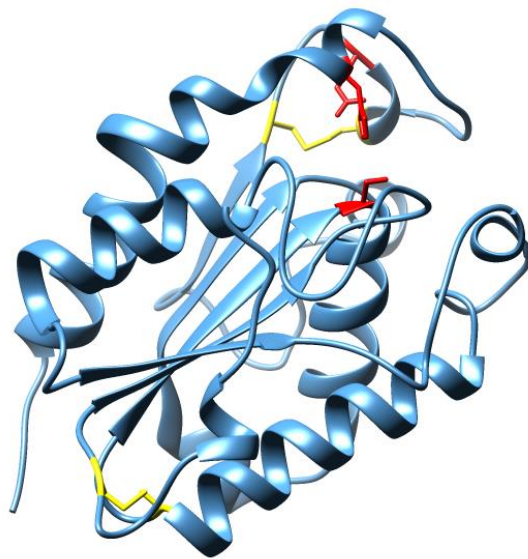




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μηχανική της ετερόλογης έκφρασης και
χαρκτηρισμός μιας κουτινάσης του μύκητα
Fusarium oxysporum



Νικολάιβιτς Ευστράτιος

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

ΑΘΗΝΑ 2014

*Σε όσους αγαπούν ερευνητές
κι ας μην καταλαβαίνουν πάντοτε τι λένε*

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.

Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης αυτής της διετούς προσπάθειάς μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον υπεύθυνό μου, κύριο Τόπακα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος και τη συνεχή στήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησής του. Οι συμβουλές του μου έμαθαν πολλά περισσότερα από όσα ευελπιστούσα να μάθω κατά τη διάρκεια αυτής της εκπαιδευτικής διαδικασίας, όχι μόνο σχετικά με το θέμα που πραγματεύτηκα, αλλά και γενικότερα για την έρευνα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω και στη Δρα Μαρία Δημαρόγκωνα, η οποία ήταν πάντα πρόθυμη να ακούσει τους προβληματισμούς μου και να μοιραστεί μαζί μου τις εμπειρίες και τις γνώσεις της. Το σημαντικότερο όμως που μου προσέφερε ήταν η βοήθειά της ώστε να μπορέσω να ωριμάσω στο περιβάλλον του εργαστηρίου.

Φυσικά θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας, για την ομαλή συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Ανθή Καρναούρη για την βοήθειά της στην προσαρμογή μου στο χώρο του Εργαστηρίου.

Σε αυτό το σημείο δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ε.Μ.Π. Φραγκίσκο Κολίση, με του οποίου την παρέμβαση ήρθα σε επαφή με το αντικείμενο της Μοριακής Βιολογίας, στο Εργαστήριο Ενζυμικής και Συνθετικής Βιοτεχνολογίας του Ι.Β.Φ.Χ.Β. του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Ε.Ι.Ε). Τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Δ. Γιαλαμά, Δ. Ζαραφέτα και Η. Μάτη, που με έμαθαν τις βασικές μοριακές τεχνικές, καθώς και τον Ερευνητή Γ' του Ε.Ι.Ε. Γιώργο Σκρέτα για την παροχή του στελέχους *E. coli* Origami2, που βοήθησε στην εξέλιξη της ερευνητικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να δώσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, με της οποίας τη στήριξη έγινε δυνατή η αφιέρωσή μου στο Εργαστήριο και την Διπλωματική μου Εργασία.

Στράτος Νικολάιβιτς,

Αθήνα, Ιανουάριος 2014

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ετερόλογη έκφραση μιας κουτινάσης (FoCut16606) του μεσόφιλου μύκητα *Fusarium oxysporum* σε τρεις διαφορετικούς ξενιστές, με στόχο τη βελτίωση της σταθερότητας και αποδοτικότητας του ανασυνδυασμένου βιοκαταλύτη.

Αρχικά, η FoCut16606 εκφράστηκε στο βακτήριο *Escherichia coli* BL21, το οποίο είχε μετασχηματισθεί με τον πλασμιδιακό φορέα pET22b(+) που έφερε το αντίστοιχο γονίδιο (*foxg_16606.3*). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παρουσίασε πολύ μικρή θερμοσταθερότητα ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες επώασης. Με στόχο τη βελτίωση της σταθερότητας, η αναδίπλωση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε στον περιπλασμικό χώρο των *E. coli* BL21 χρησιμοποιώντας τη σηματοδοτική αλληλουχία *relB*. Η περιπλασμική έκφραση δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών, που κρίνονται απαραίτητοι για την αύξηση της σταθερότητας. Παρόλο που η ανασυνδυασμένη κουτινάση παρουσίασε βελτιωμένες ιδιότητες, δεν θεωρήθηκε ικανοποιητική για εφαρμογές στη Βιομηχανία.

Για την δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών στο κυτταροπλασματικό περιβάλλον, χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* Origami2. Παρότι δοκιμάστηκε και η περιπλασμική έκφραση του ενζύμου, χρησιμοποιώντας τη σηματοδοτική αλληλουχία *relB*, το ένζυμο που παρήχθη ενδοκυτταρικά βρέθηκε σταθερότερο. Δεν υφίστατο απώλειες ενεργότητας στους 20 °C, ενώ διατήρησε λιγότερο από το 20% της αρχικής του ενεργότητας ύστερα από 4 h στους 40 °C.

Ο εντοπισμός ενεργότητας κουτινάσης σε όλα τα προαναφερθέντα συστήματα έκφρασης μελετήθηκε τόσο στον εξωκυτταρικό χώρο, όσο και στον εσωκυτταρικό ως διαλυτή πρωτεΐνη ή έγκλειστα σωματίδια (inclusion bodies), σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής (37 και 16 °C). Στις παραγωγές που πραγματοποιήθηκαν στους 37 °C η πλειοψηφία της ενεργότητας κουτινάσης εντοπίστηκε στα inclusion bodies, ενώ στους 16 °C στο κυτταρόπλασμα.

Ύστερα από απομόνωση, τα ανασυνδυασμένα ένζυμα (~23 kDa) χρησιμοποιήθηκαν για κινητικές μελέτες σε τρεις εστέρες της παρα-νιτροφαινόλης με διαφορετικό μήκος αλυσίδας – C₂, C₄ και C₁₂. Με κριτήριο την κινητική σταθερά K_m, τα ανασυνδυασμένα ένζυμα έδειξαν μεγαλύτερη συγγένεια με τον εστέρα με τα 4 άτομα άνθρακα.

Η θερμοσταθερότητα της FoCut16606 αυξήθηκε σημαντικά, όταν αυτή εκφράστηκε σε ευκαρυωτικό ξενιστή, τη μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris* η οποία δίνει τη δυνατότητα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως σχηματισμό

δισουλφιδικών δεσμών και γλυκοζυλίωση. Τα κύτταρα της *P. pastoris* X33 μετασχηματίστηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pPICZαC, ο οποίος έφερε το γονίδιο *foxg_16606.3* ρυθμιζόμενο από τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (*AOX1*), καθώς και την αλληλουχία *α-factor* (προέλευση από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*) για την έκκριση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης εξωκυτταρικά. Το ανασυνδυασμένο αυτό ένζυμο παρέμενε σταθερό στους 30 °C, ενώ έχανε το 40% τις αρχικής του ενεργότητας στους 55 °C και το 80% στους 70 °C, ύστερα από 4 h επώαση.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έρευνα της επίπτωσης διαφόρων οργανικών διαλυτών στην ενζυμική ενεργότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Όλες έδειξαν αντοχή στην επώαση στους διαλύτες και περισσότερο το προϊόν της περιπλασμικής έκφρασης των BL21. Αυτή η ιδιότητα καθιστά την FoCut16606 κατάλληλη για εφαρμογές σε μη συμβατικά συστήματα.

Abstract

The purpose of the present diploma thesis was the heterologous expression of a cutinase (FoCut16606) from the mesophilic fungus *Fusarium oxysporum* in three different hosts, in order to improve the stability and efficiency of the recombinant biocatalyst.

Initially, FoCut16606 was expressed in *Escherichia coli* BL21, which was transformed with the plasmid vector pET22b(+) carrying the corresponding gene (*foxg_16606.3*). The recombinant protein showed very little thermal stability even at low incubation temperatures. To overcome temperature sensitivity, the expression took place in the periplasmic space of *E. coli* BL21 using the signal peptide pelB. Periplasmic expression allows the formation of disulfide bonds which are deemed necessary to increase stability. Although the recombinant cutinase displayed improved properties, it was not considered satisfactory for industrial applications.

For the creation of disulfide bonds in the cytosolic environment, bacterial strain *E. coli* Origami2 was subsequently used as the host. Although periplasmic expression was also tested, using pelB signal peptide, the enzyme produced intracellularly was more stable. It suffered no activity losses at 20 °C and retained less than 20% of its initial activity after a 4-hour incubation at 40 °C.

The occurrence of cutinase activity in all the aforementioned expression systems was examined both in the extracellular and intracellular space, as soluble protein or inclusion bodies, in two different temperatures (37 και 16 °C). Most of the cutinase activity was detected in inclusion bodies at 37 °C expression, while at 16 °C it was mainly found in the cytosol.

After the purification of the recombinant enzymes (~23 kDa) kinetic studies were performed using three synthetic esters with different carbon chain length – C₂, C₄ και C₁₂. Judging by the values of K_m kinetic constant, the enzymes showed higher affinity with the C₄ ester.

The thermostability of FoCut16606 increased significantly when it was expressed in an eukaryotic host, the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The latter is capable of performing post-translational modifications such as disulfide bond formation and glycosylation. *P. pastoris* X33 cells were transformed by the vector pPICZαC carrying *foxg_16606.3* gene, regulated by the alcohol oxidase promoter (AOX1) and the a-factor sequence (from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*) for extracellular secretion of the recombinant protein. This enzyme remained stable during incubation at 30 °C and lost 40% και 80% of its initial activity after a 4-hour incubation in 55 °C and 70 °C respectively.

Finally, the impact of various organic solvents on the enzymatic activity of recombinant proteins was investigated. All enzymes showed high tolerance in the solvents used, but the product of the periplasmic expression in BL21 seemed to be the most tolerant. This property of FoCut16606 makes it suitable for application in non-conventional media.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	i
Abstract.....	iii
Περιεχόμενα	1
Κεφάλαιο 1 Θεωρητικό Μέρος	1
1.1 Δομή και Ρόλος της Κουτίνης.....	1
1.2 Προέλευση και Ορισμός κουτινάσης.....	2
1.3 Παραγωγή κουτινάσης.....	2
1.3.1 Καλλιέργεια κουτινοπαραγωγών μικροοργανισμών	2
1.3.2 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση κουτινάσης	3
1.4 Φυσικοχημικές Ιδιότητες Κουτινασών	5
1.5 Δομικά χαρακτηριστικά της Κουτινάσης	10
1.5.1 Χαρακτηριστικά της Δομής στις 3 Διαστάσεις	11
1.5.2 Σύγκριση Δομής Κουτινασών και Λιπασών	12
1.6 Ακινητοποίηση Κουτινάσης	13
1.7 Η κουτινάση σε οργανικούς διαλύτες	14
1.8 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Κουτινάσες.....	15
1.8.1 Υδρόλυση	15
1.8.2 Σύνθεση	17
1.9 Εναντιοεκλεκτικότητα	20
1.10 Εφαρμογές	22
1.10.1 Απορρυπαντικά.....	22
1.10.2 Παραγωγή Βιοντήζελ	22
1.10.3 Βιομηχανία Τροφίμων	23
1.10.4 Γεωργία	26
1.10.5 Βιομηχανία Υφασμάτων (Κλωστοϋφαντουργία).....	28

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2	Υλικά και Μέθοδοι	35
2.1	Υλικά	35
2.1.1	Συσκευές – Όργανα	35
2.1.2	Μικροοργανισμοί	36
2.1.3	Εμπορικά Ένζυμα – Αντιβιοτικά – Τυποποιημένα Χημικά Αντιδραστήρια (kits)	36
2.1.4	Θρεπτικά Μέσα Καλλιέργειας	37
2.1.5	Πλασμδιακοί φορείς Κλωνοποίησης και Έκφρασης	39
2.1.6	Εκκινητές (Primers)	42
2.2	Μοριακές Τεχνικές	43
2.2.1	Απομόνωση γενετικού υλικού	43
2.2.2	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	44
2.2.3	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	47
2.2.4	Αντίδραση Συνένωσης Μορίων DNA (Ligation)	48
2.2.5	Πέψη DNA με Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες	49
2.2.6	Αλληλούχηση του DNA (Sequencing)	50
2.2.7	Μετασχηματισμός (transformation) επιδεκτικών κυττάρων (competent cells)	50
2.3	Μέθοδοι Παραγωγής και Ανάλυσης Πρωτεϊνών	54
2.3.1	Έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στην ζύμη <i>P.pastoris</i>	54
2.3.2	Έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτήρια <i>E.coli</i>	56
2.3.3	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	59
2.3.4	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης	61
2.4	Βιοχημικός χαρακτηρισμός	62
2.4.1	Μέτρηση ενεργότητας ανασυνδυασμένων ενζύμων	62
2.4.2	Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας ενζυμικής δράσης και προσδιορισμός θερμικής σταθερότητας	62
2.4.3	Μελέτη συγγένειας υποστρωμάτων και Υπολογισμός κινητικών σταθερών	62
2.4.4	Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες	63

**Κεφάλαιο 3 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου
foxg_16606.3 67**

3.1 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου <i>foxg_16606.3</i> στην <i>P. pastoris</i>	72
3.1.1 Επιλογή κλώνου για έκφραση και παραγωγή της FoCut16606	73
3.2 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου <i>foxg_16606.3</i> στα <i>E. coli</i>	75
3.2.1 Παραγωγή και καθαρισμός της FoCut16606 από τα <i>E. coli</i>	76
3.2.2 Μελέτη τοποθέτησης ανασυνδυασμένης κουτινάσης στον κυτταρικό χώρο.....	77

Κεφάλαιο 4 Χαρακτηρισμός ανασυνδυασμένων κουτινασών78

4.1 Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης των ενζύμων.....	78
4.2 Μελέτη θερμικής σταθερότητας ενζύμων.....	79
4.3 Κινητικές μελέτες δράσης των ανασυνδυασμένων κουτινασών	84
4.4 Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες	90

Κεφάλαιο 5 Σύνοψη και συζήτηση αποτελεσμάτων.....95

5.1 Προτάσεις για το μέλλον.....	100
----------------------------------	-----

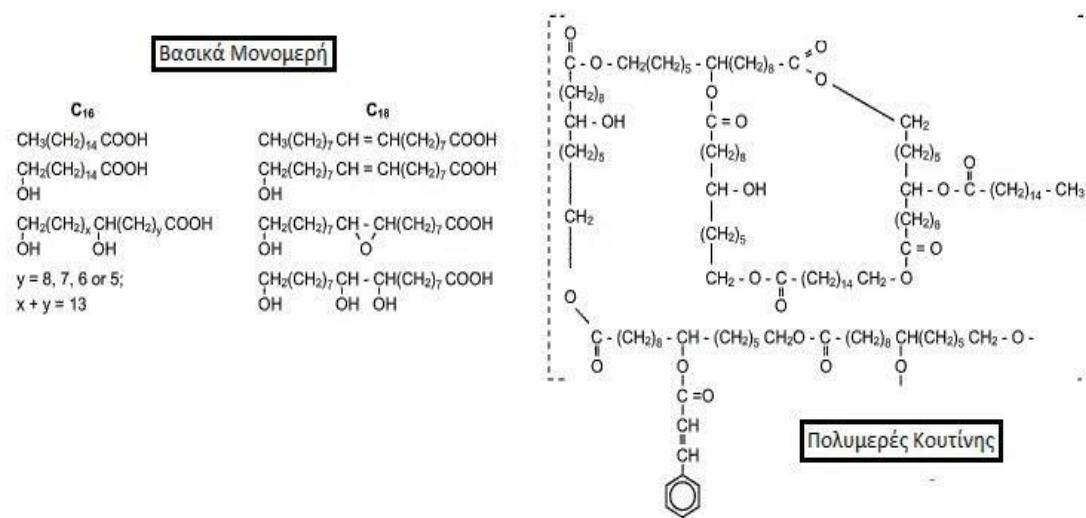
Βιβλιογραφία.....101

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1 Θεωρητικό Μέρος

1.1 Δομή και Ρόλος της Κουτίνης

Η επιδερμίδα των εναέριων τμημάτων των φυτών (μίσχοι, φύλλα, λουλούδια, καρποί, φρούτα) αποτελείται από την κουτίνη διαποτισμένη με κερί. Το δομικό συστατικό της κουτίνης είναι ένα βιοπολυμερές (πολυεστέρας) αδιάλυτο στο νερό, που αποτελείται από υδρόξυ και επόξυ λιπαρά οξέα που είναι κυρίως n -C₁₆ και n -C₁₈ (Woloshuk & Kolattukudy, 1986) και περιέχουν μία με τρεις υδροξυλομάδες, καθώς και άλλες λειτουργικές ομάδες όπως εποξειδία, αλδεΐδες και κετόνες (Εικόνα 1.1). Οι δεσμοί που κυριαρχούν στην κουτίνη είναι οι εστερικοί, αλλά υπάρχουν και στοιχεία για την ύπαρξη υπεροξειδικών γεφυρών και αιθερικών συνδέσμων (Purdy & Kolattukudy, 1975).



Εικόνα 1.1 Λιπαρά οξέα n -C₁₆ και n -C₁₈ κύρια μονομερή της κουτίνης και δομή του πολυμερούς

Η κουτίνη αποτελεί ένα από τα προστατευτικά μέσα που διαθέτει ένα φυτό απέναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Purdy & Kolattukudy, 1975) και έχει φανεί ότι η υδρόλυση της είναι ένα από τα πρώτα στάδια μόλυνσης ενός φυτού, ενώ για κάποιους άλλους μικροοργανισμούς η κουτίνη αποτελεί την μόνη πηγή άνθρακα (Köller et al., 1982). Η υδρόλυση της κουτίνης πραγματοποιείται από τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς ή από τα σπόριά τους (Woloshuk & Kolattukudy, 1986) με παραγωγή και έκκριση εξωκυτταρικών ενζύμων, που επάγονται με την παρουσία μονομερών της κουτίνης (Lin & Kolattukudy, 1978).

1.2 Προέλευση και Ορισμός κουτινάσης

Η κουτινάση είναι ένα από τα ένζυμα που παράγονται κυρίως από φυτοπαθογόνους μύκητες, όπως είναι το γένος *Fusarium* (Εικόνα 1.2), κατά την είσοδό τους στο φυτό (Lin & Kolattukudy, 1978). Μάλιστα μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση αναστολέων



Εικόνα 1.2 Μόλυνση καρπού καλαμποκιού από μύκητα του γένους *Fusarium*

της κουτινάσης αποτρέπουν τον *Fusarium solani pisi* να εισχωρήσει σε φυτά με ακέραη κουτίνη (Köller et al., 1982). Άλλα κύτταρα, εκτός από μύκητες, που έχουν τη δυνατότητα παραγωγής κουτινάσης είναι βακτήρια (π.χ. γένη *Streptomyces* και *Pseudomonas*) και η γύρη φυτών (pollen) (Maiti et al., 1979).

Το ένζυμο αυτό είναι από τα μικρότερα μέλη της οικογένειας των υδρολασών σερίνης και της υπεροικογένειας των α/β υδρολασών, με μοριακά βάρη γύρω στα 25 kDa (Hunsen et al., 2007) και χαρακτηρίζεται ως ενδιάμεσο μεταξύ λιπάσης και εστεράσης, έχοντας τη δυνατότητα να υδρολύει μεγάλο εύρος διαλυτών εστέρων και αδιάλυτων ή

γαλακτοματοποιημένων τριγλυκεριδίων (Gonçalves et al., 1997; Egmond et al., 2000; Dutta et al., 2009) καθώς επίσης και πλαστικά (Murphy et al., 1996; Masaki et al., 2005). Εκτός από τις αντιδράσεις υδρόλυσης πραγματοποιεί αντιδράσεις σύνθεσης και διαχωρισμού ρακεμικών μιγμάτων (Hunsen et al., 2007; Fontes et al., 1998).

1.3 Παραγωγή κουτινάσης

1.3.1 Καλλιέργεια κουτινοπαραγωγών μικροοργανισμών

Οι καλλιέργειες των μικροοργανισμών για παραγωγή υψηλών επιπέδων κουτινάσης είναι βασικά βυθισμένες (Fett et al., 1992; Fett et al., 1999; Pio et al., 2007; Chen et al., 2010; Speranza et al., 2013), αν και υπάρχουν και περιπτώσεις στερεών καλλιιεργειών (Speranza et al., 2011). Η έκφραση της κουτινάσης επηρεάζεται έντονα από τις συνθήκες καλλιέργειας (πηγές άνθρακα και αζώτου, θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου) (Dutta et al., 2009). Καταστέλλεται με την ύπαρξη γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας, ενώ επάγεται με την παρουσία κουτινής ή υδρολύματός της (Murphy et al., 1996; Fett et al., 1999), με την εντονότερη

επαγωγή να παρατηρείται με την προσθήκη υδροξυ-C₁₆ οξέος, διυδροξυ-C₁₆ οξέος και τριυδροξυ-C₁₈ οξέος, τα οποία είναι μονομερή της κουτίνης (Woloshuk & Kolattukudy, 1986) και των οποίων η ω-υδροξυλομάδα να είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας για την επαγωγή (Murphy et al., 1996).

Η παραγωγή κουτινασών από τα φυσικά στελέχη τους περιορίζεται από τα μειονεκτήματα της χαμηλής παραγωγικότητας και των μεγάλων περιόδων ζύμωσης. Παρότι οι ποσότητες ενζύμων που παράγονται με αυτόν τον τρόπο είναι ικανοποιητικές για τις επιστημονικές μελέτες, δεν μπορούν να καλύψουν όμως τις υψηλές απαιτήσεις των βιομηχανικών εφαρμογών. Για αυτό το λόγο οι ερευνητές στρέφονται στην παραγωγή ανασυνδυασμένων ενζύμων, είτε σε ομόλογους είτε σε ετερόλογους ξενιστές, ώστε να μειωθεί ο χρόνος καλλιέργειας και να βελτιωθεί η απόδοσή της (Chen et al., 2013).

1.3.2 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση κουτινάσης

Λόγω της σημαντικότητας των ενδεχόμενων εφαρμογών της κουτινάσης, το ένζυμο αυτό έχει κλωνοποιηθεί και εκφραστεί ετερόλογα σε διάφορους μικροοργανισμούς: μύκητες, ζύμες και βακτήρια, μερικές περιπτώσεις από τις οποίες αναφέρονται παρακάτω.

Παραγωγή του ενζύμου ενός συνθετικού γονιδίου του *Fusarium solani* πραγματοποιήθηκε εξωκυτταρικά, στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* και στον μύκητα *Aspergillus awamori* με παραγωγές 700 και 220 mg ενζύμου/L καλλιέργειας αντίστοιχα (van Gemeren et al., 1995), ενώ στον μύκητα *Trichoderma reesei* η παραγωγή ήταν 1,4 g/L καλλιέργειας (Kontkanen et al., 2009). Πολλές άλλες περιπτώσεις υπάρχουν στη βιβλιογραφία με ετερόλογη έκφραση μυκητιακής κουτινάσης από τη ζύμη *Pichia pastoris*. Για παράδειγμα, πάλι το γονίδιο από τον *Fusarium solani* εκφράστηκε εξωκυτταρικά στην *P. pastoris* με 2 διαφορετικούς τρόπους, με και χωρίς την ύπαρξη 6 ιστιδινών (His-tag) στο καρβόξυτελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και με τελικές ποσότητες πρωτεΐνης 194 και 342 μg/mL καλλιέργειας αντίστοιχα και ειδική ενεργότητα κοντά στις 4000 U/mg και για τις 2 περιπτώσεις (Kwon et al., 2009). Σε μια άλλη περίπτωση το γονίδιο από την *Monilinia fructicola* εκφράστηκε στη ζύμη είτε με το φυσικό της πεπτίδιο έκκρισης, είτε με το πεπτίδιο έκκρισης του *S. cerevisiae* (που υπάρχει συνήθως στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της *P. pastoris*) (Wang et al., 2002). Επίσης έχει γίνει κλωνοποίηση των γονιδίων από τους μύκητες: *Trichoderma harzianum* (0,9 g πρωτεΐνης/L καλλιέργειας), *Aspergillus oryzae* (Liu et al., 2009) και τον *Humicola insolens*, που έδωσε μια θερμοφίλη κουτινάση ($T_{opt}= 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Kazenwadel et al., 2012).

Ακόμα περισσότερες είναι οι περιπτώσεις έκφρασης των ανασυνδυασμένων κουτινασών σε βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli*, λόγω της ευκολίας γενετικού χειρισμού τους και των μικρότερων χρόνων καλλιέργειας. Συνηθέστερα για την έκφραση χρησιμοποιούνται τα στελέχη *E. coli* BL21 (DE3), μετασχηματισμένα με πλασμιδιακούς φορείς της οικογένειας pET (T7 promoter) και ως επαγωγός της έκφρασης χρησιμοποιείται η ένωση isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Οι συνθήκες καλλιέργειας από περίπτωση σε περίπτωση ποικίλουν. Για παράδειγμα, η θερμοκρασία παραγωγής μπορεί να είναι 20, 25 ή 37 °C, το θρεπτικό μέσο LB ή TB, η συχνότητα ανάδευσης 180-400 rpm, η συγκέντρωση του επαγωγού 0,1-1 mM IPTG. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα, εκτός από την εσωκυτταρική έκφραση, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να μεταφέρεται είτε στο περίπλασμα του κυττάρου, είτε ακόμα και εξωκυτταρικά, με τη χρήση ειδικών αλληλουχιών-σηματοδοτών, που συνεκφράζονται με αυτήν. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η συγκομιδή και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης-στόχου. Παράδειγμα εσωκυτταρικής έκφρασης είναι οι κουτινάσες από το βακτηριακό γένος *Thermobifida*, οι οποίες εκφράστηκαν στο στέλεχος *E. coli* BL21-Gold (DE3) και η απομόνωσή τους (10-15 mg καθαρού ενζύμου) πραγματοποιήθηκε ύστερα από ρήξη των κυττάρων με υπερήχους (Herrero Acero et al., 2011; Ribitsch et al., 2012). Για τη μεταφορά των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στον περιπλασμικό χώρο του κυττάρου έχουν χρησιμοποιηθεί δύο σηματοδοτικές αλληλουχίες. Η μία είναι η σηματοδοτική αλληλουχία του γονιδίου της βακτηριακής αλκαλικής φωσφατάσης (alkaline phosphatase-*phoA*), που έχει χρησιμοποιηθεί για την έκφραση της κουτινάσης του *F. solani*, η οποία αποσπάται από το περίπλασμα ύστερα από οσμωτικό σοκ των κυττάρων (Petersen et al., 2001; Melo et al., 2003). Η δεύτερη αλληλουχία είναι η λυάση του πηκτικού οξέος (pectate lyase B-*pelB*), η οποία συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη-στόχο, αναγνωρίζεται από το κύτταρο και μεταφέρεται στο περίπλασμα, όπου τα 22 της αμινοξέα απομακρύνονται από ειδικό ένζυμο (signal peptidase) που υπάρχει εκεί. Παρόλα αυτά, οι έρευνες έχουν δείξει πως το μεγαλύτερο μέρος του ανασυνδυασμένου ενζύμου εκκρίνεται εξωκυτταρικά, λόγω διαρροής από την κυτταρική μεμβράνη. Οι Sulaiman et al. (2011) χρησιμοποιώντας το στέλεχος *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP, πραγματοποίησαν την παραγωγή 6 mg LC-cutinase/L υγρού καλλιέργειας, ποσότητα που αποτελούσε πάνω από το 50% της συνολικής πρωτεΐνης που παρήχθη. Άλλη αντίστοιχη περίπτωση είναι η παραγωγή της κουτινάσης Tfu_0883 του *Thermobifida fusca* από τα *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, η οποία εκκρινόταν κυρίως εξωκυτταρικά σε ποσότητες 180 Units/mL υγρού καλλιέργειας και ύστερα από απομόνωση 458 Units/mg (Chen et al., 2008). Το ίδιο αυτό γονίδιο του *T. fusca* έχει εκφραστεί με το σύστημα έκκρισης α-αιμόλυσης (HlyA), το οποίο προέρχεται από από τα *E. coli* που πλήττουν το ουροποιητικό σύστημα. Το μεταβολικό αυτό μονοπάτι αποτελείται από μία σηματοδοτική αλληλουχία (HlyAs) ενωμένη με το ένζυμο-στόχο και 3 γονίδια που «εμπλουτίζουν» τα *E. coli* BL21, στα οποία έγινε η έκφραση, τα οποία παράγουν πρωτεΐνες (HlyB,

HlyD, TolC), οι οποίες δημιουργούν μια διαμεμβρανιακή δίοδο, που ενώνει την εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου και στέλνει το ανασυνδυασμένο ένζυμο στον εξωκυττάριο χώρο. Το πρόβλημα είναι ότι η σηματοδοτική αλληλουχία δεν κόβεται και παραμένει ενωμένη με το ένζυμο, γεγονός που ίσως επηρεάζει την ενεργότητά του. Στην συγκεκριμένη περίπτωση της Cutinase-HlyAs του *T. fusca*, εκκρίθηκε εξωκυτταρικά ποσότητα πρωτεΐνης 334 Units/mL υγρού καλλιέργειας (2,5 φορές περισσότερο από ότι στην φυσική κουτινάση), που καταλήγει σε 446,2 Units/mg καθαρού ενζύμου, όσο περίπου και στην έκφραση *pelB-cutinase* (Su et al., 2012). Η ίδια αυτή ερευνητική ομάδα έχει εκφράσει το ίδιο γονίδιο στα *E. coli* BL21 (DE3) χωρίς καμία σηματοδοτική αλληλουχία και παρατήρησε ότι το 92,5% (272.8 U/ml) της ενεργότητας κουτινάσης εντοπίζεται στο μέσο καλλιέργειας. Η ίδια πρωτεΐνη, cutinase^{NS}, παρήχθη και σε βιοαντιδραστήρα 3 L σε ποσότητα 42.6 g/L, ενώ η εξωκυτταρική ενεργότητα έφτασε τα 1063,5 U/mL και η παραγωγικότητα της διεργασίας τα 40.9 U/mL/h. Η εξήγηση που δόθηκε σε αυτήν τη «διαρροή» της κουτινάσης εξωκυτταρικά είναι η υδρόλυση μικρής έκτασης των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών (Su et al., 2013).

1.4 Φυσικοχημικές Ιδιότητες Κουτινασών

Όπως αναφέρθηκε ήδη, πολλές κουτινάσες έχουν μελετηθεί από διάφορους μικροοργανισμούς. Συνοπτικά μπορούμε να πούμε ότι τα ένζυμα αυτά έχουν μοριακά βάρη που κυμαίνονται γύρω στα 25 kDa και μπορούν να λειτουργούν σε ευρύ φάσμα pH, με το βέλτιστο να είναι συνήθως ελαφρώς αλκαλικό, κοντά στο 8, αν και υπάρχουν ένζυμα που λειτουργούν καλύτερα ακόμα και σε pH 11, ενώ ελάχιστα προτιμούν το ελαφρώς όξινο περιβάλλον (pH 5-6). Όσον αφορά τη βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας τους, αυτή κυμαίνεται γύρω στους 40 °C, αν και ένζυμα προερχόμενα από θερμοφίλους μικροοργανισμούς παρουσιάζουν το βέλτιστό τους στους 50-60 °C. Το τεχνητό υπόστρωμα στο οποίο εμφανίζουν τη μέγιστη ενεργότητα είναι το *p*-nitrophenyl butyrate (*p*NPB), το οποίο είναι εστέρας με 4 άτομα άνθρακα, ενώ όσο μεγαλώνει η ανθρακική αλυσίδα, τόσο μειώνεται και η σχετική ενεργότητα στο υπόστρωμα. Στον παρακάτω Πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά οι φυσικοχημικές ιδιότητες των κουτινασών που έχουν παραχθεί κατά καιρούς είτε από φυσικά στελέχη είτε ετερόλογα.

