(Spanikova & Biely, 2006)
Cip2	0,5	5,5	4,5	9	(Li <i>et al.</i> , 2007)
PcGE1	0,83	14,2	11,2	13,5	(Duranova <i>et al.</i> , 2009)
PcGE2	1,82	88,4	62,3	34,2	(Duranova <i>et al.</i> , 2009)
StGE1	1,3	-	0,8	0,6	(Vafiadi <i>et al.</i> , 2009)
StGE2	-	-	-	-	(Topakas <i>et al.</i> , 2010)
<b>PaGE1</b>	<b>7,6</b>	<b>2,8</b>	<b>0,27</b>	<b>0,04</b>	-

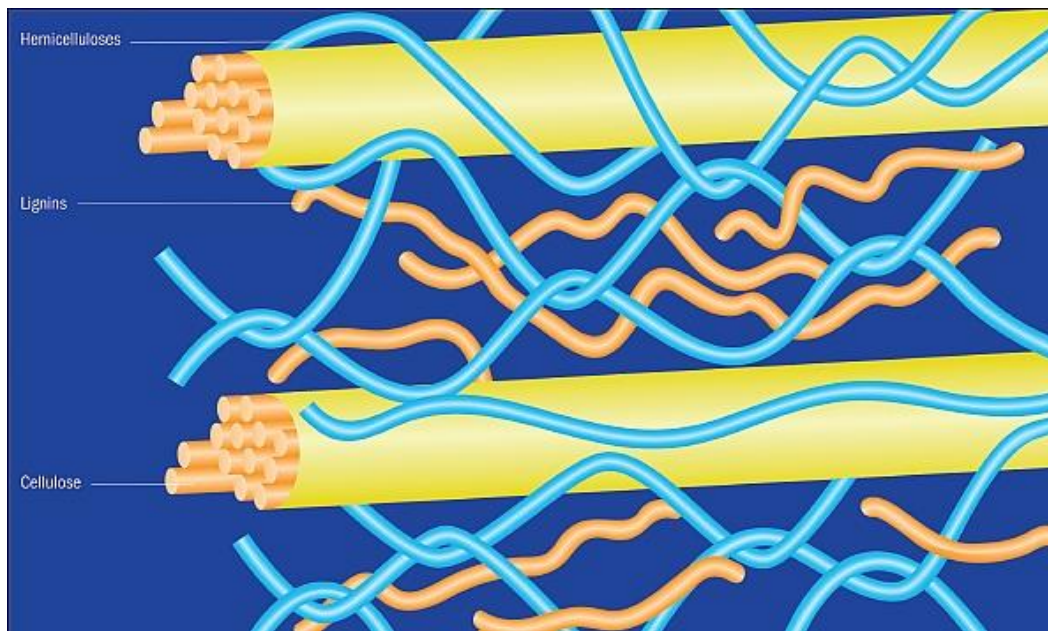
**Πίνακας 1.1.** Σύγκριση κινητικών παραμέτρων τις PaGE1 με άλλες γλυκουρονικές εστεράσες.

## 1.5 Ενζυμική αποικοδόμηση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

### 1.5.1 Κυτταρικά τοιχώματα

Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα, μια άφθονη και ανανεώσιμη πηγή άνθρακα, έχει τη δυνατότητα να συμπληρώσει το άμυλο ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης ως καυσίμου. Οι πιο κοινές μορφές άνθρακα που βρέθηκαν στη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα είναι η κυτταρίνη, ένα βιοπολυμερές της γλυκόζης, και η ημικυτταρίνη, ένα ετερογενές βιοπολυμερές του από σάκχαρα εξοζών και πεντοζών συμπεριλαμβανομένης της γλυκόζης, γαλακτόζης, ξυλόζης και αραβινόζης. Έχει αναφερθεί ότι ένα μέρος της λιγνίνης δεν είναι απλώς τοποθετημένο σε τοιχώματα

των φυτικών κυττάρων, αλλά συνδέεται ομοιοπολικά με τις ημικυτταρίνες. (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2010). Η λιγνίνη και άλλα αρωματικά είναι ομοιοπολικά συνδεμένη με τους υδατάνθρακες, και έτσι τους συγκαλύπτουν και τους προστατεύουν κατά την ενζυμική επίθεση. Συνεπώς, προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης υδρόλυση της βιομάζας των φυτών, απαιτείται μια συστοιχία που αποτελείται από κύρια και βοηθητικά ένζυμα για να είναι σε θέση να υδρολύσουν το σύνολο των δεσμών που υπάρχουν.



**Εικόνα 1.8** Η κυτταρίνη η λιγνίνη και οι ημικυτταρίνες στο πλέγμα του κυτταρικού τοιχώματος

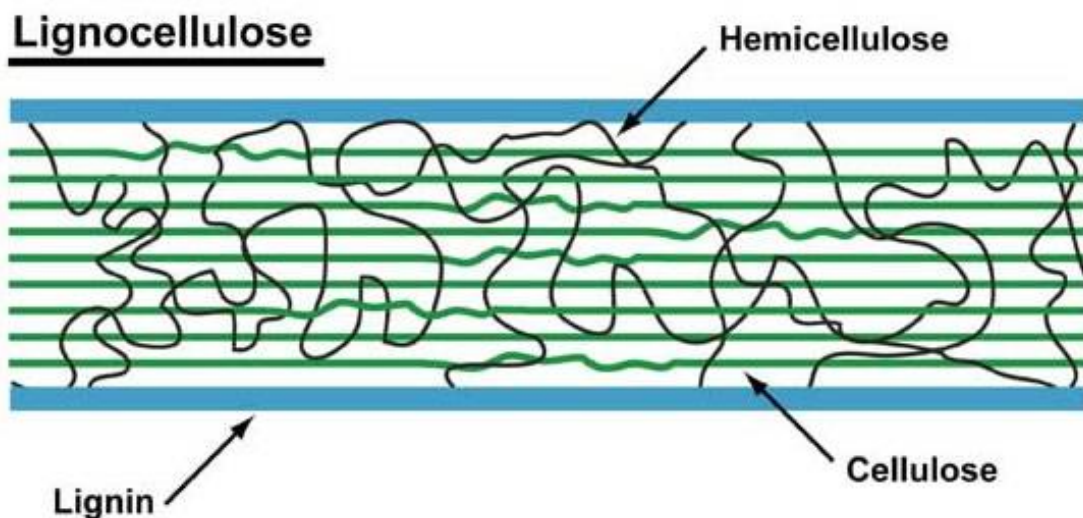
Η εκπόνηση αποτελεσματικών διεργασιών της ενζυμικής υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρίνης είναι σημαντική πρόκληση της μελλοντικής έρευνας ανοίγοντας τον δρόμο για την ορθολογική και φιλική προς το περιβάλλον χρήση των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Η κατάσταση αυτή τονίζεται από το γεγονός ότι η αλκαλική επεξεργασία του ξύλου ή των γεωργικών παραπροϊόντων εμφανίζεται να είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για να καταστραφεί η ακεραιότητα των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων και να βελτιωθεί η πεπτικότητά τους από ένζυμα.

### 1.5.2 Δεσμοί μεταξύ λιγνίνης και ημικυτταρινών

Η βιβλιογραφία περιλαμβάνει πληροφορίες για την παρουσία τριών τύπων ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ της λιγνίνης και των ημικυτταρινών στα φυτικά



κυτταρικά τοιχώματα. Ο πρώτος τύπος περιλαμβάνει π-κουμαρικό ή φερουλικό οξύ, συνδεδεμένο αιθερικά με τη λιγνίνη και εστερικά με τα σάκχαρα της ημικυτταρίνης. Αυτός ο δεσμός μπορεί θεωρητικά να διασπαστεί από εστεράσες του φερουλικού οξέος. Ο δεύτερος τύπος αντιπροσωπεύεται από αιθερικούς δεσμούς μεταξύ υδροξυλομάδων των σακχαριτών και των λιγνινικών αλκοολών. Ο τρίτος τύπος περιλαμβάνει εστερικούς δεσμούς μεταξύ υπολειμμάτων 4-O-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος (MeGlcA) ή D-γλυκουρονικού οξέος των γλυκουρονοξυλανών και των ομάδων υδροξυλίου των λιγνινικών αλκοολών. Αυτός ο εστερικός δεσμός έχει μέχρι στιγμής αποδειχθεί μόνο έμμεσα, και με δύο τρόπους. Η μία τεχνική χρησιμοποιεί *in situ* αναγωγή εστέρα με βορυδρίδιο του νατρίου, οδηγώντας στην μετατροπή του MeGlcA σε 4-O-μεθυλ-D-γλυκόζη. Η 4-O-μεθυλ-D-γλυκόζη δεν μπορεί να βρεθεί στο υδρόλυμα οξέος του ιστού πριν από την αναγωγική επεξεργασία. Η δεύτερη προσέγγιση εμπλέκει οξειδωτική διάσπαση του πλήρως ακετυλιωμένου εστέρα του ουρονικού οξέος με 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη, αποδίδοντας ελεύθερο ουρονικό οξύ και αλδεΐδη ή κετόνη, ανάλογα με τον τύπο της αλκοόλης (πρωτοταγούς ή δευτερογενούς) που συμμετέχει στον εστερικό δεσμό. (Spanikova & Biely, 2006).



Εικόνα 1.9 Λιγνινοκυτταρίνη

### 1.5.3 Ενζυμική υδρόλυση δεσμών μεταξύ λιγνίνης και ημικυτταρινών

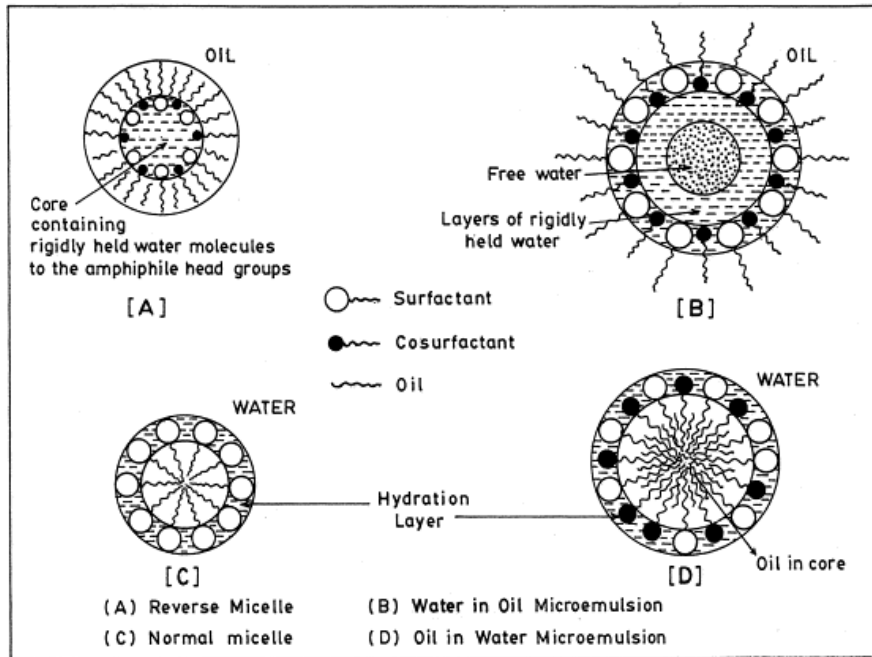
Νηματοειδείς μύκητες, καθώς και ορισμένοι άλλοι μικροοργανισμοί αποικοδομούν αποτελεσματικά τη λιγνινοκυτταρίνη χρησιμοποιώντας ένα σύνθετο μίγμα ενζύμων. Τα υλικά αυτά έχουν λάβει αυξανόμενο ενδιαφέρον ως πηγή των εναλλακτικών καυσίμων και άλλων σημαντικών χημικών. Η αναλογική μετατροπή της βιομάζας των φυτών από μικροβιακά, υδρολυτικά και οξειδωτικά ενζυμικά συστήματα ενδέχεται να είναι πιο φιλική προς το περιβάλλον από τις διαδικασίες που περιλαμβάνουν αλκαλική επεξεργασία. Ωστόσο, για να είναι σε θέση να επιτευχθεί πλήρη υδρόλυση, ένα κοκτέιλ ενζύμων απαιτείται για να καταφέρει να διασπάσει όλους τους δεσμούς στην ακάθαρτη βιομάζα.

Η πρόοδος στον τομέα αυτό εξαρτάται από την καλύτερη γνώση των ενζύμων που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Ο αριθμός των ομοιοπολικών δεσμών στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα είναι ασφαλώς μεγαλύτερος από τον αριθμό των μέχρι σήμερα γνωστών υδρολυτικών ενζύμων. Αναμένεται ότι μία τέτοια διεργασία, όχι μόνο διακόπτει τις φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διάφορων πολυμερών, αλλά επίσης διασπά έναν αριθμό γνωστών ή άγνωστων αλκαλο-ασταθών ομοιοπολικών δεσμών, όπως των εστερικών δεσμών. Ένας τέτοιος δεσμός έχει δείχτει ότι συνδέει την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη μέσω εστερικών δεσμών μεταξύ D-γλυκουρονικό ή 4-O-μεθυλο-D-γλυκουρονικό οξύ (MeGlcA) των γλυκουρονοξυλανών και λιγνινικών αλκοολών. Η σύνδεση έχει μέχρι τώρα αποδειχθεί μόνο έμμεσα, είτε με *in situ* μείωση του MeGlcA σε 4-O-μεθυλ-D-γλυκόζη, ή από οξείδωση 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνης. Το ένζυμο, το οποίο θα υδρόλυε αυτούς τους δεσμούς θα μπορούσε να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη μικροβιακή πέψη των φυτικών ιστών και ενδέχεται να έχει σημαντικό βιοτεχνολογικό δυναμικό. (Spanikova, Biely 2006)

## 1.6 Σύνθεση βιοτασιενεργών εστέρων του D-γλυκουρονικού οξέος με μη συμβατική βιοκατάλυση

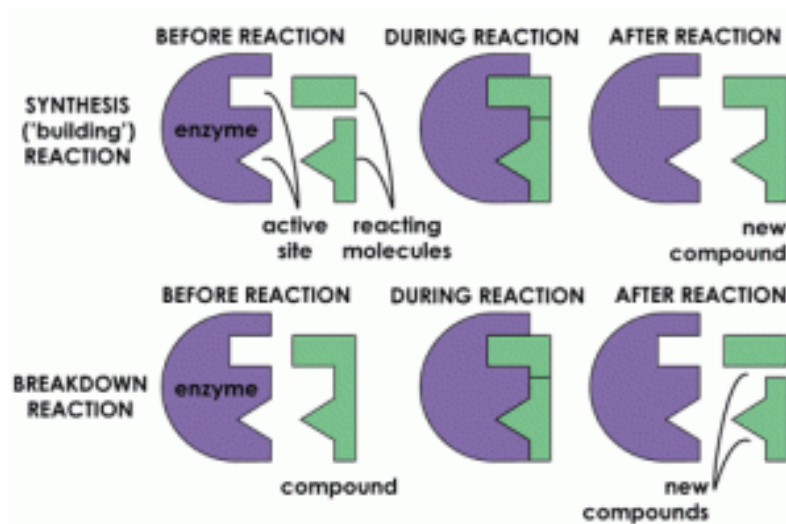
### 1.6.1 Πλεονεκτήματα βιοκατάλυσης σε μη-συμβατικά μέσα

Υπάρχουν αρκετά δυνητικά πλεονεκτήματα για την εισαγωγή των οργανικών διαλυτών σε αντιδράσεις σύνθεσης. Οι οργανικοί διαλύτες συνήθως αυξάνουν την διαλυτότητα των υδρόφοβων υποστρωμάτων, βελτιώνοντας έτσι την ογκομετρική παραγωγικότητα της αντίδρασης. Η θερμοδυναμική ισορροπία της αντίδρασης μπορεί να μετατοπίζεται ώστε να ευνοεί τη σύνθεση έναντι της υδρόλυσης, π.χ. με τη μείωση της ενεργότητας του νερού. Το τελευταίο μπορεί να επιτευχθεί με την αντικατάσταση του νερού στο μίγμα της αντίδρασης από έναν αναμίξιμο με το νερό οργανικό διαλύτη, ή με εισαγωγή πολυμερών, σακχάρων, ή αλάτων. Η μείωση της ενεργότητας του νερού ή του σχετικού περιεχόμενου του νερού θα μειώσει επίσης τις υδατο-εξαρτώμενες ανεπιθύμητες πλευρικές αντιδράσεις όπως είναι ο πολυμερισμός των οξειδωμένων φαινολών ή τις υδρολύσεις κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων μετεστεροποίησης. Επιπλέον, οι υψηλότερες αποδόσεις προϊόντος θα επιτευχθούν με μείωση του υποστρώματος και/ή παρεμπόδιση προϊόντος, είτε έμμεσα διατηρώντας μια χαμηλή συγκέντρωση στο υδατικό μικρο-περιβάλλον του βιοκαταλύτη, ή απευθείας αλλάζοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του παρεμποδιστή και του ενεργού κέντρου του ενζύμου. (Krieger *et al.*, 2004).



Εικόνα 1.10 Συστήματα μικρογαλακτωμάτων

Η εφαρμογή οργανικών διαλυτών χαμηλού σημείου ζέσεως θα απλοποιήσει την ανάκτηση του προϊόντος και του βιοκαταλύτη. Ο βιοκαταλύτης δε διαλύεται στο διαλύτη και επομένως μπορεί εύκολα να ανακτηθεί από το μίγμα αντίδρασης, για παράδειγμα με διήθηση, ενώ το προϊόν μπορεί να ληφθεί με εξάτμιση του διαλύτη, εφόσον υπάρχει επαρκής διαφορά στο σημείο ζέσεως.



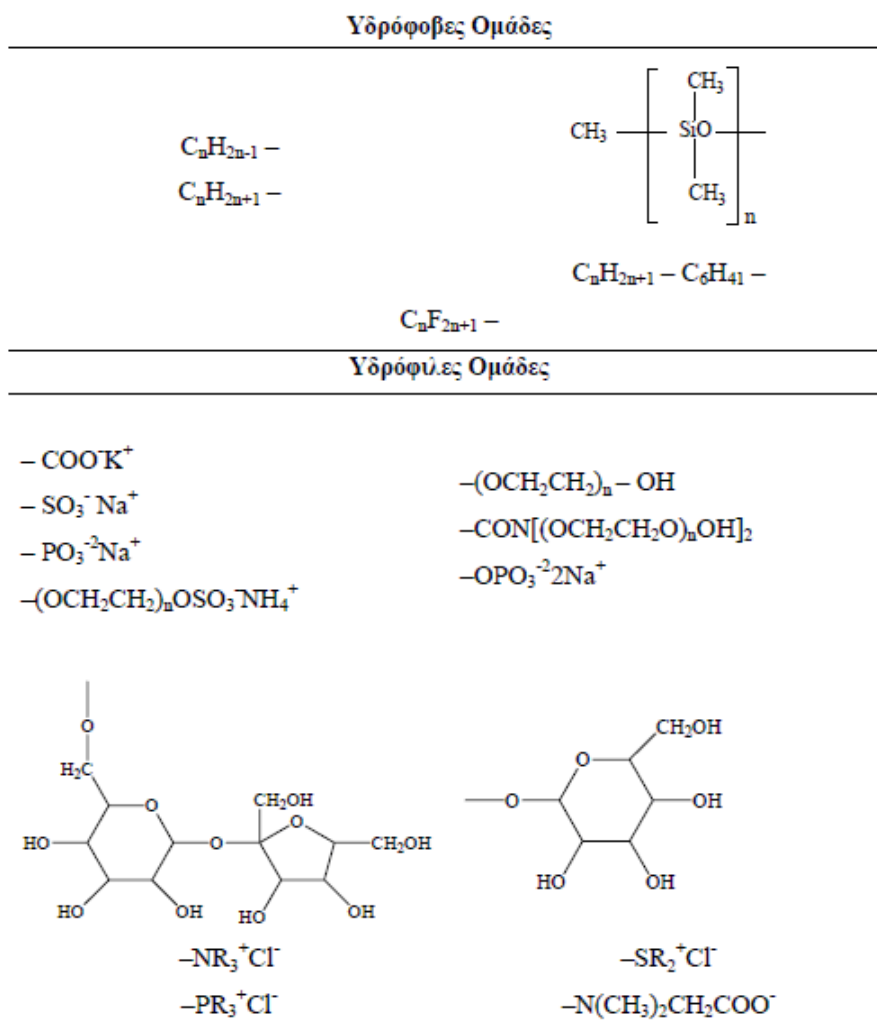
Εικόνα 1.11 Τα ένζυμα σε διαφορετικό περιβάλλον, λειτουργούν αντίστροφα

Άλλα πλεονεκτήματα της ενζυμικής κατάλυσης σε οργανικούς διαλύτες είναι η βελτιωμένη θερμική σταθερότητα του ενζύμου, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται

μικρο-υδατικά μέσα αντίδρασης και η πιθανότητα να χειριστούν η στερεο- και τοπο-εκλεκτικότητα του ενζύμου σε αυτά τα μέσα. Προφανώς δεν είναι όλα αυτά τα πλεονεκτήματα σχετικά με όλες τις κατηγορίες των αντιδράσεων με μέσα οργανικούς διαλύτες και φυσικά, μειονεκτήματα της χρήσης οργανικών διαλυτών σε βιοκατάλυση υπάρχουν, π.χ. ο οργανικός διαλύτης μπορεί αποδιατάσσει ή να αναστέλλει τον βιοκαταλύτη. Επιπλέον, η εισαγωγή ενός οργανικού διαλύτη στο μίγμα της αντίδρασης αυξάνει την πολυπλοκότητα. (Vermue M.H. & Tramper J., 1995) . Στην εργασία θα χρησιμοποιηθούν μέθοδοι μη συμβατικής βιοκατάλυσης για τη σύνθεση βιοτασιενεργών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος. Παρακάτω, αναφέρονται συνοπτικά μερικές ιδιότητες των συμβατικών τασιενεργών και των πιο σύγχρονων βιοτασιενεργών.

### 1.6.2 Τασιενεργές Ενώσεις και Ιδιότητες

Το μόριο της ομάδας των χημικών ενώσεων γνωστών ως επιφανειοδραστικές ουσίες ή ως επιφανειακά ενεργές ενώσεις ή ως τασιενεργά (surfactants, surface active agents, tensides) στην πιο κοινή του μορφή αποτελείται από ένα λυόφοβο τμήμα το οποίο έχει πολύ μικρή έλξη προς το διαλύτη και από ένα τμήμα το οποίο έχει ισχυρή έλξη προς το διαλύτη, το οποίο ονομάζεται λυόφιλο. Στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι το νερό, το λυόφοβο τμήμα (συνήθως υδρογονανθρακική αλυσίδα) ονομάζεται υδρόφοβο ενώ το άλλο τμήμα είναι το υδρόφιλο (πολικό), όπως φαίνεται στην εικόνα 1.12.



Εικόνα 1.12 Χαρακτηριστικές υδρόφιλες και υδρόφοβες ομάδες τασιενεργών

Το σχηματικό μοντέλο «ουράς – κεφαλής» (head – tail model) χρησιμοποιείται ευρέως στη γραφική αναπαράσταση απλών τασιενεργών όπου η ουρά συμβολίζει την υδρόφοβη ομάδα και η κεφαλή την υδρόφιλη ( Εικόνα 1.13) [Ottewill 1984].



Εικόνα 1.13. Σχηματική αναπαράσταση μοντέλου «Κεφαλής – Ουράς» για τα τα τασιενεργά

Οι γενικές ιδιότητες και η συμπεριφορά αυτών των ουσιών οφείλονται στη δυική φύση του μορίου τους. Ο ανταγωνισμός των δύο αυτών τμημάτων του μορίου

και η ισορροπία μεταξύ τους προσδίδει στις ενώσεις αυτές τις επιφανειοδραστικές τους ιδιότητες. Η υδρόφιλη ομάδα ασκεί επίδραση διαλυτοποίησης και τείνει να έλκει ολόκληρο το μόριο προς το διάλυμα. Η υδρόφοβη ομάδα, από την άλλη πλευρά, λόγω της μη διαλυτότητάς της, αντιτίθεται σε αυτή την τάση. Λόγω του ανταγωνισμού ανάμεσα στις δύο ομάδες η ουσία ούτε διαλύεται απόλυτα ούτε παραμένει αδιάλυτη εντελώς αλλά συγκεντρώνεται στην επιφάνεια υγρού – υγρού όπου συνήθως το μόριο της είναι προσανατολισμένο με τις υδρόφιλες ομάδες προς την υδατική φάση και τις υδρόφοβες προς την μη υδατική [Lynn 2006]. Η χρησιμότητα των τασιενεργών πηγάζει από τις επιδράσεις που επιφέρουν στις επιφανειακές, διεπιφανειακές και κύριες ιδιότητες των διαλυμάτων τους και στα υλικά με τα οποία τα διαλύματα τους έρχονται σε επαφή.

### 1.6.3 Βιοτασιενεργά στη βιομηχανία

Τα βιοτασιενεργά έχουν γίνει ένα σημαντικό προϊόν της βιοτεχνολογίας για βιομηχανικές και ιατρικές εφαρμογές [N.Cosaric 1992]. Η αιτία της δημοφιλίας τους σαν υψηλής αξίας μικροβιακά προϊόντα είναι αρχικά στην εξειδικευμένη τους δράση, χαμηλή τοξικότητα, σχετική ευκολία σύνθεσης και διαδεδομένης εφαρμογής. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν γαλακτοματοποιητές, απογαλακτοματοποιητές, παράγοντες διαβροχής, διασποράς, αφρισμού, λειτουργικά συστατικά τροφίμων, και καθαρυστικά σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς, όπως Πετρέλαιο και Πετροχημικά, Οργανικά Χημικά, Τρόφιμα και Ποτά, Αγροχημικά και Λιπάσματα, Περιβαλλοντικός Έλεγχος και διάφορους άλλους.

