

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

Διπλωματική Εργασία

**Μελέτη της συνεργιστικής δράσης δύο εστερασών του  
γλυκουρονικού οξέος για την αποικοδόμηση της  
λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας**

**Προκόπου Κατερίνα**

**Επιβλέποντες Καθηγητές:**

Τόπακας Ευάγγελος, Επίκουρος καθηγητής Ε.Μ.Π και Κέκος Δημήτριος,  
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2019



# Ευχαριστίες

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

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή του Ε.Μ.Π κ. Δημήτριο Κέκο και τον επίκουρο καθηγητή του Ε.Μ.Π κ. Ευάγγελο Τόπακα για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος. Η βοήθειά τους για όσα προβλήματα προέκυψαν ήταν παρούσα. Επίσης, η επιστημονική τους υποστήριξη και συμβουλές πολύτιμες σε κάθε στάδιο της διαδικασίας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα του Ε.Μ.Π Γρηγόριο Δέδες για τη συνεχή καθοδήγηση όλο το διάστημα εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Η διαρκής στήριξή του και προθυμία του για την επίλυση οποιουδήποτε προβλήματος έκαναν την πραγματοποίηση και τη συγγραφή αυτής της διπλωματικής ένα πολύ ευκολότερο έργο. Χωρίς την πολύτιμη βοήθειά του η παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να είχε πραγματοποιηθεί.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την επιπλέον βοήθεια που μου παρείχαν. Το υποστηρικτικό κλίμα και κλίμα σεβασμού βοήθησε σημαντικά στην εκπόνηση της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου, καθώς και όλους τους δικούς μου ανθρώπους που με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Επίσης, τους καθηγητές και καθηγήτριές μου, ιδιαίτερα στις τελευταίες τάξεις του λυκείου, που συνέβαλαν σημαντικά στην προσπάθειά μου για την εισαγωγή μου στο πανεπιστήμιο.

Κατερίνα Προκόπου,

Αθήνα 2019



# Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η παραγωγή και η απομόνωση δύο καινοτόμων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος από τους βασιδιομύκητες *Artolenzites elegans* και *Trametes Ijubarskyi*. Ακόμα, μελετήθηκε η συνεργιστική τους δράση με μία ενδοξυλανάση της οικογένειας GH11 του μικροοργανισμού *Fusarium Oxysporum*.

Αρχικά τα γονίδια των γλυκουρονικών εστερασών *AeGE15* και *TIGE15* εκφράστηκαν, παρήχθησαν και απομονώθηκαν μέσω του συστήματος ετερόλογης έκφρασης της μεθυλότροφης ζύμης *Pichia pastoris* X33. Η παραγωγή πραγματοποιήθηκε σε υγρές καλλιέργειες των κυττάρων της ζύμης, ενώ η απομόνωση έγινε μέσω των σταδίων διήθησης, 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). Το μοριακό βάρος για την πρωτεΐνη *AeGE15* υπολογίστηκε ίσο με 60 kDa και για την πρωτεΐνη *TIGE15* ίσο με 70 kDa. Το ισοηλεκτρικό σημείο για την *AeGE15* βρέθηκε στην περιοχή pH 4.2-5.3 και για την *TIGE15* στην περιοχή pH 4.6-5.8 .

Έπειτα, έλαβαν χώρα ενζυμικές αντιδράσεις με υποστρώματα λιγνινών από προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με μίγμα νερού/ακετόνης με σκοπό τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος *AeGE15* και *TIGE15*, με την ξυλανάση GH11. Η ανίχνευση των προϊόντων σε πρώτη φάση έγινε με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), χωρίς όμως την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων.

Σε δεύτερη φάση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων ως τεχνική μεγαλύτερης ευαισθησίας για τη μελέτη του συνεργισμού των ενζύμων, μέσω της ανίχνευσης γραμμικών ολιγοσακχαριτών της ξυλόζης. Από τα χρωματογραφήματα, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των απελευθερούμενων σακχάρων στις αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο ένζυμα σε σύγκριση με τις αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκε μόνο η ξυλανάση. Επομένως, ο συνεργισμός ανάμεσα στα δύο ένζυμα επαληθεύτηκε.



# Abstract

The present diploma thesis studies the production and purification of two glucuronyl esterases from the basidiomycetes *Artolenzites elegans* and *Trametes ljubarskyi*, as well as their synergistic effect with a GH11 family endo-xylanase from *Fusarium Oxysporum* .

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. The production of the recombinant enzymes took place in liquid cell cultures, which were centrifuged and filtrated. The enzymes were purified using immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC). The molecular weight of the two enzymes were assessed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) and their isoelectric points by Isoelectric Focusing-PAGE (IEF-PAGE). The molecular weight of the *AeGE15* enzyme was calculated to 60 kDa, whereas the molecular weight of the *TIGE15* enzyme was calculated to 70 kDa. The isoelectric point of the *AeGE15* was found between the 4.2-5.3 pH area and the isoelectric point of the *TIGE15* was found between the 4.6-5.8 pH area.

Furthermore, in order to study the synergistic effect of the two glucuronyl esterases with the GH11 xylanase, reactions of the enzymes with lignin substrates from acetone/water pretreated lignocellulosic biomass took place. The products were firstly identified with Thin layer chromatography (TLC), without providing reliable results.

Then through high performance anion exchange chromatography (HPEC) the synergistic effects of the enzymes was examined by measuring the linear oligosaccharides of xylose. The increased concentration of the released sugars in the reactions were both the enzymes were used, confirmed the synergism between the two enzymes.





## Πίνακας περιεχομένων

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>Κεφάλαιο 1:</b> Σύσταση φυτικού κυτταρικού τοιχώματος .....	15
1.1 Κυτταρίνη .....	16
1.2 Ημικυτταρίνη .....	17
1.3 Λιγνίνη.....	17
<b>Κεφάλαιο 2:</b> Προκατεργασία βιομάζας .....	19
2.1 Στόχος της προκατεργασίας και ανθεκτικότητα βιομάζας.....	19
2.2 Μέθοδοι προκατεργασίας.....	20
2.2.1 Φυσικές Μέθοδοι .....	20
2.2.2 Χημικές μέθοδοι .....	21
2.2.3 Φυσικοχημικές μέθοδοι .....	22
2.2.4 Βιολογικές μέθοδοι.....	23
<b>Κεφάλαιο 3:</b> Αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών.....	24
3.1 Μύκητες που παράγουν λιγνινολυτικά ένζυμα.....	24
3.1.1 <i>A. Elegans</i> .....	25
3.1.2 <i>T. Ijubarskyi</i> .....	26
3.2 Ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών.....	26
3.2.1 Κυτταρινάσες .....	26
3.2.2 Ημικυτταρινάσες.....	27
3.2.3 Ξυλανάσες.....	27
<b>Κεφάλαιο 4:</b> Γλυκουρονικές Εστεράσες.....	29
4.1 Εισαγωγή.....	29
4.2 Συνθετικά υποστρώματα από τις εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος.....	30
4.3 Δομή των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος .....	31
4.4 Προϊόντα αντιδράσεων συνεργιστικής δράσης ξυλανασών και εστερασών σε λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα .....	31
<b>Κεφάλαιο 5:</b> Υλικά και Μέθοδοι .....	35
5.1 Υλικά.....	35
5.1.1 Μικροοργανισμοί.....	35

5.1.2 Χημικά Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα Υλικά .....	36
5.1.3 Υλικά και Στήλες Χρωματογραφίας .....	36
5.1.4 Δείγματα λιγνινοκυτταρινούχων βιομαζών.....	36
5.1.5 Θρεπτικά Μέσα και Ρυθμιστικά Διαλύματα (Buffers) .....	36
5.1.6 Συσκευές και Όργανα .....	38
5.2 Μέθοδοι.....	38
5.2.1 Παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών .....	39
5.2.2 Απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	40
5.2.3 Προσδιορισμός μοριακού βάρους και ισοηλεκτρικού σημείου των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	42
5.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών μορίων .....	44
5.2.5 Ενζυμικές αντιδράσεις με υποστρώματα λιγνινών .....	45
5.2.6 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin-layer chromatography, TLC) .....	45
5.2.7 Χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης .....	46
<b>Κεφάλαιο 6:</b> Παραγωγή των ανασυνδυασμένων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 και T/GE15 .....	51
6.1 Προσδιορισμός μοριακού βάρους των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών .....	51
6.2 Προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	53
6.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των καθαρών AeGE15 και T/GE15.....	54
6.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός των γλυκουρονικών εστερασών AeGE15 και T/GE15 .....	55
6.4.1 Υπολογισμός βέλτιστης θερμοκρασίας, βέλτιστου pH δράσης και σταθερότητας των ανασυνδυασμένων ενζύμων .....	55
<b>Κεφάλαιο 7:</b> Μελέτη Ενζυμικού Συνεργητισμού .....	59
7.1 Μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Thin-layer chromatography, TLC).....	61
7.2 Μέθοδος χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPAEC) .....	63
<b>Κεφάλαιο 8:</b> Συμπεράσματα και συζήτηση .....	69
8.1 Σύνοψη αποτελεσμάτων .....	69
8.2 Μελλοντικές προκλήσεις .....	71

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**





# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



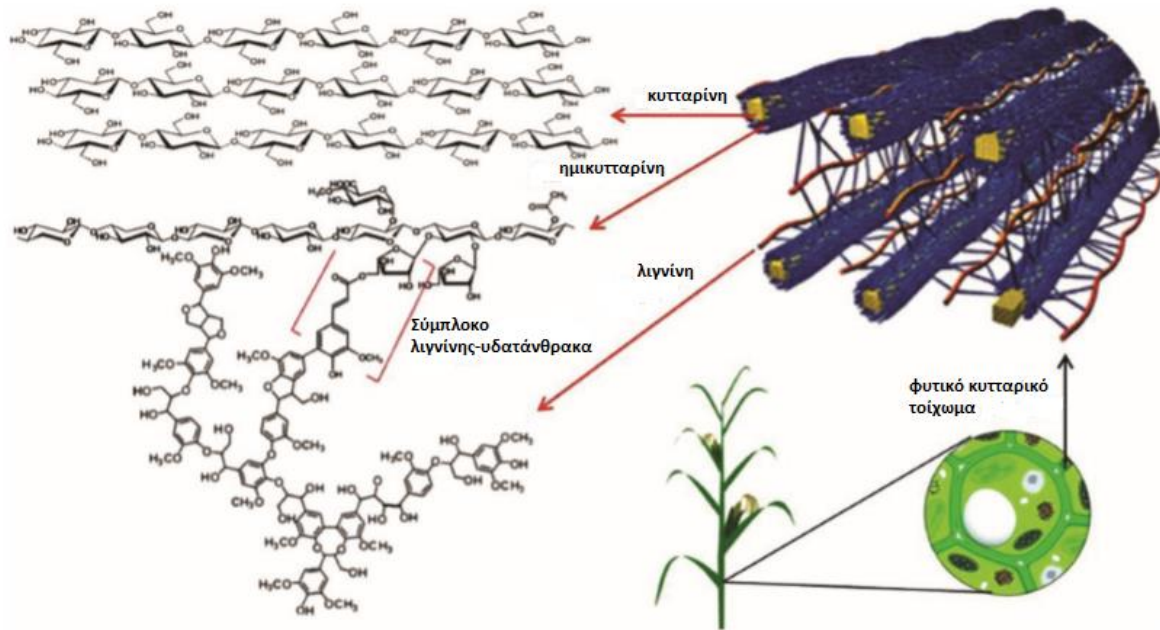
## Κεφάλαιο 1: Σύσταση φυτικού κυτταρικού τοιχώματος

Τις τελευταίες δεκαετίες η κατανάλωση ενέργειας αυξάνεται συνεχώς, αφού ο πληθυσμός του κόσμου έχει αυξηθεί και περισσότερες χώρες έχουν εκβιομηχανοποιηθεί. Τα ακατέργαστα έλαια αποτελούν τον σημαντικότερο φυσικό πόρο για την κάλυψη της αυξανόμενης ζήτησης ενέργειας. Ως εκ τούτου, η χρήση των καυσίμων οδηγεί στην υπερθέρμανση του πλανήτη, τη ρύπανση του περιβάλλοντος και άλλους σχετικούς κινδύνους. Αν η χρήση του αργού πετρελαίου συνεχιστεί με τους σημερινούς ρυθμούς, προβλέπεται ότι η ετήσια παγκόσμια παραγωγή πετρελαίου θα μειωθεί από τα σημερινά 30 δισεκατομμύρια βαρέλια ετησίως σε περίπου 5 δισεκατομμύρια βαρέλια το 2050. Επομένως, η ανάγκη για εναλλακτικές πηγές ανανεώσιμης ενέργειας αυξάνεται συνεχώς. (Puttaswamy et al. 2016)

Η βιοαιθανόλη θεωρείται σημαντικό ανανεώσιμο καύσιμο για να αντικαταστήσει εν μέρει τα ορυκτά καύσιμα. Η παγκόσμια παραγωγή βιοαιθανόλης αυξήθηκε από 50 εκατομμύρια m<sup>3</sup> το 2007 σε πάνω από 100 εκατομμύρια m<sup>3</sup> το 2012. Η βιοαιθανόλη που παράγεται από ζάχαρη (Βραζιλία) ή άμυλο (ΗΠΑ) είναι σήμερα το πιο κοινό ανανεώσιμο βιοκαύσιμο. Αυτά τα καύσιμα που προέρχονται από καλλιέργειες ονομάζονται βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς. Ωστόσο, η χρήση καλλιεργειών για την παραγωγή καυσίμων ανταγωνίζεται τα τρόφιμα και αποτελεί βραχυπρόθεσμη λύση λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας γης. Ως εκ τούτου, κρίνεται αναγκαίο να επιδιωχθούν εναλλακτικές ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, όπως η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα, για την αντιμετώπιση της έλλειψης βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς. Τα βιοκαύσιμα που παράγονται από λιγνοκυτταρίνη (ουδέτερα σε σχέση με την παραγωγή αερίων θερμοκηπίου) είναι βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς, η έρευνα των οποίων έχει κλιμακωθεί κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, με αριθμό πιλοτικών μονάδων να λειτουργούν σε ολόκληρο τον κόσμο. (Kang et al. 2014)

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα είναι ο πλέον άφθονος ανανεώσιμος πόρος στον κόσμο, με ετήσια παραγωγή που υπολογίζεται σε 10-50 δισεκατομμύρια τόνους. Η λιγνοκυτταρίνη είναι το κύριο συστατικό της φυτικής βιομάζας και είναι διαθέσιμη σε αφθονία από διάφορες ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως τα γεωργικά κατάλοιπα (σπόροι καλαμποκιού, άχυρο σίτου, σακχαροκάλαμο), αποκλειστικά ενεργειακές καλλιέργειες (χλοοτάπητες, λεύκες), δασικά υπολείμματα (ξύλινα τσιπς, πριονίδια) και αστικά στερεά απόβλητα. (Gamage, Lam, and Zhang 2010; Volynets, Ein-Mozaffari, and Dahman 2017)

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελείται από τρία κύρια συστατικά: την κυτταρίνη (20-50 %), την ημικυτταρίνη (20-35 %) και τη λιγνίνη (10 – 35 %), καθώς και άλλα συστατικά σε μικρές ποσότητες. (Gamage, Lam, and Zhang 2010)



Εικόνα 1.1: Δομή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

## 1.1 Κυτταρίνη

Τα φυτικά κύτταρα περιβάλλονται από ένα ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα πλούσιο σε πολυσακχαρίτες το οποίο βοηθά στον καθορισμό της συνολικής μορφής, δύναμης και ανάπτυξης του σώματος του φυτού. Οι δύο κύριοι τύποι κυτταρικού τοιχώματος που διακρίνονται στα φυτά είναι το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα και το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα. Το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από 15-40% κυτταρίνη, 30-50% πηκτικούς πολυσακχαρίτες και 20-30% ξυλογλυκάνες και μικρότερες ποσότητες αραβινοξυλάνων και δομικών πρωτεϊνών σε βάση ξηρού βάρους, δομημένες σε ένα ή περισσότερα ελάσματα. Το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από μικροϊνίδια κυτταρίνης με λιγνίνη, ξυλάνη και γλυκομαννάνες που αντικαθιστούν τις ξυλογλυκάνες και τις πηκτίνες.