Πίνακας 1.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες των κουτινασών που έχουν παραχθεί είτε από φυσικά στελέχη είτε ετερόλογα

Προέλευση	Γονίδιο/ Πρωτεΐνη	Ξενιστής	Μοριακό Βάρος (kDa)	Βέλτιστο pH	Βέλτιστη T	pI	pNPB Κινητικές Σταθερές			Αναφορά
							K _m (μM)	K _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ μM ⁻¹)	
<i>Fusarium solani</i> <i>f. pisi</i>	Cutinase I	WT	22							Purdy & Kolattukudy, 1975
	Cutinase II	WT	22							
	cDNA library	WT	21,6							Soliday et al., 1984
		WT	24	9-10						Murphy et al., 1996
		<i>S. cerevisiae</i> και <i>A. awamori</i>								van Gemeren et al., 1995
		<i>E. coli</i> WK-6	22	8,5-9,5		7,8				Sebastião et al., 1996
		CY 000	<i>S. cerevisiae</i>							Verrips et al., 2000
		<i>cut</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		8,5					Petersen et al., 2001
		Protein Data Bank entry 1AGY	<i>E. coli</i>				7,6			Melo et al., 2003
			<i>S. cerevisiae</i>							Silva et al., 2005a
		<i>P. pastoris</i> X- 33	~20	8	40				Kwon et al., 2009	
<i>Fusarium oxysporum</i>		WT		6	~30	8-9				Speranza et al., 2011; 2013
<i>Fusarium roseum</i>		WT	24,3	10						Soliday & Kolattukudy, 1976

Πίνακας 1.1 (Συνέχεια) Φυσικοχημικές ιδιότητες των κουτινασών που έχουν παραχθεί είτε από φυσικά στελέχη είτε ετερόλογα

Προέλευση	Γονίδιο/ Πρωτεΐνη	Ξενιστής	Μοριακό Βάρος (kDa)	Βέλτιστο pH	Βέλτιστη T	pI	pNPB Κινητικές Σταθερές			Αναφορά
							K _m (μM)	K _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ μM ⁻¹)	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	EMBL 3 cDNA library	WT								Ettinger et al., 1987
<i>Colletotrichum capsici</i> ATCC 48574	Charon 35 cDNA library	WT	24							Ettinger et al., 1987
<i>Colletotrichum kahawae</i>		WT				7,5-8,5				Chen et al., 2007
<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>P. pastoris</i>					0,21± 0,04		3,49±0,51 μM ⁻¹ min ⁻¹	Liu et al., 2009
<i>Aspergillus nidulans</i> PW1	ANCUT2	WT	29							Castro-Ochoa et al., 2012
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	<i>anig5</i> /AnCut5	<i>P. pastoris</i> X-33	25-35	5-6,5						Nyyssölä et al., 2013
<i>Glomerella cingulata</i>		<i>E. coli</i> Origami B (DE3)			25					Chin et al., 2013
<i>Humicola insolens</i>	<i>hic</i> /HiC	<i>P. pastoris</i> X-33			50		45±29		0,4	Kazenwadel et al., 2012
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>cutA</i>	WT	18	5-6						van der Vlugt-Bergmans et al., 1997
<i>Monilinia fructicola</i>	Mfcut1	<i>P. pastoris</i>	22,2			8,4	1,23± 0,21	40,8±3,6 min ⁻¹		Wang et al., 2002

Πίνακας 1.1 (Συνέχεια) Φυσικοχημικές ιδιότητες των κουτινασών που έχουν παραχθεί είτε από φυσικά στελέχη είτε ετερόλογα

Προέλευση	Γονίδιο/ Πρωτεΐνη	Ξενιστής	Μοριακό Βάρος (kDa)	Βέλτιστο pH	Βέλτιστη T	pI	pNPB Κινητικές Σταθερές			Αναφορά
							K _m (μM)	K _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ μM ⁻¹)	
<i>Trichoderma harzianum</i> T34	<i>Thcut1</i> (L03 cDNA library)	<i>P. pastoris</i> GS115 <i>his4</i>	29+-1	7,5-8			0,57mM		V _{max} =3,60 μmol/min	Rubio et al., 2008
<i>Cryptococcus magnus</i>	CmCut1	WT	21	7,5	40		1mM	0,62	V _{max} =1,464 μmol/min/mg	Suzuki et al., 2013
<i>Thielavia terrestris</i> CAU709	TtcutA		22,8 ή 25,3	4	50					Yang et al., 2013
<i>Thermobifida fusca</i>	Tfu_0882	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS	29	8	60		673±32	483±19	0,7	Chen et al., 2008 Chen et al., 2010 Su et al., 2012
	Tfu_0883	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	31	8	60		505±29	742±24	1,5	
	Thf42_Cut1	<i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3)	29-30				2100±361	30,9±8,6		Herrero Acero et al., 2011
	<i>cut1</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	30,1	8	55		131±9	178±8	1,35	Hegde et al., 2013
	<i>cut2</i>		29,6				89±17	253±11	2,84	
	Cutinase-HlyAs	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	31	8	70					Su et al., 2012
	cutinase ^{NS}	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	31	8	60		312,2	303,8		Su et al., 2013

Πίνακας 1.1 (Συνέχεια) Φυσικοχημικές ιδιότητες των κουτινασών που έχουν παραχθεί είτε από φυσικά στελέχη είτε ετερόλογα

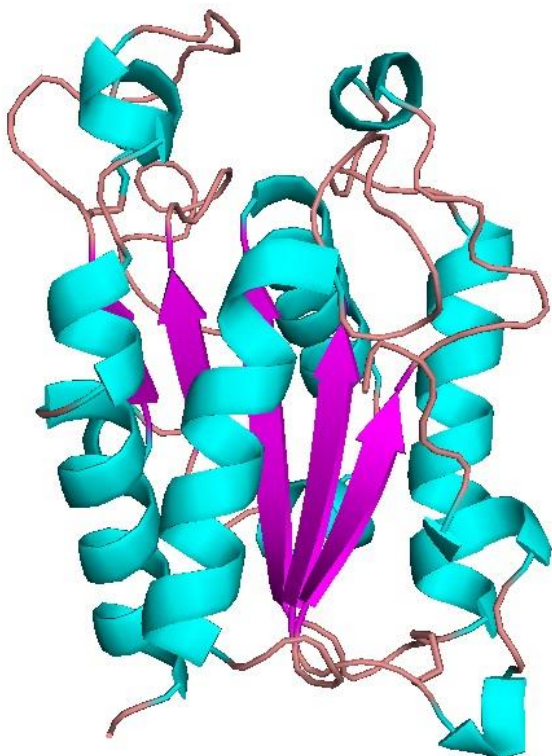
Προέλευση	Γονίδιο/ Πρωτεΐνη	Ξενιστής	Μοριακό Βάρος (kDa)	Βέλτιστο pH	Βέλτιστη T	pI	pNPB Κινητικές Σταθερές			Αναφορά
							K _m (μM)	K _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ μM ⁻¹)	
<i>Thermobifida fusca</i> ATCC 27730		WT		11						Fett et al., 1999
<i>Thermobifida alba</i> DSM43185	Tha_Cut1	<i>E.coli</i> BL21- Gold (DE3)	28,1				1933	6,03		Ribitsch et al., 2012
<i>Thermobifida cellulosilytica</i> DSM44535	Thc_Cut1	<i>E.coli</i> BL21- Gold (DE3)	29-30				1483±126	195.1±26.9		Herrero Acero et al., 2011
	Thc_Cut2						2133±416	5.3±1.2		
<i>Streptornyces</i> spp		WT								Fett et al., 1992
<i>Pseudomonas mendocina</i>	ISC-02-BE1	WT		8	37					Degani et al., 2002
<i>Pseudomonas cepacia</i> NRRL B 2320		WT	26,25	8	40		0.23mM	5000	V _{max} =7.955 U·μg ⁻¹	Dutta et al., 2013
Fosmid library of a leaf-branch compost metagenome	GenBank: HQ704839/LC- cutinase	<i>E. coli</i> BL21- CodonPlus (DE3)-RP	29	8,5	50					Sulaiman et al., 2011
<i>Tropaeolum majus</i> pollen grains		WT	40	6,8		5,45	29		V _{max} =20 mol/min/g	Maiti et al., 1979

1.5 Δομικά χαρακτηριστικά της Κουτινάσης

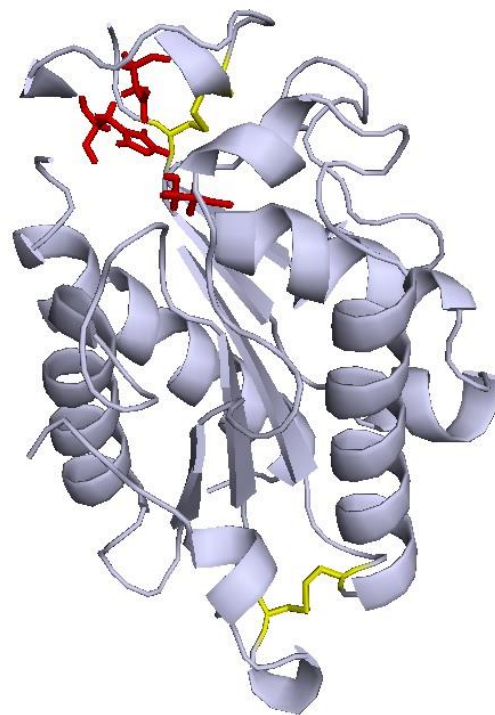
Τη δεκαετία του '80 ξεκίνησαν τα βήματα για τον προσδιορισμό της δομής της κουτινάσης από τον Kolattukudy και τους συνεργάτες του, οπότε και αποδείχθηκε ότι η κουτινάση του *Fusarium solani pisi* είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με αμίδιο του γλυκουρονικού οξέος στο αμινοτελικό της άκρο (Lin & Kolattukudy, 1980) και ανήκει στην οικογένεια των υδρολασών σερίνης καθώς περιέχει το αμινοξύ σερίνη στο ενεργό της κέντρο (Köller & Kolattukudy, 1982), ενώ στη συνέχεια αποκαλύφθηκε ένας δισουλφιδικός δεσμός της και προσδιορίστηκε η αλληλουχία του ενεργού της κέντρου, η οποία είχε μικρή ομολογία με τα άλλα ένζυμα που ήταν γνωστά τότε και περιείχαν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο (Soliday & Kolattukudy, 1983). Όσον αφορά τον δισουλφιδικό αυτό δεσμό, φαίνεται ότι είναι κρίσιμης σημασίας, διότι βρίσκεται κοντά στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης και σταθεροποιεί μια «στροφή» στην οποία τοποθετείται ένα από τα καταλυτικά της αμινοξέα (Asp) (Matak, Moghaddam, 2009). Περεταίρω, η σύγκριση της κουτινάσης του *F. solani pisi* με τις κουτινάσες από δύο στελέχη του γένους *Colletotrichum* (*C. capsici* και *C. gloeosporioides*) έδειξε ότι, παρότι η ομολογία τους είναι μικρή (43%), διατηρείται η αλληλουχία των αμινοξέων της καταλυτικής τριάδας (Ser-His-Asp ή Glu) καθώς και οι δισουλφιδικές συνδέσεις, ενώ αποκαλύφθηκε ότι και στα τρία γονίδια υπάρχει ένα εσώνιο (Ettinger et al., 1987). Λίγα χρόνια μετά αποδείχθηκε ότι το ένζυμο αυτό ανήκει στην κατηγορία των α/β υδρολασών και ότι στο ενεργό του κέντρο, εκτός από την καταλυτική τριάδα, υπάρχει και μία οξυανική τρύπα (oxyanion hole), όπως στις λιπάσες, η οποία όμως δεν ενεργοποιείται στη διεπιφάνεια ενζύμου-υποστρώματος, αλλά προϋπάρχει (Martinez et al., 1994) και η οποία σταθεροποιείται (στην κουτινάση του *F. solani pisi*) από την πλευρική αλυσίδα μιας σερίνης (Ser42 Oγ side chain) (Nicolas et al., 1996). Μάλιστα σε άλλες μελέτες μετά από καιρό, έχει δειχθεί ότι το σπάσιμο του δεσμού υδρογόνου μεταξύ των His-Asp της καταλυτικής τριάδας έχει μεγάλες επιπτώσεις όχι μόνο στη δομή του ενεργού κέντρου αλλά και όλου του υπόλοιπου μορίου, αφήνοντας όμως ανέπαφη την πλευρική αλυσίδα σερίνης (Ser42 Oγ) και κατά συνέπεια και την οξυανική τρύπα (Edmond & Bruice, 1999). Στα τέλη της δεκαετίας του '90, προσδιορίστηκε η κρυσταλλική δομή της κουτινάσης του *F. solani pisi* σε υψηλή ανάλυση (1.0 Å) (PDB ID: 1CEX), πράγμα που επέτρεψε να γίνει φανερή η ευκαμψία του ενεργού κέντρου του ενζύμου, η οποία χαρακτηρίστηκε ως «κίνηση-ανάσα» της περιοχής δέσμευσης του υποστρώματος και ίσως εξηγεί την ποικιλία υποστρωμάτων που μπορούν να προσδεθούν στο ένζυμο (Longhi et al., 1997).

1.5.1 Χαρακτηριστικά της Δομής στις 3 Διαστάσεις

Η κουτινάση είναι ένα συμπαγές πρωτεϊνικό μόριο ενός τομέα, που αποτελείται από 197 κατάλοιπα. Είναι μία α/β -πρωτεΐνη με υδρόφοβο πυρήνα, που περιλαμβάνει 5 παράλληλα β -πτυχωτά φύλλα ελαφρώς στριμμένα, τα οποία περιβάλλονται από 4 α -έλικες (Εικόνα 1.3). Υπάρχουν 2 δισουλφιδικοί δεσμοί στο μόριο, ο ένας συνδέει το αμινοτελικό άκρο με μία β -στροφή και συμμετέχει στη σταθεροποίηση ολόκληρης της τριτοταγούς δομής του μορίου, ενώ ο δεύτερος παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση των 2 διαδοχικών β -στροφών, στις οποίες εντοπίζεται το καταλυτικό ασπαρτικό οξύ (Asp). Το ενεργό κέντρο αποτελείται από την καταλυτική τριάδα Ser-Asp-His (Εικόνα 1.4), της οποίας η σερίνη εντοπίζεται στο πάνω μέρος μιας πολύ οξείας γ -στροφής μεταξύ ενός β -πτυχωτού φύλλου και μιας α -έλικας και είναι προσβάσιμη στο διαλύτη. Ο τύπος αυτής της στροφής είναι χαρακτηριστικό νουκλεοφιλικό κατάλοιπο της δομής όλων των μελών των α/β -υδρολασών. Επίσης το ενεργό κέντρο περιλαμβάνει και μία οξυανική τρύπα, η θέση της οποίας είναι διατηρημένη σε όλες τις α/β -υδρολάσες και τοποθετείται στην απέναντι πλευρά από την ιστιδίνη και το όξινο μέλος της καταλυτικής τριάδας, δηλαδή την μεριά της σερίνης. Η οξυανική αυτή τρύπα παρέχει ένα περιβάλλον που σταθεροποιεί το αρνητικό φορτίο που παράγεται κατά την νουκλεοφιλική επίθεση στον υπό διάσπαση δεσμό του υποστρώματος. Το



Εικόνα 1.3 Η τριτοταγής δομή της κουτινάσης 1CEX με τα 5 παράλληλα β -πτυχωτά φύλλα (φούξια) και τις 4 α -έλικες που τα περιβάλλουν (γαλάζιο)

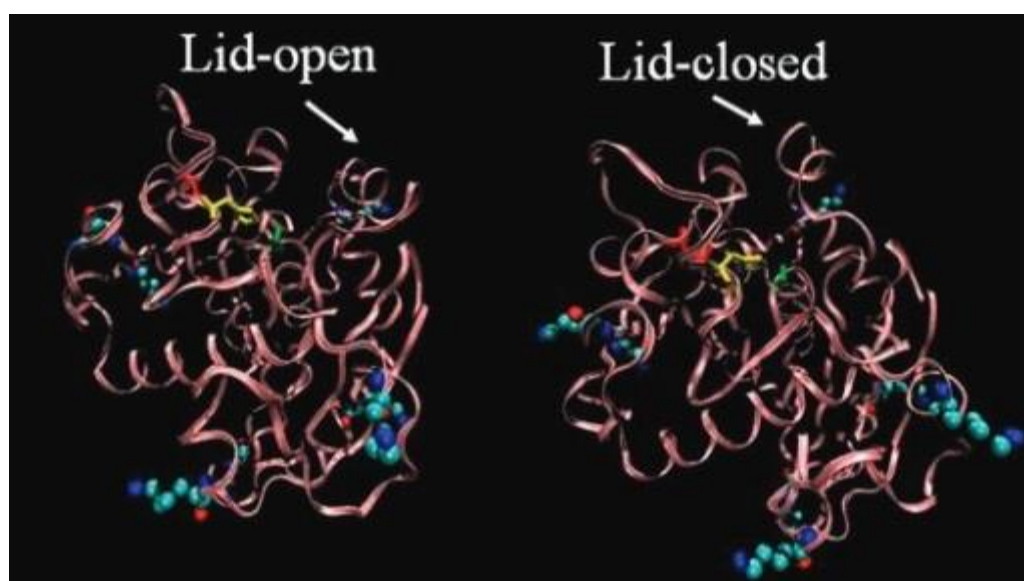


Εικόνα 1.4 Η δομή της κουτινάσης 1CEX στην οποία έχουν επισημανθεί η καταλυτική της τριάδα Ser120-Asp175-His188 (κόκκινο) και οι δύο δισουλφιδικές γέφυρες (κίτρινο)

τετραεδρικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται σταθεροποιείται κυρίως με την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου με τα άτομα αζώτου των πεπτιδικών δεσμών Ser42 και Gln121, αλλά και με την πλευρική αλυσίδα (άτομο Oγ), της Ser42. Η σερίνη αυτή διατηρεί τον σωστό προσανατολισμό της για το σχηματισμό των δεσμών υδρογόνου της οξυανικής τρύπας, με τη βοήθεια των ατόμων αζώτου των Asn84 και Gln121. (Carvalho et al., 1998; Longhi, Cambillau, 1999).

1.5.2 Σύγκριση Δομής Κουτινασών και Λιπασών

Η ομοιότητα των κουτινασών με τις λιπάσες έγινε φανερή από την αρχή, καθώς είναι και οι δύο α/β -πρωτεΐνες και ανήκουν στην οικογένεια των υδρολασών σερίνης με καταλυτική τριάδα Ser-His-Asp (Glu). Η αλληλουχία των αμινοξέων γύρω από τη σερίνη της καταλυτικής τριάδας (Gly-Tyr-Ser-Gln-Gly), έχει τεράστια ομολογία με την αντίστοιχη των λιπασών (Gly-Tyr ή His-Ser-X-Gly). Η σημαντική διαφορά όμως είναι ότι το ενεργό κέντρο της κουτινάσης είναι προσβάσιμο στον διαλύτη, ενώ στη λιπάση καλύπτεται από ένα υδρόφοβο καπάκι (lid), το οποίο «ανοίγει» και σταθεροποιείται με την επαφή του με την διεπιφάνεια λιπιδίων-νερού (Εικόνα 1.5), με αποτέλεσμα την ακόμα μεγαλύτερη αύξηση της υδρόφοβης επιφάνειας. Επίσης, με την αναδιάταξη αυτή, σχηματίζεται η οξυανική τρύπα με τη νουκλεοφιλική επίθεση στον διασπώμενο δεσμό, σε αντίθεση με την κουτινάση, στην οποία, όπως ήδη αναφέρθηκε, η οξυανική τρύπα είναι προσχηματισμένη. Αυτός είναι πιθανότατα και ένας από τους λόγους για τον οποίο η κουτινάση δεν χρειάζεται διεπιφάνειες για να δράσει (Carvalho et al., 1998).



Εικόνα 1.5 Δομή της λιπάσης του μύκητα *Thermomyces lanuginosus* στην ενεργή (αριστερά) και ανενεργή (δεξιά) διαμόρφωση. Επισημαίνεται η καταλυτική τριάδα Ser(πράσινο)-His(κίτρινο)-Asp(κόκκινο). (Hanefeld et al., 2009)

1.6 Ακίνητοποίηση Κουτινάσης

Πολλές φορές χρησιμοποιούνται μέθοδοι ακίνητοποίησης της κουτινάσης, με σκοπό την αύξηση της σταθερότητας και της ενεργότητάς της σε συγκεκριμένες αντιδράσεις. Επίσης, με αυτόν τον τρόπο γίνεται ευκολότερη η ανάκτηση και ανακύκλωσή της.

Η κουτινάση από τον *F. solani* έχει ακίνητοποιηθεί, είτε με προσρόφηση (adsorption), είτε με ομοιοπολική σύζευξη (covalent coupling), σε στερεούς φορείς και έχει χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις υδρόλυσης (Gonçalves et al., 1996a; Gonçalves et al., 1996b; Gonçalves et al., 1998b), εστεροποίησης (Sereti et al., 1997; Serralha et al., 1998; Serralha et al., 2004) και μετεστεροποίησης (Parvaresh et al., 1991; Lamare and Legoy, 1994; Lamare et al., 1997), καθώς και στο διαχωρισμό ρακεμικών μιγμάτων (Fontes et al., 1998). Οι περισσότερες μελέτες έγιναν με την προσρόφηση της κουτινάσης σε Accurel EP 100, έναν μακροπορώδη φορέα από πολυπροπυλένιο (Sereti et al., 1997) ή σε Accurel PA6, έναν μακροπορώδη φορέα από πολυαμίδιο (Serralha et al., 1998; Serralha et al., 2004). Επίσης μελετήθηκε η προσρόφηση του ενζύμου σε ζεόλιθους και χρησιμοποιήθηκε για την υδρόλυση της τρικαπρυλίνης (Gonçalves et al., 1996b), τη μετεστεροποίηση του οξικού βουτυλίου με εξανόλη (Serralha et al., 1998; Serralha et al., 2004) και του βουτυρικού βινυλίου με την (R,S)-2-φαινυλ-1-προπανόλη (Garcia et al., 2005) και το διαχωρισμό ρακεμικού μίγματος 1-φαινυλεθανόλης σε υπερκρίσιμα ρευστά (Fontes et al., 1998). Η κουτινάση προσροφήθηκε με επιτυχία σε διάφορους ζεόλιθους με υψηλές αποδόσεις (60-80%), κυρίως στον ζεόλιθο NaY (Gonçalves et al., 1996b). Η ακίνητοποίηση αυτή προσέδωσε στο ένζυμο μεγάλη θερμική σταθερότητα (45 ημέρες στους 30 °C, χωρίς καμία απώλεια), που είναι υψηλότερη από ότι για την ακίνητοποίηση με ομοιοπολική σύζευξη σε φορείς πυριτίου και παραγώγων πυριτίου (Gonçalves et al., 1996a; Gonçalves et al., 1998a).

Μια άλλη μέθοδος που έχει επιχειρηθεί είναι ο εγκλεισμός του ενζύμου σε γέλη αλγινικού ασβεστίου, η οποία όμως θεωρήθηκε ανεπαρκής για την κουτινάση, δίνοντας ειδικές ενεργότητες 16 φορές χαμηλότερες από την ομοιοπολική σύζευξη και 40 φορές χαμηλότερες από την προσρόφηση σε ζεόλιθους (Gonçalves et al., 1996a; Gonçalves et al., 1996b). Αυτό οφείλεται στα φαινόμενα διαίρεσης και διάχυσης, που εμποδίζουν την καταλυτική δράση της κουτινάσης (όπως και των λιπασών) σε λιπόφιλα υποστρώματα, λόγω του υδροφιλικού χαρακτήρα του αλγινικού πολυμερούς.

Εναλλακτικά η κουτινάση έχει μικρο-εγκλειστεί σε αντίστροφα μικκύλια επιφανειοδραστικών ουσιών σε οργανικά μέσα. Η παρουσία του ενζύμου στην υδατική φάση των αντίστροφων μικκυλίων ευνοεί τη διατήρηση της καταλυτικής ενεργότητας και προστατεύει τη δομή του ενζύμου από την αρνητική επίδραση του

οργανικού διαλύτη. Επιπλέον αυτή η μέθοδος επιτρέπει την διάλυση και υδρόφιλων και υδρόφοβων υποστρωμάτων και συχνά ενισχύει την ενζυμική ενεργότητα. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για υδρόλυση (Melo et al., 1995) και μετεστεροποίηση (Carvalho et al. 1997; Carvalho et al., 1998; Carvalho et al., 1999; Carvalho et al., 2000; Badenes et al., 2010) σε αντίστροφα μικκύλια ΑΟΤ/ισοοκτάνιο.

1.7 Η κουτινάση σε οργανικούς διαλύτες

Πολλές από τις αντιδράσεις (εστεροποίηση, μετεστεροποίηση) τις οποίες καταλύει μια κουτινάση λαμβάνουν χώρα σε οργανικούς διαλύτες. Έτσι, ένα ένζυμο με ανθεκτικότητα σε κάποιους από αυτούς τους διαλύτες έχει ακόμα μεγαλύτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Η κουτινάση του *F. oxysporum* ύστερα από επώασή της σε διάφορα οργανικά μέσα (μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη, βουτανόλη, επτανόλη, οκτανόλη, 2-νονανόλη, εξάνιο, οκτάνιο, ισοοκτάνιο, δεκάνιο, τολουένιο, ακετόνη, τετραϋδροφουράνη) αύξησε την ενεργότητά της. Συγκεκριμένα, 5 mg ενζύμου επώαστηκαν σε 1 mL διαλύτη για 1 h στους 30 °C και στη συνέχεια έγινε εξάτμιση του διαλύτη με αέριο άζωτο. Το υπόλειμμα χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις υδρόλυσης με ενεργότητα αναφοράς το ένζυμο που δεν είχε έρθει σε επαφή με οργανικό διαλύτη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε κάποιους διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη, βουτανόλη, ακετόνη, τετραϋδροφουράνη) χανόταν το μεγαλύτερο μέρος της ενεργότητας του ενζύμου (<20%), ενώ στους υπόλοιπους αυξανόταν έντονα (150-180%) (Speranza, Macedo, 2013). Η κουτινάση του *Thielavia terrestris* σε συγκέντρωση 40 mg/mL επώαστηκε για 1 h στους 30 °C σε περιεκτικότητα 80% οργανικού διαλύτη. Στις μεθανόλη και αιθανόλη η ενεργότητα παρέμεινε ίδια, ενώ παρατηρήθηκε ελαφρά αύξηση και μείωση στην ισοπροπανόλη και το ακετονιτρίλιο αντίστοιχα, ενώ 1,4 φορές αύξηση στο διμεθυλοσουλφοξύδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Yang et al., 2013). Σε μια αντίστοιχη επώαση 5 nM των δύο κουτινασών *T. fusca* σε περιεκτικότητα 75% οργανικού διαλύτη για 18 h στους 20 °C, τα ένζυμα έδειξαν μεγάλη αντοχή στους διαλύτες μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, *n*-εξάνιο και DMSO, αλλά ήταν λιγότερο σταθερά στους διαλύτες ισοπροπανόλη και βουτανόλη. Αντίθετα, η κουτινάση του *F. solani* ήταν πολύ ασταθής σε όλους τους διαλύτες εκτός από το *n*-εξάνιο (30% απώλεια) (Chen et al., 2010). Η επίδραση της συγκέντρωσης της βενζυλικής αλκοόλης (BA) και του διμεθυλακεταμιδίου (DMA) (παράγοντες διόγκωσης πολυαμιδικών υφασμάτων) στον χρόνο ημιζωής της κουτινάσης GCI 2002/1410 ερευνήθηκε και βρέθηκε πως η βέλτιστη είναι 10% BA+1.5% DMA, με σκοπό την ικανοποιητική υδρόλυση πολυαμιδικών ινών (Silva et al., 2005b).

1.8 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Κουτινάσες

1.8.1 Υδρόλυση

Η κουτινάση καταλύει την υδρόλυση εστέρων της παρανιτροφαινόλης (*p*-NP) με διαφορετικά μήκη ανθρακικής αλυσίδας (C₂-C₁₆), έχοντας μεγαλύτερη προτίμηση στους εστέρες με 4 άτομα άνθρακα (Chen et al., 2010; Thumarat et al., 2012; Yang et al., 2013). Επίσης, μπορεί και υδρολύει την τριβουτυρίνη (εστέρας C₄) αποτελεσματικά σε διφασικό σύστημα, κάτω από την κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλίων (critical micellar concentration-CMC), ενώ σε συγκεντρώσεις που ξεπερνούν το CMC το ένζυμο μπορεί και απομακρύνει όλη την τριβουτυρίνη από την λιπιδική φάση (Flipsen et al., 1996; Chen et al., 2010). Ακόμα, έχει μελετηθεί η υδρόλυση διάφορων τριγλυκεριδίων (tricaprylin-C₈, trilaurin-C₁₂, trimyristin-C₁₄, triolein-C₁₈) σε αντίστροφα μικκύλια AOT (sodium bis[2-ethylhexyl] sulfosuccinate) /ισσοοκτάνιο. Και στα δύο συστήματα προσδιορίστηκε το βέλτιστο pH 9-10 και το ένζυμο έδειξε μεγαλύτερη ενεργότητα στα υποστρώματα με το μικρότερο μήκος αλυσίδας του τριγλυκεριδίου (η τρικαπρυλίνη στην προκειμένη περίπτωση) (Melo et al., 1995). Τα δεδομένα αυτά είναι σε συμφωνία με άλλα που προέκυψαν από τη μελέτη αναλόγων τριγλυκεριδίων για την εκλεκτικότητα και ειδίκευση της κουτινάσης (Mannesse et al., 1995). Η υδρόλυση της τρικαπρυλίνης έχει μελετηθεί και με κουτινάση προσροφημένη σε ζεόλιθο NaY (Gonçalves et al., 1996b), ομοιοπολικά συζευγμένη σε πορώδες πυρίτιο και εγκλεισμένη σε αλγινικό ασβέστιο (Gonçalves et al., 1996a). Το βέλτιστο pH και στις 3 περιπτώσεις βρέθηκε να είναι το 8, ενώ η μεγαλύτερη ειδική ενεργότητα εντοπίστηκε στην προσροφημένη σε ζεόλιθο κουτινάση. Για την εγκλεισμένη κουτινάση παρατηρήθηκε κινητική Michaelis-Menten για συγκεντρώσεις υποστρώματος κάτω από 200 mM, ενώ για συγκεντρώσεις πάνω από 400 mM υπήρξε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα. Στην αντίδραση με το ακινητοποιημένο σε στερεούς φορείς ένζυμο παρατηρήθηκαν περιορισμοί διάχυσης σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος (35 mM) και παρεμπόδιση σε συγκεντρώσεις πάνω από 150 mM.

Άλλα υποστρώματα τα οποία έχει τη δυνατότητα να υδρολύει η κουτινάση είναι διάφοροι πολυεστέρες. Η πολυκαπρολακτόνη (poly[ε-caprolactone]-PCL), υδρολύεται από την κουτινάση σε διμερή PCL και στο υδατοδιαλυτό 6-υδρόξυκαπροϊκό οξύ (Εικόνα 1.6) με μεγάλες αποδόσεις ακόμα και 100% (Masaki et al., 2005; Liu et al., 2009; Baker et al., 2012; Yang et al., 2013), όπως επίσης και το πολυλακτικό οξύ (polylactic acid-PLA) που είναι ένας θερμοπλαστικός αλειφατικός πολυεστέρας, ο οποίος προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές (καλαμπόκι, σιτάρι, ζαχαροκάλαμο) (Masaki et al., 2005). Το πολύ-τριμεθυλοτερεφθαλικό (poly[trimethylene terephthalate]-PTT) είναι ένας αρωματικός πολυεστέρας, ο

κομματιών υφασμάτων PET (100%) με μία πειραματική κουτινάση από την εταιρεία Novozymes από τους Lee and Song (2010) κατέδειξε τις βέλτιστες συνθήκες pH 9, 50 °C, 100% συγκέντρωση ενζύμου και χρόνο 60 min, ενώ με την προσθήκη τασιενεργού Triton X-100 αύξανε τη δράση. Άλλες κουτινάσες που έχουν μελετηθεί αρκετά σε σχέση με την υδρόλυση του PET είναι αυτές του βακτηρίου *Thermobifida* τα γένη *cellulosilytica* (Thc_Cut1 και Thc_Cut2), *fusca* (Thf_Cut1) και *alba* (Tha_Cut1), από τις οποίες αποτελεσματικότερη είναι η Tha_Cut1 και έπεται η Thc_Cut1 (Herrero Acero et al., 2011; Ribitsch et al., 2012). Σημειακές μεταλλάξεις έχουν πραγματοποιηθεί στις κουτινάσες των *F. solani* και *T. fusca* (Tfu_0883) κοντά στο ενεργό τους κέντρο, με σκοπό τη αύξηση του μεγέθους του ή/και την αύξηση της υδροφοβικότητάς του, ώστε να γίνει πιο συγγενές με το υπόστρωμα. Αποτέλεσμα ήταν η αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων απέναντι στο PET κατά 4 και 2 φορές αντίστοιχα (Araújo et al., 2007; Silva et al., 2011). Εκτός από την περιοχή του ενεργού κέντρου, μεταλλάξεις έχουν γίνει και σε αμινοξέα της επιφάνειας της Thc_Cut2. Η αντικατάσταση μιας θετικά φορτισμένης αργινίνης (Arg) σε ένα ουδέτερο αμινοξύ, σερίνη (Ser) ή ασπαραγίνη (Asn), είχε αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας απέναντι στο PET, ενώ η αντικατάσταση ενός ουδέτερου αμινοξέος (γλουταμίνη, Gln) σε αρνητικά φορτισμένο γλουταμικό οξύ (Glu) είχε σαν αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του ενζύμου (Herrero Acero et al., 2013). Στην δεύτερη κουτινάση, Thc_Cut1, του ίδιου μικροοργανισμού (*T. cellulosilytica*), πραγματοποιήθηκε συνένωσή (fusion) με τα τμήματα δέσμησης (binding domains) των πρωτεϊνών κελλοβιουδρολάση I από τον *Hypocrea jecorina* (CBM) και υδρολάση του πολυυδροξυαλκανοϊκού (polyhydroxyalkanoate) από τον *Alcaligenes faecalis* (PBM). Τα ένζυμα Thc_Cut1+PBM και Thc_Cut1+CBM έδειξαν ενισχυμένη προσρόφηση στο PET και στην περίπτωση της Thc_Cut1+CBM παρατηρήθηκε αύξηση στην υδρολυτική δράση κατά 3,8 φορές σε σχέση με το φυσικό ένζυμο (Ribitsch et al., 2013).

1.8.2 Σύνθεση

Η κουτινάση έχει αποδειχθεί ότι μπορεί και καταλύει αντιδράσεις σύνθεσης εστέρων σε ήπιες θερμοκρασίες. Αντιδράσεις εστεροποίησης μεταξύ ενός καρβοξυλικού οξέος και μιας αλκοόλης με προϊόν εστέρα, μετεστεροποίησης μεταξύ ενός εστέρα και μιας αλκοόλης με προϊόντα νέο εστέρα και νέα αλκοόλη και πολυσυμπύκνωσης, δηλαδή πολυμερισμού διοξέων με διόλες με προϊόν πολυεστέρα.

Η πλειοψηφία των αντιδράσεων που έχουν μελετηθεί είναι με τη δράση της κουτινάσης του *Fusarium solani* με διαφορετικές μορφές ακινητοποίησης.

1.8.2.1 Εστεροποίηση

Η σύνθεση γραμμικών αλκυλεστέρων με υψηλές αποδόσεις (π.χ. 62% για τον αιθυλεστέρα του δεκανοϊκού οξέος) έχει πραγματοποιηθεί από την αντίδραση γραμμικών αλκοολών με καρβοξυλικά οξέα, σε συστήματα υδατικών μικρογαλακτωμάτων στα οποία ήταν εγκλεισμένη λυοφιλιωμένη κουτινάση, η οποία όπως φάνηκε έδειχνε προτίμηση στα καρβοξυλικά οξέα μακρύτερων ανθρακικών αλυσίδων (de Barros et al., 2010). Ακίνητοποιημένη κουτινάση σε στερεό φορέα Accurel EP 100 έχει καταλύσει την παραγωγή του εξανεστέρα του εξανοϊκού οξέος (hexanoic hexanoate) σε υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (scCO₂) στο οποίο βρέθηκε να είναι πολύ σταθερή με απώλεια ενεργότητας 10% της αρχικής ύστερα από 6 ημέρες (Sereti et al., 1997). Επίσης ακίνητοποιημένη στον ίδιο φορέα κατέλυσε τις αντιδράσεις μεταξύ διαφόρων κινναμικών (cinnamic acids) και βενζοϊκών οξέων με αλειφατικές αλκοόλες, αλλά παρουσίασε μικρότερες αποδόσεις σε σύγκριση με τις μελετώμενες λιπάσες (Stamatis et al., 2001). Η ακετυλίωση μεμβρανών αραβοξυλάνης (AX) σίκαλης με βινυλεστέρα του οξικού οξέος απουσία διαλύτη, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ξηρής κουτινάσης, η οποία έδειξε μεγαλύτερη ενεργότητα στην αξιοποίηση υποστρωμάτων με μικρότερη αλυσίδα αλκυλίου (Stapan et al., 2013). Η αντίδραση της ακυλίωσης της προεπεξεργασμένης με ιονικό υγρό (1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride – BMIMCl) κυτταρίνης (Avicel cellulose PH-101, DP=225) με προπιονικό, λαυρικό και στεαρικό βινυλεστέρα, καταλυόμενη από ακίνητοποιημένη σε Accurel EP 100 κουτινάση, απουσία διαλύτη, έδωσε αποδόσεις στην παραγωγή των αντίστοιχων εστέρων κυτταρίνης 1,9%, 1,3% και 1,0% ύστερα από 20 h αντίδρασης (Gremos, Zarafeta et al., 2011). Η ίδια αντίδραση ανάμεσα σε ίνες κυτταρίνης (χωρίς προεπεξεργασία) και λαυρικό βινυλεστέρα πραγματοποιήθηκε σε υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (scCO₂) για 9 h και έδωσε απόδοση 4,1% στην παραγωγή του λαυρικού εστέρα κυτταρίνης (Gremos et al., 2012).

1.8.2.2 Μετεστεροποίηση

Η μετεστεροποίηση του μεθυλεστέρα και αιθυλεστέρα του προπιονικού οξέος με διάφορες αλκοόλες, σε υψηλές θερμοκρασίες, έχει πραγματοποιηθεί σε συνεχή αντιδραστήρα στερεού-αερίου, όπου το στερεό είναι το ένζυμο είτε σε σκόνη (Parvaresh et al., 1991), είτε προσροφημένο σε φορέα Chromosorb P (Lamare & Legoy, 1994; Lamare et al., 1997), είτε ομοιοπολικά ενωμένο με κατιονική ρητίνη (Lamare & Legoy, 1994) και η αέρια φάση περιέχει τα αντιδρώντα και παρασύρει τα προϊόντα (πηκτικοί εστέρες). Ακίνητοποιημένο ένζυμο σε διάφορους ζεόλιθους (Serralha et al., 1998; Serralha et al., 2004), καθώς και σε πολυαμιδικό φορέα Accurel PA 6 (Serralha et al., 2004), έχει καταλύσει την αντίδραση μεταξύ του οξικού

βουτυλεστέρα και της εξανόλης σε διαλύτη ισοοκτάνιο και έχουν μελετηθεί οι συνθήκες της αντίδρασης (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος, συγκέντρωση εξανόλης) (Serralha et al., 2004). Η ίδια αντίδραση έχει πραγματοποιηθεί με το ένζυμο μικροεγκλεισμένο σε σύστημα αντίστροφων μικκυλίων ΑΟΤ/ισοοκτάνιο, όπου μελετήθηκε η σταθερότητά του και έγινε βελτιστοποίηση του συστήματος (Carvalho et al., 1999) και προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων για τα αντιδρώντα και προϊόντα (Carvalho et al., 2000), θεωρώντας την αντίδραση αντιστρέψιμη (Carvalho et al., 1998). Επίσης μελετήθηκαν τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας για συγκεντρώσεις εξανόλης 250-450 mM και φάνηκε επίδραση της διάχυσης για συγκεντρώσεις μικρότερες των 350 mM (Carvalho et al., 1998), ενώ για συγκεντρώσεις κάτω από 450 mM παρατηρούνται περιορισμοί λόγω διάχυσης των προϊόντων (εξυλεστέρας του οξικού οξέος και βουτανόλη) και πάνω από 450 mM ο ρυθμός της αντίδρασης ελέγχεται από την κινητική της (Carvalho et al., 2000). Επιπροσθέτως, έγινε μοντελοποίηση της αντίδρασης για αντιδραστήρα διαλείποντος έργου πλήρους ανάδευσης (batch stirred tank reactor-BSTR) με βάση τις κινητικές και τις μελέτες φαινομένων μεταφοράς μάζας (Carvalho et al., 1998; Carvalho et al., 2000).

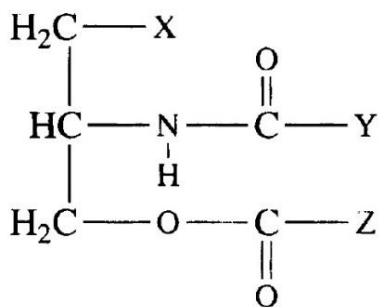
1.8.2.3 Πολυμερισμός

Ακίνητοποιημένη κουτινάση του *F. solani* σε σφαιρίδια Lewatit, στη μορφή συνδεδεμένων συσσωματωμάτων (cross-linked enzyme aggregates – CLEA) συνέθεσε ολιγομερή nylon-4,10, nylon-6,10 και nylon-8,10, μέσω πολυσυμπύκνωσης διαμινών (1,4-butanediamine, 1,6-hexanediamine, and 1,8-diaminooctane) με διεστέρα (diethyl sebacate). Ο μεγαλύτερος ρυθμός πολυμερισμού ($DP_{max}=16$) επετεύχθη στη σύνθεση του nylon-8,10 σε διαλύτη διαιθυλεστέρα του σεβακικού οξέος στους 70 °C (Stavila et al., 2013a). Η ίδια κουτινάση έχει καταλύσει την πολυσυμπύκνωση των *p*-xylylenediamine και diethyl sebacate με προϊόντα oligo(*p*-xylylene sebacamide) με υψηλές θερμοκρασίες τήξης (223-230 °C) και των dimethyl terephthalate και 1,8-diaminooctane με προϊόντα oligo(octamethylene terephthalamide) με δύο θερμοκρασίες τήξης (186 και 218 °C), ενώ μόνο μονομερή και διμερή προϊόντα προέκυψαν από την αντίδραση των dimethyl terephthalate και *p*-xylylenediamine (Stavila et al., 2013b).

