

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

Διπλωματική Εργασία

Χαρακτηρισμός καινοτόμων εστερασών της ημικυτταρίνης με μοντέλα υποστρώματα



Γκούτης Αντώνιος

Επιβλέπων Καθηγητής: Τόπακας Ευάγγελος

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Ευάγγελου Τόπακα, στο πλαίσιο της ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μου στη σχολή.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή της διπλωματικής εργασίας, Επίκουρο Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κ. Ευάγγελο Τόπακα, για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική υποστήριξη και τη συνεχή καθοδήγηση που μου προσέφερε και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον διδάκτορα Κωνσταντίνο Κασιμίπουρα για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον του καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου, την καθημερινή ενθάρρυνση, την προθυμία του να βοηθήσει στην επίλυση κάθε απορίας μου και να σταθεί δίπλα μου στις απαιτητικές στιγμές. Χωρίς αυτόν, η διπλωματική εργασία μου δεν θα είχε την παρούσα μορφή και γι' αυτό, τον ευχαριστώ από καρδιάς.

Ευχαριστώ, επίσης, τον Καθηγητή Δημήτριο Κέκο για την πάσης φύσεως βοήθεια σε διάφορα εργαστηριακά θέματα καθώς και τη Δρ. Διομή Μαμμά για τις συμβουλές της και την άμεση ανταπόκριση σε κάθε είδους πρόβλημα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους υποψήφιους διδάκτορες και τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για το ευχάριστο και φιλόξενο κλίμα και για την καθημερινή βοήθεια που μου προσέφεραν.

Τέλος, σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, η υποστήριξη και η συμπαράσταση της οικογένειάς μου υπήρξε ανεκτίμητη.

Γκούτης Αντώνης

Αθήνα, 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|-----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | i |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | v |
| ABSTRACT | vi |
| ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | vii |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ..... | 1 |
| 1.1. ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ | 1 |
| 1.1.1. ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ..... | 2 |
| 1.1.2. ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΗ..... | 3 |
| 1.1.3. ΠΗΚΤΙΝΕΣ..... | 5 |
| 1.1.4. ΛΙΓΝΙΝΗ | 6 |
| 1.2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ | 8 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ..... | 11 |
| 2.1. ΜΥΚΗΤΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΛΙΓΝΙΝΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ | 11 |
| 2.1.1. <i>A. ELEGANS</i> | 13 |
| 2.1.2. <i>T. LJUBARSKYI</i> | 14 |
| 2.2. ΕΝΖΥΜΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ | 14 |
| 2.2.1. ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ | 15 |
| 2.2.2. ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ | 15 |
| 2.2.3. ΕΝΖΥΜΑ ΠΟΥ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝ ΤΗ ΛΙΓΝΙΝΗ..... | 17 |
| 2.2.4. ΕΝΖΥΜΑ ΠΟΥ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝ ΤΗΝ ΚΥΡΙΑ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΗΣ ΠΗΚΤΙΝΗΣ..... | 18 |
| 2.2.5. ΒΟΗΘΗΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ | 18 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ | 22 |
| 3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 22 |
| 3.2. ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΙΜΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ..... | 23 |
| 3.3. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ | 25 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 26 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 27 |
| 4.1. ΥΛΙΚΑ | 27 |
| 4.1.1. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ..... | 27 |
| 4.1.2. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ | 28 |

| | |
|--|----|
| 4.1.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΤΗΛΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ..... | 28 |
| 4.1.4. ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ | 28 |
| 4.1.5. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ (BUFFERS) | 28 |
| 4.1.6. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ | 30 |
| 4.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ | 31 |
| 4.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 31 |
| 4.2.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ..... | 32 |
| 4.2.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΚΑΙ ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ | 35 |
| 4.2.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ | 39 |
| 4.3. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ | 40 |
| 4.3.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ..... | 40 |
| 4.3.2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ | 40 |
| 4.4. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΗΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)..... | 45 |
| 4.4.1. ΔΙΑΤΑΞΗ ΤΗΣ HPLC | 45 |
| 4.4.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ | 46 |
| 4.5. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ | 47 |
| 4.5.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ | 47 |
| 4.5.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΟΥ ΡΗ | 47 |
| 4.6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΥΛΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ..... | 48 |
| 4.6.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΣΤΑΘΕΡΩΝ | 48 |
| 4.6.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΙΝΝΑΜΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ..... | 48 |
| 4.6.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ | 50 |
| 4.6.4. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ | 51 |
| 4.7 ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ..... | 52 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ..... | 53 |
| 5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 53 |
| 5.2. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΙ ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ..... | 54 |
| 5.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ..... | 58 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ <i>AeGE15</i> ΚΑΙ <i>T/GE1</i> | 63 |

| | |
|---|----|
| 6.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ | 63 |
| 6.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ | 66 |
| 6.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΘΑΡΩΝ AeGE15 ΚΑΙ T/GE15..... | 67 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ D-ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΜΕ ΚΙΝΝΑΜΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ | 68 |
| 7.1. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ..... | 68 |
| 7.1.2 ΧΗΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ | 69 |
| 7.1.3. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ AeGE15 ΚΑΙ T/GE15 | 69 |
| 7.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ | 71 |
| 7.2.1 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ SILICA GEL ΩΣ ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ..... | 71 |
| 7.2.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΙΑΛΥΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗΣ | 71 |
| 7.2.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ | 71 |
| 7.2.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΗPLC. 72 | |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ | 73 |
| 8.1. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΥ ΡΗ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ | 73 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ AeGE15 ΚΑΙ T/GE15 | 77 |
| 9.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΗPLC | 77 |
| 9.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΕΩΝ..... | 78 |
| 9.3. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ..... | 79 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 82 |
| 10.1. ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 82 | |
| 10.2. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ | 85 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 86 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η παραγωγή, ο βιοχημικός χαρακτηρισμός και η δράση δύο καινοτόμων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος από τους βασιδιομύκητες *Artolenzites elegans* και *Trametes ljubarskyi* στο συνθετικό φαινυλεστέρα της κινναμικής αλκοόλης με D-γλυκουρονικό οξύ.

Αρχικά τα γονίδια των γλυκουρονικών εστερασών *AeGE15* και *TlGE15* εκφράστηκαν, παρήχθησαν και απομονώθηκαν μέσω του συστήματος ετερόλογης έκφρασης της μεθυλότροφης ζύμης *Pichia pastoris* X33. Η παραγωγή έλαβε χώρα σε υγρές καλλιέργειες των κυττάρων της ζύμης, η απομόνωση έγινε με στάδια διηθήσεων, συμπύκνωσης και **χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC)**, τα μοριακά βάρη των δύο ενζύμων προσδιορίστηκαν μέσω **ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)** και τα ισοηλεκτρικά τους σημεία μέσω ηλεκτροφόρησης **ισοηλεκτρικής εστίασης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (IEF-PAGE)**.

Ακολούθησε ενζυμική σύνθεση και καθαρισμός ενός συνθετικού, ανάλογου των φυσικών, υποστρώματος: του εστέρα της κινναμικής αλκοόλης με D-γλυκουρονικό οξύ. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιήθηκε η λιπάση Novozym 435 και ο καθαρισμός έγινε με εκχύλιση και **χρωματογραφία πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (TLC)**.

Στη συνέχεια έλαβε χώρα βιοχημικός χαρακτηρισμός και κινητική μελέτη των δύο εστερασών στο συνθετικό υπόστρωμα. Υπολογίστηκαν οι σταθερές Michaelis-Menten **K_m** και **k_{cat}**, όπως επίσης και ο λόγος **k_{cat} / K_m** ο οποίος αποτελεί ένδειξη για την προτίμηση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα. Ο υπολογισμός πραγματοποιήθηκε με ποσοτικό προσδιορισμό της απελευθέρωσης της κινναμικής αλκοόλης κατά την υδρόλυση του υποστρώματος από τις *AeGE15* και *TlGE15* με **υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)**.

Πρόκειται για την πρώτη μελέτη της δράσης των συγκεκριμένων καινοτόμων γλυκουρονικών εστερασών και μια εκ των πρώτων μελετών όπου χρησιμοποιήθηκε φαινολικός εστέρας του D-γλυκουρονικού οξέος, συμβάλλοντας στην προσπάθεια διαλεύκανσης του ρόλου των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος στην αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών.

ABSTRACT

The present diploma thesis examines the production, biochemical characterization and action of two novel glucuronyl esterases from the basidiomycetes *A. elegans* and *T. ljubarskyi* on the synthetic phenyl ester of D-glucuronic acid with cinammyl alcohol.

Initially the genes of the glucuronyl esterases *AeGE15* and *TIGE15* were expressed, produced and isolated by the heterologous expression system of the transformed methylotrophic yeast *P.pastoris* X33. For the purification of the recombinant proteins, culture broth was centrifuged, filtrated and concentrated and subsequently the proteins were purified using **immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC)**. Both the homogeneity and the molecular weight of the purified proteins were assessed by **sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE)** and their isoelectric points by **Isoelectric Focusing-PAGE (IEF-PAGE)**.

Enzymatic synthesis and purification of Cinnamyl alcohol ester with D-glucuronic acid followed. This synthetic substrate mimics the ester linkages of natural ones. Novozym 435 immobilized *Candida antarctica* Lipase B was used in organic medium. The glucuronate, containing a UV-absorbing chromophore, was purified by filtration, extraction and **silica gel chromatography (TLC)**.

Biochemical characterization and kinetic study of the two esterases on the synthetic substrate was then performed. The Michaelis-Menten **K_m** and **k_{cat}** constants, as well as the **k_{cat} / K_m** ratio, which is indicative of the enzyme's preference for the substrate, were calculated. The determination of kinetic parameters was carried out by using a quantitative assay which was based on the measurement of the increase of cinnamyl alcohol during hydrolysis of the substrate by the esterases *AeGE15* and *TIEG15* and detected by **high performance liquid chromatography (HPLC)**.

This is the first study on the action of these two novel glucuronate esterases and one of the first studies to use phenylester of D-glucuronic acid in an attempt elucidate the role of glucuronic acid esterases in the cell wall degradation process.

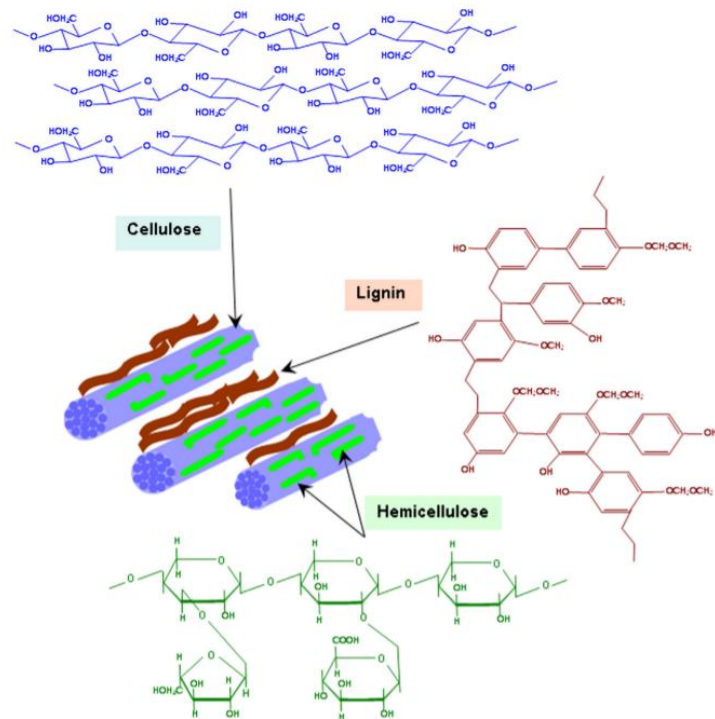
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

1.1. ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Το κυτταρικό τοίχωμα είναι ίσως ο πιο σημαντικός μηχανισμός προστασίας των φυτών απέναντι στις προκλήσεις του περιβάλλοντός τους. Πρόκειται για μία εξαιρετικά πολύπλοκη δομή η οποία εκτελεί μια μεγάλη ποικιλία λειτουργιών κατά τη ζωή του φυτού. Ο χώρος αυτός είναι το άμεσο περιβάλλον, στο οποίο τα φυτικά κύτταρα ζουν και διαμέσου του οποίου ο οργανισμός προσλαμβάνει εξωτερικά ερεθίσματα. Οι πρώτες λειτουργίες του κυτταρικού τοιχώματος που ερευνήθηκαν αφορούσαν την ακαμψία, την παροχή αντοχής και σχήματος στο κύτταρο, που λειτουργεί ως παράγοντας-κλειδί για την επίτευξη μεγάλου μεγέθους και δομικής σταθερότητας στα φυτά. Σύντομα ωστόσο έγινε αντιληπτό πως το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί επίσης ένα πολύ σκληρό και ανθεκτικό εμπόδιο μεταξύ του ευαίσθητου εσωτερικού του φυτικού κυττάρου και των μικροοργανισμών που προσπαθούν να εισβάλλουν σε αυτό. Το τοίχωμα προστατεύει το κύτταρο από τη συντριπτική πλειοψηφία των δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών από τη στιγμή που ακόμα και οι μικρότεροι από αυτούς, οι ιοί, δεν μπορούν να διεισδύσουν στο εσωτερικό του (Brett C., Waldon K., 1996).

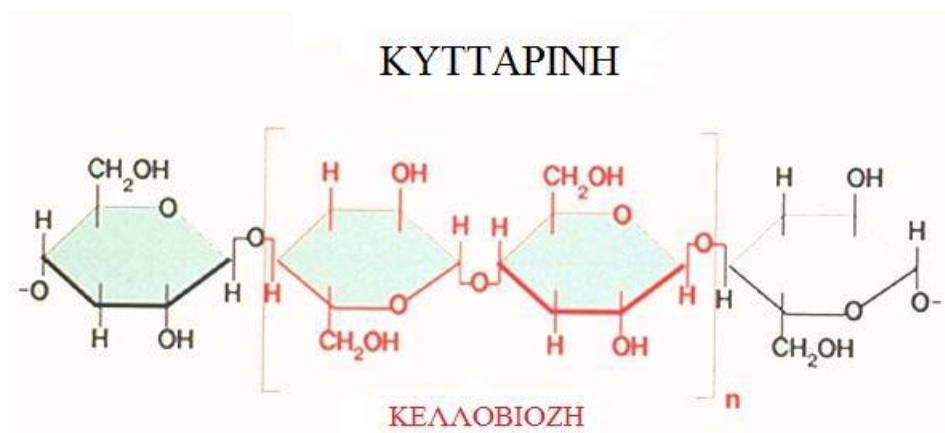
Η σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών είναι πολύπλοκη και ποικίλλει, τόσο μεταξύ των φυτικών ειδών, όσο και μεταξύ των ιστών το ίδιου φυτού. Ανομοιογένεια παρατηρείται ακόμη κι ανάμεσα σε κυτταρικά τοιχώματα διαφόρων σταδίων ανάπτυξης. Τα βασικά συστατικά τους είναι η κυτταρίνη (cellulose), η ημικυτταρίνη (hemicellulose), η πηκτίνη (pectin), η λιγνίνη (lignin), οι πρωτεΐνες και διάφορες φαινολικές ενώσεις (Κατσίμπουρας, 2013).



Εικόνα 1.1: Κύρια συστατικά του λιγνοκυτταρινικού υλικού. (Peralta et al, 2016)

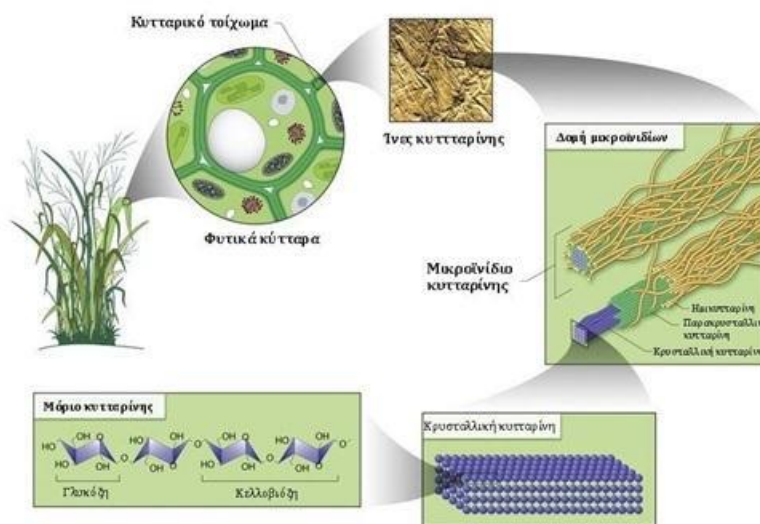
1.1.1. ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ

Η κυτταρίνη, το βασικό δομικό συστατικό όλων των φυτών και το πιο άφθονο οργανικό πολυμερές στη γη. Το 1830, πρώτος ο Anselme Payen περιέγραψε την κυτταρίνη (cellulose) ως ένα ανθεκτικό, ινώδες στερεό το οποίο παραμένει μετά από την κατεργασία διαφόρων φυτικών ιστών με οξύ και αμμωνία. Στην πιο απλή της μορφή, η κυτταρίνη αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, μήκους 8000-15000 μορίων, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό.



Εικόνα 1.2: Δομική μονάδα της κυτταρίνης. Εντός των αγκυλών απεικονίζεται η κελλοβιόζη.

Στην φύση, η κυτταρίνη παράγεται καθώς οι αλυσίδες γλυκάνης συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν κρυσταλλικές και μη κρυσταλλικές περιοχές οι οποίες συναρμολογούνται σε δομές υψηλότερης τάξης, όπως τα μικροϊνίδια κυτταρίνης. (cellulose microfibrils) Σε κάθε μικροϊνίδιο, ομάδες από 35-100 μόρια κυτταρίνης δημιουργούν κρυσταλλικές δομές οι οποίες προσδίδουν αντοχή κατά την επιμήκυνση. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις στις οποίες συναντώνται μη κρυσταλλικές περιοχές μέσα στα μικροϊνίδια οι οποίες είναι πολύ υγροσκοπικές (Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011). Η περιεκτικότητα σε κρυσταλλική και μη κρυσταλλική κυτταρίνη ποικίλλει με το είδος του φυτού. Ανάλογα με το πως συνδέονται οι αλυσίδες γλυκάνης, διαφορετικές κρυσταλλικές δομές κυτταρίνης μπορούν να παρατηρηθούν ακόμα και μέσα στο ίδιο μικροϊνίδιο. (Brown et al. , 2007), (Μουκούλη, 2012).



Εικόνα 1.3: Δομή μικροϊνιδίων κυτταρίνης

1.1.2. ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΗ

Το 1891 ο Schulze, εισήγαγε την ονομασία ημικυτταρίνη για το κλάσμα που απομονώνεται ή εκχυλίζεται από τα φυτά με τη βοήθεια αραιού αλκάλειου. Οι ημικυτταρίνες είναι κυρίως ετερογενείς πολυσακχαρίτες και αποτελούν τη δεύτερη σε αφθονία οργανική δομή στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών (Collins et al., 2005). Αποτελούνται κυρίως από σάκχαρα όπως πεντόζες (*D*-ξυλόζη, *L*-αραβινόζη), εξόζες (*D*- και *L*-γαλακτόζη, *D*-μαννόζη) και ουρονικά οξέα (*D*-γλυκουρονικό οξύ). Είναι άμορφες (μη κρυσταλλικές), έχουν χαμηλό βαθμό πολυμερισμού, είναι έντονα

υγροσκοπικές και παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστικότητα. Ένα τυπικό πρωτογενές τοίχωμα περιέχει ημικυτταρίνη σε ποσοστό 15-25% επί του ξηρού του βάρους. Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους ένα είδος ημικυτταρίνης κυριαρχεί, με τα υπόλοιπα να εντοπίζονται σε μικρότερες ποσότητες. Σε αντίθεση με τις πηκτίνες, οι ημικυτταρίνες ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό ανάμεσα στα φυτικά είδη, αλλά και ανάμεσα στα διαφορετικά κύτταρα των φυτών. Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, ένα είδος ημικυτταρινών κυριαρχεί, με τα υπόλοιπα να εντοπίζονται σε μικρότερες ποσότητες. (Μουκούλη, 2012)

Η ξυλάνη είναι το σημαντικότερο ημικυτταρινούχο πολυμερές που συναντάται στα δημητριακά και το σκληρό ξύλο και αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση μετά την κυτταρίνη. Η υδρόλυση της ξυλάνης παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Η δομή των ξυλανών που βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών μπορεί να διαφέρει έντονα ανάλογα με την προέλευση του φυτού, αλλά πάντα περιέχει την κύρια αλυσίδα μονάδων ξυλόζης, συνδεδεμένων με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό, οι οποίες μπορεί να είναι υποκατεστημένες με διαφορετικές πλευρικές ομάδες, όπως η L-αραβινόζη, η D-γαλακτόζη, η ακέτυλο ομάδα, η ομάδα του φερουλικού οξέος ή π-κουμαρικού οξέος και, τέλος, οι μονάδες γλυκουρονικού οξέος.

Οι διαφορετικές δομές που μπορούν να απαντώνται στην κύρια αλυσίδα αποτελούν την αιτία για τη μεγάλη ποικιλία ξυλανών που βρίσκονται στα φυτά. Αν και οι περισσότερες ξυλάνες είναι διακλαδισμένες δομές, έχουν απομονωθεί και μερικοί γραμμικοί πολυσακχαρίτες από μίσχο καπνού και ίνες σπάρτου. Οι ξυλάνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν, με βάση τη φύση των υποκαταστατών της κύριας αλυσίδας σε πέντε οικογένειες, τις ομοξυλάνες, τις γλυκουρονοξυλάνες, τις αραβινοξυλάνες, τις αραβινογλυκουρονοξυλάνες και τις γλυκουρονοαραβινοξυλάνες. Στα ξύλα των φυλλοβόλων δέντρων, η ξυλάνη βρίσκεται κυρίως ως Ο-ακετυλ-4-Ο-μέθυλ-D-γλυκουρονοξυλάνη, στα ξύλα των κωνοφόρων δέντρων ως αραβινο-4-Ο-μέθυλ-D- γλυκουρονοξυλάνη, ενώ στο γρασίδι και στα μονοετή φυτά ως αραβινοξυλάνη. Η ξυλάνες των δημητριακών περιέχουν μεγάλες ποσότητες L-αραβινόζης και αναφέρονται ως αραβινοξυλάνες, ενώ οι ξυλάνες του σκληρού ξύλου αναφέρονται ως γλυκουρονοξυλάνες, λόγω της υψηλής ποσότητας D-γλυκουρονικού οξέος που συνδέεται με την κυρία αλυσίδα. (Κατσίμπουρας, 2013)

Η οικογένεια των γλυκουρονοξυλανών φέρει ως υποκαταστάτες το α-D-γλυκουρονικό οξύ και το 4-O-μεθυλο-αιθερικό παράγωγό του, στις θέσεις 2 ή 3 των ξυλοπυρανοζών της κεντρικής αλυσίδας (Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011).

Πίνακας 1.1: Σύσταση των διαφόρων ειδών ξυλάνης σε σάκχαρα (Μουκούλη, 2012)

| Είδη Ξυλάνης | Ξυλόζη (%) | Αραβινόζη (%) | Γλυκόζη (%) | Γαλακτόζη (%) | Μαννόζη (%) | Γλυκουρονικό οξύ (%) |
|---|---------------|------------------|----------------|------------------|----------------|-------------------------|
| Ξυλάνη Σημύδας (Birchwood) | 89.3 | 1.0 | 1.4 | – | – | 8.3 |
| Ξυλάνη Πιτύρου Ρυζιού | 46.0 | 44.9 | 1.9 | 6.1 | – | 1.1 |
| Αραβινο- ξυλάνη Σίτου | 65.8 | 33.5 | 0.3 | 0.1 | 0.1 | – |
| Ξυλάνη από Ίνες Αραβοσίτου | 48–54 | 33 – 35 | – | – | – | 3–6 |

Άλλες ημικυτταρίνες είναι η ξυλογλυκάνη (xyloglucan), βασική ημικυτταρίνη των πρωτογενών τοιχωμάτων των δικοτυλήδων φυτών, Η (γαλακτο)γλυκομαννάνη (galactoglucomannan), η καλλόζη (callose), οι μαννάνες (mannans), οι γλυκουρομαννάνες (glucurmannans), η β-1,3 και β-1,4 γλυκάνη (glucan) που υπάρχουν στα αγρωστώδη και η αραβινογαλακτάνη II (arabinogalactan II) των γυμνοσπέρμων.

1.1.3. ΠΗΚΤΙΝΕΣ

Οι πηκτίνες διαμορφώνουν μια άλλη ομάδα ετεροπολυσακχαριτών, οι οποίες αποτελούνται από μια κύρια αλυσίδα μονάδων γαλακτουρονικού οξέος συνδεδεμένων με α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Συμμετέχουν σε ποσοστό έως 35% επί του ξηρού βάρους του τοιχώματος και διακρίνονται σε ουδέτερες και όξινες. Οι ουδέτερες ενώσεις περιλαμβάνουν τα ομοιοπολυμερή αραβινόζης και γαλακτόζης, αραβινάνη (arabinan) και γαλακτάνη (galactan) και ένα ετεροπολυμερές, την αραβινογαλακτάνη I (arabinogalactan I), στο οποίο συμμετέχουν και τα δυο

παραπάνω σάκχαρα. Οι όξινες πηκτίνες περιλαμβάνουν την ομογαλακτουρονάνη (homogalacturonan) που αποτελείται από μονάδες γαλακτουρονικού οξέος, συνδεδεμένων με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς και τις ραμνογαλακτουρονάνες I και II (rhamnogalacturonan I & II) που είναι πολυμερή μονάδων ραμνόζης και γαλακτουρονικού οξέος, συνδεδεμένων με α -1,2 γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Σε μερικά είδη πηκτινών, όπως για παράδειγμα στον ποτό σακχαρότευτλων και μήλων, το φερουλικό οξύ είναι παρόν ως τελική μονάδα που συνδέεται στη θέση O-2 της αραβινόζης ή στη θέση O-6 της γαλακτόζης. Η πηκτίνη σταθεροποιεί το πλέγμα που δημιουργείται στην περίπτωση των πρωτογενών κυτταρικών τοιχωμάτων από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη και συμμετέχει στη ρύθμιση της διαπερατότητας τους από ιόντα και ένζυμα, ενώ επιπλέον, θεωρείται ότι ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την πλαστικότητα τους.

Οι πηκτίνες περιλαμβάνουν δύο διαφορετικές καθορισμένες περιοχές: τις "ομαλές" (smooth) και τις "τριχώδεις" (hairy). Οι πρώτες αποτελούνται από μια κύρια αλυσίδα μονάδων γαλακτουρονικού οξέος, συνδεδεμένων με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίες μπορούν να είναι μεθυλιωμένες ή ακετυλιωμένες. Στις δεύτερες περιοχές οι μονάδες γαλακτουρονικού οξέος της κύριας αλυσίδας διακόπτονται από μονάδες ραμνόζης, συνδεδεμένες με α -1,2 γλυκοζιτικό δεσμό. Οι μακριές πλευρικές αλυσίδες, που αποτελούνται κυρίως από τις μονάδες L-αραβινόζης και D-γαλακτόζης, μπορούν να συνδεθούν με τις μονάδες ραμνόζης. (Κατσίμπουρας, 2013).

