

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

ATGGCGAGAACGCTTCGATACCTGCTGTGCGGCATCCTCGCGTTAGCGGGCGGGCAGCAATGCGGTTCCCG
CAGCCCGTGGTTCGACCCGAGCGGCCCGGCGGCAGAGCCAGCACTAGTGCAGACGACATACGAGGCCGA
AGATGCCATCCTGAGCGGAACCACGGTCGATACCGCTCAGGAGGGATATACCGGATCCGGTTACGTGACC
GGTTTCGATGAGGCGAGCGACAAGATCACGTTTGAAGTTCGAGAGCGAGGCCACTAAGCTCTATGACCTCA
GCATCCGCATCGCGGCCATCTACGGCGACAAACACACGACGGTGGTGTGAACGGCGGGGCGAGCAGCGA
CGTGTCCCTCCCGGCCGCGACACGTGGGTTCGATGTCCCGGCCGAGCAGGTCCCTCCTGAACGAGGGCGCC
AACACGATCGAGATTGTGAGCAACTGGGGGTGGTACCTCGTTCGACTCCATCACGCTCACGCCCTCGGCGC
CGCGGCCCGAGCACCAGATCAACCGGTCCCTCAACAACCCGTCGGCCGACGCGAGCGCCAGGGCCCTGTA
CGACTACCTGCGCTCCATCTACGGCAAGAAGATCCCTCGCGGGCCAGCAGGACCTGACCTGGGCCGACTAC
GTGACCCCAH έκφραση μιας GH26 μαννανάσης από τον *Myceliophthora thermophila* και ο
TCGAGCGGGGGACCAAGGGCACGTTCGGTTCGAGGAGGCATCACGCACGCCGAGCGCGGGCGGCATCGTCTC
ρόλος της στην αποδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας.
GGCCCTCTGGCAGTCCATCTCGCGGGCCAGCAGGACCTGACCTGGGCCGACTAC
TACACGGACGCGACCGACTTCGACGTCGCCGCCGCGCTGAGCTCCACCGACAACGCAAACCTACACCCTCC
TGCTGCGCGACATCGACGCCATCGCCGTCCAGCTCAAGCGCCTCCGGGACGCCCGCGTGCCTGCTCCTTG
GCGGCCCTCCACGAGGCCGAGGGCGGCTGGTTCGGTGGGGAGCCAAGGGCCCGGACCCGGCCAAGCAG
CTCTACGCCCTGCTCTACGACCGCCTCGTCAACCACCACGGCATCAACAACCTCATCTGGGTCTGGAAC
CGCTCTCGCCCGACTGGTATCCCGGCGACGACACGGTTCGACATCCTGAGCGCGGACGTCTACGCTCAGGG
GAACGGCCCAATGTCTACCCAGTACAACCAGCTCATCGACCTCGGCAAGGATAAGAAGATGATCGCCGCG
GCCGAGGTGGGCGCCGCGCCGCTTCGGGATCTGCTGCAGGCCTACGAAGCCATTGGTTGTGGTTTCGCCG
TCTGGGGCGACACGTTTCATAAACAACGCCGAGTGGAACTCGCCCGAGGTCTGAAGACGGTCTACACCAG
CGACTACGTCCTCACCCCTGGACGAGATTGAGGGCTGGCAGGATTTCGTGA

Περικλής Πετρόπουλος

Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος (Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π.)

ΑΘΗΝΑ 2015

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015, στα πλαίσια της ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μου στη σχολή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο της διπλωματικής μου εργασίας, Επίκουρο Καθηγητή Ε.Μ.Π. κ. Ευάγγελο Τόπακα, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με το θέμα αυτό στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, για την υποστήριξη και την καθοδήγηση του στην επίλυση των αποριών, αλλά και των προβλημάτων που προέκυψαν.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Κωνσταντίνο Κατσιμπουρα για την αδιάλειπτη προθυμία και συνεισφορά του σε όλα τα στάδια της εκτέλεσης και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμη, ευχαριστίες αρμόζουν και στους υποψηφίους διδάκτορες και εργαζόμενους του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για την βοήθεια και το άριστο κλίμα που παρείχαν κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αδιάκοπη υποστήριξη που μου παρείχαν καθ'όλη την διάρκεια των σπουδών μου μέχρι σήμερα.

Περικλής Πετρόπουλος

Αθήνα 2015

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	1
Περίληψη	4
Abstract.....	5
1. Θεωρητικό μέρος.....	1
1.1 Η λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα	2
1.2 Η ενζυμική αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας.....	8
1.2.1 Είδη διεργασιών προκατεργασίας.....	9
1.2.2 Ένζυμα που υδρολύουν την λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα	10
1.2.3 Η οικογένεια GH26.....	11
1.3 Ο μικροοργανισμός <i>Myceliophthora thermophila</i> και το γονίδιο της <i>MtMan26a</i>	12
1.4 Το σύστημα ετερόλογης έκφρασης με <i>Pichia pastoris</i>	15
1.5 Το πλασμίδιο PICZα	17
2. Πειραματικό Μέρος.....	20
2.1 Υλικά.....	21
2.1.1 Μικροοργανισμοί.....	21
2.1.2 Χημικά Αντιδραστήρια.....	23
2.1.3 Εμπορικά Ένζυμα	23
2.1.4 Φυσικά υποστρώματα.....	23
2.1.5 Τυποποιημένα πακέτα μεθόδων (kit).....	24
2.1.6 Στήλες Χρωματογραφίας.....	24
2.1.7 Θρεπτικά μέσα	24
2.1.8 Ρυθμιστικά Διαλύματα.....	26
2.1.9 Συσκευές και όργανα	28
2.2 Μέθοδοι.....	29
2.2.1 Ηλεκτροφορητικές τεχνικές.....	29
2.3 Μετασχηματισμός, παραγωγή και παραλαβή του ενζύμου	41
2.3.1 Μετασχηματισμός του γονιδίου σε κύτταρα <i>P. pastoris</i>	41
2.3.2 Καλλιέργεια και παραλαβή καθαρού ενζύμου.	43

2.4	Χαρακτηρισμός ενζύμου	45
2.4.1	Παραγόμενη ποσότητα και καθαρότητα ενζύμου	45
2.4.2	Βέλτιστο pH.....	46
2.4.3	Βέλτιστη Θερμοκρασία.....	46
2.4.4	Θερμοκρασιακή σταθερότητα (Thermal Stability).....	47
2.4.5	Σταθερότητα σε pH (pH Stability).....	47
2.4.6	Κινητική δράσης ενζύμου.....	48
2.4.7	Δραστηκότητα σε διαφορετικά υποστρώματα.....	48
2.4.8	Έλεγχος Δέσμευσης από κρυσταλλική κυτταρίνη.....	49
2.4.9	Συνεργιστική δράση σε φυσικά υποστρώματα.....	49
3.	Αποτελέσματα	52
3.1	Μετασχηματισμός <i>P.pastoris</i>	53
3.2	Ανάπτυξη καλλιέργειας-Παραγόμενη ποσότητα και καθαρότητα ενζύμου	55
3.3	Βέλτιστο pH λειτουργίας	57
3.4	Βέλτιστη Θερμοκρασία λειτουργίας.....	58
3.5	Θερμοκρασιακή σταθερότητα (Thermal Stability).....	59
3.6	Σταθερότητα σε pH (pH Stability).....	60
3.7	Ισοηλεκτρικό σημείο πρωτεΐνης	61
3.8	Κινητική δράσης ενζύμου	62
3.9	Δραστηκότητα σε διαφορετικά υποστρώματα	63
3.10	Έλεγχος Δέσμευσης από κρυσταλλική κυτταρίνη.....	63
3.11	Έλεγχος συνεργιστικής ενεργότητας σε φυσικά υποστρώματα.....	64
4.	Συμπεράσματα.....	66
4.1	Σύνοψη	67
4.2	Μελλοντικές προκλήσεις	68
5.	Βιβλιογραφία	69

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση και απομόνωση μιας μαννανάσης του ασκομύκητα *Myceliophthora thermophila* (NCBI Gene ID: 11508627), ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της και η συνεργιστική της δράση με εμπορικά κυτταρινολυτικά ένζυμα σε προκατεργασμένο φυσικό υπόστρωμα Lignocel.

Η έκφραση πραγματοποιήθηκε με συνθετικό, codon-optimized, γονίδιο, το οποίο προσαρτήθηκε σε πλασμίδιο pPICZαC, αυξήθηκε και μετασχηματίστηκε σε ζύμη *Pichia pastoris* (στέλεχος X33). Ακολούθησε καλλιέργεια των μετασχηματισμένων στελεχών για παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας της μαννανάσης. Η μαννανάση απομονώθηκε από την καλλιέργεια με χρήση στήλης συγγένειας ιόντων κοβαλτίου. Η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) όπου επιβεβαιώθηκε η παρουσία μόνο της επιθυμητής πρωτεΐνης και το μοριακό βάρος της παραγόμενης πρωτεΐνης προσδιορίστηκε στα 60 kDa.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη της δράσης της μαννανάσης πάνω σε υπόστρωμα γαλακτομαννάνης χαρουπιού (συγκέντρωσης 0.5%) σε διαφορετικές συνθήκες pH και θερμοκρασίας, καθώς και η σταθερότητα της σε περιβάλλοντα διαφορετικών pH και θερμοκρασιών. Αποδείχθηκε ότι η μέγιστη δραστηριότητα της εμφανίζεται σε pH 6 και θερμοκρασία 60 °C, ενώ είναι αρκετά σταθερή σε ένα εύρος pH 4-11 (βέλτιστη σταθερότητα pH 8). Επίσης, παρουσιάζει μεγάλη θερμοκρασιακή σταθερότητα (>95% στις 24 h) για θερμοκρασίες κάτω των 40 °C, αρκετά καλή θερμοκρασιακή σταθερότητα σε θερμοκρασία 50 °C (>85% στις 24h). Η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται σημαντικά για θερμοκρασίες άνω των 60 °C (χρόνος ημιζώης 5 h στους 60 °C, 1 h στους 65 °C). Εξετάστηκε η κινητική της ενζυμικής δράσης σε εύρος συγκεντρώσεων του υποστρώματος. Ακόμη, ερευνήθηκε η δράση του ενζύμου σε διαφορετικά υποστρώματα που απαντώνται στην λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα με το ένζυμο να εμφανίζει ισάξια ενεργότητα σε υπόστρωμα γλυκομαννάνης, ενώ δεν παρατηρήθηκε ενεργότητα σε υποστρώματα β-γλουκάνης και ξυλάνης σημύδας. Η δέσμευση του ενζύμου από κρυσταλλική κυτταρίνη μετρήθηκε και ανευρέθηκε ότι είναι μηδαμινή. Η μελέτη της συνεργιστικής δράσης του ενζύμου μαζί με εμπορικά κυτταρινολυτικά ένζυμα έδειξε βελτίωση (~10%) στην απελευθέρωση σακχάρων από υπόστρωμα προκατεργασμένου Lignocel.

Abstract

The present diploma thesis is concerned with the expression and purification of a mannanase from the ascomycota *Myceliophthora thermophila* (NCBI Gene ID: 11508627), its biochemical characterization and synergistic action with commercial cellulolytic enzymes on a natural substrate of pretreated Lignocel.

The expression was performed from a synthetic codon-optimized gene, inserted in a pPICZ α C vector, multiplied and transformed in the yeast *Pichia pastoris* (X33 strain). The yeast was then cultivated for production of sufficient quantities of the target mannanase. The enzyme was purified using a cobalt metal affinity chromatography column. The result of the purification was evaluated using polyacrylamide gel electrophoresis where it was confirmed that only the desirable enzyme was present in the solution, with a molecular weight of 60kDa.

The activity of the mannanase was measured in a substrate of carob galactomannan (0.5% concentration) under different conditions of pH and temperature, as well as its long-term stability in environments with said conditions. The optimal conditions for enzyme activity were found to be at pH 6 and a temperature of 60 °C. The enzyme is very stable in a pH range from pH 4 to 11, with its stability quickly decreasing outside this range. Furthermore, it appeared to be thermally stable at temperatures lower than 40 °C (retaining more than 95% of maximum activity over 24 h) and fairly stable at a temperature of 50 °C (>85% of maximum activity over 24 h). The enzyme stability is drastically reduced for temperature over 60 °C (half-life of 5h at 60 °C, 1h at 65 °C). The enzyme kinetic behavior was examined over a range of substrate concentrations. The activity of the enzyme in several different substrates was measured and found to have equivalent activity on glucomannan substrate as in galactomannan. No activity was observed for other substrates such as b-glucan and birch Xylan. The enzyme found to lack any binding ability towards crystalline cellulose (Avicell). The synergistic testing on a pretreated Lignocel substrate with commercially available cellulolytic enzymes resulted in an increase (~10%) in released sugars.

1.Θεωρητικό μέρος

1.1 Η λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα

Οι ανώτεροι φυτικοί οργανισμοί αποτελούν ένα από τα μεγαλύτερα αποθέματα βιομάζας στον πλανήτη Γη. Ένα μεγάλο κομμάτι της ανθρώπινης δραστηριότητας, αν όχι το μεγαλύτερο, περιστρέφεται γύρω από την παραγωγή και την αξιοποίηση προϊόντων που προέρχονται από φυτικούς οργανισμούς. Φυτικά προϊόντα, όπως δημητριακά, όσπρια, φρούτα και λαχανικά, αποτελούν την βασική πηγή τροφής για τον ανθρώπινο πληθυσμό, ενώ άλλα αποτελούν πηγή υλικών (ξύλεια, χαρτί) και καυσίμων (βιοαιθανόλη).

Τις τελευταίες δεκαετίες πραγματοποιείται όλο και μεγαλύτερη έρευνα πάνω στην δυνατότητα παραγωγής καυσίμων από ανανεώσιμες πηγές. Σήμερα υπάρχουν περιοχές όπου δραστηριοποιούνται έντονα στον τομέα της παραγωγής αιθανόλης από φυτά όπως το καλαμπόκι (Η.Π.Α.) ή το ζαχαροκάλαμο (Βραζιλία), τα οποία εμφανίζουν μεγάλη περιεκτικότητα σε εύκολα ζυμώσιμους πολυσακχαρίτες (κυρίως άμυλο) ή απλούστερα σάκχαρα. Τέτοια βιοκαύσιμα αποκαλούνται βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς (first generation biofuels). Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς, όμως, έχουν εγείρει και συνεχίζουν να εγείρουν προβληματισμούς γύρω από την χρήση ενός σημαντικού κομματιού της παραγωγής τροφίμων για παραγωγή καυσίμων, την στιγμή που ένα σημαντικό κομμάτι του ανθρώπινου πληθυσμού βρίσκεται σε κατάσταση υποσιτισμού. Μια απάντηση στους προβληματισμούς αυτούς είναι τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς.

Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς (second generation biofuels) αποτελούν βιοκαύσιμα τα οποία παράγονται από την εκμετάλλευση των παραπροϊόντων της γεωργικής δραστηριότητας. Η βιοαιθανόλη δεύτερης γενιάς, λοιπόν, παράγεται με αξιοποίηση των σακχάρων που βρίσκονται στα μη-ενεργειοφόρα μέρη του φυτού, όπως για παράδειγμα το άχυρο των δημητριακών ή τον κορμό των δέντρων. Τα σάκχαρα αυτά αποτελούν τις δομικές μονάδες του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων. Με την χρήση και αυτού του κομματιού της φυτικής βιομάζας η ποσότητα των σακχάρων που μπορούν να αξιοποιηθούν αυξάνεται δραματικά, αλλά ταυτόχρονα και η πολυπλοκότητα της ανάκτησης τους.

Το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα είναι η εξελικτική απάντηση των φυτών στην αδυναμία τους να μετακινηθούν για να αποφύγουν τις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος τους και τις έλλειψης περίπλοκων ανοσοποιητικών μηχανισμών που θα αντιμετώπιζαν την προσβολή τους από εισβολείς. Η απάντηση αυτή πήρε την μορφή ενός πολύ ανθεκτικού τοιχώματος που καλύπτει τα φυτικά κύτταρα. Αυτή ανθεκτικότητα του κυτταρικού τοιχώματος αποτελεί και την Αχίλλειο

πτέρνα της παραγωγής βιοαιθανόλης δεύτερης γενιάς, αφού γίνεται προσπάθεια να αποδομηθεί μια δομή που εξελίσσεται για εκατομμύρια χρόνια με σκοπό να μην αποδομείται εύκολα!

Το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, και κατά συνέπεια η λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα, αποτελείται, κυρίως, από 3 ομάδες πολυμερών: την κυτταρίνη, τις ημικυτταρίνες και την λιγνίνη. Ένα μικρότερο ποσοστό εκπροσωπείται από τις πηκτίνες και τις δομικές πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος.

Η παρουσία της κυτταρίνης στην βιομάζα από φυτά καταγράφηκε για πρώτη φορά το 1838 από τον Γάλλο χημικό Anselme Payen στο έργο του "Καταγραφές πάνω στην σύσταση των ιστών των φυτών και ξύλων" (Mémoire sur la composition du tissu propre des plantes et du ligneux).

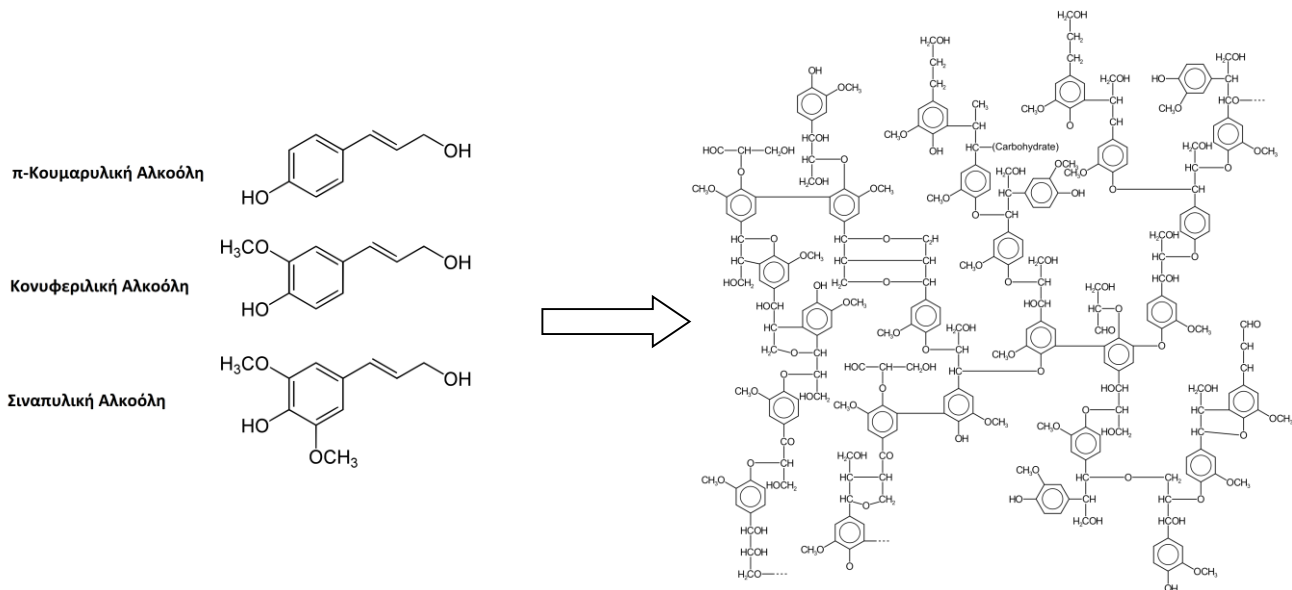
Η κυτταρίνη είναι ένας δυσδιάλυτος σε νερό πολυσακχαρίτης ο οποίος αποτελείται από μονομερή D-γλυκόζης ενωμένα με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ένα μόριο κυτταρίνης μπορεί να αποτελείται από 7000 με 15000 μόρια γλυκόζης. Ως δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος, η κυτταρίνη σχηματίζει μικροϊνίδια μήκους 100-40 000nm με κάθε ινίδιο να περιέχει κατά μέσο όρο 24 μόρια κυτταρίνης τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Η κυτταρίνη στα μικροϊνίδια είναι συνήθως κρυσταλλικής μορφής, αλλά συχνά παρατηρούνται και περιοχές με άμορφη διαμόρφωση (περίπου 30% του συνολικού πολυμερούς). Η κυτταρίνη συνιστά το 38-50% της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας.

Οι ημικυτταρίνες αποτελούν μια ομάδα από ετεροπολυσακχαρίτες με μεγάλο αριθμό πλευρικών διακλαδώσεων, και περιέχουν διαφορετικούς συνδυασμούς μονοσακχαριτών γλυκόζης, μαννόζης, ξυλόζης, ραμνόζης, φουκόζης και αραβινόζης. Η σύσταση τους και η ποσότητα τους στην βιομάζα διαφέρει αναλόγως με την προέλευση της. Μια ημικυτταρίνη λαμβάνει το όνομα της από τον μονοσακχαρίτη που την αποτελεί, λ.χ. ξυλάνη (πολυμερές ξυλόζης), μαννάνη (πολυμερές μαννόζης), αλλά μιας και πολύ σπάνια απαντώνται στην ομοπολυμερική τους μορφή, οι ενώσεις που απαντώνται συχνότερα φέρουν ένα πρόθεμα κάποιου δευτερεύοντος μονοσακχαρίτη, λ.χ. αραβινοξυλάνη και γλυκομαννάνη. Οι ημικυτταρίνες, με πρωτοστατούντες τις ξυλάνες, αποτελούν το 23-32% της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Η λιγνίνη είναι ένα αρωματικό, υδρόφοβο πολυμερές, το οποίο σχηματίζει πολύπλοκα τρισδιάστατα δίκτυα υψηλού βαθμού πολυμερισμού (περισσότερα από 100 000 μονομερή). Μονομερή της λιγνίνης αποτελούν κατά το μεγαλύτερο μέρος υποκατεστημένα φαινυλ-προπάνια (κονυφερυλική, συναφυλική, π-κουμαρυλική αλκοόλη), τα οποία συνδέονται, πέρα από

αναμεταξύ τους, και με γειτονικά μόρια κυτταρίνης και ημικυτταρίνης. Η μεγάλη αυτή διασυνδετικότητα και τρισδιάστατη δομή που εμφανίζει η λιγνίνη, την καθιστά ιδιαίτερα ανθεκτική μηχανικά και χημικά.

Η λιγνίνη συνιστά το 15-25% της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας των ανωτέρων φυτικών οργανισμών, αλλά δεν απαντάται στους απλούστερους φυτικούς οργανισμούς όπως τα φύκια και τα βρύα.



Εικόνα 1-1: Τα μονομερή της λιγνίνης και ένα πιθανό δίκτυο που μπορούν να σχηματίσουν.

Οι πηκτίνες είναι επίσης ετεροπολυμερή μόρια και αποτελούνται κυρίως από α-1,4 γλυκοζιδικά συνδεδεμένα γαλακτουρονικά οξέα. Οι πολυγαλακτουρονικές αλυσίδες έχουν συνήθως πλευρικά προσαρτημένες ραμνόζες, αραβινόζες και γαλακτόζες. Σημαντικό στοιχείο για τον λειτουργία των πηκτινών είναι οι πλευρικές καρβοξυλομάδες των γαλακτουρονικά οξέων, οι οποίες εμφανίζουν εγγύτητα με ιόντα μετάλλων (ιδίως ασβεστίου, Proseus & Boyer, 2008). Χάρη σε αυτές, μπορούν να σχηματίζουν γέφυρες ασβεστίου με άλλες πηκτίνες, αλλά και γλυκοζιδικούς δεσμούς με άλλα στοιχεία του τοιχώματος, αυξάνοντας την ανθεκτικότητά του.

