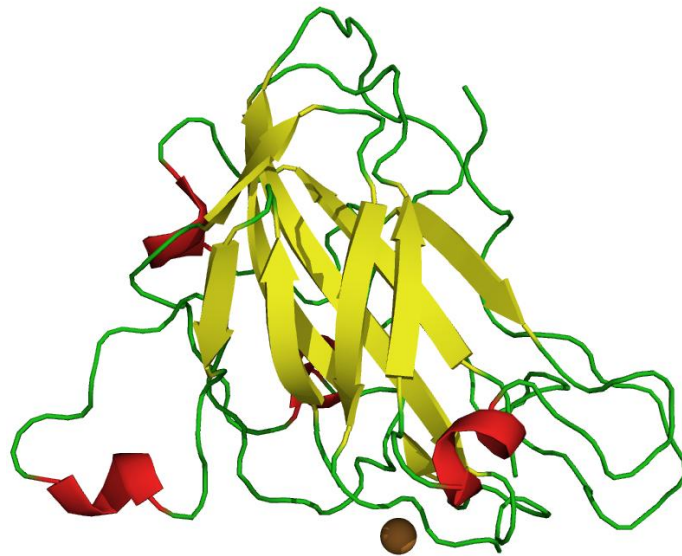




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μελέτη του μηχανισμού κατάλυσης δυο
καινοτόμων LPMOs για την αποικοδόμηση της
λιγνινοκυτταρίνης



Χέρας Βασίλειος

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

ΑΘΗΝΑ 2014

*Στους γονείς μου,
Παναγιώτη και Σταυρούλα*

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Λέκτορα Ε.Μ.Π. Ευάγγελου Τόπακα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο της διπλωματικής μου εργασίας, Λέκτορα του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κ. Ευάγγελο Τόπακα, για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική υποστήριξη, τις πολύτιμες συμβουλές του, καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησής του.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στην Δρα Μαρία Δημαρόγκωνα, η οποία έδειξε μεγάλη υπομονή και επιμονή καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, μεταλαμπαδεύοντάς μου τις γνώσεις και τις εμπειρίες της. Ο επιστημονικός της ζήλος με έκανε πραγματικά να αγαπήσω και να θέλω να ασχοληθώ με την Βιοτεχνολογία και την έρευνα γενικότερα.

Φυσικά θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που μου προσέφεραν.

Σε αυτό το σημείο δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον Dr Jean-Guy Berrin από το ινστιτούτο INRA - Institut National de la Recherche Agronomique · Biotechnologie des Champignons Filamenteux, της Μασσαλίας, για την παροχή του ενζύμου της δεϋδρογονάσης της κελλοβιόζης (CDH) από το μικροοργανισμό *Pycnoporus cinnabarinus*. Επίσης πρέπει να ευχαριστήσω τον Senior Lecturer Robert Nilsson από το Luleå University of Technology της Σουηδίας για την διεξαγωγή των πειραμάτων φασματομετρίας μάζας για την επαλήθευση του φυσικού αμινοτελικού άκρου της AA9 του *Sporotrichum thermophile*.

Τέλος, θα ήθελα να δώσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, για την στήριξή της, όχι μόνο κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου σπουδών μου.

Χέρας Βασίλειος

Αθήνα, Απρίλιος 2014

Περίληψη

Η παραγωγή βιοκαυσίμων, και συγκεκριμένα βιοαιθανόλης, από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα αποτελεί το κέντρο επιστημονικού και βιομηχανικού ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια. Συγκεκριμένα, για να αποκτήσει βιώσιμο χαρακτήρα η παραγωγή 2^{ης} γενιάς βιοαιθανόλης, η προσπάθεια έχει επικεντρωθεί στη μείωση του ενζυμικού φορτίου και, κατά συνέπεια, του κόστους που προκύπτει κατά τη διαδικασία μετατροπής της βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του μηχανισμού κατάλυσης δύο καινοτόμων υδατανθρακικών μονοοξυγενασών ((Lytic) Polysaccharide Monooxygenases, (L)PMOs) από του μύκητες *Sporotrichum thermophile* και *Fusarium oxysporum*. Για το λόγο αυτό κλωνοποιήθηκαν και εισήχθησαν με επιτυχία στο γονιδίωμα της μεθυλότροφης ζύμης – ξενιστή *Pichia pastoris* τα αντίστοιχα γονίδια. Και οι δύο πρωτεΐνες περιείχαν το φυσικό σηματοδοτικό πεπτίδιο, με στόχο κατά την έκφρασή τους να εμφανίζουν τη φυσική αλληλουχία στο αμινοτελικό τους άκρο, η οποία συμμετέχει στο συντονισμό του ιόντος χαλκού, που βρίσκεται στο ενεργό τους κέντρο.

Πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση, κατά την οποία επιχειρήθηκε η κατάταξη των δύο PMO ανάλογα με την ομολογία που δείχνουν, με τις κατηγορίες PMO που υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Έτσι από τα χαρακτηριστικά της αλληλουχίας τους, κατατάχθηκαν στην κατηγορία PMO 3, οι οποίες φαίνεται να οξειδώνουν το γλυκοζιδικό δεσμό στη θέση 1 ή/και στη θέση 4.

Μετά την επιτυχή έκφραση και καθαρισμό των δύο PMO, εξετάστηκε η ικανότητά τους να αποδοθούν μια ποικιλία σακχαρούχων υποστρωμάτων. Η FoCel61 Native N – terminal εμφάνισε ενεργότητα σε πολυσακχαρίτες όπως η β – γλουκάνη κριθαριού και λιχενάνη, αλλά και σε κελλο-ολιγοσακχαρίτες, όπως η κελλοτετραόζη και η κελλοπενταόζη. Η StCel61 Native N – Terminal δεν εμφάνισε αντίστοιχη ενεργότητα στα υποστρώματα αυτά.

Στα υποστρώματα που ανιχνεύθηκε ενεργότητα της FoCel61 Native N –terminal, μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας αναγωγικών παραγόντων όπως του ασκορβικού οξέος, και της δεϋδρογονάσης της κελλοβιόζης (CDH, *Rychnororus cinnabarinus*) στη δράση του ενζύμου. Ωστόσο, κανένας από τους αναγωγικούς παράγοντες δεν ενίσχυσε τη δράση της FoCel61 Native N – terminal.

Δείγματα από τα πειράματα ανίχνευσης ενεργότητας αναλύθηκαν με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας ανιόνταλλαγής (HPAEC) με σκοπό την ανίχνευση και ταυτοποίηση των υδατανθρακικών προϊόντων από την αποδόμηση των

υποστρώματων. Η αδυναμία ανίχνευσης οξειδωμένων προϊόντων στη θέση 1, όπως γλυκονικού οξέος, σε συνδυασμό με την παραγωγή αναγωγικών ολιγοσακχαριτών υποδεικνύει ότι η *FoCel61 Native N – terminal* οξειδώνει τον άνθρακα στη θέση 4 κατά την διάσπαση του γλυκοζιδικού δεσμού.

Κατόπιν εξετάστηκε η συμβολή των ενζύμων αυτών στην αποικοδόμηση λιγνινοκυτταρινούχου υποστρώματος, όπως έλατο το οποίο έχει υποστεί επεξεργασία με ατμό υπό ήπιες όξινες συνθήκες. Από τα πειράματα, διαπιστώθηκε η συνεργιστική δράση του συστήματος *StCel61 Native N – Terminal* – κλασικών κυτταρινάσων. Η μελέτη επεκτάθηκε και στην *StCel61*, η οποία περιέχει κάποια επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό της άκρο, και η οποία εξετάστηκε σε παλαιότερη έρευνα (Δημαρόγκωνα, 2012). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα δυο ένζυμα εμφανίζουν εφάμιλλη συνεργιστική δράση όταν προστεθούν σε μίγμα με κλασσικές κυτταρινάσες, αποδεικνύοντας πως η παρουσία αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο των PMO δεν επηρεάζει την ενεργότητά τους. Η *FoCel61 Native N – terminal* δεν κατάφερε να ενισχύσει την αποδόμηση του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού από τις κυτταρινάσες.

Τέλος επιχειρήθηκε η αποδόμηση προκατεργασμένου άχυρου σίτου (PWS), από την *StCel61 Native N – terminal* σε πιλοτικό αντιδραστήρα ρευστοποίησης, όπως αυτή εκκρίθηκε στο εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας (crude). Ωστόσο, δεν μπόρεσε να ανιχνευθεί καμιά επίδραση της PMO στο ιξώδες του PWS, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της αποδόμησης του υποστρώματος.

Abstract

Lately, the production of biofuels, and especially bioethanol, from lignocellulosic biomass has been of high scientific and industrial interest. Specifically, in order for the production of second generation bioethanol to become sustainable, the effort is focused on the reduction of enzymatic load and, as a result, the cost derived from the conversion of biomass into fermentable sugars.

The main purpose of this thesis was to study the catalytic mechanism of two novel (lytic) polysaccharide monooxygenases ((L)PMOs) from *Sporotrichum thermophile* and *Fusarium oxysporum*. LPMOs are recently discovered biocatalysts which cleave oxidatively polysaccharide substrates. StCel61 and FoCel61 were cloned and heterologously expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Both enzymes were expressed with their natural signal peptide, in order to be secreted with the naturally occurring N – terminal amino acid, which is involved in active site copper coordination.

Bioinformatic analysis was carried out, so as to classify the examined enzymes into one of the three PMO categories described in recent literature (Vu et al). Multiple sequence alignment showed that these proteins share the highest homology with PMO3 enzymes, which hydroxylate position C1 and/or C4 of the glucose ring.

After the successful expression and purification of both PMOs, their ability to oxidatively cleave a variety of polysaccharide substrates was examined. FoCel61 Native N – terminal showed activity on polysaccharide substrates, such as barley β – glucan and lichenan, but also on cellooligosaccharides, such as cellotetraose and cellopentaose. No activity on these substrates was detected in the case of StCel61 Native N – terminal. The boosting effect of reducing agents such as ascorbic acid and cellobiose dehydrogenase (CDH from *Pycnoporus cinnabarinus*) on FoCel61 Native N – terminal was also investigated. However, no significant impact on the activity of the examined enzyme was detected.

Samples from enzyme activity experiments were analyzed with anion exchange chromatography (HPAEC), in order to detect and identify the carbohydrate products of substrate degradation. The failure to detect gluconic acid in the hydrolyzed products, in combination with the release of oligosaccharides with free reducing ends, indicates that FoCel61 Native N – terminal is specific for C4 oxidation.

Subsequently, the contribution of these enzymes into the degradation of lignocellulosic material, such as steam pretreated under weak acidic conditions spruce (PS), was examined. The experimental results confirmed the synergistic effect

of *StCel61* native N – terminal on common cellulases. This experiment was also performed for *StCel61*, the same LPMO expressed in a previous work using a different cloning strategy that resulted in a recombinant enzyme with a small number of additional residues at the N – terminal (Dimarogona, 2012). The detected synergism effect was similar, indicating that the presence of additional amino – acids in the PMO N – terminal does not severely affect enzyme function. As far as *FoCel61* Native N – terminal is concerned, it could not boost the degradation of lignocellulosic substrate by common cellulases.

Finally, biomass decomposition experiments were carried out on pretreated wheat straw (PWS) in the presence of crude *StCel61* Native N – terminal, in a pilot liquefaction reactor. No effect of LPMO activity could be detected on PWS viscosity, which was measured as an indicator of substrate depolymerization.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	i
Abstract.....	iii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	v
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. Βιοκαύσιμα	2
1.1. 1 ^{ης} Γενιάς Βιοκαύσιμα	3
1.1.1. Βιοντήζελ 1 ^{ης} γενιάς: Εστεροποίηση – Μετεστεροποίηση	4
1.1.2. 1 ^{ης} γενιάς βιοαιθανόλη: Προεπεξεργασία – Ζύμωση	5
1.1.3. 1 ^{ης} γενιάς Βιοαέριο: Αναερόβια Χώνευση	6
1.2. 2 ^{ης} γενιάς βιοκαύσιμα	8
1.2.1. Διεργασίες μετατροπής λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.....	10
1.2.1.1. Θερμοχημική Μετατροπή – (Παραγωγή Fisher Tropsch βιοντήζελ)	10
1.2.1.2. Βιοχημική Μετατροπή – Παραγωγή Βιοαιθανόλης.....	14
1.3. 3 ^{ης} Γενιάς Βιοκαύσιμα	18
1.3.1. Παραγωγή 3 ^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων	18
1.3.1.1. Παραγωγή βιοντήζελ από μικροάλη	21
1.3.1.2. Παραγωγή βιοαιθανόλης από μικροάλη	21
1.3.2. Πλεονεκτήματα των μικροαλγών	21
1.3.3. Προβλήματα 3 γενιάς βιοκαυσίμων	22
2. Πηγή 2 ^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων: Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα	26
2.1. Φυτική λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα	26
2.1.1. Λιγνίνη	27
2.1.2. Ημικυτταρίνη	28
2.1.3. Κυτταρίνη.....	29
2.2. Ενζυματική αποικοδόμηση της κυτταρίνης	31
2.3 Ενζυματική αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης	34
3. Καινοτόμες δράσεις αποικοδόμησης λιγνινοκυτταρινούχων υλικών	36
3.1. Ιστορική ανασκόπηση των οικογενειών GH61 και CBM33	36
3.1.1. Η οικογένεια GH61	37

3.1.2.	Η οικογένεια CBM33	40
3.2.	Δομή των AA9 και AA10	44
3.2.1.	Η Δομή του ενεργού κέντρου μιας AA9	45
3.2.2.	Η Δομή του ενεργού κέντρου μιας AA10	46
3.3.	Συσχέτιση AA9 με CBMs.....	48
3.4.	Μηχανισμός δράσης LPMOs.....	48
3.5.	Χαρακτηρισμός προϊόντων και κατάταξη των AA9	51
3.6.	Διαφορές ανάμεσα σε AA9 και AA10	53
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		54
1.	Υλικά και μέθοδοι.....	55
1.1.	Μοριακή Βιολογία.....	55
1.2.	Μικροοργανισμοί.....	55
1.3.	Θρεπτικά Μέσα	57
1.4.	Συσκευές και Όργανα.....	58
1.5.	Εμπορικά Ένζυμα – Αντιβιοτικά – Τυποποιημένα Χημικά Αντιδραστήρια (kits).....	59
1.6.	Πλασμιδιακοί φορείς Κλωνοποίησης και Έκφρασης.....	59
1.6.1.	Πλασμιδιακός φορέας pCR® Blunt (Invitrogen)	59
1.6.2.	Πλασμιδιακός φορέας pPICZαC (Invitrogen)	60
1.7.	Εκκινητές (Primers)	61
1.8.	Υλικά και στήλες Χρωματογραφίας	62
2.	Μοριακές Τεχνικές.....	63
2.1.	Απομόνωση γενετικού υλικού	63
2.1.1.	Απομόνωση DNA από τον <i>Fusarium oxysporum</i>	63
2.1.2.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	63
2.2.	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) ...	63
2.3.	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	65
2.3.1.	Απομόνωση τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	66
2.4.	Αντίδραση Συνένωσης Μορίων DNA (Ligation).....	66
2.5.	Μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων.	67
2.6.	Ανάκτηση πλασμιδίων από τα μετασχηματισμένα βακτήρια.....	68
2.7.	Πέψη DNA με Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες	68

2.8.	Αλληλούχηση του DNA (Sequencing)	69
2.9.	Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i> για μετασηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση	69
2.10.	Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i> (X-33 και SMD1168H) με ηλεκτροδιάτρηση.....	69
2.11.	Έκφραση της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης στην ζύμη <i>P. pastoris</i>	70
2.11.1.	Επιλογή κλώνου έκφρασης <i>P. pastoris</i> με καλλιέργειες μικρής κλίμακας.	71
2.11.2.	Παραγωγή ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης σε εργαστηριακής κλίμακας καλλιέργειες <i>P. pastoris</i>	72
2.11.3.	Διήθηση και Συμπύκνωση του υπερκείμενου καλλιέργειας <i>P.pastoris</i>	72
2.11.4.	Απομόνωση ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC).....	73
2.11.5.	Αποδιάταξη πρωτεϊνών σε υψηλή συγκέντρωση ουρίας.....	75
2.11.6.	Απομόνωση ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Ιοντεναλλαγής (Ion Exchange Chromatography, IEC)	75
2.11.7.	Απομόνωση ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (Gel Filtration Chromatography).....	78
2.12.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	79
2.12.1.	Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου	80
2.12.2.	Προετοιμασία δειγμάτων – Ηλεκτροφόρηση	81
2.12.3.	Εμφάνιση πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτή Πολυακρυλαμιδίου	81
2.13.	Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνικού φορτίου.....	82
3.	Βιοχημικός χαρακτηρισμός	85
3.1.	Ένζυμα	85
3.2	Υποστρώματα και αντιδραστήρια	85
3.2.1.	Παρασκευή υποστρωμάτων.....	86
3.3.	Ανίχνευση ενεργότητας ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών	87
3.4.	Βέλτιστες συνθήκες δράσης των ενζύμων.....	87
3.5.	Αντιδράσεις ανίχνευσης ενεργότητας και συνεργιτισμού	88
3.6.	Πειράματα συνεργιτισμού StCel61 Native N – Terminal.....	89
3.7.	Πειράματα συνεργιτισμού FoCel61 Native N – Terminal.....	90

3.8.	Πειράματα ανίχνευσης ενεργότητας της <i>StCel61</i> Native N – Terminal	91
3.9.	Πειράματα ανίχνευσης ενεργότητας της <i>FoCel61</i> Native N – Terminal.....	92
3.10.	Χαρακτηρισμός προϊόντων αντιδράσεων υδρόλυσης.....	93
3.11.	Μελέτη αποικοδόμησης υδροθερμικά κατεργασμένου άχυρου σίτου παρουσία <i>StCel61</i> Native N – terminal σε μεγάλη κλίμακα	95
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		96
1.	Χαρακτηριστικά νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από το γονιδίωμα του <i>S. thermophile</i> και του <i>F.oxysporum</i>	97
2.	Παραγωγή και καθαρισμός της <i>StCel61</i> Native N –Terminal.....	101
3.	Παραγωγή και καθαρισμός της <i>FoCel61</i> Native N –Terminal.....	105
3.1.	Ενίσχυση ακολουθίας, κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>P.Pastoris</i>	105
3.2.	Επιλογή κλώνου για την έκφραση και παραγωγή της <i>FoCel61</i>	106
4.	Βιοχημικός χαρακτηρισμός της <i>StCel61</i> Native N-Terminal	111
4.1.	Πειράματα ανίχνευσης ενεργότητας της <i>StCel61</i> Native N – Terminal	111
4.2.	Αντιδράσεις συνεργιτισμού <i>StCel61</i> Native N-Terminal	113
5.	Βιοχημικός χαρακτηρισμός <i>FoCel61</i> Native N – terminal	115
5.1.	Πειράματα ανίχνευσης ενεργότητας της <i>FoCel61</i> Native N – Terminal.....	115
5.2.	Αντιδράσεις συνεργιτισμού <i>FoCel61</i> Native N-Terminal.....	124
6.	Μελέτη αποικοδόμησης υδροθερμικά κατεργασμένου άχυρου σίτου παρουσία <i>StCel61</i> Native N – terminal σε μεγάλη κλίμακα.....	125
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....		126
Συνοπτικά αποτελέσματα και συμπεράσματα διπλωματικής εργασίας.....		127
Μελλοντικές προκλήσεις		129
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ		130
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		137

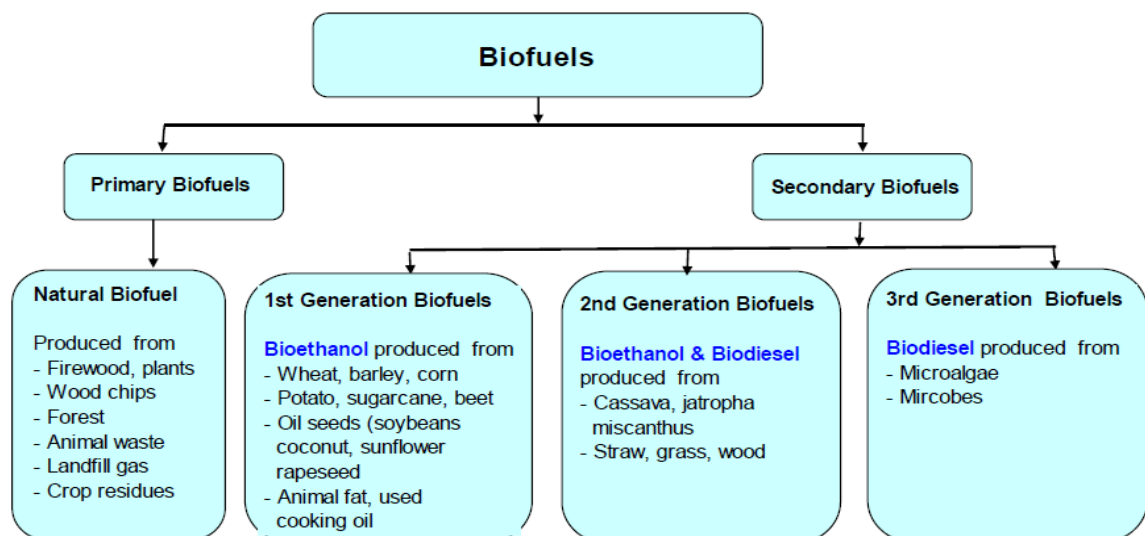
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Βιοκαύσιμα

Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα, μεγάλη έμφαση δόθηκε στην ανάπτυξη της διύλισης των ορυκτών πρώτων υλών (αργό πετρέλαιο, άνθρακας και φυσικό αέριο), προς παραγωγή κυρίως καυσίμων αλλά και άλλων προϊόντων, όπως χημικών, πλαστικών, λιπαντικών, φαρμακευτικών ουσιών κ.α. (Naik et al, 2010). Τις τελευταίες δεκαετίες τα ορυκτά καύσιμα έχουν γίνει αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης ζωής. Τα καύσιμα αυτά καίγονται προς παραγωγή ενέργειας για μεταφορά και ηλεκτρικής ενέργειας, δύο τομείς που παίζουν σημαντικό ρόλο στη βελτίωση του επιπέδου διαβίωσης αλλά και την εξέλιξη της τεχνολογίας.

Ωστόσο, τα καύσιμα αυτά δεν αποτελούν ανανεώσιμη πηγή ενέργειας και κάποια στιγμή στο μέλλον τα αποθέματα θα τελειώσουν. Επιπροσθέτως, η παγκόσμια κλιματική αλλαγή, η αυξανόμενη τιμή του αργού πετρελαίου, η ανησυχία για την εξασφάλιση ενέργειας λόγω της ραγδαίας βιομηχανοποίησης και της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού, και η υποβάθμιση του εδάφους και των υδάτων ανάγκασαν τις κυβερνήσεις, τους επιστήμονες και τους ερευνητές να βρουν εναλλακτικές πηγές ενέργειας όπως η αιολική, η ηλιακή και η γεωθερμική, αλλά και η χρήση των βιοκαυσίμων. Η παραγωγή βιοκαυσίμων από ανανεώσιμες πηγές μπορούν να μειώσουν την εξάρτηση από τα ορυκτά καύσιμα και να βοηθήσουν στη διατήρηση ενός υγιούς περιβάλλοντος και παράλληλα την οικονομική αειφορία. (Lam et al, 2012; Alam et al, 2012)

Ο όρος βιοκαύσιμα γενικά αναφέρεται σε στερεά, υγρά ή αέρια καύσιμα που προέρχονται από οργανική ύλη. Η κατάταξη των βιοκαυσίμων φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1. Κατάταξη και πηγές βιοκαυσίμων (Alam et al, 2012).

Τα βιοκαύσιμα χωρίζονται α) στα κυρίως και β) στα δευτερεύοντα βιοκαύσιμα, στα οποία περιλαμβάνονται τα 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς βιοκαύσιμα. Στα κυρίως βιοκαύσιμα συμπεριλαμβάνονται τα φυσικά βιοκαύσιμα, τα οποία προέρχονται από λαχανικά, ζωικά και αστικά απόβλητα, αλλά και καυσόξυλα κυρίως για μαγειρική, θέρμανση και παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Τα δευτερεύοντα βιοκαύσιμα αναφέρονται στην βιοαιθανόλη και το βιοντήζελ που παράγονται από την κατεργασία της βιομάζας και χρησιμοποιούνται κυρίως στον τομέα των μεταφορών (Alam et al, 2012). Η ευρεία χρήση της αιθανόλης (ως μίξη μαζί με βενζίνη σε καθαρή μορφή ή σε μορφή αιθέρα (ethyl tertiary butyl ether, ETBE) και του ντήζελ ωθούν την έρευνα προς τη μελέτη και την ανάπτυξη των δευτερευόντων βιοκαυσίμων.

1.1. 1^{ης} Γενιάς Βιοκαύσιμα

Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς παράγονται έχοντας σαν πρώτη ύλη καλλιέργειες τροφίμων (όπως για παράδειγμα καλαμπόκι κ.α.). Ένα πρώτης γενιάς βιοκαύσιμο (όπως για παράδειγμα το βιοντήζελ (βιο-εστέρες), η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο) χαρακτηρίζεται αφενός από την ικανότητά του να αναμειγνύεται με τα συμβατικά καύσιμα, να καίγεται στις υπάρχουσες μηχανές εσωτερικής καύσης και να διανέμεται μέσω της ήδη υπάρχουσας υποδομής. Αφετέρου, βρίσκει χρήση στην υπάρχουσα εναλλακτική τεχνολογία των αυτοκινήτων όπως είναι τα οχήματα με ευελιξία καυσίμων ή FFV's (Flexible Fuel Vehicles) και τα οχήματα που κινούνται με φυσικό αέριο. Η παραγωγή 1^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων γίνεται σε εμπορική κλίμακα, και αγγίζει σχεδόν τα 50 δισεκατομμύρια λίτρα ετησίως. (Naik et al, 2010; Fiorese et al, 2013)

Οι τρεις κύριοι τύποι της πρώτης γενιάς βιοκαυσίμων που χρησιμοποιούνται εμπορικά είναι το βιοντήζελ (βιο – εστέρες), η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο, τα οποία παράγονται σε μεγάλες ποσότητες παγκοσμίως και των οποίων η παραγωγική διαδικασία θεωρείται πλέον καλά καθιερωμένη.

Το βιοντήζελ αποτελεί υποκατάστατο του ντήζελ και παράγεται μέσω της μετεστεροποίησης των φυτικών ελαίων και των ελαίων και λιπών από υπολείμματα. Με μικρές μετατροπές των μηχανών μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως το συμβατικό ντήζελ.

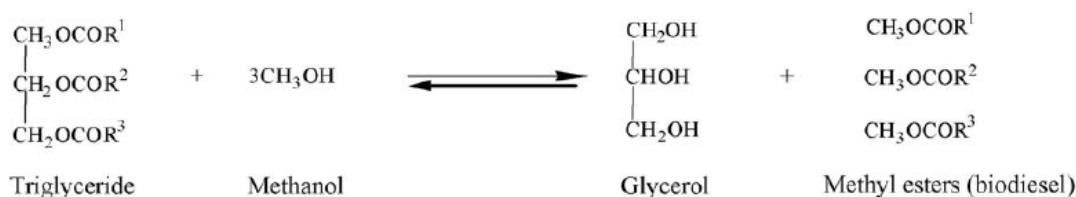
Η βιοαιθανόλη αποτελεί μεν υποκατάστατο της βενζίνης αλλά και καθαρό καύσιμο για τα αποκαλούμενα οχήματα ευέλικτων καυσίμων (FFV's). Παράγεται από την ζύμωση της ζάχαρης και του αμύλου και μπορεί να αποτελέσει την πρώτη ύλη για την παραγωγή του αίθυλο – tert – βούτυλο αιθέρα (ETBE) ο οποίος αναμειγνύεται καλύτερα με τη βενζίνη.

Το βιοαέριο, ή αλλιώς βιομεθάνιο, είναι ένα καύσιμο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βενζινοκίνητα οχήματα με μικρές μηχανολογικές προσαρμογές. Παράγεται μέσω αναερόβιας χώνευσης χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη υγρά απόβλητα αλλά και άλλες χωνεύσιμες ύλες.

Παρακάτω παρατίθενται οι κύριες διεργασίες παραγωγής 1^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων.

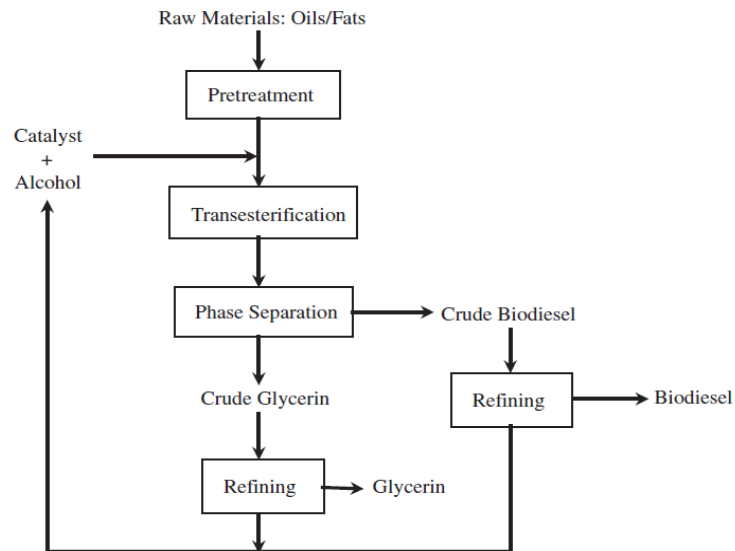
1.1.1. Βιοντήζελ 1^{ης} γενιάς: Εστεροποίηση – Μετεστεροποίηση

Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων που βασίζονται σε φυτικά έλαια (fatty acid methyl esters, FAME), ευρέως γνωστοί ως βιοντήζελ, αποκτούν αξία ως ένα φιλικό προς το περιβάλλον υποκατάστατο του ντήζελ. Είναι φτιαγμένοι από ανανεώσιμες βιολογικές πηγές όπως φυτικά έλαια και ζωικά λίπη, κατόπιν αντιδράσεως αυτών με μια αλκοόλη υπό την παρουσία ενός ομογενούς ή ετερογενούς καταλύτη. Το προϊόν της αντίδρασης είναι ένα μίγμα μεθυλεστέρων (το επιθυμητό βιοντήζελ), και γλυκερόλη, ένα παραπροϊόν υψηλής αξίας.



Σχήμα 1.2. Αντίδραση μετεστεροποίησης (αλκοόλυσης) (Naik et al, 2010)

Κατά την ομογενή κατάλυση, η αντίδραση είναι αντιστρεπτή και προχωρά με την ανάμιξη των αντιδρώντων, ενώ το ρόλο του καταλύτη παίζει κάποιο οξύ ή βάση σε υγρή κατάσταση. Η ετερογενής κατάλυση, χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου η συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free Fatty Acid, FFA) στα αντιδρώντα είναι υψηλή οπότε αυξάνει ο κίνδυνος σαπωνοποίησής τους. Ο ετερογενής καταλύτης που χρησιμοποιείται έχει τη δυνατότητα ταυτόχρονα με την μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων να εστεροποιεί και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα σε μεθυλεστέρες. Η μέθοδος αυτή φαίνεται να προτιμάται έναντι της ομογενούς κατάλυσης, καθώς εξαλείφονται τα προβλήματα του διαχωρισμού των προϊόντων, της διάβρωσης από τους καταλύτες και των περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Παρακάτω φαίνεται η γενική διεργασία που ακολουθείται για την παραγωγή βιοντήζελ (Σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.3. Διεργασία παραγωγής 1^{ης} γενιάς βιοντήζελ (Cheng et al, 2011)

1.1.2. 1^{ης} γενιάς βιοαιθανόλη: Προεπεξεργασία – Ζύμωση

Μεγάλη ποικιλία υδατανθράκων που περιέχονται μέσα στις πρώτες ύλες έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αιθανόλης μέσω της διεργασίας της ζύμωσης. Η κατηγοριοποίηση των πρώτων υλών γίνεται με βάση το είδος των υδατανθράκων που περιέχουν, όπως παρουσιάζεται ακολούθως:

- Καλλιέργειες ζάχαρης: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι καλλιέργειες ζαχαρότευτλων, σιταριού, φρούτων κ.α.
- Καλλιέργειες αμύλου: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν καλλιέργειες κριθαριού, ρυζιού, γλυκού σόργου, καλαμποκιού, πατάτας κ.α.



A



B

Σχήμα 1.4. Πηγές παραγωγής 1^{ης} γενιάς βιοαιθανόλης: A) καλλιέργειες σίτου, B) καλλιέργειες γλυκού σόργου

Η χημική δομή του αμύλου αποτελείται από μακριές αλυσίδες πολυμερών της γλυκόζης και δεν μπορεί να υποστεί ζύμωση απευθείας σε αιθανόλη με τη συμβατική τεχνολογία ζύμωσης. Για το λόγο αυτό τα μακρομόρια πρέπει

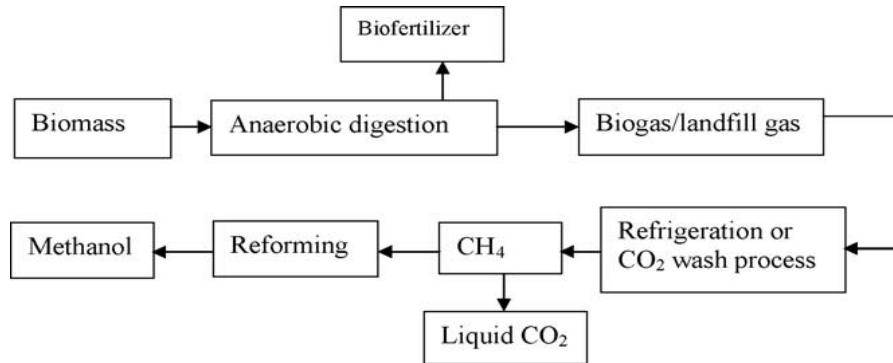
διασπαστούν προς μικρότερα και απλούστερα μόρια γλυκόζης. Για το σκοπό αυτό, η αμυλούχος πρώτη ύλη αναμιγνύεται με νερό, έως ότου προκύψει πολτός με 15 – 20% περιεκτικότητα σε άμυλο. Κατόπιν, ο πολτός ψήνεται σε θερμοκρασία ίση ή μεγαλύτερη του βρασμού του μίγματος και δέχεται ενζυμική κατεργασία με δύο ένζυμα. Το πρώτο ένζυμο υδρολύει τις αλυσίδες του αμύλου σε μικρότερες αλυσίδες γλυκόζης. Το ένζυμο αυτό ονομάζεται αμυλάση και ελευθερώνει τον ολιγοσακχαρίτη μαλτοδεξτρίνη μέσω της διεργασίας της υγροποίησης. Η δεξτρίνη και οι ολιγοσακχαρίτες υδρολύονται περαιτέρω από ένζυμα όπως η γλυκοαμυλάση και η πουλλουανάση μέσω μιας διεργασίας που είναι γνωστή ως σακχαροποίηση. Μέσω αυτής όλες οι δεξτρίνες μετατρέπονται σε γλυκόζη, μαλτόζη και ισομαλτόζη. Ακολούθως, ο πολτός ψύχεται στους 30 °C και προστίθεται η ζύμη ώστε να ξεκινήσει η ζύμωση των σακχάρων.

Ως ζύμωση ορίζεται η μεταβολική διεργασία κατά την οποία ένα οργανικό υπόστρωμα υπόκειται σε χημικές αλλαγές λόγω δράσεων ενζύμων που εκκρίνονται από μικροοργανισμούς. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι ζύμωσης ανάλογα με την απαίτηση σε οξυγόνο, η αερόβια και η αναερόβια. Για την παραγωγή αιθανόλης χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να ζυμώσουν τα σάκχαρα σε αιθανόλη. Τέτοιου είδους μικροοργανισμοί είναι οι ζύμες (του είδους *Saccharomyces*), βακτήρια (του είδους *Zygomonas*) και μύκητες (του είδους *Mycelium*). Οι μικροοργανισμοί αυτοί βρίσκονται στη φύση και παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση κατά τη ζύμωση, καθώς κάποιοι μπορούν και ζυμώνουν μόνο εξόζες, ή πεντόζες ή μίγματα αυτών. Οι διεργασίες που ακολουθούνται βιομηχανικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το ποσό του νερού που χρησιμοποιείται, στη διαδικασία υγρής και ξηρής άλεσης. Κατά την υγρή άλεση παράγονται εκτός από αιθανόλη και άλλα πολύτιμα προϊόντα όπως συμπληρώματα διατροφής, φαρμακευτικές ουσίες, οργανικά οξέα και διαλύτες. Η διεργασία της ξηρής άλεσης είναι ειδικά σχεδιασμένη για την παραγωγή αιθανόλης και ζωοτροφής.

1.1.3. 1^{ης} γενιάς Βιοαέριο: Αναερόβια Χώνευση

Λόγω της αύξησης του κόστους της ενέργειας, η αναερόβια χώνευση της βιομάζας αποτελεί μια πολύ ελκυστική εναλλακτική λύση για την παραγωγή καυσίμου και λιπάσματος για οργανική καλλιέργεια. Η αναερόβια χώνευση στερεών αποβλήτων (π.χ. χώροι υγειονομικής ταφής) είναι παρόμοια διεργασία με αυτή που χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοαερίου. Για το σκοπό αυτό αναερόβια βακτήρια χρησιμοποιούνται υπό την έλλειψη οξυγόνου για την αποικοδόμηση του οργανικού περιεχομένου της βιομάζας και την παραγωγή ενός αερίου μίγματος μεθανίου (CH₄) και διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). Η έρευνα του βιοαερίου επικεντρώνεται κυρίως στην παραγωγή υγρού αντί αερίου καυσίμου μέσω

αναερόβιας χώνευσης κι αυτό γιατί το κόστος συλλογής και καθαρισμού του μεθανίου είναι υψηλό. Έτσι η παραγωγή υγρής μεθανόλης έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως η παραγωγή καυσίμου με χαμηλή περιεκτικότητα σε θείο και τέφρα για εμπορική χρήση, καθώς και μεγάλη ευκολία στο χειρισμό, την αποθήκευση και τη μεταφορά έναντι των αέριων προϊόντων (Naik et al, 2010).



Σχήμα 1.5. Διεργασία αναερόβιας χώνευσης (Naik et al, 2010)

Ωστόσο, τα 1^{ης} γενιάς βιοκαύσιμα φαίνεται να προκαλούν σκεπτικισμό στους επιστήμονες. Λόγω της μεγάλης ζήτησης καυσίμων, οι καλλιέργειες για την παραγωγή 1^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων έχουν απαίτηση σε μεγάλες εκτάσεις γης. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των εκτάσεων για την παραγωγή ανθρωπίνων και ζωικών τροφών. Ταυτόχρονα, με την αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού οι απαιτήσεις για σίτιση αυξάνονται ενώ οι καλλιεργήσιμες εκτάσεις μειώνονται. Η αυξανόμενη παραγωγή των βιοκαυσίμων αυτών θα οδηγήσει αναπόφευκτα στην αύξηση των τιμών των τροφίμων, πράγμα το οποίο μπορεί να έχει πολιτικές και κοινωνικές επιπτώσεις που δύσκολα περιορίζονται, καθώς ο κόσμος θα έρθει αντιμέτωπος με το δίλημμα «φαγητού έναντι καυσίμων». (Naik et al, 2010; Ahmad et al 2011; Alam et al, 2012)

Για να ανταπεξέλθουν στις απαιτήσεις αυτές, πολλές χώρες ανά τον κόσμο έχουν αρχίσει να αποψιλώνουν δασικές εκτάσεις, οι οποίες μετατρέπονται σε καλλιεργήσιμες γεγονός το οποίο προκαλεί οικολογική ανισορροπία, καθώς τίθεται σε κίνδυνο η βιοποικιλότητα στα οικοσυστήματα που πλήγονται. Επιπλέον, η εκτεταμένη χρήση λιπασμάτων, παρασιτοκτόνων και καθαρού νερού σε περιορισμένες καλλιέργειες καυσίμων μπορούν όχι μόνο να μειώσουν το δυναμικό παραγωγής τροφίμων αλλά και να συνεισφέρουν περαιτέρω στην περιβαλλοντική καταστροφή. Άλλο σημαντικό πρόβλημα της παραγωγής 1^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων αποτελεί το υψηλό χρηματικό κόστος, καθώς συχνά απαιτεί επιπλέον χρηματοδότηση (π.χ. κυβερνητική) για να γίνει ανταγωνιστική έναντι της παραγωγής προϊόντων πετρελαίου. Τέλος, υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις εκτιμήσεις που αφορούν στη μείωση των αερίων του θερμοκηπίου από την χρήση των βιοκαυσίμων 1^{ης} γενιάς, εάν ληφθούν υπόψιν αφενός η μείωση των δασικών

εκτάσεων και αφετέρου η ανάμιξή τους με τα ορυκτά καύσιμα (Naik et al, 2010; Sims et al, 2010; Ahmad et al, 2011; Alam et al, 2012; Fiorese et al, 2013)

1.2. 2^{ης} γενιάς βιοκαύσιμα

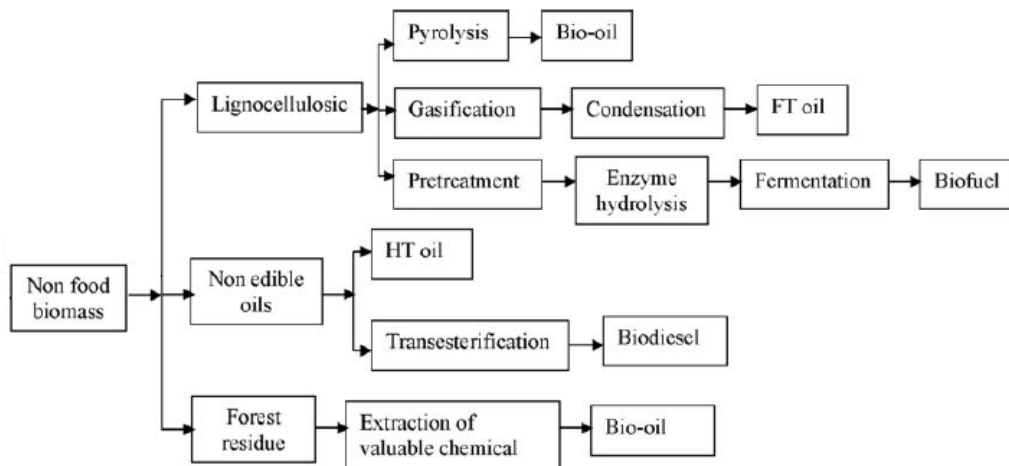
Τα 2^{ης} γενιάς βιοκαύσιμα προέρχονται από βιομάζα με πιο ανανεώσιμο χαρακτήρα, καθώς παράγονται με τρόπο που δεν επηρεάζει ή ακόμα και μειώνει τον συνολικό άνθρακα που απαιτείται αναφορικά με τον αντίκτυπο που έχει στη συγκέντρωση του CO₂. Ο όρος βιομάζα αναφέρεται στη χρήση φυτικής βιομάζας από λιγνινοκυτταρινούχο υλικό καθώς αποτελείται κυρίως από φτηνό και άφθονο μη βρώσιμο υλικό από φυτά. Η φυτική βιομάζα αποτελεί την πιο άφθονη και ανεκμετάλλευτη βιολογική πηγή σε όλο τον πλανήτη, και φαίνεται πως αποτελεί μια πολύ καλή πηγή για την παραγωγή καυσίμων αλλά και άλλων χημικών ουσιών.

Αποτελείται κυρίως από φυτικά κυτταρικά τοιχώματα, εκ των οποίων το 75% αντιστοιχεί σε πολυσακχαρίτες. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες αντιστοιχούν σε μια πολύτιμη δεξαμενή χρήσιμων σακχάρων, καθώς ακόμα και σε υπολείμματα παραδοσιακών καλλιεργειών τροφίμων είναι δεσμευμένα τόσα σάκχαρα όσα και στα εκμεταλλεύσιμα μέρη τους. Έτσι η δυνατότητα αξιοποίησης των υπολειμμάτων από καλλιέργειες π.χ. σιταριού και δασικά κατάλοιπα ως πηγή σακχάρων δεν έχει γίνει αντιληπτή.

Τα προηγμένα βιοκαύσιμα 2^{ης} γενιάς μπορούν να παραχθούν κατόπιν υδρόλυσης των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών και στη συνέχεια ζύμωσης των σακχάρων τους (βιοαιθανόλη), ή μέσω αεριοποίησης (π.χ. Fisher Tropsch βιοντήζελ, βιοαέριο σύνθεσης). Τυπικές πηγές για τα βιοκαύσιμα αυτά αποτελούν δασικά φυτά με σύντομο κύκλο καλλιέργειας (π.χ. ευκάλυπτος, ιτιά), διηλεκτή φυτά (π.χ. switch grass, miscanthus) και υπολείμματα ξυλείας και γεωργίας.

Μέσω της υδρόλυσης, εξάγονται σάκχαρα από την λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα τα οποία μέσω ζύμωσης μετατρέπονται σε αιθανόλη. Η βιοαιθανόλη μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως την βενζίνη όπως και το Fisher Tropsch βιοντήζελ το συμβατικό ντήζελ. Μέσω αεριοποίησης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας παράγεται αέριο σύνθεσης το οποίο με τη σειρά του μπορεί να μετατραπεί σε υγρούς υδρογονάνθρακες, κυρίως προς ντήζελ και κηροζίνη. Το βιοσυνθετικό φυσικό αέριο (SNG – Synthetic Natural Gas) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο σε βενζινοκίνητα οχήματα με κάποιες μικρές προσαρμογές. Επιπλέον, το αέριο σύνθεσης μπορεί να μετατραπεί σε μεθάνιο ή σε βιο-διμέθυλ – εθέρες (bio – DME) που παράγονται που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε νηζελοκίνητα οχήματα με μικρές προσαρμογές (Naik et al, 2010).

Επιπλέον, για την μείωση της εξάρτησης από τα βρώσιμα έλαια, εναλλακτικές πηγές μη βρώσιμων πρώτων υλών έχουν αναπτυχθεί για την παραγωγή βιοντήζελ. Ενεργειακές καλλιέργειες όπως φυτά του γένους *Jatropha*, *mahua* και *jojoba*, βαμβακόσποροι, αλλά και χρησιμοποιημένα μαγειρικά έλαια και ζωικά λίπη αποτελούν πρώτες ύλες για την παραγωγή 2^{ης} γενιάς βιοντήζελ. Οι διεργασίες που λαμβάνουν μέρος στη μετατροπή της βιομάζας σε 2^{ης} γενιάς βιοκαύσιμα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6. Διεργασίες παραγωγής 2^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων από μη βρώσιμες πηγές (Naik et al, 2010)

Όσον αφορά τις πηγές ελαίων για την παραγωγή δεύτερης γενιάς βιοντήζελ παρουσιάζουν διάφορα πλεονεκτήματα όπως:

- I. Εξαλείφουν το δίλημμα τροφής – βιοκαυσίμων, καθώς τα έλαια που χρησιμοποιούνται δεν είναι κατάλληλα για ανθρώπινη τροφή λόγω κάποιων τοξικών ουσιών. Ενώ υπάρχει και η δυνατότητα ανάπτυξης αυτών των καλλιεργειών σε εδάφη που δεν μπορούν να αναπτυχθούν καλλιέργειες τροφίμων (π.χ. χωματερές).
- II. Είναι πιο αποδοτικές και φιλικές προς το περιβάλλον από τις πρώτες ύλες των βιοκαυσίμων 1^{ης} γενιάς, ενώ η μετατροπή των ελαίων είναι συγκρίσιμη ως προς την παραγωγή και την ποιότητα, έναντι αυτής των βρώσιμων ελαίων.
- III. Κατά την επεξεργασία τους παράγονται χρήσιμα παραπροϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άλλες διεργασίες ή να με καύση να αποδώσουν ενέργεια (π.χ. θέρμανση).
- IV. Οι μεθυλεστέρες των ζωικών λιπών προσφέρουν μεγαλύτερο αριθμό κετανίου, έχουν μη διαβρωτικό χαρακτήρα, και παρουσιάζουν καθαρές και ανανεώσιμες ιδιότητες.

Ωστόσο, οι καλλιέργειες αυτές να μεν δε φαίνεται να επηρεάζουν την ανθρώπινη τροφική αλυσίδα, αλλά ίσως δεν επαρκούν για την πλήρη αντικατάσταση των καυσίμων μεταφοράς. Επίσης, τα φυτικά έλαια και τα ζωικά λίπη δεν παρουσιάζουν καλές ιδιότητες σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ τα δεύτερα λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά οξέα δυσχεραίνουν την αντίδραση της μετεστεροποίησης (λόγω αύξησης του ιξώδους και του σημείου τήξης). Ακόμη, η χρήση ζωικών λιπών μπορεί να κρύβει και υγειονομικούς κινδύνους εάν αυτά προέρχονται από μολυσμένα ζώα. Για όλους αυτούς τους λόγους τα έλαια από 2^{ης} γενιάς πρώτες ύλες δεν προτιμώνται για την παραγωγή βιοντήζελ με τη μέθοδο της μετεστεροποίησης, και η έρευνα επικεντρώνεται κυρίως στην εκμετάλλευση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. (Naik et al, 2010; Ahmad et al, 2011)

1.2.1. Διεργασίες μετατροπής λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Υπάρχουν δύο κύρια μονοπάτια για την παραγωγή υγρών βιοκαυσίμων από βιομάζα: το ένα περιλαμβάνει τη θερμοχημική κατεργασία και το δεύτερο την βιοχημική κατεργασία. Ως θερμοχημική κατεργασία ορίζεται η μετατροπή της βιομάζας σε μια ποικιλία προϊόντων, μέσω της θερμικής αποσύνθεσης και της χημικής μετατροπής, και περιλαμβάνει απαραίτητως τη θέρμανση της βιομάζας παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων οξυγόνου. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελεί η μετατροπή όλων των συστατικών της βιομάζας σε αντίθεση με τη βιοχημική κατεργασία, η οποία στοχεύει κυρίως το υδατανθρακικό της περιεχόμενο.

1.2.1.1. Θερμοχημική Μετατροπή – (Παραγωγή Fisher Tropsch βιοντήζελ)

Η θερμοχημική μετατροπή περιλαμβάνει τις διεργασίες της καύσης, της αεριοποίησης, της υγροποίησης και της πυρόλυσης. Όταν η βιομάζα θερμαίνεται σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, παράγεται αέριο σύνθεσης το οποίο αποτελείται κυρίως από υδρογόνο και μονοξείδιο του άνθρακα. Το αέριο σύνθεσης μπορεί να οδηγηθεί απευθείας για καύση, ή να επεξεργασθεί περαιτέρω για την παραγωγή άλλων αέριων και υγρών προϊόντων. Αυτές οι διεργασίες μετατροπής της βιομάζας εμφανίζουν πολλές ομοιότητες με αυτές που λαμβάνουν χώρα κατά την επεξεργασία του άνθρακα.

1. Απευθείας καύση

Όταν συντελείται απευθείας καύση της βιομάζας σε ένα χώρο με καλό εξαερισμό, όπως σε οικιακές εστίες και καυστήρες, μπορεί να είναι ένα υγιές υποκατάστατο των ορυκτών καυσίμων που χρησιμοποιούνται. Οι εκπομπές θείου είναι πολύ

χαμηλότερες (0,05 – 0,2 % σε υγρή βάση) και ο σχηματισμός σωματιδίων μπορεί να ελεγχθεί από την πηγή.

2. Αεριοποίηση

Η διεργασία της αεριοποίησης δεν αποτελεί νέα τεχνολογία, ωστόσο η χρήση της για τη μετατροπή της βιομάζας σε καύσιμη ύλη έχει μελετηθεί μόνο την τελευταία τριακονταετία. Το αέριο σύνθεσης μπορεί να παραχθεί τόσο μη όσο και καταλυτικά. Οι μη καταλυτικές διεργασίες απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες λειτουργίας (περίπου 1300 ° C), ενώ οι καταλυτικές διεργασίες λαμβάνουν χώρα σε σημαντικά χαμηλότερες θερμοκρασίες. Με την εξέλιξη των καταλυτικών τεχνολογιών οι θερμοκρασιακές απαιτήσεις αναμένεται να μειωθούν έως και 900 ° C από τις σημερινές.

Κατά την αεριοποίηση, η βιομάζα αντιδρά με αέρα, οξυγόνο ή ατμό για την παραγωγή ενός μίγματος που αποτελείται από μονοξείδιο και διοξείδιο του άνθρακα, υδρογόνο, μεθάνιο και άζωτο γνωστό και ως αέριο παραγωγής (producer gas) ή αέριο σύνθεσης, ανάλογα με τις σχετικές συγκεντρώσεις των αέριων συστατικών. Το αέριο παραγωγής δεν έχει το πλεονέκτημα να λειτουργήσει ως πηγή για την παραγωγή άλλων καυσίμων εν αντιθέσει με το αέριο σύνθεσης από το οποίο μπορεί να παραχθεί μια ποικιλία καυσίμων και άλλων χημικών ενδιαμέσων. Τέτοια καύσιμα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον τομέα των μεταφορών είναι το υδρογόνο (από την αντίδραση μετατόπισης αερίου –νερού, water-gas-shift), οι υδρογονάνθρακες (μέσω της αντίδρασης σύνθεσης Fisher – Tropsh και της σύνθεσης μεθανόλης με περαιτέρω συνέχιση της αντίδρασης προς παραγωγή όχι μόνο υδατανθράκων αλλά και οξυγονούχων υγρών καυσίμων) και η ζυμωτική αλλά και καταλυτική παραγωγή αιθανόλης. Η αντίδραση μετατόπισης αερίου –νερού χρησιμοποιεί το μονοξείδιο του άνθρακα και το νερό για την παραγωγή υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα, μια διεργασία με στόχο την αναβάθμιση και τον εμπλουτισμό των αέριων σύνθεσης και παραγωγής σε υδρογόνο, ή ακόμα και την παραγωγή καθαρού υδρογόνου.

Η σύνθεση Fischer – Tropsh χρησιμοποιείται από το 1930 για την παραγωγή υγρών υδρογονανθράκων από αέριο σύνθεσης, ενώ η παραγωγή μεθανόλης είναι σε εφαρμογή από το 1920. Τέλος, η παραγωγή αιθανόλης, μπορεί να επιτευχθεί είτε με διαβίβαση του αερίου σύνθεσης σε ζυμωτήρα για τη βιομετατροπή του σε αιθανόλη και οξικό οξύ (συνδυασμός βιοχημικών και θερμοχημικών διεργασιών), είτε με ανάμιξη του αερίου σύνθεσης με μεθανόλη και νερό και διαβίβαση του μίγματος σε καταλυτικό αντιδραστήρα (με συνθετικό καταλύτη: δισουλφίδιο του μολυβδαίνιου) προς παραγωγή αιθανόλης και ανώτερων γραμμικών αλκοολών (Naik et al, 2010; Χριστακόπουλος, 2011).

3. Ρευστοποίηση

Η ρευστοποίηση της βιομάζας, έχει ερευνηθεί παρουσία διαλυμάτων αλκαλίων, γλυκερίνης, προπανόλης ή βουτανόλης, αλλά και μέσω της διεργασίας της άμεσης ρευστοποίησης. Τα προϊόντα της διεργασίας αυτής είναι έλαια υψηλού ιξώδους, αδιάλυτα στο νερό και συνήθως απαιτούν την παρουσία διαλυτών και αναγωγικών αερίων όπως μονοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο, αλλά και καταλύτες μαζί με τη βιομάζα κατά την παραγωγή τους.

