

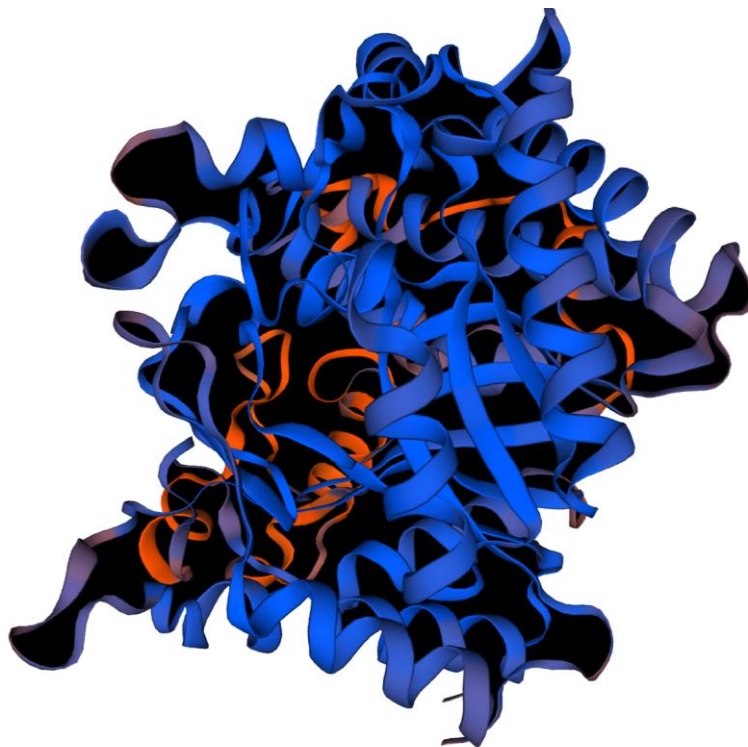


ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΑΣ
ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ Β-ΓΛΥΚΟΖΙΔΑΣΗΣ ΑΠΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΟ
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *E. COLI BL21***



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΟΡΚΟΝΤΖΕΛΟΣ ΧΑΡΙΛΑΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΕΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2020

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

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

Κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, σημαντική ήταν η βοήθεια του επιβλέποντα και των μελών του εργαστηρίου, τους οποίους ευχαριστώ θερμά: Τον Καθηγητή κ. Δημήτρη Κέκο, επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εργασία αυτή, δίνοντάς μου την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα και να κατανοήσω σε βάθος το αντικείμενο της βιοτεχνολογίας. Η στήριξη και η βοήθεια του σε οποιαδήποτε απορία ή πρόβλημα προέκυψε κατά τη διαδικασία περάτωσης της εργασίας αυτής ήταν καθοριστική.

Την Επίκουρο Καθηγήτρια Διομή Μαμμά και τη Διδάκτορα Στέλλα Καλαντζή για την συμπαράσταση και καθοδήγηση τους. Η αμέριστη βοήθεια, στήριξη και συμβολή τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και στην αντιμετώπιση προβλημάτων που προέκυψαν κατά την πορεία της εργασίας ήταν ιδιαίτερα πολύτιμη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και τη βοήθεια που μου παρείχαν όποτε τη χρειάστηκα.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους φίλους για την συμπαράσταση και στήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή μιας θερμοσταθερής β-γλυκοζιδάσης. Το ζητούμενο γονίδιο απομονώθηκε από τον θερμοφίλο μικροοργανισμό *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* και με μεθόδους ανασυνδυασμένου DNA εισήχθη σε μετασχηματισμένα κύτταρα του βακτηριακού στελέχους *E.coli* BL21. Ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο LB. Αρχικά διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του επαγωγέα IPTG και της θερμοκρασίας επαγωγής στην παραγωγή του ενζύμου η οποία ανήλθε σε 8,81 Units/mg DCW σε θερμοκρασία επαγωγής 30°C και συγκέντρωση IPTG 20μM. Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση ενός θρεπτικού μέσου ανάπτυξης καθορισμένης σύστασης στην παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης χρησιμοποιώντας την γλυκόζη ως κύρια πηγή άνθρακα και σάκχαρα όπως την λακτόζη και την γαλακτόζη ως επαγωγείς στοχεύοντας στην αντικατάσταση του επαγωγέα IPTG ώστε να προκύψει μια οικονομικά και οικολογικά συμφέρουσα διεργασία. Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο φτωχότερο μέσο ήταν 10g/L και μελετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις λακτόζης και γαλακτόζης σε θερμοκρασία επαγωγής 30°C ώστε να βρεθεί η βέλτιστη συνθήκη παραγωγής της β-γλυκοζιδάσης. Τα επίπεδα της παραγόμενης πρωτεΐνης με επαγωγείς λακτόζη συγκέντρωσης 15g/L και γαλακτόζη συγκέντρωσης 10g/L ανήλθαν σε 1,24 και 0,40 Units/mg DCW αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας το ίδιο μέσο ανάπτυξης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα IPTG και διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής, διαπιστώθηκε πως σε συγκέντρωση IPTG 40μM και θερμοκρασία επαγωγής 37°C επιτυγχάνεται η βέλτιστη παραγωγή του ενζύμου η οποία ανέρχεται σε 7,87 Units/mg DCW. Σύμφωνα με τα παραπάνω συμπεράσματα, μελετήθηκε η κυτταρική ανάπτυξη και η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο φτωχότερο μέσο σε batch καλλιέργεια χρησιμοποιώντας βιοαντιδραστήρες των 2,5L. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν περιελάμβαναν θερμοκρασία επαγωγής 30°C, σταθερό ρυθμό ανάδευσης 300 rpm και σταθερή παροχή αέρα 1,14 L/min. Αν και τα επίπεδα της κυτταρικής ανάπτυξης ήταν αρκετά υψηλότερα από αυτά των φιαλών, σημειώθηκε χαμηλότερη παραγωγή β-γλυκοζιδάσης η οποία οφείλεται στην παραγωγή οξικού οξέος. Η μέγιστη συγκέντρωση του οξικού οξέος ανήλθε σε 1,99 g/L στην περίπτωση του επαγωγέα λακτόζη και 0,58 g/L στην περίπτωση του επαγωγέα γαλακτόζη.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1.1. Εισαγωγή	6
1.1.1. Σχετικά με τον <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	6
1.1.2. Η χρήση του <i>E.coli</i> ως σύστημα έκφρασης.....	7
1.2.Επαγωγείς.....	8
1.2.1. Η χρήση του IPTG ως επαγωγέα	8
1.2.2.Επαγόμενα από σάκχαρα συστήματα	12
1.2.3. Η χρήση λακτόζης και γαλακτόζης ως επαγωγείς.....	12
1.3.Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών σε στελέχη <i>E.coli BL21</i>	14
1.3.1. Επίδραση της συγκέντρωσης επαγωγέα	14
1.3.1.1. Επίδραση της συγκέντρωσης του IPTG.....	14
1.3.1.2. Επίδραση της συγκέντρωσης λακτόζης και γαλακτόζης	16
1.3.2. Επίδραση της θερμοκρασίας καλλιέργειας.....	16
1.3.3. Επίδραση της σύστασης του θρεπτικού μέσου	17
1.3.4. Επίδραση της χρονικής στιγμής προσθήκης του επαγωγέα και της διάρκειας της επαγωγής.....	18
1.4. β-γλυκοζιδάσες	19
1.4.1. Ταξινόμηση των β-γλυκοζιδασών	19
1.4.2. Καταλυτικός μηχανισμός β-γλυκοζιδάσης	20
1.4.3. Εφαρμογές	23
2.ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	25
2.1.Υλικά.....	25
2.1.1. Όργανα και Συσκευές.....	25
2.1.2. Αντιδραστήρια- Τυποποιημένα Χημικά Παρασκευάσματα (kits).....	25
2.1.3. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers) και λοιπά διαλύματα	25
2.2. Μικροοργανισμοί και Μέθοδοι Ανάπτυξης των Μικροοργανισμών.....	26
2.2.1. Στελέχη μικροοργανισμών.....	26
2.2.2. Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.....	26
2.2.3.Ανάπτυξη τροποποιημένου οργανισμού (Προκαλλιέργεια)	26
2.2.4. Καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων.....	27

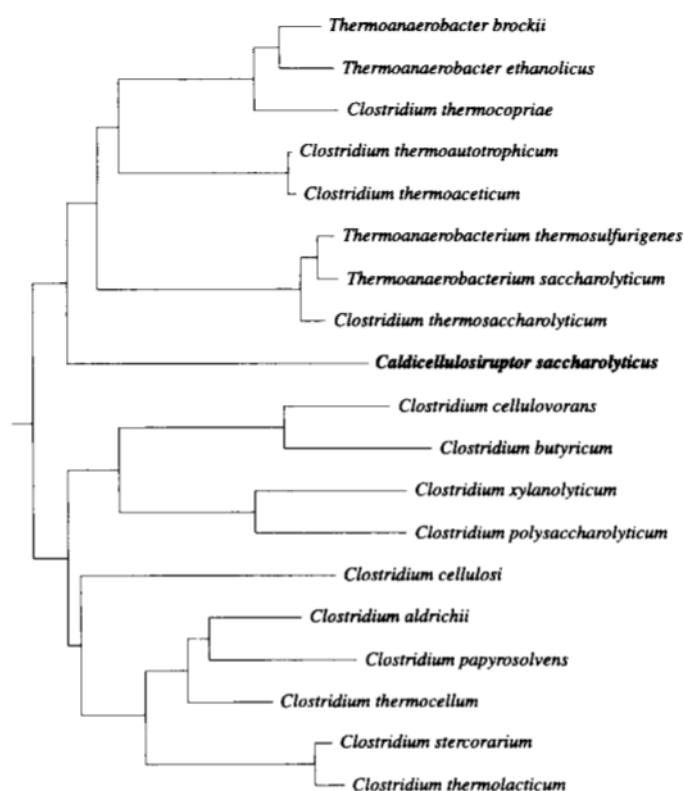
2.2.5. Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα.....	28
2.3. Μέθοδοι ανάλυσης	29
2.3.1. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας	29
2.3.2. Προσδιορισμός πρωτεϊνών.....	30
2.3.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit)	31
2.3.4. Προσδιορισμός ολικών αναγωγικών σακχάρων.....	32
2.3.5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	33
2.3.6. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυμιδίου (SDS-PAGE)	33
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
3.1. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου με θρεπτικό μέσο LB.....	36
3.1.1. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου για διάφορες συγκεντρώσεις επαγωγέα.....	37
3.1.2. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου για διάφορες θερμοκρασίες επαγωγής	42
3.2. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου σε αυτεπαγώμενα συστήματα.....	44
3.2.1. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα IPTG και θερμοκρασίες επαγωγής με χρήση Minimal Glucose.....	46
3.2.2. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου με χρήση λακτόζης ως επαγωγέα	49
3.2.3. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου με χρήση γαλακτόζης ως επαγωγέα.....	53
3.3. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου σε βιοαντιδραστήρες.....	57
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Εισαγωγή

1.1.1. Σχετικά με τον *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*

Ο μικροοργανισμός *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* είναι ένα αναερόβιο κυτταρινολυτικό βακτήριο, gram θετικό, θερμόφιλο με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 70°C (Van de Werken et al., 2008). Ανήκει στο γένος *Clostridium*. Απομονώθηκε από ένα κομμάτι ξύλου σε μια θερμή πηγή γλυκού νερού στη Νέα Ζηλανδία το 1987 και πήρε την ονομασία *Caldocellum saccharolyticum* (Sissons et al., 1987). Το 1994, το γονιδίωμα του μικροοργανισμού απομονώθηκε, περιγράφηκε λεπτομερώς και ταξινομήθηκε σε ένα νέο είδος, το *Caldicellulosiruptor*, με βάση την αλληλουχία 16S του ριβοσωμικού DNA (Raine et al., 1994). Το γονιδίωμα του είναι δίκλωνο και αποτελείται από 2,97 εκατομμύρια βάσεις οι οποίες κωδικοποιούν 2679 πρωτεΐνες (Van de Werken et al., 2008).



Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο με βάση την αλληλουχία 16S του ριβοσωμικού DNA που ταξινομεί τον *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* στο γένος *Clostridium*

Αναπτύσσεται σε pH 5,5-8 με βέλτιστη τιμή το 7. Πρόκειται για ένα βακτήριο το οποίο μπορεί να παράγει υδρογόνο από γλυκόζη (με αναλογία 3,3 με 3,6 mol H₂ ανά mol γλυκόζης), από φρουκτόζη και ξυλόζη (Chowdhary et al., 2015). Πιθανά προϊόντα της ζύμωσης των σακχάρων αποτελούν επίσης το οξικό άλας και το διοξείδιο του άνθρακα (Van de Werken et al., 2008). Επίσης, έχει την ικανότητα να μεταβολίζει ένα μεγάλο εύρος υδατανθράκων, συμπεριλαμβανομένων των πεντοζών και εξοζών καθώς και να υδρολύει πολυσακχαρίτες όπως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η πηκτίνη. Ωστόσο το H₂ έχει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των θερμοφίλων αλλά και στην δική του την παραγωγή. Η ικανότητα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού να αντέχει σε υψηλές μερικές πιέσεις υδρογόνου (P_{H_2}) εξαλείφει την ανάγκη για συνεχή απομάκρυνση του υδρογόνου από τον βιοαντιδραστήρα καθιστώντας την έτσι μια οικονομικά συμφέρουσα βιοδιεργασία (Willquist et al., 2011). Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού τον καθιστούν κατάλληλο για τη παραγωγή βιοενέργειας και την ανάπτυξη βιοδιεργασιών.

1.1.2. Η χρήση του *E.coli* ως σύστημα έκφρασης

Τα τελευταία χρόνια η παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών έχει αυξηθεί σε σημαντικό βαθμό φέροντας μεγάλη εξέλιξη στον τομέα της βιοχημείας. Το ζητούμενο γονίδιο κλωνοποιείται σε έναν διαθέσιμο φορέα έκφρασης και στη συνέχεια μετασχηματίζεται στον κατάλληλο ξενιστή με σκοπό την παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η σωστή ανάπτυξη του ξενιστή καθώς και η προέλευση της πρωτεΐνης, δηλαδή αν πρόκειται για ευκαρυωτική ή προκαρυωτική. Η επιλογή του ξενιστή που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης καθορίζει τον σχεδιασμό ολόκληρης της διεργασίας. Στους πιο συνήθεις ξενιστές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν περιλαμβάνονται τα βακτήρια, οι ζύμες, οι μύκητες και τα φύκη. (Rosano & Ceccarelli, 2014)

Ο μικροοργανισμός ο οποίος χρησιμοποιείται ευρύτατα για την παραγωγή βιομορίων είναι το βακτήριο *Escherichia coli*. Πρόκειται για ένα προκαρυωτικό μικροοργανισμό με κυκλικό DNA ο οποίος ζει στο παχύ έντερο των θερμόαιμων ζώων. Είναι προαιρετικά αναερόβιο ωστόσο μπορεί να αναπτυχθεί και σε αερόβιες συνθήκες. Οι διατροφικές του απαιτήσεις είναι ιδιαίτερα απλές γεγονός που του επιτρέπει να μεταβολίσει μεγάλη ποικιλία πηγών άνθρακα. Έχουν γίνει εκτενείς μελέτες πάνω στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού και έχει διαπιστωθεί ότι περιέχει μεγάλο αριθμό μετασχηματισμένων γενετικών στοιχείων καθώς και κατάλοιπα βακτηριοφάγων (D.Martinez, 2014).

Γνωστά στελέχη του μικροοργανισμού είναι τα *E.coli K* και *E.coli B* και συγκεκριμένα το στέλεχος *BL21* αποτελεί την συνηθέστερη επιλογή για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς παράγει λιγότερο οξικό οξύ το οποίο δρα ως ανασταλτικός παράγοντας στην κυτταρική ανάπτυξη (Li et al., 2014). Επιπλέον λόγοι που καθιστούν το *E.coli* τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ξενιστή για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών είναι οι υψηλές κυτταρικές πυκνότητες σε σύντομο χρονικό διάστημα. Επίσης αναπτύσσεται ταχύτατα καθώς υπό βέλτιστες συνθήκες ο χρόνος διπλασιασμού του είναι περίπου 20 λεπτά. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι πρόκειται για γρήγορες εφαρμογές καθώς σε μερικές ώρες έχει επέλθει η στάσιμη φάση (Rosano & Ceccarelli, 2014). Επιπρόσθετα, τα μέσα που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία της καλλιέργειας είναι φθηνά ενώ παράλληλα επιτυγχάνονται υψηλές αποδόσεις του επιθυμητού προϊόντος. Ταυτόχρονα έχει διαπιστωθεί ότι τα στελέχη έκφρασης του *E.coli* είναι εγκεκριμένα από τον FDA (Food and Drug Administration) για την εφαρμογή τους στον φαρμακευτικό τομέα (Ferres-Mintales et al., 2009). Όλα αυτά καθιστούν το *E.coli* μία οικονομική, γρήγορη και αποδοτική λύση για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βιομηχανική κλίμακα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση ανασυνδυασμένου *E.coli* για την παραγωγή της ακετυλάσης της πενικιλλίνης η οποία χρησιμοποιείται για την παραγωγή ημι-συνθετικών βιοπροϊόντων (A.Rodriguez et al., 2006).

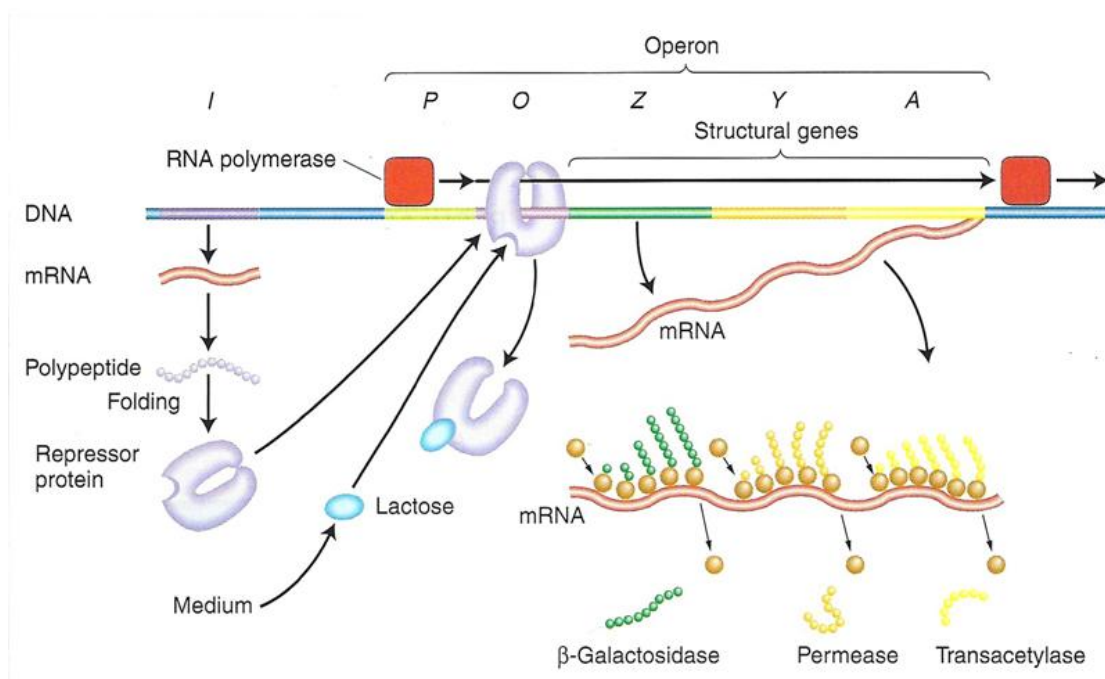
Ωστόσο η χρήση ενός συστήματος έκφρασης *E.coli* ως ξενιστή για την παρασκευή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών συναντά ορισμένα εμπόδια. Αρχικά, ο *E.coli* όντας προκαρυωτικός μικροοργανισμός δεν έχει την ικανότητα να πραγματοποιήσει μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως τα συστήματα αυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ευκαρυωτικών πρωτεϊνών (Marisch et al., 2013). Επίσης αυτά τα συστήματα έκφρασης δεν έχουν την δυνατότητα δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών ενώ δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή πρωτεϊνών που απαιτούν γλυκοζυλίωση. Τέλος, ακόμη και αν τελικά πραγματοποιηθεί η παραγωγή πρωτεΐνης, είναι πιθανή η παραγωγή ενδοτοξινών (D.Martinez, 2014).

1.2.Επαγωγείς

1.2.1. Η χρήση του IPTG ως επαγωγέα

Το IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) είναι μία χημική ένωση η οποία χρησιμοποιείται συχνά στην μοριακή βιολογία. Πρόκειται για ένα μόριο το οποίο είναι ένα μη μεταβολιζόμενο ανάλογο της αλλολακτόζης, που ενεργοποιεί την μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης και χρησιμοποιείται για να επάγει την πρωτεϊνική έκφραση. Πιο συγκεκριμένα, το οπερόνιο της λακτόζης αποτελείται από

3 γονίδια: το *lacZ* το οποίο κωδικοποιεί την β-γαλακτοζιδάση η οποία διασπά την λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη και είναι υπεύθυνη για την παραγωγή της αλλολακτόζης, δηλαδή τον φυσικό επαγωγέα του οπερονίου της λακτόζης. Έπειτα είναι το *lacY* που κωδικοποιεί τις περμεάσες της λακτόζης. Πρόκειται για πρωτεΐνες οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά της λακτόζης και των αναλόγων της προς το κυτταρόπλασμα. (A.Marbach & K.Bettenbrock, 2011). Τέλος το τρίτο γονίδιο είναι το *lacA* που κωδικοποιεί την τρανσακετυλάση. Το ένζυμο αυτό μπορεί να προστατεύσει το κύτταρο απέναντι σε τοξικά ανάλογα της λακτόζης που μπορούν να το βλάψουν (Roderick, 2005) (Εικόνα 2).

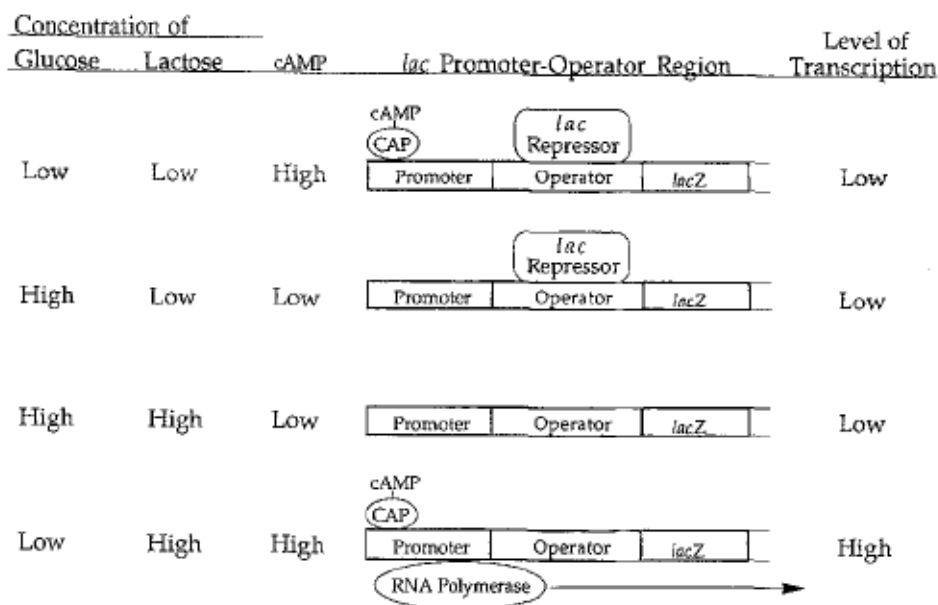


Εικόνα 2: Περιγραφή του οπερονίου της λακτόζης

Η μεταγραφή από τον υποκινητή ρυθμίζεται από τον *lac*-καταστολέα που παράγεται κατά την μεταγραφή του *lacI* γονιδίου. Όταν απουσιάζει η λακτόζη ή κάποιο ανάλογο όπως το IPTG, τότε η μεταγραφή αναστέλλεται. Ο *lac*-καταστολέας προσδέεται στον χειριστή του οπερονίου της λακτόζης και εμποδίζει την έκφραση του (Yildirim & Kazanci, 2011). Με αυτόν τον τρόπο η RNA πολυμεράση δεν μπορεί να προσδεθεί σωστά στον υποκινητή και να ξεκινήσει η μεταγραφή των *lac* γονιδίων. Αυτή η πρόσδεση του καταστολέα με τον *lac*-χειριστή δημιουργεί μια χημική ισορροπία η οποία έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου της λακτόζης σε χαμηλά επίπεδα (Donovan et al., 1996).

Η ύπαρξη λακτόζης στο εσωτερικό των κυττάρων, αυξάνει την συγκέντρωση της συγγενούς ουσίας, της αλλολακτόζης, η οποία παράγεται με την δράση της β-γαλακτοζιδάσης. Σε αυτή την περίπτωση τα επίπεδα μεταγραφής μπορούν να αυξηθούν μέχρι και χίλιες φορές (Kennell & Riezman, 1977). Η αλλολακτόζη, προσδέεται στα μόρια του καταστολέα εμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση τους στον χειριστή. Έτσι η μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου μπορεί να αρχίσει. Μάλιστα στην περίπτωση του IPTG, η πρόσδεση γίνεται κατευθείαν καθώς το IPTG δεν μεταβολίζεται (D.Martinez, 2014).

