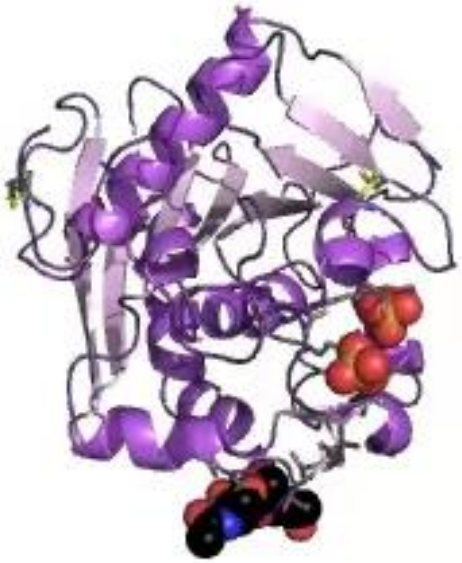
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

Βελτίωση της παραγωγής μίας ανασυνδυασμένης εστεράσης του φερουλικού οξέος του *Fusarium oxysporum* στη μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*



Ανδρόνικος Κωστής

Επιβλέπων καθηγητής : Ευάγγελος Τόπακας

ΑΘΗΝΑ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της παρούσας διπλωματικής θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου Ευάγγελο Τόπακα, πέρα από την επιστημονική του εξαιρετική συνεισφορά, και για την συμπαράσταση, την κατανόηση και πάντα πρόθυμη βοήθεια που μου πρόσφερε, σε όλο το διάστημα της εργασίας για την αποπεράτωση αυτής της διπλωματικής, αλλά και κατά την διάρκεια της ακαδημαϊκής μου φοίτησης.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διδακτορικούς του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας για την αμέριστη βοήθεια και στήριξη που μου πρόσφεραν στο εργαστήριο για την επιτυχή εκτέλεση του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου και φίλους μου για την στήριξη, συμπαράσταση και κατανόηση που μου πρόσφεραν σε όλο το διάστημα της εργασίας μου για την διπλωματική εργασία αλλά και της ακαδημαϊκής μου φοίτησης.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

FoCut5a	Κουτινάση
FoFaeC	Εστεράση του φερουλικού οξέος
P.pastoris	*Pichia pastoris*
F.oxysporum	*Fusarium oxysporum*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ **3**
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ **4**
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ **5**
ΣΧΗΜΑΤΑ **8**
ΠΙΝΑΚΕΣ **10**
ΠΕΡΙΛΗΨΗ **11**
ABSTRACT **12**
Κεφάλαιο 1 ..... **13**
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **13**
1. ΚΟΥΤΙΝΑΣΗ **13**
1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣΗΣ 14
1.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣΗΣ 16
1.2.1 Πετρέλαιο και γαλακτοκομικά προϊόντα 18
1.2.2 Αρωματικές ενώσεις 19
1.2.3 Παραγωγή φαινολικών ενώσεων 20
1.2.4 Κλωστοϋφαντουργία και απορρυπαντικά 22
2. ΕΣΤΕΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΕΡΟΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ **24**
2.1 ΤΥΠΟΙ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΤΟΥ ΦΕΡΟΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ 28
2.1.1 ΤΥΠΟΣ Α 28
2.1.2 ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ ΤΥΠΟΥ Β 29
2.1.3 ΕΣΤΕΡΑΣΗ ΤΥΠΟΥ Γ 31
3. Fusarium oxysporum **31**
4. Pichia Pastoris: ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ... **33**

4.1 Ιδιότητες της *P.pastoris* ως μεθυλότροφη ζύμη 34

Κεφάλαιο 2 37

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 37

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 37

1.1 YPD Zeocin-Αντιβιοτικό 37

1.1.1 Υλικά 37
1.1.2 Μέθοδος 37

1.2 Συνταγή για προκαλλιέργειες(τελικού όγκου 150 μlt) 38

1.2.1 Υλικά 38
1.2.2 Μέθοδος 39

1.3 Συνταγή για καλλιέργεια (1000 μlt) 39

1.3.1 Υλικά 39
1.3.2 Μέθοδος 40

1.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ 40

1.5 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ 41

1.6 Υπερδιήθηση 43

1.7 Λειτουργία στήλης χρωματογραφίας με βαθμίδωση άλατος NaCl 44

1.8 Μέθοδος BRADFORD 45

1.9 SDS-PAGE 45

1.9.1 Resolving gel 47
1.9.2 Stacking gel 47

1.10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 48

2. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΦΕΡΟΥΛΟΥΛΙΚΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ P.PASTORIS 49

2.1 Μελέτη του pH 49

2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ pH ..50

2.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ 51

2.3.1 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 53

2.4 ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΓΙΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΤΡΟΦΟΔΟΣΙΑΣ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ 61

2.4.1 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 62

2.5 ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΓΙΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΤΑΧΥΤΗΤΕΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΦΙΑΛΩΝ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ 69
2.5.1 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 70
Κεφάλαιο 3 75
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 75
1. Βιβλιογραφικές Μετρήσεις 75
2. Βελτιστοποίηση της εμφάνισης ξυλανάσης σε Pichia Pastoris -Σύγκριση αποτελεσμάτων με πειραματικά δεδομένα 77
3. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ 79
4. ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ 79
Κεφάλαιο 4 81
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 83

ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα 1.1: Κλαδόγραμμα των ενζύμων της οικογένειας των εστερασών του φερουλικού οξέος και των συγγενών τους. 26
Σχήμα 1.2:. εργαστηριακή καλλιέργεια και μικροσκοπική άποψη του Fusarium oxysporum.....32
Σχήμα 1.3:. Καταβολικό μονοπάτι της μεθανόλης στην P.pastoris.....35
Σχήμα 2.1: Μεταβολή της ενεργότητας ανα μlt καλλιέργειας για pH=4 53
Σχήμα 2.2: Μεταβολή της ενεργότητας ανα μlt καλλιέργειας για pH=5. 54
Σχήμα 2.3: Μεταβολή της ενεργότητας ανα μlt καλλιέργειας για pH=6. 55
Σχήμα 2.4: Μεταβολή της ενεργότητας ανά ml καλλιέργειας για pH=7.....56
Σχήμα 2.5: Μεταβολή της ενεργότητας ανά ml καλλιέργειας για pH=8.....57
Σχήμα 2.6: Μεταβολή της ενεργότητας ανά ml καλλιέργειας για pH=9.....59
Σχήμα 2.7: Μεταβολή της ενεργότητας φιαλών 1 και 2 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 250 μlt μεθανόλης. 62
Σχήμα 2.8: Μεταβολή της ενεργότητας φιαλών 3 και 4 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 500 μlt μεθανόλης. 63
Σχήμα 2.9: Μεταβολή της ενεργότητας φιαλών 5 και 6 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 750 μlt μεθανόλης. 64
Σχήμα 2.10: Μεταβολή της ενεργότητας φιαλών 7 και 8 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 1000 μlt μεθανόλης. 66
Σχήμα 2.11: Μεταβολή της ενεργότητας φιαλών 9 και 10 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 1250 μlt μεθανόλης. 67
Σχήμα 2.12: Μεταβολή των units ενζύμου φιαλών 1 και 2 ανά μlt καλλιέργειας για τιμή ανάδευσης 80 rpm. 70

Σχήμα 2.13: Μεταβολή των units ενζύμου φιαλών 3 και 4 ανά μlt καλλιέργειας για τιμή ανάδευσης 200 rpm. 72
Σχήμα 2.14: Μεταβολή των units ενζύμου φιαλών 5 και 6 ανά μlt καλλιέργειας για τιμή ανάδευσης 250 rpm. 73
Σχήμα 3.1: Διάγραμμα διάρκειας παραγωγής FoXyn11a στο ανασυνδυασμένο P.pastoris που φιλοξενεί το γονίδιο xyn11a. Η ξυλανάση εκφράστηκε σε καλλιέργεια με επαγωγή με 0.5% (ν / ν) μεθανόλη 77

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 2.1: Σειρές Αντιδράσεων (pH=4) 53
Πίνακας 2.2: Σειρές Αντιδράσεων (pH=5) 54
Πίνακας 2.3: Σειρές Αντιδράσεων (pH=6) 55
Πίνακας 2.4: Σειρές Αντιδράσεων (pH=7) 56
Πίνακας 2.5: Σειρές Αντιδράσεων (pH=8) 57
Πίνακας 2.6: Σειρές Αντιδράσεων (pH=9) 59
Πίνακας 2.7: Μεταβολή των ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 1, 2 Μεθανόλης 250 μlt 62
Πίνακας 2.8: Μεταβολή των ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 3, 4 Μεθανόλης 500 μlt 63
Πίνακας 2.9: Μεταβολή των ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 5, 6 Μεθανόλης 750 μlt 64
Πίνακας 2.10: Μεταβολή των ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 7, 8 Μεθανόλης 1000 μlt 65
Πίνακας 2.11: Μεταβολή των ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 9, 10 Μεθανόλης 1250 μlt 67
Πίνακας 2.12: Μέσος όρος ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 1 και 2 με κοινή τιμή ταχύτητας ανάδευσης 80rpm. 70
Πίνακας 2.13: Μέσος όρος ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 3 και 4 με κοινή τιμή ταχύτητας ανάδευσης 200rpm. 71
Πίνακας 2.14: Μέσος όρος ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 5 και 6 με κοινή τιμή ταχύτητας ανάδευσης 250rpm. 73

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία χωρίζεται σε δύο τμήματα, δεδομένου ότι πρόκειται για τη μελέτη της παραγωγής και απομόνωσης δύο ομοειδών βασικών πρωτεινών, της κουτινάσης και της εστεράσης του φερουλικού οξέος. Όσον αφορά το πρώτο μέρος, έγινε προσπάθεια για την παραγωγή και απομόνωση της πρωτείνης κουτινάσης, μέσω της διαδικασίας καλλιέργειας του μύκητα *Fusarium Oxusporum* στη μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*. Μετά την παραλαβή του διαλύματος των καλλιεργειών και αφού ακολούθησαν διαδοχικές διηθήσεις, το διήθημα πέρασε από στήλη χρωματογραφίας με βαθμίδωση άλατος NaCl προκειμένου να φανερωθεί μέσω διαγράμματος η ύπαρξη ή μη της πρωτείνης κουτινάσης, και εν τέλει αυτή να καταπέσει και να παραληφθεί. Στη συνέχεια και αφού το διάλυμα των φιαλιδίων που θεωρητικά εμπεριείχαν τη ζητούμενη πρωτείνη τοποθετήθηκε στη διάταξη της μεθόδου sds-page, όπου με βάση τα μοριακά βάρη τους γίνονται φανερά τα είδη των υπαρχόντων πρωτεινών, διαπιστώθηκε η ανεπαρκής ποσότητα πρωτείνης που παραλήφθηκε, συγκριτικά με τις υπόλοιπες που ενυπήρχαν ως ανεπιθύμητες προσμίξεις στο διάλυμα.

Στο δεύτερο μέρος και εξαιτίας της αδυναμίας μελέτης της κουτινάσης, ακολουθήθηκε η μελέτη των βέλτιστων συνθηκών κυτταρικής ανάπτυξης σε υπόστρωμα *Pichia pastoris* ανάλογης σε μέθοδο παραγωγής πρωτείνης, της εστεράσης του φερουλικού οξέος. Στην πρώτη σειρά μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικών τιμών pH ρυθμιστικά διαλύματα, διατηρώντας σταθερή την τροφοδοσία της μεθανόλης και την ταχύτητα ανάδευσης. Ακολούθως στη δεύτερη σειρά μετρήσεων διατηρήθηκε σταθερή τιμή pH και ταχύτητας ανάδευσης, μεταβάλλοντας ανά ζευγάρι φιαλών καλλιέργειας τη δοσολογία της μεθανόλης, ενώ κατά την τρίτη σειρά μετρήσεων μεταβλήθηκε η ταχύτητα ανάδευσης ανα ζευγάρι φιαλών, διατηρώντας pH και μεθανόλη σταθερά.

Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν συγκρίθηκαν με βιβλιογραφική μελέτη ανάλογης κυτταρικής ανάπτυξης και συμπεριφοράς πρωτείνης, της ξυλανάσης, προκειμένου να διαπιστωθεί η αρτιότητα των πειραματικών αποτελεσμάτων.

ABSTRACT

The present thesis is divided into two sections, following its content material, which is the study of the production and of the isolation of two similar basic proteins: first of Cutinase and second of the esterase of ferulic acid Regarding the first part, an attempt was made for the production and isolation of the protein Cutinase through the cultivation of the fungus Fusarium Oxusporum in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. After receiving the cultivation solution and after passing it through successive filtration processes, the remaining filtrate was passed through a chromatography tower of a NaCl salt elusion gradient, to manifest, through mapping, the presence or absence of the protein Cutinase, and ultimately for the tested production method to be forfeited or to be rejected. The finally received vials filled with the distilled solution, which would contain theoretically the desired protein, were placed in the measurement bench of the sds-page method. According to the sds-page method, the various types of existing proteins are revealed after measuring the molecular weights of the all found proteins in the solution. According to the measurement results, insufficient amount of Cutinase protein is produced, compared to the other proteins inherent as impurities in the solution.

Because of the aforementioned difficulty in Cutinase study, the second part of the thesis was decided to contain the study of the optimal conditions of cell growth in *ichia pastoris* substrate of the ferulic acid esterase, a protein similar in behaviour to the Cutinase. Three series of measurements were conducted, to study the influence of three different factors in cell growth, namely the influence of the pH, the influence of the stirring speech, and the influence of the methanol feed. In each of the measurements series, one of the above factors was varied, while the rest two were kept constant.

For the verification and the integrity of the obtained experimental results, a literature survey was conducted, and the results obtained here above were compared to found published results of measurements concerning similar study of cell growth and behaviour of the protein xylanase.

Κεφάλαιο 1

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι 2 χαρακτηριστικότερες ζύμες που χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή υφασμάτων είναι η κουτινάση **(FoCut5a)** και η εστεράση του φερουλικού οξέος **(FoFaeC)**, των οποίων η παραγωγή και απομόνωση μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική. Ακολουθούν ορισμένες χαρακτηριστικές πληροφορίες της δομής και των βασικών εφαρμογών των δύο αυτών εστερασών.

1. ΚΟΥΤΙΝΑΣΗ

Είναι μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση της κουτίνης, ενός βιο-πολυεστέρα που αποτελεί το δομικό στοιχείο της προστατευτικής επιδερμίδας (φλοιού) στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών, και απαρτίζεται από τα ακόλουθα:

ο-υδροξυ λιπαρά οξέα, διυδροξυ παλμιτικό οξύ,18-υδροξυ-9, 10, εποξυ-C18 κορεσμένα και D12 ακόρεστα λιπαρά οξέα και 9,10,18-τριϋδρόξυ C18 ακόρεστα και D12 μονο-ακόρεστα λιπαρά οξέα.

Η συγκεκριμένη σύνθεση της κουτίνης είναι μεταβλητή ανάλογα με τα είδη των φυτών, αλλά κατά κανόνα, τα ταχέως αναπτυσσόμενα φυτά παράγουν κυρίως κουτίνη που περιέχει 16C λιπαρά οξέα, κυρίως διυδροξυ-παλμιτικό οξύ, ενώ τα αργά αναπτυσσόμενα φυτά παράγουν FoCut5a που εμφανίζεται τόσο στα 16C όσο και στα 18C λιπαρά οξέα.

Οι Κουτινάσες είναι επίσης σε θέση να καταλύουν αντίστροφες αντιδράσεις, δηλαδή

1. αιθεροποίηση,
2. trans-εστεροποίηση
   - (ενδοεστεροποίηση,
   - αλκοόλυση, και
   - ραδιόλυση),
3. αμινόλυση.

Με τη θερμοδυναμική ενεργότητα του νερού ως μέσου της αντίδρασης είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνη για τον προσδιορισμό του τύπου της αντίδρασης πού θα επικρατήσει.
Σύμφωνα με την Brenda (2007), η FoCut5a μπορεί να ταξινομηθεί, με συνιστώμενο όνομα να είναι "τρικυλογλυκερολική λιπάση", και συστηματική ονομασία "υδρολύτική τριακυλογλυκερίνη".
Ως εκ τούτου, το ένζυμο είναι ένας εστέρας τύπου κουτίνης, αλλά επίσης δρά και έχει χαρακτηριστεί ως μία λιπάση.
Οι κουτινάσες παρουσιάζουν αρκετές ενδιαφέρουσες ιδιότητες για εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα προϊόντων, από τα τρόφιμα μέχρι τα απορρυπαντικά
Ως εκ τούτου, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στη δομή, τη λειτουργία, τον καθαρισμό, και τις εφαρμογές των κουτινασών, με στόχο την ανάπτυξη νέων διεργασιών χρησιμοποιώντας αυτά τα ένζυμα.

Παρακάτω γίνεται μια επισκόπηση των χαρακτηριστικών και πιθανές εφαρμογές των κουτινασών σε βιομηχανικές διεργασίες.

1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣΗΣ

Η FoCut5a είναι ένα από τα μικρότερα μέλη της κλασικής τριάδας καταλυτών που αποτελείται από

- σερίνη,
- ιστιδίνη, και
- μια καρβοξυλομάδα.

Η υποοικογένεια κουτινασών αποτελείται από περίπου 20 μέλη, που κατατάσσονται με βάση την ομοιότητα αλληλουχίας αμινοξέων.

Η δομή και η μοριακή δυναμική έχουν προσδιοριστεί με χρήση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ και μελέτες NMR. Σε όλες τις περιπτώσεις υδρόλυσης σερίνης, η δραστική θέση είναι πάντα στο C-τερματικό άκρο μιας β-αλυσίδας
Το μόριο του ενζύμου παρουσιάζει μία συμπαγή δομή που αποτελείται από 197 στελέχη, τα οποία είναι διατεταγμένα σε έναν υδρόφοβο πυρήνα κατασκευασμένο από ένα β κεντρικό φύλλο που περιβάλλεται από 5 α-έλικες, και ένα μοναδικό υπόλειμμα τριπτοφάνης (Trp69), που βρίσκεται δίπλα σε ένα δεσμό δισουλφιδίου (Cys31-Cys109).

Σύμφωνα με τον Borreguero, η καταλυτική θέση της FoCut5a δεν προστατεύεται από αμφιπατική ελικοειδή καλύπτρα, χαρακτηριστικό που υπάρχει στις άλλες λιπάσες.

Η θέση του οξυ-ανιόντος είναι προκαθορισμένη σε αυτές, αφού έχει ήδη διαμορφωθεί στις λιπάσες κατά τη σύζευξη με το υπόστρωμα.

Αυτά τα δύο χαρακτηριστικά μπορεί να ευθύνονται για την απουσία διεπιφανειακής ενεργοποίησης, πού ανιχνεύθηκε στην καταλυτική συμπεριφορά των κουτινασών.

Ο Melo et al. (2003b) περιγράφει, σε ορισμένες κουτινάσες, την παρουσία ενός τόπου διάπλασης που ανοίγει και κλείνει, υποδεικνύοντας ότι το ένζυμο είναι κυρίως μια λιπάση και όχι μια εστεράση. Αυτή η κίνηση κάλυψης της ενεργού θέσης μπορεί να είναι υπεύθυνη για την προσαρμογή του ενζύμου σε διαφορετικούς διαλύτες.

Λαμβάνοντας υπόψη την ομάδα των κουτινάσων, η σταθερότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το συγκεκριμένο ένζυμο που εξετάζεται. Ο Petersen παρατήρησε ότι η τριτοταγής δομή της FoCut5a παραμένει αμετάβλητη σε ένα εύρος pH από 4,0 έως 9.0. Ωστόσο, το ένζυμο διατήρησε τη δραστηριότητά του σε pH 4,0 έως 5,0 και, επίσης, σε pH 8.5.

Αυτή η συμπεριφορά πιθανώς σχετίζεται με την κατάσταση ιονισμού του υδρογόνου που είναι -188, επειδή αυτό το κατάλοιπο πρέπει να να αποπρωτονιωθεί προκειμένου να σταθεροποιηθεί η καταλυτική περιοχή.
Η σταθερότητα του pH των μυκήτων FoCut5a παραμένει στα βασικά και όξινα όρια, ενώ για σταθερότητα εμφάνισης FoCut5a σε ουδέτερο pH, η βέλτιστη τιμή του pH είναι 6.8.

Αρκετές στρατηγικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της θερμικής και λειτουργικής σταθερότητας των κουτινασών σε διαφορετικά μέσα αντίδρασης.

Η χρήση αντίστροφων μικυλλίων είναι η στρατηγική που χρησιμοποιείται περισσότερο στην βιβλιογραφία, λόγω των υψηλών αποδόσεων που επιτεύχθηκαν.

Αντίστροφα μικκύλια είναι συστήματα αποτελούνται από αμφίφυλα μόρια με πολικές ομάδες προσανατολισμένες πρός τα μέσα και άπολες ομάδες προσανατολισμένων προς τα έξω.

Η δομή τους έχει χαρακτηριστικά που μοιάζουν με βιολογικές μεμβράνες. Αυτό το χαρακτηριστικό τις καθιστά ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη των βιολογικών αλληλεπιδράσεων των βιοδραστικών πεπτιδίων (Melo et al., 2003b).

Η χρήση των αλκοολούχων μέσων, κυρίως με χρήση εξανόλης, αυξάνει την δραστηριότητα κατακράτησης FoCut5a σε αντίστροφα μικκύλια, αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός (Sebastiano et al, 1993).

1.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣΗΣ

Οι κουτινάσες είναι μια ευέλικτη ομάδα ενζύμων που παρουσιάζει πολλές χρήσιμες ιδιότητες για την εφαρμογή σε προϊόντα και βιομηχανικές διεργασίες. Κατά τα τελευταία έτη, η εστερολυτική δραστηριότητα της FoCut5a έχει διερευνηθεί εκτεταμένα.

Ένα ενζυμικό παρασκευάσμα που περιέχει FoCut5a αναπτύχθηκε, προκειμένου να βελτιωθεί το φαρμακολογικό αποτέλεσμα των γεωργικών χημικών ουσιών, εκμεταλλευόμενοι την in vitro (= απομονωμένη από το περιβάλλον, εργαστηριακά μελετημένη) δραστηριότητα της FoCut5a .

Αυτά τα ένζυμα, επίσης, παρουσιάζουν μεγάλες δυνατότητες στη διαχείριση των καταλοίπων, από τα φρούτα και τα λαχανικά. Ο φλοιός του μήλου και της ντομάτας και η φλούδα του πορτοκαλιού χρησιμοποιούνται, μέσω υδρόλυσης με κουτίνη για την παραγωγή σημαντικών βιομηχανικών χημικών προϊόντων, όπως για παράδειγμα ρικινολεϊκό οξύ, του οποίου η κύρια πηγή είναι το έλαιο Mamone (Carvalho, 1997).

Οι κουτινάσες υδρολύουν, in vitro (= στο εργαστήριο), ένα ευρύ φάσμα από εστέρες, που κυμαίνονται από διαλυτά συνθετικούς (όπως ρ-νιτροφαινυλεστέρα), αδιάλυτα μακράς αλύσου, τριγλυκερίδια (όπως τριολεϊνη και τρικαπριλίνη), και χρησιμοποιούνται για την γαλάκτωματοποίηση τριγλυκεριδίων (Egmond, 2000).

Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν στην σύνθεση των ακολούθων:

- δομημένα τριγλυκερίδια,
- πολυμερή,
- επιφανειοδραστικά,
- στην παραγωγή προϊόντων προσωπικής φροντίδας,
- σε αγροχημικά και
- φαρμακευτικές ενώσεις

Η FoCut5a έχει χρησιμοποιηθεί ως λιπολυτικό ένζυμο στη σύνθεση απορρυπαντικών πλυντηρίων πιάτων και ρούχων, και ήταν καλύτερη από μία λιπάση του εμπορίου (LipolaseTM) για την απομάκρυνση των τριακυλογλυκερολών σε επεξεργασία βιομηχανικής πλύσης, επειδή η FoCut5a είναι σε θέση να υδρολύει λίπη σε περιβάλλοντα χωρίς ασβέστιο.

Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις μιας παραγωγής διεργασίας είναι μια σημαντική πτυχή, και η χρήση υπερκρίσιμων ρευστών είναι μια καλή στρατηγική σε αυτό το πλαίσιο.

Τα υπερκρίσιμα ρευστά παρουσιάζουν καλές προοπτικές σε διάφορους τομείς, ιδιαίτερα στην βιοκατάλυση. Είναι πλέον πλήρως επιβεβαιωμένο ότι πολλά ένζυμα είναι σε θέση να καταλύουν αντιδράσεις σε μη υδατικά μέσα που είναι δύσκολο ή αδύνατο να συμβεί σε υδατικό περιβάλλον. Επίσης, ορισμένα ένζυμα γίνονται πιο σταθερά και μπορεί να εμφανίσουν μια τροποποιημένη επιλεκτικότητα, και κάποιες εφαρμογές αυτής της μη « υδατικής ενζυμολογίας" είναι ήδη σε εμπορική εκμετάλλευση.

Οι Klibanov, 2001, Krishina, 2002, Garcia et al. (2005) ερεύνησαν τη δραστηριότητα του Fusarium solani pisi FoCut5a σε υπερκρίσιμα ρευστά και οργανικούς διαλύτες.

Οι αρχικές ταχύτητες μετεστερεοποιήσεως του βουτυρικού βινυλίου από (R, S)-2-φαινυλο-1-προπανόλη ήταν παρόμοια σε υπερκρίσιμο αιθάνιο και κ-εξάνιο, και σημαντικά υψηλότερη από ότι σε ακετονιτρίλιο και σε υπερκρίσιμο CO2 κάτω από όλες τις συνθήκες που ελέγχθηκαν.

1.2.1 Πετρέλαιο και γαλακτοκομικά προϊόντα

Το ενδιαφέρον για την τεχνολογία τροποποίησης των ελαίων και του λίπους αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, ενώ η μετεστεροποίηση των λιπών και ελαίων, καθώς και η στερεοεκλεκτική εστεροποίηση των αλκοολών, μπορεί να ληφθεί με χαμηλή δραστικότητα νερού χρησιμοποιώντας FoCut5a (Macedo και Pio, 2005).

Το γεγονός ότι οι ουσίες αυτές μπορούν να ληφθούν από φυσικές, συχνά χαμηλού κόστους πηγές, και να μετατραπούν σε σημαντικές πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα και στις χημικές και φαρμακευτικές βιομηχανίες εξηγεί το ενδιαφέρον αυτό.