Υπάρχει επιπλέον η δυνατότητα, τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά να μετατραπούν απευθείας σε ένα υγρό παρόμοιο με τα βαριά κλάσματα του πετρελαίου μέσω της καταλυτικής αντίδρασης με αέριο σύνθεσης. Η υδατική υγροποίηση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών περιλαμβάνει την αποδόμηση της ξύλινης δομής τους, ακολουθούμενη από μερικό αποπολυμερισμό των ενώσεων που περιέχουν. Κατά την αλκαλική υγροποίηση, τα αλκαλικά άλατα όπως το ανθρακικό νάτριο και κάλιο μπορούν να παίξουν το ρόλο του καταλύτη για την υδρόλυση των μακρομορίων όπως η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη σε μικρότερα κλάσματα.

Το ιξώδες έλαιο που προκύπτει από τη διεργασία της ρευστοποίησης, επειδή προκαλεί προβλήματα στο χειρισμό του, συχνά απαιτεί την προσθήκη οργανικών διαλυτών στο αντιδρών σύστημα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται μπορούν να ανακτηθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν (εκτός από τον οξικό αιθυλεστέρα). Η υδατική ρευστοποίηση με παρουσία καταλύτη είναι πιο αποδοτική σε έλαια σε σχέση με την μη καταλυτική (63% έναντι 31%). Κατά την ρευστοποίηση το στερεό υπόλειμμα εμπλουτίζεται σε λιγνίνη.

Το βιο-έλαιο που λαμβάνεται από ρευστοποίηση ξηρής βιομάζας υπό υψηλή πίεση (high pressure liquefaction, HPL) καταλήγει σε ένα μίγμα από πτητικά οργανικά οξέα, αλκοόλες, αλδεΐδες, αιθέρες, εστέρες, κετόνες και μη πτητικά συστατικά. Τα έλαια αυτά μπορούν να αναβαθμιστούν καταλυτικά για την παραγωγή ενός οργανικού αποστάγματος πλούσιου σε υδρογονάνθρακες και άλλα χημικά συστατικά. Ωστόσο, η απόδοση της ρευστοποίησης υψηλής πίεσης παρουσιάζει πολύ μικρή απόδοση και δίνει πιο ιξώδες βιο – έλαιο σε σχέση με την μέθοδο της ταχείας πυρόλυσης.

4. Πυρόλυση

Με τον όρο πυρόλυση ορίζεται η θερμική αποδόμηση της βιομάζας υπό συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή στερεού άνθρακα, βιο – ελαίου, και αερίων καυσίμων. Στόχος της πυρόλυσης της βιομάζας είναι η παραγωγή ενός βιοκαυσίμου με μικρομεσαία θερμογόνο δύναμη. Ανάλογα με τις λειτουργικές συνθήκες η πυρόλυση μπορεί να διακριθεί σε:

i. Συμβατική

Κατά τη διαδικασία αυτή, η πυρόλυση λαμβάνει χώρα με χαμηλό ρυθμό θέρμανσης, χρόνο παραμονής 45 – 550 δευτερόλεπτα ενώ επεξεργάζονται μεγάλες ποσότητες βιομάζας. Το πρώτο στάδιο αποδόμησης της βιομάζας, που συμβαίνει μεταξύ 550 με 900 K, ονομάζεται προ-πυρόλυση, και λαμβάνουν χώρα εσωτερικές αναδιατάξεις αποβολή μορίων νερού, διάσπαση δεσμών εμφάνιση ελευθέρων ριζών, δημιουργία καρβονυλ- και καρβοξυλομάδων και ομάδες υπεροξειδίων. Το δεύτερο στάδιο της στερεάς αποδόμησης αποτελεί το κύριο κομμάτι της πυρόλυσης, προχωρά με γρήγορο ρυθμό θέρμανσης και κατά το στάδιο αυτό λαμβάνονται τα κύρια προϊόντα της πυρόλυσης. Στο τελευταίο στάδιο, η αποδόμηση συνεχίζεται με αργό ρυθμό και σχηματίζεται ένα πλούσιο σε άνθρακα στερεό υπόλειμμα.

ii. Ταχεία

Σε αυτή τη διεργασία απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες, 850 – 1250 K, με γρήγορο ρυθμό θέρμανσης, μικρό χρόνο παραμονής (0,5 -10s) και μικρή κοκκομετρία της βιομάζας (<1mm). Η διεργασία της ταχείας πυρόλυσης προτιμάται για την παραγωγή υγρών και αέριων προϊόντων, καθώς κατά την αποσύνθεση της βιομάζας λαμβάνονται ατμοί, αεροζόλ και λίγο στερεός άνθρακας. Μετά την ψύξη και τη συμπύκνωση των αέριων προϊόντων ένα σκούρο καφέ υγρό σχηματίζεται το οποίο έχει τη μισή θερμογόνο δύναμη από το συμβατικό πετρέλαιο. Τελικά τα προϊόντα που λαμβάνονται από την ταχεία πυρόλυση είναι 60 -75 % βιο-έλαιο (bio – oil), 15 – 25% στερεό υπόλειμμα και 10 -20% μη συμπυκνωμένα αέρια αναλόγως την πρώτη ύλη.

iii. Αστραπιαία (flash)

Διαφέρει αρκετά από την συμβατική πυρόλυση, καθώς λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασίες 1050 – 1300 K, με χίλιες φορές μεγαλύτερο ρυθμό θέρμανσης, απειροελάχιστο χρόνο παραμονής (< 0,5s) και πολύ μικρή κοκκομετρία υποστρώματος (<0,2mm). Η flash πυρόλυση προτιμάται για την παραγωγή βιο-ελαίου, το οποίο μπορεί να αναμιχθεί με την το στερεό υπόλειμμα για την παραγωγή ενός βιο – πολτού. Ο πολτός αυτός μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη σε εγκαταστάσεις αεριοποίησης για την παραγωγή αερίου σύνθεσης. Η απόδοση της μετατροπής της βιομάζας σε βιο-έλαιο είναι της τάξης του 70 %, ενώ το βιο – αργό (bio-crude), όπως αποκαλείται μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κινητήρες και τουρμπίνες ή να αποτελέσει πρώτη ύλη σε διυλιστήρια. (Naik et al, 2010)

1.2.1.2. Βιοχημική Μετατροπή – Παραγωγή Βιοαιθανόλης

Οι τεχνολογίες βιολογικής μετατροπής βασίζονται σε μικροβιακές και ενζυματικές διεργασίες, οι οποίες παράγουν σάκχαρα από τη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα. Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά βρίσκονται σε αφθονία σχεδόν σε όλο τον κόσμο και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοαιθανόλης, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνες. Ωστόσο η παραγωγή αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες είναι πολύ πιο απαιτητική σε σχέση με τα 1ης γενιάς υποστρώματα (πλούσια σε σάκχαρα και άμυλο), και απαιτεί τρία στάδια επεξεργασίας:

1) Προεπεξεργασία

Η προεπεξεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας προετοιμάζει το υπόστρωμα για την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης και των ημικυτταρινών για την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων. Στόχο της προεπεξεργασίας αποτελεί ο διαχωρισμός του κλάσματος της λιγνίνης, η μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης και η αύξηση του πορώδους της πρώτης ύλης, έτσι ώστε τα υδρολυτικά ένζυμα να έχουν πρόσβαση στα αντίστοιχα υποστρώματα κατά το στάδιο της ενζυματικής υδρόλυσης. Οι μέθοδοι προεπεξεργασίας έχουν μελετηθεί εκτενώς τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, και χωρίζονται σε φυσικές, χημικές, και βιολογικές.

- Φυσική προκατεργασία

Η φυσική προκατεργασία περιλαμβάνει μηχανικό κατακερματισμό, έκρηξη ατμού, έκρηξη αμμωνίας και πυρόλυση. Κατά τον κερματισμό συνδυάζεται η κοπή και η άλεση με σκοπό τη μείωση της κοκκομετρίας σε 0,2 – 2 mm, και της κρυσταλλικότητας της πρώτης ύλης.

Η διεργασία της έκρηξης ατμού επεξεργάζεται την βιομάζα με κορεσμένο ατμό υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας (120 – 160 °C) και αμέσως την εκτονώνει σε ατμοσφαιρική πίεση, προκαλώντας αποσύνθεση μέσω της βίαιης αποσυμπίεσης, διαχωρισμό της λιγνίνης από τους υδατάνθρακες και υποβάθμιση των ημικυτταρινών. Σε μια παρόμοια διεργασία, κατά την έκρηξη αμμωνίας χρησιμοποιείται υγρή αμμωνία για την εμβάπτιση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 100 °C) για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, και κατόπιν εκτονώνονται ακαριαία σε μικρότερη πίεση, με αποτέλεσμα την διάσπαση χημικών δεσμών μεταξύ λιγνίνης και κυτταρίνης/ ημικυτταρινών και την ουσιαστική αύξηση του πορώδους της βιομάζας.

Στην πυρόλυση, η βιομάζα εκτίθεται σε υψηλή θερμοκρασία (πάνω από 200 °C), ικανή να υποβαθμίσει τις ημικυτταρίνες και μια ποσότητα της λιγνίνης και της κυτταρίνης σε αέριες και πηκτώδεις ενώσεις, με αποτέλεσμα την κατάρρευση της

συμπαγούς δομής της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Η φυσική προκατεργασία είναι αποδοτική ως προς την υποβάθμιση της δομής της βιομάζας και βελτιώνει ουσιαστικά την απόδοση σε σάκχαρα στο επερχόμενο στάδιο της ενζυματικής υδρόλυσης, ωστόσο παρουσιάζει υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις.

- Χημική προκατεργασία

Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι χημικής προκατεργασίας είναι η όξινη ή βασική υδρόλυση. Κατά την κατεργασία με θειικό οξύ το μείγμα της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και του οξέος θερμαίνεται σε υψηλή θερμοκρασία. Το οξύ αποσυνθέτει τις ημικυτταρίνες, με αποτέλεσμα τη διάλυση της δομής της βιομάζας. Το μεγαλύτερο μέρος των ημικυτταρινών αποσυντίθεται προς σάκχαρα, τα οποία παραμένουν στο υγρό κλάσμα, ενώ η κυτταρίνη παραμένει σε στερεά μορφή. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής, αποτελεί η δημιουργία κάποιων χημικών ενώσεων κατά την αποδόμηση των ημικυτταρινών, όπως φουρφουράλες, οι οποίες παρεμποδίζουν τη μετέπειτα ενζυματική υδρόλυση και μικροβιακή ζύμωση.

Η βασική υδρόλυση πραγματοποιείται και αυτή σε υψηλή θερμοκρασία (100 – 170 οC). Κατά την διεργασία αυτή λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις σαπωνοποίησης ενδομοριακών εστερικών σταυροδεσμών μεταξύ ημικυτταρίνης, κυτταρίνης και λιγνίνης. Ακόμη μέσω της διεργασίας αυτής επιτυγχάνεται αποδόμηση της λιγνίνης, μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης καθώς και του βαθμού πολυμερισμού των σακχάρων. Ωστόσο, παρόλες τις δυνατότητες διάσπασης που παρέχει η αλκαλική επεξεργασία της βιομάζας, μια σημαντική ποσότητα λιγνίνης παραμένει αναμειγμένη με την κυτταρίνη, παρουσιάζοντας παρεμποδιστική δράση κατά την ενζυματική υδρόλυση.

- Βιολογική προεπεξεργασία

Οι βιολογικές διεργασίες προεπεξεργασίας της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας χρησιμοποιούν μικροοργανισμούς όπως μύκητες για την αποδόμηση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης. Διαφορετικά είδη μυκήτων επιτίθενται σε διαφορετικά συστατικά της βιομάζας, ενώ οι μύκητες λευκής σήψης φέρονται ως οι πιο αποδοτικοί. Η βιολογική μέθοδος αποτελεί την πιο οικονομική διεργασία για την προεπεξεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, ωστόσο ο μεγάλος χρόνος επεξεργασίας (περίπου μια εβδομάδα) αποτελεί εμπόδιο στη βιομηχανική εφαρμογή της.

2) Ενζυματική Υδρόλυση

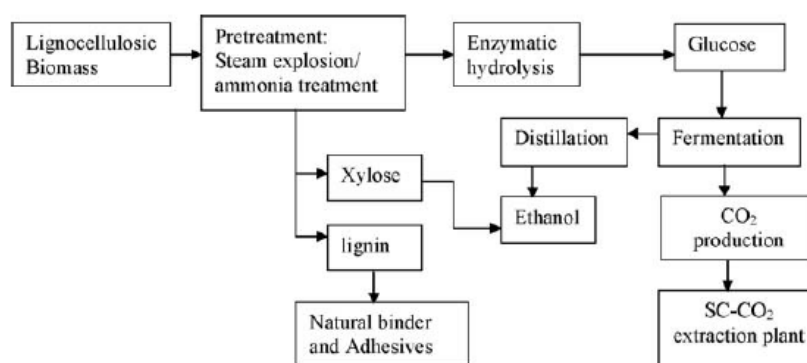
Η ενζυματική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας περιλαμβάνει ενζυματικές δράσεις που μετατρέπουν την κυτταρίνη σε γλυκόζη και τις ημικυτταρίνες σε πεντόζες (ξυλόζη και αραβινόζη) και εξόζες (γλυκόζη, γαλακτόζη

και μαννόζη). Η μετατροπή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης καταλύεται από κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες αντίστοιχα. Μετά την προεπεξεργασία το μεγαλύτερο μέρος της λιγνίνης έχει απομακρυνθεί, η κρυσταλλικότητα της βιομάζας έχει μειωθεί, και το πορώδες έχει αυξηθεί, επιτρέποντας έτσι στα ένζυμα να διεισδύσουν στη βιομάζα και να προσδεθούν στα αντίστοιχα υποστρώματα. Τα ένζυμα παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση στη δράση τους, ενώ η υδρόλυση πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και pH (pH = 4,8 , T = 45 -50 οC).

Οι κυτταρινάσες ή β – 1,4 – γλυκοζιδικές υδρολάσες χωρίζονται σε τουλάχιστον τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη δράση τους: ενδογλουκανάσες, εξωγλουκανάσες και β – γλυκοζιδάσες. Οι ενδογλουκανάσες δρουν τυχαία σε άμορφες περιοχές της κυτταρίνης και υδρολύουν τους β – 1,4 – γλυκοζιδικούς δεσμούς ελευθερώνοντας κελλο-ολιγοσακχαρίτες με ελεύθερα άκρα. Οι εξωγλουκανάσες μπορούν να υδρολύσουν β – 1,4 – γλυκοζιδικούς δεσμούς κελλο – ολιγοσακχαριτών προς παραγωγή κελλοβιόζης η οποία υδρολύεται σε γλυκόζη από τις β – γλυκοζιδάσες.

3) Ζύμωση

Η γλυκόζη που αποτελεί προϊόν της ενζυματικής υδρόλυσης μπορεί να ζυμωθεί προς αιθανόλη από διάφορες ζύμες (π.χ. της οικογένειας *Saccharomyces*) και βακτήρια (π.χ. της οικογένειας *Zygomonas*). Οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν μπορούν να ζυμώσουν τις πεντόζες, υπάρχουν όμως άλλα βακτήρια, όπως *Escherichia coli* και *Klebsiela*, τα οποία μπορούν να ζυμώσουν τόσο τις πεντόζες όσο και τις εξόζες που προέρχονται από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης, με τη διαφορά ότι δεν παράγουν αιθανόλη. Ωστόσο, γίνονται προσπάθειες ανασυνδυασμού των μικροοργανισμών αυτών με την εισαγωγή κατάλληλων γονιδίων (π.χ. αλκοολική δεϋδρογονάση, αποκαρβοξυλάση του πυροβικού) από οργανισμούς που μεταβολίζουν τα σάκχαρα προς αιθανόλη. Παρακάτω φαίνεται συνοπτικά η διαδικασία μετατροπής της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε βιοαιθανόλη (Σχήμα 1.7) (Cheng et al, 2011).



Σχήμα 1.7. Μετατροπή λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε αιθανόλη (Naik et al, 2010)

Το κύριο μειονέκτημα της παραγωγής αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες αποτελεί η δυσκολία πρόσβασης στην κυτταρίνη και τη λιγνίνη λόγω της περίπλοκης δομής της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, η χαμηλή δραστηριότητα των κυτταρινασών, καθώς και οι δυσκολίες της ζύμωσης των πεντοζών από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης προς παραγωγή αιθανόλης.

Η έρευνα για την ανάπτυξη οικονομικά ωφέλιμων τεχνολογιών για την παραγωγή 2^{ης} γενιάς αιθανόλης πρέπει να επικεντρωθεί στα ακόλουθα σημεία:

- Η βελτίωση των πρώτων υλών: τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά μπορούν να μεταλλαχθούν με στόχο τη μείωση του περιεχομένου της λιγνίνης και αύξηση της κυτταρίνης. Κατ' αυτόν τον τρόπο μπορεί να διευκολυνθεί έως και να γίνει προαιρετική η διεργασία της προκατεργασίας των λιγνινοκυτταρινούχων 1^{ων} υλών.
- Η τεχνολογία της προεπεξεργασίας: Οι χρησιμοποιούμενες διεργασίες προκατεργασίας απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες ή πιέσεις αυξάνοντας έτσι το συνολικό κόστος της παραγωγής αιθανόλης. Επομένως, είναι επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη διεργασιών χαμηλών θερμοκρασιών.
- Η μείωση του ενζυμικού κόστους: Αν και το κόστος των κυτταρινασών έχει μειωθεί σημαντικά την τελευταία δεκαετία, είναι ακόμα αρκετά ακριβές σε σχέση με τις αμυλάσες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή 1^{ης} γενιάς αιθανόλης. Μικροοργανισμοί που έχουν μεγάλη απόδοση στην παραγωγή κυτταρινασών καθώς και καινοτόμα ένζυμα που δρουν συνεργιστικά με τις κυτταρινάσες πρέπει να ανακαλυφθούν για την μείωση του ενζυμικού κόστους.
- Η ταυτόχρονη ζύμωση γλυκόζης και ξυλόζης: Τα δύο αυτά σάκχαρα αποτελούν τα προϊόντα από την υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης αντίστοιχα. Η τεχνολογία παραγωγής αιθανόλης από γλυκόζη είναι ήδη αρκετά ανεπτυγμένη εν αντιθέσει με την παραγωγή της ξυλόζης που εμφανίζει αρκετά μεγάλη πολυπλοκότητα. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιούνται προσπάθειες για την ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών (όπως ζύμες και βακτήρια) που μπορεί αποδοτικά να μετατρέψει την γλυκόζη και την ξυλόζη σε αιθανόλη (Cheng et al, 2011).

1.3. 3^{ης} Γενιάς Βιοκαύσιμα

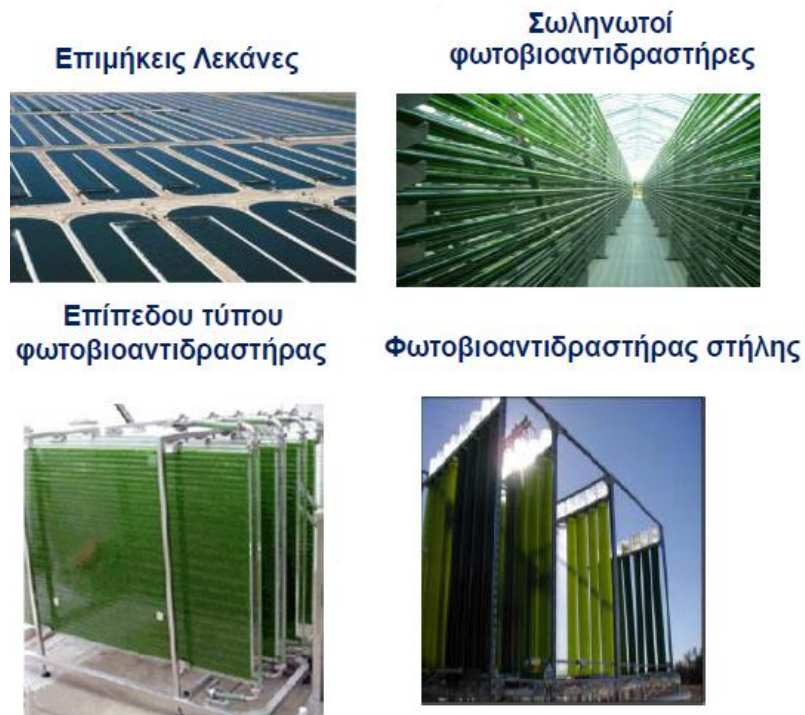
Εφόσον η μετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα απαιτεί εξελιγμένες και ακριβές τεχνολογίες κατά το στάδιο της προεπεξεργασίας της πρώτης ύλης με ειδικά ένζυμα, η παραγωγή 2^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων για εμπορική χρήση δεν είναι ακόμη οικονομικά βιώσιμη. Έτσι, ξεκίνησε η έρευνα για την ανάπτυξη των βιοκαυσίμων 3^{ης} γενιάς. Βιοντήζελ από ζύμες και μύκητες, αλλά και βιοαιθανόλη μέσω απευθείας ζύμωση της κυτταρίνης αποτελούν παραδείγματα τρίτης γενιάς βιοκαυσίμων. Ωστόσο, βασικό στοιχείο αποτελούν τα μικροάλγη, για τα οποία υπάρχει η πεποίθηση ότι αποτελούν μια πραγματικά ανανεώσιμη πηγή για την παραγωγή βιοκαυσίμων, που ξεπερνά τα προβλήματα της 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων (Alam et al, 2012).

Τα μικροάλγη είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί, οι οποίοι απαντώνται στη φύση σε θαλασσινά και γλυκά νερά και βρίσκονται στη βάση της τροφικής αλυσίδας. Θεωρούνται από τους γηραιότερους ζώντες οργανισμούς στον πλανήτη. Υπάρχουν περισσότερα από 300 χιλιάδες είδη μικροαλγών, ξεπερνώντας σε ποικιλότητα αυτή των φυτών. Αναπτύσσονται με εξαιρετικά γοργούς ρυθμούς, 100 φορές πιο γρήγορα από τα χερσαία φυτά και μπορούν να διπλασιάσουν τη βιομάζα τους σε λιγότερο από μια μέρα. Πέραν τούτου, μερικά είδη μικροαλγών έχουν την δυνατότητα να συγκεντρώνουν μεγάλη ποσότητα λιπιδίων μέσα στα κύτταρά τους, στα οποία μπορούν να μετατραπούν σε βιοντήζελ (Alam et al, 2012; Lam et al, 2012).

1.3.1. Παραγωγή 3^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων

Η παραγωγή βιοκαυσίμων από την βιομάζα των μικροαλγών είναι γενικά πιο ακριβή και τεχνολογικά απαιτητική από ότι των κλασσικών καλλιεργειών. Υπάρχουν πολλοί τρόποι για την καλλιέργεια των μικροφυκών, ωστόσο δύο συστήματα καλλιέργειας έχουν βρει ευρεία χρήση: α) το ανοικτό σύστημα (επιμήκεις λεκάνες), και β) το σύστημα του φωτοβιοαντιδραστήρα.

Οι φωτοβιοαντιδραστήρες διαιρούνται σε υποκατηγορίες: α) επίπεδοι φωτοβιοαντιδραστήρες, β) φωτοβιοαντιδραστήρες στηλών και γ) αυλωτοί φωτοβιοαντιδραστήρες. (Alam et al, 2012)



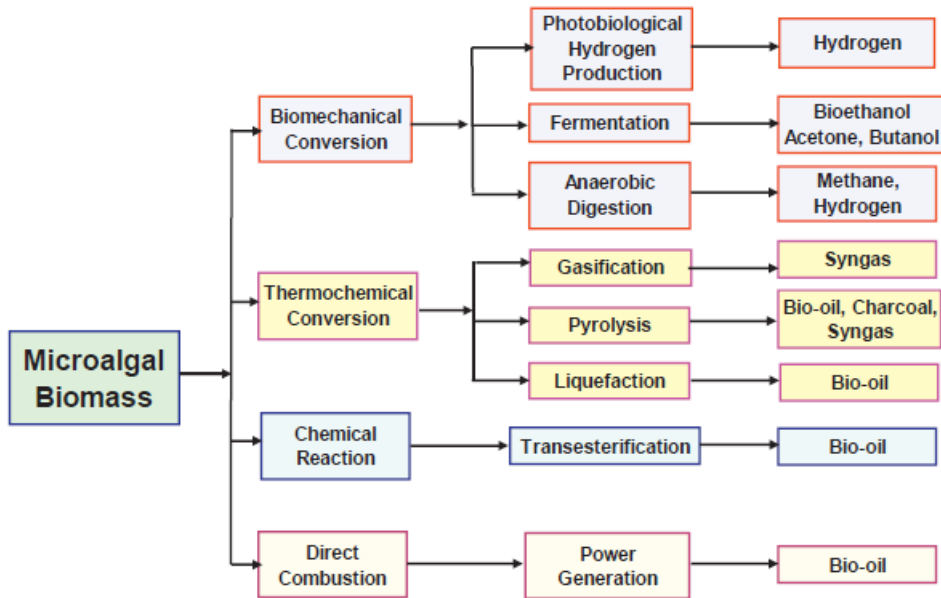
Σχήμα 1.8. Συνήθεις τύποι φωτοβιοαντιδραστήρων για την ανάπτυξη μικροαλγών

Η βιομάζα των μικροφυκών μπορεί να αναπτυχθεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους: 1) φωτοτροφικά: κατά τον οποίο γίνεται χρήση της ηλιακής ενέργειας, του διοξειδίου του άνθρακα ως πηγή άνθρακα, 2) ετεροτροφικά κατά τον οποίο ενέργεια αποκτάται από κάποιο οργανικό υπόστρωμα το οποίο δρα και ως πηγή άνθρακα και 3) μιξοτροφικά: κατά τον οποίο τα μικροάλλα αναπτύσσονται και με τους δυο τρόπους αναλόγως τη συγκέντρωση οργανικού υποστρώματος και την φωτεινότητα.

Έως τώρα, μόνο η φωτοτροφική μέθοδος φαίνεται να είναι τεχνικά και οικονομικά εφικτή σε εμπορική κλίμακα, καθώς η ηλιακή ενέργεια είναι άφθονη στη φύση ενώ το διοξείδιο του άνθρακα μπορεί να προέλθει από καυσαέρια. Παρ' όλα αυτά η μέθοδος έχει τα όριά της, καθώς δεν είναι εφικτή σε χώρες χωρίς επαρκή ετήσια ένταση φωτός.

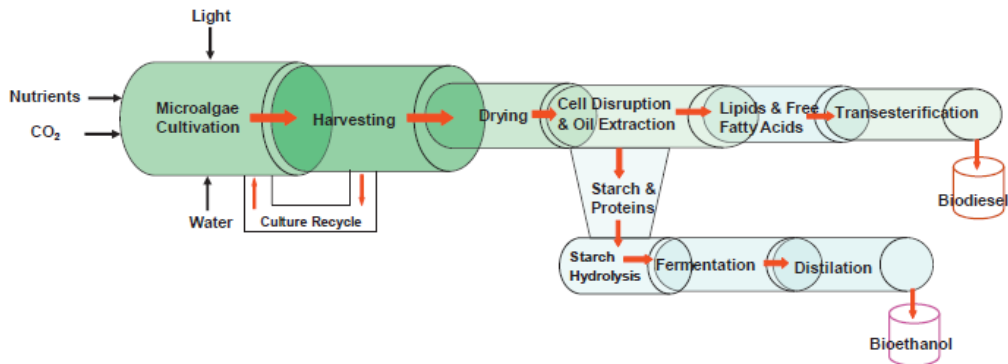
Αν και η ετεροτροφική μέθοδος φαντάζει να λύνει τα προβλήματα της προηγούμενης μεθόδου, στην πραγματικότητα είναι απαγορευτική κυρίως λόγω του υψηλού κόστους του οργανικού υποστρώματος, καθώς επίσης και λόγω μολύνσεων από ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών που ευνοούνται από την ύπαρξη οργανικού υποστρώματος (Lam et al, 2012).

Η βιομάζα που προέρχεται από τα μικροάλλα μπορεί να μετατραπεί σε πηγή ενέργειας με διάφορους τρόπους όπως χημικούς, βιοχημικούς, θερμοχημικούς ή και με άμεση καύση, όπως φαίνεται ακολούθως (Σχήμα 1.9).



Σχήμα 1.9. Διεργασίες παραγωγής βιοκαυσίμων από βιομάζα μικροαλγών (Alam et al, 2012)

Ωστόσο η παραγωγή βιοαιθανόλης και βιοντήζελ έχοντας ως πρώτη ύλη τη βιομάζα των μικροαλγών φαίνεται πως παρουσιάζει το μεγαλύτερο ερευνητικό και εμπορικό ενδιαφέρον. Οι διεργασίες που ακολουθούνται φαίνονται παρακάτω (Σχήμα 1.10).



Σχήμα 1.10. Διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης και βιοντήζελ από μικροάλη (Alam et al, 2012)

Μετά την επιλογή του συστήματος καλλιέργειας, του κατάλληλου στελέχους και των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας (pH, φωτεινότητα, θερμοκρασία, κλπ.) η βιομάζα των μικροαλγών συλλέγεται χρησιμοποιώντας επίπλευση, καθίζηση, φυγοκέντρωση, κροκίδωση ή φιλτράρισμα με μεμβράνες. Κατόπιν, ξηραίνεται υπό κενό για την αφαίρεση της μεγαλύτερης ποσότητας νερού. Η ξηρή πλέον βιομάζα πολτοποιείται πριν την εξαγωγή των λιπιδίων, για την επίτευξη της οποίας χρησιμοποιούνται μηχανικές (π.χ. μηχανικές πρέσες) αλλά και χημικές μέθοδοι όπως η εκχύλιση με κάποιον χημικό διαλύτη αλλά και η υπερκρίσιμη εκχύλιση (Ahmad et al, 2011; Alam et al, 2012).

1.3.1.1. Παραγωγή βιοντήζελ από μικροάλγη

Το βιοντήζελ 3^{ης} γενιάς παράγεται από τα λιπίδια που εξάγονται από τη βιομάζα των μικροαλγών. Τα λιπίδια αυτά μπορούν να αναμιχθούν απευθείας με άλλα πρωτογενή λάδια, να σχηματίσουν μικροσυσσωματώματα, αλλά και να πυρολυθούν προς βιοντήζελ. Ωστόσο, η πιο συνηθισμένη μέθοδος παραγωγής βιοντήζελ είναι η μετεστεροποίηση (αλκοόλυση) των λιπιδίων, η οποία διακρίνεται στην ομογενή μετεστεροποίηση με τη χρήση οξέος ή βάσης και την ετερογενή μετεστεροποίηση με τη χρήση καταλυτών όπως το CaO/Al₂O₃, όπως και στην περίπτωση των ελαιούχων χερσαίων καλλιεργειών (Ahmad et al, 2011). Επιπλέον, η μέθοδος της in situ μετεστεροποίησης εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς η εξαγωγή των λιπιδίων και η μετεστεροποίησή τους γίνονται ταυτόχρονα σε ένα στάδιο, όταν η βιομάζα έρθει σε επαφή με ένα χημικό διαλύτη υπό την παρουσία καταλύτη, απλοποιώντας και μειώνοντας το κόστος της συνολικής διεργασίας. Παρά τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου, η απαίτηση για εκτενή ξήρανση της βιομάζας, λόγω του ότι το νερό έχει παρεμποδιστικά αποτελέσματα κατά την μετεστεροποίηση, αποτελεί ένα μειονέκτημα της μεθόδου. (Ahmad et al, 2011; Lam et al, 2012)

1.3.1.2. Παραγωγή βιοαιθανόλης από μικροάλγη

Η παραγωγή βιοαιθανόλης από τη βιομάζα των μικροαλγών δεν έχει ερευνηθεί αρκετά, καθώς τα μικροφύκη είναι δημοφιλή για την καλή απόδοσή τους στην παραγωγή βιοντήζελ. Παρόλα αυτά, από τη στιγμή που τα κύτταρα των μικροφυκών δεν περιέχουν κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, μπορούν να αποτελέσουν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης, παρακάμπτοντας τα προβλήματα της προεπεξεργασίας της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Ωστόσο, η μεγαλύτερη ποσότητα των ζυμώσιμων υδατανθράκων περιέχεται στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροφυκών με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη κάποια προκατεργασία για την διάρρηξη των κυττάρων ώστε να γίνει εφικτή η ζύμωση των υδατανθράκων. Η προοπτική της ταυτόχρονης παραγωγής βιοντήζελ και βιοαιθανόλης από μικροάλγη φαντάζει ως η πιο βιώσιμη διεργασία για την παραγωγή 3^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων.

1.3.2. Πλεονεκτήματα των μικροαλγών

Τα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας μικροφυκών και οι δυνατότητες που αυτά δίνουν έναντι των φυτικών καλλιεργειών μπορούν να συνοψισθούν στα ακόλουθα:

- η σύνθεση και η συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων ουδέτερων λιπιδίων (20 – 50% του ξηρού βάρους της βιομάζας) συνοδευόμενες από ταχεία ανάπτυξη

- η δυνατότητα για συνεχή παραγωγή, με αποτέλεσμα η απόδοση ελαίων ανά περιοχή των καλλιεργειών μικροφυκών μπορεί να υπερβεί κατά πολύ την απόδοση της πιο καλής καλλιέργειας ελαιούχων σπόρων
- η μειωμένη απαίτηση σε νερό έναντι των χερσαίων καλλιεργειών, με αποτέλεσμα να μην επιβαρύνονται οι υδροφόρες πηγές
- η δυνατότητα ανάπτυξης των μικροφυκών σε εχθρικά προς τις συνηθισμένες καλλιέργειες περιβάλλοντα, όπως σε γλυκό αλλά και σε νερό με υψηλή αλατότητα
- η καλλιέργεια των μικροαλγών δεν απαιτεί τη χρήση ζιζανιοκτόνων και παρασιτοκτόνων
- η αξιοποίηση του CO₂ από τα καυσαέρια που εκπέμπονται από εργοστάσια, που βασίζουν τη λειτουργία τους σε ορυκτά καύσιμα, με αποτέλεσμα την μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου (1,83 kg CO₂ /1 kg ξηρής βιομάζας)
- η παραγωγή της βιομάζας από τα μικροάλγη δεν απαιτεί τη χρήση καλλιεργήσιμης γης, γεγονός που ξεπερνά ένα πολύ κρίσιμο εμπόδιο για την αειφορία των βιοκαυσίμων
- η χρησιμοποίηση για την απομάκρυνση αμμωνιακών, νιτρικών και φωσφορικών συστατικών από υγρά απόβλητα (π.χ. αγροτικά στραγγίσματα, απόβλητα από βιομηχανίες παραγωγής ζωοτροφών, βιομηχανικά και οικιακά απόβλητα)
- η δυνατότητα, ανάλογα με το είδος των μικροαλγών, να εξαχθούν και άλλες ουσίες με βιομηχανικό ενδιαφέρον, όπως καθαρούς διαλύτες, πολυακόρεστα λιπαρά, φυσικές βαφές, πολυσακχαρίτες, χρωστικές, αντιοξειδωτικά, υψηλής αξίας βιοδραστικές ουσίες και πρωτεΐνες (Ahmad et al, 2011; Lam et al, 2012; Alam et al, 2012).

1.3.3. Προβλήματα 3 γενιάς βιοκαυσίμων

Αν και τα βιοκαύσιμα από μικροάλγη (κυρίως το βιοντήζελ, η βιοαιθανόλη και το βιομεθάνιο) προβλέπεται να προσφέρουν σημαντικά στη διαφοροποίηση στον τομέα της ανανεώσιμης ενέργειας, υπάρχει ακόμη ένα μεγάλο ερωτηματικό που περιβάλλει την βιωσιμότητα της βιομηχανίας σε μακροχρόνια βάση. Έως και

σήμερα δεν υπάρχει εργοστάσιο που να παράγει και να επεξεργάζεται εμπορικά βιομάζα μικροαλγών προς βιοκαύσιμα. Το γεγονός αυτό προκαλεί άγνοια πάνω στην συνολική διεργασία παραγωγής βιοκαυσίμων.

Οι περισσότερες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν ότι η παραγωγή βιοκαυσίμων από μικροάλγη αποτελεί μια εξαιρετικά ενεργοβόρο διεργασία. Αυτό γίνεται αντιληπτό από τον δείκτη ενεργητικής αποδοτικότητας, που ορίζεται ως η ενέργεια που αποδίδεται προς την ενέργεια που πρέπει να χορηγηθεί για την παραγωγή ενός προϊόντος. Όταν η τιμή αυτού του δείκτη είναι μεγαλύτερη του 1, τότε υπάρχει καθαρή παραγωγή ενέργειας και αντιστρόφως.

Τα αποτελέσματα των ερευνών έδειξαν πως το βιοντήζελ που προέρχεται από καλλιέργεια ελαιούχων φυτών έχει τιμή του δείκτη EER μεγαλύτερο της μονάδας, ενώ αντιθέτως η παραγωγή του βιοντήζελ που προέρχεται από τα μικροφύκη παρουσιάζει τιμή ίση με 0,07. Τα ποσοτικά αυτά αποτελέσματα δείχνουν πως η καλλιέργεια μικροφυκών μπορεί να μην έχει τα θετικό αλλά ακόμα χειρότερο αντίκτυπο για την βιωσιμότητα της παραγωγής βιοκαυσίμων.

Κατόπιν μελετών, στις οποίες εκτιμήθηκε ο κύκλος ζωής της παραγωγής βιοκαυσίμων από μικροάλγη, 4 ενεργειακά σημεία αναγνωρίστηκαν ως τα πιο ενεργοβόρα:

A. Θρεπτικά υλικά

Η καλλιέργεια μικροαλγών σε βιομηχανική κλίμακα απαιτεί μεγάλες ποσότητες θρεπτικών, συνήθως αζώτου (κυρίως με τη μορφή νιτρικών) και φωσφόρου (κυρίως με τη μορφή ορθο-φωσφορικών). Τα θρεπτικά αυτά προέρχονται κυρίως από την χημικά ή ανόργανα λιπάσματα που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη της επιθυμητής ανάπτυξης βιομάζας. Η χρήση των χημικών λιπασμάτων παρουσιάζει το πλεονέκτημα της μείωσης της μόλυνσης του μέσου της καλλιέργειας και έτσι βοηθά στην επαναχρησιμοποίησή του για την ανακαλλιέργεια των μικροαλγών. Απ' την άλλη μεριά, αναλύσεις κύκλου ζωής έδειξαν πως 50% της συνολικής καταναλισκόμενης ενέργειας και των συνολικών αερίων ρύπων του θερμοκηπίου σχετίζονται με την χρήση χημικών λιπασμάτων. Επιπλέον, αν ληφθεί υπ' όψιν, το γεγονός ότι η καλλιέργεια των μικροαλγών καταναλώνει μεγαλύτερη ποσότητα λιπάσματος από αυτή των χερσαίων καλλιεργειών, συμπεραίνεται πως μακροπρόθεσμα η χρήση αυτών των λιπασμάτων είναι μη βιώσιμη, και μπορεί να οδηγήσει την βιομηχανική παραγωγή των βιοκαυσίμων σε αδιέξοδο.

Η χρήση αποβλήτων για την καλλιέργεια των μικροφυκών φαντάζει σαν μια ελκυστική και οικονομική λύση στο πρόβλημα των θρεπτικών, καθώς τα απόβλητα δευτεροβάθμιας και τριτοβάθμιας επεξεργασίας περιέχουν σημαντικές ποσότητες νιτρικών και φωσφορικών που δεν αφαιρούνται στην βασική επεξεργασία

αποβλήτων. Ωστόσο, η ύπαρξη βακτηρίων και ιών στα απόβλητα και η μεταβαλλόμενη περιεκτικότητα των αποβλήτων σε θρεπτικά, μπορεί να μειώσουν τον ρυθμό ανάπτυξης ή ακόμα και καταστρέψουν τον πληθυσμό των μικροαλγών. Για τους λόγους αυτούς, πρέπει να ερευνηθεί περισσότερο η χρήση αποβλήτων για την καλλιέργεια μικροαλγών.

Β. Σχεδιασμός βιοαντιδραστήρα

Ένα αποδοτικό σύστημα καλλιέργειας θα πρέπει να αποτελείται από: α) επαρκή φωτεινό χώρο, β) βέλτιστη μεταφορά αερίων και υγρών συστατικών (CO₂, νιτρικά, φωσφορικά κ.α.), γ) χαμηλό κίνδυνο μόλυνσης, δ) χαμηλό πάγιο και λειτουργικό κόστος, ε) μικρή απαίτηση σε χώρο. Οι πιο επικρατείς τύποι φωτοβιοαντιδραστήρων είναι οι αυλωτοί, αν και πρέπει να γίνουν αρκετές μετατροπές, ώστε να επικρατούν οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας (καλή ανάμιξη, καλός φωτισμός, μειωμένο ενεργειακό κόστος κ.α.).

Γ. Συλλογή της βιομάζας των μικροαλγών

Οι μέθοδοι του φιλτραρίσματος και της φυγοκέντρησης είναι αρκετά ενεργοβόρες και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανική κλίμακα. Η μέθοδος της κροκίδωσης αποτελεί μια πιο ελκυστική λύση καθώς δεν απαιτεί μεγάλες ποσότητες ενέργειας. Όμως παρουσιάζει μια σειρά από μειονεκτήματα όπως η μεγάλη ποσότητα αντιδραστηρίων που απαιτούνται καθώς και την παραγωγή μεγάλης ποσότητας λάσπης που δημιουργεί πολλά προβλήματα κατά την ξήρανση της βιομάζας μετέπειτα. Άλλες καινοτόμες μέθοδοι έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται όπως είναι η τεχνολογία της ακινητοποίησης (όταν τα κύτταρα φτάσουν σε στατική φάση ανάπτυξης, η βιομάζα παγιδεύεται σε ένα στερεό σώμα που σχηματίζεται με τη βοήθεια ενός πολυμερούς και καθιζάνει, κάνοντας τη συλλογή της πιο εύκολη). Προβλήματα όπως η σταθερότητα του ακινητοποιημένου στρώματος και οι διαρροές μικροοργανισμών από τα ακινητοποιημένα στρώματα, πρέπει να λυθούν προτού αυτές οι μέθοδοι περάσουν σε βιομηχανική κλίμακα.

Δ. Ξήρανση της βιομάζας των μικροαλγών

Η αφαίρεση του νερού από τη βιομάζα αποτελεί πολύ σημαντικό στάδιο κατά την παραγωγή βιοκαυσίμων καθώς το νερό μπορεί να δράσει ως παρεμποδιστής κατά την εξαγωγή των λιπιδίων από τη βιομάζα. Οι τεχνικές που εφαρμόζονται στο στάδιο αυτό είναι η ξήρανση με χρήση ηλιακής ενέργειας, μέθοδος που είναι μεν οικονομική αλλά απαιτεί μεγάλο χρόνο ξήρανσης και δεν είναι εφικτή σε χώρες με περιορισμένη ηλιοφάνεια, και η ξήρανση με θερμότητα που παρέχεται από ορυκτά καύσιμα, κάτι το οποίο δρα αρνητικά στην εμπορική βιωσιμότητα των παραγόμενων βιοκαυσίμων. Μέθοδοι όπως η μερική ή και καθόλου ξήρανση της

βιομάζας με *in situ* μετεστεροποίηση και η υδροθερμική υγροποίηση προσπαθούν να δώσουν λύσεις στα προαναφερθέντα προβλήματα.

Ε. Εξαγωγή λιπιδίων

Η αποτελεσματική εξαγωγή λιπιδίων από τη βιομάζα των μικροαλγών είναι υψίστης σημασίας καθώς έχει μεγάλο αντίκτυπο στο κόστος παραγωγής των βιοκαυσίμων. Λόγω της ανθεκτικότητας του κυτταρικού τοιχώματος των μικροαλγών, δεν είναι αποδοτική η εξαγωγή των λιπιδίων με μηχανική συμπίεση. Για το λόγο αυτό γίνεται η χρήση δύο εναλλακτικών μεθόδων: α) της εκχύλισης με διαλύτες για ξηρή βιομάζα και β) υπερκρίσιμης εκχύλισης για υγρή πάστα βιομάζας. Η πρώτη μέθοδος είναι αυτή που χρησιμοποιείται πιο συχνά, αν και παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα καθώς οι χημικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι πολύ τοξικοί, ενώ προέρχονται και από συμβατικές πηγές ενέργειας. Ο συνδυασμός της εκχύλισης με διεργασίες διατάραξης του κυτταρικού τοιχώματος των μικροαλγών, όπως η χρήση υπερήχων και μικροκυμάτων, μπορεί να κάνει την εξαγωγή των λιπιδίων ακόμη πιο αποδοτική, αν και προσθέτει ενεργειακό κόστος. Η μέθοδος της υπερκρίσιμης εκχύλισης μπορεί να λύσει το πρόβλημα της τοξικότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται κατά την κλασική εκχύλιση (π.χ. μέσω χρήσης CO₂ σε υπερκρίσιμες συνθήκες), εμφανίζοντας όμως μεγάλες διακυμάνσεις κατά την εξαγωγή λιπιδίων ανάλογα με το στέλεχος των μικροαλγών και τις συνθήκες της καλλιέργειας (Lam et al, 2012).

Συνοψίζοντας, υπάρχουν αρκετά εμπόδια τα οποία πρέπει να ξεπεραστούν πριν τα μικροάλγη μπορέσουν να βρουν εμπορική εφαρμογή, ιδιαίτερα με την αβεβαιότητα για το κόστος που αυτή συνεπάγεται. Αναμφίβολα, η έρευνα πάνω στα μικροφύκη είναι ακόμα σε πρωταρχικό στάδιο, καθώς ακόμα δεν είναι ξεκάθαρο ούτε ποιες οικογένειες μικροφυκών, αλλά ούτε και ποιες διεργασίες είναι πιο κατάλληλες για την παραγωγή εμπορικά βιώσιμων βιοκαυσίμων. Μεγάλο εμπόδιο στην εμπορική εκμετάλλευση της βιομάζας από μικροάλγη είναι οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις σε σχέση με τις χερσαίες καλλιέργειες. Τέλος, γίνεται όλο και πιο εμφανής η ανάγκη για παραγωγή βιοντήζελ και βιοαιθανόλης σε συνδυασμό με την παραγωγή χρήσιμων παραπροϊόντων για να θεωρείται βιώσιμο το μέλλον της 3^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων (Lam et al, 2012; Alam et al, 2012).

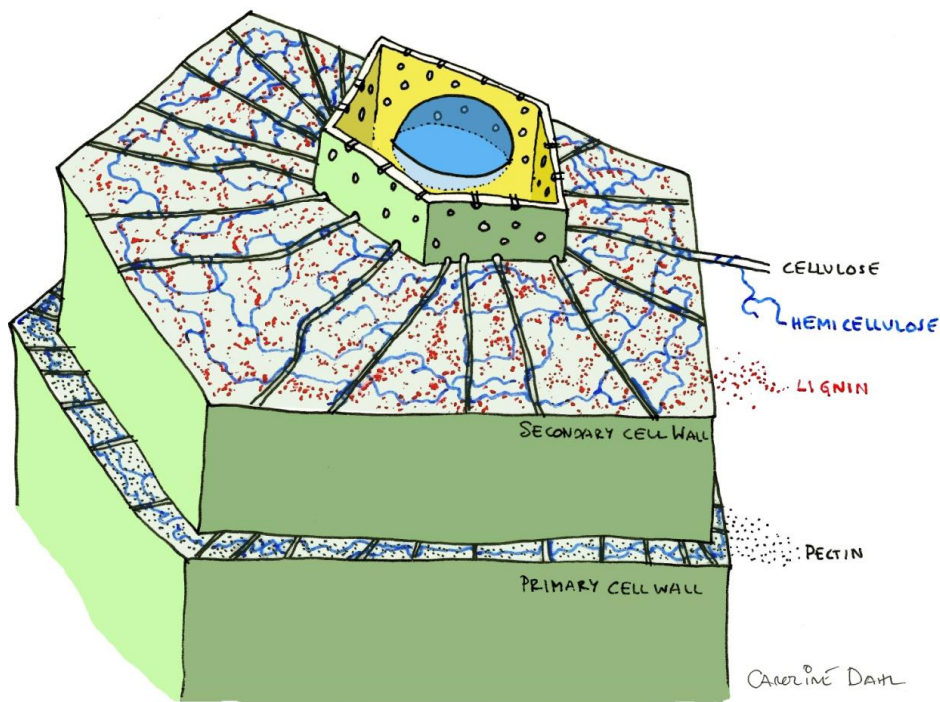
2. Πηγή 2^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων: Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα

2.1. Φυτική λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα

Η λιγνινοκυτταρίνη είναι ένας γενικός όρος που περιγράφει σαν σύνολο τα κύρια συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών, τα οποία φαίνονται ακολούθως:

- Λιγνίνη (20 – 30 %)
- Κυτταρίνη (40 – 50%)
- Ημικυτταρίνη (20 – 40%)

Τα τρία αυτά πολυμερή συνδέονται δημιουργώντας μια ετερογενή μήτρα και η σχετική τους αφθονία ποικίλει ανάλογα στον τύπο της φυτικής βιομάζας. Παραδείγματα αποτελούν τα σκληρά φυλλοβόλα δέντρα ή αγγειόσπερμα (angiosperms hardwood), τα μαλακά αειθαλή δέντρα ή γυμνόσπερμα (gymnosperms softwood) και αγρωστώδη φυτά (π.χ. άχυρο). Εκτός από τα τρία βασικά πολυμερή, μικροσυστατικά της βιομάζας αποτελούν πρωτεΐνες, λιπίδια, πηκτίνη, διαλυτά σάκχαρα και μεταλλικά στοιχεία (Horn et al, 2012; Χρισακόπουλος, 2012).

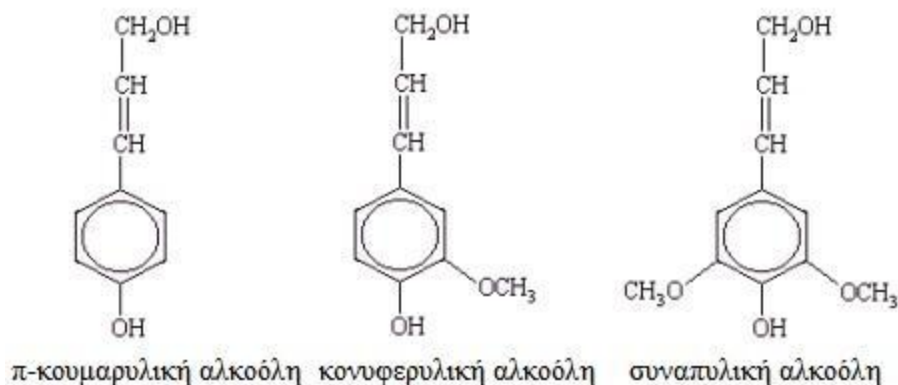


Σχήμα 2.1. Δομή του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος

Το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών αποτελείται κατά κύριο λόγο από μικροϊνίδια κυτταρίνης που ενσωματώνονται μέσα σε μια μάζα από πρωτεΐνες και άλλους πολυσακχαρίτες όπως είναι οι ημικυτταρίνες. Έτσι, δυο γειτονικά νεαρά φυτικά κύτταρα δημιουργούν πρώτα λεπτά σχετικά ευλύγιστα τοιχώματα που αποτελούνται από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Η πηκτίνη ως κολλώδης ουσία, συγκολλά και συγκρατεί τα γειτονικά κύτταρα στη θέση τους. Ορισμένα όμως κύτταρα δημιουργούν ένα δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από λιγνίνη, μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του πρωτογενούς τοιχώματος, που ισχυροποιεί επιπρόσθετα τη μηχανική υποστήριξη του φυτού.

2.1.1. Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα σχετικώς υδρόφοβο και αρωματικό ετερο-πολυμερές αποτελούμενο (Horn et al, 2012) κυρίως από 3 υδροξυκιναμικές αλκοόλες: κωνιφερυλική, σιναπυλική, και π – κουμαρυλική αλκοόλη (Σχήμα 2.2). Τα 3 αυτά συστατικά κατόπιν αφυδρογόνωσης δίνουν το σύνθετο δίκτυο της λιγνίνης. Συνδέεται με ομοιοπολικούς, και μη, δεσμούς με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη ενώ αλληλεπιδρά και με τις πρωτεΐνες του φυτικού τοιχώματος και είναι υπεύθυνη για την σκλήρυνση του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος. Τα ένζυμα που δρουν σε αυτή είναι κυρίως οξειδοαναγωγάσες που παρουσιάζουν συνεργιστική δράση, κάνοντας τη βιομηχανική χρήση τους οικονομικά απρόσιτη. Η έλλειψη μιας απλής μεθόδου για την ενζυματική αποδόμηση της λιγνίνης, επηρεάζει σημαντικά την απόδοση βιοδιεργασιών όπως η παραγωγή βιοκαυσίμων από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες.



Σχήμα 2.2. Αρωματικές αλκοόλες που αποτελούν μονομερή της λιγνίνης

2.1.2. Ημικυτταρίνη

Ο όρος ημικυτταρίνη χρησιμοποιείται για να περιγράψει όλους τους μη κυτταρινούχους πολυσακχαρίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία, τόσο ανάμεσα στα διάφορα είδη φυτών αλλά και μεταξύ των ιστών του ίδιου είδους. Αποτελούν ετερο-πολυμερή (Horn et al, 2012) και παρουσιάζουν υψηλή δομική πολυπλοκότητα, καθώς εμφανίζουν διαφορετικού βαθμού διακλαδώσεις. Όλοι οι ημικυτταρινούχοι πολυσακχαρίτες διαθέτουν ένα σκελετό σακχάρων, πεντοζών και εξοζών, ενωμένων με β – γλυκοζιδικούς δεσμούς, και κατηγοριοποιούνται με βάση το κυριότερο μονομερές σάκχαρο. Παραδείγματα τέτοιων πολυσακχαριτών αποτελούν:

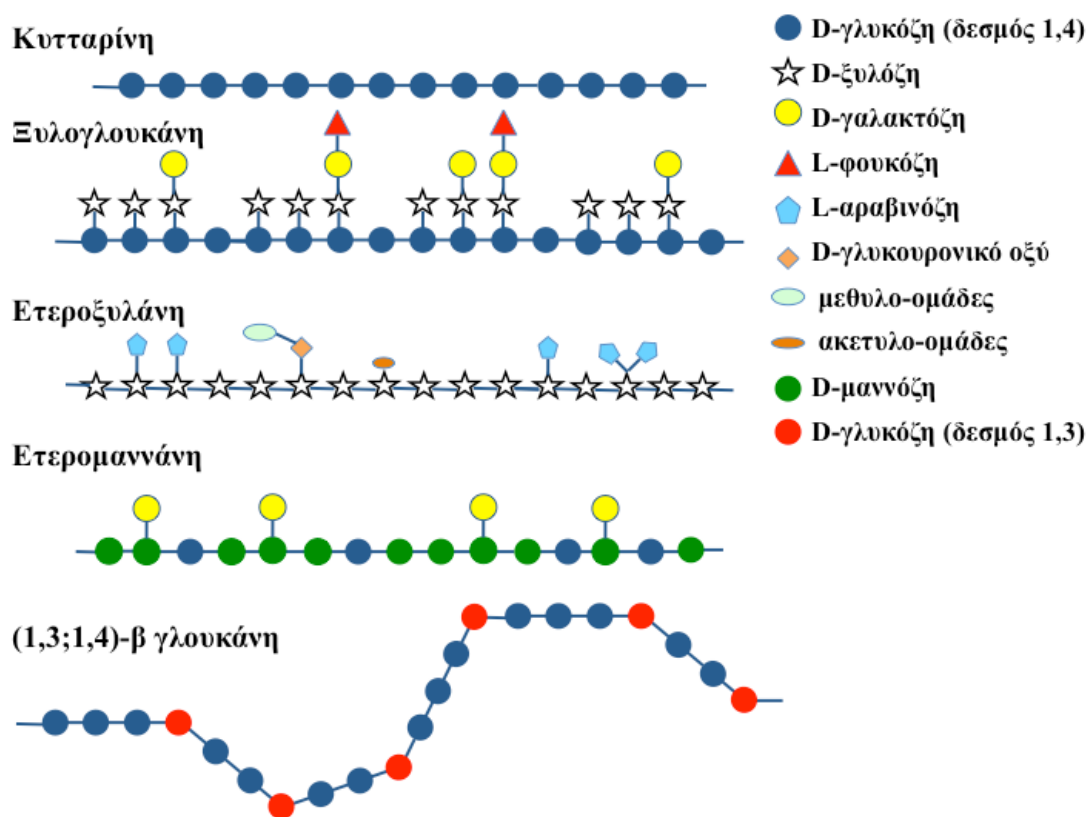
- Οι ξυλάνες, που έχουν ως δομική μονάδα την β – 1,4 – D – ξυλόζη, οι οποίες αποτελούν το κυριότερο συστατικό της ημικυτταρίνης και αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση μετά την κυτταρίνη.
- Οι μαννάνες, που έχουν ως δομική μονάδα την β – 1,4 – D – μαννόζη.
- Οι αραβινάνες που έχουν ως δομική μονάδα την β – 1,4 – L – αραβινόζη.
- Οι γλυκάνες, που έχουν ως δομική μονάδα την β – 1,4 – D – γλυκόζη.
- Οι γαλακτάνες, που έχουν ως δομική μονάδα την β – 1,4 – D – γαλακτόζη.

