

**Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο**

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

Διπλωματική Εργασία

**Παραγωγή της ενδο-1,4-β-γλουκανάσης *StEG5a* του *Myceliophthora thermophila* από το ζυμομύκητα *P.pastoris***

Κοντού Ευτυχία-Εύα

Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος (Λέκτορας Ε.Μ.Π.)

Αθήνα 2014



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών, του ιδρύματος Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ευάγγελο Τόπακα, υπεύθυνο της διπλωματικής μου εργασίας και Λέκτορα της σχολής Χημικών Μηχανικών, για την ευκαιρία που μου έδωσε να γνωρίσω καλύτερα και πιο ουσιαστικά ένα σημαντικό κομμάτι της διεπιστημονικής και πολυπρόσωπης επιστήμης της Βιοτεχνολογίας.

Ευχαριστώ θερμά τις διδάκτορες του εργαστηρίου που με βοήθησαν και με δίδαξαν στα πρώτα και σημαντικότερα βήματα της διπλωματικής μου, αλλά και που με επέβλεψαν και συμβούλευσαν σε όποια εργαστηριακή δυσκολία αντιμετώπισα. Η συνεισφορά τους υπήρξε καταλυτική για την εξέλιξη και πρόοδο του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας.

Ακόμη, θα επιθυμούσα να διατυπώσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στους κ. Γ. Νούνεση, Διευθυντή Ερευνών στο Βιομοριακό Εργαστήριο Φυσικής, INRASTES και Δρ. Μ. Νομικό, νυν Μέλος Έρευνας ΔΕΠ του Cardiff University Medical School για την ευκαιρία που μου έδωσαν να πραγματοποιήσω την πρακτική μου άσκηση στο Βιομοριακό Εργαστήριο Φυσικής του Δημόκριτου και να αποκομίσω τις πρώτες πρακτικές εμπειρίες μου στον τομέα της Βιοτεχνολογίας. Ωστόσο, θα ήταν παράλειψή μου να μην αναφέρω την αμέριστη, ανιδιοτελή και εν γένει στήριξη τους από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας έως και σήμερα.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω ολόψυχα τους γονείς μου, Δημήτρη και Αγγελική, και την αδελφή μου, Αλεξάνδρα, για την ενθάρρυνση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια. Κλείνοντας, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους αγαπημένους μου Ειρήνη και Άρη, που με στήριξαν και πίστεψαν σε εμένα σε αυτή την κρίσιμη περίοδο της ζωής μου, αλλά και για την υπομονή και κατανόησή τους.



## Περιεχόμενα

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>3</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>1. Φυτική βιομάζα: Πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων</b> .....	<b>15</b>
1.1. Βιοκαύσιμα .....	15
1.1.1. Βιοαιθανόλη .....	17
1.1.2. Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα .....	18
1.2. Λιγνοκυτταρίνη και σύσταση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος.....	19
1.2.1. Κυτταρίνη.....	20
1.2.2. Ημικυτταρίνη .....	22
1.2.3. Λιγνίνη .....	22
1.3. Ενζυμική αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος.....	23
1.3.1. Κυτταρινάσες / Μοριακή δομή.....	24
<b>2. Ενδογλουκανάσες και εξωγλουκανάσες</b> .....	<b>27</b>
2.1. Ενδογλουκανάση.....	27
2.1.1. Μηχανισμός της ενδογλουκανάσης.....	28
2.1.2. Διαμόρφωση καταλυτικής υπομονάδας ενδογλουκανασών.....	29
2.2. Εξωγλουκανάσες .....	29
2.2.1. Διαμόρφωση καταλυτικής υπομονάδας εξωγλουκανασών.....	30
2.3. Β-Γλυκοσιδάσες .....	30
2.4. Έκφραση λιγνοκυτταρινούχων ενζύμων στον μεθυλοτροφικό ζυμομύκητα <i>Pichia pastoris</i> .....	31
2.5. Το λιγνοκυτταρινολυτικό σύστημα του μύκητα <i>Myceliophthora thermophila</i> .....	33
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>3. Υλικά και μέθοδοι</b> .....	<b>37</b>
3.1. Χημικά Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά.....	37
3.2. Συσκευές-Όργανα .....	37
3.3. Θρεπτικά μέσα .....	38
3.4. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers).....	39
3.5. Στελέχη μικροοργανισμών .....	40
3.6. Υγρές και στερεές καλλιέργειες κυττάρων του ζυμομύκητα <i>P.pastoris</i> .....	40
<b>4. Μοριακές τεχνικές DNA</b> .....	<b>41</b>

4.1.	Μετασχηματισμός (transformation) επιδεκτικών κυττάρων (competent cells).....	41
4.1.1.	Κύτταρα <i>P.pastoris</i> .....	41
4.1.2.	Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>P.pastoris</i> .....	42
4.1.3.	Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>P.pastoris</i> .....	42
4.1.4.	<i>pPICZα</i> (Invitrogen).....	43
<b>5.</b>	<b>Μέθοδοι ανάλυσης και χαρακτηρισμού πρωτεϊνών .....</b>	<b>45</b>
5.1.	Παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>P.pastoris</i> .....	45
5.1.1.	Έκφραση σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας (small scale cultures).....	45
5.1.2.	Έκφραση σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale cultures) .....	45
5.1.3.	Διήθηση, συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκειμένου της καλλιέργειας....	46
5.1.4.	Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC).....	47
5.1.5.	Ηλεκτροφόρηση πολυπεπτιδίων (πρωτεϊνών) σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE).....	47
5.1.6.	Εμφάνιση των πρωτεϊνών στα πηκτώματα των ηλεκτροφορήσεων.....	48
5.1.7.	Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης.....	49
5.2.	Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας ενδογλουκανάσης & εξωγλουκανάσης.....	49
5.2.1.	Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας ενδογλουκανάσης & εξωγλουκανάσης σε υποστρώματα πολυσακχαριτών.....	49
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ &amp; ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>		
<b>6.</b>	<b>Βελτιστοποίηση της παραγωγής της ενδο-1,4-β-γλουκανάσης <i>StEG5a</i> από το ζυμομύκητα <i>P.pastoris</i>.....</b>	<b>55</b>
6.1.	Βελτιστοποίηση συνθηκών με βάση το pH.....	56
6.2.	Βελτιστοποίηση συνθηκών με βάση το ποσοστό μεθανόλης.....	58
6.3.	Βελτιστοποίηση συνθηκών με βάση την ταχύτητα ανάδευσης (αερισμός).....	60
6.4.	Βελτιστοποίηση συνθηκών με βάση τον τύπο της φιάλης.....	62
<b>7.</b>	<b>Σύνοψη και σχολιασμός .....</b>	<b>64</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>		
<b>8.</b>	<b>Σύνοψη πινάκων και διαγραμμάτων .....</b>	<b>69</b>
8.1.	Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας.....	69
8.2.	Μετρήσεις ενεργότητας.....	70
8.3.	Αποτελέσματα συγκέντρωσης πρωτεΐνης.....	73
<b>9.</b>	<b>Κατάλογος Εικόνων, Πινάκων, Διαγραμμάτων .....</b>	<b>76</b>
9.1.	Κατάλογος Πινάκων .....	76
9.2.	Κατάλογος εικόνων & διαγραμμάτων.....	76

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

*Αναφορές* ..... **81**





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Η παρούσα εργασία έγινε στα πλαίσια προσπάθειας της δημιουργίας ενός συνδυασμού ενζύμων που βιοαποικοδομούν την κυτταρίνη και βελτιστοποίησης των αναλογιών των ενζύμων αυτών με σκοπό την αποδοτικότερη υδρόλυσή της.

Η *P. pastoris* είναι ευκολότερα διαχειρίσιμη γενετικά και στη διαδικασία της καλλιέργειας, από κύτταρα θηλαστικών και μπορεί να αναπτύσσεται σε υψηλές κυτταρικές πυκνότητες. Εξίσου σημαντικά, η *P. pastoris* είναι επίσης ευκαρυωτική, και έτσι παρέχει τη δυνατότητα για την παραγωγή διαλυτών, σωστά αναδιπλωμένων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που έχουν υποστεί όλες τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που απαιτούνται για τη λειτουργικότητά τους. Για τους παραπάνω λόγους, στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της παραγωγής της ενδο-1,4-β-γλουκανάσης *StEG5a* του μύκητα *Myceliophthora thermophila* από τον ζυμομύκητα *P.pastoris*.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε παραγωγή και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ενδο-1,4-β-γλουκανάσης *StEG5a* και εξω-1,4-β-γλουκανάσης (κελλοβιοϋδρολάσης) *StCBH6a* από μετασχηματισμένα κύτταρα *P.pastoris*. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν καλλιέργειες μικρής και μεγάλης κλίμακας μετασχηματισμένων κυττάρων *P.pastoris* και μελετήθηκε η επίδραση του pH, του ποσοστού (% v/v) μεθανόλης, της ταχύτητας ανάδευσης (rpm), αλλά και του τύπου φιάλης (*Flat-Base* και *Baffled-Base Erlenmeyer Flasks*) στην ανάπτυξη των κυττάρων της ζύμης, στην ενεργότητα της ενδο-1,4-β-γλουκανάσης *StEG5a* και την πρωτεϊνική συγκέντρωση του υπερκειμένου της καλλιέργειας. Τα εξαγόμενα αποτελέσματα συζητήθηκαν και συγκρίθηκαν με αντίστοιχα που προέκυψαν από δημοσιευμένες έρευνες.

Λέξεις-κλειδιά: *P.pastoris*; Ενδο-1,4-β-γλουκανάση; Εξω-1,4-β-γλουκανάση; *Myceliophthora thermophila*; Βελτιστοποίηση; pH; Μεθανόλη; Ταχύτητα ανάδευσης; *Baffled*; *Erlenmeyer*;



## ABSTRACT

---

This thesis is part of an effort to create a combination of enzymes which biodegrade cellulose and to optimize the proportion of these enzymes to a more efficient hydrolysis.

*P. pastoris* is easier to genetically manipulate and culture than mammalian cells and can be grown to high cell densities. Equally important, *P. pastoris* is also a eukaryote, and thereby provides the potential for producing soluble, correctly folded recombinant proteins that have undergone all the post-translational modifications required for functionality. For the above reasons, the aim of this thesis is to optimize the production of endo-1,4- $\beta$ -glucanase *StEG5a* from the fungus *Myceliophthora thermophila* by the *P.pastoris* yeast.

Initially, a production and purification of recombinant proteins of endo-1,4- $\beta$ -glucanase *StEG5a* and exo-1,4- $\beta$ -glucanase (cellobiohydrolase) *StCBH6a* from transformants *P.pastoris* took place. Afterwards, cultures of *P.pastoris* cells were grown in both large and small scale and the effect of pH, methanol percentage (% v / v), stirring speed (rpm), and the type of cylinder (*Erlenmeyer* and *baffled*) were examined versus the yeast cell growth rate, the activity of endo-1,4-beta-glucanase *StEG5a* and the protein concentration of the cell-free supernatant of the culture. The results obtained were discussed and compared with corresponding derived from published studies.

Key words: *P.pastoris*; Endo-1,4- $\beta$ -glucanase; Exo-1,4- $\beta$ -glucanase; *Myceliophthora thermophila*; Optimize; pH; Methanol; Stirring speed; *Baffled*; *Erlenmeyer*;



# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---



# 1. Φυτική βιομάζα: Πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων

## 1.1. Βιοκαύσιμα

Τα βιοκαύσιμα, είναι καύσιμα των οποίων η πρώτη ύλη, που ονομάζεται *βιομάζα*, περιλαμβάνει οποιοδήποτε υλικό προέρχεται από ζωντανούς οργανισμούς. Ειδικότερα, η βιομάζα για ενεργειακούς σκοπούς, περιλαμβάνει κάθε τύπο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή στερεών, υγρών ή/και αέριων καυσίμων.

Υπάρχουν πολλά είδη βιοκαυσίμων, αλλά εκείνα στα οποία η τεχνολογία έχει επικεντρωθεί και ενδιαφέρεται περισσότερο είναι η *βιοαιθανόλη* και το *βιοντίζελ*. Περίπου 1,3lt αιθανόλης ισοδυναμεί ενεργειακά με 1lt βενζίνης. Ο πρώτος που αναφέρθηκε στη δυνατότητα χρήσης της αιθανόλης σαν καύσιμο ήταν ο Φορντ (ιδρυτής της γνωστής βιομηχανίας) το 1890. Η βιοαιθανόλη, είτε αναμιγνύεται αυτούσια με την βενζίνη, είτε μετατρέπεται πρώτα σε αντικροτικό πρόσθετο (αιθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας- ETBE). Παράγεται με αλκοολική ζύμωση από σακχαρούχα φυτά (πχ. σακχαροκάλαμο, σακχαρότευτλα , γλυκό σόργο, κ.ά.) ή αμυλούχα φυτά (πχ. αραβόσιτος, σίτος, κριθή, καλαμπόκι) καθώς και από την αξιοποίηση του μη εδωδισμού λιγνινοκυτταρινούχου κλάσματος της φυτικής βιομάζας (στελέχη, κορμοί), όπως επίσης και από απόβλητα (π.χ. απόβλητα βιομηχανικών τροφίμων) ή παραπροϊόντα (π.χ. ροκανίδια).

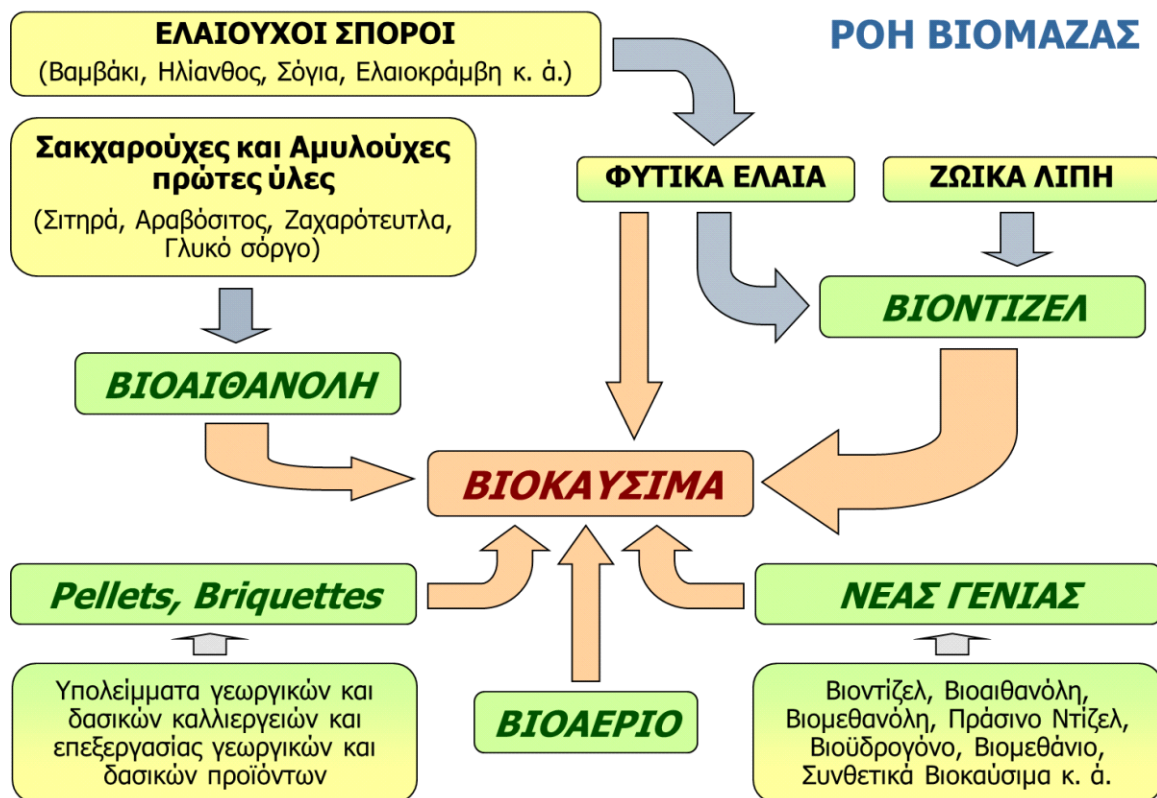


Figure 1.1-a. Εναλλακτικά και ανανεώσιμα καύσιμα από διάφορες πηγές βιομάζας.

Τα βιοκαύσιμα παρέχουν πολλά πλεονεκτήματα και μπορούν να συμβάλλουν τόσο στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος, ελαττώνοντας κυρίως τις εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα όσο και στη μείωση της εξάρτησης από το πετρέλαιο, συμβάλλοντας έτσι στην ασφάλεια του ενεργειακού εφοδιασμού, αλλά και δημιουργώντας εναλλακτικές πηγές εισοδήματος στους αγρότες.

Συγκεκριμένα, η χρήση των βιοκαυσίμων συμβάλλει στη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου που σχετίζονται με την ενέργεια που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του καυσίμου. Το φαινόμενο του θερμοκηπίου είναι φυσικό, ωστόσο ενισχύεται από την ανθρώπινη δραστηριότητα, η οποία συμβάλλει στην αύξηση της συγκέντρωσης των αερίων του θερμοκηπίου καθώς και στην έκλυση άλλων επιβλαβών ενώσεων, όπως οι χλωροφθοράνθρακες (CFC's) και έτσι τα επίπεδα των θερμοκηπικών αερίων στην ατμόσφαιρα είναι τα υψηλότερα των τελευταίων 500.000 ετών. Ειδικότερα, στην περίπτωση του διοξειδίου του άνθρακα, οι εκπομπές του αυξήθηκαν σε ποσοστό 80% τα τελευταία 40 χρόνια. Τα τρία τέταρτα της ανθρωπογενούς παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα, οφείλεται σε χρήση ορυκτών καυσίμων.

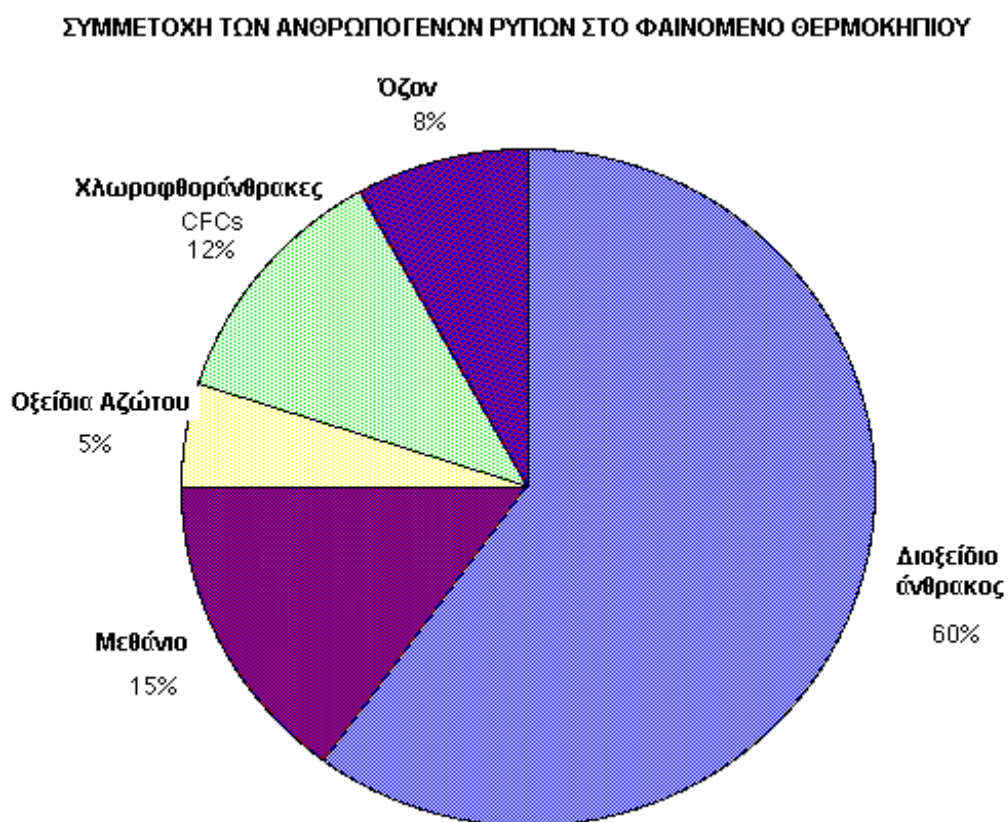


Figure 1.1-b. Συμμετοχή των ανθρωπογενών ρύπων (75% των εκπομπών του CO<sub>2</sub>) στο φαινόμενο του θερμοκηπίου.



Τα βιοκαύσιμα κατά την καύση τους ανακυκλώνουν το διοξείδιο του άνθρακα, καθώς το ποσό που εκλύεται κατά την καύση τους έχει ήδη απομακρυνθεί από την ατμόσφαιρα με τη φωτοσύνθεση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού. Αντίθετα, η καύση των πετρελαιοειδών διαχέει στην ατμόσφαιρα επιπλέον ποσότητες της ουσίας, οι οποίες βρίσκονταν θαμμένες υπόγεια για εκατομμύρια χρόνια. Στην πράξη όμως, η μείωση των εκπομπών από τα βιοκαύσιμα που προέρχονται από ενεργειακές καλλιέργειες είναι μικρότερη, γιατί η ανάπτυξη και η καλλιέργεια των φυτών απαιτεί τη χρήση συμβατικών καυσίμων. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι η χρησιμοποίηση αιθανόλης από καλαμπόκι, αντί της βενζίνης, ως καύσιμο μεταφοράς, μειώνει τις εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου κατά 21%, της αιθανόλης από σακχαροκάλαμο κατά 56%, ενώ της αιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα κατά 91%. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή 1lt βενζίνης προκαλεί την εκπομπή 2.44 lt διοξειδίου του άνθρακα.

### **1.1.1. Βιοαιθανόλη**

---

Το πετρελαϊκό ντίζελ και η βενζίνη αποτελούνται από εκατοντάδες διαφορετικούς υδρογονάνθρακες, πολλοί από τους οποίους, όπως το βενζόλιο, το λουόλιο και ξυλένιο, είναι τοξικοί και πτητικοί και απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα κατά την διάρκεια της καύσης τους. Άλλες τοξικές ενώσεις που απελευθερώνονται είναι το μονοξείδιο του άνθρακα, τα οξείδια του αζώτου, του θείου καθώς και αιωρούμενα σωματίδια.

Η αιθανόλη είναι ένα καύσιμο υψηλού αριθμού οκτανίων (περίπου 113) και με υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο (περίπου 35% κ.β.). Έτσι, αυτοαναφλέγεται σε πολύ μεγαλύτερη συμπίεση από την βενζίνη, επιτρέποντας στους κινητήρες να αποδίδουν πολύ μεγαλύτερη ισχύ. Μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί και ως πρόσθετο αύξησης του αριθμού οκτανίων της βενζίνης. Με την ανάμιξη της με βενζίνη επιτυγχάνεται επίσης και ο εμπλουτισμός του καυσίμου μίγματος σε οξυγόνο, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται μια πιο ολοκληρωμένη καύση και κατά συνέπεια μειωμένες εκπομπές επικίνδυνων καυσαερίων. Η συνεισφορά της στο σχηματισμό οξειδίων του αζώτου είναι ασήμαντη. Από την άλλη, η προσθήκη αιθανόλης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των πτητικών οργανικών ρύπων καθώς και τον σχηματισμό μεγαλύτερων αλδευδών. Το πρόβλημα όμως αυτό αντιμετωπίζεται από τους τριοδικούς καταλύτες που διαθέτουν τα σύγχρονα οχήματα. Η προσθήκη βιοντίζελ μειώνει τις εκπομπές άκαυστων υδρογονανθράκων και μονοξειδίου του άνθρακα. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις μειώνονται οι εκπομπές καπνού και σωματιδίων. Αύξηση παρατηρείται, κυρίως σε χαμηλά φορτία και στροφές του κινητήρα. Η εκπομπή των οξειδίων του αζώτου έχει απασχολήσει πολλούς ερευνητές με πληθώρα αναφορών σχετικά με την αύξηση των εκπομπών αυτών. Η μείωση ή αύξηση των οξειδίων του αζώτου εξαρτάται από τον κύκλο οδήγησης, τον κινητήρα, και την παρουσία ή όχι καταλύτη. Η χρήση του βιοντίζελ μειώνει τις εκπομπές πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, και αυξάνει τις εκπομπές ακρολεΐνης.

Σε μια προσπάθεια να προωθήσει την χρήση των βιοκαυσίμων στον τομέα των μεταφορών στην Ευρώπη, η Ευρωπαϊκή Ένωση υιοθέτησε την κοινοτική οδηγία 2003/30/ΕΚ. Σύμφωνα με τη νομοθεσία αυτή, προβλέπεται ότι τα κράτη μέλη οφείλουν να διασφαλίσουν ότι μια ελάχιστη αναλογία βιοκαυσίμων και άλλων ανανεώσιμων καυσίμων διατίθεται στις αγορές τους, αναλογία η οποία για το 2010 ορίζεται στο 5.75%, υπολογιζόμενη βάσει του ενεργειακού

περιεχομένου, επί του συνόλου της βενζίνης και του πετρελαίου ντίζελ που διατίθεται στις αγορές τους προς χρήση στις μεταφορές.

Με αφορμή τη σχετική οδηγία της ΕΕ, ανοίγεται ένα μεγάλο πεδίο επιχειρηματικής δράσης που μπορεί να προσφέρει μεγάλη προστιθέμενη αξία στη γη και την εργασία του Έλληνα αγρότη. Στην παραγωγή βιοκαυσίμων από ειδικές καλλιέργειες φυτών μπορεί να βασιστεί το μέλλον της ελληνικής γεωργίας. Η νέα τάση που «καθοδηγεί» την ελληνική γεωργία είναι οι ενεργειακές καλλιέργειες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Κατά συνέπεια, οι παραδοσιακές καλλιέργειες μπορούν να μετατραπούν σε ενεργειακές. Για την παραγωγή βιοαιθανόλης, σημαντικό ρόλο αναμένεται να παίξει το γλυκό σόργο, που έχει υψηλότερη στρεμματική απόδοση σε βιοαιθανόλη από τα σακχαρότευτλα, ενώ μετά από δοκιμαστικές καλλιέργειες δείχνει να ευδοκμεί στην Ελλάδα επιτυγχάνοντας υψηλές αποδόσεις. Είναι προφανώς επιθυμητό, τα βιοκαύσιμα που θα διακινηθούν στην ελληνική αγορά να προέρχονται όχι απλώς από εγχώρια εργοστάσια, αλλά και τα εργοστάσια αυτά να χρησιμοποιούν εγχώρια πρώτη ύλη (Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011).

### **1.1.2. Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα**

---

Ανάμεσα στις δυνατές πηγές βιομάζας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοαιθανόλης (π.χ. δασικά κατάλοιπα, αγροτικά παραπροϊόντα, κ.α.) είναι και διάφορα ενεργειακά φυτά, τα οποία διακρίνονται σε σακχαρούχα (σακχαροκάλαμο, σακχαρότευτλο, σόργο), αμυλούχα φυτά (σπόροι σιτηρών), καθώς και ενεργειακά φυτά λιγνοκυτταρινούχου σύστασης (ευκάλυπτος, ψευδακακκία, κενάφ, κυτταρινούχο σόργο, μίσχανθος, αγριαγκινάρα, switch grass, καλάμι). Όταν η πηγή βιομάζας είναι κατάλοιπα λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, απαιτείται ένα στάδιο φυσικοχημικής και ενζυμικής προκατεργασίας απαραίτητο για τη μετατροπή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε γλυκόζη, η οποία με άμεση ζύμωση από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* μετατρέπεται σε αιθανόλη.