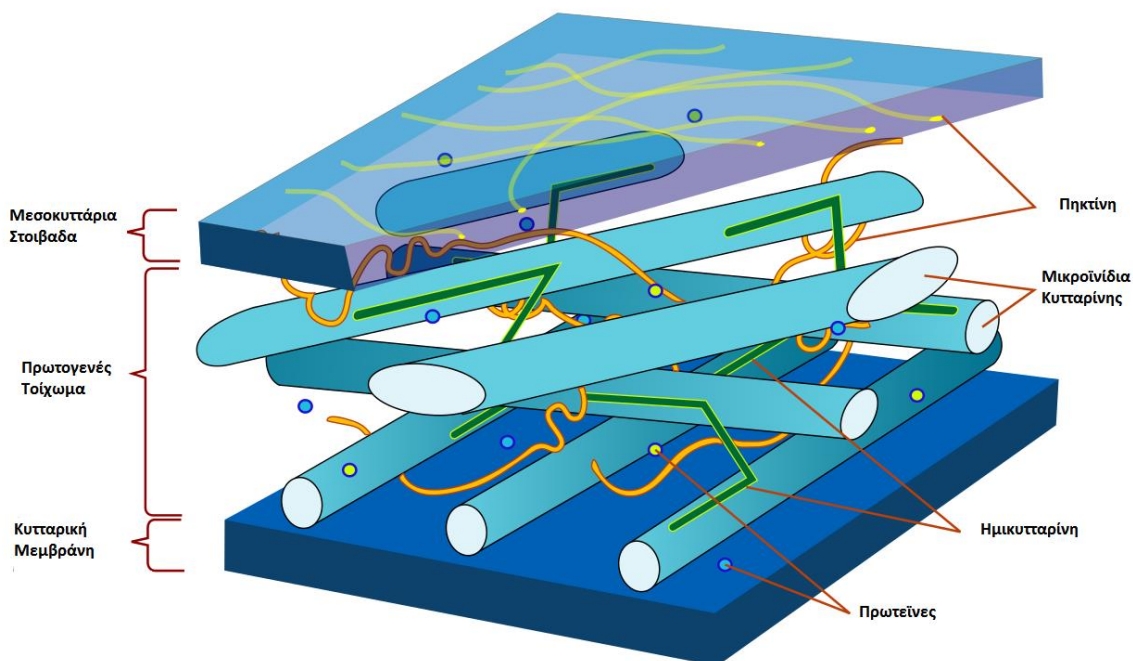
Ενδεικτικά, παρατίθενται οι συστάσεις κάποιων πηγών λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας:

Πίνακας 1-1: Ενδεικτική σύσταση πηγών λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας

Πηγή	Σύσταση % ξηρής βάσης		
	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη
Στέλεχος αραβοσίτου	41	36	18
Σπάδικες αραβοσίτου	41	24	17
Άχυρο ρυζιού	35	25	12
Άχυρο σίτου	40	25	23
Βαγάση σακχαροκάλαμου	40	24	25
Switchgrass	37	20	22
Σκληρό ξύλο	45-47	25-40	20-25
Μαλακό ξύλο	40-45	25-29	30-60
Χαρτοπολτός	50-70	12-20	6-10

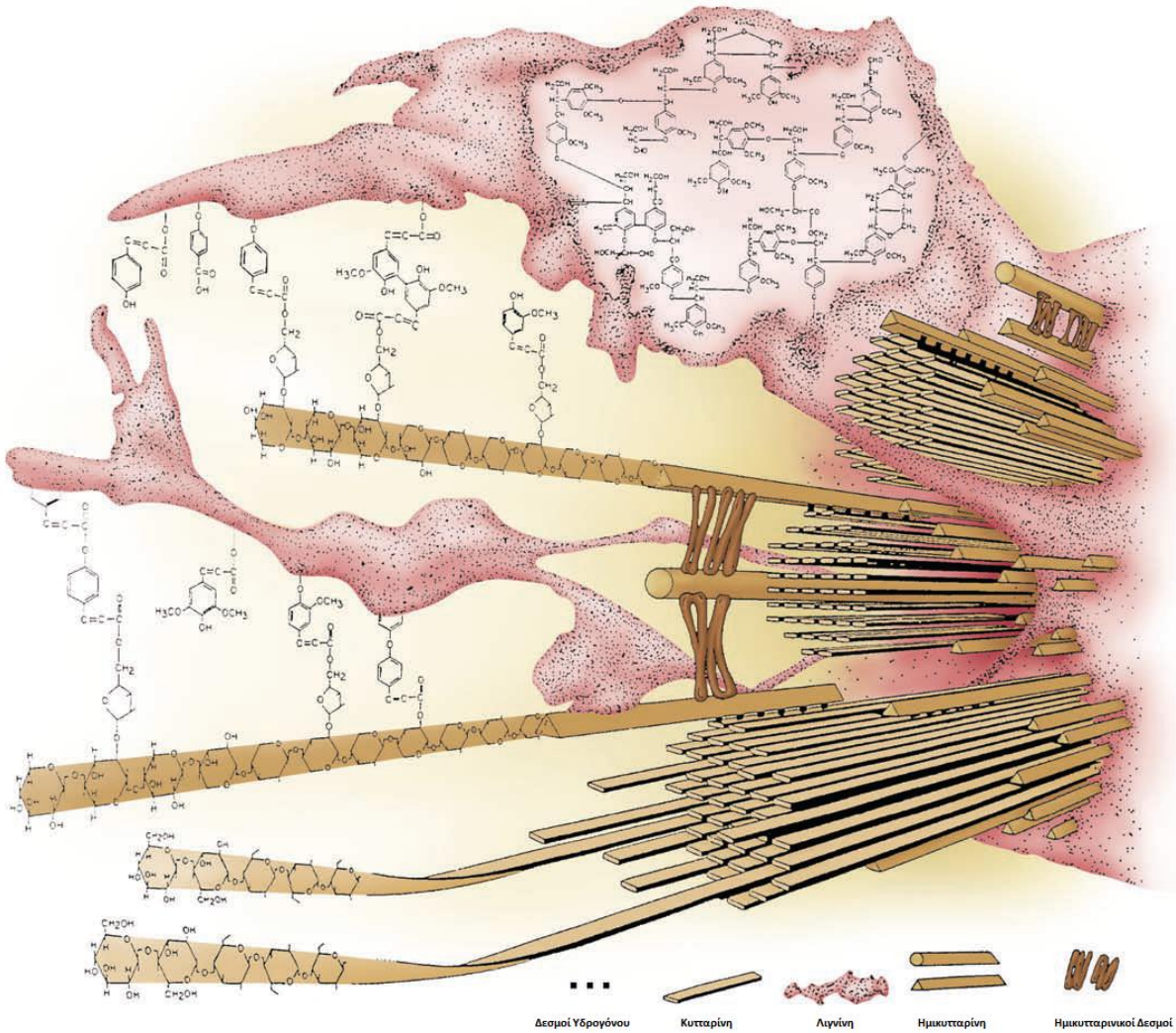
Η ανθεκτικότητα συγκεκριμένων συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, δεν είναι το μόνο εμπόδιο που πρέπει να υπερβληθεί. Ο τρόπος με τον οποίο τα συστατικά αυτά είναι διευθετημένα στην δομή του τοιχώματος δημιουργεί ένα ακόμη κύμα προκλήσεων, ειδικότερα όσον αφορά τον ενζυμικό καταβολισμό.

Μετά την διαίρεση του, το κύτταρο δημιουργεί πρώτα το επονομαζόμενο πρωτογενές τοίχωμα. Στην επιφάνεια της κυτταρικής του μεμβράνης σχηματίζονται αρχές των μικροϊνιδίων κυτταρίνης και σταδιακά, καθώς μεγαλώνει σε μέγεθος, μετακινούμενα διαμεμβρανικά συμπλέγματα (ροζέτες) προσθέτουν καινούργια μόρια γλυκόζης στα ινίδια επιμηκύνοντας τα. Παράλληλα, το κύτταρο συνθέτει στο σύμπλεγμα Golgi τις ημικυτταρίνες, οι οποίες μεταφέρονται στην επιφάνεια και μαζί με τις παραγόμενες πηκτίνες συνδέονται με χημικούς δεσμούς, δεσμούς υδρογόνου, αλλά και ιοντικούς δεσμούς, διάμεσου γεφυρών ασβεστίου (πηκτίνες). Κατά κάποιο τρόπο η κατασκευή του πρωτογενούς τοιχώματος μπορεί να παρομοιαστεί με την κατασκευή ενός κτίσματος με ενισχυμένο μπετό: Αρχικά αποτίθενται ασάλινοι ράβδοι (μικροϊνίδια κυτταρίνης) και στην συνέχεια εγχέεται το μπετό (πηκτίνη και ημικυτταρίνες) το οποίο συγκρατεί την κατασκευή. Επί του πρωτογενούς τοιχώματος σχηματίζεται και η μεσοκυττάρια στοιβάδα, η οποία αποτελείται κυρίως από πηκτίνες και συγκολλεί τα τοιχώματα των γειτονικών κυττάρων.



Εικόνα 1-2: Το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα.

Όταν το κύτταρο ωριμάσει και το μέγεθος του σταματήσει να αυξάνεται, σχηματίζεται το δευτερογενές τοίχωμα. Το δευτερογενές τοίχωμα του κυττάρου σχηματίζεται μεταξύ του πρωτογενούς και της κυτταρικής μεμβράνης. Αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη και λιγνίνη, με μικρή παρουσία πηκτινών και είναι μηχανικά πιο ανθεκτικό και λιγότερο εύκαμπτο από το πρωτογενές τοίχωμα.



Εικόνα 1-3: Το δευτερογενές φυτικό κυτταρικό τοίχωμα. (J. Bidlack et al., 1992)

1.2 Η ενζυμική αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας

Τα συστατικά της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας θα μπορούσαν να αποικοδομηθούν, και μάλιστα με υψηλή απόδοση σακχάρων, με χρήση πολύ πυκνών οξέων (41% θειικό οξύ) σε χαμηλές θερμοκρασίες (30-35 °C) ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις (<1%) οξέως και υψηλές θερμοκρασίες (180-230 °C). Τέτοιες διεργασίες, όμως, είναι είτε οικονομικά επιβαρυνμένες λόγω χρήσης ακριβών πρώτων υλών (πυκνά οξέα), που δύσκολα ανακτώνται, και υψηλού κόστους εξοπλισμού (ανθεκτικά σε οξύ υλικά), είτε οδηγούν σε δημιουργία παραπροϊόντων που δυσχεραίνουν την μετέπειτα ζύμωση, αντίστοιχα (Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων, Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2013).

Η προσπάθεια που γίνεται σήμερα είναι η εφαρμογή συστημάτων αποδόμησης που να περιλαμβάνουν μια πιο ήπια προκατεργασία του υλικού, ώστε να πραγματοποιηθεί χαλάρωση των δεσμών μεταξύ των συστατικών της βιομάζας και στην συνέχεια να πραγματοποιηθεί προσβολή των συστατικών αυτών με εξειδικευμένα ένζυμα. Το κόστος της παραγωγής και απομόνωσης τέτοιων ενζύμων ήταν αρχικά απαγορευτικό, αλλά η εξέλιξη της ερευνητικής δραστηριότητας στον τομέα αυτό τα τελευταία χρόνια, σε συνάρτηση με τις όλο και περισσότερο διευρυνόμενες βιοτεχνολογικές τεχνικές, έχει οδηγήσει το ενζυμικό κόστος σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

1.2.1 Είδη διεργασιών προκατεργασίας

Στην βιβλιογραφία (Dwivedi et al., 2009, Badal Saha, 2003) μπορούν να ανευρεθούν πολλές μέθοδοι προκατεργασίας της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Οι κυριότερες κατηγορίες διεργασιών που απαντώνται είναι οι ακόλουθες:

1. **Θερμικές μέθοδοι:** Περιλαμβάνουν θέρμανση του υλικού μέχρι κάποιας θερμοκρασίας με την βοήθεια ατμού (150-180 °C), αμμωνίας (~90 °C) ή CO₂ (μέχρι 150 °C) με ταυτόχρονη αύξηση της πίεσης. Ακολουθεί απότομη εκτόνωση που χαλαρώνει του δεσμούς των συστατικών της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και διαλυτοποιεί κάποια ποσότητα από αυτά. Οι θερμικές μέθοδοι είναι αρκετά αποτελεσματικοί, αλλά συχνά δημιουργούν (ή χρησιμοποιούν) προϊόντα που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά την ζύμωση των σακχάρων προς αιθανόλη.

2. **Όξινες μέθοδοι:** Για την αύξηση της απόδοσης, είναι δυνατόν πέρα από θέρμανση (>150 °C) να χρησιμοποιηθούν και αραιά οξέα (0.5-1.5%, συνήθως θειικό οξύ, αλλά κάποιες φορές νιτρικό οξύ), τα οποία διαλυτοποιούν και υδρολύουν τα συστατικά, ιδιαίτερως την ημικυτταρίνη. Μειονέκτημα που εμφανίζουν είναι η ανάγκη για εξουδετέρωση των οξέων μετά την κατεργασία. Η όξινη προκατεργασία αποτελεί μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους.

3. **Αλκαλικές Μέθοδοι:** Εναλλακτικά, αντί όξινων μπορεί να γίνει χρήση αλκαλικών ενώσεων όπως υδροξείδιο του νατρίου και του ασβεστίου. Αλκαλικά περιβάλλοντα ευνοούν την διαλυτοποίηση της λιγνίνης, αλλά το πρόβλημα της εξουδετέρωσης μετά την κατεργασία συνεχίζει να υπάρχει.

4. **Οξειδωτικές Μέθοδοι:** Γίνεται χρήση οξειδωτικών παραγόντων όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου και το υπεροξικό οξύ. Τα οξειδωτικά παρεμβαίνουν στους δεσμούς των συστατικών όπου πραγματοποιούν υποκαταστάσεις και διαταράσσουν την δομή του λιγνινοκυτταρινούχου τοιχώματος.

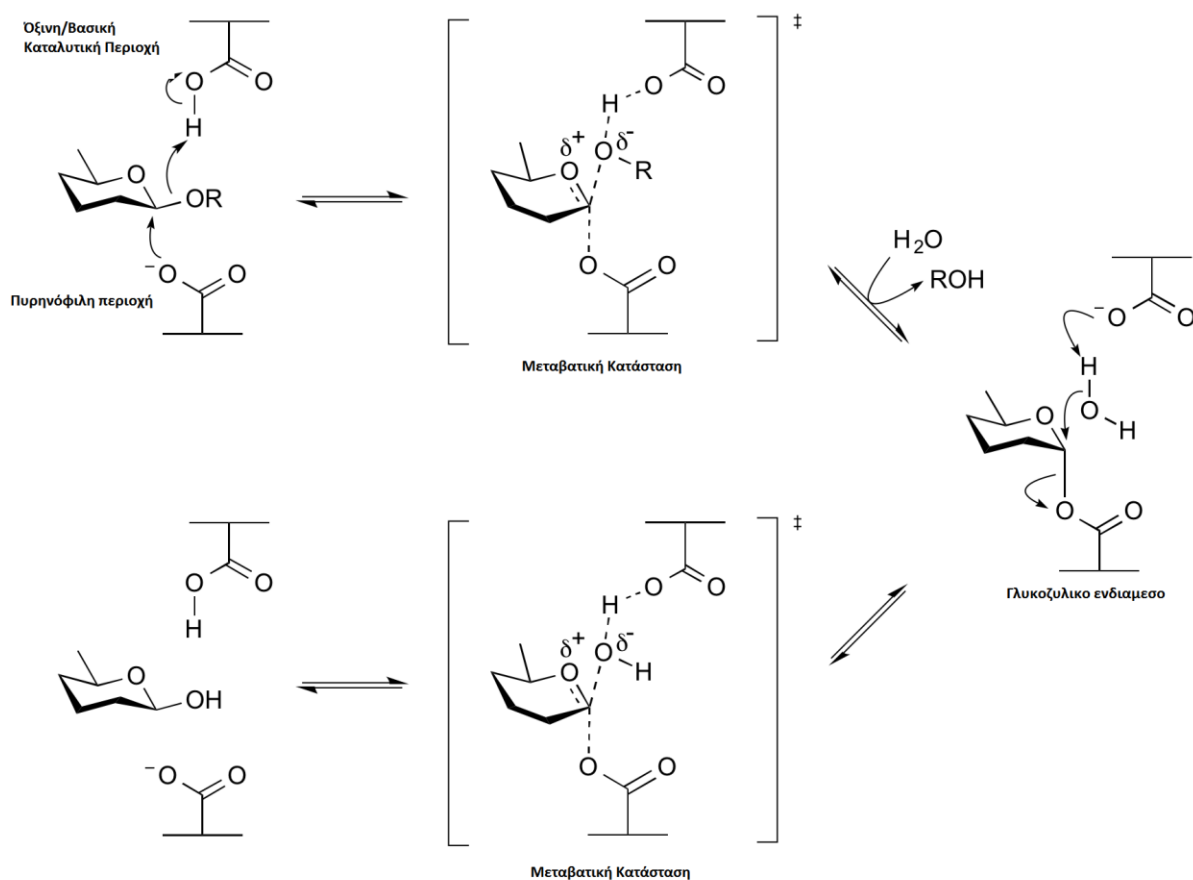
5. **Βιολογικές μέθοδοι:** Πραγματοποιείται αποικοδόμηση από μύκητες (λευκής, φαιάς ή μαλακής σήψης). Παρ'ότι αποτελεί μέθοδο που εξελίσσεται με πιο αργούς ρυθμούς, οι Lee et al., ανακάλυψαν στην δημοσίευσή τους "Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi." ότι βιολογικά προκατεργασμένα δείγματα Ιαπωνικής πεύκης ήταν πολύ πιο ευάλωτα στην μετέπειτα χώνευση με ενζυμικές μεθόδους.

1.2.2 Ένζυμα που υδρολύουν την λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα

Η συνεχής έρευνα στον τομέα της ενζυμικής αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας οδήγησε, το 1998, στην σύσταση της βάσης δεδομένων CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes) από την ομάδα "Γλυκογενομικής" του εργαστηρίου AFMB (Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques) στην Μασσαλία της Γαλλίας. Η βάση CAZy περιλαμβάνει (δεδομένα Σεπτεμβρίου 2013, Lombard et al.) 337 143 αναγνωρισμένα ένζυμα (εκ των οποίων 12 730 είναι χαρακτηρισμένα και για 1 419 είναι γνωστή και η δομή τους). Η βάση δεδομένων χρησιμοποιεί μια αλγοριθμική ανάλυση της νουκλεϊκής αλληλουχίας των γονιδίων ώστε να κατηγοριοποιήσει τις καταχωρίσεις με βάση των (προβλεπόμενων) ομοιοτήτων τους. Τα ένζυμα της βάσης CAZy χωρίζονται σε 133 οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών (GHs, Glycoside Hydrolases), 97 οικογένειες γλυκοζυλ-τρανσφεράσων (GTs, Glycosyl Transferases), 23 οικογένειες λυάσων πολυσακχαριτών (PLs, Polysaccharide Lyases), 16 οικογένειες υδατανθρακικών εστεράσων (CEs, Carbohydrate Esterases) και 13 οικογένειες με συμπληρωματικές ενεργότητες (AAs, Auxiliary Activities).

1.2.3 Η οικογένεια GH26

Η οικογένεια γλυκοζιδικών υδρολασών 26, όπου ανήκει και η μελετώμενη μαννανάση, έχει 777 από τα οποία τα 60 έχουν χαρακτηριστεί και για 11 εξ' αυτών είναι γνώστη και η δομή τους. Περιλαμβάνει κυρίως ενδο-β-1,4-μαννανασες (με μια εξαίρεση έξω-μαννανάσης του *C.japonicus*, Cartmell et al., 2008). Κάποια μέλη της οικογένειας έχουν παρατηρηθεί ότι φέρουν ενεργότητα β-1,3:1,4-γλουκανάση, ενώ κάποια άλλα β-1,3-ξυλανάσης. Από τα ήδη χαρακτηρισμένα μέλη της GH26 έχει παρατηρηθεί ότι η υδρόλυση που πραγματοποιείται έχει διατηρητικό (retaining) μηχανισμό, δηλαδή αφήνει την α/β διαμόρφωση των συμμετεχόντων σακχάρων ανεπηρέαστη και ακολουθεί μηχανισμό διπλής αντικατάστασης Koshland, ο οποίος πραγματοποιείται σε δυο βήματα, ένα αργό και ένα γρήγορο.



Εικόνα 1-4: Ο μηχανισμός διπλής αντικατάστασης που χρησιμοποιεί η οικογένεια GH26

1.3 Ο μικροοργανισμός *Myceliophthora thermophila* και το γονίδιο της MtMan26a.

Ο *Myceliophthora thermophila* (γνωστός και ως *Sporotrichum thermophile*) είναι ένας θερμόφιλος μονοκύτταρος ασκομύκητας, ο οποίος απαντάται στο χώμα και ιδιαίτερα σε σωρούς αποσυντιθέμενης οργανικής ύλης. Αναπτύσσεται βέλτιστα σε θερμοκρασίες 45-50 °C και είναι ανθεκτικός σε όξινα περιβάλλοντα, χαρακτηριστικά τα οποία τον καθιστούν ενδιαφέρον για βιοτεχνολογικές εφαρμογές σχετικά με την αποδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Ο *M. thermophila* διαθέτει μια μεγάλη γκάμα από ένζυμα που αποδομούν διάφορα κλάσματα φυτικής οργανικής ύλης, τα οποία ενδιαφέρουν ιδιαίτερα την βιομηχανία παραγωγής βιοκαυσίμων. Το ενδιαφέρον αυτό πηγάζει από το γεγονός ότι, λόγω των αντίξοων συνθηκών ανάπτυξης του, τα ένζυμα του παρουσιάζουν ενεργότητα, αλλά και σταθερότητα, σε υψηλές θερμοκρασίες και χαμηλά pH. Το γονιδίωμα του *M. thermophila* έχει πλήρως προσδιοριστεί από το DOE Joint Genome Institute το 2012 και περιλαμβάνει 9099 γονίδια σε 7 χρωμοσώματα.



Εικόνα 1-5: Υφές του *M. thermophila*

Το γονίδιο που εκφράζει την μελετώμενη μαννανάση εντοπίστηκε με τεχνικές βιοπληροφορικής ανάλυσης από τους Berka, Grigoriev et al. (2011) στα πλαίσια μια γενομικής σύγκρισης των δυο θερμόφιλων μυκήτων *M. thermophila* και *Thielavia terrestris* (τα αποτελέσματα της ανάλυσης έχουν καταχωρηθεί στην βάση του Joint Genome Institute υπό από την αιγίδα του οποίου εκτελέστηκε και η μελέτη).

Το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 στις θέσεις 2403634 με 2405410 (σύμφωνα με την βάση δεδομένων του Joint Genome institute) και περιέχει 4 εξόνια.

Η ανάλυση ομοιότητας (BLASTP του National Center for Biotechnology Information) της παραγόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας, υποδεικνύει την ύπαρξη των εξής γνωστών δομών: ενός πολυπεπτιδίου σήματος (signal peptide) της *M. thermophila* στις θέσεις 1-21 της πρωτεΐνης, μιας περιοχής με χαρακτηριστικά της μονάδας πρόσδεσης σε υδατάνθρακες (CBM, carbohydrate binding molecule) οικογένειας 6 και οικογένειας 35 στις θέσεις 52-161 και μιας περιοχής με λειτουργία γλυκοζυδικής υδρολάσης της οικογένειας 26 στις θέσεις 176-475.

Η στοίχιση της ακολουθίας της πρωτεΐνης με άλλες ακολουθίες της βάσης δεδομένων οδήγησε σε εντοπισμό μεγάλου βαθμού ομολογίας (75%), μεταξύ άλλων και, με μια χαρακτηρισμένη β-1,4-μανναση του *Podospora Anserina* (*PaMan26a*), της οποίας είναι γνωστή και η δομή (PDB ID: 3ZM8, Couturier et al., 2013).