1.9 Εναντιοεκλεκτικότητα

Εναντιοεκλεκτικότητα είναι η ιδιότητα που έχουν κάποια ένζυμα να παρουσιάζουν προτίμηση σε ένα από τα δύο εναντιομερή (S ή R) μιας οργανικής ένωσης, την οποία χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα σε κάποια αντίδραση που καταλύουν, παράγοντας το αντίστοιχο προϊόν. Η ιδιότητά τους αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί, μεταξύ άλλων, στην παρασκευή δραστικών ουσιών φαρμάκων, στις οποίες το ένα εναντιομερές μόνο της ένωσης είναι δραστικό ή μπορεί το ένα εναντιομερές να είναι ακόμα για τοξικό για τον οργανισμό.

Η κουτινάση του *Fusarium oxysporum* έχει μελετηθεί για την προτίμησή της στα εναντιομερή της οκτανόλης σε δύο διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες, εξανοϊκό και οκτανοϊκό οξύ, για αντίδραση εστεροποίησης. Στο εξανοϊκό οξύ γενικά η μετατροπές ήταν πολύ μικρές, ενώ όταν η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο οκτανοϊκό, το ένζυμο έδειξε προτίμηση στην (S)-οκτανόλη με 45% απόδοση στην εστεροποίηση και στον διαχωρισμό του ρακεμικού μίγματος (R,S)-οκτανόλη έδωσε μετατροπή (conversion, c) 40%, εναντιομερική περίσσεια (enantiomeric excess, ee_p) ~50% και ρυθμό εναντιομερίωσης (enantiomeric rate, E) ~5 (Speranza et al., 2011). Στις υπόλοιπες γνωστές εφαρμογές σχετικά με την εναντιοεκλεκτικότητα έχει χρησιμοποιηθεί η *F. solani* κουτινάση, η οποία έχει μελετηθεί στην αντίδραση μετεστεροποίησης ρακεμικών μιγμάτων φαινυλαλκανοδιολών με το οξικό βινύλιο και η επίδραση διαφόρων οργανικών διαλυτών και της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων. Το ένζυμο μπόρεσε να αναγνωρίσει τα μικρά υποστρώματα, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση σταθερότητάς του με την προεπώαση στη διόλη (Borreguero et al., 2001). Σε αντίστοιχη αντίδραση, της 1-φαίνυλ αιθανόλης με βουτυρικό βινύλιο σε υπερκρίσιμα ρευστά (sc-CO₂ και sc-αιθυλένιο), η ακινητοποιημένη σε ζεόλιθο κουτινάση έδειξε 100% προτίμηση στο (R) εναντιομερές της αλκοόλης, απόδοση που ήταν ανεξάρτητη από της συνθήκες της αντίδρασης (ενεργότητα νερού, πίεση, μέσο αντίδρασης, θερμοκρασία), σε αντίθεση με την ενεργότητα του ενζύμου που επηρεαζόταν ιδιαίτερα από την ενεργότητα του νερού (a_w) (Fontes et al., 1998). Μελέτη για εναντιοεκλεκτικότητα έγινε με την υδρόλυση συνθετικών τριγλυκεριδίων (R- και S- εναντιομερή) στα οποία ο ένας από τους βασικούς (primary) ακυλεστέρες έχει αντικατασταθεί από μία αλκυλομάδα και ο δευτερεύων εστερικός δεσμός από έναν αμιδικό (amino bond) δεσμό (Εικόνα 1.7). Όπως αποδείχθηκε η κουτινάση υδρολύει με κάποια προτίμηση τα (S)- εναντιομερή, αλλά αυτή η προτίμηση εξαρτάται έντονα από τα μήκη των ανθρακικών αλυσίδων και τη θέση των ακυλεστέρων, με τον λόγω των ενεργοτήτων του ενζύμου στα (R)/(S) να παίρνει τιμές 30-1 (Mannesse et al., 1995).



Εικόνα 1.7 Γενική μορφή των συνθετικών (R) και (S) αναλόγων τριγύκεριδίων με τις 2 αλυσίδες ακυλεστέρων αντικατασταθείσες με από μία αλυσίδα αλκυλίου και μία άκυλο αμινο αλυσίδα. Τα X, Y, Z αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στις αντίστοιχες αλυσίδες.

Πρόβλεψη της εναντιοεκλεκτικότητας έχει γίνει *in silico*, με βάση τη δομή της κουτινάσης του *F. solani* για υποστρώματα τις (R,S)-1-φαίνυλ αιθανόλης και (R,S)-2-φαίνυλ-1-προπανόλης, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα σε νερό (0-25%). Σύμφωνα με τους υπολογισμούς των ελεύθερων ενεργειών Gibbs (ΔG_{RS}) για τα τετραεδρικά ενδιάμεσα του ενζύμου με τα δύο υποστρώματα έδειξε την προτίμηση στις (S)-αλκοόλες και μέγιστη εναντιοεκλεκτικότητα για συγκέντρωση νερού 10% (Micaelo et al., 2005). Βέβαια στην αντίδραση μετεστεροποίησης της (R,S)-2-φαίνυλ-1-προπανόλης τον ένζυμο δεν έδειξε προτίμηση σε κάποιο από τα δύο εναντιομερή ανεξάρτητα από τις συνθήκες της αντίδρασης, όπως η ενεργότητα νερού (Garcia et al., 2005).

1.10 Εφαρμογές

Οι κουτινάσες είναι ένα γκρουπ ευέλικτων και πολυλειτουργικών ενζύμων που εμφανίζουν διάφορες χρήσιμες ιδιότητες με εφαρμογές σε βιομηχανικά προϊόντα και διεργασίες. Ως λιπολυτικά ένζυμα, καταλύουν αντιδράσεις (i) υδρόλυσης που χρησιμεύουν στη βιομηχανία γάλακτος, λαδιού, απορρυπαντικών και (ii) σύνθεσης δομημένων τριγλυκεριδίων, πολυμερών, επιφανειοδραστικών και ουσιών με εφαρμογές στην κοσμετολογία, φαρμακολογία και γεωργία.

1.10.1 Απορρυπαντικά

Σε πολλές περιπτώσεις απορρυπαντικών προστίθενται λιπολυτικά ένζυμα (συνήθως λιπάσες) με σκοπό την αύξηση των καθαριστικών ιδιοτήτων τους, καθώς επίσης και πρωτεάσες. Τα ένζυμα αυτά θα πρέπει να πληρούν κάποια χαρακτηριστικά όπως αυξημένη σταθερότητα σε ουδέτερα και ελαφρώς βασικά pH (6,5-11) και θερμοκρασίες 20-50 °C, καθώς και ανθεκτικά σε οξειδωτικά όπως το H₂O₂ και στην παρουσία άλλων ενζύμων όπως οι πρωτεάσες. Οι κουτινάσες καλύπτουν αυτούς τους περιορισμούς και έχουν καταχωρηθεί δύο πατέντες (US005512203A και EP0399681A2) που περιλαμβάνουν τη σύσταση απορρυπαντικών ευρείας χρήσης με κουτινάση (El-Sayed et al., 1990; Kolattukudy et al., 1996). Συγκεκριμένα έχει χρησιμοποιηθεί η βακτηριακή κουτινάση του στελέχους *Pseudomonas putida (mendocina)* ATCC53552, η οποία έχει βέλτιστο pH 7 και βέλτιστη θερμοκρασία τους 50 °C, σε συγκέντρωση 0,01-5% του βάρους του τασιενεργού (0,05-100 mg/L), το οποίο βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,2-5 mM και το οποίο πρέπει να είναι συμβατό με το ένζυμο. Επίσης, όπως έχει αποδειχθεί, η κουτινάση είναι αποτελεσματικότερη από την εμπορική λιπάση, lipolaseTM, στην απομάκρυνση των τριγλυκεριδίων και την υδρόλυση των λιπών χωρίς την παρουσία ιόντων ασβεστίου (Egmond & van Bemmel, 1997).

1.10.2 Παραγωγή Βιοντήζελ

Το βιοντήζελ αναφέρεται σε αλκυλεστέρες (μέθυλ-, αίθυλ- ή πρόπυλ-) λιπαρών οξέων φυτικής ή ζωικής προέλευσης. Η παραγωγή του μπορεί να γίνει είτε χημικά είτε ενζυμικά και στόχος είναι η μείωση της χρήσης των ορυκτών καυσίμων. Η αντίδραση πραγματοποιείται μεταξύ ενός λιπιδίου και μιας αλκοόλης, που με την

μεσολάβηση ενός ενζύμου καταλήγουν σε εστέρα (βιοντήζελ) και γλυκερόλη (παραπροϊόν). Το ένζυμο που έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτερα είναι η λιπάση, όμως έχει αποδειχθεί ότι η κουτινάση μπορεί να καταλύσει την αντίδραση αποτελεσματικότερα και μάλιστα έχει και το πλεονέκτημα ότι μπορεί να χρησιμοποιήσει ως υπόστρωμα τόσο διαλυμένα όσο και γαλακτωματοποιημένα τριγλυκερίδια. Οι αντιδράσεις μετεστεροποίησης υπό τη δράση κουτινασών που έχουν μελετηθεί, περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 1.8.2.2.

1.10.3 Βιομηχανία Τροφίμων

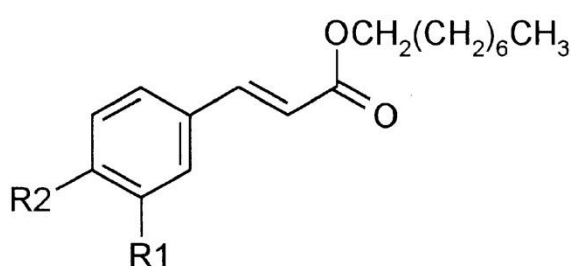
Στην βιομηχανία τροφίμων η κουτινάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ιδιότητα που έχει να υδρολύει την επιφανειακή μεμβράνη διαφόρων φρούτων ή λαχανικών. Η μερική αποικοδόμηση των αδιάλυτων τμημάτων της επιφάνειάς τους, έχει ως αποτέλεσμα την ευκολότερη αφυδάτωσή τους και την αύξηση της διαπερατότητας στο εσωτερικό τους επιθυμητών ουσιών όπως αρωματικές ουσίες, γλυκαντικά, σταθεροποιητές, συντηρητικά και ενισχυτικά γεύσης. Για να είναι αποτελεσματική, όμως, η επεξεργασία αυτή, πρέπει η διαπερατότητα του φρούτου/λαχανικού στο νερό να αυξηθεί περίπου κατά 50% σε σχέση με το ανεπεξέργαστο. Η αύξηση της διαπερατότητας, χωρίς τη χρήση ενζύμου, πραγματοποιείται με χημικά μέσα όπως οργανικούς διαλύτες (χλωροφόρμιο, μεθυλενοχλωρίδιο κ.ά.) και αλκαλικά μεταλλικά υδροξείδια, τα οποία όμως αφήνουν κατάλοιπα στο τελικό προϊόν με ενδεχόμενες παρενέργειες στον καταναλωτή. Εκτός αυτού, η γενικότερη χρήση τους μπορεί να αποβεί επικίνδυνη για τους εργαζόμενους που έρχονται σε επαφή, αλλά φυσικά και το περιβάλλον. Η πατέντα US00510131A περιγράφει μια διεργασία για ενζυμική επεξεργασία, η οποία περιλαμβάνει την εμβάπτιση των φρούτων/λαχανικών σε διάλυμα κουτινάσης προτεινόμενης συγκέντρωσης 0,1-0,5 mg/mL για τουλάχιστον 1 ώρα (βέλτιστη διάρκεια 10-20 h), σε θερμοκρασία 20-40 °C και σε εύρος pH 4-11 (προτιμώνται οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του ενζύμου) (Poulose, Boston, 1996).

Μία άλλη εφαρμογή της κουτινάσης στη βιομηχανία τροφίμων είναι η παραγωγή προϊόντων με την εμπορική ονομασία *λιπολυμένες λιπαρές ουσίες γάλακτος* (lipolysed milkfats – LMF), τα οποία είναι συμπυκνωμένα αρώματα τυριού, που έχουν προέλθει από την ενζυμική κατεργασία τυριού (ή άλλων γαλακτοκομικών υποστρωμάτων). Το LMF έχει καταστεί σημαντικό συστατικό στην βιομηχανία τροφίμων, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο σε προϊόντα αρτοποιίας (ψωμί, κέικ), γαλακτοκομικά (κρέμες ζαχαροπλαστικής, αλείμματα τυριού και βουτύρου) και σε ποικιλία άλλων προϊόντων (καρυκεύματα ποπ κορν, σάλτσες,

ντρέσινγκ σαλάτας και διάφορα σνακ). Κάτω από ειδικές συνθήκες επεξεργασίας, το LMF μπορεί να εμφανίσει μια έντονη γεύση τυριού, οπότε και χαρακτηρίζεται ως ενζυμικά τροποποιημένο τυρί (enzyme modified cheese – EMC). Τα LMFs εκτός του ότι είναι εύκολα και φθηνά στην παραγωγή τους, είναι και εύκολα στην αποθήκευση, έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και σταθερά χαρακτηριστικά από παρτίδα σε παρτίδα. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά σε διάφορα επεξεργασμένα τρόφιμα (ζυμαρικά και προϊόντα πίτσας, κατεψυγμένα και κονσερβοποιημένα τρόφιμα, μπισκότα), καθώς μεταδίδουν έντονη γεύση ακόμα και σε χαμηλά ποσοστά ενσωμάτωσης (κάτω του 2% w/w). Κατά την παραγωγή των LMFs, πραγματοποιείται μερική υδρόλυση των λιπών του υποστρώματος σε μίγμα ελευθέρων λιπαρών οξέων, τα οποία δημιουργούν γευστικές ενώσεις ή πρόδρομες ουσίες τους. Από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, αυτά με τις μικρές αλυσίδες προσδίδουν τυρώδη γεύση στο τελικό προϊόν, ενώ αυτά με τις μεγάλες αλυσίδες δεν πρέπει να ξεπερνούν κάποια συγκεκριμένη συγκέντρωση ώστε να αποφευχθεί η γεύση σαπουνιού. Οπότε, η σημαντικότερη παράμετρος είναι ο λόγος των ελευθέρων λιπαρών οξέων με μικρή αλυσίδα προς αυτά με μεγάλη αλυσίδα, ο οποίος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ένζυμο που χρησιμοποιείται. Οι Regado et al. (2007) πραγματοποίησαν μερική λιπόλυση λιπαρών ουσιών από βόειου, κατσικίσιου και πρόβειου γάλακτος, χρησιμοποιώντας 10 διαφορετικές λιπάσες και την κουτινάση από τον *F. solani*. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 40 °C για 5 h αν και με το πέρασμα των 2 ωρών ο ρυθμός της αντίδρασης μειωνόταν αισθητά, πιθανότατα από απενεργοποίηση του ενζύμου λόγω της έντονης πτώσης του pH. Η κουτινάση έδωσε το μικρότερο ποσοστό βαθμού υδρόλυσης σε σχέση με τα άλλα ένζυμα (ιδίως στο κατσικίσιο υπόστρωμα), όμως παρουσίασε τα μεγαλύτερα ποσοστά στην απελευθέρωση λιπαρών οξέων μικρών (C₄-C₈) και μεσαίων (C₁₀-C₁₄) αλυσίδων έναντι των λιπασών όπου κυριαρχούσαν οι μεγάλοι μήκους λιπαρά οξέα (C₁₆-C₁₈).

Εκμεταλλεόμενοι τη συνθετική ικανότητα των κουτινασών, μπορούμε να παράγουμε φαινολικές ενώσεις με έντονο λιπόφιλο χαρακτήρα, οι οποίες χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα κυρίως ως αντιοξειδωτικά. Γενικά οι φαινόλες είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες περιλαμβάνουν τουλάχιστον έναν αρωματικό υδρογονάνθρακα συνδεδεμένο με μία υδροξυλομάδα. Φαινολικά οξέα υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες σε φρούτα, λαχανικά και αρωματικά βότανα και τους προσδίδουν την αντιοξειδωτική τους δράση. Το πρόβλημα είναι ότι οι ουσίες αυτές έχουν υδρόφιλο χαρακτήρα και έτσι αποκλείεται η εφαρμογή τους σε τρόφιμα με λιπαρή βάση. Η λύση είναι η τροποποίηση των ενώσεων αυτών μέσω εστεροποίησης με αλειφατικά μόρια (λιπαρά οξέα ή αλκοόλες) για την αύξηση της υδροφοβικότητάς τους. Η τροποποίηση αυτή μπορεί να γίνει με χημικά μέσα, όμως δεν ενδείκνυται για εφαρμογές σε τρόφιμα, λόγω των έντονα διαβρωτικών οξέων που χρησιμοποιούνται. Η εναλλακτική λύση είναι φυσικά η ενζυμική τροποποίηση,

η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μη υδατικά μέσα (Stamatis et al., 1999). Η κουτινάση έχει δοκιμαστεί στην ενζυμική λιποφιλίωση (εστεροποίηση) των φαινολικών οξέων: κινναμικό, π-κουμαρικό, φερούλικό και π-υδροξυφαίνυλ προπιονικό, με την 1-οκτανόλη. Το ένζυμο που προερχόταν από τον *F. solani* έδειξε μεγαλύτερα ποσοστά μετατροπής στο π-υδροξυφαίνυλ προπιονικό οξύ (29% σε 12 h) και μικρότερα στο φερούλικό (5% σε 12 h), η δομή των οποίων παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.8. Βέβαια, τα ποσοστά αυτά είναι πολύ μικρότερα από τα αντίστοιχα των λιπασών που χρησιμοποιήθηκαν ως βιοκαταλύτες και ιδιαίτερα της λιπάσης της *Candida antarctica* (97% και 11% αντίστοιχα) (Stamatis et al., 2001).



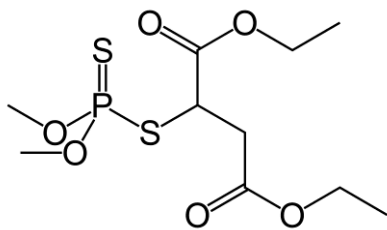
Εικόνα 1.8 Δομή ενζυματικά συντιθέμενου οκτυλεστέρα.

Για R1=OCH3 και R2=OH : εστέρας του φερούλικού οξέος,

ενώ για R1=H και R2=OH : εστέρας του *p*-υδροξυφαίνυλ προπιονικού οξέος

1.10.4 Γεωργία

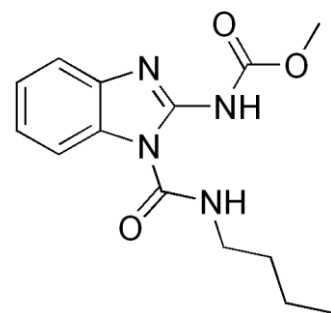
Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο των ασθενιών των φυτών και έχουν την ιδιότητα να παραμένουν στο περιβάλλον (κυρίως στα λιπίδια) για μεγάλες χρονικές περιόδους και να προσροφούνται εύκολα από τον οργανισμό μέσω διαφόρων οδών (δέρμα, βλεννογόνους, πνεύμονες, γαστρεντερικός σωλήνας). Όπως έχει αποδειχθεί, οι οργανοφωσφορικές ενώσεις είναι επικίνδυνες για το νευρικό σύστημα των ασπόνδυλων, το ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών και τους επινεφρίδιους αδένες και το ήπαρ των ψαριών. Επίσης, προκαλούν ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις στο αίμα και τα λεμφικά ανθρώπινα κύτταρα (Pio & Macedo, 2009). Έτσι γίνεται αντιληπτό, ότι είναι βαρύνουσας σημασίας η χρήση μικρότερων ποσοτήτων εντομοκτόνων χωρίς όμως να μειώνεται και η δράση τους.



Εικόνα 1.9 Χημικός τύπος του οργανοφωσφορικού μαλαθείου

Η κουτινάση του *F. oxysporum* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την υποβάθμιση και την αποτοξικοποίηση του οργανοφωσφορικού μαλαθείου (Εικόνα 1.9) με απόδοση 50 και 60% για χρόνο αντίδρασης 15 και 30 λεπτά αντίστοιχα και με κύριο τελικό μη τοξικό προϊόν το MDA.

Αντίθετα, όταν, για τον ίδιο στόχο, χρησιμοποιήθηκε εστεράση ζύμης, μόνο το 35% της αρχικής ποσότητας του μαλαθείου μετατράπηκε σε 48 ώρες, ενώ προϊόν ήταν το τοξικό MMA (Kim et al., 2006). Ακόμα, έχει αναπτυχθεί μια ενζυμική φωτομετρική ανάλυση οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων, με τη χρήση της κουτινάσης του *F. solani* και στόχο την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα. Η κουτινάση αποδείχθηκε ότι είναι το πιο αποτελεσματικό ένζυμο για αυτόν τον σκοπό αυτό, δηλαδή το ένζυμο του οποίου η δράση παρεμποδίζεται εντονότερα (Walz & Schwack, 2007). Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να προσδιοριστούν σε πολύ μικρά επίπεδα τα όξον-οργανοφωσφορικά και θιολ-οργανοφωσφορικά (ύστερα από ένα βήμα οξείδωσης πριν το τεστ), ενώ τα καρβαμιδικά φυτοφάρμακα που μελετήθηκαν έδειξαν μικρότερα όρια ανίχνευσης (Walz & Schwack, 2008). Βέβαια, η παρεμπόδιση της λειτουργίας της κουτινάσης από καρβαμιδικά φυτοφάρμακα είχε μελετηθεί ήδη από την αρχή της ιστορίας της, ώστε να συνδεθεί η μόλυνση των φυτών από κουτινοπαραγωγούς μύκητες με τη δράση του ενζύμου. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι η δράση του μυκητοκτόνου benomyl (methyl [1-[(butylamino)carbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate) (Εικόνα 1.10) απέναντι στον *F. solani*



Εικόνα 1.10 Χημικός τύπος του καρβαμιδικού μυκητοκτόνου benomyl

οφείλεται στη μη-αναστρέψιμη παρεμπόδιση της κουτινάσης λόγω της αντίδρασης της ενεργούς σερίνης της με το μεταβολικό προϊόν του benomyl, *n*-butylisocyanate, (Köller et al., 1982).

Η κουτινάση, εκτός από την ιδιότητα που έχει να διασπά και να ανιχνεύει τα φυτοφάρμακα (Kim et al., 2006), μπορεί να χρησιμεύσει και στη μείωση της χρησιμοποιούμενης ποσότητάς τους, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά τους. Οι ουσίες που παραδοσιακά χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση της βιοκτόνου δράσης των φυτοφαρμάκων είναι έλαια, τασιενεργά (π.χ. παράγοντες διαβροχής και διείσδυσης, διασκορπιστές), σταθεροποιητικοί παράγοντες, διαλύτες, υγροσκοπικοί παράγοντες, αφροί, αντιαφριστικοί παράγοντες, ενεργοποιητές κ.ά., τα οποία είναι μη βιοδιασπώμενα και έτσι υπάρχει περίπτωση να προκαλέσουν ασθένεια σε συνδυασμό με το φάρμακο (Iwasaki, Hioki, 1986; Poulouse, Kolattukudy, 1987). Έτσι, αναζητείται μια φιλικότερη για το περιβάλλον λύση, η οποία θα έχει και ευρύ φάσμα εφαρμογών σε διάφορα γεωργικά/κηπευτικά χημικά όπως ζιζανιοκτόνα, ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών, μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα, συμπεριλαμβανομένων των χημικών και μικροβιακών παρασιτοκτόνων και τα λιπάσματα. Όπως περιγράφεται στην πατέντα EP0197622B1, αύξηση της βιολογικής δράσης ενός βιοκτόνου πραγματοποιείται με την ενσωμάτωση στη σύστασή του μιας εστεράσης. Η μέθοδος, δηλαδή, αυτή περιλαμβάνει ένα βήμα κατά το οποίο γίνεται εφαρμογή διαλύματος μιας εστεράσης στον οργανισμό-στόχο του παρασιτοκτόνου, πριν ή ταυτόχρονα με την εφαρμογή του βιοκτόνου. Ο στόχος του παρασιτοκτόνου μπορεί να είναι κάποιο φυτό, έντομο, άκαρι, μύκητας, βακτήριο ή συνδυασμός αυτών και εκτός από εστεράσες μπορεί να είναι και λιπάσες ή κουτινάσες. Το υδατικό διάλυμα του ενζύμου πρέπει να είναι συγκέντρωσης 0,1-100 ppm και μπορεί να εφαρμοστεί με ψεκασμό στους μίσχους ή τα φύλλα του φυτού. Το αν θα χρησιμοποιηθεί πριν ή μαζί με το βιοκτόνο εξαρτάται από το αν το φάρμακο εμποδίζει τη λειτουργία του ενζύμου. Σε κοινά διαλύματα με παρασιτοκτόνα (Sumilex hydrate και Sumithion hydrate αντίστοιχα) χρησιμοποιήθηκαν η κουτινάση του βακτηριακού γένους *Colletotrichum* και του μύκητα *Botrytis* (Iwasaki, Hioki, 1986). Η πατέντα EP0272002B1 προτείνει τη χρήση κοκτέιλ των ενζύμων πηκτινάση, κυτταρινάση, ημικυτταρινάση και της κουτινάσης του *Pseudomonas putida*, με σκοπό την αύξηση της δράσης του ρυθμιστή ανάπτυξης φυτών Indole Acetic Acid (IAA) και του μυκητοκτόνου Benomyl (Poulouse, Kolattukudy, 1987).

1.10.5 Βιομηχανία Υφασμάτων (Κλωστοϋφαντουργία)

1.10.5.1 Μάλλινα υφάσματα

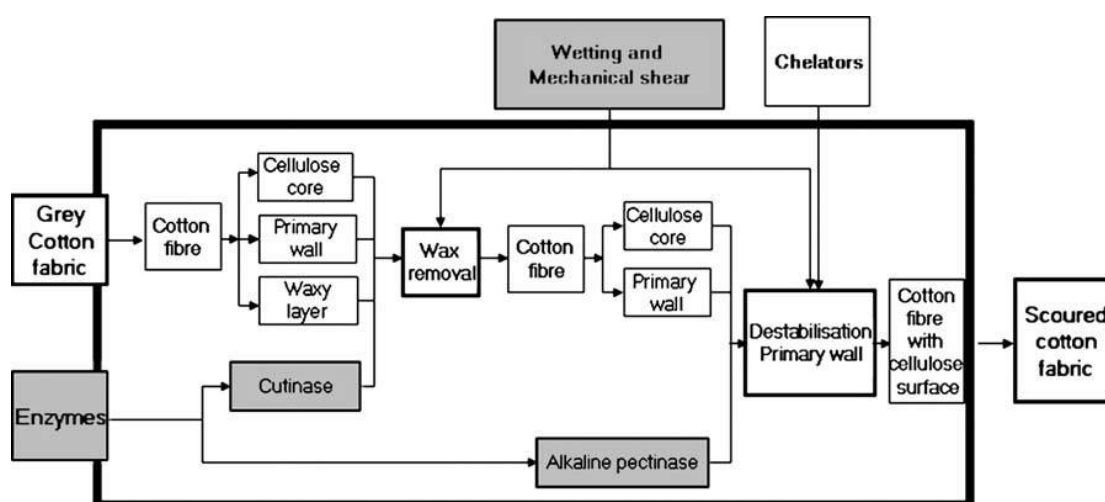
Η επεξεργασία των μάλλινων υφασμάτων με πρωτεάσες έχει ερευνηθεί εντατικά ως μία περιβαλλοντικά φιλική εναλλακτική της εμπορικής διεργασίας chlorine-Hercosett, η οποία επιδρά στην αντοχή του υφάσματος έναντι στην συρρίκνωση. Παρόλα αυτά, η επιφάνεια του υφάσματος καλύπτεται από μία επιφανειακή μεμβράνη, η οποία συντίθεται κυρίως από λιπίδια που συνδέουν υπολείμματα πεπτιδίων μέσω θειοεστερικών ή εστερικών δεσμών ή σχηματίζουν ομοιοπολικά συνδεδεμένα (crosslinked) ισοπεπτίδια μέσω αμιδικών δεσμών. Η δομές αυτές αντιστέκονται στη διείσδυση των πρωτεασών, οπότε επιτάσσεται η εκ των προτέρων υδρόλυσή τους. Οι συμβατικές χημικές μέθοδοι προεπεξεργασίας των υφασμάτων (αλκαλική, οξειδωτική, χλωρίωση) βελτιώνουν την προσβασιμότητα των πρωτεασών στο υπόστρωμα, αλλά παρέχουν άنيση επεξεργασία στην επιφάνεια του υφάσματος, προκαλώντας σε μερικά σημεία εκτεταμένη ζημιά (Chen et al., 2013). Συγκριτικά, μία προεπεξεργασία με κουτινάση μπορεί αποτελεσματικότερα να αυξήσει την απόδοση της επεξεργασίας με πρωτεάση παρέχοντας καλύτερα αποτελέσματα στην εμβρεξιμότητα (wettability) και στην αντίσταση στη συρρίκνωση του υφάσματος, ενώ επιτυγχάνεται μικρότερη απώλεια δύναμης (Wang et al., 2011; 2010; 2009).

1.10.5.2 Βαμβακερές Ίνες

Οι βαμβακερές ίνες είναι το δημοφιλέστερο υφαντουργικό προϊόν στον κόσμο. Μία αποτελεσματική διεργασία δημιουργίας βαμβακερών υφασμάτων παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 1.11. Ένα σημαντικό βήμα της διεργασίας αυτής ονομάζεται απολίπανση (cotton scouring) και περιλαμβάνει την απομάκρυνση της επιφανειακής μεμβράνης της ίνας, ώστε να πραγματοποιηθεί ομοιόμορφο βάψιμο και φινίρισμα. Παραδοσιακά, αυτή η διεργασία πραγματοποιούταν μέσω αλκαλικής υδρόλυσης σε υψηλή θερμοκρασία, η οποία απαιτεί μεγάλες ποσότητες νερού και ενέργειας, επιδεινώνοντας την μόλυνση του περιβάλλοντος και η οποία μπορεί να προκαλέσει ζημιά στο ύφασμα. Για αυτόν τον λόγο, επιδιώκεται η στροφή σε πιο «πράσινες» μεθόδους επεξεργασίας με τη χρήση βιοκαταλυτών, μεταξύ των οποίων και η κουτινάση.

Η επιφανειακή μεμβράνη μιας βαμβακερής ίνας έχει πολύπλοκη δομή και περιλαμβάνει κουτίνη, κερύ, πηκτίνη και πρωτεΐνες. Η κουτίνη και το κερύ μπορούν, όπως έχει ερευνηθεί, να υδρολυθούν αποτελεσματικά από τις κουτινάσες των

Pseudomonas mendocina (Degani et al., 2002), *F. solani pisi* (Agrawal et al., 2008), *Thermobifida fusca* (Yan et al., 2011) καθώς και κουτινάση της *Thermobifida fusca* συνδεδεμένη με τη μονάδα CBM (Zhang et al., 2010; 2011). Όταν αυτές οι κουτινάσες συνδυάζονται με πηκτινάσες, η εμβρεξιμότητα των ινών μπορεί να βελτιωθεί αποτελεσματικά, σε χαμηλή θερμοκρασία (25-50 °C) και χωρίς την προσθήκη αλκάλειου. Σε αυτές, όμως, τις χαμηλές θερμοκρασίες το κερύ υδρολύεται μόνο μερικώς και δεν μπορεί να απομακρυνθεί τελείως, πράγμα το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση διαφορετικών ιδιοτήτων σε διαφορετικά σημεία του υφάσματος. Αντιθέτως, το κερύ μπορεί να αποικοδομηθεί τελείως και να γίνει διαλυτό σε υψηλότερες θερμοκρασίες (80-90 °C). Σε υψηλές, όμως, θερμοκρασίες οι περισσότερες κουτινάσες έχουν πολύ περιορισμένη σταθερότητα. Κάποιοι ερευνητές έχουν επιχειρήσει να ενισχύσουν τη θερμοσταθερότητα του ενζύμου με διάφορες μεθόδους ακινητοποίησης, οι οποίες έχουν αναλυθεί ήδη στην παράγραφο 1.6. Το πρόβλημα που προκύπτει είναι ότι ο φορέας ακινητοποίησης επεμβαίνει στην αλληλεπίδραση του ενζύμου και των ογκωδών πολυεστέρων που πρέπει να υδρολύσει, οπότε η ακινητοποίηση δεν είναι μια βιώσιμη εναλλακτική στην βιομηχανία υφασμάτων. Οι πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην ανακάλυψη θερμοάντοχων κουτινασών, οι οποίες θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην επεξεργασία του βαμβακιού σε υψηλές θερμοκρασίες. Βέβαια, πρέπει να προστεθεί ότι, σε αντίθεση με την επιφανειακή μεμβράνη του βαμβακιού, οι ίνες είναι επιμολυσμένες και με τον φλοιό των σπόρων, ο οποίος είναι ανθεκτικός στην απομάκρυνση, όμως η ελλιπής απομάκρυνση κατά τη διάρκεια της βαφής. Ευτυχώς η κουτινάση συνδυασμένη με αλκαλική πηκτινάση ή ξυλανάση, μπορεί να βελτιώσει την αποικοδόμηση του φλοιού των σπόρων του βαμβακιού κατά τη διάρκεια της βιο-απολίπανσης των βαμβακερών υφασμάτων (Yan et al., 2009a; 2009b).

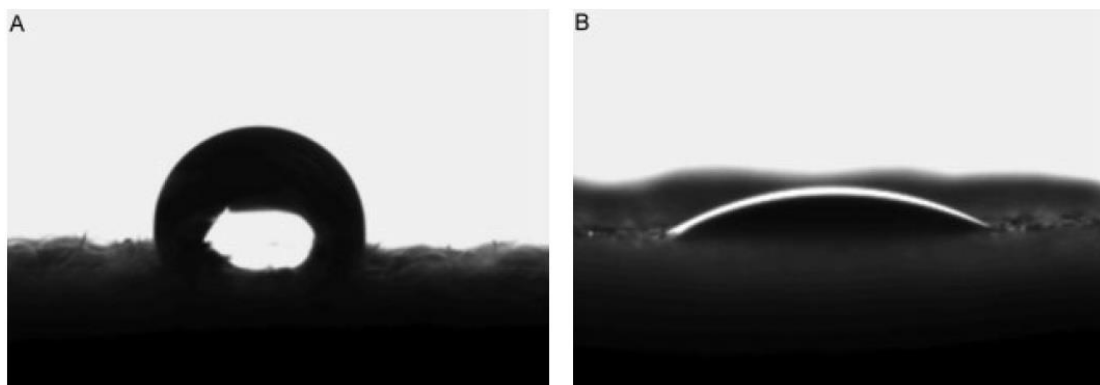


Εικόνα 1.11 Παρουσίαση των διαφόρων σταδίων για την επίτευξη γρήγορης και αποτελεσματικής διεργασίας απολίπανσης του βαμβακιού (Agrawal et al., 2008)

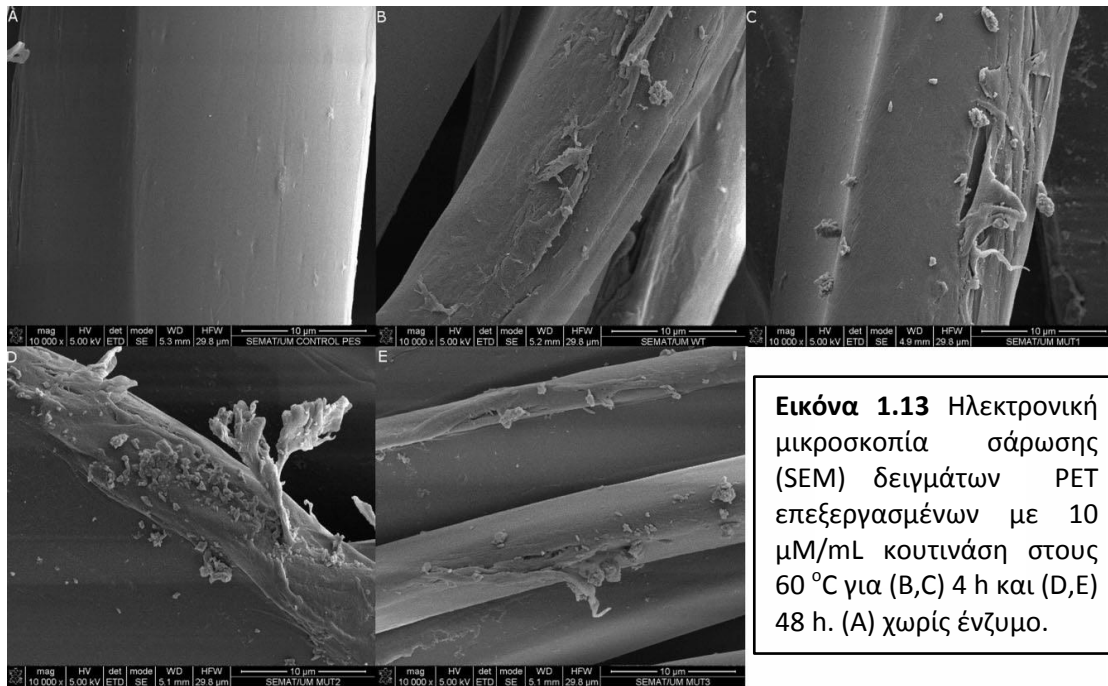
1.10.5.3 Συνθετικές Ίνες

Οι συνθετικές ίνες αντιπροσωπεύουν σχεδόν το 50% της παγκόσμιας αγοράς υφασμάτων, ποσοστό που ολοένα και αυξάνεται. Η διεργασία της επεξεργασίας τους, η οποία είναι παρόμοια με την «απολίπανση» του βαμβακιού, έχει ως αποτέλεσμα την μερική υδρόλυση της επιφάνειάς τους, βελτιώνοντας την υδροφιλικότητά τους και διευκολύνοντας το ομοιόμορφο βάψιμο και φινιρίσμα τους. Η εφαρμογή της κουτινάσης σε αυτές τις διεργασίες είναι σχετικά πρόσφατη και όπως έχει αναφερθεί η κουτινάση του *F. solani pisi* μπορεί να τροποποιήσει την επιφάνεια συνθετικών ινών, όπως πολυεστέρες, πολυαμίδια, ακρυλικά, με χαμηλούς ρυθμούς, βελτιώνοντας όμως την υδροφιλικότητα και τη δυνατότητα βαψίματος (Silva et al., 2005a; 2005b).