Ένα ιδιαίτερα σημαντικό θέμα σε αυτή τη ρύθμιση είναι η τροποποίηση των λιπιδίων, προκειμένου να γίνουν κατάλληλα για πολύ συγκεκριμένες εφαρμογές. Ως εκ

τούτου, η βιομηχανία έχει αναπτύξει διάφορες διαδικασίες για την τροποποίηση της σύνθεσης των τριγλυκεριδίων.

Η βασική δομή των ελαίων και λιπών μπορεί να τροποποιηθεί με διάφορους τρόπους:

- χημική τροποποίηση των λιπαρών οξέων (υδρογόνωση),
- διάσπαση του δεσμού εστέρα (υδρόλυση), και
- αναδιοργάνωση των λιπαρών οξέων στην κύρια αλυσίδα των τριγλυκεριδίων (Ενδοεστεροποίηση) (Clauss, 1996).

Οι βιοτεχνολογικές διεργασίες αποτελούν ενδιαφέρουσα επιλογή για χρήση στη βιομηχανία, ελαίων και λιπών, επειδή έχουν έναν αριθμό πλεονεκτήματων, όπως:

- καλύτερη απόδοση της διαδικασίας,
- λιγότερη κατανάλωση ενέργειας,
- παραγωγή βιοδιασπώμενων προϊόντων,
- φθηνότερες διαδικασίες παραγωγής
- και παραγωγή λιγότερων υπολειμμάτων.

1.2.2 Αρωματικές ενώσεις

Οι τερπενικοί εστέρες λιπαρών οξέων μικρού μήκους αλυσίδας, είναι αιθέρια έλαια και χρησιμοποιούνται σαν γευστικές και αρωματικές ενώσεις σε ένα μεγάλο πεδίο εφαρμογών, όπως

- στα τρόφιμα,
- τα καλλυντικά,
- και τις φαρμακευτικές βιομηχανίες.

Από τους τερπενικούς εστέρες, οι πιο σημαντικοί είναι οι οξικοί, προπιονικοί, και βουτυρικοί των άκυκλων αλκοολών (geraniol και κιτρονελλόλη).

Οι εστέρες αυτοί λαμβάνονται παραδοσιακά μέσω χημικής σύνθεσης, ζύμωσης, και εκχύλιση από φυσικές πηγές (Welsh et al., 1989). Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι είναι δαπανηρές και παρουσιάζουν μια χαμηλή απόδοση της αντίδρασης. Αντιμετωπίζοντας την αυξανόμενη ζήτηση από φυσικά προϊόντα, η βιομηχανία χρησιμοποιεί βιοτεχνολογική τεχνολογία προκειμένου να παράγει φυσικές γεύσεις, χρησιμοποιώντας ιδιαίτερα ενζυματικές μεθόδους (Armstrong et al., 1989).

Η χρήση των ένζυμων σαν βιομηχανικών καταλυτών σε οργανικά μέσα έχει σημαντικά πλεονεκτήματα (Klibanov, 1989). Σε τέτοια συστήματα, υδρολυτικά ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατάλυση συνθετικών αντιδράσεων, αφού η χημική ισορροπία της αντίδρασης μεταβάλλεται πρός την κατεύθυνση του προϊόντος της σύνθεσης (John and Abraham, 1991, Ballesteros et al., 1995).

Η σύνθεση τερπενικών εστέρων μέσω της άμεσης εστεροποίησης και μετεστεροποίησης σε μέσα χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό έχει περιγραφεί σε ερευνητικές εργασίες. (Stamatis et al., 1993; Claon and Akoh, 1994; Langrand et al., 1988; Karra-Chaarbouni et al., 1996; Castro et al., 1997).

1.2.3 Παραγωγή φαινολικών ενώσεων

Η οικογένεια των φαινολικών οξέων αποτελείται από παράγωγα των κινναμωνικού (C6-C3) και βενζοϊκού (C6-C1) οξέος. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία στην δομή τους ενός βενζολικού δακτυλίου με μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου, ή μία μεθοξυλική ομάδα, μαζί με μια καρβοξυλική ομάδα. Είναι φυσικά υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, πανταχού παρόντα σε φρούτα, λαχανικά και αρωματικά βότανα.

Αυτές οι ουσίες έχουν αυξήμένο ενδιαφέρον για πιθανές βιομηχανικές χρήσεις λόγω του συνολου των ιδιοτήτων τους ως:

- αντιοξειδωτικά,
- θεραπευτικά,
- καθαριστικά ελεύθερων ριζών
- αντιαλλεργικά,
- αντιφλεγμονώδη,

- αντιμικροβιακά,
- αντιιικά,
- αντικαρκινικά, και επίσης, ως
- φίλτρα υπεριωδών ακτίνων (Espinoza και Villeneuve, 2005? Silva et al, 2000)..

Λόγω της χαμηλής διαλυτότητας των φαινολικών, η χρήση τους σε προϊόντα με βάση τα λιπίδια είναι πολύ περιορισμένη. Η εστεροποίηση του καρβοξυλικού οξεως με μία λιπαρή αλκοόλη αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την υδροφοβικότητα και τα αποτελέσματά της σε ένα αμφιφυλικό πολυλειτουργικό μόριο. Τέτοια αντίδραση είναι γνωστή ως λιποφιλική μετατροπή, και μπορεί να πραγματοποιηθεί χημικά ή ενζυματικά.

Οι διαδικασίες λιποφιλικής μετατροπής των χημικών προϊόντων έχουν μειονεκτήματα που σχετίζονται με τη χαμηλή θερμική και pH σταθερότητα του μέσου αντίδρασης αυτών των ουσιών. Επιπλέον, η χημική διαδικασία λιποφιλικής μετατροπής δεν είναι επιλεκτική, και απαιτεί πολλά ενδιάμεσα στάδια αντίδρασης και διεργασίες καθαρισμού, λόγω της δημιουργίας ενός μεγάλου ποσού ανεπιθύμητων προϊόντων (Hills, 2003).

Η ενζυματική λιποφυλική μετατροπή των φαινολικών οξέων παρουσιάζει πλεονεκτήματα, όπως

- περισσότερο επιλεκτική ειδίκευση,
- μικρότερη παραγωγή υποπροϊόντων,
- μεγαλύτερη διαφοροποίηση του καθαρού συνθετικού υποστρώματος,
- λιγότερα ενδιάμεσα στάδια, και πιο
- εύκολα τροποποιήσιμους παραμέτρους της αντίδρασης.

Η ενζυματική λιποφυλική μετατροπή μελετάται χρησιμοποιώντας

- λιπάσες,
- φερουλικές εστεράσες,
- ταννάσες,και
- κουτινάσες (Soares et al., 2003).

Οι Stamates et al. (1999) μελέτησαν την εστεροποίηση φερουλικού οξέως με 1-οκτανόλη χρησιμοποιώντας διαφορετικά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων των F. solani FoCut5a. Αυτά τα ένζυμα ήταν επίσης ικανά να καταλύουν την εστεροποίηση του

- κινναμικού,
- π-κουμαρικού και
- ρ-υδροξυφαινυλ προπιονικού

οξέων σε σχετικά υψηλά ποσοστά

1.2.4 Κλωστοϋφαντουργία και απορρυπαντικά

Οι συνθετικές ίνες είναι υπεύθυνες για σχεδόν 50% της παγκόσμιας ζήτησης κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων (Silva et al., 2005), και η παραγωγή των ινών πολυεστέρα είναι μεγαλύτερη από την παραγωγή ινών βαμβακιού. Λόγω της σημασίας των συνθετικών ινών για τη κλωστοϋφαντουργία, υπήρξε έντονη έρευνα σχετικά με τη βελτίωση της διαδικασίας παραγωγής, καθώς και σε βελτιώσεις της τελικής ποιότητα του προϊόντος.

Οι συνθετικές ίνες έχουν κάποια χαρακτηριστικά, όπως

- υδροφοβικότητα, που τις καθιστούν ακατάλληλες για επαφή με το ανθρώπινο δέρμα, και
- χαμηλή αντιδραστικότητα, η οποία δημιουργεί κάποιες δυσκολίες στην μεταχείριση αυτών των ινών στην βαφή και το φινίρισμα.

Η χρήση ισχυρών αλκαλικών παραγόντων μπορεί να βελτιώσει την υδροφοβικότητα και δραστικότητα τέτοιων ινών, αλλά αυτές οι διαδικασίες είναι δύσκολο να ελέγχθουν και συχνά έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της ελαστικότητας της ίνας (Carvalho et al, 1998. Soares et al, 2003. Vertommen et al, 2005)..

Εκτός αυτού, οι μεγάλες ποσότητες υδροξειδίου του νατρίου και οι υψηλές θερμοκρασίες αντίδρασης που απαιτούνται σε αυτές τις διαδικασίες τις καθιστούν μη ελκυστικές για περιβαλλοντολογικούς λόγους. Η καλύτερη στρατηγική είναι να τροποποιήθεί μόνο η επιφάνεια κατά την επιδίωξη χαμηλής υδροφοβικότητας, χωρίς να αλλάζει το εσωτερικό της ίνας.

Σε πρόσφατη έρευνα που χρησιμοποιεί σαν ένζυμα, λιπάσες και κυρίως κουτινάσες, αποδεικνύεται η βελτίωση της ποιότητας των ινών πολυεστέρα μέσω της υδρόλυσης των δεσμών εστέρα μόνο στην επιφάνεια των ινών. Οι παραμέτροι της αντίδρασης είναι πολύ πιο ήπιες, παρουσιάζουν μικρές ποσότητες υπολειμμάτων, και χωρίς την ανάγκη πολύπλοκων μηχανημάτων (Alisch et al, 2004. Fischer-Colbrie et al, 2004 Matama ετ al, 2004. Vertommen et al, 2005)

Τελος, οι κουτινάσες και καρβοξυλοεστεράσες έχουν δείξει μια παρόμοια δυνατότητα να υδρολύουν δεσμούς εστέρα από λιπάσες.

2. ΕΣΤΕΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΕΡΟΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Οι φερουλοποιημένες εστεράσες (ΕΚ 3.1.1.73) επίσης γνωστές ως εστεράσες του φερουλικού οξέος (FAE), κινναμικές εστεράσες, υδρολάσες κιναμικού οξέος είναι μια υποκατηγορία εστερασών του καρβοξυλικού οξέος (ΕΚ 3.1.1.1) που είναι ικανές να υδρολύσουν τον εστερικό δεσμό μεταξύ υδροξυκινναμικών οξέων και σακχάρων παρόντων στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών (Williamson et al 1998 b). Αυτά τα ένζυμα έχουν ταξινομηθεί στις ομάδες τύπου Α (π.χ. *Aspergillus niger* FaeA) και τύπου Β (π.χ. *A.niger* CinnAE, FaeB, *Penicillium funiculosum* FaeB, *Neurospora crassa* Fae- 1), σύμφωνα με την εξειδίκευση του αρωματικού τμήματος του υποστρώματος, την εξειδίκευση της σύνδεσης στο αρχικό σάκχαρο και τη δυνατότητα να απελευθερώνουν αφυδατωμένα διμερή φερουλικού οξέος από τα εστεροποιημένα υποστρώματα (Crepin et al. 2003a; de Vries et al. 2002b; Kroon et al. 1999, 2000). Η χρησιμοποίηση υποστρωμάτων είτε του μεθυλεστέρα του σιναπινικού οξέος είτε του μεθυλεστέρα του καφεϊκού οξέος από φερουλοποιημένες εστεράσες είναι η βάση αυτής της ταξινόμησης. Επιπλέον, η πλειοψηφία αυτών των εστερασών παρουσιάζει ενεργότητα της εστεράσης της ακετυλοξυλάνης, ανεξάρτητα από το αν ορίζονται ως ακετυλοποιημένες ή φερουλοποιημένες εστεράσες. Ωστόσο, η συγκεκριμένη ενεργότητα της εστεράσης της ακετυλοξυλάνης είναι μάλλον χαμηλή για τα ένζυμα που ταξινομούνται ως φερουλοποιημένες εστεράσες.

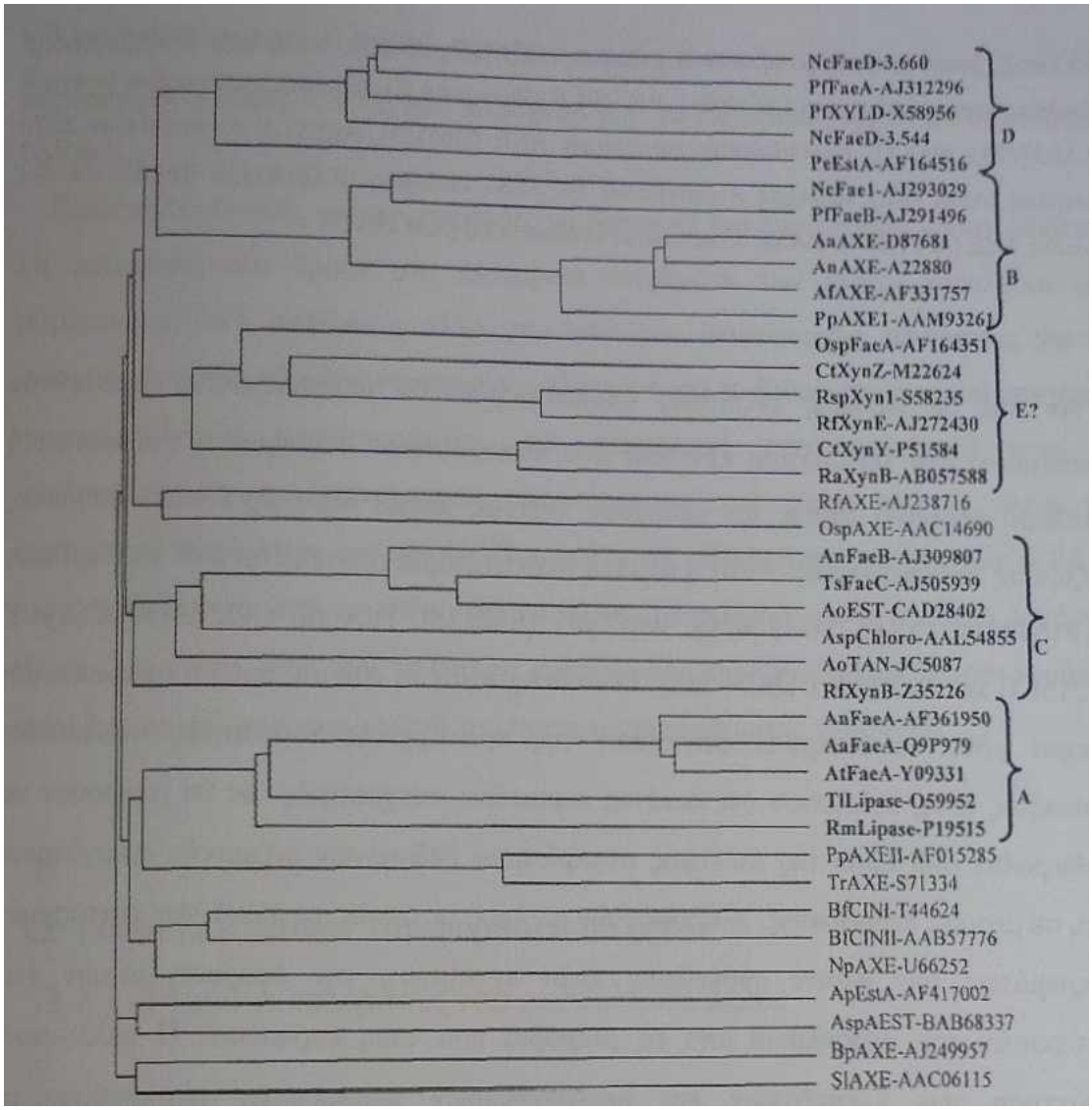
Τα FAEs φαίνεται να είναι μια ποικίλη ομάδα ενζύμων, με μικρή ενοποιητική αλληλουχία και φυσικά χαρακτηριστικά να τα ενώνουν. Πολλά FAEs έχουν καθαριστεί και χαρακτηρισθεί δείχνοντας διάφορες παραλλαγές σε φυσικά χαρακτηριστικά όπως το μοριακό βάρος, το ισοηλεκτρικό σημείο και οι άριστες συνθήκες της αντίδρασης υδρόλυσης. Δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των FAEs και των άριστων συνθηκών αντίδρασης (V. F. Crepin, C. B. Faulds, I. F. Connerton).

Σύμφωνα με τους Crepin et al., πολλαπλές ευθυγραμμίσεις αλληλουχιών ή τομέων που δείχνουν την ενεργότητα της FAE, όσο και άλλων σχετικών αλληλουχιών, χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου όπου συμβαίνει σύνδεση γειτονικών περιοχών. Το αποτέλεσμα αυτής της γενετικής σύγκρισης που

υποστηρίζεται επίσης από δεδομένα ειδικότητας υποστρώματος, επέτρεψε την υποταξινόμηση των FAEs σε 4 τύπους: A, B, C και D. Το φυλογενετικό δέντρο δείχνει ότι οι εστεράσες του φερουλικού αποκλίνουν σε τρεις κύριους κλάδους, μέσα στους οποίους εξελίσονται κατά μήκος ξεχωριστών γραμμών για να διαμορφώσουν τις υποκατηγορίες του συγκεκριμένου ενζύμου (σχήμα 1.1).

Η φυλογενετική ανάλυση υποστηρίζει σε γενικές γραμμές την ταξινόμηση των εστερασών του φερουλικού που προτείνεται ανωτέρω στη βάση των προφίλ της ενζυμικής ενεργότητας έναντι των συνθετικών μεθυλεστέρων. Εντούτοις, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η φυλογενετική ανάλυση δείχνει ότι ο TsFaeC (EMBL αριθμός προσθήκης AJ505939) και AnFaeB (AJ309807) συσχετίζονται στενά και εξελίσσονται από μια κοινή ρίζα. Κατά συνέπεια, προτείνεται ότι αυτά τα ένζυμα ανήκουν στην ίδια υποκατηγορία εστερασών του φερουλικού, τον τύπο C, παρά τη διαφορά στην εξειδίκευση του υποστρώματος του AnFaeB για τα μεθυλουδροξυκινναμικά, γεγονός που στην αρχή ενίσχυε την άποψη ότι αυτό το ένζυμο ανήκε στην τύπου B-εστεράση του φερουλικού (De Vries et al. 2002b). Τα ένζυμα του πραγματικού τύπου B έχουν έναν κοινό κόμβο, αλλά οι πρωτεϊνικές ακολουθίες των *Pen. funiculosum* FaeB (AJ291496) και *N. crassa* Fae-1 (AJ293029) μπορούν να διαχωριστούν από τον υψηλό βαθμό συντήρησης που παρατηρείται μεταξύ των εστερασών της ακετυλοξυλάνης του *A. Awamori* (D87681), A. *niger* (AF331757) και *Pen. purpurogenum* (AAM93261).

Το φυλογενετικό δέντρο αναγνωρίζει επίσης τις σχέσεις ακολουθίας έξω από το παρόν σχέδιο. Παραδείγματος χάριν, η εστεράση της ακετυλοξυλάνης II από τον *Pen. purpurogenum* (αριθμός προσθήκης AF015285) και η καταλυτική περιοχή του AXE I (acetyl xylan esterase) από τον *Trichoderma reesei* (S71334) μοιράζονται 67% «ταυτότητα ακολουθίας» (Gutierrez et al. 1998) και ένζυμα όπως τα XynY και XynZ από τον *C.thermocellum* (αριθμοί προσθήκης P51584 και M22624, αντίστοιχα), η FaeA από τον *Orpinomyces sp.* PC-2 (AF164351) και το Xynl από τον *Ruminococcus sp.* (S58235) συσχετίζονται στενά (Blum et al. 2000). Παράλληλα, το φυλογενετικό δέντρο δείχνει ότι, αν και οι εστεράσες του φερουλικού έχουν μερικές κοινές ρίζες, σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να σχετίζονται περισσότερο όσον αφορά την ακολουθία με μια ποικιλία άλλων ενζύμων, όπως λιπάσες, εστεράσες της ακετυλο ξυλάνης, ή ξυλανάσες, από όσο η μία με την άλλη.



Σχήμα 1.1: Κλαδόγραμμα των ενζύμων της οικογένειας των εστερασών του φερουλικού οξέος και των συγγενών τους.

Τα ονόματα ακολουθίας με τους αύξοντες αριθμούς φαίνονται στα δεξιά του δέντρου. NcFaeD-3.660 *Neurospora crassa* FaeD-3.660 εστεράση του φερουλικού, PfFaeA *Penicillium funiculosum* FaeA (AJ312296), PfXYLD *Pseudomonas fluorescens* XYLD (X58956), NcFaeD-3.544 *N. crassa* FaeD-3.544 εστεράση του φερουλικού, PeESTA *Piromyces eqai* ESTA (AF164516), NcFae-1 *N. Crassa* Fae 1 (AJ293029), PfFaeB *Pen. funiculosum* FaeB (AJ291496), AaAXE *Aspergillus awamori AXE* (D87681), AnAXE *A. niger* AXE (A22880), AfAXE *A. Ficuum* AXE (AF331757), PpAXEI *Pen. purpurogenum* AXE I (AAM93261), OspFaeA *Orpinomyces sp.* PC-2 FaeA (AF164351), CtXynZ *Clostridium thermocellum* XynZ (M22624), RspXynl

Ruminococcus sp. Xynl (S58235), RfXynE *R. flavefaciens* XynE (AJ272430), CtXynY *C. thermocellum* XynY (X83269), RaXynB *R. albus* XynB AB057588), RfAXE *R. flavefaciens* AXE (AJ238716), OspAXE *Orpinomyces sp.* PC-2 AXE A (AAC14690), AnFaeB *A. niger* FaeB (AJ309807), TsFaeC *Talaromyces stipitatus* FaeC (AJ505939), AoEST *A. oryzae* επιλεκτική εστεράση (CAD28402), *AspChloro Acinetobacter sp.* chlorogenate εστεράση (AAL54855), AoTAN *Asp. Oryzae* tannase (JC5087), RfXyi'B R- *flavefaciens* XynB (Z35226), AnFaeA *A. niger* FaeA (AF361950), AaFaeA *A. awamori* FaeA (Q9P979), AlFaeA *A. turbingensis* FaeA (Y09331), TILipase *Thermomyces lanuginosus* lipase (059952), RmLipase *Rhizomucor iniehei* λιπάση (PI9515), PpAXE *P. purporogenum* εστεράση της ξυλάνης, ΤγΛΧΕ *T. reesei* εστεράση της ακετυλ ξυλάνης I (S7I334), BfCINI *Butyrivibrio fibrisolvens* Γ·Μ υδρολάση κινναμικού εστέρα I (T44624), BfCINII *B. fibrisolvens* E14 υδρολάση κινναμικού εστέρα II (AAB57776), NρAXE *Neocallimastix patriciarum* AXE (U66253), ApESTA *A. parasiticus F.STA* εστεράση (AF4I7002), *AspAEST Acinetobacier sp.* AEST εστεράση (BAB68337), BpAXE *Bacillus pumilus* AXE (AJ249957), SI AXE *Streptomyces lividans* AXE (AAC06115).

Αν και οι τέσσερις ενζυμικές υποκατηγορίες θα μπορούσαν να αποδοθούν βασισμένες στα λειτουργικά κριτήρια που περιγράφηκαν ανωτέρω, η φυλογενετική ανάλυση προτείνει επίσης ότι υπάρχουν πιθανώς ακόμα περαιτέρω απροσδιόριστες ενζυμικές υποκατηγορίες. Αυτή η πέμπτη υποκατηγορία αποτελείται από τα OspFaeA (AF164351), CtXynZ (M22624), RspXynl (S58235), RfXynE (AJ272430),CtXynY (P51584) και RaXynB (AB057588). Εντούτοις, αυτή τη στιγμή, αυτή η ομαδοποίηση μπορεί μόνο να διακριθεί στη βάση της πρωταρχικής ταυτότητας ακολουθίας αμινοξέος τους, δεδομένου ότι κανένας περαιτέρω συσχετισμός δε θα μπορούσε να καθιερωθεί εδώ λόγω της έλλειψης συγκρίσιμων δεδομένων ενζυμικής ενεργότητας και, σε μερικές περιπτώσεις, πληροφοριών ως προς τις οποίες τα υλικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών προκαλούν κατά προτίμηση την έκφραση αυτών των εστερασών του φερουλικού από τα μικρόβια που τους κυριεύουν.

Η μελλοντική απόκτηση των πρωτεϊνικών και προβλεφθεισών πρωτεϊνικών ακολουθιών με συμπληρωματικά δεδομένα ενζυμικής ενεργότητας χρησιμοποιώντας συνθετικούς μεθυλεστέρες θα επιτρέψει την αιτιολόγηση αυτών και ενδεχομένως

άλλων ενζυμικών κατηγοριών που έχουν αναγνωριστεί στις φυλογενετικές αναλύσεις. Αυτά τα στοιχεία θα παράσχουν στη συνέχεια μια καλύτερη κατανόηση της σύνθετης εξελικτικής σχέσης μεταξύ των εστερασών του φερουλικού.

Συμπερασματικά, προτείνεται η ταξινόμηση των εστερασών του φερουλικού σε τέσσερις λειτουργικές υποκατηγορίες, ορισμένες ως τύποι Α, Β, και Γ, βασισμένες σε ομοιότητες στα προφίλ της ενεργότητας των εστερασών έναντι συνθετικών μεθυλεστέρων και η θεμελίωση μέσω της ενδο- και μεσο-ομάδας της ταυτότητας ακολουθίας της πρωτεΐνης των ενζύμων.

Εξαιτίας του αυξανόμενου αριθμού των FAEs που απομονώνονται, προτάθηκε μια ονοματολογία όπου χρησιμοποιούνται τα γράμματα του παραγόμενου μικροοργανισμού ακολουθούμενα από τη FAE για να υποδείξει ότι είναι ένα ένζυμο με ενεργότητα φερουλικής εστεράσης και έπειτα ένα γράμμα για να υποδείξει την προτεινόμενη υπο-θέση που βασίζεται στα δεδομένα ειδικότητας του ένζυμου. Για παράδειγμα, ο τύπος-Α FAE που παράγεται από το *Fusarium oxysporum* ***(F.oxysporum)*** θα καλείται FoFaeA.

Είναι πολύ σύνηθες για τις εστεράσες να δρουν σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Οι εστεράσες που δρουν στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών καταλύουν μια παρόμοια χημική αντίδραση αλλά παρουσιάζουν διαφορετικές ειδικότητες για το αρωματικό τμήμα υδροξυκινναμωμικών αλάτων ή για το δεσμό του αρχικού σακχάρου σε φερουλικούς ολιγοσακχαρίτες και παραλλαγή στην ικανότητά τους να απελευθερώνουν αφυδατο-διμερείς τύπους φερουλικού οξέος από το υλικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Η ποικιλία της ειδικότητας που δείχνουν οι FAEs, όπως καθορίστηκε από το ρυθμό της κατάλυσης διαιρεμένο με τη σταθερά Michaelis (kcai/k_m) η οποία δίνει την καλύτερη ένδειξη των “προτεινόμενων” υποστρωμάτων, είναι ένα αποτέλεσμα του υλικού του κυτταρικού τοιχώματος του φυτού.