1.1.4. ΛΙΓΝΙΝΗ

Η λιγνίνη (lignin) είναι το δεύτερο πιο άφθονο βιοπολυμερές στη γη και το 25-35% της ξηρής μάζας του ξύλου. Πρόκειται για ένα ετερογενές αρωματικό μακρομόριο με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο. Δομείται από τριών ειδών αρωματικές αλκοόλες, την κωνιφερυλική αλκοόλη, τη σιναπική αλκοόλη και την π -κουμαρική αλκοόλη. Οι αλκοόλες αυτές σχηματίζουν τις τρεις υπομονάδες από τις οποίες αποτελείται η λιγνίνη, την γουαΐακυλ-, συρινγκυλ- και π -υδροξυφαινυλ- υπομονάδα (Martinez et al., 2005) Οι υπομονάδες αυτές συνδέονται μεταξύ τους με οξειδωτικές αντιδράσεις σύζευξης και σχηματίζουν την εξαιρετικά πολύπλοκη τρισδιάστατη δομή του πολυμερούς της λιγνίνης, η οποία ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό στα διάφορα φυτά και είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στην αποικοδόμηση. Είναι άμορφη και έχει πολύ υψηλό βαθμό πολυμερισμού (100.000-300.000). Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι είναι

έντονα υδρόφοβη ουσία, αδιάλυτη στο νερό. Οι δεσμοί στη λιγνίνη είναι αιθερικοί δεσμοί καθώς και δεσμοί άνθρακα-άνθρακα. Εντοπίζεται κυρίως στο σκληρόγχημα και στις τραχειίδες, καθώς και στα αγγεία του ξυλώδους παρεγχύματος. (Wong, 2009)

Πίνακας 1.2: Σύσταση διαφόρων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (Saha, 2003)

| Σύσταση (% , ξηρής ύλης) | Κυτταρίνη | Ημικυτταρίνη | Λιγνίνη |
|-----------------------------|-----------|--------------|---------|
| Ύνες αραβοσίτου | 15 | 35 | 8 |
| Στάχυς αραβοσίτου | 45 | 35 | 15 |
| Στέλεχος αραβοσίτου | 40 | 25 | 17 |
| Άχυρο ρυζιού | 35 | 25 | 12 |
| Άχυρο σίτου | 30 | 50 | 20 |
| Βαγάση ζαχαροκαλάμου | 40 | 24 | 25 |
| Switch grass | 45 | 30 | 12 |
| Αγριόβρομο | 25 | 35 | 6 |

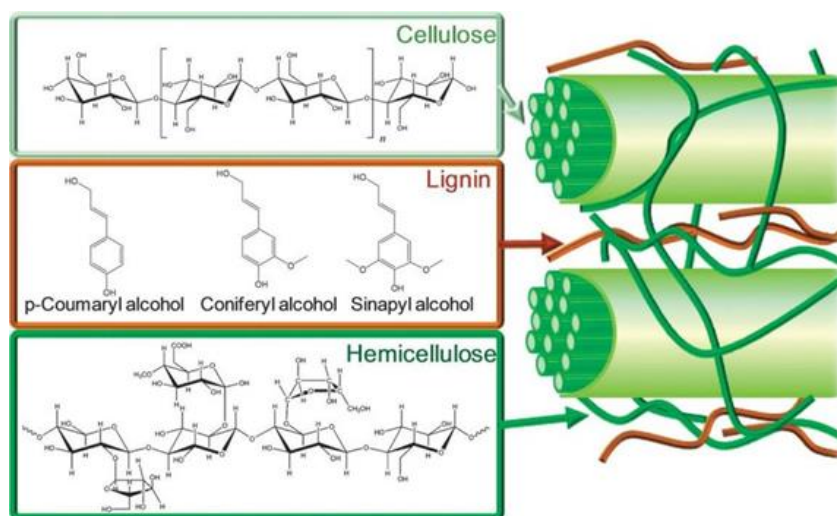
Η εμφάνιση της λιγνίνης συνδέεται με τον εποικισμό της ξηράς από τους φυτικούς οργανισμούς. Στα δευτερογενή τοιχώματα παίζει αντίστοιχο ρόλο με αυτόν της πηκτίνης. Το δευτερογενές τοίχωμα συντίθεται όταν ολοκληρωθεί η αύξηση του κυττάρου, εναποτίθεται ομοιόμορφα ή τοπικά επί του πρωτογενούς τοιχώματος και περιέχει περισσότερη κυτταρίνη και λιγότερες ημικυτταρίνες και πηκτικές ενώσεις από το πρωτογενές. (Κατσίμπουρας, 2013). Με την απόθεσή της στους χώρους μεταξύ μικροϊνιδίων της κυτταρίνης ενισχύεται σημαντικά η μηχανική αντοχή του δευτερογενούς τοιχώματος, ενώ παράλληλα εμποδίζεται τόσο η μεταφορά ουσιών διαμέσου αυτού, όσο και η είσοδος παθογόνων οργανισμών στο κύτταρο. Το αποξυλωμένο τοίχωμα χάνει την ικανότητα της επιμήκυνσης του και το κύτταρο θεωρείται «νεκρό», προστατεύοντας έτσι το υπόλοιπο φυτό από πιθανούς εισβολείς. (Μουκούλη, 2012)

1.2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ

Οι πολυσακχαρίτες ημικυτταρίνης και πηκτίνης, καθώς επίσης και το αρωματικό πολυμερές της λιγνίνης, αλληλεπιδρούν με τα μικροϊνίδια της κυτταρίνης δημιουργώντας μια άκαμπτη δομή που ενισχύει το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. (Κατσίμπουρας, 2013). Η κατανόηση των δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ των μακρομορίων του κυτταρικού τοιχώματος αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις της έρευνας στον τομέα αυτό. Μελέτες με μεθόδους που στηρίζονται στην εκχύλιση και στον καθαρισμό των προαναφερθέντων συστατικών, απέδειξαν ότι στο τοίχωμα των φυτών δημιουργούνται συγκεκριμένοι δεσμοί μεταξύ των μορίων του, οι οποίοι χωρίζονται σε ομοιοπολικούς και μη-ομοιοπολικούς δεσμούς. Τα μόρια της ξυλογλυκάνης ενώνονται ομοιοπολικά με την ουδέτερη πηκτική ένωση αραβινογαλακτάνη, η οποία με τη σειρά της ενώνεται με την ραμνογαλακτουρονάνη I. Το πρότυπο αυτό συμπληρώνεται με την παρουσία πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία συνδέονται με την τελευταία. Μεταξύ των πρωτεϊνών αναπτύσσονται ισοτυροσινικοί εγκάρσιοι δεσμοί, οι οποίοι βοηθούν στην σταθεροποίηση των μικροϊνιδίων κυτταρίνης (Brett C., Waldon K., 1996). Ο μεγάλος αριθμός δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των μικροϊνιδίων και των ημικυτταρινών, θεωρείται ότι ευθύνεται για την αδιαλυτότητα των ξυλανών, των ξυλογλυκάνων και των γλυκομαννάνων του κυτταρικού τοιχώματος.

Οι τύποι των ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των πολυσακχαριτών και της λιγνίνης, οι οποίοι έχουν εξακριβωθεί μέχρι σήμερα είναι δύο (Fry, 1982): **α)** ο εστερικός δεσμός μεταξύ της λιγνίνης και του 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικού οξέος της ξυλάνης, ο οποίος προσδιορίστηκε αρχικά σε ξύλο οξιάς (Takahashi N. & Koshijima T., 1988) (Imamura et al., 1994) (Špráňíková S., Biely P, 2006) και **β)** οι γέφυρες διφερουλικού οξέος μεταξύ των πολυσακχαριτών και της λιγνίνης, οι οποίες απαντώνται σε πολλούς φυτικούς οργανισμούς. Ειδικότερα, εντοπίζονται μεταξύ αλυσίδων αραβινοξυλάνης στα κυτταρικά τοιχώματα βλαστών μπαμπού (Ishii, 1991) μεταξύ των πολυμερών πηκτίνης στον πολτό σακχαρότευτλων (Oosterveld et al., 1997) και μεταξύ λιγνίνης και ξυλάνης στο σιτάρι (Bach Tuyet et al, 1992) Η ύπαρξη ενός τρίτου τύπου δεσμών, πιθανότατα μη ομοιοπολικών, έχει ερευνηθεί από τους Rizk *et al.*, (Rizk et al, 2000) στο μπιζέλι. Συγκεκριμένα, η νεοσυντιθέμενη πηκτίνη και η γλυκουρονοαραβινοξυλάνη δεσμεύονται στην ξυλογλυκάνη με τρόπο

εξαρτώμενο από την τιμή του pH και από τις πρωτεΐνες. Καλύτερη δέσμευση επιτυγχάνεται, σύμφωνα με τους ερευνητές, όταν το pH είναι χαμηλό και όταν απομακρύνονται οι πρωτεΐνες, αλλά και τα μόρια φουκόζη από την ξυλογλυκάνη.



Εικόνα 1.4: Δομή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας με αναπαράσταση της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. (Alonso et al, 2012)

Ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτικού οργανισμού, διακρίνονται δύο τύποι κυτταρικών τοιχωμάτων: το πρωτογενές και το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα. Το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα είναι εκείνο που εναποτίθεται στη φάση κατά την οποία το κύτταρο αυξάνει και είναι λεπτό, πλαστικό, περιέχει μεγάλη ποσότητα ύδατος και διασχίζεται από μεγάλο αριθμό πλασμοδεσμών που εξυπηρετούν τη διακυτταρική επικοινωνία. Η χημική του σύσταση ποικίλλει σημαντικά στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα είναι εκείνο που εναποτίθεται όταν το φυτικό κύτταρο έχει ολοκληρώσει την ανάπτυξή του, σχηματίζεται ομοιόμορφα ή τοπικά επί του πρωτογενούς τοιχώματος και περιέχει περισσότερη κυτταρίνη, λιγότερες ημικυτταρίνες και πηκτικές ενώσεις από το πρωτογενές. Τα δευτερογενή τοιχώματα περιέχουν και χημικές ενώσεις οι οποίες δεν ανευρίσκονται στα πρωτογενή τοιχώματα, όπως είναι η λιγνίνη, η σουβερίνη (suberin) και η κουτίνη (cutin). Τα κύτταρα στους φυτικούς ιστούς συγκρατούνται μεταξύ τους με τη βοήθεια της μέσης πλάκας, ένα λεπτό μεσοκυττάριο στρώμα που περιέχει κυρίως πηκτικές ενώσεις (Μουκούλη, 2012).

Από τα συστατικά που συνιστούν το κυτταρικό τοίχωμα, η λιγνίνη, που εμφανίζεται κυρίως στα τοιχώματα σχετικά ώριμων φρούτων, είναι αυτή που αποικοδομείται πιο δύσκολα. Ακολουθούν η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και οι

πηκτίνες. Η ανθεκτικότητα ενισχύεται με την παρουσία παράπλευρων αλυσίδων οι οποίες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: σε εκείνες που εμποδίζουν την πρόσβαση των ενζύμων στην κύρια αλυσίδα του πολυσακχαρίτη και σε αυτές που ενώνονται μεταξύ τους με αποτέλεσμα την ενίσχυση της συνοχής και της ανθεκτικότητας του κυτταρικού τοιχώματος. Παρ' όλα αυτά, διάφοροι μικροοργανισμοί καταφέρνουν να προσβάλλουν το φυτό διεισδύοντας είτε από ευκαιριακά κενά είτε με ενζυμική αποικοδόμηση. (Κατσίμπουρας, 2013) Για να εισβάλλουν στο εσωτερικό του κυττάρου, πολλά είδη μικροοργανισμών έχουν αναπτύξει ένζυμα που διασπών τις παράπλευρες αλυσίδες του κυτταρικού τοιχώματος, διευκολύνοντας την πρόσβαση των ενζύμων στην κύρια αλυσίδα των πολυσακχαριτών. Οι σαπροφυτικοί και οι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί παράγουν ένα εύρος ενζύμων προκειμένου να αποικοδομήσουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Πολλοί από αυτούς τους μικροοργανισμούς ανήκουν στους μύκητες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

2.1. ΜΥΚΗΤΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΛΙΓΝΙΝΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Πολλά είδη μικροοργανισμών έχουν αναπτύξει ένζυμα που διασπούν τις παράπλευρες αλυσίδες του κυτταρικού τοιχώματος, διευκολύνοντας την πρόσβαση των ενζύμων στην κύρια αλυσίδα των πολυσακχαριτών. Στην περίπτωση των μυκήτων αυτό το σύστημα ενζύμων έχει εξελιχθεί τόσο, ώστε σε κατάλληλες συνθήκες, να μπορούν να διασπάσουν ακόμα και τα πιο ανθεκτικά κυτταρικά τοιχώματα (Τόπακας, 2004).

Οι μύκητες καταλαμβάνουν ένα βασίλειο (regnum) από μόνοι τους, το βασίλειο των μυκήτων. (Peralta et al, 2016) Το μέγεθος της βιοποικιλότητας των μυκήτων εκτιμάται ότι ανέρχεται σε 1,5 εκατομμύρια είδη. Ωστόσο, υπολογίζεται πως μόνο 5% των ειδών αυτών έχουν περιγραφεί. Η πραγματική κλίμακα της ποικιλομορφίας των μυκήτων εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενη, αλλά αφορά άμεσα πολλά πεδία της ανθρώπινης δραστηριότητας, όπως η οικολογία, η γεωργία, η ιατρική και η βιομηχανία. Συγκεκριμένα για τη βιομηχανία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η βιομετατροπή των πολυσακχαριτών του τοιχώματος των φυτικών κυττάρων από τους μύκητες σε απλά σάκχαρα για μεταγενέστερη ζύμωση σε βιοαιθανόλη. (Berrin et al, 2012)

Η λιγνοκυτταρίνη είναι φυσικά και χημικά ανθεκτική στην αποικοδόμηση ακόμη και μετά το θάνατο των φυτών, καθώς τα ινίδια κυτταρίνης είναι ενσωματωμένα στη μήτρα ημικυτταρίνης και λιγνίνης. Οι μύκητες που αποσυνθέτουν το ξύλο και ανήκουν στους Βασιδιομύκητες διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην ανακύκλωση των θρεπτικών ουσιών στα δασικά οικοσυστήματα. Είναι γνωστό ότι παράγουν ένα μεγάλο αριθμό και ευρεία ποικιλία εξωκυτταρικών ενζύμων με διαφορετικές, συμπληρωματικές καταλυτικές δραστηριότητες για την αποικοδόμηση υλικών πλούσιων σε λιγνοκυτταρίνη. Τα λιγνοκυτταρολυτικά ένζυμα που προέρχονται από μύκητες έχουν επομένως μελετηθεί για την υδρόλυση ανανεώσιμων πόρων βιομάζας που διατίθενται σε μεγάλες ποσότητες, όπως φυτά, μέρη φυτών όπως σπόρους και μίσχους, συστατικά φυτών όπως άμυλο και ίνες, υποπροϊόντα επεξεργασίας και γεωργικά ή βιομηχανικά απόβλητα σε προϊόντα υψηλής

προστιθέμενης αξίας. Η βιομετατροπή των πολυσακχαριτών του τοιχώματος των φυτικών κυττάρων σε απλά σάκχαρα για μεταγενέστερη ζύμωση σε βιοαιθανόλη έχει μελετηθεί ευρέως, καθώς η προοπτική της βιολογικής παραγωγής της από άφθονες λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες είναι αρκετά ελκυστική. (Berrin et al, 2012)

Οι μύκητες που μπορούν να παράγουν τα απαραίτητα ένζυμα για την αποικοδόμηση της λιγνοκυτταρίνης είναι πολλοί, και περιλαμβάνουν τόσο ασκομύκητες, όπως ο *Trichoderma reesei*, όσο και βασιδιομύκητες, τόσο λευκής σήψης, όπως ο *Phanerochaete chrysosporium*, όσο και καφέ σήψης, όπως ο *Fomitopsis palustris*. Η αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας από τους μύκητες αυτούς πραγματοποιείται από πολύπλοκα μίγματα κυτταρινασών, ημικυτταρινασών και λιγνινολυτικών ενζύμων. Οι λιγνινολυτικοί μύκητες ακολουθούν δύο εναλλακτικές στρατηγικές για την αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας: είτε διασπών ταυτόχρονα όλα τα συστατικά της, όπως οι μύκητες *Trametes versicolor*, *P. chrysosporium* και *Irpex lacteus*, είτε αποικοδομούν επιλεκτικά τη λιγνίνη, όπως οι *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phlebia* spp και *Dichomitus squalens*. Οι επιλεκτικοί αποικοδομητές είναι προτιμητέοι σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές που απαιτούν την απομόνωση άθικτων ινών κυτταρίνης, όπως είναι η βιομηχανία βιοκαυσίμων και η βιομηχανία χαρτιού (Mai C., Kues U. and Militz H., 2004). Οι ασκομύκητες διασπών κυρίως την ημικυτταρίνη και την κυτταρίνη και η ικανότητά τους να διασπών τη λιγνίνη είναι περιορισμένη (Martinez et al, 2005). Ωστόσο κάποια στελέχη, μεταξύ αυτών και ο φυτοπαθογόνος μύκητας *Fusarium oxysporum* ή ο *F. solani* παράγουν τα κατάλληλα ένζυμα για την αποικοδόμηση της λιγνίνης. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετώνται ετερόλογα ένζυμα που προέρχονται από δυο μύκητες λευκής σήψης, τους *A. elegans* και *T. ljubarskyi*.

2.1.1. A. ELEGANS

Ο *A. elegans* ανήκει στους νηματώδεις μύκητες λευκής σήψης. Η αποικοδόμηση λιγνίνης από μύκητες λευκής σήψης παρέχει πρόσβαση στους πολυσακχαρίτες που μπορούν έτσι να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα ή ενέργειας από άλλους μικροοργανισμούς. Αντίθετα, οι μύκητες καστανής σήψης αφήνουν πίσω τους την αδρανή υπολειμματική λιγνίνη και συμμετέχουν στη μακροχρόνια αποθήκευση άνθρακα σε εδάφη. Ο *A. elegans* είναι εκπρόσωπος του γένους *Artolenzites*, μέσα στην ομάδα *Trametes*. Τόσο οι μοριακοί δείκτες όσο και τα μορφολογικά

Η αλληλουχία γονιδιώματος για τα *A. elegans* επιτρέπει την εξερεύνηση νέων βιοκαταλυτών και εμβαθύνει στην κατανόηση της λειτουργικής ποικιλομορφίας μεταξύ των διαφορετικών ειδών.

χαρακτηριστικά διακρίνουν τους *Artolenzites* από το γένος *Trametes*.



Εικόνα 2.1. *A. elegans*. Εικόνα από τον Stephane Welti, Πανεπιστήμιο Lille, Γαλλία.

(<https://genome.jgi.doe.gov/Artel1/Artel1.home.html>)

2.1.2. *T. LJUBARSKYI*

Ο *T. ljubarskyi* αποτελεί ένα ακόμα ελλιπώς μελετημένο είδος μύκητα. Στην Ευρώπη, αυτός ο μύκητας λευκής σήψης απαντάται από την Πορτογαλία ως τη Σερβία και ανατολικά έως την Κασπία θάλασσα στη Ρωσία. Έχει βρεθεί σε νεκρό ξύλο *Acacia*, *Carpinus*, *Prunus*, *Quercus* και *Pinus*. Χαρακτηρίζεται από σχετικά μικρούς και πλατείς σπόρους που είναι μοναδικοί στους ευρωπαϊκούς εκπροσώπους του γένους.

Επειδή είναι σε θέση να αποικοδομούν πλήρως την λιγνίνη από το ξύλο, οι νηματώδεις μύκητες λευκής σήψης έχουν υψηλό δυναμικό για βιοτεχνολογικές διεργασίες, ειδικά για τις εφαρμογές βιοτεχνολογίας λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών.



Εικόνα 2.2. *T. ljubarskyi* που καλλιεργήθηκε σε άχυρο σίτου. Εικόνα από την Isabelle Herpoel-Gimbert. (<https://genome.jgi.doe.gov/Tralj1/Tralj1.home.html>)

2.2. ΕΝΖΥΜΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Τα ένζυμα που διασπούν, τροποποιούν ή σχηματίζουν γλυκοζιδικούς δεσμούς έχουν κατηγοριοποιηθεί βάσει την αμινοξική τους αλληλουχία σε μία διαρκώς αναπτυσσόμενη βάση δεδομένων, την CAZy (Carbohydrate-Active enZymes Database, <http://www.cazy.org/>, Cantarel et al., 2009). Η CAZy διαθέτει 155 οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών (Glycoside Hydrolases, GHs), 106 γλυκοζυλ-τρανσφερασών (GlycosylTransferases, GTs), 28 λυασών (Polysaccharide Lyases, PLs) 16 εστερασών των πολυσακχαριτών (Carbohydrate Esterases, CEs) και 84 οικογένειες πρωτεϊνών πρόσδεσης σε υδατάνθρακες (CBMs). Οι οικογένειες αυτές δημιουργήθηκαν με βάση πειραματικά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες και αποτελούνται

από αλληλουχίες, οι οποίες προέρχονται από δημόσιες βάσεις δεδομένων, με σημαντική ομοιότητα. Τα βιοχημικά δεδομένα για τις διάφορες πρωτεΐνες επιμελούνται συνεχώς με βάση διαθέσιμες βιβλιογραφικές και δομικές πληροφορίες. Η κατηγοριοποίηση αυτή αντανακλά τα δομικά χαρακτηριστικά των ενζύμων, βοηθάει στην αποκάλυψη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ τους και παρέχει ένα βολικό πλαίσιο για την κατανόηση των μηχανιστικών ιδιοτήτων τους (Cantarel et al, 2008). Παρακάτω παρατίθενται ορισμένες κατηγορίες των ενζύμων που εμπλέκονται στην ενζυμική υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών.

2.2.1. ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ

Η συνδυαστική δράση μιας μεγάλης ποικιλίας ενζύμων απαιτείται για την ολική υδρόλυση της κυτταρίνης. Το ένζυμο που αφαιρεί τις μονάδες κελλοβιόζης από το τέλος της αλυσίδας των πολυσακχαριτών είναι οι εξωγλουκανάσες ή κελλοβιοδρολάσες. Οι ενδογλουκανάσες αντίθετα είναι υπεύθυνες για την εσωτερική διάσπαση των αλυσίδων κυτταρίνης. Η δράση τους ενισχύει εκείνη των εξωγλουκανασών, καθώς αρχικά διασπούν κυρίως την άμορφη περιοχή των αλυσίδων, παρέχοντας περισσότερα άκρα προς διάσπαση στις εξωγλουκανάσες. Στη συνέχεια, οι β-γλυκοζιδάσες παράγουν την εύκολα μεταβολίσιμη πηγή άνθρακα για τους μύκητες, γλυκόζη, μέσω υδρόλυσης της κελλοβιόζης. (Μουκούλη, 2012).

2.2.2. ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ

Όπως προαναφέρθηκε, η ημικυτταρίνη συμβάλλει καθοριστικά στην πολύπλοκη δομή του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Ωστόσο, ο μηχανισμός της ενζυμικής της υδρόλυσης είναι πλέον γνωστός και πολύ καλά μελετημένος. Συγκεκριμένα, τρεις τύποι ενζύμων συμμετέχουν συντονισμένα για την υδρόλυσή της: τα ενδο-ένζυμα προσβάλλουν εσωτερικά την κύρια αλυσίδα, τα εξωένζυμα απελευθερώνουν μονομερή σάκχαρα και τα βοηθητικά ένζυμα που δρουν εξειδικευμένα διασπώντας τις πλευρικές αλυσίδες των πολυμερών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αποικοδόμηση της ξυλάνης.

2.2.2.1. ENZYMA ΠΟΥ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝ ΤΗΝ ΚΥΡΙΑ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΗΣ ΞΥΛΑΝΗΣ

Οι ένδο-β-1,4-ξυλανάσες (EC 3.2.1.8, EXs) προσβάλλουν τυχαία την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης με αποτέλεσμα την παραγωγή διάφορων υποκατεστημένων ολιγοσακχαριτών. Η ταξινόμησή τους περιλαμβάνει τις οικογένειες 5, 8, 10, 11 και 43 των γλυκοζιδικών υδρολασών όπως εμφανίζονται στη βάση δεδομένων CAZy, βάση ομοιοτήτων στις ακολουθίες των αμινοξέων τους.

Η κύρια αλυσίδα της ξυλάνης αποικοδομείται από δύο κατηγορίες ενζύμων που δρουν συνεργιστικά, τις ενδοξυλανάσες και τις β-ξυλοζιδάσες. Οι ενδοξυλανάσες, είναι υπεύθυνες για τη διάσπαση της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης σε μικρότερους ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι στη συνέχεια αποικοδομούνται περαιτέρω σε ξυλόζη από τις β-ξυλοζιδάσες. Ο χαρακτηρισμός των δύο αυτών κατηγοριών ενζύμων, όπως και των γονιδίων από τα οποία εκφράζονται, έχουν χαρακτηριστεί από πολλούς μικροοργανισμούς, λόγω του μεγάλου ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν.

Η ταξινόμηση των δύο οικογενειών υδρολασών, F ή 10 και G ή 11, προέκυψε από σύγκριση της αμινοξικής τους ακολουθίας. Διαφέρουν σημαντικά τόσο ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (μοριακό βάρος, ισοηλεκτρικό σημείο), όσο και ως προς την τρισδιάστατη δομή τους. Η οικογένεια 10 χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερο μοριακό βάρος και μικρότερη εξειδίκευση σε συνθετικά υποστρώματα σε σχέση με τις ενδοξυλανάσες της οικογένειας 11. Είναι επίσης περισσότερο ικανές να προσβάλλουν την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης με στόχο δεσμούς πιο κοντά σε υποκατεστημένα μόρια, αντίθετα με τη δεύτερη οικογένεια. Οι ξυλανάσες της οικογένειας 11 φέρουν πλευρικό υποκαταστάτη, ο οποίος δρα προστατευτικά για τους παρακείμενους δεσμούς. Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, τα προϊόντα που παράγονται μέσω της δράσης των μελών της οικογένειας 10 στα διάφορα είδη ξυλάνης έχουν γενικά μικρότερο μοριακό βάρος από τα αντίστοιχα των ξυλανασών της οικογένειας 11 (Τόπακας, 2004). Διαφορές έχουν παρατηρηθεί και ως προς την καταλυτική τους δράση όπως έχει ήδη αναφερθεί (Biely P., Vršanská M., Tenkanen M., Kluepfel D., 1997). Στην περίπτωση της γλυκουρονοξυλάνης οι ξυλανάσες της οικογένειας 10 απελευθερώνουν αλδοτετραουρονικό οξύ (MeGlcA3Xyl3) ως το μικρότερο κλάσμα, ενώ αυτές της οικογένειας 11 απελευθερώνουν αλδοπενταουρονικό οξύ (MeGlcA3Xyl4) (Kolenová et al, 2005).

2.2.3. ENZYMA ΠΟΥ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝ ΤΗ ΛΙΓΝΙΝΗ

Οι φαινολοξειδάσες, όπως είναι η λακκάση (EC 1.10.3.2), και οι υπεροξειδάσες της αίμης, όπως η υπεροξειδάση που εξαρτάται από το μαγγάνιο (MnP, EC 1.11.1.13), η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP, EC 1.11.1.14) και η ευέλικτη υπεροξειδάση (VP, EC 1.11.1.16) είναι οι δύο κυριότερες κατηγορίες ενζύμων που σχετίζονται με την βιοαποικοδόμηση της λιγνίνης (Martinez et al, 2005). Το μοριακό οξυγόνο είναι γενικά δέκτης ηλεκτρονίων για τις λακκάσες, ενώ το υπεροξείδιο του υδρογόνου χρησιμοποιείται από τις υπεροξειδάσες. Σε αυτές τις δύο κατηγορίες προστίθεται μια τρίτη: οι υπεροξειδάσες αποικοδόμησης βαφών (Dye- decolorizing peroxidases, DyP's, EC 1.11.1.19). Στη διαδικασία αποικοδόμησης της λιγνίνης εμπλέκεται και ένα μεγάλο σύνολο άλλων βοηθητικών ενζύμων που παράγουν το απαραίτητο H₂O₂ για τη δράση των υπεροξειδασών. Ορισμένα από αυτά είναι οι οξειδάσες των αρυλ-αλκοολών (EC 1.1.3.7), οι οξειδάσες του γλυοξυλικού (EC 1.2.3.5) και η οξειδάση της 1-γλυκόζης (EC 1.1.3.4), (Ander, P., Marzullo, L., 1997).

Τα προαναφερθέντα ένζυμα, μαζί με άλλες απαραίτητες ενώσεις, εκκρίνονται από λιγνινολυτικούς μύκητες. Το είδος των ενζύμων που παράγονται μπορεί να διαφέρει. Για παράδειγμα, ο *P. chrysosporium* δεν παράγει λακκάσες, αλλά αρκετά ένζυμα με ενεργότητα υπεροξειδάσης σε συνδυασμό με μια οξειδάση του γλυοξυλικού οξέος. Η τελευταία είναι υπεύθυνη για την παροχή του H₂O₂ που απαιτείται για τη δράση των υπεροξειδασών (Singh D, Chen S., 2008). Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης πως από πολλούς μικροοργανισμούς αποικοδόμησης της λιγνίνης φαίνεται να απουσιάζει η υπεροξειδάση της λιγνίνης, παρόλο που είναι σε θέση να οξειδώσει το φαινολικό κομμάτι της που αποτελεί το 80-90%. Προκύπτει έτσι το συμπέρασμα ότι η λιγνίνη μπορεί να αποικοδομηθεί μέσω πολλών διαφορετικών ενζυμικών μεθόδων. Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας υποδεικνύουν ότι όγκος των λιγνινολυτικών ενζύμων είναι υπερβολικά μεγάλος για να τους επιτρέψει να εισχωρήσουν στο εσωτερικό των πόρων του ξύλου στα αρχικά στάδια της αποικοδόμησης. (Srebotnik et al, 1988). Ο πιθανότερος μηχανισμός της μυκητιακής αποικοδόμησης που έχει προταθεί είναι η προσβολή των μακρομορίων στόχων από τα οξειδωτικά ένζυμα μέσω δημιουργίας οπών στο κυτταρικό τοίχωμα από μικρού μοριακού βάρους οξειδωτικά μόρια που δρουνε πρώτα (Srebotnik E et al, 1988).

2.2.4. ENZYMA ΠΟΥ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΟΥΝ ΤΗΝ ΚΥΡΙΑ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΗΣ ΠΗΚΤΙΝΗΣ

Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της πηκτίνης εξειδικεύονται, ανάλογα με το αν προσβάλλουν την ‘τριχώδη’ ή την ‘ομαλή’ περιοχή της κύριας αλυσίδας της πηκτίνης, λόγω των σημαντικών δομικών διαφορών των δύο περιοχών. Οι λυάσες της πηκτίνης (EC 4.2.2.10), οι λυάσες του πηκτικού (EC 4.2.2.2) και οι πολυγαλακτουρονάσες (EC 3.2.1.15 και EC 3.2.1.67) είναι σε θέση να υδρολύσουν την ‘ομαλή’ περιοχή. Αντίστοιχα, οι υδρολάσες και οι λυάσες της ραμνογαλακτουρονάνης, που έχουν χαρακτηριστεί στο γένος *Aspergilli* είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση της ‘τριχώδους’ περιοχής. Όπως είναι αναμενόμενο, τα ένζυμα αυτά επιδεικνύουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης στην αποικοδόμηση των περιοχών (Mutter M et al, 1996)

2.2.5 ΒΟΗΘΗΤΙΚΑ ENZYMA ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

2.2.5.1 A-L-ΑΡΑΒΙΝΟΦΟΥΡΑΝΟΣΙΔΑΣΕΣ ΚΑΙ ΑΡΑΒΙΝΟΦΟΥΡΑΝΟΥΔΡΟΛΑΣΕΣ ΤΗΣ ΑΡΑΒΙΝΟΞΥΛΑΝΗΣ

Τα ένζυμα a-L-αραβινοφουρανοσιδάση και αραβινοφουρανοϋδρολάση της αραβινοξυλάνης είναι σε θέση να υδρολύσουν τα μόρια της αραβινόζης. Παρατηρείται μια μεγάλη ποικιλία στην εξειδίκευση τους πάνω σε διάφορα υποστρώματα, όπως παρουσιάζουν μελέτες πάνω στα ένζυμα και τα αντίστοιχα γονίδια τους από πολλούς διαφορετικούς μικροοργανισμούς.

2.2.5.2 ΕΝΔΟΑΡΑΒΙΝΑΝΑΣΕΣ

Οι ενδοαραβινανάσες συμμετέχουν στην αποικοδόμηση πλευρικών αλυσίδων της πηκτίνης και συγκεκριμένα των α-1,5 γλυκοζιτικών δεσμών μεταξύ μονάδων αραβινάνης των πολυσακχαριτών. Οι ενδοαραβινανάσες ενισχύουν έντονα την υδρόλυση του πολυμερούς της αραβινάνης και επηρεάζουν θετικά τη δράση των αραβινοφουρανοσιδασών, αν και ορισμένες αραβινοφουρανοσιδάσες έχουν επίσης την ικανότητα να αποικοδομούν την αραβινάνη.

2.2.5.3 Α- ΚΑΙ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΕΣ

Η γαλακτόζη προσβάλλεται από τις α- γαλακτοσιδάσες (EC 3.2.1.22) και β-γαλακτοσιδάσες (EC 3.2.1.23). Η απελευθέρωση των τελικών μονάδων γαλακτόζης από τις πλευρικές αλυσίδες της γαλακτάνης των πηκτινών γίνεται από τις β-γαλακτοσιδάσες.