Η μεταγραφή από τον *lac*-υποκινητή ρυθμίζεται επίσης από την πρόσδεση της πρωτεΐνης CAP (Catabolite-Activator Protein) στη περιοχή του υποκινητή. Αυτό πραγματοποιείται όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο σύστημα είναι πολύ χαμηλή. Τότε αυξάνεται η συγγένεια του υποκινητή με την RNA πολυμεράση και κατ' επέκταση αυξάνονται τα επίπεδα μεταγραφής των *lac* γονιδίων. Αυτή η συγγένεια ενισχύεται λόγω της παραγωγής των κυκλικών μορίων μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cyclic adenosine monophosphate), η οποία πυροδοτείται λόγω της απουσίας γλυκόζης. Τα επίπεδα γλυκόζης στο μέσο καθορίζουν και τον αριθμό των μορίων cAMP, καθώς όσο λιγότερη γλυκόζη υπάρχει τόσο περισσότερα είναι τα μόρια cAMP. Έτσι, εφόσον ο χειριστής είναι ελεύθερος από τον καταστολέα, οι υψηλές εσωκυτταρικές συγκεντρώσεις του cAMP οδηγούν σε υψηλά επίπεδα του συμπλόκου cAMP-CAP στην περιοχή του υποκινητή και επιτυγχάνονται υψηλά επίπεδα μεταγραφής (Εικόνα 3) (Griffiths et al., 2000).



Εικόνα 3: Επίδραση της παρουσίας γλυκόζης και λακτόζης στο μέσο ανάπτυξης κατά το στάδιο της μεταγραφής από τον *lac*- υποκινητή στο *E.coli*

Όταν στο μέσο ανάπτυξης υπάρχει μείγμα σακχάρων, το *E.coli* μεταβολίζει πρώτα τη γλυκόζη και μετά τη λακτόζη. Επίσης όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο μέσο είναι υψηλή, αυτό συνεπάγεται μικρό αριθμό μορίων cAMP. Αυτό εξηγεί ότι ακόμα και όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι υψηλή και ο επαγωγέας απουσιάζει, δεν εξασφαλίζονται υψηλά επίπεδα μεταγραφής

Επομένως, το IPTG λειτουργεί ως επαγωγέας σε συστήματα έκφρασης *E.coli* και θεωρείται η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την επαγωγή της έκφρασης του υποκινητή, επιτυγχάνοντας υψηλές αποδόσεις της επιθυμητής ετερόλογης πρωτεΐνης. Ωστόσο υπάρχουν ορισμένα μειονεκτήματα που καθιστούν δύσκολη τη συνεχή χρήση του ως επαγωγικό μέσο. Αρχικά απαιτεί συνεχή παρακολούθηση της κυτταρικής ανάπτυξης καθώς δεν είναι γνωστή η χρονική στιγμή που επιτυγχάνεται η βέλτιστη κυτταρική πυκνότητα ώστε να προστεθεί ο επαγωγέας. Επίσης θεωρείται πολύ τοξικό γεγονός το οποίο αποτρέπει την χρήση του σε τομείς όπως η φαρμακευτική και η βιομηχανία τροφίμων (Yao et al., 2017). Τέλος θεωρείται ένα αντιδραστήριο αρκετά ακριβό καθιστώντας τη χρήση του μη οικονομικά αποδοτική και μη συμβατή σε βιομηχανική κλίμακα (Briand et al., 2016).

Για τους παραπάνω λόγους η έρευνα έχει στραφεί πλέον σε εναλλακτικές και πιο οικονομικές μεθόδους και συγκεκριμένα τα επαγόμενα από σάκχαρα συστήματα.

1.2.2.Επαγώμενα από σάκχαρα συστήματα

Στα συστήματα αυτά, ο επαγωγέας IPTG αντικαθίσταται από σάκχαρα τα οποία λειτουργούν ως επαγωγείς της πρωτεϊνικής έκφρασης. Μια κατηγορία τέτοιων συστημάτων είναι τα αυτεπαγώμενα στα οποία η πρωτεΐνη-στόχος παράγεται απουσία επαγωγέα χωρίς να απαιτείται η συνεχής παρακολούθηση της κυτταρικής ανάπτυξης. Το θρεπτικό μέσο παίζει και το ρόλο του επαγωγέα (F.Studier, 2005). Σε τέτοια συστήματα, πηγή άνθρακα είναι κάποιο σάκχαρο όπως γλυκόζη, λακτόζη, γαλακτόζη ή μίγμα αυτών. Ως πηγή άνθρακα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η γλυκερόλη.

Άλλη περίπτωση τέτοιων συστημάτων είναι αυτά στα οποία η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή άνθρακα ενώ σάκχαρα όπως η λακτόζη και η γαλακτόζη επάγουν την παραγωγή της πρωτεΐνης. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο επαγωγέας προστίθεται όταν η κυτταρική ανάπτυξη έχει φτάσει στο σημείο μεταξύ εκθετικής και στάσιμης φάσης (Briand et al., 2016), όπου η πηγή άνθρακα έχει σχεδόν εξαντληθεί. Τότε, προστίθεται ο επαγωγέας. Με αυτό τον τρόπο, ο επαγωγέας δίνει “σήμα” στο σύστημα να σταματήσει την κυτταρική ανάπτυξη και να ξεκινήσει η παραγωγή της ζητούμενης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

1.2.3. Η χρήση λακτόζης και γαλακτόζης ως επαγωγείς

Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης ο οποίος αποτελείται από ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο γλυκόζης, ενωμένα μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιδικό δεσμό. Η λακτόζη και γαλακτόζη αποτελούν σάκχαρα τα οποία είναι διαθέσιμα σε μεγάλες ποσότητες, καθώς αποτελούν παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας, όπως το τυρόγαλα (Johnson & Conforti, 2003). Επίσης, σε αντίθεση με το IPTG, και τα δύο σάκχαρα θεωρούνται φθηνά και μη τοξικά μέσα (Briand et al., 2016, Xu et al., 2012). Ωστόσο η χρήση της λακτόζης ως επαγωγέας για την πρωτεϊνική έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών από τον *lac*-υποκινητή είναι μέχρι στιγμής περιορισμένη σε εργαστηριακή κλίμακα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, σε αντίθεση με το IPTG, οι βέλτιστες συνθήκες που απαιτούνται για την χρήση της ως επαγωγέας είναι περίπλοκες λόγω της φυσιολογικής απόκρισης του κυττάρου στη παρουσία του σακχάρου καθώς και ότι η λακτόζη μεταβολίζεται από το κύτταρο (Donovan et al., 1996).

Για να χρησιμοποιηθεί η λακτόζη ως επαγωγέας του *lac*-υποκινητή, είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψιν το γενετικό υπόβαθρο του στελέχους που θα χρησιμοποιηθεί ως ξενιστής. Σε αντίθεση με το IPTG, το οποίο προσδένεται αμέσως στον *lac*-καταστολέα, η λακτόζη χρειάζεται το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση για να μετατραπεί σε αλλολακτόζη και να δράσει ως επαγωγέας (Griffiths et al., 2000). Εφόσον στελέχη του *E.coli*, με περιορισμένη δραστηριότητα β-γαλακτοζιδάσης, χρησιμοποιούνται συχνά για κλωνοποίηση και έκφραση ενός γονιδίου από τον *lac*-υποκινητή, πολλά

ανασυνδυασμένα στελέχη δεν επάγονται με λακτόζη ούτε μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη λακτόζη ως πηγή άνθρακα για την κυτταρική ανάπτυξη. Είναι επομένως σημαντικό κατά την επιλογή του κατάλληλου ξενιστή, να επιλέγονται στελέχη του *E.coli* που φέρουν το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης.

Η λακτόζη μπορεί να είναι το ίδιο αποδοτική ως επαγωγέας όσο και το IPTG. Σύμφωνα με μελέτες, κατά την έκφραση της προρενίνης (προρενίνη είναι το πρωτογενές προϊόν μετάφρασης του mRNA και σχετίζεται με τη ρενίνη η οποία είναι μια πρωτεάση που βρίσκεται στο τέταρτο στομάχι των μόσχων υπεύθυνη για την πρωτεόλυση της καζεΐνης στο γάλα) η χρήση γλυκερόλης ως μέσο ανάπτυξης και λακτόζης ως επαγωγέας σε batch συνθήκες, οδήγησε σε μεγαλύτερη απόδοση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε σχέση με το IPTG συγκέντρωσης 1mM. Επιπλέον, ενώ κατά την επαγωγή με IPTG η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παρήχθη κατά την εκθετική φάση, στη περίπτωση της λακτόζης σημειώθηκαν υψηλά επίπεδα παραγωγής μεταξύ εκθετικής και στάσιμης φάσης (Kaprak et al., 1991). Αντίστοιχα, η παραγωγή της πρωτεΐνης VP1 ξεκίνησε αμέσως μετά τη προσθήκη του IPTG στο τέλος της εκθετικής φάσης ενώ στη περίπτωση της λακτόζης η παραγωγή ξεκίνησε δύο ώρες αργότερα σε συνθήκες batch και fed-batch σε θρεπτικό μέσο γλυκόζη. Μάλιστα, στη περίπτωση της fed-batch καλλιέργειας, όταν η έκφραση της πρωτεΐνης ξεκίνησε η λακτόζη είχε καταναλωθεί μέχρι εκείνο το διάστημα (Neubauer & Hofmann, 1994).

Όσον αφορά την χρήση της γαλακτόζης ως επαγωγέα, αρχικές μελέτες υποδείκνυαν πως η γαλακτόζη δεν ήταν ισχυρός επαγωγέας του οπερονίου της λακτόζης. Ισχυροί επαγωγείς του οπερονίου της λακτόζης όπως το IPTG δρούσαν ως καταστολείς του οπερονίου της γαλακτόζης ενώ οι ισχυροί επαγωγείς του οπερονίου της γαλακτόζης όπως η γαλακτόζη και η φουκόζη αποτελούσαν αδύναμους επαγωγείς του οπερονίου της λακτόζης (Williams & Paigen, 1968). Ωστόσο η αδρανοποίηση της κινάσης της γαλακτόζης (*galK*) βρέθηκε ότι ενεργοποιεί την εισαγωγή της γαλακτόζης σε μια συγκέντρωση αρκετά υψηλή ώστε να επάγει την μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης. Έτσι, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η γαλακτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επαγωγέας για την παραγωγή πρωτεϊνών στον τομέα της φαρμακοβιομηχανίας. Συγκεκριμένα, για τη παραγωγή της πρωτεΐνης TP1, η χρήση γαλακτόζης συγκέντρωσης 1mM σε θρεπτικό μέσο όπου κύρια πηγή άνθρακα ήταν η γλυκερόλη οδήγησε σε ίδια επίπεδα παραγωγής με το IPTG (Xu et al., 2012). Επίσης τα επίπεδα παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης rJZTX-III ήταν ψηλότερα κατά τη χρήση γαλακτόζης και λακτόζης ως επαγωγείς σε θερμοκρασία καλλιέργειας 30°C σε σχέση με το IPTG σε συγκεντρώσεις 0,2mM-0,8mM στην ίδια θερμοκρασία (Yao et al., 2017). Επίσης η γαλακτόζη όπως και το IPTG δεν μεταβολίζεται από το κύτταρο. Επομένως όταν η λακτόζη διασπάται σε γλυκόζη και γαλακτόζη, η συγκέντρωση της δεύτερης είναι αρκετή για να επάγει την πρωτεϊνική

έκφραση. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της γαλακτόζης έναντι του IPTG είναι ότι η προσθήκη της στο μέσο δεν αυξάνει το μεταβολικό φορτίο (Xu et al., 2012).

1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών σε στελέχη *E.coli* BL21

Η έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών σε στελέχη *E.coli* μπορεί να συναντήσει αρκετές δυσκολίες. Η ανάπτυξη κυττάρων που περιέχουν πλασμίδια πραγματοποιείται με πολύ μικρότερο ρυθμό σε σχέση με αυτή των κυττάρων που δεν περιέχουν. Αυτό οφείλεται στην μείωση της διαθέσιμης μεταβολικής ενέργειας του κυττάρου που επιφέρει η παρουσία του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Ωστόσο, η χρήση υποκινητών (όπως ο *lacUV5* και ο *tac*) καθώς και η εισαγωγή πλασμιδίων κοντά στην περιοχή της αντιγραφής έχουν οδηγήσει στην βελτίωση του ρυθμού ανάπτυξης τους (Bentley et al., 1990). Συνολικά, οι παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο είναι (Donovan et al., 1996):

- η συγκέντρωση επαγωγέα,
- η θερμοκρασία καλλιέργειας,
- η σύσταση του θρεπτικού μέσου,
- η χρονική στιγμή προσθήκης επαγωγέα και
- η διάρκεια επαγωγής.

1.3.1. Επίδραση της συγκέντρωσης επαγωγέα

1.3.1.1. Επίδραση της συγκέντρωσης του IPTG

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το IPTG είναι ένας επαγωγέας του *lac*-υποκινητή, ο οποίος προσδένεται στο καταστολέα, αποτρέποντας του την σύνδεση με το χειριστή. Πρόκειται για μια χημική ένωση η οποία χρησιμοποιείται σε διάφορες συγκεντρώσεις, ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες. Οι συγκεντρώσεις IPTG που χρησιμοποιούνται για την πρωτεϊνική έκφραση κυμαίνονται σε ένα εύρος 5μM-5mM (Donovan et al., 1996). Λόγω του αυξημένου μεταβολικού φορτίου που υφίσταται το κύτταρο λόγω της παρουσίας γονιδίων ξένων σε αυτό, η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων επαγωγέα δεν συνεπάγεται αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση. Αντιθέτως, τις περισσότερες φορές, η βέλτιστη συγκέντρωση του επαγωγέα επιλέγεται ώστε να εξισορροπήσει τον ρυθμό ανάπτυξης των ανασυνδυασμένων κυττάρων που μειώνεται μετά την επαγωγή, με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης-στόχου που αυξάνονται. Για παράδειγμα, κατά την έκφραση της πρωτεΐνης CAT (chloramphenicol-acetyl-transferase), η αύξηση της παραγωγικότητας της πρωτεΐνης, μετά την επαγωγή με IPTG κατά την εκθετική φάση, οδήγησε στη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Μάλιστα η μείωση αυτή

ενισχύθηκε ακόμα περισσότερο με την αύξηση της συγκέντρωσης του IPTG (Bentley et al., 1991).

Επιπλέον, η επαγωγή με χρήση IPTG έχει εμφανίσει μια πληθώρα στρεσογόνων αποκρίσεων στο κύτταρο. Μάλιστα σε μη-μετασχηματισμένα στελέχη *E.coli* με ένα *lac*-υποκινητή στο χρωμόσωμα, η χρήση IPTG συγκέντρωσης 0,5mM προκάλεσε την αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών που προκαλούν θερμοκρασιακό σοκ (Kosinski et al., 1992, Donovan et al., 1996). Επίσης, τα επίπεδα συγκέντρωσης του IPTG μπορεί να επηρεάσουν την πρωτεολυτική αποικοδόμηση πρωτεϊνών οι οποίες έχουν λάθος πτύχωση. Έχει αποδειχθεί ότι υψηλά επίπεδα έκφρασης μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με τη χρήση IPTG επάγουν την έκφραση πρωτεασών όταν οι συγκεντρώσεις συγκεκριμένων αμινοξέων είναι ανεπαρκείς (Harcum et al., 1993).

Η θέση του *lac*-καταστολέα, καθώς και ο αριθμός των μορίων καταστολέα που παράγονται στο κύτταρο, καθορίζουν την συγκέντρωση του IPTG που απαιτείται για την πλήρη επαγωγή της έκφρασης από τον *lac*-υποκινητή. Επίσης η συγκέντρωση του IPTG εξαρτάται και από τον αριθμό των πλασμιδιακών αντιγράφων που υπάρχουν στο κύτταρο. Οι συγκεντρώσεις του IPTG που επιτυγχάνεται η βέλτιστη επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης κυμαίνονται από 1-100μM, ανάλογα με τον αριθμό των αντιγράφων κατά την φάση της επαγωγής. Επομένως η συγκέντρωση του IPTG εξαρτάται από το εκάστοτε σύστημα, καθώς διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG απαιτούνται από σύστημα σε σύστημα για να συμβούν οι διάφορες μεταβολικές αλλαγές (Donovan et al., 1996).

Τα χαρακτηριστικά της εκάστοτε πρωτεΐνης, η ορθή της πτύχωση, καθώς και η κυτταρική θέση της πρωτεΐνης μπορεί επίσης να επηρεάσουν την συγκέντρωση του IPTG που απαιτείται για την βέλτιστη επαγωγή. Για παράδειγμα, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες ή οι πρωτεΐνες χαμηλής διαλυτότητας χρειάζονται συνήθως χαμηλές συγκεντρώσεις IPTG. Αντίθετα, στις περιπλασμικές πρωτεΐνες αυξάνεται το ποσοστό παραγωγής τους σε πιο ψηλές συγκεντρώσεις IPTG. Συγκεντρωτικά, η ποσότητα του IPTG που απαιτείται για τη βέλτιστη πρωτεϊνική έκφραση εξαρτάται από (Donovan et al., 1996):

- την ισχύ του υποκινητή
- την παρουσία ή απουσία γονιδίου *lacI* στο πλασμίδιο
- την θέση της εκφρασμένης πρωτεΐνης
- την απόκριση του κυττάρου στην έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης
- την διαλυτότητα της πρωτεΐνης στόχου
- τα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης πρωτεΐνης

Αν και η χρήση IPTG συγκέντρωσης 1mM θεωρείται ικανή για την επαγωγή μιας ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης με χρήση του *lac* υποκινητή, εντούτοις πολλές φορές η συγκέντρωση αυτή μπορεί να πέσει μέχρι και 100 φορές για εκκρινόμενες

πρωτεΐνες προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα όπως κυτταρική αναστολή ή λύση του κυττάρου.

1.3.1.2. Επίδραση της συγκέντρωσης λακτόζης και γαλακτόζης

Όπως αναφέρεται παραπάνω, τα συστήματα στα οποία η λακτόζη και η γαλακτόζη χρησιμοποιούνται ως επαγωγείς είναι σπάνια και για το λόγο αυτό δεν υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με την επίδραση της συγκέντρωσης των σακχάρων αυτών στην ενεργότητα ενός ενζύμου. Ωστόσο η συγκέντρωση της λακτόζης, δεν πρέπει να είναι αρκετά υψηλή καθώς μπορεί να αναστείλει την παραγωγή της πρωτεΐνης είτε λόγω της υψηλής υπολειπόμενης συγκέντρωσης της λακτόζης είτε λόγω συσσώρευσης της παραγόμενης γαλακτόζης (Gombert & Kilikian, 1998). Επίσης η βέλτιστη συγκέντρωση λακτόζης ως επαγωγέας για την παραγωγή της δεξτρανσουκράσης βρέθηκε ότι είναι 5g/L (Zhang et al., 2009). Ωστόσο η βέλτιστη συγκέντρωση εξαρτάται και από τις συνθήκες του εκάστοτε συστήματος. Επίσης, σύμφωνα με αναφορές, η λακτόζη αποτελεί καλύτερο επαγωγέα από τη γαλακτόζη ως προς την δραστηριότητα των ενζύμων (Xu et al., 2012).

1.3.2. Επίδραση της θερμοκρασίας καλλιέργειας

Η θερμοκρασία καλλιέργειας παίζει σημαντικό ρόλο για τη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών που εκκρίνονται κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Takagi et al., 1988). Ο μικροοργανισμός *E.coli* μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες 20-40°C με βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών 37-39°C (A.Semenov et al., 2007, A.Farewell & F.C.Neidhardt, 1998). Μάλιστα σε αυτό το βέλτιστο εύρος επιτυγχάνεται και η βέλτιστη δραστηριότητα του *lac* υποκινητή. Ωστόσο, σε χαμηλότερο εύρος είναι πιθανή η μείωση ανεπιθύμητων μεταβολικών αποκρίσεων κατά τη σύνθεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και κατ' επέκταση η βελτίωση της απόδοσης ή της διαλυτότητας της πρωτεΐνης στόχου (Donovan et al., 1996). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή της β-γαλακτοζιδάσης με επαγωγέα IPTG. Μείωση της θερμοκρασίας της καλλιέργειας από τους 37°C στους 30°C, μείωσε σημαντικά την σύνθεση πρωτεϊνών που προκαλούν στρες ή θερμοκρασιακό σοκ στο *E.coli* (Surek et al., 1991).

Επιπλέον, με την χρήση χαμηλότερων θερμοκρασιών αποφεύγεται ο σχηματισμός αδιάλυτων συσσωματωμάτων που προκύπτουν από την κατακρήμιση υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών. Μείωση της θερμοκρασίας από τους 37°C στους 20-30°C οδήγησε στην μείωση σχηματισμού συσσωματωμάτων και τη βελτίωση της συνολικής δραστηριότητας μιας β-λακταμάσης (Chalmers et al., 1990). Κατά αντίστοιχη περίπτωση, χαμηλότερες θερμοκρασίες καλλιέργειας βελτιώνουν την πτύχωση και συναρμολόγηση λειτουργικών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που εκκρίνονται στο περίπλασμα (Donovan et al., 1996).

Αντίστοιχα με τη μειωμένη συγκέντρωση του επαγωγέα, έτσι και η μείωση της θερμοκρασίας της καλλιέργειας βελτιώνει τον σχηματισμό των λειτουργικών πρωτεϊνών μειώνοντας το ρυθμό με τον οποίο σχηματίζεται μια υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη. Επίσης μείωση της θερμοκρασίας στο εύρος 20-30°C αποτρέπει την έκκριση πρωτεϊνών η έκφραση των οποίων οδηγεί σε λύση του κυττάρου και θάνατο (Donovan et al., 1996).

1.3.3. Επίδραση της σύστασης του θρεπτικού μέσου

Τα θρεπτικά μέσα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κυτταρική ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού *E.coli* με σκοπό την παραγωγή μιας ετερόλογης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μπορεί να ποικίλουν. Ένα από αυτά είναι το μέσο Luria-Bertani (LB). Πρόκειται για ένα μέσο πλούσιο σε αμινοξέα, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία (Williams & Liao, 2006). Ωστόσο, η μη χαρακτηρισμένη τους σύσταση δυσκολεύει την ανάλυση και την παρακολούθηση των συνεπειών όταν μειώνεται η διαθεσιμότητα υποστρώματος στα κύτταρα, οδηγώντας στη χρήση σακχάρων ως πηγή άνθρακα (Donovan et al., 1996). Τα μέσα αυτά, αν και έχουν χαμηλότερο κόστος, οδηγούν σε χαμηλότερους ρυθμούς καλλιέργειας και χαμηλότερη απόδοση της ζητούμενης πρωτεΐνης (Ryan et al., 1989).

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου κατά τη φάση επαγωγής επηρεάζει σημαντικά την έκφραση των ετερόλογων πρωτεϊνών. Η υπερέκφραση μιας πρωτεΐνης προσθέτει μεταβολικό φορτίο στην ενέργεια του κυττάρου μειώνοντας την ανάπτυξη της καλλιέργειας και συνθέτοντας πρωτεΐνες που προκαλούν θερμοκρασιακό σοκ. Επίσης η προσθήκη καζαμινοξέων, πεπτόνης ή εκχυλίσματος ζύμης στο θρεπτικό μέσο, βελτιώνει την απόδοση παραγωγής ετερόλογων πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, όταν η σύσταση των αμινοξέων της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης παρουσιάζει μεγάλη διαφορά με αυτή των πρωτεϊνών που βρίσκονται φυσικά στο κύτταρο-ξενιστή, τότε το κύτταρο προσπαθεί να αναπληρώσει τα αμινοξέα που καταναλώθηκαν λόγω της έκφρασης της ετερόλογης πρωτεΐνης. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η απόκριση στρες από το κύτταρο. Βέβαια η προσθήκη συγκεκριμένων αμινοξέων και κυρίως οι μεταβολικές συνέπειες τους πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν καθώς η αύξηση της περιεκτικότητας τους μπορεί να καταστείλει ή να αναστείλει την βιοσύνθεση άλλων αμινοξέων καθώς και απαραίτητων μεταβολιτών (Donovan et al., 1996).

Η χρήση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο κατά τη φάση της επαγωγής μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των ετερόλογων πρωτεϊνών υπό την μεταγραφική ρύθμιση του *lac*-υποκινητή. Αν και αποτελεί ιδανικό μέσο ανάπτυξης για μία καλλιέργεια, η παρουσία γλυκόζης στο κύτταρο καταστέλλει την μεταγραφή του *lac* υποκινητή. Η καταστολή αυτή οφείλεται στον μικρό αριθμό μορίων cAMP. Επομένως η προσθήκη αυτών των μορίων στο κύτταρο βελτιώνει τη σύνθεση της ετερόλογης πρωτεΐνης.

Η γλυκόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα για την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών από τον *lac* υποκινητή όσο η συγκέντρωση της είναι χαμηλότερη από 0,1%w/v κατά την φάση επαγωγής. Έτσι, στρατηγικές όπως η διατήρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε χαμηλά επίπεδα πριν τη στιγμή της επαγωγής, με στόχο την αποφυγή της καταστολής, μπορούν να πετύχουν υψηλές αποδόσεις παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Τέλος η παρουσία της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο φέρει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, καθώς η παρουσία της στο μέσο περιορίζει την έκφραση ανεπιθύμητων ετερόλογων πρωτεϊνών, από την άλλη όμως είναι πιθανή η παραγωγή παραπροϊόντων όπως το οξικό οξύ το οποίο αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη (Donovan et al., 1996).

