



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

Χαρακτηρισμός ενζύμων για τη βελτιστοποίηση της υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και αξιοποίηση αυτής για την παραγωγή μεταβολιτών υψηλής προστιθέμενης αξίας με χρήση μικροφυκών

Μπαριτάκη Καλλιόπη

Επιβλέπων Καθηγητής:

Τόπακας Ευάγγελος, Αναπληρωτής καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2021

«Η πραγματική γενναιοδωρία προς το μέλλον,
έγκειται στο να τα δίνουμε όλα στο παρόν»

Albert Camus

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., στο πλαίσιο ολοκλήρωσης των σπουδών μου. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν, άμεσα ή έμμεσα, στην αποπεράτωση της εργασίας μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή του Ε.Μ.Π., κύριο Ευάγγελο Τόπακα για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ολοκλήρωση του. Η επιστημονική υποστήριξη, καθώς και οι συμβουλές του, κατά τη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας, συνέβαλαν ιδιαίτερα στην κατανόηση και την πληρέστερη προσέγγιση του θέματος.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του Ε.Μ.Π., Αγγελική Ελένη Χαλιμά, καθώς διαδραμάτισε καταλυτικό ρόλο στην εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας. Ειδικότερα, η διαρκής καθοδήγησή της, η μεταλαμπάδευση επιστημονικών γνώσεων και συμβουλών αποτέλεσαν έναν καθοριστικό παράγοντα για την διεκπεραίωση του συγκεκριμένου θέματος. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω, ιδιαίτερα, για την υπομονή που υπέδειξε κατά τα αρχικά στάδια της εξοικείωσης μου με τις εργαστηριακές πρακτικές, καθώς και την προθυμία της να επιλύει διαρκώς τις απορίες μου. Τέλος, οι συμβουλές της και οι προτάσεις της πάνω στη διπλωματική μου εργασία, συνέβαλαν ουσιαστικά στην ανάδειξη του επιστημονικού έργου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Κάτια και Νίκο, την αδελφή μου, Γεωργία, και τους φίλους μου για τη απεριόριστη υπομονή τους στο χρονικό διάστημα εκπόνησης και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και της ακαδημαϊκής μου φοίτησης.

Καλλιόπη Μπαριτάκη,

Αθήνα 2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός μιας λυτικής πολυσακχαρικής μονοοξυγενάσης, η οποία συμβάλλει στη βελτιστοποίηση της ενζυμικής υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Παράλληλα, εξετάστηκε η προοπτική αξιοποίησης της βιομάζας για την ενίσχυση της παραγωγής εικοσιδιεξανοϊκού οξέος (DHA) από το μικροφύκος, *Cryptocodinium cohnii*.

Η πολύπλοκη δομή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας καθιστά αναγκαία την εξέλιξη των τεχνικών προ επεξεργασίας, ώστε να μεγιστοποιηθεί η απόδοση απλών σακχάρων, χρήσιμων στην παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι πρωτεΐνες LPMO δρουν οξειδωτικά, λύοντας γλυκοζιτικούς δεσμούς της πολυσακχαρικής αλυσίδας. Σημαντικό χαρακτηριστικό αποτελεί η δράση τους σε ανθεκτικά υποστρώματα. Στη συγκεκριμένη μελέτη, το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο, προέρχεται από το μύκητα *Myceliophthora thermophila* και εκφράζεται στη μεθυλότροφη ζύμη, *Pichia pastoris*.

Αφετηρία του πειραματικού μέρους αποτέλεσε η παραγωγή και απομόνωση 16.35 mg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από υγρές καλλιέργειες της *P. pastoris*. Έπειτα, η αλληλουχία της LPMO και πληροφορικά εργαλεία συνέβαλαν στον προσδιορισμό των Ο-γλυκοζυλιώσεων που φέρει. Το μοριακό βάρος, που κυμαίνεται στα 29-42 kDa, υπολογίστηκε με ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης. Παράλληλα, τα υποστρώματα δράσης της LPMO ορίστηκαν με τον εντοπισμό προϊόντων, μέσω της χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης. Ως δότης ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε το ασκορβικό οξύ. Η πρωτεΐνη, λοιπόν, φάνηκε να διασπά την χιτίνη και το άμυλο, ενώ σε μικρότερο βαθμό την κυτταρίνη, επεξεργασμένη με φωσφορικό οξύ (Pasc) ή μικροκρυσταλλική (Avicel). Ταυτόχρονα, δραστηκότητα σημειώθηκε στους ολιγοσακχαρίτες, κελλοπενταόζη και κελλοεξαόζη, σε αντίθεση με τους πολυσακχαρίτες ξυλάνη, αραβινοξυλάνη και γλυκομαννάνη. Στην συνέχεια, εστιάζοντας στην ύπαρξη συνεργισισμού με τις κυτταρινάσες, προέκυψε αύξηση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων για τη συνδυαστική δράση της LPMO με την ενδογλουκανάση (EG5). Μελετώντας τους πιθανούς δότες ηλεκτρονίων, ξεχώρισε το ασκορβικό κι ακολούθησε το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ. Τέλος, κατά τον προσδιορισμό της βέλτιστης τιμής pH και θερμοκρασίας, αναδείχθηκε το pH=6 και οι 50°C, αντίστοιχα.

Εκτός των παραπάνω, επιχειρήθηκε η παραγωγή του εικοσιδιεξανοϊκού οξέος (DHA) από το στέλεχος του μικροφύκου, *Cryptocodinium cohnii* ATCC 30772. Η επιλογή του *C. cohnii* οφείλεται στη μεγάλη ποσότητα DHA που μπορεί να αποδώσει, αποκλείοντας τη σύνθεση άλλων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Δημιουργήθηκαν, λοιπόν, υγρές καλλιέργειες του μικροφύκου, επιλέγοντας ως πηγή άνθρακα γλυκόζη, προερχόμενη από την ενζυμική υδρόλυση Avicel και βιομαζών πεύκου. Τα λιπαρά οξέα που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας GC-FID, ήταν το C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 και C22:6 (DHA). Οι βιομάζες πεύκου απέδωσαν το μεγαλύτερο ποσοστό λιπαρών οξέων, 46-50% επί της ξηρής βιομάζας ενώ το Avicel έφτασε στο 25.32%. Ωστόσο, η υψηλότερη συγκέντρωση DHA σημειώθηκε για το Avicel σε ποσοστό 36.56% του συνόλου των λιπαρών οξέων, ενώ για τις βιομάζες κυμάνθηκε στο 4-20%. Τέλος, μελετήθηκε και η κυτταρική ανάπτυξη του μικροφύκου σε γλυκόζη που παραλήφθηκε από 6 βιομάζες οξιάς. Τα δείγματα διέφεραν στην προεπεξεργασία που είχαν υποστεί ως προς τον οργανικό διαλύτη (αιθανόλη, ακετόνη και τετραϋδροφουράνιο), την πίεση (8-16 bar), τη θερμοκρασία (150-160°C) και τον χρόνο αντίδρασης (60-120 min).

ABSTRACT

The main purpose of this diploma thesis is the characterization of lytic polysaccharide monooxygenase which contributes to the optimization of the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. At the same time, the perspective of biomass utilization was examined in order to enhance the production of docosahexaenoic acid (DHA) from the microalgae, *Cryptocodinium cohnii*.

The complex structure of lignocellulosic biomass makes the development of pre-treatment techniques necessary so as to maximize its conversion to simple sugars, which are useful in the manufacture of high added value products. LPMO proteins act oxidatively, cleaving glycosidic bonds of the polysaccharide chain. An important characteristic is their action on recalcitrant substrates. In this thesis, the enzyme is coded by a gene that comes from the fungus *Myceliophthora thermophila* and it is expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*.

The experimental procedure began with the production and separation of 16.35 mg of recombinant protein from submerged cultures of *P. pastoris*. Afterwards, LPMO sequence and online tools contributed to the O-linked glycosylation determination. The molecular weight that ranges between 29-42 kDa, was estimated through protein electrophoresis. Meanwhile, the substrates on which LPMO is active were defined by the products detection, through high performance anion exchange chromatography. Ascorbic acid was used as an electron donor. Thus, it was found that protein cleaves chitin and starch, whereas it has a limited activity on cellulose, phosphoric acid swollen (Pasc) and microcrystalline (Avicel). At the same time, LPMO was active on oligosaccharides, cellopentaose and cellohexaose, in contrast to polysaccharides xylan, arabinoxylan and glucomannan. Later, by focusing on synergism existence with the cellulases, a concentration increase of the reducing sugars occurred as for the combinatorial effect of LPMO with the endoglucanase (EG5). Delving into the potential electron donors, ascorbic acid was distinguished and subsequently gallic and caffeic acid. At a later point, in the definition process of the optimum pH as well as temperature, the pH=6 and 50°C were distinguished, respectively.

Apart from the above mentioned, the docosahexaenoic acid (DHA) production was attempted from the microalgae strain, *Cryptocodinium cohnii* ATCC 30772. *C. cohnii*'s selection is due to the great DHA quantity that it may render, excluding the formulation of other polyunsaturated fatty acids.

Microalgae liquid cultures were created by selecting glucose as a carbon source, which came from the enzymatic hydrolysis of Avicel and pine biomasses. The fatty acids which were determined by the gas chromatography GC-FID method, were C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 and C22:6 (DHA). Pine biomasses resulted in the greatest fatty acids percentage, 46-50%, of the dry biomass whereas Avicel reached 25.32%. However, the highest DHA concentration occurred for the Avicel at a percentage of 36.56% on the fatty acids total, whereas for the biomasses, it ranged between 4-20%. At the end, the microalgae cell growth with glucose, derived from the hydrolysis of 6 samples of beech wood biomass, was examined. Samples differed in the pre-treatment methods that they had undergone regarding the organic solvent (ethanol, acetone and tetrahydrofuran), pressure (8-16 bar), temperature (150-160°C) and the reaction time (60-120 min).

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	16
Σάκχαρα.....	16
Γλυκόζη	17
Άμυλο και χιτίνη	18
Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα.....	19
Κυτταρίνη	20
Ημικυτταρίνη	21
Λιγνίνη	22
Επεξεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.....	23
Φυσικές μέθοδοι	23
Χημικές μέθοδοι	24
Φυσικοχημικές μέθοδοι	25
Βιολογικές μέθοδοι	26
Ενζυμική υδρόλυση.....	27
Λυτικές πολυσακχαρικές μονοοξυγενάσες (LPMO).....	29
Εντοπισμός και κατηγοριοποίηση κατά CAZy	30
Ονομασία LPMO	31
Δομή των LPMO	32
Ενεργό κέντρο	33
Μονάδες σύνδεσης υδατανθράκων	34
Δομικές διαφορές των LPMO	35
Γλυκοζυλίωση	36
Μηχανισμός δράσης	37
Δότες e⁻	39
Προϊόντα δράσης των LPMO και μέθοδοι ανίχνευσης	40
<i>Myceliophthora thermophila</i>	41
Πλασμιδιακός φορέας.....	42
<i>Pichia pastoris</i>	43
<i>Crypthecodinium cohnii</i>	44
Λιπαρά οξέα.....	45
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	46
Εικοσιδιεξανοϊκό οξύ (Docosahexaenoic Acid, DHA)	47

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	50
Υλικά.....	50
Όργανα-Συσκευές	50
Μικροοργανισμοί.....	52
Μέθοδοι: LPMO	52
Δημιουργία καλλιέργειας <i>Pichia pastoris</i> σε τρυβλίο	52
Δημιουργία υγρής καλλιέργειας <i>Pichia pastoris</i>	54
Παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, LPMO, σε καλλιέργειες κυττάρων <i>P. pastoris</i>, εργαστηριακής κλίμακας	55
Παραλαβή του εξωκυτταρικού υγρού της καλλιέργειας.....	57
Συμπύκνωση του εξωκυτταρικού υγρού της καλλιέργειας.....	58
Εξισορρόπηση της ακατέργαστης μορφής καλλιέργειας με διαπίδυση (dialysis)	59
Απομόνωση της πρωτεΐνης	60
Υδρόλυση γλυκοζυλιώσεων	62
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	64
Εξέταση της δράσης του ενζύμου LPMO σε υποστρώματα	68
Εξέταση ύπαρξης συνεργιτισμού μεταξύ της LPMO κι άλλων ενζύμων	72
Εξέταση πιθανών δοτών ηλεκτρονίων	75
Προσδιορισμός του βέλτιστου pH	76
Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας	77
Χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPAEC)	78
Προστασία του ζυμομύκητα <i>P. pastoris</i> με Glycerol Stock	80
Μέθοδοι: <i>C. cohnii</i> – Παραγωγή DHA	81
Προετοιμασία υγρής καλλιέργειας μικροφύκου, <i>Cryptocodinium cohnii</i>	81
Παραλαβή δείγματος από υγρή καλλιέργεια	87
Ενζυμική μέτρηση γλυκόζης με εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα	87
Εκχύλιση λιπαρών	88
Εστεροποίηση λιπαρών	90
Αέρια Χρωματογραφία (GC).....	91
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	95
Lytic Polysaccharide Monoxygenases	95
Παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LPMO.....	95
Καθαρισμός και παραλαβή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης	95

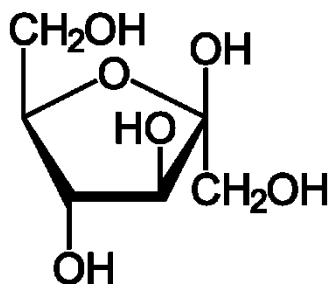
Εντοπισμός του είδους των γλυκοζυλιώσεων της LPMO	96
Προσδιορισμός του μεγέθους του ενζύμου LPMO	97
Μελέτη πιθανών υποστρωμάτων δράσης της LPMO	99
Ανίχνευση ύπαρξης συνεργιτισμού μεταξύ της LPMO και άλλων ενζύμων	106
Εξέταση των πιθανών δοτών ηλεκτρονίων	107
Εντοπισμός της βέλτιστης τιμής pH.....	109
Καθορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας	115
Καλλιέργειες <i>Crypthecodinium cohnii</i> – Παραγωγή DHA.....	120
Υδρόλυση Anicel – Υγρή καλλιέργεια και παραγωγή λιπαρών οξέων	120
Υδρόλυση Βιομάζας I – Υγρή καλλιέργεια και παραγωγή λιπαρών οξέων.....	121
Υδρόλυση βιομάζας II – Υγρή καλλιέργεια.....	129
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	134
Lytic Polysaccharide Monooxygenases	134
Συγκέντρωση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης	134
Εντοπισμός του είδους των γλυκοζυλιώσεων της LPMO	135
Προσδιορισμός του μεγέθους του ενζύμου LPMO	136
Ανίχνευση υποστρωμάτων δράσης της LPMO	137
Μελέτη της ύπαρξης συνεργιτισμού μεταξύ της LPMO και άλλων ενζύμων	140
Εντοπισμός πιθανών δοτών e ⁻	142
Προσδιορισμός βέλτιστης τιμής pH	143
Ανίχνευση βέλτιστης θερμοκρασίας	145
Καλλιέργειες <i>Crypthecodinium cohnii</i> – Παραγωγή DHA.....	146
Υδρόλυση Anicel – Υγρή καλλιέργεια και παραγωγή λιπαρών οξέων	147
Υδρόλυση Βιομάζας I – Υγρή καλλιέργεια και παραγωγή λιπαρών οξέων.....	148
Σύγκριση απόδοσης καλλιεργειών σε λιπαρά οξέα.....	151
Υδρόλυση βιομάζας II – Κυτταρική ανάπτυξη	152
Μελλοντικοί στόχοι	155
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	157

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

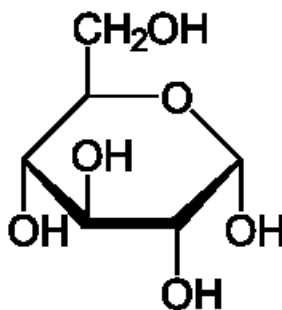
Σάκχαρα

Τα σάκχαρα συνιστούν μια ομάδα οργανικών ενώσεων που ανταποκρίνονται στον εμπειρικό τύπο $C_x(H_2O)_y$ (Alberts, et al., 2016). Αποτελούν την πολυπληθέστερη κατηγορία βιομορίων, παρέχοντας στους οργανισμούς ενέργεια, καθώς και άλλες ιδιότητες, όπως είναι η δομική στήριξη. Πρόκειται για αλδεϋδικά ή κετονικά παράγωγα πολυσθενών αλκοολών (Τζια, Ταούκης, & Ωραιοπούλου, 2009). Οι αλδεϋδες και οι κετόνες συγκαταλέγονται στις περισσότερο διαδεδομένες οργανικές ενώσεις, τόσο στη φύση, όσο και στη χημική βιομηχανία (McMurry, 2015). Η λειτουργική ομάδα και των δύο είναι το καρβονύλιο ($C=O$), με τη διαφορά ότι στις αλδεϋδες χρειάζεται να συνδέεται τουλάχιστον με ένα άτομο υδρογόνου ενώ στις κετόνες με δύο άτομα άνθρακα (Σπηλιόπουλος, Αλδεϋδες Κετόνες, 2015). Τα σάκχαρα διακρίνονται σε μονοσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Οι πρώτοι αποτελούν την πιο απλή μορφή της ομάδας αυτής, διότι δεν επιδέχονται υδρόλυση. Δομικά, συντίθενται από πολυϋδροξυ-αλδεϋδες (αλδόζες) ή πολυϋδροξυκετόνες (κετόζες), δηλαδή μία αλυσίδα ατόμων άνθρακα συνδεδεμένων με υδροξύλια, που φέρουν στην άκρη τους μία ομάδα αλδεϋδης ή κετόνης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αλδόζης είναι η γλυκόζη, ενώ κετόζης η φρουκτόζη (Σπηλιόπουλος, Υδατάνθρακες, 2015). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μονοσακχαρίτες λαμβάνουν διαφορετικές δομές στον χώρο, ανάλογα με τον προσανατολισμό που έχει η υδροξυλομάδα του ασύμμετρου άνθρακα που βρίσκεται στην πλέον απομακρυσμένη θέση ως προς το καρβονύλιο (Alberts, et al., 2016). Ως εκ τούτου, εμφανίζεται η L και D μορφή των σακχάρων, όπου στην πρώτη περίπτωση το υδροξύλιο είναι αριστερόστροφο, ενώ στη δεύτερη δεξιόστροφο. Στη φύση επικρατούν τα D-σάκχαρα. Εκτός αυτών των δομών, οι μονοσακχαρίτες λαμβάνουν και κυκλικές μορφές. Ειδικότερα, στην περίπτωση των αλδοζών, η σπάνια ένωση του C-1 άνθρακα με τον C-4, οδηγεί στην σύνθεση ενός πενταμελούς δακτυλίου, γνωστού ως φουρανόζη. Αντιθέτως, η συνηθέστερη ένωση του C-1 με τον C-5 αποδίδει ένα μόριο με εξαμελή δακτύλιο, με την ονομασία πυρανόζη. Αντίστοιχα, ο C-2 άνθρακας των κετοζών ενώνεται με τον C-5 ή C-6 οδηγώντας κι αυτός με τη σειρά του στους παραπάνω δακτυλίους (Σπηλιόπουλος, Υδατάνθρακες, 2015). Οι ολιγοσακχαρίτες συγκροτούνται συνήθως από δύο έως δέκα μόρια μονοσακχαριτών, ενωμένων με γλυκοζιτικό δεσμό, ενώ οι πολυσακχαρίτες δημι-

ουργούνται από μεγάλο αριθμό μονοσακχαριτών και χαρακτηριστικά παραδείγματα συ-
νιστούν το άμυλο, η χιτίνη και η κυτταρίνη (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2018). Σημειώ-
νεται ότι ο γλυκοζιτικός δεσμός σχηματίζεται με τη συμπύκνωση δύο υδροξυλίων, ένα
από κάθε μονοσακχαρίτη, με αποτέλεσμα την απώλεια ενός μορίου νερού.



Εικόνα 1: Φουρανόζη

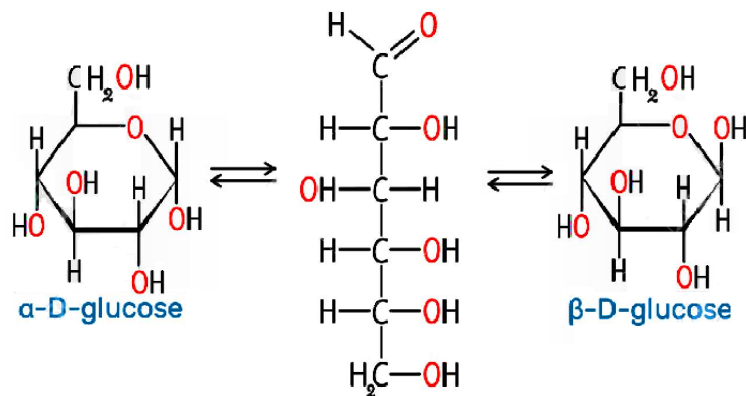


Εικόνα 2: Πυρανόζη

Γλυκόζη

Η γλυκόζη αποτελεί έναν μονοσακχαρίτη με μοριακό τύπο $C_6H_{12}O_6$, ο οποίος δι-
αδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των ζωντανών κυττάρων (Alberts, et al.,
2016). Αναλυτικότερα, πρόκειται για μία αλδοεξόζη, δηλαδή ένα σάκχαρο που αποτελεί-
ται από έξι άτομα άνθρακα, εκ των οποίων το ένα συνιστά μία αλδεϋδομάδα. Δεν μπορεί
να υδρολυθεί περαιτέρω και αποτελεί δομικό συστατικό των πολυσακχαριτών, όπως εί-
ναι το άμυλο και η κυτταρίνη. Στον χώρο λαμβάνει μορφές ανοιχτής αλυσίδας, καθώς και
δακτυλίου, οι οποίες σε υδατικά διαλύματα βρίσκονται σε ισορροπία (Kim, et al., 2005).
Αξίζει να σημειωθεί ότι στη φύση, εντοπίζεται η δεξιόστροφη μορφή της ανοιχτής αλυσί-
δας, γνωστή ως δεξτρόζη. Κατά την κυκλοποίηση του μονοσακχαρίτη στο νερό, σχημα-
τίζεται ένα μίγμα δύο ανωμερών ουσιών σε αναλογία 36:64 (McMurry, 2015). Συγκεκρι-
μένα, τα ανωμερή αυτά, γνωστά ως α και β , διαφέρουν στη θέση που κατέχει το υδρο-

ξύλιο του ανωμερικού κέντρου, δηλαδή του C-1 άνθρακα, ως προς τον υποκαταστάτη CH₂OH του C-5. Στο α-ανωμερές, το υδροξύλιο έχει αντίθετη κατεύθυνση από εκείνη του υποκαταστάτη, δηλαδή βρίσκεται σε θέση trans, ενώ στο β-ανωμερές έχουν την ίδια κατεύθυνση, οπότε καταλαμβάνει θέση cis. Στη φύση, η γλυκόζη συντίθεται μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης, που πραγματοποιείται στους φυτικούς οργανισμούς, στα φύκη και σε ορισμένα βακτήρια (Yakovlev & Shuvalov, 2013). Σε πρώτο στάδιο, δεσμεύεται η ηλιακή ακτινοβολία και αποθηκεύεται σε εξειδικευμένα μόρια που λειτουργούν ως φορείς ενέργειας (Alberts, et al., 2016). Κατά τη διαδικασία αυτή, απελευθερώνεται αέριο O₂, ως αποτέλεσμα της διάσπασης του νερού από το φως. Στη συνέχεια, οι φορείς ενέργειας συνεισφέρουν στην αντίδραση μεταξύ του αερίου CO₂ με το H₂O και οδηγούν στον σχηματισμό γλυκόζης.



Εικόνα 3: α και β ανωμερές της γλυκόζης

Άμυλο και χιτίνη

Το άμυλο αποτελεί έναν από τους σπουδαιότερους πολυσακχαρίτες και συγκροτείται από δεκάδες χιλιάδες μόρια γλυκόζης, σε ευθεία και διακλαδισμένη αλυσίδα. Ειδικότερα, στη φύση συναντάται σε μορφή αμυλοκόκκων, οι οποίοι έχουν διαφορετική σύσταση στον εσωτερικό και εξωτερικό χώρο του περιβλήματός τους (Τζια, Ταούκης, & Ωραιοπούλου, 2009). Το εσωτερικό των κόκκων καταλαμβάνεται από αμυλόζη, η οποία αποτελείται από μόρια γλυκόζης που ενώνονται με α-D-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό, σχηματίζοντας μία ευθεία αλυσίδα (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2018). Το εξωτερικό περίβλημα δημιουργείται από την αμυλοπηκτίνη, η οποία διαθέτει κι εκείνη μόρια γλυκόζης, που συνδέονται με α-D-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς σε ευθύγραμμα τμήματα, σχηματίζοντας διακλαδισμένες αλυσίδες που ενώνονται με α-D-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Ai & Jane,

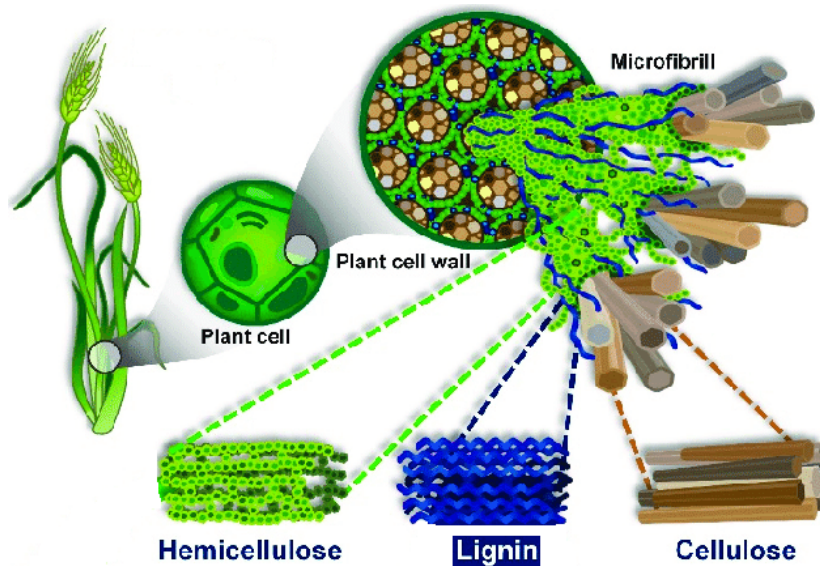
2016). Οι αμυλόκοκκοι που εντοπίζονται στη φύση, περιέχουν 20-30% αμυλόζη και 70-80% αμυλοπηκτίνη.

Η χιτίνη εντάσσεται κι εκείνη στους πολυσακχαρίτες και διαμορφώνεται από μία γραμμική αλυσίδα, πολλών μορίων D-γλυκοζαμίνης, συνδεδεμένων με β -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ο συγκεκριμένος μονοσακχαρίτης θεωρείται ιδιαίτερα δυνατός λόγω των μεγάλων, ινωδών μορίων του (McMurry, 2015). Η χιτίνη εντοπίζεται στο σκληρό, σκελετικό υλικό που περιβάλλει και προστατεύει τα έντομα και τα οστρακοειδή (Verma & Fortunati, 2019). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω πολυσακχαρίτες συγκροτούνται από σφιχτά οργανωμένα σάκχαρα, χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό, τα οποία για να υδρολυθούν, χρειάζεται να απομονωθούν (Meier, et al., 2017).

Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα

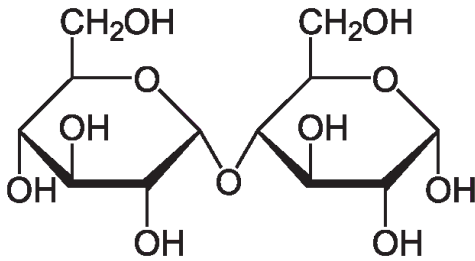
Οι φυτικοί οργανισμοί διαθέτουν ένα ευρύ σύνολο μηχανισμών που διασφαλίζουν την ακεραιότητα του εσωτερικού περιβάλλοντος των κυττάρων τους. Το σημαντικότερο μέσο προστασίας τους, απέναντι σε μηχανικές και χημικές βλάβες, αποτελεί το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο περικλείεται από ένα πυκνό πλέγμα πολυσακχαριτών (Alberts, et al., 2016). Ο ρόλος του έγκειται στην ελεγχόμενη εισαγωγή θρεπτικών στοιχείων στα φυτικά κύτταρα, αποκλείοντας την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών. Ο όρος λιγνινοκυτταρίνη χρησιμοποιείται προκειμένου να περιγράψει τα κύρια στοιχεία που απαρτίζουν το κυτταρικό τοίχωμα (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Ειδικότερα, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα συνίσταται κυρίως από τρία συστατικά: την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη σε ποσοστά 40-60%, 20-40% και 10-25%, αντίστοιχα (Han, Guo, Liu, Xia, & Wang, 2019). Εκτός των παραπάνω, περιλαμβάνονται και μικρές ποσότητες άλλων συστατικών, όπως είναι τα ανόργανα στοιχεία (Isikgor & Becer, 2015). Η περιεκτικότητα των στοιχείων στο τοίχωμα διαφέρει μεταξύ των φυτικών οργανισμών, καθώς επηρεάζεται από το είδος, την ποικιλία και το κλίμα στο οποίο έχουν αναπτυχθεί (Dimarogona, Topakas, & Christakopoulos, 2014). Η αξιοποίηση της βιομάζας με σκοπό την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, καθώς η λιγνινοκυτταρίνη αποτελεί μία ανανεώσιμη και οικονομική πηγή σακχάρων (Arevalo-Gallegos, Ahmad, Asgher, Parra-Saldivar, & Iqbal, 2017). Ωστό-

σο, απαιτείται πρώτα η ανάπτυξη μεθόδων διάσπασης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας στα δομικά της συστατικά (Isikgor & Becer, 2015).



Εικόνα 4: Δομικά στοιχεία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας: Κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη
Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι ένα από τα θεμελιώδη συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, καταλαμβάνοντας το 40-60 % του συνολικού ξηρού βάρους της βιομάζας (Kang, Appels, Tan, & Dewil, 2014). Είναι υπεύθυνη για την ακαμψία των φυτικών ιστών και ιδιαίτερως ανθεκτική στην ενζυμική αποικοδόμηση (Dimarogona, Torakas, & Christakopoulos, 2014). Πρόκειται για έναν πολυσακχαρίτη, ο οποίος συνίσταται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό (Brigham, 2018). Η μελέτη της κυτταρινούχου δομής αναδεικνύει τον δισακχαρίτη κελλοβιόζη ως την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της. Σημειώνεται ότι, η κελλοβιόζη σχηματίζεται από δύο μόρια D-γλυκόζης ενωμένα με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό (Σπηλιόπουλος, Υδατάνθρακες, 2015). Η κυτταρίνη διαθέτει κρυσταλλικές περιοχές, αλλά και άμορφες, οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ των πρώτων. Οι κρυσταλλικές περιοχές διαμορφώνονται από δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων της γλυκόζης, είτε αυτές ανήκουν στην ίδια αλυσίδα κυτταρίνης, είτε σε διαφορετικές (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Η ύπαρξη των δεσμών υδρογόνου δυσχεραίνει τη διάσπαση των περιοχών αυτών, καθώς είναι ιδιαίτερα συμπαγείς.

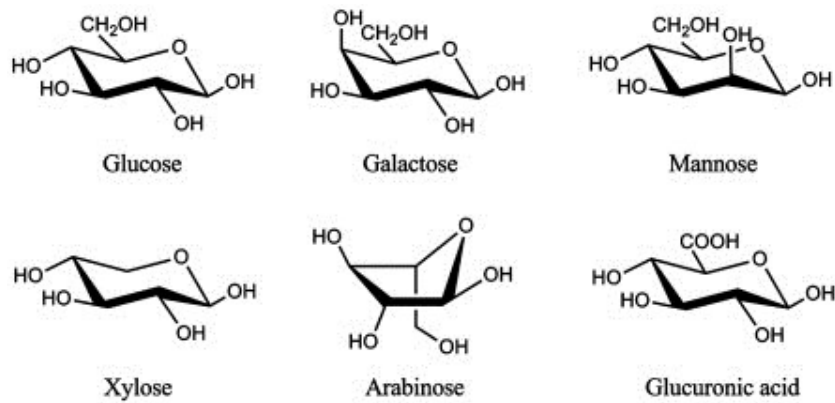


Εικόνα 5: Κελλοβιόζη, η δομική μονάδα της κυτταρίνης

Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη αποτελεί ένα σύνολο συμπολυμερών ουσιών που είναι ενσωματωμένες στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, παρέχοντας δομική στήριξη (Isikgor & Becer, 2015). Στα φυτικά είδη, εντοπίζονται σε ποσοστό 20-40% και η δομή τους είναι άμορφη (Kang, Appels, Tan, & Dewil, 2014). Στο μίγμα των συμπολυμερών ουσιών περιλαμβάνονται διάφορα είδη, όπως είναι οι πεντόζες, οι εξόζες και τα ουρονικά οξέα που συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Ως πεντόζες χαρακτηρίζονται οι μονοσακχαρίτες που διαθέτουν πέντε άτομα άνθρακα στην αλυσίδα τους, ενώ ως εξόζες εκείνοι που έχουν έξι άτομα άνθρακα (Σπηλιόπουλος, Υδατόνθαρες, 2015). Τα ουρονικά οξέα αποτελούν προϊόντα οξειδωσης του έκτου άνθρακα των εξοζών, όπου η υδροξυλομάδα (OH) μετατρέπεται σε καρβοξυλομάδα (COOH) (Μαγιάτης, 2009). Οι ημικυτταρίνες, λοιπόν, μπορούν να διακριθούν με βάση τον κυριότερο μονοσακχαρίτη που διαθέτουν (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Οι πιο συχνοί είναι η ξυλόζη και η αραβινόζη, που ανήκουν στην οικογένεια των πεντοζών, αλλά και η γλυκόζη, η γαλακτόζη και η μανόζη, που συμπεριλαμβάνονται στις εξόζες (Kang, Appels, Tan, & Dewil, 2014). Παράλληλα, εντοπίζεται και το γλυκουρονικό οξύ, που δημιουργείται από την οξειδωση της γλυκόζης. Παρ' όλα αυτά, το κυριότερο συστατικό των ημικυτταρινών είναι η ξυλάνη, η οποία αποτελεί τον δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στην φύση (Suriya, Bharathiraja, Manivasagan, & Kim, 2016). Η ξυλάνη διαθέτει μία κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλόζης, συνδεδεμένων με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς και η πολυπλοκότητα της δομής της καθιστά δύσκολη την πλήρη διάσπαση της (Abu-Ghannam & Balboa, 2018). Ο συγκεκριμένος πολυσακχαρίτης διαδραματίζει τον ρόλο του συνδετικού ιστού μεταξύ της κυτταρίνης και της λιγνίνης, με στόχο την διατήρηση της συνεκτικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων. Σημειώνεται ότι οι ημικυτταρίνες των φυλλοβόλων δέντρων συνιστώνται κυρίως από ξυλάνη, ενώ των κωνοφόρων από

γλυκομαννάνη (Dimarogona, Topakas, & Christakopoulos, 2014). Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία των ημικυτταρινών, ακόμα και σε μικρή ποσότητα, μπορεί να λειτουργήσει ανασταλτικά για την δράση των ενζύμων, κατά τη διαδικασία της υδρόλυσης της κυτταρίνης (Sindhu, Binod, & Pandey, 2015).

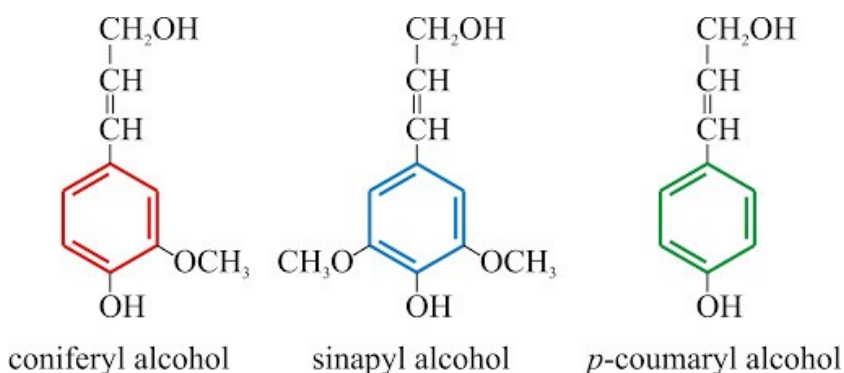


Εικόνα 6: Πεντόζες, εξόζες και ουρονικά οξέα συνθέτουν το μίγμα των συμπολυμερών των ημικυτταρινών

Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα τρισδιάστατο πολυμερές, το οποίο απαρτίζεται από φαινολικές ενώσεις και εντοπίζεται σε ποσοστό 10-25% στα φυτικά είδη. Η ύπαρξη της στο κυτταρικό τοίχωμα συνδέεται με την αντοχή του στην κάμψη και τη θλίψη (Isikgor & Becer, 2015). Η δομική μονάδα της λιγνίνης είναι το φαινυλοπροπάνιο, ένας αρωματικός υδρογονάνθρακας, με συντακτικό τύπο $\text{PhCH}(\text{CH}_3)_2$ (McMurry, 2015). Εμφανίζεται σε τρία διαφορετικά είδη: π-κουμαριλική (p-Coumaryl alcohol), σιναπιλική (Sinaryl alcohol) και κονιφεριλική αλκοόλη (Coniferyl alcohol), τα οποία συγκρατούνται με αιθερικούς και C-C δεσμούς (Velmurugan & Incharoensakdi, 2018). Η ποικιλία στην αναλογία αυτών των μονομερών είναι ο λόγος που διαφέρουν τα ποώδη από τα ξυλώδη φυτά ως προς τα χαρακτηριστικά του τοιχώματός τους (Kang, Appels, Tan, & Dewil, 2014). Η λιγνίνη ενώνεται με διάφορα είδη δεσμών με την κυτταρίνη και τις ημικυτταρίνες, και χαρακτηρίζεται από έντονη υδροφοβικότητα (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Η ποικιλία των δεσμών που διαθέτει η λιγνίνη καθιστά δύσκολη την υδρόλυση της (Suseela, 2019). Παράλληλα, οι φαινολικές ομάδες που σχηματίζονται από την αποικοδόμηση της, παρε-

μποδίζουν την ενζυμική υδρόλυση της βιομάζας (Kang, Appels, Tan, & Dewil, 2014), καθιστώντας αναγκαία την εύρεση μεθόδων αντιμετώπισης αυτού του προβλήματος.



Εικόνα 7: Τα τρία είδη του φαινυλικών ενώσεων που απαρτίζουν τη λιγνίνη

Επεξεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Η αξιοποίηση της βιομάζας για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, οδηγεί στην αναγκαία προ κατεργασία της πρώτης ύλης προκειμένου να διασπαστούν οι δεσμοί του συμπλέγματος κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης (Ayodele, Alsaffar, & Mustapa, 2019). Ειδικότερα, σκοπός της επεξεργασίας της πρώτης ύλης είναι η απομάκρυνση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, τα οποία αποτελούν φυσικά εμπόδια της αποικοδόμησης και ο περιορισμός της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Οι διαδικασίες που εφαρμόζονται οφείλουν να παρεμποδίζουν τη δημιουργία παραπροϊόντων, ανασταλτικών για την εξέλιξη της διάσπασης, να είναι ενεργειακά και οικονομικά βιώσιμες και να επιτρέπουν την ανάκτηση χρησιμων ουσιών (Chaturvedi & Verma, 2013). Το οικονομικό κομμάτι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιλογή της κατάλληλης μεθόδου, δεδομένου ότι οι υπάρχουσες διεργασίες προ επεξεργασίας καταλαμβάνουν σημαντικό ποσοστό του τελικού κόστους (Sindhu, Binod, & Pandey, 2015). Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε φυσικές, χημικές, φυσικοχημικές και βιολογικές διαδικασίες, οι οποίες προηγούνται της ενζυμικής υδρόλυσης (Kumar & Sharma, 2017).

Φυσικές μέθοδοι

Οι φυσικές μέθοδοι προ κατεργασίας της βιομάζας συμβάλλουν στη διεύρυνση της ελεύθερης, επιφανειακής περιοχής, καθώς και στη μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης (Taherzadeh & Karimi, 2008). Θεωρούνται περιβαλλοντικά φιλικές, καθώς

περιορίζουν το ρυπαντικό φορτίο, ωστόσο είναι ιδιαίτερα ενεργοβόρες, με αποτέλεσμα την εκτόξευση του κόστους εφαρμογής τους (Chen, et al., 2017). Μία συνηθισμένη μέθοδος αυτής της κατηγορίας είναι η άλεση, κατά την οποία μεταβάλλεται η δομή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και ο βαθμός κρυσταλλικότητας της. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις διατμητικές τάσεις που εφαρμόζονται στη λιγνινοκυτταρίνη (Kumar & Sharma, 2017). Μελέτες έδειξαν ότι η απόδοση της παραπάνω μεθόδου, επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους όπως είναι ο λόγος συμπίεσης, η ταχύτητα άλεσης και το ποσοστό υγρασίας (Lin, Huang, Zhang, Zhang, Yan, & Chen, 2010). Παράλληλα, η χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας αποτελεί μία συνηθισμένη τεχνική, η οποία συνοδεύεται συχνά από την προσθήκη κάποιας ήπιας βάσης ή αραιού οξέος (Zhu, Macquarrie, Simister, Gomez, & McQueen-Mason, 2015). Κατά την εφαρμογή αυτής της μεθόδου, τα πιο πολικά σημεία της βιομάζας θερμαίνονται, γεγονός που επιφέρει τελικά τη διάσπαση τους. Σημαντικά πλεονεκτήματα είναι η εύκολη εφαρμογή, οι χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις και η περιορισμένη παραγωγή ανασταλτικών παραπροϊόντων. Μάλιστα, μελέτες απέδειξαν ότι μπορεί να διασπάσει τη δομή της λιγνίνης και να καταστήσει την επιφάνεια της κυτταρίνης περισσότερο προσιτή στη δράση των ενζύμων (Lu, Xi, Zhang, & Angelidaki, 2011). Ωστόσο, το κόστος του εξοπλισμού που απαιτείται για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου είναι υψηλό (Chen, et al., 2017).

Χημικές μέθοδοι

Η χημική προ επεξεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας περιλαμβάνει χημικές αντιδράσεις, οι οποίες επιφέρουν τη διάσπαση της (Kumar, Yadav, Kumar, & Ahluwalia, 2019). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η όξινη και αλκαλική υδρόλυση, καθώς και η χρήση ιοντικών διαλυμάτων. Αναλυτικότερα, η όξινη υδρόλυση επιφέρει τη διεύρυνση των πόρων της βιομάζας και τη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, με αποτέλεσμα την ευχερή πρόσβαση των ενζύμων (Meier, et al., 2017). Η προσθήκη αραιού οξέος θεωρείται μία από τις παλαιότερες μεθόδους προ κατεργασίας και συνδυάζεται συχνά με υψηλές θερμοκρασίες (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Το οξύ που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι το θειικό, λόγω της προσιτής τιμής του (Kumar & Sharma, 2017). Ωστόσο, η σύνθεση παρεμποδιστών και η διάβρωση που προκαλεί στον εξοπλισμό, οδήγησαν στη δοκιμή άλλων οξέων, όπως είναι το οξαλικό και το μαλεϊκό (Kooststra, Beeftink, Scott, & Sanders, 2009). Η χρήση πυκνού οξέος συνδυάζεται με

ηπιότερες θερμοκρασίες και επιφέρει υψηλού ρυθμού αντιδράσεις, που βελτιώνουν σημαντικά την υδρόλυση της κυτταρίνης. Εντούτοις, το κόστος της διαδικασίας είναι ιδιαίτερα αυξημένο καθώς απαιτείται κατάλληλος εξοπλισμός, ανθεκτικός στη διάβρωση, λόγω της τοξικής φύσης του συμμετέχοντος διαλύματος (Chen, et al., 2017). Η αλκαλική προκατεργασία πραγματοποιείται με την προσθήκη βασικών διαλυμάτων, σε χαμηλές θερμοκρασίες και πιέσεις (Tahezadeh & Karimi, 2008). Συμβάλλει στην αποκρυστάλλωση της κυτταρίνης και τη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, δημιουργώντας κατάλληλες συνθήκες για την επακόλουθη δράση των ενζύμων. Μάλιστα, μελέτες έδειξαν ότι η διαδικασία αυτή αποδίδει καλύτερα σε πώδη υπολείμματα, συγκριτικά με τα ξυλώδη (Chen, et al., 2017). Η σύγκριση της όξινης και την αλκαλικής μεθόδου αναδεικνύει τη δεύτερη ως αποτελεσματικότερη λόγω της διάσπασης των δεσμών της βιομάζας και της αποφυγής καταστροφής των πεντοζών και εξοζών. Τέλος, μία σύγχρονη πρακτική περιλαμβάνει την χρήση ιοντικών υγρών, τα οποία αξιοποιούνται με δύο τρόπους, είτε πριν από την ενζυμική υδρόλυση, είτε ταυτόχρονα με τη διάσπαση (Kumar, Yadav, Kumar, & Ahluwalia, 2019). Κατά την εφαρμογή της, τα ιοντικά υγρά σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με στοιχεία των σακχάρων. Ως εκ τούτου, καταστρέφεται η συμπαγής δομή της λιγνινοκυτταρίνης, χωρίς τον σχηματισμό παρεμποδιστικών και περιβαλλοντικά βλαβερών ενώσεων (Chen, et al., 2017).

Φυσικοχημικές μέθοδοι

Οι φυσικοχημικές τεχνικές προκατεργασίας της βιομάζας συνιστούν έναν συνδυασμό φυσικών και χημικών μεθόδων. Οι συνηθέστερες εφαρμογές είναι η έκρηξη ατμού, CO₂, αμμωνίας και η υδροθερμική προεπεξεργασία (Kumar & Sharma, 2017). Συγκεκριμένα, κατά την έκρηξη ατμού, η βιομάζα δέχεται κορεσμένο ατμό υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας εύρους 160-240°C, για σύντομο χρονικό διάστημα και ακολουθεί αποσυμπίεση του συστήματος (Brodeur, Yau, Badal, Collier, Ramachandran, & Ramakrishnan, 2011). Ο ατμός εισέρχεται στη δομή της λιγνινοκυτταρίνης, επεκτείνοντας τα τοιχώματα της και προκαλώντας την καταστροφή των δεσμών υδρογόνου της κυτταρίνης. Με αυτόν τον τρόπο, μειώνεται η κρυσταλλικότητα της και διευκολύνεται η πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων. Παράλληλα, επέρχεται υδρόλυση της ημικυτταρίνης σε γλυκόζη και ξυλόζη, εξαιτίας των οξέων που παράγονται κατά την εφαρμογή της μεθόδου (Wang, Jiang, Xu, Sun, & Baird, 2010). Η λιγνίνη απομακρύνεται σε μικρότερο

ποσοστό, συγκριτικά με τα υπόλοιπα συστατικά της βιομάζας. Η έκρηξη ατμού συνδυάζεται συχνά με την προσθήκη όξινου καταλύτη, ο οποίος εντείνει την υδρόλυση της κυτταρίνης (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Ταυτόχρονα, υπάρχει και η μη τοξική πρακτική της προσθήκης CO₂, κατά την οποία σχηματίζεται ανθρακικό οξύ (H₂CO₃), το οποίο βελτιώνει σημαντικά τη διάσπαση της κυτταρίνης, χωρίς τη δημιουργία ανασταλτικών ενώσεων (Chen, et al., 2017). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την έκρηξη ατμού είναι η θερμοκρασία, ο χρόνος παραμονής, το μέγεθος της βιομάζας και το ποσοστό υγρασίας. Για το λόγο αυτό, η ορθή επιλογή των συνθηκών είναι ιδιαίτερως σημαντική, ώστε να αποφευχθεί ένα ακραίο περιβάλλον που θα οδηγήσει στην υποβάθμιση των ιδιοτήτων της κυτταρίνης (Taherzadeh & Karimi, 2008). Η έκρηξη αμμωνίας αποτελεί άλλη μία μέθοδο αυτής της κατηγορίας, η οποία περιλαμβάνει την έκθεση της βιομάζας σε διάλυμα αμμωνίας, υπό ήπια θερμοκρασία και υψηλή πίεση, για χρονικό διάστημα 30 min (Nauman Aftad, Iqbal, Riaz, Karadag, & Tabatabaei, 2019). Η συγκεκριμένη χημική ένωση προκαλεί θραύσεις στη δομή της κυτταρίνης και κατά συνέπεια καθιστά ευχερέστερη την πρόσβαση των ενζύμων. Μάλιστα, η αμμωνία μπορεί να ανακτηθεί λόγω της πτητικότητας της και να επαναχρησιμοποιηθεί. Σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η αποφυγή σύνθεσης παρεμποδιστικών ουσιών (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Τέλος, υπάρχει και η υδροθερμική προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας κατά την οποία η πρώτη ύλη έρχεται σε επαφή με νερό υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης, για χρονικό διάστημα 15 min (Nauman Aftad, Iqbal, Riaz, Karadag, & Tabatabaei, 2019). Παρόλο που, δεν απαιτείται η χρήση καταλυτών και η τεχνική θεωρείται ικανοποιητική όσον αφορά την ανάκτηση των σχηματιζόμενων σακχαριτών, είναι ιδιαίτερα ενεργοβόρα (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016).

Βιολογικές μέθοδοι

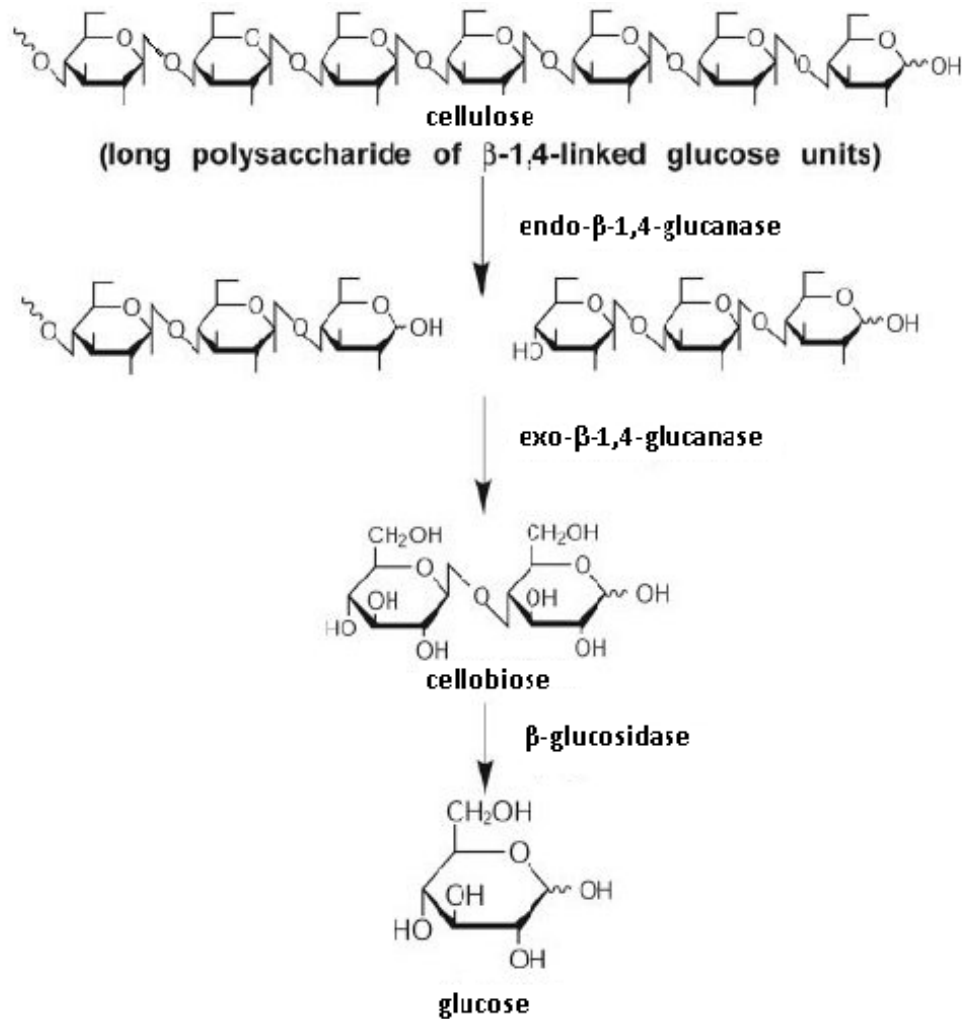
Οι βιολογικές μέθοδοι προεπεξεργασίας αφορούν τη δράση μικροοργανισμών προκειμένου να ενισχυθεί η διάσπαση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Ειδικότερα, στη φύση υπάρχουν μικροοργανισμοί, οι οποίοι παράγουν ένζυμα που αποικοδομούν τη λιγνίνη και συμβάλλουν στην ελάττωση του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης (Wagner, Lackner, Mutschlechner, Prem, Markt, & Illmer, 2018). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι μύκητες, οι οποίοι μεταβάλλουν τη δομή του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού κατά τέτοιον τρόπο ώστε να είναι περισσότερο επιδεκτικό στην ενζυματική

υδρόλυση (Aslanzadeh, Ishola, Richards, & Taherzadeh, 2014). Οι μύκητες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες - λευκής, καστανής και μαλακής σήψης - και διαφέρουν ως προς το συστατικό της βιομάζας στο οποίο επιδρούν. Συγκεκριμένα, οι μύκητες λευκής και μαλακής σήψης διασπούν τη λιγνίνη και σε ένα βαθμό την κυτταρίνη, ενώ εκείνοι που προκαλούν καστανή σήψη δρουν κυρίως εναντίον της κυτταρίνης (Nauman Aftad, Iqbal, Riaz, Karadag, & Tabatabaei, 2019). Οι βιολογικές μέθοδοι έχουν περιορισμένες απαιτήσεις όσον αφορά την ενεργειακή κατανάλωση, δεν απαιτείται η χρήση χημικών μέσων και είναι φιλικές προς το περιβάλλον (Chen, et al., 2017). Ωστόσο, ο ρυθμός δράσης των βιολογικών μεθόδων θεωρείται ακόμα αργός για βιομηχανική εφαρμογή (Taherzadeh & Karimi, 2008).

Ενζυμική υδρόλυση

Η διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης αφορά τη δράση ενζύμων, τα οποία μετατρέπουν τους πολυσακχαρίτες σε μονομερή, ζυμώσιμα σάκχαρα, όπως η γλυκόζη (Sindhu, Binod, & Pandey, 2015). Αναλυτικότερα, το αδιάλυτο κλάσμα που απομένει μετά την εφαρμογή των μεθόδων προ κατεργασίας της βιομάζας, συνίσταται κυρίως από κυτταρίνη και λιγνίνη, εφόσον το μεγαλύτερο ποσοστό της ημικυτταρίνης έχει διαλυτοποιηθεί (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Η αποικοδόμηση των συστατικών αυτών απαιτεί την προσθήκη ενζύμων, όπως είναι οι κυτταρινάσες, στο λιγνινοκυτταρινούχο υλικό που έχει απομείνει (Cai, Xu, Lu, Lin, & Yao, 2019). Ειδικότερα, οι κυτταρινάσες συγκροτούν ένα σύνολο ενζύμων που αποτελείται από την ενδογλουκανάση (EG), την εξωγλουκανάση (CBH) και τη β-γλυκοζιδάση (BG) και δρουν συνεργιστικά με σκοπό την υδρόλυση της κυτταρίνης (Zhang & Zhang, 2013). Η ενδογλουκανάση καταλύει τη διάσπαση της κυτταρίνης, μέσω της υδρόλυσης του β-1-4-D γλυκοζιτικού δεσμού στις άμορφες περιοχές, που βρίσκονται στο μέσο της κυτταρινικής αλυσίδας (Paul, Panda, Das Mohapatra, & Thatoi, 2019). Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργεί ολιγοσακχαρίτες σε διάφορα μήκη. Ακολουθεί η εξωγλουκανάση, η οποία δρα στα άκρα της κυτταρινικής αλυσίδας και πιο συγκεκριμένα στις κρυσταλλικές περιοχές και τα τμήματα που συντέθηκαν από την προηγούμενη δράση (Paul, Panda, Das Mohapatra, & Thatoi, 2019). Ως εκ τούτου, αποδίδει μόρια κελλοβιόζης. Η δομική μορφή των δύο προαναφερθέντων ενζύμων, διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στην ενεργότητα και την εξειδίκευσή τους. Αναλυτικότερα, τα ένζυμα διαθέτουν δύο υπομονάδες, μία καταλυτική που υδρολύει τους γλυ-

κοζιτικούς δεσμούς και παρουσιάζει ποικιλία όσον αφορά την αλληλουχία των αμινοξέων της, και μία μικρότερη, μη καταλυτική που συμβάλλει στην πρόσδεση του ενζύμου στην αλυσίδα (Jayasekara & Ratnayake, 2019). Οι β-γλυκοζιδάσες είναι ένζυμα που επιτελούν την υδρόλυση του β-1,4 γλυκοζιτικού δεσμού και εντοπίζονται σε φυτά, μύκητες και βακτήρια (Singh, Verma, & Kumar, 2015). Ο ρόλος τους είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς διασπούν την κελλοβιόζη σε δύο μόρια γλυκόζης, μειώνοντας την συγκέντρωση της στο λιγνινοκυτταρινούχο υλικό. Η κελλοβιόζη συνιστά έναν ισχυρό παρεμποδιστή της δράσης της εξωγλουκανάσης, πλήττοντας σοβαρά τη συνολική υδρολυτική διαδικασία των κυτταρινασών (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Μια άλλη κατηγορία ενζύμων που συμμετέχουν στη διάσπαση της βιομάζας, μετά την προ κατεργασία, είναι οι οξυγενάσες. Πρόκειται για μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις ενσωμάτωσης οξυγόνου σε ένα υπόστρωμα και διακρίνονται σε δύο είδη: τις μονοοξυγενάσες και τις δίοοξυγενάσες (Lennarz & Lane, 2013). Οι μονοοξυγενάσες ενσωματώνουν ένα άτομο οξυγόνου στο αντιδρών υπόστρωμα, απελευθερώνοντας ένα μόριο νερού, ενώ οι δίοοξυγενάσες προσθέτουν δύο άτομα οξυγόνου. Ως εκ τούτου, οξειδώνουν και διασπούν την κυτταρινική αλυσίδα σε μικρότερα τμήματα (Cai, Xu, Lu, Lin, & Yao, 2019).



Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης ενδογλουκανάσης, εξωγλουκανάσης και β -γλυκοζιδάσης στην κυτταρίνη

Λυτικές πολυσακχαριτικές μονοοξυγενάσες (LPMO)

Οι μονοοξυγενάσες πολυσακχαριτών (Lytic Polysaccharide Monooxygenases) είναι ένζυμα, τα οποία συμμετέχουν στη διάσπαση σακχάρων, ανθεκτικών στην αποικοδόμηση (Arora, Bharval, Sarswati, Sen, & Yennamalli, 2018). Ειδικότερα, οι LPMO εκμεταλλεύονται την οξειδωτική δράση του μοριακού οξυγόνου, το οποίο λύει τους γλυκοζιτικούς δεσμούς (Frandsen, et al., 2016). Αυτό επιτυγχάνεται καθώς το οξυγόνο σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, το οποίο δεσμεύει το υπόστρωμα και αλληλεπιδρούν. Έπειτα, οξειδώνουν ένα δεσμό C-H, που είναι προσκείμενος στον γλυκοζιτικό δεσμό, με την αφαίρεση ενός υδρογόνου και στη συνέχεια υδροξυλιώνουν το υπόστρωμα, με την προσθήκη μιας ομάδας OH. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα

την αποσταθεροποίηση του γλυκοζιτικού δεσμού και κατ'επέκταση τη διάσπαση του (Beeson, Phillips, Cate, & Marletta, 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα ένζυμα LPMO έχουν εφαρμοστεί εκτενώς στη λιγνινοκυτταρίνη, το άμυλο και την χιτίνη, τα οποία αποτελούν τους πολυπληθέστερους πολυσακχαρίτες στη φύση (Dimarogona, Torakas, & Christakopoulos, 2014). Μάλιστα, σε αυτό συνέβαλε και η ιδιότητα των LPMO να δρουν χωρίς απομόνωση της πολυσακχαρικής αλυσίδας, σε υποστρώματα που δεν διαλύονται εύκολα.

Εντοπισμός και κατηγοριοποίηση κατά CAZy

Τα ένζυμα LPMO συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία 20 χρόνια, χάρη τη συμβολή τους στη διάσπαση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Ειδικότερα, η παρατήρηση των LPMO σημειώθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 2000, ενώ η ανακάλυψη της οξειδωτικής τους δράσης εναντίον των πολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε το 2010 (Frandsen, et al., 2016). Ακολούθησε το 2011, έρευνα αναφορικά με τις περαιτέρω δυνατότητες των ενζύμων, καθώς και η εύρεση του χαλκού στο ενεργό τους κέντρο. Οι LPMO έχουν εντοπιστεί σε μύκητες και βακτήρια (Johansen, 2016).

Η ταξινόμηση των ενζύμων διενεργείται με βάση το πρότυπο σύστημα CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes), στο οποίο οι πρωτεΐνες κατατάσσονται με βάση την πρωτοταγή δομή των ενεργών τους κέντρων, καθώς και την αμινοξική αλληλουχία τους (Lombard, Ramulu, Drula, Coutinho, & Henrissat, 2013). Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην ίδια οικογένεια έχουν παρόμοια τρισδιάστατη δομή και μηχανισμό δράσης. Μάλιστα, η κατηγοριοποίησή τους αναδεικνύει και τις εξελικτικές τους σχέσεις.

Οι LPMO έχουν καταταχθεί σε έξι οικογένειες με τις ονομασίες AA9, AA10, AA11, AA13 και τις πρόσφατες AA14 και AA15 (Karnaouri, et al., 2019). Αναλυτικότερα, τα ένζυμα της ομάδας AA9 είχαν συμπεριληφθεί αρχικά στην οικογένεια των γλυκοσιδικών υδρολασών 61 (GH61), καθώς εμφάνιζαν μια ασθενή δράση ως ενδογλουκανάσες, συμβάλλοντας στη διάσπαση του β-1,4 γλυκοζιτικού δεσμού (Dimarogona, Torakas, & Christakopoulos, 2013). Με την πάροδο του χρόνου όμως, ανακαλύφθηκε ο οξειδωτικός μηχανισμός τους, με αποτέλεσμα την κατάργηση της ομάδας GH61 και τη μετονομασία της σε AA9 (CAZyedia contributors, 2019). Το υπόστρωμα που φαίνεται να προτιμούν

είναι η κυτταρίνη, παρόλο που ορισμένα AA9 ένζυμα παρουσιάζουν μειωμένη ή μηδενική δραστηριότητα εναντίον της. Διακρίνονται σε 3 υποκατηγορίες, οι οποίες δεν διαφέρουν ως προς το υπόστρωμα που επιλέγουν να δράσουν, αλλά στη μέθοδο αντίδρασης (Meier, et al., 2017). Η πρώτη υποομάδα σχετίζεται με την οξειδωση του C1 άνθρακα του σακχάρου της αλυσίδας, η δεύτερη με εκείνη του C4 και η τρίτη με την οξειδωση και των δύο (Basotra, Dhiman, Agrawal, Sani, Tsang, & Chadha, 2019). Μάλιστα, οι AA9 LPMO διαμορφώνουν την κρυσταλλική επιφάνεια της κυτταρίνης, κατά τέτοιον τρόπο που να επιτρέπει την αποτελεσματική δράση των κυτταρινασών (Jagadeeswaran, Gainey, Prade, & Mort, 2016). Η οικογένεια AA10 αρχικά είχε ενταχθεί στην ομάδα CBM33, στην οποία ανήκαν ένζυμα με μη καταλυτική δράση, που συνδέονταν σε διαλυτούς πολυσακχαρίτες. Μετά από εκτενή μελέτη, ανακαλύφθηκε ότι οι πρωτεΐνες αυτές συνέβαλαν στη διάσπαση της χιτίνης με έναν συνδυασμό υδρολυτικού και οξειδωτικού μηχανισμού, λειτουργώντας συνεργιστικά με τις χιπινάσες (Forsberg, et al., 2011). Η οικογένεια AA10 συνίσταται από δύο υποκατηγορίες, οι οποίες διακρίνονται με βάση την επιλογή υποστρώματος στο οποίο δρουν. Συγκεκριμένα, η μία ομάδα καταλύει τη διάσπαση της χιτίνης, ενώ η άλλη της κυτταρίνης (Meier, et al., 2017). Η κατηγορία AA11 διαθέτει παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά με την AA9 και AA10 και έχει παρατηρηθεί ότι δρα εναντίον της χιτίνης, οξειδώνοντας τον C1 άνθρακα του σακχάρου της αλυσίδας (Hemsworth, Henrissat, Davies, & Walton, 2014). Παράλληλα, η ομάδα AA13 σχετίζεται με τη διάσπαση αμύλου, οξειδώνοντας τον C1 άνθρακα του σακχάρου (Nekiunaite, Arntzen, Svensson, Vaaze-Kolstad, & Abou Hachem, 2016). Μάλιστα, η οικογένεια AA13 θεωρείται η μοναδική που εμφανίζει δραστηριότητα εναντίον των γλυκοζιτικών δεσμών α-1,4 και α-1,6. Τέλος, η οικογένεια AA14, παρόλο που δεν εμφανίζει κάποια δραστηριότητα όταν έρθει σε επαφή με κάποιο υπόστρωμα, λειτουργεί συνεργιστικά με τις κυτταρινάσες και τις ξυλανάσες, με αποτέλεσμα την αυξημένη απελευθέρωση γλυκόζης (CAZypedia contributors, 2019). Η δραστηριότητα των LPMO εφαρμόζεται σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, εντούτοις δεν έχει καταγραφεί η δράση της εναντίον της ξυλάνης (Basotra, Dhiman, Agrawal, Sani, Tsang, & Chadha, 2019).

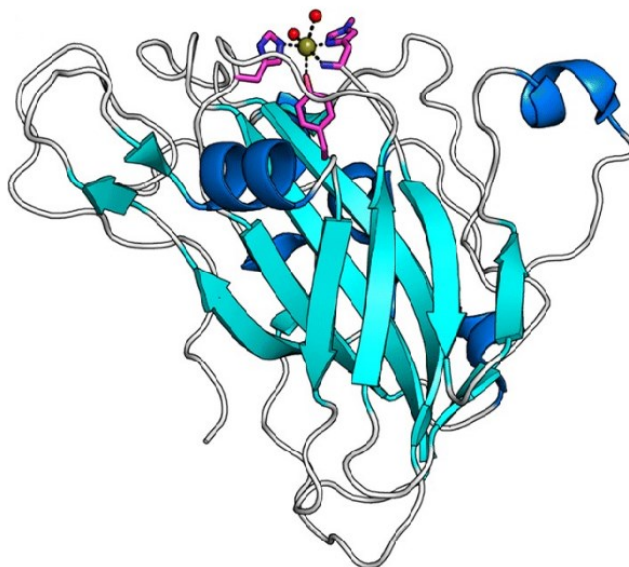
Ονομασία LPMO

Η ονομασία των ενζύμων LPMO προκύπτει από έναν συνδυασμό πληροφοριών. Αναλυτικότερα, τα πρώτα δύο γράμματα αφορούν το είδος από το οποίο προέρχονται,

ακολουθεί η λέξη LPMO, η οικογένεια στην οποία ανήκουν κατά CAZy και ένα γράμμα που σχετίζεται με το γονίδιο που τα κωδικοποιεί (Meier, et al., 2017). Ένα ένζυμο LPMO, παραδείγματος χάρη, το οποίο προέρχεται από το είδος *Serratia marcescens*, ανήκει στην AA10 οικογένεια και καταλύει τη διάσπαση της χιτίνης, συμβολίζεται ως SmLPMO10A.

Δομή των LPMO

Η δομή των λυτικών πολυσακχαρικών μονοοξυγενασών εντάσσεται στην κατηγορία των β-πτυχωτών φύλλων και προσομοιάζει εκείνη της ανοσοσφαιρίνης (Karnaouri, et al., 2019). Ειδικότερα, το πρότυπο των β-πτυχωτών φύλλων χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη παρακείμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, που έχουν τον ίδιο ή αντίθετο προσανατολισμό (Alberts, et al., 2016). Με αυτό τον τρόπο, σχηματίζουν μία άκαμπτη δομή, η οποία συγκρατείται με δεσμούς υδρογόνου (Alberts, et al., 2016). Σημειώνεται ότι, ο προσανατολισμός των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των LPMO είναι αντιπαράλληλος. Η ομοιότητα με την ανοσοσφαιρίνη έγκειται στην παρουσία ενός τετραμερούς δύο ελαφριών και δύο βαριών αλυσίδων, συνδεδεμένων με δισουλφιδικούς δεσμούς (L Mitchell, et al., 2019). Παράλληλα, η LPMO φέρει και κάποιες α-έλικες, οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ των β-πτυχωτών φύλλων. Στο σημείο αυτό, να αναφερθεί ότι οι α-έλικες διαθέτουν έναν πολυπεπτιδικό σκελετό, ο οποίος περιελίσσεται, σχηματίζοντας μια δεξιόστροφη ελικοειδή δομή. Η σταθερότητα της οφείλεται στην ύπαρξη ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των N-H και C=O αμινοξέων. Οι οικογένειες, στις οποίες κατηγοριοποιούνται τα ένζυμα LPMO, διαθέτουν αρκετές ομοιότητες όσον αφορά τη δομή τους (Arora, Bharval, Sarswati, Sen, & Yennamalli, 2018). Παρακάτω, παρουσιάζεται μία τρισδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου TaLPMO9A, το οποίο προέρχεται από το μύκητα *Thermoascus aurantiacus* και ανήκει στην οικογένεια AA9 (Eijsink, et al., 2019). Η μπλε σπειροειδής έλικα που διακρίνεται αναπαριστά τη δομή της α-έλικας, ενώ τα γαλάζια βέλη παρουσιάζουν τη δομή των β-πτυχωτών φύλλων. Το ενεργό κέντρο απεικονίζεται με γραμμές σε ροζ απόχρωση.



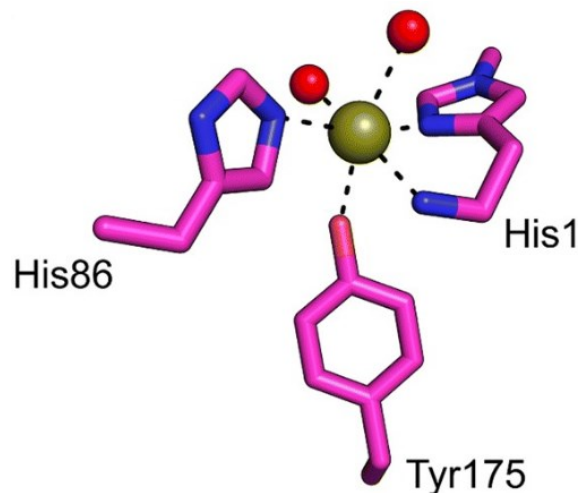
Εικόνα 9: Τρισδιάστατη απεικόνιση ενός ενζύμου LPMO (Eijsink, et al., 2019)

Ενεργό κέντρο

Το ενεργό κέντρο των λυτικών πολυσακχαριτικών μονοοξυγενασών είναι παρόμοια διαμορφωμένο σε όλα τα ένζυμα, ανεξαρτήτου οικογένειας. Αναλυτικότερα, τα κύρια, κοινά χαρακτηριστικά του είναι μία επίπεδη επιφάνεια πρόσδεσης του υποστρώματος και ένα δισθενές ιόν χαλκού (Hemsworth, Ciano, Davies, & Walton, 2018). Η συγκεκριμένη δομή ανήκει στην κατηγορία των ενεργών κέντρων τύπου 2 διότι το ιόν του χαλκού συνδέεται με δύο κατάλοιπα ιστιδίνης και κατά συνέπεια περιβάλλεται από 3 άτομα αζώτου, σχηματίζοντας μία επίπεδη επιφάνεια (Johansen, 2016). Η ιστιδίνη είναι ένα αμινοξύ, με χημικό τύπο $C_6H_9N_3O_2$ και ως πλευρική ομάδα διαθέτει έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο ιμιδαζολίου (Alberts, et al., 2016). Το ιμιδαζόλιο είναι μία αρωματική, ετεροκυκλική ένωση, η οποία έχει χημικό τύπο $(CH)_2N(NH)CH$ (McMurry, 2015). Τα δύο άτομα, λοιπόν, αζώτου που περιβάλλουν το ιόν χαλκού, προσφέρονται από το πρώτο μόριο ιστιδίνης, ενώ το τρίτο άτομο αζώτου διατίθεται από το δεύτερο μόριο (Vu & Ngo, 2018). Τα τρία άτομα αζώτου σχηματίζουν στον χώρο μία δομή που προσομοιάζει το γράμμα T. Οι αποστάσεις των μορίων αζώτου από το ιόν χαλκού κυμαίνονται από 1.9 έως 2.4 Å (Meier, et al., 2017). Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί ότι το άζωτο της πρώτης ιστιδίνης, είναι μεθυλιωμένο, δηλαδή συνδέεται με ένα μόριο CH_3 , στην περίπτωση που η πρωτεΐνη εκφράζεται σε μύκητα (Hemsworth, Ciano, Davies, & Walton, 2018). Η σημασία αυτής της πληροφορίας είναι ακόμα υπό διερεύνηση, ωστόσο θεωρείται ότι απουσία της

μεθυλίωσης, το ένζυμο εξακολουθεί να είναι ενεργό, όταν εκφράζεται, για παράδειγμα, στον ζυμομύκητα, *Pichia pastoris* (Bennati-Granier C. , et al., 2015). Τέλος, υπάρχει ένα κατάλοιπο του αμινοξέος τυροσίνη, το οποίο καταλαμβάνει μία από τις αξονικές θέσεις του χαλκού (Karnaouri, et al., 2019).

Στην εικόνα που ακολουθεί, η χρυσή σφαίρα που διακρίνεται αναπαριστά το άτομο του χαλκού στο ενεργό κέντρο, ενώ οι κόκκινες αποτελούν μόρια νερού.



Εικόνα 10: Απεικόνιση ενεργού κέντρου του ενζύμου LPMO (Eijsink, et al., 2019)

Μονάδες σύνδεσης υδατανθράκων

Η μελέτη της δομής των ενζύμων LPMO έχει οδηγήσει στον εντοπισμό χαρακτηριστικών μονάδων, οι οποίες συμβάλλουν στην σύνδεση τους με το υπόστρωμα (Gilbert, Know, & Boraston, 2013). Αναλυτικότερα, πρόκειται για διακριτές, πρωτεϊνικές αλληλουχίες, γνωστές με τα αρχικά CBM (Carbohydrate-binding modules), οι οποίες καθοδηγούν τις LPMO προς τον πολυσακχαρίτη που θα αποδομήσουν (Meier, et al., 2017). Οι μονάδες σύνδεσης των υδατανθράκων περιέχουν 30 έως 200 αμινοξέα και ταξινομούνται σε 79 οικογένειες στη βάση δεδομένων CAZy, ανάλογα με την αμινοξική αλληλουχία τους (CAZyedia contributors, 2019). Δομικά, χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη δύο επικαλυπτόμενων, β-πτυχωτών φύλλων, που το καθένα περιλαμβάνει τρεις έως έξι αντιπαράλληλες, πολυπεπτιδικές αλυσίδες (Boraston, Bolam, Gilbert, & Davies, 2004). Το σημείο πρόσδεσης του υποστρώματος εντοπίζεται είτε στην επιφάνεια του ενός β-πτυχωτού φύλλου, είτε στη θέση μεταβλητού βρόχου (VLS), που συνδέει τα δύο φύλλα (Abbott & Lammerts van Bueren, 2014). Μάλιστα, έχουν σημειωθεί αρκετές περιπτώσεις

όπου και οι δύο θέσεις σύνδεσης είναι λειτουργικές εντός της ίδιας πρωτεΐνης. Η θέση τους εντός του ενζύμου μπορεί να είναι είτε στο άκρο ενός άνθρακα, είτε ενός αζώτου (Shoseyon, Shani, & Levy, 2006). Πιο σπάνια, εντοπίζονται στο κέντρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Σημειώνεται ότι, οι ίδιες οι αλληλουχίες CBM δεν έχουν κάποια καταλυτική δραστηριότητα, παρόλο που ανιχνεύονται σε γλυκοσιδικές υδρολάσες, πολυσακχαρικές λυάσες και οξειδάσες (Crouch, Labourel, Walton, Davies, & Gilbert, 2016). Οι μονάδες σύνδεσης υδατανθράκων δεν υφίστανται κάποια αλλαγή στη διαμόρφωση τους, κατά την σύνδεση ενός υποστρώματος με το ένζυμο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, η θέση πρόσδεσης των πολυσακχαριτών είναι κατά τέτοιον τρόπο διαμορφωμένη, ώστε να είναι συμπληρωματική με το σάκχαρο.

Οι μονάδες CBM κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες (A, B, C), ανάλογα με τη μορφή του σημείου πρόσδεσης, καθώς και την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα (Rauter, Lidhorst, & Queneau, 2018). Ειδικότερα, στην ομάδα A εντάσσονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τις κρυσταλλικές περιοχές της κυτταρίνης και της χιτίνης και διαθέτουν ένα επίπεδο κέντρο πρόσδεσης (Meier, et al., 2017). Η ομάδα B θεωρείται ως ο πολυπληθέστερος τύπος CBM και δεσμεύει εσωτερικές αλληλουχίες ολιγοσακχαριτών. Τέλος, η ομάδα CBM τύπου C συνδέεται στα μη αναγωγικά άκρα μικρών σακχάρων (Rauter, Lidhorst, & Queneau, 2018). Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες CBM μπορούν να παραληφθούν με τις μεθόδους της μοριακής βιολογίας, εκφράζοντας το γονίδιο σε έναν ξενιστή, όπως είναι το βακτήριο *Escherichia coli* (Abbott & Lammerts van Bueren, 2014). Η έρευνα έχει στραφεί στην αποσαφήνιση του τρόπου με τον οποίο λειτουργούν οι συγκεκριμένες μονάδες, καθώς και στη δυνατότητα πρόβλεψης του ρόλου τους, όταν αποτελούν μέρος της δομής ενός ενζύμου.

Δομικές διαφορές των LPMO

Οι LPMO παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες όσον αφορά τη δομή τους, ωστόσο υπάρχουν και κάποια ξεχωριστά χαρακτηριστικά για κάθε οικογένεια. Ειδικότερα, παρόλο που το ενεργό κέντρο των περισσότερων λυτικών πολυσακχαρικών μονοοξυγενασών διαθέτει μία επίπεδη δομή, υπάρχουν δύο εξαιρέσεις. Τα ένζυμα της οικογένειας AA13, τα οποία φέρουν μία βαθιά σχισμή στο ενεργό τους κέντρο, και τα μέλη της AA14 που έχουν κι εκείνα μία ιδιαίτερος στενή επιφάνεια πρόσδεσης (Karnaouri, et al.,

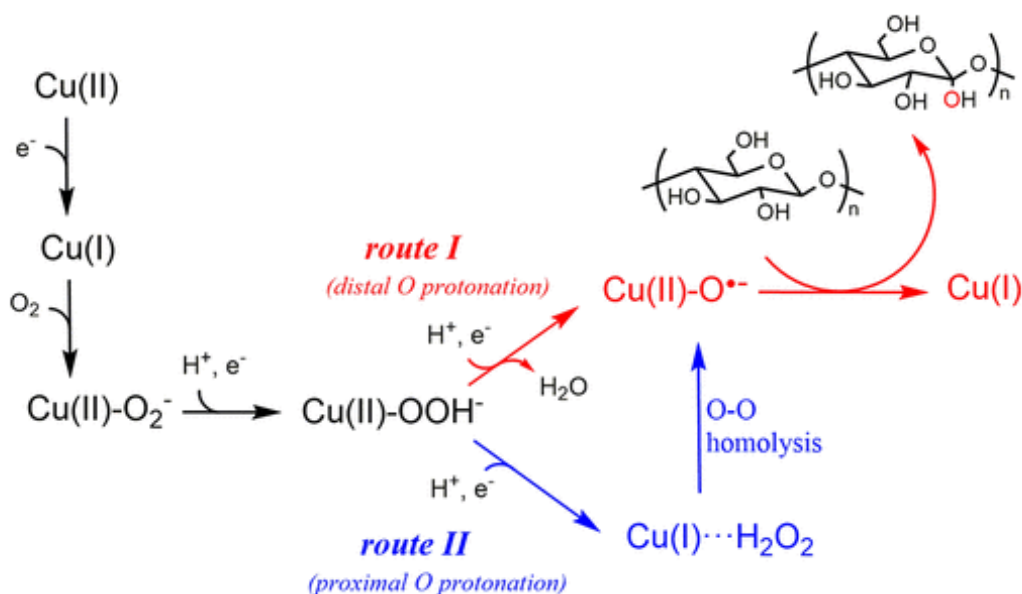
2019). Διαφορές εντοπίζονται και στο είδος των αμινοξέων που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο των ενζύμων. Αναλυτικότερα, ορισμένα μέλη της οικογένειας AA10 έχουν ένα κατάλοιπο φαινυλαλανίνης στη θέση της τυροσίνης που φέρουν οι περισσότερες LPMO, καθώς και ένα μόριο αλανίνης (Petrovic, et al., 2018). Ταυτόχρονα, τα ένζυμα της κατηγορίας AA9 διαθέτουν ένα κατάλοιπο γλουταμίνης, ενώ οι AA10 που δρουν εναντίον της χιτίνης, έχουν, αντί αυτού, ένα μόριο γλουταμινικού οξέος (Meier, et al., 2017). Τέλος, τα μέλη των οικογενειών AA9, AA11 και AA13, διαθέτουν ένα σύμπλοκο νερού / υδροξειδίου, στον χώρο που σχηματίζουν τα τρία άτομα αζώτου των μορίων ιστιδίνης (Meier, et al., 2017).

Γλυκοζυλίωση

Το φαινόμενο της γλυκοζυλίωσης αποτελεί μία από τις συνηθέστερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την σύνθεση των πρωτεϊνών και διαμορφώνουν τα βιοφυσικά τους χαρακτηριστικά (Shental-Bechor & Levy, 2008). Ειδικότερα, πρόκειται για την προσθήκη ολιγοσακχαριτών σε κάποια λειτουργική ομάδα της πρωτεΐνης, εξυπηρετώντας ποικίλες λειτουργίες, όπως είναι η προστασία του μορίου από την αποδόμηση και η καθοδήγησή του στο κατάλληλο οργανίδιο (Alberts, et al., 2016). Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί ότι η γλυκοζυλίωση μπορεί να προσδίδει δομική σταθερότητα στην πρωτεΐνη, ειδικά στις περιοχές σύνδεσης των υποστρωμάτων. Οι γλυκοζυλίωσεις μπορούν να συνδεθούν είτε σε ένα άτομο αζώτου ενός κατάλοιπου ασπαργίνης, είτε σε ένα άτομο οξυγόνου μιας σερίνης ή θρεονίνης (Meier, et al., 2017). Κατά την έκφραση του γονιδίου μίας LPMO, ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται να δοθεί στην επιλογή του οργανισμού που θα παράξει το ένζυμο. Έχει παρατηρηθεί ότι διαφορετικοί ξενιστές μπορούν να επηρεάσουν τον τύπο της γλυκοζυλίωσης και κατ'επέκταση τις ενζυμικές ιδιότητες, όπως τις περιοχές σύνδεσης των υποστρωμάτων (Petrovic, et al., 2018). Παρ' όλα αυτά, έχει παρατηρηθεί ότι τα ένζυμα που εκφράζονται στον ζυμομύκητα *P. pastoris*, εξακολουθούν να παραμένουν λειτουργικά, παρά τις διαφορές που μπορεί να φέρουν στο μοτίβο της γλυκοζυλίωσης. Η οικογένεια AA9 των LPMO φέρει ολιγοσακχαρίτες σε άτομα αζώτου και οξυγόνου. Παρόμοια, η οικογένεια AoAA13, ενώ δύο μέλη της AA10 είναι γλυκοζυλιωμένα σε άτομα αζώτου (Meier, et al., 2017).

Μηχανισμός δράσης

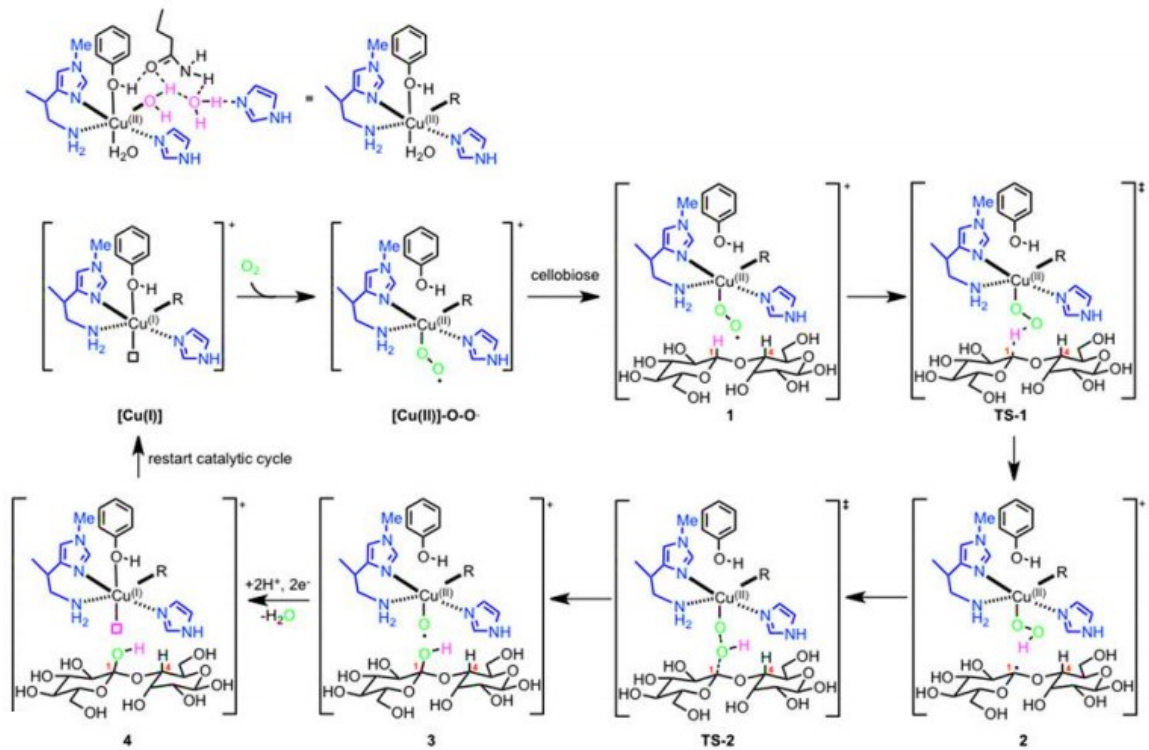
Η ανακάλυψη των ενζύμων LPMO αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην αποικοδόμηση των ανθεκτικών πολυσακχαριτών, μέσω της οξειδωτικής διάσπασης των γλυκοζιτικών τους δεσμών (Eijsink, et al., 2019). Αναλυτικότερα, από τα πρώτα στάδια της παρατήρησης των LPMO, η ενζυμική δράση μελετάται εκτενώς, ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός οξείδωσης των υποστρωμάτων, παραμένει ακόμα άγνωστος (Meier, et al., 2017). Γενικά, θεωρείται ότι για να πραγματοποιηθεί η ενζυμική οξείδωση, απαιτείται μία πηγή οξυγόνου, καθώς και δότες ηλεκτρονίων. Όσον αφορά την πηγή οξυγόνου, έχουν προταθεί τόσο το O_2 , όσο και το H_2O_2 , ακολουθώντας διαφορετικούς μηχανισμούς. Οι πρώτες μελέτες υποστήριζαν ότι το O_2 ήταν η κύρια πηγή και ακολουθούσε τα βήματα που παρουσιάζονται παρακάτω για την οξείδωση των πολυσακχαριτών (Wang, Walton, & Rovira, 2019):



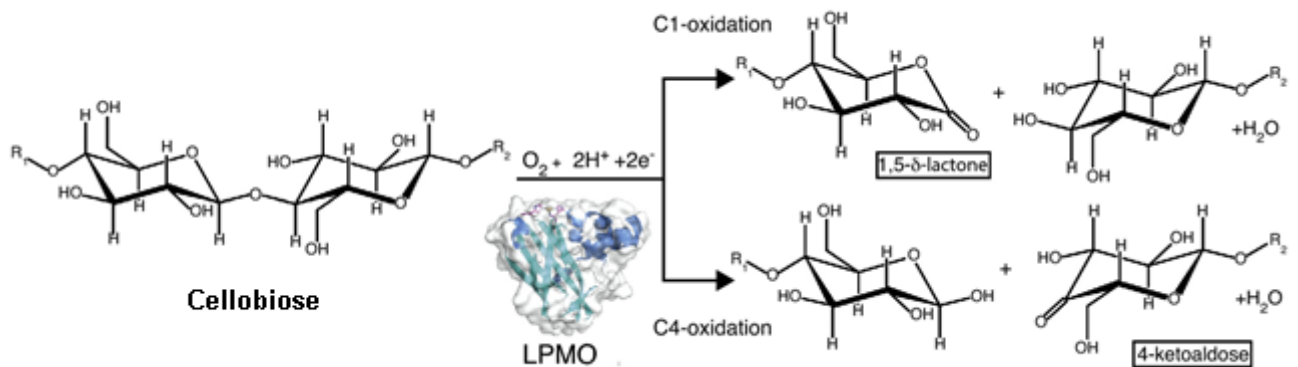
Εικόνα 11: Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης της LPMO (Wang, Walton, & Rovira, 2019)

Αρχικά, λοιπόν, ο χαλκός του ενεργού κέντρου προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο από κάποιον αναγωγικό παράγοντα και μεταπίπτει από τη μορφή $Cu(II)$ σε $Cu(I)$ (Hedegard & Ryde, 2018). Στην συνέχεια, το O_2 συνδέεται στον χαλκό, σχηματίζοντας το σύμπλοκο $Cu(II) - O - O^-$. Ακολουθεί η αλληλεπίδραση του υποστρώματος με το σύμπλοκο του χαλκού-οξυγόνου, όπου πραγματοποιείται η αφαίρεση ενός ατόμου H ,

δημιουργώντας μία ελεύθερη ρίζα στη θέση 1 ή 4 του πολυσακχαρίτη και το Cu (II)-O-O-H⁻, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



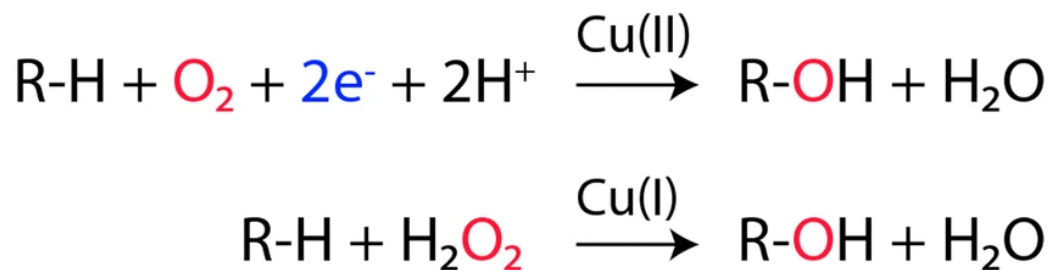
Εικόνα 12: Μηχανισμός αντίδρασης LPMO με κελλοβιόζη



Εικόνα 13: Προϊόντα αντίδρασης LPMO με κελλοβιόζη

Έχουν προταθεί δύο μονοπάτια για την ολοκλήρωση της ενζυμικής οξειδωσης των πολυσακχαριτών. Στην πρώτη περίπτωση, το σύμπλοκο του χαλκού - οξυγόνου αποσπά ηλεκτρόνια από κάποιο άλλο υπόστρωμα, με αποτέλεσμα την σύνθεση ενός

μορίου νερού, καθώς και του Cu (II) – O⁻ (Meier, et al., 2017). Παράλληλα, πραγματοποιείται η υδροξυλίωση του υποστρώματος. Ο παράγοντας Cu (II) – O⁻ επιτυγχάνει τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού μέσω αποσταθεροποίησης κι έπειτα ο δότης ηλεκτρονίων ανάγει το σύμπλοκο Cu (II) – O στο αρχικό αντιδρών Cu (II), ολοκληρώνοντας έτσι τον καταλυτικό κύκλο. Στη δεύτερη περίπτωση, ακολουθούνται όλα τα παραπάνω βήματα, ωστόσο όταν σχηματίζεται το σύμπλοκο Cu (II)-O-O-H⁻, αντιδρά με το οξυγόνο, οδηγώντας στην σύνθεση Cu (I) και H₂O₂ (Wang, Walton, & Rovira, 2019). Έπειτα, δημιουργείται το Cu (II) – OH και η ενδιάμεση ρίζα (HO⁻) μέσω ενός μηχανισμού ομολύσεως. Με την σειρά τους αυτά αποδίδουν το δραστικό σύμπλοκο Cu (II) – O⁻. Ο καταλυτικός κύκλος ολοκληρώνεται με τον τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως. Η υδροξυλίωση του υποστρώματος αποσταθεροποιεί τον γλυκοζιτικό δεσμό, επιφέροντας τη διάσπαση του και την απελευθέρωση ενός τμήματος του πολυσακχαρίτη.



Εικόνα 14: Προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης της LPMO (Eijsink, et al., 2019)

Δότες e⁻

Στο μηχανισμό ενζυμικής οξειδωσης των πολυσακχαριτών από την LPMO χρειάζεται να συμμετάσχει ένας δότης ηλεκτρονίων (Meier, et al., 2017). Για τον σκοπό αυτό, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικρά αναγωγικά μόρια, όπως είναι το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη, αλλά και η κατεχίνη και το γαλλικό οξύ (Wang, Walton, & Rovira, 2019). Παράλληλα, έχουν προταθεί ενώσεις που προέρχονται από την επεξεργασία της λιγνίνης. Αυτό οφείλεται σε παρατηρήσεις ερευνητών σχετικά με την ενισχυμένη δραστηκότητα της LPMO, που είχε προέλθει από το μύκητα *Myceliophthora thermophila*, κατά την προσθήκη λιγνίνης (Dimarogona M. , Topakas, Olsson, & Christakopoulos, 2012). Ένα άλλο είδος που μπορεί να δράσει ως δότης ηλεκτρονίων, είναι το ένζυμο CDH (Cellobi-ose Dehydrogenase). Ειδικότερα, πρόκειται για ένα ένζυμο της οικογένειας των φλαβο-κυτόχρωμων, το οποίο εντοπίζεται σε μύκητες που συμβάλλουν στην αποικοδόμηση του

ξύλου (Sulej, et al., 2015). Αποτελείται από ένα κυτόχρωμα που διαθέτει μία αίμη τύπου β (CYT), συνδεδεμένο με ένα δινουκλεοτίδιο φλεβίνης αδενίνης (FAD). Το ένζυμο CDH καταλύει την οξειδωση του αναγωγικού άκρου της κελλοβιόζης, όπως επίσης κι άλλων ολιγοσακχαριτών. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων σε εξωτερικούς δέκτες πραγματοποιείται με τη μετακίνηση τους μεταξύ των περιοχών FAD – CYT. Ωστόσο, η δράση τους ως πηγή ηλεκτρονίων συνοδεύεται από τον σχηματισμό προϊόντων που δρουν ως ανασταλτικοί παράγοντες για τις κυτταρινάσες, με αποτέλεσμα να μειώνεται η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας της σακχαροποίησης (Meier, et al., 2017). Ως εκ τούτου, η χρήση του ενζύμου CDH είναι εφικτή, με την προσθήκη β-γλυκοζιδάσης, η οποία θα διασπάσει τα παρεμποδιστικά προϊόντα της αντίδρασης. Τέλος, έρευνες έχουν δείξει ότι ορισμένες φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες μπορούν να λειτουργούν ως πηγές ηλεκτρονίων, καθώς και να συμμετέχουν στην σύνθεση H₂O₂ (Bissaro, et al., 2017). Έρευνες μελετούν την πιθανότητα, η LPMO να παρουσιάζει κάποια προτίμηση, όχι μόνο στο υπόστρωμα στο οποίο θα δράσει, αλλά και στην πηγή ηλεκτρονίων που θα χρησιμοποιήσει (Meier, et al., 2017).

Προϊόντα δράσης των LPMO και μέθοδοι ανίχνευσης

Οι LPMO καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού στον C1 ή C4 άνθρακα της αλυσίδας των σακχάρων, με αποτέλεσμα τη σύνθεση ολιγοσακχαριτών (Westereng, Loose, Vaaje-Kolstad, Aachmann, Sorlie, & Eijsink, 2018). Αναλυτικότερα, η οξειδωση στον C1 άνθρακα της πολυσακχαριτικής αλυσίδας οδηγεί στον σχηματισμό των 1,5-δ-λακτόνων, οι οποίες μετατρέπονται σε μία σταθερότερη μορφή, αποδίδοντας μόρια αλδονικών οξέων (Jensen, et al., 2019). Σημειώνεται ότι, ως λακτόνες χαρακτηρίζονται οι κυκλικοί εστέρες, ενώ ως αλδονικά οξέα τα προϊόντα οξειδωσης των αλδοζών (Bhagavan, 2002). Η οξειδωτική διάσπαση στον C4 άνθρακα παράγει κετοαλδόζες, σάκχαρα δηλαδή που στα μονομερή τους συνυπάρχουν η αλδεϋδική και η κετονική ομάδα (Jensen, et al., 2019). Αυτά, με την παρουσία νερού, μεταπίπτουν σε διόλες, δηλαδή οργανικές ενώσεις που διαθέτουν δύο υδροξυλομάδες συνδεδεμένες στο ίδιο άτομο άνθρακα. Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την κατανόηση της δράσης των ενζύμων LPMO, παρουσιάζουν μία συσσώρευση προϊόντων, οξειδωμένων στον C4 άνθρακα (Muller, Chylenski, Bissaro, Eijink, & Horn, 2018).

Κατά την προσπάθεια ανίχνευσης των σακχάρων που παράγονται, έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι, με επικρατέστερες τη φασματομετρία μάζας και την χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (Sun, et al., 2020). Η πρώτη τεχνική βασίζεται στο διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων με τη βοήθεια κατάλληλης διάταξης και συμβάλλει στην ταυτοποίηση στοιχείων και στον προσδιορισμό των συγκεντρώσεών τους (Skoog, Holler, & Crouch, 2007). Παρόλο που, οι μάζες των προϊόντων οξειδωσης του C1 και του C4 άνθρακα της πολυσακχαριτικής αλυσίδας είναι ταυτόσημες, η διάκριση είναι εφικτή. Ειδικότερα, οι λακτόνες και τα αλδοονικά οξέα που έχουν προέλθει από τον οξειδωμένο C1 άνθρακα, σχηματίζουν αζωτούχα άλατα, τα οποία έχουν χαρακτηριστική μάζα χάρης την παρουσία δύο κατιόντων αζώτου (Eijsink, et al., 2019). Αντίστοιχα, η απουσία ανίχνευσης της συγκεκριμένης μάζας υποδηλώνει ότι τα προϊόντα έχουν δημιουργηθεί από τον οξειδωμένο C4 άνθρακα. Η χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης συμβάλλει κι εκείνη στον ποιοτικό ή / και ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών που παράγονται από τη δράση των LPMO. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μεταφορά του δείγματος από μία κινητή φάση και τη διέλευση του από μία στατική (Skoog, Holler, & Crouch, 2007). Τα συστατικά που συγκρατούνται ισχυρότερα από την στατική φάση, κινούνται πιο αργά κατά την ροή της κινητής. Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται η διάκριση τους, μιας και το κάθε συστατικό καταλαμβάνει μία ξεχωριστή ζώνη κατά την έκλουση του. Ωστόσο, όσο πιο περίπλοκος είναι ο οξειδωμένος ολιγοσακχαρίτης, τόσο περισσότερο δυσχεραίνεται η αναγνώριση του τύπου της οξειδωσης (Sun, et al., 2020). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα προϊόντα του οξειδωμένου C4 άνθρακα είναι ασταθή όταν επικρατούν αλκαλικές συνθήκες στην στήλη της χρωματογραφίας (Westereng, Arntzen, Aachmann, Varnai, Eijsink, & Agger, 2016). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην εντοπίζονται επαρκώς.

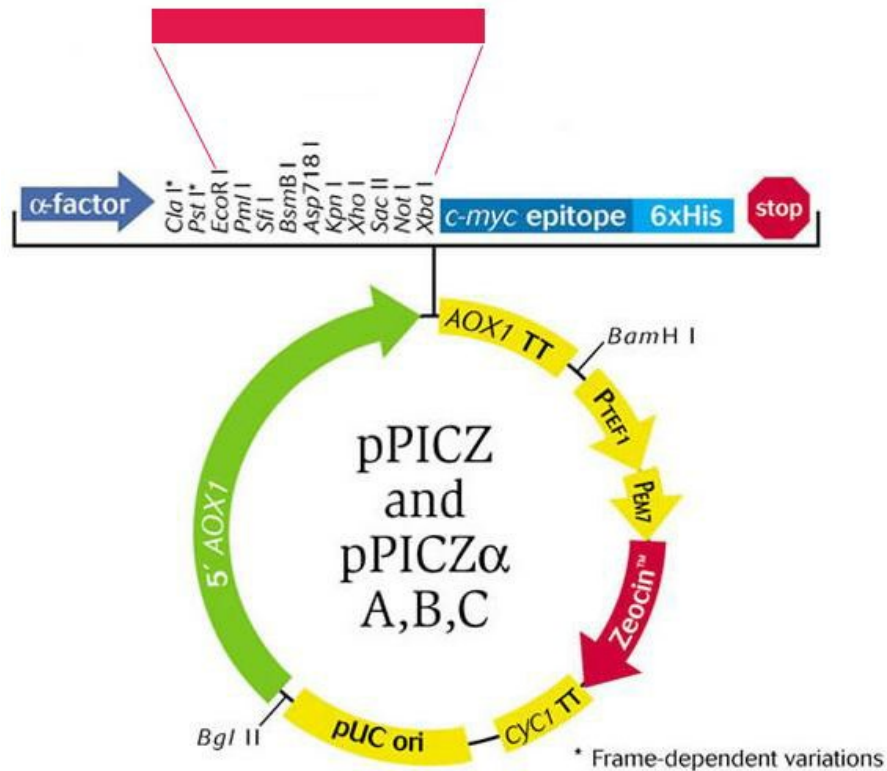
Myceliophthora thermophila

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, το γονίδιο που εκφράζει το ένζυμο LPMO, προέρχεται από το γονιδίωμα του μικροοργανισμού, *Myceliophthora thermophila*. Ειδικότερα, πρόκειται για έναν θερμόφιλο, νηματοειδή μύκητα, ο οποίος εντοπίζεται στο έδαφος, σε περιοχές της ανατολικής Ρωσίας (Karnaouri, Topakas, Antonopoulou, & Christakopoulos, 2014). Το εύρος της θερμοκρασίας ανάπτυξής του, κυμαίνεται από τους 25-55°C και ως βέλτιστη θερμοκρασία, θεωρούνται οι 45°C (Singh B. , 2016). Ο

συγκεκριμένος μύκητας αποτελεί μία σημαντική δεξαμενή ενζύμων, με βιομηχανικές εφαρμογές, όπως είναι η αποικοδόμηση της βιομάζας (Xu, et al., 2015). Μάλιστα, περιλαμβάνει γονίδια για 22 ένζυμα LPMO της οικογένειας AA9, καθώς και τις μονάδες δέσμευσης των υδατανθράκων (CBM) (Karnaouri, Torakas, Antonopoulou, & Christakopoulos, 2014). Το παραπάνω στοιχείο αποτελεί το μεγαλύτερο αριθμό ενζύμων συγκριτικά με τους υπόλοιπους μύκητες. Από το σύνολο των 22 ενζύμων, έχουν ταυτοποιηθεί τα έξι και έχουν εντοπιστεί οι διαφορετικές προτιμήσεις, όσον αφορά το υπόστρωμα που αποικοδομούν (Zhou, et al., 2019). Αξίζει να αναφερθούν μερικά παραδείγματα ενζύμων που έχουν εντοπιστεί, όπως είναι τα MtLPMO9A και MtLPMO9I, τα οποία οξειδώνουν τους β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς των ανθράκων C1 και C4 της κυτταρίνης, αντίστοιχα (Frommhagen, et al., 2015). Τα ένζυμα MtLPMO9B και MtLPMO9D συμβάλλουν στη διάσπαση του ίδιου υποστρώματος, παράγοντας ολιγοσακχαρίτες, οξειδωμένους στον C1 άνθρακα (Frommhagen, et al., 2017). Ένα ακόμα παράδειγμα ενζύμων που έχουν εντοπιστεί στο μύκητα, είναι τα MtLPMO9C και MtLPMO9E, που διασπούν τόσο την κυτταρίνη, όσο και την ξυλογλυκάνη, οξειδώνοντας τον άνθρακα C4 (Kadowaki, et al., 2018).

Πλασμιδιακός φορέας

Ο πλασμιδιακός φορέας είναι ένα γενετικό στοιχείο, συνήθως πλασμίδιο, το οποίο μπορεί να ενσωματώσει ένα κλάσμα ξένου DNA και να το μεταφέρει σ' ένα κύτταρο δέκτη (Alberts, et al., 2016). Το πλασμίδιο είναι ένα μικρό κυκλικό μόριο DNA, το οποίο αντιγράφεται ανεξάρτητα από το γονιδίωμα του κυττάρου που το περιέχει. Κατά την πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pPICZαA, της εταιρείας Invitrogen, για κλωνοποίηση, έκφραση και εντοπισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, σε κύτταρα του ζυμομύκητα *Pichia pastoris*. Ο συγκεκριμένος φορέας διαθέτει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη, καθώς και τον υποκινητή 5'AOX1, ο οποίος ενεργοποιείται κατά την προσθήκη μεθανόλης στην καλλιέργεια του ζυμομύκητα. Τέλος, ο πλασμιδιακός φορέας φέρει την αλληλουχία α-factor, για εξωκυτταρική έκφραση της πρωτεΐνης και C-άκρο, το οποίο κωδικοποιεί 6 αμινοξέα His, για τον εύκολο καθαρισμό της πρωτεΐνης.



Εικόνα 15: Πλασμιδιακός φορέας pPICZαA (Salehzadeh & Arasteh, 2012)

Pichia pastoris

Ο μικροοργανισμός *Pichia pastoris* αποτελεί μία μεθυλότροφη ζύμη, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στον χώρο της βιοτεχνολογίας, ιδιαίτερα για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών (Ahmad, Hirz, Pichler, & Schwab, 2014). Η χρήση της για εμπορικούς σκοπούς, ξεκίνησε πριν από 40 χρόνια, από την εταιρεία Phillips Petroleum για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP), ως πρόσθετης ύλης ζωοτροφών, σε μία διαδικασία ζύμωσης. Κατά τη δεκαετία του '80, άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως ως σύστημα ετερόλογης πρωτεϊνικής έκφρασης, χάρης τον υψηλό ρυθμό ανάπτυξης, καθώς και τη δυνατότητα καλλιέργειας του σε ένα οικονομικό μέσο (Shi, et al., 2020). Ιδιαίτερη σημασία για την έκφραση μίας πρωτεΐνης, έχει η επιλογή του υποκινητή, δηλαδή μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων DNA, στην οποία προσδένεται η RNA πολυμεράση για ν' αρχίσει τη μεταγραφή του γονιδίου (Alberts, et al., 2016). Στη δεδομένη εργασία, επιλέχθηκε ο υποκινητής 5'AOX1, ο οποίος επιτρέπει στον ζυμομύκητα να χρησιμοποιεί τη μεθανόλη ως πηγή άνθρακα κι ενέργειας. Ως εκ τούτου, κατά την προσθήκη της οργανικής ένωσης στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών, προκαλείται η έκφραση του γονιδί-

ου και κατ' επέκταση η παραγωγή της πρωτεΐνης. Η μεθανόλη αποτελεί μια οικονομική πηγή άνθρακα, η οποία αυξάνει σημαντικά τον όγκο της καλλιέργειας στην οποία προστίθεται (Lin, Panigraphy, Trinh, Folkman, & Shiloach, 2000). Παράλληλα, μειώνει τον κίνδυνο μόλυνσης της καλλιέργειας, κατά τη διαδικασία της ζύμωσης (Pfeifenschneider, Brautaset, & Wendisch, 2017). Ωστόσο, παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα με σημαντικότερο εκείνο της τοξικότητας της ένωσης. Παράλληλα, η διαδικασία της ζύμωσης, μετά την χρήση μεθανόλης, απαιτεί συγκέντρωση οξυγόνου 3-4 φορές υψηλότερη από εκείνη που χρειάζεται όταν η γλυκόζη είναι πηγή άνθρακα (Shi, et al., 2020). Τέλος, κατά το μεταβολισμό της οργανικής ένωσης, παράγεται υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο προκαλεί οξειδωτικό στρες και πρωτεολυτική αποικοδόμηση ορισμένων πρωτεϊνών.

5'AOX1

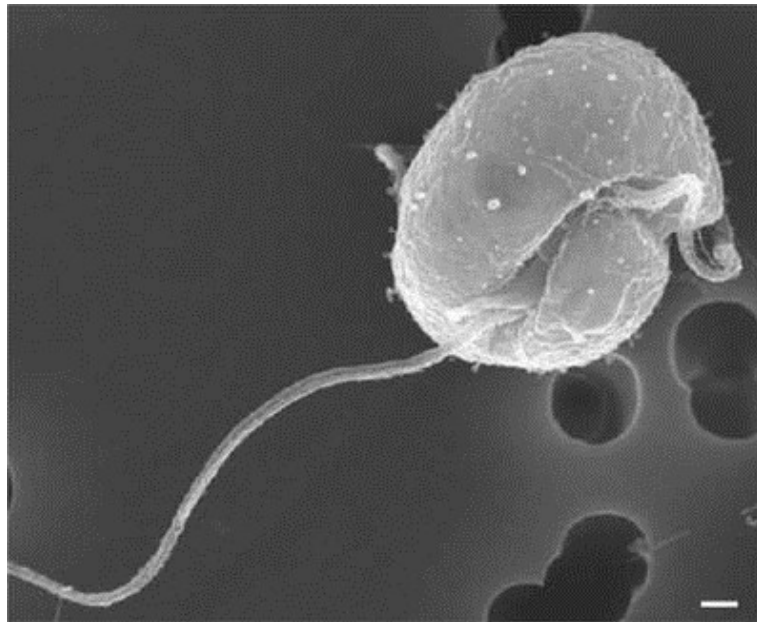
5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

Εικόνα 16: Αλληλουχία υποκινητή AOX1

Crypthecodinium cohnii

Ο μικροοργανισμός *Crypthecodinium cohnii* εντάσσεται στην κατηγορία των ετερότροφων, μη φωτοσυνθετικών μικροφυκών, αλμυρού νερού και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για την παραγωγή του εικοσιδιεξανοϊκού οξέος (DHA). Αναλυτικότερα, το μικροφύκος, γνωστό στο παρελθόν ως *Gyrodinium cohnii*, εντοπίζεται σε όλα τα υδάτινα οικοσυστήματα, από τη Βόρεια θάλασσα μέχρι την Καραϊβική, καθώς και τη Μεσόγειο (Mendes, Reis, Vasconcelos, Guerra, & Lopes da Silva, 2008). Έχουν παρατηρηθεί δύο μορφές του μικροοργανισμού, τα κινητά κύτταρα (swimming cells) και οι κύστες (cysts), οι οποίες εμφανίζουν διαφορές ως προς το μέγεθος και το σχήμα (Heimann & Huerlimann, 2015). Τα πρώτα διαθέτουν ένα μονό ή διπλό μαστίγιο, το οποίο λειτουργεί ως μέσο κίνησης, επιτάχυνσης και προσανατολισμού του κυττάρου. Η αξιοποίηση του *C. cohnii* για την παραγωγή του DHA οφείλεται στο μεγάλο ποσοστό που αποδίδει, καθώς και στον αποκλεισμό σύνθεσης άλλων πολυακόρεστων, λιπαρών οξέων. Κατά συνέπεια, η διαδικασία του καθαρισμού του DHA, καθίσταται εύκολη, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για φαρμακευτικές και διατροφικές εφαρμογές (Ratledge, Streekstra, Cohen, & Fichtali, 2010). Ως κύρια πηγή άνθρακα για το μικροφύκος, χρησιμοποιείται η γλυκόζη. Ωστόσο, το υψηλό κόστος της, καθιστά αναγκαία την εύρεση μίας εναλλακτικής πρότα-

σης. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι ο *C. cohnii* αναπτύσσεται καλά και σε άλλες πηγές άνθρακα, όπως είναι η αιθανόλη, η γλυκερόλη και το οξικό οξύ (Chalima, Hatzidaki, Καρναουγι, & Τορακας, 2019). Στην παρούσα διπλωματική εργασία, σάκχαρα που προέρχονται από την υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, εξετάζονται ως μία οικονομική πηγή άνθρακα για το μικροφύκος και την παραγωγή DHA, σε ευρεία κλίμακα.

