

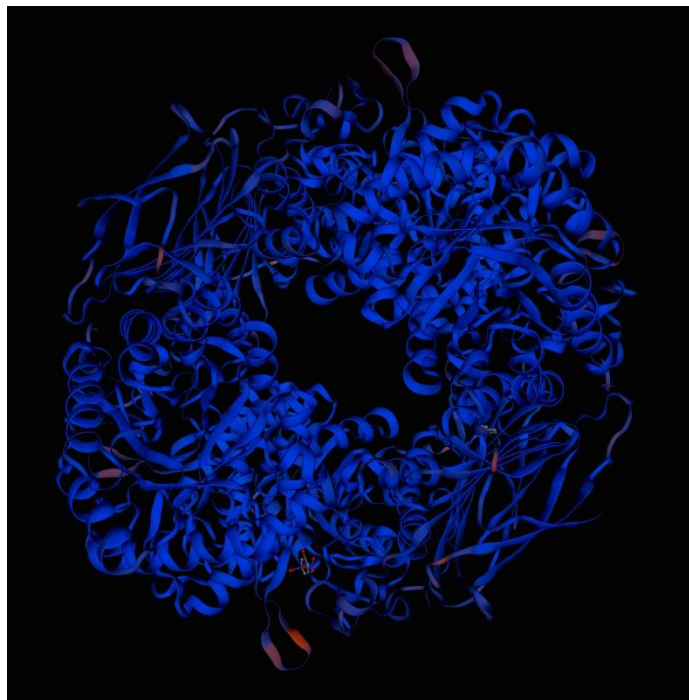
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ



**ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΑΠΟΜΪΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ  
ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ Β-ΞΥΛΟΖΙΔΑΣΗΣ sp24 ΑΠΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΟ  
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *E. COLI* BL21**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΙΝΗ ΙΩΑΝΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΕΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2020



## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο "Παραγωγή, Απομόνωση και Χαρακτηρισμός της θερμοσταθερής β-ξυλοζιδάσης sr24 από Μετασχηματισμένο Βακτηριακό Στέλεχος E.coli BL21" εκπονήθηκε κατά το έτος 2019 – 2020 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.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Δημήτρη Κέκο, για την εκπαιδευτική καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εργασία αυτή, δίνοντάς μου την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα θέμα του άμεσου ενδιαφέροντός μου 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.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια Διομή Μαμμά και τη Δρ Στέλλα Καλαντζή για την συμπαράσταση και καθοδήγηση τους και για την προσφορά γνώσεων και συμβουλών σε οποιοδήποτε πρόβλημα και δυσκολία συνάντησα κατά την επιτέλεση της εργασίας μου. 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. Ακόμα, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην μεταπτυχιακή ερευνήτρια Κοάρ Χοροζιάν, για το χρόνο της και τις γνώσεις της που διέθεσε καθώς και την άψογη συνεργασία μας σε όλη την πορεία της εργασίας.

Θα ήθελα φυσικά να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία, το ομαδικό πνεύμα, τη βοήθεια που μου παρείχαν όποτε τη χρειάστηκα αλλά και για τις ωραίες αναμνήσεις κατά το έτος αυτό.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για την πίστη, για την συμπαράσταση και στήριξη που συνέχισαν να δείχνουν σε εμένα καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας αλλά και όλα αυτά τα πέντε χρόνια σπουδών.



## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η βελτιστοποίηση της ετερόλογης έκφρασης μίας θερμοσταθερής β-ξυλοζιδάσης από το βακτήριο *Geobacillus* sp.24. Το γονίδιο του ενζύμου κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pET15b. Με θερμοεπαγόμενο μετασχηματισμό, έγινε εισαγωγή του πλασμιδίου φορέα, στα δεκτικά βακτήρια *E. coli* BL21 (DE03). Έτσι τα βακτηριακά κύτταρα εκφράζουν το ενζυμο της β-ξυλοζιδάσης και χρησιμοποιούνται ως εμβόλιο στις καλλιέργειες που μελετήθηκαν.

Διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του IPTG (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μM) στην παραγωγή του ενζύμου β-ξυλοζιδάσης και βρέθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση είναι τα 20μM στους 37°C σε 180 στροφές rpm και θρεπτικό μέσο LB, καθώς στις 12 ώρες ανάπτυξης η ενεργότητα του ενζύμου ανιχνεύθηκε στα 0,29 Units/mg DCW. Αντίθετα, σε θρεπτικό μέσο minimal glucose με πηγή άνθρακα γλυκόζη, εξετάστηκαν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις IPTG (20 και 40μM), και η μέγιστη ενεργότητα ανήλθε σε 0,20 Units/mg DCW στη συγκέντρωση 40 μM IPTG στις 15 ώρες.

Εν συνεχεία μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας επαγωγής (20°C, 27°C, 30°C και 37°C) στην παραγωγή του ενζύμου β-ξυλοζιδάση για συγκέντρωση IPTG 20μM. Η βέλτιστη ήταν στους 37°C με ενεργότητα του ενζύμου στα 0,29 Units/mg DCW στις 12 ώρες ανάπτυξης.

Ακολούθως μελετήθηκε το φαινόμενο της αυτεπαγωγής όπου η ίδια πηγή άνθρακα λειτουργεί και ως μέσο ανάπτυξης του κυττάρου και ως επαγωγέας της β-ξυλοζιδάσης. Οι πηγές άνθρακα που επιλέχθηκαν ήταν: (α) γλυκόζη, (β) λακτόζη και (γ) γαλακτόζη. Ως βέλτιστο σύστημα αυτεπαγωγής λειτούργησε αυτό που είχε ως πηγή άνθρακα την λακτόζη με μέγιστη ενεργότητα 0,18 Units/mg DCW στις 23 ώρες, αντίθετα το αυτεπαγόμενο σύστημα με πηγή άνθρακα την γαλακτόζη εμφάνισε μικρή αύξηση της κυτταρικής ανάπτυξης και μηδενική επαγωγή της πρωτεΐνης.

Μελετήθηκαν επίσης καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο γλυκόζης και επαγωγέα λακτόζης και γαλακτόζης διαφορετικών συγκεντρώσεων 1, 2, 5, 10, 15 g/L. Βρέθηκε βέλτιστη συγκέντρωση τα 10 g/L λακτόζης και γαλακτόζης αντίστοιχα, στα οποία εκτιμήθηκε η ενζυμική ενεργότητα στα 0,17 Units/mg DCW στις 33 ώρες στην περίπτωση της λακτόζης και 0,15 Units/mg DCW στις 34 ώρες στην περίπτωση της γαλακτόζης.

Για την απομόνωση της β-ξυλοζιδάσης, παράχθηκε σε μεγαλύτερη κλίμακα κυτταρική καλλιέργεια ανασυνδυασμένων κυττάρων *E.coli* με την β-ξυλοζιδάση. Ακολούθησε ο καθαρισμός της πρωτεΐνης και ο χαρακτηρισμός. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με σπάσιμο κυττάρων με υπερήχους, ο καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης Talon, διάταξη

Amicon και εξισορρόπηση στο επιθυμητό pH (dialysis), ενώ ο χαρακτηρισμός περιελάμβανε pH, T (°C) δράσης και σταθερότητας (υπολογισμός  $k_d$ ,  $t_{1/2}$  και D), επίδραση οργανικών διαλυτών, μεταλλοιδόντων, SDS και EDTA στην ενεργότητα του ενζύμου, η παρεμπόδιση από την ξυλοζη, η δραστικότητα σε διάφορα υποστρώματα, κινητική και θερμοδυναμική μελέτη ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ,  $E_a$ ,  $\Delta H^*$ ,  $\Delta G^*$ ,  $\Delta S^*$ ,  $\Delta G^*_{E-S}$  και  $\Delta G^*_{E-T}$ ) και η δράση της β-ξυλοζιδάσης σε ξυλοολιγοσακχαρίτες με χρωματογραφία χάρτου (TLC).

Τέλος, βρέθηκε η πιθανή δομή της πρωτεΐνης από την αμινοξική αλληλουχία της με το πρόγραμμα Swiss modeling tool ExPASy, συγκρίθηκε με άλλες παρόμοιες β-ξυλοζιδάσες ως προς την αμινοξική αλληλουχία της και κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο με βάση β-ξυλοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από άλλα βακτήρια.

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες .....	3
Περίληψη .....	5
1.Θεωρητικό Μέρος .....	11
1.1 Εισαγωγή .....	11
1.1.1 Σχετικά με τον <i>Geobacillus sp24</i> .....	11
1.1.2. Η χρήση του <i>E.coli</i> ως σύστημα έκφρασης.....	12
1.2 Μεταγραφική ρύθμιση του <i>lac</i> υποκινητή .....	13
1.3 Έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών υπό την ρύθμιση του <i>lac</i> υποκινητή.....	15
1.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας.....	16
1.3.2 Επίδραση της συγκέντρωσης IPTG .....	16
1.3.3 Επίδραση της σύστασης του θρεπτικού μέσου .....	18
1.3.4 Επίδραση της συγκέντρωσης της γλυκόζης.....	18
1.3.5 Επίδραση της χρονικής στιγμής προσθήκης του επαγωγέα και της διάρκειας της επαγωγής .....	19
1.4 Χρήση της λακτόζης και της γαλακτόζης ως επαγωγέα.....	20
1.5 Αυτοεπαγώμενα συστήματα.....	20
1.6 Ξυλανολυτικά ένζυμα.....	21
1.6.1 β-D-ξυλοζιδάση.....	21
1.6.2 Γλυκοζιλοϋδρολάσες (GH οικογένειες) .....	24
1.6.2.1 Γλυκοζιλοϋδρολάση, οικογένεια GH39 .....	24
1.7 Εφαρμογές β-ξυλοζιδάσης .....	25
2.ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ .....	29
2.1.Υλικά .....	29
2.1.1. Όργανα και Συσκευές .....	29
2.1.2. Αντιδραστήρια- Τυποποιημένα Χημικά Παρασκευάσματα (kits).....	29
2.1.3. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers) και λοιπά διαλύματα .....	29
2.2. Μικροοργανισμοί και Μέθοδοι Ανάπτυξης των Μικροοργανισμών .....	30
2.2.1. Στελέχη μικροοργανισμών.....	30

2.2.2. Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών .....	30
2.2.3. Ανάπτυξη τροποποιημένου οργανισμού (Προκαλλιέργεια).....	30
2.2.4. Καλλιέργεια επιδεικτικών κυττάρων .....	31
2.3 Μέθοδοι ανάλυσης .....	33
2.3.1 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας.....	33
2.3.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνών .....	36
2.3.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit).....	36
2.3.4 Προσδιορισμός ολικών αναγωγικών σακχάρων .....	38
2.3.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακριμιδίου (SDS-PAGE) .....	38
2.4 Καθαρισμός β-ξυλοζιδάσης.....	41
2.5 Χαρακτηρισμός β-ξυλοζιδάσης .....	44
2.5.1 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης και προσδιορισμός θερμικής σταθερότητας της β-ξυλοζιδάσης.....	44
2.5.2 Εύρεση βέλτιστου pH δρατικότητας ενζύμου και προσδιορισμός σταθερότερου pH..	44
2.5.3 Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες .....	44
2.5.4 Επίδραση ιόντων μετάλλων, EDTA και SDS στη δρατικότητα της β-ξυλοζιδάσης.....	45
2.5.5 Εξειδίκευση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα .....	45
2.5.6. Εύρεση κινητικών σταθερών της β-ξυλοζιδάσης σε υποστρώμα οNPX .....	46
2.5.7 Παρεμπόδιση από την ξυλόζη .....	46
2.5.8. Υδρόλυση ξυλοολιγοσακχαριτών .....	46
2.5.8.1 Χρωματογραφία χάρτου TLC .....	46
2.6 Βιοπληροφορική Μελέτη .....	48
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση .....	49
3.1 Παραγωγή β-ξυλοζιδάσης με θρεπτικό μέσο LB .....	49
3.1.1 Παραγωγή β-ξυλοζιδάσης για διάφορες συγκεντρώσεις επαγωγέα .....	49
3.1.2 Παραγωγή β-ξυλοζιδάσης για διάφορες θερμοκρασίες επαγωγής με επαγωγέα IPTG ....	53
3.2. Παραγωγή β-ξυλοζιδάσης σε αυτεπαγώμενα συστήματα .....	56
3.2.1. Παραγωγή β-ξυλοζιδάσης με χρήση λακτόζης ως επαγωγέα.....	58



3.2.2. Παραγωγή β-ξυλοζιδάσης με χρήση γαλακτόζης ως επαγωγέας .....	62
3.2.3. Σύγκριση επαγωγικής ικανότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων IPTG σε θρεπτικό μέσο Minimal Glucose .....	65
3.2 Καθαρισμός ενζύμου .....	69
3.2.1 Ηλεκτροφόρηση β-ξυλοζιδάσης σε πήκτωμα πολυακρυμιδίου (SDS-PAGE).....	70
3.3 Χαρακτηρισμός β-ξυλοζιδάσης .....	72
3.3.1 Βέλτιστη θερμοκρασία του ενζύμου και σταθερότητά του σε διαφορετικές θερμοκρασίες .....	72
3.3.2 Βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου και σταθερότητά του σε διαφορετικά pH .....	75
3.3.3 Ενζυμική σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες.....	78
3.3.4 Ενζυμική σταθερότητα σε μεταλλοϊόντα, EDTA και SDS.....	79
3.3.5 Δραστηκότητας του ενζύμου σε άλλα υποστρώματα.....	80
3.3.6 Κινητική μελέτη του ενζύμου β-ξυλοζιδάση .....	80
3.3.7 Αναστολή από την ξυλόζη .....	84
3.3.8 Αποτελέσματα TLC.....	86
3.4 Βιοπληροφορική Μελέτη .....	87
4.Συμπεράσματα .....	93
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	99
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	102



# 1.Θεωρητικό Μέρος

## 1.1 Εισαγωγή

### 1.1.1 Σχετικά με τον *Geobacillus sp24*

Η β-ξυλοζιδάση απομονώθηκε από τον μικροοργανισμό *Geobacillus sp24*. Πρόκειται για ένα στέλεχος γεωβάκιλλου, του κλάδου «kaustophilus», το οποίο έχει συλλεχθεί από την περιοχή της Νέας Καμένης στην Σαντορίνη.

Τα διαφορετικά είδη του γένους των γεωβακίλλων (*Geobacillus sp*) είναι θετικά κατά gram αερόβια βακτήρια, ή δυνητικά αναερόβια σε σχήμα ράβδου που σχηματίζουν σπόρια (Hussein *et al.*, 2015). Πριν το 2001, είχαν ταξινομηθεί στην ευρύτερη ομάδα των βακίλλων ως θερμόφιλες παραλλαγές του γένους bacillus. Όμως ύστερα από συσσώρευση διαφόρων αποδείξεων ομαδοποιήθηκαν ως μία διαφορετική υποομάδα θερμόφιλων μικροοργανισμών που υποστηρίζεται από την ανάλυση του 16s rRna, αναταξινομώντας τους στο ξεχωριστό γένος *Geobacillus* (Nazina *et al.*, 2001). Το πιο χαρακτηριστικό είδος του γένους των γεωβακίλλων είναι το θερμόφιλο βακτήριο *Geobacillus stearothermophilus* (Brux *et al.*, 2006).

Η πλειοψηφία των στελεχών του γένους των γεωβακίλλων μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα εύρος θερμοκρασίας από 45 έως 70°C ενώ μπορούν σχετικά εύκολα να απομονωθούν από διάφορες περιοχές (κυρίως ζεστά περιβάλλοντα) όπως γεωργικές εκτάσεις, ιαματικές πηγές, βαθιές γεωθερμικές τοποθεσίες, θερμές πηγές, πετρελαϊκά πετρώματα και ιζήματα βαθέων υδάτων. Ωστόσο, εδώ και καιρό είναι γνωστό πως οι γεωβάκιλλοι μπορούν να απομονωθούν από ένα ευρύ φάσμα ενδιαιτημάτων με σχετικά χαμηλή θερμοκρασία, όπως εύκρατα εδάφη, θαλάσσιοι τάφροι και ορεινές περιοχές. Επίσης έχουν απομονωθεί και από τρόφιμα όπως ραφινάρισμα ζάχαρης, κονσερβοποιημένα τρόφιμα, αφυδατωμένα λαχανικά και από απόβλητα εργοστασίων γαλακτοκομικών προϊόντων. Κάποια στελέχη, μπορούν να αναπτύσσονται ιδιαίτερα ικανοποιητικά σε θερμοκρασίες που δεν ξεπερνούν τους 30°C. Αυτή η παράδοση κατανομή αποδίδεται στην ικανότητα των γεωβακίλλων να παράγουν σπόρια (Zeigler *et al.*, 2014).

Είναι καλά τεκμηριωμένο πως τόσο το γένος *Bacillus* όσο και το *Geobacillus* μπορούν να παράγουν ενδοσπόρια και να είναι εξαιρετικά ανθεκτικά στην υπεριώδη ακτινοβολία UV, την αποξήρανση και την θερμική απενεργοποίηση (Setlow *et al.*, 2006). Επιπλέον, τα σπόρια των γεωβακίλλων όταν απελευθερωθούν στην κατώτερη ατμόσφαιρα, χάρη στο μικρό τους μέγεθος έχουν την δυνατότητα να παραμένουν αερομεταφερόμενα για πολύ περισσότερο από

ότι ένα τυπικό βακτήριο. Τα ενδοσπόρια των γεωβακίλλων έχουν διάμετρο περίπου 1 μm και μπορούν να παραμένουν στην ατμόσφαιρα σε αναστολή για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Burrows *et al.*, 2009). Η ικανότητα λοιπόν αυτή των ενδοσπορίων να παραμένουν σε αναστολή για μεγάλες χρονικές περιόδους αρκεί, ώστε να γίνονται διηπειρωτικές μετακινήσεις των γεωβακίλλων και μπορεί να εξηγήσει εύκολα την ευρεία διανομή των σπορίων των διαφόρων ειδών του γένους των γεωβακίλλων σε περιοχές όπου είναι ανέκιστα τα συγκεκριμένα βακτήρια να επιβιώσουν και να αναπαραχθούν. Τέλος, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για το γένος *Geobacillus* για βιοτεχνολογικούς σκοπούς, όπως για βιοαποκατάσταση, παραγωγή θερμοσταθερών ενζύμων και βιοκαυσίμων (Burgess *et al.*, 2017)

Αναλυτικά η συστηματική κατάταξη του γένους μέσα στο βασίλειο των βακτηρίων είναι:

**(Βασίλειο)** Bacteria › **(Φύλο)** Firmicutes › **(Ομοταξία)** Bacilli › **(Τάξη)** Bacillales › **(Οικογένεια)** Bacillaceae › **(Γένος)** *Geobacillus* › unclassified *Geobacillus* (*kaustophilus* sp24)

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

Το *E. coli* είναι ένας από τους συνηθέστερα χρησιμοποιούμενους ξενιστές για την έκφραση ετερόλογων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, σε εργαστηριακές εργασίες και στη βιομηχανική παραγωγή.

Το βακτήριο *Escherichia coli* χρησιμοποιείται ευρύτατα για την παραγωγή βιομορίων. Πρόκειται για έναν μικροοργανισμό που ζει στο παχύ έντερο των θερμόαιμων ζώων και ανήκει στα προκαρυωτικά κύτταρα με κυκλικό DNA. Είναι προαιρετικά αναερόβιος, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις αναπτύσσεται και σε αερόβιες συνθήκες. Σημαντικό πλεονέκτημα του μικροοργανισμού αποτελούν οι διατροφικές του απαιτήσεις καθώς μπορεί και μεταβολίζει ένα μεγάλο εύρος 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 *et al.*, 2014).

Γνωστά στελέχη του μικροοργανισμού είναι τα *E.coli* K12 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 μπορεί να δράσει 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 μη τροποποιημένων ετερόλογων ανασυνδυασμένων 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 διεργασίες καθώς σε μερικές ώρες έχει επέλθει η στάσιμη φάση (Rosano & Ceccarelli *et al.* 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, υπάρχουν κάποιες δυσκολίες στη χρήση του ως ξενιστή. Το *E. coli* όταν χρησιμοποιεί γλυκόζη ως πηγή άνθρακα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του, παράγει ως παραπροϊόν οξικό οξύ (ακόμη και σε αερόβιες συνθήκες). Η παραγωγή οξικού οξέος αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη. Επιπλέον, καθώς πρόκειται για προκαρυωτικό μικροοργανισμό, δεν έχει την δυνατότητα να πραγματοποιήσει μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως τα συστήματα αυτά παράγουν ανενεργές πρωτεΐνες και 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 *et al.*, 2014).

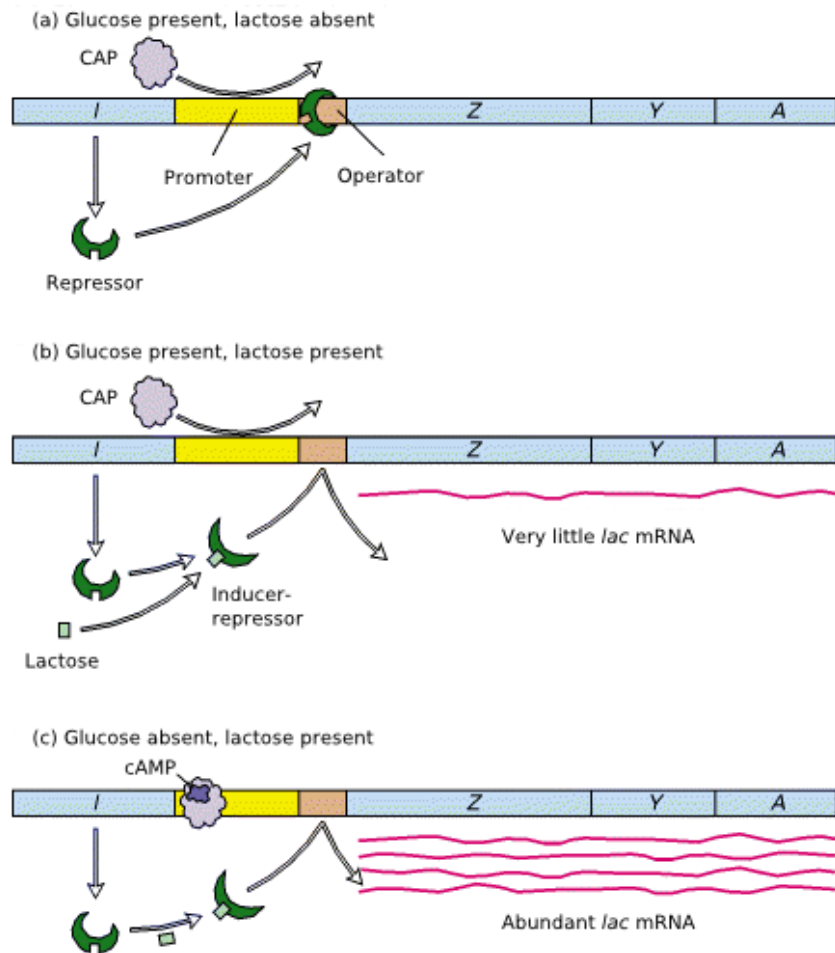
## 1.2 Μεταγραφική ρύθμιση του *lac* υποκινητή

Το οπερόνιο της λακτόζης σε wild type *E.coli* περιέχει τρία γονίδια (*lacZ*, *lacY*, *lacA*) τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες για τον μεταβολισμό του σακχάρου λακτόζης. Το *lacZ* γονίδιο κωδικοποιεί μια β-γαλακτοζιδάση που μετατρέπει την λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Το *lacY* γονίδιο κωδικοποιεί την περμεάση της λακτόζης που καταλύει την μεταφορά της μέσα στο κύτταρο, και το *lacA* γονίδιο κωδικοποιεί μια τρανσακετυλάση που συμμετέχει στην αποτοξικοποίηση του κυττάρου από τοξικά ανάλογα λακτόζης.

Η μεταγραφή απ'τον *lacUV5* υποκινητή ρυθμίζεται από τον *lac* καταστολέα, προϊόν του γονιδίου *lacI*. Απουσία επαγωγέα, (λακτόζης, IPTG, γαλακτόζης) ο *lac* καταστολέας σταματά την μεταγραφή του *lac* υποκινητή, καθώς προσδένεται στον χειριστή (operator, ρυθμιστική

περιοχή DNA) του οπερονίου ο οποίος βρίσκεται ανάμεσα στον υποκινητή και στο γονίδιο *lacZ*. Όταν ο καταστολέας είναι συνδεδεμένος με τον χειριστή, εμποδίζεται η κανονική πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή, και η μεταγραφή του οπερονίου δεν πραγματοποιείται. Η χημική ισορροπία ελεύθερου καταστολέα – δεσμευμένου καταστολέα επιτρέπει την ύπαρξη μιας μόνιμης πολύ χαμηλής μεταγραφής των *lac* γονιδίων. Όταν στο κύτταρο ανιχνευτεί λακτόζη ή άλλα γαλακτοσίδια, η μεταγραφή των *lac* γονιδίων αυξάνεται κατά χίλιες φορές. Η αύξηση αυτή οφείλεται στη μετατροπή της λακτόζης σε αλλολακτόζη, από το ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης. Η αλλολακτόζη συνδέεται στον καταστολέα αλλάζοντας την στερεοδιαμόρφωση, μειώνοντας σημαντικά την συγγένεια της σύνδεσης καταστολέα-χειριστή. Επομένως ο υποκινητής είναι ελεύθερος και η RNA πολυμεράση ξεκινά την μεταγραφή.

Η μεταγραφή του *lac* υποκινητή ρυθμίζεται επίσης από την σύνδεση σε αυτόν, της πρωτεΐνης CAP (catabolite activator protein). Όταν η CAP συνδέεται στον υποκινητή, αυξάνει τη συγγένεια του υποκινητή με την RNA πολυμεράση, αυξάνοντας τον μεταγραφικό ρυθμό του οπερονίου. Η CAP συσχετίζεται και με το cAMP. Αυξημένα επίπεδα cAMP στο κύτταρο σημαίνουν πολύ χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης στη διάθεση του κυττάρου. Η σχέση ισχύει και αντίστροφα. Επομένως με την προϋπόθεση ότι ο χειριστής είναι ελεύθερος καταστολέα, η αυξημένη συγκέντρωση cAMP οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση cAMP-CAP συμπλόκου στον υποκινητή και σε αυξημένα επίπεδα μεταγραφής. Η καταβολική απενεργοποίηση της μεταγραφής του οπερονίου, επιτρέπει στο βακτήριο *E.coli* να μεταβολίζει με προτεραιότητα την γλυκόζη και μετά την λακτόζη όταν στο θρεπτικό υπάρχει μίγμα σακχάρων (Donovan *et al.*, 1996).



Εικόνα 1: Έλεγχος του οπερονίου της λακτόζης σε σχέση με τη συγκέντρωση γλυκόζης και λακτόζης στο κύτταρο.

### 1.3 Έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών υπό την ρύθμιση του lac υποκινητή.

Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος παραγόντων που επηρεάζουν την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών στο *E.coli* BL21 στέλεχος. Γενικά, η παρουσία ανασυνδιασμένου πλασμιδίου μειώνει τη διαθέσιμη μεταβολική ενέργεια του κυττάρου. Αυτό το ενεργειακό φορτίο μπορεί να μειώσει τον ρυθμό ανάπτυξης της καλλιέργειας. Στέλεχος όπως το BL21 που έχει γενετικά τροποποιημένο μεταβολικό προφίλ ξεπερνά το πρόβλημα αυτό. Συνολικά, οι παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο είναι (RS Donovan *et al.*, 1996):

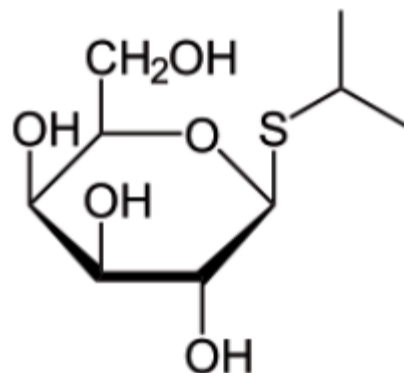
- η θερμοκρασία της καλλιέργειας,
- η σύσταση του θρεπτικού μέσου,
- η συγκέντρωση επαγωγέα,
- η χρονική φάση επαγωγής και
- η διάρκεια επαγωγής.

### 1.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης για το *E.coli* είναι οι 37-39°C. Ενώ αυτή η θερμοκρασία είναι βέλτιστη και για την λειτουργία του *lac* υποκινητή, έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση χαμηλότερων θερμοκρασιών μειώνει τις ανεπιθύμητες μεταβολικές αποκρίσεις του κυττάρου όταν σε αυτό παράγεται εξαναγκασμένη μαζική παραγωγή πρωτεΐνης. Επομένως σε χαμηλότερες θερμοκρασίες παρατηρείται υψηλότερη απόδοση στην παραγωγή πρωτεΐνης στόχου. Η κατακρήμνιση υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών που σχηματίζουν συσσωματώματα (inclusion bodies) αποφεύγεται με την χρήση χαμηλότερων θερμοκρασιών. Ακόμη, χαμηλότερες των 37°C εξυπηρετούν στην ορθή αναδίπλωση/πτύχωση των πρωτεϊνών κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Τέλος, το φαινόμενο κατά το οποίο εκκρινόμενες πρωτεΐνες οδηγούν στην λύση του κυττάρου και θάνατο, αποφεύγεται όταν η θερμοκρασία μειωθεί από τους 37°C στους 20-30°C. (RS Donovan *et al.*, 1996)

### 1.3.2 Επίδραση της συγκέντρωσης IPTG

Ο IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) είναι μία χημική ένωση η οποία χρησιμοποιείται συχνά στην μοριακή βιολογία. Πρόκειται για ένα μόριο το οποίο είναι μη μεταβολιζόμενο ανάλογο της αλλολακτόζης, που ενεργοποιεί την μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης και χρησιμοποιείται για να επάγει την πρωτεϊνική έκφραση. Ο IPTG είναι ένας ευρέως φύσης επαγωγέας του *lac* υποκινητή, καθώς προσδέεται με τον καταστολέα και δεν του επιτρέπει να συνδεθεί με τον χειριστή. Ο IPTG είναι ένα μεταβολικά ελεύθερο μόριο που δεν καταβολίζεται μέσα στο κύτταρο. Το εύρος συγκέντρωσης IPTG που χρησιμοποιείται συνήθως



Εικόνα 2: Μοριακή δομή του IPTG



είναι από 0,005 mM έως 5 mM στο θρεπτικό μέσο κατά την φάση επαγωγής. Σε πολλές περιπτώσεις, ιδανική συγκέντρωση επαγωγέα, επιλέγεται εκεί που ο ρυθμός ανάπτυξης της μετασχηματισμένης καλλιέργειας μειώνεται, ενώ η παραγωγή της πρωτεΐνης στόχου αυξάνεται. Η επαγωγή με χρήση IPTG έχει εμφανίσει μια πληθώρα στρεσογόνων συνεπειών στο κύτταρο. Σε wild type *E.coli* η προσθήκη 0,5 mM IPTG προκαλεί την παραγωγή heat shock πρωτεϊνών μετά το πέρας μισής ώρας. Επιπλέον επηρεάζεται ο ρυθμός αποικοδόμησης κακώς πτυχωμένων πρωτεϊνών που μπορεί να υπάρχουν μέσα στο κύτταρο, υπό την παρουσία IPTG. Φυσικά, η ποσότητα του καταστολέα που υπάρχει μέσα στο κύτταρο θα επηρεάσει και την ποσότητα του IPTG που απαιτείται για την δέσμευσή του σε αυτόν έτσι ώστε να τον απενεργοποιήσει. Για παράδειγμα, τα πλασμίδια υψηλής αντιγραφής που μεταγράφουν πολλά αντίγραφα *lac* χειριστών, θα είναι σε μόνιμη σύνδεση με φυσικούς καταστολείς που κωδικοποιεί το *lacI* γονίδιο του χρωμοσωμικού DNA του βακτηρίου. Οπότε η συγκέντρωση του απαιτούμενου IPTG μπορεί να είναι αρκετά χαμηλή, της τάξης του 0.001-0.1 mM. Τα χαρακτηριστικά της εκάστοτε πρωτεΐνης, η ορθή της πτύχωση, καθώς και η κυτταρική τοπολογία της πρωτεΐνης, επηρεάζουν την συγκέντρωση του IPTG που θα επάγει τη μέγιστη ποσότητα πρωτεΐνης στόχου. Χαμηλές συγκεντρώσεις IPTG χρειάζονται συνήθως οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες ή οι πρωτεΐνες χαμηλής διαλυτότητας. Αντίθετα, στις περιπλασμικές πρωτεΐνες αυξάνεται το ποσοστό παραγωγής τους σε πιο ψηλές συγκεντρώσεις IPTG. Συγκεντρωτικά, η ποσότητα IPTG που θα προκαλέσει τη μέγιστη απόδοση επαγωγής εξαρτάται από :

- την ισχύ του υποκινητή
- την παρουσία ή απουσία γονιδίου *lacI* στο πλασμίδιο
- την τοπολογία της εκφρασμένης πρωτεΐνης
- την απόκριση του κυττάρου στη παρουσία ανασυνδιασμένου πλασμιδίου και ξένου για αυτό πρωτεϊνικού φορτίου
- την διαλυτότητα της πρωτεΐνης στόχου
- τα χαρακτηριστικά αυτής κάθε αυτής πρωτεΐνης

Η χρήση 1 mM IPTG είναι μια φυσιολογική τιμή για να ξεκινήσει μια πειραματική διαδικασία (RS Donovan *et al.*, 1996).

