

**ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ENZYMΩΝ  
ΑΠΟ ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΕΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΕΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ  
ΑΠΟ ΑΚΡΑΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΑ**



**ΔΗΜΗΤΡΑ ΖΑΡΑΦΕΤΑ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Επιβλέπων καθηγητής: Φ. Κολίσης

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο  
Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

**2017**

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/1392, Άρθρο 202)

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Ομότιμος Καθηγητής ΕΜΠ (Επιβλέπων)

Κολίσης Φραγκίσκος

Ερευνητής Γ' Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών

Σκρέτας Γεώργιος

Καθηγητής ΕΜΠ

Κέκος Δημήτριος

### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Καθηγητής ΕΜΠ

Κέκος Δημήτριος

Ομότιμος Καθηγητής ΕΜΠ

Κολίσης Φραγκίσκος

Καθηγητής ΕΜΠ

Λυμπεράτος Γεράσιμος

Ερευνητής Γ' Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών

Σκρέτας Γεώργιος

Αναπλ. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Σμόνου Ιουλία

Επίκουρος Καθηγητής ΕΜΠ

Τόπακας Ευάγγελος

Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Χατζηνικολάου Δημήτριος

*Στους γονείς μου και στο σύζυγο μου για τη στήριξή τους*

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο «Ενζυμικής και Συνθετικής Βιολογίας» του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας (ΙΒΦΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, υπό την επίβλεψη του Δρ. Γεώργιου Σκρέτα.

Στη διάρκεια της διατριβής μου, πολλοί είναι οι άνθρωποι που με βοήθησαν να ανταπεξέλθω στις απαιτήσεις αυτού μου του εγχειρήματος με την άμεση ή έμμεση στήριξη τους.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Φραγκίσκο Κολίση για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου αυτή τη διατριβή, μέσω της οποίας μου δόθηκε η ευκαιρία να ταξιδέψω, να γνωρίσω πολλούς ενδιαφέροντες ανθρώπους και να ωριμάσω προσωπικά και επιστημονικά.

Το σημαντικότερο ρόλο στην επιτυχή έκβαση αυτής της διατριβής καθώς και στην ανάπτυξη της επιστημονικής μου σκέψης κατέχει ο Δρ. Γεώργιος Σκρέτας, Ερευνητής Γ' του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και επικεφαλής του Εργαστηρίου «Ενζυμικής και Συνθετικής Βιολογίας» στο οποίο εκπόνησα τη διατριβή μου, ο οποίος με την καθημερινή του καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την υπομονή και τη συνεχή του συμπαράσταση επέβλεψε κάθε βήμα αυτής της εργασίας και για το λόγο αυτό του οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κέκο, Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, τον κ. Ευάγγελο Τόπακα, Επίκουρο Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου τον κ. Γεράσιμο Λυμπεράτο, Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, την κα. Ιουλία Σμόνου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Κρήτης καθώς και τον κ. Δημήτριο Χατζηνικολάου, Επίκουρο Καθηγητή του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην Συμβουλευτική και Εξεταστική μου επιτροπή.

Στο διάστημα αυτών των τεσσάρων χρόνων, πολλοί ήταν οι άνθρωποι με τους οποίους συνεργάστηκα σε επιστημονικό επίπεδο, τόσο στο πλαίσιο της συμμετοχής μου στα ερευνητικά προγράμματα “Hotzyme”–EU/FP7/KBBE-2010.3.5-04 και «ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΑΡΙΣΤΕΙΑΣ IKY/SIEMENS»-23404, τα οποία χρηματοδότησαν τις εργασίες μου, όσο και εκτός αυτών, και η αλληλεπίδραση μου μαζί

τους συνέβαλε σημαντικά στην πρόοδο μου. Κυρίως θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Ευαγγελία Χρυσίνα, Ερευνήτρια Β΄ του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, όχι μόνο για τη συμβολή της στα επιστημονικά πεπραγμένα που περιλαμβάνονται σε αυτή τη διατριβή αλλά και για τη διάθεση της και το χρόνο που αφιέρωσε ώστε να μου μεταλαμπαδεύσει τις γνώσεις και την τεχνογνωσία της. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ. Δημήτριο Χατζηνικολάου για το συμβουλευτικό του ρόλο στα επιστημονικά θέματα που με απασχόλησαν.

