

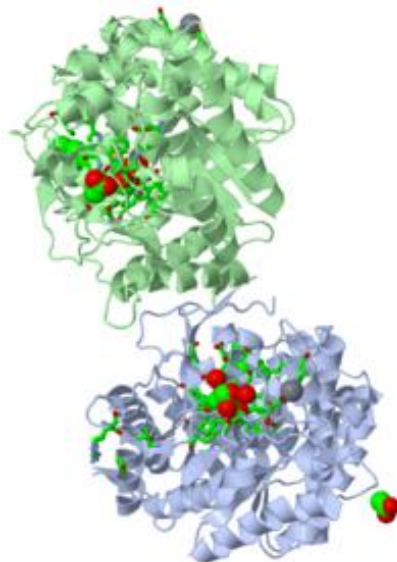


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

*Χαρακτηρισμός μιας ανασυνδυασμένης β-  
γλυκοσιδάσης της οικογένειας GH3 από το  
θερμόφιλο οργανισμό *Myceliophthora  
thermophila**

Διπλωματική εργασία  
Δημητρακοπούλου Ελένη-Αλκμήνη

Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος



Αθήνα, Φεβρουάριος 2013

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Τεχνολογίας Βιοσυστημάτων του Τομέα Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διεργασιών στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Λέκτορα κ. Ευάγγελου Τόπακα, στα πλαίσια του προγράμματος σπουδών της Σχολής Χημικών Μηχανικών. Αθηνών.

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Λέκτορας Ε.Τόπακας

Καθηγητής Δ. Κέκος

Καθηγητής Φ. Κολίσης

# Πρόλογος

Η παρούσα εργασία είναι το αποτέλεσμα της διπλωματικής εργασίας που εκπονήθηκε, βάσει του προγράμματος σπουδών της σχολής Χημικών Μηχανικών, στο εργαστήριο Τεχνολογίας Βιοσυστημάτων του Τομέα Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διεργασιών στο Τμήμα Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Λέκτορα κ. Ευάγγελου Τόπακα.

Κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, σημαντική ήταν η βοήθεια του επιβλέποντα και των μελών του εργαστηρίου, τους οποίους ευχαριστώ θερμά:

Τον Λέκτορα κ. Ευάγγελο Τόπακα, επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εργασία αυτή, δίνοντάς μου την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα και να κατανοήσω σε βάθος το αντικείμενο της βιοτεχνολογίας. Η στήριξη και η βοήθεια του σε οποιαδήποτε απορία ή πρόβλημα προέκυψε κατά τη διαδικασία περάτωσης της εργασίας αυτής ήταν καθοριστική και πολύτιμη.

Την υποψήφια διδάκτορα Ανθή Καρναούρη για την πολύτιμη καθοδήγηση και συμπαράστασή της. Η βοήθεια, η στήριξη και η συμβολή της τόσο στη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και στην αντιμετώπιση προβλημάτων και σφαλμάτων που προέκυψαν κατά την πορεία της εργασίας ήταν πολύτιμη.

Όλα τα μέλη του εργαστηρίου (υποψήφιους διδάκτορες και συναδέλφους φοιτητές) για την βοήθειά τους και την άψογη συνεργασία μας.

Την οικογένεια και τους φίλους μου για την απεριόριστη στήριξη, την υπομονή και την αγάπη τους.

## Περίληψη

Η κυτταρίνη αποτελεί το οργανικό πολυμερές που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στη φύση, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη ως φτηνά αξιοποιήσιμη, ανανεώσιμη πηγή, κατάλληλη για μεγάλο αριθμό βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Συνεπώς, η παραγωγή και απομόνωση νέων κυτταρινολυτικών ενζύμων που αποικοδομούν ή τροποποιούν τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά αποτελεί επιτακτική ανάγκη. Βασικό ρόλο ανάμεσα στις κυτταρινάσες διαδραματίζουν οι β-γλυκοζιδάσες, οι οποίες υδρολύουν την κελλοβιόζη που έχει παραχθεί προς γλυκόζη. Η δράση αυτή των β-γλυκοζιδασών είναι πολύ σημαντική καθώς αποφεύγεται η αναστολή της δράσης των κυτταρινασών από το τελικό προϊόν. Σημαντική πηγή κυτταρινολυτικών ενζύμων με πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές, αποτελούν οι θερμόφιλοι μύκητες, καθώς οι διεργασίες μετατροπής της βιομάζας σε χρήσιμα προϊόντα διεξάγονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Ο *Myceliophthora thermophila* είναι ένας θερμόφιλος αερόβιος μύκητας, ο οποίος αυξάνεται με μέγιστο ρυθμό σε θερμοκρασίες 45 – 50 °C και παράγει πολλά θερμοσταθερά ένζυμα, κατάλληλα για βιοδιεργασίες υψηλών θερμοκρασιών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο έλεγχος των ιδιοτήτων μιας πρωτεΐνης με ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης, της οποίας το γονίδιο είχε προηγουμένως απομονωθεί από το μύκητα *Myceliophthora thermophila* και στη συνέχεια εκφραστεί ετερόλογα στο ζυμομύκητα *Pichia pastoris*. Η ανασυνδυασμένη β-γλυκοζιδάση MtBgI3a παρουσιάζει μοριακό βάρος 90 kDa και ειδική ενεργότητα στο υπόστρωμα p-NP-β-D-γλυκοκυρανοζίτη ίση με 97.7 U/mg πρωτεΐνης. Το ανασυνδυασμένο ένζυμο MtBgI3a είναι μια πρωτεΐνη με κυρίαρχη ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης, η οποία μπορεί και να υδρολύει σε μικρότερα ποσοστά υποστρώματα γλουκανών, ενώ με βάση την εξειδίκευση που παρουσιάζει στα διάφορα υποστρώματα μπορεί θεωρείται ότι ανήκει στην κατηγορία των αρυλ-β-γλυκοζιδασών. Οι δοκιμές σταθερότητας σε διάφορες θερμοκρασίες κατέδειξαν μετά από επώαση 60 λεπτών διατηρεί περίπου το 56.3% της ενεργότητάς του σε θερμοκρασία 60°C, άρα μπορεί να θεωρηθεί θερμοσταθερό. Πλεονέκτημα αποτελεί, επίσης η διατήρηση περίπου του 95% της ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασία 30 και 40°C, καθώς κρίνεται απαραίτητη η σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακόμα, παρουσιάστηκε μικρή αναστολή της δράσης του ενζύμου από τα μέταλλα  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , EDTA, Urea και SDS και ενεργοποίηση του ενζύμου από τα ιόντα  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  και  $Cu^{2+}$ . Επίσης, μελετήθηκε η αναστολή του ενζύμου από την D-γλυκόζη, η οποία βρέθηκε ότι αποτελεί ισχυρό αναστολέα της ανασυνδυασμένης β-γλυκοζιδάσης ( $K_i=282 \mu M$ ), ενώ η D-ξυλόζη και το D-γλουκονικό οξύ παρουσιάζουν αρκετά μικρότερες σταθερές αναστολής (30μ M και 22μ M, αντίστοιχα). Η ιδιότητα αυτή της β-γλυκοζιδάσης είναι αρκετά σημαντική, καθώς η αναστολή από τη γλυκόζη παίζει αρνητικό ρόλο στην ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης στην βιομηχανική παραγωγή. Τέλος, μελετήθηκε η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης σε αντιδράσεις τρανσγλυκοζυλίωσης και η ανάλυση των προϊόντων έδειξε απότομη αύξηση της σύνθεσης μέθυλο-D-γλυκοζιδών για συγκεντρώσεις κελλοβιόζης από 4% w/v και άνω, ενώ η τιμή της σταθεράς ( $K_m$ ) της αντίδρασης υπολογίστηκε 91mM. Η αντίδραση αυτή είναι αρκετά σημαντική, καθώς η διεξαγωγή της σε βιομηχανικές διεργασίες μειώνει την τελική συγκέντρωση του επιθυμητού προϊόντος, όμως μπορεί να παράξει χρήσιμους ολιγοσακχαρίτες.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος ..... 3

Περίληψη..... 4

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η ΦΥΤΙΚΗ ΒΙΟΜΑΖΑ ΩΣ ΠΗΓΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ..... 8

1.1 Η φυτική βιομάζα ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων ..... 8

1.2 Κύρια χαρακτηριστικά της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας..... 11

1.3 Κυτταρίνη ..... 12

1.4 Ημικυτταρίνες ..... 13

1.4.1 Ξυλάνη ..... 14

1.5 Λιγνίνη ..... 16

1.6 Δομή και σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος..... 17

2. Η ΛΙΓΝΙΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΟΣ ΒΙΟΜΑΖΑ ΩΣ ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ  
..... 18

2.1 Υδρόλυση της βιομάζας..... 19

2.1.1 Όξινη υδρόλυση ..... 19

2.1.2 Προκατεργασία για την ενζυμική υδρόλυση της βιομάζας..... 20

2.1.3 Ενζυμική υδρόλυση ..... 21

2.1.3.1 Κυτταρινάσες ..... 22

2.1.3.2 Δομή και δράση των κυτταρινασών ..... 23

2.1.3.3 Β-γλυκοζιδάσες ..... 26

2.1.3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης ..... 29

2.1.3.4 Ενζυμική υδρόλυση ημικυτταρινών και λιγνίνης..... 30

3. Ο ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΣ ΜΥΚΗΤΑΣ *Myceliphthora thermophila* (*Sporotrichum thermophile*/  
*Chrysosporium lucknowense c1*) ..... 30

4. Η ΖΥΜΗ *Pichia pastoris* ..... 32

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

1.ΥΛΙΚΑ ..... 33

1.1 Όργανα και συσκευές.....	33
1.2 Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά – Στήλες Χρωματογραφίας – Εμπορικά ένζυμα – Τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα (kits) .....	34
1.3. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers) και λουπά διαλύματα .....	34
2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ, ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .....	35
2.1. Στελέχη μικροοργανισμών.....	35
2.2. Θρεπτικά μέσα για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών .....	35
2.3. Καλλιέργειες κυττάρων .....	36
2.4. Πλασμιδιακοί Φορείς Κλωνοποίησης και Έκφρασης.....	36
2.4.1. Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pPICZαC (Invitrogen) .....	37
2.5 Περιοριστικές ενδονουκλεάσες .....	38
2.6 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων (transformation) .....	39
2.6.1 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης <i>P. pastoris</i> .....	40
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	41
3.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα μετασχηματισμένα κύτταρα <i>P. Pastoris</i> .....	41
3.1.1 Έκφραση της πρωτεΐνης σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας (προκαλλιέργειες) .....	42
3.1.2 Καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας .....	42
3.1.3 Επεξεργασία του υπερκειμένου της καλλιέργειας (Διήθηση, συμπύκνωση, εξισορρόπηση).....	42
3.1.4 Χρωματογραφία Συγγενείας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC).....	43
3.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) .....	45
3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών .....	49
3.4 Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας.....	50
3.4.1. Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης .....	50
3.4.2 Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας σε υποστρώματα πολυσακχαριτών.....	50
3.5 Υπολογισμός βέλτιστης θερμοκρασίας ενζυμικής ενεργότητας και σταθερότητας της β-γλυκοζιδάσης.....	56

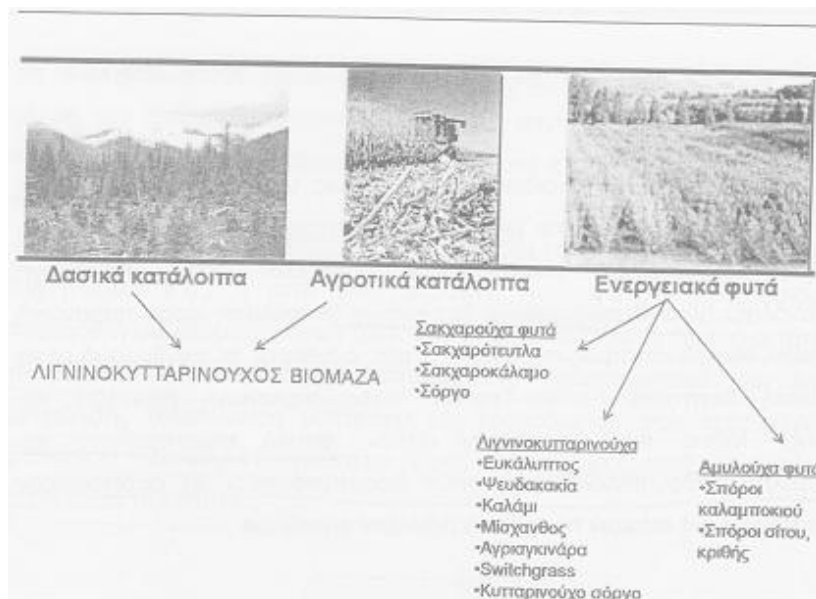
3.6 Επίδραση μετάλλων και ιόντων στην ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης .....	56
3.7 Αναστολή της δράσης της β-γλυκοζιδάσης .....	57
3.7.1 Επίδραση της γλυκόζης και της ξυλόζης.....	57
3.7.2 Επίδραση του γλυκονικού οξέος.....	58
4.ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΡΑΝΣΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ .....	59
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	
1.ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>P. pastoris</i> .....	60
1.1 Πλασμιδιακός φορέας pPICZαC .....	60
1.2 Έλεγχος ανασυνδυασμένων κυττάρων <i>P. pastoris</i> .....	62
2.ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MtBgI3a ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ	64
2.1 Έκφραση του γονιδίου σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας.....	64
2.2 Καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας και απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης .....	65
3.ΕΛΕΓΧΟΣ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ MtBgI3a.....	68
3.1 Ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης σε πολυσακχαριτικά υποστρώματα .....	68
3.2 Υπολογισμός βέλτιστης θερμοκρασίας ενζυμικής ενεργότητας και σταθερότητας της β-γλυκοζιδάσης.....	70
3.3 Επίδραση μετάλλων και ιόντων στην ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης .....	72
3.4 Αναστολή της δράσης της β-γλυκοζιδάσης .....	73
3.4.1 Αναστολή από D-γλυκόζη .....	74
3.4.2Αναστολή από D-ξυλόζη.....	74
3.4.3 Αναστολή από γλυκονικό οξύ .....	75
4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΡΑΝΣΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ .....	75
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. Η ΦΥΤΙΚΗ ΒΙΟΜΑΖΑ ΩΣ ΠΗΓΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

### 1.1 Η φυτική βιομάζα ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων

Η παραγωγή και κυρίως η χρήση βιοκαυσίμων αποτελεί μια από τις βασικές στοχεύσεις, όσο αφορά τον ενεργειακό τομέα, της Ευρωπαϊκής (και γενικότερα της παγκόσμιας) κοινότητας, και είναι σύμφωνες με συνθήκες που έχουν υπογραφεί, όπως το πρωτόκολλο του Κιότο, καθώς θα μπορούσαν να βοηθήσουν στο να ξεπεραστούν οικονομικά προβλήματα και άλλα, όπως η μόλυνση του περιβάλλοντος και όχι μόνο. Η διάθεση και χρήση των βιοκαυσίμων στην Ελλάδα θεσμοθετήθηκε με το νόμο 3423/2005 για την «Εισαγωγή στην Ελληνική Αγορά των Βιοκαυσίμων και των Άλλων Ανανεώσιμων Καυσίμων», μετά από την κοινοτική οδηγία 2003/30/ΕΚ. Εκτός από το θεσμικό πλαίσιο, η παραγωγή και χρήση βιοκαυσίμων καθίσταται επιτακτική, καθώς παρουσιάζει πολλά οφέλη για τις χώρες που θα υιοθετήσουν μια τέτοια πολιτική. Αρχικά, ελαττώνεται η εξάρτηση από το πετρέλαιο και τις χώρες που το παράγουν, γεγονός πολύ σημαντικό για την οικονομική πολιτική μιας χώρας και ταυτόχρονα ενισχύεται η αγροτική οικονομία με τη στήριξη ενεργειακών καλλιεργειών, οι οποίες θα παράγουν την απαραίτητη πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων (ειδικά σε μια χώρα όπως η Ελλάδα που είναι κυρίως αγροτική χώρα), ενώ η δημιουργία μονάδων παραγωγής βιοκαυσίμων μπορεί να βοηθήσει την τοπική ανάπτυξη, εκτός των μεγάλων αστικών κέντρων δημιουργώντας και νέες θέσεις εργασίας, ενώ παράλληλα και η ενσωμάτωση μονάδων παραγωγής βιοκαυσίμων μπορεί να βοηθήσει κάποιες ήδη υπάρχουσες βιομηχανίες όπως η πετρελαϊκή βιομηχανία, η βιομηχανία ζάχαρης, η χαρτοβιομηχανία. Πέραν των οικονομικών, η παραγωγή και η χρήση βιοκαυσίμων έχει και άλλα σημαντικά οφέλη, με κυριότερο την προστασία του περιβάλλοντος, καθώς η χρήση βιοκαυσίμων έχει αποδειχθεί ότι ελαττώνει σημαντικά τους ρύπους.



**Εικόνα 1:**  
Συνηθεις πηγές βιομάζας.



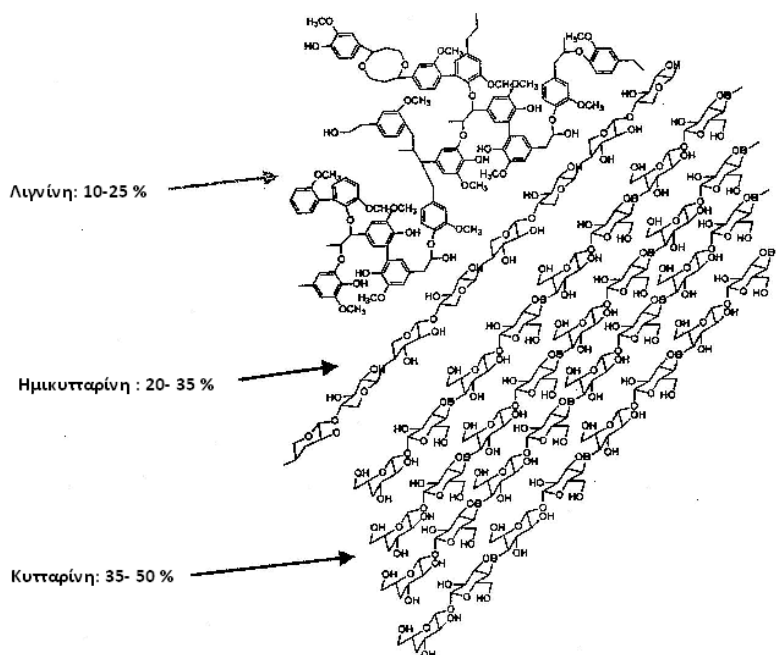
Οι δυνατές πηγές βιομάζας που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αιθανόλης είναι διάφορα δασικά κατάλοιπα (όπως καυσόξυλα), υπολείμματα καλλιέργειας των δασών (αραιώσεων, υλοτομίας), προϊόντα καθαρισμών για την προστασία τους από πυρκαγιές, υπολείμματα επεξεργασίας τους ξύλου, διάφορα αγροτικά παραπροϊόντα, όπως υπολείμματα γεωργικών καλλιεργειών (στελέχη, κλαδιά, φύλλα, άχυρο, κλαδοδέματα κλπ) και υπολείμματα επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων (όπως υπολείμματα εκκοκκισμού βαμβακιού, πυρηνόξυλο, πυρήνες φρούτων κλπ) και τέλος διάφορα ενεργειακά φυτά. Οι ενεργειακές καλλιέργειες και τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά είναι οι κύριες πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Τα ενεργειακά φυτά, διακρίνονται σε σακχαρούχα φυτά (σακχαροκάλαμο, σακχαρότευτλο, σόργο), αμυλούχα φυτά (σπόροι σιτηρών) καθώς και ενεργειακά φυτά λιγνινοκυτταρινούχου σύστασης (ευκάλυπτος, κενάφ, κυτταρινούχο σόργο, μίσχανθος, αγριαγκινάρα, καλάμι, switchgrass). Το κύριο πλεονέκτημα των φυτών αυτών (αν και κάποια από αυτά, όπως η αγριαγκινάρα, ο μίσχανθος και το καλάμι δεν καλλιεργούνται σε μεγάλη έκταση προς το παρόν) είναι ότι η σταθερή παραγωγή τους, μπορεί να εξασφαλίσει μεγάλης κλίμακας, μακροπρόθεσμη προμήθεια πρώτης ύλης, με ομοιόμορφα ποιοτικά χαρακτηριστικά σε μονάδες παραγωγής υγρών βιοκαυσίμων και ενέργειας. Ειδικά οι νέες καλλιέργειες, παρουσιάζουν βελτιωμένη οικονομικότητα και ελαχιστοποιημένες απαιτήσεις σε έδαφος, χημικά, μεταφορικά και ελαχιστοποιημένες αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Πρέπει όμως να σημειωθεί, ότι υπάρχει ο κίνδυνος κλονισμού της τροφικής ασφάλειας και αύξησης των τιμών των τροφίμων, λόγω της χρήσης σακχαρούχων και αμυλούχων φυτών για την παραγωγή βιοκαυσίμων, κάτι που μπορεί να επιδεινώσει την παγκόσμια επισιτιστική κρίση. Ένας τρόπος να αποφευχθεί αυτό το πρόβλημα είναι η χρήση του μη εδώδιμου κλάσματος της φυτικής φυτικής βιομάζας, που είναι η λιγνινοκυτταρίνη και όχι των εδώδιμων κλασμάτων, όπως είναι το άμυλο και η ζάχαρη.

<b>Βιοκαύσιμο</b>	<b>Πρώτη Ύλη</b>	<b>Απόδοση (kg/στρέμμα)</b>	<b>Απόδοση σε βιοκαύσιμο (lt/στρέμμα)</b>
Βιοντήζελ	Ηλίανθος	120-210	43-75
	Ελαιοκράμβη	120-250	43-90
Βιοαιθανόλη	Βαμβάκι.	120-160	18-25
	Σόγια	160-240	29-44
	Σιτάρι	150-800	45-240
	Αραβόσιτος	900	270
	Τεύτλα	6000	600
	Σόργο	7000-10000	675-900

**Πίνακας 1:** Παραγόμενα βιοκαύσιμα από διάφορα φυτά και οι αποδόσεις τους ανά στρέμμα σε σπόρο και καύσιμο [Πηγή: Ανανεώσιμες πηγές ενέργειας–Η θέση τους στο νέο ενεργειακό τοπίο της χώρας και στην περιοχή της Θεσσαλίας (ΤΕΕ–ΚΔΘ, Λάρισα, 29 Νοεμ.–1 Δεκεμ., 2007)]

Τα βιοκαύσιμα που προέρχονται από την αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας ονομάζονται καύσιμα δεύτερης γενιάς. Η σύσταση των υλικών αυτών διαφέρει ανάλογα με την προέλευση του κάθε υλικού. Το κύριο συστατικό τους είναι η κυτταρίνη, σε ποσοστό 35-50%, και ακολουθούν η ημικυτταρίνη (20-35%) και η λιγνίνη (10-25%). Το υπόλοιπο κλάσμα της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας αποτελείται από πρωτεΐνες, έλαια και τέφρα [Saha, 2003].

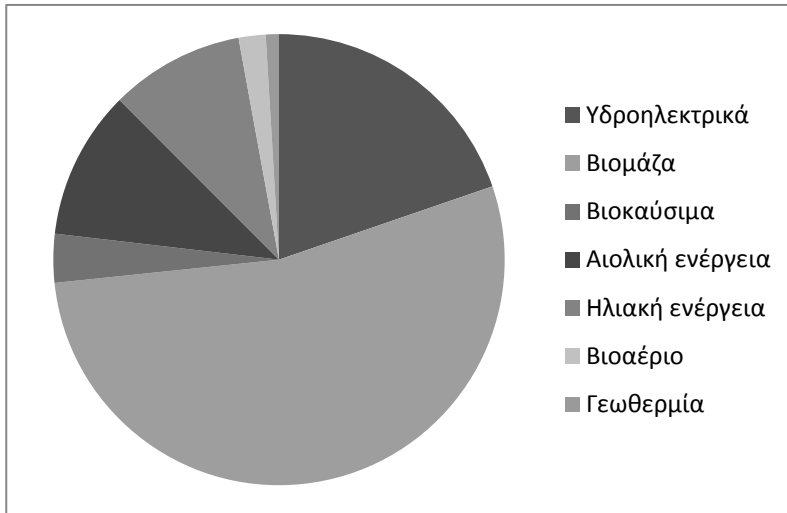
### Σύσταση Βιομάζας



**Εικόνα 2:** Τυπική σύσταση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Η αξιοποίηση της βιομάζας για την παραγωγή ενέργειας παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, καθώς είναι υλικό ανεξάντλητο, όντας «αποθήκη» ηλιακής ενέργειας. Ακόμη, θεωρείται καύσιμο «CO<sub>2</sub> – ουδέτερο» αφού το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται κατά την καύση της, δεσμεύεται και πάλι από τα φυτά με τη φωτοσύνθεση, ενώ συμμετέχει πολλαπλά στο ισοζύγιο του CO<sub>2</sub> δίνοντας τη δυνατότητα δέσμευσης άνθρακα σε οργανική μορφή (στα φυτά και τους άλλους οργανισμούς) και εξοικονόμησης ισοδύναμου ποσού CO<sub>2</sub>. Η αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων με βιομάζα που είναι ουδέτερη σε εκπομπές CO<sub>2</sub> συνεισφέρει θετικά στην καταπολέμηση του φαινομένου του θερμοκηπίου.

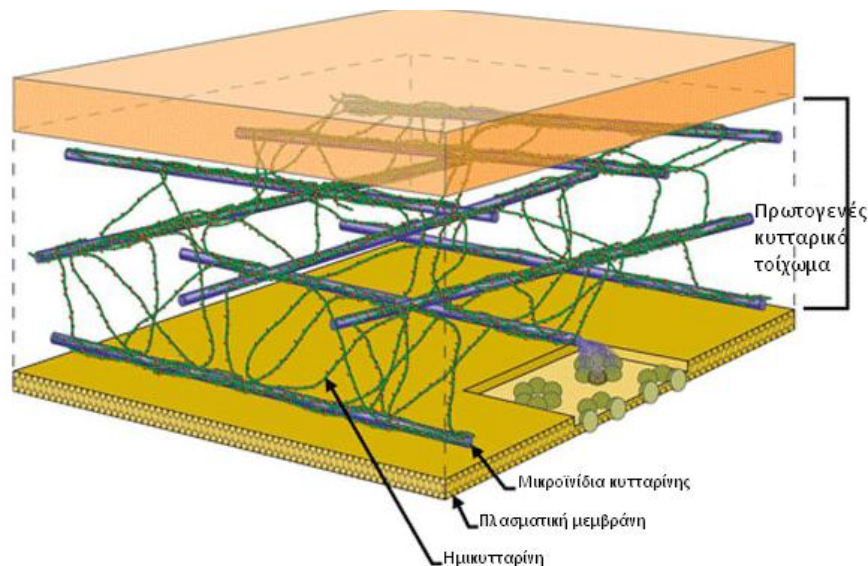
Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω, η αξιοποίηση της βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων, παρουσιάζει πολλαπλά οφέλη, τόσο για την παραγωγή ενέργειας όσο και για την οικονομική ανάπτυξη της χώρας αλλά και την προστασία του περιβάλλοντος.



**Εικόνα 3:** Η συνεισφορά των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας στο εθνικό ενεργειακό ισοζύγιο της χώρας, σε επίπεδο παραγωγής πρωτογενούς ενέργειας για το 2008 [Πηγή: ΚΑΠΕ, Ετήσια Έκθεση 2009].

## 1.2 Κύρια χαρακτηριστικά της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

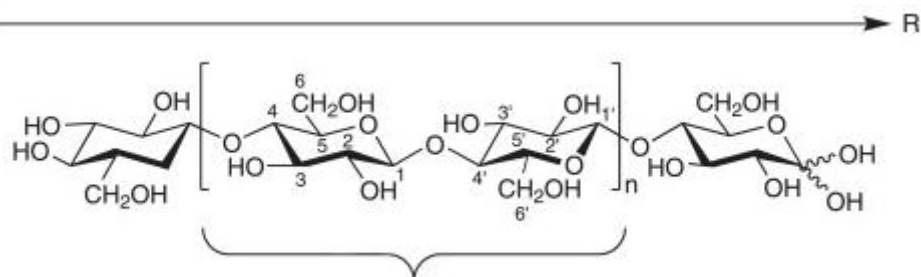
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κάθε λιγνοκυτταρινούχο υλικό αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη (πολυμερή υδατανθράκων) και λιγνίνη, ενώ σε μικρότερο ποσοστό διαθέτει και οξέα, άλατα και ανόργανες ενώσεις. Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης της γλυκόζης, οι ημικυτταρίνες είναι πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από διαφορετικές εξόζες (γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη) και πεντόζες (ξυλόζη, αραβινόζη) και η λιγνίνη είναι ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο. Η κυτταρίνη προσδίδει ακαμψία στους φυτικούς ιστούς (υψηλή αντοχή σε αξονικό εφελκυσμό), ενώ οι ημικυτταρίνες και η λιγνίνη προσδίδουν αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση. Τα τρία αυτά συστατικά, σχηματίζουν ένα ισχυρό σύμπλοκο, το οποίο πρέπει να διασπαστεί ώστε να γίνει η υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης προς διάφορα διαλυτά ζυμώσιμα σάκχαρα. Κάτι τέτοιο, όμως δεν συμβαίνει εύκολα για την λιγνίνη. Συγκεκριμένα, τα μόρια της κυτταρίνης τοποθετούνται στο χώρο έτσι ώστε να σχηματίζουν μικροδομές που ονομάζονται μικροϊνίδια (microfibrils) και απαιτούνται περίπου 15-40 μακρομόρια ανά μικροϊνίδιο. Ακολούθως, τα μικροϊνίδια συνδέονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας τα κυτταρικά ινίδια (fibrils), τα οποία συμπλέκονται με τη βοήθεια των άμορφων μακρομοριακών αλυσίδων της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό των ινών (fibers).



**Εικόνα 4:** Δομή του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος

### 1.3 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Είναι ένα γραμμικό ομοπολυμερές που αποτελείται από μονομερή D-ανυδρογλυκοκυρανόζης που συνδέονται με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Κάθε μονομερές (δακτύλιος γλυκοκυρανόζης) περιστρέφεται κατά 180° ως προς το γειτονικό του μονομερές, γύρω από το β-1,4- γλυκοζιτικό δεσμό. Σε αυτή την περιστροφή, οφείλεται η μεγάλη συμμετρία του μορίου της κυτταρίνης, καθώς κάθε πλευρά της αλυσίδας έχει τον ίδιο αριθμό υδροξυλομάδων. Η σύνδεση των παρακείμενων μορίων κυτταρίνης με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waal's οδηγεί στην παράλληλη διάταξη και την κρυσταλλική δομή. Οι εκτεταμένοι δεσμοί υδρογόνου της εξωτερικής αλυσίδας (2 ανά ανυδρογλυκοκυρανόζη) και της εσωτερικής αλυσίδας ( 2~3 ανά ανυδρογλυκοκυρανόζη) έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ευθέων, σταθερών ινών με μεγάλη αντοχή στον εφελκυσμό. [Zhang & Lynd, 2004]. Οι υδροξυλομάδες του δακτυλίου γλυκοκυρανόζης σχηματίζουν υδρόφιλη επιφάνεια, ενώ οι δακτύλιοι σχηματίζουν υδρόφοβη επιφάνεια. Το αναγωγικό άκρο είναι μια αλδεΐδομάδα [Hilden & Johansson, 2004].



**Εικόνα 5:** δομή της αλυσίδας της κυτταρίνης, όπου n είναι ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μονάδων του δισακχαρίτη στην αλυσίδα, ενώ εμφανίζεται και το αναγωγικό άκρο της αλυσίδας [Πηγή: Perez et al., 2010]

Η οργάνωση ενός μορίου κυτταρίνης κυμαίνεται από υψηλή κρυσταλλικότητα ( π.χ. στους οργανισμούς *Acetobacter xylinum* και *Valonia ventricosa*) έως και μορφές όπου κυριαρχεί η αταξία. Η ιδιότητα αυτή της κυτταρίνης, είναι πολύ σημαντική καθώς ο βαθμός κρυσταλλικότητας σε συνδυασμό με τις προσμίξεις της κυτταρίνης με την λιγνίνη και την ημικυτταρίνη, επηρεάζει σημαντικά την ανθεκτικότητα της κυτταρίνης στην ενζυμική υδρόλυση. Συγκεκριμένα, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, οι ρυθμοί υδρόλυσης της άμορφης κυτταρίνης είναι συνήθως 3-30 φορές ταχύτεροι από τους αντίστοιχους για την κυτταρίνη με υψηλή κρυσταλλικότητα. [Lynd et al., 2002]

Η φυσική κυτταρίνη, η οποία ονομάζεται κυτταρίνη I, έχει δύο διακριτές κρυσταλλικές δομές, την τρικλινή κυτταρίνη,  $I_a$ , η οποία κυριαρχεί στην βακτηριακή κυτταρίνη και την μονοκλινή κυτταρίνη,  $I_b$  η οποία κυριαρχεί σε πιο πολύπλοκα φυτά [Zhang & Lynd, 2004]. Οι δύο αυτές δομές διαφέρουν ως προς την κρυσταλλική δομή και τους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των γειτονικών τους αλυσίδων. Έτσι, η δομή  $I_a$ , θεωρείται λιγότερο σταθερή και άρα πιο ευάλωτη στην ενζυμική υδρόλυση.

#### 1.4 Ημικυτταρίνες

Ο όρος «ημικυτταρίνη» δεν μπορεί να θεωρηθεί σωστός, καθώς υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι ημικυτταρινών. Οι ημικυτταρίνες ορίζονται ως το μίγμα συμπολυμερών ουσιών που μαζί με την κυτταρίνη και τη λιγνίνη συγκροτούν τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών κυττάρων. Γενικά, οι ιδιότητες, ο τύπος και οι ποσότητες των ημικυτταρινών διαφέρουν ανάλογα με την προέλευσή τους. Είναι άμορφες ενώσεις, με μικρότερο βαθμό πολυμερισμού, είναι έντονα υγροσκοπικές και έχουν χαμηλή χημική δραστηριότητα. Ακόμη, διαλύονται σε αλκαλικά διαλύματα και υδρολύονται πολύ εύκολα με αραιά διαλύματα οξέων. Η παρουσία τους στη φύση είναι στενά συνδεδεμένη με την κυτταρίνη και τη λιγνίνη. Το ποσοστό τους στα φυτικά είδη ποικίλει από 17-42%.