	10	20	30	40	50	60	70	80																								
MtMan26a	35	AEFSTSA	TYEADAIL	SGTIV	DTAQEGY	TGSGYV	TGFDEAS	DKITFEV	SEATKLY	DLRSIRIA	AIYGD	KHTTV	VNL	GGA	114																	
PaMan26a	6	CKPRD	GPVTYE	ADAILT	GTIV	DTAQV	GYTGR	GYVTF	GDEG	SDKIT	TFQISS	ATTKLY	DLRSIRY	AAIYGD	KKRN	VNL	NGA	85														
	90	100	110	120	130	140	150	160																								
MtMan26a	115	SSDVS	F	PAGD	TWVDV	PAGQV	LLNE	GANTIE	IVSN	WGWYL	VDSIT	ILTP	SA	PRPEH	QINR	S	LNNP	SADAS	ARALY	DYLR	SIY	194										
PaMan26a	86	VSEVF	F	PAGDS	F	TSVA	AGQV	LLNAG	QNTI	DIVN	NW	GWYLI	DSIT	ILTP	SA	PRP	PHD	IN	PNL	NNP	NAD	TNA	KKLY	SYLR	SVY	165						
	170	180	190	200	210	220	230	240																								
MtMan26a	195	GKKILA	GQQDL	TWADY	VTQQT	KGKIP	ALVSV	DLMDY	SPSR	VERGT	KGTS	VVEEA	ITHA	ERG	GIVS	AL	WHWN	APAG	LYDT	DEH	274											
PaMan26a	166	GNKI	IIS	GQQL	ELHHA	EWIR	QQT	KGKIP	ALVSV	DLMDY	SPSR	VERGT	TSH	AVE	DAIA	HHN	AGG	IVS	VL	WHWN	APV	G	LYDT	EEN	245							
	250	260	270	280	290	300	310	320																								
MtMan26a	275	PWWSG	F	YTDAT	DFDVA	AALS	STDN	ANYT	LLLR	DIRD	IAV	Q	LKRL	RDAR	V	P	VLWR	PL	HEA	E	GGWF	FW	GAK	GP	PAK	QL	YAL	354				
PaMan26a	246	KWWSG	F	YTRAT	DFDIA	ATLAN	PQGAN	Y	TL	LRD	IAV	Q	LKRL	E	AAGV	P	VLWR	PL	HEA	E	GGWF	FW	GAK	GP	PAK	QL	WDI	325				
	330	340	350	360	370	380	390	400																								
MtMan26a	355	LYDRL	VNH	HGIN	NLIW	VWNS	LSP	DWY	PGDD	TVDIL	SAD	VYA	Q	GN	GP	MST	QYN	QLI	DLG	K	DKM	I	AAA	E	V	G	AAP	LP	DL	LQA	434	
PaMan26a	326	LYERL	TV	HHGL	D	NLIW	VWNS	I	LDWY	PGDD	TVDIL	SAD	VYA	Q	GN	GP	MST	QYN	ELI	AL	GR	DKM	I	AAA	E	V	G	AAP	LP	GL	LQA	405
	410	420	430	440																												
MtMan26a	435	YEAH	WLW	FAV	WGDT	F	INNAE	WNS	PEV	LK	TVY	T	SDY	V	L	L	DEI	IQ	GW	Q	480											
PaMan26a	406	YQAN	WLW	FAV	WGDD	F	INNPS	WNT	VAVL	NEI	Y	NSDY	V	L	L	DEI	IQ	GW	R	451												

Εικόνα 1-6: Τα αποτελέσματα της στοίχισης των ακολουθιών της MtMan26a και της PaMan26a.

Καθώς το γονίδιο εκφράστηκε ετερόλογα στην παρούσα διπλωματική, πραγματοποιήθηκε αφαίρεση της ακολουθίας πεπτιδίου σήματος της *M. thermophila* (καθώς το πλασμίδιο-φορέας που χρησιμοποιείται (pPICZαC) παρέχει δικό του πλασμίδιο σήματος για την ευκολότερη έκκριση της πρωτεΐνης από *P.pastoris*). Επειδή το πεπτιδίο σήματος έτσι και αλλιώς αποκόπτεται κατά την έξοδο της πρωτεΐνης από το κύτταρο, η αλλαγή του δεν επιφέρει αλλαγές στην ενεργότητα της.

Επιπροσθέτως, η γενετική ακολουθία του γονιδίου τροποποιήθηκε καταλλήλως ώστε να εμφανίζονται συχνότερα τα κωδικόνια που χρησιμοποιούνται συχνότερα από τα γονίδια της *P.pastoris* με σκοπό να επιτευχθεί αυξημένη παραγωγικότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται βελτιστοποίηση κωδικονίων (codon optimization).

1.4 Το σύστημα ετερόλογης έκφρασης με *Pichia pastoris*

Η *Pichia pastoris* είναι μια μεθυλότροφη ζύμη που ανακαλύφθηκε στις αρχές του 20ου αιώνα στην προσπάθεια αναγνώρισης των ζυμών που παρεμβάλλονται στην λειτουργία των ζυμοτηρίων της εποχής. Η χρησιμότητα της στην βιοτεχνολογία εμφανίστηκε αρκετά αργότερα, όταν τράβηξε το ενδιαφέρον της Philips Petroleum Company για παραγωγή μονοκυτταρικής πηγής πρωτεΐνης για ζωοτροφή, από μεθανόλη. Με την αφορμή αυτή αναπτύχθηκαν την δεκαετία του 70', από την ίδια εταιρία, τα πρώτα πρωτόκολλα για την μαζική καλλιέργεια της *P.pastoris*. Όμως, οι κρίσεις που χτύπησαν την πετρελαϊκή αγορά το 1973 και το 1979, αποθάρρυναν την ανάπτυξη της εφαρμογής αυτής καθώς η τιμή του μεθανίου (το οποίο χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή της μεθανόλης) εκτοξεύτηκε στα ύψη. Παράλληλα, η πτώση της τιμής της σόγιας, η οποία αποτελούσε την μέχρι στιγμής πηγή για αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των ζωοτροφών, κατέστησε το όλο εγχείρημα οικονομικά δυσπρόσιτο, οπότε η ιδέα της παραγωγής πρωτεΐνης από μεθανόλη εγκαταλείφθηκε. Μια δεκαετία αργότερα, η Philips Petroleum μαζί με το Salk Institute of Biotechnology/Industrial Associates Inc. επανεξέτασαν την χρήση της *P.pastoris*, αυτή την φορά για την πιθανότητα της ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών, καθώς παρατηρήθηκε η ικανότητα της να παράγει μεγάλες ποσότητες ακόμη και ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών. Η έρευνα αυτή οδήγησε στον εντοπισμό και αλληλούχιση των εκκινητών AOX, αλλά και στην ανάπτυξη πρωτοκόλλων για τον μετασχηματισμό της *P.pastoris*. Το σύστημα έκφρασης που αναπτύχθηκε από την προσπάθεια καταχωρήθηκε ως ευρεσιτεχνία (patent) στο όνομα της Philips Petroleum και το 1993 πέρασε στην ιδιοκτησία της Research Corporation Technologies, από όπου συνεχίζει να διατίθεται μέχρι σήμερα (η Life Sciences/Invitrogen κατέχει τα δικαιώματα για παρασκευή και διανομή τυποποιημένων πακέτων για την εφαρμογή της μεθόδου-expression kits).

Η *P.pastoris* εμφανίζει σχετικά μεγάλους ρυθμούς ανάπτυξης, ενώ παράλληλα αναπτύσσεται σε απλό και χαμηλού κόστους υποστρώματα. Παρ'ότι η ταχύτητα ανάπτυξης είναι χαμηλότερη από άλλους μετασχηματίσιμους φορείς (λχ *E.Coli*), όντας ευκαρυωτικός οργανισμός διαθέτει την ικανότητα για μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα η γλυκοζυλίωση. Επίσης, η *P.pastoris* εκκρίνει μόνο μικρές ποσότητες εξωκυτταρικών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να διευκολύνεται ο διαχωρισμός της ετερόλογης πρωτεΐνης από το διάλυμα. Η έκκριση της ετερόλογης πρωτεΐνης επάγεται με την προσθήκη συγκεκριμένων αλληλουχιών από

τον *S. cerevisiae* στο μετασχηματιζόμενο πλασμίδιο (α-παράγοντας), οι οποίες κωδικοποιούν για ένα πεπτίδιο σήματος.

Η ικανότητα της να μεταβολίζει την μεθανόλη πηγάζει από τα δυο γονίδια αλκοολικής οξειδάσης που διαθέτει, ονόματι AOX1 και AOX2. Παρ'ότι τα δυο αυτά γονίδια εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό ομολογίας (~97%), η απώλεια της λειτουργίας του AOX1 οδηγεί σε δραστική μείωση της ικανότητας της *P.pastoris* να αναπτύσσεται σε υπόστρωμα μεθανόλης. Βάσει της ικανότητας τους να αναπτύσσονται σε υπόστρωμα μεθανόλης, τα στελέχη χαρακτηρίζονται ως Mut^s (Methanol utilization slow), που αποτελούν συνήθως στελέχη στα οποία δεν λειτουργεί το AOX1 και μεταβολίζουν την μεθανόλη με σχετικά αργό ρυθμό, ή Mut⁺ (Methanol utilization plus), δηλαδή στελέχη με την ικανότητα να αναπτύσσονται γρήγορα με την μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα.

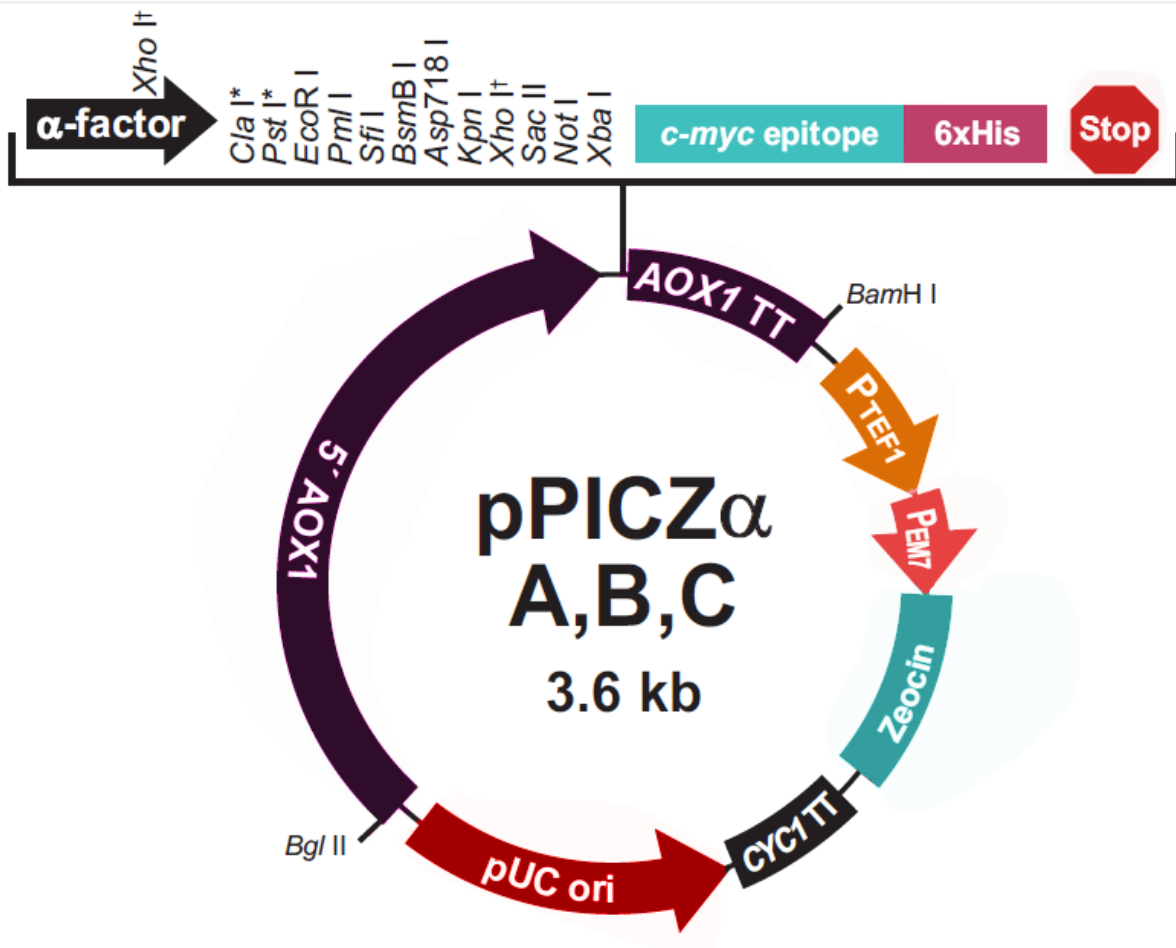
Η έκφραση του γονιδίου AOX1 ελέγχεται ταυτόχρονα από δυο μηχανισμούς: ένα μηχανισμό παρεμπόδισης από την γλυκόζη και ένα μηχανισμό επαγωγής από την μεθανόλη. Οπότε, προκειμένου να επαχθεί η μεταγραφή του γονιδίου πρέπει ο μικροοργανισμός να αναπτύσσεται και απουσία γλυκόζης και παρουσία μεθανόλης. Ο τρόπος ελέγχου του συγκεκριμένου γονιδίου παρουσιάζει ιδιαίτερη χρησιμότητα, καθώς είναι δυνατή η εκμετάλλευση του για τον έλεγχο της παραγωγής της ετερόλογης πρωτεΐνης με εισαγωγή του επιθυμητού γονιδιώματος σε σημείο ώστε να διενεργείται η έκφραση του μαζί με την έκφραση του AOX1.

1.5 Το πλασμίδιο PICZa

Το πλασμίδιο PICZa είναι ένα πλασμίδιο μεγέθους 3593bp το οποίο χρησιμοποιείται συχνά ως φορέας γονιδίων για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών στον μικροοργανισμό *P. pastoris*. Συγκεκριμένα το πλασμίδιο περιέχει τα εξής λειτουργικά στοιχεία:

- Τον εκκινητή AOX1, ο οποίος, όπως αναφέρθηκε, ενεργοποιείται παρουσία μεθανόλης και απουσία γλυκόζης, καθιστώντας τον έναν εύκολα ελεγχόμενο υποκινητή.
- Μια περιοχή που κωδικοποιεί για τον α-παράγοντα του *S. cerevisiae* ο οποίος προστίθεται στο N άκρο της πρωτεΐνης και επιτρέπει την εξωκυτταρική έκκριση των πρωτεϊνών από την *P.pastoris*. Η προσθήκη του παράγοντα-α δεν επηρεάζει την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης καθώς αποκόπτεται κατά την έκκριση. Επί της περιοχής αυτής βρίσκεται και μια περιοχή τομής *Xho* I, σε περίπτωση που χρειάζεται να παραλειφθεί η προσθήκη του α-παράγοντα.
- Μια περιοχή με πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης (MCS, Multiple Cloning Site), η οποία περιέχει ακολουθίες σχεδιασμένες για κοπή από περιοριστικά ένζυμα, για την εύκολη προσάρτηση του επιθυμητού γονιδίου. Η περιοχή κλωνοποίησης του rPICZa περιλαμβάνει περιοχές για την τομή από περιοριστικά ένζυμα με την ακόλουθη σειρά: *Cla* I (μόνο για την μορφή C του πλασμιδίου), *Pst* I (μόνο για την μορφή B του πλασμιδίου), *EcoR* I, *Pml* I, *Sfi* I, *BsmB* I, *Asp7 18*, *Kpn* I, *Xho* I, *Sac* II, *Not* I, *Xba* I.
- Ακολουθία που κωδικοποιεί για ένα ολιγοπεπτίδιο το οποίο περιέχει τον c-myc επίτοπο και το 6xHis tag. Η παρουσία του c-myc επίτοπου και 6xHis tag καθιστούν δυνατό τον εντοπισμό με αντισώματα (Anti-myc και Anti-myc-HRP) και την απομόνωση της παραγόμενης πρωτεΐνης (στήλη ιοντικής συγγένειας), αντίστοιχα.
- Μια περιοχή τερματισμού μεταγραφής (TT,transcription termination) του γονιδίου AOX1. Η περιοχή αυτή περιέχει πληροφορίες για τον τερματισμό της μεταγραφής του γονιδίου και την πολυαδενυλίωση του mRNA. Η πολυαδενυλίωση (προσθήκη πολλαπλών βάσεων αδενοσίνης στο τέλος του mRNA) είναι μια σημαντική μεταγραφική διεργασία που συντελεί στην κινητικότητα και στην σταθερότητα του mRNA στα περισσότερα στάδια της μεταγραφικής/μεταφραστικής διαδικασίας.
- Τον εκκινητή TEF1, έναν εκκινητή του *S. cerevisiae* που καθιστά δυνατή την έκφραση του γονιδίου αντίστασης σε Zeocin[™] από την *P.pastoris*.

- Τον εκκινητή EM7, έναν συνθετικό προκαρυωτικό εκκινητή που καθιστά δυνατή την έκφραση του γονιδίου αντίστασης σε Zeocin™ από το *E.coli*.
- Γονίδιο αντίστασης σε Zeocin™ (*Sh ble*), το οποίο εκφράζεται από τον *P. pastoris*, αλλά και τον *E. coli*, συντελώντας στην εύκολη επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών.
- Μια περιοχή τερματισμού μεταγραφής (TT,transcription termination) του γονιδίου CYC1 προερχόμενη από τον *S. cerevisiae*, που επιτρέπει τον τερματισμό και την επεξεργασία του 3' άκρου του mRNA που κωδικοποιεί για το γονίδιο *Sh ble*, βελτιώνοντας την σταθερότητα του.
- Μια περιοχή έναρξης αντιγραφής pUC, που επάγει την αντιγραφή και συντήρηση του πλασμιδίου σε *E.coli*. Περιέχει την εντολή για συντήρηση αυξημένου αριθμού αντιγράφων ώστε να διευκολύνει το στάδιο του μετασχηματισμού όπου πραγματοποιείται αύξηση του πλασμιδίου.



Εικόνα 1-7: Το πλασμίδιο pPICZα

Το pPICZα διατίθεται σε τρεις μορφές, ονομαζόμενες A, B και C, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το πλαίσιο ανάγνωσης. Ο λόγος για την διαφοροποίηση αυτή είναι η σωστή έκφραση του ολιγοπεπτιδίου c-myc/6xHis tag, καθώς μετά την προσθήκη του γονιδίου στην περιοχή κλωνοποίησης, το πλαίσιο ανάγνωσης μπορεί να αλλάξει. Οι μορφές δεν διαφέρουν μεταξύ τους στα υπόλοιπα λειτουργικά σημεία.

Το pPICZα συνίσταται να πολλαπλασιάζεται με στελέχη *E.coli* τα οποία παρουσιάζουν χαμηλή ανασυνδυαστική ικανότητα (*recA*, recombination deficient), δηλαδή έλλειψη του γονιδίου *recA* το οποίο προκαλεί αλλαγές σε μετασχηματιζόμενα πλασμίδια και στερούνται του γονιδίου για ενδονουκλεάση A (*endA*, endonuclease A deficient), η οποία μπορεί να αλλοιώσει τα μετασχηματιζόμενα πλασμίδια. Τέτοια στελέχη είναι, μεταξύ άλλων, το TOP10 και το DH5.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Υλικά

2.1.1 Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες μικροοργανισμών *E. coli* και *P. pastoris*.

2.1.1.1 *Escherichia coli*

Ο μικροοργανισμός *E. coli* (στέλεχος TOP10, Invitrogen) χρησιμοποιήθηκε για την αύξηση του πλασμιδίου pUC57 (GenScript, USA) (μέγεθος 2710bp), φορέα του γονιδίου *MtMan26a* και στην συνέχεια του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZαC/*MtMan26a*.

Το *E.coli* είναι ένα Gram-αρνητικό, δυνητικά αναερόβιο βακτήριο που απαντάται στο γαστρεντερικό σύστημα θερμόαιμων οργανισμών και αναπτύσσεται βέλτιστα σε θερμοκρασία 37°C.

Απαντάται σε πολλές εφαρμογές στην βιοτεχνολογία καθώς αναπτύσσεται με ιδιαίτερα γοργούς ρυθμούς (20-30 λεπτά σε ιδανικές συνθήκες), ενώ παράλληλα απαιτεί απλά και διαθέσιμα υποστρώματα για την ανάπτυξη του.

Το στέλεχος TOP10 καθίσταται δεκτικό (competent) σε θερμικό σοκ δια μέσου επεξεργασίας με CaCl₂. Τα κύτταρα αρχικά καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο LB. Στην συνέχεια φυγοκεντρώνται και επαναιωρούνται σε διάλυμα 0.1M CaCl₂, έπειτα φυγοκεντρώνται ξανά και αποθηκεύονται σε διάλυμα γλυκερόλης 15%/ 0.1M CaCl₂ στους -80 °C. Η γλυκερόλη αποτρέπει την δημιουργία κρυσταλλών νερού οι οποίοι προκαλούν ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών. Το Ca⁺² που προέρχεται από το CaCl₂, όντας θετικά φορτισμένο, έχει την τάση να έλκει τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό του πλασμιδιακού DNA και τον αρνητικά φορτισμένο πυρήνα των λιποπολυσακχαρίτων (lipopolysacharides) της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων. Φέρνοντας κοντά τα δυο αυτά στοιχεία, η παρουσία του Ca⁺² συντελεί στην επιτυχή μεταβίβαση του πλασμιδίου από το εξωτερικό στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης.

2.1.1.2 *Pichia pastoris*

Ο μικροοργανισμός *P. pastoris* (στέλεχος X33, Φαινότυπος: Mut+, Invitrogen) χρησιμοποιήθηκε για την ετερόλογη έκφραση της εξεταζόμενης μαννανάσης.

Για την επιτυχία του μετασχηματισμού πρέπει τα κύτταρα *P.pastoris* να καταστούν δεκτικά σε ηλεκτροδιάτρηση (electrocompetent). Αυτό πραγματοποιείται ως ακολούθως: Αρχικά πραγματοποιείται μια καλλιέργεια *P.pastoris* X33 σε υγρό μέσο YPD (250 ml) στους 30 °C για περίπου 18h μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600 nm της καλλιέργειας να ανέλθει σε 2.6-3 μονάδες. Ακολουθεί η εξής επεξεργασία της καλλιέργειας:

1. Φυγοκέντριση στα 1500×g για 5min και απόρριψη υπερκείμενου
2. Επαναιώρηση σε 250 ml H₂O
3. Φυγοκέντριση στα 1500×g για 5min και απόρριψη υπερκείμενου
4. Επαναιώρηση σε 250 ml H₂O
5. Φυγοκέντριση στα 1500×g για 5min και απόρριψη υπερκείμενου
6. Επαναιώρηση σε 20 ml διαλύματος 1M Σορβιτόλης
7. Φυγοκέντριση στα 1500×g για 5min και απόρριψη υπερκείμενου
8. Επαναιώρηση σε 0.5 ml διαλύματος 1M Σορβιτόλης (επιπλέον προσθήκη σε περίπτωση μη επαρκούς επαναιώρησης)

Οι πολλαπλοί κύκλοι επαναιώρησης συμβάλλουν στην αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και των λοιπών αλάτων της καλλιέργειας, η παρουσία των οποίων μπορεί να δημιουργήσει βραχυκύκλωμα στην κυψελίδα της ηλεκτροδιάτρησης μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα επιτυχίας της. Η σορβιτόλη συμβάλλει στην σταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα επιβίωσης των κυττάρων και στην πρόληψη δημιουργίας κρυστάλλων νερού που λύουν τις κυτταρικές μεμβράνες.

2.1.2 Χημικά Αντιδραστήρια

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

Το υπόστρωμα γαλακτομαννάνης για την μέτρηση της ενεργότητας ήταν γαλακτομαννάνη χαρουπιού, χαμηλού ιξώδους (Carob galactomannan-Low Viscosity, Megazyme, Ιρλανδία) μέσου μοριακού βάρους 105kD.

Χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες διαπίδωσης κυτταρίνης (cellulose dialysis membrane) Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), μεμβράνες PM-10, Amicon, Millipore (Η.Π.Α.) και μεμβράνες υποστήριξης Cellophane, Bio-Rad (Η.Π.Α.).

2.1.3 Εμπορικά Ένζυμα

Για τα πειράματα συνεργατισμού χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά ένζυμα Celluclast 1.5L (Novozymes Corp., Denmark) και Novozyme 188 (Novozymes Corp., Denmark). Το Celluclast 1.5L (υδατικό διάλυμα ≥ 700 units/g) περιέχει κυτταρινάση του μύκητα *Trichoderma reesei*, η οποία υδρολύει την κυτταρίνη προς γλυκόζη, κελλοβιόζη, και άλλους πολυσακχαρίτες. Το Novozyme 188 (υδατικό διάλυμα, ≥ 250 units/g) αποτελεί μια κελλοβιάση του μικροοργανισμού *Aspergillus niger* η οποία υδρολύει κελλοβιόζη προς γλυκόζη

2.1.4 Φυσικά υποστρώματα

Για την μελέτη της συνεργιστικής δράσης του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα Lignocel το οποίο έχει προκατεργαστεί με την μέθοδο της υγρής οξειδωσης (wet oxidation) σε διάλυμα 50%-50% Νερό-Ακετόνης υπό ατμόσφαιρα υψηλής πίεσης εμπλουτισμένη με οξυγόνο 40%. Το προκατεργασμένο υπόστρωμα ήταν ευγενική προσφορά του Δρ. Ευάγγελου Λάππα, του Εθνικού Κέντρου Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης.