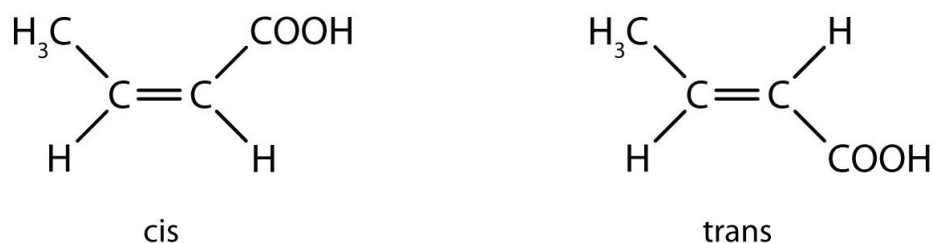


Εικόνα 17: Το μικροφύκος *Cryptothecodinium cohnii* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Λιπαρά οξέα

Ως λιπαρά οξέα χαρακτηρίζονται οι οργανικές ενώσεις, οι οποίες διαθέτουν μία μακριά αλυσίδα, άρτιου αριθμού ατόμων άνθρακα και μία καρβοξυλική ομάδα στην άκρη της. Οι συγκεκριμένες δομικές μονάδες είναι αδιάλυτες στο νερό, σχηματίζοντας ένα επιφανειακό υμένιο (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2018). Ειδικότερα, εντός του υδατικού διαλύματος, οι πολικές καρβοξυλικές ομάδες προσανατολίζονται προς το νερό, ενώ οι υδρόφοβες ουρές προεξέχουν στην αέρια φάση. Αντιθέτως, τα λιπαρά οξέα είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η διαλυτότητα τους αυξάνει με μείωση του αριθμού των ατόμων άνθρακα. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τα κορεσμένα και τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, ανάλογα με το είδος των δεσμών της ανθρακικής αλυσίδας (Τζια, Ταούκης, & Ωραιοπούλου, 2009). Συνιστούν τα κυριότερα συστατικά των φυσικών λιπών και ελαίων. Τα κορεσμένα αποτελούνται από απλούς δεσμούς και χωρίζονται σε υποκατηγορίες με βάση τον αριθμό των ατόμων άνθρακα, καθώς και τη διάταξη τους

(ευθύγραμμη ή διακλαδισμένη). Κορεσμένα λιπαρά οξέα με λιγότερα από δέκα άτομα στην ανθρακική τους αλυσίδα είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ όσα διαθέτουν περισσότερα από δέκα, είναι στερεά. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα διαθέτουν στο μόριο τους διπλούς δεσμούς μεταξύ των ατόμων άνθρακα και διακρίνονται σε υποομάδες ανάλογα με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας και τα χαρακτηριστικά των διπλών δεσμών (Moghadasian & Shahidi, 2017). Ειδικότερα, οι διπλοί δεσμοί μπορούν να διαφέρουν ως προς τον αριθμό, τη θέση τους στο μόριο του λιπαρού οξέος, τη γεωμετρική τους διάταξη και τη συζυγία (Τζια, Ταούκης, & Ωραιοπούλου, 2009). Όσον αφορά τη στερεοϊσομερία των λιπαρών οξέων, διακρίνονται σε cis και trans. Στην πρώτη κατηγορία, εντάσσονται τα λιπαρά οξέα των οποίων όμοιοι υποκαταστάτες, γύρω από ένα διπλό δεσμό, βρίσκονται από την ίδια πλευρά, ενώ trans όταν είναι σε διαφορετικό σημείο (Roos & Roos, 2015). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα cis ισομερή εντοπίζονται σε όλα τα εδώδιμα λίπη και έλαια, ενώ τα trans σε μικρές ποσότητες που προέρχονται από μηρυκαστικά είδη. Παράλληλα, trans λιπαρά οξέα μπορούν να σχηματιστούν κατά τη θέρμανση των ελαίων σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες, γεγονός που τα καθιστά επιβλαβή για την υγεία (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2018).



Εικόνα 18: Cis και trans ισομερή

Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα διαθέτουν στην ανθρακική τους αλυσίδα δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς και χωρίζονται σε τρεις υποκατηγορίες: ω-3, ω-6 και ω-9. Ειδικότερα, χαρακτηρίζονται από το γράμμα ω και έναν αριθμό, ο οποίος υποδηλώνει το πλήθος των ατόμων άνθρακα που μεσολαβούν μεταξύ του διπλού δεσμού και της τελευταίας μεθυλομάδας της ανθρακικής αλυσίδας (Τζια, Ταούκης, & Ωραιοπούλου, 2009). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ, τα οποία αναφέρονται ως ω-6 και ω-3 λιπαρό οξύ, αντίστοιχα. Εστιάζοντας στην ομάδα

των ω-3 λιπαρών οξέων, εκτός του λινολενικού οξέος, ξεχωρίζουν το εικοσιπεντανοϊκό (eicosapentaenoic acid, EPA) και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (docosahexaenoic acid, DHA). Μάλιστα, τα συγκεκριμένα οξέα εντάσσονται στις απαραίτητες ουσίες που χρειάζεται ο ανθρώπινος οργανισμός προκειμένου να διατηρείται υγιής. Τα μόρια αυτά διαθέτουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιβακτηριακές ιδιότητες, καθώς και είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών παθήσεων (Archer, et al., 2019). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα δεν μπορούν να συντεθούν από τον άνθρωπο, ως εκ τούτου χρειάζεται να προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Σημαντική πηγή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων είναι τα ψάρια, των οποίων το λίπος είναι πολυποίκιλο και επηρεάζεται από το είδος των θαλασσινών, την ηλικία, την εποχή και τις διατροφικές τους συνήθειες (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2018). Η εναπόθεση του λίπους πραγματοποιείται στους μυϊκούς ιστούς, στο συκώτι και τα έντερα.

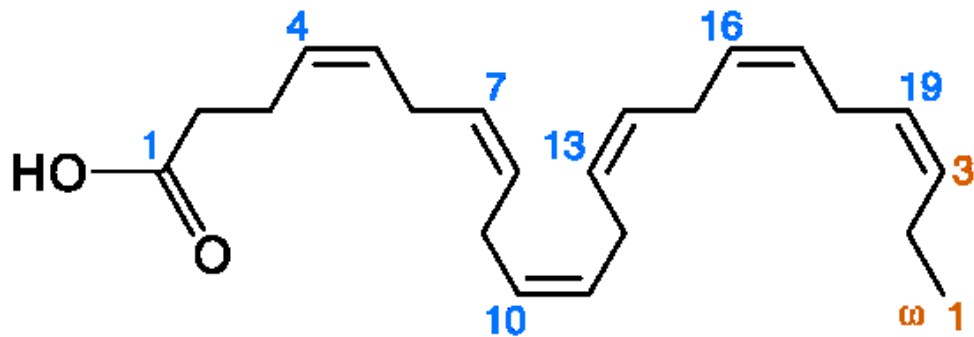
Πίνακας 1: Περιεκτικότητα σε ω-3 λιπαρά οξέα σε ψάρια (g/100 g φιλέτου)

Τύπος ψαριού	EPA (20:5)	DHA (22:6)
Σκουμπρί	0.65	1.10
Σολομός (Ατλαντικού)	0.18	0.61
Σολομός (Ερυθρός)	1.30	1.70
Πέστροφα	0.22	0.62
Τόνος	0.63	1.70
Μουρούνα	0.08	0.15
Πλάτυχθυσ	0.11	0.11
Πέρκα	0.17	0.47
Γάδος	0.05	0.10
Γλώσσα	0.09	0.09

Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (Docosahexaenoic Acid, DHA)

Το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ ανήκει στην οικογένεια των ω-3 λιπαρών οξέων και συνιστά κύριο δομικό συστατικό του ανθρώπινου εγκεφάλου, του δέρματος και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα (Τζια, Ταούκης, & Ωραιοπούλου, 2009). Αναλυτικότερα, πρόκειται για ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, το οποίο αναφέρεται με τον συντομογραφικό προσδιορισμό C22:6, καθώς διαθέτει 22 άτομα άνθρακα κι έξι διπλούς δεσμούς (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2018). Στον ανθρώπινο οργανισμό εμφανίζεται είτε με την σύνθεση του από το α-λινολενικό οξύ, η οποία όμως είναι περιορισμένη, είτε μέσω της πρόσληψης του από το μητρικό γάλα, το ιχθυέλαιο ή το έλαιο μικροφυκών. Το DHA είναι ευεργετικό για τον άνθρωπο, ιδιαίτερα για την αντιμετώπιση καρδιακών παθήσεων και υψηλής χο-

ληστερόλης. Αυτό συμβαίνει καθώς το εικοσιδιεξανοϊκό οξύ ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των καρδιαγγειακών, μυϊκών κυττάρων και μειώνει την πυκνότητα του αίματος, μέσω της πτώσης των επιπέδων των τριγλυκεριδίων. Παράλληλα, χρησιμοποιείται για την ενίσχυση της μνήμης και της ανάπτυξης των παιδιών, ειδικά εκείνων που γεννήθηκαν πρόωρα (Lauterbach & Pawlik, 2014). Συγκεκριμένα, κατά την εγκυμοσύνη, το DHA συσσωρεύεται στους νευρικούς ιστούς, ιδιαίτερα στους μετωπικούς λοβούς του εγκεφάλου, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για διάφορες γνωστικές λειτουργίες (Gould & Smithers, 2019). Τα βρέφη, λοιπόν, που γεννιούνται πρόωρα, έχουν μειωμένη συγκέντρωση του ω-3 λιπαρού οξέος στον οργανισμό τους κι έτσι καθίσταται απαραίτητη η πρόσληψη του, μέσω της διατροφής τους.



Εικόνα 19: Δομή εικοσιδιεξανοϊκού οξέος (DHA)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά

Όργανα-Συσκευές

Κατά την εκτέλεση των πειραματικών δοκιμών, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες συσκευές και όργανα:

- ❖ Αέριος χρωματογράφος GC 17 A Shimadzu apparatus, Kyoto, Japan
- ❖ Αναδευτήρας Vortex Mixer, ISG
- ❖ Αναλυτικός ζυγός Abs 120-4N (KERN & Sohn GmbH)
- ❖ Αποστειρωμένος χώρος εργασίας UNIFLOW UV1200
- ❖ Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- ❖ Ηλεκτρονικοί ζυγοί Mark 2060 και Mark 4065 (BEL Engineering)
- ❖ Θερμαινόμενη πλάκα με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης ARE (VELP Scientifica)
- ❖ Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- ❖ Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο
- ❖ Μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- ❖ Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- ❖ pH-μετρο 537, WTW (Γερμανία)
- ❖ Στήλη βαρύτητας (Biorad, Η.Π.Α.) με ρητίνη Talon® ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου (Clontech, Η.Π.Α)
- ❖ Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- ❖ Συσκευή διήθησης υπό κενό
- ❖ Συσκευή Dionex για High Performance Anion Exchange Chromatography
- ❖ Συσκευή ηλεκτροφόρησης για διαχωρισμό πρωτεϊνών Mini-PROTEAN 3, Biorad (Η.Π.Α.)
- ❖ Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό Christ Alpha 1-4, B. Braun Biotec. International, Melsungen (Γερμανία)

- ❖ Συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.)
- ❖ Συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectramax 250 (Molecular Devices)
- ❖ Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- ❖ Φυγόκεντροι Model J2-21 και TJ-6, Beckman Coulter (Η.Π.Α.)
- ❖ Φωτόμετρο S-22 UV-VIS Spectrophotometer, BOECO (Γερμανία)

Εκτός των παραπάνω οργάνων, γίνεται χρήση και του ακόλουθου, εργαστηριακού εξοπλισμού:

- ❖ Γυάλινα μπουκάλια
- ❖ Δοκιμαστικοί σωλήνες
- ❖ Eppendorf Tubes
- ❖ Falcon Tubes
- ❖ Κυψελίδα
- ❖ Κωνικές φιάλες
- ❖ Μαγνήτης
- ❖ Ογκομετρικοί κύλινδροι
- ❖ Πιπέτες
- ❖ Ποτήρια ζέσεως
- ❖ Ρύγχη πιπετών
- ❖ Σπαθίδες
- ❖ Σταγονόμετρα
- ❖ Σύριγγες
- ❖ Τρυβλία
- ❖ Φιλμ σφράγισης (Parafilm)
- ❖ Φίλτρα διήθησης υπό κενό
- ❖ Φίλτρα Nylon συριγγών 0.45 μm
- ❖ Χωνιά

Ο παραπάνω εργαστηριακός εξοπλισμός είναι των εταιρειών:

SCHOTT AG (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Millipore (Η.Π.Α.), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), ISO LAB (Γερμανία), Greiner-Bio One (Γερμανία), SIMAX (Τσεχία), BOMEX (Κίνα)

Μικροοργανισμοί

Κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι μικροοργανισμοί:

- *Myceliophthora thermophila*
- *Pichia pastoris*
- *Crypthecodinium cohnii* ATCC 30772

Μέθοδοι: LPMO

Δημιουργία καλλιέργειας *Pichia pastoris* σε τρυβλίο

Η προετοιμασία του θρεπτικού υλικού, στο οποίο θα αναπτυχθεί ο ζυμομύκητας *P. pastoris*, είναι απαραίτητη για τη δημιουργία καλλιέργειας μικροοργανισμών σε τρυβλίο και αποτελείται από τα παρακάτω στάδια:

1. Ζύγισμα των ακόλουθων ουσιών στον ηλεκτρονικό ζυγό.

Πίνακας 2: Σύσταση θρεπτικού υλικού, YPD Medium

Συστατικό	Σύσταση % w/v σε απιονισμένο H ₂ O (g/ 100 mL)
Yeast Extract	1
Peptone	2
Dextrose	2
Nutrient Agar	2

2. Μεταφορά των ουσιών Yeast Extract, Peptone και Nutrient Agar σε κωνική φιάλη των 100 mL και προσθήκη 50 mL απιονισμένου νερού.
3. Μεταφορά της δεξτρόζης σε δεύτερη κωνική φιάλη των 100 mL. Σημειώνεται ότι, η δεξτρόζη, που βρίσκεται σε στερεή μορφή, δεν προστίθεται στην πρώτη κωνική φιάλη με τις υπόλοιπες ουσίες. Αυτό γίνεται προκειμένου να μην αλλοιωθεί η σύ-

στασή της, αν βρεθεί υπό μορφή διαλύματος, κατά την αποστείρωση που ακολουθεί στους 121°C για 20 λεπτά. Αν κρίνεται απαραίτητο να βρίσκεται σε υγρή μορφή, τότε η αποστείρωσή της πραγματοποιείται στους 109°C για χρονική περίοδο 40 λεπτών.

4. Ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικής πλάκας του υγρού που περιέχεται στην πρώτη κωνική φιάλη, για λίγα λεπτά έως ότου επέλθει ομογενοποίηση του διαλύματος.
5. Κάλυψη των κωνικών φιαλών με αλουμινόχαρτο.
6. Εισαγωγή των κωνικών φιαλών στο αυτόκαυστο και ρύθμιση του μηχανήματος για χρονικό διάστημα 20 λεπτών και θερμοκρασία 121°C. Σημειώνεται ότι, η διαδικασία της αποστείρωσης στο αυτόκαυστο διαρκεί περισσότερη ώρα, μέχρι να φτάσει το σύστημα στην επιθυμητή θερμοκρασία.
7. Μεταφορά των αποστειρωμένων κωνικών φιαλών σε στείρο πάγκο εργασίας.
8. Μίξη όλων των ουσιών των δύο κωνικών φιαλών και μεταφορά του υγρού σε τρυβλία.
9. Με τη βοήθεια ενός ρύγχους πιπέτας, λαμβάνεται δείγμα από ένα τρυβλίο καλλιέργειας *P. pastoris* και με αυτό εμβολιάζονται οι καινούριες καλλιέργειες που δημιουργήθηκαν.



Εικόνα 20: Κωνικές φιάλες, όγκου 100 mL

Δημιουργία υγρής καλλιέργειας *Pichia pastoris*

Η ανάπτυξη του ζυμομύκητα *P. pastoris* μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τη δημιουργία υγρής καλλιέργειας σε κωνική φιάλη. Η προετοιμασία της παρουσιάζεται παρακάτω:

1. Ζύγισμα όλων των ουσιών στον ηλεκτρονικό ζυγό, εκτός του Nutrient Agar (**Πίνακας 2**). Τονίζεται ότι, δεν προστίθεται το συστατικό αυτό διότι ο ρόλος του είναι να στερεοποιεί την καλλιέργεια, γεγονός μη επιθυμητό για τις υγρές καλλιέργειες.
2. Μεταφορά των ουσιών Yeast Extract και Peptone σε κωνική φιάλη των 250 mL και προσθήκη 100 mL απιονισμένου νερού.
3. Μεταφορά της δεξτρόζης σε δεύτερη κωνική φιάλη των 250 mL.
4. Ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικής πλάκας του υγρού που περιέχεται στην πρώτη κωνική φιάλη, για λίγα λεπτά έως ότου επέλθει ομογενοποίηση του διαλύματος.
5. Κάλυψη των κωνικών φιαλών με αλουμινόχαρτο.
6. Εισαγωγή των κωνικών φιαλών στο αυτόκαυστο και ρύθμιση του μηχανήματος για χρονικό διάστημα 20 λεπτών και θερμοκρασία 121°C.
7. Μεταφορά των αποστειρωμένων κωνικών φιαλών σε στείρο πάγκο εργασίας.
8. Μίξη όλων των ουσιών των δύο κωνικών φιαλών και μεταφορά του υγρού σε νέες, κωνικές φιάλες.
9. Με τη βοήθεια ενός ρύγχους πιπέτας, λαμβάνεται δείγμα από ένα τρυβλίο καλλιέργειας *P. pastoris* και με αυτό εμβολιάζονται οι καινούριες καλλιέργειες που δημιουργήθηκαν.
10. Τέλος, το στόμιο της φιάλης καίγεται στον λύχνο και πωματίζεται με αποστειρωμένο βαμβάκι. Οι υγρές καλλιέργειες τοποθετούνται στον επωαστήρα σε θερμοκρασία 30°C και υπό ανάδευση 180 rpm, για 6 ημέρες.



Εικόνα 21: Ηλεκτρονικός ζυγός

Παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, LPMO, σε καλλιέργειες κυτάρων *P. pastoris*, εργαστηριακής κλίμακας

Η επαγωγή της έκφρασης της LPMO στο ζυμομύκητα *P. pastoris* πραγματοποιείται με την προσθήκη μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Ειδικότερα, η μεθανόλη ενεργοποιεί τον υποκινητή 5'AOX1, με αποτέλεσμα να εκφράζεται το γονίδιο της LPMO. Η πρωτεΐνη απελευθερώνεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, από το οποίο συλλέγεται για περαιτέρω χρήση.

Αρχικά, παραλαμβάνονται οι καλλιέργειες του ζυμομύκητα *P. pastoris*, που είχαν αναπτυχθεί σε τρυβλία. Στην συνέχεια, επιλέγονται ορισμένες από αυτές και ανακαλλιεργούνται σε τρυβλία YPD-Zeocin. Έπειτα, επιλέγονται 6 στελέχη, τα οποία χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό των υγρών καλλιεργειών.

Σε πρώτη φάση, δημιουργούνται προκαλλιέργειες του ζυμομύκητα. Αναλυτικότερα, 50 mL θρεπτικού μέσου BMGY μεταφέρονται εντός δύο κωνικών φιαλών των 250 mL και πραγματοποιείται εμβολιασμός από τα στελέχη που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου BMGY παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 3: Σύσταση θρεπτικού μέσου BMGY

Συστατικό	Σύσταση % w/v σε απιονισμένο H₂O (g/L)
Peptone	2
Yeast Extract	1
	Σύσταση % v/v στον τελικό όγκο του θρεπτικού υλικού
Potassium Phosphate Buffer	10
YNB	10
Glycerol	1

Σημειώνεται ότι, το Potassium Phosphate Buffer συντίθεται ως εξής:

1. Δημιουργία διαλύματος KH_2PO_4 , συγκέντρωσης 1M και όγκου 400 mL. Αυτό πραγματοποιείται με τη διάλυση 54.44 g σε 400 mL απιονισμένο νερό.
2. Δημιουργία διαλύματος K_2HPO_4 , συγκέντρωσης 1M και όγκου 200 mL. Αυτό πραγματοποιείται με τη διάλυση 34.84 g σε 200 mL απιονισμένο νερό.
3. Μεταφορά του διαλύματος K_2HPO_4 στο KH_2PO_4 και σταδιακή προσθήκη απιονισμένου νερού έως ότου το pH να λάβει την τιμή 6.

Παράλληλα, για τη σύνθεση του διαλύματος YNB (Yeast Nitrogen Base), ακολουθείται η σύσταση που εμφανίζεται παρακάτω:

Πίνακας 4: Σύσταση διαλύματος YNB

Συστατικό	Σύσταση % w/v σε απιονισμένο H₂O (g/L)
Ammonium Sulfate	10
Yeast Nitrogen Base	3.4

Οι προκαλλιέργειες τοποθετούνται στον επωαστήρα, για μια ολόκληρη νύχτα, σε θερμοκρασία 30°C και υπό ανάδευση 180 rpm. Αξίζει να αναφερθεί ότι, η γλυκερόλη,

στο δεδομένο τύπο καλλιέργειας, αποτελεί την πηγή άνθρακα για τον ζυμομύκητα, *P. pastoris*. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται φωτομέτρηση δείγματος, που έχει ληφθεί από τις καλλιέργειες, στα 600 nm, αφού έχει προηγηθεί αραίωση 20 φορές. Ακολουθεί φυγοκέντρηση συγκεκριμένου όγκου της προκαλλιέργειας, έτσι ώστε η επαναιώρηση των κυττάρων σε 500 mL θρεπτικού μέσου BMMY, να δίνει οπτική πυκνότητα $OD_{600nm}=1$. Τέλος, πραγματοποιείται εμβολιασμός, όγκου 50 mL, σε καλλιέργεια BMMY, συνολικού όγκου 500 mL. Οι καλλιέργειες αυτές τοποθετούνται εντός κωνικών φιαλών, όγκου 2 L. Σημειώνεται ότι, η καλλιέργεια BMMY, έχει την ίδια σύσταση με την BMGY, με τη διαφορά ότι η γλυκερόλη, αντικαθίσταται από μεθανόλη περιεκτικότητας 0.5 % v/v. Οι καλλιέργειες τοποθετούνται στον επωαστήρα, σε θερμοκρασία 30°C, υπό ανάδευση 180 rpm και για χρονικό διάστημα 5 ημερών. Καθημερινά, προστίθενται 5 mL/L μεθανόλης σε κάθε κωνική φιάλη, καθώς η συγκεκριμένη οργανική ένωση αποτελεί την πηγή άνθρακα των καλλιεργειών. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται κατά την προσθήκη της μεθανόλης. Δεν πρέπει να έρθει απευθείας σε επαφή με την καλλιέργεια, αλλά ούτε και να παραμείνει στο στόμιο της φιάλης, καθώς αυτό θα προκαλούσε ανάφλεξη, κατά την αποστείρωση της με φλόγα. Το γεγονός αυτό θα κατέστρεφε την καλλιέργεια του ζυμομύκητα.

Παραλαβή του εξωκυτταρικού υγρού της καλλιέργειας

Μετά το πέρας των 5 ημερών, η υγρή καλλιέργεια *P. pastoris* αφαιρείται από τον επωαστήρα και εκτελούνται τα παρακάτω βήματα προκειμένου να παραληφθεί το εξωκυτταρικό υγρό, το οποίο περιέχει την πρωτεΐνη LPMO.

1. Μετάγγιση του δείγματος σε δύο πλαστικά δοχεία και μεταφορά αυτών εντός της μεγάλης φυγοκέντρου. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιείται στα 10^4 rpm και διαρκεί 7 min. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται ώστε οι δύο περιέκτες να έχουν το ίδιο βάρος. Για αυτόν το λόγο, ζυγίζονται κι αν υπάρχει κάποια απόκλιση, μεταφέρεται υγρό από τον έναν στον άλλο με τη βοήθεια σταγονόμετρου.
2. Παραλαβή του υπερκείμενου υγρού, το οποίο περιέχει το ένζυμο LPMO.
3. Συναρμολόγηση της συσκευής της διήθησης υπό κενό. Τονίζεται ότι, η διήθηση πραγματοποιείται σταδιακά. Αυτό σημαίνει ότι αρχικά τοποθετείται διηθητικό χαρτί, στην συνέχεια τοποθετείται φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.8 μm και τέλος 0.22

μm. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί κατά την εκτέλεση της διήθησης υπό κενό, ώστε στην περίπτωση που παρατηρηθεί η δημιουργία αφρού εντός της κωνικής φιάλης, να διακοπεί η διεργασία.

Συμπύκνωση του εξωκυτταρικού υγρού της καλλιέργειας

Μετά την ολοκλήρωση της διήθησης υπό κενό, ακολουθεί η διαδικασία της υπερδιήθησης, η οποία στοχεύει στη συμπύκνωση του διαλύματος που περιέχει την πρωτεΐνη, σε τελικό όγκο 50 mL. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται η συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10. Ειδικότερα:

1. Τοποθέτηση της συσκευής υπερδιήθησης Amicon εντός πλαστικού περιέκτη με πάγο. Σύνδεση της συσκευής με παροχή αέρα και μεταφορά της διάταξης πάνω σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης.
2. Σταδιακή προσθήκη του υγρού, που παραλήφθηκε από τη διήθηση υπό κενό, εντός της συσκευής Amicon. Σημειώνεται ότι, κατά τη διάρκεια της συμπύκνωσης, μόρια μεγαλύτερα από τη διάμετρο των πόρων της μεμβράνης συγκρατούνται, ενώ μικρότερα μόρια διαφεύγουν μαζί με το διάλυμα. Στο εσωτερικό της συσκευής παραμένει τελικά το συμπυκνωμένο διάλυμα των πρωτεϊνών, μοριακού βάρους πάνω από 10 kDa, όγκου περίπου 64 mL.

Όταν ολοκληρωθεί και η διαδικασία της υπερδιήθησης, χρειάζεται η εξισορρόπηση του ακάθαρτου υγρού της καλλιέργειας σε ρυθμιστικό διάλυμα. Αυτό πραγματοποιείται με δύο τεχνικές: α) αραίωση του υγρού με ρυθμιστικό διάλυμα Talon κι έπειτα συμπύκνωση αυτού με υπερδιήθηση, β) διαπίδυση (dialysis).



Εικόνα 22: Θερμαινόμενη πλάκα με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης ARE (VELP Scientifica)
Εξισορρόπηση της ακατέργαστης μορφής καλλιέργειας με διαπίδυση (dialysis)

Η τεχνική της διαπίδυσης αποτελεί μία μέθοδο διάχυσης διαλυτών ουσιών, διαμέσου μιας εκλεκτικά διαπερατής μεμβράνης, η οποία είναι τεχνητή και χωρίζει το διάλυμα από το διαλύτη του. Τα ογκώδη συστατικά του μίγματος, αδυνατούν να περάσουν από τους πόρους της μεμβράνης και ως εκ τούτου, συγκρατούνται από τη μία πλευρά της. Αντιθέτως, τα μικρότερα συστατικά του διαλύματος διαπερνούν τη μεμβράνη και κατευθύνονται από την περιοχή υψηλής συγκέντρωσης προς την χαμηλή.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την εξισορρόπηση του υγρού με τη μέθοδο της διαπίδυσης, παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Βρασμός μεμβράνης κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Da, Sigma-Aldrich) σε απιονισμένο νερό, για χρονικό διάστημα 30 min.
2. Προετοιμασία 5L ρυθμιστικού διαλύματος Talon, εντός του οποίου θα βυθιστεί η μεμβράνη. Το συγκεκριμένο buffer αποτελείται από 4.5 L απιονισμένο νερό και 500 mL 10x Talon. Το τελευταίο έχει σύσταση 3M NaCl και 500mM Tris. Το pH του Talon έχει ρυθμιστεί σε pH=8, με την προσθήκη HCl.
3. Μεταφορά του διαλύματος σε μεγάλο, πλαστικό περιέκτη.

4. Βύθιση της μεμβράνης εντός του περιέκτη, σφράγιση του κάτω άκρου της με πλαστικό μανταλάκι και μετάγγιση της πρωτεΐνης στο εσωτερικό της.
5. Σφράγιση του επάνω μέρους της μεμβράνης και μεταφορά του δοχείου στο cold room για μια ολόκληρη νύχτα. Τονίζεται ότι, είναι σημαντική η ελαφριά ανάδευση του υγρού που περιέχει τη μεμβράνη. Για το λόγο αυτό, ο πλαστικός περιέκτης τοποθετείται πάνω σε μαγνητική πλάκα.

Απομόνωση της πρωτεΐνης

Η απομόνωση της πρωτεΐνης στηρίζεται στη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Αναλυτικότερα, η κινητή φάση, δηλαδή το υγρό που περιέχει την πρωτεΐνη, διέρχεται από στήλη βαρύτητας με ρητίνη, η οποία φέρει ακινητοποιημένα ιόντα κοβαλτίου Co^{2+} . Ο φορέας κλωνοποίησης pPICZaA, έχει την ιδιότητα να εισάγει στο C-άκρο της πρωτεΐνης, 6 συνεχόμενα κατάλοιπα His, τα οποία περιέχουν έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο. Χάρη σε αυτόν, οι πρωτεΐνες είναι φορτισμένες αρνητικά κι έτσι προσδένονται σε κατιόντα μετάλλου, όπως είναι το κοβάλτιο. Η αποδέσμευση της πρωτεΐνης από τη ρητίνη πραγματοποιείται με έκπλυση αυτής με υδατικό διάλυμα ιμιδαζολίου, το οποίο ανταγωνίζεται τα μόρια του ενζύμου και τελικώς τα αντικαθιστά. Ως εκ τούτου, η LPMO συλλέγεται ως κλάσμα που απορρέει από την στήλη.

Κατά τη διαδικασία καθαρισμού, χρησιμοποιήθηκε η στήλη βαρύτητας (Biorad, Η.Π.Α) με 3 mL ρητίνη ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου Talon® Metal Affinity Resin (Clontech, Η.Π.Α.), η οποία διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C και υδατικό διάλυμα 20% v/v αιθανόλης.

Τα στάδια του καθαρισμού είναι τα εξής:

1. Απομάκρυνση του διαλύματος της αιθανόλης από την στήλη.
2. Έκπλυση της στήλης με 20 mL απιονισμένο νερό.
3. Εξισορρόπηση της ρητίνης με έκπλυση αυτής με 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος Talon επί τρεις φορές.
4. Διαπέραση του ακατέργαστου διαλύματος της πρωτεΐνης προκειμένου το ένζυμο να δεσμευτεί από τα ιόντα κοβαλτίου. Συλλογή του διαλύματος που απορρέει σε falcon.

5. Έκπλυση της στήλης με 10 mL ρυθμιστικό διάλυμα Talon και συλλογή του διαλύματος σε falcon.
6. Έκπλυση της στήλης με 5 mL υδατικού διαλύματος ιμιδαζολίου 5 mM και συλλογή του διαλύματος σε falcon. Σημειώνεται ότι, το διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 5 mM συντίθεται σταδιακά, καθώς η μέγιστη αραιώση που μπορεί να πραγματοποιηθεί κάθε φορά είναι της τάξης του 10. Συνεπώς, πρώτα δημιουργείται διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 100 mM, που προκύπτει από τη διάλυση 0.1362 g ιμιδαζολίου σε 20 mL Talon. Έπειτα, παραλαμβάνονται 600 μ L από το παραπάνω διάλυμα και προστίθενται 5.4 mL Talon. Τέλος, 5 mL από αυτό το διάλυμα αραιώνονται με 5 mL Talon.
7. Έκπλυση της στήλης με 7 mL υδατικού διαλύματος ιμιδαζολίου 100 mM για αποδέσμευση της πρωτεΐνης και συλλογή του διαλύματος σε falcon. Σημειώνεται ότι, το διάλυμα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 100 mM προκύπτει από τη διάλυση 0.1362 g ιμιδαζολίου σε 20 mL Talon.
8. Έκπλυση της στήλης με 20 mL απιονισμένο H₂O επί τέσσερις φορές, για απομάκρυνση των αλάτων
9. Αποθήκευση της στήλης σε θερμοκρασία 4°C, ύστερα από την προσθήκη 4 mL υδατικού διαλύματος 20% v/v αιθανόλης εντός αυτής.

Τα κλάσματα που συλλέγονται από την παραπάνω πειραματική διαδικασία, αποθηκεύονται καθ' όλη τη διάρκεια της σε παγόλουτρο T=4°C. Το επόμενο βήμα είναι η μέτρηση της ενεργότητας κάθε κλάσματος, με σκοπό να προσδιοριστεί εκείνο που φέρει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Αυτό πραγματοποιείται με τη φωτομέτρηση των δειγμάτων, μετά από κατάλληλη αραιώση, στα 280 nm. Η φασματομετρική αυτή τεχνική βασίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή, με μέγιστο μήκος κύματος 280 nm, λόγω της παρουσίας των αρωματικών αμινοξέων τυροσίνης και τρυπτοφάνης. Το κλάσμα με το ένζυμο LPMO, θα είναι εκείνο που θα εμφανίσει τη μέγιστη ενεργότητα.

Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής μεθόδου, πραγματοποιείται διαπίδυση του δείγματος που περιέχει την πρωτεΐνη με υδατικό διάλυμα Tris, συγκέντρωσης 20mM. Το

διάλυμα αποτελείται από 4.856 g Trizma, διαλυμένα σε 2 L απιονισμένο νερό. Το pH έχει ρυθμιστεί στην τιμή 8 με την προσθήκη HCl.

Υδρόλυση γλυκοζυλιώσεων

1^η μέθοδος-Υδρόλυση των Ο-γλυκοζυλιώσεων

Η απόσπαση των γλυκοζυλιώσεων που φέρει η LPMO είναι απαραίτητη για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους του ενζύμου. Ειδικότερα, διαπιστώθηκε ότι η LPMO διαθέτει Ο-γλυκοζυλιώσεις, δηλαδή εξωτερικούς σακχαρίτες συνδεδεμένους σε άτομα οξυγόνου της πρωτεΐνης (Meier, et al., 2017). Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε με την χρήση ειδικών, πληροφορικών εργαλείων, του NetNGlyc (NetNGlyc 1.0 Server) και NetOGlyc (NetOGlyc 4.0 Server), στα οποία καταχωρείται η αλληλουχία της πρωτεΐνης και γίνεται μία εκτίμηση για τον τύπο των γλυκοζυλιώσεων που διαθέτει. Ο καθορισμός, λοιπόν, του βάρους της πρωτεΐνης είναι εφικτός μετά από την αποδιάταξη του ενζύμου και την μετέπειτα διάσπαση των γλυκοζυλιώσεων. Αυτό πραγματοποιείται με την ακόλουθη μέθοδο:

1. Χρήση δύο eppendorf tubes μεγέθους 1.5 mL.
2. Προετοιμασία του πρώτου δείγματος, το οποίο περιέχει το ένζυμο LPMO και Denaturing Buffer και μεταφορά αυτού στο πρώτο eppendorf. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα δείγματα χρειάζεται να έχουν ξεπαγώσει πλήρως, ειδάλλως δεν θα είναι αντιπροσωπευτική η σύσταση του δείγματος που θα παραληφθεί.

Πίνακας 5: Σύσταση πρώτου δείγματος για την υδρόλυση των Ο-γλυκοζυλιώσεων

Συστατικό	Σύσταση v/v για 10 µL διαλύματος
LPMO	9 µL
Denaturing Buffer	1 µL

3. Προετοιμασία του δεύτερου δείγματος, το οποίο περιέχει το ένζυμο LPMO, Denaturing Buffer και αποστειρωμένο, υπερκάρθαρο νερό, και μεταφορά αυτού στο δεύτερο eppendorf.

Πίνακας 6: Σύσταση δεύτερου δείγματος για την υδρόλυση των O-γλυκοζυλιώσεων

Συστατικό	Σύσταση v/v για 10 µL διαλύματος
LPMO	5 µL
Denaturing Buffer	1 µL
Αποστειρωμένο νερό	4 µL

4. Τοποθέτηση των erpendorf για 10 min στο Thermomixer, σε θερμοκρασία 99°C.
5. Απομάκρυνση των erpendorf από το Thermomixer μετά το πέρας των 10 min.
6. Προσθήκη σε κάθε erpendorf των συστατικών του εμπορικού σκευάσματος διάσπασης των δεσμών O-γλυκοζυλίωσης σε ποσότητες όπως παρουσιάζονται παρακάτω. Η σειρά που πρέπει να ακολουθηθεί είναι πρώτα το απιονισμένο H₂O, έπειτα το NP-40, το Glucobuffer 2, το οποίο διασπά τους δεσμούς γλυκοζυλίωσης και τέλος το ένζυμο O-Glycosidase. Τονίζεται ότι, η O-Glycosidase χρειάζεται να προστεθεί τελευταία προκειμένου να ξεκινήσει η αντίδραση της διάσπασης των O-γλυκοζυλιώσεων και πρέπει να διατηρείται σε πάγο.

Πίνακας 7: Σύσταση εμπορικού σκευάσματος διάσπασης των δεσμών O-γλυκοζυλίωσης

Συστατικό	Σύσταση v/v για 20 µL διαλύματος
Απιονισμένο H ₂ O	3 µL
NP-40	2 µL
Glucobuffer 2	2 µL
O-Glycosidase	3 µL

7. Παραμονή των erpendorf tubes στο Thermomixer, για 4 h σε θερμοκρασία 38°C.

2^η μέθοδος-Υδρόλυση των N-γλυκοζυλιώσεων

Στο πλαίσιο μελέτης των γλυκοζυλιώσεων που φέρει η πρωτεΐνη, έλαβε χώρα η ακόλουθη δοκιμή προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο παρουσίας N-γλυκοζυλιώσεων, δηλαδή ολιγοσακχαριτών συνδεδεμένων σε άτομα αζώτου του ενζύμου. Η υδρόλυση των N-γλυκοζυλιώσεων παρουσιάζεται στα βήματα που ακολουθούν:

1. Ανάμιξη 9 µL ενζύμου LPMO με 1 µL Denaturation Buffer, εντός erpendorf.

2. Βρασμός του διαλύματος για 5 min.
3. Προσθήκη 6 μL υπερκάθαρου νερού.
4. Προσθήκη 2 μL Reaction Buffer.
5. Προσθήκη 2 μL EndoH. Σημειώνεται ότι το ένζυμο EndoH έχει την ικανότητα να τεμαχίζει τις αλυσίδες σακχαριτών που έχουν προστεθεί στην πρωτεΐνη, μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις θέσεις N-γλυκοζυλίωσης.
6. Παραμονή του διαλύματος στο Thermomixer για 1 h στους 37°C .

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση συνιστά μία τεχνική διαχωρισμού μίγματος ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους (Καρκαλούσος, και συν., 2015). Αναλυτικότερα, περιγράφεται ως το φαινόμενο της κίνησης χημικών ενώσεων, μέσα σε ένα πήκτωμα (gel), με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η κίνηση των ουσιών εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό τους βάρος (Blaber, 2019). Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια μετακινούνται προς την άνοδο, ενώ τα θετικά προς την κάθοδο. Μάλιστα, όσο αυξάνεται η τάση του πεδίου, τόσο αυξάνεται και η κινητικότητα των φορτισμένων μορίων. Παράλληλα, όσο πιο μικρό είναι το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης, τόσο χαμηλότερα θα έχει μετακινηθεί. Το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών προσδιορίζεται συγκρίνοντας με κάποιο πρότυπο δείγμα.

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται κατά την ηλεκτροφόρηση είναι αδρανή υλικά, τα οποία μπορεί να βρίσκονται σε επίπεδη ή κυλινδρική μορφή ή να διαθέτουν πόρους. Ως μέσο ηλεκτροφόρησης, μπορούν να λειτουργήσουν η πηκτή αγαρόζης, αμύλου, πολυακρυλαμιδίου, η οξική κυτταρίνη και το διηθητικό χαρτί (Καρκαλούσος, και συν., 2015). Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκε η πηκτή πολυακρυλαμιδίου, η οποία λειτουργεί ως μοριακός ηθμός και επιβραδύνει τη μετανάστευση των πρωτεϊνών, ανάλογα με το λόγο φορτίου προς μάζα. Αξιοποιείται σε κατακόρυφες ηλεκτροφορήσεις, εξασφαλίζοντας μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα σε σχέση με την πηκτή αγαρόζης.

Η διαδικασία πραγματοποίησης της ηλεκτροφόρησης είναι η ακόλουθη:

1. Προετοιμασία της διάταξης που θα υποδεχτεί το πήκτωμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.

2. Διάλυση της ουσίας APS (Ammonium Persulfate) σε απιονισμένο νερό, σε σύσταση 10% w/v, εντός ενός eppendorf tube.
3. Σύνθεση του Resolving gel εντός ενός falcon, σύμφωνα με την σύσταση που δίνεται παρακάτω. Σημειώνεται ότι, το 0.75 M Tris / SDS 0.2% έχει δημιουργηθεί με τη διάλυση 18.17 g Tris και 0.4 g SDS, σε 200 mL απιονισμένου H₂O και έχει ρυθμιστεί το pH του κατάλληλα ώστε να έχει τιμή pH=8.8.

Πίνακας 8: Σύσταση Resolving gel

Συστατικό	Όγκος
dH ₂ O	1.75 mL
0.75 M Tris/SDS 0.2%	4.7 mL
Bis-acrylamide 40%	2.9 mL
TEMED	15 μL
APS 10%	90 μL

4. Προσθήκη του Resolving gel σε διάταξη που αποτελείται από δύο μικρές και δύο μεγάλες γυάλινες επιφάνειες, μέχρι να συμπληρώσει τα 2/3 του διαθέσιμου χώρου και αναμονή έως ότου στερεοποιηθεί. Τονίζεται ότι, το Resolving gel αποτελεί το μέσο στο οποίο θα μετακινηθούν τα μόρια της πρωτεΐνης.
5. Παρασκευή του Stacking gel εντός ενός falcon, σύμφωνα με την σύσταση που παρουσιάζεται παρακάτω. Σημειώνεται ότι, το 0.25 M Tris / SDS 0.2% έχει δημιουργηθεί με τη διάλυση 6.057 g Tris και 0.4 g SDS, σε 200 mL απιονισμένου H₂O και έχει ρυθμιστεί το pH του κατάλληλα ώστε να έχει τιμή pH=6.8.

Πίνακας 9: Σύσταση Stacking gel

Συστατικό	Όγκος
dH ₂ O	1.5 mL
0.25 M Tris/SDS 0.2%	1.9 mL
Bis-acrylamide 40%	0.38 mL
TEMED	10 μL
APS 10%	30 μL

6. Προσθήκη του Stacking gel στη διάταξη των γυάλινων επιφανειών, πάνω από το υπάρχον Resolving gel. Σημειώνεται ότι, το Stacking gel είναι το μέσο στο οποίο πραγματοποιείται αρχικά η εισαγωγή των πρωτεϊνών.
7. Διαμόρφωση θέσεων υποδοχής των δειγμάτων στο πήκτωμα με την χρήση ειδικής, πλαστικής «χτένας».
8. Μεταφορά της διάταξης που περιέχει τα δύο gel, εντός περιέκτη. Προσθήκη άλλης μίας διάταξης, πλαστικών επιφανειών, η οποία είναι κενή.
9. Υπερχείλιση του περιέκτη με διάλυμα SDS Running Buffer, του οποίου η σύσταση παρουσιάζεται παρακάτω. Σημειώνεται ότι, κατά τη σύνθεση του SDS Running Buffer, μετά τη διάλυση των ουσιών σε 300 mL απιονισμένου νερού, απαιτείται η ρύθμιση του pH με την προσθήκη HCl στην τιμή 8.3. Το διάλυμα SDS Running Buffer αποτελεί ένα ανιοντικό απορρυπαντικό, που προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες.

Πίνακας 10: Σύσταση SDS Running Buffer

Συστατικό	Σύσταση w/v σε απιονισμένο H₂O (g/L)
Tris	30.3
Glycine	144
SDS	10

10. Προετοιμασία των δειγμάτων που θα συμμετάσχουν στην ηλεκτροφόρηση. Ειδικότερα, 20 μL από τα πρωτεϊνικά δείγματα μεταφέρονται σε eppendorf tubes, στα οποία προστίθενται 5 μL από το Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue (Bioline).
11. Βρασμός των δειγμάτων για χρονικό διάστημα 5 min.
12. Τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα με τη βοήθεια πιπέτας. Επιπλέον, προσθήκη 7 μL Marker (Pink Prestained Protein Marker Nippon Genetics Europe GmbH), δηλαδή πρότυπου δείγματος πρωτεΐνης, γνωστού μεγέθους. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ο Marker προστίθεται σε τόσο μικρή ποσότητα διότι βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση.

13. Σύνδεση των ηλεκτροδίων της διάταξης ηλεκτροφόρησης με συσκευή παροχής ρεύματος. Η ένταση του ρεύματος ανέρχεται στα 35 mA. Η επίδραση του ηλεκτρικού ρεύματος έχει ως αποτέλεσμα την κάθοδο των πρωτεϊνών στο πήκτωμα.
14. Μετά το πέρας μιας δεδομένης χρονικής διάρκειας, κατά την οποία οι πρωτεΐνες έχουν μετακινηθεί προς τον θετικό πόλο λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρουν, αποσυνδέεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το πήκτωμα που φέρει τις πρωτεΐνες τοποθετείται εντός πλαστικού περιέκτη και προστίθεται μικρή ποσότητα υδατικού διαλύματος χρώσης, Staining Solution. Το διάλυμα αυτό, παραμένει για χρονικό διάστημα 20 min και στην συνέχεια αποχύνεται. Η σύστασή του παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 11: Σύσταση Staining Solution

Συστατικό	Σύσταση
Brilliant Blue R	0.1%
Acetic Acid Glacial	10%
MeOH	40%
dd H ₂ O	50%

15. Προστίθεται μικρή ποσότητα Destaining Solution προκειμένου να αποχρωματιστεί η πηκτή. Σημειώνεται ότι, μόνο τα πρωτεϊνικά μόρια διατηρούν το μπλε χρώμα. Μετά το πέρας 10 min, απορρίπτεται και προστίθεται καινούρια ποσότητα του διαλύματος. Το πήκτωμα παραμένει για μία ολόκληρη νύχτα στο Destaining Solution υπό ήπια ανάδευση. Η σύσταση του συγκεκριμένου διαλύματος παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 12: Σύσταση Destaining Solution

Συστατικό	Όγκος σε διάλυμα 1 L
H ₂ O	70%
Methanol	20%
Acetic Acid	10%

16. Τέλος, παρατηρείται το πήκτωμα και η θέση των πρωτεϊνών συγκρίνεται με εκείνη του Marker, ώστε να προσδιοριστεί το μέγεθος των δειγμάτων.

Εξέταση της δράσης του ενζύμου LPMO σε υποστρώματα

Στο πλαίσιο μελέτης της δράσης της LPMO, πραγματοποιείται μία σειρά πειραματικών δοκιμών ώστε να προσδιοριστούν τα υποστρώματα στα οποία δρα το ένζυμο.

1^η δοκιμή

Τα υποστρώματα που επιλέχθηκαν, είναι τα ακόλουθα:

- Χιτίνη (chitin) σε συγκέντρωση 1% w/v
- Άμυλο (starch) σε συγκέντρωση 1% w/v
- Επεξεργασμένη κυτταρίνη με φωσφορικό οξύ (Pasc) σε συγκέντρωση 5% w/v
- Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel) 1% w/v

Παράλληλα, χρειάζεται να δημιουργηθεί διάλυμα ασκορβικού οξέος, συγκέντρωσης 200 mM σε όγκο 15 mL. Υπενθυμίζεται ότι το ασκορβικό οξύ λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων ώστε το ένζυμο να πραγματοποιήσει την οξειδωση του υποστρώματος.

Τα βήματα που χρειάζεται να ακολουθηθούν για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, παρουσιάζονται στην συνέχεια:

1. Ζύγισμα στον ηλεκτρονικό ζυγό, εντός falcon, 0.5284 g ασκορβικού οξέος και προσθήκη 15 mL απιονισμένου νερού. Ανάδευση του περιεχομένου στην συσκευή Vortex έως ότου διαλυθεί.
2. Μεταφορά 0.5 mL χιτίνης σε erpendorf tube. Προσθήκη 0.01 mL ασκορβικού οξέος, 0.44 mL διαλύματος Buffer Citrate – Phosphate 50 mM και 0.05 mL LPMO. Ανάδευση του διαλύματος στην συσκευή Vortex. Σημειώνεται ότι, το Buffer Citrate – Phosphate παρασκευάζεται από διαλύματα citric acid 50 mM και sodium phosphate dibasic 100 mM.

3. Μεταφορά 0.5 mL αμύλου σε erpendorf tube. Προσθήκη 0.01 mL ασκορβικού οξέος, 0.44 mL διαλύματος Buffer και 0.05 mL LPMO. Ανάδευση του διαλύματος στην συσκευή Vortex.
4. Μεταφορά 0.1 mL επεξεργασμένης κυτταρίνης (Pasc) σε erpendorf tube. Προσθήκη 0.01 mL ασκορβικού οξέος, 0.84 mL διαλύματος Buffer και 0.05 mL LPMO. Ανάδευση του διαλύματος στην συσκευή Vortex.
5. Μεταφορά 0.5 mL Avicel σε erpendorf tube. Προσθήκη 0.01 mL ασκορβικού οξέος, 0.44 mL διαλύματος Buffer και 0.05 mL LPMO. Ανάδευση του διαλύματος στην συσκευή Vortex.
6. Προετοιμασία 4 τυφλών δειγμάτων. Το τυφλό διάλυμα περιέχει όλες τις ουσίες του υπό μελέτη διαλύματος, εκτός από την μετρούμενη ουσία. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, δεν προστίθεται ποσότητα του ενζύμου LPMO, αλλά μεταφέρονται σε κάθε erpendorf tube, 0.05 mL απιονισμένου νερού.
7. Τοποθέτηση των erpendorf tubes στον θερμαινόμενο, ανακινούμενο επωαστήρα (Eppendorf Thermomixer Comfort) σε θερμοκρασία 50°C και για μία ολόκληρη νύχτα.



Εικόνα 23: Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)

2^η δοκιμή

Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, μελετάται η δράση του ενζύμου LPMO στα ακόλουθα υποστρώματα: β-D-κελλοτετραόζη (C₄), κελλοπενταόζη (C₅) και κελλοεξαόζη (C₆).

Τα βήματα που ακολουθούνται για την προετοιμασία των διαλυμάτων, παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Προετοιμασία 7.5 mL διαλύματος ασκορβικού οξέος, συγκέντρωσης 0.2 M. Αυτό γίνεται με την διάλυση 0.2665 g ασκορβικού οξέος σε 7.5 mL απιονισμένο νερό.
2. Δημιουργία έξι διαλυμάτων, εντός erpendorf tubes, με σύσταση που παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 13: Σύσταση διαλυμάτων, διαφορετικών υποστρωμάτων

1 ^ο διάλυμα	2 ^ο διάλυμα	3 ^ο διάλυμα
10 μL Ασκορβικού οξέος, 500 μL C ₄ , 440 μL Buffer, 50 μL LPMO	10 μL Ασκορβικού οξέος, 500 μL C ₅ , 440 μL Buffer, 50 μL LPMO	10 μL Ασκορβικού οξέος, 500 μL C ₆ , 440 μL Buffer, 50 μL LPMO

Πίνακας 14: Σύσταση τυφλών διαλυμάτων, διαφορετικών υποστρωμάτων

1 ^ο διάλυμα	2 ^ο διάλυμα	3 ^ο διάλυμα
10 μL Ασκορβικού οξέος, 500 μL C ₄ , 440 μL Buffer, 50 μL Απιονισμένου νερού	10 μL Ασκορβικού οξέος, 500 μL C ₅ , 440 μL Buffer, 50 μL Απιονισμένου νερού	10 μL Ασκορβικού οξέος, 500 μL C ₆ , 440 μL Buffer, 50 μL Απιονισμένου νερού

3. Παραμονή των erpendorf στο Thermomixer, σε θερμοκρασία 50°C για λίγες ώρες.

3^η δοκιμή

Εκτός των παραπάνω, μελετήθηκαν άλλα τρία υποστρώματα προκειμένου να παρατηρηθεί η δράση του ενζύμου. Ειδικότερα, εξετάστηκαν η γλυκομαννάνη, η ξυλάνη και η αραβινοξυλάνη.

Η προετοιμασία της γλυκομαννάνης (1% w/v) έχει τα ακόλουθα βήματα:

1. Μεταφορά 1 g γλυκομαννάνης σε ποτήρι ζέσεως.
2. Προσθήκη 6 mL αιθανόλης, σύστασης 95% v/v.
3. Προσθήκη 90 mL απιονισμένου νερού και ανάδευση υπό θέρμανση μέχρι βρασμού.
4. Συνέχεια της ανάδευσης για 20 min.
5. Ογκομέτρηση στα 100 mL.

Η προετοιμασία της ξυλάνης (1% w/v) παρουσιάζεται παρακάτω:

1. Μεταφορά 80 mL απιονισμένου νερού εντός ποτηριού ζέσεως και θέρμανση αυτού μέχρι θερμοκρασίας 80°C.
2. Προσθήκη 1 g ξυλάνης και ανάδευση για 10 min
3. Αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι βρασμού και παραμονή για χρονικό διάστημα 1-2 min
4. Παύση της θέρμανσης και παραμονή του ποτηριού ζέσεως πάνω σε μαγνητική πλάκα, υπό ανάδευση για μία ολόκληρη νύχτα
5. Ογκομέτρηση με απιονισμένο νερό έως όγκο 100 mL

Η προετοιμασία της αραβινοξυλάνης (1% w/v) διαθέτει τα εξής στάδια:

1. Μεταφορά 100 mL απιονισμένου νερού εντός ποτηριού ζέσεως
2. Προσθήκη 1 g αραβινοξυλάνης
3. Θέρμανση και ανάδευση για 15 min

Μετά την προετοιμασία των υποστρωμάτων, δημιουργήθηκαν τα παρακάτω δείγματα:

Πίνακας 15: Σύσταση διαλυμάτων, διαφορετικών υποστρωμάτων

1° διάλυμα	2° διάλυμα	3° διάλυμα
10 μL Ασκορβικού οξέος, 500 μL Γλυκομαννάνης, 440 μL Buffer, 50 μL LPMO	10 μL Ασκορβικού οξέος, 500 μL Ξυλάνης, 440 μL Buffer, 50 μL LPMO	10 μL Ασκορβικού οξέος, 500 μL Αραβινοξυλάνης, 440 μL Buffer, 50 μL LPMO

Πίνακας 16: Σύσταση τυφλών διαλυμάτων, διαφορετικών υποστρωμάτων

1° διάλυμα	2° διάλυμα	3° διάλυμα
10 μL Ασκορβικού οξέος, 500 μL Γλυκομαννάνης, 440 μL Buffer, 50 μL Απιονισμένου νερού	10 μL Ασκορβικού οξέος, 500 μL Ξυλάνης, 440 μL Buffer, 50 μL Απιονισμένου νερού	10 μL Ασκορβικού οξέος, 500 μL Αραβινοξυλάνης, 440 μL Buffer, 50 μL Απιονισμένου νερού

Το τελευταίο στάδιο κάθε δοκιμής είναι η ανίχνευση ολιγοσακχαριτών που μπορεί να προκύψουν μέσω της λήψης χρωματογραφημάτων με τη μέθοδο της χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης.

Εξέταση ύπαρξης συνεργισμού μεταξύ της LPMO κι άλλων ενζύμων

Κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας, μελετάται η ύπαρξη συνεργισμού μεταξύ της LPMO και ορισμένων ενζύμων.

1^η δοκιμή

Αρχικά, εξετάστηκε η δράση της LPMO με τα ακόλουθα ένζυμα: εξωγλουκανάση (CBH), ενδογλουκανάσες (EG5) και (EG7).

Η σύσταση των διαλυμάτων που ελέγχονται, παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 17: Σύσταση διαλυμάτων για τον έλεγχο της ύπαρξης συνεργισμού

1° διάλυμα	2° διάλυμα	3° διάλυμα
10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 790 µL Buffer, 50 µL LPMO, 50 µL CBH	10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 790 µL Buffer, 50 µL LPMO, 50 µL EG5	10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 825 µL Buffer, 50 µL LPMO, 15 µL EG7

Πίνακας 18: Σύσταση control διαλυμάτων για τον έλεγχο της ύπαρξης συνεργισμού

1° διάλυμα	2° διάλυμα	3° διάλυμα
10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 840 µL Buffer, 50 µL CBH	10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 840 µL Buffer, 50 µL EG5	10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 875 µL Buffer, 15 µL EG7

Εκτός των παραπάνω, δημιουργούνται δύο επιπλέον διαλύματα με τις ακόλουθες συστάσεις:

Πίνακας 19: Σύσταση διαλυμάτων για τον έλεγχο της ύπαρξης συνεργισμού

Διάλυμα LPMO	Τυφλό διάλυμα
10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 840 µL Buffer, 50 µL LPMO	10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 890 µL Buffer

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, ακολουθεί η παραμονή των erpendorf tubes στο Thermomixer, σε θερμοκρασία 50°C για μία ολόκληρη νύχτα.