Φυσικά δε μπορώ να μην αναφερθώ στα άτομα με τα οποία συνεργάστηκα άμεσα, όπως τον συνεργάτη και φίλο Ευθύμιο Λαδουκάκη ο οποίος συνέβαλε ουσιαστικά στην επίτευξη των επιστημονικών μου στόχων καθώς η βοήθεια του ήταν πολύτιμη και συνεχής. Πέραν όμως των άμεσων συνεργασιών, οι συνάδελφοι μου στο εργαστήριο «Ενζυμικής και Συνθετικής Βιολογίας» του ΕΙΕ ήταν εκείνοι που με την καθημερινή τους βοήθεια και τη θετική τους διάθεση απέναντι σε κάθε θέμα που με απασχόλησε, έκαναν την επί πολλά χρόνια καθημερινότητα μου πολύ ευχάριστη και για αυτό τους ευχαριστώ πολύ. Ειδικότερα, οι συνάδελφοι και φίλοι Δήμητρα Γιαλαμά, Ηλίας Μάτης και Δάφνη Δεληβοριά ήταν εκείνοι με τους οποίους ξεκινήσαμε μαζί αυτό το «ταξίδι» και τους οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ γιατί με βοήθησαν ουσιαστικά σε ό,τι και εάν χρειάστηκα αλλά και γιατί έκαναν την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής μια ευχάριστη εμπειρία την οποία θα θυμάμαι πάντα με τις καλύτερες αναμνήσεις.

Στη διάρκεια της διατριβής μου, πολλοί ήταν οι φοιτητές με τους οποίους δουλέψαμε μαζί, όπως η κα. Δανάη Μοσχίδη και ο κ. Δημήτριος Κίσσας, οι οποίοι συνέβαλαν σημαντικά στην πρόοδο των πειραμάτων, εργαζόμενοι με όρεξη και ήθος και για αυτό δε μπορώ παρά να τους ευχαριστήσω, ελπίζοντας να συνέβαλα και εγώ, έστω και λίγο, στην πρόοδο τους.

Φυσικά, οι άνθρωποι χωρίς τη βοήθεια, την αγάπη και τη στήριξη των οποίων τίποτα από όλα αυτά δε θα ήταν εφικτό είναι οι γονείς μου, Παναγιώτης και Καλλιόπη αλλά και ο σύζυγος μου Αναστάσης, στους οποίους οφείλω όλα όσα έχω επιτύχει έως σήμερα.

## Περίληψη

Οι υδρολάσες είναι μια οικογένεια ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση ενός μεγάλου εύρους υποστρωμάτων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανικές βιομετατροπές προς την παραγωγή πληθώρας προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η χρήση τους δύναται να αντικαταστήσει τις καθαρά χημικές μεθόδους επεξεργασίας των υλικών καθώς απαιτεί ηπιότερες συνθήκες, και είναι αποδοτικότερη και ακριβέστερη λόγω της υψηλής εξειδίκευσης των ενζύμων, οδηγώντας έτσι σε μια πιο «πράσινη» βιομηχανία. Παρότι τα πλεονεκτήματα χρήσης των υδρολασών στη βιομηχανία είναι πολλά, η χρήση τους περιορίζεται από το γεγονός ότι οι συμβατικοί βιοκαταλύτες καθίστανται ανενεργοί στις υψηλές θερμοκρασίες και σε άλλες «αντίξοες» συνθήκες που συχνά επικρατούν στις βιομηχανικές διεργασίες. Το κόστος ψύξης και απομάκρυνσης των αποδιατακτικών παραγόντων πριν την προσθήκη των ενζύμων προς αποφυγή της αποδιάταξής τους, είναι τις περισσότερες φορές απαγορευτικό και αυτός είναι ο λόγος που περιορίζει την αντικατάσταση των κλασσικών χημικών κατεργασιών από ενζυμικές μετατροπές. Μια λύση σε αυτό το πρόβλημα, που καθιστά τις ενζυμικές διεργασίες οικονομικά βιώσιμες, αποτελεί η χρήση θερμοσταθερών και εν γένει σταθερών υδρολασών. Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον των βιοτεχνολόγων έχει στραφεί τα τελευταία χρόνια στην ανακάλυψη θερμοσταθερών βιοκαταλυτών. Στη φύση, τα ένζυμα αυτά απαντώνται στην πρωτεϊνική φαρέτρα των ακραιόφιλων οργανισμών, των οργανισμών δηλαδή που έχουν προσαρμοστεί εξελικτικά σε ακραία περιβάλλοντα. Επειδή όμως το 99% της μικροβιακής βιοποικιλότητας δεν μπορεί να καλλιεργηθεί στο εργαστήριο, για χρόνια, η συντριπτική πλειοψηφία των οργανισμών αυτών και των πρωτεϊνών τους παρέμεινε ανεξερεύνητη. Τα τελευταία χρόνια, μέσω της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης που απαλείφει την ανάγκη της μικροβιολογικής καλλιέργειας, οι βιοτεχνολόγοι απέκτησαν πρόσβαση στον τεράστιο πρωτεϊνοχώρο των ακραιόφιλων οργανισμών.