Το PET, μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες συνθετικές ίνες, είναι ένας πολυεστέρας που αποτελείται από τereφθαλικό οξύ και αιθυλενογλυκόλη. Η κουτινάση έχει τη δυνατότητα της μερικής υδρόλυσης των εστερικών δεσμών της επιφάνειας του υφάσματος, απελευθερώνοντας υδρόφιλες υδροξυλομάδες και καρβοξυλομάδες. Η ενζυμική αυτή επεξεργασία αυξάνει την υδροφιλικότητα των πολυεστερικών υφασμάτων, χωρίς όμως να επηρεάζει την αντοχή των ινών. Στην παράγραφο 1.8.1 περιγράφονται αναλυτικά οι αντιδράσεις κουτινάσων (κυρίως της *T. fusca*) με PET υποστρώματα (Müller et al., 2005; Alisch-Mark et al., 2006; Eberl et al., 2009; Ronkvist et al., 2009). Να τονισθεί ότι η αντίδραση αυτή της υδρόλυσης διευκολύνεται από της προσθήκη Triton X-100 (Lee and Song, 2010) και ότι σημαντικό ρόλο στην απόδοση παίζει η κρυσταλλικότητα του πολυμερούς (Vertommen et al., 2005). Στις εικόνες 1.12 και 1.13 παρουσιάζονται οι επιπτώσεις τις επεξεργασίας με μεταλλαγμένη κουτινάση της *Thermobifida fusca*, στη δομή και την υδροφιλικότητα (Silva et al., 2011).



Εικόνα 1.12 Σταγονίδιο νερού (15μL) σε (A) ανεπεξέργαστο και (B) επεξεργασμένο με κουτινάση ύφασμα PET



Εικόνα 1.13 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) δειγμάτων PET επεξεργασμένων με 10 μM/mL κουτινάση στους 60 °C για (B,C) 4 h και (D,E) 48 h. (A) χωρίς ένζυμο.

Το πολυαμίδιο, μια άλλη σημαντική συνθετική ίνα για την κλωστοϋφαντουργία, αποτελείται από εξαμεθυλενοδιαμίνη και αδιπικό οξύ, μέσω της δημιουργίας αμιδικών δεσμών. Το πολυμερές αυτό μπορεί να επεξεργαστεί από πρωτεάσες, πολυαμιδάσες και κουτινάσες (Silva et al., 2005a; 2005b; Chen et al., 2013). Οι ενεργότητες των ενζύμων αυτών έδειξαν αθροιστικά αποτελέσματα με υψηλότερα επίπεδα μηχανικής ανάδευσης (Silva et al., 2007).

Τα ακρυλικά είναι ελαφρώς διαφορετικά από τους πολυεστέρες και τα πολυαμίδια, διότι ο δεσμός που έχει τη δυνατότητα να υδρολύσει η κουτινάση δεν είναι μέρος της ραχοκοκαλιάς του πολυμερούς. Τα ακρυλικά παράγονται από τον πολυμερισμό ακρυλονιτριλίου με 7% οξικό βινυλίου. Η κουτινάση μπορεί να υδρολύσει τους εστερικούς δεσμούς στις μονάδες του οξικού βινυλίου, απελευθερώνοντας οξικό οξύ και αφήνοντας ελεύθερες υδροξυλομάδες στην επιφάνεια του υφάσματος, με αποτέλεσμα την αύξηση της υδροφιλικότητάς του (Silva et al., 2005a).

Επιπροσθέτως, η κουτινάση παρουσιάζει ενεργότητα εστεράσης του οξικού οξέος στη διοξική και τριοξική κυτταρίνη, που είναι οι δομικοί λίθοι των ινών οξικής κυτταρίνης. Η αύξηση του αριθμού των υδροξυλομάδων στη διοξική και τριοξική επιφάνεια των ινών μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη δράση της κουτινάσης. Η ανασυνδυασμένη κουτινάση στην οποία έχει προστεθεί η μονάδα CBM, έχει φανεί ότι έχει καλύτερα αποτελέσματα στην υδρόλυση των συγκεκριμένων ινών (σε όρους υδροφιλικότητας και δυνατότητας βαψίματος) από ότι η φυσική πρωτεΐνη (Matamá et al., 2010; Zhang et al., 2012).

Επίσης, έχουν αναπτυχθεί μοντέλα πολυμερικών υποστρωμάτων για την εύρεση ενζύμων που θα μπορούν αποτελεσματικά να τροποποιήσουν συνθετικές ίνες. Τέτοια υποστρώματα είναι το bis (benzoyloxyethyl) terephthalate για το PET και το adipic acid bishexyl-amide για τα πολυαμίδια (Heumann et al., 2006).

Κλείνοντας, να σημειωθεί ότι οι κουτινάσες έχουν τεράστιες δυνατότητες, ως βιομηχανικά ένζυμα, ιδιαίτερα στον τομέα της κλωστοϋφαντουργίας. Είναι σχετικά καινούρια ένζυμα, όμως τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί οι πολλές δυνατότητες που έχουν. Ωστόσο, οι περισσότερες από τις διαθέσιμες μελέτες, που έχουν πραγματοποιηθεί, περιγράφουν εφαρμογές σε εργαστηριακή κλίμακα, οπότε στόχος είναι η αύξηση της κλίμακας (scale-up) των εφαρμογών αυτών για εμπορική χρήση. Για να γίνει αυτό πρέπει πρώτα να πραγματοποιηθεί έρευνα για τις συνθήκες υψηλών επιπέδων παραγωγής του ενζύμου, ίσως με τη χρήση βιοαντιδραστήρα. Επίσης, είναι κρίσιμη η αύξηση της σταθερότητας του ενζύμου, είτε με κατάλληλες τεχνικές ακινητοποίησης, είτε με μεταλλάξεις του.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Συσκευές - Όργανα

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- pH-μετρο 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- Φωτόμετρο UV2000, Hitachi (Η.Π.Α.)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης TC-512, TECHNE (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης αγαρόζης Easygel H1-set, Scie-plas (Μ. Βρετανία)
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™, Biorad (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης για διαχωρισμό πρωτεϊνών Mini-PROTEAN 3, Biorad (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ηλεκτρικής τροφοδοσίας E863, CONSORT (Βέλγιο)
- Συσκευή φωτογράφισης σε κλειστό θάλαμο InGenius BioImaging, Syngene (Μ. Βρετανία), με λογισμικό GeneSnap v6.05 και GeneTools v3.06
- Συσκευή υπερήχων VC 600, Sonics and Materials (Η.Π.Α.)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντροι J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), Sorval® RC28S, DuPont (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)

2.1.2 Μικροοργανισμοί

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε ο μεσόφιλος μύκητας *Fusarium oxysporum* F3, ο οποίος έχει απομονωθεί από κύμνο (Christakopoulos et al., 1989).

Για την κλωνοποίηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* TOP10, TOP10F' (Invitrogen, Η.Π.Α.) και XL-1 Blue (Stratagene, Η.Π.Α.). Συγκεκριμένα, το *E. coli* TOP10 χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού φορέα pCR® Blunt (Invitrogen), το στέλεχος TOP10F' για τον πολλαπλασιασμό του φορέα pPICZαC (Invitrogen), ενώ το στέλεχος XL1-Blue για τον φορέα pET-22b(+) (Novagen, Η.Π.Α.).

Για την ετερόλογη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν η μεθυλότροφη ζύμη *Pichia Pastoris* (Invitrogen), το στέλεχος X-33 (γονότυπος: φυσικός τύπος, φαινότυπος: Mut⁺) και τα βακτηριακά στελέχη *E. coli* BL21 (DE3) και Origami2 (DE3).

2.1.3 Εμπορικά Ένζυμα – Αντιβιοτικά – Τυποποιημένα Χημικά Αντιδραστήρια (kits)

Οι πολυμεράσες VentR® DNA και KOD Hot Start προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες New England Biolabs® Inc., (Η.Π.Α.) και Novagen (Η.Π.Α.) αντίστοιχα, ενώ τα περιοριστικά ένζυμα από την Takara BIO Inc. (Ιαπωνία).

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των φυσικών βακτηριακών στελεχών είναι: στρεπτομυκίνη (TOP10, Origami2), τετρακυκλίνη (TOP10F', XL1-Blue, Origami2) και χλωραμφενικόλη (BL21). Για την επιλογή των κυττάρων *E. coli*, που περιείχαν τον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt χρησιμοποιήθηκε καναμυκίνη, ενώ για τα μετασηματισμένα από το pET22b(+) αμπικιλίνη. Όσοι κλώνοι *E. coli* TOP10F' και *P. pastoris* X-33 είχαν μετασηματιστεί με τον φορέα pPICZαC, επιλέχθηκαν με ζεοσίνη 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.

2.1.4 Θρεπτικά Μέσα Καλλιέργειας

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. Η σύσταση των θρεπτικών μέσων παρουσιάζεται συνοπτικά στον παρακάτω Πίνακα.

Πίνακας 2.1 Σύσταση θρεπτικών μέσων ανάπτυξης των μικροοργανισμών *E. coli* και *P.pastoris*

Μικροοργανισμός	Θρεπτικό Μέσο	Σύσταση
<i>E. coli</i>	Luria Bertani (LB)	1% w/v τρυπτόνη, 1% w/v NaCl, 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης, pH 7,4
	Low Salt Luria Bertani (LS-LB)	1% w/v τρυπτόνη, 0,5% w/v NaCl, 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης, pH 7,4 ± Ζεοσίνη
<i>P. pastoris</i>	YPD(S)	2% w/v πεπτόνη, 2% w/v δεξτρόζη, 1% w/v εκχύλισμα ζύμης, (1 M σορβιτόλη)
	BMGY/BMMY	2% w/v πεπτόνη, 1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,0, 1x10 ⁻⁵ % v/v βιοτίνη, 1,34% w/v YNB, 1% v/v γλυκερόλη ή 0,5% μεθανόλη YNB: 3,4% w/v Yeast Nitrogen Base (χωρίς αμινοξέα και θειικό αμμώνιο), 10% w/v θειικό αμμώνιο

Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που προστέθηκαν στα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης των μικροοργανισμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2 Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών στα θρεπτικά μέσα

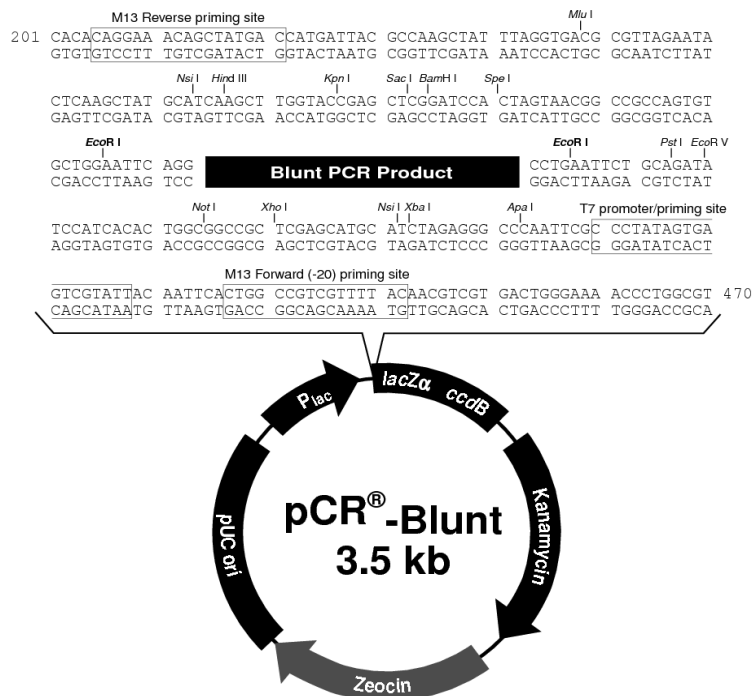
Αντιβιοτικό	Συγκέντρωση (μg/mL)
Στρεπτομυκίνη	50
Τετρακυκλίνη	10
Χλωραμφενικόλη	25
Καναμυκίνη	50
Αμπικιλλίνη	100
Ζεοσίνη	50 (LB) ή 100 (YPD(S))

2.1.5 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 χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pPICZαC και pET22b(+).

2.1.5.1 pCR® Blunt (Invitrogen)

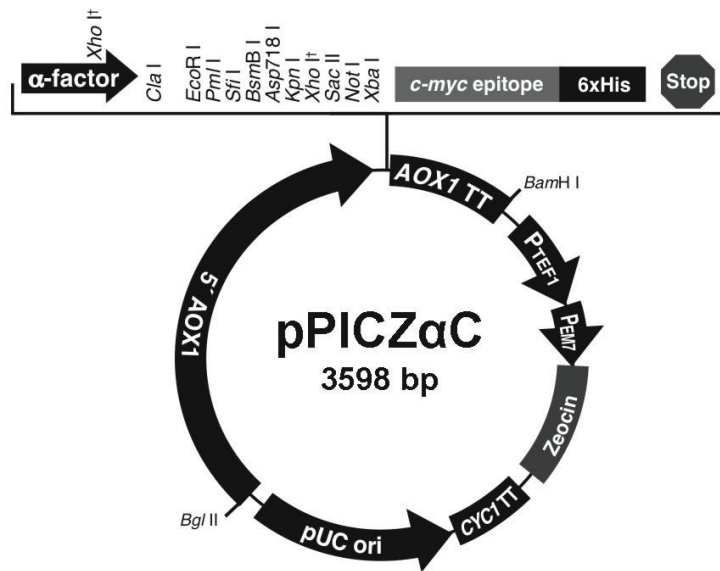
Ο πλασμιδιακός αυτός φορέας με μέγεθος 3512 bp, είναι σχεδιασμένος να κλωνοποιεί τμήματα DNA με ισοτελή άκρα. Εμπεριέχει το γονίδιο θανάτου του *E. coli ccdB*, το οποίο είναι συνδεδεμένο στο καρβοξυτελικό άκρο του γονιδίου *lacZα*. Με αυτόν τον τρόπο, όταν πραγματοποιείται ένωση ενός κομματιού DNA με το πλασμίδιο, παύει η δυνατότητα έκφρασης του συστήματος *lacZα-ccdB*, επιτρέποντας την ανάπτυξη μόνο μετασηματισμένων κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Τα κύτταρα που έχουν λάβει το μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σκοτώνονται λόγω της έκφρασης του *ccdB*, ενώ τα μη μετασηματισμένα κύτταρα θανατώνονται λόγω έκθεσης στο αντιβιοτικό του στερεού θρεπτικού μέσου (καναμυκίνη ή ζεοσίνη) (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pCR® Blunt με τα σημεία περιορισμού και τις χαρακτηριστικές αλληλουχίες

2.1.5.2 pPICZαC (Invitrogen)

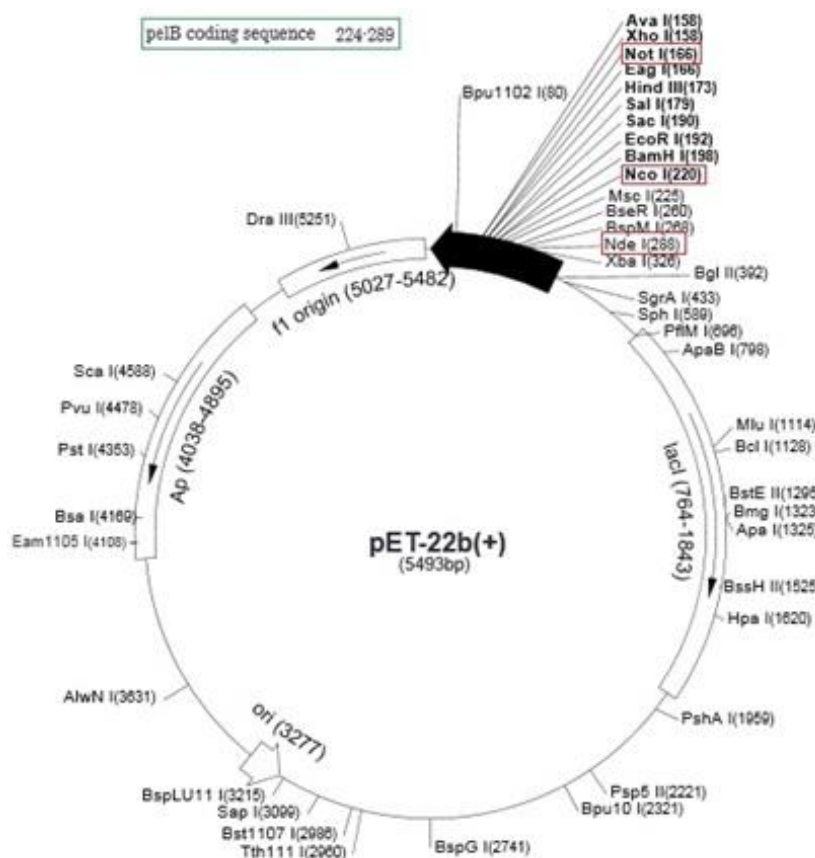
Ο πλασμιδιακός φορέας pPICZαC (3598 bp), επιτρέπει την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στη ζύμη *P. pastoris* και την παράλληλη εξωκυτταρική τους έκκριση, με τη χρήση της αλληλουχίας *α-factor* που περιέχει, η οποία προέρχεται από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Επίσης στο φορέα εμπεριέχεται γονίδιο 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 (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pPICZαC με τα σημεία περιορισμού και τις χαρακτηριστικές αλληλουχίες

2.1.5.3 pET22b(+) (Novagen)

Ο πλασμιδιακός φορέας pET22b(+) (5493 bp) εμπεριέχει τη σηματοδοτική αλληλουχία *pelB*, η οποία οδηγεί στη μεταφορά των πρωτεϊνών στο περίπλασμα των κυττάρων. Επίσης, πριν το σημείο του γονιδίου ενδιαφέροντος, περιλαμβάνει το οπερόνιο *lac*, το οποίο λειτουργεί ως προαγωγός της έκφρασης και ενεργοποιείται με την παρουσία του Isopropyl-β-D-thio-galactoside (IPTG). Το IPTG είναι ένα ανάλογο λακτόζης που προσδέεται στον καταστολέα του οπερονίου και δεν μπορεί να μεταβολιστεί από τα ένζυμα καταβολισμού της λακτόζης (συγκεκριμένα από τη β-γαλακτοζιδάση), οπότε διατηρείται και έτσι κρατάει σταθερό το ρυθμό της παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Μια άλλη αλληλουχία ενδιαφέροντος είναι αυτή που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη, με το οποίο γίνεται η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων. Τέλος, υπάρχει και η αλληλουχία που κωδικοποιεί 6 κωδικόνια ιστιδίνης (His-tag), για τον καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pET22b(+) με επισημασμένα τα σημεία περιορισμού και της αλληλουχίας *pelB* και με τις άλλες χαρακτηριστικές αλληλουχίες

2.1.6 Εκκινητές (Primers)

Οι αλληλουχίες συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA έχουν κατασκευαστεί από την εταιρεία Eurofins MWG Operon και παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3 Αλληλουχίες συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων για κλωνοποίηση του γονιδίου σε κάθε πλασμιδιακό φορέα με επισημασμένα τα σημεία περιορισμού των αντίστοιχων ενδονουκλεασών

Πλασμιδιακός φορέας Έκφρασης	Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία Ολιγονουκλεοτιδίου (5'→3')	Περιοριστικά Ένζυμα
pPICZαC	FoCut16606F	CGA TCG ATG CTT CCC GCT GGT CAG GAT GC	Clal
	FoCut16606R	CGT CTA GAG CGG CTC CAG CAG CAT CAG C	Xbal
	FoCut16606eF	GGA ACT CTC GGT CCC CGC G	
	FoCut16606eR	GGG ACC GAG AGT TCC AAG GTT GCC AGA TTC AGT GGA GC	
pET22b(+)	Fopet22b16606F	GCC ATA TGC TTC CCG CTG GTC AGG ATG C	NdeI
	Fopet22b16606R	CGG CGG CCG CTC CAG CAG CAT CAG CCT TCT G	NotI
pET22b(+) (pelB)	Fopet22pelb16606F2	GCC CAT GGA TCT TCC CGC TGG TCA GGA TGC CG	NcoI

Πιο συγκεκριμένα, οι εκκινητές FoCut16606F - FoCut16606R χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *foxg_16606* του *F. oxysporum* σύμφωνα με την αλληλουχία της βάσης δεδομένων του Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>), ενώ οι FoCut16606eF - FoCut16606eR για την απομάκρυνση του εσωνίου που περιείχε (65 bp). Με τη χρήση των εκκινητών Fopet22b16606F - Fopet22b16606R και Fopet22pelb16606F2 - Fopet22b16606R έγινε η ενίσχυση του γονιδίου που είχε κλωνοποιηθεί ήδη στο φορέα pPICZαC για την κλωνοποίησή του στον φορέα pET22b(+), (αλλαγή των αλληλουχιών περιορισμού). Στον παραπάνω Πίνακα επισημαίνονται και οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα και οι οποίες προστίθενται στο γονίδιο ώστε να γίνει δυνατή η κλωνοποίησή του στους πλασμιδιακούς φορείς.

2.2 Μοριακές Τεχνικές

2.2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού

2.2.1.1 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 της κουτινάσης. Αυτό πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Sigma-Aldrich για το GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit.

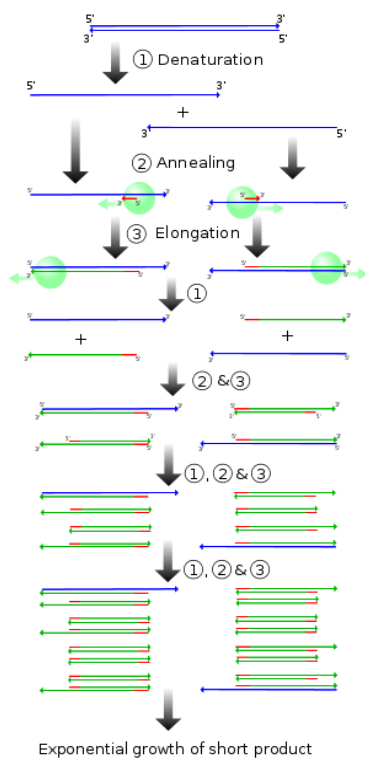
2.2.1.2 Απομόνωση τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης

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).

2.2.1.3 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.).

2.2.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)



Εικόνα 2.4 Σχηματική απεικόνιση των σταδίων μιας αντίδρασης PCR

αριθμός των αντιγράφων του επιθυμητού τμήματος αυξάνεται εκθετικά. Η διαδικασία παρουσιάζεται συνοπτικά στην Εικόνα 2.4 , ενώ στην Εικόνα 2.5 φαίνεται ο θερμοκυκλοποιητής TC-512 (TECHNE, Η.Π.Α.) που χρησιμοποιήθηκε.

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: i) αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation), ii) υβριδισμό των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA (annealing), iii) 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



Εικόνα 2.5 Συσκευή PCR TC-512 της εταιρείας TECHNE, Η.Π.Α.

Στον Πίνακα 2.4 παρουσιάζεται η σύσταση της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου από το γενωμικό DNA.

Πίνακας 2.4 Σύσταση αντίδρασης PCR για ενίσχυση του γονιδίου *foxg_16606* του *F.oxysporum*

Συστατικό	Ποσότητα (μL)
Πολυμεράση (2 Units/μL)	1
Γενωμικό DNA (~100 ng/μL)	5
Εκκινητής F (50 μM)	1
Εκκινητής R (50 μM)	1
dNTPs mix (10 mM)	5
MgSO ₄ (100 mM)	3
Ρυθμιστικό Διάλυμα (10X)	5
Υπερκάθαρο Νερό	29

Όπως αναφέρθηκε ήδη, το γονίδιο *foxg_16606* περιέχει ένα εσώνιο (intron), δηλαδή τμήμα του γονιδίου που δεν μεταφράζεται σε αμινοξέα στην ώριμη πρωτεΐνη. Για την απομάκρυνση του πραγματοποιήθηκε PCR με εκτομή τμημάτων DNA μέσω επικάλυψης εκκινητών (Splicing by Overlapping Extension PCR, SOE-PCR ή *in vitro* μάτισμα), η οποία βασίζεται στο σχεδιασμό ζεύγους αλληλοεπικαλυπτόμενων εκκινητών. Αυτοί, σε συνδυασμό με τους εξωτερικούς εκκινητές, χρησιμοποιούνται σε ζεύγη για την ενίσχυση των δύο εξωνίων ξεχωριστά, με εκμαγείο το πλασμιδιακό DNA pCR® Blunt[FoCut16606] και ύστερα γίνεται η ένωσή τους σε μία τελική PCR με DNA-στόχο τα προϊόντα των δύο προηγούμενων αντιδράσεων PCR. Η σύσταση των αντιδράσεων αυτών παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.5, ενώ στον Πίνακα 2.6 παραθέτονται οι θερμοκρασιακές συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν όλες οι αντιδράσεις PCR, οι εκκινητές και οι πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το μέγεθος του προϊόντος της κάθε αντίδρασης.

Πίνακας 2.5 Συστατικά αντιδράσεων PCR για το μάτισμα του γονιδίου

Συστατικό (μL)	SOE-PCR	PCR συνένωσης
Πολυμεράση (2 Units/μL)	1	1
Πλασμιδιακό DNA (Αραίωση 1:100) ή Προϊόντα SOE-PCR	1	1+1
Εκκινητής F (50 μM)	1	1
Εκκινητής R (50 μM)	1	1
dNTPs mix (10 mM)	5	5
MgSO ₄ (100 mM)	3	3
Ρυθμιστικό Διάλυμα (10X)	5	5
Υπερκάθαρο Νερό	33	32

Πίνακας 2.6 Οι εκκινητές, οι πολυμεράσες, οι θερμοκρασιακές συνθήκες των αντιδράσεων PCR και το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων

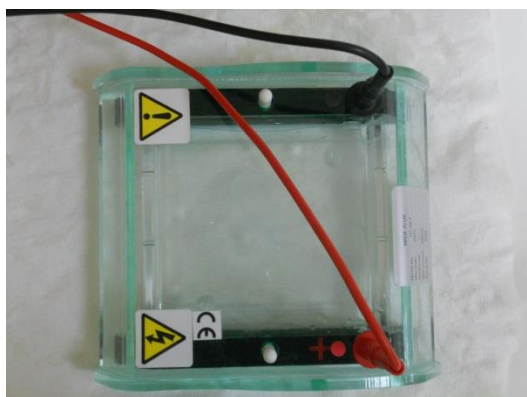
Αλληλουχία	Εκκινητές	Πολυμεράση	Κύκλος PCR	Μέγεθος Προϊόντος (bp)
FoCut16606 (με εσώνιο)	FoCut16606F - FoCut16606R	Vent® DNA Polymerase	[95 °C, 20s 56°C, 10s 70 °C, 20s] x 40	710
Εξώνιο 1	FoCut16606F - FoCut16606eR		[95 °C, 20s 55°C, 10s 70 °C, 20s] x 40	147
Εξώνιο 2	FoCut16606eF - FoCut16606R		[95 °C, 20s 57°C, 10s 70 °C, 30s] x 40	498
FoCut16606 (χωρίς εσώνιο)	FoCut16606F - FoCut16606R		[95 °C, 20s 57°C, 10s 70 °C, 60s] x 35	645
FoCut16606 (pET22b(+))	Fopet22b16606F - Fopet22b16606R	KOD Hot Start	[95 °C, 20s 55°C, 20s 70 °C, 20s] x 35	645
pelB- FoCut16606 (pET22b(+))	Fopet22pelb16606F2 - Fopet22b16606R		[95 °C, 20s 57°C, 20s 70 °C, 30s] x 35	645

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ανάκτηση των τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% (w/v). Στις περιπτώσεις ταυτοποίησης χρησιμοποιήθηκε η Agarose low EEO (AppliChem, Γερμανία), ενώ, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.2.1.2, 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 2.7), ενώ για την φόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue (Bioline, Η.Π.Α.).

Πίνακας 2.7 Σύσταση διαλύματος TBE(10X) για την παρασκευή γέλης αγαρόζης

Διάλυμα TBE (10X)	
Συστατικό	Συγκέντρωση
Tris Base	108 g/L
Βορικό Οξύ	55 g/L
EDTA 0,5 M pH8,0	40 mL/L



Εικόνα 2.6 Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης γινόταν ανάμιξη 0,5 g αγαρόζης με 50 mL TBE και βρασμός του μίγματος για περίπου 2 λεπτά. Ύστερα από ψύξη περίπου στους 50 °C προστίθετο 5 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide) και το υγρό ακόμα μίγμα μεταφερόταν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 2.6). Μετά την πήξη του μίγματος προστίθενται 50-55 mL διαλύματος TBE και τα δείγματα φορτώνονταν 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 πραγματοποιούνταν η ηλεκτροφόρηση ήταν 60 V για περίπου 45 min. Για την εμφάνιση και φωτογράφιση των προκυπτουσών ζωνών χρησιμοποιούνταν η συσκευή InGenius BioImaging, Syngene (M. Βρετανία), ενώ σε περίπτωση που ήταν επιθυμητή η ανάκτηση κάποιου τμήματος DNA ακολουθούταν η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.2.

2.2.4 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 τους πλασμιδιακούς φορείς pPICZαC και pET22b(+), που είχαν 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 στον Πίνακα 2.8.

Πίνακας 2.8 Σύσταση αντιδράσεων συνένωσης τμημάτων DNA με πλασμιδιακούς φορείς

Περίπτωση	Ισοτελή Άκρα (pCR® Blunt)	Κολλώδη Άκρα (pPICZαC ή pET22b(+))				
		1:3	1:5	1:7	Control Single Cut	Control No Cut
Συστατικό						
Πλασμιδιακός φορέας	1	1	1	1	1	1
Τμήμα DNA	5	3	5	7	-	-
Λιγάση	1	1	1	1	1	-
Ρυθμιστικό Διάλυμα Λιγάσης (10X)	2	2	2	2	2	2
Υπερκάθαρο νερό	2	13	11	9	16	17

Όλες αυτές οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 16 °C για 1-2 h στην περίπτωση του pCR® Blunt ή 3-4 h στην περίπτωση των pPICZαC και pET22b(+).

2.2.5 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. Στον παρακάτω Πίνακα αναφέρονται τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν, οι θέσεις στις οποίες κόβουν, καθώς και οι αντιδράσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2.9 Τα ένζυμα περιορισμού, οι θέσεις πέψης τους και τα μίγματα των αντιδράσεων πέψης

Περιοριστική Ενδονουκλεάση	Θέση Πέψης	Σύσταση Αντίδρασης
ClaI	5'...AT CGAT...3' 3'...TAGC TA...5'	5 μL DNA (προϊόν PCR ή πλασμιδιακός φορέας) 2 μL ρυθμιστικό διάλυμα M (10X)
XbaI	5'...T CTAGA...3' 3'...AGATC A...5'	1 μL ClaI 1 μL XbaI 11 μL υπερκάθαρο νερό
SacI	5'...GAGCT C...3' 3'...C TCGAG...5'	80 μL πλασμίδιο pPICZαC[FoCut16606] 2 μL ρυθμιστικό διάλυμα L (10X) 5 μL SacI 5 μL υπερκάθαρο νερό
NdeI	5'...CA TATG...3' 3'...GTAT AC...5'	5 μL DNA (προϊόν PCR ή πλασμιδιακός φορέας)
NotI	5'...GC GGCCGC...3' 3'...CGCCGG CG...5'	2 μL ρυθμιστικό διάλυμα H ή K (10X) 2 μL BSA (10X)
NcoI	5'...C CATGG...3' 3'...GGTAC C...5'	1 μL NotI 1 μL NdeI ή NcoI 9 μL υπερκάθαρο νερό

Οι αντιδράσεις λάμβαναν χώρα στους 37 °C για 1-2 h στις περιπτώσεις διπλής πέψης, ενώ στην περίπτωση γραμμικοποίησης του πλασμιδίου pPICZαC η αντίδραση διήρκησε 3 h. Ο έλεγχος της κατατετημένης αλληλουχίας έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, ενώ όπου χρειαζόταν ο καθαρισμός του επιθυμητού DNA χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel).

2.2.6 Αλληλούχηση του DNA (Sequencing)

Ύστερα από την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pCR® Blunt, pPICZαC και pET22b(+), 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).

2.2.7 Μετασχηματισμός (transformation) επιδεκτικών κυττάρων (competent cells)

Μετασχηματισμός κυττάρων είναι η διαδικασία κατά την οποία κύτταρα δέχονται γενετικό υλικό ξένο προς αυτά. Για να πραγματοποιηθεί αυτό πρέπει πρώτα τα κύτταρα να έχουν μετατραπεί σε παροδικώς διαπερατά (επιδεκτικά-competent) και έπειτα πρέπει να γίνει η επιλογή όσων μετασχηματίστηκαν.

Οι τρόποι μετασχηματισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δύο: i) Θερμικό σοκ (heat-shock transformation), που βασίζεται στην απότομη θέρμανση των επιδεκτικών κυττάρων και αποτελεί αρκετά αποδοτικό τρόπο για αρνητικά κατά Gram βακτήρια και ii) Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation), η οποία μπορεί να εφαρμοστεί για το μετασχηματισμό μεγάλου εύρους κυττάρων και βασίζεται στην εφαρμογή σύντομου παλμού ηλεκτρικού ρεύματος στα επιδεκτικά κύτταρα.

2.2.7.1 Χημική προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* για θερμικό μετασχηματισμό

Η προετοιμασία των βακτηριακών κυττάρων έγινε με κατεργασία με χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂). Με αυτόν τον τρόπο τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων αποκτούν θετικό φορτίο και έλκουν τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του πλασμιδιακού DNA.

Αναλυτικότερα, γίνεται εμβολιασμός προκαλλιέργειας 5 mL LB με μία αποικία επιθυμητών βακτηρίων (TOP10 ή TOP10F' ή XL1-Blue ή BL21 ή Origami2), με την παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (Παράγραφος 2.1.3 και Πίνακας 2.2), η οποία επωάζεται στους 37 °C υπό ανάδευση (180 rpm) για 16-20 h. Ύστερα, 1 mL της προκαλλιέργειας μεταφέρεται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100 mL LB (χωρίς αντιβιοτικό), η οποία επωάζεται (37 °C, 180 rpm) έως ότου η οπτική πυκνότητα



Εικόνα 2.7 Flash freezing επιδεικτικών κυττάρων *E.coli* σε υγρό άζωτο

διαλύματος CaCl_2 0,1 M. Το κυτταρικό αυτό εναιώρημα παραμένει στους 4 °C για 16 h και στη συνέχεια, αφού προστεθεί 1,9 mL διαλύματος γλυκερόλης 50% v/v, χωρίζεται σε κλάσματα των 100 μL σε αποστειρωμένους σωλήνες erpendorf, οι οποίοι καταψύχονται απότομα (flash freezing, Εικόνα 2.7) με εμβάπτισή τους σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80 °C.