Ο IPTG λειτουργεί ως επαγωγέας σε συστήματα έκφρασης *E.Coli* και θεωρείται η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την επαγωγή της έκφρασης του εκκινητή, επιτυγχάνοντας υψηλές αποδόσεις της επιθυμητής ανασυνδυασμένης 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.

Έπειτα, μπορεί να παρουσιάσει τεχνικά θέματα σε μικρούς όγκους (Briand *et al.*, 2016). Επίσης θεωρείται πολύ τοξικό, γεγονός το οποίο αποτρέπει την χρήση του σε τομείς όπως η φαρμακοβιομηχανία 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 αυτεπαγώμενα συστήματα.

### **1.3.3 Επίδραση της σύστασης του θρεπτικού μέσου**

Σύνθετα θρεπτικά υποστρώματα όπως το LB που είναι πλούσια σε αμινοξέα, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία, μπορούν να υποστηρίξουν υψηλές αποδόσεις παραγωγής πρωτεϊνών από το *E.coli*. Όμως η μη χαρακτηρισμένη τους σύσταση δυσκολεύει την ανάλυση και την παρακολούθηση των συνεπειών όταν μειώνεται η διαθεσιμότητα υποστρώματος στα κύτταρα. Minimal media γνωστής συγκέντρωσης άνθρακα, αζώτου, και ιχνοστοιχείων οδηγούν σε χαμηλότερους ρυθμούς καλλιέργειας και χαμηλότερη απόδοση πρωτεϊνών επαγωγής. Η σύσταση του θρεπτικού κατά τη φάση επαγωγής επηρεάζει σημαντικά την έκφραση των ετερόλογων πρωτεϊνών. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η υπερέκφραση μιας πρωτεΐνης προσθέτει μεταβολικό φορτίο στη διαθεσιμότητα του κυττάρου ως προς τη πηγή άνθρακα και τα αμινοξέα, πράγμα που μπορεί να μειώσει την ανάπτυξη της καλλιέργειας. Έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη στο θρεπτικό μέσο καζαμινοξέων, πεπτόνης, και εκχυλίσματος ζύμης, βελτιώνει την απόδοση παραγωγής ετερόλογων πρωτεϊνών. Μελέτες που στόχευαν στην ερμηνεία αυτού του φαινομένου κατέληξαν ότι μικροποσότητες γαλακτόζης ή λακτόζης στα παραπάνω συστατικά, λειτουργούν ως επαγωγείς μεταγραφής του *lac* οπερονίου. (RS Donovan *et al* 1996)

### **1.3.4 Επίδραση της συγκέντρωσης της γλυκόζης**

Η έκφραση των ετερόλογων πρωτεϊνών υπό την μεταγραφική ρύθμιση του *lac* υποκινητή επηρεάζεται από τα επίπεδα γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο, κατά την φάση επαγωγής. Ενώ η γλυκόζη αποτελεί ιδανικό μέσο ανάπτυξης για μία καλλιέργεια, η παρουσία γλυκόζης στο κύτταρο καταστέλλει την μεταγραφή του *lac* υποκινητή, λόγω της καταστολής από τον καταβολίτη (CAP). Η καταστολή αυτή οφείλεται στον μικρό αριθμό μορίων cAMP (εικόνα 1). Επομένως, η προσθήκη αυτών των μορίων στο κύτταρο βελτιώνει τη σύνθεση της ετερόλογης

πρωτεΐνης. Η γλυκόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα καθώς εκφράζεται η ετερόλογη πρωτεΐνη από τον *lac* υποκινητή όσο η συγκέντρωση της είναι χαμηλότερη από 0,1% w/v κατά την φάση επαγωγής. Η παρουσία της γλυκόζης επιλέγεται σε περιπτώσεις που η έκφραση της ετερόλογης πρωτεΐνης πρέπει να περιοριστεί. 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 η ακετόνη η οποία αναστέλλει τη κυτταρική ανάπτυξη (Donovan *et al.*, 1996).

### **1.3.5 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. Η προσθήκη του επαγωγέα προτιμάται να γίνει μεταξύ εκθετικής και στάσιμης φάσης, όπου επιτυγχάνονται υψηλές κυτταρικές πυκνότητες, άρα και 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 *tac* 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.*, 2013).

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 (Neubauer *et al.*, 1992).

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 κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών (Donovan *et al.*, 2013).

## 1.4 Χρήση της λακτόζης και της γαλακτόζης ως επαγωγέα

Η λακτόζη και η γαλακτόζη είναι πρωτεΐνες διαθέσιμες σε μεγάλη κλίμακα από την βιομηχανία γάλακτος. Είναι συστατικά προϊόντων που αποτελούν παραπροϊόντα ενός εργοστασίου, όπως είναι το τυρόγαλα. Η λακτόζη και η γαλακτόζη είναι φυσικά στοιχεία μεταβολισμού του βακτηρίου *E.coli* και αφομοιώνεται στον καταβολισμό του, χωρίς να ενεργοποιούνται στρεσογόνες αποκρίσεις στο κύτταρο. Η λειτουργία τους ως επαγωγείς έγκειται στο ότι η λακτόζη διασπάται σε αλλολακτόζη και προσδένεται στον καταστολέα απενεργοποιώντας τον. Η συγκέντρωση της λακτόζης, δεν πρέπει να είναι αρκετά υψηλή καθώς μπορεί να αναστείλει την παραγωγή της πρωτεΐνης είτε λόγω της υψηλής υπολειμματικής συγκέντρωσης της λακτόζης είτε λόγω συσσώρευσης της παραγόμενης γαλακτόζης (Gombert & Kilikian *et al.*, 1998). Επίσης οι βέλτιστες συγκεντρώσεις λακτόζης ως επαγωγέας κυμαίνονται από 5-15 g/L (Zhang *et al.*, 2009). Φυσικά 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). Αντίστοιχα και η γαλακτόζη προσδένεται στον καταστολέα και τον απενεργοποιεί. (Xu *et al.*, 2012) Η αλλολακτόζη έχει δέκα φορές μεγαλύτερη συγγένεια από την γαλακτόζη στην πρόσδεση της στον καταστολέα (Mary D. Barkley *et al.*, 1975). Συγκριτικά με την λακτόζη και την γαλακτόζη, ο IPTG είναι ακριβός σε κόστος, είναι τοξικός για τον άνθρωπο, και δεν μπορεί να απομακρυνθεί από το τελικό προϊόν της παραγόμενης πρωτεΐνης. Για τον λόγο αυτό σε φαρμακολογικές μελέτες δημιουργίας νέων φαρμάκων με γενετική μηχανική, προτιμάται η απουσία του IPTG στο σύστημα ετερόλογης έκφρασης του γονιδίου που θα παράγει την φαρμακευτική πρωτεΐνη.

## 1.5 Αυτοεπαγόμενα συστήματα

Η μελέτη των αυτοεπαγόμενων συστημάτων έχει ανοίξει ένα νέο πεδίο στο οποίο ελέγχονται διάφορα θρεπτικά μέσα τα οποία έχουν τη δυνατότητα αφενός να λειτουργούν ως επαρκή μέσα για την ανάπτυξη της καλλιέργειας, αφετέρου να επάγουν το οπερόνιο. Έτσι δεν χρειάζεται να ελέγχεται η πορεία καλλιέργειας για την φάση επαγωγής. Για να κατανοηθούν οι μηχανισμοί αυτοεπαγωγής ελέγχονται διαφορετικά θρεπτικά μέσα γνωστής σύστασης και ποσοτικοποιείται η μείωση των υποστρωμάτων αλλά και η αύξηση της παραγόμενης πρωτεΐνης. Έχει αποδειχθεί πως η γλυκόζη δεν μπορεί να λειτουργήσει ως σύστημα αυτοεπαγωγής. Αντίθετα, πετυχημένα μοντέλα αυτοεπαγωγής είναι η λακτόζη, η γαλακτόζη και η γλυκερόλη (Donovan *et al.*, 2013).

## 1.6 Ξυλανολυτικά ένζυμα

Λόγω της πολυπλοκότητας της ξυλάνης, ένας αριθμός ενζύμων με διαφορετική ενζυμική εξειδίκευση πρέπει να δράσει για την πλήρη υδρόλυσή της. Έτσι, βάσει της διαφορετικής εξειδίκευσης που παρουσιάζουν ως προς το υπόστρωμα, τα ξυλανολυτικά ένζυμα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

- **Ενδοξυλανάσες** (endo-1,4-β-xylanases) (EC 3.2.1.8). Τα συγκεκριμένα ένζυμα καταλύουν την υδρόλυση γλυκοσιδικών δεσμών σε εσωτερικά σημεία του κύριου σκελετού της ξυλάνης.
- **β-ξυλοζιδάσες** (xylan 1,4-β-xylosidases) (EC 3.2.1.37). Τα ένζυμα αυτά, καταλύουν την απελευθέρωση μονομερών ξυλόζης από ξυλοολιγοσακχαρίτες ή και από ακραία τμήματα της πολυσακχαριτικής αλυσίδας της ξυλάνης.

Οι δύο παραπάνω κατηγορίες ενζύμων είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση της κύριας πολυσακχαριτικής αλυσίδας της ξυλάνης.

Όταν το ξυλόλιο υποστεί αρκετές διαδοχικές υδρολύσεις από ξυλανάση συσσωρεύονται ολιγομεροί β-D-ξυλοπυρανοζυλίου, τα οποία μπορούν να αναστείλουν την ενδοξυλανάση. Η β-ξυλοζιδάση στη συνέχεια υδρολύει αυτά τα προϊόντα, αφαιρώντας την αιτία της αναστολής και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης προς ξυλάνη (Andrade *et al.*, 2004).

### 1.6.1 β-D-ξυλοζιδάση

Η β-ξυλοζιδάση είναι το κύριο ένζυμο για την παραγωγή μονομερούς ξυλόζης και αποτελεί μέρος των περισσότερων μικροβιακών ξυλανολυτικών συστημάτων. Μπορεί να υδρολύσει ξυλοολιγοσακχαρίτες και ξυλοβιόζη σε ξυλόζη αφαιρώντας διαδοχικά κατάλοιπα D -ξυλόζης από το μη αναγωγικό άκρο.

Οι β-ξυλοζιδάσες έχουν απομονωθεί από ευκαρυωτικούς οργανισμούς, προκαρυωτικούς αλλά και αρχαίους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Παράγονται από μια ποικιλία βακτηρίων και μυκήτων και μπορούν να βρεθούν ενδοκυτταρικά ή συνδεδεμένες με την κυτταρική μεμβράνη (Sunna and Antranikian *et al.*, 1997). Παρόλα αυτά, έχει ανιχνευτεί και σε εξωκυτταρικά κλάσματα. Τα υψηλότερα επίπεδα εξωκυτταρικής παραγωγής έχουν αναφερθεί για τους μύκητες (Bajrai *et al.*, 1997; Sunna & Antranikian *et al.*, 1997). Είναι πιθανό όμως, καθώς οι αναφορές για εξωκυτταρική ενζυμική ενεργότητα προέρχονται από καλλιέργειες που βρίσκονται στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, ο εντοπισμός του ενζύμου στο υπερκείμενο της μικροβιακής καλλιέργειας να οφείλεται στη λύση των κυττάρων (Nanmori, Watanabe *et al.*, 1990).

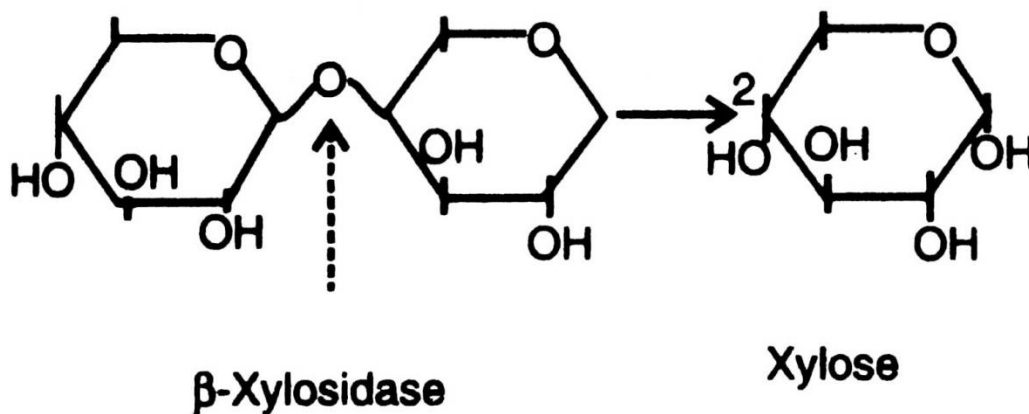
Η β-ξυλοζιδάση θεωρείται σχετικά μεγάλο ένζυμο. Μπορεί να αποτελείται από δύο ή περισσότερες υπομονάδες δηλαδή να είναι μονομερές, διμερές ή τετραμερικό, με τιμές MW που κυμαίνονται από 26 έως 360 kDa. Οι περισσότερες καθαρισμένες β-ξυλοζιδάσες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη δραστικότητα σε υπόστρωμα ξυλοβιόζης και καμία ή ελάχιστη δραστικότητα σε ξυλάνη. Σε μερικές περιπτώσεις το ένζυμο παρουσιάζει δραστικότητα σε ξυλάνη περίπου 30% σε σχέση με εκείνη που παρατηρείται έναντι της ξυλοβιόζης. Η δραστικότητα προς τους ξυλοολιγοσακχαρίτες γενικά μειώνεται γρήγορα με την αύξηση του μήκους της αλυσίδας. Εκτός από τον σχηματισμό της ξυλόζης, πολλές β-ξυλοζιδάσες παράγουν προϊόντα μεταφοράς με υψηλότερα μοριακά βάρη από αυτό του υποστρώματος. Μερικές β-ξυλοζιδάσες έχουν επίσης αναφερθεί ότι έχουν δραστικότητα β-γλυκοζιδάσης και α-αραβινοφουρανοζιδάσης. Η πολλαπλή εξειδίκευση που έχει παρατηρηθεί έναντι υποστρωμάτων που περιέχουν τόσο ξυλόζη όσο και αραβινόζη, είναι φαινόμενο το οποίο συναντάται σε πολλές ξυλοζιδάσες. Η εξήγηση που έχει δοθεί για την παραπάνω παρατήρηση, είναι η ομοιότητα στην χωρική κατανομή των υδροξυλομάδων και των γλυκοσιδικών δεσμών οι οποίοι σχηματίζονται μεταξύ μορίων β-D-ξυλόζης και α-L-αραβινόζης (Shallom, Leon *et al.*, 2004; Wagschal, Heng *et al.*, 2009).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των β-ξυλοζιδασών είναι η ευαισθησία τους στην αναστολή από ξυλόζη, η οποία μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την απόδοση σε συνθήκες διεργασίας.

Οι β-D-ξυλοζιδάσες μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τις σχετικές τους συγγένειες για ξυλοβιόζη και μεγαλύτερους ξυλοολιγοσακχαρίτες. Ξυλοβιάσες και εξω-1,4-β-ξυλανάσες μπορούν να αναγνωριστούν ως ξεχωριστές πρωτεΐνες, όπως προτείνεται από τον Biely (*et al.*, 1985&1993), αλλά θα αντιμετωπίζονται ως ξυλοζιδάσες που υδρολύουν μικρούς ξυλοολιγοσακχαρίτες και ξυλοβιόζη, απελευθερώνοντας κατάλοιπα β-D-ξυλοπυρανοζυλίου από το μη αναγωγικό άκρο. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι καθαρές β-ξυλοζιδάσες συνήθως δεν υδρολύουν ξυλάνη, το βέλτιστο υπόστρωμα τους είναι η ξυλοβιόζη και η συγγενειά τους για τους ξυλοολιγοσακχαρίτες είναι αντιστρόφως ανάλογη με τον βαθμό πολυμερισμού του υποστρώματος. Είναι σε θέση να διασπάσουν τεχνητά υποστρώματα όπως p-nitrophenyl- και o-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside (oNPX-pNPX). Δραστηριότητα τρανσξυλοζυλίωσης (transxylosilation) έχει ανιχνευθεί σε μύκητες, δίνοντας προϊόντα υψηλότερων MW από τα αρχικά υποστρώματα (Kurakabe *et al.*, 1997).

Σχετικά με τον εντοπισμό των β-ξυλοζιδασών, αυτών από νηματοειδείς μύκητες μπορούν να διατηρηθούν εντός του μυκηλίου, να ανιχνευθούν μόνο σε κυτταρικά εκχυλίσματα ή μπορεί να απελευθερωθούν στο μέσο ανάπτυξης (εξωκυτταρικό). Για παράδειγμα, οι β-ξυλοσιδάσες από την *Humicola grisea* var. (Almeida *et al.*, 1995) και *Aspergillus phoenicis* (Rizzatti *et al.*, 2001) καθαρίστηκαν, από το κυτταρικό εκχύλισμα και το μέσο καλλιέργειας, αντίστοιχα. Αυτά που

παράγονται από βακτήρια και ζυμομύκητες, ωστόσο, συναντώνται κυρίως μέσα στο κύτταρο. Οι μυκητοκτόνες β-ξυλοζιδάσες είναι συχνά μονομερείς γλυκοπρωτεΐνες, αλλά μερικές έχουν αναφερθεί ότι διαθέτουν δύο ή τρεις υπομονάδες (Sunna και Antranikian *et al.*, 1997). Παρόλο που υπάρχει μεγάλη ποικιλία σχετικά με το pH optimum παρατηρήθηκε ότι οι περισσότεροι αναπτύσσονται καλύτερα μεταξύ 4,0 και 6,0. Η βέλτιστη θερμοκρασία μπορεί να κυμαίνεται από 40 έως 80 ° C, αλλά οι περισσότερες β-ξυλοζιδάσες δίνουν καλύτερα αποτελέσματα ανάλυσης σε 60 ° C. Η θερμοσταθερότητά τους είναι πολύ μεταβλητή και εξαρτάται από τον οργανισμό. Ένα καλό παράδειγμα ενός σταθερού ενζύμου είναι αυτό από *Aspergillus phoenicis*, το οποίο διατήρησε το 100% της δραστηριότητάς του μετά από 4 ώρες σε 60°C ή μετά από 21 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου (Rizzatti *et al.*, 2001).



**Εικόνα 3: Δράση β-ξυλοζιδάσης σε ξυλοβιόζη προς σχηματισμό δύο μορίων ξυλόζης**

Οι β-ξυλοζιδάσες ανήκουν στην κατηγορία των GH (glycoside hydrolase) ενζύμων, και έχουν κατηγοριοποιηθεί κυρίως στις οικογένειες GH 1, 3, 30, 39, 43, 52, 54 και 120, σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης GH CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes Database). Μέχρι πρόσφατα, πολλές β-ξυλοζιδάσες από διαφορετικές οικογένειες GH έχουν χαρακτηριστεί σε μια ποικιλία μικροοργανισμών. Γενικά, οι ξυλοζιδάσες από πηγές μυκήτων έχουν βέλτιστες τιμές pH από 3 έως 5 και βέλτιστη θερμοκρασία από 40 ° C έως 60 ° C και έχουν ομαδοποιηθεί στις οικογένειες GH 3, GH 43 και GH 54. Η β-ξυλοζιδάση που εξετάζεται στην παρούσα εργασία ανήκει στην οικογένεια GH39. Η βιβλιογραφία σχετικά με τις εξαιρετικά θερμοφιλικές και ανεκτικές σε ξυλόζη β-ξυλοζιδάσες είναι σχετικά περιορισμένη. Επομένως, τα θερμοφιλά βακτήρια θεωρούνται αξιοσημείωτες πηγές θερμικών ανθεκτικών β-ξυλοζιδασών. Συνήθως, οι θερμοσταθερές β-ξυλοζιδάσες, με υψηλή δραστηριότητα και μεγάλη ανοχή στην ξυλόζη

χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές διεργασίες, καθώς οι υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν την διαλυτότητα των υποστρωμάτων και τη μείωση του κινδύνου μόλυνσης και η αντοχή στην ξυλόζη μπορεί να μειώσει την αναστολή της ανάδρασης του υποστρώματος. Ως αποτέλεσμα, η αναζήτηση για θερμοσταθερές και ανεκτικές σε ξυλόζη β-ξυλοζιδάσες αυξήθηκε σημαντικά τα τελευταία χρόνια. (Li Qi, *et al.*, 2018)

### **1.6.2 Γλυκοζιλοϋδρολάσες (GH οικογένειες)**

Οι γλυκοζιλοϋδρολάσες (EC 3.2.1.-) είναι μια ευρέως διαδεδομένη ομάδα ενζύμων που υδρολύουν τον γλυκοζιδικό δεσμό μεταξύ δύο ή περισσότερων υδατανθράκων ή μεταξύ ενός τμήματος υδατάνθρακα και ενός μη υδατανθρακικού τμήματος. Η ονοματολογία των ενζύμων IUBMB των γλυκοζιλοϋδρολασών βασίζεται στην εξειδίκευση του υποστρώματος και ενίοτε στον μοριακό μηχανισμό τους. Μια τέτοια ταξινόμηση δεν αντικατοπτρίζει τα δομικά χαρακτηριστικά αυτών των ενζύμων. Η ταξινόμηση των γλυκοζιλοϋδρολασών σε οικογένειες με βάση τις ομοιότητες της αμινοξικής αλληλουχίας είχε προταθεί πριν από μερικά χρόνια. Επειδή υπάρχει μια άμεση σχέση μεταξύ αλληλουχίας και ομοιότητας δομής, μια τέτοια ταξινόμηση αντανάκλα τα δομικά χαρακτηριστικά αυτών των ενζύμων καλύτερα από την εξειδίκευση του υποστρώματος τους και συμβάλλει στην κατανόηση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ αυτών των ενζύμων.

#### **1.6.2.1 Γλυκοζιλοϋδρολάση, οικογένεια GH39**

Αυτή η οικογένεια γλυκοζιλοϋδρολάσης αποτελείται κυρίως από δύο γνωστές ενζυμικές ενεργότητες, της β-ξυλοζιδάσης και της α-L-ιδουρονιδάσης. Όλες οι ξυλοζιδάσες της οικογένειας GH39 που χαρακτηρίζονται δομικά παρουσιάζουν μια οργάνωση πολλαπλών περιοχών που συναρμολογούν μία τετραμερή τεταρτοταγή διαμόρφωση.

Τα ένζυμα της οικογένειας GH39 είναι γλυκοζιλοϋδρολάσες που ακολουθούν τον κλασικό μηχανισμό διπλής μετατόπισης Koshland. Αυτό σημαίνει ότι η προαναφερθείσα ομάδα ενζύμων εκτελεί υδρόλυση σε αντίδραση δύο σταδίων που αποτελείται από βαθμίδες γλυκοζυλίωσης και μεσολαβούμενης από νερό απογλυκοζυλίωσης που οδηγούν σε διπλή αναστροφή και επομένως καθαρή συγκράτηση της διαμόρφωσης του ανωμερούς άνθρακα στο προϊόν ξυλόζης (Koshland *et al.*, 1953). Αντίθετα για παράδειγμα, οι β-ξυλοζιδάσες GH-43 είναι ένζυμα που καταλύουν ένα υδρολυτικό μηχανισμό ενός σταδίου (inverting enzyme) ο οποίος οδηγεί σε αναστροφή της διαμόρφωσης του ανωμερούς άνθρακα στο προϊόν. Αυτή η διαφορά στον μοριακό μηχανισμό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα ένζυμα των οικογενειών GH 3, 39,



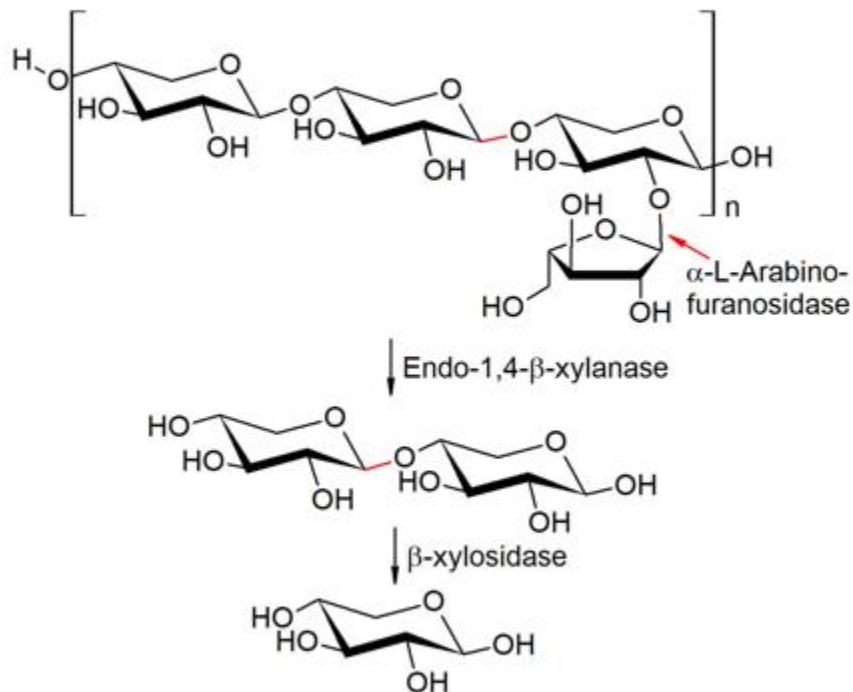
51 και 52 μπορούν να εκτελέσουν τόσο αντιδράσεις υδρόλυσης όσο και αντιδράσεις τρανσξυλοζυλίωσης, ενώ οι β-ξυλοζιδάσες της GH 43 μπορούν να πραγματοποιήσουν μόνο υδρόλυση (Smaali *et al.*, 2006).

Η τρισδιάστατη δομή της β-ξυλοζιδάσης της οικογένειας αυτής είναι της σειράς GH-A, και δομής ( $\alpha / \beta$ ) 8 TIM barrel.

## 1.7 Εφαρμογές β-ξυλοζιδάσης

Πρόσφατα, όλο και περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στην υδρόλυση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης σε μια προσπάθεια χρήσης λιγνοκυτταρινικών υπολειμμάτων ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών αποτελείται κυρίως από 30-45% κυτταρίνη, 20-30% ημικυτταρίνη και 5-20% λιγνίνη. Οι ημικυτταρίνες, ως ο δεύτερος πιο άφθονος και ανανεώσιμος πόρος λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας αποτελούνται από μια σειρά ετεροπολυσακχαριτών που περιέχουν ξυλάνες, αραβινάνες, γλυκάνες και μαννάνες, όπου η ξυλάνη είναι ο κύριος ημικυτταρινικός πολυσακχαρίτης που μπορεί να υδρολυθεί αποτελεσματικά στα σακχαρούχα συστατικά του. Ο σκελετός της ξυλάνης αποτελείται από β-(1,4) -συνδεδεμένες μονάδες ξυλοπυρανοζυλίου με πλευρικές αλυσίδες, όπως οξικό, γλυκουρονοζύλιο και αραβινοφουρανοζύλιο, ανάλογα με την πηγή προέλευσης. Η πλήρης αποικοδόμηση της ξυλάνης απαιτεί τη συνεργιστική δράση των ξυλανολυτικών ενζύμων, λόγω της πολύπλοκης δομής της. Πρώτον, η ξυλανάση διασπά τυχαία τους β-1,4 δεσμούς στην ξυλάνη για να δώσουν ξυλολιγοςσακχαρίτες (XO), ξυλοβιόζη και ξυλόζη. Δεύτερον, η α-αραβινοφουρανοζιδάση, ο ακετυλεστέρας, η α-γλυκουρονιδάση και η εστεράση φερουλικού οξέος διασπούν τους υποκαταστάτες της πλευρικής αλυσίδας. Στο τελευταίο στάδιο, η β-ξυλοζιδάση, είναι το ένζυμο που αποικοδομεί τα μη αναγωγικά άκρα των β-1,4-συνδεδεμένων υπολειμμάτων D-ξυλόζης για την απελευθέρωση του τελικού προϊόντος, ξυλόζης, από μικρούς ξυλοολιγοςσακχαρίτες. Ωστόσο, οι ρόλοι της β-ξυλοζιδάσης δεν περιορίζονται στην αποικοδόμηση ξυλοολιγοςσακχαριτών. Η β-ξυλοζιδάση έχει μεγάλες δυνατότητες σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές, ιδιαίτερα στις βιομηχανίες καυσίμων και τροφίμων καθώς και στη βιομετατροπή σαπωνινών.

## Hemicellulose (Simplified)



Εικόνα 4: Συνεργιστική δράση των ξυλολυτικών ενζύμων για την διάσπαση της ημικυτταρίνης

Η  $\beta$ -ξυλοζιδάση αποτελεί αντικείμενο έρευνας στα εργαστήρια, για τις ιδιότητές της και τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές της. Η ανακάλυψη και η βελτίωση του καταλυτικά αποδοτικού ενζύμου για την πλήρη αποικοδόμηση 1,4- $\beta$ -ξυλοολιγοσακχαριτών σε μονοσακχαρίτες D-ξυλόζης παρουσιάζει ενδιαφέρον σε βιομηχανικό επίπεδο για επακόλουθες διεργασίες όπως η ζύμωση σε βιοκαύσιμα και άλλα βιοπροϊόντα. Σε βιομηχανική κλίμακα, η χρήση της  $\beta$ -ξυλοζιδάσης εμφανίζει υψηλές αποδόσεις ενζυμικής υδρόλυσης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας όταν αυτή φορτώνεται σε υψηλή συγκέντρωση στερεών οδηγώντας σε υψηλές συγκεντρώσεις των επιθυμητών προϊόντων και μειωμένη κατανάλωση νερού.

Η  $\beta$ -ξυλοζιδάση χρησιμοποιείται στη βιομηχανική κλίμακα όταν περιλαμβάνεται σε κοκτέιλ ξυλανασών για:

- την αποσύνθεση ανακυκλωμένου χαρτιού (Marques *et al.*, 2003),

- την επεξεργασία χαρτοπολτού (Tsujiho *et al.*, 2001),
- την βελτίωση του ψησίματος της ζύμης και του ψωμιού (διατροφική ποιότητα) (Dornez *et al.*, 2007),
- την υδρόλυση πικρών ξυλοσυλιωμένων ενώσεων από χυμό σταφυλιών κατά την εκχύλιση και απελευθέρωση του αρώματος που προέρχεται από ξυλοσυλιωμένες ενώσεις σταφυλιών κατά την παρασκευή οινοποιήσεως (Manzanares *et al.*, 1999),
- και την υδρόλυση ξυλάνης προς υπολείμματα D-ξυλόζης για μετέπειτα μείωση της ξυλιτόλης (Polizeli *et al.*, 2005).

Για αυτές τις εφαρμογές, μεγάλες ποσότητες των ενζύμων παρασκευάζονται από μυκητιακές και βακτηριακές πηγές όπως τους *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* και *Bacillus sp.* μεταξύ άλλων (Polizeli *et al.*, 2005). Ενώ οι διεργασίες αυτές μπορούν να είναι μεγάλες σε κλίμακα, είναι επικαλυμμένες από τη πιθανή χρήση της β-ξυλοζιδάσης, άλλες ημικυτταρίνασες, και κυτταρινάσες σε διαδικασίες που υδρολύουν λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα σε μονοσακχαρίτες για ζύμωση σε βιοκαύσιμα, καθώς και μετατροπή σε άλλα προϊόντα με προστιθέμενη αξία (Wergry και Petersen *et al.*, 2004). Ως εκ τούτου, σημαντικό ενδιαφέρον αποτελεί η εύρεση της παραγωγής μιας οικονομικά αποδοτικής β-ξυλοζιδάσης η οποία θα περιλαμβάνει χαρακτηριστικά ενζύμου όπως υψηλή kcat και kcat / Km, χαμηλή συγγένεια για αναστολές μονοσακχαριτών, καλή σταθερότητα στο pH και τη θερμοκρασία, χαμηλά επίπεδα απενεργοποίησης από πρώτες ύλες βιομάζας και χαμηλό κόστος παραγωγής (Jordan *et al.*, 2010).

Η β-ξυλοζιδάση πέρα από τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές στις βιομηχανίες καυσίμων και τροφίμων παρουσιάζει και στη βιομετατροπή σαπωνινών. Η σαπωνίνη είναι ένα είδος βιοδραστικής ουσίας με ένα μεγάλο εύρος φυσιολογικών λειτουργιών, όπως αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινικά και ανοσορυθμιστικά αποτελέσματα. Διάφορες σαπωνίνες έχουν διαφορετικές φυσιολογικές ιδιότητες ως αποτέλεσμα διαφορετικών σκελετών και τμημάτων σακχάρων. Έτσι, πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην μετατροπή γλυκοζυλιωμένων σαπωνινών σε απογλυκοζυλιωμένες σαπωνίνες με απομάκρυνση τμημάτων σακχάρου με ένζυμα, όπως η β-γλυκοσιδάση και η α-ραμνοζιδάση, για να επιτευχθούν καλύτερα φαρμακολογικά αποτελέσματα. Επομένως, στο μέρος που οι σαπωνίνες χρειάζονται να υδρολυθούν στο τμήμα της ξυλόζης μπορούν να χρησιμοποιηθούν β-ξυλοζιδάσες. Γι' αυτό πραγματοποιούνται εργαστηριακές μελέτες ώστε να βρεθεί μια εξαιρετικά θερμοσταθερή ανασυνδυασμένη β-ξυλοζιδάση με την ικανότητα μετατροπής σαπωνινών. (Li Qi *et al.*, 2018)



## 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, Sunnyvale, 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)
- ❖ Συσκευή Amicon chamber 8400, Millipore, Billerica, Η.Π.Α
- ❖ Ανιχνευτής UV (280nm) με λογισμικό καταγραφής Clarity Version 2.3.3. 124 (DataApex, Τσεχία)
- ❖ Συλλέκτης κλασμάτων (Waters, Millipore, Η.Π.Α.).