2.1 ΤΥΠΟΙ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΤΟΥ ΦΕΡΟΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

2.1.1 ΤΥΠΟΣ Α

Οι τύπου Α φερουλοποιημένες εστεράσες έχουν την τάση να προκαλούνται κατά την ανάπτυξη σε παραγόμενα από σιτηρά υποστρώματα. Το ένζυμο απελευθερώνει

φερουλικό οξύ από την συνδεδεμένη με εστερικό δεσμό αραβινόζη (Ralet et al. 1994) και είναι επίσης ικανό να απελευθερώσει μικρές ποσότητες 5,5' και 8-0-4' αφυδατωμένων διμερών του φερουλικού από το φυτικό ιστό όταν προκατεργάζεται με μια ξυλανάση ή όταν μια ξυλανάση συν-επωάζεται με τη φερουλοποιημένη εστεράση (Bartolome et al. 1997; Faulds and Williamson 1995; Kroon et al. 1999; Williamson et al. 1998a).

Δεν υπάρχει καμία έκθεση αυτών των ενζύμων να απελευθερώνουν διφερουλικά από υλικά που παράγονται από πηκτίνη. Οι τύπου Α φερουλοποιημένες εστεράσες παρουσιάζουν επίσης μια προτίμηση προς το φαινολικό τμήμα του υποστρώματος που περιέχει μεθοξυ-υποκατάστατα, ειδικά στον/στους άνθρακα/κες 3 και/ή 5, όπως συμβαίνει στα φερουλικά και σιναπικά οξέα. Όσον αφορά την εξειδίκευση έναντι των συνθετικών υποστρωμάτων, οι τύπου Α φερουλοποιημένες εστεράσες είναι ενεργές έναντι στο μεθυλεστέρα του φερουλικού οξέος, σιναπινικού οξέος και του π-κουμαρικού αλλά όχι στο μεθυλεστέρα του καφεϊκού οξέος (V. F. Crepin, C. B. Faulds, I. F. Connerton).

Εμφανίζονται να προτιμούν υδροφοβικά υποστρώματα με ογκώδεις υποκαταστάτες στο δακτύλιο του βενζολίου (Kroon et al. 1997, 1999; Williamson et al. 1998a; Topakas et al.2005b).

2.1.2 ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ ΤΥΠΟΥ Β

Οι φερουλοποιημένες εστεράσες τύπου Β εκκρίνονται κατά προτίμηση από την ανάπτυξη στον πολτό ζαχαροτεύτλων. Τα ένζυμα απελευθερώνουν φερουλικό οξύ που είναι συνδεδεμένο με εστερικό δεσμό σε είτε C-2 φερουλοποιημένης αραβινόζης ή σε C-6 υπολείμματα φερουλοποιημένης γαλακτόζης (Kroon and Williamson 1996), αλλά είναι ανίκανα να απελευθερώσουν τις διμερείς μορφές του φερουλικού. Το ένζυμο τύπου Β από τον *A.niger* λειτουργεί επίσης στο 1.5-συνδεμένο φερουλικό οξύ όπως βρίσκεται στα σιτηρά αλλά σε χαμηλότερο ποσοστό από τις εστεράσες τύπου Α (Kroon et al. 1996; Ralet et al. 1994; Williamson et al. 1998a). Οι φερουλοποιημένες εστεράσες τύπου Β παρουσιάζουν μια προτίμηση προς το φαινολικό τμήμα του υποστρώματος που περιέχει ένα ή δύο υδροξυλικά υποκατάστατα, όπως βρίσκεται στα π-κουμαρικά και καφεϊκά οξέα, αντίστοιχα. Τα ποσοστά υδρόλυσης μειώνονται σημαντικά όταν μια μεθοξυ- ομάδα είναι παρούσα. Όσον αφορά την εξειδίκευση

έναντι συνθετικών υποστρωμάτων, οι τύπου Β φερουλοποιημένες εστεράσες είναι ενεργές έναντι στο μεθυλεστέρα του καφεϊκού οξέος, του φερουλικού και του π-κουμαρικού, αλλά όχι στο μεθυλεστέρα του σιναπινικού οξέος. Αρκετές μελέτες ειδικότητας καθοδηγήθηκαν έτσι ώστε να δείξει την ικανότητα των FAEs να απελευθερώνουν φερουλικό οξύ από πρότυπα υποστρώματα που αποτελούνται από χημικοενζυματικές συνθέσεις (Biely et al.2002) ή από φυσικά σχηματιζόμενους φερουλικούς ολιγοσακχαρίτες που έχουν αποκτηθεί από ελεγχόμενη ενζυματική χώνεψη του υλικού του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Φαίνεται ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στην ταξινόμηση της FAE και τη συγγένεια αυτών των ενζύμων με τη θέση α-L-αραβινοφουρανόζης της φερουλοποίησης. Οι τύπου Α εστεράσες όπως η AnFaeA (Williamson et al.1998), η TsFaeA (Garcia-Conesa et al.2004) και η FoFaeA (Topakas et al.2003b) (Πίνακας 3.1) είναι ενεργές μόνο σε υποστρώματα που περιέχουν εστέρα φερουλικού οξέος συνδεδεμένο στον C-5 και όχι σε υποστρώματα που περιέχουν εστέρα φερουλικού οξέος συνδεδεμένο στον C-2 της L-αραβινοφουρανόζης. Αντίθετα, οι τύπου Β FAEs όπως η AnFaeB (Williamson et al. 1998), η PfFaeB (Kroon et al.2000), η FAE από *A.pullulans* (Rumbold et al.2003), η TsFaeB (Garcia-Conesa et al.2004), η FoFaeB (Topakas et al. 2003a) και η StFaeB (Topakas et al.2004) είναι ενεργές σε υποστρώμτα που περιέχουν εστέρα φερουλικού οξέος συνδεδεμένο στον C-5 και C-2 της L-αραβινοφουρανόζης με διαφορετικές προτιμήσεις ανάλογα με την εστεράση που μελετάται. Η ανικανότητα της τύπου Α FAE να υδρολύσει το δεσμό C-2 μεταξύ του φερουλικού οξέος και του υπολείμματος της L-αραβινοφουρανόζης θα μπορούσε να είναι ένα καινούριο κριτήριο ταξινόμησης σε αυτήν την υπο-θέση των εστερασών. Οι τύπου C και D FAEs όπως η StFaeC (Topakas et al.2005a), η TsFaeC (Garcia-Conesa et al.2004) και PfFaeD (Kroon et al.2000) μπορούν να υδρολύουν και τους δύο δεσμούς. Τα ενεργά μέρη των FAEs από μεσόφιλες και θερμόφιλες πηγές έχουν εξεταστεί χρησιμοποιώντας επίσης μεθυλεστέρες φαινυλαλκανιακών οξέων (Kroon et al.1997; Topakas et al.2005b). Οι θερμόφιλες εστεράσες από τον *S.thennophile* (StFaeB και StFaeC) έδειξαν χαμηλότερς τιμές K_{cat} έναντι των φαινυλαλκανιακών κινναμοϋλικών μεθυλεστέρων συγκρινόμενες με τις μεσόφιλες εστεράσες από τον *F.oxysporum* (FoFaeA και FoFaeB). Αυτό το αποτέλεσμα φαίνεται καλύτερα με σύγκριση των τιμών K_{cm} έναντι των μεθυλεστέρων των υδροξυ-κινναμικών οξέων του ίδιου τύπου FAEs StFaeB και FoFaeB (V. F. Crepin, C. B. Faulds, I. F. Connerton).

2.1.3 ΕΣΤΕΡΑΣΗ ΤΥΠΟΥ Γ

Ένας τρίτος τύπος εστεράσης με ευρεία εξειδίκευση έναντι στα συνθετικά υδροξυκινναμικά οξέα (φερουλικό, καφεϊκό, π-κουμαρικό, σιναπικό) έχει αναφερθεί ως ακετυλεστεράση (XYLD) από τον *Pseudomonas fluorescens* (Ferreira et al. 1993). Τα στοιχεία δείχνουν ότι XYLD είναι σε θέση να διασπάσει εστερικούς δεσμούς στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών, αν και το ένζυμο εκθέτει μεγαλύτερη ενεργότητα προς την απελευθέρωση του οξικού οξέος από το 4-νιτροφαινυλ του οξικού άλατος. Το ποσοστό υδρόλυσης της XYLD εστεράσης, τόσο για τα υδροξυκινναμικά οξέα όσο και για τα ακετυλιωμένα υποστρώματα, είναι σημαντικά χαμηλότερη (25- έως 500- φορές) από ότι έχει αναφερθεί για τις χαρακτηρισμένες μυκητοειδείς φερουλοποιημένες εστεράσες (de Vries et al. 2002b; Faulds and Williamson 1994; Kroon et al. 1996, 2000) και άλλες μικροβιακές εστεράσες ακετυλ ξυλάνης (Basaran and Hang 2000,Blum et al. 1999,Degrassi et al. 2000,Linden et al. 1994,McDermid et al. 1990). Επιπλέον, η XYLD μπορεί να απελευθερώσει τα 5-5' αφυδατωμένα διμερή του φερουλικού από τα κυτταρικά τοιχώματα του κριθαριού και σίτου (Bartolome et al. 1997). Για αυτήν την ευρεία εξειδίκευση σε υποστρώματα, η XYLD έχει ταξινομηθεί πειραματικά ως μια γενική εστεράση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών.

3. Fusarium oxysporum

Η επιστημονική ταξινόμηση του μύκητα που χρησιμοποιήθηκε τόσο για την παραγωγή της FoCut5a όσο και της FoFaeC είναι η εξής:

Βασίλειο : Μύκητες
Κατηγορία: Ascomycota
Τάξη : Sordariomycetes
Σειρά : Hypocreales
Οικογένεια: Nectriaceae
Γένος : Fusarium
Είδος: F. oxysporum

Τα στελέχη του μύκητα αποτελούν μερικά από τα πιο άφθονα και διαδεδομένα μικρόβια της παγκόσμιας μικροχλωρίδας του εδάφους. Αυτοί οι εξαιρετικά ποικίλοι και προσαρμόσιμοι μύκητες έχουν βρεθεί σε εδάφη που κυμαίνονται από την έρημο

μέχρι τα τροπικά και εύκρατα δάση, και τα λιβάδια και εδάφη της τούνδρας. Στελέχη *oxysporum F.* μπορεί να αποικίσουν τις ρίζες των φυτών και μπορούν να προστατεύσουν τα φυτά ή να συμβάλλουν στην καταστολή πιθανής νόσου. Αν και γενικά ο ρόλος αυτών των μυκήτων στα εδάφη μπορεί να είναι ακίνδυνος ή ακόμη και ευεργετικός, πολλά στελέχη μέσα στο συγκρότημα *oxysporum F.* είναι παθογόνα για τα φυτά, ειδικά στον τομέα των γεωργικών καλλιεργειών. Παθογόνα στελέχη του *F. oxysporum* έχουν μελετηθεί για περισσότερα από 100 χρόνια. Το εύρος ξενιστών αυτών των μυκήτων είναι εξαιρετικά ευρύ και περιλαμβάνει διάφορα ζώα, καθώς και φυτά, συμπεριλαμβανομένων και μια σειρά από γυμνόσπερμα και αγγειόσπερμα . Στο παρακάτω σχήμα εμφανίζεται εργαστηριακή καλλιέργεια και μικροσκοπική άποψη του μύκητα.

Σχήμα 1.2:. εργαστηριακή καλλιέργεια και μικροσκοπική άποψη του Fusarium oxysporum..

Διάφορα στελέχη του *F. oxysporum* έχουν χρησιμοποιηθεί στο σκοπό της παραγωγής νανοϋλικών (ειδικά νανοσωματίδια αργύρου) .

4. Pichia Pastoris: ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Η *Pichia pastoris (P.pastoris) είναι* ένας ευκαρυωτικός μονοκύτταρος μικροοργανισμός, που ανήκει στην ομάδα των ζυμομυκήτων, και χαρακτηρίζεται ως μεθυλότροφος, καθώς χρησιμοποιεί τη μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας.

Η χρήση του συστήματος της μεθυλότροφης ζύμης, *P.pastoris,* ως κύτταρο ξενιστή στην ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων πρώτεινών είναι ευρέως διαδεδομένη (Cregg et aL, **2000**), καθώς διαθέτει μία σειρά από πλεονεκτήματα που την καθιστούν ορνανισμό- μοντέλο σε αυτή την διαδικασία.

Πρώτον, ως ευκαρυωτικός μικροοργανισμός διαθέτει υψηλά συστήματα έκφρασης πρωτεινών, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα παραγωγής σωστά διπλωμένων πρωτεινών που έχουν υποστεί όλες τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που είναι απαραίτητες για τη λειτουργικότητά τους. Δεύτερον, η γενετική του τροποποίηση είναι ευκολότερη από την τροποποίηση κυττάρων θηλαστικών, καθώς είναι μονοκύτταρος οργανισμός και αναπτύσσεται σε απλά θρεπτικά υποστρώματα. Επίσης, αποτελεί ένα ταχύ, εύκολο και φθηνό σύστημα έκφρασης πρωτεινών, συγκρινόμενο με άλλα ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης, όπως αυτό του βακυλοιού ή των καλλιεργειών κυττάρων θηλαστικών.

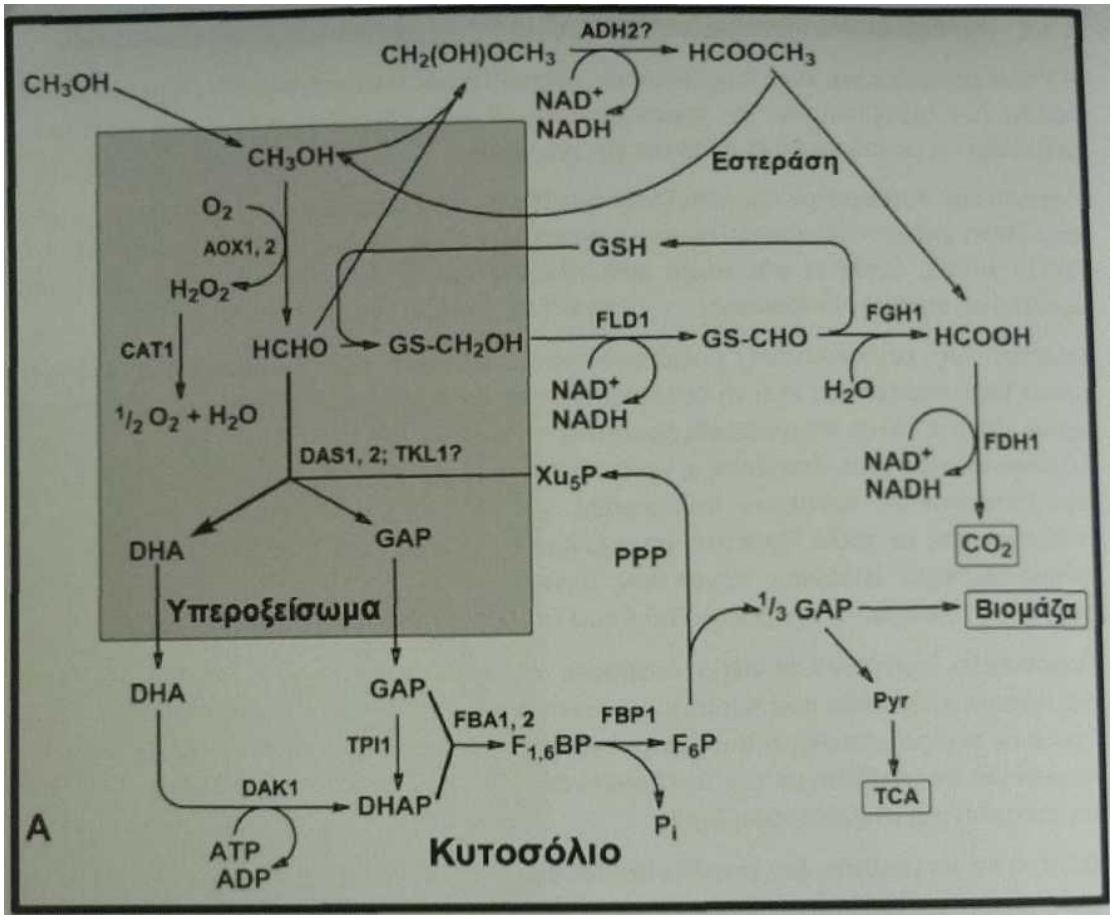
Παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης ετερόλογων πρώτεινών, 10 εώς 100 φορές υψηλότερα από εκεί που παρατηρούνται στον *Saccharomyces cerevisiae.* Η *P.pastoris* έχει έναν ισχυρό υποκινητή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεινών, *σε* αντίθεση με τον *Saccharomyces cerevisiae,* κάτι που σχετίζεται με το γεγονός ότι αποτελεί μία μεθυλότροφη ζύμη.

Τέλος, η *P.pastoris,* δεν εκκρίνει πολλές δικές της πρώτεινες στον εξωκυττάριο χώρο με αποτέλεσμα να καθίσταται ευκολότερη η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρώτε νών που εκκρό/ονται στον εξωκυττάριο χώρο.

4.1 Ιδιότητες της *P.pastoris* ως μεθυλότροφη ζύμη

Η *P.pastoris* χαρακτηρίζεται ως μεθυλότροφη ζύμη, διότι είναι ικανή να μεταβολίζει την μεθανόλη και να την χρησιμοποιεί ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Το πρώτο βήμα στον καταβολισμό της μεθανόλης είναι η οξείδωσή της σε φορμαλδεΰδη, με την κατανάλωση μοριακού οξυγόνου (αερόβιος μεταβολισμός), αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο αλκοολική οξειδάση (AOX, EC 1.1.3.13).

Από αυτή την αντίδραση παράγεται επίσης και υπεροξείδιο του υδρογόνου (Ledeboer et al., 1985). Για να αποφευχθεί η τοξικότητα που προκαλεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου, ο καταβολισμός της μεθανόλης λαμβάνει χώρα στα υπεροξεισώματα, τα οποία διαχωρίζουν τα τοξικά υποπροϊόντα από το υπόλοιπο κύτταρο. Otav η *P.pastoris* αναπτύσσεται σε διαφορετικό της μεθανόλης υπόστρωμα πολύ λίγα υπεροξεισώματα ανιχνεύονται στο κύτταρο, ενώ παρουσία μεθανόλης τα υπεροξεισώματα μπορεί να περιλαμβάνουν μέχρι και το 80 % του συνολικού όγκου τουκυττάρου. Παρακάτω φαίνεται το μεταβολικό μονοπάτι της μεθανόλης στην *P.pastoris*.



Σχήμα 1.3:. Καταβολικό μονοπάτι της μεθανόλης στην P.pastoris.

Η αλκοολική οξειδάση καταλύει την πρώτη αντίδραση αυτής της αλυσίδας αντιδράσεων, οξειδώνοντας την μεθανόλη σε φορμαλδεΰδη, και μετατρέποντας ταυτόχρονα το 0_2 σε H_20_2. Η φορμαλδεΰδη έπειτα είτε οξειδώνεται σε $C0_2$ απελευθερώνοντας 2 μόρια NADH για κάθε μόριο φορμαλδευδης, είτε συμπυκνώνεται με την 5-P-ξυλουλόζη και μετατρέπεται σε διυδροξυακετόνη και 3-P-νλυκερυναλδεΟδη

Η αλκοολική οξειδάση παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια στο οξυγόνο, και γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η παραγωγή του ένζυμου αυτού σε μεγάλες ποσότητες.

Το γονίδιο της αλκοολικής οξειδάσης υπόκειται αυστηρή ρύθμιση. Έτσι, εάν η *P.pastoris* αναπτύσσεται σε γλυκόζη ή αιθανόλη, η αλκοολική οξειδάση δεν ανιχνεύεται στα κύτταρα της ζύμης. Αντιθέτως, όταν η μεθυλότροφη ζύμη αναπτύσσεται σε μεθανόλη, η αλκοολική οξειδάση μπορεί να αποτελεί μέχρι και το 35% των συνολικών πρώτε ά/ών του κυττάρου. 0 έλεγχος της ποσότητας της αλκοολικής οξειδάσης γίνεται μεταγραφικά (Cregg, et.al 1985)

Το γονιδίωμα της *Pichia* περιλαμβάνει δύο γονίδια, τα AOX1 και AOX2, που κωδικοποιούν για ένζυμα με ενεργότητα αλκοολικής οξειδάσης (Cereghino JL, Cregg JM,2000). Το γονίδιο AOXl μπορεί να αποδίδει το 30% των διαλυτών πρωτεινών, όταν η *P.pastoris* αναπτύσσεται σε υπόστρωμα που περιέχει μόνο μεθανόλη, κάτι που αποδεικνύει πόσο ισχυρός είναι ο υποκινητής του, pAOXl (Couderc R, Baratti J, 1980). Εν αντιθέσει, το γονίδιο A0X2 βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός λιγότερο ισχυρού υποκινητή, ρAOX2, και κατά συνέπεια αντιπροσωπεύει μόνο το 15% της συνολικής ενεργότητας της αλκοολικής οξειδάσης στο κύτταρο (Cregg,1989). Τα παραπάνω γίνονται φανερά, από το γεγονός ότι οι κώδικές περιοχές των γονιδίων αυτών παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους, συγκεκριμένα 92% ομολογία σε νουκλεοτίδια και 97% ομολογία σε αμινοξέα (Ohi,1994), και συνεπώς παρουσιάζουν και τα δύο κοινή ενεργότητα αλκοολικής οξειδάσης, ενώ οι υποκινητές τους δεν παρουσιάζουν καμία ομολογία, και γι'αυτό το λόγο παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις στις ιδιότητές τους.

Το γονίδιο AOX1 έχει απομονωθεί και ο υποκινητής του χρησιμοποιείται για να οδηγήσει την έκφραση οποιουδήποτε ανασυνδυασμένου γονιδίου πρόκειται να μελετηθεί (Ellis et al., 1985, Koutz et al., 1989, Tschopp et al., 1987a).

Διακρίνονται τρεις φαινότυποι *P.pastoris*, ανάλογα με τη δυνατότητα του κάθε στελέχους να καταβολίζει την μεθανόλη. Ο φαινότυπος Mut* (Methanol utilization plus), όπου και τα δύο γονίδια, AOX1 και AOX2, είναι ενεργά και λειτουργικά, ο φαινότυπος Mut^s (Methanol utilization Slow), όπου το γονίδιο AOX1 έχει απενεργοποιηθεί, και κατά συνέπεια η μεθανόλη καταβολίζεται μόνο από το AOX2 με πιο αργούς ρυθμούς, και τέλος, ο φαινότυπος Mut' (Methanol utilization minus), στον οποίο έχουν απενεργοποιηθεί και τα δύο γονίδια αλκοολικής οξειδάσης, με συνέπεια το στέλεχος αυτό να μην επιβιώνει σε υπόστρωμα που περιέχει μόνο μεθανόλη, καθώς δεν μπορεί να την καταβολίσει (Cereghino & Cregg,2000). Κατά την πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιούνται οι φαινότυποι Mut* και Mut^s για την αξιολόγηση των μετασχηματισμένων κυττάρων *P.pastoris*.

Κεφάλαιο 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πρωταρχικής σημασίας εργασία για την δημιουργία των κυττάρων FoCut5a, των οποίων η κυτταρική ανάπτυξη επιθυμείται να μελετηθεί στην παρούσα διπλωματική ήταν η παρασκευή του κατάλληλου υποστρώματος, στο οποίο έγινε η ανακαλλιέργειά τους. Το καταλληλότερο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η ζύμη *P.pastoris*. Η συνταγή που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των εν λόγω τρυβλίων ήταν η ακόλουθη:

1.1 YPD Zeocin-Αντιβιοτικό

1.1.1 Υλικά

1% yeast extract

2% peptone from meat

2% dextrose

2% agar

100 μg/ml zeocin

1.1.2 Μέθοδος

Για Παρασκευή 50 ml διαλύματος οι παραπάνω δοσολογίες είναι οι εξής:

0,5 gr yeast

1gr peptone

1gr dextrose

1gr agar

Σε φιαλίδιο με πώμα ζυγίζεται και εισάγεται η ποσότητα του yeast,peptone και agar που αναγράφεται παραπάνω, και ακολουθεί πλήρωση του φιαλιδίου μέχρι τα 50 ml με απιονισμένο νερό. Το μίγμα τοποθετείται για ανάδευση προκειμένου να διαλυθούν τα στερεά συστατικά, και στη συνέχεια κλείνεται καλά με πώμα. Σε δεύτερο φιαλίδιο

ζυγίζεται και εισάγεται η παραπάνω ποσότητα dextrose(ή glucose) και κλείνεται κι αυτό καλά με πώμα. Τα 2 φιαλίδια τοποθετούνται για αποστείρωση στους 109°Cγια 40 min.

Αφού ολοκληρωθεί η αποστείρωση, τα φιαλίδια αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου φτάσουν σε θερμοκρασία περίπου 50 ^{o}C. Δεν επιθυμείται θερμοκρασία κατώτερη αυτής, αφού υπάρχει η πιθανότητα στερεοποίησης του agar, πράγμα που πρέπει να αποφευχθεί. Στη συνέχεια και σε αποστειρωμένο περιβάλλον, εκχύνεται η ποσότητα του υγρού μίγματος των τριών συστατικών στο φιαλίδιο με τη στερεή δεξτρόζη, και το νέο μίγμα αναδεύεται καλά μέχρι να διαλυθεί εντελώς η γλυκόζη. Στο νέο μίγμα εισάγονται 50ml αντιβιοτικού zeocin, η οποία βρισκόταν σε κατάψυξη, αφού αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να υγροποιηθεί.

Το νέο μίγμα μοιράζεται σε 2 τρυβλία, από 25 ml στο καθένα, τα οποία αφήνονται για περίπου 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να στερεοποιηθεί το υπόστρωμα.