1.3.4. Επίδραση της χρονικής στιγμής προσθήκης του επαγωγέα και της διάρκειας της επαγωγής

Η χρονική στιγμή που προστίθεται ο επαγωγέας επηρεάζει σημαντικά την μέγιστη απόδοση της ζητούμενης ετερόλογης πρωτεΐνης. Μάλιστα, η προσθήκη του επαγωγέα μεταξύ εκθετικής και στάσιμης φάσης, όπου επιτυγχάνονται υψηλές κυτταρικές πυκνότητες, συνεισφέρει στην αυξημένη παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος (Briand et al., 2016). Βέβαια η περίπτωση αυτή δεν ισχύει πάντοτε. Συγκεκριμένα, κατά την έκφραση της πρωτεΐνης CAT με τη χρήση του *lac* υποκινητή, η απόδοση της ετερόλογης πρωτεΐνης μπορεί να μειωθεί, καθώς στην στάσιμη φάση, τα θρεπτικά μέσα έχουν καταναλωθεί με αποτέλεσμα να μειώνεται η κυτταρική ανάπτυξη και η δραστηριότητα της πρωτεάσης (Bentley et al., 1992). Όταν η απόδοση του προϊόντος είναι χαμηλή και δεν επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη, τότε η απόδοση της ετερόλογης πρωτεΐνης μεγιστοποιείται όταν ο επαγωγέας προστίθεται συνεχώς κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης (Donovan et al., 1996).

Αντίστοιχα, στην περίπτωση που η λακτόζη παίζει το ρόλο του επαγωγέα, η βέλτιστη επαγωγή είναι άμεσα εξαρτώμενη από την χρονική στιγμή της επαγωγής. Για παράδειγμα, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης VP1 βρέθηκαν υψηλότερα όταν η λακτόζη προστέθηκε στο τέλος της εκθετικής φάσης όπου η γλυκόζη είχε σχεδόν καταναλωθεί. Η προσθήκη της λακτόζης μία ώρα αργότερα, στην στάσιμη φάση οδήγησε σε χαμηλότερες αποδόσεις της πρωτεΐνης-στόχου (Neubauer et al., 1992). Επομένως, το σημείο στο οποίο η γλυκόζη έχει σχεδόν καταναλωθεί μπορεί να είναι η κατάλληλη χρονική στιγμή για την επαγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με λακτόζη (Donovan et al., 1996).

Όσον αφορά την διάρκεια της επαγωγής, σε συστήματα έκφρασης *E.coli*, αν και δεν είναι συχνή η έκκριση πρωτεϊνών στο μέσο, αύξηση του χρόνου επαγωγής ενισχύει την απελευθέρωση περιπλασμικών πρωτεϊνών (Donovan et al., 1996).

1.4. β-γλυκοζιδάσες

1.4.1. Ταξινόμηση των β-γλυκοζιδασών

Οι β-γλυκοζιδάσες αποτελούν μια ομάδα υδρολυτικών ενζύμων τα οποία συναντώνται σε βακτήρια, μύκητες και φύκη. Ταξινομούνται με βάση την εξειδίκευση τους ως προς κάποιο υπόστρωμα και την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων τους (Yang et al., 2013). Όσον αφορά την εξειδίκευση στο υπόστρωμα, οι β-γλυκοζιδάσες χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, τις αρυλ-β-γλυκοζιδάσες οι οποίες εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση στην υδρόλυση αρυλ-β-γλυκοζιδών, οι κελλοβιάσες οι οποίες συμμετέχουν στην μετατροπή της κελλοβιόζης σε μόρια γλυκόζης και οι γλυκοζιδάσες οι οποίες εμφανίζουν υψηλή ενεργότητα σε μεγάλο εύρος υποστρωμάτων και αποτελούν την πιο συχνά παρατηρούμενη ομάδα στους κυτταρινολυτικούς μικροοργανισμούς (Yeoman et al., 2010).

Ο δεύτερος τρόπος ταξινόμησης, είναι ευρέως αποδεκτός και βασίζεται τόσο στην ομοιότητα της αλληλουχίας των αμινοξέων όσο και στην όμοια δομή των ενζύμων. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου ταξινόμησης έγκειται στο γεγονός ότι επιτρέπει τη μελέτη της εξελικτικής σχέσης, των δομικών χαρακτηριστικών και του μηχανισμού κατάλυσης των ενζύμων αυτών. Σύμφωνα με την ταξινόμηση αυτή έχουν βρεθεί 164 οικογένειες γλυκοζυδρολασών (glycosyl hydrolases GH), με την πλειοψηφία των β-γλυκοζιδασών να ανήκουν στις οικογένειες GH1 και GH3. Στην οικογένεια GH1 ανήκουν 62 β-γλυκοζιδάσες οι οποίες προέρχονται κυρίως από αρχαιοβακτήρια, φυτά και θηλαστικά, ενώ εκείνες της οικογένειας 3, οι οποίες είναι περίπου 44, προέρχονται από βακτήρια, μύκητες και ζύμες (Srivastava et al., 2019). Μέχρι σήμερα, αρκετές β-γλυκοζιδάσες έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορους μύκητες όπως *Trichoderma reesei*, *Humicola grisea*, *Talaromyces emersonii* και άλλους, με τις περισσότερες από αυτές να ανήκουν στην οικογένεια GH3. Αντίθετα, υπάρχει μικρός αριθμός β-γλυκοζιδασών, που έχουν απομονωθεί από μύκητες, που ανήκουν στην κατηγορία GH1, όπως *Humicola grisea*, *Piromyces sp.* και *N. Fischeri* (Yang et al., 2013).

Οι οικογένειες των γλυκοζυδρολασών χωρίζονται επίσης σε ομάδες οι οποίες περιλαμβάνουν οικογένειες με ομοιόμορφη καταλυτική περιοχή και κοινή γενεαλογία και καταλυτικό μηχανισμό. Έτσι, οι περισσότερες οικογένειες, συμπεριλαμβανομένων των οικογενειών στις οποίες ανήκουν οι β-γλυκοζιδάσες, όπως οι GH1, GH3 και GH50 κατατάσσονται στην ομάδα GH-A. Η κατηγοριοποίηση με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων χρησιμοποιείται στο χαρακτηρισμό και προσδιορισμό των ενζυμικών δομών ενώ η ταξινόμηση με βάση την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα αποτελεί τη μοναδική λύση όταν πρόκειται για άγνωστες ή μη προσδιορισμένες γλυκοζιδάσες. Αν και η δεύτερη μέθοδος ταξινόμησης δεν παρέχει

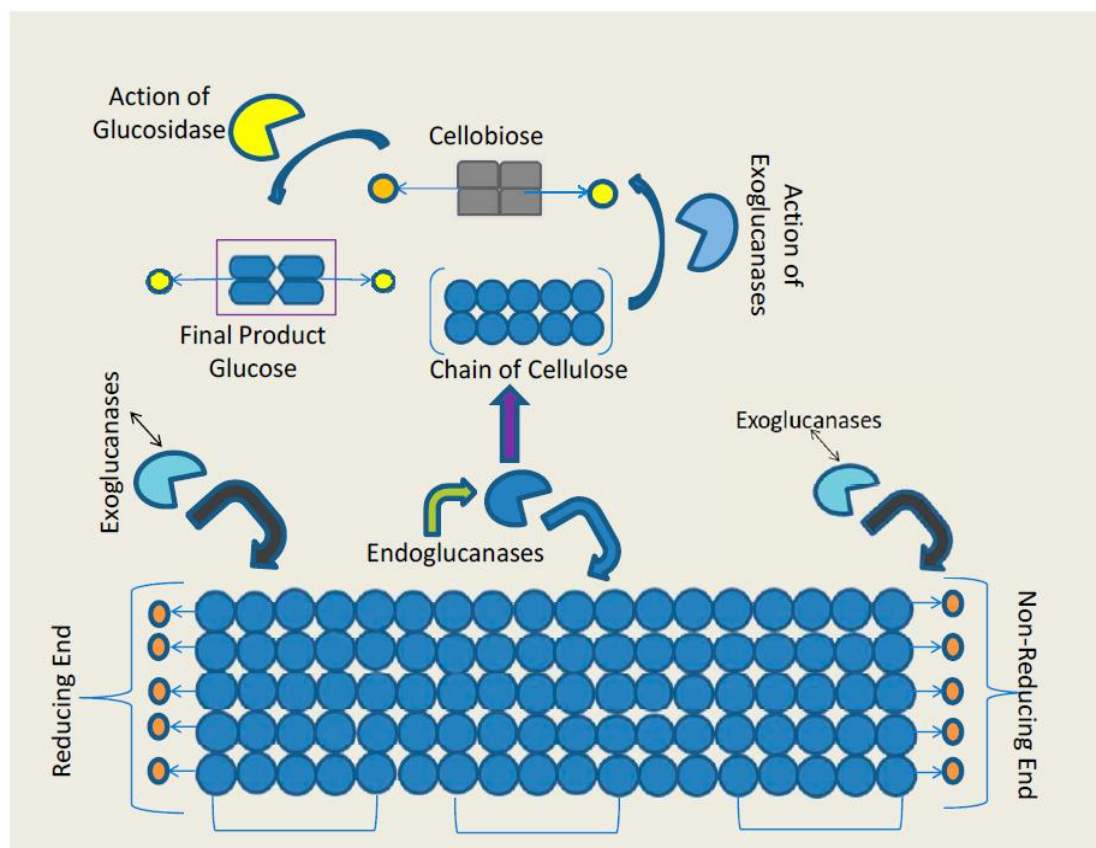
πάντοτε βοήθεια καθώς υπάρχει πληθώρα υποστρωμάτων που δεν μπορούν να προσδιοριστούν για ένα συγκεκριμένο ένζυμο, μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή άλλων γλυκοζιδάσων της ίδιας οικογένειας με χρήση των εργαλείων της βιοπληροφορικής (Srivastava et al.,2019).

Αν και τα παραπάνω συστήματα κατηγοριοποίησης χρησιμοποιούνται ευρύτατα λόγω της ευκολίας τους, δεν περιλαμβάνουν πληροφορίες σχετικά με την ανοχή στη γλυκόζη και την ενεργοποίηση της. Η β-γλυκοζιδάση κατηγοριοποιήθηκε με βάση την επίδραση της γλυκόζης στη καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου και εν συνεχεία η ταξινόμηση της επεκτάθηκε σε τέσσερις βασικές κατηγορίες: (i) ισχυρή παρεμπόδιση σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, (ii) ανοχή στη γλυκόζη, (iii) ενεργοποίηση σε χαμηλές συγκεντρώσεις και παρεμπόδιση σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, (iv) καμία παρεμπόδιση σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Cao et al.,2015).

Οι β-γλυκοζιδάσες της πρώτης κατηγορίας παρουσιάζουν υψηλή παρεμπόδιση σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και η τιμή της σταθεράς K_i είναι μικρότερη από 0,1 για τα ένζυμα αυτά. Στη κατηγορία αυτή ανήκουν οι β-γλυκοζιδάσες της οικογένειας GH3, μερικές από την οικογένεια GH1 καθώς και αυτές που δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί σύμφωνα με το CAZY (Carbohydrate Active enZYme). Στην επόμενη κατηγορία, ανήκουν οι β-γλυκοζιδάσες που παρουσιάζουν ανοχή στη γλυκόζη με την τιμή του K_i σε αυτήν την περίπτωση να είναι μεγαλύτερη από 0,1. Οι περισσότερες χαρακτηρισμένες β-γλυκοζιδάσες της οικογένειας GH1 ανήκουν σε αυτήν την ομάδα καθώς και μία β-γλυκοζιδάση της οικογένειας GH3 που προήλθε από το μύκητα *Mucor circinelloides*. Οι β-γλυκοζιδάσες της τρίτης κατηγορίας ενεργοποιούνται υπό χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης ενώ υψηλές συγκεντρώσεις του σακχάρου αναστέλλουν τη δράση τους. Η οικογένεια GH1 περιλαμβάνει τις β-γλυκοζιδάσες αυτής της κατηγορίας, ενώ δύο β-γλυκοζιδάσες της οικογένειας GH3 παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά. Τέλος οι β-γλυκοζιδάσες της τελευταίας κατηγορίας παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα καθώς η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξάνεται (Srivastava et al.,2019).

1.4.2. Καταλυτικός μηχανισμός β-γλυκοζιδάσης

Οι β-γλυκοζιδάσες λοιπόν διακρίνονται σε αυτές που παρουσιάζουν ανοχή στη γλυκόζη και σε αυτές που η γλυκόζη δρα ως ενεργοποιητής του ενζύμου. Επίσης, έχουν διεξαχθεί μελέτες σχετικά με την εύρεση του ενεργού κέντρου και την περιγραφή του καταλυτικού μηχανισμού της β-γλυκοζιδάσης.



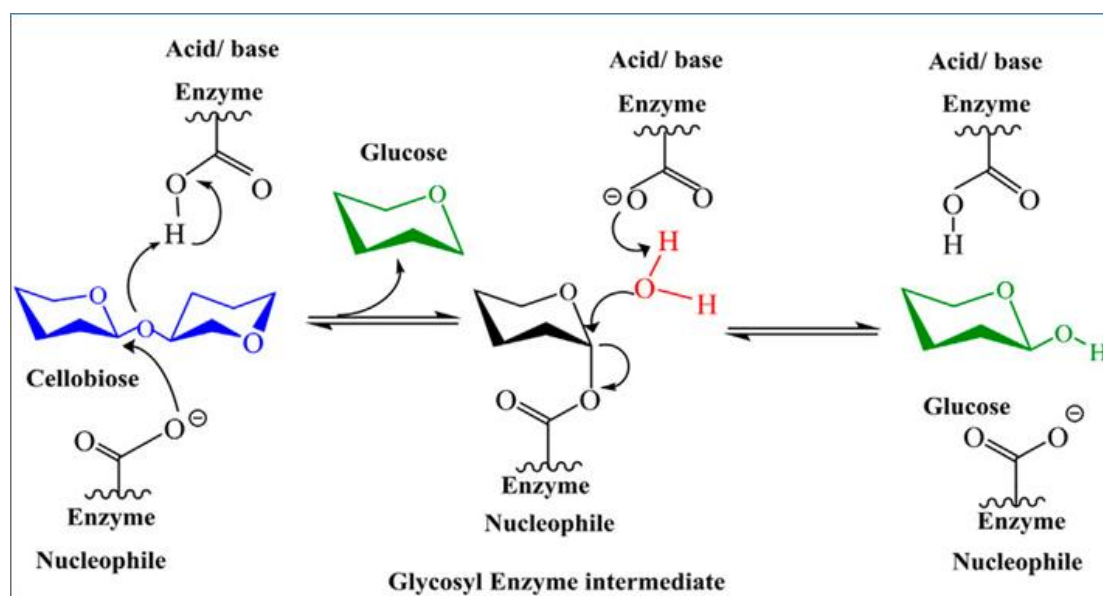
Εικόνα 4: Υδρόλυση της κυτταρίνης μέσω της συνεργιστικής δράσης των κυτταρινασών

Στην διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης οι ενδογλουκανάσες και οι εξωγλουκανάσες μετατρέπουν την κυτταρίνη σε κελλοβιόζη και στη συνέχεια οι β-γλυκοζιδάσες υδρολύουν την κελλοβιόζη προς ελεύθερα μόρια γλυκόζης, καταλύοντας την επιλεκτική διάσπαση των β-γλυκοζιδικών δεσμών των μη αναγωγικών άκρων των υποστρωμάτων με τα οποία αντιδρούν. Η δράση αυτή των ενζύμων έχει πολύ μεγάλη σημασία, καθώς η κελλοβιόζη αναστέλλει τη δράση της β-1,4-ενδογλουκανάσης και β-1,4-εξωγλουκανάσης μειώνοντας έτσι το ρυθμό της αντίδρασης και κατ' επέκταση της υδρόλυσης της κυτταρίνης (Εικόνα 4) (Singhanian et al., 2013). Αποτελούν μια σημαντική ομάδα ενζύμων καθώς οι βιολογικοί τους ρόλοι εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία και εμπλέκονται σε όλα τα είδη των ζωντανών οργανισμών (Yang et al., 2013).

Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την εύρεση του καταλυτικού μηχανισμού των ενζύμων της οικογένειας GH1 όπως εξάρτηση από το pH, παρεμπόδιση και άλλα. Οι β-γλυκοζιδάσες της οικογένειας αυτής διατηρούν τη διαμόρφωση του ανομερικού άνθρακα του υποστρώματος ενώ καταλύουν την υδρόλυση τους. Η κατάλυση των β-γλυκοζιδασών περιλαμβάνει δύο στάδια γλυκοζυλίωσης και απογλυκοζυλίωσης και την διπλή υποκατάσταση δύο καρβοξυλίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου όπου το ένα δρα ως πυρηνόφιλο ενώ

τα άλλο ως οξύ και βάση. Στο στάδιο της γλυκοζυλίωσης που πραγματοποιείται από την β-γλυκοζιδάση, η μία ομάδα καρβοξυλίου δρα ως πυρηνόφιλο και προσδέεται στον ανομερικό άνθρακα δημιουργώντας ένα σύμπλοκο ενζύμου-γλυκόζης. Η άλλη καρβοξυλική ομάδα δρα ως δότης πρωτονίων και διασπά τον γλυκοζιδικό δεσμό με τη μεταφορά ενός H^+ στο οξυγόνο του γλυκοζιδικού δεσμού, οδηγώντας στη δημιουργία ενός συμπλόκου ενζύμου-γλυκοζιλίου και στην απελευθέρωση ενός άγλυκου τμήματος. Στο δεύτερο στάδιο της απογλυκοζυλίωσης, η καρβοξυλική ομάδα που προηγουμένως δρούσε ως οξύ, δρα τώρα ως βάση και παραλαμβάνει ένα πρωτόνιο από ένα πυρηνόφιλο το οποίο μπορεί να είναι νερό, μονοσακχαρίτης και δισακχαρίτης. Το σύμπλοκο μεταξύ της γλυκόζης και του ενζύμου διασπάται και το ένζυμο απελευθερώνεται με την παραγωγή ενός δεύτερου προϊόντος ολοκληρώνοντας έτσι τον καταλυτικό μηχανισμό (Εικόνα 5)

Σε αντίθεση με τις β-γλυκοζιδάσες των οικογενειών GH1 και GH3, ο καταλυτικός μηχανισμός των β-γλυκοζιδασών της οικογένειας GH9 πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο. Τα ένζυμα της κατηγορίας αυτής περιέχουν ένα μηχανισμό αντιστροφής που περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη πρόσδεση ενός μορίου νερού στον ανομερικό άνθρακα, οδηγώντας έτσι στην απελευθέρωση του άγλυκου τμήματος σε ένα μόνο στάδιο.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της υδρόλυσης της κελλοβιόζης

Ανασταλτικό παράγοντα της δράσης των β-γλυκοζιδασών αποτελεί η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης, καθώς αποκλείει το υπόστρωμα από το ενεργό κέντρο ή εμποδίζει το υδρολυμένο υπόστρωμα να απομακρυνθεί, επηρεάζοντας έτσι ολόκληρη τη κυτταρολυτική διαδικασία (Singhanian et al., 2013). Εκτός από τη συγκέντρωση, και η θερμοκρασία δύναται να επηρεάσει τη δράση των β-γλυκοζιδασών. Γενικά η σταθερότητα ενός ενζύμου εξαρτάται από την ικανότητα

της δομής του να παραμένει σταθερή από παράγοντες που μπορεί να την αποδιατάξουν. Η θερμοσταθερότητα εξαρτάται από παράγοντες όπως η αλληλουχία των αμινοξέων, οι υδρόφοβες και αρωματικές αλληλεπιδράσεις, οι μεταλλικοί δεσμοί, η σταθερότητα του υποστρώματος και η μείωση του αριθμού και του μεγέθους των επιφανειακών αναδιπλώσεων (Yeoman et al., 2010).

1.4.3. Εφαρμογές

Οι β-γλυκοζιδάσες είναι ένζυμα που συμμετέχουν τόσο στη διάσπαση όσο και στη σύνθεση του γλυκοζιδικού δεσμού καθιστώντας το ένα ένζυμο με μεγάλη βιομηχανική χρήση. Μία από αυτές είναι η παραγωγή βιοκαυσίμων σε μεγάλη κλίμακα ώστε να αντικαταστήσουν τα ορυκτά καύσιμα. Η διαδικασία παραγωγής κυτταρινικών βιοκαυσίμων περιλαμβάνει τη διάσπαση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε σάκχαρα και στη συνέχεια την παραγωγή βιοκαυσίμων μέσω ζύμωσης. Οι β-γλυκοζιδάσες είναι τα ένζυμα τα οποία μετατρέπουν την κελλοβιόζη και τους κελλολιγολιγοςακχαρίτες σε μονομερή μόρια γλυκόζης. Ωστόσο η ανεπαρκής παραγωγή β-γλυκοζιδασών αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην παραγωγή βιοκαυσίμων (Srivastava et al., 2019). Η χρήση θερμοσταθερών και θερμοφίλων β-γλυκοζιδασών στην υδρόλυση της κυτταρίνης συγκεντρώνει αρκετό ενδιαφέρον, καθώς η χρήση υψηλών θερμοκρασιών δεν θα εμπόδιζε τη δράση της β-γλυκοζιδάσης και ευνοεί επίσης τη διαδικασία υδρόλυσης της κυτταρίνης (Zhang et al., 2017).

Οι β-γλυκοζιδάσες, βρίσκουν ευρεία εφαρμογή επίσης στην βιομηχανία τροφίμων, ζωοτροφών, υφασμάτων, καλλυντικών, απορρυπαντικών και φαρμακευτικών προϊόντων (Bhatti et al., 2013). Στη βιομηχανία τροφίμων και συγκεκριμένα στην οινοποιία, η χρήση της β-γλυκοζιδάσης βοηθά στην βελτίωση της ποιότητας του κρασιού ενισχύοντας το άρωμα και τη γεύση (Gueguen et al., 1997). Επίσης στην βιομηχανία τσαγιού, η χρήση ακινητοποιημένης β-γλυκοζιδάσης οδηγεί στην αύξηση του περιεχομένου των ελαίων ενώ στους χυμούς εσπεριδοειδών βρέθηκε ότι βελτιώνει τις οργανοληπτικές ιδιότητες τους μειώνοντας την πικράδα τους (Singh et al., 2016). Επίσης χρησιμοποιείται στην βαφή υφασμάτων. Συγκεκριμένα, το υπόστρωμα *indican* υδρολύεται με τη δράση της β-γλυκοζιδάσης ώστε να προκύψει το *indoxyl* το οποίο είναι άχρωμο. Στη συνέχεια το ύφασμα βυθίζεται στο διάλυμα *indoxyl* παρουσία αέριας αμμωνίας όπου το *indoxyl* μετατρέπεται σε *indigo* δίνοντας το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα στο ύφασμα (Song et al., 2010).

Πίνακας 1: Μελέτες σχετικά με την παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης με τη χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων

Microorganism	Carbon Substrate	Activity of β-glucosidase (IU/g)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Microcrystalline cellulose (Avicel)	27.5
	Kraft pulp	5.68
<i>Penicillium verruculosum</i>	Alkali pretreated passion fruit peel	8.54 IU/ml
<i>Lichtheimia ramosa</i>	Wheat bran	162.2 ± 4.2
	Soy bran	11.5 ± 0.7
	Sugarcane bagasse	11.1 ± 0.25
<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	Biomass sorghum +0.5% peptone	54.90
<i>Aspergillus ibericus</i>	Washed seaweed	6.94 ± 0.21
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Spent mushroom	6.83
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	Wheat bran	51.0 ± 0.75
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	Wheat bran	11.6 ± 0.8
<i>Bacillus subtilis</i> PS-CM5-UM3	Citrus sinensis bagasse +1% peptone	264.0
<i>Gongronella butleri</i>	Wheat bran	215.4
<i>Penicillium oxalicum</i> GZ-2	Rice straw	2.7 IU/mL

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1. Υλικά

2.1.1. Όργανα και Συσκευές

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

- Φωτόμετρο μικροκυψελίδων (Molecular Devices Corporation, Sunnvale, USA)
- Φωτόμετρο Hitachi UV 2000
- Φωτόμετρο SPECTRAmax 250 (Molecular Devices, USA)
- pH-μετρο 537 της εταιρείας WTW (Γερμανία).
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία)
- Για την αποστείρωση αντιδραστηρίων και διαφόρων γυαλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε αυτόκαυστο Labo Autoclave του οίκου SANYO.
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτα
- Θερμοστατούμενοι ηλεκτρικοί αναδευτήρες
- Φυγόκεντρος TJ-6 της Beckman Counter (ΗΠΑ) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Συσκευή υπερήχων Ultrasonic Processor (Sonics & Material Inc, Newtown, USA)

2.1.2. Αντιδραστήρια- Τυποποιημένα Χημικά Παρασκευάσματα (kits)

Χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας χημικά αντιδραστήρια των εταιριών Sigma (Η.Π.Α), Merck (Γερμανία), CIBA (Ελβετία), Δελής (Αθήνα).