#### 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:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50mM σε pH=6.0 και σε pH=7 (για dialysis)

- Διάλυμα Bradford: 100 mg/L Coomassie Brilliant Blue, 50ml/L C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O, 100ml/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- Διάλυμα Ringer: NaCl 8,69g/l, KCl 0,3g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,245g/l σε pH=6,4
- Talon buffer: Tris HCl 0.5M, NaCl 3M σε pH=8,1
- Ιμιδαζόλιο 100mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα Glycine/NaOH 50mM σε pH=10 και pH=9
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 50mM σε pH=9, pH=8 και pH=7
- Ρυθμιστικό διάλυμα Citrate/Phosphate 50mM σε pH=7, pH=6 pH=5 pH=4 και pH=3
- Ρυθμιστικό διάλυμα Glycine/HCl 50mM σε pH=3 και pH=2

## 2.2. Μικροοργανισμοί και Μέθοδοι Ανάπτυξης των Μικροοργανισμών

### 2.2.1. Στελέχη μικροοργανισμών

Για την ετερόλογη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (β-ξυλοζιδάσης) χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *Escherichia Coli* και συγκεκριμένα το στέλεχος BL21, από τη Σχολή Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

### 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 0,1 mPA. 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*: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,3g/l, MgSO<sub>4</sub> 0,59g/l, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 1,55g/l, Glucose 10g/l σε pH=6,8
- *Trace Elements*: Zn(CH<sub>3</sub>COOH)<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 3,38g/l, CuCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0,15g/l, MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O 1,5g/l, CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 0,25g/l, Na-EDTA 1,32g/l, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0,21g/l, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,3 g/l, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO<sub>7</sub> 10,08g/l.

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

### 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 ανασυνδυασμένα κύτταρα που αναπτύχθηκαν έφεραν το γονίδιο της β-ξυλοζιδάσης

και είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Στη συνέχεια σε κωνική φιάλη των 100 ml, σε 30 ml αποστειρωμένου LB, εμβολιάζεται σε αυτήν μια απομονωμένη αποικία από το τρυβλίο και προστίθεται αμπικιλίνη 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 ( $OD_{600}$ ) φτάσει την τιμή 1,5-2.



Εικόνα 5: Στερεές καλλιέργειες μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli* σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα LB. Τα μετασηματισμένα κύτταρα φέρουν το γονίδιο της β-ξυλοζιδάσης και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη

#### 2.2.4. Καλλιέργεια επιδεκτικών κυττάρων

Η πειραματική διαδικασία που αφορά την καλλιέργεια των ανασυνδυασμένων 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 OD<sub>600</sub> 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 (IPTG, λακτόζη ή γαλακτόζη). 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 να αρχίζει να μειώνεται που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα αποθέματα του θρεπτικού μέσου τελειώνουν και αρχίζει να επέρχεται ο κυτταρικός θάνατος. 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 της συγκέντρωσης της γλυκόζης και των αναγωγικών σακχάρων.



## 2.3 Μέθοδοι ανάλυσης

Αφού ολοκληρωθεί η παρακολούθηση της κυτταρικής ανάπτυξης, ακολουθούν οι μέθοδοι που απαιτούνται για το προσδιορισμό της δραστικότητας της πρωτεΐνης. Στα δείγματα τα οποία περιέχουν το pellet των κυττάρων προστίθεται 1 ml buffer. Επειδή η β-ξυλοζιδάση 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 Ultrasonic Processor (Sonics & Material Inc, Newtown, USA). Για κάθε δείγμα η διαδικασία αυτή διαρκεί ένα λεπτό και πραγματοποιείται σε τρεις γύρους των 20 δευτερολέπτων. Αυτό γίνεται διότι, 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.



Εικόνα 6: Σπάσιμο της μεμβράνης των κυττάρων με συσκευή υπερήχων

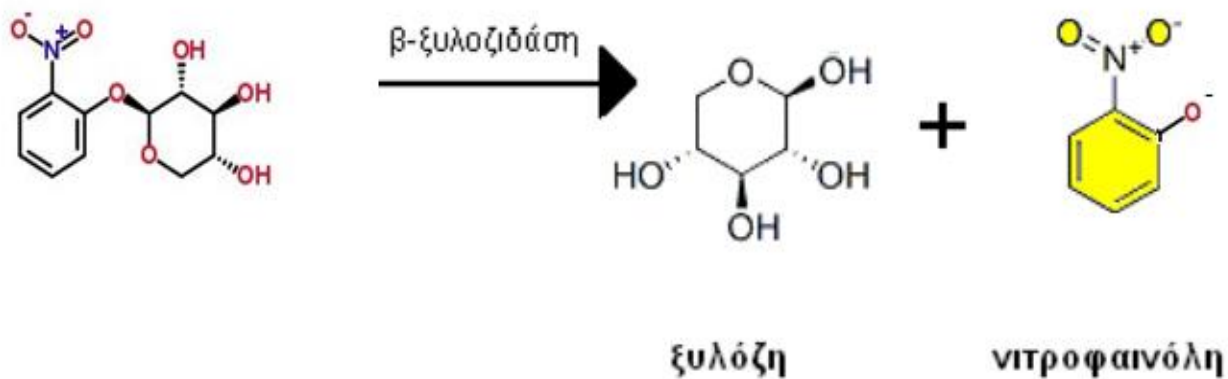
### 2.3.1 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας

Μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit, U) ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μμοί 4-νιτροφαινόλης ανά λεπτό, σε υπόστρωμα (2-νιτροφαίνυλο β-D ξυλοπυρανόζη - oNPX) συγκέντρωσης 1 mM, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,0 και θερμοκρασία 60° C.

Η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-ξυλοζιδάσης έγινε με μέτρηση της υδρόλυσης του υποστρώματος o-nitrophenyl β-D-xylopyranoside (oNPX). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το φυσικό υπόστρωμα της β-ξυλοζιδάσης είναι η ξυλοβιόζη η οποία διασπάται σε δύο μόρια ξυλόζης. Αντίστοιχα με τη ξυλοβιόζη, η β-ξυλοζιδάση υδρολύει τον β-1,4 ξυλοζιτικό δεσμό που υπάρχει στο μόριο του oNPX και το διασπά σε ένα μόριο ξυλόζης και ένα μόριο ο-νιτροφαινόλης (W Shao *et al.*, 1992).

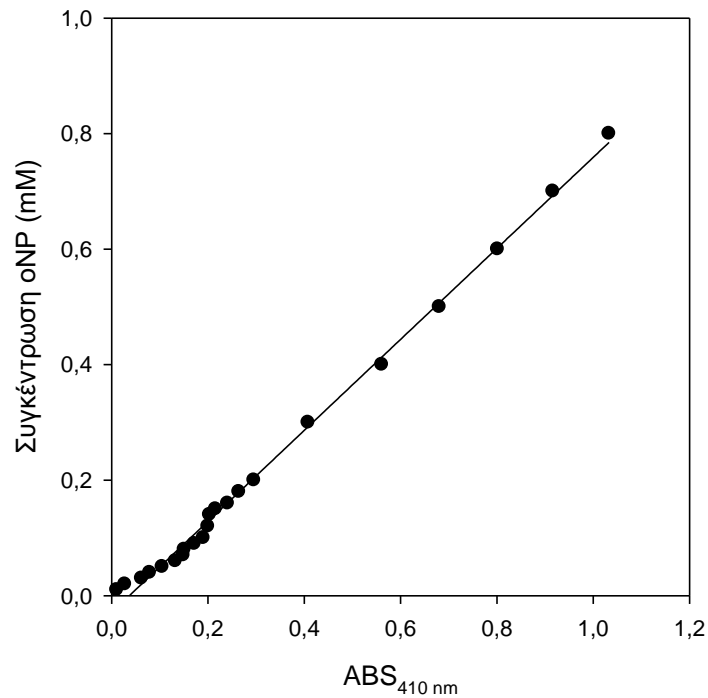
Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας παρασκευάστηκε διάλυμα oNPX 1mM σε 50 ml ρυθμιστικό διάλυμα . Στη συνέχεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθενται 450 μL oNPX και 50 μL του δείγματος. Η διάσπαση του oNPX πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες. Για

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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> συγκέντρωσης 10%w/v. Η προσθήκη του ανθρακικού νατρίου έχει διπλό ρόλο. Αρχικά το Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> σταματά την αντίδραση. Ωστόσο ο σημαντικότερος ρόλος οφείλεται στο γεγονός ότι το oNP που προκύπτει από τη διάσπαση του oNPX είναι άχρωμο. Η προσθήκη του ανθρακικού νατρίου απελευθερώνει την ιονισμένη μορφή του oNP<sup>-</sup>, η οποία έχει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα, και μπορεί να φωτομετρηθεί στα 410 nm (W Shao *et al.*, 1992).



Εικόνα 7: Η μοριακή αντίδραση της β-ξυλοζιδάσης σε υπόστρωμα oNPX

Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς του οNP:



Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη που συσχετίζει την συγκέντρωση της ο-νιτροφαινόλης με την απορρόφηση στα 410nm

Η μαθηματική εξίσωση από την οποία υπολογίζεται η ενεργότητα είναι η εξής:

$$\text{Ενεργότητα} \left( \frac{\text{Units}}{\text{mL}} \right) = \frac{OD_{410\text{nm}} \times \text{Αραίωση} \times \left( \frac{V_{\text{αντίδρασης}}}{V_{\text{ενζύμου}}} \right) \times \text{Συντ.πρότυπης καμπύλης}}{t_{\text{αντίδρασης}}} \quad (1)$$

Όπου:  $-V_{\text{αντίδρασης}}/V_{\text{ενζύμου}}=(500/50)\mu\text{l}=10 \mu\text{l}$

$-t_{\text{αντίδρασης}}=15 \text{ min}$

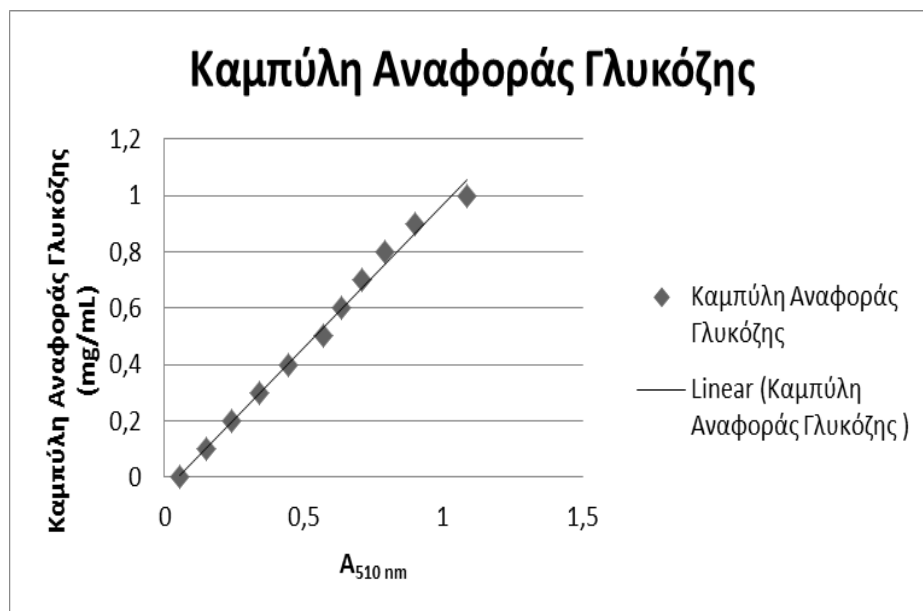
$-\text{Συντελεστής πρότυπης καμπύλης}=1,3477$

### 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 πρωτεΐνης-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 *et al.*, 2009). Ωστόσο είναι σημαντικό μόλις δημιουργηθεί το σύμπλοκο να ακολουθήσει έντονη ανάδευση για 1 λεπτό 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. Στο Διάγραμμα 2, φαίνεται η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης η οποία ισούται με  $y = 1,0344 * ABS_{510} - 0,0473$  ( $R^2 = 0,9925$ )



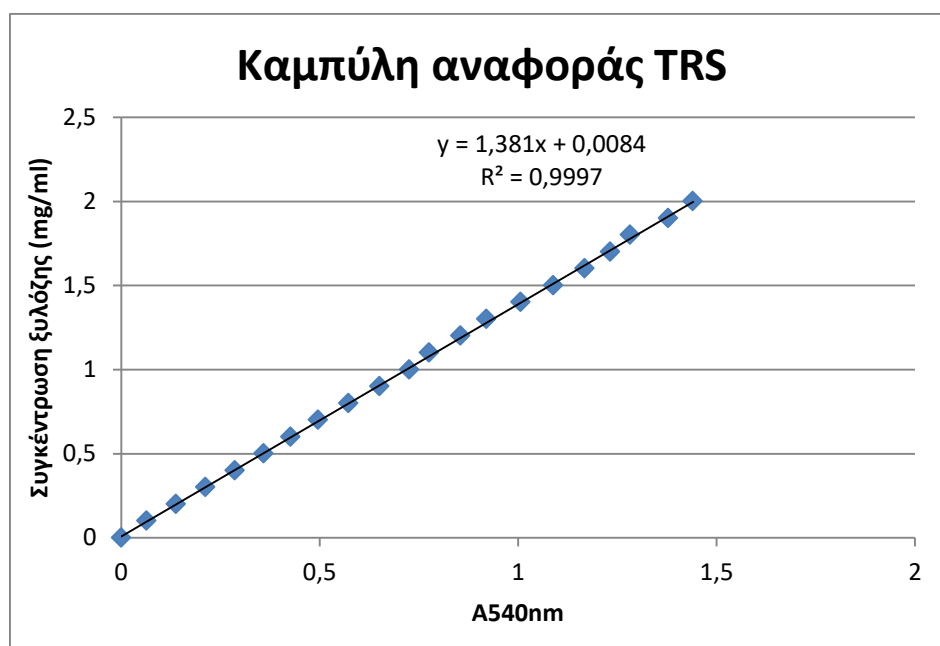
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης



Εικόνα 8: Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit)

### 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 3, φαίνεται η καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα ξυλόζης. Η εξίσωση της καμπύλης είναι ίση με  $y = 1,381 * ABS_{540} + 0,0084$  ( $R^2 = 0,9997$ )



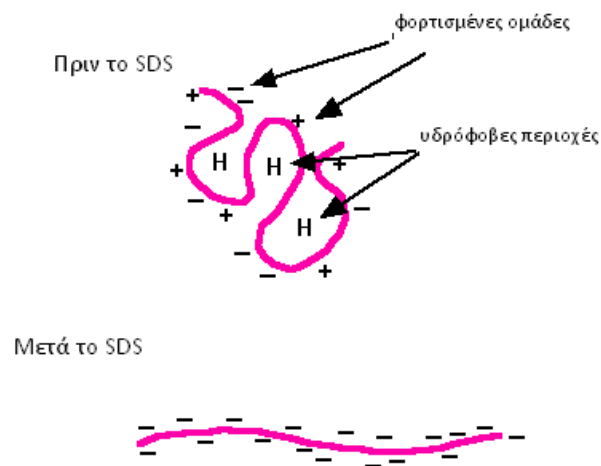
Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς ολικών αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης

### 2.3.5 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 σύνδεσή 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 επιστοιβαγμένων πήκτωμάτων. Το πήκτωμα επιστοιβάξης (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 9:** 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. Τελικά, η πρωτεΐνη αποδιατάσσεται και μετατρέπεται σε γραμμικό μόριο.

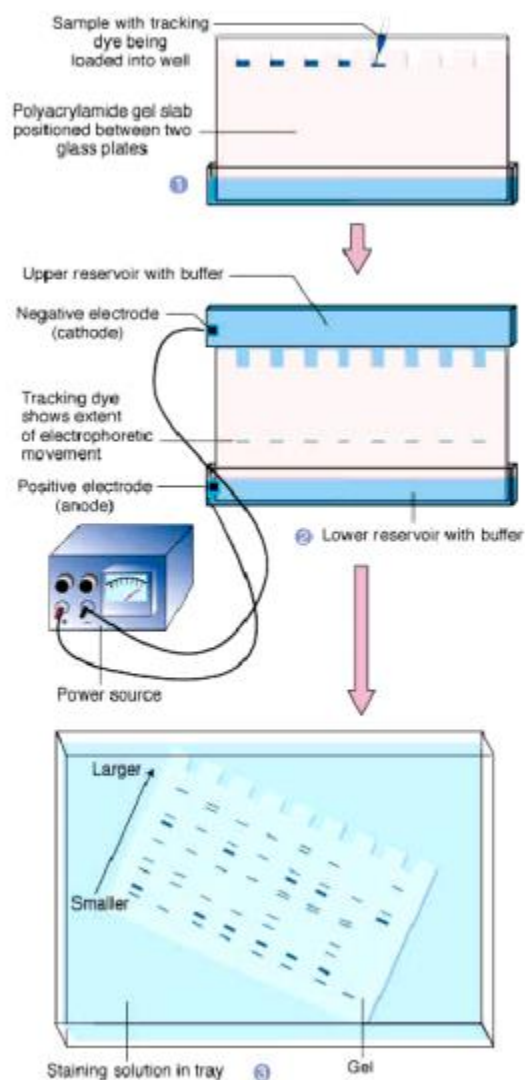
Οι ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή Mini-Protean 3 της εταιρείας BIORAD, (Η.Π.Α.), όπως περιγράφεται παρακάτω (Laemmli *et al.*, 1970):

- 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 16 μL αναμίχθηκε με 4 μL κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (SDS loading buffer) και το μίγμα επώαστηκε σε βραστό νερό για 5-7 λεπτά περίπου. Στην περίπτωση ηλεκτροφόρησης πρωτεΐνης στην ενεργή της μορφή, χρησιμοποιήθηκε native loading buffer, χωρίς επώαση στους 100° C.
- 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 10: Σχηματική παράσταση των σταδίων εκτέλεσης αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης παρουσία SDS.

## 2.4 Καθαρισμός β-ξυλοζιδάσης

Μετά τη μελέτη της παραγωγής του ενζύμου σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας σε κωνικές φιάλες χωρητικότητας 2 L. Για την παραγωγή μιας ικανοποιητικής ποσότητας ενζύμου, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη καλλιέργειας ανασυνδιασμένων κυττάρων *E. coli* με β-ξυλοζιδάση στους 37° C με προσθήκη IPTG 20μM για 20 ώρες σε LB. Το δείγμα στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκε σε ψυχόμενη

φυγόκεντρο για 15 λεπτά και έγινε έκχυση του υπερκείμενου υγρού και επαναδιάλυση των κυττάρων που έχουν μείνει στο ίζημα με Talon buffer pH=8,1. Επειδή η πρωτεΐνη είναι εσωκυτταρική τα κύτταρα υπέστησαν ρήξη με υπερήχους στη συσκευή υπερήχων VC 600 (Sonics and Materials, Η.Π.Α.) για 1 λεπτό (8 sec διάρκεια λειτουργίας ηχώδιο 8 sec παύση) επί 4 φορές.

Στη συνέχεια το δείγμα καθαρίζεται με στήλη Talon. Πρόκειται για μία στήλη ρητίνης με δακτυλίου κοβαλτίου. Το στάδιο του καθαρισμού πραγματοποιήθηκε με αξιοποίηση των 6 συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης (His-tag) που είχαν προστεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης και τα οποία έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με ιόντα κοβαλτίου ακινητοποιημένα σε στήλες ρητίνης. Η έκλυση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή διαλύματος ιμιδαζολίου που ανταγωνίζεται τους ιμιδαζολικούς δακτυλίους των ιστιδινών της πρωτεΐνης για την πρόσδεση στα ιόντα  $Co^{2+}$ . Η ρύθμιση της ροής της κινητής φάσης της χρωματογραφίας στα 2 ml/min έγινε με χρήση της αντλίας Econo Gradient (Biorad, Η.Π.Α.) ενώ για την ανίχνευση των εκλουόμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής UV (280nm) με λογισμικό καταγραφής Clarity Version 2.3.3. 124 (DataApex, Τσεχία). Τα δείγματα συλλέχθηκαν με συλλέκτη κλασμάτων (Waters, Millipore, Η.Π.Α.).

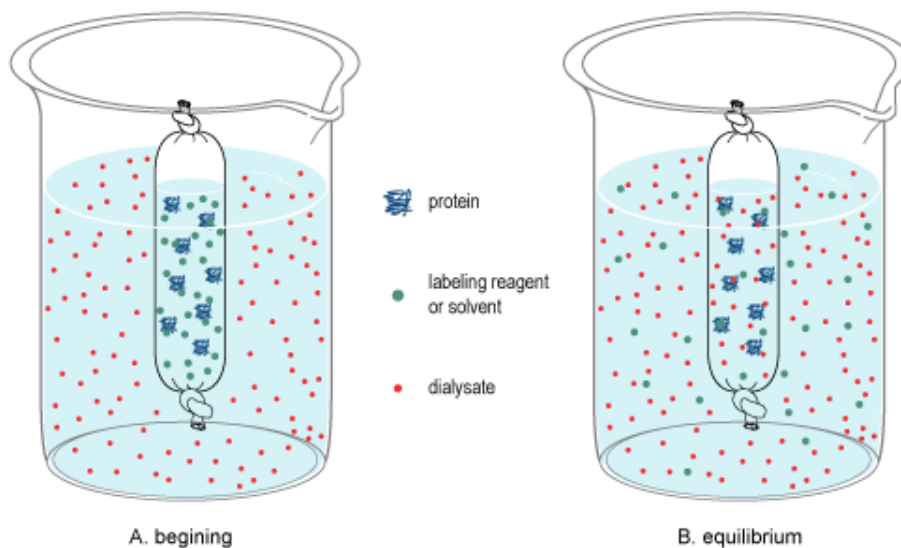
Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε έκπλυση της στήλης με περίπου 80 ml milli-αποσταγμένου νερού και έπειτα 80 ml ρυθμιστικού διαλύματος Talon. Ακολούθησε φόρτωση του δείγματος που υπέστη σπάσιμο με υπερήχους, για πρόσδεση της ανασυνδυασμένης β-ξυλοζιδάσης στα ιόντα  $Co^{2+}$ , και έπειτα πάλι Talon buffer μέχρι η απορρόφηση να σταθεροποιηθεί σε χαμηλή ένδειξη (<0,02). Στη συνέχεια πέρασε από την στήλη το ιμιδαζόλιο 100mM όπου αναμειγνύεται και αυξάνεται γραμμικά η συγκέντρωσή του σύμφωνα με το πρόγραμμα από 0% σε 100% με ρυθμιστικό διάλυμα Talon. Στο στάδιο αυτό αποδεσμεύεται η β-ξυλοζιδάση σε περιεκτικότητα ιμιδαζολίου περίπου 64% v/v και συλλέγονται τα δείγματα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έκπλυση και καθαρισμός της στήλης με απιονισμένο νερό.



Εικόνα 11: Διάταξη στήλης Talon και κλασματοσυλλέκτη

Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης ακολουθεί συμπύκνωση σε τελικό όγκο των 15 mL χρησιμοποιώντας συσκευή Amicon με μεμβράνη που επιτρέπει την διέοδο μακρομορίων μικρότερων από 10 kDa (Amicon chamber 8400, Millipore, Billerica, Η.Π.Α.).

Τέλος, το διάλυμα πρωτεΐνης που συλλέχθηκε εξισορροπήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7 με τη μέθοδο της διαπίδυσης από μεμβράνες κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Da, Sigma-Aldrich), overnight στους 4° C.



Εικόνα 12: Μέθοδος διαπίδυσης από μεμβράνες κυτταρίνης (Dialysis) A. στην αρχή B. overnight στους 4° C όπου έχει επέλθει εξισορρόπηση.

## **2.5 Χαρακτηρισμός β-ξυλοζιδάσης**

### **2.5.1 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης και προσδιορισμός θερμικής σταθερότητας της β-ξυλοζιδάσης**

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της ανασυνδυασμένης β-ξυλοζιδάσης βρέθηκε με μέτρηση της ενεργότητάς της σε ένα εύρος θερμοκρασιών (20 – 90°C), πραγματοποιώντας αντιδράσεις υδρόλυσης του οNPX για 15 min σε pH 6,0 (ρ.δ. φωσφορικών), όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Η σταθερότητα των ενζύμων μελετήθηκε στις θερμοκρασίες 30,40,50,60,70,75,80 και 85° C, με επώαση του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=6,0 και ύστερα μετρήθηκε η εναπομένουσα ενζυμική ενεργότητα.

### **2.5.2 Εύρεση βέλτιστου pH δρατικότητας ενζύμου και προσδιορισμός σταθερότερου pH**

Το βέλτιστο pH δράσης της ανασυνδυασμένης β-ξυλοζιδάσης έγινε μετρώντας την ενεργότητά της σε ένα εύρος pH (2 – 10), πραγματοποιώντας αντιδράσεις υδρόλυσης του οNPX για 15 min σε θερμοκρασία 60°C, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. Glycine/NaOH 50mM σε pH=10 και pH=9
2. Tris/HCl 50mM σε pH=9, pH=8 και pH=7
3. Citrate/Phosphate 50mM σε pH=7, pH=6 pH=5 pH=4 και pH=3
4. Glycine/HCl 50mM σε pH=3 και pH=2

Η σταθερότητα του ενζύμου μελετήθηκε στα παραπάνω pH μετρώντας την εναπομένουσα ενζυμική ενεργότητα ύστερα από 22 και 96 ώρες, σε θερμοκρασία 4°C.

### **2.5.3 Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες**

Η σταθερότητα των ανασυνδυασμένων ενζύμων σε οργανικούς διαλύτες μελετήθηκε σε διαλύματα με περιεκτικότητα 50,40,30,20,10 και 5% v/v οργανικού διαλύτη. Η ποσότητα του ενζύμου ήταν σταθερή στα 100 μL και χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=6. Η εναπομένουσα ενζυμική ενεργότητα μετρήθηκε ύστερα από 30 λεπτά επώασης στους 70°C στο υπόστρωμα οNPX. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεθανόλη, αιθανόλη και διμέθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO).

#### 2.5.4 Επίδραση ιόντων μετάλλων, EDTA και SDS στη δραστικότητα της β-ξυλοζιδάσης

Μελετήθηκε η επίδραση ιόντων μετάλλων, EDTA και SDS στη δραστικότητα της β-ξυλοζιδάσης. Η συγκέντρωση των ιόντων ήταν 5 mM. Τα μέταλλα που εξετάστηκαν ήταν:

1.  $Mn^{2+}$  από την ένωση  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
2.  $Mg^{2+}$  από την ένωση  $MgCl_2$
3.  $Na^+$  από την ένωση  $NaCl$
4.  $K^+$  από την ένωση  $KCl$
5.  $Ca^{2+}$  από την ένωση  $CaCl_2$
6.  $Cu^{2+}$  από την ένωση  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$
7.  $Co^{2+}$  από την ένωση  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$
8.  $Fe^{2+}$  από την ένωση  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
9.  $Fe^{3+}$  από την ένωση  $FeCl_3$
10.  $Zn^{2+}$  από την ένωση  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
11.  $Ba^{2+}$  από την ένωση  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$
12.  $Ni^{2+}$  από την ένωση  $NiCl_2$

Καθώς επίσης και οι ουσίες:

13. EDTA
14. SDS

Το ένζυμο μαζί με το μεταλλοϊόν, SDS και EDTA επωάστηκαν για 30 και 60 λεπτά στους 30° C και μετρήθηκε η εναπομένουσα ενεργότητα με υπόστρωμα οNPX και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=6 σε υδατόλουτρο για 15 λεπτά.

#### 2.5.5 Εξειδίκευση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα

Τα υποστρώματα που εξετάστηκαν ήταν:

1. οNPX
2. p-nitrophenyl β-D-cellobioside
3. p-nitrophenyl β-D-glucopyranoside
4. p-nitrophenyl α-L-rhamnopyranoside
5. p-nitrophenyl β-D-galactopyranoside
6. Ξυλάνη (Birchwood)
7. Ξυλάνη (Oat Spelts)

Τα 5 πρώτα υποστρώματα ήταν σε συγκέντρωση 1 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,0 και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 60° C όπως περιγράφηκε παραπάνω μετρώντας την απορρόφηση της ιονισμένης μορφής του οNP<sup>-</sup> και pNP<sup>-</sup> στα 410nm, η οποία έχει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Οι ξυλάνες ήταν σε συγκέντρωση 2% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=6 και επώαστηκαν μαζί με το ένζυμο σε υδατόλουτρο στους 60° C για 15 λεπτά. Στην συνέχεια στα δείγματα προστέθηκαν 200 μL διάλυμα DNS και τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά σε βραστό νερό και αφού τους προστέθηκε 1 mL νερό και φυγοκεντρήθηκαν μετρήθηκε η απορρόφηση του υπερκείμενού τους στα 540nm.

#### **2.5.6. Εύρεση κινητικών σταθερών της β-ξυλοζιδάσης σε υποστρώμα οNPX**

Για την κινητική μελέτη της ανασυνδυασμένης β-ξυλοζιδάσης στο υπόστρωμα οNPX , το ένζυμο τέθηκε να αντιδράσει με συγκεντρώσεις οNPX από 0,1-1mM σε υδατόλουτρο στους 60° C με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=6. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 410 nm.

#### **2.5.7 Παρεμπόδιση από την ξυλόζη**

Η αντοχή της καθαρής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε ξυλόζη μελετήθηκε για τις συγκεντρώσεις 0,1125 , 0,225 , 0,45 , 0,675 , 0,9 , 1,125 , 1,35 , 1,575 και 1,8 M με επώαση του ενζύμου σε υπόστρωμα οNPX 0,5 mM σε υδατόλουτρο στους 60° C για 15 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=6.

#### **2.5.8. Υδρόλυση ξυλοολιγοσακχαριτών**

Εξετάστηκε η ικανότητα της ανασυνδυασμένης β-ξυλοζιδάσης να υδρολύει ξυλοολιγοσακχαρίρες. Τα υποστρώματα που εξετάστηκαν ήταν: ξυλοβιόζη 1,5% w/v και ξυλοτριόζη 1,5% w/v. Το υπόστρωμα μαζί με την ανασυνδυασμένη β-ξυλοζιδάση επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 70° C για 2, 5 και 22 ώρες. Τα δείγματα τοποθετούνται σε βραστό νερό για να απενεργοποιηθεί η ενζυμική δράση και αποθηκεύονται μέχρι να ξεκινήσει η χρωματογραφία χάρτου.

##### **2.5.8.1 Χρωματογραφία χάρτου TLC**

Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος γίνεται μέσα σε γυάλινο δοχείο χρωματογραφίας το οποίο περιέχει το κατάλληλο μίγμα διαλυτών που αποτελεί την υγρή κινούμενη φάση.

Στο γυάλινο δοχείο τοποθετείται μικρή ποσότητα (25 mL) διαλύτη βουτανόλης-οξικού οξέος-νερού σε αναλογία 2:1:1 μέχρι ύψους 1-2cm. Στο χαρτί TLC silica gel 60 τοποθετούνται στην κάτω άκρη υπό μορφή μικρών κηλίδων (spots) τα δείγματα και ξεκινάει η χρωματογραφία με τον εμποτισμό του στο γυάλινο δοχείο. Κατά τη διάρκεια λήψης του χρωματογραφήματος, δεν μετακινείται το γυάλινο δοχείο για να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη ανάπτυξη. Για την ανίχνευση των κηλίδων των συστατικών του μίγματος, μετά το τέλος του χρωματογραφήματος, το χαρτί στεγνώνεται και ψεκάζεται με διάλυμα μεθανόλης και θειικού οξέος 9:1 και τοποθετείτε στον φούρνο στους 105° C για λίγα λεπτά, έτσι ώστε να δώσουν μια χαρακτηριστική έγχρωμη αντίδραση.



**Εικόνα 13: Γυάλινο δοχείο χρωματογραφήματος με χαρτί TLC**

## 2.6 Βιοπληροφορική Μελέτη

Για την βιοπληροφορική μελέτη χρησιμοποιήθηκε η αμινοξική αλληλουχία της β-ξυλοζιδάσης.

Εισάγοντας την αμινοξική αλληλουχία στο πρόγραμμα ProtParam προκύπτουν θεωρητικά τα χαρακτηριστικά ως προς το μοριακό βάρος, τον χημικό τύπο, το ισοηλεκτρικό σημείο και άλλα.

Χρησιμοποιώντας το βιοπληροφορικό εργαλείο BLASTp και εισάγοντας την αμινοξική αλληλουχία, εντοπίστηκαν β-ξυλοζιδάσες με παρόμοια αμινοξική αλληλουχία. Εισάγοντας στις εντολές Search set<Database< Non redundant protein sequence , Program selection< algorithm< protein-protein Blast και Matrix<BLOSUM62 προκύπτουν β-ξυλοζιδάσες από διαφορετικούς μικροοργανισμούς με τις πιο όμοιες αμινοξικές αλληλουχίες. Στη συνέχεια κατασκευάζεται το φυλογενετικό δέντρο στο BLASTp pairwise alignment με τις εντολές Tree method < Neighbor joining, Max sequence difference<0,85 και Distance< Grishin (protein).

Με το πρόγραμμα Clustal omega πολλαπλής στοίχισης γίνεται σύγκριση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος που προέκυψαν από το BLASTp, στοιχίζοντας την αλληλουχία ένα προς ένα ως προς τα αμινοξέα της.