2^η δοκιμή

Επαναλαμβάνεται η μελέτη της ύπαρξης συνεργισισμού, εστιάζοντας στην ενδο-γλουκανάση (EG5), μεταβάλλοντας ταυτόχρονα την ποσότητα του ενζύμου LPMO που προστίθεται σε κάθε erpendorf.

Η σύσταση των διαλυμάτων που ελέγχονται, παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 20: Σύσταση διαλυμάτων για έλεγχο της δράσης του ενζύμου LPMO

1° διάλυμα	10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 820 µL Buffer, 50 µL EG5, 20 µL LPMO	3° διάλυμα	10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 870 µL Buffer, 20 µL LPMO
2° διάλυμα	10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 810 µL Buffer, 50 µL EG5, 30 µL LPMO	4° διάλυμα	10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 860 µL Buffer, 30 µL LPMO
1° τυφλό διάλυμα	10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 840 µL Buffer, 50 µL EG5	2° τυφλό διάλυμα	10 µL Ασκορβικού οξέος, 100 µL Pasc (0.5%), 890 µL Buffer

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, ακολουθεί η παραμονή των erpendorf tubes στο Thermomixer, σε θερμοκρασία 50°C για μία ολόκληρη νύχτα.

Το τελικό στάδιο στις δύο πειραματικές δοκιμές είναι ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων που έχουν προκύψει. Ειδικότερα, 250 µL μεταφέρονται από κάθε αντίδραση σε δοκιμαστικούς σωλήνες, φυγοκεντρώνται, λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό και σε κάθε ένα προστίθενται 250 µL 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Ακολουθεί βρασμός για 5 min και προσθήκη 2 mL απιονισμένου νερού. Τέλος, πραγματοποιείται φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 540 nm. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στο DNS, το οποίο είναι φωτοευαίσθητο.

Εξέταση πιθανών δοτών ηλεκτρονίων

Στο πλαίσιο μελέτης της LPMO, εξετάζεται η δράση των ακόλουθων αντιδραστηρίων-δοτών ηλεκτρονίων:

- Καφεϊκό οξύ
- Βανιλίνη
- Πυρογαλόλη
- Γουαϊκόλη
- Γαλλικό οξύ
- Κουμαρικό οξύ
- Φερουλικό οξύ
- Ασκορβικό οξύ

Η σύσταση των διαλυμάτων που ελέγχονται, παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 21: Σύσταση διαλυμάτων για έλεγχο της δράσης της LPMO σε διάφορα αντιδραστήρια

1^ο διάλυμα	100 μ L Pasc, 26 μ L Καφεϊκού οξέος, 624 μ L Buffer, 50 μ L LPMO	5^ο διάλυμα	100 μ L Pasc, 22 μ L Γαλλικού οξέος, 628 μ L Buffer, 50 μ L LPMO
2^ο διάλυμα	100 μ L Pasc, 22 μ L Βανιλίνης, 628 μ L Buffer, 50 μ L LPMO	6^ο διάλυμα	100 μ L Pasc, 21 μ L Κουμαρικού οξέ- ος, 629 μ L Buffer, 50 μ L LPMO
3^ο διάλυμα	100 μ L Pasc, 14 μ L Πυρογαλόλης, 636 μ L Buffer, 50 μ L LPMO	7^ο διάλυμα	100 μ L Pasc, 28 μ L Φερουλικού οξέ- ος, 622 μ L Buffer, 50 μ L LPMO
4^ο διάλυμα	100 μ L Pasc, 6 μ L Γουαϊκόλης, 644 μ L Buffer, 50 μ L LPMO	8^ο διάλυμα	100 μ L Pasc, 14 μ L Ασκορβικού οξέ- ος, 636 μ L Buffer, 50 μ L LPMO

Σημειώνεται ότι, για κάθε διάλυμα που προετοιμάστηκε παραπάνω, δημιουργείται κι ένα αντίστοιχο τυφλό δείγμα, το οποίο περιέχει 100 μL Pasc, Buffer και το εκάστοτε αντιδραστήριο, σε ποσότητες ώστε ο τελικός όγκος να ισούται με 1 mL.

Μετά την προετοιμασία των διαλυμάτων εντός erpendorf, τοποθετούνται στο Thermomixer σε θερμοκρασία 50°C και για μία ολόκληρη νύχτα. Τέλος, αξιολογείται η αλληλεπίδραση τους με το ένζυμο, μέσω χρωματογραφημάτων που λαμβάνονται με τη μέθοδο HPAEC.

Προσδιορισμός του βέλτιστου pH

Κατά τη διαδικασία ελέγχου της δράσης του ενζύμου LPMO στα υποστρώματα, επιχειρείται ο προσδιορισμός του βέλτιστου pH. Για τον σκοπό αυτό, συντίθενται 8 διαλύματα με διαφορετικές τιμές pH. Η προετοιμασία των διαλυμάτων παρουσιάζεται ακολούθως:

1. **Citrate Phosphate:** Δημιουργούνται δύο διαλύματα, το Citric acid 50 mM και το Na_2HPO_4 , με τιμές pH 3 και 4 αντίστοιχα. Αρχικά, ζυγίζονται στον αναλυτικό ζυγό 0.21 g Citric acid και 0.284 g Na_2HPO_4 , και μεταφέρονται σε δύο falcons. Στην συνέχεια, προστίθενται 20 mL απιονισμένου νερού στο καθένα και ακολουθεί ανάδευση των διαλυμάτων στην συσκευή Vortex. Τέλος, μεταγγίζεται το Citric acid σε δύο άλλα falcons και προστίθεται σταδιακά ποσότητα του Na_2HPO_4 , καθώς μετριέται η τιμή του pH. Στόχος είναι η δημιουργία δύο διαλυμάτων με pH 3 και 4.
2. **Sodium Acetate:** Δημιουργούνται τρία διαλύματα με τιμές pH 4, 5 και 6 αντίστοιχα. Αρχικά, ζυγίζονται στον αναλυτικό ζυγό 0.2051 g Sodium Acetate 50 mM και ογκομετρούνται 143 μL Acetic acid 50 mM, και μεταφέρονται σε δύο falcons. Στην συνέχεια, προστίθενται 50 mL απιονισμένου νερού στο καθένα και ακολουθεί ανάδευση των διαλυμάτων στην συσκευή Vortex. Τέλος, μεταγγίζεται το Sodium Acetate σε τρία άλλα falcons και προστίθεται σταδιακά ποσότητα του Acetic acid, καθώς μετριέται η τιμή του pH. Στόχος είναι η δημιουργία τριών διαλυμάτων με pH 4, 5 και 6 αντίστοιχα.

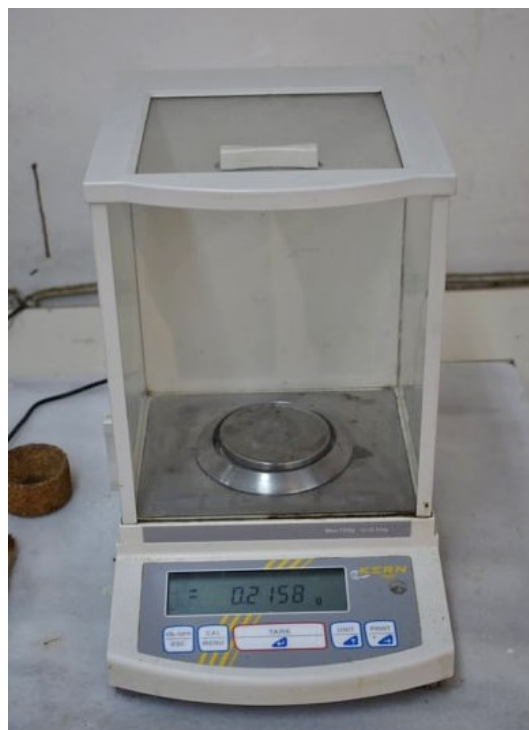
3. **Sodium Phosphate:** Δημιουργούνται τρία διαλύματα με τιμές pH 6, 7 και 8 αντίστοιχα. Αρχικά, ζυγίζονται στον αναλυτικό ζυγό 0.156 g NaH_2PO_4 50 mM και 0.142 g Na_2HPO_4 50 mM, και μεταφέρονται σε δύο falcons. Στην συνέχεια, προστίθενται 20 mL απιονισμένου νερού στο καθένα και ακολουθεί ανάδευση των διαλυμάτων στην συσκευή Vortex. Τέλος, μεταγγίζεται το NaH_2PO_4 σε τρία άλλα falcons και προστίθεται σταδιακά ποσότητα Na_2HPO_4 , καθώς μετريέται η τιμή του pH. Στόχος είναι η δημιουργία τριών διαλυμάτων με pH 6, 7 και 8 αντίστοιχα.

Μετά την προετοιμασία των παραπάνω διαλυμάτων, ακολουθεί η δημιουργία των δειγμάτων. Κάθε erpendorf tube περιέχει 10 μL Ασκορβικού οξέος, 100 μL Pasc, 870 μL Buffer και 20 μL LPMO. Για κάθε διάλυμα, προετοιμάζεται κι ένα τυφλό δείγμα, το οποίο περιέχει 10 μL Ασκορβικού οξέος, 100 μL Pasc και 890 μL Buffer.

Έπειτα, τοποθετούνται στο Thermomixer σε θερμοκρασία 50°C , με ανάδευση 900 rpm για 20 h. Τέλος, αξιολογούνται οι διάφορες τιμές pH, μέσω της λήψης χρωματογραφημάτων με τη μέθοδο της χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης.

Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας

Στο πλαίσιο χαρακτηρισμού του ενζύμου, αναζητείται η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του. Για τον σκοπό αυτό, προετοιμάζονται 12 διαλύματα, τα οποία μελετώνται σε 4 διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 40°C , 50°C , 60°C και 70°C . Η σύσταση των διαλυμάτων έχει ως εξής: 8 erpendorf tubes με 10 μL Ασκορβικού οξέος, 100 μL Pasc, 870 μL Buffer (pH=6) και 20 μL LPMO. Παράλληλα, δημιουργούνται 4 τυφλά διαλύματα με σύσταση: 10 μL Ασκορβικού οξέος, 100 μL Pasc και 890 μL Buffer (pH=6).



Εικόνα 24: Αναλυτικός ζυγός Abs 120-4N (KERN & Sohn GmbH)

Τα δείγματα τοποθετούνται ανά δύο σε 4 διαφορετικά Thermomixers, τα οποία έχουν ρυθμιστεί στις θερμοκρασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Εκεί παραμένουν για 20 h, υπό ανάδευση 900 rpm.

Τέλος, παρατηρείται η δράση του ενζύμου σε κάθε θερμοκρασία, με τη λήψη χρωματογραφημάτων με τη μέθοδο HPAEC. Αναλυτικές πληροφορίες για τη μέθοδο και τον τρόπο που πραγματοποιούνται οι μετρήσεις, παρουσιάζονται παρακάτω.

Χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPAEC)

Η χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (High Performance Anion-Exchange Chromatography) αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο ανάλυσης, καθώς επιτρέπει το διαχωρισμό των ουσιών με βάση τα δομικά τους χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος, τη σύνθεση και την ισομέρεια θέσης (Corradini, Cavazza, & Bignardi, 2012). Ειδικότερα, αρκετά σάκχαρα είναι ασθενή οξέα με τιμές pK_a να κυμαίνονται μεταξύ 12 και 14. Ως εκ τούτου, σε υψηλές τιμές pH, οι υδροξυλομάδες τους μετατρέπονται σε οξυανιόντα κι έτσι είναι εφικτή η απομόνωση τους ως ανιόντων κατά την εκτέλεση της μεθόδου. Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, η διάταξη περιλαμβάνει την στήλη Car-

boPac PA-1 (4x250 nm), η οποία είναι συνδεδεμένη με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή ED50 (Dionex, Sunnyvale, CA, Η.Π.Α.). Ως κινητή φάση της στήλης, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες. Αρχικά, εγχύθηκε στο σύστημα ο πρώτος, συγκέντρωσης 100 mM NaOH και ακολούθησε γραμμικώς αυξανόμενος ο δεύτερος διαλύτης, συγκέντρωσης 1 M CH₃COONa σε διάλυμα 0.1 M NaOH.

Τα βήματα που ακολουθούνται κατά την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης ανάλυσης, περιγράφονται παρακάτω:

1. Προετοιμασία του πρώτου διαλύτη, συγκέντρωσης 100 mM NaOH. Χρήση δύο ογκομετρικών φιαλών, όγκου 100 mL και 1 L αντίστοιχα, και μεταφορά εντός αυτών, 100 mL NaOH στον έναν κύλινδρο και 900 mL υπερκάθαρου νερού στον άλλον. Σημειώνεται ότι, το υπερκάθαρο νερό συλλέγεται από την συσκευή Direct-Q Millipore. Μεταφορά των διαλυμάτων σε πλαστικό μπουκάλι και ανάδευση.
2. Προετοιμασία του δεύτερου διαλύτη, συγκέντρωσης 1M CH₃COONa σε διάλυμα 100 mM NaOH. Χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 mL και προσθήκη εντός του 50 mL NaOH. Ζύγισμα 41.02 g CH₃COONa. Μεταφορά, εντός γυάλινης, ογκομετρικής φιάλης, των δύο συστατικών και σταδιακή προσθήκη υπερκάθαρου νερού μέχρι τα 500 mL. Στόχος είναι να διαλυθεί το στερεό συστατικό πλήρως. Ακολουθεί φιλτράρισμα του διαλύτη, πραγματοποιώντας διήθηση υπό κενό. Το διάλυμα διέρχεται από φίλτρο, με διάμετρο πόρων 0.2 μm.
3. Απαέρωση των δύο διαλυτών με ήλιον. Ο πρώτος διαλύτης χρειάζεται να απαερωθεί για 30 min, ενώ ο δεύτερος για 15 min. Η απαέρωση είναι απαραίτητη προκειμένου να απομακρυνθεί ο αέρας και να μην δημιουργούνται φυσαλίδες κατά την εισαγωγή του διαλύτη στην συσκευή Dionex.
4. Σύνδεση των πλαστικών μπουκαλιών που περιέχουν τους διαλύτες στην συσκευή Dionex.
5. Έγχυση του δείγματος εντός της συσκευής με τη βοήθεια λεπτής σύριγγας.
6. Αναμονή 40 λεπτών μέχρι την προσθήκη του επόμενου δείγματος.

Προστασία του ζυμομύκητα *P. pastoris* με Glycerol Stock

Η αποθήκευση ενός μικροοργανισμού στην υπερκατάψυξη, δηλαδή στους -80°C , είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος διατήρησης τους (Bajinting & Ng, 2019). Αυτό πραγματοποιείται με τη δημιουργία διαλύματος γλυκερόλης. Η συγκεκριμένη οργανική ένωση συμβάλλει στην προστασία των μικροοργανισμών από τους κρυστάλλους νερού που δημιουργούνται κατά την ψύξη. Οι κρύσταλλοι μπορούν να οδηγήσουν σε αφυδάτωση των κυττάρων λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης των αλάτων, καθώς και σε διάτρηση των κυτταρικών μεμβρανών. Τα βήματα που χρειάζεται να πραγματοποιηθούν, παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Δημιουργία υγρής καλλιέργειας του ζυμομύκητα *P. pastoris* και παραμονή στον επωαστήρα για ένα ολόκληρο βράδυ, προκειμένου να παραληφθούν φρέσκα κύτταρα.
2. Σύνθεση YPD Medium, χωρίς την προσθήκη άγαρ, αλλά με περιεκτικότητα σε γλυκερόλη 15% v/v. Ειδικότερα, στη μία φιάλη προστίθεται 1 g Yeast Extract, 2 g Peptone και 100 mL αποιονισμένου νερού. Ακολουθεί η προσθήκη της γλυκερόλης. Σε δεύτερη κωνική φιάλη, μεταφέρονται 2 g Dextrose.
3. Αποστείρωση των παραπάνω κωνικών φιαλών στο αυτόκαυστο στους 121°C , για χρόνο 20 min.
4. Μεταφορά των κωνικών φιαλών, μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, σε στείρο πάγκο εργασίας και ανάμειξη του περιεχομένου τους.
5. Παραλαβή 2 mL από την υγρή καλλιέργεια της *P. pastoris* και μεταφορά κάθε mL εντός eppendorf tubes.
6. Έλεγχος της απορρόφησης των κυττάρων της *P. pastoris* στα 600 nm. Για τη φωτομέτρηση, απαιτείται αραιώση των δειγμάτων 20 φορές. Αυτό πραγματοποιείται σταδιακά, δηλαδή επιτυγχάνεται σε πρώτη φάση αραιώση 10 φορές και έπειτα αραιώση 2 φορές. Παράλληλα, χρειάζεται η προετοιμασία ενός τυφλού δείγματος, το οποίο θα προκύψει από τη φυγοκέντρηση των παραπάνω δειγμάτων. Σημειώνεται ότι, το τυφλό διάλυμα δεν περιλαμβάνει την υπό προσδιορισμό ουσία, δη-

λαδή στην συγκεκριμένη περίπτωση τα κύτταρα του ζυμομύκητα. Γι' αυτόν το λόγο, παραλαμβάνονται 50 μL από το υπερκείμενο υγρό του δείγματος και αναμιγνύονται με 950 μL απιονισμένου νερού.

7. Αραίωση των δειγμάτων με το θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκερόλη, αναλόγως με την απορρόφηση που προκύπτει από τη φωτομέτρηση. Ειδικότερα, επιδιώκεται η απορρόφηση να είναι $\text{O.D.}_{600} = 100$. Επομένως, αν για παράδειγμα η απορρόφηση ισούται με 10, απαιτείται 10 φορές συμπύκνωση προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή.
8. Τέλος, μεταφορά του διαλύματος σε erpendorf tubes και αποθήκευση αυτών στην υπερκατάψυξη.

Μέθοδοι: *C. cohnii* – Παραγωγή DHA

Προετοιμασία υγρής καλλιέργειας μικροφύκους, *Cryptocodium cohnii*

Τα στάδια προετοιμασίας της υγρής καλλιέργειας του μικροφύκους, *C. cohnii* ATCC 30772, παρατίθενται ακολούθως. Αξίζει να αναφερθεί ότι, το συστατικό **Yeast Extract** λειτουργεί κυρίως ως **πηγή αζώτου**, η **γλυκόζη** ως **πηγή άνθρακα** ενώ το **Sea Salt** προστίθεται λόγω των **μεταλλικών στοιχείων** και των **αλάτων** που διαθέτει. Στα πρώτα βήματα που παρουσιάζονται, παράγεται γλυκόζη από τη διάσπαση μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (Avicel), καθώς και από βιομάζα. Το μικροφύκος αναπτύσσεται φυσικά σε θαλάσσιο περιβάλλον και γι' αυτόν το λόγο, είναι απαραίτητη η προσθήκη του Sea Salt. Τέλος, σε μία υγρή καλλιέργεια, το 10% του συνολικού όγκου, αποτελεί το εμβόλιο με το μικροοργανισμό και προέρχεται από μία ήδη ανεπτυγμένη καλλιέργεια, όταν ο *C. cohnii* βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξής του.

Υδρόλυση Avicel

1. Προετοιμασία του Buffer Phosphate με συγκέντρωση 50 mM και pH=5. Η σύσταση παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 22: Σύσταση διαλύματος Buffer Phosphate

Συστατικό	Συγκέντρωση (mM)
Citric Acid	50
Sodium Phosphate dibasic	100

2. Ζύγισμα των ακόλουθων ουσιών στον ηλεκτρονικό ζυγό.

Πίνακας 23: Σύσταση διαλύματος για την παραγωγή γλυκόζης από κυτταρίνη (Avicel)

Συστατικό	Σύσταση σε 100 mL διαλύματος
Buffer Phosphate	100 MI
Avicel	9 g
Cellic CTec 2	270 mg πρωτεΐνης

3. Χρήση δύο κωνικών φιαλών των 100 mL.
4. Προσθήκη 50 mL Buffer Phosphate σε κάθε κωνική φιάλη.
5. Μεταφορά 4.5 g Avicel σε κάθε κωνική φιάλη.
6. Προσθήκη ορισμένου όγκου ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec 2 σε κάθε κωνική φιάλη. Το αντιδραστήριο αυτό αποτελεί ένα μίγμα κυτταρινασών, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση του β - 1, 4 γλυκοζιτικού δεσμού στην κυτταρίνη (Rodrigues, Ostergaard Haven, Lindedam, Felby, & Gama, 2015). Σημειώνεται ότι, η ποσότητα του Cellic CTec 2 που θα προστεθεί σε κάθε περιέκτη, είναι συνάρτηση της ποσότητας του Avicel. Ειδικότερα, ισχύει ότι για κάθε g Avicel, απαιτούνται 30 mg Cellic CTec 2.
7. Παραμονή των δειγμάτων σε επωαστήριο για 48 ώρες, σε θερμοκρασία 50°C και υπό ανάδευση 180 rpm.

Υδρόλυση βιομάζας

Κατά την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιείται δύο φορές υδρόλυση βιομαζών. Συγκεκριμένα, στον πρώτο κύκλο υδρολύσεων, επιλέγονται τρία δείγματα που προέρχονται από πεύκο και περιέχουν κυρίως κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Αυτό έχει επιτευχθεί με την προεπεξεργασία τους με οργανικούς διαλύτες (EtOH, ACO, THF), προκειμένου να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο ποσοστό της λιγνίνης, η οποία δρα

σαν παρεμποδιστικός παράγοντας. Στο σημείο αυτό χρειάζεται να διευκρινιστεί ότι το εργαστήριο βιοτεχνολογίας παρέλαβε έτοιμες τις βιομάζες και δεν προέβη σε κάποια τεχνική προεπεξεργασίας. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι συνθήκες πίεσης, θερμοκρασίας και ο χρόνος αντίδρασης των δειγμάτων.

Πίνακας 24: Συνθήκες προκατεργασίας δειγμάτων βιομάζας πεύκου

Δείγμα	Διαλύτες	Αναλογία διαλυτών	Αρχική πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος αντίδρασης (min)	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Λιγνίνη (%)
12	H ₂ O/EtOH	50/50%	16	175	60	77.60	13.23	7.18
13	H ₂ O/ACO	50/50%	16	175	60	82.75	10.13	4.23
16	H ₂ O/EtOH	50/50%	16	175	120	79.57	9.74	6.38

Στο δεύτερο κύκλο των υδρολύσεων, χρησιμοποιούνται 6 δείγματα βιομάζας που έχουν προέλθει από ξύλο οξιάς. Κατά τη διάρκεια της ήπιας υδροθερμικής προκατεργασίας τους, έχουν εφαρμοστεί οι ακόλουθες συνθήκες:

Πίνακας 25: Συνθήκες προκατεργασίας δειγμάτων βιομάζας οξιάς

Δείγμα	Διαλύτες	Αναλογία διαλυτών	Αρχική πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος αντίδρασης (min)	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Λιγνίνη (%)
4	H ₂ O/EtOH	50/50%	16	150	60	51.36	20.96	16.73
5	H ₂ O/THF	50/50%	16	150	60	60.40	20.58	15.14
6	H ₂ O/ACO	50/50%	16	150	60	54.21	21.16	18.77
19	H ₂ O/EtOH	50/50%	16	160	120	72.96	16.03	6.44
20	H ₂ O/THF	50/50%	16	160	120	79.13	12.10	5.51
21	H ₂ O/THF	50/50%	8	160	120	65.27	14.98	14.87

Τα βήματα που ακολουθούνται και στις δύο περιπτώσεις είναι παρόμοια και παρουσιάζονται ακολούθως:

1. Προετοιμασία του Buffer με pH=5 και την παρακάτω σύσταση:

Πίνακας 26: Σύσταση διαλύματος Buffer

Συστατικό	Συγκέντρωση (mM)
Sodium Phosphate	15
Sodium Dihydrogen Phosphate	15

- Μετάγγιση 30 mL Buffer σε κάθε κωνική φιάλη των 250 mL
- Προσθήκη 2.7 g βιομάζας σε κάθε κωνική φιάλη. Σημειώνεται ότι, η βιομάζα χρειάζεται να έχει 9% dm, δηλαδή dry matter. Για τον σκοπό αυτό, προστέθηκαν τα 2.7 g στα 30 mL κάθε φιάλης.
- Μεταφορά 300 µL διαλύματος ενζύμων σε κάθε κωνική φιάλη με στόχο να αντιστοιχούν 137 mg πρωτεΐνης σε κάθε mL.
- Κάλυψη των φιαλών με λαστιχένια πώματα.
- Μεταφορά των κωνικών φιαλών σε επωαστήρα με θερμοκρασία 50°C και υπό ανάδευση 180 rpm. Παραμονή εντός του για 48h.

Προετοιμασία καλλιέργειας *C. cohnii*

Avicel

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων μετά το πέρας των 48 ωρών και παραλαβή του υπερκείμενου υγρού που περιέχει την γλυκόζη.
- Ζύγισμα στον ηλεκτρονικό ζυγό των ουσιών Yeast extract και Sea Salt, και μεταφορά αυτών σε καινούριες κωνικές φιάλες των 100 mL.

Πίνακας 27: Σύσταση θρεπτικού υλικού για υγρές καλλιέργειες *C. cohnii*

Συστατικό	Σύσταση w/v σε απιονισμένο H ₂ O (g/L)
Γλυκόζη	20
Yeast Extract	2
Sea Salt	18.7

- Προσθήκη 45 mL απιονισμένου νερού στις κωνικές φιάλες.
- Ρύθμιση του pH του διαλύματος σε τιμή 6.3-6.6 με την προσθήκη HCl.

5. Μεταφορά των κωνικών φιαλών στο αυτόκαυστο προκειμένου να αποστειρωθούν.
6. Ολοκλήρωση της αποστείρωσης και τοποθέτηση των κωνικών φιαλών σε στείρο πάγκο εργασίας
7. Προσθήκη του θρεπτικού μέσου στην γλυκόζη.
8. Εμβολιασμός των δειγμάτων με 5 mL από το μικροφύκος, *C. cohnii*. Σημειώνεται ότι, κατά την προετοιμασία καλλιέργειας μικροοργανισμού, το εμβόλιο με το μικροφύκος συνιστά το 10% του όγκου του διαλύματος.
9. Παραμονή των καλλιεργειών σε επωαστήρα, σε θερμοκρασία 27°C και υπό ανάδευση 160 rpm, για 6 ημέρες.
10. Καθημερινή παραλαβή δειγμάτων προκειμένου να ελεγχθεί η ανάπτυξη του μικροφύκου. Αυτό επιτυγχάνεται με τον προσδιορισμό της γλυκόζης στο δείγμα. Συγκεκριμένα, αν η συγκέντρωση του σακχάρου παραμένει σταθερή, τότε ο *C. cohnii* έχει φτάσει στη μέγιστη ανάπτυξη του. Αντιθέτως, αν η συγκέντρωση της γλυκόζης μειώνεται, τότε ο μικροοργανισμός συνεχίζει να αναπτύσσεται.

Βιομάζα

1. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων μετά το πέρας των 48 ωρών και παραλαβή του υπερκείμενου υγρού που περιέχει την γλυκόζη. Μεταφορά του υγρού σε κωνικές φιάλες των 100 mL.
2. Επαναιώρηση του στερεού που έχει απομείνει στα falcons με την προσθήκη 30 mL Buffer Sodium Phosphate monobasic/dibasic και 30 μL από το διάλυμα των ενζύμων. Η σύσταση του Buffer, το οποίο έχει pH=5.5, παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 28: Σύσταση διαλύματος Buffer Sodium Phosphate monobasic/dibasic

Συστατικό	Συγκέντρωση (mM)
Sodium Phosphate monobasic	17
Sodium Phosphate dibasic	15

3. Μεταφορά των falcons στον επωαστήρα και παραμονή για μία ακόμη ημέρα προκειμένου να παραχθεί η μέγιστη δυνατή γλυκόζη. Υπενθυμίζεται ότι, οι συνθήκες στον επωαστήρα είναι 50°C και 180 rpm.

4. Ζύγισμα στον ηλεκτρονικό ζυγό των ουσιών Yeast extract και Sea Salt, και μεταφορά αυτών σε καινούριες κωνικές φιάλες των 100 mL (Πίνακας 27).
5. Ζύγισμα στον ηλεκτρονικό ζυγό της ουσίας Tris προκειμένου η συγκέντρωση της να ανέρχεται στα 30 mM σε 80 mL καλλιέργειας.
6. Προσθήκη 44 mL απιονισμένου νερού στις κωνικές φιάλες.
7. Ρύθμιση του pH του διαλύματος σε τιμή 6.3-6.6 με την προσθήκη HCl.
8. Μεταφορά των κωνικών φιαλών στο αυτόκαυστο προκειμένου να αποστειρωθούν σε θερμοκρασία 109°C για χρονικό διάστημα 40 min.
9. Ολοκλήρωση της αποστείρωσης και τοποθέτηση των κωνικών φιαλών σε στείρο πάγκο εργασίας.
10. Προσθήκη του θρεπτικού μέσου στην γλυκόζη.
11. Εμβολιασμός των δειγμάτων από το μικροφύκος, *C. cohnii*. Σημειώνεται ότι, κατά την προετοιμασία καλλιέργειας μικροοργανισμού, το εμβόλιο με το μικροφύκος συνιστά το 10% του όγκου του διαλύματος.
12. Παραμονή των καλλιεργειών σε επωαστήριο, σε θερμοκρασία 27°C και υπό ανάδευση 160 rpm, για 5 ημέρες.
13. Καθημερινή παραλαβή δειγμάτων προκειμένου να ελεγχθεί η ανάπτυξη του μικροφύκου.



Εικόνα 25: Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)

Παραλαβή δείγματος από υγρή καλλιέργεια

1. Μεταφορά των κωνικών φιαλών, που περιέχουν τις υγρές καλλιέργειες, από τον επωαστήρα σε στείρο πάγκο εργασίας.
2. Χρήση ρυγχών πιπेटών, που έχουν αποστειρωθεί προηγουμένως στο αυτόκαυστο.
3. Αφαίρεση του αποστειρωμένου βαμβακιού που καλύπτει το στόμιο της κωνικής φιάλης, ήπια ανάδευση και ταυτόχρονη καύση του στομίου.
4. Παραλαβή δείγματος με την χρήση πιπέτας και μεταφορά αυτού σε erpendorf tube.
5. Δεύτερη καύση του στομίου της κωνικής φιάλης, μετά την παραλαβή του δείγματος προκειμένου να μην μολυνθεί η υγρή καλλιέργεια.
6. Πωματισμός κάθε κωνικής φιάλης με βαμβάκι και μεταφορά αυτών στον επωαστήρα.

Ενζυμική μέτρηση γλυκόζης με εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα

Η μέτρηση της γλυκόζης πραγματοποιείται ενζυμικά με την 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. Σημειώνεται ότι, το προϊόν ερυθρού χρώματος παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm. Τα βήματα που ακολουθούνται, παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Παραλαβή του εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος με την ονομασία **Σάκχαρο GOD/PAP** από το Cold Room και μεταφορά αυτού στον χώρο του εργαστηρίου. Το σκεύασμα χρειάζεται να διατηρηθεί εντός πάγου κατά τη διάρκεια εκτέλεσης των μετρήσεων, λόγω ευαισθησίας στις εναλλαγές της θερμοκρασίας.
2. Προσθήκη 240 μL από το εμπορικό σκεύασμα με τη βοήθεια πιπέτας, σε κάθε υποδοχή στην ειδική βάση της συσκευής φωτομέτρησης microplate, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία πρόκειται να προσδιοριστεί η γλυκόζη.
3. Προσθήκη 10 μL από τα δείγματα που πρόκειται να μελετηθούν στις υποδοχές. Χρειάζεται να αναφερθεί ότι, η γλυκόζη βρίσκεται στο υπερκείμενο υγρό, συνε-

πώς πρέπει να προηγηθεί διαχωρισμός με φυγοκέντρηση κι ενδεχομένως αραίωση των δειγμάτων με απιονισμένο νερό.

4. Προετοιμασία τυφλού δείγματος, το οποίο θα περιέχει όλα τα συστατικά, εκτός εκείνου που πρόκειται να προσδιοριστεί, δηλαδή στην συγκεκριμένη περίπτωση της γλυκόζης. Συνήθως, ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται το απιονισμένο νερό.
5. Εισαγωγή της βάσης στην συσκευή φωτομέτρησης Microplate και επιλογή του κατάλληλου μήκους κύματος και της θερμοκρασίας, που θα πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις. Για τον προσδιορισμό της γλυκόζης, εφαρμόζεται μήκος κύματος 510 nm και επιλέγεται θερμοκρασία 27°C.
6. Παραμονή των δειγμάτων εντός της συσκευής για 15 min προκειμένου να πραγματοποιηθεί η επώαση της αντίδρασης, φωτομέτρηση στα 510 nm και τέλος παραλαβή των μετρήσεων της απορρόφησης.

Εκχύλιση λιπαρών

Η μελέτη του είδους των λιπαρών οξέων που παράγονται στα κύτταρα του μικροφύκου, *C. cohnii*, απαιτεί την απομόνωσή τους από το μικροοργανισμό. Αυτό πραγματοποιείται με τον τρόπο που ακολουθεί παρακάτω και πρόκειται για μία τροποποιημένη προσέγγιση της μεθόδου Folch. Πιο συγκεκριμένα, τα λιπίδια των μικροοργανισμών είναι υδρόφοβα και κατά συνέπεια είναι διαλυτά σε πολλούς οργανικούς διαλύτες (Breil, Abert Vian, Zemb, Kunz, & Chemat, 2017). Ως εκ τούτου, η παραλαβή των ουδέτερων λιπιδίων, όπως είναι τα λιπαρά οξέα είναι εφικτή σε δύο στάδια. Αρχικά, πραγματοποιείται διαχωρισμός φάσεων του διαλύματος κι ακολουθεί διάκριση των βιομορίων σε δύο μέσα με την προσθήκη απιονισμένου νερού, μεθανόλης και χλωροφορμίου. Η οργανική φάση που δημιουργείται, περιέχει τα λιπίδια και η υδατική περιλαμβάνει άλλες ενώσεις, όπως είναι τα σάκχαρα και οι πρωτεΐνες. Πολλοί ερευνητές προβαίνουν σε τροποποιήσεις της μεθόδου, με κυριότερη την αντικατάσταση των επικίνδυνων για την υγεία διαλυτών.

1. Παραλαβή 50 mL δείγματος από την κωνική φιάλη, στην οποία είχε αναπτυχθεί η υγρή καλλιέργεια του μικροφύκου και διαχωρισμός αυτών σε δύο μεγάλα falcons.
2. Φυγοκέντρηση για 7 min κι έπειτα απόχυση της υπερκείμενης φάσης.

3. Έκπλυση με αλατόνερο σύστασης 18.7 g Sea Salt/L. Ειδικότερα, προστίθενται 5 mL από το αλατόνερο στο διάλυμα, το falcon τοποθετείται για ανάδευση στην συσκευή Vortex κι έπειτα φυγοκεντρείται ξανά για 7 min. Σημειώνεται ότι, το αλατόνερο προστίθεται προκειμένου να αποφευχθεί το οσμωτικό σοκ των κυττάρων. Συγκεκριμένα, η αιφνίδια αραίωση του διαλύματος, προκαλεί διαφορά πίεσης, η οποία οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση αλάτων στο εσωτερικό των κυττάρων. Αν δεν επέλθει ισορροπία της συγκέντρωσης τους εντός των κυττάρων και στο διάλυμα, θα προκληθεί έκλυση των συστατικών των κυττάρων στο περιβάλλον (Altendorf, Booth, Gralla, Greye, Rosenthal, & Wood, 2009).
4. Απόρριψη της υπερκείμενης φάσης, προσθήκη 1 mL αλατόνερου και ανάδευση στην συσκευή Vortex.
5. Μεταφορά του δείγματος στην κατάψυξη για 4 ώρες προκειμένου να παγώσει.
6. Πραγματοποίηση λυοφιλίωσης του δείγματος έως ότου εξαχνωθεί το περιεχόμενο νερό. Η διαδικασία αυτή διαρκεί μία ολόκληρη νύχτα. Σημειώνεται ότι, η λυοφιλίωση είναι μέθοδος ξήρανσης που βασίζεται στην εξάτμιση του νερού σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και συνθήκες κενού. Η πρακτική αυτή εφαρμόζεται κατά την επεξεργασία ουσιών που διασπώνται εύκολα με τη θέρμανση (Mellor & Bell, 2003).
7. Ζύγισμα της ξηρής μάζας, που παραλήφθηκε μετά την ολοκλήρωση της λυοφιλίωσης, στον ηλεκτρονικό ζυγό.
8. Προσθήκη 5 mL διαλύματος χλωροφορμίου και μεθανόλης σε αναλογία 2:1, σε κάθε 25 mg ξηρής βιομάζας. Αναμονή μίας ολόκληρης νύχτας.
9. Προσθήκη απιονισμένου νερού σε όγκο 20% του όγκου του μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης και ανάδευση.
10. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 7 min, με σκοπό την παραμονή της οργανικής φάσης στον πυθμένα των falcons και την εξύψωση της υδατικής φάσης στην επιφάνεια. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στην οργανική φάση περιέχονται τα λιπαρά που μελετώνται.

11. Τοποθέτηση των falcons εντός του απαγωγού και παραλαβή της οργανικής φάσης με τη βοήθεια σύριγγας.
12. Μεταφορά της οργανικής φάσης σε σύστημα δύο διαδοχικών προχοϊδων.
13. Προσθήκη 1 mL μίγματος μεθανόλης-νερού σε αναλογία 1:1 για έκπλυση της οργανικής φάσης.
14. Ανάδευση του διαλύματος και αναμονή μέχρι να επέλθει ένας εμφανής διαχωρισμός φάσεων.
15. Απόχυση της κατώτερης φάσης στην δεύτερη προχοϊδα και προσθήκη 1 mL μίγματος μεθανόλης-νερού σε αναλογία 1:1.
16. Ανάδευση του διαλύματος και αναμονή μέχρι να επέλθει ένας εμφανής διαχωρισμός φάσεων.
17. Συλλογή της κατώτερης φάσης σε προζυγισμένους, δοκιμαστικούς σωλήνες.
18. Μεταφορά των δοκιμαστικών σωλήνων στον φούρνο κενού ώστε να εξαχνωθεί ο διαλύτης, για μία ημέρα.
19. Ζύγισμα στον αναλυτικό ζυγό των δοκιμαστικών σωλήνων προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα των λιπαρών που παρήχθησαν.

Εστεροποίηση λιπαρών

Ο προσδιορισμός του είδους των λιπαρών οξέων που παρήχθησαν από τον *C. cohnii*, επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας. Ωστόσο, για να πραγματοποιηθεί αυτό, απαιτείται η μετατροπή των λιπαρών οξέων σε μεθυλεστέρες, με τη μέθοδο που παρουσιάζεται παρακάτω:

1. Προσθήκη 1 mL χλωροφορμίου HPLC grade σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, προκειμένου να επαναδιαλυθούν τα λιπαρά οξέα.
2. Προσθήκη 2.5 mL διαλύματος MeOH / HCl σύστασης 92:8 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και τοποθέτηση αυτών στο υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 60°C για χρονικό διάστημα 15 min. Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η πραγμα-

τοποίηση της αντίδρασης της εστεροποίησης. Σημειώνεται ότι, τα δείγματα χρειάζεται να καλυφθούν με αλουμινόχαρτο κατά την παραμονή τους στο υδατόλουτρο.

3. Μεταφορά των δοκιμαστικών σωλήνων εκτός υδατόλουτρου και προσθήκη 2.5 mL διαλύματος CaCl_2 5% w/v σε κάθε δείγμα, προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση.
4. Τοποθέτηση των δοκιμαστικών σωλήνων στον απαγωγό και προσθήκη 1 mL εξανίου σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί ανάδευση των διαλυμάτων στην συσκευή Vortex.
5. Αναμονή έως ότου επέλθει ο διαχωρισμός των φάσεων και παραλαβή με τη βοήθεια σύριγγας της πάνω φάσης. Σημειώνεται ότι, η οργανική φάση που βρίσκεται στην επιφάνεια του διαλύματος, περιέχει τους μεθυλεστέρες που πρόκειται να μελετηθούν.
6. Μεταφορά της οργανικής φάσης σε νέα falcons.
7. Επανάληψη των βημάτων 4-6 για 3 φορές ακόμα.
8. Πραγματοποίηση ανάλυσης με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας, GC.

Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Ο όρος χρωματογραφία αποδίδεται σε ένα σύνολο ποικίλων μεθόδων διαχωρισμού χημικών ουσιών, οι οποίες στηρίζονται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος, μεταξύ μιας κινούμενης και μιας στατικής φάσης (Skoog, Holler, & Croug, 2007). Ειδικότερα, η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography) εφαρμόζεται για την ανίχνευση πτητικών ενώσεων και έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα τα τελευταία 30 χρόνια για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πετρελαιοειδών, φυσικών προϊόντων και βιολογικών δειγμάτων (Θεοδωρίδης, Γηρούση, Ζαχαριάδης, Ζώτου, & Σαμανίδου, 2015). Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται ένα φέρον αέριο, το οποίο οφείλει να είναι χημικώς αδρανές, όπως είναι το άζωτο, το αργό ή το υδρογόνο και ως σταθερή φάση, κάποιο μη πτητικό υγρό ή κάποια στερεή ουσία. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι η έγχυση του δείγματος στον αεριοχρωματογράφο, η εξαέρωση του δείγματος και η παράσυρση του

από το φέρον αέριο. Σημειώνεται ότι, το στόμιο εισόδου του δείγματος, βρίσκεται συνήθως σε θερμοκρασία 50°C πάνω από το σημείο βρασμού του λιγότερο πτητικού συστατικού του δείγματος. Το δείγμα φτάνει στην στήλη, όπου διαχωρίζεται στα συστατικά του και έπειτα διέρχεται από τον ανιχνευτή. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, ως ανιχνευτής χρησιμοποιείται φλόγα ιοντισμού, FID (Flame Ionization Detector). Πρόκειται για τον πιο διαδεδομένο ανιχνευτή και στηρίζει τη λειτουργία του στο γεγονός ότι οι περισσότερες οργανικές ενώσεις, όταν πυρολυθούν στη θερμοκρασία της φλόγας υδρογόνου/αέρα, παράγουν ιόντα και ηλεκτρόνια. Τα σωματίδια αυτά άγουν τον ηλεκτρισμό και η ανίχνευση γίνεται με τη μέτρηση του ρεύματος που παράγεται από τη συλλογή αυτών των φορτισμένων φορέων (Skoog, Holler, & Crouch, 2007). Η ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται με την σύγκριση των χρόνων έκλουσης. Η ποσοτική ανάλυση των συστατικών γίνεται με βάση την επιφάνεια της κορυφής ενός εκλουόμενου συστατικού, η οποία με μια κατάλληλη καμπύλη αναφοράς από πρότυπα δείγματα, μετατρέπεται σε συγκέντρωση.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η αέρια χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε με την χρήση συστήματος GC-FID, το οποίο διέθετε στήλη Equity 5 Capillary GC. Σημειώνεται ότι, καθώς το δείγμα διοχετεύεται στην συσκευή και έρχεται σε επαφή με την φλόγα, παράγονται ιόντα. Τα συγκεκριμένα σωματίδια αποδίδουν ηλεκτρικά σήματα, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν στην ταυτοποίηση και τον υπολογισμό των οργανικών ουσιών. Η θερμοκρασία εισαγωγής του δείγματος στον αεριοχρωματογράφο έχει ρυθμιστεί στους 270°C, η ροή του φέροντος αερίου, που είναι ήλιο, στο 1 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης κυμαίνεται από 125°C έως 240°C, με ρυθμό αύξησης 5°C/min.



Εικόνα 26: Αέριος χρωματογράφος GC 17 A Shimadzu apparatus, Κυότο, Japan



Εικόνα 27: Φιάλες αερίων συνδεδεμένων με τον αέριο χρωματογράφο GC

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Lytic Polysaccharide Monooxygenases

Παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LPMO

Η παραγωγή του ενζύμου LPMO πραγματοποιήθηκε με τη δημιουργία υγρών καλλιεργειών του ζυμομύκητα, *Pichia pastoris*, όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στο [πειραματικό μέρος](#). Αρχικά, έλαβε χώρα η επώαση των καλλιεργειών με την καθημερινή προσθήκη μεθανόλης και ακολούθησε η φυγοκέντρηση και συλλογή του υπερκείμενου υγρού, το οποίο περιείχε την πρωτεΐνη. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η απομάκρυνση άλλων μορίων με τη μέθοδο της διήθησης υπό κενό και η συμπύκνωση του διαλύματος με την υπερδιήθηση. Από την παραπάνω διαδικασία, παραλήφθηκαν 64 mL διαλύματος που φέρει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, LPMO.

Καθαρισμός και παραλαβή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

Το διάλυμα πρωτεΐνης που παράχθηκε, εξισορροπήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Talon με τη [μέθοδο της διαπίδυσης](#) και στη συνέχεια έλαβε χώρα η [απομόνωση](#) του ενζύμου με τη διέλευση του από στήλη βαρύτητας με ρητίνη ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της LPMO στο λαμβανόμενο διάλυμα με μέτρηση της απορρόφησης δείγματος της σε ακτινοβολία μήκους κύματος 280 nm.

Παρατηρήθηκε, λοιπόν, απορρόφηση του ενζύμου 0.783 ABS, σε δείγμα το οποίο είχε αραιωθεί σε λόγο 1:2. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα μπορεί να εξαχθεί με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου:

$$C \text{ (mg/mL)} = \frac{O.D_{280} * \text{Dilution} * MW}{E_M}$$

Σημειώνεται ότι, ο συντελεστής $O.D_{280}$ αφορά την τιμή της οπτικής απορρόφησης του διαλύματος στα 280 nm, το MW είναι το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και το E_M είναι ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας. Τα μεγέθη αυτά είναι χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης και σχετίζονται με την αλληλουχία της. Ειδικότερα, με τη βοήθεια του προγράμματος ProtParam του ελεύθερου λογισμικού ExPASy, προκύπτει ότι $MW = 31881.26$ Da και το $E_M = 45880$ για τη δεδομένη LPMO. Υπολογίζεται, λοιπόν, η τιμή

1.09 mg/mL και λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο του διαλύματος που παραλήφθηκε από τον καθαρισμό της LPMO, 15 mL, προκύπτουν 16.35 mg πρωτεΐνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι, εφόσον το διάλυμα της πρωτεΐνης συμπυκνώθηκε πριν από την απομόνωση του ενζύμου, τα 16.35 mg LPMO αντιστοιχούν και στον αρχικό όγκο καλλιέργειας, 500 mL.

Εντοπισμός του είδους των γλυκοζυλιώσεων της LPMO

Τα ένζυμα LPMO φέρουν κάποιες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις στη δομή τους, τις γλυκοζυλιώσεις, όπως έχει αναφερθεί στην [αντίστοιχη παράγραφο](#). Ο προσδιορισμός του είδους των γλυκοζυλιώσεων της LPMO πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ειδικών, πληροφορικών εργαλείων, του NetNGlyc και του NetOGlyc. Ειδικότερα, καταχωρήθηκε η αλληλουχία του ενζύμου και προέκυψε ότι διαθέτει μόνο O-γλυκοζυλιώσεις. Υπάρχουν τέσσερις πιθανές θέσεις των O-γλυκοζυλιώσεων, όπως παρουσιάζεται παρακάτω:

```
      10      20      30      40      50      60
FEMKPFSLVA LATAVSGHAI FQRVSVNGQD QGQLKGV RAP  SSNSPIQNVN DAMMACNANI

      70      80      90     100     110     120
VYHDNTIIKV PAGRVRGAWW QHVIGGPRQGA NDPDNPIAAS HKGPIQVYLA KVDNAATASP

     130     140     150     160     170     180
SGLKWFKVAE RGLNNGVWAV DELIANNGWH YFDLPSCVAP GQYLMRVELL ALHSASSPGG

     190     200     210     220     230     240
AQFYMGCAQI EVTGSGTMSG SDFVSFPGAY SANDPGILLS IYDSSGKPNM GGRSYPPIGP

     250     260     270     280     290     300
RPISCSGSGG GGNNGDGGD DNNGGGNNG GGSVPLYGQC GGIGYTTCAQ GTCKVSNEY

SQCLPLE
```

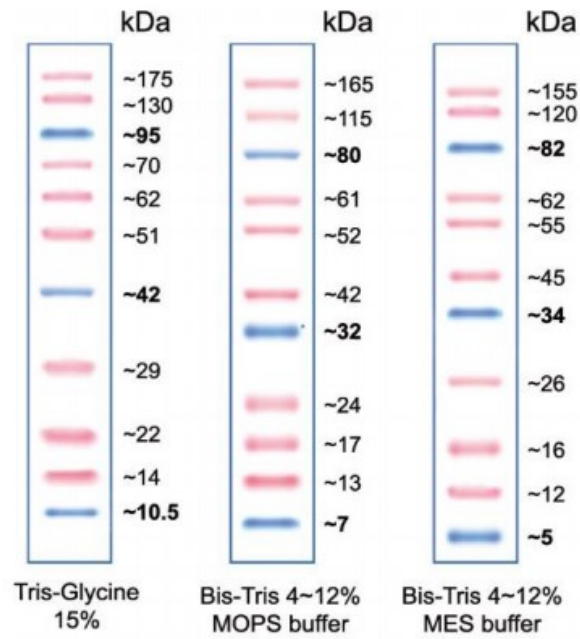
Εικόνα 28: Αλληλουχία ενζύμου LPMO

#seqname	source	feature	start	end	score	strand	frame	comment		
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	7	7	0.0332252	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	13	13	0.0326931	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	16	16	0.088808	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	25	25	0.07833	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	41	41	0.415817	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	42	42	0.34927	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	44	44	0.248187	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	66	66	0.0348882	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	100	100	0.311791	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	117	117	0.428904	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	119	119	0.251735	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	121	121	0.165499	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	156	156	0.0265118	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	174	174	0.0181363	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	176	176	0.0473027	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	177	177	0.0255262	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	193	193	0.108078	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	195	195	0.0287406	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	197	197	0.0823138	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	199	199	0.226172	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	201	201	0.259614	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	205	205	0.18659	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	211	211	0.141288	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	220	220	0.0399827	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	224	224	0.287658	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	225	225	0.140757	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	234	234	0.512194	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	244	244	0.670558	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	246	246	0.623303	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	248	248	0.636613	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	273	273	0.354287	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	286	286	0.354607	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	289	289	0.237369	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	290	290	0.184898	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	295	295	0.0556839	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	299	299	0.0962211	.	.	
SEQUENCE	netOG1yc	-4.0.0.13		CARBOHYD	304	304	0.0136331	.	.	

Εικόνα 29: Αποτελέσματα πληροφορικού εργαλείου, NetOG1yc

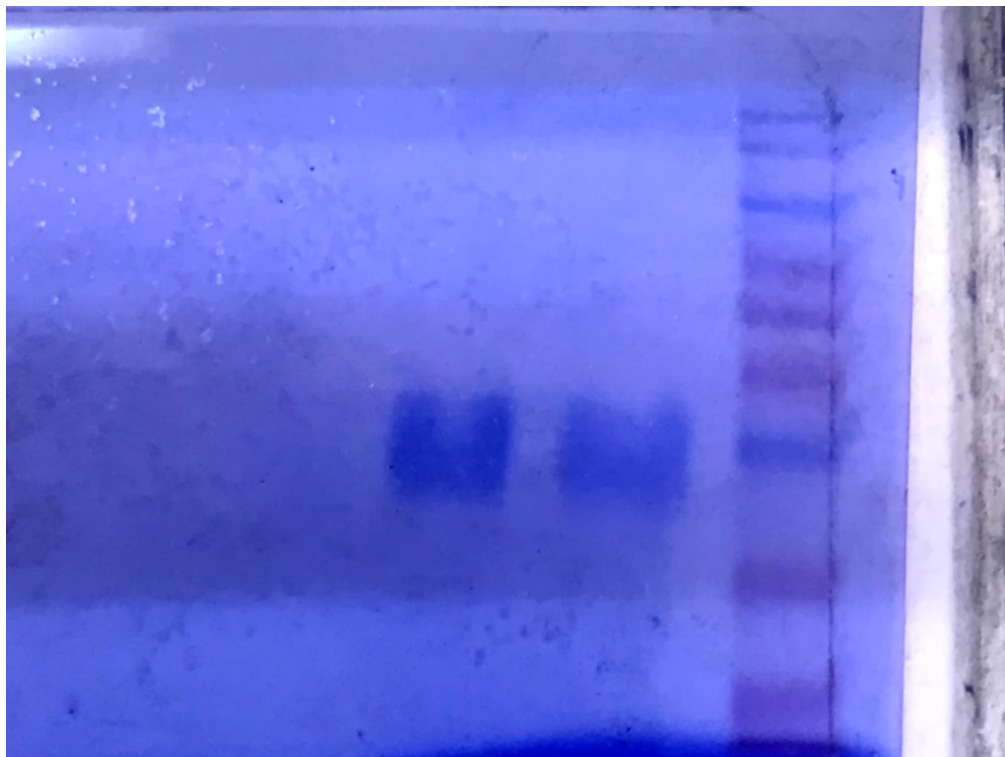
Προσδιορισμός του μεγέθους του ενζύμου LPMO

Κατά τη μελέτη του ενζύμου LPMO, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του μεγέθους του με τη μέθοδο της [ηλεκτροφόρησης](#). Για τον σκοπό αυτό, προηγήθηκε η αποδιάταξη της πρωτεΐνης και η [υδρόλυση των γλυκοζυλιώσεων](#). Η ηλεκτροφόρηση της LPMO εφαρμόστηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και χρησιμοποιήθηκε marker, δηλαδή πρότυπο δείγμα πρωτεΐνης. Ο marker σχηματίζει μία λωρίδα με χαρακτηριστικές διαγραμμίσεις για κάθε πρότυπο δείγμα γνωστού βάρους που περιέχει, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 30: Το εύρος των μεγεθών του Marker

Το ένζυμο και το πρότυπο δείγμα αρχίζουν την καθοδική πορεία τους στην πηκτική πολυακρυλαμιδίου υπό την επίδραση ρεύματος. Μετά το πέρας κάποιων ωρών, το πήκτωμα απομακρύνεται από την συσκευή ηλεκτροφόρησης, χρωματίζεται και την επόμενη ημέρα λαμβάνεται η παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 31: Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που φέρει το marker και δύο δείγματα πρωτεΐνης

Η σύγκριση του δείγματος της LPMO με το marker οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος μεταξύ των τιμών 29-42 kDa. Αυτό διαφαίνεται και στην εικόνα του χρωματισμένου πηκτώματος, όπου παρατηρείται μία ζώνη κοντά στην περιοχή αυτή.

Μελέτη πιθανών υποστρωμάτων δράσης της LPMO

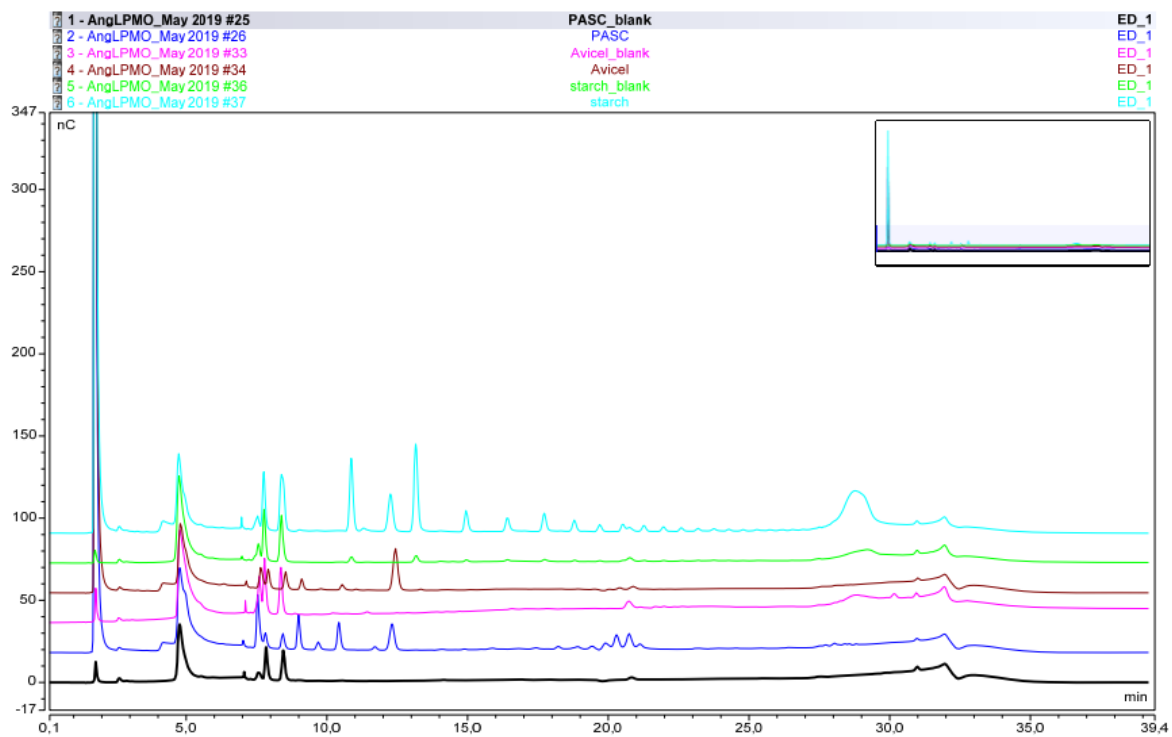
Στο πλαίσιο εξέτασης της δράσης του ενζύμου, πραγματοποιήθηκαν πειραματικές δοκιμές προκειμένου να προσδιοριστούν τα υποστρώματα με τα οποία αντιδρά η LPMO.