(OD_{600}) να φτάσει στην περιοχή τιμών 0,4-0,8 (περίπου 2-3 h) και τότε μεταφέρεται σε παγόλουτρο όπου και παραμένει για 30 min. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται (1500xg, 5 min, 4 °C) και έπειτα τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 12 mL στείρου και παγωμένου διαλύματος MgCl_2 0,1 M. Ακολουθεί ξανά

φυγοκέντρηση και επαναιώρηση σε 4 mL στείρου και παγωμένου

2.2.7.2 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με θερμικό σοκ

Για την εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν, στα κύτταρα *E. coli* γινόταν πρώτα απόψυξη των επιθυμητών επιδεικτικών στελεχών με την παραμονή τους σε πάγο. Ύστερα πραγματοποιούταν ήπια προσθήκη 5 μL του μίγματος αντίδρασης συνένωσης (Παράγραφος 2.2.4) ή 1 μL από το πλασμιδιακό DNA που είχε απομονωθεί με βάση το πρωτόκολλο του GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.) και το μίγμα επωαζόταν στον πάγο για 30 min. Ακολουθούσε θερμικό σοκ στους 42 °C για αυστηρά 60-90 s και άμεση επανατοποθέτηση στον πάγο, όπου γινόταν προσθήκη 200 μL LB και ύστερα επώαση στους 37 °C για 1 h. Η ποσότητα αυτή των κυττάρων επιστρωνόταν σε τρυβλία Petri που περιείχαν στερεό θρεπτικό μέσο LB ή LS-LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό στο οποίο προσφέρει ανθεκτικότητα το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε (Παράγραφος 2.1.3 και 2.1.4), με σκοπό την επιλογή μόνο των ανασυνδυασμένων βακτηρίων. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37 °C για 16-20 h.

2.2.7.3 Ανάλυση μετασηματισμένων βακτηρίων

Στην περίπτωση που ο μετασηματισμός των βακτηριακών κυττάρων γίνεται με το προϊόν της αντίδρασης συνένωσης, πρέπει να ελεγχθεί ποιες από τις αποικίες που προκύπτουν έχουν λάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Για αυτό το λόγο, γίνεται επιλογή 3-6 αποικιών, οι οποίες εμβολιάζονται σε 5 mL LB (LS-LB)/αντιβιοτικό η καθεμία και επωάζονται για 16-20 h στους 37 °C υπό ανάδευση (180 rpm). Έπειτα φυγοκεντρώνονται (1500xg, 10 min) και απομονώνεται το πλασμιδιακό τους DNA (Παράγραφος 2.2.1.3), το οποίο χρησιμοποιείται σε αντίδραση πέψης με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.5. Τα προϊόντα των αντιδράσεων διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και επιλέγονται όσα προέκυψαν θετικά στην ανάλυση πέψης. Σε αυτά γίνεται και ανάλυση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας.

2.2.7.4 Προετοιμασία επιδεικτικών κυττάρων *P. pastoris* για μετασηματισμό 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, 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_{600}) 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 εναιώρημα που προέκυψε (περίπου 1 mL) φυλάχθηκε σε πάγο μέχρι την χρησιμοποίησή του (την ίδια μέρα).

2.2.7.5 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris* X-33 με ηλεκτροδιάτρηση



Εικόνα 2.8 Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ (Biorad, Η.Π.Α.) και ειδικές κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης

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 rPICZαC πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε, υπέστη πρώτα γραμμικοποίηση (linearization) με πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *SacI* σε μοναδική θέση αναγνώρισης στην περιοχή 5'AOX1 του πλασμιδίου, όπως περιγράφεται στον Πίνακα 2.9. 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 μ L αναμείχθηκαν με 80 μ L επιδεκτικών κυττάρων X-33 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.) (Εικόνα 2.8) και εφαρμόστηκε το εργοστασιακό πρόγραμμα *Pic* (2 kV για 4ms), ενώ αμέσως μετά προστέθηκε στην κυψελίδα 1 mL παγωμένου διαλύματος σορβιτόλης 1 M. 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. Ύστερα από επώαση 3 ημερών στους 30 °C σχηματίστηκαν οι ανασυνδυασμένες αποικίες.

2.3 Μέθοδοι Παραγωγής και Ανάλυσης Πρωτεϊνών

2.3.1 Έκφραση της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης στην ζύμη *P.pastoris*

Η επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης στο στέλεχος X-33 της ζύμης *P. pastoris* γίνεται με την προσθήκη μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Η μεθανόλη ενεργοποιεί τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (AOX1) που υπάρχει στο πλασμίδιο pPICZαC, το οποίο έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα της ζύμης. Επίσης, η ανασυνδυσασμένη πρωτεΐνη εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο λόγω του πεπτιδίου-οδηγού *α-factor* (του *Saccharomyces cerevisiae*), πράγμα που καθιστά τη συλλογή και απομόνωσή της εύκολη.

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

Από τις αποικίες που είχαν σχηματιστεί στα τρυβλία ύστερα από την ηλεκτροδιάτρηση, επιλέχθηκαν τυχαία 10, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 50 mL θρεπτικού μέσου BMGY σε ισάριθμες κωνικές φιάλες των 250 mL και επωάστηκαν (30 °C, 200 rpm) για 16-20 h. Έπειτα φυγοκεντρήθηκε συγκεκριμένος όγκος της προκαλλιέργειας έτσι ώστε η επαναιώρηση των κυττάρων σε 50 mL θρεπτικού BMMY να δώσει OD₆₀₀=1. Οι καλλιέργειες με BMMY επωάστηκαν 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 OD₆₀₀) και τα επίπεδα έκφρασης της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης (με κινητικό πείραμα-assay). 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 OD₆₀₀=50-100 και χωρίστηκε σε αποστειρωμένα erpendorf, τα οποία καταψύχθηκαν απότομα (flash freezing) με εμβάπτιση σε υγρό άζωτο και αποθηκεύθηκαν στους -80 °C.

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



Εικόνα 2.9 Καλλιέργειες ανασυνδυασμένης ζύμης X-33 σε θρεπτικό μέσο BMMY

Ο κλώνος που επιλέχθηκε χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 4 κωνικών φιαλών (250 mL) με 50 mL BMMY έκαστη και ύστερα από επώαση 16 h (30 °C, 200 rpm) έγινε μεταφορά κατάλληλης ποσότητας κυττάρων (όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.4.1.1) σε κωνικές φιάλες 2 L (Εικόνα 2.9), που περιείχαν 400 mL BMMY έκαστη. Η επαγωγή διατηρήθηκε με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης σε τελική συγκέντρωση στη φιάλη 0,5% v/v. Με το πέρας 6 ημερών, 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.

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

Το υπερκείμενο, που προέκυψε ύστερα από την φυγοκέντρωση του υγρού καλλιέργειας του ανασυνδυασμένου στελέχους X-33, διηθήθηκε υπό κενό (Εικόνα 2.10A) 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 (Millipore, Η.Π.Α., Εικόνα 2.10B), η οποία επιτρέπει την διέλευση μακρομορίων μικρότερων από 10 kDa.



Εικόνα 2.10 Α) Συσσκευή διήθησης υπό κενό και Β) συσκευή υπερδιήθησης Amicon

2.3.2 Έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτήρια *E.coli*

Η επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα στελέχη των βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (BL21 και Origami2) γίνεται με την προσθήκη IPTG, στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, το οποίο προσδένεται στον καταστολέα του οπερονίου *lac* του πλασμιδιακού φορέα pET22b(+) και ενεργοποιώντας το προάγει την έκφραση (Παράγραφος 2.1.5.3).

Η έκφραση της ανασυνδυασμένης κουτινάσης έγινε με δύο τρόπους. Στον πρώτο απομακρύνθηκε η σηματοδοτική αλληλουχία *relB* του πλασμιδίου pET22b(+), με τη χρήση κατάλληλου περιοριστικού ενζύμου (*NcoI*), ώστε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να παραμένει εσωκυτταρικά, ενώ στο δεύτερο τρόπο διατηρήθηκε η αλληλουχία αυτή, με σκοπό τη μεταφορά των παραγόμενων πρωτεϊνών στο περίπλασμα των κυττάρων και την πιθανή έκκρισή τους εξωκυτταρικά.

2.3.2.1 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα *E. coli* BL21 (DE3) και Origami2 (DE3)

Ένας κλώνος από κάθε μετασηματισμένο στέλεχος χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 5 mL θρεπτικού μέσου LB/Αμπικικιλίνη, τα οποία επωάστηκαν για 16 h στους 37 °C υπό ανάδευση 180 rpm. Στη συνέχεια εμβολιάστηκαν φιάλες των 500 mL με 1% v/v προκαλλιέργεια, οι οποίες περιείχαν 200 mL LB/Αμπικικιλίνη και επωάστηκαν (37 °C, 180 rpm) μέχρι η οπτική τους πυκνότητα (OD_{600}) να φτάσει την τιμή 0,6 (2-4 h). Τότε προστίθενται 200 μ L IPTG 1 M (τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια 1 mM) και επωάζονται στους 37 ή τους 16 °C για 16-20 h.

2.3.2.2 Καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών



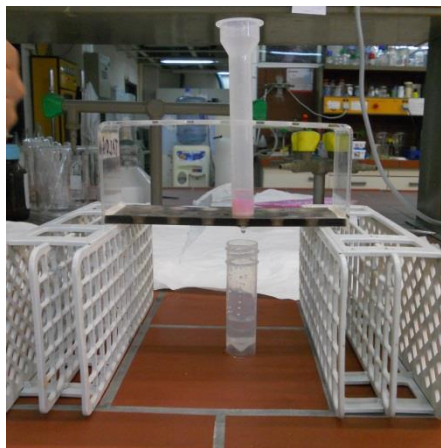
Εικόνα 2.11 Συσκευή υπερήχων VC 600 (Sonics and Materials)

Τα κύτταρα από κάθε καλλιέργεια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (4000xg, 15 min, 4 °C) και επαναιωρήθηκαν σε 40 mL ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, ενώ το υπερκείμενο αφού συμπυκνώθηκε μέχρι όγκο ~40 mL, χρησιμοποιώντας συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10 (αφού πρώτα είχε διηθηθεί υπό κενό χρησιμοποιώντας διαδοχικά διηθητικό χαρτί και φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,8, και 0,2 μm) αποθηκεύθηκε στους 4 °C (κλάσμα 1). Στη συνέχεια τα κύτταρα υπέστησαν ρήξη με υπερήχους (5 x 60 s, 50% Duty Cycle, ένταση 7) στη συσκευή υπερήχων VC 600 (Sonics and Materials, Η.Π.Α., Εικόνα 2.11) και τα κυτταρικά υπολείμματα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (10000xg, 20 min, 4 °C), ενώ και πάλι το υπερκείμενο (διαλυμένες πρωτεΐνες) αποθηκεύθηκε στους 4 °C ύστερα από διήθηση υπό κενό με φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,45 μm (κλάσμα 2). Τα κυτταρικά υπολείμματα επαναιωρήθηκαν σε 40 mL διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 1% v/v Triton X-100 και επανασυλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (10000xg, 20 min, 4 °C). Το βήμα αυτό πραγματοποιήθηκε 3 φορές, με σκοπό την απομάκρυνση των κυτταρικών μεμβρανών, ώστε τελικά να απομονωθούν τα έγκλειστα σωματίδια (inclusion bodies) που πιθανό δημιουργούνται κατά τη διαδικασία της παραγωγής και τα οποία είναι αδιάλυτα στο νερό. Τελικά γίνεται διαλυτοποίησή τους σε 3 mL διαλύματος 8 M Urea, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, αραιώση στα 4 mL και φυγοκέντρηση (10000xg, 10 min, 4 °C). Το υπερκείμενο αυτό (κλάσμα 3) εξισορροπήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl (διάλυμα Talon) με τη μέθοδο της διαπίδυσης από μεμβράνες κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Da, Sigma-Aldrich), ώστε να απομακρυνθεί η ουρία, που είναι αποδιατακτικός παράγοντας και να επαναδιαταχθεί η πρωτεΐνη σε λειτουργική μορφή. Στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (Talon) εξισορροπήθηκαν και τα άλλα δύο κλάσματα.

Η απομόνωση της πρωτεΐνης από τα τρία προαναφερθέντα κυτταρικά κλάσματα έγινε εκμεταλλευόμενοι 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+}). Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε στήλη βαρύτητας (Biorad, Η.Π.Α.- Εικόνα 2.12) με 2 mL ρητίνη ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου Talon® Metal Affinity Resin (Clontech, Η.Π.Α) από την οποία η έκλυση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή διαλύματος ιμιδαζολίου,

το οποίο ανταγωνίζεται τους ιμιδαζολικούς δακτυλίους των ιστιδινών για πρόσδεση στα κατιόντα Co^{2+} . Τα βήματα του καθαρισμού ήταν τα εξής:

- i. *Εξισορρόπηση της μήτρας της στήλης με 60 mL διάλυμα Talon*
- ii. *Φόρτωση του δείγματος για πρόσδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα ιόντα Co^{2+}*
- iii. *Έκπλυση της στήλης με 10 mL διάλυμα Talon για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που δεν προσδέθηκαν στη στήλη*
- iv. *Απομάκρυνση ελαφρά προσδεμένων πρωτεϊνών με εφαρμογή 5 mL διαλύματος Talon με χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου (5 mM)*
- v. *Έκλυση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με εφαρμογή 7 mL (2 φορές) διαλύματος Talon με υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου (100 mM)*
- vi. *Έκπλυση της μήτρας της στήλης με 80 mL απιονισμένο νερό και αποθήκευση της ρητίνης σε διάλυμα αιθανόλης 20% στους 4 °C*



Εικόνα 2.12 Στήλη βαρύτητας (Biorad, Η.Π.Α.) με ρητίνη Talon® ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου (Clontech, Η.Π.Α)

Ο βαθμός καθαρότητας της πρωτεΐνης 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.

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



Εικόνα 2.13 Συσσκευή SDS-PAGE Mini-Protean 3 (Biorad, Η.Π.Α.)

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., Εικόνα 2.13) και η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω.

2.3.3.1 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές: την επιστοιβάση (stacking gel) και την διαχωρισμού (resolving gel). Το μίγμα της κάθε πηκτής (Πίνακας 2.10), 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 επιστοιβάσης, 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 επιστοιβάσης, 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 2.10 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

2.3.3.2 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 2.11), για τον προσδιορισμό του βάρους των πρωτεϊνών των δειγμάτων. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό 35 mA/πήκτωμα για περίπου 90 min.

Πίνακας 2.11 Σύσταση πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas



MW (kDa)	Πρωτεΐνη	Προέλευση
116,0	β-γαλακτοζιδάση	<i>E. coli</i>
66,2	αλβουμίνη ορού βοδιού	πλάσμα βοδινού αίματος
45,0	Ωαλβουμίνη	ασπράδι αυγού κότας
35,0	γαλακτική αφυδρογονάση	μύες χοίρων
25,0	REase Bsp98I	<i>E. coli</i>
18,4	β-λακτογλοβουλίνη	γάλα αγελάδος
14,4	λυσοζύμη	ασπράδι αυγού κότας

2.3.3.3 Εμφάνιση πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου

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.

2.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε με δύο μεθόδους: τη μέθοδο Bradford (Bradford , 1976) και με μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm (Stoscheck, 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 βοδιού (Bovine Serum Albumin-BSA).

Στη δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιείται το μαθηματικό μοντέλο:
$$C(\text{mg/mL}) = (\text{OD}_{280} \cdot \text{MW})/\epsilon$$

όπου: **C(mg/mL)**, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε mg/mL

OD₂₈₀, 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, Gattiker et al. 2003).

2.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός

2.4.1 Μέτρηση ενεργότητας ανασυνδυασμένων ενζύμων

Μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit, U) ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol 4-νιτροφαινόλης ανά λεπτό, σε υπόστρωμα (εστέρας του 4-νιτροφαίνυλο βουτυρικού οξέος - *p*NPB) συγκέντρωσης 0,96 mM, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών φωσφορικών pH 6,0 και θερμοκρασία 40 °C. Η ανίχνευση της απελευθερούμενης 4-νιτροφαινόλης έγινε με φωτομετρία ορατού με μέγιστο απορρόφησης στα 410 nm. Η μετατροπή της απορρόφησης σε Units έγινε με βάση το νόμο Lambert-Beer, με τη χρήση καμπύλης αναφοράς 4-νιτροφαινόλης, η οποία είχε κατασκευασθεί υπό τις ίδιες συνθήκες (ρ.δ. κιτρικών φωσφορικών pH 6,0, 40 °C) μετρώντας την απορρόφηση που δίνουν διαδοχικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος 2 mM.

2.4.2 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας ενζυμικής δράσης και προσδιορισμός θερμικής σταθερότητας

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των ανασυνδυασμένων κουτινασών έγινε μετρώντας την ενεργότητά τους σε ένα εύρος θερμοκρασιών (25 – 70 °C), πραγματοποιώντας αντιδράσεις υδρόλυσης του εστέρα *p*NPB για 10 min σε pH 6,0 (ρ.δ. κιτρικών φωσφορικών).

Η σταθερότητα των ενζύμων μελετήθηκε σε θερμοκρασίες 20 – 70 °C, όπου έγινε επώαση του ενζύμου (σε Tris-HCl pH 8,0) για 1 – 4 h και ύστερα μετρήθηκε η εναπομείνασα ενζυμική ενεργότητα.

2.4.3 Μελέτη συγγένειας υποστρωμάτων και Υπολογισμός κινητικών σταθερών

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις των ενζύμων σε ένα εύρος συγκεντρώσεων διαφορετικών συνθετικών εστέρων παρανιτροφαινόλης, που διέφεραν στο μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας (C_2 , C_4 , C_{12}). Από τα δεδομένα αυτών των αντιδράσεων υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές της εξίσωσης Michaelis-Menten, η οποία είναι της μορφής:

$$u = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

όπου u , ο ρυθμός της ενζυμικής αντίδρασης ($d[P]/dt$)

$[S]$, η συγκέντρωση του υποστρώματος

V_{max} (σταθερά), ο μέγιστος ρυθμός που επιτυγχάνεται από το σύστημα

K_m (σταθερά), η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί σε ρυθμό αντίδρασης ίσο με το ήμισι της V_{max}

Η προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση αυτή έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 της GraphPad Software, από όπου υπολογίστηκαν οι δύο σταθερές. Από τη σταθερά V_{max} μπορεί να υπολογιστεί και η σταθερά k_{cat} από την εξίσωση $V_{max} = k_{cat} \cdot [E]_0$, όπου $[E]_0$ είναι η ολική συγκέντρωση του ενζύμου. Η σταθερά k_{cat} δείχνει την ποσότητα του υποστρώματος που μετατρέπεται (στην προκειμένη περίπτωση, η ποσότητα της παρανιτροφαινόλης που απελευθερώνεται) από ένα μόριο ενζύμου στη μονάδα του χρόνου. Επίσης υπολογίζεται και ο λόγος των σταθερών k_{cat}/K_m , ο οποίος δείχνει πόσο αποτελεσματικά ένα ένζυμο μετατρέπει το υπόστρωμα σε προϊόν. Ενώ η σταθερά K_m δείχνει τη συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμα (αντίστροφη σχέση).

2.4.4 Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες

Η επίπτωση που μπορεί να έχουν οι οργανικοί διαλύτες στην ενεργότητα της κουτινάσης είναι μεγάλης σημασίας, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης (Speranza et al., 2013).

Η σταθερότητα των ανασυνδυασμένων ενζύμων σε οργανικούς διαλύτες μελετήθηκε σε διάλυμα με 80% v/v οργανικό διαλύτη και 20% v/v ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 8, το οποίο περιείχε την ποσότητα του ενζύμου. Η εναπομείνουσα ενζυμική ενεργότητα μετρήθηκε ύστερα από 20 h επώασης στους 20 °C στο υπόστρωμα pNPB.



Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι: μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, 1-επτανόλη, ισοοκτάνιο, δεκάνιο, τολουένιο, διμέθυλ σουλφοξείδιο (DMSO).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 3 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου *foxg_16606.3*

Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της αλληλούχησης του γονιδιώματος του *Fusarium oxysporum* (Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT, <http://www.broadinstitute.org>), το γονίδιο *foxg_16606.3* της προς μελέτη κουτινάσης FoCut16606 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 του γονιδιώματος του και συγκεκριμένα στη θέση 334934-337435 (Εικόνα 3.1A). Αποτελείται από 758 bp, συμπεριλαμβανομένου ενός εσωνίου μεγέθους 65 bp. Η κωδικοποιούσα αλληλουχία μήκους 230 αμινοξέων, εκκρίνεται εξωκυτταρικά στο φυσικό στέλεχος με τη βοήθεια μιας σηματοδοτικής αλληλουχίας μήκους 16 αμινοξέων (MKFSIISTLLAATASA) (Εικόνα 3.1B).



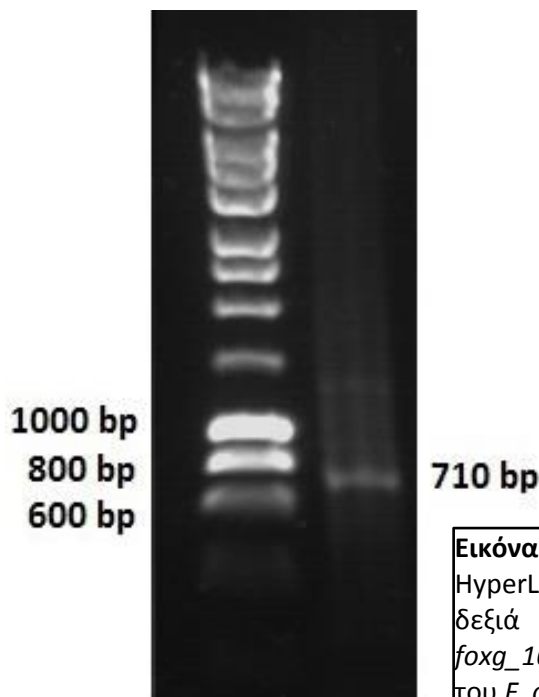
A) 5'   3'

B) MKFSIISTLLAATASALPAGQDAAALEARQLGGSITRNDLANGNSGSCPGVIFIYARGS
TESGNLGLTLPVASKLEAKYGKNGVWIQGVGGAYRATLGDNALPRGTSSAAIREML
GHFNDANQKCPDAVLIAGGYSQGAALAAASVTDVDAGIREKIAGVVLFGYTKNLQN
RGKIPSYPEDRTKVCNTGDLVCTGSLIVAAPHLAYQSAASGAAPEFLIQKADAAGAA

Εικόνα 3.1 A) Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου *foxg_16606.3* με το ένα εσώνιο του (λεπτή γαλάζια γραμμή) και **B)** η αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία με τη σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης (κόκκινο χρώμα)

Με σκοπό την ενίσχυση του γονιδίου αυτού, αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενωμικού DNA από τα κύτταρα του μεσόφιλου μύκητα *F. oxysporum* με βάση το πρωτόκολλο της Sigma-Aldrich για το GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Παράγραφος 2.2.1.1). Η βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από καλλιέργεια κυττάρων δύο ημερών σε υγρό θρεπτικό μέσο, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (Μουκούλη Μ., 2012).

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου (μαζί με το εσώνιο) ενισχύθηκε από το απομονωμένο γενωμικό DNA με τη μέθοδο της PCR, όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 2.2.2, χρησιμοποιώντας εκκινητές, οι οποίοι σχεδιάστηκαν ώστε να αποκλειστούν οι 48 πρώτες βάσεις του γονιδίου που αντιστοιχούν στην σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης και επιπλέον να εισαχθούν οι περιοχές πέψης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *ClaI* και *XbaI* στην αρχή και το τέλος του

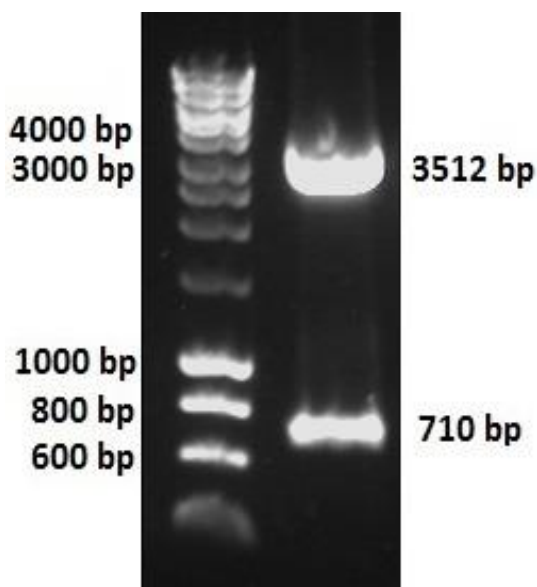


γονιδίου, αντίστοιχα (Πίνακας 2.3). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολυμεράσης Vent® (New England Biolabs® Inc., Η.Π.Α.) στις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 2.6. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση δείγματος (1/10 του όγκου της αντίδρασης) σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) (Εικόνα 3.2).

Εικόνα 3.2 Πήκτωμα αγαρόζης. Αριστερά HyperLadder™ I: 200-10,000 bp και δεξιά το προϊόν της PCR, το γονίδιο *foxg_16606.3* (710 bp) από το γονιδίωμα του *F. oxysporum*

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του επιθυμητού τμήματος DNA από πήκτωμα, όπου ηλεκτροφορήθηκε ο υπόλοιπος όγκος της αντίδρασης, με τη χρήση του προπαρασκευασμένου αντιδραστήριου NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Γερμανία).

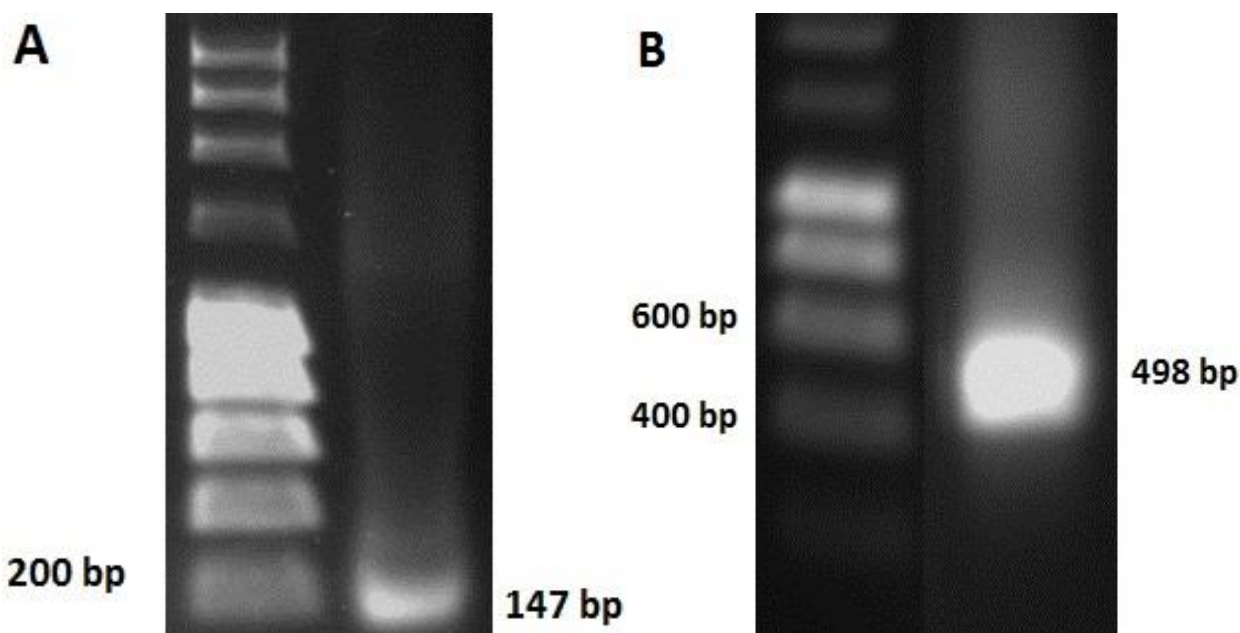
Το τμήμα αυτό του DNA, το οποίο έφερε ισοτελή άκρα, εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt (Invitrogen Η.Π.Α.) με αντίδραση συνένωσης (Παράγραφος 2.2.4) και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο κλωνοποιήθηκε σε κύτταρα *E. coli* TOP10.



Εικόνα 3.3 Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα στον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt (3512 bp) με το γονίδιο *foxg_16606.3* (710 bp)

Η επιλογή των μετασηματισμένων βακτηρίων έγινε με τη χρήση αντιβιοτικού καναμικίνη, από τα οποία, στη συνέχεια, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA με το πρωτόκολλο του GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.). Η επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού του πλασμιδιακού φορέα πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα *ClaI* και *XbaI* (Εικόνα 3.3). Στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια πραγματοποιήθηκε και ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από την εταιρεία VBC-Biotech Services GmbH (Αυστρία).

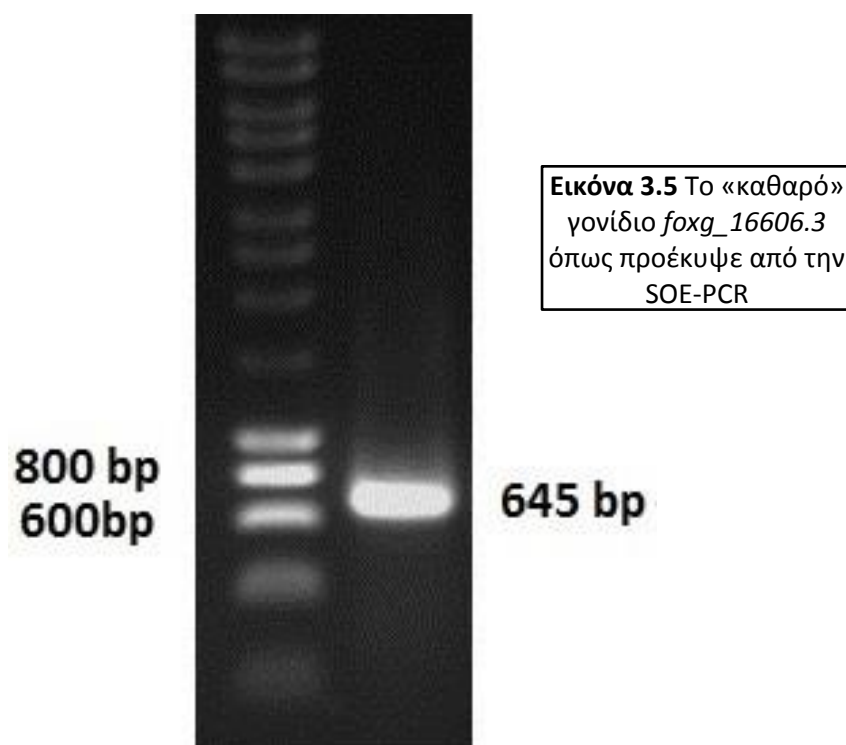
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση του εσωνίου του (65 bp) με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εκτομή τμημάτων DNA, μέσω επικάλυψης εκκινητών (Splicing by Overlapping Extension PCR, SOE-PCR ή *in vitro* μάτισμα), όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.2. Έτσι, χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές (Πίνακας 2.6), απομονώθηκαν τα δύο εξώνια του γονιδίου



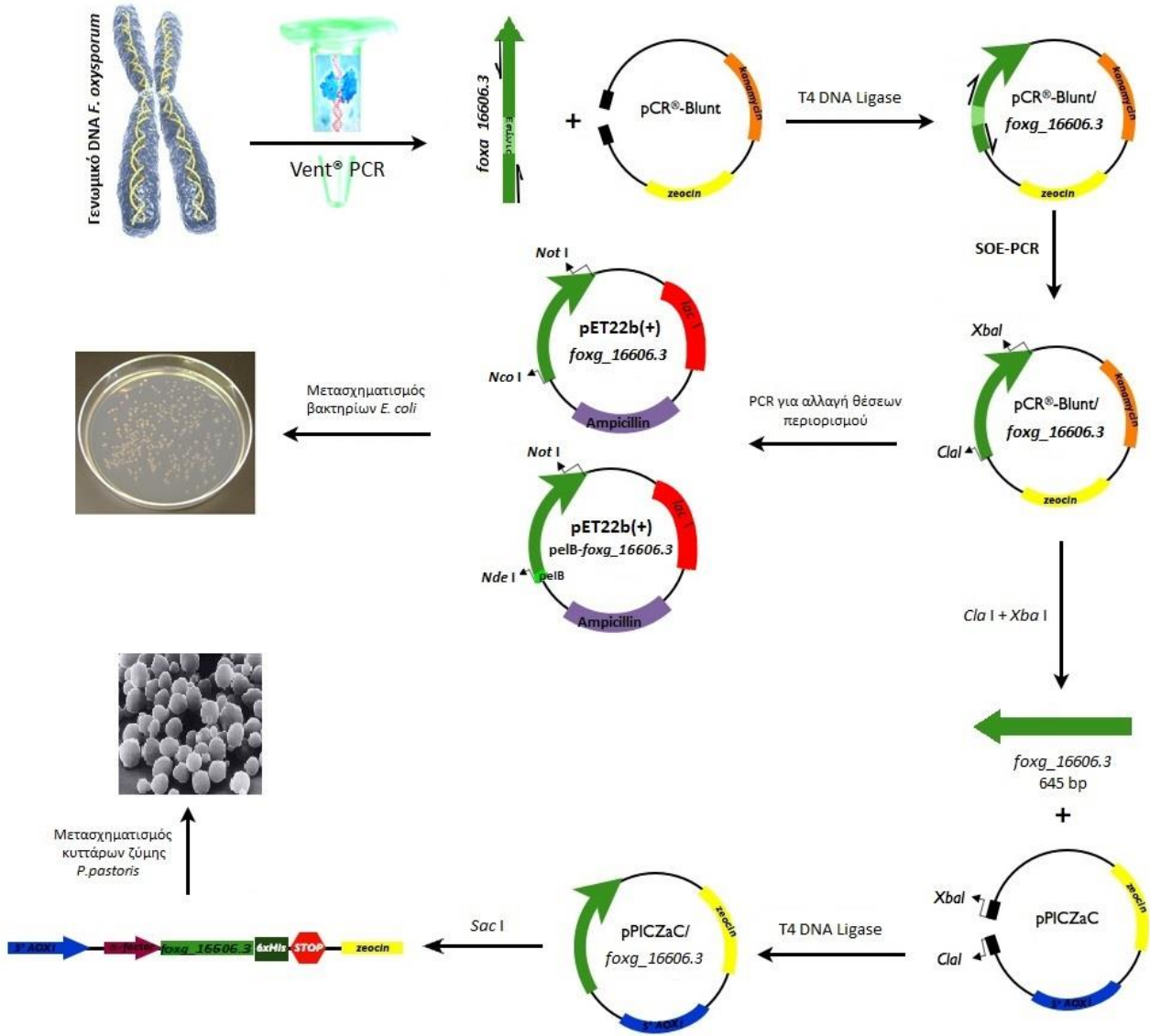
Εικόνα 3.4 Gel αγαρόζης που παρουσιάζουν τα εξώνια του *foxg_16606.3*, που προέκυψαν από τις αντίστοιχες αντιδράσεις PCR

(Εικόνες 3.4A και 3.4B), ενώ στη συνέχεια συνενώθηκαν με άλλη PCR αντίδραση.

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με πριν, έγινε επιβεβαίωση του προϊόντος της SOE-PCR (645 bp) σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v), απομόνωση του DNA αυτού (Εικόνα 3.5), ανασυνδυασμός πλασμιδιακού φορέα pCR® Blunt, μετασχηματισμός *E. coli* TOP10, επιλογή των μετασχηματισμένων και έλεγχος των πλασμιδίων με πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

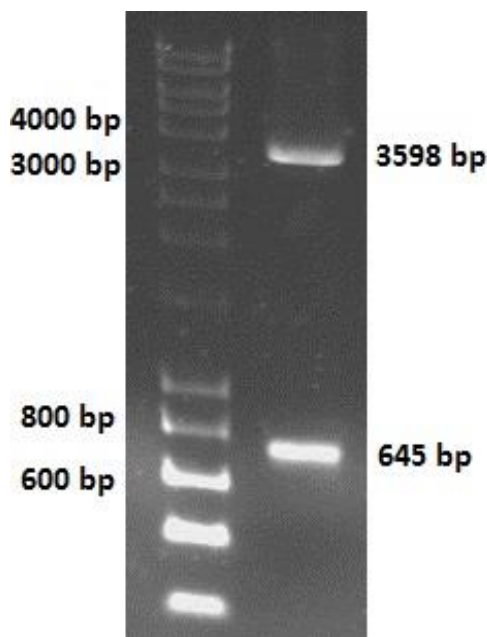


Συνολικά η διαδικασία κλωνοποίησης του γονιδίου *foxg_16606.3* τόσο στην *P. pastoris* όσο και στα *E. coli* περιγράφεται σχηματικά στην Εικόνα 3.6.