2.2.5.4 ΕΝΔΟΓΑΛΑΚΤΑΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΕΞΩΓΑΛΑΚΤΑΝΑΣΕΣ

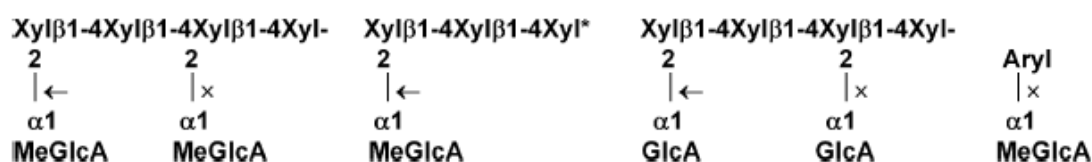
Οι β- γαλακτοσιδάσες, οι ενδογαλακτανάσες (EC 3.2.1.89) και οι εξωγαλακτανάσες αποικοδομούν τις πλευρικές αλυσίδες γαλακτάνης της πηκτίνης. Οι πολυσακχαρίτες της γαλακτάνης υδρολύονται από τις ενδογαλακτανάσες, οπότε απελευθερώνεται γαλακτοβιόζη και γαλακτόζη. Ανάλογα αν οι δεσμοί μεταξύ μονάδων γαλακτόζης είναι β-1,3, β-1,4 ή β-1,6, χρησιμοποιούνται τα κατάλληλα εξειδικευμένα μεταξύ των τριών ενζύμων. Στις πλευρικές αλυσίδες της πηκτίνης εντοπίζονται δύο κατηγορίες αραβινογαλακτάνης. Η πρώτη κατηγορία χαρακτηρίζεται από μια κύρια αλυσίδα μονάδων γαλακτοπυρανόζης, που συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό και η δεύτερη από μια κύρια αλυσίδα μονάδων γαλακτοπυρανόζης, συνδεδεμένων με β-1,3 γλυκοζιτικό δεσμό, που γίνεται να υποκατασταθούν και με μονάδες γαλακτοπυρανόζης με β-1,6 δεσμό. Παρόλο που αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν την ανάγκη ύπαρξης και των τριών κατηγοριών ενζύμων ώστε να αποικοδομηθούν πλήρως πολυσακχαρίτες αυτής της μορφής, υπάρχουν περιπτώσεις, όπως του *Aspergillus*, που έχουν εντοπιστεί μόνο οι β-1,4 ενδογαλακτανάσες. (Κατσίμπουρας, 2013)

2.2.5.5 Α-ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΟΖΙΔΑΣΕΣ

Ο α-1,2-γλυκοζιδικός δεσμός μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων του 4-Ο-μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος με την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης προσβάλλεται από τις α-D-γλυκουρονοζιδάσες. Πρόκειται για έναν αναγνωρισμένο ως πολύ σταθερό στην όξινη υδρόλυση δεσμό, ενώ οι παρακείμενοι ξυλοζιδικοί δεσμοί ενισχύονται επιπλέον από το 4-Ο-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ (Zaide et al, 2001)

Οι α-γλυκουρονοζιδάσες της οικογένειας 67 απελευθερώνουν μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ (MeGlcA) ή γλυκουρονικό οξύ (GlcA) μόνο από τα κλάσματα γλυκουρονοξυλάνης στα οποία το ουρονικό οξύ συνδέεται με τις μη αναγωγικές μονάδες ξυλοπυρανόζης. Συνεπώς, δεν λειτουργούν σε πολυμερικά υποστρώματα

δηλαδή σε γλυκουρονοξυλάνες.. Επίσης οι α-γλυκουροζιδάσες της οικογένειας 67 δεν προσβάλλουν αρυλ γλυκοζίτες (aryl glycosides) του GlcA ή του MeGlcA. Αν και μια α-γλυκουρονοζιδάση που υδρολύει αρυλ γλυκουρονοζίτες (aryl glucuronides) εντοπίζεται στην οικογένεια 4, δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως ημικυτταρινολυτική γλυκοζιδάση, επειδή αναγνωρίζει την γλυκουρονοξυλάνη ως υπόστρωμα, αλλά ούτε και τα κλάσματά της.



Σχήμα 2.1. Γλυκοζιδικοί δεσμοί σε κλάσματα γλυκουρονοξυλάνης. Με βέλος σημειώνονται οι περιπτώσεις που προσβάλλονται από τις α-γλυκουροζιδάσες της οικογένειας 67 και με X οι περιπτώσεις που δεν προσβάλλονται. Ο αστερίσκος υποδηλώνει το αναγωγικό άκρο (Ryabova et al, 2009).

2.2.5.6 Β-ΞΥΛΟΖΙΔΑΣΕΣ

Οι β-ξυλοζιδάσες ανήκουν στις οικογένειες 3, 39, 43, 52 και 54 και αποικοδομούν μικρούς ξυλοολιγοσακχαρίτες και ξυλοβιόζη ενώ απελευθερώνουν μονάδες ξυλόζης από τα μη αναγωγικά άκρα (Lee et al, 1993). Όσο μεγαλώνει ο βαθμός πολυμερισμού των ξυλοολιγοσακχαριτών, η συγγένεια των β-ξυλοζιδασών ελαττώνεται (Wong et al, 1988). Στις οικογένειες 3, 43 και 54 υπάρχουν και οι ξυλοζιδάσες-αραβινοζιδάσες. Τα μεγάλα αυτά ένζυμα, με μοριακά βάρη μεταξύ των 60 και 360 kDa, αποκαλούνται και διλειτουργικά ένζυμα (bifunctional enzymes).

2.2.5.7 Α-L-ΑΡΑΒΙΝΟΦΟΥΡΑΝΟΖΙΔΑΣΕΣ

Η υδρόλυση των πλευρικών μονάδων της L-αραβινόζης, που συνδέονται με α-1,2, α-1,3 και α-1,5-L-αραβινοφουρανοζιδικούς δεσμούς με μονάδες ξυλοπυρανόζης διαφόρων oligo- και πολυσακχαριτών της ξυλάνης καταλύεται από τις α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες (Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011). Οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες ανήκουν στις οικογένειες 3, 43, 51,54 και 62 των γλυκοζιδοϋδρολασών. Επίσης υπάρχουν και οι ενδο-1,5-α-L-αραβινάσες (EC 3.2.1.99) οι οποίες παρουσιάζουν ενεργότητα μόνο προς γραμμικές αραβινάνες (van der Veen et al, 1991).

2.2.5.8 ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ ΤΟΥ ΦΕΡΟΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ Π-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Η δράση των εστερασών του φερούλικού οξέος διευκολύνει την αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος επειδή καθιστά τις γλυκοζιτικές υδρολάσες ικανές να προσεγγίσουν τους πολυσακχαρίτες της κύριας αλυσίδας. Συγκεκριμένα, από τις εστεράσες του φερούλικού οξέος υδρολύονται οι εστερικοί δεσμοί μεταξύ των πολυσακχαριτών της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης και μονομερών ή διμερών μορφών του φερούλικού οξέος (Τόπακας, 2004). Ομοίως οι εστεράσες του π-κουμαρικού οξέος προσβάλλουν τον εστερικό δεσμό μεταξύ π-κουμαρικού οξέος και των κύριων πολυμερών αλυσίδων της ξυλάνης (Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., 2011).

2.2.5.9 ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

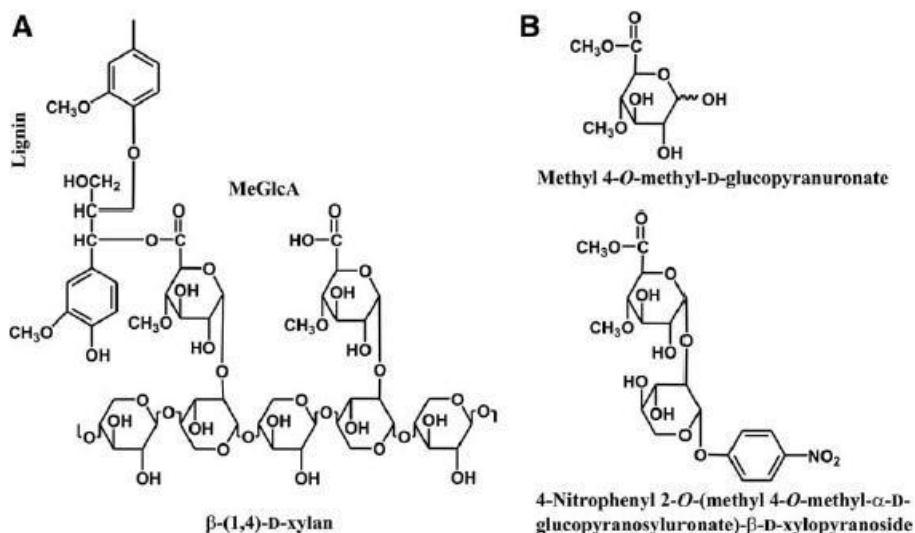
Το 2006 αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από τους Šráníková S. και Biely P. οι εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος. Τα ένζυμα αυτά ανήκουν στην οικογένεια CE 15 και αποικοδομούν τον εστερικό δεσμό μεταξύ του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και των αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης (Šráníková S., Biely P, 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τρεις τύποι δεσμών μεταξύ λιγνίνης και των ημικυτταρινών έχουν ευρέως μελετηθεί στα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα. Ο πρώτος τύπος αφορά τον αιθερικό δεσμό μεταξύ του π-κουμαρικού οξέος ή φερουλικού οξέος και της λιγνίνης τον εστερικό δεσμό τους με τα σάκχαρα της ημικυτταρίνης. Οι φερουλικές εστεράσες διασπούν αυτόν τον τύπο δεσμού. Ο δεύτερος τύπος περιλαμβάνει τους αιθερικούς δεσμούς μεταξύ των ομάδων OH των σακχαριτών και των αλκοολών της λιγνίνης. Ο τρίτος τύπος αφορά τους εστερικούς δεσμούς μεταξύ του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος ή του D-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και των υδροξυλίων των αλκοολών της λιγνίνης (Špráníková S., Biely P, 2006).

Το 2006, οι Špráníková S. και Biely P. ανέφεραν πρώτοι την ύπαρξη μιας εστεράσης που απομονώθηκε από καλλιέργεια του μύκητα *Schizophyllum commune*, η οποία παρουσίασε ενεργότητα σε συνθετικούς εστέρες του 4-O-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος, υποδηλώνοντας πως είναι σε θέση να υδρολύσει τους δεσμούς του τρίτου τύπου μεταξύ λιγνίνης και των ημικυτταρινών. Το νέο αυτό ένζυμο ονομάστηκε εστεράση του γλυκουρονικού οξέος (glucuronoyl esterase) και είναι ικανό να υδρολύει τους μεθυλεστέρες ελεύθερου ή γλυκοζιδικά συνδεδεμένου 4-O-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος. (Špráníková S., Biely P, 2006). Από τη μελέτη του νέου αυτού ενζύμου και την αναζήτηση της έκφρασης του από περισσότερους μικροοργανισμούς προέκυψε μια νέα οικογένεια ενζύμων στη βάση δεδομένων CAZy, οι υδατανθρακικές εστεράσες (CE15, <http://www.cazy.org/fam/CE15.html>) (Špráníková et al, 2007).



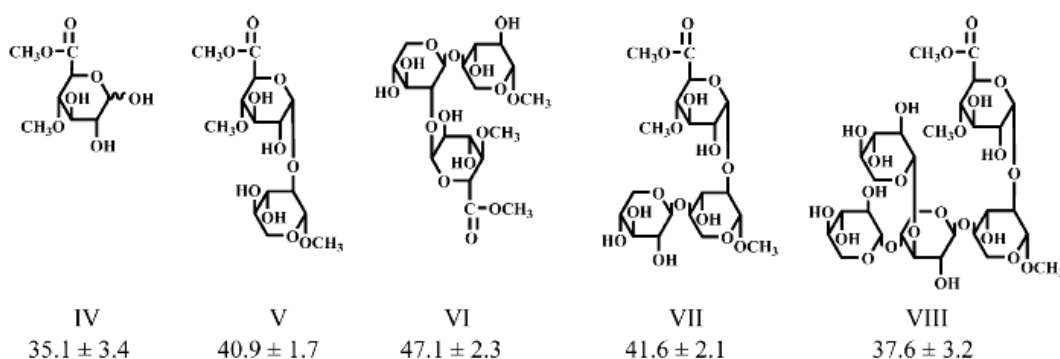
Σχήμα 3.1. (A) Εστερικός δεσμός μεταξύ μονάδων 4-O-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης σε φυτικά κυτταρικά τοιχώματα. (B) Δομές δύο συνθετικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος (Špráníková S., Biely P, 2006).

3.2. ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΙΜΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Η μελέτη των γλυκουρονικών εστερασών, όσο ενδιαφέρον και αν παρουσιάζει για την επιστημονική κοινότητα, δυσχεραίνεται εξαιτίας της έλλειψης των κατάλληλων υποστρωμάτων. Το 2007 βρέθηκε από τους Biely et al ότι η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος είναι ικανή να υδρολύει δύο συνθετικές ενώσεις που μιμούνται τους εστερικούς δεσμούς των συμπλεγμάτων λιγνίνης-υδατάνθρακα, τους εστέρες του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού και D-γλυκουρονικού οξέος με την 3-(4-μεθοξυφαινυλ)προπυλική αλκοόλη. Η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος φάνηκε να αναγνωρίζει το τμήμα του ουρονικού οξέος των υποστρωμάτων περισσότερο από την αλκοόλη, όπως κατέδειξε η σύγκριση μεταξύ των κινητικών της υδρόλυσης των μεθυλεστέρων και της υδρόλυσης των 3-(4 μεθοξυφαινυλ)προπυλεστέρων. Η καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου ήταν αρκετά υψηλότερη στους εστέρες του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος σε σχέση με αυτούς του D-γλυκουρονικού. Η εξέταση της δράσης της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος σε μια σειρά μεθυλεστέρων 4-O-μεθυλ-D-γλυκοπυρανουρονοζυλίου συνδεδεμένων με ξυλόζη και αρκετούς

ξύλοολιγοσακχαρίτες κατέδειξε ότι ο ρυθμός αποεστεροποίησης είναι ανεξάρτητος από τον χαρακτήρα του υδατανθρακικού μέρους γλυκοζυλιωμένο από το 4-0-μεθυλ-ϋ-γλυκουρονικό οξύ. (Šráníková et al, 2007).

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν άλλα συνθετικά υποστρώματα προκειμένου να μετρηθεί η ενεργότητα της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από το μικροοργανισμό *P. chrysosporium* (Đuranová et al, 2009).



Σχήμα 3.2. Συνθετικά υποστρώματα για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της GE με TLC (compound I), HPLC (compound VI) και με τη διαδικασία Hestrin (compounds I – V) (Đuranová et al, 2009).

Σε γενικές γραμμές η απομόνωση, ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός των υποστρωμάτων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και τα περισσότερα από τα αναγνωρισμένα συνθετικά και φυτικά υποστρώματα δεν είναι ακόμα εμπορικά διαθέσιμα. Η χημική σύνθεση τους είναι εφικτή, αλλά αποτελείται από αρκετά στάδια ακόμα και για τα πιο απλά μοντέλα-υποστρώματα, ενώ τα αντισδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση είναι ιδιαίτερα τοξικά.

Πρόσφατα, επιχειρήθηκε ενζυμική σύνθεση κάποιων καινοτόμων υποστρωμάτων με χρήση της λιπάσης B από το μικροοργανισμό *Candida antarctica* (CALB) ως βιοκαταλύτη. Η σύνθεση, που αποσκοπούσε στον χαρακτηρισμό γλυκουρονικών εστερασών, πραγματοποιήθηκε σε ένα βήμα.. Πραγματοποιήθηκε εστεροποίηση κινναμυλικής αλκοόλης, 3-φαινυλ-1-προπανόλης και 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλης επιτρέποντας τη δημιουργία ενός απλού υποστρώματος. Έτσι, διευκολύνθηκε σημαντικά ο χαρακτηρισμός της εξειδίκευσης των γλυκουρονικών εστερασών σχετικά με την αλκοόλη των εστέρων του γλυκουρονικού οξέος

3.3. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Η *StGE2* και η *Cip2_GE* (Pokkuluri et al, 2011) είναι οι μόνες χαρακτηρισμένες εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος για τις οποίες έχει προσδιορισθεί η τρισδιάστατη δομή τους μέχρι σήμερα. Οι δύο πρωτεΐνες, που έχουν χαρακτηριστεί ως εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος, παρουσιάζουν υψηλή δομική ομοιότητα. Φέρουν και οι δύο αναδίπλωση α/β -υδρολασών, με τα β -πτυχωτά φύλλα να είναι μπλεγμένα ανάμεσα σε δύο στρώσεις α -ελίκων. Μία από τις τρεις δισουλφιδικές γέφυρες που παρουσιάζονται βρίσκεται κοντά στο ενεργό κέντρο, με αποτέλεσμα η καταλυτική σχισμή να είναι πιθανώς άκαμπτη και συντηρημένη ανάμεσα σε όλους τους κλάδους εκτός από τον κλάδο B (Charavgi et al, 2012); (Huynh et al, 2018).

Η κρυστάλλωση των δύο ενζύμων φανέρωσε πως το ενεργό τους κέντρο βρίσκεται στην επιφάνεια τους, κάτι που επαληθεύει την τον υποθετικό ρόλο των γλυκουρονικών εστερασών στη φύση που είναι η αποδόμηση μεγάλων πολυμερικών συμπλεγμάτων. (Charavgi et al, 2012). Πολλές εστεράσες μυκητιακής προέλευσης έχουν ένα συντηρημένο καταλυτικό μηχανισμό στον οποίο συμμετέχει η καταλυτική τριάδα Ser213, His346 και Glu236, με αρίθμηση σύμφωνα με το PDB 4G4J και συντηρημένα αμινοξέα πρόσδεσης σακχάρων. Ο μηχανισμός αυτός ωστόσο δεν είναι κοινός για πολλές εστεράσες της οικογένειας 15 από βακτήρια αλλά και μύκητες (De Santi et al, 2017)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. ΥΛΙΚΑ

4.1.1. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Ο ζυμομύκητας *P.pastoris* (Invitrogen) και συγκεκριμένα το μετασηματισμένο του στέλεχος X33 (γονότυπος: φυσικός τύπος, φαινότυπος: methanol utilization plus, Mut+) χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία για την παραγωγή των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 και TlGE15. Ο *P. Pastoris* είναι πολύ ελκυστικός ξενιστής για μερικές πρωτεΐνες. Πρόκειται για μονοκύτταρο μεθυλότροφο μικροοργανισμό και έχει αποτελέσει ευρέως σύστημα ετερόλογης έκφρασης γονιδίων από διάφορους οργανισμούς καθώς χαρακτηρίζεται από τα ειδικά λειτουργικά πλεονεκτήματα των ανώτερων συστημάτων έκφρασης, όπως είναι οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, δηλαδή δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και γλυκοζιλίωση πρωτεϊνών. Είναι ένα εύκολο στη χρήση σύστημα, με υψηλό ρυθμό αύξησης ακόμη και σε θρεπτικά μέσα ιδιαίτερα χαμηλού κόστους. Το φυσικό στέλεχος χαρακτηρίζεται από την ικανότητά του να αναπτύσσεται με τη μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Η μεθανόλη αποτελεί ταυτόχρονα επαγωγέα του υποκινητή *AOX1*, ο οποίος χρησιμοποιείται συνήθως για τον έλεγχο έκφρασης της πρωτεΐνης-στόχου. Πιο συγκεκριμένα, η αλκοολική οξειδάση είναι ένα ένζυμο που κωδικοποιείται από δύο γονίδια, το *AOX1* και το *AOX2*, τα οποία έχουν 97% ομολογία, και καταβολίζει τη μεθανόλη σε φορμαλδεΰδη παρουσία οξυγόνου. Το γονίδιο *AOX1* οδηγεί σε υψηλότερη παραγωγή ενζύμου όταν εκφράζεται, ενώ αντίθετα το *AOX2* οδηγεί σε χαμηλότερη. Σε υψηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης αυξάνονται τα κύτταρα στα οποία υπάρχει έκφραση και των δύο γονιδίων (φαινότυπος Mut+, methanol utilization plus), ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυξάνονται εκείνα στα οποία εκφράζεται μόνο το *AOX2* (φαινότυπος Muts, methanol utilization slow). Με αυτό τον τρόπο υπάρχει η δυνατότητα να παραχθούν αρκετά αυξημένες πυκνότητες κυττάρων. Εάν μάλιστα οι παραγόμενες πρωτεΐνες έχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης μπορεί να επιτευχθεί πραγματικά εντυπωσιακή παραγωγή κατ' όγκο σε αυτές τις καλλιέργειες. Τέλος, η απομόνωση υψηλών συγκεντρώσεων των παραγόμενων ετερόλογων πρωτεϊνών από καλλιέργειες της *P.Pastoris* διευκολύνεται λόγω έκκρισης περιορισμένων ποσοτήτων ενδογενών πρωτεϊνών. (Μουκούλη, 2012) , (Michael L. Shuler, Fikret Kargi, 2005)

4.1.2. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε χρήση χημικών αντιδραστηρίων των εταιριών Applichem (Γερμανία), Fisher Scientific (Η.Π.Α.), LAB-SCAN (Ιρλανδία), Panreac (Ισπανία) και Sigma – Aldrich (Η.Π.Α.) με καθαρότητα αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά είδη προμηθεύτηκαν από τις BOMEX (Κίνα), Eppendorf (Γερμανία), Greiner-Bio One (Γερμανία), ISO LAB (Γερμανία), Millipore (Η.Π.Α.), SCHOTT AG (Γερμανία), SIMAX (Τσεχία), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο) και Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο).

4.1.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΤΗΛΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Τα υλικά χρωματογραφίας ήταν προϊόντα της BioRad (Η.Π.Α.). Τα ένζυμα AeGE15 και TIGE15 απομονώθηκαν με στήλες χρωματογραφίας με Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.). Για την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης C18 Nucleosil (250 mm x 4.6 mm, Macherey –Nagel, Γερμανία). Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) πραγματοποιήθηκε με φύλλα αλουμινίου TLC Silica gel 60 F254 Merck (Γερμανία), ενώ η απομόνωση του εστέρα έγινε με τη στήλη (Ace glass, Η.Π.Α.) silica gel με στατική φάση Silica gel 60 (0.040 – 0.063 mm) της Merck.

4.1.4. ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Η ακινητοποιημένη λιπάση B, Novozym® 435 από το μικροοργανισμό *C. antarctica* (CALB) ήταν χορηγία της Novozymes (Bagsværd, Δανία). Η CALB χρησιμοποιείται σε ευρύ φάσμα εφαρμογών επειδή διαθέτει υψηλή αποδοτικότητα και εκλεκτικότητα. Αντίθετα με τις περισσότερες λιπάσες, η είσοδος στο ενεργό κέντρο της CALB δεν εμφανίζει εμπόδια και δεν παρουσιάζει μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση. Δομικά, είναι ένα μονομερές της οικογένειας των α/β υδρολασών και παριστάνεται από μια κεντρική δομή από οκτώ μεμονωμένα, σχεδόν παράλληλα, συστρεφόμενα β-πτυχωτά φύλλα πλαισιωμένα και από τις δύο πλευρές από α-έλικες..

4.1.5. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ (BUFFERS)

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τις καλλιέργειες της *P.Pastoris* και τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάστηκαν με απιονισμένο νερό και αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min και υπό πίεση 0.1 MPa. Το θρεπτικό μέσο

παρασκευάστηκε με προσθήκη 2% άγαρ. Η γλυκόζη, σε μορφή σκόνης, αποστειρώθηκε ξεχωριστά. Η παρασκευή των διαλυμάτων της χρωματογραφίας έγινε με υπερκάρθρο νερό. ($R=18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$). Η σύσταση των θρεπτικών μέσων παρουσιάζεται στον πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1. Σύσταση χρησιμοποιούμενων θρεπτικών μέσων

| Θρεπτικό Μέσο | Σύσταση |
|---------------------------|--|
| YPD + ζεοσίνη | 1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 2% (w/v) γλυκόζη +100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ζεοσίνη |
| YPD-άγαρ + ζεοσίνη | YPD με 2% (w/v) άγαρ +100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ζεοσίνη |
| BMGY | 1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 100 mM P-Δ φωσφορικών, pH 6.0, 1,34% (w/v) YNB, 4×10^{-5} % (w/v) βιοτίνη, 1% (v/v) γλυκερόλη |
| BMMY | 1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 100 mM P-Δ φωσφορικών, pH 6.0, 1,34% (w/v) YNB, 4×10^{-5} % (w/v) βιοτίνη, 0.5 % (v/v) μεθανόλη |

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία καθώς και η σύστασή τους παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2. Σύσταση χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων

| Ρυθμιστικό διάλυμα | Σύσταση |
|--|---|
| ΡΔ Talon | 0.3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 |
| ΡΔ φωσφορικών | 132 mL K ₂ HPO ₄ 1M, 868 mL KH ₂ PO ₄ 1M, pH 6.0 |
| ΡΔ δείγματος SDS-PAGE (Loading buffer) | 3.55 mL 0.25M Tris Base pH 6.8, 1.8 mL Γλυκερόλη 50% (v/v), 1.8 mL β-Μερκαπτοαιθανόλη, 0.71 gr SDS, 2.85 mL Βρωμοφαινόλη Blue 0.1 % (w/v) |
| ΡΔ ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (running buffer) | 3.03 g/L Tris-base, 14.4 g/L γλυκίνη, 1 g/L SDS, pH 8.3 |

4.1.6. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Ο πίνακας 4.3. περιέχει τις συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στη διπλωματική εργασία.

Πίνακας 4.3. Συσκευές και όργανα.

| |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Sanyo, Osaka, Ιαπωνία) |
| <ul style="list-style-type: none">• Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Shanghai, Κίνα) |
| <ul style="list-style-type: none">• Θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Hamburg, Γερμανία) |
| <ul style="list-style-type: none">• Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες. |
| <ul style="list-style-type: none">• Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα). |
| <ul style="list-style-type: none">• Περισταλτική αντλία Econo Gradient, BioRad (Hercules, CA, Η.Π.Α.) |
| <ul style="list-style-type: none">• Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Berkshire, Ηνωμένο Βασίλειο) |
| <ul style="list-style-type: none">• Συσκευή διήθησης υπό κενό |
| <ul style="list-style-type: none">• Συσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία) |

- Συσκευή υπερδιήθησης διαλυμάτων Stirred Cell Model 8400, 400 mL και μεμβράνες PM-10, Amicon, Millipore, (Η.Π.Α.)
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Direct-Q, Millipore (Merck Millipore, Billerica, MA, Η.Π.Α.)
- Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) Jasco (Ιαπωνία) με αντλία PU 987, φωτομετρικό ανιχνευτή UV 975 και λογισμικό διαχείρισης και καταγραφής Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία)
- Υπερφυγόκεντρος Sorvall[®] RC 28S DuPont (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντρος Beckman[®] Coulter (Brea, CA, Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Φωτόμετρο UV-VIS S-22 (Boeco, Hamburg, Γερμανία)

4.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

4.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Περιγράφεται η παραγωγή και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών AeGE15 και TlGE15 από μετασχηματισμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *P. pastoris* καθώς και ο προσδιορισμός του μοριακού τους βάρους και του ισοηλεκτρικού τους σημείου. Η παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα γονίδια των οποίων έχουν υποκλωνοποιηθεί στο πλασμιδιακό φορέα pPICZαC (Torakas et al., 2010), επάγεται κατά την προσθήκη μεθανόλης στην καλλιέργεια. Η μεθανόλη ενεργοποιεί τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης *AOX*, μέσω του μηχανισμού που αναλύεται στην παράγραφο 4.1.1. και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες οδηγούνται με τη βοήθεια του πεπτιδίου οδηγού, α -factor, από τη ζύμη *S. cerevisiae* προς έκκριση στο υπερκείμενο των κυττάρων, γεγονός που καθιστά εύκολη τη συλλογή και απομόνωσή τους.

Η παραγωγή πραγματοποιήθηκε με υγρές καλλιέργειες των κυττάρων της ζύμης. Η απομόνωση των ενζύμων επιτεύχθηκε με στάδια διηθήσεων, συμπύκνωσης και χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC), ο

προσδιορισμός του μοριακού τους βάρους έγινε με ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και του ισοηλεκτρικού τους σημείου με ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης πήγματος πολυακρυλαμιδίου (IEF-PAGE).

4.2.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

4.2.2.1. ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *P.PASTORIS*

Τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο YPD και ζεοσίνη εμβολιάστηκαν με κύτταρα του μετασχηματισμένου στελέχους X33 της ζύμης *P.pastoris* και επώαστηκαν στους 30 °C για 24 h. Οι αποικίες που σχηματίστηκαν στα τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 300 mL θρεπτικού υλικού BMGY ισόποσα χωρισμένων σε 6 γυάλινες κωνικές φιάλες των 250 mL. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για 16 – 20 h και υπό ανάδευση (200 rpm) σε επωαστήρα ZHWY-211C της Zhicheng (Κίνα). Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση της προκαλλιέργειας για προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας OD_{600nm} σε φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, Labequip (Καναδάς). Από κάθε γυάλινη κωνική φιάλη, έγινε λήψη 100 μL δείγματος. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 900 μL H₂O δηλαδή πραγματοποιήθηκε αραίωση 10 φορές του υγρού της προκαλλιέργειας. Με βάση τις τιμές της οπτικής πυκνότητας υπολογίστηκαν οι όγκοι προκαλλιέργειας που πρέπει να ληφθούν προκειμένου στην κύρια καλλιέργεια να επιτευχθεί OD_{600nm} ίσο με 1.

4.2.2.2. ΚΥΡΙΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *P.PASTORIS*

Οι όγκοι που επιλέχτηκαν φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο Beckman Coulter (Η.Π.Α.), τα κύτταρα συλλέχθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 1 L του θρεπτικού υλικού BMMY ισόποσα χωρισμένο σε 4 γυάλινες κωνικές φιάλες του 1 L.

Τα κύτταρα της ζύμης παρέμειναν για επώαση υπό ανάδευση (200 rpm) σε θερμοκρασία 30 °C για χρονικό διάστημα 5 ημερών με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης 0.5 % (v/v). Επειδή για την ανάπτυξη του ζυμομύκητα *P.pastoris* απαιτείται καλός αερισμός της καλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες μεγάλης χωρητικότητας και πόματα από βαμβάκι.