Η κυτταρίνη, ο πλέον άφθονος πολυσακχαρίτης στη Γη, είναι ένα πολυμερές που αποτελείται από μονάδες D-γλυκόζης, συνδεδεμένες με  $\beta$ -1,4-γλυκοζιτικό δεσμό. (Coseri 2017) Οι παράλληλες μη διακλαδισμένες αλυσίδες γλυκόζης σχηματίζουν μικροϊνίδια μέσω δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων Van der Waals. Τα μικροϊνίδια κυτταρίνης αποτελούνται από καλώς πακεταρισμένες, μακριές συνδεδεμένες με δεσμούς υδρογόνου εκτάσεις κρυσταλλικής κυτταρίνης και λιγότερο διατεταγμένες άμορφες περιοχές. (Endler and Persson 2011)

Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης καθορίζεται από τον αριθμό των μονομερών που συνθέτουν κάθε αλυσίδα κυτταρίνης. (Festucci-Buselli, Otoni, and Joshi 2007) Ειδικότερα, ο βαθμός πολυμερισμού ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με την προέλευση και την



επεξεργασία της πρώτης ύλης, για παράδειγμα η κυτταρίνη που προέρχεται από ξυλοπολτό έχει βαθμό πολυμερισμού μεταξύ 300 και 1700. Οι υψηλότερες τιμές βαθμού πολυμερισμού είναι χαρακτηριστικές για την κυτταρίνη από βαμβάκι ή άλλες φυτικές ίνες. Μικρότερες τιμές βαθμού πολυμερισμού (250-500) είναι ειδικές για την κυτταρίνη από αναγεννημένες ίνες και επίσης αυτές που ταξινομούνται ως μικροκρυσταλλική κυτταρίνη. (Coseri 2017)

## 1.2 Ημικυτταρίνη

Οι ημικυτταρίνες είναι ετερογενή πολυμερή πεντοζών (ξυλόζη, αραβινόζη), εξοζών (μανόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη) και οξέων σακχάρων. Οι πρωταρχικές ημικυτταρίνες είναι οι ξυλάνες, οι μαννάνες, οι αραβινάνες και οι γαλακτάνες. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, οι ημικυτταρίνες δεν είναι χημικά ομοιογενείς. Οι ημικυτταρίνες στα μη κωνοφόρα δέντρα περιέχουν κυρίως ξυλάνες, ενώ στα κωνοφόρα δέντρα περιέχουν κυρίως γλυκομανάνες. (Saha 2003)

Οι πολυσακχαρίτες της ημικυτταρίνης είναι γνωστό ότι συνδέονται στενά με μικροϊνίδια κυτταρίνης μέσω δεσμών υδρογόνου και τα περισσότερα μοντέλα τοιχώματος έχουν ενσωματώσει αυτήν την αλληλεπίδραση ως ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της αρχιτεκτονικής του κυτταρικού τοιχώματος. (Höfte and Voxeur 2017)

Η βιομετατροπή της ημικυτταρίνης έχει λάβει μεγάλη προσοχή λόγω των πρακτικών εφαρμογών της σε διάφορες αγροτοβιομηχανικές διεργασίες, όπως η αποτελεσματική μετατροπή της ημικυτταρινικής βιομάζας σε καύσιμα και χημικές ουσίες, η αποικοδόμηση χαρτοπολτού, η βελτίωση της πεπτικότητας της ζωικής τροφής, την καθαρότητα των χυμών και η βελτίωση της συνεκτικότητας της μύρας. Επίσης, η χρησιμοποίηση των ημικυτταρινικών σακχάρων είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική μετατροπή των λιγνοκυτταρινικών υλικών στο καύσιμο της αιθανόλης και άλλων προϊόντων ζύμωσης προστιθέμενης αξίας. Άλλες πιθανές εφαρμογές των ημικυτταρινών είναι η βιοπολυτοποίηση του ξύλου, η κατεργασία του καφέ, η διαβροχή φρούτων και λαχανικών και η παρασκευή ψητών προϊόντων με υψηλή περιεκτικότητα σε ίνες. (Saha 2003)

## 1.3 Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένας από τους σημαντικότερους δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγεται από τη μεταβολική οδό φαινυλαλανίνης/τυροσίνης στα φυτικά κύτταρα και παρέχει ανθεκτικότητα στο κυτταρικό τοίχωμα. Είναι το δεύτερο πιο άφθονο βιοπολυμερές που αντιπροσωπεύει το 30% της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα στη βιόσφαιρα. (Kumar, Campbell, and Turner 2016; Liu, Luo, and Zheng 2018)

Η λιγνίνη πολυμερίζεται από τρεις κύριους τύπους μονοαλκοολών τη συναπυλική αλκοόλη (μονάδα S), τη κονυφερυλική αλκοόλη (μονάδα G) και τη π-κουμαρμυλική αλκοόλη (μονάδα H) με υπεροξειδάση (POD) και λακκάση (LAC) στο δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα. Επιπλέον,

έχουν αναγνωρισθεί και άλλες ενώσεις που συμπεριλαμβάνουν υδροξυκινναμαλδεΐδες (hydroxycinnamaldehydes), τρικινικές φλαβόνες (tricin flavones), υδροξυστυλοβένια (hydroxystilbenes) και ξενοβιοτικά (xenobiotics) ότι είναι υπομονάδες της λιγνίνης. (Liu, Luo, and Zheng 2018)

Η ακριβής αναλογία των τριών μονομερών μονάδων της λιγνίνης ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τη βιολογική πηγή της λιγνίνης. Η λιγνίνη στα δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα τόσο των μονοκοτυλήδων όσο και των δικοτυλίδων περιέχει κυρίως τη μονάδα G (35-49%) και τη μονάδα S (40-61%). Εντούτοις, η μονόκοκκη λιγνίνη περιέχει επίσης μικρότερες αλλά σημαντικές ποσότητες μονάδων H (4-15%), οι οποίες απαντώνται μόνο σε ιχνοστοιχεία στην λιγνίνη από είδη δικοτυλίδων. (Kumar, Campbell, and Turner 2016)

Η λιγνίνη σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάκτηση ενέργειας στους μύλους χαρτοπολτού και δεν έχει μετατραπεί ακόμη σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας σε μεγάλη κλίμακα. (Norgren and Edlund 2014) Στις μονάδες επεξεργασίας λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, η λιγνίνη απορρίπτεται από το ξύλο και γίνεται παραπροϊόν. Από αυτό μόνο ένα ασήμαντο μέρος χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ειδικών προϊόντων, το υπόλοιπο χρησιμοποιείται ως καύσιμο για παραγωγή θερμικής ενέργειας. Η λιγνίνη είναι ένα εξαιρετικό καύσιμο, καθώς παράγει περισσότερη ενέργεια όταν καίγεται από την κυτταρίνη. Υπάρχουν διάφοροι τύποι λιγνίνης όσον αφορά τον φυτικό πόρο από τον οποίο προέρχονται (ξυλεία ή γεωργική συγκομιδή) αλλά και ανάλογα με τη διεργασία απομόνωσης. (Smaranda and Tucu 2010)

Υπάρχουν ωστόσο και άλλες εφαρμογές της λιγνίνης, όπως η χρήση της σε ανανεώσιμη βιοπολυμερική ταινία συσκευασίας. Η ενσωμάτωση της λιγνίνης στη βιοπολυμερική ταινία είναι ικανή να προσφέρει πρόσθετα οφέλη και λύσεις σε διάφορες βιομηχανίες, όπως τρόφιμα, συσκευασίες, γεωργία και φαρμακευτικά προϊόντα. (Zadeh, O'Keefe, and Kim 2018) Ένα ειδικό υλικό που βασίζεται σε μήτρα λιγνίνης είναι το Arboform. Κατασκευασμένο από καθαρά βιοπολυμερή, αυτό το θερμοπλαστικό υλικό είναι κατάλληλο για χύτευση με έγχυση. (Smaranda and Tucu 2010)

Επίσης, στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί εφαρμογές της λιγνίνης ή των παραγώγων της με στόχο τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας. Πιθανές εφαρμογές είναι στη θεραπεία της παχυσαρκίας, του διαβήτη, της θρόμβωσης, των ιογενών λοιμώξεων και του καρκίνου. (Vinardell and Mitjans 2017)

## Κεφάλαιο 2: Προκατεργασία βιομάζας

### 2.1 Στόχος της προκατεργασίας και ανθεκτικότητα βιομάζας

Η μετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα και κατ' επέκταση σε βιοκαύσιμα ή άλλα προϊόντα περιλαμβάνει τα εξής κύρια στάδια: την προκατεργασία της βιομάζας, την υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης σε αναγωγικά σάκχαρα, τη ζύμωση των σακχάρων για την παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος, το διαχωρισμό από το στερεό υπόλειμμα και τέλος, την ανάκτηση και απομόνωση του προϊόντος. Τα απελευθερούμενα μόρια κυτταρίνης και ημικυτταρίνης που υπάρχουν στην προκατεργασμένη βιομάζα στη συνέχεια υδρολύονται σε διαλυτά σάκχαρα μέσω χημικής ή ενζυματικής μεθόδου, τα οποία μετατρέπονται τελικά σε αιθανόλη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η ζύμωση των παραγόμενων σακχάρων μπορεί να γίνει με τη βοήθεια μυκήτων ή βακτηρίων. (Zabed et al. 2017)



**Εικόνα 1.2:** Τυπική διεργασία παραγωγής βιοαιθανόλης και άλλων προϊόντων από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα

Η λιγνινοκυτταρίνη είναι το κύριο συστατικό της φυτικής βιομάζας και είναι διαθέσιμο σε αφθονία από διάφορες ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως γεωργικά κατάλοιπα (σπόροι καλαμποκιού, άχυρο σιταριού, ζαχαροκάλαμο), αποκλειστικά ενεργειακές καλλιέργειες (switch grass, λεύκες), υπολείμματα δασοκομίας (ξύλινα τσιπς, πριονίδια) και αστικά στερεά απόβλητα. (Volynets, Ein-Mozaffari, and Dahman 2017) Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη (20-50% του συνολικού ξηρού βάρους), ημικυτταρίνη (20-35%) και λιγνίνη (10-35%), καθώς και από άλλα συστατικά, όπως τέφρα, δομικές πρωτεΐνες και εκχύλισμα σε μικρές ποσότητες. (Gamage, Lam, and Zhang 2010; Volynets, Ein-Mozaffari, and Dahman 2017)

Τα πολυμερή κυτταρίνη και ημικυτταρίνη είναι σταθερά συνδεδεμένα με τη λιγνίνη μέσω ομοιοπολικών δεσμών και δεσμών υδρογόνου, γεγονός που καθιστά τη δομή εξαιρετικά ισχυρή και ανθεκτική στον αποπολυμερισμό. (Zabed et al. 2016) Τα σύμπλοκα λιγνίνης-υδατάνθρακα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα της βιομάζας. Αυτές είναι οι γέφυρες μεταξύ της λιγνίνης και των ημικυτταρινών που σχηματίζονται μέσω δεσμών εστέρα και αιθέρα μεταξύ των π-κουμαρικών, φερουλικών και γλυκουρονικών οξέων. (Volynets, Ein-Mozaffari, and Dahman 2017) Η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης, η προσιτή επιφάνεια, η προστασία από τη λιγνίνη και ο ετερογενής χαρακτήρας των σωματιδίων βιομάζας συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Επομένως, σχηματίζεται ένας φυσικός φραγμός στην υδρόλυση της βιομάζας για την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων. (Zabed et al. 2016)

Προκειμένου να αντιμετωπισθεί η ανθεκτικότητα της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και η παραγωγή των βιοκαυσίμων να πραγματοποιείται σε ανταγωνιστικά κόστη είναι απαραίτητη η προκατεργασία της βιομάζας. Κατά την προκατεργασία επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των συμπλόκων λιγνίνης-κυτταρίνης-ημικυτταρίνης μέσω αλλαγής των μακροσκοπικών, υπομικροσκοπικών και μικροσκοπικών δομών της βιομάζας, καθιστώντας τη βιομάζα προσιτή σε υδρολυτικά ένζυμα που τελικά μετατρέπουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Οι μεταβολές της βιομάζας που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας περιλαμβάνουν την απομάκρυνση της λιγνίνης, τη μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης και την αύξηση της επιφάνειας και του πορώδους της βιομάζας. (Zabed et al. 2016)

## 2.2 Μέθοδοι προκατεργασίας

Οι μέθοδοι προκατεργασίας μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις ευρείες κατηγορίες: φυσικές, χημικές, φυσικοχημικές και βιολογικές. Παρακάτω ακολουθεί μία σύντομη περιγραφή των μεθόδων αυτών.

### 2.2.1 Φυσικές Μέθοδοι

Οι φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας περιλαμβάνουν τη μηχανική λείανση (άλεση με σφαίρα, άλεση δύο κυλίνδρων, άλεση με σφύρα, κολλοειδής και δονητική άλεση, θερμόλυση και ακτινοβολία (ακτίνες γάμα, δέσμη ηλεκτρονίων ή μικροκύματα). Το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής της προκατεργασίας με τη βιομάζα είναι η μείωση της επιφάνειας και του όγκου των πόρων, η μείωση του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης και της κρυσταλλικότητάς της, η υδρόλυση των ημικυτταρινών και ο μερικός αποπολυμερισμός της λιγνίνης. Οι φυσικές προκατεργασίες καταναλώνουν ενέργεια, είναι φιλικές προς το περιβάλλον και δεν είναι βιώσιμες για εμπορικές διαδικασίες. (Zabed et al. 2017)

Η μηχανική προκατεργασία του λιγνινοκυτταρινικού υλικού είναι ένα σημαντικό βήμα για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της βιομετατροπής, της πυκνότητας και της κατανομής των σωματιδίων, τη διευκόλυνση της ενζυμικής προσπέλασης και του συνολικού μετασχηματισμού του λιγνινοκυτταρινικού υλικού σε βιοκαύσιμα χωρίς τη δημιουργία τοξικών παράπλευρων ρευμάτων. (Amin et al. 2017)

### 2.2.2 Χημικές μέθοδοι

Οι μέθοδοι χημικής προκατεργασίας χρησιμοποιούνται συχνότερα από τις μεθόδους βιολογικής ή φυσικής προκατεργασίας επειδή είναι πιο αποτελεσματικές και ενισχύουν τη βιοαποικοδόμηση σύνθετων υλικών. (Amin et al. 2017) Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα μπορεί να υποβληθεί σε χημική προκατεργασία με χρήση κυρίως βάσεων και οξέων που οδηγούν στην απολιγνινοποίηση της βιομάζας και στη μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. (Zabed et al. 2017)

Η αλκαλική προκατεργασία περιλαμβάνει την προσθήκη βάσεων στη βιομάζα, οδηγώντας σε αύξηση της εσωτερικής επιφάνειας με διόγκωση, μείωση του βαθμού πολυμερισμού και της κρυσταλλικότητας, καταστροφή συνδέσεων μεταξύ λιγνίνης και άλλων πολυμερών και υποβάθμιση της λιγνίνης. Η αλκαλική προκατεργασία λειτουργεί καλύτερα για τη βιομάζα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιγνίνη, αυξάνοντας την περιεκτικότητα της βιομάζας σε λιγνίνη η μέθοδος καθίσταται λιγότερο αποτελεσματική. (Amin et al. 2017) Επομένως, η αποτελεσματικότητα αυτής της μεθόδου εξαρτάται από τη σύσταση της βιομάζας σε λιγνίνη. (Gamage, Lam, and Zhang 2010) Οι ουσίες NaOH, KOH και Ca(OH)<sub>2</sub> είναι τα περισσότερα αναφερόμενα χημικά που χρησιμοποιούνται στην αλκαλική προκατεργασία, όπου οι συνθήκες της διεργασίας είναι σχετικά ήπιες, αλλά οι χρόνοι αντίδρασης μπορεί να είναι μεγάλοι. (Amin et al. 2017)

Ισχυρά οξέα όπως το θειικό οξύ και το υδροχλωρικό οξύ έχουν χρησιμοποιηθεί στην προκατεργασία των λιγνινοκυτταρινικών υλικών. Οι προκατεργασίες συμπυκνωμένων οξέων διαταράσσουν τους δεσμούς υδρογόνου στην κρυσταλλική κυτταρίνη μετατρέποντάς την σε άμορφη κατάσταση. Συστήματα που χρησιμοποιούν αυτήν την προκατεργασία συνεπάγεται υψηλότερο κόστος εξαιτίας των απαραίτητων ειδικών ανθεκτικών στη διάβρωση υλικών. Επιπλέον, προκειμένου να γίνει η διαδικασία οικονομικά εφικτή, το συμπυκνωμένο οξύ ανακτάται. (Gamage, Lam, and Zhang 2010) Η προκατεργασία αραιωμένης όξινης υδρόλυσης από την άλλη πλευρά μπορεί να επιτύχει υψηλά ποσοστά αντίδρασης και να βελτιώσει σημαντικά την υδρόλυση της κυτταρίνης. Η λιγνίνη είναι σχεδόν αδιάλυτη στις περισσότερες περιπτώσεις, αλλά διασπάται σε υψηλό βαθμό, καθιστώντας έτσι την κυτταρίνη εύκολα προσβάσιμη στα ένζυμα. (Amin et al. 2017)

Επί προσθέτως, η προκατεργασία με ένα οργανικό ή υδατικό μίγμα οργανικού διαλύτη με καταλύτη ανόργανου οξέος χρησιμοποιείται για να διασπάσει τους δεσμούς ενδο-λιγνίνης και ημικυτταρίνης. Οι οργανικοί διαλύτες μπορεί να είναι: μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, αιθυλενογλυκόλη, τριαιθυλενογλυκόλη ή τετραϋδροφουρφουρύλιο. Ο καταλύτης μπορεί να είναι ένα οργανικό οξύ όπως οξαλικό, ακετυλοσαλικυλικό και σαλικυλικό οξύ. Από την προσθήκη οξέος μπορεί να ληφθεί υψηλή απόδοση, ωστόσο οι διαλύτες πρέπει να ανακυκλώνονται προκειμένου αυτή η διεργασία να είναι οικονομικά βιώσιμη και να αποτραπούν ανασταλτικές επιδράσεις στις επόμενες διεργασίες. (Gamage, Lam, and Zhang 2010) Ακόμα, από το συγκεκριμένο τύπο προκατεργασίας, προκύπτουν ρεύματα πλούσια σε λιγνίνη, λόγω της διαλυτότητάς της σε αυτούς, η οποία μπορεί να περιέχει σάκχαρα της ημικυτταρίνης τα οποία έχουν μείνει συνδεδεμένα στη λιγνίνη. Τέτοια δείγματα λιγνίνης από προκατεργασία οξειδωσης με μείγμα νερού-ακετόνης χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική με σκοπό τη μελέτη του συνεργιτισμού των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος.