Οι μοναδικές ιδιότητες των βιοτασιενεργών επιτρέπουν τη χρήση τους και πιθανή αντικατάσταση των χημικά συνθεμένων τασιενεργών σε σημαντικό αριθμό βιομηχανικών λειτουργιών. Τα τασιενεργά χρησιμοποιούνται από πολλές βιομηχανίες σε τέτοιο βαθμό ώστε θα μπορούσε να πει κανείς πως δεν υπάρχει σύγχρονη βιομηχανική λειτουργία που δεν αξιοποιούνται επιφανειακές ιδιότητες και τασιενεργά. (Η πιθανή εφαρμογή των βιοτασιενεργών στις βιομηχανίες είναι επίσης μια πραγματικότητα.). Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα των βιοτασιενεργών σε σύγκριση με τα χημικής σύνθεσης αντίστοιχά τους.

Κάποια από αυτά αποτελούν :

- Βιοαποικοδομησιμότητα, γενικά χαμηλή τοξικότητα, βιοσυμβατότητα, που επιτρέπει τη χρήση τους σε καλλυντικά, φαρμακευτικά και λειτουργικά πρόσθετα τροφίμων.
- Διαθεσιμότητα πρώτων υλών. Τα βιοτασιενεργά μπορούν να παραχθούν από οικονομικές πρώτες ύλες που είναι διαθέσιμες σε μεγάλες ποσότητες. Η πηγή άνθρακα μπορεί να προέρχεται από υδατάνθρακες, υδρογονάνθρακες, και/ή λιπίδια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ξεχωριστά ή σε συνδυασμό το ένα με το άλλο.
- Αποδεκτά οικονομικά παραγωγής. Ανάλογα την εφαρμογή, τα βιοτασιενεργά μπορούν επίσης να παραχθούν από βιομηχανικά απόβλητα και παραπροϊόντα και είναι ειδικού ενδιαφέροντος για μαζική παραγωγή (π.χ. για χρήση σε τεχνολογίες που σχετίζονται με το πετρέλαιο).
- Χρήση στον περιβαλλοντικό έλεγχο. Τα βιοτασιενεργά μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στη διαχείριση βιομηχανικών γαλακτωμάτων, έλεγχο πετρελαιοκηλίδων, βιοδιάσπαση και αποτοξικότητα των βιομηχανικών αποβλήτων και στη βιοεξυγίανση μολυσμένου εδάφους.
- Εξειδίκευση. Τα βιοτασιενεργά, όντας πολύπλοκα οργανικά μόρια με συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες, είναι συχνά συγκεκριμένα στη δράση τους. Αυτό θα μπορούσε να είναι ειδικού ενδιαφέροντος για να την αποτοξίνωση ειδικών ρυπαντών, απογαλακτωματοποίηση βιομηχανικών γαλακτωμάτων και συγκεκριμένων εφαρμογών σε καλλυντικά, φαρμακευτικά και τρόφιμα.

Σχετικά με τα μειονεκτήματα, ένα από τα προβλήματα σχετίζεται με τις απαιτήσεις για παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα και χαμηλό κόστος των βιοτασιενεργών. Μεγάλες ποσότητες είναι απαραίτητες συγκεκριμένα στις πετροχημικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές που λόγω ποσότητας μπορεί να είναι



ακριβές. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, οι διεργασίες θα πρέπει να συνδεθούν με τη χρησιμοποίηση των απόβλητων υποστρωμάτων που αντιμετωπίζουν την ίδια στιγμή το αποτέλεσμα της μόλυνσής τους που ισοσταθμίζει τα συνολικά κόστη.

#### 1.6.4 Χρήση εστέρων του D-γλυκουρονικού οξέος ως βιοτασιενεργά

In vivo, οι εστέρες του D-γλυκουρονικού οξέος βρίσκονται στα ούρα, που συμμετέχουν στην μετατροπή του αρυλαλκανοϊκού οξέους. Χρησιμοποιούνται επίσης εν μέρει στην στόχευση αντικαρκινικών φαρμάκων σαν το Paclitaxel ή σαν προφάρμακα επιλεκτικά ενεργοποιημένα σε όγκους από την εξωκυτταρική ανθρώπινη β-γλυκουρονιδάση. Αυτές οι συνθέσεις, χάρη στις λιπάσες είναι ένα εναλλακτικό στη σύνθεση ακόρεστων εστέρων γλυκόζης φαρμακευτικού ενδιαφέροντος (Otto et al. 1998 ; Otto et al., 2000).

Για αρκετά χρόνια, έχει υπάρξει μεγάλο ενδιαφέρον στη χρήση λιπαρών εστέρων των σακχάρων σαν μη ιοντικά τασιενεργά. Οι ιδιότητες των τασιενεργών και γαλακτωματοποιητών προέρχονται από την παρουσία και υδρόφιλων και υδρόφοβων περιοχών στο ίδιο μόριο. Οι εστέρες σακχάρων παρουσιάζουν αυτό το χαρακτηριστικό. Η υδρόφιλη ομάδα εδώ, παρέχεται από ένα σάκχαρο και η χρήση μιας γραμμικής αλκυλικής αλυσίδας σαν υδροφοβική ομάδα μας επιτρέπει να προσαρμόσουμε την επιρροή της.

Για αυτό το λόγο, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για τη σχετική επιρροή της υδροφοβικότητας στο μόριο. Η υδρόφιλη - υδρόφοβη ισορροπία είναι η κύρια παράμετρος που καθορίζει την διεπιφανειακή ενεργότητα ενός αμφίφιλου μορίου. Αυτή η τιμή ελέγχεται από τη φύση του μήκους της αλυσίδας και από τη σημαντικότητα της υδρόφιλης κεφαλής. Ο αριθμός των εστεροποιημένων υδροξυλικών ομάδων έχει επίσης μεγάλη επιρροή. Οι εστέρες σακχάρων έχουν μια πολύ πλατιά τυχαία ισορροπία υδροφιλικότητας και λιποφιλικότητας (HLB - Hydrophilicity and lipophilicity balance) . Πράγματι, οι ιδιότητές του μπορούν να κυμαίνονται από αυτές των υδατοδιαλυτών τασιενεργών (HLB υψηλότερο του 10) ως αυτές των λιποδιαλυτών γαλακτοματοποιητών (τιμή HLB μικρότερη του 4).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, και οι δύο υπάρχουσες ομάδες παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες : Είναι φτιαγμένες από ανανεώσιμες και οικονομικές πρώτες ύλες. Επιπροσθέτως, είναι πλήρως βιοαποικοδομήσιμες, μη τοξικές, δεν ερεθίζουν το δέρμα, άοσμες και άγευστες. Παρόλα αυτά τα πλεονεκτήματα και για αρκετό καιρό, η σύνθεση εστέρων σακχάρων ήταν περιορισμένη. Η αιτία είναι ότι η κλασσική χημική διεργασία σύνθεσης παρουσιάζει κάποια σημαντικά μειονεκτήματα. Αυτή η συμβατική προσέγγιση απαιτεί μια υψηλή θερμοκρασία, που προκαλεί χρωματισμό, υψηλή κατανάλωση ενέργειας και σημαντικό αριθμό παραπροϊόντων.

Η χρήση βιολογικών καταλυτών κάτω από ήπιες συνθήκες μπορεί να βοηθήσει στο να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα. Η ενζυμική σύνθεση έχει δώσει νέες δυνατότητες στην παραγωγή εστέρων των σακχάρων. Οι περισσότερες μελέτες για εστέρες σακχάρων παρουσιάζουν τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από εστέρες σακχαρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης. Η ιδιαιτερότητα των τασιενεργών που χρησιμοποιούνται σε αυτή την έρευνα είναι δεμένη στη φύση της υδρόφιλης ομάδας : του γλυκουρονικού οξέος. Οι Otto *et al.* ανέφεραν για πρώτη φορά την καταλυμένη από λιπάση εστεροποίηση αυτού του σακχαρικού οξέος με μια αλκοόλη (κ-βουτανόλη). Έχει επίσης ερευνηθεί το αποτέλεσμα του μήκους της υδροφοβικής αλυσίδας στις επιφανειακές ιδιότητες των ενζυμικά συνθεμένων εστέρων του γλυκουρονικού οξέος.

Οι επιφανειακές ιδιότητες ενός τασιενεργού παρέχουν τη βάση για διάφορες εφαρμογές και χαρακτηρίζονται συνήθως από την τάση επιφανειακής ισορροπίας, την κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίου (CMC - critical micellar concentration), την επιφανειακή συγκέντρωση και το εμβαδό επιφάνειας ανά μόριο. Ωστόσο, σε πολλές διεπιφανειακές διεργασίες, όπως η ενυδάτωση ή ο αφρισμός, οι συνθήκες ισορροπίας δεν επιτυγχάνονται και οι δυναμικές διεργασίες παίζουν ένα μεγάλο ρόλο. Άρα, οι κινητικές προσρόφησης του τασιενεργούς πρέπει να χαρακτηριστούν.

Οι υδατανθρακικοί λιπαροί εστέρες είναι πολύ ελκυστικά τασιενεργά επειδή διάφορες επιφανειοδραστικές ιδιότητες μπορούν να παραληφθούν ανάλογα τη δομή τους. Όσον αφορά τους κ-αλκυλεστέρες του D-γλυκουρονικού οξέος, ήταν καθιερωμένο ότι αυτά τα μόρια μπορούν να παρουσιάσουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες εξαρτώμενα από το μήκος της υδρόφοβης αλυσίδας (Blecker *et al.*, 2002). Για

παράδειγμα, η σημαντική ταχύτητα προσρόφησης των δεκυλο και δωδεκυλο γλυκουρονικών εστέρων τους επιτρέπει να δημιουργήσουν σημαντική μείωση της επιφανειακής τάσης σε λίγα δευτερόλεπτα. Αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να συνδεθεί με ιδιότητες αφρισμού. Οι δομές μικκυλίων θα μπορούσαν να παραληφθούν χρησιμοποιώντας μικρού όγκου συγκέντρωση οκτυλογλυκουρονεστέρα. Άρα, η χρήση αυτού του μορίου μπορεί να προβλεφθεί σε τασιενεργά ή γενικά μιλώντας, σε συστήματα όπου μια υδροφοβική ουσία πρέπει να διασπαρεί σε μια υδατική φάση. Τέτοια συστήματα βρίσκονται σε φαρμακευτικές και καλλυντικές φόρμουλες. (Moreau *et al.*, 2006).

Όσον αφορά κάποιες ιδιότητες των αλκυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος, οι έρευνες έχουν δείξει ότι όλοι οι ενζυμικά συνθεμένοι οκτυλικοί εστέρες του γλυκουρονικού οξέος, καθαρισμένοι και λυοφιλιμένοι από υδατικά διαλύματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις είναι λευκά στερεά. Σε θερμοκρασία δωματίου, όλοι παρουσιάζουν διαθλώμενη υφή κάτω από το μικροσκόπιο πόλωσης, δείχνοντας την παρουσία της κρυσταλλικής δομής.

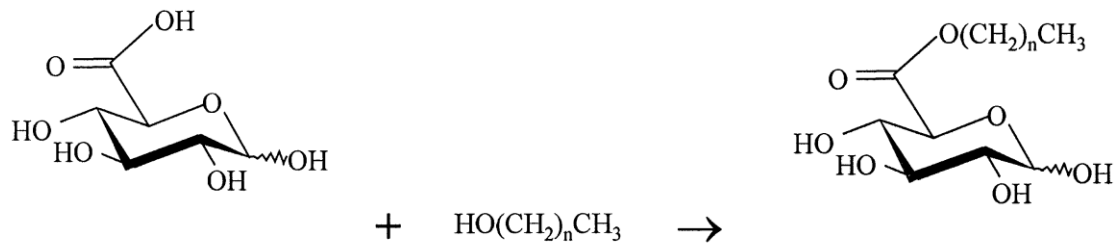
### 1.6.5 Σύνθεση εστέρων του D-γλυκουρονικού οξέος με λιπάσες

#### 1.6.5.α. Σύνθεση με βιοκατάλυση από λιπάση B της *Candida antarctica* σε τριτοταγή βουτανόλη (tert-βουτανόλη)

Το 2004, με τη συνεργασία επιστημόνων από το Βέλγιο και τη Γαλλία, συντέθηκαν με άμεση εστεροποίηση σε μη υδατική φάση (τριτοταγή βουτανόλη) με χρήση μιας ακινητοποιημένης λιπάσης κ-αλκυλεστέρες του γλυκουρονικού οξέος και οι αντίστοιχοι εστέρες της γλυκόζης, μια καινούρια κατηγορία πολλά υποσχόμενων βιοτασιενεργών. [Paquot & Marlier *et al.*, 2004].

Τα αποτελέσματα της έρευνας, εστίασαν στη σύνθεση μέσου και μεγάλου μήκους (C6 ως C18:1) υδατανθρακικής αλυσίδας εστέρων του γλυκουρονικού οξέος χρησιμοποιώντας την λιπάση της *Candida antarctica* B (Εικόνα 1.14). Ο στόχος ήταν να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες της σύνθεσης και να παραχθούν δείγματα εστέρων υψηλής καθαρότητας για να ερευνηθούν σε βάθος οι επιφανειακές ιδιότητές τους.

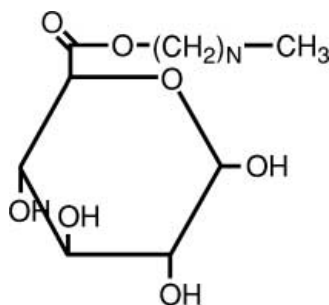
Αφού από τις προκαταρκτικές μελέτες είχαν παρουσιαστεί σχετικά αποτελέσματα για τις ομολογίες C8 ως C18 [Blecker et al. 2002], η κύρια προσπάθεια συγκεντρώθηκε σε αυτή τη σειρά μορίων. Για λόγους σύγκρισης, η προετοιμασία των αντίστοιχων παραγώγων σακχάρων διεξάχθηκε με εστεροποίηση των ζυγά αριθμημένων οξέων (από κ-οκτανοϊκό ως κ-τετραδεκανοϊκό οξύ) με γλυκόζη και τον ίδιο βιοκαταλύτη.



$n = 11, 13, 15 \text{ or } 17$

**Εικόνα 1.14.** Η λιπάση B της *Candida antarctica* κατέλυσε την εστεροποίηση του γλυκουρονικού οξέος με λιπαρή αλκοόλη.

Στη ίδια εργασία, ως και 10 gr από πολύ καθαρούς C8 ως C18:1 διακλαδισμένους αλκυλεστέρες του γλυκουρονικού οξέος παρασκευάστηκαν για πρώτη φορά με έναν απλό τρόπο, με άμεση εστεροποίηση χρησιμοποιώντας βέλτιστες συνθήκες. Οι νέοι εστέρες του D-γλυκουρονικού οξέος χαρακτηρίστηκαν πλήρως με διαφορετικές χρωματογραφικές και φασματογραφικές τεχνικές. Οι αναλύσεις RP-HPLC οδήγησαν στο διαχωρισμό και των  $\alpha$  και των  $\beta$  ανωμερικών μορφών των εστέρων του γλυκουρονικού οξέος: Όσο μεγαλύτερη η πλάγια αλκυλική αλυσίδα (side-chain) τόσο καλύτερη η χρωματογραφική ανάλυση. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (Blecker et al. 2002), είναι πιθανό να παραλάβουμε διάφορα βιοτασιενεργά προσαρμόζοντας το μήκος της υδροφοβικής αλυσίδας δεμένη στην ομάδα του γλυκουρονικού οξέος.



**Εικόνα 1.15** Εστέρας γλυκουρονικού οξέος και λιπαρής αλκοόλης

### 1.6.5.β. Χαρακτηρισμός νέας ομάδας γλυκουρονικών εστέρων συνθεμένων με λιπάση

Σε δημοσίευση του 2006 από τον Benoît Moreau και τους συνεργάτες του, συντέθηκε για πρώτη φορά μια ομάδα διαφορετικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος (C8 ως C18:1) σε 2 1 αντιδραστήρα επιτρέποντας βελτίωση απόδοσης κατά την εστεροποίηση σε σύγκριση με την παραπάνω μελέτη (Moreau et al. 2004). Πρόσθετα, οι αποδόσεις αυτής της ομάδας γλυκουρονικών εστέρων ήταν ισοδύναμες, εξηγώντας με αυτόν τον τρόπο ότι το γλυκουρονικό οξύ (ακυλοδότης) ήταν πιο ογκώδης από ένα παραδοσιακό ακυλοδότη όπως ένα λιπαρό οξύ και σα συνέπεια, η αναστροφή της θέσης της ακυλομάδας είχε επίπτωση στην απόδοση της αντίδρασης.

Αυτή η δημοσίευση έδωσε έμφαση στην αναγνώριση από διαφορετικές χρωματογραφικές και φασματογραφικές τεχνικές μιας νέας ομάδας D-γλυκουρονικών εστέρων. Οι αναλύσεις με RP-HPLC (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης) οδήγησαν στο διαχωρισμό και των δύο ανωμερικών μορφών αυτών των ουσιών. Επιπλέον, όσο μακρύτερη ήταν η αλκυλική αλυσίδα, τόσο καλύτερη ήταν η χρωματογραφική ανάλυση. Μέσω MS/MS επιβεβαιώθηκε η σύνθεση του τετραδεκυλο D-γλυκουρονεστέρα που επίσης πιστοποιήθηκε από τα αποτελέσματα της  $^1\text{H}$ NMR.

Αυτές οι ουσίες, παρασκευασμένες από μία λιπάση, αντιπροσωπεύουν διάφορα νέα τασιενεργά και τελικά περισσότερες ουσίες μπορούν να ληφθούν προσαρμόζοντας το μήκος της υδροφοβικής αλυσίδας δεμένη στην ομάδα του D-γλυκουρονικού οξέος. Η αναλυτική μελέτη των επιφανειακών ιδιοτήτων και της λειτουργικότητας των καινούριων μορίων είναι σε εξέλιξη. (Moreau et al. 2006)

Συγκρίνοντας την εστεροποίηση του γλυκουρονικού οξέος με αλκοόλη με τη συνηθισμένη σύνθεση σακχαρικών εστέρων από σακχαρικές αλκοόλες (π.χ. γλυκόζη) και λιπαρά οξέα, η μέθοδός μας δίνει πρόσβαση σε μια μεγάλη ποικιλία από νέες ουσίες σακχαρικών εστέρων. Ένα μεγάλο εύρος αλειφατικών όπως και αρυλαλειφατικών και αρωματικών αλκοολών μπορεί να χρησιμοποιηθεί και νέες ιδιότητες (π.χ. τασιενεργές) μπορεί να αναμένεται από τα προϊόντα.

**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## Κεφάλαιο 2

### Υλικά και Μέθοδοι

Στην παράγραφο που ακολουθεί, περιγράφονται τα απαραίτητα υλικά, οι συσκευές, τα όργανα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν για να πραγματοποιηθούν οι σκοποί της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

#### 2.1 Υλικά

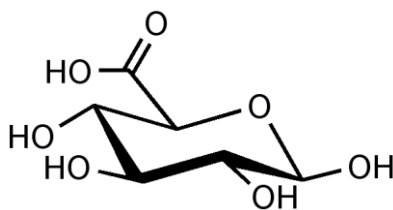
##### 2.1.1 Ένζυμα

Για την πραγματοποίηση των ενζυμικών αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν τρία ένζυμα, η StGE2 από τον μικροοργανισμό *Myceliophthora thermophila* (συνώνυμο *Sporotrichum thermophile*) και οι PaGE1 και PaGE2 από τον μικροοργανισμό *Podospora anserina*. Για την παραγωγή των παραπάνω ενζύμων ακολουθήθηκε ετερόλογη έκφραση μέσω γενετικά τροποποιημένων στελεχών του ζυμομύκητα *Pichia pastoris*.

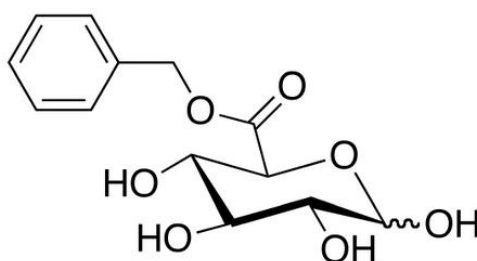
##### 2.1.2 Υπόστρώματα ενζύμων

###### 2.1.2.1 D-γλυκουρονικό οξύ

Το D-γλυκουρονικό οξύ (στη συνέχεια θα αναφέρεται απλά ως γλυκουρονικό οξύ) είναι ένα καρβοξυλικό οξύ με δομή παρόμοια με τη γλυκόζη. Ωστόσο, ο έκτος του άνθρακα είναι οξειδωμένος προς καρβοξυλικό οξύ. Χρησιμοποιήθηκε ως κύριο υπόστρωμα οξέος στη σύνθεση εστέρων στην παρούσα εργασία, διότι η δομή του παρουσιάζει ομοιότητες με αυτή του 4-μέθυλο-O-γλυκουρονικού οξέος που θεωρείται υπόστρωμα των υπό μελέτη ενζύμων ενώ αποτελούσε το πιο άμεσα διαθέσιμο υπόστρωμα.



### 2.1.2.2 Βενζυλικός εστέρας του γλυκουρονικού οξέος

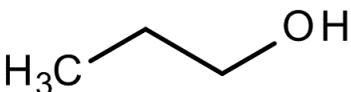
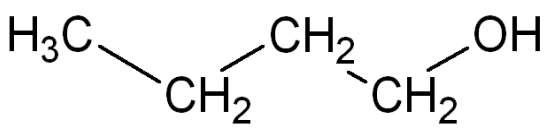
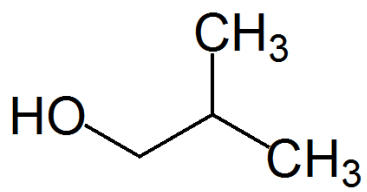
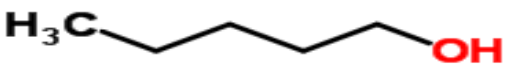
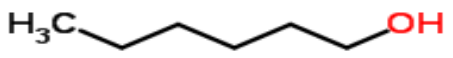



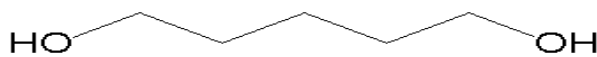
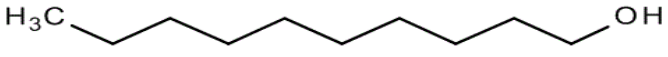
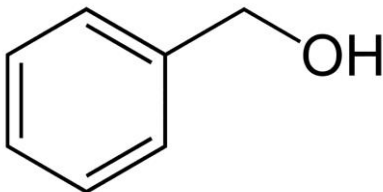
Ο βενζυλικός εστέρας του γλυκουρονικού οξέος ήταν το υπόστρωμα με το οποίο μελετήθηκε η ενεργότητα των ενζύμων κατά την υδρόλυση, καθώς περιέχει εστερικό δεσμό μεταξύ του γλυκουρονικού οξέος και του μεθυλίου της βενζυλικής αλκοόλης, δεσμού παρόμοιου με αυτούς που περιγράφονται στην παράγραφο 1.5 ανάμεσα στη λιγνίνη και τις ημικυτταρίνες που το καθιστά πιθανό υπόστρωμα των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος. Διατηρείται στην κατάψυξη στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , είναι υγροσκοπικό και χρησιμοποιείται σε φάρμακα και καλλυντικά. Το υπόστρωμα ήταν δωρεά από εργαστήριο στη Σουηδία.

### 2.1.2.3 Αλκοόλες

Στον Πίνακα 2.1 συνοψίζονται οι αλκοόλες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα διπλωματική εργασία. Αλειφατικές αλκοόλες αξιοποιήθηκαν για τη μελέτη της ενζυμικής σύνθεσης εστέρων του γλυκουρονικού οξέος μέσω των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε βενζυλική αλκοόλη ως πρότυπο με βάση την καμπύλη κατανομής συγκέντρωσης της οποίας και μέσω συστήματος χρωματογραφικού διαχωρισμού HPLC, υπολογίστηκε η ενζυμική υδρόλυση του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος.



Αλκοόλη	Συντακτικός τύπος
προπανόλη	
κ-βουτανόλη	
ισοβουτανόλη	
κ-πεντανόλη	
κ-εξανόλη	

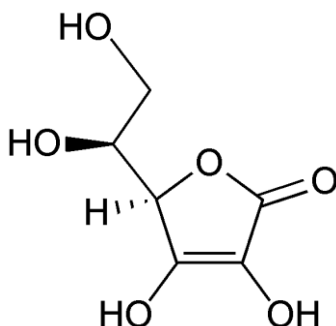
κ-επτανόλη	
1,5-πενταν-διόλη	
κ-δεκανόλη	
Βενζυλική αλκοόλη	

Πίνακας 2.1 Αλκοόλες - Υποστρώματα

#### 2.1.2.4 Ασκορβικό οξύ

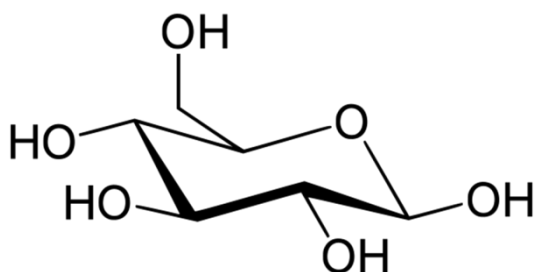
Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C, 2-οξο-L-γουλονικό οξύ-g-λακτόνη) είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά. Εστεροποιημένα ασκορβικά οξέα, σαν το 6-O-παλμιτολικό-L-ασκορβικό οξύ, χρησιμοποιούνται π.χ. σε κρέμες και βρεφικό γάλα (Humeau *et al.*, 1995). Ωστόσο, οι χημικές μετατροπές της βιταμίνης C είναι περιορισμένες λόγω της χαρακτηριστικής της αστάθειας. Το ασκορβικό οξύ

δοκιμάστηκε ως υπόστρωμα στη σύνθεση εστέρα του γλυκουρονικού οξέος, κάτι που είχε επιτευχθεί σε παλαιότερα πειράματα με ένζυμο λιπάση της *Candida antarctica* (Otto et al., 1998).