Σε αυτή τη διατριβή, η οποία εκπονήθηκε στο πλαίσιο της διεθνούς κοινοπραξίας “Hotzyme”, η βιοπληροφορική και η *in vivo* λειτουργική σάρωσης μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών που προέκυψαν από δειγματοληψίες ακραίων ενδιαιτημάτων, οδήγησε στην ανακάλυψη τριών νέων θερμοσταθερών υδρολασών. Τα αντίστοιχα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις υδρολάσες εντοπίστηκαν και ανακτήθηκαν από τις μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες, και μετά από ετερόλογη έκφραση τους σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli*, τα ανασυνδυασμένα ένζυμα απομονώθηκαν και μελετήθηκαν βιοχημικά.

Συνοπτικά, το πρώτο ένζυμο που απομονώθηκε είναι η θερμοανθεκτική ενδογλουκανάση CelDZ1. Η CelDZ1 προέκυψε από τη βιοπληροφορική σάρωση δείγματος

εμπλουτισμού Ισλανδικής θερμοπηγής και ανήκει στη οικογένεια GH5. Η CeIDZ1 είναι μια θερμοανθεκτική, οξεόφιλη ενδογλουκανάση με βέλτιστες συνθήκες δράσης το pH 5 και τους 70 °C. Παράλληλα, η νέα ενδογλουκανάση παρουσιάζει εντυπωσιακή αλοανθεκτικότητα και αλοσταθερότητα αφού διατηρεί την ενεργότητα της σε συγκεντρώσεις αλάτων που τείνουν στον κορεσμό. Σε συνεργασία με τους εταίρους μας μελετήθηκε η κρυσταλλική της δομή η οποία αποκάλυψε ότι η CeIDZ1 διαφέρει από τις ομόλογες πρωτεΐνες καθώς υπολείπεται της υποπεριοχής-2 πρόσδεσης των σακχαριτών.

Το δεύτερο ένζυμο που απομονώθηκε και μελετήθηκε σε αυτή τη διατριβή είναι η εστεράση EstDZ2, η οποία προέκυψε μέσω βιοπληροφορικής σάρωσης του μεταγονιδιωματικού υλικού Ρωσικής θερμοπηγής. Η νέα εστεράση είναι θερμοσταθερή, με χρόνο ημιζωής πάνω από έξι ώρες στους 60 °C και παρουσιάζει εξαιρετική σταθερότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών διαλυτών. Η φυλογενετική μελέτη της νέας εστεράσης έδειξε ότι η EstDZ2 εγκαινιάζει μια νέα οικογένεια λιπολυτικών ενζύμων που φέρει το χαρακτηριστικό καταλυτικό αμινοξικό μοτίβο GHSAG, την οποία και ονομάσαμε Οικογένεια XV. Παράλληλα, η μελέτη του μοντέλου της τρισδιάστατης δομής της EstDZ2 έδειξε ότι πιθανότατα το νέο ένζυμο να υπολείπεται μεγάλο μέρος της χαρακτηριστικής δομής του «πρωτεϊνικού καπακιού» που συναντάται στις δομές των μελών της κοντινότερης οικογένειας IV των λιπολυτικών ενζύμων.