### 2.2.3 Φυσικοχημικές μέθοδοι

Κατά τη φυσικοχημική προκατεργασία συνδυάζονται φυσικές συνθήκες και χημικές ουσίες. Οι φυσικοχημικές μέθοδοι ασκούν δράσεις στη βιομάζα αυξάνοντας την προσβάσιμη επιφάνεια, μειώνοντας την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και αφαιρώντας τις ημικυτταρίνες και τη λιγνίνη από τη λιγνινοκυτταρίνη. (Zabed et al. 2017)

Η προκατεργασία με έκρηξη ατμού είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προκατεργασίας, καθώς χρησιμοποιεί τόσο χημικές όσο και φυσικές τεχνικές για να σπάσει τη δομή του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού. Αυτή η μέθοδος υδροθερμικής προκατεργασίας υποβάλλει το υλικό σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες για μια σύντομη χρονική περίοδο, μετά την οποία αποσυμπιέζει γρήγορα το σύστημα, διασπώντας τη δομή των ινιδίων. Η διάσπαση των ινιδίων αυξάνει την προσβασιμότητα της κυτταρίνης στα ένζυμα κατά την διάρκεια της υδρόλυσης. (Brodeur et al. 2011)

Μία άλλη μέθοδος προκατεργασίας είναι η προκατεργασία υγρού θερμού ύδατος, που ονομάζεται επίσης αυτοϋδρολύση ή θερμοϋδρόλυση. Αυτή η μέθοδος έχει αναφερθεί ότι είναι παρόμοια αποτελεσματική σε σύγκριση με την προκατεργασία αραιού οξέος, αλλά χωρίς τη χρήση τέτοιων χημικών ουσιών. Έχει επίσης αυξημένους ρυθμούς ανάκτησης πεντόζης και δεν παράγει αναστολείς σε μεταγενέστερες διεργασίες. (Gamage, Lam, and Zhang 2010)

Η διαδικασία έκρηξης ίνας αμμωνίας/κατάψυξης είναι μια άλλη φυσικοχημική διαδικασία, όπως η προκατεργασία με έκρηξη ατμού, στην οποία το υλικό βιομάζας υποβάλλεται σε υγρή άνυδρη αμμωνία κάτω από υψηλές πιέσεις και μέτριες θερμοκρασίες και στη συνέχεια αποσυμπιέζεται γρήγορα. Οι μέτριες θερμοκρασίες (60°C έως 100°C) είναι σημαντικά

χαμηλότερες από εκείνες της διαδικασίας έκρηξης με ατμό, που σημαίνει μικρότερη κατανάλωση ενέργειας και συνολικό κόστος που σχετίζεται με τη διαδικασία. (Brodeur et al. 2011; Gamage, Lam, and Zhang 2010)

Μία ακόμα μέθοδος είναι η προκατεργασία με υπερκρίσιμα ρευστά (SCF). Ένα υπερκρίσιμο ρευστό είναι ένα υλικό που μπορεί να είναι είτε υγρό είτε αέριο, που χρησιμοποιείται σε μία κατάσταση πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία και την κρίσιμη πίεση όπου μπορούν να συνυπάρχουν αέρια και υγρά. Δείχνει μοναδικές ιδιότητες οι οποίες είναι διαφορετικές από εκείνες είτε αερίων είτε υγρών υπό κανονικές συνθήκες-διαθέτει πυκνότητα υγρού και εμφανίζει ιδιότητες μεταφοράς αερίου όπως διάχυση και ιώδες. Έτσι, η προκατεργασία με υπερκρίσιμα ρευστά έχει την ικανότητα να διεισδύει στην κρυσταλλική δομή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, ξεπερνώντας τους περιορισμούς μεταφοράς μάζας που συναντώνται σε άλλες προκατεργασίες. (Brodeur et al. 2011)

#### **2.2.4 Βιολογικές μέθοδοι**

Η βιολογική προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας μπορεί να διεξαχθεί χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς, ιδιαίτερα μύκητες, οι οποίοι είναι άσπρης σήψης, καφέ σήψης και μαλακούς μύκητες σήψης, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί αποικοδόμηση της λιγνίνης και των ημικυτταρινών. (Sindhu, Binod, and Pandey 2016; Zbed et al. 2017) Μεταξύ αυτών των μικροοργανισμών προκατεργασίας, οι μύκητες λευκής σήψης είναι οι πιο αποτελεσματικοί. Οι μύκητες της καφέ σήψης προσβάλλουν την κυτταρίνη, ενώ λευκοί και μαλακοί μύκητες σάρωσης επιτίθενται τόσο στην κυτταρίνη όσο και στην λιγνίνη. (Gamage, Lam, and Zhang 2010). Τα υποπροϊόντα που παράγονται κατά τη διάρκεια της βιολογικής προκατεργασίας κανονικά δεν θα αναστέλλουν την επακόλουθη υδρόλυση αφού η προκατεργασία πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες. Κατά τη διάρκεια της βιολογικής προκατεργασίας, η αποτελεσματική αποικοδόμηση της λιγνίνης εξαρτάται από τα λιγνολυτικά ένζυμα που παράγονται από βασιδιομύκητες όπως η υπεροξειδάση της λιγνίνης, η υπεροξειδάση μαγγανίου και η λακκάση. (Sindhu, Binod, and Pandey 2016)

Τα κύρια μειονεκτήματα της βιολογικής προκατεργασίας είναι ο χαμηλότερος ρυθμός υδρόλυσης και η απαίτηση μεγαλύτερου χρόνου επώασης σε σύγκριση με άλλες μεθόδους προκατεργασίας. (Zbed et al. 2017)





## Κεφάλαιο 3: Αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών

### 3.1 Μύκητες που παράγουν λιγνινολυτικά ένζυμα

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.

Το μέγεθος της βιοποικιλότητας των μυκήτων εκτιμάται ότι ανέρχεται σε 1,5 εκατομμύρια είδη. Ωστόσο, υπολογίζεται πως μόνο 5% των ειδών αυτών έχουν περιγραφεί. Οι μύκητες είναι από τους πιο διαδεδομένους οργανισμούς στη Γη και έχουν μεγάλη περιβαλλοντική και ιατρική σημασία. Ο ρόλος τους είναι πολύ σημαντικός και στον κλάδο της βιομηχανίας, όπου συμμετέχουν στη βιομετατροπή των πολυσακχαριτών του τοιχώματος των φυτικών κυττάρων σε απλά σάκχαρα για μεταγενέστερη ζύμωση σε βιοαιθανόλη. (Berrin et al. 2012)

Οι μύκητες που μπορούν να παράγουν τα απαραίτητα ένζυμα για την αποικοδόμηση της λιγνοκυτταρίνης είναι πολλοί και περιλαμβάνουν ασκομύκητες, όπως ο *Trichoderma reesei*, βασιδιομύκητες, λευκής σήψης, όπως ο *Phanerochaete chrysosporium*, καθώς και καφέ σήψης, όπως ο *Fomitopsis paltustris*. Η αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας από τους μύκητες αυτούς πραγματοποιείται από κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και λιγνινολυτικά ένζυμα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετώνται ετερόλογα ένζυμα που προέρχονται από δυο μύκητες λευκής σήψης, τους *Artolenzites elegans* και *Trametes ljobarskyi*.

#### 3.1.1 *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. Ο *A. elegans* είναι εκπρόσωπος του γένους *Artolenzites*, μέσα στην ομάδα *Trametes*. Τόσο οι μοριακοί δείκτες όσο και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά διακρίνουν τους *Artolenzites* από το γένος *Trametes*.

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

### 3.1.2 *T. Ijubarskyi*

Ο *T. Ijubarskyi* αποτελεί ένα ακόμα ελλειπώς 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 τη λιγνίνη από το ξύλο, οι νηματώδεις μύκητες λευκής σήψης έχουν υψηλό δυναμικό για βιοτεχνολογικές διεργασίες, ειδικά για τις εφαρμογές βιοτεχνολογίας λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών.

## 3.2 Ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών

### 3.2.1 Κυτταρινάσες

Τα μικροϊνίδια κυτταρίνης αποτελούνται γενικά από ένα μείγμα διαταραγμένης άμορφης κυτταρίνης και κυτταρίνης I, η οποία σχηματίζει σε μεγάλο βαθμό διατεταγμένες κρυσταλλικές περιοχές σταθεροποιημένες με ενδο- και διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου. Για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης, πολλοί οργανισμοί παράγουν κυτταρινάσες, που υδρολύουν τις β-1,4-γλυκοζιδικές συνδέσεις του πολυμερούς. Η κυτταρινάση είναι ένας γενικός όρος για ένζυμα που υδρολύουν αυτούς τους δεσμούς. (Igarashi et al. 2012) Τρεις βασικές κυτταρινάσες παρέχουν συνεργιστικά την πλήρη υδρόλυση της κυτταρίνης. Αυτές είναι οι ενδογλουκανάσες, οι εξωγλουκανάσες και οι β-γλυκοζιδάσες. Οι ενδογλουκανάσες υδρολύουν τους γλυκοζιδικούς δεσμούς στις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης παράγοντας ολιγομερή μακράς αλυσίδας (μη αναγωγικά άκρα) για τη δράση των εξωγλουκανασών ή των κελλοβιοϋδρολασών (cellobiohydrolases), οι οποίες διασπούν τη μακρά αλυσίδα ολιγοσακχαριτών που παράγεται από τη δράση των ενδογλουκανασών σε ολιγοσακχαρίτες βραχείας αλυσίδας. Υπάρχουν δύο τύποι εξωγλουκανασών που δρουν μονομερώς στα ολιγομερή μακράς αλυσίδας είτε από τα αναγωγικά είτε από τα μη αναγωγικά άκρα απελευθερώνοντας κελλοβιόζη, η οποία υδρολύεται περαιτέρω προς γλυκόζη από τις β-γλυκοζιδάσες. (Juturu and Wu 2014) Επιπροσθέτως, όλες οι κυτταρινάσες μπορούν να υδρολύσουν την άμορφη κυτταρίνη, ενώ μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μπορεί να υδρολύσει την κρυσταλλική κυτταρίνη. Τα ένζυμα που υδρολύουν την κρυσταλλική κυτταρίνη ονομάζονται κελλοβιοϋδρολάσες (cellobiohydrolases, CBHs) επειδή το κύριο προϊόν της αντίδρασης είναι η κυλλοβιόζη (cellulobiose), ένα διαλυτό β-1,4-συνδεδεμένο διμερές της γλυκόζης. Πολλές κελλοβιοϋδρολάσες έχουν μία δομή δύο τομέων, που έχει μια καταλυτική περιοχή και μια περιοχή δέσμησης κυτταρίνης. (Igarashi et al. 2012)

Οι κυτταρινάσες ομαδοποιούνται σε υδρολάσες γλυκοζιδίου (GH). Σύμφωνα με τη Βάση Δεδομένων Carbohydrate-Active enZymes (CAZy), οι ενδογλουκανάσες βρίσκονται στις οικογένειες GH 5-8, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 64, 71, 74, 81, 87, 124 και 128. Οι εξωγλουκανάσες βρίσκονται στις οικογένειες GH 5-7 και 48 και οι β-γλυκοζιδάσες στις οικογένειες GH 1, 3, 4, 17, 30 και 116. (Juturu and Wu 2014)

### 3.2.2 Ημικυτταρινάσες

Οι ημικυτταρινάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας και της ροής του άνθρακα στη φύση. Τα υποστρώματα αυτών των ενζύμων είναι οι ημικυτταρίνες, που όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη ενότητα, είναι μια ετερογενής ομάδα διακλαδισμένων και γραμμικών πολυσακχαριτών που δεσμεύονται μέσω δεσμών υδρογόνου με τα μικροϊνίδια κυτταρίνης στο τοίχωμα των φυτικών κυττάρων, διασυνδέοντάς τα σε ένα εύρωστο δίκτυο. Οι ημικυτταρίνες συνδέονται επίσης ομοιοπολικά με την λιγνίνη, σχηματίζοντας μαζί με την κυτταρίνη μια πολύ περίπλοκη δομή. (Richards n.d.; Shallom and Shoham 2003). Οι τυπικές ημικυτταρινάσες είναι οι L-αραβινανάσες, οι D-γαλακτανάσες, οι D-μαννανάσες και οι D-ξυλανάσες. (Richards n.d.)

Οι καταλυτικές μονάδες των ημικυτταρινασών είναι είτε υδρολάσες γλυκοζιδίου (glycoside hydrolases, GHs) που υδρολύουν γλυκοζιδικούς δεσμούς είτε εστεράσες υδατάνθρακα (carbohydrate esterases, CEs), οι οποίες υδρολύουν εστερικές συνδέσεις οξικών ή φερουλικών όξινων πλευρικών ομάδων. Αυτές οι καταλυτικές μονάδες, με βάση την ομολογία της πρωταρχικής αλληλουχίας τους, μπορούν να εκχωρηθούν σε οικογένειες που σημειώνονται με αριθμούς (π.χ. GH7 για οικογένεια 7 υδρολάσης γλυκοζιδίου). (Shallom and Shoham 2003)

### 3.2.3 Ξυλανάσες

Οι ξυλανάσες είναι γλυκοζιδάσες (υδρολάσες O-γλυκοζιδίου, EC 3.2.1.x) οι οποίες καταλύουν την ενδοϋδρόλυση των 1,4-β-D-ξυλοζιδικών δεσμών στην ξυλάνη. Η επίσημη ονομασία τους είναι η ένδο-1,4-β-ξυλανάση. (Collins, Gerday, and Feller 2005) Οι ξυλανάσες, όπως και τα υπόλοιπα ξυλανολυτικά ένζυμα ομαδοποιούνται σε οικογένειες των γλυκοζιδικών υδρολασών (glycoside hydrolases, GH). Το υπόστρωμα των ξυλανασών, η ξυλάνη, είναι ένας από τους κύριους δομικούς πολυσακχαρίτες στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα και μπορεί να αποτελεί πάνω από το 30% του συνολικού ξηρού βάρους. Η δομή της ξυλάνης ποικίλει και μπορεί να είναι από γραμμική ξυλάνη έως πολλαπλά υποκατεστημένος ετεροπολυσακχαρίτης. Ο βαθμός υποκατάστασης διαφέρει ανάλογα με το είδος της βιομάζας.

Μια μεγάλη ποικιλία ξυλανασών που παράγονται από μικροοργανισμούς γίνεται μια σημαντική ομάδα βιομηχανικών ενζύμων που είναι σε θέση να αποικοδομούν την ξυλάνη σε ανανεώσιμα

καύσιμα και χημικά, εκτός από τη χρήση τους σε βιομηχανίες τροφίμων, χαρτιού και χαρτοπολτού.(Walia et al. 2017)

Οι ημικυτταρινάσες περιλαμβάνουν ενδοξυλανάσες οι οποίες διασπούν την κύρια αλυσίδα β-1,4-ξυλόζης της ξυλάνης, την κυρίαρχη μορφή ημικυτταρίνης στη λιγνοκυτταρινική βιομάζα. Οι ενδοξυλανάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκμετάλλευση της φυτικής βιομάζας επειδή εκτός από τη γενική χρησιμότητά τους στην αποικοδόμηση της ξυλάνης, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για να δημιουργήσουν καθορισμένες συνθέσεις ξυλοολιγοσακχαριτών.