2.1.3. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers) και λοιπά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα καθώς και τα λοιπά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών: Na_2HPO_4 50mM, NaH_2PO_4 50mM σε pH=6.0

Διάλυμα Bradford: 100 mg/L Coomassie Brilliant Blue, 50mL/L $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$, 100mL/L H_3PO_4

Διάλυμα Ringer: NaCl 8,69g/L, KCl 0,3g/L, CaCl_2 0,245g/L σε pH=6,4

2.2. Μικροοργανισμοί και Μέθοδοι Ανάπτυξης των Μικροοργανισμών

2.2.1. Στελέχη μικροοργανισμών

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *Escherichia Coli* και συγκεκριμένα το στέλεχος BL21, από τη Βιολογική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με σκοπό την ετερόλογη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

2.2.2. Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών

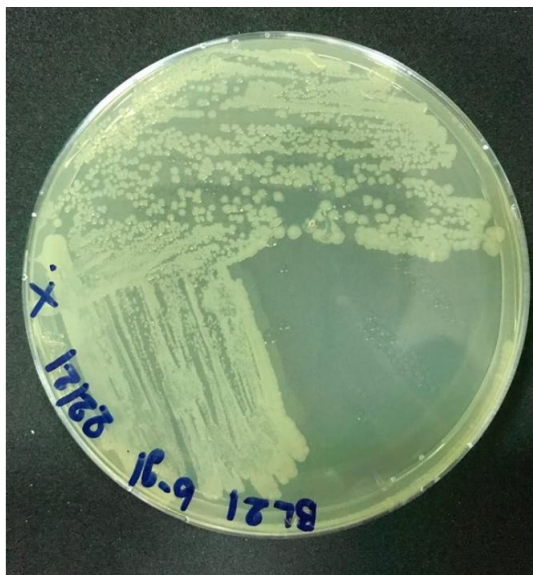
Για την παρασκευή των θρεπτικών μέσων χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Τα θρεπτικά μέσα αποστειρώθηκαν στο αυτόκαυστο που αναφέρεται παραπάνω στους 121°C για 15 λεπτά και υπό πίεση 0,1mPA. Παρακάτω αναφέρονται τα θρεπτικά μέσα που παρασκευάστηκαν για την ανάπτυξη του βακτηρίου *E.Coli*:

- *Luria-Bertani (LB) Medium*: Tryptone 10g/L, Yeast Extract 5g/L, NaCl 10g/L σε pH=7.0
- *Minimal Glucose Medium*: (NH₄)₂PO₄ 4g/L, KH₂PO₄ 13,3g/L MgSO₄ 0,59g/L, C₆H₈O₇ 1,55g/L, Glucose 10g/L σε pH=6,8
- *Trace Elements*: Zn(CH₃COOH)₂*2H₂O 3,38g/L, CuCl₂*2H₂O 0,15g/L, MnCl₂*4H₂O 1,5g/L, CoCl₂*6H₂O 0,25g/L, Na-EDTA 1,32g/L, Na₂MoO₄*2H₂O 0,21g/L, H₃BO₃ 0,3 g/L, C₆H₅FeO₇ 10,08g/L.

Τα trace elements προστίθενται στο Minimal Glucose σε αναλογία 1/100. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6,8 μετά τη πρόσθεση των trace elements.

2.2.3. Ανάπτυξη τροποποιημένου οργανισμού (Προκαλλιέργεια)

Τα μετασηματισμένα κύτταρα βρίσκονταν υπό τη μορφή στερεών καλλιεργειών σε υπόστρωμα LB-άγαρ σε τρυβλία. Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη τους πραγματοποιήθηκε στους 37°C. Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν έφεραν το γονίδιο της β-γλυκοζιδάσης και παρουσιάζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικιλίνη. Στη συνέχεια σε κωνική φιάλη των 100 mL, σε 30 mL αποστειρωμένου LB, εμβολιάζεται σε αυτήν μια απομονωμένη αποικία από το τρυβλίο και προστίθεται αμικιλίνη σε αναλογία 1/1000 του θρεπτικού με στόχο την αποφυγή μόλυνσης. Στη συνέχεια, το εμβόλιο αφήνεται να αναπτυχθεί σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα στους 37°C και 180rpm για 9-12 ώρες μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα των κυττάρων (OD₆₀₀) φτάσει την τιμή 1,5-2.



Εικόνα 6: Στερεές καλλιέργειες μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* σε τρυβλία *Petri* με θρεπτικό υπόστρωμα LB. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα φέρουν το γονίδιο της β-γλυκοζιδάσης και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη

2.2.4. Καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων

Η πειραματική διαδικασία που αφορά την καλλιέργεια των μετασχηματισμένων κυττάρων διαφέρει ανάλογα με το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται.

➤ Χρήση LB ως θρεπτικό μέσο

Μόλις η οπτική πυκνότητα των κυττάρων της προκαλλιέργειας φτάσει την τιμή 1,5-2, σε κωνική φιάλη των 250 mL με 62,5 mL αποστειρωμένου LB (1/4 του ενεργού όγκου) προστίθεται εμβόλιο 1% και αμπικιλίνη σε αναλογία 1/1000. Η ανάπτυξη της καλλιέργειας πραγματοποιείται σε θερμοστατούμενους αναδευτήρες σε θερμοκρασία 37°C και 180rpm. Στη συνέχεια παρακολουθείται η οπτική πυκνότητα των κυττάρων με συχνές δειγματοληψίες μέχρις ότου η τιμή του OD₆₀₀ φτάσει τη τιμή 0,6-0,9. Σε αυτό το εύρος τιμών η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιείται με εκθετικό ρυθμό. Σε εκείνο το σημείο προστίθεται στη καλλιέργεια η απαιτούμενη συγκέντρωση του επαγωγέα. Με αυτόν τον τρόπο ξεκινά και η παραγωγή της ζητούμενης πρωτεΐνης. Μόλις προστεθεί ο επαγωγέας, ανάλογα με τις συνθήκες που μελετώνται, η θερμοκρασία της καλλιέργειας αλλάζει. Η παρακολούθηση της καλλιέργειας συνεχίζεται μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα των κυττάρων αρχίζει να μειώνεται. Τα δείγματα των διαφόρων ωρών συλλέγονται σε erpendorfs. Από κάθε δείγμα, αποθηκεύεται 1 mL της υγρής καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα διάφορα δείγματα φυγοκεντρούνται σε μικροφυγόκεντρο πάγκου και το pellet των κυττάρων που παραμένει στο πάτο αποθηκεύεται για μελλοντική ανάλυση.

➤ Χρήση Minimal Glucose ως θρεπτικό μέσο

Στην περίπτωση αυτή, πραγματοποιείται μια επιπλέον διαδικασία. Αφού η οπτική πυκνότητα των κυττάρων φτάσει την ζητούμενη τιμή 1,5-2, η ποσότητα του εμβολίου τοποθετείται σε αποστειρωμένο falcon των 50 ml και φυγοκεντρείται σε μεγάλη φυγόκεντρο. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το ίζημα των κυττάρων κρατείται και προστίθεται σε αυτό ίση ποσότητα Ringer με αυτή του εμβολίου. Το εμβόλιο φυγοκεντρείται άλλες δύο φορές. Η διαδικασία αυτή γίνεται προκειμένου τα κύτταρα να ξεπλυθούν από το LB καθώς η πηγή άνθρακα διαφέρει σε αυτή τη περίπτωση. Στη συνέχεια σε κωνική φιάλη των 250 ml με 62,5 ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου προστίθεται εμβόλιο σε αναλογία 1/100 αυτού και αμπικιλίνη σε αναλογία 1/1000. Η υπόλοιπη διαδικασία είναι ίδια με αυτήν που αναφέρεται παραπάνω. Επίσης σε αυτήν τη περίπτωση, εκτός από το pellet των κυττάρων αποθηκεύεται και το υπερκείμενο υγρό για περαιτέρω ανάλυση.

2.2.5. Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα

Η πειραματική αυτή διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρες των δύο λίτρων. Μετά την προετοιμασία του θρεπτικού μέσου, έγινε βαθμονόμηση του pH με χρήση δύο προτύπων διαλυμάτων με pH 4 και 7 αντίστοιχα. Στη συνέχεια αποστειρώθηκε ο βιοαντιδραστήρας με το θρεπτικό μέσο. Μετά το πέρας της αποστείρωσης, ο βιοαντιδραστήρας συνδέεται σύμφωνα με τη διάταξη που φαίνεται στην Εικόνα 7 και ρυθμίζεται η θερμοκρασία στους 37°C, ο ρυθμός ανάδευσης στα 300 rpm και ο αερισμός με ρυθμό 1,14 L/min. Μόλις η οπτική πυκνότητα της προκαλλιέργειας φτάσει την τιμή 1,5-2, σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω, προστίθεται στο θρεπτικό μέσο το εμβόλιο σε αναλογία 1/100. Τότε ρυθμίζεται και το διαλυμένο οξυγόνο στην τιμή 100. Το διαλυμένο οξυγόνο αποτελεί μια ένδειξη της ποσότητας της γλυκόζης που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα συλλέγονται δείγματα και μόλις η οπτική πυκνότητα φτάσει την τιμή 0,6, προστίθεται ο επαγωγέας και μειώνεται η θερμοκρασία στους 30°C. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης παρακολουθείται η ένδειξη του διαλυμένου οξυγόνου. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν η οπτική πυκνότητα των κυττάρων μειωθεί.



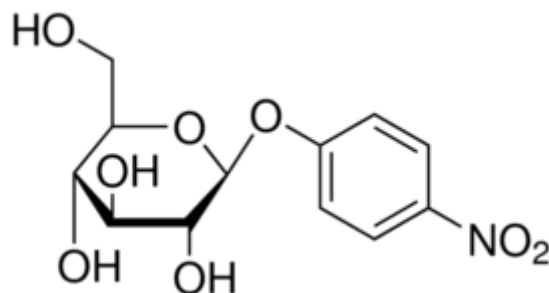
Εικόνα 7: Διάταξη βιοαντιδραστήρων σε batch συνθήκες

2.3. Μέθοδοι ανάλυσης

Αφού ολοκληρωθεί η παρακολούθηση της κυτταρικής ανάπτυξης, ακολουθούν οι μέθοδοι που απαιτούνται για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της πρωτεΐνης. Στα δείγματα τα οποία περιέχουν το pellet των κυττάρων προστίθεται 1 mL buffer. Επειδή η β-γλυκοζιδάση είναι ένα ένζυμο εσωκυτταρικό, προκειμένου να υπολογισθεί το παραγόμενο ποσό της πρωτεΐνης, είναι απαραίτητο το σπάσιμο της μεμβράνης των κυττάρων. Η διαδικασία αυτή γίνεται με την χρήση συσκευής υπερήχων. Για κάθε δείγμα η διαδικασία αυτή διαρκεί ένα λεπτό και πραγματοποιείται σε τρεις γύρους των 20 δευτερολέπτων. Αυτό γίνεται καθώς, κατά τη χρήση των υπερήχων, αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες οι οποίες μπορούν να αδρανοποιήσουν το ένζυμο. Για το λόγο αυτό, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, τα δείγματα βρίσκονται σε πάγο. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου καθώς και των συνολικών πρωτεϊνών, η μέθοδος των οποίων θα αναλυθεί παρακάτω.

2.3.1. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας

Η μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας της β-γλυκοζιδάσης έγινε με μέτρηση της υδρόλυσης του υποστρώματος p-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (pNPG). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το φυσικό υπόστρωμα της β-γλυκοζιδάσης είναι η κελλοβιόζη η οποία διασπάται σε δύο μόρια γλυκόζης G-G. Αντίστοιχα με τη κελλοβιόζη, η β-γλυκοζιδάση υδρολύει τον β-1,4 γλυκοζιδικό δεσμό που υπάρχει στο μόριο του pNPG και το διασπά σε ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο p-νιτροφαινόλης (Strahsburger et al.,2017).



Εικόνα 8: Δομή του p-νιτροφαινυλο-γλυκοπυρανοζίτη

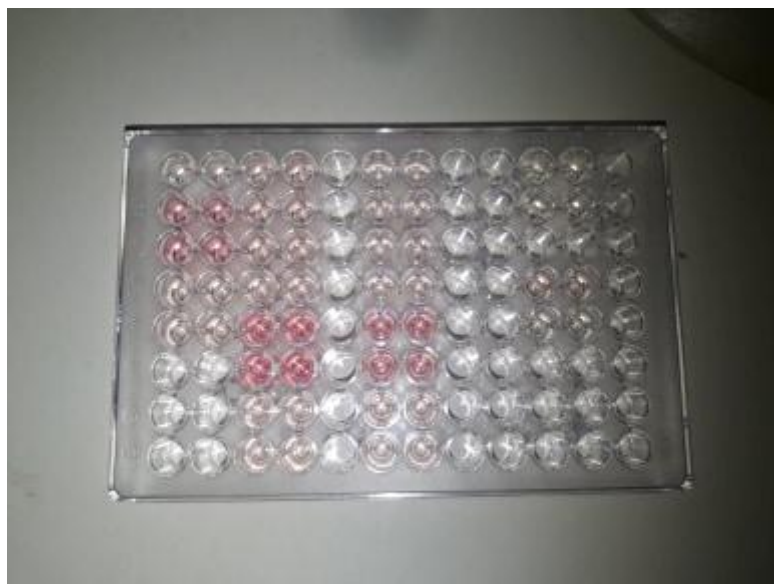
Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας παρασκευάστηκε διάλυμα pNPG 1mM σε 50 mL buffer. Στη συνέχεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθενται 450μL pNPG και 50 μL του δείγματος. Η διάσπαση του pNPG πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες. Για το λόγο αυτό τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 60°C και για 15 λεπτά. Μετά το πέρας των 15 λεπτών, προστίθενται στα δείγματα 2,5 mL Na₂CO₃ συγκέντρωσης 10%w/v. Η προσθήκη του ανθρακικού νατρίου έχει διπλό ρόλο. Αρχικά το Na₂CO₃ σταματά την αντίδραση. Ωστόσο ο σημαντικότερος ρόλος οφείλεται στο γεγονός ότι το pNP που προκύπτει από τη διάσπαση του pNPG είναι άχρωμο. Η προσθήκη του ανθρακικού νατρίου απελευθερώνει την ιονισμένη μορφή του pNP⁻, η οποία έχει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα, και μπορεί να φωτομετρηθεί στα 410 nm (Strahsburger et al.,2017).

2.3.2. Προσδιορισμός πρωτεϊνών

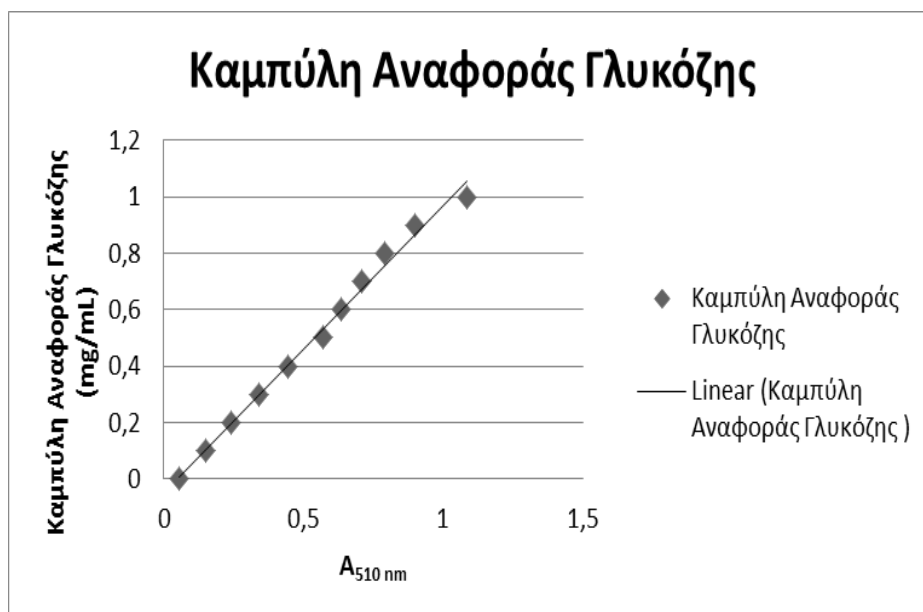
Ο προσδιορισμός των συνολικών πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο Bradford. Πρόκειται για μία αρκετά γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο. Βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να προσδένεται σε βασικές ή και όξινες ομάδες των αμινοξέων. Το αρχικό διάλυμα έχει χαρακτηριστικό καστανό χρώμα ενώ μετά τη προσθήκη του δείγματος, το σύμπλοκο πρωτεϊνης-χρωστικής έχει σκούρο μπλε χρώμα και απορροφά στα 595 nm. Πρόκειται για μία μέθοδο η οποία έχει μεγάλο περιθώριο μέχρις ότου γίνει η μέτρηση (J.Kruger,2009). Ωστόσο είναι σημαντικό μόλις δημιουργηθεί το σύμπλοκο να ακολουθήσει έντονη ανάδευση για 1-2 λεπτά καθώς είναι πιθανό οι πρωτεΐνες να καταβυθιστούν οδηγώντας σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Η τιμή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, υπολογίζεται από την τιμή της απορρόφησης του διαλύματος που περιέχει το σύμπλοκο της πρωτεΐνης και της χρωστικής στα 595 nm και τη σύγκριση της μετρούμενης τιμής με την πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιούνται διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων, στα οποία προστίθεται διάλυμα Bradford και στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση στα 595 nm.

2.3.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit)

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Αρχικά, η γλυκόζη με τη δράση της οξειδάσης της γλυκόζης μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ με την ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ακολούθως, το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία αμινοφαιναζόνης και κάποιου φαινολικού παραγώγου με τη δράση της υπεροξειδάσης μετατρέπεται σε κάποιο προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης γίνεται με τη βοήθεια microplate reader (Εικόνα 9). Στο Διάγραμμα 1, φαίνεται η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης η οποία ισούται με $y = 1,0344 * ABS_{510}$ ($R^2 = 0,9925$)



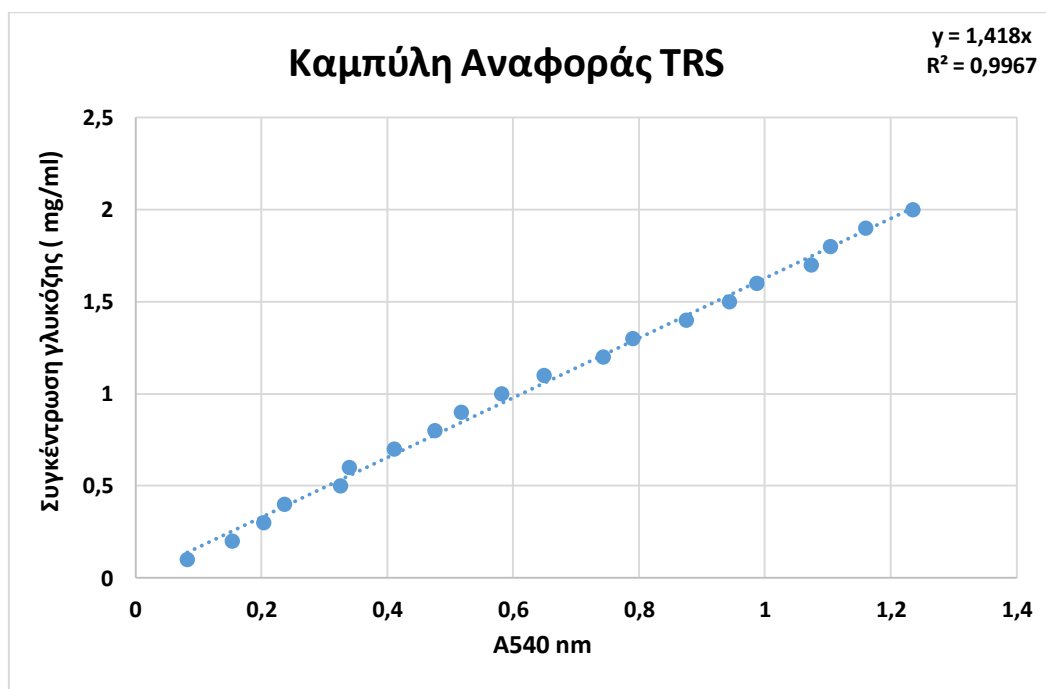
Εικόνα 9: Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με glucotest



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης

2.3.4. Προσδιορισμός ολικών αναγωγικών σακχάρων

Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS ή 2-υδρόξυ-3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ) (Miller, 1959). Στο Διάγραμμα 2, φαίνεται η καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης. Η εξίσωση της καμπύλης είναι ίση με $y = 1,418 * ABS_{540}$ ($R^2 = 0,9967$)



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς ολικών αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης

2.3.5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

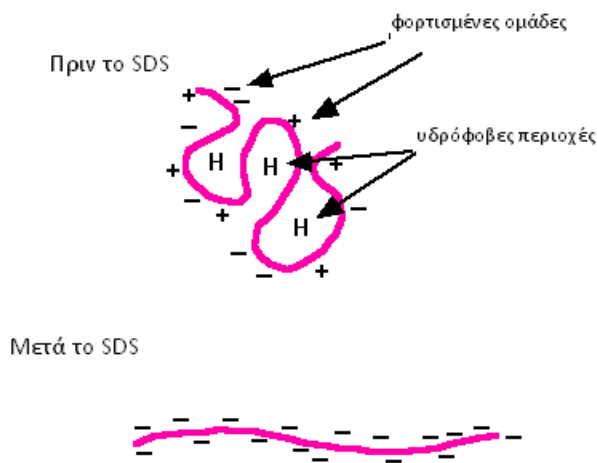
Ο διαχωρισμός μορίων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μετακίνηση των γραμμικών μορίων DNA μέσα σε πήκτωμα αγαρόζης, με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους, εάν εφαρμοστεί σε αυτά ηλεκτρικό πεδίο (Sambrook et al., 1989). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται από το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA, όπως επίσης και την ένταση του ρεύματος που εφαρμόζεται. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, παρασκευάστηκαν πηκτώματα αγαρόζης συγκέντρωσης 1 % (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου, για την οπτικοποίηση των ζωνών DNA. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες οπές του πηκτώματος, μετά από ανάμιξή τους με το διάλυμα χρώσης (loading buffer), και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE, κάτω από ηλεκτρική τάση 60-80 Volt για 1 h περίπου. Ακολούθως, το πήκτωμα τοποθετήθηκε επάνω σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (InGenius BioImaging, Syngene, Μεγάλη Βρετανία), προκειμένου να εμφανιστούν και να φωτογραφηθούν οι ζώνες του DNA που προέκυψαν. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των ζωνών που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μάρτυρα DNA γνωστών μοριακών βαρών. Οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό ήταν ο FastGene® 1 kb DNA Ladder και ο FastGene® 100 bp DNA Ladder, της εταιρείας NIPPON Genetics Europe GmbH (Ελβετία).

2.3.6. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυμιδίου (SDS-PAGE)

Σε αυτή τη μέθοδο, για το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών μορίων χρησιμοποιείται πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ενός χημικά αδρανούς πολυμερούς, το οποίο σχηματίζεται με τον πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου σε μακριές αλυσίδες, με εγκάρσιες διακλαδώσεις ομάδων δισακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του καταλύτη υπερθειικού αμμωνίου (APS) και του ενεργοποιητή N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλενο-διαμίνης (TEMED). Για την παρασκευή του πηκτώματος χρησιμοποιούνται αποδιατακτικοί παράγοντες, που έχουν ως στόχο την πλήρη αποδιάταξη των υπό μελέτη πρωτεϊνικών μορίων, δηλαδή ο επιφανειοδραστικός παράγοντας SDS και η μερκαπτοαιθανόλη, η οποία ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Το SDS με τη συνδεσή του στα πρωτεϊνικά μόρια, προσδίδει σε όλα τους αρνητικό φορτίο. Έτσι η κινητικότητα των πρωτεϊνών είναι αποκλειστικά συνάρτηση του μοριακού τους βάρους.

Η μετακίνηση των πρωτεϊνικών μορίων κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται διαμέσου δύο επιστοιβαγμάτων πηκτωμάτων. Το πήκτωμα επιστοιβαξης (Stacking gel), στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα προς ανάλυση, λόγω της χαμηλότερης συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου που δημιουργεί μεγαλύτερους πόρους, επιτρέπει σε όλα τα πρωτεϊνικά μόρια, ανεξαρτήτως

μεγέθους να διαταχθούν σε μια γραμμή, έτσι ώστε να κινηθούν όλα μαζί προς το ακόλουθο πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel), όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός ανάλογα με το μοριακό βάρος.