Στη φύση οι ημικυτταρίνες έχουν μια πολύπλοκη δομή που περιλαμβάνει πάνω από ένα τύπο πολυσακχαριτών, όπως για παράδειγμα:

- Οι ξυλογλουκάνες, που έχουν ως δομική μονάδα την β – 1,4 – D – γλυκόζη και β – 1,4 – D – ξυλόζη.
- Οι γλυκομαννάνες, που η δομή τους αποτελείται από τυχαία εναλλασσόμενες μονάδες β – 1,4 – D – μαννόζης και β – 1,4 – D – γλυκόζης.
- Οι γλυκουρονοξυλάνες, που αποτελούνται από D – ξυλόζη και D – γλυκουρονικό οξύ.

Οι σκελετοί των ημικυτταρινούχων πολυσακχαριτών είναι υποκατεστημένοι με μια ποικιλία σακχάρων και οξικών ομάδων οι οποίοι σχηματίζουν δεσμούς μεταξύ των διαφορετικών αλυσίδων (π.χ. σταυροδεσμούς), γεγονός που εξηγεί τη μη κρυσταλλική φύση της ημικυτταρίνης. Έτσι, για παράδειγμα, οι ξυλάνες, ανάλογα την πηγή από την οποία προέρχονται, εμφανίζουν ως διακλαδώσεις του σκελετού, μονάδες 4- O – μέθυλ – D- γλυκουρονικό οξύ, D- γλυκουρονικό οξύ, L – αραβινοφουρανόζη και ακέτυλο – ομάδες, ενώ οι γλυκομαννάνες έχουν ως υποκαταστάτες α -1,6 – γαλακτόζες.

Οι ημικυτταρίνες είναι ενζυμικά πιο εύκολα αποδομήσιμες απ' ό,τι η κυτταρίνη αλλά μερικές ολιγομερικές δομές είναι ανθεκτικές λόγω πολύπλοκων διακλαδώσεων και μοτίβων ακετυλίωσης. Συχνά, οι δομές αυτές ενισχύουν την ανθεκτικότητα της ημικυτταρίνης ενάντια στην αποδόμησή της. Για το λόγο αυτό στα συνήθη κοκτέιλ των ενζύμων κατά την επεξεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, προστίθενται και ξυλανάσες. Σημαντικό στοιχείο κατά την αποδόμηση της ημικυτταρίνης αποτελεί το γεγονός, ότι προκύπτει ένα μίγμα διαφορετικών σακχάρων, στα οποία περιέχονται και δύσκολα ζυμώσιμες πεντόζες, ενώ αντιθέτως κατά την αποδόμηση της κυτταρίνης παράγεται γλυκόζη η οποία αποτελεί το επιθυμητό ζυμώσιμο προϊόν (Δημαρόγκωνα,2012; Χριστακόπουλος,2012; Horn et al 2012).



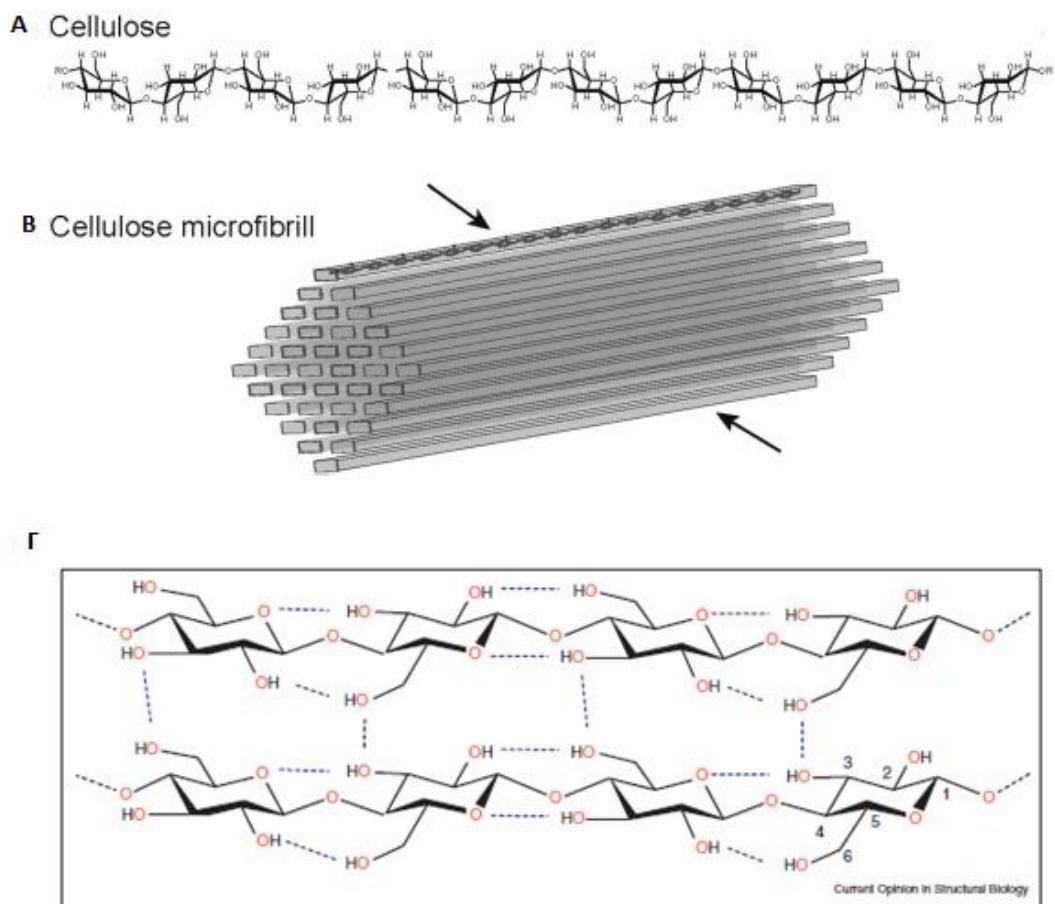
Σχήμα 2.3. Δομές ημικυτταρινών και κυτταρίνης που απαντώνται στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα. Αναδεικνύεται η υψηλή ετερογένεια των ημικυτταρινών εν αντιθέσει με το πολυμερές της κυτταρίνης

2.1.3. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί τα σημαντικότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων και ονομάστηκε έτσι από τον Anselme Payen. Ο Payen τον όρισε ως τον πολυσακχαρίτη που αποτελούσε στοιχειώδη και ομοιόμορφο

συστατικό όλων των φυτικών κυττάρων και έτσι τον ονόμασε cellulose (cell = κύτταρο).

Αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D – γλυκόζης συνδεδεμένων μεταξύ τους με β – 1,4 – γλυκοζιδικό δεσμό. Λόγω του δεσμού αυτού, παρατηρείται μια στροφή των σακχάρων κατά 180° και έτσι ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης έχει ένα εύρος από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης.



Σχήμα 2.4. Α) Δομή μεμονωμένης αλυσίδας κυτταρίνης, Β) Δομή μικροϊνιδίων κυτταρίνης, Γ) Αναπαράσταση του δικτύου των υδρογονικών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων κυτταρίνης.

Τα πολυμερή κυτταρίνης παρουσιάζονται ως διατεταγμένες δομές με τη μορφή μικροϊνιδίων. Τα μικροϊνίδια έχουν διάμετρο 2 – 20 nm και μήκος 100 – 40000 nm, ενώ το καθένα μπορεί να περιέχει μέχρι από 24 έως 36 αλυσίδες κυτταρίνης.

Δεσμοί υδρογόνου, αλλά και αλληλεπιδράσεις τύπου van der Waals, μεταξύ μορίων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας αλλά και μεταξύ γειτονικών αλυσίδων κυτταρίνης διευθετούν τις αλυσίδες σε παράλληλη επίπεδη διάταξη προκαλώντας ταυτόχρονα το σχηματισμό υδρογονικών δεσμών μεταξύ των παράλληλων επιπέδων της κυτταρίνης. Με τον τρόπο αυτό, δημιουργούνται συμπαγείς και δύσκολα αποδομήσιμες κρυσταλλικές περιοχές. Πέραν του κρυσταλλικού μέρους της κυτταρίνης υπάρχουν και άμορφες περιοχές οι οποίες παρεμβάλλονται ανάμεσα στις κρυσταλλικές (Δημαρόγκωνα, 2012; Horn et al 2012). Στη φύση η κυτταρίνη απαντάται με δυο διαφορετικές κρυσταλλικές μορφές:

1. Τρικλινής φάση μίας αλυσίδας (single chain triclinic phase (I α))
2. Μονοκλινής φάση δύο αλυσίδων (two chain monoclinic phase (I β)) (Atalla et al, 1984)

Ενώ κατόπιν προκατεργασίας η κυτταρίνη μπορεί να εμφανίσει κι άλλες κρυσταλλικές δομές (π.χ. II, III και IV)

Η κύρια λειτουργία των πολυμερών της κυτταρίνης είναι να εξασφαλίσουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος, κάτι το οποίο οφείλεται ακριβώς στην κρυσταλλική δομή της κυτταρίνης.

Χαρακτηριστικό της κυτταρίνης είναι η ανθεκτικότητά της κατά την ενζυματική αποικοδόμηση της βιομάζας, γεγονός που έχει οδηγήσει στην αποτυχία όποια προσπάθεια έχει γίνει για χρήση της βιομάζας ως αειφόρο πηγή βιοκαυσίμων. Ωστόσο, ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματά της, έναντι οποιουδήποτε άλλου συστατικού της βιομάζας, είναι η ομοιογένειά της, καθώς κατά την αποικοδόμησή της αποδίδει ως μοναδικό προϊόν καθαρή γλυκόζη. Η γλυκόζη αποτελεί το πιο εύκολα ζυμώσιμο σάκχαρο, με αποτέλεσμα η αποικοδόμηση της κυτταρίνης να είναι σημαίνουσα σημασία για τα μελλοντικά βιοδιυλιστήρια (Δημαρόγκωνα, 2012; Horn et al, 2012; Hemsworth et al, 2013).

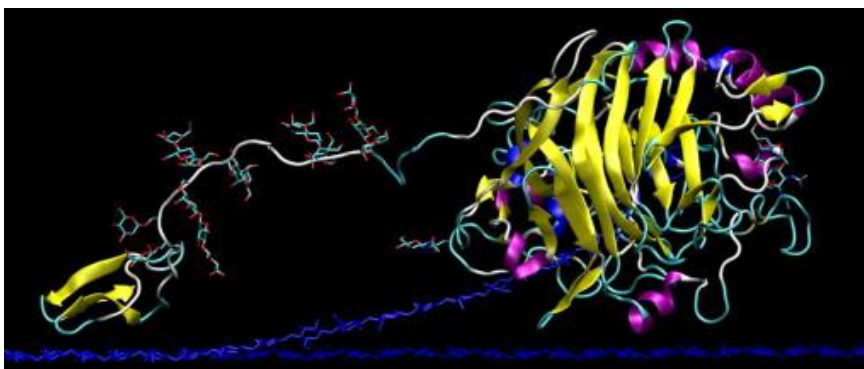
2.2. Ενζυματική αποικοδόμηση της κυτταρίνης

Η κλασική άποψη για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης περιλαμβάνει τρεις κατηγορίες ενζύμων τα οποία εμφανίζουν συνεργιστική δράση. Οι κατηγορίες αυτές είναι οι ακόλουθες:

- I. Οι ένδο - 1,4 - β - γλουκανάσες, οι οποίες διασπούν τυχαία εσωτερικούς 1,4 - β - D - γλυκοζιδικούς δεσμούς στην αλυσίδα της κυτταρίνης. Αυτά τα ένζυμα μπορούν να έχουν διαδοχική ή μη δράση. Κατά την διαδοχική δράση η σύνδεση υποστρώματος - ενεργού κέντρου ακολουθείται από μερικά συνεχόμενα κοψίματα σε μια αλυσίδα κυτταρίνης που διέρχεται μέσω του ενεργού κέντρου.

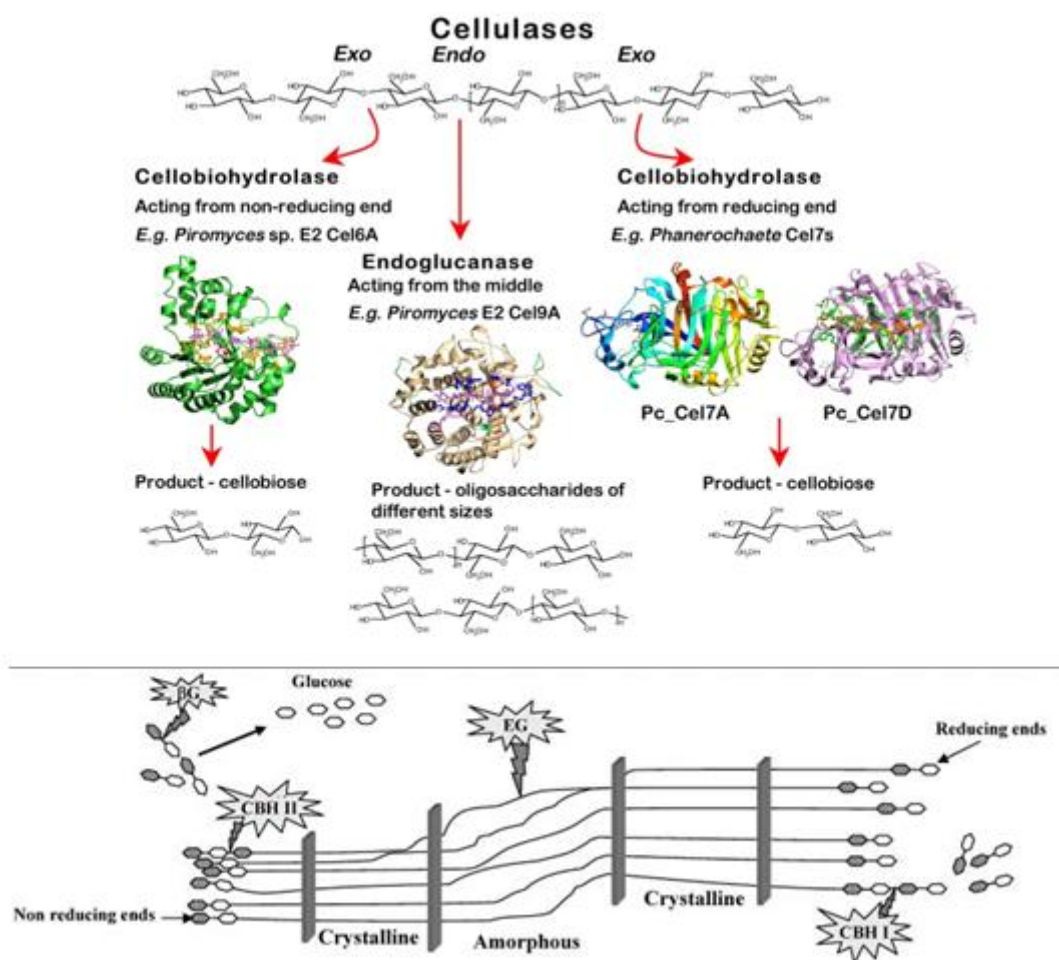
- II. Οι έξω – 1,4 – β – γλουκανάσες, οι οποίες επιτίθενται είτε στο αναγωγικό είτε στο μη αναγωγικό άκρο του πολυμερούς της κυτταρίνης, απελευθερώνοντας μόρια κελλοβιόζης. Τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας που εμφανίζουν διαδοχική δράση αναφέρονται ως κελλοβιουδρολάσες, και είναι τα πιο ευρέως διαδεδομένα στα μίγματα ενζύμων για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης που απαντώνται τόσο στη φύση όσο και στη βιομηχανία.
- III. Γ) Οι β – γλυκοζιδάσες, οι οποίες διασπούν τον δισακχαρίτη κελλοβιόζη, ο οποίος αποτελεί το κύριο προϊόν της δράσης των έξω- και των ένδο-γλουκανασών, σε μονάδες γλυκόζης.

Τα ένζυμα αυτά δρουν συνεργιστικά καθώς τα ενδο – δραστικά ένζυμα επιτίθενται στις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης και απελευθερώνουν συνεχώς τόσο αναγωγικά όσο και μη αναγωγικά άκρα για τα έξω – δραστικά ένζυμα, τα οποία απελευθερώνουν μόρια κελλοβιόζης. Αυτά με τη σειρά τους μετατρέπονται από τις β – γλυκοζιδάσες σε γλυκόζη. Είναι σημαντικό να επισημανθεί, ότι στα φυσικά κυτταρολυτικά ενζυμικά συστήματα περιλαμβάνονται διάφορα ένζυμα τόσο με εξωτερική όσο και με εσωτερική δράση τα οποία μπορεί να έχουν διαφορετική συνάφεια στις διάφορες μορφές της κυτταρίνης (πχ άμορφες ή κρυσταλλικές περιοχές, συγκεκριμένες κρυσταλλικές δομές κτλ). Η διαφοροποίηση στη συνάφεια για τις διάφορες μορφές της κυτταρίνης μπορεί εν μέρει να είναι συνέπεια της ύπαρξης διαφόρων μονάδων πρόσδεσης υδατανθράκων (Carbohydrate Binding Modules, CBMs), οι οποίες είναι συνδεδεμένες ομοιοπολικά στο καταλυτικό κέντρο των ενζύμων (Χριστακόπουλος, 2012; Horn et al, 2012).



Σχήμα 2.5. Τρισδιάστατη αναπαράσταση μιας β – 1,4 – ενδογλουκανάσης που δρα πάνω στη κυτταρίνη. Φαίνεται ξεκάθαρα ο καταλυτικός τομέας της πρωτεΐνης, καθώς επίσης και η μονάδα πρόσδεσης στην κυτταρίνη (CBM) και το πεπτιδίο σύνδεσης (linker peptide) που τις ενώνει.

Όλα αυτά τα ένζυμα ονομάζονται γλυκοζιδικές υδρολάσες (glycoside hydrolases, GH) διότι διασπούν τους γλυκοζιδικούς δεσμούς με την προσθήκη ενός μορίου νερού στο ανωμερικό κέντρο διαφόρων ολιγο- και πολυσακχαριτών (Davies G. et al, 1995). Για να συμβεί η υδρόλυση, οι αλυσίδες πρέπει να απομονωθούν από την κρυσταλλική επιφάνεια της κυτταρίνης και να οδηγηθούν σε μια σήραγγα ή σχισμή, ανάλογα τη δομή του ενζύμου, όπου βρίσκεται το καταλυτικό κέντρο του εκάστοτε ενζύμου. Τα εμπορικά μίγματα κυτταρινασών είναι βασισμένα κυρίως στο κυτταρολυτικό ενζυμικό μίγμα, που παράγεται από το μικροοργανισμό *Hypocrea jecorina* και κυριαρχείται από κελλοβιουδρολάσες (έως και 80% των πρωτεϊνών) (Horn et al, 2012).



Σχήμα 2.6. (Πάνω) Είδη των κυτταρινασών, τρόπος δράσης και προϊόντα. (Κάτω) Κλασική άποψη αποδόμησης της κυτταρίνης, με τη συνεργιστική δράση κυτταρινασών και β - γλυκοζιδάσης.

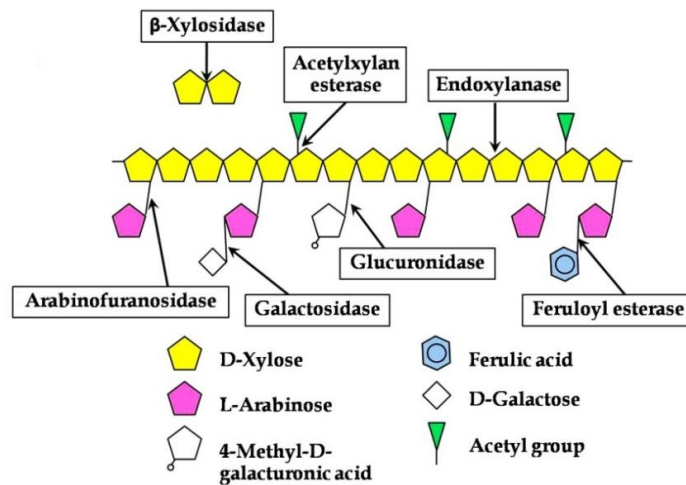
2.3 Ενζυματική αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης

Ένα μεγάλο ποσοστό από τις διαθέσιμες λιγνινοκυτταρινούχες πηγές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αιθανόλης περιέχουν ένα σημαντικό ποσό ημικυτταρίνης. Όταν η ημικυτταρίνη χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αιθανόλης, τότε η απόδοση μπορεί να αυξηθεί μέχρι και 80%. Η πλήρης ενζυμική υδρόλυση των ημικυτταρινών απαιτεί μια μεγάλη ποικιλία ενζύμων τα οποία δρουν συνεργιστικά, όπως και στην αποδόμηση της κυτταρίνης. Τα κυριότερα ένζυμα που αποτελούν το σύστημα αυτό είναι:

- I. Ξυλανάσες: Η βιοαποικοδόμηση της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης επιτυγχάνεται με τη δράση ενδοξυλανασών, οι οποίες διασπούν την αλυσίδα της ξυλάνης σε μικρότερους ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι μπορούν με τη σειρά τους να αποικοδομηθούν περαιτέρω σε ξυλόζη από τις β – ξυλοσιδάσες. Οι κυριότερες οικογένειες ξυλανασών είναι οι 10 και 11, τα μέλη των οποίων παρουσιάζουν μεγάλες δομικές και άρα λειτουργικές διαφορές. Η πρώτη οικογένεια παρουσιάζει μικρότερη παρεμπόδιση στο καταλυτικό της κέντρο κάτι που ισοδυναμεί σε μικρότερη εξειδίκευση και μεγαλύτερη καταλυτική προσαρμοστικότητα. Αντιθέτως η οικογένεια 11 περιλαμβάνει μικρές πρωτεΐνες, το καταλυτικό κέντρο των οποίων βρίσκεται σε μια σχισμή που μπορεί να χωρέσει μόνο μια αλυσίδα ξυλανοπυρανοζών, μήκους 5 – 7 μονομερών.
- II. α – L – Αραβινοφουρανοσιδάσες: Τα ένζυμα αυτά υδρολύουν τις πλευρικές μονάδες L – αραβινόζης, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με α – L – 1,2 , α – L – 1,3 , α – L – 1,5 δεσμούς με μονάδες ξυλοπυρανόζης διάφορων ολιγο – και πολυσακχαριτών ξυλάνης.
- III. α – Γλυκουρονοζιδάζες: Αυτή η κατηγορία ενζύμων απομακρύνουν μονάδες γλυκουρονικού οξέος και των αντίστοιχων 4 – μέθυλο αιθέρων τους από την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης.
- IV. Ακέτυλο- εστεράσες: Είναι υπεύθυνες για την απελευθέρωση ακέτυλο ομάδων, υποκαταστατών της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης.
- V. Εστεράσες του φερουλικού και π – κουμαρικού οξέος: Αποτελούν υποομάδα των καρβοξυλ-εστερασών, οι οποίες υδρολύουν τον εστερικό δεσμό μεταξύ υδρόξυ - κινναμικών οξέων (φερουλικό ή π – κουμαρικό) ή διϋδρο-διμερών μορφών του φερουλικού οξέος και των κύριων πολυμερών αλυσίδων της

ξυλάνης. Η δράση αυτή των εστερασών διευκολύνει την πρόσβαση των γλυκοζυλ – υδρολασών στους κύριους πολυσακχαρίτες, και έτσι δρουν συνεργιστικά με τις ξυλανάσες και τις κυτταρινάσες για την αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών.

Ο κύριος συνεργιστικός τρόπος δράσης των ξυλανολυτικών ενζύμων είναι η απελευθέρωση των υποκαταστατών της κύριας αλυσίδας όπως μονάδες φερουλικού οξέος και L – αραβινόζης από μια ομάδα ενζύμων και η διάσπαση της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης από κάποια άλλα ένζυμα. Τέλος, μέσω της συνεργασίας αυτής ενισχύεται η δράση βοηθητικών ενζύμων για την δράση των οποίων είναι απαραίτητη η υδρόλυση της κύριας αλυσίδας (Χριστακόπουλος, 2012).



Σχήμα 2.7. Ένζυμα που παίρνουν μέρος στην αποδόμηση της ημικυτταρίνης

3. Καινοτόμες δράσεις αποικοδόμησης λιγνινοκυτταρινούχων υλικών

Παρά την συνεργιστική δράση που παρουσιάζεται από τους προαναφερθέντες βιοκαταλύτες η εντυπωσιακή κυτταρολυτική ικανότητα διαφόρων μικροοργανισμών στη φύση δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά σε αυτόν τον ενδο-έξω μηχανισμό δράσης. Η υψηλή κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και η στενή σχέση της με άλλους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος καθιστούν την εξαγωγή και την επεξεργασία της ενεργειακά απαιτητική. Από καιρό υπάρχει η υποψία ότι τα συστήματα απελευθερώνουν μικρού μοριακού βάρους οξειδωτικά τα οποία επιτίθενται τυχαία στα υποστρώματα μέσω χημικών αντιδράσεων τύπου Fenton, δρώντας σε συνεργασία με τις κλασσικές κυτταρινάσες. Σε αυτά περιλαμβάνονται, ο οξειδοαναγωγικός κύκλος της κινόνης και η βασισμένη σε γλυκό-πεπτίδια Fenton αντίδραση. Η παρουσία μη υδρολυτικού παράγοντα, ο οποίος μειώνει την αντίσταση της βιομάζας σε ενζυματική προσβολή έχει επίσης προταθεί. Η υδρόλυση της κυτταρίνης έχει αποδοθεί στην συνεργιστική δράση δύο συστατικών: το πρώτο διογκώνει και διασπά την κυτταρίνη και το δεύτερο παρουσιάζει την δράση ενδογλουκανάσης (Dimarogona et al, 2013; Arantes et al, 2010).

Διάφορα ένζυμα έχουν προταθεί για τη διάρρηξη της κυτταρίνης υψηλής κρυσταλλικότητας, όπως μονάδες πρόσδεσης υδατανθράκων (CBMs), εκτασίνες και παρεμφερή σε αυτές ένζυμα (swollenins). Ωστόσο παρά τα πολλά χρόνια έρευνας, η φύση των ενζύμων αυτών και ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους, που κάνει την λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα ενζυματικά αποδομήσιμη παραμένουν δυσδιάκριτα. Προσφάτως καταγράφηκε ότι κάποιες πρωτεΐνες μυκητιακής προέλευσης, συνέβαλλαν σε ενισχυμένη κυτταρολυτική δράση, όταν συνδυάστηκαν με κοινές κυτταρινάσες (Merino et al , 2007).

3.1. Ιστορική ανασκόπηση των οικογενειών GH61 και CBM33

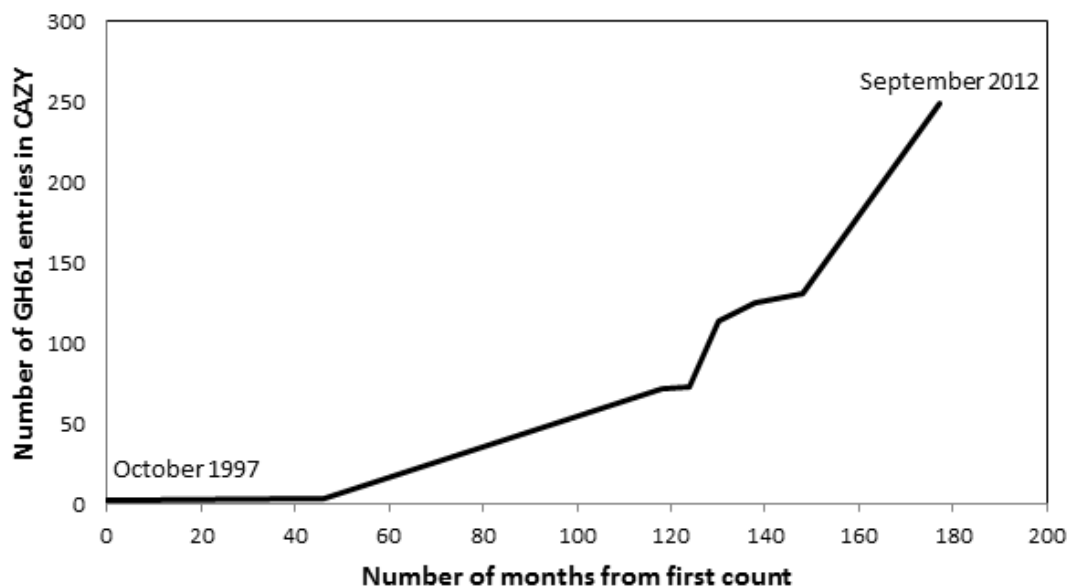
Από το 1950, ο Reese και οι συνεργάτες του πρότειναν πως η υδρόλυση της κυτταρίνης απαιτεί ένα στοιχείο χωρίς υδρολυτική δράση, το οποίο θα μπορούσε να διαταράξει την δομή του πολυμερούς, διευκολύνοντας έτσι την πρόσβαση στα υδρολυτικά ένζυμα. (Reese E.T. et al, 1950). Τα ένζυμα τα οποία φαίνεται πως ρίχνουν φως στην υπόθεση αυτή ανήκουν στις πρώην οικογένειες GH61 και CB33 της βάσης δεδομένων CAZy (Carbohydrate Active enZymes)

3.1.1. Η οικογένεια GH61

Η οικογένεια GH61 (πρόσφατα ανακατηγοριοποιημένη ως AA9) περιλαμβάνει περίπου 270 μέλη, και είναι ευρέως διαδεδομένη στο γονιδίωμα των μυκήτων (ασκομυκήτων και βασιδιομυκήτων (λευκής και καστανής σήψης)). (Dimarogona et al, 2013) Η πρώτη GH61 πρωτεΐνη που μελετήθηκε ήταν η Cel1 του *Agaricus bisporus*, η αλληλουχία της οποίας περιγράφηκε το 1992 μετά από κλωνοποίηση του γονιδίου. Αν και δεν μπόρεσε να ανιχνευθεί καθόλου δραστικότητα, η πρωτεΐνη εκφράστηκε κατά την ανάπτυξη σε κυτταρίνη, και λόγω της ομοιότητας της αλληλουχίας με αυτή μια τυπικής μονάδας πρόσδεσης στην κυτταρίνη, συμπεριλήφθηκε στα ένζυμα που εμφανίζουν κυτταρινολυτική δράση (Raguz et al, 1992).

Για μεγάλο χρονικό διάστημα, η μοναδική καταγεγραμμένη καταλυτική δράση των GH61 ήταν η ασθενής δράση τους ως ενδογλουκανάσες, η οποία δεν θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ο κύριος ρόλος τους in vivo (Dimarogona et al, 2013). Για παράδειγμα, η Cel61A (*Trichoderma reesei*), παρουσίασε κάποια δραστικότητα σε κυτταρινούχα υποστρώματα, αλλά 5 με 6 φορές μικρότερη σε σχέση με αυτή των συμβατικών κυτταρινασών (π.χ. Cel7B) (Karlsson et al, 2001). Η οικογένεια GH61 δημιουργήθηκε για πρώτη φορά το 1997 (Henrissat et al, 1997), και στο ακόλουθο διάγραμμα φαίνεται η προσθήκη νέων δεδομένων στην CAZY για αυτήν.

Growth of GH61 family in CAZY with time



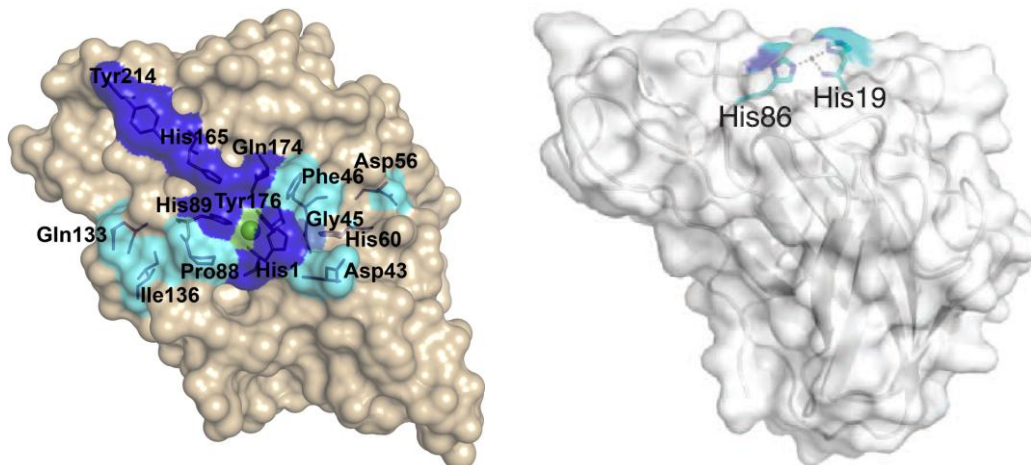
Σχήμα 3.1. Στο διάγραμμα φαίνεται η προσθήκη νέων μελών στην οικογένεια GH61 της CAZY από τότε που αυτή δημιουργήθηκε. (Lo Leggio et al, 2012)

Η χαμηλή δραστικότητα μπορεί να εξηγηθεί από την έλλειψη απαραίτητων συμπαραγόντων, οι οποίοι παρέμεναν άγνωστοι εκείνη την περίοδο – και από την τεχνική ανίχνευσης προϊόντων. Ωστόσο, η ταυτοποίηση μελών της οικογενείας

GH61 σε κυτταρολυτικούς μικροοργανισμούς όπως *Trichoderma reesei*, *Neurospora crassa* και το είδος *Aspergilli*, μαζί με την ταυτόχρονη επαγωγή κλασικών κυτταρινασών κατά την ανάπτυξη στην κυτταρίνη, υπέδειξαν την συμμετοχή της οικογένειας GH61 στην αποδόμηση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (Raguz et al, 1997; Wymelenberg et al, 2002). Πιο συγκεκριμένα, τρεις πρωτεΐνες GH61 του μικροοργανισμού *Thielavia terrestris* αναγνωρίστηκαν ως ενισχυτικοί παράγοντες των κυτταρινασών και ένα γονίδιο GH61 του *Thermoascus aurantiacus* εισήχθη στο γονιδίωμα του *Trichoderma reesei*, ο οποίος αποτελεί συνήθη παραγωγό κυτταρινασών για την παραλαβή ενός στελέχους με βελτιωμένη κυτταρολυτική απόδοση. Το ενισχυτικό φαινόμενο της δράσης των κυτταρινασών εξαρτάται από την ύπαρξη μεταλλικών ιόντων και εξαλείφεται όταν το μίγμα κυτταρινασών/GH61 χρησιμοποιείται σε υπόστρωμα που αποτελείται μόνο από κυτταρίνη (Harris et al, 2010). Η συνεργιστική δράση διαπιστώθηκε και στην *StCel61* του *Myceliophthora thermophila* (γνωστός και ως *Sporotrichum thermophile*) και συσχετίστηκε με την περιεχόμενη λιγνίνη και την αντιοξειδωτική δράση μιας σειράς λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων (Dimarogona et al, 2012b; Cannella et al, 2012).

Το πρώτο επαναστατικό βήμα για την κατανόηση της λειτουργίας των GH61 σε μοριακό επίπεδο έγινε με την επίλυση της δομής 2 μελών, το 2008. Αν και τα δύο ένζυμα εμφανίζουν μόνο 29% ομοιότητα στην αλληλουχία, έχουν κοινά πολύ σημαντικά δομικά χαρακτηριστικά. Η πρώτη δημοσίευση αποκάλυψε την τρισδιάστατη δομή της Cel61B της *H. jecorina* (*T. reesei*), με βάση την οποία οι ερευνητές κατέληξαν ότι είναι απίθανο να αποτελεί μια γλυκοζιδική υδρολάση (Glycoside Hydrolase, GH), καθώς λείπουν τα συντηρημένα καρβοξυλικά αμινοξέα, τα οποία είναι απαραίτητα για την κλασική υδρόλυση από τις κυτταρινάσες (Welner et al, 2008; Karkehabadi et al, 2008).

Οι Harris et al πέρα από τη λύση της δομής της GH61E του *Thielavia terrestris*, παρουσίασαν και την πρώτη μέθοδο εκτίμησης της δραστηριότητας των ενζύμων αυτών. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή η δραστηριότητα μετράται αναλογικά με τη ενισχυτική επίδραση που έχουν οι GH61 στη δράση των συμβατικών κυτταρινασών. Η καθιέρωση μιας μεθόδου μέτρησης ενεργότητας, ακόμα και αν αυτή έχει έμμεσο χαρακτήρα, ήταν πολύ σημαντική για την συσχέτιση της πρωτεϊνικής δομής με την αποδόμηση της κυτταρίνης. Η απόδειξη της ενισχυτικής επίδρασης των GH61 στη δράση των κυτταρινασών δικαιολόγησε βιολογικά τη συνύπαρξη και την συν-έκφραση των ενζύμων αυτών (Harris et al, 2010; Lo Leggio et al, 2012).



Σχήμα 3.2. (Αριστερά) Η δομή της Cel61 B του μικροοργανισμού *Hypocrea jecorina*. Οι περιοχές με διαφορετική χρώση (μπλε) δείχνουν τις συντηρημένες περιοχές που απαντώνται και στις υπόλοιπες GH61 (Karkehabadi et al, 2008). (Δεξιά) Η δομή της GH61E *Thielavia terrestris*, στην οποία φαίνονται οι συντηρημένες ιστοδίνες. (Harris et al, 2010)

Οι Quinlan et al έδειξαν πως η GH61 του *Thermoascus aurantiacus* απαιτεί την ύπαρξη ενός αναγωγικού παράγοντα, όπως το γαλλικό και το ασκορβικό οξύ, για την αποδόμηση της κρυσταλλικής κυτταρίνης και ότι η συνεργιστική δράση ανάμεσα στις κλασσικές κυτταρινάσες και την TαGH61 υποδεικνύει την ύπαρξη ενός μηχανισμού δράσης των GH61 ανεξάρτητο από αυτών των κλασσικών κυτταρινασών. Τα δύο αυτά συμπεράσματα οδήγησαν στην γενικότερη πρόταση, ότι τα ένζυμα αυτά καταλύουν το άμεσο σπάσιμο των γλυκοζιδικών δεσμών της κυτταρίνης, εκθέτοντας την στη δράση των κυτταρινασών, και ότι ο μηχανισμός δράσης των GH61 προσομοιώνεται καλύτερα με αυτόν των οξειδοαναγωγασών παρά των γλυκοζιδικών υδρολασών.

Πέραν του διαλυτού οξειδοαναγωγικού παράγοντα, τα ένζυμα αυτά απαιτούν την ύπαρξη ενός μεταλλικού ιόντος για να μεγιστοποιήσουν την δράση τους. Για τον καθορισμό της ταυτότητας και του ρόλου του ιόντος αυτού, κατόπιν πειραμάτων με διάφορα ιόντα (Ca, Mg, Co, Ni, Zn) διαπιστώθηκε πως τα ιόντα του δισθενούς χαλκού (Cu^{+2}) είναι αυτά που δένονται ισχυρά με την πρωτεΐνη, και μάλιστα σε στοιχειομετρία 1:1. Μάλιστα, η πρόσδεση του χαλκού στην πρωτεΐνη ήταν τόσο έντονη που δεν ήταν δυνατός ο ακριβής καθορισμός της σταθεράς διάστασης. Κατόπιν μελετών EPR (electron paramagnetic resonance spectroscopy) αποδείχθηκε πως πρόκειται για χαλκό τύπου II, παρουσιάζοντας μεγάλη ομοιότητα με τον χαλκό τύπου II, που απαντάται στις οξυγενάσες χαλκού (Quinlan et al, 2011).

Ταυτόχρονα, αποδείχθηκε πως ότι ο συνδυασμός των GH61 με τις δεϋδρογονάσες της κελλοβιόζης (CDH) από τον ίδιο ή διαφορετικούς οργανισμούς μπορεί να

αποδομήσει υψηλής κρυσταλλικότητας υπόστρωμα χωρίς την προσθήκη κάποιου αναγωγικού παράγοντα (Langston et al, 2012). Αργότερα το 2011, μελέτες επιβεβαίωσαν πως οι GH61 αποτελούν μεταλλοένζυμα που δρουν πάνω στην κυτταρίνη, ενώ γενετικά και βιοχημικά πειράματα πρότειναν ότι ανηγμένες CDH ίσως ανάγουν τον Cu (II) σε Cu (I) κατά την δράση των GH61 (Westereng et al, 2011; Phillips et al, 2011).

Ένας μηχανισμός δράσης, που έχει προταθεί για τα ένζυμα αυτά, έχει ως αποτέλεσμα την εισαγωγή ενός οξυγόνου στους δεσμούς C-H της κυτταρίνης που είναι προσκείμενοι στο γλυκοζιδικό δεσμό. Το υδροξυλιωμένο προϊόν είναι ασταθές με αποτέλεσμα την αποσύνθεση του γλυκοζιδικού δεσμού προκαλώντας σπάσιμο της αλυσίδας του πολυμερούς (Beeson et al, 2012; Phillips et al, 2011). Για το λόγο αυτό προτάθηκε η μετονομασία τους σε πολυσακχαρικές μονοοξυγενάσες (PMOs), ή πολυσακχαρολυτικές μονοοξυγενάσες (LPMOs), ονομασίες που έχουν γίνει αποδεκτές από την επιστημονική κοινότητα και χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως. Μετά την ανακάλυψη της καινοτόμου λειτουργίας των ενζύμων αυτών, μια νέα κλάση οξειδαναγωγικών ενζύμων δημιουργήθηκε στην βάση δεδομένων της CAZy, με την ονομασία “βοηθητικές λειτουργίες” (Auxiliary Activities, AA). Έτσι, οι GH61 και CBM33 ανακατατάχθηκαν στις οικογένειες AA9 και AA10 αντίστοιχα (Levasseur et al, 2013).

Εντυπωσιακό είναι το γεγονός, ότι η αλληλουχική και φυλογενετική ποικιλότητα των PMO που απαντώνται στους μύκητες είναι αρκετά μεγάλη. Για παράδειγμα, το γονιδίωμα πολλών κυτταρολυτικών μυκήτων κωδικοποιεί περισσότερες PMOs απ’ ότι κυτταρινάσες, υποστηρίζοντας την άποψη ότι η οξειδωτική διάσπαση της κυτταρίνης αποτελεί σημαντική συνεισφορά στην αποδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης (Dimarogona et al, 2013).

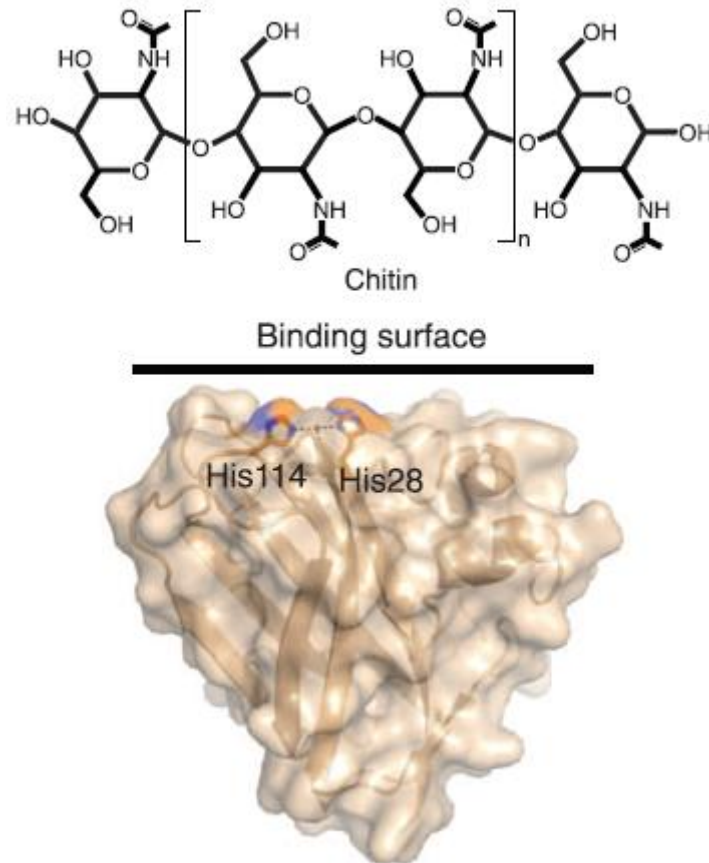
Συγκρίσεις σε δομικό και επίπεδο αλληλουχίας, αποκαλύπτουν επίσης ποικιλότητα και στην θέση πρόσδεσης υποστρωμάτων, βοηθώντας στην προσπάθεια αναγνώρισης των υποστρωμάτων των PMOs. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευθεί καθώς η κυτταρίνη από μόνη της παρουσιάζει μεγάλο δομικό πολυμορφισμό συμπεριλαμβανομένου διάφορων κρυσταλλικών δομών και πεπλεγμένων μικροϊνιδίων, οι οποίες οδηγούν σε διαφοροποιημένες κυτταρινικές επιφάνειες που βρίσκονται εκτεθειμένες στο κυτταρικό τοίχωμα (Li et al, 2012).

3.1.2. Η οικογένεια CBM33

Η κατηγορία μονάδων πρόσδεσης σε πολυσακχαρίτες 33 της CAZy (CBM33), η οποία πρόσφατα ανακατατάχθηκε στη νέα κατηγορία βοηθητικής δράσης 10 της CAZy (AA10), περιλαμβάνει μικρές πρωτεΐνες, που απαντώνται στα γονιδιώματα των βακτηρίων που αποδομούν την χιτίνη, όπως και των ιών που προσβάλλουν έντομα.

Η χιτίνη παρουσιάζει ανάλογη κρυσταλλικότητα με αυτήν της κυτταρίνης, και αποτελείται από μονάδες N – ακέτυλο- γλυκοζαμίνης ενωμένες με β – 1,4 – δεσμούς. Μετά την κυτταρίνη αποτελεί την δεύτερη οργανική ένωση σε αφθονία πάνω στον πλανήτη και απαντάται στον εξωσκελετό των αρθροπόδων, σε κατώτερα ασπόνδυλα όπως (π.χ. σφουγγάρια και νηματοειδή) και στα κυτταρικά τοιχώματα μυκήτων και ζυμών. Τα ένζυμα που δρουν πάνω στη χιτίνη χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τις ενδοχιτινάσες, οι οποίες σπάνε τους δεσμούς σε τυχαίες θέσεις της αλυσίδας, και τις εξωχιτινάσες, που περιλαμβάνουν τις χιτοβιάσες και τις β – 1,4 – N – ακέτυλο – γλυκοζαμιδάσες. Οι αρχικές παρατηρήσεις της οικογένειας CBM33 περιείχαν την έκκρισή τους κατά την ανάπτυξη πάνω σε χιτίνη, την πρόσδεσή τους σε αυτή και τη μη ανιχνεύσιμη υδρολυτική δράση, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι συμμετείχαν στην αναγνώριση του υποστρώματος (Schrempf et al, 2001; Dahiya et al, 2006).

Το 2005, ανακαλύφθηκε ότι το χιτινολυτικό βακτήριο *Serratia marcescens* παράγει μια πρωτεΐνη (CBP21) που αυξάνει την πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων στο υπόστρωμα. Η πρωτεΐνη αυτή, κατατάχθηκε στην οικογένεια CBM 33 στη βάση δεδομένων της CAZy (Vaaje-Kolstad et al, 2005a; Cantarel et al, 2009). Η πρώτη κρυσταλλική δομή μέλους της οικογένειας CBM33 ήταν αυτή της CBP21 του *Serratia marcescens*, η οποία αποκάλυψε μια πρωτεΐνη με δομή β – σάντουιτς, και την παρουσία επιφανειακών αρωματικών αμινοξέων, χαρακτηριστικό που απαντάται στις περισσότερες CBM πρωτεΐνες. Η CBP21 μπόρεσε να ενισχύσει την δράση των χιτινασών, εμφανίζοντας μια πιο ενεργή συμμετοχή στην αποδόμηση της χιτίνης. (Vaaje-Kolstad et al, 2005b)



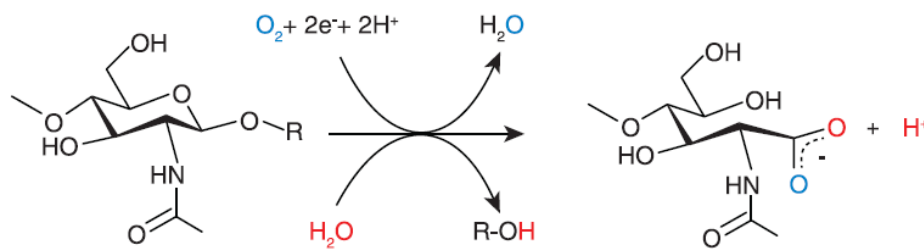
Σχήμα 3.3. Η δομή της CBP21 του *Serratia marcescens*, η οποία προσδένεται στο υπόστρωμα της χιτίνης

Σε εργασία που ακολούθησε, οι Wilson et al έδειξαν πως πρωτεΐνες CBM33 του μικροοργανισμού *Thermobifida fusca* ενίσχυσαν την υδρόλυση της χιτίνης από χιτινάσες και πιθανώς της κυτταρίνης από κυτταρινάσες. (Moser et al, 2005)

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις CBM33 απαντώνται συχνά σε βακτήρια και ιούς αλλά σπάνια στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ωστόσο, οι μύκητες παράγουν τις GH61, οι οποίες μοιάζουν δομικά με τις CBM33, και δρουν σε συνεργασία με τις κυτταρινάσες. Η δομική ομοιότητα περιλαμβάνει μια διαγνωσμένη διαμόρφωση μιας ομάδας αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο, εκ των οποίων δύο συντηρημένες ιστιδίνες, που θα μπορούσαν να είναι συνδεδεμένες με ένα μεταλλικό ιόν. Μία από αυτές τις ιστιδίνες είναι το τελευταίο αμινοξύ του αμινοτελικού άκρου της εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Έτσι προτάθηκε ότι οι πρωτεΐνες αυτές ίσως να έχουν κοινό μηχανισμό δράσης που οδηγεί σε αυξημένη υδρόλυση πολυσακχαριτών υψηλής ανθεκτικότητας (Harris et al, 2010; Dimarogona et al 2012a).

Έως το 2010, ήταν ασαφής ο τρόπος δράσης των CBM33 και GH61. Οι ενζυματικές δράσεις δεν είχαν αποδειχθεί ακόμη, ωστόσο ήταν ξεκάθαρο πως αυτές οι πρωτεΐνες διευκόλυναν την πρόσβαση των κυτταρολυτικών ενζύμων στο

υπόστρωμα με κάποιον τρόπο. Ωστόσο, σε μια εργασία ορόσημο στα τέλη του 2010, αποδείχθηκε ότι η CBP21, αποδομεί τους γλυκοζιδικούς δεσμούς της χιτίνης με έναν οξειδωτικό τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, από τη δράση του ενζύμου πάνω στη β - χιτίνη απελευθερώνονταν ισάριθμοι ολιγοσακχαρίτες, οξειδωμένοι στο αναγωγικό τους άκρο, και επίσης η δραστηριότητα αυξανόταν δραματικά με την προσθήκη αναγωγικών παραγόντων όπως το ασκορβικό οξύ. Η CBP21 φαίνεται πως επιτίθεται σε κάθε δεύτερο γλυκοζιδικό δεσμό, και λαμβάνοντας υπόψιν πως η δομική μονάδα του υποστρώματος είναι ένας δισακχαρίτης, υποτέθηκε πως αυτό το ένζυμο δρα διαδοχικά, από την αρχή της αλυσίδας με συγκεκριμένη κατεύθυνση. Ωστόσο, η CBM33 του *Enterococcus faecalis*, EfCBM33A, δεν περιείχε κανένα συντονισμένο μεταλλικό ιόν σε αντίθεση με το τυπικό μοτίβο των συντηρημένων ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Κατά την δράση της πάνω σε χιτίνη απελευθέρωσε ισάριθμα αλδονικά οξέα από χιτοολιγοσακχαρίτες, υπό τη παρουσία ενός εξωτερικού δότη ηλεκτρονίων και εμφάνισε αυξημένη αποδόμηση υποστρώματος υπό την παρουσία μιας GH18 χιτινάσης. Ακόμη, μέσω ιστοπικής σήμανσης επιβεβαιώθηκε ότι στην αντίδραση συμπεριλαμβάνεται μοριακό οξυγόνο (O₂) (Vaaje-Kolstad et al, 2010; Vaaje-Kolstad et al, 2012).



Σχήμα 3.4. Η ενζυματική δράση της CBP21 του *Serratia marcescens*, η οποία αποδομεί το υπόστρωμα εισάγοντας ένα οξυγόνο προερχόμενο από μοριακό οξυγόνο και ένα δεύτερο από νερό (Vaaje-Kolstad et al, 2010)

Τα ευρήματα για την CBP21 και προηγούμενες ενδείξεις για κάποιες CBM33, οι οποίες δρουν συνεργιστικά με τις κυτταρινάσες, αποτέλεσαν αφορμές για την έναρξη μελετών, με στόχο να διαπιστωθεί η δράση ορισμένων CBM33 στην κυτταρίνη, με τρόπο ανάλογο της CBP21 στη χιτίνη. Το 2011, αποδείχθηκε πως μια CBM33, η CelS2 του *Streptomyces coelicolor*, όντως αποδομεί την κυτταρίνη, παράγοντας αλδονικά οξέα. Όπως και στην περίπτωση της CBP21, η δραστηριότητα της CelS2 εξαρτάται από τη ύπαρξη δισθενών μεταλλικών ιόντων. Και οι δύο πρωτεΐνες αποδείχθηκε πως μπορούν να χρησιμοποιήσουν διάφορα δισθενή μεταλλικά ιόντα, αλλά σύμφωνα με πιο πρόσφατα αποτελέσματα φαίνεται ξεκάθαρα πως τα ένζυμα αυτά αποτελούν μονοοξυγενάσες εξαρτώμενες από χαλκό (Moser et al, 2005; Forsberg et al, 2011).