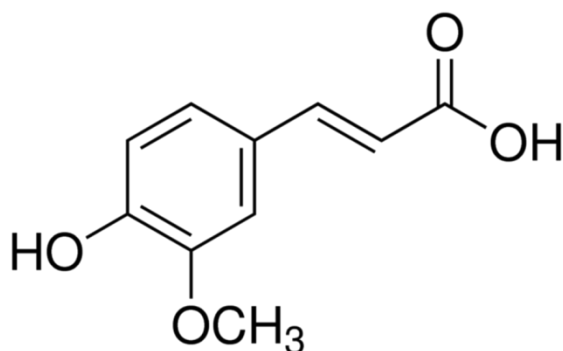
### 2.1.2.5 Γλυκόζη και Φερουλικό οξύ

Η γλυκόζη είναι απλός μονοσακχαρίτης που βρίσκεται στα φυτά. Είναι ένας από τους τρεις διατροφικούς μονοσακχαρίτες, μαζί με τη φρουκτόζη και τη γαλακτόζη, οι οποίοι απορροφώνται άμεσα στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια της πέψης. Αποτελεί τον σημαντικότερο υδατάνθρακα στη βιολογία, αφού τα κύτταρα την χρησιμοποιούν ως την πρωταρχική πηγή ενέργειας και ως μέσο μεταβολισμού. Η γλυκόζη είναι ένα από τα κύρια προϊόντα της φωτοσύνθεσης και χρησιμοποιείται ως καύσιμο για κυτταρική αναπνοή. (Carey, 2000). Η γλυκόζη εξετάστηκε σαν πιθανό υπόστρωμα των ενζύμων εξ αιτίας της ομοιότητάς της με το γλυκουρονικό οξύ, διαφέρει μόνο κατά μία καρβοξυλική ομάδα για να εξαχθούν συμπεράσματα σε σχέση με την εκλεκτικότητα των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος ως προς το υπόστρωμα.



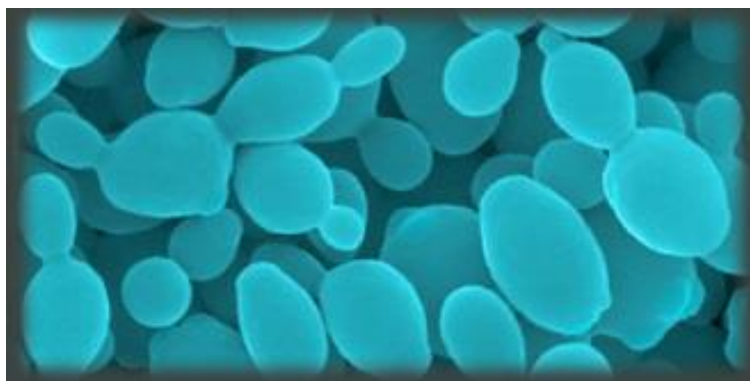
Το φερουλικό οξύ είναι ένα υδροξυκιναμικό οξύ, άφθονο φωτοχημικό που βρίσκεται στα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος όπως στις αραβινοξυλάνες σαν

ομοιοπολική πλευρική αλυσίδα. Σχετίζεται με το τρανς-κινναμικό οξύ. Σαν συστατικό της λιγνίνης, το φερουλικό οξύ είναι πρόδρομος στη σύνθεση άλλων αρωματικών ουσιών. Η ετυμολογία του είναι από το γένος *Ferula*, που αναφέρεται στο γιγάντιο μάραθο (*Ferula communis*). (Shahadi *et al.*, 2004). Εξετάστηκε σαν πιθανό υπόστρωμα των ενζύμων λόγω της ύπαρξής του στο κυτταρικό τοίχωμα συνδεδεμένο αιθερικά με τη λιγνίνη και εστερικά με τα σάκχαρα της ημικυτταρίνης.



### 2.1.3 *Pichia pastoris*

Για την παραγωγή των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το μετασηματισμένο στέλεχος X33 του ζυμομύκητα *Pichia pastoris* (Invitrogen). Η *Pichia pastoris* είναι ένας ευκαρυωτικός μονοκύτταρος μικροοργανισμός που ανήκει στην ομάδα των ζυμομυκήτων. Η *P.pastoris* χρησιμοποιεί τη μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, εξ ου και ο χαρακτηρισμός της ως μεθυλότροφος μύκητας. Χρησιμοποιείται ευρέως ως κύτταρο-ξενιστής στην ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, χάρη σε μια σειρά πλεονεκτημάτων που την καθιστούν ιδανική για αυτή τη διαδικασία.



**Εικόνα 2.1** Στελέχη *Pichia pastoris*

Σχετικά με άλλα ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης όπως αυτό του βακυλοϊού ή των καλλιιεργειών κυττάρων από θηλαστικά, η *P.pastoris* ξεχωρίζει λόγω του υψηλού ρυθμού ανάπτυξης και με τη δυνατότητά της να αναπτυχθεί είτε σε αναδεδυόμενες φιάλες, είτε σε ζυμωτήρα, κάνοντάς την κατάλληλη τόσο για μικρή όσο και για μεγάλη κλίμακα παραγωγής. Πέρα της ευκολίας στη χρήση και της εύκολης καλλιέργειας, η *P.pastoris*, ως ευκαρυωτικός οργανισμός παράγει σωστά τις διπλωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν υποστεί όλες τις απαραίτητες για τη λειτουργία τους μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις.

Η *P.pastoris* διαθέτει δύο γονίδια αλκοολικής οξειδάσης, τα AOX1 και AOX2, τα οποία έχουν έναν ισχυρό υποκινητή. Χάρη σε αυτά τα γονίδια έχει τη δυνατότητα η *P.pastoris* να χρησιμοποιεί τη μεθανόλη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Εν κατακλείδι, η *P.pastoris*, δεν εκκρίνει πολλές δικές της πρωτεΐνες στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ευκολότερη απομόνωση των επιθυμητών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που εκκρίνονται εκεί.

#### 2.1.4 Θρεπτικά μέσα της *Pichia pastoris*

Παρουσιάζονται τα απαραίτητα θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη των στελεχών της *P.pastoris* κατά την ετερόλογη παραγωγή των γλυκουρονικών εστερασών.

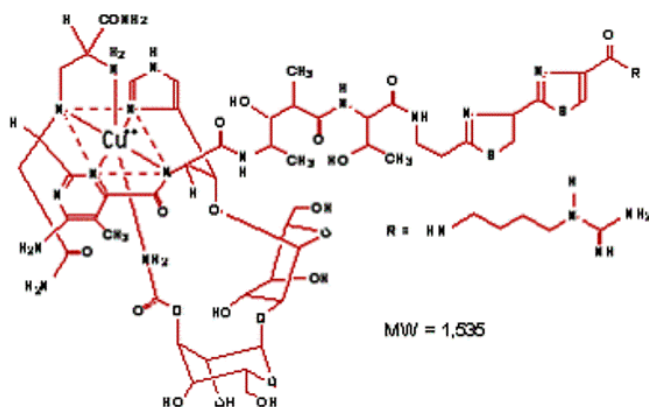
- YPD or YEPD Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (1 liter)

- 1 % yeast extract
- 2 % πεπτόνη
- 2 % δεξτρόζη (γλυκόζη)

- YPD (+ Zeocin™) Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (1 liter)

- 1 % yeast extract
- 2 % πεπτόνη
- 2 % δεξτρόζη (γλυκόζη)

- $\pm 2$  % άγαρ
  - $\pm 100$   $\mu\text{g/ml}$  Zeocin<sup>TM</sup> (εικ. 3.2)
- YPDS + Zeocin<sup>TM</sup> Άγαρ (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)
- 1 % yeast extract
  - 2 % πεπτόνη
  - 2 % δεξτρόζη (γλυκόζη)
  - 1 M σορβιτόλη
  - 2 % άγαρ
  - 100  $\mu\text{g/ml}$  Zeocin<sup>TM</sup> (εικ. 3.2)
- BMGY and BMMY Buffered Glycerol-complex Medium/Buffered Methanol-complex Medium
- 1 % yeast extract
  - 2 % πεπτόνη
  - 100 mM potassium phosphate, pH 6.0
  - 1.34 % YNB
  - $4 \times 10^{-5}$  % βιοτίνη
  - 1 % γλυκερόλη ή 0.5 % μεθανόλη



Εικόνα 2.2 Συντακτικός τύπος Ζεοσίνης

### 2.1.5 Ρυθμιστικά διαλύματα

Αναφέρονται τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους.

#### - Ρυθμιστικό διάλυμα Talon

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος Talon 10πλάσιας συγκέντρωσης της επιθυμητής διαλύονται στην επιθυμητή ποσότητα απιονισμένου νερού : 21,80 % w/v NaCl και 3,03 % w/v tris pure (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) με ταυτόχρονη ανάδευση. Από το διάλυμα που προκύπτει παραλαμβάνονται 50 mL και αραιώνονται 1:10 με 450 mL απιονισμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται σε τιμή pH=8 με προσθήκη πυκνού διαλύματος NaOH ή HCl. Η μέτρηση του pH γίνεται με ψηφιακό pHμετρο με ηλεκτρόδιο.

#### - Διαλύματα ιμιδαζολίου σε ρυθμιστικό διάλυμα Talon.

Για την παρασκευή 200 mL 5 mM διαλύματος ιμιδαζολίου σε Talon ζυγίστηκαν αντίστοιχα, 1,361 gr ιμιδαζολίου τα οποία στη συνέχεια διαλύθηκαν υπό ανάδευση σε 200 mL Talon buffer.

#### - Ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl

Το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl έχει συγκέντρωση 50 mM σε αμινοτρις-(υδροξυμεθυλ)-μεθάνιο (Tris pure C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) και pH=8 που έχει επιτευχθεί με προσθήκη σταγόνων HCl. Το pH μετριέται με ψηφιακό pHμετρο με ηλεκτρόδιο.

#### - Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE

Για την παρασκευή 10πλάσιας συγκέντρωσης της επιθυμητής ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, αναμιγνύονται :

- 30,3 g/L Tris
  - 144 g/L γλυκίνη
  - 1 % w/v SDS
  - pH=8,3 (self pH)
- Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE

Για την παρασκευή 15 mL ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, αναμιγνύονται.

- 1 gr SDS
- 5 mL 0,25 M Tris, pH=6,8
- 2,5 mL διαλύματος 50 % γλυκερόλης
- 2,5 mL 2-mercaptoethanol
- 4 mL 0,1 % BPB Dye

### 2.1.6 Βαφή για χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Η σύσταση της βαφής για την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας : 0,1895 gr/mL N-1-ναφθυλαιθυλενοδιγλωροδιαμίνη σε 97 % v/v μεθανόλη και 3 % v/v πυκνό θειικό οξύ. (Bounias M., 1980).

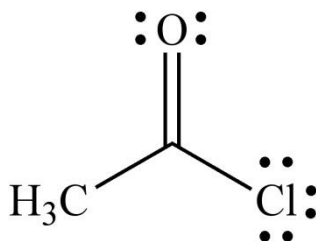
### 2.1.7 Διαλύτες TLC

Ο διαλύτης έκλουσης ήταν διάλυμα κ-βουτανόλη : αιθανόλη : νερό με αναλογία 50:25:10 (v/v/v).

### 2.1.8 Ακετυλοχλωρίδιο

Το ακετυλοχλωρίδιο είναι ένα όξινο χλωρίδιο που προέρχεται από το οξικό οξύ. Χρησιμοποιείται στην ακετυλίωση οργανικών ουσιών και κατέλυσε την αντίδραση σύνθεσης μεθυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος.





### 2.1.9 Όργανα - Συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία :

- Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Κίνα)
- Επωαστήρας Orbital incubator S150, Stuart Scientific (M. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Περισταλτική αντλία Econo Gradient, BioRad (Η.Π.Α.)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας Rotavapor Buchi RE 111, Buchi (Ελβετία)
- Συλλέκτης κλασμάτων Waters, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (M. Βρετανία)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή υπερδιήθησης διαλυμάτων Stirred Cell Model 8400, 400 mL και μεμβράνες PM-10, Amicon, Millipore, (Η.Π.Α.)
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Σύστημα χρωματογραφίας διαχωρισμού πρωτεϊνών (Econo Gradient Pump, BioRad και Waters 600E, Millipore (Η.Π.Α.) και ανιχνευτής UV ακτινοβολίας (280 nm) για την ανίχνευση των εκλούόμενων πρωτεϊνών.

- Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) Jasco (Ιαπωνία) με αντλία PU 987, φωτομετρικό ανιχνευτή UV 975 και λογισμικό διαχείρισης και καταγραφής Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία)
- Φυγόκεντρος Beckman Coulter (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, Labequip (Καναδάς)

### 2.1.10 Υλικά και στήλες Χρωματογραφίας

Τα υλικά χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προϊόντα της BioRad (Η.Π.Α.).

- Στήλες χρωματογραφίας υλικού Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.) για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών *StGE2*, *PaGE1* και *PaGE2*.
- Στήλη αντίστροφης φάσης C18 Nucleosil (250 mm x 4.6 mm, Macherey – Nagel, Γερμανία) στη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography).
- Φύλλα αλουμινίου TLC Silica gel 60 F254 Merck (Γερμανία) για τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC).

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1 Παραγωγή εστερασών του γλυκουρονικού οξέος

Για την υπερέκφραση και των τριών ενζύμων, *StGE2*, *PaGE1*, και *PaGE2*, χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένα στελέχη της *Pichia pastoris* στα οποία ήταν ήδη κλωνοποιημένα τα αντίστοιχα γονίδια.

#### 2.2.1.α. Προκαλλιέργειες κυττάρων *Pichia pastoris*

Οι προκαλλιέργειες των ανασυνδυασμένων κυττάρων έγιναν σε θρεπτικό μέσο BMGY για αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων που πρώτα αποστειρώθηκε στους 121 °C με πίεση 0,1 MPa για 20 min. Τα κύτταρα εμβολιάστηκαν σε κωνικές φιάλες με το αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό σε όχι περισσότερο από 25 % του όγκου τους για να επιτευχθεί ικανοποιητικός αερισμός. Ο εμβολιασμός έγινε σε hood με λύχνο για στείρες συνθήκες. Στη συνέχεια, οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 30 °C με ανάδευση 180 rpm μέχρι η καλλιέργεια να φτάσει οπτική πυκνότητα (optical density) O.D. 2-6, 16-18 ώρες μετά. Η O.D. υπολογίστηκε με φωτόμετρο UV-VIS στα 600 nm, αφού πρώτα φυγοκεντρήθηκε το υπερκείμενο.

#### 2.2.1.β. Κύριες καλλιέργειες κυττάρων *Pichia pastoris*

Για τον υπολογισμό των αντίστοιχων όγκων που έπρεπε να παραληφθούν από την κάθε προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε ο λόγος  $O.D._{\text{προκαλλιέργειας}} \cdot V_{\text{προκαλλιέργειας}} = O.D._{\text{καλλιέργειας}} \cdot V_{\text{καλλιέργειας}}$  με στόχο η αρχική  $O.D._{\text{καλλιέργειας}}$  να ισούται με 1,.

Οι όγκοι αυτοί φυγοκεντρήθηκαν στις 5000-7000 στροφές για 10 min με σκοπό το διαχωρισμό των κυττάρων από το μέσο της προκαλλιέργειας. Τα κύτταρα αυτά επαναιωρήθηκαν με BMMY (επαγωγή με μεθανόλη) σε κωνικές φιάλες όπως πριν και τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα στους 30 °C με ανάδευση 180 rpm για παραγωγή ενζύμου, για 7 ημέρες. Απαραίτητο για την επιβίωση των καλλιεργειών και την παραγωγή των ενζύμων ήταν η καθημερινή τροφοδότηση τους με μεθανόλη ως το τέλος της καλλιέργειας για να διατηρηθεί η συγκέντρωσή της καταναλωμένης

μεθανόλης σε 0,5 % v/v. Για την επίτευξη καλού εξαερισμού στις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν ξανά κωνικές φιάλες γεμισμένες ως το 25 % του όγκου τους με πώματα από βαμβάκι.

Οι εκκρινόμενες ανασυνδρασμένες πρωτεΐνες, συλλέχθηκαν αρχικά με φυγοκέντριση, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση, συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκείμενου της καλλιέργειας.

### 2.2.1.γ. Διήθηση και συμπύκνωση του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας

Μετά το τέλος της καλλιέργειας, όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται σε πάγο για να διατηρηθούν χαμηλές θερμοκρασίες για τα ένζυμα. Φυγοκεντρείται η καλλιέργεια στις 10000 στροφές για να διαχωριστεί το υπερκείμενο της από τα κύτταρα. Το υπερκείμενο της καλλιέργειας περιέχει το παραγόμενο ένζυμο.

Στη συνέχεια, διηθούμε το υπερκείμενο σε απλό διηθητικό χαρτί, και μετά υπό κενό με φίλτρα από 0,8 ως 0,2  $\mu\text{m}$ . Το φιλτραρισμένο πλέον υπερκείμενο συμπυκνώνεται σε συσκευή υπερδιήθησης Amicon με μεμβράνη 30000 kDa για να συγκρατηθούν οι βαρύτερες ουσίες και να καταλήξει το συμπύκνωμα σε όγκο περίπου 15 mL.



**Εικόνα 2.3** Συσκευή Υπερδιήθησης Amicon

### 2.2.1.δ. Εξισορρόπηση υπερκείμενου υγρού καλλιέργειας

Το συμπυκνωμένο και φιλτραρισμένο υπερκείμενο της καλλιέργειας οδηγείται σε διαπίδυση (dialysis) νυκτός με διάλυμα 20 mM Tris – HCl, pH=8, για εξισορρόπηση. Η διαπίδυση (dialysis) είναι μέθοδος διαχωρισμού με βάση το μέγεθος κατά την οποία χρησιμοποιείται μια ημιπερατή μεμβράνη για να διαχωρίσει τον αναλύτη από τις παρεμποδίσεις. Οι μεμβράνες αυτές συνήθως κατασκευάζονται από κυτταρίνη (cellulose) με διάμετρο πόρων 1-5 nm. Το δείγμα τοποθετείται εντός δοχείου το οποίο είναι κατασκευασμένο από τη μεμβράνη αυτή και εμβαπτίζεται σε διάλυμα του οποίου η σύσταση διαφέρει από αυτή του δείγματος. Εάν η συγκέντρωση ενός συστατικού είναι διαφορετική εκατέρωθεν της μεμβράνης η δημιουργούμενη βαθμίδα συγκέντρωσης παρέχει την κινητήρια δύναμη για τη διάχυσή της κατά μήκος της μεμβράνης. Έτσι, ενώ τα μικρά σωματίδια μπορούν να διέλθουν ελεύθερα μέσω της μεμβράνης, τα μεγαλύτερα κατακρατούνται. Η διαπίδυση ως μέθοδος διαχωρισμού χρησιμοποιείται συχνά στον καθαρισμό των πρωτεϊνών, ορμονών και ενζύμων.. Η διεργασία βασίζεται στην οσμωτική πίεση. (Reed, 2007)

### 2.2.1.ε. Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)

Ακολουθώντας τη διαπίδυση, το πρωτεϊνικό διάλυμα διαβιβάζεται σε στήλη Talon για απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μέσω της χρωματογραφίας συγγένειας.

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί μια αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και απομόνωσης πρωτεϊνών. Η αρχή της λειτουργίας της τεχνικής στηρίζεται στη χημική συγγένεια δέσμευσης. Συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια που εμφανίζουν πολλές πρωτεΐνες για ειδικές χημικές ομάδες. Υπάρχει περίπτωση το συμπύκνωμα να διαθέτει και άλλες πρωτεΐνες σε μικρότερη όμως συγκέντρωση. Για αυτό χρησιμοποιείται στήλη συγγένειας ιστιδινών με διάλυμα TALON. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που παράχθηκαν,

είναι γενετικά τροποποιημένες ώστε να διαθέτουν ουρά ιστιδινών στο τέλος για συνδέονται στην στήλη συγγένειας. Οι πρωτεΐνες που πρέπει να απομονωθούν συνδέονται στα μέταλλα - κοβάλτιο (στατική φάση). Η έκλυση της πρωτεΐνης από τη στήλη επιτυγχάνεται με προσθήκη στη στήλη διαλυμάτων αυξημένης συγκέντρωσης ενός χηλικού παράγοντα, του ιμιδαζολίου. Η δομή του ιμιδαζολίου προσομοιάζει αυτή της ιστιδίνης (που διαθέτει ιμιδαζολικό δακτύλιο). Το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται την ιστιδίνη ως προς τη δέσμευση των ιόντων κοβαλτίου και τελικά αντικαθιστά την πρωτεΐνη στο δεσμό υψηλής συγγένειας με τα χηλικά σύμπλοκα των σφαιριδίων της ρητίνης της χρωματογραφικής στήλης, απελευθερώνοντάς την στο έκλουσμα. Το σύστημα διαθέτει ανιχνευτή UV (280 nm) και από το φάσμα απορρόφησης που εμφανίζεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή μπορούμε να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα για την περιεκτικότητα της πρωτεΐνης και την καθαρότητα. Αν οι κορυφές εμφανίζονται κομμένες ή υπάρχουν μικρές κορυφές δίπλα στις μεγάλες, πιθανό να έχει συμβεί προτεόλυση. Ο έλεγχος του βαθμού καθαρότητας και του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών διεξάγεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE).

Μετά τη στήλη συγγένειας, συμπυκνώνεται ξανά το ένζυμο, μπορεί να γίνει προαιρετικά διαπίδυση ξανά και συμπύκνωση. Στη συνέχεια φυλάσσεται στο ψυγείο (cold room), στους 4 °C.

### 2.2.1.στ. Ηλεκτροφόρηση SDS σε πηκτή παλυακρυλαμίδιου

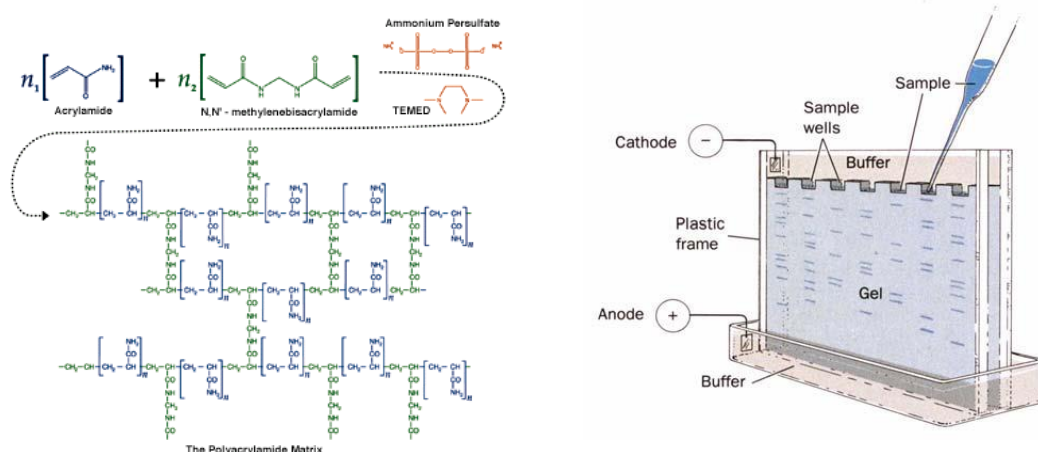
Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης που βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικά πεδία, προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια όπως DNA και RNA. Η ταχύτητα μετακίνησης ( $v$ ) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ( $E$ ), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης ( $z$ ) και το συντελεστή τριβής ( $f$ ).

$$v = Ez / f$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη  $Ez$  που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής που εμφανίζεται μεταξύ

του μορίου που μετακινείται και του μέσου μετακίνησης. Η σταθερά τριβής  $f$  εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πήκτωμα και όχι σε διάλυμα, επειδή το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων κι επιπλέον καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για σωστό διαχωρισμό μορίων. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδης (MBA) (Εικόνα 2.4, αριστερά).



**Εικόνα 2.4 Αριστερά:** Σχηματισμός πηκτώματος ακρυλαμίδης. **Δεξιά:** πήκτωμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης. Διακρίνεται ο τρόπος «φόρτωσης» των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής καθώς και η συνδεσμολογία της συσκευής.

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι τα καταλληλότερα για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Επίσης το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και

MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Έτσι σχηματίζεται ένα πλέγμα, με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται αφενός ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμίδης (%T) και MBA (%C, crosslinker) και, αφετέρου, ανάλογα με τη σχετική συγκέντρωση της MBA ως προς την ακρυλαμίδα. Γενικά πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται κυρίως με βάση διαφορές στο φορτίο (ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης), στη μάζα ή σε διάφορες άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων. Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση.

Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης (Εικόνα 2.4, δεξιά). Η απόσταση μετακίνησης των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων κάτω από αυτές τις συνθήκες σε ομοιογενή πηκτώματα ( $R_f$ ) είναι αντιστρόφως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους. Αυτή η εμπειρική σχέση δεν ακολουθείται σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. σε πρωτεΐνες πλούσιες σε υδατάνθρακες. Το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται πλέον αμελητέο καθώς το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο σε μία ευρεία κλίμακα pH. Έτσι, τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση από την κάθοδο προς την άνοδο (Εικόνα 2.4,



δεξιά). Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδρομής (που κρίνεται από το μέτωπο του διαλύτη) οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα εμφανίζονται με χρώση κυανού του Coomassie, χρώση αργύρου, ή χρώση ειδική για τα σιαλικά οξέα των γλυκοφορινών. Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευτούν με ραδιενεργή σήμανση και εμφάνισή τους σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

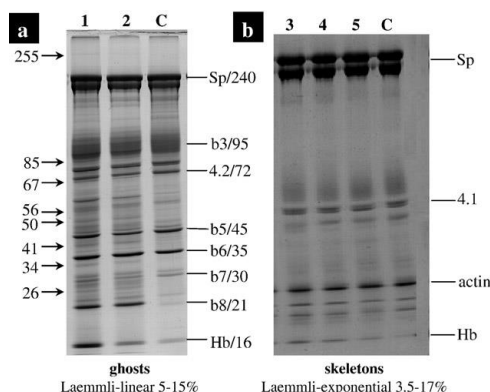
Το «καλούπι» στο οποίο σχηματίζεται το πήκτωμα μπορεί να είναι είτε μικροί κυλινδρικοί σωλήνες είτε ένα sandwich επίπεδων τζαμιών (ηλεκτροφόρηση σε σωληνάκια ή επίπεδη (Εικόνα 2.4). Η ηλεκτροφόρηση σε σωληνάκια χρησιμοποιείται κυρίως για ισοηλεκτρική εστίαση που προηγείται του αποδιατακτικού διαχωρισμού στις δυσδιάστατες ηλεκτροφορήσεις. Το φόρτωμα των δειγμάτων γίνεται είτε στην επιφάνεια των σωλήνων, είτε σε κατάλληλες θέσεις υποδοχής (slots) που δημιουργούνται σε πήκτωμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης με την τοποθέτηση ειδικής «χτένας» (Εικόνα 2.4), όσο το πήκτωμα είναι ακόμα υγρό. Η επίπεδη ηλεκτροφόρηση έχει το πλεονέκτημα ότι όλα τα δείγματα διαχωρίζονται στο ίδιο πήκτωμα, συνεπώς στις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης ακρυλαμίδης, θερμοκρασίας κλπ κι έτσι είναι περισσότερο αξιόπιστη η ποιοτική και ποσοτική σύγκριση των ζωνών μεταξύ τους. Σε περιπτώσεις ανάλυσης σύνθετων πρωτεϊνικών δειγμάτων που χαρακτηρίζονται από μεγάλες διαφορές στα μοριακά τους βάρη, ή σε περιπτώσεις άγνωστων δειγμάτων, επιλέγεται ο διαχωρισμός σε πήκτωμα γραμμικής ή εκθετικής κλίσης συγκέντρωσης ακρυλαμίδης. Τέτοια πηκτώματα παρασκευάζονται με τη βοήθεια του κατασκευαστή κλίσης (gradient maker). Για γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης ακρυλαμίδης τοποθετούνται ίσοι όγκοι πυκνού και αραιού διαλύματος σε δύο ανεξάρτητους χώρους της συσκευής και με τη σταδιακή τους ανάμειξη προκύπτει το πήκτωμα κλίσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής (discontinuous) επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel) το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα πακεταρίσματος. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού του Laemmli, το πήκτωμα πακεταρίσματος δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά μάλλον τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό

διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, σε άμεση επαφή με το πήκτωμα. Διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης (γιατί χρειάζεται πολικότητα) με τη βοήθεια τροφοδοτικού, αντισταθμίζοντας τις αλλαγές που προκαλούνται από το γεγονός ότι η αντίσταση που προβάλλει το υλικό μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση, μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου, κυρίως λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με SDS είναι γρήγορη, ευαίσθητη και έχει μεγάλη διαχωριστική (αναλυτική) ικανότητα. Οι απαιτούμενες ποσότητες των πρωτεϊνών είναι μικρές: περίπου 0,1 μg για χρώση με Coomassie και ακόμη λιγότερο (0,02 μg) όταν χρησιμοποιείται χρώση αργύρου. Πρωτεΐνες που διαφέρουν στη μάζα τους κατά 2 % (π.χ. 40 και 41 kd, διαφορά 10 αμινοξέων) μπορούν εύκολα να διαχωριστούν σε κατάλληλο ηλεκτροφορητικό σύστημα. Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε σύστημα SDS-PAGE χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του MB και της σχετικής ποσότητας (αφθονία) πρωτεϊνικών μορίων σε ένα δείγμα, αλλά και για τον καθορισμό της κατανομής πρωτεϊνών σε διάφορα βιοχημικά εκχυλίσματα ιστών και κυττάρων (Εικόνα 2.5). Είναι επίσης απαραίτητο βήμα για άλλες τεχνικές όπως το ανοσοαποτύπωμα Western και η δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση.

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης που βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικά πεδία, προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια όπως DNA και RNA. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται κυρίως με βάση διαφορές στο φορτίο (ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης), στη μάζα ή σε διάφορες άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων. Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDSPolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση. Χρησιμοποιείται ηλεκτροφόρηση κατά την παραγωγή και μετά το διαχωρισμό για τη διάκριση της ποιότητας της πρωτεΐνης. Με έναν ιχνηθέτη (marker)

γνωστών μοριακών βαρών μπορεί να γίνει μια εκτίμηση για την παραγόμενη πρωτεΐνη, εφόσον γνωρίζουμε το μοριακό βάρος της και κατά πόσο η πρωτεΐνη έχει διασπαστεί σε άλλα κομμάτια ή όχι. (Μαργέτης *et al.*, 2007)



**Εικόνα 2.5** Ανάλυση πρωτεϊνών ολικής ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (**a**) και απομονωμένων κυτταροσκελετών (**b**) από φυσιολογικά άτομα (C, control) και ασθενείς με κληρονομική σφαιρο-κυττάρωση (1-5) σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE κατά Laemmli, ύστερα από χρώση με Coomassie blue. Τα πηκτώματα είναι γραμμικής (α) ή εκθετικής (β) κλίσης συγκέντρωσης ακρυλαμίδης. Είναι σαφείς τόσο οι μεταβολές στην πρωτεϊνική έκφραση (ένταση πρωτεϊνικών ζωνών) όσο και η παρουσία έκτοπων ζωνών στη μεμβράνη και τους σκελετούς των ασθενών (Ανατύπωση από Margetis *et al.*, 2007)

### 2.2.1.ζ Προσδιορισμός συγκέντρωσης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνικών μορίων

Τη συμπύκνωση και την αφαλάτωση των παραγμένων εστερασών ακολουθεί η έμμεση μέτρηση της συγκέντρωσής τους σε mg/ml. Η μέτρηση πραγματοποιείται σε φασματοφωτόμετρο στα 280 nm σε ειδικές UV κυψελίδες χαλαζία, με αραιώση 50 φορές. Στη συγκεκριμένη φωτομέτρηση, λόγω μικρής απορρόφησης των αραιωμένων *StGE 2* και *PaGE1*, δεν έγινε αραιώση για την τελική μέτρηση.

Οι τελικές συγκεντρώσεις των ενζύμων υπολογίστηκαν από την εξίσωση :

$$C = \frac{A_{280} * MB * Αραιώση}{\epsilon}$$

Όπου  $A_{280}$  : η απορρόφηση στα 280 nm

MB : το μοριακό βάρος της κάθε πρωτεΐνης όπως υπολογίστηκε από την  
SDS-PAGE

$\epsilon$  : ο συντελεστής απορρόφησης του κάθε ενζύμου

## 2.2.2 Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης

Περιγράφονται οι φυσικές μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πειραμάτων υδρόλυσης και σύνθεσης στην εργασία, συγκεκριμένα η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography – TLC) και οι ενόργανες υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (high pressure liquid chromatography – HPLC) και φασματοσκοπία μάζας (Mass spectrometry – MS).

### 2.2.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography – TLC) είναι μια χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό μειγμάτων. Εφαρμόζεται σε ένα κομμάτι γυαλιού, πλαστικού ή κομμάτι αλουμινίου που είναι επιχρισμένο με μια λεπτή στιβάδα από απορροφήσιμο υλικό, συνήθως τζελ σίλικας, οξείδιο αλουμινίου ή κυτταρίνη. Αυτό το λεπτό στρώμα που απορροφάει είναι γνωστό ως η στατική φάση.

Αφού το δείγμα έχει τοποθετηθεί στην πλάκα, ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών (γνωστών ως η κινητή φάση) ανέρχεται την πλάκα μέσω τριχοειδών δυνάμεων. Επειδή διαφορετικοί αναλύτες ανέρχονται την TLC πλάκα σε διαφορετικούς ρυθμούς, το αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός.

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της προόδου μιας αντίδρασης, στην αναγνώριση ουσιών παρόντων

σε ένα δοσμένο μείγμα και στην διαπίστωση της καθαρότητας μιας ουσίας. Συγκεκριμένα παραδείγματα περιλαμβάνουν : ανάλυση κεραμικών και λιπαρών οξέων, ανίχνευση εντομοκτόνων ή λιπασμάτων σε φαγητό και νερό, ανάλυση της σύνθεσης της βαφής των ινών στη σήμανση, ανάλυση της ραδιοχημικής καθαρότητας των ραδιοφαρμακευτικών ή αναγνώριση θεραπευτικών φυτών και των περιεχομένων τους.

Για την εμφάνιση των κηλίδων των σακχάρων στις χρωματογραφικές πλάκες χρησιμοποιείται κατάλληλο χρωστικό διάλυμα. Η εμφάνιση χρώματος είναι αποτέλεσμα της αντίδραση της ενεργής ουσίας του χρωστικού διαλύματος και των σακχάρων. Τα υδρογόνα της ενεργής ουσίας N-1-ναφθυλαιυλενο-διχλωροδιαμίνη αντιδρούν με τις υδροξυλομάδες των σακχάρων παράγοντας χρωμοφόρες ομάδες. Η αντίδραση αυτή επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία 100 °C και χρόνο αντίδρασης 10 λεπτά. Τέλος, αναφέρεται ότι η βαφή αυτή είναι υπεύθυνη για το βάψιμο όλων των σακχάρων, αναγωγικών και μη.

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής : αρχικά ο διαλύτης έκλουσης τοποθετείται σε ειδικό παραλληλεπίπεδο δοχείο το οποίο στη συνέχεια πωματίζεται ώστε να ισορροπήσει ο διαλύτης. Συγκεκριμένη ποσότητα από τα δείγματα εγχέονται υπό μορφή κηλίδας (spot) πάνω σε μια λεπτή ευθεία η οποία είναι χαραγμένη πάνω στην πλάκα σίλικα και σε απόσταση 1 cm από το κάτω άκρο της. Στη συνέχεια γίνεται ξήρανση της πλάκας με θερμό αέρα και εισαγωγή της στο δοχείο που περιέχει τον διαλύτη έκλουσης. Η στάθμη του διαλύτη έκλουσης πρέπει να είναι σε χαμηλότερο ύψος σε σχέση με το επίπεδο που βρίσκονται οι κηλίδες έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ομαλή ροή του διαλύτη προς αυτές.

Η πλάκα εξέρχεται από το δοχείο όταν ο διαλύτης έχει προσεγγίσει το άνω άκρο της πλάκας και ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη με θερμό αέρα. Στη συνέχεια, η πλάκα περιλούζεται με ικανή ποσότητα χρωστικού διαλύματος, ώστε να καλυφθεί εξ' ολοκλήρου. Ακολουθεί ξήρανση της πλάκας με θερμό αέρα και εισαγωγή της σε κλίβανο ρυθμισμένο για θερμοκρασία 100 °C για 10 min. Μετά την πάροδο των 10 min εμφανίζονται οι χρωματισμένες κηλίδες των διαχωρισμένων συστατικών του δείγματος πάνω στην επιφάνεια της πλάκας. (Skoog *et al.*, 2005)

### 2.2.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της ενζυμικής υδρόλυσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης στηρίζεται στη διαφορετική μετατόπιση των συστατικών ενός μίγματος κατά μήκος μιας στήλης που περιέχει εξαιρετικά λεπτόκοκκο υλικό (στατική φάση) με τη βοήθεια ενός διαλύτη (κινητή φάση), που ρέει συνεχώς μέσω της στήλης. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική έλξη του κάθε συστατικού για τις δύο φάσεις. Η φύση του πληρωτικού υλικού και του διαλύτη καθορίζουν το μηχανισμό διαχωρισμού βάσει του οποίου προκύπτει μια ποικιλία τεχνικών, όπως χρωματογραφία προσροφήσεως, χρωματογραφία κατανομής ή υγρή-υγρή χρωματογραφία, χρωματογραφία αποκλεισμού, χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής, χρωματογραφία ζεύγους ιόντων ή χρωματογραφία σάπωνος, χρωματογραφία συγγένειας.

Η βάση του ποιοτικού προσδιορισμού στην HPLC είναι ο χρόνος ανάσχεσης που καθορίζεται από την ταχύτητα μετακίνησης της ουσίας μέσω της στήλης. Άλλες χρωματογραφικές παράμετροι για την αξιολόγηση των χρωματογραφικών διαχωρισμών είναι ο συντελεστής χώρησης, ο συντελεστής κατανομής, ο συντελεστής διαχωρισμού, η διαχωριστικότητα, ο αριθμός θεωρητικών δίσκων, ύψος θεωρητικών δίσκων, ο συντελεστής ασυμμετρίας.

Η HPLC πλεονεκτεί έναντι άλλων τεχνικών υγρής χρωματογραφίας (LC) ως προς

- Επαναληψιμότητα
- Αναπαραγωγιμότητα
- Χρόνο ανάλυσης
- Όγκο δείγματος
- Χαμηλά όρια ευαισθησίας

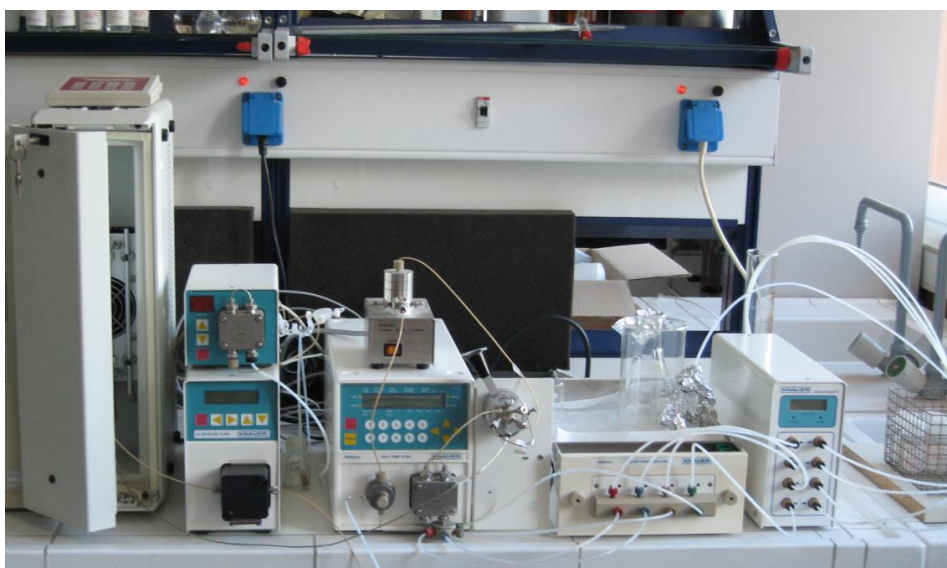
Σήμερα η HPLC παρουσιάζει πολύ μεγάλο εύρος εφαρμογών κυρίως σε τομείς όπως η βιοτεχνολογία, οι επιστήμες ζωής, η βιοχημεία, η φαρμακευτική. Επίσης βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία, σε περιβαλλοντικά δείγματα, καθώς και στην

ανόργανη χημεία, όπως αναλύσεις ιόντων και ειδοταυτοποίηση σε οικολογικά δείγματα. (Παπά, 2004)

#### 2.2.2.2.α. Οργανολογία

Τα κυριότερα τμήματα ενός HPLC συστήματος είναι :

1. Η δεξαμενή διαλύτη/των
2. Το σύστημα άντλησης της κινητής φάσης που αποτελείται από μία ή περισσότερες αντλίες
3. Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη
4. Η χρωματογραφική στήλη
5. Ο ανιχνευτής
6. Το σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων για την απόδοση του χρωματογραφήματος. (Skoog *et al.*, 2005)



**Εικόνα 2.6** Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Από αριστερά προς τα δεξιά διακρίνονται ο θάλαμος θερμοστάτησης που περιέχει τη στήλη, ο ανιχνευτής, η αντλία, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος και η δεξαμενή του διαλύτη

### 2.2.2.2.β. Φασματόμετρα συστοιχίας φωτοδιόδων

Τα φασματόμετρα τύπου συστοιχίας φωτοδιόδων (photodiode array detector, PDA) βασίζονται στην ύπαρξη περίπου 1000 φωτοδιόδων που είναι τοποθετημένες μετά το φράγμα και είναι δυνατή η ταυτόχρονη μέτρηση της απορρόφησης του κάθε συστατικού σε όλα τα μήκη κύματος. Υπάρχει δηλαδή τρισδιάστατη βάση δεδομένων, μήκος κύματος, χρόνος, απορρόφηση (spectrochromatogram). Οι ανιχνευτές PDA κερδίζουν συνεχώς έδαφος λόγω των μεγάλων δυνατοτήτων τους, όσον αφορά στη συλλογή/χειρισμό δεδομένων και στις πολλαπλές πληροφορίες που παρέχουν. Σε τέτοιου τύπου ανιχνευτές είναι δυνατή η λήψη του φάσματος της κάθε κορυφής (peak), η σύγκριση φασμάτων αγνώστων με φάσματα προτύπων, που είναι αποθηκευμένα στη μνήμη του ηλεκτρονικού υπολογιστή, προσφέροντας έτσι πληροφορίες για ταυτοποίηση συστατικών πέρα του χρόνου ανάλυσης. Επίσης προσδιορίζεται η καθαρότητα της κορυφής με διάφορες τεχνικές, (με βάση το δείκτη καθαρότητας και με την αναλογία σημάτων με διάφορα μήκη κύματος). Έτσι είναι δυνατή η μέτρηση του κάθε συστατικού στο μέγιστο της απορρόφησης μαζί με το χρόνο ανάλυσης, το δείκτη καθαρότητας και τα απαιτούμενα φάσματα. Με κατάλληλη ρύθμιση των διαφόρων παραμέτρων, η ευαισθησία τους είναι παρόμοια με εκείνη των απλών φωτόμετρων. Μειονέκτημα των ανιχνευτών αυτού του τύπου είναι το υψηλό κόστος. (Skoog *et al.*, 2005)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων της υδρόλυσης του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος και για το πείραμα σύνθεσης του ίδιου εστέρα σε σύστημα με διαλύτη *tert*-βουτανόλη, χρησιμοποιήθηκε HPLC με ανιχνευτή PDA (διαλύτης ακετονιτρίλιο/νερό 80:20 (v/v), ροή 1 ml/min) και στήλη C18.

### 2.2.2.3 Φασματομετρία μάζας (MS)

Η φασματομετρία μάζας ή φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS) είναι ένα αναλυτικό εργαλείο απαραίτητο για τη διερεύνηση της δομής των οργανικών και ανόργανων ενώσεων. Βασίζεται στην παραγωγή ιόντων κατά τον ιονισμό του μορίου και το διαχωρισμό τους βάσει του λόγου  $m/z$ , όπου  $m$  η μάζα του ιόντος και  $z$  το φορτίο του ιόντος. Μπορεί να προσδιορίσει μοριακά βάρη ουσιών ως



και 4000. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική ανάλυση αερίων, υγρών και υπό ειδικές συνθήκες στερεών, όπως και στην κινητική και στους μηχανισμούς διερεύνησης μονομοριακών αντιδράσεων αποσύνθεσης. Επίσης με την φασματομετρία μάζας μπορούν να μετρηθούν αλλαγές στις κατανομές ισοτόπων στοιχείων, βάσει των οποίων γίνονται γεωχρονολογικές μελέτες.

Αν και η αρχή λειτουργίας του είναι απλή, το φασματόμετρο μάζας (mass spectrometer) είναι ένα πολύπλοκο όργανο με υψηλό κόστος. Λόγω όμως των δυνατοτήτων που έχει στην εύρεση δομής των ενώσεων, της ταχύτητας και της αξιοπιστίας του, η χρήση του στα αναλυτικά εργαστήρια συνεχώς αυξάνεται. (Παππά, 2004).

#### 2.2.2.3.α. Αρχή λειτουργίας

Η μέθοδος βασίζεται στην παραγωγή μοριακών ιόντων ή θραυσμάτων, συνήθως με βομβαρδισμό του δείγματος με δέσμη ηλεκτρονίων και στη συνέχεια με διαχωρισμό των ιόντων με βάση το λόγο της μάζας τους ως προς το φορτίο τους  $m/z$ . Τα όντα αυτά περιέχουν περίσσεια ενέργειας και θραύονται στη συνέχεια σε ιόντα μικρότερου μεγέθους. Όλη αυτή η θραυσματοποίηση δημιουργείται μέσω σχάσης ή αντιδράσεων ανασύνταξης παρέχοντας πληροφορίες για τη δομή του αρχικού μορίου. Μετά την επιτάχυνσή τους από ένα ηλεκτρικό πεδίο, τα ιόντα εισέρχονται στον αναλυτή μαζών, όπου διαχωρίζονται με βάση το λόγο  $m/z$ . Στη συνέχεια, τα ιόντα διαφορετικών μαζών καταγράφονται με κατάλληλο ανιχνευτή. Το σύστημα βρίσκεται σε υψηλό κενό για αποφυγή διαμοριακών συγκρούσεων.

Τα δεδομένα αποθηκεύονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, με τη βοήθεια του οποίου παράγεται το φάσμα μάζας (mass spectrum, ms).

#### 2.2.2.3.β. Οργανολογία

Ένα φασματόμετρο μάζας αποτελείται από τα εξής βασικά τμήματα.

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος
2. Πηγή ιονισμού

3. Επιταχυντή ιόντων
4. Διαχωριστή ιόντων ή αναλυτή μαζών
5. Ανιχνευτή ιόντων

Το όλο σύστημα βρίσκεται υπό υψηλό κενό. Η επεξεργασία των σημάτων του ανιχνευτή με H/Y παράγει το φάσμα μάζας. (Skoog *et al.*, 2005)



Εικόνα 2.7 Διάγραμμα ροής φασματομέτρου μαζών (Wiley *et al.* 2007)

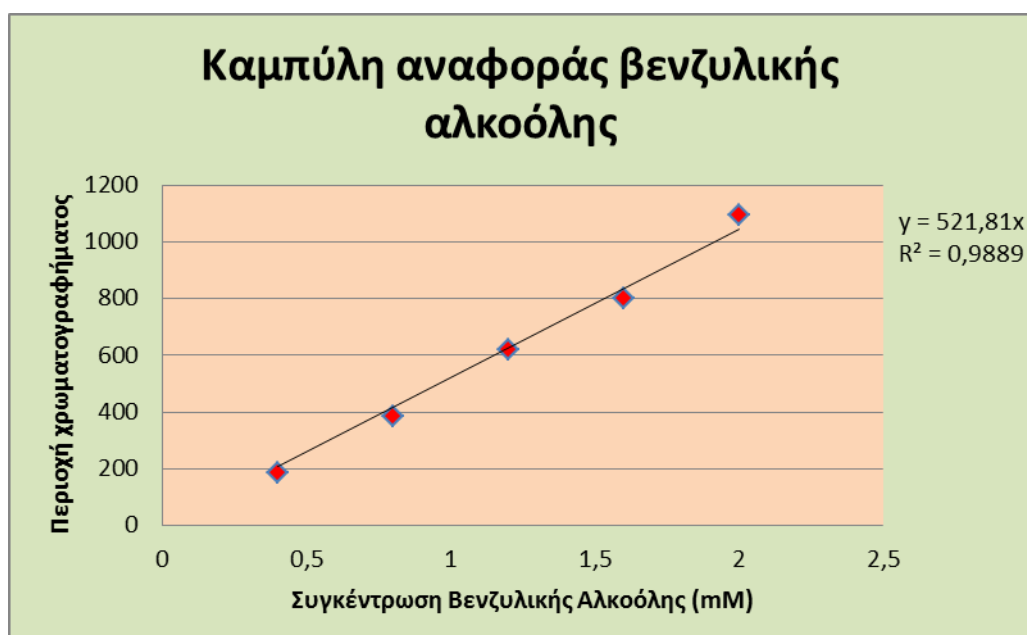
### 2.2.3 Ενζυμική υδρόλυση βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος – Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας και κινητικών σταθερών

Περιγράφεται η ενζυμική υδρόλυση βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος με τη χρήση των ενζύμων *StGE2*, *PaGE1*, *PaGE2* και ο ποσοτικός προσδιορισμός της αντίδρασης με βάση την απελευθέρωση της βενζυλικής αλκοόλης με σκοπό τη μελέτη της ενζυμικής ενεργότητας και τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών των τριών ενζύμων.

Οι ενζυμικές υδρολύσεις πραγματοποιήθηκαν σε φιαλίδια erpendorf των 2 mL με όγκο αντίδρασης 400  $\mu$ L. Το προς υδρόλυση υπόστρωμα ήταν ο βενζυλικός εστέρας του γλυκουρονικού οξέος, όπου 50  $\mu$ L ήταν ένζυμο και 350  $\mu$ L ρυθμιστικό

διάλυμα (buffer) με pH=5 για τα *StGE2* και *PaGE2* και 40μL με 360 μL για το *PaGE1* αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 - 1,2 mM. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 30 min και στη συνέχεια οδηγήθηκαν σε βρασμό για 10 min για την καταστροφή του ενζύμου και τον τερματισμό της αντίδρασης. Όταν τα δείγματα επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήθηκαν και αναλύθηκαν με HPLC (παράγραφος 2.2.2.2).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υδρόλυσης, όπου προϊόντα είναι η βενζυλική αλκοόλη και το γλυκουρονικό οξύ, κατασκευάστηκε η γραμμική καμπύλη αναφοράς της βενζυλικής αλκοόλης. Η ανάλυση έγινε στο ίδιο σύστημα HPLC, όπου έγινε αντιστοιχία της συγκέντρωσης της βενζυλικής αλκοόλης με το εμβαδό των κορυφών της στο φασματογράφημα ενώ χρησιμοποιήθηκαν πέντε συγκεντρώσεις πρότυπου διαλύματος. Με χρήση της μεθόδου των ελάχιστων τετραγώνων έγινε προσαρμογή ευθείας στα παραπάνω σημεία με εξίσωση  $y=521,81x$  και  $R^2=0,9889$ .