Οι εκκρινόμενες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, συλλέχθηκαν αρχικά με φυγοκέντριση, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση, συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκείμενου της καλλιέργειας.

4.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

4.2.3.1. ΔΙΗΘΗΣΗ, ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΥΓΡΟΥ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η καλλιέργεια μοιράστηκε ανά 40 mL σε 10 σωλήνες φυγοκέντρησης (50 mL, Falcon) και τοποθετήθηκε στην υπερφυγόκεντρο (14000 rpm, Beckman Coulter, Η.Π.Α.) Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε 3 φορές. Στη συνέχεια το υπερκείμενο της καλλιέργειας συλλέχθηκε, προκειμένου να συμπυκνωθεί και να απομονωθεί η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη από τις υπόλοιπες εκκρινόμενες πρωτεΐνες της ζύμης.

Αρχικά, το υπερκείμενο διηθήθηκε υπό κενό, χρησιμοποιώντας διαδοχικά διηθητικό χαρτί Whatman (Μ. Βρετανία) και φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.8 και 0.2 μm (Supor® 200, PALL Life Sciences) ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κυτταρικά θραύσματα.

Στη συνέχεια, με χρήση της συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 και μεμβράνες PM-10 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.) πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση του διαλύματος πρωτεϊνών. Μόρια μεγαλύτερα από τη διάμετρο των πόρων της μεμβράνης, συγκρατούνται ενώ τα μικρότερα μόρια διαφεύγουν μαζί με το διάλυμα. Στο εσωτερικό της συσκευής παρέμεινε τελικά το συμπυκνωμένο διάλυμα των πρωτεϊνών μοριακού βάρους πάνω από 10 kDa.

4.2.3.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕΤΑΛΛΟΥ (IMAC)

Πρωτεΐνες και πεπτίδια που εμφανίζουν συγγένεια με μεταλλικά ιόντα μπορούν να απομονωθούν χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου. Τα μέταλλα στη στήλη ακινητοποιούνται με τον σχηματισμό χηλικών συμπλόκων (Sulkowski, 1985). Συγκεκριμένα αμινοξέα, όπως η ιστιδίνη και η κυστεΐνη σχηματίζουν σύμπλοκα με τα χηλιωμένα μέταλλα σε ουδέτερο pH και η περιεκτικότητα μιας πρωτεΐνης σε ιστιδίνες ευθύνεται για την πρόσδεση της πρωτεΐνης αυτής σε ένα χηλιωμένο μέταλλο. Το είδος αυτό της χρωματογραφίας είναι εξαιρετικό για τον καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που φέρουν 6 ιστιδίνες καθώς και για πολλές φυσικές πρωτεΐνες. Τα 6 συνεχόμενα κατάλοιπα ιστιδίνης (His-tag) που είχαν προστεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης έχουν την ιδιότητα να προσδένονται σε κατιόντα

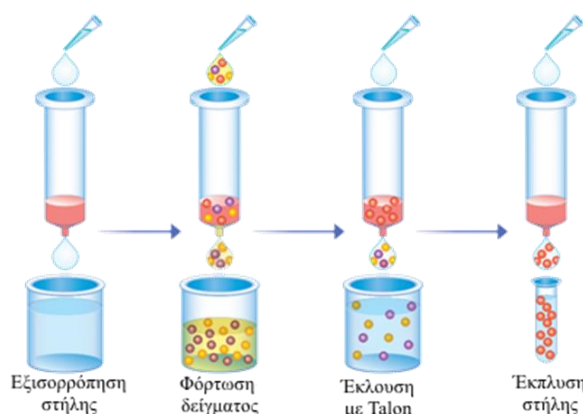
μετάλλου (Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) λόγω της αρνητικής φόρτισης των αμινοξικών καταλοίπων. Πριν από τη χρήση, το υπόστρωμα «φορτίζεται» με διάλυμα ιόντων δισθενών μετάλλων, όπως νικέλιο, ψευδάργυρος, χαλκός, ασβέστιο, κοβάλτιο ή σίδηρος. Η αντίδραση πρόσδεσης με την πρωτεΐνη - στόχο εξαρτάται από το pH και τα μόρια που έχουν προσδεθεί, συνήθως εκκλούνται με ελάττωση του pH και αύξηση της ιοντικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος ή με την προσθήκη EDTA ή ιμιδαζολίου στο ρυθμιστικό διάλυμα.

Αρχικά, το συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό διάλυμα εξισορροπήθηκε με διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl (Talon). Η διαδικασία της διαπίδυσης έγινε με τη χρήση μεμβρανών κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Daltons, Sigma-Aldrich). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης δηλαδή μικρά μόρια διαλύτη δύνανται να διαπερνούν την ημιπερατή μεμβράνη μέχρι αποκατάστασης ισορροπίας στο σύστημα. Η μεμβράνη πριν τη χρήση βυθίστηκε σε βραστό απιονισμένο νερό για περίπου 30 min, ενώ στη συνέχεια έγινε η μεταφορά του διαλύματος των πρωτεϊνών στο 1/3 περίπου του όγκου του σχηματιζόμενου σωλήνα. Το σύστημα παρέμεινε μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου όγκου ($V_{\text{PΔ}} \geq 100 \times V_{\text{διαλ/τος πρωτεϊνών}}$), για 24 h σε θερμοκρασία 4 °C, υπό ήρεμη ανάδευση.

Εν συνεχεία, το πρωτεϊνικό διάλυμα διαβιβάστηκε σε στήλη Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.). Η λειτουργία της στήλης μπορεί να περιγραφεί ως εξής:

- I. Αρχικά η στήλη εξισορροπείται με 200-300 mL ρυθμιστικού διαλύματος Talon με ροή 2.5 mL/ min.
- II. Το μίγμα των πρωτεϊνών φορτώνεται στη στήλη με σταθερή ροή 2 mL/ min.
- III. Ακολουθεί έκπλυση της στήλης με διάλυμα Talon προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες οι οποίες δεν προσδέθηκαν στη στήλη.
- IV. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται η έκλυση των προσδεμένων πρωτεϊνών με προσθήκη διαλύματος Talon παρουσία ιμιδαζολίου, το οποίο ανταγωνίζεται τα κατάλοιπα ιστιδίνης στη μήτρα κοβαλτίου απελευθερώνοντας έτσι τα προσδεμένα μόρια. Η συγκέντρωση του άλατος στην κινητή φάση αυξανόταν σταδιακά (gradient) έως 100mM.

V.Τέλος, η στήλη ξεπλένεται με Talon και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C, βυθισμένη σε διάλυμα EtOH 20 % (v/v).



Εικόνα 4.1: Απεικόνιση βημάτων για τον καθαρισμό πρωτεϊνών με επισύναψη καταλοίπων ιστιδίνης σε His GraviTrap™ TALON (GE Healthcare, 2016).

Τα κλάσματα που περιείχαν την ζητούμενη πρωτεΐνη συλλέχθηκαν και αφαλατώθηκαν με διαπίδυση έναντι ΡΔ 20 mM Tris-HCl pH 8.0. Ο έλεγχος βαθμού καθαρότητας πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE).

Η ρύθμιση της ροής της κινητής φάσης της χρωματογραφίας στα 2 mL/ min έγινε με χρήση της αντλίας Econo Gradient (Biorad, Η.Π.Α.) ενώ για την ανίχνευση των εκλουόμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής UV (280 nm) με λογισμικό καταγραφής Clarity Version 2.3.3.124 (DataApex, Τσεχία). Τα δείγματα συλλέχθηκαν με τον κλασματοσυλλέκτη Waters, Millipore (Η.Π.Α.).

4.2.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΚΑΙ ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και η εμφάνιση των πρωτεϊνών στο πήκτωμα πραγματοποιήθηκε με χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250.

4.2.2.1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου ύστερα από κατεργασία με δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο (SDS) αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού πρωτεϊνών με κριτήριο το μέγεθος τους και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των

πρωτεϊνών. Το πολυακρυλαμίδιο είναι μια χημικά αδρανής ένωση, σταθερή σε μεγάλο εύρος pH, ιονικής ισχύος και θερμοκρασίας. Το πήκτωμα προκύπτει από τον πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου σε μακριές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου καθώς και από τη δημιουργία εγκάρσιων διακλαδώσεων με ομάδες του δι-ακρυλαμιδίου (cross-linking). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται με την παρουσία μιας χημικής ένωσης που παίζει τον ρόλο του καταλύτη, του υπερθειικού αμμωνίου (APS) και ενός ενεργοποιητή ο οποίος καλείται TEMED. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν καθορίζεται και το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος.

Η SDS αποδιατάσσει τα μόρια των πρωτεϊνών μετά από θέρμανση, καθώς εξουδετερώνει τους δευτερεύοντες δεσμούς και συνδέεται με τα πολυπεπτίδια με σταθερό λόγο βάρους. Με τον τρόπο αυτό εξουδετερώνεται το φορτίο του πολυπεπτιδίου, μιας και το ενδογενές φορτίο του μορίου είναι ελάχιστο σε σύγκριση με το αρνητικό φορτίο του συνδεδεμένου SDS. Έτσι, η κινητικότητα των πολυπεπτιδίων είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους.


Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE είναι ασυνεχής καθώς επιτελείται συνήθως σε ένα πολυ-ρυθμιστικό σύστημα (Multi Buffer System, MBS) δια μέσου δύο πηκτωμάτων, με το ένα να επιστοιβάζεται του άλλου. Χρησιμοποιούνται τρία ρυθμιστικά διαλύματα: το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer), το ρυθμιστικό διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβασής (stacking gel) και το ρυθμιστικό διάλυμα του πηκτώματος διαχωρισμού (resolving gel).

Πίνακας 4.4. Σύσταση πηγμάτων διαχωρισμού και επιστοιβασής για την παρασκευή 1 πήγματος για την πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, με όγκους συστατικών για 1 πήγμα (mL).

| Συστατικά | Resolving Gel (mL) | Stacking Gel (mL) |
|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| dH₂O | 1.75 | 1.50 |
| 0.75 M Tris/SDS 0.2% (pH 8.8) | 4.70 | - |
| 0.25 M Tris/SDS 0.2% (pH 6.8) | - | 1.90 |
| 40% bis-acrylamide | 2.90 | 0.38 |

| | | |
|-------------------------|-------|-------|
| TEMED | 0.015 | 0.010 |
| 10 % APS (fresh) | 0.090 | 0.030 |

Η κατεργασία των δειγμάτων έγινε με την προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (loading buffer, 7 μ L) στο πρωτεϊνικό διάλυμα (15 μ L) ενώ ακολούθησε βρασμός του μίγματος για 7 min. Η σύσταση του running buffer και loading buffer περιγράφονται στην παράγραφο 4.1.5.

| | MW, kDa | Πρωτεΐνη | Προέλευση |
|--|---------|--------------------------|------------------------|
|  | 116,0 | β -γαλακτοσιδάση | <i>E. coli</i> |
| | 66,2 | Αλβουμίνη ορού βοδινού | Πλάσμα βοδινού αίματος |
| | 45,0 | Ωαλβουμίνη | Ασπράδι αυγού κότας |
| | 35,0 | Γαλακτική αφυδρογονάση | Μύες χοίρων |
| | 25,0 | REase Bsp98I | <i>E. coli</i> |
| | 18,4 | β -λακτογλοβουλίνη | Γάλα αγελάδος |
| | 14,4 | Λυσοζύμη | Ασπράδι αυγού κότας |

Πίνακας 4.5. Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas)

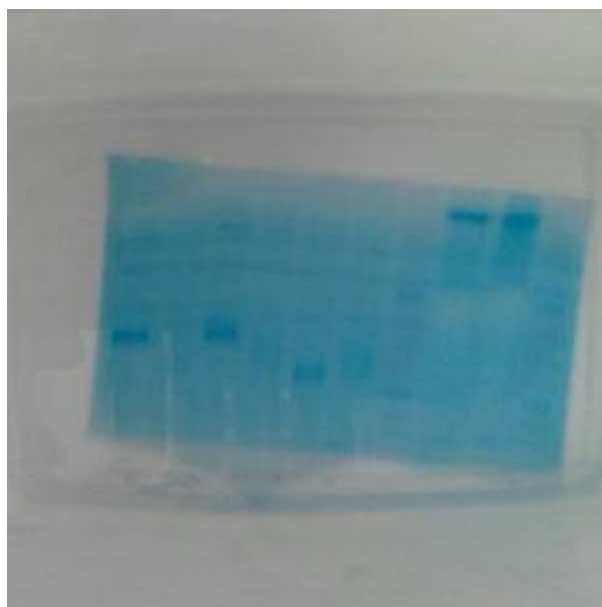
4.2.2.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗΣ ΕΣΤΙΑΣΗΣ ΠΗΓΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Ο προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου (pI) των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών επιτεύχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης ισοηλεκτρικής εστίασης πήγματος πολυακρυλαμιδίου (isoelectric focusing – polyacrylamide gel electrophoresis, IEF PAGE) με τη συσκευή PhastSystem electrophoresis unit (Amersham Biosciences Corp., Σουηδία). Τα πήγματα ήταν προκατασκευασμένα ομογενή πήγματα πολυακρυλαμιδίου (PhastGel IEF, GE Healthcare LS, Little Chalfont, Ηνωμένο Βασίλειο) τα οποία εμπεριέχουν 2 % - 6 % Pharmalyte® ως φέρων αμφολύτη. Ο αμφολύτης Pharmalyte® δημιουργεί σταθερές, γραμμικές βαθμιδώσεις pH με ομοιόμορφη αγωγιμότητα σε όλο το εύρος τιμών pH (3.0-9.0), επιτρέποντας έτσι εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου μεγαλύτερες από 500 V/cm για διαχωρισμούς υψηλής ευκρίνειας. Ως πρότυπο μίγμα πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το Broad pI Kit (GE Healthcare LS, Little Chalfont, Ηνωμένο Βασίλειο) εύρους από 3.5 έως 9.3. Το μίγμα

των πρωτεϊνών περιείχε αμυλογλυκοζιδάση (pI 3.50), παρεμποδιστή της τρυψίνης της σόγιας (pI 4.55), β- λακτογλοβουλίνη Α (pI 5.20), ανθρακική ανυδράση Β βόεια (pI 5.85) και ανθρώπου (pI 6.55) μυογλοβίνη αλόγου (όξινη τιμή pI 6.85 και βασική τιμή pI 7.35), λεκτίνη φακής (όξινη τιμή pI 8.15, ενδιάμεση τιμή pI 8.45 και βασική τιμή pI 8.65) και τρυψινογόνο (pI 9.30).

4.2.2.3 ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΧΡΩΣΤΙΚΗ COOMASSIE BRILLIANT BLUE

Για τη χρώση των πρωτεϊνών, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιήθηκε χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB). Η χρώση των πρωτεϊνών με CBB βασίζεται στην αλληλεπίδραση των όξινων και βασικών ομάδων των αμινοξέων των πρωτεϊνών με τις οργανικές ομάδες των χρωστικών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό χρωματισμένων ζημάτων. Το πήκτωμα μεταφέρθηκε με προσοχή σε διάλυμα χρώσης (staining solution) Coomassie Brilliant Blue G-250 για 20 min και στη συνέχεια εμβαπτίστηκε σε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) μέχρι να γίνουν ευδιάκριτες οι ζώνες των πρωτεϊνών. Το διάλυμα αποχρωματισμού ανανεωνόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα των 20-30 min. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, το πήκτωμα αναδεύονταν σε ειδική συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Orbit LS, Labnet, Ηνωμένο Βασίλειο) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Εικόνα 4.2. Το πήκτωμα σε διάλυμα αποχρωματισμού.

4.2.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των ακατέργαστων ενζυμικών διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου όπως αυτή περιγράφεται από τον Bradford (1976). Η μέθοδος βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής ουσίας Coomassie Brilliant Blue G-250 σε πρωτεΐνες. Η πρόσδεση της βαφής στην πρωτεΐνη προκαλεί μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της βαφής από τα 465 nm στα 595 nm όπου εν τέλει μετριέται η αύξηση της απορρόφησης.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών μορίων πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μήκος κύματος 280 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης μιας καθαρής πρωτεΐνης σε διάλυμα γίνεται με τη βοήθεια του παρακάτω μαθηματικού μοντέλου Beer-Lambert:

$$C_{\frac{mg}{mL}} = \frac{O \cdot D_{280 \text{ nm}} \cdot MW}{\epsilon}$$

Όπου $C_{mg/mL}$: η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε mg/mL

$O \cdot D_{280 \text{ nm}}$: η τιμή της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος

$M.W.$: το μοριακό βάρος του πρωτεϊνικού μορίου όπως αυτό προσδιορίστηκε από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

ϵ : ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας (M^{-1}/cm^{-1}) της πρωτεΐνης, όπως προσδιορίστηκε για κάθε πρωτεΐνη μέσω του εργαλείου ProtParam του ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

4.3. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

4.3.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Περιγράφεται η παραγωγή και ο καθαρισμός του φαινολικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος καθώς και η ταυτοποίησή του. Η παραγωγή του εστέρα πραγματοποιήθηκε με ενζυμική εστεροποίηση με βιοκαταλύτη τη λιπάση Novozym 435 και ο καθαρισμός έγινε με εκχύλιση και χρωματογραφία προσρόφησης με στήλη silica gel.

Η σύνθεση του εστέρα της κινναμικής αλκοόλης (cinnamyl alcohol) με D-γλυκουρονικό οξύ πραγματοποιήθηκε ενζυμικά με τη χρήση της ακινητοποιημένης λιπάσης B, Novozym 435, από τον μικροοργανισμό *C. antarctica* (CALB) όπως περιγράφεται από τους Katsimpouras et al. (Katsimpouras et al, 2014). Η φαινολική αλκοόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η κινναμική αλκοόλη.

4.3.1.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ ΚΙΝΝΑΜΙΚΗΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΜΕ D-ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ

Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL προστίθενται 0.971 g D-γλυκουρονικού οξέος, 0.671 g αλκοόλης B, 0.5 g ενζύμου Novozym 435 και 2.5 g ενεργοποιημένων μοριακών κοσκίων. Προστίθενται επιπλέον 50 mL τριτοταγούς βουτανόλης και η φιάλη μπαίνει σε αναδευόμενο επωαστήριο σε θερμοκρασία 60 °C και 150 rpm για 48 h. Η πρόοδος των αντιδράσεων ελεγχόταν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), σε πλάκες αλουμινίου με επίστρωση silica gel 60 F254 (Merck, Γερμανία), χρησιμοποιώντας διαλύτη ανάπτυξης μίγμα χλωροφορμίου: μεθανόλης: απιονισμένου νερού 65: 15: 2 (v/v/v).

4.3.2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ

4.3.2.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Σε πρώτο στάδιο, το ακινητοποιημένο ένζυμο και τα μοριακά κόσκινα απομακρύνθηκαν μέσω διήθησης με κοινό διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια το διήθημα αραιώθηκε με 100 mL απιονισμένο νερό και ακολούθησε εκχύλιση με 3 x 100 mL διγλωρομεθάνιο (εκχύλιση υγρού-υγρού, liquid-liquid extraction). Μετά από κάθε

εκχύλιση η οργανική φάση συλλέχθηκε και στο συνολικό όγκο προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα άνυδρου θειικού νατρίου (Na_2SO_4) το οποίο λειτουργεί ως αφυδατικός παράγοντας. Ακολούθησε διήθηση για την απομάκρυνση του θειικού νατρίου και το διήθημα, αφού ελέγχθηκε για την ύπαρξη του προϊόντος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό κενό σε περιστροφικό εξατμιστήρα Rotavapor Buchi RE 111 (Buchi, Flawil, Ελβετία) σε θερμοκρασία 30 °C.

Το ξηρό υπόλειμμα διαχωρίστηκε από την ελεύθερη αλκοόλη με χρωματογραφία προσρόφησης. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε στήλη πακεταρισμένη με Silica gel 60 (0.040-0.063 mm) και ως διαλύτης έκλουσης μίγμα οξικού αιθυλεστέρα: μεθανόλης 9:1 (v/v). Ο έλεγχος του διαχωρισμού έγινε ποιοτικά με χρωματογραφία TLC. Για την εύρεση του κατάλληλου συστήματος έκλουσης έγιναν δοκιμές με τη μέθοδο της TLC.

Μετά τη συλλογή των κλασμάτων έγινε ανάλυση για να προσδιοριστεί σε ποια από αυτά υπήρχε η ουσία. Ένας απλός και γρήγορος τρόπος ελέγχου της καθαρότητας των κλασμάτων αποτελεί η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.

4.3.2.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΣΤΗΛΗΣ SILICA GEL

Όπως προαναφέρθηκε η διαδικασία διαχωρισμού του εστέρα από την ελεύθερη αλκοόλη πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία προσρόφησης όπου ο χρόνος διαχωρισμού λόγω του πολύ μικρού μεγέθους σωματιδίων της στατικής φάσης και σε συνδυασμό με την εξαναγκασμένη προώθηση του διαλύτη έκλουσης με πεπιεσμένο αέρα (χρωματογραφία στήλης με πίεση, flash column chromatography) είναι πολύ μικρότερος σε σχέση με τις στήλες όπου ο διαλύτης κινείται μόνο με τη βοήθεια της βαρύτητας. Ο διαλύτης έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα οξικού αιθυλεστέρα: μεθανόλης 9:1 (v/v) και η διάμετρος και το ύψος της στήλης 2.5 cm και 50 cm αντίστοιχα. Η στήλη πρέπει να διαθέτει στο κάτω μέρος της ειδικό πορώδη δίσκο ο οποίος επιτρέπει το πακετάρισμά της.

Αρχικά σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν ποσότητα silica gel 60 (0.040 – 0.063 mm) και κατάλληλη ποσότητα από το διαλύτη έκλουσης και αναδεύτηκαν μέχρι να σχηματιστεί ιλύς. Η στήλη πληρώθηκε με την ιλύ από silica gel και στη συνέχεια προστέθηκε επιπλέον διαλύτης στον οποίο επεβλήθη εξαναγκασμένη ροή υπό την πίεση του αέρα διαμέσου της στατικής φάσης. Η προσθήκη έγινε προσεκτικά

προκειμένου να μην διαταραχθεί η επιφάνεια της στατικής φάσης η οποία δεν πρέπει να αφηθεί να έρθει σε επαφή με τον αέρα. Ακολούθησε συλλογή του διαλύτη σε ποτήρι ζέσεως προκειμένου να επαναχρησιμοποιηθεί. Η στήλη είναι πια έτοιμη όταν η στάθμη του υλικού φτάσει περίπου στα 2/3 του ύψους της και σταματήσει να κατεβαίνει, ενώ το υλικό έχει αποκτήσει μια ημιδιάφανη όψη.

4.3.2.3. ΦΟΡΤΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ, ΛΗΨΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥΣ

Η φόρτωση του δείγματος πραγματοποιείται ως εξής:

- I. Αρχικά αφήνεται να τρέξει ο διαλύτης από τη στήλη μέχρι η στάθμη του να βρίσκεται ακριβώς πάνω από την ελεύθερη επιφάνεια της Silica gel και κλείνεται η στρόφιγγα.
- II. Το ξηρό πια δείγμα στην σφαιρική φιάλη έπειτα από εξάτμιση επαναδιαλύεται σε 1-2 mL του χρησιμοποιούμενου διαλύτη.
- III. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας μια πιπέτα Pasteur προστίθεται προσεκτικά το δείγμα στην ελεύθερη επιφάνεια της Silica gel.
- IV. Η φιάλη ξεπλένεται με 3 x 1 mL φρέσκου διαλύτη και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της φόρτωσης του δείγματος.
- V. Η στρόφιγγα ανοίγει και ο διαλύτης αφήνεται να τρέξει μέχρι το δείγμα να απορροφηθεί από την επιφάνεια της Silica gel.
- VI. Τέλος προστίθεται περισσότερος διαλύτης στη στήλη προσέχοντας να μην διαταραχθεί η ελεύθερη επιφάνεια του υλικού. Η προσθήκη περισσότερου διαλύτη γίνεται όποτε χρειάζεται ώστε η ελεύθερη επιφάνεια να παραμένει βυθισμένη.

Με παροχή αέρα πραγματοποιήθηκε η εξαναγκασμένη ροή του διαλύτη έκλουσης και συλλέχθηκαν τα κλάσματα. Η λήψη των κλασμάτων έγινε σε δοκιμαστικούς σωλήνες 13x120 mm σε περίπου 10 mL όγκο το κάθε κλάσμα. Τα κλάσματα που ελήφθησαν ελέγχθηκαν ποιοτικά για την ύπαρξη του εστέρα με χρωματογραφία TLC και διαλύτη ανάπτυξης μίγμα χλωροφορμίου: μεθανόλης: απιονισμένου νερού 65:15:2 (v/v/v).

Τα κλάσματα τα οποία περιείχαν τον ζητούμενο εστέρα συγκεντρώθηκαν και εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το ξηρό υπόλειμμα συλλέχθηκε ποσοτικά από τη σφαιρική φιάλη με επαναδιάλυση σε ποσότητα –

επαρκή για την πλήρη διαλυτοποίησή του – οξικού αιθυλεστέρα και φυλάχθηκε σε υάλινα φιαλίδια (vials) σε θερμοκρασία 4 °C.

4.3.2.4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) ακολουθεί τις βασικές αρχές της χρωματογραφίας περιλαμβάνοντας τη χρήση μιας λεπτής ροφητικής στοιβάδας, πάχους συνήθως 0.10 με 0.25 mm ως στατική φάση. Η στατική φάση επιστρώνεται με κατάλληλο τρόπο επάνω σε γυαλί, πλαστικό ή αλουμίνιο που αποτελούν το φορέα επίστρωσης. Το γυαλί είναι το δημοφιλέστερο από τα τρία αλλά με το αλουμίνιο και το πλαστικό να προσφέρουν το πλεονέκτημα της ελαστικότητας και του εύκολου κοψίματος χωρίς απώλειες και καταστροφή της επίστρωσης (Wall P.E., 2005). Ως υλικά επίστρωσης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διοξείδιο του πυριτίου (Silica gel), τριοξείδιο του αργιλίου (Alumina), κυτταρίνη σε μορφή σκόνης ή ακόμα και ρητίνες με όξινες ή βασικές ομάδες. Τα υλικά αυτά είναι συνήθως αναμεμιγμένα με μικρή ποσότητα γύψου (10-15%) για καλύτερη προσκόλληση πάνω στο φορέα επίστρωσης. Για τον διαχωρισμό σχετικώς μη πολικών μορίων όπως, υδρογονανθράκων, αιθέρων, αλδεϋδών, κετονών κ.α. ως υλικό επίστρωσης προτιμάται η Alumina, ενώ για τον διαχωρισμό περισσότερο πολικών μορίων όπως, αλκοολών, οξέων, αμινών, κ.α., η Silica gel. Ως διαλύτη ανάπτυξης (κινητή φάση) χρησιμοποιούνται διαλύτες (εξάνιο, τολουόλιο, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη κ.ά.) ή μίγματα διαλυτών (Κορδοπάτης Π. & Μαγκαφά Β., 2005).

Η TLC αποτελεί μια γρήγορη και απλή μέθοδο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τεχνική καθοδήγησης για:

- τον έλεγχο της καθαρότητας μιας ενώσεως (εμφάνιση μιας ή περισσοτέρων κηλίδων σε διαφορετικά χρωματογραφήματα με διαφορετικούς διαλύτες ανάπτυξης) ή της πολυπλοκότητας ενός μίγματος
- τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των εφαρμοζομένων μεθόδων διαχωρισμού και καθαρισμού μιας ενώσεως
- τον καθορισμό των ιδανικών συνθηκών για τον καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος σε μεγάλη κλίμακα (π.χ. με υγρή χρωματογραφία στήλης)
- την ποιοτική μελέτη της πορείας μιας χημικής αντίδρασης και τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών πραγματοποίησεως αυτής για την

ταυτοποίηση φαρμάκων, εκχυλισμάτων φυτών και βιοχημικών παρασκευασμάτων ή για την ανίχνευση νοθειών και μολύνσεων τροφίμων

Η διαδικασία εφαρμογής της TLC έχει ως εξής:

- I. Αρχικά τα φύλλα TLC Silica gel 60 F254 Merck (Γερμανία) κόβονται στις επιθυμητές διαστάσεις ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να φορτωθούν.
- II. Στη συνέχεια, με ένα μολύβι, χαράσσεται η γραμμή βάσης (base line) σε απόσταση 1 cm από τη κάτω πλευρά της πλάκας TLC και σημειώνονται οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων οι οποίες πρέπει να απέχουν περίπου 1-1.5 cm μεταξύ τους αλλά και από τα άκρα.
- III. Σε ειδικό βάζο ανάπτυξης TLC προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύτη έτσι ώστε όταν τοποθετηθεί η πλάκα TLC σε αυτό, η στάθμη του διαλύτη να είναι αρκετά πιο κάτω από την γραμμή βάσης. Το βάζο κλείνεται με καπάκι και αφήνεται μέχρι ο χώρος μέσα σε αυτό να κορεστεί σε ατμούς του διαλύτη. Σε αυτό μπορεί να βοηθήσει η προσθήκη ενός φύλλου διηθητικού χαρτιού το οποίο θα εφάπτεται στα τοιχώματα.
- IV. Τα δείγματα φορτώνονται στις προσημειωμένες θέσεις προσέχοντας η διάμετρος της κηλίδας που σχηματίζεται να είναι όσον το δυνατό μικρότερη. Το φύλλο TLC βυθίζεται ομοιόμορφα στον διαλύτη του βάζου και αφήνεται να ανέβει ο διαλύτης χάριν στις τριχοειδείς δυνάμεις.
- V. Τέλος, όταν ο διαλύτης έχει φτάσει σε ύψος 1 cm περίπου κάτω από το τέλος του φύλλου, αυτό αφαιρείται και σημειώνεται με μια γραμμή το ύψος που έφτασε ο διαλύτης. Αφού εξατμιστεί ο διαλύτης από το φύλλο TLC ακολουθεί η ανίχνευση των κηλίδων.