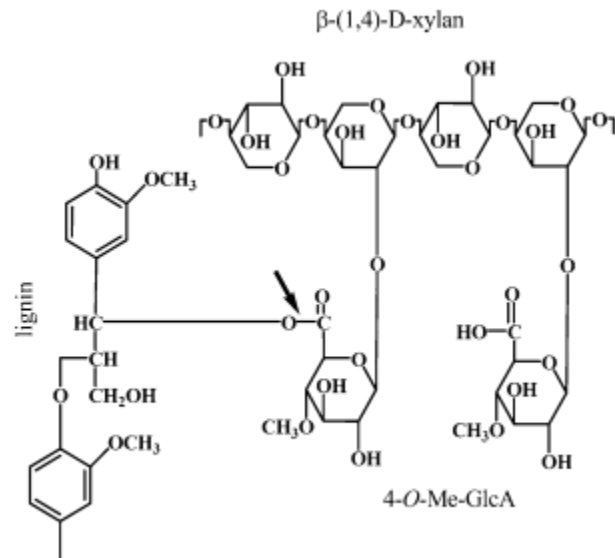
Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η οικογένεια ξυλανασών GH11, η οποία είναι μία από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών με βακτηριακά και μυκητιακά μέλη που θεωρούνται ως πραγματικές ξυλανάσες σε σύγκριση με τις άλλες οικογένειες λόγω της υψηλής εξειδίκευσης των υποστρωμάτων τους. (Paës, Berrin, and Beaugrand 2012)

## Κεφάλαιο 4: Γλυκουρονικές Εστεράσες

### 4.1 Εισαγωγή

Υπάρχουν τρεις τύποι ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ της λιγνίνης και των ημικυτταρινών στα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων. Ο πρώτος τύπος περιλαμβάνει π-κουμαρικό ή φερουλικό οξύ, συνδεδεμένο αιθερικά στη λιγνίνη και εστερικά με σάκχαρα ημικυτταρίνης. Αυτή η σύνδεση θα μπορούσε να αποκοπεί με φερουλικές εστεράσες. Ο δεύτερος τύπος αντιπροσωπεύεται από δεσμούς αιθέρα μεταξύ ομάδων-OH σακχαριτών και αλκοολών λιγνίνης. Ο τρίτος τύπος περιλαμβάνει εστερικούς δεσμούς μεταξύ υπολειμμάτων 4-Ο-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος (MeGlcA) ή D-γλυκουρονικού οξέος των γλυκουρονοξυλάνων και ομάδων υδροξυλίου αλκοολών της λιγνίνης.

Το 2006, οι Šráníková S. και Biely P. ανέφεραν πρώτοι την ύπαρξη μιας εστεράσης που απομονώθηκε από καλλιέργεια του μύκητα *Schizophyllum commune* σε λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα. Το ένζυμο αυτό παρουσίασε ενεργότητα σε συνθετικούς εστέρες του 4-Ο-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος (MeGlcA), υποδηλώνοντας πως είναι σε θέση να διασπάσει τους εστερικούς δεσμούς οι οποίοι συνδέουν την ημικυτταρίνη με τη λιγνίνη στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα. Το νέο αυτό ένζυμο ονομάστηκε εστεράση του γλυκουρονικού οξέος (glucuronoyl esterase, GE). Καθώς και νέα γονίδια που εκφράζουν τέτοια ένζυμα βρέθηκαν σε αρκετά μικροβιακά γονιδιώματα, μια νέα οικογένεια ενζύμων με την ονομασία υδατανθρακικές εστεράσες (carbohydrate esterases 15, CE15) προστέθηκε στη βάση δεδομένων CAZy.



**Εικόνα 1.3:** Πιθανή θέση διάσπασης της γλυκουρονικής εστεράσης: εστερική σύνδεση μεταξύ των υπολειμμάτων του 4-Ο-μέθυλο-D-γλυκουρανικού οξέος των γλυκουροξυλάνων και των αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης (Đuranová et al. 2009)

## 4.2 Συνθετικά υποστρώματα από τις εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος

Η μελέτη των γλυκουρονικών εστερασών παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς αποτελούν ελκυστικούς βιοκαταλύτες για βιοτεχνολογικές εφαρμογές όπως η αποδόμηση της φυτικής βιομάζας. Ωστόσο, η έλλειψη κατάλληλων υποστρωμάτων δυσχεραίνει την προσπάθεια χαρακτηρισμού των γλυκουρονικών εστερασών. Η απομόνωση, ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός φυσικών υποστρωμάτων, προερχόμενα από το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα, όπως είναι τα σύμπλοκα λιγνίνης-υδατάνθρακα (lignin-carbohydrate complexes, LCCs) δεν είναι ένα εύκολο έργο.

Έχει αποδειχτεί ότι το ένζυμο είναι ικανό να υδρολύει δύο συνθετικές ενώσεις που μιμούνται τους εστερικούς δεσμούς που περιγράφονται σε συμπλέγματα λιγνίνης-υδατάνθρακα, εστέρες 4-Ο-μεθυλο-D-γλυκουρονικού και D-γλυκουρονικού οξέος με 3-(4-μεθοξυφαινυλο) προπυλική αλκοόλη. (Ϊράνικόνά et al. 2007) Επίσης, έχει διερευνηθεί η καταλυτική δραστηριότητα δύο ανασυνδυασμένων γλυκουρονικών εστερασών *Phanerochaete chrysosporium*, των PcGE1 και PcGE2, σε συνθετικά υποστρώματα, μεθυλεστέρες ουρονικών οξέων και γλυκοσίδων τους, που παρασκευάστηκαν με εστεροποίηση με αιθερικό διαζωμεθάνιο. (ĐURANOVÁ et al. 2009) Επιπροσθέτως, στη βιβλιογραφία αναφέρεται η σύνθεση τεσσάρων καινούργιων μοντέλων υποστρωμάτων γλυκουρονικών εστερασών, που περιλαμβάνουν α- και αρυλαλκυλεστέρες που

είναι αντιπροσωπευτικοί του τμήματος της λιγνίνης των φυσικώς απαντώμενων εστέρων στα σύμπλοκα λιγνίνης-υδατάνθρακα (lignin-carbohydrate, LCCs). (d'Errico et al. 2015)

Το 2015 αναφέρθηκαν τα πρώτα παραδείγματα βελτιωμένης αποικοδόμησης λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με τη χρήση γλυκουρονικών εστερασών χρησιμοποιώντας φυσικό υπόστρωμα ινών καλαμποκιού. (d'Errico et al. 2016) Την ίδια χρονιά άλλη ομάδα ερευνητών παρουσίασε αποτελέσματα που δείχνουν για πρώτη φορά τη δράση ενζύμων σε πολυμερικό υπόστρωμα, που μιμείται πιο κοντά το φυσικό υπόστρωμα των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων από τα τεχνητά υποστρώματα χαμηλής μοριακής μάζας που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα. (Biely et al. 2015)

### 4.3 Δομή των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος

Η πρώτη τρισδιάστατη δομή υδατανθρακικής εστεράσης της οικογένειας 15 διασαφηνίστηκε στον καταλυτικό τομέα της γλυκουρονικής εστεράσης Cip2 από το μύκητα *Hypocrea jeronica*. Η δομή έχει μία αναδίπλωση  $\alpha/\beta$ -υδρολάσης με συνολική αρχιτεκτονική  $\alpha\beta$ -σάντουιτς. Το στριμμένο  $\beta$ -φύλλο περιτυλίγεται μεταξύ δύο στρωμάτων  $\alpha$ -ελίκων με την καταλυτική τριάδα Ser-His-Glu εκτεθειμένη στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Μία παρόμοια τρισδιάστατη δομή αναφέρθηκε για τη γλυκουρονική εστεράση από το μύκητα *Myceliophthora thermophila*. (Biely 2016; Pokkuluri et al. 2011)

### 4.4 Προϊόντα αντιδράσεων συνεργιστικής δράσης ξυλανασών και εστερασών σε λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη παράγραφο, η φυσική λειτουργία των γλυκουρονικών εστερασών θεωρείται ότι είναι η διάσπαση εστερικών δεσμών σε σύμπλοκα λιγνίνης-υδατάνθρακα ιδιαίτερα εκείνα που συνδέουν υπολείμματα λιγνίνης και γλυκουρονολικές μονάδες σε ξυλάνες σε κωνοφόρα δέντρα.

Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η απόδειξη της συνεργιστικής δράσης των γλυκουρονικών εστερασών με άλλα ένζυμα με στόχο την πιο αποτελεσματική διάσπαση των συμπλόκων λιγνίνης-ημικυτταρίνης και κατ'επέκταση το διαχωρισμό λιγνίνης από την ημικυτταρίνη. Στη βιβλιογραφία γίνεται αναφορά για τη συνεργιστική δράση μιας γλυκουρονολικής εστεράσης από το μύκητα λευκής σήψης *Cerrena unicolor* (CuGE) μαζί με την ενδοξυλανάση GH10. Η απελευθέρωση υποστρώματος από την CuGE για την ενδοξυλανάση GH10 έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της απελευθέρωσης του προϊόντος σε σύγκριση με τη δράση μόνο της ενδο-ξυλανάσης. Η CuGE απελευθερώνει επίσης ουδέτερους ξυλο-ολιγοσακχαρίτες που μπορούν να αποδοθούν στην ενζυματική πλευρική δραστηριότητα της φερουλο-εστεράσης όπως αποδεικνύεται από την απελευθέρωση φερουλικού οξέος από αδιάλυτη αραβινοξυλάνη σίτου. (Mosbech et al. 2018)

## Κεφάλαιο 4

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη της συνεργιστικής δράσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 και T/GE1 με την ενδο-ξυλανάση GH11 σε υποστρώματα λιγνινο-ημικυτταρίνης.



# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## Κεφάλαιο 5: Υλικά και Μέθοδοι

### 5.1 Υλικά

#### 5.1.1 Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διπλωματική εργασία για την παραγωγή της ξυλανάσης (της οικογένειας GH-11) του μικροοργανισμού *Fusarium oxysporum* και την παραγωγή των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 και TIGE15, χρησιμοποιήθηκε το μετασχηματισμένο στέλεχος X33 (γονότυπος: φυσικός τύπος, φαινότυπος: methanol utilization plus, Mut+) του ζυμομύκητα *Pichia pastoris* (Invitrogen). 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 ικανότητα 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 φορμαλδεΐδη 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 υπάρχει η δυνατότητα να παραχθούν αρκετά αυξημένες πυκνότητες κυττάρων. Εάν μάλιστα οι παραγόμενες πρωτεΐνες έχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης μπορεί να επιτευχθεί πραγματικά ενυπωσιακή 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.

### 5.1.2 Χημικά Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα Υλικά

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε χρήση χημικών αντιδραστηρίων των εταιρειών 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 BIOMEX (Κίνα), Erpendorf (Γερμανία), SIMAX (Τσεχία), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο) και Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο).

### 5.1.3 Υλικά και Στήλες Χρωματογραφίας

Τα υλικά χρωματογραφίας ήταν προϊόντα της BioRad (Η.Π.Α). Τα ένζυμα AeGE15 και T/GE15 απομονώθηκαν με στήλες χρωματογραφίας με Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.). Για τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) χρησιμοποιήθηκαν φύλλα αλουμινίου TLC Silica gel 60 F254 Merck (Γερμανία), ενώ για τη χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντως υψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε η στήλη Carbo-pac PA1.

### 5.1.4 Δείγματα λιγνινοκυτταρινούχων βιομαζών

Τα δείγματα λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από το υλικό lignocel και έχουν υποστεί προκατεργασία οξείδωσης με μείγμα νερού/ακετόνης. Έχουν λάβει την κωδικοποίηση ACO.12071K.L lignin και ACO\_230818\_L lignin.

Αναλυτικά οι συνθήκες προκατεργασίας των δειγμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 5.1 .

**Πίνακας 5.1:** Συνθήκες προκατεργασίας των δειγμάτων λιγνίνης

Δείγμα λιγνίνης	Αέριο	Αρχική πίεση (bar)	Τελική πίεση (bar)	Αναλογία διαλυτών	Διαλύτες	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος αντίδρασης (min)
ACO.12071K.L lignin	O <sub>2</sub>	16	26.5	50%/50%	dH <sub>2</sub> O/ACO	160	60
ACO_230818_L lignin	O <sub>2</sub>	8	15.1	50%/50%	dH <sub>2</sub> O/ACO	160	120

### 5.1.5 Θρεπτικά Μέσα και Ρυθμιστικά Διαλύματα (Buffers)

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για της 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 υπερκάθαρο νερό. ( $R=18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ ). Η σύσταση των θρεπτικών μέσων παρουσιάζεται στον πίνακα 5.2.

**Πίνακας 5.2:** Σύσταση χρησιμοποιούμενων θρεπτικών μέσων

Θρεπτικό Μέσο	Σύσταση
YPD άγαρ + ζεοσίνη	1 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2 % (w/v) πεπτόνη, 2 % (w/v) γλυκόζη, 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, $4 \times 10^{-5}$ % (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, $4 \times 10^{-5}$ % (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 5.3.

**Πίνακας 5.3:** Σύσταση χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα	Σύσταση
PΔ Talon	0.3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
PΔ φωσφορικών	132 mL $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1 M, 868 mL $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1 M, pH 6.0
PΔ δείγματος SDS-PAGE (loading buffer)	5 mL 0.25M Tris Base pH 6.8, 2.5 mL γλυκερόλη 50 % (v/v), 2.5 mL 2-μερκαπτοαιθανόλη, 1 g SDS, 4 mL βρωμοφαινόλη μπλε 0.1 % (w/v)
PΔ ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (running buffer)	3.03 g/L Tris-base, 14.4 g/L γλυκίνη, 1 g/L SDS, pH 8.3
PΔ οξικού νατρίου και οξικού οξέος	40 mL διάλυμα οξικού νατρίου και οξικού οξέος 0.1 M, 0.04 g αζίδιο του νατρίου

### 5.1.6 Συσκευές και Όργανα

Ο πίνακας 5.4 περιέχει τις συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στη διπλωματική εργασία.

**Πίνακας 5.4:** Συσκευές και Όργανα

Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Sanyo, Osaka, Ιαπωνία)
Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Shanghai, Κίνα)
Θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Hamburg, Γερμανία)
Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες
Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα)
Περισταλτική αντλία Econo Gradient, BioRad (Hercules, CA, Η.Π.Α.)
Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Berkshire, Ηνωμένο Βασίλειο)
Συσκευή διήθησης υπό κενό
Συσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία)
Συσκευή υπερδιήθησης διαλυμάτων Stirred Cell Model 8400, 400 m L και μεμβράνες PM-10, Amicon, Millipore, (Η.Π.Α.)
Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Merck Millipore, Bellerica, MA, Η.Π.Α.)
Σύστημα χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (Thermo Scientific™ Dionex™) με στήλη Carbo-Pac PA1 (Η.Π.Α)
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)

## 5.2 Μέθοδοι

Περιγράφεται η παραγωγή και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GH11 (*FoXyl*, *fusarium oxysporum xylanase*), AeGE15 και TlGE15 από μετασηματισμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *p. pastoris* καθώς και ο προσδιορισμός του μοριακού τους βάρους. Η παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα γονίδια τα οποία έχουν κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pPICZαC επάγεται κατά την προσθήκη μεθανόλης στην καλλιέργεια. Η μεθανόλη ενεργοποιεί τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης AOX, μέσω του μηχανισμού που αναλύεται στην παράγραφο 5.1.1. και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες οδηγούνται με τη βοήθεια του πεπτιδίου οδηγού α-factor, από τη ζύμη *Saccharomyces 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 καθαρισμού σε στήλη TalonTM, 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).

### **5.2.1 Παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών**

#### **5.2.1.1 Προκαλλιέργειες κυττάρων *p. pastoris***

Τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο YPD και ζεοσίνη εμβολιάστηκαν με κύτταρα του μετασηματισμένου στελέχους X33 της ζύμης *p. pastoris* και επώαστηκαν στους 30 °C για 24 h. Οι αποικίες που σχηματίστηκαν στα τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 200 mL θρεπτικού υλικού BMMY. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για 24 h και υπό ανάδευση (200 rpm) σε επωαστήρα ZHWY-211C της Zhicheng (Κίνα). Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση της προκαλλιέργειας για τον προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας OD<sub>600nm</sub> σε φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, Labequip (Καναδάς). Από κάθε γυάλινη κωνική φιάλη έγινε λήψη 25 mL δείγματος. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 1000 mL H<sub>2</sub>O δηλαδή πραγματοποιήθηκε αραίωση 40 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<sub>600nm</sub> ίσο με 1.

#### **5.2.1.2 Κύριες καλλιέργειες κυττάρων *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 πώματα από βαμβάκι.

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

## **5.2.2 Απομόνωση των ανασυνδυνασμένων πρωτεϊνών**

### **5.2.2.1 Διήθηση, Συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας**

Η καλλιέργεια μοιράστηκε ανά 250 mL σε 4 μπουκάλια των 250 mL και τοποθετήθηκε στην υπερφυγόκεντρο (1400 rpm, Beckman Coulter, Η.Π.Α.) . Στη συνέχεια το υπερκείμενο της καλλιέργειας συλλέχθηκε, προκειμένου να συμπυκνωθεί και να απομονωθεί η ανασυνδυνασμένη πρωτεΐνη από τις υπόλοιπες εκκρινόμενες πρωτεΐνες της ζύμης.

Αρχικά, με χρήση της συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 και μεμβράνες PM-10 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.) πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση του ιαλύματος 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.

### **5.2.2.2 Καθαρισμός πρωτεΐνης σε στήλη Talon™**

Πρωτεΐνες και πεπτίδια που εμφανίζουν συγγένεια με μεταλλικά ιόντα μπορούν να απομονωθούν χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου. Τα μέταλλα στην 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 ανασυνδυνασμένων 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 ανασυνδυνασμένης πρωτεΐνης κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης έχουν την ιδιότητα να προσδέονται σε κατιόντα μετάλλου (Ni<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>) 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 εκλύονται με ελάττωση του pH και αύξηση της ιοντικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος ή με την προσθήκη EDTA ή ιμιδαζολίου στο ρυθμιστικό διάλυμα.