Σχήμα 2.1 Καμπύλη αναφοράς βενζυλικής αλκοόλης

Όσον αφορά τις κινητικές σταθερές, το  $K_m$  (σταθερά Michaelis – Menten) αποτελεί μια εγγενή παράμετρο και μεταβάλλεται μόνο με το pH και τη θερμοκρασία. Αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του υποστρώματος που δίνει το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της αντίδρασης. Επομένως μικρές τιμές του  $K_m$  δηλώνουν μεγάλη συγγένεια μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος. Το  $V_{max}$ , η μέγιστη ταχύτητα, είναι μια

συνάρτηση της παραμέτρου  $k_2$  ( $k_{cat}$ ) και της αρχικής συγκέντρωσης του ενζύμου (Shuler L.M. & Kargi F., 2005). Η εξειδίκευση, όπως ορίζεται από το λόγο του ρυθμού κατάλυσης προς τη σταθερά Michaelis – Menten ( $k_{cat}/K_m$ ), αποτελεί την καλύτερη ένδειξη για την προτίμηση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα (Τόπακας Ε., 2004).

## 2.2.4 Πειράματα ενζυμικής σύνθεσης εστέρων του D-γλυκουρονικού οξέος

### 2.2.4.α. Συστήματα μικρογαλακτωμάτων δίχως επιφανειοενεργές ουσίες

Οι αντιδράσεις σύνθεσης προπυλικών και βουτυλικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος πραγματοποιήθηκαν αρχικά σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων με διαλύτες κ-εξάνιο, την αντίστοιχη αλκοόλη/υπόστρωμα και την υδατική φάση με το ένζυμο. Δοκιμάστηκαν πέντε τέτοια συστήματα με διαφορετικές αναλογίες διαλυτών πριν επιλεγθούν τα πιο αποτελεσματικά.

Αριθμός συστήματος	κ-Εξάνιο	Προπανάλη/κ-Βουτανόλη	Υδατική Φάση
α	37,8	57,2	5,0
β	47,2	50,8	2,0
γ	53,4	43,4	3,2
δ	19,8	74,7	5,5
ε	0,0	95,0	5,0

Πίνακας 2.2 Συστήματα μικρογαλακτωμάτων.

Ο όγκος των αντιδράσεων ήταν 1 mL, σε φιαλίδια Eppendorf των 2 mL. Χρησιμοποιήθηκαν 50 mM (9,7 mg) γλυκουρονικού οξέος.

α. Για τη δημιουργία των γαλακτωμάτων, προστέθηκαν το κ-εξάνιο και η αλκοόλη στα φιαλίδια eppendorf

β. Σε ξεχωριστό φιαλίδιο eppendorf αναδεύτηκαν σε Vortex για 20 sec το D-γλυκουρονικό οξύ με το ρυθμιστικό διάλυμα για τις αντιδράσεις χωρίς ένζυμο (control) και με το ένζυμο για τις ενζυμικές αντιδράσεις.

γ. Το υπόστρωμα με το ένζυμο ή με το ρυθμιστικό προστέθηκαν στη συνέχεια στα φιαλίδια eppendorf που περιείχαν τους αρχικούς διαλύτες κ-εξάνιο και αλκοόλη και αναδεύτηκαν εκ νέου.

δ. Τα φιαλίδια τυλίχτηκαν με μεβράνη Parafilm για να αντιμετωπίσουμε την πτητικότητα του κ-εξανίου και τοποθετήθηκαν σε Thermomixer στους 40 °C και ανάδευση 1000 rpm για 1 ημέρα.

Οι επόμενες αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε σφραγιστά γυάλινα φιαλίδια για την αποφυγή της απώλειας των διαλυτών λόγω της εξάτμισης σε υδατόλουτρο στους 40 °C και 50 °C με χρόνο 7 ημέρες χωρίς ωστόσο ανάδευση. Τα συστήματα β και γ χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά στην πορεία.

Οι αντιδράσεις με σύστημα μικρογαλακτωμάτων β και γ μεταφέρθηκαν σε μεγαλύτερη κλίμακα με όγκο και 10 και 20 mL χρησιμοποιώντας σφαιρικές φιάλες με εσφυρισμένο πώμα σε περιστρεφόμενο φούρνο με ανάδευση στις 180 rpm και ¼ αναλογία ενζύμου/ρυθμιστικού στην υδατική φάση καθώς δεν διαθέταμε αρκετή ποσότητα ενζύμου. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με υγρή χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Τέλος, στο σύστημα των μικρογαλακτωμάτων δοκιμάστηκαν αντιδράσεις με υποστρώματα γλυκόζη αλλά και φερουλικό οξύ σε 10 mL όγκο, με την *StGE2* στους 50 °C, 50 mM υπόστρωμα και ¼ αραίωση στο ένζυμο ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για την εκλεκτικότητα του ενζύμου.

#### 2.2.4.β. Συνθέσεις σε διαλύτη τριτοταγή-βουτανόλη (tert-βουτανόλη)

Οι αντιδράσεις ενζυμικής σύνθεσης εστέρων του γλυκουρονικού οξέος διεξήχθησαν επίσης σε διαλύτη t-βουτανόλη με 3,2 % υδατική και ισομοριακές ποσότητες 50 mM γλυκουρονικού οξέος και υποστρώματος (χρησιμοποιήθηκαν αλκοόλες και ασκορβικό οξύ) με τα αντίστοιχα τρία ένζυμα. Ο όγκος των αντιδράσεων ήταν 1 mL φιαλίδια erpendorf των 2 ml.

Οι αλειφατικές αλκοόλες που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα ήταν κ-προπανόλη, κ-βουτανόλη, ισοβουτανόλη, κ-πεντανόλη, κ-εξανόλη, κ-επτανόλη, κ-δεκανόλη, 1,5-πεντανδιόλη. Επίσης, εκτός από τις αλειφατικές αλκοόλες χρησιμοποιήθηκαν και ως υποστρώματα ασκορβικό οξύ και βενζυλική αλκοόλη.

Ο ποιοτικός έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με TLC με διαλύτη χλωροφόρμιο – μεθανόλη - νερό σε αναλογία 65:12:2 (v/v/v) και την ίδια βαφή και συγκεκριμένα για την αντίδραση με τη βενζυλική αλκοόλη χρησιμοποιήθηκε επίσης HPLC (Παράγραφος 2.2.2.2).

#### 2.2.4.γ. Πειράματα ενζυμικής μετεστεροποίησης

Η μετεστεροποίηση δοκιμάστηκε στον βενζυλικό εστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε διαλύτη tert-βουτανόλη με αναλογία με την ενζυμική/υδατική φάση 96,8:3,2 κατ' όγκο και με τα τρία ένζυμα σε 500  $\mu$ L αντίδρασης, 1,5  $\mu$ L ενζύμου, 0,025 mol εστέρα και 23  $\mu$ L βουτανόλης σε thermomixer στους 50 °C χωρίς ανάδευση.

#### 2.2.4.δ. Ποιοτικός έλεγχος αντιδράσεων – TLC

Για γρήγορο ποιοτικό έλεγχο των αντιδράσεων σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με διαλύτη έκλουσης κ-βουτανόλη : αιθανόλη : νερό με αναλογία 50:25:10 (v/v/v) και η εμφάνιση των κηλίδων έγινε με βαφή 0,1895 gr/mL N-1-ναφθυλαιθυλενοδιχλωροδιαμίνη σε 97 % (v/v) μεθανόλη και 3 % (v/v) πυκνό θειικό οξύ. (Bounias M., 1980).

#### 2.2.5 Πειράματα χημικής σύνθεσης μεθυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος

Στην προσπάθεια για σύνθεση εναλλακτικού υποστρώματος για τα ένζυμα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση για την παρασκευή του μεθυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος που περιέχει μια μεθυλομάδα στο ελεύθερο καρβοξύλιο με καταλύτη ακετυλοχλωρίδιο από 1 gr γλυκουρονικού οξέος. Χρησιμοποιήθηκαν 20 mL μεθανόλης, 4 mL ακετυλοχλωριδίου και 1 gr γλυκουρονικού οξέος. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σφαιρική φιάλη υπό ανάδευση με μαγνήτη και διαλύτη μεθανόλη. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα για να εξατμιστεί η μεθανόλη. Το περιεχόμενο της φιάλης καθαρίστηκε με στήλη silica

με κινητή φάση οξικό μεθυλεστέρα και μετά την εξάτμιση τοποθετήθηκε σε προζυγισμένη φιάλη.

### 2.2.6 Σύστημα βενζυλικής αλκοόλης

Αντιδράσεις όγκου 1 mL πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα βενζυλικής αλκοόλης – υδατικής φάσης σε αναλογία 96,8:3,2 με 50 mM γλυκουρονικού οξέος και ένζυμο StGE2 για τη διεξαγωγή πειράματος σύνθεσης βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε σφραγιστά φιαλίδια σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 50 °C.

### 2.2.7 Απομόνωση προϊόντων από πειράματα ενζυμικής σύνθεσης μέσω συστημάτων μικρογαλακτωμάτων δίχως επιφανειοδραστικές ουσίες

#### 2.2.7.α. Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Για την απομόνωση των παραγόμενων εστέρων προς ταυτοποίηση με φασματομετρία μάζας, χρησιμοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Παρόλο που δεν ήταν διαθέσιμες οι εξειδικευμένες πλάκας για παρασκευαστική χρωματογραφία στοιβάδας ώστε να γίνει η απομόνωση, χρησιμοποιήθηκε αντί για αυτών πλάκα TLC αυξημένου πάχους 0,2 μm με επιτυχία. Το διάλυμα της αντίδρασης σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων μεγάλης κλίμακας με βουτανόλη απλώθηκε σε όλη τη γραμμή βάσης και εκλούστηκε για 30 min. Στη συνέχεια κόπηκαν και βάφτηκαν τα άκρα για να διαπιστωθεί σε ποιο ύψος βρίσκονται οι διαχωρισμένες ουσίες. Εντοπίστηκαν δύο ουσίες πέρα από τη ζώνη του D-γλυκουρονικού οξέος και με βάση αυτό ξύστηκαν τα αντίστοιχα σημεία της πλάκας TLC. Οι δύο σκόνες μαζεύτηκαν σε διαφορετικά φιαλίδια και στη συνέχεια εκχυλίστηκαν με αιθανόλη για να οδηγηθούν στην φασματοσκοπία μάζας για ταυτοποίηση.

#### 2.2.7.β. Εκχύλιση σκόνης της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας με οξικό αιθυλεστέρα. Εξάτμιση σε φούρνο κενού

Χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης για την εκχύλιση οξικός αιθυλεστέρας. Πραγματοποιήθηκαν τρεις εκχυλίσεις με ανάδευση και έγινε διήθηση μετά την τρίτη.



**Εικόνα 2.8** Φούρνος Κενού

Αφέθηκαν τα φιαλίδια στον απαγωγό για εξάτμιση και έγινε TLC για να επιβεβαιωθεί η παρουσία προϊόντος στο εκχύλισμα. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φούρνο κενού στους 60 °C για να εξατμιστεί πλήρως ο διαλύτης και να ακολουθήσει φασματοσκοπία μάζας





# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## Κεφάλαιο 3

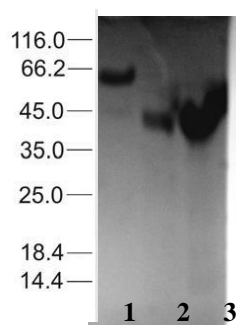
### Παραγωγή, απομόνωση και προσδιορισμός συγκέντρωσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος

#### 3.1 Παραγωγή και απομόνωση εστερασών του γλυκουρονικού οξέος

Οι εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος των μικροοργανισμών *Sporotrichum thermophile* και *Podospora anserina* παράχθηκαν σε καλλιέργειες κυττάρων του μετασηματισμένου στελέχους X33 του μικροοργανισμού *Pichia pastoris*. Οι προκαλλιέργειες επώστηκαν για 20 περίπου ώρες, ενώ τα παραγόμενα κύτταρα επώστηκαν εκ νέου με διαφορετικό υπόστρωμα για 5 μέρες σε θερμοκρασία 30 °C με στόχο την υπερέκφραση του επιθυμητού ενζύμου που εκκρίνεται έξω από το κυτταρικό περιβάλλον. Ύστερα από φιλτράρισμα και υπερδιήθηση, τα ανασυνδυασμένα ένζυμα απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν από το υγρό καλλιέργειας με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.1. Η καθαρότητα των ενζύμων και το μοριακό τους βάρος ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ακολούθησε η συμπύκνωση και αφαλάτωσή τους. Στη συνέχεια η συγκέντρωσή των ενζύμων προσδιορίστηκε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 280 nm.

#### 3.2 Έλεγχος καθαρότητας και προσδιορισμός μοριακού βάρους των παραγόμενων ενζύμων με SDS-PAGE

Το μοριακό βάρος και η καθαρότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών υπολογίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Η ηλεκτροφόρηση των απομονωμένων εστερασών παρουσιάζεται στη φωτογραφία παρακάτω (Εικόνα 3.1).



**Εικόνα 3.1** Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE: Στο gel της εικονιζόμενης ηλεκτροφόρησης, η σειρά των δειγμάτων είναι η εξής : Στήλη 1 : *PaGE1*, στήλη 2 : *StGE2*, στήλη 3 : *PaGE2*.

Οι markers – ιχνηθέτες είναι πρότυπα διαλύματα ορισμένων πρωτεϊνών που αποτελούν δείκτες για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάση του μοριακού τους βάρους. Η *PaGE1* εμφανίζεται στα 63 kDA, ενώ η *StGE2* και *PaGE2* στα 43 kDA, όπως ήταν περίπου τα πειραματικά μοριακά τους βάρη (Παράγραφοι 1.4.3.β., 1.4.5).

### 3.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης των απομονωμένων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, οι τελικές συγκεντρώσεις των ενζύμων σε mg/ml υπολογίστηκαν μέσω της απορρόφησης σε φωτόμετρο UV-vis στα 280 nm με χρήση κυψελίδας χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm, χρησιμοποιώντας το ίδιο διάλυμα με το υπό μέτρηση δείγμα αλλά απουσία πρωτεΐνης για το μηδενισμό του φωτόμετρου. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ενζύμων επιτεύχθηκε με το παρακάτω μαθηματικό μοντέλο που προκύπτει από το νόμο της απορρόφησης των Lambert – Beer :

$$C = \frac{A_{280} * MB * Αραιώση}{\epsilon}$$

Όπου  $A_{280}$  η απορρόφηση στα 280 nm

MB : το μοριακό βάρος της αντίστοιχης πρωτεΐνης όπως προσδιορίστηκε μέσω SDS-PAGE

$\epsilon$  : η μοριακή απορροφητικότητα ή μοριακός συντελεστής απόσβεσης για το κάθε πρωτεϊνικό δείγμα (M-1/cm-1) (molar extinction coefficient), όπως αυτός

### Κεφάλαιο 3 Παραγωγή, Απομόνωση, Προσδ. Συγκέντρωσης

υπολογίζεται με τη χρήση του προγράμματος ProtParam του ExPASy (<http://expasy.org/tools/protparam>) [Wilkins et al., 1999].

Τα παραπάνω δεδομένα, οι μετρήσεις και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

**Πίνακας 3.1** Προσδιορισμένες συγκεντρώσεις ενζυμικών δειγμάτων

Ένζυμο	MB (gr/mol)	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> /cm <sup>-1</sup> )	Αραίωση	Απορρόφηση	Συγκέντρωση (mg/ml)
<i>StGE 2</i>	43000	50795	-	0,821	0,69
<i>PaGE 1</i>	63000	89545	-	1,015	0,71
<i>PaGE 2</i>	43000	52285	1/50	0,4	16,45

## Κεφάλαιο 4.

### Κινητική μελέτη της δράσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος *StGE2*, *PaGE1* και *PaGE2*

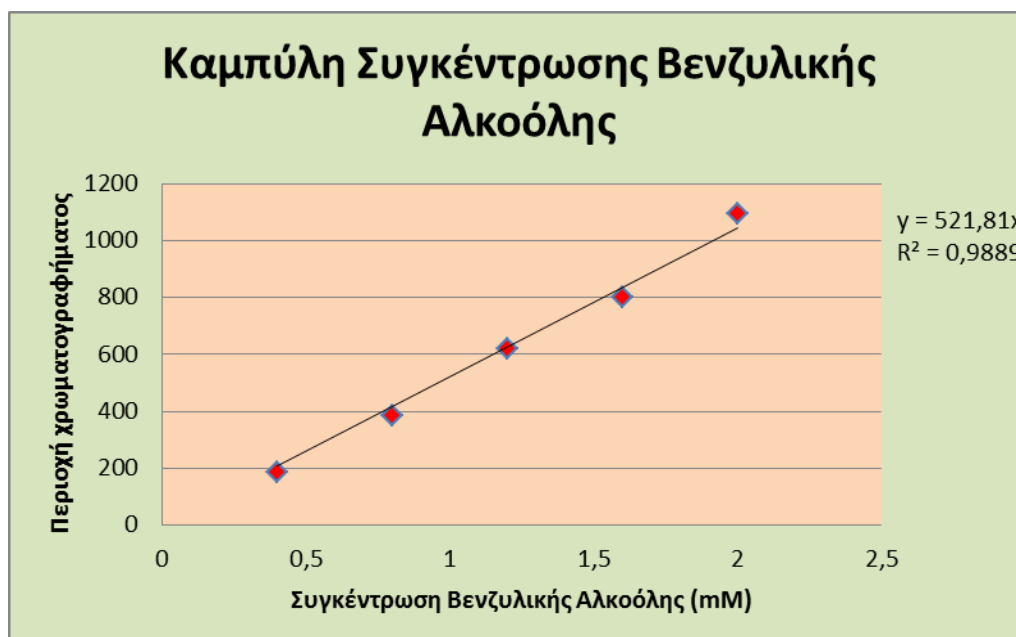
#### 4.1 Μέθοδος μέτρησης της απελευθέρωσης βενζυλικής αλκοόλης κατά την ενζυμική υδρόλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Η υδρόλυση βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος, από τις εστεράσες *StGE2*, *PaGE1*, *PaGE2*, προσδιορίστηκε ποσοτικά με την απελευθέρωση της βενζυλικής αλκοόλης στο διάλυμα της αντίδρασης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αλκοόλης πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε στήλη αντίστροφης φάσης C18, θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Ο διαλύτης επιλέχθηκε με κριτήριο την εύκολη επίτευξη διαχωρισμού μεταξύ εστέρα και αλκοόλης και ολοκλήρωσης των κορυφών. Η καταγραφή και η ολοκλήρωση των κορυφών των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογισμικό Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία). Μετά από δοκιμές σε διάφορες αναλογίες, ο διαχωρισμός κρίθηκε ικανοποιητικός με τη χρήση του διαλύτη ακετονιτρίλιο : νερό 8:2 (v/v) με ροή στη στήλη 1 ml/min.

##### 4.1.α. Καμπύλη συγκέντρωσης της βενζυλικής αλκοόλης

Η μέτρηση της βενζυλικής αλκοόλης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αντίδρασης, πραγματοποιήθηκε με χρήση συστήματος HPLC (Jasco PU 987) με στήλη αντίστροφης φάσης C18 Nucleosil (250 mm x 4.6 mm, Macherey – Nagel, Γερμανία), ροή 1 mL/ min και διαλύτη μίγμα ACN:H<sub>2</sub>O 8:2 (v/v) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η καταγραφή και η ολοκλήρωση των κορυφών των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογισμικό Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία).

Η βενζυλική αλκοόλη μετρήθηκε φωτομετρικά (Jasco UV 975) στα 254 nm με ροή 1 mL/min. Πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν και επομένως πέντε διαφορετικά σημεία για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς. Με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων η καμπύλη αναφοράς της αλκοόλης A είναι  $y = 521.81 \cdot x$  με  $R^2 = 0.9889$ .



Σχήμα 4.1 Καμπύλη συγκέντρωσης βενζυλικής αλκοόλης

#### 4.1.β. Συνθήκες των ενζυμικών υδρολύσεων

Οι ενζυμικές υδρολύσεις πραγματοποιήθηκαν σε φιαλίδια erpendorf των 2 mL με όγκο αντίδρασης 400  $\mu$ L. Το προς υδρόλυση υπόστρωμα ήταν ο βενζυλικός εστέρας του γλυκουρονικού οξέος με 350  $\mu$ L ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) με pH=5 και 50  $\mu$ L ένζυμο, συγκέντρωσης 0,69 mg/mL και 16,44 mg/mL αντίστοιχα για τα *StGE2* και *PaGE2* και 40  $\mu$ L σε 360  $\mu$ L ρυθμιστικό για το *PaGE1* συγκέντρωσης 0,71 mg/mL.. Η θερμοκρασία των αντιδράσεων ήταν 40 °C. Οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 - 1,2 mM. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 30 min και στη συνέχεια οδηγήθηκαν σε βρασμό για 10 min για την απενεργοποίηση του ενζύμου και τον τερματισμό της αντίδρασης. Όταν τα δείγματα επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήθηκαν και αναλύθηκαν

σε HPLC με στήλη C18 και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA-photodiode array detector).

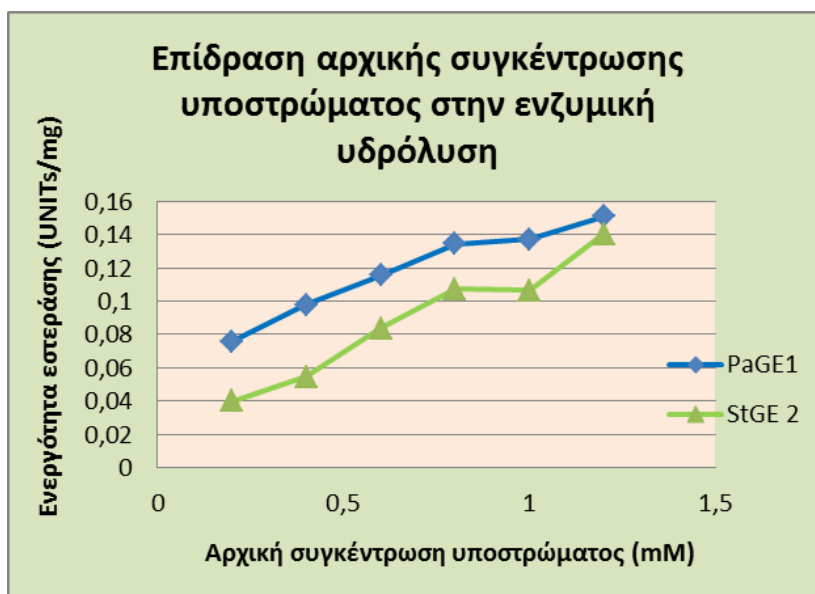
## 4.2 Αποτελέσματα της κινητικής μελέτης των *StGE2*, *PaGE1*, *PaGE2*

Τα αποτελέσματα των υδρολύσεων του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος από τις εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος *StGE2*, *PaGE1*, *PaGE2* παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 4.1. Η προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση Michaelis-Menten έγινε με την εφαρμογή GraphPad Prism 6 της GraphPad Softwares, Inc. Από τις αντιδράσεις των 400 μl διάρκειας 30 min, με pH=5 στους 40 °C προέκυψαν τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης που οδήγησαν στον Πίνακα 4.1 και το Σχήμα 4.2 Η *PaGE2* δεν παρουσίασε ενεργότητα στην υδρόλυση, συνεπώς, δεν πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί για αυτό το ένζυμο.

**Πίνακας 4.1** Κινητικές σταθερές από την υδρόλυση του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος με χρήση των ενζύμων *StGE2* και *PaGE1*

Όνομα Ενζύμου	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (UNITS/mg)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> *min <sup>-1</sup> )
<b>StGE2</b>	5,541	0,835	10,36	2,59
<b>PaGE1</b>	0,336	0,188	4,74	14,1





**Σχήμα 4.2** Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος (mM) στην ενζυμική ενεργότητα ανά mg ενζύμου μετά από 30 min επώασης στους 40 °C.

Η ύπαρξη συγγένειας των ενζύμων ως προς τον βενζυλικό εστέρα του γλυκουρονικού οξέος, εξετάστηκε υπολογίζοντας τις τιμές της σταθεράς  $K_m$ . Η *PaGE1* εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με το βενζυλικό εστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε σχέση με την *StGE2*. Όσον αφορά την εξειδίκευση, από το λόγο του ρυθμού κατάλυσης προς τη σταθερά Michaelis – Menten ( $k_{cat}/K_m$ ) προκύπτει επίσης ότι η *PaGE1* έχει μεγαλύτερη εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Πρέπει να σημειωθεί ωστόσο, ότι η *StGE2* είναι θερμοφιλή και ίσως σε αυτό οφείλεται η υψηλότερη τιμή  $K_m$  στη συγκεκριμένη θερμοκρασία. Τέλος, σε σχέση με τα πειράματα των Berrin *et al.* (Παράγραφος 1.4.5) συγκρίνοντας την ενεργότητα της *PaGE1* στην υδρόλυση του μεθυλο-4-O-μεθυλο-D-γλυκοκυρανοεστέρα, ως προς την ενεργότητα στην υδρόλυση του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος εμφανίζει μικρότερη  $K_m$  και μεγαλύτερη  $k_{cat}/K_m$ , που υπονοεί ότι ως ένζυμο είναι πιο συγγενές και έχει μεγαλύτερη εξειδίκευση στο γλυκουρονικό οξύ, αντί στο μεθυλογλυκουρονικό οξύ. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.2, οι τιμές της *PaGE1* για το μεθυλογλυκουρονικό υπόστρωμα είναι  $K_m=7,6$  mM και  $k_{cat}/K_m=2,4$  mM/min, σε αντίθεση με τις τιμές του για τον βενζυλικό εστέρα του γλυκουρονικού οξέος,  $K_m=0,336$  mM και  $k_{cat}/K_m=14,1$  mM/min.