2.1.5 Τυποποιημένα πακέτα μεθόδων (kit)

Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά σχεδιασμένα πακέτα για την απομόνωση των πλασμιδίων από *E.coli* (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich) και για την απομόνωση πλασμιδίων από την πηκτή αγαρόζης (GenElute™ Gel Extraction Kit, Sigma-Aldrich)

2.1.6 Στήλες Χρωματογραφίας

Για την απομόνωση του ανασυνδυασμένου ενζύμου χρησιμοποιήθηκε στήλη εναλλαγής ιόντων κοβαλτίου σε ρητίνη Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.).

2.1.7 Θρεπτικά μέσα

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

Πίνακας 2-1: Θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν και τα στάδια που απαντώνται.

Είδος θρεπτικού μέσου	Σύσταση	Στάδιο χρήσης
LB+Αμπικιλίνη	1% Τρυπτόνη 0.5% Εκχύλισμα ζύμης 1% NaCl 50 µg/ml Αμπικιλίνη	Καλλιέργεια TOP10 για πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου pUC57/ <i>MtMan26a</i>
Low Salt LB + Zeocin™	1% Τρυπτόνη 0.5% Εκχύλισμα ζύμης 0.5% NaCl 25 µg/ml Zeocin™	Καλλιέργεια TOP10 για πολλαπλασιασμό πλασμιδίου pPICZαC και pPICZαC/ <i>MtMan26a</i>
YPD	1% Εκχύλισμα ζύμης 2% Πεπτόνη 2% Δεξτρώζη (Γλυκόζη)	Ανάπτυξη προκαλλιέργειας X33 (χωρίς Zeocin™)

YPDS	1% Εκχύλισμα ζύμης 2% Πεπτόνη 2% Δεξτρόζη (Γλυκόζη) 1M Σορβιτόλη 10 µg/ml Zeocin™	Ανάπτυξη καλλιέργειας X33 μετά την ηλεκτροδιάτρηση
Plate Assay Medium	0.34% YNB medium 1% Ammonium Sulfate 0.5% MetOH 0.4% Carob Galactomannan 0.4 µg/ml Βιοτίνη (0.00004%)	Ανάπτυξη μετασχηματισμένων X33 για εντοπισμό ενεργότητας ενζύμου
BMGY	1% Εκχύλισμα Ζύμης 2% Πεπτόνη 0.34% YNB medium 1% Ammonium Sulfate 1% Γλυκερόλη 1% 100mM Potassium Phosphate buffer pH=6 0.4µg/ml Βιοτίνη (0.00004%)	Προκαλλιέργεια μετασχηματισμένων X33
BMMY	1% Εκχύλισμα Ζύμης 2% Πεπτόνη 0.34% YNB medium 1% Ammonium Sulfate 1% 100mM Potassium Phosphate buffer 0.4 µg/ml Βιοτίνη (0.00004%)	Κύρια καλλιέργεια μετασχηματισμένων X33

Η παρασκευή των αντίστοιχων στερεών μέσων γίνεται με προσθήκη 1.5% Agar.

Τα θρεπτικά μέσα αποστειρώνονται σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 20 min. Τα σάκχαρα αποστειρώνονται χωριστά για την αποφυγή της αμαύρωσης του σακχάρου (αντίδραση Maillard με τα αμινοξέα της πηγής αζώτου). Τα αντιβιοτικά (Zeocin™, Αμπικιλίνη) και η Βιοτίνη δεν αποστειρώνονται, λόγω της ευαισθησίας τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Αντ' αυτού, είτε

παραλαμβάνονται στείρα και διατηρούνται σε στείρες συσκευασίες (Zeocin, Αμπικιλίνη), είτε φιλτράρονται (Βιοτίνη) με φίλτρα σύριγγας 0.2 μm (Whatman, USA).

2.1.8 Ρυθμιστικά Διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του pH των αντιδράσεων και των πειραμάτων σταθερότητας ήταν ως εξής:

Πίνακας 2-2: Ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν.

pH	Σύσταση
3	Κιτρικό οξύ 0.1M- Όξινο Φωσφορικό Δινάτριο (Na_2HPO_4) 0.2M
4	Κιτρικό οξύ 0.1M- Όξινο Φωσφορικό Δινάτριο (Na_2HPO_4) 0.2M
5	Κιτρικό οξύ 0.1M- Όξινο Φωσφορικό Δινάτριο (Na_2HPO_4) 0.2M
6	Κιτρικό οξύ 0.1M- Όξινο Φωσφορικό Δινάτριο (Na_2HPO_4) 0.2M
7	Κιτρικό οξύ 0.1M- Όξινο Φωσφορικό Δινάτριο (Na_2HPO_4) 0.2M
8	Tris 0.1M- πυκνό δ.HCl
9	Tris 0.1M- πυκνό δ.HCl
10	Γλυκίνη 0.2M- NaOH 0.2M
11	Γλυκίνη 0.2M- NaOH 0.2M

Τα ανωτέρω ρυθμιστικά διαλύματα επίσης περιέχουν 0.02% Νατραζίδιο (Sodium Azide), το οποίο λειτουργεί ως βιοκτόνο παρεμποδίζοντας την λειτουργία της κυτοχρωμικής οξειδάσης, περιορίζοντας σημαντικά την ανάπτυξη μικροοργανισμών στα ρυθμιστικά διαλύματα.

Για την αποθήκευση του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.01M-πυκνό δ.HCl με 0.02% νατραζίδιο.

Για την ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris/Boric acid/EDTA) το οποίο παρασκευάζεται συμπυκνωμένο 5 φορές με ανάμειξη 54 g Trizma Base (Τρι(υδροξυ-μέθυλο)αμινομεθάνιο), 20 ml 0.5M EDTA pH 8 και 27.5 g Βορικού οξέως διαλυμένα σε τελικό όγκο 1 L υπερκάθαρου νερού, τελικό pH 8.3.

Κεφάλαιο: 2.1 Υλικά

Για την ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα Tris/Glycine το οποίο παρασκευάζεται συμπυκνωμένο 10 φορές με διάλυση 20.3 g Tris, 144 g Γλυκίνη και 10g SDS αραιωμένα σε τελικό όγκο 1 L τελικού pH 8.3.

Για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης σε στήλη συγγένειας ιόντων κοβαλτίου, γίνεται χρήση ρυθμιστικού διαλύματος Talon (50 mM Tris-HCl σε pH 8.0 με 0.3 M NaCl) και Talon με 100mM Ιμιδαζόλιο.

2.1.9 Συσκευές και όργανα

Οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν τα εξής:

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Κίνα)
- Επωαστήρας Orbital incubator S150, Stuart Scientific (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος Επωαστήρας με ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Περισταλτική αντλία Econo Gradient, BioRad (Η.Π.Α.)
- Συλλέκτης κλασμάτων Waters, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Ηνωμένο Βασίλειο)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης MicroPulser, Bio-Rad (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE), Bio-Rad (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτής αραρόζης, Easigel H1-Set, Scie-Plas (Ηνωμένο Βασίλειο)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης PhastSystem™, (Ηνωμένο Βασίλειο)
- Συσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή υπερδιήθησης διαλυμάτων Stirred Cell Model 8400, 400 mL
- Συσκευή φωτογράφισης σε κλειστό θάλαμο InGenius BioImaging, Syngene (Ηνωμένο Βασίλειο)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Σύστημα χρωματογραφίας διαχωρισμού πρωτεϊνών (Econo Gradient Pump, BioRad και Waters 600E, Millipore (Η.Π.Α.) και ανιχνευτής UV ακτινοβολίας (280 nm) για την ανίχνευση των εκλούμενων πρωτεϊνών.
- Φυγόκεντρος Beckman Coulter (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Φωτόμετρο UV-VIS S-22, Boeco (Γερμανία)

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Ηλεκτροφορητικές τεχνικές

2.2.1.1 Ηλεκτροφόρηση πηκτής Αγαρόζης (Agarose Gel Electrophoresis)

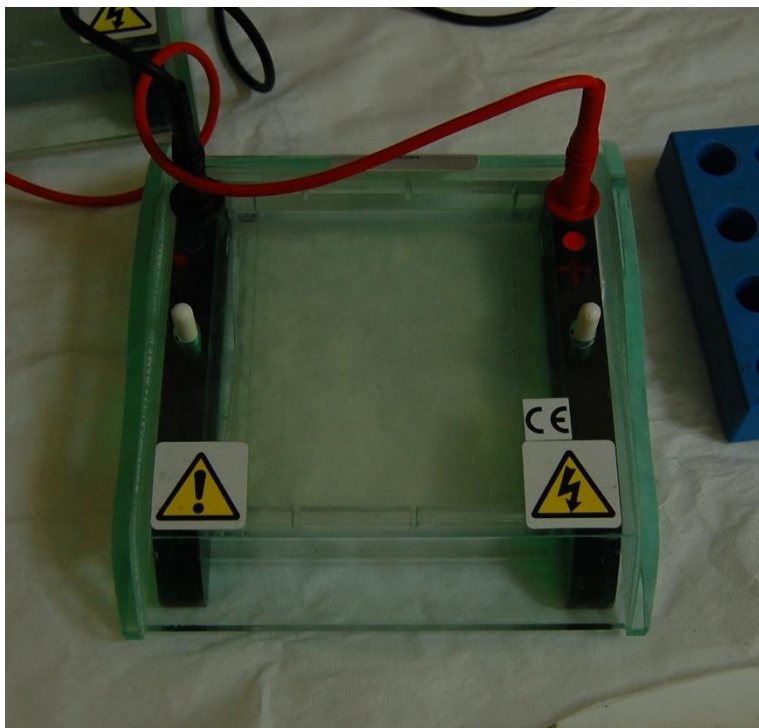
Η ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μορίων DNA με βάση το μέγεθος τους.

Για την παρασκευή της πηκτής γίνεται χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE με 1% αγαρόζη και 1 mg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide). Η αγαρόζη είναι ένα πολυσακχαρίτης, ο οποίος με την διάλυση του σε νερό και την θέρμανση του ζελατινοποιείται, και με την πήξη του σχηματίζει ένα δίκτυο μέσα από το οποίο είναι δυνατό να διέλθουν και να διαχωριστούν βάσει του μεγέθους τα μόρια του DNA. Το EDTA που περιέχεται στο TBE είναι ισχυρός χηλικός υποκατάστατης, οπότε δεσμεύει τα κατιόντα μαγνησίου Mg^{+2} τα οποία αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην λειτουργία των νουκλεάσων και άλλων περιοριστικών ενζύμων, προστατεύοντας τα δείγματα από τυχόν αλλοιώσεις. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα υπό UV ένωση η οποία προσδέεται σε δίκλιωνα νουκλεϊκά οξέα, καταλαμβάνοντας τον χώρο μεταξύ δυο διαδοχικών ζευγών βάσεων. Η πρόσδεση του με το DNA (και υπό περιπτώσεις αναδιπλωμένο RNA) ενισχύει την φθοριστική του ικανότητα καθιστώντας την παρουσία DNA στην πηκτή ιδιαίτερα εμφανή υπό υπεριώδη φωτισμό.

Η πήξη πραγματοποιείται στην διάταξη της ηλεκτροφόρησης με προσθήκη ειδικών φραγμάτων που αποτρέπουν την άμεση επαφή της πηκτής με τα ηλεκτρόδια. τοποθετείται επίσης μια χτένα, η οποία δημιουργεί ειδικές εσοχές για την τοποθέτηση των δειγμάτων στην πηκτή, αναφερόμενες ως "πηγάδια" (wells). Με την πήξη της πηκτής τα φράγματα και η χτένα αφαιρούνται και πηκτή καλύπτεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE το οποίο ολοκληρώνει το ηλεκτροφορητικό κύκλωμα.

Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται με ανάμειξη 5 μl δείγματος DNA με 5 μl υπερκάθαρο νερό και 5 μl διαλύματος φόρτωσης. Το διάλυμα φόρτωσης αποτελείται από 0.9% SDS, 50% Γλυκερόλη και 0.05% Βαφή Μπλε της Βρωμοφαινόλης (BPB, BromoPhenol Blue). Το SDS έχει την δυνατότητα αποδιατάσει πρωτεΐνες που πιθανώς να είναι περιπλεγμένες με το DNA και αλλάζουν το φαινόμενο μέγεθος του. Η γλυκερόλη έχοντας μεγαλύτερη πυκνότητα από το

ρυθμιστικό διάλυμα αναγκάζει το δείγμα να καταβυθιστεί στο πηγάδι της πηκτής, περιορίζοντας την διάχυση του DNA εκτός της πηκτής. Η βαφή BPB λειτουργεί ως ένδειξη της προόδου της ηλεκτροφόρησης καθώς λόγω του ελαφρώς αρνητικού φορτίου της συμπεριφέρεται σαν μόριο DNA με μήκος ~450 ζεύγη βάσεων (bp, base pairs). Παράλληλα με το δείγμα που πρόκειται να μελετηθεί τοποθετείται πάντα και ένα δείγμα αναφοράς (Ladder) που περιέχει μόρια DNA γνωστού μήκους.



Εικόνα 2-1: Διάταξη ηλεκτροφόρησης πηκτής αγαρόζης.

Το κελί συνδέεται με τροφοδοτικό ρεύματος το οποίο παρέχει 190mA στα 60V. Η πρόοδος της ηλεκτροφόρησης ελέγχεται παρατηρώντας τη διαδρομή της βαφής μπλε της βρωμοφαινόλης στην πηκτή και τερματίζεται αναλόγως. Στην συνέχεια η διάταξη τοποθετείται υπό υπεριώδες φωτισμό και φωτογραφίζεται.

2.2.1.2 Ηλεκτροφόρηση SDS πηκτής πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

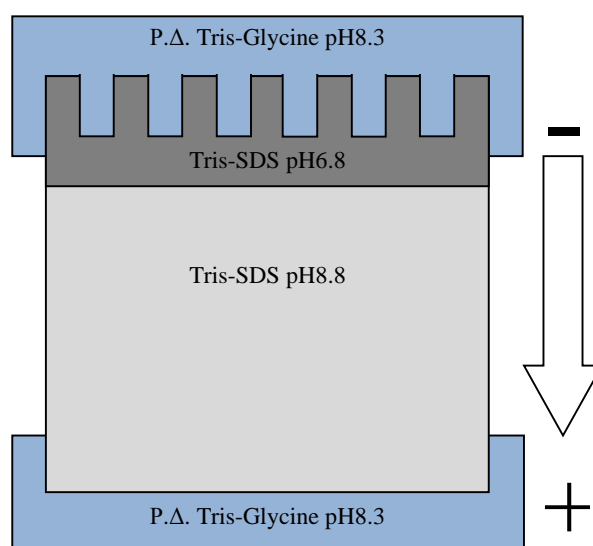
Η ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου SDS είναι μια ηλεκτροφορητική τεχνική που επιτρέπει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος.

Το πολυακρυλαμιδίου είναι ένα αδρανές και σταθερό πολυμερές, το οποίο μπορεί να παρασκευαστεί επί τόπου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Δημιουργεί ένα πλέγμα από πολυμερικές αλυσίδες το οποίο διαθέτει πόρους από τους οποίους διέρχονται οι πρωτεΐνες κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) είναι ένα ανιονικό τασιενεργό που απαντάται πολύ συχνά σε πολλά προϊόντα καθαρισμού και υγιεινής. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εκτέλεση της τεχνικής καθώς προκαλεί λύση των δευτερευόντων πολυπεπτιδικών δεσμών και εξουδετερώνει τα τυχόν φορτία που εμφανίζονται. Αυτή η δράση έχει ως αποτέλεσμα την εκδίπλωση της πρωτεΐνης, εκμηδενίζοντας έτσι παρεμβολές που θα εμφανίζονταν λόγω διαφορετικού σχήματος. Παρόμοιο ρόλο διαδραματίζει και η ουσία β-Μερκαπτοαιθανόλη, η οποία προστίθεται στο διάλυμα φόρτωσης της SDS-PAGE και διασπάει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που προσδίδουν στην πρωτεΐνη την τριτοταγή της δομή. Για την περαιτέρω εκδίπλωση της πρωτεΐνης το δείγμα επωάζεται και σε υψηλές θερμοκρασίες για μερικά λεπτά. Κατά συνέπεια ο μόνος παράγοντας που καθορίζει την κινητικότητα μιας πρωτεΐνης στην πηκτή είναι το μοριακό της βάρος.

Για την εκτέλεση της τεχνικής χρησιμοποιούνται δυο διαφορετικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου με διαφορετικό pH (ασυνεχής τεχνική): ένα να πήκτωμα επιστοίβασης (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα προς διαχωρισμό και ένα πήκτωμα ηλεκτροφόρησης (resolving gel) μέσα στο οποίο γίνεται ο εν λόγω διαχωρισμός. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι για την επίτευξη ενός "συγχρονισμού" στην εκκίνηση των πρωτεϊνών του δείγματος. Ο "συγχρονισμός" επιτυγχάνεται ως εξής: καθώς η γλυκίνη είναι μια αμφολυτική ένωση η οποία σε αυξημένα pH εμφανίζει αρνητική φόρτιση και σε χαμηλά, θετική. Με την έναρξη της ηλεκτροφόρησης, η γλυκίνη που βρίσκεται στο ρυθμιστικό διάλυμα εκτός της πηκτής στοίβασης και είναι αρνητικά φορτισμένη αρχίζει να κινείται προς το ηλεκτρόδιο της ανόδου, παρασέρνοντας τα μόρια των πρωτεϊνών. Όταν όμως εισέρθει στην πηκτή στοίβασης το

χαμηλότερο pH της πηκτής την οδηγεί προς την αμφοτερική μορφή της, με αποτέλεσμα το ηλεκτρικό πεδίο να ασκεί μικρότερη επιρροή πάνω της. Αυτό οδηγεί στην δημιουργία ενός μετώπου γλυκίνης το οποίο έπεται ενός μετώπου πρωτεϊνών. Όταν το μέτωπο φτάσει στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης η γλυκίνη αποκτά ξανά το αρνητικό της φορτίο, λόγω του υψηλού pH του πηκτώματος, και λόγω του μικρού της μοριακού βάρους προσπερνά το πρωτεϊνικό μέτωπο το οποίο, λόγω του μεγέθους των πρωτεϊνών είναι πολύ πιο δυσκίνητο. Κατά συνέπεια οι πρωτεΐνες του δείγματος βρίσκονται στοιβαγμένες στην αρχή της πηκτής ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 2-2: Δομή της πηκτής πολυακρυλαμιδίου και τα ρυθμιστικά διαλύματα που συμμετέχουν στην ηλεκτροφόρηση.

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου παρασκευάζονται επί τόπου σε γυάλινη συναρμολογούμενη (διαφανής για παρατήρηση και μη-αγώγιμη για αποφυγή βραχυκυκλώσεων) μήτρα, που αποτελείται από δυο πλάκες διαστάσεων 101×73 mm και 101×83 mm, οι οποίες διατηρούνται σε απόσταση 1.5mm από δυο μικρότερες πλάκες, η μήτρα ασφαρίζεται περιφερειακά με μεταλλικά κλιπ. Το κάτω άνοιγμα της μήτρας διατηρείται σφραγισμένο με ένα κομμάτι σπογγώδους ελαστικού σε ειδική διάταξη καθ' όλη την διάρκεια της πήξης του πολυακρυλαμιδίου. Η πηκτική θα παραμείνει στην μήτρα αυτή και καθ' όλη την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Αρχικά, παρασκευάζεται η πηκτή ηλεκτροφόρησης. Αυτό πραγματοποιείται με ανάμειξη:

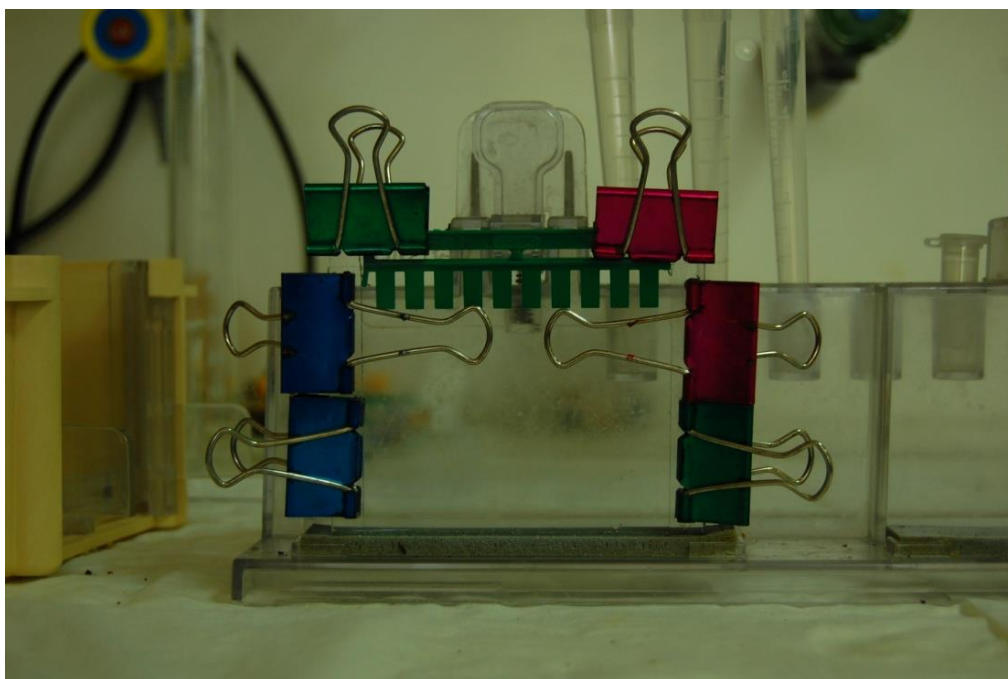
- 1.75 ml υπερκάθαρου νερού,
- 4.7 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.75M Tris-HCl pH 8.8/0.2% SDS,
- 2.9 ml 40% ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο (bis-acrylamide) σε αναλογία 37.5:1
- 15 µl TEMED (Tetramethylethylenediamine), το οποίο λειτουργεί ως καταλύτης του πολυμερισμού και
- 90 µl 10% APS (Ammonium PerSulfate), το οποίο λειτουργεί ως εκκινητής του πολυμερισμού, παρασκευασμένο επιτόπου, λόγω της αστάθειας του σε μορφή διαλύματος.

Τα συστατικά αναδεύονται ελαφρώς και στην συνέχεια διοχετεύονται στην μήτρα, αφήνοντας ένα κομμάτι ύψους περίπου 15 mm ελεύθερο για την περαιτέρω έγχυση της πηκτής επιστοίβασης. Μια προσθήκη μικρής ποσότητας νερού πάνω από την πηκτή συμβάλλει στην εξομάλυνση της εκτεθειμένης επιφάνειας, μειώνοντας τις αλλοιώσεις του σχήματος των πρωτεϊνικών λωρίδων λόγω ανομοιομορφίας της πηκτής. Ο πολυμερισμός διαρκεί περίπου 20-30 min (το υπολειπόμενο διάλυμα πηκτής μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένδειξη για την ολοκλήρωση της πήξης).

Ακολουθεί η παρασκευή της πηκτής επιστοίβασης. Η πηκτή επιστοίβασης παρασκευάζεται με την ανάμειξη:

- 1.5 ml υπερκάθαρου νερού,
- 1.9 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.25 M Tris-HCl pH 6.8/0.2% SDS,
- 0.38 ml 40% ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο (bis-acrylamide) σε αναλογία 37.5:1
- 10 µl TEMED (Tetramethylethylenediamine), το οποίο λειτουργεί ως καταλύτης του πολυμερισμού και
- 30 µl 10% APS (Ammonium PerSulfate) το οποίο λειτουργεί ως εκκινητής του πολυμερισμού, παρασκευασμένο επιτόπου, λόγω της αστάθειας του σε μορφή διαλύματος.

Τα συστατικά αναδεύονται ελαφρώς και διοχετεύονται στην μήτρα, πληρώνοντας όλο τον κενό χώρο που είχε απομείνει. Στην συνέχεια τοποθετείται ειδική κτένα η οποία θα δημιουργήσει εσοχές (πηγάδια, wells) για την τοποθέτηση των δειγμάτων στην πηκτή. Ο πολυμερισμός διαρκεί περίπου 20-30 λεπτά (το υπολειπόμενο διάλυμα πηκτής μπορεί, όπως και προηγουμένως, να χρησιμοποιηθεί ως ένδειξη για την ολοκλήρωση της πήξης). Με την ολοκλήρωση της πήξης, αφαιρείται προσεκτικά η ειδική κτένα, αποκαλύπτοντας τις εσοχές για τα δείγματα.