Τέλος, το τρίτο ένζυμο που απομονώθηκε και μελετήθηκε σε αυτή τη διατριβή είναι η εστεράση EstDZ3, ένα υπερ-θερμοσταθερό ένζυμο που διατηρεί την καταλυτική του δράση ακόμα και μετά από πολύωρη επώαση σε θερμοκρασίες κοντά στο βρασμό. Η νέα εστεράση εντοπίστηκε μετά από *in vivo* λειτουργική σάρωση του γενετικού υλικού βακτηριακού στελέχους που απομονώθηκε από δείγμα εμπλουτισμού Κινεζικής θερμοπηγής. Πέρα από την εξαιρετική θερμοσταθερότητα της, η EstDZ3 παρουσιάζει σταθερότητα και σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών διαλυτών. Παράλληλα, η μελέτη του μοντέλου της δομής της, έδειξε ότι πρόκειται για ένα ένζυμο που φέρει ένα πρωτεϊνικό ένθετο της δομής α/β, παρόμοιο με αυτό της πλησιέστερης δομικά πρωτεΐνης, που προβλέπεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην εκλεκτικότητα του ενζύμου.

Και τα τρία νέα ένζυμα παρουσιάζουν χαμηλή ομολογία με ήδη γνωστές και χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες κάτι που σε συνδυασμό με τα ενδιαφέροντα βιοχημικά και δομικά τους χαρακτηριστικά τα καθιστά τόσο υποψήφιους βιοκαταλύτες για βιοτεχνολογικές εφαρμογές όσο και μοριακά μοντέλα για τη μελέτη της θερμοσταθερότητας των πρωτεϊνών και όχι μόνο.



## Abstract

Hydrolases are an enzyme class that catalyze the modification of a wide range of substrates and can be employed in various industrial biotransformations towards the production of a plethora of value-added products. Their use can substitute the classic harsh chemical treatments used in industry with more eco-friendly procedures as they require milder operation conditions and offer high precision transformations due to the enzyme's highly selective nature. Even though the advantages of using enzymes in industrial biotechnology are many, their use is restricted by the fact that common biocatalysts cannot function under high temperatures and other harsh conditions that occur in industrial environments. The cost involved in material cooling and elimination of other denaturing conditions before adding the biocatalyst in order to protect it from deactivation is often prohibitive and this is the reason why enzymes do not take over the chemical treatments very often. The employment of thermostable and overall stable biocatalysts can alleviate the need for cooling and elimination of denaturing conditions, making enzymic biotransformations economically viable. For this reasons, biotechnologists have been focusing their efforts on the discovery of thermostable hydrolases. In nature, such enzymes can be found in the protein toolbox of extremophiles, the organisms that have been adapted to extreme conditions through evolutionary pressure. Due to the fact that 99% of the microbial biodiversity cannot be cultivated using standard laboratory techniques, for years, the vast majority of extremophiles and their proteins have remained unexplored. Recently, biotechnologists have gained access to this enormous protein space through metagenomic analysis which overcomes the bottleneck of microbiological cultivation.

Within this thesis, which was carried out in the framework of the multinational "Hotzyme" consortium, bioinformatic analysis and *in vivo* functional screening of metagenomic libraries originating from extreme environments, led to the discovery and characterization of three novel and thermostable hydrolases. The corresponding genes coding for these enzymes were isolated from metagenomic DNA and the recombinant proteins were produced in bacterial *E. coli* cells, followed by purification and biochemical characterization.

Briefly, the first enzyme that was isolated and studied is the CelDZ1 cellulase. CelDZ1 was retrieved through bioinformatic screening of an enrichment sample originating from an Icelandic hot spring. CelDZ1 is a GH5 cellulase, with a pH optimum at 5 and a temperature optimum at 70 °C. Interestingly, CelDZ1 is hyper-halostable and halotolerant

as it is able to maintain high catalytic activity at near-saturating salt concentrations. In cooperation with our colleagues, the crystal structure of CeIDZ1 was studied and revealed that the new enzyme lacks the defined sugar-binding 2 subsite which is present in all homologues proteins.