Ακολουθεί ο εμβολιασμός με κύτταρα FoCut5a από παλαιότερο τρυβλίο προκειμένου να αναπτυχθούν εκ νέου στο καινούριο υπόστρωμα. Ο εμβολιασμός γίνεται σε αποστειρωμένες συνθήκες

1.2 Συνταγή για προκαλλιέργειες(τελικού όγκου 150 μlt)

1.2.1 Υλικά

Yeast 1% w/v => 1.5gr/150 ml

Peptone 2% => 3gr/150 ml

H_2O => 105ml

Buffer: Potassium Phosphate 15ml/150 ml διαλύματος

Biotin =>0,3ml για 150 ml δ/τος

Glycerol => 15ml για 150 ml δ/τος

YNB => Για 15ml H2O

1,5gr ammonium sulphate

0,5gr yeast nitrogen

1.2.2 Μέθοδος

Για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού της προκαλλιέργειας ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας 1.5 gr yeast extract και 3gr peptone, εισάγονται σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο πληρώνεται με 105ml απιονισμένο H_2O. Το μίγμα τοποθετείται για ανάδευση μέχρις ότου τα στερεά συστατικά να διαλυθούν πλήρως, και στη συνέχεια εισάγεται σε φιαλίδιο το οποίο κλείνεται με πώμα. Σε διαφορετικό ποτήρι ζέσεως εισάγονται, αφού ζυγισθούν οι προαναφερθείσες ποσότητες για την παρασκευή του YNB, εισάγονται και αυτές σε φιαλίδιο, και διαλύονται με ανάδευση σε 15ml H_2O.
Σε τρίτο φιαλίδιο εισάγονται 15ml αραιωμένης γλυκερόλης (5ml πυκνό glucerol σε 45ml απιονισμένο νερό, αραίωση 1:10), ενώ σε τέταρτο φιαλίδιο εισάγονται 15ml potassium phosphate buffer pH =6.

Τα 4 φιαλίδια τοποθετούνται στον αποστειρωτήρα μαζί με τις 3 κενές φιάλες των 250 ml που θα χρησιμοποιηθούν για την προκαλλιέργεια, και αφήνονται για αποστείρωση στους 121 ^{o}C για 15min.

Αφού ολοκληρωθεί η αποστείρωση και τα μίγματα αφεθούν να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου, σε αποστειρωμένες συνθήκες και με παρουσία φλόγας γίνεται ανάμιξη των τεσσάρων σε ένα φιαλίδιο. Σε αυτό εισάγονται τέλος 0,3ml προπαρασκευασμένης βιοτίνης. Το ενιαίο μίγμα μοιράζεται στις 3 κωνικές φιάλες των 250 ml, από 50 ml περίπου σε καθεμία.

Ακολουθεί ο εμβολιασμός των φιαλών με τα κύτταρα της FoCut5a, που είχαν αναπτυχθεί σε υπόστρωμα YPD Zeocin,και στη συνέχεια οι 3 φιάλες τοποθετούνται σε επωαστήρα ρυθμισμένο στους 30 ^{o}C και σε 200 rpm ανάδευση, για περίπου 24h, προκειμένου να γίνει όσο το δυνατόν καλύτερη κυτταρική ανάπτυξη.

1.3 Συνταγή για καλλιέργεια (1000 μlt)

1.3.1 Υλικά

Yeast 1% =>10 ml για 1000 ml δ/τος
Peptone 2% =>20 ml για 1000 ml δ/τος

Potassium Phosphate Buffer pH =6 =>100 ml για 1000 ml δ/τος

YNB: Ammonium Sulphate 10% =>10gr για 100 ml δ/τος

Yeast Nitrogen 3,4%=> 3,4 gr για 100 ml δ/τος

Biotin =>1600 μlt για 1000 ml δ/τος

H_2O=>700 ml για 1000 ml δ/τος

1.3.2 Μέθοδος

Για την Παρασκευή του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας οι παραπάνω ποσότητες yeast και peptone, και εισάγονται σε φιαλίδιο με πώμα, το οποίο πληρώνεται με 700 ml απιονισμένο νερό, αφού έχει προηγηθεί καλή ανάδευση προκειμένου να διαλυθούν καλά τα στερεά συστατικά στο υγρό.

Σε δεύτερο φιαλίδιο εισάγονται αφού ζυγισθούν, οι προαναφερθείσες ποσότητες των συστατικών του YNB, δηλαδή του ammonium sulphate και του yeast nitrogen, το οποίο πληρώνεται με 100 ml απιονισμένο H_2O. Σε τρίτο φιαλίδιο εισάγεται και το potassium phosphate buffer. Τα 3 φιαλίδια τοποθετούνται για αποστείρωση στους 121 ^oC για 20min. Μετά την αποστείρωση και αφού αφεθούν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min, τοποθετούνται στον απαγωγό, όπου και θα γίνει η ανάμιξή τους. Μετά την ανάμειξη σε ένα φιαλίδιο, σε αποστειρωμένες συνθήκες, και των τριών μιγμάτων, στο ενιαίο μίγμα που προκύπτει εμβολιάζονται 1600μl βιοτίνης, και στη συνέχεια το μίγμα χωρίζεται σε 4 κωνικές φιάλες χωρητικότητας 1000 ml η καθεμία, από 250 ml σε κάθε φιάλη.

1.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Μετά το πέρας των 24h περίπου, εξάγονται οι 3 κωνικές φιάλες της προκαλλιέργειας από τον επωαστήρα και λαμβάνεται δείγμα 1000 μlt από καθεμία, προκειμένου να μετρηθεί η απορρόφηση στα 600nm. Πρώτα όμως, και λόγω των αναμενόμενων πολύ μεγάλων απορροφήσεων από το πυκνό διάλυμα της προκαλλιέργειας, τα δείγματα αραιώνονται 1:20 φορές με απιονισμένο νερό. Τα αραιωμένα δείγματα που προκύπτουν εισάγονται στο φωτόμετρο, με χρήση του υπερκείμενου από φυγοκεντριμένο επιπλέον δείγμα ως τυφλό, και διαπιστώνονται τελικά μεγάλες απορροφήσεις, γεγονός που μαρτυρά καλή κυτταρική ανάπτυξη στην προκαλλιέργεια. Προκειμένου να επαναιωρηθούν τα κύτταρα της προκαλλιέργειας

και να χρησιμοποιηθούν στην κυρίως καλλιέργεια, οι απορροφήσεις που ελήφθησαν, πολλαπλασιάζονται επί 20, λόγω αραίωσης, και μέσω του νόμου της αραίωσης $C_1*V_1=C_{τελ}*V_{τελ}$, για τελικό όγκο 250 ml και τελική απορρόφηση ίση με 1, υπολογίζεται ο απαιτούμενος όγκος υγρού που πρέπει να ληφθεί από την προκαλλιέργεια και να χρησιμοποιηθεί σε κάθε φιάλη της καλλιέργειας.

Στη συνέχεια και πάντα σε αποστειρωμένο περιβάλλον, οι υπολογισμένες ποσότητες από κάθε φιάλη προκαλλιέργειας εισάγονται σε πλαστικά αποστειρωμένα falcons, τα οποία τοποθετούνται για φυγοκέντριση, έτσι ώστε να καταπέσουν τα κύτταρα και να αφαιρεθεί το υπερκείμενο του καθενός. Εφόσον γίνει αυτό, μικρή ποσότητα θρεπτικού από κάθε φιάλη καλλιέργειας εκχύνεται στα falcons με τα κύτταρα της προκαλλιέργειας, και στη συνέχεια αυτά τοποθετούνται σε αναμικτήρες vortex, ώστε να επαναιωρηθούν τα κύτταρα στο θρεπτικό της καλλιέργειας. Αφού γίνει αυτό, το περιεχόμενο των falcons εκχύνεται εκ νέου στις φιάλες της καλλιέργειας απ όπου ελήφθη προηγουμένως. Οι φιάλες εν συνεχεία τοποθετούνται στους επωαστήρες, όπου και θα παραμείνουν υπό συνεχή αμάδευση στα 200rpm για 7 μέρες.

1.5 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Μετά το πέρας των πρώτων 24 ωρών περίπου, εξάγονται οι φιάλες της καλλιέργειας από τον επωαστήρα και τοποθετούνται στον απαγωγό. Εκεί, έχοντας εξασφαλίσει, με χρήση φλόγας, αποστειρωμένες συνθήκες, λαμβάνεται δείγμα 1000 μlt από κάθε κωνική, και στη συνέχεια τροφοδοτείται η καθεμία με 1250 μlt μεθανόλης, συστατικό που αποτελεί την «τροφή» των κυττάρων, που απαιτείται προκειμένου να αναπτυχθούν. Έπειτα επανατοποθετούνται οι φιάλες στον απαγωγό, και τα δείγματα που ελήφθησαν αραιώνονται 1:20 φορές με απιονισμένο H_2O. Ακολουθεί φωτομέτρηση των αραιωμένων στα 600nm, για να διαπιστωθεί εάν υπήρξε ανάπτυξη των κυττάρων σε σχέση με την πρώτη μέρα που εμβολιάσθηκαν στο θρεπτικό υλικό.
Η ίδια διαδικασία ακριβώς ακολουθείται και τις επόμενες μέρες, προκειμένου να μελετηθεί με βάση τις απορροφήσεις, η κυτταρική ανάπτυξη.

Στο τέλος της 7^{ης} μέρας, λαμβάνονται τα τελευταία δείγματα για φωτομέτρηση, και το περιεχόμενο των τεσσάρων φιαλών εισάγεται σε tubes φυγοκέντρισης, τα οποία τοποθετούνται για φυγοκέντριση αντιδιαμετρικά ανάλογα με τα βάρη τους, για 15

min, ώστε να καταπέσουν τα κύτταρα και να μείνει το υπερκείμενο. Μετά απο 15 min, τα υπερκείμενα των tubes που φυγοκεντρήθηκαν εκχύνονται σε ποτήρι ζέσεως. Το διάλυμα που προκύπτει περιέχει πολλές προσμίξεις, απόβλητα και ανεπιθύμητα συστατικά, τα οποία πρέπει να αφαιρεθούν, ώστε να απομονωθεί η πρωτείνη σε όσο το δυνατόν πιο καθαρή μορφή. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται για το διάλυμα, διήθηση υπό κενό με 3 διαφορετικά φίλτρα, με μεγαλύτερους και μικρότερους πόρους, για την απομάκρυνση των πιο ογκωδών και των μικρότερων σωματιδίων αντίστοιχα. Κατά τη διάρκεια της διήθησης υπό κενό παρατηρείται συχνά η δημιουργία έντονου αφρισμού στο διήθημα, γεγονός που μαρτυρά την ύπαρξη πρωτείνης.

Μετά το πέρας των τριών διαδοχικών διηθήσεων υπό κενό και αφού έχει εξασφαλισθεί η απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων ανεπιθύμητων ξένων προς την πρωτείνη μικροοργανισμών, το διήθημα πρόκειται να εισαχθεί για συμπύκνωση μέσω της διαδικασίας της Amicon. Πρίν απο αυτό όμως πρέπει να διαπιστωθεί κατά πόσο έντονη είναι η παρουσία πρωτεινών στο διάλυμα, η συγκέντρωση δηλαδή του ενζύμου στο διάλυμα, αποτέλεσμα που επιτυγχάνεται μέσω της διαδικασίας Bradford. Πιο συγκεκριμένα, σε ογκομετρικό κύλινδρο εισάγονται 125 μlt αντιδραστηρίου Bradford και 25 μlt δείγματος, ενώ σε άλλο κύλινδρο εισάγεται ίδια ποσότητα αντιδραστηρίου και 25 μlt απιονισμένου H_2O. Γίνεται γρήγορη ανάδευση και των δύο και παρατηρείται η εμφάνιση γαλάζιου χρώματος στον κύλινδρο που περιέχει το ένζυμο, και γκρί χρώματος στον κύλινδρο του τυφλού, γεγονός που καταδεικνύει ποιοτικά ότι υπάρχει αρκετά μεγάλη συγκέντρωση ενζύμου. Για να προσδιοριστεί, ωστόσο, και ποσοτικά, ακολουθεί φωτομέτρηση του δείγματος με το αντιδραστήριο στα 595nm με αποτέλεσμα απορρόφηση ABS=0,182, γεγονός που δείχνει υπαρκτή αλλά όχι σε πολύ μεγάλη ποσότητα συγκέντρωση ενζύμου.

Εν συνεχεία, όλο το διήθημα εισάγεται στη συσκευή της Amicon προκειμένου να γίνει συμπύκνωσή του, ώστε να αυξηθούν τα units/ml ενζύμου στο διάλυμα και να απομακρυνθούν τα περιττά συστατικά από το υπόστρωμα της *P.pastoris*.
Αρχικά η συσκευή γεμίζεται με καυστικό νάντιο (NaOH) και αφήνεται να λειτουργήσει μέχρι να περάσει απο την ειδική μεμβράνη που βρίσκεται στον πυθμένα της συσκευής σχεδόν ολόκληρη η ποσότητα καυστικού νατρίου που εισήχθη(η

μεγάλη amicon έχει χωρητικότητα 150ml), ώστε να καθαριστεί όσο το δυνατόν καλύτερα η μεμβράνη και να απομακρυνθούν πιθανά απόβλητα και προσμίξεις απο τις σπείρες της. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με απιονισμένο H_2O, αυτή τη φόρα για να απομακρυνθεί το καυστικό νάτριο και να καθαριστεί επιπλέον η συσκευή, και στη συνέχεια εισάγεται η πρώτη δόση του δείγματος, μέχρι τα 50 ml που είναι η χωρητικότητα της συσκευής, και αφήνεται να λειτουργήσει μέχρις ότου επιτευχθεί συμπύκνωση περί τα 50 ml. Έπειτα εισάγεται και το υπόλοιπο(συνολική ποσότητα δείγματος=114ml). Ενδιάμεσα επαναλαμβάνεται η διαδικασία του Bradford, με τη διαφορά ότι το δείγμα που μελετάται προέρχεται τόσο από το κυρίως σώμα που βρίσκεται στη συσκευή, όσο και από αυτό που απομακρύνεται από τον πλαινό σωλήνα, που αποτελεί ουσιαστικά τα απόβλητα. Ο στόχος είναι η απορρόφηση του δείγματος των αποβλήτων να είναι 0, δηλαδή να μην απομακρύνεται καθόλου ένζυμο και συνεπώς, πρωτείνη κατα τη συμπύκνωση, κάτι που επιβεβαιώθηκε στην πράξη αφού μετρήθηκε απορρόφηση αποβλήτων με αντιδραστήριο Bradford ίση με -0.05<0.

1.6 Υπερδιήθηση

Για την απομάκρυνση των αλάτων και την παραλαβή όσο το δυνατόν καθαρότερου διαλύματος, εφαρμόζεται η μέθοδος υπερδιήθησης με μεμβράνες 10000 Da cut-off. Η διαδικασία της μεθόδου είναι η εξής:

Κατασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα Talon Buffer (500mM tris-HCL, 3mM NaCl), στο οποίο στη συνέχεια εφαρμόζεται αραίωση 1:10, για τελικό όγκο διαλύματος 4000 ml, δηλαδή αναμιγνύονται 400 ml talon buffer με 3600 ml απιονισμένου νερού.

Το μίγμα εκχύνεται σε 2 μεγάλα ποτήρια ζέσεως χωρητικότητας 5000 ml το καθένα.

Οι μεμβράνες υπερδιήθησης 10000 Da cut-off στις οποίες θα εισαχθεί το συμπυκνωμένο από τη διαδικασία της Amicon δείγμα, τοποθετούνται σε βραστό νερό για περίπου 30min, προκειμένου να ελαστικοποιηθούν και να γίνει εφικτή η εισαγωγή του διαλύματος στο εσωτερικό τους.

Από τη διαδικασία της Amicon παρελήφθησαν 80 ml συμπυκνωμένου δείγματος, από τα οποία τα 10 ml τοποθετούνται για κατάψυξη, και τα υπόλοιπα 70 μlt εισάγονται στις ημιδιαπερατές ζελατινώδεις μεμβράνες, οι οποίες καταβυθίζονται η καθεμία στα 2 μίγματα buffer-νερού που παρασκευάσθηκαν, και εν συνεχεία

τοποθετούνται στο cold room για περίπου 1 ημέρα, με ανανέωση του μίγματος buffer-απιονισμένου H_2O περίπου 12h μετά την τοποθέτηση της διάταξης.
Την επόμενη μέρα και αφού γίνει αλλαγή του buffer για 3η φορά και η διάταξη παραμείνει στο cold room για περίπου 2 ώρες, το περιεχόμενο αφαλατωμένο διάλυμα των μεμβρανών, το οποίο από 80 ml που ήταν αρχικά, έχει αυξηθεί στα 114ml, εκχύνεται σε ογκομετρικό κύλινδρο. Η αύξηση αυτή του τελικού όγκου του διαλύματος οφείλεται στη διαπερατότητα των μεμβρανών, συνεπώς εισήλθε ορισμένη ποσότητα νερού από το περιβάλλον μίγμα στο διάλυμα εντός της κάθε μεμβράνης.

Το διάλυμα που προκύπτει συμπυκνώνεται στη μικρή Amicon για εξοικονόμηση χώρου, οπότε παραλαμβάνονται τελικά 91ml διαλύματος, το οποίο θα τοποθετηθεί για καθαρισμό στην στήλη χρωματογραφίας με βαθμίδωση άλατος NaCl. Όσον αφορά τα 10 ml δείγματος που τοποθετήθηκαν για κατάψυξη, μετράται η ενεργότητα, και διαπιστώνεται μείωσή της σε σχέση με την προηγούμενη μέρα.

1.7 Λειτουργία στήλης χρωματογραφίας με βαθμίδωση άλατος NaCl

Η στήλη ρυθμίζεται σε κατάλληλη θερμοκρασία και χρόνο λειτουργίας και αφήνεται να λειτουργήσει για 120min. Παράλληλα, είναι συνδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στην στήλη μετράται η απορρόφηση στα 280 nm συναρτήσει του χρόνου.
Στο αρχικό κομμάτι της καμπύλης απορρόφησης - χρόνου σχηματίζεται πλατό, ένδειξη ότι υπάρχει ολική πρωτείνη στο διάλυμα, μαζί με άλλα συστατικά που πρέπει μέσω της στήλης να απομακρυνθούν. Σε αυτό το πρώτο κομμάτι της καμπύλης, η στήλη είναι συνδεμένη με το talon buffer και με το διάλυμα που περιέχει την πρωτείνη, ενώ τη χρονική στιγμή που ξεκινά άνοδος της καμπύλης συμπεραίνεται ότι αποθηκεύτηκε όλη η ποσότητα του διαλύματος από τη στήλη. Τότε μετακινείται το σωληνάκι από το ποτήρι ζέσεως που περιείχε το διάλυμα, σε 3ο ποτήρι ζέσεως με ρυθμιστικό διάλυμα ημιδαζόλειο, και συνεχίζεται η λειτουργία της στήλης.
Το ημιδαζόλειο λειτουργεί ανταγωνιστικά ως προς την πρωτείνη, η οποία είναι προσδεμένη στα ιόντα NaCl της στήλης, προσπαθώντας καθ όλη τη διάρκεια λειτουργίας της να αποσπάσει την πρωτείνη από αυτά και να προσδεθεί εκείνο στα ιόντα της στήλης.

Την χρονική στιγμή που παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση και καταδεικνύεται η ύπαρξη πρωτεΐνης, καταγράφονται τα αντίστοιχα φιαλίδια διαλύματος στα οποία αυτή πιθανώς εμπεριέχεται.

Τα φιαλίδια αυτά αφού έχουν τοποθετηθεί για κατάψυξη στο Cold room για περίπου 24h, συμπυκνώνονται και με τη μέθοδο Bradford, η οποία περιγράφεται παρακάτω μετράται και διαπιστώνεται η ποσότητα της πρωτεΐνης. που περιέχουν.

1.8 Μέθοδος BRADFORD

Η μέθοδος Bradford είναι μία ταχύτατη φασματοσκοπική μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Στηρίζεται στην αλλαγή του χρώματος της χρωστικής Coomasie Blue G όταν υπάρχουν στο διάλυμα μόρια πρωτεΐνης (Bradford,1976). Η χρωστική αυτή είναι όξινη, με αποτέλεσμα να προσδένεται σε αμινοξέα με βασικές ή αρωματικές πλευρικές ομάδες.

Για τη χρήση της μεθόδου, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης για τα οποία μετράμε την οπτική πυκνότητα στα 595 nm. Συνεπώς, με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του άγνωστου δείγματος μπορούμε από την πρότυπη καμπύλη να συμπεράνουμε την συγκέντρωσή του σε πρωτεΐνη.

Συγκεκριμένα για κάθε δείγμα που εξετάστηκε χρησιμοποιήθηκε 1,5ml διαλύματος Bradford (με σύσταση: 0.5 mg/ml Coomassie Blue G, 25% μεθανόλη, and 42.5% H_3PO_4 που διατηρείται σε σκουρόχρωμη φιάλη στους 4^oC) και 30 ml δείγματος. Το μείγμα αναμύχθηκε έντονα στη συσκευή Vortex και φωτομετρήθηκε στα 595 nm σε κυψελίδες χαλαζία που δεν παθαίνουν βλάβες παρουσία υπεριώδους φωτός.

1.9 SDS-PAGE

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η ενεργότητα που μετρήθηκε στα παραπάνω φιαλίδια οφείλεται στην ύπαρξη της FoCut5a, ή σε άλλες πρωτείνες που πιθανόν εμπεριέχονταν στο διάλυμα, θα χρησιμοποιηθεί η μέθοδος SDS page, μια μέθοδος διαχωρισμού πρωτεινών ενός διαλύματος ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε **πήκτωμα** και όχι σε διάλυμα, επειδή το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων κι επιπλέον καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για σωστό διαχωρισμό μορίων.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται κυρίως με βάση διαφορές στο φορτίο (ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης), στη μάζα ή σε διάφορες άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων. Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση σε **αποδιατακτικές συνθήκες** (**SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE**) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (**SDS**), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά.

Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης. Η απόσταση μετακίνησης των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων κάτω από αυτές τις συνθήκες σε ομοιογενή πηκτώματα (**Rf**) είναι αντιστρόφως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους. Αυτή η εμπειρική σχέση δεν ακολουθείται σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. σε πρωτεΐνες πλούσιες σε υδατάνθρακες. Το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται πλέον αμελητέο καθώς το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο σε μία ευρεία κλίμακα pH**.** Έτσι, τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση **από την κάθοδο προς την άνοδο**. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδρομής (που κρίνεται από το μέτωπο του διαλύτη) οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα εμφανίζονται με χρώση **κυανού του Coomassie**, χρώση αργύρου, ή χρώση ειδική για τα σιαλικά οξέα των γλυκοφορινών. Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευτούν με ραδιενεργή σήμανση και εμφάνισή τους σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

Η διάταξη του SDS-page για να επιτελέσει τη λειτουργία της, πρέπει να γεμισθεί με 2 διαφορετικά gel, τα οποία και παρασκευάσθηκαν με ανάδευση των συστατικών των ακόλουθων συνταγών:

1.9.1 Resolving gel

H_2O=> 4,6ml
Tris 0,75 M/SDS 0,2%=>9,4ml
(pH =8,8)
40% bis-acrylamide=>4,7ml
Temed=>30μl
APS 10%=>90μl

1.9.2 Stacking gel

H_2O=> 1,5ml
Tris 0,25M/SDS 0,2% =>1,9ml
(pH =6,8)
40% bis-acrylamide =>0,38ml
TEMED =>10μl
APS 10% => 30μl

Τα δείγματα που θα εισαχθούν στα ειδικά κελιά της διάταξης είναι τα εξής:
$1^{ο}$ δείγμα=>flow through που εξήχθη από την στήλη χρωματογραφίας (15ml διάλυμα και 7 ml loading buffer)
$2^{ο}$ δείγμα=>διάλυμα όπου σχηματίσθηκε η $1^{η}$ κορυφή στο διάγραμμα που προέκυψε από τη λειτουργία της στήλης(15 ml διάλυμα και 7ml loading buffer)
$3^{ο}$ δείγμα=>διάλυμα όπου σχηματίσθηκε η $2^{η}$ κορυφή στο διάγραμμα που προέκυψε από τη λειτουργία της στήλης(15 ml διάλυμα και 7ml loading buffer)

Τα 3 δείγματα που παρασκευάσθηκαν τοποθετούνται για βρασμό για 5-7min, και στη συνέχεια φορτώνονται στα ειδικά κελιά που έχουν σχηματισθεί με ειδικό χτενάκι στην επιφάνεια των gel της διάταξης, μαζί με πρότυπο διάλυμα πρωτείνης γνωστού μοριακού βάρους, και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση με 35MA/πήκτωμα για περίπου 1h.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή απομακρύνθηκε από τη συσκευή και εμβαπτίσθηκε στο διάλυμα χρωματισμού(40%v/v μεθανόλη,10%v/v οξικό οξυ,0,4%v/v Coomasie-250), όπου και παρέμεινε για 20min υπό ήπια ανάδευση. Ακολούθησε αποχρωματισμός και εμφάνιση πρωτεινικών ζωνών με συνεχείς πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού(40%v/v μεθανόλη,10%v/v οξικό οξυ). Το διάγραμμα που προέκυψε κατέδειξε την ανεπαρκή ποσότητα καθαρής πρωτείνης FoCut5a, τη οποία εν τέλει εμπεριείχε η πηκτή, και κατά συνέπεια την αδυναμία περεταίρω μελέτης της.

1.10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την παραλαβή του περιεχομένου των φιαλιδίων του διαλύματος, όπου κατέδειχτηκε η ύπαρξη πρωτείνης, επειδή πιθανώς υπήρχαν ακόμη αρκετές προσμίξεις στο διάλυμα με αρκετά είδη πρωτεινών πέραν της επιθυμητής που μελετάται, ακολουθήθηκε η διαδικασία ηλεκτροφόρησης sds-page, προκειμένου ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, να γίνουν φανερά τα είδη των πρωτεινών που υπήρχαν εν τέλει στο διάλυμα.

Όπως διαπιστώθηκε εκ του αποτελέσματος, η FoCut5a εμπεριεχόταν σε πολύ μικρό ποσοστό στο διάλυμα σε σχέση με άλλες πρωτείνες, γεγονός που απέτρεψε την περεταίρω χρήση και μελέτη της συμπεριφοράς της. Ο πιθανότερος λόγος που εν τέλει δεν επετεύχθη η παραλαβή της επιθυμητής ποσότητας ήταν η πολύ ισχυρή πρόσδεση των μορίων της FoCut5a στο υλικό της στήλης χρωματογραφίας, καθιστώντας αδύνατη την απομόνωση των, με αποτέλεσμα το ανταγωνιστικό προς αυτά ημιδαζόλειο να μην μπορεί εν τέλει να τα αποσπάσει από αυτήν, αποσπώντας ταυτόχρονα άλλες διαφορετικού μοριακού βάρους πρωτείνες, πιο χαλαρά προσδεμένες στη στήλη.

2. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΦΕΡΟΥΛΟΥΛΙΚΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ P.PASTORIS

Εξαιτίας της αδυναμίας απομόνωσης της FoCut5a λόγω της πολύ ισχυρής πρόσδεσης των μορίων της στην στήλη χρωματογραφίας με βαθμίδωση άλατος NaCl, κρίθηκε αναγκαία η στροφή προς τη μελέτη της ανάλογου τρόπου παραγωγής πρωτείνης της εστεράσης του φερουλικού οξέος (FoFaeC). Πιο συγκεκριμένα, θα μελετηθούν διαφορετικές συνθήκες pH**,** συγκέντρωσης μεθανόλης, καθώς και ταχύτητας ανάδευσης, σε καλλιέργειες φερουλουλικής εστεράσης σε υπόστρωμα *P.pastoris*, προκειμένου να διαπιστωθούν οι βέλτιστες συνθήκες υπό τις οποίες παράγεται η (FoFaeC) σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τις υπόλοιπες.

2.1 Μελέτη του pH

Με τη γνωστή διαδικασία και με τα ίδια συστατικά που αναφέρθηκαν αναλυτικά παραπάνω, προετοιμάστηκε η προκαλλιέργεια του υποστρώματος *P.pastoris*, τελικού όγκου 150ml, και αφήνεται για μια ημέρα προκειμένου να αναπτυχθούν τα κύτταρα. Παράλληλα προετοιμάζεται και η κυρίως καλλιέργεια, με ίδια συστατικά και διαδικασία με αυτή για την παραγωγή FoCut5a, τελικού όγκου 600ml,

Η βασική διαφορά της καλλιέργειας αυτής έναντι της προηγούμενης έγκειται στο γεγονός ότι το περιεχόμενό της δεν θα μοιρασθεί σε ογκομετρικές φιάλες των 1000 ml, αλλά σε 12 μικρές κωνικές φιάλες χωρητικότητας ml η καθεμία, με κάθε ζευγάρι κωνικών να αντιστοιχεί σε μια διαφορετική τιμή pH**.** Για κάθε τιμή pH που μελετήθηκε απαιτούνται 2 κωνικές φιάλες, για καλύτερη επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ pH

Για να μελετηθεί η κυτταρική ανάπτυξη για διαφορετικές τιμές pH, κατασκευάσθηκαν 6 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, ξεκινώντας από τιμή pH =4 έως pH =9, καλύπτοντας έτσι ένα ευρύ φάσμα τιμών από την όξινη στη βασική περιοχή. Για τα ρυθμιστικά διαλύματα από pH =4 έως pH =7 παρασκευάσθηκαν 4 διαφορετικά διαλύματα phosphate-citrate, με την εξής διαδικασία:

-Σε 2 μεγάλα ποτήρια ζέσεως ζυγίζονται και εισάγονται σε στερεή μορφή, στο ένα phosphate acid MB=178 και στο άλλο citric acid MB=210, και πληρώνονται με απιονισμένο νερό για τελική συγκέντρωση 50Mm και τελικό όγκο για καθένα το 1lt.

-Στη συνέχεια εκχύνεται μικρή ποσότητα phosphate buffer σε 4 κωνικές φιάλες χωρητικότητας 250ml η καθεμία, συμπληρώνοντας σε καθεμία κατάλληλη ποσότητα citrate buffer, έχοντας καταβυθισμένο σε κάθε διάλυμα το ειδικό πεχάμετρο, προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό pH σε κάθε φιάλη. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας έχουν παρασκευασθεί 4 ρυθμιστικά διαλύματα, με τιμές pH =4, pH =5, pH =6 και pH =7.

-Για την Παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων pH =8 και pH =9 ζυγίζονται και εισάγονται σε 2 ποτήρια ζέσεως στερεό KH_2PO_4 και glycine στο άλλο, και πληρώνονται με απιονισμένο νερό για τελική συγκέντρωση 50Mm και τελικό όγκο 500 ml το καθένα. Σε καθένα από τα παρασκευασθέντα προστίθεται στη συνέχεια κατάλληλη ποσότητα NaOH, με καταβυθισμένο το πεχάμετρο και υπό συνεχή ανάδευση, μέχρις ότου επιτευχθούν οι επιθυμητές τιμές pH =8 και pH =9.

Τα 6 παρασκευασθέντα ρυθμιστικά διαλύματα, αφού κλειστούν αεροστεγώς, τοποθετούνται για αποστείρωση μαζί με τα υπόλοιπα φιαλίδια του θρεπτικού *P.pastoris*, στους 121°Cκαι για 15min. Στη συνέχεια και αφού όλα τα φιαλίδια και οι κωνικές με τα buffer αφεθούν να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου, γίνονται σε αποστειρωμένες συνθήκες οι αναμίξεις τους, όπως περιγράφονται στην αντίστοιχη διαδικασία για καλλιέργειες κουτινάσης, όλων των συστατικών εκτός από το buffer, εξαιτίας του γεγονότος ότι κάθε ζευγάρι κωνικών με θρεπτικό πρέπει να περιέχει και διαφορετικό ρυθμιστικό διάλυμα. Έτσι, αφού αναμίχθηκαν τα υπόλοιπα συστατικά

του θρεπτικού και αφού μοιράστηκαν ισόποσα σε κάθε κωνική φιάλη από 45ml, προστέθηκαν στο πρώτο ζευγάρι κωνικών απο 5ml phosphate citrate buffer pH =4, στις 2 επόμενες απο 5ml phosphate citrate buffer pH =5, επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία μέχρι την τιμή pH =7. Στο προτελευταίο ζευγάρι κωνικών προστίθενται 5ml ρυθμιστικού KH_2PO_4-NaOH, ενώ στο τελευταίο 5 μlt ρυθμιστικού glycine-NaOH. Με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων της προκαλλιέργειας στο θρεπτικό της κυρίως καλλιέργειας, και οι κωνικές εν συνεχεία τοποθετούνται στον επωαστήρα και υπο συνεχή ανάδευση στα 250rpm, όπου και παρέμειναν για μια εβδομάδα.

2.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Μετά την πάροδο των πρώτων 24h περίπου από την τοποθέτηση της καλλιέργειας στον επωαστήρα, λαμβάνεται δείγμα 1000 μlt από κάθε κωνική, κι έπειτα όλες οι κωνικές τροφοδοτούνται με 250 μlt μεθανόλης η καθεμία. Τα δείγματα που λαμβάνονται αραιώνονται 20 φορές το καθένα με απιονισμένο νερό(σε eppendorfs εισάγονται 50 μlt δείγματος και 950 μlt νερού, ενώ στο 13° eppendorf τοποθετούνται 50 μlt υπερκείμενου υγρού απο φυγοκεντριμένο επιπλέον δείγμα που ελήφθη απο τυχαία κωνική και χρησιμοποιείται ως τυφλό για μηδενισμό του φωτόμετρου). Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 600nm,προκειμένου να διαπιστωθεί για ποιά τιμή του pH παρατηρείται μεγαλύτερη απορρόφηση, και κατά συνέπεια κυτταρική ανάπτυξη. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν καθημερινά για 7 μέρες.

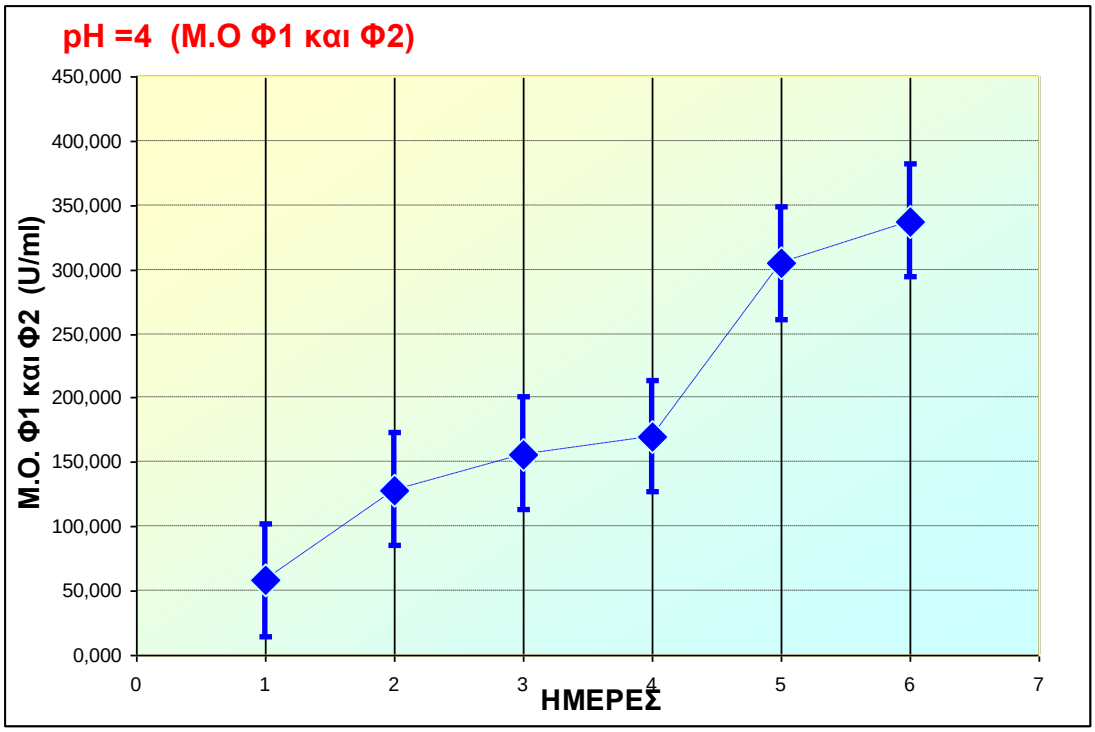
Όλα τα δείγματα, μετά από κάθε φωτομέτρηση, φυλλάσσονταν στην κατάψυξη προκειμένου να σταματήσει η κυτταρική ανάπτυξη, αλλά και να διατηρηθούν αναλλοίωτα για τη μέτρηση της ενεργότητας στο τέλος της εβδομάδας.
Έτσι, μετά το πέρας των 7 ημερών της καλλιέργειας και αφού ελήφθησαν και τα τελευταία δείγματα της 7^{ης} μέρας, τίθεται σε λειτουργία το λογισμικό του microplate, προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις που θα εξάγουν τα αποτελέσματα της μείωσης ή αύξησης της ενεργότητας για κάθε σειρά δειγμάτων από κάθε μέρα ξεχωριστά.

Οι αντιδράσεις στις κυψελίδες του microplate λαμβάνουν χώρα μεταξύ αραιωμένου σε 1ml dimethyl sulphoxide, συστατικού para-nitrophainyl boutyrate, αρχικής συγκέντρωσης 20Mm. Το διάλυμα που προκύπτει εκχύνεται σε κατάλληλη ποσότητα phosphate-citrate buffer pH =6, ώστε η συγκέντρωσή του στο προκύπτον διάλυμα να είναι 1,2 Mm, και προγραμματίζονται για θερμοκρασία 40°C. Σε κάθε κυψελίδα εισάγονται 200 μlt μίγματος pnp-b-ρυθμιστικού, και 50 μlt δείγματος. Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για τις αντιδράσεις αυτές προκύπτουν μετά από φυγοκέντριση όλων των δειγμάτων που ελήφθησαν από κάθε μέρα της εβδομάδας, από την οποία προκαλείται κατακάθιση των κυττάρων στον πυθμένα των χρησιμοποιούμενων eppendorf, και παραλαβή των υπερκειμένων που περιέχουν εν τέλει το επιθυμητό πρός απομόνωση ένζυμο. Τελικά προγραμματίζονται 6 διαφορετικές σειρές αντιδράσεων, 13 κυψελίδων η καθεμία(12 δείγματα +1 τυφλό), και εξάγονται μετά απο 10min που διαρκεί η κάθε αντίδραση, οι παρακάτω σειρές μετρήσεων OD, μια για κάθε μέρα της εβδομάδας, μετά από μετατροπή τους σε units/ml, καθώς και τα αντίστοιχα διαγράμματα(όπου Φ1 και Φ2 οι φιάλες 1 και 2 κάθε ζεύγους).

2.3.1 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πίνακας 2.1: Σειρές Αντιδράσεων (pH=4)

Ημέρες	Φ1	Φ2	Μ.Ο Φ1,Φ2	(Μ.Ο)*1,021*5 (U/ml)
1	11,325	11,495	11,410	*58,248*
2	24,406	25,852	25,129	*128,284*
3	28,135	33,037	30,586	*156,142*
4	21,987	44,621	33,304	*170,017*
5	28,367	59,744	59,744	*304,993*
6	35,831	66,084	66,084	*337,359*



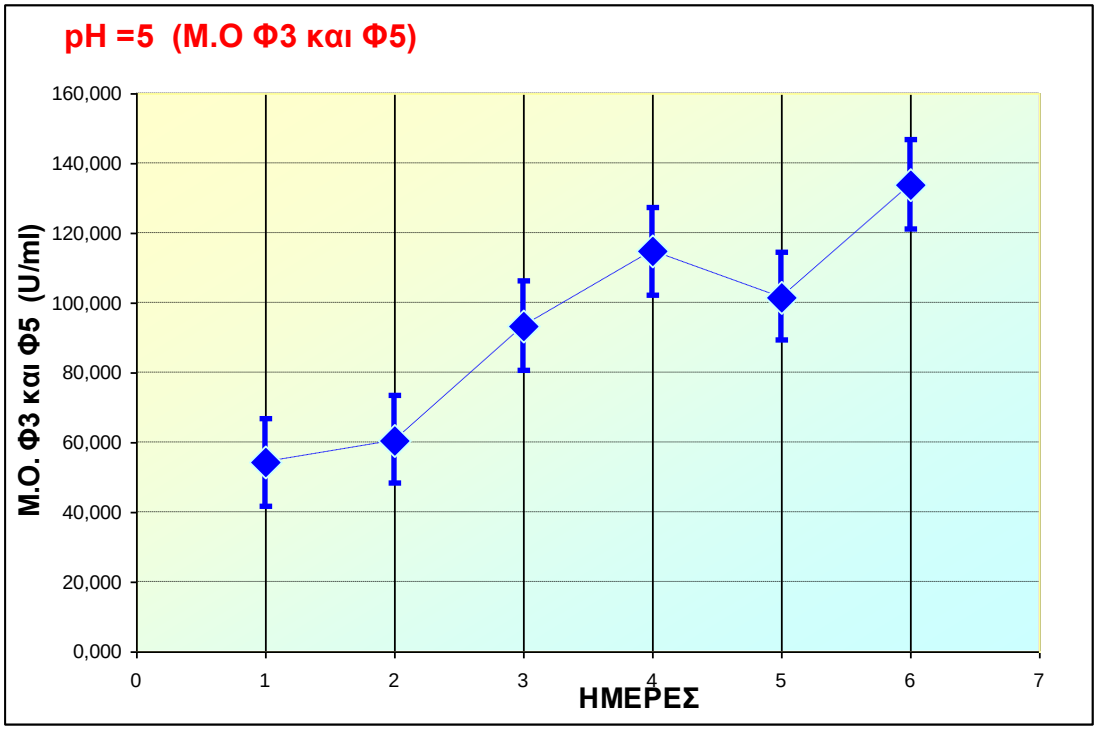
Σχήμα 2.1: Μεταβολή της ενεργότητας ανα μlt ***καλλιέργειας για*** pH=***4***

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει τη μεταβολή της ενεργότητας ανά ml καλλιέργειας για pH =4. Παρατηρείται σχεδόν γραμμική αύξηση της ενεργότητας με την πάροδο των ημερών, ξεκινώντας την μέρα 1 από την τιμή 58,248 U/ml, τη 2^{η} μέρα με μια πιο απότομη αύξηση μέχρι την τιμή 128,284, σχετικά μικρότερη αύξηση την 3^{η} μέρα μέχρι την τιμή 156,142, και καταλήγοντας εν τέλει την 6^{η} μέρα, οπότε

και έχει προσεγγισθεί η τιμή 337,3 U/ml διαλύματος. Η σχετικά ομαλή γραμμική αύξηση των ενεργοτήτων για την 1η συνθήκη μαρτυρά σχετική καταλληλότητα χρήσης του συγκεκριμένου pH για μελλοντικές καλλιέργειες.

Πίνακας 2.2: Σειρές Αντιδράσεων (pH=5)

Ημέρες	Φ3	Φ5	Μ.Ο Φ3,Φ5	(Μ.Ο)*1,021*5 (U/ml)
1	10,706	10,504	10,605	*54,139*
2	11,164	12,621	11,893	*60,711*
3		18,276	18,276	*93,299*
4		22,462	22,462	*114,669*
5		19,911	19,911	*101,646*
6		26,219	26,219	*133,848*



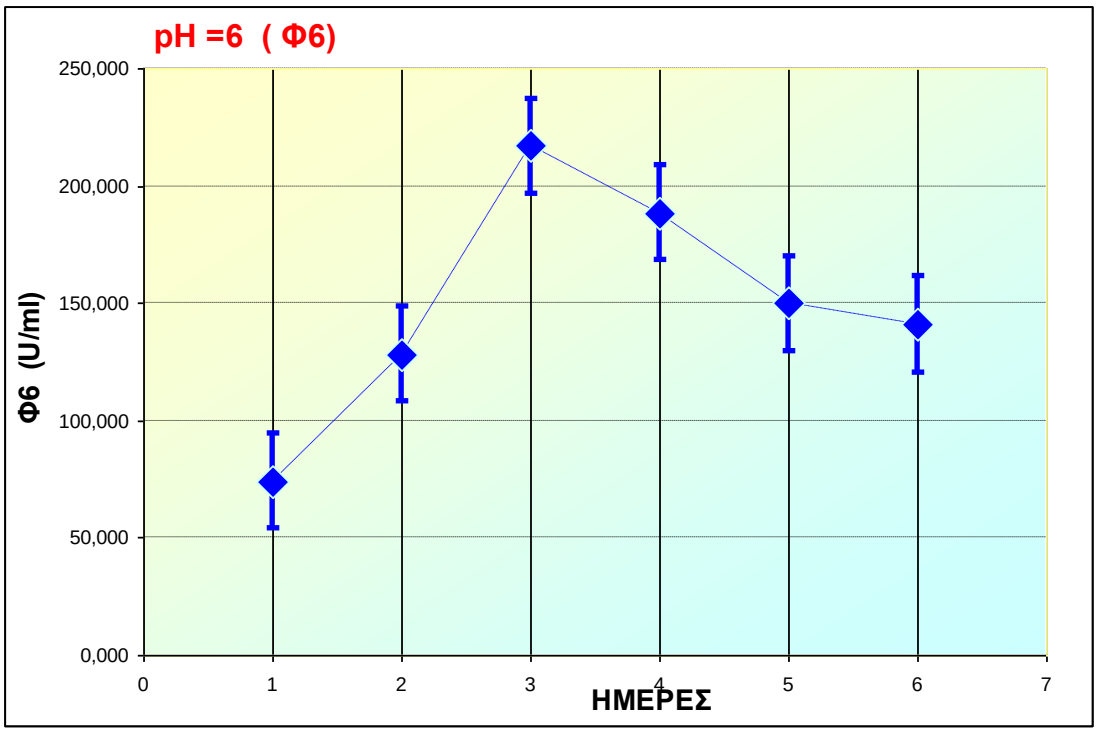
Σχήμα 2.2: Μεταβολή της ενεργότητας ανα μlt ***καλλιέργειας για*** pH=***5.***

Το 2ο διάγραμμα απεικονίζει τη μεταβολή της ενεργότητας ανα μlt καλλιέργειας για pH =5. Παρατηρείται αρχικά αύξηση της ενεργότητας από την 1η στη 2η μέρα επώασης της καλλιέργειας, από αρχική τιμή 61,796 U/ml σε τιμή 98,999 U/ml. Ωστόσο, την 3η μέρα της καλλιέργειας παρατηρείται μικρή πτώση της ενεργότητας μέχρι την τιμή 93,299. Στη συνέχεια την 4η μέρα ακολουθεί και πάλι αύξηση φτάνοντας τα 114,699 U/ml, ενώ την 5η μέρα υπάρχει και πάλι μείωση της τιμής της

τάξεως των 14 U/ml. Η καταληκτική τιμή ενεργότητας για την 6η μέρα καλλιέργειας είναι η τιμή 133,848 U/ml διαλύματος. Η ανομοιομορφία των τιμών με την πάροδο των ημερών και οι συνεχείς αυξομειώσεις καθιστούν αδύνατη την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος για καταλληλότητα ή μη της συγκεκριμένης τιμής pH για βέλτιστη παραγωγή εστεράσης.

Πίνακας 2.3: Σειρές Αντιδράσεων (pH=6)

Ημέρες		Φ6	Μ.Ο Φ3,Φ5	(Μ.Ο)*1,021*5 (U/ml)
1		14,537	14,537	*74,211*
2		25,094	25,094	*128,105*
3		42,525	42,525	*217,090*
4		36,943	36,943	*188,594*
5		29,382	29,382	*149,995*
6		27,627	27,627	*141,036*



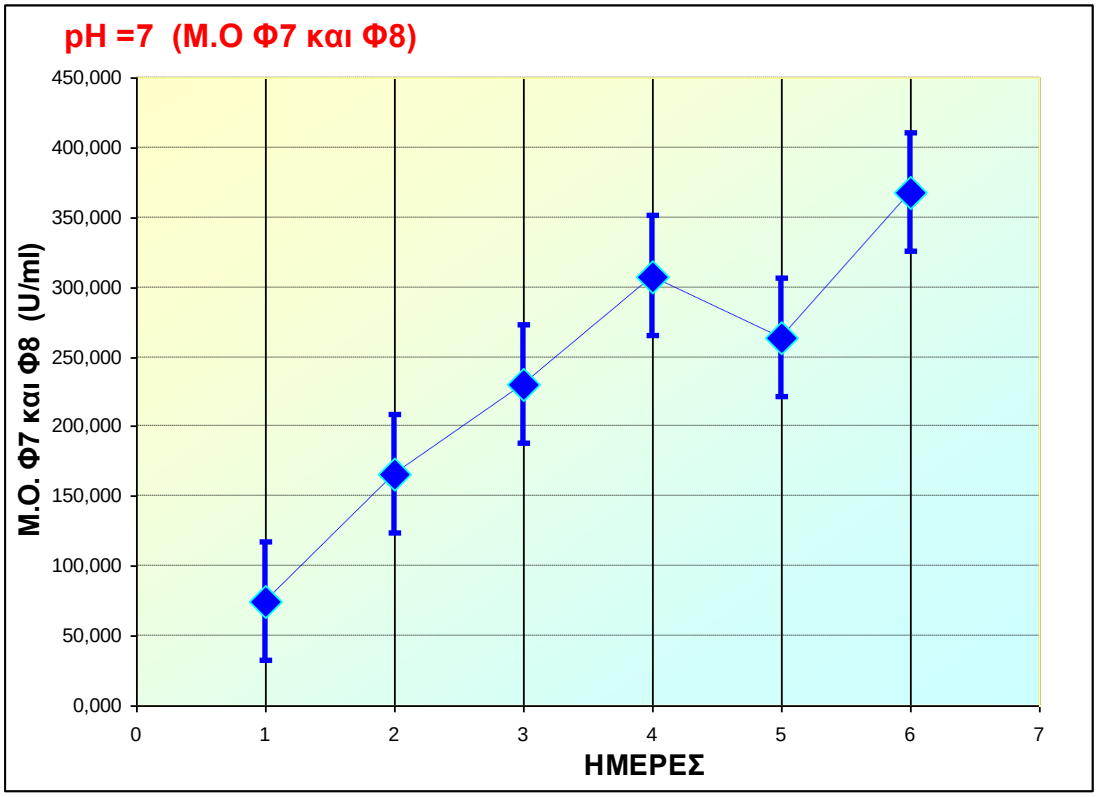
Σχήμα 2.3: Μεταβολή της ενεργότητας ανα μlt ***καλλιέργειας για*** pH=***6.***

Το 3ο διάγραμμα απεικονίζει τη μεταβολή της ενεργότητας ανά ml καλλιέργειας για pH =6. Παρατηρείται αρχικά αύξηση της ενεργότητας από την 1η στη 2η κι από τη 2η στην 3η μέρα καλλιέργειας, αγγίζοντας μια μέγιστη τιμή της τάξεως των 217,09 U/ml.

Στη συνέχεια ωστόσο παρατηρείται σταδιακή πτώση των τιμών με την πάροδο των ημερών, καταλήγοντας την 6η μέρα σε τιμή ενεργότητας 141,03 U/ml. Η συγκεκριμένη τιμή pH επομένως κρίνεται ακατάλληλη, εφόσον η πορεία ενεργότητας δεν είναι σταθερή, και μάλιστα από μια ημέρα και μετά ήταν πτωτική, γεγονός που μαρτυρά θάνατο ορισμένων κυττάρων από την 3η μέρα καλλιέργειας και μετά, είτε λόγω του pH είτε άλλων παραγόντων.