Αναλυτικότερα, οι ημικυτταρίνες είναι ένα πλέγμα διασταυρωμένων φυτικών ημικυτταρινικών πολυσακχαριτών, οι οποίοι αποτελούνται από πεντόζες, ( όπως D - ξυλόζη, L - αραβινόζη, L - ραμνόζη και L - φουκόζη), από εξόζες, (όπως D - μαννόζη, D - γλυκόζη, D - γαλακτόζη) και ουρονικά οξέα (όπως D - γλυκουρονικό οξύ, D - 4 - O - μεθυλ - γλυκουρονικό οξύ και D - γαλακτουρονικό οξύ). Οι ημικυτταρίνες χωρίζονται σε κατηγορίες ανάλογα με το κυριότερο μονομερές σάκχαρο από το οποίο αποτελούνται. Έτσι, οι κυριότερες ημικυτταρίνες είναι οι ξυλάνες, οι μαννάνες, οι γαλακτάνες, και οι αραβινάνες. Τα πολυμερή αυτά διαθέτουν αντίστοιχα τους μονοσακχαρίτες D-ξυλόζη, D- μαννόζη, D- γαλακτόζη και L-αραβινόζη. [Dhiman et al., 2008] Στη φύση, σπάνια απαντώνται ημικυτταρίνες αποτελούμενες μόνο από ένα τύπο πολυσακχαρίτη. Συνήθως, παρουσιάζουν μια πολύπλοκη δομή που περιλαμβάνει πάνω από ένα τύπο πολυσακχαριτών, όπως η γλυκουρονοξυλάνη (ξυλόζη και ουρονικό οξύ), η αραβινογλυκουρονοξυλάνη

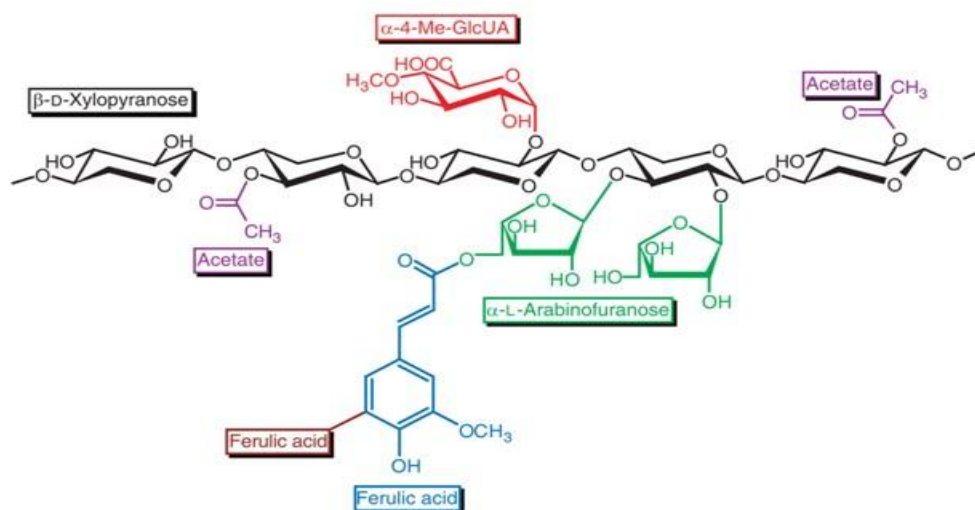
(αραβινόζη, ξυλόζη και ουρονικό οξύ), η γλυκομαννάνη (ετεροπολυμερές γλυκόζης και μαννόζης), η αραβινογαλακτάνη (ετεροπολυμερές αραβινόζης και γαλακτόζης), η ξυλογλυκάνη (ετεροπολυμερές ξυλόζης και γλυκόζης).

### 1.4.1 Ξυλάνη

Η ξυλάνη αποτελεί το κύριο συστατικό της ημικυτταρίνης και είναι ο μη-κυτταρινικός πολυσακχαρίτης που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στη γη. Περίπου το ένα τρίτο της ανανεώσιμης πηγής άνθρακα στον πλανήτη βρίσκεται στη μορφή της ξυλάνης. Είναι βασικό δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών και αποτελεί περίπου το 20-30% το ξηρού βάρους του σκληρού ξύλου και των ετησίων φυτών. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυμαίνεται από 150 έως 200 ξυλόζες για τα φυλλοβόλα και από 70 έως 130 για τα κωνοφόρα. Αρκετές μελέτες αποδεικνύουν ότι η ξυλάνη εμφανίζεται κυρίως στη διεπιφάνεια μεταξύ της λιγνίνης και άλλων πολυσακχαριτών. [Dhiman et al., 2008]. Ανεξάρτητα από το είδος του κυτταρικού τοιχώματος στο οποίο βρίσκεται, η ξυλάνη αλληλεπιδρά με άλλα δομικά συστατικά και συγκεκριμένα με μικροϊνίδια κυτταρίνης, πρωτεΐνες, πηκτινικούς πολυσακχαρίτες, με άλλα μη κυτταρινικά πολυμερή και τις περισσότερες φορές με λιγνίνη. Συνήθως συνδέεται με ομοιοπολικούς δεσμούς με τα φαινολικά κατάλοιπα της λιγνίνης και με μη ομοιοπολικούς δεσμούς (δεσμούς υδρογόνου) με τους άλλους πολυσακχαρίτες.

Οι ξυλάνες ουσιαστικά λειτουργούν ως συνδετικός κρίκος ανάμεσα στην κυτταρίνη και τη λιγνίνη ώστε να εξασφαλιστεί η συνεκτικότητα και η ακεραιότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων. Με αυτό τον τρόπο προστατεύεται ο σκελετός των μικροϊνιδίων κυτταρίνης από ενδεχόμενη ενζυμική διάσπαση, και διατηρείται η ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος. [Uffen, 1997]

Η κεντρική αλυσίδα του μορίου της ξυλάνης αποτελείται από μόρια D-ξυλοπυρανόζης ενωμένα μεταξύ τους με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η δομή της ξυλάνης έχει ιδιαίτερη ποικιλομορφία, και εξαρτάται από την πηγή προέλευσής της. Η δομή της μπορεί να είναι από μια απλή, σχεδόν γραμμική, μη υποκατεστημένη αλυσίδα, μέχρι ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα ετεροπολυσακχαριτών με πολύ υψηλό βαθμό διακλαδώσεων. Οι κυριότεροι υποκαταστάτες είναι μονάδες αραβινόζης, D- γλυκουρονικού οξέος και ακετυλομάδες. [Dhiman et al., 2008] Οι υποκαταστάτες αυτοί συνδέονται με γλυκοζυτικούς δεσμούς με τους άνθρακες 2 και 3 των ξυλανοπυρανοζών. Άλλοι υποκαταστάτες που εμφανίζονται στο μόριο της ξυλάνης είναι ομάδες γλυκόζης, γαλακτόζης, ραμνόζης και μικρές ποσότητες φαινολικών συστατικών όπως φερουλικό ή π-κουμαρικό οξύ. Απαντώνται λοιπόν, στο περιβάλλον, αρκετοί διαφορετικοί τύποι ξυλανών. Έχει αποδειχθεί το γεγονός ότι η χημική δομή των ξυλανών εξαρτάται από το φυτό από το οποίο προέρχονται. [Joseleau et al., 1992]



**Εικόνα 6:** Δομή της ξυλάνης. Η κεντρική αλυσίδα αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μόρια D-ξυλοπυρανόζης συνδεδεμένα με β-1,4-δεσμούς, τα οποία συνδέονται με ομάδες ακετυλίου, αραβινόζης και γλυκουρονικού οξέος, γλυκόζης, λακτόζης, ραμνόζης, φερουλικό οξύ κ.α.

Με βάση τους υποκαταστάτες της κύριας αλυσίδας, οι ξυλάνες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες (αν και σε κάθε κατηγορία υπάρχει μεγάλη ετερογένεια):

➤ **Γραμμικές ομοξυλάνες:** οι ξυλάνες της κατηγορίας αυτής δεν διαθέτουν υποκαταστάτες στην κύρια αλυσίδα. Τέτοιου είδους ξυλάνες έχουν βρεθεί στα τοιχώματα πράσινων φυκών, κόκκινων θαλασσίων φυκών, στο φυτό *Esparto* και σε μίσχο καπνού [Joseleau et al., 1992]. Γενικά, στα ανώτερα χερσαία φυτά, πολύ σπάνια υπάρχουν γραμμικές ομοξυλάνες.

➤ **Αραβινοξυλάνες:** σε αυτή την οικογένεια ξυλανών, η κύρια αλυσίδα ξυλάνης είναι υποκατεστημένη με α-L-αραβινοφουρανοζυλικές ομάδες, οι οποίες μπορεί να συνδέονται με τον άνθρακα 2 ή 3 της ξυλοπυρανόζης, με α-1,2 ή α-1,3 γλυκοζιτικό. Αραβινοξυλάνες απαντώνται στα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα συνηθών μονοκοτυλήδων και σε φυτά όπως το σιτάρι, η σίκαλη, το κριθάρι, η βρώμη, το ρύζι, το σόργο αλλά και σε βλαστούς μπαμπού. Οι πολυσακχαρίτες αυτοί αποτελούν σημαντικό συστατικό των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων, αν και στα σπέρματα των δημητριακών βρίσκονται σε μικρές μόνο ποσότητες. Συγκεκριμένα, στο ενδοσπέρμιο και το περικάρπιο έχουν βρεθεί αραβινοξυλάνες υψηλού βαθμού υποκατάστασης.

➤ **Γλυκουρονοξυλάνες:** φέρουν ως υποκαταστάτες το α-D-γλυκουρονικό οξύ και το 4-O-μέθυλο-αιθερικό παράγωγο του, στις θέσεις 2 ή 3 των ξυλοπυρανόζων της κεντρικής αλυσίδας. Οι γλυκουρονοξυλάνες των αγγειοσπέρμων είναι σε μεγάλο βαθμό (70-80%) υποκατεστημένες από ακετυλομάδες, οι οποίες προσδίδουν στις ξυλάνες αυτές την μερική διαλυτότητά τους στο νερό, αλλά απομακρύνονται εύκολα με κατεργασία με αλκαλικό διάλυμα. Οι ακετυλομάδες εμποδίζουν την πλήρη αποικοδόμηση των ακετυλιωμένων ξυλανών από τις ξυλανάσες. Οι πλευρικές αλυσίδες καθορίζουν τη διαλυτότητα, τις φυσικές ιδιότητες και τις αλληλεπιδράσεις του μορίου της ξυλάνης με τα υπόλοιπα

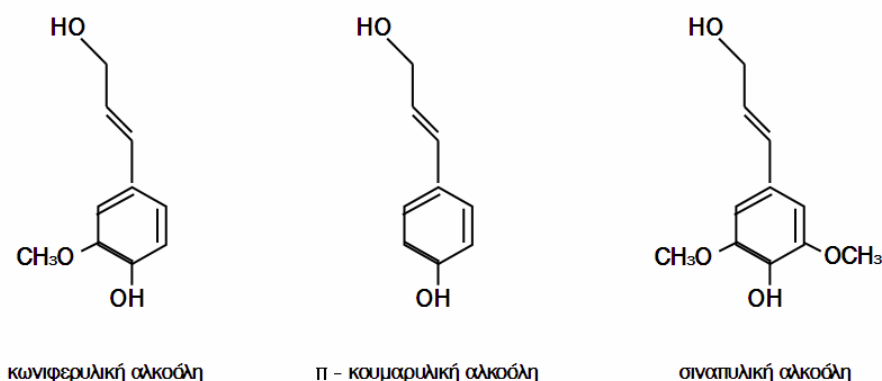
ημικυτταρινικά συστατικά, και άρα επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τον τρόπο και την έκταση της ενζυμικής αποικοδόμησης. Γλυκουρονοξυλάνες βρίσκονται στο φλοιό της σόγιας, στα σκληρά ξύλα και στα όσπρια. [Joseleau et al., 1992]

➤ Γλυκουροααραβινοξυλάνες: Η οικογένεια των γλυκουροααραβινοξυλανών απαντάται συνήθως στα κωνοφόρα, έχει παρόμοια δομή με τη γλυκουροξυλάνη, αλλά ανά δέκα ξυλοπυρανόζες έχει μια υποκατάσταση α-L-ααραβινοφουρανόζης, μέσω α-1,3-γλυκοζιτικού δεσμού ανά. Οι ξυλάνες αυτές δεν είναι ακετυλιωμένες και εξαιτίας της φουρανοζικής δομής τους οι πλευρικές αλυσίδες της αραβινόζης υδρολύονται εύκολα από τα οξέα.

➤ Αραβινογλυκουροξυλάνες: Η οικογένεια των αραβινογλυκουροξυλανών διαφέρει από την οικογένεια των γλυκουροααραβινοξυλανών μόνο στο ότι οι αραβινοφουρανοζικοί υποκαταστάτες είναι σημαντικά περισσότεροι από τους υποκαταστάτες των ουρονικών οξέων. Αυτός ο τύπος της ξυλάνης απαντάται στα κωνοφόρα και στους λιγνινοκυτταρικούς ιστούς των χόρτων και των μονοετών φυτών.

## 1.5 Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα από τα πιο άφθονα συστατικά της φυτικής βιομάζας. Είναι μια οργανική ουσία η οποία συνδέει τα κύτταρα, τις ίνες και τα αγγεία που αποτελούν το ξύλο και τα συστατικά των φυτών. Η παρουσία της στη φύση είναι στενά συνδεδεμένη με την κυτταρίνη, δεν συναντάται όμως σε όλα τα φυτικά είδη. Είναι άμορφη και έχει πολύ υψηλό βαθμό πολυμερισμού (100000-300000). Δεν είναι δυνατό να οριστεί η ακριβής δομή της λιγνίνης ως χημικό μόριο, καθώς η δομή της διαφέρει σημαντικά από οργανισμό σε οργανισμό. Στη λιγνίνη υπάρχουν τρία διαφορετικά φαινυλοπροπάνια. Γενικά, είναι ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές και βασική της μονάδα είναι το φαινυλοπροπάνιο.



**Εικόνα 7:** Τα φαινυλοπροπάνια της λιγνίνης

Η λιγνίνη είναι έντονα υδρόφοβη ουσία, αδιάλυτη στο νερό. Οι δεσμοί στη λιγνίνη είναι αιθερικοί δεσμοί και δεσμοί άνθρακα-άνθρακα. Ενώνεται με χημικούς δεσμούς με τις ημικυτταρίνες και την κυτταρίνη. Υδρολύεται δύσκολα, με αλκαλικά διαλύματα και σε υψηλές θερμοκρασίες (150-180 °C). Όπως προαναφέρθηκε, η λιγνίνη προσδίδει υψηλή αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση στα κυτταρικά



τοιχώματα. Η παρουσία της λιγνίνης προστατεύει την κυτταρίνη, προσδίδοντας της δομική ακαμψία και σταθερότητα. Η απομάκρυνση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης μπορεί να αποκαλύψει σημεία στην επιφάνεια της κυτταρίνης που είναι ευάλωτα στην ενζυμική υδρόλυση.

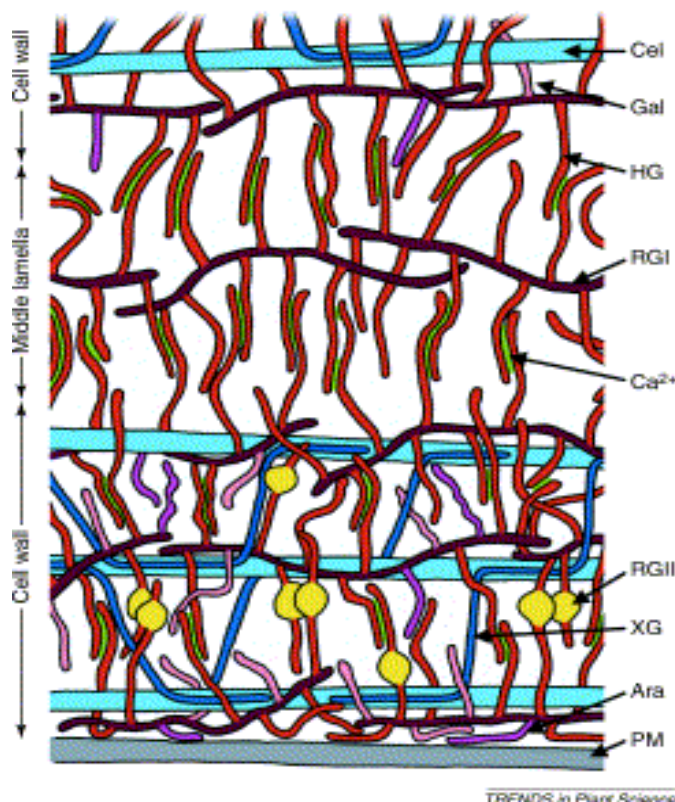
### **1.6 Δομή και σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος**

Το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της βιομάζας που παράγεται ετησίως στη Γη. Είναι ένα εκπληκτικά περίπλοκο κράμα υδρογονανθράκων, πρωτεϊνών, λιγνίνης, νερού και άλλων ουσιών, όπως κουτίνη, σουμπερίνη και κάποιων ανόργανων ουσιών. Τα συστατικά αυτά διαφέρουν ανάλογα με το είδος του φυτού, το είδος των κυττάρων, ακόμα και των γειτονικών κυττάρων. Ακόμα, διάφορα εξελικτικά γεγονότα και η έκθεση των κυττάρων σε διάφορες καταπονήσεις, μπορεί να αυξήσουν ακόμα περισσότερο αυτές τις διαφοροποιήσεις στη δομή και τη σύνθεση. [Showalter, 1993]. Το κυτταρικό τοίχωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του φυτού, καθορίζει τις διακυτταρικές σχέσεις και την τελική μορφή του κυττάρου και είναι ο πιο σημαντικός μηχανισμός προστασίας από μικροοργανισμούς, καθώς το μέγεθος των πόρων του κυτταρικού τοιχώματος είναι τόσο μικρό που δεν επιτρέπει την είσοδο ούτε σε ιούς, ούτε σε βακτήρια. Οι λειτουργίες αυτές, αν και παρουσιάζονται σε όλα τα κυτταρικά τοιχώματα, εμφανίζουν διαφοροποιήσεις, ανάλογα με τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτικού οργανισμού, διακρίνονται δυο τύποι κυτταρικών τοιχωμάτων: τα πρωτογενή και τα δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα. Το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα, δημιουργείται στη φάση κατά την οποία το κύτταρο αυξάνει και είναι λεπτό, πλαστικό και περιέχει μεγάλη ποσότητα ύδατος. Το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα, δημιουργείται όταν το φυτικό κύτταρο έχει ολοκληρώσει την ανάπτυξή του, εναποτίθεται ομοιόμορφα ή τοπικά επί του πρωτογενούς τοιχώματος και περιέχει περισσότερη κυτταρίνη, λιγότερες ημικυτταρίνες και πηκτικές ενώσεις από το πρωτογενές. Οι σκελετικές ενώσεις (κυτταρίνη, χιτίνη, ξυλάνη) μπορούν να αυξηθούν σε ποσοστό που φτάνει το 95% του βάρους του, με αποτέλεσμα το κυτταρικό τοίχωμα να χάνει την πλαστικότητά του και να γίνεται περισσότερο ελαστικό. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης στο δευτερογενές τοίχωμα ποικίλει μεταξύ 13.000 – 16.500, ενώ τα μικροϊνίδια κυτταρίνης είναι παράλληλα μεταξύ τους. Λόγω της παραλληλότητας αυτής, το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα είναι έντονα ανισότροπο. Στα κύτταρα που έχει σχηματιστεί το δευτερογενές τοίχωμα, συνυπάρχει και το πρωτογενές. Τα κύτταρα στους φυτικούς ιστούς συγκρατούνται μεταξύ τους με τη μέση πλάκα, ένα λεπτό μεσοκυττάριο στρώμα που περιέχει κυρίως πηκτικές ενώσεις.

Ένα τυπικό πρωτογενές τοίχωμα περιέχει ημικυτταρίνες σε ποσοστό 15 – 25% του ξηρού βάρους και πηκτικές ενώσεις (αραβινογαλακτάνη, ραμνογαλακτουρονάνες) σε ποσοστό μέχρι 35%. Η βιολογική δράση των πηκτικών

πολυσακχαριτών σχετίζεται με την πλαστικότητα του κυτταρικού τοιχώματος και έχουν συγκολλητικό ρόλο. Ακόμη, τα πρωτογενή τοιχώματα περιέχουν πρωτεΐνες σε ποσοστό 5 – 10% του ξηρού βάρους, ένζυμα και νερό.



**Εικόνα 8:** Μοντελοποίηση της οργάνωσης των πολυσακχαριτών σε φυτικά κυτταρικά τοιχώματα. Τα μικροϊνίδια κυτταρίνης (Cel) συνδέονται με την ημικυτταρίνη (ξυλογλουκάνη, XG), η οποία συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με τα ινίδια κυτταρίνης. [Πηγή: [Vorwerk et al,2004](#)]

## 2. Η ΛΙΓΝΙΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΟΣ ΒΙΟΜΑΖΑ ΩΣ ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Η αιθανόλη είναι το πιο κοινό ανανεώσιμο καύσιμο και αποτελεί μια αρκετά καλή εναλλακτική λύση για τα παράγωγα πετρελαίου που χρησιμοποιούνται στον τομέα των μεταφορών. Η βιομάζα είναι μια από τις καλύτερες πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης, καθώς είναι ανανεώσιμη, σχετικά οικονομική πρώτη ύλη, έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε θείο, δεν απελευθερώνει καθαρό διοξείδιο του άνθρακα στην ατμόσφαιρα και έχει μεγάλη πιθανότητα να γίνει ακόμα πιο οικονομική στο κοντινό μέλλον. Αρκετές μελέτες καταλήγουν στο γεγονός ότι μέσα στα επόμενα χρόνια η παραγωγή αιθανόλης θα γίνεται κυρίως από την λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα. Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι για την παραγωγή αιθανόλης από βιομάζα: πρώτον, μέσω υδρολυτικών μηχανισμών που στοχεύουν στην απελευθέρωση μονοσακχαριτών από τους λιγνινοκυτταρινούχους μονοσακχαρίτες και δεύτερον, μέσω θερμοχημικών διεργασιών, που αποικοδομούν τόσο τους πολυσακχαρίτες όσο και τη λιγνίνη.

Οι θερμοχημικές διεργασίες μετατροπής της βιομάζας περιλαμβάνουν είτε απευθείας ρευστοποίηση- πυρόλυση της βιομάζας (θερμική επεξεργασία απουσία

οξυγόνου, η οποία μπορεί να οδηγήσει και σε παραγωγή αερίων αλλά και στερεού υπολείμματος που δεν αποικοδομείται στις συνθήκες της πυρόλυσης) είτε έμμεση ρευστοποίηση-αεριοποίηση της βιομάζας. Στη δεύτερη περίπτωση, το απαιτούμενο τελικό προϊόν δημιουργείται με καταλυτική ή βιολογική αναμόρφωση των παραγόμενων αερίων [Hayes, 2009]. Η υδρόλυση της βιομάζας γίνεται είτε με τη χρήση οξέος (όξινη υδρόλυση), είτε με τη βοήθεια ενζύμων (ενζυμική υδρόλυση).

## 2.1 Υδρόλυση της βιομάζας

### 2.1.1 Όξινη υδρόλυση

Το κύριο πλεονέκτημα της όξινης υδρόλυσης της βιομάζας είναι το γεγονός ότι τα οξέα μπορούν να εισχωρήσουν στη λιγνίνη χωρίς να απαιτείται προκατεργασία της βιομάζας, αποικοδομώντας την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη προς ξεχωριστά μόρια σακχάρων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι οξέων όπως το θειικό, το υδροχλωρικό, το φωσφορικό, το νιτρικό κ.α. [Verardi et al.]

Η όξινη υδρόλυση της βιομάζας (η οποία έχει προηγουμένως υποστεί κατάλληλη προκατεργασία) γίνεται με τις εξής μεθόδους:

1. *Όξινη υδρόλυση με χρήση αραιού οξέος* σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις για σύντομο χρονικό διάστημα. Το οξύ που χρησιμοποιείται συνήθως είναι το θειικό οξύ λόγω του χαμηλού του κόστους και της χαμηλής διάβρωσης που παρουσιάζει σε σχέση με άλλα οξέα. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η καταστροφή του μεγαλύτερου μέρους των πεντοζών που προέρχονται από την ημικυτταρίνη και ενός μέρους των εξοζών που προέρχονται από την κυτταρίνη, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών. Ακόμα, μειονέκτημα αποτελεί και η παραγωγή παρεμποδιστών που αναστέλλουν την μικροβιακή ανάπτυξη των μικροοργανισμών αλλά και τη δράση ενζύμων που χρησιμοποιούνται στην προκατεργασία. Για το λόγο αυτό, η διεργασία αυτή πλέον γίνεται σε 2 στάδια διάρκειας περίπου 3 λεπτών το καθένα. Αρχικά, γίνεται προκατεργασία με το αραιό οξύ σε θερμοκρασίες 140–160 °C για την απελευθέρωση των πεντοζών και στη συνέχεια αυξάνεται η θερμοκρασία στους 200–240 °C για να επιτευχθεί η υδρόλυση της κυτταρίνης [Hayes, 2009]. Έρευνες έχουν δείξει ότι η απόδοση της διεργασίας αυτής είναι 89% για τη μανόζη, 82% για τη γαλακτόζη και μόνο 50 % για τη γλυκόζη, της οποίας η θεωρητική μετατροπή έφτανε το 90%. [Nguyen Q. ,1998].

2. *Όξινη υδρόλυση με τη χρήση πυκνού οξέος*. Η διεργασία αυτή περιλαμβάνει προκατεργασία της βιομάζας με οξύ (αραιό ή πυκνό) ώστε να απελευθερωθούν τα σάκχαρα της ημικυτταρίνης και στη συνέχεια ξήρανση της βιομάζας και προσθήκη πυκνού θειικού οξέος (70–90%) σε ήπιες θερμοκρασίες (30–35°C). Το πυκνό οξύ φέρει την κυτταρίνη σε απολύτως άμορφη κατάσταση. Σε αυτή την κατάσταση, η κυτταρίνη είναι αρκετά επιδεκτική στην υδρολύση. Η διαδικασία αυτή επιφέρει σχετικά γρήγορη (10-12 ώρες) και πλήρη υδρόλυση της γλυκόζης χωρίς αποικοδόμηση των πεντοζών και με παραγωγή ελάχιστων παρεμποδιστών. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι το γεγονός ότι απαιτείται

ελαχιστοποίηση του κόστους αγοράς του πυκνού οξέος, κάτι που αντιμετωπίζεται με την ανακύκλωσή του, μετά από διαχωρισμό του από τα σάκχαρα, με συνεχείς διεργασίες ιοντοεναλλαγής, διεργασίες δηλαδή που έχουν υψηλό κόστος.

3. Μια τρίτη μέθοδος όξινης υδρόλυσης της βιομάζας είναι η μέθοδος *Biofine*, η οποία δεν χρησιμοποιείται ακόμα ευρέως εμπορικά. Η μοναδικότητα της μεθόδου αυτής, έγκειται στο γεγονός ότι δεν απαιτείται καθόλου βιολογική επεξεργασία για την μετατροπή της βιομάζας στο τελικό προϊόν που διατίθεται προς πώληση. Στη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιείται αραιό θειικό οξύ σε ένα σύστημα δύο αντιδραστήρων, σχεδιασμένου με τέτοιο τρόπο ώστε να παρουσιάζει μεγάλες αποδόσεις. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το πολύ υψηλό (μέχρι στιγμής) κόστος και ο σχηματισμός μεγάλων ποσοτήτων πίσσας. [Hayes, 2009]

### **2.1.2 Προκατεργασία για την ενζυμική υδρόλυση της βιομάζας**

Η προκατεργασία της βιομάζας, αποτελεί απαραίτητο βήμα πριν την ενζυμική υδρόλυση. Με την διαδικασία της προκατεργασίας απομακρύνεται η λιγνίνη και η κυτταρίνη χάνει την κρυσταλλικότητά της (γίνεται άμορφη). Έτσι, τα υδρολυτικά ένζυμα (κυτταρινάσες) αποκτούν εύκολη πρόσβαση στα βιοπολυμερή. Η διαδικασία της προκατεργασίας στοχεύει στον διαχωρισμό των υδρογονανθράκων από τη λιγνίνη και την ελαχιστοποίηση της χημικής αποικοδόμησης των σακχάρων που απαιτούνται για την παραγωγή της αιθανόλης. Η προκατεργασία είναι κρίσιμο βήμα για την παραγωγή βιοαιθανόλης από βιομάζα, καθώς επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα των προϊόντων και το κόστος της όλης διεργασίας. Οι μέθοδοι προκατεργασίας μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες: φυσικές, φυσικοχημικές, χημικές, βιολογικές ηλεκτρικές ή και συνδυασμός των παραπάνω.

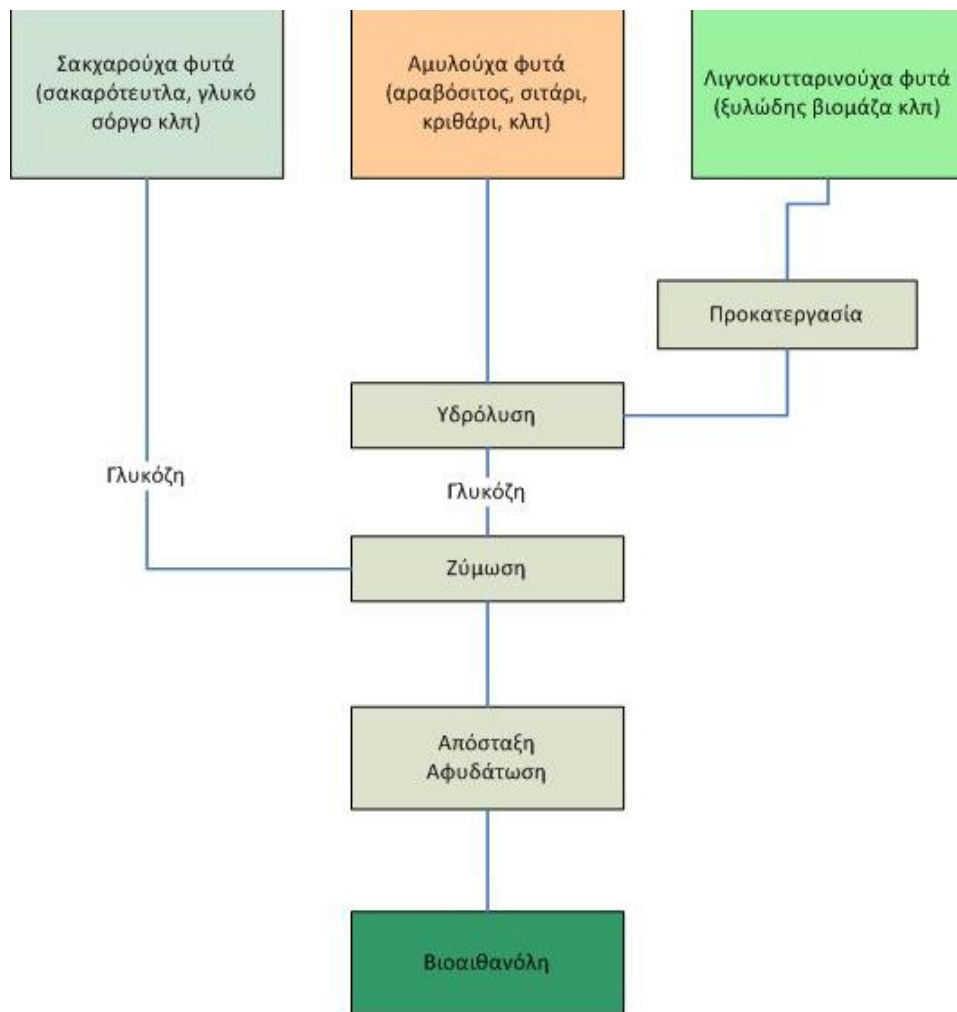
Οι φυσικές μέθοδοι περιλαμβάνουν μείωση μεγέθους των σωματιδίων με κοπή, λείανση ή άλεσμα, (δημιουργείται έτσι μεγαλύτερη επιφάνεια, άρα η αντίδραση πραγματοποιείται γρηγορότερα). Οι φυσικοχημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν έκρηξη ατμού (η βιομάζα εκτίθεται για λίγα λεπτά σε ατμό υψηλής πίεσης, θερμοκρασίας 210-290°C και στη συνέχεια υφίσταται εκτονωτική αποσυμπίεση), κατεργασία με ζεστό νερό (περιλαμβάνει υπέρθερμο νερό(180-230 °C), το οποίο διατηρείται σε υγρή φάση μέσω υψηλής πίεσης και έρχεται σε επαφή με τη βιομάζα), οζονόλυση, υγρή προκατεργασία οξείδωσης ( προκατεργασία με νερό και αέρα ή και καθαρό οξυγόνο σε θερμοκρασίες άνω των 120 °C και συχνά με την προσθήκη αλκαλικού καταλύτη. Η διαδικασία αυτή ενδείκνυται για υλικά με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη) κ.α. . Οι χημικές μέθοδοι, περιλαμβάνουν προκατεργασία με αραιό οξύ σε ήπιες συνθήκες (συγκέντρωση οξέος 0,5-1,2% w/w και θερμοκρασίες 170-190 °C), , αλκαλική προκατεργασία και έκρηξη αμμωνίας (για περίπου 10-60 λεπτά σε θερμοκρασίες κάτω από 100 °C και υψηλές πιέσεις). Η βιολογική προκατεργασία περιλαμβάνει την επαφή της βιομάζας με διάφορους αποικοδομητικούς οργανισμούς, οι οποίοι αποικοδομούν τη λιγνίνη και τις κυτταρίνες. Τέλος, η ηλεκτρική προκατεργασία περιλαμβάνει την εφαρμογή

παλμικού ηλεκτρικού πεδίου, διασπώντας έτσι τα κύτταρα. Η επιλογή της κατάλληλης προκατεργασίας εξαρτάται τόσο από την φύση και την προέλευση της βιομάζας, όσο και από τη διαδικασία υδρόλυσης που θα ακολουθήσει.[Mielenz, 2001] [ Hayes, 2009 ] [Verardi et al.]