**Πίνακας 4.2.** Σύγκριση κινητικών παραμέτρων της *PaGE1* με άλλες γλυκουρονικές εστεράσες. Η  $k_{cat}/K_m$  της *PaGE1* σε mM/min είναι 2,4 mM/min

Enzyme	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ U.mg <sup>-1</sup>	$k_{cat}$ s <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ mM.s <sup>-1</sup>	Référence
<i>ScGE</i>	0,31	4,4	3,2	10,3	(Spanikova & Biely, 2006)
<i>Cip2</i>	0,5	5,5	4,5	9	(Li <i>et al.</i> , 2007)
<i>PcGE1</i>	0,83	14,2	11,2	13,5	(Duranova <i>et al.</i> , 2009)
<i>PcGE2</i>	1,82	88,4	62,3	34,2	(Duranova <i>et al.</i> , 2009)
<i>StGE1</i>	1,3	-	0,8	0,6	(Vafiadi <i>et al.</i> , 2009)
<i>StGE2</i>	-	-	-	-	(Topakas <i>et al.</i> , 2010)
<b><i>PaGE1</i></b>	<b>7,6</b>	<b>2,8</b>	<b>0,27</b>	<b>0,04</b>	-

## **Κεφάλαιο 5**

### **Διερεύνηση της συνθετικής ικανότητας των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος σε μη συμβατικά συστήματα**

#### **5.1 Διαδικασία διερεύνησης της συνθετικής ικανότητας των γλυκουρονικών εστερασών σε μη συμβατικά συστήματα**

##### **5.1.α. Δοκιμή διαφορετικών αντιδρώντων συστημάτων**

Για τη διερεύνηση της συνθετικής ικανότητας των γλυκουρονικών εστερασών δοκιμάστηκαν αρχικά πέντε διαφορετικές αναλογίες ενός συστήματος μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειοδραστικές ουσίες (κ-εξάνιο: αλκοόλη/υπόστρωμα : νερό), όπως φαίνονται και στον Πίνακα 5.1. Ο στόχος ήταν το ένζυμο να λειτουργήσει αντίστροφα στο υδρόφοβο περιβάλλον, δηλαδή να οδηγήσει την αντίδραση προς τη σύνθεση αντί για την υδρόλυση. Από πειράματα αυτά, διαπιστώθηκε με ποιοτικό έλεγχο με TLC ότι τα β και γ συστήματα έδιναν πιο έντονα προϊόντα στο TLC και στο τέλος, από σύγκριση των δύο, προτιμήθηκε το γ με το οποίο πραγματοποιήθηκαν τα υπόλοιπα πειράματα σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειοενεργές ουσίες. Σαν υποστρώματα δότες σε αυτό το σύστημα χρησιμοποιήθηκαν η κ-προπανόλη και η κ-βουτανόλη που συμπεριφέρονταν ταυτόχρονα ως μέρος του αντιδρώντος συστήματος και ως υποστρώματα των ενζύμων. Τα πειράματα έγιναν σε όγκο 1 mL και 10 mL. Οι αντιδράσεις αρχικά πραγματοποιήθηκαν σε thermomixer υπό ανάδευση, αλλά λόγω μεγάλης πτητικότητας του κ-εξανίου στα φιαλίδια erpendorf, χρησιμοποιήθηκαν σφραγιστά φιαλίδια και οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε υδατόλουτρο.

## Κεφάλαιο 5 Διερεύνηση Συνθετικής Ικανότητας Εστερασών

Πίνακας 5.1 Συστήματα διαλυτών σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοδραστικές ουσίες

Αριθμός συστήματος	κ-Εξάνιο	Προπανόλη/κ-Βουτανόλη	Υδατική φάση
α	37,8	57,2	5,0
β	47,2	50,8	2,0
γ	53,4	43,4	3,2
δ	19,8	74,7	5,5
ε	0,0	95,0	5,0

Ο βουτυλικός εστέρας του γλυκουρονικού οξέος που συντέθηκε, απομονώθηκε, και ταυτοποιήθηκε σε φασματοσκοπία μάζας. Οι δοκιμές για δημιουργία μεθόδου HPLC δεν πέτυχαν, καθώς δεν έγινε δυνατός ο διαχωρισμός των κορυφών του γλυκουρονικού οξέος και του αντίστοιχου εστέρα του σε καμία αναλογία διαλύτη ή χρωματογραφική στήλη που δοκιμάστηκε.

Επίσης, εκτός από το σύστημα μικρογαλακτωμάτων, δοκιμάστηκαν στη συνέχεια αντιδράσεις σε μη συμβατικό σύστημα με οργανικό διαλύτη τριτοταγή βουτανόλη (t-βουτανόλης) σε αναλογία 96,8 : 3,2 (v/v) με την υδατική φάση και ισομοριακές ποσότητες υποστρωμάτων. Ο λόγος που δοκιμάστηκε διαφορετικό σύστημα αρχικά ήταν διότι οι αντιδράσεις σε μικρογαλακτώματα, παρήγαγαν μια ενδιάμεση ουσία στα TLC που δεν αναγνωρίστηκε στη φασματοσκοπία μάζας, οπότε ακολουθήθηκε διαφορετικό σύστημα αντίδρασης για να διερευνηθεί αν αυτό οφείλονταν στο σύστημα διαλυτών. Τελικά, και στο δεύτερο σύστημα παρουσιάστηκε η ενδιάμεση ουσία, όπου στο τέλος των πειραμάτων, εξήχθηκε το συμπέρασμα ότι η έντασή της επηρεάζεται από το χρόνο αντίδρασής της. Η άγνωστη ουσία ενδεχομένως να είναι ενδιάμεσο προϊόν, πρόσμιξη, ή να οφείλεται στην ύπαρξη νερού, ως ένα ενδεχόμενο προϊόν υδρόλυσης. Τέλος, σε αυτό το σύστημα χρησιμοποιήθηκαν από αλειφατικές αλκοόλες οι κ-προπανόλη, κ-βουτανόλη, ισοβουτανόλη, κ-πεντανόλη, κ-εξανόλη, κ-επτανόλη, κ-δεκανόλη, 1,5-πεντανδιόλη. αλλά και ως εναλλακτικά υπόστρωμα ασκορβικό οξύ και βενζυλική αλκοόλη.

Πραγματοποιήθηκαν ακόμη δοκιμές σύνθεσης σε οργανικό διαλύτη βενζυλική αλκοόλη σε αναλογία 96,8% v/v με την υδατική φάση, όπου ο οργανικός διαλύτης θα

## Κεφάλαιο 5 Διερεύνηση Συνθετικής Ικανότητας Εστερασών

συμπεριφέρονταν ταυτόχρονα ως υπόστρωμα. Δε φάνηκε ωστόσο από τον ποιοτικό έλεγχο με TLC να πραγματοποιήθηκε αντίδραση.

5.1.β. Δοκιμή σύνθεσης με διαφορετικά υποστρώματα. Χημική σύνθεση υποστρώματος - δέκτη για μετεστεροποίηση.

Δοκιμάστηκε σύνθεση με υποστρώματα παραπλήσια ως προς το γλυκουρονικό οξύ, τη γλυκόζη, και το φερουλικό οξύ, ενώ χρησιμοποιήθηκε και το ασκορβικό οξύ. Τέλος, δοκιμάστηκε μετεστεροποίηση, με υπόστρωμα των βενζυλικό εστέρα του γλυκουρονικού οξέος και το μεθυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος που συντέθηκε χημικά για την αντίδραση.

### **5.2 Ενζυμική σύνθεση εστέρων του D-γλυκουρονικού οξέος μέσω συστημάτων μικρογαλακτωμάτων δίχως επιφανειοενεργές ουσίες**

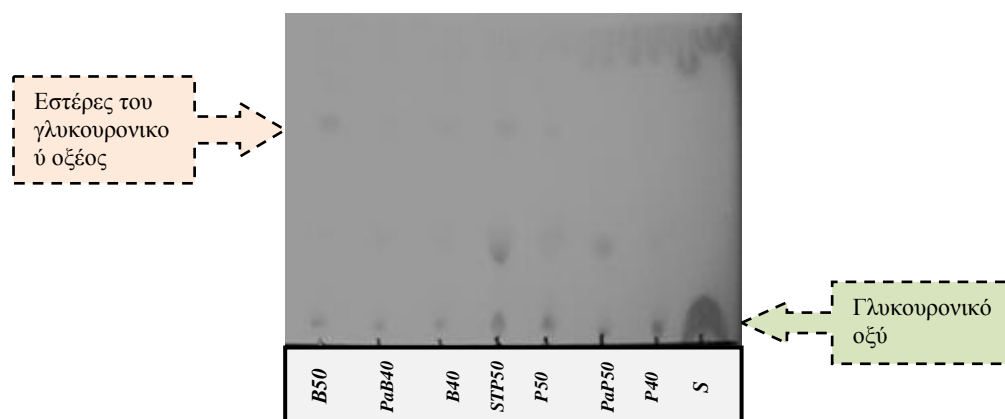
#### 5.2.1 Πειράματα ενζυμικής βουτυλίωσης και προπυλίωσης

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.2.4, για τα πειράματα ενζυμικής σύνθεσης σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων απουσία επιφανειοενεργών ουσιών, χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές συστάσεις διαλυτών από τις οποίες η σύσταση ( $\gamma$ ) που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα, περιείχε κ-εξάνιο : αλειφατική αλκοόλη (υπόστρωμα-/διαλύτης) : υδατική φάση, σε αναλογίες 53,4 : 43,4 : 3,2 (v/v). Οι αλειφατικές αλκοόλες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτά τα πειράματα ως υπόστρωμα του ενζύμου και ταυτόχρονα ως διαλύτες ήταν η κ-βουτανόλη και η κ-προπανόλη. Ο όγκος των αντιδράσεων ήταν 1 ml, σε σφραγιστά φιαλίδια, οι θερμοκρασίες αντίδρασης 40 °C και 50 °C και 50 mM, ενώ ως δεύτερο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το D-γλυκουρονικό οξύ συγκέντρωσης 50 mM και ένζυμα τα *StGE2*, *PaGE1*, *PaGE2*. Ο χρόνος των αντιδράσεων κυμάνθηκε από 1 έως 4 ημέρες.

## Κεφάλαιο 5 Διερεύνηση Συνθετικής Ικανότητας Εστερασών

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των πειραμάτων ενζυμικών βουτυλιώσεων και προπυλιώσεων του D-γλυκουρονικού οξέος έγινε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) (Παράγραφος 2.2.2.1). Ο διαλύτης έκλουσης ήταν κ-βουτανόλη – αιθανόλη - νερό σε αναλογία 50:25:10 (v/v/v) και η βαφή 0,1895 gr/mL N-1-ναφθυλαιθυλενοδιχλωροδιαμίνη σε 97 % v/v μεθανόλη και 3 % v/v πυκνό θειικό οξύ (Παράγραφος 2.1.6).

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αντίδρασης στο σύστημα διαλυτών γ που αναφέρεται παραπάνω σε κλειστά φιαλίδια μετά από μία ημέρα όπως προσδιορίστηκαν μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Η ουσία στη γραμμή βάσης της TLC της Εικόνας 5.1 είναι το γλυκουρονικό οξύ, το υπόστρωμα των αντιδράσεων, όπως βλέπουμε και από το πρότυπό του (50 mM υποστρώματος διαλυμένο σε νερό).



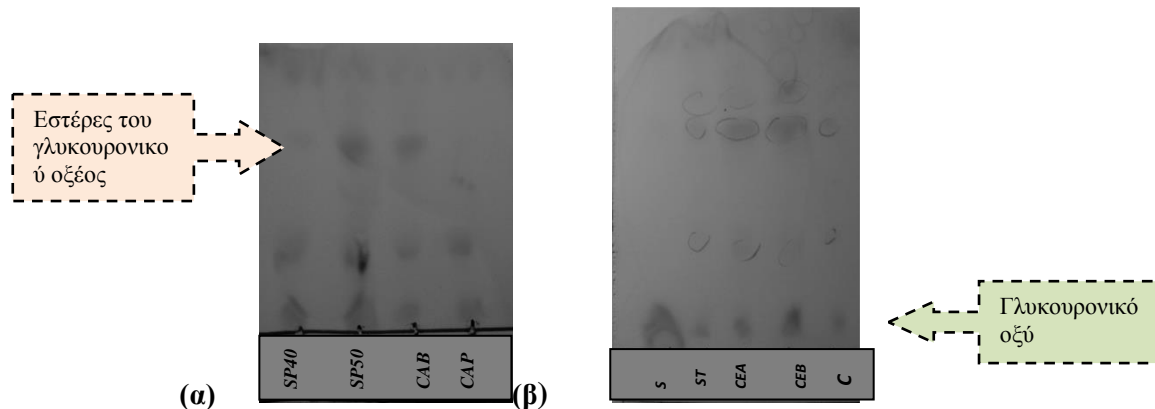
**Εικόνα 5.1** TLC των αντιδράσεων εστεροποίησης σε συστήματα γ με χρόνο επώασης μία ημέρα, όπου εμφανίζονται το τυφλό της βουτυλίωσης στους 50 °C (B50), η ενζυμική βουτυλίωση με *PaGE1* στους 40 °C (PaB40), το τυφλό της βουτυλίωσης στους 40 °C (B40), η ενζυμική προπυλίωση με *StGE2* στους 50 °C (STP50), το τυφλό της προπυλίωσης στους 50 °C (P50), η ενζυμική προπυλίωση με *PaGE1* στους 40 °C (PaP40), το τυφλό της προπυλίωσης στους 40 °C (P40) και το πρότυπο του γλυκουρονικού οξέος (S).

Όσον αφορά τη βουτυλίωση, βλέπουμε στα τυφλά των 40 °C και 50 °C δύο ουσίες πέρα από το γλυκουρονικό οξύ. Ο εστέρας του οξέος όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, είναι και στις δύο περιπτώσεις πιο έντονος από την μεσαία ουσία. Άρα, η αντίδραση γίνεται αυθόρμητα και χωρίς την ύπαρξη του ενζύμου.

## Κεφάλαιο 5 Διερεύνηση Συνθετικής Ικανότητας Εστερασών

Αντίστοιχα αποτελέσματα βλέπουμε για την προπυλίωση. Η αντίδραση στα τυφλά διαλύματα ευνοείται με την αύξηση της θερμοκρασίας (συγκρίνοντας τα P40 και P50, τυφλά προπανόλης στους 40 °C και 50 °C, η ουσία, ο εστέρας είναι πιο έντονος στη δεύτερη περίπτωση). Στους 40 °C, βλέπουμε ότι η αντίδραση με το ένζυμο *PaGE1* οδηγεί στο σχηματισμό της ενδιάμεσης ουσίας σχεδόν αποκλειστικά, εξαφανίζοντας σχεδόν το αντιδρών, γλυκουρονικό οξύ. Παρομοίως, στους 50 °C, η ενζυμική αντίδραση με το *StGE2* παράγει πολύ περισσότερο και από τα δύο προϊόντα σε σύγκριση με το τυφλό στην ίδια θερμοκρασία, με έμφαση πάλι στην ενδιάμεση ουσία.

Στο TLC της Εικόνας 5.2 (α), σε ίδιες συνθήκες και ίδιο χρόνο, μια ημέρα, παρατηρούμε ότι : η προπυλίωση με το *StGE2* στους 50o °C (SP50) ευνοείται περισσότερο από ό,τι στους 40 °C (SP40) και πάλι η ενδιάμεση ουσία είναι πιο έντονη. Αξίζει να σημειωθεί ότι στους 40 °C, το ο εστέρας δε φαίνεται σχεδόν καθόλου. Το ίδιο παρατηρούμε για την ίδια αντίδραση με το *PaGE1* ένζυμο στους 40 °C (CA P). Αντίθετα, η βουτυλίωση στην ίδια θερμοκρασία, οδηγεί και στα δύο προϊόντα (CA B).



**Εικόνα 5.2 (α)** TLC των αντιδράσεων εστεροποίησης σε σύστημα γ με χρόνο επώασης μία ημέρα όπου εμφανίζεται το τυφλό της αντίδρασης προπυλίωσης στους 40 °C (SP40), το τυφλό της προπυλίωσης στους 50 °C (SP50), η ενζυμική βουτυλίωση με *PaGE1* στους 40 °C (CAB), η ενζυμική προπυλίωση με *PaGE1* στην ίδια θερμοκρασία (CAP) και το πρότυπο του γλυκουρονικού οξέος (50 mM) (S). **(β)** Αντιδράσεις εστεροποίησης στο ίδιο σύστημα με χρόνο επώασης τέσσερις ημέρες. Οι ενζυμικές αντιδράσεις στη σειρά με *StGE1* (ST), *PaGE1* (CEA), *PaGE2* (CEB) και το τυφλό (C).

Τέλος, δίνεται το TLC της Εικόνας 5.2 (β) με αντιδράσεις βουτυλίωσης στους 50 °C, με τη διαφορά ότι αυτή τη φορά ο χρόνος ήταν τέσσερις ημέρες. Σε όλες τις

## Κεφάλαιο 5 Διερεύνηση Συνθετικής Ικανότητας Εστερασών

αντιδράσεις έχουμε τρεις ουσίες, το γλυκουρονικό οξύ, την ενδιάμεση ουσία και τον βουτυλικό εστέρα του γλυκουρονικού οξέος. Σε αντίθεση με τις ενζυμικές αντιδράσεις των προηγούμενων δύο TLC, παρατηρείται ότι με το πέρας των 4 ημερών ευνοείται ο βουτυλικός εστέρας και το ενδιάμεσο προϊόν που βλέπαμε στα προηγούμενα TLC διάρκειας αντίδρασης μίας ημέρας είναι σχεδόν εξαφανισμένο. Οι αντιδράσεις στα *PaGE1* και 2, ήταν οι πιο έντονες, ακολουθούσε η *StGE2* και το τυφλό που δεν αντέδρασε σχεδόν καθόλου.

Η ουσία γραμμής βάσης των πλακών είναι το D-γλυκουρονικό οξύ, σύμφωνα με τα πρότυπα διαλύματα του γλυκουρονικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν στο TLC. Από τις άλλες δύο ουσίες που εμφανίστηκαν στις περισσότερες αντιδράσεις, ο βουτυλικός εστέρας του γλυκουρονικού οξέος ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας MS/MS και HPLC με ανιχνευτή PDA (συστοιχία φωτοδιόδων), και η μεσαία ουσία δε χαρακτηρίστηκε, είναι πιθανό να αποτελεί κάποιο παραπροϊόν της αντίδρασης. Με την αύξηση του χρόνου της αντίδρασης παρατηρείται σύνθεση βουτυλικού εστέρα στις αντιδράσεις που διήρκεσαν 3 ή 4 μέρες. Αντίθετα, στις αντιδράσεις της μιας ημέρας, το προϊόν που δεν χαρακτηρίστηκε αλλά δύναται να είναι παραπροϊόν (η ενδιάμεση άγνωστη ουσία) παράχθηκε σε συγκρίσιμο βαθμό με τον εστέρα. Το συγκεκριμένο εν δυνάμει παραπροϊόν εικάζεται ότι μπορεί να αποτελεί μια ενδιάμεση ουσία που μετατρέπεται στη συνέχεια σε εστέρα ή απλά κάποιο παραπροϊόν της αντίδρασης χωρίς να επηρεάζει τη σύνθεση. Η προσπάθεια μελέτης της αντίδρασης με το χρόνο μέσω HPLC δεν ήταν επιτυχημένη, γιατί δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των κορυφών των προϊόντων σε καμία από τις στήλες ή διαλύτες που δοκιμάστηκαν. Περαιτέρω μελέτη των αντιδράσεων σε TLC με βάση το χρόνο θα δώσει ενδείξεις για το αν υπάρχει μια μετατροπή της ουσίας της ενδιάμεσης ουσίας στον εστέρα, ή πρόκειται απλώς για ένα παραπροϊόν.

### 5.2.2.α. Απομόνωση προϊόντος

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση όγκου 10 mL για παραγωγή σε μεγαλύτερη κλίμακα, ικανής ποσότητας ουσίας για απομόνωση σε παρασκευαστική χρωματογραφία στιβάδας (Παράγραφος 2.2.7) και στη συνέχεια ταυτοποίηση των



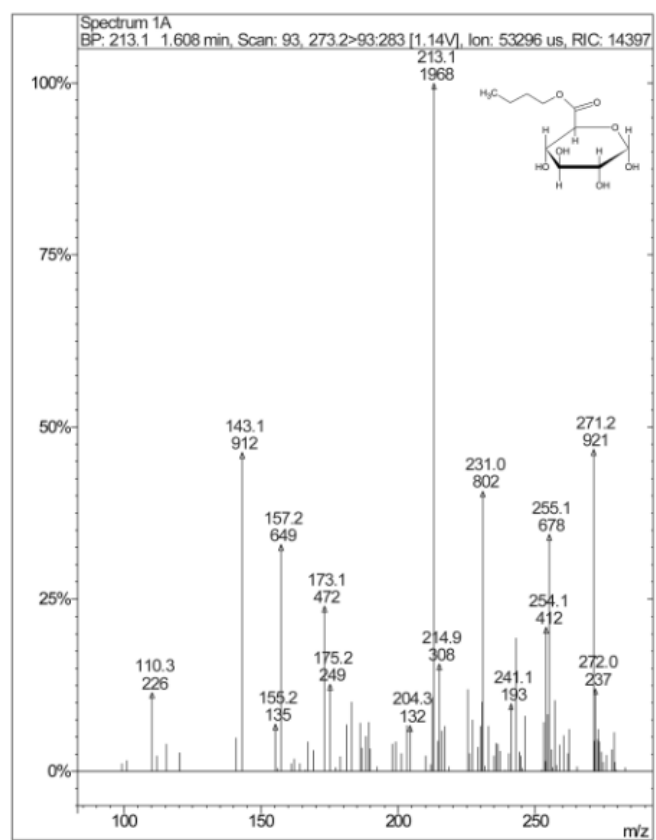
## Κεφάλαιο 5 Διερεύνηση Συνθετικής Ικανότητας Εστερασών

προϊόντων της αντίδρασης με φασματοσκοπία μάζας MS/MS. Το σύστημα αντίδρασης ήταν το γ, 53,4:43,4:3,2 (v/v/v) κ-εξάνιο : βουτανόλη : νερό. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σφαιρική φιάλη με εσφυρισμένο πόμα που επώαστηκε σε φούρνο υπό ανάδευση 180 rpm στους 50 °C για τέσσερις μέρες. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *StGE2*.

Έπειδή δεν ήταν διαθέσιμο υλικό για παρασκευαστική χρωματογραφία στοιβάδας (PLC) ώστε να γίνει ο διαχωρισμός, χρησιμοποιήθηκε πλάκα TLC πάχους 0,2 μm όπως περιγράφεται προηγουμένως στην παράγραφο 3.2.5. Ακολούθησε εκχύλιση για την παραλαβή του εστέρα και τέλος εξάτμιση σε φούρνο κενού ώστε να εξατμιστεί πλήρως ο διαλύτης της εκχύλισης και να είναι έτοιμα τα φιαλίδια για τη φασματοσκοπία μάζας.

### 5.2.2.β. Ταυτοποίηση προϊόντος με φασματομετρία μάζας (MS)

Μετά την απομόνωση των δύο ουσιών που εμφανίστηκαν στις πλάκες TLC, πέρα του γλυκουρονικού οξέος, χρησιμοποιήθηκε MS/MS. Για τη συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκε διαλύτης μεθανόλη υψηλής καθαρότητας. Χρησιμοποιώντας ένα διαδοχικό φασματόμετρο μάζας (MS/MS), οι ενώσεις μπορούν να θρυμματιστούν παράγοντας προβλέψιμες μορφές. Αυτές οι μορφές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση του προσδιορισμού ενώσεων, δίνοντας σημαντική ακρίβεια στη μέτρηση δειγμάτων με χαμηλές συγκεντρώσεις. Στην Εικόνα 5.3 δίνεται το φάσμα της ουσίας της πάνω κηλίδας του TLC ταυτοποιήθηκε ως ο βουτυλικός εστέρας του D-γλυκουρονικού οξέος.



Εικόνα 5.3. Φασματόμετρο μάζας MS/MS

Στο φάσμα MS της Εικόνας 5.3, η δεύτερη σε ύψος κορυφή 271,2 m/z αποδίδεται στο ιόν  $[M+Na]^+$ , δηλαδή στον εστέρα του γλυκουρονικού οξέος. Οι υπόλοιπες μεγάλες κορυφές αντιστοιχούν σε θραύσματα του προέκυψαν από τη θραυσμοτοποίηση με τη δίδυμη MS/MS. Η κορυφή 213,1 m/z που είναι και η μεγαλύτερη αντιστοιχεί στο θραύσμα του γλυκουρονικού οξέος. Το m/z 143,1 αντιστοιχεί σε σχάση στο δακτύλιο του οξέος και η κορυφή 231,0 αντιστοιχεί στη σχάση του βουτυλίου από τον εστέρα.