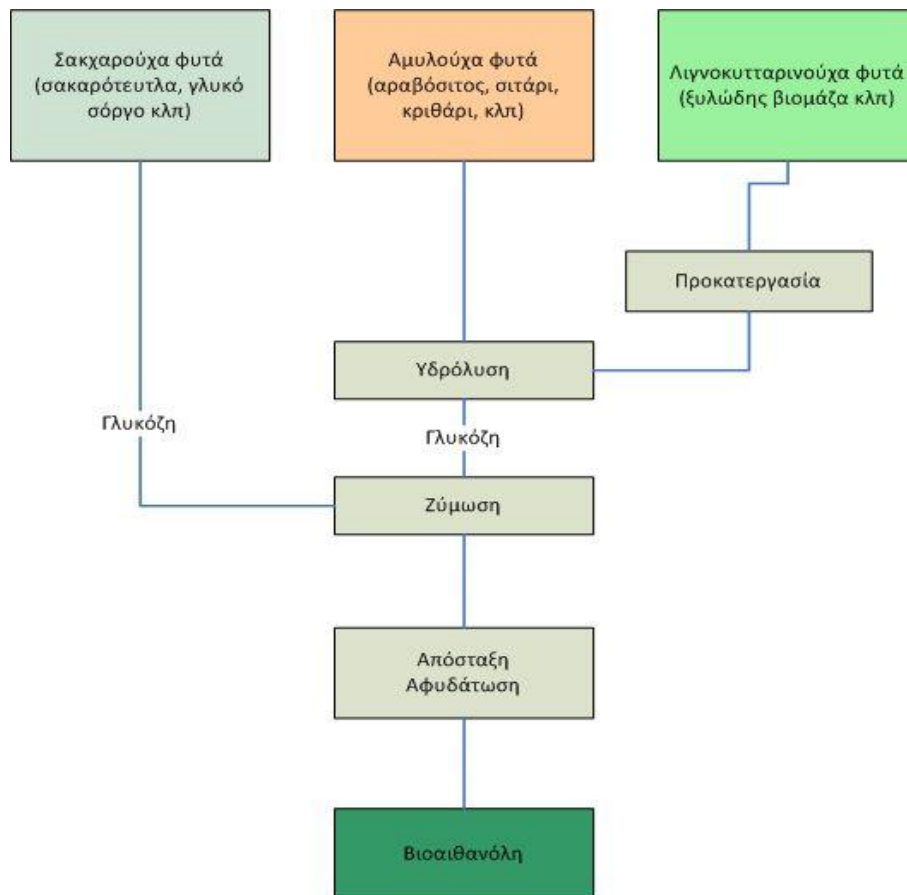


Figure 1.1-c. Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης από διάφορες πηγές βιομάζας.

## 1.2. Λιγνοκυτταρίνη και σύσταση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος

Ο όρος *λιγνοκυτταρίνη* περιγράφει το σύνολο των κύριων συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών, τα οποία είναι: η λιγνίνη, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη. Συγκεκριμένα, η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης της γλυκόζης, οι ημικυτταρίνες είναι πολυσακχαρίτες που ο σκελετός τους αποτελείται από διαφορετικές εξόζες (γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη) και πεντόζες (ξυλόζη, αραβινόζη) και η λιγνίνη είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο από διαφορετικές μονάδες φαινυλοπροπανίου (Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011).

Η εξωκυτταρική μήτρα των φυτικών κυττάρων ονομάζεται κοινώς κυτταρικό τοίχωμα. Είναι ένα ανθεκτικό εξωτερικό περίβλημα, που αποτελείται από κυτταρίνη (cellulose), ημικυτταρίνη (hemicellulose), πηκτίνη (pectin), λιγνίνη (lignin), πρωτεΐνες και διάφορες φαινολικές ενώσεις. Εάν το κυτταρικό τοίχωμα απομακρυνθεί με ενζυματική επεξεργασία, το χωρίς-τοιχώμα κύτταρο (που ονομάζεται «πρωτοπλάστης») διαθέτει ένα σφαιρικό σχήμα. Με την παρουσία του τοιχώματος, ο πρωτοπλάστης παίρνει το σχήμα που ορίζεται από το τοίχωμα που το περιβάλλει, σαν αυτό να ήταν ένα μπαλόνι συμπιεσμένο σε ένα κουτί. Το δίκτυο των κυτταρικών τοιχωμάτων παρέχει ένα δομικό πλαίσιο για το φυτό. Τα τοιχώματα των πλήρως ανεπτυγμένων τμημάτων του σώματος του φυτού είναι σκληρά και άκαμπτα «*δευτερογενή*»

κυτταρικά τοιχώματα ('secondary' cell walls), που είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά τόσο στον εφελκυσμό όσο και στη συμπίεση - αυτό είναι και αυτό που επιτρέπει στα φυτά να κατέχουν μεγάλο μέγεθος, χωρίς να έχουν σκελετό. Αντίθετα, το «πρωτογενές» τοίχωμα ('primary' cell wall) περιβάλλει κύτταρα τα οποία εξακολουθούν να βρίσκονται σε φάση διαίρεσης ή / και την επέκτασης, δεν είναι τόσο άκαμπτα, και μπορούν να τεντωθούν για να επιτρέψουν στα κύτταρα να αναπτυχθούν.

Τα «πρωτογενή» τοιχώματα περιέχουν τρεις κύριες κατηγορίες πολυσακχαριτών. Η πρώτη είναι η κυτταρίνη, ένα πολυμερές υπομονάδων γλυκόζης που συντίθεται και αποτίθεται εντός του τοιχώματος από ένα σύμπλοκο ενζύμου (cellulose synthase) στην πλασματική μεμβράνη. Ατομικά πολυμερή κυτταρίνης συνδέονται σε σύνολα που ονομάζονται «microfibrils». Τα μικροϊνίδια κυτταρίνης συνδέονται μαζί με δύο άλλες κατηγορίες πολυσακχαρίτη - τις ημικυτταρίνες και τις πηκτίνες - που είναι και οι δύο διακλαδισμένοι πολυσακχαρίτες ποικίλης σύστασης, που συντίθενται στο σύμπλοκο Golgi και κατατίθενται στο τοίχωμα μέσω έκκρισης.

Τα κύτταρα στους φυτικούς ιστούς συγκρατούνται μεταξύ τους με τη βοήθεια της μέσης πλάκας, ένα λεπτό μεσοκυττάριο στρώμα που περιέχει κυρίως πηκτικές ενώσεις (Laurie G. Smith, 2001).

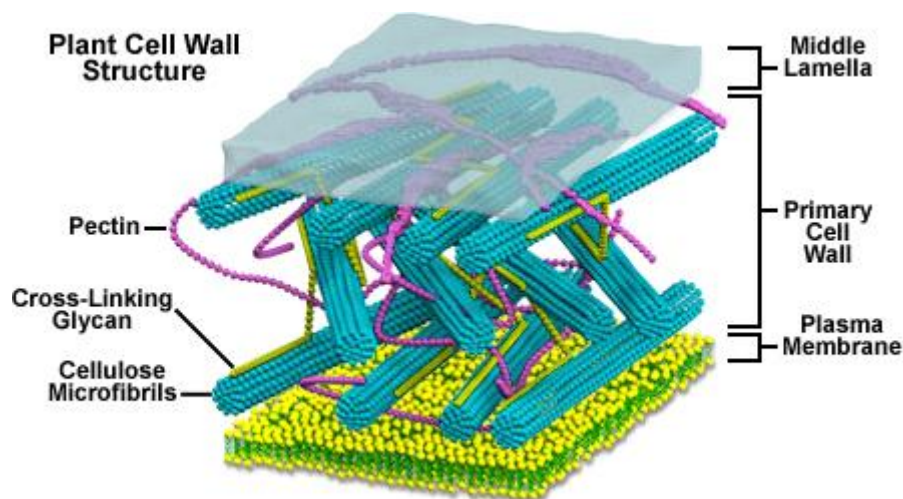
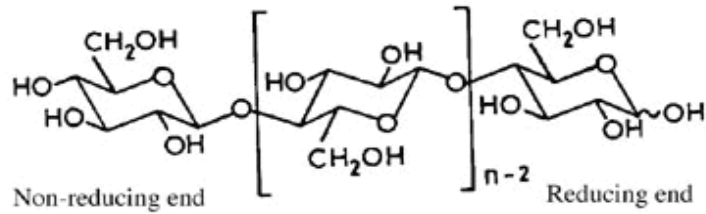


Figure 1.2-a. Δομή της μέσης πλάκας του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών (Laurie G. Smith, 2001).

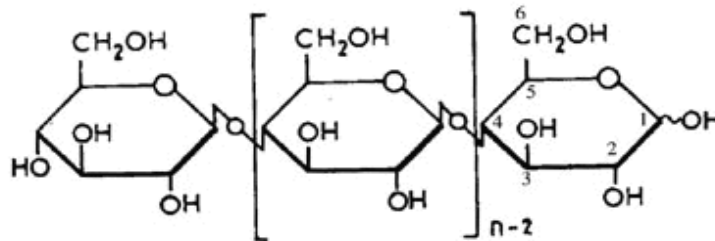
### 1.2.1. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη ανακαλύφθηκε το 1838 από τον Γάλλο χημικό Anselme Payen, ο οποίος την απομόνωσε από φυτική ύλη και προσδιόρισε τον χημικό της τύπο. Ο ίδιος την όρισε ως τον πολυσακχαρίτη που αποτελούσε στοιχειώδες και ομοιόμορφο συστατικό των φυτικών κυττάρων και έτσι την ονόμασε cellulose (cell = κύτταρο). Η κυτταρίνη αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Ο δισακχαρίτης γλυκόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης έχει ένα εύρος από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης.



Sometimes shown as



## Cellulose

Figure 1.2-b. Δομική μονάδα της κυτταρίνης. Εντός των αγκυλών απεικονίζεται η κελλοβιόζη.

Τα πολυμερή κυτταρίνης παρουσιάζονται ως διατεταγμένες δομές που ονομάζονται μικροϊνίδια (cellulose micro fibrils) (Korplak & Blackwell, 1976) και η κύρια λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Τα μικροϊνίδια έχουν διάμετρο 2-20nm και μήκος 100-40000nm και το καθένα περιέχει μέχρι 36 αλυσίδες κυτταρίνης.

Η κυτταρίνη είναι ένας αδιάλυτος πολυσακχαρίτης που σχηματίζει κρυσταλλικές περιοχές. Αυτές σχηματίζονται από τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των μορίων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας κυτταρίνης καθώς και τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ μορίων γλυκόζης που ανήκουν σε διαφορετικές αλυσίδες κυτταρίνης. Ένα μέρος της κυτταρίνης είναι άμορφο και παρεμβάλλεται μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών. Οι δεσμοί υδρογόνου διευθετούν τις αλυσίδες της κυτταρίνης σε παράλληλη επίπεδη διάταξη προκαλώντας ταυτόχρονα και το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των παράλληλων αυτών επιπέδων, δημιουργώντας έτσι συμπαγείς και δύσκολα αποικοδομήσιμες κρυσταλλικές περιοχές. Οι κρυσταλλικές περιοχές της κυτταρίνης έχουν έναν βαθμό κρυσταλλικότητας περίπου 70% ως προς το συνολικό πολυμερές. Οι άμορφες περιοχές είναι πολύ υγροσκοπικές. Τέλος, η κυτταρίνη διογκώνεται και διαλύεται πλήρως από το θειικό ( $H_2SO_4$ ), το υδροχλωρικό ( $HClO_3$ ) και το φωσφορικό οξύ ( $H_3PO_4$ ) (Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011).

### 1.2.2. Ημικυτταρίνη

---

Οι ημικυτταρίνες είναι κυρίως ετερογενείς πολυσακχαρίτες, οι οποίοι αποτελούν τη δεύτερη σε αφθονία οργανική δομή στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών (Collins *et al.*, 2005) και αποτελούνται κυρίως από σάκχαρα όπως εξόζες, πεντόζες και ουρονικά οξέα. Είναι άμορφες (μη κρυσταλλικές), έχουν χαμηλό βαθμό πολυμερισμού, είναι έντονα υγροσκοπικές και παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστηριότητα. Ένα τυπικό πρωτογενές τοίχωμα περιέχει ημικυτταρίνη σε ποσοστό 15-25% επί του ξηρού του βάρους. Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους ένα είδος ημικυτταρίνης κυριαρχεί, με τα υπόλοιπα να εντοπίζονται σε μικρότερες ποσότητες. Υπάρχουν πολλοί και διαφορετικοί τύποι ημικυτταρινών, τις οποίες μπορούμε να ορίσουμε σαν το μίγμα συμπολυμερών ουσιών που μαζί με την κυτταρίνη και τη λιγνίνη συγκροτούν τα κυτταρικά τοιχώματα των ξύλινων ιστών. Είναι άμορφες (όχι κρυσταλλικές), έχουν χαμηλό βαθμό πολυμερισμού (150-300), είναι έντονα υγροσκοπικές και παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστηριότητα.

Πιο αναλυτικά, η ημικυτταρίνη είναι ένα πλέγμα διασταυρωμένων φυτικών μη-κυτταρινικών πολυσακχαριτών, οι οποίοι αποτελούνται από πεντόζες όπως D- ξυλόζη, L-αραβινόζη, L-ραμνόζη και L-φρουκτόζη, από εξόζες όπως D-μαννόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη και ουρονικά οξέα όπως D-γλυκουρονικό οξύ, D-4-Ο-μέθυλ-γλυκουρονικό οξύ και D-γαλακτουρονικό οξύ. Η κατηγοριοποίηση των ημικυτταρινών συνήθως γίνεται με βάση το κυριότερο μονομερές σάκχαρο. Έτσι, οι ημικυτταρίνες διακρίνονται σε γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες, γαλακτάνες και ξυλάνες. Στη φύση, οι ημικυτταρίνες σπάνια αποτελούνται από ένα μόνο τύπο μονοσακχαρίτη. Συνήθως, έχουν μια πολύπλοκη δομή που περιλαμβάνει πάνω από ένα τύπο πολυσακχαριτών, όπως η γλυκουρονοξυλάνη (ξυλόζη και ουρονικό οξύ), η αραβινογλυκουροξυλάνη (αραβινόζη, ξυλόζη και ουρονικό οξύ), η γλυκομαννάνη (ετεροπολυμερές της γλυκόζης και μαννόζης), η αραβινογαλακτάνη (ετεροπολυμερές της αραβινόζης και γαλακτόζης), η ξυλογλυκάνη (ετεροπολυμερές ξυλόζης και γλυκόζης) και η γαλακτογλυκομαννάνη (ετεροπολυμερές γαλακτόζης, γλυκόζης και μαννόζης). Η ξυλάνη είναι το σημαντικότερο ημικυτταρινούχο πολυμερές που συναντάται στα δημητριακά και το σκληρό ξύλο και αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση μετά την κυτταρίνη. Η υδρόλυση της ξυλάνης παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011).

### 1.2.3. Λιγνίνη

---

Η λιγνίνη είναι ένα από τα σπουδαιότερα και πιο άφθονα συστατικά της φυτικής βιομάζας. Η παρουσία της στη φύση είναι στενά συνδεδεμένη με την κυτταρίνη. Δεν βρίσκεται όμως σε όλα τα φυτικά είδη (βρύα, λειχήνες, φύκη). Το ποσοστό της στα είδη ξύλου ποικίλλει (17-35%), ωστόσο, σε ξύλο κωνοφόρων υπάρχει κατά κανόνα περίπου 20-30% περισσότερη λιγνίνη από ότι σε ξύλο πλατύφυλλων.

Είναι άμορφη και έχει πολύ υψηλό βαθμό πολυμερισμού (100.000-300.000). Είναι πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο. Στη λιγνίνη υπάρχουν τρία διαφορετικά φαινυλοπροπάνια και αυτό κάνει τη χημική διαφορά μεταξύ των

κωνοφόρων και πλατύφυλλων. Επίσης, να τονισθεί ότι είναι έντονα υδρόφοβη ουσία αδιάλυτη στο νερό. Οι δεσμοί στη λιγνίνη είναι αιθερικοί δεσμοί καθώς και δεσμοί άνθρακα-άνθρακα. Η λιγνίνη ενώνεται με χημικούς δεσμούς και με τις ημικυτταρίνες και με την κυτταρίνη. Η διάγκωσή της είναι χαμηλή. Υδρολύεται δύσκολα, κυρίως με αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες (150-180). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η λιγνίνη προσδίδει υψηλή αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση (Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011).

### **1.3. Ενζυμική αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος**

---

Η αυξανόμενη παγκόσμια ζήτηση για ενέργεια, σε συνδυασμό με την εξάντληση των αποθεμάτων και την υπερθέρμανση του πλανήτη, έχουν καταστήσει επιτακτική τη σταδιακή αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων από εναλλακτικά μέσα, όπως οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Μεταξύ αυτών, η βιομάζα είναι μία από τις πλέον υποσχόμενες πηγές για την παραγωγή καυσίμων μεταφοράς. Η βιομάζα που προέρχεται από αιθανόλη είναι σήμερα το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο βιοκαύσιμο στις Ηνωμένες Πολιτείες και παράγεται κυρίως από άμυλο ή ζάχαρη. Ωστόσο, δεδομένου ότι τα τελευταία είναι επίσης πηγές τροφίμων, η παραγωγή της δεύτερης γενιάς βιοαιθανόλης, που προέρχεται κυρίως από λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες, είναι ένας στόχος για την κυβέρνηση και τον ιδιωτικό τομέα για τις τρεις τελευταίες δεκαετίες. Η μετατροπή των λιγνοκυτταρινούχων προς αιθανόλη περιλαμβάνει δύο διαδικασίες: την αποικοδόμηση της βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα, που συνήθως καταλύεται από κυτταρινολυτικά ένζυμα, και η ζύμωση των σακχάρων προς αιθανόλη από ζύμες ή βακτήρια. Ανάλογα με τη σύνθεση του εναρκτήριου υλικού, υπάρχουν διάφορες τεχνικές προεπεξεργασίας που έχουν αναπτυχθεί προκειμένου να προετοιμαστεί για το επόμενο βήμα της ενζυμικής υδρόλυσης. Ένα από τα κύρια εμπόδια για την οικονομικά ανταγωνιστική παραγωγή αιθανόλης είναι το υψηλό κόστος των δύο φάσεων προεπεξεργασίας και υδρόλυσης, που προκύπτουν από την αυξημένη δυστροπία της βιομάζας. Μεγάλες προσπάθειες έχουν, επομένως, γίνει στην ανάπτυξη οικονομικά αποδοτικών και ισχυρών βιοκαταλυτών που χρησιμοποιούνται για την αποικοδόμηση της λιγνοκυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα.

Η ενζυμική αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, λόγω της σύνθετης φύσης του και της περίπλοκης δομής του, απαιτεί τη συνεργιστική δράση ενός μεγάλου αριθμού βιοκαταλυτών που διαφέρουν ως προς την εξειδίκευση και το μηχανισμό δράσης τους. Τα ένζυμα που διασπούν, τροποποιούν ή σχηματίζουν γλυκοζιδικούς δεσμούς έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία σε μία διαρκώς αναπτυσσόμενη βάση δεδομένων, την CAZy (Carbohydrate-Active enZymes Database, <http://www.cazy.org/>) (Cantarel, Coutinho *et al.*, 2009). Η CAZy σήμερα διαθέτει 128 οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών (Glycoside Hydrolases, GHs), 94 γλυκοζυλ-τρανσφερασών (GlycosylTransferases, GTs), 22 λυασών (Polysaccharide Lyases, PLs) και 16 εστερασών των πολυσακχαριτών (Carbohydrate Esterases, CEs) και 64 οικογένειες πρωτεϊνών πρόσδεσης σε υδατάνθρακες (CBMs). Μόνο το 3% των ενζύμων που ανήκουν στην CAZy έχουν χαρακτηριστεί βιοχημικά ενώ η τρισδιάστατη δομή μόλις του 0.3% αυτών έχει προσδιορισθεί. Τα παραπάνω ποσοστά αναδεικνύουν την τεράστια προσπάθεια που πρέπει να καταβληθεί ακόμα προκειμένου να διαλευκανθεί πλήρως ο μηχανισμός ενζυμικής αποικοδόμησης του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος (Gilbert, 2010).

Οι υδατάνθρακες (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) που βρίσκονται σε λιγνοκυτταρινούχα υλικά μπορούν να μετατραπούν σε βιοαιθανόλη, αφού πρώτα υδρολυθούν σε μονομερή σάκχαρα. Η υδρόλυσή τους πραγματοποιείται με την χρήση εξειδικευμένων ενζύμων, γνωστών και ως *κυτταρινάσες*. Παλαιότερα, για την μετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε μονομερή σάκχαρα χρησιμοποιούνταν και η όξινη υδρόλυση σε διαλύματα πυκνού οξέος (π.χ. θειικό οξύ), το οποίο πλέον τείνει να εγκαταλειφθεί τελείως λόγω των προβλημάτων που δημιουργεί στον εξοπλισμό, καθώς επίσης, και των περιβαλλοντικών ζητημάτων που εγείρει, καθώς τα απόβλητα που δημιουργούνται θα πρέπει να κατεργαστούν για να αποτοξικοποιηθούν.

Όσον αφορά την ενζυμική υδρόλυση, είναι απαραίτητο να προηγηθεί μία προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (φυσική ή χημική), η οποία θα αυξήσει την επιδεκτικότητα της κυτταρίνης στις διάφορες ενζυμικές δράσεις, απομακρύνοντας ταυτόχρονα την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη που αποτελούν τα φυσικά εμπόδια της δράσης των κυτταρινασών. Παράλληλα, με την προκατεργασία αυτή μπορεί να ελαττωθεί και ο δείκτης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης με αποτέλεσμα την περαιτέρω διευκόλυνση της υδρόλυσής της. Η προκατεργασία της βιομάζας μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους: με εκτόνωση ατμού συνδυαζόμενη με αυτοϋδρόλυση, με εκτόνωση ατμού συνδυαζόμενη με την προσθήκη όξινου καταλύτη, με αραιό οξύ σε ήπιες συνθήκες, με υδροθερμική προκατεργασία, με υγρή προκατεργασία οξειδωσης, με έκρηξη αμμωνίας κτλ. (Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011).

### **1.3.1. Κυτταρινάσες / Μοριακή δομή**

---

Η κυτταρίνη είναι ο κύριος πολυσακχαρίτης που απομένει μετά από τις περισσότερες προκατεργασίες. Τρία είδη ενζύμων δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης: *οι ενδο-1,4-β-γλουκανάσες*, προσβάλλουν εσωτερικά τις άμορφες περιοχές της αλυσίδας της κυτταρίνης, *οι κελλοβιοϋδρολάσες ή εξωγλουκανάσες* προσβάλλουν τα άκρα του πολυμερούς, απελευθερώνοντας κελλοβιόζη, η οποία τελικά διασπάται σε δύο μόρια γλυκόζης από τις *β-γλυκοζιδάσες* (Hayes, 2009).



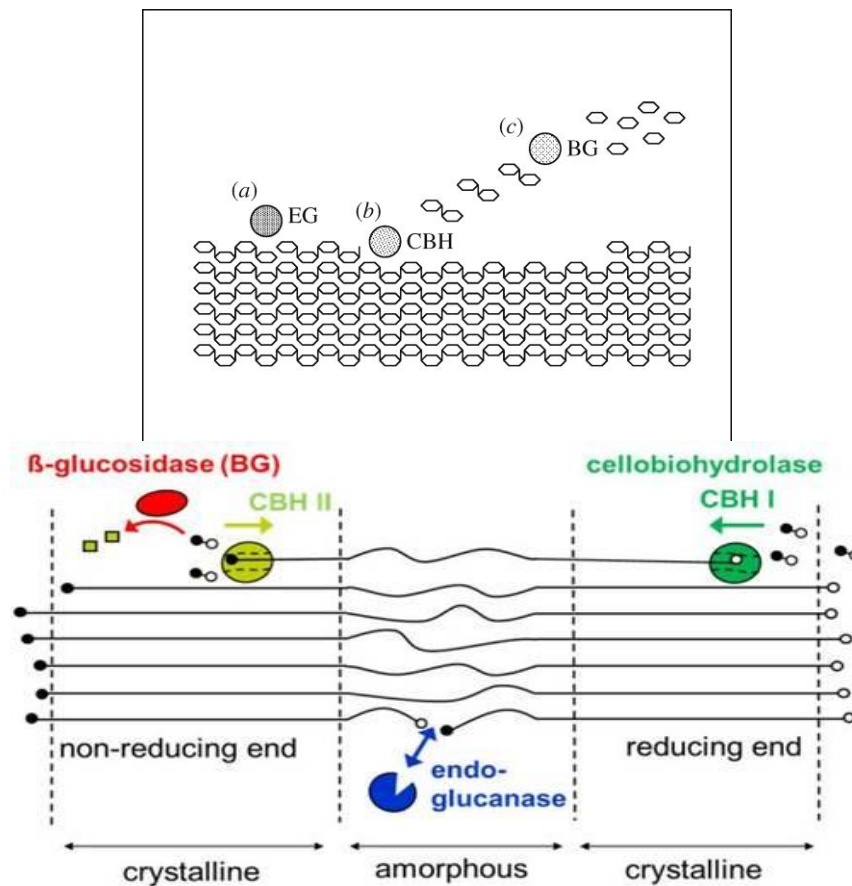


Figure 1.3-a. Απεικονίσεις των κυτταρινασών που αποικοδομούν την αλυσίδα της κυτταρίνης.

Πρόσφατα, νέοι τύποι κυτταρινασών έχουν χαρακτηριστεί και έχουν προστεθεί στα παλαιότερα κλασικά ένζυμα. Συγκεκριμένα, οι *swollenin* από τον μύκητα *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) παρουσιάζουν αμινοξική ομολογία με τις πρωτεΐνες εξαπανσίνες, οι οποίες διασπούν τις ίνες κυτταρίνης χωρίς να εμφανίζουν υδρολυτική ενεργότητα. Έχει διαπιστωθεί ότι η δράση του νέου ενζύμου διευκολύνει την υδρόλυση της κυτταρίνης από τις άλλες κυτταρινάσες (Saloheimo *et al.*, 2002).

Ακόμα, έχουν γνωστοποιηθεί πρόσφατα βιοκαταλύτες που εμπλέκονται στην οξειδωτική διάσπαση της κυτταρίνης, συμπεριλαμβανομένων πολυσακχαριτών μονοοξυγενασών (PMOs ή LPMOs, που σημαίνει λυτικοί PMOs), κελλοβιόζη αφυδρογονασών (CDHs) και μέλη του μοντέλου δέσμευσης υδατανθράκων της οικογένειας 33 (CBM33). Οι πολυσακχαρίτες PMOs, μια νέα κατηγορία ενζύμων που ονομαζόταν προηγουμένως GH61s, ενισχύουν την αποτελεσματικότητα των κοινών κυτταρινασών με αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της υδρόλυσης, ενώ ταυτόχρονα γίνεται μείωση του απαραίτητου πρωτεϊνικού φορτίου. Δρουν στο κρυσταλλικό μέρος της κυτταρίνης δημιουργώντας οξειδωμένα και μη-οξειδωμένα άκρα. Απαιτείται ένας εξωτερικός δότης ηλεκτρονίων για την ενίσχυση της δραστηριότητας των PMOs. Μέχρι και σήμερα γίνεται συζήτηση που αφορά τα πρόσφατα ευρήματα σχετικά με το μηχανισμό δράσης τους και τον εντοπισμό θεμάτων και θεμάτων που πρέπει να αντιμετωπιστούν στο μέλλον (Dimarogona *et al.*, 2012).