Για την ανίχνευση και οπτικοποίηση των κηλίδων των δειγμάτων χρησιμοποιούνται:

1. **Φυσικές μέθοδοι**, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (χρησιμοποιούνται ειδικές πλάκες φθορίζουσες στο υπεριώδες φως οπότε στις θέσεις όπου υπάρχει ουσία η οποία απορροφά εμφανίζονται σκούρες κηλίδες) .
2. **Χημικές μέθοδοι**, όπως ο ψεκασμός με ειδικά αντιδραστήρια, όταν οι ουσίες οι οποίες χρωματογραφούνται μπορούν να δώσουν έγχρωμα παράγωγα

με τα αντιδραστήρια αυτά και η έκθεση σε χώρο ο οποίος περιέχει ατμούς ενός αερίου αντιδραστηρίου, π.χ. NH₃, I₂, H₂S.

Η ανίχνευση των σακχάρων πραγματοποιείται με ένα διάλυμα συγκέντρωσης 6.5mM N-(1-Naphthyl)ethylenediamine Dihydrochloride σε μεθανόλη που περιέχει 3% θειικό οξύ (Bounias M., 1980). Το φύλλο TLC διαβρέχεται με τη βαφή και αφήνεται για περίπου 5-10 min στους 100 °C.

4.4. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΗΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

4.4.1. ΔΙΑΤΑΞΗ ΤΗΣ HPLC

Η εμφάνιση της HPLC, που είναι η τεχνολογική εξέλιξη της υγρής χρωματογραφίας στήλης, έγινε στο τέλος της δεκαετίας του '60, κυρίως χάριν στην ανακάλυψη του DNA καθώς ήταν ανάγκη να βρεθεί μια αξιόπιστη και ταχεία τεχνική για τον διαχωρισμό και την ανάλυση των νουκλεοτιδίων στην τάξη των δεκάτων του ng. Η θεωρητική ανάπτυξη της HPLC στηρίχθηκε στις βασικές αρχές της υγρής χρωματογραφίας, ενώ η ανάπτυξη της οργανολογίας της στην αέρια χρωματογραφία (GC), η οποία ήταν η πιο δημοφιλής τεχνική στην δεκαετία του '60 (Παππά Α., 2004).

Τα βασικά τμήματα ενός συστήματος HPLC είναι:

- σύστημα παροχής κινητής φάσεως
- σύστημα εισαγωγής δείγματος,
- στήλη
- ανιχνευτής και
- καταγραφείας

Όταν η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση έχουμε ισοκρατική έκλουση (isocratic elution), ενώ όταν μεταβάλλεται βαθμιαία έχουμε βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution). Για τις ανάγκες του διαχωρισμού του φαινολικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος από τις αντίστοιχες αλκοόλες χρησιμοποιούνται ισοκρατικές συνθήκες.

Το σύστημα παροχής κινητής φάσεως αποτελείται από μία αντλία υψηλής πίεσεως PU 987 Jasco (Ιαπωνία) και ένα σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της

συστάσεως της κινητής φάσεως. Το σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συμπληρώνεται από φωτομετρικό ανιχνευτή UV 975 και λογισμικό διαχείρισης και καταγραφής Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία).

Το σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector) είναι μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσεως, με βρόχο δείγματος. Στη θέση “φορτώσεως” η κινητή φάση προωθείται προς τη στήλη χωρίς να περνά από το βρόχο ο οποίος έχει πληρωθεί με το προς ανάλυση διάλυμα του δείγματος, ενώ στη θέση “εισαγωγής” η κινητή φάση παρασύρει ποσοτικά τον όγκο του δείγματος και τον προωθεί προς τη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος στην βαλβίδα Rheodyne πραγματοποιείται με σύριγγα 250 μL Hamilton (Η.Π.Α.).

4.4.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ

Η κινητή φάση στην HPLC συμμετέχει ενεργά στο διαχωρισμό. Η επιτυχία ενός υγρού χρωματογραφικού διαχωρισμού εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δείγματος, ακίνητης φάσης και διαλύτη έκλουσης. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη έκλουσης γίνεται με βάση τη δύναμη (solvent strength) και την εκλεκτικότητα (selectivity) του διαλύτη. Η δύναμη του διαλύτη θα πρέπει να έχει τέτοια τιμή ώστε τα συστατικά του δείγματος να εκλούνται σε χρόνο διάφορο του νεκρού χρόνου της στήλης.

Στην περίπτωση εκείνη, όπου η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή φάση και τα πολικότερα συστατικά του δείγματος προσκολλώνται ασθενέστερα στην στατική φάση και επομένως εκλούνται γρηγορότερα από τα λιγότερο πολικά συστατικά, η τεχνική ονομάζεται υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσεως (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC). Κατά την RP-HPLC χρησιμοποιούνται υλικά πληρώσεως (κυρίως μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου) με χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις (chemically bonded stationary phases). Τα σωματίδια αυτά είναι συνήθως διαμέτρου 5-10 μm με πόρους 20 nm και διαθέτουν μεγάλη επιφάνεια επαφής στην οποία συνδέονται ομοιοπολικά οι στατικές φάσεις (αλκυλομάδες και άλλες δραστικές ομάδες). Στατικές φάσεις αλκυλομάδων με αλυσίδες C₈H₁₇ (octyl) και C₁₈H₃₇ (octadecyl) δεσμευμένες στη silica είναι ευρέως διαδεδομένες και βρίσκουν εφαρμογές σε διαχωρισμούς αμινοξέων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών, βιταμινών, λιπών, στεροειδών, αντιβιοτικών, νουκλεοτιδίων, σακχάρων

κ.ά. Κατά την RP-HPLC η ισχύς έκλυσης αυξάνει με την παράλληλη μείωση της πολικότητας του διαλύτη, διότι έτσι ελαττώνεται η συγκράτηση μιας ουσίας στη στατική φάση. Στην περίπτωση ουσιών που μπορούν να υποστούν ιονισμό, μια αλλαγή στο pH μπορεί να επηρεάσει την συγκράτηση και την εκλεκτικότητά τους.

Αφού επιλεγεί η κατάλληλη αναλογία του διαλύτη έκλυσης μεθανόλης : νερού έτσι ώστε εστερας και αλκοόλη να εκλύονται σε διαφορετικούς χρόνους, κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς της κινναμικής αλκοόλης, προκειμένου να εξαχθούν οι σχέσεις οι οποίες συνδέουν την επιφάνεια των κορυφών της αλκοόλης με τη συγκέντρωσή της.

4.5. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

4.5.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ

Ο προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας ενζυμικής ενεργότητας για τα ανασυνδυασμένα ένζυμα πραγματοποιήθηκε μέσω μέτρησης της ενεργότητάς τους σε ένα εύρος θερμοκρασιών, συνήθως από 30 °C έως 70 °C, για χρόνο από 15 min έως 30 min. Όσον αφορά στον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος, αυτός πραγματοποιήθηκε με χρήση του εστερα της κινναμικής αλκοόλης με D-γλυκουρονικό οξύ σε εύρος θερμοκρασιών από 10 °C έως 80 °C. Η σταθερότητα των ανασυνδυασμένων ενζύμων προσδιορίστηκε μέσω μέτρησης της εναπομένουσας ενζυμικής ενεργότητας ύστερα από επώαση τους για διαφορετικά χρονικά διαστήματα σε θερμοκρασιακό εύρος από 30 °C έως 70 °C σε ΡΔ κιτρικών-φωσφορικών συγκέντρωσης 0.1 M (pH 5.0) απουσία υποστρώματος.

4.5.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΟΥ PH

Ο προσδιορισμός της βέλτιστης τιμής pH πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των ανασυνδυασμένων ενζύμων σε εύρος τιμών pH από 3.0 έως 6.0, στην βέλτιστη θερμοκρασία για το κάθε ένζυμο.

4.6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΥΛΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

4.6.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΣΤΑΘΕΡΩΝ

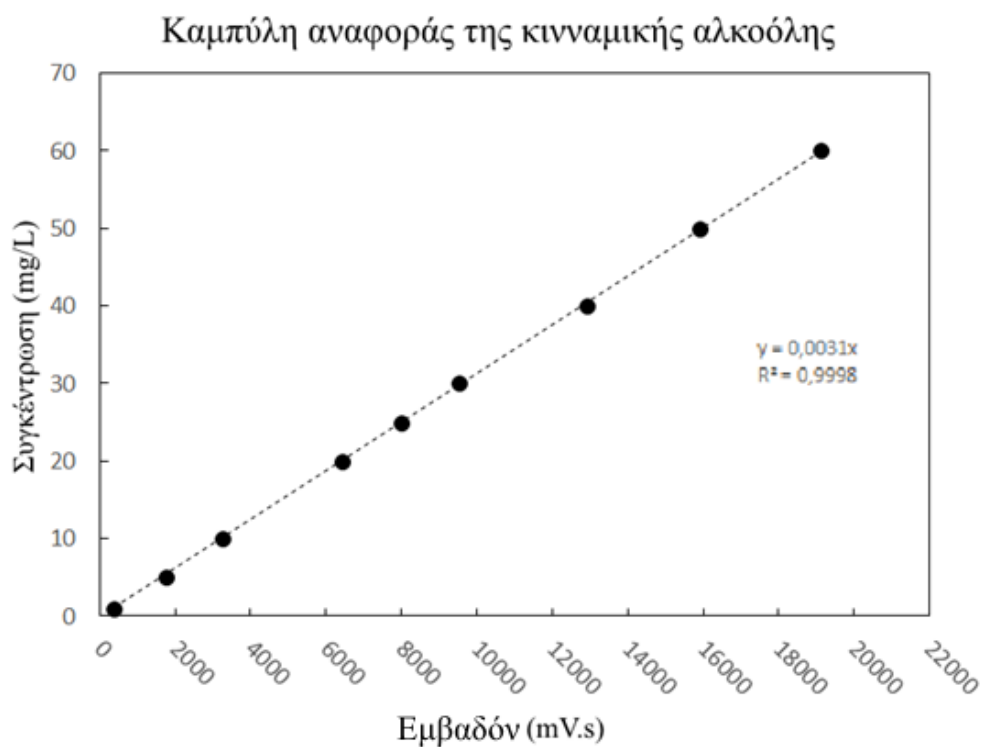
Το πρώτο μαθηματικό μοντέλο για την κινητική μιας ενός-υποστρώματος-ενζύμου καταλυόμενης αντίδρασης αναπτύχθηκε από τον V. C. R. Henry το 1902 και από τους Michaelis και M.L. Menten το 1913. Η κινητική μιας απλής ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης συχνά αναφέρεται ως κινητική Michaelis – Menten ή κινητική κορεσμού (saturation kinetics). Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της ενζυμικής κινητικής είναι παρόμοια με αυτά της κινητικής Langmuir – Hinshelwood. Τα μοντέλα αυτά βασίζονται σε στοιχεία από αντιδραστήρες διαλείποντος έργου με σταθερό όγκο υγρού, στο οποίο οι αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος [S₀], και ενζύμου [E₀], είναι γνωστές. Στα βιολογικά συστήματα λαμβάνουν χώρα περισσότερο πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις ενζύμου- υποστρώματος, όπως πολύ-υποστρωματικές πολυενζυμικές αντιδράσεις.

4.6.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΙΝΝΑΜΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ

Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς έγινε με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων της κινναμικής αλκοόλης σε μεθανόλη. Αρχικά παρασκευάζονται διαλύματα 500 mg/L. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικά σημεία που αντιστοιχούν σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 4.6. Η μέτρηση της αλκοόλης πραγματοποιήθηκε με χρήση συστήματος HPLC (Jasco PU 987) με στήλη αντίστροφης φάσης C18 Nucleosil (250 mm x 4.6 mm, Macherey – Nagel, Γερμανία), ροή 0.4 mL/ min και διαλύτη μίγμα CH₃OH:H₂O 7:3 (v/v) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος . Η αλκοόλη μετρήθηκε φωτομετρικά (Jasco UV 975) στα 250 nm. Η καταγραφή και η ολοκλήρωση των κορυφών των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογισμικό Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία).

Πίνακας 4.6. Οι συγκεντρώσεις της κινναμικής αλκοόλης που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και οι αντίστοιχες περιοχές που μετρήθηκαν μέσω HPLC.

| Concentration (mg/L) | Area (mV.s) |
|----------------------|-------------|
| 1 | 369 |
| 5 | 1751 |
| 10 | 3269 |
| 20 | 6444 |
| 25 | 7997 |
| 30 | 9510 |
| 40 | 12925 |
| 50 | 15893 |
| 60 | 19132 |



Σχήμα 4.1: Καμπύλη αναφοράς για την κινναμική αλκοόλη σε μεθανόλη.

4.6.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του εστέρα στο αρχικό του διάλυμα έγινε χημική υδρόλυση τους με καυστικό νάτριο (NaOH) 0.3 M και μέτρηση της απελευθέρωσης αλκοόλης με HPLC. Η χημική υδρόλυση του εστέρα πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- I. Λαμβάνονται 20 μL εστέρα και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε τρία eppendorf του 1.5 mL με ομαλή διοχέτευση αέρα.
- II. Προστίθενται 500 μL ΡΔ φωσφορικών pH 6 σε κάθε eppendorf και αναδεύονται έντονα σε Vortex μέχρι πλήρους διαλύσεως.
- III. Από τα 500 μL λαμβάνονται 250 μL και τοποθετούνται σε τρία νέα eppendorf τα οποία θα αποτελέσουν τα τυφλά δείγματα (controls).
- IV. Στα eppendorf όπου θα γίνει η χημική υδρόλυση προστίθενται 250 μL NaOH 0.3 M ενώ στα τυφλά προστίθενται 250 μL ΡΔ φωσφορικών.
- V. Όλα τα eppendorf επωάζονται σε Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία) σε θερμοκρασία 30 °C υπό ήπια ανάδευση για 15 min. Σκοπός είναι η πλήρης υδρόλυση του εστέρα.
- VI. Οι αντιδράσεις και τα τυφλά μετρώνται με HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της απελευθέρωσης των αλκοολών με διαλύτη έκλουσης μεθανόλη: νερό 7:3 (v/v), ροή 0.4 mL/min ενώ ο ανιχνευτής UV ρυθμίζεται στα 250 nm για την κινναμική αλκοόλη και τον εστέρα της.
- VII. Η ολοκλήρωση των κορυφών γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία).

Αφού προσδιοριστεί η σχέση μεταβολής των επιφανειών των κορυφών του χρωματογραφήματα μεταξύ εστέρα και αλκοόλης, στη συνέχεια με χρήση των καμπυλών αναφοράς που έχουν ήδη κατασκευαστεί και τις κατάλληλες αναγωγές προσδιορίζεται η συγκέντρωση του εστέρα στο αρχικό του διάλυμα.

4.6.4. ENZYMIKH ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Υπολογίζονται οι ποσότητες που πρέπει να ληφθούν από τα αρχικά διαλύματα του εστέρα για την επίτευξη των επιθυμητών συγκεντρώσεων σε αντιδράσεις των 500 μL για τα κινητικά πειράματα.

- I. Αρχικά λαμβάνονται οι κατάλληλες ποσότητες του εστέρα και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε erpendorf του 1.5 mL με ομαλή διοχέτευση αέρα.
- II. Προστίθενται 470 μL ΡΔ φωσφορικών pH 6 και ακολουθεί έντονη ανάδευση σε Vortex μέχρι ο εστέρας να διαλυθεί πλήρως.
- III. Στη συνέχεια, λαμβάνονται 235 μL και τοποθετούνται σε νέα erpendorf τα οποία θα αποτελέσουν τα τυφλά δείγματα (controls).
- IV. Στα erpendorf όπου θα γίνει η ενζυμική υδρόλυση προστίθενται 15 μL ενζύμου AeGE15 και T/GE15 ενώ στα τυφλά προστίθενται 15 μL ΡΔ φωσφορικών.
- V. Όλα τα erpendorf επωάζονται σε Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία) σε θερμοκρασία 50 $^{\circ}\text{C}$ υπό ανάδευση (750 rpm) για 30 min.
- VI. Ο τερματισμός των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με 50 μL HCl 6 M για τον εστέρα της αλκοόλης C. Δοκιμή τερματισμού της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε και με βρασμό των δειγμάτων για 7 min.
- VII. Οι αντιδράσεις και τα τυφλά μετρώνται με HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της απελευθέρωσης της αλκοόλης με διαλύτη έκλυσης μεθανόλη : νερό 7:3 (v/v), ροή 0.4 mL/ min ενώ ο ανιχνευτής UV ρυθμίζεται στα 250 nm για την αλκοόλη B και τον εστέρα της.
- VIII. Η ολοκλήρωση των κορυφών γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία).

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την υδρόλυση του φαινυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος, υπολογίστηκαν οι σταθερές Michaelis-Menten K_m και k_{cat} , καθώς και ο λόγος k_{cat} / K_m ο οποίος αποτελεί ένδειξη για την προτίμηση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα.

4.7 ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε χρήση αρκετών υπολογιστικών εργαλείων, προγραμμάτων και αλγορίθμων. Μέσω του εργαλείου **Translate** (<https://web.expasy.org/translate/>) γίνεται μετάφραση των αλληλουχιών κωδικονίων σε αμινοξική αλληλουχία. Το **SignalP 4.1** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) προβλέπει το μήκος του πεπτιδίου σήματος της αμινοξικής αλληλουχίας. Με χρήση του **ProtParam** (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) γίνεται πρόβλεψη, για την αμινοξική αλληλουχία χωρίς πεπτίδιο σήματος, του μήκους των γονιδίων και των θεωρητικών τιμών pI, MW και παράγοντα ε. Το **ClustalW2** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>) επιτυγχάνει πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών και αναγνώριση ομόλογων περιοχών τους. Η μορφοποίηση και παρουσίαση των αποτελεσμάτων του **ClustalW2** έλαβε χώρα μέσω του **EsPript 3.0** (<http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>). Για την εύρεση πιθανών θέσεων N γλυκοζυλίωσης χρησιμοποιήθηκε το **NetNGlyc** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), ενώ οι θέσεις πιθανής O-γλυκοζυλίωσης εντοπίστηκαν με χρήση του **NetOGlyc** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). Τέλος, ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων των εστερασών έγινε μέσω του Graphpad Prism 7 της Graphpad Software.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το 2006 αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Šráníková S. και Biely P. μια εστεράση που ήταν σε θέση να υδρολύει τον εστερικό δεσμό μεταξύ των μονάδων του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και των αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης. Η γλυκουρονική αυτή εστεράση, που προήλθε από τον μύκητα *Schizophyllum commune*, ανήκει σε μια νέα οικογένεια ενζύμων στην βάση δεδομένων CAZY, την οικογένεια CE 15 (Šráníková S., Biely P, 2006).

Στην CAZY είναι πλέον καταγεγραμμένες 249 γλυκουρονικές εστεράσες της οικογένειας 15 εκ των οποίων 23 προέρχονται από μύκητες. Συνολικά έχουν χαρακτηριστεί 14 εστεράσες και έχουν ενεργότητα σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα. Από τις 14 αυτές εστεράσες, οι 6 προέρχονται από βασιδιομύκητες και οι 8 από ασκομύκητες. Παρόλο που η πιθανή εφαρμογή τους για ενισχυμένη ενζυμική αποικοδόμηση της βιομάζας και σύνθεση χρήσιμων χημικών τις καθιστά ελκυστικούς στόχους έρευνας για βιοτεχνολογικές εφαρμογές, η δυσκολία καθαρισμού των φυσικών κλασμάτων των συμπλεγμάτων λιγνίνης-υδατανθράκων δυσχεραίνει τον χαρακτηρισμό των γλυκουρονικών εστερασών από μύκητες. Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζονται οι υποθετικές (futative) γλυκουρονικές εστεράσες AeGE15 και TlGE15 που προέρχονται από τους μύκητες *A. elegans* και *T. ljubarskyi* αντίστοιχα.

Οι βασιδιομύκητες λευκής σήψης *A. elegans* και *T. ljubarskyi* που περιγράφονται στις παραγράφους 2.1.1-2, παρουσιάζουν ερευνητικό ενδιαφέρον σε ότι αφορά το ενζυμικό τους δυναμικό που σχετίζεται με την αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης. Το αξιοσημείωτο λιγνινοκυτταρινολυτικό δυναμικό των μυκήτων αυτών τους καθιστά σημαντική πηγή καινούριων λιγνινολυτικών ενζύμων με πιθανά καινούριες ιδιότητες, μεταξύ αυτών και ένα πλήθος εξωκυτταρικών πρωτεϊνών που εκφράζονται όταν ο οργανισμός αναπτύσσεται σε λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα. Ανάμεσα σε αυτά περιλαμβάνεται και μια πρωτεΐνη που αντιστοιχεί στο Model ID 369508. Η αμινοξική αλληλουχία αυτή εμφανίζει ομοιότητα με γνωστές γλυκουρονικές εστεράσες μυκήτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του υπολογιστικού εργαλείου BLAST της Clustal Omega η πρωτεΐνη φέρει σημαντική ομοιότητα με αυτήν της αντίστοιχης GE του βασιδιομύκητα *T. ljubarskyi* (80 %). Η

βιοπληροφορική ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας δείχνει μια μικρή ομοιότητα με άλλες χαρακτηρισμένες γλυκουρονικές εστεράσες τα αποτελέσματα της οποίας εμφανίζονται στον πίνακα 5.1. Η υποθετική εστεράση εμφανίζει ταυτότητα αμινοξικής αλληλουχίας σε εύρος 47-80 % και ομοιότητα σε 64-89 %. Υψηλότερη ομολογία βρέθηκε ανάμεσα στις εστεράσες που προέρχονται από τη συνομοταξία των βασιδιομυκήτων (αμινοξική ταυτότητα 64-80 %) και λιγότερο σε σχέση με αυτές που προέρχονται από τη συνομοταξία των ασκομυκήτων (αμινοξική ταυτότητα 47-53 %).

Το γονίδιο 369508 επιλέχθηκε για ετερόλογη έκφραση στη ζύμη *P.pastoris* σκοπό τη μελέτη των ιδιοτήτων του. Η βιοπληροφορική ανάλυση του γονιδίου και της αμινοξικής ακολουθίας πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των εργαλείων που αναφέρονται στο Κεφάλαιο 3.8.

5.2. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ

Το γονίδιο που προέρχεται από τον βασιδιομύκητα *A. elegans* περιέχει 4 εσώνια (58, 57, 59 και 49 bp) στο wild type.

ATGAGATTTCCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCC
AGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACT
CAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGG
TTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGA
GAAAAGAGAGGCTGAAGCTCAGGCTGCTGAAATGGGGCCAATGCGGTGGCATAGGTTGGAAGG
GCGCAACTTCCTGTGTCAGTGGCACGATATGTA CTGTAATCAATAGTTAT TACTCACAATGC
TTACCCGGAAGTGCTTCCTCCGCTCCTGCTTC CGCAAGTGCTCCCGCTACGTCAGCCCCTGC
TTCCCCTCCA ACTACGACGGCTGCTCCAGCCCCTACGGGCCCTGCAGGAGCCTGTAGTACAC
CCTCTACCATCTCCGGCTTTTTCAAATGCTAAAT TACCCAATCCCTTTTTGTTCGCTGACGGT
AGTGACGTGAAGAGTGCTTCAGACTGGGAATGTCGTAGGGCTCAAATACTGGCATTGGTCCA
AGGATACGAAGGTGGTGA ACTGCCTGGAAAACCATCTACCCTAACAGCATCATTTTCAGGCT
CAGGTACATCTGGCACTTTAAGTATCACCGCTTCTAACGGCGGTGCCTCAATAAATTTTGCA
CCTAAGATAACCTTTCCTTCCGGAAATCCACCTGAAGGAGGATGGCCTCTACTTATAGTATA
TGAAGGTCTTTCTATTCCTGTGCCATCCGGAATCGCCACTTTAATTTATAGTAACTCAGACA
TGGCCCAACAGAATGACGCTAGTACTTCACGTGGCGTCCGGCTTATTCTACA ACTTATATGGC
AAAACCGCCACGGCCTCCGCTATGACAGCTTGGGCTTGGGGCGTGAGTAGGATCATCGACGC
ACTAGAGCAAACACCTGCTGCTAAGATCAACATGGCAAGGATCGGTGTGACGGGTTGTAGTC
GTAACGGAAAGGGCGCTTTGGTGGCTGGTGC ACTAGAACCACGTGTGGCCTTGACCTTACCA
CAAGAATCAGGTTCCGGTGGTGATGCTTGTGGAGACTGTCCAAGTTTGAGCAAGATCAAGG

ATCTGTCGTGCAAACAGCAACTGAAATTGTAACGGAGAATGTCTGGTTCTCCACCGCTTTCG
CTAATTACGTGAATACACTAGATGTCCTACCATACGATCACCATCTGTTGGCAGCCTTAGTT
GCTCCAAGAGGAATGATAAGTTTCGAAAACACAGACTACGTCTGGTTGAGTCCTTTGAGTAG
TTTTGGTTGCATGACGGCTGCTCACAGTGTCTGGGAAGCATTTGGGCGCAGCTGATCACCACG
GTTTTGAGCAAGTCGGCGGTCACGCCATTGTGCCTGGCCAGCTAGTCTTACGCCTATGCTA
AACGCCTTCTTCGACAAGTTTTTTATTGGGCCAGAATGTTAGTACGAATTTTTTTAGTACGAA
CAACCAGTTCAACGGCGTAACTTGAACGCTAACCAGTGGATAGACTGGTCAACACCCACTC
TTAACCC**TCTAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCAT**
CATCATCATCATTGA

Εικόνα 5.1: Το γονίδιο 369508 όπως απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *A.Elegans*, με κωδικόνια βελτιστοποιημένα για έκφραση σε *P.pastoris*. Με γκρι χρώμα σημειώνονται τα εσόνια στην αλληλουχία. Με κίτρινο χρώμα αναπαρίσταται το τμήμα της πολυιστιδίνης. Οι υπογραμμισμένες ακολουθίες αντιστοιχούν στα σημεία του γονιδίου για τα οποία σχεδιάστηκε το πεπτίδιο σήματος, a-factor. Στο τέλος της αλληλουχίας παρατηρείται το κωδικόνιο λήξης.

Το γονίδιο που προέρχεται από τον *T. ljubarskyi* αποτελείται από τέσσερα εσώνια στο wild type.

ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCT
GCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTC
ATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAAC
AGCACAAATAACGGGTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAA
GAAGAAGGGGTATCT CTCGAGAAAAGAGAGGGTGAAGCT CAGTCACAAGCACAAAGAG
TGGGGTCAATGTGGTGGTATAGGTTGGACTGGACCCACGTCCTGCGTTTTCAGGCACT
GTCTGTACGGTAATCAATTCTATTATTACAGTGCCTACCCGGTGCTGCCTCATCA
GCCCCGCTTCTACATCCACTATAACCAGTCACCACACCATCATCACCCGCCTCTCCT
CCCACCACGTCCGCACCAGCACCAACAGGCCCCGCGCTTCATGTGCTACTCCAGCT
ACCATCCCTAATTACTCCAATACTAAATTACCAAATCCTTTCTTGTTCGATGACGGA
ACTCCCGTGAAGACCGCAGCTGACTGGGAGTGTGTCGTGCCCCAAATAAATGCCCTT
ATCCAGGGTTACGAAGCAGGTGCTCTTCTGGCAAGCCCTCATCCGTTTTCCGCCAG
TTTAGTAAGTCAGGAACTCAGGGCACGTTATCCATAACCGTTTTCAAACGCAGGCAA
TCCATTAATTCGCCCAACTGTAACTTTCCCCTCCGGCAACCCACCAGCCGGTGGT
TGGCCCCTAGTTATCGCATACTGACTCCCTATCCATTCCCGTTCCCTCCAACATAGCT
GTAATGATTTACTCCAATAGTGCAATGGCACAACAGAACGATCAGTCTTCACGTGGC
GTGGGTCTTTTCTATAATCTATTTCGGTTCTAGTGCAACAGCCTCCGCTATGACAGCC
TGGGCTTGGGGCGTCAGTAGAATTATTGATGCTTTGGAACAGACACCATCTGCTCAG
ATCAACACCCGTAGGATCGCAGTAACGGGTGCAGTCGTGATGGCAAGGGCGCTTTA
ATGGCAGGAGCCCTGGAACCAAGAATCGCATTACTATCCCCAAGAATCTGGCTCA
GGCGGTGACGCTTGTGGAGGTTATCCAAATACGAGCAGGATCAGGGTAGTGTAGTA
CAGACTGCCACAGAAAAGTACTGAAAATGTCTGGTTCTCTACTAACTTTGCCAAT
TACGTGAATAACCTGTCCGTCTTGCCTTACGATCACCATTTATTAGCTGCCATGATC
GCCCCACGTCCCATGATTTCTTTCGAAAATACAGACTATGTATGGCTTTCTCCCCTA
AGTTCCCTTCGGCTGTATGACGGCTGCTCACACCGTATGGGATGCCCTGGGAGTAGCA
GATAGGCACGGCTTCGAACAGATCGGCGGCCACGCACATTGTGCATGGCCAACATCT
TTATCTCCCCAACTAAATGCTTTCTTCGATAGATTTCTGCTGGATCAAAATGTCAAT
ACTTCATACTTTGCTTCTAACATGGTCTTCAATGGCGTCACTTGGAAATCAGGCACAG
TGGATTGACTGGACGACTCCTAAATTGACG CC CTAGAACAAAACTCATCTCAGAA
GAGGATCTGAATAGCGCCGTGCACCATCATCATCATCATCATTGA

Εικόνα 5.2: Το γονίδιο 369508 όπως απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *T. ljubarskyi*, με κωδικόνια βελτιστοποιημένα για έκφραση σε *P.pastoris*. Με γκρι χρώμα σημειώνονται τα εσόνια στην αλληλουχία. Με κίτρινο χρώμα αναπαρίσταται το τμήμα της πολυιστιδίνης. Οι υπογραμμισμένες ακολουθίες αντιστοιχούν στα σημεία του γονιδίου για τα οποία σχεδιάστηκε το πεπτίδιο σήματος, a-factor. Στο τέλος της αλληλουχίας παρατηρείται το κωδικόνιο λήξης.

Το γονίδιο απομονώθηκε από το γονιδιακό DNA του *A.Elegans* και *T. ljubarskyi* με χρήση των κατάλληλων εκκινητών. Με γαλάζιο χρώμα και στις δύο εικόνες σημειώνονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *XhoI* και *XbaI* αντίστοιχα, οι οποίες προστέθηκαν προκειμένου να διευκολυνθεί η περαιτέρω κλωνοποίηση του γονιδίου στους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς.