Πίνακας 2.4: Σειρές Αντιδράσεων (pH=7)

Days	Φ7	Φ8	M.O Φ7,Φ8	(M.O)*1,021*5
1	14,265	14,826	14,546	*74,255*
2	25,642	39,546	32,594	*166,392*
3	33,432	56,536	44,984	*229,643*
4	35,570	85,036	60,303	*307,847*
5	37,403	65,928	51,666	*263,752*
6	82,216	61,704	71,960	*367,356*



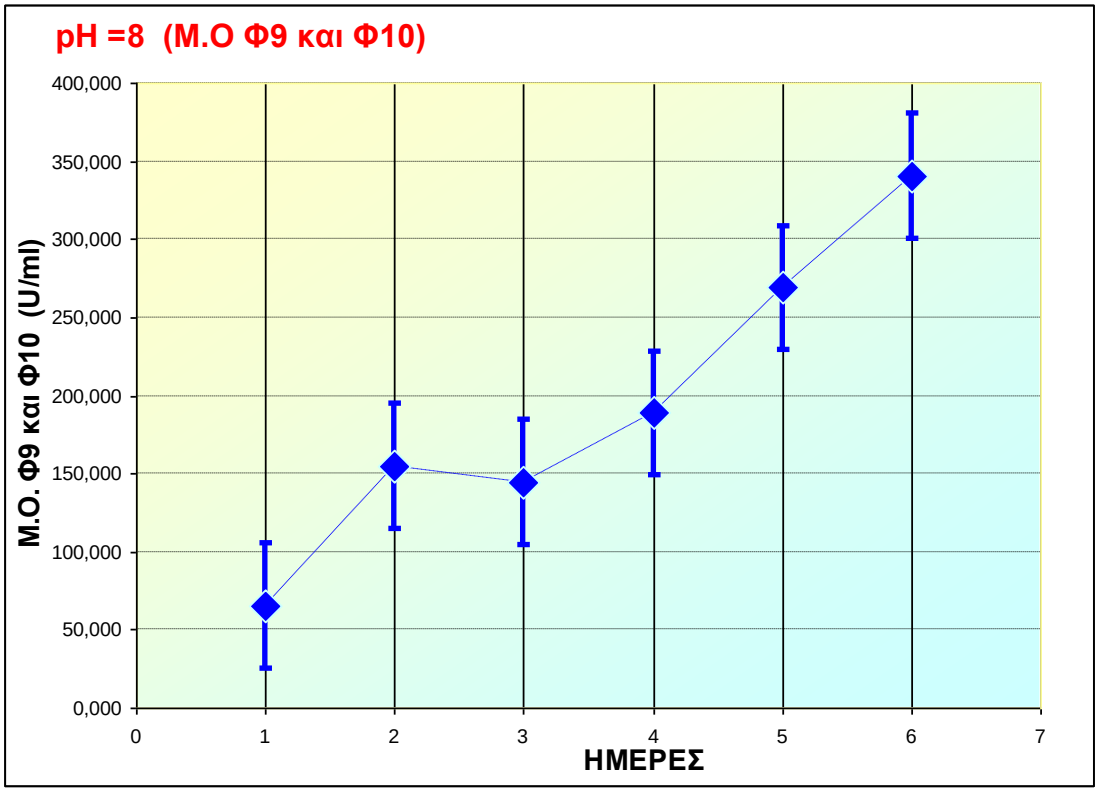
Σχήμα 2.4: Μεταβολή της ενεργότητας ανά ml καλλιέργειας για pH=*7*

Το 4ο διάγραμμα απεικονίζει τη μεταβολή της ενεργότητας ανά ml καλλιέργειας για pH =7. Παρατηρείται σταδιακή αύξηση της τιμής της ενεργότητας από την 1η μέρα

και με την πάροδο των ημερών, προσεγγίζοντας μάλιστα την 4η μέρα καλλιέργειας την τιμή 307,43 U/ml. Την επόμενη όμως μέρα παρατηρείται μικρή πτώση της τιμής (263,75 U/ml), ενώ την επόμενη και τελευταία μέρα η ενεργότητα αυξάνεται και πάλι μέχρι την τιμή 367,35 U/ml. Η πορεία των τιμών ενεργότητας για pH =7με βάση το διάγραμμα καταδεικνύει σχετική καταλληλότητα της εν λόγω τιμής για βέλτιστη παραγωγή εστεράσης, έχοντας κατορθώσει να προσεγγισθούν μεγάλες τιμές ενεργοτήτων και αυξητική πορεία αυτών, με μοναδικό «μελανό» σημείο την τιμή της 5ης μέρας.

Πίνακας 2.5: Σειρές Αντιδράσεων (pH=8)

Ημέρες	Φ9	Φ10	Μ.Ο Φ9,Φ10	(Μ.Ο)*1,021*5 (U/ml)
1	13,979	11,495	12,737	*65,022*
2	34,757	25,852	30,305	*154,704*
3	23,432	33,037	28,235	*144,137*
4	29,256	44,621	36,939	*188,571*
5	27,697	77,656	52,677	*268,914*
6	39,957	93,376	66,667	*340,332*

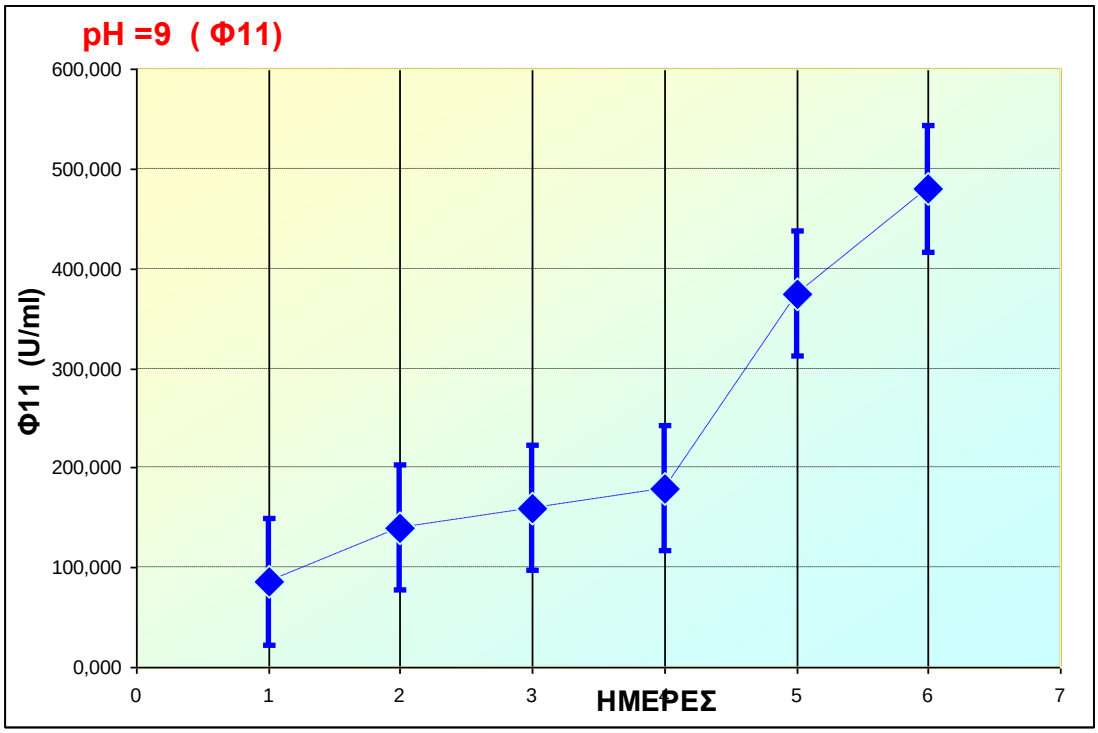


Σχήμα 2.5: Μεταβολή της ενεργότητας ανά ml καλλιέργειας για pH=*8.*

Το 5^{ο} διάγραμμα απεικονίζει τη μεταβολή της ενεργότητας ανά ml καλλιέργειας για pH =8. Παρατηρείται συνεχής αυξητική πορεία των τιμών ενεργότητας με την πάροδο των ημερών, γεγονός που αποδεικνύεται και από τη γραμμικότητα της καμπύλης που περνά από τα σφάλματα των τιμών. Η καταληκτική τιμή ενεργότητας την 6^{η} μέρα ήταν 340,33 U/ml. Η τιμή αυτή pH θεωρείται εξίσου κατάλληλη για βέλτιστη παραγωγή εστεράσης, εφόσον με χρήση του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος η παρουσία και η κυτταρική ανάπτυξη συνεχώς αυξάνονταν, όμως εξαιτίας του γεγονότος ότι η καταληκτική τιμή ενεργότητας για pH =8 ήταν 340 U/ml, ενώ η αντίστοιχη για pH =7 ήταν 367,35 U/ml, αν έπρεπε να γίνει επιλογή μιας από τις 2 τιμές, αυτή θα ήταν το ουδέτερο pH =7.

Πίνακας 2.6: Σειρές Αντιδράσεων (pH=9)

Ημέρες		Φ11	Μ.Ο Φ1,Φ2	(Μ.Ο)*1,021*5 (U/ml)
1		16,717	16,717	*85,340*
2		27,350	27,350	*139,622*
3		31,286	31,286	*159,715*
4		35,131	35,131	*179,344*
5		73,332	73,332	*374,360*
6		93,904	93,904	*479,380*



Σχήμα 2.6: Μεταβολή της ενεργότητας ανά ml ***καλλιέργειας για*** pH=***9.***

Το 6ο και τελευταίο διάγραμμα απεικονίζει τη μεταβολή της ενεργότητας ανά ml καλλιέργειας για pH =9. Παρατηρείται και εδώ αυξητική ταση των τιμών ενεργότητας με την πάροδο των ημερών, με μικρότερη ωστόσο ένταση σε σχέση με προηγούμενες τιμές pH**.** Η πρώτη απότομη αύξηση παρατηρείται την 5η μέρα(374,36 U/ml) για να καταλήξει τελικά στην τιμή 479,38 U/ml. Η τιμή αυτή κρίνεται σχετικά ακατάλληλη, λόγω της ανομοιομορφίας των μετρήσεων, καθώς και της

καθυστέρησης που διαπιστώθηκε στην αύξηση της ενεργότητας, δεδομένου ότι μπορεί να υπήρχε η ανάγκη για παραλαβή διαλύματος πρίν την καταληκτική ημέρα επώασης των καλλιεργειών.

2.4 ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΓΙΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΤΡΟΦΟΔΟΣΙΑΣ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ

Όπως συμπερασματικά προκύπτει από τα παραπάνω διαγράμματα, ως βέλτιστο pH για βέλτιστη κυτταρική ανάπτυξη διαπιστώθηκε η τιμή pH =7. Το επόμενο βήμα για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών παραγωγής της FoFaeC είναι η μελέτη κυτταρικής ανάπτυξης μέσω νέας καλλιέργειας για διαφορετικές ποσότητες τροφοδοσίας με μεθανόλη. Η μεθανόλη αποτελεί την τροφή που χορηγείται καθημερινά στα κύτταρα της εκάστοτε καλλιέργειας προκειμένου αυτά να αναπτυχθούν και να δώσουν εν τέλει ικανές ποσότητες του ζητούμενου ενζύμου.

Η διαδικασία για την παραγωγή της προκαλλιέργειας και της κυρίως καλλιέργειας ακολουθεί επακριβώς τα βήματα που περιγράφονται στην παράγραφο 2, για τελικό όγκο προκαλλιέργειας 150 ml, και τελικό όγκο καλλιέργειας 500 ml,

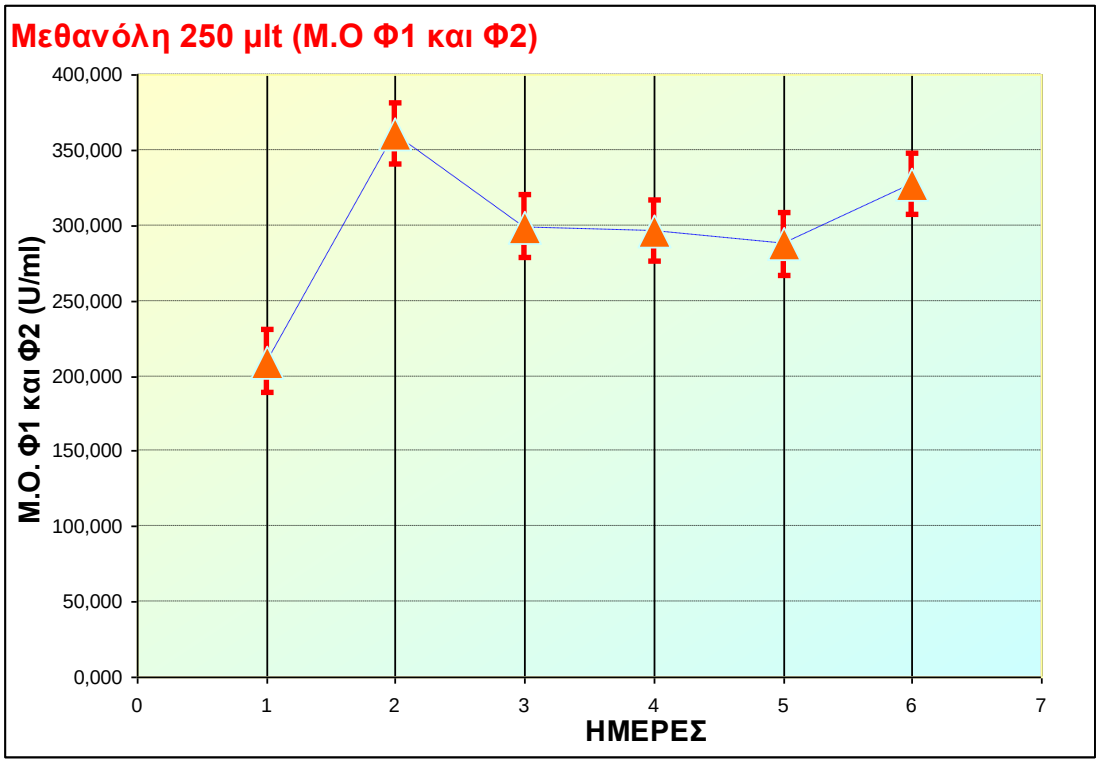
Το σώμα της κυρίως καλλιέργειας αποτελείται από 10 κωνικές φιάλες χωρητικότητας 250 ml η καθεμία, στις οποίες ισομοιράσθηκαν απο 50 ml θρεπτικού, με buffer KH_2PO_4-NaOH pH=7. Κάθε ζευγάρι φιαλών διαφέρει από τα υπόλοιπα ως πρός τη χορηγούμενη δοσολογία μεθανόλης. Οι δοσολογίες που χρησιμοποιήθηκαν και μελετήθηκαν στην κυρίως καλλιέργεια ήταν οι εξής: 250 μlt, 500 μlt, 750 μlt, 1000 μlt και 1250 μlt, Οι καλλιέργειες τοποθετούνται στους απαγωγούς και μετά το πέρας κάθε εικοσιτετραώρου, λαμβάνονται με τη γνωστή διαδικασία δείγματα 1000 μlt από κάθε κωνική, και στη συνέχεια τροφοδοτείται ξεχωριστά κάθε ζευγάρι φιαλών με τις προαναφερθείσες ποσότητες μεθανόλης. Τα ληφθέντα δείγματα, αφού αραιωθούν το καθένα 20 φορές, φωτομετρούνται στα 600nm, προκειμένου να διαπιστωθούν οι διαφορές στην κυτταρική ανάπτυξη, ανάλογα με τη δοσολογία μεθανόλης που χορηγήθηκε. Στο τέλος της εβδομάδας, και αφού ληφθούν και τα τελευταία δείγματα της $7^{ης}$ μέρας, τίθεται σε λειτουργία η συσκευή microplate, προκειμένου να προκύψουν οι ενεργότητες(ODs), δηλαδή τα mg/ml ενζύμου για κάθε μέρα της εβδομάδας ξεχωριστά. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ακριβώς η ίδια που περιγράφτηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

2.4.1 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα δεδομένα που προέκυψαν μετατράπηκαν σε units ενζύμου/μlt διαλύματος και κατασκευάσθηκαν τα παρακάτω διαγράμματα, που απεικονίζουν τη μεταβολή των ενεργοτήτων κάθε ζεύγους φιαλών με την πάροδο των ημερών:

Πίνακας 2.7: Μεταβολή των ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 1, 2 Μεθανόλης 250 μlt

Μεθανόλη 250 μlt			Φ1+Φ2	M.O * 5*1,021
Ημέρες	Φ1	Φ2	M.O	(U/ml)
1	39,529	42,518	41,023	209,423
2	72,341	68,816	70,579	360,305
3	64,369	52,748	58,558	298,939
4		58,031	58,031	296,250
5		56,273	56,273	287,271
6		64,073	64,073	327,090



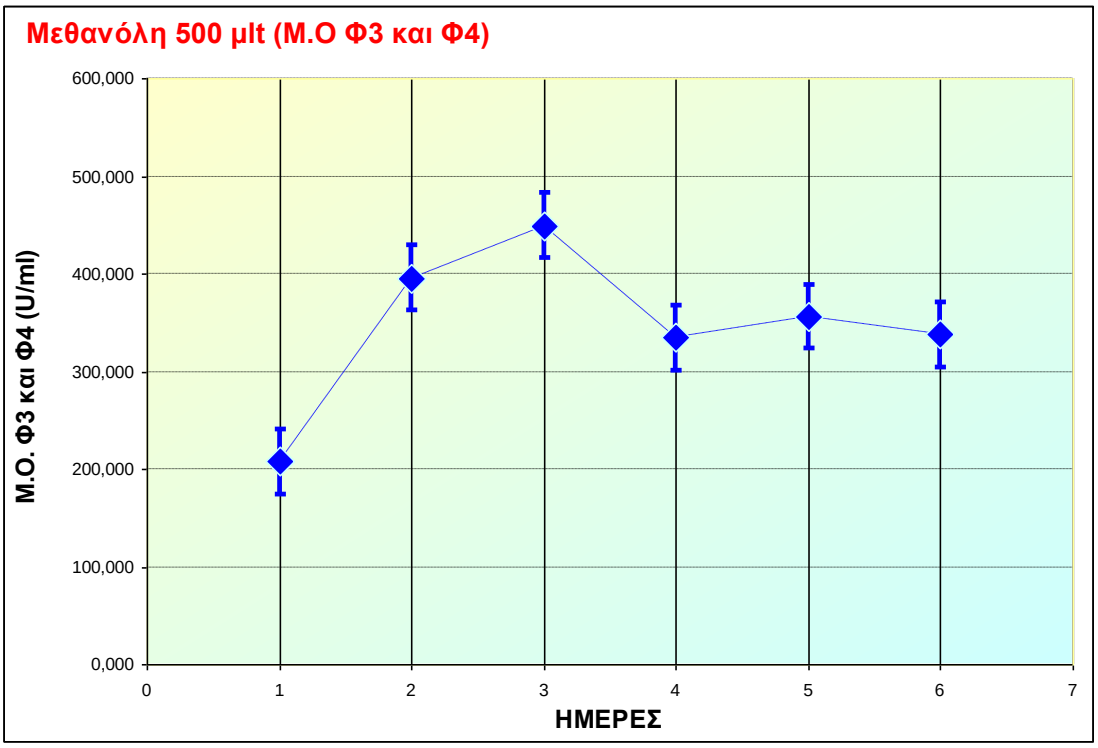
Σχήμα 2.7: Μεταβολή της ενεργότητας φιαλών 1 και 2 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 250 μlt μεθανόλης.

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει την πορεία των τιμών ενεργότητας των φιαλών 1 και 2 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 250 μlt μεθανόλης. Παρατηρείται

αρχικά αύξηση της τιμής από την 1η στη 2η μέρα, ενώ τις 2 επόμενες μέρες υπάρχει σημαντική πτωτική τάση, για να καταλήξει εν τέλει και πάλι σε αύξηση την 5η και 6η μέρα μέχρι την τελική τιμή **327,090**U/ μlt. Η ακανόνιστη πορεία της καμπύλης και οι συνεχείς αυξομοιώσεις των τιμών ενεργότητας καθιστούν σχετικά αδύναμη τη δοσολογία των 250 μlt για βέλτιστη κυτταρική ανάπτυξη και βέλτιστη παραγωγή εστεράσης.

Πίνακας 2.8: Μεταβολή των ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 3, 4 Μεθανόλης 500 μlt

Μεθανόλη 500 μlt			Φ3+Φ4	Μ.Ο * 5*
Ημέρες	Φ3	Φ4	Μ.Ο	1,021
1	40,920	40,395	40,658	207,557
2	66,953	88,073	77,513	395,701
3	92,336	83,790	88,063	449,562
4	68,509	62,509	65,509	334,422
5	69,184	70,219	69,701	355,825
6	57,041	75,225	66,133	337,610

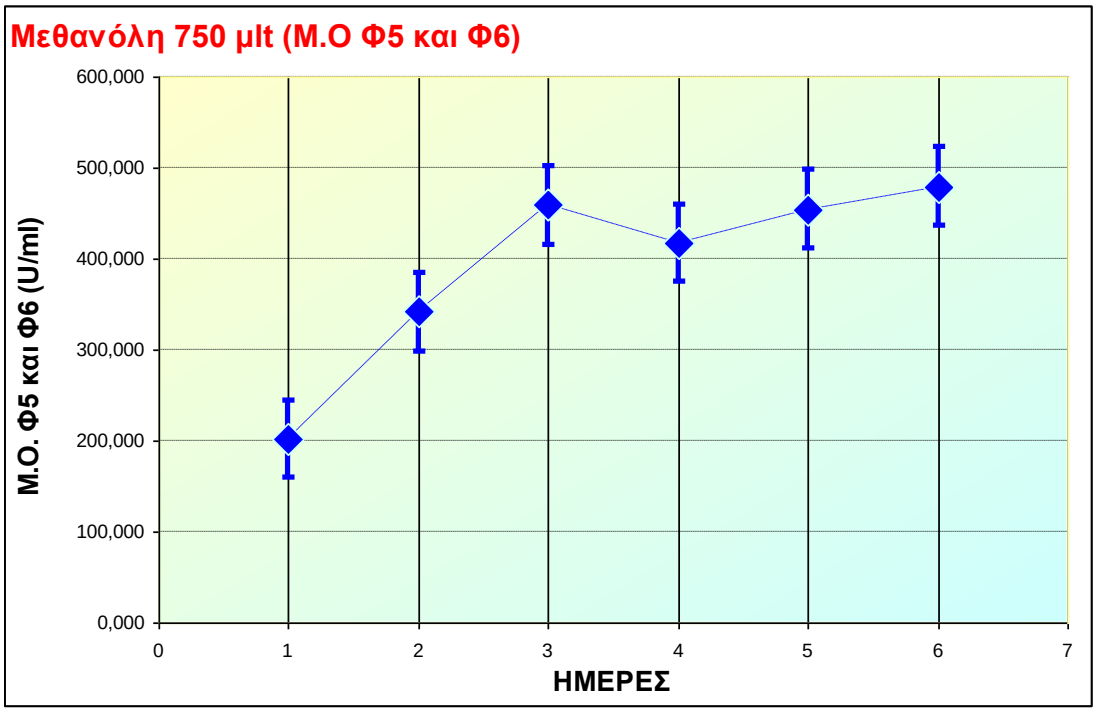


Σχήμα 2.8: Μεταβολή της ενεργότητας φιαλών 3 και 4 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 500 μlt ***μεθανόλης.***

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει την πορεία των τιμών ενεργότητας των φιαλών 3 και 4 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 500 μlt μεθανόλης. Παρατηρείται αρχικά αύξηση της τιμής από την 1η στη 2η μέρα, ενώ στη συνέχεια υπήρξε συνεχής πτώση τους, μέχρι και την 6η μέρα, οπότε και κατέληξε στην τιμή **337,610 U**/ml. Διαπιστώνεται έτσι η πλήρης ακαταλληλότητα της δόσης 500 μlt μεθανόλης για βέλτιστη κυτταρική ανάπτυξη, καθώς η μεγάλη και συνεχής πτώση της ενεργότητας με την πάροδο των ημερών δεν είναι το ζητούμενο.

Πίνακας 2.9: Μεταβολή των ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 5, 6 Μεθανόλης 750 μlt

Μεθανόλη 750 μlt			Φ5+Φ6	M.O * 5*1,021
Ημέρες	Φ5	Φ6	M.O	(U/ml)
1	42,300	36,803	39,551	201,909
2	47,730	86,029	66,879	341,419
3	99,765	79,939	89,852	458,694
4	67,811	95,595	81,703	417,094
5	78,326	99,713	89,019	454,444
6	94,924	92,963	93,943	479,580

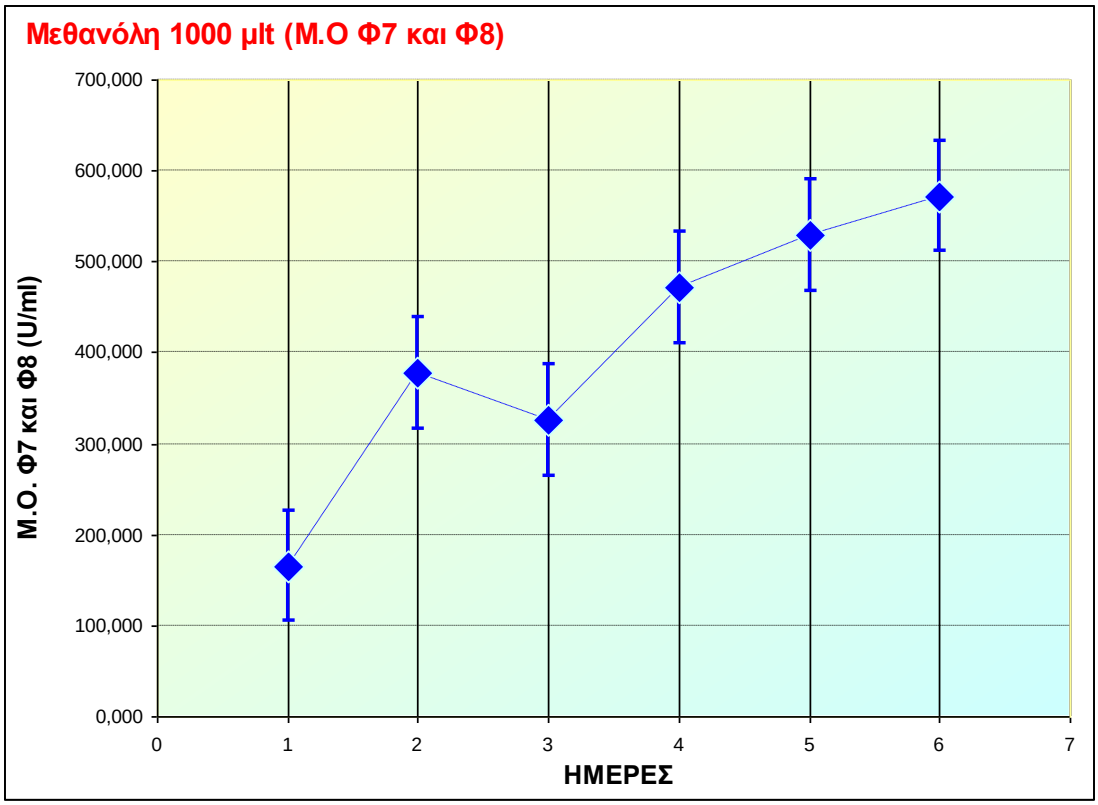


Σχήμα 2.9: Μεταβολή της ενεργότητας φιαλών 5 και 6 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 750 μlt μεθανόλης.

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει την πορεία των τιμών ενεργότητας των φιαλών 5 και 6 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 750 μlt μεθανόλης. Παρατηρείται αρχικά αύξηση της τιμής ενεργότητας από την 1η στη 2η κι από τη 2η στην 3η μέρα καλλιέργειας, προσεγγίζοντας τότε την τιμή 122,31 U/ml, ενώ στη συνέχεια υπήρξε μικρή πτώση την 4η μέρα, χωρίς ωστόσο αυτή να είναι σημαντική και χωρίς να συνεχίζεται και τις επόμενες 2 ημέρες, κατά τις οποίες υπήρξε αύξηση της ενεργότητας, με καταληκτική τιμή την 6η μέρα, αυτή των **479,580** U/ml. Συμπεραίνεται σχετική καταλληλότητα της εν λόγω δοσολογίας μεθανόλης, εφόσον η αυξητική τάση των τιμών, εξαιρώντας την 4η μέρα, ήταν εμφανής και σημαντική για την εξασφάλιση ικανών ποσοτήτων εστεράσης.