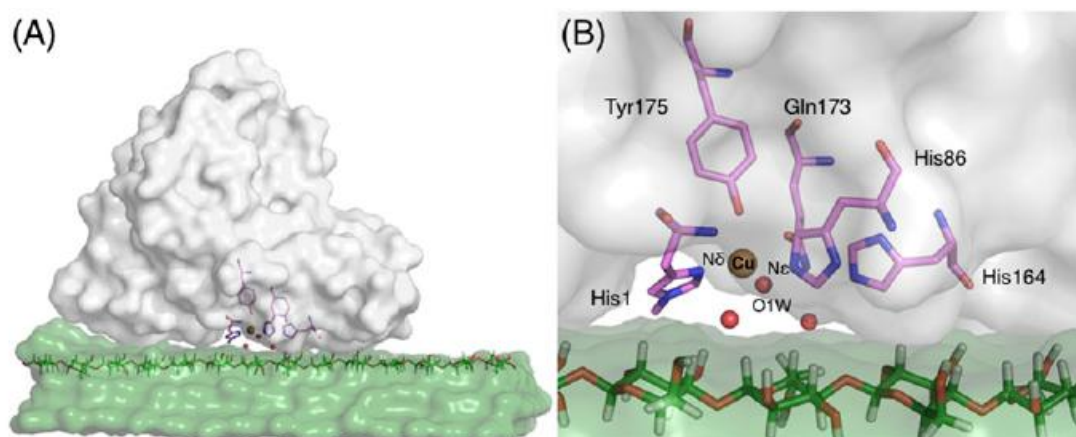
Συνοψίζοντας, οι CBM33 έχουν δείξει πως μπορούν να ενισχύσουν την υδρόλυση της κυτταρίνης και της χιτίνης από κυτταρινάσες και χιτινάσες αντίστοιχα,

χρησιμοποιώντας έναν πρωτοφανή μηχανισμό οξειδωτικής διάσπασης της αλυσίδας των πολυσακχαριτών (Dimarogona et al, 2012a).

3.2. Δομή των AA9 και AA10

Δομές μελών των οικογενειών AA9 και AA10 έχουν δημοσιευθεί πριν το 2011, αν και κανείς δεν είχε αναγνωρίσει σωστά τον χαλκό ως το απαιτούμενο μέταλλο. Πράγματι στην βιβλιογραφία ο χαλκός έχει συγχυστεί με άλλα μέταλλα, όπως το Na, Mg, Ca, Ni, Mn και Zn (Davies et al, 1995; Harris et al, 2010). Το κοινό στοιχείο που έχουν τα ένζυμα των δυο οικογενειών είναι ένα τριτοταγές δομικό μοτίβο, στο οποίο ο πυρήνας αποτελείται από μια μορφή β – σάντουιτς, που θυμίζει ανοσοσφαιρίνη, συχνά ενισχυμένος με κάποιες α – έλικες συνοδευόμενες από μεγάλες περιοχές μεγάλης ποικιλομορφίας. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου δημιουργείται από μια ιστιδίνη στο αμινοτελικό άκρο του, όπου μαζί με άλλη μία ιστιδίνη δεσμεύουν το ιόν του χαλκού (Lo Leggio et al, 2012).

Το ενεργό κέντρο βρίσκεται στο κέντρο μιας εκτεταμένης επίπεδης επιφάνειας, γεγονός ασυνήθιστο με τις άλλες γνωστές υδρολάσες, οι οποίες εμφανίζουν διαμόρφωση σχισμής ή σήραγγας στο ενεργό τους κέντρο, στο οποίο μπορούν να εισέλθουν μόνο ελεύθερες και μεμονωμένες αλυσίδες πολυσακχαριτών. Το συμπέρασμα είναι ότι η επίπεδη επιφάνεια των AA9 και AA10 είναι το σημείο αλληλεπίδρασης του ενζύμου με υποστρώματα εκτεταμένης στερεάς κατάστασης όπως η χιτίνη και η κυτταρίνη (Davies et al, 1995; Hemsworth et al, 2013).



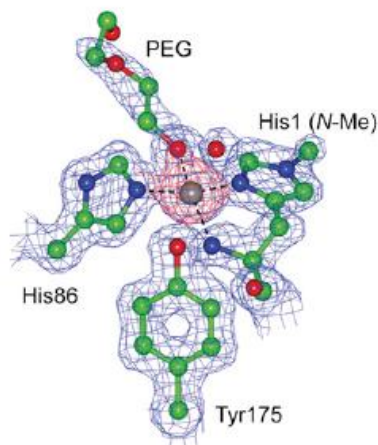
Σχήμα 3.5. (A) Αναπαράσταση της πρόσδεσης της LPMO του *Thermoascus aurantiacus* στην κυτταρίνη με (B) εστίαση στην επίπεδη διάταξη του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης (Kim et al, 2013)

3.2.1. Δομή του ενεργού κέντρου μιας AA9

Η πρώτη δομή μιας AA9 που λύθηκε, έχοντας στο καταλυτικό της κέντρο το ιόν του χαλκού, ήταν αυτή από τον μικροοργανισμό *Thermoascus aurantiacus*. Ο χαλκός χαρακτηρίστηκε ως κλασσικού τύπου 2 (Cu (II)). Κατά γενική ομολογία φαίνεται πως ο χαλκός αποτελεί το ενεργό μέταλλο για τις GH61, ωστόσο μερικές φορές υπάρχει η πιθανότητα να αποδεσμευθεί ή και να υποκατασταθεί κατά την υπερέκφραση και τον καθαρισμό των ενζύμων παρά την μεγάλη συνάφειά του σε δραστικό pH. Ο Cu(II) εμφανίζει συντονισμό τετραγωνικής γεωμετρίας σε όλες τις καταγεγραμμένες δομές, και τα αμινοξέα με τα οποία είναι συνδεδεμένος είναι συντηρημένα σε αυτές. Όπως αναμενόταν από παλαιότερες μελέτες πάνω στις AA9 και AA10 με διαφορετικά μεταλλικά ιόντα, το ιόν του Cu (II) συντονίζεται από :

- Ένα άζωτο του ιμιδαζολικού δακτύλιου της ιστιδίνης της κύριας πρωτεϊνικής αλυσίδας.
- Ένα άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης.
- Το άζωτο της αμινομάδας της ιστιδίνης του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης.

Έτσι σχηματίζεται μια δομή που ονομάζεται στήριγμα ιστιδινών. Επίσης από τη μελέτη του ενζύμου αυτού, ανακαλύφθηκε η μεθυλίωση της ιστιδίνης του αμινοτελικού άκρου, που φαίνεται ότι απουσιάζει στις άλλες δομές των AA9 (Quinlan et al; Westereng et al, 2011; Wu et al, 2013).



Σχήμα 3.6. Συναρμογή του ιόντος χαλκού στη δομή της GH61 του *Thermoascus aurantiacus* και η μεθυλιωμένη His 1 (Quinlan et al, 2011)

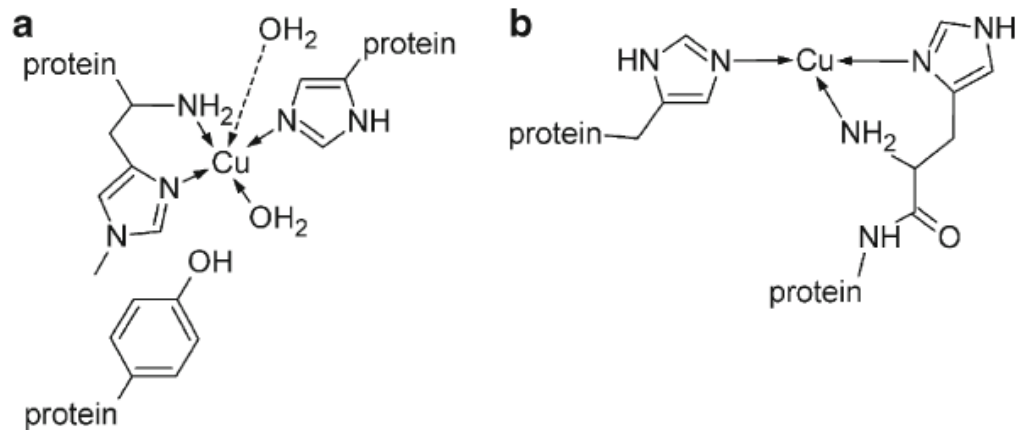
Οι λόγοι ύπαρξης αυτής τη μεθυλίωσης είναι άγνωστοι, αν και μια πρόσφατα απομονωμένη και δομικά χαρακτηρισμένη AA9 στην *Pichia pastoris* φαίνεται πως δεν είναι μεθυλιωμένη. Απ' την άλλη μεριά, η *Pichia pastoris* δεν περιλαμβάνει κάποια AA9 στο φυσικό γονιδίωμα της κάτι το οποίο μπορεί να έχει μηχανιστικές επιπτώσεις κατά την υπερέκφραση μιας AA9 σε έναν ξενιστή χωρίς μηχανισμό N-μεθυλίωσης της ιστιδίνης. Η σημασία της μεθυλομάδας στον μηχανισμό δράσης του ενζύμου δεν είναι σαφής, αν και υπάρχουν εικασίες, ότι εμπλέκεται στον έλεγχο της οξειδοαναγωγής του μετάλλου, (Wu et al, 2013). Στις AA9 το ιόν του χαλκού συσχετίζεται με μια απομακρυσμένη τυροσίνη/ικό για την οποία έχει αποδειχθεί μέσω μελετών κατευθυνόμενης μετάλλαξης να αποτελεί σημαντικό, αλλά όχι καθοριστικό παράγοντα στην ενεργότητα των ενζύμων. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε πως η παρουσία μιας γλουταμίνης προσφέρει δευτερογενή συντονισμό, που είναι σημαντικός για την επίτευξη μέγιστης ενεργότητας. Κατά πάσα πιθανότητα, η γλουταμίνη αυτή σχετίζεται με τον υδρογονικό δεσμό που συνδέει το υπόστρωμα με το υπόλοιπο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (Harris et al, 2010).

Σε μια δομή AA9 από τον μικροοργανισμό της *Neurospora crassa* βρέθηκε ότι το ιόν του χαλκού συντονίζεται με ένα ανιόν υπεροξειδίου, ενώ ακόμα δεν έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη Cu τύπου 1, αν και υπάρχουν μελέτες όπου το φάσμα απορρόφησης ακτίνων X του μετάλλου είναι πιο κοντά στην μορφή Cu (I) (Wu et al, 2013).

Ενδιαφέρον προκαλεί επίσης το γεγονός, ότι αν και η ιστιδίνη του αμινοτελικού άκρου του ενζύμου είναι πολύ συντηρημένη στις GH61, σε κάποια μέλη της οικογένειας αυτή έχει αντικατασταθεί από μια Arg όπως στην περίπτωση της HiGH61G του *Heterobasidion irregulare*, από τον οποίο λείπει και η άλλη ιστιδίνη που συμβάλει στο συντονισμό. Έχει παρατηρηθεί πως και τα δύο είδη πρωτεϊνών επάγονται από μύκητες κατά την ανάπτυξή τους σε λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα, γεγονός που υποδεικνύει κάποιον επιπρόσθετο, ανεξάρτητο μέταλλου, ρόλο των GH61 στην αποδόμηση της κυτταρίνης (Yakovlev et al, 2012).

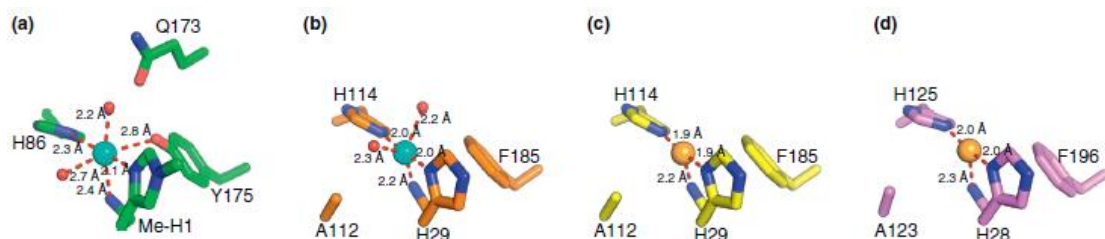
3.2.2. Η Δομή του ενεργού κέντρου μιας AA10

Τα τελευταία χρόνια έχουν καταγραφεί πολλές δομές Cu – AA10 στη βάση δεδομένων PDB. Η δομή μιας Cu - AA10 του *Bacillus amyloliquefaciens* έδειξε ότι το ιόν του χαλκού συντονίζεται από τρία άτομα αζώτου ενός στηρίγματος ιστιδινών με γεωμετρία τύπου T (CuN₃) (Chu et al, 2001; Glyn et al, 2013). Αντίθετα με τις AA9, οι μελέτες στις AA10 έδειξαν πως ο χαλκός εμφανίζει μια ενδιάμεση μορφή ανάμεσα στην τύπου I και II, πράγμα το οποίο υποδηλώνει παραμόρφωση στον σφαιρικό συντονισμό του χαλκού. Γενικότερα η γεωμετρία του συντονισμού που παρατηρείται και στις υπόλοιπες δομές των AA10 που έχουν λυθεί είναι πολύ διαφορετική από αυτή που παρατηρείται στις AA9.



Σχήμα 3.7. Συντονισμός του ιόντος του χαλκού στις LPMO από μύκητες (α) και βακτήρια (β) (Dimarogona et al, 2013)

Εξετάζοντας τις διαφορές στα συντηρημένα αμινοξέα του ενεργού κέντρου των ενζύμων των δύο οικογενειών, παρατηρείται ότι η παρουσία μιας φαινυλαλανίνης στη θέση μιας τυροσίνης/ινικού στις AA9 και μια μοναδικά συντηρημένη αλανίνη η οποία προεξέχει από τη θέση συντονισμού του μεταλλικού ιόντος (πιθανή θέση συντονισμού με το υπεροξείδιο στην AA9) έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν σημαντικά τον συντονισμό του χαλκού και άρα την ενεργότητα οποιουδήποτε χημικού είδους χαλκού –οξυγόνου που σχηματίζεται εκεί (Li et al, 2012; Wu et al, 2013).



Σχήμα 3.8. Σύγκριση του ενεργού κέντρου μιας AA9 (*Thermoascus aurantiacus*) (a) με τρεις δομές AA10 εκ των οποίων οι δύο εμφανίζουν Cu (I) (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus amyloliquefaciens*) (c,d) και μια Cu (II) (*Enterococcus faecalis*) (b) (Hemsworth et al, 2013)

Επιπροσθέτως, σε καμία AA10 δεν έχει εντοπισθεί μεθυλίωση της ιστιδίνης αλλά δεδομένου ότι η ετερόλογη έκφραση αυτών των πρωτεϊνών γίνεται σε *E.coli*, δεν γνωρίζουμε αν η έλλειψη αυτή είναι αληθινή ή οφείλεται στην έλλειψη της N – μεθυλτρανσφεράσης από τον ξενιστή έκφρασης. Ωστόσο, η έλλειψη μεθυλίωσης στις AA10 στηρίζεται: α) στο ότι παρατηρήθηκε ενεργότητα από μη μεθυλιωμένα ένζυμα, β) στο ότι τα χαρακτηριστικά του ενεργού κέντρου των AA10 διαφέρουν

από αυτά των AA9 και τέλος γ) από την αλληλούχηση πρωτεϊνών που απομονώθηκαν κατόπιν ομολογής έκφρασης (Chu et al, 2001).

3.3. Συσχέτιση AA9 με CBMs

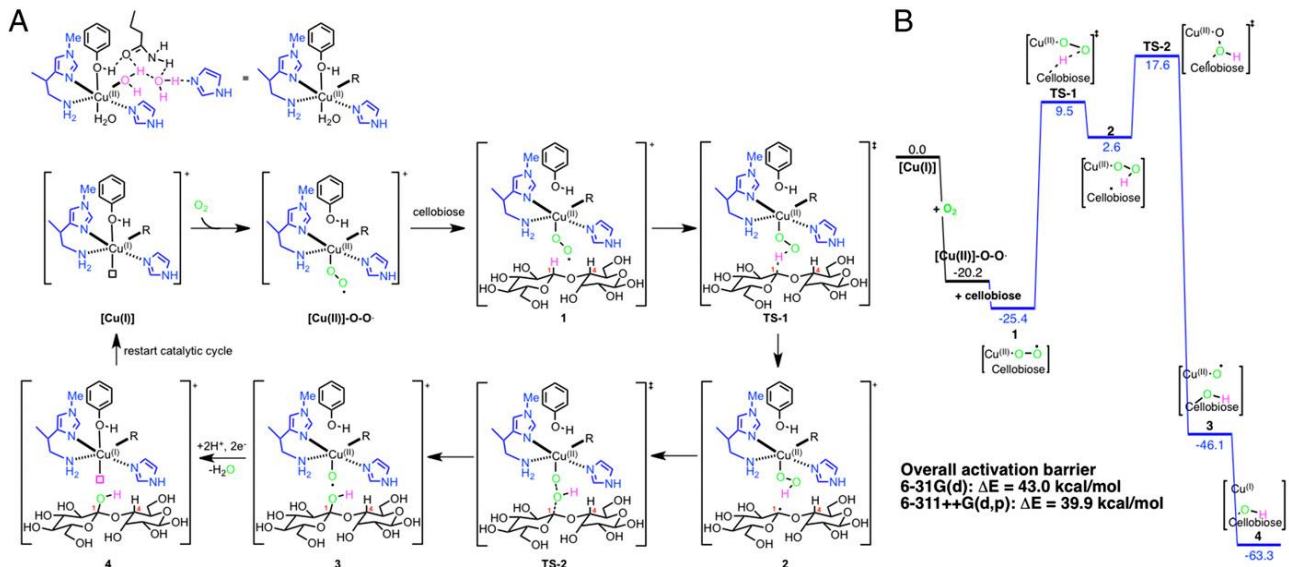
Έως σήμερα 6 δομές AA9 ενζύμων έχουν λυθεί, μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ (http://www.cazy.org/AA9_structure.html) . Από μελέτες κλωνοποίησης και αλληλούχησης πολλών γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν AA9 πρωτεΐνες, φαίνεται πως αυτές είναι πολλές φορές συνδεδεμένες με μονάδες πρόσδεσης υδατανθράκων (CBMs), και κυρίως CBM 1. Εκτιμάται πως το 20% των AA9 αλληλουχιών συσχετίζονται με μια CBM 1 στο καρβοξυτελικό άκρο τους (Boraston et al, 2004). Οι CBM 1, εμφανίζουν μια επίπεδη επιφάνεια, στην οποία προσδένεται ο κρυσταλλικός πολυσακχαρίτης, συνήθως η κυτταρίνη. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της CAZy, σε οργανισμούς οι οποίοι περιέχουν στο γονιδίωμά τους πολλές AA9, κάποιες από αυτές περιλαμβάνουν μια CBM 1 και κάποιες όχι. Επιπροσθέτως, μόνο δύο AA9 έχουν καταγραφεί να είναι συνδεδεμένες με μια CBM18, η οποία τυπικά προσδένεται στην χιτίνη. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη πως οι GH61 αυτές μπορεί να εμπλέκονται στην αποδόμηση της χιτίνης, όπως ακριβώς κάποιες AA10 αποδομούν την κυτταρίνη. Συγκεκριμένα η CelS2 είναι μια AA10 πρωτεΐνη συνδεδεμένη με μια CBM 2, η οποία δίνει την δυνατότητα πρόσδεσης όχι μόνο στην κυτταρίνη αλλά και στην χιτίνη και την ξυλάνη (Forsberg et al, 2011; Yakovlev et al, 2012).

Όσες πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί δομικά, δεν είναι συνδεδεμένες με κάποια CBM, καθώς η επιτυχής κρυστάλλωση ευνοείται από την ύπαρξη μιας συμπαγούς και μεμονωμένης δομής (Lo Leggio et al, 2012).

3.4. Μηχανισμός δράσης LPMOs

Είναι γενικά αποδεκτό πως οι PMOs χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο στο χαλκό του ενεργού κέντρου τους ώστε να υδροξυλιώσουν την κυτταρίνη, με αποτέλεσμα την διάσπαση του γλυκοζιδικού δεσμού. Για την αντίδραση αυτή απαιτούνται συνολικά 4 e⁻ ανά μόριο O₂ που χρησιμοποιείται, δύο από τα οποία προέρχονται από το υπόστρωμα και άλλα δύο από κάποιο χημικό αναγωγικό παράγοντα, ή κάποια δεϋδρογονάση της κελλοβιόζης. Έως και σήμερα, έχουν γίνει αρκετές ανακαλύψεις όσον αφορά την πρόσδεση του χαλκού στην πρωτεΐνη, αλλά δεν υπάρχει ακόμα ταυτοποίηση των χημικών ειδών οξυγόνου – χαλκού που σχηματίζονται και των βημάτων- κλειδιών μέσα από τα οποία ακολουθεί ο οξειδωτικός μηχανισμός (Vu et al, 2013).

Οι Kim et al προσπάθησαν με κβαντομηχανικούς υπολογισμούς (συγκεκριμένα, υπολογισμούς βασισμένους στη θεωρία της λειτουργικής πυκνότητας, density functional theory calculations, DFT) να αναγνωρίσουν τα στάδια και τα ενδιάμεσα που εμφανίζει ο μηχανισμός δράσης των LPMO, μετρώντας σε κάθε στάδιο αλλά και συνολικά την ενέργεια ενεργοποίησης που απαιτείται. Κατά τη μελέτη ερευνήθηκαν δύο ενδιάμεσα σύμπλοκα Cu – O, ένα υπερόξο- σύμπλοκο (Cu (II) – O – O[·]) και ένα όξυλ- σύμπλοκο (Cu (II) – O[·] ↔ Cu (III) – O⁻), τα οποία συμμετάσχουν στο μηχανισμό δράσης των PMOs.



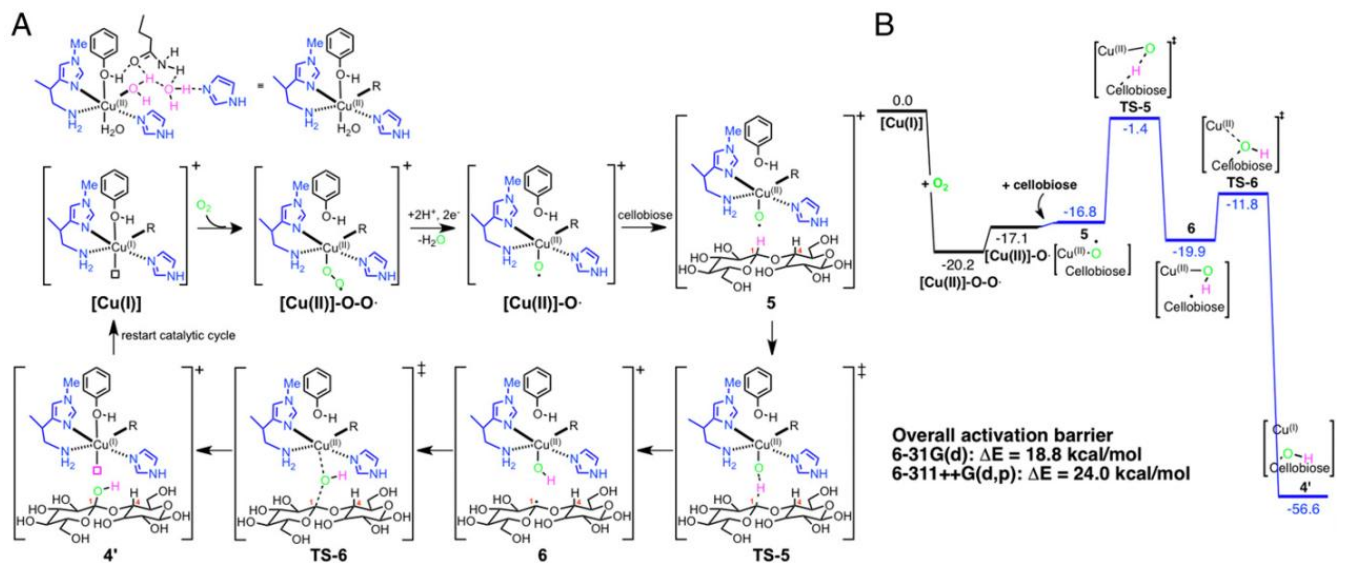
Σχήμα 3.9. (Α) Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης των LPMO με το σχηματισμό του υπερόξο συμπλόκου του Cu(II) ([Cu(II)]-O-O[·]) σε υπόστρωμα κελλοβιόζης και για οξείδωση του C1 άνθρακα, (Β) Εκτίμηση ενέργειας ενεργοποίησης της αντίδρασης.

Ο πρώτος μηχανισμός (Σχήμα 3.9) ξεκινά έχοντας ως αντιδρών τον Cu (I) κατόπιν αναγωγής του χαλκού από κάποιο αναγωγικό παράγοντα, όπως το ασκορβικό οξύ, και ακολουθεί η προσθήκη του O₂ με το σχηματισμό του Cu (II) – O – O[·]. Κατόπιν, το υπόστρωμα (όπου στη συγκεκριμένη εργασία επιλέχθηκε να είναι η κελλοβιόζη) αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο του χαλκού και αποσπάται από αυτό ένα υδρογόνο, παράγοντας μια ελεύθερη ρίζα στη θέση 1 ή 4 του υποστρώματος. Ακολουθεί η υδροξυλίωση του υποστρώματος κατόπιν της ομολυτικής διάσπασης του δεσμού O – O. Η διάσπαση του γλυκοζιδικού δεσμού επιτυγχάνεται μέσω αντίδρασης απόσπασης, ενώ το ασκορβικό οξύ ανάγει το σύμπλοκο Cu (II) - O[·] στο αρχικό αντιδρών Cu (I) ολοκληρώνοντας έτσι τον καταλυτικό κύκλο.

Ο δεύτερος μηχανισμός (Σχήμα 3.10) ξεκινάει πάλι από το ίδιο αντιδρών όμως κατά την προσθήκη του O₂ το σχηματιζόμενο σύμπλοκο ανάγεται από τον αναγωγικό παράγοντα με αποτέλεσμα το σχηματισμό του όξυλ- συμπλόκου (Cu (II) – O[·] ↔ Cu (III) – O⁻). Ακολουθεί η απόσπαση ενός υδρογόνου από το υπόστρωμα και η

υδροξυλίωση αυτού επιτυγχάνεται με τη μεταφορά τη υδροξυλομάδας από το σύμπλοκο Cu (II) – OH στην ελεύθερη ρίζα του υποστρώματος με τον ταυτόχρονο σχηματισμό του αρχικού αντιδρώντος (Kim et al, 2014).

Κατά την υδροξυλίωση του υποστρώματος, το επιπρόσθετο άτομο του οξυγόνου αποσταθεροποιεί το γλυκοζιδικό δεσμό, οδηγώντας στη διάσπασή του, την απελευθέρωση της παρακείμενης γλουκάνης και το σχηματισμό μιας αλδονολακτόνης (οξείδωση C1) ή μιας 4 – κετοαλδόζης (οξείδωση C4). Η απόσπαση αυτή διευκολύνεται από την ύπαρξη κάποιου οξέος, ίσως μια τρίτης πολύ συντηρημένης ιστιδίνης που απαντάται στην επιφάνεια και κοντά στο ενεργό κέντρο όλων των PMO μυκητιακής προέλευσης (Phillips et al, 2011).

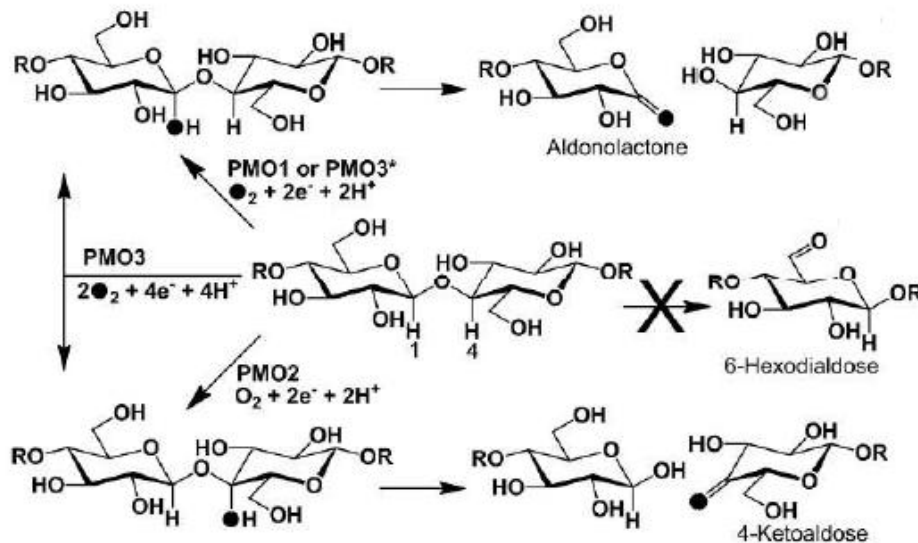


Σχήμα 3.10. (Α)Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης των LPMO με το σχηματισμό του όξυλ-συμπλόκου ([Cu(II)]-O[•]) σε υπόστρωμα κελλοβιόζης και για οξείδωση του C1 άνθρακα, (B) Εκτίμηση ενέργειας ενεργοποίησης της αντίδρασης.

Συγκρίνοντας τις ενέργειες ενεργοποίησης των δύο μηχανισμών φαίνεται πως ο ενεργειακά ευνοούμενος είναι ο δεύτερος καθώς εμφανίζει αρκετά χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην μεγάλη δραστηριότητα που εμφανίζει το ενδιάμεσο όξυλ-έναντι του υπερόξο – συμπλόκου του χαλκού. Ωστόσο, η μελέτη αυτή αποτελεί μια πρόβλεψη του μηχανισμού με υπολογιστικό τρόπο, και απαιτούνται πολλά ακόμα πειραματικά και επιστημονικά δεδομένα και εργαλεία τα οποία θα βοηθήσουν στην πλήρη ταυτοποίηση του μηχανισμού δράσης των ενζύμων αυτών (Kim et al, 2014).

3.5. Χαρακτηρισμός προϊόντων και κατάταξη των AA9

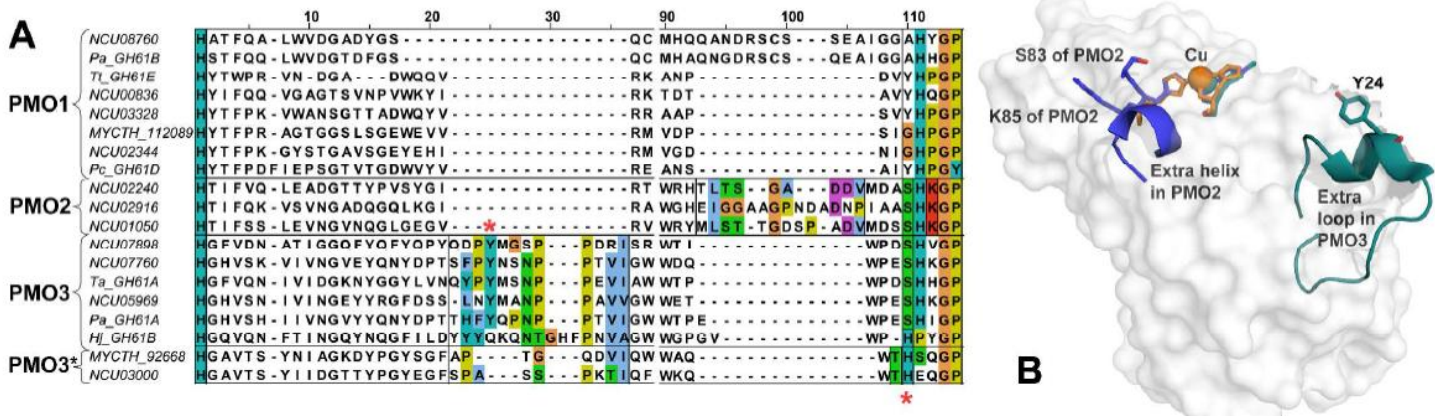
Ο χαρακτηρισμός των προϊόντων που προκύπτουν από την οξειδωτική δράση των PMOs είναι εξέχουσα σημασία. Αλδονικά οξέα, 4- κετοαλδόζες και 6 – εξοαλδόζες έχουν καταγραφεί ως προϊόντα της οξείδωσης του C1, C4 και C6 άνθρακα της γλυκόζης του υποστρώματος. Αν και τα αλδονικά οξέα είναι επαρκώς χαρακτηρισμένα οι άλλοι δύο τύποι προϊόντων είναι δύσκολο να χαρακτηριστούν λόγω έλλειψης συνθετικών προτύπων. Αν και υπάρχουν καταγραφές 6 - εξοαλδοζών από PMOs, κατόπιν φασματομετρικής ανάλυσης μάζας, επειδή εμφανίζουν το ίδιο μοριακό βάρος με αυτό των 4 – κετοαλδοζών, δεν έχει αποδειχθεί με βεβαιότητα ο σχηματισμός τους. Εν αντιθέσει, μέσω χρωματογραφίας ανιόνταλλαγής υψηλής απόδοσης (High Performance Anion Exchange Chromatography, HPAEC) και φασματομετρικής ανάλυσης μάζας (Mass spectrometry, MS), έχει αποδειχθεί ο σχηματισμός αλδονικών οξέων και 4-κετοαλδοζών από τις PMO 1 και PMO2 της *Neurospora crassa* αντίστοιχα, ενώ 6- εξοαλδόζες δεν ανιχνεύθηκαν (Beeson et al, 2012; Vu et al, 2013).



Σχήμα 3.11. Οξειδωτική διάσπαση του γλυκοζιδικού δεσμού από τις AA9, με C1 ή/και C4 υδροξυλίωση.

Οι Vu et al προσπάθησαν να κατατάξουν τις PMO με βάση την ανάλυση της αλληλουχίας και της τοπο-ειδικότητάς τους. Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν πως η κατηγοριοποίηση αυτή ήταν εφικτή, απ' όπου τελικά προέκυψαν τρεις κατηγορίες PMOs. Οι PMO 1 και 2 είναι εξειδικευμένες στην οξείδωση της θέσης 1 και 4 αντίστοιχα του υποστρώματος, αποτέλεσμα το οποίο συνάδει με παλαιότερες παρατηρήσεις που είχαν γίνει. Ωστόσο οι PMO 3 φαίνεται πως υδροξυλιώνουν τόσο τη θέση 1 όσο και τη θέση 4 του υποστρώματος. Κατόπιν σύγκρισης PMOs

αλληλουχιών από όλες τις κατηγορίες φαίνεται, πως μια μικρή αλληλουχία αποτελούμενη από 12 αμινοξέα στις PMO 3 σχηματίζουν μια έλικα που βρίσκεται παράλληλα στην επίπεδη επιφάνεια του ενεργού κέντρου. Κατόπιν μετάλλαξης, αφαιρέθηκε αυτή η αλληλουχία από μια PMO3, εξαλείφοντας παράλληλα την παραγωγή 4 – κετοαλδοζών, επιβεβαιώνοντας πως η αλληλουχία αυτή είναι σημαντική για την C4 οξείδωση από τις PMO3.



Σχήμα 3.12. (A) Κατάταξη των PMO με πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (multiple sequence alignment, MSA). (B) Συσχέτιση δομικών και αλληλουχικών διαφορών ανάμεσα στις κατηγορίες των PMO

Επιπροσθέτως, υπάρχει και μια υποκατηγορία των PMO3, η οποία ονομάστηκε ως PMO3* η οποία παράγει μόνο αλδονικά οξέα. Κατά την σύγκριση της αλληλουχίας της φαίνεται, ότι από στην προσθήκη αυτής της μικρής αλληλουχίας αμινοξέων, που απαντάται μόνο στις PMO3, λείπουν αρκετά συντηρημένα αμινοξέα. Το γεγονός αυτό, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την έλλειψη αυτής της μικρής έλικας που απαντάται στις PMO3.

Επιπλέον, χαρακτηριστικό γνώρισμα των PMO3 από τις PMO2 αποτελεί μια συντηρημένη στην επιφάνεια των πρωτεϊνών σερίνη, η οποία βρίσκεται αμέσως μετά τη δεύτερη ιστοιδίνη που συντονίζει το χαλκό του ενεργού κέντρου. Το αμινοξύ αυτό φαίνεται πως έχει αντικατασταθεί από μια θρεονίνη στις PMO3 * ενώ εκλείπει από τις PMO1, δείχνοντας πως μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των ενζύμων αυτών με το υπόστρωμα. Τέλος, οι PMO2 εμφανίζουν μια πολύ συντηρημένη λυσίνη αμέσως μετά την δεύτερη ιστοιδίνη του ενεργού κέντρου, καθώς επίσης και μια μοναδική αλληλουχία από 9 – 14 αμινοξέα κοντά σε αυτήν σχηματίζοντας μια μικρή έλικα, η οποία ίσως να επηρεάζει την πρόσδεση πρωτεΐνης – κυτταρίνης.

Φυσικά, πρέπει να γίνουν και άλλες μελέτες μεταλλάξεων σε σημεία της επιφάνειας των πρωτεϊνών για να βρεθούν εκείνα τα δομικά χαρακτηριστικά που δίνουν την αντίστοιχη εξειδίκευση στις διάφορες PMOs (Vu et al, 2013).

3.6. Διαφορές ανάμεσα σε AA9 και AA10

Όπως είναι μέχρι τώρα γνωστό, η οξειδωτική δράση των AA9 στην κυτταρίνη διαφέρει αρκετά από αυτή των AA10. Πρώτον, ο βαθμός πολυμερισμού των προϊόντων δεν περιορίζεται σε άρτιο αριθμό, με προϊόντα με βαθμό πολυμερισμού $dp = 2,3,4,\dots,9$ να είναι διακριτά, και να περιορίζονται σε μέγεθος λόγω υδατοδιαλυτότητας (Quinlan et al, 2011). Δεύτερον, σε αντίθεση με τις AA10, έχει καταγραφεί οξείδωση στους άνθρακες 1, 4 και 6 της γλυκοζιδικής μονάδας, η οποία εξαρτάται από την AA9 που χρησιμοποιείται, την ύπαρξη ή μη ενός αναγωγικού παράγοντα ή μια δεϋδρογονάσης της κελλοβιόζης και την σχετική τους αναλογία στην αντίδραση (Bey et al, 2013). Όσον αφορά την δράση των AA9, η οξείδωση στη θέση 1 (C-H) θεωρείται ως η προτιμώμενη θέση οξείδωσης των ολιγοσακχαριτών, ενώ με την παρουσία ισχυρών οξειδωτικών (όπως οι ρίζες υδροξυλίου) μπορεί να επιτευχθεί οξείδωση πολυσακχαριτών σε άλλες θέσεις. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι οι AA9 είναι πρωτεΐνες πολύ πιο ισχυρές και λιγότερο εξειδικευμένες σε σχέση με τις AA10. Έτσι, η θέση που οξειδώνουν οι AA9 το υπόστρωμα συσχετίζεται με την κατάταξη των PMOs και άρα το πώς αυτές τοποθετούνται πάνω στην επιφάνεια του υποστρώματος, και είναι επίσης συνάρτηση των ειδών οξυγόνου - χαλκού που σχηματίζονται στο ενεργό κέντρο (Li et al, 2012). Επομένως, απαιτείται γνώση των λεπτομερειών του συντονισμού του μεταλλικού ιόντος, συμπεριλαμβανομένου της μεθυλίωσης της ιστιδίνης και της πηγής και του δυναμικού οποιουδήποτε αναγωγικού παράγοντα. Έτσι, οποιαδήποτε εξήγηση του μηχανισμού των AA9 και AA10 απαιτεί την κατανόηση όχι μόνο των βιοχημικών χαρακτηριστικών της αλληλεπίδρασης ενζύμου – υποστρώματος και της διαθεσιμότητας της CDH αλλά και την εκτίμηση της δραστηριότητας και του τύπου των χημικών ειδών χαλκού -οξυγόνου τα οποία σχηματίζονται (Hemsworth et al, 2013).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Υλικά και μέθοδοι

1.1. Μοριακή Βιολογία

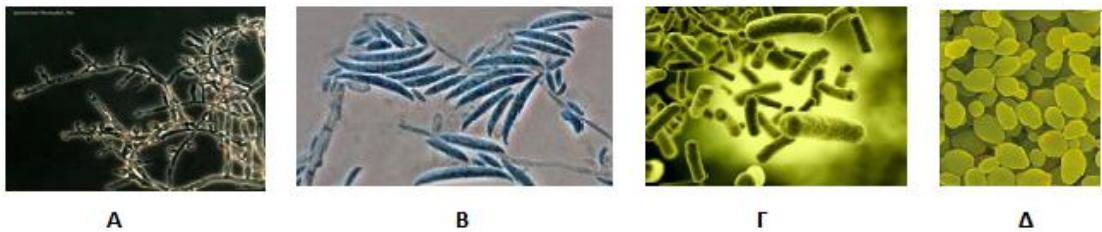
Στη συγκεκριμένη εργασία κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε στη ζύμη *Pichia pastoris* μια πρωτεΐνη της οικογένειας AA9 (πρώην GH61) από το μύκητα *Fusarium oxysporum* και μια ακόμη AA9 του *Sporotrichum thermophile*. Και στις δύο αυτές πρωτεΐνες έγινε προσπάθεια έκφρασης με το ορθό αμινοτελικό άκρο, μέσω χρήσης του φυσικού σηματοδοτικού πεπτιδίου έκκρισης, σε αντίθεση με παλαιότερη έκφραση όπου λόγω του τρόπου κλωνοποίησης το αμινοτελικό άκρο έφερε 1 ή 2 επιπλέον αμινοξέα. Παρακάτω παρουσιάζονται οι μέθοδοι και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.

1.2. Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι μικροοργανισμοί:

- I. *Sporotrichum thermophile*: Γνωστός και ως *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464, ο θερμοφίλος αυτός μύκητας είναι εξειδικευμένος στην αποδόμηση της κυτταρίνης. Απομονώνεται από το έδαφος, και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 45 – 50 °C, ως θερμοφίλος μικροοργανισμός. Η απομόνωση θερμοστατών πρωτεϊνών, και η παραγωγή ενδημικών μιγμάτων από το γονιδίωμά του παρουσιάζουν μεγάλο επιστημονικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το γονιδίωμά του για την απομόνωση της επιθυμητής AA9, και η προμήθειά του έγινε από την εταιρία DSMZ (DSM No:1799, Γερμανία).
- II. *Fusarium oxysporum*: Αποτελεί μουςόφιλο μύκητα (στέλεχος FGSC 9935 (NRRL 34936)) ο οποίος απομονώθηκε από το κύμινο (Christakopoulos, Macris et al. 1989). Ο μύκητας αυτός είναι ευρέως διαδεδομένος στη φύση, και είναι γνωστός για την παθογένειά του σε φυτικούς οργανισμούς. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι 28 – 30 °C.
- III. *Escherichia coli*: Είναι αρνητικό κατά Gram βακτήριο το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση, ενώ απαντάται και στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού. Χρησιμοποιείται συχνά ως ξενιστής ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών και κλωνοποίησης γονιδίων, καθώς εμφανίζει ταχύ ρυθμό ανάπτυξης, με χρόνο διπλασιασμού 20 – 30 λεπτά. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν επιδεκτικά σε ανασυνδυασμό κύτταρα *E.coli*, TOP10 και TOP10F' Invitrogen (Η.Π.Α) .

IV. *Pichia pastoris*: Πρόκειται για μεθυλότροφη ζύμη (γονότυπος: φυσικός τύπος, φαινότυπος Mut⁺), η οποία χρησιμοποιείται για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών. Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει ως ξενιστής, είναι ο εύκολος γενετικός χειρισμός της, και η επίτευξη μεγάλης κυτταρικής πυκνότητας, που μεταφράζεται σε μεγάλη παραγωγικότητα. Ως ευκαρυωτικός οργανισμός μπορεί να παράγει διαλυτές, σωστά αναδιπλωμένες, ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, ενώ διαθέτει όλους τους μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς (δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και γλυκοζιλίωση πρωτεϊνών) οι οποίοι είναι σημαντικοί για τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη, X33 και SMD1168H Invitrogen (Η.Π.Α). Η διαφορά των στελεχών αυτών έγκειται στην απουσία της πρωτεάσης vacuole peptidase A πρωτεασών από το SMD στέλεχος.



Σχήμα 1.1. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

1.3. Θρεπτικά Μέσα

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των αντίστοιχων μικροοργανισμών:

Πίνακας 1.1 Σύσταση θρεπτικών υλικών για την ανάπτυξη μικροοργανισμών

Μικροοργανισμός	Θρεπτικό μέσο	Σύσταση
<i>E. coli</i>	Luria Bertani (LB)	1% w/v tryptone 1% w/v NaCl 0,5% w/v yeast extract pH 7,4 ± 50 µg/mL Zeocin
	Low Salt Luria Bertani (LS-LB)	1% w/v tryptone 0,5% w/v NaCl 0,5% w/v yeast extract, pH 7,4 ± 50 µg/mL Zeocin
<i>P. pastoris</i>	YPD(S)	2% w/v peptone 2% w/v dextrose 1% w/v yeast extract (1 M sorbitol) ± 100 µg/mL Zeocin
	BMGY/BMMY	2% w/v peptone 1% w/v yeast extract 0,1 M potassium phosphate pH 6,0 4*10 ⁻⁵ % w/v biotin 1,34% w/v Yeast Nitrogen Base (YNB) 1% v/v glycerol / 0,5% v/v methanol

Τα θρεπτικά μέσα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, παρασκευάζονταν με απιονισμένο νερό και πριν τον εμβολιασμό τους αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 min υπό πίεση 0,1 MPa. Σε περίπτωση που το θρεπτικό μέσο περιείχε δεξτρόζη, αυτή αποστειρωνόταν ξεχωριστά σε μορφή σκόνης. Όσον αφορά τις θερμοευαίσθητες ουσίες (αντιβιοτικά και βιταμίνες), αυτές αποστειρώνονταν με διήθηση σε φίλτρα σύριγγας πόρων διαμέτρου 0,2 µm και προσθέτονταν στα θρεπτικά ύστερα από ψύξη τους στους 50-60 °C. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού προστίθετο και 1,5 % (για τα βακτήρια) ή 2 % (για την ζύμη) άγαρ.

1.4. Συσκευές και Όργανα

Παρουσιάζονται οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Κίνα)
- Θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Συλλέκτης κλασμάτων Waters, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying) Christ ALPHA 1-4, B. Braun Biotec. International, Melsungen (Γερμανία)
- Συσκευή μέτρησης pH 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) TC – 512, TECHNE (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης αγαρόζης Easygel H1-set, Scie-plas (Μ. Βρετανία)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης για διαχωρισμό πρωτεϊνών Mini-PROTEAN 3, Biorad (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulsar™, Biorad (Η.Π.Α.)
- Συσκευές υπερδιήθησης διαλυμάτων Stirred Cell Model 8400, 400 και 50 mL και μεμβράνες PM-10 και PM - 30, Amicon, Millipore, (Η.Π.Α.)
- Συσκευή φωτογράφισης σε κλειστό θάλαμο InGenius BioImaging, Syngene (Μ. Βρετανία)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάρθρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Σύστημα χρωματογραφίας διαχωρισμού πρωτεϊνών (Econo Gradient Pump, BioRad και Waters 600E, Millipore (Η.Π.Α.)
- Σύστημα χρωματογραφίας ανιονανταλλαγής υψηλής απόδοσης (HPAEC), με αντλία Jasco PU 1580i (Ιαπωνία), με στήλη CarboPac PA1 Analytical Column: 4 × 250 mm, με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή ED40 – Dionex 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)
- Συσκευή υπερσυμπύκνωσης Millipore, Merck Millipore (Η.Π.Α.)
- Ρεόμετρο, Anton Paar Physica MCR rheometer, Anton Paar GmbH (Αυστρία)
- Αυτοσχέδιος αντιδραστήρας υγροποίησης δύο θέσεων (τυμπάνων) (two drummed liquefaction reactor based on fall mixing)

1.5. Εμπορικά Ένζυμα – Αντιβιοτικά – Τυποποιημένα Χημικά Αντιδραστήρια (kits)

Η πολυμεράση KOD Hot Start προμηθεύτηκε από τις εταιρείες New England Biolabs® Inc Novagen (Η.Π.Α.) αντίστοιχα, ενώ τα περιοριστικά ένζυμα Xba, Bstb1, και Sac από την Takara BIO Inc (Ιαπωνία).

για την επιλογή των κυττάρων *E. coli*, που περιείχαν τον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt χρησιμοποιήθηκε καναμυκίνη (kanamycin) (50 µg/mL). Όσοι κλώνοι *E. Coli* TOP10F' και *P. pastoris* X-33 και SMD1168H είχαν μετασχηματιστεί με τον φορέα pPICZαC, επιλέχθηκαν με ζεοσίνη (zeocin) της Invivogen (Γαλλία).

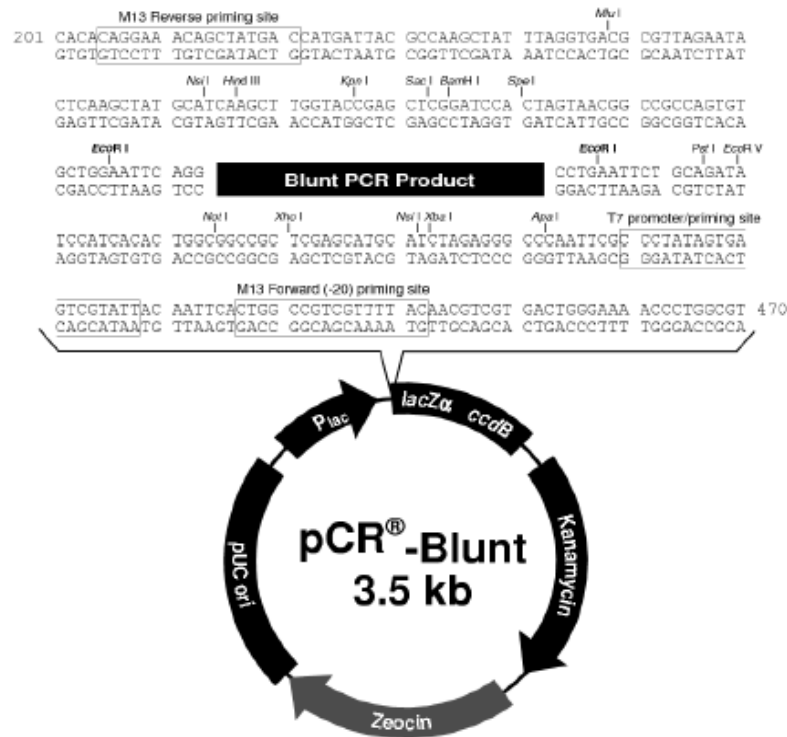
Το τυποποιημένο αντιδραστήριο NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, για την απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης αγοράστηκε από την εταιρεία Macherey-Nagel (Γερμανία), τα GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA και GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit, για την απομόνωση γενωμικού DNA αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), ενώ το Zero Blunt® PCR Cloning Kit της Invitrogen (Η.Π.Α.) χρησιμοποιήθηκε για την συνένωση τμημάτων DNA με ισοτελή άκρα με τον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt.

1.6. Πλασμιδιακοί φορείς Κλωνοποίησης και Έκφρασης

Για την κλωνοποίηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pCR® Blunt (Invitrogen, Η.Π.Α.), ενώ για την έκφραση χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pPICZαC (Invitrogen, Η.Π.Α.).

1.6.1. Πλασμιδιακός φορέας pCR® Blunt (Invitrogen)

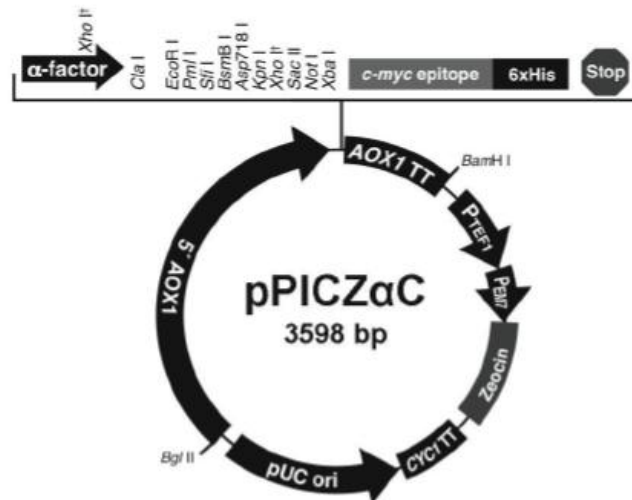
Ο πλασμιδιακός αυτός φορέας με μέγεθος 3512 bp, είναι σχεδιασμένος να κλωνοποιεί τμήματα DNA με ισοτελή άκρα. Εμπεριέχει το γονίδιο θανάτου του *E. coli* *ccdB*, το οποίο είναι συνδεδεμένο στο καρβοξυτελικό άκρο του γονιδίου *LacZα*. Με αυτόν τον τρόπο, όταν πραγματοποιείται ένωση ενός κομματιού DNA με το πλασμίδιο, παύει η δυνατότητα έκφρασης του συστήματος *lacZα-ccdB*, επιτρέποντας την ανάπτυξη μόνο μετασχηματισμένων κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Τα κύτταρα που έχουν λάβει το μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σκοτώνονται λόγω της έκφρασης του *ccdB*, ενώ τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα θανατώνονται λόγω έκθεσης στο αντιβιοτικό του στερεού θρεπτικού μέσου (καναμυκίνη ή ζεοσίνη) (Σχήμα 1.2.).



Σχήμα 1.2. Πλασμιδιακός φορέας pCR® Blunt (Invitrogen)

1.6.2. Πλασμιδιακός φορέας pPICZαC (Invitrogen)

Ο πλασμιδιακός φορέας pPICZαC (3598 bp), επιτρέπει την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στη ζύμη *P. pastoris* και την παράλληλη εξωκυτταρική τους έκκριση, με τη χρήση της αλληλουχίας α -factor που περιέχει, η οποία προέρχεται από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Επίσης στο φορέα εμπεριέχεται γονίδιο ανθεκτικότητας στη ζεοσίνη, υποκινητής της αλκοολικής οξειδάσης (*AOX1*) και περιοχή ομολογίας που επιτρέπει την ενσωμάτωση του φορέα στο γονιδίωμα της *P. pastoris*. Τέλος, εμπεριέχει το επίτοπο του c-myc και 6 κωδικόνια ιστιδίνης (His-tag) που χρησιμεύουν στον καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (Σχήμα 1.3). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pPICZαC από το οποίο έλειπε η αλληλουχία α -factor, έτσι ώστε το γονίδιο να εκφραστεί με το φυσικό σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide).



Σχήμα 1.3. Πλασμιδιακός φορέας pPICZαC (Invitrogen)

1.7. Εκκινητές (Primers)

Οι αλληλουχίες συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA έχουν κατασκευαστεί από την εταιρεία Eurofins MWG Operon και παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω (Πίνακα 1.2).

Πίνακας 1.2. Αλληλουχίες συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων για κλωνοποίηση του γονιδίου σε φορέα pPICZαC με επισημασμένα τα σημεία περιορισμού των αντίστοιχων ενδονουκλεασών.

Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης	Εκκινητής	Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίου	Περιοριστικά ένζυμα	Tm (°C)
pPICZαC	FoGH09688SPF	GCT TCG AAA TGC ACT GCA ACC TCT CTC TCG	Bstb I	57
	FoGH09688R	GCT CTA GAA TAG TTC GCA CAG CAG GGC C	Xba I	56

1.8. Υλικά και στήλες Χρωματογραφίας

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *StCel61* απομονώθηκε με τη βοήθεια στηλών χρωματογραφίας υλικού Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *FoCel61* απομονώθηκε με συνδυασμό της στήλης ανιονανταλλαγής Q Sepharose Fast Flow και της στήλης Gel Filtration - Sephacryl S – 200 HR. Για την αναγνώριση των προϊόντων από τη δράση των ενζύμων πάνω στα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας ανιονανταλλαγής Carbo Pac PA1 Analytical Column: 4 × 250 mm.

2. Μοριακές Τεχνικές

2.1. Απομόνωση γενετικού υλικού

2.1.1. Απομόνωση DNA από τον *Fusarium oxysporum*

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από τον μύκητα *F. oxysporum* έγινε με σκοπό τη χρησιμοποίησή του ως εκμαγείο για την ενίσχυση του γονιδίου *FOXG_09688.3* της πολυσακχαρικής μονοοξυγενάσης (πρώην GH61). Αυτό πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Sigma-Aldrich για το GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit.