The second enzyme that was isolated and characterized within this study, is the EstDZ2 esterase, which was retrieved through bioinformatic screening of a Russian hot spring metagenome. The new esterase is thermostable with a half-life of more than six hours at 60 °C, and exhibits exceptional stability against high concentrations of organic solvents. Phylogenetic analysis revealed that EstDZ2 opens a new family of lipolytic enzymes termed Family XV, which bares the catalytic motif GHSAG. The study of its structural model implied that EstDZ2 is missing the largest part of the “protein lid” present in the structures of all members of the closest IV family.

Finally, the third enzyme of this thesis is the EstDZ3 esterase. EstDZ3 is hyperthermostable as it retains its catalytic activity after several hours of incubation at near-boiling temperatures. The corresponding gene coding for this new enzyme was retrieved through *in vivo* functional screening of the genetic material of a bacterial strain isolated from an *in situ* enrichment of a Chinese hot spring. Apart from the exceptional thermostability, EstDZ3 also exhibits great stability against high concentrations of organic solvents. Furthermore, the study of EstDZ3’s structural model revealed that the enzyme bares a “subdomain insertion” similar to the one reported for the closest structural homologue that is expected to have a determinant role for EstDZ3’s catalytic properties.

All three hydrolases, exhibit low homology to known and characterized proteins, a fact that combined with their interesting biochemical profile renders them not only candidate enzymes for biotechnological applications but also molecular models for studying the thermostabilization mechanisms of proteins and more.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	13
1.1 Τα υδρολυτικά ένζυμα και οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές τους.....	13
1.1.1 Αμυλάσες.....	14
1.1.2 Ξυλανάσες .....	17
1.1.3 Κυτταρινάσες.....	18
1.1.4 Εστεράσες και λιπάσες.....	27
1.2 Θερμοανθεκτικά Ένζυμα .....	32
1.2.1 Μηχανισμοί σταθεροποίησης των θερμοανθεκτικών πρωτεϊνών .....	34
1.2.2 Στρατηγικές επιλογής και ανάπτυξης θερμοανθεκτικών ενζύμων .....	38
1.3 Ανακάλυψη και χαρακτηρισμός νέων θερμοανθεκτικών υδρολασών- Πλαίσιο εργασίας της παρούσας διατριβής.....	45
2. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΥΠΕΡ-ΑΛΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΕΝΔΟΓΛΟΥΚΑΝΑΣΗΣ ΑΠΟ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟ ΔΕΙΓΜΑ ΙΣΛΑΝΔΙΚΗΣ ΘΕΡΜΟΠΗΓΗΣ.....	50
2.1. Περίληψη.....	51
2.2 Εισαγωγή.....	51
2.3 Αποτελέσματα.....	52
2.3.1 Εμπλουτισμός δείγματος και ταξινομική ανάλυση .....	52
2.3.2 Εντοπισμός και ανακάλυψη της ενδογλουκανάσης CelDZ1 .....	53
2.3.3 Κλωνοποίηση, καθαρισμός και βιοχημικός χαρακτηρισμός.....	55
2.3.4 Δομικές μελέτες.....	65
2.4 Σχολιασμός.....	69
3. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΠΟΥ ΕΓΚΑΙΝΙΑΖΕΙ ΜΙΑ ΝΕΑ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΑΠΟ ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ ΡΩΣΙΚΗΣ ΘΕΡΜΟΠΗΓΗΣ .....	71
3.1 Περίληψη.....	71
3.2 Εισαγωγή.....	71
3.3 Αποτελέσματα.....	73
3.3.1 Δειγματοληψία μεταγονιδιωματικού υλικού και βιοπληροφορική ανάλυση.....	73
3.3.2 Απομόνωση, κλωνοποίηση και επιβεβαίωση της εστερολυτικής δράσης της EstDZ2.....	76
3.3.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης EstDZ2.....	81
3.3.4 Φυλογενετική Ανάλυση.....	85