Πίνακας 2.10: Μεταβολή των ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 7, 8 Μεθανόλης 1000 μlt

Μεθανόλη 1000 μlt			Φ7+Φ8	Μ.Ο * 5*1,021
Ημέρες	Φ7	Φ8	Μ.Ο	(U/ml)
1	33,008	31,898	32,453	165,670
2	56,858	90,960	73,909	377,304
3	32,501	95,141	63,821	325,807
4	31,095	153,563	92,329	471,338
5	37,343	169,886	103,614	528,951
6	42,821	181,361	112,091	572,226

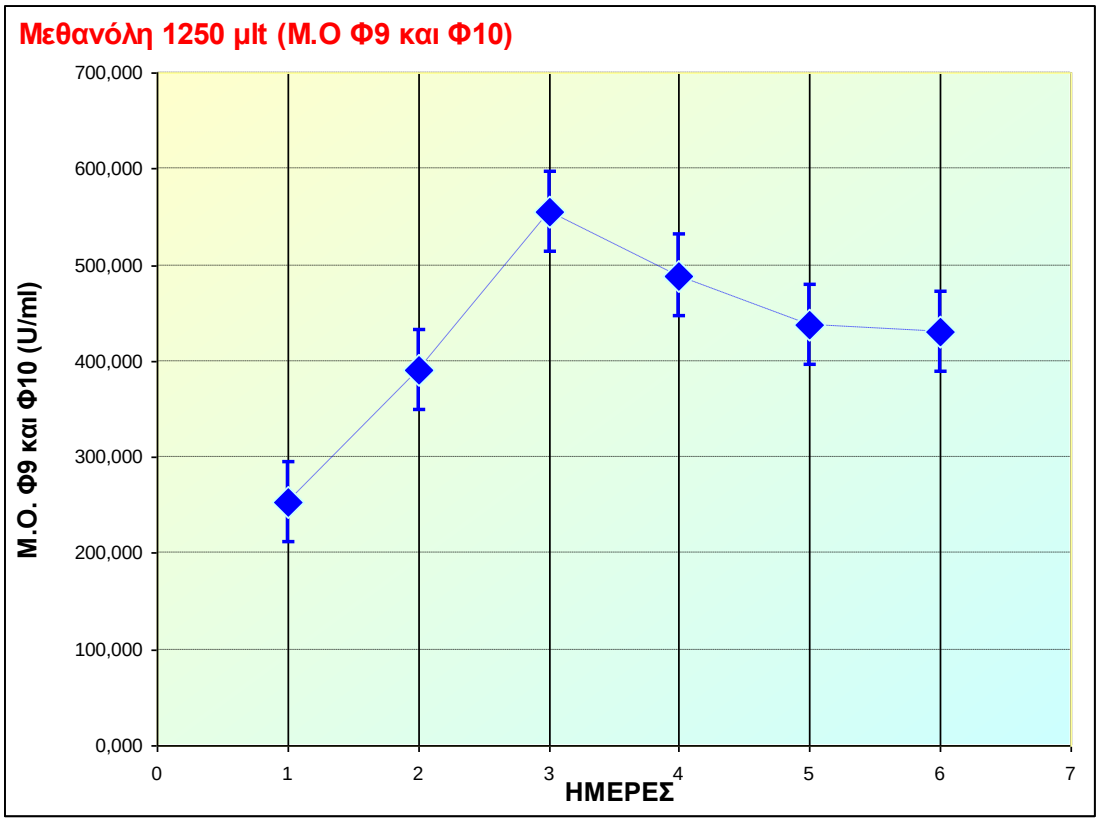


Σχήμα 2.10: Μεταβολή της ενεργότητας φιαλών 7 και 8 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 1000 μlt μεθανόλης.

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει την πορεία των τιμών ενεργότητας των φιαλών 7 και 8 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 1000 μlt μεθανόλης. Η πορεία των τιμών ήταν αρκετά παρόμοια με αυτή για τα 750 μlt μεθανόλης, γεγονός που αποτυπώνεται στα αντίστοιχα διαγράμματα, εφόσον και εδώ, εξαιρώντας την 3^{η} μέρα οπότε και διαπιστώθηκε μικρή πτώση της ενεργότητας, η αυξητική τάση είναι εμφανής, προσεγγίζοντας μάλιστα τη γραμμικότητα στην περίπτωση των 1000 μlt, Η καταληκτική τιμή για τη συγκεκριμένη δοσολογία ήταν τα **572,226** U/ml, η οποία ήταν και η μεγαλύτερη από όλες τις αντίστοιχες καταληκτικές τιμές για τις υπόλοιπες δοσολογίες. Από όλα τα παραπάνω, η τιμή των 1000 μlt μεθανόλης κρίνεται η πλέον κατάλληλη για βέλτιστη παραγωγή εστεράσης.

Πίνακας 2.11: Μεταβολή των ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 9, 10 Μεθανόλης 1250 μlt

Μεθανόλη 1250 μlt			Φ9+Φ10	Μ.Ο * 5*1,021
Ημέρες	Φ9	Φ10	Μ.Ο	(U/ml)
1	68,726	30,229	49,478	252,583
2	75,413	77,554	76,483	390,446
3	107,160	110,659	108,909	555,982
4	60,401	131,239	95,820	489,161
5	34,028	137,269	85,648	437,234
6	30,881	137,730	84,306	430,380



Σχήμα 2.11: Μεταβολή της ενεργότητας φιαλών 9 και 10 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 1250 μlt μεθανόλης.

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει την πορεία των τιμών ενεργότητας των φιαλών 9 και 10 της καλλιέργειας, στις οποίες χορηγήθηκαν 1250 μlt μεθανόλης. Εδώ παρατηρείται συνεχής αύξηση της ενεργότητας μέχρι την 3η μέρα, ενώ στη συνέχεια υπάρχει πτωτική τάση μέχρι και την 6η μέρα, της οποίας η τιμή ήταν **430,380**U/ml. Η συνεχής πτωτική τάση μετά την 3η μέρα πιθανώς να οφειλόταν σε υπερκατανάλωση

τροφής από τα κύτταρα, με αποτέλεσμα εν τέλει το θάνατο μερικών από αυτά. Κρίνεται επομένως ακατάλληλη και η συγκεκριμένη δοσολογία για βέλτιστη παραγωγή εστεράσης.

2.5 ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΓΙΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΤΑΧΥΤΗΤΕΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΦΙΑΛΩΝ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Όπως διαπιστώθηκε από τα παραπάνω διαγράμματα, ως βέλτιστη δοσολογία μεθανόλης για βέλτιστη κυτταρική ανάπτυξη κρίθηκε η τιμή 1000 μlt, Η τρίτη και τελευταία παράμετρος ως προς την οποία μελετήθηκε η ενζυμική παραγωγή της FoFaeC είναι η ταχύτητα ανάδευσης των ογκομετρικών φιαλών στους επωαστήρες. Στις προηγούμενες καλλιέργειες και προκαλλιέργειες, η ταχύτητα ανάδευσης ήταν ίδια για όλες τις φιάλες, στην τιμή 250rpm, γεγονός που επέτρεπε την τοποθέτηση όλων των φιαλών στον ίδιο επωαστήρα. Σε αυτή την καλλιέργεια όμως, εφόσον μελετήθηκαν 3 διαφορετικές τιμές ταχύτητας ανάδευσης, τα ζευγάρια φιαλών τοποθετήθηκαν σε τρείς διαφορετικούς επωαστήρες, εφόσον ο κάθε επωαστήρας μπορεί να προγραμματιστεί όπως είναι φυσικό σε μία τιμή ταχύτητας ανάδευσης. Με την γνωστή διαδικασία παρασκευάσθηκε προκαλλιέργεια υποστρώματος *P.pastoris*, τελικού όγκου 150 ml, και μετά από 24h έγινε και πάλι ανακαλλιέργεια των κυττάρων στην κυρίως καλλιέργεια τελικού όγκου 200 ml, η οποία ισομοιράσθηκε σε 6 κωνικές φιάλες, απο 50 ml σε καθεμία. Προκύπτουν έτσι 3 ζευγάρια κωνικών, με το πρώτο να τοποθετείται σε επωαστήρα με ταχύτητα ανάδευσης 80rpm, το δεύτερο σε επωαστήρα με ταχύτητα ανάδευσης 200rpm και το τρίτο σε ταχύτητα 250rpm, που αποτελεί και τη μέγιστη ταχύτητα ανάδευσης που μπορούν να υποστηρίξουν οι εργαστηριακοί επωαστήρες.

Μετά την πάροδο κάθε εικοσιτετραώρου λαμβάνεται και πάλι δείγμα 1000 μlt απο κάθε κωνική, οι οποίες αφού τροφοδοτηθούν με 1000 μlt μεθανόλης η καθεμία, που αποτελεί τη βέλτιστη διαπιστωμένη δοσολογία, τοποθετούνται εκ νέου στους επωαστήρες, κάθε ζευγάρι στον εκάστοτε. Τα ληφθέντα δείγματα αραιώνονται 1:20 φορές και φωτομετρούνται ως γνωστόν στα 600nm για να διαπιστωθούν οι διαφορές στην κυτταρική ανάπτυξη ανάλογα με την ταχύτητα ανάδευσης, καθώς και η μείωση ή αύξησή της με την πάροδο των ημερών.

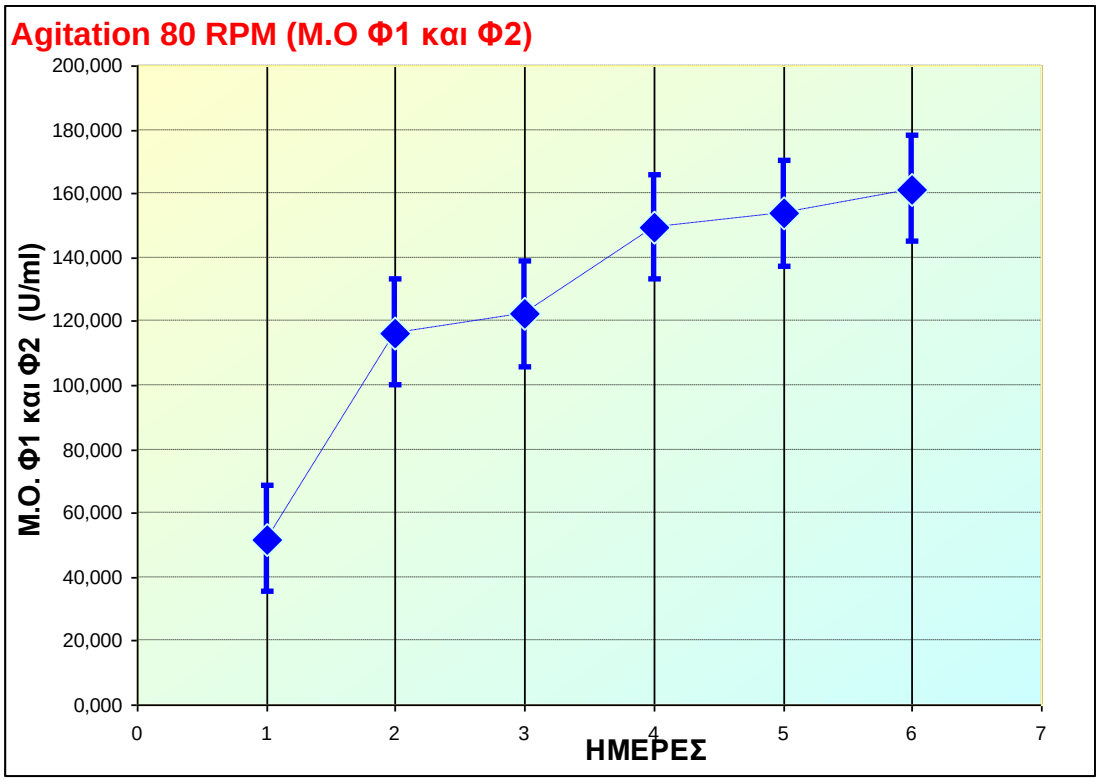
Με το πέρας των 7 ημερών και αφού ληφθούν και τα τελευταία δείγματα, τίθεται ξανά σε λειτουργία η συσκευή microplate, για την εξαγωγή των διαγραμμάτων μεταβολής των ενεργοτήτων για κάθε μέρα ξεχωριστά για όλες τις φιάλες.

2.5.1 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη συνέχεια τα δεδομένα μετατρέπονται σε U/ml και συμπληρώνεται ο ακόλουθος πίνακας του μέσου όρου ενεργοτήτων για κάθε ζευγάρι φιαλών με κοινή τιμή ταχύτητας ανάδευσης, σε σχέση με τις μέρες της καλλιέργειας, και προκύπτουν τα ακόλουθα διαγράμματα

Πίνακας 2.12: Μέσος όρος ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 1 και 2 με κοινή τιμή ταχύτητας ανάδευσης 80rpm.

Ημέρες	Φ1	Φ2	Μ.Ο Φ1,Φ2	(Μ.Ο)*1,021*5 (U/ml)
1	10,125	10,176	10,151	*51,818*
2	28,308	17,330	22,819	*116,491*
3	27,305	20,583	23,944	*122,234*
4	29,151	29,419	29,285	*149,500*
5	27,098	33,105	30,102	*153,668*
6	28,248	34,981	31,615	*161,392*

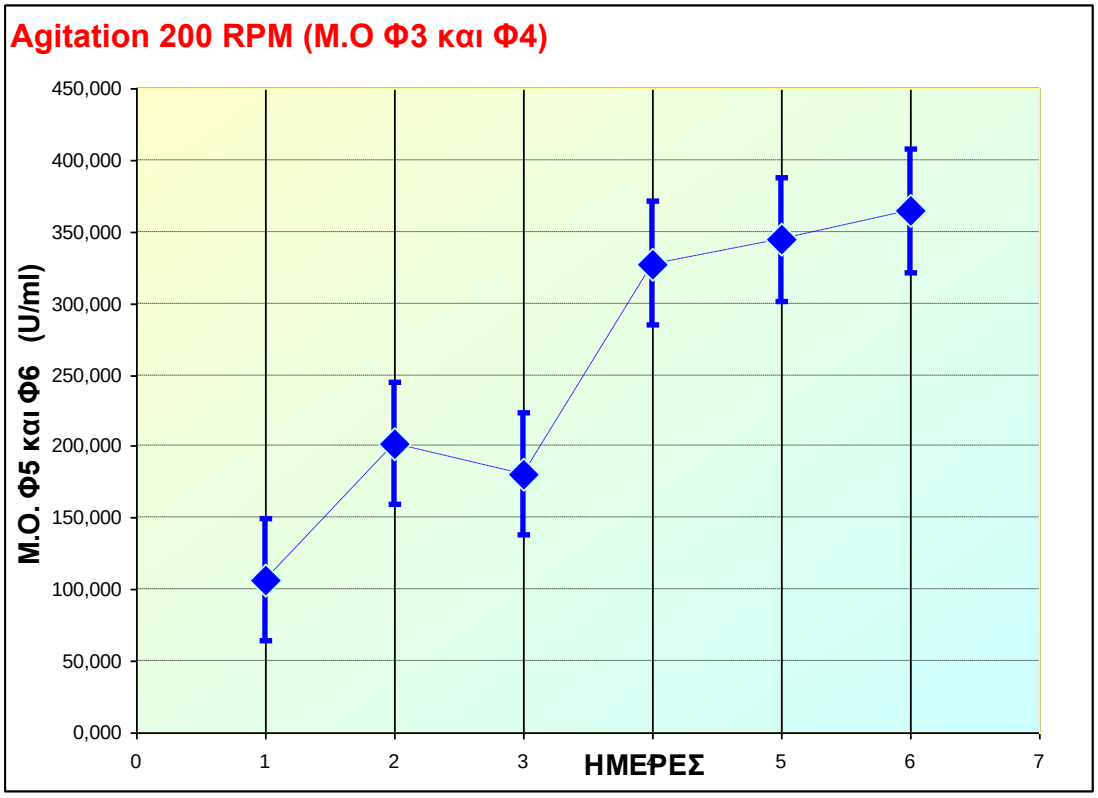


Σχήμα 2.12: Μεταβολή των units ενζύμου φιαλών 1 και 2 ανά μlt ***καλλιέργειας για τιμή ανάδευσης 80 rpm.***

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει τη μεταβολή των units ενζύμου ανά μlt καλλιέργειας για τιμή ανάδευσης 80 rpm. Παρατηρείται αυξητική τάση των τιμών από την 1η έως την τελευταία ημέρα καλλιέργειας, ξεκινώντας από τιμή 51,818 U/ml την 1η μέρα και καταλήγοντας σε 161,39 U/ml την 6η, τιμές που θα μπορούσαν να είναι ικανοποιητικές, έχουν όμως αρκετά περιθώρια βελτίωσης για να προσεγγίσουν βέλτιστες συνθήκες παραγωγής εστεράσης, γι αυτό και η συγκεκριμένη τιμή ανάδευσης δεν θεωρείται η πλέον κατάλληλη.

Πίνακας 2.13: Μέσος όρος ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 3 και 4 με κοινή τιμή ταχύτητας ανάδευσης 200rpm.

Ημέρες	Φ3	Φ4	Μ.Ο Φ3,Φ4	(Μ.Ο)*1,021*5 (U/ml)
1	20,800	20,897	20,849	*106,432*
2	46,929	32,158	39,544	*201,870*
3	49,112	21,587	35,350	*180,459*
4	98,916	29,404	64,160	*327,537*
5	103,172	31,647	67,410	*344,125*
6	109,960	32,847	71,404	*364,515*

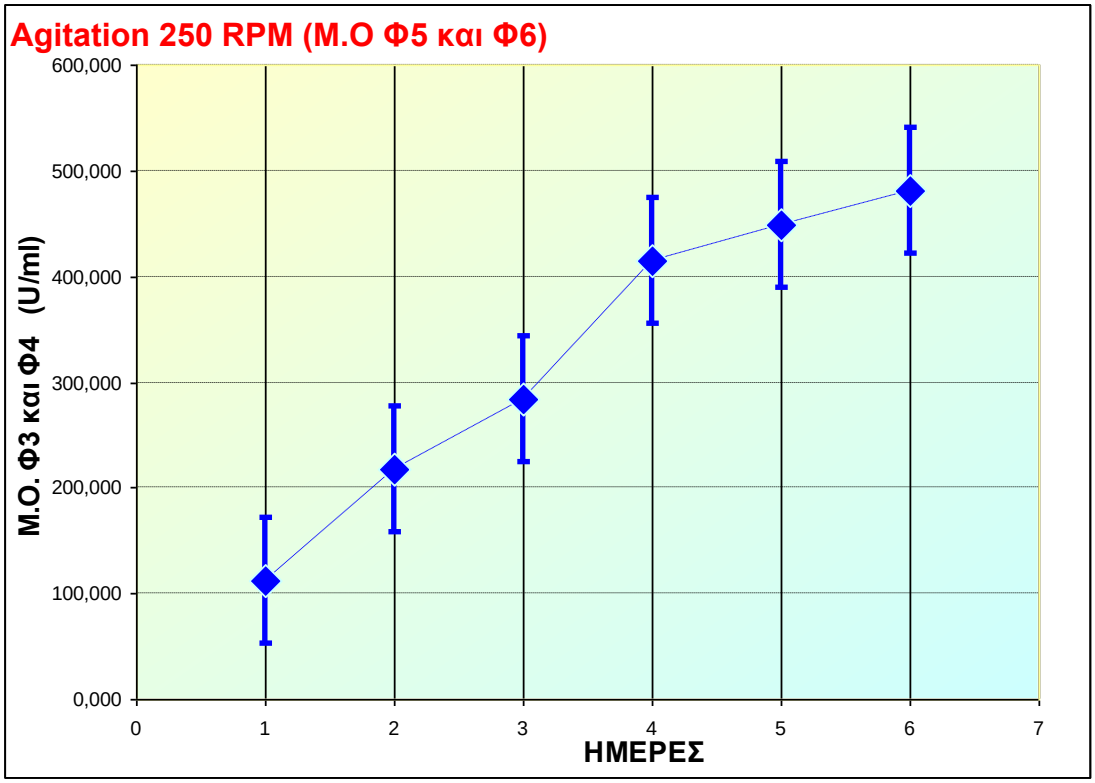


Σχήμα 2.13: Μεταβολή των units ενζύμου φιαλών 3 και 4 ανά μlt ***καλλιέργειας για τιμή ανάδευσης 200 rpm.***

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει τη μεταβολή των units ενζύμου ανά μlt καλλιέργειας για τιμή ανάδευσης 200 rpm. Οι τιμές που επιτεύχθηκαν χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες τιμές και των προηγούμενων παραμέτρων που μελετήθηκαν, σε συνδυασμό με την συγκεκριμένη τιμή ανάδευσης, είναι φανερό ότι είναι αρκετά μεγάλες, ξεκινώντας από την 1η κιόλας μέρα με ενεργότητα 106,43 U/ml και προχωρώντας συνεχώς αυξητικά, καταλήγοντας την 6η μέρα σε τιμή 364,515 U/ml ενζύμου. Είναι φανερό ότι ο συνδυασμός των τριών τιμών pH, δοσολογίας μεθανόλης και ταχύτητας ανάδευσης, είναι αρκετά κατάλληλος για βέλτιστη παραγωγή εστεράσης.

Πίνακας 2.14: Μέσος όρος ενεργοτήτων ζεύγους φιαλών 5 και 6 με κοινή τιμή ταχύτητας ανάδευσης 250rpm.

Ημέρες	Φ5	Φ6	Μ.Ο Φ5,Φ6	(Μ.Ο)*1,021*5 (U/ml)
1	23,031	20,707	21,869	*111,641*
2	42,846	42,389	42,618	*217,562*
3	59,600	51,608	55,604	*283,858*
4	77,192	85,040	81,116	*414,097*
5	85,568	90,456	88,012	*449,301*
6	88,756	99,716	94,236	*481,075*



Σχήμα 2.14: Μεταβολή των units ενζύμου φιαλών 5 και 6 ανά μlt ***καλλιέργειας για τιμή ανάδευσης 250 rpm.***

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει τη μεταβολή των units ενζύμου ανά μlt καλλιέργειας για τιμή ανάδευσης 250 rpm. Οι τιμές ενεργότητας που επετεύχθησαν και εδώ παρουσιάζουν αυξητική τάση, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, με τη διαφορά ότι εδώ ήταν κατάτι μεγαλύτερες σε σύγκριση με την προηγούμενη τιμή ταχύτητας, έχοντας προσεγγίσει την 1^{η} μέρα καλλιέργειας τα 111 U/ml(106,42 U/ml η τιμή που επετεύχθη στις προηγούμενες 2 φιάλες), και καταλήγοντας την 6^{η} μέρα σε

τιμή 481,075 U/ml (364,515 ενζύμου η τελική τιμή που επετεύχθη στις 2 προηγούμενες φιάλες). Αποδεικνύεται λοιπόν ότι η βέλτιστη τιμή ταχύτητας ανάδευσης ήταν τα 250rpm, γεγονός αναμενόμενο δεδομένου του καλύτερου αερισμού των φιαλών και της καλύτερης ομογενοποίησης των συστατικών με αυξημένη ανάδευση.

Κεφάλαιο 3

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Βιβλιογραφικές Μετρήσεις

Προκειμένου να εξακριβωθεί και να επαληθευτεί η αρτιότητα των αποτελσμάτων των πειραμάτων που διεξήχθησαν, και το κατά πόσο οι τιμές που ελήφθησαν αποτελούν πράγματι τις βέλτιστες δυνατές συνθήκες για την παραγωγή FoFaeC, θα συγκριθούν με αντίστοιχα αποτελέσματα από την έρευνα που πραγματοποιήθηκε για αντίστοιχες παραμέτρους, για την GH-11 ξυλανάση από *F.oxysporum*, κι αυτή σε υπόστρωμα *P.pastoris* με αντίστοιχες μεθόδους παραγωγής.

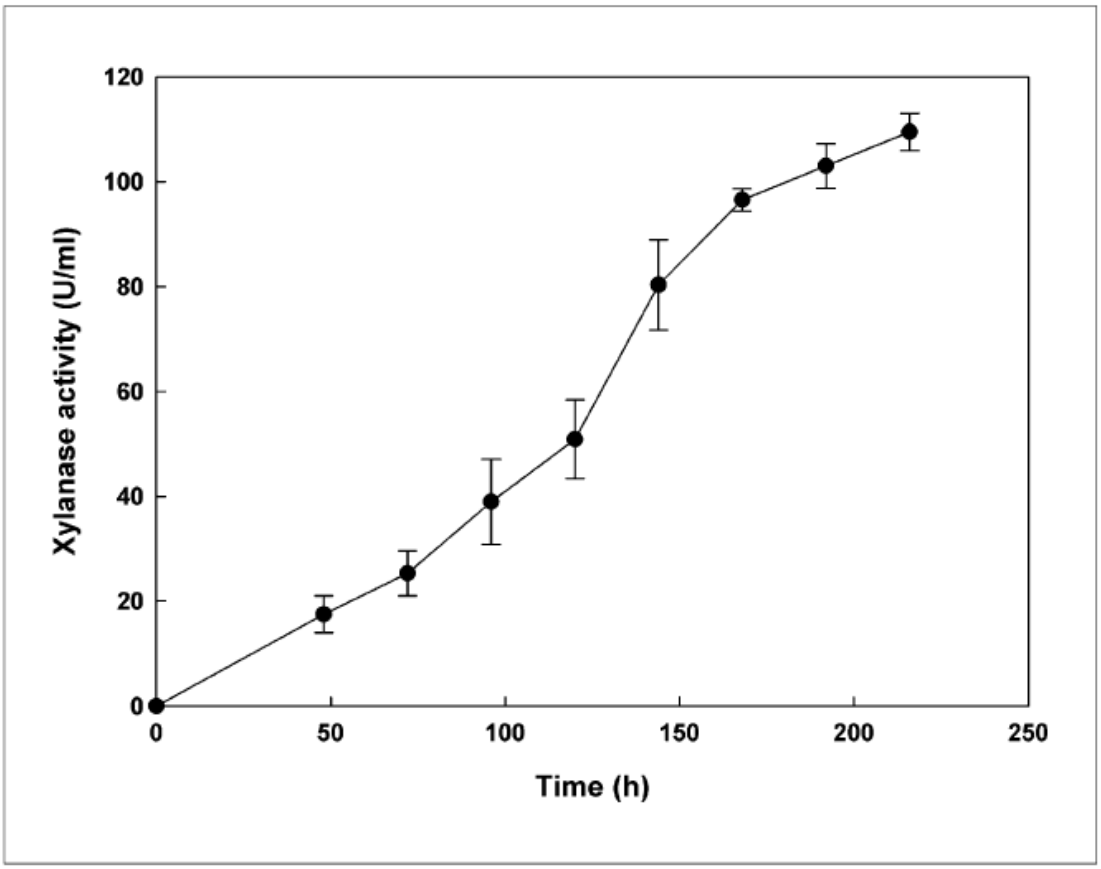
Το xyn11a γονιδίο της ενδο-1,4-β-ξυλανάσης, μέλος της οικογένειας 11 του μύκητα γλυκόσυλουδρολάση (GH), προερχόμενη από τον μύκητα *F.oxysporum* κλωνοποιήθηκε και εμφανίστηκε σε *P.pastoris*.
Το ώριμο γονίδιο της ξυλανάσης, που παράγεται μετά την εκτομή ενός ιντρονίου και το εκκρινόμενο πεπτίδιο σήματος, τοποθετήθηκαν στο πλασμίδιο pPICZaC. κάτω από την επίδραση ενός προαγωγέα οξειδάσης αλκοόλης (AOX1)
Η τελική κατασκευή είχε ενσωματωθεί μέσα στο γονιδίωμα του μεθυλοτρόφου ζυμομύκητα *P.pastoris* X33 και εκεί μετρήθηκε η δυνατότητα παραγωγής δραστικής ξυλανάσης σε καλλιέργειες μέσα σε φιαλίδια αντίδρασης, με την ίδια ακριβώς διαδικασία που παρήχθη η FoCut5a και η FoFaeC.
Ανασυνδυασμένα *Pichia Pastoris* εκκρίνουν σε μεγάλες ποσότητες ξυλανάσες και παράγουν σε υψηλό επίπεδο ενζυμική δραστικότητα (110 U / ml) μετά από 216h ανάπτυξης, με χρήση επαγωγικής μεθανόλης.
Για να επιτευχθεί υψηλότερη παραγωγή ενζύμου, αξιολογήθηκαν και εδώ τρείς βασικές παράμετροι:

- η επίδραση του αρχικού pH,
- η συγκέντρωση μεθανόλης,
- η ανάδευση

Ο *F.oxysporum*, όπως και στην περίπτωση FoCut5a και FoFaeC, μεταφέρει ένα ισχυρό ξυλανο-λυτικό σύστημα από το οποίο αρκετές ξυλανάσες (μέλη της GHO οικογένειες 10 και 11) έχουν απομονωθεί σε προηγουμένες μελέτες. Η ικανότητα του *F.oxysporum* να παράγει ενεργές ξυλανάσες, μαζί με την πρόσφατα δημοσιευμένη πλήπη αλληλουχία του γονιδιώματος του κέντρισε το ερευνητικό ενδιαφέρον να αναδημιουργηθούν ξυλανάσες με εντυπωσιακές ιδιότητες.