### **2.1.3 Ενζυμική υδρόλυση**

Μετά το πέρας της προκατεργασίας της βιομάζας, ο πολυσακχαρίτης έχει καταστεί πλέον επιδεκτικός στις διάφορες ενζυμικές δράσεις και η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη, οι οποίες αποτελούν αναστολείς της δράσης των κυτταρινασών έχουν απομακρυνθεί, ενώ ο δείκτης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης έχει μειωθεί και έτσι διευκολύνεται η υδρόλυσή της. Το αδιάλυτο κλάσμα που μένει μετά την προκατεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη και λιγνίνη, καθώς το μεγαλύτερο μέρος του κλάσματος των ημικυτταρινών έχει διαλυτοποιηθεί, Έτσι η πιο σημαντική ενζυμική δράση που είναι αναγκαία για την υδρόλυση της προκατεργασμένης βιομάζας είναι εκείνη των κυτταρινασών. Βέβαια, και η παρουσία των ημικυτταρινασών είναι απαραίτητη, καθώς το ημικυτταρινούχο κλάσμα μπορεί να μετατραπεί σε σάκχαρα, τα οποία στη συνέχεια ζυμώνονται προς βιοαιθανόλη. Γενικά, η χρήση ενζύμων για την υδρόλυση της βιομάζας έχει περισσότερα πλεονεκτήματα από την όξινη υδρόλυση ,καθώς τα ένζυμα είναι πιο εξειδικευμένα και λειτουργούν σε πιο ήπιες συνθήκες. Η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης, συνήθως, καταλύεται από ένζυμα της κατηγορίας των κυτταρινασών (cellulases), τα οποία μπορούν να παραχθούν από βακτήρια και μύκητες.

Η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης αποτελείται από τρία στάδια: προσρόφηση των κυτταρινασών στην επιφάνεια της κυτταρίνης, βιοαποικοδόμηση της κυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα και εκρόφηση της κυτταρίνης. Στη συνέχεια, το διάλυμα των σακχάρων που έχουν παραχθεί, υφίσταται ζύμωση, απόσταξη ή ξήρανση ανάλογα με το επιθυμητό τελικό προϊόν. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό της αντίδρασης της υδρόλυσης και σχετίζονται με το υπόστρωμα είναι η κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, η διαθέσιμη επιφανειακή περιοχή και η ύπαρξη λιγνίνης και ημικυτταρίνης.



**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση των διεργασιών αποικοδόμησης της βιομάζας και μετατροπής της σε αιθανόλη

Εκτός από τη βιομετατροπή σε βιοαιθανόλη και άλλα ενεργειακά προϊόντα, η αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας από τα κυτταρινολυτικά ένζυμα αποδίδει διάφορα σάκχαρα, τα οποία μπορούν να ζυμωθούν προς προϊόντα μεγάλης χρησιμότητας. Για παράδειγμα, η ξυλάνη/ ξυλόζη μπορεί να μετατραπεί σε φουράνια και κετόνες, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιούνται ως δομικές μονάδες για διάφορα καινοτόμα πολυμερή υλικά. Ένα άλλο προϊόν που παρασκευάζεται από την ξυλόζη είναι η ξυλιτόλη, η οποία αποτελεί σημαντικό υλικό για βιομηχανίες τροφίμων. Ακόμα, από την χημική αποικοδόμηση της γλυκόζης μπορούν να παραχθούν αρκετά προϊόντα, όπως η σορβιτόλη, ενώ η λιγνίνη που απομακρύνεται χρησιμοποιείται ως ενδιάμεσο προϊόν για τη σύνθεση φαινόλης, βενζενίου, τολουενίου, ξυλενίου και άλλων αρωματικών. [Verardi et al.]

### 2.1.3.1 Κυτταρινάσες

Οι κυτταρινάσες είναι πολύ χρήσιμα ένζυμα για πολλούς κλάδους βιομηχανίας, όπως οι χαρτοβιομηχανίες, οι βιομηχανίες τροφίμων και υφασμάτων, οι βιομηχανίες απορρυπαντικών, κ.α. [Kuhad et al, 2001] Η χρήση κυτταρινασών για την υδρόλυση της βιομάζας αποτελεί προσπάθεια των τελευταίων 50 ετών. Η

έρευνα πάνω στην υδρόλυση της κυτταρίνης με τη χρήση κυτταρινασών ξεκίνησε στο δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, με την παραγωγή και εφαρμογή των κυτταρινασών του μύκητα *Trichoderma reesei*, ενώ το 1979 με τη γενετική βελτίωση του μικροοργανισμού αυτού επιτεύχθηκε 20 φορές μεγαλύτερη παραγωγικότητα. Από τότε πολλοί μικροοργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή και απομόνωση κυτταρινασών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να είναι αερόβιοι ή αναερόβιοι, μεσόφιλοι ή θερμόφιλοι. Βακτήρια με ικανότητα παραγωγής κυτταρινασών είναι τα *Acidothermus cellulolyticus* [Dai et al., 2000], *Anaerocellum thermophilum* [Zverlov et al., 1998], *Clostridium stercorarium*, *Thermotoga marittima* [Bronnenmeier et al., 1991], *Clostridium thermocellum* [Bergquist et al., 2004] και άλλοι. Εκτός από τον κυτταρινολυτικό μύκητα *Trichoderma reesei*, άλλοι μύκητες που παράγουν κυτταρινάσες είναι οι *Fusarium oxysporum* [Singh & Kumar, 1991], *Aspergillus niger* [Sharma et al., 2001] και *Aspergillus fumigatus* [Trivedi & Rao, 1980]. Θερμόφιλοι μύκητες, όπως ο *Myceliophthora thermophila* [Kaur et al., 2004] επίσης παράγουν κυτταρινολυτικά ένζυμα και αποδεικνύονται εξαιρετικές πηγές θερμοσταθερών ενζύμων που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία.

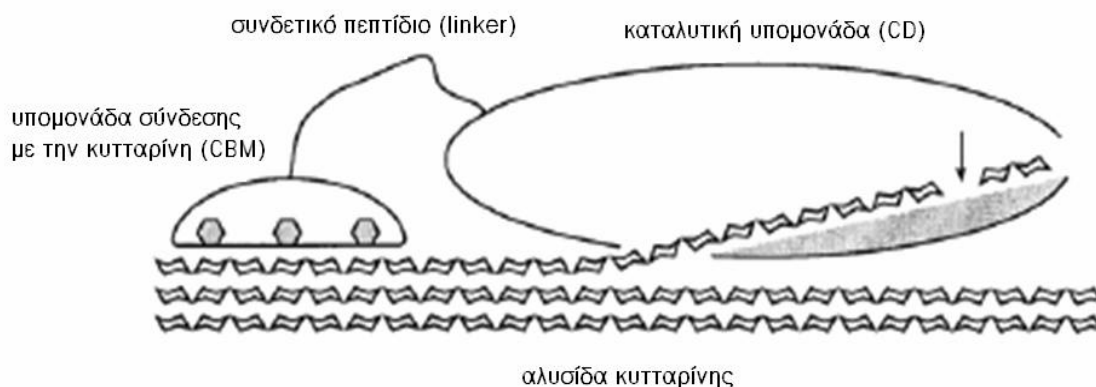
Οι κυτταρινάσες είναι ένα πολύπλοκο σύνολο ενζύμων, που αποτελείται από τουλάχιστον τρεις ομάδες ενζύμων: 1) την β-1,4-ενδογλουκανάση (EG, E.C. 3.2.1.4) , η οποία δρα σε περιοχές της κυτταρίνης με χαμηλή κρυσταλλικότητα, υδρολύοντας τους β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς και δημιουργώντας ελεύθερα άκρα στην αλυσίδα , 2) την β- 1,4-εξωγλουκανάση ή κελλοβιοϋδρολάση (CBH, E.C. 3.2.1.91), η οποία διασπά περαιτέρω το μόριο της κυτταρίνης, απελευθερώνοντας ως τελικό προϊόν μονάδες β- κελλοβιόζης από τα ελεύθερα μη αναγωγικά άκρα της αλυσίδας της κυτταρίνης και 3) την β-γλυκοσιδάση (CB, E.C. 3.2.1.21), η οποία υδρολύει τους διασκαχαρίτες της β-κελλοβιόζης παράγοντας γλυκόζη. [ Kuhad et al, 2011] Οι τρεις αυτές ενζυμικές ομάδες δρουν συνεργιστικά για την αποτελεσματική υδρόλυση της κυτταρίνης.

### **2.1.3.2 Δομή και δράση των κυτταρινασών**

Γενικά, η δομή των κυτταρινασών αποτελείται από δύο διακριτές περιοχές: την καταλυτική περιοχή (Catalytic Domain) η οποία είναι υπεύθυνη για την αντίδραση της υδρόλυσης και την περιοχή σύνδεσης της κυτταρίνης (Cellulose-binding Domain), η οποία δεν έχει καταλυτική δράση, αλλά ευθύνεται για την προσρόφηση του ενζύμου επάνω στην μακρομοριακή κυτταρίνη. Η περιοχή σύνδεσης της κυτταρίνης αυξάνει τη συγκέντρωση του ενζύμου στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος , βοηθάει στην απομάκρυνση της γλουκάνης από την επιφάνεια της κυτταρίνης αλλά και προωθεί τη μη παραγωγική πρόσδεση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ενζύμου. Ο μηχανισμός της προσρόφησης του ενζύμου στην κυτταρίνη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην γνώση της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης. Η πρόσδεση των ενζύμων στην επιφάνεια της κυτταρίνης είναι είτε εξειδικευμένη είτε όχι, ενώ οι αλληλεπιδράσεις είναι συνήθως ετεροπολικές. Ο πιο

σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την προσρόφηση είναι ο υδρόφιλος χαρακτήρας της ελεύθερης επιφάνειας. [Palonen *et al*, 2004]

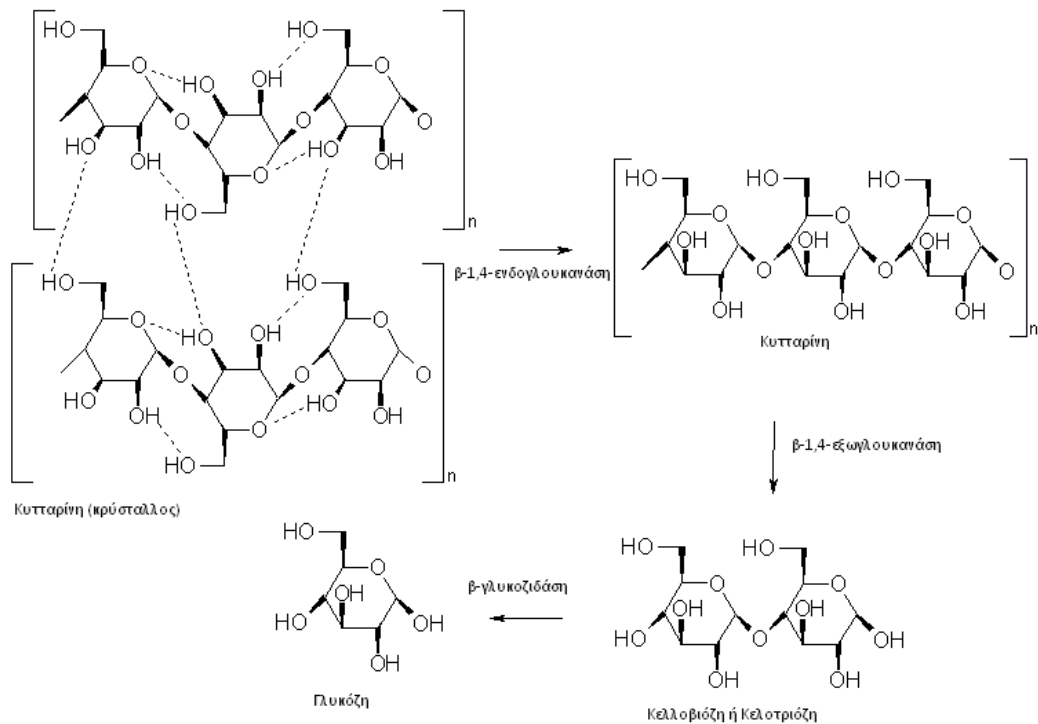
Στα φυσικά ένζυμα, οι δύο περιοχές συνδέονται με μία πεπτιδική αλυσίδα (linker) που αποτελείται συνήθως από 50-60 αμινοξέα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρούνται και άλλα δομικά στοιχεία, όπως μια δεύτερη καταλυτική περιοχή, μια περιοχή επαναλαμβανόμενων υδρόβιων αμινοξέων και άλλες περιοχές. Πρέπει να σημειωθεί, ότι δεν έχουν όλες οι κυτταρινάσες την ίδια δομή, και έχουν παρατηρηθεί μεγάλες διαφορές, με βάση τις οποίες κατηγοριοποιούνται σε διάφορες οικογένειες. [Herinssat, 1994].



**Εικόνα 10:** Απεικόνιση της τυπικής δομής μιας κυτταρινάσης. Διακρίνεται η καταλυτική περιοχή και η περιοχή σύνδεσης με την κυτταρίνη CBD, οι οποίες ενώνονται με ένα πεπτίδιο

Όπως προαναφέρθηκε, ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των κυτταρινασών είναι η συνεργιστική δράση που παρουσιάζουν, έτσι η ενεργότητα ενός μίγματος κυτταρινασών είναι αρκετά μεγαλύτερη από την ενεργότητα της κάθε κυτταρινάσης ξεχωριστά. Αρχικά, η β-1,4-ενδογλουκανάση προσβάλλει τις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης, δημιουργώντας νέα ελεύθερα άκρα όπου δρα η β-1,4-εξωγλουκανάση, απελευθερώνοντας μόρια κελλοβιόζης. Στη συνέχεια, η κελλοβιόζη υδρολύεται σε γλυκόζη με τη δράση της β-γλυκοζιδάσης. Η β-γλυκοζιδάση είναι πολύ σημαντική, καθώς η κελλοβιόζη αποτελεί ισχυρό παρεμποδιστή της β-1,4-εξωγλουκανάσης.





**Εικόνα 11:** Σχηματική αναπαράσταση της συνεργιστικής δράσης των κυτταρινασών. Οι τρεις αντιδράσεις που καταλύονται από τις κυτταρινάσες είναι: 1) προσβολή των άμορφων περιοχών της κυτταρίνης από την β-1,4-ενδογλυκανάση, 2) Υδρόλυση των μορίων της κυτταρίνης προς κελλοβιόζη ή κελοτριόζη από την β-1,4-εξωγλυκανάση, 3) Υδρόλυση της κελλοβιόζης προς γλυκόζη από την β-γλυκοζιδάση.

Για τον ακριβή μηχανισμό της συνεργιστικής δράσης των κυτταρινασών έχουν κατά καιρούς προταθεί διάφορα μοντέλα, λαμβάνοντας υπόψη ότι ο βαθμός οργάνωσης της κυτταρίνης κυμαίνεται από περιοχές υψηλής οργάνωσης (κρυσταλλικές περιοχές) σε περιοχές όπου κυριαρχεί η αταξία (άμορφες περιοχές). Η πρώτη υπόθεση, ο μηχανισμός C1/Cx, έγινε το 1950 από τον Reese, ενώ ακολούθησε το 1972 η ευρέως αποδεκτή θεωρία των Wood και McCrae για τη συνεργασία ενδογλυκανάσης και εξωγλυκανάσης. Από τότε έχουν γίνει αρκετές άλλες μελέτες και έχουν προταθεί και διάφοροι άλλοι μηχανισμοί. Παρά όμως την τεράστια πρόοδο που έχει γίνει τα τελευταία χρόνια στην μοριακή βιολογία και τη δομική βιολογία των κυτταρινασών, η μοριακή βάση της συνεργιστικής δράσης των κυτταρινασών δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί πλήρως. [Henrissat,1994]

Τελικά, η πολυπλοκότητα της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης καθιστά δύσκολη την πλήρη περιγραφή του μηχανισμού υδρόλυσης αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό του ρυθμού υδρόλυσης. Η πολυπλοκότητα αυτή οφείλεται αφενός στο γεγονός ότι η κυτταρίνη είναι ένα αδιάλυτο και πολύ καλά δομημένο υπόστρωμα και αφετέρου στο γεγονός ότι η υδρόλυση διεξάγεται από τη συνεργιστική δράση των κυτταρινασών.

### 2.1.3.3 Β-γλυκοζιδάσες

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για την επιτυχή ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, απαιτείται η συνεργιστική δράση τριών ειδών κυτταρινασών: της β-1,4-ενδογλουκανάσης, της β-1,4-εξωγλουκανάσης και της β-γλυκοζιδάσης. Σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διεργασία παίζουν οι β-γλυκοζιδάσες (EC 3.2.1.21), οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση της κελλοβιόζης προς D-γλυκόζη. Η μελέτη των ενζύμων αυτών, είναι πολύ σημαντική, καθώς η κελλοβιόζη εκτός από κύριο προϊόν της υδρόλυσης της κυτταρίνης, αποτελεί και πιθανό αναστολέα της δράσης της β-1,4-ενδογλουκανάσης και της β-1,4-εξωγλουκανάσης και έτσι, αν της επιτραπεί να δράσει μπορεί να προκαλέσει σημαντική μείωση στο ρυθμό της αντίδρασης και συνολικά στα επίπεδα υδρόλυσης της κυτταρίνης. Έτσι μετά τη δράση της β-γλυκοζιδάσης οι υπόλοιπες κυτταρινάσες που συμμετέχουν μπορούν να δράσουν περισσότερο αποδοτικά. Φαίνεται λοιπόν, ότι οι β-γλυκοζιδάσες αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα καθορισμού του ρυθμού της αντίδρασης, ρυθμίζοντας τελικά όλη την διεργασία. Τα τελευταία χρόνια, οι β-γλυκοζιδάσες έχουν γίνει αντικείμενο πολλών ερευνών, λόγω των πολλών εφαρμογών που έχουν σε πολλές διαφορετικές βιομηχανικές διεργασίες, όπως οι βιομηχανίες τροφίμων, υφασμάτων, απορρυπαντικών, φαρμακευτικών και οι διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης. [Yang *et al*,2013]

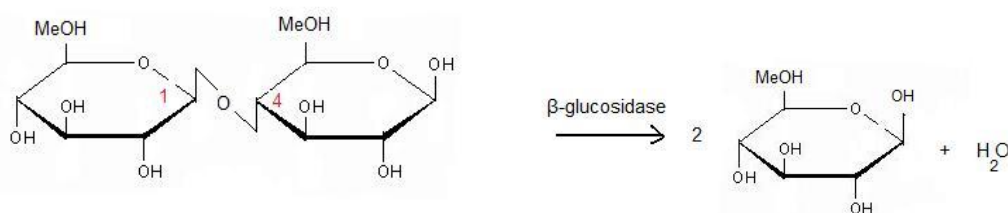
Οι β-γλυκοζιδάσες ανήκουν στις οικογένειες υδρολασών GH 1, 3, 5, 9, 30 και 116, κυρίως όμως, έχουν μελετηθεί οι οικογένειες GH1 και GH3. Η κατηγοριοποίηση γίνεται με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων που τις αποτελούν. Λόγω του αυξημένου ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν, τα τελευταία χρόνια ανακαλύπτονται και μελετώνται συνεχώς β-γλυκοζιδάσες διαφορετικών οικογενειών, μια αρκετά ενημερωμένη λίστα των οποίων,βρίσκεται στην ιστοσελίδα CAZy (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). Οι β-γλυκοζιδάσες της οικογένειας 1, προέρχονται κυρίως από αρχαιοβακτήρια, φυτά και θηλαστικά, ενώ εκείνες της οικογένειας 3, προέρχονται από βακτήρια, μύκητες και ζύμες. Μέχρι σήμερα, ένας αριθμός β-γλυκοζιδασών έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορους μύκητες όπως *Trichoderma reesei* (Murray *et al.*, 2004) *Humicola grisea* (Takashima *et al*, 1999) και άλλους, με τις περισσότερες από αυτές να ανήκουν στην οικογένεια GH 3. Αντίθετα, υπάρχει μόνο ένας μικρός αριθμός β-γλυκοζιδασών (που έχουν απομονωθεί από μύκητες) που ανήκουν στην κατηγορία GH1, όπως από τους μύκητες *Humicola grisea* (Takashima, *et al.*, 1999) , *Piromyces sp.* (Harhangi *et al.*, 2002) και *N. fischeri* (Kalyani *et al.*, 2012; Ramachandran *et al.*, 2012). Και οι δύο αυτές οικογένειες υδρολύουν τα αντίστοιχα υποστρώματα με μηχανισμό καθαρής διατήρησης του σχηματισμού του ανομερικού άνθρακα. [Yeoman *et al.* 2010]. Ειδικά τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σε β-γλυκοζιδάσες που προέρχονται από θερμόφιλους μύκητες λόγω των βιοχημικών ιδιοτήτων που κατέχουν και των μεγάλων δυνατοτήτων τους για χρήση σε διεργασίες που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες.[Yang *et al*,2013]

Εκτός από την αλληλουχία των αμινοξέων, οι β-γλυκοζιδάσες ταξινομούνται και με βάση την εξειδίκευση που παρουσιάζουν σε διάφορα υποστρώματα. Έτσι χωρίζονται σε αρυλ-β-γλυκοζιδάσες, κελλοβιάσες και ευρείας-εξειδίκευσης β-γλυκοζιδάσες. Η πρώτη κατηγορία εμφανίζει μεγάλη εξειδίκευση στην υδρόλυση αρυλ-β-γλυκοζιδίων, ενώ οι κελλοβιάσες υδρολύουν μόνο τους κέλλο-ολιγοσακχαρίτες. Οι γλυκοζιδάσες της τρίτης κατηγορίας, επιδεικνύουν υψηλή ενεργότητα και στους δύο παραπάνω τύπους υποστρωμάτων και αποτελούν την πιο συχνά παρατηρούμενη ομάδα στους κυτταριολυτικούς μικροοργανισμούς [Yeoman et al. 2010].

Οι β-γλυκοζιδάσες είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση των β-γλυκοζιτικών δεσμών προς αρυλ-, αμινο- ή αλκυλο-β-D-γλυκοζιδή και ολιγο- ή δισακχαρίτες. Στην διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης οι ενδογλουκανάσες και οι εξωγλουκανάσες μετατρέπουν την κυτταρίνη σε κελλοβιόζη και στη συνέχεια οι β-γλυκοζιδάσες υδρολύουν την κελλοβιόζη προς ελεύθερα μόρια γλυκόζης. [Yeoman et al, 2010]., καταλύοντας την επιλεκτική διάσπαση των β-γλυκοζιτικών δεσμών των μη αναγωγικών άκρων των υποστρωμάτων με τα οποία αντιδρούν, ενώ κάποιες από αυτές έχουν και τη δυνατότητα να σχηματίζουν ολιγοπολυμερή και άλλα πολύπλοκα μόρια, όπως τα αλκυλο-γλυκοζιδή. Αυτός ο συνθετικός ρόλος των β-γλυκοζιδασών είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης τρανσγλυκοζυλίωσης που διεξάγεται παρουσία ενός πυρηνόφιλου ισχυρότερου από το νερό (όπως η μεθανόλη) ή της αντίδρασης αντίστροφης υδρόλυσης στην οποία συμμετέχουν οι β-γλυκοζιδάσες, και αποτελεί πολύ σημαντική λειτουργία των β-γλυκοζιδασών καθώς τα αλκυλογλυκοζιδή και οι ολιγοσακχαρίτες που προκύπτουν, έχουν πολλές εφαρμογές σε βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Ανάμεσα στις δύο αυτές αντιδράσεις, η τρανσγλυκοζυλίωση φαίνεται πιο ελκυστική, καθώς απαιτεί μικρότερες συγκεντρώσεις αντιδρώντων, διεξάγεται σε πιο ήπιες συνθήκες και παρουσιάζει μεγαλύτερες αποδόσεις. [Christakopoulos et al, 1994] Η λειτουργία αυτή των β-γλυκοζιδασών είναι αρκετά σημαντική, καθώς τα αλκυλο-γλυκοζιδή είναι επιφανειοδραστικές ουσίες με υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα και χαμηλή τοξικότητα, τα οποία σχηματίζουν καλώς σχηματισμένα στεροχημικά προϊόντα.

Αποτελούν μια πολύ επιλεκτική ομάδα ενζύμων, λόγω της διαφορετικότητας των βιολογικών λειτουργιών στις οποίες συμμετέχουν και της γενικευμένης εμφάνισής τους σε όλα τα είδη ζωντανών οργανισμών. Σε πολλές περιπτώσεις διαθέτουν εξειδίκευση σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, ανάλογα με τα κατάλοιπα μονοσακχαριτών, τη θέση των δεσμών και το μήκος των αλυσίδων του υποστρώματος. Βασική λειτουργία των β-γλυκοζιδασών αποτελεί η διάσπαση των β-1,4-γλυκοζιτικών δεσμών που συνδέουν δύο κατάλοιπα γλυκόζης ή δύο μόρια υποκατεστημένα με γλυκόζη. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής του ενζύμου, είναι η απελευθέρωση μονάδων γλυκόζης. Όμως, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης, φαίνεται να δρα ανασταλτικά ως προς τη δράση των β-γλυκοζιδασών, αποκλείοντας το υπόστρωμα από το ενεργό κέντρο ή εμποδίζοντας το υδρολυμένο

υπόστρωμα να απομακρυνθεί, κάτι που μπορεί να επηρεάσει ολόκληρη την κυτταρινολυτική διαδικασία. Άλλος ένας παράγοντας που επηρεάζει τη δράση όλων των ενζύμων και κατά συνέπεια και των β-γλυκοζιδασών είναι η θερμοκρασία. Γενικά, η σταθερότητα ενός ενζύμου βασίζεται στη δυνατότητά του να διατηρεί την δομή του παρά την ύπαρξη αποδιατακτικών παραγόντων, όπως είναι η αύξηση της θερμοκρασίας. Η θερμοσταθερότητα των β-γλυκοζιδασών, αποτελεί σημαντική ιδιότητα τους, καθώς η διεργασία της αποδόμησης της λιγνινοκυτταρίνης προς ζυμώσιμα σάκχαρα απαιτεί σχετικά υψηλές θερμοκρασίες. Η θερμοσταθερότητα αυτή, οφείλεται σε ένα πλήθος παραγόντων όπως είναι η αλληλουχία των αμινοξέων, οι υδρόφοβες και αρωματικές αλληλεπιδράσεις, η μείωση της επιφανειακής περιοχής που εκτίθεται στον διαλύτη, οι μεταλλικοί δεσμοί, η σταθερότητα του υποστρώματος και η μείωση του αριθμού και του μεγέθους των επιφανειακών αναδιπλώσεων. [Yeoman *et al*, 2010]. Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σε θερμόφιλες β-γλυκοζιδάσες, καθώς η χρήση τέτοιων ενζύμων σε διεργασίες που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες (όπως είναι και η υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας) οδηγεί στην αποφυγή του κινδύνου απενεργοποίησης του ενζύμου.



**Εικόνα 12:** Μηχανισμός της αντίδρασης υδρόλυσης της κελλοβιόζης, η οποία καταλύεται από τη β-γλυκοζιδάση. Το ένζυμο δρα στον β-1,4-γλυκοζυτικό δεσμό που συνδέει τα δύο μονομερή, με αποτέλεσμα την παραγωγή δύο μορίων D-γλυκόζης και ενός μορίου νερού.

Υπάρχουν δύο πιθανά στερεοχημικά προϊόντα της υδρόλυσης ενός γλυκοζυτικού δεσμού: αντιστροφή ή διατήρηση της ανομερικής διαμόρφωσης. Και οι δύο μηχανισμοί περιλαμβάνουν ένα ενδιάμεσο ιόν (το οποίο προσομοιάζει σε ιόν οξυκαρβενίου) και ένα ζεύγος καρβοξυλικών οξέων. Στην περίπτωση της αντιστροφής, οι δύο αυτοί σχηματισμοί βρίσκονται σε απόσταση περίπου 10 Å και η αντίδραση διεξάγεται μέσω μηχανισμού απλής αντικατάστασης, όπου ένα καρβοξύλιο δρα ως βάση και το άλλο ως οξύ. Στην περίπτωση της διατήρησης της διαμόρφωσης, τα δύο καρβοξύλια απέχουν περίπου 5.5 Å και η αντίδραση διεξάγεται μέσω του μηχανισμού της διπλής αντικατάστασης.

Σε ότι αφορά τις διεργασίες παραγωγής βιοαιθανόλης από κυτταρίνη, έχει αποδειχθεί ότι η ύπαρξη επαρκούς ποσότητας β-γλυκοζιδάσης στο μίγμα των ενζύμων, αυξάνει την απόδοση της υδρόλυσης άνω του 20%, φτάνοντας ακόμα και αύξηση κατά 40% στην συνολική παραγωγή αιθανόλης. [Xin, Yinbo & Peiji 1993]

#### 2.1.3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης είναι η σύσταση του υποστρώματος, η ενεργότητα των κυτταρινασών, η επιφάνεια προσρόφησης, η παρεμπόδιση της δράσης από το προϊόν, και οι συνθήκες της αντίδρασης (θερμοκρασία, pH, ανάδευση). [Sun, Cheng, 2002]

Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση και τον αρχικό ρυθμό της αντίδρασης. Για χαμηλά επίπεδα υποστρώματος, αύξηση της συγκέντρωσης οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης και του ρυθμού της αντίδρασης. Όμως, υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος μπορεί να προκαλέσει μείωση του ρυθμού της αντίδρασης υδρόλυση, ενώ η έκταση της αναστολής εξαρτάται από την αναλογία του υποστρώματος προς το ένζυμο. Η ευαισθησία του κυτταρινικού υποστρώματος στις κυτταρινάσες εξαρτάται από τα δομικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος, δηλαδή από το βαθμό κρυσταλλικότητας και το βαθμό πολυμερισμού της κυτταρίνης, την επιφάνεια επαφής και το περιεχόμενο σε λιγνίνη.

Ακόμα, η ενζυμική υδρόλυση επηρεάζεται από την ποσότητα των κυτταρινασών. Αύξηση της δόσης των κυτταρινασών στην διαδικασία, μέχρι ένα συγκεκριμένο όριο μπορεί να αυξήσει την απόδοση και το ρυθμό της υδρόλυσης, όμως αυξάνει σημαντικά και το κόστος. Όμως η δράση των κυτταρινασών μειώνεται κατά τη διάρκεια της διεργασίας, λόγω πρόσδεσης της κυτταρίνης, κάτι που μπορεί να αποτραπεί με τη χρήση κατάλληλων επιφανειοδραστικών προσθέτων.

Τέλος, η δραστηριότητα των κυτταρινασών αναστέλλεται από την κελλοβιόζη και λιγότερο από τη γλυκόζη. Αρκετές μέθοδοι έχουν προταθεί για την μείωση της αναστολής από το τελικό προϊόν, με κυριότερη μέθοδο την **SSF (simultaneous saccharification and fermentation)**. Σε αυτή τη διεργασία, τα αναγωγικά σάκχαρα που παράγονται από την υδρόλυση της κυτταρίνης, ζυμώνονται απευθείας προς αιθανόλη, γεγονός που μειώνει σημαντικά την αναστολή της υδρόλυσης από το προϊόν. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι ο μύκητας *T. reesei* και η ζύμη *S. cerevisiae*. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την διεργασία SSF είναι περίπου 38°C, θερμοκρασία που βρίσκεται ανάμεσα στη βέλτιστη θερμοκρασία της υδρόλυσης (45-50 °C) και της ζύμωσης (30 °C). Σε σχέση με την υδρόλυση δύο σταδίων **SHF (separate hydrolysis and fermentation)**, η διεργασία αυτή έχει τα εξής πλεονεκτήματα: αύξηση του ρυθμού της υδρόλυσης, χαμηλότερες απαιτήσεις σε ένζυμα, υψηλότερες αποδόσεις σε προϊόντα, λιγότερες απαιτήσεις αποστειρωμένων συνθηκών, μικρότερος χρόνος της διεργασίας και μικρότερος όγκος αντιδραστήρα, καθώς απαιτείται μόνο ένας αντιδραστήρας. Τα μειονεκτήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη για τη διεργασία, είναι: κατά πόσο η αιθανόλη είναι ανθεκτική στα μικρόβια, η πιθανότητα να μην συνδυάζονται οι θερμοκρασίες της υδρόλυσης και της σακχαροποίησης και η αναστολή των ενζύμων από την αιθανόλη. [Sun, Cheng, 2002]

#### 2.1.3.4 Ενζυμική υδρόλυση ημικυτταρινών και λιγνίνης

Ένα μεγάλο ποσοστό από τις διαθέσιμες λιγνινοκυτταρινούχες πηγές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αιθανόλης περιέχουν ένα σημαντικό ποσοστό ημικυτταρίνης. Όταν η ημικυτταρίνη χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αιθανόλης, η απόδοση της διεργασίας μπορεί να αυξηθεί έως και 80%. Η πλήρης ενζυμική υδρόλυση των ημικυτταρινών και συνεπώς των ξυλανών, απαιτεί μεγάλη ποικιλία ενζύμων τα οποία δρουν συνεργιστικά, όπως συμβαίνει και για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης. Τα κυριότερα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι οι ξυλανάσες, αραβινοφουρανοσιδάσες, γλουκουρονοζιδάσες, ακετυλοεστεράσες και εστεράσες του φερουλικού οξέος [Duff & Murray, 1996].

Η αποικοδόμηση της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης γίνεται με τη δράση δύο ενζύμων: των ενδοξυλανασών, οι οποίες διασπούν την αλυσίδα της ξυλάνης σε ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι στη συνέχεια αποικοδομούνται σε ξυλόζη από τις β-ξυλοζιδάσες. Η ενεργότητα των ξυλανασών εξαρτάται από το μήκος της αλυσίδας του υποστρώματος: Όσο μικραίνει το μήκος της αλυσίδας, τόσο μειώνεται και η ενεργότητά τους. Στην αποικοδόμηση της ξυλάνης, είναι απαραίτητη η ύπαρξη και άλλων ενζύμων, όπως η εστεράση της ακέτυλο-ξυλάνης, η α-L-αραβινοφουρανοσιδάση, η α-γλουκουρονιδάση και οι εστεράσες του φερουλικού και π-κουμαρικού οξέος. Γενικά, η συνδυασμένη δράση των διαφόρων ξυλανολυτικών ενζύμων διευκολύνει την πρόσβαση των ενδοξυλανασών στο μόριο της ξυλάνης, μειώνοντας τις στερεοχημικές παρεμποδίσεις των πλευρικών αλυσίδων και των ποικίλης φύσης υποκαταστατών. Οι β-ξυλοζιδάσες διασπούν τους ξυλοολιγοσακχαρίτες οι οποίοι αναστέλλουν τη δράση της ξυλανάσης, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την αποτελεσματική υδρόλυση της ξυλάνης.