2.1.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

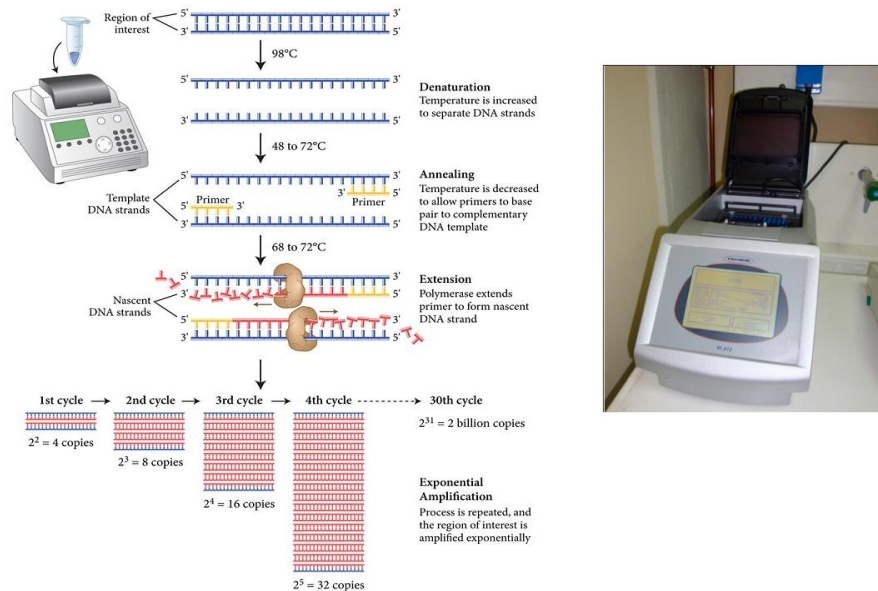
Η απομόνωση του πλασμιδιακού γενετικού υλικού από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας, έγινε με βάση το πρωτόκολλο του πακέτου προπαρασκευασμένων χημικών αντιδραστηρίων GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.).

2.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR είναι *in vitro* μέθοδος για την επιλογή και ενίσχυση τμημάτων DNA, με την προϋπόθεση ότι είναι γνωστή η επιθυμητή αλληλουχία, ώστε να είναι δυνατός ο σχεδιασμός δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές, primers), συμπληρωματικών για τον κάθε κλώνο του υπό εξέταση τμήματος DNA. Σημαντικά επίσης στοιχεία είναι η χρήση μιας θερμοάντοχης πολυμεράσης και μιας συσκευής που μπορεί να μεταβάλλει ταχύτητα τη θερμοκρασία της (θερμοκυκλοποιητής). Ένας πλήρης κύκλος της αντίδρασης PCR περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation),
- υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA (annealing)
- επιμήκυνση των εκκινητών (extension-elongation). Η διαδικασία περιλαμβάνει πολλούς τέτοιους κύκλους, σε κάθε έναν εκ των οποίων χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία οι νεοσύστατοι κλώνοι.

Με αυτόν τον τρόπο ο αριθμός των αντιγράφων του επιθυμητού τμήματος αυξάνεται εκθετικά. Η διαδικασία παρουσιάζεται συνοπτικά στο Σχήμα 2.1. , όπου φαίνεται ο θερμοκυκλοποιητής TC-512 (TECHNE, Η.Π.Α.) που χρησιμοποιήθηκε.



Σχήμα 2.1. Διαδικασία αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), και θερμοκυκλοποιητής TC-512 (TECHNE, Η.Π.Α.).

Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζεται η σύσταση της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου από το γενωμικό DNA.

Πίνακας 2.1. Σύσταση αντίδρασης PCR για ενίσχυση του γονιδίου *FoCel61* (*FOXG_09688.3*) του *F.oxysporum*

Συστατικό	Ποσότητα (μL)
Πολυμεράση KOD (2 Units/μL)	1
Γενωμικό DNA (100 ng/μL)	5
Εκκινητής F (50 μM)	1
Εκκινητής R (50 μM)	1
dNTPs mix (2 mM)	5
MgSO4(25 mM)	3
Ρυθμιστικό Διάλυμα (10X)	5
Υπερκάθαρο Νερό	29

Το γονίδιο *FoCel61* δεν περιέχει κάποιο εσώνιο (intron), δηλαδή τμήμα του γονιδίου που δεν μεταφράζεται σε αμινοξέα στην ώριμη πρωτεΐνη, οπότε δεν ήταν απαραίτητη η εκτομή τμημάτων DNA μέσω επικάλυψης εκκινητών (Splicing by Overlapping Extension PCR, SOE-PCR). Οι εκκινητές, η πολυμεράση και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η PCR φαίνονται ακολούθως (Πίνακα 2.2.).

Πίνακας 2.2. Συνθήκες PCR

Γονίδιο	Εκκινητές	Πολυμεράση	Πρόγραμμα PCR	Μέγεθος Προϊόντος (bp)
<i>FoGH09688</i>	<i>FoGH09688SPF</i> - <i>FoGH09688R</i>	KOD Hot Start	95 °C για 2min [95 °C για 20s 58 °C για 20s 70 °C για 20s] x35	728

2.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ανάκτηση του επιθυμητού τμήματος DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% (w/v). Στις περιπτώσεις ταυτοποίησης χρησιμοποιήθηκε η Agarose low EEO (AppliChem, Γερμανία), ενώ για την ανάκτηση DNA χρησιμοποιήθηκε η Seakem® Gold Agarose (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Δανία). Το διάλυμα στο οποίο έγινε η παρασκευή της γέλης ήταν το TBE (Πίνακας 2.3.), ενώ για την φόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue (Bioline, Η.Π.Α.).

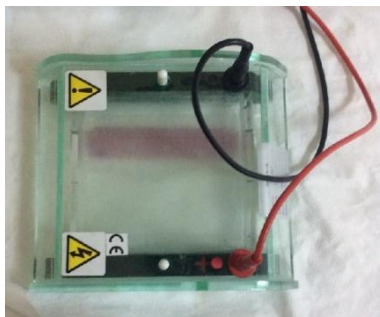
Πίνακας 2.3. Σύσταση διαλύματος TBE(10X) για την παρασκευή γέλης αγαρόζης ,σύσταση Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue

Διάλυμα TBE (10X)		Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue	
Συστατικό	Συγκέντρωση	Συστατικό	Συγκέντρωση
Tris Base	108 g/L	Gluceronol (50 %)	900 µL
Βορικό Οξύ	55 g/L	Bromophenol Blue 10X	100 µL
EDTA 0,5 M pH8,0	40 mL/L		

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης γινόταν:

- ανάμιξη 0,5 g αγαρόζης με 50 mL TBE
- βρασμός του μίγματος για περίπου 2 λεπτά.

- Ύστερα από ψύξη περίπου στους 50 °C προστίθεται 5 µL βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 1 mg/ml (ethidium bromide)
- το υγρό ακόμα μίγμα μεταφερόταν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Σχήμα 2.2).



Σχήμα 2.2. Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA

Μετά την πήξη του μίγματος προστίθενται 50-55 mL διαλύματος TBE και τα δείγματα φορτώνονται στις ειδικές θέσεις που είχαν σχηματιστεί (πηγαδάκια-wells).

Για την εκτίμηση του μεγέθους των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα δείγματα μορίων DNA (HyperLadder™ I: 200-10,000 bp), ενώ οι συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιούταν η ηλεκτροφόρηση ήταν 60 V για περίπου 45 min. Για την εμφάνιση και φωτογράφιση των προκυπτουσών ζωνών χρησιμοποιούταν η συσκευή InGenius BioImaging, Syngene (M. Βρετανία).

2.3.1. Απομόνωση τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για την απομόνωση DNA από το πήκτωμα αγαρόζης, είναι πρώτα απαραίτητη η κατάτμηση του τεμαχίου της γέλης, το οποίο περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA, πράγμα που κρίνεται από τον αριθμό των βάσεων του. Στη συνέχεια ακολουθείται το πρωτόκολλο του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit της Macherey-Nagel. Επίσης, για την αύξηση της απόδοσης της απομόνωσης χρησιμοποιείται αγαρόζη υψηλής καθαρότητας Seakem® Gold Agarose (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Δανία).

2.4. Αντίδραση Συνένωσης Μορίων DNA (Ligation)

Οι αντιδράσεις συνένωσης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του ενζύμου T4 DNA Ligase μεταξύ τμημάτων DNA και πλασμιδιακών φορέων. Αρχικά έγινε η συνένωση τμημάτων DNA (προϊόντων αντίδρασης PCR) με ισοτελή άκρα (blunt ends) στον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt με τη χρήση του Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Invitrogen) με μοριακή αναλογία 10:1. Για την συνένωση τμημάτων DNA με

κολλώδη άκρα (sticky ends) με τον πλασμιδιακό φορέα pPICZαC, που είχε προηγουμένως υποστεί πέψη με περιοριστικά ένζυμα (ίδια με τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη των αντίστοιχων τμημάτων DNA), πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με διάφορες μοριακές αναλογίες, αλλά και αντιδράσεις ελέγχου της αντίδρασης πέψης του πλασμιδιακού φορέα. Οι αντιδράσεις αυτές παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω (Πίνακας 2.4).

Πίνακας 2.4. Σύσταση αντιδράσεων συνένωσης τμημάτων DNA με πλασμιδιακούς φορείς

Συστατικό	pCR® Blunt	Κολλώδη Άκρα pPICZαC				
	Ποσότητα (μL)	Ποσότητα (μL) 1:3	Ποσότητα (μL) 1:5	Ποσότητα (μL) 1:7	Control Single Cut	Control No Cut
Πλασμιδιακός φορέας	1	1	1	1	1	1
Γονίδιο DNA	5	3	5	7	-	-
Ligase	1	1	1	1	1	-
Ligase Buffer (10X)	2	2	2	2	2	2
Υπερκάθαρο νερό (milie Q)	2	13	11	9	16	17

Όλες αυτές οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 16 °C για 2 h στην περίπτωση του pCR® Blunt ή 3-4 h στην περίπτωση των pPICZαC.

2.5. Μετασηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων.

Για την εισαγωγή πλασμιδιακού φορέα στο εσωτερικό των επιδεικτικών κυττάρων TOP10 και TOP10F' αρχικά γινόταν αργή απόψυξή τους από την υπερκατάψυξη των -80°C με μεταφορά τους σε παγόλουτρο. Στη συνέχεια γινόταν ήπια προσθήκη 1 μL πλασμιδίου απομονωμένου με τη χρήση GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.) ή 5 μL από την αντίδραση συνένωσης (Ligation) και το μίγμα παρέμενε σε πάγο για 30 min. Μετά από μεταφορά τους στους 42 °C αυστηρά για 90 sec και επανατοποθέτηση στο παγόλουτρο, γινόταν προσθήκη 200μL LB για τα TOP10 και LS-LB για τα TOP10F' και επώαση στους 37 για 1 h. Ακολούθησε επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία με LB – καναμυκίνη στην περίπτωση των TOP10 μετασηματισμένων με pCR®-Blunt ή σε τρυβλία LB - ζεοσίνη στην περίπτωση των TOP10F' μετασηματισμένων με pPICZαC. Η επώαση διαρκούσε περίπου 16 ώρες στους 37 °C και κατόπιν τα τρυβλία αποθηκεύονταν στους 4 °C.

2.6. Ανάκτηση πλασμιδίων από τα μετασχηματισμένα βακτήρια

Για την απομόνωση πλασμιδίων pCR[®]-Blunt και pPICZαC από TOP10 και TOP10F', έγιναν καλλιέργειες 5 mL LB – καναμυκίνη και LS – LB – ζεοσίνη αντίστοιχα. Κατόπιν επώασης για 16 h στους 37 °C και ανάδευση 180 rpm, γινόταν ανάκτηση των πλασμιδίων μικρής κλίμακας με τη χρήση του GenElute™ Plasmid Miniprep Kit από την Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.).

2.7. Πέψη DNA με Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στο μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA και τις κόβουν σε συγκεκριμένα σημεία. Παράγονται από βακτήρια και αποτελούν μέρος του μηχανισμού προστασίας τους από την «εισβολή» ξένου προς αυτά DNA. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από την εταιρεία TAKARA (Ιαπωνία), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της οποίας πραγματοποιήθηκαν και οι αντιδράσεις πέψης. Παρακάτω (Πίνακας 2.5) αναφέρονται τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν, οι θέσεις στις οποίες κόβουν, καθώς και οι αντιδράσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2.5. Τα ένζυμα περιορισμού, οι θέσεις πέψης τους και η σύσταση των αντιδράσεων πέψης

Περιοριστική Ενδονουκλεάση	Θέση Πέψης	Σύσταση Αντίδρασης
Bstb I	5'...T TCGAA...3' 3'...AAGCA A...5'	5 μL DNA (gene ή vector) 3 μL Buffer (10X) 2 μL Bstb I / 2 μL Xba I 11 μL υπερκάθαρο νερό
Xba I	5'...T CTAGA...3' 3'...AGATC A...5'	
Sac I	5'...GAGCT C...3' 3'...C TCGAG...5'	50 μL pPICZαC[FoGH09688] 10 μL Buffer (10X) 5 μL Sac I 35 μL υπερκάθαρο νερό

Οι αντιδράσεις λάμβαναν χώρα στις βέλτιστες θερμοκρασίες δράσης των εκάστοτε ενζύμων (37 °C για Xba I και Sac I, 65 °C Bstb I). Η διπλή πέψη των φορέων και του

γονιδίου διήρκεσε 4 ώρες ενώ η μονή πέψη για τον έλεγχο δράσης των περιοριστικών ενζύμων διήρκεσε 2 ώρες (2 ώρες δράσης για κάθε ένζυμο, ενώ μετά από τη πρώτη ώρα γινόταν προσθήκη 1μL ενζύμων στο μίγμα της αντίδρασης). Στην περίπτωση γραμμικοποίησης του πλασμιδίου pPICZαC η αντίδραση διήρκεσε 3 h. Ο έλεγχος της κατατετημένης αλληλουχίας έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη, ενώ όπου χρειαζόταν καθαρισμός του επιθυμητού DNA χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel).

2.8. Αλληλούχηση του DNA (Sequencing)

Ύστερα από την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pCR® Blunt και pPICZαC, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους, με σκοπό την διαβεβαίωση της ορθότητάς της ύστερα από την επεξεργασία μέσω των μοριακών διαδικασιών (PCR, πέψη). Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία VBC-Biotech Services GmbH (Αυστρία), παρέχοντάς της δείγμα καθαρού πλασμιδιακού DNA 10 μL (300-500 ng).

2.9. Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris* για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των κυττάρων της ζύμης *P. pastoris* βασίστηκε στο πρωτόκολλο του EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen). Αρχικά δημιουργήθηκε προκαλλιέργεια 5 mL YPD του στελέχους X-33 (και SMD1168H αντίστοιχα), η οποία επωάστηκε για περίπου 16 h στους 30 °C υπό ανάδευση (180 rpm) και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε 200 mL YPD, τα οποία χωρίστηκαν σε 2 κωνικές φιάλες των 500 mL και επωάστηκαν στις ίδιες συνθήκες με την προκαλλιέργεια έως ότου η οπτική πυκνότητα (OD_{600nm}) να φτάσει την τιμή 1,3-1,5 (3-4 h). Ακολούθησαν 4 διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (1500xg, 5 min, 4 °C) και αντίστοιχες επαναιωρήσεις του κυτταρικού ιζήματος σε 500 και 250 mL υπερκάθαρου νερού, 20 και 0,75 mL διαλύματος σοβιτόλης 1 M. Τα παραπάνω διαλύματα ήταν αποστειρωμένα και προψυγμένα, ενώ το κυτταρικό εναίωρημα που προέκυψε (περίπου 1 mL) φυλάχθηκε σε πάγο μέχρι την χρησιμοποίησή του (την ίδια μέρα).

2.10. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris* (X-33 και SMD1168H) με ηλεκτροδιάτρηση

Ο μετασχηματισμός της ζύμης πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου στα κύτταρα, το οποίο αυξάνει την διαπερατότητα της μεμβράνης τους και επιτρέπει την είσοδο του πλασμιδίου. Το ανασυνδυασμένο pPICZαC πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε, υπέστη πρώτα γραμμικοποίηση (linearization) με πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση Sac I σε μοναδική θέση

αναγνώρισης στην περιοχή 5'ΑΟΧ1 του πλασμιδίου, όπως περιγράφεται στον Πίνακα 2.5 . Ακολούθησε καθαρισμός του με το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel), με τη διαφορά ότι στο στάδιο της έκλουσης χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό. Από το γραμμικό αυτό πλασμίδιο 30 µL αναμείχθηκαν με 80 µL επιδεικτικών κυττάρων X-33 και SMD1168H αντίστοιχα και μεταφέρθηκαν σε ειδική προψυγμένη κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης, η οποία παρέμεινε στον πάγο για 5 min. Ακολούθησε τοποθέτηση της κυψελίδας στη συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ της Biorad (Η.Π.Α.) (Σχήμα 2.3.) και εφαρμόστηκε το πρόγραμμα *Pic* (2 kV για 4ms), ενώ αμέσως μετά προστέθηκε στην κυψελίδα 1 mL παγωμένου διαλύματος σορβιτόλης 1 M.



Σχήμα 2.3. Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ (Biorad, Η.Π.Α.)

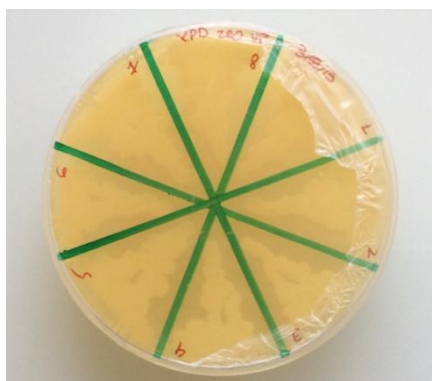
Το μίγμα αυτό μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου falcon (15 mL), επώαστηκε σε θερμοκρασία 30 °C για 1-2 h και στη συνέχεια έγινε επίστρωση σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό YPDS - ζεοσίνη (4 τρυβλία με ποσότητες του μίγματος μετασχηματισμού 50, 100 και 2x200 µL αντίστοιχα). Ύστερα από επώαση 3 ημερών στους 30 °C σχηματίστηκαν οι ανασυνδυασμένες αποικίες.

2.11. Έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στην ζύμη *P. pastoris*

Η επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα στελέχη X-33 και SMD1168H της ζύμης *P. pastoris* γίνεται με την προσθήκη μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Η μεθανόλη ενεργοποιεί τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (ΑΟΧ1) που υπάρχει στο πλασμίδιο pPICZαC, το οποίο έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα της ζύμης. Επίσης, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο λόγω του φυσικού σηματοδοτικού πεπτιδίου), πράγμα που καθιστά τη συλλογή και απομόνωσή της εύκολη.

2.11.1. Επιλογή κλώνου έκφρασης *P. pastoris* με καλλιέργειες μικρής κλίμακας

Από τις αποικίες που είχαν σχηματιστεί στα τρυβλία επιλέχθηκαν κάποιες (όχι πολύ απομονωμένες, αλλά χωρίς να επικαλύπτονται από άλλες) και ανακαλλιεργήθηκαν σε τριβλύα YPD -Zeocin που χωρίζονται σε 8 μέρη (Σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.4. Τριβλύο YPD –Zeocin, διαχωρισμένο για ανακαλλιέργεια 8 μετασηματισμένων αποικιών *P.Pastoris*

Ύστερα, επιλέχθηκαν τυχαία 6 στελέχη (3 από X33 και 3 από SMD1168H), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 50 mL θρεπτικού μέσου BMMY σε ισάριθμες κωνικές φιάλες των 250 mL και επώαστηκαν (30 °C, 200 rpm) για 16-20 h. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας της προκαλλιέργειας (OD_{600nm}) με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 600nm σε φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, Labequip (Καναδάς).

Έπειτα φυγοκεντρήθηκε συγκεκριμένος όγκος της προκαλλιέργειας έτσι ώστε η επαναιώρηση των κυττάρων σε 50 mL θρεπτικού BMMY να δώσει $OD_{600nm} = 1$. Οι καλλιέργειες με BMMY επώαστηκαν υπό ανάδευση (30 °C, 200 rpm) για 6 ημέρες, διατηρώντας την επαγωγή με την προσθήκη 250 μL μεθανόλης κάθε ημέρα (τελική συγκέντρωση 0,5% v/v). Επίσης καθημερινά ελήφθη δείγμα από το υγρό καλλιέργειας στο οποίο μετρούνταν η κυτταρική ανάπτυξη (φωτομετρικά OD_{600nm}) και τα επίπεδα έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (με την μέθοδο μέτρησης συγκέντρωσης πρωτεϊνών Lowry).

Ο κλώνος με τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης που επιλέχθηκε, ανακαλλιεργήθηκε σε τρυβλία με YPD/ζεοσίνη και αποθηκεύτηκε στους 4 °C. Για μακροχρόνια αποθήκευση, έγινε καλλιέργεια του κλώνου σε θρεπτικό YPD για 16 h (30 °C, 200 rpm), η οποία φυγοκεντρήθηκε (1500xg, 10 min, 4 °C) και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε YPD με 15% v/v γλυκερόλη με τελικό $OD_{600nm} = 50-100$ και

χωρίστηκε σε αποστειρωμένα errendorf, τα οποία καταψύχθηκαν απότομα (flash freezing) με εμβάπτιση σε υγρό άζωτο και αποθηκεύθηκαν στους -80 °C.

2.11.2. Παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε εργαστηριακής κλίμακας καλλιέργειες *P. pastoris*

Ο κλώνος που επιλέχθηκε χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 4 κωνικών φιαλών (250 mL) με 50 mL BMGY έκαστη και ύστερα από επώαση 16 h (30 °C, 200 rpm) έγινε μεταφορά κατάλληλης ποσότητας κυττάρων (όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.11.1) σε κωνικές φιάλες 2 L (Σχήμα 2.5), που περιείχαν 400 mL BMMY έκαστη και κωνική φιάλη 1 L που περιείχε 200 mL BMMY, προς τελικό όγκο καλλιέργειας 1 L.



Σχήμα 2.5. Καλλιέργειες ανασυνδυασμένης ζύμης X-33 και SMD1168H σε θρεπτικό μέσο BMMY

Η επαγωγή διατηρήθηκε με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης σε τελική συγκέντρωση στη φιάλη 0,5% v/v. Μετά την ημέρα κατά την οποία παρατηρήθηκε βέλτιστη παραγωγή πρωτεΐνης, το υγρό της καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε (1500xg, 10 min, 4 °C) για την απομάκρυνση των κυττάρων και το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους 4 °C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.

2.11.3. Διήθηση και Συμπύκνωση του υπερκείμενου καλλιέργειας *P.pastoris*

Το υπερκείμενο, που προέκυψε ύστερα από την φυγοκέντρωση του υγρού καλλιέργειας του ανασυνδυασμένου στελέχους, διηθήθηκε υπό κενό χρησιμοποιώντας διαδοχικά διηθητικό χαρτί και φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,8, 0,45 και 0,2 μm (Pall Supor Membrane Disc Filters, Pall Filters) για απομάκρυνση τυχόν κυτταρικών θραυσμάτων. Στη συνέχεια το υγρό που προέκυψε, συμπυκνώθηκε μέχρι όγκο 50 mL, χρησιμοποιώντας συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell

8400 με μεμβράνη PM-10/30 (Millipore, Η.Π.Α.) (Σχήμα 2.6). Μόρια μεγαλύτερα από τη διάμετρο των πόρων της μεμβράνης (10 και 30 kDa αντίστοιχα), συγκρατούνται ενώ τα μικρότερα μόρια διαφεύγουν μαζί με το διάλυμα.

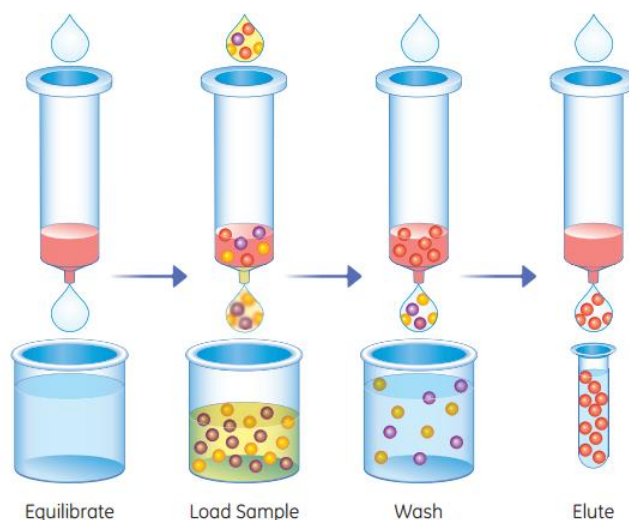


Σχήμα 2.6. (Α) Διάταξη διήθησης υπό κενό, (Β) συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10/30 (Millipore, Η.Π.Α.)

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

Η χρωματογραφία συγγένειας ακίνητοποιημένου μετάλλου εκμεταλλεύεται τα 6 συνεχόμενα κατάλοιπα ιστιδίνης (His-tag) που είχαν προστεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης και τα οποία έχουν την ιδιότητα να προσδένονται σε κατιόντα μετάλλου (Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) λόγω της αρνητικής φόρτισης των αμινοξικών καταλοίπων. Αρχικά, το συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό διάλυμα εξισορροπήθηκε με διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl (Talon). Η διαδικασία της διαπίδυσης έγινε με τη χρήση μεμβρανών κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Daltons, Sigma-Aldrich). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης δηλαδή μικρά μόρια διαλύτη δύνανται να διαπερνούν την ημιπερατή μεμβράνη μέχρι αποκατάστασης ισορροπίας στο σύστημα. Η μεμβράνη πριν τη χρήση βυθίστηκε σε βραστό απιονισμένο νερό για περίπου 30 min, ενώ στη συνέχεια έγινε η μεταφορά του διαλύματος των πρωτεϊνών στο 1/3 περίπου του όγκου του σχηματιζόμενου σωλήνα. Το σύστημα παρέμεινε μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου όγκου ($V_{P.A.} \geq 100 \times V_{\text{διαλύτος πρωτεϊνών}}$), για 24 h σε θερμοκρασία 4 °C, υπό ήρεμη ανάδευση. Εν συνεχεία, το πρωτεϊνικό διάλυμα διαβιβάστηκε σε στήλη Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.). Η λειτουργία της στήλης μπορεί να περιγραφεί ως εξής:

- Αρχικά η στήλη εξισορροπείται με 200-300 mL ρυθμιστικού διαλύματος Talon με ροή 2.5 mL/ min.
- Το μίγμα των πρωτεϊνών φορτώνεται στη στήλη με σταθερή ροή 2 mL/ min.
- Ακολουθεί έκπλυση της στήλης με διάλυμα Talon προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες οι οποίες δεν προσδέθηκαν στη στήλη.
- Εν συνεχεία, πραγματοποιείται η έκλυση των προσδεσμένων πρωτεϊνών με προσθήκη διαλύματος Talon παρουσία ιμιδαζολίου, το οποίο ανταγωνίζεται τα κατάλοιπα ιστιδίνης στη μήτρα κοβαλτίου απελευθερώνοντας έτσι τα προσδεδεμένα μόρια. Η συγκέντρωση του άλατος στην κινητή φάση αυξανόταν σταδιακά (gradient) έως 100mM.
- Τέλος, η στήλη ξεπλένεται με Talon και νερό και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C, βυθισμένη σε διάλυμα EtOH 20 % (v/v).



Σχήμα 2.7. Καθαρισμός πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)

Σε περίπτωση μικρού όγκου καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε στήλη βαρύτητας (Biorad, Η.Π.Α.) με 2 mL ρητίνη ακίνητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου Talon® Metal Affinity Resin (Clontech, Η.Π.Α). Τα βήματα του καθαρισμού ήταν τα εξής:

- Εξισορρόπηση της μήτρας της στήλης με 60 mL διάλυμα Talon
- Φόρτωση του δείγματος για πρόσδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα ιόντα Co^{2+}
- Έκπλυση της στήλης με 10 mL διάλυμα Talon για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που δεν προσδέθηκαν στη στήλη

- Απομάκρυνση ελαφρά προσδεμένων πρωτεϊνών με εφαρμογή 5 mL διαλύματος Talon με χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου (5 mM)
- Έκλυση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με εφαρμογή 7 mL (2 φορές) διαλύματος Talon με υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου (100 mM)
- Έκπλυση της μήτρας της στήλης με 80 mL απιονισμένο νερό και αποθήκευση της ρητίνης σε διάλυμα αιθανόλης 20% στους 4 °C

2.11.5. Αποδιάταξη πρωτεϊνών σε υψηλή συγκέντρωση ουρίας

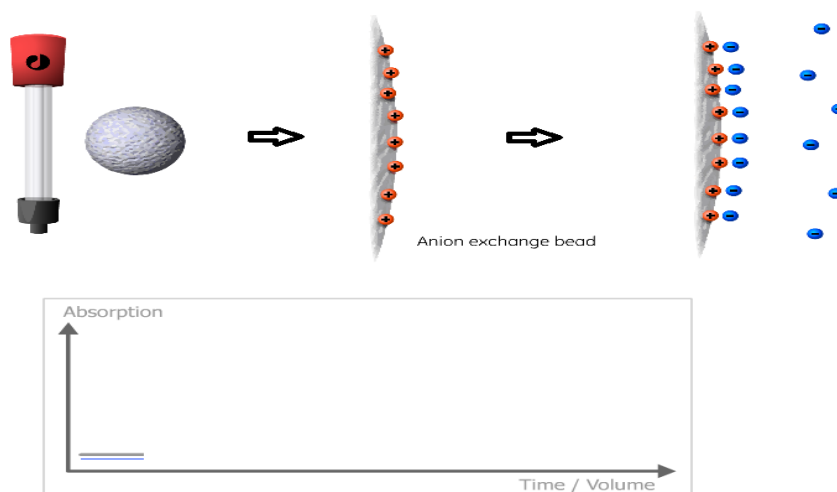
Στη συγκεκριμένη εργασία η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη FoCel61 Native N-terminal, η οποία φέρει το His – Tag , λόγω κάποιας ανωμαλίας, είτε κατά την αναδίπλωση στο χώρο, είτε λόγω πιθανής απομάκρυνσης των επιπλέον αμινοξέων μέσω πρωτεολυσης επεξεργασίας κατά την έκφρασή της, δεν μπόρεσε να αλληλεπιδράσει με το ακινητοποιημένο μέταλλο της στήλης. Για το λόγο αυτό, επιχειρήθηκε να ξεδιπλωθεί η δομή της πρωτεΐνης με την παρουσία ουρίας σε συγκέντρωση 8M, και εν συνεχεία να καθαριστεί εκ νέου με τη χρήση των στηλών TALON, για να εξεταστεί το ενδεχόμενο απόκρυψης του His – Tag μέσα στην δομή της πρωτεΐνης.

2.11.6. Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Ιοντεναλλαγής (Ion Exchange Chromatography, IEC)

Αποτελεί μια μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά τον παραδοσιακό διαχωρισμό πρωτεϊνών. Βρίσκει εφαρμογή σε περιπτώσεις -έκφρασης πρωτεϊνών, στις οποίες δεν υπάρχει κάποια αλληλουχία όπως τα κατάλοιπα ιστιδίνης (His – Tag), με αποτέλεσμα να μην μπορεί να εφαρμοστεί χρωματογραφία συγγένειας. Η χρωματογραφία ιοντεναλλαγής βασίζεται στην αντιστρεπτή προσρόφηση φορτισμένων διαλυτών μορίων σε ακινητοποιημένες ομάδες ιοντεναλλαγής με αντίθετο φορτίο. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από 4 στάδια.

I. Εξισορρόπηση

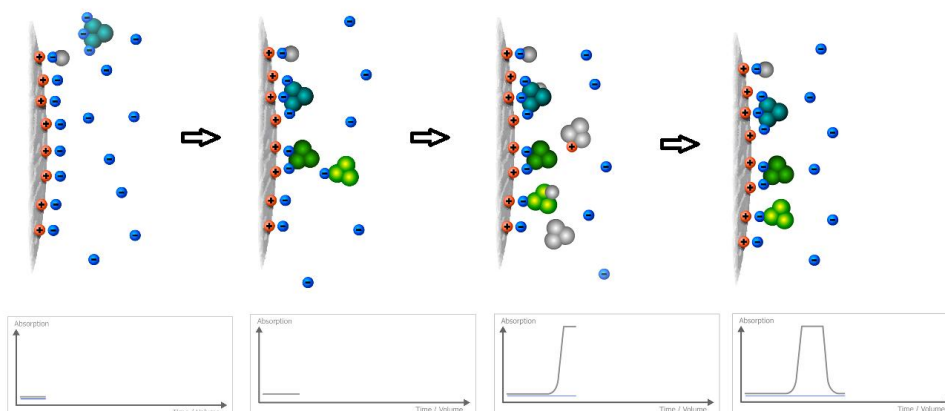
Κατά το στάδιο αυτό, εξισορροπείται η ακίνητη φάση στις επιθυμητές αρχικές συνθήκες, με αποτέλεσμα όλες οι φορτισμένες μονάδες είναι προσδεμένες με μονάδες αντίθετου φορτίου (π.χ. ανιόντα χλωρίου) που μπορούν να ιοντεναλλαχθούν από άλλα μόρια. Παρακάτω φαίνεται η διαδικασία της εξισορρόπησης, όπου με μπλε χρώμα φαίνονται τα μόρια της κινητής φάσης, ενώ με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι αντίθετα φορτισμένες ομάδες της ακίνητης φάσης.



Σχήμα 2.8. Εξισορρόπηση της στήλης ιοντεναλλαγής στο κατάλληλο pH - παρατήρηση έκλουσης πρωτεϊνών φωτομετρικά

II. Προσθήκη του δείγματος και πλύση

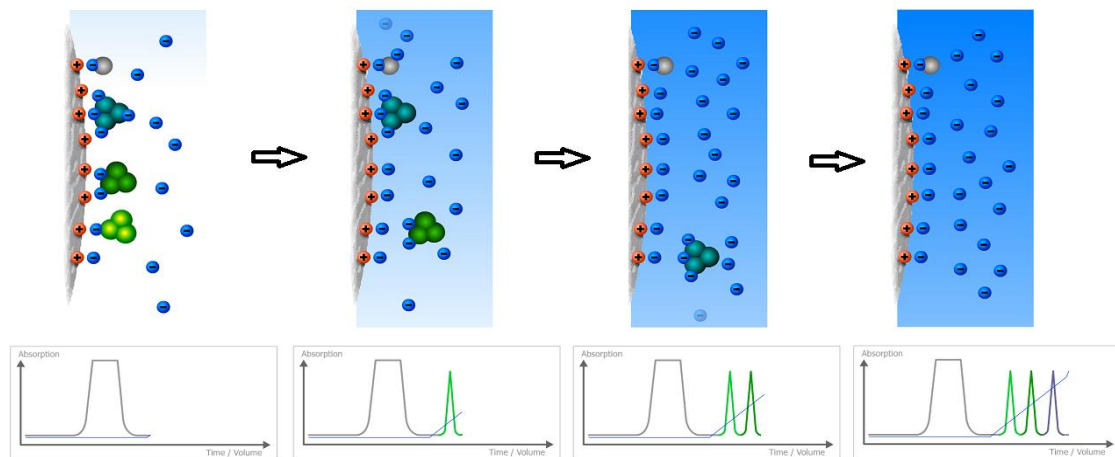
Σε αυτό το δεύτερο στάδιο το δείγμα ρέει μέσα στη στήλη ενώ διαλύτης συνεχίζει να περνά. Στόχος του βήματος αυτού είναι η πρόσδεση των κατάλληλα φορτισμένων μορίων – στόχων (εδώ η επιθυμητή πρωτεΐνη) και η έκπλυση του υλικού το οποίο δεν προσδέεται στη στήλη. Για την σωστή πρόσδεση των επιθυμητών μορίων πρέπει τα αυτά να βρίσκονται σε ρυθμιστικό διάλυμα με το ίδιο pH και ιοντική ισχύ με την κινητή φάση. Για το λόγο αυτό πριν τον καθαρισμό των πρωτεϊνών, αυτές εξισορροπούνται με διαπίδυση, όπως προαναφέρθηκε στην κινητή φάση που χρησιμοποιείται κατά την εξισορρόπηση της στήλης.



Σχήμα 2.9. Ροή του δείγματος προς καθαρισμό μέσω της στήλης- πρόσδεση πρωτεϊνών με το κατάλληλο δυναμικό και έκλυση μη αλληλεπιδρώντων ουσιών.

III. Έκλυση πρωτεϊνών

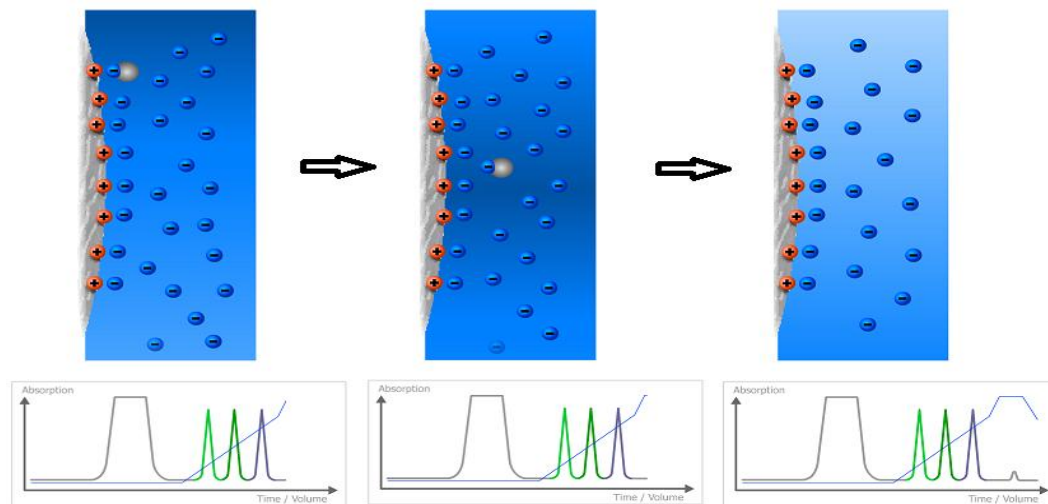
Ακολουθεί η έκλυση των βιο-μορίων από την επιφάνεια ιοντεναλλαγής με την αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης. Ο πιο συνήθης τρόπος είναι η αύξηση της ιοντικής ισχύος με αυξανόμενη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου, ή κάποιου άλλου απλού άλατος, έτσι ώστε να εκροφηθούν οι δεσμευμένες πρωτεΐνες (gradient). Η έκλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ανάλογα με τον αριθμό των φορτισμένων ομάδων στην επιφάνειά τους, με αποτέλεσμα διαφορετικές πρωτεΐνες να εκλύονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος, επιτυγχάνοντας έτσι το διαχωρισμό τους.



Σχήμα 2.10. Έκλυση και διαχωρισμός των προσδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών με αντίστοιχη αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύτη (gradient)

IV. Αναγέννηση της ακίνητης φάσης

Σε αυτό το τελικό στάδιο εκλύεται από τη στήλη οποιοδήποτε μόριο έχει παραμείνει συνδεδεμένο με αυτή και πλέον όλη η ακίνητη φάση είναι διαθέσιμη για νέα προσρόφηση βιομορίων. Για τον πλήρη καθαρισμό της στήλης, ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης άλατος διέρχεται από τη στήλη.



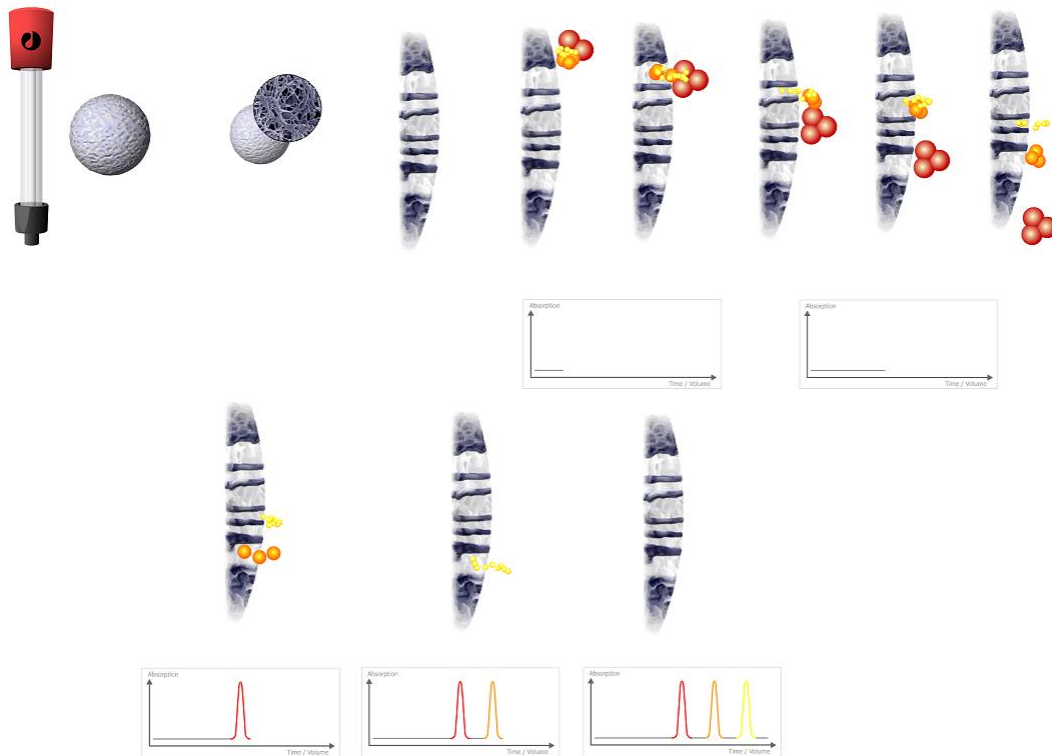
Σχήμα 2.11. Έκλουση ισχυρά προσδεμένων μορίων- αναγέννηση της στήλης

2.11.7. Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (Gel Filtration Chromatography)

Η τεχνική αυτή ανήκει όπως και η χρωματογραφία ιοντεναλλαγής στις παραδοσιακές μεθόδους καθαρισμού πρωτεϊνών. Αρχή της μεθόδου αποτελεί η διαφορά των μοριακών βαρών, και άρα του μεγέθους μεταξύ των διάφορων βιομορίων καθώς αυτά διέρχονται από το χρωματογραφικό υλικό της στήλης, το οποίο βρίσκεται σε μορφή γέλης (gel).

Μηχανισμός διαχωρισμού

Κάθε βιομόριο έχει το δικό του μοριακό βάρος. Μόρια τα οποία ξεπερνούν σε μέγεθος τους πόρους του χρωματογραφικού υλικού, δεν διαχέονται μέσα στο υλικό και αναγκάζονται να διέλθουν περιμετρικά από αυτό. Τα μόρια τα οποία έχουν ενδιάμεσο μέγεθος (μεταξύ πολύ μεγάλου και πολύ μικρού) μπορούν και διεισδύουν στους πόρους κατά τρόπο ανάλογο του μεγέθους τους. Σε περίπτωση που ένα μόριο είναι μικρότερο σε μέγεθος και από τους πιο μικρούς πόρους του gel τότε αυτό μπορεί να διέλθει μέσα από το συνολικό όγκο των πόρων. Τελικά, τα βιομόρια εξέρχονται από τη στήλη ανάλογα με το μέγεθός τους, καθώς πρώτα βγαίνουν τα μεγαλύτερα μόρια που διέρχονται περιμετρικά του χρωματογραφικού υλικού ενώ τα μικρότερα εξέρχονται τελευταία, καθώς διανύουν μεγαλύτερη διαδρομή μέσα από το πορώδες υλικό.



Σχήμα 2.12. Καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (Gel Filtration Chromatography)

Ο βαθμός καθαρότητας των πρωτεϊνών που προέκυπταν από κάθε μια μέθοδο διαχωρισμού, προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και τα κλάσματα με την καθαρή πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκαν αφού είχαν πρώτα αφαλατωθεί με τη μέθοδο διαπίδυσης από μεμβράνες κυτταρίνης έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8,0.

2.12. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνικών μορίων. Η πηκτή προκύπτει από τον πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου σε μακριές αλυσίδες αλλά και σε εγκάρσιες διακλαδώσεις, ο οποίος πραγματοποιείται με την προσθήκη καταλύτη (υπερθειικό αμμώνιο-APS) και ενεργοποιητή (*N,N,N',N'* – τετραμεθυλο – αιθυλενο - διαμίνη – TEMED). Οι αποδιατακτικές συνθήκες για την πρωτεΐνη δημιουργούνται με την παρουσία ιοντικών απορρυπαντικών (SDS) κατά την παρασκευή του πηκτώματος και αναγωγικών παραγόντων (β-μερκαπτοαιθανόλη) κατά την προετοιμασία του δείγματος. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Mini-Protean

3 (Biorad, Η.Π.Α.) (Σχήμα 2.13) και η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω.



Σχήμα 2.13 Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών που Mini-Protean 3 (Biorad, Η.Π.Α.)

2.12.1. Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές: την επιστοίβασης (stacking gel) και την διαχωρισμού (resolving gel). Το μίγμα της κάθε πηκτής (Πίνακας 2.5), αφού παρασκευασθεί, αφήνεται ανάμεσα στις δύο ειδικές γυάλινες πλάκες για περίπου 20 min να πολυμεριστεί, ξεκινώντας πρώτα από την πηκτή διαχωρισμού και συνεχίζοντας με την πηκτή επιστοίβασης, στην οποία τοποθετείται και ειδικό χτενάκι για το σχηματισμό θηκών φόρτωσης δειγμάτων. Ο λόγος των όγκων των δύο πηκτών είναι περίπου 2:1. Όταν ολοκληρωθεί και ο πολυμερισμός της πηκτής επιστοίβασης, το σύστημα των γυάλινων πλακών τοποθετείται στη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, στην οποία προστίθενται περίπου 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος 30,3 g/L Tris, 144 g/L γλυκίνη, 1% w/v SDS, pH 8,3.


Πίνακας 2.5. Σύσταση πηκτών για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Μίγμα Πηκτής Διαχωρισμού (Resolving Gel) 12,5%		Μίγμα Πηκτής Επιστοίβασης (Stacking Gel) 4%	
Υπερκάθαρο νερό	3.5 mL	Υπερκάθαρο νερό	3 mL
0,75 M Tris, 0.2% w/v SDS, pH 8,8	9.4 mL	0,25 M Tris, 0.2% w/v SDS, pH 6,8	3.75 mL
40% bis-acrylamide	5.8 mL	40% bis-acrylamide	0.75 mL
TEMED	30 µL	TEMED	20 µL
10% w/v APS	90 µL	10% w/v APS	60 µL

2.12.2. Προετοιμασία δειγμάτων – Ηλεκτροφόρηση

Τα προς ανάλυση δείγματα όγκου 15 μL (1-5 μg πρωτεΐνης) αναμειγνύονται με 7 μL διαλύματος φόρτωσης (1 g SDS, 5 ml 0,25 M Tris pH 6,8, 2,5 ml 50% w/w γλυκερόλη, 2,5 ml μερκαπτοαιθανόλη, 4 ml 0,1% w/v κυανούν βρωμοφαινόλης) και ακολουθεί βρασμός για 5-7 min. Εκτός από τα δείγματα, στο πήκτωμα τοποθετούνται και 7 μL πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) (Πίνακας 2.6), για τον προσδιορισμό του βάρους των πρωτεϊνών των δειγμάτων. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό 35 mA/πήκτωμα για περίπου 90 min.

Πίνακας 2.6. Σύσταση και απεικόνιση πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas



MW (kDa)	Πρωτεΐνη	Προέλευση
116	β – γλυκοζιδάση	E. coli
66,2	αλβουμίνη ορού βοδινού	πλάσμα βοδινού αίματος
45	Ω – αλβουμίνη	ασπράδι αυγού κότας
35	γαλακτική αφυδρογονάση	μύες χοίρων
25	REase Bsp98I	E. coli
18,4	β -λακτογλοβουλίνη	γάλα αγελάδος
14,4	λυσοζύμη	ασπράδι αυγού κότας

2.12.3. Εμφάνιση πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτή Πολυακρυλαμίδιου

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή απομακρύνεται από τις γυάλινες πλάκες και εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης (staining solution) 40% v/v μεθανόλη, 10% v/v οξικό οξύ, 0.4% w/v Coomassie Brilliant Blue G-250 για 20 min υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αποχρωματισμός της πηκτής με εμβάπτιση σε διάλυμα (destaining solution) 40% v/v μεθανόλη, 10% v/v οξικό οξύ και συνεχείς πλύσεις με αυτό μέχρι την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών.

Σε περίπτωση όπου η ποσότητα των πρωτεϊνών δεν ήταν αρκετή ώστε να φανεί με την παραπάνω μέθοδο χρώσης, ακολουθήθηκε η μέθοδος της χρώσης με άργυρο

(Silver Staining). Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ευαισθησία κατά την ανίχνευση των πρωτεϊνών. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται ακολούθως:

Μετά τον αποχρωματισμό του gel:

- 1) Απομάκρυνση οξικού (CH_3COOH): 2 x 20 min πλύση με 50% v/v EtOH
1 x 30 min πλύση με 30% v/v EtOH
πλύση με υπερκάθαρο H_2O
- 2) Προετοιμασία για χρώση: Επώαση με διάλυμα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0,02%
3 x πλύση με υπερκάθαρο H_2O
- 3) Χρώση: εμβάπτιση του gel σε διάλυμα AgNO_3 0,2% w/v, HCHO 0,075% v/v
Επώαση για 20 min

Πλύση με υπερκάθαρο H_2O (2 x 20 sec)
- 4) Εμφάνιση: Επώαση με διάλυμα Na_2CO_3 6% w/v, HCHO 0,05% v/v, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0,02% w/v (το οποίο προστίθεται στο μίγμα λίγο πριν την εμβάπτιση)

Όταν αρχίσουν να εμφανίζονται οι ζώνες των πρωτεϊνών και το gel αποκτά χαρακτηριστικό ασημένιο – καφέ χρώμα τότε η εμφάνιση επιβραδύνεται με νερό και σταματά στο επιθυμητό στάδιο με την προσθήκη 50 mL διαλύματος 50% v/v CH_3OH , 12% v/v CH_3COOH για 10 min. Επισημαίνεται, ότι όλα τα διαλύματα φτιάχτηκαν με υπερκάθαρο νερό και κάθε πλύση ή επώαση γινόταν με 25 mL από το εκάστοτε διάλυμα.

2.13. Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνικού φορτίου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε με δύο μεθόδους: τη μέθοδο Lowry (Lowry et al, 1951) και με μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm (Stoscheck et al, 1990).

Στην πρώτη περίπτωση, ο υπολογισμός της συγκέντρωσης έγινε με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις της πρότυπης πρωτεΐνης αλβουμίνη ορού από βοδινό (Bovine Serum Albumin-BSA) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ, Σχήμα 4). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται παρακάτω:

- Δημιουργία stock διαλυμάτων (σε θερμοκρασία δωματίου):

1% w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (A)

2% w/v Sodium Potassium tartate (B)

0,2 M NaOH (C)

4% w/v Na_2CO_3 (D)

50% v/v Folin (F)

- Δημιουργία φρέσκου διαλύματος (E) σε κάθε ανάλυση με σύσταση:

1% A + 1% B + 49% C + 49% D (v/v)

- Ανάμιξη διαλύματος (E) με το εκάστοτε δείγμα σε δοκιμαστικό σωλήνα, σε αναλογία:

2,5 mL (E) + 0,5 mL δείγμα

Αφήνεται σε ηρεμία για 10 min

- Προσθήκη και ανάμιξη με 250 μL (F), αφήνεται σε ηρεμία για 30 min
- Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD) σε φωτόμετρο με μήκος κύματος 750 nm

Η αρχή πάνω στην οποία βασίζεται η μέθοδος είναι ένας συνδυασμός της αντίδρασης των ιόντων χαλκού με τους πεπτιδικούς δεσμούς σε αλκαλικό περιβάλλον και την οξείδωση των αρωματικών αμινοξέων. Αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη μέθοδο που μετρά συγκεντρώσεις πρωτεϊνών 0,01–1,0 mg/mL, και οπτικά βασίζεται στην αντίδραση των κατιόντων Cu, τα οποία προέρχονται από την οξείδωση των πεπτιδικών δεσμών, με την φολίνη, η οποία ανάγεται και είναι δυνατή η ανίχνευση της μετρώντας την απορρόφηση στα 750 nm.

Στη δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιείται το μαθηματικό μοντέλο:

$$C(\text{mg/mL}) = (\text{OD}_{280} \times \text{MW}) / \epsilon$$

όπου:

- C(mg/mL), η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε mg/mL
- OD_{280} , η τιμή της οπτικής απορρόφησης του διαλύματος στα 280 nm
- MW, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης
- ϵ , ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης ($\text{M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$) προσδιορισμένος με το πρόγραμμα ProtParam του ExpASy (Gasteiger et al, 2003).

Κατά τη μέθοδο αυτή, μια ποσότητα δείγματος εισάγεται σε μια κυψελίδα χαλαζία λόγω του ότι μετράται η απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας, και από το παραπάνω μαθηματικό μοντέλο υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα.

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό ενός δείγματος πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford, κατά την οποία το αντιδραστήριο παίρνει χαρακτηριστικό μπλε χρώμα, σε περίπτωση ύπαρξης πρωτεΐνης.

3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός

3.1. Ένζυμα

Για τις αντιδράσεις υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα: το πολυενζυμικό κυτταρινολυτικό μίγμα Celluclast, από το μύκητα *Trichoderma reesei* και το Novozyme 188 που περιέχει β – γλυκοζιδάσες του μικροοργανισμού *Aspergillus niger*, της εταιρίας Novozymes (Δανία). Επίσης χρησιμοποιήθηκε και μια αφυδρογονάση της κελλοβιόζης CDH του μικροοργανισμού *Rychnororus cinnabarinus*, η οποία παράχθηκε στο εργαστήριο του Dr Jean-Guy Berrin (INRA, UMR 1163 BCF, Μασσαλία, Γαλλία).

3.2 Υποστρώματα και αντιδραστήρια

Για την ανίχνευση ενεργότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα υποστρώματα: καρβοξυμέθυλ- κυτταρίνη χαμηλού ιξώδους (carboxymethyl- cellulose, Low – viscosity CMC) από την εταιρία Fluka (Ελβετία), ξυλάνη οξιάς (birchwood xylan) από την εταιρία SIGMA (Γερμανία), β – γλουκάνη κριθαριού μεσαίου ιξώδους (barley β – glucan, medium viscosity), λιχενάνη (lichenan), αραβοξυλάνη σίτου (wheat arabinoxylan) από την εταιρία MEGAZYME (Ιρλανδία) και μικροκρυσταλλική κυτταρίνη Avicel από την εταιρία Macherey – Nagel (Γερμανία). Επιπροσθέτως, χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα κελλο – ολιγοσακχαριτών μήκους αλυσίδας 4 – 5 κελλοτετραόζη (cellotetraose), κελλοπενταόζη (cellopentaose) από την εταιρία SIGMA (Γερμανία). Τέλος, παρασκευάστηκε και υπόστρωμα PASC (Phosphoric Acid Swollen Protein) από Avicel.

Για τα πειράματα συνεργιστικής δράσης χρησιμοποιήθηκε ως αναγωγικός παράγοντας ασκορβικό οξύ από την εταιρία MERCK (Γερμανία), και ως λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα, έλατο επεξεργασμένο με ατμό υπό ήπιες όξινες συνθήκες (Steam pretreated under weak acidic conditions spruce, PS) από την εταιρία SEKAB E-Technology (Σουηδία), με σύσταση 51,4% γλουκάνη, 7 % ημικυτταρίνη, 39,7 % λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 1,6% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ.