Για την απεικόνιση της δομής της β-ξυλοζιδάσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Swiss model tool ExPASy. Το πρόγραμμα αυτό απεικονίζει την πιθανή τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης.



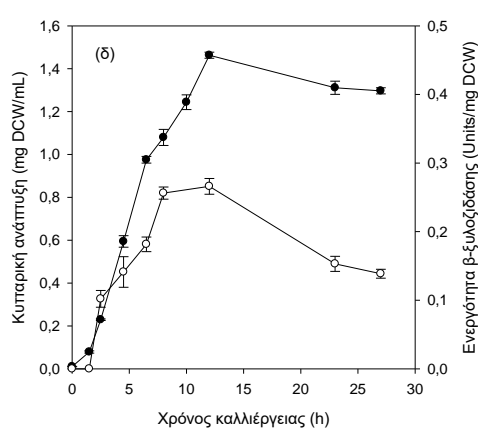
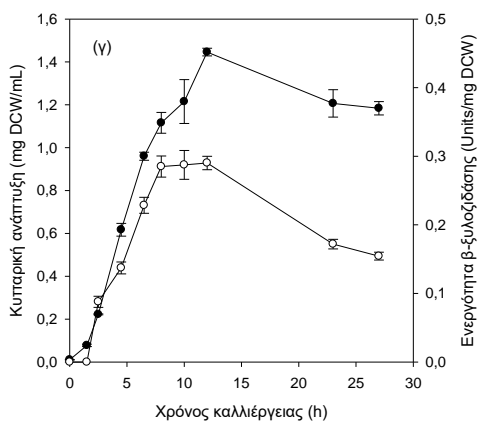
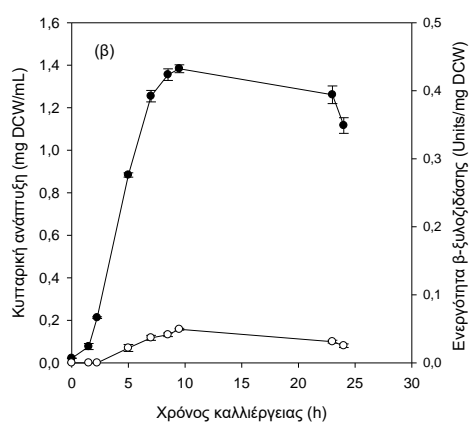
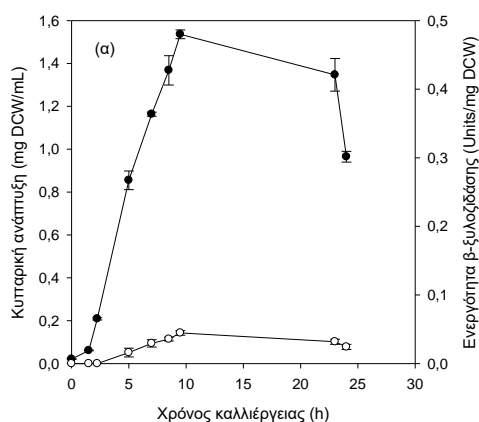
### 3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

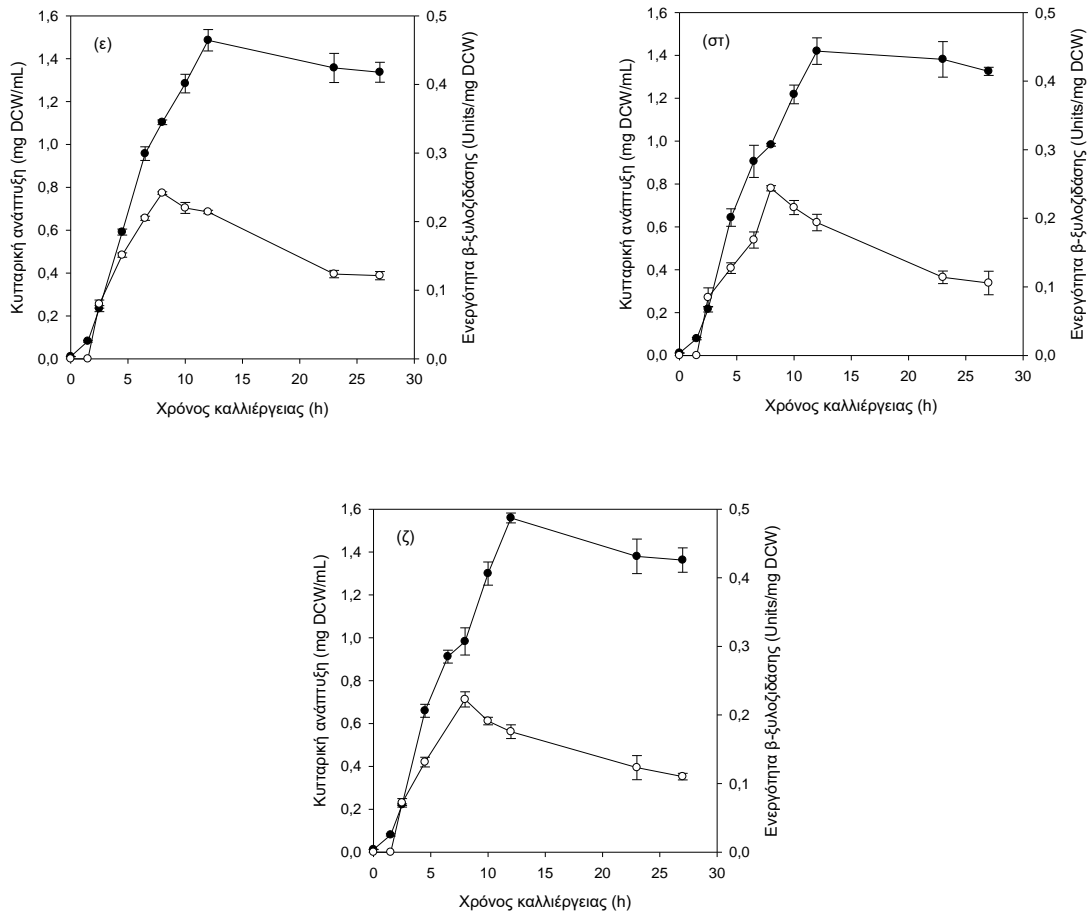
#### 3.1 Παραγωγή β-ξυλοζιδάσης με θρεπτικό μέσο LB

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

##### 3.1.1 Παραγωγή β-ξυλοζιδάσης για διάφορες συγκεντρώσεις επαγωγέα

Για την μελέτη της επίδρασης του θρεπτικού μέσου LB στην ανάπτυξη του βακτηρίου και στην παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις του επαγωγέα IPTG 5,10,20,40,60,80 και 100  $\mu\text{M}$  σε θερμοκρασία επαγωγής 37°C με θρεπτικό μέσο LB.





**Διάγραμμα 4: Ανάπτυξη (●) του βακτηρίου *E. coli* BL21 και παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης (○) 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) 60μM IPTG & 37°C (στ) 80μM IPTG & 37°C (ζ) 100μM IPTG & 37°C**

Παρατηρείται ότι για όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG, η μέγιστη κυτταρική ανάπτυξη βρέθηκε στο εύρος 1,4-1,6 mg DCW/L. Επίσης η μέγιστη παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης παρατηρείται στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του ανασυνδυασμένου βακτηρίου. Για συγκέντρωση IPTG ίση με 20 μM παρουσιάζεται η μέγιστη ενζυμική ενεργότητα, μετά από 12 ώρες καλλιέργειας. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυξάνοντας την συγκέντρωση του επαγωγέα δεν αυξάνεται και η παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης. Αντιθέτως, μετά τα 20 μM η παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα. Η βέλτιστη συγκέντρωση του επαγωγέα είναι αυτή κατά την οποία επιτυγχάνονται ταυτόχρονα υψηλά επίπεδα κυτταρικής ανάπτυξης και παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Για την συνέχεια των πειραμάτων, θα θεωρηθούν τα 20 μM IPTG ως η βέλτιστη συγκέντρωση.

Υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) για καθεμία από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις με χρήση της λογιστικής εξίσωσης:

$$x = \frac{x_o * \exp(\mu * t)}{1 - \left(\frac{x_o}{x_{max}}\right) * (1 - \exp(\mu * t))} \quad (2)$$

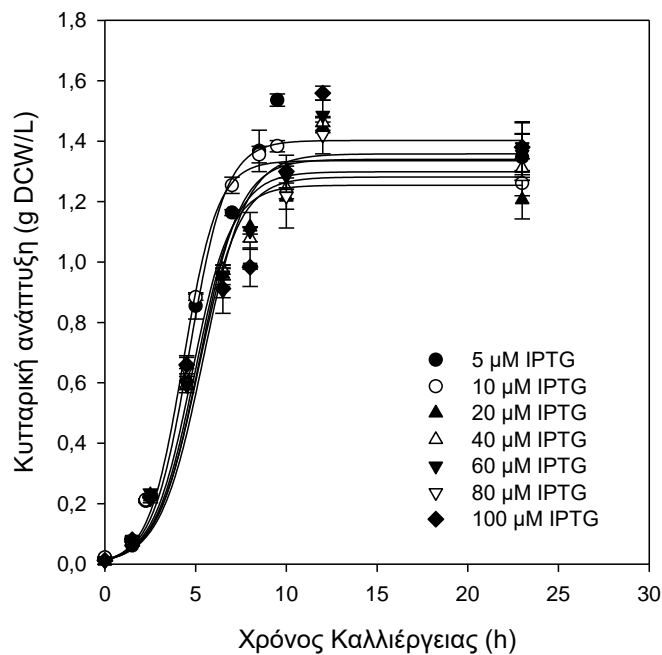
Όπου:

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

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

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

Για τις παραπάνω συγκεντρώσεις IPTG σε θρεπτικό μέσο LB υπολογίστηκαν οι τιμές στον Πίνακα 1.



Διάγραμμα 5: Ανάπτυξη του βακτηρίου *E.coli* BL21 σε θρεπτικό μέσο LB. Συνθήκες: (●) 5μM IPTG & 37°C, (○) 10μM IPTG & 37°C, (▲) 20μM IPTG & 37°C, (△) 40μM IPTG & 37°C, (▼) 60μM IPTG & 37°C, (▽) 80μM IPTG & 37°C και (◆) 100μM IPTG & 37°C

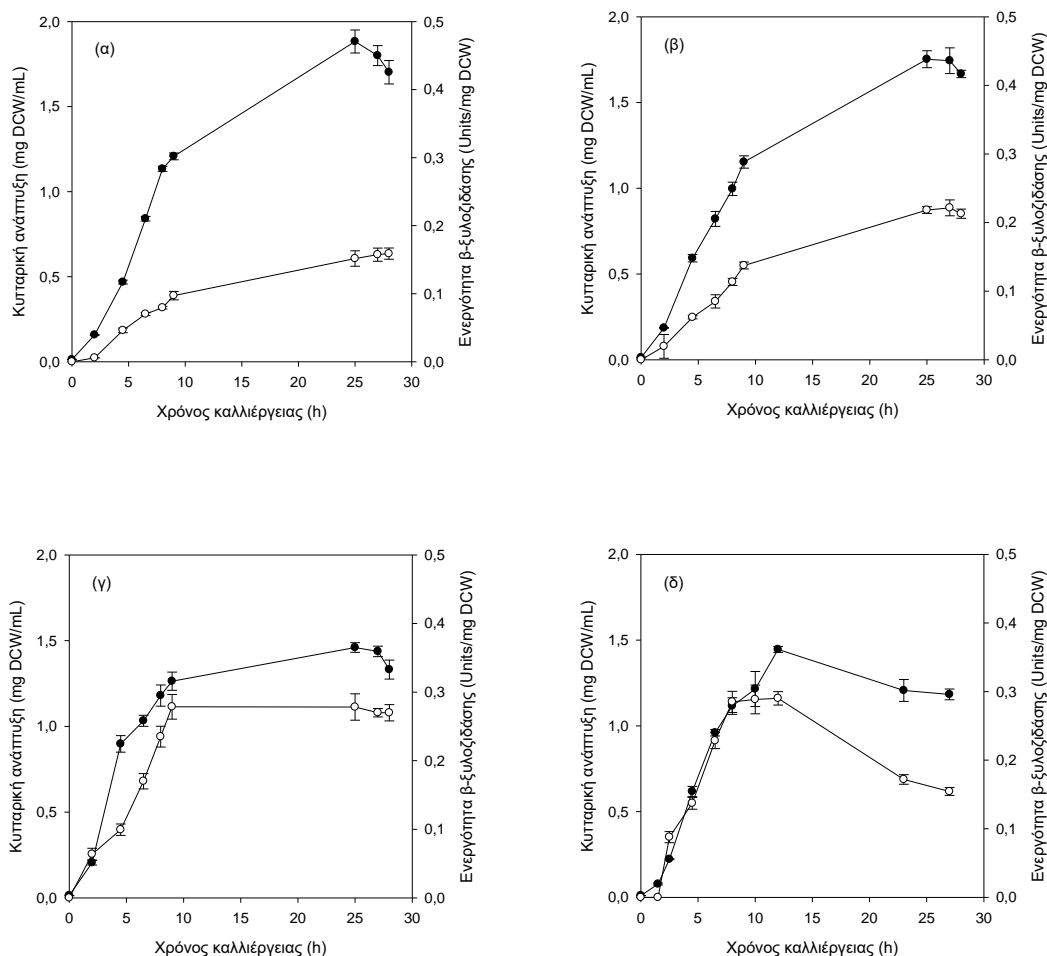
**Πίνακας 1: Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης  $\mu$  και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο LB για διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG και σταθερή θερμοκρασία επαγωγής 37°C**

	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$x_{max}$ (mg DCW/mL) (predicted)	$x_{max}$ (mg DCW/mL) (experimental)	$R^2$
<b>5<math>\mu</math>M IPTG</b>	0,99 ( $p < 0.0001$ )	1,40 ( $p < 0.0001$ )	1,54	0,98
<b>10<math>\mu</math>M IPTG</b>	1,06 ( $p < 0.0001$ )	1,34 ( $p < 0.0001$ )	1,38	0,99
<b>20<math>\mu</math>M IPTG</b>	0,94 ( $p < 0.0001$ )	1,25 ( $p < 0.0001$ )	1,45	0,97
<b>40<math>\mu</math>M IPTG</b>	0,90 ( $p < 0.0001$ )	1,30 ( $p < 0.0001$ )	1,46	0,97
<b>60<math>\mu</math>M IPTG</b>	0,88 ( $p < 0.0001$ )	1,34 ( $p < 0.0001$ )	1,49	0,97
<b>80<math>\mu</math>M IPTG</b>	0,88 ( $p < 0.0001$ )	1,28 ( $p < 0.0001$ )	1,42	0,95
<b>100<math>\mu</math>M IPTG</b>	0,84 ( $p < 0.0001$ )	1,36 ( $p < 0.0001$ )	1,56	0,94

Για τις χαμηλές συγκεντρώσεις του επαγωγέα ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κυμαίνεται σε ένα εύρος από 0,9 έως 1,06  $h^{-1}$ , ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (60-100 $\mu$ M) από 0,84 έως 0,88  $h^{-1}$ . Συνεπώς, αυξάνοντας την συγκέντρωση του IPTG παρατηρείται μία ελαφρώς μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων. Όπως αναφέρεται και στην βιβλιογραφία, αυτό συμβαίνει διότι για υψηλές συγκεντρώσεις του επαγωγέα εμφανίζονται στρεσογόνες συνέπειες στο κύτταρο. Ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  προκύπτει πολύ κοντά στη μονάδα, επομένως η λογιστική εξίσωση εφαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα. Αυτό φαίνεται και από τις κοντινές τιμές που προκύπτουν για την προβλεπόμενη και την πραγματική τιμή της μέγιστης κυτταρικής ανάπτυξης  $x_{max}$ . Επίσης, επειδή η τιμή του  $p$  είναι πολύ μικρή (μικρότερη από 0,0001) οι τιμές που προκύπτουν από την λογιστική εξίσωση, είναι στατιστικά σημαντικές.

### 3.1.2 Παραγωγή β-ξυλοζιδάσης για διάφορες θερμοκρασίες επαγωγής με επαγωγέα IPTG

Στη συνέχεια εξετάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας επαγωγής, υπό σταθερή συγκέντρωση επαγωγέα IPTG 20  $\mu$ M, στην κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης. Οι θερμοκρασίες επαγωγής που μελετήθηκαν είναι 20 $^{\circ}$ C, 27 $^{\circ}$ C και 30 $^{\circ}$ C αντίστοιχα.

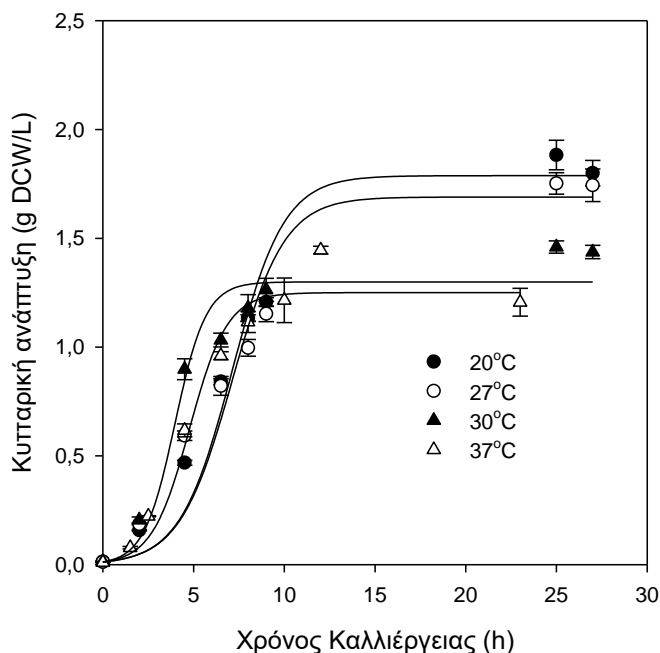


**Διάγραμμα 6:** Ανάπτυξη (●) του βακτηρίου *E. coli* BL21 και παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης (○) σε θρεπτικό μέσο LB. Συνθήκες: (α) 20 $\mu$ M IPTG & 20 $^{\circ}$ C, (β) 20 $\mu$ M IPTG & 27 $^{\circ}$ C, (γ) 20 $\mu$ M IPTG & 30 $^{\circ}$ C και (δ) 20 $\mu$ M IPTG & 37 $^{\circ}$ C

Η κυτταρική ανάπτυξη κυμάνθηκε στο εύρος 1,45-1,88 mg DCW/L στις διαφορετικές θερμοκρασίες. Για τους 20 και 27 $^{\circ}$  C η μέγιστη παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης παρατηρείται στη φάση θανάτου του ανασυνδυασμένου βακτηρίου, ενώ για τους 30 $^{\circ}$  C στο τέλος της εκθετικής

φάσης. Στους 20 και 27° C το βακτήριο αναπτύσσεται με αργότερο ρυθμό συνεπώς επηρεάζεται και η παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης, φτάνοντας ενεργότητα μόλις 0,16 και 0,22 Units/mg DCW. Στους 30 και 37° C η ενεργότητα του ενζύμου είναι 0,28 και 0,29 Units/mg DCW, σχεδόν διπλάσια δηλαδή από αυτή στους 20°C.

Αντίστοιχα υπολογίζονται οι τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης για καθεμία από τις παραπάνω περιπτώσεις:

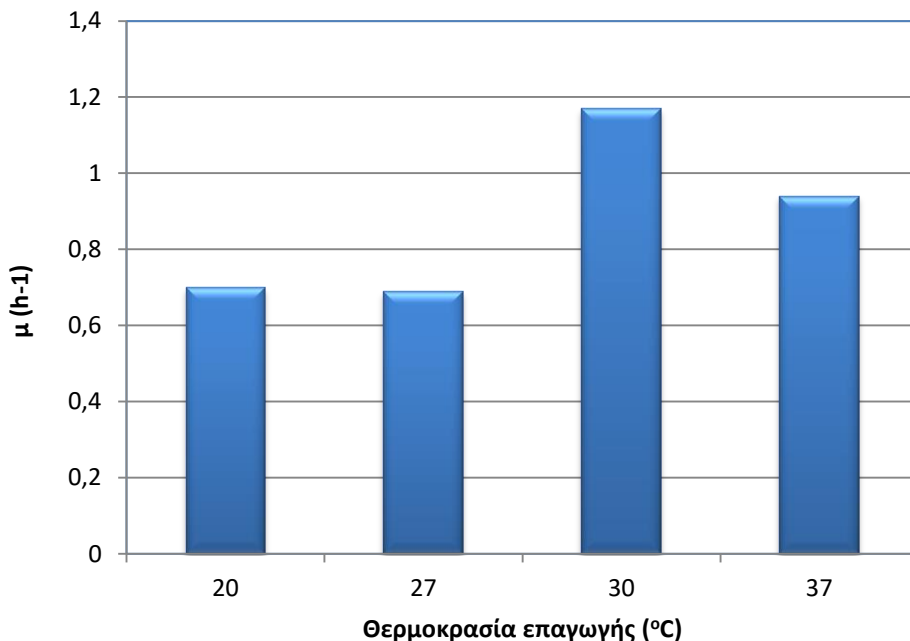


Διάγραμμα 7: Ανάπτυξη του βακτηρίου *E.coli* BL21 σε θρεπτικό μέσο LB. Συνθήκες: (●) 20μM IPTG & 20°C, (○) 20μM IPTG & 27°C, (▲) 20μM IPTG & 30°C και (△) 20μM IPTG & 37°C

Πίνακας 2: Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης  $\mu$  και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο LB για διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής υπό σταθερή συγκέντρωση επαγωγέα IPTG 20μM

	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$x_{max}$ (mg DCW/mL) (predicted)	$x_{max}$ (mg DCW/mL) (experimental)	$R^2$
<b>T=20°C</b>	0,70 ( $p < 0.0001$ )	1,79 ( $p < 0.0001$ )	1,88	0,96
<b>T=27°C</b>	0,69 ( $p < 0.0001$ )	1,69 ( $p < 0.0001$ )	1,75	0,93
<b>T=30°C</b>	1,17 ( $p < 0.0001$ )	1,30 ( $p < 0.0001$ )	1,46	0,95
<b>T=37°C</b>	0,97 ( $p < 0.0001$ )	1,25 ( $p < 0.0001$ )	1,45	0,97

Από την εφαρμογή της λογιστικής εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα υπολογίζεται ότι ο βέλτιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι στους 30°C και όχι στους 37° C που θεωρείται η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *E.coli* (Διάγραμμα 8).



**Διάγραμμα 8:** Ραβδόγραμμα ειδικού ρυθμού ανάπτυξης συναρτήσει της θερμοκρασίας επαγωγής

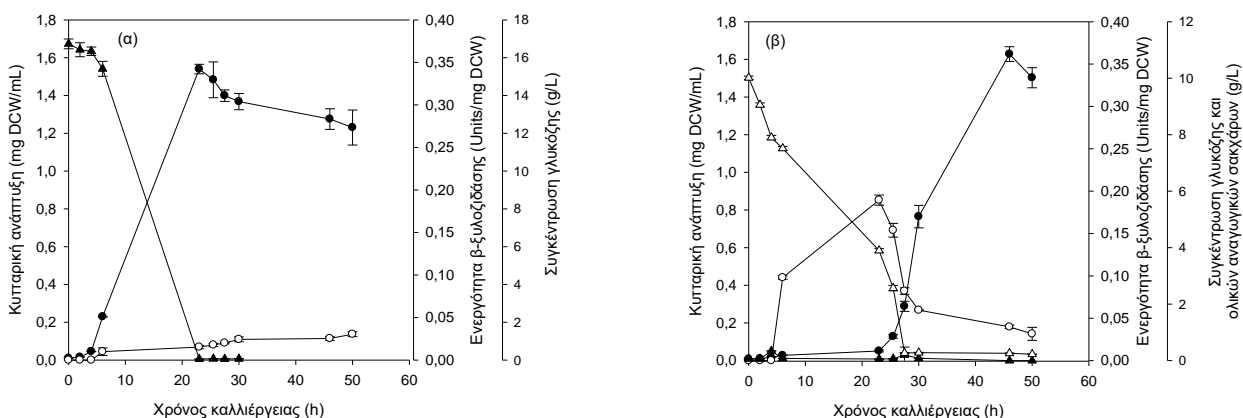
Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τις μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τη βέλτιστη θερμοκρασία επαγωγής που απαιτείται για την επίτευξη υψηλών επιπέδων παραγωγής ετερόλογων πρωτεϊνών, σύμφωνα με τις οποίες, μείωση της θερμοκρασίας επαγωγής στους 30°C μειώνει την παραγωγή πρωτεϊνών που προκαλούν θερμοκρασιακό σοκ στα κύτταρα (Surek *et al.*,1991). Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στους 20° και 27° C είναι χαμηλότερος (Διάγραμμα 8).

Και στην περίπτωση αυτή ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  προκύπτει πολύ κοντά στη μονάδα, επομένως η λογιστική εξίσωση εφαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα. Αυτό φαίνεται και από τις κοντινές τιμές που προκύπτουν για την προβλεπόμενη και την πραγματική τιμή της μέγιστης κυτταρικής ανάπτυξης  $x_{max}$ . Επίσης, επειδή η τιμή του  $p$  είναι πολύ μικρή (μικρότερη από 0,0001) οι τιμές που προκύπτουν από την λογιστική εξίσωση, είναι στατιστικά σημαντικές.

### 3.2. Παραγωγή β-ξυλοζιδάσης σε αυτεπαγόμενα συστήματα

Το υψηλό κόστος του θρεπτικού μέσου LB καθώς και η τοξικότητα του επαγωγέα IPTG, έχει οδηγήσει στην αναζήτηση διαφορετικών πηγών άνθρακα ως υπόστρωμα για τη παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης.

Εξετάστηκαν τρία διαφορετικά σάκχαρα: γλυκόζη, λακτόζη και γαλακτόζη σε συγκέντρωση 10g/L και θερμοκρασία επαγωγής 37°C.



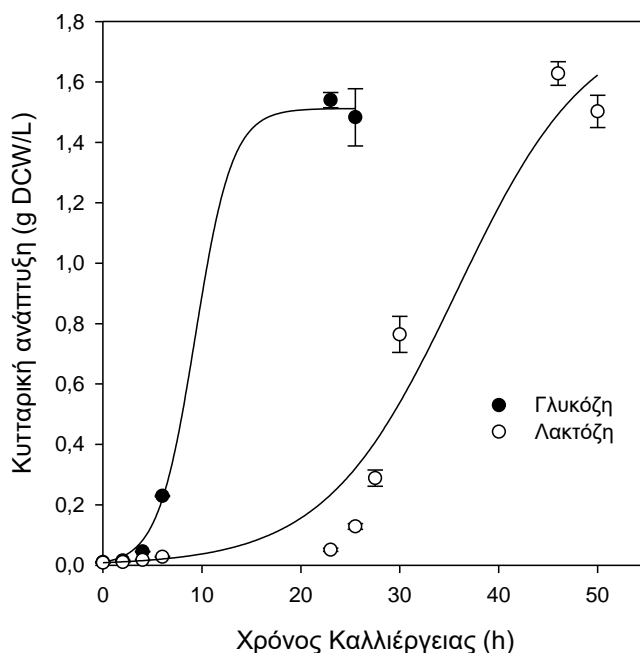
**Διάγραμμα 9:** Ανάπτυξη (●) του βακτηρίου *E.coli* BL21, συγκέντρωση γλυκόζης (▲) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (Δ) και παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης (○) σε διαφορετικές πηγές άνθρακα. Συνθήκες: (α) 10g/L γλυκόζη & 37°C, (β) 10g/L λακτόζη & 37°C

Στα διαγράμματα 9(α) και (β), παρατηρείται ότι κατά τη χρήση γλυκόζης ως κύρια πηγή άνθρακα επιτυγχάνεται ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους με πολύ χαμηλή παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης, ενώ με την λακτόζη επιτυγχάνεται καλύτερη παραγωγή β-ξυλοζιδάσης από ότι με την γλυκόζη. Να σημειωθεί ότι εξετάστηκε και ως πηγή άνθρακα η γαλακτόζη όπου ο μικροοργανισμός δεν αναπτύχθηκε αφού το *E.coli* δεν μπορεί να μεταβολίσει τη γαλακτόζη.

Στην περίπτωση της γλυκόζης η παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης είναι αρκετά χαμηλή. Λόγω του μικρού αριθμού μορίων cAMP καταστέλλεται η μεταγραφή του *Iac* υποκινητή. Πιο συγκεκριμένα μειωμένα επίπεδα cAMP στο κύτταρο σημαίνουν αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στη διάθεση του κυττάρου. Επομένως με την προϋπόθεση ότι ο χειριστής είναι ελεύθερος καταστολέα, η μειωμένη συγκέντρωση cAMP οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση cAMP-CAP συμπλόκου στον υποκινητή και σε μειωμένα επίπεδα μεταγραφής (Donovan *et al.*, 1996).



Αντίστοιχα από την εξίσωση (2) υπολογίζεται ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την γλυκόζη και τη λακτόζη καθώς και το αντίστοιχο διάγραμμα (Διάγραμμα 10):



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

**Πίνακας 3:** Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης  $\mu$  και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη για διαφορετικές πηγές άνθρακα υπό σταθερή θερμοκρασία επαγωγής 37°C

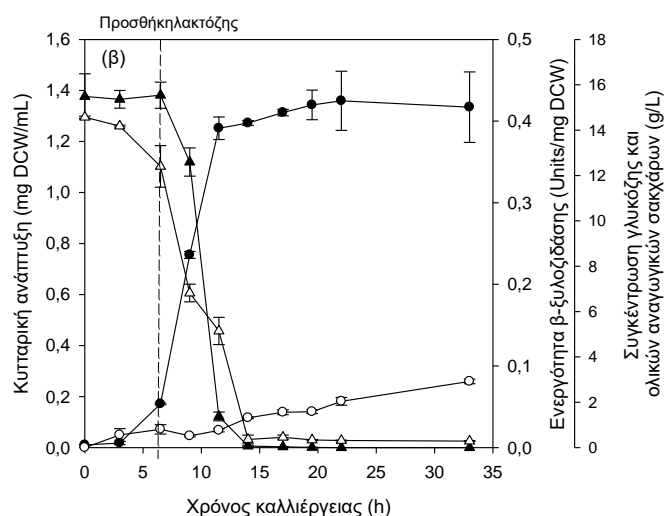
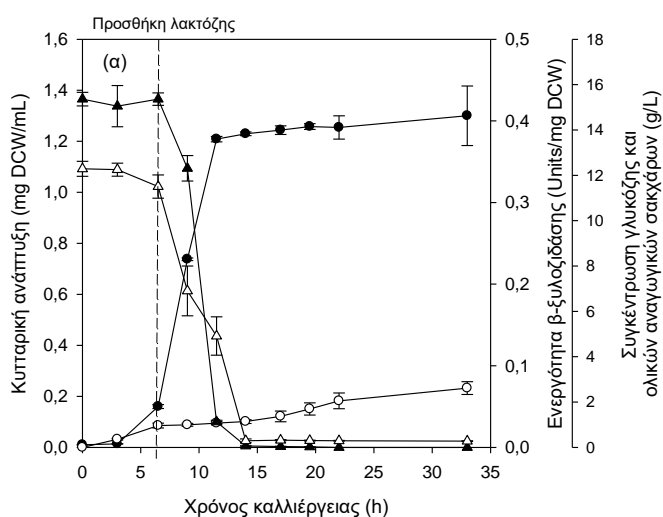
	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$x_{max}$ (mg DCW/mL) (predicted)	$x_{max}$ (mg DCW/mL) (experimental)	$R^2$
<b>Γλυκόζη 10g/L</b>	0,54 ( $p < 0.0001$ )	1,51 ( $p < 0.0001$ )	1,48	0,99
<b>Λακτόζη 10g/L</b>	0,15 ( $p < 0.0001$ )	1,82 ( $p < 0.0001$ )	1,63	0,95

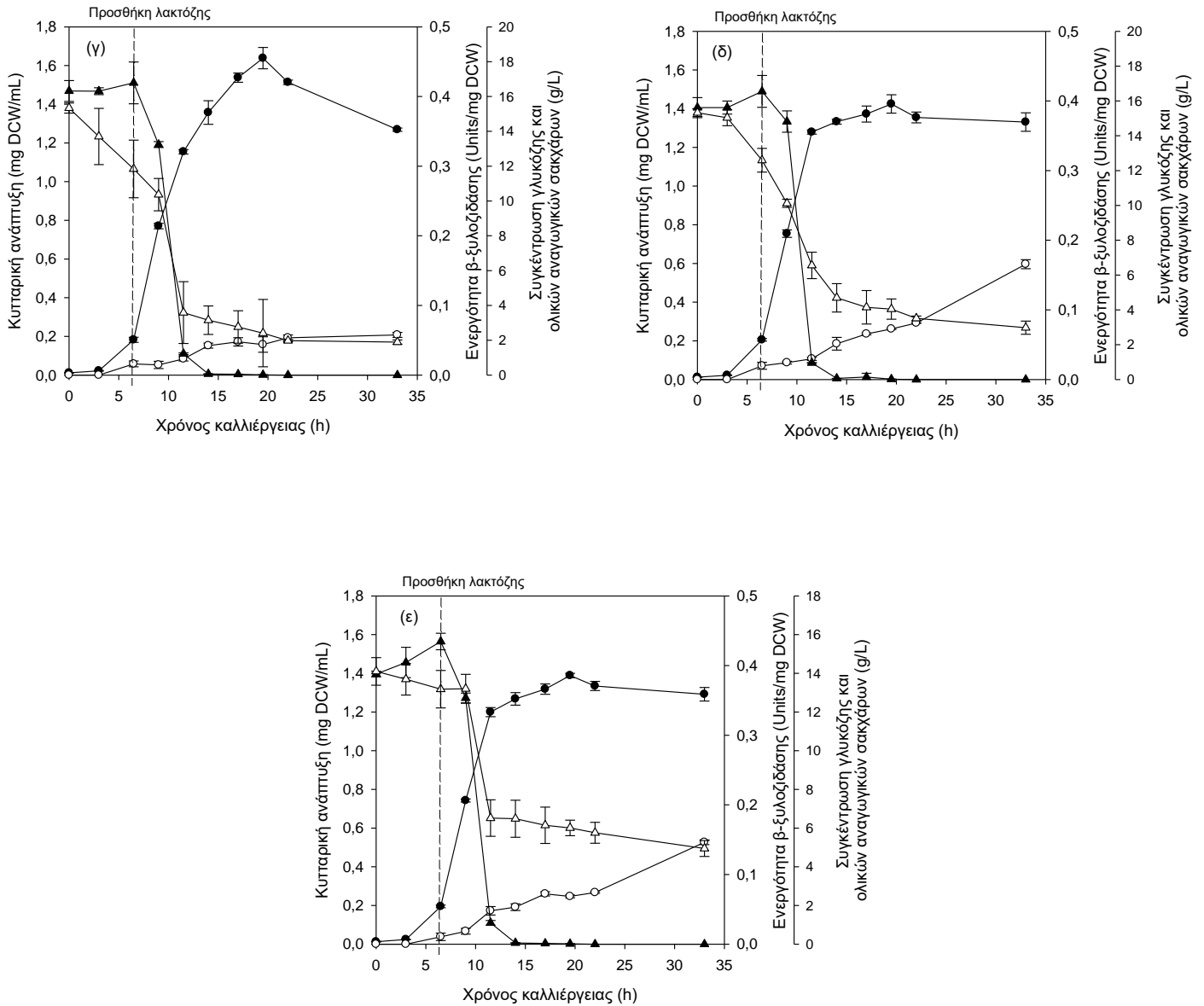
Από τον πίνακα 3 και τον υπολογισμό του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης προκύπτει ότι η γλυκόζη βοηθάει τα κύτταρα να αναπτυχθούν γρηγορότερα και λειτουργεί σαν καλύτερο θρεπτικό μέσο από ότι η λακτόζη, συνεπώς επιβεβαιώνεται ότι το *E.coli* μεταβολίζει τη γλυκόζη καλύτερα από τη λακτόζη. Αυτό φαίνεται καθαρά και από το διάγραμμα 10. Συγκριτικά βέβαια με το θρεπτικό μέσο LB ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι διπλάσιος από ότι με αυτόν της γλυκόζης και σχεδόν επταπλάσιος από ότι με αυτόν της λακτόζης.