Η αλληλουχία του γονιδίου μεταφράζεται στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης με χρήση του εργαλείου ExPasy Translate (<https://web.expasy.org/translate/>) το οποίο μετατρέπει την αλληλουχία των κωδικονίων στα αντίστοιχα αμινοξέα. Στη συνέχεια με χρήση του SignalP 4.1 Server της DTU Bioinformatics (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) προβλέπεται το μήκος του πεπτιδίου σήματος.

QAAEWGQCGGIGWKGATSCVSGTICTVINSYYSQCLPGSASSAPASASAPATSAPASPTTT
AAPAPTGPAGACSTPSTISGFNSAKLPNPFLLFADGSDVKSASDWECRRAQILALVQGYEGGE
LPGKPSTLTASFSGSGTSGTLSITASNGGASINFAPKITFPSPGNPPEGGWPLLIVYEGLSIP
VPSGIATLIYSNSDMAQQNDASTSRGVGLFYNLYGKTATASAMTAWAWGVSRIIDALEQTPA
AKINMARIGVTGCSRNGKALVAGALEPRVALTLPQESGSGGDACWRLSKFEQDQGSVVQTA
TEIVTENVWFSTAFANYVNTLDVLPYDHLLAALVAPRGMISFENTDYVWLSPLSSFGCMTA
AHSVWEALGAADHHGFEQVGGHAHCAWPASLTPMLNAFFDKFLLGQNVSTNFFSTNNQFNGV
TWNANQWIDWSTPTLN

Εικόνα 5.3: Αμινοξική αλληλουχία του γονιδίου 369508 που απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *A.elegans*. Με πορτοκαλί χρώμα σημειώνεται η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο πεπτίδιο έκκρισης, όπως αυτό προβλέφθηκε από τον αλγόριθμο SignalP.

QSQAQEWGQCGGIGWTGPTSCVSGTVCTVINSYYSQCLPGAASSAPASTSTIPVTTTPSSPAS
PPTTSAPARTGPAASCATPATIPNYSNTKLPNPFLLFDDGTPVKTAADWECRRAQINALIQGY
EAGALPGKPSVSAQFSKSGTQGTLSITVSNAGKSINFAPTVTFPSGNPPAGGWPLVIAYDS
LSIPVPSNIAVMIYSNSAMAQQNDQSSRGVGLFYNFLFGSSATASAMTAWAWGVSRIIDALEQ
TPSAQINTRRIAIVTGCSDRGKALMAGALEPRIALTIPQESGSGGDACWRLSKYEQDQGSVV
QTATEIVTENVWFSTNFANYVNNLSVLPYDHHLLAAMIAPRPMISFENTDYVWLSPLSSFGC
MTAAHTVWDALGVADRHGFQIGGHAHCAWPTSLSPQLNAFFDRFLLDQNVNTSYFASNMF
NGVTWNQAQWIDWTTPKLT

Εικόνα 5.4: Αμινοξική αλληλουχία του γονιδίου 369508 που απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *T. ljubarskyi*. Με πορτοκαλί χρώμα σημειώνεται η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο πεπτιδίο έκκρισης, όπως αυτό προβλέφθηκε από τον αλγόριθμο SignalP.

Όπως φαίνεται και στις παραπάνω εικόνες 5.3-4, η ώριμη αμινοξική αλληλουχία που προήλθε από τον *A. elegans*, μετά την αφαίρεση του πεπτιδίου έκκρισης, αποτελείται από 414 αμινοξέα, τα οποία αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος 43050.03 Da σύμφωνα με την πρόβλεψη του αλγορίθμου ExPASy ProtParan του ExPASy server. Με τον ίδιο αλγόριθμο υπολογίστηκε και το θεωρητικό pI της πρωτεΐνης, 5.09.

Αντίστοιχα, η ώριμη αμινοξική αλληλουχία που προήλθε από τον *T. ljubarskyi*, μετά την αφαίρεση του πεπτιδίου έκκρισης, αποτελείται από 415 αμινοξέα, τα οποία αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος 43908.16 Da σύμφωνα με την πρόβλεψη του αλγορίθμου ExPASy ProtParan του ExPASy server. Με τον ίδιο αλγόριθμο υπολογίστηκε και το θεωρητικό pI της πρωτεΐνης, 5.48.

5.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ

Η σύγκριση μεταξύ των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των υποθετικών εστερασών του γλυκουρονικού οξέος (GEs), *AeGE15* και *TlGE15* και άλλων 11 χαρακτηρισμένων GEs

της οικογένειας CE15 από διάφορους μικροοργανισμούς γίνεται με BLAST μέσω του εργαλείου Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>). Επιλέγεται ευθυγράμμιση πολλαπλών αλληλουχιών. Η απεικόνιση έγινε μέσω του ESPript3.0 (<http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 5.1.

Myceliophthora thermophila StGE2

1 10 20 30 40 50 $\alpha 1$

Myce... APMNHIFERQDTCSVSDNYFPTVNSAKLDFDFITFAS...GEKFTTKDQFBCKRAEINKLI
 Artolenzites_elegans...PAGACSTPSTISGFSNARLDFDFLDFAD...GSDVKVSASDWBCKRAQILALV
 Trametes_ljubarski...PAASATPAPTIPNYSNTRLDFDFLDFD...GTPVKTAADWCKRASQILALI
 Schizophyllum_commune...QDCTPATVSGYSNSALDFDFLDFD...GSPVTTAEDWCKRASQILALI
 Cip2_Trichoderma_reesei...PASSTGAGGATCSALPGLITLRSNARLDFDFLDFD...GDKVITTKDKFCKRAEIMSELI
 Neurospora_crassa...APASQIFER...QCSVA.GNYPTAAVSRKDFDFLDFD...GQKLTTKADDFCKRAEIKSIL
 Phanerochaete_carnosa...PQTSSKEAQSFCCSTPANTIP.FNDDKLEDFDFLDFD...GTPVRSLSLTDWSCRQQLASLI
 Podospora_anserina_PaGE1...PVVTNPPVNPNGTCNPSTPSGITPVANQLNDFDFLDFD...GNKVTSKADWACKRQREISELL
 Aspergillus_fumigatus_AfGE1...CPSLPSSPQLQSIITLDFDFLDFD...GTRVSTLSDWCKRQSHISELL
 Cerrena_unicolor...SAPTGSSPVVAGACGAIASVTPNYNNARLDFDFLDFD...GTALRTKADWCKRASQILALI
 Wolfiporia_cocos_WcGE1...LPFSQVVPRAACATPSTVPGYNNDRLEDFDFLDFD...GTAVTSSADWCKRASQIAAVV
 Phanerochaete_chrysosporium_pcge1...SVPTCS.SVASLIPGFSNARLDFDFLDFD...GSPVQSKADFTCKRQQILALI
 Phanerochaete_chrysosporium_pcge2...RPSSEHEARSLEFCSTPSTNIP.FNDDKLEDFDFLDFD...GSPVRSFADWCKRQQLSALI

Myceliophthora thermophila StGE2

60 70 80 90 100 $\beta 1$ $\beta 2$ $\beta 3$

Myce... QYEEGEPYPPDSVEASLSGN...SITVRVT.VGSKSISFASIRKPS.G.AGPFPA
 Artolenzites_elegans...QYEEGELPGRPSTLTASFSGSTSGTSLITAS.NGGA.SINFAPKITFP.SGNPPEGGWPL
 Trametes_ljubarski...QYEEGALPGRPSSVSAQFSKSGTQGLSITVS.NAGK.SINFAPTVT.FPSGNPPAGGWPL
 Schizophyllum_commune...QYEEGALPGRPSSVTAFTASGN...SLSVQVS.YGGK.SIFNNSITP.SGTAPAEGWPV
 Cip2_Trichoderma_reesei...QYEEGTLPPGRPSTLTASFSGGN...LTLINC.G.EAGK.SIFVTITP.SSG..TAPYPA
 Neurospora_crassa...QYEEGCTYPGRPKVEGSLSGN...LTLVRIT.VGSQTVS.FASIKK.PSSG..SGPFP
 Phanerochaete_carnosa...QYEEGTLPPGRPPIVTSFSPQGLTGNLTVTAGFP.G.NTTF.FSPVT.FPNGTVPTEGWPL
 Podospora_anserina_PaGE1...QYEEGTLPPGRPSSVTAFTASGN...SITVRVT.VGSKSISFASIRKPS.G.AGPFPA
 Aspergillus_fumigatus_AfGE1...QYEEGTLPPGRPSSVTAFTASGN...SITVRVT.VGSKSISFASIRKPS.G.AGPFPA
 Cerrena_unicolor...QYEEGTLPPGRPSSVTAFTASGN...SITVRVT.VGSKSISFASIRKPS.G.AGPFPA
 Wolfiporia_cocos_WcGE1...QYEEGTLPPGRPSSVTAFTASGN...SITVRVT.VGSKSISFASIRKPS.G.AGPFPA
 Phanerochaete_chrysosporium_pcge1...QYEEGTLPPGRPSSVTAFTASGN...SITVRVT.VGSKSISFASIRKPS.G.AGPFPA
 Phanerochaete_chrysosporium_pcge2...QYEEGTLPPGRPSSVTAFTASGN...SITVRVT.VGSKSISFASIRKPS.G.AGPFPA

Myceliophthora thermophila StGE2

110 120 130 140 150 160 $\beta 4$ $\beta 5$ $\alpha 2$ $\eta 1$ $\alpha 3$

Myce... IIGTG...GASLIPPSNVAITTFNNDPFGAQMG.SSRGQGRFYDLFGKRDHSA.GSLTAWAW
 Artolenzites_elegans...LIVYE...GLSPVPSGIALLIYSNSDMAQQNDAST.SSRVGLFYNYLKTATASAMTAWAW
 Trametes_ljubarski...VIAYD...FSPSPVPSNVAITTFNNDPFAQQSGT.SSRGQGRFYDLFGKRDHSA.GSLTAWAW
 Schizophyllum_commune...IIAYE...FSPSPVPSNVAITTFNNDPFAQQSGT.SSRVGLFYNYLGHNATASAMTAWAW
 Cip2_Trichoderma_reesei...IIGYG...CGSLPPAGVAMINFNNDNIAAQVNT.GSRGQGRFYDLFGKRDHSA.GSLTAWAW
 Neurospora_crassa...IIGTG...GLSPVPSNVAITTFNNDPFAQQSGT.SSRGQGRFYDLFGKRDHSA.GSLTAWAW
 Phanerochaete_carnosa...IIAYS...GLSPVPSNVAITTFNNDPFAQQSGT.SSRVGLFYNYLGHNATASAMTAWAW
 Podospora_anserina_PaGE1...IINFGTF...GASLIPPSNVAITTFNNDPFAQQSGT.SSRGQGRFYDLFGKRDHSA.GSLTAWAW
 Aspergillus_fumigatus_AfGE1...MIAYG...GLSPVPSNVAITTFNNDPFAQQSGT.SSRVGLFYNYLGHNATASAMTAWAW
 Cerrena_unicolor...IIAYE...FSPSPVPSNVAITTFNNDPFAQQSGT.SSRVGLFYNYLGHNATASAMTAWAW
 Wolfiporia_cocos_WcGE1...VIAYD...GLSPVPSNVAITTFNNDPFAQQSGT.SSRVGLFYNYLGHNATASAMTAWAW
 Phanerochaete_chrysosporium_pcge1...VIAYE...GLSPVPSNVAITTFNNDPFAQQSGT.SSRVGLFYNYLGHNATASAMTAWAW
 Phanerochaete_chrysosporium_pcge2...VIAYG...GLSPVPSNVAITTFNNDPFAQQSGT.SSRVGLFYNYLGHNATASAMTAWAW

Myceliophthora thermophila StGE2

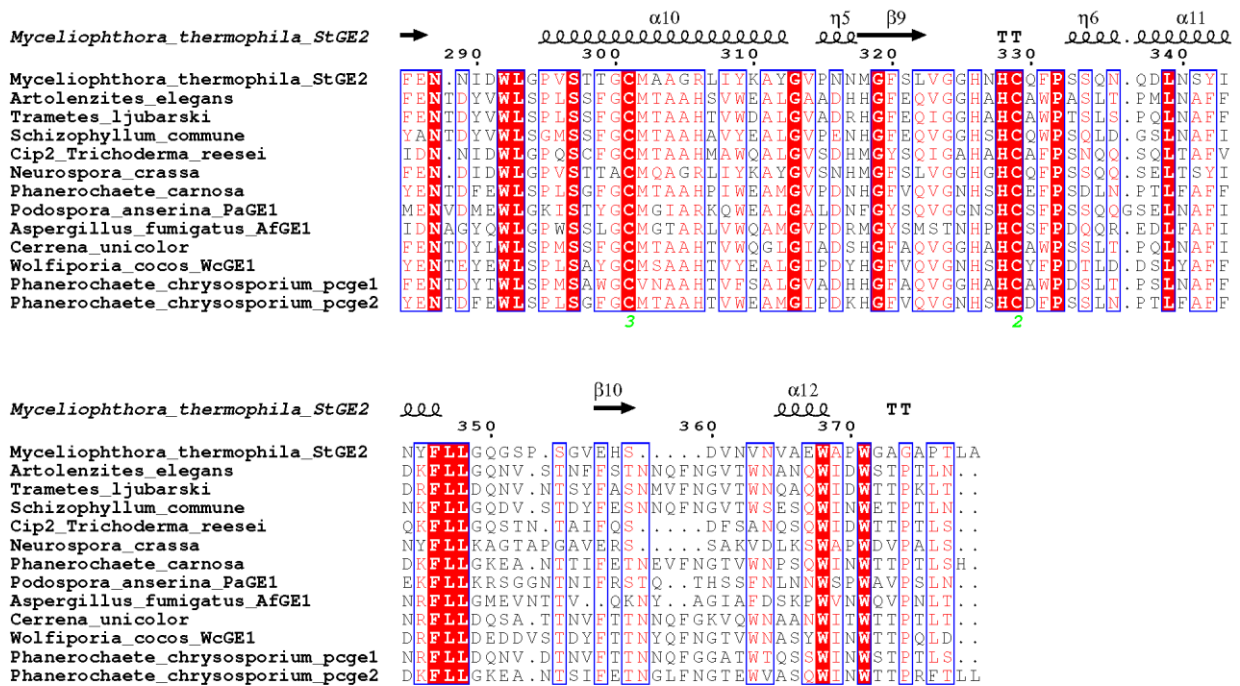
170 180 190 200 210 220 $\alpha 4$ $\alpha 5$ $\beta 6$ $\alpha 6$ $\beta 7$

Myce... GVDRLIDGLEQVGAQAASGIDTKRLGVTGCSRNGKGAIFITGALVDRIALTLPQESGAGGAA
 Artolenzites_elegans...GVSRIIDALEQTPA..AKINMARI.GVTGCSRNGKCALVAGALEFRIVALTLPQESGGCDA
 Trametes_ljubarski...GVSRIIDALEQTPS..AQINTRRIV.GVTGCSRNGKCALMAGALEFRIVALTLPQESGGCDA
 Schizophyllum_commune...GVSRIIDALESTFD..AKLNPAAV.GVTGCSRNGKCALMAGALEFRIVALTLPQESGGCDA
 Cip2_Trichoderma_reesei...GVSRIIDALELVFG..ARIDTKKI.GVTGCSRNGKCALMAGALEFRIVALTLPQESGGCDA
 Neurospora_crassa...GVDRLIDALEQVQS.TSGIDPKRLGVTGCSRNGKCAFVAGALEFRIVALTLPQESGAGGAA
 Phanerochaete_carnosa...GVSRIIDALEVTFP..AHVNTAKI.GVTGCSRNGKCALMAGALEFRIVALTLPQESGGCDA
 Podospora_anserina_PaGE1...GVSRIIDALELITQA.QTGLDPTRLGVTGCSRNGKCALVAGALEFRIVALTLPQESGAGGAA
 Aspergillus_fumigatus_AfGE1...ATSLIIDRLAETFA..ARINTSRI.GVTGCSRNGKCALVAGALEFRIVALTLPQESGTCGSG
 Cerrena_unicolor...GVSRIIDALEMTFT..AQINTQRI.GVTGCSRNGKCALMAGALEFRIVALTLPQESGGCDA
 Wolfiporia_cocos_WcGE1...GVSRIIDALELTFP..ANINTAKI.GVTGCSRNGKCALMAGALEFRIVALTLPQESGGCDA
 Phanerochaete_chrysosporium_pcge1...GVSRIIDALEKTFP..AQINTQRI.GVTGCSRNGKCALMAGALEFRIVALTLPQESGGCDA
 Phanerochaete_chrysosporium_pcge2...GLSRIIDSLVTFP..AHINTAKI.GVTGCSRNGKCALMAGALEFRIVALTLPQESGGCDA

Myceliophthora thermophila StGE2

230 240 250 260 270 280 $\alpha 7$ $\alpha 8$ $\eta 2$ $\eta 3$ $\eta 4$ $\alpha 9$ $\beta 8$

Myce... CWRLSDQKKAAGANITQTAALITENWFPSRNFDPHVNSITSVDPDHHLLAALIVPRGLAV
 Artolenzites_elegans...CWRLSKFEQDQGSVQTATBIVTENWFPSAFANYVNTLDVLPDHHLLAALVAPRGMIS
 Trametes_ljubarski...CWRLSKFEQDQGSVQTATBIVTENWFPSAFANYVNNLSVLPDHHLLAAMIAPRPMIS
 Schizophyllum_commune...CWRLSDYEEQQGSVQTATBIVTENWFPSAGFDQYVNNLSDVLPDHHLLAALVAPRGLIS
 Cip2_Trichoderma_reesei...CWRLSDYLKSKGANITQTAASEITGEDPWFSFTFNSYVNVQVLPDHHLLAALVAPRGLFV
 Neurospora_crassa...CWRLSDDEKSAKGNITQTAASQIVTENWFPSAFNAYTRQNTLPDHHLLAALVAPRGLIA
 Phanerochaete_carnosa...CWRLSKFEQDQGSVQTATBIVTENWFPSAFNAYVFNISVLPDHHLLAAGLIAPRPMIS
 Podospora_anserina_PaGE1...CWRLATWQKNQNVQDSTIVQENWFPSAFNAYVNVNQVLPDHHLLAAGLIAPRPLIV
 Aspergillus_fumigatus_AfGE1...CWRLAAASEGAPQNVQTAGVIVQENWFPSAFNAYANDEDRLPDHHLLAAGLIAPRGLIS
 Cerrena_unicolor...CWRLSKYEIDNGQNVQDABVIVQENWFPSAFNAYVQKLPVLPDHHLLAAMVAPRPMIS
 Wolfiporia_cocos_WcGE1...CWRLSKYEQDQGSVQQTATBIVTENWFPSAFNAYVNNLSVLPDHHLLAAMVAPRPLIS
 Phanerochaete_chrysosporium_pcge1...CWRLSKAESDQGVQQTATBIVTENWFPSAFNAYVNNLSVLPDHHLLAALVAPRPLIS
 Phanerochaete_chrysosporium_pcge2...CWRLSKFEQDQGSVQQTATBIVQENWFPSAFNAYVFNISVLPDHHLLAALVAPRPLIS



Σχήμα 5.1: Σύγκριση πρωτοταγούς δομής εστερασών του γλυκουρονικού οξέος από μύκητες. Η παρουσιαζόμενη δευτεροταγής δομή αντιστοιχεί στη γλυκουρονική εστεράση από το *M. Thermophila*, όπου τα β-πτυχωτά φύλλα και οι α-έλικες απεικονίζονται ως βέλη και σπείρες, αντίστοιχα. Τα πανομοιότυπα αμινοξέα απεικονίζονται λευκά σε κόκκινο πλαίσιο, ενώ τα όμοια απεικονίζονται κόκκινα. Τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας βρίσκονται στις θέσεις 195, 218 και 328. Οι συντηρημένες αλληλουχίες που τα περιέχουν καταλαμβάνουν τις περιοχές 191-201, 216-223 και 328-329. Οι κυστεΐνες που αναμένεται να σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς υποδεικνύονται από αριθμούς πράσινου χρώματος.

Η πυρηνόφιλη σερίνη που περιέχεται στην αλληλουχία G-C-S-R-X-G από 193-198 φαίνεται πως είναι ισχυρά συντηρημένη σε όλες τις πρωτεΐνες. Το 2010 έγινε για πρώτη φορά ταυτοποίηση της συγκεκριμένης αλληλουχίας έπειτα από μελέτη τριών χαρακτηρισμένων γλυκουρονικών εστερασών από τους μύκητες *T. reesei* (*Cip2*), *S. thermophile* (*StGE2*) και *P. Chrysosporium* και ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών τους με άλλες υποθετικές γλυκουρονικές εστεράσες (Torakas et al, P, 2010). Η ευθυγράμμιση των 13 γλυκουρονικών εστερασών δείχνει πως η αλληλουχία της σερίνης συντηρείται ως V-T-G-C-S-R-X-G-K-G-A, από 191-201. Οι δομές των πρωτεϊνών για τις οποίες έχει επιτευχθεί κρυστάλλωση, *StGE2* και *Cip2*, υποδεικνύουν ότι η καταλυτική τριάδα των ενζύμων αποτελείται επίσης από ένα γλουταμινικό οξύ (E) και μια ιστιδίνη (H). Η ίδια υπόθεση επαληθεύεται από μελέτες πρόσδεσης της *StGE2* με συνθετικά υποστρώματα, (Katsimpouras et al,

2014) Οι αλληλουχίες τους είναι οι P-Q-E-S-G και H-C (Σχήμα 5.1). Προκύπτει έτσι ότι τα αμινοξέα S-H-E στις θέσεις 195, 218 και 328 αποτελούν την καταλυτική τριάδα των γλυκουρονικών εστερασών, τουλάχιστον αυτών μυκητιακής προέλευσης. Οι συντηρημένες αλληλουχίες που τα περιέχουν καταλαμβάνουν τις περιοχές 191-201, 216-223 και 328-329.

Στο Σχήμα 5.1. φαίνονται οι κυστεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών. Οι C194 και C329 σχηματίζουν ένα δισουλφιδικό δεσμό φέρνοντας κοντά τα καταλυτικά S και H. Επιπλέον, ακόμα δύο ζεύγη κυστεϊνών C (C13-C47 και C226-C301) είναι ισχυρά συντηρημένα σε όλες τις χαρακτηρισμένες γλυκουρονικές εστεράσες από μύκητες και αναμένεται να σχηματίζουν δεσμούς. Οι δεσμοί αυτοί μέσω αναδίπλωσης φέρνουν κοντά την καταλυτική τριάδα και την εκθέτουν στην επιφάνεια του ενζύμου, ώστε να είναι σε θέση να διασπάσει τους δεσμούς μεταξύ ογκωδών ομάδων της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Από την *StGE1* που έχει κρυσταλλωθεί φαίνεται πως η σταθερότητα της καταλυτικής περιοχής διατηρείται από ένα δισουλφιδικό δεσμό στην είσοδο του ενεργού κέντρου. (Charavgi et al, 2012). Οι (Huynhet al, 2018) απέδειξαν ότι το συντηρημένο αμινοξικό κατάλοιπο λυσίνη, η οποία βρίσκεται στην συντηρημένη αλληλουχία V-T-G-C-S-R-X-G-K-G-A, παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση της μεθυλομάδας του υποστρώματος από το ένζυμο συμμετέχοντας στη δημιουργία δεσμών Van der Waals με αυτή.

Η σύγκριση μεταξύ των 13 γλυκουρονικών εστερασών παρουσιάζεται με μεγαλύτερη ευκρίνεια στον πίνακα 5.1. Η υποθετική εστεράση *AeGE15* εμφανίζει ταυτότητα αμινοξικής αλληλουχίας σε εύρος 47-80 % και ομοιότητα σε 64-89 %. Για την *TIGE15* επιδεικνύεται υψηλή αμινοξική ταυτότητα έως και 80 % με την *AeGE15* και 74 % με την χαρακτηρισμένη γλυκουρονική εστεράση από τον *P. Chrysosporium*. Υψηλότερη ομολογία διακρίνεται μεταξύ των προερχόμενων από βασιδιομύκητες εστερασών, με αμινοξική ταυτότητα 64-80 % και λιγότερη σε σχέση με τις προερχόμενες από ασκομύκητες, με αμινοξική ταυτότητα 47-53 %.

Πίνακας 5.1: Τιμές ταυτότητας και ομοιότητας μεταξύ των πρωτοταγών δομών των υποθετικών *AeGE15* και *TlGE15* και άλλων χαρακτηρισμένων γλυκουρονικών εστερασών.

| Εστεράση του γλυκουρονικού οξέος | Ταυτότητα % <i>AeGE15</i> | Ομοιότητα % <i>AeGE15</i> | Ταυτότητα % <i>TlGE15</i> | Ομοιότητα % <i>TlGE15</i> |
|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Artolenzites elegans (<i>AeGE15</i>) | - | - | 80 | 89 |
| Aspergillus fumigatus (<i>AfGE1</i>) | 49 | 64 | 49 | 64 |
| Cerrena unicolor (<i>CuGE</i>) | 69 | 80 | 70 | 81 |
| Myceliophthora thermophile (<i>StGE2</i>) | 45 | 63 | 46 | 63 |
| Neurospora crassa (<i>NcGE</i>) | 47 | 64 | 45 | 64 |
| Phanerochaete carnosae (strain HHB-10118-sp) | 64 | 77 | 65 | 80 |
| Phanerochaete chrysosporium (<i>pcge1</i>) | 73 | 84 | 74 | 86 |
| Phanerochaete chrysosporium (<i>pcge2</i>) | 66 | 78 | 67 | 83 |
| Podospira anserina (<i>PaGE1</i>) | 51 | 68 | 49 | 67 |
| Schizophyllum commune (<i>ScGE</i>) | 68 | 81 | 66 | 80 |
| Trametes ljubarskyi (<i>TlGE15</i>) | 80 | 89 | - | - |
| Trichoderma reesei (<i>Cip2</i>) | 53 | 70 | 52 | 68 |
| Wolfiporia cocos (<i>WcGE1</i>) | 65 | 81 | 69 | 82 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ AeGE15 ΚΑΙ TIGE1

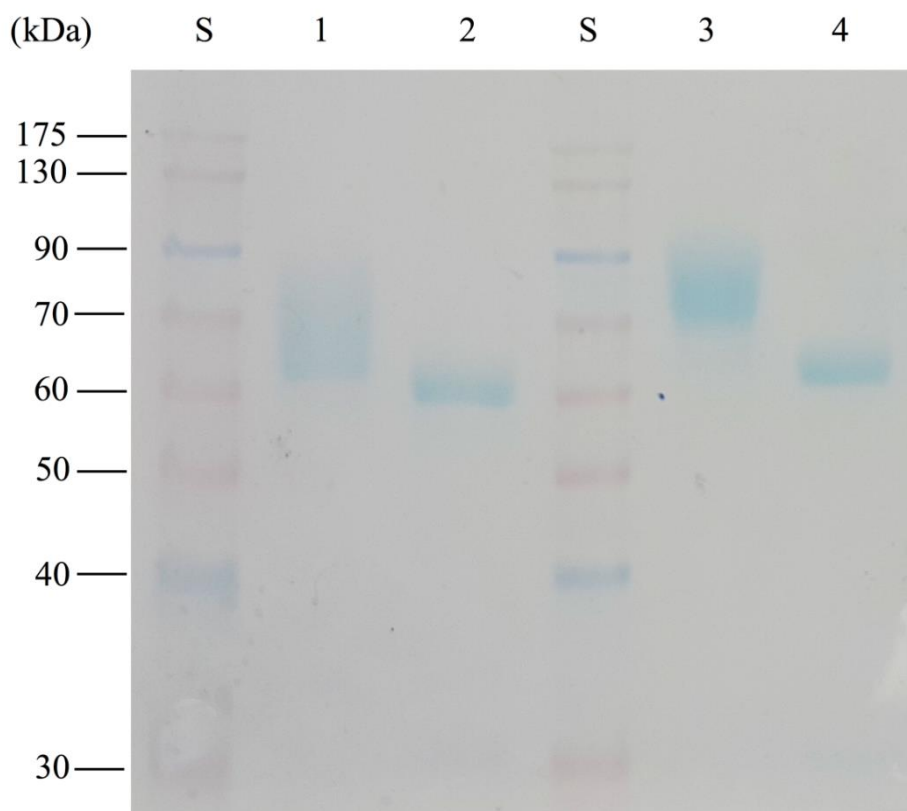
6.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Για την παραγωγή των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 και TIGE15 αρχικά εμβολιάστηκαν τρυβλία με κύτταρα του μετασχηματισμένου στελέχους X33 της ζύμης *P.pastoris* και οι αποικίες που σχηματίστηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή προκαλλιέργειών. Οι προκαλλιέργειες επώαστηκαν για περίπου 20 h και στη συνέχεια τα κύτταρα της ζύμης παρέμειναν για επώαση στις κύριες καλλιέργειες για χρονικό διάστημα 5 ημερών σε θερμοκρασία 30 °C.

Οι ανασυνδυασμένες εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 και TIGE15 απομονώθηκαν από το υγρό καλλιέργειας με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC).

Η παρασκευή τόσο των προκαλλιέργειών όσο και των κύριων καλλιέργειών καθώς και τα στάδια καθαρισμού και απομόνωσης περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 4.2. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, καθώς και ο βαθμός καθαρότητας που προέκυψε από τη διαδικασία καθαρισμού της, προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Η εμφάνιση των ζωνών πραγματοποιήθηκε με χρώση Coomassie Brilliant Blue G-250.

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 5.1 το μοριακό βάρος της ανασυνδυασμένης εστεράσης AeGE15 προσδιορίστηκε στα 63 kDa που είναι μεγαλύτερο από τη θεωρητική τιμή η οποία υπολογίστηκε με τη βοήθεια του εργαλείου ProtParam μέσω του διακομιστή ExPASy (45550 Da; Gasteiger et al., 2005) συνυπολογίζοντας την παρουσία του επιτόπου myc και της επισήμανσης πολυιστιδίνης (His-tag), η οποία συνεισφέρει 2.5 kDa στο συνολικό μοριακό βάρος της AeGE15. Αντίστοιχα το μοριακό βάρος της ανασυνδυασμένης εστεράσης TIGE15 προσδιορίστηκε στα 70 kDa που είναι μεγαλύτερο από τη θεωρητική τιμή η οποία υπολογίστηκε με τη βοήθεια του ProtParam.



Σχήμα 6.1: SDS-PAGE των *AeGE15* και *TIGE15*. Στήλες: (S) Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas), (1) *AeGE15* μετά από πλήρη καθαρισμό, (2) *AeGE15* μετά από πλήρη καθαρισμό και χρήση EndoH, (3) *TIGE15* μετά από πλήρη καθαρισμό, (4) *TIGE15* μετά από πλήρη καθαρισμό και χρήση EndoH.