Για το πείραμα υδρόλυσης σε ημι – βιομηχανική κλίμακα, χρησιμοποιήθηκε ως λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα, υδροθερμικά κατεργασμένο άχυρο σίτου (pretreated wheat straw, PWS) από την εταιρία Inbicon (Skaerbaek, Δανία). Ο χρόνος παραμονής στον υδροθερμικό αντιδραστήρα ήταν κατά μέσο όρο 12 min, ενώ η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή στους 190 °C με την παροχή ατμού. Η

σύσταση του PWS (50.2% γλουκάνη, 3.8% ημικυτταρίνη, 25.5% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ, 2.8% άμυλο) προσδιορίσθηκε με βάση γνωστή διαδικασία (Xiros et al, 2009).

3.2.1. Παρασκευή υποστρωμάτων

Κάποια από τα υποστρώματα που αναφέρθηκαν παραπάνω απαιτούν ειδική προκατεργασία, η οποία περιγράφεται ακολούθως.

Υπόστρωμα CMC (Low viscosity) και λιχενάνης

Το υπόστρωμα αναμειγνύεται με την κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος, για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης. Η προσθήκη του υποστρώματος γίνεται με πολύ αργό ρυθμό υπό ήπια θέρμανση, προς αποφυγή δημιουργίας δυσδιάλυτων συσσωματωμάτων.

Υπόστρωμα β – γλουκάνης κριθαριού (barley β – glucan)

Το υπόστρωμα αναμειγνύεται με EtOH 95% σε συγκέντρωση 5% v/v και κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος. Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού, και κατόπιν αναδεύεται για 10 λεπτά χωρίς επιπρόσθετη θέρμανση, ώστε διαλυθεί όλο το υπόστρωμα. Τέλος, το διάλυμα που προκύπτει ογκομετρείται, με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης υποστρώματος.

Υπόστρωμα αραβοξυλάνη σίτου (wheat arabinoxylan)

Το υπόστρωμα αναμειγνύεται με EtOH 95% σε συγκέντρωση 8% v/v και κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος. Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού, και κατόπιν αφήνεται να αναδεύεται υπό βρασμό για 10 λεπτά, ώστε διαλυθεί όλο το υπόστρωμα. Τέλος, το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου ογκομετρείται, με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης υποστρώματος.

Υπόστρωμα ξυλάνης οξιάς (Birchwood xylan)

Προθερμαίνεται η κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος στους 80 °C και ακολουθεί προσθήκη του υποστρώματος. Το μίγμα αναδεύεται για 10 λεπτά στη θερμοκρασία αυτή, και κατόπιν θερμαίνεται έως βρασμού. Κατόπιν, αφαιρείται η θέρμανση και το διάλυμα που προκύπτει αφήνεται υπό ανάδευση για 16 - 18 ώρες. Τέλος ακολουθεί ογκομέτρηση του διαλύματος για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης του υποστρώματος.

Υπόστρωμα Phosphoric Acid Swollen Cellulose (PASC)

Για την παρασκευή του υποστρώματος PASC ακολουθήθηκαν τα ακόλουθα βήματα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Walseth et al, 1952):

1. Διαλύθηκε η επιθυμητή ποσότητα μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης Avicel σε κατάλληλη ποσότητα φωσφορικού οξέος σε συγκέντρωση 4% w/v. Το μίγμα αναδεύτηκε για 1 ώρα στους 4 °C
2. Αραιώθηκε 200 φορές με υπερκάθαρο νερό, και το προκύπτον διάλυμα αναδεύτηκε για 1 ώρα.
3. Διαχωρίστηκε η επεξεργασμένη κυτταρίνη με τη διήθηση με τη χρήση διηθητικού χαρτιού (filter paper).
4. Ακολούθησαν πλύσεις με υπερκάθαρο νερό (4 φορές),
5. Πλύσεις με NaHCO₃, για την εξουδετέρωση των εναπομεινάντων φωσφορικών (2 φορές)
6. Πλύσεις με υπερκάθαρο νερό (2 φορές)
7. Η πάστα κυτταρίνης που παραλαμβάνεται ομογενοποιείται σε γουδί, ή κάποιο μύλο ανάλογα με την ποσότητα που παρασκευάζεται.
8. Μικρή ποσότητα της υγρής πάστας λυοφυλιώθηκε, και προσδιορίστηκε η ξηρή μάζα του δείγματος, για τον ακριβή προσδιορισμό της κυτταρίνης η οποία προέκυψε μετά την επεξεργασία.
9. Ακολούθησε επαναιώρηση της προκύπτουσας πάστας σε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης υποστρώματος.

3.3. Ανίχνευση ενεργότητας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων που προέκυπταν από τις αντιδράσεις των διαφόρων υποστρωμάτων προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος, DNS (Miller et al, 1959). Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με διαδοχικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκόζης συγκέντρωσης 2mg/mL (Παράρτημα, Σχήμα 5).

3.4. Βέλτιστες συνθήκες δράσης των ενζύμων

Οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και pH είναι γνωστές από προηγούμενες μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν πάνω στα ίδια ένζυμα (Δημαρόγκωνα, 2012) , τα

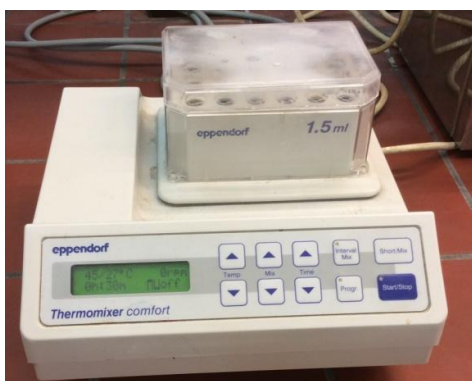
οποία όμως είχαν μερικά αμινοξέα παραπάνω στο αμινοτελικό τους άκρο. Θεωρήθηκε λοιπόν πως δεν υπήρχε δραματική μεταβολή των βέλτιστων συνθηκών στις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με το σωστό αμινοτελικό άκρο. Οι βέλτιστες συνθήκες για τις δύο πρωτεΐνες φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1. Βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίες και pH για τις AA9 από προηγούμενη μελέτη.

Ένζυμο	T _{optimum} (°C)	pH _{optimum}
StCel61	65	5
FoCel61	40	7

3.5. Αντιδράσεις ανίχνευσης ενεργότητας και συνεργισισμού

Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε σωλήνες τύπου Eppendorf των 2 mL, οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενο επωαστήρα Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία) (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1. Θερμαινόμενο επωαστήρα Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία)

Σε πειράματα που λάμβαναν χώρα για 24 ώρες λαμβανόταν δείγμα με το πέρας της αντίδρασης, ενώ για πειράματα μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας, λαμβάνονταν δείγματα από τις αντιδράσεις και μετρούνταν τα αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο DNS. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν εις διπλούν.

3.6. Πειράματα συνεργισμού StCel61 Native N – Terminal

Στα πειράματα αυτά, εξετάστηκε η απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων από το σύστημα PMO –κυτταρινασών, και μελετήθηκε η επίδραση του φυσικού αμινοτελικού άκρου της StCel61 κατά τη συνεργιστική δράση της πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με αυξανόμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης StCel61, τόσο με το φυσικό όσο και με το αμινοτελικό άκρο που φέρει τα επιπλέον αμινοξέα. Η σύσταση και οι συνθήκες, των αντιδράσεων που έλαβαν χώρα φαίνεται ακολούθως.

Πίνακας 3.2. Συνθήκες και Σύσταση πειραμάτων συνεργισμού StCel61 Native N – Terminal

Συνθήκες αντιδράσεων		Sample (mg/g υποστρώματος)	Celluclast	StCel61	StCel61 Native N -Terminal	Novozyme 118 (μL)
Υπόστρωμα (Spruce, mg/mL)	30	A	11	-	-	61
Buffer Citrate - Phosphate +0,02% w/v NaN ₃ (mM)	100	B	11	3	-	61
pH	5	C	11	6	-	61
T (°C)	45	D	11	9	-	61
V _{reaction} (mL)	1,5	E	11	-	3	61
Ανάδευση (rpm)	900	F	11	-	6	61
t _{reaction} (h)	120	G	11	-	9	61
		H	22	-	-	61
		Control	-	-	-	-

3.7. Πειράματα συνεργιτισμού *FoCel61* Native N - Terminal

Στην περίπτωση της *FoCel61* Native N - terminal ακολουθήθηκε διαφορετική προσέγγιση, καθώς τοποθετήθηκε στην αντίδραση η μέγιστη συγκέντρωση του ενζύμου (9 mg/g υποστρώματος), ενώ παράλληλα προστέθηκε ως αναγωγικός παράγοντας στην αντίδραση αφυδρογονάση της κελλοβιόζης. Οι συνθήκες των αντιδράσεων, καθώς και η σύστασή τους παρουσιάζονται ακολούθως.

Πίνακας 3.3. Συνθήκες και σύσταση πειραμάτων συνεργιτισμού *FoCel61* Native N – Terminal

Συνθήκες αντιδράσεων		Sample (mg/g substrate)	Celluclast	<i>FoCel61</i> Native N - Terminal	CDH	Novozyme 118 (μL)
Υπόστρωμα (Spruce, mg/ mL)	30	A	11	-	-	61
Buffer Citrate - Phosphate +0,02% w/v NaN ₃ (mM)	100	B	11	9	-	61
pH	5,5	C	11	9	1	61
T (°C)	45	D	11	-	1	61
V _{reaction} (mL)	1,5	Control	-	-	-	-
Ανάδευση (rpm)	900					
t _{reaction} (h)	120					

3.8. Πειράματα ανίχνευσης ενεργότητας της *StCel61* Native N – Terminal

Οι συνθήκες των αντιδράσεων με τα διάφορα υποστρώματα φαίνονται παρακάτω.

Πίνακας 3.4. Συνθήκες και σύσταση πειραμάτων ανίχνευσης ενεργότητας *StCel61* Native N – Terminal

Συνθήκες αντιδράσεων		Υποστρώματα
Υπόστρωμα (mg/ mL)	10	CMC Lichenan barley β - glucan Wheat arabinoxylan Birchwood xylan
Buffer Citrate - Phosphate +0,02% w/v NaN_3 (mM)	50	
pH	5	
T ($^{\circ}\text{C}$)	50	
V_{reaction} (mL)	0,5	
Ανάδευση (rpm)	1000	
t_{reaction} (h)	24	
C_{protein} (μM)	1	

Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η δράση της *StCel61* σε υποστρώματα μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (Avicel), και επεξεργασμένης με φωσφορικό οξύ κυτταρίνης (PASC), υπό την παρουσία δεϋδρογονάσης της κελλοβιόζης αλλά και του ασκορβικού οξέος ως αναγωγικοί παράγοντες. Στα δείγματα όπου προστέθηκε η CDH ως αναγωγικός παράγοντας, πραγματοποιήθηκε προσθήκη μικρής ποσότητας κελλοβιόζης. Οι συνθήκες των αντιδράσεων φαίνεται παρακάτω.

Πίνακας 3.5. Συνθήκες και σύσταση πειραμάτων ανίχνευσης ενεργότητας *StCel61* Native N – Terminal σε υποστρώματα Avicel και PASC υπό την παρουσία αναγωγικών παραγόντων

Συνθήκες αντιδράσεων		Sample	<i>StCel61</i> (μM)	Ascorbic (mM)	CDH (μM)	Cellobiose (μM)
Υπόστρωμα (mg/ mL)*	10	1	2,6	-	-	-
Buffer Citrate - Phosphate +0,02% w/v NaN_3 (mM)	50	2	2,6	2	-	-
pH	5	3	2,6	-	0,8	12,5
T ($^{\circ}\text{C}$)	50	4	-	2	-	-
V_{reaction} (mL)	0,5	5	-	-	0,8	12,5
Ανάδευση (rpm)	1000	6	-	-	-	-
t_{reaction} (h)	48					
C_{CuSO_4} (μM)	20					

* Για το PASC η συγκέντρωσή του στις αντιδράσεις ήταν 2,3 mg/mL

3.9. Πειράματα ανίχνευσης ενεργότητας της *FoCel61* Native N – Terminal

Οι συνθήκες των αντιδράσεων με τα διάφορα υποστρώματα φαίνονται παρακάτω.

Πίνακας 3.6. Συνθήκες και σύσταση πειραμάτων ανίχνευσης ενεργότητας *FoCel61* Native N – Terminal

Συνθήκες αντιδράσεων		Υποστρώματα
Υπόστρωμα (mg/ mL)	10	CMC Lichenan barley β - glucan Wheat arabinoxylan Birchwood xylan
Buffer Citrate - Phosphate +0,02% w/v NaN ₃ (mM)	50	
pH	7	
T (°C)	40	
V _{reaction} (mL)	0,5	
Ανάδευση (rpm)	1000	
t _{reaction} (h)	24	
C _{protein} (μM)	1	

Η *FoCel61* δοκιμάστηκε περαιτέρω στη β – γλουκάνη, όπως και σε υποστρώματα Avicel και PASC όπου πραγματοποιήθηκαν πειράματα με αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης και για περισσότερο χρόνο, καθώς επίσης μελετήθηκε και το ενισχυτικό φαινόμενο της δεϋδρογονάσης της κελλοβιόζης και του ασκορβικού οξέος ως αναγωγικών παραγόντων. Οι συνθήκες των αντιδράσεων φαίνεται παρακάτω.

Πίνακας 3.7. Συνθήκες και σύσταση πειραμάτων μελέτης ενεργότητας *FoCel61* Native N – Terminal σε υποστρώματα β – γλουκάνης, Avicel και PASC υπό την παρουσία αναγωγικών παραγόντων

Συνθήκες αντιδράσεων		Sample	<i>FoCel61</i> (μM)	Ascorbic (mM)	CDH (μM)	Cellobiose (μM)
Υπόστρωμα (mg/ mL)*	10	1	2,6	–	–	–
Buffer Citrate - Phosphate +0,02% w/v NaN ₃ (mM)	50	2	2,6	2	-	–
pH	7	3	2,6	–	0,8	12,5
T (°C)	40	4	–	2	–	–
V _{reaction} (mL)	0,5	5	–	–	0,8	12,5
Ανάδευση (rpm)	100 0	6	–	–	–	–
t _{reaction} (h)	48					
C _{CuSO4} (μM)	20					

* Για το PASC η συγκέντρωσή του στις αντιδράσεις ήταν 2,3 mg/mL

Ακολούθησαν αντιδράσεις με κελλολιγοςακχαρίτες, και συγκεκριμένα με κελλοτετραόζη και κελλοπενταόζη. Ειδικά στην περίπτωση της κελλοπενταόζης μελετήθηκε και αυξανόμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης (6,6/ 8,8 μM). Οι συνθήκες και η σύσταση των αντιδράσεων παρουσιάζεται παρακάτω.

Πίνακας 3.8. Συνθήκες και σύσταση πειραμάτων μελέτης ενεργότητας FoCel61 Native N – Terminal σε υποστρώματα κελλοτετραόζης και κελλοπενταόζης υπό την παρουσία αναγωγικών παραγόντων.

Συνθήκες αντιδράσεων		Sample	FoCel61 (μM)	Ascorbic (mM)	CDH (μM)
Υπόστρωμα (mg/ mL)	10	1	4,4/6,6 /8,8	–	–
Buffer Citrate - Phosphate +0,02% w/v NaN ₃ (mM)	50	2	4,4/6,6 /8,8	2	
pH	5	3	4,4/6,6 /8,8	–	1,4
T ($^{\circ}\text{C}$)	40	4	–	2	–
V _{reaction} (mL)	0,5	5	–	–	1,4
Ανάδευση (rpm)	100 0	6	–	–	–
t _{reaction} (h)	48				
C _{CuSO₄} (μM)	20				

3.10. Χαρακτηρισμός προϊόντων αντιδράσεων υδρόλυσης

Ο χαρακτηρισμός των προϊόντων από τις αντιδράσεις ανίχνευσης ενεργότητας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωματογραφίας ανιόνταλλαγής υψηλής απόδοσης (HPLC). Η στήλη ανιόνταλλαγής Carbo Pac PA1 ήταν συζευγμένη με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή ED40 – Dionex, δίνοντας τη δυνατότητα ανίχνευσης οξειδωμένων και μη κελλολιγοςακχαριτών. Πριν την ανάλυση των δειγμάτων, μια σειρά από πρότυπα δείγματα (φουκόζης, γλυκόζης, κελλοβιόζης, κελλοτριόζης, κελλοτετραόζης, κελλοπενταόζης, και γλυκονικού οξέος) ανιχνεύθηκαν επιτυχώς. Η φουκόζη χρησιμοποιήθηκε ως ουσία αναφοράς σε κάθε δείγμα, σε περίπτωση μετατόπισης της βασικής γραμμής είτε των χρόνων έκλουσης των προϊόντων. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση ήταν NaOH 0,1 M (A) με γραμμικά αυξανόμενη συγκέντρωση (gradient) NaOAc 1M σε διάλυμα 0,1 M NaOH (B). Η μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται ακολούθως:

1^ο στάδιο: 10 min 90% A/ 10% B



2^ο στάδιο: 25 min 70% A/ 30% B



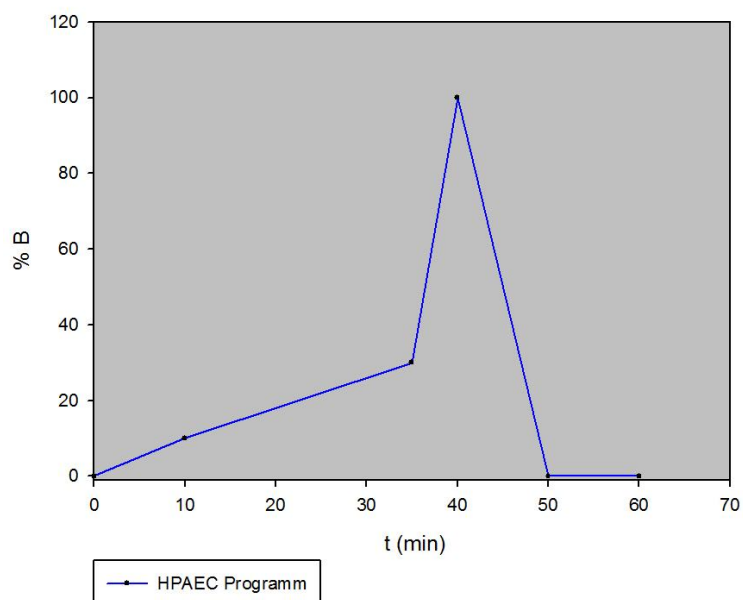
3^ο στάδιο: 5 min 100%B



4^ο στάδιο: 10 min 0% B (τέλος gradient)



5^ο στάδιο: 10 min 100% A (εξισορρόπηση της στήλης)



Σχήμα 3.7. Μέθοδος ανάλυσης με αυξανόμενη συγκέντρωση NaOAc (gradient) για την ανίχνευση οξειδωμένων και μη κελλο - ολιγοσακχαριτών με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής υψηλής απόδοσης (HPAEC).

3.11. Μελέτη αποικοδόμησης υδροθερμικά κατεργασμένου άχρου σίτου παρουσία *StCel61* Native N – terminal σε μεγάλη κλίμακα

Επιχειρήθηκε η υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχου υποστρώματος, υδροθερμικά προκατεργασμένο άχρου σίτου (PWS), υπό την παρουσία της AA9 του *Sporotrichum thermophile* (*StCel61* Native N – terminal). Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας (crude) που περιείχε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, αφού πρώτα πέρασε από συσκευή υπερσυμπύκνωσης Millipore, (Η.Π.Α). Η εκτίμηση της πορείας της αντίδρασης, έγινε με τη μέτρηση του ιξώδους δειγμάτων, τα οποία λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα (2, 4, 24 h), σε ρεόμετρο, Anton Paar Physica MCR rheometer, (Αυστρία). Οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται ακολούθως.

Πίνακας 3.9. Συνθήκες και σύσταση πειραμάτων υδρόλυσης PWS παρουσία *StCel61* Native N – terminal

Συνθήκες Υδρόλυσης PWS παρουσία <i>StCel61</i> Native N – terminal	
Συγκέντρωση PWS (% ξηρής βάσης)	16
m_{reaction} (g)	500
pH	6,6
T (°C)	50
Συγκέντρωση <i>StCel61</i> crude (mg _{συνολικής πρωτεΐνης} / g ξηρού υποστρώματος)	2,7
t_{reaction} (h)	24

Η αντίδραση έλαβε χώρα σε αντιδραστήρα υγροποίησης, δύο θέσεων (τυμπάνων), όπου στη μία έλαβε χώρα η αντίδραση παρουσία της *StCel61*, ενώ στη δεύτερη έλαβε χώρα η αντίδραση ελέγχου (Blank), όπου το υπόστρωμα αναμίχθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH = 6,6.



A



B



Γ

Σχήμα 3.8. (Α) Συσκευή υπερσυμπύκνωσης Millipore, (Η.Π.Α), (Β) Αντιδραστήρας υγροποίησης, δύο θέσεων (τυμπάνων), (Γ) ρεόμετρο, Anton Paar Physica MCR rheometer, (Αυστρία)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Χαρακτηριστικά νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από το γονιδίωμα του *S. thermophile* και του *F.oxysporum*

Ο νηματοειδής μύκητας *S. thermophile* παρουσιάζει υψηλό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Το γεγονός ότι παράγει λιγότερες κυτταρινάσες και περισσότερες πρωτεΐνες της οικογένειας AA9 σε σχέση με τον *T.reesei* (Bhat et al, 1987), ενώ διασπά την κυτταρίνη γρηγορότερα, σε συνδυασμό με τη θερμόφιλη φύση του, έστρεψε το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από το κυτταρινολυτικό του σύστημα για την ανακάλυψη νέων ενζυμικών ενεργοτήτων (Berka et al, 2011).

Απ' την άλλη μεριά ο μεσόφιλος μύκητας *F. oxysporum* εμφανίζει στο γονιδίωμα του πάρα πολλές αλληλουχίες που κωδικοποιούν υποθετικές πρωτεΐνες με ομολογία σε μέλη της οικογένειας AA9. Γενικότερα, μελέτες έχουν αποδείξει τον ισχυρό κυτταρινολυτικό χαρακτήρα του μικροοργανισμού αυτού (Panagiotou et al, 2003; Christakopoulos et al, 2008).

Με τη βοήθεια βιοπληροφοριακών εργαλείων προσδιορίστηκαν τα χαρακτηριστικά των γονιδίων, που εκφράζουν τις υπό εξέταση πρωτεΐνες, τα οποία φαίνονται παρακάτω.

Πίνακας 1.1. Χαρακτηριστικά των γονιδίων *StCel61* Native N – terminal και *FoCel61* Native N – terminal. Για την κάθε πρωτεΐνη, η σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης προσδιορίσθηκε με το SignalP (Emanuelsson et al 2007), το θεωρητικό M.B. και το pI με το ProtParam (Gasteiger et al, 2005), ενώ οι θέσεις γλυκοζυλίωσης με τα NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCGlyc/>, (Gupta et al, 2004)) και NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>, (Julenius et al, 2005)).

Χαρακτηριστικά	<i>StCel61</i>	<i>FoCel61</i>
Κωδικός Genome Portal/ Broad Institute	46583	<i>Foxg_09688.3</i>
Περιοχή (Scaffold)	2:3103350-3104378	12: 400758-401801
Μήκος γονιδίου	1029	1044
Αριθμός αμινοξέων	343	242
Δομικά αυτοτελείς περιοχές – Οικογένεια CAZy	Αμινοξέα 4 – 237: AA9 Αμινοξέα 310 – 338: CBM 1	AA9
Αριθμός εξωνίων	1	1
Σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης	Αμινοξέα 1 – 20: MSKASALLAGLTGAALVAA	Αμινοξέα 1 – 19: MHCNLSLGVVAALLAGANA
Θεωρητικό Μοριακό Βάρος (Da)	33238	26300

Χαρακτηριστικά	StCel61	FoCel61
Θεωρητικό pI	5,59	7,12
Περιοχές Γλυκοζυλίωσης	Πιθανές θέσεις N – Γλυκοζυλίωσης: 1	Πιθανές θέσεις N – Γλυκοζυλίωσης: 1
	Πιθανές θέσεις O – Γλυκοζυλίωσης: 23	Πιθανές θέσεις O – Γλυκοζυλίωσης: 1

Με τη βοήθεια του protein BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) εντοπίστηκαν πολλές αλληλουχίες αναγνωρισμένων αλλά και υποθετικών πρωτεϊνών AA9 (πρώην GH61) της βάσης δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) , οι οποίες εμφανίζουν μεγάλη ομολογία με τις 2 πρωτεΐνες που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη.

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της AA9 του *Sporotrichum thermophile*, οι πρωτεΐνες με την μεγαλύτερη ομολογία είναι οι υποθετικές GH61 των μικροοργανισμών *E.lata* (EMR69551.1) με 66% και *T. minima* (EON99761.1) με 64% ομολογία. Επίσης ομοιότητα βρέθηκε και με τις αναγνωρισμένες GH61 των μικροοργανισμών *T. terrestris* (XP_003650513.1), *C. graminicola* (EFQ36324.1), *T.virens* (EHK19374.1), *T.reesei* (XP_006961567.1) κατά 63%, 62%, 61%, 60% αντίστοιχα.

Αντίστοιχα στην περίπτωση της AA9 του *Fusarium Oxysporum* εντοπίστηκαν 3 LPMO από του μικροοργανισμούς *B. zeicola* (EUC39233.1), *B.victoriae* (EUN23843.1) και *B.oryzae* (EUC46665.1) με ομοιότητα 59%, 59% και 58% αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, ομοιότητα βρέθηκε και με τις αναγνωρισμένες GH61 των *B.sorokiniana* (EMD66246.1) και *S.turcica* (EOA85303.1) κατά 59%, και την υποθετική GH61 του *N. parvum* (EOD52617.1) κατά 55%.

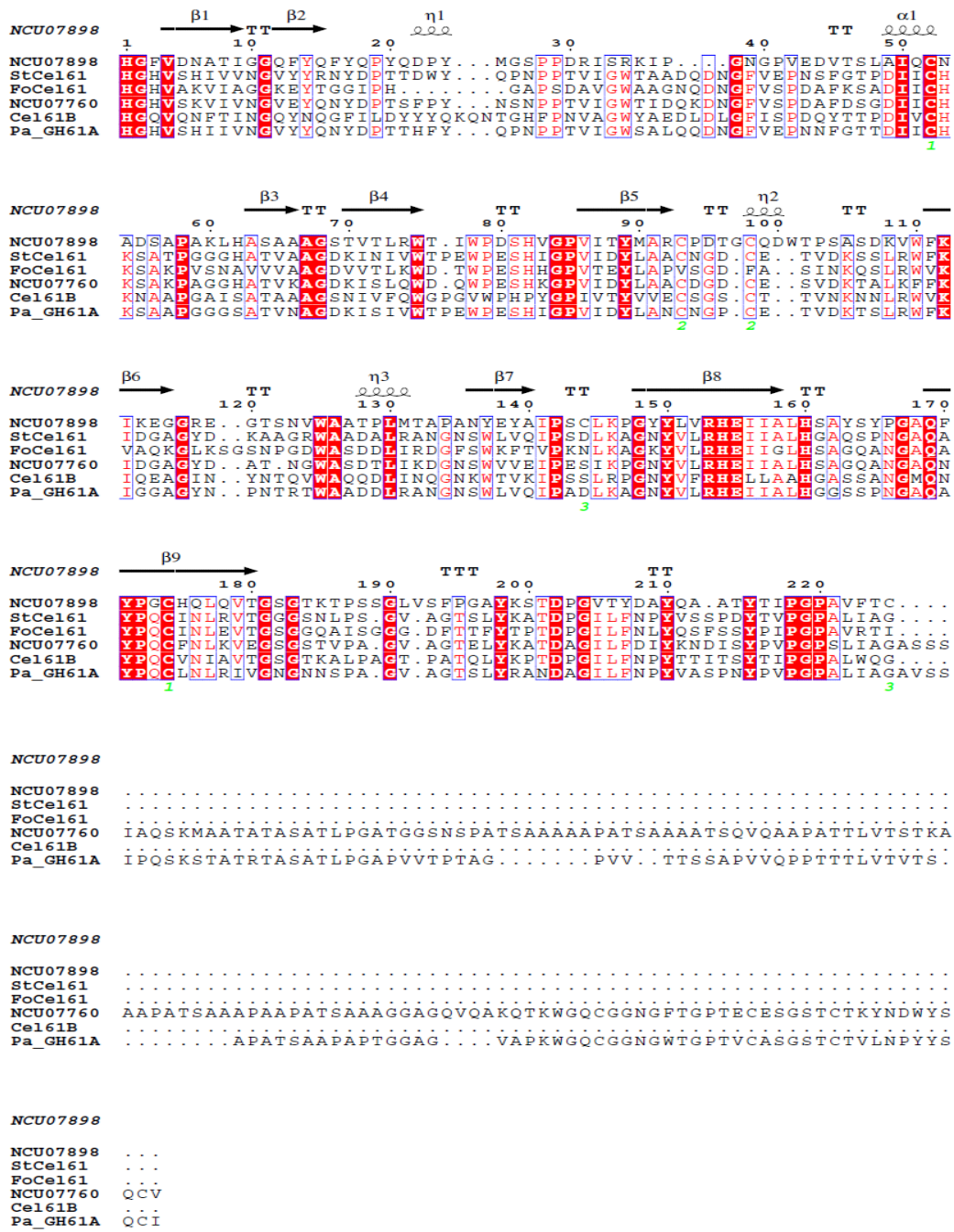
Με το ίδιο βιοπληροφοριακό εργαλείο πραγματοποιήθηκε σύγκριση των 2 υπό εξέταση AA9 και τα αποτελέσματα έδειξαν 50% ταύτιση αμινικής αλληλουχίας για 90% αλληλοεπικάλυψη κατά τη στοίχιση των δύο ακολουθιών.

Με βάση την κατηγοριοποίηση των PMOs, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της αλληλουχίας τους, επιχειρήθηκε η πρόβλεψη της στερεοειδίκευσης που εμφανίζουν οι δύο εξεταζόμενες AA9 πρωτεΐνες κατά το μηχανισμό δράσης τους. Για το σκοπό αυτό οι αλληλουχίες των AA9 των δύο μικροοργανισμών συγκρίθηκαν με την βοήθεια των βιοπληροφοριακών εργαλείων Clustal Omega και Esript 3 με ήδη κατηγοριοποιημένες AA9 από τους Vu et al. Οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών αυτών αναζητήθηκαν και βρέθηκαν στις βάσεις δεδομένων RSCB Protein Data Bank (PDB)

και CAZy (Carbohydrate Active enZymes). Επίσης, σε όσες πρωτεΐνες υπήρχε λυμένη δομή στην βάση δεδομένων PDB, ορίστηκε σαν είσοδος στο εργαλείο Esprirt με στόχο την αντιστοίχιση των δομικών χαρακτηριστικών με την αλληλουχία των πρωτεϊνών.

Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής μελέτης έδειξαν πως τόσο η AA9 του *S.thermophile* αλλά και του *F.oxysporum* εμφανίζουν τις συντηρημένες περιοχές που είναι χαρακτηριστικές σε όλες τις κατηγορίες των PMOs. Συγκεκριμένα, φαίνεται ξεκάθαρα η συντηρημένη ιστιδίνη στο αμινοτελικό άκρο όλων των πρωτεϊνών, το μοτίβο [Hx_nGP], που απαντάται για την δεύτερη ιστιδίνη – στήριγμα, καθώς επίσης και το μοτίβο [QxYxxC] της τυροσίνης (Y) του ενεργού κέντρου. Ωστόσο από την σύγκριση των πρωτεϊνών με τα μέλη των οικογενειών PMO1/2/3/3* φαίνεται, πως οι υπό εξέταση AA9 εμφανίζουν μεγαλύτερη ομολογία, δηλαδή περισσότερες συντηρημένες περιοχές με την οικογένεια PMO 3 η οποία είναι γνωστή για την οξειδωτική της δράση της τόσο στο C1 όσο και στο C4 άνθρακα του β – 1,4- γλυκοζιδικού δεσμού. Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια του βιοπλοφορικού εργαλείου protein BLAST, οι *StCel61* και *FoCel61* Native – N terminal συγκρίθηκαν με την NCU07898 του *Neurospora crassa*, χαρακτηριστικό μέλος της οικογένειας PMO3. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι δύο AA9 εμφανίζουν 41% και 38% ταύτιση αμινικής αλληλουχίας με την NCU07898, κατά την αλληλοεπικάλυψη του 99% και 100% των αλληλουχιών τους, αντίστοιχα. Οι υπόλοιπες συγκρίσεις των αλληλουχιών, της βιοπληροφορικής μελέτης παρουσιάζονται στα Σχήματα 1,2,3 του Παραρτήματος.

Σύγκριση PMO 3 – StCel61 – FoCel61

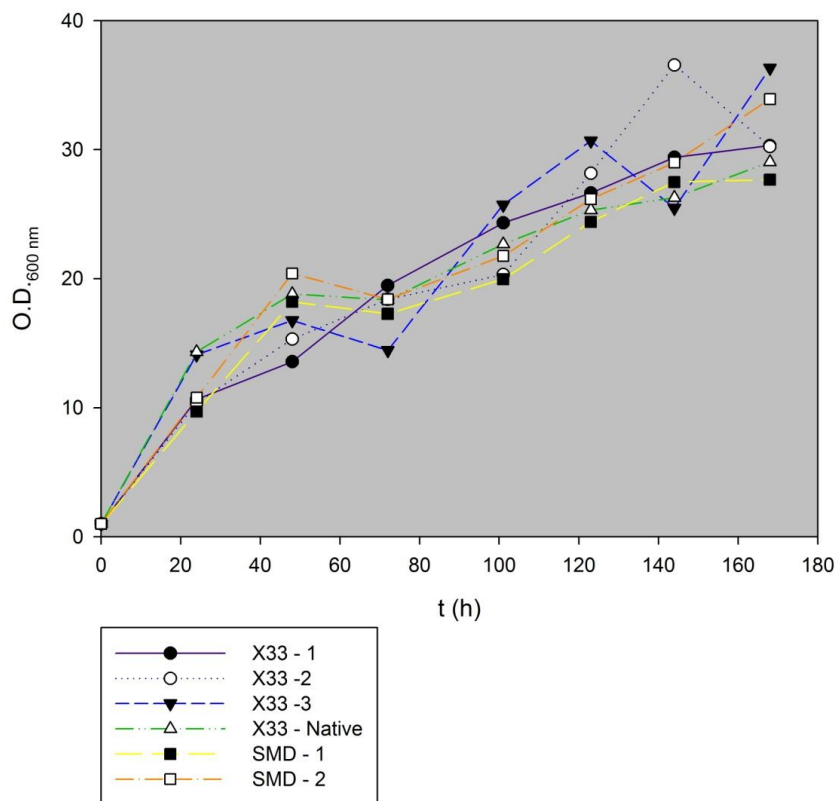


Σχήμα 1.1. Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (Multiple Sequence alignment, MSA) μεταξύ των μελών της κατηγορίας PMO3, όπως αυτή ορίστηκε από τους Vu et al (Vu et al, 2013)

2. Παραγωγή και καθαρισμός της *StCel61* Native N – Terminal

Στην περίπτωση της AA9 του *Sporotrichum thermophile* η μελέτη ξεκίνησε με την επιλογή του κατάλληλου ανασυνδυασμένου στελέχους, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.11.1. του Πειραματικού Μέρους. Συνολικά απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν σε τριβλύα - πίτες YPD - Zeocin 10 κλώνοι (5 SMD1168H και 5 X33) για να ελεγχθεί η ικανότητά τους να παράγουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε σταθερή μορφή και ικανοποιητική ποσότητα. Από αυτούς τους κλώνους 6 επιλέχθηκαν (3 X33 και 3 SMD1168H) για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας (50 mL BMGY προκαλλιέργεια για την ανάπτυξη της βιομάζας και 50 mL BMMY για την έκφραση της *StCel61*).

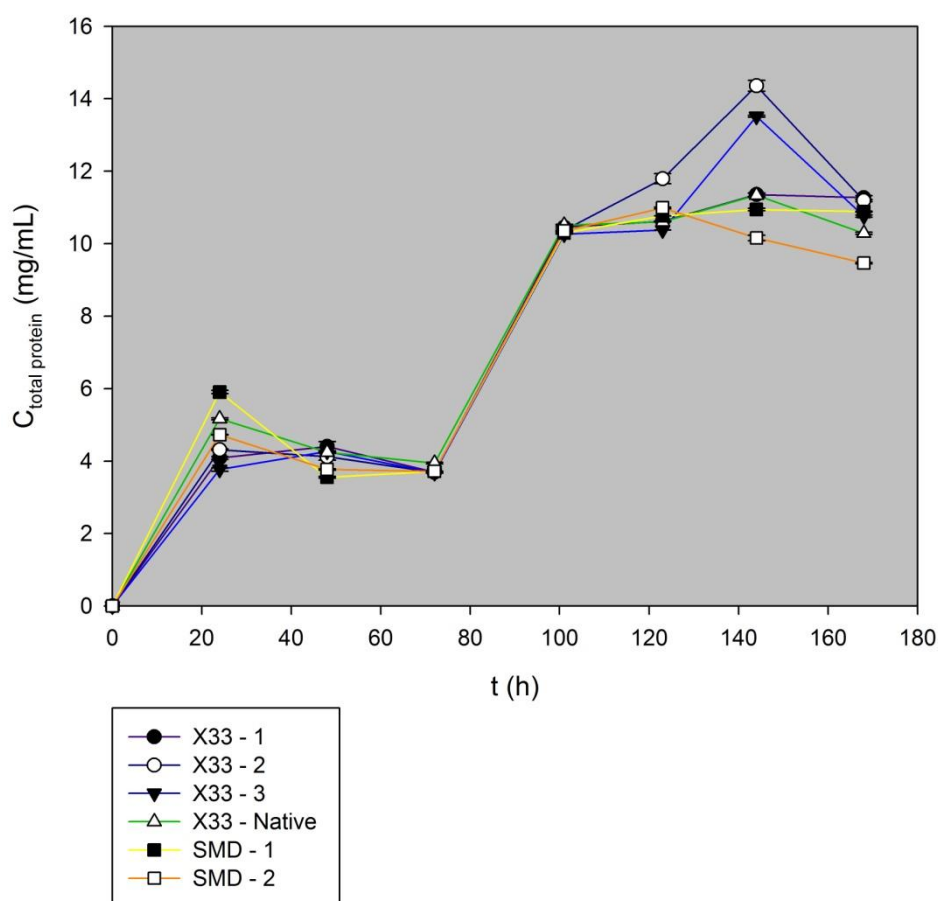
Κάθε μέρα λαμβανόταν δείγμα από την κάθε καλλιέργεια, ώστε να ληφθούν μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 600 nm. Τα διαγράμματα κυτταρικής ανάπτυξης που λήφθηκαν φαίνονται στο παρακάτω.



Σχήμα 2.1. Κυτταρική ανάπτυξη ανασυνδυασμένων στελεχών *P.Pastoris*, που εκφράζουν την *StCel61* Native N – terminal

Επίσης πραγματοποιήθηκε μια καλλιέργεια με το φυσικό στέλεχος της *Pichia Pastoris* (X33 - Native) για να χρησιμοποιηθεί ως δείγμα ελέγχου σε σχέση με τα ανασυνδυασμένα στελέχη. Πρέπει να επισημανθεί πως τα στελέχη SMD – 3 και SMD - Native δεν χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο της έκφρασης καθώς δεν αναπτύχθηκαν κατά την προκαλλιέργειά τους.

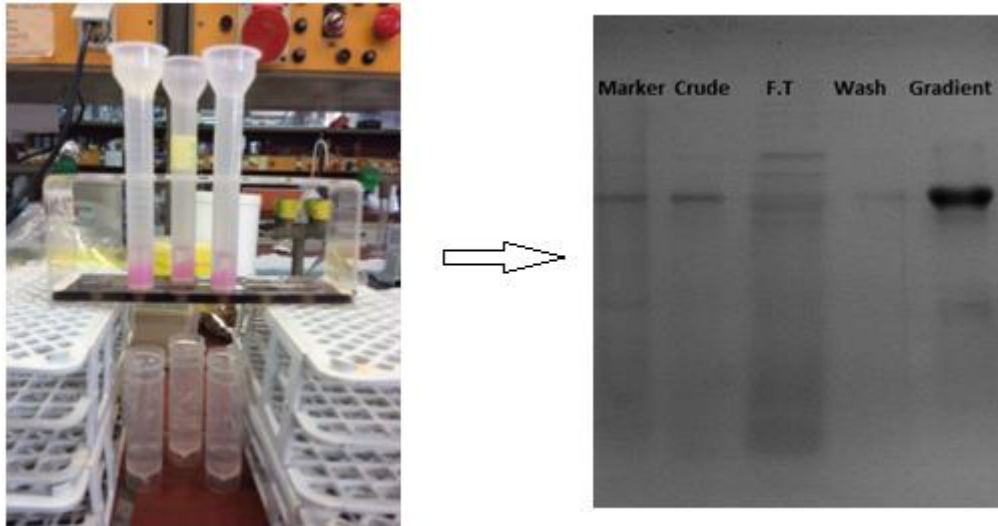
Παρακάτω φαίνεται η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών που εκκρίθηκαν εξωκυτταρικά από το κάθε στέλεχος. Όπως ήταν φυσιολογικό, το φυσικό στέλεχος εμφανίζει κάποια ποσότητα πρωτεϊνών στο εξωκυτταρικό υγρό. Στην περίπτωση των ανασυνδυασμένων στελεχών θα πρέπει να εμφανίζεται αυξημένη ποσότητα λόγω της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με την μέθοδο Lowry.



Σχήμα 2.2. Παραγωγή συνολικών πρωτεϊνών από τα ανασυνδυασμένα στελέχη της *Pichia Pastoris*, τα οποία εκφράζουν την StCel61 Native N - terminal

Από τα παραπάνω διαγράμματα φάνηκε πως το στέλεχος με την μεγαλύτερη παραγωγικότητα σε συνολική πρωτεΐνη (14,32 mg/mL την 6η μέρα) ήταν το X33 – 2 με βέλτιστο χρόνο τις 6 μέρες. Η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, μετά τον καθαρισμό της

καλλιέργειας κάθε στελέχους με τις μικρές στήλες χρωματογραφίας συγγένειας TALON. Η *StCel61* Native N - terminal εντοπίστηκε στα στελέχη X33 – 1/2/3 και SMD – 1, και τελικώς το X33 - 2 επιλέχθηκε ως το κατάλληλο στέλεχος για την παραγωγή της *StCel61* με το σωστό αμινοτελικό άκρο.



Σχήμα 2.3. Καθαρισμός *StCel61* Native N – terminal με στήλες χρωματογραφίας Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC), TALON, Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE, επιτυχής καθαρισμός της *StCel61* Native N – terminal

Μετά την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών έγινε επιτυχής επαλήθευση των αμινοξέων στο αμινοτελικό τους άκρο με φασματομετρία μάζας (Παράρτημα, Σχήματα 7 και 8). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη με το σωστό αμινοτελικό άκρο εμφανίζει πειραματικό μοριακό βάρος περί τα 60 kDa, όπως προσδιορίστηκε από την ηλεκτροφόρηση SDS – Page. Ωστόσο το θεωρητικό μοριακό της βάρος υπολογίζεται 33,2 kDa. Η δραματική αυτή αύξηση στο μοριακό βάρος δεν μπορεί να προέρχεται από τα επιπλέον αμινοξέα (σηματοδοτικό πεπτιδίο και αλληλουχία ιστιδινών (His – tag), LEQKLISEEDLNSAVDHHHHH) καθώς εμφανίζουν μοριακό βάρος μόλις 2,6 kDa, όπως υπολογίστηκε από με το εργαλείο ProtParam (Gasteiger et al, 2005). Η αιτία για την μεταβολή αυτή είναι το φαινόμενο της υπεργλυκοζυλίωσης από την *P.Pastoris* (Conde et al, 2004), καθώς υπάρχουν 24 πιθανές θέσεις (1 N – και 23 - O –) γλυκοζυλίωσης, οι οποίες εντοπίζονται στην περιοχή του πεπτιδίου σύνδεσης μεταξύ του καταλυτικού τομέα της πρωτεΐνης και του τομέα πρόσδεσης σε πολυσακχαρίτη (CBM 1) που εκφράζεται μαζί με την *StCel61*.

Ακολούθησε υγρή καλλιέργεια BMMY 1L διάρκειας 6 ημερών του στελέχους X33 – 2, από την οποία απομονώθηκε η *StCel61* Native N - terminal με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε μια στήλη TALON για μεγάλο όγκο δείγματος (Παράγραφος 2.11.4, Πειραματικό Μέρος) . Η καθαρή

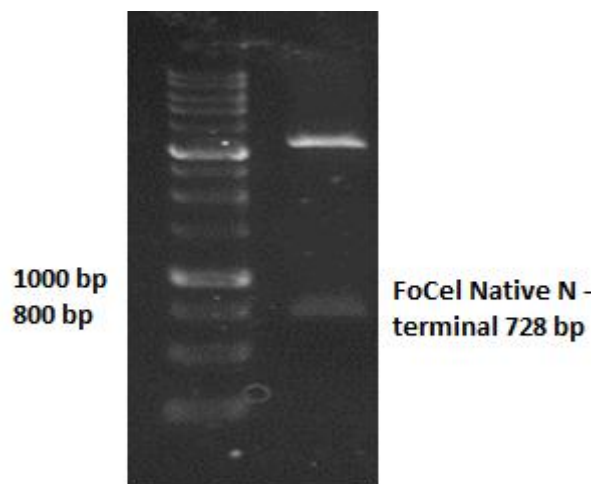
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

πρωτεΐνη εξισορροπήθηκε τελικά σε διάλυμα Tris – HCL 20mM/ 0,02% sodium azide pH = 8 για την αποφυγή μολύνσεων κατά την αποθήκευσή της, ενώ η τελική της συγκέντρωση ήταν 2,2 mg/mL, δηλαδή 36μM σε όγκο περί τα 10 mL . Με την ίδια διαδικασία καλλιέργειας και καθαρισμού παράχθηκε και η StCel61 που φέρει τα επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο με τελική συγκέντρωση 1 mg/mL, δηλαδή 16,7μM, σε όγκο περί τα 10 mL.

3. Παραγωγή και καθαρισμός της *FoCel61 Native N – Terminal*

3.1. Ενίσχυση ακολουθίας, κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *P.Pastoris*

Η επιλεγμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενισχύθηκε από απομονωμένο γονιδιακό DNA του *F. oxysporum* χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR (Πειραματικό Μέρος, Παράγραφος 2.2). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να εισαχθούν οι αλληλουχίες πέψης των περιοριστικών ενζύμων Bstb I και Xba I στην αρχή και το τέλος του γονιδίου αντίστοιχα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pPICZαC από το οποίο έλειπε η αλληλουχία *myc – epitope*, έτσι ώστε το γονίδιο να εκφραστεί με το φυσικό σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide) και η πρωτεΐνη να έχει το σωστό αμινοτελικό της άκρο. Παρακάτω φαίνεται το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR, όπως αυτό οπτικοποιήθηκε και ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.



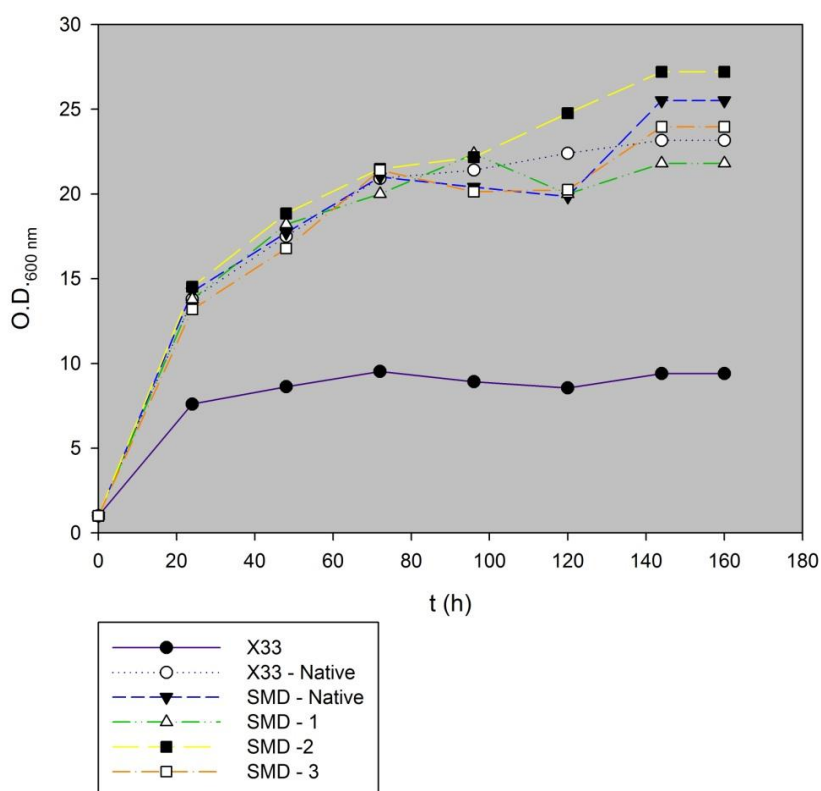
Σχήμα 3.1. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *FoCel61 Native N – terminal* από το γονιδιακό DNA του *Fusarium oxysporum*, όπως οπτικοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Στη συνέχεια έγινε απομόνωση της ενισχυμένης ακολουθίας με ηλεκτροφόρηση του υπόλοιπου μίγματος PCR σε πηκτή αγαρόζης υψηλής ακολουθούμενη από καθαρισμό με χρήση του σκευάσματος Nucleospin DNA Cleanup (Macherey-Nagel). Το γονίδιο ενσωματώθηκε στο φορέα pCR®-Blunt με αντίδραση συνένωσης και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο κλωνοποιήθηκε με μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων TOP 10. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδίου με χρήση του σκευάσματος GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) και ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του για να εξακριβωθεί η επιτυχής κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου. Στη συνέχεια έγινε πέψη του πλασμιδίου pCR®-Blunt/*Stce161*

με τα περιοριστικά ένζυμα Bstb I και Xba I, απομόνωση του γονιδίου με τα κολλώδη πλέον άκρα και εισαγωγή του στο φορέα rPICZaC υπό τον έλεγχο του εκκινήτη AOX1. Ο καινούργιος ανασυνδυασμένος φορέας χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων TOP 10F' και ακολούθησε απομόνωσή του και γραμμικοποίησή του με το ένζυμο Sac I. Το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο απομονώθηκε από το μίγμα πέψης χρησιμοποιώντας το σκεύασμα Nucleosprin DNA Clean-up kit (Macherey-Nagel) με μόνη διαφορά το ότι το τελευταίο στάδιο έκλουσης πραγματοποιήθηκε με υπερκάθαρο αποστειρωμένο νερό και όχι με το διάλυμα έκλουσης του σκευάσματος προκειμένου να αποφευχθεί η παρουσία αλάτων στο διάλυμα του γραμμικοποιημένου φορέα. Ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *P.Pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση και επώαση στους 30° C προκειμένου να επιλεγθούν οι αποικίες εκείνες που παρουσίαζαν αντίσταση στην ζεοσίνη.

3.2. Επιλογή κλώνου για την έκφραση και παραγωγή της FoCel61

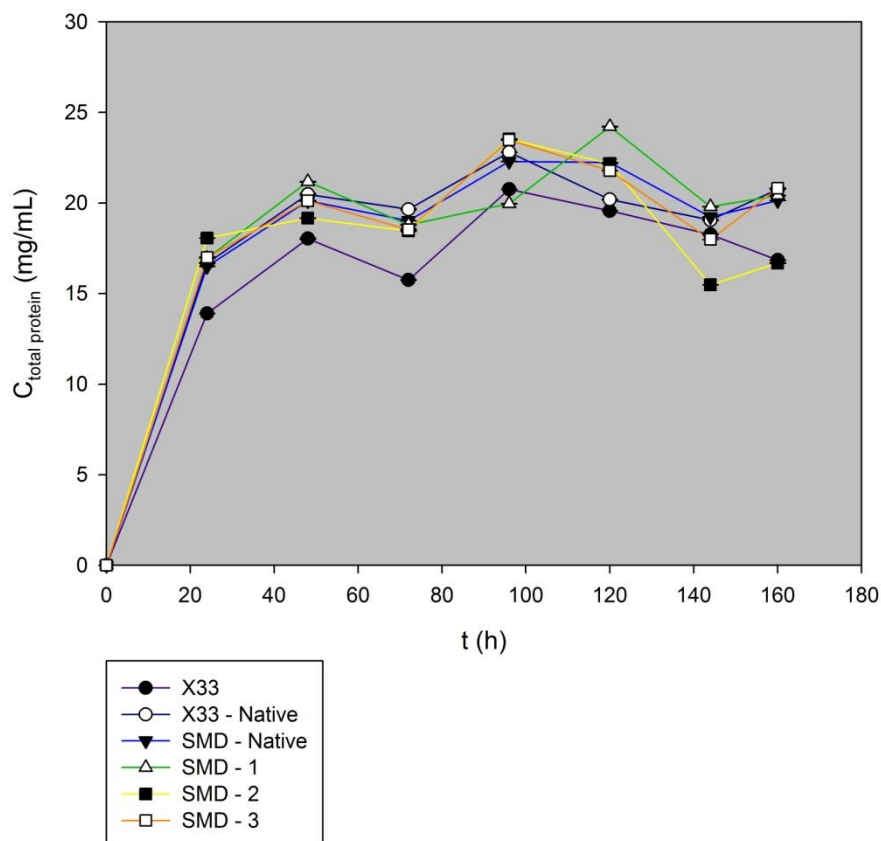
Η διαδικασία επιλογής κλώνου που να παράγει την FoCel61, είναι η ίδια που ακολουθήθηκε και κατά την παραγωγή της StCel61 Native N - terminal. Τα διαγράμματα κυτταρικής ανάπτυξης των στελεχών και φαίνονται παρακάτω.



Σχήμα 3.2. Κυτταρική ανάπτυξη ανασυνδυασμένων στελεχών *P.Pastoris*, που εκφράζουν την FoCel61 Native N – terminal

Πρέπει να επισημανθεί πως δύο από τα επιλεγμένα στελέχη X33 δεν καλλιεργήθηκαν καθώς δεν αναπτύχθηκαν κατά την προκαλλιέργειά τους. Επίσης παρατηρείται μειωμένη ανάπτυξη του ανασυνδυασμένου στελέχους X33, πράγμα το οποίο απέτρεψε την επιλογή του για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης FoCel61.

Παρακάτω φαίνεται η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών που εκκρίθηκαν εξωκυτταρικά από το κάθε στέλεχος, όπως αυτή μετρήθηκε με τη μέθοδο Lowry.

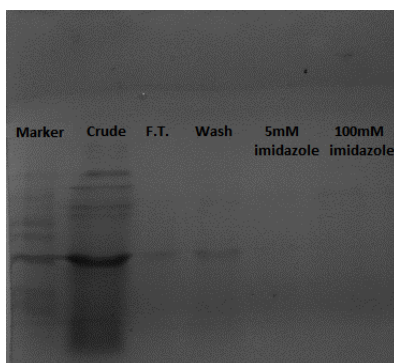


Σχήμα 3.3. Παραγωγή συνολικών πρωτεϊνών από τα ανασυνδυασμένα στελέχη της *Pichia pastoris*, τα οποία εκφράζουν την FoCel61 Native N - terminal

Από τα παραπάνω διαγράμματα φάνηκε πως και τα 3 SMD στελέχη εμφάνισαν εφάμιλλη παραγωγικότητα σε συνολική πρωτεΐνη (περίπου 24 mg/mL, την 4^η μέρα). Οπότε η επιλογή του κατάλληλου στελέχους κρίθηκε από την ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE των δειγμάτων κάθε καλλιέργειας. Η ηλεκτροφόρηση έδειξε πως τα στελέχη SMD – 1 και 3 παρήγαγαν επιτυχώς την FoCel61, ενώ το στέλεχος X33 εμφάνισε δύο μπάντες (μία στο σωστό M.B. και μια λίγο πιο κάτω), το οποίο είναι πιθανώς αποτέλεσμα πρωτεόλυσης.