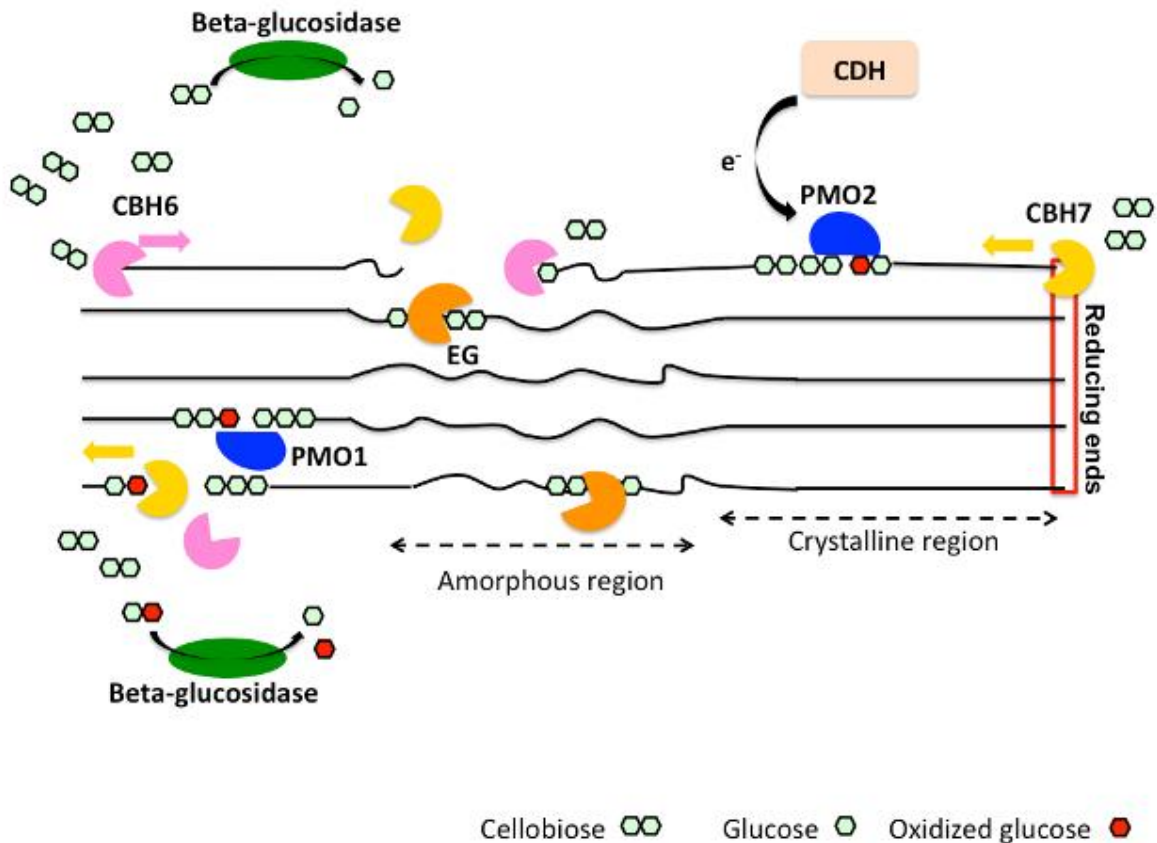


Figure 1.3-b. Ένα απλοποιημένο σχήμα της σύγχρονης ματιάς στην ενζυματική αποικοδόμηση της κυτταρίνης, με τη συμμετοχή κελλοβιοϋδρολασών (CBH), ενδογλουκανασών (EG), τύπου και τύπου 2 PMOs (PMO1 και PMO2, αντίστοιχα). Η CDH (cellobiose dehydrogenase) είναι ένας δυναμικός δότης ηλεκτρονίων για τους πολυσακχαρίτες PMOs. Οι EGs και οι PMOs διασπούν εσωτερικά τις αλυσίδες κυτταρίνης απελευθερώνοντας άκρα της αλυσίδας που στοχοποιούνται από τις CBHs. Οι CBHs παράγουν κελλοβιόζη ή οξειδωμένη κελλοβιόζη που στη συνέχεια υδρολύεται με τη β-γλυκοσιδάση.

Περισσότερες από 90 οικογένειες γλυκοζυλ-υδρολασών έχουν περιγραφεί, σύμφωνα με την τράπεζα δεδομένων CAZy (Carbohydrate Active enZymes). Αυτό το σύστημα κατηγοριοποίησης συνδυάζει τα δομικά και καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων, καθώς τόσο η δομή τους όσο και οι καταλυτικοί μηχανισμοί τους, σχετίζονται άμεσα με την πρωτοταγή τους δομή. Τα ένζυμα της ίδιας οικογένειας εμφανίζουν παρόμοια τριτοταγή δομή και παρόμοιους καταλυτικούς μηχανισμούς, ενώ έχει προταθεί ότι μπορεί να εμφανίζουν παρόμοια εξειδίκευση ως προς μικρά, διαλυτά, τεχνητά υποστρώματα. Οι κυτταρινάσες είναι μέλη των οικογενειών: 1,3,5,6,7,9,10,12,16,44,45,48,51,61,74.

Η μοριακή διαμόρφωση των ενδογλουκανασών και εξωγλουκανασών είναι σημαντική για την καταλυτική τους ενεργότητα και εξειδίκευση. Και τα δύο ένζυμα, εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις, είναι δομικά οργανωμένα σε δύο υπομονάδες. Η μία, η οποία είναι και η μεγαλύτερη, είναι η καταλυτική υπομονάδα που υδρολύει τους γλυκοζιδικούς δεσμούς της αλυσίδας της κυτταρίνης, ενώ η μικρή υπομονάδα δεν έχει κάποιο καταλυτικό ρόλο. Απλά προσδέεται στην κυτταρίνη και έτσι διατηρεί προσδεμένη και την καταλυτική υπομονάδα αυξάνοντας τον χρόνο επαφής της με το αδιάλυτο κυτταρινούχο υπόστρωμα. Η μικρή υπομονάδα ονομάζεται υπομονάδα πρόσδεσης σακχάρων (Carbohydrate Binding Domain, CBD) και συνδέεται με την καταλυτική υπομονάδα μέσω μιας πεπτιδικής αλυσίδας, που αποτελείται συνήθως από 50-60 αμινοξέα (Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011).

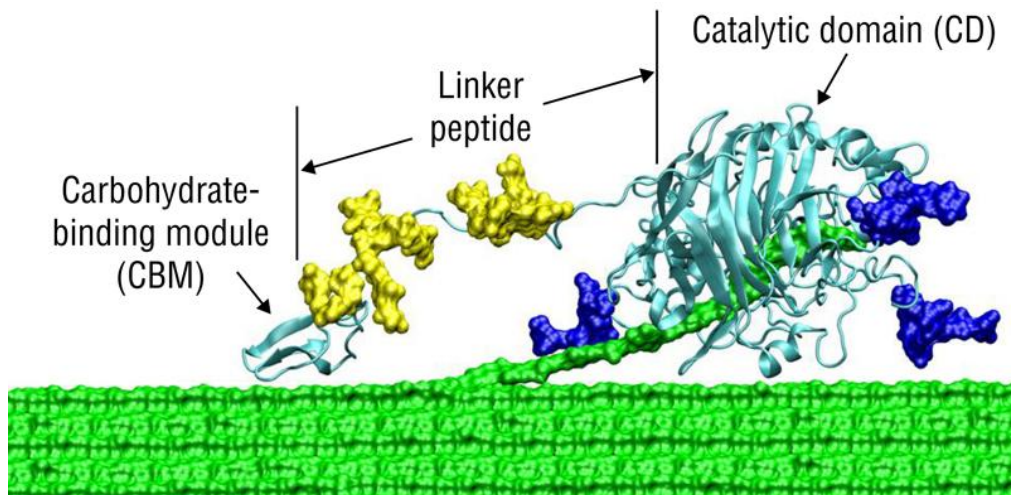


Figure 1.3-c. Το ένζυμο κελλοβιοϋδρολάση από τον μικροοργανισμό *T. reesei* αποτελείται από τρεις υποδομικές αυτοτελείς περιοχές / domains: (αριστερά) μία υπομονάδα πρόσδεσης σακχάρων (CBM); (μέση) ένα συνδετικό πεπτίδιο αποτελούμενο από πολυσακχαρίτες (κίτρινο); και (δεξιά) μια καταλυτική περιοχή (CD) αποτελούμενη από πολυσακχαρίτες (μπλε). Μια ενιαία αλυσίδα κυτταρίνης από το μικροϊνίδιο (πολυμερές) κυτταρίνης (πράσινο) εναποτίθεται ως νήμα σε μια σήραγγα στην περιοχή CD; η αλυσίδα διασπάται και το δι-σακχαρικό προϊόν, η κελλοβιόζη, αποβάλλεται από το δεξιό άκρο της σήραγγας. [Credit: National Renewable Energy Laboratory]

## 2. Ενδογλουκανάσες και εξωγλουκανάσες

### 2.1. Ενδογλουκανάση

Η  $\beta$ -1,4-ενδο-γλουκανάση είναι ένα ειδικό ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση της κυτταρίνης. Παράγεται κυρίως από μύκητες, βακτήρια και πρωτόζωα. Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι ενδογλουκανάσες (EG) καταλύουν την τυχαία διάσπαση των εσωτερικών  $\beta$ -1, 4 γλυκοσιδικών δεσμών της αλυσίδας κυτταρίνης και επιτίθενται στις άμορφες περιοχές του υποστρώματος, παρέχοντας έτσι νέα άκρα για τη δράση της κελλοβιοϋδρολάσης (CBH) (G. S. Oliveira *et al.*, 2012). Τα τελευταία 20 χρόνια, οι ερευνητές έχουν διαπιστώσει ότι ενδογλουκανάσες δεν μπορούν να διασπάσουν πολυσακχαρίτες αποτελεσματικά χωρίς τη βοήθεια των μη καταλυτικών μονάδων πρόσδεσης υδατάνθρακα. Έτσι, ως επί το πλείστον, η ενδογλουκανάση βρίσκεται υπό την μορφή ενός συμπλόκου που αποτελείται από τρεις δομικές αυτοτελείς περιοχές / domains: την καταλυτική υπομονάδα, την υπομονάδα πρόσδεσης στον πολυσακχαρίτη και το συνδετικό πεπτίδιο (linker). Η μια περιοχή περιέχει τον μεγάλο, σφαιρικό καταλυτικό τομέα που εκφράζει την ενεργή θέση.

### 2.1.1. Μηχανισμός της ενδογλουκανάσης

Η CBM "τραβά επάνω" την αλυσίδα και την τροφοδοτεί μέσα στην καταλυτική περιοχή (Figure 2.1-a) (Zhao *et al.*, 2008). Όπως προαναφέρθηκε, η υδροφοβική θέση δέσμησης της CBM που αποτελείται από τρεις τυροσίνες παραμένει σε επαφή με την επιφάνεια σε όλη την αντίδραση, αλλά μπορεί να κινείται ελεύθερα μεταφραστικά. Η CBM υφίσταται μία δομική διαμόρφωση αφότου το υπόστρωμα βρεθεί στη θέση του. Η τέταρτη τυροσίνη ξεδιπλώνεται μέσα από στη CBM και σχηματίζει μία Van der Waals αλληλεπίδραση με την επιφάνεια της κυτταρίνης στην άλλη πλευρά της αλυσίδας, περιλαμβάνοντας έτσι το αναγωγικό άκρο. Ενώ το υπόλοιπο της CBM δομής παραμένει αρκετά άκαμπτο λόγω των δεσμών υδρογόνου (μεταξύ κλώνου βήτα-3 και βήτα-1 και βήτα-2) και των δισουλφιδικών γεφυρών (μεταξύ βήτα-1 και βήτα-2) που διατηρούν την απόσταση, συνδέοντας τα μονομερή κυτταρίνης στη θέση δέσμησης, η τέταρτη τυροσίνη βρίσκεται επί του υπολοίπου ενός βρόχου της πρωτεΐνης και είναι πιο ευέλικτη για την επαγόμενη προσαρμογή (Nimlos *et al.*, 2007). Το ενζυμικό σύμπλοκο οδηγείται από την υδρόλυση του γλυκοσιδικού δεσμού της κυτταρίνης (όπως οι φωσφορικοί δεσμοί στην ATP) ως πηγή ενέργειας, για κίνηση κατά μήκος του υποστρώματός τους (Igarashi *et al.*, 2009).

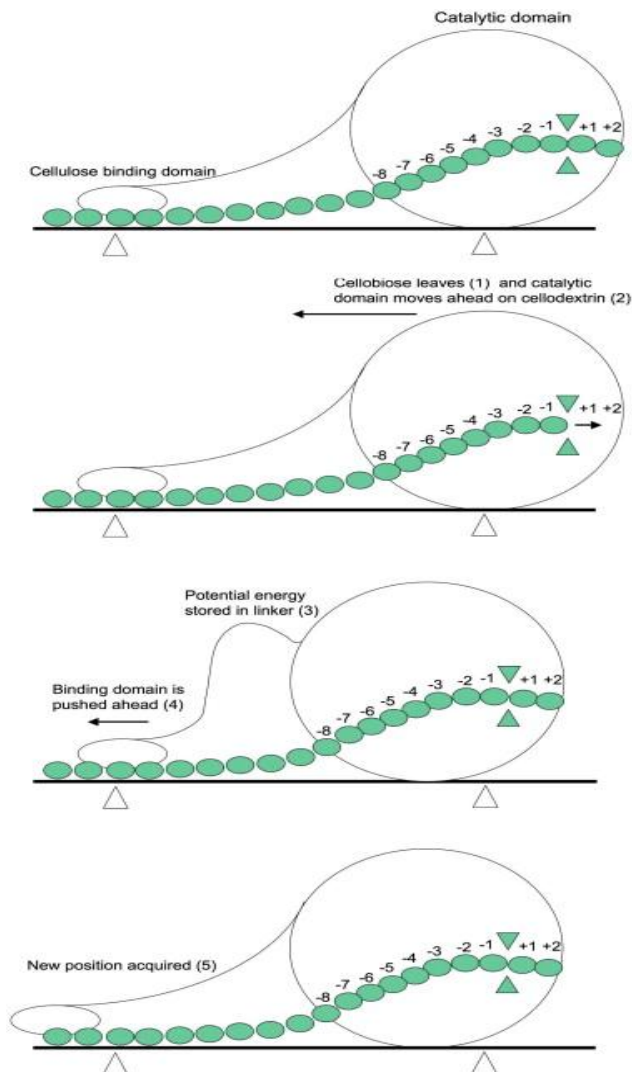


Figure 2.1-a. Αναπαράσταση του μηχανισμού υδρόλυσης από το σύμπλοκο της ενδογλουκανάσης (Zhao *et al.*, 2008).

### 2.1.2. Διαμόρφωση καταλυτικής υπομονάδας ενδογλουκανασών

---

Το ενεργό κέντρο της ενδογλουκανάσης έχει μία ανοιχτή διαμόρφωση, που επιτρέπει την προσέγγιση των αλυσίδων της κυτταρίνης χωρίς κάποια παρεμπόδιση, και έτσι το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση των γλυκοζιδικών δεσμών σε τυχαίες θέσεις του πολυσακχαρίτη.

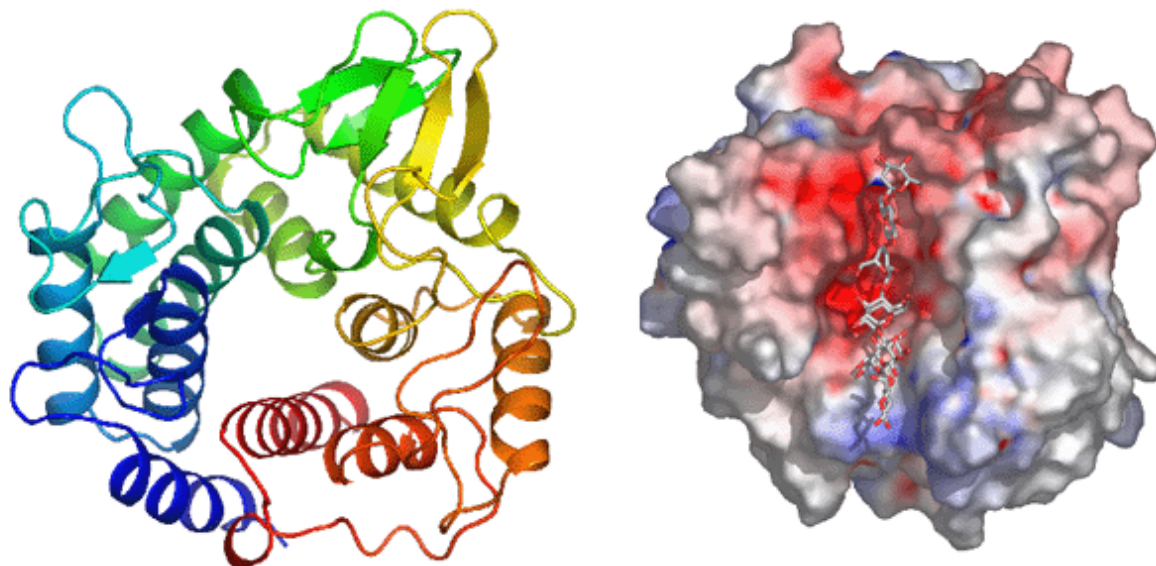


Figure 2.1-b. Δομικός χαρακτηρισμός του *Trichoderma reesei* Endo-  $\beta$ -1,4-Glucanase που απαιτείται για τη βιοσύνθεση της κυτταρίνης με τη δράση πρωτεϊνών.

## 2.2. Εξωγλουκανάσες

---

Οι ενδογλουκανάσες δρουν στις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης και υδρολύουν το μόριο ενεργώντας σε συνέργεια με τις κελλοβιοϋδρολάσες (εξωγλουκανάσες) για να υδρολύσουν το υπόστρωμα σε μικρούς ολιγοσακχαρίτες. Τέλος, η  $\beta$ -γλυκοσιδάση υδρολύει την κελλοβιοζή και μερικούς διαλυτούς ολιγοσακχαρίτες προς γλυκόζη (Ilmén *et al.*, 2011).

Οι κελλοβιοϋδρολάσες (CBH/εξωγλουκανάσες) είναι καθοριστικά ένζυμα για την υδρόλυση της φυσικής κυτταρίνης που περιέχει αυστηρά διατεταγμένες κρυσταλλικές περιοχές. Αυτά τα ένζυμα δρουν τόσο από τα αναγωγικά όσο και από τα μη αναγωγικά άκρα της κυτταρινικής αλυσίδας, απελευθερώνοντας γλυκόζη ή κελλοβιοζή ως κύρια προϊόντα. Οι CBHs δεσμεύουν την αλυσίδα κυτταρίνης σε μια προσεγγιστικά κλειστή σήραγγα και αποκόπτουν μονάδες κελλοβιοζής από το ένα άκρο του κυτταρινικού πολυμερούς, ενώ οι ενδογλουκανάσες έχουν τις δραστικές θέσεις τους σε μια προσεγγιστικά ανοιχτή σχισμή και δείχνουν μεγαλύτερη τάση αποκοπής δεσμών στο εσωτερικό της πολυμερούς.

Η κελλοβιοϋδρολάση Cel7A (που ονομαζόταν παλαιότερα CBH 1), η κύρια κυτταρινάση που παράγεται από τον μύκητα *Trichoderma reesei*, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως χειρόμορφος επιλογή για το διαχωρισμό των στερεοϊσομερών μερικών σημαντικών φαρμακευτικών ενώσεων, π.χ. αδρενεργικοί  $\beta$ -αναστολείς (Jerry Ståhlberg *et al.*, 2001). Γενικά, οι μυκητιακές

κελλοβιοϋδρολάσες από την οικογένεια γλυκοζυλ-υδρολασών 7 είναι βασικά ένζυμα για την υδρόλυση της κρυσταλλικής κυτταρίνης. Ωστόσο, παρουσιάζονται δυσκολίες στην ετερόλογη έκφραση από ένα βακτηριακό ή ζυμομυκητιακό ξενιστή, οι οποίες παρεμποδίζουν την εφαρμογή αυτών των κυτταρινασών στη βιομηχανία (Sanni P. Voutilainen *et al.*, 2007).

### 2.2.1. Διαμόρφωση καταλυτικής υπομονάδας εξωγλουκανασών

Σε αντίθεση με τις ενδογλουκανάσες, το ενεργό κέντρο των εξωγλουκανασών βρίσκεται στο εσωτερικό ενός τούνελ όπου υπάρχουν τουλάχιστον έξι θέσεις πρόσδεσης σακχάρων. Το τούνελ είναι υπεύθυνο για την σωστή τοποθέτηση της αλυσίδας της κυτταρίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και τα σημεία πρόσδεσης εξασφαλίζουν την παραμονή της κυτταρίνης στο τούνελ μετά από κάθε καταλυτική δράση του ενζύμου, το οποίο συνεχίζει την υδρόλυση της κυτταρινικής αλυσίδας με έναν παραγωγικό τρόπο δράσης.

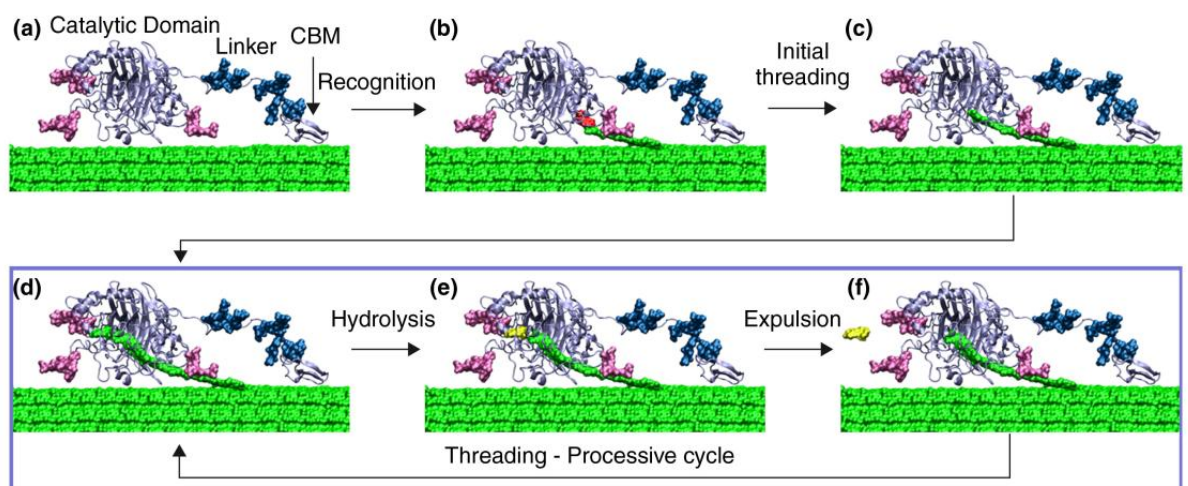


Figure 2.2-a. Δραστηριότητα στο υπόστρωμα της κυτταρίνης (εξωγλουκανάση, Cel7A) του *T. reesei*.

### 2.3. Β-Γλυκοσιδάσες

Η β-γλυκοσιδάση αποκόπτει β-γλυκοσιδικούς δεσμούς σε δισακχαρίτες ή υποκατεστημένα μόρια γλυκόζης και παίζουν σημαντικό ρόλο σε βασικές βιολογικές διεργασίες. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε γεωργικές, βιοτεχνολογικές, βιομηχανικές και ιατρικές εφαρμογές (Wen-Yih Jeng *et al.*, 2011). Είναι γενικά υπεύθυνη για τη ρύθμιση ολόκληρης της κυτταρινολυτικής διαδικασίας και είναι ένας παράγοντας περιορισμού του ρυθμού κατά τη διάρκεια της ενζυματικής υδρόλυσης της κυτταρίνης, καθώς η δραστηριότητα της ενδογλουκανάσης και της εξωγλουκανάσης συχνά παρεμποδίζεται από την κελλοβιόζη (Harhangi *et al.*, 2002). Έτσι, η β-γλυκοσιδάση, όχι μόνο παράγει γλυκόζη από κελλοβιόζη, αλλά μειώνει επίσης την αναστολική δράση της κελλοβιόζης, επιτρέποντας στα δύο ένζυμα (ενδογλουκανάση και εξωγλουκανάση) να λειτουργούν πιο αποτελεσματικά. Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον για τη β-γλυκοσιδάση έχει γίνει πιο έντονο, λόγω της ικανότητάς της να καταλύει αντιδράσεις *trans*-γλυκοζυλιώσεως. Αυτοί οι τύποι αντιδράσεων έχουν μεγάλη

σημασία για τη βιομηχανία του οίνου, λόγω της ικανότητά τους να βελτιώνουν το άρωμα των οίνων.

Αν και υπάρχουν πολλές έρευνες σχετικά με την παραγωγή β-γλυκοσιδάσης από ζύμες (*S. cerevisiae*, *Pichia etchellsii*) και μεσόφιλους μύκητες (*Trichoderma harzianum* και *Aspergillus* sp.), πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι οι θερμοφιλικόι μύκητες (*Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *Sporotrichum thermophile*) και ο νέος μύκητας *Cladosporium resinae* είναι επίσης καλές πηγές β-γλυκοσιδάσης (Pandey and Mishra, 1997; Iwashita et al., 1998; Van Rensburg et al., 1998; Oh et al., 1999; Maheshwari et al., 2000; Parry et al., 2001; Yun et al., 2001). Πρόσφατα, έχουν αναφερθεί ενδογλουκανάσες και β-γλυκοσιδάσες παραγωγής ενός σπάνιου θερμοφιλου μύκητα, *Melanocarpus* sp. Microbial Type Culture Collection (MTCC) 3922 (Kaur et al., 2006), ένας μύκητας που αναφέρθηκε αρχικά να στερείται κυτταρινασών (Maheshwari and Kamalam, 1985).

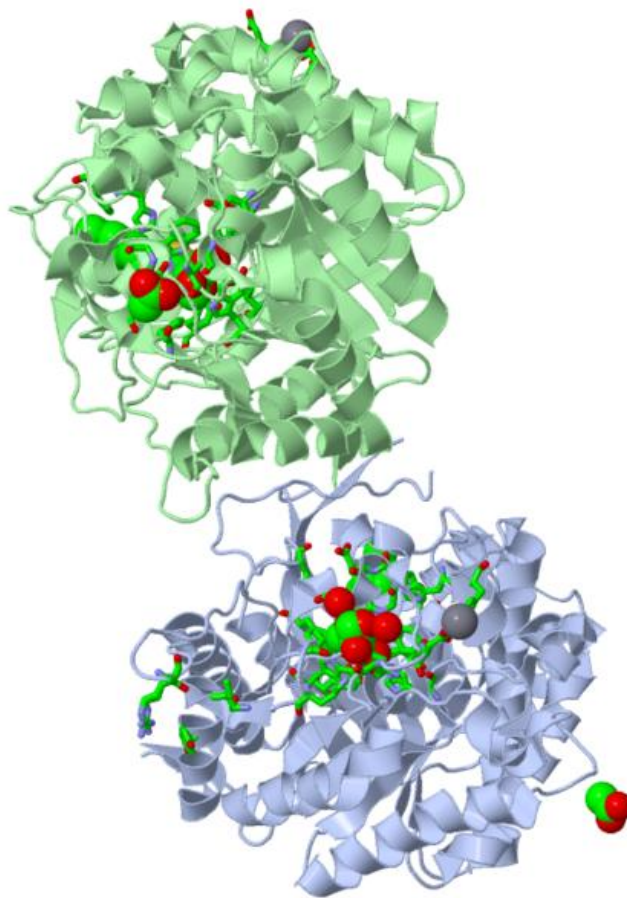


Figure 2.3-0-a. Κρυσταλλική δομή της β-γλυκοσιδάσης.