Εικόνα 3.6 Διαδικασία κατασκευής των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων έκφρασης του ενζύμου FoCut16606, *pPICZαC* και *pET22b(+)* για τη ζύμη *P. pastoris* και τα βακτήρια *E. coli*

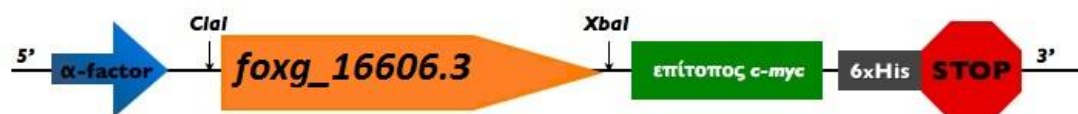
3.1 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου *foxg_16606.3* στην *P. pastoris*



Εικόνα 3.8 Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα στον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα pPICZαC (3598 bp) με το γονίδιο *foxg_16606.3* (645 bp)

Τα επιβεβαιωμένα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCR® Blunt-*foxg_16606.3* υπέστησαν πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *ClaI* και *XbaI* για 3 h και το προκύπτον τμήμα DNA (γονίδιο *foxg_16606.3*) απομονώθηκε από γέλη αгарόζης υψηλής καθαρότητας Seakem® Gold Agarose (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Δανία). Το γονίδιο αυτό, που πλέον είχε κολλώδη μονόκλινα άκρα, συνενώθηκε με τον πλασμιδιακό φορέα pPICZαC, που έφερε τα αντίστοιχα συμπληρωματικά άκρα, με τη δράση του ενζύμου T4 DNA Ligase (Πίνακας 2.8). Ο πλασμιδιακός αυτός φορέας, όπως έχει ήδη αναφερθεί, περιέχει τον ισχυρά ρυθμιζόμενο υποκινητή *AOX1* και τον παράγοντα έκκρισης της ζύμης *S. cerevisiae*, α -factor (Εικόνα 2.2). Το επιβεβαιωμένα με

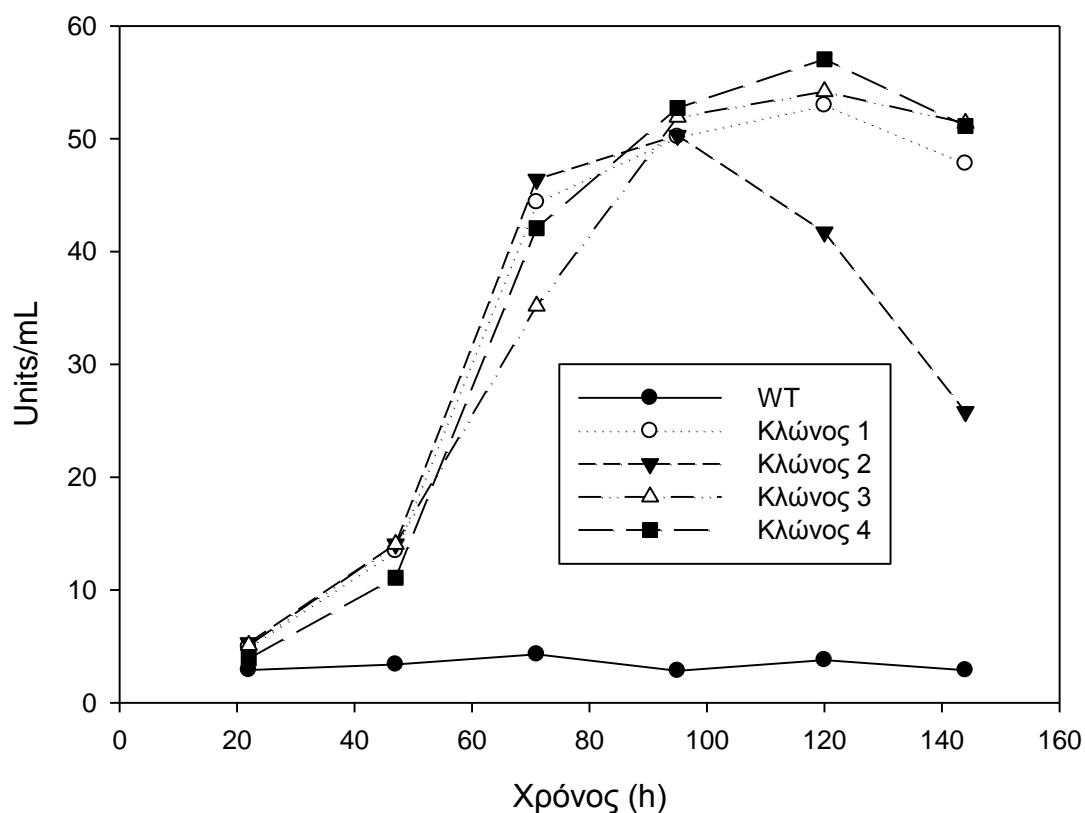
πέψη (Εικόνα 3.7) ανασυνδυασμένο, λοιπόν, πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των βακτηρίων *E. coli* TOP10F', τα οποία επιλέχθηκαν με το αντιβιοτικό ζεοσίνη και το πλασμιδιακό DNA των οποίων, αφού απομονώθηκε, υπέστη πέψη σε ένα σημείο (δηλαδή γραμμικοποίηση) με την περιοριστική ενδονουκλεάση *SacI*. Το πλέον γραμμικοποιημένο πλασμίδιο (Εικόνα 3.8), απομονώθηκε από την αντίδραση πέψης με το πρωτόκολλο του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) με τη διαφορά ότι στο τελικό στάδιο έκλουσης του DNA χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο αποστειρωμένο νερό αντί για το αντίστοιχο διάλυμα έκλουσης, προκειμένου να αποφευχθεί η παρουσία αλάτων στο διάλυμα του γραμμικοποιημένου φορέα. Ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων της ζύμης *P. pastoris* με ποσότητα του παραπάνω DNA ίση με 5-10 μ g (30 μ L) και επώαση των ανασυνδυασμένων, τα οποία επιλέχθηκαν από την ανθεκτικότητά τους στη ζεοσίνη, στους 30 °C για 3 ημέρες (Παράγραφος 2.2.7.5).



Εικόνα 3.7 Σχηματική απεικόνιση του γραμμικοποιημένου ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pPICZαC που ενσωματώνεται στο γονιδίωμα της ζύμης

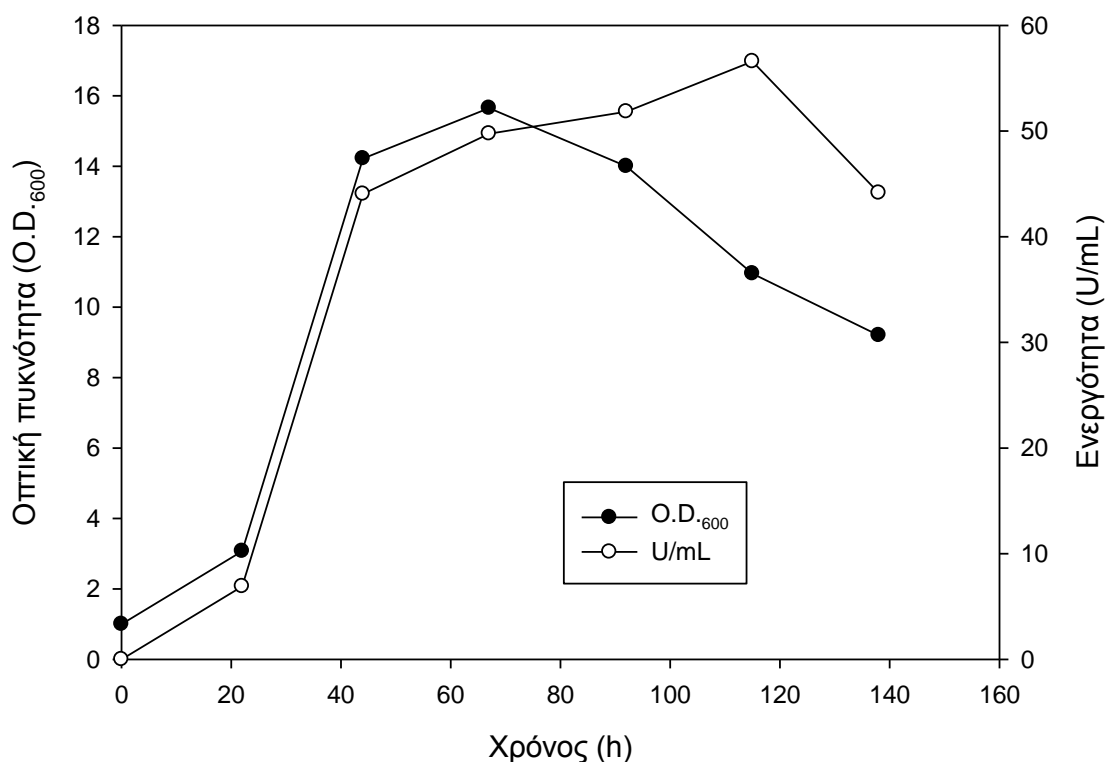
3.1.1 Επιλογή κλώνου για έκφραση και παραγωγή της FoCut16606

Για την επιλογή του καλύτερου κλώνου, από την άποψη παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος 5 μετασχηματισμένων αποικιών της ζύμης, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό ισάριθμων υγρών καλλιέργειών μικρής κλίμακας διάρκειας 7 ημερών (Παράγραφος 2.3.1.1). Στις καλλιέργειες αυτές, η επαγωγή της έκφρασης γινόταν με την προσθήκη 0,5% (v/v) μεθανόλης κάθε 24 h, οπότε και λαμβάνονταν δείγματα από το υγρό καλλιέργειας. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιούνταν μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD600) για τον προσδιορισμό της κυτταρικής συγκέντρωσης, όπως επίσης και προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας κουτινάσης σε υπόστρωμα βουτυρικό εστέρα της παρανιτροφαινόλης (Παράγραφος 2.4.1). Στο παρακάτω διάγραμμα (3.1) παρουσιάζεται η παραγωγή ενζύμου, σε Units/mL, για 4 διαφορετικούς κλώνους της *P. pastoris* συναρτήσει του χρόνου. Ως αναφορά για την ενζυμική ενεργότητα έχει χρησιμοποιηθεί υγρό καλλιέργειας του φυσικού στελέχους της *P. pastoris* (WT).



Διάγραμμα 3.1 Ενζυμική ενεργότητα κουτινάσης για διαφορετικούς κλώνους της ζύμης *P. pastoris*, καθώς και για το φυσικό στέλεχος (WT) συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας

Το στέλεχος της ζύμης (#4) το οποίο, συγκριτικά, εξέφρασε τη μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης (σε U/mL), επιλέχθηκε για την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα (2 L) της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Στο Διάγραμμα 3.2 φαίνεται η ενεργότητα κουτινάσης σε συνάρτηση με τον χρόνο καλλιέργειας και την αντίστοιχη κυτταρική ανάπτυξη στο υγρό καλλιέργειας (400 mL) μιας φιάλης 2 L. Το μέγιστο της ενζυμικής ενεργότητας παρατηρήθηκε την 5^η ημέρα και ήταν 56,6 U/mL.

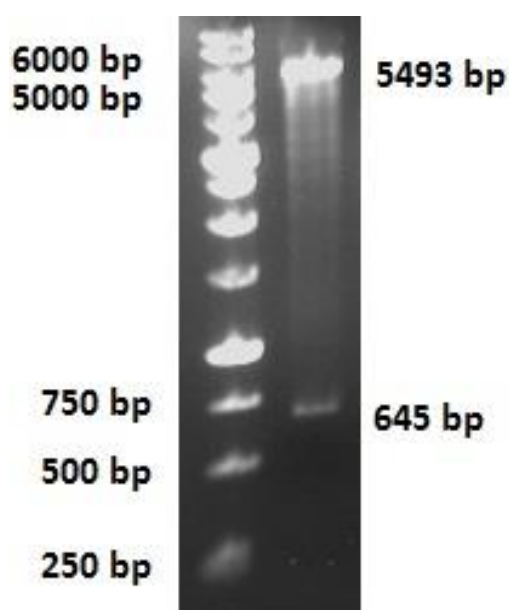


Διάγραμμα 3.2 Τυπικό διάγραμμα παραγωγής της FoCut16606 από την *P. pastoris* συναρτήσει του χρόνου

Το υγρό της καλλιέργειας αυτής, αφού φυγοκεντρήθηκε (1500xg, 10 min, 4 °C) για την απομάκρυνση των κυττάρων, διηθήθηκε υπό, για απομάκρυνση τυχόν κυτταρικών θραυσμάτων και συμπυκνώθηκε μέχρι όγκο ~50 mL, χρησιμοποιώντας συσκευή υπερδιήθησης (μεμβράνη με cut off 10 kDa).

3.2 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου *foxg_16606.3* στα *E. coli*

Με DNA εκμαγείο τον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt-*foxg_16606.3*, ο οποίος είχε υποστεί ανάλυση με πέψη και ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR, με σκοπό την αλλαγή των περιοχών πέψης εκατέρωθεν του γονιδίου, ώστε να είναι δυνατή η συνένωσή του με τον πλασμιδιακό φορέα pET22b(+). Η περιοχή πέψης του ενζύμου *ClaI*, στη μία περίπτωση αντικαταστάθηκε με την αλληλουχία που αναγνωρίζει το *NdeI*, ενώ στην άλλη με την αλληλουχία του *NcoI*, ενώ και στις δύο περιπτώσεις η αλληλουχία του *NotI* αντικατέστησε αυτήν του *XbaI*. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ζεύγη περιοριστικών ενζύμων είναι για να αποκλειστεί με το ένα ζεύγος (*NotI*166-*NdeI*288) η σηματοδοτική αλληλουχία *relB* (224-289) του pET22b(+), ενώ με την άλλη (*NotI*166-*NcoI*220) να διατηρηθεί, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.3. Με αυτόν τον τρόπο κατασκευάστηκαν δύο διαφορετικά ανασυνδυασμένα πλασμίδια, pET22b(+)-*foxg_16606.3* και pET22b(+)*relB-foxg_16606.3*, τα οποία περιείχαν το ίδιο γονίδιο *foxg_16606.3* μόνο που στο ένα συνεκφραζόταν με την σηματοδοτική



Εικόνα 3.9 Gel αγαρόζης από ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα στον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα pET22b(+) (5493 bp) με το γονίδιο *foxg_16606.3* (645 bp)

αλληλουχία *relB*. Στην Εικόνα 3.9 φαίνεται το gel αγαρόζης που επιβεβαιώνει τη συνένωση του πλασμιδίου pET22b(+) με το γονίδιο *foxg_16606.3* χωρίς την αλληλουχία *relB*, αντίστοιχο είναι όμως και το gel για το δεύτερο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET22b(+)*relB-foxg_16606.3*. Τα δύο αυτά πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασηματισμό δύο διαφορετικών βακτηριακών στελεχών *E. coli*, των BL21 (DE3) και Origami2 (DE3), με τεχνικές όπως αναφέρονται και παραπάνω, τα οποία επιλέχθηκαν με την ανθεκτικότητα που έδειξαν στο αντιβιοτικό αμικυλλίνη. Όπως έχει αναφερθεί και στην Παράγραφο 2.1.5.3 ο πλασμιδιακός φορέας pET22b(+) περιέχει πριν το σημείο του γονιδίου ενδιαφέροντος, το οπερόνιο

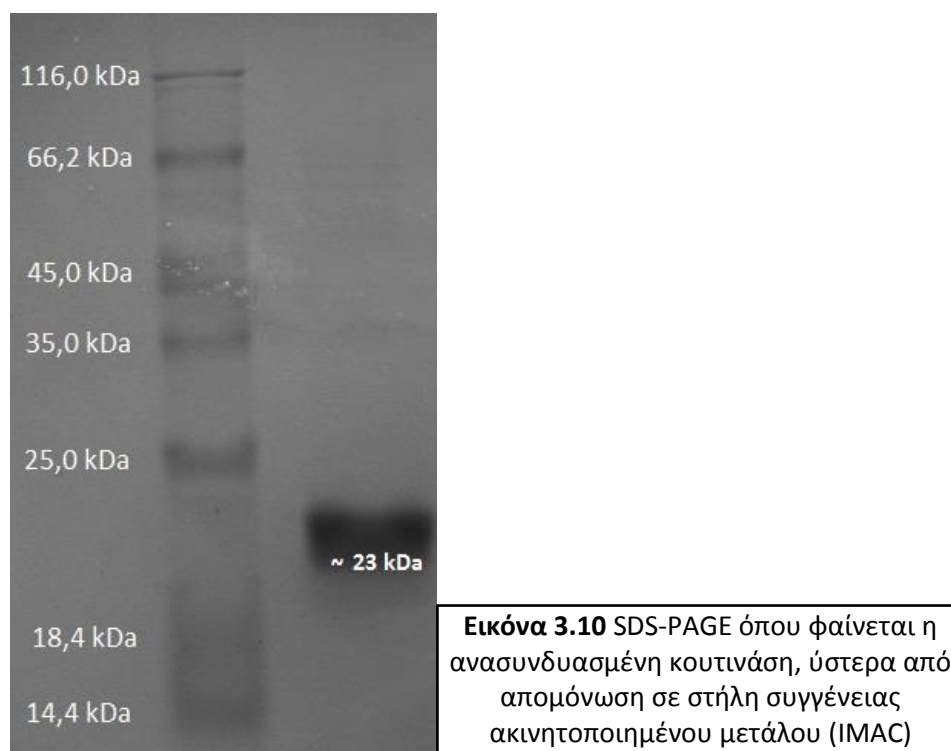
lac, το οποίο λειτουργεί ως προαγωγός της έκφρασης και ενεργοποιείται με την παρουσία του IPTG, ενός αναλόγου της λακτόζης. Επίσης, να σημειωθεί ότι η σηματοδοτική αλληλουχία *relB* έχει τη δυνατότητα να μεταφέρει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη στο περίπλασμα του κυττάρου, όπου και κόβεται από ειδικό ένζυμο.

3.2.1 Παραγωγή και καθαρισμός της FoCut16606 από τα *E. coli*

Η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 37 και 16 °C. Οι συνθήκες καλλιέργειας περιγράφονται αναλυτικότερα στην Παράγραφο 2.3.2.1.

Ύστερα από το πέρας του χρόνου καλλιέργειας (16-20 h), πραγματοποιήθηκε σε κάθε καλλιέργεια φυγοκέντρηση για το διαχωρισμό των κυττάρων και του εξωκυτταρικού υγρού. Το μεν εξωκυτταρικό υγρό συμπυκνώθηκε με υπερδιήθηση σε όγκο ~20 mL και εξισορροπήθηκε σε διάλυμα Talon (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl). Το δε κυτταρικό υπόλειμμα, που προέκυψε από την φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκε σε 40 mL διάλυμα Talon και υπέστη ρήξη με υπερήχους (5 x 60 s, 50% Duty Cycle, ένταση 7) όπως έχει περιγραφεί ήδη (Παράγραφος 2.3.2.2). Από τα πρωτεϊνικά αυτά διαλύματα απομονώθηκε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, όπου υπήρχε, με στήλη βαρύτητας ακινητοποιημένου μετάλλου (Παράγραφος 2.3.2.2). Επίσης, από τα κυτταρικά υπολείμματα απομονώθηκε η ποσότητα πρωτεΐνης που είχε εγκλειστεί σε inclusion bodies μέσα στο κύτταρο με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2.2.

Στην παρακάτω Εικόνα παρουσιάζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) με το απομονωμένο ανασυνδυασμένο ένζυμο.



3.2.2 Μελέτη τοποθέτησης ανασυνδυασμένης κουτινάσης στον κυτταρικό χώρο

Κατά την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτηριακό ξενιστή εντοπίστηκε ενεργότητα κουτινάσης τόσο εξωκυτταρικά όσο και εσωκυτταρικά. Στον εσωκυτταρικό χώρο η κουτινάση ήταν είτε σε διαλυμένη μορφή, είτε «πακεταρισμένη» σε έγκλειστα σωματίδια (inclusion bodies). Τα inclusion bodies είναι πιθανόν ένας τρόπος προστασίας του κυττάρου από την ανεξέλεγκτη παραγωγή της ξένης πρωτεΐνης. Έτσι τις απομονώνει από το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα. Με αυτόν τον τρόπο όμως χαλάει η αναδίπλωση της πρωτεΐνης, οπότε χάνεται και η λειτουργικότητά της. Για να ανακτηθεί αυτή η ποσότητα ενζύμου, ακολουθείται μια διαδικασία αποδιάταξής του (ώστε να απομακρυνθεί το ένα πρωτεϊνικό μόριο από το άλλο) και επαναδίπλωσής του, ώστε να καταστεί και πάλι λειτουργικό.

Στον παρακάτω Πίνακα (3.1) παρουσιάζονται τα συνολικά Units ανασυνδυασμένου ενζύμου που παρήχθησαν από την κάθε διαφορετική παραγωγή (εσωκυτταρική ή περιπλαστική) στα δύο διαφορετικά στελέχη *E. coli* (BL21 και Origami2) σε 2 διαφορετικές θερμοκρασίες (37 και 16 °C) σε καλλιέργειες όγκου 40 mL. Επίσης παρουσιάζονται και τα ποσοστά της κουτινάσης που εντοπίστηκαν σε κάθε ένα από τα 3 διαφορετικά κυτταρικά κλάσματα που απομονώθηκαν.

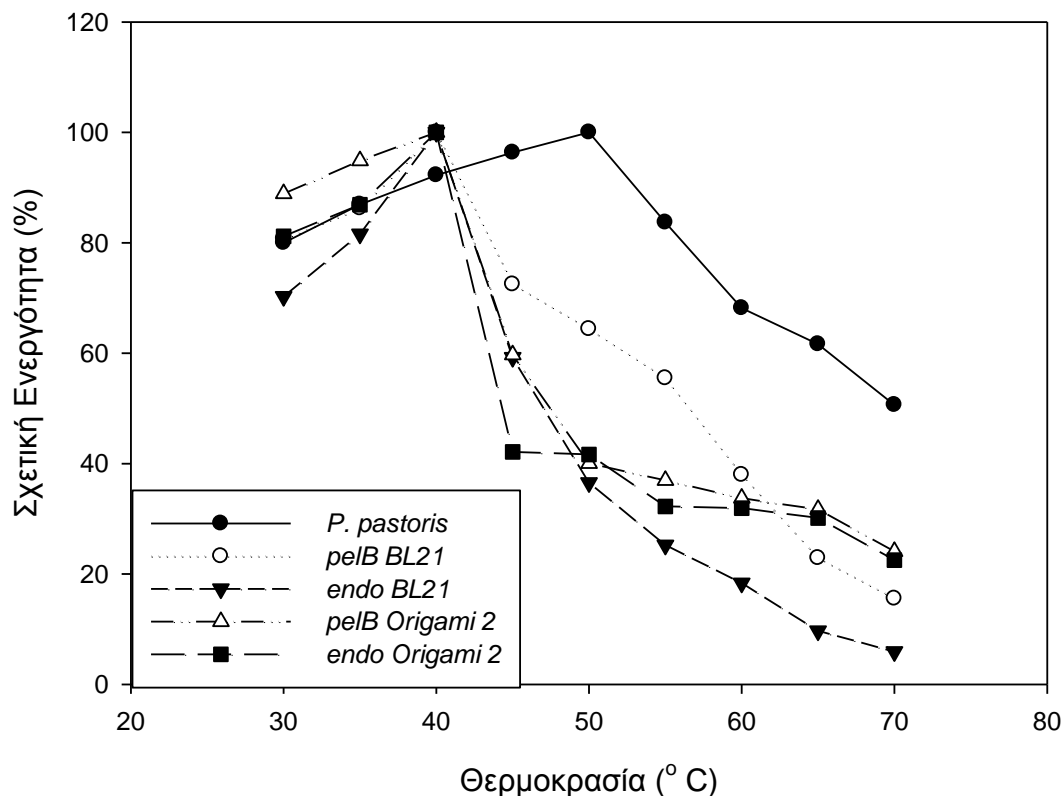
Πίνακας 3.1 Ποσότητες ανασυνδυασμένου ενζύμου (Units) για τους διαφορετικούς τρόπους παραγωγής στα δύο βακτηριακά στελέχη BL21 και Origami2 από καλλιέργειες 40 mL

Ξενιστής	Τοποθεσία Έκφρασης	Θερμοκρασία Έκφρασης (°C)	Units	Ποσοστό επί της συνολικής ποσότητας (%)		
			Συνολική Ποσότητα	Εξωκυτταρικό	Εσωκυτταρικό	Έγκλειστα Σωματίδια
BL21	Κυτταρόπλασμα	37	740305	1	0	99
		16	80604	0,5	98,5	1
	Περίπλασμα	37	252522	63,5	1,5	35
		16	4546142	53,5	43,5	3
Origami2	Κυτταρόπλασμα	37	131352	13	4	83
		16	387578	0,2	99,5	0,2
	Περίπλασμα	37	73843	25	4	71
		16	2003762	0,5	98,5	1

Κεφάλαιο 4 Χαρακτηρισμός ανασυνδυασμένων κουτινασών

4.1 Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης των ενζύμων

Ο προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης των ανασυνδυασμένων κουτινασών έγινε μετρώντας την ενεργότητά τους στο θερμοκρασιακό εύρος 30–70 °C, πραγματοποιώντας αντιδράσεις υδρόλυσης του εστέρα *p*NPB για 10 min σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών φωσφορικών pH 6,0. Με αυτόν τον τρόπο κατασκευάστηκε διάγραμμα (4.1) σχετικής ενεργότητας (%) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, θεωρώντας το 100% τη μέγιστη ενεργότητα, δηλαδή την ενεργότητα στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης.

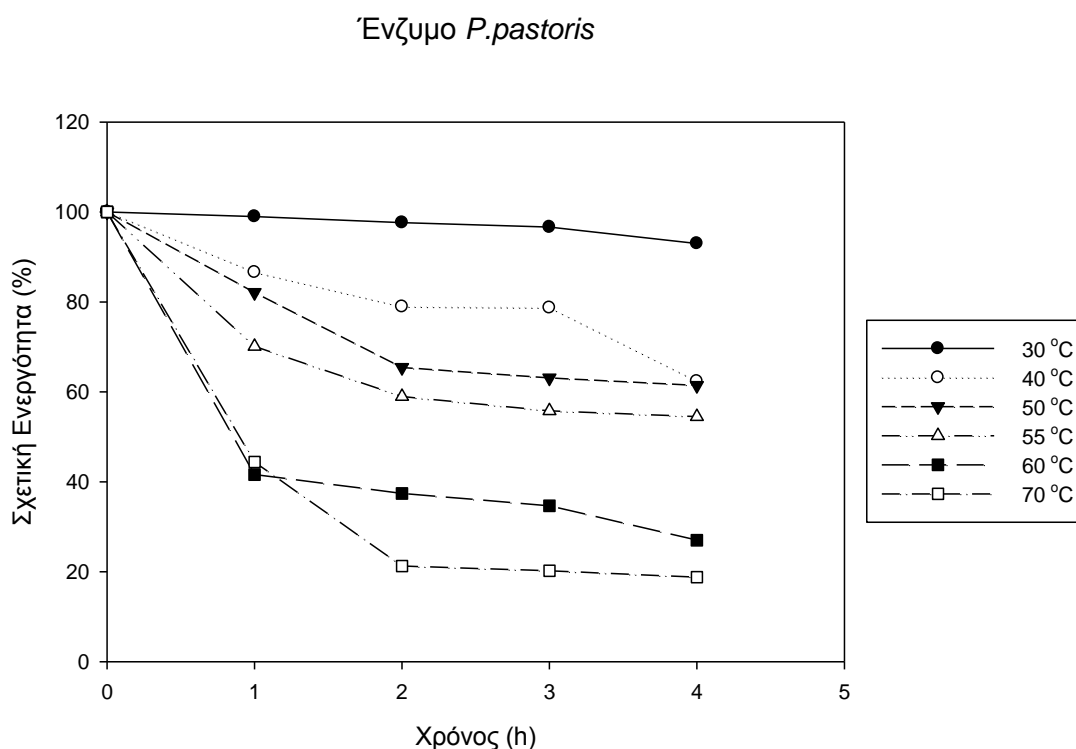


Διάγραμμα 4.1 Σχετική ενεργότητα των ενζύμων προερχόμενων από την *P. pastoris* και τα βακτηριακά στελέχη BL21 και Origami 2 για ένα εύρος θερμοκρασιών

Όπως παρατηρείται, η βέλτιστη θερμοκρασία για τα ενζυμικά προϊόντα των *E. coli* είναι οι 40 °C, ενώ για την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη της ζύμης *P. pastoris*, η βέλτιστη θερμοκρασία είναι μεγαλύτερη κατά 10 °C. Επίσης παρατηρείται ότι η πτώση της σχετικής ενεργότητας για το εσωκυτταρικό προϊόν των *E. coli* γίνεται εντονότερα από ότι για το αντίστοιχο της περιπλασμικής (με *pelB*) έκφρασης.

4.2 Μελέτη θερμικής σταθερότητας ενζύμων

Η μελέτη της σταθερότητας των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασίες 20–70 °C, όπου έγινε επώαση του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 8,0 για 1–4 h και στη συνέχεια μετρήθηκε η εναπομείνασα ενζυμική ενεργότητα με την προαναφερθείσα αντίδραση (Παράγραφος 2.4.1). Στο επόμενο διάγραμμα παρουσιάζεται η μείωση της εναπομείνασας ενεργότητας της ανασυνδυασμένης κουτινάσης από την *P. pastoris* σε θερμοκρασίες 30-70.

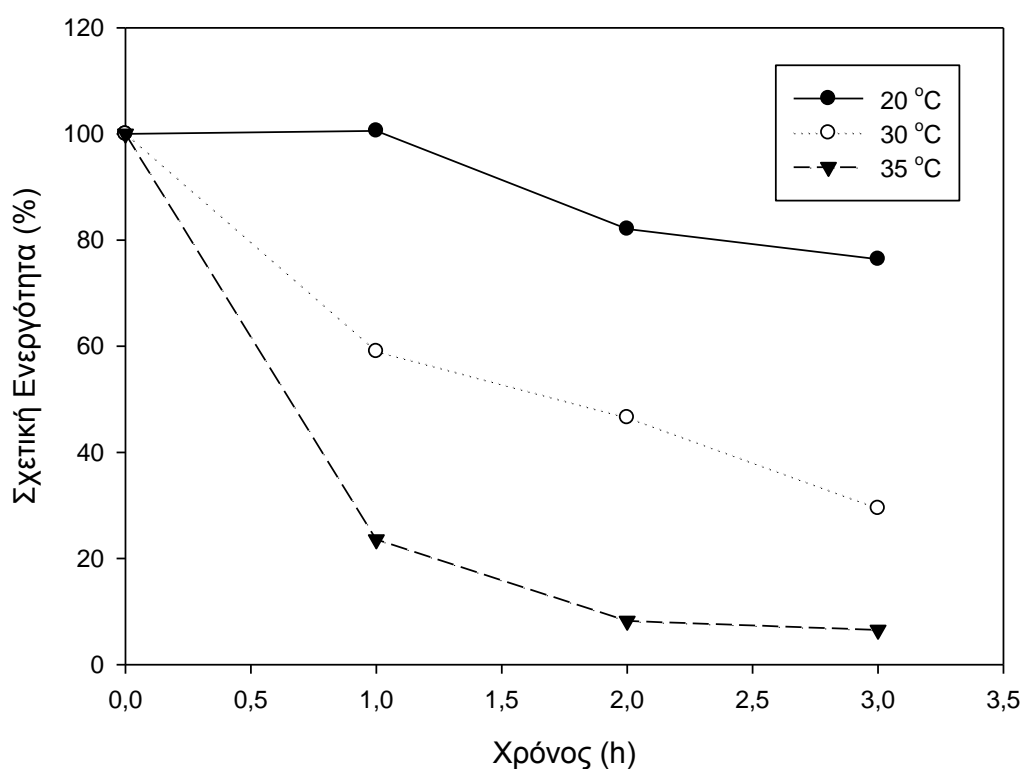


Διάγραμμα 4.2 Σχετική ενεργότητα για το προϊόν της *P. pastoris* ύστερα από επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες για διάφορες χρονικές περιόδους

Όπως παρατηρείται, το προϊόν της ζύμης, στους 30 °C είναι πολύ σταθερό αφού χάνει μόνο 7% της αρχικής του ενεργότητας ύστερα από 4 h επώαση, ενώ παραμένει και αρκετά σταθερό στους 40 και 50 °C με απώλεια μικρότερη του 40% της αρχικής ενεργότητας ύστερα από 4 h. Αντίθετα στους 60 και 70 °C χάνει ήδη από την 1^η ώρα περίπου το 60% της αρχικής ενεργότητας.

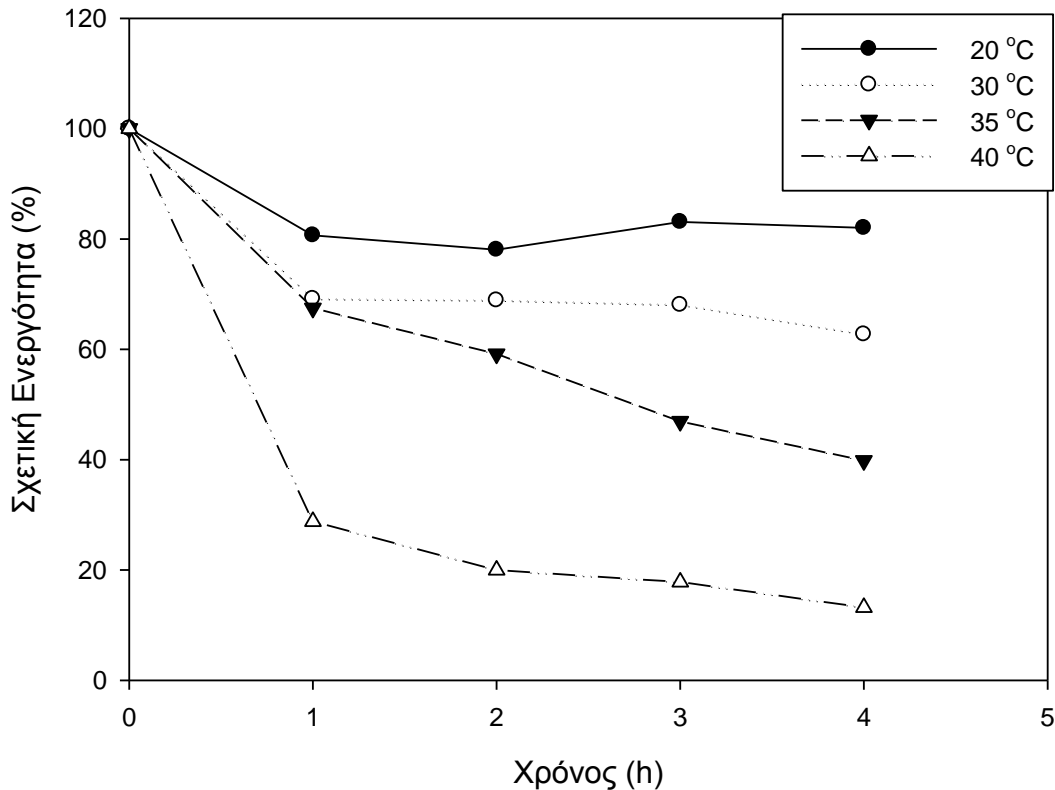
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα για τα προϊόντα των *E. coli* BL21 και Origami2, στη μία περίπτωση περιπλαστικό προϊόν (Διαγράμματα 4.3 και 4.4) με τη χρήση της αλληλουχίας *relB* και στην άλλη εσωκυτταρικά (Διαγράμματα 4.5 και 4.6) χωρίς τη μεσολάβηση της αλληλουχίας αυτής.

Περιπλαστικό ένζυμο BL21



Διάγραμμα 4.3 Σχετική ενεργότητα για το εξωκυτταρικό προϊόν των BL21 με τη μεσολάβηση του *relB* ύστερα από επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες για διάφορες χρονικές περιόδους

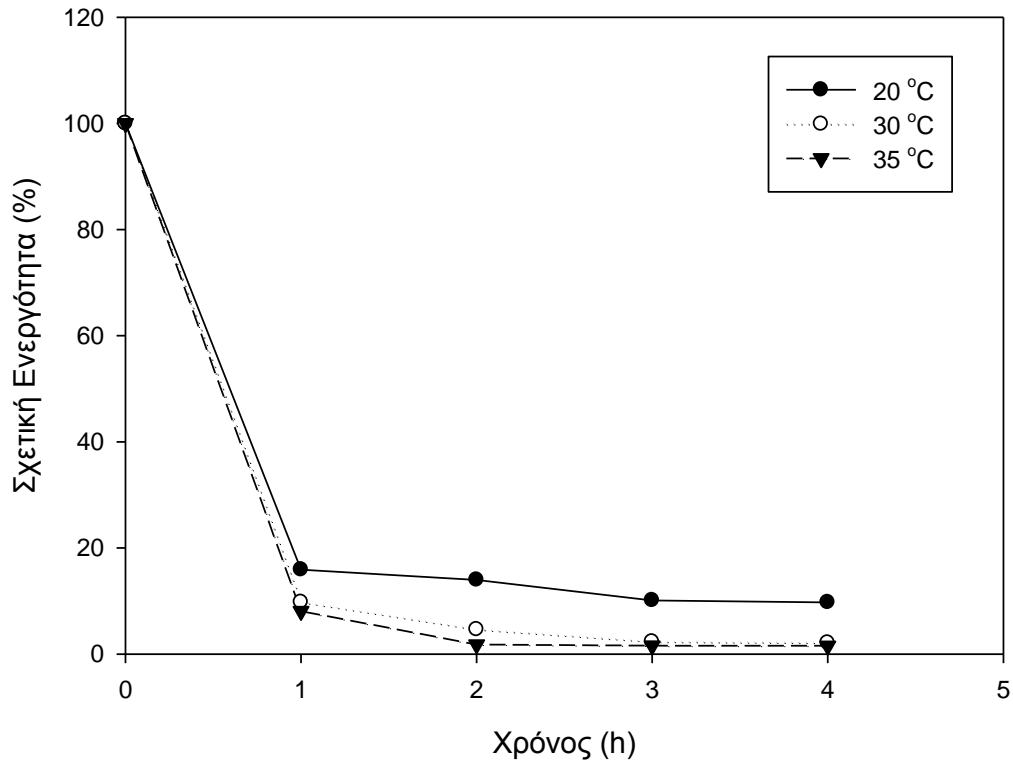
Περιπλαστικό ένζυμο Origami 2



Διάγραμμα 4.4 Σχετική ενεργότητα για το εξωκυτταρικό προϊόν των Origami 2 με τη μεσολάβηση του relB ύστερα από επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες για διάφορες χρονικές περιόδους

Το προϊόν των BL21 που είχε παραχθεί στον περιπλαστικό χώρο, παρουσιάζει περιορισμένη σταθερότητα στη θερμοκρασία. Μόνο στους 20 °C παραμένει σταθερό για 1 h και χάνει περίπου το 25% της αρχικής του ενεργότητας στις 3 h, ενώ για επώαση στους 30 και 35 °C χάνει ήδη από την 1^η ώρα 40 και 87%, αντίστοιχα. Μάλιστα στους 35 °C για 3 h επώαση απομένει μόνο το 6,5% της αρχικής ενεργότητας. Αντίθετα, το αντίστοιχο προϊόν των Origami2, εμφανίζει συγκριτικά αυξημένη σταθερότητα στη θερμοκρασία, παραμένοντας και αυτό σχεδόν σταθερό στους 20 °C (απώλειες κοντά στο 20%), και χάνοντας το 60% της αρχικής του ενεργότητας ύστερα από 4 h επώαση στους 35 °C.