Η τυχαία δομή της λιγνίνης και οι ισχυροί δεσμοί μεταξύ των μονομερών της, την καθιστούν εξαιρετικά ανθεκτική στη διαδικασία της μικροβιακής αποικοδόμησης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Υπάρχουν πολλοί μικροοργανισμοί που μπορούν να αποικοδομούν μερικά από τα συστατικά του μορίου της λιγνίνης, όμως μόνον ένας μικρός αριθμός μπορεί να αποδομεί την εσωτερική δομή της. Τα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στην αποδόμηση της λιγνίνης είναι η υπεροξειδάση της λιγνίνης, η υπεροξειδάση του μαγγανίου και η λακκάση.

### 3. Ο ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΣ ΜΥΚΗΤΑΣ *Myceliphthora thermophila* (*Sporotrichum thermophile*/ *Chrysosporium lucknowense c1*)

Ο μικροοργανισμός *Myceliphthora thermophila* είναι ένας νηματοειδής μύκητας που αυξάνεται ταχύτατα όταν καλλιεργείται σε θρεπτικό μέσο με εκχύλισμα βύνης, φτάνοντας σε διάμετρο 9 cm μετά από επώαση 3 ημερών στους 45 °C. Οι ώριμες αποικίες έχουν χρώμα καστανό και υφή θυσανωτή. Στελέχη έχουν απομονωθεί από

χώμα, ξύλο που σαπίζει και κυτταρινούχα υλικά. Συνώνυμα του *Myceliphthora thermophila*, είναι τα *Sporotrichum thermophile*, *Cryosporium thermophilum*, *Thielalvia heterothallica*, *Myceliophthora indica* και *Corynascus heterothallicus*. [Maheswari et al., 2000]

Ο μικροοργανισμός ανάλογα με το υπόστρωμα, αυξάνεται με μέγιστο ρυθμό σε θερμοκρασίες 45 – 50 °C, μπορεί να καλλιεργηθεί σε θερμοκρασίες 25 – 55 °C και μπορεί να αντέξει σε σύντομη έκθεση στους 59 °C [Bhat & Maheshwari, 1987]. Ο ρυθμός ανάπτυξης στους 50 °C υπολογίζεται σε 0,23 h<sup>-1</sup>, ενώ στους 30 °C σε 0,11 h<sup>-1</sup>. Εκτός από το ρυθμό ανάπτυξης, ανάλογα με τη θερμοκρασία διαφοροποιείται και η μορφολογία των αποικιών, καθώς στους 30 °C ο μύκητας αναπτύσσει πρόωρα σπόρια [Maheshwari et al., 2000].

Ο ρυθμός ανάπτυξης του *Myceliphthora thermophila* σε θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης (0,1 h<sup>-1</sup>) είναι παρόμοιος με εκείνον που παρατηρείται όταν ο μύκητας αυξάνεται σε υπόστρωμα κυτταρίνης (0,09 – 0,16 h<sup>-1</sup>), γεγονός που τον χαρακτηρίζει ως ισχυρό κυτταρινολυτικό οργανισμό [Maheshwari et al., 2000]. Οι αποικίες έχουν διαφορετική μορφολογία ανάλογα με το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται. .

Ο *Myceliphthora thermophila* παράγει πολλά θερμοσταθερά ένζυμα τα οποία έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί και χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία σε βιοδιεργασίες που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες. Μεταξύ αυτών αρκετά είναι ένζυμα που υδρολύουν πολυσακχαρίτες. Έτσι, έχει απομονωθεί μια γλυκουρονόυλεστεράση, η οποία καταλύει τη διάσπαση του δεσμού μεταξύ του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και της λιγνίνης [Vafiadi et al., 2009], δύο τύποι εστερασών που καταλύουν τη διάσπαση του εστερικού δεσμού μεταξύ του φερουλικού οξέος και της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης [Torakas et al., 2004], [Torakas et al., 2007], μια αλδοноλακτονάση [Beeson et al, 2010] , μια ενδοξυλανάση της οικογένειας 11 [Katapodis et al., 2003] και αρκετές β-γλυκοσιδάσες [Canevascini & Meyer, 1979; Meyer & Canevascini, 1981; Gaikwad & Maheshwari, 1994]. Οι β-γλυκοσιδάσες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μοριακό βάρος, το pH, την βέλτιστη θερμοκρασία δράσης, τα όρια θερμοανθεκτικότητας και την ενεργότητα σε αντιδράσεις τρανσγλυκοζυλίωσης. Τα ένζυμα αυτά είναι είτε ενδοκυτταρικά είτε προσδεμένα στο κυτταρικό τοίχωμα, από το οποίο απελευθερώνονται σε συνθήκες που προωθούν την αυτόλυση του κυτταρικού τοιχώματος. Ο λειτουργικός ρόλος των β-γλυκοζιδασών δεν είναι απόλυτα γνωστός. Μπορεί να συμμετέχουν στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος ή στην αναδιαμόρφωση κατά τη διάρκεια της επιμύκησης. Επίσης, υπάρχει η πιθανότητα, οι β-γλυκοζιδάσες του κυτταρικού τοιχώματος να συνδυάζονται με κυτταρινάσες ώστε να σχηματίσουν ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που είναι αρκετά αποδοτικό στη διαλυτοποίηση της κυτταρίνης. [ Maheswari et al, 2000]

Ο *Myceliphthora thermophila* βρίσκεται σε αφθονία στο έδαφος και απομονώνεται εύκολα, αυξάνεται σε απλό και σχετικά φθινό υπόστρωμα και είναι ακίνδυνος για τον άνθρωπο. Όπως προαναφέρθηκε, ο μύκητας αυτός μπορεί να

παράξει μεγάλη ποικιλία θερμοσταθερών ενζύμων, άρα αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον σύστημα μελέτης και το γονιδίωμα του χαρακτηρίστηκε πρόσφατα (2009). Γενικά, ο *Myceliphthora thermophila* θεωρείται κατάλληλος για χρήση σε διεργασίες βιομετατροπής της βιομάζας, οι οποίες διεξάγονται σε υψηλές θερμοκρασίες, καθώς διαθέτει υψηλή ικανότητα αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και παραγωγής θερμοσταθερών ενζύμων.

#### **4. Η ΖΥΜΗ *Pichia pastoris***

Για την ετερόλογη έκφραση του γονιδίου που απομονώθηκε από τον μύκητα *Myceliphthora thermophila* χρησιμοποιήθηκε ο μονοκύτταρος μεθυλοτροφικός ζυμομύκητας *Pichia pastoris*. Η ζύμη *Pichia pastoris* μετά την βελτίωσή της στις αρχές του 1970 αποτελεί ένα από τα πιο χρήσιμα συστήματα για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών. Το σύστημα αυτό, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω του ισχυρού και αυστηρά καθορισμένου παράγοντα αλκοολικής οξειδάσης που διαθέτει (AOX1), της ικανότητάς της να εκφράζει ξένες πρωτεΐνες, της ιδιότητάς της να δέχεται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τις ικανότητάς της να αυξάνεται σε συγκεκριμένα θρεπτικά μέσα με υψηλές κυτταρικές συγκεντρώσεις και της αερόβιας ανάπτυξής του. [Potvin et al., 2012] Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στην *P. pastoris* προσομοιάζουν περισσότερο με αυτές που γίνονται στον ανθρώπινο οργανισμό, σε σχέση με τις αντίστοιχες τροποποιήσεις που γίνονται στον *Saccharomyces cerevisiae*. Το γονιδίωμα της *P. pastoris* είναι σχετικά απλό και εύκολο στο χειρισμό, ενώ ετερόλογες πρωτεΐνες μπορούν να εκφράζονται σε αυτό με σηματοδοτικά πεπτίδια έκκρισης στον εξωκυττάριο χώρο, απλοποιώντας την ανάκτηση των τελικών προϊόντων, εφόσον παραλαμβάνονται από το υπερκείμενο της καλλιέργειας.

Η απόδοση των ετερόλογων πρωτεϊνών, επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, τόσο στο γενετικό στάδιο όσο και κατά την καλλιέργεια. Στο γενετικό στάδιο, οι παράγοντες περιλαμβάνουν την πρωτεολυτική διάσπαση και τα μέρη γλυκοζυλίωσης τη εκφρασμένης πρωτεΐνης. Κατά την καλλιέργεια, οι παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση των ετερόλογων πρωτεϊνών, είναι η θερμοκρασία, το pH, το θρεπτικό μέσο και οι συνθήκες αερισμού.

Ο ζυμομύκητας *P. pastoris* έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30°C και αναπτύσσεται σε τιμές pH από 3 έως 7, ενώ απαιτείται επαρκής αερισμός και λόγω του παράγοντα AOX 1 που διαθέτει είναι ικανή να χρησιμοποιεί μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας [Potvin et al., 2012]



# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

## 1. ΥΛΙΚΑ

### 1.1 Όργανα και συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, αναφέρονται παρακάτω:

- Για τον προσδιορισμό του pH των ρυθμιστικών και άλλων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε pH-μετρο μοντέλο 537 της εταιρείας WTW (Γερμανία).
- Για την αποστείρωση αντιδραστηρίων και διαφόρων γυαλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε αυτόκαυστο Labo Autoclave του οίκου SANYO.
- Θερμαινόμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία).
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες.
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα).
- Για τη συλλογή των πρωτεϊνών μετά τη διαδικασία της Χρωματογραφίας Συγγενείας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου χρησιμοποιήθηκε συλλέκτης κλασμάτων Waters, Millipore, Η.Π.Α..
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία).
- Για την υπερδιήθηση των υπερκειμένων των καλλιέργειών χρησιμοποιήθηκε συσκευή υπερδιήθησης διαλυμάτων Stirred Cell Model 8400, 400 α και μεμβράνες PM-10 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.).
- Για τη διεξαγωγή πειραμάτων που απαιτούσαν τη χρήση υπερκάθαρου νερού χρησιμοποιήθηκε σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q (Millipore, Η.Π.Α.).
- Κατά τη διαδικασία της Χρωματογραφίας Συγγενείας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου χρησιμοποιήθηκε σύστημα χρωματογραφίας διαχωρισμού πρωτεϊνών (ECONO gradient pump, BIORAD, Η.Π.Α.) και ανιχνευτής UV ακτινοβολίας (280 nm) για την ανίχνευση των εκλουόμενων πρωτεϊνών.
- Για τις φυγοκεντρήσεις υπερκειμένων καλλιέργειας και άλλες φυγοκεντρήσεις που χρειάστηκαν κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν φυγόκεντροι Model J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), ALC 4239R (Μεγάλη Βρετανία) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία).
- Φωτόμετρο SPECTRAMax 250 (Molecular Devices, Η.Π.Α.).
- Φωτόμετρο του οίκου Hitachi UV 2000.
- πολυφωτόμετρο Microplate Spectrophotometer System

- σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής ακρίβειας (HPLC), Shimadzu LC-20AD, το οποίο περιέχει ανιχνευτή με βάση το δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A) και στήλη Macherey-Nagel CC 250 x 4.6 mm Nucleosil 100-5 NH2

## **1.2 Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά – Στήλες Χρωματογραφίας – Εμπορικά ένζυμα – Τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα (kits)**

Τα χημικά αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και AppliChem (Γερμανία). Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά υλικά ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SCHOTT AG (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.) και ROTH (Η.Π.Α.).

Τα υλικά χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν είναι της εταιρίας BIORAD (Η.Π.Α.). Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography) έγινε με στήλες υλικού Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.).

Τα ένζυμα και τα τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα (kits) αγοράστηκαν 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.).

## **1.3. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers) και λοιπά διαλύματα**

Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάστηκαν με απιονισμένο νερό. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα μοριακής βιολογίας και χρωματογραφίας παρασκευάστηκαν με υπερκάθαρο νερό MilliQ ( $R=18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ ).

Τα ρυθμιστικά και λοιπά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- **Διαλύματα ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE**

**Ρυθμιστικό Διάλυμα 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

**Ρυθμιστικό Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer):**

3,03 g/L Tris-base, 14.4 g/L γλυκίνη, 1 g/L SDS, με pH διαλύματος: 8,3 (self pH)

**Χρωματισμός πηκτώματος (Staining Solution):**

0,4% w/v Coomassie G-250, 40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 50% ddH<sub>2</sub>O

Αποχρωματισμός πηκτώματος (Destaining Solution):

20% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 70% ddH<sub>2</sub>O

- **Διαλύματα καλλιέργειών της ζύμης *P. pastoris***

Ρυθμιστικό Διάλυμα φωσφορικών: 132 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M, 868 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M, pH =6,0

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

- **Διαλύματα χρωματογραφίας IMAC**

Ρυθμιστικό Διάλυμα Talon: 0,3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, με pH =8,0

## **2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ, ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

### **2.1. Στελέχη μικροοργανισμών**

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*, στέλεχος X33 (γονότυπος: άγριος τύπος, φαινότυπος: Mut<sup>+</sup>) , από την εταιρεία Invitrogen για την ετερόλογη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

### **2.2. Θρεπτικά μέσα για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών**

Για την παρασκευή των θρεπτικών μέσων, χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Τα θρεπτικά μέσα αποστειρώθηκαν στο αυτόκαστο που αναφέρεται παραπάνω στους 121°C, για 15 λεπτά, υπό πίεση 0,1 mPa. Τα θερμοευαίσθητα υλικά, όπως τα αντιβιοτικά και οι βιταμίνες αποστειρώθηκαν με διήθηση από φίλτρα σύριγγος με πόρους διαμέτρου 0,2 μm, και προστέθηκαν στα θρεπτικά μέσα στους 50 – 60 °C περίπου.

- **Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη της ζύμης *P. pastoris***

Σύσταση YPD (Yeast extract Peptone Dextrose medium) ± ζεοσίνη: 1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v πεπτόνη, 2% w/v δεξτρόζη ± 25 μg/mL ζεοσίνη

Σύσταση YPD-άγαρ ± ζεοσίνη: YPD με 2% w/v άγαρ ± 25 μg/mL ζεοσίνη

Σύσταση YPDS (Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol medium) ± ζεοσίνη: 1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v πεπτόνη, 2% w/v δεξτρόζη, 1 M σορβιτόλη ± 25 μg/mL ζεοσίνη

Σύσταση YPDS-άγαρ ± ζεοσίνη: YPDS με 1,5 % w/v άγαρ ± 25 μg/mL ζεοσίνη

Σύσταση BMGY (Buffered Glycerol complex medium): 1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v πεπτόνη, 100 mM ΡΔ φωσφορικών, pH 6,0, 1,34% w/v YNB , 4x10<sup>-5</sup>% w/v βιοτίνη, 1% (v/v) γλυκερόλη

Σύσταση BMMY (Buffered Methanol complex medium): 1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v πεπτόνη, 4x10<sup>-5</sup> w/v βιοτίνη, 0,5 % (v/v) μεθανόλη

MD (Minimal Dextrose medium)-άγαρ: 1,34 % (w/v) yeast nitrogen base (YNB), 2% (w/v) δεξτρόζη, 4x10<sup>-5</sup> % (w/v) βιοτίνη και 1,5% (w/v) άγαρ

MM (Minimal Methanol medium)-άγαρ: 1,34 % (w/v) YNB, 4x10<sup>-5</sup> % (w/v) βιοτίνη, 0,5% (v/v) μεθανόλη και 1,5% (w/v) άγαρ

### 2.3. Καλλιέργειες κυττάρων

#### ➤ καλλιέργειες κυττάρων του ζυμομύκητα *P. pastoris*

Η ανάπτυξη του άγριου τύπου (στέλεχος X33) έγινε υπό συνεχή ανάδευση (σε 200 rpm), στους 28 – 30 °C, για τις υγρές καλλιέργειες, σε θρεπτικό υπόστρωμα YPD, σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer ή, για τις στερεές καλλιέργειες σε υπόστρωμα YPD-άγαρ σε τρυβλία. Μετά τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης, τα ανασυνδυασμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό YPDS που περιέχει σορβιτόλη, με σκοπό να αυξηθεί το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων.

Οι μικρές κλίμακας καλλιέργειες των ανασυνδυασμένων στελεχών πραγματοποιήθηκαν στα θρεπτικά μέσα BMGY και BMMY. Σε αυτό το στάδιο, χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες τύπου *baffled* (με εσωτερικά πτερύγια), για να επιτευχθεί αύξηση του αερισμού και συνεπώς μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας. Οι στερεές καλλιέργειες στα τρυβλία, έπειτα από 48ωρη επώαση στους 30 °C, διατηρήθηκαν για λίγες εβδομάδες σε θάλαμο χαμηλής θερμοκρασίας (4°C).

Ακόμα, για τη φύλαξη μετασχηματισμένων 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 – 5,0 × 10<sup>9</sup> κύτταρα/mL).

### 2.4. Πλασμιδιακοί Φορείς Κλωνοποίησης και Έκφρασης

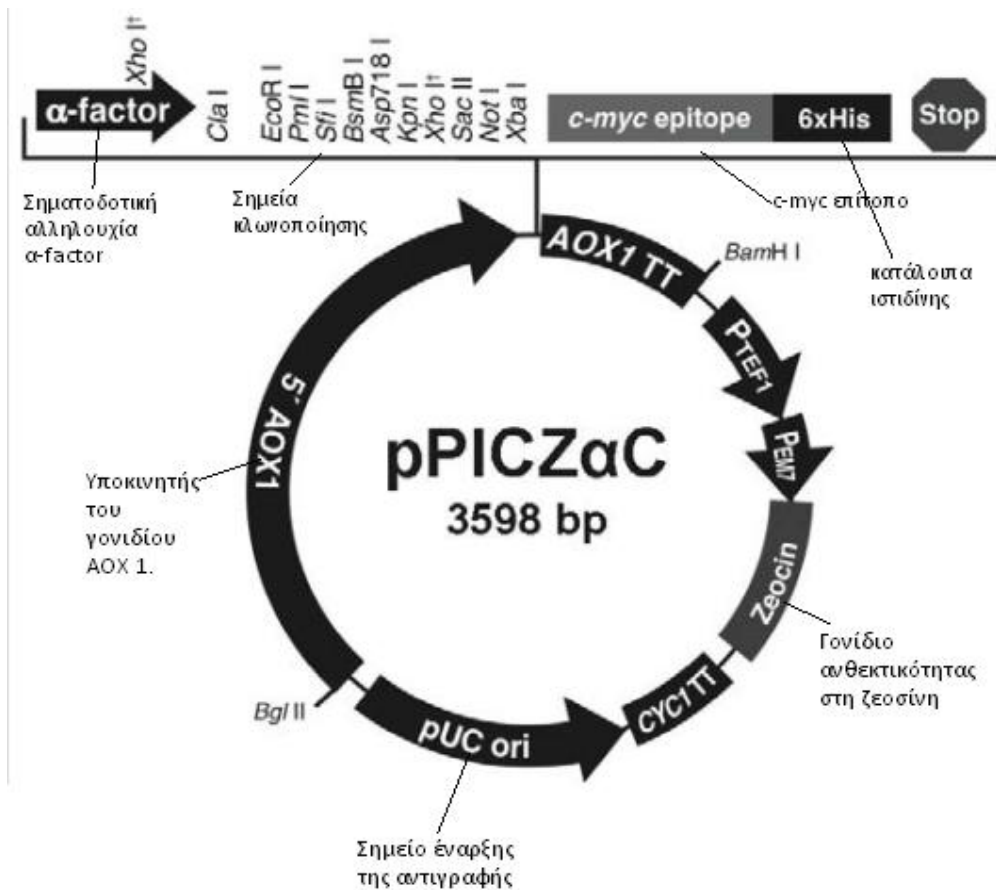
Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν οι ιδιότητες ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που παράχθηκαν από μετασχηματισμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *P.pastoris*. Οι διαδικασίες, που προηγούνται του μετασχηματισμού των κυττάρων του ζυμομύκητα, δεν διεξήχθησαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αλλά χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα αυτών των διαδικασιών που είχαν διεξαχθεί προηγουμένως στο εργαστήριο. Για το λόγο αυτό οι μέθοδοι αυτές, θα αναφερθούν συνοπτικά παρακάτω.

Αρχικά, έγινε καλλιέργεια του θερμόφιλου μύκητα *Sporotrichum thermophile* (*Myceliophthora thermophila*), από το γονιδίωμα του οποίου απομονώθηκε το τμήμα που περιέχει τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν την έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, μετά τη διεξαγωγή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), για τον έλεγχο του τμήματος που απομονώθηκε

χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης και τα τμήματα που προέκυψαν συνενώθηκαν (ligation) με χρήση πλασμιδιακού φορέα pCR® Blunt (Invitrogen). Ακολούθως, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για να μετασχηματίσουν βακτηριακά κύτταρα *E.coli* TOP10, ενώ στη συνέχεια δημιουργήθηκαν ανασυνδυασμένα πλασμίδια pPICZαC που έφεραν την επιθυμητή αλληλουχία και τελικά έγινε μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων του ζυμομύκητα *P. pastoris*. Η παρούσα εργασία, ξεκινά από το σημείο του μετασχηματισμού των κυττάρων του ζυμομύκητα *P.pastoris*.

#### **2.4.1. Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pPICZαC (Invitrogen)**

Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pPICZαC (Invitrogen) χρησιμοποιήθηκε για το **μετασχηματισμό κυττάρων του μεθυλότροφου ζυμομύκητα *p.pastoris***. Η χρήση του φορέα κλωνοποίησης pPICZαC επιτρέπει τόσο την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από το μύκητα *P. pastoris*, αλλά και την έκκριση πρωτεϊνών στον εξωκυτταρικό χώρο. Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει μια σηματοδοτική αλληλουχία α-factor, που επιτρέπει την έκκριση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στον εξωκυττάριο χώρο, μια περιοχή με πολλαπλά σημεία κλωνοποίησης από ενδονουκλεάσες που βοηθά στην εισαγωγή του γονιδίου στον εκφραστή και μία αλληλουχία c-myc επιτόπου (c-myc epitope) για την ανίχνευση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με το αντίστοιχο αντίσωμα. Επίσης, περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη, έξι αμινοξικά κατάλοιπα ιστοιδίνης (His), τα οποία επιτρέπουν την ανίχνευση των πρωτεϊνών και τον καθαρισμό τους με τη χρήση στηλών ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας, αλλά και τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (AOX1). Η αλκοολική οξειδάση συμμετέχει στον καταβολισμό της μεθανόλης, παράγοντας φορμαλδεΰδη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Έτσι, μόνο τα κύτταρα που περιέχουν το ανασυνδυασμένο γονίδιο μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν μέσα σε θρεπτικό υλικό που περιέχει μεθανόλη και με αυτό τον τρόπο γίνεται διαχωρισμός των ανασυνδυασμένων κυττάρων από τα μη ανασυνδυασμένα.



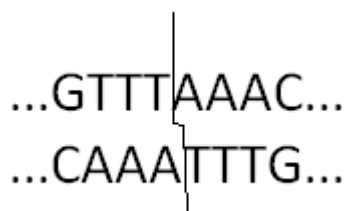
**Εικόνα 13:** Απεικόνιση του πλασμιδίου pPICZαC της Invitrogen, Διακρίνονται οι περιοχές του υποκινητή του γονιδίου AOX1, του σημείου έναρξης της αντιγραφής( pUC ori), του γονιδίου ανθεκτικότητας στη ζεοσίνη, η περιοχή της σηματοδοτικής αλληλουχίας (α-factor) για την έκκριση της ετερόλογης πρωτεΐνης, η περιοχή με τα πολλαπλά σημεία κλωνοποίησης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η αλληλουχία του c-myc επιτόπου (c-myc epitope) για την ανίχνευση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με το αντίστοιχο αντίσωμα, και η αλληλουχία κωδικοποίησης έξι συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης (6xHis) για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης με τη χρήση σηλών ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.

## 2.5 Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα, τα οποία παράγονται σε βακτηριακά κύτταρα, αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων μέσα στην δίκλωνη ή μονόκλωνη αλυσίδα του DNA και διασπούν την αλυσίδα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Τα ένζυμα αυτά, ουσιαστικά προστατεύουν το κύτταρο από την εισβολή ετερόλογου DNA, ενώ το γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή είναι προστατευμένο από αυτά, καθώς είτε δεν διαθέτει τη συγκεκριμένη αλληλουχία είτε οι θέσεις αυτές είναι μεθυλιωμένες. [Roberts, 1976] Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή ανασυνδυασμένου DNA.

Στην παρούσα εργασία, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της εταιρείας TAKARA (Japan), από όπου έγινε η προμήθεια των ενζύμων. Η περιοριστική ενδονουκλεάση που χρησιμοποιήθηκε είναι η PmeI, η οποία προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Pseudomonas mendocina* και η

αλληλουχία πέψης της (η αλληλουχία την οποία εντοπίζει στο γονιδίωμα και το «κόβει» σε εκείνο το σημείο είναι η εξής:



**Εικόνα 14:** Αλληλουχία πέψης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης PmeI

Οι αντιδράσεις έγιναν με τις αναλογίες που φαίνονται στο παρακάτω πίνακα:

<b>Συστατικό</b>	<b>Ποσότητα</b>
Δείγμα απομονωμένου DNA / πλασμιδιακό DNA φορέα	40 $\mu\text{L}$
Ρυθμιστικό διάλυμα NEB4 (10x)	10 $\mu\text{L}$
BSA (10x)	10 $\mu\text{L}$
Περιοριστικό ένζυμο PmeI	2 $\mu\text{L}$
Υπερκαθαρό νερό	38 $\mu\text{L}$
Τελικός όγκος	100 $\mu\text{L}$

**Πίνακας 2:** Αντιδράσεις πέψης

Η περιοριστική ενδονουκλεάση PmeI χρησιμοποιήθηκε για τη γραμμικοποίηση κυκλικού DNA πριν την εισαγωγή του σε κύτταρα *Pichia pastoris*. Για τη μέγιστη αποτελεσματικότητα της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε μέγιστη ποσότητα πλασμιδιακού DNA (τελικός όγκος 80 $\mu\text{L}$ ). Ο έλεγχος του «κομμένου» τμήματος DNA γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια, η απομόνωση του επιθυμητού τμήματος του DNA, έγινε είτε με απευθείας αποκοπή του τμήματος της αγαρόζης που το περιέχει είτε με τη χρήση Nucleospin Gel Clean up kit της εταιρείας Macherey – Nagel.

## 2.6 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων (transformation)

Για να εισέλθει το νουκλειικό οξύ στα κύτταρα χρειάζεται μια διαδικασία προετοιμασίας των κυττάρων ώστε να γίνουν επιδεκτικά (competent cells). Ο μετασηματισμός αποτελεί τη διαδικασία κατά την οποία τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισάγονται σε κύτταρα, μετά την μετατροπή τους σε διαπερατά μακρομόρια. Μετά το τέλος της διαδικασίας, ο διαχωρισμός των κυττάρων που μετασηματίστηκαν από εκείνα που δεν μετασηματίστηκαν, επιτυγχάνεται μέσω της ικανότητας τους να επιβιώνουν παρουσία αντιβιοτικών. Καθώς το πλασμίδιο προσδίδει στα κύτταρα ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, μόνο τα κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο θα αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει αντιβιοτικό και συγκεκριμένα ζεοσίνη.

### 2.6.1 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης *P. pastoris*

Ο μετασχηματισμός των κυττάρων γίνεται με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation). Η μέθοδος βασίζεται στην χρήση υψηλής τάσης ώστε να καταστεί διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη. Εφαρμόζοντας εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο ξεπερνά την διηλεκτρική σταθερά της μεμβράνης επάγεται παροδική και αναστρέψιμη διαπερατότητα της μεμβράνης. Αυτή η παροδική κατάσταση χρησιμοποιείται για την εισαγωγή στο κύτταρο διαφόρων μορίων (σε αυτή την εργασία μορίων DNA). [Gehl,2003] Κατά την εφαρμογή της υψηλής τάσης, δημιουργούνται στην κυτταρική μεμβράνη πόροι (40-120 nm) διαμέσου των οποίων είναι δυνατή η είσοδος εντός του κυττάρου εξωγενούς πλασμιδιακού DNA [Dower *et al.*, 1988]. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της διαδικασίας είναι: το μέγεθος του κυττάρου, η θερμοκρασία, ο χειρισμός του κυττάρου μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου και τα ηλεκτρόδια και το διάλυμα που χρησιμοποιείται.[Gehl,2003] Η διαδικασία μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση είναι πολύ πιο αποδοτική από άλλες μεθόδους μετασχηματισμού (όπως είναι οι χημικές μέθοδοι), όμως χρειάζεται προσοχή κατά τη διεξαγωγή της καθώς η υπερβολική έκθεση ζωντανών κυττάρων σε ηλεκτρικά πεδία μπορεί να προκαλέσει το θάνατο των κυττάρων.

Κατά τη διαδικασία μετασχηματισμού των κυττάρων της *P. pastoris*, κύτταρα ζύμης που έχουν υποστεί κατάλληλη επεξεργασία, καθίστανται διαπερατά στο πλασμίδιο (το οποίο έχει μετατραπεί σε γραμμικό μόριο), το οποίο και εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Η μη καταστρεπτική για το κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης, μέθοδος, έχει αρκετά μεγάλη αποτελεσματικότητα, καθώς μπορεί να μετασχηματίσει περίπου  $10^3 - 10^4$  κύτταρα/μg γραμμικού DNA.

#### ➤ Προετοιμασία κυττάρων *P. Pastoris*:

Για την προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων γίνεται ανάπτυξη κυττάρων ζύμης σε θρεπτικό υλικό YPD 50 mL σε κωνική φιάλη όγκου 250 mL για 24 ώρες σε επωαστήρα θερμοκρασίας 30 °C. Ακολούθως, 10 mL προκαλλιέργειας εμβολιάζονται σε 250 mL μέσου YPD σε κωνική φιάλη 1000 mL. Ακολουθεί εκ νέου επώαση στους 30 °C υπό ανάδευση, ώσπου η οπτική απορρόφηση στα 600 nm να ισούται με 1,3–1,6. Ακολουθούν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις 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 1 M σορβιτόλης και τέλος του τέταρτου ιζήματος σε 0,5 mL αποστειρωμένου και προψυγμένου διαλύματος 1 M σορβιτόλης. Μετά το τέλος της διαδικασίας και μέχρι τη στιγμή που θα γίνει ο μετασχηματισμός φυλάσσονται σε πάγο.



➤ Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*:

Όπως προαναφέρθηκε, πριν την έναρξη της διαδικασίας ηλεκτροδιάτρησης έγινε γραμμικοποίηση του πλασμιδίου pPICZαC με πέψη από περιοριστική ενδονουκλεάση. Μετά την πέψη, έγινε καθαρισμός του προϊόντος της αντίδρασης με χρήση του Nucleospin Gel Clean up kit της εταιρείας Macherey-Nagel. Στη συνέχεια, 80 μL εναιωρήματος κυττάρων X33 που είχαν προετοιμαστεί όπως περιγράφηκε προηγουμένως, αναμείχθηκαν με 30 μL πλασμιδίου pPICZαC. Ακολούθως, το μείγμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλη κυψελίδα 0,2 cm, η οποία είχε πλυθεί με διάλυμα 70% αιθανόλη και το μείγμα τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία 4 °C για 5 λεπτά. Τελικά, έγινε η διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης στη συσκευή GENE PULSER της εταιρείας BIORAD. Αφού εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο, προστέθηκε 1 mL διαλύματος σορβιτόλης (συγκέντρωσης 1 M), το μείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία 30 °C για 1 – 2 ώρες. Τέλος, έγινε εμβολιασμός μετασηματισμένων κυττάρων σε στερεό θρεπτικό υλικό YPDS με ζεοσίνη και επώαση στους 30 °C για 3 – 4 ημέρες.

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται καλλιέργεια μέρους των αποικιών σε 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 επιστρώνονται με 5 mL διαλύματος άγαρος 1% (w/v), το οποίο περιέχει το ειδικό για την πρωτεΐνη υπόστρωμα, 4-methylumbelliferyl-β-D-glucopyranoside (10μL από 4mg/mL υποστρώματος που περιέχει τη μεθυλ-ουμπελλι-φευλομάδα). Το προϊόν της υδρόλυσης, η μεθυλ-ουμπελλιφευλομάδα, μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (320nm) εμφανίζει φθορισμό. Τα τρυβλία ελέγχονται για το σχηματισμό κηλίδων φθορισμού γύρω από τις υπό εξέταση αποικίες της ζύμης. Σε κάθε τρυβλίο υπάρχει και μια αποικία του φυσικού στελέχους X33.

### **3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

#### **3.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα μετασηματισμένα κύτταρα *P. Pastoris***

Η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών τα γονίδια των οποίων έχουν υποκλωνοποιηθεί στο πλασμιδιακό φορέα pPICZαC, επάγεται κατά την προσθήκη μεθανόλης στην καλλιέργεια. Αυτό γίνεται διότι η μεθανόλη δρα ως ενεργοποιητής του υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (*AOX1*) και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες οδηγούνται προς έκκριση στο υπερκείμενο των κυττάρων, γεγονός που καθιστά εύκολη τη συλλογή τους. Αρχικά, γίνονται καλλιέργειες μικρής κλίμακας, για να γίνει ένας αρχικός έλεγχος της έκφρασης. Στη συνέχεια, επιλέγεται ο κατάλληλος κλώνος για έκφραση του γονιδίου και γίνεται καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας.