1^η δοκιμή

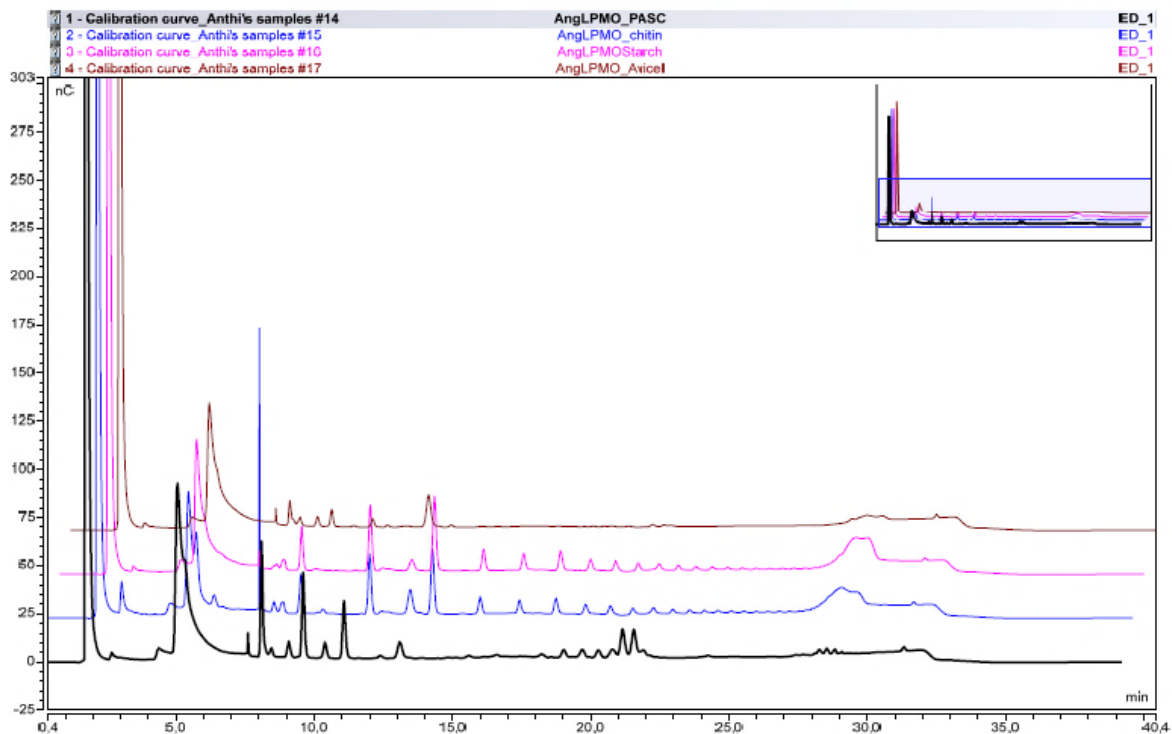
Αρχικά, τα υποστρώματα που μελετήθηκαν ήταν:

- Χιτίνη (chitin) συγκέντρωσης 1% w/v
- Άμυλο (starch) συγκέντρωσης 1% w/v
- Επεξεργασμένη κυτταρίνη με φωσφορικό οξύ (Pasc) συγκέντρωσης 5% w/v
- Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel) 1% w/v

Η εφαρμογή της χρωματογραφίας εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPAEC) διαμόρφωσε τα παρακάτω χρωματογραφήματα:



Εικόνα 32: Σύγκριση χρωματογραφήματων αντίδρασης ανίχνευσης ενεργότητας σε υποστρώματα Pasc, Avicel, αμύλου και των τυφλών δειγμάτων τους

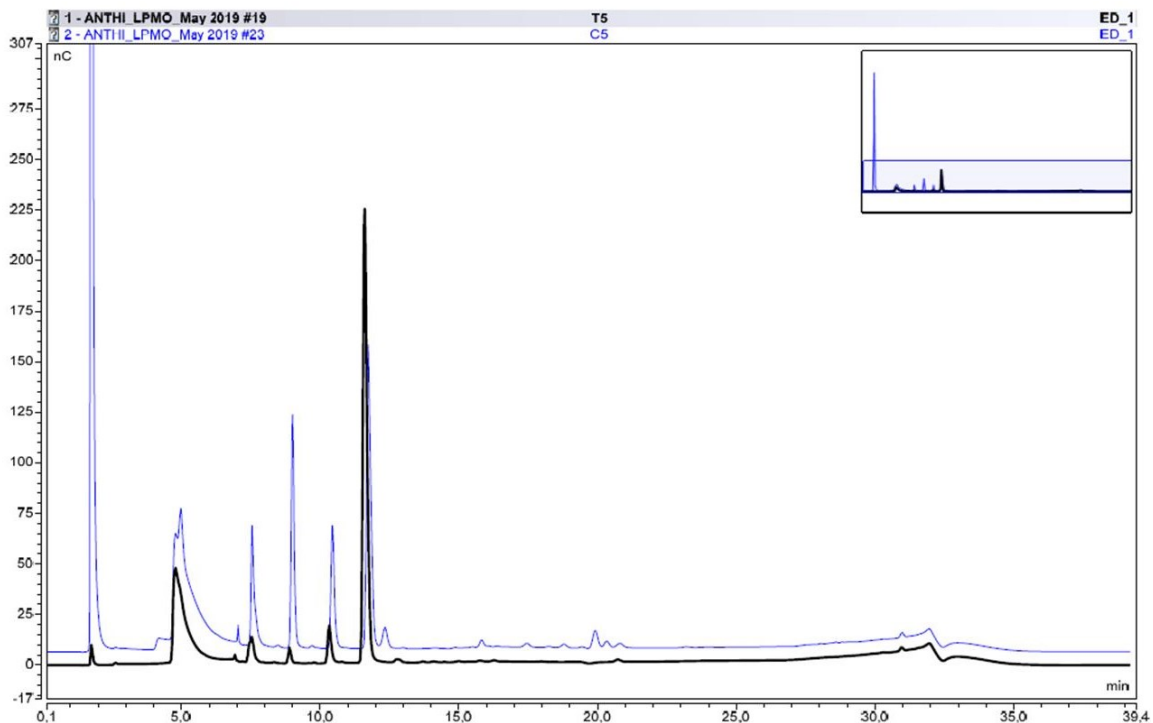


Εικόνα 33: Σύγκριση χρωματογραφημάτων αντίδρασης ανίχνευσης ενεργότητας σε υποστρώματα Pasc, χιτίνης, αμύλου και Avicel

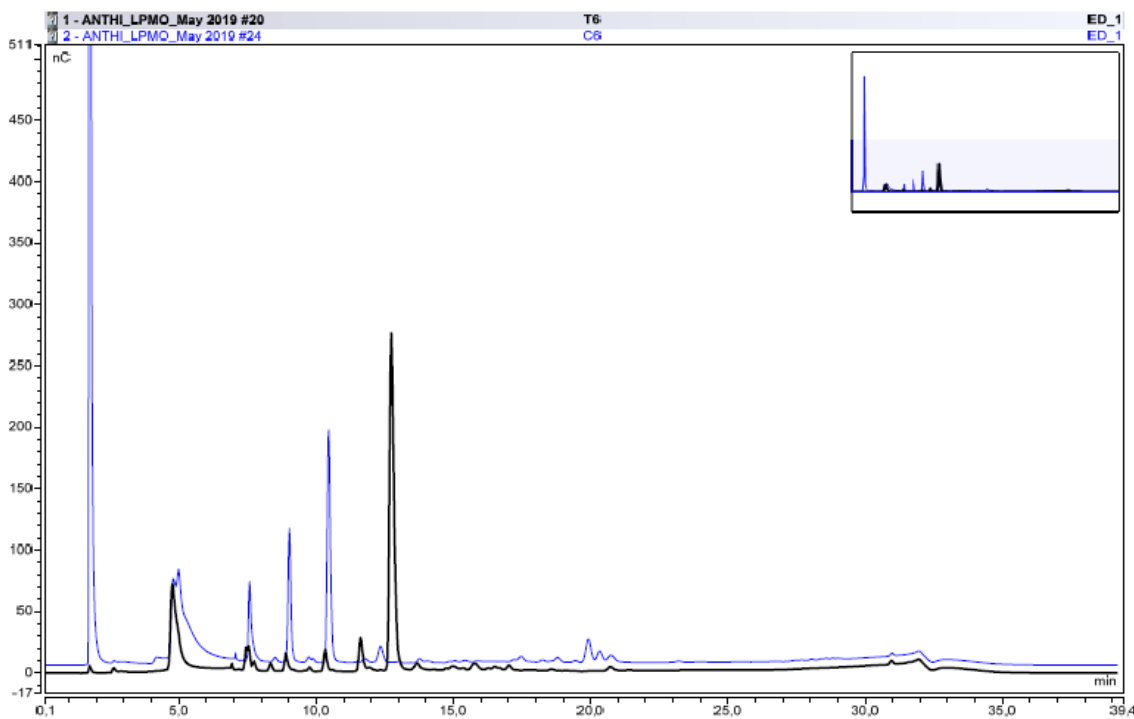
Κάθε κορυφή που εμφανίζεται στο γράφημα αντιστοιχεί σε κάποιο χημικό είδος, που προϋπήρχε στο δείγμα ή παράχθηκε χάρη στη δράση της LPMO. Συγκρίνοντας, λοιπόν, τα χρωματογραφήματα με τα τυφλά δείγματα, καθώς και μεταξύ τους παρατηρείται ότι η χιτίνη και το άμυλο εμφανίζουν τις περισσότερες κορυφές, έπειτα το Pasc και τέλος το Avicel.

2^η δοκιμή

Σε συνέχεια της μελέτης των πιθανών υποστρωμάτων δράσης της LPMO, διεξήχθησαν πειράματα ανίχνευσης ενεργότητας του ενζύμου σε τρεις ολιγοσακχαρίτες: β-D-κελλοτετραόζη, κελλοπενταόζη και κελλοεξαόζη.



Εικόνα 34: Σύγκριση χρωματογραφημάτων αντίδρασης ανίχνευσης ενεργότητας σε υπόστρωμα κελλοπενταόξης και του τυφλού δείγματος

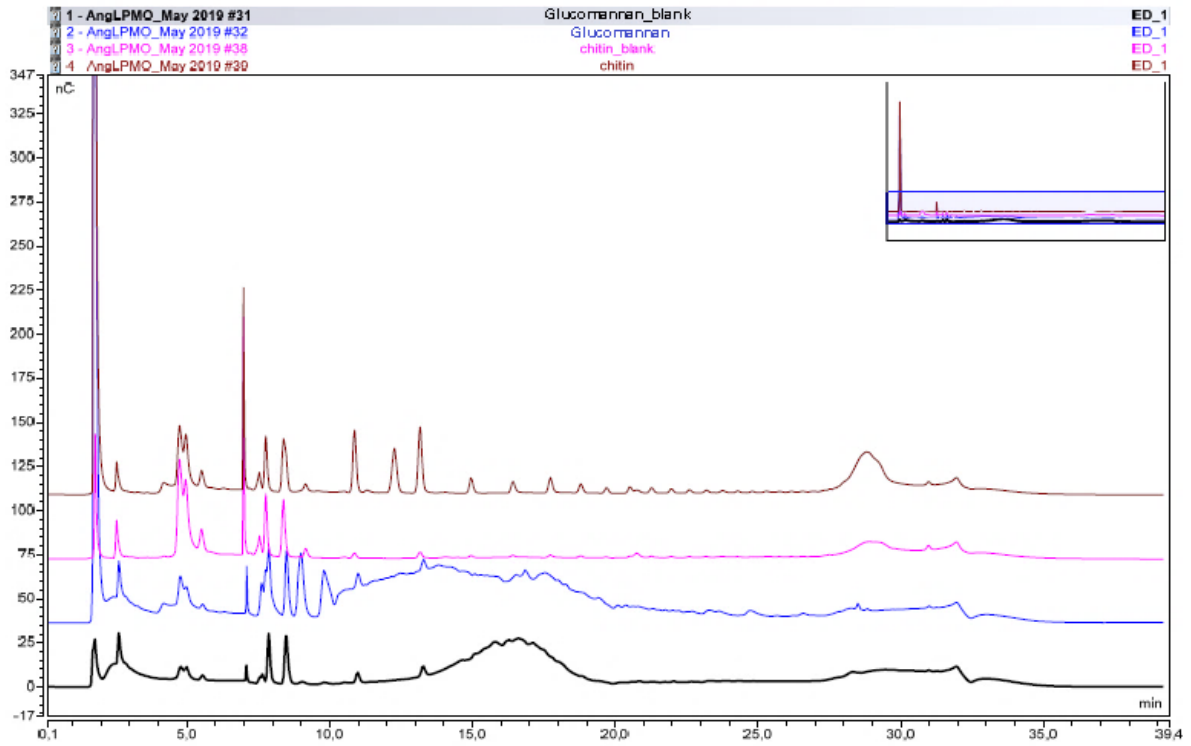


Εικόνα 35: Σύγκριση χρωματογραφημάτων αντίδρασης ανίχνευσης ενεργότητας σε υπόστρωμα κελλοεξαόζης και του τυφλού δείγματος

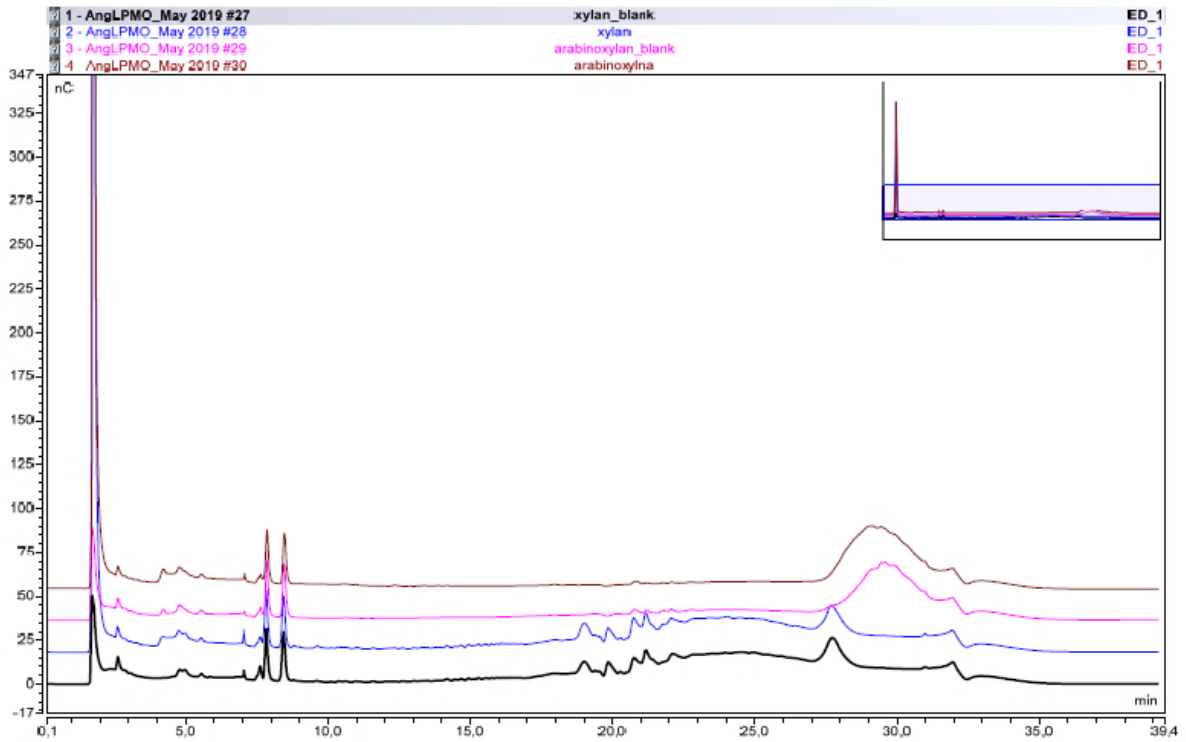
Αρχικά, να αναφερθεί ότι το χρωματογράφημα της β-D-κελλοτετραόζης που ελήφθη δεν ήταν κατάλληλο για μελέτη και γι' αυτόν το λόγο δεν παρουσιάζεται στην εργασία. Στη συνέχεια, συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα της κελλοπενταόζης και της κελλοεξαόζης με τα αντίστοιχα των τυφλών τους δειγμάτων, διακρίνονται επιπλέον κορυφές και στις δύο περιπτώσεις, που μπορούν να αποδοθούν στη δράση της LPMO.

3^η δοκιμή

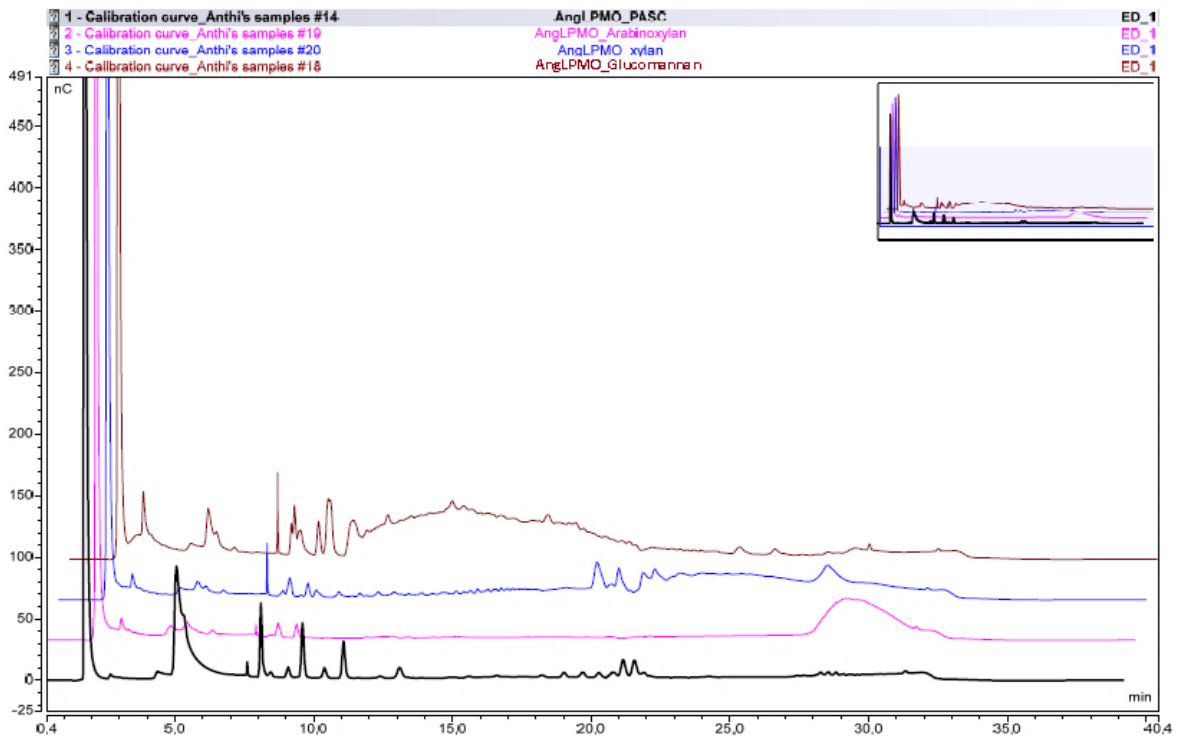
Μελετήθηκε η δράση της LPMO στα ακόλουθα υποστρώματα: γλυκομαννάνη, ξυλάνη και αραβινοξυλάνη. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την χρωματογραφία εναλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης των δειγμάτων αυτών παρουσιάζονται παρακάτω:



Εικόνα 36: Σύγκριση χρωματογραφημάτων αντίδρασης ανίχνευσης ενεργότητας σε υποστρώματα γλυκομαννάνης, χιτίνης και των τυφλών τους δειγμάτων



Εικόνα 37: Σύγκριση χρωματογραφημάτων αντίδρασης ανίχνευσης ενεργότητας σε υποστρώματα ξυλάνης, αραβινοξυλάνης και των τυφλών τους δειγμάτων



Εικόνα 38: Σύγκριση χρωματογραφημάτων Pasc, αραβινοξυλάνης, ξυλάνης και γλυκομαννάνης

Η σύγκριση των χρωματογραφημάτων των διαλυμάτων που φέρουν το ένζυμο με εκείνα των τυφλών δειγμάτων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η LPMO δεν παρουσιάζει καμία ενεργότητα στην περίπτωση της ξυλάνης και της αραβινοξυλάνης. Σχετικά με τη γλυκομαννάνη, υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ των δύο χρωματογραφημάτων, η οποία όμως θα μπορούσε να αποδοθεί και σε κάποια αστοχία κατά την εισαγωγή του δείγματος στον χρωματογράφο.

Ανίχνευση ύπαρξης συνεργισισμού μεταξύ της LPMO και άλλων ενζύμων

Κατά την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας, εξετάστηκε η ύπαρξη συνεργισισμού μεταξύ της LPMO και άλλων πρωτεϊνών.

1^η δοκιμή

Σε [πρώτο επίπεδο](#), το ένζυμο συνδυάστηκε με εξωγλουκανάση (CBH) και τις ενδογλουκανάσες (EG5) και (EG7), όπως έχει περιγραφεί στο πειραματικό μέρος.

Πίνακας 29: Συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων των δειγμάτων

Δείγμα	Συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων (g/L)
LPMO-EG5	1.40
LPMO-CBH	1.39
LPMO-EG7	1.58
Control 1 (EG5)	1.45
Control 2 (CBH)	1.15
Control 3 (EG7)	1.52
LPMO	0.12

Η ύπαρξη συνεργισισμού μπορεί να ανιχνευτεί συγκρίνοντας τα δείγματα που φέρουν μόνο τις κυτταρινάσες με τα αντίστοιχα που περιέχουν και την LPMO. Ειδικότερα, στις περιπτώσεις συνδυασμού της LPMO με την εξωγλουκανάση (CBH) και την ενδογλουκανάση (EG7), παρατηρείται αύξηση των αναγωγικών σακχάρων που παρήχθησαν, επιβεβαιώνοντας τον ενζυμικό συνεργισισμό. Ωστόσο, δεν σημειώνεται κάποια μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων που προέκυψαν από τη δράση

της ενδογλουκανάσης (EG5) και του συνδυασμού της με την LPMO. Συνεπώς, είτε δεν υφίσταται συνεργισμός σε αυτήν την περίπτωση, είτε έχει γίνει κάποια αστοχία κατά την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας.

2^η δοκιμή

Σε [δεύτερο επίπεδο](#), μελετήθηκε ξανά η ύπαρξη συνεργισμού, εστιάζοντας όμως στο συνδυασμό της πρωτεΐνης με την ενδογλουκανάση (EG5) και μεταβάλλοντας την ποσότητα της LPMO που προστίθεται, κάθε φορά. Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης των δειγμάτων στα 540 nm παρουσιάζονται ακολούθως:

Πίνακας 30: Συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων των δειγμάτων

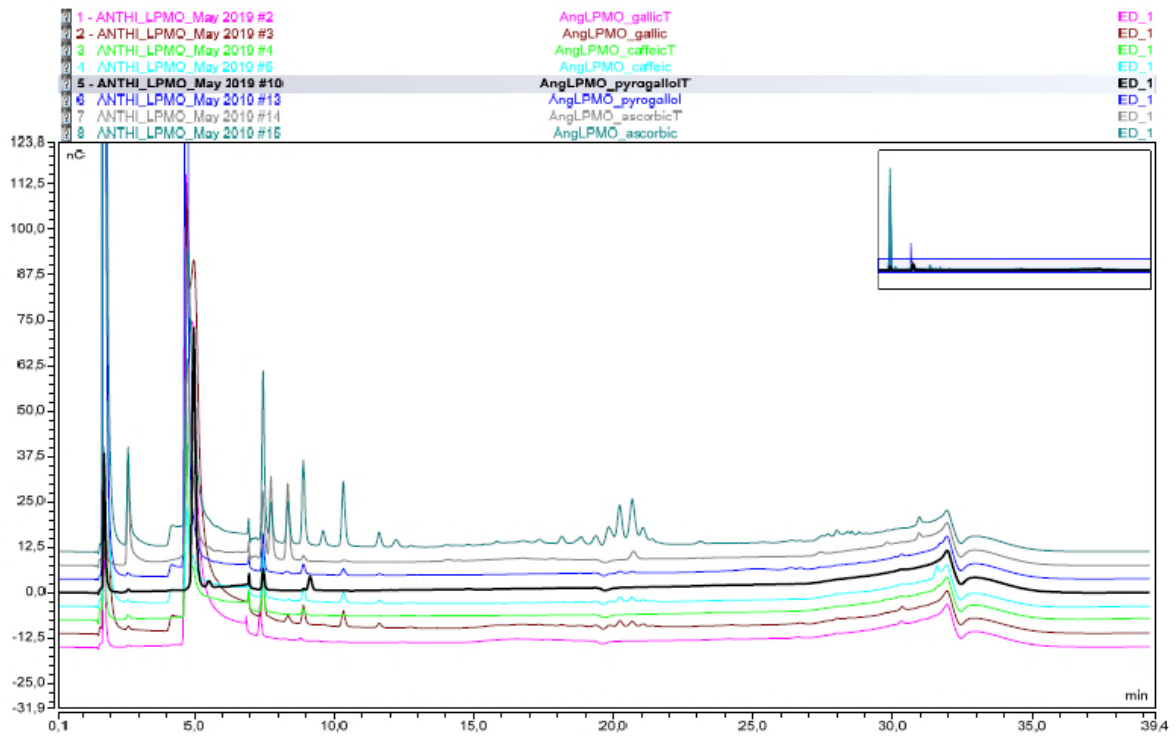
Δείγμα	Συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων (g/L)
20 μL LPMO – 50 μL EG5	1.72
30 μL LPMO – 50 μL EG5	1.76
50 μL EG5	1.04
20 μL LPMO	0.19
30 μL LPMO	0.26

Παρατηρώντας την συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων, διακρίνεται μία μικρή αύξηση στην απελευθέρωση τους, όταν προστίθεται μεγαλύτερη ποσότητα της LPMO και διατηρείται σταθερή η ενδογλουκανάση (EG5). Μάλιστα, συγκρίνοντας τις τιμές αυτές με εκείνες που έχουν σημειωθεί για τα δείγματα που περιέχουν ξεχωριστά την EG5 και την LPMO, φαίνεται ότι υπάρχει συνεργισμός μεταξύ των δύο ενζύμων κι ότι πιθανώς το αποτέλεσμα της πρώτης δοκιμής να οφείλεται σε κάποια λανθασμένη εκτέλεση της διαδικασίας.

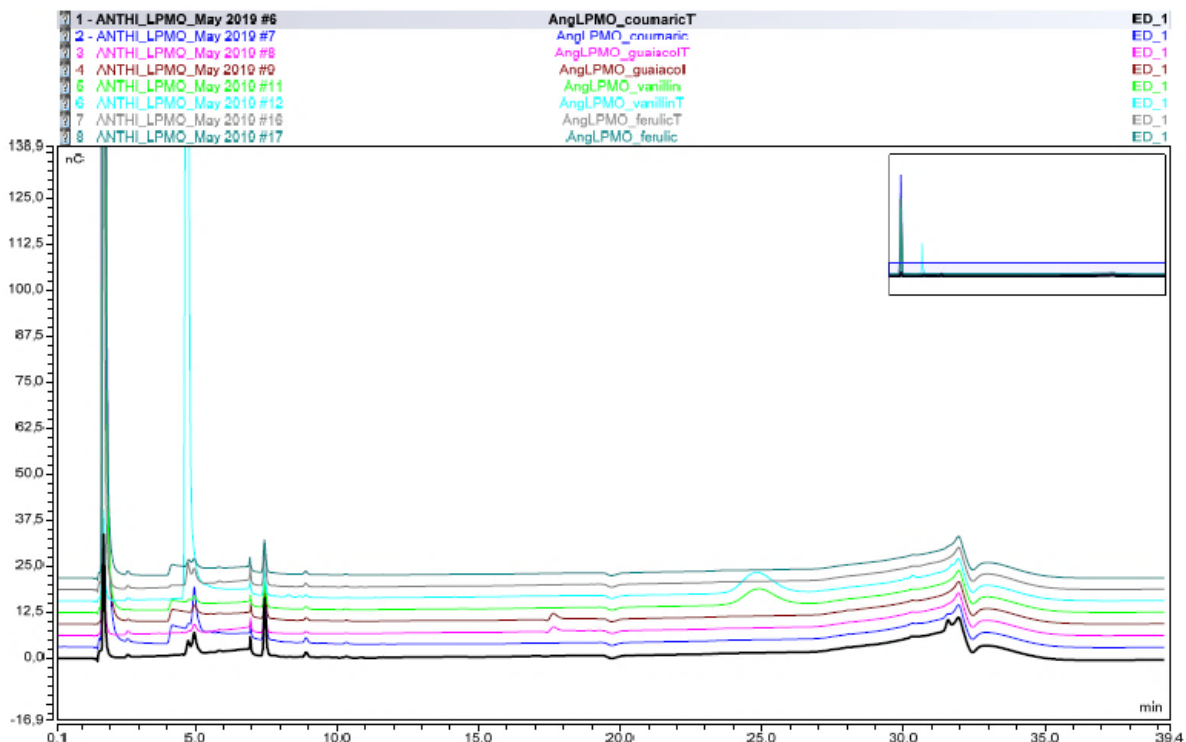
Εξέταση των πιθανών δοτών ηλεκτρονίων

Στο πλαίσιο χαρακτηρισμού της LPMO, μελετήθηκε μία σειρά αντιδραστηρίων για την [ενδεχόμενη λειτουργία τους ως δότες ηλεκτρονίων](#). Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν τα: καφεϊκό οξύ (caffeic acid), βανιλίνη (vanillin), πυρογαλόλη (pyrogallol), γουαϊκόλη (guaiacol), γαλλικό οξύ (gallic acid), κουμαρικό οξύ (coumaric acid), φερουλικό οξύ

(ferullic acid) και ασκορβικό οξύ (ascorbic acid). Παρουσιάζονται παρακάτω τα χρωματογραφήματα που παρελήφθησαν με εφαρμογή της μεθόδου ΗΡΑΕC:



Εικόνα 39: Σύγκριση χρωματογραφήματων δοτών ηλεκτρονίων και των τυφλών δειγμάτων τους



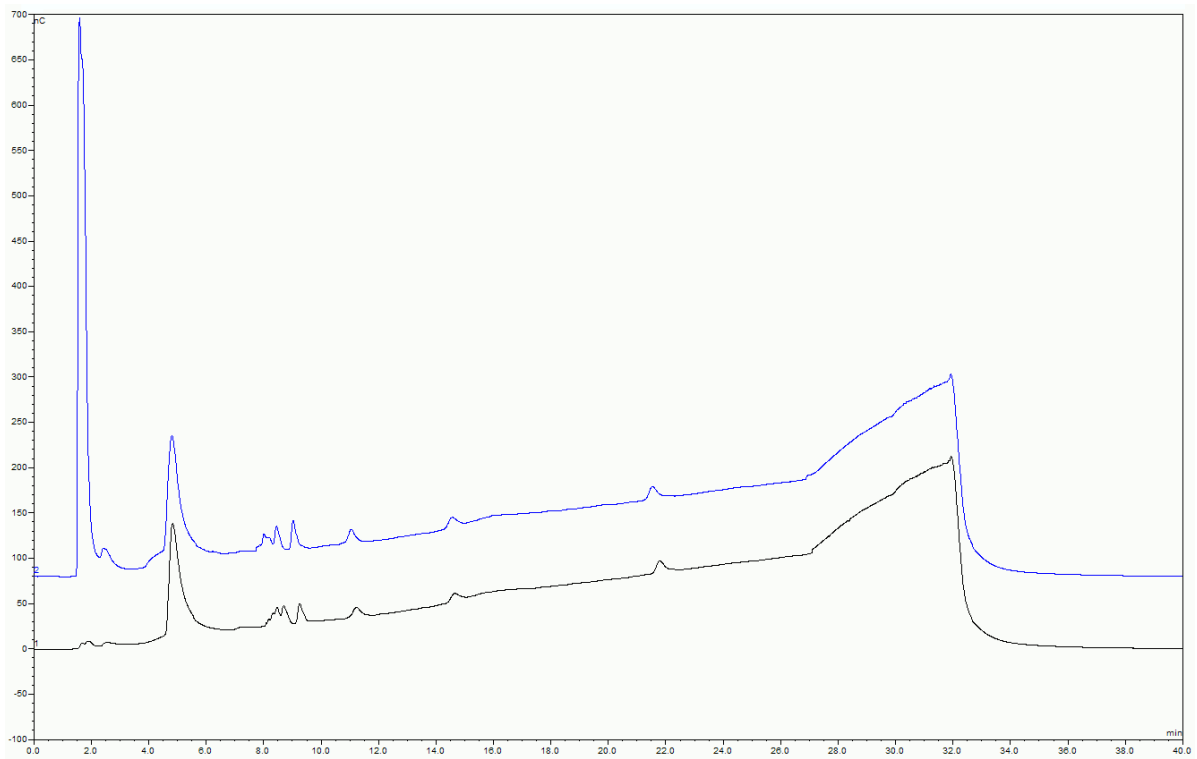
Εικόνα 40: Σύγκριση χρωματογραφήματων δοτών ηλεκτρονίων και των τυφλών δειγμάτων τους

Παρατηρώντας τα παραπάνω χρωματογραφήματα γίνεται αντιληπτό ότι μεγάλη ενεργότητα του ενζύμου σημειώνεται όταν έχει ως δότη ηλεκτρονίων το ασκορβικό οξύ και περιορισμένη στις περιπτώσεις του γαλλικού και καφεϊκού οξέος. Αντιθέτως, καμία δράση δεν εμφανίστηκε για τα υπόλοιπα αντιδραστήρια: βανιλίνη, πυρογαλόλη, γουαϊκόλη, κουμαρικό και φερουλικό οξύ.

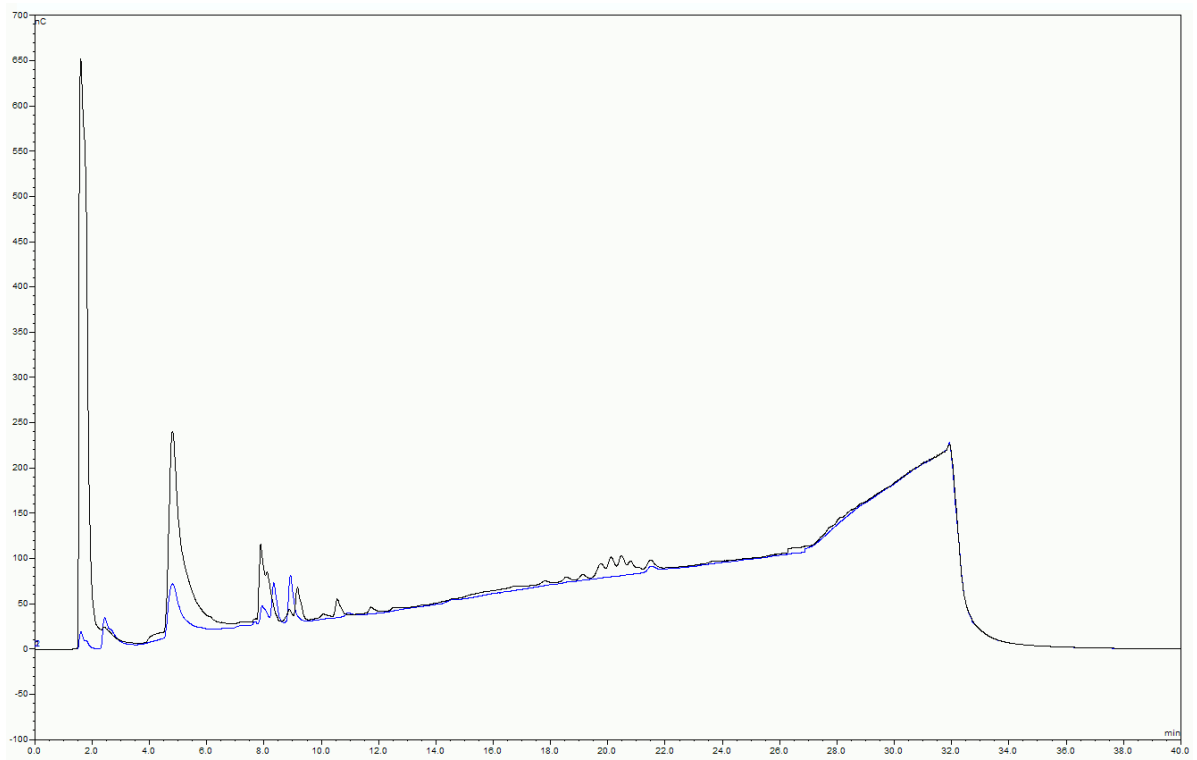
Εντοπισμός της βέλτιστης τιμής pH

1^η δοκιμή

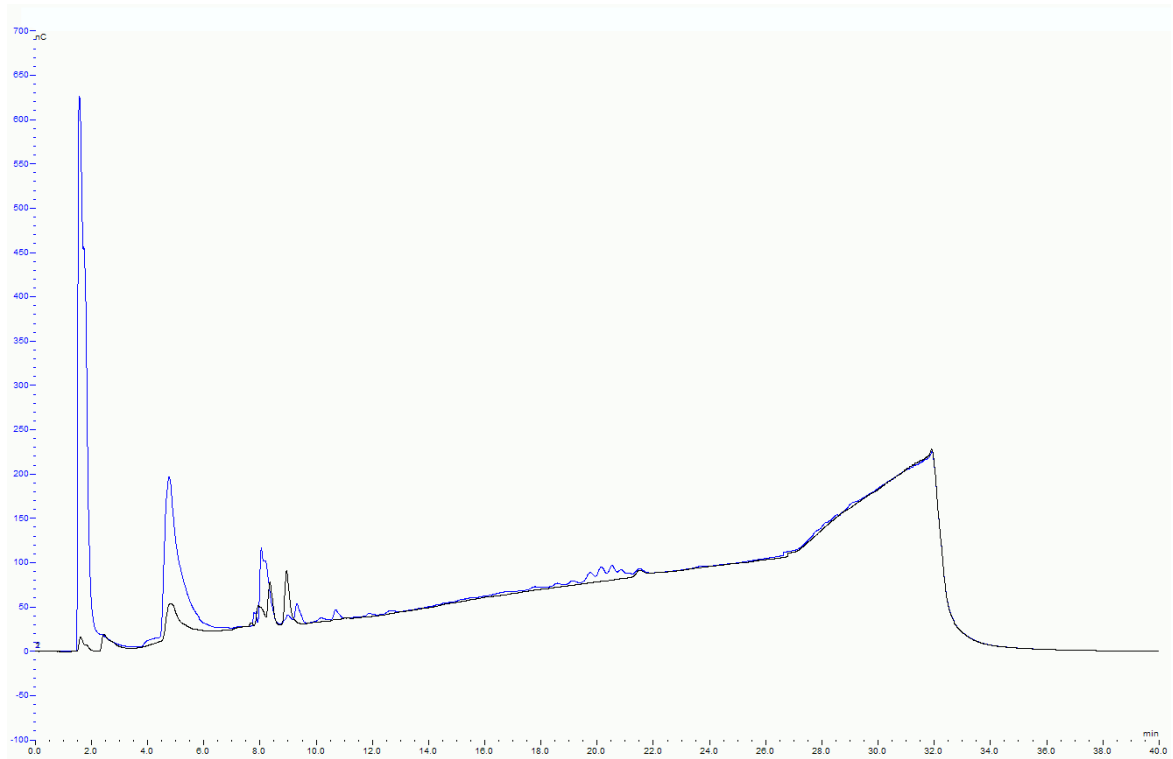
Κατά τη διαδικασία ελέγχου της δράσης της LPMO, αναζητήθηκε η [βέλτιστη τιμή pH](#), στην οποία λειτουργεί καλύτερα το ένζυμο. Ειδικότερα, δημιουργήθηκαν διαλύματα με εύρος τιμών pH 3-7, υπόστρωμα Pasc και δότη ηλεκτρονίων το ασκορβικό οξύ, τα οποία μετά την επώαση τους, εισήχθησαν στη συσκευή Dionex ώστε να ανιχνευθούν οι ολιγοσακχαρίτες που προέκυψαν, με τη μέθοδο HPAEC:



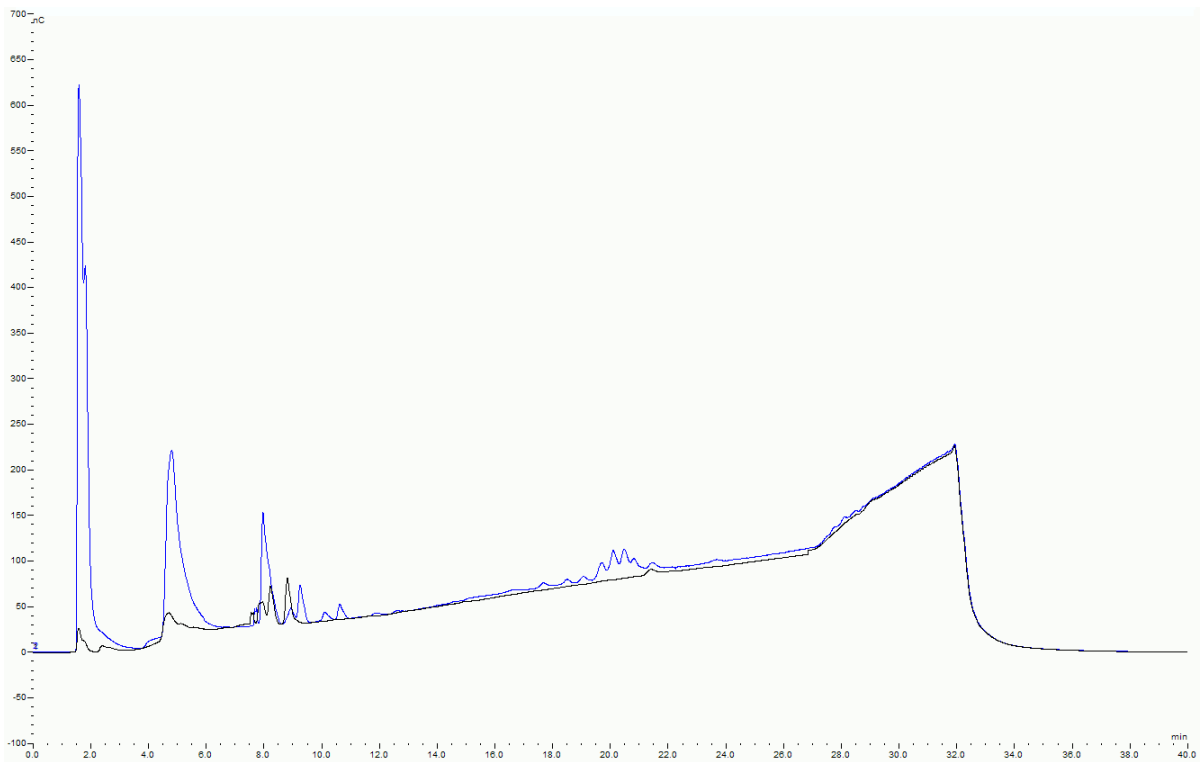
Εικόνα 41: Σύγκριση χρωματογραφημάτων διαλύματος με pH=3 και του τυφλού δείγματος (μαύρο)



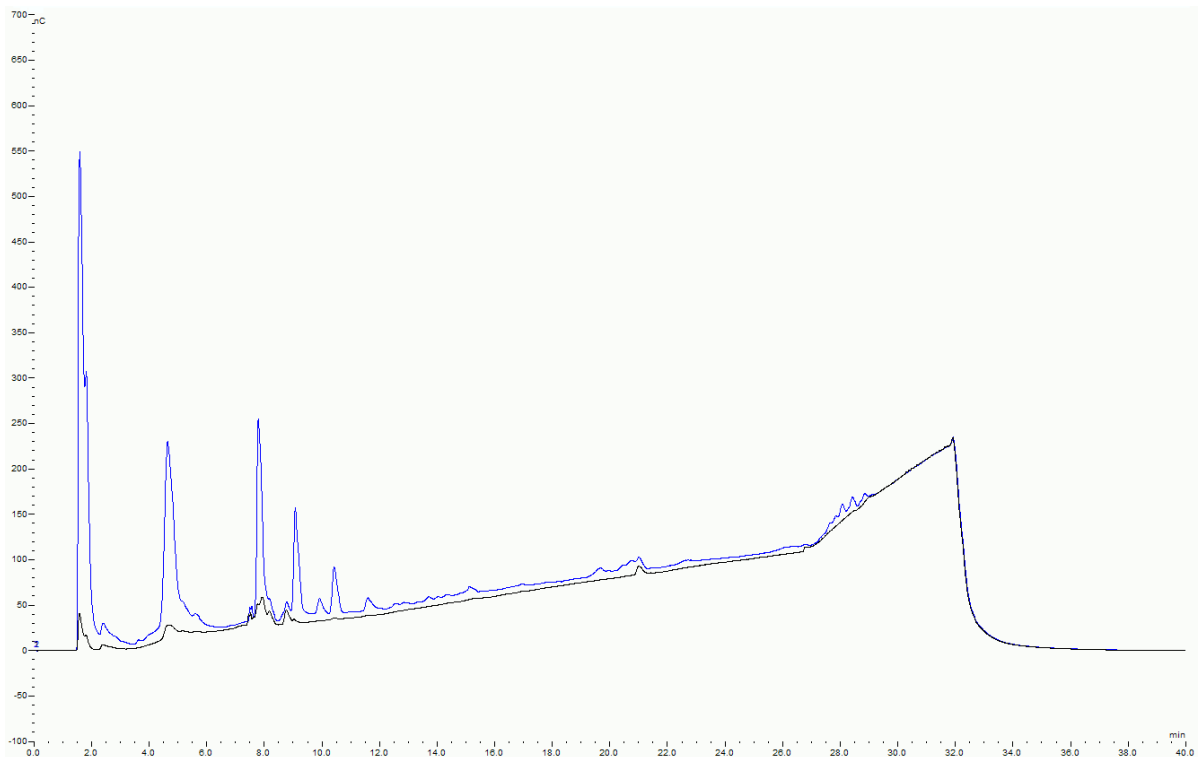
Εικόνα 42: Σύγκριση χρωματογραφημάτων διαλύματος με pH=4 και του τυφλού δείγματος (μπλε)



Εικόνα 43: Σύγκριση χρωματογραφημάτων διαλύματος με pH=5 και του τυφλού δείγματος (μαύρο)



Εικόνα 44: Σύγκριση χρωματογραφημάτων διαλύματος με pH=6 και του τυφλού δείγματος (μαύρο)

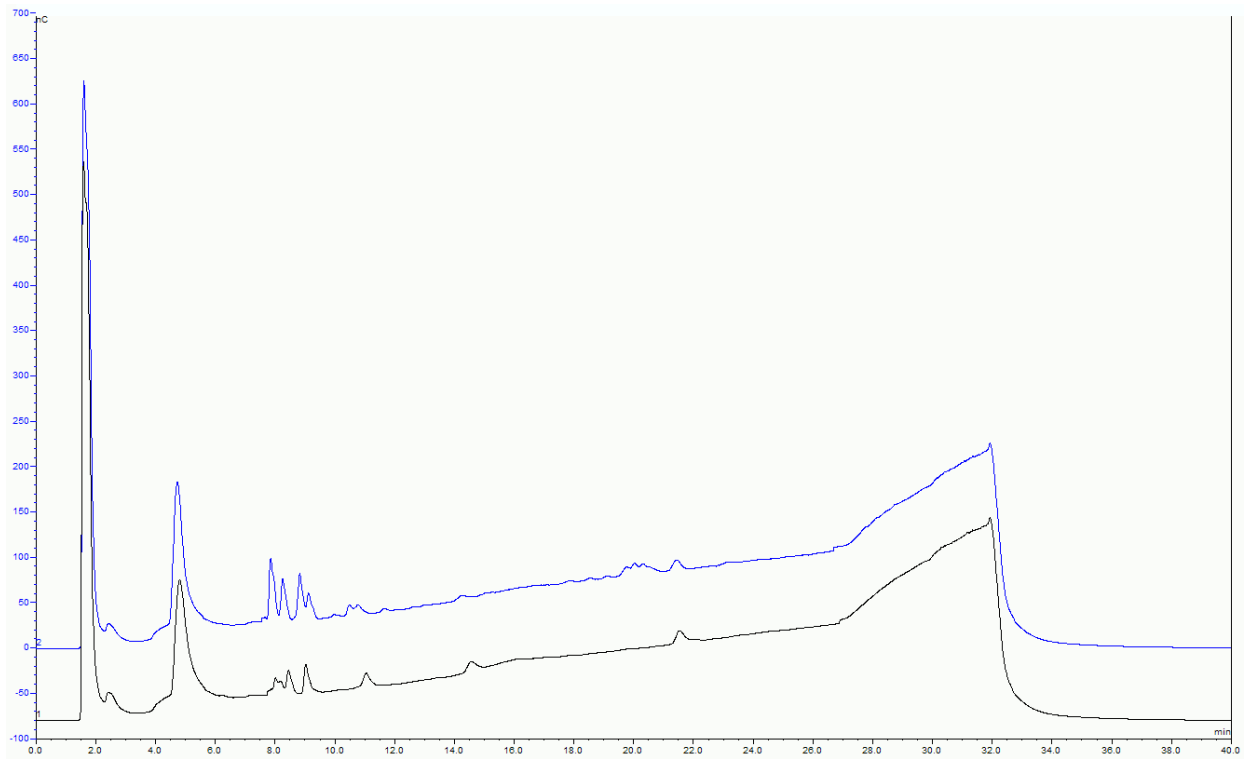


Εικόνα 45: Σύγκριση χρωματογραφημάτων διαλύματος με pH=7 και του τυφλού δείγματος (μαύρο)

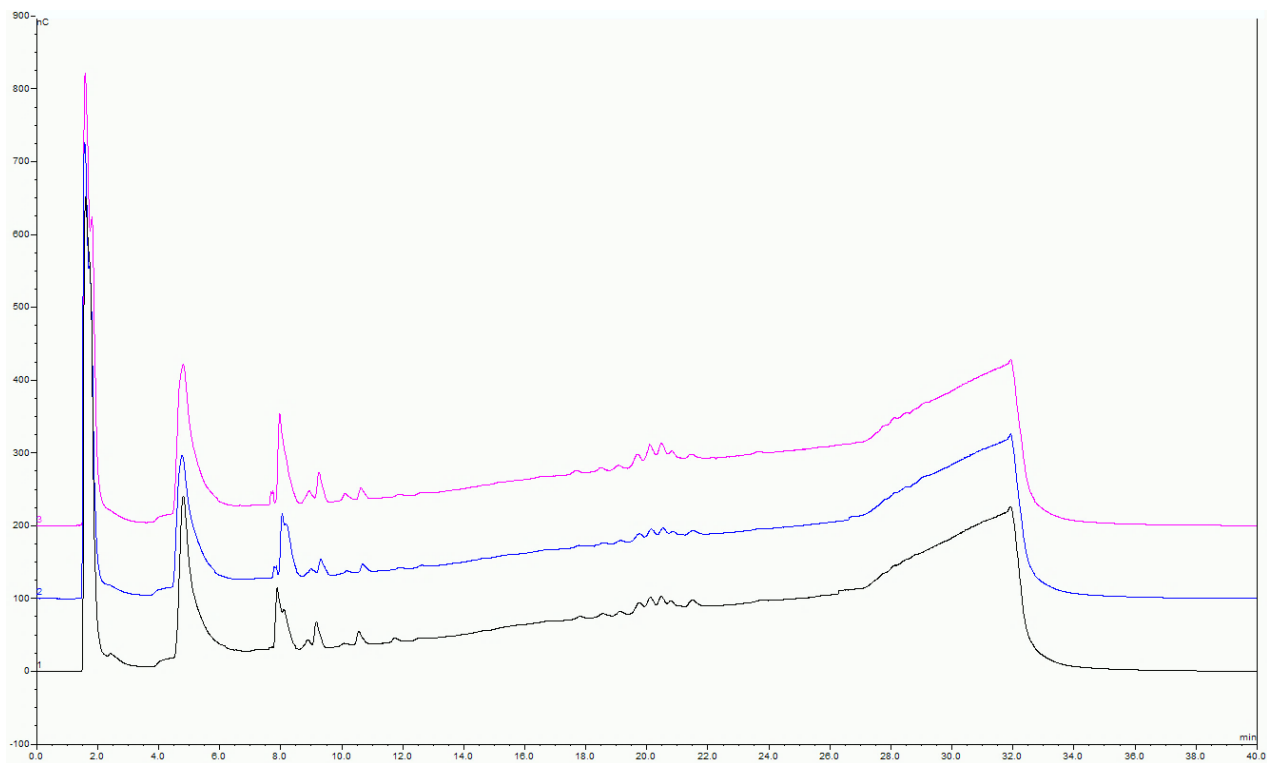
Από τα πειράματα που διεξήχθησαν προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη τιμή pH για τη δράση της LPMO, παρατηρείται ότι δεν υπάρχει κάποια μεταβολή για pH=3 μεταξύ των χρωματογραφημάτων του δείγματος που περιείχε το ένζυμο και του τυφλού. Κορυφές που υποδηλώνουν την παραγωγή ολιγοσακχαριτών έχουν εντοπιστεί στο εύρος pH=4-7, με τις πιο έντονες κορυφές να εμφανίζονται στις τιμές 6 και 7.

2^η δοκιμή

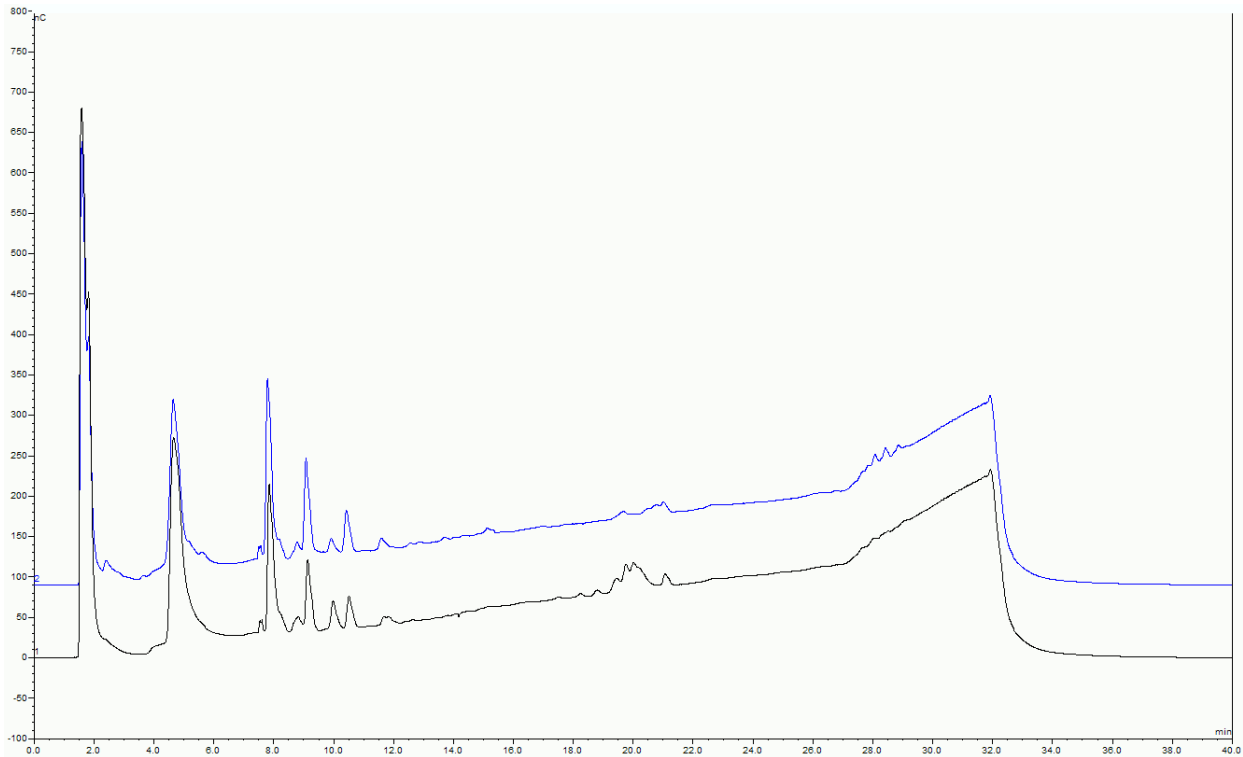
Ακολουθεί μία σύγκριση των χρωματογραφημάτων, διαλυμάτων παρόμοιας σύστασης, αλλά με διαφορετικές τιμές pH. Αναλυτικότερα, παρουσιάζεται το διάλυμα Citrate Phosphate με τιμές pH 3 και 4, το Sodium Acetate με pH 4, 5 και 6, καθώς και το Sodium Phosphate με τιμές 6, 7 και 8. Το υπόστρωμα είναι το Pasc και ο δότης ηλεκτρονίων το ασκορβικό οξύ.