Κατά την πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής εργασίας, το συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό διάλυμα εξισορροπήθηκε με διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl (Talon). Η διαδικασία της διαπίδυσης έγινε με τη χρήση μεμβρανών κυταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 nm, 12000 Daltons, SigmaAldrich).



Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης δηλαδή μικρά μόρια διαλύτη δύνανται να διαπερνούν την ημιπερατή μεμβράνη μέχρι αποκατάστασης ισορροπία 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 ( $V_{PD} \geq 100 \times V_{\text{διαλ/τος πρωτεϊνών}}$ ), για 24 h σε θερμοκρασία 4 °C, υπό ήρεμη ανάδευση.

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

- I. Αρχικά γίνεται έκπλυση της στήλης με απιονισμένο νερό.
- II. Η στήλη εξισορροπείται με 45 mL διαλύματος Talon.
- III. Έπειτα φορτώνεται το μίγμα των πρωτεϊνών.
- IV. Ακολουθεί έκπλυση της στήλης με 10 mL διαλύματος Talon προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες οι οποίες δεν προσδέθηκαν στην στήλη.
- V. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται η έκλυση των προσδεμένων πρωτεϊνών με προσθήκη διαλύματος ιμιδαζολίου 5 mM.
- VI. Έπειτα γίνεται έκπλυση της στήλης με 7,5 mL διαλύματος ιμιδαζολίου 100 mM, το οποίο ανταγωνίζεται τα κατάλοιπα ιστιδίνης στη μήτρα κοβαλτίου απλευθερώνοντας έτσι τα προσδεμένα μόρια.
- VII. Τέλος, η στήλη ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C, σε διάλυμα EtOH 20% (v/v)

Έπειτα ακολούθησε συμπύκνωση του κλάσματος που συλλέχθηκε ύστερα από την έκπλυση της στήλης με το διάλυμα του πυκνού ιμιδαζολίου, γιατί εκεί αναμένεται να βρίσκεται η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Η συμπύκνωση του διαλύματος έγινε και πάλι με χρήση της συσκευής υπερδιήθησης Stired Cell Model 8400 και μεμβράνες PM-10 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.)

Τέλος, το διάλυμα της καθαρής και συμπυκνωμένης πλέον πρωτεΐνης προκειμένου να αποθηκευτεί, αφαλατώθηκε με διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8.0. Ο έλεγχος βαθμού καθαρότητας πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπο αποδιατακτικές συνθήκες (ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE).

### 5.2.3 Προσδιορισμός μοριακού βάρους και ισοηλεκτρικού σημείου των ανασυμδυσμένων πρωτεϊνών

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

#### 5.2.3.1 Ηλεκτροφόρηση SDS σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου ύστερα από κατεργασία με δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο (SDS) αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού πρωτεϊνών με κριτήριο το μέγεθός τους και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών. Το πολυακρυλαμίδιο είναι μια χημικά αδρανής ένωση, σταθερή σε μεγάλο εύρος pH, ιοντικής 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 δις-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 πολυπεπτιδία με σταθερό λόγο βάρους. Με τον τρόπο αυτό εξουδετερώνεται το φορτίο του πολυπεπτιδίου, μιας και το ενδογενές φορτίο του μορίου είναι ελάχιστο σε σύγκριση με το αρνητικό φορτίο του σενδεδεμένου 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. Εφαρμόζεται ένταση ρεύματος 35 mA. Χρησιμοποιούνται τρία ρυθμιστικά διαλύματα: το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer), το ρυθμιστικό διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβάσεως (stacking gel) και το ρυθμιστικό διάλυμα του πηκτώματος διαχωρισμού (resolving gel).

**Πίνακας 5.5:** Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος του πυκτώματος διαχωρισμού (resolving gel) και του ρυθμιστικού διαλύματος πηκτώματος επιβίβασης (stacking gel)

Συστατικά	Resolving Gel (mL)	Stacking Gel (mL)
dH <sub>2</sub> O	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, 4  $\mu$ L) στο πρωτεϊνικό διάλυμα ( 16  $\mu$ L) ενώ ακολούθησε βρασμός του μίγματος για 5 min. Η σύσταση του running buffer και loading buffer περιγράφονται στην παράγραφο 5.1.5 .

### 5.2.3.2 Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης πήγματος πολυακρυλαμιδίου

Ο προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου (pI) των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών επιτεύχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης ισοηλεκτρικής εστίασης πήγματος πολυακρυλαμιδίου (isoelectric focusing-polyacrylimide 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<sup>®</sup> ως φέρων αμφολύτη. Ο αμφολύτης Pharmalyte<sup>®</sup> 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),  $\beta$ -λακτογλοβουλίνη A (pI 5.20) ανθρακική αντίδραση Β βόρεια (pI 5.85) του ανθρώπου (pI 6.55) μυογλοβίνη αλόγου (όξινη τιμή pI 6.85 και βασική τιμή pI 7.35), λεκτίνη φακή (όξινη τιμή pI 8.15, ενδιάμεση τιμή pI 8.45 και βασική τιμή pI 8.65) και τρυψινογόνο (pI 9.30)

### 5.2.3.3 Εμφάνιση των πρωτεϊνών με χρωστική 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 χρωματιμένων ιζημάτων. Το πήκτωμα μεταφέρθηκε με προσοχή σε διάλυμα χρώσης (staining solution) Coomassie Brilliant Blue G-250 για 15 min και στη συνέχεια, αφού αφαιρέθηκε το διάλυμα χρώσης, έγινε ξέπλυση με απιονισμένο νερό. Έπειτα, το πήκτωμα εμβαπτίστηκε σε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) για 15 min. Στη συνέχεια, έγινε έκπλυση με απιονισμένο νερό και τέλος το πήκτωμα εμβαπτίστηκε και πάλι σε διάλυμα αποχρωματισμού για 24 h, ούτως ώστε να γίνουν ευδιάκριτες οι ζώνες των πρωτεϊνών. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, το πήκτωμα αναδεύεται σε ειδική συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Orbit LS, Labnet, Ηνωμένο Βασίλειο) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

### 5.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών μορίων

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 πραγματοποιείται 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:

$$C_{\frac{mg}{mL}} = \frac{OD_{280nm} MW}{\epsilon}$$

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

$O.D_{280nm}$  : η τιμή της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος

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

$\epsilon$  : ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας ( $M^{-1}/cm^{-1}$ ) της πρωτεΐνης, όπως προσδιορίστηκε για κάθε πρωτεΐνη μέσω του εργαλείου ProtParam ExPASy.

### 5.2.5 Ενζυμικές αντιδράσεις με υποστρώματα λινινών

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις για τα ένζυμα της ξυλανάσης GH11 του μικροοργανισμού *f. oxysporum* και των γλυκουρονικών εστερασών AeGE15 και T/GE15 με υποστρώματα λινινών ACO.12071K.L lignin και ACO\_230818\_L lignin σε ποσότητα 30 mg όπως αναφέρονται στην παράγραφο 5.1.4 . Οι ενζυμικές αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 500 μL και σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου-οξικού οξέος (33 mM), η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα 5.6 . Ο όγκος των ενζύμων στην αντίδραση ήταν 50 μL. Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε μίγμα που περιείχε τα σάκχαρα ξυλόζη, ξυλοβιόζη, ξυλοτριόζη, ξυλοτετρόζη, ξυλοπενταόζη και ξυλοεξαόζη. Συγκεκριμένα, οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω αναλυτικά στον πίνακα 5.6

**Πίνακας 1.6:** Ενζυμικές αντιδράσεις

Αντίδραση	Υπόστρωμα	Ένζυμα
1	ACO.12071K.L lignin	-
2	ACO.12071K.L lignin	GH11
3	ACO.12071K.L lignin	GH11 + AeGE15
4	ACO.12071K.L lignin	GH11 + T/GE15
5	ACO_230818_L lignin	-
6	ACO_230818_L lignin	GH11
7	ACO_230818_L lignin	GH11 + AeGE15
8	ACO_230818_L lignin	GH11 + T/GE15

Η κάθε αντίδραση έγινε στους 50 °C, με ανάδευση 900 rpm για 24 h.

### 5.2.6 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin-layer chromatography, TLC)

Παρόμοια με άλλες χρωματογραφικές μεθόδους, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας βασίζεται επίσης στην αρχή του διαχωρισμού. Ο διαχωρισμός εξαρτάται από τη σχετική συγγένεια των ενώσεων προς την ακίνητη και την κινητή φάση. Οι ενώσεις υπό την επίδραση της κινητής φάσης (που κινούνται με τριχοειδή δράση) κινούνται πάνω στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Κατά τη διάρκεια αυτής της κίνησης, οι ενώσεις με υψηλότερη συγγένεια προς τη στατική φάση ταξιδεύουν αργά, ενώ οι άλλες ταξιδεύουν πιο γρήγορα. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών στο μείγμα. Αφού γίνει ο διαχωρισμός, τα επιμέρους στοιχεία απεικονίζονται ως σημεία σε ένα αντίστοιχο επίπεδο κίνησης στην πλάκα. Η φύση ή ο χαρακτήρας τους αναγνωρίζονται μέσω κατάλληλων τεχνικών ανίχνευσης.

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε διαλύτης προσρόφησης του οποίου η σύσταση δίνεται στον πίνακα 5.7 . Ο διαλύτης διοχετεύτηκε σε γυάλινο φρέαρ, το οποίο καπακώθηκε με σκοπό τον κορεσμό της ατμόσφαιρας του δοχείου στο διαλύτη. Έγινε βρασμός

των δειγμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min, σε 5000 rpm, προκειμένου να γίνει συλλογή του υπερκείμενου όπου περιέχονται τα προϊόντα των αντιδράσεων. Η πλάκα διαχωρισμού των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε ήταν χαρτί silica gel, όπου η γραμμή έναρξης διάχυσης των δειγμάτων βρίσκεται 1 cm πάνω από τον πάτο της πλάκας. Αφού έγινε spot των δειγμάτων πάνω στη γραμμή έναρξης, η πλάκα βαπτίστηκε στο δοχείο που περιείχε το διαλύτη προσρόφησης. Όταν ο διαλύτης έφτασε στην κορυφή της πλάκας, η πλάκα αφαιρέθηκε από το δοχείο με το διαλύτη και παρέμεινε για περίπου 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η διαδικασία εμβάπτισης της πλάκας επαναλήφθηκε ακόμα μία φορά με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Μετά το πέρας της δεύτερης εμβάπτισης η πλάκα αφέθηκε να στεγνώσει και πραγματοποιήθηκε ψεκάσμος της με χρωστική M. Bounias. Τέλος, αφότου ξαναστέγνωσε τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 120 °C για περίπου 7-8 min προκειμένου να εμφανιστούν οι μπάντες των προϊόντων των αντιδράσεων.

**Πίνακας 5.7:** Σύσταση διαλύτη προσρόφησης

Διαλύτης προσρόφησης	
Ethyl Acetate	25 mL
Acetic Acid	10 mL
2-propanol	5 mL
Formic Acid	1 mL
dH <sub>2</sub> O	15 mL

## 5.2.7 Χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης

### 5.2.7.1 Αρχή της μεθόδου

Η χρωματογραφική τεχνική γνωστή ως εναλλαγή ανιόντων υψηλής απόδοσης (high-performance anion exchange chromatography, HPAEC) χρησιμοποιείται και για το διαχωρισμό των υδατανθράκων. Σε συνδυασμό με την ανίχνευση αμπερομετρικών παλμών (pulsed amperometric detection, PAD), επιτρέπει την άμεση ποσοτικοποίηση των μη παραγωγοποιημένων υδατανθράκων σε χαμηλά επίπεδα picomole με ελάχιστη προετοιμασία και καθαρισμό δείγματος. Η χρωματογραφία HPAE εκμεταλλεύεται την ασθενώς όξινη φύση των υδατανθράκων για να δώσει εξαιρετικά επιλεκτικούς διαχωρισμούς σε υψηλό pH χρησιμοποιώντας μία ισχυρή σταθερή φάση εναλλαγής ανιόντων.

Η HPAEC-PAD είναι εξαιρετικά επιλεκτική και ειδική για τους υδατάνθρακες, επειδή η παλμική αμπερομετρία ανιχνεύει μόνο εκείνες τις ενώσεις που περιέχουν λειτουργικές ομάδες οι οποίες είναι οξειδώσιμες στην ανίχνευση της εφαρμοζόμενης τάσης (στην περίπτωση αυτή, η ευαισθησία για τους υδατάνθρακες είναι τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες από τις άλλες κατηγορίες αναλυτών). Επίσης, τα συστατικά ουδέτερου ή κατιονικού δείγματος στην μήτρα

εκκλούνται στον ή κοντά στον κενό όγκο της στήλης. Επομένως, ακόμη και αν αυτά τα είδη είναι οξειδώσιμα, συνήθως δεν παρεμβαίνουν στην ανάλυση των υδατανθρακικών συστατικών που μας ενδιαφέρουν.

Αν και η χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για να αναλύσει τους όξινους υδατάνθρακες και γλυκοπεπτίδια, δεν έχει χρησιμοποιηθεί συνήθως για ανάλυση ουδέτερων σακχάρων. Ωστόσο, εξέταση που έχει γίνει για τις τιμές pKa των ουδέτερων μονοσακχαριτών έχει δείξει ότι οι υδατάνθρακες είναι στην πραγματικότητα ασθενή οξέα. Σε υψηλό pH, ιονίζονται τουλάχιστον μερικώς και έτσι μπορούν να διαχωριστούν με μηχανισμούς εναλλαγής ανιόντων. Αυτή η προσέγγιση δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί με κλασσικές στήλες με βάση το διοξείδιο του πυριτίου, επειδή αυτές οι μήτρες διαλύονται σε υψηλό pH. Η ανταλλαγή ανιόντων σε υψηλό pH είναι, ωστόσο, ιδανική.

### 5.2.7.2 Προετοιμασία δειγμάτων και οι διαλύτες για τη λειτουργία της στήλης

Κατά την πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τα δείγματα των αντιδράσεων φυγοκεντρήθηκαν για 5 min σε 5000 rpm. Έπειτα, έγινε καθαρισμός στο υπερκείμενο όπου περιέχονται και τα προϊόντα της αντίδρασης με φίλτρο πόρων διαμέτρου 0.2 μm, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν σωματίδια.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την εξισορρόπηση της στήλης και την ταυτοποίηση των ενώσεων, καθώς και η συγκέντρωσή τους παραθέτονται στον πίνακα 5.8.

**Πίνακας 5.8:** Σύσταση διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στη χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων

A	ddH <sub>2</sub> O
B	500 mM Sodium hydroxide (NaOH)
C	500 mM Sodium acetate (NaOAc)

Στη συνέχεια, οι διαλύτες διηθήθηκαν υπό κενό, χρησιμοποιώντας φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.2 μm (Supor® 200, PALL Life Sciences). Έπειτα, έγινε απαέρωση των διαλυτών με He προκειμένου να απομακρυνθεί ο αέρας από τους διαλύτες και να μην δημιουργηθούν προβλήματα κατά τη λειτουργία της στήλης. Η ροή των διαλυτών που εφαρμόστηκε για τη λειτουργία της στήλης ήταν 1 mL/min.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε στη συσκευή Dionex ήταν η CarboPac PA1.

### 5.2.7.3 Πρόγραμμα λειτουργίας της στήλης

Τα στάδια του προγράμματος που εφαρμόστηκε για τη λειτουργία της στήλης παρατίθενται στον πίνακα 5.9.