### **3.1.1 Έκφραση της πρωτεΐνης σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας (προκαλλιέργειες)**

50 mL θρεπτικού υλικού BMGY σε γυάλινες κωνικές φιάλες των 250 mL, εμβολιάστηκαν με αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων της *P. pastoris* που φέρουν το γονίδιο της πρωτεΐνης που ερευνάται. Ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών στους 30°C, υπό ανάδευση (200 rpm) για περίπου 16-20 ώρες. Ακολούθως, ικανός όγκος της προκαλλιέργειας φυγοκεντρείται ώστε να γίνει απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού που περιείχε γλυκερόλη και επαναδιαλύεται σε 50 mL θρεπτικού υλικού BMMY, ώστε η τελική συγκέντρωση κυττάρων να αντιστοιχεί περίπου σε  $O.D._{600nm} = 1$ . Οι προκαλλιέργειες τοποθετούνται για επώαση σε θερμοκρασία 30 °C, υπό ανάδευση, και ανά 24 ώρες προστίθενται 250 μL μεθανόλης ώστε να διατηρείται σταθερός ο ρυθμός έκφρασης των πρωτεϊνών.

Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, ελήφθησαν δείγματα, όγκου περίπου 1mL, ανά 24 ώρες. Το δείγμα που λαμβάνεται κάθε φορά αραιώνεται (για να υπάρξει λογική απορρόφηση) και φωτομετράται. Με αυτό τον τρόπο, μελετάται η ανάπτυξη της ζύμης, ενώ ελέγχεται η ύπαρξη και η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, με δοκιμές κατάλληλες για κάθε μία. Από αυτό τον έλεγχο, επιλέγεται η κατάλληλη προκαλλιέργεια (ο κατάλληλος κλώνος), από την οποία λαμβάνονται τα κύτταρα για την καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας.

### **3.1.2 Καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας**

Για την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες, αποικίες μετασχηματισμένων κλώνων εμβολιάστηκαν σε 50 mL θρεπτικού υλικού BMGY σε κωνικές φιάλες. Μετά τον εμβολιασμό, γίνεται επώαση στους 30°C, για 16-20 ώρες, υπό ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση κατάλληλου όγκου καλλιέργειας BMGY, συλλογή των κυττάρων και επαναιώρηση σε 500 mL θρεπτικού υλικού BMMY. Η καλλιέργεια σε BMMY γίνεται σε κωνική φιάλη όγκου 2L, ώστε να υπάρχει ο απαραίτητος για την καλλιέργεια αερισμός. Στη συνέχεια, τα κύτταρα της ζύμης επωάζονται σε θερμοκρασία 30°C, για κατάλληλο χρονικό διάστημα με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης 0,5 % v/v. Οι επιθυμητές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, που εκκρίνονται από τα κύτταρα της ζύμης, αρχικά διαχωρίζονται από τα κύτταρα με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά.

### **3.1.3 Επεξεργασία του υπερκείμενου της καλλιέργειας (Διήθηση, συμπύκνωση, εξισορρόπηση)**

Μετά τη φυγοκέντρηση, συλλέγεται το υπερκείμενο της καλλιέργειας, ώστε να συμπυκνωθεί και τελικά να διαχωριστεί η επιθυμητή πρωτεΐνη από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τη ζύμη. Αρχικά, το υπερκείμενο καθαρίζεται με **διήθηση υπό κενό**, περνώντας διαδοχικά από φίλτρα με πόρους 0,8 και 0,2 mm

(membrane filter, Pall Corporation), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κυτταρικά θραύσματα.

Ακολούθως, το δείγμα που λαμβάνεται, τοποθετείται στη **συσσκευή υπερδιήθησης Amicon (centrifree micropartition)**. Η μεμβράνη συγκρατεί όσα μόρια έχουν διάμετρο μεγαλύτερη από αυτή των πόρων της, ενώ μόρια μικρότερης διαμέτρου διαφεύγουν μαζί με το διάλυμα. Τα συστήματα φυγοκέντρωσης που περιλαμβάνουν μεμβράνες υπερδιήθησης είναι κατάλληλα για την απομάκρυνση αλάτων, σακχάρων, νουκλεοτιδίων, μη υδατικών διαλυτών και άλλων σωματιδίων χαμηλού μοριακού βάρους. Για να επιτευχθεί η συμπύκνωση της πρωτεΐνης, εφαρμόζεται πίεση στη στήλη (περίπου 50bar) και μεμβράνη με πόρους διαμέτρου 30kDalton. Μετά το τέλος της διαδικασίας, στο εσωτερικό της συσκευής παραμένει το συμπυκνωμένο διάλυμα (όγκου περίπου 30 mL) των πρωτεϊνών.

Μετά τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη υπερδιήθησης Amicon, το διάλυμα εξισορροπείται με ρυθμιστικό διάλυμα Talon, το οποίο χρησιμοποιείται και στην υπόλοιπη διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, το δείγμα τοποθετείται σε ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης **Dialysis tubing cellulose membrane**, με πόρους διαμέτρου 25 mm, της εταιρείας Sigma-Aldrich, όπου αφήνεται να εξισορροπήσει για 12-14 ώρες. Η ημιπερατή μεμβράνη αφήνει να περάσουν μικρά μόρια μέσω του φαινομένου της διαπίδυσης. Η μέθοδος αυτή, βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης, καθώς μικρά μόρια του διαλύτη διαπερνούν την μεμβράνη μέχρι να αποκατασταθεί η ισορροπία του συστήματος. Πριν τη χρήση, η μεμβράνη πλένεται σε απιονισμένο νερό που βράζει, για περίπου 30 λεπτά, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, μεταφέρεται το διάλυμα των πρωτεϊνών περίπου στο 1/3 του όγκου του σωλήνα που σχηματίζει η μεμβράνη. Το σύστημα, παραμένει μέσα σε 3 λίτρα ρυθμιστικού διαλύματος TALON, σε θερμοκρασία 4°C, με ήρεμη ανάδευση.

### **3.1.4 Χρωματογραφία Συγγενείας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)**

Για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται η μέθοδος της **Χρωματογραφίας Συγγενείας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (IMAC)**. Η μέθοδος αυτή, βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων επιφανειακών συστατικών των πρωτεϊνών (όπως είναι η ιστιδίνη, η κυστεΐνη και σπανιότερα η τρυπτοφάνη) και των κατιόντων μετάλλων, τα οποία βρίσκονται ακίνητοποιημένα σε στήλες ρητίνης. Ανάλογα με το ακίνητοποιημένο ιόν μετάλλου της κάθε στήλης, διαφορετικές αλυσίδες των αμινοξέων προσροφώνται και ακίνητοποιούνται στη στήλη. Πιο συγκεκριμένα, σε αλκαλικό περιβάλλον, μόρια πρωτεϊνών που διαθέτουν στην αλληλουχία τους έξι συνεχόμενα αμινοξέα ιστιδίνης (6X His-tag), προσδένονται σε κατιόντα μετάλλου ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), λόγω του αρνητικού φορτίου των αμινοξικών καταλοίπων. Η μέθοδος αυτή, περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Porath et al., το 1975 και από τότε χρησιμοποιείται ευρέως για την

απομόνωση πρωτεϊνών, πεπτιδίων και νουκλικών οξέων και για το διαχωρισμό κυττάρων. [Winzerling et. al, 1992]

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε στήλη κοβαλτίου, σχεδιασμένη για τον καθαρισμό ανασυνδυασμένων His-tagged πρωτεϊνών, που βρίσκονται είτε σε φυσική κατάσταση είτε υπό την επίδραση αποδιατακτικών παραγόντων. Η στήλη ρητίνης διαθέτει ηλεκτροαρνητική θέση πρόσδεσης που δομείται από τετραεδρικό χηλικό παράγοντα που δεσμεύει το ηλεκτροθετικό ιόν κοβαλτίου και την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη με τα κατάλοιπα ιστιδίνης για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες της ζύμης, εκλούσθηκαν αμέσως από τη στήλη καθώς δεν διαθέτουν τις έξι ιστιδίνες. Η έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης γίνεται με τη χρήση αζωτούχου ιμιδατολίου (σε σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση από 0 έως 100 mM). Το ιμιδατόλιο ανταγωνίζεται με τις σημασμένες με ιστιδίνη πρωτεΐνες για τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης και συνεπώς όσο αυξάνει η συγκέντρωση του ιμιδατολίου, η πρωτεΐνη αποδεσμεύεται.

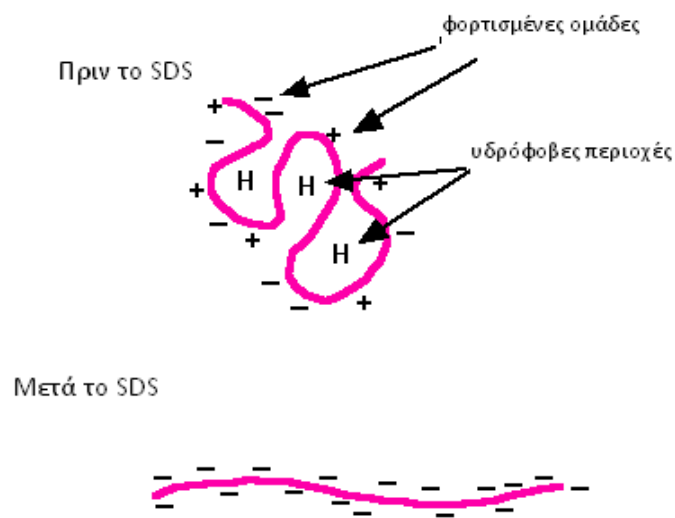
Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια: εξισορρόπηση της μήτρας της στήλης, φόρτωση του δείγματος, έκπλυση για την απομάκρυνση των μη επιθυμητών πρωτεϊνικών μορίων, έκλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και την τελική εξισορρόπηση της μήτρας της στήλης. Η ροή της κινητής φάσης της στήλης ρυθμίζεται με τη χρήση της αντλίας Econo Gradient της εταιρείας BIORAD (Η.Π.Α.). Οι εκλουόμενες πρωτεΐνες ανιχνεύονται με χρήση ανιχνευτή UV ακτινοβολίας (στα 280 nm) με λογισμικό διαχείρισης και καταγραφής Clarity Version 2.3.3.124 (DataApex, Τσεχία). Τέλος, η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συλλέκτη κλασμάτων (Waters, Millipore, Η.Π.Α.).

Αρχικά, γίνεται εξισορρόπηση της στήλης (η οποία αποτελείται από 15 mL υλικού χρωματογραφίας Talon® Metal Affinity Resin (Clontech, Η.Π.Α)), με 300 mL ρυθμιστικού διαλύματος Talon 1X με ροή 2,0 mL/min. Στη συνέχεια, το δείγμα (υπερκείμενο της καλλιέργειας), περνάει από τη στήλη με ρυθμό 2 mL/min, τα κατάλοιπα ιστιδίνης δεσμεύονται στη ρητίνη και η πρωτεΐνη μένει στη στήλη. Μετά το πέρασμα του υπερκειμένου της καλλιέργειας, το υλικό ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα buffer 1x, ώστε να απομακρυνθούν όλες πρωτεΐνες δεν δεσμεύονται στη στήλη, και τελικά μετράται η απορρόφηση. Μετά τη χρήση, η στήλη αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C, βυθισμένη σε διάλυμα αιθανόλη συγκέντρωσης 20% v/v. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, που ελήφθη καθαρή μετά την στήλη, εξισορροπείται με ρυθμιστικό διάλυμα Tris 30mM, με τη μέθοδο της διαπίδυσης σε ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, με πόρους διαμέτρου 25 mm, της εταιρείας Sigma-Aldrich).

### 3.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η μέθοδος αυτή, βασίζεται στον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Στη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιείται και ένας αποδιατακτικός παράγοντας (μερκαπτοαιθανόλη), ενώ γίνεται και βρασμός των δειγμάτων. Συνεπώς, διαχωρίζονται και οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες από τις οποίες αποτελούνται τα μόρια της πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS). Η ηλεκτροφόρηση πολυπεπτιδίων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, καθιερώθηκε σε από τον Ulrich K. Laemmli το 1970 και από τότε χρησιμοποιείται ευρέως.

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στα υλικά που χρησιμοποιούνται, όπως φαίνεται αναλυτικότερα παρακάτω. Αρχικά, το θειικό δωδεκυλικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS) είναι ένα ιοντικό απορρυπαντικό, που μπορεί να αποδιατάξει υδροφοβικά μόρια, ενώ επίσης διαθέτει και αρνητικό φορτίο. Συνεπώς, όταν ένα κύτταρο επωαστεί με SDS, οι κυτταρικές μεμβράνες διαλύονται και όλες οι πρωτεΐνες διαλυτοποιούνται. Έτσι, μετά την επώαση με SDS, όλες οι πρωτεΐνες διατηρούν μόνο την πρωτοταγή δομή τους και εξουδετερώνεται το φορτίο του πολυπεπτιδίου. Έτσι, η κινητικότητα των πολυπεπτιδίων είναι αντιστρόφως ανάλογη προς το μοριακό τους βάρος.

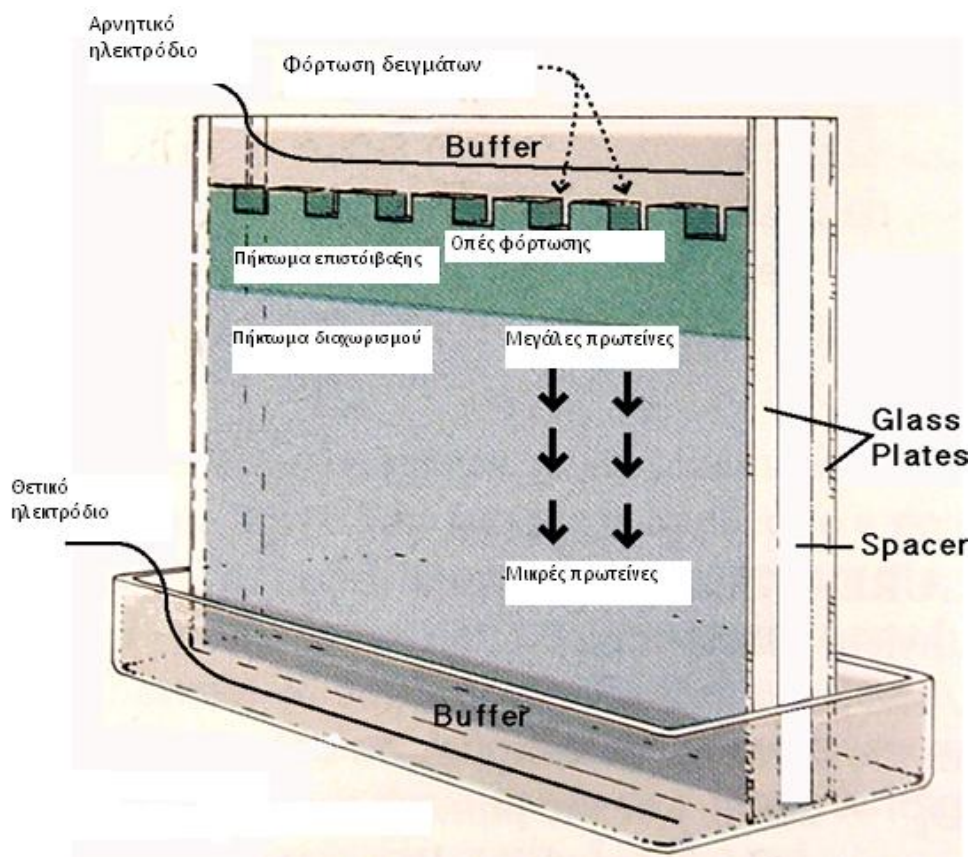


**Εικόνα 15:** Στο παραπάνω σχήμα δείχνει τι συμβαίνει σε μια πρωτεΐνη όταν επωάζεται σε SDS. Στο άνω τμήμα της εικόνας, φαίνεται μια πρωτεΐνη με θετικά και αρνητικά φορτία και υδρόφοβες περιοχές (H). Στο κάτω τμήμα φαίνεται ότι το SDS έχει την ικανότητα να αποδιατάσσει τις υδρόφοβες περιοχές και να καλύπτει τις πρωτεΐνες με αρνητικά. Τελικά, η πρωτεΐνη αποδιατάσσεται και μετατρέπεται σε γραμμικό μόριο.

Ακόμα, χρησιμοποιείται η  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη η οποία δημιουργεί αποδιατακτικές συνθήκες (αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών). Το πολυακρυλαμίδιο, είναι μια χημικά αδρανής ένωση, που παραμένει σταθερή σε διάφορες θερμοκρασίες και σε μεγάλο εύρος ιονικής ισχύος και pH. Τα μονομερή ακρυλαμιδίου, που αποτελούν τις δομικές μονάδες του πολυμερούς πολυακρυλαμιδίου, πολυμερίζονται και προκύπτει το πήκτωμα. Για να επιτευχθεί ο

πολυμερισμός, χρησιμοποιείται υπερθειικό αμμώνιο (APS), το οποίο παίζει το ρόλο του καταλύτη, αλλά και η N,N,N,N'- τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED), που δρα ως ενεργοποιητής. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν καθορίζεται και το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος.

Η ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου με SDS (SDS-PAGE) είναι μια συνεχής διαδικασία. Τα δείγματα αρχικά τοποθετούνται σε πηκτώμα με χαμηλή περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου (stacking gel), το οποίο ακριβώς λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας ακρυλαμιδίου που διαθέτει επιτρέπει τη δημιουργία μεγάλων πόρων. Συνεπώς, πεπτίδια μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους, αποκτούν την ίδια κινητικότητα και παρατάσσονται στην ίδια νοητή γραμμή, μεταξύ των δύο πηκτωμάτων. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες περνούν σε πηκτώμα υψηλής συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου (resolving gel), όπου και πραγματοποιείται ο διαχωρισμός τους. Στο resolving gel τα μόρια κινούνται δια μέσου πολύ μικρότερων πόρων, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.



**Εικόνα 16:** Διάταξη ηλεκτροφόρησης πολυπεπτιδίων σε πηκτώμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

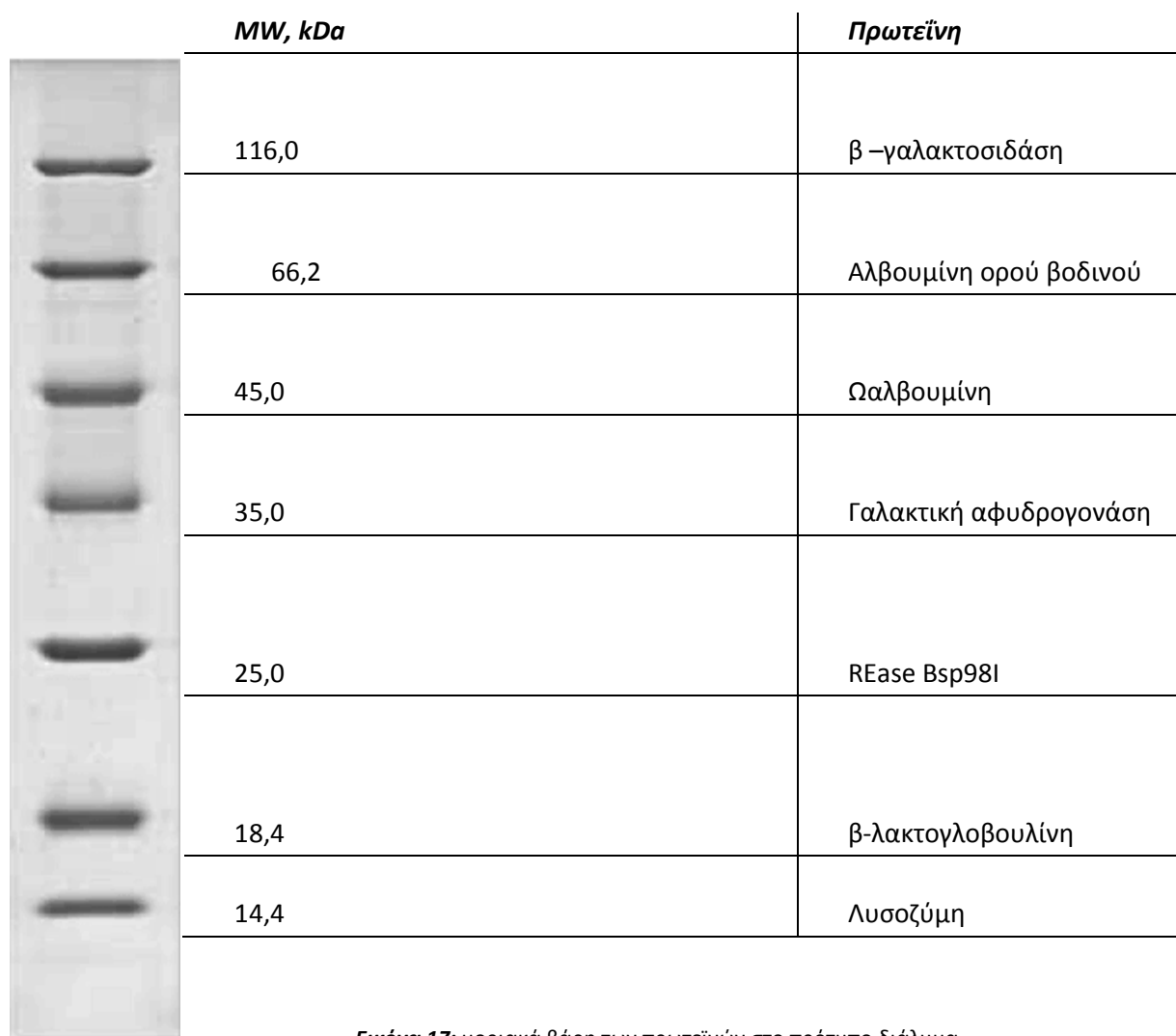
Στην συγκεκριμένη εργασία η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε είναι η Mini – Protean 3 (BIORAD, Η.Π.Α.). Οι γυάλινες πλάκες, διαστάσεων 10,1 cm × 7,3 cm και 10,1 cm × 8,3 cm που χρησιμοποιήθηκαν, καθαρίστηκαν με διάλυμα 70% αιθανόλης, ενώθηκαν με μεταλλικούς σφιγκτήρες και σταθεροποιήθηκαν πάνω στη συσκευή. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται το διάλυμα διαχωρισμού και εκχύθηκε ανάμεσα στις δύο πλάκες, έτσι ώστε να απέχει περίπου 1,5 cm από την κορυφή τους και αφέθηκε περίπου 30 λεπτά μέχρι να πολυμερισθεί. Ακολούθως,

παρασκευάστηκε και εκχύθηκε το πήκτωμα επιστοιίβαξης (stacking gel) και τοποθετήθηκε η ειδική «χτένα» για να σχηματιστούν οι οπές στις οποίες τοποθετούνται τα δείγματα. Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος επιστοιίβαξης, στερεώθηκαν οι πλάκες στα ειδικά δοχεία της συσκευής και προστέθηκαν 400 – 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος SDS 1X. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε η «χτένα» και τα δείγματα, μετά την κατάλληλη κατεργασία, τοποθετήθηκαν στις οπές. Η κατεργασία των δειγμάτων έγινε με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος (7 µL) στο πρωτεϊνικό διάλυμα (15 µL) και βρασμός του μίγματος για 5 – 7 λεπτά. Εκτός από τα δείγματα, στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου τοποθετήθηκαν και 5 – 7 µL πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, ή Low Range Markers: sc-2360, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Μετά τη φόρτωση των δειγμάτων και του πρότυπου διαλύματος έγινε ηλεκτροφόρηση με 35 mA/πήκτωμα για περίπου 1 ώρα.

Πήκτωμα Επιστοιίβαξης (Stacking gel) [για ένα 1 gel]		Πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving gel) [για 1 gel]	
Υπερκάθαρο Νερό	1,5 mL	Υπερκάθαρο Νερό	1,75 mL
0,25 M Tris/SDS 0,2% (pH 8,8)	1,9 mL	0,75 M Tris/SDS 0,2% (pH 8,8)	4,7 mL
40% bis – acrylamide (30:1)	0,38 mL	40% bis – acrylamide (30:1)	2,9 mL
TEMED	10 µL	TEMED	15 µL
10% APS	30 µL	10% APS	90 µL

**Πίνακας 3:** συστάσεις των πηκτωμάτων επιστοιίβαξης και διαχωρισμού που χρησιμοποιήθηκαν

Όπως προαναφέρθηκε, για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Το μοριακό βάρος κάθε πρωτεΐνης του πρότυπου διαλύματος φαίνονται παρακάτω:



**Εικόνα 17:** μοριακά βάρη των πρωτεϊνών στο πρότυπο διάλυμα

Μετά το τέλος της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης για να χρωματισθούν οι πρωτεΐνες και να εμφανιστούν πάνω στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική ουσία Coomassie Brilliant Blue G – 250. Η αρχή της μεθόδου χρωματισμού, βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής ουσίας σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα και πιο συγκεκριμένα σε κατάλοιπα αργινίνης, με αποτέλεσμα την παραγωγή έγχρωμων προϊόντων. Συγκεκριμένα, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετήθηκε μέσα σε δοχείο που περιείχε το διάλυμα χρώσης (Staining Solution) Coomassie Brilliant Blue G-250 για περίπου 20 λεπτά και μετά βυθίστηκε σε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution), μέχρι οι ζώνες των πρωτεϊνών να φαίνονται καθαρά, όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας χρωματισμού και αποχρωματισμού, το πήκτωμα ανακινούνταν σε συσκευή ανάδευσης Orbit LS, (της εταιρείας Labnet, Μεγάλη Βρετανία).



### 3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που παράχθηκαν με την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι: ο προσδιορισμός με μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος στα 280nm και ο προσδιορισμός με τη μέθοδο Bradford.

#### ➤ Χρωματομετρική μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι μια αρκετά γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών. Βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να προσδέεται σε βασικές ή και όξινες ομάδες των αμινοξέων. Το σύμπλοκο της πρωτεΐνης και της χρωστικής διαθέτει μεγάλο συντελεστή απόσβεσης, κάτι που οδηγεί σε μεγάλη ευαισθησία της μέτρησης της πρωτεΐνης και οδηγεί σε προϊόντα χρώματος γαλάζιου με μέγιστο απορρόφησης στα 595nm, ενώ η ελεύθερη χρωστική ουσία έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465 nm. Η πρόσδεση της χρωστικής ουσίας στην πρωτεΐνη είναι μια πολύ γρήγορη διαδικασία (διαρκεί περίπου 2 λεπτά), ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης και χρωστικής παραμένει διασκορπισμένο στο διάλυμα για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα (περίπου 1 ώρα). Κατά συνέπεια, η διαδικασία είναι πολύ γρήγορη, ενώ δεν απαιτείται και άμεση διεξαγωγή της χρωσιμείωσης [Bradford 1976]. Το έγχρωμο προϊόν που παράγεται από την πρόσδεση της χρωστικής στα κατάλοιπα αργινίνης που διαθέτει η πρωτεΐνη, έχει ένταση ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η τιμή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, υπολογίζεται από την τιμή της απορρόφησης του διαλύματος που περιέχει το σύμπλοκο της πρωτεΐνης και της χρωστικής στα 595 nm και τη σύγκριση της μετρούμενης τιμής με την πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιούνται διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων, στα οποία προστίθεται διάλυμα Bradford και στη συνέχεια γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm.

#### ➤ Ποσοτικός προσδιορισμός με μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm

Η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών με μέτρηση απορρόφησης υπεριώδους φωτός (280nm) διαθέτει αρκετά πλεονεκτήματα, καθώς μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας στο δείγμα, διεξάγεται αρκετά γρήγορα καθώς δεν απαιτείται επώαση, είναι μη καταστρεπτική για την πρωτεΐνη και η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και της απορρόφησης είναι γραμμική. Η μέτρηση γίνεται στην περιοχή του υπεριώδους φωτός (280nm) καθώς σε αυτή την περιοχή απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα κατάλοιπα των πρωτεϊνών [Stoscheck, 1990]. Κατά τη μέθοδο αυτή, το δείγμα φωτομετράται σε μήκος κύματος 280nm μέσα σε κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1cm, αφού έχει προηγηθεί μηδενισμός με το ίδιο διάλυμα χωρίς την παρουσία πρωτεΐνης (blank). Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης χρησιμοποιείται η μαθηματική σχέση:

$$A = (O.D._{280nm} \times MW) / \epsilon$$

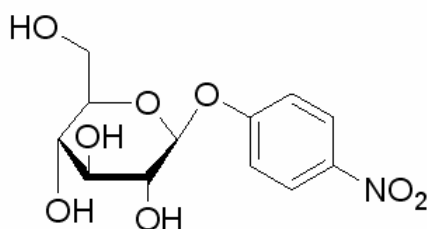
Όπου: A: η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε mg ανά mL δείγματος

*O.D.* <sub>280nm</sub>: η μετρούμενη απορρόφηση του δείγματος στα 280nm  
*MW*: το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης  
και *ε*: η μοριακή απορροφητικότητα ή μοριακός συντελεστής απόσβεσης (molar extinction coefficient) ( $M^{-1}/cm^{-1}$ ), που εξαρτάται από το pH και την ιοντική ισχύ [Stoscheck, 1990] και υπολογίζεται μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων.

### 3.4 Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας

#### 3.4.1. Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης

Η ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης έγινε με μέτρηση της υδρόλυσης του υποστρώματος p-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (PNPG, SIGMA).



**Εικόνα 18:** Δομή του p-νιτροφαινυλο-γλυκοπυρανοζίτη

Η δομική μονάδα του p-νιτροφαινυλο-γλυκοπυρανοζίτη περιλαμβάνει ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο p-νιτροφαινόλης ενωμένα με β-D- γλυκοζιτικό δεσμό.

Η υδρόλυση του υποστρώματος αυτού, με αποτέλεσμα την παραγωγή p-νιτροφαινόλης, καταλύεται από την β-γλυκοζιδάση και αυτή η διαδικασία της υδρόλυσης χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου [Cai *et al.*, 1998]

Τα δείγματα της ενζυμικής αντίδρασης, με τελικό όγκο 1ml, περιείχαν 50μL ενζυμικού διαλύματος και 950 μL διαλύματος 100 mM p-β-NPG σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών- φωσφορικών 0,1 M pH 5.0. Μετά την παρασκευή τους, τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50°C. Μετά την επώαση, προστίθενται στα δείγματα 200μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> συγκέντρωση 1M , ώστε να τερματιστεί η αντίδραση, τα δείγματα αποκτούν κίτρινο χρώμα και τελικά φωτομετρούνται στα 410 nm.

#### 3.4.2 Ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας σε υποστρώματα πολυσακχαριτών

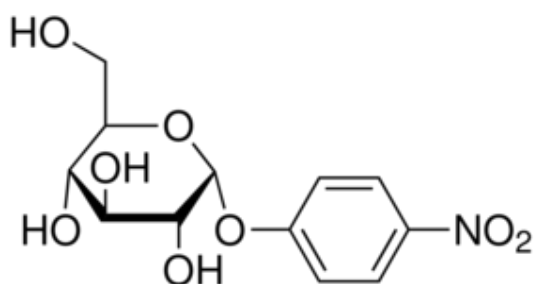
Για την ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης, χρησιμοποιούνται ως μονάδα τα units, σύμφωνα με τον παρακάτω ορισμό:

Ως μονάδα ενζυμικής **ενεργότητας** (*unit*, *U*) ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει το σχηματισμό 1 μmol προϊόντος (ανηγμένα σάκχαρα ή νιτροφαινυλομάδα) από το αντίστοιχο υπόστρωμα στη μονάδα του χρόνου (*min*).

Στην παρούσα εργασία, για την ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας χρησιμοποιήθηκαν τα υποστρώματα: υποκατεστημένος γλυκοπυρανοζίτης *p* NPG (*p*-NPh- $\alpha$ -D-glucopyranoside, SIGMA), υποκατεστημένος γαλακτοπυρανοζίτης *p* NPG (*p*-NPh- $\beta$ -D-galactopyranoside, *p*-NPh- $\alpha$ -D-galactopyranoside, SIGMA) και *p*-NPh- $\beta$ -D-cellobioside (SIGMA), κελλοβιόζη (cellobiose, SIGMA), λαμιναρίνη (laminarin, SIGMA) , λιχενάνη (lichenan, SIGMA),  $\beta$ -γλουκάνη κριθαριού (barley  $\beta$ -glucan, MEGAZYME), καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνη (carboxymethylcellulose, CMC, SIGMA), ξυλάνη σημύδας (Birchwood xylan, ROTH), διηθητικό χαρτί (filter paper, Whatman No1) και μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel, Macherey – Nagel).

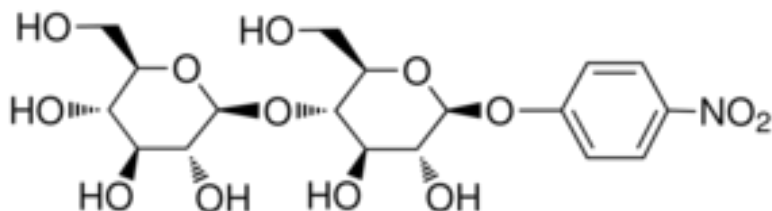
Στη συνέχεια, ακολουθεί μια συνοπτική παρουσίαση της δομής και των ιδιοτήτων των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν:

υποκατεστημένος γλυκοπυρανοζίτης *p* NPG (*p*-NP- $\alpha$ -D-glucopyranoside):



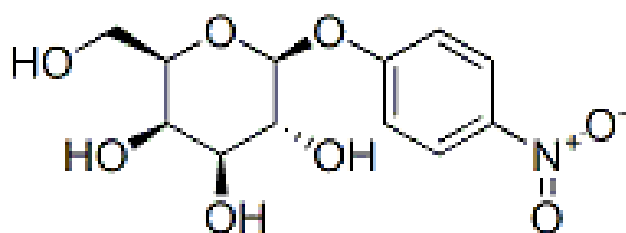
**Εικόνα 19:** Δομή του *p*-νιτροφαινυλο-γλυκοπυρανοζίτη

*p*-νιτροφαινυλο-κελλοβιοζίτη (*p*-NPh- $\beta$ -D-cellobioside):



**Εικόνα 20:** Δομή του *p*-νιτροφαινυλο-κελλοβιοζίτη

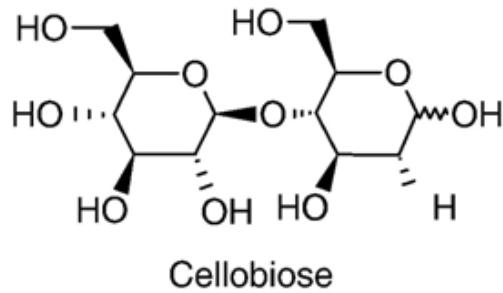
*p*-νιτροφαινυλο-γαλακτοπυρανοζίτη (*p*-NP- $\beta$ -D-galactopyranoside):



**Εικόνα 21:** Δομή του *p*-νιτροφαινυλο-γαλακτοπυρανοζίτη

Η δομική μονάδα του *p*-νιτροφαινυλο-γαλακτοπυρανοζίτη περιλαμβάνει ένα μόριο λακτόζης και ένα μόριο *p*-νιτροφαινόλης ενωμένα με  $\beta$ -D- γλυκοζιτικό δεσμό.