Και στην περίπτωση αυτή ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  προκύπτει πολύ κοντά στη μονάδα, επομένως η λογιστική εξίσωση εφαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα. Αυτό φαίνεται και από τις κοντινές τιμές που προκύπτουν για την προβλεπόμενη και την πραγματική τιμή της μέγιστης κυτταρικής ανάπτυξης  $x_{max}$ . Επίσης, επειδή η τιμή του  $p$  είναι πολύ μικρή (μικρότερη από 0,0001) οι τιμές που προκύπτουν από την λογιστική εξίσωση, είναι στατιστικά σημαντικές.

### 3.2.1. Παραγωγή β-ξυλοζιδάσης με χρήση λακτόζης ως επαγωγέα

Για την μελέτη της επίδρασης της λακτόζης ως επαγωγέας στην παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο η γλυκόζη συγκέντρωσης 10 g/L. Οι συγκεντρώσεις του επαγωγέα που μελετήθηκαν είναι 1,2,5,10 και 15 g/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-ξυλοζιδάσης (○) 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

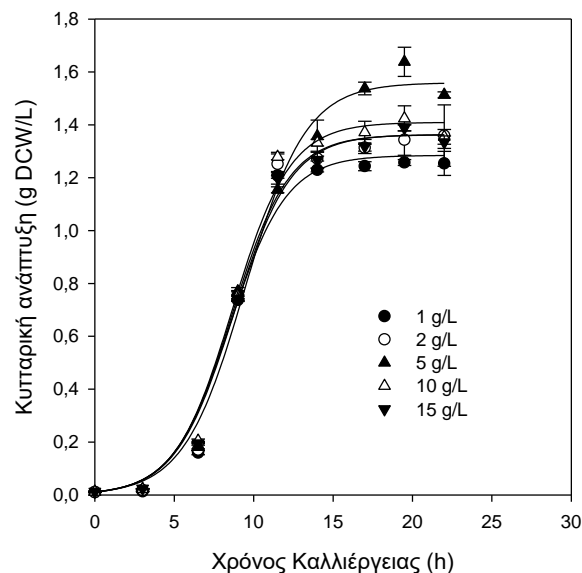
Από τα διαγράμματα 11(α)-(ε) παρατηρείται πως μεταξύ των 9 και 11,5 ωρών καταναλώνεται πλήρως η γλυκόζη που βρίσκεται στο θρεπτικό μέσο, ενώ η συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων σταθεροποιείται μετά από αυτό το διάστημα. Αυτή η σταθερή

συγκέντρωση οφείλεται στην ποσότητα της γαλακτόζης που έχει προκύψει από τη διάσπαση της λακτόζης η οποία δεν μεταβολίζεται από τα κύτταρα.

Αναφορικά με την παραγωγή της ανασυνδυασμένης β-ξυλοζιδάσης, διαπιστώνεται ότι η συγκέντρωση των 10 g/L θεωρείται η βέλτιστη για την παραγωγή της πρωτεΐνης στόχου και όχι η υψηλότερη συγκέντρωση επαγωγέα (15 g/L). Συγκρίνοντας τους δύο επαγωγείς, είναι προφανές πως το IPTG αποτελεί καλύτερο επαγωγέα του οπερονίου της λακτόζης. Μάλιστα τα επίπεδα παραγωγής της β-ξυλοζιδάσης σε θρεπτικό μέσο LB και επαγωγέα IPTG είναι σχεδόν διπλάσια 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 μέσω της β-γαλακτοζιδάσης να μετατραπεί σε αλλολακτόζη και μετά να προσδεθεί στον καταστολέα (D.Martinez *et al.*, 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).

Στην συνέχεια υπολογίστηκε με χρήση της λογιστικής εξίσωσης, η τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης με βάση τις πειραματικές τιμές.



**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

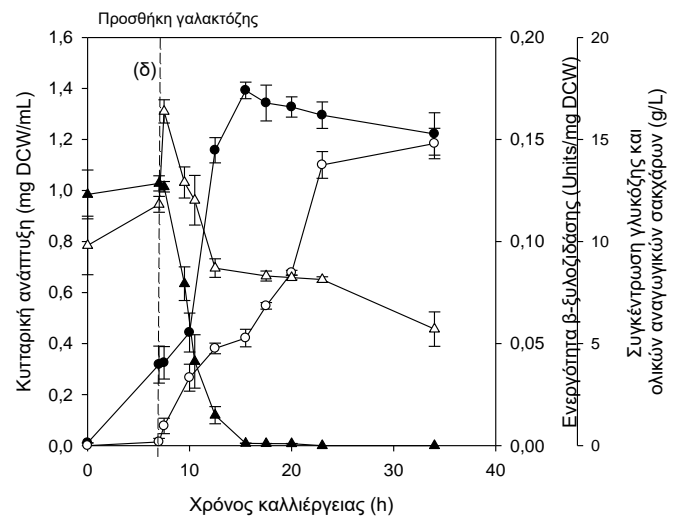
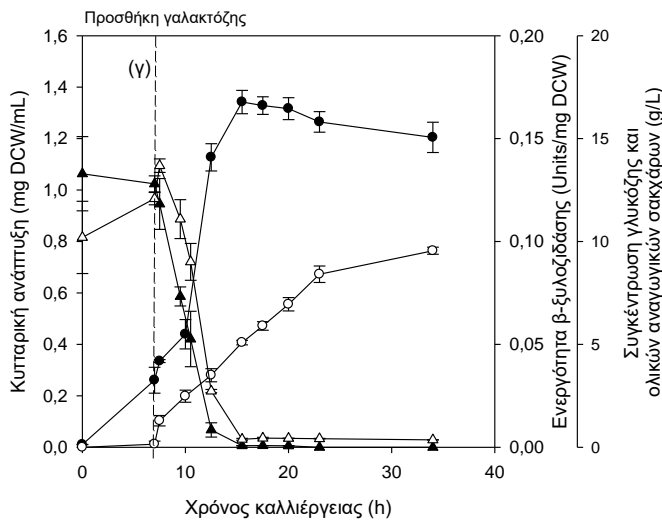
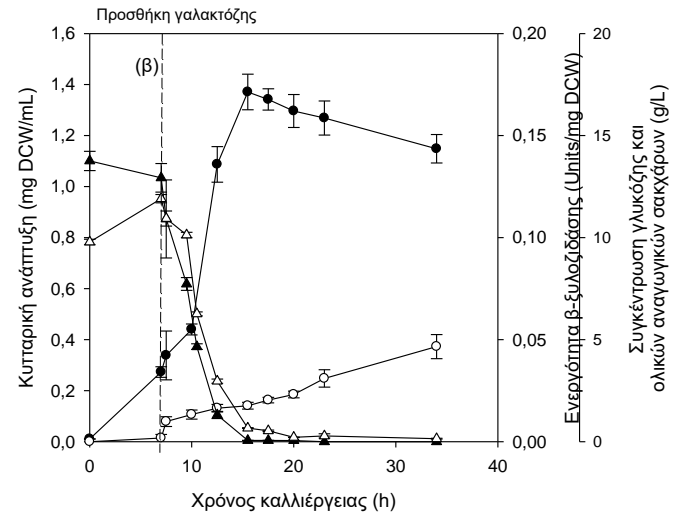
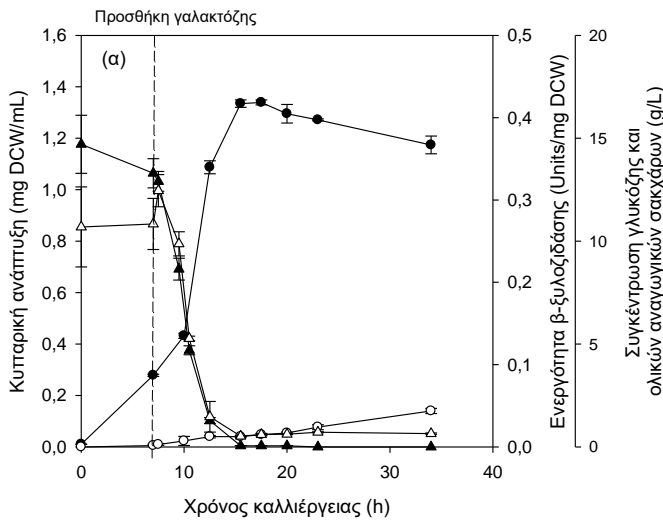
**Πίνακας 4: Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης  $\mu$  και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη για διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα λακτόζης σε *Minimal Glucose* υπό σταθερή θερμοκρασία επαγωγής 30°C**

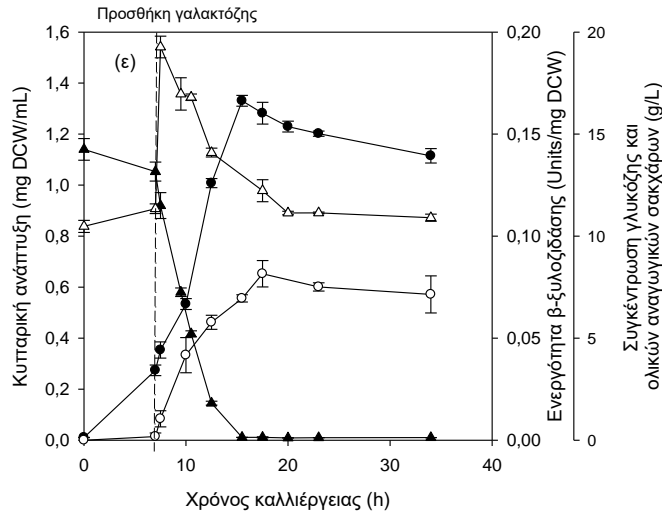
	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$x_{max}$ (mg DCW/mL) (predicted)	$x_{max}$ (mg DCW/mL) (experimental)	$R^2$
<b>Λακτόζη 1 g/L</b>	0,56 ( $p < 0.0001$ )	1,28 ( $p < 0.0001$ )	1,26	0,98
<b>Λακτόζη 2 g/L</b>	0,55 ( $p < 0.0001$ )	1,36 ( $p < 0.0001$ )	1,36	0,99
<b>Λακτόζη 5 g/L</b>	0,52 ( $p < 0.0001$ )	1,56 ( $p < 0.0001$ )	1,64	0,99
<b>Λακτόζη 10 g/L</b>	0,56 ( $p < 0.0001$ )	1,41 ( $p < 0.0001$ )	1,42	0,99
<b>Λακτόζη 15 g/L</b>	0,55 ( $p < 0.0001$ )	1,36 ( $p < 0.0001$ )	1,39	0,99

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κυμαίνεται στο εύρος 0,52-0,56  $h^{-1}$ , επομένως η συγκέντρωση της λακτόζης δεν επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης του *E.coli*. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για θρεπτικό μέσο LB είναι σχεδόν διπλάσιος από αυτόν για *Minimal glucose*. Πράγματι το LB είναι ένα θρεπτικό μέσο εξαιρετικά πλούσιο σε άνθρακα, μέταλλα και ιχνοστοιχεία κατάλληλο για την ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών *E.coli*. Τέλος και στην περίπτωση αυτή ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  προκύπτει πολύ κοντά στη μονάδα, επομένως η λογιστική εξίσωση εφαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα. Αυτό φαίνεται και από τις κοντινές τιμές που προκύπτουν για την προβλεπόμενη και την πραγματική τιμή της μέγιστης κυτταρικής ανάπτυξης  $x_{max}$ . Επίσης, επειδή η τιμή του  $p$  είναι πολύ μικρή (μικρότερη από 0,0001) οι τιμές που προκύπτουν από την λογιστική εξίσωση, είναι στατιστικά σημαντικές.

### 3.2.2. Παραγωγή β-ξυλοζιδάσης με χρήση γαλακτόζης ως επαγωγέας

Η επίδραση της γαλακτόζης ως επαγωγέας όταν η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή άνθρακα εξετάστηκε για συγκεντρώσεις του επαγωγέα 1,2,5,10 και 15 g/L σε θερμοκρασία επαγωγής 30°C.



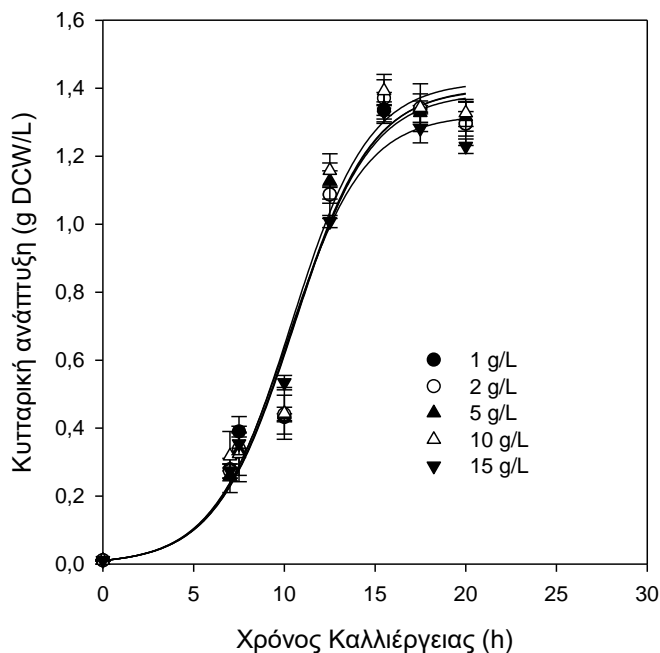


**Διάγραμμα 13:** Ανάπτυξη (●) του βακτηρίου *E. coli* BL21, συγκέντρωση γλυκόζης (▲) και ολικών αναγωγικών σακχάρων (△) και παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης (○) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα γαλακτόζης. Συνθήκες: (α) 1g/L γαλακτόζη & 30°C, (β) 2g/L γαλακτόζη & 30°C, (γ) 5g/L γαλακτόζη & 30°C, (δ)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

Παρατηρείται ότι η μέγιστη κυτταρική ανάπτυξη είναι κοντά στο 1,4 mg DCW/mL σε όλα τα διαγράμματα. Όπως και στην περίπτωση της λακτόζης παρατηρείται πως μεταξύ των 7 και 12,5 ωρών καταναλώνεται πλήρως η γλυκόζη που βρίσκεται στο θρεπτικό μέσο. Στις 7,5 ώρες που γίνεται η προσθήκη της γαλακτόζης παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών αναγωγικών σακχάρων όπου στην συνέχεια καταναλώνεται όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1,2 και 5 g/L) ή σταθεροποιείται στις μεγαλύτερες (10 και 15 g/L). Αυτή η σταθερή συγκέντρωση οφείλεται στην ποσότητα της γαλακτόζης η οποία δεν μεταβολίζεται από τα κύτταρα.

Αναφορικά με την παραγωγή της ανασυνδυασμένης β-ξυλοζιδάσης, η συγκέντρωση των 10 g/L θεωρείται η βέλτιστη και όχι η υψηλότερη συγκέντρωση επαγωγέα (15 g/L). Συγκρίνοντας τους δύο επαγωγείς, είναι προφανές πως το IPTG αποτελεί καλύτερο επαγωγέα του οπερονίου της λακτόζης. Μάλιστα τα επίπεδα παραγωγής της β-ξυλοζιδάσης σε θρεπτικό μέσο LB και επαγωγέα IPTG είναι σχεδόν διπλάσια από αυτά που προέκυψαν σε θρεπτικό μέσο Minimal Glucose και επαγωγέα γαλακτόζη. Συγκριτικά όμως με τα επίπεδα παραγωγής β-ξυλοζιδάσης σε θρεπτικό μέσο Minimal Glucose και επαγωγέα λακτόζη είναι ελαφρώς χαμηλότερα από αυτά που προέκυψαν σε θρεπτικό μέσο Minimal Glucose και επαγωγέα γαλακτόζη.

Οι τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης για καθεμία από τις παραπάνω περιπτώσεις καθώς και το αντίστοιχο διάγραμμα (Διάγραμμα 14) υπολογίζονται από την λογιστική εξίσωση (εξίσωση 2):



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

Πίνακας 5: Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης  $\mu$  και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη για διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα γαλακτόζης σε Minimal Glucose υπό σταθερή θερμοκρασία επαγωγής 30°C

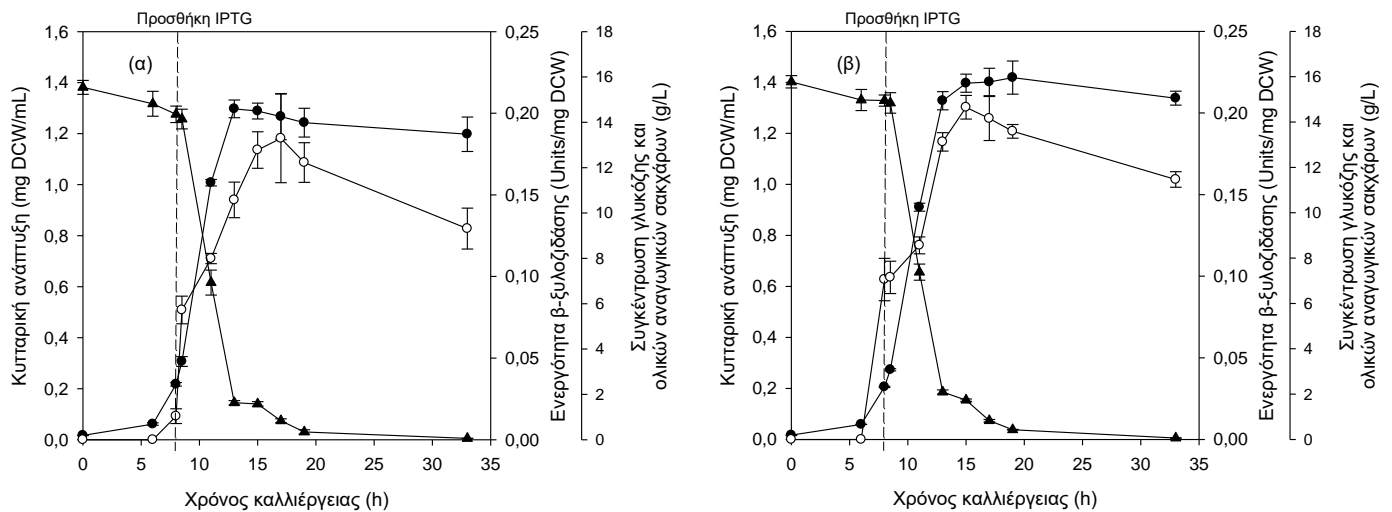
	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$x_{max}$ (mg DCW/mL) (predicted)	$x_{max}$ (mg DCW/mL) (experimental)	$R^2$
Γαλακτόζη 1 g/L	0,47 ( $p < 0.0001$ )	1,39 ( $p < 0.0001$ )	1,34	0,97
Γαλακτόζη 2 g/L	0,46 ( $p < 0.0001$ )	1,40 ( $p < 0.0001$ )	1,37	0,97
Γαλακτόζη 5 g/L	0,47 ( $p < 0.0001$ )	1,40 ( $p < 0.0001$ )	1,34	0,97
Γαλακτόζη 10 g/L	0,47 ( $p < 0.0001$ )	1,42 ( $p < 0.0001$ )	1,39	0,97
Γαλακτόζη 15 g/L	0,47 ( $p < 0.0001$ )	1,32 ( $p < 0.0001$ )	1,33	0,98



Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι ο ίδιος για όλες τις συγκεντρώσεις της γαλακτόζης. 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*. Τέλος και στην περίπτωση αυτή, ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  προκύπτει πολύ κοντά στη μονάδα, επομένως η λογιστική εξίσωση εφαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα. Αυτό φαίνεται και από τις κοντινές τιμές που προκύπτουν για την προβλεπόμενη και την πραγματική τιμή της μέγιστης κυτταρικής ανάπτυξης  $x_{max}$ . Επίσης, επειδή η τιμή του  $p$  είναι πολύ μικρή (μικρότερη από 0,0001) οι τιμές που προκύπτουν από την λογιστική εξίσωση, είναι στατιστικά σημαντικές.

### 3.2.3. Σύγκριση επαγωγικής ικανότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων IPTG σε θρεπτικό μέσο Minimal Glucose

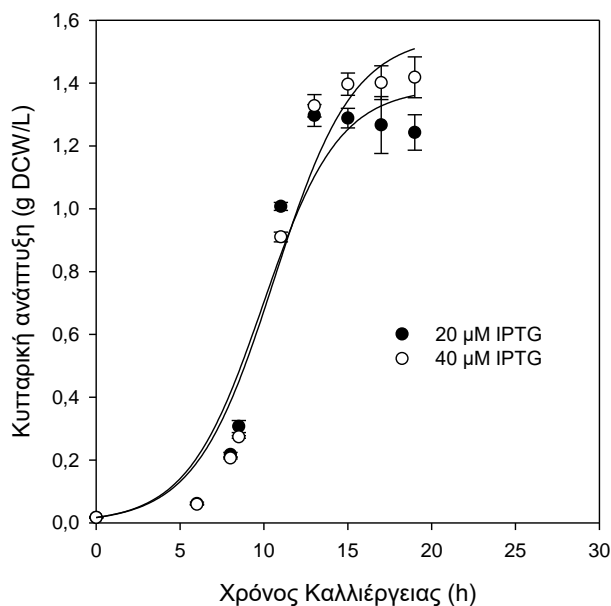
Σε αυτήν την πειραματική διαδικασία συγκρίθηκε η επαγωγική ικανότητα του IPTG σε Minimal Glucose στις δύο καλύτερες συγκεντρώσεις. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν είναι: (α) IPTG 20μM και 37°C και (β) IPTG 40μM και 37°C.



Διάγραμμα 15: Ανάπτυξη (●) του βακτηρίου *E. coli* BL21, συγκέντρωση γλυκόζης (▲) και παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης (○) σε διαφορετική συγκέντρωση επαγωγέα και θερμοκρασία επαγωγής. Συνθήκες: (α) 20μM IPTG & 37°C και (β) 40μM IPTG & 37°C

Στην περίπτωση αυτή η μέγιστη κυτταρική ανάπτυξη κυμάνθηκε στα 1,4-1,5 mg DCW/mL και η παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης έγινε στην φάση ανάπτυξης των κυττάρων με μέγιστη ενεργότητα 0,18 και 0,20 Units/mg DCW στις 17 ώρες, σε συγκέντρωση 20 και 40 μM IPTG, αντίστοιχα. Επίσης μεταξύ των 8 και 11 ωρών όπου το κύτταρο βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης, καταναλώνεται πλήρως η γλυκόζη που βρίσκεται στο θρεπτικό μέσο.

Οι τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης για καθεμία από τις παραπάνω περιπτώσεις καθώς και το αντίστοιχο διάγραμμα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 16 και στον πίνακα 6.



**Διάγραμμα 16:** Ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli* BL21 σε θρεπτικό μέσο Minimal Glucose. Συνθήκες: (●) 20μM IPTG & 37°C και (○) 40μM IPTG & 37°C

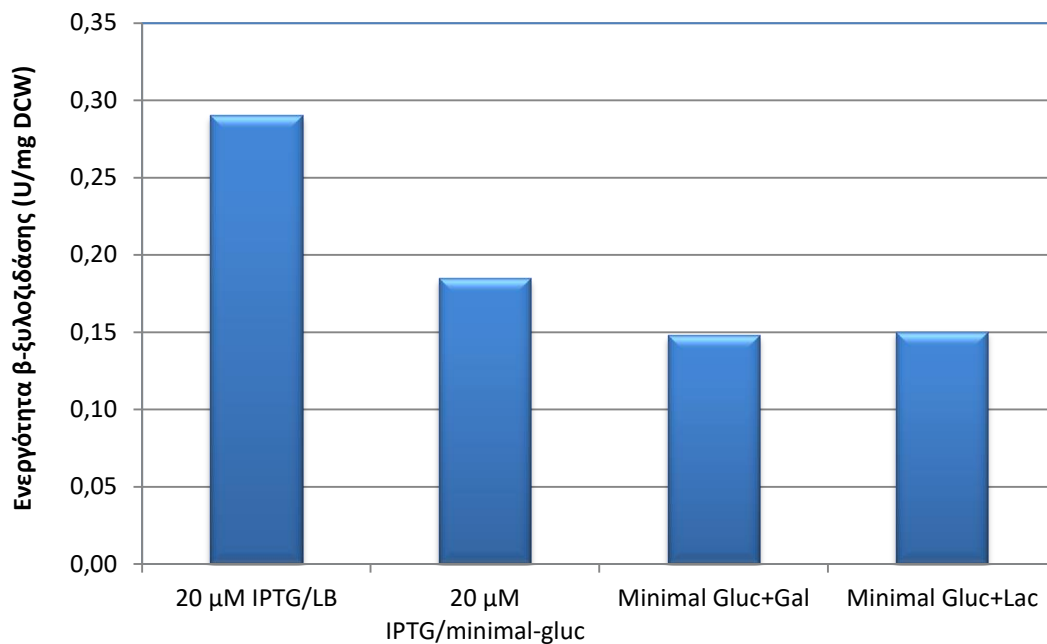
**Πίνακας 6:** Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης  $\mu$  και μέγιστη προβλεπόμενη και πειραματική κυτταρική ανάπτυξη για συγκεντρώσεις επαγωγέα IPTG 20μM και 40μM σε Minimal Glucose στους 37° C

	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$x_{max}$ (mg DCW/mL) (predicted)	$x_{max}$ (mg DCW/mL) (experimental)	$R^2$
<b>IPTG 20μM</b>	0,44 ( $p < 0.0001$ )	1,39 ( $p < 0.0001$ )	1,30	0,94
<b>IPTG 40μM</b>	0,42 ( $p < 0.0001$ )	1,55 ( $p < 0.0001$ )	1,42	0,96

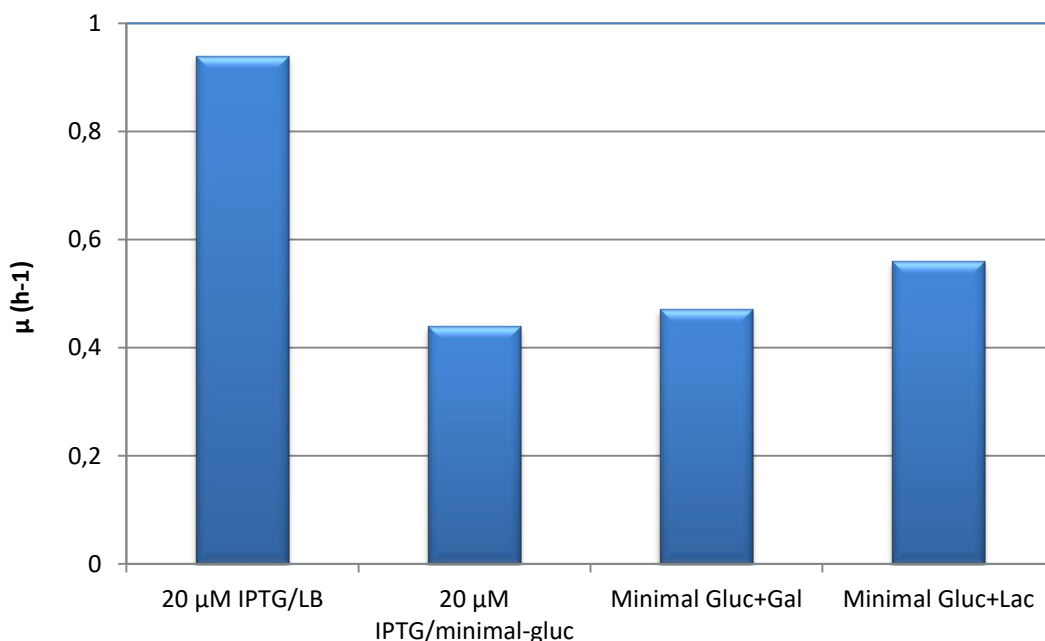
Συγκρίνοντας την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων με θρεπτικό μέσο LB και Minimal Glucose, διαπιστώνεται πως στη δεύτερη περίπτωση η κυτταρική ανάπτυξη πραγματοποιείται

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*. Τέλος και στην περίπτωση αυτή, ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  προκύπτει πολύ κοντά στη μονάδα, επομένως η λογιστική εξίσωση εφαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα. Αυτό φαίνεται και από τις κοντινές τιμές που προκύπτουν για την προβλεπόμενη και την πραγματική τιμή της μέγιστης κυτταρικής ανάπτυξης  $x_{max}$ . Επίσης, επειδή η τιμή του  $p$  είναι πολύ μικρή (μικρότερη από 0,0001) οι τιμές που προκύπτουν από την λογιστική εξίσωση, είναι στατιστικά σημαντικές.

Συγκεντρώνοντας τις βέλτιστες συνθήκες από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτουν τα Διαγράμματα 17 και 18:



Διάγραμμα 17: Ραβδόγραμμα ενεργότητας της β-ξυλοζιδάσης στις διαφορετικές συνθήκες που μελετήθηκαν



**Διάγραμμα 18:** Ραβδόγραμμα του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης των *E.coli* στις διαφορετικές συνθήκες που μελετήθηκαν

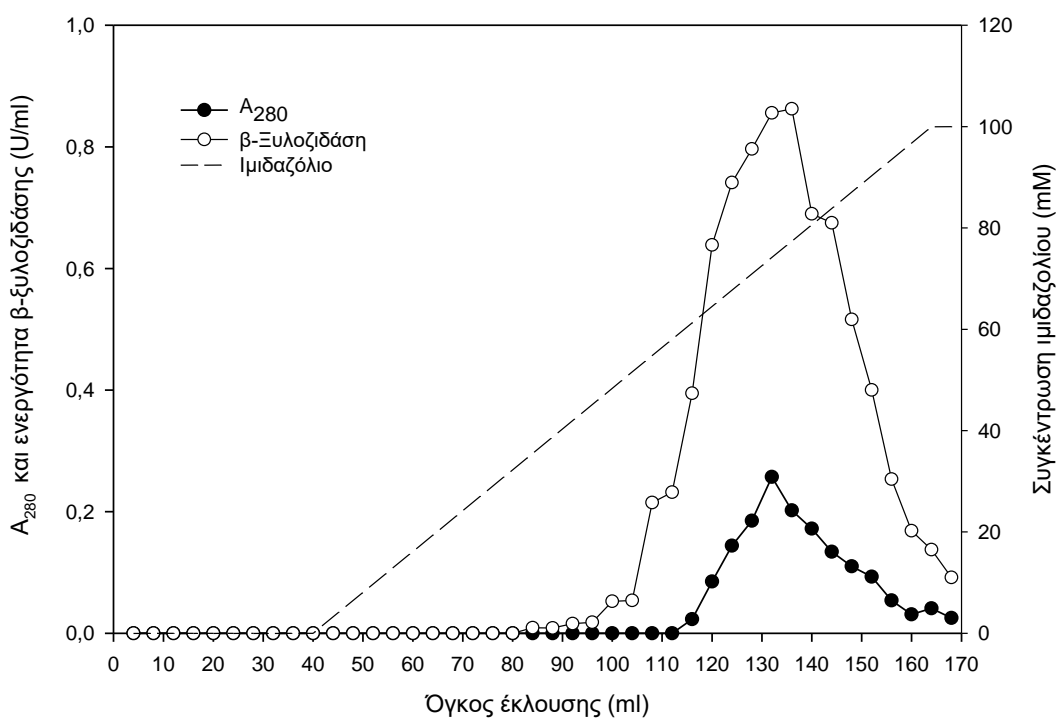
Από τα διαγράμματα 17 και 18 παρατηρείται ότι η μέγιστη παραγωγή του ενζύμου και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης εμφανίζεται για θρεπτικό μέσο LB και επαγωγέα IPTG 20 $\mu$ M. Καθώς το LB είναι ένα θρεπτικό μέσο εξαιρετικά πλούσιο σε άνθρακα, μέταλλα και ιχνοστοιχεία αποτελεί και το καταλληλότερο για την ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών *E.coli*. Επιπλέον το IPTG λειτουργεί ως επαγωγέας σε συστήματα έκφρασης *E.Coli* και θεωρείται η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την επαγωγή της έκφρασης του εκκινητή καθώς είναι ένα μόριο το οποίο είναι μη μεταβολιζόμενο ανάλογο της αλλολακτόζης, που ενεργοποιεί την μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης και χρησιμοποιείται για να επάγει την πρωτεϊνική έκφραση. Ο IPTG είναι ένας ευρέως φύσης επαγωγέας του lac υποκινητή, καθώς προσδένεται με τον καταστολέα και δεν του επιτρέπει να συνδεθεί με τον χειριστή. Επομένως ο συνδυασμός LB-IPTG είναι λογικό να είναι και ο καλύτερος.