Οι διαφορές μεταξύ του πειραματικά υπολογιζόμενου μοριακού βάρους και της θεωρητικής τιμής του για τις δυο εστεράσες οφείλεται στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που δέχονται και συγκεκριμένα σε πιθανή N και O γλυκοζυλίωση. Για τον υπολογισμό του αριθμού των θέσεων γλυκοζυλίωσης χρησιμοποιήθηκαν τα εργαλεία NetNGlyc 1.0 Server και NetOGlyc 4.0 Server που προβλέπουν τις θέσεις της N και O γλυκοζυλίωσης αντίστοιχα. Έπειτα από ανάλυση των δυο αλληλουχιών, προέκυψε πως και τα δυο ένζυμα φέρουν μια θέση N γλυκοζυλίωσης, ενώ η *AeGE15* έχει 19 θέσεις και η *TIGE15* έχει 22 θέσεις O γλυκοζυλίωσης.

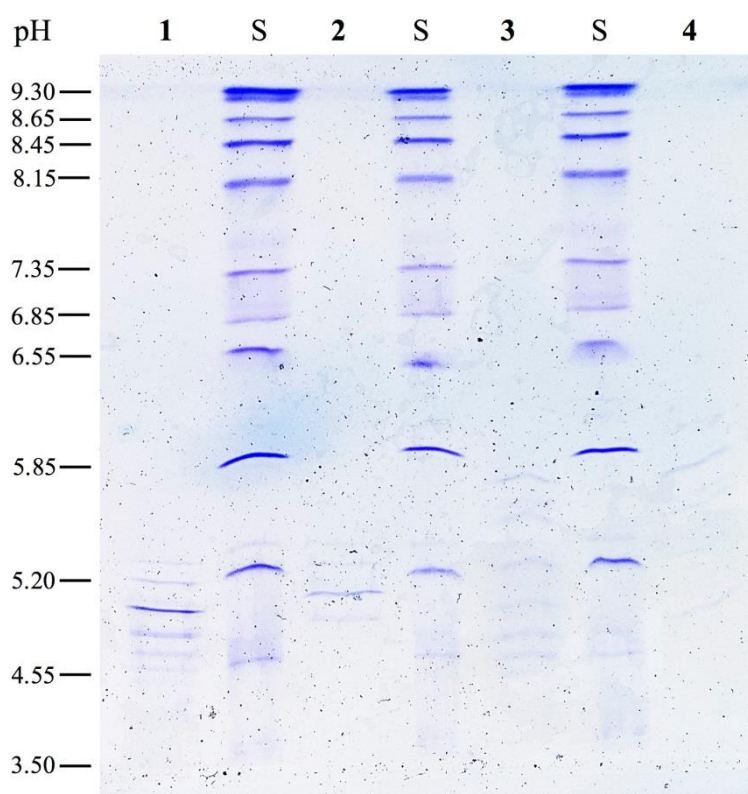
Προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι προβλέψεις των αλγορίθμων, οι καθαρές πρωτεΐνες *AeGE15* και *TIGE15* επώαστηκαν με ενδογλυκοζιδάση H (endo H) προκειμένου να απομακρυνθεί η N-γλυκοζυλίωση. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 6.1., η καθαρή πρωτεΐνη *TIGE15* μετά την πέψη με ενδογλυκοζιδάση H εμφανίζεται

σε αρκετά χαμηλότερο μοριακό βάρος που αντιστοιχεί περίπου στα 63 kDa, δηλαδή αρκετά πιο κοντά στο θεωρητικό μοριακό της βάρος. Η AeGE15 εμφανίζεται σε ελαφρώς χαμηλότερο μοριακό βάρος, από τα 63 kDa στα 61 kDa. Άρα φαίνεται ότι η θολή ζώνη που εμφανίστηκε στην αρχική ηλεκτροφόρηση, καθώς και το αυξημένο μοριακό βάρος της TIGE15, οφείλονται κατά κύριο λόγο στην προσθήκη μεγάλων σακχαρικών ομάδων στις θέσεις N γλυκοζυλίωσης του ενζύμου. Ο βαθμός και η έκταση της γλυκοζυλίωσης διαφέρει πιθανόν μεταξύ της φυσικής πρωτεΐνης και της ετερόλογης. Άλλωστε, είναι γνωστό ότι οι ζύμες που χρησιμοποιούνται για μελέτες ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών, όπως η *P. pastoris* και η *S. cerevisiae*, γλυκοζυλιώνουν τις παραγόμενες πρωτεΐνες με πολύ διαφορετικό τρόπο από τους φυσικούς ξενιστές τους, κάτι που εξαρτάται από το μηχανισμό Golgi του κυττάρου. Η γλυκοζυλίωση μπορεί να διαφέρει ακόμα και ανάμεσα σε κύτταρα του ίδιου πληθυσμού (Daly et al., 2005), γεγονός που, σε συνδυασμό με τον αριθμό των προβλεπόμενων θέσεων γλυκοζυλίωσης για την TIGE15, μπορεί να εξηγήσει την εμφάνιση της θολής ζώνης που εμφανίστηκε στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

Μεγάλο μέρος της O γλυκοζυλίωσης γίνεται συνήθως πάνω σε ένα πεπτίδιο συνδέτη (linker peptide) το οποίο διαθέτουν οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και συνδέει μεταξύ τους το CBM1 και την καταλυτική μονάδα. CBM της οικογένειας 1 συναντώνται στις κυτταρινάσες και στις ημικυτταρινάσες και βοηθούν την πρόσδεση του ενζύμου στην επιφάνεια του αδιάλυτου υποστρώματος. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι οι μονάδες CBM1 μπορούν να συμβάλλουν στην ενίσχυση των φαινομένων συνεργιτισμού κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρίνης (Inoue et al., 2015). Ο συνδέτης συνδέει την καταλυτική μονάδα με τη μονάδα CBM, επιτρέποντας όμως μια περιορισμένη κίνηση. Η αμινοξική αλληλουχία του συνδέτη διαφέρει ως προς τη σύσταση σε αμινοξέα και δεν περιέχει συντηρημένες περιοχές. Ωστόσο, συνήθως παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε προλίνη, θρεονίνη και σερίνη (Sammond et al., 2012). Οι συνδέτες των δύο ενζύμων προσδιορίστηκαν με τη χρήση του διακομιστή dbCAN (<http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN/index.php>) (Yin et al., 2012) και προέκυψε ότι αποτελούνται από 55 και 57 αμινοξέα για τις AeGE15 και TIGE15, αντίστοιχα, ενώ αποτελούνται από περίπου 22 % P, 20 % S και 13 % T. Επομένως, οι διαφορές των πειραματικά παρατηρούμενων MW συγκριτικά με τα αντίστοιχα υπολογισμένα μπορούν να αποδοθούν σε μεγάλο βαθμό Ο γλυκοζυλίωση του συνδέτη μεταξύ του CBM1 και της καταλυτικής μονάδας CE15.

6.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν και με IEF-PAGE προκειμένου να βρεθεί το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 6.1., όπου παρατηρείται η εμφάνιση πολλαπλών ζωνών, γεγονός το οποίο οφείλεται στο διαφορετικό βαθμό γλυκοζυλίωσης που υπέστησαν τα δύο ανασυνδυασμένα ένζυμα. Το ισοηλεκτρικό σημείο της *AeGE15* εντοπίζεται στην περιοχή pH 4.2-5.3 με την πιο έντονη ζώνη να εμφανίζεται για pH 5.2 που είναι κοντά στη θεωρητικά υπολογισμένη τιμή (5.09). Στην περίπτωση της *TlGE15*, το ισοηλεκτρικό σημείο βρίσκεται στην περιοχή pH 4.6-5.8, με την πιο έντονη ζώνη να εμφανίζεται σε pH 5.8, κοντά στο θεωρητικά υπολογιζόμενο 5.4. Επίσης, παρατηρείται ότι ακόμα και για τις κατεργασμένες με EndoH εστεράσες συνεχίζουν να εμφανίζονται πολλαπλές ζώνες, κάτι που οφείλεται στην αναμενόμενη O-γλυκοζυλίωση.



Εικόνα 6.1: IEF-PAGE ηλεκτροφόρηση των καθαρών πρωτεϊνών *AeGE15* και *TlGE*. Στήλες: (1) Μάρτυρας ισοηλεκτρικών σημείων με εύρος 3.0-11.0, (2) *AeGE15* μετά από πλήρη καθαρισμό, (3) *AeGE15* μετά από πλήρη καθαρισμό και χρήση EndoH, (4) *TlGE15* μετά από πλήρη καθαρισμό, (5) *TlGE15* μετά από πλήρη καθαρισμό και χρήση EndoH.

6.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΘΑΡΩΝ AeGE15 ΚΑΙ TIGE15

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της καθαρής AeGE15 και TIGE15 πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μήκος κύματος 280 nm σε φυτόμετρο UV-Vis με χρήση κυψελίδας από χαλαζία.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης μιας καθαρής πρωτεΐνης σε διάλυμα γίνεται με τη βοήθεια του παρακάτω μαθηματικού μοντέλου:

$$C_{\frac{mg}{mL}} = \frac{O \cdot D_{280\text{ nm}} \cdot MW}{\epsilon}$$

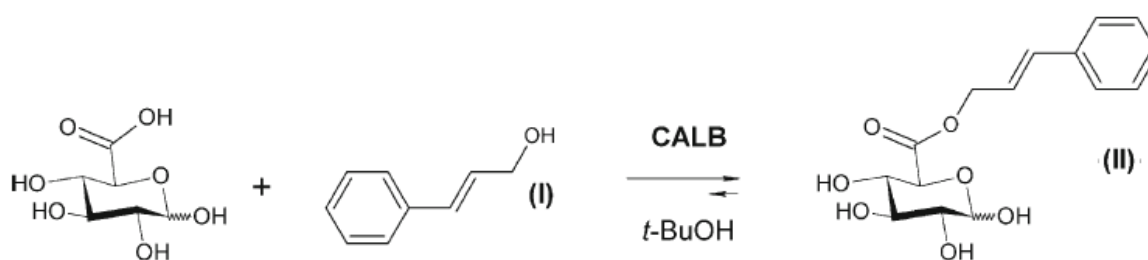
Το μοριακό βάρος (M.W.) της AeGE15 προσδιορίστηκε 63 kDa (παράγραφος 6.1.), η απορρόφηση του διαλύματος στα 280 nm ,αραιωμένου 3:100, 0.06 και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας ϵ (molar absorptivity) υπολογίζεται από το πρόγραμμα ProtParam της ExPASy ίσος με 78295 M⁻¹ cm⁻¹. Επομένως η συγκέντρωση της καθαρής AeGE15 στο διάλυμα είναι 1.45 mg/ mL. Το μοριακό βάρος (M.W.) της TIGE15 προσδιορίστηκε 46408 Da (παράγραφος 5.1.), η απορρόφηση του διαλύματος στα 280 nm ,αραιωμένου 3:100, 0.057 και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας ϵ (molar absorptivity) υπολογίζεται από το πρόγραμμα ProtParam της ExPASy ίσος με 81275 M⁻¹ cm⁻¹. Επομένως η συγκέντρωση της καθαρής TIGE15 στο διάλυμα είναι 1.47 mg/ mL.

Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί πως ο υπολογισμός συγκέντρωσης των δυο καθαρών εστερασών είναι προσεγγιστικός, αφού ο θεωρητικός παράγοντας ϵ προκύπτει για το προβλεπόμενο από το υπολογιστικό εργαλείο ProtParam μοριακό βάρος των ενζύμων. Εξαιτίας της απόκλισης των πειραματικών από τα θεωρητικά μοριακά βάρη, είναι πιθανή και μια σχετική απόκλιση των αποτελεσμάτων, ο υπολογισμός όμως είναι προσεγγιστικά ενδεικτικός της συγκέντρωσης των ενζύμων στο διάλυμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ D-ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΜΕ ΚΙΝΝΑΜΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ

7.1. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

Η ενζυμική εστεροποίηση του D-γλυκουρονικού οξέος διεξήχθη με σκοπό την παραγωγή συνθετικού υποστρώματος όσο το δυνατόν πλησιέστερα σε υποστρώματα που απαντούν στη φύση, ώστε στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί κινητική μελέτη των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος *AeGE15* και *TlGE15*. Για την εστεροποίηση του D-γλυκουρονικού οξέος (Σχήμα 7.1.) χρησιμοποιήθηκε η κινναμική αλκοόλη (ένωση I) με διαμόρφωση παρόμοια με την κύρια δομική μονάδα λιγνίνης, την υδροξυκινναμική αλκοόλη. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις όγκου 50 mL σε οργανικό διαλύτη (τριτοταγής βουτανόλη) με χρήση του ενζύμου Novozym 435 (ακινητοποιημένη λιπάση B *C.antarctica*) σε θερμοκρασία 60 °C και ανάδευση 150 rpm για 48 h. Έτσι παρήχθη ο εστέρας της κινναμικής αλκοόλης με D-γλυκουρονικό οξύ (Εστέρας II).



Σχήμα 7.1.: Η λιπάση B της *C. antarctica* (Novozym 435®) καταλύει την εστεροποίηση του D-γλυκουρονικού οξέος με κινναμική αλκοόλη (ένωση I) στον αντίστοιχο εστέρα (ένωση II).

Ο προσδιορισμός της παρουσίας του εστέρα πραγματοποιήθηκε με TLC σε πλάκες αλουμινίου με επίστρωση silica gel 60 F254 (Merck, Γερμανία), χρησιμοποιώντας διαλύτη ανάπτυξης μίγμα χλωροφορμίου: μεθανόλης: απιονισμένου νερού 65:15:2 (v/v/v). Η ανίχνευση και οπτικοποίηση των κηλίδων που οφείλονται στη φαινολική αλκοόλη και τον αντίστοιχο εστέρα της με D-γλυκουρονικό οξύ έγινε με τη βοήθεια λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) στα 254 nm.

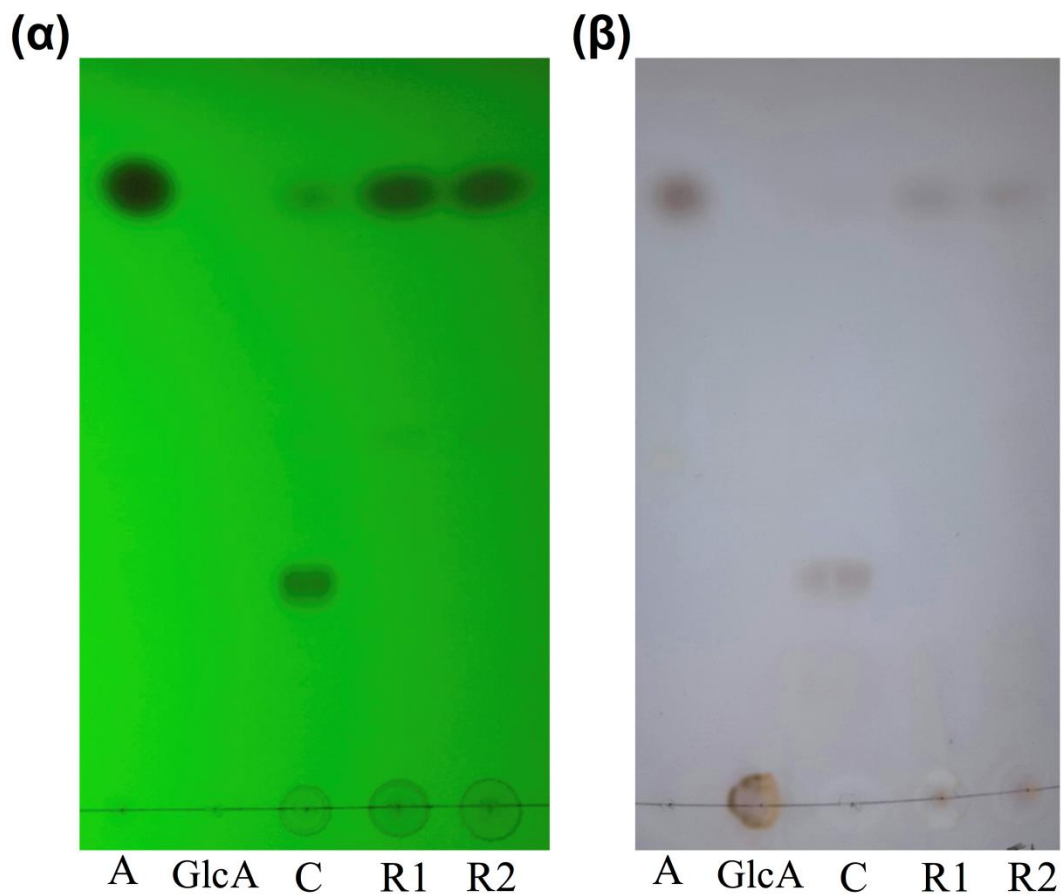
Πρέπει να σημειωθεί ότι τα διαλύματα των αντιδράσεων μετά το πέρας του χρόνου της αντίδρασης και αφού επιβεβαιώθηκε η παρουσία επιπλέον συστατικού εκτός αυτής των αντιδρώντων με TLC, υπέστησαν διήθηση, για την απομάκρυνση του ακινητοποιημένου ενζύμου και των μοριακών κοσκίνων, και εκχύλιση για την απομάκρυνση του D-γλυκουρονικού οξέος. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα εξατμίστηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα και οι εστέρες επαναδιαλύθηκαν σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη (οξικός αιθυλεστέρας). Με βάση αυτά τα διαλύματα πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις χημικής και ενζυμικής υδρόλυσης που περιγράφονται στις παραγράφους 6.1.2 και 6.1.3 αντίστοιχα.

7.1.2 ΧΗΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η κηλίδα που βρίσκεται κάτω από αυτή της κινναμικής αλκοόλης ανήκει στον εστέρα του γλυκουρονικού οξέος πραγματοποιείται χημική υδρόλυση με καυστικό νάτριο σε αντιδράσεις του 1 mL. Πιο συγκεκριμένα σε erpendorf προστέθηκαν 500 μ L από το διάλυμα της αντίδρασης και 500 μ L NaOH 1 N. Για την αντίδραση παρασκευάστηκε και ένα τυφλό διάλυμα με απιονισμένο νερό αντί του NaOH και όλα μαζί τοποθετήθηκαν σε thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία) σε θερμοκρασία 30 °C για 15 min υπό ανάδευση. Ακολούθησε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για τον έλεγχο του αποτελέσματος.

7.1.3. ENZYΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ AeGE15 ΚΑΙ TlGE15

Πριν το στάδιο καθαρισμού του εστέρα πραγματοποιήθηκε δοκιμαστική, ενζυμική αυτή τη φορά, υδρόλυση με χρήση των γλυκουρονικών εστερασών AeGE15 και TlGE15. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε ως εξής: σε erpendorf προστέθηκαν 30 μ L Εστέρα B και 30 μ L ενζύμου συγκέντρωσης 1.665 mg/ mL. Σε δεύτερο erpendorf, το οποίο αποτέλεσε το τυφλό, προστέθηκαν επίσης 30 μ L Εστέρα B και 30 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Tris HCl 20 mM με pH: 8. Τα δύο erpendorf τοποθετήθηκαν σε Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία) σε θερμοκρασία 50 °C για 1.5 h υπό ήπια ανάδευση. Με TLC προσδιορίστηκε το αποτέλεσμα της ενζυμικής υδρόλυσης.



Σχήμα 7.2. TLC ενζυμικής υδρόλυσης του εστέρα του γλυκουρονικού οξέος με χρήση *AeGE15* και *TIGE15*. Και για τις δύο εικόνες: (A): Κιναμική αλκοόλη, (GlcA): D-γλυκουρονικό οξύ, (C): υπόστρωμα-control της αντίδρασης, (R1): αντίδραση με χρήση *AeGE15*, (R2): αντίδραση με χρήση *TIGE15*. (α): ανίχνευση και οπτικοποίηση του TLC με υπεριώδη ακτινοβολία UV στα 254 nm. Η παρουσία μόνο της κηλίδας της αλκοόλης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πραγματοποιήθηκε υδρόλυση του εστέρα. (β): Οπτικοποίηση του TLC με βαφή (Bounias M., 1980). Παρατηρείται με καφέ χρώμα (κηλίδα σε κύκλο) η παρουσία γλυκουρονικού οξέος στη γραμμή βάσης.

Από την οπτικοποίηση του TLC και με τις δύο μεθόδους, υπεριώδη ακτινοβολία και βαφή, φαίνεται ότι ο εστέρας αναγνωρίζεται από τις *AeGE15* και *TIGE15* και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η απόδοση της αντίδρασης της ενζυμικής εστεροποίησης ήταν αρκετά χαμηλή (12 %, 197 mg), υποδεικνύοντας ότι η λιπάση CALB δεν επέδειξε προτίμηση για την εστεροποίηση της συγκεκριμένης αλκοόλης.

7.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

7.2.1 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ SILICA GEL ΩΣ ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ

Αρχικά το υπόστρωμα περνάει από στάδια καθαρισμού τα οποία περιλαμβάνουν διήθηση και εκχύλιση, τα εκχυλίσματα εξατμίζονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα και επαναδιαλύονται σε οξικό αιθυλεστέρα και το δείγμα φορτώνεται κατά μήκος της γραμμής βάσης σε φύλλο TLC Silica gel 60 F254. Ακολουθεί η ανάπτυξη του TLC με διαλύτη ανάπτυξης χλωροφόρμιο: μεθανόλη: νερό 65:15:2 (v/v/v). Πραγματοποιείται δοκιμή απομόνωσης του φαινολικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος από αντιδράσεις εστεροποίησης της κινναμικής αλκοόλης με D-γλυκουρονικό οξύ, όγκου 5 mL, με χρήση του ενζύμου λιπάση Novozym 435 (ακινητοποιημένη λιπάση *B. Candida antarctica*) με τη βοήθεια πλακών TLC. Στον διαχωρισμό με silica gel δεν χρησιμοποιείται νερό στο διαλύτη λόγω της δυσκολίας εξάτμισής του κατά την εξάτμιση των κλασμάτων αλλά και λόγω πιθανής υδρόλυσης του εστέρα.

7.2.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΙΑΛΥΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗΣ

Για την απομόνωση του φαινολικού εστέρα του γλυκουρονικού οξέος που παρασκευάστηκε με τις μεγαλύτερες αντιδράσεις των 50 mL χρησιμοποιήθηκε στήλη πακεταρισμένη με Silica gel 60 (0.040-0.063 mm) και ως διαλύτης έκλουσης μίγμα οξικού αιθυλεστέρα: μεθανόλης 9:1 (v/v). Ο διαχωρισμός ελέγχθηκε ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).

7.2.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

Η λήψη των κλασμάτων, τα οποία προέκυψαν κατά το διαχωρισμό, έγινε σε δοκιμαστικούς σωλήνες 13x120 mm σε περίπου 10 mL όγκο το κάθε κλάσμα. Τα κλάσματα που ελήφθησαν ελέγχθηκαν ποιοτικά για την ύπαρξη του εστέρα με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και διαλύτη ανάπτυξης μίγμα χλωροφορμίου: μεθανόλης: απιονισμένου νερού 65:15:2 (v/v/v).

Τα κλάσματα τα οποία προέκυψαν από το διαχωρισμό του εστέρα από την αλκοόλη με χρωματογραφική στήλη ελέγχθηκαν για την καθαρότητά τους με TLC. Η ανίχνευση έγινε με τη βοήθεια λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας στα 254 nm. Στη συνέχεια τα κλάσματα που περιείχαν τον εστέρα συγκεντρώθηκαν και εξατμίστηκαν

σε περιστροφικό εξατμιστήρα Rotavapor Buchi RE 111 (Buchi , Ελβετία). Το υπόλειμμα παρελήφθη από τη σφαιρική φιάλη με κατάλληλη ποσότητα διγλωρομεθανίου και φυλάσσεται σε υάλινο φιαλίδιο.

7.2.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ HPLC

Ο τελικός έλεγχος της καθαρότητας των διαλυμάτων του εστέρα πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με στήλη αντίστροφης φάσης C18 Nucleosil (250 mm x 4.6 mm, Macherey – Nagel, Γερμανία), ροή 0.4 mL/ min και διαλύτη μίγμα CH₃OH:H₂O 7:3 (v/v) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

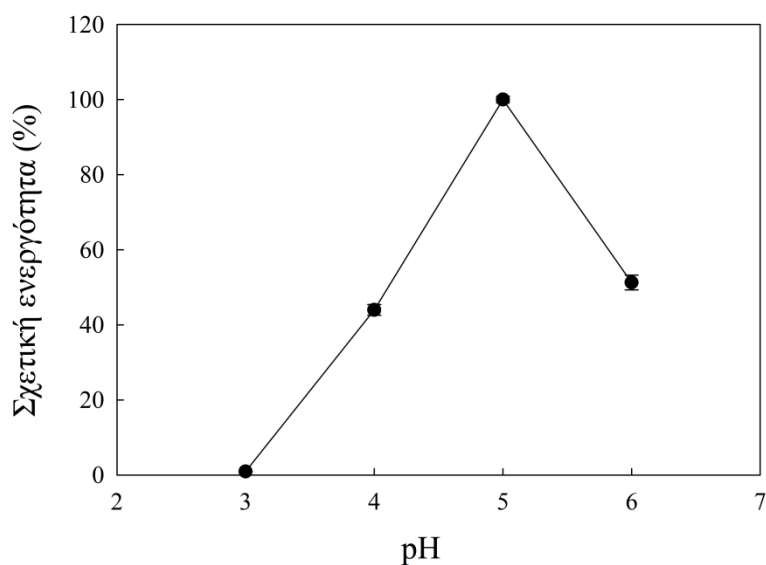
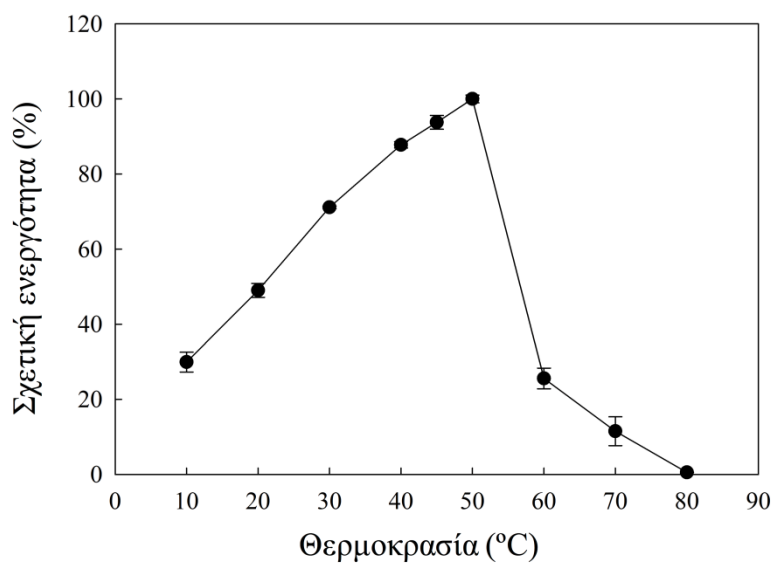
Ο εστέρας μετρήθηκε στα 220 nm με ροή 0.7 mL/ min και εμφάνισε κορυφή στο χρωματογράφημα στα 5.7 min. Η απουσία άλλων κορυφών υποδεικνύει τον ικανοποιητικό διαχωρισμό που επιτεύχθηκε με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας προσρόφησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

8.1. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΥ ΡΗ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

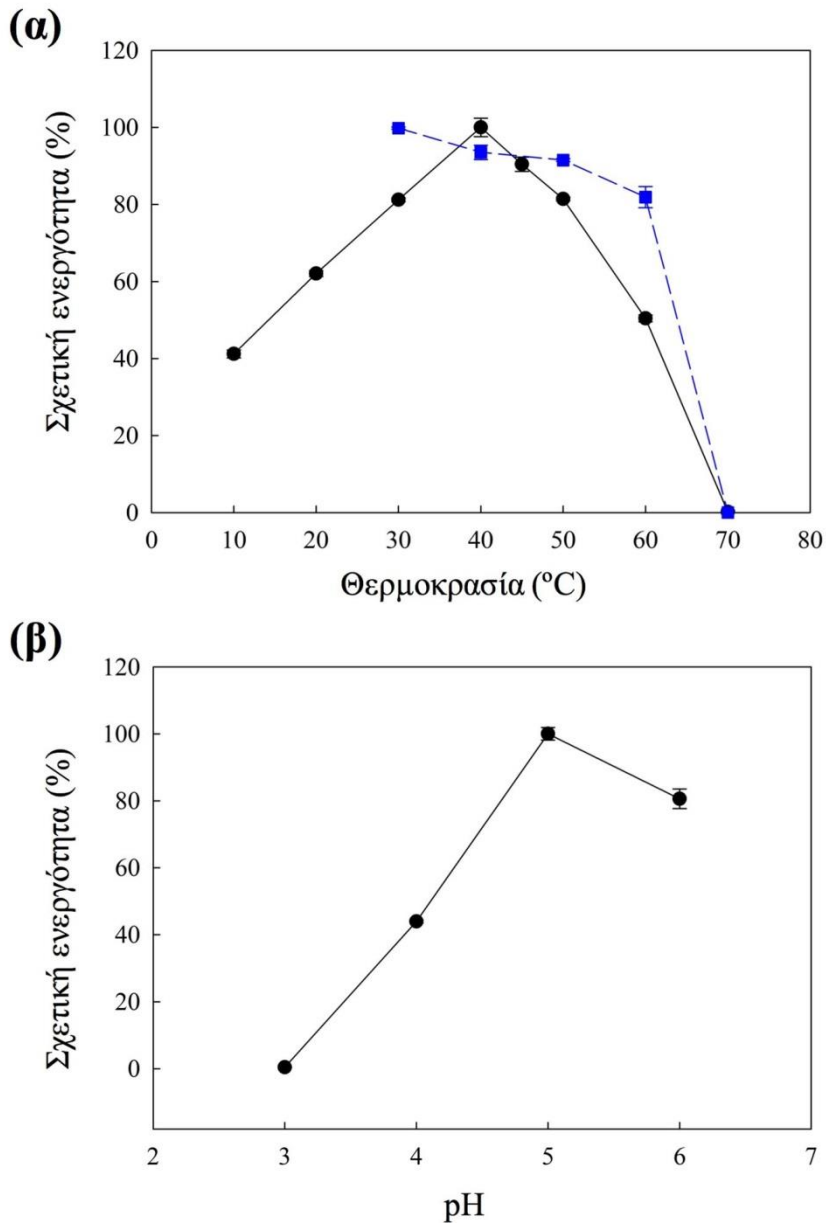
Μετά την απομόνωση των *AeGE15* και *TlGE15* ακολούθησε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός των ενζύμων. Η εύρεση των ιδιοτήτων όσον αφορά το βέλτιστο pH και θερμοκρασία δράσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος, όπως και η σταθερότητα που τις χαρακτηρίζει σε διάφορες ακραίες τιμές pH και θερμοκρασίας, αποτελούν βασικότατη πληροφορία για την βιοτεχνολογική αξιολόγησή τους. Επίσης, η γνώση των ιδιοτήτων αυτών βοηθά κατά πολύ στον πειραματικό σχεδιάσμό για την απομόνωση των εστερασών με χρωματογραφικές μεθόδους.