Εικόνα 46: Σύγκριση χρωματογραφημάτων διαλύματος Citrate Phosphate με pH 3 (μαύρο) και 4 (μπλε)



Εικόνα 47: Σύγκριση χρωματογραφημάτων διαλύματος Sodium Acetate με pH 4 (μαύρο), 5 (μπλε) και 6 (ροζ)



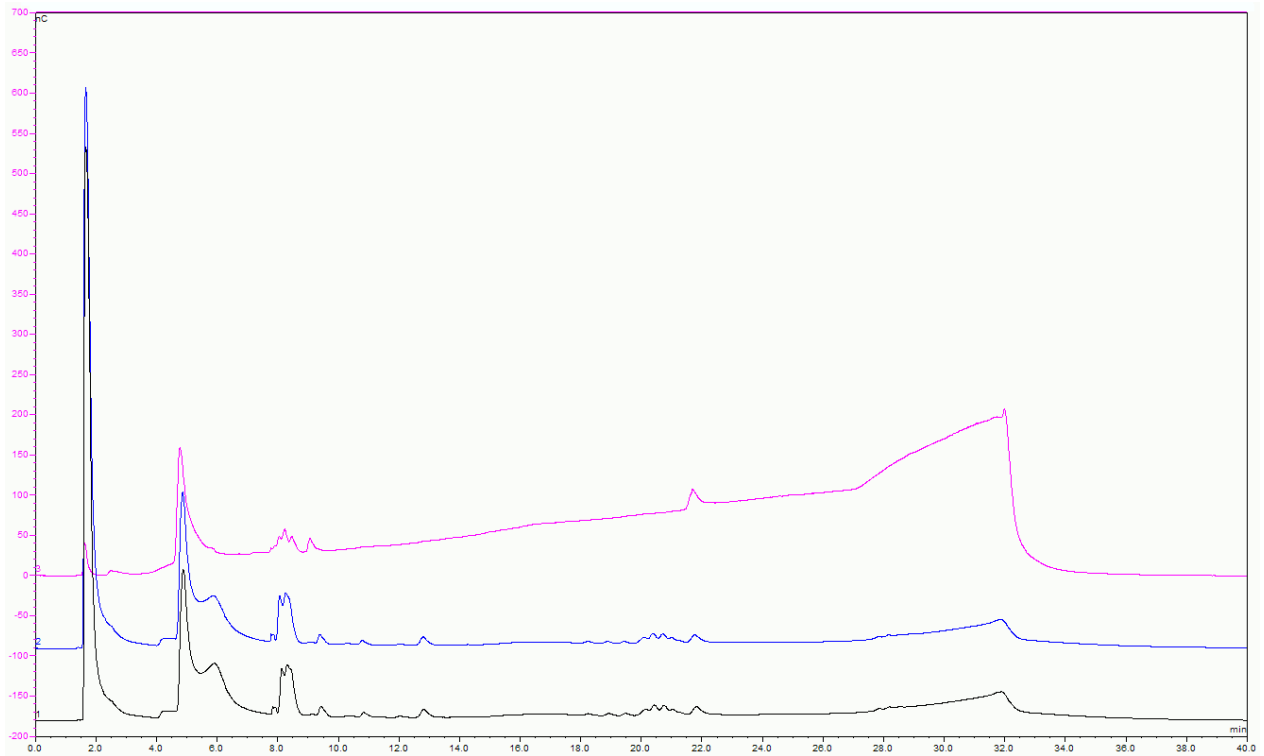
Εικόνα 48: Σύγκριση χρωματογραφημάτων διαλύματος Sodium Phosphate με pH 6 (μαύρο) και 7 (μπλε)

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρείται ότι το χρωματογράφημα του διαλύματος Citrate Phosphate με τιμή pH=4 εμφανίζει περισσότερες κορυφές συγκριτικά με το αντίστοιχο για pH=3. Παράλληλα, στην περίπτωση του Sodium Acetate, τα διαγράμματα των τιμών 4 και 5 είναι ίδια μεταξύ τους, ενώ ελάχιστη μεταβολή παρουσιάζεται για pH=6. Τέλος, για το διάλυμα Sodium Phosphate εμφανίζονται παρόμοιες κορυφές για τους πρώτους χρόνους έκλουσης, στα χρωματογραφήματα για pH 6 και 7. Ωστόσο, υπάρχουν και ορισμένες διαφορές μεταξύ τους που οφείλονται στην ενισχυμένη παραγωγή κάποιων προϊόντων. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του pH=6, διακρίνονται κάποιες κορυφές προς τη μέση του διαγράμματος ενώ για pH=7 προς το τέλος του.

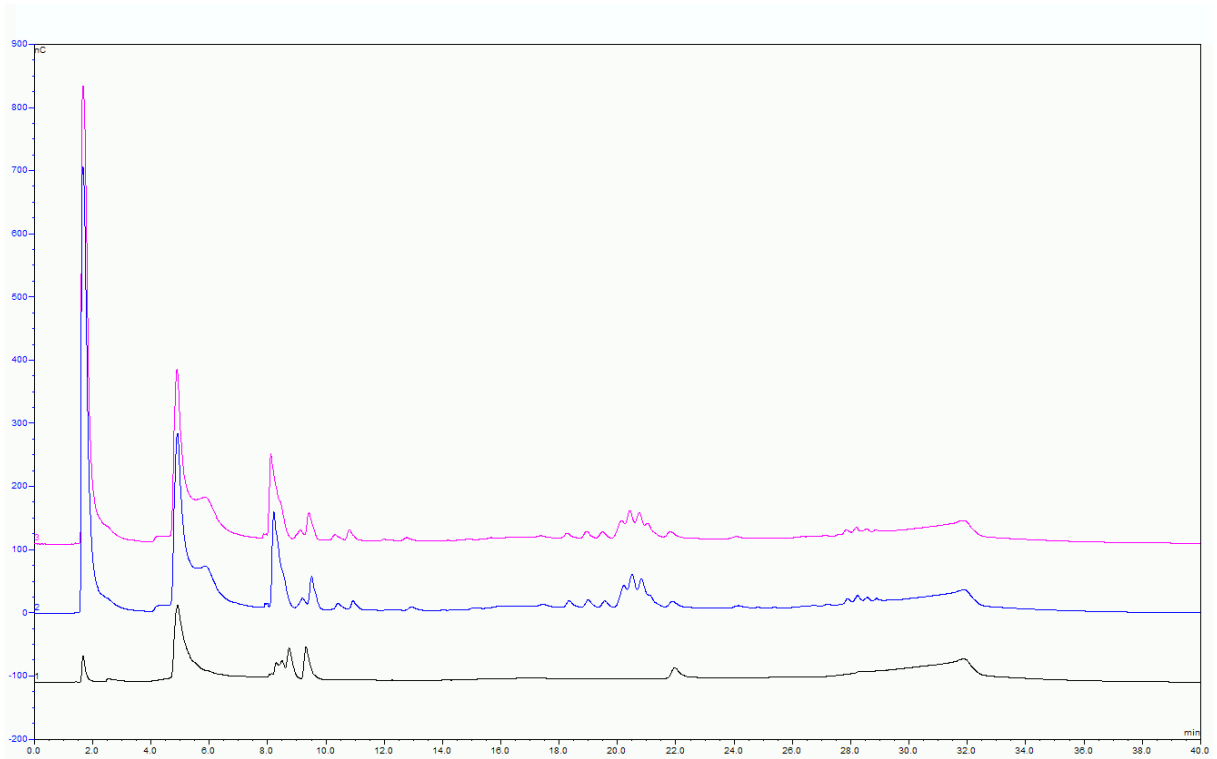
Καθορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας

Στο πλαίσιο χαρακτηρισμού της LPMO, έλαβαν χώρα πειραματικές δοκιμές προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου. Τα δείγματα που δημιουργήθηκαν επώαστηκαν ανά δύο σε θερμοκρασίες 40°C, 50°C, 60°C και

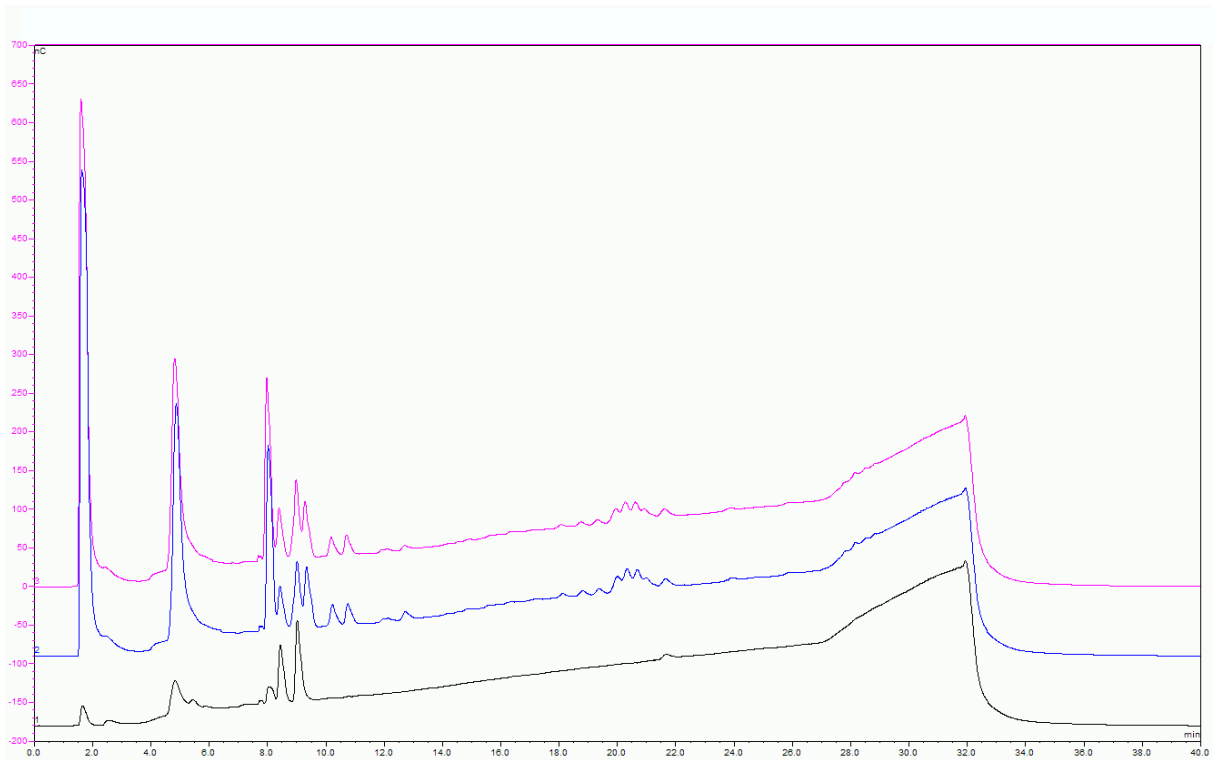
70°C, αντίστοιχα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των ολιγοσακχαριτών που προέκυψαν με τη μέθοδο ΗΡΑΕC.



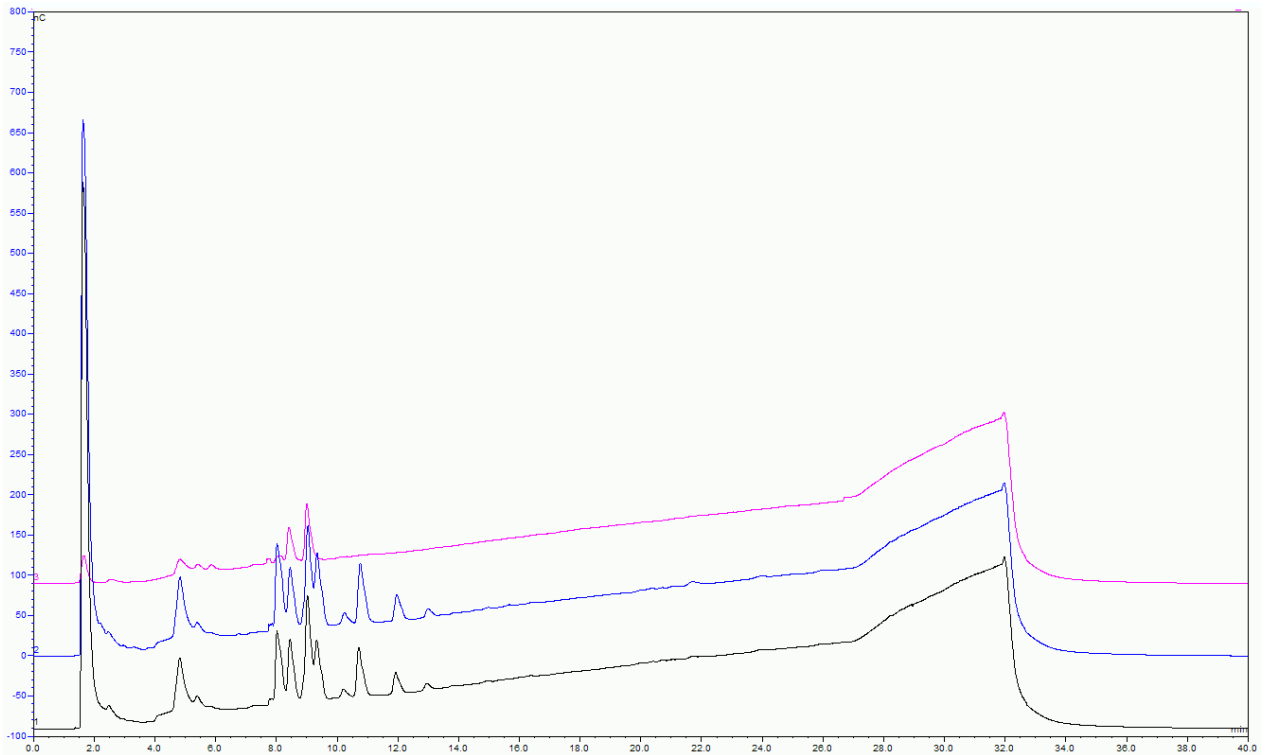
Εικόνα 49: Σύγκριση χρωματογραφημάτων δειγμάτων και τυφλού διαλύματος (ροζ) για T=40°C



Εικόνα 50: Σύγκριση χρωματογραφήματων δειγμάτων και τυφλού διαλύματος (μαύρο) για T=50°C

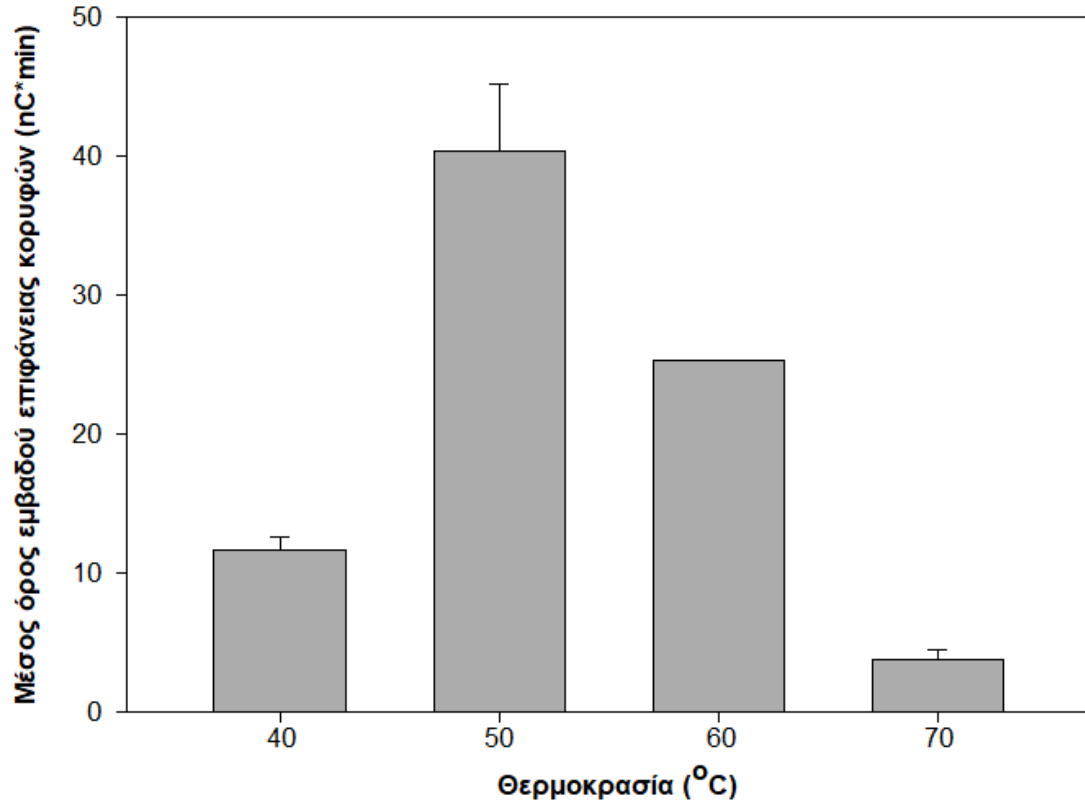


Εικόνα 51: Σύγκριση χρωματογραφήματων δειγμάτων και τυφλού διαλύματος (μαύρο) για T=60°C



Εικόνα 52: Σύγκριση χρωματογραφημάτων δειγμάτων και τυφλού διαλύματος (ροζ) για $T=70^{\circ}\text{C}$

Εκτός των χρωματογραφημάτων, υπολογίστηκε και το εμβαδόν των κορυφών που εμφανίζονται στο διάστημα 18-22 min των χρόνων έκλουσης, καθώς είναι μία ένδειξη της συγκέντρωσης των οξειδωμένων ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου.



Εικόνα 53: Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης των οξειδωμένων ολιγοσακχαριτών συναρτήσει της θερμοκρασίας

Εκτελώντας τα πειράματα για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου κι έπειτα παρατηρώντας τα χρωματογραφήματα, συμπεραίνεται ότι το πιο δυσχερές περιβάλλον είναι στους 70°C. Ειδικότερα, στην συγκεκριμένη θερμοκρασία παρατηρούνται μικρότερου εύρους κορυφές, συγκεντρωμένες στους πρώτους χρόνους της εφαρμογής της χρωματογραφίας. Το γεγονός αυτό συνδέεται άρρηκτα με τη μειωμένη παραγωγή των οξειδωμένων ολιγοσακχαριτών. Ακολουθούν οι 40°C, στους οποίους σημειώνεται σχετικά χαμηλή συγκέντρωση οξειδωμένων σακχάρων. Έπειτα, κατατάσσονται οι 60°C όπου εμφανίζουν αρκετά εντονότερη σύνθεση ολιγοσακχαριτών, τόσο στους πρώτους χρόνους της μεθόδου, όσο και μεταγενέστερα. Τέλος, η θερμοκρασία των 50°C χαρακτηρίζεται από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σακχάρων, σε χρονικό διάστημα, αρκετά μεγάλου εύρους.

Καλλιέργειες *Cryptocodinium cohnii* – Παραγωγή DHA

Υδρόλυση Avicel – Υγρή καλλιέργεια και παραγωγή λιπαρών οξέων

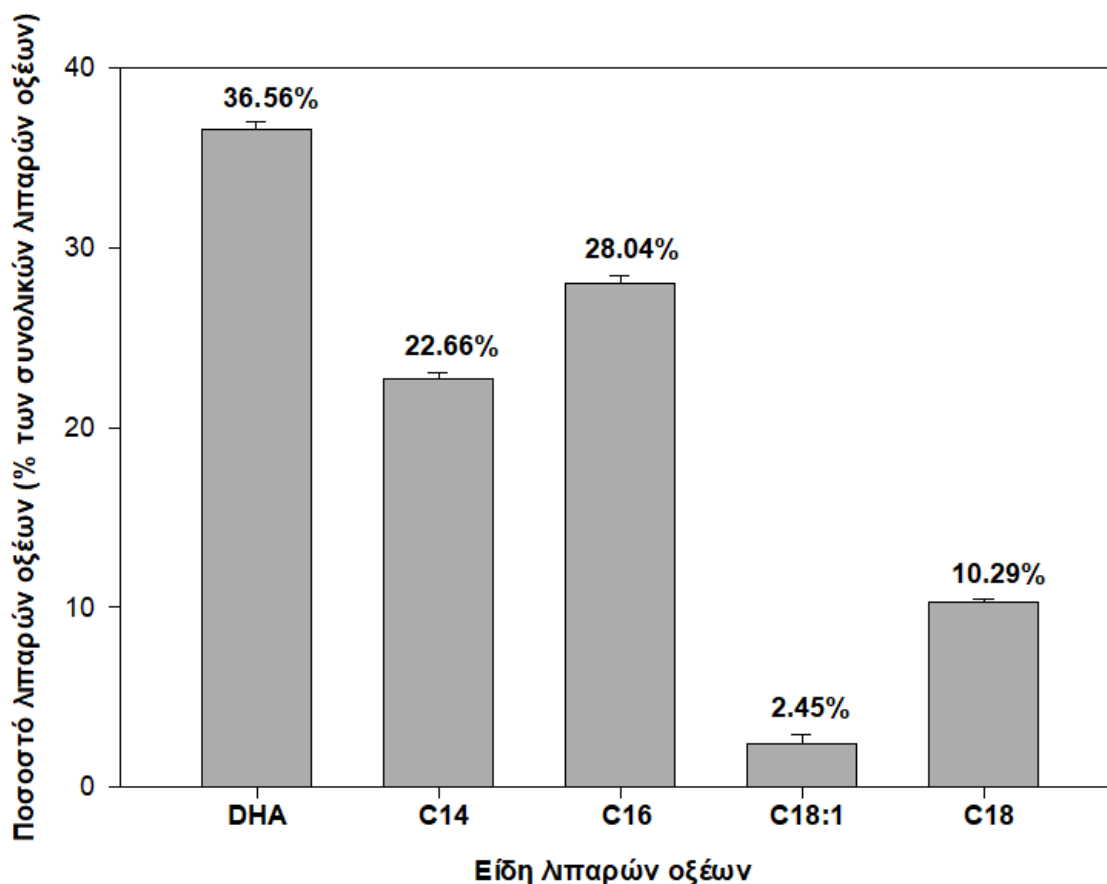
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε [ενζυμική υδρόλυση Avicel](#) προκειμένου να παραληφθεί γλυκόζη, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα σε υγρές καλλιέργειες. Έπειτα, δημιουργήθηκαν υγρές καλλιέργειες του μικροφύκου, *C. cohnii*, και καθημερινά γινόταν [λήψη δειγμάτων](#) για να προσδιοριστεί η φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού και κατ'επέκταση ο χρόνος που έπρεπε να διακοπεί η επώαση.

Ακολούθησε η απομόνωση των κυττάρων του μικροφύκου με τη μέθοδο της φυγοκέντρωσης κι έπειτα η εξάχνωση του περιεχόμενου νερού με την τεχνική της λυοφιλίωσης. Ο μέσος όρος συγκέντρωσης της ξηρής βιομάζας που παραλήφθηκε από 50 mL υγρής καλλιέργειας, ανέρχεται σε 3.25 mg/mL.

Η διαδικασία της [εκχύλισης των λιπαρών οξέων](#) είναι αρκετά κοστοβόρα και γι' αυτόν το λόγο επιλέχθηκε ένα τμήμα της συνολικής ξηρής βιομάζας. Συγκεκριμένα, από τα 162.3 mg ξηρής βιομάζας που προέκυψαν κατά μέσο όρο, επιλέχθηκε η ποσότητα των 53.5 mg για να εκχυλιστεί.

Η μάζα των λιπαρών οξέων που απελευθερώθηκαν από τα κύτταρα του μικροφύκου, προέκυψε από τη διαφορά της μάζας των φιαλιδίων, όταν είναι κενά και μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης που περιέχουν τα λιπαρά. Το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας ανέρχεται στο 25.32%.

Ο προσδιορισμός του είδους των λιπαρών οξέων που παράχθηκαν από το μικροφύκος πραγματοποιήθηκε με τη [μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας \(GC\)](#). Ωστόσο, χρειάστηκε να προηγηθεί η [μετατροπή τους σε μεθυλεστέρες](#), προκειμένου να μπορούν να ανιχνευτούν στον χρωματογράφο. Ακολουθεί η παρουσίαση του είδους και του ποσοστού των λιπαρών οξέων που εντοπίστηκαν:



Εικόνα 54: Ποσοστό λιπαρών οξέων που εκχυλίστηκαν (% των συνολικών λιπαρών οξέων)

Στο παραπάνω διάγραμμα διαφαίνεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των λιπαρών οξέων που εκχυλίστηκαν από τα κύτταρα του *C. cohnii* αφορά το DHA, γεγονός ιδιαίτε- ρως ενθαρρυντικό για τη μαζική παραγωγή του. Ειδικότερα, το εικοσιδιεξανοϊκό οξύ (C22:6) ανέρχεται στο 36.56% του συνόλου των λιπαρών οξέων, ακολουθεί το εξαδεκα- νοϊκό (C16:0) στο 28.04% και το τετραδεκανοϊκό (C14:0) στο 22.66%. Τέλος, σε χαμη- λότερη συγκέντρωση ανιχνεύεται το οκταδεκανοϊκό οξύ (C18:0) στο 10.29% και το βαξε- νικό (C18:1) στο 2.45%.

Υδρόλυση Βιομάζας Ι – Υγρή καλλιέργεια και παραγωγή λιπαρών οξέων

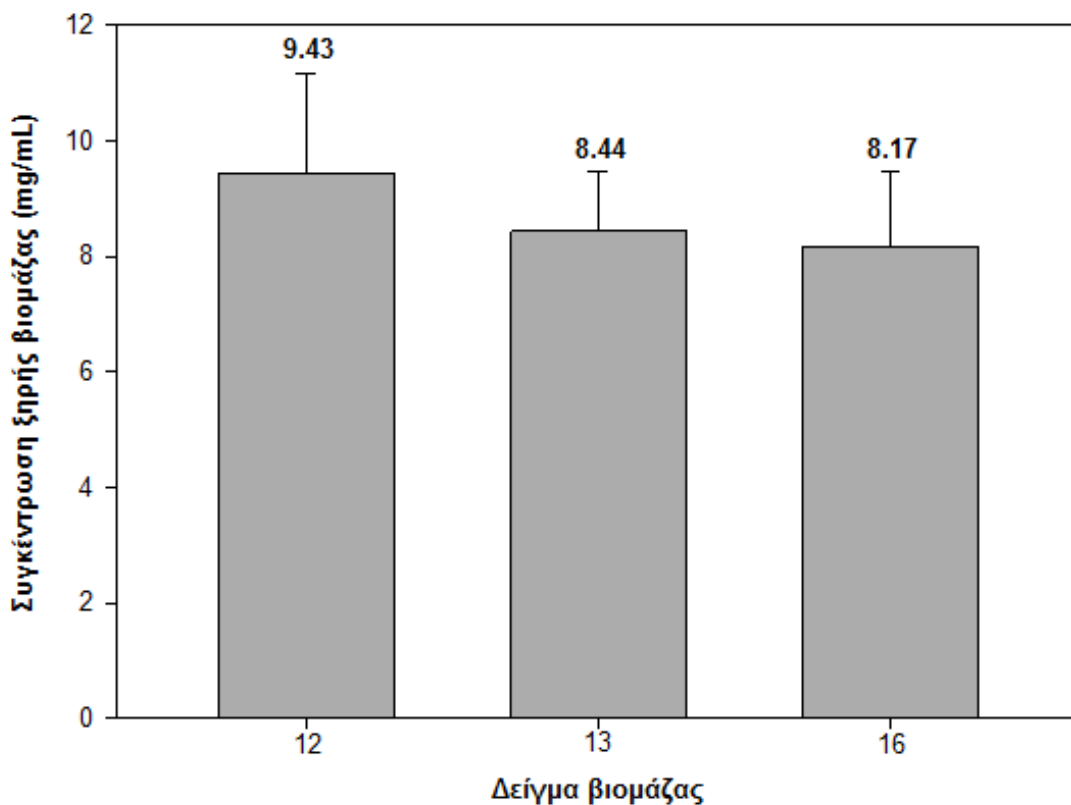
Εκτός από την υδρόλυση του Anicel, γλυκόζη απομονώθηκε και μέσω της [ενζυμι- κής διάσπασης βιομάζας](#). Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά είδη φυτικής βι- ομάζας από ξύλο πεύκου, τα οποία περιείχαν κυτταρίνη και ημικυτταρίνη σε μεγαλύτερο ποσοστό, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί. Αυτό οφείλεται στην προε- πεξεργασία της πρώτης ύλης με οργανικούς διαλύτες ώστε να απομακρυνθεί το μεγαλύ-

τερο μέρος της λιγνίνης, που δρα παρεμποδιστικά. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται και η απόδοση των υδρολύσεων σε γλυκόζη, όπου φαίνεται ότι το δείγμα 12 απελευθερώνει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση του μονοσακχαρίτη, έπειτα το 16 και τέλος η φυτική βιομάζα 13.

Πίνακας 31: Σύσταση βιομάζας (%) και απόδοση υδρολύσεων

Δείγμα	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Λιγνίνη (%)	Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/mL)
12	77.60	13.23	7.18	53.60
13	82.75	10.13	4.23	32.08
16	79.57	9.74	6.38	46.60

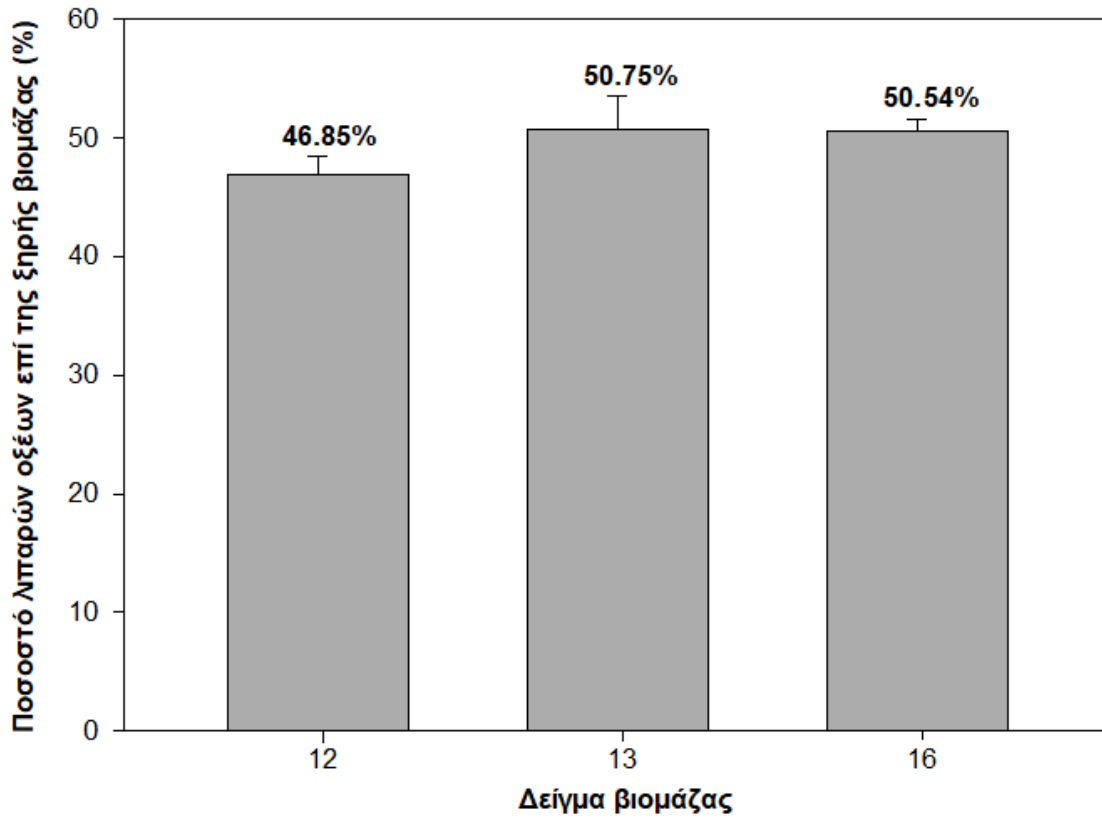
Μετά την συλλογή της γλυκόζης που παράχθηκε από τις παραπάνω βιομάζες, δημιουργήθηκαν υγρές καλλιέργειες του μικροφύκου, οι οποίες επώαστηκαν για 5 ημέρες, σε θερμοκρασία 27°C και υπό ανάδευση 160 rpm, αξιοποιώντας ως πηγή άνθρακα το προαναφερθέν σάκχαρο. Ακολουθώντας τα βήματα που περιγράφηκαν και προηγουμένως, απομονώθηκε η ξηρή βιομάζα από τις υγρές καλλιέργειες. Ο μέσος όρος συγκέντρωσης της συνολικής ξηρής βιομάζας που προέκυψε από περίπου 45 mL υγρής καλλιέργειας ανέρχεται σε 9.43 mg/mL για το δείγμα 12, σε 8.44 mg/mL για το 13 και σε 8.17 mg/mL για το 16. Διαγραμματικά, εμφανίζεται ακολούθως:



Εικόνα 55: Μέσος όρος συγκέντρωσης ξηρής βιομάζας

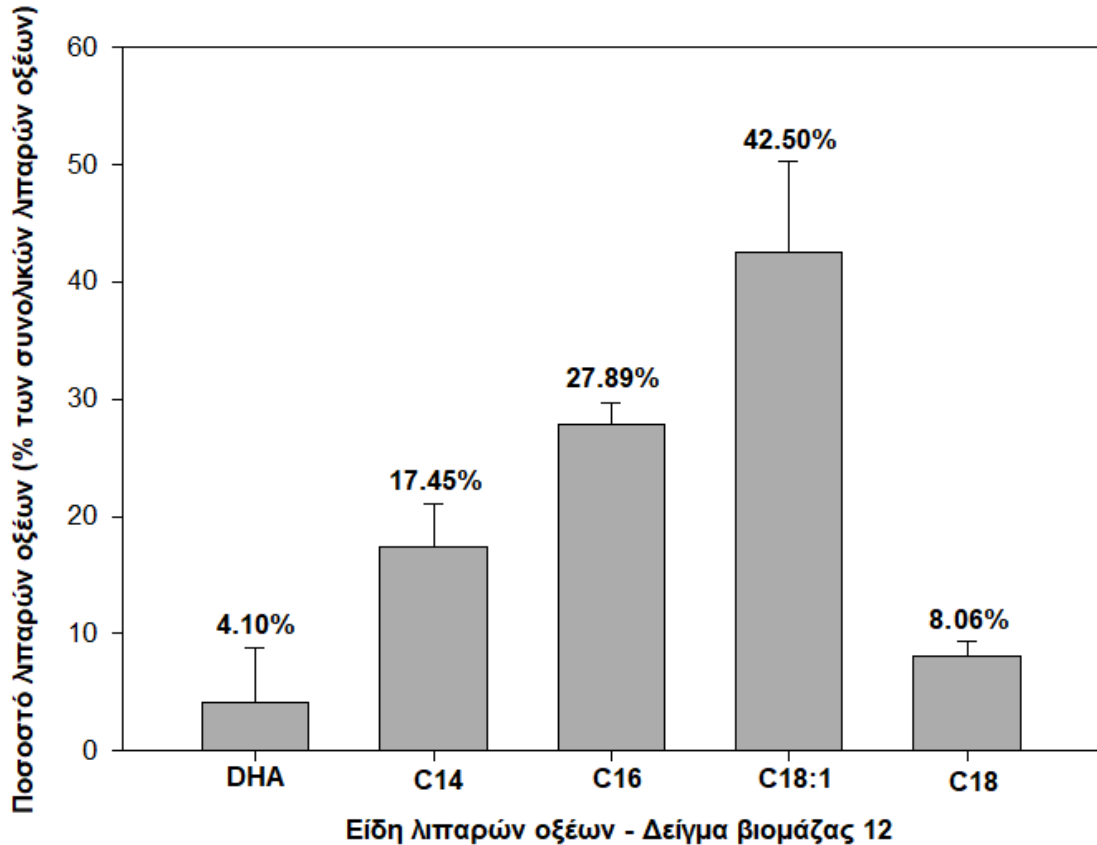
Από την συνολική ξηρή βιομάζα που συλλέχθηκε μετά τη λυοφιλίωση, επιλέχθηκαν περίπου 45 mg από κάθε δείγμα για να υποβληθούν σε εκχύλιση των λιπαρών οξέων.

Το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας που παραλήφθηκαν κυμαίνεται περίπου στο 45-50% και παρουσιάζεται αναλυτικά για κάθε δείγμα παρακάτω:



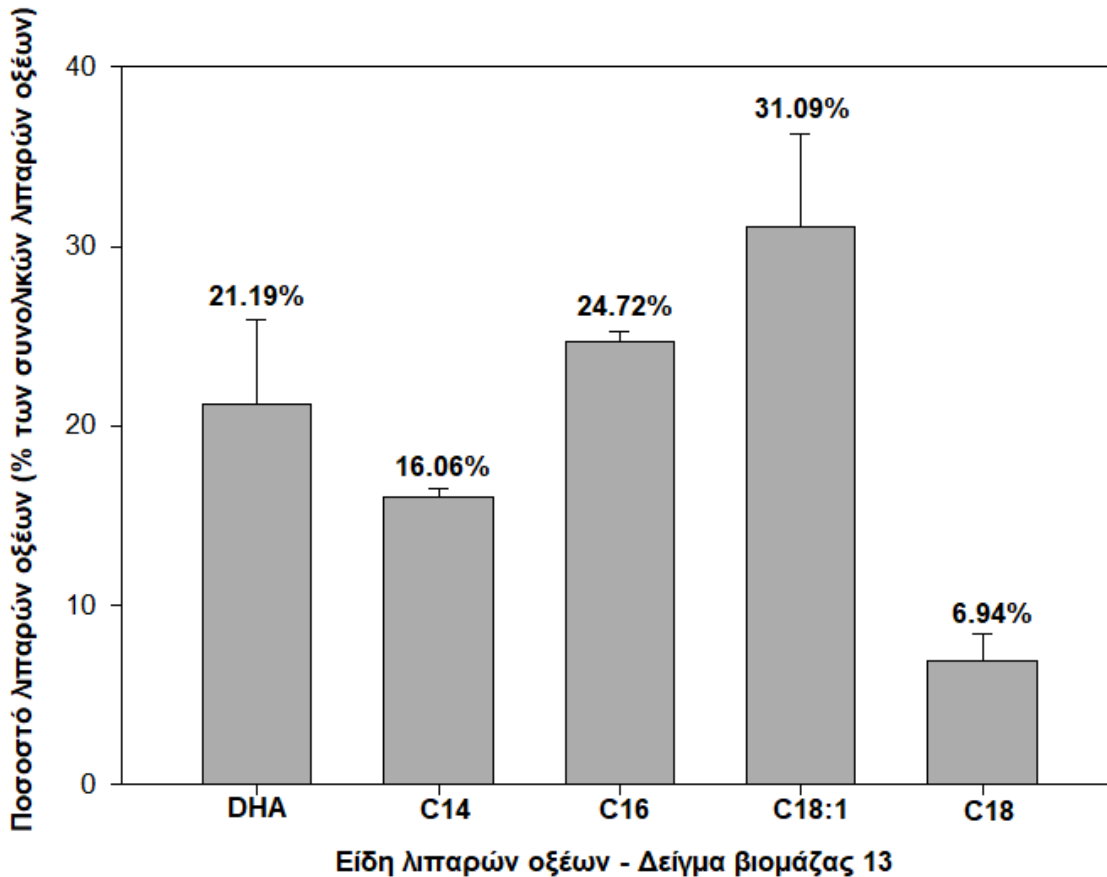
Εικόνα 56: Ποσοστό λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας

Τέλος, έλαβε χώρα ο προσδιορισμός του είδους των λιπαρών οξέων που απελευθερώθηκαν από τα κύτταρα του μικροφύκου, με εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας.



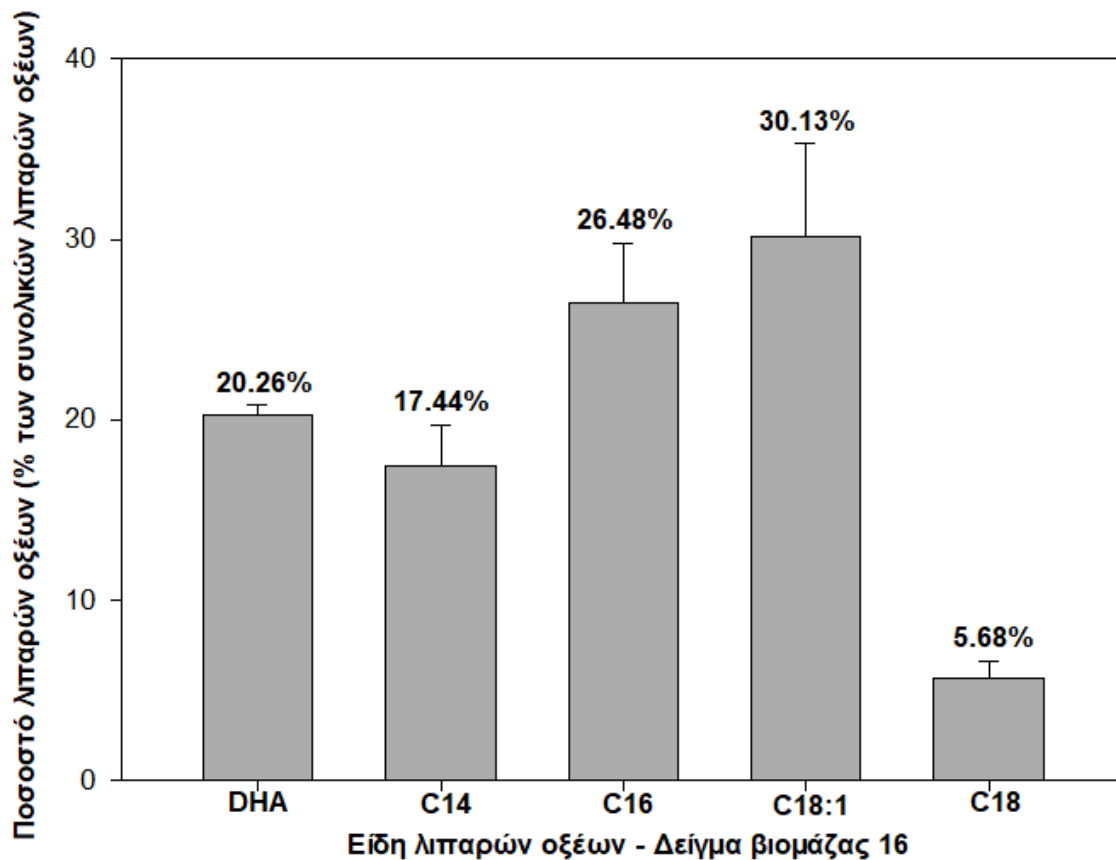
Εικόνα 57: Ποσοστό λιπαρών οξέων που εκχυλίστηκαν (% των συνολικών λιπαρών οξέων) – Δείγμα βιομάζας 12

Στο παραπάνω διάγραμμα, το οποίο αφορά το δείγμα φυτικής βιομάζας 12, παρουσιάζεται ελάχιστη παραγωγή του DHA, μόλις στο 4.10% των συνολικών λιπαρών οξέων που απομονώθηκαν από το μικροφύκος. Αντιθέτως, η υψηλότερη συγκέντρωση έχει σημειωθεί για το βαξενικό οξύ (C18:1) σε ποσοστό 42.50% και ακολουθούν κατά φθίνουσα σειρά το εξαδεκανοϊκό (C16:0) με 27.89%, το τετραδεκανοϊκό (C14:0) με 17.45% και το οκταδεκανοϊκό οξύ (C18:0) με 8.06%. Το χαμηλό ποσοστό του DHA αποθαρρύνει για περαιτέρω χρήση φυτικής βιομάζας με σύσταση παρόμοια με εκείνη του δείγματος 12.



Εικόνα 58: Ποσοστό λιπαρών οξέων που εκχυλίστηκαν (% των συνολικών λιπαρών οξέων) – Δείγμα βιομάζας 13

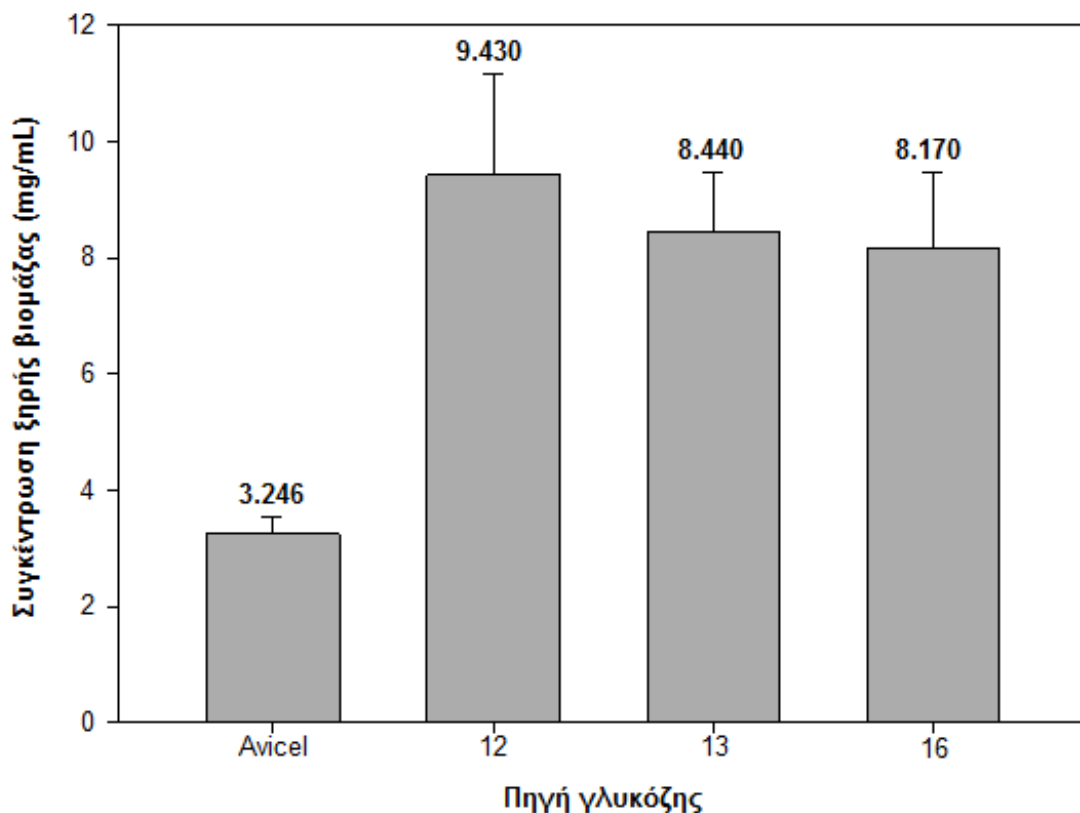
Η διαγραμματική απεικόνιση των λιπαρών οξέων, που εντοπίστηκαν στα κύτταρα του *C. cohnii* για το δείγμα φυτικής βιομάζας 13, παρουσιάζει μία μέτρια παραγωγικότητα του DHA σε ποσοστό 21.19% του συνόλου των λιπαρών οξέων. Η υψηλότερη συγκέντρωση σημειώνεται για το βαξενικό οξύ (C18:1) με 31.09% και μετά κατατάσσεται το εξαδεκανοϊκό οξύ (C16:0) με 24.72%. Στη μέση βρίσκεται το εικοσιδιεξανοϊκό οξύ (C22:6), όπως έχει ήδη αναφερθεί και ακολουθούν το τετραδεκανοϊκό οξύ (C14:0) με 16.06% και τέλος το οκταδεκανοϊκό (C18:0) με 6.94%.



Εικόνα 59: Ποσοστό λιπαρών οξέων που εκχυλίστηκαν (% των συνολικών λιπαρών οξέων) – Δείγμα βιομάζας 16

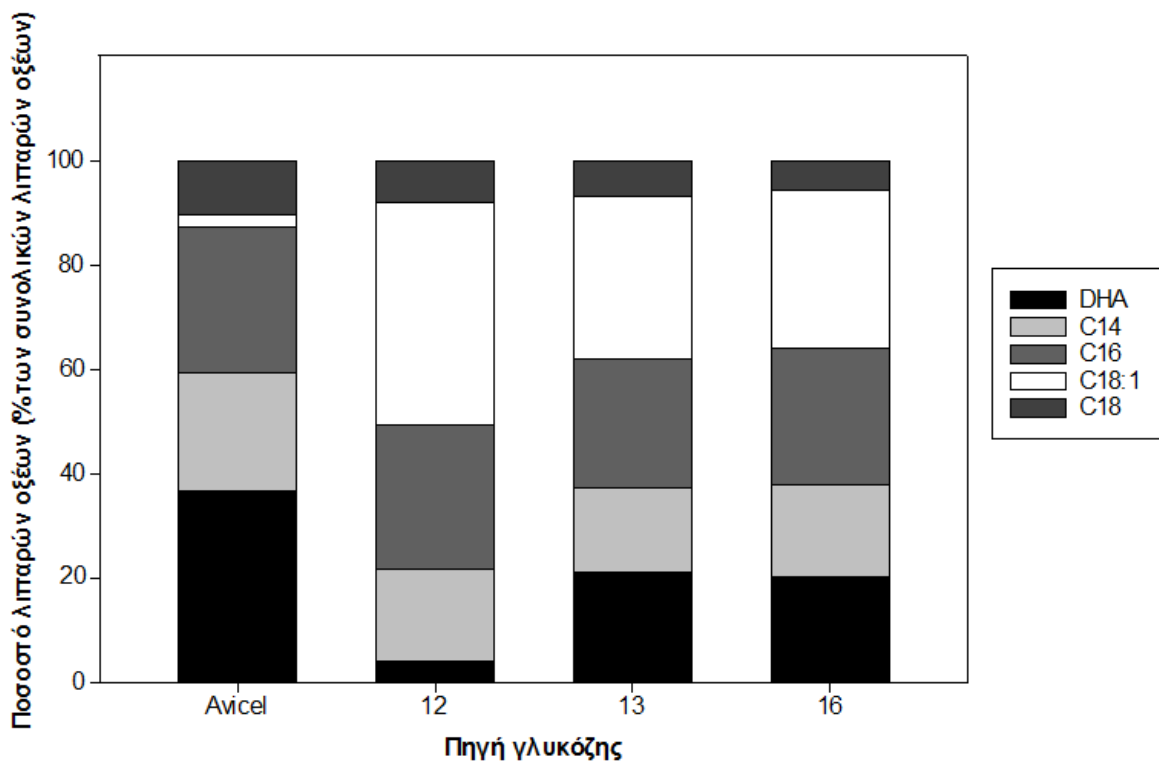
Στο παραπάνω διάγραμμα γίνεται φανερό ότι το DHA σημειώνει μία μέτρια συγκέντρωση με ποσοστό 20.26% του συνόλου των λιπαρών οξέων, παρόμοια με την περίπτωση της φυτικής βιομάζας 13. Η υψηλότερη τιμή καταγράφεται για το βαξενικό οξύ (C18:1) με 30.13% κι έπειτα για το εξαδεκανοϊκό (C16:0) με 26.48%. Στη μέση της κατάταξης βρίσκεται το DHA κι ακολουθούν το τετραδεκανοϊκό οξύ (C14:0) με 17.44% και το οκταδεκανοϊκό (C18:0) με 5.68%.

Παρακάτω παρουσιάζονται δύο συγκριτικά διαγράμματα προκειμένου να αξιολογηθεί η απόδοση σε ξηρή βιομάζα και λιπαρά οξέα, των υγρών καλλιεργειών που αναπτύχθηκαν με γλυκόζη που προήλθε από υδρόλυση Avicel κι από φυτικές βιομάζες.



Εικόνα 60: Συγκριτικό διάγραμμα απόδοσης συνολικής ξηρής βιομάζας που έχει αναπτυχθεί με γλυκόζη που προήλθε από την υδρόλυση Avicel και φυτικών βιομαζών

Η απεικόνιση της συγκέντρωσης της ξηρής βιομάζας για όλες τις πηγές γλυκόζης αναδεικνύει ως ευνοϊκότερο για την ανάπτυξη του μικροφύκους το δείγμα 12. Ειδικότερα, για τη δεδομένη πρώτη ύλη παραλαμβάνονται 9.430 mg/mL ξηρής βιομάζας από τις υγρές καλλιέργειες του *C. cohnii*. Παραπλήσιες τιμές εμφανίζουν τα δείγματα 13 και 16, με συγκέντρωση 8.440 mg/mL και 8.170 mg/mL, αντίστοιχα. Η τελευταία θέση καταλαμβάνεται από το Avicel με απόδοση μόλις 3.246 mg/mL, που δεν προσεγγίζει ούτε το μισό των τιμών που έχουν σημειωθεί για τις φυτικές βιομάζες.



Εικόνα 61: Συγκριτικό διάγραμμα του είδους των λιπαρών οξέων που εκχυλίστηκαν από το μικροφύκος με βάση την πηγή γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκε

Από το παραπάνω διάγραμμα διαφαίνεται ότι οι μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων σημειώνονται για το DHA και για το C18:1. Ειδικότερα, γίνεται φανερό ότι το Avicel εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό εικοσιδιεξανοϊκού οξέος, αγγίζοντας σε ποσοστό το 36.56% του συνόλου των λιπαρών οξέων που απομονώθηκαν από τα κύτταρα του μικροφύκου. Αντιθέτως, όσον αφορά το βαξενικό οξύ (C18:1) καταλαμβάνει μόλις το 2.45% του συνόλου. Στον αντίποδα βρίσκεται το δείγμα φυτικής βιομάζας 12, με το ποσοστό του DHA να ανέρχεται μόλις στο 4.10% ενώ του C18:1 στο 42.50%. Τις μεσαίες θέσεις, με γνώμονα κατάταξης το ποσοστό των παραπάνω οξέων, κατέχουν τα δείγματα φυτικής βιομάζας 13 και 16 με τιμή DHA στο 20% και C18:1 στο 30%, περίπου. Τα υπόλοιπα οξέα που έχουν απομονωθεί από τα κύτταρα του *C. cohnii* έχουν παραπλήσιες τιμές για όλες τις πηγές γλυκόζης που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, το C14:0 κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 17-22%, το C16:0 στο 24-28% και το C18:0 στο 5-10%.

Υδρόλυση βιομάζας II – Υγρή καλλιέργεια

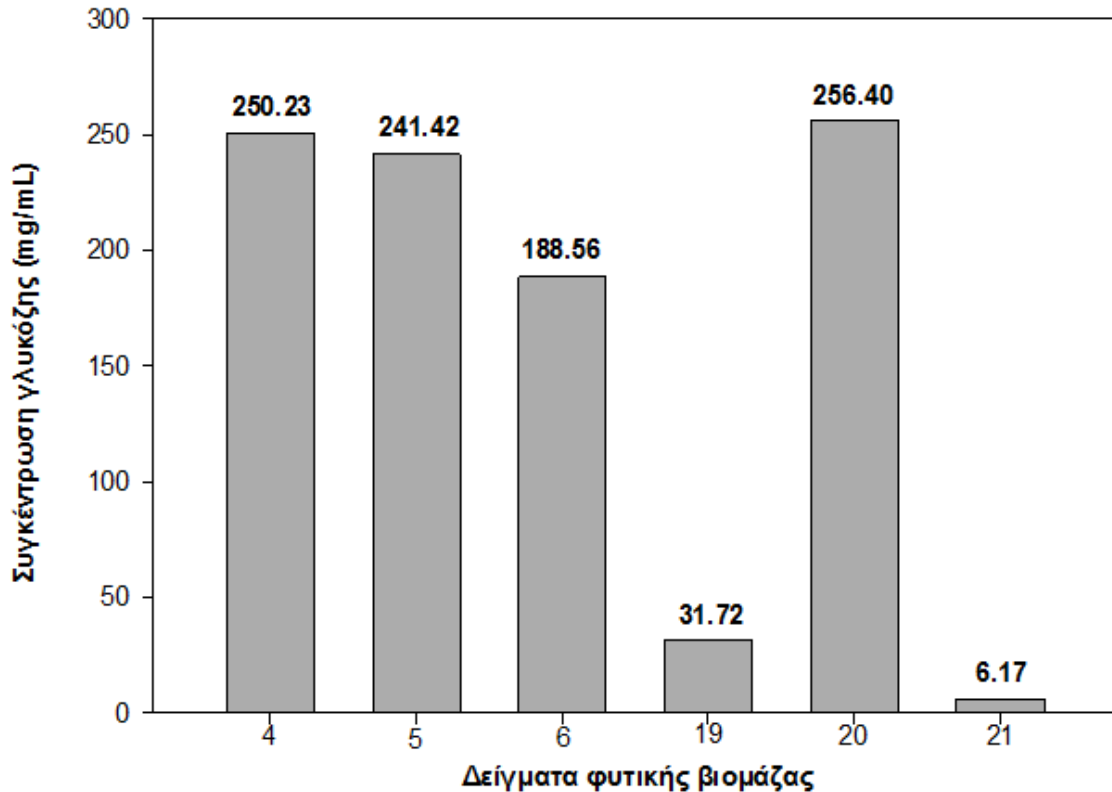
Στο πλαίσιο μελέτης της καλλιέργειας του μικροφύκου, *C. cohnii*, εξετάστηκε ένα επιπλέον σύνολο βιομαζών από ξύλο οξιάς, που με την υδρόλυση τους απέδωσαν μό-

ρια γλυκόζης. Το σάκχαρο αξιοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη του μικρο-οργανισμού.