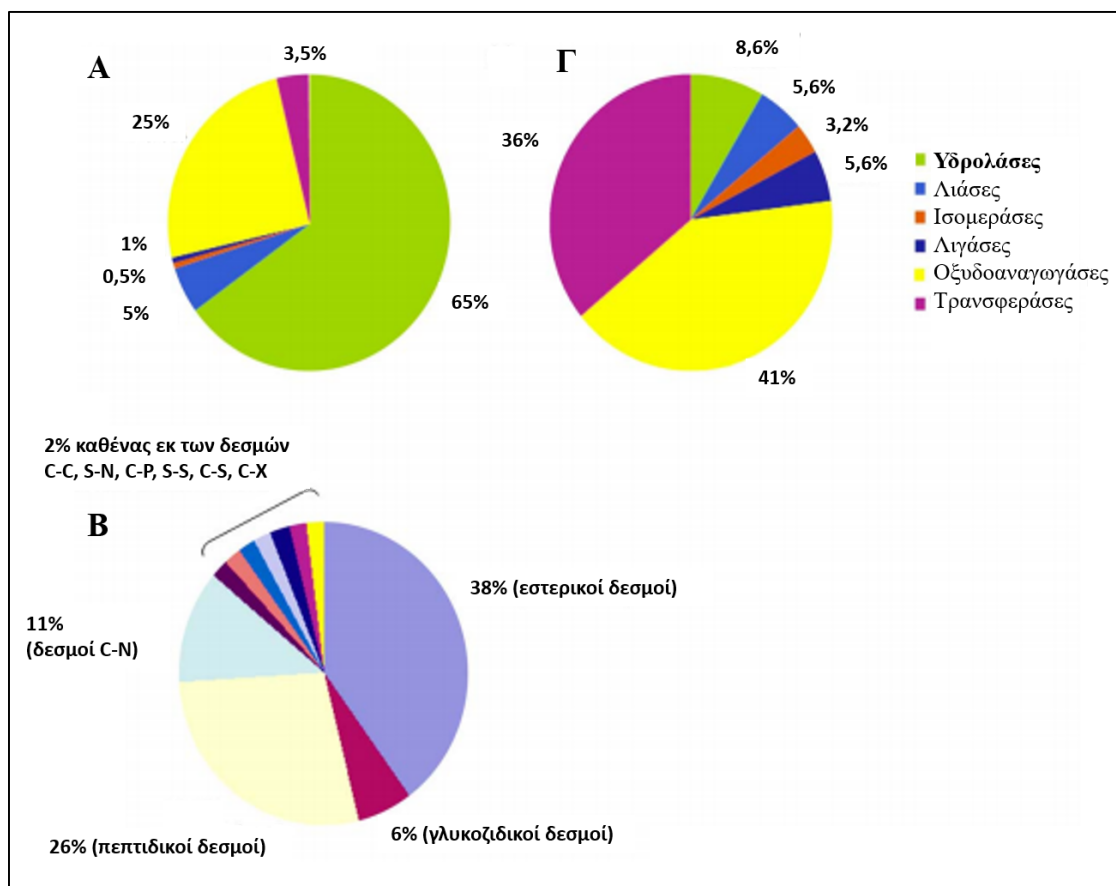
3.3.5 Μοντέλο τρισδιάστατης δομής EstDZ2 .....	88
3.4 Σχολιασμός.....	92
4. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΥΠΕΡ-ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ <i>in vivo</i> ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ .....	95
4.1 Περίληψη.....	95
4.2 Εισαγωγή.....	96
4.3 Αποτελέσματα.....	96
4.3.1 Δειγματοληψία, κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης και <i>in vivo</i> σάρωση της βιβλιοθήκης έκφρασης .....	96
4.3.2 Απομόνωση και Βιοχημικός Χαρακτηρισμός της EstDZ3 .....	100
4.3.3 Μελέτη σύγκρισης της αλληλουχίας και του δομικού μοντέλου της EstDZ3 με τις αλληλουχίες και τις δομές των πλησιέστερων δομικά εστερασών. ....	105
4.4 Σχολιασμός.....	110
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	113
5.1 Υλικά.....	113
5.2 Μέθοδοι.....	113
5.2.1 Δειγματοληψίες μεταγονιδιωματικού και γονιδιωματικό υλικού .....	113
5.2.2 Βιοπληροφορική ανάλυση.....	114
5.2.3 Κατασκευή μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών έκφρασης και επιλογή γονιδίου .....	120
5.2.4 Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων .....	120
5.2.5 Υπερέκφραση γονιδίων και πρωτεϊνικός καθαρισμός .....	122
5.2.6 Ενζυμικές αντιδράσεις.....	123
5.2.7 Ζυμογραφία .....	126
5.2.8 Κρυσταλλογραφία .....	127
5.2.9 Φυλογενετική ανάλυση .....	127
5.2.10 Πολλαπλή στοίχιση και δημιουργία δομικών μοντέλων.....	127
6. ΕΠΙΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ .....	128
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	131