#### 2.4. Έκφραση λιγνοκυτταρινούχων ενζύμων στον μεθυλοτροφικό ζυμομύκητα *Pichia pastoris*

---

Παρότι η μεθυλότροφη ζύμη *Pichia Pastoris* είναι ένας σχετικά απλός ευκαρυωτικός οργανισμός, μπορεί να εκτελέσει πολλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως είναι η γλυκοζυλίωση, ο σχηματισμός δισουλφιδικού δεσμού και η πρωτεολυτική επεξεργασία. Ως εκ

τούτου, η *Pichia pastoris* εξυπηρετεί ως μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση σε άλλα (πιο δύσκολα στον χειρισμό) εκκριτικά συστήματα έκφρασης μυκήτων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή λιγνοκυτταρινούχων ενζύμων και άλλων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, οι οποίες απαιτούν συνήθως μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις για τη σωστή αναδίπλωση, σταθερότητα και δραστηριότητα. Η δύστροπη και σύνθετη φύση των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων παρέχει τη δυνατότητα εφαρμογής σύνθετων ενζυμικών μιγμάτων για αποδοτική υδρόλυση των ανανεώσιμων αυτών πηγών. Συνεπώς, για την βιώσιμη παραγωγή καυσίμων, χημικών δομικών μονάδων, και λειτουργικών μακρομορίων από τη βιομάζα των φυτών, απαιτείται μία πληθώρα διαφορετικών ενζύμων. Για να παραχθούν όλα αυτά τα ένζυμα και οι παραλλαγές αυτών, θα πρέπει να παρασκευασθούν στελέχη, των οποίων ο χειρισμός και ο μηχανισμός είναι απλός. Ως εκ τούτου, η ζύμη *P. pastoris*, εφόσον είναι ένα καλά περιγραφέν κύτταρο και ένας ευρέως εφαρμόσιμος ξενιστής έκφρασης, είναι η πρώτη επιλογή για την ετερόλογη έκφραση των επιλεγμένων πρωτεϊνών-στόχων. Επιπλέον, σε αντίθεση με πολλά άλλα ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης, η *P. pastoris* εκκρίνει μη ενδογενή λιγνοκυτταρινούχα ένζυμα σε σημαντικές ποσότητες. Συνεπώς, τα ανασυνδυασμένα στελέχη *P. pastoris* μπορούν να παρέχουν σχεδόν καθαρά παρασκευάσματα ετερόλογου ενζύμου, χωρίς την ανάγκη εκτεταμένης και δαπανηρής δευτερογενούς επεξεργασίας. Ακόμα, οι απλές απαιτήσεις σε θρεπτικά μέσα και ο σχετικά εύκολος χειρισμός στους βιοαντιδραστήρες επιτρέπουν ανέξοδες καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της *pichia* συμβάλλουν στις πιθανότητες για μείωση του κόστους παραγωγής λιγνοκυτταρινούχων ενζύμων, ιδιαίτερα στις ερευνητικές μελέτες, στις οποίες απαιτείται χαμηλής και μεσαίας κλίμακας παραγωγή ενζύμων. Ωστόσο, ακόμα και αν η ζύμη αυτή είναι ένας καλός ξενιστής για την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών, υπάρχει ακόμα περιθώριο για βελτιώσεις σε μεταγραφικό, μετα-μεταφραστικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Mellitzer *et al.*, 2012).



## 2.5. Το λιγνοκυτταρινολυτικό σύστημα του μύκητα *Myceliophthora thermophila*

---

Η μικροβιακή μετατροπή της στερεάς κυτταρινικής βιομάζας προς υγρά βιοκαύσιμα μπορεί να παρέχει μια ανανεώσιμη πηγή ενέργειας για καύσιμα μεταφορών, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Οι κυτταρινολυτικοί μύκητες αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη ομάδα οργανισμών, καθώς έχουν εξελίξει πολύπλοκα συστήματα για την προσαρμογή τους στο φυσικό τους περιβάλλον. Ο *Myceliophthora thermophila* (συνώνυμο *Sporotrichum thermophile*) είναι ένας θερμοφίλος νηματοειδής μύκητας, που κατατάσσεται και ως *Ascomycota*, ο οποίος απομονώθηκε από το έδαφος της ανατολικής Ρωσίας και αποτελεί ένα εξαιρετικά ισχυρό κυτταρινολυτικό μικροοργανισμό που συνθέτει ένα πλήρες σύνολο ενζύμων απαραίτητων για τη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Το γονιδίωμα αυτού του μύκητα έχει πρόσφατα αλληλουχηθεί και σχολιασθεί, επιτρέποντας συστηματική εξέταση και ταυτοποίηση των ενζύμων που απαιτούνται για την αποικοδόμηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Η γονιδιωματική ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη μίας ευρείας ενζυματικής ποικιλίας που περιλαμβάνει πολυάριθμες κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και ένζυμα με βοηθητικές δραστηριότητες, που καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος των αναγνωρισμένων CAZy οικογενειών. Τα περισσότερα από αυτά διαθέτουν σύστημα έκκρισης και υποβάλλονται σε τροποποιήσεις μετα-μεταφραστικής γλυκοζυλίωσης. Ερευνητικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι ο οργανισμός *M. thermophila* θα μπορούσε να γίνει χρήσιμος ως ένας ξενιστή βιομηχανικής παραγωγής για κυτταρινολυτικά και ημικυτταρολυτικά ένζυμα (Gusakov, A. V. *et al.*, 2011).



# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---



### 3. Υλικά και μέθοδοι

---

#### 3.1. Χημικά Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά

---

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma – Aldrich (Η.Π.Α.), Panreac (Ισπανία), Applichem (Γερμανία), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και Fisher Scientific (Η.Π.Α), και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SIMAX (Τσεχία), SCHOTT AG (Γερμανία), BOMEX (Κίνα) και ISO LAB (Γερμανία).

Τα ένζυμα και τα τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα (kits) προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες: Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), Fermentas (Η.Π.Α.), New England Biolabs® Inc., (Η.Π.Α.), TAKARA BIO Inc., (Ιαπωνία), Invitrogen (Η.Π.Α.), Invivogen (Γαλλία), Novagen (Η.Π.Α.), Clontech (Η.Π.Α.), EMD4Biosciences (Γερμανία), Stratagene (Η.Π.Α.), BIORAD Laboratories (Η.Π.Α.).

#### 3.2. Συσκευές-Όργανα

---

Οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι οι εξής:

- ΡΗ-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Αυτόκαυστος Labo Autoclave του οίκου SANYO
- Θερμαινόμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufactory Co. Ltd (Κίνα)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης αгарόζης Easigel H1-Z της εταιρείας Scie-plas (Μ. Βρετανία)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία)
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ BIORAD (Η.Π.Α.)
- Συσκευή υπερδιήθησης διαλυμάτων Stirred Cell Model 8400, 400mL και μεμβράνες PM, 10 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.)
- Συσκευή φωτογράφισης σε κλειστό θάλαμο InGenius BioImaging της Syngene (Μ.Βρετανία) και λογισμικό GeneSnap v6.05 και GeneTools v3.06
- Φυγόκεντροι Model J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), ALC 4239R (Μ.Βρετανία) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Φωτόμετρο SPECTRAmax 250 (Molecular Devices, Η.Π.Α.)
- Φωτόμετρο του οίκου Hitachi UV 2000

### 3.3. Θρεπτικά μέσα

---

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο (autoclave) στους 121°C για 15 min και υπό πίεση 0.1 MPa. Η γλυκόζη αποστειρώνεται ξεχωριστά υπό τη μορφή σκόνης. Η σύσταση των θρεπτικών μέσων παρουσιάζεται παρακάτω. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου γίνεται προσθήκη 2 % άγαρ.

Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης της ζύμης <i>P.pastoris</i>	Σύσταση
<u>YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose medium) ± zeocin</u>	1%(w/v) εκχύλισμα ζύμης (yeast) 2% (w/v) πεπτόνη (peptone from meat enzymatic yeast) 2% (w/v) δεξτρόζη ±100 µg/mL zeocin
<u>YPD-agar ± zeocin</u>	1%(w/v) εκχύλισμα ζύμης (yeast) 2% (w/v) πεπτόνη (peptone from meat enzymatic yeast) 2% (w/v) δεξτρόζη 2% (w/v) agar ±100 µg/mL zeocin
<u>YPDS (Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol medium) ± zeocin</u>	1%(w/v) εκχύλισμα ζύμης (yeast) 2% (w/v) πεπτόνη (peptone from meat enzymatic yeast) 2% (w/v) δεξτρόζη 1M σορβιτόλη ±100 µg/mL zeocin
<u>BMGY (Buffered Glycerol Complex Medium)</u>	1 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης (yeast) 2 % (w/v) πεπτόνη (peptone from meat enzymatic yeast) 1 M buffer potassium phosphate pH 6.0 1,34 % (w/v) YNB (yeast nitrogen base without amino acids) 4×10 <sup>-5</sup> % (w/v) βιοτίνη 1 % (v/v) γλυκερόλη
<u>BMMY (Buffered Methanol Complex Medium)</u>	1 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης (yeast) 2 % (w/v) πεπτόνη 1 M buffer potassium phosphate pH 4.0/ 5.0/ 6.0/ 7.0/ 100mM buffer Tris-HCl pH 8.0/ 9.0 1,34 % (w/v) YNB (yeast nitrogen base without amino acids) 4×10 <sup>-5</sup> % (w/v) βιοτίνη 0.5% (v/v) μεθανόλη

### 3.4. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers)

Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάστηκαν με απιονισμένο νερό.

Τα ρυθμιστικά και λοιπά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία αναγράφονται παρακάτω:

Buffer	Σύσταση
<u>Ρυθμιστικά διαλύματα ηλεκτροφόρησης αγαρόζης</u>	
TBE (10x) pH 8.0	108 g/l Tris Base 55 g/l βορικό οξύ 40 mL/l 0.5M EDTA
ΡΔ δείγματος (Sample buffer)	3.55 mL 0.25M Tris-Base pH 6.8 1.8 mL γλυκερόλη 50% (v/v) 1.8 mL β-μερκαπτοαιθανόλη 0.71 g SDS 2.85 mL βρωμοφαινόλη blue 0.1% (w/v)
ΡΔ ηλεκτροφόρησης (Running buffer)	3.03 g/l Tris-Base 14.4 g/l γλυκίνη 1 g/l SDS pH 8.3
Χρωματισμός πηκτής (Solving gel)	0.4 % (w/v) Coomassie G-250 400 mL μεθανόλη 100 mL οξικό οξύ 500 mL ddH <sub>2</sub> O
Αποχρωματισμός πηκτής (Desolving gel)	200 mL μεθανόλη 100 mL οξικό οξύ 700 mL ddH <sub>2</sub> O
<u>Διαλύματα καλλιέργειών της ζύμης P.pastoris</u>	
ΡΔ φωσφορικών pH 6.0	132 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M 868 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M
Διάλυμα YNB	34 g/l YNB χωρίς θειικό αμμώνιο και αμινοξέα 100 g/l θειικό αμμώνιο
Διάλυμα γλυκερόλης 10X	100 mL γλυκερόλης σε 900 mL ddH <sub>2</sub> O
ΡΔ Φωσφορικό- κιτρικό pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 0.1M	500 mL 0.1M Κιτρικό οξύ 500 mL 0.2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
ΡΔ Tris-HCl pH 8.0, 9.0 0.1M	500 mL 0.1M Tris Base (tris(hydroxymethyl)aminomethane)) Πυκνό διάλυμα HCl 0.1M για ρύθμιση pH

pH Talon 8.0

0.3 M NaCl  
50 mM Tris- HCl

### 3.5. Στελέχη μικροοργανισμών

---

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μικροοργανισμοί:

1. Ο θερμοφίλος μύκητας *Sporotrichum thermophile* (ή *Myceliophthora thermophila*) ATCC 42464, ο οποίος προμηθεύτηκε από την εταιρεία DSMZ (DSM No: 1799, Γερμανία)
2. Η μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*, στελέχη X33 (γονότυπος: άγριος τύπος, φαινότυπος: Mut+) (Invitrogen) για την ετερόλογη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

### 3.6. Υγρές και στερεές καλλιέργειες κυττάρων του ζυμομύκητα *P.pastoris*

---

Η ανάπτυξη των στελεχών X33 (άγριος τύπος) έγινε υπό συνεχή ανάδευση (200rpm) στους 28-30° C, σε θρεπτικό υπόστρωμα YPD, σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer (υγρές καλλιέργειες) ή σε υπόστρωμα YPD-άγαρ, σε τρυβλία (στερεές καλλιέργειες). Μετά τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης, τα ανασυνδυασμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό YPDS που περιέχει σορβιτόλη, η οποία αυξάνει το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων. Τα θρεπτικά μέσα MM και MD χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στα στελέχη. Οι καλλιέργειες μικρής κλίμακας των ανασυνδυασμένων στελεχών πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικά μέσα BMGY και BMMY. Εκτός από τις γυάλινες κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer, χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες με εσωτερικά πτερύγια (τύπου *baffled*) για αύξηση του αερισμού και υψηλότερη παραγωγή βιομάζας. Οι στερεές καλλιέργειες της ζύμης σε τρυβλία έπειτα από 48 ώρες επώασης στους 30° C, διατηρήθηκαν για λίγες εβδομάδες σε θάλαμο χαμηλής θερμοκρασίας (4° C).

Για τη φύλαξη μετασηματισμένων και μη στελεχών της *P.pastoris* για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους -20° C και στους -80° C, μονές αποικίες αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό YPD για περίπου 16 ώρες στους 30° C. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα YPD, που περιέχει 15% (v/v) γλυκερόλη, έτσι ώστε η τελική OD<sub>600nm</sub> να είναι 50-100 (περίπου 2.5 – 5.0x 10<sup>9</sup> κύτταρα/mL).



## 4. Μοριακές τεχνικές DNA

---

### 4.1. Μετασχηματισμός (transformation) επιδεικτικών κυττάρων (competent cells)

---

Ο μετασχηματισμός αποτελεί μία διαδικασία κατά την οποία ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισάγονται σε κύτταρα τα οποία έχουν μετατραπεί σε παροδικά διαπερατά μακρομόρια. Ο εντοπισμός των μετασχηματισμένων κυττάρων επιτυγχάνεται από την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά που τους προσδίδει το εισαγόμενο πλασμίδιο (παρουσία αντιβιοτικού θα αναπτυχθούν μόνο τα βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο).

Ο τρόπος μετασχηματισμού διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος και την κυτταρική δομή του ξενιστή. Οι πιο γνωστές μέθοδοι είναι οι εξής:

**A) Χημικός μετασχηματισμός.** Αποδοτικός τρόπος για τα αρνητικά κατά gram βακτήρια.

**B) Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation).** Αποτελεί κατάλληλη διαδικασία μετασχηματισμού για ένα μεγάλο φάσμα κυττάρων, λόγω της χρήσης σύντομου παλμού ηλεκτρικού ρεύματος.

#### 4.1.1. Κύτταρα *P.pastoris*

---

Η διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης περιγράφει την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης κατά την εφαρμογή εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου και χρησιμοποιείται ως τρόπος εισαγωγής κάποιων ουσιών στο κύτταρο. Κατά την εφαρμογή υψηλής τάσης, οι πόροι στην κυτταρική μεμβράνη ανοίγουν παροδικά και έτσι η μεμβράνη γίνεται περατή για πλασμιδιακό DNA [Dower *et al.*, 1988]. Οι πόροι δημιουργούνται όταν το δυναμικό κατά μήκος της μεμβράνης ξεπεράσει τη διηλεκτρική της σταθερά. Αν η δύναμη του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου ή η διάρκεια εφαρμογής επιλεγθούν κατάλληλα, τότε οι πόροι που δημιουργούνται από τον ηλεκτρικό παλμό ξανακλείνουν έπειτα από κάποιο χρονικό διάστημα, κατά τη διάρκεια του οποίου τα εξωκυτταρικά συστατικά έχουν την ευκαιρία να εισαχθούν στο κύτταρο. Ωστόσο, η υπερβολική έκθεση των ζωντανών κυττάρων σε ηλεκτρικά πεδία μπορεί να προκαλέσει απόπτωση και κυτταρικό θάνατο. Η διαδικασία μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση παρουσιάζεται πολύ πιο αποδοτική σε σχέση με μεθόδους χημικού μετασχηματισμού.

Στην προσπάθεια μετασχηματισμού της *P.pastoris* με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης, κατάλληλα επεξεργασμένα κύτταρα της ζύμης γίνονται διαπερατά στο πλασμίδιο, που εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Για μεγαλύτερη ικανότητα μετασχηματισμού, γίνεται μετατροπή του πλασμιδίου σε γραμμικό μόριο πριν τη διαδικασία ηλεκτροδιάτρησης (γραμμικοποίηση (*linearization*) του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZαC με πέψη από την περιοριστική ενδονουκλεάση *SaCI* σε μοναδική θέση αναγνώρισης στην αλληλουχία 5' *AOX1* του πλασμιδίου.). Η μέθοδος έχει ικανότητα μετασχηματισμού  $10^3$ - $10^4$  κύτταρα/μg γραμμικού DNA, χωρίς να καταστρέφει το κυτταρικό τοίχωμα της *P.pastoris* και αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο μετασχηματισμού κυττάρων.

από τις ανασυνδυασμένες αποικίες σχηματίζονται ορατές κυλίδες, οι οποίες αν αφεθούν στον αέρα, οξειδώνονται και γίνονται σκουρόχρωμες και πιο ευδιάκριτες. Οι κυλίδες αυτές μαρτυρούν τη δράση του ενζύμου και συνεπώς υποδεικνύουν τις ανασυνδυασμένες αποικίες ζύμης. Οι αποικίες αυτές απομονώθηκαν από τα τρυβλία MD για περαιτέρω ανακαλλιέργεια και επεξεργασία.

#### **4.1.2. Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *P.pastoris***

---

Για την παρασκευή ηλεκτροδεκτικών κυττάρων, κύτταρα ζύμης σε θρεπτικό υλικό YPD όγκου 50 mL, αναπτύχθηκαν σε κωνική φιάλη Erlenmeyer (250 mL) για 24 ώρες σε περιστρεφόμενο επωαστήρα στους 30o C. Στη συνέχεια, 10 mL από την προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 250 mL θρεπτικού μέσου YPD σε κωνική φιάλη Erlenmeyer (1000 mL). Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 30o C υπό συνεχή ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600nm να ισούται με 1.3 – 1.6 (περίπου 3-4 h). Ακολούθησαν τέσσερις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (1500xg, 5min, 4oC) και αναδιάλυση του πρώτου ιζήματος σε 250 mL αποστειρωμένου και προψυγμένου υπερκάθαρου νερού, του δεύτερου ιζήματος σε 125 mL αποστειρωμένου και προψυγμένου υπερκάθαρου νερού, του τρίτου ιζήματος σε 10 mL αποστειρωμένου και προψυγμένου διαλύματος 1M σορβιτόλης και τέλος, του τέταρτου ιζήματος σε 0.5 mL αποστειρωμένου και προψυγμένου διαλύματος 1M σορβιτόλης. Το τελικό εναιώρημα κυττάρων που προέκυψε είχε όγκο 0.75 mL, περίπου. Τα κύτταρα φυλάσσονται σε πάγο μέχρι τη στιγμή του μετασχηματισμού (την ίδια πάντα ημέρα).

#### **4.1.3. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *P.pastoris***

---

Πριν τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης πραγματοποιήθηκε η γραμμικοποίηση (linearization) του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZaC με πέψη από την περιοριστική ενδονουκλεάση SaCI σε μοναδική θέση αναγνώρισης στην αλληλουχία 5' AOX1 του πλασμιδίου. Η πέψη διήρκησε 3 ώρες και το νουκλεοτιδικό προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με Nucleospin Gel Clean up kit της Macherey-Nagel. Στο τελευταίο βήμα του πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό για την έκλουση του DNA από τη στήλη αντί για ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης για την αποφυγή αλάτων στο προς ηλεκτροδιάτρηση διάλυμα. Στη συνέχεια, 80 µL εναιωρήματος των επιδεκτικών κυττάρων X33 αναμίχθηκε με 30 µL γραμμικού ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZaC (Invitrogen). Ακολούθησε μεταφορά του μίγματος σε προψυγμένη κυψελίδα 0.2 cm (ειδική για ηλεκτροδιάτρηση και πλυμένη σε διάλυμα 70% αιθανόλη) και επώαση σε 4o C για 5 min. Ακολούθησε μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση στη συσκευή GENE PULSER της BIORAD. Μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού προστέθηκε αμέσως 1mL διαλύματος 1M σορβιτόλης και ακολούθησε η μεταφορά του μίγματος σε στείρο σωλήνα τύπου falcon (15 mL) και η επώασή του στους 30o C για 1-2 ώρες. Μετά την επώαση, έγινε επίστρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων X33 σε στερεό θρεπτικό υλικό YPDS που περιείχε ζεοσίνη και επώαση στους 30o C για 3-4 ημέρες.

Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στο στερεό θρεπτικό μέσο εξετάστηκαν για την παρουσία του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Ειδικότερα, 30 αποικίες μεταφέρθηκαν σε 2 τρυβλία με θρεπτικό υλικό MM (minimal methanol medium) στα οποία επάγεται η έκφραση του ανασυνδυασμένου γονιδίου από τον AOX1 υποκινητή, παρουσία μεθανόλης και σε τρυβλία ελέγχου MD (minimal dextrose medium), στα οποία αναπτύσσεται η βιομάζα. Έπειτα από 24 ώρες επώασης στους 30° C, τα τρυβλία MM επιστρώθηκαν με 4mL διαλύματος agarose 1% (w/v), το οποίο περιείχε το ειδικό για την πρωτεΐνη υπόστρωμα (Carboxylethyl-κυτταρίνη, 0.4% w/v). Ακολούθησε χρώση με διάλυμα χρωστικής Congored 1% (w/v) και ξέπλυμα με νερό. Ο αποχρωματισμός έγινε με διαδοχικές εκπλύσεις ανά 10min με διάλυμα NaCl 1M. Γύρω από τις ανασυνδυασμένες αποικίες σχηματίζονται ορατές κυλίδες, οι οποίες αν αφεθούν στον αέρα, οξειδώνονται και γίνονται σκουρόχρωμες και πιο ευδιάκριτες. Οι κυλίδες αυτές μαρτυρούν τη δράση του ενζύμου και συνεπώς υποδεικνύουν τις ανασυνδυασμένες αποικίες ζύμης. Οι αποικίες αυτές απομονώθηκαν από τα τρυβλία MD για περαιτέρω ανακαλλιέργεια και επεξεργασία.

#### **4.1.4. pPICZa (Invitrogen)**

---

Στην παρούσα εργασία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pPICZaC (Invitrogen) για μετασχηματισμό κυττάρων της ζύμης *P.pastoris*.

Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pPICZaC (3598 bp) (Invitrogen) που επιλέχθηκε, επιτρέπει την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στον μεθυλότροφο ζυμομύκητα *P. Pastoris*, αλλά και την έκκρισή τους στον εξωκυττάριο χώρο με τη χρήση της σηματοδοτικής αλληλουχίας  $\alpha$ -factor της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*. Ακόμη, περιέχει τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (AOX1) και περιοχή ομολογίας που επιτρέπει τον αναδυνδασμό και την ενσωμάτωση του γονιδίου στο χρωμόσωμα του μύκητα. Η αλκοολική οξειδάση συμμετέχει στον καταβολισμό της μεθανόλης, οξειδώνοντάς την σε φορμαλδεΰδη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Συνεπώς, μόνο τα κύτταρα που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μπορούν να μεγαλώσουν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει μεθανόλη. Στο πλασμίδιο υπάρχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη, καθώς επίσης κι ένας επίτοπος του c - myc (Glu-Gln- Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) και έξι αμινοξικά κατάλοιπα ιστιδίνης (His), τα οποία επιτρέπουν την ανίχνευση των πρωτεϊνών και τον καθαρισμό τους με τη χρήση στηλών ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.

Figure 1 - EasySelect™ vector maps (pPICZ, pPICZα)

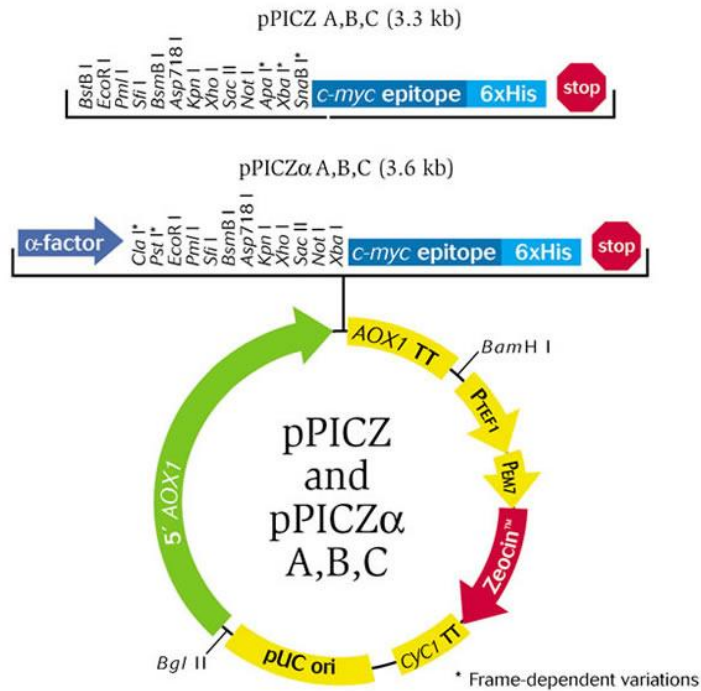


Figure 4.1-a. Εικόνα 2.2 Ο χάρτης του πλασμιδίου pPICZαC της Invitrogen, όπου διακρίνονται: (i) ο υποκινητής του γονιδίου AOX1 (942 bp) που επάγει υψηλά επίπεδα έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης παρουσία μεθανόλης, (ii) το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ζεοσίνη (Zeocin), (iii) το σημείο έναρξης της αντιγραφής (pUC ori), (iv) η περιοχή της σηματοδοτικής αλληλουχίας (α-factor) για την έκκριση της ετερόλογης πρωτεΐνης (v) η περιοχή με τα πολλαπλά σημεία κλωνοποίησης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (vi) η αλληλουχία του c-myc επίτοπου (c-myc epitope) για την ανίχνευση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με το αντίστοιχο αντίσωμα, και (vii) η αλληλουχία κωδικοποίησης έξι συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης (6×His) για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης με τη χρήση στηλών ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.

## 5. Μέθοδοι ανάλυσης και χαρακτηρισμού πρωτεϊνών

---

### 5.1. Παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από μετασχηματισμένα κύτταρα *P.pastoris*

---

Η παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, τα γονίδια των οποίων έχουν υποκλωνοποιηθεί στο πλασμιδιακό φορέα pPICZαC, επάγεται κατά την προσθήκη μεθανόλης στην καλλιέργεια. Η μεθανόλη ενεργοποιεί τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (*AOX1*) και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες οδηγούνται με την βοήθεια του πεπτιδίου-οδηγού (παράγοντας α από την ζύμη *S. cerevisiae*), προς έκκριση στο υπερκείμενο των κυττάρων, γεγονός που καθιστά εύκολη την συλλογή τους. Ο προκαταρκτικός έλεγχος της έκφρασης πραγματοποιείται σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας, ενώ εν συνεχεία, επιλέγεται κλώνος για έκφραση του γονιδίου σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας.