Ωστόσο κατά την απόπειρα καθαρισμού της καλλιέργειας κάθε στελέχους με τις μικρές στήλες χρωματογραφίας συγγένειας TALON η πρωτεΐνη, στα στελέχη που την

παρήγαγαν, ανιχνεύθηκε στο κλάσμα διέλευσης του δείγματος (flowthrough), και κατά την έκπλυση της στήλης από τη στήλη (wash). Το γεγονός αυτό δείχνει πως κάποιο πρόβλημα υπήρξε με την αλληλουχία ιστιδινών (His – Tag), με αποτέλεσμα να μην πιαστεί η πρωτεΐνη στα ιόντα κοβαλτίου της ρητίνης.



Σχήμα 3.4. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE. Ανεπιτυχής καθαρισμός της FoCel61 Native N – terminal με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου, TALON.

Αρχικά υποτέθηκε πως η αλληλουχία των ιστιδινών έχει κρυφτεί μέσα στη δομή της πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό, επιχειρήθηκε να ξεδιπλωθεί η δομή της πρωτεΐνης με την παρουσία 8M ουρίας, και εν συνεχεία να καθαριστεί εκ νέου με τη χρήση των στηλών TALON. Ωστόσο και πάλι η πρωτεΐνη δεν πιάστηκε στη στήλη. Η απόπειρα αυτή πραγματοποιήθηκε με βάση την πρωτεΐνη που παρήχθη από το στέλεχος SMD 1.

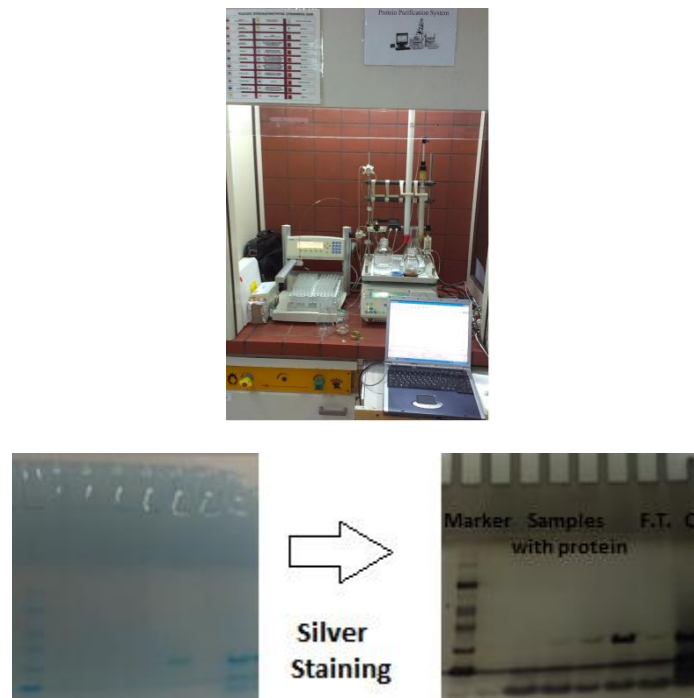
Κατόπιν αποφασίσθηκε να πραγματοποιηθεί κλασσικός καθαρισμός της FoCel61. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη από το στέλεχος SMD – 3, καθώς δεν είχε υποστεί κατεργασία με ουρία, όπως είχε γίνει στην περίπτωση του στελέχους SMD – 1. Έτσι χρησιμοποιήθηκε στήλη ανιονανταλλαγής Q – Sepharose Fast Flow για τον καθαρισμό της FoCel61, όπως ακριβώς περιγράφεται στο κεφάλαιο. Εδώ χρησιμοποιήθηκε ως βασικός διαλύτης ρυθμιστικό διάλυμα Bis - Tris 1M pH = 7,5, ως διαλύτης έκλουσης Bis - Tris 20mM/ 300mM NaCl pH = 7,5 (gradient), ενώ για τον καθαρισμό της στήλης Bis - Tris 20mM/ 1 M NaCl pH = 7,5. Η ροή της κινητής φάσης μέσα από τη στήλη ήταν 1 mL/min.

Για να πιαστεί ισχυρά η πρωτεΐνη στην επιφάνεια της στήλης πρέπει να εξασφαλισθεί ότι εμφανίζει αρνητικό φορτίο. Για το σκοπό αυτό πρέπει το pH το οποίο υπάρχει στο περιβάλλον της πρωτεΐνης να είναι πάνω από το ισοηλεκτρικό της σημείο. Για την FoCel61 με τα παραπάνω αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο έχει προσδιοριστεί πειραματικά $pI = 5,6$ (Δημαρόγκωνα, 2012) , για το λόγο αυτό το pH επιλέχθηκε να έχει την τιμή 7,5.

Ωστόσο ο καθαρισμός είχε σαν αποτέλεσμα να μην προσδεθεί ισχυρά στην στήλη η πρωτεΐνη σε σχέση με τις άλλες πρωτεΐνες. Έτσι, στα κλάσματα που συλλέχθηκαν

κατά το πέρασμα του δείγματος από τη στήλη ανιχνεύθηκαν 3 μπάντες στο gel της ηλεκτροφόρησης, 1 μπάντα με πολύ μεγάλο M.B, 1 μπάντα που αντιστοιχεί στην FoCel61 (26 kDa) και μια με πολύ μικρό M.B.

Ωστόσο, από τη χρωματογραφία ανιονανταλλαγής επιτεύχθηκε μερικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Έτσι, για τον επαρκή διαχωρισμό της FoCel61 ακολουθήθηκε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Gel Filtration) σε στήλη Sephacryl S-200 High Resolution από την οποία διαχωρίστηκε με επιτυχία η FoCel61 από τις ακραίες πρωτεΐνες,. Εδώ χρησιμοποιήθηκε διαλύτης Bis – Tris 20mM pH = 7,5, ο οποίος έρεε ισοκρατικά με ροή 1 mL/min. Για την ανίχνευσή κάποιας πρωτεΐνης η οποία βρίσκεται σε μικρή ποσότητα και προς επιβεβαίωση του σωστού διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος βαφής Silver Staining όπως αυτή (Πειραματικό Μέρος, Παράγραφος 2.12.3). Τελικά, το SMD – 3 επιλέχθηκε ως το πιο κατάλληλο στέλεχος για την παραγωγή της FoCel61 καθώς ο αντίστροφος καθαρισμός του ήταν επιτυχής.



Σχήμα 3.5. Αποτέλεσμα καθαρισμού FoCel61 με στήλη χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (Gel filtration) Sephacryl S-200 High Resolution, αφού είχε προηγηθεί αντίστροφος καθαρισμός με στήλη ανιονανταλλαγής Q – Sepharose Fast Flow. Επιβεβαίωση αποτελέσματος με Silver Staining.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

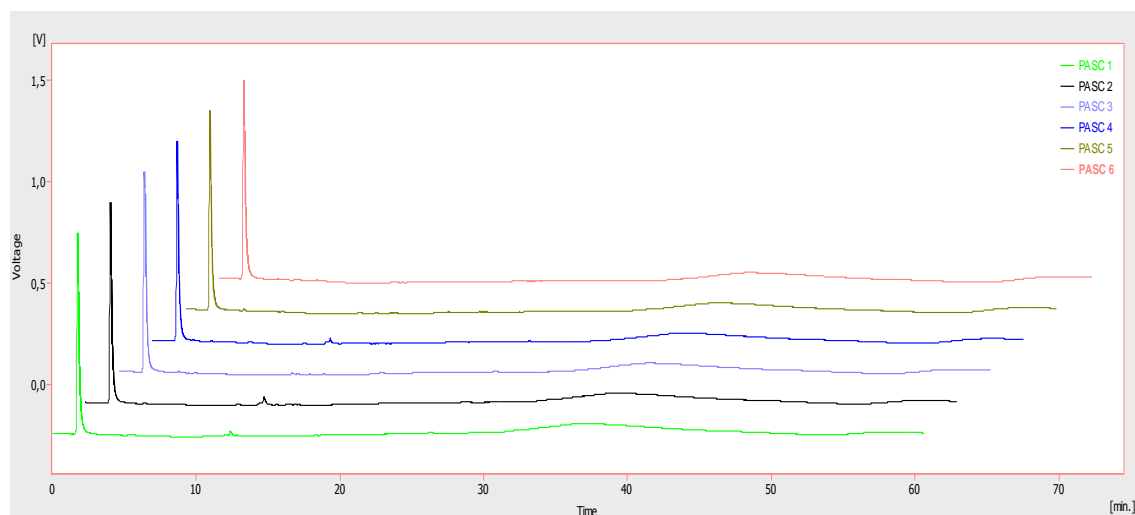
Ακολούθησε υγρή καλλιέργεια BMMY 1L διάρκειας 6 ημερών του στελέχους SMD – 3. Από αυτήν απομονώθηκε η FoCel61 Native N – terminal με το συνδυασμό των μεθόδων που περιγράφηκαν παραπάνω. Η καθαρή πρωτεΐνη εξισορροπήθηκε τελικά σε διάλυμα Tris – HCL 20mM/ 0,02% NaN₃ pH = 8 για την αποφυγή μολύνσεων κατά την αποθήκευσή της, ενώ η τελική της συγκέντρωση ήταν 0,69 mg/mL, δηλαδή 26μM σε όγκο περί τα 10 mL.

4. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της *StCel61* Native N-Terminal

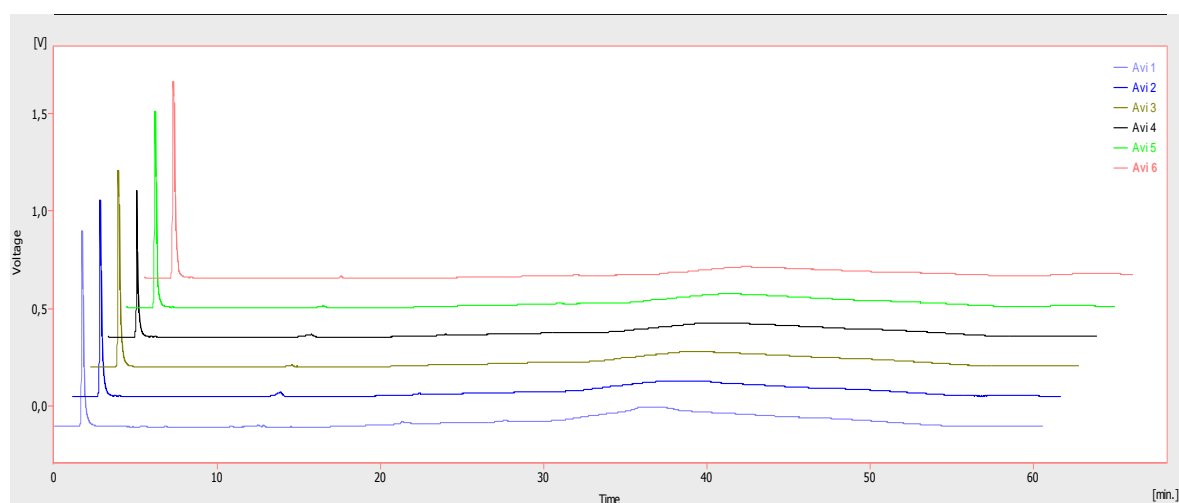
4.1. Πειράματα ανίχνευσης ενεργότητας της *StCel61* Native N – Terminal

Για την ανίχνευση ενεργότητας της *StCel61* Native N - terminal χρησιμοποιήθηκε μια σειρά υποστρωμάτων. Η επιλογή των υποστρωμάτων βασίστηκε σε μελέτη που είχε γίνει στην *StCel61*, με το τροποποιημένο αμινοτελικό άκρο, όπου ανιχνεύθηκε ασθενής υδρολυτική δράση στα υποστρώματα CMC, β – γλουκάνη κριθαριού, λιχενάνη, αραβοξυλάνη σίτου και ξυλάνη οξειάς. Η αποδόμηση των υποστρωμάτων εκτιμήθηκε με την μέτρηση των αναγωγικών άκρων των προϊόντων, τα οποία ελευθερώνονται και ανιχνεύονται με την μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS), και οι συνθήκες των αντιδράσεων φαίνονται στη παράγραφο 3.8 του Πειραματικού Μέρους. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, υποδεικνύουν πως το ένζυμο δεν παρουσιάζει ενεργότητα σε κανένα από τα υποστρώματα αυτά σε κανένα από τα υποστρώματα.

Κατόπιν εξετάσθηκε η δράση της *StCel61* Native N – terminal σε υποστρώματα Avicel και PASC, τόσο μόνη της όσο και υπό την παρουσία αναγωγικών παραγόντων (ασκορβικού οξέος και δεϋδρογονάσης της κελλοβιόζης του οργανισμού (*CDH*) *Pyrenopeziza cinnabarinus*). Στα υποστρώματα αυτά δεν ανιχνεύθηκε υδρολυτική δράση, ωστόσο δείγματα των αντιδράσεων αυτών υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία ιοντεναλλαγής υψηλής ακρίβειας (HPAEC) με στόχο την ανίχνευση και την ταυτοποίηση τυχόν οξειδωμένων προϊόντων της αντίδρασης, η οποία θα έδειχνε οξειδωτική δράση των ενζύμων στο C1 ή C4 άνθρακα των μονομερών της κυτταρίνης, καθώς αυτή δεν μπορεί να ανιχνευθεί με τη μέθοδο του DNS. Τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας, δεν έδειξαν παραγωγή οποιουδήποτε προϊόντος αποδόμησης του υποστρώματος, όπως φαίνεται στα διαγράμματα που ακολουθούν, όπου τα χρωματογραφήματα βρίσκονται σε υπέρθεση στο χώρο.



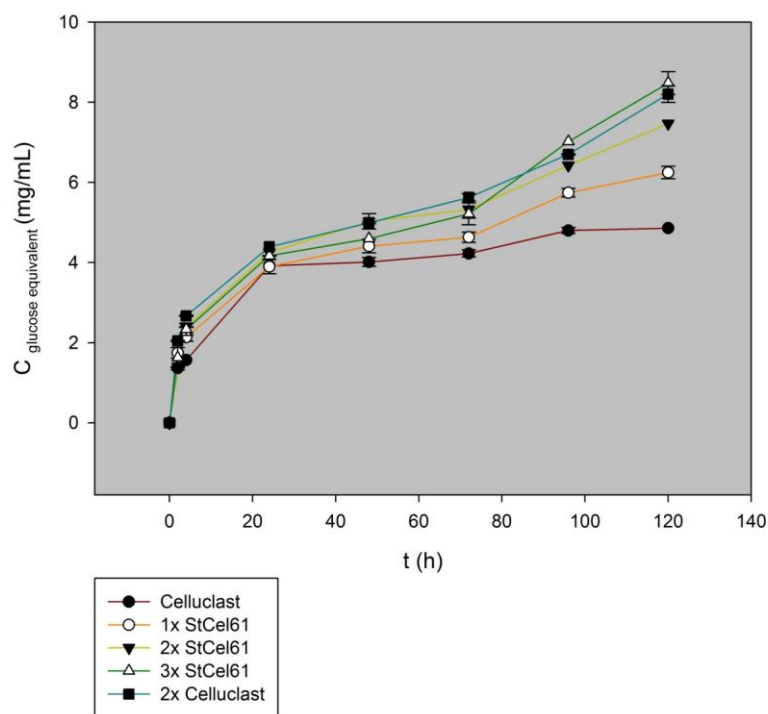
Σχήμα 4.1. Χρωματογραφήματα αντιδράσεων ανίχνευσης ενεργότητας σε υπόστρωμα PASC, σε υπέρθεση στο χώρο. PASC 1,2,3: αντιδράσεις παρουσία *StCel61* Native N – terminal (1), ασκορβικού + *StCel61* Native N – terminal (2), CDH + *StCel61* Native N – terminal (3). PASC 4,5,6: αντιδράσεις ελέγχου απουσία της *StCel61* Native N – terminal: (4) ασκορβικό, (5) CDH, (6) Blank



Σχήμα 4.2. Χρωματογραφήματα αντιδράσεων ανίχνευσης ενεργότητας σε υπόστρωμα Avicel, σε υπέρθεση στο χώρο. Avicel 1,2,3: αντιδράσεις παρουσία *StCel61* Native N – terminal (1), ασκορβικού + *StCel61* Native N – terminal (2), CDH + *StCel61* Native N – terminal (3). Avicel 4,5,6: αντιδράσεις ελέγχου απουσία της *StCel61* Native N – terminal: (4) ασκορβικό, (5) CDH, (6) Blank

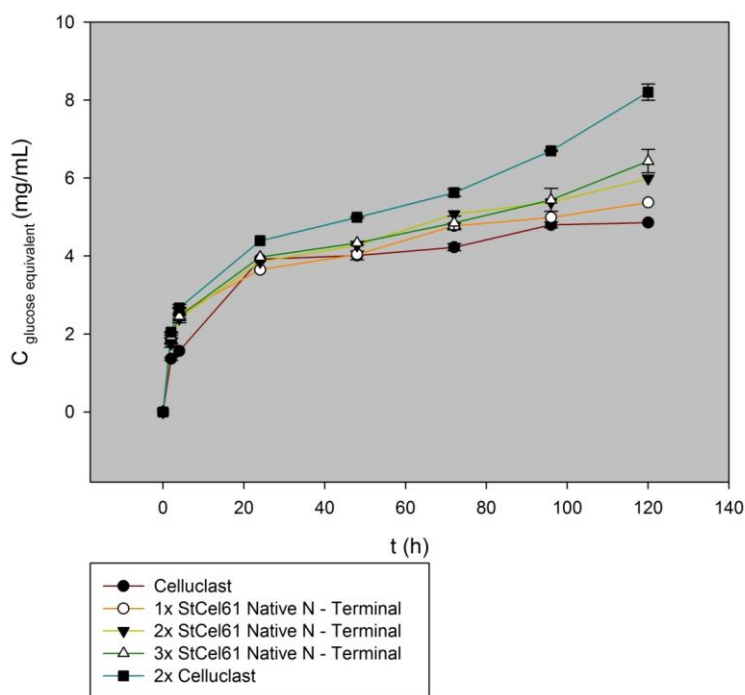
4.2. Αντιδράσεις συνεργιτισμού *StCel61* Native N-Terminal

Με σκοπό να εξεταστεί το ενισχυτικό φαινόμενο της *StCel61* Native N-terminal στη δράση των γνωστών κυτταρινασών κατά την υδρόλυση της φυτικής βιομάζας όπως έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες για άλλα μέλη της οικογένειας AA9, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνεργιτισμού πάνω σε υπόστρωμα PS (Steam pretreated under weak acidic conditions spruce). Η *StCel61* Native N – terminal συνδυάστηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις με το εμπορικό κυτταρινολυτικό σκεύασμα Celluclast που προέρχεται από τον μύκητα *T. reesei*, και το εμπορικό σκεύασμα Novozyme 188, το οποίο περιέχει β – γλυκοζιδάσες του μικροοργανισμού *Aspergillus niger*. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις υπό τις ίδιες συνθήκες, με την *StCel61* με τα επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο για να εξεταστεί, αν αυτό επηρεάζει σημαντικά την δράση του ενζύμου. Οι αντιδράσεις διήρκησαν 5 ημέρες, ενώ δείγμα λήφθηκε με το πέρασμα 2, 4 και 24 ωρών και κατόπιν κάθε 24ωρο. Στα προς μέτρηση δείγματα πραγματοποιήθηκε μέτρηση αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS, για την εκτίμηση της δράσης των ενζύμων, αφού αυτά πρώτα είχαν υποστεί φυγοκέντρηση προς αποφυγή του στερεού υποστρώματος. Οι συνθήκες και η σύσταση των αντιδράσεων φαίνονται στην παράγραφο 3.6 του Πειραματικού Μέρους. Παρακάτω εμφανίζονται τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για τις δύο πρωτεΐνες:



Σχήμα 4.3. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώνονται κατά τις αντιδράσεις συνεργιτισμού με την *StCel61* με τα πλεονάζοντα αμινοξέα στο αμινοτελικό της άκρο

Όπως είναι εμφανές με την παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης *StCel61* εμφανίζεται και ανάλογη αύξηση των αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώνονται από το υπόστρωμα. Η συνεργιστική δράση των ενζύμων φαίνεται από το γεγονός ότι η υδρόλυση του λιγνινοκυτταρινούχου υποστρώματος PS υπό την παρουσία μόνο των κλασικών κυτταρινασών και β – γλυκοζιδασών, είναι μικρότερη από αυτές που μετρήθηκαν υπό την παρουσία της *StCel61* που χρησιμοποιήθηκε μαζί με τα σκευάσματα αυτά. Μάλιστα, φαίνεται πως η υδρόλυση του υποστρώματος που επιτεύχθηκε με την συγκέντρωση *StCel61* 9 mg/g υποστρώματος και Celluclast 11 mg/g υποστρώματος, ήταν εφάμιλλη με την χρήση διπλάσιας ποσότητας κυτταρινασών (Celluclast 22 mg/g υποστρώματος, χωρίς την παρουσία *StCel61*). Επισημαίνεται πως η *StCel61* από μόνη της δεν απελευθερώνει σάκχαρα με αναγωγικά ακρα έχει κανένα υδρολυτικού αποτέλεσμα.



Σχήμα 4.4. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώνονται κατά τις αντιδράσεις συνεργισμού με την *StCel61* Native N - terminal

Και στην περίπτωση της *StCel61* Native N – terminal παρατηρήθηκε το ενισχυτικό φαινόμενο στη δράση των κλασικών κυτταρινασών, το οποίο αυξανόταν σε ένταση ανάλογα με την συγκέντρωση της *StCel61* Native N – terminal που χρησιμοποιούνταν (3 – 6 – 9 mg/g υποστρώματος). Μέχρι και τις 24 ώρες η παρουσία της *StCel61* Native N – terminal είχε ανάλογα αποτελέσματα με την περίπτωση όπου γινόταν διπλάσια χρήση κυτταρινασών με το φαινόμενο να εξαλείφεται αισθητά μετά τις 72 h. Από το αποτέλεσμα αυτό συμπεραίνεται πως τελικά η προσθήκη μιας μικρής αλληλουχίας αμινοξέων στο N – terminal της πρωτεΐνης δεν επηρεάζει σημαντικά την δράση της *StCel61*.

5. Βιοχημικός χαρακτηρισμός *FoCel61* Native N – terminal

5.1. Πειράματα ανίχνευσης ενεργότητας της *FoCel61* Native N – Terminal

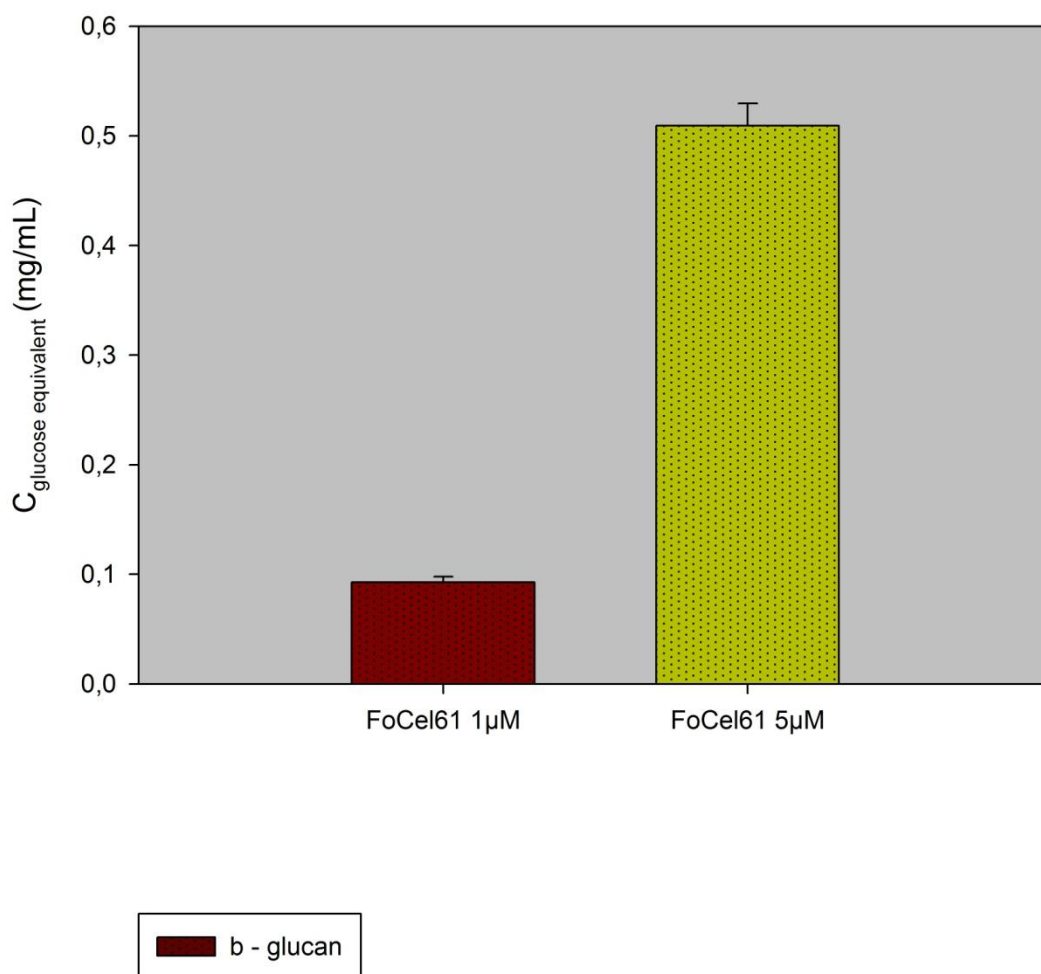
Όπως και στην περίπτωση της *StCel61* Native N – terminal, μελετήθηκε η δράση της *FoCel61* Native N – terminal στα υποστρώματα CMC, β – γλουκάνη κριθαριού, λιχενάνη, αραβοξυλάνη σίτου και ξυλάνη οξειάς. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε pH = 7 και είχαν διάρκεια 24 h. Η ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε με τη μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων, τα οποία ελευθερώνονταν από το εκάστοτε υπόστρωμα, με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Επισημαίνεται ότι από όλες τις αντιδράσεις αφαιρέθηκε η ποσότητα των αναγωγικών σακχάρων που ελευθερώθηκαν από το υπόστρωμα απουσία της *FoCel61* Native N – terminal, με στόχο τη μέτρηση της καθαρής ενεργότητας της πρωτεΐνης, η οποία εκφράζεται σε $\mu\text{mole}/\text{min g}_{\text{πρωτεΐνης}}$.

Πίνακας 5.1. Αποτελέσματα πειραμάτων ανίχνευσης ενεργότητας της *FoCel61* Native N – terminal.

Υποστρώματα / Ένζυμα ($\mu\text{mole}/\text{min g protein}$)	<i>FoCel61</i> Native N – terminal
CMC	-
Lichenan	7,58±0,38
barley β – glucan	13,67±0,75
Wheat arabinoxylan	-
Birchwood xylan	-

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εμφανής η ενεργότητα του ενζύμου σε υπόστρωμα β – γλουκάνης κριθαριού, ενώ ασθενής ενεργότητα παρατηρήθηκε στη λιχενάνη. Πολύ μικρή έως και αμελητέα υδρολυτική δράση εντοπίστηκε σε όλα τα άλλα υποστρώματα.

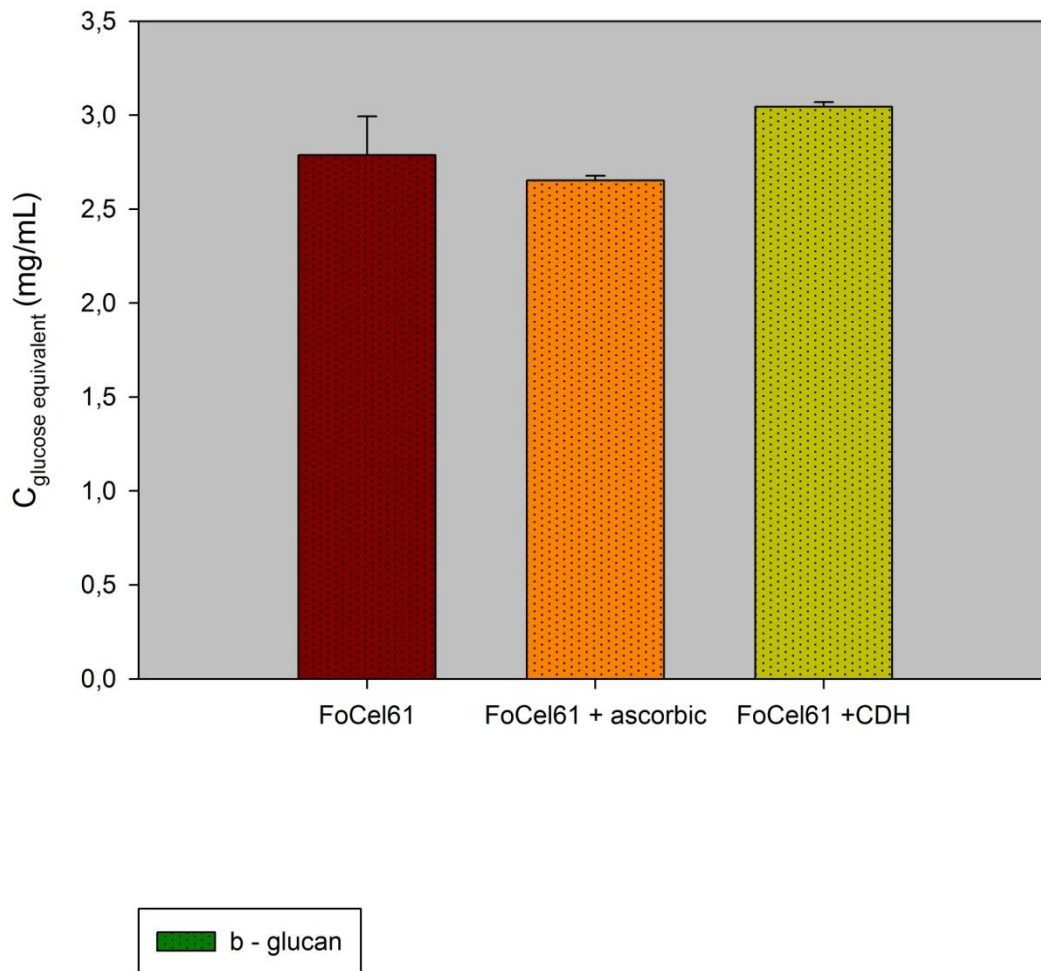
Από τα αποτελέσματα αυτά, το υπόστρωμα της β – γλουκάνης τέθηκε προς περαιτέρω μελέτη. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις β – γλουκάνης με αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης (5 μM) στις ίδιες συνθήκες με τα αρχικά πειράματα υδρόλυσης, για να διαπιστωθεί όντως ότι η υδρόλυση οφείλεται στην *FoCel61* Native N - terminal. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.



Σχήμα 5.1. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώνονται κατά τις αντιδράσεις αποδόμησης της β – γλουκάνης κριθαριού με αυξανόμενη συγκέντρωση *FoCel61* Native N - terminal

Από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανής η αποδόμηση του υποστρώματος αναλογικά με την αύξηση στην συγκέντρωση της *FoCel61* Native N – terminal.

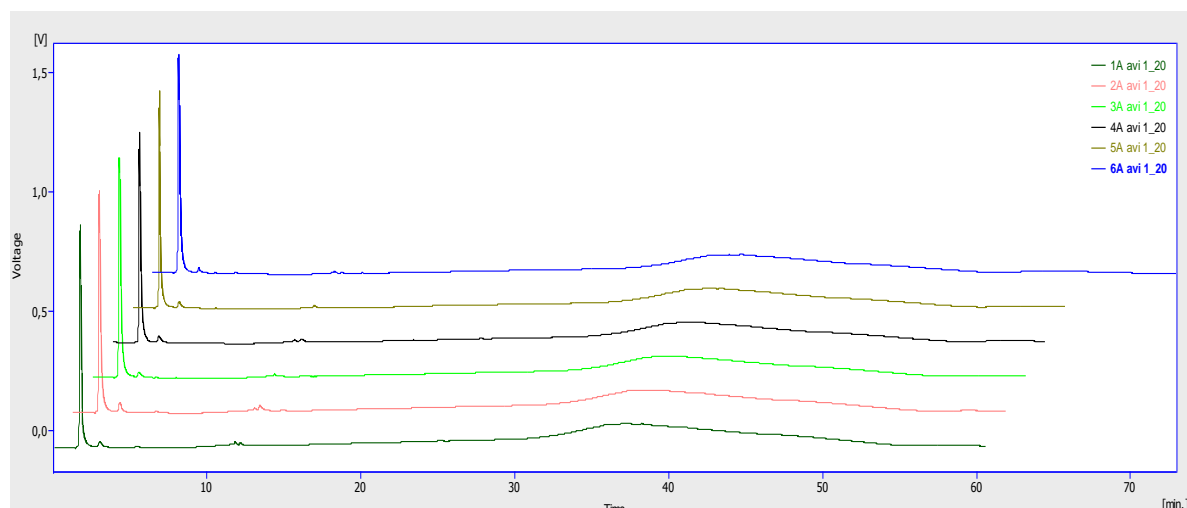
Για να υπάρξει μια πιο ολοκληρωμένη άποψη πάνω στο υπόστρωμα αυτό, εξετάστηκε η προσθήκη του ασκορβικού οξέος (2 mM) ως αναγωγικός παράγοντας στη θέση της CDH, ενώ πραγματοποιήθηκαν και αντιδράσεις με την CDH (0,8 μM) παρουσία κελλοβιόζης (12,5 μM), για την εξασφάλιση της δράσης της. Οι χρόνος της αντίδρασης ήταν 2 ημέρες, ενώ οι ίδιες αντιδράσεις δοκιμάστηκαν και σε υποστρώματα Avicel και PASC. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκαν φαίνεται στη παράγραφο 3.9 του Πειραματικού Μέρους. Τα αναγωγικά προϊόντα που ανιχνεύθηκαν από τη δράση της *FoCel61* Native N – terminal φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



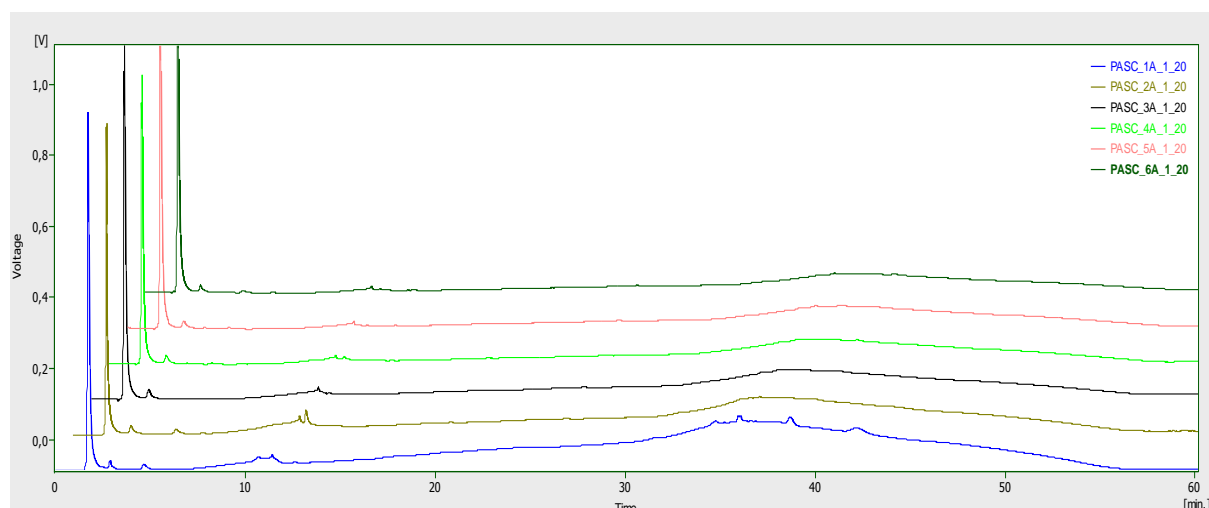
Σχήμα 5.2. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώνονται κατά τις αντιδράσεις αποδόμησης β – γλουκάνης κριθαριού παρουσία *FoCel61* Native N – terminal και αναγωγικών παραγόντων

Στα υποστρώματα Anicel και PASC δεν ανιχνεύθηκαν προϊόντα αποδόμησης με τη μέθοδο του DNS, σε κανένα από τα δείγματα. Απ' την άλλη μεριά, στη β - γλουκάνη δεν διαπιστώθηκε κάποια σημαντική αύξηση στην αποδόμηση του υποστρώματος παρουσία της CDH. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην οξειδωτική δράση της, πάνω στα αναγωγικά σάκχαρα τα οποία ελευθερώνονται από την *FoCel61* Native N – Terminal. Αντιθέτως, με την παρουσία ασκορβικού, παρατηρήθηκε ελαφρά μείωση των προϊόντων αποδόμησης, κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται στην μείωση του pH της αντίδρασης, και την απομάκρυνσή του από το optimum pH.

Σε επόμενο στάδιο, τα δείγματα από αυτά τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση οξειδωμένων, και μη, υδατανθρακικών προϊόντων μέσω χρωματογραφίας ανιόνταλλαγής (HPAEC). Τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν, κατόπιν υπέρθεσής τους στο χώρο (3D) φαίνονται παρακάτω.

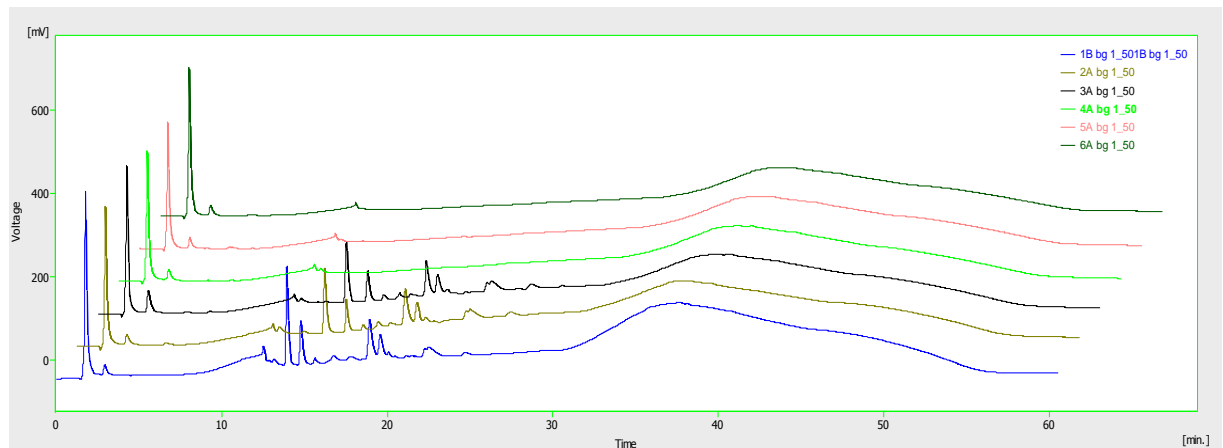


Σχήμα 5.3. Χρωματογραφήματα αντιδράσεων ανίχνευσης ενεργότητας σε υπόστρωμα Avicel, σε υπέρθεση στο χώρο. Avicel 1,2,3: αντιδράσεις παρουσία *FoCel61* Native N – terminal (1), ασκορβικού + *FoCel61* Native N – terminal (2), CDH + *FoCel61* Native N – terminal (3). Avicel 4,5,6: αντιδράσεις ελέγχου απουσία της *FoCel61* Native N – terminal: (4) ασκορβικό, (5) CDH, (6) Blank



Σχήμα 5.4. Χρωματογραφήματα αντιδράσεων ανίχνευσης ενεργότητας σε υπόστρωμα PASC, σε υπέρθεση στο χώρο. PASC 1,2,3: αντιδράσεις παρουσία *FoCel61* Native N – terminal (1), ασκορβικού + *FoCel61* Native N – terminal (2), CDH + *FoCel61* Native N – terminal (3). PASC 4,5,6: αντιδράσεις ελέγχου απουσία της *FoCel61* Native N – terminal: (4) ασκορβικό, (5) CDH, (6) Blank

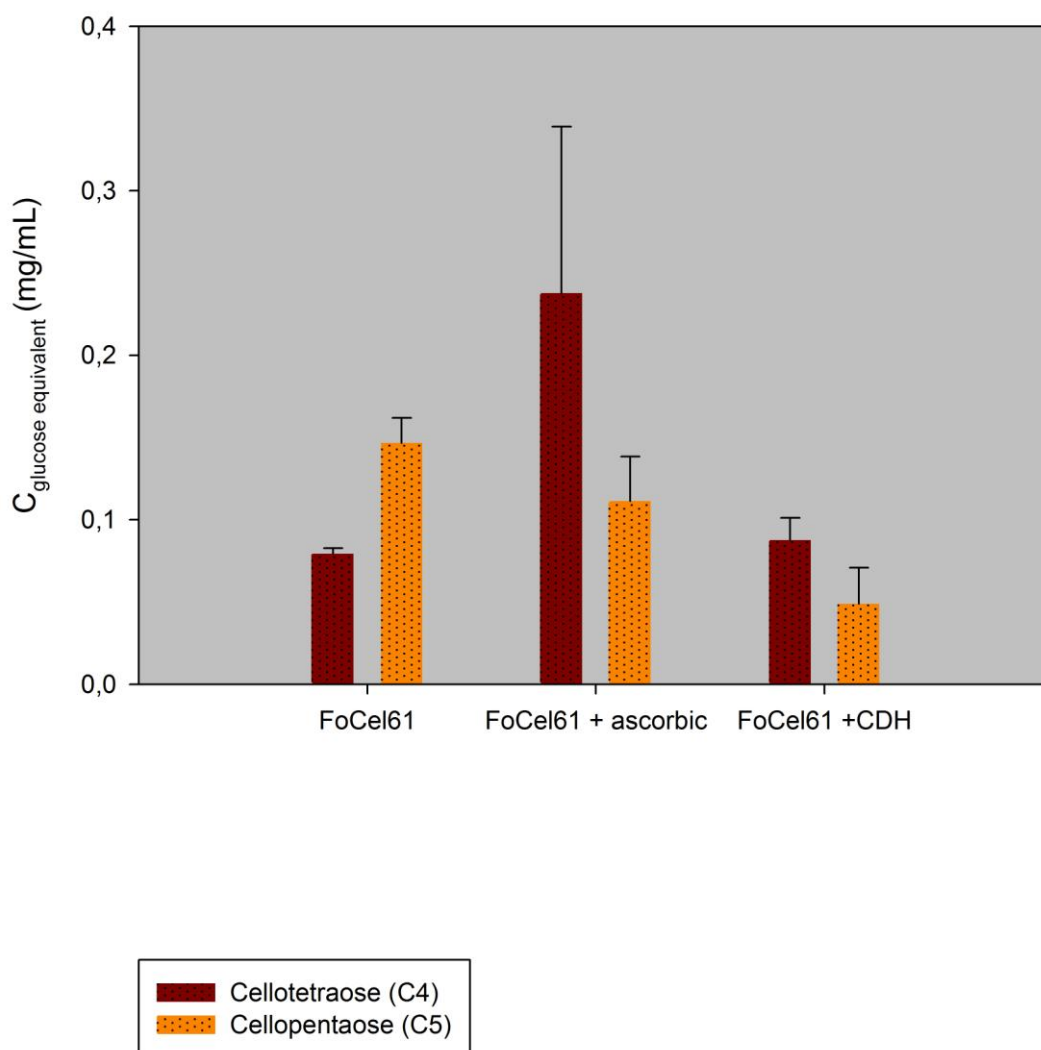
Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η έλλειψη ανιχνεύσιμης ποσότητας οξειδωμένων και μη, υδατανθράκων επιβεβαιώνοντας την εκτίμηση ότι η *FoCel61* Native N – terminal δεν παρουσιάζει ενεργότητα σε υπόστρωμα Avicel. Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγούν και τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν στην περίπτωση του υποστρώματος PASC.



Σχήμα 5.5. Χρωματογραφήματα αντιδράσεων ανίχνευσης ενεργότητας σε υπόστρωμα b - glucan, σε υπέρθεση στο χώρο. b - glucan 1,2,3: αντιδράσεις παρουσία *FoCel61* Native N – terminal (1), ασκορβικού + *FoCel61* Native N – terminal (2), CDH + *FoCel61* Native N – terminal (3). b - glucan 4,5,6: αντιδράσεις ελέγχου απουσία της *FoCel61* Native N – terminal: (4) ασκορβικό, (5) CDH, (6) Blank

Στην περίπτωση της β – γλουκάνης τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν έδειξαν την παραγωγή προϊόντων, τα οποία ελευθερώθηκαν κατά την αποδόμηση του υποστρώματος. Η αδυναμία ανίχνευσής τους στα δείγματα από τα οποία έλειπε η *FoCel61* Native N – terminal (δείγματα 4-5-6) αποδεικνύουν την ενεργότητα που εμφανίζει το ένζυμο στο υπόστρωμα αυτό. Ωστόσο, η β-γλουκάνη από κριθάρι αποτελεί πολυσακχαρίτη της γλυκόζης όπου τα μονομερή συνδέονται μεταξύ τους με β - 1,3 και 1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς, ενώ η δομή του είναι περίπλοκη με αρκετές διακλαδώσεις. Σε αυτήν ακριβώς την περίπλοκη δομή οφείλεται η μεγάλη απόκλιση των χρόνων έκλουσης των προϊόντων από τα πρότυπα των κελλο – ολιγομερών που ανιχνεύθηκαν, κάνοντας την ταυτοποίησή τους μη εφικτή (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ, Σχήμα 6).

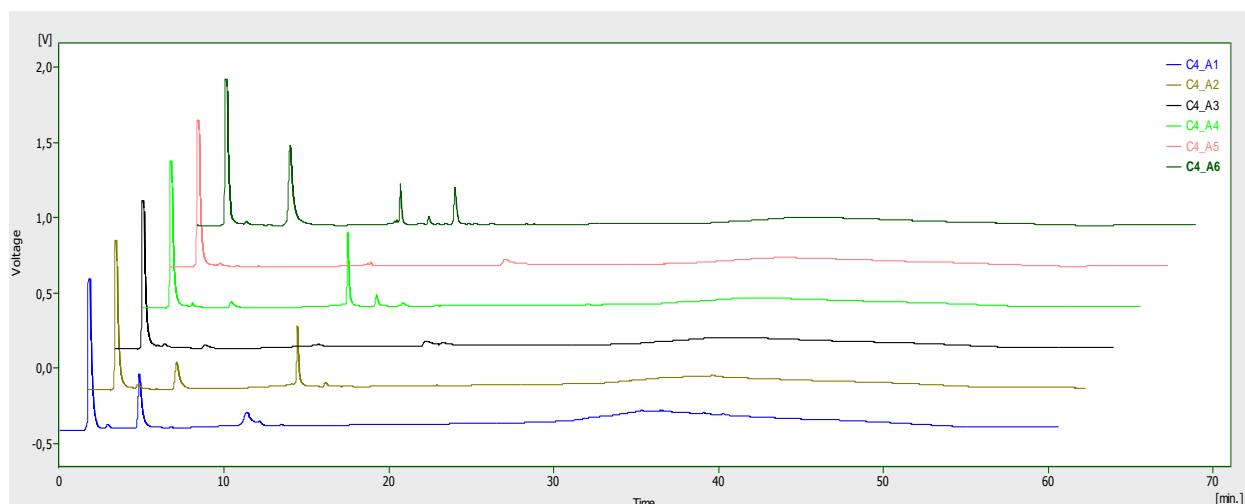
Τέλος εξετάστηκε η δράση της *FoCel61* σε υποστρώματα κελλοολιγοσακχαριτών, καθώς υπάρχουν πρόσφατες μελέτες όπου καταγράφηκε ενεργότητα των AA9 πρωτεϊνών στα υποστρώματα αυτά (Isaksen et al, 2014). Έτσι δοκιμάστηκαν οι κελλοολιγοσακχαρίτες κελλοτετραόζη και κελλοπενταόζη ως υποστρώματα, ενώ εξετάστηκε και η επίδραση αναγωγικών παραγόντων (ασκορβικό οξύ και CDH) στη δράση της *FoCel61*. Στα δείγματα που λήφθηκαν από τις αντιδράσεις μετρήθηκε η παραγωγή προϊόντων με αναγωγικά άκρα με τη μέθοδο DNS, καθώς επίσης επιχειρήθηκε η ανίχνευση οξειδωμένων προϊόντων με τη μέθοδο ΗΡΑΕC. Οι συνθήκες των αντιδράσεων που έλαβαν χώρα αναλύθηκαν παραπάνω (Παράγραφος 3.9, Πειραματικό Μέρος) και παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα της μελέτης.



Σχήμα 5.6. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώνονται κατά τις αντιδράσεις αποδόμησης κελλοτετραόζης και κελλοπενταόζης παρουσία *FoCel61* Native N – terminal και αναγωγικών παραγόντων

Στην περίπτωση της κελλοτετραόζης φαίνεται καθαρά η ενεργότητα που εμφανίζει η *FoCel61* Native N – terminal. Μάλιστα φαίνεται πως η παρουσία του ασκορβικού οξέος ενισχύει την δράση του ενζύμου, καθώς απελευθερώθηκε τριπλάσια ποσότητα αναγωγικών προϊόντων από το υπόστρωμα. Παρουσία της CDH, ωστόσο, δεν παρουσιάστηκε δραματική ενίσχυση της *FoCel61*, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στην οξείδωση αναγωγικών άκρων από την CDH και κατά συνέπεια την αδυναμία ανίχνευσής τους με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος

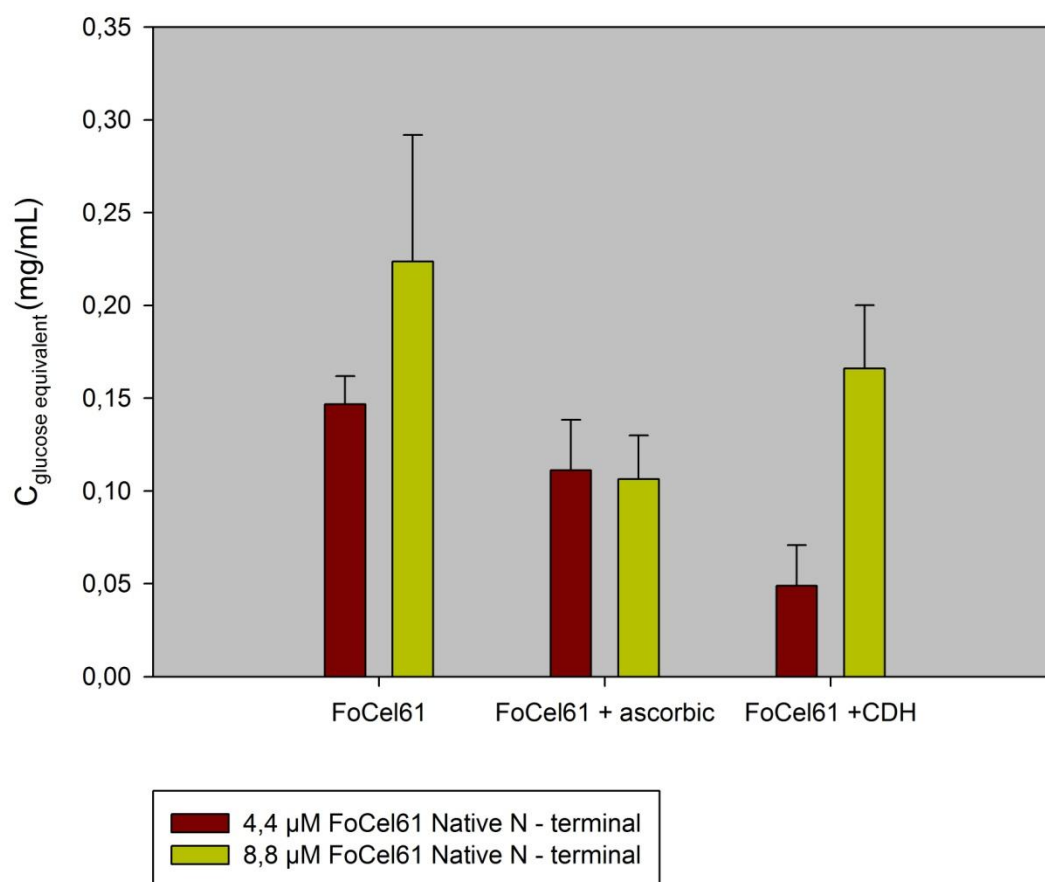
Τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν κατά την εξέταση των δειγμάτων κελλοτετραόζης φαίνονται παρακάτω σε υπέρθεση:



Σχήμα 5.7. Χρωματογραφήματα αντιδράσεων ανίχνευσης ενεργότητας σε υποστρώμα κελλοτετραόζης, σε υπέρθεση στο χώρο. Κελλοτετραόζη 1,2,3: αντιδράσεις παρουσία *FoCel61* Native N – terminal (1), ασκορβικού + *FoCel61* Native N – terminal (2), CDH + *FoCel61* Native N – terminal (3). Κελλοτετραόζη 4,5,6: αντιδράσεις ελέγχου απουσία της *FoCel61* Native N – terminal: (4) ασκορβικό, (5) CDH, (6) Blank

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα των αντιδράσεων ελέγχου (C4_4/5/6) παρατηρείται η αποδόμηση του υποστρώματος σε μικρότερα κλάσματα (γλυκόζη, κελλοβιόζη και κελλοτριόζη (C4_6)). Μάλιστα στις αντιδράσεις ελέγχου παρουσία ασκορβικού οξέος (C4_4) φαίνεται, πως όλη η ποσότητα του υποστρώματος έχει μετατραπεί σε κελλοβιόζη, ενώ ανιχνεύθηκε και πολύ μικρή ποσότητα γλυκόζης και κελλοτριόζης. Ενδιαφέρον προκαλεί η αδυναμία ανίχνευσης του υποστρώματος αλλά και οποιουδήποτε προϊόντος στην περίπτωση της αντίδραση ελέγχου παρουσία της CDH (C4_A5). Τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν για τις αντιδράσεις ελέγχου, είναι ότι παρατηρείται μια αποδόμηση του υποστρώματος, ίσως λόγω υδρόλυσής του από τις συνθήκες θερμοκρασίας της αντίδρασης. Ταυτόχρονα, η οξειδωτική δράση της CDH σε συνδυασμό με την αδυναμία ανίχνευσης οξειδωμένων προϊόντων θα μπορούσε να εξηγήσει την εικόνα του χρωματογραφήματος που λήφθηκε.