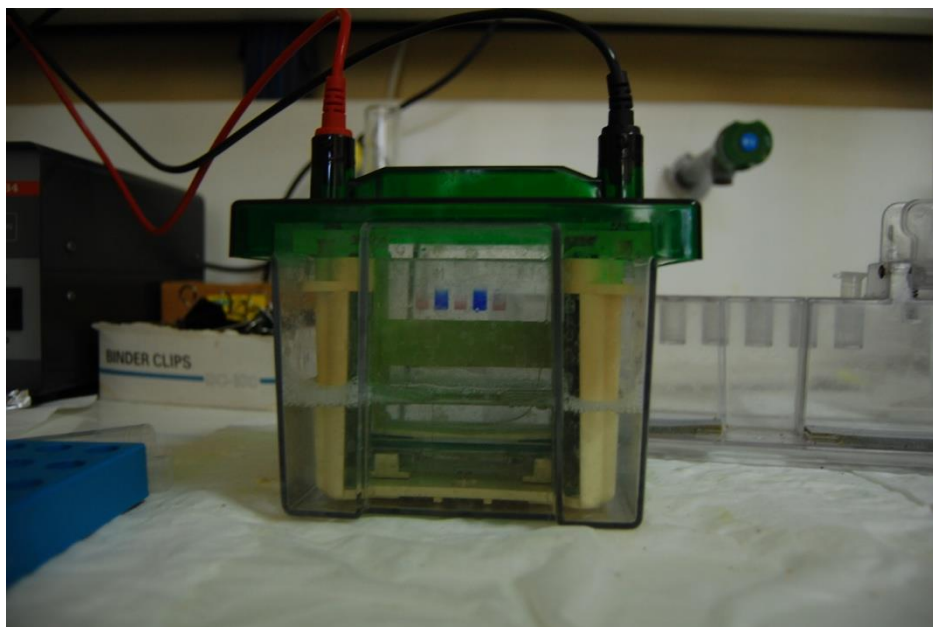
Εικόνα 2-3: Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου μετά την εναπόθεση της στοιβάδας επιστοίβασης και την εφαρμογή της κτένας για την δημιουργία των πηγαδιών.

Στην συνέχεια η γυάλινη μήτρα αφαιρείται από την διάταξη που βρισκόταν κατά την διάρκεια της πήξης και τοποθετείται στο ηλεκτροφορητικό κελί, το οποίο πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα Tris/Glycine/SDS pH 8.3. Το κελί ελέγχεται για διαρροές και εξετάζεται αν η στάθμη του ρυθμιστικού διαλύματος καλύπτει τα ηλεκτρόδια και τα εκτεθειμένα άκρα της πηκτής, ολοκληρώνοντας το κύκλωμα.

Το δείγμα προς ηλεκτροφόρηση προετοιμάζεται ως εξής: Αναμιγνύονται 20 μ l διαλύματος πρωτεΐνης και 7 μ l διαλύματος φόρτωσης (loading buffer), το οποίο παρασκευάζεται με ανάμειξη 1g SDS, 5 ml 0.25 M Tris pH 6.8, 2.5 ml 50% Γλυκερόλης, 2.5 ml 2-Μερκαπτοαιθανόλης και 4 ml 0.1% Βαφής Μπλε της Βρωμοφαινόλης. Το δείγμα πρωτεΐνης-διαλύματος φόρτωσης επωάζεται για 5min σε θερμοκρασία 100 °C.

Κάθε δείγμα τοποθετείται σε ένα από τα πηγάδια που έχουν δημιουργηθεί. Ένα πηγάδι διατηρείται ελεύθερο για την τοποθέτηση μείγματος από πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους, το οποίο λειτουργεί ως δείκτης (PiNK Plus Prestained Protein Ladder, Nippon Genetics), όγκου 7 μ l.

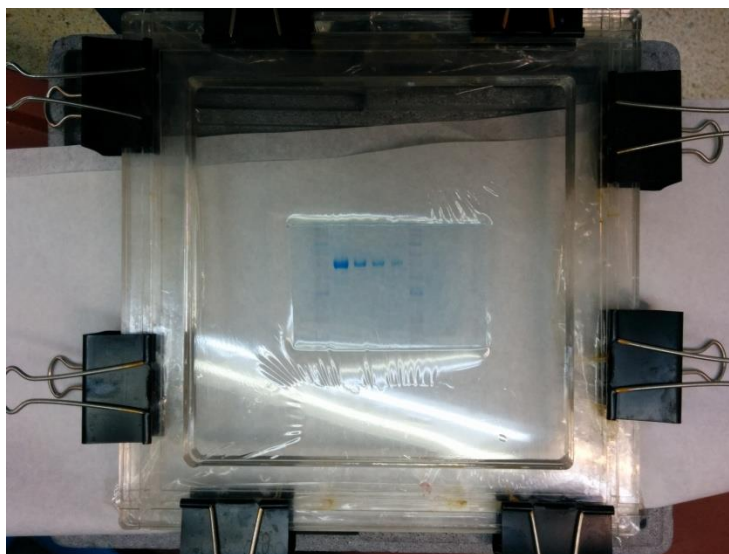
Η διάταξη της ηλεκτροφόρησης τροφοδοτείται με ρεύμα τάσης 200 V και 35 mA. Η διαδικασία διακόπτεται όταν παρατηρηθεί ότι ο δείκτης έχει εκταθεί πλήρως και το μέτωπο της βαφής του δείγματος βρίσκεται κοντά στο άκρο της πηκτής.



Εικόνα 2-4: Η διάταξη της ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου κατά την έναρξη της ηλεκτροφόρησης. Παρατηρούνται τα έγχρωμα δείγματα στα πηγάδια της πηκτής.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί η βαφή της πηκτής για την εμφάνιση της θέσης των πρωτεϊνών. Η γυάλινη μήτρα αποσυναρμολογείται και η πηκτή αφαιρείται προσεκτικά και επώάζεται σε διάλυμα 40% Μεθανόλη, 10% Οξικό οξύ και 50% dH₂O με χρωστική Coomassie Brilliant Blue (0.1%) για 15-20 λεπτά, υπό αργή ανάδευση. Η βαφή εισέρχεται στην πηκτή και προσδένεται στις πρωτεΐνες που βρίσκονται στο εσωτερικό της. Καθώς η βαφή σε αυτό το στάδιο είναι ομοιόμορφη οι βαμμένες πρωτεΐνες δεν ξεχωρίζουν ιδιαίτερα από την βαμμένη πηκτή. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιείται αποχρωματισμός με διάλυμα αποχρωματισμού σύστασης 20% Μεθανόλη, 10% Οξικό Οξύ και 70% Νερό. Η βαφή που δεν έχει προσδεθεί σε πρωτεΐνη παρασύρεται γρηγορότερα από αυτή που είναι προσδεμένη με αποτέλεσμα να γίνεται εμφανής η παρουσία των πρωτεϊνών μέσα στην πηκτή. Η διαδικασία του αποχρωματισμού πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου, σε συσκευή ανάδευσης (Orbit LS, Labnet). Το διάλυμα αποχρωματισμού ανανεώνεται τακτικά μέχρι την επίτευξη της επιθυμητής ευκρίνειας. Η πηκτή τοποθετείται σε ειδική πλάκα με φωτισμό και φωτογραφείται

Η πηκτή είναι δυνατόν να ξηραθεί για ευκολότερη αποθήκευση, αλλά και για επίτευξη μεγαλύτερης ευκρίνειας. Η διαδικασία ξήρανσης πραγματοποιείται ως εξής: Αρχικά απομακρύνεται το διάλυμα αποχρωματισμού και η πηκτή επωάζεται σε διάλυμα 3% γλυκερόλης /30% μεθανόλης για 30 λεπτά για απομάκρυνση του υπολειπόμενου οξικού οξέος καθώς η παρουσία του στην ξηρή πηκτή την καθιστά εύθραυστη. Στην συνέχεια η πηκτή εναποτίθεται μεταξύ δυο ενυδατωμένων φύλλων κυτταρίνης (Cellophane support, Bio-Rad) μαζί με μικρή ποσότητα νερού προς αποφυγή δημιουργίας θυλάκων αέρα. Τα φύλλα τοποθετούνται μεταξύ δυο πλαισίων και ασφαλιζονται ώστε η πηκτή να παραμείνει στερεωμένη μεταξύ τους. Η διάταξη αφήνεται μέχρι να απομακρυνθεί το νερό δια μέσου των πόρων των μεμβρανών και η μεμβράνη να ξηραθεί επαρκώς.



Εικόνα 2-5: Ξήρανση της πηκτής.

2.2.1.3 *Ισοηλεκτρική εστίαση (Isoelectric Focusing)-Υπολογισμός ισοηλεκτρικού σημείου (pI) πρωτεΐνης*

Η τεχνική της ισοηλεκτρικής εστίασης είναι μια ηλεκτροφορητική τεχνική που επιτρέπει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI).

Οι πρωτεΐνες είναι αμφολυτικά μόρια, ιδιότητα που προέρχεται από την αμφολυτική φύση των αμινοξέων που τις αποτελούν. Κατά συνέπεια, μια πρωτεΐνη μπορεί να είναι φορτισμένη αρνητικά ή θετικά ή να είναι ουδέτερη ηλεκτρικά, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Το ισοηλεκτρικό σημείο μιας πρωτεΐνης αποτελεί την τιμή pH για την οποία εμφανίζεται η ηλεκτρικά ουδέτερη συμπεριφορά, δηλαδή η κατάσταση όπου τα αρνητικά και τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα είναι ίσα σε αριθμό. Σε τιμές pH άνω του pI η πρωτεΐνη είναι αρνητικά φορτισμένη και σε τιμές pH κάτω αυτού, θετικά φορτισμένη. Η τιμή του αποτελεί μια πληροφορία με ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς στο σημείο αυτό η πρωτεΐνη εμφανίζει ελάχιστη διαλυτότητα και μπορεί να καταβυθιστεί, με αποτέλεσμα την δραστική μείωση της ενεργότητας της.

Η ισοηλεκτρική εστίαση πραγματοποιείται, όπως και η SDS-PAGE, σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό την επιρροή ηλεκτρικού πεδίου, με την διαφορά ότι αυτή την φορά η πηκτή έχει κατασκευαστεί με προσθήκη Pharmalyte™ (μίγμα από γλυκίνη, δι-γλυκίνη αμίνες και επιχλωρυδρίνη), που χρησιμοποιείται για την δημιουργία μια βαθμίδωσης pH στο εσωτερικό της πηκτής. Η πηκτή παραλαμβάνεται έτοιμη (PhastGel IEF – 3-9) σε προστατευτική συσκευασία και είναι παρασκευασμένη πάνω σε πλαστικό υμένιο ώστε να είναι δυνατός ο χειρισμός χωρίς να αλλοιώνεται η πηκτή. Τοποθετείται στο ειδικό παράθυρο της συσκευής PhastGel, με προσθήκη μικρής ποσότητας νερού για την ομοιόμορφη εφαρμογή της στην προκαθορισμένη θέση. Η θέση εναπόθεσης της πηκτής είναι θερμοκρασιακά ελεγχόμενη ώστε να αποφευχθεί υπερθέρμανση λόγω της ροής του ρεύματος. Στην συνέχεια, χαμηλώνονται τα ηλεκτρόδια της συσκευής ώστε να έρθουν σε επαφή με τα άκρα της πηκτής. Κατόπιν προετοιμάζονται τα επιθυμητά δείγματα πρωτεϊνών, μαζί με δείγμα που περιέχει πρωτεΐνες με γνωστό pI (Amersham Broad range pI Calibration Kit) και έρχονται σε επαφή με τις άκρες του εφαρμογέα δειγμάτων οι οποίες είναι σχεδιασμένες ώστε να συγκρατούν καθορισμένη ποσότητα δείγματος, ίση με 1 μl. Ο εφαρμογέας τοποθετείται στην θέση του στην συσκευή, προς αναμονή της εφαρμογής των δειγμάτων στην πηκτή. Η διάταξη ασφαλίζεται προς αποφυγή ηλεκτροπληξίας και εφαρμόζεται το ακόλουθο πρόγραμμα τάσεων:

- Φάση 1: Εφαρμογή τάσης 2000 V στα 2.5 mA (3.4 W) για 75 Vh. Σε αυτή την φάση πραγματοποιείται η βαθμίδωση του pH. Οι αμφολύτες του Pharmalyte™ μετακινούνται στην πηκτή δημιουργώντας περιοχές διαφορετικής σύστασης, άρα και διαφορετικού pH, με τους πιο όξινους να βρίσκονται πιο κοντά στην άνοδο και τους πιο βασικούς, στην κάθοδο.
- Φάση 2: Εφαρμογή δειγμάτων και αλλαγή τάσης στα 200 V στα 2.5 mA (3.4 W) για 15 Vh. Σε αυτή την φάση ο εφαρμογέας χαμηλώνεται αυτόματα και πραγματοποιείται η μεταφορά των δειγμάτων στην πηκτή.
- Φάση 3: Άρση του εφαρμογέα και επαναφορά τάσης 2000 V στα 2.5 mA (3.4 W) για 410 Vh. Σε αυτή την φάση πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των δειγμάτων με βάση το pI τους. Η διάρκεια της φάσης αυτής μπορεί να εκταθεί όσο χρειαστεί μέχρι να πραγματοποιηθεί η βαφή τους, ώστε να αποφευχθεί η διάχυση των πρωτεϊνών.



Εικόνα 2-6: Συσκευή διαχωρισμού και ελέγχου της διάταξης PhastSystem™

Η διαδικασία της εμφάνισης της πηκτής έχει ως ακολούθως:

- Βήμα 1: Καταβύθιση των πρωτεϊνών πάνω στην πηκτή με υδατικό διάλυμα 20% τριχλωροοξικό οξύ για 5 min στους 20 °C.
- Βήμα 2: Έκπλυση με υδατικό διάλυμα 30% μεθανολη-10% οξικό οξύ για 2 min στους 20 °C
- Βήμα 3: Βαφή της πηκτής με διάλυμα 0.02% PhastGel Blue R σε διάλυμα 30% μεθανολη-10% οξικό οξύ, παρουσία 0.1% CuSO₄ για 10 min στους 50 °C. Το διάλυμα PhastGel Blue R παρασκευάζεται από διάλυμα στοκ αραιωμένο 10 φορές με διάλυμα έκλυσης του βήματος 2. Το στοκ διάλυμα έχει παρασκευαστεί με διάλυση 1 ταμπλέτας PhastGel Blue R σε 80 ml νερού, ανάδευση για 10 min και στην συνέχεια προσθήκη 120 ml μεθανόλης.
- Βήμα 4: Έκπλυση με υδατικό διάλυμα 30% μεθανολη-10% οξικό οξύ για 10 min στους 50 °C

Μετά την βαφή της πηκτής μπορεί να πραγματοποιηθεί απεικόνιση της με φωτογραφικά μέσα.

2.3 Μετασχηματισμός, παραγωγή και παραλαβή του ενζύμου

2.3.1 Μετασχηματισμός του γονιδίου σε κύτταρα *P. pastoris*

Το γονίδιο παραλαμβάνεται ως προϊόν *de novo* σύνθεσης γνωστού κομματιού του γονιδιώματος του *M. thermophila*. Το πλασμίδιο στο οποίο είναι ενσωματωμένο (pUC57) περιέχει ειδικές περιοχές για την κοπή του με περιοριστικά ένζυμα, μια περιοχή που κωδικοποιεί για αντίσταση στην Αμικικιλίνη και μια περιοχή έναρξης αντιγραφής με οδηγίες για αντιγραφή και συντήρηση μεγάλου αριθμού του πλασμιδίου. Το πλασμίδιο έχει υποστεί λυοφιλίωση για την αποθήκευσή του, οπότε πριν την χρήση ενυδατώνεται με υπερκάθαρο νερό (Milli-Q) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για τον πολλαπλασιασμό του παραληφθέντος πλασμιδίου, γίνεται χρήση δεκτικών κυττάρων *E.coli* TOP10 (κύτταρα επεξεργασμένα με CaCl_2) τα οποία παραλαμβάνονται από απόθεμα που διατηρείται στους -80°C . Για τον μετασχηματισμό τους με το πλασμίδιο γίνεται χρήση της τεχνικής θερμικού σοκ (heat shock). Αναμειγνύονται 5 μl διαλύματος πλασμιδίου και 100 μl κυττάρων TOP10 σε δοχείο Eppendorf και τοποθετούνται σε λουτρό πάγου για 30 min. Το μείγμα στην συνέχεια τοποθετείται για 90s σε θερμοκρασία 42°C και ύστερα επαναφέρεται στο λουτρό πάγου για μερικά λεπτά, ώστε να ψυχθεί ξανά. Εν συνέχεια, στο μίγμα προστίθενται 200 μl μέσου LB με Αμικικιλίνη και αφήνεται να επωαστεί για 18h στους 37°C . Ποσότητες 100 και 200 μl από την καλλιέργεια χρησιμοποιούνται για εμβολιασμό δυο τρυβλίων LB με Αμικικιλίνη, τα οποία επωάζονται με την σειρά τους για 18 h στους 37°C . Από τα τρυβλία επιλέγονται 5 μεμονωμένες αποικίες (αποικίες που εμφανίζουν αντίσταση στο αντιβιοτικό, άρα κατά συνέπεια έχουν δεχθεί το πλασμίδιο) από τις οποίες απομονώνεται το πλασμίδιο με Sigma-Aldrich *E.Coli* plasmid extraction kit. Στα απομονωμένα πλασμίδια πραγματοποιείται ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα *Cla* I και *Xba* I ώστε να εξακριβωθεί η επιτυχία του μετασχηματισμού. Για την αντίδραση περιορισμού αναμειγνύονται 5 μl απομονωμένου πλασμιδίου με 2 μl 10X Buffer M (Invitrogen), 1 μl εμπορικού περιοριστικού ενζύμου *Cla* I, 1 μl εμπορικού περιοριστικού ενζύμου *Xba* I και 11 μl υπερκάθαρου νερού. Το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 90 min και στην συνέχεια ηλεκτροφορεύεται σε πηκτή αγαρόζης 1% για έλεγχο του αποτελέσματος της πέψης. Η ύπαρξη έντονης φθορίζουσας λωρίδας στα ~1400b επισημαίνει την επιτυχία της πέψης. Το κομμάτι της πηκτής που περιέχει την λωρίδα αφαιρείται και το κομμένο γονίδιο απομονώνεται με την βοήθεια του Sigma-Aldrich Gel Extraction Kit.

Ομοίως, πραγματοποιείται αύξηση του πλασμιδίου pPICZαC σε *E.coli* TOP10 και πέψη του με περιοριστικά ένζυμα *Cla* I και *Xba* I. Το κομμένο πλασμίδιο που προκύπτει ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης 1% και απομονώνεται με Sigma-Aldrich Gel Extraction Kit.

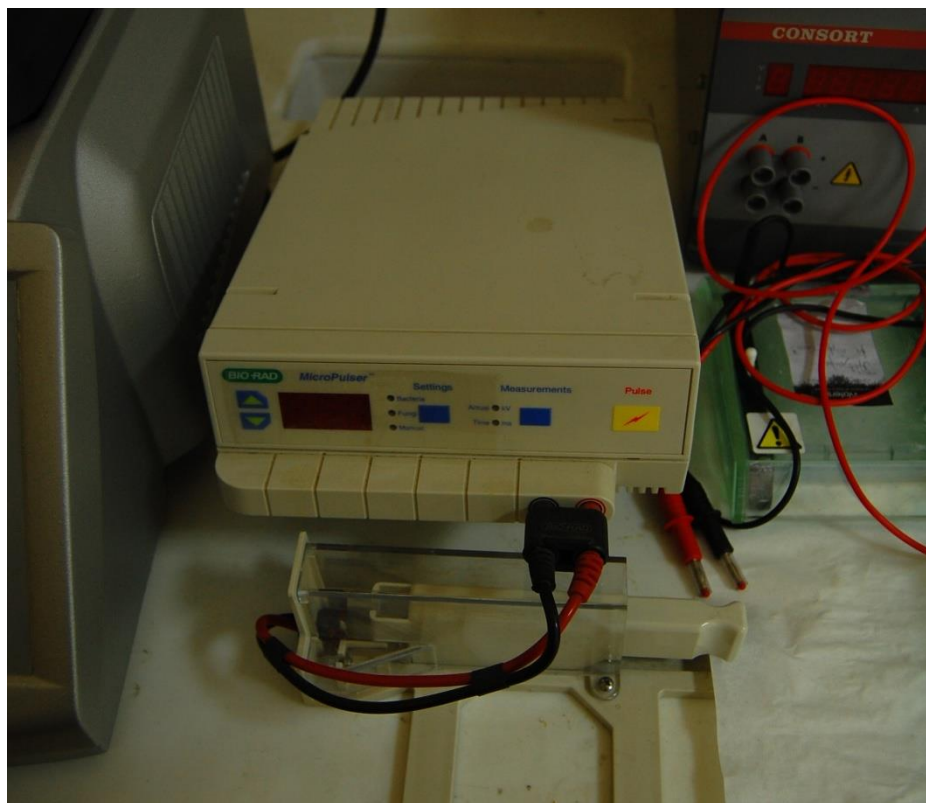
Τα χωνευμένα κομμάτια DNA του πλασμιδίου PICZαC (Vector) και του γονιδίου (Insert) συγκολλούνται με την βοήθεια T4 DNA Ligase (Invitrogen) σε αντίδραση όγκου 20 μl (9 μl dH₂O, 2 μl Ligase Buffer 10X, 1 μl Vector, 7 μl Insert, 1 μl T4 Ligase)

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZαC/*MtMan26a* πολλαπλασιάζεται ξανά σε *E.coli* TOP10 με την τεχνική του θερμικού σοκ και ανάπτυξη σε τρυβλίο LB με Zeocin για 16 h. Κύτταρα που έχουν παραλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο είναι ανθεκτικά σε Zeocin και αναπτύσσονται στο τρυβλίο. Επιλέγονται αποικίες, οι οποίες μεταφέρονται σε υγρή καλλιέργεια LB/Zeocin για 18h. Στην συνέχεια τα κύτταρα λύνονται και το πλασμίδιο απομονώνεται με Sigma-Aldrich E.Coli plasmid extraction kit. Τα δείγματα πλασμιδίου υπόκεινται σε ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα *Cla*I/*Xba*I ώστε να εξακριβωθεί η επιτυχία της διαδικασίας του πολλαπλασιασμού.

Μετά την εξακρίβωση της επιτυχίας του πολλαπλασιασμού του επιθυμητού πλασμιδίου πραγματοποιείται ο τελικός μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) σε κύτταρα *P. pastoris*.

Το πλασμίδιο προετοιμάζεται για την διαδικασία με γραμμικοποίηση. Η γραμμικοποίηση του πλασμιδίου γίνεται από το περιοριστικό ένζυμο *Sac*I στους 37 °C για 2.5 h (το οποίο τέμνει σε σημείο όπου δεν επηρεάζει τις λειτουργικές περιοχές του πλασμιδίου). Το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο έχει μεγαλύτερες πιθανότητες να παραληφθεί από τα κύτταρα και μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα της *P.pastoris*.

Η διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης πραγματοποιείται σε κυψελίδα με αγώγιμα τοιχώματα η όποια τοποθετείται σε συσκευή η όποια εφαρμόζει παλμούς ρεύματος σε συγκεκριμένης τάσης για συγκεκριμένο χρόνο. Στην κυψελίδα τοποθετούνται 30 μl γραμματικοποιημένου πλασμιδίου και 80 μl δεκτικών κυττάρων και εφαρμόζεται παλμός 2 kV για 4 ms. Με την ολοκλήρωση του παλμού προστίθενται άμεσα 1 ml διαλύματος 1 M Σορβιτόλης και τα κύτταρα επωάζονται στους 30 °C για 2h. Ακολουθεί εμβολιασμός τρυβλίων YPDS/Zeocin με τα μετασχηματισμένα κύτταρα και πραγματοποιείται επώαση τους για 18h στους 30 °C.



Εικόνα 2-7: Διάταξη ηλεκτροδιάρτησης MicroPulser.

2.3.2 Καλλιέργεια και παραλαβή καθαρού ενζύμου.