Η χρήση Minimal glucose ως θρεπτικό μέσο ρίχνει την τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης. Πέρα από το γεγονός ότι αποτελεί φτωχότερο θρεπτικό μέσο από τι το LB, όταν υπάρχει στο θρεπτικό μέσο γλυκόζη είναι πιθανή και η παραγωγή παραπροϊόντων όπως η ακετόνη η οποία αναστέλλει τη κυτταρική ανάπτυξη (Donovan *et al.*, 1996). Η ενεργότητα της β-ξυλοζιδάσης μειώνεται κατά 36% για επαγωγέα IPTG 20  $\mu$ M ενώ υποδιπλασιάζεται στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ως επαγωγέας λακτόζη και γαλακτόζη.

### 3.2 Καθαρισμός ενζύμου

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη περιέχει 6 κατάλοιπα ιστιδίνης τα οποία έχουν αρνητικό φορτίο. Η χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε παρουσία ιμιδαζολίου, σε στήλη κοβαλτίου που έχει αρνητικό φορτίο. Έτσι, υπήρξε ισχυρή έλξη μεταξύ του αρνητικού και του θετικού φορτίου και το ένζυμο προσδέθηκε ισχυρά στη στήλη, ενώ όλες οι υπόλοιπες πρωτεΐνες εκλούστηκαν από αυτήν.

Όπως περιγράφηκε η ανασυνδυασμένη β-ξυλοζιδάση εκλούστηκε από την στήλη Talon με αυξανόμενη συγκέντρωση (0-100mM) ιμιδαζολίου, λόγω του ότι το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται τις ιστιδίνες της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ως προς τις θέσεις πρόσδεσης στη στήλη. Στο διάγραμμα 19 παρουσιάζεται η πορεία καθαρισμού της ανασυνδυασμένης β-ξυλοζιδάσης. Η έκλυση ξεκίνησε για περιεκτικότητα ιμιδαζολίου 64% v/v. Η μέγιστη ποσότητα πρωτεΐνης εκλούστηκε για περιεκτικότητα ιμιδαζολίου 75% v/v.



Διάγραμμα 19: Έκλυση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης κατά την αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου

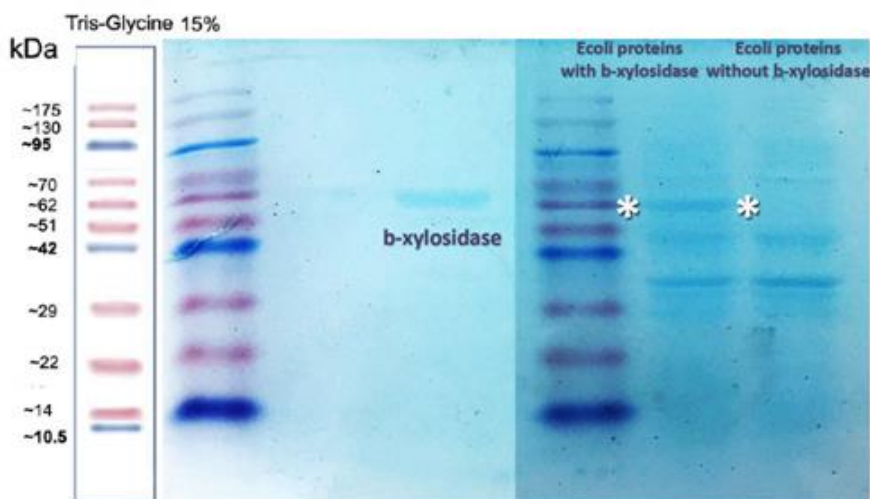
Πίνακας 7: Πίνακας καθαρισμού ανασυνδυασμένης β-ξυλοζιδάσης

	ΣΥΝΟΛΙΚΑ UNITS (Units)	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ (mg)	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ (Units/mg)	ΑΝΑΚΤΗΣΗ (%)	ΒΑΘΜΟΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ
CRUDE EXTRACT	43,5	56,5	0,8	100,0	1,0
TALON	20,9	6,2	3,4	48,2	4,4
AMICON	17,2	4,1	4,2	39,5	5,5
DIALYSIS	12,2	2,4	5,0	27,9	6,5

Στο πρώτο στάδιο καθαρισμού με την χρωματογραφία Talon πραγματοποιήθηκε ανάκτηση 48,2% με βαθμό καθαρισμού 4,4. Η καθαρή πρωτεΐνη που προέκυψε έπειτα από τα τρία στάδια καθαρισμού είχε τελική ειδική ενεργότητα 5,0 Units/mg πρωτεΐνης με βαθμό καθαρισμού 6,5 και ανάκτηση 27,9%.

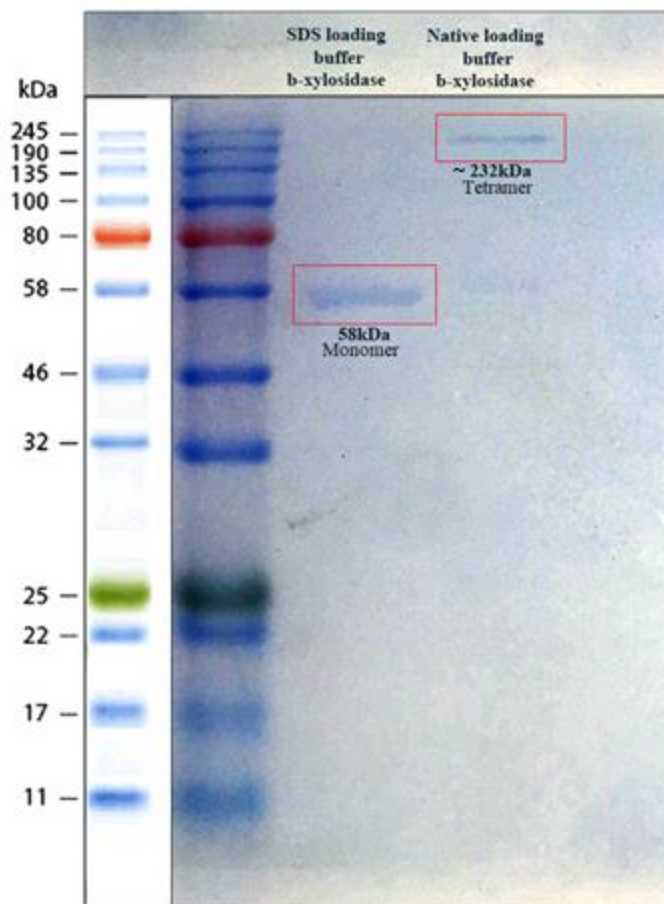
### 3.2.1 Ηλεκτροφόρηση β-ξυλοζιδάσης σε πήκτωμα πολυακριμιδίου (SDS-PAGE)

Το SDS-PAGE που προέκυψε ύστερα από ηλεκτροφόρηση της απομονωμένης και καθαρισμένης πρωτεΐνης καθώς και του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με και χωρίς ετερόλογη έκφραση παρουσιάζεται στην εικόνα 14.



Εικόνα 14: SDS-PAGE της καθαρισμένης β-ξυλοζιδάσης (αριστερά) και του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ανασυνδυασμένα και μη κύτταρα *E.coli* (δεξιά)

Είναι εμφανής η διαφορά της απομονωμένης και καθαρισμένης β-ξυλοζιδάσης από αυτή του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος του *E.coli*. Δεξιά εμφανίζονται στο SDS-PAGE και άλλες πρωτεΐνες που εκφράζονται από τον *E.coli* με μικρότερα μοριακά βάρη. Επίσης δεξιά στο SDS-PAGE είναι εμφανής η διαφορά στις μπάντες όπου στην πρώτη το *E.coli* έχει δεχθεί το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και εκφράζει την β-ξυλοζιδάση, ενώ στην δεύτερη όχι.



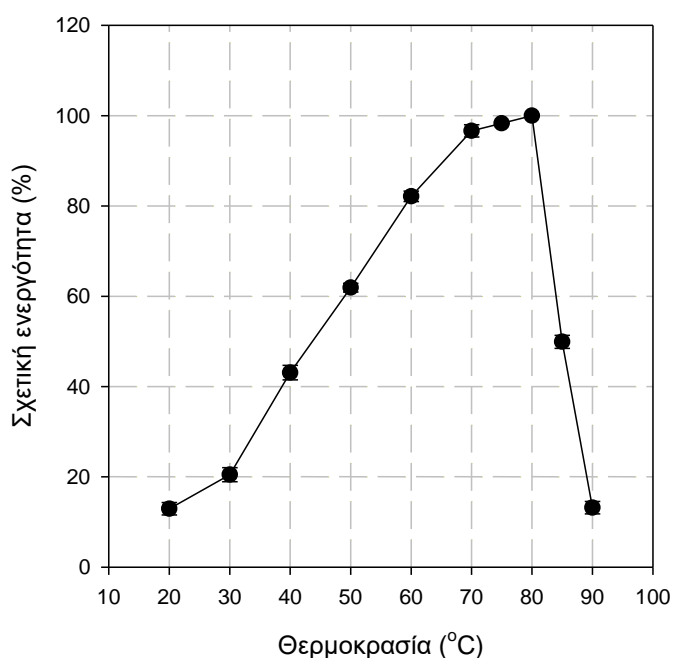
Εικόνα 15: SDS-PAGE για β-ξυλοζιδάση ύστερα από θερμική επεξεργασία και αντίδραση με SDS και χωρίς.

Στο πρώτο πηγάδι όπου το ένζυμο έχει υποστεί θερμική επεξεργασία και έχει αντιδράσει με τον αποδιατακτικό παράγοντα SDS τελικά απεικονίζεται μόνο η υπομονάδα της πρωτεΐνης. Το μοριακό βάρος σύμφωνα με τις πρωτεΐνες πρότυπου μοριακού βάρους υπολογίζεται στα 58 kDa. Στο δεύτερο πηγάδι όπου το ένζυμο δεν υπέστη επεξεργασία προκύπτει τελικά πρωτεΐνη με περίπου τετραπλάσιο μοριακό βάρος, ίσο με 232 kDa ( $4 \times 58 = 232$ ). Επομένως πρόκειται για μία τετραμερή πρωτεΐνη.

### 3.3 Χαρακτηρισμός β-ξυλοζιδάσης

#### 3.3.1 Βέλτιστη θερμοκρασία του ενζύμου και σταθερότητά του σε διαφορετικές θερμοκρασίες

Για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας δραστηριότητας του ανασυνδυασμένου ενζύμου, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του με το υπόστρωμα οNPX 1mM σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 20° έως 90°C, η οποία είχε διάρκεια 15 λεπτών. Μετά το πέρας των 15 λεπτών, τερματίστηκε η αντίδραση με ποσότητα Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και φωτομετρήθηκαν τα δείγματα κάθε θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία στην οποία παρουσίασε τη μέγιστη ενεργότητα η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ήταν στους 80°C. Στην θερμοκρασία αυτή, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παρουσιάζει το 100% της σχετικής δραστηριότητας της, και με βάση αυτήν ορίστηκαν τα ποσοστά σχετικής δραστηριότητάς της στις υπόλοιπες θερμοκρασίες.

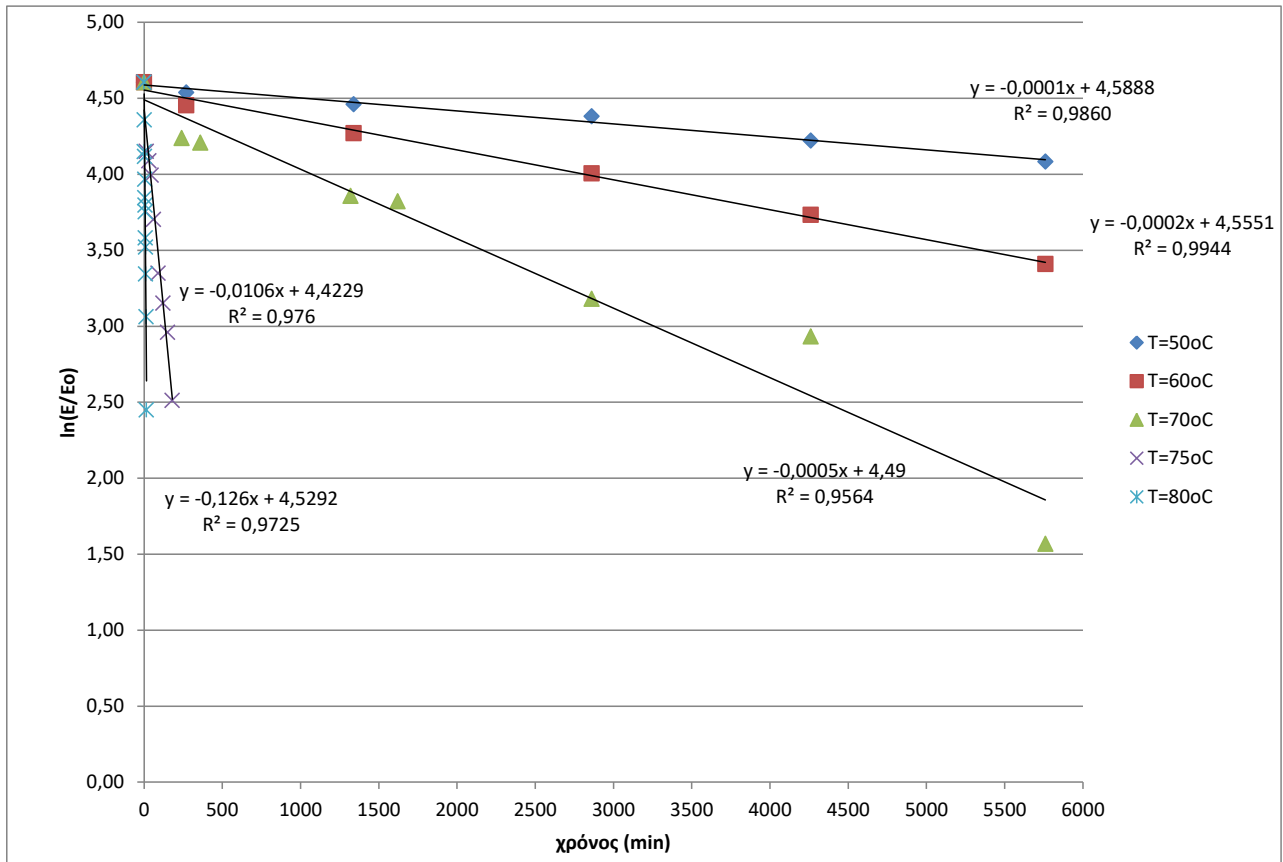


Διάγραμμα 20: Σχετική ενεργότητα της β-ξυλοζιδάσης σε υπόστρωμα οNPX και σε θερμοκρασίες από 20-90° C

Στο διάγραμμα 20 παρατηρείται ότι για τις θερμοκρασίες 70, 75 και 80°C η σχετική ενεργότητα είναι πολύ κοντά στο 100%. Παρόλα αυτά, παρουσιάζει βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας στους 80°C. Στους 60°C η σχετική ενεργότητα είναι 80% και στους 50°C είναι 60%, ενώ στους 85°C η σχετική ενεργότητα έχει μειωθεί στο 50%. Στους 20,30 και 90° C η εναπομένουσα σχετική ενεργότητα της β-ξυλοζιδάσης βρίσκεται κάτω από το 30%.

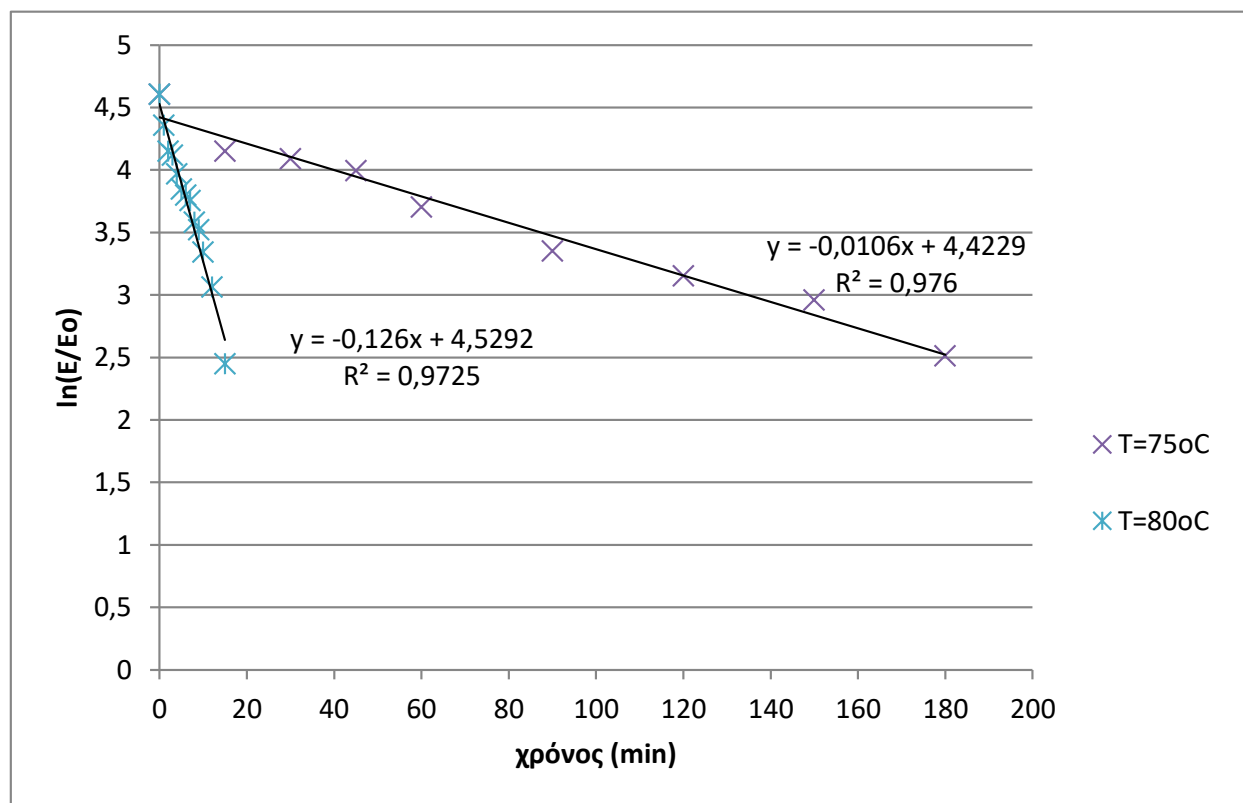


Η σταθερότητα του ενζύμου μελετήθηκε για τις θερμοκρασίες 30,40,50,60,70,75,80 και 85°C. Στους 30° και στους 40° C το ένζυμο παρέμεινε σταθερό για μία βδομάδα χωρίς να επηρεαστεί η ενεργότητά του. Στους 85° C μόλις σε ένα λεπτό μηδενίστηκε η ενεργότητά του. Για τις υπόλοιπες θερμοκρασίες παρουσιάζονται οι καμπύλες επιβίωσης με κατακόρυφο άξονα την λογαριθμική % σχέση της ενεργότητας κάποια χρονική στιγμή προς την αρχική και οριζόντιο άξονα τον χρόνο.



Διάγραμμα 21: Καμπύλη επιβίωσης της β-ξυλοζιδάσης στις θερμοκρασίες 50,60,70,75 και 80° C

Οι 75 και 80° C παρουσιάζονται μεγεθυμένοι ξανά στο διάγραμμα 22.



Διάγραμμα 22: Καμπύλη επιβίωσης της β-ξυλοζιδάσης στις θερμοκρασίες 75 και 80° C

Η αδρανοποίηση των ενζύμων περιγράφεται συχνά από ένα κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης στο οποίο η ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται λογαριθμικά γραμμικά ως συνάρτηση του χρόνου όπως περιγράφεται από την εξίσωση:  $\ln(E/E_0) = -k_d t + c$  όπου  $E_0$  η αρχική ενεργότητα του ενζύμου ( $t=0$ ),  $E$  η ενεργότητα του ενζύμου την χρονική στιγμή  $t$  και  $k_d$  η σταθερά απενεργοποίησης.

Προσαρμόζοντας στα πειραματικά σημεία ευθεία προκύπτει από την κλίση της η σταθερά απενεργοποίησης  $k_d$ . Ο χρόνος ημιζωής στην συνέχεια υπολογίζεται από την σχέση  $t_{1/2} = \ln 2 / k_d$  και ο χρόνος δεκαδικής μείωσης από την σχέση  $D = 2,303 / k_d$ .

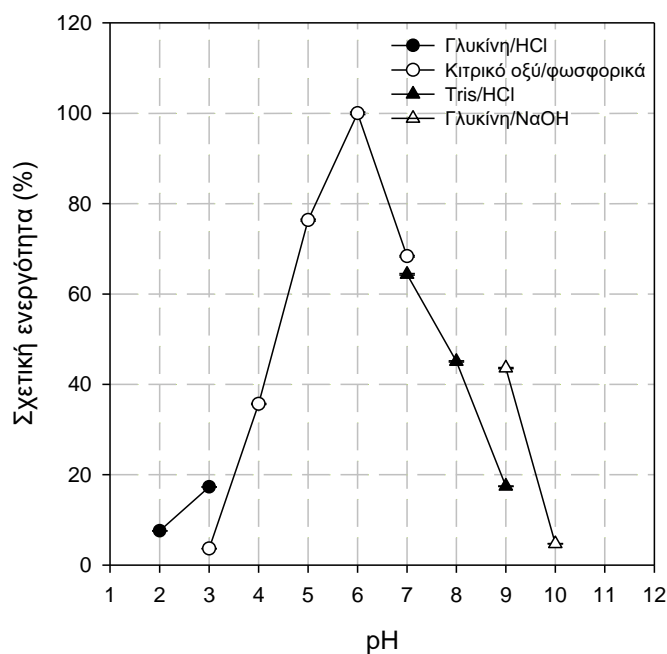
**Πίνακας 8:** Υπολογισμός σταθεράς απενεργοποίησης, χρόνου ημιζωής, σταθεράς D στις θερμοκρασίες 50,60,70,75 και 80° C της β-ξυλοζιδάσης

T(°C)	K <sub>d</sub> (min <sup>-1</sup> )	Half-life	D
50	0,0001	6931,0 min (115,5 h)	23030,0 min (383,8h)
60	0,0002	3465,5 min (57,6 h)	11515,0 min (191,9h)
70	0,0005	1386,2 min (32,1 h)	4606,0 min (76,6h)
75	0,0106	65,4min (1,1 h)	217,3 min (3,6h)
80	0,126	5,5 min	18,3 min

Η β-ξυλοζιδάσης που απομονώθηκε από τον *Geobacillus* sp.24 εμφανίζει χρόνος ημιζωής 32 ωρών στους 70° C. Ο χρόνος ημιζωής για β-ξυλοζιδάσες που απομονώθηκαν από τους οργανισμούς *Geobacillus stearothermophilus* (Contreras *et al.*, 2008), *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 (Anand *et al.*, 2013) και *Geobacillus pallidus* (Quintero *et al.*, 2007) είναι 3,4 , 3 και 10 ώρες στους 70°C, αντίστοιχα. Συγκριτικά λοιπόν η β-ξυλοζιδάση που μελετήθηκε εμφανίζει αυξημένη σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Παρόλα αυτά η β-ξυλοζιδάση που έχει απομονωθεί από τον *Geobacillus* sp. WSUCF1 (Bhalla *et al.*, 2004) εμφάνισε χρόνο ημιζωής 9 ημέρες (Πίνακας 11).

### 3.3.2 Βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου και σταθερότητά του σε διαφορετικά pH

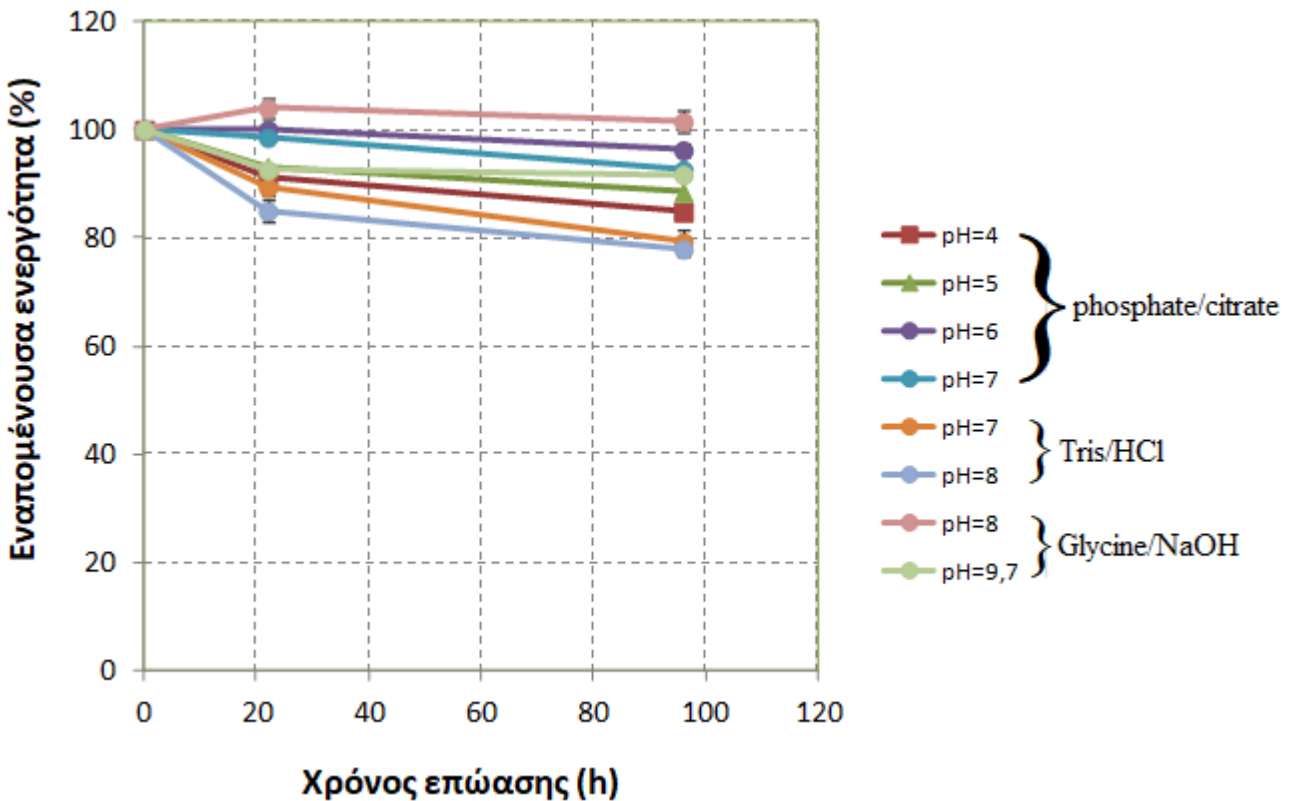
Για την εύρεση του βέλτιστου pH δράσης του ανασυνδυασμένου ενζύμου, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του με το υπόστρωμα oNPX 1 mM σε ένα εύρος pH από 2 έως 10. Το pH στο οποίο εμφάνισε τη μέγιστη ενεργότητα η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παρουσιάζει το 100% της σχετικής δραστηριότητάς της, και με βάση αυτό ορίστηκαν τα ποσοστά σχετικής δραστηριότητάς της για τα υπόλοιπα pH.



**Διάγραμμα 23: Σχετική ενεργότητα της β-ξυλοζιδάσης σε υπόστρωμα οNPX σε διάφορα pH (2-10)**

Το ένζυμο β-ξυλοζιδάσης αντέδρασε με υπόστρωμα 1 mM οNPX σε ένα εύρος pH (2 έως 10) για 15 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 60° C και μετρήθηκε η ενεργότητα του για κάθε pH στα 410 nm. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 23 παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα για pH = 6 (ρ.δ. citrate-phosphate). Για pH=2 και pH=10 το ένζυμο παρουσιάζει ελάχιστη δραστηριότητα. Αξίζει να αναφερθεί ότι εμφάνισε δραστηριότητα 18% σε pH=3 γλυκίνης/ HCl ενώ σε pH=3 κιτρικού οξέος με φωσφορικό μόλις 2% σχετική ενεργότητα. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και στο pH=9 με γλυκίνη/NaOH και Tris/HCl όπου στο πρώτο έχει σχετική ενεργότητα 48% ενώ στο δεύτερο 19%.

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η σταθερότητα του ενζύμου σε ένα μεγάλο εύρος pH (4-9,7) σε υπόστρωμα οNPX 1 mM. Τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία 4° C για 22 ώρες και για 96 ώρες και πραγματοποιήθηκε αντίδραση με το υπόστρωμα, ώστε να μετρηθεί η ενεργότητά του. Ως 100% της σχετική ενεργότητας χρησιμοποιήθηκε αυτή για pH 6 καθώς εμφάνισε τη μέγιστη, και με βάση αυτό ορίστηκαν τα ποσοστά σχετικής δραστηριότητάς της για τα υπόλοιπα pH, στις 22 και στις 96 ώρες.

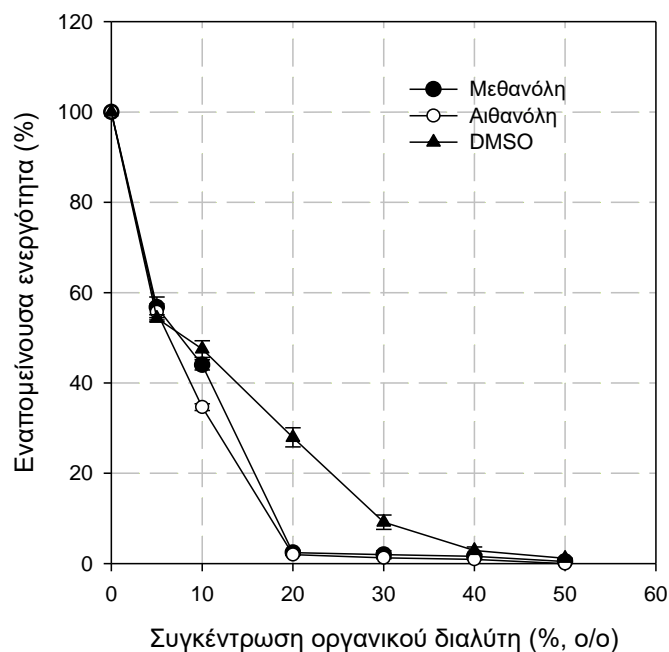


Διάγραμμα 24: Η % εναπομένουσα σχετική ενεργότητα της β-ξυλοζιδάσης σε υπόστρωμα οNΡΧ

Στα περισσότερα pH, και στις δύο διαφορετικές ώρες η ενεργότητα που μετρήθηκε παρουσίασε πολύ μικρές αποκλίσεις. Σε ένα εύρος pH από 4 έως 7 citrate-phosphate το ένζυμο εμφάνισε αυξημένη σταθερότητα. Η % εναπομένουσα σχετική ενεργότητα του ενζύμου κυμάνθηκε από 91,2-100% στις 22 ώρες και παρουσίασε μικρή πτώση (84,8-96,2%) στις 96 ώρες, αντίστοιχα. Επίσης, το ένζυμο εμφάνισε αυξημένη ενεργότητα σε pH=8,33 και 9,7 ρυθμιστικού διαλύματος γλυκίνης-NaOH. Μάλιστα για pH=8 παρουσιάζει % εναπομένουσα σχετική ενεργότητα μεγαλύτερη από 100% κατά 3,9% στις 22 ώρες και κατά 1,5% στις 96 ώρες. Επομένως πρόκειται για ένα πολύ σταθερό ένζυμο σε ένα μεγάλο εύρος pH (4-9,7).