Για τη επίτευξη δημιουργίας ενός τέτοιου ένζυμου, χρησιμοποιήθηκε η μερική αμινοξύ-ανάλυση της ξυλανάσης από *F.oxysporum,* ένα ανθεκτικό σε αλκαλικό περιβάλλον ένζυμο που δείχνει σταθερότητα σε εύρος pH 7-9, το οποίο μπορεί να έχει πλεονεκτήματα σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, ειδικά στην διαχείριση του αλκαλικού πολτού.

Ακολουθεί διάγραμμα που απεικονίζει τη μεταβολή της ενεργότητας της ξυλανάσης στο προαναφερθέν υπόστρωμα, με την πάροδο των ημερών:



Σχήμα 3.1: Διάγραμμα διάρκειας παραγωγής FoXyn11a στο ανασυνδυασμένο P.pastoris που φιλοξενεί το γονίδιο xyn11a. Η ξυλανάση εκφράστηκε σε καλλιέργεια με επαγωγή με 0.5% (v / v) μεθανόλη.

2. Βελτιστοποίηση της εμφάνισης ξυλανάσης σε Pichia Pastoris -Σύγκριση αποτελεσμάτων με πειραματικά δεδομένα

Σε κάθε περίπτωση, όλοι οι υπόλοιποι παράγοντες παρέμειναν σταθεροί εκτός από τον παράγοντα που εξετάζονταν κάθε φορά και ο οποίος ήταν ο μόνος που μεταβάλλονταν.

Η διαδικασία ήταν ακριβώς η ίδια με αυτή που περιγράφτηκε για την παραγωγή FoFaeC, όπου ανασυνδυασμένο *P.pastoris* εμβολιάσθηκε με 50 ml μέσου προκαλλιέργειας σε κωνικές φιάλες των 250 ml, και επωάζονταν σε περιστροφικό αναδευτήρα στους 30 ^{o}C και 250 rpm.

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 100 ml μέσου καλλιέργειας, σε εύρος (pH 4,0 - 9,0), έτσι ώστε να φθάσει σε μια τιμή 1 για μέτρηση ενεργότητας στα 600nm, σε κωνική φιάλη των 250 ml. Η επώαση συνεχίστηκε επί ενός περιστροφικού αναδευτήρα σε 30 ^{o}C και 0-250 rpm, με συνεχή προσθήκη μεθανόλης σε διαστήματα 24 ωρών για την επίτευξη συγκεντρώσεων που κυμαίνονταν από 0.5% έως 3.0%.

Πρώτα από όλα, αξιολογήθηκε η επίδραση του αρχικού pH στην παραγωγή ενζύμου με την καλλιέργεια του μετασχηματισμένου ζυμομύκητα σε μέσο καλλιέργειας σε διάφορες αρχικές τιμές pH υπό συνεχή ανάδευση.

Επαγωγή επιτεύχθηκε όταν 0.5% (ν / ν) μεθανόλη προστέθηκε στο μέσο. Μέγιστη δραστηριότητα ξυλανάσης (120 U / ml) παρατηρήθηκε όταν η ζύμωση διεξήχθη με pH=7, ενώ μόνο 70 U / ml μετρήθηκαν με pH 9.0. Στην περίπτωση της φερουλικής εστεράσης, οι βέλτιστες τιμές ενεργότητας προσεγγίσθηκαν για τιμές pH =7 και 8, με αυτήν του 7 να θεωρείται κατάτι καλύτερη, λόγω των μεγαλύτερων ενεργοτήτων που προσεγγίζονται, γεγονός που συμφωνεί με την πρότυπη μελέτη βέλτιστη βέλτιστης παραγωγής ξυλανασών.

3. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ

Η επίδραση της συγκέντρωσης μεθανόλης μελετήθηκε για παραγωγή πρωτεΐνης, σε αρχικό pH του μέσου ίσο με 7.0 και η ταχύτητα ανάδευσης διατηρήθηκε στις 250 rpm.

Τα υψηλότερα επίπεδα ξυλανάσης εμφανίστηκαν όταν 1,5% (ν / ν) μεθανόλης προστέθηκαν στην καλλιέργεια, ενώ για υψηλότερες συγκεντρώσεις μεθανόλης, η παραγωγή ενζύμου ήταν περιορισμένη (λιγότερο από 45 U / ml).
Εδώ παρατηρείται και η πρώτη διαφοροποίηση σε σχέση με το αντίστοιχο πείραμα για την παραγωγή της εστεράσης, καθώς η δοσολογία για την οποία παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή ήταν εκείνη των 1000 μlt, δηλαδή για συγκέντρωση μεθανόλης 2%v/v. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι οι φιάλες που περιείχαν κύτταρα ξυλανάσης αφέθηκαν για επώαση 216h συνολικά, γεγονός που επέτρεπε μικρότερη δοσολογία μεθανόλης και πιο μακροχρόνια αποτελέσματα, ενώ αντίθετα οι φιάλες με κύτταρα FoFaeC αφέθηκαν συνολικά 140h, οπότε και η απαίτηση σε «τροφή» ήταν μεγαλύτερη προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική παραγωγή.

4. ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ

Ο αερισμός και η ανάδευση των μετασχηματισμένων *P.pastoris* που αυξάνονται σε φιάλες ανακίνησης φαίνεται να είναι μία σημαντική παράμετρος για την απόκτηση της βέλτιστη έκκρισης.

Το οξυγόνο απαιτείται για το πρώτο βήμα του μεταβολισμού της μεθανόλης για την οξείδωση της προς φορμαλδεΰδη.

Η επίδραση της ανάδευσης στην παραγωγή ξυλανάσης δοκιμάστηκε με την μεταβολή της ταχύτητας ανακίνησης από 0 έως 250 rpm, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξη ζύμης σε pH 7.0 μετά την προσθήκη 1,5% (ν / ν) μεθανόλης.

Μέγιστη δραστικότητα ξυλανάσης μετρήθηκε σε 250 rpm (166 U /ml), ενώ δεν υπάρχει παρουσία ξυλανάσης υπό σταθερές συνθήκες (0 έως 80 στροφές ανά λεπτό).

Εντατική ανάδευση αύξησε την παραγωγή της ξυλανάσης κατά περίπου 50% σε σταθερές συνθήκες καλλιέργειας προεπιλογής. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με την παρουσία του γονιδίου ξυλανάσης στο *P.pastoris*, όπου η μέγιστη δραστικότητα είχε αναφερθεί σε ανάδευση στις 250 rpm.. Ακόμη, συμφωνεί και με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν κατά την παραγωγή FoFaeC, εφόσον και εκεί η βέλτιστη ταχύτητα ανάδευσης που διαπιστώθηκε ήταν αυτή των 250rpm, γεγονός λογικό και αναμενόμενο εφόσον όσο γρηγορότερη είναι η ανάδευση των φιαλών, τόσο ευκολότερα διαχέεται το οξυγόνο από το περιβάλλον στο περιεχόμενό τους, με αποτέλεσμα την ευκολότερη και ταχύτερη πρόσληψή του από τα κύτταρα, και συνεπώς την ταχύτερη ανάπτυξή τους.

Κεφάλαιο 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκε η ετερόλογη παραγωγή από την *P.pastoris* δύο εστερασών: της FoCut5a και της FoFaeC.

Αρχικά, έγινε προσπάθεια παραγωγής και απομόνωσης της FoCut5a, μέσω καλλιέργειας ανασυνδυασμένων κυττάρων P. pastorisχρησιμοποιώντας μεθανόλη ως μέσο επαγωγής. Με το πέρας της καλλιέργειας 7 ημερών και την παραλαβή του εξωκυττάριου υγρού στο οποίο εντοπίστηκε ενεργότητα FoCut5a, και αφού μεσολάβησαν διαδοχικές διηθήσεις και εν τέλει υπερδιήθηση με μεμβράνες 10000 Da cut-off για την παραλαβή όσο το δυνατόν καθαρότερου και συμπυκνωμένου ενζυμικού παρασκευάσματος, ακολουθήθηκε η διαδικασία απομόνωσης της με χρήση χρωματογραφίας ιοντικής ανταλλαγής. Μετά την διαδικασία έκλουσης της πρωτείνης με βαθμίδωση άλατος NaCl παρατηρήθηκε ότι το ένζυμο προσροφήθηκε στο υλικό της στήλης χρωματογραφίας, καθιστώντας αδύνατη την απομόνωση του.
Στο δεύτερο κομμάτι της διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η ετερόλογη παραγωγήμιας FoFaeC από τη *P. Pastoris* με στόχο την βελτίωση της παραγωγής της σε φιάλες. Για τον σκοπό αυτό, μεταβλήθηκε η παραγωγήσε κάθε παρτίδα καλλιέργειας ενός παράγοντα συμβολής στην ενζυμική παραγωγή διατηρώντας τους άλλους σταθερούς. Αποδείχθηκε εν τέλει βέλτιστη ενεργότητα εστεράσης για pH=7,προσεγγίζοντας μετά από 5 μέρες επώασης της καλλιέργειας, την τιμή 367,35 U/ml διατηρώντας σταθερή την τροφοδοσία μεθανόλης στα 0,5 % v/v και την ταχύτητα ανάδευσης στα 250rpm.

Στη συνέχεια και για σταθερή τιμή pH=7 και ανάδευση στα 250 rpm, χρησιμοποιήθηκε ανα ζευγάρι καλλιέργειας διαφορετική δοσολογία μεθανόλης, διαπιστώνοντας βέλτιστη κυτταρική ανάπτυξη για τροφοδοσία 1000 μlt, προσεγγίζοντας μέγιστη τιμή ενεργότητας ίση με **572,226** U/ml .

Ο τελευταίος παράγοντας ο οποίος μεταβλήθηκε ανά ζευγάρι φιαλών καλλιέργειας, διατηρώντας τους υπόλοιπους σταθερούς και σε τιμές pH=7 και τροφοδοσία 1000 μlt,

ήταν η ταχύτητα ανάδευσης, όπου διαπιστώθηκε βέλτιστη κυτταρική αναπτυξη για τιμή ταχύτητας ανάδευσης 250 rpm, προσεγγίζοντας την τιμή 481,07 U/ml, γεγονός αναμενόμενο εφόνον όσο ταχύτερη είναι η ανάδευση, τόσο περισσότερο οξυγόνο διαχέεται στο διάλυμα, με συνέπεια την ταχύτερη ανάπτυξη των κυττάρων του.
Τέλος, για την εξακρίβωση της αρτιότητας των πειραματικών αποτελεσμάτων, αυτά συγκρίθηκαν με βιβλιογραφική μελέτη της κυτταρικής ανάπτυξης αντίστοιχης σε συμπεριφορά και παραγωγή πρωτείνης,της ξυλανάσης, η οποία παρήχθη και αυτή από *F.oxysporum* σε υπόστρωμα *P.pastoris*. Η βέλτιστη κυτταρική ανάπτυξη ξυλανάσης παρατηρήθηκε κι εδώ για pH =7 και ταχύτητα ανάδευσης ίση με 250 rpm, γεγονός που συμφωνεί με την πειραματική μελέτη στην παρούσα διπλωματική. Η μόνη διαφοροποίηση της βιβλιογραφικής μελέτης παρατηρήθηκε στη δοσολογία της μεθανόλης, όπου η βέλτιστη κυτταρική ανάπτυξη παρατηρήθηκε για τελικό όγκο μεθανόλης ίσο με 1.5% v/v, σε αντίθεση με τα πειραματικά αποτελέσματα, όπου βέλτιστη ενεργότητα παρατηρήθηκε για τελικό όγκο μεθανόλης 2%. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι οι φιάλες που περιείχαν κύτταρα ξυλανάσης αφέθηκαν για επώαση 216 ώρες συνολικά, γεγονός που επέτρεπε μικρότερη δοσολογία μεθανόλης και πιο μακροχρόνια αποτελέσματα, ενώ αντίθετα οι φιάλες με κύτταρα φερουλικής εστεράσης αφέθηκαν συνολικά 140 ώρες, οπότε και η απαίτηση σε «τροφή» ήταν μεγαλύτερη προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική παραγωγή.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη δίνει επαρκή στοιχεία για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων FoFaeC, οι οποίες είναι αναγκαίες για την πιλοτική εφασμογή των ενζύμων αυτών σε διάφορους τομείς της Βιοτεχνολογίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ballesteros, A., Bornscheuer, U., Capewell, A., Combes, D., Condoret, J. S., Ko¨nig, K.,Kolisis, F. N., Marty, A., Menge, U., Scheper, T., Stamatis, H., and Xenakis, A. (1995).Enzymes in non-conventional phases. Biocatal. Biotransform. 13, 1–42.
2. Bartolome B, Faulds C.B. & Williamson G (1997a). Enzymic release of ferulic acid from barkley spent grain. Journal of Cereal Science 25:285-288.
3. Bartolome B, Faulds CB, Kroon PA, Waldron K, Gilbert HJ, Hazlewood G, Williamson G (1997) An Aspergillus niger esterase (ferulic acid esterase III) and a recombinant Pseudomonas fluorescens subsp, cellulose esterase (XylD) release a 5-5-ferulic dehydrodimer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. Appl Environ Microbiol 63:208m- 212.
4. Bartolome, B., Faulds, C. B., and Williamson, G. (1997), J. Cereal Sci. 25, 285–288.
5. Bartolome, B., Faulds, C. B., Kroon, P. A., Waldron, K., Gilbert, H. J., Hazlewood, G., and Williamson, G. (1997), Appl. Environ. Microbiol. 63, 208–212.
6. Biely P., Vršanská M., Tenkanen M., Kluepfel D. (1997). Endo-β-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. J. Biotechnol. 57: 151 – 166
7. Biely Peter, Cote Gregory L. (2005), Microbial Hemicellulolytic Carbohydrate Esterases 21:1-24.
8. Biely, P., Wong, K. K. Y., Suckling, I. D., and Spanikova, S. (2003), Trtansacetylations to carbohydrates catalysed by acetyxylan esterase in the presence of organic solvent. Biochem. Biophy. Acta 1623.62-71.Biotechnol. 63, 686–690.
9. Blum, D. L., Kataeva, I. A., Li, X.-L., and Ljungdahl, L. G. (2000), J. Bacteriol. 182, 1346–1351.
10. Borreguero, I., Carvalho, C. M. L., Cabral, J. M. S., Sinisterra, J. V., and Alca´ntara, A. R. (2001). Enantioselective properties of Fusarium solani pisi cutinase on transesterification of acyclic diols: Activity and stability evaluation. J. Mol. Catal. B: Enzym. 11, 613–622.
11. Brenda: The Comprehensive Enzyme Information System. Assessed online as http://www.brenda-enzymes.info.
12. Carvalho, C. M. L., Serralheiro, M. L. M., Cabral, J. M. S., and Aires-Barros, M. R. (1997).Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles. Enzyme Microb. Technol. 21, 117–123.
13. Carvalho, P. O., Calafatti, S. A., Marassi, M., Silva, D. M., Contesini, F. J., Bizaco, R., and Macedo, G. A. (2005). Potencial de biocata´lise enantiosseletiva de lipases microbianas. Quim. Nova 28, 614–621.

14. Castro, H. F., Oliveira, P. C., and Pereira, E. B. (1997). Evaluation of different approaches for lipase catalyzed synthesis of citronellyl acetate. Biotechnol Lett. 19, 229–232.

15. Claon, P. A., and Akoh, C. C. (1994). Effect of reaction parameters on SP435 lipase-catalyzed synthesis of citronellyl acetate in organic solvent. Enzyme Microb. Technol. 16, 835–838.

16. Clauss, J. (1996). Interesterificac¸a˜o de O ´ leo de Palma. O ´ leos & Gra˜os 5, 31–37.

17. Couderc, R., and Baratti, J., (1980). Oxidation of methanol by the yeast Pichia pastoris: purification and properties of alcohol oxidase. Agric. Biol. Chem. 44: 2279-

18. Cregg, J.M., Cereghino, L., Shi, J. and Higgins, D.R. (2000). Recombinant protein

19. Cregg, J.M., Vedvick, T.S. and Raschke W.C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris. Bio/Technology. 11: 905-910.

20. Crepin V. F., Faulds, C B., Connerton I. F.. (2003a) A non-molecular type b feruloid esterase from Neurospora crassa exhibits concentration- dependent substrate inhibition. Biochem. J. 370:417-427.

21. Crepin V. F., Faulds, C B., Connerton I. F.. Functional classification of the microbial feruloid esterases. Appl. Microbiol Biotechnol. (2004) 63:647-652.

22. Crepin, V. F., Faulds, C. B., and Connerton, I. F. (2003), Biochem. J. 370, 417–427.

23. Crepin, V. F., Faulds, C. B., and Connerton, I. F. (2004), Appl. Microbiol. Biotechnol. 63, 647–652.Cutinases: Properties

24. deVries, R. P., Michelsen, B., Poulsen, C. H., Kroon, P. A., van den Heuvel, R. H. H.,

25. E. Topakas, H. Stamatis, M. Mastihubova, P. Biely, D. Kekos, BJ Macris, P. Christakopoulos. Purification and characterization of feruloiyl esterase (FAE-1) from *F.oxysporum* catalyzing transesterification of phenolic acids esters. Enzyme Microob,. Technol.33:727-737, 2003.

26. E. Topakas, H. Stamatis, P. Biely, D. Kekos, BJ Macris, P. Christakopoulos. Purification and characterization of feruloiyl esterase *F.oxysporum* catalyzing transesterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures. J. Biotechnol. 10233-44, 2003.

27. Egmond, M. R., and De Vlieg, J. (2000). Fusarium solani pisi Cutinase. Biochem. 82, 1015–1021. Espinoza, M. C. F., and Villeneuve, P. (2005). Phenolic Acids Enzymatic Lipophilization. J. Agric. Food Chem. 53, 2779–2787. expression in Pichia pastoris. Mol. Biotech. 16: 23-52.

28. Faulds, C. B., Williamson, G., van den Hombergh, J. P. T. W., and Visser, J. (1997),

29. Fischer-Colbrie, G., Heumann, S., Liebminger, S., Almansa, E., Cavaco-Paulo, A., and Gubitz, G. M. (2004). New enzymes with potential for pet surface modification. Biocatal. Biotransform. 22, 341–346.

30. Garcia T., Coteron A., Martinez M., Aracil J. 2000. Kinetic model for the sterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst Chem. Eng. Sci. 55: 1411–1423.

31. Higgins, D.R. and Cregg, J.M. (1998). Methods in Molecular Biology: Pichia

32. Hills, G. (2003). Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105, 601–607.

33. http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/SDSPAGE/SDSPAGE.html(sds-page)

34. http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v1n3-8/797(cutinase)

35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15565717(*P.pastoris*)

36. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19203649(cutinase)

37. J. Biotechnol. 66, 11–26.

38. John, V. T., and Abraham, G. (1991). Lipase catalysis and its applications. In ‘‘Biocatalysis for Industry’’ (J. S. Dodrick, ed.), pp. 193–217. Plenum Press, New York.

39. Karra-Chaabouni, M., Pulvin, S., Touraud, D., and Thomas, D. (1996). Enzymatic synthesis of geraniol esters in a solvent-free system by lipases. Biotechnol. Lett. 18, 1083–1088.

40. Klibanov, A. M. (1989). Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. Trends Biochem. Sci. 14, 141–144.

41. Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature 409, 241–246.

42. Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K.,

43. Krishina, S. H. (2002). Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. Biotechnol. Adv. 20, 239–267.

44. Kroon, P. A., Garcia-Conesa, M. T., Fillingham, I. J., Hazlewood, G. P., and

45. Langrand, G., Triantaphylides, C., and Baratti, J. (1989). Lipase catalyzed formation of flavour esters. Biotechnol Lett. 10, 549–554.

46. Macedo, G. A., and Pio, T. F. (2005). A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. Braz. J. Microbiol. 36, 388–394.

47. Matama´, T., Silva, C., O’Neill, A., Casal, M., Soares, C., Gubitz, G.M., and Cavaco-Paulo, A. (2004). Improving synthetic fibers with enzymes. 3rd International Conference on Textile Biotechnology (abstract 5).

48. Melo, E. P., Baptista, R. P., and Cabra, J. M. S. (2003a). Improving cutinase stability in aqueous solution and in reverse micelles by media engineering. J. Mol. Catal. B: Enzymatic.22, 299–306.

49. Melo, E. P., Costa, S. M. B., Cabral, J. M. S., Fojan, P., and Petersen, S. B. (2003b). Cutinase-AOT interactions in reverse micelles: The effect of 1-hexanol. Chem. Phys. Lipids 124,37–47.

50. Petersen, S. B., Johnson, P. H., Fojan, P., Petersen, E. I., Petersen, M. T. N., Hansen, S.,Ishak, R. J., and Hough, R. J. (1998). Protein engineering the surface of enzymes.

51. Protocols. Totowa, New Jersey. Humana Press. Quoted in Lin Cereghino, G.P.,

52. Ralet, M.-C., Faulds, C. B., Williamson, G., and Thibault, J.-F. (1994), Carbohydr. Res. 263, 257–269.

53. Silva, C. M., Carneiro, F., O'Neill, A., Fonseca, L. P., Cabral, J. M. S., Guebitz, G., and Cavaco-Paulo, A. (2005). Cutinase—A new tool for biodegradation of synthetic fibers. J. Polym.Sci. 43, 2448–2450.

54. Soares, C. M., Teixeira, V. H., and Baptista, A. M. (2003). Protein structure and dynamics in no aqueous solvents: Insights from molecular dynamics simulation studies. Biophys. J. 84, 1628–1641.

55. Soares, C. M., Teixeira, V. H., and Baptista, A. M. (2003). Protein structure and dynamics in no aqueous solvents: Insights from molecular dynamics simulation studies. Biophys. J. 84, 1628–1641.

56. Stamatis, H., Kolisis, F. N., and Xenakis, A. (1993). Enantiomeric selectivity of a lipase from Penicillium simplicissimum in the esterification of menthol in microemulsions. Biotechnol. Lett. 15, 471–476.

57. Stamatis, H., Sereti, V., and Kolisis, F. M. (1999). Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc. 12, 1505–1510.

58. Tatiana Fontes Pio and Gabriela Alves Mace(cutinase)

59. Topakas E., Christakopoulos P., Faulds C. B. (2005). Comparison of mesophilic and thermophilic feruloyl esterases: Characterization of their substrate specificity for methyl phenylalkanoates. Journal of Biotechnology 115: 355 – 366

60. Topakas E., Moukouli M., Dimarogona M., Vafiadi C., Christakopoulos P. (2010). Functional expression of a thermophilic glucuronoyl esterase from Sporotrichum thermophile: identification of the nucleophilic serine. Appl Microbiol Biotechnol 87: 1765 – 1772

61. Topakas, E., Christakopoulos, P., and Faulds, C. B. (2005), J. Biotechnol. 115, 355–366.

62. Topakas, E., Stamatis, H., Biely, P., and Christakopoulos, P. (2004), Appl. Microbiol.

63. Topakas, E., Stamatis, H., Biely, P., Kekos, D., Macris, B. J., and hristakopoulos, P. (2003), J. Biotechnol. 102, 33–44.

64. Topakas, E., Stamatis, H., Mastihubova, M., Biely, P., Kekos, D., Macris, B. J., and Christakopoulos, P. (2003), Enzyme Microb. Technol. 33, 729–737.

65. Vafiadi C., Topakas E., Biely P., Christakopoulos P. (2009). Purification, characterization and mass spectrometric sequencing of a thermophilic glucuronoyl esterase from Sporotrichum thermophile. FEMS Microbiol Lett 296: 178 – 184

66. Vertommen,M. A.M. E.,Nierstrasz, V. A., Van Der Veer,M., and Warmoeskerken, M. M. C. G. (2005). Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephtalate). J. Biotechnol. 120, 376–386.

67. Welsh, W. W., Murray, W. D., and Williams, R. E. (1989). Microbiological and enzymatic production of flavor and fragance chemicals. Crit. Rev. Biotechnol. 9, 105–169.

68. Williamson, G. (1999), J. Sci. Food Agric. 79, 428–434.World j microbial-biotechnol 24:1393-1401

69. Yoon, M., Kellis, J., and Poulouse, A. J. (2002). Enzymatic modification of polyester. AATCC 2, 33–36.