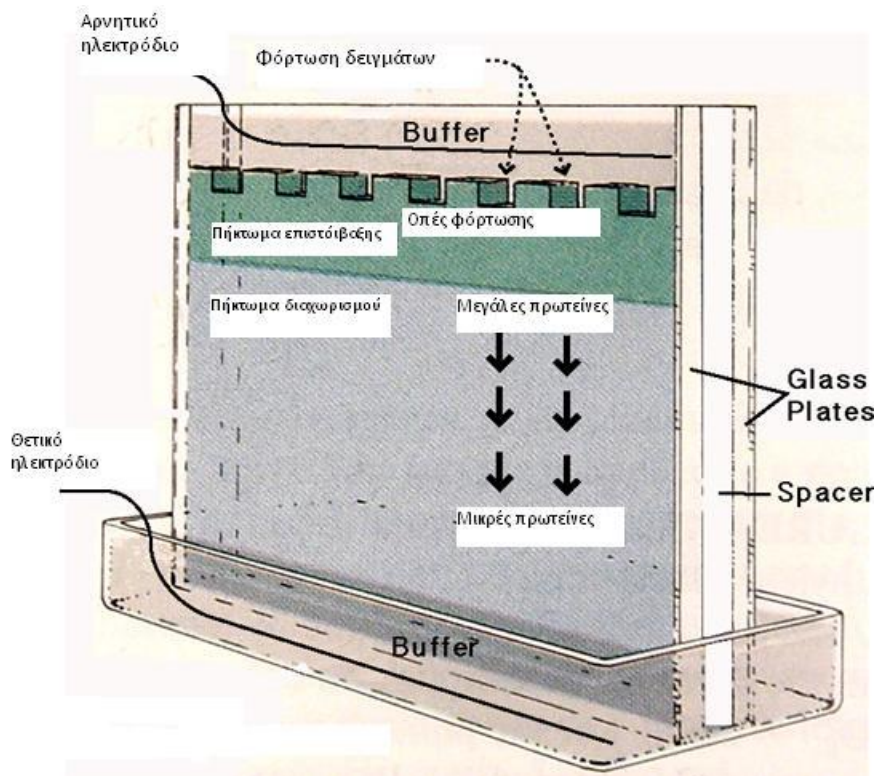
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της πρωτεΐνης κατά την επώαση σε SDS. Στο άνω τμήμα της εικόνας, φαίνεται μια πρωτεΐνη με θετικά και αρνητικά φορτία και υδρόφοβες περιοχές (H). Στο κάτω τμήμα φαίνεται ότι το SDS έχει την ικανότητα να αποδιατάσσει τις υδρόφοβες περιοχές και να καλύπτει τις πρωτεΐνες με αρνητικά φορτία. Τελικά, η πρωτεΐνη αποδιατάσσεται και μετατρέπεται σε γραμμικό μόριο.

Οι ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή Mini-Protean 3 της εταιρείας BIORAD, (Η.Π.Α.), όπως περιγράφεται παρακάτω (Laemmli, 1970):

- Το πήκτωμα διαχωρισμού, μετά την ανάμιξη των συστατικών του, τοποθετήθηκε ανάμεσα σε κατάλληλες γυάλινες πλάκες (10,1 cm × 7,3 cm και 10,1 cm × 8,3 cm), έως ~1,5 cm κάτω από το άκρο τους. Το μίγμα αφέθηκε να πολυμεριστεί για 30 λεπτά περίπου.
- Ακολούθως, μετά την ανάμιξη των συστατικών του πηκτώματος επιστοιβάξης, αυτό τοποθετήθηκε ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες και επάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού. Αμέσως τοποθετήθηκε και η ειδική «χτένα» για το σχηματισμό των θέσεων φόρτωσης, και το μίγμα αφέθηκε να πολυμεριστεί για ~30 min.
- Οι γυάλινες πλάκες που περιείχαν πλέον τα πηκτώματα της ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες θέσεις της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης, και η συσκευή πληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα SDS running buffer 1X. Η «χτένα» αφαιρέθηκε και τα δείγματα φορτώθηκαν στις θέσεις που είχαν σχηματιστεί.
- Η προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση ήταν η ακόλουθη: Πρωτεϊνικό διάλυμα όγκου 15 μL αναμίχθηκε με 7 μL κατάλληλου

ρυθμιστικού διαλύματος (sample buffer) και το μίγμα επώαστηκε σε βραστό νερό για 5-7 λεπτά περίπου.

- Παράλληλα με τα δείγματα, στη συσκευή φορτώθηκε και κατάλληλος μάρτυρας μοριακών βαρών, προκειμένου να προσδιοριστεί με ακρίβεια το μοριακό βάρος των προς ανάλυση πρωτεϊνών. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Prestained protein marker PiNK (NIPPON Genetics, Ιαπωνία),
- Στη συσκευή εφαρμόστηκε ρεύμα έντασης 35 mA/πήκτωμα για 1 h περίπου προκειμένου να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες των εκάστοτε δειγμάτων.



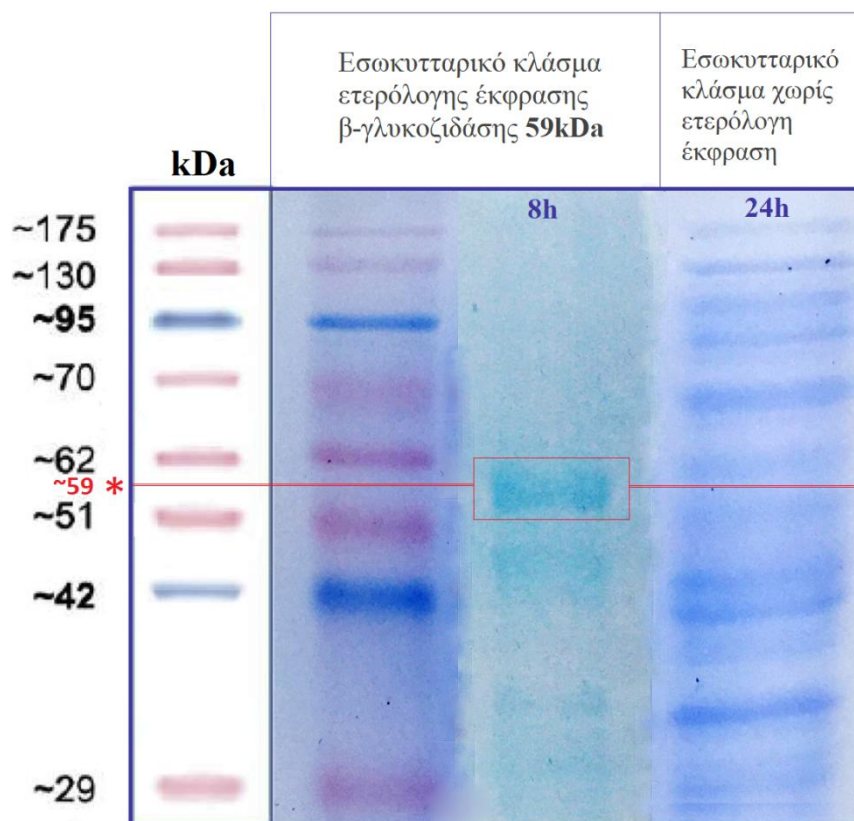
Εικόνα 11: Διάταξη ηλεκτροφόρησης πολυπεπτιδίων σε πήκτωμα πολυακρυμιδίου (SDS-PAGE)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου με θρεπτικό μέσο LB

Προσδιορίστηκε η κυτταρική πυκνότητα και η ενζυμική ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG και σε διαφορετικές θερμοκρασίες με θρεπτικό μέσο LB.

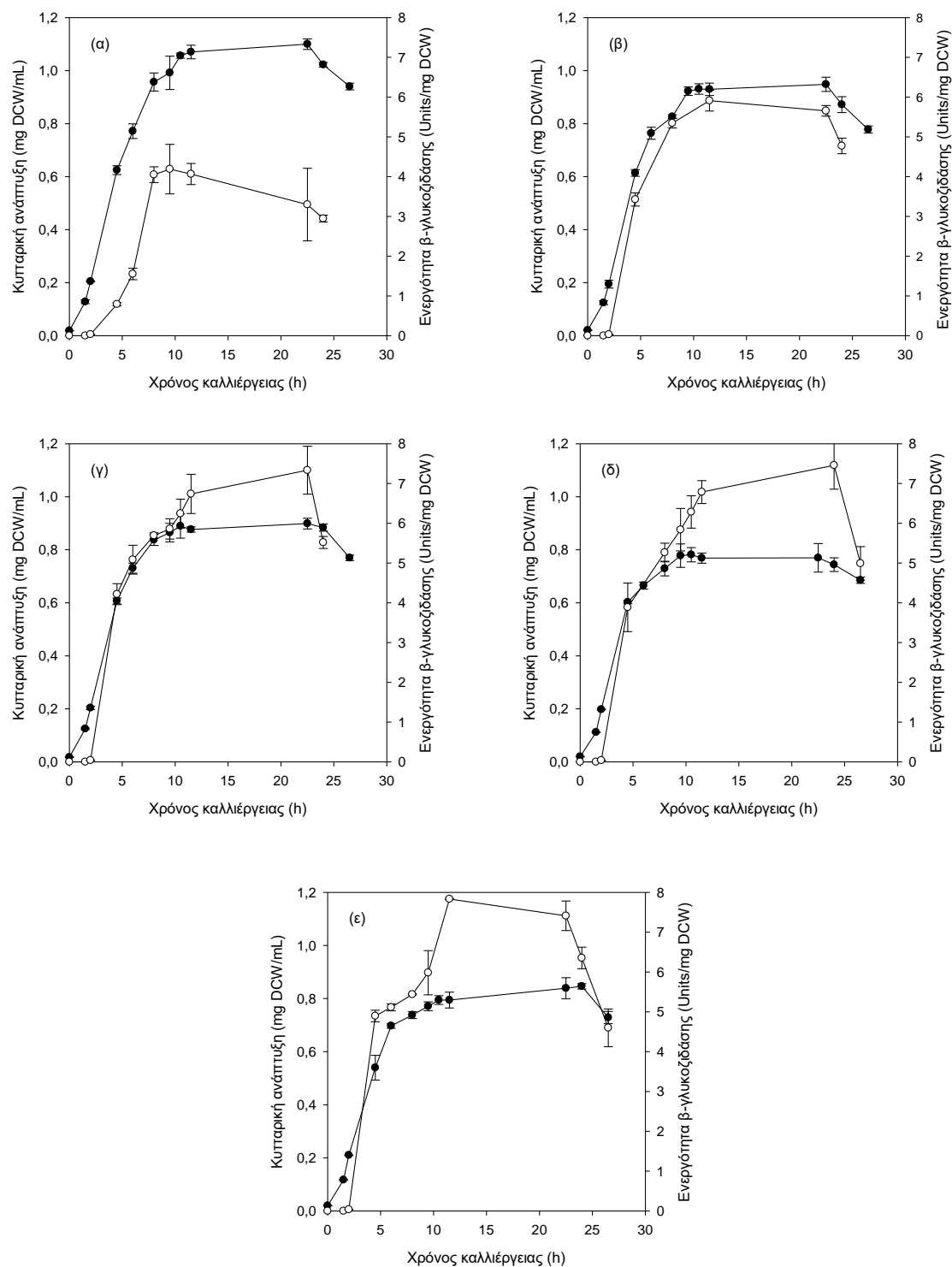
Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι τα μελετούμενα μετασχηματισμένα κύτταρα φέρουν το γονίδιο της β-γλυκοζιδάσης, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυμιδίου (SDS-PAGE) σε κύτταρα τα οποία δεν είναι μετασχηματισμένα και επομένως δεν φέρουν το ζητούμενο γονίδιο (control δείγμα) και σε κύτταρα από τη καλλιέργεια. Όπως διαπιστώνεται στην Εικόνα 12, το δείγμα των 8 ωρών της καλλιέργειας φέρει το γονίδιο της β-γλυκοζιδάσης το μοριακό βάρος της οποίας είναι 59 kDA (δίνεται με αστερίσκο στα αριστερά της εικόνας), ενώ στο δείγμα των 24 ωρών δεν έχει σχηματιστεί κάποια ζώνη. Επομένως τα μετασχηματισμένα κύτταρα της καλλιέργειας φέρουν το γονίδιο της β-γλυκοζιδάσης και εκφράζουν την πρωτεΐνη



Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE με πήκτωμα πολυακριμιδίου μη μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli* που δεν φέρουν το γονίδιο της β-γλυκοζιδάσης (control) και κυττάρων καλλιέργειας

3.1.1. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου για διάφορες συγκεντρώσεις επαγωγέα

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του επαγωγέα IPTG στην ανάπτυξη του βακτηρίου και στην παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης σε θρεπτικό μέσο LB. Οι συγκεντρώσεις του επαγωγέα IPTG που μελετήθηκαν είναι 5, 10, 20, 40 και 100μM σε θερμοκρασία επαγωγής 37°C. Παρακάτω δίνονται τα σχετικά διαγράμματα:

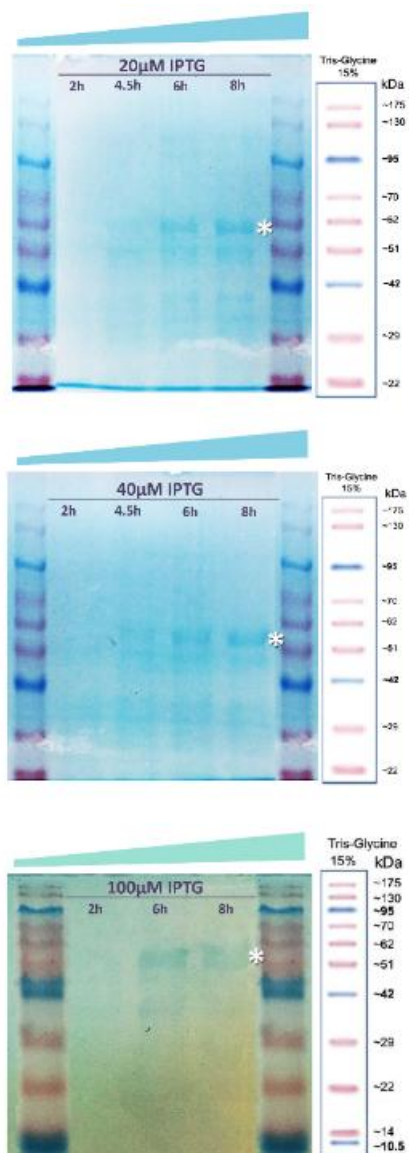


Διάγραμμα 3: Ανάπτυξη (●) του βακτηρίου *E. coli* BL21 και παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης (○) σε θρεπτικό μέσο LB. Συνθήκες: (α) 5μM IPTG & 37°C, (β) 10μM IPTG & 37°C, (γ) 20μM IPTG & 37°C, (δ) 40μM IPTG & 37°C, (ε) 100μM IPTG & 37°C

Παρατηρείται πως οι χαμηλές συγκεντρώσεις του IPTG οδηγούν σε υψηλή κυτταρική ανάπτυξη χωρίς αυτή να συνοδεύεται από υψηλή παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης. Καθώς η συγκέντρωση του επαγωγέα αυξάνεται, η παραγωγή της πρωτεΐνης πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την ανάπτυξη του βακτηρίου,

οδηγώντας σε χαμηλότερα επίπεδα κυτταρικής ανάπτυξης. Σε υψηλές συγκεντρώσεις IPTG, δηλαδή, καταστέλλεται η κυτταρική ανάπτυξη επάγοντας την πρωτεϊνική έκφραση. Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με την θεωρία του Donovan και των συνεργατών του (Donovan et al., 1996) η οποία αναφέρει πως η βέλτιστη συγκέντρωση επαγωγέα εξισορροπεί τον ρυθμό ανάπτυξης των ανασυνδυασμένων κυττάρων που μειώνεται μετά την επαγωγή, με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης-στόχου που αυξάνονται.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE για τις συγκεντρώσεις 20, 40 και 100μM IPTG και χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από τρεις διαφορετικές ώρες της καλλιέργειας. Όπως φαίνεται παρακάτω, στην δεύτερη ώρα της καλλιέργειας δεν έχει σχηματιστεί κάποια ζώνη σε κανένα από τα τρία δείγματα επομένως η παραγωγή της πρωτεΐνης είναι μηδενική το οποίο είναι αναμενόμενο αφού εκείνη την στιγμή προστίθεται ο επαγωγέας. Στη συνέχεια, καθώς ξεκινά η δράση του IPTG, το χρώμα της ζώνης γίνεται πιο έντονο με το πέρασμα του χρόνου το οποίο δικαιολογεί την αύξηση της παραγωγής της πρωτεΐνης στόχου (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα πολυακρυμιδίου μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli* που φέρουν γονίδιο ετερόλογης έκφρασης β-γλυκοζιδάσης, σε θρεπτικό μέσο LB και διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα IPTG.

Προκειμένου να προσδιορισθεί η βέλτιστη συγκέντρωση του επαγωγέα για την παραγωγή του ενζύμου, υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μ (h^{-1}) για καθεμία από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις με χρήση της λογιστικής εξίσωσης:

$$x = \frac{x_o * \exp(\mu * t)}{1 - \left(\frac{x_o}{x_{max}}\right) * (1 - \exp(\mu * t))}$$

Όπου:

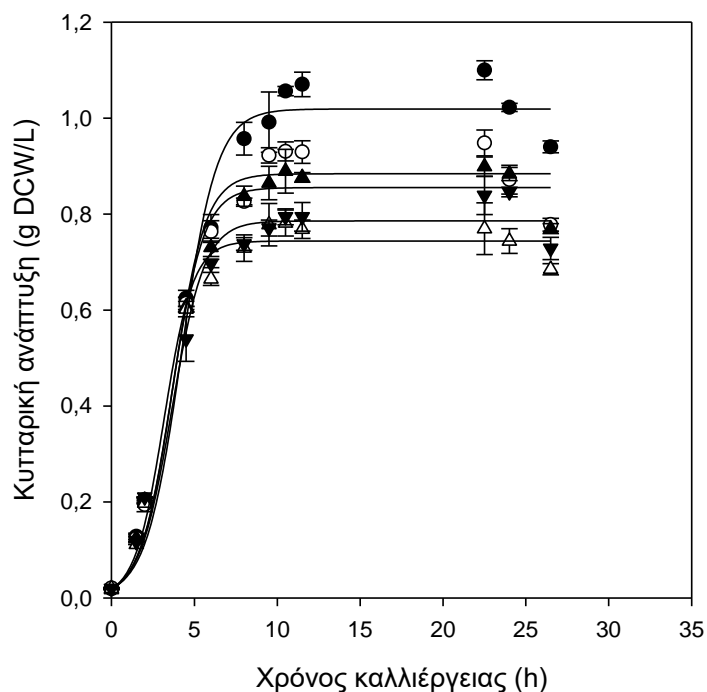
x: η κυτταρική ανάπτυξη τη χρονική στιγμή t (mg DCW/mL)

x_{max} : η μέγιστη προβλεπόμενη κυτταρική ανάπτυξη (mg DCW/mL)

x_0 : η κυτταρική ανάπτυξη τη χρονική στιγμή $t=0$ (mg DCW/mL)

Πίνακας 2: Μέγιστη ποσότητα ενζύμου, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μ και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο LB για διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG και σταθερή θερμοκρασία επαγωγής 37°C

	μ (h^{-1})	Units/ mg DCW	x_{max} (mg DCW/mL) (predicted)	x_{max} (mg DCW/mL) (experimental)	R^2
IPTG 5 μ M	0,94 ($p < 0.0001$)	4,19	1,02 ($p < 0.0001$)	1,10	0,9774
IPTG 10 μ M	1,03 ($p < 0.0001$)	5,91	0,88 ($p < 0.0001$)	0,95	0,9759
IPTG 20 μ M	1,04 ($p < 0.0001$)	7,33	0,86 ($p < 0.0001$)	0,90	0,9817
IPTG 40 μ M	1,15 ($p < 0.0001$)	7,46	0,74 ($p < 0.0001$)	0,78	0,9862
IPTG 100 μ M	1,02 ($p < 0.0001$)	7,83	0,79 ($p < 0.0001$)	0,85	0,9789

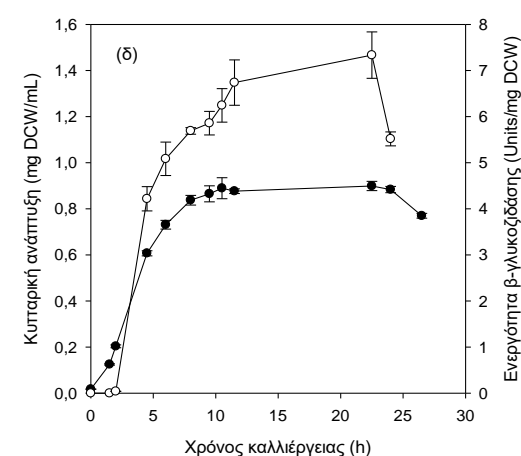
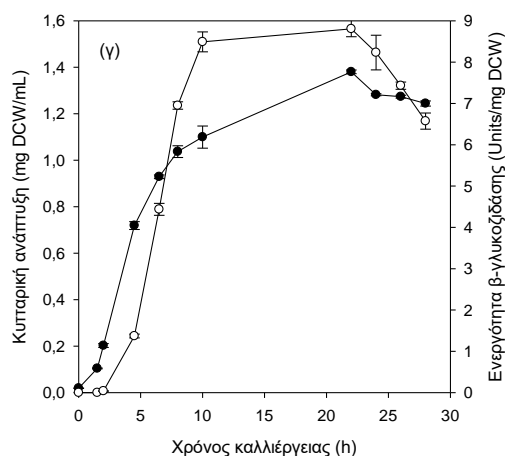
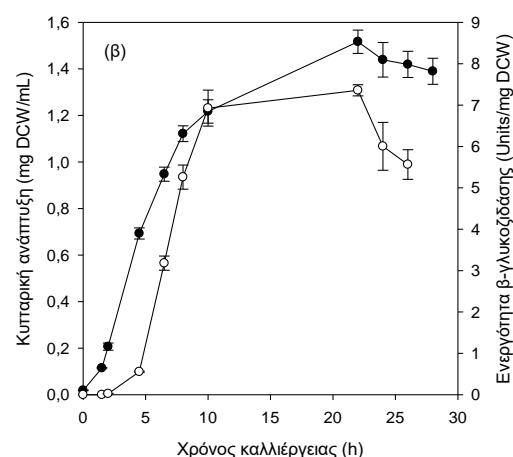
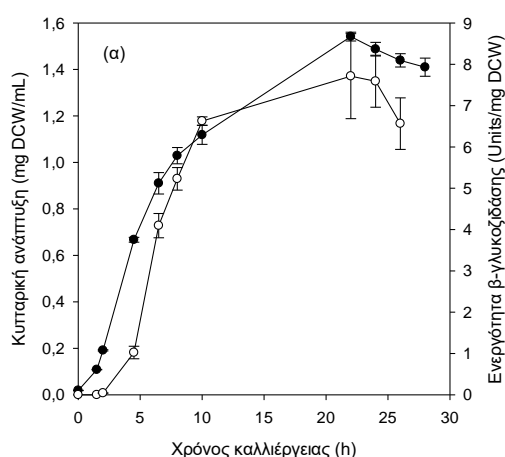


Διάγραμμα 4: Ανάπτυξη του βακτηρίου *E.coli* BL21 σε θρεπτικό μέσο LB. Συνθήκες: (●) 5 μ M IPTG & 37°C, (○) 10 μ M IPTG & 37°C, (▲) 20 μ M IPTG & 37°C, (△) 40 μ M IPTG & 37°C, (▼) 100 μ M IPTG & 37°C.

Η βέλτιστη συγκέντρωση του επαγωγέα είναι αυτή κατά την οποία επιτυγχάνονται ταυτόχρονα υψηλά επίπεδα κυτταρικής ανάπτυξης και παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Με βάση τα δεδομένα αυτά προκύπτει πως οι δύο βέλτιστες συγκεντρώσεις του επαγωγέα IPTG για την παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης είναι τα 20 και 40μM. Ωστόσο, λόγω του υψηλού κόστους της συγκεκριμένης χημικής ένωσης καθώς και ότι τα επίπεδα παραγωγής της β-γλυκοζιδάσης είναι πολύ κοντά στις δύο περιπτώσεις, θα θεωρηθούν για την συνέχεια των πειραμάτων τα 20μM IPTG ως η βέλτιστη συγκέντρωση.

3.1.2. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου για διάφορες θερμοκρασίες επαγωγής

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας επαγωγής, υπό σταθερή συγκέντρωση επαγωγέα IPTG 20μM, στην κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή της μελετώμενης πρωτεΐνης. Οι θερμοκρασίες επαγωγής που μελετήθηκαν είναι 20°C, 27°C, 30°C και 37°C αντίστοιχα.