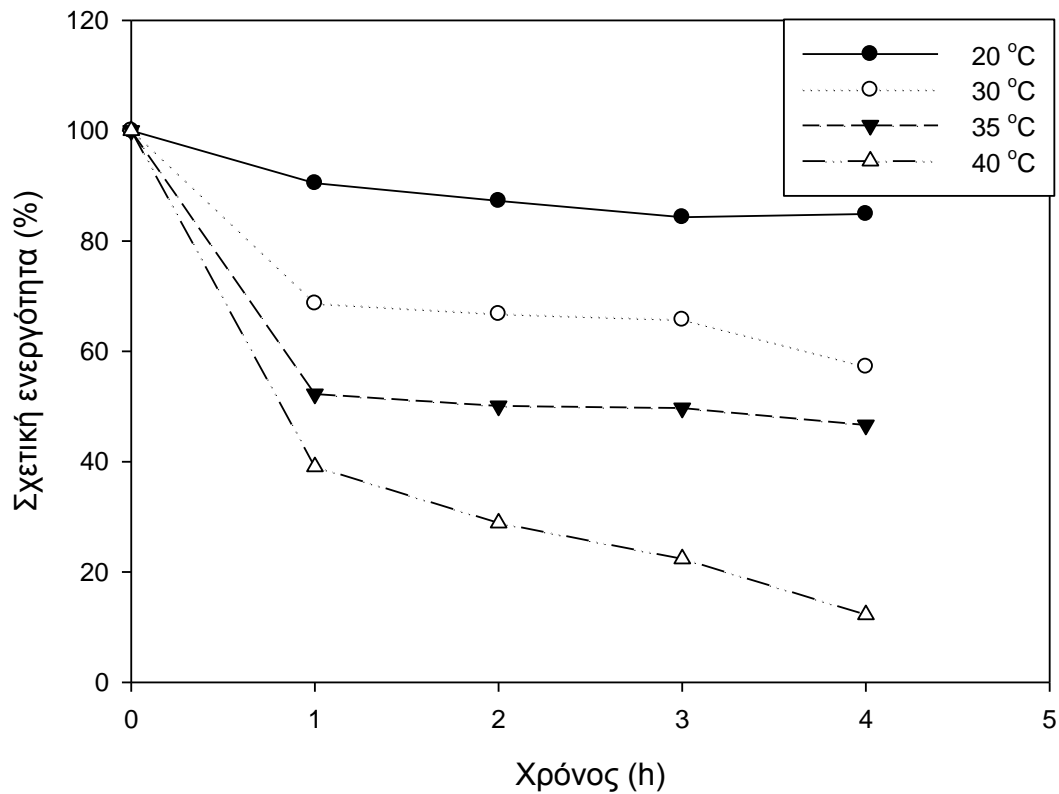
Εσωκυτταρικό ένζυμο BL21



Διάγραμμα 4.5 Σχετική ενεργότητα για το εσωκυτταρικό προϊόν των BL21 χωρίς τη μεσολάβηση του *pelB* ύστερα από επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες για διάφορες χρονικές περιόδους

Όπως φαίνεται, το εσωκυτταρικό ανασυνδυασμένο ένζυμο των BL21 είναι ακόμα ασταθέστερο από το αντίστοιχο περιπλασματικό, χάνοντας ήδη από την 1^η ώρα στους 20 °C το 85% της αρχικής ενεργότητας, καταλήγοντας ύστερα από 4 h μόνο στο 10% της αρχικής. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες η απώλεια είναι ακόμα μεγαλύτερη ήδη από την 1^η ώρα (πάνω από 90%).

Εσωκυτταρικό ένζυμο Origami 2



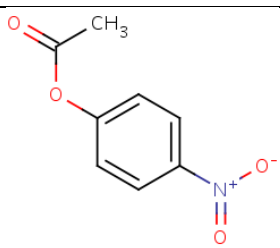
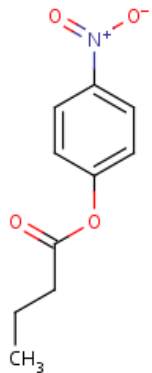
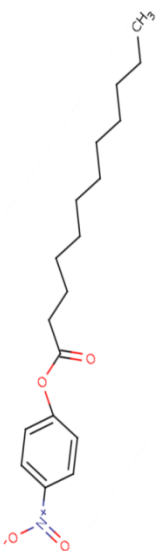
Διάγραμμα 4.6 Σχετική ενεργότητα για το εσωκυτταρικό προϊόν των Origami2 χωρίς τη μεσολάβηση του *relB* ύστερα από επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες για διάφορες χρονικές περιόδους

Αντίθετα από το ένζυμο των BL21, το αντίστοιχο προϊόν του βακτηριακού στελέχους Origami2, έχει απώλειες ενεργότητας στους 20 °C γύρω στο 15%, ενώ στους 30 και 35 °C δείχνει κάποια σταθερότητα με απώλειες μικρότερες από 40 και 60% αντίστοιχα, μέχρι την 4^η ώρα επώασης.

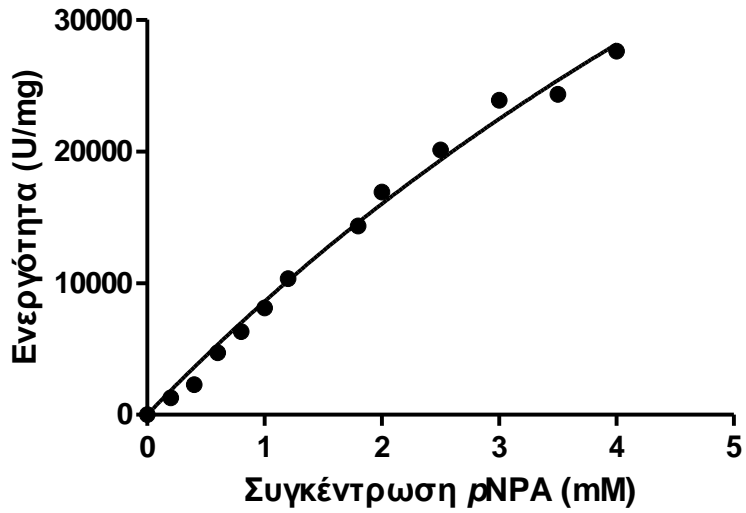
4.3 Κινητικές μελέτες δράσης των ανασυνδυασμένων κουτινασών

Για τις κινητικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν τα καθαρά ενζυμικά προϊόντα των στελεχών *E. coli* Origami 2 (εσωκυτταρική έκφραση – endo-Cut) και BL21 (περιπλασματική και εσωκυτταρική έκφραση – relB-Cut και endo-Cut, αντίστοιχα). Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις υδρόλυσης εστέρων λιπαρών οξέων διαφορετικών ανθρακικών αλυσίδων (C_2 , C_4 , C_{12}) σε ένα εύρος συγκεντρώσεων με τα 3 διαφορετικά ένζυμα. Η προσαρμογή των δεδομένων των αντιδράσεων στην εξίσωση Michaelis-Menten και ο υπολογισμός των κινητικών σταθερών έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 της GraphPad Software και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1. Έπειτα, παρουσιάζονται και τα διαγράμματα με τα δεδομένα των αντιδράσεων (ενεργότητα/συγκέντρωση υποστρώματος) του κάθε ενζύμου με το αντίστοιχο υπόστρωμα, στα οποία έχει γίνει προσαρμογή της Michaelis-Menten (Διαγράμματα 4.7-4.15).

Πίνακας 4.1 Κινητικές σταθερές 3 διαφορετικών ανασυνδυασμένων κουτινασών στα 3 διαφορετικά υποστρώματα

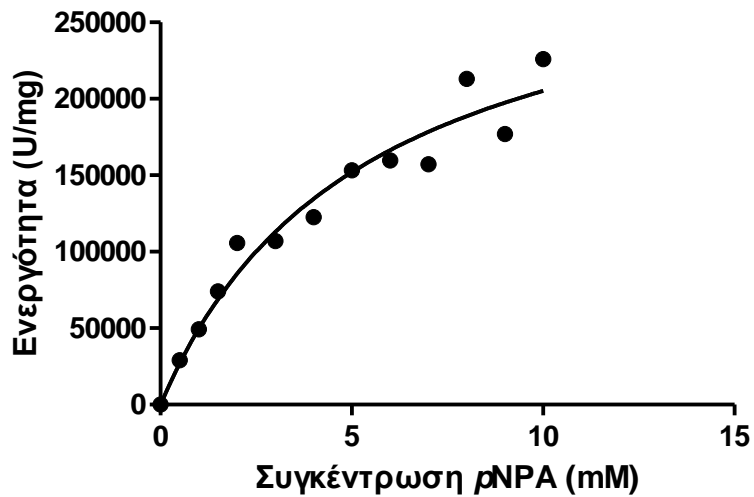
Δομή	Όνομα	Σταθερές	Origami 2 endo-Cut	BL21 pelB-Cut	BL21 endo-Cut
	Οξικός εστέρας της παρανιτροφαινόλης	K_m (mM)	8,17± 1,56	5,39± 1,45	12,5± 3,7
		k_{cat} (s ⁻¹)	6664±740	120993± 15457	44574± 10711
		k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	815±180	22464± 6698	3557± 1354
	Βουτυρικός εστέρας της παρανιτροφαινόλης	K_m (mM)	1,23±0,15	0,73± 0,17	1,48± 0,14
		k_{cat} (s ⁻¹)	11371±702	111949± 9961	64217± 3234
		k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	9282±1301	152539± 37521	43537± 4681
	Λαυρικός εστέρας της παρανιτροφαινόλης	K_m (mM)	0,66±0,31	3,76± 0,47	1,73± 0,28
		k_{cat} (s ⁻¹)	661±154	8318±857	483±54
		k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	995±519	2212±357	279±55

BL21 endo-Cut

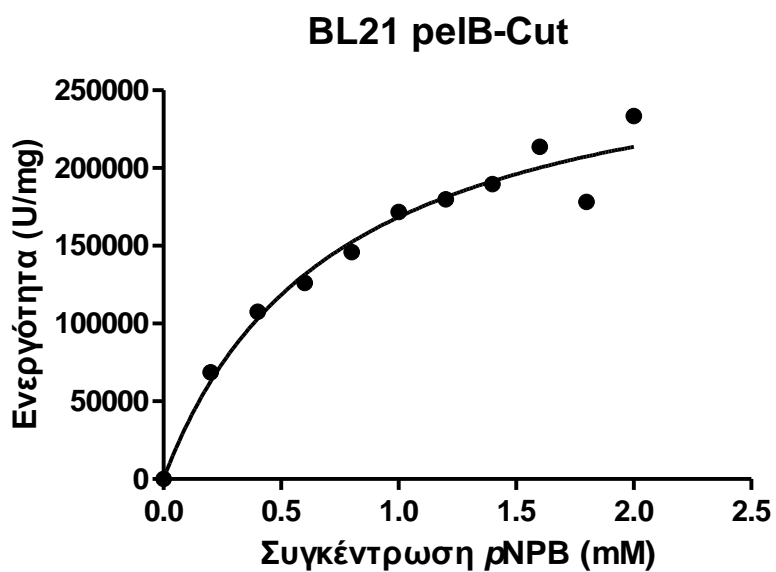


Διάγραμμα 4.7 Επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού εστέρα της παρα-νιτροφαινόλης στην ειδική ενεργότητα (U/mg) του ενζύμου endo-Cut των BL21

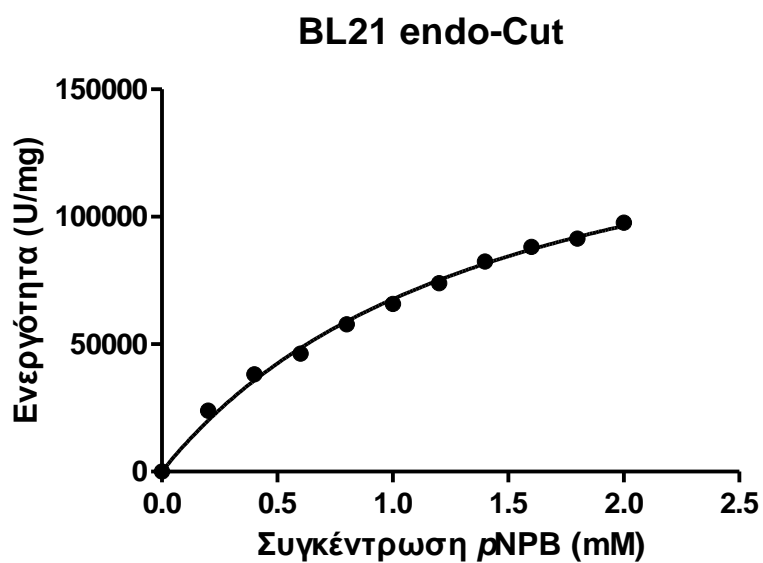
BL21 pelB-Cut



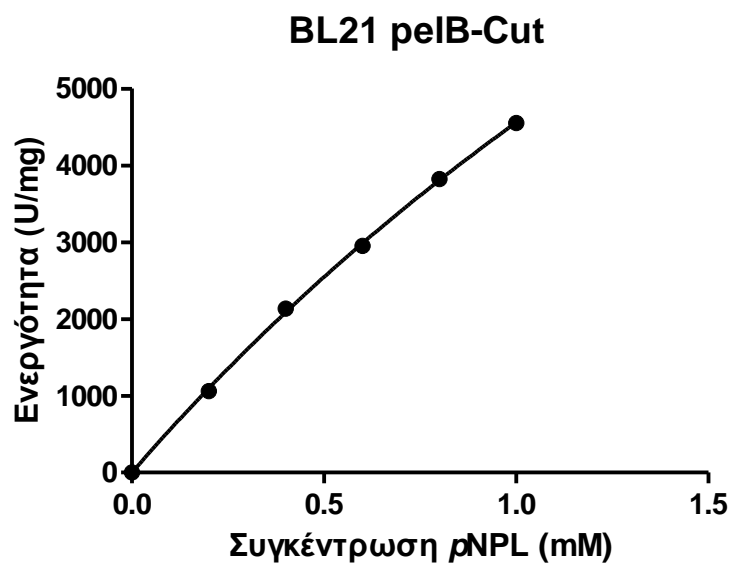
Διάγραμμα 4.8 Επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού εστέρα της παρα-νιτροφαινόλης στην ειδική ενεργότητα (U/mg) του ενζύμου pelB-Cut των BL21



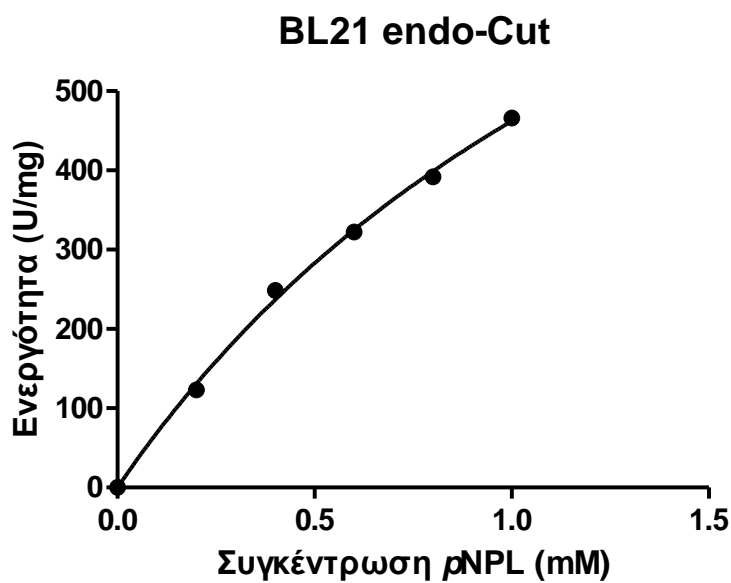
Διάγραμμα 4.9 Επίδραση της συγκέντρωσης του βουτυρικού εστέρα της παρανιτροφαινόλης στην ειδική ενεργότητα (U/mg) του ενζύμου pelB-Cut των BL21



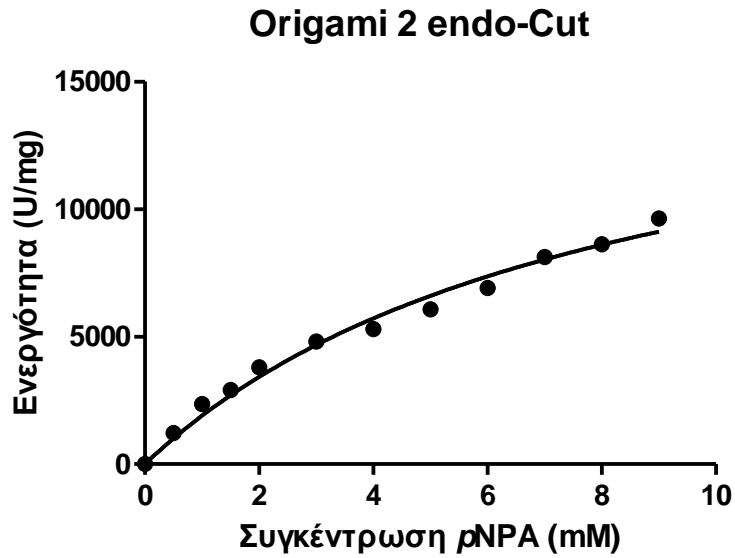
Διάγραμμα 4.10 Επίδραση της συγκέντρωσης του βουτυρικού εστέρα της παρανιτροφαινόλης στην ειδική ενεργότητα (U/mg) του ενζύμου endo-Cut των BL21



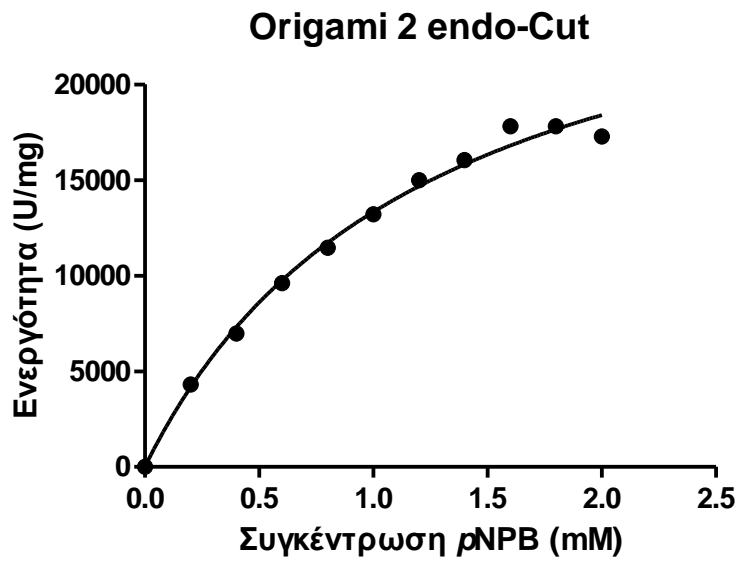
Διάγραμμα 4.11 Επίδραση της συγκέντρωσης του λαυρικού εστέρα της παρανιτροφαινόλης στην ειδική ενεργότητα (U/mg) του ενζύμου pelB-Cut των BL21



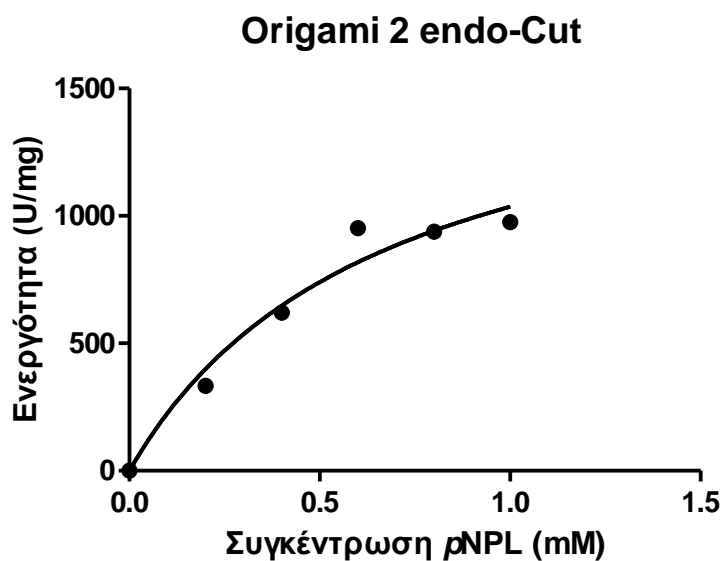
Διάγραμμα 4.12 Επίδραση της συγκέντρωσης του λαυρικού εστέρα της παρανιτροφαινόλης στην ειδική ενεργότητα (U/mg) του ενζύμου endo-Cut των BL21



Διάγραμμα 4.13 Επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού εστέρα της παρανιτροφαινόλης στην ειδική ενεργότητα (U/mg) του ενζύμου endo-Cut των Origami2



Διάγραμμα 4.14 Επίδραση της συγκέντρωσης του βουτυρικού εστέρα της παρανιτροφαινόλης στην ειδική ενεργότητα (U/mg) του ενζύμου endo-Cut των Origami2



Διάγραμμα 4.15 Επίδραση της συγκέντρωσης του λαυρικού εστέρα της παρανιτροφαινόλης στην ειδική ενεργότητα (U/mg) του ενζύμου endo-Cut των Origami2

4.4 Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες

Τόσο το προϊόν της *P. pastoris*, όσο και τα προϊόντα των *E. coli* BL21 και το προϊόν της εσωκυτταρικής έκφρασης των Origami2, δοκιμάστηκαν για την επίπτωση που έχουν στη δραστηότητά τους διάφοροι οργανικοί διαλύτες. Τα ένζυμα επωάστηκαν σε 80% v/v οργανικού διαλύτη για 20 h στους 20 °C και στη συνέχεια μετρήθηκε η ενεργότητά τους στο υπόστρωμα ρNPB. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα (4.2).

Πίνακας 4.2 Σχετική ενεργότητα κουτινάσης, ύστερα από επώαση 20 h, στους 20 °C, σε 80% v/v οργανικό διαλύτη

Διαλύτης	<i>P. pastoris</i> -Cut	BL21 pelB-Cut	BL21 endo-Cut	Origami2 endo-Cut
Control	100	100	100	100
EtOH	1	702	77	51
MetOH	12	560	89	16
Acetone	0	37	12	22
1-propanol	2	193	59	39
DMSO	103	24	943	901
1-butanol	109	72	40	4
1-heptanol	45	467	N.D.	N.D.
iso-octane	32	404	399	187
dacane	35	636	549	163
toluene	38	558	418	137

*N.D.: δεν έχει προσδιοριστεί

Παρατηρούμε ότι το προϊόν της *P. pastoris* διατηρεί την ενεργότητά του στο DMSO και τη βουτανόλη, ενώ στους υπόλοιπους διαλύτες χάνει το μεγαλύτερο μέρος της ή και όλη. Αντίθετα, η ενεργότητα του περιπλασμικού προϊόντος των BL21 αυξάνεται σε όλους τους διαλύτες εκτός από την ακετόνη, το DMSO και την βουτανόλη όπου η μείωση είναι 60%, 75% και 30% αντίστοιχα. Τα προϊόντα της ενδοκυτταρικής έκφρασης τόσο στα BL21, όσο και στα Origami2, χάνουν ένα μέρος της ενεργότητάς τους στους αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, προπανόλη και βουτανόλη (το προϊόν Origami2 υφίσταται μεγαλύτερη μείωση), ενώ στο DMSO αυξάνεται. Η επώαση στους διαλύτες ισοοκτάνιο, δεκάνιο, τολουένιο αύξησε την ενεργότητα και των δύο ενδοκυτταρικών εκφράσεων (των BL21 περισσότερο από ότι των Origami2).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κεφάλαιο 5 Σύνοψη και συζήτηση αποτελεσμάτων

Η επιλογή της κουτινάσης, ως προς μελέτη ένζυμο, έγινε λόγω του μεγάλου βιομηχανικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζει, ιδίως στον τομέα της κλωστοϋφαντουργίας, για την επεξεργασία συνθετικών (πολυεστερικών και πολυαμιδικών) υφασμάτων. Όπως έχει αναφερθεί και στο θεωρητικό μέρος της εργασίας, σημαντικό σημείο της δομής και κατ' επέκταση της σταθερότητας και δραστηριότητας του ενζύμου αυτού είναι οι δύο δισουλφιδικοί δεσμοί του.

Η παραγωγή της κουτινάσης FoCut16606 του μεσόφιλου μύκητα *Fusarium oxysporum* πραγματοποιήθηκε ετερόλογα σε τρεις διαφορετικούς ξενιστές: τη ζύμη *Pichia pastoris* X-33 και τα βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* BL21 (DE3) και Origami2 (DE3). Η διαδικασία κλωνοποίησης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε κάθε ένα από τα δύο είδη ξενιστών (ευκαρυωτικός και προκαρυωτικοί) παρουσιάστηκε σχηματικά στην Εικόνα 3.6 και οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι pPICZαC και pET22b(+) για τη ζύμη και τα βακτήρια, αντίστοιχα. Η κλωνοποίηση του γονιδίου *foxg_16606.3* στο pET22b(+) έγινε είτε διατηρώντας, είτε απομακρύνοντας τη σηματοδοτική αλληλουχία *reiB*, η οποία μεταφέρει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη από τον εσωκυτταρικό χώρο στον περιπλασμικό, όπου και γίνεται η αναδίπλωσή της.

Στη μεθυλότροφη ζύμη *P. pastoris* η επαγωγή της έκφρασης πραγματοποιήθηκε με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης (0,5% v/v) και η παραγωγή του ενζύμου έγινε εξωκυτταρικά από καλλιέργεια τελικού όγκου 2 L, 5 ημερών, όποτε και παρατηρείται η μέγιστη τιμή ενεργότητας κουτινάσης.

Στα βακτηριακά στελέχη *E. coli* η επαγωγή της έκφρασης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη IPTG (0,1 M) και η παραγωγή έγινε σε δύο θερμοκρασίες (16 και 37 °C). Το μοριακό βάρος των βακτηριακών ανασυνδυασμένων προϊόντων προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12,5% SDS-PAGE) και ήταν περίπου 23 kDa.

Ενζυμική ενεργότητα κουτινάσης εμφανίστηκε τόσο στον εσωκυτταρικό χώρο, είτε σε διαλυμένη μορφή, είτε σε μορφή inclusion bodies, αλλά και στο υγρό καλλιέργειας, παρότι τα συγκεκριμένα βακτήρια δεν έχουν μηχανισμούς μεταφοράς πρωτεϊνών εξωκυτταρικά. Στον Πίνακα 3.1 έχουν παρουσιαστεί οι ποσότητες των ανασυνδυασμένων ενζύμων σε Units (ενεργότητα σε υπόστρωμα *pNPB*) που εντοπίστηκαν στα 3 διαφορετικά κυτταρικά κλάσματα των δύο στελεχών *E. coli* στις

δύο θερμοκρασίες με τους δύο τρόπους έκφρασης (περιπλασμική και εσωκυτταρική – με και χωρίς pelB).

Από τον Πίνακα 3.1 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι στις παραγωγές που πραγματοποιήθηκαν στους 37 °C η πλειοψηφία της ποσότητας του ενζύμου (71-99%) εντοπίστηκε εσωκυτταρικά, πακεταρισμένη σε inclusion bodies. Αντίθετα στις παραγωγές στους 16 °C η μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου εμφανίστηκε διαλυμένη στον εσωκυτταρικό χώρο (πάνω από 98%). Επίσης, σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από την περιπλασμική έκφραση στα BL21, η παραγωγή στους 16 °C έδωσε συνολικά μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου από ότι η αντίστοιχη παραγωγή στους 37 °C. Η περιπλασμική έκφραση στα BL21 αποτελεί εξαίρεση και στα υπόλοιπα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν παραπάνω. Σε αυτήν την περίπτωση η πλειονότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε στον εξωκυτταρικό χώρο. Εδώ να σημειωθεί ότι δεν είναι σύνηθες για τις παραγωγές ενζύμων σε βακτηριακούς ξενιστές να υπάρχει έκκριση προϊόντος στο υγρό καλλιέργειας. Όμως για την περίπτωση της κουτινάσης, αυτό έχει παρατηρηθεί ξανά και έχει προταθεί η θεωρία ότι οφείλεται σε περιορισμένη αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών του ξενιστή, λόγω περιορισμένης υδρόλυσης των φωσφολιπιδίων τους από το ανασυνδυασμένο ένζυμο (Su et al., 2013).

Επίσης είναι πιθανό, ο σχηματισμός των inclusion bodies, που παρατηρούνται τόσο έντονα στις παραγωγές των 37 °C, να οφείλεται ακριβώς σε αυτήν την υψηλή θερμοκρασία, σε σχέση με τους 16 °C. Τα κύτταρα που αναγκάζονται να παράγουν μεγάλες ποσότητες ενός ανασυνδυασμένου ενζύμου, υφίστανται θερμικό στρες, στο οποίο και αντιδρούν με διάφορους τρόπους, μεταξύ των οποίων και ο σχηματισμός πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που δεν έχουν αναδιπλωθεί σωστά. Τα συσσωματώματα αυτά, μπορούν αργότερα να επεξεργαστούν περαιτέρω, είτε να πρωτεολυθούν (Villaverde & Carrió, 2003).

Η μελέτη της βέλτιστης θερμοκρασίας ενζυμικής δράσης των ανασυνδυασμένων κουτινασών, έδειξε ότι το προϊόν της ζύμης *P. pastoris* λειτουργούσε βέλτιστα στους 50 °C, σε αντίθεση με όλα τα προϊόντα των *E. coli*, των οποίων η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν 10 βαθμοί χαμηλότερα (40 °C). Από την βιβλιογραφία βλέπουμε ότι η κουτινάση του *Fusarium solani* εκφρασμένη στην *P. pastoris* έχει βέλτιστη θερμοκρασία τους 40 °C (Kwon et al., 2009), ενώ του *Humicola insolens* τους 50 °C (Kazenwadel et al., 2012). Η μοναδική παραγωγή σε Origami2 ήταν της μυκητιακής κουτινάσης του *Glomerella cingulata*, της οποίας η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν 25 °C. Οι κουτινάσες του θερμόφιλου βακτηρίου *Thermobifida fusca* που έχουν παραχθεί σε βακτηριακούς ξενιστές (*E. coli* Rosseta, BL21, BL21-Gold) δείχνουν βέλτιστη θερμοκρασία σε εύρος 55-70° C (Chen et al., 2008; Chen et al., 2010; Chen et al., 2012; Herrero Acero et al., 2011; Su et al., 2012; Su et al., 2013; Hegde et al., 2013).

Η μελέτη της θερμοσταθερότητας των ανασυνδυασμένων ενζύμων, έδειξε ότι το προϊόν της *P. pastoris* είναι το σταθερότερο σε σχέση με τα προϊόντα των προκαρυωτικών ξενιστών. Βέβαια, ανάμεσα στις κουτινάσες που παρήχθησαν εσωκυτταρικά στα δύο διαφορετικά στελέχη *E. coli* βλέπουμε μια σαφή διαφορά όσον αφορά τη θερμοσταθερότητα, με το προϊόν των Origami2 να είναι το σταθερότερο. Αυτό πιθανότατα οφείλεται σε αυτό καθαυτό το στέλεχος των *E. coli*, το οποίο είναι γενετικά τροποποιημένο ώστε να δημιουργεί τις οξειδωτικές συνθήκες που ευνοούν το σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών. Η μετάλλαξη που έχει υποστεί το στέλεχος Origami2, ώστε το αναγωγικό (υπό κανονικές συνθήκες) κυτταροπλασματικό περιβάλλον του να μετατρέπεται σε οξειδωτικό, έγκειται στην απενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα αναγωγάση της θειορεδοξίνης (*trxB*) και αναγωγάση της γλουταθειόνης (*gor*) (Seras-Franzoso et al., 2012).

Η διαφορά στη θερμοσταθερότητα είναι αισθητή και στα προϊόντα της περιπλασμικής έκφρασης των δύο στελεχών, με την κουτινάση των Origami2 να είναι και πάλι η σταθερότερη. Στη σύγκριση όμως ανάμεσα στους δύο διαφορετικούς τρόπους έκφρασης στο στέλεχος BL21, η περιπλασμική έκφραση φαίνεται να δίνει το σταθερότερο προϊόν. Αυτό ίσως να οφείλεται στην τοποθέτηση του ενζύμου στο οξειδωτικό περιβάλλον του περιπλάσματος που ευνοεί το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών (Choi, Lee 2004). Η σύγκριση των δύο προϊόντων των διαφορετικών εκφράσεων στα Origami 2 έδειξε ότι δεν έχουν μεγάλη διαφορά στη θερμική σταθερότητα, αν εξαιρέσουμε τους 40 °C στους οποίους η κουτινάση της εσωκυτταρικής έκφρασης έχει μικρότερο ρυθμό απώλειας ενεργότητας.

Το ανασυνδυασμένο προϊόν της *P. pastoris* παρέμενε σταθερό στους 30 °C (για 4 h), ενώ έχανε 40% τις αρχικής του ενεργότητας στους 55 °C και το 80% στους 70 °C, ύστερα από επώαση 4 h. Κουτινάσες που έχουν παραχθεί από φυσικά στελέχη του *F. oxysporum*, παραμένουν σταθερές στους 30-40 °C (Speranza et al., 2011) ή ακόμα και στους 50 °C (Speranza et al., 2013) για επώαση 1 h, ενώ υφίσταντο απώλειες 80% στους 60 °C. Μια κουτινάση του *F. solani* χάνει 40% της αρχικής της ενεργότητας ήδη από την 1^η ώρα στους 30 °C (Liu et al., 2013), ενώ αυτή του *G. cingulata* έχει απώλειες μέχρι 90% σε δίωρη επώαση στους 50 °C (Chin et al., 2013). Από την άλλη, στη βιβλιογραφία υπάρχουν και θερμοσταθερότερες κουτινάσες μυκητιακής προέλευσης όπως του *H. insolens*, που διατηρεί το 90% της ενεργότητάς της ύστερα από επώαση 48 h στους 50 °C (Kazenwadel et al., 2012) και του *T. terrestris*, η οποία παραμένει σταθερή για 30 min στους 65 °C (Yang et al., 2013). Από βακτηριακές κουτινάσες, αυτή του *P. ceracia* παραμένει σταθερή για 1h στους 40 °C, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες δεν δείχνει καμία σταθερότητα (Dutta et al., 2013). Αντίθετα, οι κουτινάσες του θερμόφιλου βακτηρίου *T. fusca* είναι οι θερμοσταθερότερες που έχουν χαρακτηριστεί ως τώρα, έχοντας χρόνο ημιζωής τις

80 h στους 50 °C (Su et al., 2012) και τις 40 h στους 60 °C (Chen et al., 2008), ενώ στους 40 °C χάνει μόνο το 30% της αρχικής του ενεργότητας ύστερα από 160 h (Chen et al., 2008).