### 3.3.3 Ενζυμική σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες

Η β-ξυλοζιδάση επώαστηκε στους 70° C παρουσία των οργανικών διαλυτών μεθανόλη, αιθανόλη και DMSO σε διάφορες συγκεντρώσεις.

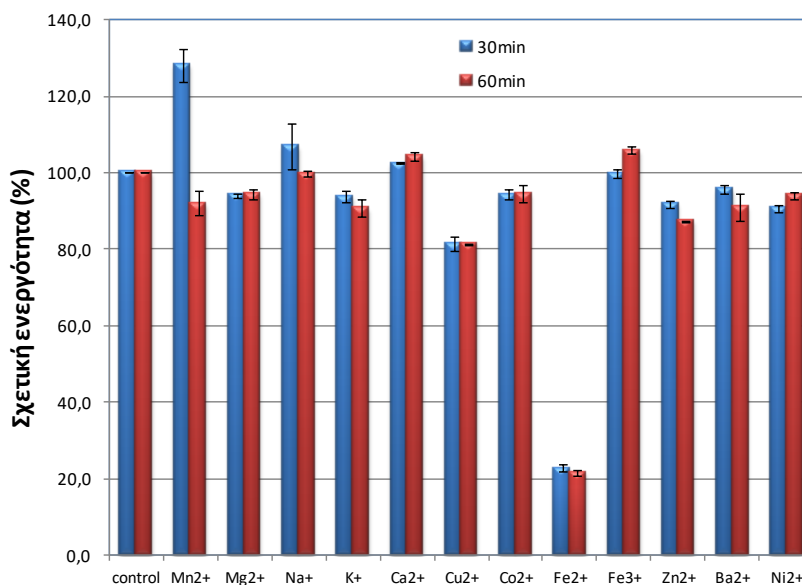


**Διάγραμμα 25: Σχετική ενεργότητα της β-ξυλοζιδάσης στους οργανικούς διαλύτες μεθανόλη, αιθανόλη και DMSO**

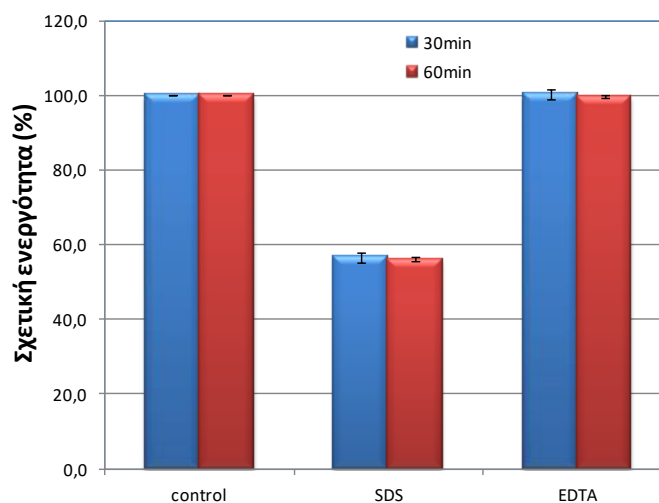
Στο διάγραμμα 25 παρατηρείται μια πτώση της σχετικής ενεργότητας για την μεθανόλη, την αιθανόλη και το DMSO. Για συγκέντρωση μόλις 5% v/v η % εναπομένουσα σχετική ενεργότητα μειώνεται στο 57% για την μεθανόλη, στο 56% για την αιθανόλη και στο 54% για το DMSO. Η μεθανόλη και η αιθανόλη από συγκέντρωση μόλις 20% v/v σχεδόν μηδενίζουν την ενεργότητα του ενζύμου, ενώ το DMSO την μηδενίζει για συγκέντρωση 40%. Επομένως η παρουσία οργανικού διαλύτη δεν επηρεάζει θετικά την δραστηριότητα του ενζύμου. Βιβλιογραφικά, η β-ξυλοζιδάση που απομονώθηκε από τον *Dictyoglomus thermophilum* (Qi Li *et al.*, 2018) για συγκέντρωση 5% μεθανόλης και αιθανόλης παρουσίασε μία μικρή αύξηση κατά 10% στην ενεργότητά της.

### 3.3.4 Ενζυμική σταθερότητα σε μεταλλοϊόντα, EDTA και SDS

Η επίδραση των μεταλλοϊόντων και των χημικών ενώσεων EDTA και SDS στην δραστικότητα του ενζύμου φαίνονται στα διαγράμματα 26 και 27.



Διάγραμμα 26: Ραβδόγραμμα της % εναπομένουσας σχετικής ενεργότητας της β-ξυλοζιδάσης για διάφορα μεταλλοϊόντα ύστερα από επώαση στους 30° C για 30 και 60 λεπτά



Διάγραμμα 27: Ραβδόγραμμα της % εναπομένουσας σχετικής ενεργότητας της β-ξυλοζιδάσης για τις χημικές ενώσεις SDS και EDTA ύστερα από επώαση στους 30° C για 30 και 60 λεπτά

Η δραστηριότητα του ενζύμου παρεμποδίστηκε αρκετά από τον δισθενή σίδηρο, με μείωση της % εναπομένουσας σχετικής ενεργότητας στο 22,8% στα 30 λεπτά και στο 21,5% στα 60 λεπτά. Επίσης και κατά την επώαση με SDS η % εναπομένουσα σχετική ενεργότητα μειώθηκε στο 56,6% στα 30 λεπτά και στο 56,1% στα 60 λεπτά. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας SDS συνδέεται στα πρωτεϊνικά μόρια, προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα να αποδιατάσσει την πρωτεΐνη. Έτσι είναι λογικό να μειώνεται η δραστηριότητά της. Η δραστηριότητα των ιόντων  $Mn^{+2}$ ,  $Na^{+}$  και  $Ca^{2+}$  παρατηρήθηκε να είναι ελαφρώς αυξημένη με % εναπομένουσα σχετική ενεργότητα 128,2%, 106,9% και 102,6% αντίστοιχα στα 30 λεπτά αλλά και του τρισθενή σιδήρου στα 60 λεπτά ίση με 106%.

### 3.3.5 Δραστηριότητας του ενζύμου σε άλλα υποστρώματα

Μελετήθηκε η ικανότητα της β-ξυλοζιδάσης να δράσει σε διαφορετικά υποστρώματα. Η σχετική ενεργότητα του ενζύμου για το υπόστρωμα οNPX θεωρήθηκε ως 100%.

**Πίνακας 9: Σχετική ενεργότητα ενζύμου σε διάφορα υποστρώματα**

Υπόστρωμα	Σχετική Ενεργότητα %
οNPX	100,00
pNPCellobioside	0,93
pNPGlucopyranoside	3,41
pNP-a-L-Rhamnopyranoside	0,62
pNPGalactopyranoside	-
Ξυλάνη (Birchwood )	-
Ξυλάνη (Oat spelts )	-

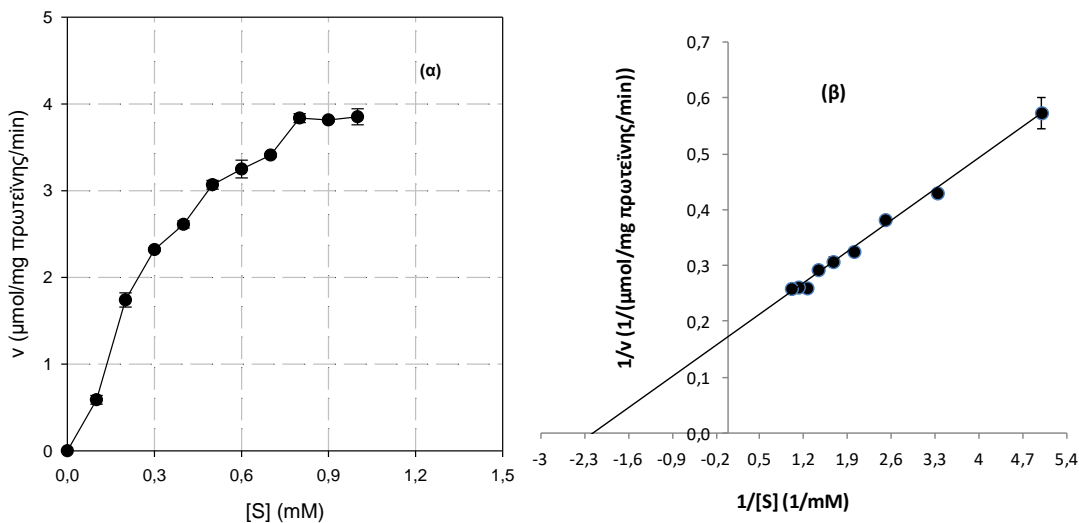
Η β-ξυλοζιδάση δεν παρουσιάζει σχετική ενεργότητα έναντι των παραπάνω υποστρωμάτων καθώς δεν τα υδρολύει προς απελευθέρωση pNP<sup>-</sup>, ούτε είναι δραστική έναντι της ξυλάνης.

### 3.3.6 Κινητική μελέτη του ενζύμου β-ξυλοζιδάση

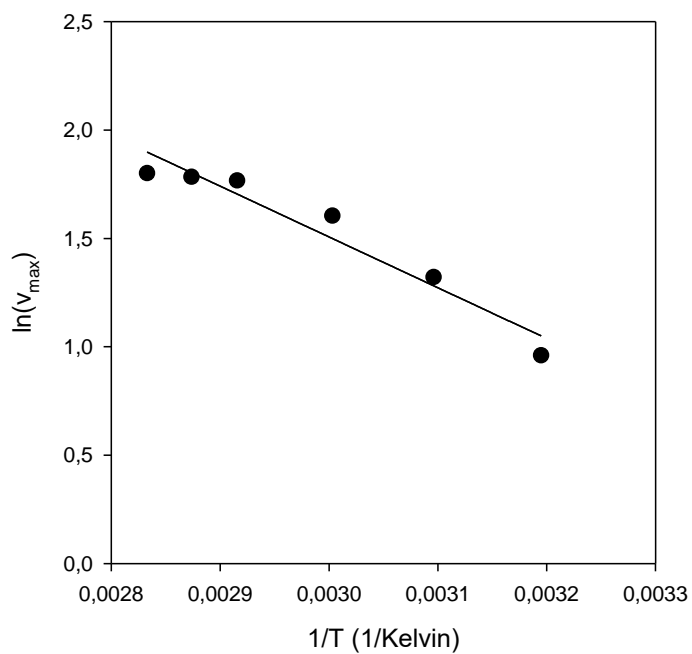
Οι κινητικοί παράμετροι  $K_m$  (σταθερά Michaelis-Menten) και  $V_{max}$  υπολογίστηκαν με προσαρμογή της εξίσωσης Lineweaver-Burk, από την τομή του διαμήκου άξονα ( $1/V_{max}$ ) και την κλίση ( $K_m/V_{max}$ ) του διαγράμματος Lineweaver-Burk (διάγραμμα 28β). Η σταθερά  $k_{cat}$  υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση  $k_{cat}=V_{max}/[E_t]$  όπου  $[E_t]$ =η συνολική συγκέντρωση του



ενζύμου. Από την προσαρμογή της λογαριθμικής εξίσωσης Arrhenius με άξονες  $y : \ln k_{cat}$  και  $x : 1 / T$  υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης από την κλίση  $(-E_a / R)$  (διάγραμμα 29).



**Διάγραμμα 28:** (α) Διάγραμμα Michaelis-Meneten, (β) Διάγραμμα Lineweaver-Burk για τον υπολογισμό των  $K_m$  και  $V_{max}$



**Διάγραμμα 29:** Διάγραμμα Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης

Η ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης ( $\Delta G^*$ ), η ενθαλπία ( $\Delta H^*$ ) και η εντροπία ( $\Delta S^*$ ) υπολογίστηκαν για την βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου (80° C) από τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\Delta G^* = RT \ln \frac{k_{cat} \cdot h}{k_b \cdot T} \quad (3)$$

$$\Delta H^* = E_a - RT \quad (4)$$

$$\Delta S^* = \frac{(\Delta H^* - \Delta G^*)}{T} \quad (5)$$

Όπου:

- σταθερά Boltzmann ( $k_b$ )=1,38E-23 J/K
- σταθερά Planck ( $h$ ) = 6,63E-34 J\*s
- σταθερά αερίων R=8,314 J/mol/K

Η επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό αντίδρασης που εκφράζεται ως λόγος θερμοκρασίας ( $Q_{10}$ ), είναι ο συντελεστής με τον οποίο ο ρυθμός αυξάνεται λόγω αύξησης της θερμοκρασίας κατά 10°C. Το  $Q_{10}$  υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση που δόθηκε από τους Dixon και Webb:

$$Q_{10} = \exp( E_a \cdot 10 / RT^2 ) \quad (6)$$

Η ελεύθερη ενέργεια της ενεργοποίησης της σύνδεσης του υποστρώματος ( $\Delta G^*_{E-S}$ ) και του σχηματισμού της μεταβατικής κατάστασης (transition state) ( $\Delta G^*_{E-T}$ ) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες σχέσεις:

$$\Delta G^*_{E-S} \text{ (free energy of substrate binding)} = RT \ln(1/K_M) \quad (7)$$

$$\Delta G^*_{E-T} \text{ (free energy for transition state formation)} = RT \ln( k_{cat}/K_M ) \quad (8)$$

(Javed *et al.*, 2009)

Οι παραπάνω υπολογισμοί δίνονται στον πίνακα 10.

**Πίνακας 10: Κινητικοί και θερμοδυναμικοί παράμετροι β-ξυλοζιδάσης**

<b>Παράμετρος</b>	<b>Τιμή</b>
$K_M$ (mM)	0.46
$V_{max}$ ( $\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg protein})^{-1}$ )	5.77
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	22.32
$k_{cat}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	48.52
$E_a$ ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	19.5
$Q_{10}$	1.0
$\Delta H^*$ ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	16.6
$\Delta G^*$ ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	77.7
$\Delta S^*$ ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )	-173.20
$\Delta G_{E-S}^*$ ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	-2.3
$\Delta G_{E-T}^*$ ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	-7.46

Η σταθερότητα ενός πρωτεϊνικού μορίου είναι αποτέλεσμα ισορροπίας μεταξύ σταθεροποιητικών και αποσταθεροποιητικών τάσεων οι οποίες επηρεάζονται από υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου και δισουλφιδικούς δεσμούς (Gouzi *et al.*, 2011). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση, ορισμένοι ή όλοι οι χημικοί δεσμοί των αντιδρώντων πρέπει να σπάσουν έτσι ώστε να σχηματιστούν νέοι δεσμοί, εκείνοι των προϊόντων. Για να φτάσουν οι δεσμοί σε μια κατάσταση που τους επιτρέπει να σπάσουν, το μόριο πρέπει να παραμορφωθεί σε μια ασταθή κατάσταση που ονομάζεται μεταβατική κατάσταση (transition state). Επειδή η μεταβατική κατάσταση είναι ασταθής, τα μόρια των αντιδρώντων δεν παραμένουν εκεί, αλλά προχωρούν γρήγορα στο επόμενο στάδιο της χημικής αντίδρασης.

Για να ξεκινήσει λοιπόν η αντίδραση και να πραγματοποιηθεί η επιθυμητή παραμόρφωση χρειάζεται ενέργεια, την ενέργεια ενεργοποίησης ( $E_a$ ). Τα ένζυμα συμβάλουν στην μείωση της ενέργειας αυτής, χαμηλώνοντας τους ενεργειακούς φραγμούς και καταλύοντας την αντίδραση. Η τιμή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ( $\Delta G^*$ ) σχετίζεται άμεσα με την σταθερότητα της πρωτεΐνης. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της  $\Delta G^*$ , τόσο μεγαλύτερη είναι και η σταθερότητα του ενζύμου. Τα  $\Delta H^*$  και  $\Delta S^*$  είναι δύο σημαντικές παράμετροι οι οποίες σχετίζονται με τη δομή-λειτουργία των ενζύμων. Η μεταβολή της ενθαλπίας ( $\Delta H^*$ ) αποτελεί μέτρο διάσπασης των μη ομοιοπολικών δεσμών κατά τη δημιουργία της μεταβατικής κατάστασης. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της  $\Delta H^*$ , τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μη ομοιοπολικών

δεσμών που είναι παρόντα στο μόριο με αποτέλεσμα να είναι περισσότερο σταθερό (Gouzi *et al.*, 2011). Η εντροπία αποτελεί την μεταβολή της δομικής διαταραχής (structural disorder) κατά την αναδίπλωση του ενζύμου. Σύμφωνα με την θερμοδυναμική, μείωση της εντροπίας σημαίνει μείωση του βαθμού δομικής διαταραχής των μορίων. Όπως στην περίπτωση αυτή, αρνητική τιμή της εντροπίας για την ενεργοποίηση της κατάλυσης από το ένζυμο, υποδεικνύει ότι η δομή του ενζύμου με το υπόστρωμα στην μεταβατική κατάσταση είναι πιο σταθερό/τακτοποιημένο από ότι του συμπλόκου ενζυμο-υπόστρωμα. Οι υψηλές τιμές του  $\Delta H^*$  συνδέονται με την αυξημένη σταθερότητα των ενζύμων εκτός εάν συνδυάζονται παράλληλα και με μια μεγάλη αύξηση της τιμής του  $\Delta S^*$ , η οποία λειτουργεί αποσταθεροποιητικά.

Επειδή προκύπτουν  $\Delta H^* > 0$ ,  $\Delta S^* < 0$  και  $\Delta G^* > 0$  η αντίδραση δεν είναι αυθόρμητη. Η αντίδραση είναι ενδόθερμη άρα απορροφά ενέργεια από το περιβάλλον της υπό μορφή θερμότητας. Η αρνητική τιμή του  $\Delta G^*_{(E-T)}$  υποδηλώνει τον αυθόρμητο σχηματισμό των προϊόντων μετά τη δέσμευση του υποστρώματος.

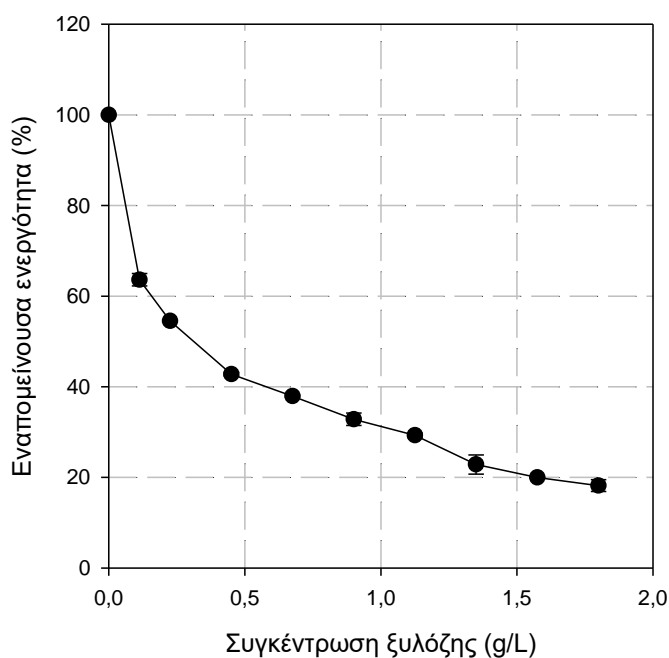
Η ενέργεια ενεργοποίησης για την β-ξυλοζιδάση που απομονώθηκε από τους *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (Shallom *et al.*, 2005), *Thermomonospora* strain LL (Ristroph *et al.*, 1985), *Sclerotium rolfsii* (Lachke *et al.*, 1985), *Caldocellum saccharolyticum* (Hudson *et al.*, 1991), *Kluyveromyces marxianus* (Rajoka *et al.*, 2007) και *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Shao *et al.*, 1992) υπολογίστηκε στα 10, 12, 44, 53, 57 και 69 kJ/mol, αντίστοιχα. Η ενέργεια ενεργοποίησης που υπολογίστηκε 19,5 kJ/mol για την παρούσα β-ξυλοζιδάση βρίσκεται στο εύρος αυτών.

Η μεταβολή της ενθαλπίας και της εντροπίας για την ενεργοποίηση της β-ξυλοζιδάσης που απομονώθηκε από τον *Kluyveromyces marxianus* (Rajoka *et al.*, 2007) είναι 45 kJ/mol και 56 J/molK, αντίστοιχα. Και οι δύο παράμετροι είναι μεγαλύτεροι συγκριτικά με την προς μελέτη β-ξυλοζιδάση. Η αυξημένη τιμή του  $\Delta H^*$  συνδέεται με την αυξημένη σταθερότητα του ενζύμου εκτός εάν συνδυάζεται παράλληλα και με μια μεγάλη αύξηση της τιμής του  $\Delta S^*$ , η οποία λειτουργεί αποσταθεροποιητικά όπως στην περίπτωση της β-ξυλοζιδάσης που απομονώθηκε από τον *Kluyveromyces marxianus*.

Για την β-ξυλοζιδάση που απομονώθηκε από τον *Humicola lanuginosa* (Bokhari *et al.*, 2010) έχουν υπολογιστεί οι τιμές  $E_a=23$  kJ/mol,  $\Delta G^*=76,4$  kJ/mol,  $\Delta H^*=20$  kJ/mol,  $\Delta S^*=-168,5$  J/molK,  $\Delta G_{E-S}^*=1,29$  kJ/mol και  $\Delta G_{E-T}^*=-5,5$  kJ/mol. Οι τιμές αυτές είναι πολύ κοντά με τις τιμές που υπολογίστηκαν στον πίνακα 10 για την μελετώμενη β-ξυλοζιδάση. Η τιμή για το  $\Delta G_{E-S}^*$  είναι μεγαλύτερη από αυτήν του  $\Delta G_{E-T}^*$ , επομένως στην μεταβατική κατάσταση το σύμπλοκο ένζυμο-υπόστρωμα είναι λιγότερο σταθερό και υποδηλώνει τον αυθόρμητο σχηματισμό των προϊόντων μετά τη δέσμευση του υποστρώματος.

### 3.3.7 Αναστολή από την ξυλόζη

Για την μελέτη της παρεμπόδισης της β-ξυλοζιδάσης από την ξυλόζη το ένζυμο αντέδρασε με το υπόστρωμα οNPX 0,5 mM παρουσία ξυλόζης σε διάφορες συγκεντρώσεις.

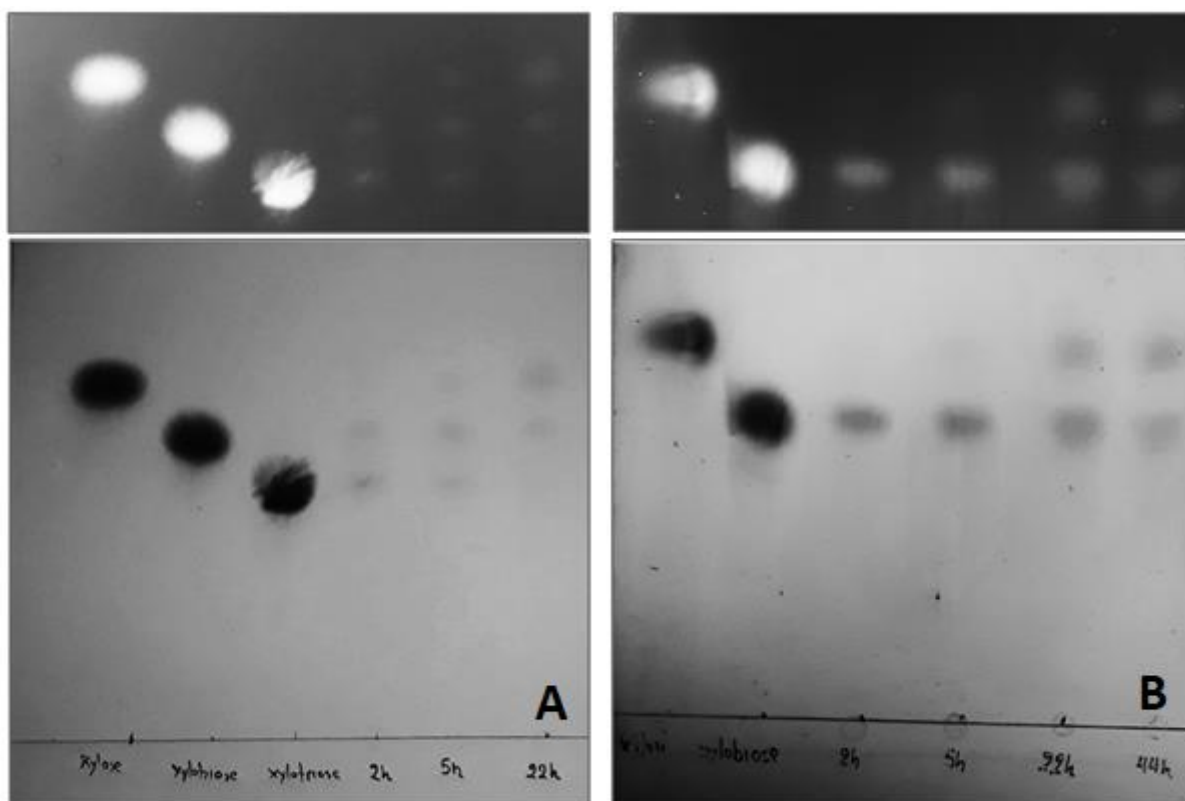


**Διάγραμμα 30:** Η % εναπομένουσα σχετική ενεργότητα της β-ξυλοζιδάσης για διάφορες συγκεντρώσεις ξυλόζης

Για συγκέντρωση μόλις 0,1125 M ξυλόζης η % εναπομένουσα σχετική ενεργότητα πέφτει στο 63,6%, για 0,225 M στο 54,5%, για 0,45 M στο 42,8%, για 0,675 M στο 37,9%, για 0,9 M στο 32,8%, για 1,125 στο 29,3%, για 1,35 στο 22,8% , για 1,575 στο 20% και για 1,8 M στο 18,2% αντίστοιχα.

### 3.3.8 Αποτελέσματα TLC

Παρακάτω παρουσιάζονται τα χαρτογραφήματα που προέκυψαν από TLC για υπόστρωμα ξυλοβιόζη και ξυλοτριόζη.



Εικόνα 16: Χρωματογραφία χάρτου υδρόλυσης (A) ξυλοτριόζης και (B) ξυλοβιόζης από την β-ξυλοζιδάση

Παρατηρείται ότι η υδρόλυση της ξυλοτριόζης από την β-ξυλοζιδάση ξεκινάει στις 2 ώρες όμως φαίνεται πιο έντονη στις 5 ώρες όπου είναι ευδιάκριτες οι κουκίδες και των τριών ενώσεων. Στις 22 ώρες όλη η ξυλοτριόζη έχει διασπαστεί σε ξυλόζη και ξυλοβιόζη.

Στην δεύτερη χρωματογραφία που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η ξυλοβιόζη, παρατηρείται ότι στις 2 ώρες δεν έχει ξεκινήσει η αποικοδόμησή της, ενώ αχνή είναι και στις 5 ώρες. Στις 22 ώρες φαίνεται έντονα η αποικοδόμηση της ξυλοβιόζης σε ξυλόζη.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ανασυνδυασμένη β-ξυλοζιδάση έχει υδρολυτική ενεργότητα έναντι των μικρών ξυλοολιγοσακχαριτών.

### 3.4 Βιοπληροφορική Μελέτη

Η αλληλουχία των αμινοξέων της β-ξυλοζιδάσης είναι η παρακάτω:

>Xyd39sp24

MKVVNVPSNGREKFKKNWKFVGTGRLGLALQKEYLDHLKLVQEKIGFRYIRGHGLLSDDVGIYREVEIDGE  
MKPFYNFTYIDRIVDSYLALNIRPFIEFGFMPKALASGDQTVFYWKGNVTPPKDYNKWRDLIVAVVSHFIERY  
GIEEVRTWLFVWNEPNLVNFWKDKANKQEYFKLYEVTARAVKSVDPHLQVGGPAICGGSDEWITDFLHFCA  
ERRVPVDFVSRHAYTSKAPHKKTFEYQQELEPPEDMLEQFKTVRALIRQSPFPHLPLHITEYNTSYSPINPVHD  
TALNAAIARILSEGGDYVDSFSYWTFSDVFEEMDVPKALFHGGFGLVALHSIPKPTFFHAFTFFNALGDELLYR  
DGEMIVTRRKDGSIAAVLWNLVMEKGEGLTKEVQLVIPVSFSAVFIKRQIVNEQYGNAWRVWKQMGRPRF  
PSRQAVETLRQVAQPHVMTEQRRATDGVIHLSIVLSKNEVTLIEIEQVRDETSTYVGLDDGEMTSYSS

Γνωρίζοντας την αλληλουχία των πρωτεϊνών της β-ξυλοζιδάσης με εφαρμογή του προγράμματος ProtParam ExPASy tool προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα:

**Number of amino acids:** 503

**Molecular weight:** 58094.28

**Theoretical pI:** 6.14

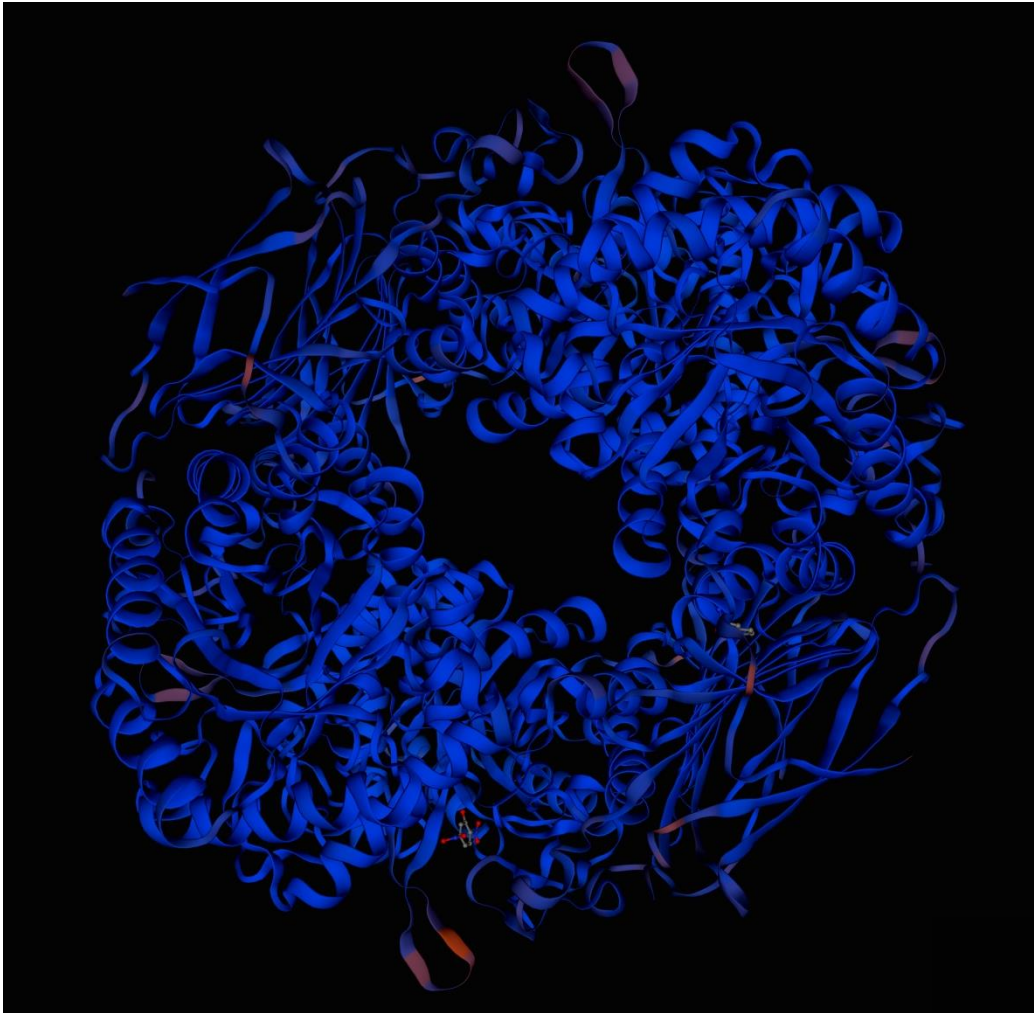
**Total number of negatively charged residues (Asp + Glu):** 65

**Total number of positively charged residues (Arg + Lys):** 58

**Formula:** C<sub>2658</sub>H<sub>4036</sub>N<sub>696</sub>O<sub>746</sub>S<sub>13</sub>

**Total number of atoms:** 8149

Επίσης, από το πρόγραμμα Swiss model tool ExPASy εισάγοντας την αμινοξική αλληλουχία προκύπτει η πιθανή δομή της ομο-τετραμερης πρωτεΐνης.