#### 5.1.1. Έκφραση σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας (small scale cultures)

---

Μεμονωμένες αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων X33 της ζύμης *P. Pastoris* που φέρουν το ζητούμενο γονίδιο της πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 50 mL θρεπτικού υλικού BMGY σε γυάλινες κωνικές φιάλες όγκου 250 mL. Ακολούθησε επώαση στους 30°C, υπό ανάδευση (200 rpm) για 16-20 ώρες. Κατάλληλος όγκος της προκαλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε, προκειμένου να απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό που περιείχε γλυκερόλη, και επαναδιαλύθηκε σε 50 mL θρεπτικού υλικού BMMY ώστε η τελική συγκέντρωση κυττάρων να αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα  $O.D._{600nm}=1$ . Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν για επώαση στους 30°C, υπό ανάδευση (200 rpm), ενώ καθημερινά προστίθενται 250 μL μεθανόλης {τελική συγκέντρωση 0.5% (v/v)} για να διατηρηθεί η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Από το υπερκείμενο των καλλιεργειών λαμβάνονταν μικρά δείγματα ( $\approx 1$  mL) κάθε 24 ώρες, προκειμένου να μελετηθεί η ανάπτυξη της ζύμης και να ελεγχθεί η ύπαρξη, καθώς και τα επίπεδα παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με δοκιμές ειδικές για κάθε ένζυμο. Από τον παραπάνω προκαταρκτικό έλεγχο, επιλέχθηκε ο κλώνος της ζύμης, ο οποίος εξέφραζε τη ζητούμενη πρωτεΐνη σε σημαντικά επίπεδα, με σκοπό την έκφραση σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας. Το συγκεκριμένο στέλεχος ανακαλλιεργήθηκε σε τρυβλία YPD με ζεοσίνη στους 4°C, ενώ με κατάλληλη επεξεργασία με γλυκερόλη αποθηκεύτηκε στο -80°C.

#### 5.1.2. Έκφραση σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale cultures)

---

Για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες, αποικίες μετασχηματισμένων κλώνων X33 εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υλικό BMGY όγκου 50 mL σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer. Οι φιάλες επώαστηκαν στους 30°C, για 16-20 ώρες, υπό ανάδευση (200rpm). Ακολούθησε φυγοκέντρωση κατάλληλου όγκου καλλιέργειας BMGY,

συλλογή κυττάρων και επαναιώρηση σε 500 mL θρεπτικού υλικού BMMY, ώστε η οπτική πυκνότητα των κυττάρων στην τελική καλλιέργεια να ισούται με την μονάδα. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε κωνική φιάλη μεγάλης χωρητικότητας (2 lt) για να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες αερισμού. Τα κύτταρα της ζύμης παρέμειναν για επώαση υπό ανάδευση στους 30 °C, για κατάλληλο χρονικό διάστημα με την καθημερινή προσθήκη μεθανόλης 0.5% (v/v). Οι εκκρινόμενες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, απομονώθηκαν σε πρώτη φάση με φυγοκέντρηση (1500 x g) για δέκα λεπτά, στους 4 °C.

### **5.1.3. Διήθηση, συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκειμένου της καλλιέργειας**

Το υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά από φυγοκέντρηση συλλέχθηκε, προκειμένου να συμπυκνωθεί και να απομονωθεί η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη από τις υπόλοιπες εκκρινόμενες πρωτεΐνες της ζύμης. Αρχικά το υπερκείμενο διηθήθηκε υπό κενό, χρησιμοποιώντας διαδοχικά διηθητικό χαρτί και φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.8 και 0.2 μm (Pall Supor Membrane Disc Filters, Pall Filters), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κυτταρικά θραύσματα.

Στη συνέχεια, το διάλυμα που λήφθηκε, συμπυκνώθηκε με την χρήση συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8000 και μεμβράνες PM-10 (Amicon, Millipore. Η.Π.Α.). Η μεμβράνη συγκρατεί μόρια μεγαλύτερα από τη διάμετρο των πόρων της, ενώ τα μικρότερα μόρια διαφεύγουν μαζί με το διάλυμα. Τα συστήματα φυγοκέντρησης που περιλαμβάνουν μεμβράνες υπερδιήθησης είναι κατάλληλα για την απομάκρυνση σακχάρων, νουκλεοτιδίων, μη υδατικών διαλυτών και άλλων σωματιδίων χαμηλού μοριακού βάρους. Για την συμπύκνωση της πρωτεΐνης, εφαρμόζεται πίεση στη στήλη, ενώ η μεμβράνη έχει πόρους διαμέτρου 76 mm. Μετά την υπερδιήθηση, στο εσωτερικό της συσκευής παρέμεινε το συμπυκνωμένο διάλυμα (όγκου περίπου 30 mL) των πρωτεϊνών μοριακού βάρους πάνω από 10 kDa.

Μετά τη συμπύκνωση πρωτεϊνών στη μεμβράνη υπερδιήθησης, το διάλυμα υποβλήθηκε σε εξισορρόπηση με το ρυθμιστικό διάλυμα Talon, το οποίο χρησιμοποιείται και στην επακόλουθη διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης από στήλη χρωματογραφίας. Η διαδικασία έγινε με τη μέθοδο της διαπίδυσης από ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, πόροι διαμέτρου 25 mm, Sigma – Aldrich). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης καθώς μικρά μόρια του διαλύτη δύναται να διαπερνούν την ημιπερατή μεμβράνη μέχρι αποκατάστασης της ισορροπίας στο σύστημα. Η μεμβράνη πριν τη χρήση βυθίστηκε σε βραστό απιονισμένο νερό για 30 λεπτά, ενώ στη συνέχεια έγινε η μεταφορά του διαλύματος των πρωτεϊνών στο 1/3 περίπου του όγκου του σχηματιζόμενου σωλήνα. Το σύστημα παρέμεινε μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου όγκου 3 lt για 20-24 ώρες, στους 4° C, υπό ήρεμη ανάδευση.

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

---

Η χρωματογραφία συγγένειας ακίνητοποιημένου μετάλλου είναι μια μέθοδος που στηρίζεται στην αντιστρεπτή αλληλεπίδραση μεταξύ ορισμένων αμινοξέων των πρωτεϊνών και ιόντων μετάλλων που βρίσκονται ακίνητοποιημένα σε στήλες ρητίνης. Ανάλογα με το ιόν που είναι ακίνητοποιημένο, πλευρικές ομάδες διαφορετικών αμινοξέων εμπλέκονται στη δημιουργία δεσμών και τη δέσμευση της πρωτεΐνης στη στήλη. Ευρέως διαδεδομένα είναι τα ιόντα μετάλλων και ψευδαργύρου που προσδένουν πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα ιστιδίνης, κυστεΐνης και τρυπτοφάνης. Ειδικότερα, σε αλκαλικό περιβάλλον, πρωτεϊνικά μόρια που φέρουν στην αλληλουχία τους έξι συνεχόμενα αμινοξέα ιστιδίνης (6 x His-tag), προσδένονται σε κατιόντα μετάλλου ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), λόγω της αρνητικής φόρτισης των αμινοξικών καταλοίπων. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1975 από τους Porath *et al.*, και αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την απομόνωση ετερόλογων πρωτεϊνών από το σύνολο των αυτόλογων πρωτεϊνικών μορίων του μικροοργανισμού ξενιστή.

#### **5.1.5. Ηλεκτροφόρηση πολυπεπτιδίων (πρωτεϊνών) σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)**

---

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος, με ηλεκτροφόρηση σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS) {Laemmli, 1970}. Το πολυακρυλαμίδιο είναι μια χημικά αδρανής ένωση, σταθερή σε μεγάλο εύρος pH, ιονικής ισχύος και θερμοκρασίας. Το πήκτωμα προκύπτει από τον πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου σε μακριές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου καθώς και από την δημιουργία εγκάρσιων διακλαδώσεων με ομάδες του δις-ακρυλαμιδίου (cross-linking). Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται με την παρουσία μίας χημικής ένωσης που παίζει το ρόλο του καταλύτη, του υπερθειικού αμμωνίου (APS) και ενός ενεργοποιητή, της N,N,N,N – τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED). Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν καθορίζεται και το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος. Κατά την παρασκευή του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου καθώς και κατά την προετοιμασία του προς διαχωρισμό δείγματος χρησιμοποιούνται κυρίως ιοντικά απορρυπαντικά (SDS) αλλά και αναγωγικοί παράγοντες ( $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη), η οποία δημιουργεί αποδιατακτικές συνθήκες (αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών). Το SDS αποδιατάσσει τα μόρια των πρωτεϊνών μετά από θέρμανση, καθώς εξουδετερώνει τους δευτερεύοντες δεσμούς και συνδέεται με τα πολυπεπτιδία με σταθερό λόγο βάρους. Με τον τρόπο αυτό εξουδετερώνεται το φορτίο του πολυπεπτιδίου, μιας και το ενδογενές φορτίο του μορίου είναι ελάχιστο σε σύγκριση με το αρνητικό φορτίο του συνδεδεμένου SDS. Έτσι, η κινητικότητα των πολυπεπτιδίων είναι αντιστρόφως ανάλογη προς το μοριακό τους βάρος.

Αντίθετα με την ηλεκτροφόρηση της αγαρόζης, η ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου με SDS (SDS-PAGE) είναι ασυνεχής. Στην κάθετη ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά σε πήκτωμα χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πήκτωμα επιστοιβάξης, stacking gel), ενώ ο διαχωρισμός πραγματοποιείται, αφού οι πρωτεΐνες περάσουν σε πήκτωμα υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πήκτωμα διαχωρισμού, resolving gel). Το πήκτωμα επιστοιβάξης επιτρέπει τη δημιουργία μεγάλων πόρων, λόγω της μικρής ποσότητας ακρυλαμιδίου που περιέχει. Έτσι, πολυπεπτίδια μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους μετατοπίζονται με την ίδια κινητικότητα και παρατάσσονται όλα μαζί σε μία ιδεατή γραμμή, στο όριο των δύο πήκτωμάτων. Στη συνέχεια, τα μόρια κινούνται στο πήκτωμα διαχωρισμού, διαμέσου πολύ μικρότερων πόρων, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-Protean 3 (BIORAD, Η.Π.Α.). Ένα ζεύγος γυάλινων πλακών (10.1 cm x 7.3 cm και 10.1 cm x 8.3 cm) καθαρίστηκαν με 70% αιθανόλη, ενώθηκαν με τη βοήθεια δύο μεταλλικών σφικτήρων και σταθεροποιήθηκαν πάνω στη συσκευή. Παρασκευάστηκε το διάλυμα διαχωρισμού και εκχύθηκε ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες περίπου 1.5 cm κάτω από την κορυφή τους, όπου και αφέθηκε να πολυμερισθεί για 30 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε και εκχύθηκε το πήκτωμα επιστοιβάξης και τοποθετήθηκε η ειδική «χτένα» ώστε να σχηματισθούν οι οπές φόρτωσης των δειγμάτων. Μετά τον πολυμερισμό του πήκτωματος επιστοιβάξης (30 min), οι πλάκες στερεώθηκαν στα ειδικά δοχεία της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης και προστέθηκαν 400-500 mL ρυθμιστικού διαλύματος SDS 1x. Η «χτένα» απομακρύνθηκε προσεκτικά και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις οπές, αφού είχαν κατεργασθεί κατάλληλα. Η κατεργασία των δειγμάτων έγινε με την προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (7  $\mu$ L) στο πρωτεϊνικό διάλυμα (15  $\mu$ L) και βρασμός του μίγματος για 5-7 min. Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου εκτός από τα δείγματα, τοποθετήθηκαν 5-7  $\mu$ L πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, ή Low Range Markers: sc-2360, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) το οποίο χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των άγνωστων διαλυμάτων πρωτεϊνών. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με 35  $\mu$ A/πήκτωμα για 1 ώρα περίπου.

#### **5.1.6. Εμφάνιση των πρωτεϊνών στα πήκτώματα των ηλεκτροφορήσεων**

---

Μετά το τέλος των ηλεκτροφορήσεων, η χρώση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250. Η μέθοδος στηρίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα και ειδικότερα σε κατάλοιπα αργινίνης (Arg), με αποτέλεσμα την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος. Το πήκτωμα αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση μεταφέρθηκε προσεκτικά σε διάλυμα χρώσης (Staining solution) Coomassie Brilliant Blue G-250 για 20 min και μετά εμβαπτίστηκε σε διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution) μέχρι οι ζώνες των πρωτεϊνών να γίνουν ευδιάκριτες. Καθ' όλη τη διάρκεια χρωματισμού-αποχρωματισμού το πήκτωμα ανακινούταν σε ειδική συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία).



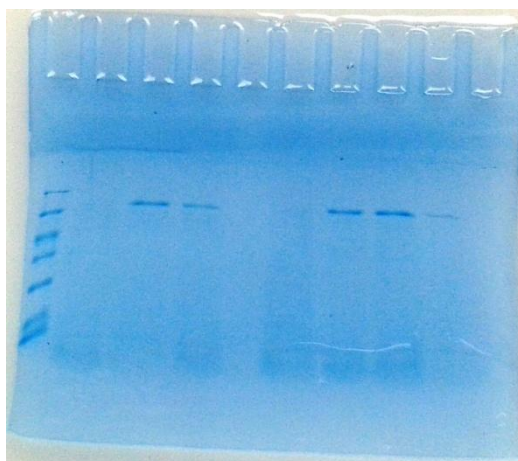


Figure 5.1-a. Χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue μετά το τέλος των ηλεκτροφορήσεων.

### **5.1.7. Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης**

---

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976) Χρωματομετρική μέθοδος Bradford.

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα της όξινης χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να προσδέεται κυρίως σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα και ειδικότερα σε κατάλοιπα αργινίνης, όπως προαναφέρθηκε, με αποτέλεσμα την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος, έντασης ανάλογης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (Bradford, 1976). Η τιμή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης προκύπτει από την τιμή απορρόφησης του συμπλόκου πρωτεΐνη- χρωστική στα 595 nm και τη σύγκριση της μετρούμενης τιμής με πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με χρήση διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων, προσθήκη διαλύματος Bradford και μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm.

## **5.2. Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας ενδογλουκανάσης & εξωγλουκανάσης**

---

### **5.2.1. Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας ενδογλουκανάσης & εξωγλουκανάσης σε υποστρώματα πολυσακχαριτών**

---

Ως μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας (unit, U) ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει το σχηματισμό 1  $\mu\text{mol}$  προϊόντος (ανηγμένα σάκχαρα) από το αντίστοιχο υπόστρωμα στη μονάδα του χρόνου (min) , στους 50° C.

Για την ανίχνευση της ενεργότητας της ενδογλουκανάσης χρησιμοποιήθηκαν τα πολυσακχαριτικά υποστρώματα καρβοξυλμεθυλ-κυτταρίνη (carboxymethylcellulose, CMC, SIGMA) και  $\beta$ -γλουκάνη κριθαριού (barley b-glucan, MEGAZYME). Για την ανίχνευση

ενεργότητας κελλοβιοϋδρολάσης (εξωγλουκανάσης) χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (Avicel, Macherey- Nagel).

<b>Ενεργότητα</b>	<b>Υπόστρωμα</b>
<b>Ενδογλουκανάση</b>	CMC 1% LV (low viscosity), 4% LV β-γλουκάνη κριθαριού 1% w/v
<b>Εξωγλουκανάση</b>	Avicel 2% w/v

Table 1. Πολυσακχαριτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας του ενζύμου [*StEG5a*]

#### **5.2.1.1. Παρασκευή των υποστρωμάτων**

Όλα τα υποστρώματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού φωσφορικού (buffer phosphate citrate) 100 mM, pH 5.0. Το υπόστρωμα CMC είναι σχετικά διαλυτό στο νερό, συνεπώς η παρασκευή του έγινε με σταδιακή προσθήκη της ουσίας (CMC low viscosity) στο ρυθμιστικό διάλυμα και ανάδευση υπό ταυτόχρονη θέρμανση. Το υπόστρωμα διατηρήθηκε στους 4° C. Η μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel) είναι αδιάλυτη και συνεπώς μένει υπό ανάδευση στο ρυθμιστικό διάλυμα κατά την ενζυμική αντίδραση και δεν διατηρείται. Η παρασκευή της β-γλουκάνης κριθαριού έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας MEGAZYME.

#### **5.2.1.2. Δοκιμές με πολυσακχαριτικά υποστρώματα**

Οι δοκιμές στα υποστρώματα CMC και β-γλουκάνη κριθαριού περιλαμβάνουν την ανάμειξη του ενζύμου (50 µL) στο υπόστρωμα (200 µL) και την επακόλουθη επώαση για 15 λεπτά στους 50° -60° C. Στη συνέχεια, σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού αναγωγικών σακχάρων του δινιτροσαλυκυλικού οξέος [DNS, Miller 1959], 250 µL DNS προστέθηκαν στην αντίδραση και ακολούθησε βρασμός για 5 λεπτά. Τέλος, έγινε αραίωση του μίγματος με 2 mL απιονισμένου νερού και φωτομετρήθηκε στα 540 nm. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, με χρήση αντίστοιχων αντιδράσεων ελέγχου (control) με απενεργοποιημένο ένζυμο. Η απελευθέρωση των αναγωγικών σακχάρων προσδιορίστηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης.

Η ενεργότητα σε μικροκρυσταλλική κυτταρίνη μετρήθηκε με προσθήκη 500 µL ενζύμου σε 500 µL Avicel 2% w/v και επώαση υπό ανάδευση για 1 ώρα στους 50°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, μεταφορά 250 µL από το υπερκείμενο σε δοκιμαστικό σωλήνα και προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο του δινιτροσαλυκυλικού οξέος, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

### 5.2.1.3. Ενεργότητα ενδογλουκανάσης σε πολυσακχαριτικά υποστρώματα

Η ενζυμική ενεργότητα του ανασυνδυασμένου ενζύμου μετρήθηκε με την ποσότητα των απελευθερούμενων σακχάρων από αντίδραση σε πολυσακχαριτικά υποστρώματα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος. Ως μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας (unit, U) ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει το σχηματισμό 1 μmol προϊόντος (ανηγμένα σάκχαρα) από το αντίστοιχο υπόστρωμα στη μονάδα του χρόνου (min) , στους 50 °C.

Η ενεργότητα υπολογίσθηκε από τον τύπο:

$$\text{Ενεργότητα (Units/mL)} = \frac{\text{OD} \times \text{αραίωση δείγματος} \times \left( \frac{\text{V}_{\text{αντίδρασης}}}{\text{V}_{\text{ενζύμου}}} \right) \times 1.5506 \times 1000}{\text{MBγλυκόζης} \times \text{χρόνος αντίδρασης}}$$

για τα υποστρώματα κυτταρινασών, από τα οποία η δράση του ενζύμου απελευθερώνει ανηγμένα μόρια γλυκόζης (CMC, HEC, HPMC, λιχενάνη, λαμιναρίνη, β-γλουκάνη, Avicel, pNP ανηγμένα μόρια γλυκόζης γλυκοπυρανοζίτης, αραβικό κόμμι, διηθητικό χαρτί).



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---



## 6. Βελτιστοποίηση της παραγωγής της ενδο-1,4-β-γλουκανάσης *StEG5a* από το ζυμομύκητα *P.pastoris*

---

Σύμφωνα με δεδομένα που προκύπτουν από διεθνή βιβλιογραφία, η ενίσχυση της παραγωγής των πρωτεϊνών από το μικροοργανισμό *P.pastoris* μπορεί να επιτευχθεί με τρεις τρόπους:

- 1) Μέσω ενσωμάτωσης περισσότερων του ενός αντιγράφου του υπό μελέτη γονιδίου στο χρωμοσωμικό DNA του ζυμομύκητα (στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι αναγκαία η χρήση υψηλότερων συγκεντρώσεων αντιβιοτικού για την επιλογή των καταλληλότερων στελεχών) (Romanos *et al.*, 1992),
- 2) χρησιμοποιώντας ειδικά στελέχη ζύμης, τα οποία χαρακτηρίζονται από περιορισμένη παραγωγή πρωτεασών και κατά συνέπεια μειωμένη αποικοδόμηση των ετερόλογων ενζύμων (Gleeson *et al.*, 1998) και τέλος,
- 3) εξασφαλίζοντας τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της ζύμωσης του μικροοργανισμού.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε ο τρίτος τρόπος ενίσχυσης της παραγωγής της ενδογλουκανάσης *StEG5a*, όπου κάθε φορά μία συνθήκη της καλλιέργειας μεταβαλλόταν (αρχικό pH θρεπτικού μέσου, ταχύτητα ανάδευσης, συγκέντρωση μεθανόλης, σχήμα κωνικών φιαλών), ενώ οι υπόλοιπες διατηρούνταν σταθερές. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό μέσο BMMY, σε απλές γυάλινες κωνικές φιάλες Erlenmeyer όγκου 250 mL και σε δεύτερη φάση σε ειδικά σχεδιασμένες φιάλες με εσωτερικά πτερύγια (τύπου baffled). Ο χρόνος επώασης ήταν 168 h, ενώ καθημερινά προστίθετο μεθανόλη. Για όλες τις καλλιέργειες ανεξαιρέτως, πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία προκαλλιέργειας (καλλιέργεια μικρής κλίμακας), όπως περιγράφηκε στην παράγραφο (5.2), με θρεπτικό υλικό BMGY, στους 30°C, pH 6.0 και 200 rpm.

Κατά τη διάρκεια των καλλιεργειών και σε καθημερινή βάση, λήφθηκε δείγμα όγκου 1mL/φιάλη το οποίο, μετά από αραιώση (1:50 ή 1:100) και φωτομέτρηση στα 600 nm, με σκοπό τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ ), φυγοκεντρήθηκε για 1-2 min και το υπερκείμενο φυλάχθηκε στην κατάψυξη. Με τη βοήθεια του πολυσακχαριτικού υποστρώματος καρβοξυλμεθυλ-κυτταρίνη (carboxymethylcellulose, CMC, 1% low viscosity, SIGMA), πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας της ενδογλουκανάσης οικογένειας 5 [*StEG5a*] από τα δείγματα του υπερκειμένου, μέσω της διαδικασίας που περιγράφηκε στην παράγραφο (5.9.1.2.), ενώ με τη μέθοδο Bradford (παρ. 5.8.1.) υπολογίστηκε η συνολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης στον όγκο της καλλιέργειας (mg/mL). Τέλος, με τη βοήθεια του προγράμματος excel, έγινε διαγραμματική απεικόνιση των μετρήσεων για εμφανέστερη σύγκριση των αποτελεσμάτων.

## 6.1. Βελτιστοποίηση συνθηκών με βάση το pH

Μελετήθηκε η επίδραση του αρχικού pH του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στην ενζυμική παραγωγή, υπό σταθερή ανάδευση 200 rpm (rounds per minute) και παροχή 0.5% (v/v) μεθανόλης σε καθημερινή βάση. Για την επίτευξη ενός εύρους διαφορετικών pH (4.0 έως 9.0) χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα phosphate-citrate (pH 4.0-7.0) και Tris-HCl (pH 8.0-9.0) (βλ. παρ. 3.4.), ενώ μελετήθηκε και η ανάπτυξη καλλιέργειας χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα (*unbuffered*). Η μέγιστη ενεργότητα της ενδογλουκανάσης παρατηρήθηκε σε pH 6.0 (2.79 IU/mL/min), ενώ σε αλκαλικό περιβάλλον η απόδοση της ενδογλουκανάσης σχεδόν υποπενταπλασιάστηκε. Ομοίως, η οπτική πυκνότητα των κυττάρων εμφάνισε τη μέγιστη τιμή της σε τιμή αρχικού pH 6.0 και την ελάχιστη σε τιμή pH 9.0. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε διαφωνία με εκείνα που προέκυψαν κατά την προσπάθεια βελτιστοποίησης της παραγωγής ξυλανάσης *FoXyn11* του μεσόφιλου μικροοργανισμού *F. oxysporum* από τη ζύμη *P.pastoris*, όπου τα υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας παρατηρήθηκαν σε pH 7.0 (Μουκουλι Maria *et al.*, 2011). Αντιθέτως, το ανασυνδυασμένο γονίδιο  $\beta$ -mannanase (Man5) από τον *Bacillus subtilis* BS5, βρέθηκε να εκφράζεται ιδανικά σε pH 6.0 (Li RK *et al.*, 2014).

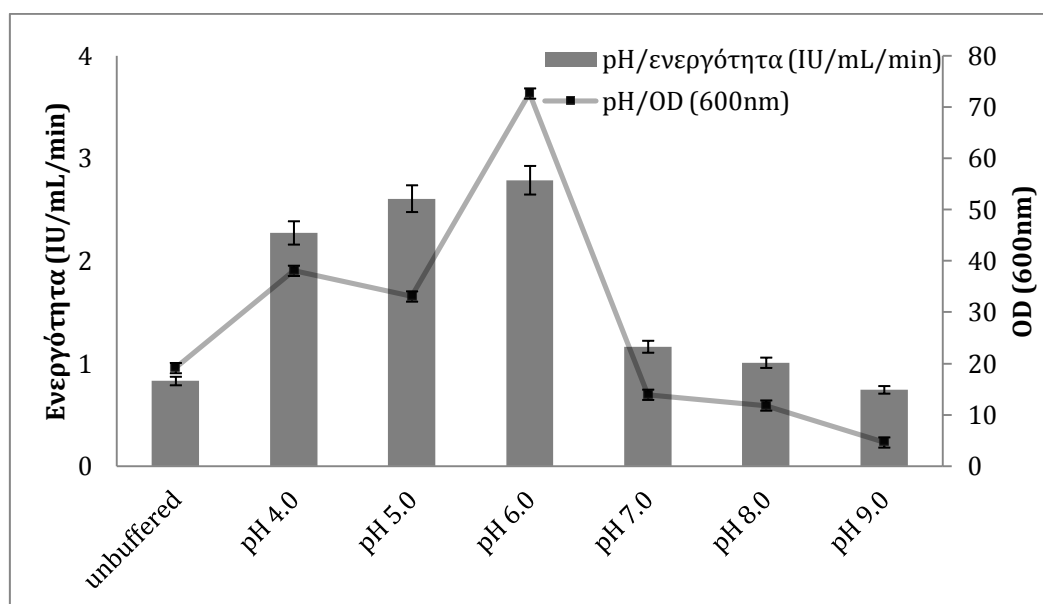


Figure 6.1-a. Απεικόνιση της επίδρασης του αρχικού pH του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας (μετά το πέρας 168 h) στην ενζυμική ενεργότητα της ενδογλουκανάσης *StEG5a* και στην κυτταρική αύξηση της ζύμης *P.pastoris*.



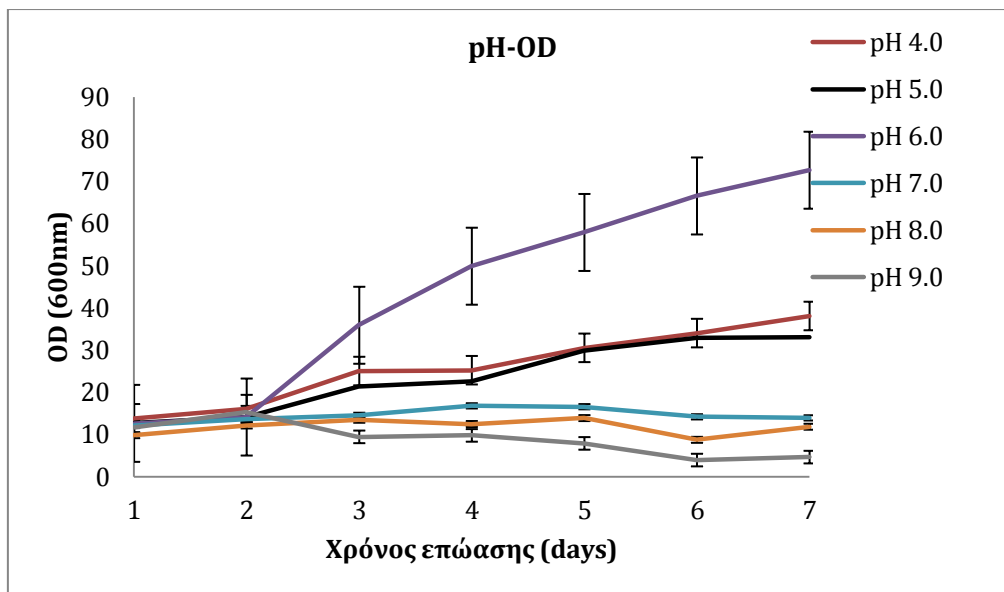


Figure 6.1-b. Απεικόνιση της επίδρασης του αρχικού pH καλλιέργειας στην οπτική πυκνότητα (κυτταρική ανάπτυξη) συναρτήσει του χρόνου.