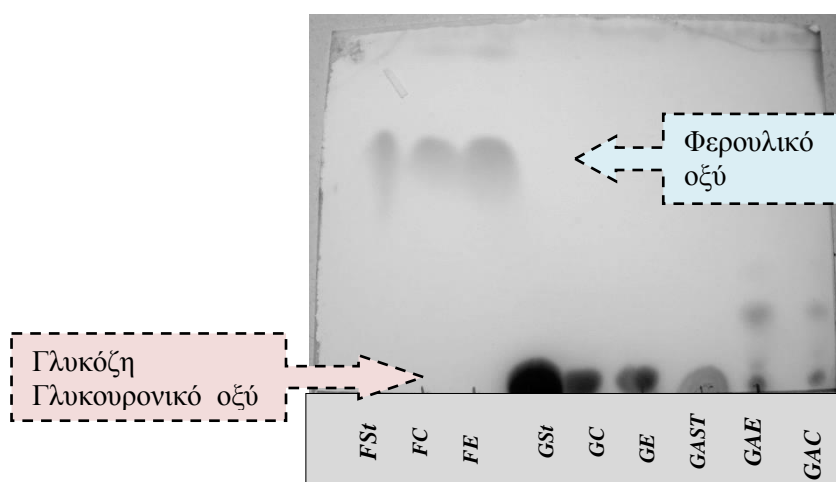
### 5.2.3 Δοκιμή ενζυμικής σύνθεσης εστέρων του γλυκουρονικού οξέος με ένζυμο *StGE2* και ως υποστρώματα γλυκόζη και φερουλικό οξύ

Για μια πρώτη μελέτη της εκλεκτικότητας του ενζύμου *StGE2*, δοκιμάστηκαν αντιδράσεις ενζυμικής σύνθεσης βουτυλικών εστέρων του φερουλικού οξέος και της γλυκόζης, δύο ουσίες παρόμοιες με το γλυκουρονικό οξύ. Το σύστημα αντίδρασης ήταν μικρογαλακτώματα γ (Παράγραφος 2.2.4), σύστασης κ-εξάνιο-βουτανόλη-νερό, 53,4:43,4:3,2 (v/v/v) θερμοκρασία 50 °C, με χρόνο αντίδρασης μία ημέρα σε όγκο 10

## Κεφάλαιο 5 Διερεύνηση Συνθετικής Ικανότητας Εστερασών

mL, με  $\frac{1}{4}$  τη συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήσαμε στα υπόλοιπα πειράματα και περιγράφεται στην Παράγραφο 5.2, 0,69 mg/mL. Η συγκέντρωση των υποστρωμάτων, γλυκόζης, φερουλικού οξέος και D-γλυκουρονικού οξέος ήταν 50 mM.

Στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν με υπόστρωμα του ενζύμου τη γλυκόζη και το φερουλικό οξύ όπως φαίνεται στο TLC της Εικόνας 5.4, παρατηρήθηκε ότι καμία από τις δύο ουσίες δεν αντέδρασε προς σχηματισμό προϊόντος όπως φαίνεται στο παρακάτω TLC, καθώς είχαμε μόνο μια ουσία στην ενζυμική και στην τυφλή αντίδραση και για τα δύο προϊόντα και ταυτίζονταν με τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 50 mM σε νερό της γλυκόζης και του φερουλικού οξέος. Αντίθετα, στην περίπτωση των αντιδράσεων με γλυκουρονικό οξύ και η ενζυμική αντίδραση και το τυφλό παρουσίασαν δύο ουσίες, του γλυκουρονικού οξέος και την ενδιάμεση μεσαία ουσία που σχολιάστηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Παραγωγή εστέρα δε φάνηκε.



**Εικόνα 5.4** Αντιδράσεις εστεροποίησης σε σύστημα διαλυτών  $\gamma$ , με ένζυμο *StGE2*, χρόνο επώασης μία ημέρα. Στο TLC φαίνονται τα πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 50 mM σε νερό, τυφλά βουτυλίωσης στους 50 °C, ενζυμικές αντιδράσεις με *StGE2* για την ίδια θερμοκρασία με υπόστρωμα φερουλικό οξύ αντίστοιχα (FSt), (FC), (FE), με υπόστρωμα γλυκόζη αντίστοιχα (GSt), (GC). (GE) και υπόστρωμα γλυκουρονικό οξύ αντίστοιχα (GAST), (GAC), (GAE).

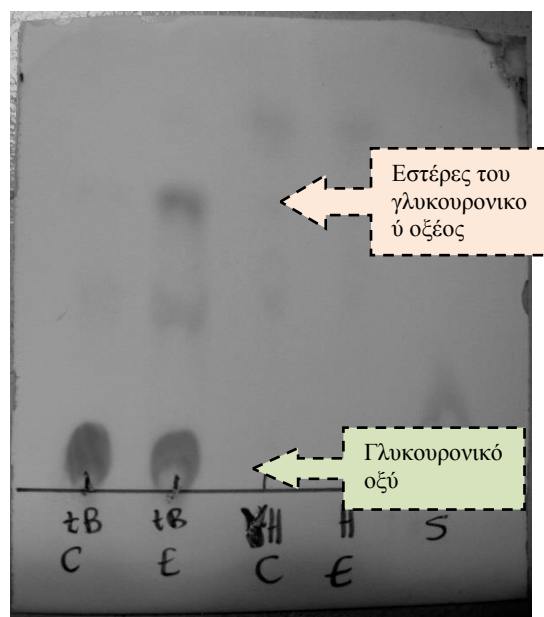
### 5.3 Ενζυμικές αντιδράσεις σε οργανικό διαλύτη τριτοταγή βουτανόλη (tert-βουτανόλη)

#### 5.3.1 Πειράματα ενζυμικής βουτυλίωσης

Σε μια προσπάθεια για να μειωθεί το ενδιάμεσο προϊόν της αντίδρασης, δοκιμάστηκε ένα διαφορετικό σύστημα διαλυτών που περιγράφεται στην εργασία Otto, Bornsheuer *et al*, του 1998 που τη χρησιμοποίησαν επιτυχώς οι Moreau *et al* το 2006 για τη σύνθεση εστέρων του γλυκουρονικού οξέος με λιπάση. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε περιγράφεται αναλυτικά στην Παράγραφο 2.4.4.β.

Έτσι, η παρούσα αντίδραση, με όγκο 10 mL σε φιάλες με εσφυρισμένα πώματα, έγινε με ισομοριακές ποσότητες γλυκουρονικού οξέος και βουτανόλης, συγκέντρωσης 50 mM σε διαλύτη tert-βουτανόλη. Το μίγμα επωάστηκε σε περιστρεφόμενο φούρνο στους 50 °C για 4 ημέρες και με ανάδευση 180 rpm. Στην Εικόνα 5.5 παρουσιάζεται η πλάκα TLC που λήφθηκε στο πέρας της αντίδρασης, 4 ημέρες μετά. Η αναλογία διαλύτη, υδατικής φάσης ήταν 96,8:3,2 (v/v). Στο τυφλό της αντίδρασης, το υπόστρωμα, D-γλυκουρονικό οξύ, εισήχθη αναδεδυμένο με ρυθμιστικό διάλυμα pH=5 και στην ενζυμική αντίδραση, το υπόστρωμα εισήχθη με τον ίδιο τρόπο σε ενζυμικό διάλυμα αναλογίας 1:4 ένζυμο προς ρυθμιστικό, λόγω του μεγέθους της αντίδρασης.

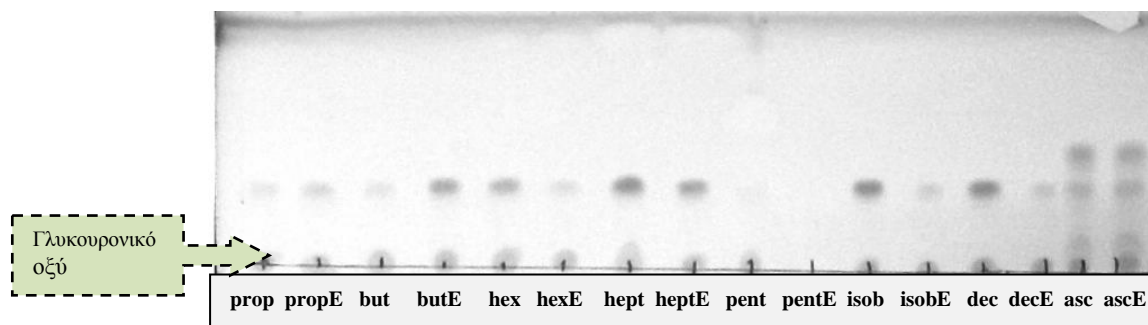
Επιστρέφοντας στην Εικόνα 5.5, στο τυφλό της αντίδρασης φαίνεται το γλυκουρονικό οξύ, η ενδιάμεση ουσία αχνά, ενώ δεν υπάρχει ένδειξη ότι σχηματίστηκε εστέρας. Αντίθετα, στην ενζυμική αντίδραση, πέρα από το γλυκουρονικό οξύ, παρατηρούνται και ο εστέρας του γλυκουρονικού οξέος και η ενδιάμεση ουσία, με πιο έντονο από τις δύο τον εστέρα και λίγο πιο έντονη τη δεύτερη ουσία από ότι στο τυφλό, αλλά πιο αχνή σε σχέση με τον εστέρα.



**Εικόνα 5.5** TLC από τη σύνθεση βουτυλικού εστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος σε σύστημα διαλύτη t-βουτανόλης. Από αριστερά προς δεξιά, τυφλό (tBC), αντίδραση με ένζυμο *StGE2* στους 50 °C (tBE) και πρότυπο γλυκουρονικού οξέος συγκέντρωσης 50 mM σε νερό (S). Η αντίδραση έλαβε χώρα σε φούρνο με περιστρεφόμενη ανάδευση, 180 rpm.

### 5.3.2 Πειράματα ενζυμικής εστεροποίησης του D-γλυκουρονικού οξέος με ποικιλία υποστρωμάτων

Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκε σύνθεση εστέρων του γλυκουρονικού οξέος με διάφορες αλκοόλες καθώς και άλλα υποστρώματα, όπως βενζυλική αλκοόλη και ασκορβικό οξύ. Το σύστημα αντίδρασης ήταν τριτοταγούς βουτανόλης, με αναλογία όπως στην παραπάνω παράγραφο tert-βουτανόλη : υδατική φάση 96,8:3,2 (v/v). Οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων ήταν ισομοριακές, 50 mM. Το γλυκουρονικό οξύ τοποθετήθηκε αναδευόμενο με την ενζυμική ή τη φάση του ρυθμιστικού στην ενζυμική αντίδραση και στο τυφλό αντίστοιχα και οι αντιδράσεις, όγκου 1 mL, έλαβαν χώρα σε φιαλίδια erpendorf στους 50 °C και ο χρόνος αντίδρασης ήταν μία ημέρα και το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτές τις αντιδράσεις ήταν το *StGE2*. Στην Εικόνα 5.6 δίνεται η πλάκα TLC που λήφθηκε μετά το πέρας των αντιδράσεων.



**Εικόνα 5.6** TLC από εστεροποιήσεις όγκου 1mL σε φιαλίδια erpendorf των 2mL στους 50°C του D-γλυκουρονικού οξέος με διάφορα υποστρώματα με διαλύτη tert-βουτανόλη 96,8% κατ' όγκο και ισομοριακές συγκεντρώσεις υποστρωμάτων 50 mM. Ο χρόνο επώασης ήταν μία ημέρα και το ένζυμο στις ενζυμικές αντιδράσεις *StGE2*. Από αριστερά στα δεξιά : τυφλά και ενζυμικές αντιδράσεις αντίστοιχα για προπανόλη (prop propE), κ-βουτανόλη (but - butE), κ-εξανόλη (hex -hexE), κ-επτανόλη (hept - heptE), 1,4-πεντανδιόλη (pent - pentE), ισοβουτανόλη (isob - isobE), κ-δεκανόλη (dec - decE ), ασκορβικό οξύ (asc - ascE).

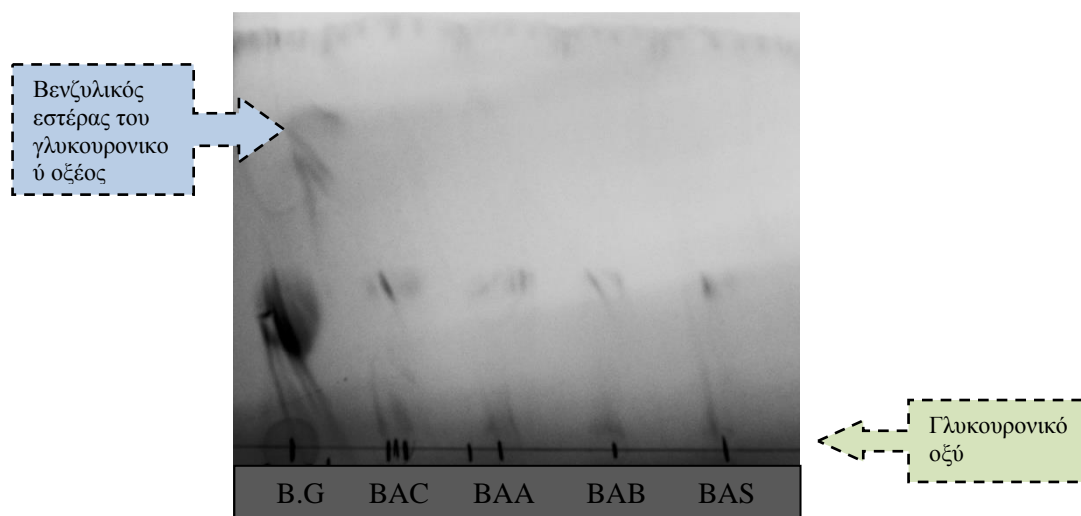
Όσον αφορά τις ενζυμικές αντιδράσεις με υποστρώματα αλκοόλες, όλες παρουσιάζουν δύο μόνο ουσίες στο TLC της Εικόνας 5.6, το D-γλυκουρονικό οξύ και την ενδιάμεση ουσία. Εστέρας δεν εμφανίζεται σε καμία από αυτές τις αντιδράσεις. Άρα, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε μέχρι ενός σημείου, αλλά δεν προχώρησε μέχρι τη δημιουργία του εστέρα, πράγμα που δικαιολογείται αν λάβουμε υπόψη το γεγονός ότι οι αντιδράσεις ήταν μόλις μίας ημέρας, ενώ οι προηγούμενη της Παραγράφου 5.3.1 που ο εστέρας ήταν πιο έντονος από τη μεσαία ουσία, διήρκεσε τέσσερις ημέρες. Επίσης, παρατηρείται μεγαλύτερη ένταση στις μεσαίες ουσίες των ενζυμικών αντιδράσεων, από ό,τι των αντίστοιχων τυφλών για την προπανόλη και τη βουτανόλη. Το αντίστροφο ισχύει για τις υπόλοιπες αλκοόλες, μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας αλλά και της ισοβουτανόλης.

Τέλος, οι αντιδράσεις με ασκορβικό οξύ δε φαίνεται από το TLC να έχουν πραγματοποιηθεί, καθώς οι κηλίδες στο τυφλό και στην ενζυμική αντίδραση είναι ίδιες με αυτές του προτύπου του ασκορβικού οξέος σε συγκέντρωση 50 mM σε νερό που εμφανίστηκαν σε άλλα TLC.

## Κεφάλαιο 5 Διερεύνηση Συνθετικής Ικανότητας Εστερασών

### 5.3.3 Πειράματα ενζυμικής βενζυλίωσης του γλυκουρονικού οξέος σε οργανικό διαλύτη tert-βουτανόλη

Οι παρακάτω αντιδράσεις στόχευσαν στην ενζυμική σύνθεση του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε διαλύτη tert-βουτανόλη σε αναλογία με την υδατική φάση 96,8:3,2 (v/v) και ισομοριακές ποσότητες βενζυλικής αλκοόλης – γλυκουρονικού οξέος συγκέντρωσης 50 mM. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σφραγιστά φιαλίδια 1 ml, με όγκο αντίδρασης 1 ml. Ο χρόνος επώασης ήταν δύο ημέρες, η θερμοκρασία 50 °C σε υδατόλουτρο.



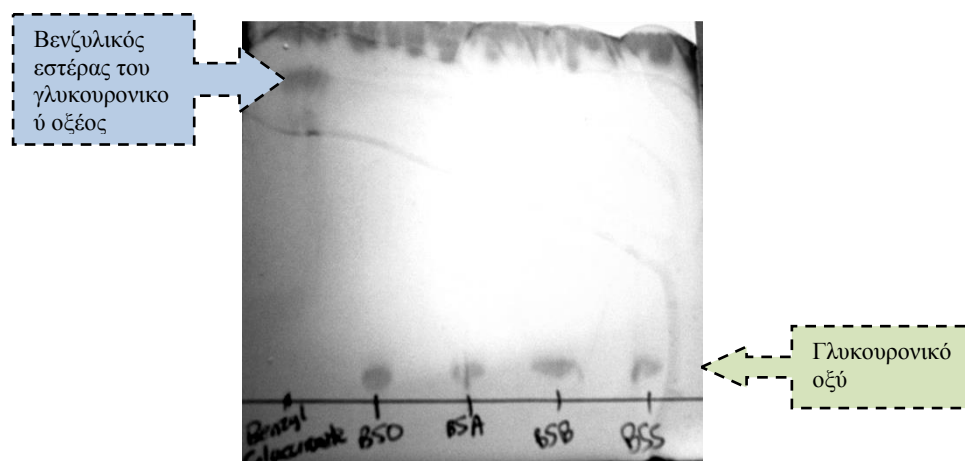
**Εικόνα 5.7** Αντιδράσεις σύνθεσης του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε διαλύτη tert-βουτανόλη (96,8% κατ' όγκο). Ο χρόνος επώασης ήταν δύο ημέρες σε θερμοκρασία 50 °C. Στο TLC φαίνεται το πρότυπο του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος (B.G.), συγκέντρωσης 50 mM σε διαλύτη DMSO, το τυφλό της αντίδρασης (BAC), η ενζυμική με *PaGE1* (BAA), η ενζυμική με *PaGE2* (BAB) και τέλος, η ενζυμική με *StGE2* (BAS).

Από το πρότυπο συγκέντρωσης 50mM σε DMSO του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος, φαίνεται πως το υπόστρωμα έχει υποστεί υδρόλυση, ωστόσο, από την Εικόνα 5.7. Σε αυτό το TLC είναι υδρολυμένο σε βενζυλική αλκοόλη και γλυκουρονικό οξύ. Παρ' όλα αυτά, στα TLC του τυφλού και των ενζυμικών αντιδράσεων φαίνονται δύο ουσίες, μία για το γλυκουρονικό οξύ στη γραμμή βάσης και μία μεσαία κοινή και στο πρότυπο, καμία ωστόσο δεν αντιστοιχεί στον βενζυλικό εστέρα του γλυκουρονικού οξέος.

## 5.4 Πειράματα σύνθεσης εστέρων του γλυκουρονικού οξέος μέσω οργανικού διαλύτη βενζυλική αλκοόλη

Οι αντιδράσεις αυτής της παραγράφου είχαν ως διαλύτη-υπόστρωμα σε άπειρη συγκέντρωση την βενζυλική αλκοόλη σε αναλογία οργανικού διαλύτη-υδατικής φάσης 96,8 : 3,2 (v/v). Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 1 mL, η επώαση έγινε σε σφραγιστά φιαλίδια 1 mL σε υδατόλουτρο στους 50 °C, με υπόστρωμα D-γλυκουρονικό οξύ 50 mM για τη σύνθεση βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος. Χρησιμοποιήθηκαν και οι τρεις διαθέσιμες εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος στις ενζυμικές αντιδράσεις. Ο ποιοτικός έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC και με το πρότυπο του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος με συγκέντρωση 50 mM σε DMSO. Ο χρόνος επώασης ήταν δύο ημέρες.

Το TLC της αντίδρασης δίνεται στην Εικόνα 5.8. Στις ενζυμικές αντιδράσεις και το τυφλό, παρατηρείται μόνο μία ουσία, το D-γλυκουρονικό οξύ που είναι το υπόστρωμα, υποδεικνύοντας ότι η αντίδραση δεν πραγματοποιήθηκε.



**Εικόνα 5.8** Αντίδραση σύνθεσης βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε διαλύτη βενζυλικής αλκοόλης (96,8% κατ' όγκο). Ο χρόνος επώασης ήταν δύο ημέρες και η θερμοκρασία 50 °C. Το TLC φαίνονται το πρότυπο του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος στα 50 mM και διαλύτη DMSO (benzyl glucuronate), το τυφλό της αντίδρασης (BSO) και οι ενζυμικές αντιδράσεις με *PaGE1* (BSA), *PaGE2* (BSB) και *StGE2* (BSS) αντίστοιχα.



### **5.5 Χημική σύνθεση μεθυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος**

Στο στόχο για τη σύνθεση εναλλακτικού υποστρώματος για τη μελέτη της ενζυμικής μετεστεροποίησης, παρασκευάστηκε επιτυχώς μεθυλεστέρας του γλυκουρονικού οξέος που περιέχει μια μεθυλομάδα στο ελεύθερο καρβοξύλιο, με καταλύτη ακετυλοχλωρίδιο από 1 gr γλυκουρονικού οξέος. Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 20 mL μεθανόλης, 4 mL ακετυλοχλωριδίου και 1 gr γλυκουρονικού οξέος. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σφαιρική φιάλη υπό ανάδευση με μαγνήτη και διαλύτη μεθανόλη. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα για να εξατμιστεί η μεθανόλη. Το περιεχόμενο της φιάλης καθαρίστηκε με στήλη silica με κινητή φάση οξικό μεθυλεστέρα και μετά την εξάτμιση τοποθετήθηκε σε προζυγισμένη φιάλη. Η μάζα του απομονωμένου μεθυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος βρέθηκε ίση με 0,9939 gr. Το γλυκουρονικό οξύ ως αντιδρών είχε μάζα 1 gr.

Το γλυκουρονικό οξύ έχει μοριακό βάρος 194 gr/mol και ο μεθυλεστέρας του 208 gr/mol. Με βάση τις παραπάνω μάζες, το γλυκουρονικό οξύ ήταν 0,0052 mol και παράχθηκαν 0,0048 mol από το μεθυλεστέρα. Αφού η αντίδραση ήταν 1-1, μπορούμε να υπολογίσουμε τη μοριακή απόδοση της σύνθεσης ως  $\text{moles}_{\text{προ}}/\text{moles}_{\text{αντ}} = 0,927$ . Η απόδοση της σύνθεσης ήταν 92,7%.

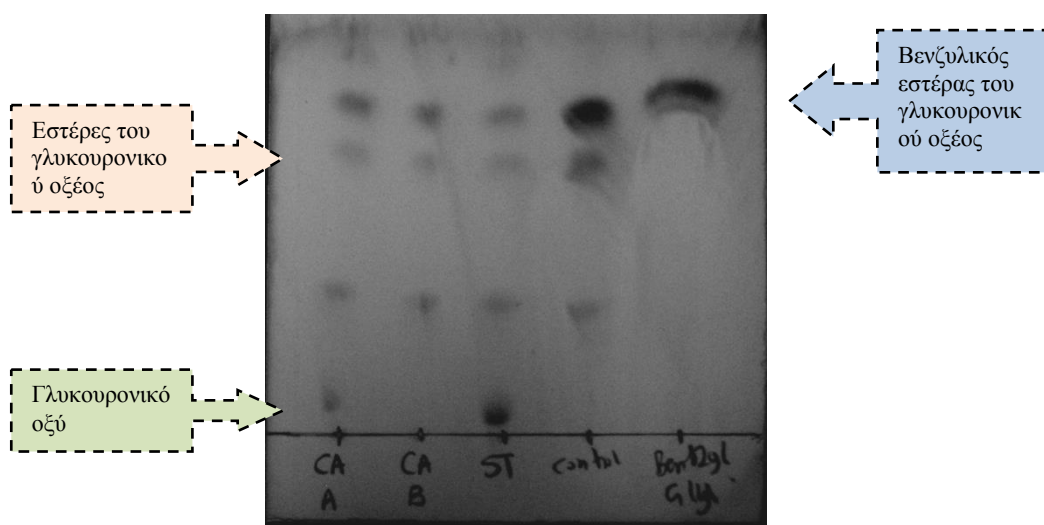
Ο μεθυλεστέρας του γλυκουρονικού οξέος που συντέθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε ακόμη και στα πειράματα συγκρυστάλλωσης του ενζύμου της *StGE2* σε συνεργασία με την ερευνήτρια Δρ. Χρυσίνα Ευαγγελία από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών στη μελέτη για τη διερεύνηση της δράσης του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου.

### **5.6 Πειράματα ενζυμικής μετεστεροποίησης εστέρων του γλυκουρονικού οξέος σε διαλύτη tert-βουτανόλη**

Τα πειράματα μετεστεροποίησης πραγματοποιήθηκαν σε διαλύτη tert-βουτανόλη με υποστρώματα δύο εστέρες του γλυκουρονικού οξέος, τον βενζυλικό

## Κεφάλαιο 5 Διερεύνηση Συνθετικής Ικανότητας Εστερασών

εστέρα και το μεθυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος. Η αναλογία οργανικού διαλύτη προς υδατική φάση ήταν 96,8 : 3,2 (v/v/), όπως και στις προηγούμενες αντιδράσεις και η συγκέντρωση των υποστρωμάτων ισομοριακή, 50 mM και για τους εστέρες και για το γλυκουρονικό οξύ. Οι ενζυμικές αντιδράσεις χρησιμοποίησαν και τα τρία ένζυμα σε 500  $\mu$ L αντίδρασης, 1,5  $\mu$ L ενζύμου, 0,025 mol εστέρα και 23  $\mu$ L βουτανόλης σε thermomixer στους 50 °C χωρίς ανάδευση. Μετά το πέρας της αντίδρασης, οι αντιδράσεις μελετήθηκαν ως προς την εξέλιξή τους με TLC όπως φαίνεται παρακάτω, στην Εικόνα 5.9. Ο χρόνος της αντίδρασης ήταν 2 ημέρες.