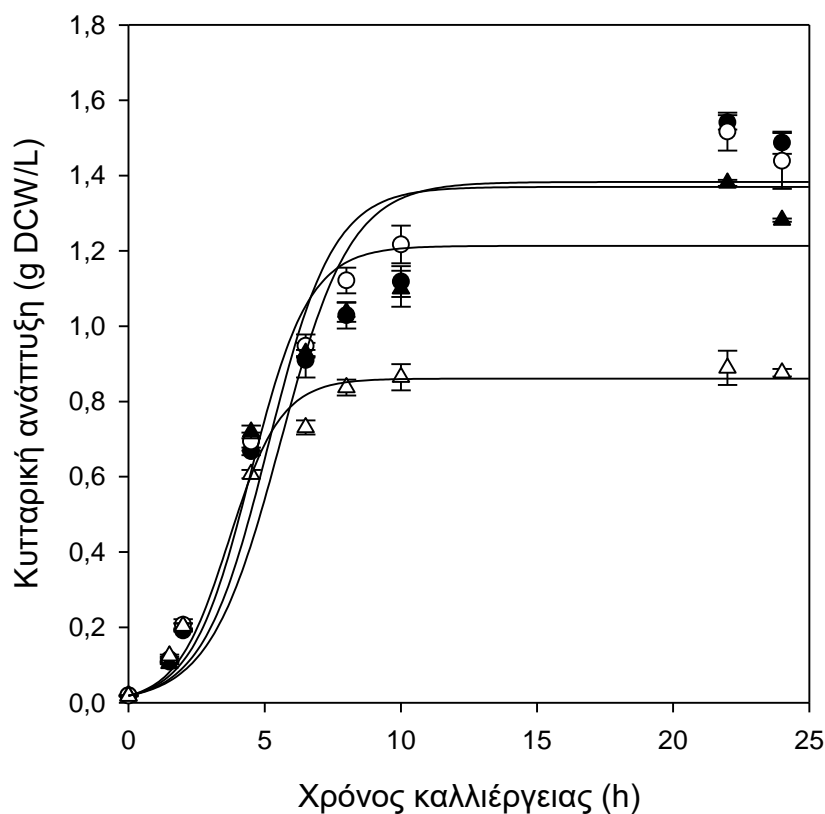


Διάγραμμα 5: Ανάπτυξη (●) του βακτηρίου *E. coli* BL21 και παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης (○) σε θρεπτικό μέσο LB. Συνθήκες: (α) 20μM IPTG & 20°C, (β) 20μM IPTG & 27°C, (γ) 20μM IPTG & 30°C, (δ) 20μM IPTG & 37°C

Δίνονται επίσης υπό μορφή πίνακα, οι τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης για καθεμία από τις παραπάνω περιπτώσεις:

Πίνακας 3: Μέγιστη ποσότητα ενζύμου, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μ και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο LB για διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής υπό σταθερή συγκέντρωση επαγωγέα IPTG 20μM

	μ (h ⁻¹)	Units/ mg DCW	x_{max} (mg DCW/mL) (predicted)	x_{max} (mg DCW/mL) (experimental)	R ²
T=20°C	0,76 (p<0.0001)	7,71	1,39 (p<0.0001)	1,54	0,9391
T=27°C	0,82 (p<0.0001)	7,36	1,37 (p<0.0001)	1,52	0,9611
T=30°C	0,91 (p<0.0001)	8,81	1,22 (p<0.0001)	1,38	0,9593
T=37°C	1,04 (p<0.0001)	7,33	0,86 (p<0.0001)	0,90	0,9817

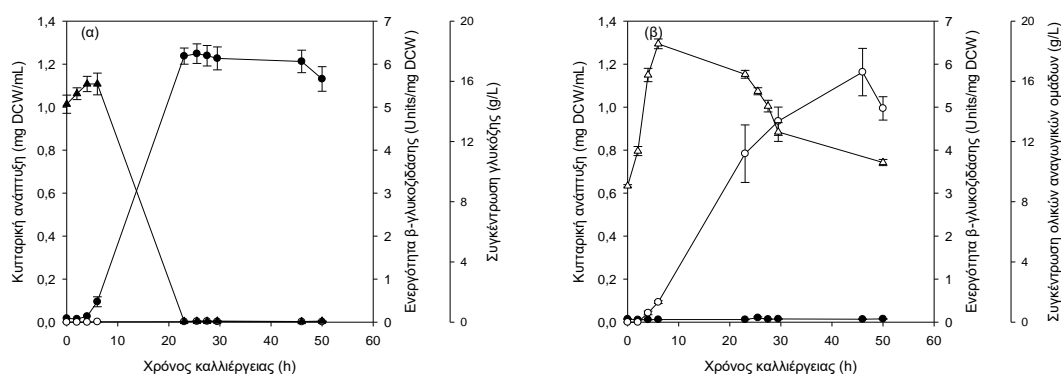


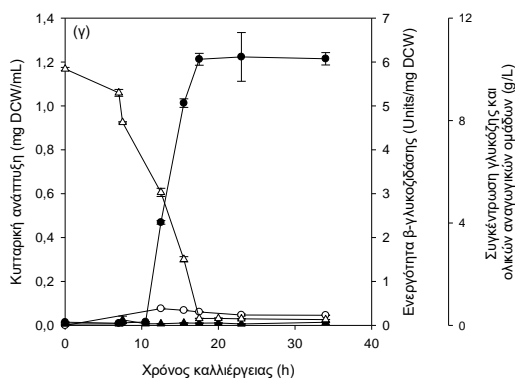
Διάγραμμα 6: Ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli* BL21 σε θρεπτικό μέσο LB. Συνθήκες: (●) 20μM IPTG & 20°C, (○) 20μM IPTG & 27°C, (▲) 20μM IPTG & 30°C, (△) 20μM IPTG & 37°C

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα καθώς και με βάση τις τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης με χρήση του λογιστικού μοντέλου καθώς και της μέγιστης ποσότητας ενζύμου προκύπτει πως η θερμοκρασία των 30°C είναι η βέλτιστη δυνατή για την παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης σε θρεπτικό μέσο LB. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τις μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τη βέλτιστη θερμοκρασία επαγωγής που απαιτείται για την επίτευξη υψηλών επιπέδων παραγωγής ετερόλογων πρωτεϊνών, σύμφωνα με τις οποίες, αν και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *E. coli* είναι οι 37°C, μείωση της θερμοκρασίας επαγωγής στους 30°C μειώνει την παραγωγή πρωτεϊνών που προκαλούν θερμοκρασιακό σοκ στα κύτταρα (Surek et al.,1991). Επίσης αύξηση της θερμοκρασίας επαγωγής οδηγεί σε αύξηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία από τους 20°C στους 37°C, η θερμοκρασία επαγωγής είναι πολύ κοντά στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων *E. coli*.

3.2. Προσδιορισμός δραστηριότητας ενζύμου σε επαγόμενα από σάκχαρα συστήματα

Το υψηλό κόστος του θρεπτικού μέσου LB σε συνδυασμό με το υψηλό κόστος και την τοξικότητα του επαγωγέα IPTG για τα κύτταρα, ωθεί στη χρήση διαφορετικών πηγών άνθρακα ως υπόστρωμα για τη παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης καθιστώντας μια οικονομικά και οικολογικά συμφέρουσα διεργασία. Εξετάστηκαν τρία διαφορετικά σάκχαρα: γλυκόζη, γαλακτόζη και λακτόζη σε συγκέντρωση 10g/L και θερμοκρασία επαγωγής 37°C. Παρακάτω δίνονται τα σχετικά διαγράμματα:





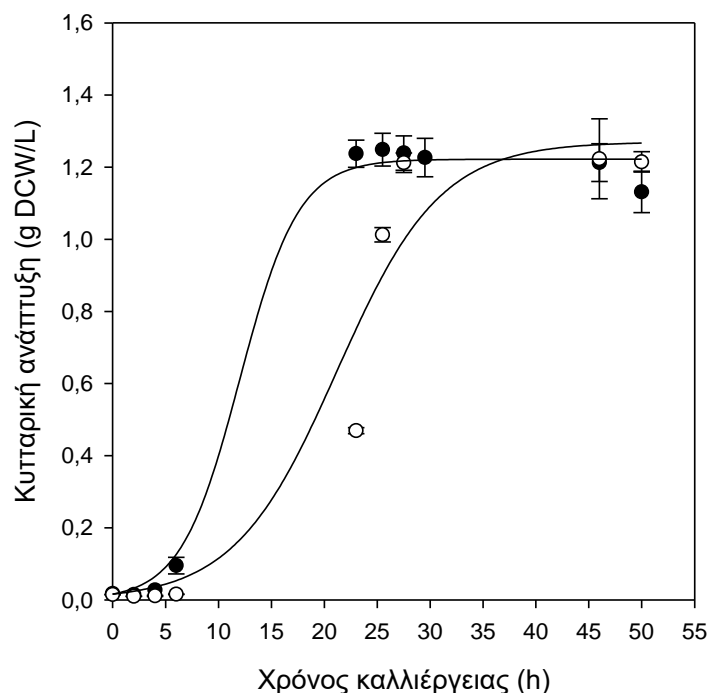
Διάγραμμα 7: Ανάπτυξη (●) του βακτηρίου *E.coli* BL21, συγκέντρωση γλυκόζης (▲) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (△) και παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης (○) σε διαφορετικές πηγές άνθρακα. Συνθήκες: (α) 10g/L γλυκόζη & 37°C, (β) 10g/L γαλακτόζη & 37°C, (γ) 10g/L λακτόζη & 37°C

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα, παρατηρείται ότι κατά τη χρήση γλυκόζης και λακτόζης ως κύριες πηγές άνθρακα επιτυγχάνεται ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους χωρίς να συνεπάγεται την παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης. Αντίθετα κατά τη χρήση γαλακτόζης ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται. Επομένως, το *E.coli* δεν μπορεί να μεταβολίσει τη γαλακτόζη.

Δίνεται επίσης ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την γλυκόζη και τη λακτόζη καθώς και το αντίστοιχο διάγραμμα:

Πίνακας 4: Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μ και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη για διαφορετικές πηγές άνθρακα υπό σταθερή θερμοκρασία επαγωγής 37°C

	μ (h^{-1})	x_{max} (mg DCW/mL) (predicted)	x_{max} (mg DCW/mL) (experimental)	R^2
Γλυκόζη 10g/L	0,36 ($p < 0.0001$)	1,22 ($p < 0.0001$)	1,25	0,9957
Λακτόζη 10g/L	0,21 ($p < 0.0001$)	1,21 ($p < 0.0001$)	1,22	0,9462

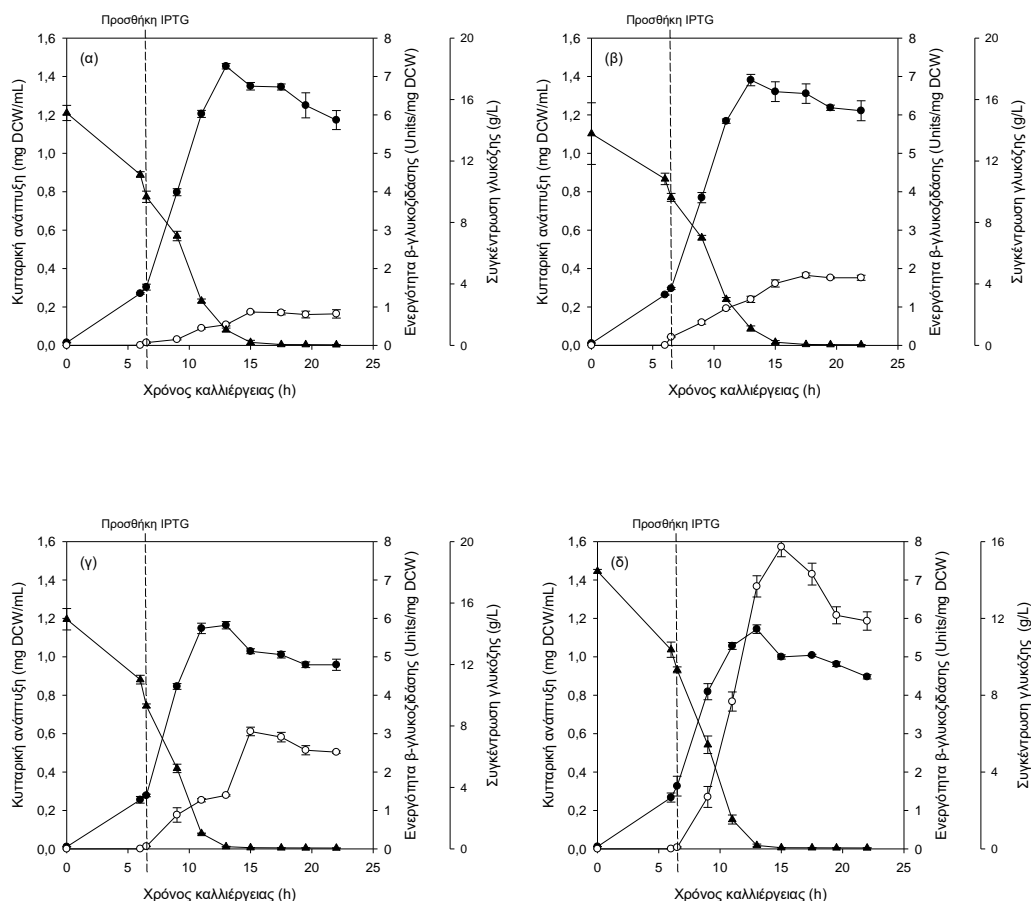


Διάγραμμα 8: Ανάπτυξη του βακτηρίου *E.coli* BL21 σε διαφορετικές πηγές άνθρακα. Συνθήκες: (●) 10g/L γλυκόζη & 37°C, (○) 10g/L λακτόζη & 37°C

Αν και η λακτόζη φαίνεται να λειτουργεί και αυτή ως πηγή άνθρακα, εντούτοις για τα επόμενα πειράματα θα χρησιμοποιηθεί η γλυκόζη ως κύρια πηγή άνθρακα καθώς βάσει μελετών, το *E.coli* μεταβολίζει τη γλυκόζη καλύτερα από τη λακτόζη. Αυτό μπορεί να επαληθευτεί και από την τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της γλυκόζης η οποία είναι αρκετά υψηλότερη από την αντίστοιχη της λακτόζης.

3.2.1. Προσδιορισμός δραστηριότητας ενζύμου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα IPTG και θερμοκρασίες επαγωγής με χρήση Minimal Glucose

Χρησιμοποιώντας ένα διαφορετικό θρεπτικό υπόστρωμα καθορισμένης σύστασης με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη (Minimal Glucose), μελετήθηκε η παραγωγή του ενζύμου στις δύο βέλτιστες συγκεντρώσεις του επαγωγέα IPTG και θερμοκρασίες επαγωγής. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν λοιπόν είναι: (α) IPTG 20μM και 30°C, (β) IPTG 40μM και 30°C, (γ) IPTG 20μM και 37°C και (δ) IPTG 40μM και 37°C. Παρακάτω παριστάνονται τα σχετικά διαγράμματα:

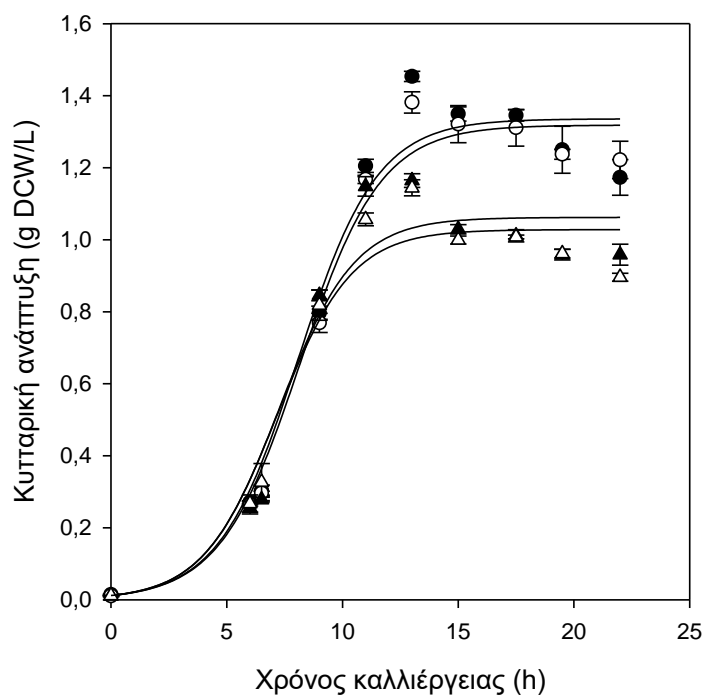


Διάγραμμα 9: Ανάπτυξη (●) του βακτηρίου *E. coli* BL21, συγκέντρωση γλυκόζης (▲) και παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης (○) σε διαφορετική συγκέντρωση επαγωγέα και θερμοκρασία επαγωγής. Συνθήκες: (α) 20μM IPTG & 30°C, (β) 40μM IPTG & 30°C, (γ) 20μM IPTG & 37°C, (δ) 40μM IPTG & 37°C

Οι τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης για καθεμία από τις παραπάνω περιπτώσεις καθώς και το αντίστοιχο διάγραμμα δίνονται παρακάτω:

Πίνακας 5: Μέγιστη ποσότητα ενζύμου, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μ και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη για διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα IPTG σε *Minimal Glucose* σε διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής

	μ (h^{-1})	Units/ mg DCW	X_{max} (mg DCW/mL) (predicted)	X_{max} (mg DCW/mL) (experimental)	R^2
IPTG 20μM 30°C	0,59 ($p < 0.0001$)	0,87	1,34 ($p < 0.0001$)	1,45	0,9664
IPTG 40μM 30°C	0,58 ($p < 0.0001$)	1,82	1,32 ($p < 0.0001$)	1,38	0,9805
IPTG 20μM 37°C	0,62 ($p < 0.0001$)	3,06	1,06 ($p < 0.0001$)	1,16	0,9365
IPTG 40μM 37°C	0,62 ($p < 0.0001$)	7,87	1,03 ($p < 0.0001$)	1,14	0,9509



Διάγραμμα 10: Ανάπτυξη του βακτηρίου *E.coli* BL21 σε θρεπτικό μέσο Minimal Glucose. Συνθήκες: (●) 20μM IPTG & 30°C, (○) 40μM IPTG & 30°C, (▲) 20μM IPTG & 37°C και (△) 40μM IPTG & 37°C

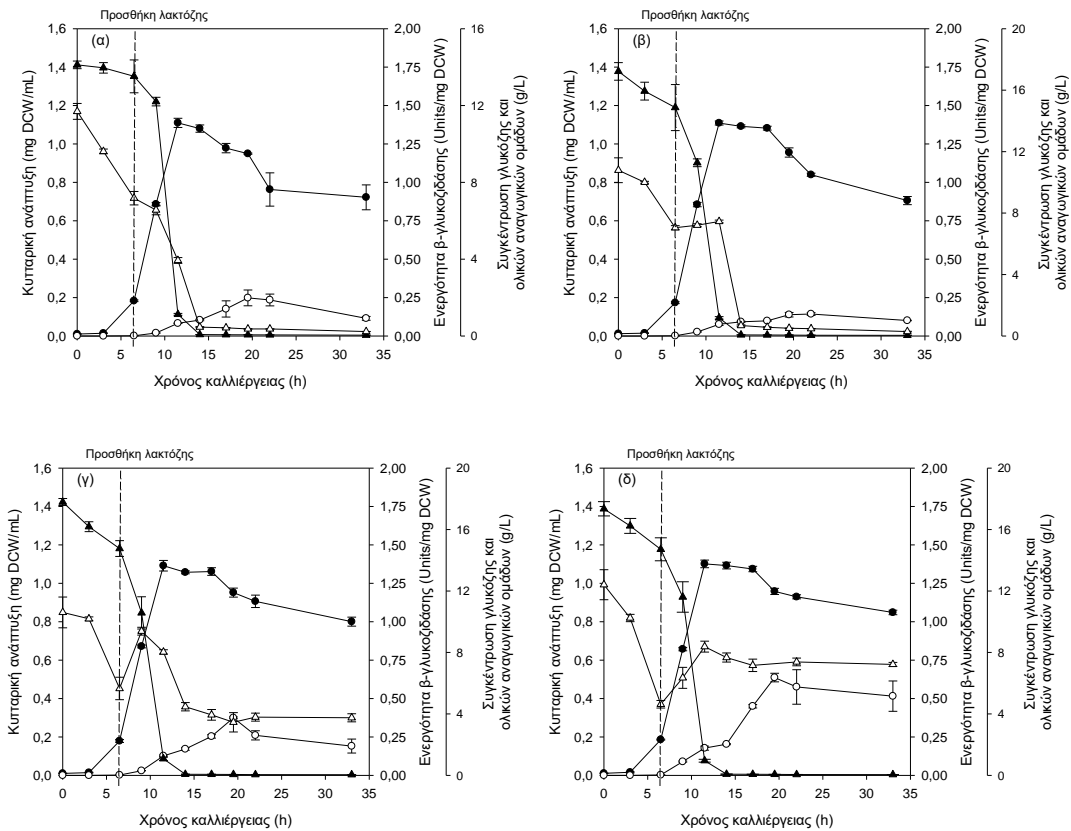
Συγκρίνοντας την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων με θρεπτικό μέσο LB και Minimal Glucose, διαπιστώνεται πως στη δεύτερη περίπτωση η κυτταρική ανάπτυξη πραγματοποιείται με αργότερο ρυθμό το οποίο φαίνεται και από την τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης των δύο περιπτώσεων. Πράγματι το LB είναι ένα θρεπτικό μέσο εξαιρετικά πλούσιο σε άνθρακα, μέταλλα και ιχνοστοιχεία κατάλληλο για την ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών *E.coli*.

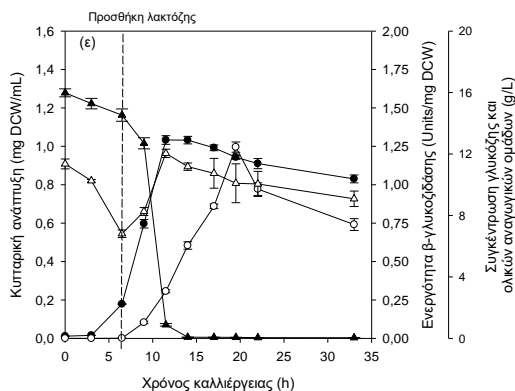
Επίσης σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρείται πως αύξηση της συγκέντρωσης του επαγωγέα και της θερμοκρασίας καλλιέργειας οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης. Μάλιστα στη περίπτωση των 40μM IPTG, αύξηση της θερμοκρασίας επαγωγής από τους 30°C στους 37°C οδηγεί σε τετραπλάσια ποσότητα ενζύμου. Το αποτέλεσμα αυτό αντιβαίνει πλήρως στη θεωρία που αναφέρεται παραπάνω και χρειάζεται περαιτέρω ανάλυση. Επίσης σε αυτή την περίπτωση που η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή άνθρακα, η συγκέντρωση των 40μM IPTG παρουσιάζει καλύτερα επίπεδα της παραγόμενης πρωτεΐνης σε σχέση με τα 20μM, τα οποία είναι παραπάνω από διπλάσια για κάθε θερμοκρασία επαγωγής. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανόν να οφείλονται στο διαφορετικό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε σε σχέση με τα προηγούμενα αποτελέσματα με θρεπτικό μέσο LB. Η καταστολή της γλυκόζης στην μεταγραφή του *Iac* υποκινητή είναι πιθανόν να απαιτεί μεγαλύτερη ποσότητα επαγωγέα ώστε να παραχθούν υψηλά επίπεδα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Επίσης παρατηρείται

πως ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι μεγαλύτερος στους 37°C, το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς πρόκειται για τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων.

3.2.2. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου με χρήση λακτόζης ως επαγωγέα

Στη συνέχεια μελετήθηκε η χρήση σακχάρων ως επαγωγείς και η επίδραση τους στην παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης. Μελετήθηκε η χρήση της λακτόζης ως επαγωγέα. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε στο θρεπτικό μέσο είναι η γλυκόζη συγκέντρωσης 10g/L. Οι συγκεντρώσεις του επαγωγέα που μελετήθηκαν είναι 1,2,5,10 και 15g/L σε θερμοκρασία επαγωγής 30°C. Παρακάτω δίνονται τα σχετικά διαγράμματα.