Στην παραπάνω διαγραμματική απεικόνιση (Figure 6.1-β.) φαίνεται ξεκάθαρα η διαφορά στην κυτταρική ανάπτυξη μεταξύ της καλλιέργειας αρχικού pH 6.0 και όλων των υπολοίπων. Σε πιο αλκαλικό περιβάλλον (pH 8.0 & 9.0) παρατηρείται ακόμη και μείωση της οπτικής πυκνότητας στο πέρας των ημερών, γεγονός που σημαίνει θάνατος των κυττάρων, ο οποίος οδηγεί σε καθίζηση της ζύμης (*Pichia*) στις φιάλες, με αποτέλεσμα το δείγμα που λαμβάνεται να προκύπτει διαυγέστερο μέρα παρά μέρα. Σε πιο όξινο περιβάλλον ωστόσο, φαίνεται ότι η *P.pastoris* αναπτύσσεται περισσότερο (pH 4.0, 5.0). Μετά από έρευνα, έχει αποδειχθεί ότι η ζύμη *P.pastoris* είναι ικανή να αναπτυχθεί σε μία σχετικά ευρεία περιοχή pH (3.0-7.0). Αυτό το εύρος δεν επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη, γεγονός το οποίο επιτρέπει σημαντική ελευθερία στην προσαρμογή του pH σε κάποιο το οποίο δεν είναι βέλτιστο για μια πρωτεάση. Διαφορετικές τιμές pH βρέθηκαν να είναι βέλτιστες από την άποψη της σταθερότητας μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης: το pH 6.0 βρέθηκε βέλτιστο για την παραγωγή του ανασυνδυασμένου επιδερμικού παράγοντα ποντικού και της αλβουμίνης ανθρώπινου ορού και το pH 3.0 βρέθηκε βέλτιστο για την παραγωγή της ινσουλίνης αυξητικού παράγοντα-I (Sue Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Επίσης, κατά την προσπάθεια βελτιστοποίησης της παραγωγής ενδο-β-1,4-ξυλανάσης του *Aspergillus niger* IA-001 από την *Pichia pastoris* η optimum τιμή pH βρέθηκε 5.0 (Gao H. *et al.*, 2014).

Σε προσπάθεια μεγιστοποίησης της παραγωγής ανασυνδυασμένης ενδογλουκανάσης οικογένειας 7 (GH7) από τον μύκητα *Sporotrichum thermophile* με ετερόλογη έκφραση στην ζύμη *P.pastoris*, βρέθηκε ότι παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα σε τιμή pH 5.0, συνθήκη που αντιπροσωπεύει τις συνθήκες αύξησης του *S. thermophile*, οργανισμού στον οποίο παράγεται ενδογενώς. Συμπερασματικά, το ένζυμο StEG7a παρουσιάζει μέγιστο βαθμό δραστηριότητας σε ελαφρώς όξινο pH. Οι ιδιότητες αυτές εξασφαλίζουν τη δυνατότητα χρήσης του ενζύμου σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές που απαιτούν χαμηλό pH, όπως οι διεργασίες τροφίμων και ποτών και οι διεργασίες επεξεργασίας υφασμάτων. Παρόμοια χαρακτηριστικά φέρουν και άλλες ενδογλουκανάσες που έχουν χαρακτηριστεί και παράγονται από μύκητες, όπως ο *Formitopsis*

*pinicola* (pH 5.0) [Yoon *et al.*, 2008], ο *Aspergillus niger* (pH 4.5) [Shumiao *et al.*, 2010], ο *Aspergillus aculeatus* (pH 5.0) [Naika *et al.*, 2007], ο *Aspergillus terreus* (pH 5.5) [Youssef, G.A. and M.M. Berekaa, 2009], το στέλεχος TOP 10 της *E. coli* (pH 6.0) [Li *et al.*, 2009], ο *Thermoascus aurantiacus* (pH 4.5) [I. Gomes *et al.*, 2000] και το στέλεχος *Bacillus M-9* (pH 5.0) [Bajaj *et al.*, 2009].

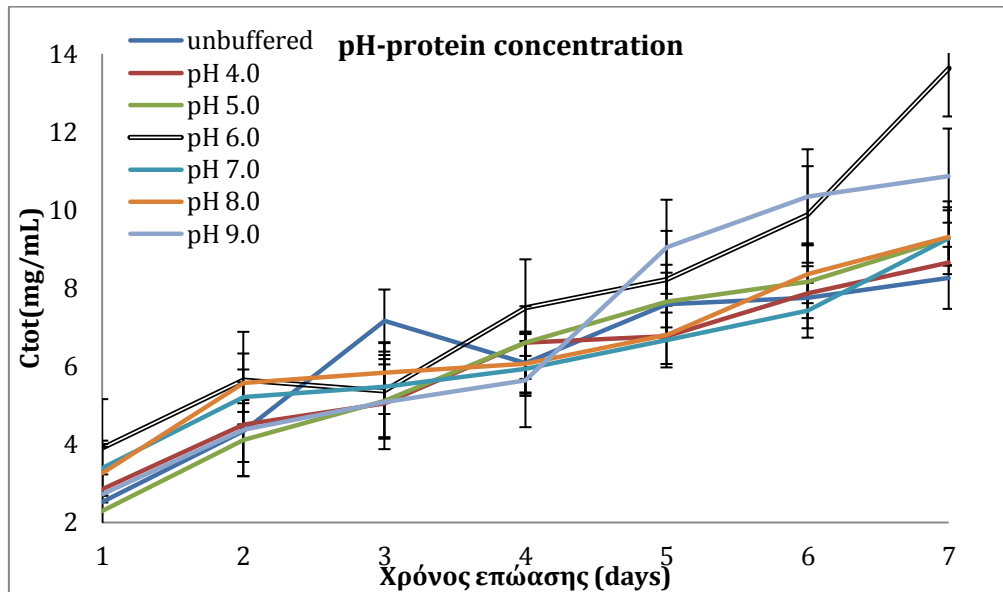


Figure 6.1-c. Απεικόνιση της επίδρασης του αρχικού pH καλλιέργειας στην συγκέντρωση της πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Bradford που απεικονίζονται παραπάνω [Figure 6.1-c] συμφωνούν με τα αναμενόμενα.

## 6.2. Βελτιστοποίηση συνθηκών με βάση το ποσοστό μεθανόλης

Διατηρώντας την ταχύτητα ανάδευσης στα 200 rpm και το pH του μέσου BMMY στο 6.0, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της μεθανόλης στην έκφραση του γονιδίου. Κάθε 24 h προστίθεντο σε πέντε ζεύγη καλλιιεργειών 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 και 2.5% (v/v) μεθανόλη (MetOH), αντίστοιχα. Στη συγκέντρωση 0.5% παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα ενδογλουκανάσης (2.79 IU/mL/min), ενώ αντιθέτως στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μεθανόλης τα επίπεδα αυτά μειώθηκαν σημαντικά. Παρόμοια συμπεριφορά έδειξε και ο πληθυσμός των κυττάρων, όπου στις υψηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης περιορίστηκε αισθητά, σύμφωνα με μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 600 nm (Figure 6.2-a). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με αυτά που προέκυψαν κατά την προσπάθεια βελτιστοποίησης της παραγωγής ξυλανάσης *FoXyn11* από τη ζύμη *P.pastoris* (Μουκουλι Maria *et al.*, 2011), ενώ αντιπαρατίθενται με εκείνα που προέκυψαν για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής ξυλανάσης *xynII* από το μικροοργανισμό *A.usamii E001* στο ίδιο σύστημα έκφρασης, όπου τα υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας παρατηρήθηκαν έπειτα από επαγωγή της έκφρασης με 1.5% (v/v) μεθανόλη (Zhou *et al.*, 2008). Ακόμη, σε μία προσπάθεια βελτιστοποίησης της έκφρασης ενός γονιδίου ικανό να εκκρίνει τον ιό του Δάγκειου πυρετού, τύπου 2 και περιβλήματος III, (*sEDIII-2*) στη

μεθυλότροφη ζύμη *P.pastoris*, βρέθηκε ότι η παρουσία 2 % (v/v) μεθανόλης στην καλλιέργεια οδηγεί στη μεγαλύτερη έκκριση του *sEDIII-2* (Batra G. et al., 2010).

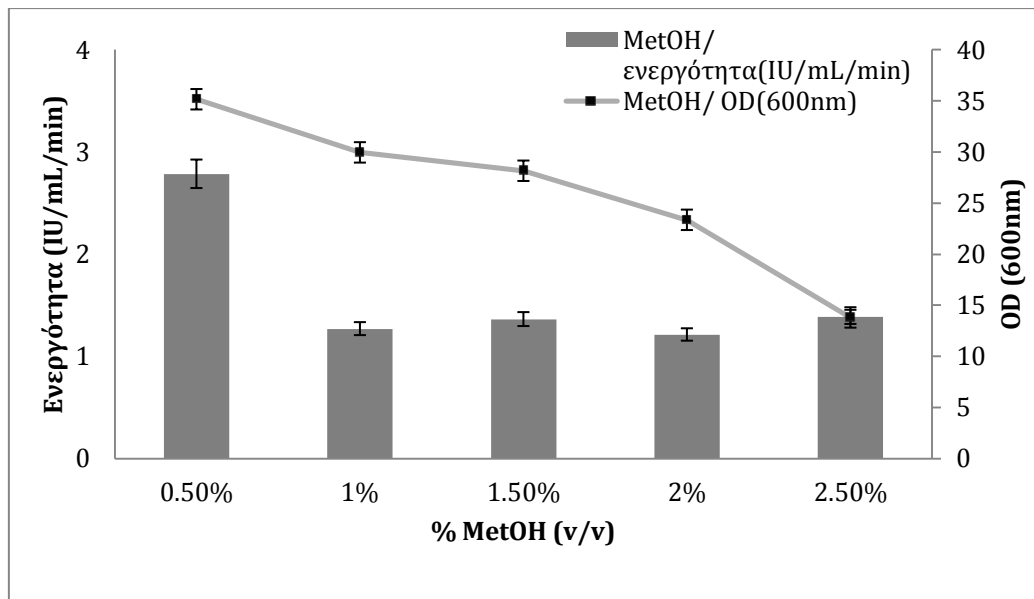


Figure 6.2-a. Απεικόνιση της επίδρασης της % (v/v) συγκέντρωσης μεθανόλης (μετά το πέρας 168 h) στην ενζυμική ενεργότητα της ενδογλουκανάσης *StEG5a* και στην κυτταρική αύξηση της ζύμης *P.pastoris*.

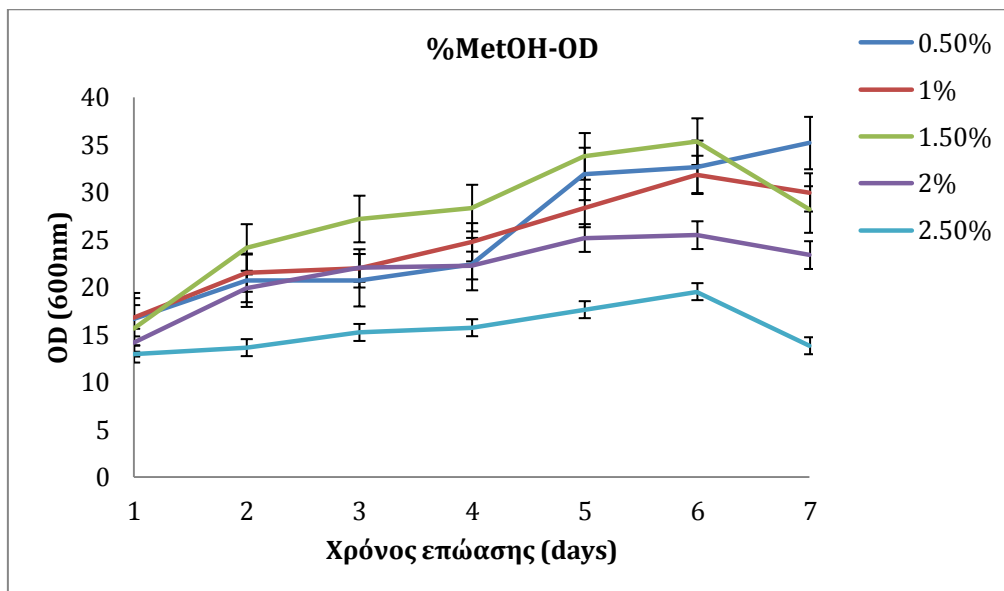


Figure 6.2-b. Απεικόνιση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης καλλιέργειας στην οπτική πυκνότητα (κυτταρική ανάπτυξη) συναρτήσει του χρόνου.

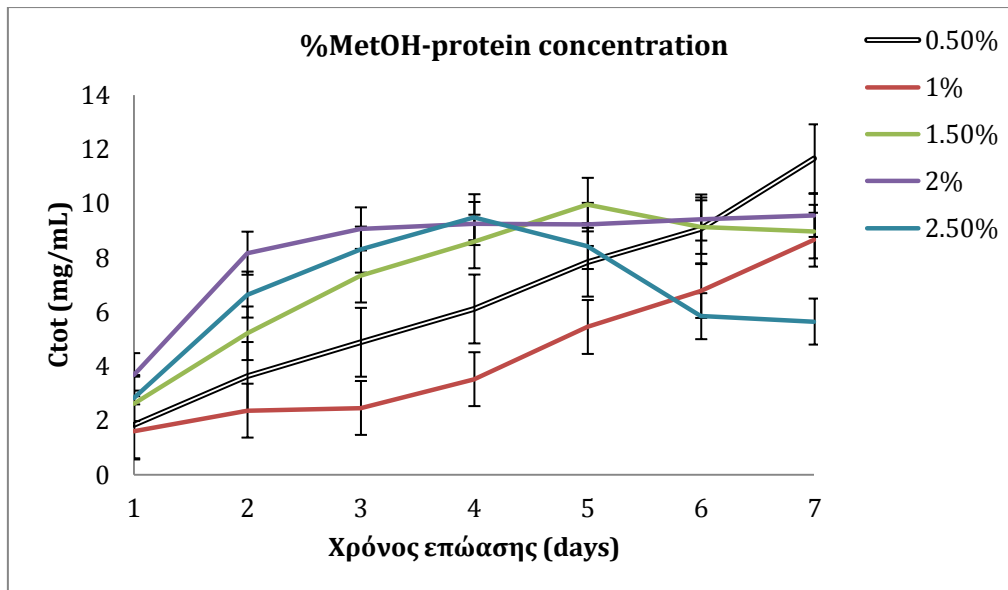


Figure 6.2-c. Απεικόνιση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης καλλιέργειας στην συγκέντρωση της πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου.

Στην παραπάνω διαγραμματική απεικόνιση (Figure 6.2-b) παρουσιάζεται η επίδραση του ποσοστού μεθανόλης στην οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών συναρτήσει του χρόνου. Παρατηρείται μικρή διαφορά στην ανάπτυξη των κυττάρων ζύμης στα οποία προστέθηκε καθημερινά 1.5 % (v/v) μεθανόλης συγκριτικά με τις υπόλοιπες, με την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας αυτής να υπερिशύει των άλλων μέχρι και την 5<sup>η</sup> ημέρα. Αμέσως μετά, υπάρχει έντονη ταύτιση των τιμών  $OD_{600nm}$  με εκείνες της καλλιέργειας στην οποία προστέθηκε 0.50% (v/v) μεθανόλη, ενώ την έβδομη μέρα η τελευταία παρουσιάζει μεγαλύτερη ανάπτυξη. Αντιθέτως, η ελάττωση της  $OD_{600nm}$  στην καλλιέργεια με 1.5% (v/v) είναι αξιοσημείωτη και σημαίνει τον θάνατο των κυττάρων. Μικρή κυτταρική ανάπτυξη και έντονη μείωση της οπτικής πυκνότητας παρατηρείται στην καλλιέργεια με προσθήκη 2.5% (v/v) μεθανόλης. Τα αποτελέσματα της μεθόδου Bradford [Figure 6.2-c] δείχνουν σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης της καλλιέργειας με επαγωγή 0.5% (v/v) μεθανόλης από εκείνη με 1% (v/v) μεθανόλη (11.64 και 8.66 mg/mL αντίστοιχα), ενώ φαίνεται έντονη αύξηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης τις πρώτες 48 h στις καλλιέργειες με 2 και 2.5% (v/v) καθημερινή προσθήκη μεθανόλης, η οποία μετά το πέρας των πρώτων ημερών ελαττώνεται αισθητά.

### 6.3. Βελτιστοποίηση συνθηκών με βάση την ταχύτητα ανάδευσης (αερισμός)

Ο επαρκής αερισμός είναι απαραίτητος για τα κύτταρα με φαινότυπο  $Mut^+$ , καθώς εξασφαλίζει τον καταβολισμό της μεθανόλης σε φορμαλδεΰδη. Σε τρίτο στάδιο έγιναν δοκιμές μεταβάλλοντας την ταχύτητα ανάδευσης από 0 έως 250 rpm, σε αρχικό pH 6.0 και προσθέτοντας καθημερινά 0.5% (v/v) μεθανόλη. Η μέγιστη ενεργότητα ενδογλουκανάσης μετρήθηκε στις 200 rpm (2.79 IU/mL/min), ενώ απουσία ανάδευσης σημειώθηκε μηδαμινή

έκφραση της πρωτεΐνης. Ωστόσο, στην καμπύλη κυτταρικής αύξησης παρατηρήθηκε μετά από 168 h επώασης ελάχιστη ανάπτυξη σε ταχύτητα ανάδευσης 80 rpm και μέγιστη ανάπτυξη στη μέγιστη ταχύτητα των 250 rpm, στην οποία η τιμή αυτή διπλασιάστηκε (Figure 6.3-a). Οι μετρήσεις αυτές βρίσκονται σε μερική διαφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ετερόλογη έκφραση της ξυλανάσης *xynII* του μύκητα *A. usarii E001*, αλλά και της ξυλανάσης *FoXynII*, όπου τα υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας, αλλά και κυτταρικής ανάπτυξης και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκαν σε ταχύτητα ανάδευσης 250 rpm (Zhou *et al.*, 2008; Moukoulis Maria *et al.*, 2011).

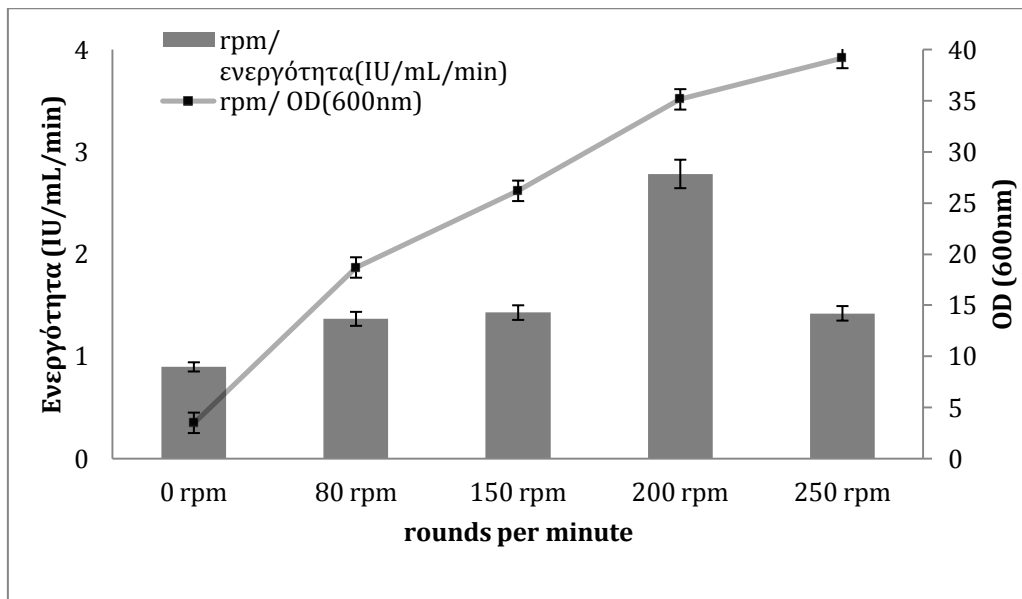


Figure 6.3-a. Απεικόνιση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης (μετά το πέρας 168 h) στην ενζυμική ενεργότητα της ενδογλουκανάσης *StEG5a* και στην κυτταρική αύξηση της ζύμης *P.pastoris*

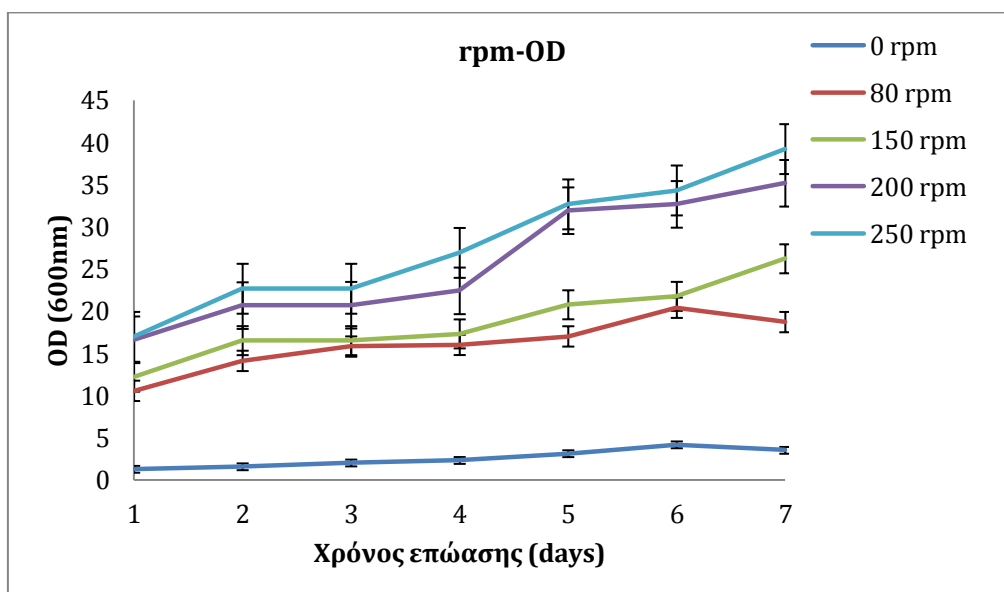


Figure 6.3-b. Απεικόνιση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης της καλλιέργειας στην οπτική πυκνότητα (κυτταρική ανάπτυξη) συναρτήσεϊ του χρόνου.

Στο παραπάνω διάγραμμα [Figure 6.3-b] φαίνεται ξεκάθαρα η χαμηλή κυτταρική ανάπτυξη που οφείλεται στην μηδενική ταχύτητα ανάδευσης (αμελητέος αερισμός). Αυξανόμενης της ταχύτητας, αυξάνεται και η οπτική πυκνότητα.

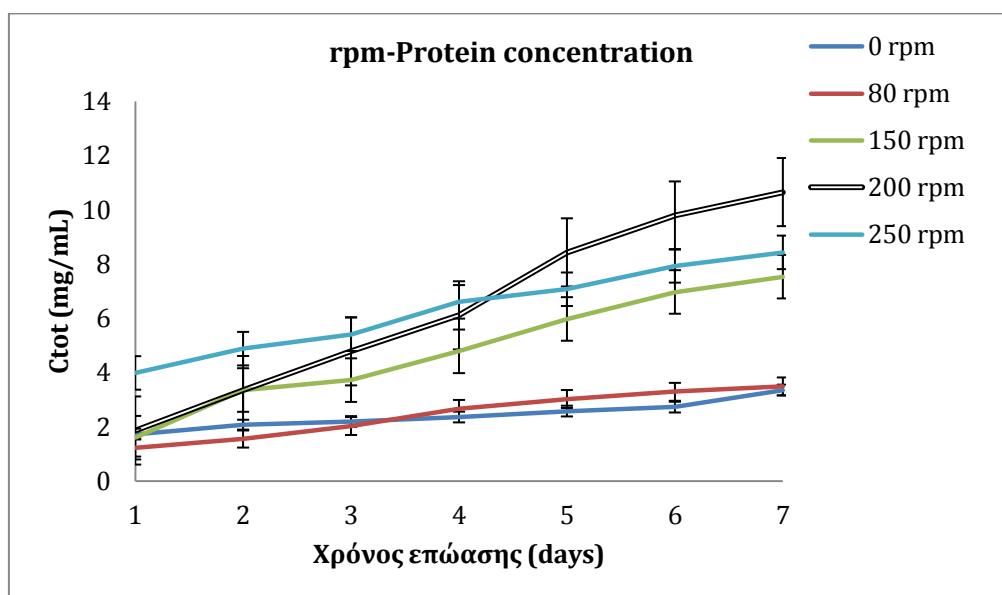


Figure 6.3-c. Απεικόνιση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης της καλλιέργειας στην πρωτεϊνική συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Bradford [Figure 6.3-c] δείχνουν μεγαλύτερη πρωτεϊνική συγκέντρωση στα δείγματα των καλλιεργείων που αναδεύτηκαν με ταχύτητα 200 rpm, αμέσως μετά ακολουθούν εκείνα των καλλιεργείων με ταχύτητα 250 rpm και στη συνέχεια εκείνα που προήλθαν από καλλιέργειες με ταχύτητα ανάδευσης 150 rpm, χωρίς μεγάλες διαφορές μεταξύ των τιμών της τελευταίας ημέρας καλλιέργειας.

#### 6.4. Βελτιστοποίηση συνθηκών με βάση τον τύπο της φιάλης

Τέλος, με όλες τις υπό μελέτη συνθήκες να διατηρούνται σταθερές στις τιμές στις οποίες καταγράφηκε η βέλτιστη παραγωγή ενζύμου (pH 6.0, 200 rpm, 0.5% μεθανόλη), πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε απλές φιάλες (*Flat-base Erlenmeyer Flasks*) και σε φιάλες τύπου *Baffled-base Erlenmeyer Flasks* (όγκου 250 mL). Τα εσωτερικά πτερύγια που υπάρχουν στις φιάλες αυτές αυξάνουν το διαλυμένο οξυγόνο (dissolved oxygen) που μεταφέρεται στην καλλιέργεια και κατ' επέκταση οδηγούν σε μεγαλύτερη κυτταρική αύξηση, κυρίως σε καλλιέργειες βακτηρίων και ζυμομυκήτων. Πράγματι, στην περίπτωση της παραγωγής ενδογλουκανάσης, η μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας παρατηρήθηκε στα δείγματα που προήλθαν από καλλιέργειες σε φιάλες τύπου *baffled* (2.94 IU/mL/min), χωρίς μεγάλη διαφορά με τις τιμές ενεργότητας των καλλιεργείων σε φιάλες *Erlenmeyer* (2.79 IU/mL/min). Στην περίπτωση της κυτταρικής συγκέντρωσης, η αύξηση της βιομάζας κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα τόσο για τις απλές όσο και για τις φιάλες τύπου *baffled* (Figure 6.4-a). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και κατά την προσπάθεια βελτιστοποίησης της παραγωγής ξυλανάσης *FoXynII* (Moukoulis Maria *et al.*, 2011).