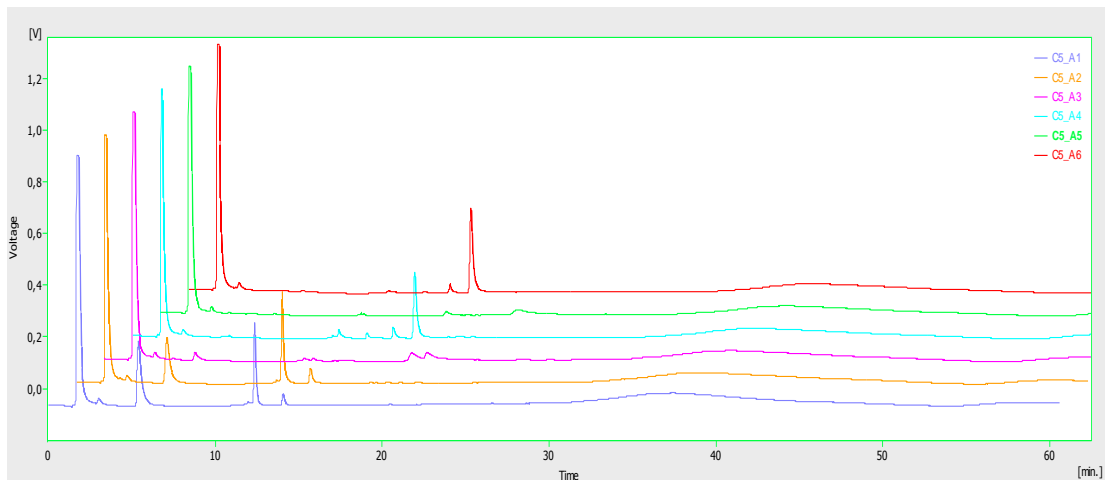
Κατά την εξέταση των δειγμάτων που περιείχαν την *FoCel61* (C4_A1/2/3) παρατηρήθηκε η αποδόμηση του υποστρώματος προς γλυκόζη και κελλοβιόζη. Κατά την απουσία, οποιουδήποτε αναγωγικού παράγοντα (C4_A1) ευνοήθηκε η παραγωγή γλυκόζης, ενώ υπό την παρουσία ασκορβικού οξέος και *FoCel61* (C4_A2) η κελλοβιόζη παρέμεινε το κύριο προϊόν αποδόμησης. Ωστόσο η παραγωγή γλυκόζης αυξήθηκε σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (C4_A4), ενώ ανιχνεύθηκε και πολύ μικρή ποσότητα κελλοτριόζης. Τέλος, η παρουσία της CDH μαζί με την *FoCel61* οδήγησε στην ανίχνευση πολύ μικρή ποσότητας γλυκόζης, κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται στην οξείδωση των προϊόντων της αντίδρασης από την CDH.



Σχήμα 5.8. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώνονται κατά τις αντιδράσεις αποδόμησης κελλοπενταόζης παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης *FoCel61* Native N – terminal και αναγωγικών παραγόντων

Παραπάνω φαίνεται η δράση της *FoCel61* Native N –terminal σε υπόστρωμα κελλοπενταόζης με αυξανόμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Από τα αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό ότι αυξανόμενη της συγκέντρωσης αυξήθηκε και η αποδόμηση του υποστρώματος αντίστοιχα. Από τα δείγματα των αντιδράσεων παρουσία αναγωγικών παραγόντων κανένα από τα δύο δεν φαίνεται να ενίσχυσε τη δράση του ενζύμου.

Τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν κατά την εξέταση των δειγμάτων κελλοπενταόζης με συγκέντρωση *FoCel61* Native N – terminal 4,4μM φαίνονται παρακάτω σε υπέρθεση:



Σχήμα 5.9. Χρωματογραφήματα αντιδράσεων ανίχνευσης ενεργότητας σε υποστρώμα κελλοπενταόζη, σε υπέρθεση στο χώρο. Κελλοπενταόζη 1,2,3: αντιδράσεις παρουσία *FoCel61* Native N – terminal (1), ασκορβικού + *FoCel61* Native N – terminal (2), CDH + *FoCel61* Native N – terminal (3). Κελλοπενταόζη 4,5,6: αντιδράσεις ελέγχου απουσία της *FoCel61* Native N – terminal: (4) ασκορβικό, (5) CDH, (6) Blank

Από τα αποτελέσματα των αντιδράσεων ελέγχου (C5_A4/5/6) δεν παρατηρείται σημαντική αποδόμηση του υποστρώματος σε μικρότερα κλάσματα σε αντίθεση με την περίπτωση του υποστρώματος της κελλοτετραόζης. Στις αντιδράσεις ελέγχου παρουσία (C5_A4) και μη ασκορβικού οξέος (C5_A6) φαίνεται, πως η ποσότητα του υποστρώματος έχει μείνει σχεδόν ακέραια. Μόνο ένα μικρό μέρος έχει μετατραπεί σε κελλοτετραόζη, ενώ ανιχνεύθηκε και πολύ μικρή ποσότητα κελλοβιόζης και κελλοτριόζης στα δείγματα ελέγχου με ασκορβικό.

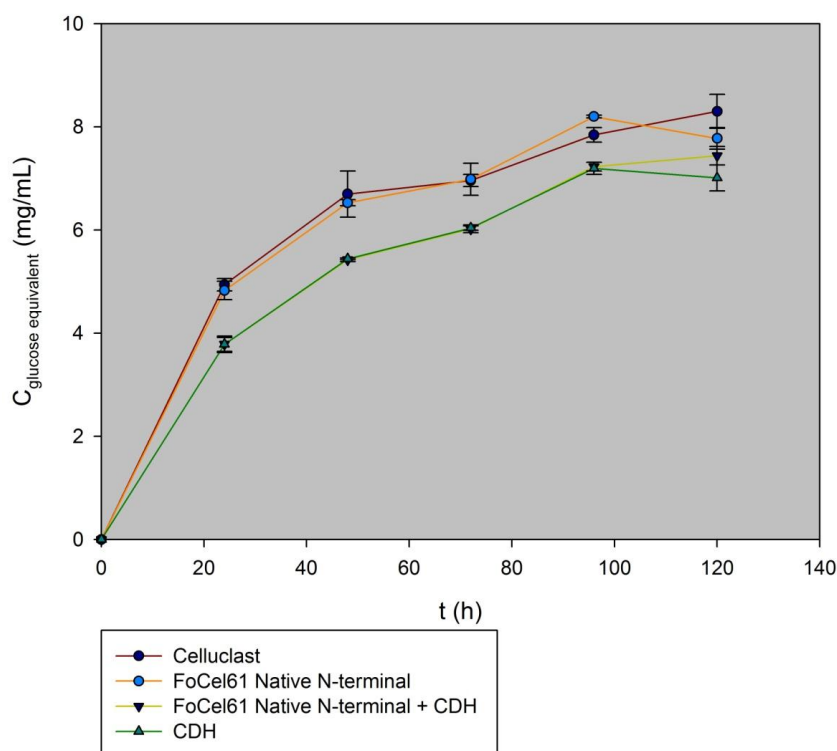
Και στην περίπτωση του υποστρώματος της κελλοπενταόζης δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση υποστρώματος αλλά και οποιουδήποτε προϊόντος στην περίπτωση της αντίδραση ελέγχου παρουσία της CDH (C5_A5). Τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν για τις αντιδράσεις ελέγχου, είναι ότι παρατηρείται μια πολύ μικρή αποδόμηση του υποστρώματος, ίσως λόγω υδρόλυσης του από τις συνθήκες θερμοκρασίας της αντίδρασης. Ταυτόχρονα, η οξειδωτική δράση της CDH σε συνδυασμό με την αδυναμία ανίχνευσης οξειδωμένων προϊόντων θα μπορούσε να εξηγήσει την εικόνα του χρωματογραφήματος που λήφθηκε.

Κατά την εξέταση των δειγμάτων που περιείχαν την *FoCel61* (C5_A1/2/3) παρατηρήθηκε η αποδόμηση του υποστρώματος προς γλυκόζη, κελλοβιόζη και μικρή ποσότητα κελλοβιόζης. Συγκεκριμένα, κατά την απουσία, οποιουδήποτε αναγωγικού παράγοντα (C5_A1) ευνοήθηκε η παραγωγή γλυκόζης και κελλοτριόζης, ενώ το ίδιο μοτίβο προϊόντων καταγράφηκε και υπό την παρουσία ασκορβικού οξέος και *FoCel61* (C5_A2). Τέλος, η παρουσία της CDH μαζί με την *FoCel61* οδήγησε στην ανίχνευση πολύ μικρής ποσότητας γλυκόζης, κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται στην οξείδωση των προϊόντων της αντίδρασης από την CDH.

5.2. Αντιδράσεις συνεργισισμού *FoCel61* Native N-Terminal

Όπως και στην περίπτωση της *StCel61* επιχειρήθηκε να εξετασθεί η συνεργιστική δράση της *FoCel61* Native N-terminal με κλασικές κυτταρινάσες κατά την αποδόμηση του λιγνινοκυτταρινούχου υποστρώματος PS. Έτσι, συνδυάστηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις με το εμπορικό κυτταρινολυτικό σκεύασμα Celluclast που προέρχεται από τον μύκητα *T. reesei*, και το εμπορικό σκεύασμα β – γλυκοζιδασών, Novozyme 188. Επίσης, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν και με την παρουσία της δεϋδρογονάσης της κελλοβιόζης CDH ως αναγωγικό παράγοντα.

Οι αντιδράσεις διήρκησαν 5 ημέρες, ενώ δείγμα λαμβανόταν κάθε 24ωρο. Στα προς μέτρηση δείγματα πραγματοποιήθηκε μέτρηση αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS, για την εκτίμηση της δράσης των ενζύμων, αφού αυτά πρώτα είχαν υποστεί φυγοκέντρηση προς αποφυγή του στερεού υποστρώματος. Οι συνθήκες και η σύσταση των αντιδράσεων φαίνεται στην παράγραφο 3.7 του Πειραματικού Μέρους. Παρακάτω εμφανίζονται η πορεία των αντιδράσεων.



Σχήμα 5.10. Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώνονται κατά τις αντιδράσεις συνεργισισμού με την *FoCel61* Native N – terminal υπό την παρουσία αναγωγικών παραγόντων

Από το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνεται πως η παρουσία της *FoCel61 Native N – terminal* δεν είχε καμία επίδραση στην αποικοδόμηση του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού. Η παρουσία της CDH έφερε την αναμενόμενη μείωση των αναγωγικών προϊόντων της υδρόλυσης από το κυτταρινολυτικό σύστημα (Celluclast + Novozyme 188) λόγω της οξειδωτικής της δράσης, χωρίς όμως να παρουσιάσει ενισχυμένη αποδόμηση του υποστρώματος όταν συνδυάστηκε με την *FoCel61 Native N – terminal*.

6. Μελέτη αποικοδόμησης υδροθερμικά κατεργασμένου άχυρου σίτου παρουσία *StCel61 Native N – terminal* σε μεγάλη κλίμακα

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η εκτίμηση της μείωσης του ιξώδους λιγνινοκυτταρινούχου υλικού, εδώ υδροθερμικά κατεργασμένου άχυρου σίτου (PWS), από την *StCel61 Native N – terminal*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μεγάλη καλλιέργεια, όγκου 4 L, του ανασυνδυασμένου στελέχους X33 – 2, από την οποία παραλήφθηκε και συμπυκνώθηκε το εξωκυτταρικό υγρό, που περιείχε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, μέχρι όγκο 400 mL συγκέντρωσης 0,55 mg_{total prot}/mL. Το πείραμα βασίστηκε στην υπόθεση, ότι κατά την οξειδωτική δράση της, η *StCel61* αποδομεί τις κρυσταλλικές περιοχές του υποστρώματος, μειώνοντας το ιξώδες του. Αυτή ακριβώς η μείωση εκμεταλλεύτηκε για την εκτίμηση της δράσης του ενζύμου, με την μέτρηση του ιξώδους σε δείγματα που λαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (2, 4, 24 h). Οι συνθήκες και η σύσταση της αντίδρασης αναλύθηκε στην παράγραφο 3.11 του Πειραματικού Μέρους. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, δεν έδειξαν κάποια μεταβολή του ιξώδους του υποστρώματος, σε σχέση πάντα με την αντίδραση ελέγχου που γινόταν παράλληλα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοπτικά αποτελέσματα και συμπεράσματα διπλωματικής εργασίας

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη του μηχανισμού δράσης δύο LPMO από τους μικροοργανισμούς *Sporotrichum thermophile* και *Fusarium oxysporum*. Τα στελέχη *P. pastoris* X33 και SMD1168H ανασυνδυάστηκαν επιτυχώς με τα γονίδια των δύο πρωτεϊνών. Και οι δύο πρωτεΐνες περιείχαν το φυσικό σηματοδοτικό πεπτίδιο έκκρισης, με στόχο κατά την έκφρασή τους να εμφανίζουν τη φυσική αλληλουχία στο αμινοτελικό τους άκρο (His 1), η οποία συμμετέχει στο συντονισμό του ιόντος χαλκού που βρίσκεται στο ενεργό τους κέντρο. Η επαλήθευση των αμινοξέων στο αμινοτελικό του άκρο της StCel61 Native N – terminal έγινε με φασματομετρία μάζας (MS).

Η παραγωγή της StCel61 Native N – terminal έγινε με υγρή καλλιέργεια όγκου 1 L των κυττάρων της ζύμης σε θρεπτικό υλικό BMMY και η απομόνωση έγινε με διαδοχικά στάδια διηθήσεων, συμπύκνωσης και χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Το μοριακό βάρος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) στα 60 kDa και η συγκέντρωσή της στο τελικό διάλυμα (όγκου περί τα 10 ml), 2,2 mg/mL .

Η παραγωγή της FoCel61 Native N – terminal έγινε με υγρές καλλιέργειες όγκου 1 L των κυττάρων της ζύμης σε θρεπτικό υλικό BMMY. Η απομόνωσή της έγινε με διαδοχικά στάδια διηθήσεων, συμπύκνωσης και συνδυασμό χρωματογραφίας ανιονανταλλαγής (Anion exchange chromatography) και μοριακού αποκλεισμού (Gel filtration) καθώς η χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) δεν απέδωσε, λόγω κάποιου δομικού προβλήματος με το His – Tag της πρωτεΐνης. Το μοριακό βάρος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) στα 26 kDa και η συγκέντρωσή της στο τελικό διάλυμα (όγκου περί τα 10 mL) 0,69 mg/mL.

Ακολούθησαν πειράματα ανίχνευσης ενεργότητας των ενζύμων σε διάφορα υποστρώματα. Η FoCel61 Native N - terminal εμφάνισε ενεργότητα στα υποστρώματα της β – γλουκάνης κριθαριού (barley β – glucan), και στους κελλοολιγосακχαρίτες, κελλοτετραόζη και κελλοπενταόζη. Με τη βοήθεια χρωματογραφίας ανιονανταλλαγής υψηλής απόδοσης (HPAEC) έγινε ανίχνευση προϊόντων αποικοδόμησης των υποστρωμάτων (β – γλουκάνης, κελλοτετραόζης και κελλοπενταόζης), όπου διαπιστώθηκε η απελευθέρωση αναγωγικών προϊόντων, όπως αυτά μετρήθηκαν και με τη μέθοδο του DNS. Η αδυναμία ανίχνευσης οξειδωμένων προϊόντων με την ταυτόχρονη απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων, οδηγεί στο συμπέρασμα πως η FoCel61 Native N – terminal οξειδώνει το

γλυκοζιδικό δεσμό στη θέση 4, παράγοντας κετοαλδόζες και αναγωγικά σάκχαρα. Η *StCel61* Native N – terminal δεν εμφάνισε ενεργότητα σε κανένα από τα υποστρώματα αυτά.

Από τη βιοπληροφορική μελέτη που εκπονήθηκε, οι δύο πρωτεΐνες κατατάχθηκαν στις PMO 3 (κατά Vu et al) με βάση τα αλληλουχικά τους χαρακτηριστικά, με τη μέθοδο της στοίχισης πολλαπλών αλληλουχιών (MSA). Οι PMO 3 φέρονται να παρουσιάζουν χαμηλότερη εξειδίκευση οξειδώνοντας το γλυκοζιδικό δεσμό στη θέση 1 ή/και τη θέση 4 κάτι, το οποίο συνάδει με την δράση της *FoCel61* Native N – terminal που ανιχνεύθηκε. Ωστόσο, η κατηγοριοποίηση αυτή είναι απλουστευμένη και στο μέλλον φαίνεται πως θα αναθεωρηθεί, καθότι αναμένεται να βρεθούν ενεργότητες σε νέα υποστρώματα. Ακολούθησε μελέτη της επίδρασης του ασκορβικού οξέος και της CDH του *P. cinnabarinus* ως αναγωγικών παραγόντων στην δράση των LPMOs. Φαίνεται πως η παρουσία των παραγόντων αυτών δεν είχε σημαντική επίδραση στη δράση των LPMOs.

Κατόπιν ακολούθησε μελέτη του συνεργιτισμού που εμφανίζουν οι LPMOs με εμπορικά σκευάσματα κυτταρινασών, κατά τη δράση τους σε λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα PS. Η *StCel61* Native N – terminal εμφάνισε συνεργιτισμό με τις κυτταρινάσες, καθώς παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα υδρόλυσης όταν προστέθηκε στο μίγμα των κυτταρινασών. Υπό τις ίδιες συνθήκες μελετήθηκε και η συνεργιστική δράση της *StCel61*, η οποία φέρει επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό της άκρο. Ο συνεργιτισμός ο οποίος παρατηρήθηκε ήταν εφάμιλλος με αυτόν της *StCel61* Native N – terminal, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η προσθήκη μιας μικρής αλληλουχίας αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο της LPMO του *S. thermophile* δεν επηρεάζει τη δράση του ενζύμου. Απ' την άλλη μεριά η *FoCel61* δεν εμφάνισε συνεργιτισμό με τις κλασσικές κυτταρινάσες στο λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα.

Τέλος επιχειρήθηκε η αποδόμηση προκατεργασμένου άχυρου σίτου (PWS), από την *StCel61* Native N – terminal σε πιλοτικό αντιδραστήρα ρευστοποίησης, όπως αυτή εκκρίθηκε στο εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας (crude) (όγκου 400 mL, συγκέντρωσης 0,55 mg_{total prot}/mL). Ωστόσο οι μετρήσεις του ιξώδους της αντίδρασης, το οποίο αποτέλεσε δείκτη αποδόμησης του υποστρώματος, δεν έδειξαν κάποια επίδραση της *StCel61* Native N – terminal στο υπόστρωμα.

Μελλοντικές προκλήσεις

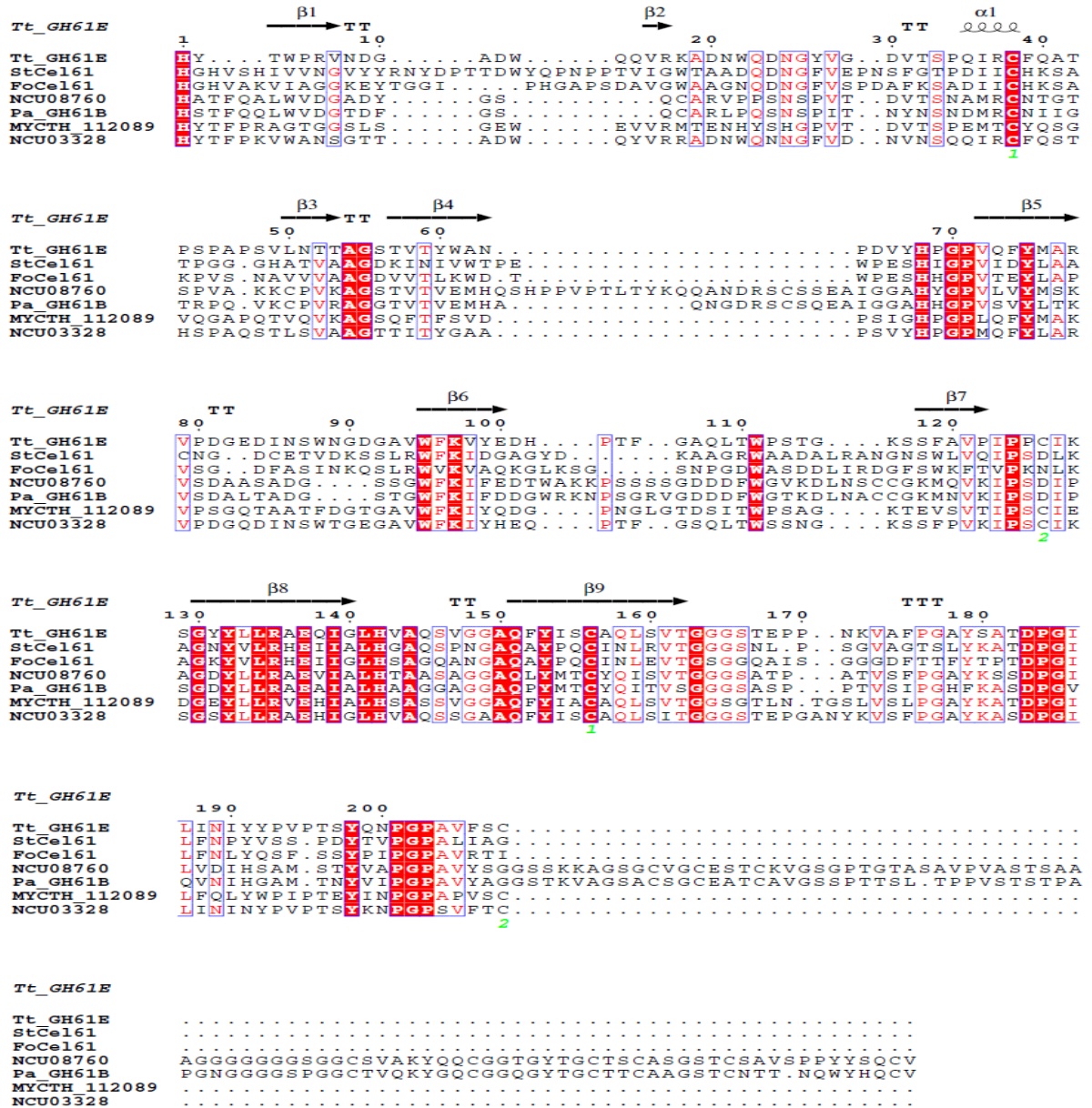
Ο καινοτόμος χαρακτήρας των πρωτεϊνών της οικογένειας AA9 συνεπάγεται ένα μεγάλο αριθμό προκλήσεων, οι οποίες εμφανίζουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον. Μερικές από αυτές παρουσιάζονται παρακάτω:

- Επέκταση της μελέτης και σε άλλα υποστρώματα. Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να δρουν σε μια ποικιλία υποστρωμάτων όπως κελλο-ολιγοσακχαρίτες και διάφορες γλουκάνες (π.χ. β – γλουκάνη κριθαριού). Η μελέτη ενεργότητας και σε άλλα υποστρώματα όπως ημικυτταρίνες, όπως διάφορες ξυλάνες και γλυκομαννάνες, είναι επιτακτική ανάγκη για τον ολοκληρωμένο χαρακτηρισμό δράσης της οικογένειας AA9.
- Εξέταση της δράσης των AA9 πάνω σε μια ποικιλία προκατεργασμένων και μη λιγνινοκυτταρινούχων υλικών με σκοπό την προσομοίωση της αποδόμησης της φυσικής βιομάζας.
- Μέτρηση της ενεργότητας των ενζύμων αυτών με καινοτόμες μεθόδους (assays), όπως αυτό του Amplex Red, το οποίο ανακαλύφθηκε πρόσφατα, η ακόμα καλύτερα προσπάθεια ανάπτυξης ενός assay μέσω της ενεργότητας των πρωτεϊνών αυτών σε κάποιο υπόστρωμα.
- Ακριβής αναγνώριση των προϊόντων, και ιδιαίτερα οξειδωμένων προϊόντων (αλδονικά οξέα – C1 οξείδωση, 4- κετοαλδόζες – C4 οξείδωση) που προέρχονται από τη δράση των δύο πρωτεϊνών, μέσω σύζευξης υγρής χρωματογραφία ανιονανταλλαγής (HPAEC) με φασματομετρία μάζας (MS), με στόχο να διαλευκανθεί ο τρόπος με τον οποίο δρουν οι πρωτεΐνες αυτές.
- Κρυσταλλογραφική μελέτη των πρωτεϊνών αυτών θα εμπλούτιζε τις πληροφορίες γύρω από τη δομή των μελών της οικογένειας AA9.
- Διεξαγωγή πειραμάτων υδρόλυσης λιγνινοκυτταρινούχου υλικού από τις ΡΜΟ σε συνδυασμό τόσο με εμπορικά σκευάσματα κυτταρινασών (Celluclast) και β – γλυκοζιδασών (Novozyme 188), όσο και με μεμονωμένες (ανασυνδυασμένες) κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες σε ημι-βιομηχανική κλίμακα, για την εκτίμηση της ενισχυτική δράσης των AA9 σε μεγαλύτερη κλίμακα. Ταυτόχρονα, θα φαινόταν και το όφελος των πρωτεϊνών αυτών στη βιομηχανία με τη μείωση του ενζυμικού φορτίου που απαιτείται για την επίτευξη της υδρόλυσης.
- Λεπτομερής μελέτη πάνω στην επίδραση των αναγωγικών παραγόντων όπως του ασκορβικού οξέος, της CDH αλλά και άλλων ουσιών (π.χ. λιγνίνη) θα έριχνε φως στο τρόπο με τον οποίο αυτές οι ΡΜΟ οξειδώνουν τους γλυκοζιδικούς δεσμούς και αποδομούν τα εκάστοτε υποστρώματα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

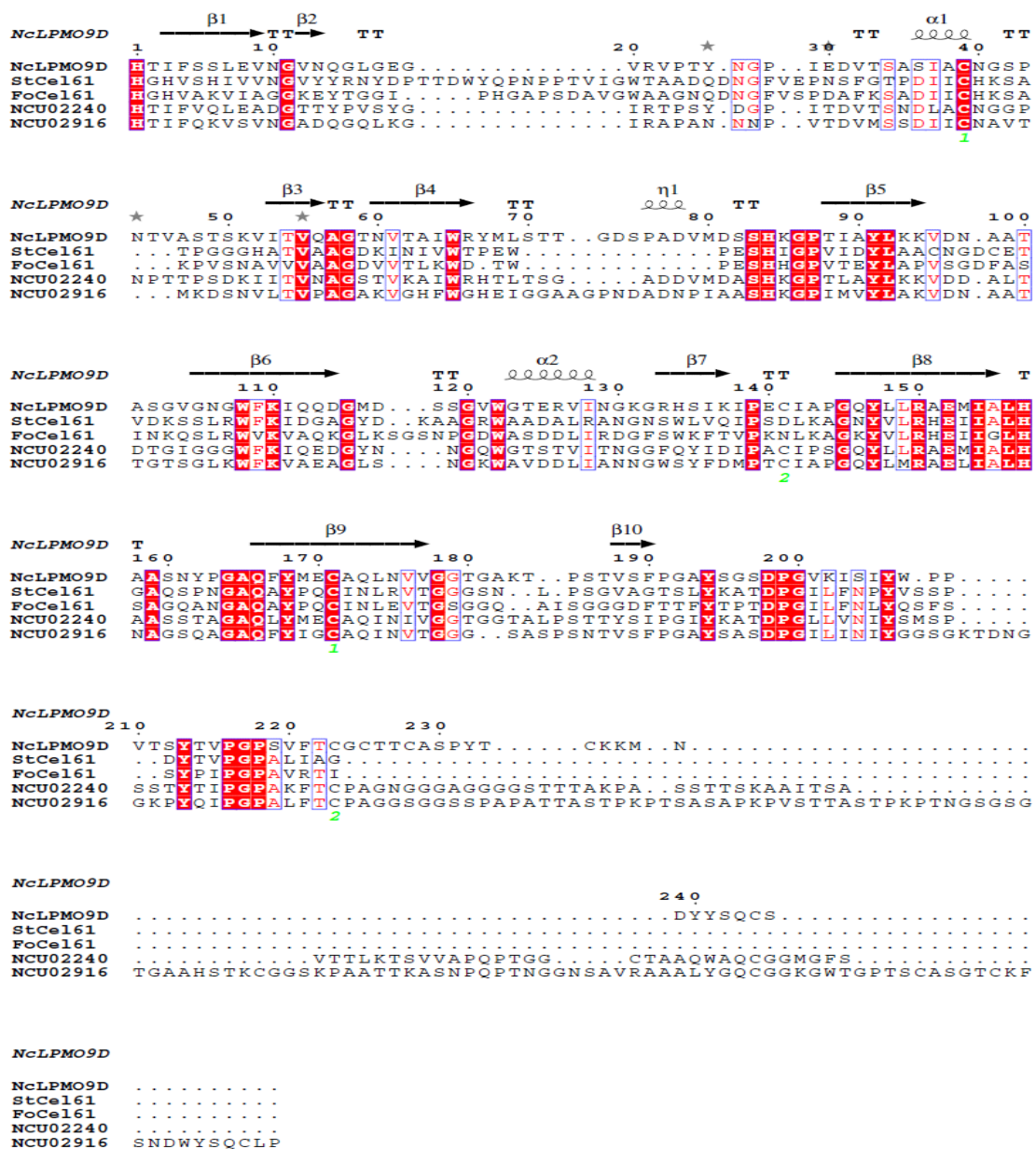
A) Βιοπληροφορική ανάλυση

- Σύγκριση PMO 1– *StCel61* – *FoCel61*



Σχήμα 1. Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (Multiple Sequence alignment, MSA) μεταξύ των μελών της κατηγορίας PMO1, όπως αυτή ορίστηκε από τους Vu et al (Vu et al, 2013)

- Σύγκριση PMO2– *StCel61* – *FoCel61*



Σχήμα 2. Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (Multiple Sequence alignment, MSA) μεταξύ των μελών της κατηγορίας PMO2, όπως αυτή ορίστηκε από τους Vu et al (Vu et al, 2013)

- Σύγκριση PMO 3*– *StCel61* – *FoCel61*

```

1      10      20      30      40      50      60
StCel61  HGHVSHIVVNGVYRNYDPTTDWYQPNPPTVIGWTAADQDNGFVEPNSFGTDPDIICHKSA
FoCel61  HGHVAKVIAGGKEYTGGI...PHGAPSDAVGWAAGNQDNGFVSPDAFKSADIICHKSA
AEO56665.1 HGAVTSYNIAGKDYPGYSGFA...PTG.QDVIQWQWPDYNPVLS...ASDPKLRCNGG.
NcGH61-8  HGAVTSYIIDGTTYPGYEGFS...PASSPKTIQFQWPNYDPTMT...VSDAKMRCNGG.

70      80      90      100     110
StCel61  TPGGGHATVAAGDKINIVWTPEWPESHIGPVIDYLAACNGDCE.TVDKSSLRWFKIDGAG
FoCel61  KPVSNNAVVVAAGDVVTLKWD.TWPESHHGPVTEYLAPVSGDFA.SINKQSLRWVKVAQKG
AEO56665.1 TGAALYEEAAPGDTITATWA.QWTH.SQGPILVWMYKCPGDFS.SCDGSGAGWFKIDEAG
NcGH61-8  TSAQLSATVQAGSNVTAVWK.QWTH.EQGPVQVWLFKCPAFGSSCKGDGKGWFKIDEMG

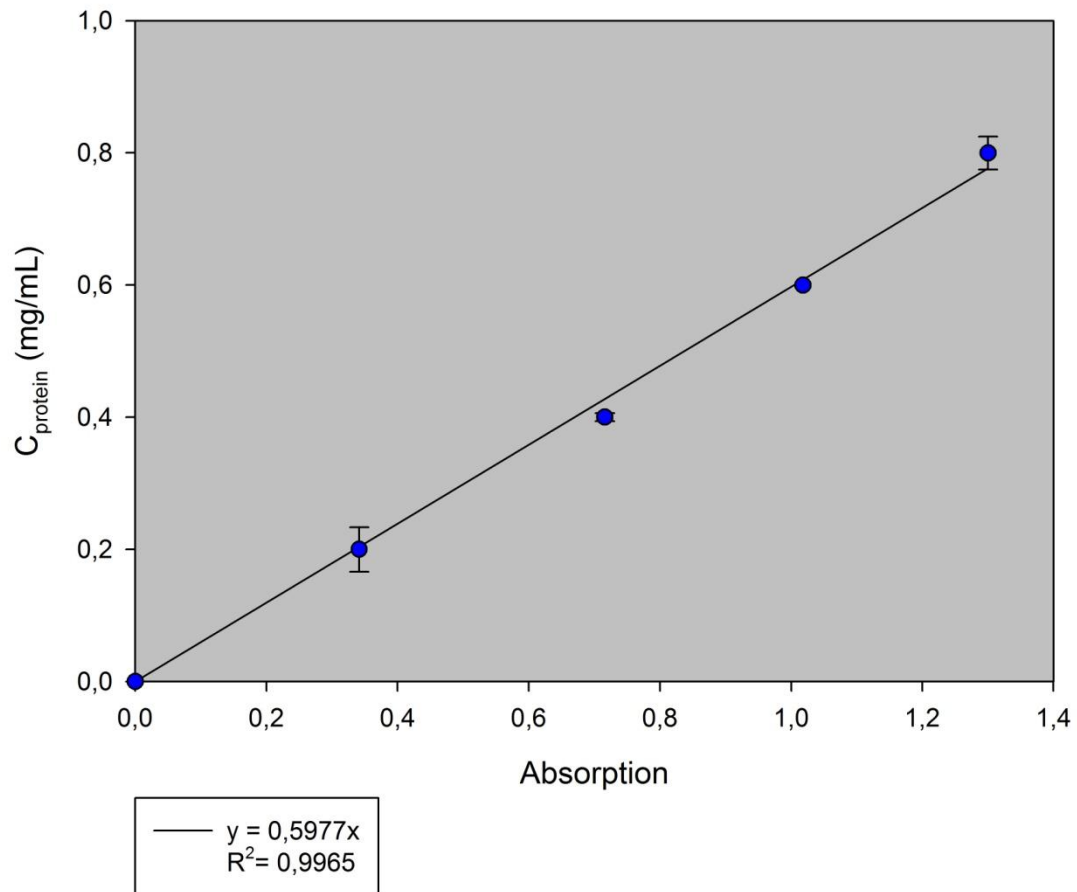
120     130     140     150     160
StCel61  YD..K.....AAGRWAADALLRANGNSWLVQIPSDLKAGNYVLRHEIIALHGAQSPNG
FoCel61  LKSGS.....NPGDWASDDLIRDGFSWKFTVPKNLKAGKYVLRHEIIGLHSAGQANG
AEO56665.1 FHGDGTTVFLDTETPSGWDIAKLVGGNKSWSSKIPDGLAPGNYLVRHELIALHQA...NN
NcGH61-8  MWGGKL.....NSANWGTA.LIVKNHQWSSEIPKNMAPGNYLIRHELLALHQA...NT

170     180     190     200     210     220
StCel61  AQAYPCINLRVTGGSNL.PSGV..AGTSLYKATDPGILFNPYVSS..PDYTVPGPALI
FoCel61  AQAYPCINLRVTGGSGQAISGGG..DFTTFYTPTDPGILFNLYQSF..SSYPIPGPAVR
AEO56665.1 PQAYPCQAQIKVTGSGTAEPAASYKAAIPGYCQSDPNISFNINDHSLPQEYKIPGPPVF
NcGH61-8  PQAYPCQAQIVVQGSGNAVPPSDYLYSIPTYAPQNDPGVTILIYSSK.ATTYTPPGPGRVW

StCel61  AG.....
FoCel61  TI.....
AEO56665.1 KGTASAKARAFQA
NcGH61-8  SGFQF.....

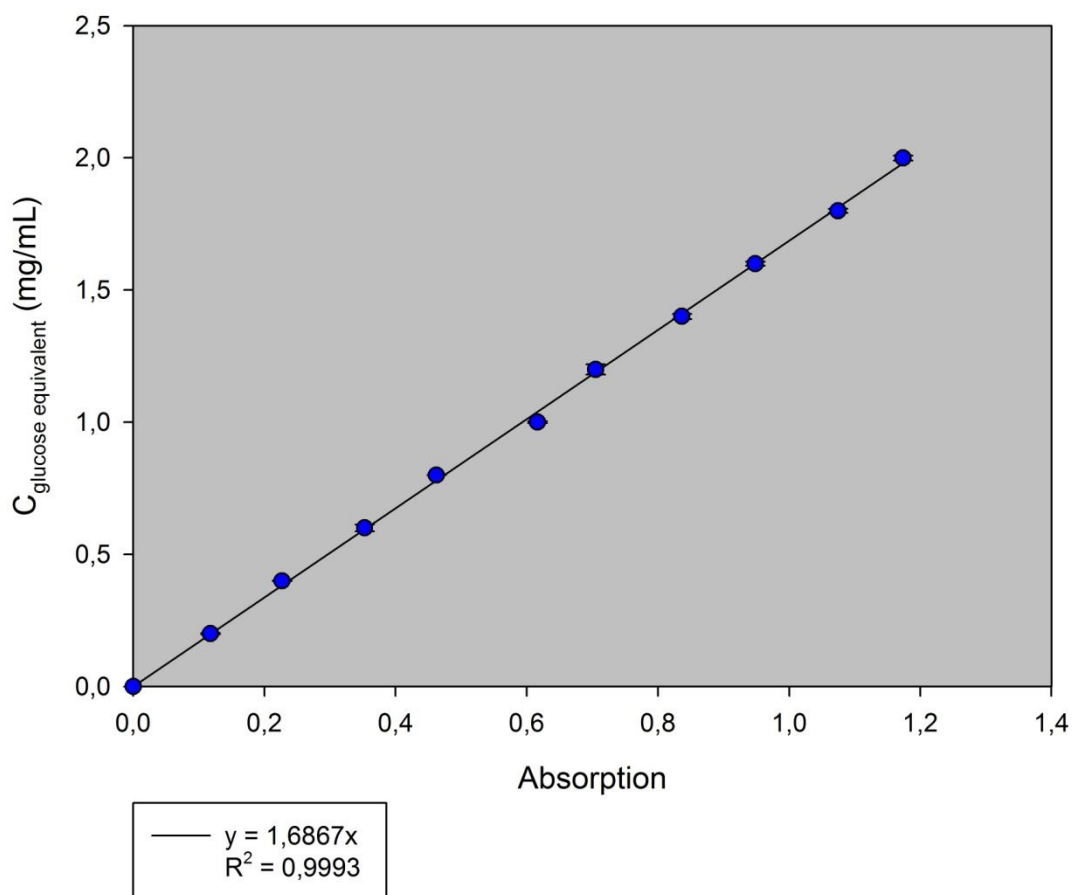
```

Σχήμα 3. Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (Multiple Sequence alignment, MSA) μεταξύ των μελών της κατηγορίας PMO1, όπως αυτή ορίστηκε από τους Vu et al (Vu et al, 2013)

Β) Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών - Καμπύλη αναφοράς Lowry

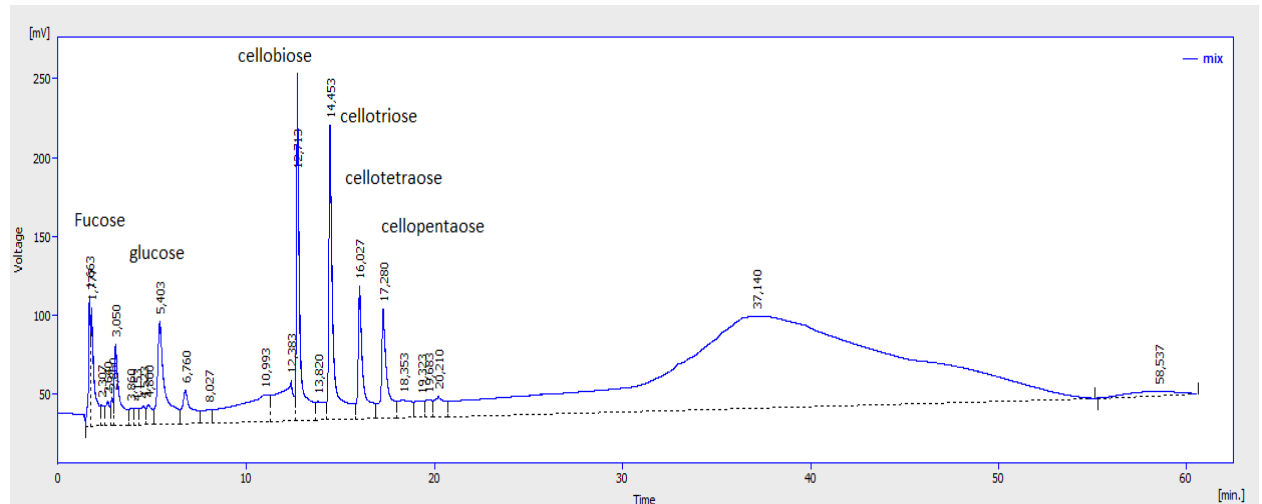
Σχήμα 4. Καμπύλη αναφοράς με πρότυπο αλβουμίνης ορού από βοδινό (Bovine serum albumin, BSA) για την ποσοτική μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.

Γ) Ποσοτικός προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων – μέτρηση σε ισοδύναμα σακχάρων - Καμπύλη αναφοράς δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)



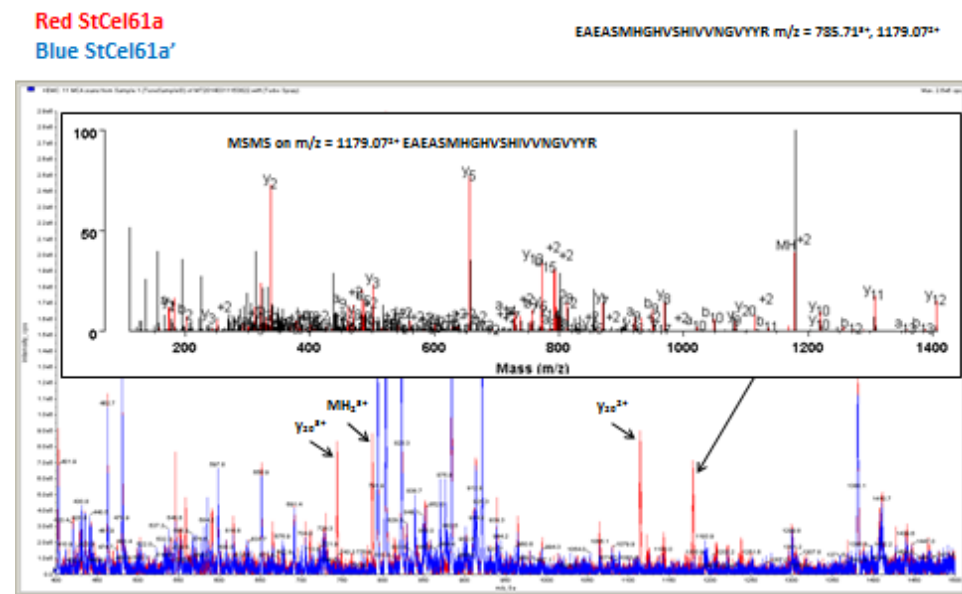
Σχήμα 5. Καμπύλη αναφοράς με πρότυπο γλυκόζης για την ποσοτική μέτρηση της συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

Δ) Ταυτοποίηση προϊόντων από αντιδράσεις υδρόλυσης με χρωματογραφία ανιόνταλλαγής υψηλής απόδοσης (ΗΡΑΕC) -Μέτρηση πρότυπου μίγματος κελλο – ολιγοσακχαριτών

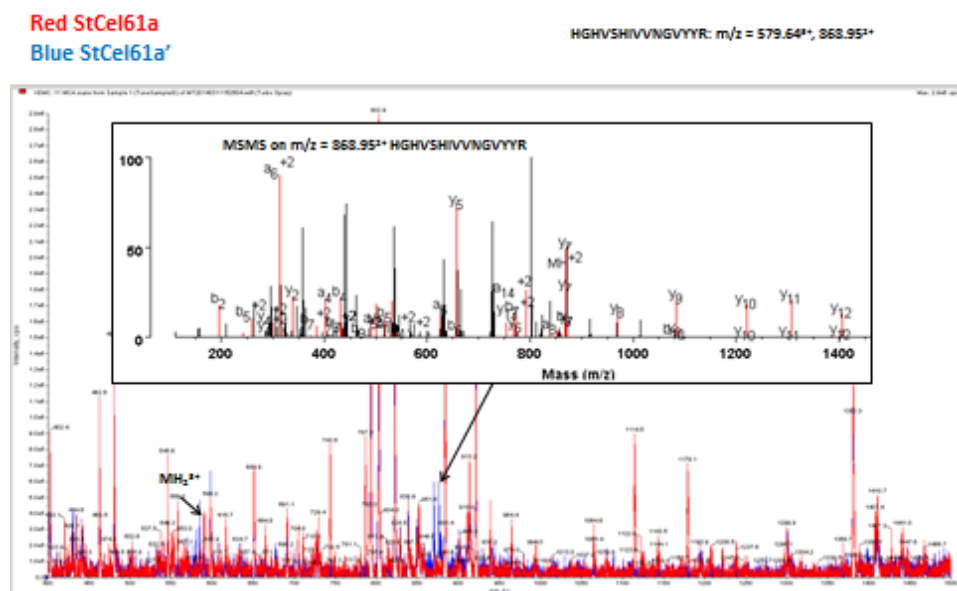


Σχήμα 6. Χρωματογράφημα προτύπων φουκόζης (εσωτερικό πρότυπο), γλυκόζης, κελλοβιοζης, κελλοτριόζης, κελλοτετραόζης και κελλοπενταόζης, για την ποιοτική ανάλυση των προϊόντων αποδόμησης διαφόρων υποστρωμάτων

Ε) Επαλήθευση ορθότητας αμινοτελικού άκρου της *StCel61* Native N – terminal



Σχήμα 7. Φασματογράφημα *StCel61* με τη προσθήκη των παραπάνω αμινοξέων στο αμινοτελικό της άκρο (*StCel61a'* - μπλε)



Σχήμα 8. Φασματογράφημα *StCel61* Native N - terminal (*StCel61a* – κόκκινο)

Βιβλιογραφία

Ahmad A.L. , Mat Yasin N.H. , Derek C.J.C. , Lim J.K. , Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15 (2011) 584–593

Alam F. , Date A. , Rasjidin R. , Mobin S. , Moria H. , Baqui A. , Biofuel from algae- Is it a viable alternative? *Procedia Engineering* 49 (2012) 221 – 227

Arantes V, Saddler JN (2010) Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels* 3:4

Atalla RH, Vanderhart DL (1984) Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* 223: 283-285

Beeson, W.T., Phillips, C.M., Cate, J.H., and Marletta, M.A. (2012). Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 890–892.

Berka, R. M., I. V. Grigoriev, et al. (2011). "Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*." *Nat Biotechnol* 29(10): 922-927.

Bey M. , Zhou S. , Poidevin L. , Henrissat B. , Coutinho P. , Berrin J.G. , Sigoillot J.C. , Comparison of two lytic polysaccharide monooxygenases (GH61) from *Podospira anserina* reveals differences upon cello-oligosaccharides oxidation, *Applied Environmental Microbiology*. 2013 Jan;79(2):488-96

Bhat, K. M. and R. Maheshwari (1987). "Sporotrichum thermophile Growth, Cellulose Degradation, and Cellulase Activity." *Appl Environ Microbiol* 53(9): 2175-2182.

Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ and Davies GJ (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* 382:769-781

Cannella D. , Hsieh C. , Felby C. , Jørgensen H. , Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content, *Biotechnology for Biofuels* 2012, 5:26

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B: The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 2009, 37:233–238.

Cheng J. , Govinda T. , Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review, *Renewable Energy* 36 (2011) 3541 - 3549

Christakopoulos, P., C. Xiros, et al. (2008). "Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production." *Industrial Crops and Products* 28(2): 213-224.

Chu HH, Hoang V, Hofemeister J, Schrempf H: A *Bacillus amyloliquefaciens* ChbB protein binds beta- and alpha-chitin and has homologues in related strains. *Microbiology-Sgm* 2001, 147:1793-1803

Conde, R., R. Cueva, et al. (2004). "A search for hyperglycosylation signals in yeast glycoproteins." *J Biol Chem* 279(42): 43789-43798.

D. Welner, M. H. Jensen, K. McFarland, J.-C. N. Poulsen, H. Otten et al (2009) Structure and function of enzymes in biomass degradation. In *Biotechnology of lignocellulose degradation and Biomass Utilization - Mie Bioforum 2008*

Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 773-782

Davies G, Henrissat B: Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 1995, 3:853–859.

Dimarogona M, Topakas E, Olsson L, Christakopoulos P (2012b) Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*. *Bioresour Technol* 110: 480-487

Dimarogona M., Topakas E. , Christakopoulos P. , Cellulose degradation by oxidative enzymes, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, Volume No: 2, Issue: 3, September (2012a)

Dimarogona M., Topakas E. , Christakopoulos P. , Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts, , *Applied Microbiology Biotechnology*, Volume 97, Issue 18, September 2013

Emanuelsson, O., S. Brunak, et al. (2007). "Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools." *Nat Protoc* 2(4): 953-971.

Fiorese G. , Catenacci M. , Verdolini E. , Bosetti V. ,Advanced biofuels: Future perspectives from an expert elicitation survey, *Energy Policy* 56 (2013) 293–311

Forsberg Z, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Bunæs AC, Stenstrøm Y, MacKenzie A, Sørli M, Horn SJ, Eijsink VGH: Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. *Prot Science* 2011, 20:1479–1483.

Gasteiger, E., A. Gattiker, et al. (2003). "ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis." *Nucleic Acids Research* 31(13): 3784-3788.

Glyn R, Hemsworth EJT, Kim RQ, Gregory RC, Lewis SJ, Turkenburg JP, Parkin AJ, Davies GJ, Walton PH: The copper active site of CBM33 polysaccharide oxygenases. *J Am Chem Soc* 2013, 135:6069-6077

Gupta R., J. E. a. B. S. (2004). "Prediction of N-glycosylation sites in human proteins." In preparation.

Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Navarro Poulsen JC, et al. (2010) Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry* 49: 3305-3316.

Hemsworth G.R. , Davies G.J. , Walton P.H. , Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases, *Current Opinion in Structural Biology* 2013, 23:1–9

Henrissat B and Davies G (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* 7:637-644

Horn S.J. , Vaaje-Kolstad G. , Westereng B. , Eijsink V. , Novel enzymes for the degradation of cellulose, *Biotechnology for Biofuels* 2012, 5:45

Isaksen T. , Westereng B. , Aachmann F. L. , Agger J. W. , Kracher D. , Kittl R. , Ludwig R. , Haltrich D. , Eijsink V. , Horn S.J. , A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides, *The Journal of Biological Chemistry*, , January 2014 289: 2632-2642

Julenius, K., A. Molgaard, et al. (2005). "Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites." *Glycobiology* 15(2): 153-164

Karkehabadi S. , Hansson H. , Kim S. , Piens K. , Mitchinson C. , Sandgren M. , The First Structure of a Glycoside Hydrolase Family 61 Member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å Resolution, *Journal of Molecular Biology* (2008) 383, 144–154

Karlsson J, Saloheimo M, Siika-aho M, Tenkanen M, Penttilä M et al (2001) Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *Eur J Biochem* 268:6498–6507

Kim S. , Ståhlberg J. , Sandgren M. , Paton R.S. , Beckham G.T. , Quantum mechanical calculations suggest that lytic polysaccharide monooxygenases use a copper-oxygen-rebound mechanism, *PNAS* January 7, 2014 vol. 111 no. 1 149-154

Lam M.K. , Lee K.T. ,Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward, *Biotechnology Advances* 30 (2012) 673–690

Langston JA, Brown K, Xu F, Borch K, Garner A and Sweeney MD (2012) Cloning, expression, and characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Thielavia terrestris* induced under cellulose growth conditions. *BBA* 1824:802-812

Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B (2013) Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol Biofuels* 6(1):41

Li X., Beeson IV W.T. , Phillips C.M. , Marletta M.A. , Cate J.H. , Structural Basis for Substrate Targeting and Catalysis by Fungal Polysaccharide Monooxygenases, *Structure* 20, 1051–1061, June 6, 2012

Lo Leggio L. , Welner D. , De Maria L. , A structural overview of GH61 proteins – fungal cellulose degrading polysaccharide monooxygenases, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, Volume No: 2, Issue: 3, September 2012, e201209019

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-275

Merino ST, Cherry J (2007) Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108:95–120 Reese ET, Siu RGH, Levinson HS: The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J Bacteriol* 1950, 59:485–497.

Miller, G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars." *Anal. Chem.* 31: 426-428.

Moser F, Irwin D, Chen SL, Wilson DB: Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8, *Biotechnol Bioeng* 2008, 100:1066–1077

Naik S. , Goud V. , Rout P. , Dalai A. , Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 578–597

Panagiotou, G., D. Kekos, et al. (2003). "Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation." *Industrial Crops and Products* 18(1): 37-45.

Phillips C.M. , Beeson IV W.T. , Cate J.H. , Marletta M.A. , Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*, , *ACS Chemical Biology* 2011, 6, 1399–1406

Quinlan R.J., Sweeney M. D. , Lo Leggio L. , Otten H. , Poulsen J.C , Johansen K.S. , Krogh K. , Jørgensen C. , Tovborg M. , Anthonsen A. , Tryfona T. , Walter C.P. , Dupree P. , Xu F. , Davies G.J. , Walton P. , Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components, PNAS September 13, 2011 vol. 108,no. 37 15079-15084

Raguz S, Yagüe E, Wood D and Thurston C (1992) Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus*. *Gene* 119:183-190, 1992.

Schrempf H (2001) Recognition and degradation of chitin by *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79: 285-289.

Sims R. , Mabee W. , Saddler J. , Taylor M. , An overview of second generation biofuel technologies, *Bioresource Technology* 101 (2010) 1570–1580

Stoscheck, C. M. (1990). "Quantitation of protein." *Methods Enzymol* 182: 50-68

Vaaje-Kolstad G, Bohle LA, Gaseidnes S, Dalhus B, Bjoras M, et al. (2012) Characterization of the chitinolytic machinery of *Enterococcus faecalis* V583 and high-resolution structure of its oxidative CBM33 enzyme. *J Mol Biol* 416: 239-254.

Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, van Aalten DMF, Synstad B, Eijsink VGH: The noncatalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem* (2005a), 280:28492–28497.

Vaaje-Kolstad G, Houston DR, Riemen AH, Eijsink VG, van Aalten DM (2005b) Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21. *J Biol Chem* 280(12):11313–11319

Vaaje-Kolstad G. , Westereng B. , Horn S.J. , Liu Z. , Zhai H. , Sørli M. , Eijsink V. , An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides, *Science* 330, 219 (2010)

Vu V. , Beeson W. , Phillips C.M. , Cate J.H. , Marletta M.A. , Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136 (2), pp 562–565

Walseth, C. S. (1952) *Tappi J. Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.* 35, 228–233.

Westereng B, Ishida T, Vaaje-Kolstad G, Wu M, Eijsink VGH et al (2011) The putative endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose. *PLOS One* 6:e27807

Wu M., Beckham G.T., Larsson A., Ishida T. , Kim S. , Payne C. , Himmel M. , Crowley M. , Horn S.J., Westereng B. , Igarashi K. , Samejima M. , Ståhlberg J. , Eijsink V., Sandgren M., Crystal Structure and Computational Characterization of the Lytic

Polysaccharide Monoxygenase GH61D from the Basidiomycota Fungus *Phanerochaete chrysosporium*, The Journal of Biological Chemistry VOL. 288, NO. 18, pp. 12828–12839, May 3, 2013

Wymelenberg AV, Denman S, Dietrich D, Bassett J, Yu X et al (2002) Transcript Analysis of Genes Encoding a Family 61 Endoglucanase and a Putative Membrane-Anchored Family 9 Glycosyl Hydrolase from *Phanerochaete chrysosporium*. App Env Microbiol 68:5765–5768

Xiros, C., P. Katapodis, et al. (2009). "Evaluation of *Fusarium oxysporum* cellulolytic system for an efficient hydrolysis of hydrothermally treated wheat straw." Bioresour Technol 100(21): 5362-5365.

Yakovlev I, Vaaje-Kolstad G, Hietala AM, Stefańczyk E, Solheim H et al (2012) Substrate-specific transcription of the enigmatic GH61 family of the pathogenic white-rot fungus *Heterobasidion irregulare* during growth on lignocellulose. App Micr Biotech 95:979-990

Δημαρόγκωνα Μ. 2012. Δομική και μοριακή μελέτη βιοκαταλυτών που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης. Διδακτορική διατριβή Ε.Μ.Π. Αθήνα. Σελ. 10 - 13

Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε. (2011). Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων. Αθήνα. Εκδόσεις Ε.Μ.Π. Σελ.34 – 38, 65

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

http://www.cazy.org/AA9_structure.html

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCGlyc>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>