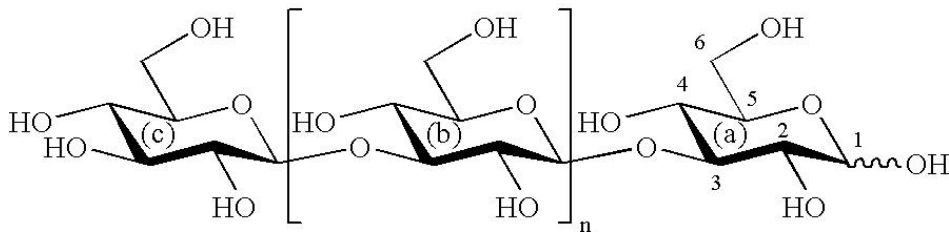
Κελλοβιόζη(cellobiose):



**Εικόνα 22:** Δομή της κελλοβιόζης

Η κελλοβιόζη είναι ένας δισακχαρίτης, αποτελούμενος από δύο μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα με ένα β(1→4) δεσμό. Η κελλοβιόζη υδρολύεται ενζυμικά προς γλυκόζη και διαθέτει οκτώ ελεύθερες ομάδες αλκοόλης (OH), έναν ακετικό δεσμό και ένα ημιακετικό δεσμό, οι οποίοι οδηγούν σε ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου. Η κελλοβιόζη μπορεί να παραχθεί μέσω ενζυμικής ή όξινης υδρόλυσης από την κυτταρίνη ή από υλικά πλούσια σε κυτταρίνη, όπως είναι το χαρτί.

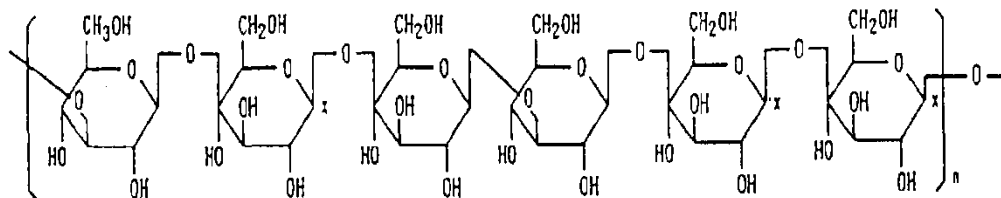
λαμιναρίνη (laminarin):



**Εικόνα 23:** Δομή της λαμιναρίνης.

Η λαμιναρίνη είναι μια αποθηκευτική γλυκάνη που αποτελείται από μονομερή γλυκόζης και απαντάται στα φύκη. Δημιουργείται κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης και αποτελείται από β-1,3 γλυκάνη με διακλαδώσεις με β-1,6 δεσμούς.

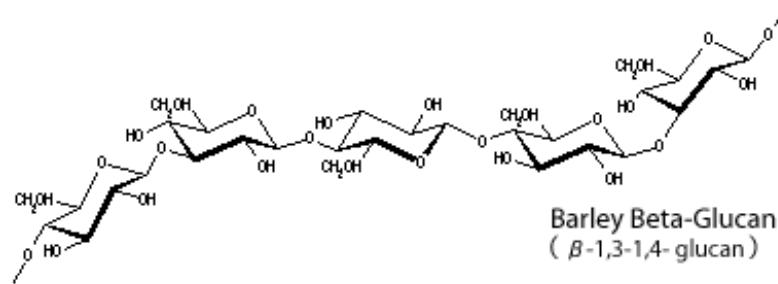
Λιχενάνη (lichenan):



**Εικόνα 24:** Δομή της λιχενάνης

Η λιχενάνη είναι γραμμικό πολυμερές και έχει δομή παρόμοια με τη δομή της β-γλυκάνης του κριθαριού. Περιέχει δεσμούς β-1,3 και β-1,4 σε αναλογία 1 προς 2.

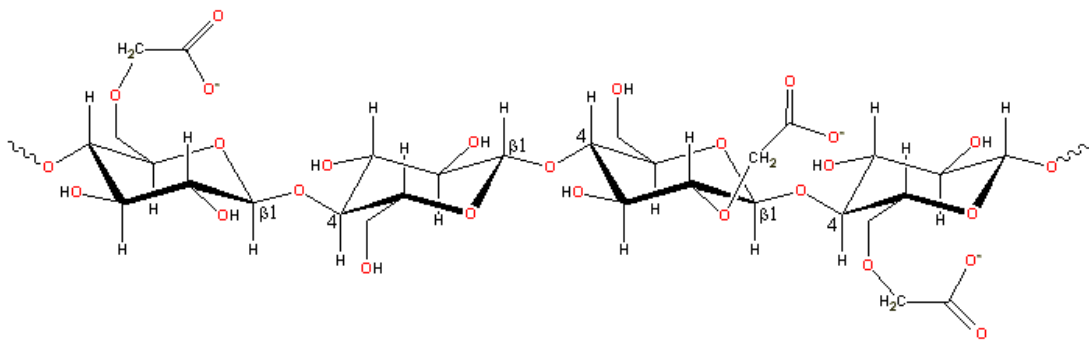
β-γλουκάνη κριθαριού (barley β-glucan):



**Εικόνα 25:** Δομή της β-γλουκάνης κριθαριού.

Η β-γλουκάνη αποτελείται από μονομερή D-γλυκόζης που συνδέονται με β-γλυκοζιτικούς δεσμούς με αναλογία δεσμών β-1,3 προς β-1,4 ,1 προς 3 και σχηματίζουν μακρά κυλινδρικά μόρια.

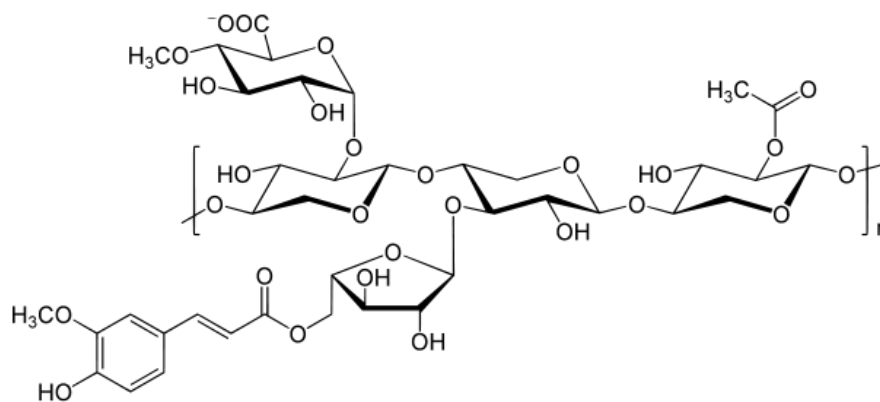
καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνη (carboxymethylcellulose, CMC):



**Εικόνα 26:** Δομή της καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνης

Η καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνη είναι ένα παράγωγο της κυτταρίνης, που διαθέτει καρβοξυμεθυλομάδες (-CH<sub>2</sub>-COOH) συνδεδεμένες σε κάποιες από τις υδροξυλομάδες των γλυκοπυρανοζιτικών μονομερών που αποτελούν το κεντρικό τμήμα του μορίου.

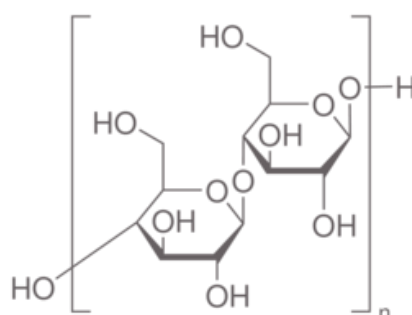
ξυλάνη σημύδας (Birchwood xylan):



**Εικόνα 27:** Δομή μονομερούς της ξυλάνης

Η ξυλάνη είναι ένας περίπλοκος πολυσακχαρίτης που βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών κυττάρων και κάποιων φυκών. Οι ξυλάνες αποτελούνται από μονομερή ξυλόζης (πεντόζη).

μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel):



*Εικόνα 28:* Δομή μονομερούς της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης

Avicel είναι η εμπορική ονομασία για τη μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, η οποία έχει υποστεί μερική υδρόλυση με οξύ και έχει έρθει σε μορφή λεπτής σκόνης .

### 3.4.2.1 Παρασκευή των υποστρωμάτων

Όλα τα υποστρώματα που προαναφέρθηκαν, παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM και pH =5.0. Για τα υποστρώματα που είναι σχετικά ευδιάλυτα (**CMC, λιχενάνη, λαμιναρίνη, pNP - γλυκοπυρανοζίτης και pNP- γαλακτοπυρανοζίτης**), η παρασκευή έγινε με προσθήκη της ουσίας στο ρυθμιστικό διάλυμα υπό ανάδευση και σε μερικές περιπτώσεις με θέρμανση για λίγα λεπτά, ενώ στη συνέχεια τα υποστρώματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C. Η παρασκευή της **β-γλουκάνης** κριθαριού έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας MEGAZYME. Για την παρασκευή του διαλύματος **ξυλάνης**, 1 g της ουσίας προστέθηκε σε 80 mL ρυθμιστικού διαλύματος σε θερμοκρασία 80 °C και έμεινε υπό ανάδευση για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία αυξήθηκε μέχρι το σημείο βρασμού για 1-2 min και το διάλυμα έμεινε υπό ανάδευση, χωρίς θέρμανση για 24 ώρες. Τέλος, το διάλυμα ογκομετρήθηκε ως τα 100 mL και αποθηκεύτηκε. Για την **μικροκρυσταλλική κυτταρίνη**, η οποία είναι αδιάλυτη, η παρασκευή του διαλύματος έγινε υπό συνεχή ανάδευση, και το διάλυμα έμεινε υπό ανάδευση κατά τη διεξαγωγή της αντίδρασης, ενώ το διάλυμα δεν μπορεί να διατηρηθεί.

Οι τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων των υποστρωμάτων που παρασκευάστηκαν για τον έλεγχο της ενεργότητας του ενζύμου, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Υπόστρωμα	Τελική συγκέντρωση
p-NPh-β-D-γλυκοπυρανοζίτης	1mM
p-NPh-α-D-γλυκοπυρανοζίτης	5mM

<i>p</i> -NPh-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης	5mM
<i>p</i> -NPh-α-D-γαλακτοπυρανοζίτης	5mM
<i>p</i> -NPh-β-D-κελλοβιοζίτης	1mM
Κελλοβιόζη	10mM
Λαμιναρίνη	0.5%
Λιχενάνη	1%
β-γλουκάνη κριθαριού	1%
CMC low viscosity	1%
ξυλάνη σημύδας	1%
Avicel	2%

**Πίνακας 4:** Συγκεντρώσεις διαλυμάτων υποστρωμάτων

### 3.4.2.2 Δοκιμές με πολυσακχαριτικά υποστρώματα

Οι δοκιμές για τα υποστρώματα **CMC, λιχενάνη, λαμιναρίνη, β-γλουκάνη κριθαριού, κελλοβιόζη και ξυλάνη σημύδας** έγιναν ως εξής: αρχικά, 50 μL ενζύμου αναμείχθηκαν με 200 μL διαλύματος του εκάστοτε υποστρώματος και ακολούθησε επώαση του διαλύματος για 15 λεπτά στους 50 °C, ώστε να διεξαχθεί η αντίδραση. Στη συνέχεια, για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές μέθοδοι, ανάλογα με το υπόστρωμα. Έτσι, για τα υποστρώματα λαμιναρίνη, λιχενάνη, β-γλουκάνη κριθαριού, CMC (low viscosity), ξυλάνη σημύδας, διηθητικό χαρτί, και avicel, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του δινιτροασαλυκυλικού οξέος (DNS) [Miller 1959]. Σύμφωνα με τη μέθοδο, 250 μL διαλύματος DNS προστέθηκαν στο διάλυμα της αντίδρασης και ακολούθησε βρασμός για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, το μείγμα αραιώθηκε με 2 mL απιονισμένου νερού και φωτομετρήθηκε στα 540 nm. Τέλος, για την κελλοβιόζη η μέτρηση της ενεργότητας έγινε με τη μέθοδο του Glucotest. Εκτός από τις αντιδράσεις που έγιναν παρουσία ενζύμου (οι οποίες έγιναν με διπλά δείγματα για κάθε υπόστρωμα, για μεγαλύτερη ακρίβεια), έγιναν και αντιδράσεις ελέγχου, με απενεργοποιημένο ένζυμο. Ο τελικός προσδιορισμός της απόδοσης των αντιδράσεων, έγινε με βάση την απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων, η οποία προσδιορίστηκε με βάση καμπύλες αναφοράς.

Για τα υποστρώματα ***pNP γλυκοπυρανοζίτης, pNP κελλοβιοζίτης και pNP γαλακτοπυρανοζίτης***, των οποίων η υδρόλυση απελευθερώνει φαινυλομάδες (δηλαδή τα: *p*-NPh-β-D-γλυκοπυρανοζίτης, *p*-NPh-α-D-γλυκοπυρανοζίτης, *p*-NPh-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης, *p*-NPh-α-D-γαλακτοπυρανοζίτης, *p*-NPh-β-D-κελλοβιοζίτης), ακολουθήθηκε διαφορετική διαδικασία δοκιμών. Αρχικά, έγινε ανάμειξη 50 μL ενζύμου με 950 μL διαλύματος υποστρώματος και ακολούθησε επώαση του μίγματος για 10 λεπτά στους 50°C. Τέλος, προστέθηκαν 200 μL διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) συγκέντρωσης 1M, για τον τερματισμό της αντίδρασης και έγινε φωτομέτρηση στα 410 nm. Και σε αυτή την περίπτωση,

όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, ενώ έγιναν και αντιδράσεις ελέγχου με απενεργοποιημένο ένζυμο. Ως ένδειξη της ενζυμικής ενεργότητας, χρησιμοποιήθηκε η απελευθέρωση p-νιτροφαινόλης (η απελευθέρωση της οποίας είναι αποτέλεσμα της δράσης του ενζύμου), η οποία προσδιορίστηκε με βάση την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Τέλος, για την κελλοβιόζη η μέτρηση της ενεργότητας έγινε με τη μέθοδο του Glucotest.

### **3.5 Υπολογισμός βέλτιστης θερμοκρασίας ενζυμικής ενεργότητας και σταθερότητας της β-γλυκοζιδάσης**

Οι ενζυμικές δράσεις παρουσιάζουν το λεγόμενο θερμοκρασιακό βέλτιστο, δηλαδή υπάρχει κάποια θερμοκρασία (ή εύρος θερμοκρασιών) στην οποία η ενζυμική αντίδραση γίνεται με μέγιστη αποτελεσματικότητα. Γενικά, ο ρυθμός των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων αυξάνεται με τη θερμοκρασία μέχρι ένα ορισμένο σημείο. Πάνω από αυτό το σημείο, η ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται συναρτήσει της θερμοκρασίας, λόγω μετουσίωσης του ενζύμου. Ο υπολογισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας στην οποία η ανασυνδυασμένη β-γλυκοζιδάση έχει τη μέγιστη ενεργότητα, έγινε με μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου σε διάφορες θερμοκρασίες. Για τον έλεγχο της βέλτιστης θερμοκρασίας, έγινε επώαση ποσότητας ανασυνδυασμένου ενζύμου (σε αραιώση 1:10) διαλυμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα MOPS συγκέντρωσης 50 mM και pH=6.5 [Good et al., 1966], παρουσία 1mg/ml BSA σε διαφορετικές θερμοκρασίες από 30 έως 90°C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα ελήφθησαν δείγματα και ακολούθησε δοκιμή σε υπόστρωμα p-β-NPG, όπως περιγράφηκε παραπάνω και τελικά υπολογίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου στις διάφορες θερμοκρασίες.

### **3.6 Επίδραση μετάλλων και ιόντων στην ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης**

Τα μεταλλικά ιόντα είναι απαραίτητοι συμπράγοντες και σταθεροποιητές της διαμόρφωσης πολλών ενζύμων. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί συμπράγοντες για τα ένζυμα που μετατρέπουν μικρά μόρια. Επηρεάζουν τη σύνδεση του υποστρώματος και συμμετέχουν στις καταλυτικές δράσεις υπό μορφή οξέων ή διαδραματίζουν το ρόλο μεταφορέα ηλεκτρονίων. Για τον προσδιορισμό της επίδρασης διαφόρων ιόντων και μετάλλων στη δράση του ανασυνδυασμένου ενζύμου ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Αρχικά, έγινε προεπώαση διαλύματος που συγκέντρωση ενζύμου 0,00064 mg/mL (διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα κιντρικών- φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM και pH 5.0) και ποσότητα διαλύματος μετάλλου συγκέντρωσης 10mM, σε θερμοκρασία 4 °C για 40 λεπτά. Στη συνέχεια, η ενεργότητα μετρήθηκε με δοκιμή σε υπόστρωμα p-β-NPG σε θερμοκρασία 50 °C, παρουσία του διαλύματος ιόντων μετάλλων. Η ενεργότητα που μετρήθηκε, απουσία ιόντων μετάλλων (δείγμα ελέγχου) θεωρήθηκε ως 100% και τα αποτελέσματα των δοκιμών εκφράστηκαν ως επί τοις εκατό «σχετική ενεργότητα»



(relative activity), η οποία είναι η απορρόφηση του δείγματος σε διάλυμα μετάλλου, προς την απορρόφηση του δείγματος ελέγχου, επί τοις εκατό. Τα μέταλλα και τα ιόντα μετάλλων των οποίων η επίδραση στη δράση του ανασυνδυασμένου ενζύμου μελετήθηκε, είναι:  $Zn^{2+}$  (χρησιμοποιήθηκε διάλυμα  $ZnSO_4$ ),  $Co^{2+}$  (διάλυμα  $CoCl_2$ ), **EDTA**, **Urea** ( $CO(NH_2)_2$ ), **SDS**,  $Cu^{2+}$  (διάλυμα  $CuSO_4$ ),  $Mn^{2+}$  (διάλυμα  $MnSO_4$ ),  $Ca^{2+}$  (διάλυμα  $CaCl_2$ ),  $K^+$  (διάλυμα  $KCl$ ) και  $Mg^{2+}$  (διάλυμα  $MgSO_4$ ).

### 3.7 Αναστολή της δράσης της β-γλυκοζιδάσης

Η δραστηριότητα ενός ενζύμου, εκτός από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, τη θερμοκρασία κ.λπ., επηρεάζεται και από τον τύπο και τη συγκέντρωση των αναστολέων, ενώσεων δηλαδή που μειώνουν το ρυθμό της αντίδρασης. Οι αναστολείς χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες: ανταγωνιστικοί ή μη ανταγωνιστικοί. Ο χαρακτηρισμός της δράσης ενός αναστολέα περιλαμβάνει τον χαρακτηρισμό του ως ανταγωνιστικό ή μη ανταγωνιστικό και τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής  $K_i$ .

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση ως αναστολέων, διαφόρων συγκεντρώσεων D-γλυκόζης (από 0 έως 25mM), D-ξυλόζης (από 0 έως 10 mM) και D-γλυκονικού οξέος (από 0 έως 10 mM) στην ικανότητα της β-γλυκοζιδάσης να υδρολύει το υπόστρωμα p-β-NPG, όπως αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω:

#### 3.7.1 Επίδραση της γλυκόζης και της ξυλόζης

Η επίδραση της γλυκόζης στην δράση του ενζύμου μελετήθηκε σε υπόστρωμα p-β-NPG συγκέντρωσης 1mM παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων γλυκόζης (από 0 έως 25 mM), σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών –φωσφορικών 100 mM pH =5.0 και ποσότητας ενζύμου 0,0128 mg/mL. Στη συνέχεια, οι αντιδράσεις τοποθετήθηκαν στο πολυφωτόμετρο Microplate Spectrophotometer System, όπου αφέθηκαν να αντιδράσουν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 45°C. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, προσμετρούταν συνεχώς η απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 410nm, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας καμπύλης, η κλίση της οποίας υποδηλώνει την αύξηση της απορρόφησης ανά το χρόνο. Πολλαπλασιάζοντας την κλίση του πολυφωτόμετρου επί την κλίση της πρότυπης καμπύλης της π-νιτροφαινόλης, βρέθηκε η αύξηση της συγκέντρωσης της π-νιτροφαινόλης στο δείγμα ανά το χρόνο. Η αύξηση αυτή μας δίνει στοιχεία για τη δράση του ενζύμου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος στον υπολογιστή βρέθηκαν οι σταθερές  $K_m$  και  $V_{max}$  του ενζύμου για το υπόστρωμα του 4-νιτροφαινυλ-πυρανογλυκοζίτη. Τέλος, έγινε προσαρμογή των αποτελεσμάτων στην εξίσωση Michaelis–Menten ώστε να υπολογιστούν τελικά οι κινητικές παράμετροι  $K_m$ ,  $V_{max}$  και  $K_i$ , με χρήση του προγράμματος GraFit, μέσω του οποίου υπολογίζεται και η τυπική απόκλιση της κάθε παραμέτρου. [Leatherbarrow, 1998] [Kakkar et al. ,1999] Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των παραμέτρων είναι:

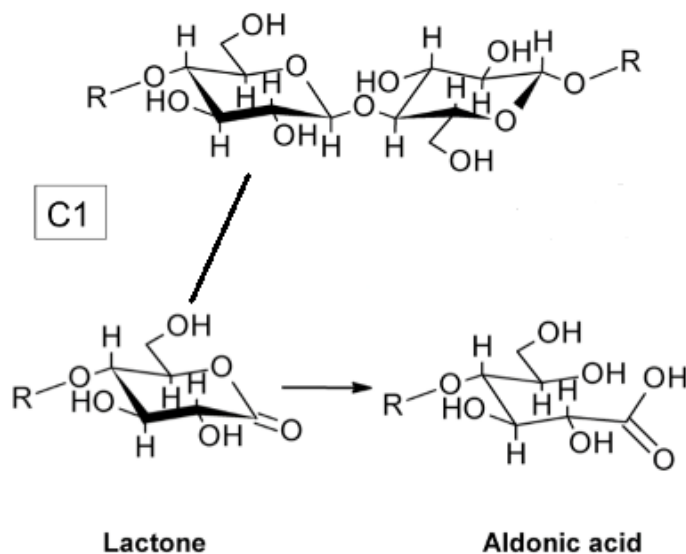
$$K_{m,app} = K_m * (1 + [I]/K_i) \text{ και τελικά: } K_i = [I] * K_m / (K_{m,app} - K_m)$$

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης της ξυλόζης στην ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, για διαφορετικές συγκεντρώσεις ξυλόζης από 0 έως 10 mM.

### 3.7.2 Επίδραση του γλυκονικού οξέος

Προσδιορίστηκε η επίδραση D- γλυκονικού οξέος το οποίο είχε παρασκευαστεί στο εργαστήριο, στην ενεργότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Παρασκευή D- γλυκονικού οξέος: Η διαδικασία παραγωγής του οξέος έγινε με ήπια οξείδωση της D-γλυκόζης προς β-γλυκονο-δ-λακτόνη και γλυκονικό οξύ, μια μέθοδο που έχει αποδειχθεί ότι οξειδώνει επιλεκτικά τους ημιακετικούς άνθρακες προς παραγωγή αλδονικών οξέων.



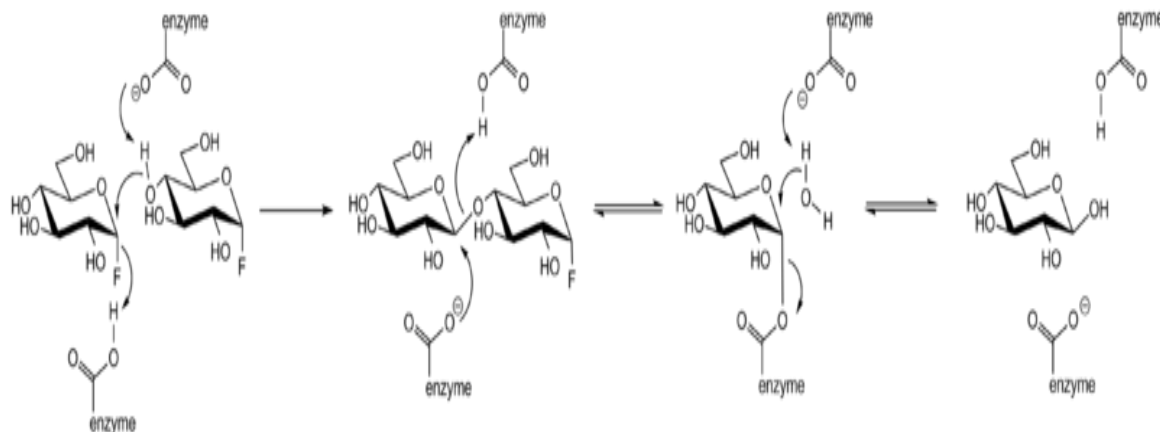
**Εικόνα 29:** μηχανισμός της αντίδρασης οξείδωσης της γλυκόζης προς λακτόνη και γλυκονικό οξύ [Dimarogona et. al, 2012]

Για την παραγωγή του D-γλυκονικού οξέος μέσω χημικής οξείδωσης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: 2,90g ολιγοσακχαρίτη (D-γλυκόζη) διαλύθηκαν σε 10ml απιονισμένου νερού και αναμείχθηκε με κατάλληλο διάλυμα ιωδίου (7.3 mmol ιωδίου σε 15 ml μεθανόλης). Ενώ το μίγμα ήταν υπό ανάδευση, προστέθηκαν σε σταγόνες 48 ml διαλύματος KOH σε μεθανόλη (για περίπου 15 λεπτά). Στη συνέχεια, το διάλυμα επώαστηκε σε θερμοκρασία 40°C για 1 ώρα, όπου και αποχρωματίστηκε. Ακολούθως, το διάλυμα αφέθηκε να καταψυχθεί για 12-14 ώρες, κάτι που οδήγησε στη δημιουργία λευκών κρυστάλλων, οι οποίοι φιλτραρίστηκαν, πλύθηκαν με κρύο διάλυμα μεθανόλης και ξηράθηκαν. [Forsberg, 2011].

Η επίδραση του γλυκονικού οξέος στην ικανότητα της β-γλυκοζιδάσης να υδρολύει το υπόστρωμα p-β-NPG, εξετάστηκε για διαφορετικές συγκεντρώσεις D-γλυκονικού οξέος από 0 έως 10 mM, με τη μέθοδο που αναφέρεται και παραπάνω.

#### 4.ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΡΑΝΣΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ

Τρανσγλυκοζυλίωση ονομάζεται η αντίδραση κατά την οποία ένα γλυκοζιτικό κατάλοιπο μεταφέρεται από ένα γλυκοζιτικό μόριο προς ένα μόριο-δέκτη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό νέου γλυκοζιτικού δεσμού. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει τη διάσπαση απλών γλυκοζιτικών δεσμών και το μετασχηματισμό τους σε διαφορετικής μορφής γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ο μηχανισμός της αντίδρασης τρανσγλυκοζυλίωσης της β-γλυκοζιδάσης, φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί:



**Εικόνα 30:** μηχανισμός της αντίδρασης τρανσγλυκοζυλίωσης

Η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης σε αντιδράσεις τρανσγλυκοζυλίωσης εξετάστηκε με χρήση κελλοβιόζης ως δότη και μεθανόλης ως δέκτη. Το μίγμα της αντίδρασης (τελικού όγκου 2ml ) περιείχε μεθανόλη συγκέντρωσης 5M, 0.02%  $\text{NaN}_3$  και διαφορετικές συγκεντρώσεις κελλοβιόζης (1, 2, 4, 5 και 6% w/v) σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών- φωσφορικών , pH 5.0 και 64  $\mu\text{g}$  ενζύμου. Τα δείγματα των αντιδράσεων επώαστηκαν σε θερμοκρασία 50°C , ενώ λαμβάνονταν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα για 5 ώρες.

Η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης τρανσγλυκοζυλίωσης έγινε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής ακρίβειας (HPLC) Shimadzu LC-20AD, με στήλη ανταλλαγής ιόντων Macherey-Nagel CC 250 x 4.6 mm Nucleosil 100-5  $\text{NH}_2$  σε θερμοκρασία 40 °C. Ακόμα, το σύστημα περιέχει ανιχνευτή με βάση το δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A) και η κινητή φάση (διαλύτης) αποτελείται από διάλυμα ακετονιτριλίου και νερού (87:13 v/v), ενώ τα σάκχαρα εκλούσθηκαν με ρυθμό ροής 1 ml/min [Tsitsimprίκου et al. 1997]. Η ποσοτικοποίηση των προϊόντων έγινε με βάση της κορυφές των διαγραμμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων μεθυλο-β-D-γλυκοκυρανοζίτη, D- γλυκόζης και κελλοβιόζης.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, έγινε μετασχηματισμός κυττάρων του ζυμομύκητα *P.pastoris*, τα οποία είχαν καταστεί επιδεκτικά, με χρήση του πλασμιδιακού φορέα pPICZaC, ώστε να επιτευχθεί η παραγωγή και έκκριση της πρωτεΐνης MtBgl3a, που είχε προηγουμένως απομονωθεί από το θερμόφιλο μύκητα *Myceliphthora thermophila*. Για το σκοπό αυτό, έγιναν αρχικά μικρές καλλιέργειες μετασχηματισμένων στελεχών *P.pastoris* και στη συνέχεια μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες. Ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που εκκρίθηκε στο υπερκείμενο των καλλιεργειών και έλεγχος της ως προς τη βέλτιστη θερμοκρασία ενεργότητας και σταθερότητας, ως προς την ενεργότητά της σε υποστρώματα πολυσακχαριτών, ως προς την επίδραση που έχουν διάφορα μέταλλα και ιόντα στην ενεργότητα της πρωτεΐνης, την αναστολή της δραστηριότητας της πρωτεΐνης από τη γλυκόζη, την ξυλόζη και το γλυκονικό οξύ και τέλος, μελετήθηκε η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης σε αντιδράσεις τρανσγλυκοζυλίωσης.

## **1.ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *P. pastoris***

### **1.1 Πλασμιδιακός φορέας pPICZaC**

Με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *PmeI* (Μέθοδοι και υλικά, §2.5) έγινε γραμμικοποίηση του τμήματος του κυκλικού DNA που κωδικοποιεί την MtBgl3a, το οποίο κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pPICZaC (Invitrogen). Αποτέλεσμα ήταν η παραγωγή γραμμικών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, τα οποία διέθεταν την αλληλουχία που κωδικοποιεί την MtBgl3a. Η αλληλουχία αυτή, εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης *AOX1* (Μέθοδοι και υλικά, §2.4.1). Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, η αλκοολική οξειδάση είναι υπεύθυνη για τον καταβολισμό της αλκοόλης προς φορμαλδεΐδη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Έτσι, μόνο τα κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει μεθανόλη.

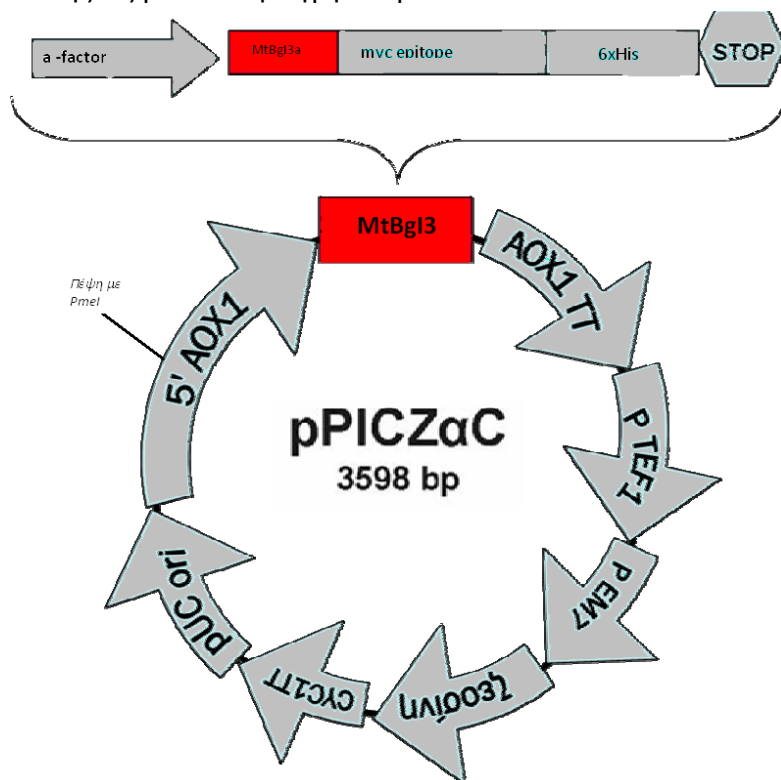


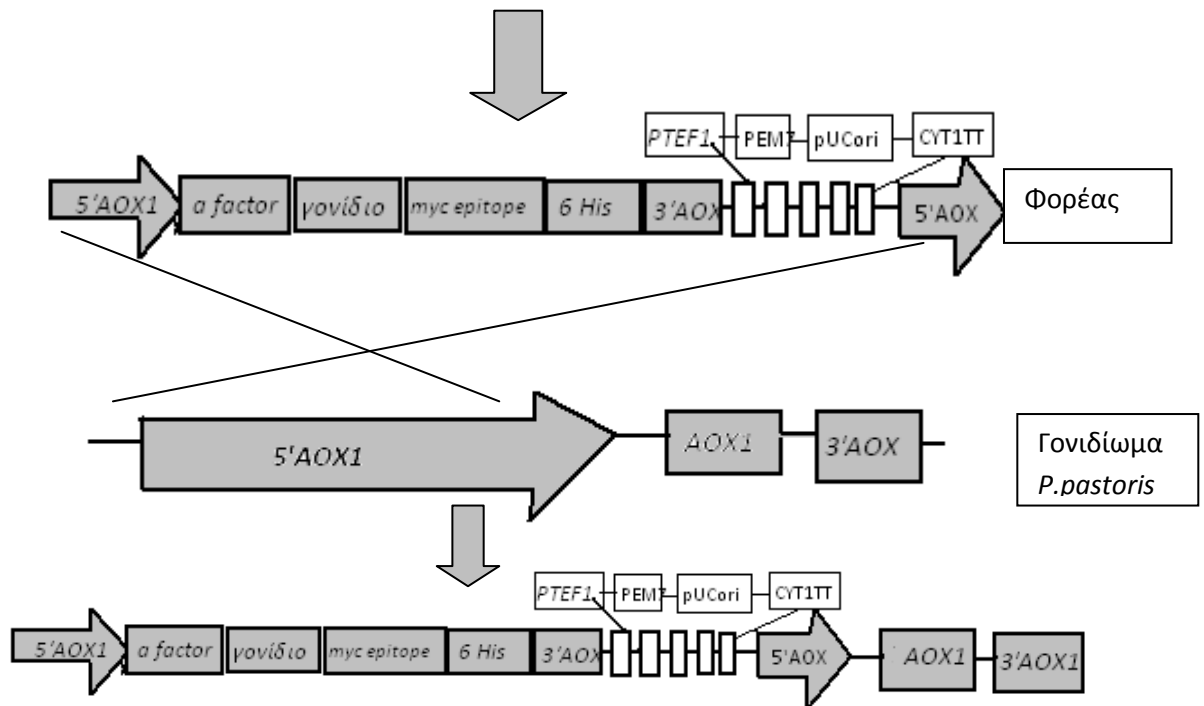
χρησιμοποιείται διότι αυξάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, καθώς τα προστατεύει από την καταπόνηση που προκύπτει λόγω του φαινομένου της ώσμωσης. Για να γίνει διαχωρισμός και τελικά επιλογή των αποικιών που είχαν ανασυνδυαστεί, έγινε επίστρωση των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό YPDS το οποίο περιείχε και ζεοσίνη και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για περίπου 3-4 μέρες. Τα κύτταρα που είχαν προσλάβει επιτυχώς το πλασμίδιο, ήταν ανθεκτικά στη ζεοσίνη και τελικά αναπτύχθηκαν.