**Εικόνα 5.9** TLC από ενζυμική μετεστεροποίηση του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος. Από αριστερά, ενζυμική αντίδραση με *PaGE1*(CAA), με *PaGE2* (CAB), με *StGE2* (ST), το τυφλό (control) και το πρότυπο διάλυμα του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος (Benzyl Gluc.), συγκέντρωσης 50mM σε διαλύτη DMSO. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα με διαλύτη t-βουτανόλη (96,8% κατ' όγκο) στους 50 °C για 2 ημέρες.

Μελετώντας τη φωτογραφία της πλάκας TLC των μετεστεροποιήσεων στην Εικόνα 5.9, εμφανίζονται από τρεις ως τέσσερις ουσίες στη στήλη της κάθε αντίδρασης. Η ουσία που εμφανίζεται πιο ψηλά είναι ο βενζυλικός εστέρας του γλυκουρονικού οξέος, το υπόστρωμα της αντίδρασης, όπως επιβεβαιώνει το πρότυπο σε DMSO συγκέντρωσης 50 mM του εστέρα (Benzyl. Gluc.). Σύνθεση βουτυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος, παρατηρείται σε όλες τις αντιδράσεις επίσης και εμφανίζονται δύο ουσίες ως προϊόντα, η άγνωστη και ο εστέρας, με πιο ισχυρό τον εστέρα στο τυφλό.

## Κεφάλαιο 5 Διερεύνηση Συνθετικής Ικανότητας Εστερασών

Παρατηρούμε ωστόσο, όσον αφορά τις υπόλοιπες ουσίες, ότι στις ενζυμικές αντιδράσεις με ένζυμα το *PaGE1* (CAA) και *StGE2* (ST) πραγματοποιήθηκε πέρα από τη σύνθεση, υδρόλυση του υποστρώματος, με έντονο το D-γλυκουρονικό οξύ. Ο βενζυλικός εστέρας του γλυκουρονικού οξέος, άλλωστε, αποτελείται από βενζυλική αλκοόλη και γλυκουρονικό οξύ. Το γεγονός αυτό, συν με το ότι το τυφλό παρήγαγε περισσότερο εστέρα, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μετεστεροποίηση συμβαίνει πιο γρήγορα χωρίς ένζυμα, και ότι τα ένζυμα στο συγκεκριμένο περιβάλλον, δρουν ανταγωνιστικά στη σύνθεση, οδηγώντας στην πορεία της αντίδρασης στην υδρόλυση. Εξαιρέση είναι το *PaGE2* που όπως φάνηκε και από τις κινητικές μελέτες της υδρόλυσης παραπάνω, υδρολύει πολύ λιγότερο τον βενζυλικό εστέρα του γλυκουρονικού οξέος από ότι τα άλλα δύο ένζυμα.

Στα πειράματα μετεστεροποίησης με υπόστρωμα το μεθυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος στις ίδιες συνθήκες δεν παρατηρήθηκαν προϊόντα σε καμία αντίδραση.

# ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

## Κεφάλαιο 6

### Σύνοψη διπλωματικής εργασίας και συμπεράσματα

#### 6.1 Παραγωγή και απομόνωση εστερασών του γλυκουρονικού οξέος

Η μελέτη της καταλυτικής δράσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος από τον ζυμομύκητα *S.thermophille*, *StGE2* και των *PaGE1* και *PaGE2* από το μύκητα *P.anserina*, προϋποθέτει την παραγωγή των εν λόγω ενζύμων μέσω του μεθυλότροφου συστήματος ετερόλογης έκφρασης *P.pastoris*.

Η παραγωγή των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σε υγρές καλλιέργειες των κυττάρων της ζύμης *P.pastoris* και η απομόνωση έγινε με στάδια διηθήσεων, συμπύκνωσης και χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Τα μοριακά βάρη των ανασυνδυασμένων εστερασών *StGE2*, *PaGE1* και *PaGE2* προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) με βαθμό πολυμερισμού 12.5% στα 43kDA, 63 kDa και 43 kDa πολύ κοντά στα θεωρητικά μοριακά τους βάρη. Η συγκέντρωσή τους στο διάλυμα, η οποία πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μήκος κύματος 280 nm και συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας 50795 89545 και 52285  $M^1/cm^{-1}$  αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στα 0,69 mg/mL, 0,71 mg/mL και 16,45 mg/mL αντίστοιχα.

#### 6.2 Αντιδράσεις ενζυμικής υδρόλυσης του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος

Από τις αντιδράσεις των 400  $\mu$ l διάρκειας 30 min, με pH=5 στους 40 °C προέκυψαν τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης που οδήγησαν στον Πίνακα 6.1. Η *PaGE2* δεν παρουσίασε ενεργότητα στην υδρόλυση, συνεπώς, δεν πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί για αυτό το ένζυμο.

**Πίνακας 6.1** Κινητικές σταθερές από την υδρόλυση του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος με χρήση των ενζύμων *StGE2* και *PaGE1*

Όνομα Ενζύμου	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (UNITS/mg)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> *min <sup>-1</sup> )
<b>StGE2</b>	5,541	0,835	10,36	2,59
<b>PaGE1</b>	0,336	0,188	4,74	14,1

Η ύπαρξη συγγένειας των ενζύμων ως προς τον βενζυλικό εστέρα του γλυκουρονικού οξέος, εξετάστηκε υπολογίζοντας τις τιμές της σταθεράς  $K_m$ . Η *PaGE1* εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με το βενζυλικό εστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε σχέση με την *StGE2*. Όσον αφορά την εξειδίκευση, από το λόγο του ρυθμού κατάλυσης προς τη σταθερά Michaelis – Menten ( $k_{cat}/K_m$ ) προκύπτει επίσης ότι η *PaGE1* έχει μεγαλύτερη εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα.

Τέλος, σε σχέση με τα πειράματα των Berrin *et al.* (Παράγραφος 1.4.5) συγκρίνοντας την ενεργότητα της *PaGE1* στην υδρόλυση του μεθυλο-4-O-μεθυλο-D-γλυκοπυρανοουροεστέρα, ως προς την ενεργότητα στην υδρόλυση του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος, εμφανίζει μικρότερη  $K_m$  και μεγαλύτερη  $k_{cat}/K_m$ , δείχνοντας ότι ως ένζυμο είναι πιο συγγενές και έχει μεγαλύτερη εξειδίκευση στο γλυκουρονικό οξύ, αντί στο μεθυλογλυκουρονικό οξύ.

### 6.3 Πειράματα ενζυμικής σύνθεσης εστέρων του γλυκουρονικού οξέος

#### 6.3.1 Πειράματα ενζυμικής σύνθεσης σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων

Στα πειράματα ενζυμικής σύνθεσης προπυλικών και βουτυλικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος σε σύστημα διαλυτών με μικρογαλακτώματα που περιείχαν κ-εξάνιο : αλειφατική αλκοόλη (υπόστρωμα/διαλύτης) : υδατική φάση, σε αναλογίες 53,4 : 43,4 : 3,2 (v/vv). παρατηρήθηκαν δύο ουσίες ως προϊόντα, η μία αναγνωρίστηκε ως ο βουτυλικός εστέρας του γλυκουρονικού οξέος στη βουτυλίωση με φασματοσκοπία μάζας και η δεύτερη δεν αναγνωρίστηκε. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με TLC.

Συγκρίνοντας το χρόνο των αντιδράσεων, από μία έως τέσσερις ημέρες, παρατηρήθηκε ότι ο παραγόμενος εστέρας ήταν πιο έντονος στο TLC από την ενδιάμεση ουσία στις τέσσερις μέρες, ενώ στην αρχή της αντίδρασης συνέβαινε το αντίστροφο. Συμπερασματικά, με την αύξηση του χρόνου αντίδρασης, τα ενζυμικά διαλύματα όλων των ενζυμικών αντιδράσεων οδηγούν τελικά στη σύνθεση του εστέρα αντί για την ενδιάμεση ουσία. Για αυτό το λόγο, ενδέχεται αυτή η ουσία να αποτελεί ένα ενδιάμεσο προϊόν της αντίδρασης που τελικά μετατρέπεται στον εστέρα του γλυκουρονικού οξέος.

Από αντιδράσεις εστεροποίησης σε σύστημα διαλυτών  $\gamma$  με παρόμοια υποστρώματα ως προς το γλυκουρονικό οξύ, δηλαδή τη γλυκόζη και το φερουλικό οξύ, με ένζυμο StGE2 και χρόνο επώασης μία ημέρα στο TLC δε φάνηκε να συνέβη αντίδραση, γεγονός που δίνει ενδείξεις της εκλεκτικότητας του ενζύμου.

### 6.3.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση Βουτυλικού εστέρα

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση όγκου 10mL για παραγωγή σε μεγαλύτερη κλίμακα, ικανής ποσότητας ουσίας για απομόνωση σε παρασκευαστική χρωματογραφία στιβάδας και στη συνέχεια ταυτοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης με φασματοσκοπία μάζας MS/MS. Από τις δύο ουσίες που απομονώθηκαν, πέραν του γλυκουρονικού οξέος, αυτή που εμφανίστηκε ψηλότερα στις πλάκες TLC των αντιδράσεων στα μικρογαλακτώματα ταυτοποιήθηκε ως ο βουτυλικός εστέρας του D-γλυκουρονικού οξέος.

### 6.3.3 Πειράματα ενζυμικής σύνθεσης σε διαλύτη tert-βουτανόλη

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα εστεροποίησης του γλυκουρονικού οξέος σε διαλύτη tert-βουτανόλη 96,8 : 3,2 (v/v) με την υδατική φάση, με ισομοριακές ποσότητες γλυκουρονικού οξέος και του αντίστοιχου υποστρώματος. Ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν προπανάλη, 1-βουτανόλη, 1-εξανόλη, 1-επτανόλη, 1-δεκανόλη, 1,4-πεντανδιόλη, ισοβουτανόλη. Από τα αποτελέσματα για αντιδράσεις μίας ημέρας με ένζυμο StGE2 παρατηρείται ότι δεν εμφανίζεται καθόλου εστέρας σε καμία από τις αντιδράσεις, αντίθετα εμφανίζεται η ενδιάμεση ουσία που αναφέρθηκε

παραπάνω στο σύστημα των μικρογαλακτωμάτων. Η μη εμφάνιση εστέρα συμφωνεί και με τα προηγούμενα αποτελέσματα αφού και στις δύο περιπτώσεις, οι αντιδράσεις μίας ημέρας ευνοούσαν τις ενδιάμεσες ουσίες. Τέλος, παρατηρείται μεγαλύτερη ένταση στις μεσαίες ουσίες των ενζυμικών αντιδράσεων, από ό,τι των αντίστοιχων τυφλών για την προπανόλη και τη βουτανόλη. Το αντίστροφο ισχύει για τις υπόλοιπες αλκοόλες, μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας αλλά και της ισοβουτανόλης.

Σε αντίδραση τεσσάρων ημερών στις ίδιες συνθήκες με το *StGE2* για καταλύτη και *tert*-βουτανόλη σαν υπόστρωμα, ο εστέρας ήταν πολύ πιο έντονος από ό,τι στην ενδιάμεση ουσία, που υποδεικνύει ότι η αντίδραση ευνοείται με το χρόνο και ότι ενδεχομένως η συγκεκριμένη ουσία είναι κάποιο ενδιάμεσο που μετατρέπεται στο τέλος στον εστέρα του γλυκουρονικού οξέος. Χρειάζονται περαιτέρω πειράματα, με μεγαλύτερους χρόνους αντίδρασης για τις αλκοόλες ανθρακικής αλυσίδας μεγαλύτερης της βουτανόλης για να εξαχθούν συμπεράσματα για την πορεία της αντίδρασης σε αυτά τα υποστρώματα. Τέλος, δοκιμάστηκαν επίσης ως υποστρώματα η βενζυλική αλκοόλη και ασκορβικό οξύ στο ίδιο σύστημα διαλύτη, αλλά δε φάνηκε αντίδραση από τα TLC.

#### 6.3.4 Πειράματα ενζυμικής σύνθεσης βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε διαλύτη βενζυλική αλκοόλη

Οι αντιδράσεις που στόχευσαν στην ενζυμική σύνθεση του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε διαλύτη/υπόστρωμα βενζυλική αλκοόλη σε αναλογία με την υδατική φάση 96,8 : 3,2 (v/v) με γλυκουρονικό οξύ συγκέντρωσης 50 mM με χρόνο επώασης δύο ημέρες, θερμοκρασία 50°C δεν οδήγησαν σε σχηματισμό προϊόντος. Είναι πιθανό η αφθονία βενζυλική αλκοόλης να παρεμποδίζει τη δράση του ενζύμου, κάνοντάς την ακατάλληλη για διαλύτη το συγκεκριμένο πείραμα.

#### 6.3.5 Χημική σύνθεση μεθυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος

Στο στόχο για σύνθεση εναλλακτικού υποστρώματος για μελέτη της ενζυμικής μετεστεροποίησης, παρασκευάστηκε επιτυχώς μεθυλεστέρας του



γλυκουρονικού οξέος που περιέχει μια μεθυλομάδα στο ελεύθερο καρβοξύλιο, με καταλύτη ακετυλοχλωρίδιο από 1 gr γλυκουρονικού οξέος. Η απόδοση της σύνθεσης ήταν 92,7 %. Ο μεθυλεστέρας του γλυκουρονικού οξέος που συντέθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε ακόμη και στα πειράματα συγκρυστάλλωσης του ενζύμου της *StGE2* σε συνεργασία με την ερευνήτρια Δρ. Χρυσίνα Ευαγγελία από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών στη μελέτη για τη διερεύνηση της δράσης του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου.

### 6.3.6 Πειράματα ενζυμικής μετεστεροποίησης του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος

Στα πειράματα μετεστεροποίησης του βενζυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε διαλύτη *tert*-βουτανόλη, σε ίδιες συνθήκες με της παραγράφου 6.3.3, παρατηρήθηκε, τόσο στο τυφλό, όσο και στις ενζυμικές αντιδράσεις, σύνθεση του βουτυλικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος και της ενδιάμεσης ουσίας που αναφέρθηκε στα παραπάνω πειράματα. Ωστόσο, στις ενζυμικές αντιδράσεις παρατηρήθηκε επίσης υδρόλυση του υποστρώματος στις *StGE2* και *PaGE1*, πλην της *PaGE2* που όπως και στη μελέτη της υδρόλυσης παρουσίασε μηδενική ενεργότητα. Στο τυφλό, η κηλίδα του βενζυλικού εστέρα στην πλάκα του TLC ήταν εντονότερη από όλες τις ενζυμικές αντιδράσεις. Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα δύο ένζυμα στο συγκεκριμένο περιβάλλον, δρουν ανταγωνιστικά στη σύνθεση, οδηγώντας στην πορεία της αντίδρασης στην υδρόλυση. Εξαίρεση αποτελεί το *PaGE2* που όπως φάνηκε και από τις κινητικές μελέτες της υδρόλυσης παραπάνω, υδρολύει πολύ λιγότερο τον βενζυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος από ότι τα άλλα δύο ένζυμα. Άρα, από αυτό το πείραμα τα *PaGE1* και *StGE2* δε φαίνονται κατάλληλα ένζυμα για την σύνθεση σε αυτό το περιβάλλον. Με το ελάχιστο νερό που διαθέτει το σύστημα, υδρολύεται ο παραγόμενος εστέρας παρουσία ενζύμων, μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την υδρόλυση, αντί για τη σύνθεση. Ίσως να αποφεύγονταν η υδρόλυση με χρήση μοριακών κοσκίνων που θα περιόριζαν την υδατική φάση και άρα την υδρόλυση ή με χρήση ακινητοποιημένου ενζύμου στον ίδιο διαλύτη.

Στα πειράματα με υπόστρωμα το μεθυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος δεν παρατηρήθηκε σύνθεση κάποιου προϊόντος σε καμία από τις αντιδράσεις στις συγκεκριμένες συνθήκες.

## 6.4 Μελλοντικές Προκλήσεις

Μερικές μελλοντικές προκλήσεις που προκύπτουν από την περάτωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι οι εξής:

- Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης των εστέρων του γλυκουρονικού οξέος. Δειγματοληψία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης για την εύρεση του πέρατος της σύνθεσης, την κινητική μελέτη και τη σύγκριση των ενεργοτήτων των ενζύμων.
- Βελτιστοποίηση αντιδράσεων σύνθεσης, όσων αφορά θερμοκρασία, pH, συγκεντρώσεις υποστρωμάτων, ενζύμου, αναλογίες διαλυτών. Περιορισμός νερού στις αντιδράσεις μετεστεροποίησης για αντιμετώπιση υδρόλυσης με ενδεχόμενη χρήση μοριακών κοσκίνων ή ακινητοποιημένου ενζύμου.
- Δοκιμή κανονικών αλκοολών μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας ως αλκυλοδότες στη σύνθεση εστέρων του γλυκουρονικού οξέος. Οι μεγαλύτερες αλκοόλες θα αυξήσουν την υδροφοβικότητα των παραγόμενων εστέρων, επομένως θα επηρεάσουν τις ιδιότητές τους.
- Σύνθεση εστέρων του γλυκουρονικού οξέος σε μεγαλύτερη κλίμακα για απομόνωση και ταυτοποίηση με NMR και για τη μελέτη των ιδιοτήτων τους ως τασιενεργά.



# Βιβλιογραφία

**Berka RM.** (2011). Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielania terrestris*. *Nature Biotechnol.* 29(10) Q 922-927

**Blecker C., Danthine S., Pétréa M., Lognay G., Moreau B.** (2008) Enzymatically prepared n-alkyl esters of glucuronic acid: The effect of freeze-drying conditions and hydrophobic chain length on thermal behavior. *Journal of Colloid and Interface Science* 321 (2008) 154–158

**Blecker C., Piccicuto S., Lognay G., Deroanne C., Marlier M., Paquot M.** (2002). Enzymatically prepared n-alkyl esters of glucuronic acid: the effect of hydrophobic

**Bounias M.** 1980. N-(1-Naphthyl)ethylenediamine Dihydrochloride as a New Reagent for Nanomole Quantification of Sugars on Thin-Layer Plates by a Mathematical Calibration Process. *Analytical Biochemistry* **106**: 291-295

**Carey FA** (2000). Organic Chemistry 4th ed. *McGraw-Hill*, chapter : "Ch. 25 Carbohydrates", chain length on surface properties. *J. Coll. Interf. Sci.*247, p. 424–428.

**Charavgi M., Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P., Chrysinia E.** (2012). The structure of a novel glucuronoyl esterase from *Myceliophthora thermophila* gives new insights into its role as a potential biocatalyst.

**Coutinho P.M., Henrissat B.** (1999). Carbohydrate-active enzymes : an intergrated database approach. *Recent Advances in carbohydrate Bioengineering* : 3-12

**Ďuranová M., Hirsch J., Kolenová K., Biely P.** (2009). Fungal Glucuronoyl Esterases and Substrate Uronic Acid Recognition. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 2483 – 2487

**Espagne *et al.*** (2008). The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol.* 2008;9(5)

**Faber K. *et al.*** (2011) Biotransformations in organic Chemistry, A textbook, 6<sup>th</sup> edition. *Springer*. p. 3-9

**Hatti-Kaul R., Tornvall T., Gustafsson L., Borjesson P.** (2007). Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective. *TRENDS in Biotechnology Vol.25 No.3*

**Khmelnitsky Y. L., van Hock A., Veeger C. and Visser A.** (1989) Detergentless Microemulsions as Media for Enzymatic Reactions. Spectroscopic and Ultracentrifugation Studies. *J. Phys. Chem.* 1989, 93, 872-878

**Khmelnitsky Y. L., Hilhosrt R. and Veergerd C.** (1988) Detergentless microemulsions as media for enzymatic reactions Cholesterol oxidation catalyzed by cholesterol oxidase. *Eur. J. Biochem.* 176, 265- 271 (1988)

**Kosaric N.** (1992) Biosurfactants in industry. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 64, No. 11, pp. 1731-1737

**Krieger N. *et al.*** (2004). Non-aqueous Biocatalysts in Heterogeneous Solvent Systems. *Food Technol. Biotechnol.* 42 (4) 279-286

**Li X.-L., Špáníková S., de Vries R. P., Biely P.** (2007). Identification of genes encoding microbial glucuronoyl esterases. *FEBS Letters.* **581**: 4029–4035

**Margetis P, Antonelou M, Karababa F, Loutradi A, Margaritis L, Papassideri I.** (2007) Physiologically important secondary modifications of red cell membrane in hereditary spherocytosis-evidence for in vivo oxidation and lipid rafts variations. *Blood Cells Mol Dis* 38:210.

**Mohr A., Raman S.** (2012) Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. *Energy Policy*

**Moreau B., Lognay G., Blecker C., Destain J., Gerbaux P., Chéry F., Rollin P., Paquot M., Marlier M.** (2006). Chromatographic, Spectrometric and NMR Characterization of a New Set of Glucuronic Acid Esters Synthesized by Lipase. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2007 11 (1), 9–17

**Moreau B., Lognay G.C., Blecker C., Brohée J.C., Chéry F., Rollin P., Paquot M. & Marlier M.** (2004) Synthesis of novel D-glucuronic acid fatty esters using *Candida antarctica* lipase in tert-butanol. *Biotechnology Letters* 26: 419–424

**Narodoslawsky M.** (2013). Chemical engineering in a sustainable economy. *CHERD-1289*

**Otto R.T., Bornscheuer U.T., Scheib H., Pleiss J., Syldatk C. and Schmid R.D.** (1998) Lipase-catalyzed esterification of unusual substrates: Synthesis of glucuronic acid and ascorbic acid (vitamin C) esters. *Biotechnology Letters*, Vol 20, No 11, November 1998, pp. 1091–1094

**Otto RT., Scheib H., Bornscheuer UT., Pleiss J., Syldatk C., Schmid RD.** (2000). Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids. *J. Mol. Catal. Part B. Enzym.* 8, p. 201–211.

**Picciuto S., Blecker C., Brohée JC., Mbampara A., Lognay G., Deroanne C., Paquot M., Marlier M.** (2001). Les esters de sucres : voies de synthèse et potentialités d'utilisation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5, p. 209–219.

**Pokkuluri P., Duke N. E. C., Wood S. J., Cotta M. A., Li X.-L., Biely P., Schiffer M.** 2011. Structure of the catalytic domain of glucuronoyl esterase Cip2 from *Hypocrea jecorihna*. *Proteins* 79: 2588–2592.

**Reed R,** (2007). Practical skills in Biomolecular Sciences, 3<sup>rd</sup> edition. *Essex : Pearson Education Limited. P. 69*

**Shahadi, Fereidoon, Naczk, Marian** (2004). Phenolics in food and nutraceuticals. Florida, USA: CRC Press LLC. p. 4.

**Skoog, Holler & Nieman**. Αρχές τις ενόργανης ανάλυσης, έκδοση 5<sup>η</sup>. Εκδόσεις Κωσταράκης 2005. Σελ. 301-310, 844-891.

**Špáníková S., Biely P.** (2006). Glucuronoyl esterase – Novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune*. *FEBS Letters* **258**: 4597 – 4601

**Špáníková S., Poláková M., Joniak D., Hirsch J., Biely P.** (2007). Synthetic esters recognized by glucuronoyl esterase from *Schizophyllum commune*. *Arch Microbiol* **188**: 185 – 189

**Thompson W, Meyer S.** (2013) S. Second generation biofuels and food crops : Co-products or competitors? *Global FoodSecurity*2(2013)89–96

**Topakas E, Kalogeris E, Kekos D, Macris BJ, Christakopoulos P** (2003) Production and partial characterization of feruloyl esterase by *Sporotrichum thermophile* in solid-state fermentation. *Proc Biochem* 38:1539–1543

**Topakas E., Moukouli M., Dimarogona M., Vafiadi C., Christakopoulos P.** (2010). Functional expression of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*: identification of the nucleophilic serine. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 1765 – 1772

**Vafiadi C, Topakas E, Biely P, Christakopoulos P** (2009) Purification, characterization and mass spectrometric sequencing of a thermophile glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*. *FEMS Microbiol Lett* 296:178–184

**Vafiadi C., Topakas E., Biely P., Christakopoulos P.** (2009). Purification, characterization and mass spectrometric sequencing of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*. *FEMS Microbiol Lett* **296**: 178 – 184

**Vafiadi, C. Topakas E., Wong K.Y., Suckling I.D. and Christakopoulos P.** (2004) Mapping the hydrolytic and synthetic selectivity of a type C feruloyl esterase (StFaeC) from *Sporotrichum thermophile* using alkyl ferulates. *Tetrahedron: Asymmetry* 16 (2005) 373–379

**Vermue M. H. and Tramper J.** (1995). Biocatalysis in non-conventional media : Medium Engineering Aspects. *Pure & Appl. Chem. Vol. 67, No2, pp. 345-373*

**Viikari L., Vehmaanpera L., Koivula A.** (2012) Lignocellulosic ethanol: From science to industry. *Biomass and Bioenergy* 46 (2012) 13-24

**Woodley J., Breuer M., Mink D.** (2013). A future perspective on the role of industrial biotechnology for chemicals production, *CHERD-1290*

**Yeoman C.J. et al.** (2010) Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. *Advances in Applied Microbiology, Volume 70*

**Παππά Α. 2004** (2004). Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης. *Εκδόσεις Ε.Μ.Π. Σελ 18-21, 48-80, 166-202.*

**Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε.** (2010). Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοακαυσίμων. *Πανεπιστημιακές εκδόσεις ΕΜΠ Σελ. 18-44*