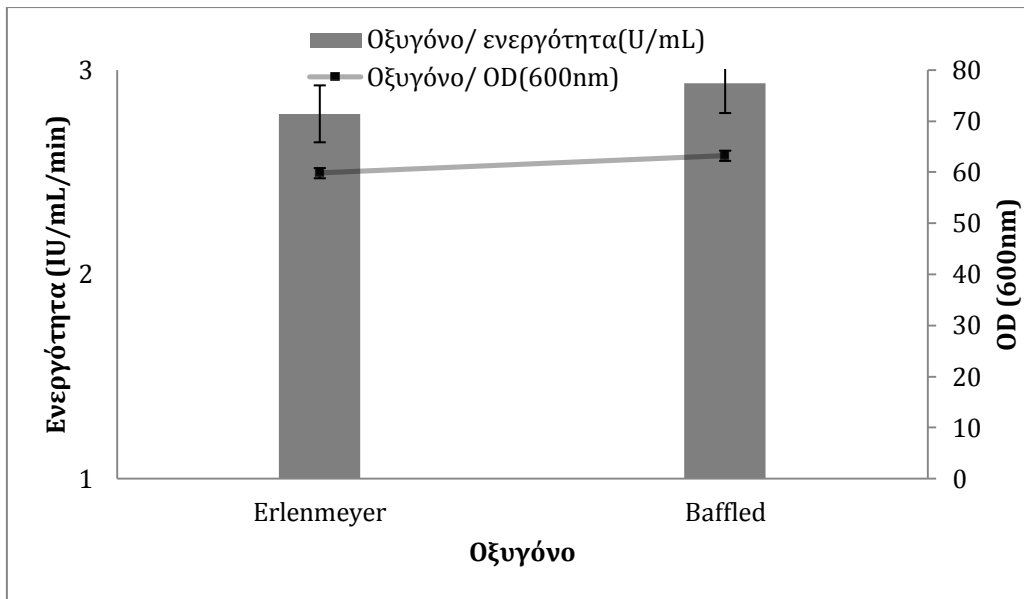


Figure 6.4-a. Απεικόνιση της επίδρασης του σχήματος των κωνικών φιαλών στην ενζυμική ενεργότητα της ενδογλουκανάσης *StEG5a* και στην κυτταρική αύξηση της ζύμης *P.pastoris*, μετά το πέρας 618 h.

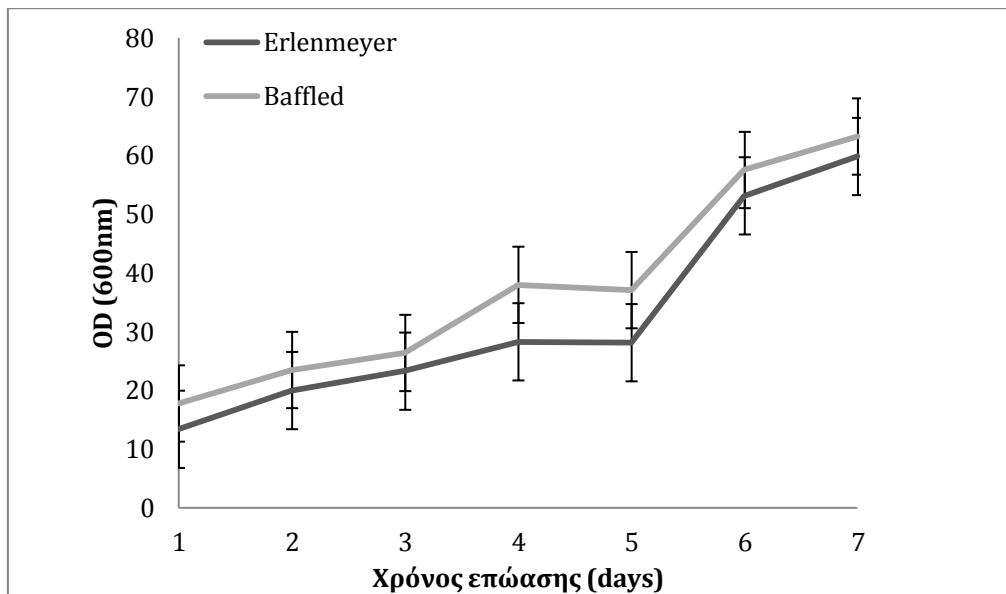


Figure 6.4-b. Απεικόνιση της επίδρασης του τύπου φιαλών στην οπτική πυκνότητα (κυτταρική ανάπτυξη) συναρτήσει του χρόνου.

Εύκολα παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα η συγκλίνουσα συμπεριφορά μεταξύ της καλλιέργειας *Erlenmeyer* φιαλών και της καλλιέργειας *Baffled* φιαλών.

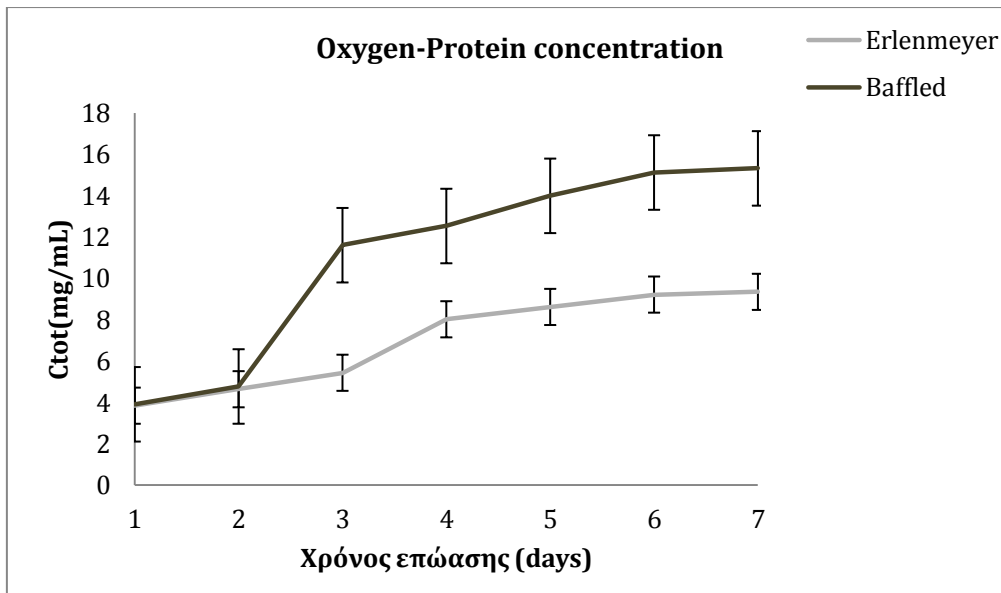


Figure 6.4-c. Απεικόνιση της επίδρασης του τύπου φιαλών στην πρωτεϊνική συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Bradford δείχνουν μία σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στους δύο τύπους φιαλών. Στις πρώτες 24 h υπάρχει ταύτιση στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στους δύο τύπους καλλιέργειών, ενώ μετά το πέρας συνολικά 3 ημερών, η αρχική συγκέντρωση στις *baffled* φιάλες τριπλασιάστηκε. Την 7<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας οι τιμές για τις *Flat-Base* και *Baffled-Base Erlenmeyer Flasks* προέκυψαν 9.35 και 15.33 mg/mL αντίστοιχα.

## 7. Σύνοψη και σχολιασμός

Πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια ενίσχυσης της παραγωγής του ενζύμου ενδο-1,4-β-γλουκανάση του μύκητα *Myceliophthora thermophila* από το ζυμομύκητα *P.pastoris*, μέσω βελτιστοποίησης των συνθηκών ζύμωσης. Μελετήθηκε αρχικά η ενζυμική παραγωγή σε θρεπτικό μέσο με αρχικής τιμής pH από 4.0 έως 9.0, σε σταθερή ταχύτητα ανάδευσης (200 στροφές/min) και παροχή 0,5% (v/v) μεθανόλης. Η υψηλότερη ενεργότητα για το ανασυνδυασμένο ένζυμο, παρατηρήθηκε σε αρχικό pH 6.0 έπειτα από 618 h (2.79 IU/mL/min).

Διατηρώντας την ταχύτητα ανάδευσης στις 200 στροφές/min και το pH του μέσου BMMY στο 6.0, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της μεθανόλης στην έκφραση των γονιδίων. Τα υψηλότερα επίπεδα ενδογλουκανάσης παρατηρήθηκαν έπειτα από προσθήκη μεθανόλης συγκέντρωσης 0.5% (v/v), αντίστοιχα (2.79 IU/mL/min).

Σε τρίτο στάδιο έγιναν δοκιμές μεταβάλλοντας την ταχύτητα ανάδευσης από 0 έως 250 στροφές/min, σε αρχικό pH 6.0, προσθέτοντας μεθανόλη 0.5 %. Η ανάδευση και ο αερισμός



φάνηκε να επηρεάζει το ένζυμο. Η μέγιστη ενεργότητα μετρήθηκε στις 200 στροφές, ενώ απουσία ανάδευσης σημειώθηκε μηδαμινή έκκριση πρωτεϊνών (2.79 IU/mL/min).

Με όλους τους μελετώμενους παράγοντες να παραμένουν στις βέλτιστες τιμές τους (*StEG5*: pH 6.0, 200 rpm, 0.5 % μεθανόλη), πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε απλές φιάλες και σε φιάλες τύπου baffled (όγκου 250 mL). Στο στάδιο αυτό, σημειώθηκε διπλασιασμός της ενεργότητας των ενζύμων στις φιάλες *baffled* τις πρώτες 48 h επώασης, ενώ στη συνέχεια η παραγωγικότητα κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα τόσο στις απλές όσο και στις ειδικές φιάλες. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανότατα στην αύξηση των επιπέδων του οξυγόνου στις φιάλες με τα εσωτερικά πτερύγια σε σύγκριση με τις απλές τις πρώτες κιόλας 48 h επώασης. Μάλιστα, σε αντίστοιχη έρευνα των Villatte *et al.*, (2001) βρέθηκε ότι τα επίπεδα οξυγόνου σε παρόμοιες φιάλες αυξήθηκαν κατά 56% περίπου. Ωστόσο, η καταγραφή παρόμοιων τιμών παραγωγικότητας μετά το πέρας των δύο ημερών και για τις δύο περιπτώσεις υποδηλώνει ότι πιθανότατα διαφορετικοί παράγοντες, όπως ο αφρισμός, επηρεάζουν την αποδοτικότητα της παραγωγής των συγκεκριμένων ενζύμων από τον μεθυλότροφο ζυμομύκητα. Συγκεκριμένα, η δημιουργία φυσαλίδων αέρα μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της απόδοσης παραγωγής του πρωτεϊνικού μορίου, καθώς η θραύση τους επηρεάζει την σταθερότητα της εκκρινόμενης πρωτεΐνης, ενώ παράλληλα παρεμποδίζεται σημαντικά η μεταφορά οξυγόνου προς την καλλιέργεια των κυττάρων (Holmes *et al.*, 2006).

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Bradford θεωρούνται αξιόπιστα, πλην ορισμένων σφαλμάτων που μπορεί να οφείλονται στη χαμηλή ευαισθησία της μεθόδου σε σύγκριση με άλλες (π.χ. Lowry technique), σε κακό χειρισμό των οργάνων λήψεως δειγμάτων, αλλά και σε χρωστικές που προέρχονται από τον *crude* τύπο των κυττάρων και μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη του χρώματος της βαφής. Παρεμβολές στη μέθοδο Bradford μπορεί να προκληθούν είτε από αλληλεπιδράσεις χημικών πρωτεϊνών είτε / και χημικών βαφών. Ο Πίνακας [14] παραθέτει τα χημικά αντιδραστήρια που δεν επηρεάζουν άμεσα την ανάπτυξη του χρώματος της βαφής. (Σημείωση: Βασικά ρυθμιστικά διαλύματα και απορρυπαντικά παρεμποδίζουν τη μέθοδο). Δεδομένου ότι δεν έχει δοκιμαστεί κάθε συνδυασμός πρωτεΐνης-χημικού αντιδραστηρίου, είναι πιθανό ότι κάποια από τα αναφερόμενα αντιδραστήρια παράγουν παρεμβολές σε συνδυασμό με ορισμένες πρωτεΐνες. Οι αποδεκτές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την τυποποιημένη διαδικασία (Standard Procedure) δίνονται στον Πίνακα [14] (Biorad Protein Assay).

**Table 1. Reagents Compatible with the Bio-Rad Protein Assay When Using the Standard Procedure.\***

Acetate, 0.6 M	KCl, 1.0 M
Acetone	Malic acid, 0.2 M
Adenosine, 1 mM	MgCl <sub>2</sub> , 1.0 M
Amino Acids	Mercaptoethanol, 1.0 M
Ammonium sulfate, 1.0 M	MES, 0.7 M
Ampholytes, 0.5%	Methanol
Acid pH	MOPS, 0.2 M
ATP, 1 mM	NaCl, 5 M
Barbital	NAD, 1 mM
BES, 2.5 M	NaSCN, 3 M
Boric acid	Peptones
Cacodylate-Tris, 0.1 M	Phenol, 5%
CDTA, 0.05 M	Phosphate, 1.0 M
Citrate, 0.05 M	PIPES, 0.5 M
Deoxycholate, 0.1%	Polyadenylic acid, 1 mM
Dithiothreitol, 1 M	Polypeptides (MW<3000)
DNA, 1 mg/ml	Pyrophosphate, 0.2 M
EDTA, 0.1 M	rRNA, 0.25 mg/ml
EGTA, 0.05 M	tRNA, 0.4 mg/ml
Ethanol	total RNA, 0.30 mg/ml
Eagle's MEM	SDS, 0.1%
Earle's salt solution	Sodium phosphate
Formic acid, 1.0 M	Streptomycin sulfate, 20%
Fructose	Triton X-100, 0.1%
Glucose	Tricine
Glutathione	Tyrosine, 1 mM
Glycerol, 99%	Thymidine, 1 mM
Glycine, 0.1 M	Tris, 2.0 M
Guanidine-HCl	Urea, 6 M
Hank's salt solution	Vitamins
HEPES buffer, 0.1 M	

Table 2. Χημικά αντιδραστήρια που δεν επηρεάζουν άμεσα την ανάπτυξη του χρώματος βαφής.

Εν κατακλείδι, η διαδικασία ης ενίσχυσης της παραγωγής του ενζύμου του μύκητα *M.thermophile* μέσω κατάλληλης προσαρμογής των συνθηκών ζύμωσης, είχε ως αποτέλεσμα την επιβεβαίωση και ταυτοποίηση του αρχικού πρωτοκόλλου.

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων προτείνεται να ολοκληρωθεί το πείραμα με ηλεκτροφορήσεις SDS-PAGE (Ηλεκτροφόρηση πολυπεπτιδίων (πρωτεϊνών) σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου) και να γίνουν περισσότερες επαναλήψεις για ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων. Επίσης, προτείνεται διήθηση, συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκειμένου των καλλιεργειών, αλλά και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC) πριν την επανάληψη των assays, για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα και λιγότερα σφάλματα (παρ. 5.1.3,4,5&6). Τέλος, θα μπορούσε να αντικατασταθεί η μέθοδος Bradford με τη μέθοδο μέτρησης της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης Lowry (Redmile-Gordon MA *et al.*, 2013).

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

---



## 8. Σύνοψη πινάκων και διαγραμμάτων

### 8.1. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας

Σε κάθε περίπτωση, στις μετρήσεις οπτικής πυκνότητας πολλαπλασιάστηκαν οι αντίστοιχες αραιώσεις που έγιναν πριν τις φωτομετρήσεις (600 nm). Παρακάτω, παραθέτονται οι πίνακες και τα διαγράμματα των μετρήσεων οπτικών πυκνοτήτων των καλλιιεργειών προς σύγκριση της επίδρασης του pH, του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης, της ταχύτητας στροφών και του τύπου της φιάλης που χρησιμοποιήθηκε.

pH/OD(600nm)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
<b>Unbuffered</b>	14.10	16.90	19.40	19.90	17.50	15.80	19.10
<b>4</b>	13.80	15.98	25.00	25.20	30.50	34.00	38.05
<b>5</b>	12.70	14.03	21.30	22.50	29.85	32.90	33.05
<b>6</b>	12.60	14.10	35.85	49.85	57.85	66.50	72.60
<b>7</b>	12.10	13.65	14.50	16.75	16.55	14.15	13.90
<b>8</b>	9.80	12.10	13.45	12.45	13.85	8.70	11.80
<b>9</b>	11.70	15.25	9.40	9.75	7.85	3.90	4.60

Table 1. Μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των καλλιιεργειών για σύγκριση της επίδρασης του pH.

SAMPLE/OD[600nm]	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
<b>0.50%</b>	16.60	20.65	20.70	22.40	31.90	32.65	35.15
<b>1%</b>	16.80	21.50	21.95	24.70	28.30	31.80	29.95
<b>1.50%</b>	15.63	24.15	27.15	28.30	33.75	35.30	28.15
<b>2%</b>	14.13	19.85	22.00	22.25	25.15	25.45	23.35
<b>2.50%</b>	12.93	13.60	15.20	15.70	17.60	19.50	13.80

Table 2. Μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των καλλιιεργειών για σύγκριση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης.

SAMPLE/OD[600nm]	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
<b>0 rpm</b>	1.25	1.55	2.00	2.30	3.10	4.15	3.50
<b>80 rpm</b>	10.55	14.10	15.80	16.00	17.00	20.40	18.70
<b>150 rpm</b>	12.18	16.50	16.50	17.30	20.75	21.75	26.20
<b>200 rpm</b>	16.60	20.65	20.70	22.40	31.90	32.65	35.15
<b>250 rpm</b>	16.95	22.65	22.65	26.90	32.65	34.30	39.20

Table 3. Μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των καλλιιεργειών για σύγκριση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης (rpm).

SAMPLE/OD[600nm]	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
<i>Erlenmeyer</i>	13.35	19.95	23.25	28.25	28.10	53.10	59.80
<i>Baffled</i>	17.75	23.45	26.35	37.95	37.05	57.50	63.20

Table 4. Μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των καλλιιεργειών για σύγκριση της επίδρασης του τύπου φιαλών.

## 8.2. Μετρήσεις ενεργότητας

Σε κάθε περίπτωση, για την μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας εφαρμόστηκε assay με υπόστρωμα CMC 1% low viscosity.

pH/ενεργότητα(IU/mL/min)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
<b>Unbuffered</b>	0.59	0.76	0.79	1.03	1.09	0.84	0.83
<b>pH 4.0</b>	1.46	1.53	1.58	1.77	1.81	1.94	2.27
<b>pH 5.0</b>	1.39	1.59	2.15	2.22	2.24	2.36	2.61
<b>pH 6.0</b>	1.77	1.91	2.08	2.24	2.44	2.67	2.79
<b>pH 7.0</b>	0.64	0.85	0.99	1.09	1.12	1.14	1.16
<b>pH 8.0</b>	0.66	0.82	0.84	0.91	0.95	1.00	1.01
<b>pH 9.0</b>	0.51	0.73	0.76	0.81	0.85	0.76	0.74

Table 5. Μετρήσεις της ενεργότητας του ενζύμου για σύγκριση της επίδρασης του pH.

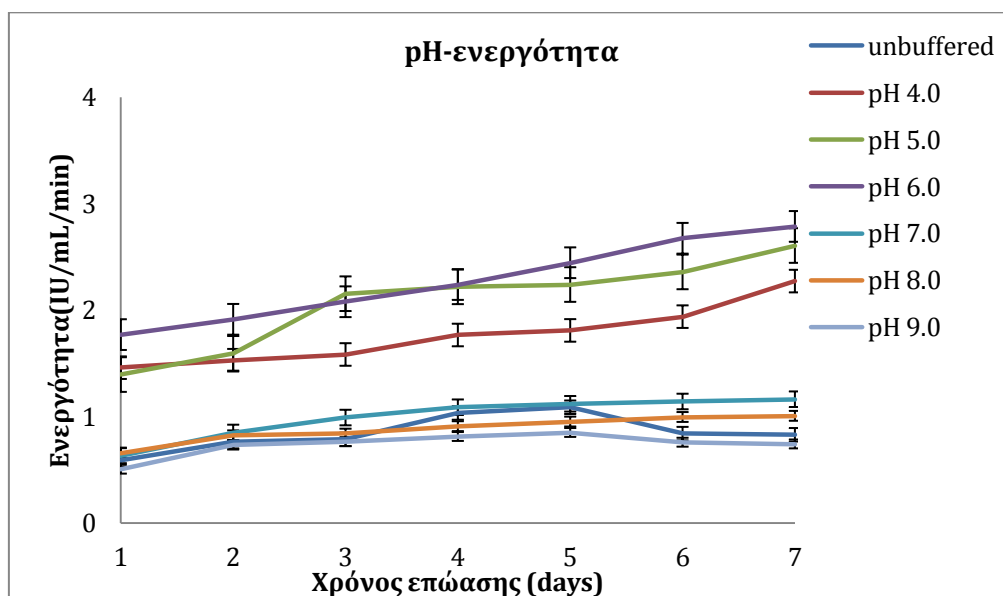


Figure 8.2-a. Απεικόνιση της επίδρασης του αρχικού pH καλλιέργειας στην ενεργότητα του ενζύμου συναρτήσει του χρόνου.

MetOH/ενεργότητα(U/mL)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
0.50%	1.77	1.91	2.08	2.24	2.44	2.67	2.79
1%	1.75	1.81	1.82	1.84	1.78	1.65	1.27
1.50%	2.06	1.82	1.90	1.92	1.65	1.60	1.36
2%	1.96	1.73	1.73	1.60	1.54	1.51	1.21
2.50%	1.20	1.55	1.51	1.41	1.43	1.42	1.39

Table 6. Μετρήσεις της ενεργότητας του ενζύμου για σύγκριση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης.

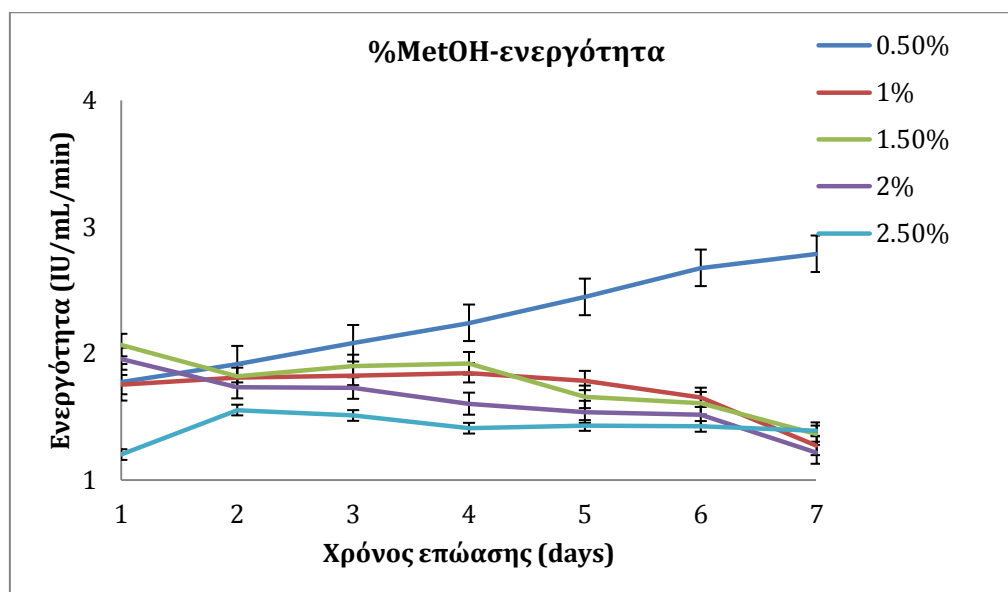


Figure 8.2-b. Απεικόνιση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης καλλιέργειας στην ενεργότητα του ενζύμου συναρτήσει του χρόνου.

rpm/ενεργότητα(U/mL)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
0 rpm	0.64	0.58	0.69	0.77	0.80	0.86	0.90
80 rpm	1.65	1.64	1.77	1.36	1.41	1.47	1.37
150 rpm	1.20	1.35	1.45	1.51	1.63	1.65	1.43
200 rpm	1.77	1.91	2.08	2.24	2.44	2.67	2.79
250 rpm	1.16	1.21	1.48	1.51	1.44	1.40	1.42

Table 7. Μετρήσεις της ενεργότητας του ενζύμου για σύγκριση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης (rpm).

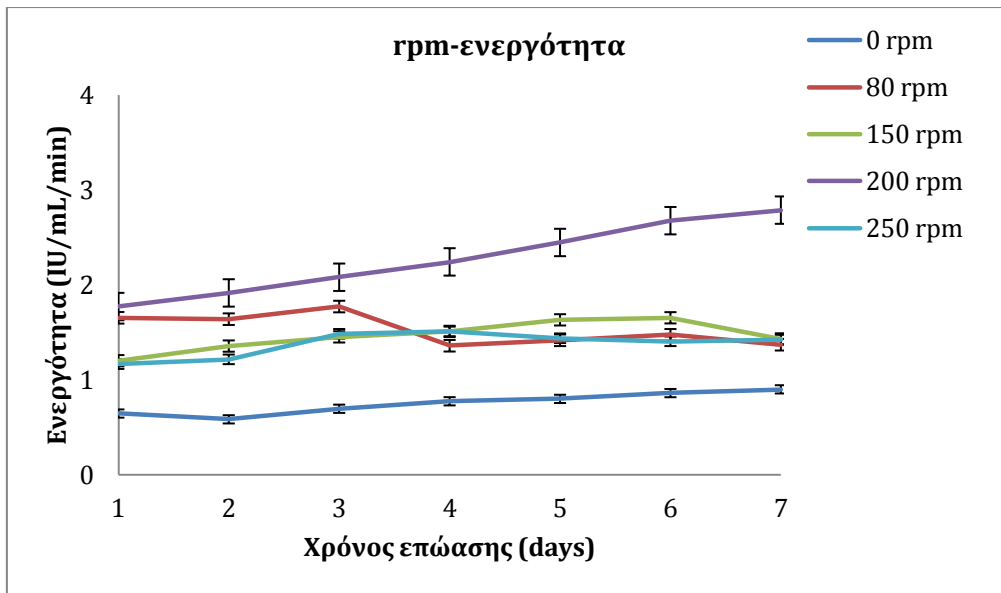


Figure 8.2-c. Απεικόνιση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης της καλλιέργειας στην ενζυμική ενεργότητα συναρτήσει του χρόνου.

oxygen/ενεργότητα(U/mL)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
<i>Erlenmeyer</i>	1.07	1.91	2.08	2.24	2.44	2.67	2.79
<i>Baffled</i>	1.08	2.12	2.33	2.46	2.54	2.86	2.94

Table 8. Μετρήσεις της ενζυμικής ενεργότητας για σύγκριση της επίδρασης του τύπου φιαλών.

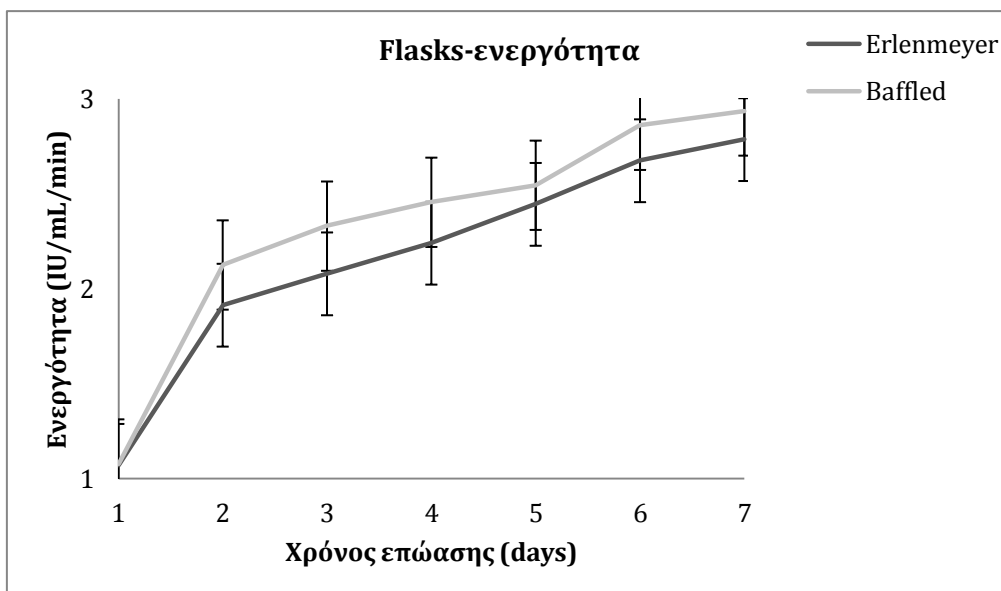


Figure 8.2-d. Απεικόνιση της επίδρασης του αερισμού στην ενζυμική ενεργότητα συναρτήσει του χρόνου.