## 1.2 Έλεγχος ανασυνδυασμένων κυττάρων *P. pastoris*

Το φυσικό στέλεχος X33 του ζυμομύκητα *P. pastoris* έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί τη μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα καθώς διαθέτει το ένζυμο αλκοολική οξειδάση (AOX, EC 1.1.3.13), το οποίο καταλύει το πρώτο βήμα της αντίδρασης καταβολισμού της μεθανόλης σε φορμαλδεΐδη (methanol utilization pathway, MUT). Το γονιδίωμα της *P. pastoris* περιέχει δύο γονίδια που κωδικοποιούν δύο ένζυμα με δράση αλκοολικής οξειδάσης. Τα γονίδια αυτά αν και παρουσιάζουν ομολογία κατά περίπου 97%, έχουν σημαντικές διαφορές στη δράση τους. Το γονίδιο AOX1 οδηγεί στην παραγωγή αρκετά μεγάλων ποσοτήτων ενζύμου, ενώ το AOX2 έχει πολύ μικρότερη αποτελεσματικότητα.

Για τον μετασηματισμό κυττάρων X33, το πλασμιδιακό DNA (το οποίο έχει γραμμικοποιηθεί με χρήση του περιοριστικού ενζύμου *PmeI*), εισάγεται στο γονιδίωμα της *P.pastoris* με ομόλογο ανασυνδυασμό στην περιοχή του γονιδίου 5'AOX1. Οι ανασυνδυασμένες αποικίες που προκύπτουν μπορούν να αυξάνονται παρουσία ζεοσίνης και να αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας μεγάλες ποσότητες μεθανόλης ως μοναδική πηγή άνθρακα.

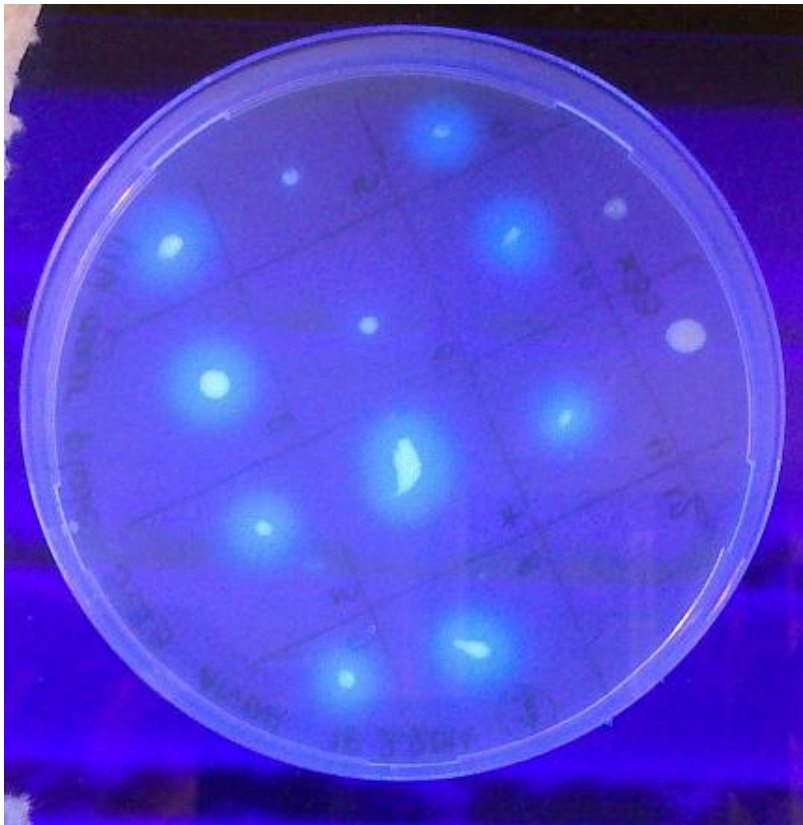




**Εικόνα 32:** Σχηματική αναπαράσταση του ομόλογου ανασυνδυασμού στην περιοχή του υποκινητή *AOX1* γονιδίου που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ανασυνδυασμένων στελεχών στα οποία η αλληλουχία του πλασμιδίου ενσωματώνεται στο γονιδίωμα και οδηγεί στην παραγωγή υψηλής ποσότητας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και αλκοολικής οξειδάσης, υπό τον έλεγχο του *AOX1* υποκινητή.

Οι μετασχηματισμένες αποικίες αναπτύχθηκαν σε τρυβλία YPDS με ζεοσίνη για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του πλασμιδίου. Στη συνέχεια, έγινε καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό MD (minimal dextrose medium) και MM (minimal methanol medium). Για τον έλεγχο της έκφρασης του ανασυνδυασμένου γονιδίου, χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο για τη συγκεκριμένη πρωτεϊνική ενεργότητα υπόστρωμα 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranoside. Αποτέλεσμα της υδρόλυσης του υποστρώματος αυτού είναι η απελευθέρωση μεθυλ-ουμπελλι-φερυλομάδων, οι οποίες μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (320nm) εμφανίζουν φθορισμό. Έτσι, τα τρυβλία ελέγχονται για τον σχηματισμό κηλίδων φθορισμού γύρω από τις αποικίες της ζύμης, ενώ σε κάθε τρυβλίο υπάρχει και μια αποικία του φυσικού στελέχους X33, για τον έλεγχο της διαδικασίας. (βλ. Μέθοδοι και υλικά, §2.6.1)





**Εικόνα 33:** Τρυβλία *Petri* με θρεπτικό υλικό MM, στο οποίο έχει προστεθεί 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranoside για τον έλεγχο της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης MtBgl3a. Οι αποικίες που εκφράζουν το ένζυμο απελευθερώνουν μεθυλ-ουμπελλι-φερυλομάδες, οι οποίες μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (320nm) εμφανίζουν φθορισμό. Σε κάθε τρυβλίο, για τον έλεγχο της διαδικασίας, υπάρχει και μια αποικία του φυσικού στελέχους X33, η οποία δεν εμφανίζει φθορισμό.

## **2.ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MtBgl3a ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ**

### **2.1 Έκφραση του γονιδίου σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας**

Από τα τρυβλία στα οποία αναπτύχθηκαν τα ανασυνδυασμένα κύτταρα της ζύμης, έγινε επιλογή ορισμένων αποικιών για την περαιτέρω μελέτη της έκφρασης του ανασυνδυασμένου γονιδίου μέσω καλλιιεργειών μικρής κλίμακας (όγκου 50mL). Αρχικά, έγινε καλλιέργεια των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό BMGY (buffered complex glycerol medium), το οποίο αναστέλλει τη δράση του υποκινητή AOX άρα και την έκφραση του γονιδίου, όμως ευνοεί την ανάπτυξη της βιομάζας. Μετά από 24 ώρες, δείγμα προκαλλιέργειας συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υλικό BMMY (buffered complex methanol medium), το οποίο περιέχει μεθανόλη και επάγει την έκφραση του γονιδίου MtBgl3a. Η καλλιέργεια αναπτύχθηκε για 7 ημέρες με τακτική προσθήκη μεθανόλης σε ποσοστό 0,5% v/v επί του όγκου της καλλιέργειας. Καθημερινά λαμβάνονταν δείγμα το οποίο μετά από κατάλληλη αραιώση φωτομετράται στα 600nm ώστε να ελεγχθεί η ενεργότητα της πρωτεΐνης. Ακόμα, έγινε έλεγχος του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης που παράχθηκε, με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE σε

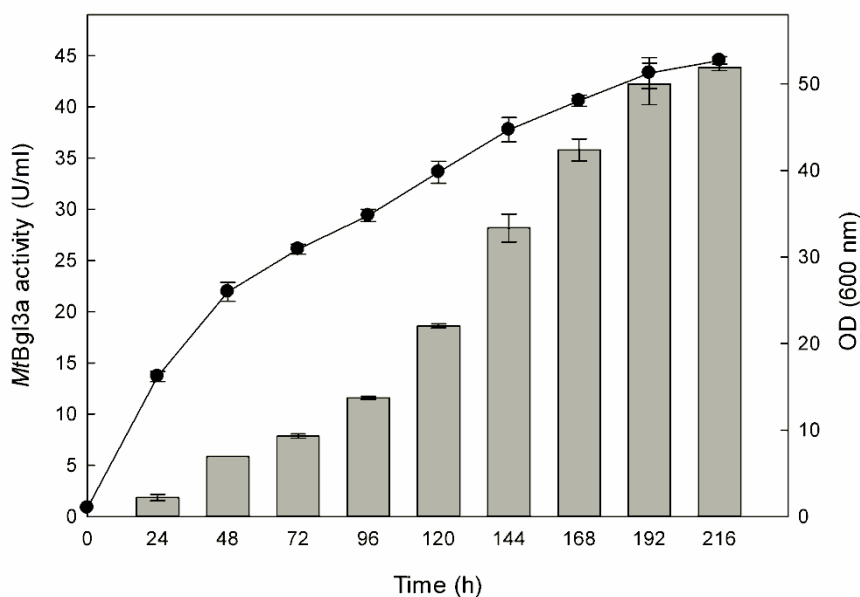


πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και έλεγχος της ποσότητας της πρωτεΐνης με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford έγινε με βάση την σχέση:

$$\text{Συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/mL)} = A_{595} * 0.9 * \text{αραίωση του δείγματος}$$

Από τον έλεγχο αυτό, επιλέχθηκε ο κατάλληλος κλώνος, από τον οποίο ελήφθη κατάλληλη ποσότητα κύτταρων για την καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα που ακολουθεί, η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στην καλλιέργεια μετά από επώαση για 24 ώρες και κορυφώθηκε στις 192 ώρες έχοντας τιμή 41 U/ml.



**Διάγραμμα 1:** Απεικόνιση της αύξησης της βιομάζας της ζύμης *P.pastoris* σε θρεπτικό μέσο BMMY και της ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης στο υπερκείμενο καλλιέργειας όγκου 50 mL. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε γυάλινες κωνικές φιάλες όγκου 250 mL. Η ανάπτυξη προσδιορίστηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του δείγματος στα 600 nm, ενώ η ενεργότητα ανιχνεύθηκε με δοκιμή της ενζυμικής δραστηριότητας σε υπόστρωμα pNPG. Η μέτρηση της ενεργότητας στο υπόστρωμα έγινε μετά από προσθήκη 200  $\mu$ L διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  συγκέντρωσης 1M και φωτομέτρηση στα 410nm

## 2.2 Καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας και απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

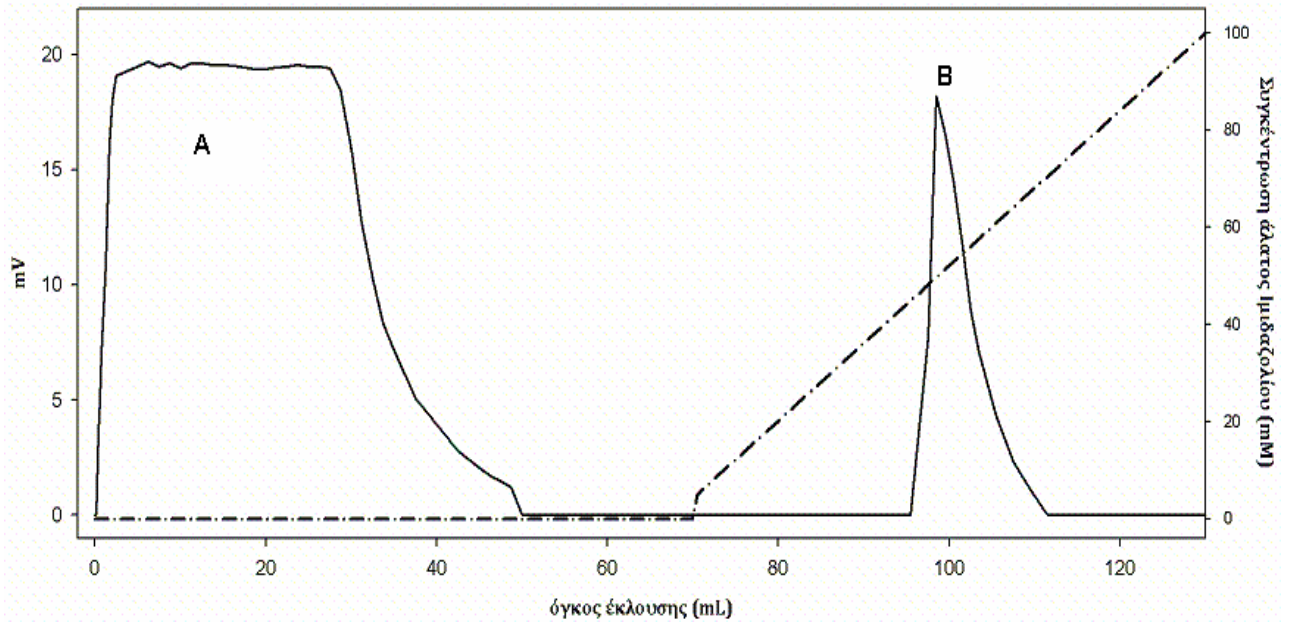
Για την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκαν μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό BMMY (buffered complex methanol medium). Οι καλλιέργειες αφέθηκαν να επωαστούν για 4 ημέρες, καθώς το διάστημα αυτό θεωρείται κατάλληλο από άποψη κυτταρικής ανάπτυξης και παραγωγής πρωτεΐνης, μετά από μελέτες που έγιναν σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Στη συνέχεια, συλλέχθηκε το υπερκείμενο των καλλιεργειών προκειμένου να συμπυκνωθεί και να απομονωθεί η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη

από τις υπόλοιπες εκκρινόμενες πρωτεΐνες της ζύμης. Το υπερκείμενο διηθήθηκε υπό κενό για να απομακρυνθούν τυχόν κυτταρικά θραύσματα και συμπυκνώθηκε με τη χρήση συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 και μεμβράνες PM-10 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.). Μετά την υπερδιήθηση, στο εσωτερικό της συσκευής παρέμεινε το συμπυκνωμένο διάλυμα όγκου 30 mL που περιείχε τις πρωτεΐνες με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10 kDa.

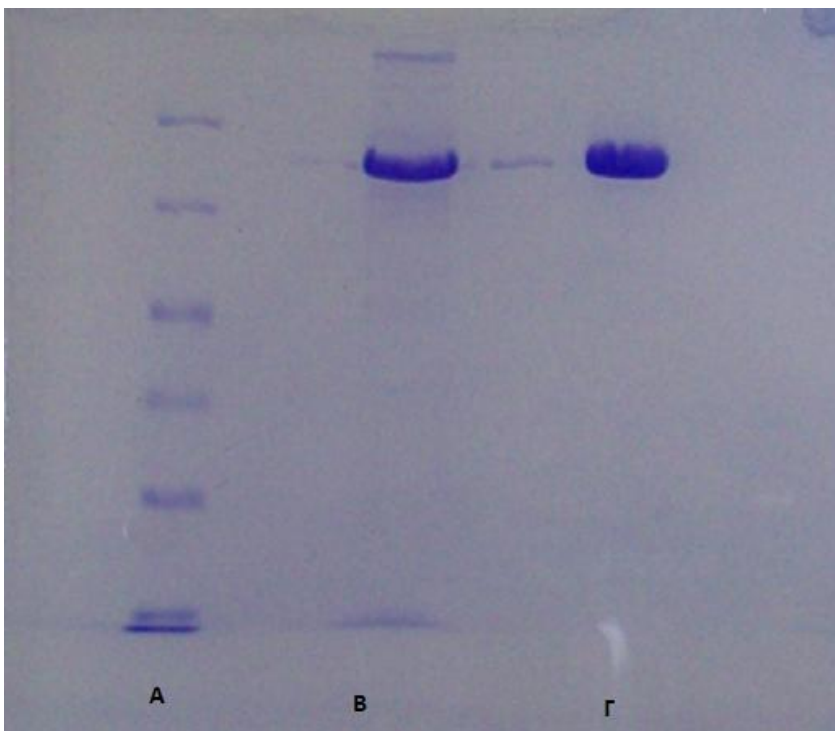
Μετά τη συμπύκνωση στη συσκευή υπερδιήθησης, το διάλυμα υποβλήθηκε σε εξισορρόπηση με ρυθμιστικό διάλυμα Talon, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στη διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης από στήλη χρωματογραφίας. Η διαδικασία έγινε με τη μέθοδο της διαπίδυσης από ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, πόροι διαμέτρου 25 mm, Sigma-Aldrich). Στη συνέχεια, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγενείας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) σε στήλη κοβαλτίου, στην οποία δεσμεύονται τα κατάλοιπα ιστιδίνης που περιέχει (6xHis-tag), με τη βοήθεια διαλύματος TALON παρουσία ιμιδαζολίου.

Τέλος, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκλούσθηκε από τη στήλη με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος Talon, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου. Τελικά, η καθαρή πρωτεΐνη, εξισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα Tris - HCl 30 mM pH 8.0, με τη μέθοδο διαπίδυσης από ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης.

Το μέγεθος της ανασυνδυασμένης MtBgl3a προσδιορίστηκε στα 90 kDa, με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης η MtBgl3a εμφανίστηκε σε μία ζώνη, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπήρξε γλυκοζυλίωσή της κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του τελικού προϊόντος έγινε με μέτρηση της οπτικής απορρόφησής του ενζύμου (σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH=8.0) στα 280nm και βρέθηκε ότι η ποσότητα ήταν 1,2836 mg/mL.



**Διάγραμμα 2:** Απεικόνιση των συνθηκών και των αποτελεσμάτων της χρωματογραφίας IMAC για την απομόνωση και τον καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης MtBg13a. Η περιοχή (A) αντιστοιχεί στην έκλυση με Talon 1X των πρωτεϊνών που δε φέρουν τα κατάλοιπα ιστιδίνης (6xHis-tag) και άρα δεν προσδένονται στη στήλη κοβαλτίου. Η περιοχή (B) αντιστοιχεί στην εκλουόμενη καθαρή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκλύεται με την προσθήκη διαλύματος Talon αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου από 5 ως 100 mM, το οποίο ανταγωνίζεται τα κατάλοιπα ιστιδίνης στη στήλη κοβαλτίου απελευθερώνοντας έτσι τα προσδεμένα μόρια.



**Εικόνα 34:** Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου δειγμάτων από τη διαδικασία καθαρισμού του ενζύμου. Στη θέση A φαίνονται οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν (Μέθοδοι και Υλικά, §3.2), στη θέση B απεικονίζεται το ένζυμο όπως προέκυψε μετά την υπερδιήθηση με Amicon και στη θέση Γ απεικονίζεται το καθαρισμένο ένζυμο μετά την εξισορρόπηση με ρυθμιστικό διάλυμα TALON και την συμπύκνωσή του. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παρουσιάζει μοριακό βάρος περίπου 90 kDa.

### 3.ΕΛΕΓΧΟΣ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ MtBgI3a

#### 3.1 Ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης σε πολυσακχαριτικά υποστρώματα

Η ενεργότητα του ανασυνδυασμένου ενζύμου μετρήθηκε με βάση την ποσότητα των σακχάρων που απελευθερώνονται από την αντίδραση σε πολυσακχαριτικά υποστρώματα, με τη μέθοδο του δινιτροσαλυκυλικού οξέος (DNS) για τα υποστρώματα λαμιναρίνη, λιχενάνη, β-γλουκάνη κριθαρίου, CMC (low viscosity), ξυλάνη σημύδας, διηθητικό χαρτί, και avicel, ενώ για τα υποστρώματα που περιέχουν φαινυλομάδα (p-NPh-β-D-γλυκοκυρανοζίτης, p-NPh-α-D-γλυκοκυρανοζίτης, p-NPh-β-D-γαλακτοκυρανοζίτης, p-NPh-α-D-γαλακτοκυρανοζίτης, p-NPh-β-D-κελοβιοζίτης) η μέτρηση έγινε με προσθήκη ανθρακικού ασβεστίου (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 410nm. Τέλος, η μέτρηση για την κελλοβιόζη έγινε με τη μέθοδο του Glucotest.

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (U/mL) ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει το σχηματισμό 1 μmol προϊόντος (ανηγμένα σάκχαρα ή νιτροφαινυλομάδα) από το αντίστοιχο υπόστρωμα στη μονάδα του χρόνου (min), στους 50 °C, σε 1 mL αντίδρασης.

Για τον υπολογισμό της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες γνωστών συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, για τη μέθοδο DNS, η συγκέντρωση προϊόντος (ανάλογα γλυκόζης) υπολογίστηκε από την σχέση:

$$C \text{ (mg/mL)} = 1.813 * A_{540nm}$$

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης προϊόντος στα υποστρώματα που απελευθερώνουν νιτροφαινυλομάδα, χρησιμοποιήθηκε η σχέση:

$$C \text{ (mg/mL)} = 6.42 * A_{410nm}$$

Τέλος, για την μέτρηση με τη μέθοδο του Glucotest, η συγκέντρωση της γλυκόζης προσδιορίστηκε από τη σχέση:

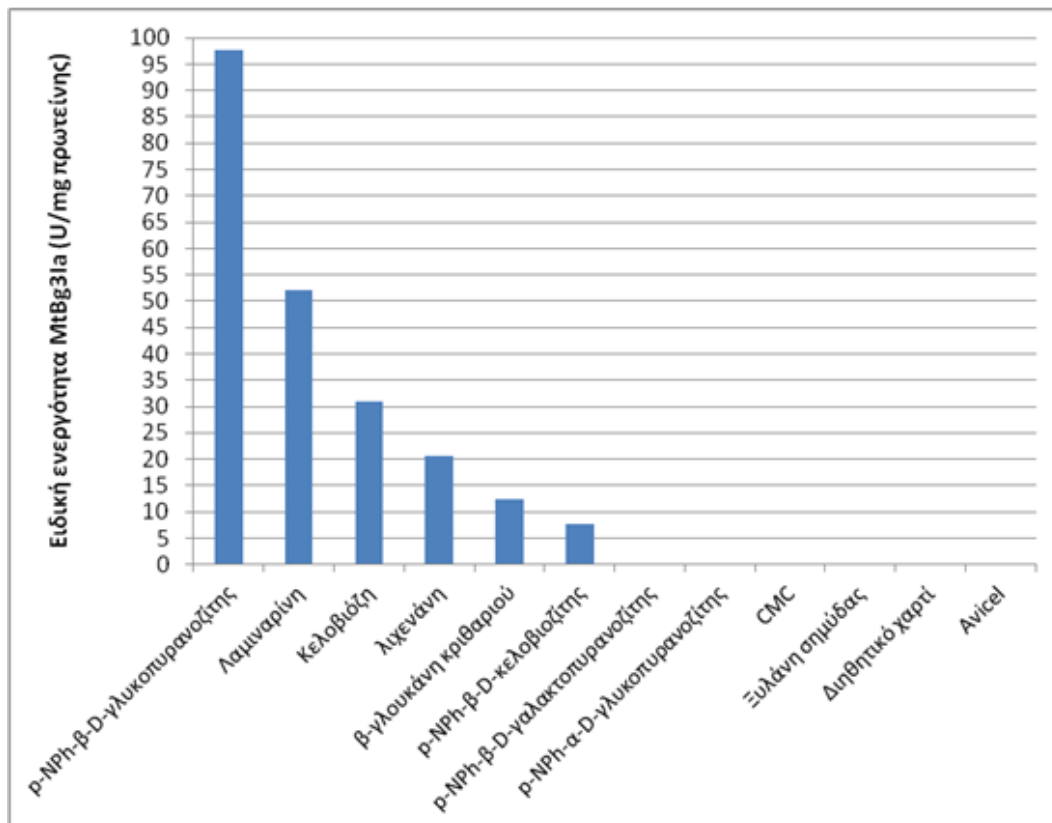
$$C \text{ (mg/mL)} = 1.18 * A_{510nm}$$

Η ενεργότητα του ενζύμου, όπως υπολογίστηκε με τον παραπάνω τρόπο, φαίνεται για κάθε υπόστρωμα, στον πίνακα και το διάγραμμα που ακολουθεί:

Υπόστρωμα	Ειδική ενεργότητα (U / mg protein)
p-NPh-β-D-γλυκοκυρανοζίτης 1mM	97.7
p-NPh-α-D-γλυκοκυρανοζίτης 5mM	n.d.
p-NPh-β-D-γαλακτοκυρανοζίτης 5mM	0.02 ± 0.001
p-NPh-α-D-γαλακτοκυρανοζίτης 5mM	n.d.
p-NPh-β-D-κελοβιοζίτης 1mM	7.62 ± 0.072
Κελλοβιόζη 10mM	30.7 ± 0.967

Λαμιναρίνη 0.5%	52 ± 2.198
Λιχενάνη 1%	20.59 ± 0.039
Β-γλουκάνη κριθαρίου 1%	12.35 ± 0,179
CMC 1% (low viscosity)	n.d.
Ξυλάνη σημύδας 1%	n.d.
Διηθητικό χαρτί	n.d.
Avicel	n.d.

**Πίνακας 5:** ειδική ενεργότητα του ενζύμου για διάφορα πολυσακχαριτικά υποστρώματα ( Δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα για τα υποστρώματα *p*-NPh- $\alpha$ -D-γλυκοκυρανοζίτης, *p*-NPh- $\alpha$ -D-γαλακτοκυρανοζίτης, CMC, ξυλάνη σημύδας, διηθητικό χαρτί και avicel).



**Διάγραμμα 3:** ειδική ενεργότητα της ανασυνδυασμένης MtBg31a σε διάφορα πολυσακχαριτικά υποστρώματα

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα και το παραπάνω διάγραμμα, το ανασυνδυασμένο ένζυμο που προέρχεται από το μύκητα *Myceliophthora thermophila* επιδεικνύει υψηλή ενεργότητα στα υποστρώματα *p*-NPh- $\beta$ -D-γλυκοκυρανοζίτη και κελλοβιόζη. Αντίστοιχα, υψηλή ενεργότητα στα συγκεκριμένα υποστρώματα, έχει παρατηρηθεί και για  $\beta$ -γλυκοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από τους μικροοργανισμούς: *Melanocarpus* sp. [Kaur et al, 2007], *Penicillium italicum* [Park et al., 2012], *Termitomyces clypeatus* [S.Pal et al, 2010], *Humicola insolens* [Souza et al., 2010] και *A. Japonicus* [Korotkova et. al, 2009]. Η υψηλή ενεργότητα του ενζύμου σε αυτά τα υποστρώματα συνεπάγεται ότι παρουσιάζει δράση  $\beta$ -γλυκοζιδάσης. Αντίθετα, δεν μετρήθηκε σχεδόν καθόλου ενεργότητα στο υπόστρωμα *p*-NPh- $\alpha$ -D-γλυκοκυρανοζίτη, κάτι που ήταν αναμενόμενο καθώς, εκτός

από τον μικροοργανισμό *Sulfolobus shibatae*, λίγοι μικροοργανισμοί μπορούν να παράξουν β-γλυκοζιδάσες που έχουν τη δυνατότητα να υδρολύουν τόσο β- όσο και α- γλυκοκυρανοζίτες [Liu et al., 2012]. Ακόμα, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εμφανίζει υψηλή ενεργότητα στο υπόστρωμα λαμιναρίνη, όπως έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση του μικροοργανισμού *Aspergillus japonicus* [Korotkova et al, 2009]. Αντίθετα, δεν παρουσιάστηκε ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης για τα υποστρώματα *p*-NPh-α-D-γλυκοκυρανοζίτη, *p*-NPh-α-D-γαλακτοκυρανοζίτη, CMC, ξυλάνη σημύδας, Avicel και διηθητικό χαρτί, γεγονός που παρατηρήθηκε και σε β-γλυκοζιδάσες από τους μικροοργανισμούς *Melanocarpus* sp. [Kaur et al, 2007], *Penicillium italicum* [Park et al., 2012], *Termitomyces clypeatus* [S.Pal et al, 2010] και *Humicola insolens* [Souza et al., 2010]. Η απουσία ενεργότητας του ενζύμου σε αυτά τα υποστρώματα σημαίνει ότι δεν παρουσιάζει δράση ενδογλουκανάσης, αβισελάσης, ξυλανάσης ή β-γαλακτοζιδάσης. Ακόμα, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι η MtBgl3a μπορεί να υδρολύει γλουκάνες όπως η λαμιναρίνη και η λιχενάνη, κάτι που δεν παρατηρείται συχνά στις β-γλυκοζιδάσες, καθώς τα πολυμερή δεν θεωρούνται κατάλληλα υποστρώματα για αυτές. Σύμφωνα με αυτή την παρατήρηση μπορεί να ειπωθεί ότι η MtBgl3a παρουσιάζει τη δράση εξωγλουκανάσης.

Με βάση την εξειδίκευση που παρουσιάζουν στα διάφορα υποστρώματα, οι β-γλυκοζιδάσες κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες: αρυλ-β-γλυκοζιδάσες, κελλοβιάσες και ευρείας-εξειδίκευσης β-γλυκοζιδάσες. Η πρώτη κατηγορία εμφανίζει μεγάλη εξειδίκευση στην υδρόλυση αρυλ-β-γλυκοζιδών, ενώ οι κελλοβιάσες υδρολύουν μόνο τους κέλλο-ολιγοσακχαρίτες. Οι γλυκοζιδάσες της τρίτης κατηγορίας, επιδεικνύουν υψηλή ενεργότητα και στους δύο παραπάνω τύπους υποστρωμάτων και αποτελούν την πιο συχνά παρατηρούμενη ομάδα στους κυτταρινολυτικούς μικροοργανισμούς [Yeoman et al. 2010]. Με βάση αυτή την κατηγοριοποίηση, και δεδομένου ότι η MtBgl3a εμφάνισε αρκετά μεγαλύτερη ενεργότητα στο υπόστρωμα *p*NP-β-glucopyranoside, από ότι στην κελλοβιόζη θεωρείται ότι ανήκει στην πρώτη κατηγορία.

### **3.2 Υπολογισμός βέλτιστης θερμοκρασίας ενζυμικής ενεργότητας και σταθερότητας της β-γλυκοζιδάσης.**

Ο υπολογισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας, στην οποία η ανασυνδυασμένη β-γλυκοζιδάση έχει τη μέγιστη ενεργότητα, έγινε με μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες από 30 έως 90°C. Για τον έλεγχο της βέλτιστης θερμοκρασίας, έγινε επώαση ποσότητας ανασυνδυασμένου ενζύμου διαλυμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα MOPS συγκέντρωσης 50 mM και pH=6.5 [Good et al., 1966], παρουσία 1mg/ml BSA σε διαφορετικές θερμοκρασίες από 30 έως 90°C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα ελήφθησαν δείγματα και ακολούθησε δοκιμή σε υπόστρωμα *p*-β-NPG, όπως περιγράφηκε παραπάνω και τελικά υπολογίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου στις διάφορες θερμοκρασίες. Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι σε

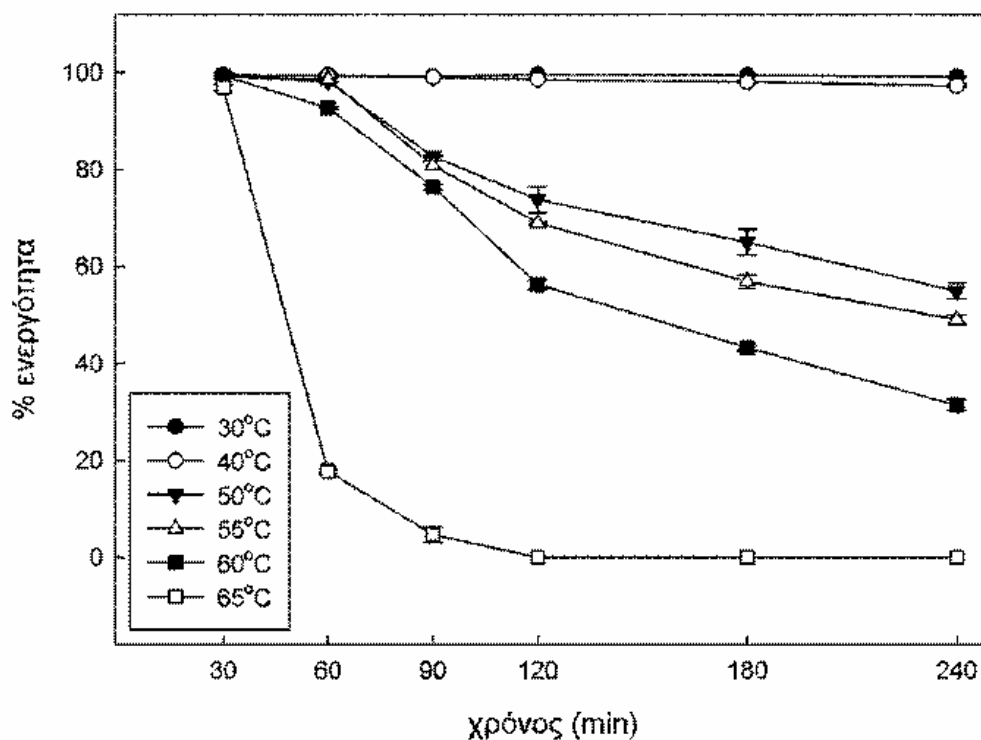
θερμοκρασίες από 70°C και άνω η ενεργότητα προσεγγίζει το μηδέν, άρα ουσιαστικά το ένζυμο απενεργοποιείται

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η MtBgl3a παρέμεινε σχετικά σταθερή σε θερμοκρασίες έως και 60 °C για 60 λεπτά, ενώ διατήρησε περίπου το 56,3% της ενεργότητάς της μετά από προεπάση 2 ωρών σε διάλυμα 50 mM MOPS (pH 6.5), όπως φαίνεται και στο διάγραμμα που ακολουθεί. Ακόμα, παρατηρούμε ότι σε θερμοκρασίες 30 και 40 °C, διατηρήθηκε σχεδόν το 100% της ενεργότητας, ενώ σε θερμοκρασίες 50 και 55 °C, διατηρήθηκε περίπου το 70-75% της ενεργότητας της πρωτεΐνης. Ακόμα, υπολογίστηκε ο χρόνος ημιζωής (half life) του ενζύμου, στις διάφορες θερμοκρασίες, από τον τύπο:

$$t_{1/2} = (t_{\text{αντίδρασης}} * \ln 2) / \ln [S_t/S_o],$$

όπου:  $S_t$  είναι η ενεργότητα που απομένει μετά από χρόνο  $t$  και  $S_o$  η αρχική ενεργότητα (100%). Υπολογίστηκε, λοιπόν, ότι η MtBgl3a, παρουσίασε χρόνους ημιζωής 4,56 ωρών στους 50 °C, 3,56 ωρών στους 55 °C και 2,39 ωρών στους 60 °C.