**Πίνακας 5.9:** Πρόγραμμα για τη λειτουργία της στήλης

<b>Χρόνος (min)</b>	<b>Αναλογίες διαλυτών</b>
0-2	59% A, 40% B, 1% C
2-35	5% A, 40% B, 45% C
35.1-39	5% A, 5% B, 90% C
39.1-50	59% A, 40% B, 1% C



# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



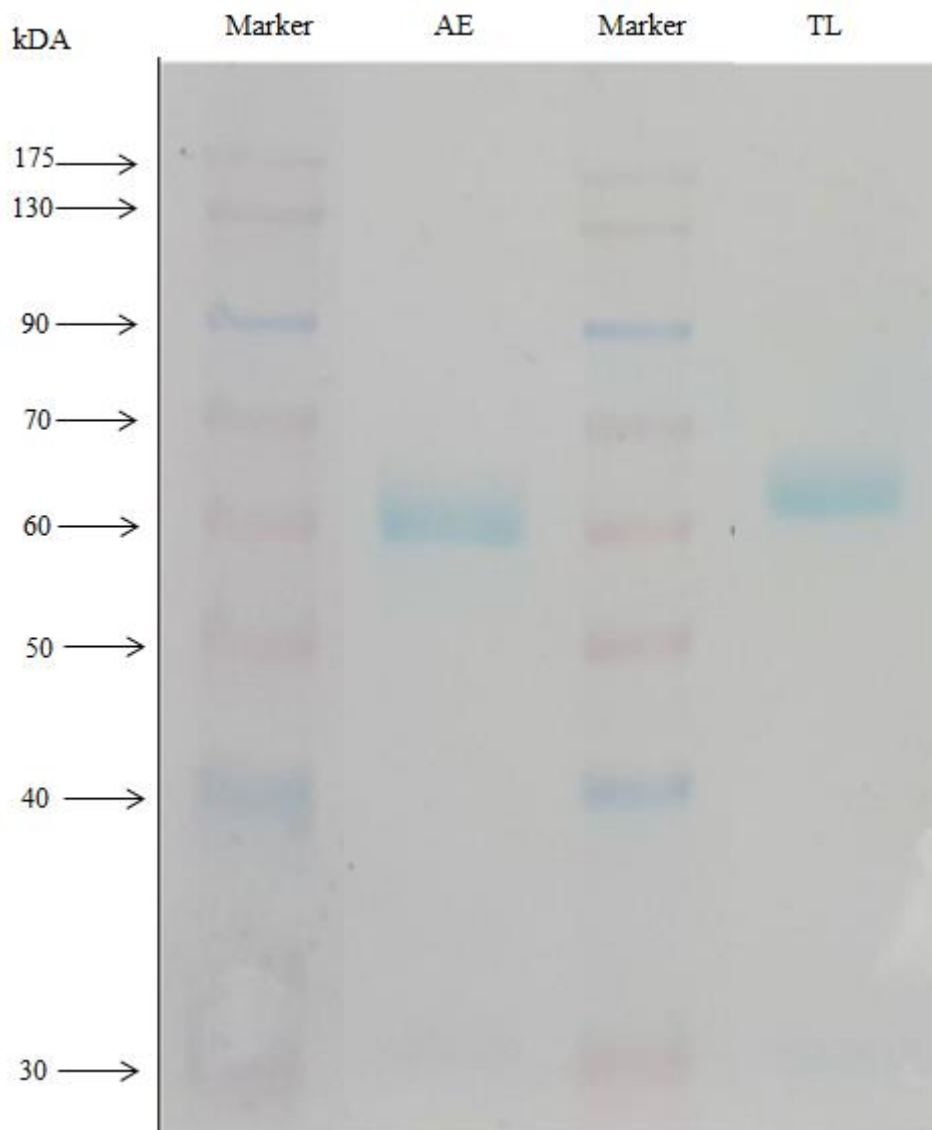
## Κεφάλαιο 6: Παραγωγή των ανασυνδυασμένων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 και T/GE15

### 6.1 Προσδιορισμός μοριακού βάρους των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Προκειμένου να επιτευχθεί η παραγωγή των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 και T/GE15 έγινε εμβολιασμός τρυβλίων με κύτταρα του μετασχηματισμένου στελέχους X33 της ζύμης *p.pastoris* που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30 °C για 24 h. Στη συνέχεια, οι αποικίες χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή υγρών προκαλλιιεργειών. Οι προκαλλιιεργειες επώαστηκαν για 24 h στους 30 °C υπό έντονη ανάδευση και έπειτα τα κύτταρα της ζύμης παρέμειναν για επώαση στις υγρές κύριες καλλιιεργειες για χρονικό διάστημα 5 ημερών στους 30 °C υπό έντονη ανάδευση.

Για την απομόνωση των καθαρών ανασυνδυασμένων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 και T/GE15 από το υγρό της καλλιιεργειας χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC).

Τα στάδια παρασκευής των προκαλλιιεργιών και των κύριων καλλιιεργιών, καθώς και του καθαρισμού και απομόνωσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 5.2 . Ο βαθμός καθαρότητας, καθώς και το μοριακό βάρος της πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Η εμφάνιση των ζωνών πραγματοποιήθηκε με χρώση Coomassie Brilliant Blue G-250.

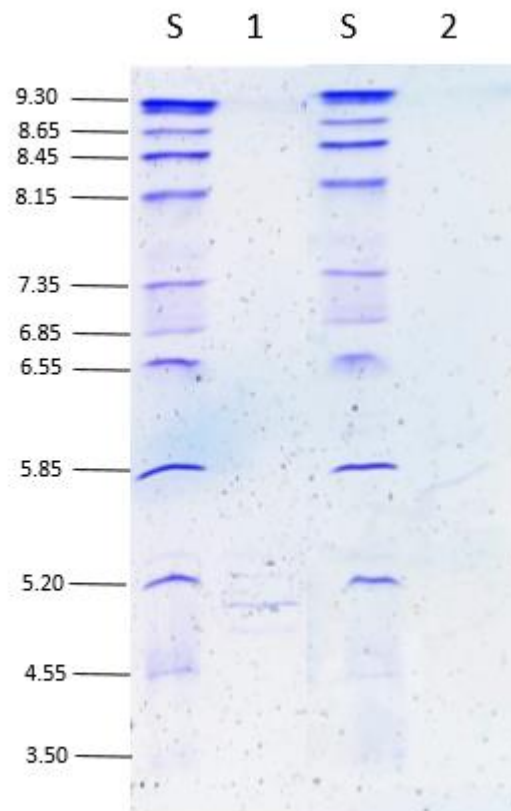


**Εικόνα 6.1:** SDS-PAGE των *AeGE15* και *T/GE15* με πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas)

Το μοριακό βάρος της ανασυνδυασμένης εστεράσης *AeGE15*, όπως φαίνεται και από την εικόνα 6.1, προσδιορίστηκε στα 63 kDa που είναι μεγαλύτερο από τη θεωρητική τιμή η οποία υπολογίστηκε με τη χρήση του προγράμματος 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 για την ανασυνδυασμένη εστεράση *T/GE15*, από την εικόνα 6.1, το μοριακό βάρος προσδιορίστηκε στα 70 kDa, που είναι μεγαλύτερο από τη θεωρητική τιμή η οποία υπολογίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος ProtParam.

## 6.2 Προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών AeGE15 και T/GE15 προσδιορίστηκε με IEF-PAGE. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 6.2. Για την AeGE15 το ισοηλεκτρικό σημείο βρίσκεται στην περιοχή pH 4.2-5.3, ενώ η πιο έντονη ζώνη εμφανίζεται για pH 5.2 που είναι κοντά στη θεωρητικά υπολογισμένη τιμή, 5.09. Για την T/GE15 το ισοηλεκτρικό σημείο εντοπίζεται στην περιοχή pH 4.6-5.8, με την πιο έντονη ζώνη να εμφανίζεται σε pH 5.8, κοντά στη θεωρητικά υπολογιζόμενη τιμή, 5.4 .



**Εικόνα 6.2:** IEF-PAGE ηλεκτροφόρηση των καθαρών πρωτεϊνών AeGE15 και T/GE15, με μάρτυρα ισοηλεκτρικών σημείων με εύρος 3.0-11.0 .

### 6.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των καθαρών AeGE15 και TIGE15

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της καθαρής AeGE15 και TIGE15 έγινε μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος από το κλάσμα πυκνού ιμιδαζολίου, το οποίο συλλέχτηκε κατά τον καθαρισμό των πρωτεϊνών από τη στήλη Talon. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε σε μήκος κύματος 280 nm σε φωτόμετρο UV-Vis με χρήση κυψελίδας από χαλαζία.

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

$$C_{\frac{mg}{mL}} = \frac{OD_{280nm} MW}{\epsilon}$$

Για τη γλυκουρονική εστεράση AeGE15 το μοριακό βάρος (M.W.) από την παράγραφο 6.1 προσδιορίστηκε 63 kDa, η απορρόφηση του πρωτεϊνικού διαλύματος στα 280 nm, 1.652 Abs και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας  $\epsilon$  (molar absorptivity) υπολογίζεται από το πρόγραμμα ProtParam της ExPASy ίσος με  $78295 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Οπότε, η συγκέντρωση της καθαρής AeGE15 στο διάλυμα είναι 1.33 mg/ mL .

Αντίστοιχα, για τη γλυκουρονική εστεράση TIGE15 το μοριακό βάρος (M.W.) προσδιορίστηκε 70 kDa (παράγραφος 6.1), απορρόφηση του διαλύματος στα 280 nm, 0.831 Abs και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας  $\epsilon$  (molar absorptivity) υπολογίζεται από το πρόγραμμα ProtParam της ExPASy ίσος με  $81275 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Επομένως, η συγκέντρωση της καθαρής TIGE15 στο διάλυμα είναι 0.72 mg/mL .

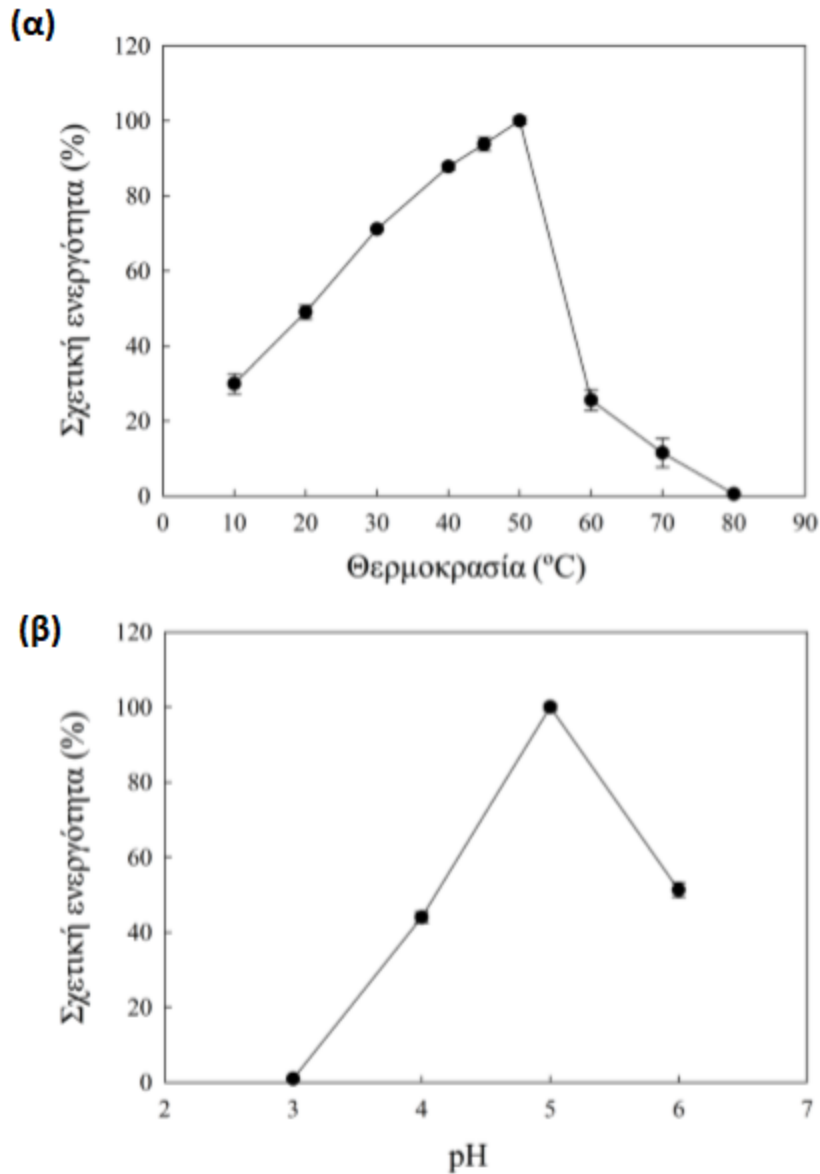
## **6.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός των γλυκουρονικών εστερασών AeGE15 και T/GE15**

Στην ενότητα 6.4 παρουσιάζονται αποτελέσματα από παλιότερη δουλειά του εργαστηρίου σχετικά με το βιοχημικό χαρακτηρισμό των γλυκουρονικών εστερασών.

### **6.4.1 Υπολογισμός βέλτιστης θερμοκρασίας, βέλτιστου pH δράσης και σταθερότητας των ανασυνδυασμένων ενζύμων**

Κατά το βιοχημικό χαρακτηρισμό των ενζύμων μελετήθηκε το βέλτιστο pH και η θερμοκρασία δράσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος. Η γνώση των ιδιοτήτων αυτών, καθώς και η σταθερότητα που τις χαρακτηρίζει σε διάφορες ακραίες τιμές pH και θερμοκρασίας αποτελούν πολύ σημαντική πληροφορία για τη βιοτεχνολογική αξιολόγησή τους.

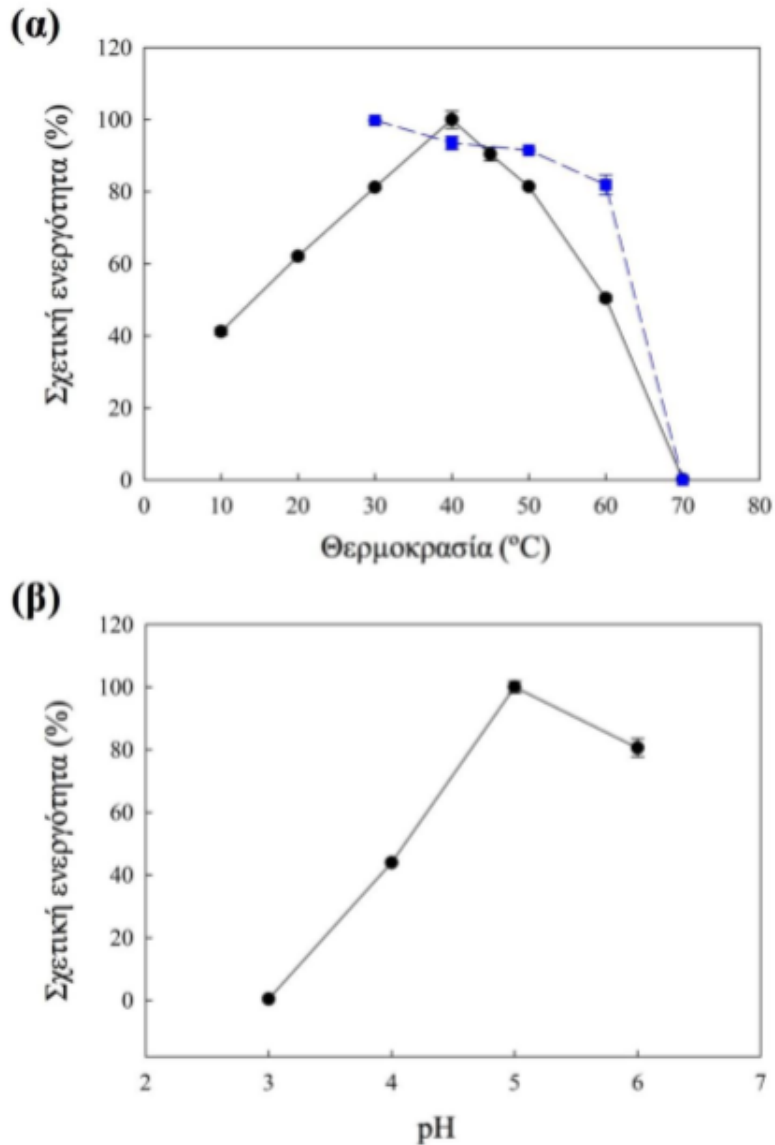
Οι αντιδράσεις για τη μέτρηση ενεργότητας σε θερμοκρασία και pH πραγματοποιήθηκαν σε υπόστρωμα εστέρα κινναμυλικής αλκοόλης-γλυκουρονικού οξέος το οποίο συντέθηκε στο εργαστήριο. Η ποσοτικοποίηση του γλυκουρονικού οξέος που απελευθερώθηκε σε κάθε περίπτωση μετρήθηκε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σε στήλη αντίστροφης φάσης C-18.



**Διάγραμμα 6.1:** Επίδραση της θερμοκρασίας (α) και του pH (β) στη σχετική ενεργότητα της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος AeGE15

Από το διάγραμμα 6.1 προκύπτει ότι οι βέλτιστες συνθήκες για τη δράση της εστεράσης AeGE15 είναι οι τιμές pH 5 και θερμοκρασίας 50 °C. Παρατηρείται ότι πάνω από τη βέλτιστη θερμοκρασία του ενζύμου, η απώλεια της καταλυτικής ικανότητας είναι ταχεία, φτάνοντας το 26 % και 12 % σε θερμοκρασίες 60 °C και 70 °C, αντίστοιχα. Επίσης, προκύπτει ότι το ένζυμο εμφανίζει αξιόλογο βαθμό θερμοσταθερότητας, καθώς σύμφωνα με το διάγραμμα 6.1 (α), φαίνεται ότι διατηρεί το 70 % της ενεργότητάς του μετά από επώαση 8, 24 και 32 ωρών στους 50 °C.





**Διάγραμμα 6.2:** Επίδραση της θερμοκρασίας (α) και του pH (β) στη σχετική ενεργότητα της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος *TIGE15*. Με διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται η σταθερότητα της *TIGE15*. Η εναπομένουσα ενεργότητα μετρήθηκε μετά από επώαση του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες για 2 h σε pH 8.0, με σκοπό τον προσδιορισμό της θερμοσταθερότητας.