Εικόνα 17: Πιθανή πρωτεϊνική δομή της β-ξυλοζιδάσης

Από το πρόγραμμα Clustal omega multiple alignment πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση της β-ξυλοζιδάσης sr24 με τις πιο όμοιες σε αμινοξική αλληλουχία β-ξυλοζιδάσες σύμφωνα με το BLASTp. Αυτές είναι:

1. η WP\_020755811.1 από τον *Geobacillus* sp. WSUCF1 (Bhalla *et al.*, 2014)
2. η Xyd39 από τον *Geobacillus* sp. 24 που εξετάζεται στην παρούσα εργασία
3. η WP\_023633600.1 από τον *Geobacillus* sp. MAS1
4. και η KFL17021.1 από τον *Geobacillus stearothermophilus*

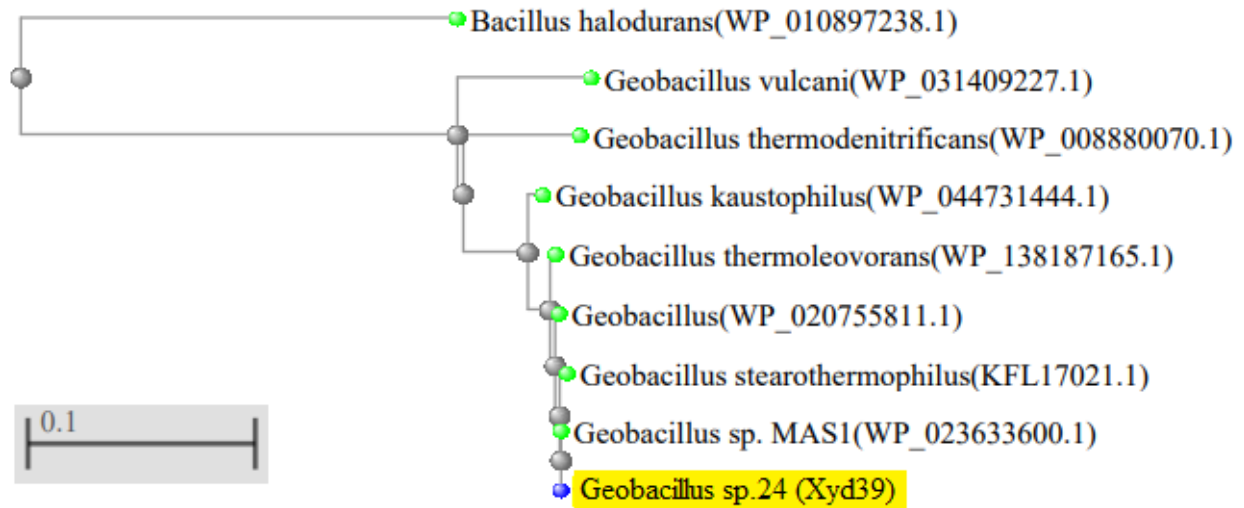


WP_020755811.1	MKVVNVPSNGREKFKKNWKFVCGTGRGLGLALQKEYLDHLKLVQEKIGFRYIRGHGLLSDD	60
Xyd39	MKVVNVPSNGREKFKKNWKFVCGTGRGLGLALQKEYLDHLKLVQEKIGFRYIRGHGLLSDD	60
WP_023633600.1	MKVVNVPSNGREKFKKNWKFVCGTGRGLGLALQKEYLDHLKLVQEKIGFRYIRGHGLLSDD	60
KFL17021.1	MKVVNVPSNGREKFKKNWKFVCGTGRGLGLALQKEYLDHLKLVQEKIGFRYIRGHGLLSDD	60
	*****	
WP_020755811.1	VGIYREVEIDGEMKPFYNFTYIDRIVDSYLALNIRPFIEFGFMPKALASGDQTVFYWKGN	120
Xyd39	VGIYREVEIDGEMKPFYNFTYIDRIVDSYLALNIRPFIEFGFMPKALASGDQTVFYWKGN	120
WP_023633600.1	VGIYREVEIDGEMKPFYNFTYIDRIVDSYLALNIRPFIEFGFMPKALASGDQTVFYWKGN	120
KFL17021.1	VGIYREVEIDGEMKPFYNFTYIDRIVDSYLALNIRPFIEFGFMPKALASGDQTVFYWKGN	120
	*****	
WP_020755811.1	VTPPKDYNKWRDLIVAVVSHFIERYGIEEVRTWLFEVWNEPNLVNFWKDANKQEYFKLYE	180
Xyd39	VTPPKDYNKWRDLIVAVVSHFIERYGIEEVRTWLFEVWNEPNLVNFWKDANKQEYFKLYE	180
WP_023633600.1	VTPPKDYNKWRDLIVAVVSHFIERYGIEEVRTWLFEVWNEPNLVNFWKDANKQEYFKLYE	180
KFL17021.1	VTPPKDYNKWRDLIVAVVSHFIERYGIEEVRTWLFEVWNEPNLVNFWKDANKQEYFKLYE	180
	*****	
WP_020755811.1	VTARAVKSVDPHLQVGGPAICGGSDEWITDFLHFCAERRVPVDFVSRHAYTSKAPHKKT	240
Xyd39	VTARAVKSVDPHLQVGGPAICGGSDEWITDFLHFCAERRVPVDFVSRHAYTSKAPHKKT	240
WP_023633600.1	VTARAVKSVDPHLQVGGPAICGGSDEWITDFLHFCAERRVPVDFVSRHAYTSKAPHKKT	240
KFL17021.1	VTARAVKSVDPHLQVGGPAICGGSDEWITDFLHFCAERRVPVDFVSRHAYTSKAPHKKT	240
	*****	
WP_020755811.1	EYYYQELEPPEDMLEQFKTVRALIRQSPFPHLPLHITEYNTSYSPINP <b>I</b> HDTALNAAYIA	300
Xyd39	EYYYQELEPPEDMLEQFKTVRALIRQSPFPHLPLHITEYNTSYSPINP <b>V</b> HDTALNAAYIA	300
WP_023633600.1	EYYYQELEPPEDMLEQFKTVRALIRQSPFPHLPLHITEYNTSYSPINP <b>V</b> HDTALNAAYIA	300
KFL17021.1	EYYYQELEPPEDMLEQFKTVRALIRQSPFPHLPLHITEYNTSYSPINP <b>V</b> HDTALNAAYIA	300
	***** ; *****	
WP_020755811.1	RILSEGDDYVDSFSYWTFSDVFEEMDVPKALFHGGFGLVALHSIPKPTFHAF <sup>T</sup> FFNALGD	360
Xyd39	RILSEGDDYVDSFSYWTFSDVFEEMDVPKALFHGGFGLVALHSIPKPTFHAF <sup>T</sup> FFNALGD	360
WP_023633600.1	RILSEGDDYVDSFSYWTFSDVFEEMDVPKALFHGGFGLVALHSIPKPTFHAF <sup>T</sup> FFNALGD	360
KFL17021.1	RILSEGDDYVDSFSYWTFSDVFEEMDVPKALFHGGFGLVALHSIPKPTFHAF <sup>T</sup> FFNALGD	360
	*****	

WP_020755811.1	ELLYRDGEMIVTRRKDGSIAAVLWNLVMEKGE <b>G</b> FTKEVQLVIPVSFSAVFIKRQIVNEQY	420
Xyd39	ELLYRDGEMIVTRRKDGSIAAVLWNLVMEKGE <b>L</b> TKEVQLVIPVSFSAVFIKRQIVNEQY	420
WP_023633600.1	ELLYRDGEMIVTRRKDGSIAAVLWNLVMEKGE <b>L</b> TKEVQLVIPVSFSAVFIKRQIVNEQY	420
KFL17021.1	ELLYRDGEMIVTRRKDGSIAAVLWNLVMEKGE <b>L</b> TKEVQLVIPVSFSAVFIKRQIVNEQY	420
	*****:*****	
WP_020755811.1	GNAWRVWKQMGRPRFPSRQAVETLRQVAQPHVMTEQRRATDGVIHLSIVLSKNEVTLIEI	480
Xyd39	GNAWRVWKQMGRPRFPSRQAVETLRQVAQPHVMTEQRRATDGVIHLSIVLSKNEVTLIEI	480
WP_023633600.1	GNAWRVWKQMGRPRFPSRQAVETLRQVAQPHVMTEQRRATDGVIHLSIVLSKNEVTLIEI	480
KFL17021.1	GNAWRVWKQMGRPRFPSRQAVETLRQVAQPHVMTEQRRATDGVIHLSIVLSKNEVTLIEI	480
	*****	
WP_020755811.1	EQ <b>V</b> RDETSTYVGLDDGEMTSYSS	503
Xyd39	EQ <b>V</b> RDETSTYVGLDDGEMTSYSS	503
WP_023633600.1	EQ <b>V</b> RDETSTYVGLDDGEMTSYSS	503
KFL17021.1	EQ <b>I</b> RDETSTYVGLDDGE <b>I</b> TSYSS	503
	** : ***** : *****	

Οι διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία είναι ελάχιστες. Η προς μελέτης Xyd39 β-ξυλοζιδάση παρουσιάζει 100% ομοιότητα με την WP\_023633600.1 από τον *Geobacillus sp. MAS1*. Για την ξυλοζιδάση αυτή δεν υπάρχει περαιτέρω μελέτη στην βιβλιογραφία. Με την WP\_020755811.1 από τον *Geobacillus sp. WSUCF1* έχουν διαφορά σε δύο αμινοξέα, στην θέση 289 όπου αντί για βαλίνη (V) που υπάρχει στην Xyd39 υπάρχει ισολευκίνη (I) και στην θέση 394 αντί για λευκίνη (L) υπάρχει φαινυλαλανίνη (F). Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι είναι τετραμερής πρωτεΐνη. Τέλος, με την KFL17021.1 από τον *Geobacillus stearothermophilus* έχει επίσης διαφορά σε δύο αμινοξέα, στην θέση 483 όπου αντί για βαλίνη (V) υπάρχει ισολευκίνη (I) και στην θέση 498 αντί για μεθειονίνη (M) υπάρχει ισολευκίνη (I). Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι είναι διμερής πρωτεΐνη.

Το φυλογενετικό δέντρο που προκύπτει είναι:



Το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε είναι αποτέλεσμα σύγκρισης της αμινοξικής αλληλουχίας β-ξυλοζιδάσεων μέσα στο γένος γεωβακίλων. Από τους χαρακτηρισμένους γεωβακίλους, ο *Geobacillus* sp24 παρουσιάζει την μεγαλύτερη ομοιότητα με τον *Geobacillus stearothermophilus*.



## 4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε η παραγωγή, η απομόνωση, ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός μιας β-1,4-D-ξυλοζιδάσης από το θερμοφίλο βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp.24 το οποίο συλλέχθηκε και απομονώθηκε από το ηφαιστειακό σύμπλεγμα της Σαντορίνης.

Για την παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής το προκαρυωτικό βακτήριο *Escherichia Coli* και συγκεκριμένα το στέλεχος BL21 λόγω των φτηνών πρώτων υλών και της γρήγορης κυτταρικής ανάπτυξης. Η β-ξυλοζιδάση επειδή έχει την ικανότητα να διασπά τους β-ξυλοζιτικούς δεσμούς βρίσκει εφαρμογή στη παραγωγή βιοκαυσίμων και φαρμάκων καθώς και στο τομέα των τροφίμων.

Μελετήθηκαν διαφορετικοί παράγοντες που επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν είναι: (α) το θρεπτικό μέσο (LB, Minimal glucose), (β) ο επαγωγέας και η συγκέντρωσή του (IPTG, η λακτόζη, η γαλακτόζη και η γλυκόζη) και (γ) η θερμοκρασία επαγωγής (20,27,30,37°C).

Η μελέτη του ενζύμου σε θρεπτικό μέσο LB με διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα IPTG και διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής έδειξε πως τα υψηλότερα επίπεδα β-ξυλοζιδάσης επιτυγχάνονται σε συγκέντρωση 20μM IPTG και θερμοκρασία επαγωγής 37°C όπου η ενεργότητα ανήλθε στα 0,29Units/mg DCW. Με αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε Minimal glucose και επαγωγέα IPTG προέκυψαν χαμηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης στόχου τα οποία κυμάνθηκαν μεταξύ 0,18-0,20 Units/mg DCW καθώς επίσης υποδιπλασιάστηκε ο ρυθμός της κυτταρικής ανάπτυξης. Για την θερμοκρασία επαγωγής καλύτερη κυτταρική ανάπτυξη εμφανίστηκε στους 30° C ενώ μέγιστη παραγωγή ενζύμου στους 37° C.

Ακολούθως, μελετήθηκαν τα αυτεπαγώμενα συστήματα. Αλλαγή του θρεπτικού μέσου με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη και επαγωγείς την λακτόζη και την γαλακτόζη οδήγησε σε πολύ χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης που κυμάνθηκε από 0,4 έως 0,5 mg DCW/mL και μέγιστη παραγωγή β-ξυλοζιδάσης 0,17 και 0,15 Units/mg DCW, αντίστοιχα, για συγκέντρωση επαγωγέα 10g/L. Τέλος, όταν χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και ως επαγωγέας, η παραγωγή της β-ξυλοζιδάσης παρέμεινε σε πολύ χαμηλά επίπεδα γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επαγωγέας. Όταν για πηγή άνθρακα και επαγωγέα εξετάστηκε η γαλακτόζη δεν κατάφερε να μεταβολιστεί από το κύτταρο ώστε να επιτευχθεί κυτταρική ανάπτυξη και ακολούθως παραγωγή β-ξυλοζιδάσης. Αντίθετα με πηγή άνθρακα αλλά και επαγωγέα την λακτόζη πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη του κυττάρου και επαγωγή της πρωτεΐνης.

Η απομόνωση στην συνέχεια της β-ξυλοζιδάσης έγινε από καλλιέργειες μεγαλύτερης κλίμακας με θρεπτικό μέσο LB και επαγωγέα IPTG στους 37° C. Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης

πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης Talon, διάταξη Amicon και τέλος εξισορρόπηση σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=7 (Dialysis) με τελικό βαθμό καθαρισμού 6,54.

Στην καθαρισμένη πλέον β-ξυλοζιδάση προσδιορίστηκε το μοριακό της βάρος με ηλεκτροφόρηση με αποδιατακτικές συνθήκες και θερμική επεξεργασία (SDS-PAGE) και με μη αποδιατακτικές συνθήκες. Κατά την ηλεκτροφόρηση παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα εμφανίστηκε ως μία ζώνη μοριακού βάρους 58 kDa ενώ κατά την ηλεκτροφόρηση απουσία αποδιατακτικού παράγοντα και θερμικής επεξεργασίας το μοριακό βάρος εκτιμήθηκε στα 232 kDa, δηλαδή τετραπλάσιο του πρώτου, ενδεικτικό τετραμερούς πρωτεΐνης. Η τετραμερή δομή της επιβεβαιώθηκε στην συνέχεια και με το υπολογιστικό εργαλείο Swiss Model ExPASy tool (Εικόνα 17). Το μοριακό βάρος της υπομονάδας της β-ξυλοζιδάσης είναι ίδιο με αυτό από το στέλεχος *Geobacillus thermoleovorans* και αυτό από το στέλεχος *Geobacillus sp. WSUCF1* (58kDa) και γενικότερα με το μοριακό βάρος που έχουν οι υπομονάδες των ενζύμων των οικογενειών GH39 και 43 (Wagschal, Heng *et al.*, 2009, Bhalla *et al.*, 2014).

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον χαρακτηρισμό της β-ξυλοζιδάσης. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης βρέθηκε να κυμαίνεται σε ένα εύρος 70° με 80°C με το βέλτιστο να είναι στους 80° C. Το ένζυμο παρέμεινε σταθερό για 7 μέρες στους 30° και 40° C. Στους 50° C εμφάνισε % σχετική εναπομένουσα ενεργότητα ίση με 59% για 4 μέρες και χρόνο ημιζωής 115,5h. Στους 60° C εμφάνισε % σχετική εναπομένουσα ενεργότητα ίση με 30% για 4 μέρες και χρόνο ημιζωής 57,6h. Στους 70° C εμφάνισε % σχετική εναπομένουσα ενεργότητα ίση με 5% για 4 μέρες και χρόνο ημιζωής 32,1h. Στους 75° C μηδενίστηκε η ενεργότητα της β-ξυλοζιδάσης μόλις σε 3 ώρες (χρόνος ημιζωής 1,1h), ενώ στους 80° C και στους 85° C μόλις στα 15 και 2 λεπτά, αντίστοιχα. Το ένζυμο είναι αρκετά σταθερό στις υψηλές θερμοκρασίες και μπορεί να χαρακτηριστεί ως θερμοσταθερό. Το βέλτιστο pH υπολογίστηκε ίσο με 6, ενώ η πρωτεΐνη παρέμεινε σταθερή σε ένα μεγάλο εύρος pH από 4 έως 9,7 για 4 μέρες. Είναι εμφανές ότι η β-ξυλοζιδάση παρουσιάζει σταθερότητα σε ένα μεγάλο εύρος pH και σε όξινα αλλά και σε αλκαλικά. Το φαινόμενο αυτό έχει παρουσιαστεί βιβλιογραφικά και για την β-ξυλοζιδάση xylB39 που έχει απομονωθεί από τον *Bacillus halodurans* (Smaali *et al.*, 2006) όπου παρέμεινε σταθερό σε pH από 3,5 έως 8,5.

Οι πειραματικές τιμές που προέκυψαν από την μελέτη της εξεταζόμενης β-ξυλοζιδάσης, είναι παραπλήσιες με τις τιμές που έχουν αναφερθεί και για άλλες β-ξυλοζιδάσες που έχουν απομονωθεί από γεωβακίλλους. Από τον πίνακα 11 το εύρος των παραπάνω τιμών που υπολογίστηκαν είναι για την βέλτιστη θερμοκρασία από 55-75° C και για το βέλτιστο pH από 4 έως 8.

Το ένζυμο δεν διατήρησε την σταθερότητα του παρουσία οργανικών διαλυτών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι μη πολικές πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων είναι περισσότερο διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες παρά σε νερό και ως εκ τούτου η παρουσία

οργανικού διαλύτη σε πρωτεϊνικό διάλυμα να έχει σαν αποτέλεσμα την εξασθένηση των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης. Επομένως, το ένζυμο δεν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανικές εφαρμογές παρουσία οργανικών διαλυτών.

Η ενζυμική ενεργότητα φάνηκε να μην επηρεάζεται θετικά από την παρουσία μετάλλων στο διάλυμα της ενζυμικής αντίδρασης υποδεικνύοντας πως δεν απαιτείται κάποιο μεταλλοκατιόν ως συμπαραγοντας για την εμφάνιση της ενζυμικής δράσης. Μόνο παρουσία  $Mn^{2+}$  εμφάνισε αυξημένη ενεργότητα κατά 26% όταν επώασθη μαζί με το ένζυμο για 30 λεπτά στους 30° C. Αντίθετα, μείωση της % σχετικής εναπομένουσας ενεργότητας σε 81% και 21% οδήγησε η παρουσία του ιόντος  $Cu^{2+}$  και  $Fe^{2+}$  αντίστοιχα. Σχετικά με τον  $Cu^{2+}$ , βιβλιογραφικά έχει βρεθεί να παρεμποδίζει και β-ξυλοζιδάσες από άλλους μικροοργανισμούς, όπως τον *Geobacillus sp. Strain WSUCF1* (Bhalla et al., 2014) που η σχετική ενεργότητα μειώνεται στο 28% και από τον *Dictoglomus thermophilum* στο 40% (Li Qi et al., 2018).

Επιπλέον μελετήθηκε η δραστικότητα της β-ξυλοζιδάσης και σε άλλα υποστρώματα πέρα από το οNPX, όπως pNPCellobioside, pNPGlucopyranoside, pNP-a-L-Rhamnopyranoside, pNPGalactopyranoside και ξυλάνη. Η β-ξυλοζιδάση δεν παρουσίασε ενεργότητα σε κανένα από τα υποστρώματα αυτά παρά μόνο ένα 3,4% για το pNPGlucopyranoside. Επομένως, η β-ξυλοζιδάση δεν είναι δραστική στα υποστρώματα αυτά.

Η μελέτη των κινητικών παραμέτρων της ενζυμικής κατάλυσης ελέγχθηκαν για το υπόστρωμα οNPX. Υπολογίστηκε η σταθερά Michaelis-Menten  $K_M = 0,46$  mM, η  $V_{max} = 5,77$   $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg protein})^{-1}$  και η  $k_{cat} = 22,32$   $\text{s}^{-1}$ . Με προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης  $E_a = 19,5$  kJ/mol. Επιπλέον, υπολογίστηκαν τα θερμοδυναμικά μεγέθη  $\Delta H^* = 16,6$  kJ/mol,  $\Delta G^* = 77,7$  kJ/mol,  $\Delta S^* = -173,2$  J/mol/K,  $Q_{10} = 1,0$ ,  $\Delta G_{(E-S)}^* = -2,3$  kJ/mol και  $\Delta G_{(E-T)}^* = -7,46$  kJ/mol, που είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα της β-ξυλοζιδάσης που απομονώθηκε από τον *Humicola lanuginosa*. Όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα 11 το εύρος των  $K_M$  και  $V_{max}$  είναι από 0,06-28mM και από 4,16-276 Units/mg, αντίστοιχα. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του  $K_M$  τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος. Η παράμετρος  $k_{cat}$  εκφράζει τον αριθμό των μορίων υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν στη μονάδα του χρόνου από κάθε ενεργό κέντρο, ενώ η  $k_{cat}/K_M$  (σταθερά ειδικότητας), εκφράζει την ειδικότητα του ενζύμου για υποστρώματα που ανταγωνίζονται να προσδεθούν σε αυτό, δηλαδή την καταλυτική αποτελεσματικότητα των ενζύμων και όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της τόσο πιο ικανό είναι να προσδεθεί στο υπόστρωμα. Η β-ξυλοζιδάση που εξετάζεται στην παρούσα εργασία έχει  $k_{cat}/K_M = 48,52$   $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Βιβλιογραφικά, έχει υπολογιστεί και για άλλες β-ξυλοζιδάσες από τα βακτήρια *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485 (Shao W et al., 2011), *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 (Anand et al., 2013) και *Geobacillus pallidus* (Quintero et al., 2007) 6,6, 93,5 και 7,9  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , αντίστοιχα. Συγκριτικά λοιπόν, εμφανίζει σχετικά υψηλή τιμή άρα παρουσιάζει υψηλή ικανότητα πρόσδεσης με το υπόστρωμα.

**Πίνακας 11: Χαρακτηριστικά θερμοσταθερών β-ξυλοζιδασών**

Οργανισμός	Οικογένεια GH	Βέλτιστο pH	Βέλτιστη θερμοκρασία (° C)	Θερμική σταθερότητα	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (Units / mg)	βιβλιογραφικές αναφορές
<i>Geobacillus</i> sp.24	39	6	80	Ημιζωή 32 ωρών στους 70 ° C	0,46	5,77	Παρούσα εργασία
<i>Geobacillus</i> sp. WSUCF1	39	6,5	70	Ημιζωή 9 ημερών στους 70 ° C	2,3	147	Bhalla, 2014
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> JW / SL-YS485	novel	6	65	Ημιζωή 1 ώρα στους 67 ° C	28	276	Shao W, 2011
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> TSAA1	52	7	60	Ημιζωή 3 ωρών στους 70 ° C	2,8	4,16	Anand, 2013
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	52	6,5	70	Η ημιζωή 3,4 ώρες στους 70 ° C	0,15	-	Contreras, 2008
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	-	6	70	Ο χρόνος ημιζωής περίπου. 1 ώρα στους 70 ° C	1,2	-	Nanmori, 1990
<i>Bacillus thermantarcticus</i>	-	6	70	Σταθερό για 1 ώρα στους 60 ° C	0,5	-	Lama, 2004
<i>Geobacillus pallidus</i>	52	8	70	Ο χρόνος ημιζωής περίπου. 10 ώρες στους 70 ° C	2,4	4,72	Quintero, 2007
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> IT-08	43	6	60	Διατηρήθηκε περισσότερη από 70% δραστηριότητα μετά από 1 ώρα στους 70 ° C	0,06	-	Ratnadewi, 2013
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> IT-08	43	5	-	Ημιζωή 35 λεπτών στους 57,5 ° C	0,55	-	Wagschal, 2009
<i>Bacillus halodurans</i> (xylBH39)	39	7,5	55	Ημιζωή 2,4 ώρες στους 60 ° C	8,61	-	Smaali, 2006
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	7	55	Διατηρήθηκε 45% δραστηριότητα μετά από 4 ώρες στους 90 ° C	-	20,73	Zafar, 2018
<i>Dictoglomus thermophilum</i>	39	6	75	Σταθερό για 2 ώρες στους 75 ° C	1,66	78,46	Qi Li, 2018
<i>Aspergillus phoenicis</i> (μύκητας)	-	4	75	Σταθερό για 4 ώρες στους 60 ° C	2,36	-	Rizzati, 2001



Στην συνέχεια μελετήθηκε η αναστολή της β-ξυλοζιδάσης από ξυλόζη. Για συγκέντρωση μόλις 0,1125 M ξυλόζης η % εναπομένουσα σχετική ενεργότητα υπολογίστηκε ίση με 63,6%, ενώ για 1,8M μόνο 18,2% . Επομένως η ξυλόζη παρεμποδίζει την δράση του ενζύμου.

Ταυτόχρονα, επαληθεύτηκε η δράση του ενζύμου ως ξυλοζιδάση με χρωματογραφία χάρτου (TLC) όπου κατάφερε να υδρολύσει τους ολιγοσακχαρίτες ξυλοτριόζη και ξυλοβιόζη δίνοντας μονομερή ξυλόζης.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική μελέτη σύμφωνα με την αμινοξική αλληλουχία της β-ξυλοζιδάσης sp24 που εξετάζεται στην παρούσα εργασία. Με την βοήθεια του BLASTp βρέθηκαν β-ξυλοζιδάσες παρόμοιες ως προς την αμινοξική αλληλουχία και κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δέντρο. Βρέθηκε μία β-ξυλοζιδάση 100% όμοια από τον *Geobacillus sp. MAS1* με αυτήν από τον *Geobacillus sp.24*, για την οποία όμως δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα και δεν έχει χαρακτηριστεί. Άλλες δύο β-ξυλοζιδάσες που απομονώθηκαν από τον *Geobacillus sp. Strain WSUCF1* και τον *Geobacillus stearothermophilus* εμφάνιζαν διαφορά σε μόνο 2 αμινοξέα. Η πρώτη μοιράζεται πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τη β-ξυλοζιδάση που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία. Τα δύο ένζυμα έχουν ίδιο μοριακό βάρος, είναι και τα δύο τετραμερή, μοιράζονται τον ίδιο μηχανισμό κατάλυσης και δρουν έναντι των ίδιων υποστρωμάτων. Παρόλα αυτά, παρουσιάζουν αποκλίσεις όσον αφορά την βέλτιστη θερμοκρασία δράσης (70°C) και την σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες , τον χρόνο ημιζωής, την παρεμπόδιση από ξυλόζη, το  $K_M$  και το  $V_{max}$ .

Η παραγωγή αυτών των ενζύμων προκαλεί εξαιρετικό ενδιαφέρον λόγω του μεγάλου εύρους αξιοποίησης τους στον βιομηχανικό τομέα. Οι υψηλές τιμές θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου και η ικανοποιητική σταθερότητα που παρουσίασε σε ένα εύρος τιμών θερμοκρασίας και pH καθιστούν τη β-ξυλοζιδάση που απομονώθηκε από το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus sp24*, κατάλληλο υποψήφιο για την αξιοποίηση του στις απαιτητικές συνθήκες ενός πλήθους βιοτεχνολογικών εφαρμογών.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anand, Ashima, Vikash Kumar, and T. Satyanarayana. "Characteristics of thermostable endoxylanase and  $\beta$ -xylosidase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 and its applicability in generating xylooligosaccharides and xylose from agro-residues." *Extremophiles* 17.3 (2013): 357-366.

Antonio De Leon-Rodríguez, 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* .

Bajpai, Pratima. "Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications." *Advances in applied microbiology*. Vol. 43. Academic Press, 1997. 141-194.

Barkley, Mary D., et al. "Interaction of effecting ligands with lac repressor and repressor-operator complex." *Biochemistry* 14.8 (1975): 1700-1712.

Biely, P., 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286\_290.

Biely, P., 1993. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: Coughlan, M.P., Hazlewood, G.P. (Eds.), *Hemicelluloses and hemicellulases*. Portland Press, London, pp. 29\_52.

Bokhari, Syed Ali Imran, et al. "Characterization of a  $\beta$ -xylosidase produced by a mutant derivative of *Humicola lanuginosa* in solid state fermentation." *Annals of microbiology* 60.1 (2010): 21-29.

Burgess, S. A., et al. "Insights into the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles." *BMC microbiology* 17.1 (2017): 140.

Contreras, Lellys M., et al. "The family 52  $\beta$ -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* is a dimer: structural and biophysical characterization of a glycoside hydrolase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1784.12 (2008): 1924-1934.

D.R. Love, R. Fisher, and P.L. Bergquist Sequence structure and expression of a cloned p-glucosidase gene from an extreme thermophile *Mol Gen Genet* (1988) 213:84-92

Donovan RS 1,2, CW Robinson 1,2 and BR Glick Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter 1996 Society for Industrial Microbiology 01694146/96/512,00

German L.Rosano, Eduardo A.Ceccarelli. (2014, April). Recombinant protein expression in Escherichia Coli: advances and challenges. *frontiers in Microbiology* .

Gouzi, Hicham, Christophe Depagne, and Thibaud Coradin. "Kinetics and thermodynamics of the thermal inactivation of polyphenol oxidase in an aqueous extract from Agaricus bisporus." *Journal of agricultural and food chemistry* 60.1 (2012): 500-506.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT. (2000). An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. New York: W. H. Freeman and Company.

Hudson, R. C., L. R. Schofield, T. Coolbear, R. M. Daniel, and H. W. Morgan. 1991. Purification and properties of an aryl  $\beta$ -xylosidase from a cellulolytic extreme thermophile expressed in Eschenchia coli. *Biochem. J.* 273:645-650

Javed, Muhammad Rizwan, et al. "Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae cmc-1*." *Applied biochemistry and biotechnology* 157.3 (2009): 483-497.

Jordan, Douglas B., and Kurt Wagschal. "Properties and applications of microbial  $\beta$ -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*." *Applied microbiology and biotechnology* 86.6 (2010): 1647-1658.

Koshland Jr, D. E. "Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions." *Biological reviews* 28.4 (1953): 416-436.

Kurakake, Masahiro, Shinji Osada, and Toshiaki Komaki. "Transxylosylation of  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 61.12 (1997): 2010-2014.

Lachke, A. H., M. V. Deshpande, and M. C. Srinivasan. 1985. Extracellular  $\beta$ -D-xylosidase of *Sclerotium rolfsii*. *Enzyme Microb. Technol.* 7:445-448.

Lama, Licia, et al. "Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*." *Research in Microbiology* 155.4 (2004): 283-289.

Li, Qi, et al. "Characterization of a novel thermostable and xylose-tolerant GH 39  $\beta$ -xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum*." *BMC biotechnology* 18.1 (2018): 29.

Manzanares, P., Ramon, D., Querol, A., 1999. Screening of nonSaccharomyces wine yeasts for production of b-xylossidase activity. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 105–112

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

Nanmori, T. A. K. A. S. H. I., et al. "Purification and properties of thermostable xylanase and beta-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain." *Journal of bacteriology* 172.12 (1990): 6669-6672.

Quintero, Denny, et al. "Isolation and characterization of a thermostable  $\beta$ -xylosidase in the thermophilic bacterium *Geobacillus pallidus*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1774.4 (2007): 510-518.

Rajoka, M. I. "Kinetic parameters and thermodynamic values of  $\beta$ -xylosidase production by *Kluyveromyces marxianus*." *Bioresource technology* 98.11 (2007): 2212-2219.

Ratnadewi, Anak Agung Istri, et al. " $\beta$ -d-Xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08: biochemical characterization and bioinformatics of the enzyme." *Applied biochemistry and biotechnology* 170.8 (2013): 1950-1964.

Ristroph, D. L., and A. E. Humphrey. 1985. The  $\beta$ -xylosidase of *Thermomonospora*. *Biotechnol. Bioeng.* 27:909-913.

Rizzatti, Ana Carolina Segato, et al. "Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26.3 (2001): 156-160.

Rohman, Ali, et al. "Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a thermostable glycoside hydrolase family 43  $\beta$ -xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08." *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 63.11 (2007): 932-935.

Shallom, D., Leon, M., Bravman, T., Ben-David, A., Zaide, G., Belakhov, V., ... Shoham, Y. (2005). Biochemical Characterization and Identification of the Catalytic Residues of a Family 43  $\beta$ -d-Xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6<sup>+</sup>. *Biochemistry*, 44(1), 387–397. doi:10.1021/bi048059w

Shao, Weilan, et al. "Characterization of a novel  $\beta$ -xylosidase, XylC, from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485." *Appl. Environ. Microbiol.* 77.3 (2011): 719-726.

Smaali, Issam, Caroline Rémond, and Michael J. O'Donohue. "Expression in *Escherichia coli* and characterization of  $\beta$ -xylosidases GH39 and GH-43 from *Bacillus halodurans* C-125." *Applied microbiology and biotechnology* 73.3 (2006): 582-590.

Sunna, A. and G. Antranikian (1997). "Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria." *Critical Reviews in Biotechnology* 17(1): 39 - 67.

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.

Tsujibo, H., Takada, A., Kosaka, M., Miyamoto, K., Inamori, Y., 2001. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding an intracellular beta-D-xylosidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65, 1824–1831.

Wagschal, Kurt, et al. "Purification and characterization of a glycoside hydrolase family 43  $\beta$ -xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08." *Applied biochemistry and biotechnology* 155.1-3 (2009): 1-10.

Withers, S. G. "Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases." *Carbohydrate polymers* 44.4 (2001): 325-337.

Xu J1, Banerjee A, Pan SH, Li ZJ. Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using *E. coli* BL21 strains. *Protein Expr Purif.* 2012 May;83(1):30-6.

Zafar, Asma, et al. "Purification and Characterization of a recombinant  $\beta$ -Xylosidase from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 into *E. coli* BL21." *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* 31.6 (Supplementary (2018): 2755-2762.

## **ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Σ. Βαρασσάς, "Συγκριτική φυσιολογική μελέτη στελεχών του γένους *Geobacillus*" , 2016