Πίνακας 32: Σύσταση βιομάζας (%)

Δείγμα	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Λιγνίνη (%)
4	51.36	20.96	16.73
5	60.40	20.58	15.14
6	54.21	21.16	18.77
19	72.96	16.03	6.44
20	79.13	12.10	5.51
21	65.27	14.98	14.87

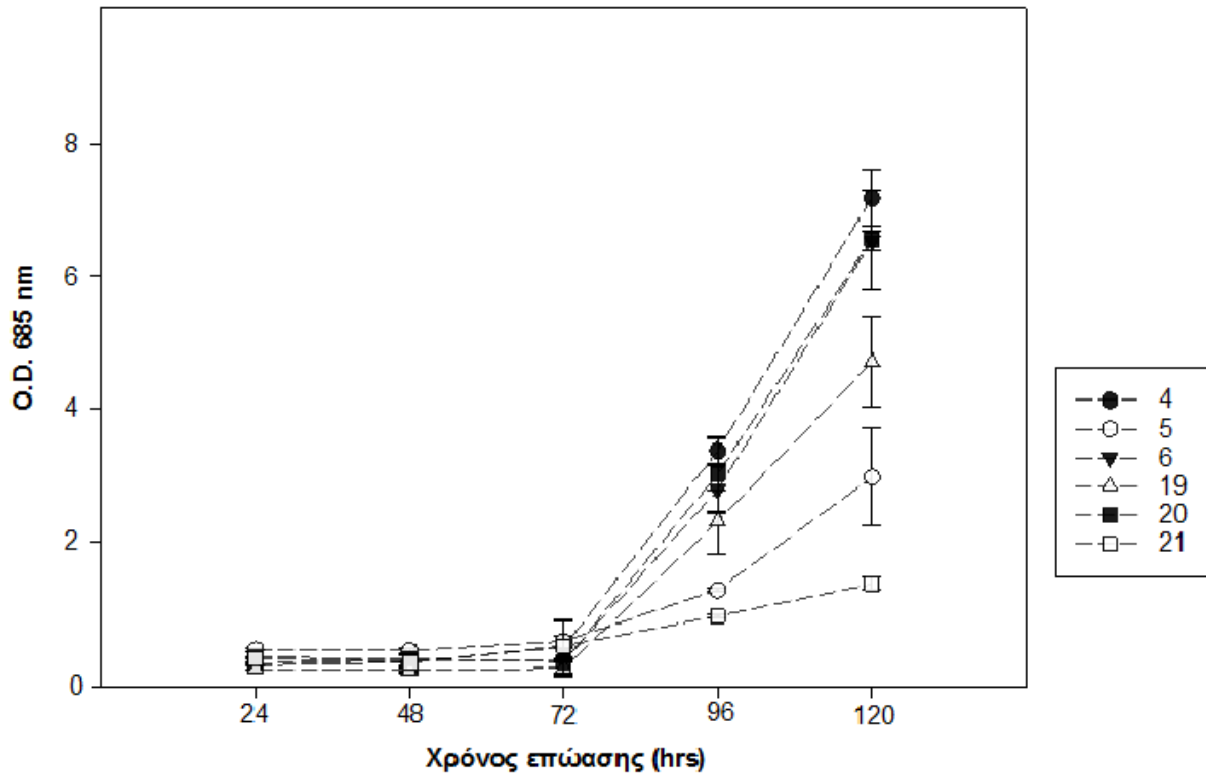
Οι φυτικές αυτές βιομάζες δέχθηκαν διάλυμα ενζύμων – κυτταρινασών και παρέμειναν στον επωαστήρα για χρονικό διάστημα 10 ημερών. Έπειτα, αφαιρέθηκαν και πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης που είχε προκύψει, εφαρμόζοντας τη μέθοδο GOD / PAD. Υπενθυμίζεται ότι, οι τιμές της απορρόφησης που λαμβάνονται από τη φωτομέτρηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 510 nm, μπορούν να μετατραπούν σε συγκέντρωση του σακχάρου πολλαπλασιάζοντας με τον συντελεστή 0.8811.



Εικόνα 62: Απόδοση υδρολύσεων των δειγμάτων φυτικής βιομάζας σε συγκέντρωση γλυκόζης

Από την παραπάνω διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης φαίνεται ότι η μεγαλύτερη απόδοση αφορά τα δείγματα 20, 4 και 5 με παραπλήσιες τιμές κοντά στα 250 mg/mL. Ακολουθεί η φυτική βιομάζα με τον συμβολισμό 6 με 188.56 mg/mL ενώ τελευταία κατατάσσονται τα δείγματα 19 και 21 με 31.72 mg/mL και 6.17 mg/mL αντίστοιχα, σημειώνοντας πολύ μεγάλες αποκλείσεις από τις υπόλοιπες πηγές γλυκόζης.

Τέλος, δημιουργήθηκαν υγρές καλλιέργειες του μικροφύκου, στις οποίες αξιοποιήθηκε η γλυκόζη που παραλήφθηκε από την ενζυμική υδρόλυση κάθε δείγματος. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα και κάθε ημέρα, πραγματοποιούνταν φωτομετρήσεις στα 685 nm προκειμένου να προσδιοριστεί το πλήθος των κυττάρων του *C. cohnii*.



Εικόνα 63: Κυτταρική ανάπτυξη του μικροφύκου σε γλυκόζη που προέρχεται από την υδρόλυση δειγμάτων φυτικής βιομάζας

Από το παραπάνω διάγραμμα ξεχωρίζει ο χρόνος των 120 ωρών, όπου θεωρείται ότι ο *C. cohnii* φτάνει στη μέγιστη φάση ανάπτυξης του για όλα τα δείγματα. Η υψηλότερη απορρόφηση στο δεδομένο χρόνο έχει καταγραφεί για τη βιομάζα 4 κι έπειτα κατατάσσονται τα δείγματα 20 και 6. Μέτρια απορρόφηση σημειώνεται για τη φυτική βιομάζα 19, ενώ οι χαμηλότερες απορροφήσεις προκύπτουν για τα δείγματα 5 και 21.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Lytic Polysaccharide Monooxygenases

Συγκέντρωση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

Η επώαση των υγρών καλλιιεργειών του ζυμομύκητα *P. pastoris*, σε θερμοκρασία 30°C και χρονικό διάστημα 6 ημερών, οδήγησε στην παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Ο καθαρισμός της με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου και η μέτρηση της απορρόφησης δείγματος της στα 280 nm, συνέβαλαν στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου.

Η LPMO που παράχθηκε, λοιπόν, ανέρχεται σε 1.09 mg/mL και κατ'επέκταση η ποσότητα της διαμορφώνεται σε 16.35 mg για συνολικό όγκο καλλιέργειας 500 mL. Η συγκέντρωση αυτή χαρακτηρίζεται ως ικανοποιητική καθώς κινείται εντός του αναμενόμενου πλαισίου, που οριοθετείται μεταξύ των τιμών 1-5 mg/mL (Varnai, Tang, Bengtsson, Atterton, Mathiesen, & Eijsink, 2014). Ωστόσο, η κατάταξη της στο χαμηλότερο άκρο θα μπορούσε να αποδοθεί στον χρόνο επώασης. Ειδικότερα, μελέτες έχουν δείξει ότι ο υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων της *P. pastoris* αντιστοιχεί σε χρόνο επώασης 4 ημερών, ενώ η μέγιστη έκφραση πρωτεΐνης στις 2 ημέρες (Karbalaei, Rezaee, & Farsiani, 2020). Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι ο παρατεταμένος χρόνος επώασης ενδέχεται να οδηγήσει σε πρωτεόλυση των πρωτεϊνών, δηλαδή διάσπαση τους σε μικρότερα πεπτίδια. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι δεν έγινε κάποια προσπάθεια βελτιστοποίησης της διαδικασίας παραγωγής της πρωτεΐνης.

Ένα άλλο συμπέρασμα που προκύπτει από την παραγωγή της LPMO, είναι η ορθή επιλογή του ευκαρυωτικού οργανισμού που φιλοξένησε το γονίδιο της. Αναλυτικότερα, ο ζυμομύκητας *P. pastoris* είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος ξενιστής έκφρασης πρωτεϊνών καθώς εξασφαλίζει υψηλή παραγωγικότητα, με οικονομικό τρόπο (O'Dell, Swartz, Weiss, & Meilleur, 2017). Παράλληλα, ο μικροοργανισμός παρέχει τις κατάλληλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως είναι οι γλυκοζυλιώσεις και η σύνθεση δισουλφιδικών δεσμών, προκειμένου να είναι λειτουργικό το ένζυμο (Varnai, Tang, Bengtsson, Atterton, Mathiesen, & Eijsink, 2014). Τέλος, εκκρίνει χαμηλή ποσότη-

τα εγγενών πρωτεϊνών, επιτρέποντας την εύκολη συλλογή και τον καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Εντοπισμός του είδους των γλυκοζυλιώσεων της LPMO

Η χρήση των πληροφορικών εργαλείων, NetnGlyc και NetOGlyc, σε συνδυασμό με τη γνώση της αλληλουχίας του ενζύμου που μελετάται, έδωσαν μία εικόνα για την παρουσία και το είδος των γλυκοζυλιώσεων που φέρει. Μάλιστα, η ύπαρξη τους αποδεικνύεται εμπειρικά κι από την ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης, καθώς η ζώνη που σχηματίστηκε στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι αρκετά συγκεχυμένη, μεταξύ των τιμών 29-42 kDa (Kittl, Kracher, Burgstaller, Haltrich, & Ludwig, 2012). Η LPMO φαίνεται να μη διαθέτει γλυκοζυλιώσεις σε άτομα N, υπόθεση που υποστηρίζεται κι από την απογλυκοζυλίωση του ενζύμου με EndoH και την ακόλουθη ηλεκτροφόρησή του. Ειδικότερα, η κατάσταση της γλυκοζυλιωμένης και της επεξεργασμένης με EndoH πρωτεΐνης στην ίδια ζώνη της πηκτής πολυακρυλαμιδίου, επιβεβαιώνουν την απουσία των N-γλυκοζυλιώσεων. Η LPMO, λοιπόν, διαθέτει O-γλυκοζυλιώσεις και υπάρχουν τέσσερα πιθανά σημεία πρόσδεσης τους, όλα σε άτομα O του αμινοξέος σερίνη, στις θέσεις 234, 244, 246 και 248.

Ο τύπος και ο αριθμός των γλυκοζυλιώσεων που φέρει ένα ένζυμο επηρεάζονται τόσο από το μικροοργανισμό που επιλέγεται για να εκφραστεί το γονίδιο, όσο κι από τις συνθήκες καλλιέργειας (Zoglowek, Lubeck, Ahning, & Lubeck, 2015). Ωστόσο, όταν οι λυτικές πολυσακχαρικές μονοοξυγενάσες που προέρχονται από νηματοειδείς μύκητες εκφράζονται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως είναι η *P. pastoris*, διατηρούν συνήθως τον τύπο των γλυκοζυλιώσεων που θα έφεραν φυσικά (Gaber, et al., 2020). Συνεπώς, το στοιχείο αυτό σε συνδυασμό με την παρουσία των O-γλυκοζυλιώσεων θα μπορούσε να οδηγήσει σε κάποιο συμπέρασμα για την οικογένεια στην οποία ανήκει το ένζυμο, με μεγαλύτερη ασφάλεια. Συγκεκριμένα, στα μέλη της οικογένειας AA9, έχουν παρατηρηθεί και οι δύο τύποι γλυκοζυλιώσεων (Bennati-Granier C. , et al., 2015), όπως και στην περίπτωση της AA13 (Meier, et al., 2017). Οι οικογένειες AA10, AA11 και AA14 θα μπορούσαν να αποκλειστούν άμεσα λόγω των μικροοργανισμών στους οποίους έχουν ανιχνευτεί. Αναλυτικότερα, η οικογένεια AA10 εντοπίζεται κυρίως σε βακτήρια, σε αντίθεση με το ένζυμο που μελετάται, το οποίο προέρχεται από το νηματοειδή μύκητα, *M.*

thermophila. Παράλληλα, η ομάδα AA11 τίθεται εκτός μελέτης μιας και το μοναδικό είδος που έχει σημειωθεί έως σήμερα, έχει παραληφθεί από το μύκητα *Aspergillus oryzae* (Hemsworth, Henrissat, Davies, & Walton, 2014). Αντιστοίχως, η κατηγορία AA14 διότι έχει εντοπιστεί μόνο στο μύκητα *Pycnoporus coccineus* (Zerva, Pentari, Grisel, Berrin, & Topakas, 2020).

Προσδιορισμός του μεγέθους του ενζύμου LPMO

Η ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και η σύγκριση της με το πρότυπο δείγμα, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το μοριακό της βάρος κυμαίνεται μεταξύ 29-42 kDa. Υπενθυμίζεται ότι το θεωρητικό βάρος του ενζύμου υπολογίζεται στα 35 kDa και η απόκλιση αυτή ερμηνεύεται από το φαινόμενο των γλυκοζυλιώσεων των πρωτεϊνών, κατά την έκφραση τους σε κάποιον ξενιστή.

Η αναζήτηση τιμών βάρους που έχουν σημειωθεί για τις οικογένειες των λυτικών πολυσακχαρικών μονοοξυγενασών, οδήγησε στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 33: Ενδεικτικά μοριακά βάρη LPMO (Forsberg, και συν., 2019)

Οικογένεια LPMO	Μοριακό βάρος (kDa)
AA9	24.5
AA10	19.7
AA11	22.4
AA13	24.8
AA14	29.4

Συσχετίζοντας το θεωρητικό βάρος της πρωτεΐνης με τα παραπάνω στοιχεία παρατηρείται ότι διαφέρει σημαντικά από τις τιμές του πίνακα. Θα μπορούσε, λοιπόν, να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το μοριακό βάρος του ενζύμου δεν είναι ένα χαρακτηριστικό που επιτρέπει την ασφαλή ένταξη του σε μία ομάδα κατά CAZy.

Ανίχνευση υποστρωμάτων δράσης της LPMO

1^η δοκιμή

Στον πρώτο κύκλο των πειραματικών δοκιμών που διεξήχθησαν για τη μελέτη της δράσης του ενζύμου σε υποστρώματα, εξετάστηκαν η χιτίνη, το άμυλο, η επεξεργασμένη κυτταρίνη με φωσφορικό οξύ (Pasc) και η μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel). Στα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν από την εφαρμογή της μεθόδου χρωματογραφίας ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPLC) στα δείγματα, παρατηρούνται διάφορες κορυφές στο χρονικό διάστημα 0-35 min. Αναλυτικότερα, η πρώτη κορυφή που εντοπίζεται και στις τέσσερις περιπτώσεις στα 2 min σχετίζεται με την έκλυση της LPMO. Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται από την απουσία της στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα των τυφλών διαλυμάτων, στα οποία δεν έχει προστεθεί το ένζυμο. Μία ακόμα κοινή κορυφή εμφανίζεται στα 5 min για όλα τα δείγματα, η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί στην έκλυση του ασκορβικού οξέος, μιας και αποτελεί κοινό συστατικό όλων των δειγμάτων. Ωστόσο, η παρουσία της συγκεκριμένης κορυφής στα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν αργότερα, κατά τη μελέτη διαφορετικών δοτών ηλεκτρονίων, μπορεί να αποκλείσει την πιθανότητα να οφείλεται στο ασκορβικό οξύ. Πειράματα, στα οποία ακολουθήθηκε παρόμοια μέθοδος εκτέλεσης, έχουν δείξει ότι στο χρονικό διάστημα 5-13 min εμφανίζονται μη οξειδωμένοι ολιγοσακχαρίτες (Jakadeeswaran, Gainey, & Mort, 2018).

Ο προσδιορισμός του τρόπου δράσης της LPMO προϋποθέτει την αναζήτηση προϊόντων που έχουν προέλθει από την οξείδωση του C1 άνθρακα της πολυσακχαρικής αλυσίδας, του C4 ή και των δύο μαζί. Ειδικότερα, αν το ένζυμο δρα στον C1 άνθρακα, προϊόντα της διάσπασης της αλυσίδας θα ανιχνευθούν σε χρόνο έκλυσης 13-19 min, ενώ για τον C4 θα παρατηρηθούν στο διάστημα 19-25 min. Ολιγοσακχαρίτες που έχουν προκύψει από οξείδωση και των δύο ανθράκων αναμένεται να εντοπιστούν μεταξύ των χρόνων 25-30 min. Η ταυτοποίηση των κορυφών που εμφανίζονται στα χρωματογραφήματα και οφείλονται στη δράση της LPMO, πραγματοποιείται με την σύγκριση των διαγραμμάτων των τυφλών δειγμάτων με τα αντίστοιχα που φέρουν το ένζυμο. Τα χρωματογραφήματα της χιτίνης, λοιπόν, και του αμύλου εμφανίζουν αρκετές κορυφές στο διάστημα 10-13 min, που μπορούν να αποδοθούν σε μη οξειδωμένους ολιγοσακχαρίτες, 15-20 min που αφορούν προϊόντα οξείδωσης στον C1 και 27-29 min που σχετίζο-

νται με την δράση του ενζύμου και στους δύο άνθρακες, C1 και C4. Το χρωματογράφημα του Pasc παρουσιάζει κάποιες κορυφές για χρόνους 10-13 min και 19-22 min, που αντιστοιχούν σε μη οξειδωμένους, αλλά και οξειδωμένους στον C4 ολιγοσακχαρίτες. Τέλος, στο Avicel δεν εντοπίζεται κάποια σημαντική κορυφή από τον χρόνο έκλουσης 14 min μέχρι και το τέλος, ενώ οι κορυφές στο διάστημα 6-13 αφορούν μη οξειδωμένους ολιγοσακχαρίτες.

Η LPMO φαίνεται να είναι πιο δραστική στις περιπτώσεις της χιτίνης, του αμύλου και του Pasc, σε σχέση με το Avicel. Μάλιστα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το ένζυμο διασπά το άμυλο, καθώς ο συγκεκριμένος πολυσακχαρίτης αποτελείται από α-1,4 και α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Vu, Beeson, Span, Farquhar, & Marletta, 2014), ενώ τα υπόλοιπα υποστρώματα διαθέτουν β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Μια πιθανή εξήγηση είναι η ύπαρξη μονάδων σύνδεσης υδατανθράκων (Carbohydrate-Binding Modules), οι οποίες αναγνωρίζουν το άμυλο και συμβάλλουν στην ένωση του υποστρώματος και της πρωτεΐνης (Leggio, et al., 2015). Εστιάζοντας στα δύο είδη κυτταρίνης, της επεξεργασμένης με φωσφορικό οξύ και της μικροκρυσταλλικής, παρατηρείται μεγαλύτερη ενεργότητα του ενζύμου στο Pasc συγκριτικά με το Avicel. Η διαφορετική έκταση της διάσπασης της πολυσακχαριτικής αλυσίδας έγκειται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι το πορώδες, ο βαθμός πολυμερισμού και η κρυσταλλικότητα (Hall, Bansal, Lee, Realf, & Bommarius, 2010). Συγκεκριμένα, ένα δείγμα κυτταρίνης με μεγάλο ποσοστό κρυσταλλικών περιοχών υδρολύεται πιο αργά από εκείνο στο οποίο οι άμορφες περιοχές υπερτερούν (Mukarakate, et al., 2016). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι κρυσταλλικές περιοχές περιορίζουν την πρόσβαση των ενζύμων στην πολυσακχαριτική αλυσίδα κι έτσι δυσχεραίνουν τη διάσπαση της (Kruer-Zerhusen, Cantero-Tubilla, & Wilson, 2017). Συνεπώς, είναι αναμενόμενο το Pasc, το οποίο διαθέτει αρκετές άμορφες περιοχές, να διασπάται πιο εύκολα σε σχέση με το Avicel, που εμφανίζει έντονη κρυσταλλικότητα (Andersen, Johansen, Michelsen, Stenby, Krogh, & Olsson, 2008).

2^η δοκιμή

Στο δεύτερο κύκλο των πειραμάτων που διεξήχθησαν με σκοπό τον προσδιορισμό των υποστρωμάτων δράσης της LPMO, μελετήθηκαν τρεις ολιγοσακχαρίτες. Πρό-

κείται για την β-D-κελλοτετραόζη, την κελλοπενταόζη και την κελλοεξαόζη. Ωστόσο, μόνο τα χρωματογραφήματα των δύο τελευταίων ολιγοσακχαριτών παρουσιάζονται στην εργασία, καθώς το διάγραμμα της β-D-κελλοτετραόζης δεν ήταν κατάλληλο για μελέτη. Συγκρίνοντας, λοιπόν, τα χρωματογραφήματα των τυφλών δειγμάτων κι εκείνων που περιέχουν την LPMO, εμφανίζεται η αναμενόμενη κορυφή της πρωτεΐνης στα 2 min κι έπειτα μία κορυφή στα 5 min που, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αφορά μάλλον κάποιον μη οξειδωμένο ολιγοσακχαρίτη. Έπειτα, σημειώνονται κορυφές στο χρονικό διάστημα 7-13 min, καθώς και 19-21 min. Οι πρώτες αντιστοιχούν σε μη οξειδωμένους ολιγοσακχαρίτες, ενώ οι τελευταίες σε προϊόντα οξειδωσης στον C4 άνθρακα. Αξίζει να αναφερθεί ότι, οι κορυφές των μη οξειδωμένων ολιγοσακχαριτών εμφανίζονται και στα τυφλά δείγματα, αλλά σε πολύ μικρότερη έκταση.

Από τα παραπάνω δεδομένα γίνεται φανερό ότι η LPMO είναι δραστική στην περίπτωση των ολιγοσακχαριτών που φέρουν β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, γεγονός αναμενόμενο (Isaksen, et al., 2014). Η δράση της LPMO σε υποστρώματα που φέρουν α-γλυκοζιτικούς δεσμούς είναι σπάνια και μέχρι στιγμής έχει σημειωθεί μόνο για την οικογένεια AA13 (Vu, Beeson, Span, Farquhar, & Marletta, 2014). Εστιάζοντας στους δύο ολιγοσακχαρίτες που μελετήθηκαν, έρευνες έχουν δείξει ότι κατά την επαφή του ενζύμου με το υπόστρωμα, κάποιος από τους γλυκοζιτικούς δεσμούς που φέρει αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα ιστιδίνης της LPMO. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η κελλοπενταόζη και η κελλοεξαόζη να έχουν την κατάλληλη απόσταση από το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Guo, et al., 2020). Ως εκ τούτου, ευνοείται η οξειδωτική δράση της πρωτεΐνης στα συγκεκριμένα υποστρώματα. Το στοιχείο αυτό είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικό καθώς οι ολιγοσακχαρίτες έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα κατά την αξιοποίηση τους για την παραγωγή γλυκόζης. Ειδικότερα, ο μειωμένος χρόνος επεξεργασίας τους και η περιορισμένη αναστολή της διαδικασίας λόγω υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, τους καθιστούν πολλά υποσχόμενους για μελλοντική χρήση (Barbosa, et al., 2020).

3^η δοκιμή

Στον τελευταίο κύκλο των πειραμάτων, εξετάστηκε η δράση του ενζύμου σε τρία επιπλέον υποστρώματα: τη γλυκομαννάνη, την ξυλάνη και την αραβινοξυλάνη. Η παρατήρηση των χρωματογραφημάτων που λήφθησαν οδηγεί στο συμπέρασμα η LPMO δεν

εμφανίζει καμία ενεργότητα απέναντι στην ξυλάνη και την αραβινοξυλάνη, ενώ μειωμένη δράση παρουσιάζεται στην περίπτωση της γλυκομαννάνης. Τα παραπάνω υποστρώματα διαθέτουν β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, επομένως αυτή η διαφορά θα μπορούσε να αποδοθεί στην πολυπλοκότητα της δομής των πολυσακχαριτών. Ειδικότερα, μελέτες έχουν δείξει ότι οι λυτικές πολυσακχαρικές μονοοξυγενάσες συμβάλλουν στη διάσπαση της ξυλάνης, όταν αποτελεί μέρος της ημικυτταρίνης (Dimarogona, Topakas, & Christakopoulos, 2014). Ωστόσο, όταν ο πολυσακχαρίτης είναι απομονωμένος, δεν παρουσιάζεται η ίδια δραστηριότητα. Η εξήγηση που δίνεται για αυτήν τη διαφορά έγκειται στη διαμόρφωση της δομής της ξυλάνης όταν έρχεται σε επαφή με άλλα συστατικά (Zerva, Pentari, Grisel, Berrin, & Topakas, 2020). Κατ' αντιστοιχία, μπορεί να ερμηνευθεί και η αδυναμία της LPMO να διασπάσει την αραβινοξυλάνη. Στην περίπτωση της γλυκομαννάνης, υπάρχει διαφορά μεταξύ των χρωματογραφημάτων του δείγματος που φέρει το ένζυμο και του τυφλού, παρ' όλ' αυτά οι κορυφές που εμφανίζονται στο χρονικό διάστημα 9-10 min, μπορούν να αποδοθούν σε μη οξειδωμένους ολιγοσακχαρίτες, με διαφορετικό βαθμό πολυμερισμού. Συνεπώς, δεν μπορεί να ειπωθεί με τα έως τώρα πειράματα εάν το ένζυμο εμφανίζει πραγματικά ενεργότητα στη γλυκομαννάνη, ειδικά αφού είναι πολύ λίγα τα είδη των λυτικών πολυσακχαρικών μονοοξυγενασών που έχουν αυτό το χαρακτηριστικό (Liu, et al., 2018).

Μελέτη της ύπαρξης συνεργισμού μεταξύ της LPMO και άλλων ενζύμων

1^η δοκιμή

Αρχικά, διενεργήθηκε έρευνα προκειμένου να εξεταστεί η ύπαρξη συνεργισμού μεταξύ της LPMO και άλλων ενζύμων. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν ήταν η εξωγλουκανάση (CBH) και οι ενδογλουκανάσες (EG5) και (EG7). Στην περίπτωση της CBH παρατηρήθηκε αύξηση των αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώθηκαν όταν η πρωτεΐνη συνδυάστηκε με την LPMO. Ο συνεργισμός των δύο ενζύμων οφείλεται στην ικανότητα της λυτικής πολυσακχαρικής μονοοξυγενάσης να βελτιώνει την πρόσβαση της εξωγλουκανάσης στις κρυσταλλικές περιοχές του υποστρώματος, με τη δημιουργία τομών στην αλυσίδα (Eibinger, et al., 2014). Αντιθέτως, ο συνδυασμός της LPMO με την EG5 δεν παρουσίασε κάποια μεταβολή στην συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων συγκριτικά με το δείγμα που έφερε μόνο την ενδογλουκανάση. Η ορθότητα του συγκε-

κριμένου αποτελέσματος θα μπορούσε να αμφισβητηθεί καθώς μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη συνεργιτισμού μεταξύ των δύο ενζύμων. Μάλιστα, έρευνες υποστηρίζουν ότι ο συνδυασμός τους μπορεί να ενισχύσει έως και 16 φορές τη διάσπαση της πολυσακχαρικής αλυσίδας (Guo, et al., 2020). Όσον αφορά την ενδογλουκανάση (EG7), παρατηρείται πολύ μικρή αύξηση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων. Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι η δράση της LPMO δεν έχει αποδώσει αρκετά ώστε να διευκολυνθεί η πρόσβαση της EG7 στην πολυσακχαρική αλυσίδα.

Παράλληλα, ένα στοιχείο που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι ότι σύμφωνα με μελέτες η LPMO δεν ενισχύει ιδιαίτερα τη δράση των κυτταρινασών, όταν η προσβασιμότητα στην κυτταρίνη είναι ήδη αυξημένη (Song, et al., 2018). Ο παράγοντας που δυσχεραίνει την πρόσβαση των ενζύμων στην πολυσακχαρική αλυσίδα είναι η ύπαρξη των κρυσταλλικών περιοχών. Συνεπώς, σε ένα υπόστρωμα με μικρότερο βαθμό κρυσταλλικότητας, ο συνεργιτισμός δεν θα είναι το ίδιο έντονος. Υπενθυμίζεται ότι το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Pasc, το οποίο χαρακτηρίζεται από περιορισμένη έκταση των κρυσταλλικών περιοχών. Επομένως, τα δύο αυτά στοιχεία θα μπορούσαν να αιτιολογήσουν τη μικρή σχετικά αύξηση που σημειώθηκε στη συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώθηκαν.

2^η δοκιμή

Σε συνέχεια των παραπάνω πειραματικών δοκιμών, μελετήθηκε ξανά η δράση της LPMO σε συνδυασμό με την ενδογλουκανάση (EG5), δίνοντας έμφαση στο κατά πόσο η συγκέντρωση της μονοοξυγενάσης στο δείγμα μπορεί να επηρεάσει τη δράση τους. Αρχικά, λοιπόν, προετοιμάστηκαν τρία δείγματα που έφεραν μόνο ένα ένζυμο, σε ποσότητες 20 μ L LPMO, 30 μ L LPMO και 50 μ L EG5, αντίστοιχα. Τα αναγωγικά σάκχαρα που προέκυψαν από τη μεμονωμένη δράση της LPMO σε διαφορετικές ποσότητες, αγγίζουν τα 0.19-0.26 g/L, ενώ από την EG5 φτάνουν στα 1.04 g/L. Η σημαντική αυτή διαφορά έγκειται στον τρόπο δράσης των ενζύμων και στα προϊόντα που δημιουργούν. Η LPMO οξειδώνει την πολυσακχαρική αλυσίδα είτε στον C1 άνθρακα οδηγώντας στον σχηματισμό 1,5- δ -λακτονών που μεταπίπτουν σε αλδονικά οξέα, είτε στον C4 παράγοντας κετοαλδόζες που με τη σειρά τους καταλήγουν σε διόλες (Vermaas, Crowley, Beckham, & Payne, 2015). Οι συγκεκριμένες ενώσεις δεν αποτελούν αναγωγικά σάκχα-

ρα. Αντιθέτως, η EG5 υδρολύει τυχαία β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς σε άμορφες περιοχές της κυτταρίνης, αποδίδοντας ολιγοσακχαρίτες με ελεύθερα άκρα.

Παράλληλα, δημιουργήθηκαν και δύο δείγματα που περιείχαν την LPMO σε όγκο 20 μL και 30 μL αντίστοιχα, και την ενδογλουκανάση (EG5) στα 50 μL το καθένα. Η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων σε αυτά άγγιξε τα 1.72 g/L και 1.76 g/L, αντίστοιχα, αποδεικνύοντας την ύπαρξη του συνεργιτισμού μεταξύ των δύο ενζύμων. Εκτός αυτού, ένα στοιχείο που έχει ενδιαφέρον είναι ότι παρόλο που ο όγκος της LPMO στο δεύτερο δείγμα αυξήθηκε κατά 50%, διατηρώντας σταθερή την ποσότητα της ενδογλουκανάσης, σημειώθηκε πολύ μικρή μεταβολή στην συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων, της τάξης του 2.3%. Εξάγεται, λοιπόν, το συμπέρασμα ότι η αναλογία των δύο ενζύμων επηρεάζει το βαθμό διάσπασης του υποστρώματος, ωστόσο δεν είναι πάντοτε αυξανόμενος. Μελέτες έχουν δείξει ότι μεγάλη συγκέντρωση της LPMO συγκριτικά με την κυτταρινάση ενδέχεται να δράσει παρεμποδιστικά στην αποδόμηση της πολυσακχαριτικής αλυσίδας (Zhou, et al., 2019). Αυτό συμβαίνει διότι τα δύο ένζυμα λειτουργούν ανταγωνιστικά όσον αφορά τη διάσπαση του υποστρώματος (Kim, et al., 2015).

Ταυτόχρονα, αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι τα αναγωγικά σάκχαρα σχεδόν διπλασιάστηκαν, μετά το πέρας 24 επιπλέον ωρών. Μία ερμηνεία για αυτήν την παρατήρηση είναι ότι η LPMO είχε τον απαραίτητο χρόνο προκειμένου να δράσει και να ενισχύσει την προσβασιμότητα της ενδογλουκανάσης στην πολυσακχαριτική αλυσίδα (Zhou, et al., 2019).

Εντοπισμός πιθανών δοτών e⁻

Κατά τη μελέτη των χρωματογραφημάτων που παρελήφθησαν, φαίνεται ότι η LPMO εμφανίζει μεγαλύτερη ενεργότητα όταν το ασκορβικό οξύ διαδραματίζει το ρόλο του δότη ηλεκτρονίων. Ακολουθεί το γαλλικό και καφεϊκό οξύ με μειωμένη δραστηριότητα, ενώ καμία αλλαγή δεν παρατηρείται στις ακόλουθες περιπτώσεις: βανιλίνη, πυρογαλόλη, γουαϊκόλη, κουμαρικό και φερουλικό οξύ.

Γενικά, το ένζυμο αποσπά ηλεκτρόνια από ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, όπως είναι το ασκορβικό και γαλλικό οξύ, προκειμένου να προβεί στην οξειδωση της πολυσακχαριτικής αλυσίδας (Frommhagen, Westphal, van Berkel, & Kabel, 2018). Το

ασκορβικό οξύ είναι μια ένωση που χρησιμοποιείται συνήθως ως δότης ηλεκτρονίων κατά τον χαρακτηρισμό των λυτικών πολυσακχαρικών μονοοξυγενασών. Μάλιστα, μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να δράσει ανεξάρτητα από την πηγή οξυγόνου που χρησιμοποιεί το ένζυμο, δηλαδή O_2 ή H_2O_2 (Hegnar, Petrovic, Bissaro, Alfredsen, Varnai, & Eijssink, 2019). Το γεγονός μπορεί να δικαιολογήσει την αυξημένη ενεργότητα που εμφανίζει η LPMO παρουσία του. Ωστόσο, είναι αναγκαίο η συγκέντρωση του H_2O_2 να περιορίζεται εντός κάποιων ορίων διότι έχουν σημειωθεί περιπτώσεις απενεργοποίησης της LPMO. Τέλος, αρκετές έρευνες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι κάθε είδος των λυτικών πολυσακχαρικών μονοοξυγενασών δεν εμφανίζει προτίμηση μόνο όσον αφορά το υπόστρωμα και τον τρόπο δράσης του, αλλά και το δότη ηλεκτρονίων που θα χρησιμοποιήσει (Meier, et al., 2017).

Προσδιορισμός βέλτιστης τιμής pH

1^η δοκιμή

Στον πρώτο κύκλο των πειραμάτων, μελετήθηκε ένα εύρος τιμών $pH=3-7$, προκειμένου να προσδιοριστεί η τιμή που εντείνει τη δράση της LPMO. Ειδικότερα, καμία δράση της πρωτεΐνης δεν σημειώθηκε στην περίπτωση του $pH=3$, καθώς το χρωματογράφημα του δείγματος που περιείχε το ένζυμο ήταν πανομοιότυπο με εκείνο του τυφλού διαλύματος. Έπειτα, αρκετές κορυφές εντοπίστηκαν για τις τιμές 4 και 5, στα χρονικά διαστήματα 4-6, 8-12 και 19-22 min. Οι κορυφές που εμφανίζονται στο εύρος 5-13 min μπορούν να αποδοθούν σε μη οξειδωμένους ολιγοσακχαρίτες, με διαφορετικό βαθμό πολυμερισμού. Παράλληλα, οι κορυφές που παρουσιάζονται για χρόνους έκλουσης 19-22 min πιθανόν αφορούν ολιγοσακχαρίτες οξειδωμένους στον C4 άνθρακα. Κορυφές στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα παρατηρούνται και για $pH=6$, ωστόσο είναι μεγαλύτερες σε εύρος, γεγονός που υποδηλώνει αυξημένη παραγωγή ολιγοσακχαριτών, οξειδωμένων στον C4 και μη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση της τιμής 7 στο χρωματογράφημα της οποίας εντοπίζονται κορυφές στους χρόνους 4-6, 8-12, 14-16, 19-22 και 28-30 min. Τα διαστήματα 4-6 και 8-12 min μπορούν να αντιστοιχηθούν σε μη οξειδωμένους ολιγοσακχαρίτες, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, ενώ το εύρος 14-16 min σε οξειδωμένα σάκχαρα στον C1 άνθρακα. Τέλος, οι κορυφές που εμφανίζονται για χρόνους 19-22 min σχετίζονται με οξείδωση της πολυσακχαρικής αλυσίδας

στον C4, ενώ εκείνες που σημειώνονται στα 28-30 min αφορούν οξειδωση και στους δύο άνθρακες. Η ισχνή καμπυλότητα των κορυφών που έχουν σημειωθεί στους χρόνους 19-22 min μπορεί να δικαιολογηθεί καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα προϊόντα της οξειδωσης στον C4 άνθρακα είναι αρκετά ασταθή σε υψηλές τιμές pH και δύσκολα ανιχνεύονται (Zhou, et al., 2019).

Συνοψίζοντας, το εύρος pH=4-6 θεωρείται μία καλή επιλογή για τη δράση του ενζύμου καθώς εμφανίζονται προϊόντα διάσπασης της πολυσακχαρικής αλυσίδας, σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις. Στην περίπτωση της τιμής 7, παρόλο που παρατηρείται ότι η συγκέντρωση των προϊόντων είναι σχετικά υψηλότερη, συγκριτικά με τις άλλες τιμές pH, ίσως δεν οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα, λόγω των ακραίων συνθηκών. Αξίζει να σημειωθεί ότι, το ασκορβικό οξύ που χρησιμοποιείται ως δότης ηλεκτρονίων, παρουσιάζει αστάθεια σε υψηλές τιμές pH και θερμοκρασίας (Frommthagen, et al., 2017). Ως βέλτιστη τιμή pH, λοιπόν, θα μπορούσε να προταθεί το 6 για όλους τους λόγους που αναλύθηκαν παραπάνω.

2^η δοκιμή

Στο δεύτερο κύκλο εκτέλεσης των πειραματικών μεθόδων, επιλέχθηκαν τρία διαλύματα, τα οποία ρυθμίστηκαν σε διάφορες τιμές pH και σε αυτά μελετήθηκε η δράση του ενζύμου. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκε το Citrate Phosphate σε τιμές pH 3 και 4, το Sodium Acetate σε περιβάλλον pH 4, 5 και 6, καθώς και το Sodium Phosphate σε τιμές 6 και 7. Συγκρίνοντας τα δύο χρωματογραφήματα που λήφθηκαν για το Citrate Phosphate, παρατηρείται ότι σε συνθήκες pH=4 εμφανίζονται περισσότερες και πιο έντονες κορυφές στα χρονικά διαστήματα 8-10 min και 19-21 min. Η πρώτη μεταβολή θα μπορούσε να αποδοθεί σε μη οξειδωμένους πολυσακχαρίτες, ενώ η δεύτερη σε οξειδωμένα σάκχαρα στον C4 άνθρακα. Ακολουθεί το Sodium Acetate για το οποίο παρουσιάζεται ελάχιστη μεταβολή μεταξύ των διαφορετικών pH. Συγκεκριμένα, τα χρωματογραφήματα που αντιστοιχούν στις τιμές 4 και 5 είναι σχεδόν ίδια μεταξύ τους, ενώ λίγο εντονότερες κορυφές φέρει το διάγραμμα για pH=6. Η μελέτη και των τριών γραφημάτων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι παράχθηκαν κάποιοι μη οξειδωμένοι πολυσακχαρίτες για χρόνο έκλουσης 8-11 min και οξειδωμένα στον C4 σάκχαρα στο διάστημα 19-21 min. Παράλληλα, το Sodium Phosphate συμβάλλει στη λειτουργία του ενζύμου καθώς στα

χρωματογραφήματα για pH 6 και 7 διακρίνονται κορυφές στους χρόνους 9-11 min και 19-22 min, που αφορούν μη οξειδωμένους ολιγοσακχαρίτες και οξειδωμένα στον C4 άνθρακα σάκχαρα, αντίστοιχα. Ωστόσο, σημειώνονται μεταβολές μεταξύ των δύο τιμών διότι για pH=6 οι κορυφές είναι εντονότερες. Ταυτόχρονα, ορισμένες γωνίες εμφανίζονται για τιμή 7 στο διάστημα 27-29 min, οι οποίες θα μπορούσαν να αποδοθούν σε οξειδωμένους και στους δύο άνθρακες ολιγοσακχαρίτες. Συμπερασματικά, για τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω προκειμένου να επιτρέψουν τη μελέτη όλου του εύρους των τιμών pH που εξετάστηκαν, επιβεβαιώνεται ότι η βέλτιστη τιμή είναι το 6 ή όσο το δυνατόν πιο κοντινή σε αυτή.

Ανίχνευση βέλτιστης θερμοκρασίας

Ο τρόπος με τον οποίο επιδρά η θερμοκρασία επώασης στη λειτουργία της πρωτεΐνης μελετήθηκε για συνθήκες 40°C, 50°C, 60°C και 70°C. Από τα διαγράμματα και τον υπολογισμό του εμβαδού των κορυφών που έχουν ληφθεί, διαφαίνεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της LPMO είναι στους 50°C και ακολουθούν οι 60°C και 40°C ενώ με μεγάλη διαφορά κατατάσσονται στην τελευταία θέση οι 70°C.

Γενικά, τα ένζυμα θεωρούνται ευαίσθητα και ασταθή κατά την αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος στο οποίο δρουν. Ειδικότερα, σε συνθήκες υψηλής θερμότητας, οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται, δηλαδή χάνουν τη δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους, με αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας του (Singh, Tiwari, Singh, & Lee, 2013). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι δυσχεραίνεται η σύνδεση τους με τα υποστρώματα που μπορούν να διασπάσουν. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι ορισμένα ένζυμα του μύκητα *Myceliophthora thermophila*, παραδείγματος χάρη το MtLPMO9B, εμφανίζουν μη αναστρέψιμη αλλαγή της δομής τους, κατά την αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από τους 70°C (Singh, et al., 2019). Παράλληλα, η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να επιφέρει τον σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) στο ενεργό κέντρο των μονοοξυγενασών, τα οποία προκαλούν οξειδωτικές τροποποιήσεις (Frommhagen, et al., 2017). Οι αλλαγές αυτές στα κατάλοιπα της ιστιδίνης και στα γειτονικά αμινοξέα οδηγούν στην απενεργοποίηση του ενζύμου.

Τέλος, η θερμοκρασία του περιβάλλοντος στο οποίο δρα το ένζυμο επηρεάζει όχι μόνο την LPMO αλλά και το δότη ηλεκτρονίων (Frommhagen, et al., 2017). Ειδικότερα,

έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε λιγότερο σταθερές μορφές τους δότες ηλεκτρονίων με συνέπεια να αδυνατούν να υποστηρίξουν τον ενζυμικό μηχανισμό διάσπασης των πολυσακχαριτών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι εκείνο του ασκορβικού οξέος, το οποίο χρησιμοποιείται κατά κόρον ως δότης, ωστόσο αποδομείται σε υψηλές θερμοκρασίες (Kadakai, Duman, & Ekinçi, 2017).

Καλλιέργειες *Cryptocodinium cohnii* – Παραγωγή DHA

Στο πλαίσιο εκπόνησης της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του μικροφύκου, *C. cohnii* ATCC 30772 με σκοπό την παραλαβή του εικοσιδιεξανοϊκού οξέος (DHA), ενός ω-3 λιπαρού οξέος με ευεργετικές ιδιότητες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Η επιλογή του μικροφύκου δεν ήταν τυχαία μιας και παρουσιάζει υψηλό ρυθμό ανάπτυξης συγκριτικά με άλλα είδη, καθώς και αυξημένο ποσοστό λιπαρών οξέων που συσσωρεύονται στα κύτταρα του (Pei, et al., 2017). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα λιπαρά οξέα μπορούν να καταλάβουν έως και το 45-50% της ξηρής βιομάζας του μικροοργανισμού, εκ των οποίων το κλάσμα του DHA μπορεί να πλησιάζει το 30-50% του συνόλου των οξέων (Karnaouri, Chalima, Kalogiannis, Varamogianni-Mamatsi, Lappas, & Torakas, 2020). Παράλληλα, το μικροφύκος έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται αξιοποιώντας διάφορες πηγές άνθρακα, όπως είναι τα σάκχαρα, η γλυκερόλη και τα καρβοξυλικά οξέα (Paz, Karnaouri, Templis, Papayannakos, & Torakas, 2020). Στην οικογένεια των λιπαρών οξέων που απομονώθηκαν από τα κύτταρα του *C. cohnii* περιλαμβάνονται το εικοσιδιεξανοϊκό οξύ ή DHA (C22:6), το τετραδεκανοϊκό (C14:0), το εξαδεκανοϊκό (C16:0), το βαξενικό (C18:1) και το οκταδεκανοϊκό οξύ (C18:0). Εκτός αυτών, το στέλεχος ATCC 30772 του *C. cohnii* που έχει επιλεγεί, θεωρείται ως το καλύτερο για την παραγωγή λιπαρών οξέων συγκριτικά με άλλα στελέχη του μικροφύκου (Ratlidge C. , Kanagachandran, Anderson, Grantham, & Stephenson, 2001).

Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για την επώαση των υγρών καλλιεργειών στόχευαν στη μέγιστη δυνατή απόδοση των κυττάρων του μικροφύκου σε λιπαρά οξέα. Αναλυτικότερα, σύμφωνα με μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *C. cohnii* σε ένα εύρος 15-30°C, το ανώτατο άκρο των 30°C επιταχύνει τον ρυθμό ανάπτυξης του μικροφύκου (Jiang & Chen, 2000). Αντιθέτως, οι χαμηλές θερμοκρασίες ευνοούν τον σχηματισμό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, καθώς εκείνα

συμβάλλουν στη διατήρηση της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης, που επηρεάζεται από τις ψυχρές συνθήκες (Chalima, Taxeidis, & Topakas, 2020). Με γνώμονα τα παραπάνω δεδομένα, οι υγρές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 27°C. Μάλιστα, πειραματικές δοκιμές έχουν δείξει ότι το μικροφύκος δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε θερμοκρασιακές μεταβολές μικρής απόκλισης από τους 27°C. Μία ακόμη παράμετρος που επιλέχθηκε με προσοχή ήταν ο ρυθμός ανάπτυξης του περιεχομένου των κωνικών φιαλών. Ειδικότερα, εφαρμόστηκαν τα 160 rpm στον επωαστήρα, τα οποία θεωρείται ότι παρέχουν στον *C. cohnii* ικανό ποσοστό οξυγόνου, απαραίτητου για την ανάπτυξη του (Karnaouri, Chalima, Kalogiannis, Varamogianni-Mamatsi, Lappas, & Topakas, 2020).

Υδρόλυση Avicel – Υγρή καλλιέργεια και παραγωγή λιπαρών οξέων

Στον πρώτο κύκλο δημιουργίας υγρών καλλιεργείων του *C. cohnii*, χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα γλυκόζη, που προέκυψε από την ενζυμική υδρόλυση Avicel, σε συγκέντρωση 20 g/L. Γενικά, το σάκχαρο αυτό θεωρείται ως η βέλτιστη πηγή άνθρακα για καλλιέργειες που στοχεύουν στην παραγωγή DHA (Li, Pei, Liu, Chen, & Zhang, 2017). Παράλληλα, η συγκέντρωση της γλυκόζης έχει επιλεγεί με προσοχή καθώς όταν υπερβαίνει τα 25 g/L, μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης του μικροφύκου (de Swaaf, de Rijk, Eggink, & Sijtsma, 1999). Η ξηρή βιομάζα που παραλήφθηκε μετά την εφαρμογή της λυοφιλίωσης ανέρχεται σε 3.25 mg/mL. Συγκρίνοντας αυτό το δεδομένο με την τιμή 3.73 mg/mL που έχει σημειωθεί για υγρές καλλιέργειες στις οποίες έγινε χρήση γλυκόζης προερχόμενης από Avicel, φαίνεται ότι κινείται εντός αναμενόμενων πλαισίων (Karnaouri, Chalima, Kalogiannis, Varamogianni-Mamatsi, Lappas, & Topakas, 2020). Τα λιπαρά οξέα που εκχυλίστηκαν από τα κύτταρα του μικροφύκου αγγίζουν το 25.32% της ξηρής βιομάζας. Η ανάλυση του είδους τους με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας δείχνει ότι το DHA καταλαμβάνει το 36.56% του συνόλου των λιπαρών οξέων που απομονώθηκαν, το εξαδεκανοϊκό οξύ (C16:0) το 28.04%, το τετραδεκανοϊκό (C14:0) το 22.66%, το οκταδεκανοϊκό (C18:0) το 10.29% και το βαξενικό οξύ (C18:1) το 2.45%. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό ότι το εικοσιδιεξανοϊκό οξύ (C22:6) διατηρεί το μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ των υπόλοιπων λιπαρών οξέων. Συγκρίνοντας τις τιμές των λιπαρών οξέων που αποτελούν το 25.32% της ξηρής βιομάζας και του DHA, με 36.56% του συνόλου των λιπαρών οξέων, με εκείνες άλλων μελετών που ανέρχονται σε 23.3% και 45.7%, αντίστοιχα, παρατηρείται μια σχετική ταύτιση των λιπαρών οξέων αλλά μικρή

απόκλιση μεταξύ των ποσοστών DHA (Karnaouri, Chalima, Kalogiannis, Varamogianni-Mamatsi, Lappas, & Torakas, 2020). Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στο διαφορετικό ποσοστό γλυκόζης που περιείχαν οι καλλιέργειες, καθώς στη δεδομένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν 20 g/L γλυκόζη, ενώ στην συγκρινόμενη μελέτη 30 g/L. Ωστόσο, παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι το συνολικό ποσοστό των λιπαρών οξέων δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την συγκέντρωση της γλυκόζης σε σχέση με εκείνο του DHA. Αξίζει να σημειωθεί ακόμα ότι συσσώρευση της ένωσης που χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα αλλά με περιορισμό ενός από τα υπόλοιπα θρεπτικά συστατικά, διεγείρει την παραγωγή του DHA (Wang, Fosse, Li, Chauton, Vadstein, & Reitan, 2019).

Υδρόλυση Βιομάζας I – Υγρή καλλιέργεια και παραγωγή λιπαρών οξέων

Στο δεύτερο κύκλο προετοιμασίας υγρών καλλιεργειών του *C. cohnii* χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα γλυκόζη που προήλθε από την υδρόλυση δειγμάτων βιομάζας πεύκου. Αναλυτικότερα, αξιοποιήθηκαν τρία δείγματα, με τον συμβολισμό 12, 13 και 16, τα οποία είχαν υποβληθεί σε ήπια, υδροθερμική προκατεργασία, πριν το στάδιο της υδρόλυσης. Υπενθυμίζεται ότι το εργαστήριο βιοτεχνολογίας στο οποίο έλαβε χώρα το πειραματικό μέρος, παρέλαβε προεπεξεργασμένη τη βιομάζα. Η θερμοκρασία και η πίεση που είχαν εφαρμοστεί ήταν σταθερές στους 175°C και 16 bar, αντίστοιχα. Ωστόσο, η κατεργασία των βιομαζών διέφερε ως προς τους διαλύτες που είχαν χρησιμοποιηθεί και τον χρόνο αντίδρασης. Συγκεκριμένα, στα δείγματα 12 και 16 είχαν προστεθεί διαλύματα που περιείχαν νερό και αιθανόλη σε αναλογία 1:1, ενώ στο 13 διάλυμα νερού ακετόνης, σε ποσοστό 50/50%. Αξίζει να σημειωθεί ότι η προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας με οργανικούς διαλύτες, συμβάλλει στη μείωση της κρυσταλλικότητας, στην ευχερέστερη πρόσβαση των ενζύμων στο υπόστρωμα και κατ'επέκταση στη μεγαλύτερη απόδοση μορίων γλυκόζης (Kalogiannis, Matsakas, Aspden, Lappas, Rova, & Christakopoulos, 2018). Παράλληλα, διαφορές σημειώθηκαν και στη διάρκεια εφαρμογής της προκατεργασίας, μιας και ο χρόνος αντίδρασης για τα δείγματα 12 και 13 ήταν 60 min, ενώ για το 16 120 min. Οι βιομάζες υπέστησαν υδρόλυση με την προσθήκη διαλύματος υδρολυτικών ενζύμων και την παραμονή τους σε επωαστήριο για χρονικό διάστημα δύο ημερών.

Μετά το πέρας των 48 ωρών, ακολούθησε φωτομέτρηση του υπερκείμενου υγρού κάθε βιομάζας, που περιέχει την γλυκόζη, σε μήκος κύματος 510 nm, με σκοπό την αξιολόγηση της πορείας της υδρόλυσης. Το δείγμα 12 απελευθέρωσε 53.60 mg/mL γλυκόζης, το 13 οδήγησε σε 32.08 mg/mL και για το 16 προέκυψαν 46.60 mg/mL. Παρατηρείται, λοιπόν, ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης παραλήφθηκε από τη φυτική βιομάζα 12, έπειτα από την 16 και τέλος από την 13. Αναζητώντας το λόγο διαμόρφωσης αυτής της κατάταξης, μελετάται εκτενώς η σύσταση των δειγμάτων. Αναλυτικότερα, η βιομάζα 13 περιέχει το υψηλότερο ποσοστό κυτταρίνης, σε αντίθεση με το δείγμα 12. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την υψηλή απόδοση γλυκόζης του 12 οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση της κυτταρίνης μπορεί να δυσχεραίνει τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων. Αυτό οφείλεται στη σύνθετη δομή της λόγω της ύπαρξης διαφορετικών δεσμών μεταξύ των μορίων της, γεγονός που μειώνει την προσβασιμότητα των ενζύμων στην πολυσακχαρική αλυσίδα (Agbor, Cicek, Sparling, Berlin, & Levin, 2011). Παράλληλα, η ύπαρξη παρεμποδιστικών ουσιών μπορεί να ελαττώσει την απόδοση των ενζύμων (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η συσσώρευση κελλοβιόζης στο υπό υδρόλυση υλικό, καθώς ο συγκεκριμένος δισακχαρίτης προσκολλάται στο ενεργό κέντρο των κυτταρινασών, εμποδίζοντας τη δράση τους (Atreya, Strobel, & Clark, 2015).

Την παραλαβή του διαλύματος γλυκόζης μετά το πέρας των υδρολύσεων, διαδέχθηκε η προετοιμασία και επώαση των υγρών καλλιιεργειών του μικροφύκου, για 5 ημέρες, σε θερμοκρασία 27°C και υπό ανάδευση 160 rpm. Η ξηρή βιομάζα που παραλήφθηκε μετά την εφαρμογή της λυοφιλίωσης, κινείται σε κοντινές τιμές και για τα τρία δείγματα. Συγκεκριμένα, για το 12 προέκυψε η τιμή 9.43 mg/mL, για το 13 υπολογίστηκαν 8.44 mg/mL και για το 16 ο αριθμός 8.17 mg/mL. Η σχετικά υψηλή σύγκλιση που παρουσιάζουν αυτές οι τιμές μπορεί να αποδοθεί στην παρόμοια συγκέντρωση γλυκόζης, 25 g/L, που επιλέχθηκε να προστεθεί στις καλλιέργειες. Η απόκλιση, όμως, μπορεί να συσχετιστεί με την ύπαρξη κάποιου παρεμποδιστικού παράγοντα. Το δείγμα 16, παραδείγματος χάρη, εμφανίζει τη μικρότερη ποσότητα ξηρής βιομάζας. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στον αυξημένο χρόνο αντίδρασης, 120 min, κατά τον οποίο παράχθηκαν παρπροϊόντα με παρεμποδιστική δράση. Μάλιστα, προηγούμενες έρευνες έχουν αναδείξει ως βέλτιστες συνθήκες προκατεργασίας με οργανικούς διαλύτες θερμοκρασίες που

εντάσσονται στο εύρος 150-220°C, ποσοστό συστατικών 50/50% και χρόνο αντίδρασης 60 min (Borand & Karaosmanoglu, 2018).