### 8.3. Αποτελέσματα συγκέντρωσης πρωτεΐνης

pH/Ctot(mg/mL)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
<b>Unbuffered</b>	2.52	4.34	7.17	6.09	7.60	7.76	8.26
<b>pH 4.0</b>	2.85	4.51	5.04	6.60	6.77	7.86	8.66
<b>pH 5.0</b>	2.29	4.11	5.11	6.60	7.66	8.16	9.29
<b>pH 6.0</b>	3.91	5.64	5.37	7.50	8.23	9.89	13.63
<b>pH 7.0</b>	3.38	5.21	5.47	5.94	6.67	7.43	9.29
<b>pH 8.0</b>	3.25	5.57	5.84	6.07	6.80	8.36	9.32
<b>pH 9.0</b>	2.72	4.38	5.08	5.64	9.06	10.35	10.88

Table 9. Μετρήσεις της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των καλλιέργειών για σύγκριση της επίδρασης του pH.

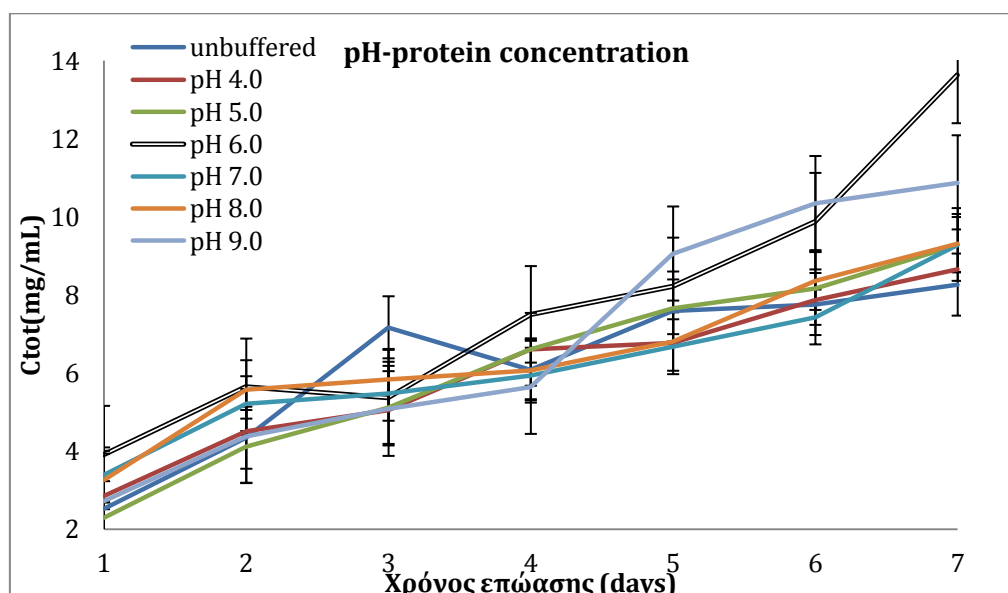


Figure 8.3-a. Απεικόνιση της επίδρασης του αρχικού pH καλλιέργειας στην πρωτεϊνική συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου.

MetOH/Ctot(mg/mL)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
<b>0.50%</b>	1.82	3.62	4.88	6.10	7.83	9.06	11.64
<b>1%</b>	1.59	2.36	2.45	3.52	5.44	6.77	8.66
<b>1.50%</b>	2.62	5.21	7.33	8.59	9.95	9.12	8.96
<b>2%</b>	3.68	8.16	9.06	9.26	9.22	9.42	9.55
<b>2.50%</b>	2.82	6.63	8.29	9.49	8.43	5.84	5.64

Table 10. Μετρήσεις της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των καλλιέργειών για σύγκριση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης.

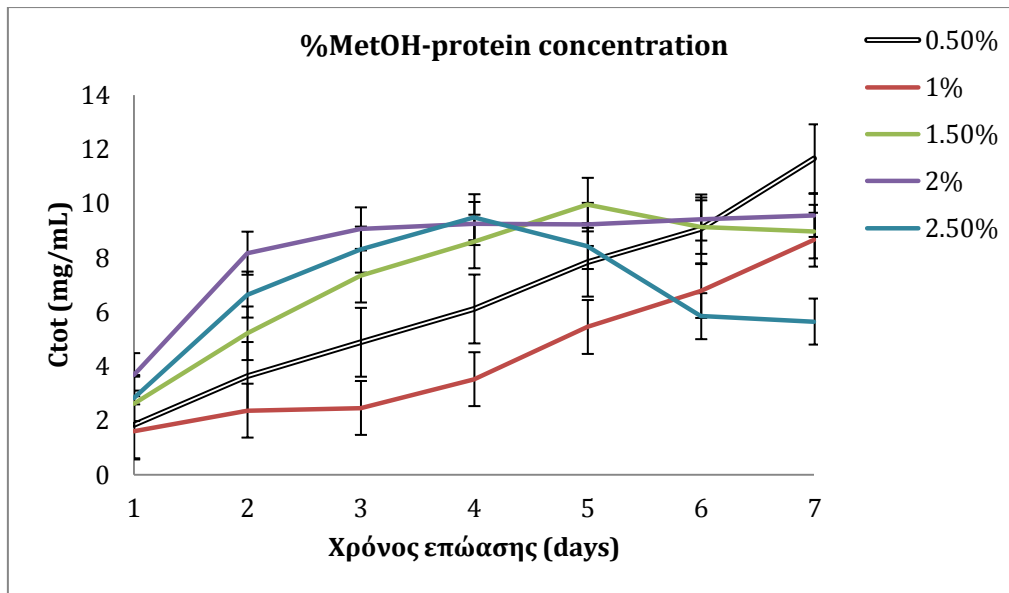


Figure 8.3-b. Απεικόνιση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης καλλιέργειας στην πρωτεϊνική συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου.

rpm/Ctot(mg/mL)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
<b>0 rpm</b>	1.72	2.06	2.19	2.36	2.57	2.72	3.35
<b>80 rpm</b>	1.23	1.56	2.02	2.65	3.02	3.28	3.48
<b>150 rpm</b>	1.59	3.35	3.72	4.78	5.97	6.97	7.53
<b>200 rpm</b>	1.86	3.35	4.78	6.10	8.43	9.79	10.65
<b>250 rpm</b>	3.98	4.88	5.41	6.60	7.07	7.93	8.43

Table 11. Μετρήσεις της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των καλλιιεργειών για σύγκριση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης (rpm).

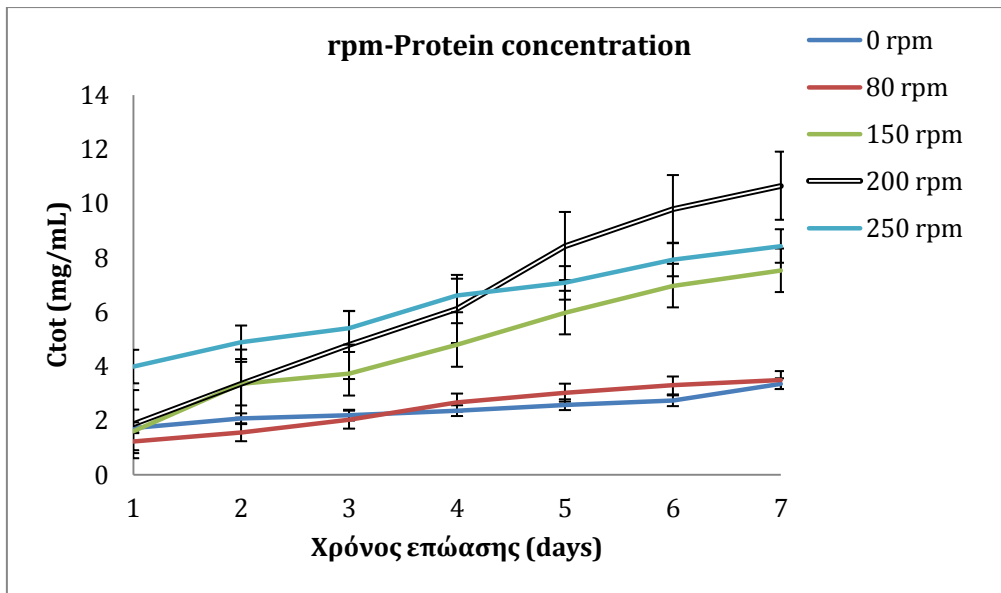


Figure 8.3-c. Απεικόνιση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης της καλλιέργειας στην πρωτεϊνική συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου.

SAMPLE/Ctot(mg/mL)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
<i>Erlenmeyer</i>	3.85	4.64	5.44	8.03	8.62	9.22	9.35
<i>Baffled</i>	3.91	4.78	11.61	12.54	14.00	15.13	15.33

Table 12. Μετρήσεις της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των καλλιιεργειών για σύγκριση του τύπου φιαλών.

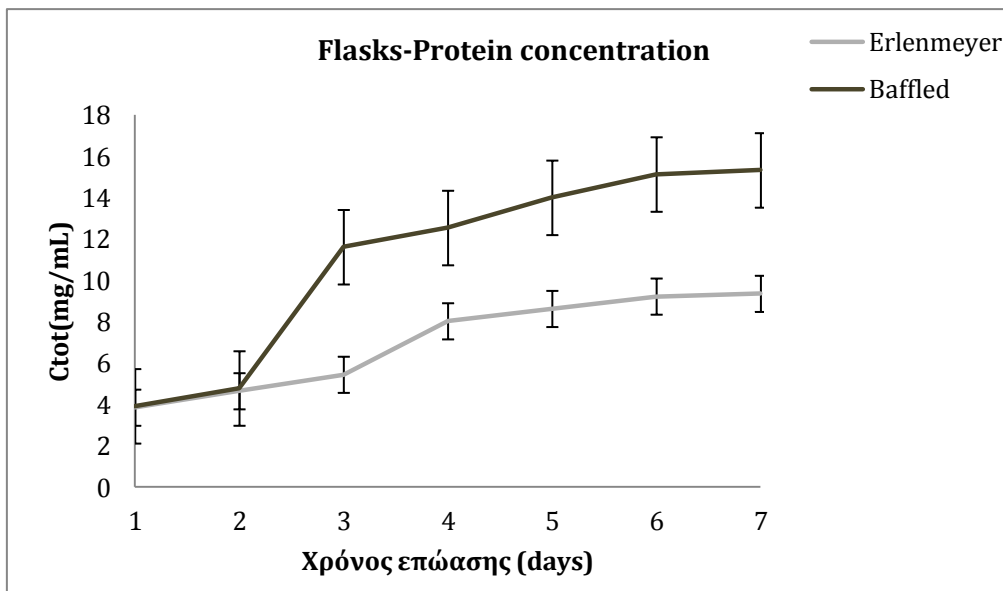


Figure 8.3-d. Απεικόνιση της επίδρασης του τύπου φιαλών στην πρωτεϊνική συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου.

## 9. Κατάλογος Εικόνων, Πινάκων, Διαγραμμάτων

---

### 9.1. Κατάλογος Πινάκων

---

Table 1. Πολυσακχαριτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας του ενζύμου [StEG5a] .....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
Table 2. Χημικά αντιδραστήρια που δεν επηρεάζουν άμεσα την ανάπτυξη του χρώματος βαφής. ....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
Table 3. Μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών για σύγκριση της επίδρασης του pH.....	69
Table 4. Μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών για σύγκριση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης. ....	69
Table 5. Μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών για σύγκριση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης (rpm).....	69
Table 6. Μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών για σύγκριση της επίδρασης του τύπου φιαλών.....	70
Table 7. Μετρήσεις της ενεργότητας του ενζύμου για σύγκριση της επίδρασης του pH.....	70
Table 8. Μετρήσεις της ενεργότητας του ενζύμου για σύγκριση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης.....	71
Table 9. Μετρήσεις της ενεργότητας του ενζύμου για σύγκριση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης (rpm). ....	71
Table 10. Μετρήσεις της ενζυμικής ενεργότητας για σύγκριση της επίδρασης του τύπου φιαλών. ....	72
Table 11. Μετρήσεις της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των καλλιεργειών για σύγκριση της επίδρασης του pH. ....	73
Table 12. Μετρήσεις της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των καλλιεργειών για σύγκριση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης. ....	73
Table 13. Μετρήσεις της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των καλλιεργειών για σύγκριση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης (rpm). ....	74
Table 14. Μετρήσεις της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των καλλιεργειών για σύγκριση του τύπου φιαλών.....	75

### 9.2. Κατάλογος εικόνων & διαγραμμάτων

---

Figure 1.1-a. Εναλλακτικά και ανανεώσιμα καύσιμα από διάφορες πηγές βιομάζας.....	15
Figure 1.1-b. Συμμετοχή των ανθρωπογενών ρύπων (75% των εκπομπών του CO <sub>2</sub> ) στο φαινόμενο του θερμοκηπίου. ....	16
Figure 1.1-c. Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης από διάφορες πηγές βιομάζας. ....	19
Figure 1.2-a. Δομή της μέσης πλάκας του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών (Laurie G. Smith, 2001).....	20
Figure 1.2-b. Δομική μονάδα της κυτταρίνης. Εντός των αγκυλών απεικονίζεται η κελλοβιόζη. 21	
Figure 1.3-a. Απεικονίσεις των κυτταρινασών που αποικοδομούν την αλυσίδα της κυτταρίνης. ....	25

Figure 1.3-b. Ένα απλοποιημένο σχήμα της σύγχρονης ματιάς στην ενζυματική αποικοδόμηση της κυτταρίνης.....	26
Figure 1.3-c. Το ένζυμο κελλοβιοϋδρολάση από τον μικροοργανισμό <i>T. reesei</i> [Credit: National Renewable Energy Laboratory].....	27
Figure 2.1-a. Αναπαράσταση του μηχανισμού υδρόλυσης από το σύμπλοκο της ενδογλουκανάσης (Zhao <i>et al.</i> , 2008).....	28
Figure 2.1-b. Δομικός χαρακτηρισμός του <i>Trichoderma reesei</i> Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase που απαιτείται για τη βιοσύνθεση της κυτταρίνης με τη δράση πρωτεϊνών.....	29
Figure 2.2-a. Δραστηριότητα στο υπόστρωμα της κυτταρίνης (εξωγλουκανάση, Cel7A) του <i>T. reesei</i> . ....	30
Figure 2.3-0-a. Κρυσταλλική δομή της $\beta$ -γλυκοσιδάσης.....	31
Figure 4.1-a. Εικόνα 2.2 Ο χάρτης του πλασμιδίου pPICZαC της Invitrogen.....	44
Figure 5.1-a. Χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue μετά το τέλος των ηλεκτροφορήσεων.....	49
Figure 6.1-a. Απεικόνιση της επίδρασης του αρχικού pH του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας (μετά το πέρας 168 h) στην ενζυμική ενεργότητα της ενδογλουκανάσης <i>StEG5a</i> και στην κυτταρική αύξηση της ζύμης <i>P.pastoris</i> .....	56
Figure 6.1-b. Απεικόνιση της επίδρασης του αρχικού pH καλλιέργειας στην οπτική πυκνότητα (κυτταρική ανάπτυξη) συναρτήσει του χρόνου. ....	57
Figure 6.2-a. Απεικόνιση της επίδρασης της % (v/v) συγκέντρωσης μεθανόλης (μετά το πέρας 168 h) στην ενζυμική ενεργότητα της ενδογλουκανάσης <i>StEG5a</i> και στην κυτταρική αύξηση της ζύμης <i>P.pastoris</i> .....	59
Figure 6.2-b. Απεικόνιση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης καλλιέργειας στην οπτική πυκνότητα (κυτταρική ανάπτυξη) συναρτήσει του χρόνου. ....	59
Figure 6.3-a. Απεικόνιση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης (μετά το πέρας 168 h) στην ενζυμική ενεργότητα της ενδογλουκανάσης <i>StEG5a</i> και στην κυτταρική αύξηση της ζύμης <i>P.pastoris</i> .....	61
Figure 6.3-b. Απεικόνιση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης της καλλιέργειας στην οπτική πυκνότητα (κυτταρική ανάπτυξη) συναρτήσει του χρόνου. ....	61
Figure 6.4-a. Απεικόνιση της επίδρασης του σχήματος των κωνικών φιαλών στην ενζυμική ενεργότητα της ενδογλουκανάσης <i>StEG5a</i> και στην κυτταρική αύξηση της ζύμης <i>P.pastoris</i> , μετά το πέρας 618 h. ....	63
Figure 6.4-b. Απεικόνιση της επίδρασης του τύπου φιαλών στην οπτική πυκνότητα (κυτταρική ανάπτυξη) συναρτήσει του χρόνου.....	63
Figure 7.2-a. Απεικόνιση της επίδρασης του αρχικού pH καλλιέργειας στην ενεργότητα του ενζύμου συναρτήσει του χρόνου.....	70
Figure 7.2-b. Απεικόνιση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης καλλιέργειας στην ενεργότητα του ενζύμου συναρτήσει του χρόνου. ....	71
Figure 7.2-c. Απεικόνιση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης της καλλιέργειας στην ενζυμική ενεργότητα συναρτήσει του χρόνου.....	72
Figure 7.2-d. Απεικόνιση της επίδρασης του αερισμού στην ενζυμική ενεργότητα συναρτήσει του χρόνου. ....	72
Figure 7.3-a. Απεικόνιση της επίδρασης του αρχικού pH καλλιέργειας στην πρωτεϊνική συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου.....	73
Figure 7.3-b. Απεικόνιση της επίδρασης του ποσοστού % (v/v) μεθανόλης καλλιέργειας στην πρωτεϊνική συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου.....	74

Figure 7.3-c. Απεικόνιση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης της καλλιέργειας στην πρωτεϊνική συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου. ....	75
Figure 7.3-d. Απεικόνιση της επίδρασης του τύπου φιαλών στην πρωτεϊνική συγκέντρωση συναρτήσει του χρόνου. ....	75

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---





## Αναφορές

---

1. Bajaj B, Pangotra H, Wani M, Sharma P, Sharma A (2009) *Partial purification and characterization of a highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated Bacillus strain M9*, Indian Journal of Chemical technology 16: 382 – 387.
2. Batra G, Gurramkonda C, Nemani SK, Jain SK, Swaminathan S, Khanna N. *Optimization of conditions for secretion of dengue virus type 2 envelope domain III using Pichia pastoris*. J Biosci Bioeng. 2010 Oct;110(4):408-14. doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.05.001. Epub 2010 Jun 2.
3. Dimarogona M, Topakas E, Christakopoulos P (2012). *Cellulose degradation by oxidative enzymes*. Computational and Structural Biotechnology Journal. 2 (3): e201209015. doi: <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201209015>
4. Gao H1, Yan P, Zhang B, Shan A. ; *Expression of Aspergillus niger IA-001 Endo-β-1,4-Xylanase in Pichia pastoris and Analysis of the Enzymic Characterization*. Appl Biochem Biotechnol. 2014 Jun 3.
5. G. S. Oliveira, C. J. Ulhoa, M. H. L. Silveira, J. Andreus, I. Silva-Pereira, M. J. P. Fonseca, F. P. Faria, *An alkaline thermostable recombinant Humicola grisea var. thermoidea cellobiohydrolase presents bifunctional (endo/exoglucanase) activity on cellulosic substrates*. World J Microbiol.
6. Gilbert, H. J. (2010). "The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction." Plant Physiol 153(2): 444-455.
7. Gusakov, A. V., Punt, P. J., Verdoes, J. C., van der Meij, J., Sinitsyn, A. P., Vlasenko, E., et al. (2011). Fungal Enzymes. Jupiter, FL: Dyadic International (USA), Inc. US Patent No. 7,923,236.
8. HARHANGI, Harry R.; PETER, J.M. Steenbakkers; AKHMANOVA, Anna; JETTEN, Mike S.M.; VAN DER DRIFT, Chris and OP DEN CAMP, Huub J.M. *A highly expressed family 1 β-glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus Piromyces sp.* E2. Biochimica et Biophysica Acta, April 2002, vol. 1574, no. 3, p. 293-303.
9. Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, et al. (2007) *Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production*. Science 315: 804-807. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1137016>  
PMid:17289988
10. Holmes W., Smith R., Bill R. (2006). Evaluation of antifoams in the expression of a recombinant Fc fusion protein in shake flask cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 5: 30-33.
11. Igarashi, K., Koivula, A., Wada, M. Kimura, S., Penttila, M., Samejima, M. 2009. *High speed atomic force microscopy visualizes processive movement of Trichoderma reesei cellobiohydrolase I on crystalline cellulose*. Journal of Biological Chemistry. 284(52): 36186–36190.

12. I. Gomes, J. Gomes, D. J. Gomes, W. Steiner; *Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus**; Applied Microbiology and Biotechnology, April 2000, Volume 53, Issue 4, pp 461-468
13. Ilmén et al.: *High level secretion of cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae**. Biotechnology for Bio fuels, 2011, 4: 30.
14. IWASHITA, Kazuhiro; TODOROKI, Kouichi; KIMURA, Hitoshi; SHIMOI, Hitoshi and ITO, Kiyoshi. *Purification and characterization of extracellular and cell wall bound  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus kawachii**. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, October 1998, vol. 62, no. 10, p. 1938-1946.
15. Jerry Ståhlberg, Hongbin Henriksson, Christina Divne, Roland Isaksson, Göran Pettersson, Gunnar Johansson, T. Alwyn Jones, *Structural basis for enantiomer binding and separation of a common  $\beta$ -blocker: crystal structure of cellobiohydrolase Cel7A with bound (S)-propranolol at 1.9 Å resolution*, Journal of Molecular Biology, Volume 305, Issue 1, 5 January 2001, Pages 79-93 .
16. Laurie G. Smith, *Plant cell division: building walls in the right places*, Nature Reviews Molecular Cell Biology 2, 33-39 (January 2001).
17. Li RK, Chen P, Ng TB, Yang J, Juan L, Yan F, Ye XY; *Highly efficient expression and characterization of a  $\beta$ -mannanase from *Bacillus subtilis* in *Pichia pastoris**, Biotechnol Appl Biochem. 2014 May 26. doi: 10.1002/bab.1250.
18. MAHESHWARI, Ramesh; BHARADWAJ, Girish and BHAT, Mahalingeshwara K. *Thermophilic fungi: their physiology and enzymes*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, September 2000, vol. 64, no. 3, p. 461-488.
19. Mellitzer et al.: *Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris**. *Microbial Cell Factories*, 2012 11:61.
20. Moukouli Maria, Topakas Evangelos & Christakopoulos Paul (2011). Cloning and optimized expression of a GH-11 xylanase from *Fusarium oxysporum* in *Pichia pastoris*. *New Biotechnology*, 28 (4): 369-374.
21. Naika G, Kaul P, Rakash V (2007) *Purification and Characterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus** Journal of agricultural and food chemistry 55: 7566-7572.
22. Nimlos, M.R., Matthews, J.F., Crowley, M.F., Walker, R.C., Chukkapalli, G., Brady, J.W., Adney, W.S., Cleary, J.M., Zhong, L., Himmel, M.E. 2007. *Molecular modeling suggests induced fit of Family 1 carbohydrate-binding modules with a broken-chain cellulose*. Protein engineering Design and Selection. 20(4):179-187.
23. OH, Ki-Bong; HAMADA, Kazu; SAITO, Mikako; LEE, Hun-Jun and MATSUOKA, Hideaki. *Isolation and properties of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from a filamentous fungus, *Cladosporium resinae*, isolated from kerosene*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1999, vol. 63, no. 2, p. 281-287.
24. PANDEY, Manjula and MISHRA, Saroj. *Expression and characterization of *Pichia etchellsii*  $\beta$ -glucosidase in *Escherichia coli**. Gene, April 1997, vol. 190, no. 1, p. 45-51.

25. Panwar NL, Kaushik S. C., Kothari Surendra (2011) *Role of renewable energy sources in environmental protection: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 15: 1513-1524.
26. PARRY, Neil J.; BEEVER, David E.; OWEN, Emyr; VANDENBERGHE, Isabel; VAN BEEUMEN, Jozef and BHAT, Mahalingeshwara K. *Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable  $\beta$ -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus**. Biochemical Journal, January 2001, vol. 353, no. 1, p. 117-127.
27. Pilz, I., Schwarz, E. Kilburn, D.G., Miller, R.C. Jr., Warren, R.A.J, Gilkes, N.R. 1990. *The tertiary structure of a bacterial cellulase determined by angle X-ray-scattering analysis*. Biochem. J. 271:277-280.
28. Sanni P. Voutilainen, Harry Boer, Markus B. Linder, Terhi Puranen, Juha Rouvinen, Jari Vehmaanperä, Anu Koivula, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 41, Issue 3, 2 August 2007, Pages 234-243
29. Shumiao Z, Huang J, Zhang C, Deng L, Hu N, Liang Y (2010) *High-level expression of an *Aspergillus niger* endo-beta-1,4-glucanase in *Pichia pastoris* through gene codon optimization and synthesis* Journal of microbiology and biotechnology 20: 467-73.
30. Sims RE, Mabee W, Saddler JN, Taylor M (2010). *An overview of second generation biofuel technologies*. Bioresour Technol 101: 1570-1580.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>  
PMid:19963372
31. Sue Macauley-Patrick,\* Mariana L. Fazenda, Brian McNeil and Linda M. Harvey, *Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system*, Strathclyde Fermentation Centre, Department of Bioscience, University of Strathclyde, 204 George Street, Glasgow G1 1XW, UK, Yeast 2005; 22: 249–270.
32. Sun Y, Cheng J (2002) *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Bioresour Technol 83: 1-11.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
33. VAN RENSBURG, Pierre; VAN ZYL, Willem H. and PRETORIUS, Isak S. *Engineering yeast for efficient cellulose degradation*. Yeast, January 1998, vol. 14, no. 1, p. 67-76.
34. Villatte F., Hussein A.S., Bachmann T.T., Schmid R.D. (2001). *Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design*. Appl Microbiol Biotechnol, 55: 463–465.
35. Wen-Yih Jeng, Nai-Chen Wang, Man-Hua Lin, Cheng-Tse Lin, Yen-Chywan Liaw, Wei-Jung Chang, Chia-I Liu, Po-Huang Liang, Andrew H.-J. Wang, *Structural and functional analysis of three  $\beta$ -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis**, Journal of Structural Biology, Volume 173, Issue 1, January 2011, Pages 46-56.
36. Yoon J, Cha Z, Kim Z, Kim W (2008) *Degradation of cellulose by the major endoglucanase produced from the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola**, Biotechnology Letters 30:1373–1378.

37. Youssef, G.A. and M.M. Berekaa, , 2009. *Improved production of endoglucanase enzyme by Aspergillus terreus: Application of plackett burman design for optimization of process parameters*. Biotechnology, 8: 212-219.
38. YUN, Soo-In; JEONG, Choon-Soo; CHUNG, Dae-Kyun and CHOI, Hye-Seon. *Purification and some properties of a beta-glucosidase from Trichoderma harzianum type C-4*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, September 2001, vol. 65, no. 9, p. 2028-2032.
39. Zhao, X., Rignall, T.R., McCabe, C., Adney, W.S., Himmel, M.E. 2008. *Molecular simulation evidence for processive motion of Tricoderma reesei Cel7A during cellulose depolymerisation*. Chemical Physics Letters. 460: 284-288.
40. Zhou C., Li D., Wu M., Wang W. (2008). *Optimized expression of an acid xylanase from Aspergillus usamii in Pichia pastoris and its biochemical characterization*. World J Microbiol Biotechnol, 24: 1393–1401.
41. Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε. (2011), *Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων*. Αθήνα, Εκδόσεις Ε.Μ.Π. Σελ. 30 – 43.