#### Θερμοσταθερότητα *Mtbgl3* (MOPS pH=6.5 / BSA 1mg/mL)



**Διάγραμμα 4:** Σταθερότητα του ενζύμου σε διάφορες τιμές θερμοκρασίας για χρονικό διάστημα 240 λεπτών. Η μέτρηση των σακχάρων έγινε με τη μέθοδο DNS.

Η μεγάλη πλειοψηφία β- γλυκοζιδασών που έχουν απομονωθεί και ελεγχθεί ως προς την θερμοσταθερότητά τους, παρουσιάζουν βέλτιστη δράση σε θερμοκρασίες 60-75 °C, ενώ υπάρχουν και υπερθερμόφιλες β- γλυκοζιδάσες που παρουσιάζουν βέλτιστη ενεργότητα σε θερμοκρασίες που φτάνουν μέχρι και τους

105 °C , όπως η β γλυκοζιδάση που έχει απομονωθεί από τον *Pyrococcus furiosus* . [Yeoman et al. , 2010]. Γενικά, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, οι β-γλυκοζιδάσες που απομονώνονται από τον θερμοφιλό μύκητα *Myceliophthora thermophila* εμφανίζουν βέλτιστη δράση σε θερμοκρασία περίπου 65 °C [Maheshwari et al., 2000].

Οι δοκιμές σταθερότητας σε διάφορες τιμές θερμοκρασίας κατέδειξαν ότι το ένζυμο μετά από επώαση 60 λεπτών διατηρεί περίπου το 56.3% της ενεργότητάς του σε θερμοκρασία 60°C, άρα μπορεί να θεωρηθεί θερμοσταθερό. Πλεονέκτημα αποτελεί επίσης η διατήρηση περίπου του 95% της ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασία 30 και 40 ° C, καθώς κρίνεται απαραίτητη η σταθερότητα σε χαμηλότερες τιμές θερμοκρασίας (θερμοκρασία δωματίου) για πρακτικούς λόγους. Παρόμοια συμπεριφορά, έχουν επιδείξει β-γλυκοζιδάσες που απομονώθηκαν από τους μικροοργανισμούς *A.jaronicus*, *P. verruculosum*, *T. reesei* [Korotkova et al., 2009], *Humicol insolens* [Souza et al. ,2010], *Aspergillus fumigatus* [Liu et al., 2012], *Orpinomyces sp.* [Chen et al., 1994], *Aspergillus terreus* [Elshafei et al.,2011].

Η θερμοσταθερότητα ενζύμων όπως η β-γλυκοζιδάση είναι μια πολύ βασική ιδιότητα για ένζυμα που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές διεργασίες, καθώς σε κάποια βήματα της διεργασίας κρίνεται απαραίτητη η χρήση ατμού, όπως για παράδειγμα κατά τη διαδικασία της σακχαροποίησης όπου χρησιμοποιείται ατμός ώστε τα υποστρώματα να γίνουν κατάλληλα για την ενζυμική υδρόλυση. Τα θερμοσταθερά ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε τέτοιες διεργασίες, χωρίς να προηγηθεί διεργασία πρόψυξής τους, κάτι που μειώνει σημαντικά, τόσο το κόστος όσο και τη χρονική διάρκεια της διαδικασίας. Έτσι, η απόκτηση αποδοτικών και θερμοσταθερών β-γλυκοζιδασών αποτελεί στόχο πολλών ερευνών παγκοσμίως.

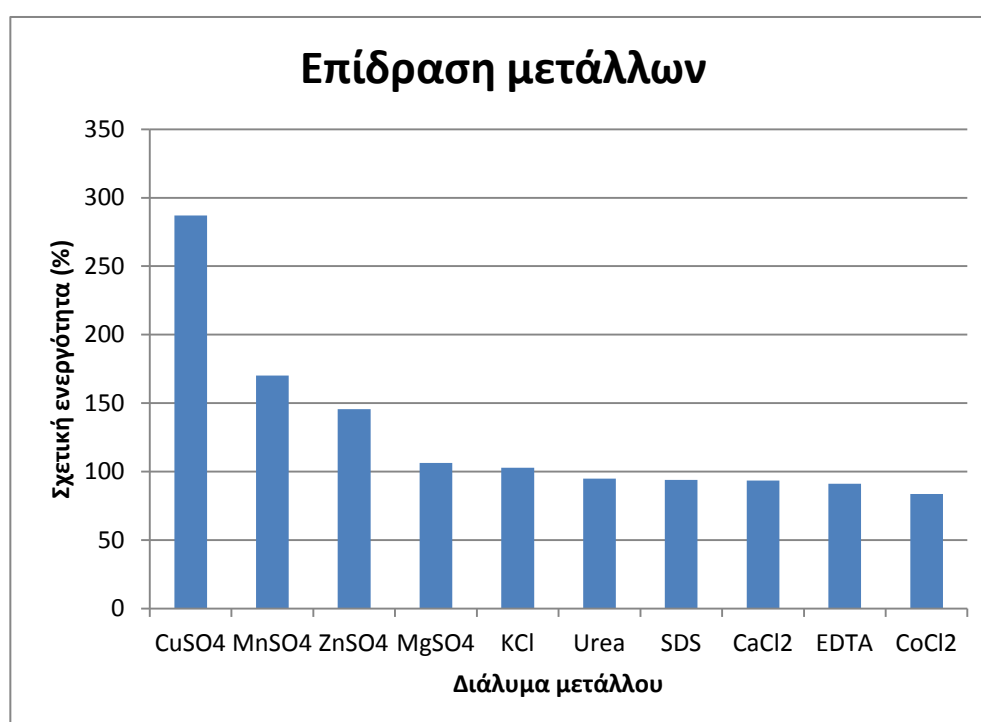
### 3.3 Επίδραση μετάλλων και ιόντων στην ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης

Εξετάστηκε η επίδραση διαφόρων διαλυμάτων μετάλλων και ιόντων συγκέντρωσης 10mM στην ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης. Τα μέταλλα και τα ιόντα μετάλλων των οποίων η επίδραση στη δράση του ανασυνδυασμένου ενζύμου μελετήθηκε, είναι: **Zn<sup>2+</sup>** (χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Zn SO<sub>4</sub>), **Co<sup>2+</sup>** (διάλυμα CoCl<sub>2</sub>), **EDTA**, **Urea**(CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), **SDS**, **Cu<sup>2+</sup>** ( διάλυμα CuSO<sub>4</sub>), **Mn<sup>2+</sup>** (διάλυμα MnSO<sub>4</sub>), **Ca<sup>2+</sup>** (διάλυμα CaCl<sub>2</sub>), **K<sup>+</sup>** (διάλυμα KCl) και **Mg<sup>2+</sup>** (διάλυμα MgSO<sub>4</sub>) και η διαδικασία έγινε όπως περιγράφεται στην ενότητα Μέθοδοι και Υλικά, §3.6. Από τη διαδικασία αυτή, μετρήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου σε υπόστρωμα p-β-NPG σε θερμοκρασία 50 °C απουσία μετάλλου (και η μέτρηση αυτή αποτελεί το δείγμα ελέγχου και αντιστοιχεί σε ενεργότητα 100%) και η ενεργότητα του ενζύμου σε υπόστρωμα p-β-NPG σε θερμοκρασία 50 °C παρουσία των διαλυμάτων μετάλλων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων φαίνονται στον πίνακα και το διάγραμμα που ακολουθεί:



Διάλυμα (συγκέντρωση 10m M)	Σχετική ενεργότητα (%)
CuSO <sub>4</sub>	286,95
MnSO <sub>4</sub>	170,07
ZnSO <sub>4</sub>	145,57
MgSO <sub>4</sub>	106,34
KCl	102,82
Urea	94,83
SDS	93,89
CaCl <sub>2</sub>	93,54
EDTA	91,26
CoCl <sub>2</sub>	83,68

**Πίνακας 6:** επίδραση διαλυμάτων μετάλλων στην ενεργότητα του ενζύμου



**Διάγραμμα 5:** επίδραση διαλυμάτων μετάλλων στην ενεργότητα του ενζύμου

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, παρουσιάστηκε σχετικά μικρή αναστολή του ενζύμου από τα Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, EDTA, Urea και SDS, ενώ παρουσιάστηκε ενεργοποίηση του ενζύμου από τα ιόντα Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> και Cu<sup>2+</sup>. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για β-γλυκοζιδάσες που απομονώθηκαν από τους οργανισμούς *Aspergillus fumigatus* Z5 [Liu et al, 2012], *Aspergillus terreus* [Workman et al, 1982] και *Neocalimastix patriciarum* [Chen et al, 2012].

### 3.4 Αναστολή της δράσης της β-γλυκοζιδάσης

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση ως αναστολέων, διαφόρων συγκεντρώσεων D-γλυκόζης (από 0 έως 25mM), D-ξυλόζης (από 0 έως 10 mM) και

D-γλυκονικού οξέος (από 0 έως 10 mM) στην ικανότητα της β-γλυκοζιδάσης να υδρολύει το υπόστρωμα p-β-NPG.

### 3.4.1 Αναστολή από D-γλυκόζη

Το ποσοστό της αναστολής της δράσης της β-γλυκοζιδάσης από τη γλυκόζη αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των β-γλυκοζιδασών, καθώς η αναστολή παίζει αρνητικό ρόλο στην ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης στην βιομηχανική παραγωγή. [Korotkova et al, 2009]. Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης έχει αποδειχθεί ανασταλτική για πολλές β-γλυκοζιδάσες καθώς αποκλείει το υπόστρωμα από το ενεργό κέντρο ή εμποδίζει την απελευθέρωση του υδρολυμένου υποστρώματος [Yeoman et al, 2010].

Η επίδραση της D-γλυκόζης στην δράση του ενζύμου μελετήθηκε σε υπόστρωμα p-β-NPG συγκέντρωσης 1mM παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων γλυκόζης (από 0 έως 25 mM), σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών –φωσφορικών 100 mM pH =5.0 και ποσότητας ενζύμου 0,0128 mg/mL. Οι αντιδράσεις αφέθηκαν να διεξαχθούν στο πολυφωτόμετρο Microplate Spectrophotometer System, για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 45°C, ενώ παράλληλα, καταγραφόταν η απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 410nm. Με βάση αυτές τις μετρήσεις, δημιουργήθηκε καμπύλη, η κλίση της οποίας, αντιστοιχεί στην αύξηση της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου. Πολλαπλασιάζοντας αυτή την τιμή της κλίσης επί την κλίση της πρότυπης καμπύλης της π-νιτροφαινόλης, βρίσκεται η αύξηση της συγκέντρωσης της π-νιτροφαινόλης στο δείγμα ανά το χρόνο και από εκεί παίρνουμε αρκετά στοιχεία για την αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου όσο περνάει ο χρόνος. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος στον υπολογιστή βρέθηκαν οι σταθερές Km και Vmax του ενζύμου για το υπόστρωμα του 4-νιτροφαινυλ-γλυκοκυρανοζίτη. Τέλος, έγινε προσαρμογή των αποτελεσμάτων στην εξίσωση Michaelis–Menten ώστε να υπολογιστούν τελικά οι κινητικές παράμετροι Km, Vmax και Ki, με χρήση του προγράμματος GraFit, μέσω του οποίου υπολογίζεται και η τυπική απόκλιση της κάθε παραμέτρου. [Leatherbarrow, 1998] [Kakkar et al. ,1999] Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των παραμέτρων είναι:

$$K_{m,app} = K_m * (1 + [I]/K_i) \text{ και τελικά: } K_i = [I] * K_m / (K_{m,app} - K_m)$$

Από την παραπάνω διαδικασία υπολογίστηκε η σταθερά αναστολής (Ki) από την D- γλυκόζη, η οποία είναι ίση με 282 μM. Προέκυψε δηλαδή, ότι η D-γλυκόζη δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας της δράσης της β-γλυκοζιδάσης. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς είναι γνωστό ότι η β-γλυκοζιδάση αποτελεί παράγοντα περιορισμού της ταχύτητας των αντιδράσεων της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης και παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία στην αναστολή από D-γλυκόζη.

### 3.4.2 Αναστολή από D-ξυλόζη

Με τη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω, υπολογίστηκε η σταθερά αναστολής (Ki) της δράσης της β-γλυκοζιδάσης από την D-ξυλόζη, η οποία βρέθηκε

ίση με 30  $\mu\text{M}$ , αρκετά μικρότερη (περίπου 9 φορές) από την αντίστοιχη σταθερά για την γλυκόζη.

### 3.4.3 Αναστολή από γλυκονικό οξύ

Στην παρούσα εργασία, αρχικά παρασκευάστηκε γλυκονικό οξύ με ήπια οξειδωση της D-γλυκόζης προς  $\beta$ -γλυκονο- $\delta$ -λακτόνη και γλυκονικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια καθαρίστηκε και ξηράνθηκε (Μέθοδοι και Υλικά, §3.7.2). Η ποσότητα του γλυκονικού οξέος που παράχθηκε ήταν 1,58g.

Ακολούθως, η επίδραση του γλυκονικού οξέος στην ικανότητα της  $\beta$ -γλυκοζιδάσης να υδρολύει το υπόστρωμα  $p$ - $\beta$ -NPG, εξετάστηκε για διαφορετικές συγκεντρώσεις D-γλυκονικού οξέος από 0 έως 10 mM, με τη μέθοδο που αναφέρεται και παραπάνω και η σταθερά αναστολής βρέθηκε ίση με 22  $\mu\text{M}$  (περίπου 13 φορές μικρότερη από την αντίστοιχη τιμή για την D-γλυκόζη). Βρέθηκε επίσης ότι πρόκειται για ανταγωνιστική αναστολή, ενώ το γεγονός ότι μετρήθηκε μικρή τιμή της σταθεράς  $K_i$ , συνεπάγεται ότι το ένζυμο είναι σχετικά ανθεκτικό απέναντι σε αυτό τον αναστολέα.

Αντίστοιχες τιμές σταθερών αναστολής ( $K_i$ ) της  $\beta$ -γλυκοζιδάσης από την D-γλυκόζη, την D-ξυλόζη και το γλυκονικό οξύ, μετρήθηκαν για  $\beta$ -γλυκοζιδάσες που απομονώθηκαν από τους μικροοργανισμούς *Aspergillus oryzae* [Langston et al., 2006], *Fusarium oxysporum* [Christakopoulos et al., 1994], *Thermoascus aurantiacus* [Parry et al., 2001] και άλλους. Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι η D-γλυκόζη αποτελεί ισχυρότερο αναστολέα της δράσης της  $\beta$ -γλυκοζιδάσης, σε σχέση με τη D-ξυλόζη και το γλυκονικό οξύ, καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές σταθεράς αναστολής ( $K_i$ ). Η διαφορά αυτή οφείλεται στη διαφορετική δομή των τριών ουσιών ή σε τυχόν ανεπιθύμητες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. [Langston et al., 2006]

Ακόμα, όπως προκύπτει και από τη βιβλιογραφία, φαίνεται πως η αναστολή της δράσης της  $\beta$ -γλυκοζιδάσης από τις παραπάνω ουσίες, ανήκει στην κατηγορία της ανταγωνιστικής αναστολής, για τις περισσότερες  $\beta$ -γλυκοζιδάσες που έχουν μελετηθεί [Gueguen et al, 1995, Saha et al., 1996].

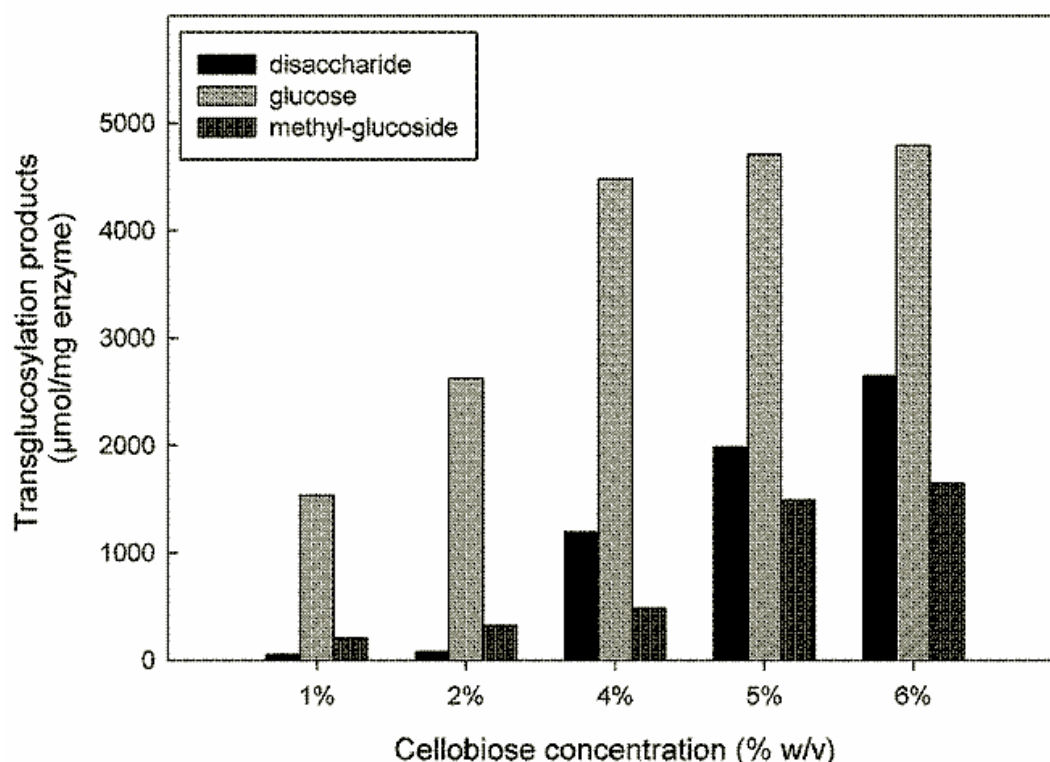
## 4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΡΑΝΣΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ

Η μελέτη της αντίδρασης τρανσγλυκοζυλίωσης με τη συμμετοχή της  $\beta$ -γλυκοζιδάσης είναι αρκετά σημαντική, καθώς η διεξαγωγή της αντίδρασης αυτής σε βιομηχανικές διεργασίες μειώνει την τελική συγκέντρωση του επιθυμητού προϊόντος της σακχαροποίησης της κυτταρίνης, όμως ταυτόχρονα η αντίδραση αυτή μπορεί να παράξει χρήσιμα προϊόντα (διαφορετικούς ολιγοσακχαρίτες), που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά.

Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε η ενεργότητα της  $\beta$ -γλυκοζιδάσης σε αντιδράσεις τρανσγλυκοζυλίωσης σε μίγματα που περιείχαν μεθανόλη 5M, 0.02%  $\text{NaN}_3$  και διαφορετικές συγκεντρώσεις κελλοβιόζης (1, 2, 4, 5 και 6% w/v) σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών, pH 5.0 και 64  $\mu\text{g}$  ενζύμου. Τα δείγματα

των αντιδράσεων επώαστηκαν σε θερμοκρασία 50°C , ενώ λαμβάνονταν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα για 5 ώρες. Η κελλοβιόζη, επιλέχθηκε ως δότης καθώς αποτελεί το φυσικό υπόστρωμα για τη β-γλυκοζιδάση, ενώ η μεθανόλη αποτελεί ένα σχετικά ισχυρό πυρηνόφιλο, αναμίξιμο με το νερό. Επιλέχθηκε συγκέντρωση μεθανόλης 5M καθώς από προηγούμενη μελέτη αποδείχθηκε ότι αποτελεί τη βέλτιστη συγκέντρωση μεθανόλης για τη σύνθεση μεθυλο-D-γλυκοζιδών. (βλ. Μέθοδοι και Υλικά, §4). Η ανάλυση των προϊόντων έγινε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής ακρίβειας (HPLC) Shimadzu LC-20AD, με στήλη ανταλλαγής ιόντων Macherey-Nagel CC 250 x 4.6 mm Nucleosil 100-5 NH<sub>2</sub> σε θερμοκρασία 40 °C. Το σύστημα περιέχει ανιχνευτή με βάση το δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A) και η κινητή φάση (διαλύτης) αποτελείται από διάλυμα ακετονιτριλίου και νερού (87:13 v/v), ενώ τα σάκχαρα εκλούσθηκαν με ρυθμό ροής 1 ml/min. Η ποσοτικοποίηση των προϊόντων έγινε με βάση της κορυφές των διαγραμμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων μεθυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτη, D- γλυκόζης και κελλοβιόζης.

Η ανάλυση των προϊόντων έδειξε απότομη αύξηση της σύνθεσης μέθυλο-D-γλυκοζιδών για συγκεντρώσεις κελλοβιόζης από 4% w/v και άνω. Η τιμή της σταθεράς Michaelis–Menten (K<sub>m</sub>) της αντίδρασης υπολογίστηκε 91mM.



**Διάγραμμα 6:** απεικόνιση των προϊόντων της αντίδρασης τρανσγλυκοζυλίωσης με τη συμμετοχή της β-γλυκοζιδάσης για διαφορετικές συγκεντρώσεις κελλοβιόζης. Η κελλοβιόζη, επιλέχθηκε ως δότης καθώς αποτελεί το φυσικό υπόστρωμα για τη β-γλυκοζιδάση, ενώ η μεθανόλη αποτελεί ένα σχετικά ισχυρό πυρηνόφιλο, αναμίξιμο με το νερό.

Παρόμοια αποτελέσματα, δηλαδή απότομη αύξηση της σύνθεσης μέθυλο-D-γλυκοζιδών από μια ορισμένη συγκέντρωση του δότη (κελλοβιόζη) και άνω έχει

παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις β- γλυκοζιδασών, όπως αυτές που απομονώθηκαν από τους οργανισμούς *Thermoascus aurantiacus* [Parry et al., 2001], *Fusarium oxysporum* [P. Christakopoulos et al., 1994] και άλλους.

Έχει αναφερθεί ότι ένα ένζυμο που παραμένει σταθερό, παρουσία αλκοολών και καταλύει αποτελεσματικά τη μεταφορά γλυκόζης σε ένα ευρύ φάσμα αλκοολών είναι κατάλληλο για τη σύνθεση μέθυλο-D-γλυκοζιδών. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω φαίνεται ότι η β-γλυκοζιδάση από το *M. thermophila* διαθέτει τις παραπάνω ιδιότητες και φαίνεται να είναι ιδανικό ένζυμο για τη σύνθεση μέθυλο-D-γλυκοζιδών .

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Bergquist, P.,L.; Te'o, V.,S.,J.; Gibbs, M.,D.; Curah, N.,C. & Nevalainen, K.,M.,H (2004). Recombinant enzymes from thermophilic micro-organisms expressed in fungal hosts. *Biochemical Society Transaction*, Vol. 32, No.2 (April, 2004), pp.293–297

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding , *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.

Bronnenmeier, K. & Staudenbauer, W. (1990) Cellulose hydrolysis by a highly thermostable endo-1,4-glucanase (Avicelase I) from *Clostridium stercorarium*. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 12, No.6 (June, 1990), pp. 431–436

Cai Y. J., Buswell A. J., Chang T.S. , (1998)  $\beta$ -Glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *volvariella volvacea*, *Enzyme and Microbial Technology* 22:122-129, 1998

Chen H.L., Chen Y.C.,Lu M.Y., Chang J.J.,Wang H.T., Ke H.M., Wang T.Y., Ruan S.K, Wang T.Y.,Hung K.Y., Cho H.Y.,Lin W.T.,Shih M.C. and Hsiung Li W.H, (2012) A highly efficient b-glucosidase from the buffalo rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5, *Biotechnology for Biofuels*, 5:24

Chen H., Li X., Ljungdahl G.L. ,(1994) Isolation and Properties of an Extracellular 1-Glucosidase from the Polycentric Rumen Fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2, *Applied and environmental microbiology*, Vol. 60, No. 1, p. 64-7

Christakopoulos P.,Goodenough P.W.,Kekos D., Macris B.J., Clayssens M., Bhat M.K. (1994) Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Biochemistry*, September 1994, vol. 224, no. 2, p. 379-385.

Christakopoulos P., Bhat K.M., Kekos D., Macris J.B., (1994) Enzymatic synthesis of trisaccharides and alkyl  $\beta$ -D-glucosides by the transglycosylation reaction of  $\beta$ -glucosidase from *Fusarium oxysporum*, *Int. J. Biol. Macromol.* Volume 16 Number 6

Dai Z, Hooker BS, Anderson DB, Thomas SR (2000) Expression of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase E1 in transgenic tobacco: biochemical characteristics and physiological effects, *Transgenic Research* 9: 43-54.

Dhiman S.S., Sharma J., Battan B., (2010) Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review, *BioResources* 3 (4), 1377-1402

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

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acids Research* 16: 6127-6145.

Duff SJB, Murray WD (1996) Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology* 55: 1-33

Elshafei A.M., Hassan M.M., Morsi M.N., Elghonamy H.D.,(2011) Purification and some kinetic properties of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus terreus* NRRL 265, African Journal of Biotechnology Vol. 10(84), pp. 19556-19569

Forsberg Z, Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Bunæs A. C, Stenstrøm Y., MacKenzie A., Sørli M., Horn S. J., Eijsink V. G.H. (2011) Cleavage of cellulose by a CBM33 protein, Protein Science

Gehl J., (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research, Acta Physiol Scand 2003, 177, 437–447

Good E. N., Winget D.G., Winter W., Connolly T.N., Seikichi I., Singh R.M. (1966) Hydrogen Ion Buffers for Biological Research .*Biochemistry* 5 (2): 467–77.

Gueguen Y, Chemardin P, Arnaud A, Galzy P (1995). Purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Botrytis cinerea*. Enzyme Microbiol. Technol. 78: 900-906.

Hayes J.D., (2009) An examination of biorefining processes, catalysts and challenges, Catalysis Today 145 , 138–151

Henrissat B., (1994) Cellulases and their interaction with cellulose, CELLULOSE 1,169-196

Hildén L, Johansson G (2004) Recent developments on cellulases and carbohydrate binding modules with cellulose affinity. *Biotechnology Letters* 26: 1683 -1693

Joseleau J.P., Comtat J. , Ruel K., (1992) Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls, Xylans and Xylanases, Elsevier Science Publishers

Kakkar T., Boxenbaum H., Mayersohn M. (1999) Estimation of  $K_i$  in a competitive enzyme inhibition model: comparisons among three methods of data analysis, Drug Metabolism and disposition, Vol. 27, No. 6, 756-762

Kaur G, Kumar S, Satyanarayana T (2004) Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis, Bioresource Technology 94: 239-43.

Korotkova O. G., Semenova M. V., Morozova V. V., Zorov I. N., Sokolova L. M., Bubnova T. M., Okunev O. N., Sinitsyn A. P, (2009) Isolation and Properties of Fungal  $\beta$  Glucosidases, Biochemistry (Moscow) Vol. 74 No. 5

Kuhad C.R., Gupta R., Singh A., (2011) Microbial Cellulases and Their Industrial Applications, Enzyme Research, Volume 2011

Laemmli UK ( 1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (5259): 680–685

Langston J., Sheehy N., Xu F., (2006) Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3  $\beta$ -glucosidase, Biochimica et Biophysica Acta 1764 , p. 972–978

Leatherbarrow J. R. (1998) GraFit User's Guide Version 4.0, Erithacus Software Limited

Liu D., Zhang R., Yang X., Zhang Z., Song S., Miao Y., Shen Q., (2012), Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33, *Microbial Cell Factories*, 11:25

Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:506–577.

Maheshwari R., Bharadwaj G., Bhat K. M. , (2010) Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 64, No. 3 , p. 461–488

Mielenz R.J., (2001) Ethanol production from biomass: technology and commercialization status, *Current Opinion in Microbiology*, Volume 4, Issue 3, Pages 324–329

Miller L.G., (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.

Murray, P., Aro, N., Collins, C., Grassick, A., Penttila, M., Saloheimo, M., et al. (2004). Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3-glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Protein Expression and Purification*, 38, 248–257.

Nguyen Q. (1998), Milestone Completion Report: Evaluation of a Two-Stage Dilute Sulfuric Acid Hydrolysis Process, Internal Report, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.

Pal S., Banik P.S., Ghorai S., Chowdhury S., Khowala S., (2010) Purification and characterization of a thermostable intra-cellular  $\beta$ -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*, *Bioresource Technology* 101 ,2412–2420

Palonen H., Tjerneld F., Zacchi G., Tenkanen M., (2004) Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin, *Journal of Biotechnology* 107 65–72

Park A., Hong H. J., Kim J.J., Yoon J.J., (2012) Biochemical Characterization of an Extracellular  $\beta$ -Glucosidase from the Fungus *Penicillium italicum*, Isolated from Rotten Citrus Peel, *Mycobiology* 40(3) : 173-180

Parry N. J., Beever E.D., Owen E., Vandenberghe I., Van Beeumen J. Bhat.M., (2001) Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable  $\beta$ -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus* , *Biochem. J.* 353, 117-127

Pérez S., Samain D., (2010) Structure and Engineering of Celluloses, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* , Volume 64, 25–116

Potvin G., Ahmad A., Zhang Z., (2012) Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review, *Biochemical Engineering Journal* 64 , 91– 105

Roberts R. J., (1976), *Restriction Endonucleases*, CRC Critical Reviews in Biochemistry, Cold Spring Harbor Laboratory



Rye S.C., Withers G.S., (2000) Glycosidase mechanisms, *Current Opinion in Chemical Biology* 2000, 4:573–580

Saha B.C. (2003) Hemicellulose bioconversion, *Journal of industrial microbiology and biotechnology* 30: 279-91

Saha BC, Bothast RJ (1996). Production, purification, and characterization of a novel highly glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Candida peltata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3165-3170

Sharma A, Khare SK, Gupta MN (2001) Hydrolysis of rice hull by cross linked *Aspergillus niger* cellulose *Bioresource technology* 78: 281–284.

Showalter M.A. (1993) Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins, *The Plant Cell*, Vol. 5, 9-23

Singh A, Kumar PK (1991) *Fusarium oxysporum*: status in bioethanol production *Critical reviews in biotechnology* 11: 129-47.

Souza H.M. F, Nascimento V.C., Rosa J.C., Masui D.C., Leone A.F., Jorge A.J., Furriel R., (2010) Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*, *Process Biochemistry* 45 272–278

Stoscheck M. C., (1990) Quantitation of Protein, *Methods in Enzymology* 182

Sun Y., Chen J., (2001) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource Technology* 83 , 1–11

Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H., & Uozumi, T. (1999). Molecular cloning and expression of the novel fungal  $\beta$ -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *Journal of Biochemistry*, 125, 728–736.

Uffen RL (1997) Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19: 1-6.

Verardi A., De Bari I., Ricca E., Calabro V., Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives

Vorwerk S., Somerville S., Somerville C., (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance, *Trends in plant science*, Volume 9, Issue 4, Pages 203–209

Winzerling J. , Berna P., Porath J. (1992) How to Use Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 4, 4-13

Workman W., Day D., (1982) Purification and Properties of  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus terreus*, *Applied and environmental microbiology*, Vol. 44, No. 6, p. 1289-1295

XIN, Z., Yinbo, Q., Peiji, G., 1993. Acceleration of ethanol production from paper mill waste fiber by supplementation with  $\beta$ -glucosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 62-65.

Yang S., Hua C., Yan Q., Li Y., Jiang Z., (2013) Biochemical properties of a novel glycoside hydrolase family 1  $\alpha$ -glucosidase (PtBglu1) from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Pichia pastoris* *Carbohydrate Polymers* 92 , 784– 791

Yeoman J C., Han Y., Dodd D., Schroeder M C., Mackie R. I., Cann I.K. O. (2010) Chapter 1: Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry ,*Advances in Applied Microbiology*, Volume 70

Zhang YHP, Lynd LR (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems ,*Biotechnology and Bioengineering* 88: 797-824.

Zverlov, V.; Mahr, S.; Riedel, K. & Bronnenmeier, K. (1998). Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from the extreme thermophile *Anaerocellum thermophilum* with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains. *Microbiology*, Vol. 143, (Part2), pp. 3537–3542

Ανανεώσιμες πηγές ενέργειας–Η θέση τους στο νέο ενεργειακό τοπίο της χώρας και στην περιοχή της Θεσσαλίας (ΤΕΕ– ΚΔΘ, Λάρισα, 29 Νοεμ.–1 Δεκεμ., 2007)

ΚΑΠΕ, Ετήσια Έκθεση 2009