Αρχικά επιχειρήθηκε η εύρεση του βέλτιστου pH και θερμοκρασίας δράσης τους, καθώς επίσης και η σταθερότητά τους σε ένα εύρος τιμών θερμοκρασίας και pH. Η ποσοτικοποίηση του γλυκουρονικού οξέος που απελευθερώθηκε σε κάθε περίπτωση, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με στήλη αντίστροφης φάσης C-18. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Σχήμα 8.1: Επίδραση της θερμοκρασίας (α) και του pH (β) στη σχετική ενεργότητα της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος *AeGE15*.

Από την παραπάνω εικόνα είναι προφανές ότι οι βέλτιστες συνθήκες για τη δράση της εστεράσης είναι οι τιμές pH 5 και θερμοκρασίας 50 °C. Επιπλέον, φαίνεται ότι το ένζυμο εμφανίζει αξιόλογο βαθμό θερμοσταθερότητας, καθώς διατηρεί το 70% της ενεργότητάς του μετά από επώαση 8, 24 και 32 ωρών στους 50 οC. Πάνω από αυτή τη θερμοκρασία, η εστεράση παρουσίασε ταχεία απώλεια της καταλυτικής της ικανότητας, φτάνοντας το 26 % και 12 % σε θερμοκρασίες 60 °C και 70 °C, αντίστοιχα (Σχήμα 8.1).



Σχήμα 8.2: Επίδραση της θερμοκρασίας (α) και του pH (β) στη σχετική ενεργότητα της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος *TIGE15*. Με διακεκομμένη γραμμή αναπαρίσταται η σταθερότητα της *TIGE1*. Για τον προσδιορισμό της θερμοσταθερότητας, η εναπομένουσα ενεργότητα μετρήθηκε μετά από επώαση του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες για 2 h σε pH 8.0.

Στην περίπτωση της *TIGE15*, οι συνθήκες βέλτιστης ενεργότητας βρέθηκαν να είναι θερμοκρασία 40 °C και τιμή pH 5.0 (Σχήμα 8.2.α και 8.2.β.). Επιπλέον, φαίνεται ότι το ένζυμο εμφανίζει αξιόλογο βαθμό θερμοσταθερότητας, καθώς διατηρεί το 70% της ενεργότητάς του μετά από επώαση 8, 24 και 32 ωρών στους 40 °C. Μέχρι και τους 50 °C το ένζυμο διατήρησε πάνω από το 80 % της ενεργότητάς

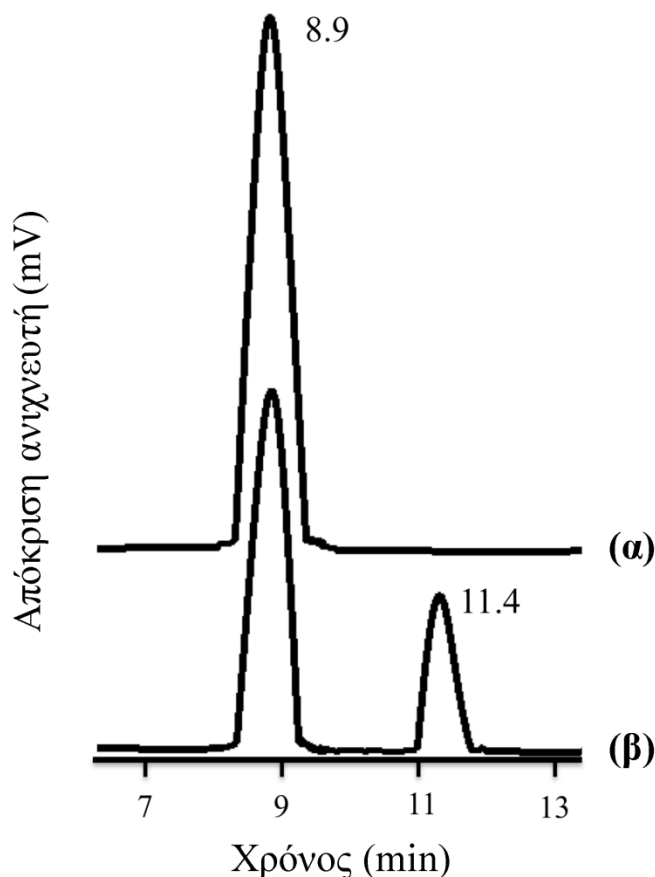
του, ενώ διατήρησε το 50 % σε θερμοκρασία 60 °C. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες επήλθε ταχύτατη απώλεια της καταλυτικής ικανότητας του ενζύμου με την ενεργότητα να μηδενίζεται σε θερμοκρασία 70 °C. Η εστεράση διατήρησε το 80 % της βέλτιστης ενεργότητάς του σε τιμή pH 6.0. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν εξετάστηκαν υψηλότερες τιμές pH λόγω της υψηλής αυτοϋδρόλυσης του υποστρώματος σε αλκαλικές συνθήκες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ AeGE15 ΚΑΙ TlGE15

9.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ HPLC

Η υδρόλυση του υποστρώματος από τις εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 και TlGE15 προσδιορίστηκε ποσοτικά με την απελευθέρωση της αλκοόλης στο διάλυμα της αντίδρασης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αλκοόλης πραγματοποιήθηκε με HPLC με στήλη αντίστροφης φάσης C18 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο διαλύτης επιλέχθηκε έτσι ώστε να επιτυγχάνεται διαχωρισμός μεταξύ εστέρα και αλκοόλης και η ολοκλήρωση των κορυφών να γίνεται με ευκολία. Η καταγραφή και η ολοκλήρωση των κορυφών των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογισμικό Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία).

Μετά από δοκιμές σε διάφορες αναλογίες, ο διαχωρισμός κρίθηκε ικανοποιητικός με τη χρήση του διαλύτη μεθανόλη: νερό 7:3 (v/v). Η ροή αρχικά ρυθμίστηκε στα 0.7 mL/ min για καθαρισμό και στη συνέχεια άλλαξε στα 0.4 mL/ min. Οι κορυφές εστέρα και αλκοόλης εμφανίζονται με διαφορά 1.2 min.



Σχήμα 9.1: Χρωματογράφημα HPLC της υδρόλυσης του εστέρα του γλυκουρονικού οξέος με κινναμική αλκοόλη. (α) Υπόστρωμα πριν την προσθήκη ενζύμου και (β) υπόστρωμα μετά από 30 min επώασης με AeGE15. Η κορυφή με χρόνο υστέρησης 11.4 min αντιστοιχεί στην κινναμική αλκοόλη.

9.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΕΩΝ

Οι αντιδράσεις των ενζυμικών υδρόλυσεων πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλον pH 6 με χρήση ΡΔ φωσφορικών καθώς σε περιβάλλον pH 7 στο οποίο η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα παρατηρήθηκε έντονη υδρόλυση του υποστρώματος στα τυφλά διαλύματα. Η θερμοκρασία στην οποία έλαβαν χώρα οι ενζυμικές υδρόλυσεις ήταν 50 °C όπου η AeGE15 παρουσιάζει βέλτιστη δραστηριότητα και υψηλή σταθερότητα

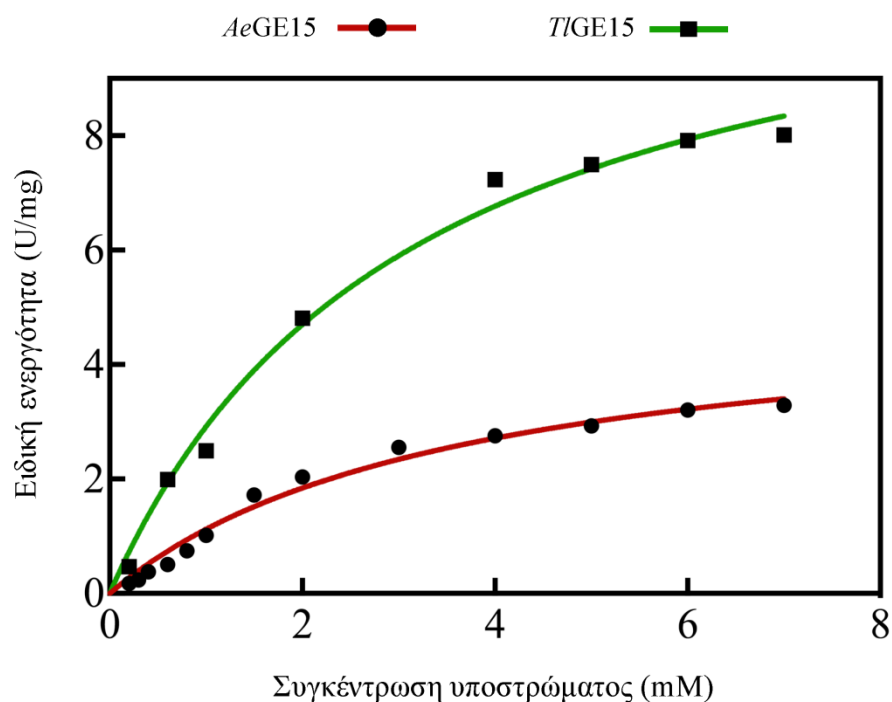
Ο τερματισμός των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με 50 μL πυκνού CH₃COOH για τον εστέρα. Ο βρασμός των δειγμάτων δεν επιλέχθηκε ως μέθοδος τερματισμού καθώς παρατηρήθηκε έντονη υδρόλυση του υποστρώματος η οποία δεν επέτρεπε την ασφαλή εξαγωγή αποτελεσμάτων.

Η ύπαρξη συγγένειας του ενζύμου ως προς τον φαινυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος εξετάστηκε υπολογίζοντας τις τιμές της σταθεράς K_m . Η σύγκριση του λόγου του ρυθμού κατάλυσης προς τη σταθερά Michaelis – Menten (k_{cat}/K_m) δεν έδειξε υψηλή εξειδίκευση της εστεράσης ως προς τον φαινυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος.

9.3. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Οι υπολογισμοί των κινητικών σταθερών της ενζυμικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού πακέτου GraphPad Prism v.7 της εταιρείας GraphPad Software, Inc. (Η.Π.Α.)

Σε γενικές γραμμές, το K_m που υπολογίστηκε και για τις δύο εστεράσες παρουσιάζει σχετικά παρόμοιες τιμές, K_m 3.6 mM και 3.2 mM, αντίστοιχα, με τις καταλυτικές αποδόσεις τους k_{cat}/K_m να είναι 1.5 $mM^{-1} s^{-1}$ και 4.0 $mM^{-1} s^{-1}$, αντίστοιχα. Όπως παρατηρείται και από τις σχετικά υψηλές τιμές της σταθεράς K_m , οι δυο γλυκουρονικές εστεράσες επιδεικνύουν χαμηλή προτίμηση προς το υπόστρωμα. Αρκετές γλυκουρονικές εστεράσες, όπως οι Cip2, η CuGE, η PcGE1, η PcGE2 και η ScGE, έχουν επιδείξει προτίμησή για υποστρώματα που φέρουν μια 4-Ο-μεθυλομάδα. Ο φυσικός εστερικός δεσμός μεταξύ των ημικυτταρινών και της λιγνίνης άλλωστε περιλαμβάνει μια μεθυλομάδα στο κατάλοιπο του γλυκουρονικού οξέος, κάτι που πιθανώς εξηγεί τη χαμηλή καταλυτική αποτελεσματικότητα των εστερασών όταν η συγκεκριμένη ομάδα απουσιάζει. (Arnling Bååth et al., 2016; Biely, 2016; d'Errico et al., 2015).



Σχήμα 9.2: Προσαρμογή της καμπύλης της κινητικής Michaelis-Menten στα πειραματικά δεδομένα από την υδρόλυση του εστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος με κινναμική αλκοόλη από την *AeGE15* σε θερμοκρασία 50 °C και pH 5.0 και από την *TlGE15* σε θερμοκρασία 40 °C και pH 5.0.

Πίνακας 9.1: Κινητικές ιδιότητες διαφόρων γλυκουρονικών εστερασών χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον εστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος με κινναμική αλκοόλη.

| Γλυκουρονική εστεράση | K_m (mM) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_m ($mM^{-1} s^{-1}$) |
|-----------------------|-------------|------------------------|------------------------------------|
| <i>AeGE15</i> | 3.57 (0.59) | 5.4 (0.4) | 1.5 (0.3) |
| <i>TlGE15</i> | 3.15 (0.51) | 12.7 (0.9) | 4.0 (0.7) |
| <i>StGE2</i> | 3.63 (0.6) | 1.9 (0.1) | 0.5 (0.1) |
| <i>PaGE1</i> | 2.66 (0.5) | 5.3 (0.7) | 2.0 (0.5) |

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 9.1, η *TlGE15* εμφανίζει χαμηλότερη τιμή K_m συγκριτικά με την *AeGE15* αλλά και με *StGE2* όπου η μελέτη των κινητικών σταθερών της πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το ίδιο υπόστρωμα.

Την χαμηλότερη τιμή K_m παρουσιάζει η PaGE1, ωστόσο, η TlGE15 εμφάνισε τον μεγαλύτερο ρυθμό μετατροπής του υποστρώματος σε προϊόντα με αποτέλεσμα την υψηλότερη τιμή του λόγου k_{cat}/K_m , συγκεκριμένα 2 φορές μεγαλύτερο από αυτόν της PaGE1.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

10.1. ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται σταδιακά όλο και περισσότερο η επίγνωση της κοινωνίας σε θέματα επί των επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής του πλανήτη. Η αλλαγή αυτή, που αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις για το μέλλον της ανθρωπότητας, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας από τα συμβατικά καύσιμα. Οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας έχουν συνεπώς προσελκύσει σε μεγάλο βαθμό το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας όπως υποδεικνύεται από τον ραγδαία αυξανόμενο ρυθμό δημοσιεύσεων. Οι παραπάνω παράγοντες, καθώς και μια σειρά οικονομικών λόγων, έχουν ωθήσει τις κυβερνήσεις να επιδείξουν και το δικό τους ενδιαφέρον αναπτύσσοντας νέα πλαίσια ενεργειακής πολιτικής και υποστηρικτικές νομοθεσίες. Σήμερα, η ανάγκη για μια ελκυστική και πράσινη εναλλακτική επιλογή έναντι των ορυκτών καυσίμων γίνεται ολοένα επιτακτικότερη, όχι μόνο λόγω της επικείμενης μείωσης των αποθεμάτων αργού πετρελαίου αλλά λόγω και της ραγδαίας κλιματικής αλλαγής που προκαλείται από τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου.

Τα καύσιμα από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα, γνωστά και ως βιοκαύσιμα 2ης γενιάς, αντιπροσωπεύουν μια ενδιαφέρουσα επιλογή για την παραγωγή βιώσιμων καυσίμων μεταφοράς, εξαλείφοντας τις όποιες ανησυχίες συμβιβασμού μεταξύ των βιομηχανιών τροφίμων και καυσίμων. Τα οφέλη των βιοκαυσίμων 2ης γενιάς είναι πολλαπλά και περιλαμβάνουν την οικονομική ασφάλεια, τη μειωμένη εξάρτηση από εισαγόμενο πετρέλαιο, τη μείωση του περιβαλλοντικού αντίκτυπου και την αύξηση επενδύσεων και θέσεων εργασίας σε αγροτικές περιοχές μεταξύ άλλων. Ωστόσο, η επίτευξη της εμπορευματοποίησης των βιοκαυσίμων 2ης γενιάς αποτελεί πρόκληση, κυρίως εξαιτίας της ανθεκτικότητας της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας και της προαναφερθείσας πολυπλοκότητας του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Η αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας περιλαμβάνει τις διεργασίες εκείνες οι οποίες θα επιτρέψουν την αποδοτικότερη μετατροπή της σε ζυμώσιμα σάκχαρα με το μικρότερο δυνατό κόστος. Τα σημαντικότερα βήματα προς αυτή την κατεύθυνση αποτελούν η προκατεργασία και η ενζυμική υδρόλυση της βιομάζας.

Το ενζυμικό κόστος συγκεκριμένα αποτελεί μια εκ των επίμονων προκλήσεων. Η ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων υψηλού βιομηχανικού και τεχνολογικού ενδιαφέροντος συμβάλλει στην παρασκευή αποδοτικότερων ενζυμικών σκευασμάτων, οδηγώντας κατ' αυτόν τον τρόπο στη μείωση του ενζυμικού φορτίου που απαιτείται για την αποτελεσματική μετατροπή της βιομάζας. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η παραγωγή και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός δύο καινοτόμων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος της ημικυτταρίνης από τους βασιδιομύκητες *A. Elegans* και *T. ljubarskyi* (*AeGE15* και *TlGE15*, αντίστοιχα).

Οι δύο νέες εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος εκφράστηκαν επιτυχώς. Η παραγωγή των ενζύμων πραγματοποιήθηκε με υγρές καλλιέργειες των κυττάρων της μεθυλότροφης ζύμης *P.pastoris* και η απομόνωση έγινε με στάδια διηθήσεων, συμπύκνωσης και χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Τα μοριακά βάρη των δύο πρωτεϊνών *AeGE15* και *TlGE15* προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) στα 63 kDa και 70 kDa, αντίστοιχα, παρουσιάζοντας αρκετές ισομορφές λόγω διαφορετικών τύπων γλυκοζυλίωσης. Για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των δύο εστερασών της οικογένειας CE15 συντέθηκε ενζυμικά ο εστέρας της κινναμικής αλκοόλης του D-γλυκουρονικού οξέος ο οποίος μιμείται τα φυσικά σύμπλοκα λιγνίνης-υδατανθράκων. Για τη σύνθεση του εστέρα έλαβαν χώρα αντιδράσεις όγκου 50 mL σε οργανικό διαλύτη (τριτοταγής βουτανόλη) με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου ενζύμου Novozym 435 (ακινητοποιημένη λιπάση B της *C.antarctica*).

Οι ενζυμικές συνθέσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 60 °C και ανάδευση 150 rpm για 48 h και παρουσίασαν σχετικά μικρές αποδόσεις. Η απομόνωση του εστέρα του γλυκουρονικού οξέος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (Silica gel chromatography) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το μίγμα οξικού αιθυλεστέρα: μεθανόλης 9:1 (v/v). Η καθαρότητα του εστέρα μετρήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με στήλη αντίστροφης φάσης C18 και ανιχνευτή υπεριώδους/ορατού. Ως κατάλληλος διαλύτης έκλουσης κρίθηκε το μίγμα μεθανόλης: νερού 7:3 (v/v), με ροή έκλουσης στα 0.4 mL/ min και μήκος κύματος στα 250 nm. Η υδρόλυση του υποστρώματος από τις εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος *AeGE15*

και *TlGE15* προσδιορίστηκε ποσοτικά με την απελευθέρωση της κινναμικής αλκοόλης στο διάλυμα της αντίδρασης.

Με τη χρήση του συνθετικού υποστρώματος προσδιορίστηκαν στη συνέχεια οι βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής ενεργότητας για το κάθε ένζυμο. Η *AeGE15* επέδειξε βέλτιστη ενεργότητα σε θερμοκρασία 50 °C και pH 5.0, ενώ η *TlGE15* σε θερμοκρασία 40 °C και pH 5.0. Η ενεργότητα στην περίπτωση της *AeGE15* έπεσε γρήγορα σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 50 °C, ενώ έως τους 30 °C διατηρείται πάνω από το 70 % της μέγιστης. Στην περίπτωση της *TlGE15* η ενεργότητα στο θερμοκρασιακό εύρος από 30 °C έως 50 °C είναι πάνω από το 80 % της μέγιστης. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των κινητικών σταθερών αποτελώντας μια εκ των πρώτων μελετών με χρήση φαινυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος. Ο χαρακτηρισμός τέτοιων ενζύμων συμβάλλει στην προσπάθεια διαλεύκανσης της βιολογικής λειτουργίας τους στην αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος.

10.2. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ

Αν και η επιστημονική κοινότητα συμμετέχει προς την κατεύθυνση βελτιστοποίησης της παραγωγής αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα με συχνή δημοσίευση μελετών, η ανάγκη για περαιτέρω βελτίωση της διεργασίας δεν παύει να υπάρχει. Το κόστος της παραγωγής βιοκαυσίμων από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα θα πρέπει να ελαχιστοποιηθεί προκειμένου να γεφυρωθεί το χάσμα μεταξύ εργαστηριακού πάγκου και αγοράς. Με αυτό το σκεπτικό, μελλοντικές προκλήσεις, όπως αυτές προκύπτουν από την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα μπορούσαν να είναι οι εξής:

- Ανάπτυξη και παραγωγή νέων ενζυμικών κοκτέιλ τα οποία θα περιλαμβάνουν καινοτόμες ενεργότητες με στόχο να επιτευχθούν ακόμα υψηλότερες αποδόσεις ενζυμικής υδρόλυσης. Ειδικότερα, οι γλυκουρονικές εστεράσες θα μπορούσαν να δράσουν συνεργιστικά με άλλα ένζυμα προκειμένου να ενισχύσουν την αποδόμηση της γλυκουρονοξυλάνης που είναι συνδεδεμένη με τη λιγνίνη, απελευθερώνοντας υποκατεστημένους ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι με τη σειρά τους θα δράσουν ως νέο υπόστρωμα για τις ξυλανάσες.
- Χρήση των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος σε μη συμβατικά συστήματα για τη σύνθεση εστέρων του γλυκουρονικού οξέος με τοποεκλεκτικότητα.
- Βελτιστοποίηση των αντιδράσεων ενζυμικής σύνθεσης των εστέρων του γλυκουρονικού οξέος με τη λιπάση Novozym 435 ώστε να έχουν υψηλότερη απόδοση και κατ' επέκταση μειωμένο κόστος.
- Κρυστάλλωση των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 και TlGE15 με το κατάλληλο υπόστρωμα, ώστε να γίνει πιο κατανοητή η δράση των γλυκουρονικών εστερασών από βασιδιομύκητες στο σύνολό τους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ander, P., Marzullo, L. (1997). Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *Journal of Biotechnology* 53, 115–131.
- Bach Tuyet Lam T., Iiyama K., & Stone B.A. (1992). Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and phalaris internodes. *Phytochemistry* 31, 1179–1183.
- Biely P., Vršanská M., Tenkanen M., Kluepfel D. (1997). Endo-β-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* 57, 151 – 166.
- Brett C., Waldon K. (1996). *Physiology and biochemistry of plant cell walls. Second Edition.* London: Chapman Hall.
- Brown R.Malcolm Jr., Saxena Inder M. . (2007). *Cellulose: Molecular and structural Biology.* . The Netherlands: Springer.
- Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. (2008). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research, Vol. 37*, Database issue D233-D238.
- Charavgi M., Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P., Chrysina E. (2012). The structure of a novel glucuronoyl esterase from *Myceliophthora thermophila* gives new insights into its role as a potential biocatalyst.
- Collins T., Gerday C., Feller G. (2005). Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol, Rev* 29: 3–23.
- David Martin Alonso, Stephanie G. Wettstein and James A. Dumesic. (2012). Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chemical Society Reviews* 41 (24), 8075-8098.
- De Santi, C., Gani, O.A., Helland, R., Williamson, A. (2017). Structural insight into a CE15 esterase from the marine bacterial metagenome. *Sci. Rep.* 7, 17278.
- Đuranová M., Hirsch J., Kolenová K., Biely P. (2009). Fungal Glucuronoyl Esterases and Substrate Uronic Acid Recognition. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 2483 – 2487.
- Fry, S. (1982). Phenolic components of the primary cell wall. *Biochemical Journal* 203, 493-504.
- Huynh, H.H., Ishii, N., Matsuo, I., Arioka, M. (2018). A novel glucuronoyl esterase from *Aspergillus fumigatus*—the role of conserved Lys residue in the preference for 4-O-methyl glucuronoyl esters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2191–2201.
- Imamura T., Watanabe T., Kuwahara M. & Koshijima T. (1994). Ester linkages between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes from *Fagus crenata*. *Phytochemistry* 37, 1165–1173.

- Ishii, T. (1991). Acetylation of O-2 of arabinofuranose residues in feruloylated arabinoxylan from bamboo shoot cell walls. *Phytochemistry* 30, 2317-2320.
- Jean-Guy Berrin, David Navarro, Marie Couturier, Caroline Olivé, Sacha Grisel, Mireille Haon, Sabine Taussac, Christian Lechat, Régis Courtecuisse, Anne Favel, Pedro M. Coutinho and Laurence Lesage-Meessen. (2012). Exploring the Natural Fungal Biodiversity of Tropical and Temperate Forests toward Improvement of Biomass Conversion. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 78, Number 18, p. 6483– 6490.
- Katsimpouras C., Bénarouche A., Navarro D., Karpusas M., Dimarogona M., Berrin J-G., Christakopoulos P., Topakas E. (2014). Enzymatic synthesis of model substrates recognized by glucuronoyl esterases from *Podospora anserina* and *Myceliophthora thermophila*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 5507-5516.
- Kolenová K., Vršanská M., Biely P. (2005). Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *Journal of Biotechnology* 121, 338 – 345.
- Lee Y.E., Lowe S.E., Henrissat B. (1993). Characterization of the active site and thermostability regions of endoxylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-R1. *Journal of Bacteriology* Vol.175, 5890 – 5898.
- Mai C., Kues U. and Militz H. (2004). Biotechnology in the wood industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 63, 477-494.
- Martinez A.T., Speranza M., Ruiz-Duenas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillen F., Martinez M.J., Gutierrez A., del Rio J.C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8, 195-204.
- Michael L. Shuler, Fikret Kargi. (2005). *Μηχανική Βιοδιεργασιών, Βασικές Έννοιες*. Αθήνα: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ε.Μ.Π.
- Mutter M., Colquhoun I.J., Schols H.A., Beldman G. & Voragen A.G.J. (1996). Rhamnogalacturonase B from *Aspergillus aculeatus* is a rhamnogalacturonan α -L-rhamnopyranosyl-(1,4)- α -D-galactopyranosyluronide lyase. *Plant Physiology* 110, 73-77.
- Oosterveld A., Grabber J.H., Beldman G., Ralph J. & Voragen A.G.J. (1997). Formation of ferulic acid dehydrodimers through oxidative cross-linking of sugar beet pectin. *Carbohydr. Res.* 300, 179–189.
- Pokkuluri P., Duke N. E. C., Wood S. J., Cotta M. A., Li X.-L., Biely P., Schiffer M. (2011). Structure of the catalytic domain of glucuronoyl esterase Cip2 from *Hypocrea jecorihna*. *Proteins* 79, 2588–2592.
- Polizeli M.L.T.M., Rizzatti A.C.S., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., Amorim D.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 577–591.

- Rizk S.E., Abdel-Massih R.M., Baydoun E.A.H. & Brett C. T. (2000). Protein- and pH-dependent binding of nascent pectin and glucuronoarabinoxylan to xyloglucan in pea. *Planta* 211, 423–429.
- Rosane Marina Peralta, Bruna Polacchine da Silva, Rúbia Carvalho Gomes Côrrea, Camila Gabriel Kato, Flávio Augusto Vicente Seixas and Adelar Bracht. (2016). Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. Στο *Brahmachari-1611312* (σ. CH005). Maringa, Brazil: Department of Biochemistry, University of Maringa.
- Ryabova O., Vršanská M., Kaneko S., Willem H. van Zyl, Biely P. (2009). A novel family of hemicellulolytic α-glucuronidase. *FEBS Letters* 583, 1457 – 1462.
- Saha, B. (2003). Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 279–291.
- Singh D, Chen S. (2008). The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 81, 399-417.
- Špáníková S., Biely P. (2006). Glucuronoyl esterase – Novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune*. *FEBS Letters* 258, 4597 – 4601.
- Špáníková S., Poláková M., Joniak D., Hirsch J., Biely P. (2007). Synthetic esters recognized by glucuronoyl esterase from *Schizophyllum commune*. *Arch Microbiol* 188, 185 – 189.
- Srebotnik E, Messner K and Foisner R. (1988). Penetrability of white rot-degraded pine wood by the. *Appl Environ Microbiol*, 54, 2608- 2614.
- Takahashi N. & Koshijima T. (1988). Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Sci. Technol.* 22, 231–241.
- 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.
- 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.
- van der Veen, P., Flipphi, M. J., Voragen, A. G. & Visser, J. (1991). Induction, purification and characterisation of arabinases produced by *Aspergillus niger*. *Arch Microbiol* 157, 23-28.
- Wong K.K., Tan L.U., Saddler J. (1988). Multiplicity of β-1-4 xylanase in microorganism: functions and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 52, 305 – 317.
- Wong, D. W. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157, 174–209.

- Zaide G., Shallom D., Shulami S., Zolotnitsky G., Golan G., Baasov T. Shoham G. and Shoham Y. (2001). Biochemical characterization and identification of catalytic residues in α -glucuronidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Eur. J. Biochem.* 268, 3006-3016.
- Κατσίμπουρας, Κ. (2013). *Σύνθεση καινοτόμων υποστρωμάτων για τον χαρακτηρισμό εστερασών του γλυκουρονικού οξέος της ημικυτταρίνης*. ΑΘΗΝΑ: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Μουκούλη, Μ. (2012). *Χρήση μοριακών εργαλείων για τη μελέτη της καταλυτικής εξειδίκευσης των εστερασών του φερουλικού οξέος*. ΑΘΗΝΑ: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Τόπακας, Ε. (2004). *Παραγωγή, χαρακτηρισμός και τεχνολογική αξιολόγηση μικροβιακών εστερασών του φερουλικού οξέος της ημικυτταρίνης*. Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε. (2011). *Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων*. Αθήνα.: Εκδόσεις Ε.Μ.Π. Σελ. 30 – 43.