Η επιλογή των καλλιιεργειών καταλλήλων για παράγωγη του ενζύμου γίνεται με Plate Assay σε μέσο που περιέχει, πέρα από τα απαραίτητα θρεπτικά για την ανάπτυξη της *P.pastoris*, Μεθανόλη για την επαγωγή της έκφρασης και γαλακτομαννάνη για την παρατήρηση της ενεργότητας (Plate Assay medium). Το τρυβλίο χωρίζεται σε περιοχές όπου η κάθε μια εμβολιάζεται με μια μετασχηματισμένη αποικία. Μετά από ανάπτυξη για 18h στους 30 °C το τρυβλίο βάφεται με διάλυμα Congo Red 1% (βαφή η οποία προσδέεται σε πολυσακχαρίτες) για 15min. Στην συνέχεια εκπλένεται με H₂O και διάλυμα 1M NaCl ώστε να απομακρυνθεί η μη-προσδεμένη βαφή. Οι αποικίες εμφανίζουν αποχρωματισμένους δίσκους που σηματοδοτούν την αποδόμηση του πολυσακχαρίτη στην περιοχή αυτή. Επιλέγεται ένας αριθμός από τις αποικίες που εμφανίζουν την μεγαλύτερη δραστηριότητα, για καλλιέργεια μεγαλύτερης κλίμακας.

Για την παράγωγη μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου πραγματοποιείται υγρή καλλιέργεια. Αρχικά, εμβολιάζονται προ-καλλιέργειες μικρότερου μεγέθους για ανάπτυξη του επαρκούς πληθυσμού για τον εμβολιασμό μεγαλύτερων καλλιιεργειών. Η προκαλλιέργεια πραγματοποιείται

σε μέσο BMGY και όγκο 20 ml για 18h στους 30 °C υπό ανάδευση. Στην συνέχεια εμβολιάζεται η κύρια καλλιέργεια (μέσο BMMY, όγκος 50 ml) με κατάλληλη ποσότητα μικροοργανισμών ώστε η τελική οπτική πυκνότητα στα 600nm στην κύρια καλλιέργεια να ανέρχεται στη 1 μονάδα απορρόφησης. Οι κύριες καλλιέργειες τροφοδοτούνται με 1.25ml μεθανόλης κάθε 24h, η όποια επάγει την παράγωγή του ενζύμου και ταυτόχρονα αποτελεί και πηγή ανθρακα για την ανάπτυξη των κυττάρων. Η οπτική πυκνότητα στα 600nm και η ενεργότητα του εσωκυτταρικού υγρού σε υπόστρωμα γαλακτομαννάνης καταγράφονται καθημερινά για καλύτερη παρατήρηση της εξέλιξης της καλλιέργειας. Μετά από το πέρας ~120h οι καλλιέργειες διακόπτονται και τα προϊόντα τους συλλέγονται και καθαρίζονται.

Το περιεχόμενο των κυρίων καλλιιεργειών φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο υγρό διηθείται υπό κενό και στην συνέχεια φιλτράρεται με φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.45μm και κατόπιν 0.2μm (Whatman, USA). Το φιλτραρισμένο διάλυμα συμπυκνώνεται 10 φορές σε συσκευή Amicon με χρήση φίλτρου διαμέτρου πόρων 30kDa σε τελικό όγκο 50 ml. Το συμπυκνωμένο διάλυμα εξισορροπείται σε μεμβράνη διαπίδυσης κυτταρίνης (όριο αποκοπής μ.β. 14000) με διάλυμα Talon για 18 h.

Περαιτέρω καθαρισμός πραγματοποιείται με χρήση στήλης ιοντικής συγγένειας μετάλλων τύπου Talon. Η ρητίνη της στήλης εμφανίζει έντονη συγγένεια με μια συστάδα από 6 αμινοξέα Ιστιδίνης (6-His Tag) τα οποία είναι σκοπίμως κωδικοποιημένα στο τέλος της ετερόλογα εκφραζόμενης πρωτεΐνης, επομένως κατακρατούνται μόνο οι επιθυμητές πρωτεΐνες από την ρητίνη, ενώ οι υπόλοιπες εκλούονται. Οι δεσμευμένη πρωτεΐνη εκλούεται με την διέλευση διαλύματος Talon-100mM Ιμιδαζόλιο (Imidazole) από την στήλη, με το Ιμιδαζόλιο να εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με τα ιόντα της ρητίνης, αντικαθιστώντας έτσι την δεσμευμένη πρωτεΐνη.

Η στήλη εξισορροπείται με διέλευση 300 ml διαλύματος Talon σε ρυθμό 2.5 ml/min, στην συνέχεια διοχετεύεται στην στήλη με ρυθμό 2 ml/min το συμπυκνωμένο προϊόν των καλλιιεργειών. Ακολουθεί έκπλυση της στήλης με ρυθμό 2 ml/min από μίγμα Talon/Talon-Ιμιδαζόλιο και συλλογή των κλασμάτων. Τα συλλεγόμενα κλάσματα φωτομετρούνται στα 280nm και συλλέγονται όσα εμφανίζουν απορρόφηση στο μήκος κύματος αυτό. Το διάλυμα εξισορροπείται για 18h με μεμβράνη διαπίδυσης κυτταρίνης με διάλυμα Tris-HCl 20mM pH 8 με Sodium Azide 0.01% για αφαίρεση του Ιμιδαζόλιου προς μακροχρόνια αποθήκευση.

2.4 Χαρακτηρισμός ενζύμου

2.4.1 Παραγόμενη ποσότητα και καθαρότητα ενζύμου

Η παραγόμενη ποσότητα ελέγχεται φωτομετρικά στα 280nm με χρήση εμπειρικού τύπου που υπολογίζει την συντελεστή απορρόφησης βάσει της σύστασης του ενζύμου σε συγκεκριμένα αμινοξέα. Ο εμπειρικός τύπος δίνει μια καλή ($\pm 5\%$, μεγαλύτερη απόκλιση για πρωτεΐνες χωρίς υπολείμματα τρυπτοφάνης) και γρήγορη (απλή φωτομέτρηση) εκτίμηση της συγκέντρωσης.

Ο τύπος που δίνεται από την βιβλιογραφία έχει ως εξής:

$$\epsilon_{tot} = a \cdot \epsilon_{Tyr} + b \cdot \epsilon_{Trp} + c \cdot \epsilon_{Cystine}$$

Όπου:

ϵ_{tot} : Ο συνολικός συντελεστής σε $M^{-1}cm^{-1}$.

ϵ_{Tyr} : Ο συντελεστής συνεισφοράς των υπολειμμάτων Τυροσίνης ίσος με $1490 M^{-1}cm^{-1}$

ϵ_{Trp} : Ο συντελεστής συνεισφοράς των υπολειμμάτων Τρυπτοφάνης ίσος με $5500 M^{-1}cm^{-1}$

$\epsilon_{Cystine}$: Ο συντελεστής συνεισφοράς των υπολειμμάτων Κυστίνης (ζεύγος Κυστεϊνών ενωμένες με δισουλφιδικό δεσμό) ίσος με $125 M^{-1}cm^{-1}$

a, b, c : Ο αριθμός Τυροσίνων, Τρυπτοφάνων, Κυστινών στην πρωτεΐνη.

Ο συντελεστής απορρόφησης υπολογίζεται με το υπολογιστικό εργαλείο ProtParam (ExPASy, SIB Bioinformatics Resource Portal) το οποίο δέχεται την αλληλουχία μιας πρωτεΐνης σε αμινοξέα και υπολογίζει τον αντίστοιχο συντελεστή ϵ_{tot} αυτής. Η αλληλουχία της πρωτεΐνης εξάγεται από την γνωστή αλληλουχία της πρωτεΐνης σε, με μέριμνα για τα επιπλέον αμινοξέα που προστίθενται κατά τον μετασχηματισμό. Συγκεκριμένα, το c-myc epitope και το 6-His tag. Ο συντελεστής υπολογίζεται, σύμφωνα με τα παραπάνω, ίσος με $142780 M^{-1}cm^{-1}$.

Εάν ο συντελεστής ϵ_{tot} διαιρεθεί με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης ($MW_{MtMan26a} = 52862 g/mol$) προκύπτει η οπτική πυκνότητα της πρωτεΐνης στα 280nm: $OD_{280nm} = 2.701 \frac{1}{l * cm}$

Η ενεργότητα του ενζύμου σε Units ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1mmol/min αναγωγικά άκρα από υπόστρωμα γαλακτομαννάνης 0.5% στους 60 °C και pH 6.

Για τον έλεγχο της καθαρότητας, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου 12.5% (SDS-PAGE).

2.4.2 Βέλτιστο pH

Για τον υπολογισμό του βέλτιστου pH λειτουργίας του ενζύμου πραγματοποιούνται αντιδράσεις όγκου 600 μl με 300 μl διάλυμα 1% Carob Galactomannan, 270 μl ρυθμιστικού διαλύματος διαφορετικού pH και 30 μl διαλύματος ενζύμου συγκέντρωσης 0.01 mg/ml (τελική συγκέντρωση στην αντίδραση 0.0005 mg/ml), για 15 min, στους 50 °C με ανάδευση 300 rpm. Κάθε φορά χρησιμοποιείται μια αντίδραση ελέγχου η οποία περιέχει 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 20mM pH 8 χωρίς ένζυμο.

Ο προσδιορισμός των ολικών αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα μαννόζης πραγματοποιείται με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Μεγαλύτερη ενεργότητα επάγει την ελευθέρωση περισσότερων αναγωγικών άκρων. Χρησιμοποιούνται δυο δείγματα των 0.25 ml από κάθε αντίδραση τα οποία αναμειγνύονται με ίσους όγκους διαλύματος δινιτροσαλικυλικού οξέως και επωάζονται για 5min σε λουτρό 100 °C .Εν συνέχεια αραιώνονται με 2 ml H₂O και μετράται η απορρόφηση στα 540nm σε σχέση με την αντίδραση ελέγχου.

2.4.3 Βέλτιστη Θερμοκρασία

Για τον υπολογισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας λειτουργίας του ενζύμου πραγματοποιούνται αντιδράσεις όγκου 600 μl με 300 μl διάλυμα 1% Carob Galactomannan, 270 μl ρυθμιστικού διαλύματος Citric Acid-Sodium Phosphate pH 6 και 30 μl διαλύματος ενζύμου συγκέντρωσης 0.01 mg/ml (τελική συγκέντρωση στην αντίδραση 0.0005 mg/ml), για 15min, με ανάδευση 300rpm σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Κάθε φορά χρησιμοποιείται μια αντίδραση ελέγχου η οποία περιέχει 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 20mM pH 8 χωρίς ένζυμο.

Ο προσδιορισμός των ολικών αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα μαννόζης πραγματοποιείται με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

2.4.4 Θερμοκρασιακή σταθερότητα (Thermal Stability)

Για τον έλεγχο της σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες, διάλυμα ενζύμου συγκέντρωσης 0.01 mg/ml επωάζεται σε σταθερή θερμοκρασία με λήψη δειγμάτων ανά τακτά χρονικά διαστήματα και μέτρηση της ενεργότητας αυτών.

Πραγματοποιείται αντίδραση όγκου 600 μl με 300 μl διάλυμα 1% Carob Galactomannan, 270 μl ρυθμιστικού διαλύματος Citric Acid-Sodium Phosphate pH 6 και 30 μl διαλύματος ενζύμου συγκέντρωσης 0.01 mg/ml (τελική συγκέντρωση στην αντίδραση 0.0005 mg/ml), για 15 min, με ανάδευση 300 rpm σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Κάθε φορά χρησιμοποιείται μια αντίδραση ελέγχου η οποία περιέχει 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 20mM pH 8 χωρίς ένζυμο.

Ο προσδιορισμός των ολικών αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα μαννόζης πραγματοποιείται με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

2.4.5 Σταθερότητα σε pH (pH Stability)

Για τον έλεγχο της σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικά pH, ρυθμιστικό διάλυμα συγκεκριμένου pH με συγκέντρωση ενζύμου 0.01mg/ml επωάζεται στους 4 °C για 24 h. Δείγματα λαμβάνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα προς μέτρηση της ενεργότητάς τους.

Πραγματοποιείται αντίδραση όγκου 600 μl με 300 μl διάλυμα 1% Carob Galactomannan, 270 μl ρυθμιστικού διαλύματος Citric Acid-Sodium Phosphate pH 6 και 30μl διαλύματος ενζύμου συγκέντρωσης 0.01 mg/ml (τελική συγκέντρωση στην αντίδραση 0.0005 mg/ml), για 15 min, με ανάδευση 300 rpm σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Κάθε φορά χρησιμοποιείται μια αντίδραση ελέγχου η οποία περιέχει 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 20 mM pH 8 χωρίς ένζυμο.

Ο προσδιορισμός των ολικών αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα μαννόζης πραγματοποιείται με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

2.4.6 Κινητική δράσης ενζύμου

Για την παρατήρηση της κινητικής της δράσης του ενζύμου πραγματοποιούνται αντιδράσεις όγκου 600 μl με 300 μl διαλύματος Carob Galactomannan σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, 270 μl ρυθμιστικού διαλύματος Citric Acid-Sodium Phosphate pH 6 και 30 μl διαλύματος ενζύμου συγκέντρωσης 0.01 mg/ml (τελική συγκέντρωση στην αντίδραση 0.0005 mg/ml), για 15 min, με ανάδευση 300 rpm στους 60 °C. Χρησιμοποιείται μια αντίδραση ελέγχου η οποία περιέχει 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 20 mM pH 8 χωρίς ένζυμο.

Ο προσδιορισμός των ολικών αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα μαννόζης πραγματοποιείται με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

2.4.7 Δραστικότητα σε διαφορετικά υποστρώματα

Εξετάστηκε η περίπτωση εμφάνισης ενεργότητας σε υποστρώματα Γλυκομαννάνης (Glucomannan), β-γλουκάνης (b-Glucan) και Ξυλάνη Σημύδας (Birch Xylan), πολυσακχαρίτες που απαντώνται συχνά στα φυσικά υποστρώματα. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις όγκου 600 μl με 300 μl διαλύματος υποστρώματος 1% σε 270 μl ρυθμιστικού διαλύματος Citric Acid-Sodium Phosphate pH 6 και 30 μl διαλύματος ενζύμου 0.02 mg/ml, για 15 min, με ανάδευση 300 rpm στους 60 °C. Χρησιμοποιείται μια αντίδραση ελέγχου η οποία περιέχει 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 20 mM pH 8 χωρίς ένζυμο.

Ο προσδιορισμός των ολικών αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα μαννόζης πραγματοποιείται με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

2.4.8 Έλεγχος Δέσμευσης από κρυσταλλική κυτταρίνη

Εξετάστηκε η δυνατότητα του ενζύμου να προσδένεται σε κρυσταλλική κυτταρίνη (Avicell). Αιώρημα 10 mg/ml Avicell σε ρυθμιστικό διάλυμα Citric Acid-Sodium Phosphate pH 6 επωάζεται στους 4 °C για 1h μαζί με διαφορετικές ποσότητες ενζύμου ανά mg Avicell. Στην συνέχεια το αιώρημα φυγοκεντρείται και μετράται η ενεργότητα του υπερκείμενου υγρού σε αντίδραση όγκου 600 μl με 300 μl διαλύματος υποστρώματος Carob galactomannan 1% σε 270μl ρυθμιστικού διαλύματος Citric Acid-Sodium Phosphate pH 6 και 30 μl διαλύματος υπερκείμενου, για 15 min, με ανάδευση 300 rpm στους 60 °C.

Ο προσδιορισμός των ολικών αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα μαννόζης πραγματοποιείται με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

2.4.9 Συνεργιστική δράση σε φυσικά υποστρώματα

Εξετάστηκε η δράση του ενζύμου πάνω σε φυσικό υπόστρωμα προκατεργασμένης βιομάζας με ταυτόχρονη παρουσία εμπορικών ενζύμων που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση της Λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.

Χρησιμοποιήθηκε πρώτη ύλη Lignocel η οποία έχει επεξεργαστεί σε υψηλή πίεση σε διάλυμα 50/50-H₂O/Ακετόνης. Το δείγμα περιέχει 2.07% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ, 1.33% λιγνίνη διαλυόμενη σε οξύ, 86.68% κυτταρίνη και 10.27% ημικυτταρίνη.

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις εμπορικών ενζύμων και MtMan26a, καθώς και αντιδράσεις ελέγχου με Αλβουμίνη Βόειου Ορού (BSA, Bovine Serum Albumin).

Σε τέτοιου είδους πειράματα συνεργατισμού συχνά παρατηρείται δέσμευση λειτουργικής πρωτεΐνης από το στερεό υπόστρωμα, μειώνοντας την δραστηριότητα της. Με την προσθήκη επιπλέον ποσότητας κάποιας άλλης πρωτεΐνης, ένα μέρος της θα καταλήξει, επίσης, δεσμευμένο στο υπόστρωμα. Καθώς το υπόστρωμα μπορεί να δεσμεύσει περιορισμένη ποσότητα πρωτεϊνών η νέα πρωτεΐνη θα καταλάβει θέσεις που, απουσία αυτής, θα καταλαμβάνονταν από πρωτεΐνη που παρουσιάζει ενεργότητα, επιτρέποντας έτσι σε μεγαλύτερη ποσότητα της ενεργής πρωτεΐνης να

κινηθεί ελεύθερα και να πραγματοποιήσει την δράση της. Επομένως, υπάρχει περίπτωση να παρατηρηθεί αύξηση στην απόδοση της αντίδρασης ακόμη και αν η επιπρόσθετη πρωτεΐνη δεν εμφανίζει καμία δράση πάνω στο υπόστρωμα., απλά και μόνο επειδή η τελευταία "θυσιάζεται" αντί της ενεργής πρωτεΐνης.

Για την αποφυγή σφαλμάτων λόγου αυτού του φαινομένου η συνεργιστική δραστηριότητα της *MtMan26a* συγκρίνεται με αντίδραση όπου η *MtMan26a* έχει αντικατασταθεί από ίση ποσότητα αλβουμίνης (η οποία δεν εμφανίζει ενεργότητα πάνω στο υπόστρωμα).

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν σχεδιαστήκαν σε τελικό όγκο 1.5 ml με 6% (90 mg) υποστρώματος προκατεργασμένου Lignocel. Τα εμπορικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Celluclast 1.5L και Novozyme 188 σε αναλογία 5:1 (v/v) (συγκέντρωση ενζύμων στο μίγμα: 18.85 mg/ml). Το υπόστρωμα Lignocel έχει προκατεργαστεί με διάλυμα 50/50 Ακετόνη-Νερό υπό ατμόσφαιρα αέρα υψηλής πίεσης εμπλουτισμένου σε 40% v/v περιεκτικότητα σε οξυγόνο. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε pH 5 και θερμοκρασία 50 °C.

Πίνακας 2-3: Σύσταση αντιδράσεων συνεργισισμού.

Αντίδραση	1	2	3	4
Celluclast-Nov. 188 5:1 (mg/g _s)	6	6	6	6
<i>Mtman26</i> (mg/g _s)	-	-	3	6
Αλβουμίνη (mg/g _s)	3	6	-	-

Ομοιογενή δείγματα όγκου 100 μl προλαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για τον έλεγχο της προόδου της αντίδρασης. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για την καταβύθιση του στερεού μέρους και το υπερκείμενο υγρό αραιώνεται κατάλληλα ώστε να μετρηθεί η περιεκτικότητα του σε ολικά αναγωγικά σάκχαρα με την μέθοδο DNS και η περιεκτικότητα του σε γλυκόζη με την μέθοδο GOD-PAP.

Η μέθοδος GOD-PAP είναι μια ενζυμική μέθοδος προσδιορισμού γλυκόζης. Βασίζεται στην επιλεκτική αντίδραση της γλυκόζης με οξυγόνο και νερό από το ένζυμο οξειδωση της γλυκόζης (GOD) προς γλουκονικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Δυο μόρια

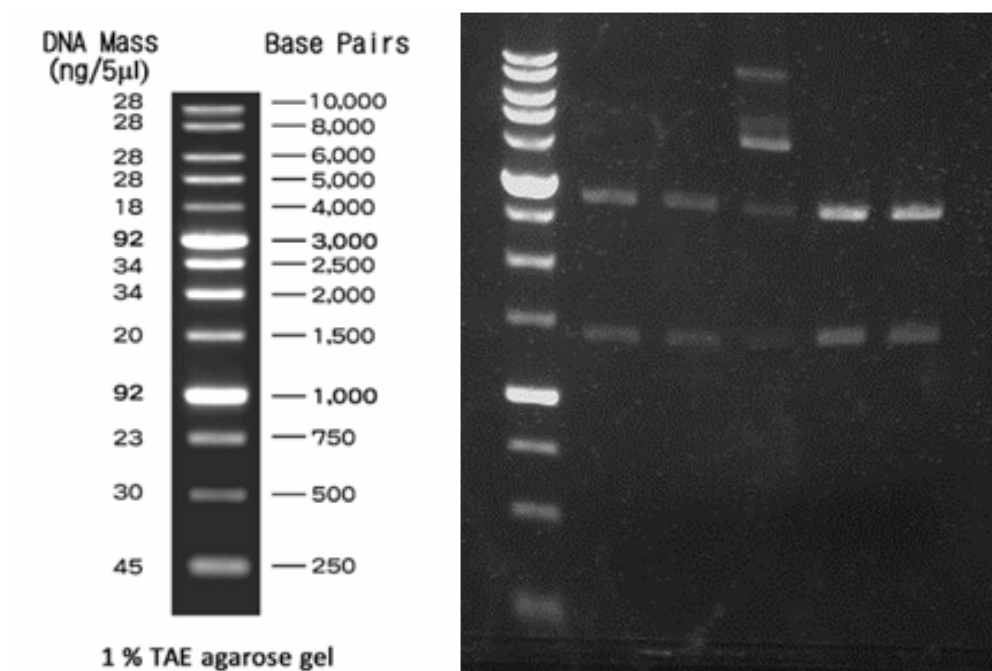
Κεφάλαιο: 2.4 Χαρακτηρισμός ενζύμου

υπεροξειδίου του υδρογόνου αντιδρούν, στην συνέχεια, με ένα φαινολικό μόριο και ένα μόριο Αμινοφαιναζόνης με την βοήθεια του ενζύμου υπεροξειδάση (POD) προς παραγωγή 4 μορίων νερού και ενός μορίου χρωμοφόρου προϊόντος. Η συγκέντρωση του χρωματοφόρου προϊόντος μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά στα 510nm μετά από επώαση της αντίδρασης για 10 min στους 37 °C.

3.Αποτελέσματα

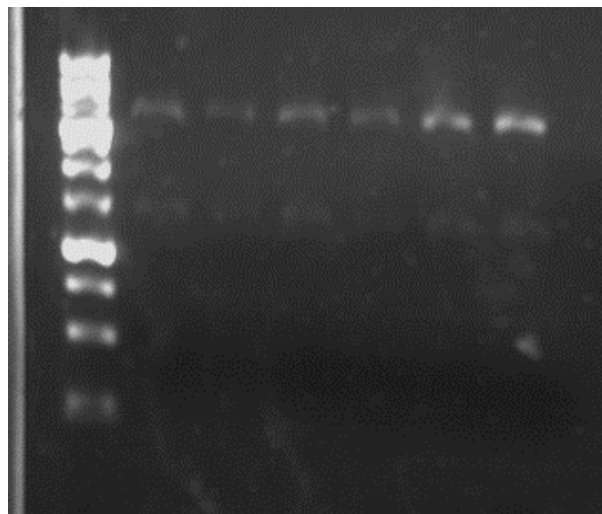
3.1 Μετασχηματισμός *P.pastoris*

Μετά την αύξηση και απομόνωση του πλασμιδίου pUC57/*MtMan26a* πραγματοποιείται τομή ενός δείγματος αυτού με περιοριστικά ένζυμα *Cla* I, *Xba* I, ώστε να διαπιστωθεί η επιτυχία της διαδικασίας (restriction analysis).