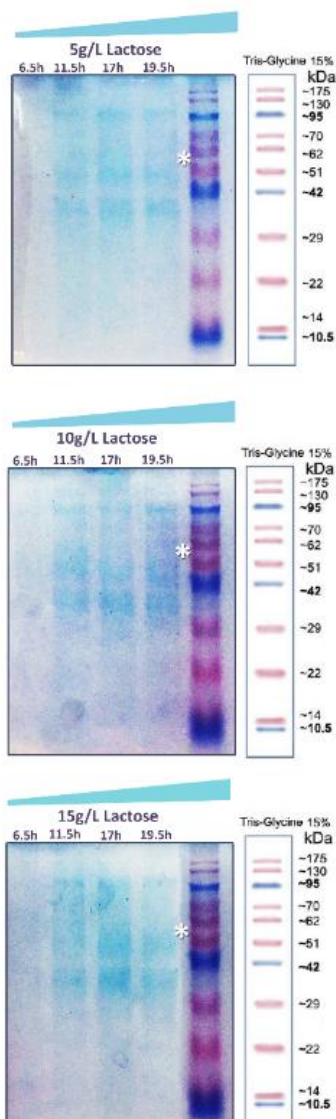




Διάγραμμα 11: Ανάπτυξη (●) του βακτηρίου *E.coli* BL21, συγκέντρωση γλυκόζης (▲) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (△) και παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης (○) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα λακτόζης. Συνθήκες: (α) 1g/L λακτόζη & 30°C, (β) 2g/L λακτόζη & 30°C, (γ) 5g/L λακτόζη & 30°C, (δ) 10g/L λακτόζη & 30°C, (ε) 15g/L λακτόζη & 30°C

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται πως μεταξύ των 9 και 11,5 ωρών καταναλώνεται πλήρως η γλυκόζη που βρίσκεται στο θρεπτικό μέσο, ενώ η συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων σταθεροποιείται μετά από αυτό το διάστημα. Αυτή η σταθερή συγκέντρωση οφείλεται στην ποσότητα της γαλακτόζης που έχει προκύψει από τη διάσπαση της λακτόζης η οποία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεν μεταβολίζεται από τα κύτταρα.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με την μέθοδο SDS-PAGE για τα δείγματα στα οποία η συγκέντρωση της λακτόζης ήταν 5, 10 και 15g/L αντίστοιχα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Παρακάτω δίνεται η σχετική εικόνα:



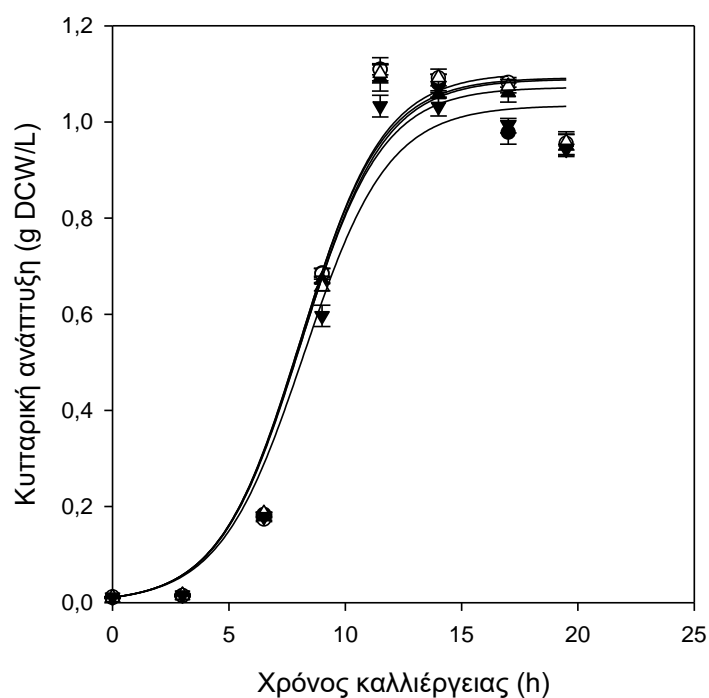
Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα πολυακριμιδίου μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli* που φέρουν γονίδιο ετερόλογης έκφρασης β-γλυκοζιδάσης, σε θρεπτικό μέσο Minimal Glucose και διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα λακτόζη

Στις 6,5 ώρες καλλιέργειας προστίθεται ο επαγωγέας. Κατά συνέπεια, η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι μηδενική όπως επιβεβαιώνεται από το Διάγραμμα 9. Στις 11,5 ώρες καλλιέργειας έχει σχηματιστεί μια ζώνη η οποία εντείνεται με το πέρασμα του χρόνου. Επίσης διακρίνεται ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις του επαγωγέα αυξάνεται και η παραγόμενη πρωτεΐνη.

Τέλος υπολογίστηκε με χρήση της λογιστικής εξίσωσης, η τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης με βάση τις πειραματικές τιμές. Τα σχετικά αποτελέσματα δίνονται στο παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6: Μέγιστη ποσότητα ενζύμου, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μ και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη για διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα λακτόζη σε *Minimal Glucose* υπό σταθερή θερμοκρασία επαγωγής 30°C

	μ (h^{-1})	Units/ mg DCW	X_{max} (mg DCW/mL) (predicted)	X_{max} (mg DCW/mL) (experimental)	R^2
Λακτόζη 1 g/L	0,57 ($p < 0.0001$)	0,25	1,10 ($p < 0.0001$)	1,11	0,9634
Λακτόζη 2 g/L	0,57 ($p < 0.0001$)	0,15	1,09 ($p < 0.0001$)	1,11	0,9622
Λακτόζη 5 g/L	0,57 ($p < 0.0001$)	0,37	1,07 ($p < 0.0001$)	1,09	0,9651
Λακτόζη 10 g/L	0,57 ($p < 0.0001$)	0,64	1,09 ($p < 0.0001$)	1,10	0,965
Λακτόζη 15 g/L	0,55 ($p < 0.0001$)	1,24	1,03 ($p < 0.0001$)	1,03	0,9697



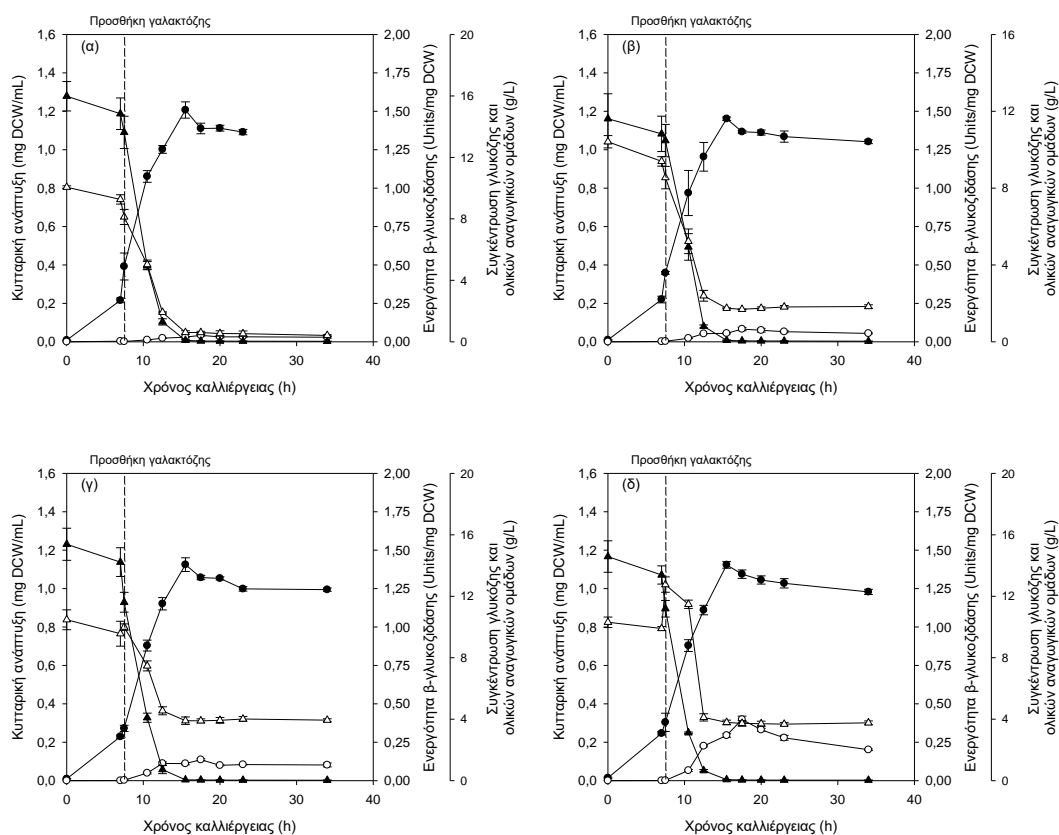
Διάγραμμα 12: Ανάπτυξη του βακτηρίου *E.coli* BL21 σε θρεπτικό μέσο *Minimal Glucose*. Συνθήκες: (●) 1g/L λακτόζη & 30°C, (○) 2g/L λακτόζη & 30°C, (▲) 5g/L λακτόζη & 30°C, (△) 10g/L λακτόζη & 30°C, (▼) 15g/L λακτόζη & 30°C

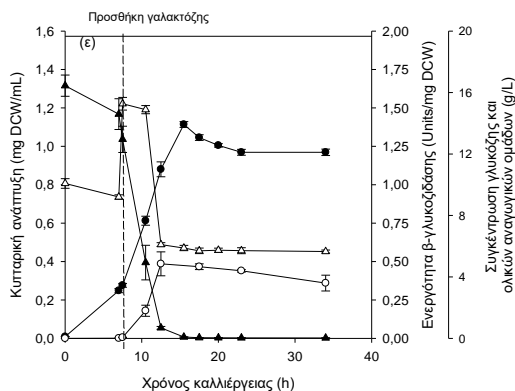
Αναφορικά με την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, διαπιστώνεται πως η υψηλότερη συγκέντρωση επαγωγέα ενισχύει τα επίπεδα δραστηριότητας συνεπώς η συγκέντρωση των 15g/L θεωρείται η βέλτιστη για την παραγωγή της πρωτεΐνης στόχου. Συγκρίνοντας τους δύο επαγωγείς, είναι προφανές πως το IPTG αποτελεί καλύτερο επαγωγέα του οπερονίου της λακτόζης. Μάλιστα τα επίπεδα παραγωγής

της β-γλυκοζιδάσης σε θρεπτικό μέσο LB και επαγωγέα IPTG είναι κατά επτά φορές μεγαλύτερα από αυτά που προέκυψαν σε θρεπτικό μέσο Minimal Glucose και επαγωγέα λακτόζη. Τα χαμηλά επίπεδα παραγωγής του ενζύμου στη περίπτωση της λακτόζης μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι όταν η λακτόζη εισέλθει στα κύτταρα πρέπει να μετατραπεί σε αλλολακτόζη από το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση και μετά να προσδεθεί στον καταστολέα (D.Martinez, 2014). Άλλη αιτία αποτελεί και η παρουσία της γλυκόζης στο σύστημα. Αν και αποτελεί κατάλληλη πηγή άνθρακα για τη κυτταρική ανάπτυξη καταστέλλει την μεταγραφή του *lac* υποκινητή λόγω του μικρού αριθμού μορίων cAMP (Donovan et al., 1996).

3.2.3. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου με χρήση γαλακτόζης ως επαγωγέα

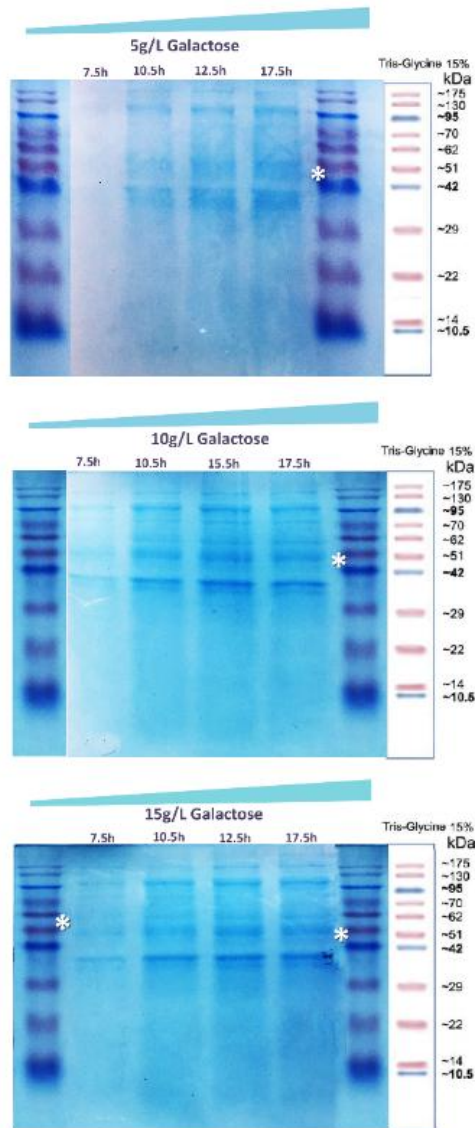
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η επίδραση της γαλακτόζης ως επαγωγέας όταν η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή άνθρακα. Οι συγκεντρώσεις του επαγωγέα που διερευνήθηκαν είναι 1,2,5,10 και 15g/L σε θερμοκρασία επαγωγής 30°C.





Διάγραμμα 13: Ανάπτυξη (●) του βακτηρίου *E. coli* BL21, συγκέντρωση γλυκόζης (▲) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (△) και παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης (○) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα γαλακτόζης. Συνθήκες: (α) 1g/L γαλακτόζη & 30°C, (β) 2g/L γαλακτόζη & 30°C, (γ) 5g/L γαλακτόζη & 30°C, (δ) 10g/L γαλακτόζη & 30°C, (ε) 15g/L γαλακτόζη & 30°C

Αντίστοιχα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυμιδίου για τα δείγματα στα οποία η συγκέντρωση του επαγωγέα ήταν 5, 10 και 15g/L σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 15, στις 7,5 ώρες καλλιέργειας και αφού έχει επέλθει μία ώρα από την στιγμή της προσθήκης του επαγωγέα, έχει σχηματιστεί μια ζώνη που υποδεικνύει την έναρξη παραγωγής της πρωτεΐνης. Επίσης παρατηρείται πως όταν η συγκέντρωση της γαλακτόζης είναι 10 και 15g/L αντίστοιχα επιτυγχάνεται ικανοποιητική παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης σε σύγκριση με την συγκέντρωση των 5g/L που η ζώνη είναι αρκετά θολή. Επίσης, τα επίπεδα παραγωγής της ετερόλογης πρωτεΐνης είναι σχεδόν σταθερά από τις 12,5 ώρες και μετά όπως επιβεβαιώνεται και από το παραπάνω διάγραμμα.

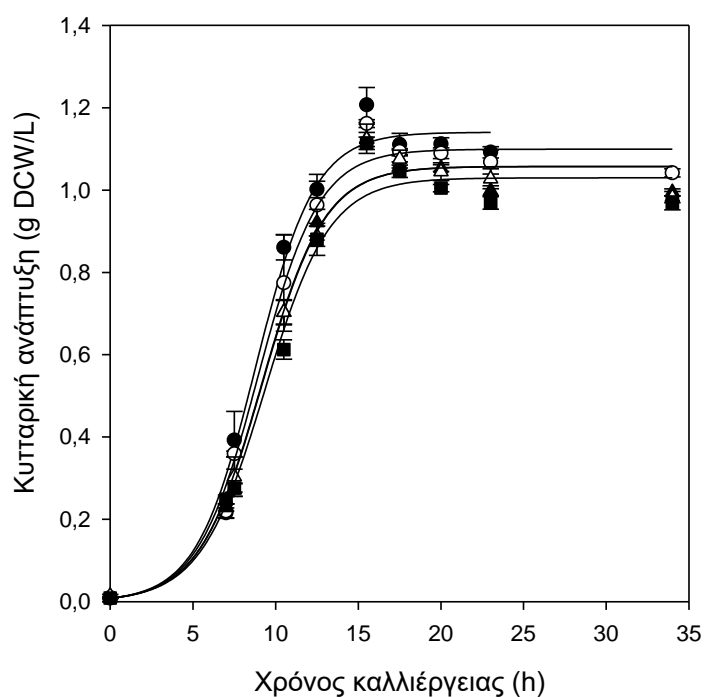


Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα πολυακριμιδίου μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli* που φέρουν γονίδιο ετερόλογης έκφρασης β-γλυκοζιδάσης, σε θρεπτικό μέσο Minimal Glucose και διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα γαλακτόζη

Δίνονται υπό μορφή πίνακα, οι τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης για καθεμία από τις παραπάνω περιπτώσεις με το αντίστοιχο διάγραμμα:

Πίνακας 7: Μέγιστη ποσότητα ενζύμου, Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μ και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη για διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα γαλακτόζη σε *Minimal Glucose* υπό σταθερή θερμοκρασία επαγωγής 30°C

	μ (h^{-1})	Units/mg DCW	X_{max} (mg DCW/mL) (predicted)	X_{max} (mg DCW/mL) (experimental)	R^2
Γαλακτόζη 1 g/L	0,56 ($p < 0.0001$)	0,04	1,14 ($p < 0.0001$)	1,21	0,9862
Γαλακτόζη 2 g/L	0,54 ($p < 0.0001$)	0,08	1,10 ($p < 0.0001$)	1,16	0,9894
Γαλακτόζη 5 g/L	0,53 ($p < 0.0001$)	0,14	1,06 ($p < 0.0001$)	1,12	0,9864
Γαλακτόζη 10 g/L	0,53 ($p < 0.0001$)	0,40	1,06 ($p < 0.0001$)	1,12	0,9877
Γαλακτόζη 15 g/L	0,51 ($p < 0.0001$)	0,49	1,03 ($p < 0.0001$)	1,11	0,9806



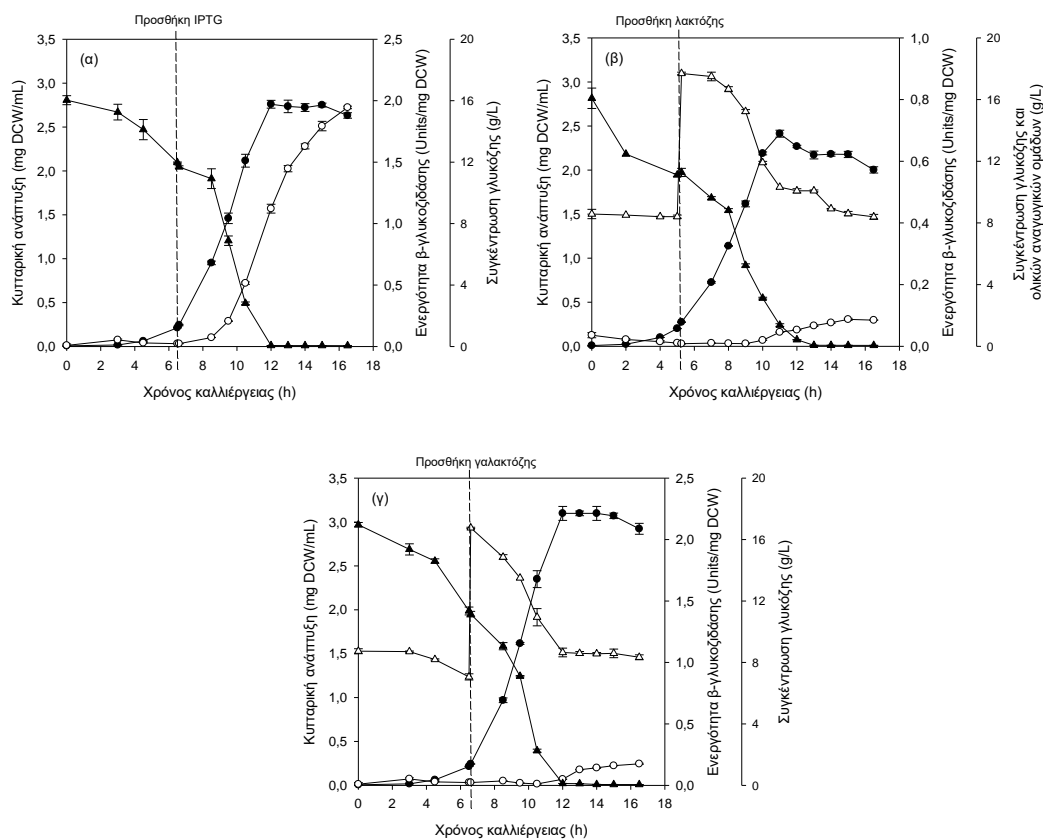
Διάγραμμα 14: Ανάπτυξη του βακτηρίου *E.coli* BL21 σε θρεπτικό μέσο *Minimal Glucose*. Συνθήκες: (●) 1g/L γαλακτόζη & 30°C, (○) 2g/L γαλακτόζη & 30°C, (▲) 5g/L γαλακτόζη & 30°C, (△) 10g/L γαλακτόζη & 30°C, (▼) 15g/L γαλακτόζη & 30°C

Παρατηρείται πως η αύξηση της συγκέντρωσης του επαγωγέα δεν επηρεάζει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης ο οποίος παραμένει σταθερός. Επίσης, αντίστοιχα με την περίπτωση της λακτόζης, αύξηση της γαλακτόζης οδηγεί σε υψηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου. Μάλιστα σε συγκεντρώσεις 10 και 15g/L επιτυγχάνεται

η βέλτιστη παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης. Εφόσον τα επίπεδα της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι παρόμοια στις δύο αυτές συγκεντρώσεις, για λόγους οικονομίας του σακχάρου, θα θεωρηθεί η συγκέντρωση των 10g/L γαλακτόζης ως η βέλτιστη για την παραγωγή της ετερόλογης πρωτεΐνης.

3.3. Προσδιορισμός δραστικότητας ενζύμου σε βιοαντιδραστήρες

Με βάση τα παραπάνω συνολικά αποτελέσματα μελετήθηκε η παραγωγή του ενζύμου σε βιοαντιδραστήρες κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες pH, αέρα και οξυγόνου. Οι περιπτώσεις που μελετήθηκαν είναι: (α) IPTG 40μM , (β) 15g/L λακτόζη και (γ) 10g/L γαλακτόζη σε θερμοκρασία επαγωγής 30°C. Παρακάτω δίνονται τα σχετικά διαγράμματα:

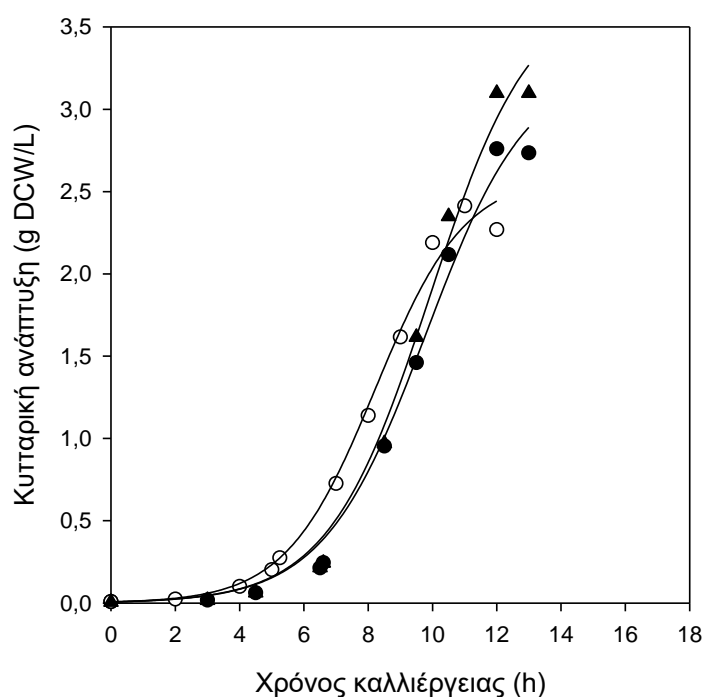


Διάγραμμα 15: Ανάπτυξη (●) του βακτηρίου *E. coli* BL21, συγκέντρωση γλυκόζης (▲) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (△) και παραγωγή της β-γλυκοζιδάσης (○) σε βιοαντιδραστήρες σε διαφορετικούς επαγωγείς. Συνθήκες: (α) 40μM IPTG & 30°C, (β) 15g/L λακτόζη & 30°C και (γ) 10g/L γαλακτόζη & 30°C,

Δίνεται επίσης ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για τις παραπάνω περιπτώσεις:

Πίνακας 8: Μέγιστη ποσότητα ενζύμου, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μ και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρες για διαφορετικούς επαγωγείς σε *Minimal Glucose* υπό σταθερή θερμοκρασία επαγωγής 30°C

	μ (h ⁻¹)	Units/mg DCW	X_{max} (mg DCW/mL) (predicted)	X_{max} (mg DCW/mL) (experimental)	R ²
IPTG 40μM	0,63 (p<0.0001)	2,04	3,28 (p<0.0001)	2,76	0,9904
Λακτόζη 15 g/L	0,72 (p<0.0001)	0,10	2,60 (p<0.0001)	2,41	0,9919
Γαλακτόζη 10 g/L	0,63 (p<0.0001)	0,18	3,73 (p<0.0001)	3,10	0,9902



Διάγραμμα 16: Ανάπτυξη του βακτηρίου *E.coli BL21* σε βιοαντιδραστήρες σε θρεπτικό μέσο *Minimal Glucose*. Συνθήκες: (●) 40μM IPTG & 30°C, (○) 15g/L λακτόζη & 30°C και (▲) 10g/L γαλακτόζη & 30°C

Παρατηρείται πως η καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρες κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες οδηγεί σε πολύ υψηλότερα επίπεδα κυτταρικής ανάπτυξης σε σύγκριση με τους θερμοστατούμενους αναδευτήρες. Επίσης η τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο τρόπων καλλιέργειας. Μάλιστα στη περίπτωση των βιοαντιδραστήρων, η φάση της εκθετικής ανάπτυξης

ολοκληρώνεται στις 11 ώρες, περίπου 3 ώρες πιο γρήγορα σε σχέση με τους αναδευτήρες. Ωστόσο τα επίπεδα της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι χαμηλότερα από αυτά των φιαλών. Τα αποτελέσματα αυτά δεν συμφωνούν με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας καθώς η λειτουργία βιοαντιδραστήρων σε batch συνθήκες με ελεγχόμενες συνθήκες αέρα και οξυγόνου οδηγούν σε υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης στόχου από τις φιάλες. Αυτά τα χαμηλά επίπεδα της β-γλυκοζιδάσης είναι πιθανό να οφείλονται στη παραγωγή οξικού οξέος το οποίο παράγεται ως παραπροϊόν και αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή της πρωτεΐνης. Ένας λόγος για την παραγωγή οξικού οξέος είναι ότι ο άνθρακας που εισέρχεται στα κεντρικά μεταβολικά μονοπάτια υπερβαίνει τις ανάγκες του κυττάρου για την ανάπτυξη του και έτσι εξισορροπείται από την έκκριση όξινων μεταβολιτών με κυριότερο το οξικό οξύ (Chou et al., 1994).