Από τα διαγράμματα 6.2 (α) και 6.2 (β) βρέθηκε ότι οι συνθήκες βέλτιστης ενεργότητας για τη γλυκουρονική εστεράση *TIGE15* είναι η θερμοκρασία 40 °C και η τιμή pH 5.0 . Επίσης, παρατηρείται ότι μετά από επώαση 8, 24 και 32 ωρών στους 40 °C, η πρωτεΐνη διατηρεί το 70 % της ενεργότητάς της. Επομένως, η *TIGE15* εμφανίζει αξιόλογο βαθμό θερμοσταθερότητας. Σημειώνεται ότι το ένζυμο διατήρησε πάνω από το 80 % της ενεργότητάς του μέχρι τους 50 °C, ενώ σε θερμοκρασία 60 °C διατήρησε το 50 %. Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες η απώλεια της

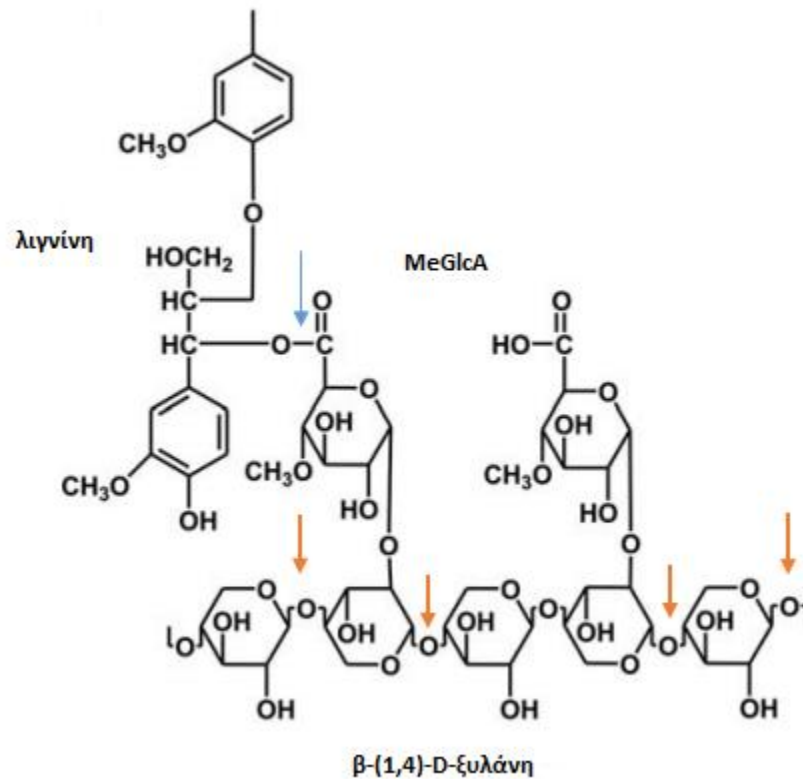
## Κεφάλαιο 6

ενεργότητας του ενζύμου επήλθε ταχύτατα και μηδενίζεται στους 70 °C. Σύμφωνα με το διάγραμμα 6.2 (β), σε τιμή pH 6.0 η T/GE15 διατήρησε το 80 % της βέλτιστης ενεργότητάς της. Υψηλότερες τιμές pH δεν εξετάστηκαν λόγω της υψηλής αυτοϋδρόλυσης του υποστρώματος σε αλκαλικές συνθήκες.

## Κεφάλαιο 7: Μελέτη ενζυμικού συνεργητισμού

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές αντιδράσεις των γλυκουρονικών εστερασών με άλλο ημικυτταρινολυτικό ένζυμο, με στόχο τη μελέτη της φυσιολογικής δράσης των καινοτόμων αυτών ενζύμων, καθώς και της εξέτασης της συνεργιστικής δράσης τους με άλλα ένζυμα.

Στο σχήμα 7.1 φαίνεται η φυσική δράση της γλυκουρονικής εστεράσης και της ξυλανάσης σε σύμπλοκο λιγνίνης-ξυλάνης. Η εστεράση αφού διασπάσει τον εστερικό δεσμό μεταξύ του 4-O-μέθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και των αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης, καθιστά το σύστημα πιο επιρρεπές στη δράση της ενδο-ξυλανάσης. Με αυτό τον τρόπο απελευθερώνονται περισσότερα σάκχαρα. Πιο συγκεκριμένα απελευθερώνονται τόσο γραμμικά σάκχαρα όσο και υποκατεστημένοι ολιγοσακχαρίτες με γλυκουρονικό οξύ. Σε θεωρητική βάση, η διάσπαση των εστερικών δεσμών του γλυκουρονικού οξέος και η απελευθέρωση του συτήματος, θα ενισχύσει τη δράση της ξυλανάσης, με αποτέλεσμα να αυξηθεί η συγκέντρωση των γραμμικών ολιγοσακχαριτών της ξυλόζης, καθώς και των υποκατεστημένων με γλυκουρονικό οξύ ολιγοσακχαριτών.



**Σχήμα 7.1:** Ο εστερικός δεσμός μεταξύ του 4-O-μέθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουροξυλάνης και των αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης. Το μπλε βέλος συμβολίζει τη θέση δράσης της γλυκουρονικής εστεράσης στον εστερικό δεσμό, ενώ το πορτοκαλί βέλος συμβολίζει τη θέση δράσης της ενδο-ξυλανάσης. Κατά τη δράση των ενζύμων η λιγνίνη απελευθερώνεται από την ξυλάνη και παράγονται γραμμικά σάκχαρα και υποκατεστημένοι ολιγοσακχαρίτες με γλυκουρονικό οξύ.

Για την ανίχνευση των παραγόμενων σακχάρων και την επαλήθευση ή τη διάψευση του συνεργιτισμού χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) και χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων (HPAEC).

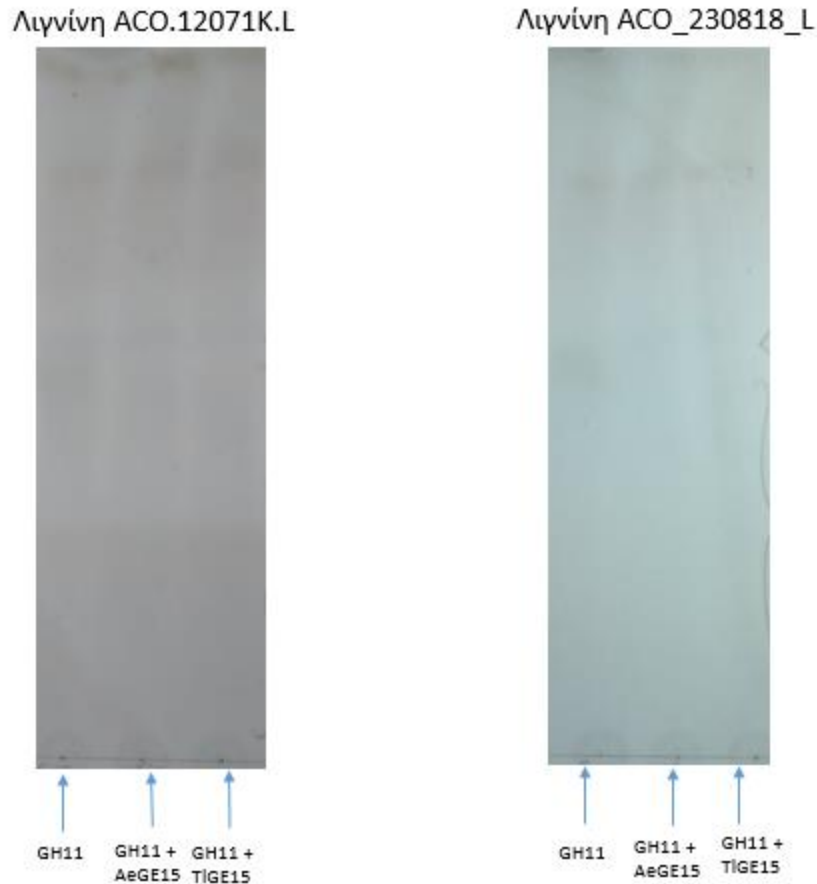
## 7.2 Μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Thin-layer chromatography, TLC)

Κατά την πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με τα ένζυμα της ξυλανάσης GH11 του μικροοργανισμού *f. oxysporum* και των γλυκουρονικών εστερασών AeGE15 και TIGE15 σε υποστρώματα λινινίων ACO.12071K.L lignin και ACO\_230818\_L lignin. Αναλυτικά οι συνθήκες των αντιδράσεων παρουσιάζονται στην ενότητα 5.2.5 .

**Πίνακας 7.1:** Ενζυμικές αντιδράσεις

Αντίδραση	Υπόστρωμα	Ένζυμα
1	ACO.12071K.L lignin	-
2	ACO.12071K.L lignin	GH11
3	ACO.12071K.L lignin	GH11 + AeGE15
4	ACO.12071K.L lignin	GH11 + TIGE15
5	ACO_230818_L lignin	-
6	ACO_230818_L lignin	GH11
7	ACO_230818_L lignin	GH11 + AeGE15
8	ACO_230818_L lignin	GH11 + TIGE15

Αρχικά, η μελέτη του συνεργητισμού των ενζύμων έγινε με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, κατά την οποία τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν σε χαρτί silica gel. Έγινε spot των δειγμάτων της κάθε αντίδρασης πάνω στη γραμμή έναρξης και ο διαλύτης προσρόφησης παρέσυρε τα δείγματα προς την κορυφή της πλάκας. Τα συστατικά του κάθε δείγματος διαχωρίστηκαν ανάλογα με τη σχετική τους συγγένεια προς την ακίνητη και κινητή φάση. Τέλος, πραγματοποιήθηκε χρωματισμός της πλάκας με σκοπό την εμφάνιση των προϊόντων της αντίδρασης.



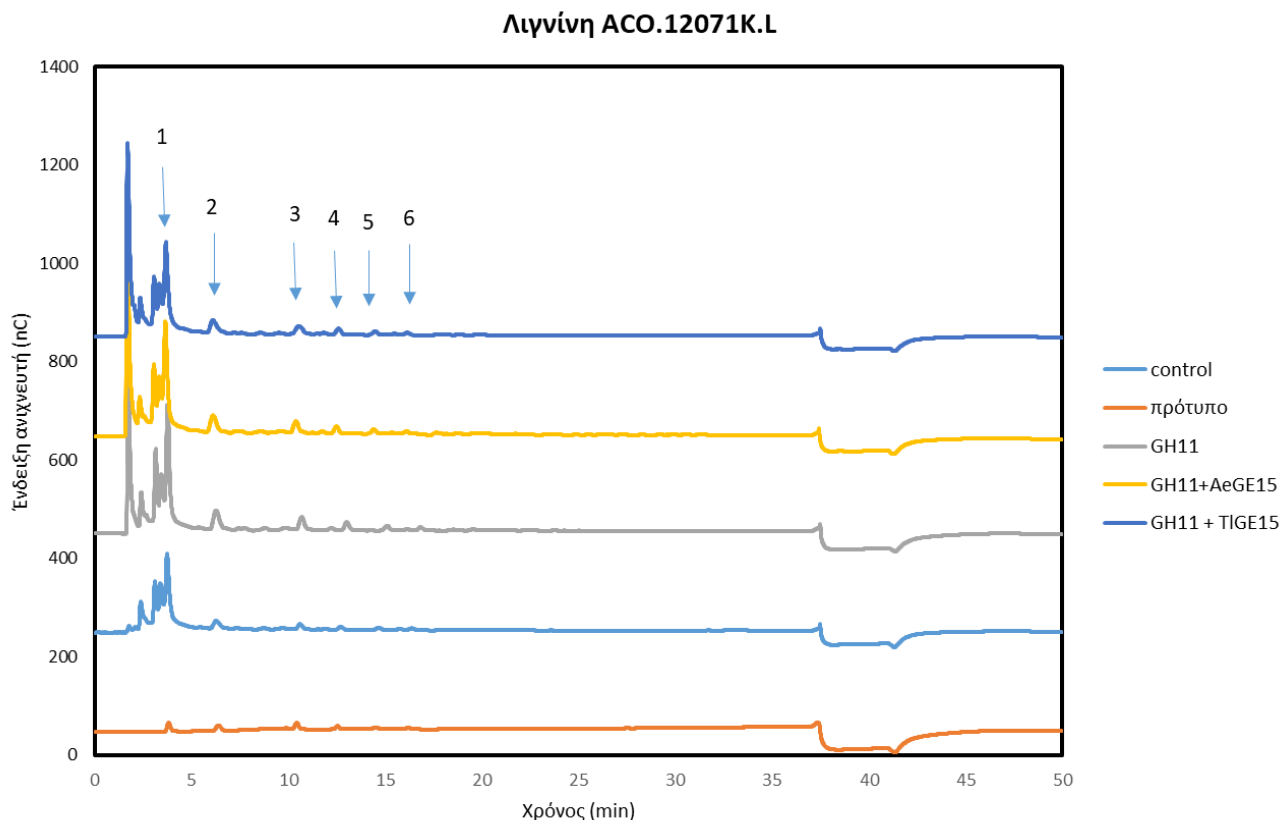
**Εικόνα 7.2 :** Χρωματογραφία λεπτής στίβαδας για τις ενζυμικές αντιδράσεις. (α) Οι αντιδράσεις της λιγνίνης ACO.12071K.L και (β) οι αντιδράσεις της λιγνίνης ACO\_230818\_L

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 7.2 στο χαρτί silica gel δεν έγινε εμφάνιση των προϊόντων των αντιδράσεων, τόσο για τα δείγματα της λιγνίνης ACO.12071K.L lignin, όσο και για τα δείγματα της λιγνίνης ACO\_230818\_L lignin. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς να οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση των προϊόντων ή στη μη συμβατότητα των προϊόντων με το σύστημα του διαλύτη. Ως εκ τούτου κρίθηκε απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί αναλυτική τεχνική μεγαλύτερης ευαισθησίας. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης.

### 7.3 Μέθοδος χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (ΗΡΑΕC)

Για την εξέταση του συνεργητισμού των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης. Εξετάστηκε η συγκέντρωση των προϊόντων των αντιδράσεων του πίνακα 7.1, μέσω του γραφήματος που λήφθηκε κάνοντας χρήση της συσκευής Dionex. Πιο συγκεκριμένα ο έλεγχος του συνεργητισμού της ενδο-ξυλανάσης GH11 με τη γλυκουρονική εστεράση AeGE15 ή T/GE15 εξετάστηκε με την παραγωγή των γραμμικών ολιγοσακχαριτών. Το πρότυπο διάλυμα που επιλέχτηκε για τις ενζυμικές αντιδράσεις περιείχε τα γραμμικά σάκχαρα ξυλόζη, ξυλοβιόζη, ξυλοτριόζη, ξυλοτετραόζη, ξυλοπενταόζη και ξυλοεξαόζη.

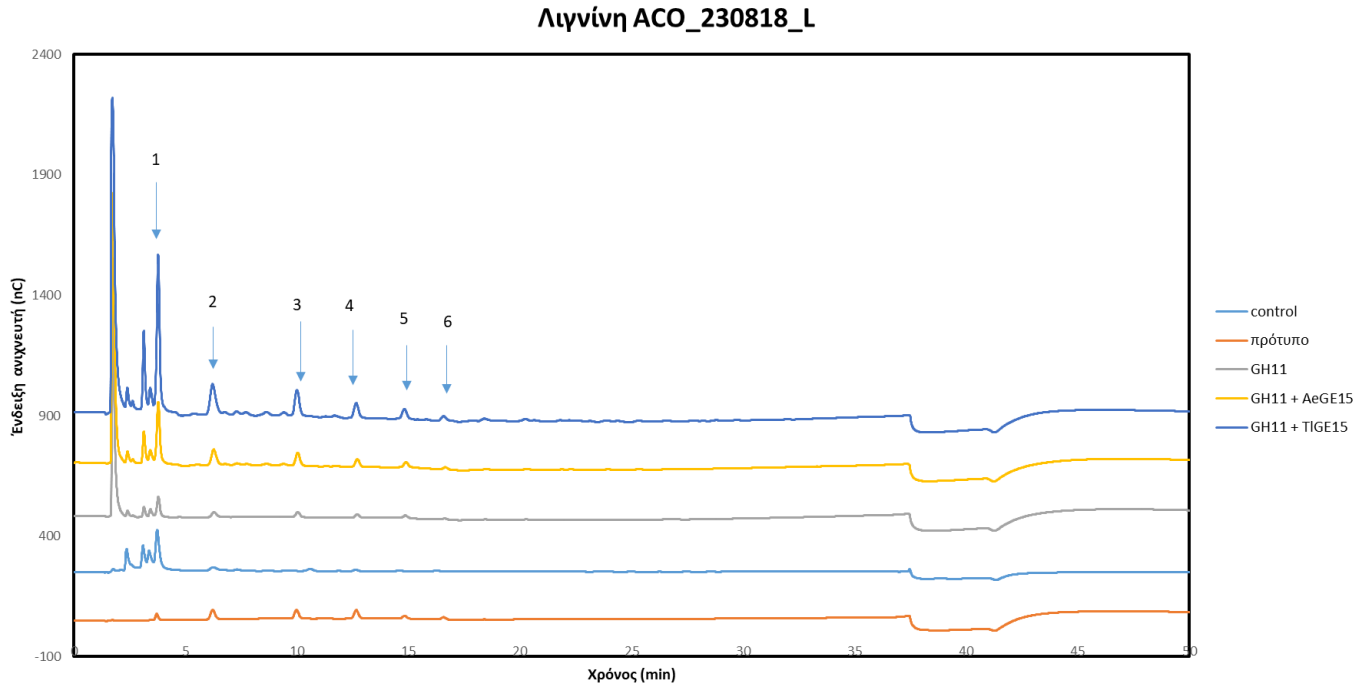
Ο έλεγχος του συνεργητισμού δεν μελετήθηκε με βάση την παραγωγή του γλυκουρονικού οξέος, επειδή το γλυκουρονικό οξύ έχει ισχυρή σύνδεση στη ρητίνη της στήλης με αποτέλεσμα ο χρόνος κατακράτησής του να είναι μεγάλος. Επομένως, οι αντίστοιχες κορυφές που λαμβάνονται από το μηχάνημα στο γράφημα βρίσκονται πέρα από το χρόνο ανάλυσης που εφαρμόζεται. Οπότε, η ανίχνευση του συνεργητισμού γίνεται με βάση τα ουδέτερα σάκχαρα, τα οποία θα πρέπει να αυξάνονται με την προσθήκη επι πλέον ενζύμου έτσι ώστε να επαληθεύεται η συνεργηστική ενζυμική δράση.