Εικόνα 3-1: Λείκτης DNA και αποτελέσματα ανάλυσης περιορισμού pUC57/*MtMan26a*- *Cla* I/*Xba* I

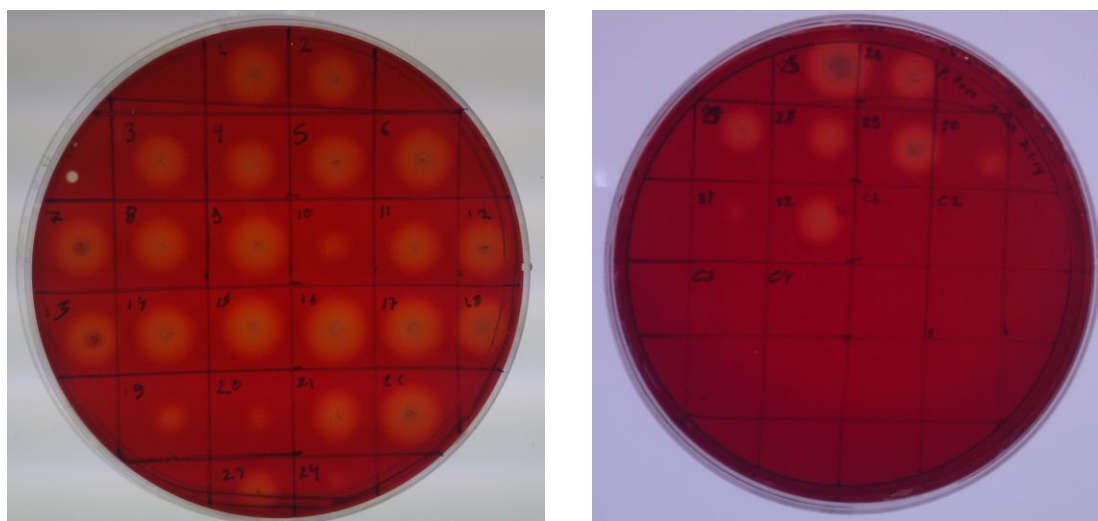
Παρατηρούνται λωρίδες DNA μεγέθους ~2700bp (pUC57) και ~1300bp (*MtMan26a*), οπότε και επιβεβαιώνεται η αύξηση του σωστού πλασμιδίου. Θα πραγματοποιηθεί εκ νέου αντίδραση περιορισμού και ηλεκτροφόρηση με αγαρόζη υψηλής καθαρότητας (Low EEO, χαμηλή συγκέντρωση ιόντων που επηρεάζουν τον διαχωρισμό) όπου θα απομονωθεί η λωρίδα που περιέχει το γονίδιο με ειδικό kit. Μετά την πραγματοποίηση της συγκόλλησης του γονιδίου στο pPICZαC, ελέγχεται ξανά η πρόοδος με ανάλυση περιορισμού.



Εικόνα 3-2: Ανάλυση περιορισμού rPICZαC/MtMan26a - Cla I/Xba I

Παρατηρούνται οι λωρίδες του rPICZαC (~3600bp) και του MtMan26a (~1300bp), άρα η παραγωγή του επιθυμητού πλασμιδίου ήταν επιτυχής.

Ακολουθεί ο μετασχηματισμός του πλασμιδίου σε *P. pastoris* και η καλλιέργεια των μετασχηματισμένων κυττάρων σε Plate Assay με υπόστρωμα γαλακτομαννάνης. Η βαφή του τρυβλίου με Congo Red θα υποδείξει ποιες αποικίες εμφανίζουν ενεργότητα στο υπόστρωμα αυτό.



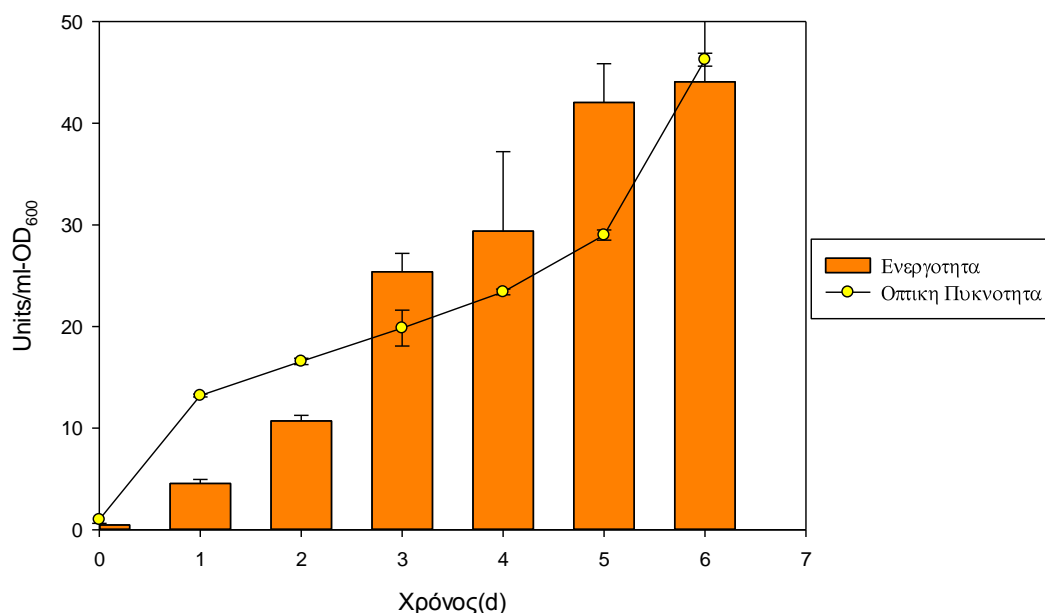
Εικόνα 3-3: Αποτελέσματα plate assay για 32 αποικίες.

Επιλέχθηκαν 32 αποικίες για το plate assay (καθώς και 4 αποικίες μη-μετασχηματισμένου *P.pastoris* X33, ως δείγματα αναφοράς) οι οποίες παρουσίασαν όλες ενεργότητα στο υπόστρωμα

γαλακτομαννάης. Από τις αποικίες αυτές πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των πιο ενεργών για αποθήκευση και χρήση στις καλλιέργειες μεγάλου μεγέθους.

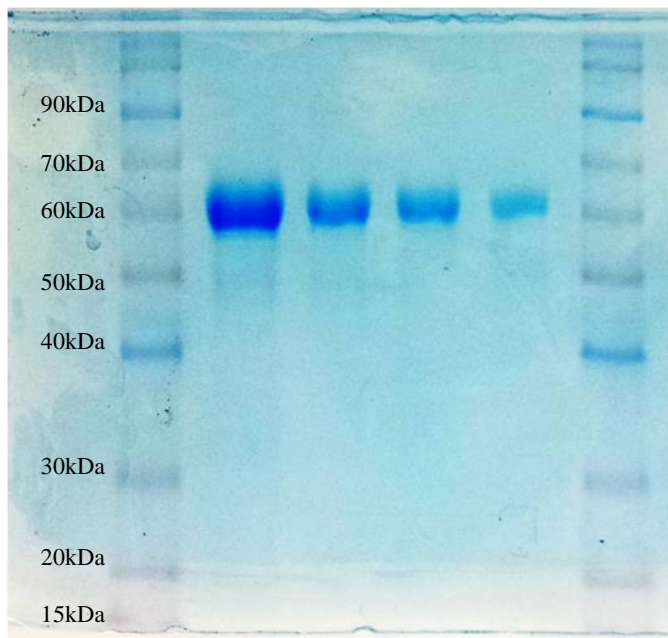
3.2 Ανάπτυξη καλλιέργειας-Παραγόμενη ποσότητα και καθαρότητα ενζύμου

Η ανάπτυξη της βιομάζας στην καλλιέργεια (μετρούμενη ως οπτική πυκνότητα στα 600nm) και η ενεργότητα του υγρού της καλλιέργειας μετρήθηκαν ως εξής:



Εικόνα 3-4: Ενεργότητα και οπτική πυκνότητα κόριας καλλιέργειας

Η καλλιέργεια τερματίζεται την 5η ημέρα μετά τον εμβολιασμό και το υγρό της υποβάλλεται σε καθαρισμό. Ένα δείγμα από την καθαρισμένη ποσότητα του υγρού της καλλιέργειας υποβάλλεται σε SDS-PAGE για έλεγχο της καθαρότητας της παραγόμενης πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φαίνεται παρακάτω:



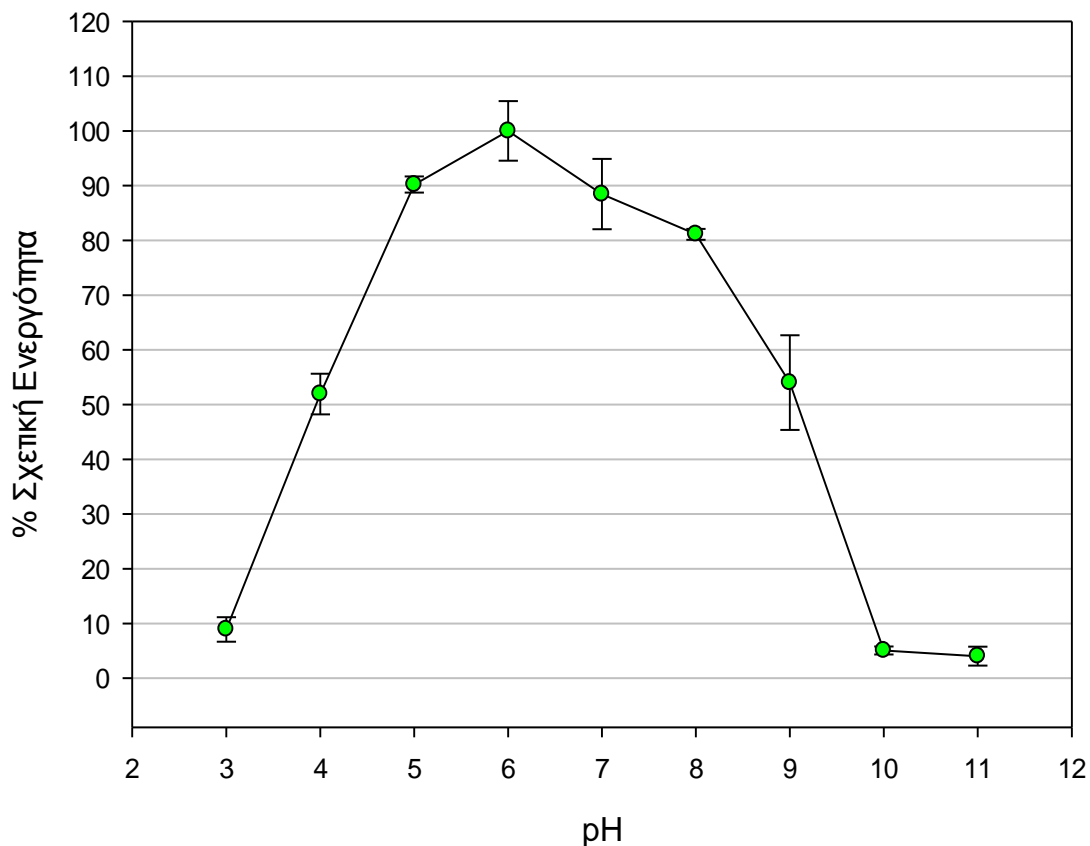
Εικόνα 3-5: Αποτέλεσμα SDS-PAGE 12.5% καθαρισμένης πρωτεΐνης, δείγματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης

Παρατηρείται μια ισχυρή λωρίδα μοριακού βάρους 60kDa, χωρίς επιπλέον πρωτεϊνικές λωρίδες που θα υποδήλωναν ύπαρξη άλλων πρωτεϊνών στο δείγμα (δηλαδή ελλιπή καθαρισμό της πρωτεΐνης). Το θεωρητικό βάρος της *MtMan26a* ανέρχεται στα 53kDa (υπολογιζόμενο βάση της σύστασης της σε αμινοξέα), αυτό το μοριακό βάρος ενδέχεται να είναι ελαφρώς μικρότερο από το πραγματικό καθώς πραγματοποιείται και προσθήκη σακχάρων στην πρωτεΐνη (γλυκοζυλίωση) ως κομμάτι της μετά-μεταφραστικής επεξεργασίας της.

Η απορρόφηση της πρωτεΐνης στα 280nm ανέρχεται στις 0.233 μονάδες για δείγμα αραιωμένο 20 φορές, κατά συνέπεια σύμφωνα με τον εμπειρικό τύπο, προκύπτει ότι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι ίση με 1.72 mg/ml.

3.3 Βέλτιστο pH λειτουργίας

Η ενεργότητα της μαννανάσης μετρήθηκε, σε διαφορετικά pH, ως ακολούθως:

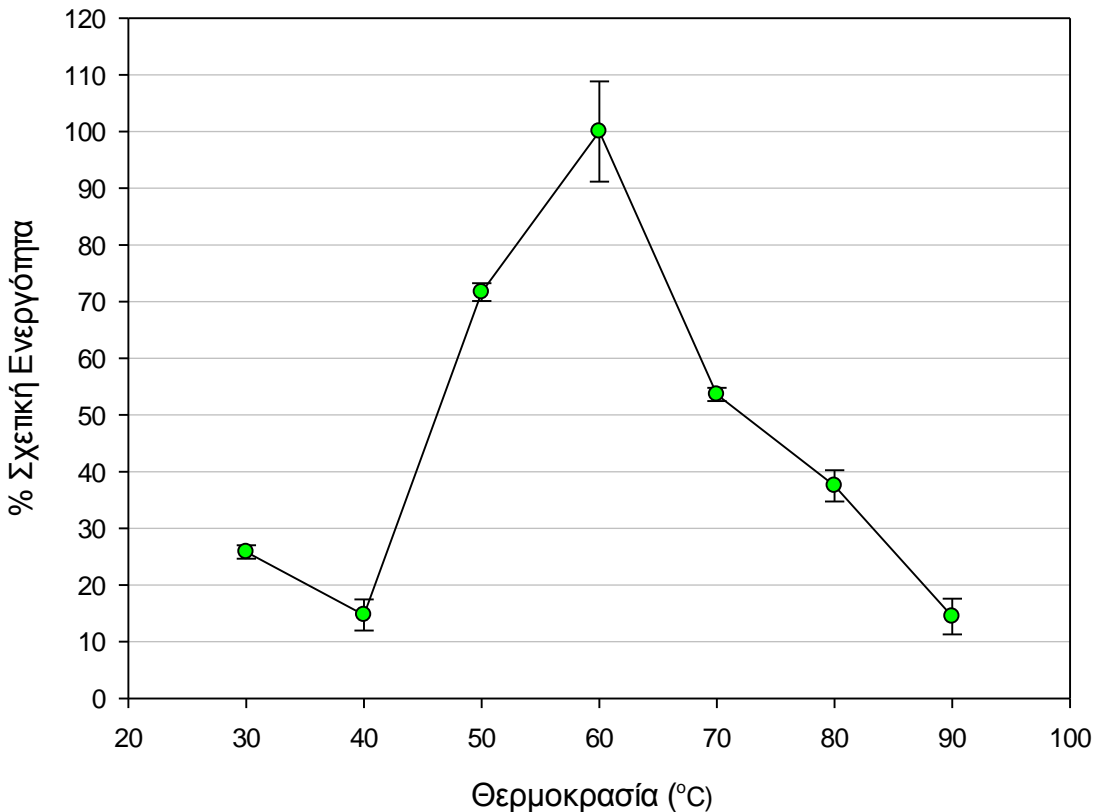


Εικόνα 3-6: Ενεργότητα σε αντίδραση με διαφορετικά pH.

Παρατηρείται ότι η βέλτιστη ενεργότητα επιτυγχάνεται σε pH 6. Αυτό συνάδει με τα γνωστά δεδομένα μας για τις συνθήκες επιβίωσης του *M. thermophila*, ο οποίος απαντάται σε όξινα περιβάλλοντα αποσυντιθέμενης φυτικής βιομάζας. Είναι επόμενο, λοιπόν, τα ένζυμα του να δρουν καλύτερα σε χαμηλότερα pH. Παρ' αυτά φαίνεται να διατηρεί μεγάλο ποσοστό της ενεργότητας της και σε μεγαλύτερα pH (>80% για pH 8), αλλά κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει για τα pH μικρότερα του βέλτιστου pH όπου η ενεργότητα μειώνεται πιο δραστικά.

3.4 Βέλτιστη Θερμοκρασία λειτουργίας

Η ενεργότητα της μαννανάσης μετρήθηκε, σε διαφορετικές θερμοκρασίες, ως ακολούθως:

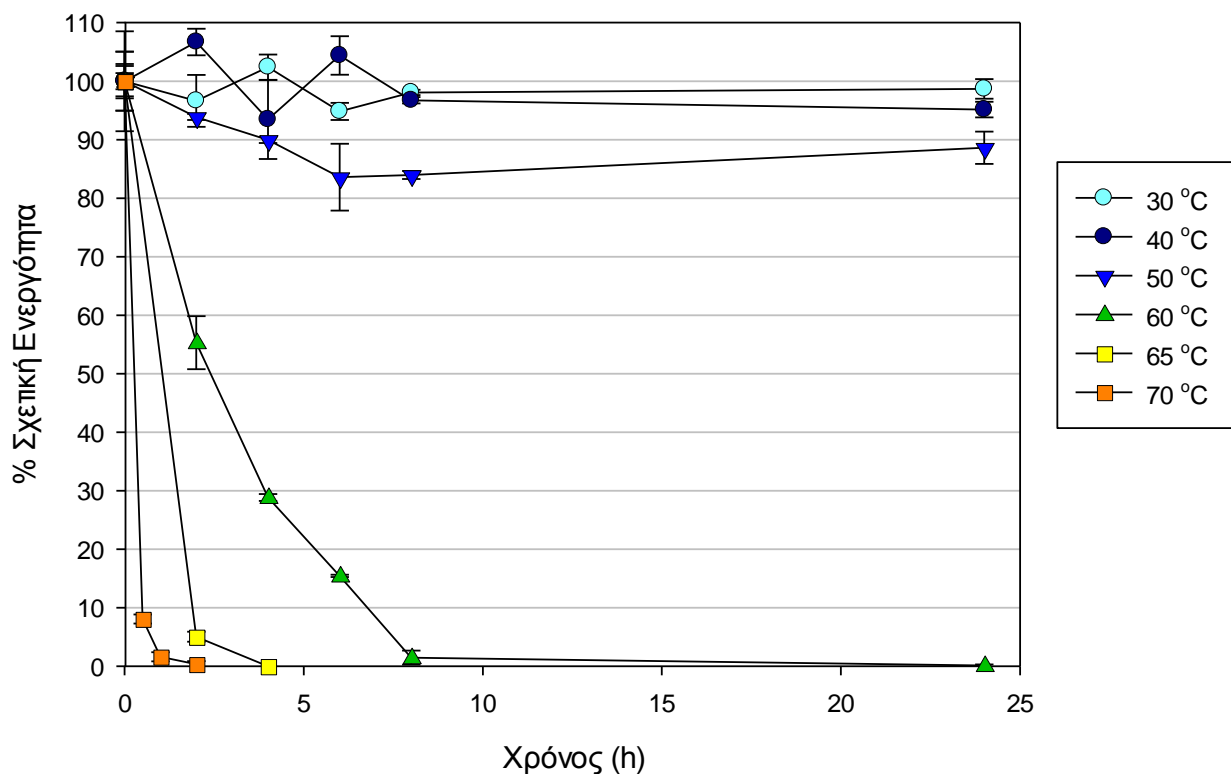


Εικόνα 3-7: Ενεργότητα σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Παρατηρείται ότι η βέλτιστη ενεργότητα επιτυγχάνεται για την θερμοκρασία των 60 °C. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει, επίσης, με την θερμοφιλή φύση της *M. thermophila* η οποία αναπτύσσεται με βέλτιστο ρυθμό σε θερμοκρασίες 45-50 °C. Παρατηρείται ότι αύξηση ή μείωση της θερμοκρασίας για 10 βαθμούς Κελσίου έχει σημαντική επίπτωση στην ενεργότητα του ενζύμου.

3.5 Θερμοκρασιακή σταθερότητα (Thermal Stability)

Η σταθερότητα της μαννανάσης μετρήθηκε, σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης, ως ακολούθως:

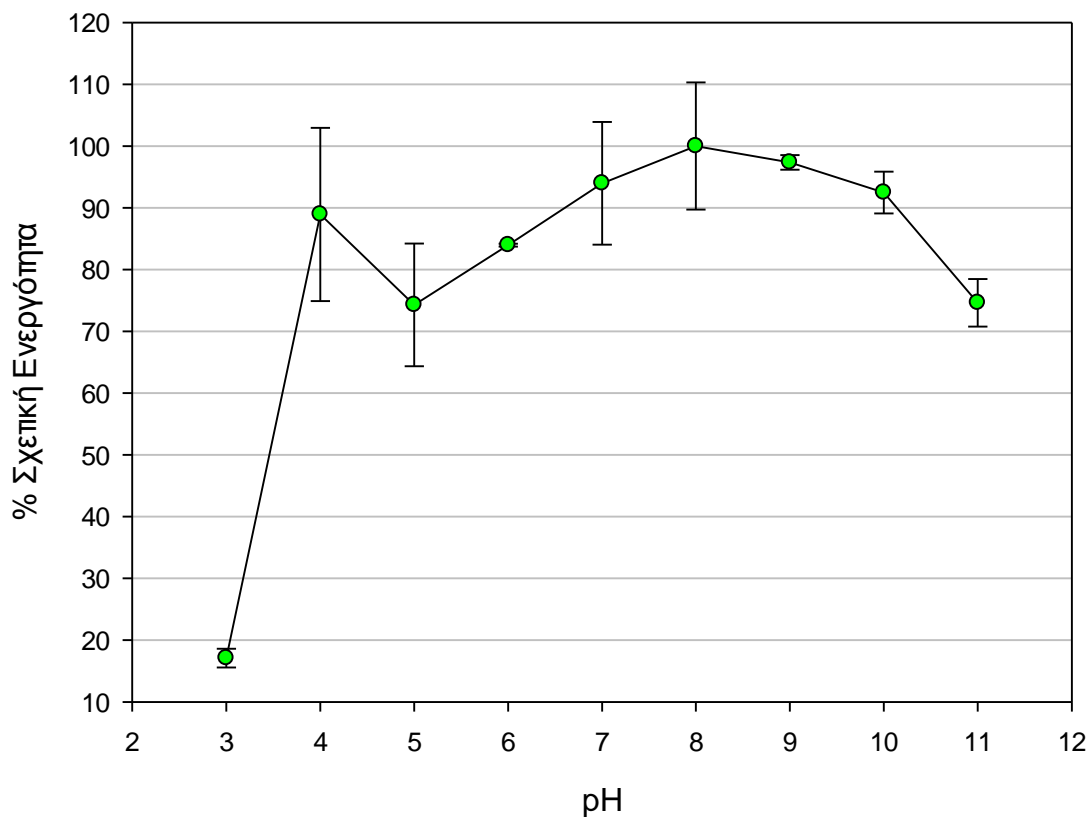


Εικόνα 3-8: Διάγραμμα ενεργότητας μετά από επώαση σε περιβάλλον με σταθερή θερμοκρασία για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα

Παρατηρείται ότι το ένζυμο εμφανίζει αρκετά καλή θερμοκρασιακή σταθερότητα (σχετική ενεργότητα μεγαλύτερη από 85% στις 24 h επώασης) για θερμοκρασίες χαμηλότερες των 50 °C, το οποίο συνάδει με το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο αναπτύσσεται και η *M. thermophila*. Αυτό αποτελεί ένα πολύ θετικό στοιχείο καθώς αρκετές χωνεύσεις με εμπορικά ένζυμα πραγματοποιούνται σε αυτή την θερμοκρασία. Για υψηλότερες θερμοκρασίες η σταθερότητα του ενζύμου μειώνεται σημαντικά (πλήρης απώλεια ενεργότητας στις 8 h για θερμοκρασία 60 °C)

3.6 Σταθερότητα σε pH (pH Stability)

Η ενεργότητα της μαννανάσης μετρήθηκε μετά από επώαση σε διαφορετικά pH αποθήκευσης, ως ακολούθως:

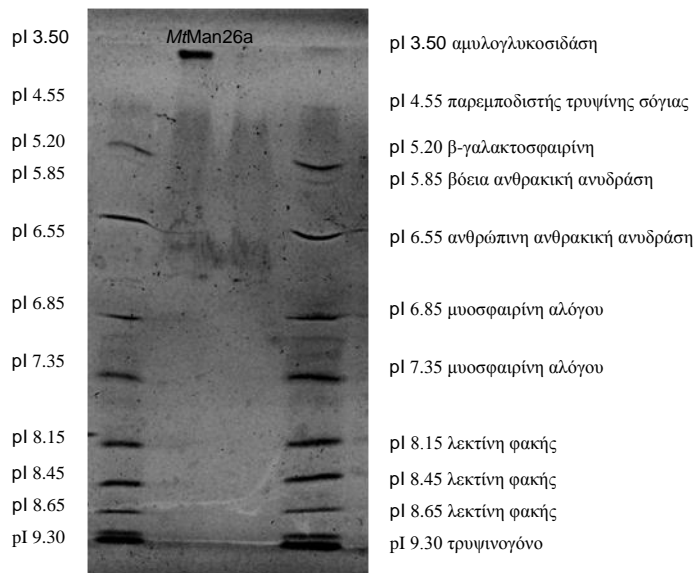


Εικόνα 3-9: Ενεργότητα μετά από επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα με διαφορετικά pH για 24 h.