Στη συνέχεια του χαρακτηρισμού των ανασυνδυασμένων κουτινασών, πραγματοποιήθηκαν οι υπολογισμοί των κινητικών σταθερών της εξίσωσης Michaelis-Menten για τρεις διαφορετικούς εστέρες της παρανιτροφαινόλης με διαφορετικό μήκος αλυσίδας. Ο οξικός εστέρας αποτελείται από 2 άτομα άνθρακα, ο βουτυρικός από 4 και ο λαυρικός από 12. Οι κουτινάσες έδειξαν ότι έχουν μεγαλύτερη συγγένεια (μικρότερα K_m) με τον βουτυρικό εστέρα της παρανιτροφαινόλης (C_4) και μικρότερη με τον οξικό (C_2). Η αποτελεσματικότητά τους (λόγος k_{cat}/K_m) φάνηκε ότι είναι μεγαλύτερη στον βουτυρικό εστέρα και μικρότερη στον λαυρικό (C_{12}). Επίσης, παρατηρείται ότι το περιπλασμικό προϊόν των BL21 είναι δραστικότερο από ότι το ενδοκυτταρικό και στα 3 υποστρώματα, όμως είναι δραστικότερο από το αντίστοιχο ενδοκυτταρικό προϊόν των Origami2 στα $pNPA$ και $pNPB$. Αξιοσημείωτο, επίσης, είναι ότι η εσωκυτταρική κουτινάση των Origami2 δείχνει ελαφρά μεγαλύτερη προτίμηση στον εστέρα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας ($pNPL$) από ότι σε αυτόν με τα 4 άτομα άνθρακα ($pNPB$).

Σε σύγκριση με άλλες χαρακτηρισμένες κουτινάσες από τη βιβλιογραφία, οι συγκεκριμένες του *F. oxysporum* παρουσιάζουν σχετικά μεγάλο K_m (~0,7-1,5 mM) σε σχέση με τις μυκητιακές κουτινάσες των *H. insolens* και *M. fructicola* (0,05 και 0,001 mM αντίστοιχα) (Kazenwadel et al., 2012; Wang et al., 2002), ενώ είναι κοντά σε αυτές των *T. harzanum* και *C. mangus* (Rubio et al., 2008; Suzuki et al., 2013). Επίσης, παρόμοιες τιμές παρουσιάζουν και κάποιες κουτινάσες του βακτηριακού στελέχους *T. fusca* (Chen et al., 2010), *T. alba* (Ribitsch et al., 2012) και *T. cellulolytica* (Herrero Acero et al., 2011). Όσον αφορά την ενεργότητα και αποτελεσματικότητα του ενζύμου, όπως αυτή εκφράζεται από τις τιμές των k_{cat} και k_{cat}/K_m , οι κουτινάσες αυτές του *F. oxysporum* υπερέχουν κατά πολύ των υπόλοιπων ήδη χαρακτηρισμένων, είτε μυκητιακών, είτε βακτηριακών. Μόνη εξαίρεση αποτελεί η κουτινάση του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas ceracia* με τιμές $k_{cat}=5000 s^{-1}$ και $k_{cat}/K_m=22000 s^{-1} mM^{-1}$ (Dutta et al., 2013).

Όσον αφορά την κινητική σταθερά K_m στο συνθετικό υπόστρωμα $pNPA$ είναι και αυτή μεγαλύτερη από των υπόλοιπων της βιβλιογραφίας, συγκρινόμενη μόνο με την αντίστοιχη της κουτινάσης του *A. oryzae*, της οποίας όμως η αποτελεσματικότητα είναι πολύ χαμηλότερη (Liu et al., 2009). Μόνο η κουτινάση της *T. alba* έχει παρόμοια αποτελεσματικότητα με τις ανασυνδυασμένες κουτινάσες του *F. oxysporum* (Ribitsch et al., 2012).

Τα ανασυνδυασμένα ένζυμα τόσο από την *P. pastoris* και περισσότερο από τα *E. coli* έδειξαν αρκετή αντοχή ύστερα από επώαση (20 h) σε διάφορους οργανικούς

διαλύτες, ενώ σε κάποιους άλλους φάνηκε ότι ευνοήθηκε η δράση τους (στα προϊόντα των *E. coli* περισσότερο από ότι στο προϊόν της ζύμης). Από την βιβλιογραφία φαίνεται ότι η κουτινάση που έχει παραχθεί από το φυσικό στέλεχος του *F. oxysporum* (Speranza 2013), ύστερα από επώαση 1 h στους 30 °C έχανε το μεγαλύτερο μέρος ή όλη της την ενεργότητα στους μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη, ακετόνη όπως και το δικό μας προϊόν της *P. pastoris*. Επίσης και στη βουτανόλη έχανε όλη της την ενεργότητα η φυσική πρωτεΐνη, όπως περίπου και στο ενδοκυτταρικό προϊόν των Origami2 (96% μείωση) και σε αντίθεση με το προϊόν της *P. pastoris* που διατήρησε ανέπαφη την ενεργότητά του. Στους διαλύτες ισοοκτάνιο και δεκάνιο, η ενεργότητά του φυσικού ενζύμου εμφάνιζε αύξηση αντίστοιχη με το ανασυνδυασμένο ενδοκυτταρικό προϊόν των Origami2. Κουτινάση με προέλευση τον *F. solani* (Chen et al., 2010) χάνει σχεδόν όλη την ενεργότητά της στους μεθανόλη, αιθανόλη (όπως και το ανασυνδυασμένο προϊόν της *P. Pastoris*), ενώ διατηρεί μικρό μέρος της στους ακετόνη και βουτανόλη (όπως και τα δικά μας ανασυνδυασμένα βακτηριακά προϊόντα). Η κουτινάση από τον μύκητα *T. terrestris* (Yang et al., 2013) είχε πολύ μικρές απώλειες ενεργότητας στους μεθανόλη, αιθανόλη (παρόμοιες με το ενδοκυτταρικό προϊόν των BL21), ενώ εμφάνιζε αύξηση στο DMSO (όπως και τα δύο δικά μας ενδοκυτταρικά βακτηριακά προϊόντα). Οι κουτινάσες με προέλευση από το βακτήριο *T. fusca* (Chen et al., 2010) δεν έδειξαν απώλειες στους αιθανόλη και ακετόνη, πράγμα αξιοσημείωτο, ενώ είχαν μικρές απώλειες στη μεθανόλη και μεγαλύτερες στη βουτανόλη (παρόμοια συμπεριφορά με την endo-Cut των BL21).

Η αύξηση της ενεργότητας σε διαλύτες όπως το ισοοκτάνιο και το δεκάνιο, μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές στη διαμόρφωση του ενζύμου κατά τη διάρκεια της επώασης, λόγω της αλληλεπίδρασης με τα μόρια του διαλύτη. Άλλοι διαλύτες (ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη) τείνουν να αντικαθιστούν τα μόρια νερού, που είναι συνδεδεμένα με την επιφάνεια του ενζύμου ή και του εσωτερικού του, διαστρεβλώνοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις στις οποίες οφείλει το ένζυμο τη φυσική του διαμόρφωση. Η αύξηση της πολικότητας των αναμίξεων με το νερό διαλυτών, οδηγεί σε αύξηση της ενζυμικής απενεργοποίησης, λόγω της απώλειας του απαραίτητου για το ένζυμο νερού (Speranza et al., 2013).

5.1 Προτάσεις για το μέλλον

Προσπάθειες βελτίωσης επιβάλλεται να γίνουν στα εξής σημεία:

- Αύξηση της παραγωγικότητας στη μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*, χρησιμοποιώντας ίσως διαφορετικό στέλεχος ή/και πραγματοποιώντας την παραγωγή σε βιοαντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου
- Αποτελεσματική απομόνωση της ανασυνδυασμένης κουτινάσης από την *P. pastoris* και τον πλήρη χαρακτηρισμό της

Επίσης, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί το ανασυνδυασμένο αυτό ένζυμο σε αντιδράσεις:

- Επεξεργασίας συνθετικών υφασμάτων (επιφανειακή υδρόλυση)
- Σύνθεσης πολυεστερικών και πολυαμιδικών πλαστικών
- Σύνθεσης εστέρων με βιολογική δράση

Στη συνέχεια, αν κριθεί απαραίτητο, να βελτιωθεί η δράση του ενζύμου στις αντιδράσεις αυτές με εργαλεία πρωτεϊνικής μηχανικής, με σκοπούς:

- Διεύρυνση ενεργού κέντρου, ώστε να αποκτήσει μεγαλύτερη συγγένεια με υποστρώματα μεγάλου μοριακού βάρους (π.χ. πολυμερή)
- Μεταβολή των ηλεκτροστατικών και υδροφοβικών επιφανειακών ιδιοτήτων, για πιθανή αύξηση της υδρολυτικής δράσης σε πολυεστέρες (π.χ. PET)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alisch-Mark M., Herrmann A., Zimmermann W. 2006. Increase of the Hydrophilicity of Polyethylene Terephthalate Fibres by Hydrolases from *Thermomonospora fusca* and *Fusarium solani* f. sp. *psii*. **28(10)**: 681-685

Araújo R., Silva C., O'Neill A., Micaelo N., Guebitz G., Soares C.M., Casal M., Cavaco-Paulo A. 2007. Tailoring cutinase activity towards polyethylene terephthalate and polyamide 6,6 fibers. *J. Biotechnol.* **128(4)**: 849-857

Argawal P.B., Nierstrasz V.A., Bouwhuis G.H., & Warmoeskerken M.M.C.G. 2008. Cutinase and pectinase in cotton bioscouring: an innovative and fast bioscouring process. *Biocatalysis and Biotransformation.* **26(5)**: 412-421

Badenes S.M., Lemos F., Cabral J.M.S. 2010. Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. *Biotechnol. Lett.* **32(3)**: 399-403

Baker P.J., Poultney C., Liu Z., Gross R., Montclare J.K. 2012. Identification and comparison of cutinases for synthetic polyester degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93(1)**: 229-240

de Barros D.P., Fonseca L.P., Cabral J.M., Aschenbrenner E.M., Weiss C.K., Landfester K. 2010. Miniemulsion as efficient system for enzymatic synthesis of acid alkyl esters. *Biotechnol. Bioeng.* **106(4)**: 507-515

Borreguero I., Carvalho C.M., Cabral J.M.S., Sinisterra J.V., Alcántara A.R. 2001. Enantioselective properties of *Fusarium solani pisi* cutinase on transesterification of acyclic diols: activity and stability evaluation. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* **11(4-6)**: 613-622

Carvalho C.M., Serralheiro M.L.M., Cabral J.M.S., and Aires-Barros M.R. 1997. Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles. *Enzyme and Microbial Technology.* **21(2)**: 117-123

Carvalho C.M., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S. 1998. Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *Electron. J. Biotechnol.* **1(3)**

Carvalho C.M., Cabral J.M.S., and Aires-Barros M.R. 1999. Cutinase stability in AOT reversed micelles: system optimization using the factorial design methodology. *Enzyme and Microbial Technology.* **24(8-9)**: 569-576

Carvalho C.M., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S. 2000. Kinetics of cutinase catalyzed transesterification in AOT reversed micelles: modeling of a batch stirred tank reactor. *J. Biotechnol.* **81(1)**: 1-13

Castro-Ochoa D., Peña-Montes C., González-Canto A., Alva-Gasca A., Esquivel-Bautista R., Navarro-Ocaña A., Farrés A. 2012. ANCUT2, an extracellular cutinase

from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166(5)**: 1275-1290

Chen S., Tong X., Woodard R.W., Du G., Wu J., and Chen J. 2008. Identification and Characterization of Bacterial Cutinase. *J. Biol. Chem.* **283(38)**: 25854-25862

Chen S., Su L., Billig S., Zimmermann W., Chen J., Wu J. 2010. Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* **63(3-4)**: 121-127

Chen S., Su L., Chen J., Wu J. 2013. Cutinase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*. In press

Chen Z., Franco C.F., Baptista R.P., Cabral J.M., Coelho A.V., Rodrigues C.J. Jr., Melo E.P. 2007. Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73(6)**: 1306-1313

Chin I.S., Abdul Murad A.M., Mahadi N.M., Nathan S. and Abu Bakar F.D. 2013. Thermal stability engineering of *Glomerella cingulata* cutinase. *Protein Eng. Des. Sel.* **26(5)**: 369-375

Choi J.H., Lee S.Y. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64(5)**: 625-635

Christakopoulos P., Macris B.J., Kekos D. 1989. Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*. *Enzyme and Microbial Technology.* **11(4)**: 236-239

Degani O., Gepstein S., and Dosoretz C.G. 2002. Potential use of cutinase in enzymatic scouring of cotton fiber cuticle. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **102-103(1-6)**: 277-289

Donelli I., Taddei P., Smet P.F., Poelman D., Nierstrasz V.A., Freddi G. 2009. Enzymatic surface modification and functionalization of PET: a water contact angle, FTIR, and fluorescence spectroscopy study. *Biotechnol. Bioeng.* **103(5)**: 845-856

Dutta K., Sen S., Veeranki V.D. 2009. Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry.* **44(2)**: 127-134

Dutta K., Krishnamoorthy H., and Venkata Dasu V. 2013. Novel cutinase from *Pseudomonas cepacia* NRRL B 2320: purification, characterization and identification of cutinase encoding genes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **59(3)**: 171-184

Eberl A., Heumann S., Kotek R., Kaufmann F., Mitsche S., Cavaco-Paulo A., Gübitz G.M. 2008. Enzymatic hydrolysis of PTT polymers and oligomers. *J. Biotechnol.* **135(1)**: 45-51

Eberl A., Heumann S., Brückner T., Araujo R., Cavaco-Paulo A., Kaufmann F., Kroutil W., Guebitz G.M. 2009. Enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules. *J. Biotechnol.* **143(3)**: 207-212

Egmond M.R. and van Bommel C.J. 1997. Impact of structural information on understanding lipolytic function. *Methods Enzymol.* **284**: 119-129

Egmond M.R., de Vlieg J. 2000. *Fusarium solani pisi* cutinase. *Biochimie.* **82(11)**: 1015-1021

El-Sayed M.Y., Lewis S.L., Anderson S.A., Wiersema R.J. 1990. Lipase and cutinase surfactant systems and method useful in laundering. European Patent Office. **0399681A2**

Ettinger W.F., Thukral S.K., and Kolatukkydy P.E. 1987. Structure of cutinase gene, cDNA, and the derived amino acid sequence from phytopathogenic fungi. *Biochemistry.* **26(24)**: 7883-7892

Fett W.F., Gérard H.C., Moreau R.A., Osman S.F., and Jones L.E. 1992. Cutinase Production by *Streptomyces* spp. . *Current Microbiology.* **25**: 165-171

Fett W.F., Wijey C., Moreau R.A. and Osman S.F. 1999. Production of cutinase by *Thermomonospora fusca* ATCC27730. *Journal of Applied Microbiology.* **86(4)**: 561-568

Flipsen J.A., van der Hijden H.T., Egmond M.R., Verheij H.M. 1996. Action of cutinase at the triolein-water interface. Characterisation of interfacial effects during lipid hydrolysis using the oil-drop tensiometer as a tool to study lipase kinetics. *Chem. Phys. Lipids.* **84(2)**: 105-115

Fontes N., Conceição Almeida M., Peres C., Garcia S., Grave J., Aires-Barros M.R., Soares C.M., Cabral J.M.S., Maycock C.D., and Barreiros S. 1998. Cutinase Activity and Enantioselectivity in Supercritical Fluids. *Ind. Eng. Chem. Res.* **37**: 3189-3194

Garcia S., Vidinha P., Arvana H., da Silva M.D.R.G., Ferreira M.O., Cabral J.M.S., Macedo E.A., Harper N., Barreiros S. 2005. Cutinase activity in supercritical and organic media: water activity, solvation and acid–base effects. *J. of Supercritical Fluids.* **35(1)**: 62-69

van Geremen I.A., Musters W., van den Hondel C.A.M.J.J., Verrips C.T. 1995. Construction and heterologous expression of a synthetic copy of the cutinase cDNA from *Fusarium solani pisi*. *Journal of Biotechnology.* **40(3)**: 155-162

Gonçalves A.P., Cabral J.M., and Aires-Barros M.R. 1996a. Immobilization of a recombinant cutinase by entrapment and by covalent binding. Kinetic and stability studies. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **60(3)**: 217-228

Gonçalves A.P.V., Lopes J.M., Lemos F., Ramôa Ribeiro F., Prazeres D.M.F., Cabral J.M.S., Aires-Barros M.R. 1996b. Zeolites as supports for enzymatic hydrolysis reactions. Comparative study of several zeolites. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* **1(2)**: 53-60

Gonçalves A.P.V., Lopes J.M., Lemos F., Ramôa Ribeiro F., Prazeres D.M.F., Cabral J.M.S., and Aires-Barros M.R. 1997. Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani pisi*. *Enzyme and Microbial Technology.* **20(2)**: 93-101

Gonçalves A.M., Schacht E., Matthijs G., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S., and Gil M.H. 1998a. Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports. *Enzyme and Microbial Technology.* **24(1-2)**: 60-66

Gonçalves A.M., Schacht E., Matthijs G., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S., and Gil M.H. 1998b. Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports. *Enzyme and Microbial Technology.* **24(1-2)**: 60-66

Gremos S., Zarafeta D., Kekos D., Kolisis F. 2011. Direct enzymatic acylation of cellulose pretreated in BMIMCl ionic liquid. *Bioresour. Technol.* **102(2)**: 1378-1382

Gremos S., Kekos D., Kolisis F. 2012. Supercritical carbon dioxide biocatalysis as a novel and green methodology for the enzymatic acylation of fibrous cellulose in one step. *Bioresour. Technol.* **115**: 96-101

Hanefeld U., Gardossi L. and Magner E. 2009. Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* **38(2)**: 453-468

Hegde K., Veeranki V.D. 2013. Production optimization and characterization of recombinant cutinases from *Thermobifida fusca* sp. NRRL B-8184. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **170(3)**: 654-675

Herrero Acero E., Ribitsch D., Steinkellner G., Gruber K., Greimel K., Eiteljoerg I., Trotscha E., Wei R., Zimmermann W., Zinn M., Cavaco-Paulo A., Freddi G., Schwab H., and Guebitz G. 2011. Enzymatic Surface Hydrolysis of PET: Effect of Structural Diversity on Kinetic Properties of Cutinases from *Thermobifida*. *Macromolecules.* **44(12)**: 4632-4640

Herrero Acero E., Ribitsch D., Dellacher A., Zitzenbacher S., Marold A., Steinkellner G., Gruber K., Schwab H., Guebitz G.M. 2013. Surface engineering of a cutinase from

Thermobifida cellulolytica for improved polyester hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* **110(10)**: 2581-2590

Heumann S., Eberl A., Pobeheim H., Liebming S., Fischer-Colbrie G., Almansa E., Cavaco-Paulo A., Gübitz G.M. 2006. New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and polyamide fibres. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **69(1-2)**: 89-99

Hunsen M., Azim A., Mang H., Wallner S.R. Rpnkvist A., Xie Wenchun, and Gross R.A. 2007. A Cutinase with Polyester Synthesis Activity. *Macromolecules.* **40**: 148-150

Iwasaki T., Hioki Y. 1986. Enhancement of biocide activity. European Patent Office. **0197622B1**

Kazenwadel C., Eiben S., Maurer S., Beuttler H., Wetzl D., Hauer B., Koschorreck K. 2012. Thiol-functionalization of acrylic ester monomers catalyzed by immobilized *Humicola insolens* cutinase. *Enzyme and Microbial Technology.* **51(1)**: 9-15

Kim Y.H., Kim S.W., Lee J. 2006. Enzymatic degradation and detoxification of diethyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. *psi* Cutinase. *Studies in Surface Science and Catalysis.* **159**: 137–140

Köller W. and Kolattukudy P.E. 1982. Mechanism of Action of Cutinase: Chemical Modification of the Catalytic Triad Characteristic for Serine Hydrolases. *Biochemistry.* **21(13)**: 3083-3090

Köller W., Allan C.R., and Kolattukudy P.E. 1982. Inhibition of cutinase and prevention of fungal penetration into plants by benomyl—A possible protective mode of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **18(1)**: 15–25

Kolattukudy P., Poulouse A.J. 1996. Cutinase cleaning compositions. United States Patent. **005512203A**

Kontkanen H., Westerholm-Parvinen A., Saloheimo M., Bailey M., Rättö M., Mattila I., Mohsina M., Kalkkinen N., Nakari-Setälä T., and Buchert J. 2009. Novel *Coprinopsis cinerea* Polyesterase That Hydrolyzes Cutin and Suberin. *Appl. Environ. Microbiol.* **75(7)**: 2148-2157

Kwon M., Kim H.S., Yang T.H., Song B.K., Song J.K. 2009. High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification.* **68(1)**: 104-109

Lamare S. and Legoy M.D. 1994. Working at controlled water activity in a continuous process: The gas/solid system as a solution. *Biotechnology and Bioengineering.* **45(5)**: 387-397

- Lamare S., Lortie R., Legoy M.D.** 1997. Kinetic studies of fusarium solani pisi cutinase used in a gas/solid system: transesterification and hydrolysis reactions. *Biotechnology and Bioengineering*. **56(1)**: 1-8
- Lau E.Y. and Bruce T.C.** 1999. Consequences of breaking the Asp-His hydrogen bond of the catalytic triad: effects on the structure and dynamics of the serine esterase cutinase. *Biophys. J.* **77(1)**: 85-98
- Lee S.H. and Song W.S.** 2010. Surface modification of polyester fabrics by enzyme treatment. *Fibers and Polymers*. **11(1)**: 54-59
- Lin T.S. and Kolattukudy P.E.** 1978. Induction of a Biopolyester Hydrolase (Cutinase) by Low Levels of Cutin Monomers in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *J. Bacteriol.* **133(2)**: 942-951
- Lin T.S. and Kolattukudy P.E.** 1980. Structural studies on cutinase, a glycoprotein containing novel amino acids and glucuronic acid amide at the N terminus. *Eur. J. Biochem.* **106(2)**: 341-351
- Liu Z., Gosser Y., Baker P.J., Ravee Y., Lu Z., Alemu G., Li H., Butterfoss G.L., Kong X., Gross R., and Montclare J.K.** 2009. Structural and Functional Studies of *Aspergillus oryzae* Cutinase: Enhanced Thermostability and Hydrolytic Activity of Synthetic Ester and Polyester Degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **131(43)**: 15711-15716
- Longhi S., Czjzek M., Lamzin V., Nicolas A. and Cambillau C.** 1997. Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. *Journal of Molecular Biology*. **268(4)**: 779-799
- Longhi S., Cambillau C.** 1999. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **1441(2-3)**: 185-196
- Mannesse M.L., Cox R.C., Koops B.C., Verheij H.M., de Haas G.H., Egmond M.R., van der Hijden H.T., and de Vlieg J.** 1995. Cutinase from *Fusarium solani* pisi hydrolyzing triglyceride analogues. Effect of acyl chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity. *Biochemistry*. **34(19)**: 6400-6407
- Martinez C., Nicolas A., van Tilbeurgh H., Egloff M.P., Cudrey C., Verger R., Cambillau C.** 1994. Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochemistry*. **33(1)**: 83-89
- Maiti I.B., Kolattukudy P.E. and Shaykh M.** 1979. Purification and Characterization of a Novel Cutinase from Nasturtium (*Tropaeolum majus*) Pollen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **192(2)**: 412-423

- Masaki K., Kamini N.R., Ikeda H., and Iefuji H.** 2005. Cutinase-Like Enzyme from the Yeast *Cryptococcus* sp. Strain S-2 Hydrolyzes Polylactic Acid and Other Biodegradable Plastics. *Appl. Environ. Microbiol.* **71(11)**: 7548-7550
- Matak M.Y., Moghaddam M.E.** 2009. The role of short-range Cys171-Cys178 disulfide bond in maintaining cutinase active site integrity: a molecular dynamics simulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390(2)**: 201-204
- Matamá T., Araújo R., Gübitz G.M., Casal M., Cavaco-Paulo A.** 2010. Functionalization of cellulose acetate fibers with engineered cutinases. *Biotechnology Progress.* **26(3)**: 636-643
- Melo E.P., Aires-Barros M.R., and Cabral J.M.S.** 1995. Triglyceride hydrolysis and stability of a recombinant cutinase from *Fusarium solani* in AOT-*iso*-octane reversed micelles. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* **50(1)**: 45-56
- Melo E.P., Baptista R.P., Cabral J.M.S.** 2003. Improving cutinase stability in aqueous solution and in reverse micelles by media engineering. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* **22(5-6)**: 299-306
- Micaelo N.M., Teixeira V.H., Baptista A.M., Soares C.M.** 2005. Water dependent properties of cutinase in nonaqueous solvents: a computational study of enantioselectivity. *Biophys. J.* **89(2)**: 999-1008
- Müller R.J., Schrader H., Profe J., Dresler K., Deckwer W.D.** 2005. Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from *T. fusca*. **26(17)**: 1400-1405
- Murphy C.A., Cameron J.A., Huang S.J., and Vinopal R.T.** 1996. *Fusarium* Polycaprolactone Depolymerase Is Cutinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(2)**: 456-460
- Nicolas A., Egmond M., Verrips C.T., de Vlieg J., Longhi S., Cambillau C., and Martinez C.** 1996. Contribution of cutinase serine 42 side chain to the stabilization of the oxyanion transition state. *Biochemistry.* **35(2)**: 398-410
- Nyyssölä A., Pihlajaniemi V., Järvinen R., Mikander S., Kontkanen H., Kruus K., Kallio H., Buchert J.** 2013. Screening of microbes for novel acidic cutinases and cloning and expression of an acidic cutinase from *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Enzyme Microb. Technol.* **52(4-5)**: 272-278
- Parvaresh F., Robert H., Thomas D., and Legoy M.D.** 1991. Gas phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes. *Biotechnol Bioeng.* **39(4)**: 467-473

- Petersen S.B., Fojan P., Petersen E.I., and Petersen M.T.N.** 2001. The thermal stability of the *Fusarium solani pisi* cutinase as a function of pH. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **1(2)**: 62-69
- Pio T.F., Macedo G.A.** 2007. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology* **41(5)**: 613–619
- Pio T.F. and Macedo G.A.** 2009. Cutinases: properties and industrial applications. *Adv. Appl. Microbiol.* **66**: 77-95
- Poulose A.J., Boston M.** 1996. Enzyme assisted degradation of surface membranes of harvested fruits and vegetables. United States Patent. **005510131A**
- Poulose A.J., Kolattukudy P.** 1987. Enzymes as agricultural chemical adjuvants. European Patent Office. **0272002B1**
- Purdy R.E. and Kolattukudy P.E.** 1975. Hydrolysis of Plant Cuticle by Plant Pathogens. Purification, Amino Acid Composition, and Molecular Weight of Two Isozymes of Cutinase and a Nonspecific Esterase from *Fusarium solani f. pisi*. *Biochemistry*. **14(13)**: 2824-2831
- Regado M.A., Cristóvão B.M., Moutinho C.G., Balcão V.M., Aires-Barros R., Ferreira J.P.M. & Malcata F.X.** 2007. Flavour development via lipolysis of milkfats: changes in free fatty acid pool. *International Journal of Food Science & Technology*. **42(8)**: 961–968
- Ribitsch D., Herrero Acero E., Greimel K., Eiteljoerg I., Trotscha E., Freddi G., Schwab H., and Guebitz G.** 2012. Characterization of a new cutinase from *Thermobifida alba* regarding PET-surface hydrolysis. *Biocatalysis and Biotransformation*. **30(1)**: 2-9
- Ribitsch D., Yebra A.O., Zitzenbacher S., Wu J., Nowitsch S., Steinkellner G, Greimel K, Doliska A., Oberdorfer G., Gruber C.C., Gruber K., Schwab H., Stana-Kleinschek K., Herrero Acero E., and Guebitz G.M.** 2013. Fusion of Binding Domains to *Thermobifida cellulolytica* Cutinase to Tune Sorption Characteristics and Enhancing PET Hydrolysis. *Biomacromolecules*. **14(6)**: 1769–1776
- Ronkvist Å.M., Lu W., Feder D., and Gross R.A.** 2009. Cutinase-Catalyzed Deacetylation of Poly(vinyl acetate). *Macromolecules*. **42(16)**: 6086–6097
- Rubio M.B., Cardoza R.E., Hermosa R., Gutiérrez S., Monte E.** 2008. Cloning and characterization of the *Thcut1* gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Curr. Genet.* **54(6)**: 301-312

- Sebastião M.J., Cabral J.M.S., and Aires-Barros M.R.** 1996. Improved purification protocol of a *Fusarium solani pisi* recombinant cutinase by phase partitioning in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and phosphate. *Enzyme and Microbial Technology*. **18(4)**: 251-260
- Seras-Franzoso J., Affentranger A., Ferrer-Navarro M., Daura X., Villaverde A., and García-Fruitós E.** 2012. Disulfide Bond Formation and Activation of *Escherichia coli* β -Galactosidase under Oxidizing Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **78(7)**: 2376-2385
- Sereti V., Stamatis H., Kolisis F.N.** 1997. Improved stability and reactivity of *Fusarium solani* cutinase in supercritical CO₂. *Biotechnology Techniques*. **11(9)**: 661-665
- Serralha F.N., Lopes J.M., Prazeres D.M.F., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S., Ribeiro R.** 1998. Zeolites as supports for an enzymatic alcoholysis reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **4(5-6)**: 303-311
- Serralha F.N., Lopes J.M., Lemos F., Ribeiro F.R., Prazeres D.M.F., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S.** 2004. Application of factorial design to the study of an alcoholysis transformation promoted by cutinase immobilized on NaY zeolite and Accurel PA6. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **27(1)**: 19-27
- Silva C.E., Carneiro F., O'Neil A., Fonseca L.P., Cabral J.S.M., Guebitz G., Cavaco-Paulo A.** 2005a. Cutinase—A new tool for biomodification of synthetic fibers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. **43(11)**: 2448-2450
- Silva C.E., Matama T., Guebitz G.M., Cavaco-Paulo A.** 2005b. Influence of organic solvents on cutinase stability and accessibility to polyamide fibers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. **43(13)**: 2749-2753
- Silva C.E., Araújo R., Casal M. Guebitz G.M., Cavaco-Paulo A.** 2007. Influence of mechanical agitation on cutinases and protease activity towards polyamide substrates. *Enzyme and Microbial Technology*. **40(7)**: 1678–1685
- Silva C., Da S., Silva N., Matamá T., Araújo R., Martins M., Chen S., Chen J., Wu J., Casal M. and Cavaco-Paulo A.** 2011. Engineered *Thermobifida fusca* cutinase with increased activity on polyester substrates. *Biotechnol. J.* **6(10)**: 1230-1239
- Soliday C.L. and Kolattukudy P.E.** 1976. Isolation and characterization of a cutinase from *Fusarium roseum culmorum* and its immunological comparison with cutinases from *F. solani pisi*. *Arch. Biochem. Biophys.* **176(1)**: 334-43
- Soliday C.L., Kolattukudy P.E.** 1983. Primary structure of the active site region of fungal cutinase, an enzyme involved in phytopathogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114(3)**: 1017-1022

Soliday C.L., Flurkey W.H., Okita T.W., and Kolattukudy P.E. 1984. Cloning and structure determination of cDNA for cutinase, an enzyme involved in fungal penetration of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81(13)**: 3939-3943

Speranza P., Carvalho P.O., Macedo G.A. 2011. Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* **72**: 181-186

Speranza P., Macedo G.A. 2013. Biochemical characterization of highly organic solvent-tolerant cutinase from *Fusarium oxysporum*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2(4)**: 372-376

Stamatis H., Sereti V., Kolisis F.N. 2001. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* **11(4-6)**: 323–328

Stamatis H., Sereti V., Kolisis F.N. 1999. Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* **76(12)**: 1505-1510

Stavila E., Arsyi R.Z., Petrovic D.M., Loos K. 2013a. *Fusarium solani pisi* cutinase-catalyzed synthesis of polyamides. *European Polymer Journal.* **49(4)**: 834-842

Stavila E., Alberda van Ekenstein G.O., and Loos K. 2013b. Enzyme-catalyzed synthesis of aliphatic-aromatic oligoamides. *Biomacromolecules.* **14(5)**: 1600-1606

Stepan A.M., Anasontzis G.E., Matama T., Cavaco-Paulo A., Olsson L., Gatenholm P. 2013. Lipases efficiently stearate and cutinases acetylate the surface of arabinoxylan films. *J. Biotechnol.* **167(1)**: 16-23

Sulaiman S., Yamato S., Kanaya E., Kim J., Koga Y., Takano K., and Kanaya S. 2011. Isolation of a Novel Cutinase Homolog with Polyethylene Terephthalate-Degrading Activity from Leaf-Branch Compost by Using a Metagenomic Approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **78(5)**: 1556-1562.

Su L., Chen S., Yi L., Woodard R.W., Chen J., Wu J. 2012. Extracellular overexpression of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase by alpha-hemolysin secretion system in *E. coli* BL21(DE3). *Microb. Cell Fact.* **11(8)**

Su L., Woodard R.W., Chen J., Wu J. 2013. Extracellular Location of *Thermobifida fusca* Cutinase Expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) without Mediation of a Signal Peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* **79(14)**: 4192-4198

Suzuki K., Sakamoto H., Shinozaki Y., Tabata J., Watanabe T., Mochizuki A., Koitabashi M., Fujii T., Tsushima S., Kitamoto H.K. 2013. Affinity purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from a yeast isolated from the larval midgut of a stag beetle, *Aegus laevicollis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97(17)**: 7679-7688

Thumarat U., Nakamura R., Kawabata T., Suzuki H., Kawai F. 2012. Biochemical and genetic analysis of a cutinase-type polyesterase from a thermophilic *Thermobifida alba* AHK119. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95(2)**: 419-430

Verrips T., Duboc P., Visser C., Sagt C. 2000. From gene to product in yeast: production of fungal cutinase. *Enzyme Microb. Technol.* **26(9-10)**: 812-818

Vertommen M.A., Nierstrasz V.A., van der Veer M., Warmoeskerken M.M. 2005. Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate). *J. Biotechnol.* **120(4)**: 376-386

Villaverde A. & Carrió M.M. 2003. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* **25(17)**: 1385-1395

van der Vlugt-Bergmans C.J., Wagemakers C.A., van Kan J.A. 1997. Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10(1)**: 21-29

Walz I. and Schwack W. 2007. Cutinase inhibition by means of insecticidal organophosphates and carbamates. 3. Oxidation of phosphorothionates by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *J. Agric. Food Chem.* **55(20)**: 8177-8186

Walz I., Schwack W. 2008. Cutinase inhibition by means of insecticidal organophosphates and carbamates Part 2: screening of representative insecticides on cutinase activity. *European Food Research and Technology.* **226(5)**: 1135-1143

Wang G.Y., Michailides T.J., Hammock B.D., Lee Y., and Bostock R.M. 2002. Molecular Cloning, Characterization, and Expression of a Redox-Responsive Cutinase from *Monilinia fructicola* (Wint.). *Honey Fungal Genetics and Biology.* **35(3)**: 261-276

Wang P., Wang Q., Fan X., Cui L., Yuan J., Chen S., Wu J. 2009. Effects of cutinase on the enzymatic shrink-resist finishing of wool fabrics. *Enzyme and Microbial Technology.* **44(5)**: 302-308

Wang P., Wang Q., Cui L., Fan X., Yuan J., and Gao M. 2010. A comparative evaluation of the action of savinase and papain to the cutinase-pretreated wool. *Fibers and Polymers.* **11(4)**: 586-592

Wang P., Wang Q., Cui L., Gao M. and Fan X. 2011. The combined use of cutinase, keratinase and protease treatments for wool bio-antifelting. *Fibers and Polymers*. **12(6)**: 760-764

Woloshuk C.P. and Kolattukudy P.E. 1986. Mechanism by which contact with plant cuticle triggers cutinase gene expression in the spores of *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. **83(6)**: 1704-1708

Yan H., Hua Z., Qian G., Wang M., Du G., Chen J. 2009a. Analysis of the chemical composition of cotton seed coat by Fourier-transform infrared (FT-IR) microspectroscopy. *Cellulose*. **16(6)**: 1099-1107

Yan H., Hua Z., Qian G., Wang M., Du G., and Chen J. 2009b. Effect of cutinase on the degradation of cotton seed coat in bio-scouring. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **14(3)**: 354-360

Yan H.J., Du G.C., Chen J. 2011. Enhancement of Cotton Waxes Removal with *Thermobifida fusca* Cutinase by Temperature Control Process. *Advanced Materials Research*. **332-334**:81-86

Yang S., Xu H., Yan Q., Liu Y., Zhou P., Jiang Z. 2013. A low molecular mass cutinase of *Thielavia terrestris* efficiently hydrolyzes poly(esters). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40(2)**:217-26

Zhang Y., Chen S., Xu M., Cavoco-Paulo A., Wu J., and Chen J. 2010. Characterization of *Thermobifida fusca* Cutinase-Carbohydrate-Binding Module Fusion Proteins and Their Potential Application in Bioscouring. *Appl. Environ. Microbiol.* **76(20)**: 6870-6876

Zhang Y., Chen S., He M., Chen J., and Wang Q. 2011. Effects of *Thermobifida fusca* cutinase-carbohydrate-binding module fusion proteins on cotton bioscouring. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **16(4)**: 645-653

Zhang Y., Chen S., Wu J., and Chen J. 2012. Enzymatic surface modification of cellulose acetate fibre by cutinase-CBM (carbohydrate-binding module) fusion proteins. *Biocatalysis and Biotransformation*. **30(2)**: 184-189

Μουκούλη Μ. 2012. Χρήση μοριακών εργαλείων για τη μελέτη της καταλυτικής εξειδίκευσης των εστερασών του φερουλικού οξέος. Διδακτορική διατριβή Ε.Μ.Π. Αθήνα