**Διάγραμμα 7.1:** Το διάγραμμα της χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων για τις ενζυμικές αντιδράσεις της λιγνίνης ACO.12071K.L . Οι αριθμημένες κορυφές 1 έως 6 αναπαριστούν τα γραμμικά σάκχαρα ξυλόζη, ξυλοβιόζη, ξυλοτριόζη, ξυλοτετραόζη, ξυλοπενταόζη και ξυλοεξαόζη, αντίστοιχα. Η κόκκινη γραμμή απεικονίζει το πρότυπο διάλυμα των γραμμικών σακχάρων, η γαλάζια γραμμή τα προϊόντα της αντίδρασης με το control δείγμα, η γκρι γραμμή τα προϊόντα της αντίδρασης με την ξυλανάση GH11, η κίτρινη γραμμή τα προϊόντα της αντίδρασης με τα ένζυμα GH11 και AeGE15, ενώ η μπλε γραμμή τα προϊόντα της αντίδρασης με τα ένζυμα GH11 και TIGE15.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 7.1 κατά την προσθήκη των ενζύμων AeGE15 και TIGE15, το σήμα που δίνει ο ανιχνευτής δεν αυξάνεται, αφού δεν υπάρχει αύξηση στο εμβαδόν των αντίστοιχων κορυφών. Επομένως, συμπεραίνεται ότι για τη λιγνίνη ACO.12071K.L δεν επαυθεύεται η συνεργιστική ενζυμική δράση.





**Διάγραμμα 7.2:** Το διάγραμμα της χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων για τις ενζυμικές αντιδράσεις της λιγνίνης ACO\_230818\_L. Οι αριθμημένες κορυφές 1 έως 6 αναπαριστούν τα γραμμικά σάκχαρα ξυλόζη, ξυλοβιόζη, ξυλοτριόζη, ξυλοτετραόζη, ξυλοπενταόζη και ξυλοεξαόζη, αντίστοιχα. Η κόκκινη γραμμή απεικονίζει το πρότυπο διάλυμα των γραμμικών σακχάρων, η γαλάζια γραμμή τα προϊόντα της αντίδρασης με το control δείγμα, η γκρι γραμμή τα προϊόντα της αντίδρασης με την ξυλανάση GH11, η κίτρινη γραμμή τα προϊόντα της αντίδρασης με τα ένζυμα GH11 και AeGE15, ενώ η μπλε γραμμή τα προϊόντα της αντίδρασης με τα ένζυμα GH11 και TIGE15.

Σύμφωνα με τα δεδομένα που λαμβάνονται από το διάγραμμα 7.2 για τις ενζυμικές αντιδράσεις της λιγνίνης ACO\_230818\_L, με την προσθήκη επιπλέον ενζύμου το σήμα που δίνει ο ανιχνευτής αυξάνεται. Πιο συγκεκριμένα, με την προσθήκη τόσο της γλυκουρονικής εστεράσης AeGE15, όσο και της TIGE15 οι κορυφές που λαμβάνονται στο γράφημα έχουν μεγαλύτερο εμβαδόν από αυτές που αντιστοιχούν στα προϊόντα της αντίδρασης μόνο με την ξυλανάση GH11. Επομένως, επαληθεύεται ο ενζυμικός συνεργητισμός, αφού αύξηση του εμβαδού των κορυφών των προϊόντων των αντιδράσεων συνεπάγεται αύξηση της συγκέντρωσής τους.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ



## Κεφάλαιο 8: Συμπεράσματα και συζήτηση

### 8.1 Σύνοψη αποτελεσμάτων

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η παραγωγή και η απομόνωση δύο καινοτόμων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος από τους μύκητες λευκής σήψης *A. elegans* και *T. ljubarskyi*, η AeGE15 και η TIGE15 αντίστοιχα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών, καθώς και προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών μορίων. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται αποτελέσματα από προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου σχετικά με το βιοχημικό χαρακτηρισμό των γλυκουρονικών εστερασών. Τέλος, μελετάται ο συνεργητισμός των πρωτεϊνών AeGE15 και TIGE15 με την ενδο-ξυλανάση GH11 του μικροοργανισμού *f. oxysporum*.

Η παραγωγή των ενζύμων πραγματοποιήθηκε με υγρές καλλιέργειες των κυττάρων του μικροοργανισμού *p. pastoris* και η απομόνωση έγινε μέσω των σταδίων διήθησης, συμπύκνωσης και χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των γλυκουρονικών εστερασών έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Για την πρωτεΐνη AeGE15 προσδιορίστηκε στα 63 kDa, ενώ για την TIGE15 στα 70 kDa. Από το βιοχημικό χαρακτηρισμό των ενζύμων βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής ενεργότητας για την κάθε πρωτεΐνη. Για τη γλυκουρονική εστεράση AeGE15 η βέλτιστη ενεργότητα προσδιορίστηκε σε θερμοκρασία 50 °C και pH 5.0, ενώ για την TIGE15 σε θερμοκρασία 40 °C και pH 5.0 .

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε με τη βοήθεια του μαθηματικού μοντέλου Beer-Lambert. Η συγκέντρωση της καθαρής AeGE15 στο διάλυμα βρέθηκε ίση με 1.33 mg/ mL, ενώ η συγκέντρωση της καθαρής TIGE15 βρέθηκε ίση με 0.72 mg/mL.

Τέλος, για την ανίχνευση των παραγόμενων σακχάρων και την επαλήθευση ή τη διάψευση του συνεργητισμού χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) και χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων (HPAEC). Με την πρώτη μέθοδο δεν λήφθηκαν αποτελέσματα, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των προϊόντων ή της μη συμβατότητας των προϊόντων με το σύστημα του διαλύτη.

Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τη χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων για τα ένζυμα AeGE15 και TIGE15 συμπεραίνεται ότι ο συνεργητισμός επαληθεύτηκε, αφού στο δείγμα της λιγνίνης ACO\_230818\_L φαίνεται ότι η συγκέντρωση των απαλευθερούμενων γραμμικών ξυλοολιγοσακχαριτών αυξάνεται στις αντιδράσεις που υπήρχαν τα ένζυμα εστεράση και ξυλανάση. Παρ' όλα αυτά στο δείγμα της λιγνίνης ACO.12071K.L δεν μπορούμε να εξάγουμε κάποιο συμπέρασμα σχετικά με το συνεργητισμό των ενζύμων, διότι το εμβαδόν των κορυφών από το χρωματογράφημα που λήφθηκε δεν εμφανίζει αξιόπιστες διαφορές σε ότι αφορά στη

συγκέντρωση των ξυλοολιγοσακχαριτών. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο μεγάλο σφάλμα που υπάρχει στις αντιδράσεις λόγω των μικρών ποσοτήτων των αντιδρώντων που χρησιμοποιήθηκαν είτε στο γεγονός ότι το δείγμα αυτό καθέ αυτό δεν περιέχει αρκετή συγκέντρωση σακχάρων.

Η επαλήθευση του συνεργιτισμού των γλυκουρονικών εστερασών με άλλα ένζυμα αποκοδόμησης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, όπως η ξυλανάση GH11, επιβεβαιώνει μεταξύ άλλων και τη λειτουργία των ενζύμων αυτών στη φύση και σε φυσικά υποστρώματα. Πρόκειται για έναν πολύ εξειδικευμένο μηχανισμό της φύσης για την αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας η γνώση του οποίου έχει μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Γνωρίζοντας τη λειτουργία των ενζύμων αυτών είναι δυνατή αφ'ενός η ενισχυμένη παραγωγή των ενζύμων αυτών και αφ'ετέρου η προσθήκη των ενζύμων αυτών σε εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στη βιοηχανία εκμετάλλευσης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με σκοπό τη βελτιωμένη αποδόμηση της. Αυτό θα βοηθήσει στους εξής τομείς:

- Καλύτερη απομόνωση του κλάσματος της κυτταρίνης και ενίσχυση των προϊόντων που προέρχονται από αυτή, όπως η βιοαιθανόλη που χρησιμοποιείται ευρέως σαν βιοκαύσιμο δεύτερης γενιάς.
- Αποδόμηση της ημικυτταρίνης σε ολιγομερή της ξυλόζης, τα οποία έχει βρεθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν πρόσθετα τροφίμων ως πρεβιοτικά, βελτιώνοντας τη λειτουργία της μικροχλωρίδας του εντέρου.
- Παραλαβή ενός καθαρού κλάσματος λιγνίνης απομονωμένο από άλλα κατάλοιπα της βιομάζας, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σύνθεση χημικών υψηλής προστιθέμενης αξίας.

## 8.2 Μελλοντικές προκλήσεις

Μελλοντικές προκλήσεις, όπως αυτές προκύπτουν από την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας, θα μπορούσαν να είναι οι εξής:

- Χρήση των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος σε μη συμβατικά συστήματα για τη σύνθεση εστέρων του γλυκουρονικού οξέος με τοποεκλεκτικότητα.
- Κρυστάλλωση των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος AeGE15 και T/GE15 με το κατάλληλο υπόστρωμα, ώστε να γίνεται πιο κατανοητή η δράση των γλυκουρονικών εστερασών από βασιδιομύκητες στο σύνολό τους.
- Σε συνέχεια αυτής της διπλωματικής μπορούν να δοκιμαστούν ενζυμικές αντιδράσεις των γλυκουρονικών εστερασών με δείγματα λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής προκατεργασίας από αυτήν που υπέστησαν τα δείγματα αυτής της διπλωματικής για να μελετηθεί αν η ποιότητα της λιγνίνης παίζει ρόλο στη δημιουργία των ενζύμων μας





## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



- Amin, Farrukh Raza et al. 2017. "Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass for Anaerobic Digestion." *AMB Express* 7(1).
- Berrin, Jean-guy et al. 2012. "Exploring the Natural Fungal Biodiversity of Tropical and Temperate Forests toward Improvement of Biomass Conversion." 78(18): 6483–90.
- Biely, Peter et al. 2015. "Glucuronoyl Esterases Are Active on the Polymeric Substrate Methyl Esterified Glucuronoxylan." *FEBS Letters* 589(18): 2334–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.019>.
- Biely, Peter et al. 2016. "Microbial Glucuronoyl Esterases: 10 Years after Discovery." *Applied and Environmental Microbiology* 82(24): 7014–18.
- Brodeur, Gary et al. 2011. "Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review." *Enzyme Research* 2011(1).
- Collins, Tony, Charles Gerday, and Georges Feller. 2005. "Xylanases , Xylanase Families and Extremophilic Xylanases." 29: 3–23.
- Coseri, Sergiu. 2017. "Cellulose: To Depolymerize... or Not To?" *Biotechnology Advances* 35(2): 251–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.01.002>.
- d'Errico, Clotilde et al. 2015. "Enzymatic Degradation of Lignin-Carbohydrate Complexes (LCCs): Model Studies Using a Fungal Glucuronoyl Esterase from *Cerrena unicolor*." *Biotechnology and Bioengineering* 112(5): 914–22.
- d' Errico, Clotilde et al. 2016. "Improved Biomass Degradation Using Fungal Glucuronoyl-Esterases-Hydrolysis of Natural Corn Fiber Substrate." *Journal of Biotechnology* 219: 117–23.
- Đuranová, Miroslava et al. 2009. "Two Glucuronoyl Esterases of *Phanerochaete chrysosporium*." *Archives of Microbiology* 191(2): 133–40.
- ĐURANOVÁ, Miroslava, Ján HIRSCH, Katarína KOLENOVÁ, and Peter BIELY. 2009. "Fungal Glucuronoyl Esterases and Substrate Uronic Acid Recognition." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73(11): 2483–87. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.90486>.
- Endler, Anne, and Staffan Persson. 2011. "Cellulose Synthases and Synthesis in *Arabidopsis*." *Molecular Plant* 4(2): 199–211.
- Festucci-Buselli, Reginaldo A., Wagner C. Otoni, and Chandrashekhar P. Joshi. 2007. "Structure, Organization, and Functions of Cellulose Synthase Complexes in Higher Plants." *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19(1): 1–13.
- Gamage, Joanne, Howard Lam, and Zisheng Zhang. 2010. "Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass, a Review." *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 4(1): 3–11.
- Höfte, Herman, and Aline Voxeur. 2017. "Plant Cell Walls." *Current Biology* 27(17): R865–70.
- Igarashi, Kiyohiko et al. 2012. "Visualization of Cellobiohydrolase i from *Trichoderma reesei* Moving on Crystalline Cellulose Using High-Speed Atomic Force Microscopy." *Methods in Enzymology* 510: 169–82.
- Juturu, Veeresh, and Jin Chuan Wu. 2014. "Microbial Cellulases: Engineering, Production and Applications." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33: 188–203.
- Kang, Qian, Lise Appels, Tianwei Tan, and Raf Dewil. 2014. "Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Current Findings Determine Research Priorities." *Scientific World Journal* 2014(Ci).
- Kumar, Manoj, Liam Campbell, and Simon Turner. 2016. "Secondary Cell Walls: Biosynthesis and Manipulation." *Journal of Experimental Botany* 67(2): 515–31.

- Liu, Qingquan, Le Luo, and Luqing Zheng. 2018. "Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants." *International Journal of Molecular Sciences* 19(2).
- Mosbech, Caroline, Jesper Holck, Anne S. Meyer, and Jane Wittrup Agger. 2018. "The Natural Catalytic Function of CuGE Glucuronoyl Esterase in Hydrolysis of Genuine Lignin-Carbohydrate Complexes from Birch." *Biotechnology for Biofuels* 11(1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1075-2>.
- Norgren, Magnus, and Håkan Edlund. 2014. "Lignin: Recent Advances and Emerging Applications." *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 19(5): 409–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2014.08.004>.
- Paës, Gabriel, Jean Guy Berrin, and Johnny Beaugrand. 2012. "GH11 Xylanases: Structure/Function/Properties Relationships and Applications." *Biotechnology Advances* 30(3): 564–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.003>.
- Pokkuluri, Phani Raj et al. 2011. "Structure of the Catalytic Domain of Glucuronoyl Esterase Cip2 from *Hypocrea Jecorina*." *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 79(8): 2588–92.
- Puttaswamy, C T et al. 2016. "Indian Journal of Advances in Chemical Science Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass." *Indian Journal of Advances in Chemical Science* 51: 239–44.
- Richards, Geoffrey N. "Hemicellulases: Their Occurrence. Purification. Properties." : 9–11.
- Saha, Badal C. 2003. "Hemicellulose Bioconversion." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30(5): 279–91.
- Shallom, Dalia, and Yuval Shoham. 2003. "Microbial Hemicellulases." *Current Opinion in Microbiology* 6(3): 219–28.
- Sindhu, Raveendran, Parameswaran Binod, and Ashok Pandey. 2016. "Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass - An Overview." *Bioresource Technology* 199: 76–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>.
- Smaranda, Alexandru, and Dumitru Tucu. 2010. "Different Industrial Applications of Lignin As a Sustainable Material."
- Špáníková, Silvia et al. 2007. "Synthetic Esters Recognized by Glucuronoyl Esterase from *Schizophyllum Commune*." *Archives of Microbiology* 188(2): 185–89.
- Vinardell, Maria Pilar, and Montserrat Mitjans. 2017. "Lignins and Their Derivatives with Beneficial Effects on Human Health." *International Journal of Molecular Sciences* 18(6).
- Volynets, Bohdan, Farhad Ein-Mozaffari, and Yaser Dahman. 2017. "Biomass Processing into Ethanol: Pretreatment, Enzymatic Hydrolysis, Fermentation, Rheology, and Mixing." *Green Processing and Synthesis* 6(1): 1–22.
- Walia, Abhishek et al. 2017. "Microbial Xylanases and Their Industrial Application in Pulp and Paper Biobleaching: A Review." *3 Biotech* 7(1): 1–12.
- Zabed, H. et al. 2017. "Bioethanol Production from Renewable Sources: Current Perspectives and Technological Progress." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 71(January): 475–501. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>.
- Zabed, H., J. N. Sahu, A. N. Boyce, and G. Faruq. 2016. "Fuel Ethanol Production from Lignocellulosic Biomass: An Overview on Feedstocks and Technological Approaches." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66: 751–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>.
- Zadeh, Elham Mohammad, Sean F. O'Keefe, and Young Teck Kim. 2018. "Utilization of Lignin in

Biopolymeric Packaging Films." *ACS Omega* 3(7): 7388–98.