Παρατηρείται ότι το ένζυμο εμφανίζει αρκετά καλή σταθερότητα σε ένα εύρος pH από 4 έως 11 με την μέγιστη σταθερότητα να παρατηρείται σε pH 8. Για pH χαμηλότερα του 4 παρατηρείται δραστική μείωση της σταθερότητας του ενζύμου.

3.7 Ισοηλεκτρικό σημείο πρωτεΐνης

Το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης μετρήθηκε με την μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης έχει ως εξής:

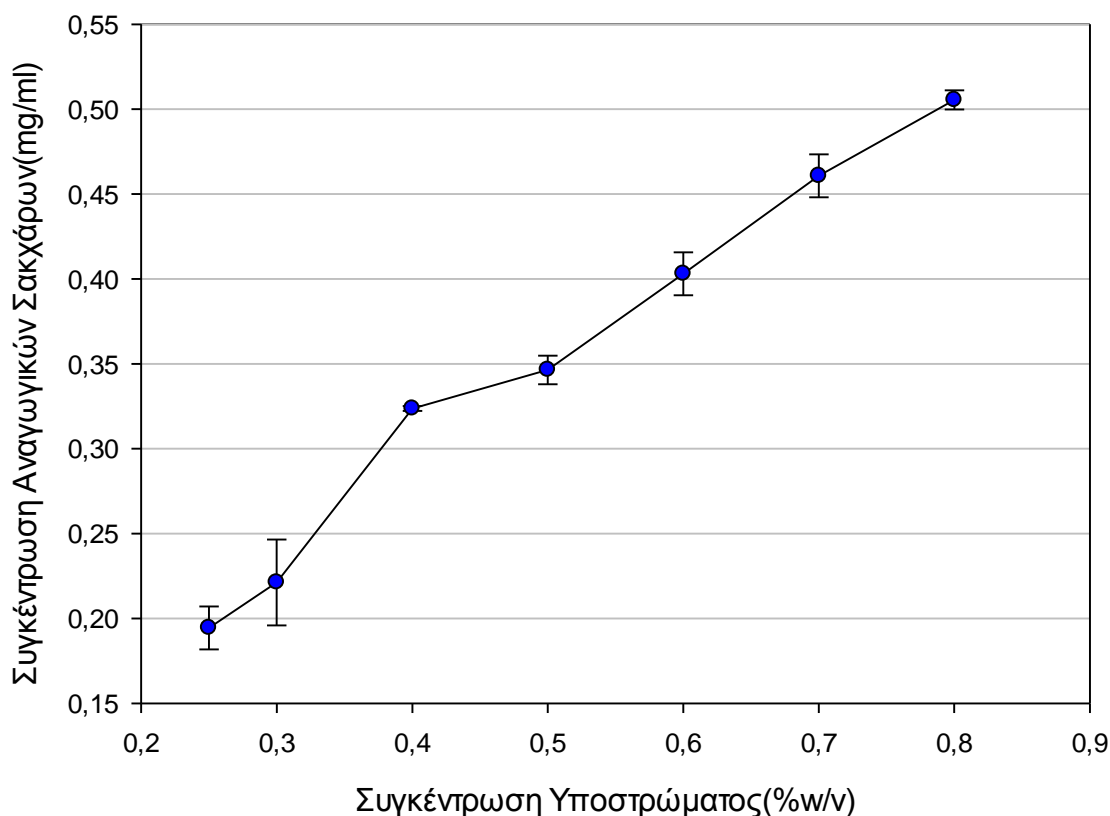


Εικόνα 3-10: Ισοηλεκτρική εστίαση MtMan26a

Παρατηρείται ότι η *MtMan26a* εμφανίζει το ισοηλεκτρικό της σημείο για pH ελαφρώς μεγαλύτερο του pH 3.5. Το αποτέλεσμα συμβαδίζει με τα προηγούμενα αποτελέσματα για την σταθερότητα σε pH όπου εμφανίστηκε δραστική πτώση της ενεργότητας του ενζύμου για pH ~3

3.8 Κινητική δράσης ενζύμου

Τα δεδομένα ενεργότητας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος έχουν ως ακολούθως:



Εικόνα 3-11: Κινητική δράσης ενζύμου για διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος

Παρατηρείται ότι, για το εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκε, εμφανίζεται μόνο μια γραμμική συμπεριφορά, και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατόν να υπολογιστούν κινητικές σταθερές. Η διεύρυνση του εύρους των συγκεντρώσεων δημιουργεί προβλήματα, καθώς για υψηλότερες συγκεντρώσεις γαλακτομαννάνης το ιξώδες του διαλύματος αυξάνεται σε επίπεδα προβληματικά για την ομαλή εκτέλεση της αντίδρασης.

3.9 Δραστικότητα σε διαφορετικά υποστρώματα

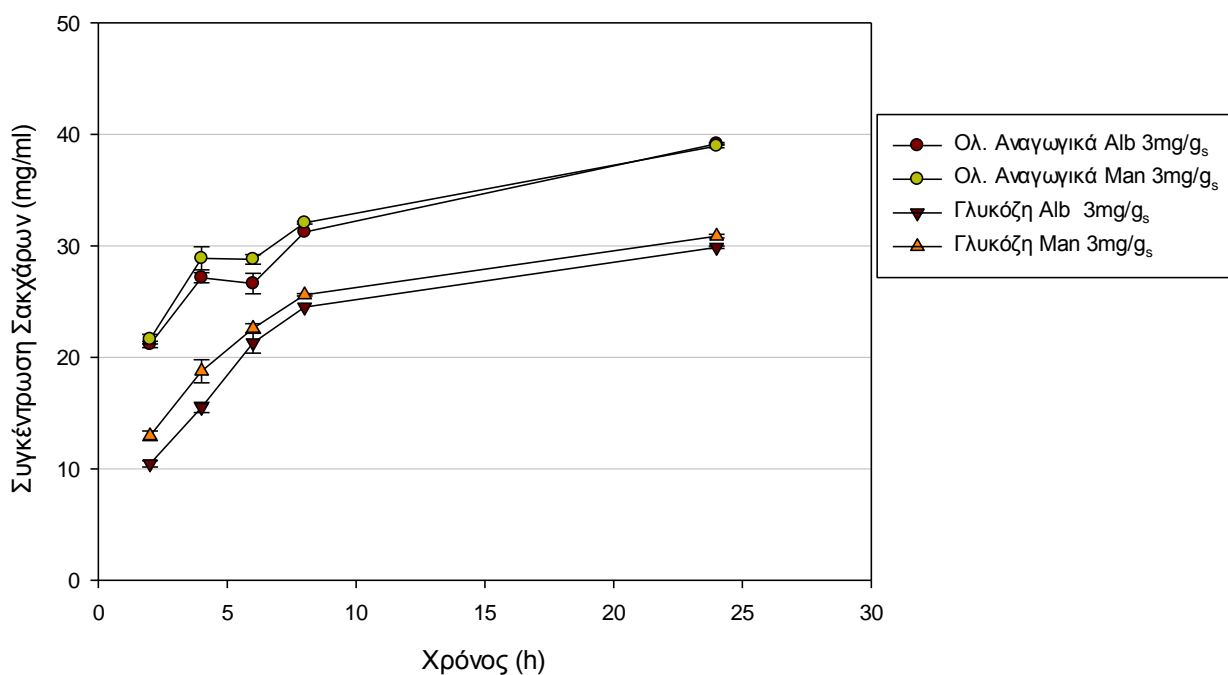
Παρατηρήθηκε ισάξια ενεργότητα σε υπόστρωμα γλυκομαννάνης σε σχέση με το υπόστρωμα γαλακτομαννάνης. Δεν εμφανίστηκε καμία ενεργότητα πάνω σε υποστρώματα β-γλουκάνης και ξυλάνης σημύδας, ενώσεις που εμφανίζονται στην λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα.

3.10 Έλεγχος Δέσμευσης από κρυσταλλική κυτταρίνη

Δεν παρατηρήθηκε κατακράτηση από κρυσταλλική κυτταρίνη, ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης του ενζύμου. Η μελέτη της ομολογίας υπέδειξε ότι η *MtMan26a* κατέχει μονάδα πρόσδεσης σε υδατάνθρακες (CBM) της οικογένειας 6 ή της οικογένειας 35. Η οικογένεια 6 έχει βρεθεί ότι εμφανίζει ικανότητα πρόσδεσης σε ξυλάνες και κυτταρίνη, άρα η αδυναμία σύνδεσης σε συνδυασμό με την δράση του ενζύμου μόνο σε μαννάνες επιβεβαιώνει ότι η *MtMan26a* κατέχει CBM της οικογένειας 35, το οποίο είναι γνωστό ότι εμφανίζεται σε ένζυμα με ενεργότητα μαννανάσης και προσδέεται μόνο σε μαννάνες (Tunncliffe et al., 2005).

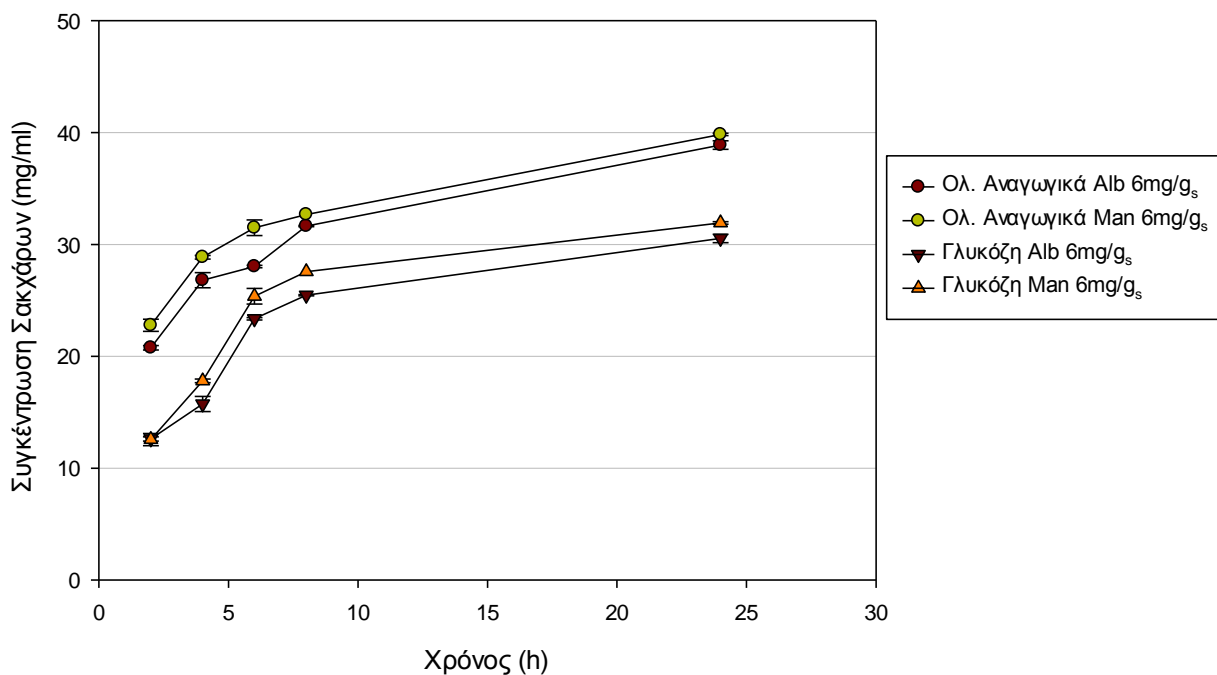
3.11 Έλεγχος συνεργιστικής ενεργότητας σε φυσικά υποστρώματα

Η συνεργιστική ικανότητα ελέγχθηκε για δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις της μελετώμενης μαννανάσης. Για συγκέντρωση μαννανάσης 3 mg/g ξηρής βιομάζας και συγκέντρωση εμπορικών ενζύμων 6 mg/g ξηρής βιομάζας τα αποτελέσματα της υδρόλυσης έχουν ως εξής:



Εικόνα 3-12: Συγκέντρωση Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων και Γλυκόζης για αντιδράσεις με 3 mg/g_s ενζύμου/αλβουμίνης

Ενώ αντιστοίχως, για συγκέντρωση μαννανάσης 6 mg ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας και συγκέντρωση εμπορικών ενζύμων 6 mg ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας. Τα αποτελέσματα της υδρόλυσης έχουν ως εξής:



Εικόνα 3-13: Συγκέντρωση Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων και Γλυκόζης για αντιδράσεις με 6 mg/g_s ενζύμου/αλβουμίνης

Παρατηρείται ότι η διαφορά στην παραγόμενη ποσότητα σακχάρων είναι μεγαλύτερη με αύξηση της ποσότητας του ενζύμου, κατά ~10%. Επιβεβαιώνεται η υπαρξη συνεργιστικής δράσης.

4.Συμπεράσματα

4.1 Σύνοψη

Ο μετασχηματισμός της *P.pastoris* πραγματοποιήθηκε με χρήση de novo συνθετιμένου γονιδίου *MtMan26a* το οποίο έχει υποστεί αφαίρεση του πεπτιδίου σήματος και βελτιστοποίηση κωδικονίων. Το γονίδιο παραλήφθηκε σε φορέα pUC57 ο οποίος αυξήθηκε με χρήση TOP10 *E. coli* και απομονώθηκε με χρήση GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich. Το γονίδιο αποκόπηκε από τον φορέα pUC57 με χρήση περιοριστικών ενζύμων *Cla* I και *Xba* I και συγκολλήθηκε σε φορέα pPICZαC κατατετημένο με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα. Το καινούργιο πλασμίδιο pPICZαC/*MtMan26a* αυξάνεται και απομονώνεται εκ νέου με χρήση TOP10 *E. coli*. Το καθαρό πλασμίδιο που παραλαμβάνεται γραμματικοποιείται με περιοριστικό ένζυμο *Sac* I και μετασχηματίζεται σε κύτταρα *P. pastoris* με την τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης.

Οι μετασχηματισμένες καλλιέργειες επωάζονται παρουσία Zeocin προς επιλογή αυτών που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο. Η παραγωγή *MtMan26a* από τις αποικίες επιβεβαιώνεται με plate assay, από όπου και επιλέγονται οι πιο παραγωγικές για καλλιέργεια μεγαλύτερου μεγέθους. Η καλλιέργεια διαρκεί 6 ημέρες (1 ημέρα προκαλλιέργεια και 5 κύριας καλλιέργειας) από όπου απομονώνεται και καθαρίζεται η επιθυμητή πρωτεΐνη με στήλη συγγένειας ιόντων κοβαλτίου. Η ποιότητα του καθαρισμού εκτιμάται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12.5% όπου παρατηρείται μόνο η ύπαρξη της επιθυμητής πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση της παραγόμενης *MtMan26a* μετρήθηκε με φασματοφωτομετρική μέθοδο και υπολογίζεται ίση με 1.72 mg/ml.

Εν συνεχεία πραγματοποιούνται αντιδράσεις σε υπόστρωμα γαλακτομαννάνης χαρουπιού συγκέντρωσης 0.5% για τον χαρακτηρισμό του ενζύμου. Οι αντιδράσεις αποκαλύπτουν ότι η *MtMan26a* λειτουργεί βέλτιστα σε θερμοκρασία 60 °C και pH 6. Η πρωτεΐνη παρουσιάζει εξαιρετική θερμική σταθερότητα για θερμοκρασίες κάτω των 50 °C, με την σταθερότητα να μειώνεται δραστικά σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες. Η πρωτεΐνη βρέθηκε ανθεκτική σε ένα εύρος pH από pH4 έως pH 11. Το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης μετρήθηκε με την τεχνική της ισοηλεκτρικής εστίασης και βρέθηκε ~ 3.50. Ο έλεγχος της κινητικής του ενζύμου εμφάνισε μια γραμμική συμπεριφορά κατά συνέπεια δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός κινητικών σταθερών. Παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη δεν δεσμεύεται από κρυσταλλική κυτταρίνη (Avicell). Εξετάστηκε η ενεργότητα της πρωτεΐνης σε υποστρώματα γλυκομαννάνης, β-γλουκάνης και ξυλάνης σημύδας. Η *MtMan26a* εμφανίζει όμοια ενεργότητα σε υπόστρωμα γλυκομαννάνης σε σχέση με το υπόστρωμα γαλακτομαννάνης, αλλά δεν εμφανίζει ενεργότητα σε β-γλουκάνη και σε ξυλάνη

σημύδας. Η συνεργιστική δράση της *MtMan26a* ελέγχθηκε σε φυσικό υπόστρωμα προκατεργασμένου Lignocel (wet oxidation) με παρουσία εμπορικών κυτταρινολυτικών ενζύμων. Παρατηρήθηκε αύξηση ~10% στην απελευθέρωση σακχάρων με προσθήκη 6 mg/g υποστρώματος *MtMan26a*.

4.2 Μελλοντικές προκλήσεις

Με βάση την γνώση που αποκομίστηκε από την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας προτείνεται η περαιτέρω διερεύνηση των εξής σημείων:

- ❖ Μελέτη, σε μεγαλύτερο βάθος, της κινητικής της δράσης της *MtMan26a*.
- ❖ Αποκοπή της μονάδας πρόσδεσης σε υδατάνθρακες (CBM) με γενετική τροποποίηση του γονιδίου, ώστε να διαπιστωθεί ο ρόλος του στον μηχανισμό δράσης της *MtMan26*.
- ❖ Μελέτη των προϊόντων υδρόλυσης μαννο-ολιγοσακχαρίτων (μαννοβιόζη, μαννοτριόζη κ.λπ.) από την *MtMan26a* για την ανεύρεση του μηχανισμού δράσης του ενζύμου.
- ❖ Μελέτη της επίδρασης σε ποικίλα φυσικά υποστρώματα τα οποία έχουν υποστεί διαφορετικές μεθόδους προκατεργασίας.
- ❖ Διερεύνηση εναλλακτικών χρήσεων της *MtMan26a*, όπως λ.χ. την εφαρμογή της στην βιομηχανία τροφίμων για μείωση του ιξώδους ζελατινοποιημένων μαννάνων.

5.Βιβλιογραφία

- [1] Berka, Randy M., Igor V. Grigoriev, Robert Otilar, Asaf Salamov, Jane Grimwood, Ian Reid, Nadeeza Ishmael, Tricia John, Corinne Darmond, Marie-Claude Moisan, Bernard Henrissat, Pedro M. Coutinho, Vincent Lombard, Donald O. Natvig, Erika Lindquist, Jeremy Schmutz, Susan Lucas, Paul Harris, Justin Powlowski, Annie Bellemare, David Taylor, Gregory Butler, Ronald P De Vries, Iris E. Allijn, Joost Van Den Brink, Sophia Ushinsky, Reginald Storms, Amy J. Powell, Ian T. Paulsen, Liam D H Elbourne, Scott E. Baker, Jon Magnuson, Sylvie Laboissiere, A. John Clutterbuck, Diego Martinez, Mark Wogulis, Alfredo Lopez De Leon, Michael W. Rey, and Adrian Tsang. "Comparative Genomic Analysis of the Thermophilic Biomass-degrading Fungi *Myceliophthora Thermophila* and *Thielavia Terrestris*." *Nature Biotechnology* 29.10 (2011): 922-27. Web.
- [2] Bidlack, Jim, Mike Malone, and Russel Benson. "Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants." *Proc. Okla. Acad. Sci.* 72:51-56 (1992).
- [3] Brody, Jonathan R., and Scott E. Kern. "History and Principles of Conductive Media for Standard DNA Electrophoresis." *Analytical Biochemistry* 333.1 (2004): 1-13. Web.
- [4] Cartmell, A., E. Topakas, V. M-A. Ducros, M. D. L. Suits, G. J. Davies, and H. J. Gilbert. "The *Cellvibrio Japonicus* Mannanase CjMan26C Displays a Unique Exo-Mode of Action That Is Conferred by Subtle Changes to the Distal Region of the Active Site." *Journal of Biological Chemistry* 283.49 (2008): 34403-4413. Web.
- [5] Couturier, M., A. Roussel, A. Rosengren, P. Leone, H. Stalbrand, and J.-G. Berrin. "Structural and Biochemical Analyses of Glycoside Hydrolase Families 5 and 26 - (1, 4)-Mannanases from *Podospora Anserina* Reveal Differences upon Manno-oligosaccharide Catalysis." *Journal of Biological Chemistry* 288.20 (2013): 14624-4635. Web.
- [6] Dagert, M., and S.d. Ehrlich. "Prolonged Incubation in Calcium Chloride Improves the Competence of *Escherichia Coli* Cells." *Gene* 6.1 (1979): 23-28. Web.
- [7] Δημαρογκωνα, Μαρια. *Δομική και μοριακή μελέτη βιοκαταλυτών που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης*. Διατριβή. Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2012. .
- [8] Edelhoch, Harold. "Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins." *Biochemistry* 6.7 (1967): 1948-954. Web.
- [9] Gill, Stanley C., and Peter H. Von Hippel. "Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data." *Analytical Biochemistry* 182.2 (1989): 319-26. Web.

- [10] Kang, Qian, Lise Appels, Tianwei Tan, and RAF Dewil. "Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Current Findings Determine Research Priorities." *The Scientific World Journal* (2014): n. pag. *Hindawi Publishing Corporation*. Web.
- [11] Lichstein, Herman C., and Malcolm H. Soule. "Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration: IV. The Effect of Sodium Azide on Glucose Fermentation and Lactic Acid Production by Streptococci and Lactobacilli." *Journal of Bacteriology*. U.S. National Library of Medicine, n.d. Web.
- [12] Macauley-Patrick, Sue, Mariana L. Fazenda, Brian Mcneil, and Linda M. Harvey. "Heterologous Protein Production Using the *Pichia pastoris* Expression System." *Yeast* 22.4 (2005): 249-70. Web.
- [13] Madden, Tom. "The BLAST Sequence Analysis Tool." *The NCBI Handbook*. Biolateral Pty, 2003.
- [14] *PPICZ α A, B, and C Pichia Expression Vectors for Selection on Zeocin™ and Purification of Secreted, Recombinant Proteins (User Manual)*. Invitrogen, 2010. .
- [15] Rose, Markus, Mouhanad Babi, and Jose Moran-Mirabal. "The Study of Cellulose Structure and Depolymerization Through Single-Molecule Methods." *Industrial Biotechnology*. Web.
- [16] Saha, Badal C. "Hemicellulose Bioconversion." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30.5 (2003): 279-91. Web.
- [17] Sharma, Rakesh Kumar, and Daljit Singh Arora. "Fungal Degradation of Lignocellulosic Residues: An Aspect of Improved Nutritive Quality." *Critical Reviews in Microbiology* (2013): 1-9. Web.
- [18] Κατσίμπουρας, Κωνσταντίνος. "Σύνθεση καινοτόμων υποστρωμάτων για τον χαρακτηρισμό εστερασών του γλυκουρονικού οξέος της ημικυτταρίνης." Διπλωματική Εργασία. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2013. .
- [19] Tolstorukov, Ilya, Anasua Kusari, Jay Sunga, Knut Madden, and Thomas Chappell. "Expression in the Yeast *Pichia pastoris*." *Guide to Protein Purification*. By James Cregg. Amsterdam: Elsevier/Academic, 2009. Web.
- [20] Tsukagoshi, Hikaru, Akihiko Nakamura, Takuya Ishida, Masato Otagiri, Shigeharu Moriya, Masahiro Samejima, Kiyohiko Igarashi, Katsuhiko Kitamoto, and Manabu Arioka. "The GH26 B-mannanase RsMan26H from a Symbiotic Protist of the Termite

Reticulitermes Speratus Is an Endo-processive Mannobiohydrolase: Heterologous Expression and Characterization." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 452 (2014): n. pag. *ScienceDirect*. Web.

[21] Tunnicliffe, Richard B., David N. Bolam, Gavin Pell, Harry J. Gilbert, and Mike P. Williamson. "Structure of a Mannan-specific Family 35 Carbohydrate-Binding Module: Evidence for Significant Conformational Changes upon Ligand Binding." *Journal of Molecular Biology* 347.2 (2005): 287-96. Web.

[22] Xiros, Charilaos, Evangelos Topakas, and Paul Christakopoulos. "Hydrolysis and Fermentation for Cellulosic Ethanol Production." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment* 2.6 (2013): 633-54. Web.