Το ποσοστό των λιπαρών οξέων που υπολογίστηκε για τα δείγματα βιομάζας πεύκου εντάσσεται στο εύρος 46-50%. Αναλυτικότερα, το ποσοστό των λιπαρών οξέων επί της ξηρής βιομάζας για το δείγμα 12 ανέρχεται σε 46.85%, για το 13 στο 50.75% και για το 16 στο 50.54%. Συγκρίνοντας τις παραπάνω τιμές με το ποσοστό των λιπαρών οξέων που έχει προκύψει για χρήση καθαρής γλυκόζης ως πηγή άνθρακα και κυμαίνεται στο εύρος 40-45% επί της ξηρής βιομάζας, φαίνεται ότι οι φυτικές βιομάζες έχουν οδηγήσει σε υψηλή συσσώρευση λιπαρών (Ratledge C. , Kanagachandran, Anderson, Grantham, & Stephenson, 2001). Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανόν να υπάρχει κάποιος παρεμποδιστικός παράγοντας στα υδρολύματα. Αναλυτικότερα, κατά την ανάπτυξη του μικροφύκου, η παρουσία κάποιας ουσίας που δρα παρεμποδιστικά ή η έλλειψη ενός θρεπτικού συστατικού, με ταυτόχρονη υψηλή συγκέντρωση της πηγής άνθρακα, οδηγεί τον *C. cohnii* στην πρόσληψη του C και τη συσσώρευση του ως λιπαρά οξέα (Chalima, Hatzidaki, Karnaouri, & Torakas, 2019). Παράλληλα, χρειάζεται να αναφερθεί ότι το ποσοστό 40-45% λιπαρά οξέα επί της ξηρής βιομάζας που αναφέρθηκε προηγουμένως, αφορά συγκέντρωση καθαρής γλυκόζης 9 g/L, ενώ στην περίπτωση των φυτικών βιομαζών επιλέχθηκαν 25 g/L. Το γεγονός αυτό εγείρει ερωτηματικά σχετικά με τη βέλτιστη συγκέντρωση γλυκόζης στις καλλιέργειες καθώς και κατά πόσο επηρεάζουν την απόδοση τους άλλες ουσίες.

Εστιάζοντας στο είδος των λιπαρών οξέων που έχουν ανιχνευτεί, η βιομάζα 12 απέδωσε DHA σε ποσοστό 4.10% επί του συνόλου των λιπαρών οξέων, C14:0 σε 17.45%, C16:0 σε 27.89%, C18:1 σε 42.50% και C18:0 σε 8.06%. Από τις τιμές αυτές γίνεται αντιληπτό ότι η παραγωγή των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων ευνοήθηκε συγκριτικά με εκείνη των κορεσμένων και των πολυακόρεστων. Αναζητώντας μια εξήγηση για το γεγονός αυτό, χρειάζεται να αναφερθούν οι πιθανοί τρόποι σύνθεσης του εικοσιδιεξανοϊκού οξέος. Μία πρόταση είναι ότι πρώτα δημιουργούνται τα κορεσμένα λιπαρά οξέα μεταξύ των οποίων βρίσκεται το οκταδεκανοϊκό (C18:0), το οποίο μετατρέπεται στο μονοακόρεστο, βαξενικό οξύ (C18:1) με τη δράση ενζύμων (Pei, et al., 2017). Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ενορχηστρώνουν την απόσπαση δύο ατόμων υδρογόνου από δύο

άνθρακες, οδηγώντας στην ανάπτυξη διπλού δεσμού μεταξύ των ανθρακικών ατόμων (Starikov, Sidorov, Mironov, Goriainov, & Los, 2020). Στη συνέχεια, το βαξενικό οξύ μετατρέπεται σε μια σειρά από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, έως ότου παραχθεί το εικοσιδιεξανοϊκό οξύ (C22:6). Μία άλλη πρόταση αφορά την σύνθεση του DHA απευθείας από το ακετυλο-CoA με τη συμβολή διαφόρων ενζύμων (Chalima, Taxeidis, & Topakas, 2020). Συνεπώς, η αυξημένη παραγωγή των κορεσμένων λιπαρών και του βαξενικού οξέος έναντι του DHA θα μπορούσε να αποδοθεί στην συσσώρευση ουσιών που ευνοούν την παραγωγή του C18:1, όπως είναι οι πεντόζες, αλλά όχι τη σύνθεση του C22:6 (Karnaouri, Chalima, Kalogiannis, Varamogianni-Mamatsi, Lappas, & Topakas, 2020). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται κι από την περιεκτικότητα του δείγματος 12 σε ημικυτταρίνη, που είναι η υψηλότερη, μιας και οι πεντόζες αποτελούν ένα από τα κυριότερα συστατικά της. Για τα δείγματα 13 και 16 παρατηρούνται παρόμοια ποσοστά για το DHA και το C18:1. Ειδικότερα, για τη βιομάζα 13 έχουν προκύψει τα ποσοστά: DHA 21.19%, C14:0 16.06%, C16:0 24.72%, C18:1 31.09% και C18:0 6.94%. Η ανάλυση του λιπιδιακού περιεχομένου της βιομάζας 16, έχει δώσει την ακόλουθη εικόνα: DHA 20.26%, C14:0 17.44%, C16:0 26.48%, C18:1 30.13% και C18:0 5.68%. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό ότι η παραγωγή του DHA είναι αρκετά αυξημένη συγκριτικά με εκείνη του δείγματος 12, ενώ του C18:1 μειωμένη, ενισχύοντας την υπόθεση για τους ανασταλτικούς παράγοντες σύνθεσης του C22:6, που προηγήθηκε.

Σύγκριση απόδοσης καλλιέργειών σε λιπαρά οξέα

Στο πλαίσιο δημιουργίας υγρών καλλιεργειών του *C. cohnii*, χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα γλυκόζη, η οποία προήλθε είτε από την υδρόλυση Avicel, είτε φυτικής βιομάζας πεύκου, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Προχωρώντας σε σύγκριση των αποτελεσμάτων που έχουν εξαχθεί, παρατηρείται ότι στην περίπτωση του Avicel, η ξηρή βιομάζα που συλλέχθηκε μετά τη λυοφιλίωση είναι αρκετά λιγότερη σε σχέση με εκείνη των δειγμάτων 12, 13 και 16. Συγκεκριμένα, ανέρχεται σε 3.25 mg/mL, ενώ στα δείγματα της βιομάζας πεύκου κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 8-9.50 mg/mL. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με τη διαφορετική συγκέντρωση γλυκόζης που είχε προστεθεί αρχικά σε κάθε δείγμα. Ειδικότερα, στις υγρές καλλιέργειες με πηγή άνθρακα γλυκόζη προερχόμενη από την υδρόλυση Avicel, προστέθηκαν 20 g/L γλυκόζης, ενώ σε εκείνες των φυτικών βιομαζών χρησιμοποιήθηκαν 25 g/L. Ωστόσο, θα μπορούσε να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του

Avicel, η αρχική γλυκόζη ήταν 20% λιγότερη σε σχέση με εκείνη των δειγμάτων 12, 13 και 16, αλλά η διαφορά της ξηρής βιομάζας τους ανέρχεται στο 60% περίπου. Ως εκ τούτου, υπήρξαν κι άλλες παράμετροι που επηρέασαν το τελικό αποτέλεσμα. Παράλληλα, το μικροφύκος μπορεί να χρησιμοποιήσει ως πηγή άνθρακα διάφορες ουσίες, πέρα από την γλυκόζη, όπως είναι η αιθανόλη, η γλυκερόλη και το οξικό οξύ (Chalima, Hatzidaki, Karnaouri, & Topakas, 2019). Με βάση αυτήν τη διαπίστωση, έχουν μελετηθεί κι άλλες ουσίες, με πρόσφατες έρευνες να αναδεικνύουν και την ξυλόζη ως μία πιθανή πηγή άνθρακα για τον *C. cohnii* (Karnaouri, Chalima, Kalogiannis, Varamogianni-Mamatsi, Lappas, & Topakas, 2020). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αιτιολογήσει την αυξημένη ξηρή βιομάζα των δειγμάτων 12, 13 και 16, χάρις το αυξημένο ποσοστό τους σε ξυλόζη, ως προϊόν διάσπασης της ημικυτταρίνης.

Το λιπιδιακό περιεχόμενο των κυττάρων που συλλέχθηκαν δείχνει ότι τα δείγματα 12, 13 και 16 υπερτερούν συγκριτικά με το Avicel. Αναλυτικότερα, το ποσοστό των λιπαρών οξέων που φέρουν κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 46-50%, σε αντίθεση με το Avicel που φτάνει μόλις στο 25.32%. Ωστόσο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση του εικοσιδιεξανοϊκού οξέος σημειώνεται για το Avicel, με ποσοστό 36.56% του συνόλου των λιπαρών οξέων. Στον αντίποδα, το δείγμα 12 εμφανίζει μόλις 4.10% DHA, ενώ οι βιομάζες 13 και 16, περίπου 20%. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την αντίληψη ότι η σχέση μεταξύ του λιπιδιακού περιεχομένου και του ποσοστού του C22:6 είναι αντιστρόφως ανάλογη (Chalima, Hatzidaki, Karnaouri, & Topakas, 2019).

Υδρόλυση βιομάζας II – Κυτταρική ανάπτυξη

Κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε ακόμα μία σειρά πειραμάτων με δείγματα φυτικής βιομάζας, που προέρχονταν από οξιά. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν έξι δείγματα, με διαφορετική σύσταση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης, καθώς και άλλες συνθήκες προκατεργασίας. Οι βιομάζες υποβλήθηκαν σε ενζυμική υδρόλυση προκειμένου να παραληφθεί γλυκόζη. Η μέθοδος προσδιορισμού του μονοσακχαρίτη έδειξε ότι τα δείγματα 6, 5, 4 και 20 έφεραν την υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης, με τιμές που κυμαίνονταν από τα 188 έως 256 mg/mL. Αντιθέτως, τα

δείγματα 19 και 21 εμφάνισαν την χαμηλότερη απόδοση, με την συγκέντρωση να ανέρχεται μόλις στο 31.72 mg/mL και 6.17 mg/mL, αντίστοιχα.

Κατά τη μέθοδο προκατεργασίας της βιομάζας, ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν η αιθανόλη (EtOH), η ακετόνη (ACO) και το τετραϋδροφουράνιο (THF) σε διαλύματα σύστασης 50/50 w/w με το νερό. Εξετάζοντας τη συμβολή του διαλύτη στη διαμόρφωση της απόδοσης σε γλυκόζη, παρατηρείται μέγιστη συγκέντρωση για το δείγμα 20, στο οποίο έχει επιδράσει το THF. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μεταβάλλοντας τον χρόνο αντίδρασης από τα 120 min στα 60 min και τη θερμοκρασία από τους 160°C στους 150°C, υπάρχει ελάχιστη μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Ωστόσο, αλλαγή της πίεσης από τα 16 bar στα 8 bar, προκαλεί ραγδαία μεταβολή της απόδοσης, δίνοντας μόλις 6.17 mg/mL γλυκόζης (δείγμα 21), σε αντίθεση με τα 256.40 mg/mL (δείγμα 20). Ακολουθεί η αιθανόλη, η οποία δίνει σημαντική ποσότητα γλυκόζης (δείγμα 4) σε σύντομο χρόνο αντίδρασης 60 min και θερμοκρασία 150°C. Ωστόσο, παρουσιάζει έντονη μείωση της συγκέντρωσης με διπλασιασμό του χρόνου στα 120 min και αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10°C. Τέλος, η ακετόνη εμφανίζει μία ικανοποιητική απόδοση γλυκόζης, σε ήπια θερμοκρασία 150°C και χρόνο 60 min. Συνεπώς, ως καλύτερος διαλύτης θα μπορούσε να θεωρηθεί το THF, μιας και δρα εξίσου αποτελεσματικά σε ήπιες συνθήκες (60 min, 150°C), διατηρώντας την πίεση στα 16 bar. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην πολικότητα του, που διευκολύνει τη διάλυση της λιγνίνης, καθώς και στην ικανότητα του να αποσταθεροποιεί τα όξινα πρωτόνια, αυξάνοντας τα ποσοστά διάσπασης (Shuai, Questell-Santiago, & Luterbacher, 2015).

Η μελέτη των υπόλοιπων χαρακτηριστικών της ήπιας υδροθερμικής κατεργασίας δείχνει ότι υψηλοί χρόνοι αντίδρασης και θερμοκρασίες δεν αποδίδουν μεγάλη συγκέντρωση γλυκόζης. Χαρακτηριστικά, ως βέλτιστος χρόνος επαφής της βιομάζας με τον διαλύτη και θερμοκρασία, προτείνονται τα 60 min και οι 150°C, υπό συνθήκες πίεσης (Borand & Karaosmanoglu, 2018). Η εξήγηση σε αυτό θα μπορούσε να ήταν ότι σε αυξημένους χρόνους και θερμοκρασίες, απελευθερώνονται ουσίες οι οποίες δρουν παρεμποδιστικά στην εξέλιξη της υδρόλυσης. Παραδείγματα αποτελούν ενώσεις διάσπασης των σακχάρων, όπως είναι η φουρφοουράλη από τις πεντόζες και η υδροξυλομεθυλοφουρφοουράλη από τις εξόζες, καθώς και προϊόντα αποικοδόμησης της λιγνίνης (λιγνινό-

λες κι άλλες φαινολικές αλκοόλες) (Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2016). Παράλληλα, η προκατεργασία απαιτεί συνθήκες πίεσης προκειμένου να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύτη (Borand & Karaosmanoglu, 2018). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να ερμηνεύσει και τη χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης, όταν η πίεση μειώθηκε από τα 16 στα 8 bar. Ωστόσο, τα παραπάνω δεν μπορούν να αξιολογηθούν αποσπασματικά, καθώς για την επίτευξη υψηλής απόδοσης γλυκόζης, απαιτείται ο κατάλληλος συνδυασμός των παραμέτρων που αναφέρθηκαν.

Αξιολογώντας το πλήθος των κυττάρων του *C. cohnii* με τη μέθοδο της φωτομέτρησης στα 685 nm, παρατηρείται υψηλή απορρόφηση σε χρόνο επώασης 120 h. Ξεχωρίζουν τα δείγματα 4, 20 και 6 για τα οποία σημειώνονται οι υψηλότερες τιμές απορρόφησης. Ακολουθεί η βιομάζα 19, που παρουσιάζει μία καλή κυτταρική ανάπτυξη. Μάλιστα, η συγκεκριμένη λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα είναι η μοναδική από την οποία απουσιάζουν η γαλακτόζη και η αραβινόζη από τη σύσταση της ημικυτταρίνης. Το γεγονός αυτό εγείρει ερωτήματα για το πώς θα μπορούσε να επηρεάσει την ανάπτυξη του μικροφύκους. Έπειτα, κατατάσσεται το δείγμα 5 με χαμηλή κυτταρική ανάπτυξη που οδηγεί στην εικασία ύπαρξης κάποιας ουσίας που δρα παρεμποδιστικά, όπως και στην περίπτωση του δείγματος 21 που λαμβάνει την τελευταία θέση.

Μελλοντικοί στόχοι

Οι δυνατότητες αξιοποίησης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και η ανάγκη εύρεσης αποτελεσματικότερων τεχνικών προ επεξεργασίας της, στρέφουν το ερευνητικό ενδιαφέρον στις λυτικές πολυσακχαρικές μονοοξυγενάσες. Παράλληλα, οι ευεργετικές ιδιότητες του εικοσιδιεξανοϊκού οξέος (DHA) στον ανθρώπινο οργανισμό υπογραμμίζουν την σημασία εξέλιξης των μεθόδων παραγωγής του με σκοπό τη μεγιστοποίηση. Σε επιστημονικό επίπεδο, λοιπόν, εμφανίζονται οι ακόλουθοι στόχοι για έρευνα:

Λυτικές πολυσακχαρικές μονοοξυγενάσες

- ❖ Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών επώασης των υγρών καλλιιεργειών του ζυμομύκητα *P. pastoris* με στόχο τη μεγιστοποίηση της παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης
- ❖ Πιθανά υποστρώματα δράσης της LPMO
- ❖ Ενεργότητα του ενζύμου σε ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες που φέρουν α-γλυκοζιτικούς δεσμούς
- ❖ Προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης της LPMO και του υποστρώματος προκειμένου να επιτευχθεί ο μέγιστος συνεργισμός με άλλα ένζυμα.
- ❖ Εντοπισμός πιθανών δοτών ηλεκτρονίων, παραδείγματος χάρη ο ρόλος της CDH
- ❖ Μελέτη της δομής του ενζύμου με εφαρμογή της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

Παραγωγή ω-3 λιπαρών οξέων από το μικροφύκος, *C. cohnii*

- ❖ Εύρεση εναλλακτικών πηγών άνθρακα
- ❖ Βέλτιστη συγκέντρωση yeast extract και sea salt
- ❖ Ο βαθμός που επηρεάζει η διαθέσιμη γλυκόζη το ποσοστό των λιπαρών οξέων καθώς κι εκείνο του εικοσιδιεξανοϊκού οξέος
- ❖ Βέλτιστες συνθήκες προκατεργασίας της φυτικής βιομάζας

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbott, W., & Lammerts van Bueren, A. (2014, October). *Using structure to inform carbohydrate binding module function*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X14000761#fig0005>
- Abu-Ghannam, N., & Balboa, E. (2018). Biotechnological, food and health care applications. Στο *Sustainable recovery and reutilization of cereal processing by-products* (σσ. 253-278). Woodhead Publishing.
- Agbor, V., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. (2011, December). *Biomass pretreatment: Fundamentals toward application*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011000607>
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014, April 18). *Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production*. Ανάκτηση από NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743983>
- Ai, Y., & Jane, J.-L. (2016). *Starch: Structure, property and determination*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472006577>
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., και συν. (2016). *Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας*. (N. Ανάγνου, Π. Παπαζαφείρη, Ι. Παπαματθαϊάκης, & Κ. Σταματόπουλος, Επιμ.) Λευκωσία: Πασχαλίδης.
- Altendorf, K., Booth, I., Gralla, J., Greye, J., Rosenthal, A., & Wood, J. (2009, August). *Osmotic Stress*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26443764>
- Andersen, N., Johansen, K., Michelsen, M., Stenby, E., Krogh, K., & Olsson, L. (2008, March 4). *Hydrolysis of cellulose using monocomponent enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on Avicel*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022907003456>
- Annual Fuel Ethanol Production*. (2018). Ανάκτηση από RFA: <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>
- Archer, L., Mc Gee, D., Paskuliakova, A., McCoy, G., Smyth, T., Gillespie, E., και συν. (2019, December). *Fatty acid profiling of new Irish microalgal isolates producing the high-value metabolites EPA and DHA*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926419300931>
- Arevalo-Gallegos, A., Ahmad, Z., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., & Iqbal, H. (2017, June). *Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach-A review*. Ανάκτηση από Scopus: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85014389262&origin=inward&txGid=f08f99d24e66dffc6d179fbf6357e98c>

- Arora, R., Bharval, P., Sarswati, S., Sen, T., & Yennamalli, R. (2018, December 18). *Structural dynamics of lytic polysaccharide monoxygenases reveals a highly flexible substrate binding region*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1093326318306776>
- Aslanzadeh, S., Ishola, M., Richards, T., & Taherzadeh, M. (2014). *Biorefineries: Integrated biochemical processes for liquid biofuels*.
- Atreya, M., Strobel, K., & Clark, D. (2015, August). *Alleviating product inhibition in cellulase enzyme Cel7A*. Ανάκτηση από Wiley Online Library: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bit.25809>
- Ayodele, B., Alsaffar, M., & Mustapa, S. (2019, October 11). *An overview of intergation opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652619337278>
- Bajinting, A., & Ng, H. (2019, June 5). *A detailed protocol for large-scale recombinant expression and validation of human FGFR2 with its transmembrane and extracellular domains in Escherichia coli*. Ανάκτηση από Bio-protocol: <https://bio-protocol.org/e3261>
- Barbosa, F., Kendrick, E., Brenelli, L., Arruda, H., Pastore, G., Rabelo, S., και συν. (2020, October). *Optimization of cello-oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane straw using cellulolytic and oxidative enzymes*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953420302312>
- Basotra, N., Dhiman, S., Agrawal, D., Sani, R., Tsang, A., & Chadha, B. (2019, April 24). *Characterization of a novel Lytic Polysaccharide Monoxygenase from Malbranchea cinnamomea exhibiting dual catalytic behavior*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621518307389>
- Beeson, W., Phillips, C., Cate, J., & Marletta, M. (2011, December). *Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monoxygenases*. Ανάκτηση από Journal of the American chemical society: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja210657t>
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2018). *Χημεία Τροφίμων* (Τόμ. 4). (Σ. Ραφαηλίδης, Επιμ., Μ. Παπαγεωργίου, & Α. Βάρναλης, Μεταφρ.) Αθήνα: Τζιόλας.
- Bennati-Granier, C., Garajova, S., Champion, C., Grisel, S., Haon, M., Zhou, S., και συν. (2015, June 20). *Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monoxygenases secreted by Podospora anserina*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26136828>
- Bennati-Granier, C., Garajova, S., Champion, C., Grisel, S., Haon, M., Zhou, S., και συν. (2015, June 20). *Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monoxygenases*

secreted by Podospora anserina. Ανάκτηση από Biotechnology for biofuels:
<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-015-0274-3>

Bhagavan, N. (2002). *Medical Biochemistry*. Academic Press.

Bissaro, B., Rohr, A., Skaugen, M., Forsberg, Z., Horn, S., Vaaje-Kolstad, G., και συν. (2017, August 28). *Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂*. Ανάκτηση από Nature Chemical Biology: <https://www.nature.com/articles/nchembio.2470#citeas>

Blaber, M. (2019, June 5). *Gel Electrophoresis of proteins*. Ανάκτηση από Biology - Libretexts:
[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Supplemental_Modules_\(Biochemistry\)/5._Lab_Notes_Part_1/5.5%3A_Gel_Electrophoresis_of_Proteins](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Supplemental_Modules_(Biochemistry)/5._Lab_Notes_Part_1/5.5%3A_Gel_Electrophoresis_of_Proteins)

Borand, M., & Karaosmanoglu, F. (2018, June 20). *Effects of organosolv pretreatment condtions for lignocellulosic biomass in biorefinery applications: A review*. Ανάκτηση από AIP:
https://aip.scitation.org/doi/full/10.1063/1.5025876?casa_token=u4GPNLGO1iwAAAAA%3A-WS3aQeOrc63dwN9OKnMp1jdMYEgTTbIvIAw3sq_4PWGf7xybqcoSwowkmlWRfVauGH5kStiw

Boraston, A., Bolam, D., Gilbert, H., & Davies, G. (2004, September 7). *Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition*. Ανάκτηση από Biochemical Journal:
<https://portlandpress.com/biochemj/article/382/3/769/43964/Carbohydrate-binding-modules-fine-tuning>

Breil, C., Abert Vian, M., Zemb, T., Kunz, W., & Chemat, F. (2017, April 18). *"Bligh and Dyer" and Folch methods for solid-liquid-liquid extraction of lipids from microorganisms. Comprehension of solvation mechanisms and towards substitution with alternative solvents*. Ανάκτηση από NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5412294/>

Brigham, C. (2018). Biopolymers: Biodegradable alternatives to traditional plastics. Στο *Green Chemistry* (σσ. 753-770).

Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K., & Ramakrishnan, S. (2011, May 24). *Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review*. Ανάκτηση από Hindawi: <https://www.hindawi.com/journals/er/2011/787532/>

Cai, L.-N., Xu, S.-N., Lu, T., Lin, D.-Q., & Yao, S.-J. (2019, November 29). *Salt-tolerant mechanism of marine Aspergillus niger cellulase cocktail and improvement of its activity*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1004954119309310>

CAZypedia contributors. (2019, February 4). *Main Page*. Ανάκτηση από CAZypedia:
http://www.cazypedia.org/index.php?title=Main_Page&oldid=13510

Chalima, A., Hatzidaki, A., Karnaouri, A., & Topakas, E. (2019, May 1). *Integratation of a dark fermentation effluent in a microalgal-based biorefinery for the production of high-added value omega-3 fatty acids*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261919304696>

- Chalima, A., Taxeidis, G., & Topakas, E. (2020, January 16). *Optimization of the production of docosahexaenoic fatty acid by the heterotrophic microalga Cryptocodinium cohnii utilizing a dark fermentation effluent*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096014812030046X>
- Chaturvedi, V., & Verma, P. (2013, September 5). *An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products*. Ανάκτηση από Springer Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-013-0167-8#citeas>
- Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., και συν. (2017, March 10). *A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378382016311766>
- Corradini, C., Cavazza, A., & Bignardi, C. (2012, May 9). *High-Performance Anion-Exchange Chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: Principles and Applications*. Ανάκτηση από Hindawi:
<https://www.hindawi.com/journals/ijcc/2012/487564/>
- Creating bacterial glycerol stocks for long-term storage of plasmids*. (n.d.). Ανάκτηση March 24, 2020, από Add Gene: <https://www.addgene.org/protocols/create-glycerol-stock/>
- Crouch, L., Labourel, A., Walton, P., Davies, G., & Gilbert, H. (2016, April 1). *The contribution of non-catalytic carbohydrate binding modules to the activity of lytic polysaccharide monoxygenases*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4817175/>
- Darmstadter, J. (2013). *Recalling the oil shock of 40 years ago*.
- de Swaaf, M., de Rijk, T., Eggink, G., & Sijtsma, L. (1999, April). *Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by Cryptocodinium cohnii*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165699000711>
- Dias De Oliveira, M., Vaughan, B., & Rykiel, E. (2005). *Ethanol as fuel: Energy, Carbon Dioxide Balances and Ecological Footprint*.
- Dimarogona, M., Topakas, E., & Christakopoulos, P. (2013, August 31). *Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts*. Ανάκτηση από Springer Link:
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-013-5197-y>
- Dimarogona, M., Topakas, E., & Christakopoulos, P. (2014, August 11). *Cellulose degradation by oxidative enzymes*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2001037014600933?via%3Dihub>
- Dimarogona, M., Topakas, E., Olsson, L., & Christakopoulos, P. (2012, April). *Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from Sporotrichum thermophile*. Ανάκτηση από NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22342036>

- Eibinger, M., Ganner, T., Bubner, P., Rosker, S., Kracher, D., Haltrich, D., και συν. (2014, October 17). *Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monoxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency*. Ανάκτηση από Journal of biological chemistry: <https://www.jbc.org/content/289/52/35929.full.pdf>
- Eijsink, V., Petrovic, D., Forsberg, Z., Mekasha, S., Røhr, Å., Várnai, A., και συν. (2019, January 14). *On the functional characterization of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs)*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6423801/>
- Forsberg, Z., Sorlie, M., Petrovic, D., Courtade, G., Aachmann, F., Vaaje-Kolstad, G., και συν. (2019, December). *Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monoxygenases*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X18301441>
- Forsberg, Z., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Bunaes, A., Stenstrom, Y., Mackenzie, A., και συν. (2011, September). *Cleavage of cellulose by a CBM33 protein*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3190143/>
- Frandsen, K., Simmons, T., Dupree, P., Poulsen, J.-C., Hemsworth, G., Ciano, L., και συν. (2016, April 12). *The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monoxygenases*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26928935>
- Frommhagen, M., Sforza, S., Westphal, A., Visser, J., Hinz, S., Koetsier, M., και συν. (2015, July 17). *Discovery of the combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monoxygenase*. Ανάκτηση από Springer Link: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13068-015-0284-1>
- Frommhagen, M., Westphal, A., Hilgers, R., Koetsier, M., Hinz, S., Visser, J., και συν. (2017, December 2). *Quantification of the catalytic performance of C1-cellulose-specific lytic polysaccharide monoxygenases*. Ανάκτηση από Springer Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-017-8541-9>
- Frommhagen, M., Westphal, A., van Berkel, W., & Kabel, M. (2018, May 29). *Distinct substrate specificities and electron-donating systems of fungal lytic polysaccharide monoxygenases*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5987398/>
- Gaber, Y., Rashad, B., Hussein, R., Abdelgawad, M., Ali, N., Dishisha, T., και συν. (2020, November). *Heterologous expression of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs)*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497502030080X>
- Gilbert, H., Know, P., & Boraston, A. (2013, October). *Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X13000857?via%3Dihub>

- Gould, J., & Smithers, L. (2019). Chapter 6: Prenatal n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and children's executive functions. Στο *Omega fatty acids in brain and neurological health* (σσ. 83-105). Academic Press.
- Grieco, M., Haon, M., Grisel, S., Oliveira-Carvalho, A., Magalhaes, A., Zingali, R., και συν. (2020, August 25). *Evaluation of the enzymatic arsenal secreted by Myceliophthora thermophila during growth on sugarcane bagasse with a focus on LPMOs*. Ανάκτηση από Frontiers in Bioengineering and Biotechnology: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.01028/full>
- Guo, X., Sang, J., Chai, C., An, Y., Wei, Z., Zhang, H., και συν. (2020, October 15). *A lytic polysaccharide monoxygenase from Myceliophthora thermophila C1 and its characterization in cleavage of glycosidic chain of cellulose*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X20302667>
- Hall, M., Bansal, P., Lee, J., Realf, M., & Bommarius, A. (2010, February 24). *Cellulose crystallinity - a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate*. Ανάκτηση από Febs Press: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1742-4658.2010.07585.x>
- Han, X., Guo, Y., Liu, X., Xia, Q., & Wang, Y. (2019, January). *Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into hydrocarbons: A mini review*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586118305819#fig0085>
- Hedegard, E., & Ryde, U. (2018, March 26). *Molecular mechanism of lytic polysaccharide monoxygenases*. Ανάκτηση από Publishing: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/sc/c8sc00426a#!divAbstract>
- Hegnar, O., Petrovic, D., Bissaro, B., Alfredsen, G., Varnai, A., & Eijsink, V. (2019, March 1). *pH-Dependent relationship between catalytic activity and hydrogen peroxide production shown via characterization of a lytic polysaccharide monoxygenase from Gloeophyllum trabeum*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6384097/>
- Heimann, K., & Huerlimann, R. (2015). Chapter 3: Microalgal classification: Major classes and genera of commercial microalgal species. Στο *Handbook of marine microalgae* (σσ. 25-41). Academic Press.
- Hemsworth, G., Ciano, L., Davies, G., & Walton, P. (2018, November 15). *Production and spectroscopic characterization of lytic polysaccharide monoxygenases*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687918304282>
- Hemsworth, G., Henrissat, B., Davies, G., & Walton, P. (2014, December). *Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monoxygenases*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4274766/>
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., & Tiffany, D. (2006). *Environmental, economic and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels*.

- Isaksen, T., Westereng, B., Aachmann, F., Agger, J., Kracher, D., Kittl, R., και συν. (2014, January 31). *A C4-oxidizing lytic polysaccharide monoxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides*. Ανάκτηση από <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3908397/>:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3908397/>
- Isikgor, F., & Becer, R. (2015, May 5). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 4497-4559.
- Jagadeeswaran, G., Gaaney, L., Prade, R., & Mort, A. (2016, April 13). *A family of AA9 lytic polysaccharide monoxygenases in Aspergillus nidulans is differentially regulated by multiple substrates and at least one is active on cellulose and xyloglucan*. Ανάκτηση από Springer Link:
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-016-7505-9#citeas>
- Jakadeeswaran, G., Gaaney, L., & Mort, A. (2018, October 17). *An AA9-LPMO containing a CBM1 domain in Aspergillus nidulans is active on cellulose and cleaves cello-oligosaccharides*. Ανάκτηση από Springer Open: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-018-0701-5>
- Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019, April 2). *Microbial Cellulases: An overview and applications*. Ανάκτηση από Intechopen: <https://www.intechopen.com/books/cellulose/microbial-cellulases-an-overview-and-applications>
- Jensen, M., Klinkenberg, G., Bissaro, B., Chylenski, P., Vaaje-Kolstad, G., Kvitvang, H., και συν. (2019, October 27). *Engineering chitinolytic activity into a cellulose-active lytic polysaccharide monoxygenase provides insights into substrate specificity*. Ανάκτηση από JBC.ORG:
<https://www.jbc.org/content/early/2019/10/27/jbc.RA119.010056.full.pdf>
- Jiang, Y., & Chen, F. (2000, July). *Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic Cryptocodinium cohnii*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959200001631>
- Jiang, Y., & Chen, F. (2000, March). *Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalga Cryptocodinium cohnii*. Ανάκτηση από Springer Link:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11746-000-0099-0>
- Johansen, K. S. (2016, August 12). *Lytic Polysaccharide Monoxygenases: The microbial power tool for lignocellulose degradation*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136013851630098X>
- Johnson, E. L., Smith, C. A., O'Reilly, K. T., & Hyman, M. R. (2003, October 31). *Induction of Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE)-Oxidizing Activity in Mycobacterium vaccae JOB5 by MTBE*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC348811/>
- Kadikal, C., Duman, T., & Ekinci, R. (2017, July 1). *Thermal degradation kinetics of ascorbic acid, thiamine and riboflavin in rosehip (Rosa canina L) nectar*. Ανάκτηση από Scielo.br:
<https://www.scielo.br/pdf/cta/2017nahead/0101-2061-cta-1678-457X11417.pdf>

- Kadowaki, M., Varnai, A., Jameson, J.-K., Leite, A., Costa-Filho, A., Kumagai, P., και συν. (2018, August 20). *Functional characterization of a lytic polysaccharide monoxygenase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila**. Ανάκτηση από PLOS: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6101365/>
- Kalogiannis, K., Matsakas, L., Aspden, J., Lappas, A., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2018, July). *Acid assisted organosolv delignification of beechwood and pulp conversion towards high concentrated cellulosic ethanol via high gravity enzymatic hydrolysis and fermentation*. Ανάκτηση από PubMed.gov: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29976912/>
- Kang, Q., Appels, L., Tan, T., & Dewil, R. (2014, December 31). *Bioethanol from lignocellulosic biomass: Current findings determine research priorities*. Ανάκτηση από Hindawi: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/298153/>
- Karbalaei, M., Rezaee, S., & Farsiani, H. (2020, February 14). *Pichia pastoris: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins*. Ανάκτηση από Online Library: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.29583>
- Karimi, K., & Chisti, Y. (2015). *Future of bioethanol...* Ανάκτηση από Biofuel Research Journal: https://www.biofueljournal.com/article_8438_d3e1fd4af333f2c0c914108f9ecf03bf.pdf
- Karnaouri, A., Antonopoulou, I., Zerva, A., Dimarogona, M., Topakas, E., Rova, U., και συν. (2019, January 16). *Thermophilic enzyme systems for efficient conversion of lignocellulose to valuable products: Structural insights and future perspectives for esterases and oxidative catalysts*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419300756>
- Karnaouri, A., Chalima, A., Kalogiannis, K., Varamogianni-Mamatsi, D., Lappas, A., & Topakas, E. (2020, January 27). *Utilization of lignocellulosic biomass towards the production of omega-3 fatty acids by the heterotrophic marine microalga *Cryptocodinium cohnii**. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852420301681>
- Karnaouri, A., Topakas, E., Antonopoulou, I., & Christakopoulos, P. (2014, June 18). *Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Mycelio**. Ανάκτηση από Frontiers in Microbiology: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00281/full>
- Kim, I., Nam, K., Yun, E., Kim, S., Youn, H., Lee, H., και συν. (2015, May 5). *Optimization of synergism of a recombinant auxiliary activity 9 from *Chaetomium globosum* with cellulase in cellulose hydrolysis*. Ανάκτηση από Springer Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-015-6592-3>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., και συν. (2005, June 8). *D-Glucose*. Ανάκτηση από National Center for Biotechnology Information: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/GLUCOSE>
- Kittl, R., Kracher, D., Burgstaller, D., Haltrich, D., & Ludwig, R. (2012, October 26). *Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monoxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a*

fluorimetric assay. Ανάκτηση από Biotechnology for biofuels:

<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-5-79>

Kooststra, M., Beeftink, H., Scott, E., & Sanders, J. (2009, October 1). *Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw*. Ανάκτηση από Science Direct:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X09001405?casa_token=hjQVLdgh2nwAAAAA:HYB7Kwn4Zh4CELpjMwWlemHdGOVinuDdeSCidV7vXVRospkkiW0QbO0Gy53Qia4B2fj4ED1bo

Kruer-Zerhusen, N., Cantero-Tubilla, B., & Wilson, D. (2017, April 13). *Characterization of cellulose crystallinity after enzymatic treatment using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)*.

Ανάκτηση από Bioenergy Center:

https://bioenergycenter.org/besc/publications/kruer_zerhusen_cellulose_yr11.pdf

Kumar, A. K., & Sharma, S. (2017, January 18). *Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review*. Ανάκτηση από NCBI:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5241333/>

Kumar, V., Yadav, S., Kumar, J., & Ahluwalia, V. (2019, December 17). *A critical review on current strategies and trends employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment*. Ανάκτηση από Science Direct:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419318632?via%3Dihub>

L Mitchell, A., K Attwood, T., C Babbitt, P., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., και συν. (2019). *InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations*. Ανάκτηση January 19, 2020, από Interpro: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>

Lauterbach, R., & Pawlik, D. (2014). Chapter 23: Fish-oil fat emulsion and retinopathy in very low birth weight infants. Στο *Handbook of nutrition, diet and the eye* (σσ. 233-240). Academic Press.

Leggio, L., & Frandsen, K. (2016, October 14). *Lytic polysaccharide monoxygenases: a crystallographer's view on a new class of biomass-degrading enzymes*. Ανάκτηση από IUCrJ:

<http://journals.iucr.org/m/issues/2016/06/00/be5273/index.html#BB82>

Leggio, L., Simmons, T., Poulsen, J.-C., Frandsen, K., Hemsworth, G., Stringer, M., και συν. (2015, January 22). *Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monoxygenase*.

Ανάκτηση από Nature Communications: <https://www.nature.com/articles/ncomms6961>

Lennarz, W., & Lane, D. (2013). *Encyclopedia of biological chemistry*. Academic Press.

Li, X., Pei, G., Liu, L., Chen, L., & Zhang, W. (2017, July). *Metabolomic analysis and lipid accumulation in a glucose tolerant *Cryptocodinium cohnii* strain obtained by adaptive laboratory evolution*.

Ανάκτηση από Science Direct:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241730319X#b0055>

- Lin, J., Panigraphy, D., Trinh, L., Folkman, J., & Shiloach, J. (2000, January). *Production process for recombinant human angiostatin in Pichia pastoris*. Ανάκτηση από Springer Link: <https://link.springer.com/article/10.1038/sj.jim.2900766>
- Lin, Y., & Tanaka, S. (2005). *Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects*.
- Lin, Z., Huang, H., Zhang, H., Zhang, L., Yan, L., & Chen, J. (2010, July 1). *Ball milling pretreatment of corn stover for enhancing the efficiency of enzymatic hydrolysis*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20593309>
- Liu, B., Krishnaswamyreddy, S., Nair Muraleedharan, M., Olson, A., Broberg, A., Stahlberg, J., και συν. (2018, September 5). *Side-by-side biochemical comparison of two lytic polysaccharide monoxygenases from the white-rot fungus Heterobasidion irregulare on their activity against crystalline cellulose and glucomannan*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6124812/>
- Lombard, V., Ramulu, G., Drula, E., Coutinho, P., & Henrissat, B. (2013, November 21). *The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013*. Ανάκτηση από NCBI: <http://www.cazy.org/>
- Lorenz, T. (2012, May 22). *Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846334/>
- Lu, X., Xi, B., Zhang, Y., & Angelidaki, I. (2011, June 24). *Microwave pretreatment of reepe straw for bioethanol production: Focus on energy efficiency*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411008923>
- McMurry, J. (2015). *Οργανική Χημεία*. (Α. Βάρβογλης, Μ. Ορφανόπουλος, Ι. Σμόνου, & Μ. Στρατάκης, Μεταφρ.) Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Meier, K. K., Jones, S. M., Kaper, T., Hansson, H., Koetsier, M. J., Karkehabadi, S., και συν. (2017, November 20). *Oxygen activation by Cu LPMOs in recalcitrant carbohydrate polysaccharide conversion to monomer sugars*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29155571>
- Mellor, J., & Bell, G. (2003, December 6). *Freeze Drying - The basic process*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012227055X005198>
- Mendes, A., Reis, A., Vasconcelos, R., Guerra, P., & Lopes da Silva, T. (2008, August 17). *Cryptocodium cohnii with emphasis on DHA production: A review*. Ανάκτηση από Springer Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-008-9351-3#citeas>
- Moghadasian, M., & Shahidi, F. (2017). *Fatty Acids*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128036785001570>

- Mukarakate, C., Mital, A., Ciesielski, P., Budhi, S., Thompson, L., Lisa, K., και συν. (2016, April 19). *Influence of crystal allomorph and crystallinity on the products and behaviour of cellulose during fast pyrolysis*. Ανάκτηση από ACS Publications:
<https://www.osti.gov/pages/servlets/purl/1324229>
- Muller, G., Chylenski, P., Bissaro, B., Eijink, V., & Horn, S. (2018, July). *The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail*. Ανάκτηση από Biotechnology for biofuels:
<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-018-1199-4>
- Nauman Aftad, M., Iqbal, I., Riaz, F., Karadag, A., & Tabatabaei, M. (2019, November 18). *Different pretreatment methods of lignocellulosic biomass for use in biofuel production*. Ανάκτηση από Intechopen: <https://www.intechopen.com/books/biomass-for-bioenergy-recent-trends-and-future-challenges/different-pretreatment-methods-of-lignocellulosic-biomass-for-use-in-biofuel-production>
- Nekiunaite, L., Arntzen, M., Svensson, B., Vaaze-Kolstad, G., & Abou Hachem, M. (2016, September). *Lytic polysaccharide monoxygenases and other oxidative enzymes are abundantly secreted by Aspergillus nidulans grown on different starches*. Ανάκτηση από Pubmed.NCBI:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27588040/>
- NetNGlyc 1.0 Server. (n.d.). Ανάκτηση από CBS.DTU: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
- NetOGlyc 4.0 Server. (n.d.). Ανάκτηση από CBS.DTU: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>
- O'Dell, W., Swartz, P., Weiss, K., & Meilleur, F. (2017, February). *Crystallization of a fungal lytic polysaccharide monoxygenase expressed from glycoengineered Pichia pastoris for X-ray and neutron diffraction*. Ανάκτηση από NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297926/>
- Panahi, H., Denhaghhi, M., Kinder, J. E., & Ezeji, T. (2019, September 1). *A review on green liquid fuels for transportation sector: a prospect of microbial solutions to climate change*. Ανάκτηση από Biofuel Research Journal: https://www.biofueljournal.com/article_92199.html
- Paul, M., Panda, G., Das Mohapatra, P., & Thatoi, H. (2019, December 6). *Study of structural and molecular interaction for the catalytic activity of cellulases: An insight in cellulose hydrolysis for higher bioethanol yield*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286019316564>
- Paz, A., Karnaouri, A., Templis, C., Papayannakos, N., & Topakas, E. (2020, December). *Valorization of exhausted olive pomace for the production of omega-3 fatty acids by Cryptocodium cohnii*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X20305225?via%3Dihub>

- Pei, G., Li, X., Liu, L., Liu, J., Wang, F., Chen, L., και συν. (2017, September). *De novo transcriptomic and metabolomic analysis of docosahexaenoic acid (DHA)-producing Crypthecodinium cohnii during fed-batch fermentation*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926417301789>
- Petrovic, D., Bissaro, B., Chylenski, P., Skaugen, M., Sorlie, M., Jensen, M., και συν. (2018, July 4). *Methylation of the N-terminal histidine protects a lytic polysaccharide monoxygenase from auto-oxidative inactivation*. Ανάκτηση από Wiley Online Library:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.3451>
- Pfeifenschneider, J., Brautaset, T., & Wendisch, V. (2017, May 9). *Methanol as carbon substrate in the bio-economy: Metabolic engineering of aerobic methylotrophic bacteria for production of value-added chemicals*. Ανάκτηση από Wiley Online Library:
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bbb.1773?casa_token=p1T9yLrAsVkAAAAA%3A-miyZcTPsEP0uDL9XgYZmM4dtwCOdBRTyljgsLJctE-14ZsL5cKJ0hbz_iHAEPk5ozUOLe1HqznAWkC
- Rahikainen, J., Martin-Sampedro, R., Heikkiken, H., Rovio, S., Marjamaa, K., Tammiminen, T., και συν. (2013, April). *Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413000989>
- Ratledge, C., Kanagachandran, K., Anderson, A., Grantham, D., & Stephenson, J. (2001, November). *Production of docosahexaenoic acid by Crypthecodinium cohnii grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source*. Ανάκτηση από PubMed:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11795857/>
- Ratledge, C., Kanagachandran, K., Anderson, A., Grantham, D., & Stephenson, J. (2001, November). *Production of docosahexaenoic acid by Crypthecodinium cohnii grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source*. Ανάκτηση από Pubmed.NCBI:
pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11795857/
- Ratledge, C., Streekstra, H., Cohen, Z., & Fichtali, J. (2010). Downstream processing, extraction and purification of single cell oils. Στο *Single cell oils* (σσ. 179-197). AOCS Press.
- Rauter, A., Lidhorst, T., & Queneau, Y. (2018). *Carbohydrate chemistry*. London, UK: Royal Society of Chemistry.
- Rodrigues, A., Ostergaard Haven, M., Lindedam, J., Felby, C., & Gama, M. (2015, July 17). *Cellulast and Cellic CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022915300211>
- Roos, G., & Roos, C. (2015). Chapter 5 - Reactivity: How and Why. Στο *Organic Chemistry Concepts: An EFL Approach* (σσ. 65-81). Academic Press.

- Salehzadeh, A., & Arasteh, A. (2012, January). *Expressing of rice ribosome inactivating protein as tool for treatment of cancer cells*. Ανάκτηση από Research Gate:
https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-RIP-gene-and-pPICZaA-vector_fig1_274779824
- Sannigrahi, P., Ragauskas, A., & Miller, S. (2010). *Lignin structural modifications resulting from ethanol organosolv treatment of loblolly pine*. Ανάκτηση από ACS Publications:
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ef900845t>
- Shental-Bechor, D., & Levy, Y. (2008, June 11). *Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization*. Ανάκτηση από NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2448824/>
- Shi, L., Wang, J., Wang, X., Zhang, Y., Song, Z., Cai, M., και συν. (2020, March 25). *Transcriptional regulatory networks of methanol-independent protein expression in Pichia pastoris under the AOX1 promoter with trans-acting elements engineering*. Ανάκτηση από Springer Link:
<https://link.springer.com/article/10.1186/s40643-020-00306-w>
- Shoseyov, O., Shani, Z., & Levy, I. (2006, June). *Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications*. Ανάκτηση από NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489539/>
- Shuai, L., Questell-Santiago, Y., & Luterbacher, J. (2015, December). *A mild biomass pretreatment using γ -valerolactone for concentrated sugar production*. Ανάκτηση από Royal society of chemistry:
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/GC/C5GC02489G#!divAbstract>
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2015, August 24). *Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview*. Ανάκτηση από Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415011347>
- Singh, B. (2016). *Myceliophthora thermophila syn. sporotrichum thermophile: A thermophilic mould of biotechnological potential*. Ανάκτηση από PubMed.NCBI:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25025273/>
- Singh, G., Verma, A., & Kumar, V. (2015, December 31). *Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases*. Ανάκτηση από NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4697909/>
- Singh, R., Blossom, B., Russo, D., van Oort, B., Croce, R., Jensen, P., και συν. (2019, September 19). *Thermal unfolding and refolding of a lytic polysaccharide monoxygenase from Thermoascus aurantiacus*. Ανάκτηση από The royal society of chemistry:
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/ra/c9ra05920b>

- Singh, R., Tiwari, M., Singh, R., & Lee, J.-K. (2013, January 10). *From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes*. Ανάκτηση από MDPI: <https://www.mdpi.com/1422-0067/14/1/1232/htm>
- Skoog, D., Holler, J., & Crouch, S. (2007). *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* (6η εκδ.). Αθήνα: Κωσταράκη.
- Song, B., Li, B., Wang, X., Shen, W., Park, S., Collings, C., και συν. (2018, February 15). *Real-time imaging reveals that lytic polysaccharide monoxygenase promotes cellulase activity by increasing cellulose accessibility*. Ανάκτηση από Biotechnology for biofuels: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5815216/>
- Starikov, A., Sidorov, R., Mironov, K., Goriainov, S., & Los, D. (2020, December). *Delta or Omega? Δ12 (ω6) fatty acid desaturases count 3C after the pre-existing double bond*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908420302157>
- Sulej, J., Janusz, G., Osinska-Jaroszuk, M., Rachubik, P., Majur, A., Komanięcka, I., και συν. (2015, May 24). *Characterization of cellobiose dehydrogenase from a biotechnologically important *Cerrena unicolor* strain*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4515248/>
- Sun, P., Frommhagen, M., Haar, M., van Erven, G., Bakx, E., van Berkel, W., και συν. (2020, April). *Mass spectrometric fragmentation patterns discriminate C1 and C4-oxidised cello-oligosaccharides from their non-oxidised and reduced forms*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720300916?via%3Dihub>
- Sun, Y., & Cheng, J. (2001, October 31). *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401002127>
- Suriya, J., Bharathiraja, S., Manivasagan, P., & Kim, S.-K. (2016). Enzymes from rare actinobacterial strains. Στο *Advances in food and nutrition research* (σσ. 67-98).
- Suseela, V. (2019). Potential roles of plant biochemistry in mediating ecosystem responses to warming and drought. Στο *Ecosystem consequences of soil warming* (σσ. 103-124). Academic Press.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008, September 1). *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review*. Ανάκτηση από MDPI: <https://www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621/htm>
- Varnai, A., Tang, C., Bengtsson, O., Atterton, A., Mathiesen, G., & Eijsink, V. (2014, April 18). *Expression of endoglucanases in *Pichia pastoris* under control of the GAP promoter*. Ανάκτηση από Microbial Cell Factories: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-57>
- Velmurugan, R., & Incharoensakdi, A. (2018). Nanoparticles and organic matter: Process and impact. Στο *Nanomaterials in plants, algae and microorganisms* (σσ. 407-428). Academic Press.

- Verma, D., & Fortunati, E. (2019). *Biopolymer processing and its composites: An introduction*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081024263000011>
- Vermaas, J., Crowley, M., Beckham, G., & Payne, C. (2015, May). *Effects of lytic polysaccharide monoxygenase oxidation on cellulose structure and binding of oxidized cellulose oligomers to cellulases*. Ανάκτηση από Pubmed.NCBI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25785779/>
- Vu, V., & Ngo, S. (2018, May 5). *Copper active site in polysaccharide monoxygenases*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854517304952>
- Vu, V., Beeson, W., Span, E., Farquhar, E., & Marletta, M. (2014, September 23). *A family of starch-active polysaccharide monoxygenases*. Ανάκτηση από NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4183312/>
- Wagner, A., Lackner, N., Mutschlechner, M., Prem, E., Markt, R., & Illmer, P. (2018, July 9). *Biological pretreatment strategies for second-generation lignocellulosic resources to enhance biogas production*. Ανάκτηση από MDPI: <file:///C:/Users/%CE%9A%CE%AC%CF%84%CE%B9%CE%B1/Downloads/energies-11-01797.pdf>
- Wang, B., Walton, P., & Rovira, C. (2019, April 22). *Molecular mechanisms of oxygen activation and hydrogen peroxide formation in lytic polysaccharide monoxygenases*. Ανάκτηση από ACS Publications: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscatal.9b00778#>
- Wang, K., Jiang, J.-X., Xu, F., Sun, R.-C., & Baird, M. (2010). *Influence of steam pressure on the physicochemical properties of degraded hemicelluloses obtained from steam-exploded Lespedeza stalks*. Ανάκτηση από Bioresources: https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_05_3_1717_WAng_LLHG_Steam_Pressure_Explosion_Pulp
- Wang, S., Zou, C., Lou, C., Yang, H., Mei, M., Jing, H., και συν. (2020, August). *Effects of hemicellulose, cellulose and lignin on the ignition behaviors of biomass in a drop tube furnace*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852420307288>
- Wang, X., Fosse, H., Li, K., Chauton, M., Vadstein, O., & Reitan, K. (2019, March). *Influence of nitrogen limitation on lipid accumulation and EPA and DHA content in four marine microalgae for possible use in aquafeed*. Ανάκτηση από Frontiers in Marine Science: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2019.00095/full>
- Westereng, B., Arntzen, M., Aachmann, F., Varnai, A., Eijsink, V., & Agger, J. (2016, May 6). *Simultaneous analysis of C1 and C4 oxidized oligosaccharides, the products of lytic polysaccharide monoxygenases acting on cellulose*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967316303466>
- Westereng, B., Loose, J., Vaaje-Kolstad, G., Aachmann, F., Sorlie, M., & Eijsink, V. (2018). *Analytical tools for characterizing cellulose-active lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs)*. Ανάκτηση από

Springer Nature: https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-4939-7877-9_16

Xu, J., Li, J., Lin, L., Liu, Q., Sun, W., Huang, B., και συν. (2015, May 27). *Development of genetic tools for Myceliophthora thermophila*. Ανάκτηση από BMC Biotechnology: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-015-0165-5>

Yakovlev, A., & Shuvalov, V. (2013, November 22). *Modeling of reversible charge separation in reaction centers of photosynthesis: An incoherent approach*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519313005365>

Zerva, A., Pentari, C., Grisel, S., Berrin, J.-G., & Topakas, E. (2020, August 13). *A new synergistic relationship between xylan-active LPMO and xylobiohydrolase to tackle recalcitrant xylan*. Ανάκτηση από Biotechnology for biofuels: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7419196/>

Zhang, X.-Z., & Zhang, Y.-H. (2013). *Cellulases: Characteristics, sources, production and applications*. Ανάκτηση από Bioenergy Center: https://bioenergycenter.org/besc/publications/Zhang_cellulases_yr7.pdf

Zhang, Z., Lv, G., Pan, H., Pandey, A., He, W., & Fan, L. (2012, September 12). *Antioxidant and hepatoprotective potential of endo-polysaccharides from Hericium erinaceus grown on tofu whey*. Ανάκτηση από PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22982810/>

Zhou, H., Li, T., Yu, Z., Ju, J., Zhang, H., Tan, H., και συν. (2019, October 15). *A lytic polysaccharide monoxygenase from Myceliophthora thermophila and its synergism with cellobiohydrolases in cellulose hydrolysis*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019346495>

Zhu, Z., Macquarrie, D., Simister, R., Gomez, L., & McQueen-Mason, S. (2015, October 6). *Microwave assisted chemical pretreatment of Miscanthus under different temperature regimes*. Ανάκτηση από Springer Open: <https://sustainablechemicalprocesses.springeropen.com/articles/10.1186/s40508-015-0041-6>

Zoglowek, M., Lubeck, P., Ahring, B., & Lubeck, M. (2015, February). *Heterologous expression of cellobiohydrolases in filamentous fungi - An update on the current challenges, achievements and perspectives*. Ανάκτηση από Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511314006114>

Ζιώμας, Ι. (2007). *Ατμόσφαιρα-Ατμοσφαιρική ρύπανση*. Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α., & Σαμανίδου, Β. (2015). *Χρωματογραφικές τεχνικές στη βιοανάλυση*. Ανάκτηση από Repository.kallipos: https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/3676/1/02_chapter_11.pdf

- Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Ά., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., και συν. (2015). *Ηλεκτροφόρηση. Βασικές αρχές-σύγχρονη τεχνολογία. Εφαρμογές στην κλινική χημεία*. Ανάκτηση από Kallipos: <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/5385>
- Λόης, Ε., Ζαννίκος, Φ., & Καρώνης, Δ. (2014). *Τεχνολογία καυσίμων και λιπαντικών*. Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Μαγιάτης, Π. (2009). Σημειώσεις φαρμακογνωσίας Ι: Πρωτογενείς μεταβολίτες. Αθήνα: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., & Κατσαρέλη, Ε. (2015). Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Στο *Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου* (σσ. 129-142). Κάλλιπος.
- Σπηλιόπουλος, Ι. (2015). *Αλδεΰδες Κετόνες*. Ανάκτηση από repository.kallipos: <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/930>
- Σπηλιόπουλος, Ι. (2015). *Υδατάνθρακες*. Ανάκτηση από repository.kallipos: <http://hdl.handle.net/11419/932>
- Τζια, Κ., Ταούκης, Π., & Ωραιοπούλου, Β. (2009). *Επιστήμη και μηχανική τροφίμων: Συστατικά - Ιδιότητες - Ποιότητα, Μικροβιολογία - Ρεολογία - Συσκευασία*. Αθήνα: Ε. Μ. Πολυτεχνείο.
- Χριστακόπουλος, Π., & Τόπακας, Ε. (2016). *Βιοτεχνολογία παραγωγής βιοκαυσίμων*. Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.