Για να διαπιστωθεί η ποσότητα του παραγόμενου οξικού οξέος κατά την καλλιέργεια στους βιοαντιδραστήρες πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) στα δείγματα της λακτόζης και της γαλακτόζης που τα επίπεδα της παραγόμενης β-γλυκοζιδάσης ήταν πολύ χαμηλά. Παράτων δίνονται οι σχετικοί πίνακες με τα αποτελέσματα:

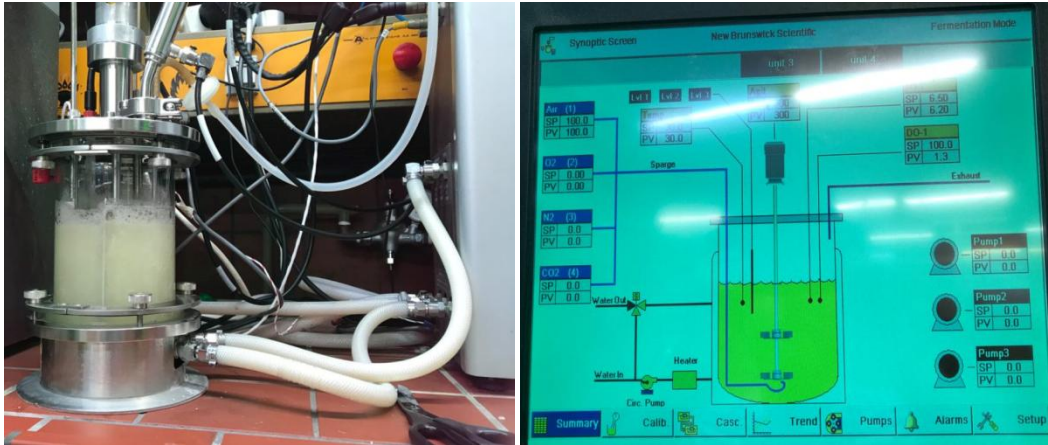
Πίνακας 9: Συγκέντρωση παραγόμενου οξικού οξέος σε βιοαντιδραστήρα με επαγωγέα γαλακτόζη συγκέντρωσης 10g/L

t (h)	C _{οξικού οξέος} (g/L)
6,6	0
8,5	0
9,5	0
10,5	0,36
12	0,58
13	0,56
14	0,52
15	0,41
16,5	0,24

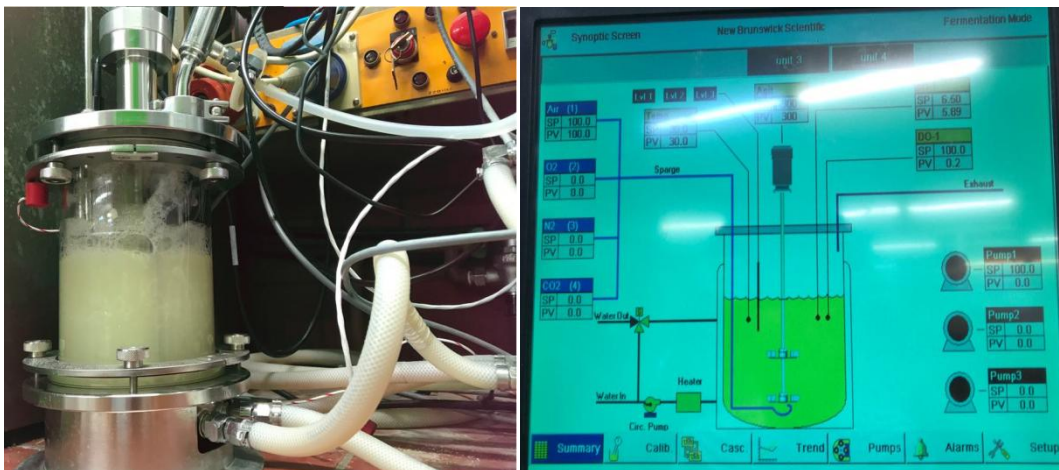
Πίνακας 10: Συγκέντρωση παραγόμενου οξικού οξέος σε βιοαντιδραστήρα με επαγωγέα λακτόζη συγκέντρωσης 15g/L

t (h)	C _{οξικού οξέος} (g/L)
5,25	0
7	0
8	0
9	0
10	0,1
11	0,25
12	0,66
13	1,11
14	1,60
15	1,99
16,5	1,85

Σύμφωνα με τους παραπάνω πίνακες, παρατηρείται πως και στις δύο περιπτώσεις η παραγωγή του οξικού οξέος ξεκινά μετά τις 10 ώρες. Στην περίπτωση της γαλακτόζης, η μέγιστη συγκέντρωση του οξικού οξέος πραγματοποιείται στις 12 ώρες καλλιέργειας, όπου η γλυκόζη έχει εξαντληθεί και έχει επιτευχθεί η μέγιστη κυτταρική ανάπτυξη. Στην περίπτωση της λακτόζης, η συγκέντρωση του οξικού οξέος αυξάνεται συνεχώς μέχρι τις 15 ώρες όπου η συγκέντρωση του είναι σχεδόν 2 g/L. Η υψηλή συγκέντρωση του οξικού οξέος μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η συγκέντρωση της λακτόζης που προστέθηκε ως επαγωγέας ήταν 15 g/L και όχι 10 όπως στη περίπτωση της γαλακτόζης. Επιπλέον αυτή η υψηλή συγκέντρωση του οξικού οξέος μπορεί να δικαιολογεί γιατί η παραγόμενη β-γλυκοζιδάση ήταν λιγότερη με επαγωγέα λακτόζη ενώ στις φιάλες η λακτόζη παρουσιάζει καλύτερη επαγωγική ικανότητα.



Εικόνα 16: Διάταξη βιοαντιδραστήρα και ένδειξη διαλυμένου οξυγόνου μετά από 9 ώρες καλλιέργειας με επαγωγέα IPTG συγκέντρωσης 40μM και θερμοκρασία επαγωγής 30°C



Εικόνα 17: Διάταξη βιοαντιδραστήρα και ένδειξη διαλυμένου οξυγόνου μετά από 9 ώρες καλλιέργειας με επαγωγέα λακτόζη συγκέντρωσης 15g/L και θερμοκρασία επαγωγής 30°C

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρήση μικροοργανισμών ως ξενιστές αποτελεί πλέον μια εύκολη και οικονομική μέθοδο για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα. Το προκαρυωτικό βακτήριο *Escherichia coli* και συγκεκριμένα το στέλεχος BL21 χρησιμοποιείται ευρύτατα για την παραγωγή φαρμακευτικών και άλλων πρωτεϊνών λόγω των φτηνών πρώτων υλών και της γρήγορης κυτταρικής ανάπτυξης. Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε το ένζυμο της β-γλυκοζιδάσης το οποίο λόγω της ικανότητας του να διασπά τους β-γλυκοζιδικούς δεσμούς βρίσκει εφαρμογή στη παραγωγή βιοκαυσίμων και φαρμάκων καθώς και στο τομέα των τροφίμων. Η παραγωγή των ετερόλογων πρωτεϊνών εξαρτάται επίσης από την χημική ένωση που θα χρησιμοποιηθεί για να επάγει την πρωτεϊνική έκφραση. Το IPTG αποτελεί τον πιο διαδεδομένο επαγωγέα σε αυτές τις περιπτώσεις λόγω της ικανότητας του να επάγει το οπερόνιο της λακτόζης οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα μεταγραφής. Αν και δεν μεταβολίζεται από τα βακτηριακά κύτταρα, παράγοντες όπως το υψηλό κόστος του και η τοξικότητα του περιορίζουν τη χρήση του στον φαρμακευτικό τομέα. Η λύση στρέφεται λοιπόν στα επαγόμενα από σάκχαρα συστήματα, τα οποία παρά την μέχρι πρότινος περιορισμένη εφαρμογή τους, παρουσιάζουν πολλές προοπτικές για το μέλλον. Βέβαια, η παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως το θρεπτικό μέσο που θα χρησιμοποιηθεί για την κυτταρική ανάπτυξη, η συγκέντρωση του επαγωγέα και η θερμοκρασία επαγωγής καθώς και η χρονική στιγμή της επαγωγής.

Μελετώντας την παραγωγή του ενζύμου σε θρεπτικό μέσο LB σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα IPTG και διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής διαπιστώθηκε πως τα βέλτιστα επίπεδα β-γλυκοζιδάσης επιτυγχάνονται σε συγκεντρώσεις 20-40μM IPTG και θερμοκρασία επαγωγής 30°C. Ωστόσο το LB θεωρείται ένα θρεπτικό μέσο υψηλού κόστους και λόγω της σύστασης του δεν επιτρέπει την παρακολούθηση της συγκέντρωσης της κύριας πηγής άνθρακα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Για το λόγο αυτό αντικαταστάθηκε με ένα θρεπτικό μέσο καθορισμένης σύστασης με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη. Χρησιμοποιώντας αυτό το θρεπτικό μέσο, η κυτταρική ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε με αργότερο ρυθμό συγκριτικά με το θρεπτικό μέσο LB. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του επαγωγέα IPTG και της θερμοκρασίας επαγωγής στο φτωχότερο θρεπτικό μέσο. Διαπιστώθηκε πως η βέλτιστη συγκέντρωση του επαγωγέα είναι τα 40μM και η βέλτιστη θερμοκρασία επαγωγής οι 37°C. Η αύξηση της συγκέντρωσης του επαγωγέα πιθανώς να οφείλεται στη παρουσία της γλυκόζης η οποία, αν και θεωρείται ιδανικό

υπόστρωμα για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων, αναστέλλει τη μεταγραφή του *lac* υποκινητή. Όσον αφορά τη θερμοκρασία επαγωγής, αν και η θερμοκρασία των 37°C θεωρείται η βέλτιστη για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων, οδηγεί συχνά σε παραγωγή πρωτεϊνών που προκαλούν θερμοκρασιακό σοκ στα κύτταρα, επομένως η περαιτέρω μελέτη της παραγωγής του ενζύμου σε αυτή τη θερμοκρασία κρίνεται επιτακτική.

Ακολούθως, το IPTG αντικαταστάθηκε και ως επαγωγείς χρησιμοποιήθηκαν σάκχαρα όπως η λακτόζη και η γαλακτόζη και μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των σακχάρων αυτών στην παραγωγή της ετερόλογης πρωτεΐνης. Τα επίπεδα της β-γλυκοζιδάσης βρέθηκαν χαμηλότερα συγκριτικά με αυτά με επαγωγέα IPTG με τη βέλτιστη συγκέντρωση της λακτόζης να είναι τα 15g/L και της γαλακτόζης τα 10 g/L και τα αντίστοιχα επίπεδα της β-γλυκοζιδάσης να ανέρχονται σε 1,24 και 0,40 Units/mg DCW σε θερμοκρασία επαγωγής 30°C. Εξήχθη λοιπόν το συμπέρασμα πως η λακτόζη αποτελεί ισχυρότερο επαγωγέα της πρωτεϊνικής έκφρασης από τη γαλακτόζη.

Μετά την μελέτη της παραγωγής της β-γλυκοζιδάσης σε φιάλες, ακολούθησε batch καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρες κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες οξυγόνου, αέρα, pH και θερμοκρασίας. Υπό αυτές τις συνθήκες, η κυτταρική ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε πολύ υψηλά επίπεδα, ωστόσο η παραγωγή της ετερόλογης πρωτεΐνης ήταν χαμηλότερη από αυτή των φιαλών για τις περιπτώσεις που επαγωγείς ήταν η λακτόζη και η γαλακτόζη. Τα αποτελέσματα αυτά οφείλονται στην παραγωγή οξικού οξέος το οποίο δρα ανασταλτικά στην παραγωγή του ενζύμου. Για το λόγο αυτό, η συγκέντρωση του οξικού οξέος προσδιορίστηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και η μέγιστη συγκέντρωση οξικού οξέος για τον επαγωγέα λακτόζη και γαλακτόζη ήταν 1,99 g/L και 0,58 g/L αντίστοιχα. Η υψηλή συγκέντρωση του οξικού οξέος στη περίπτωση του επαγωγέα λακτόζης δικαιολογεί την χαμηλότερη επαγωγική ικανότητα της λακτόζης από τη γαλακτόζη σε batch συνθήκες.

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την παρούσα διπλωματική εργασία, δημιουργούνται ορισμένες μελλοντικές μελέτες σχετικά με την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Μία από αυτές είναι η μελέτη της παραγώμενης πρωτεΐνης σε batch συνθήκες σε θερμοκρασία επαγωγής 37°C ώστε να διαπιστωθεί αν αυτή η θερμοκρασία επαγωγής ευνοεί την παραγωγή της πρωτεΐνης στόχου. Επίσης η χρονική στιγμή της επαγωγής χρήζει μεγάλης σημασίας. Έτσι έχει ιδιαίτερη σημασία να φανεί πως η προσθήκη του επαγωγέα στο τέλος της εκθετικής φάσης, όπου η γλυκόζη έχει σχεδόν καταναλωθεί, επηρεάζει την απόδοση της β-γλυκοζιδάσης. Επίσης σε πολλές μελέτες αναφέρεται πως η χρήση της γλυκερόλης ως συνυπόστρωμα με τη γλυκόζη στο θρεπτικό μέσο οδηγεί σε υψηλά επίπεδα κυτταρικής ανάπτυξης και παραγόμενης πρωτεΐνης (F.Studier,

2005). Τέλος, προκειμένου να επιτευχθούν υψηλά επίπεδα της ετερόλογης πρωτεΐνης, συνίσταται η λειτουργία fed-batch καλλιέργειας η οποία είναι πολύ πιο αποδοτική από την batch-καλλιέργεια και περιορίζει την παραγωγή οξικού οξέος (Xu et al., 2012).

Η παραγωγή αυτών των ενζύμων προκαλεί εξαιρετικό ενδιαφέρον λόγω του τεράστιου εύρους αξιοποίησης τους στον βιομηχανικό τομέα. Ωστόσο η μετάβαση από εργαστηριακή σε βιομηχανική κλίμακα απαιτεί πολλή έρευνα ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες και να γίνει ο απαραίτητος σχεδιασμός προκειμένου να επιτευχθούν τα μέγιστα δυνατά επίπεδα παραγωγής των ετερόλογων πρωτεϊνών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Erwin Strahsburger, Ana Maria Lopez de Lacey, Ilaria Marotti, Diana DiGioia, Bruno Biavati, Giovanni Dinelli. (2017). In vivo assay to identify bacteria with β -glucosidase activity. *Electronic Journal of Biotechnology* , 83-87.

Neus Ferrer-Mirales, Joan Domingo-Espín, José Luis Corchero, Esther Vázquez & Antonio Villaverde . (2009, March). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* .

A.K. Gombert, B.V. Kilikian. (1998). Recombinant gene expression in Escherichia coli cultivation using lactose as a inducer. *Journal of Biotechnology* , 47-54.

Alexander V. Semenov, Ariena H.C. van Bruggen, Leo van Overbeek, Aad J. Termorshuizen and Alexander M. Semenov. (2007, May). Influence of temperature fluctuations on Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica serovar Typhimurium in cow manure. *Federation of European Microbiological Societies* , σσ. 419-428.

Anja Marbach, Katja Bettenbrock. (2011). lac operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG. *Journal of Biotechnology* , 82-88.

Anne Farewell, Frederick C. Neidhardt. (1998). Effect of Temperature on In Vivo Protein Synthetic Capacity in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* .

Antonio De Leon-Rodriguez, Dulce Rivera-Pastrana, Emilio Medina-Rivero, Jose Luis Flores-Flores, Alejandro Estrada-Baltazar, Leandro G. Ordonez-Acevedo, Ana P. Barba de la Rosa. (2006). Production of penicillin acylase by a recombinant Escherichia coli. *Biomolecular engineering* .

Bernard Henrissat, Isabelle Callebaut, Sylvie Fabrega, Pierre Lehn, Jean-Paul Mornon and Gideon Davies. (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 7090-7094.

Cao.L, Wang.Z, Ren.G , Kong.W, Li.L , Xie.W ,Liu.Y. (2015). Engineering a novel glucose-tolerant β -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration. *Biotechnology for Biofuels* .

Carl J. Yeoman, Yejun Han, Dylan Dodd, Charles M. Schroeder, Roderick I. Mackie and Isaac K. O. Cann. (2010). Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. Στο *Advances in Applied Microbiology* (σσ. 1-55).

Chalmers JJ, Kim E, Telford JN, Wong EY, Tacon WC, Shuler ML, Wilson DB. (1990, January). Effects of temperature on Escherichia coli overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor. *56* (1), σσ. 104-11.

- Chou C.H, Bennett G.N, San K.Y. (1994, June 3). Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in Escherichia coli dense cultures. *Biotechnol Bioeng* , σσ. 952-960.
- David Kennell and Howard Riezman. (1977). Transcription and Translation Initiation Frequencies of the Escherichia coli lac Operon. *J.Mol.Biol* , 1-21.
- F. William Studier. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein and Expression Purification* , 207-234.
- F.A. Rainey, A.M. Donnison, P.H. Janssen, D. Saul, A. Rodrigo, P.L. Bergquist, R.M. Daniel, E. Stackebrandt, H.W. Morgan. (1994). Description of Caldicellulosiruptor saccharolyticus gen. nov., sp. nov: An obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. Στο *FEMS Microbiology Letters* (σσ. 263-266).
- German L.Rosano, Eduardo A.Ceccarelli. (2014, April). Recombinant protein expression in Escherichia Coli: advances and challenges. *frontiers in Microbiology* .
- Gopal Singh, A. K. Verma and Vinod Kumar. (2016). Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech* , 6 (1).
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Haq Nawaz Bhatti, Samia Batool and Nosheen Afzal. (2013). Production and Characterization of a Novel β -Glucosidase from Fusarium solani. *International Journal of Agriculture and Biotechnology* , 140-144.
- Harmen J. G. van de Werken, Marcel R. A. Verhaart, Amy L. VanFossen, Karin Willquist, Derrick L. Lewis, Jason D. Nichols, Heleen P. Goorissen, Emmanuel F. Mongodin, Karen E. Nelson, Ed W. J. van Niel, Alfons J. M. Stams, Donald E. Ward, Willem M. de Vos, . (2008, September 5). Hydrogenomics of the Extremely Thermophilic Bacterium Caldicellulosiruptor saccharolyticus. *American Society for Microbiology* .
- Hiroshi Takagi, Yasushi Morinaga, Makoto Tsuchiya, Haruo Ikemura & Masayori Inouyea . (1988, August 01). Control of Folding of Proteins Secreted by a High Expression Secretion Vector, pIN-III-ompA: 16-Fold Increase in Production of Active Subtilisin E in Escherichia Coli. *Nature Biotechnology* , σσ. 948-950.
- Hong-Bin Zhang , Xiao-Qing Mao, Ya-Jie Wang and Xue-Qin Hu. (2009). Optimization of culture conditions for high-level expression of dextransucrase in Escherichia coli. *Journal of Food, Agriculture & Environment* , 75-78.
- J.Kruger, N. (2009). The Bradford Method For Protein Quantitation. Στο *The Protein Protocols Handbook* (σσ. 17-24).
- J.M. Johnson, F.D. Conforti. (2003). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition).

Jingyuan Song, Hiroyuki Imanaka, Koreyoshi Imamura, Kouichi Kajitani and Kazuhiro Nakanishi. (2010, April 27). Development of a highly efficient indigo dyeing method using indican with an. *The Society for Biotechnology* , σσ. 281-287.

Kaprálek.F, Jecmen.P, Sedláček.J, Fábry.M, Zadrzil S. (1991, Jan 5). Fermentation conditions for high-level expression of the tac-promoter-controlled calf prochymosin cDNA in Escherichia coli HB101. *Biotech Bioeng* (37), σσ. 71-79.

Karin Willquist, Sudhanshu S Pawar & Ed WJ Van Niel . (2011, December 21). Reassessment of hydrogen tolerance in Caldicellulosiruptor saccharolyticus. *Microbial Cell Factories* .

Karoline Marisch, Karl Bayer, Monika Cserjan-Puschmann, Markus Luchner and Gerald Striedner. (2013). Evaluation of three industrial Escherichia Coli strains in fed-batch cultivation during high-level SOD protein production. *Microbial Cell Factories* .

L. Briand, G. Marcion, A. Kriznik, J. M. Heydel, Y. Artur, C. Garrido, R. Seigneuric & F. Neiers. (2016, September 9). A self-inducible heterologous protein expression system in Escherichia Coli.

Laemmli. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,. *Nature* 227 , σσ. 680-685.

Maria P. MacWilliams & Min-Ken Liao. (2006, October 09). Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol. *American Society for Microbiology* .

Martinez Daniel Calleja. (2014, September). Modeling bioreactors for the production of recombinant proteins in high cell density cultures of Escherichia Coli.

Meng Yao, Jing Wang, Lei Wu, Lu Min, Wen-Ying Li, Ling-Yun Zhu, Er Meng & Dong-Yi Zhang. (2017, March 6). An efficient strategy for the expression of Jingzhaotoxin-III in Escherichia coli. *Pharmaceutical Biotechnology* .

Michael J. Kosinski, Ursula Rinas, and James E. Bailey . (1992). Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of Escherichia coli . *Applied Microbiology and Biotechnology* , σσ. 782-784.

Necmettin Yildirim, Caner Kazanci. (2011). Chapter twelve - Deterministic and Stochastic Simulation and Analysis of Biochemical Reaction Networks: The Lactose Operon Example. Στο *Methods in Enzymology* (σσ. 371-395).

Neha Srivastava, Rishabh Rathour , Sonam Jha, Karan Pandey, Manish Srivastava, Vijay Kumar Thakur, Rakesh Singh Sengar, Vijai K. Gupta, Pranab Behari Mazumder, Ahamad Faiz Khan and Pradeep Kumar Mishra. (2019, June 6). Microbial Beta Glucosidase Enzymes: Recent Advances in Biomass Conversation for Biofuels Application. *biomolecules* .

Neubauer. P, Hofmann. K. (1994, 14 May). Efficient use of lactose for the lac promoter-controlled overexpression of the main antigenic protein of the foot and mouth disease virus in Escherichia coli under fed-batch fermentation conditions. *FEMS Microbiol Rev* , 14 (1), σσ. 99-102.

Nupoor Chowdhary, Ashok Selvaraj, Lakshmi KrishnaKumaar, Gopal Ramesh Kumar. (2015, July 21). Genome Wide Re-Annotation of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* with New Insights into Genes Involved in Biomass Degradation and Hydrogen Production. *Plos One* .

P. Neubauer, K. Hofmann, O. Holst, B. Mattiasson, P. Kruschke. (1992). Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 36 (6), σσ. 739-744.

Reeta Rani Singhania , Anil Kumar Patel , Rajeev K. Sukumaran , Christian Larroche , Ashok Pandey. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. Στο *Bioresource Technology* (σσ. 500-507).

RS Donovan, CW Robinson and BR Glick. (1996). Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology* , σσ. 145-154.

Ryan W, Parulekar SJ, Stark BC. (1989). Expression of beta-lactamase by recombinant *Escherichia coli* strains containing plasmids of different sizes--effects of pH, phosphate, and dissolved oxygen. Στο *Biotechnology and bioengineering* (σσ. 309-319).

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (2η εκδ.).

Sarah W. Harcum and William E. Bentley. (1993, March 22). Response Dynamics of 26-, 34-, 39-, 54-, and 80-kDa Proteases in Induced Cultures of Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* , 42 (6), σσ. 675-685.

Shaoqing Yang, Chengwei Hua, Qiaojuan Yan, Yinan Li , Zhengqiang Jianga. (2013). Biochemical properties of a novel glycoside hydrolase family 1 -glucosidase (PtBglu1) from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Pichia pastoris*. Στο *Carbohydrate Polymers* (σσ. 784-791).

Shaoqing Yang, Zhengqiang Jiang, Qiaojuan Yan and Huifang Zhu. (2008). Characterization of a Thermostable Extracellular β -Glucosidase with Activities of Exoglucanase and Transglycosylation from *Paecilomyces thermophila*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 602-608.

Sissons CH, Sharrock KR, Daniel RM, Morgan HW. (1987, April). Isolation of cellulolytic anaerobic extreme thermophiles from new zealand thermal sites. *Appl Environ Microbiol.* , 53 (4), σσ. 832-838.

Steven L.Roderick. (2005). *The lac operon galactoside acetyltransferase*. *Comptes Rendus Biologies*.

Surek B., Wilhelm M, Hillen W. (1991, January). Optimizing the promoter and ribosome binding sequence for expression of human single chain urokinase-like plasminogen activator in *Escherichia coli* and stabilization of the product by avoiding heat shock response. *Appl Microbiol Biotechnol.* , 34 (4), σσ. 488-494.

William E. Bentley, Robert H. Davis, and Dhinakar S. Kompala. (1991, 20 February). Dynamics of Induced CAT Expression in E.Coli. *Biotechnology and Bioengineering* , 38 (7), σσ. 749-760.

William E. Bentley, Noushin Mirjalili, Dana C. Andersen, Robert H. Davis and Dhinakar S. Kompala. (1990). Plasmid-Encoded Protein: The Principal Factor in the “Metabolic Burden” Associated with Recombinant Bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* , 35 (7), σσ. 668-681.

Williams Beverley and Paigen Kenneth. (1968). Relationships between the regulation of the lactose and galactose operons in Escherichia Coli. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* , 769-775.

Xu J., Banerjee A., Pan S., Li Z.J. (2012). Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using E. coli BL21 strains. Στο *Protein Expression and Purification* (σσ. 30-36).

Yannick Gueguen, Patrick Chemardin, Stephane Pien, Alain Arnaud , Pierre Galzy. (1997). Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized b-glucosidase. *Journal of Biotechnology* , 51-56.

Zhang Z., Wang M., Gao R., Yu X., Chen G. (2017, February 27). Synergistic effect of thermostable b-glucosidase TN0602 and cellulase on cellulose hydrolysis. *3 Biotech* .

Zhaopeng Li, Manfred Nimtz, Ursula Rinas. (2014). The metabolic potential of Escherichia Coli BL21 in defined and rich medium. *Microbial Cell Factories* .