# 1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1 Τα υδρολυτικά ένζυμα και οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές τους

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση ενζύμων στις βιομηχανικές εφαρμογές υπήρξε το άλμα μεταξύ της χημικής βιομηχανίας και της «λευκής βιοτεχνολογίας». Σε αυτή τη μετάβαση, οι κλασσικές χημικές μέθοδοι επεξεργασίας των υλικών αντικαταστάθηκαν από τη χρήση ενζύμων, γεγονός που οδήγησε σε μια πιο «πράσινη» βιομηχανία, μιας και τα ένζυμα απαιτούν ηπιότερες συνθήκες λειτουργίας και λιγότερο τοξικά μέσα αντίδρασης. Ανάμεσα στις έξι υπάρχουσες κατηγορίες ενζύμων: οξειδοαναγωγάσες, τρανσφεράσες, υδρολάσες, λυάσες, ισομεράσες και λιγάσες, οι υδρολάσες είναι τα ένζυμα που πρώτα χρησιμοποιήθηκαν συστηματικά σε ποικίλες εφαρμογές, και συνεχίζουν να παρουσιάζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Οι υδρολάσες καταλύουν την υδρόλυση των χημικών δεσμών των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και άλλων υποστρωμάτων ακολουθώντας το γενικό σχήμα  $[A-B + H_2O \rightarrow A-OH + B-H]$ . Στις συνήθεις συνθήκες, στα υδατικά διαλύματα, η υδρόλυση αυτών των δεσμών συνοδεύεται από μείωση της ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G$ ) και έτσι λαμβάνει χώρα αυθόρμητα. Αυτό συνεπάγεται ότι οι υδρολυτικές ενζυμικές αντιδράσεις μπορούν να πραγματοποιούνται σε ένα βήμα, χωρίς να απαιτείται αναγέννηση συμπαραγόντων, κατανάλωση τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) ή σύζευξη με άλλες ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις. Παράλληλα, κάποιες υδρολάσες, όπως οι εστεράσες, όταν βρεθούν σε μη υδατικό περιβάλλον είναι ικανές να καταλύσουν την αντίστροφη της υδρόλυσης αντίδραση, δηλαδή τη σύνθεση των εστερικών δεσμών (Klibanov 2001). Αυτά τα χαρακτηριστικά των υδρολασών, σε συνδυασμό με τη σταθερότητα τους και την «ευκολία» παραγωγής τους, καθιστούν τα ένζυμα αυτά υποψήφιους βιοκαταλύτες για μεγάλου εύρους εφαρμογές, και σε αυτό οφείλουν τη κεντρική θέση που κατέχουν στη βιομηχανία (Adler-Nissen 1982).

Από τη μεγάλη οικογένεια των υδρολασών, τα μέλη που χρησιμοποιούνται ευρέως στις βιοτεχνολογικές διεργασίες είναι οι αμυλάσες, οι ξυλανάσες, οι κυτταρινάσες και οι εστεράσες/ λιπάσες. Παρακάτω θα δούμε τα χαρακτηριστικά και τις εφαρμογές αυτών των ενζύμων στη βιοτεχνολογία, δίνοντας έμφαση στις κυτταρινάσες και τις εστεράσες, μιας και αποτελούν το αντικείμενο της παρούσας διατριβής.



**Εικόνα 1.1:** Κατανομή των ενζύμων που χρησιμοποιούνται σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές (**A,B**) και των ενζύμων που συναντώνται στα μικροβιακά μεταγονιδιώματα (**Γ**). Το ένθετο (**B**) αναφέρεται στα βιοτεχνολογικά ένζυμα της οικογένειας των υδρολασών που φαίνονται στο ένθετο (**A**). (Fernández-Arrojo, Guazzaroni et al. 2010)

### 1.1.1 Αμυλάσες

Οι αμυλάσες είναι τα ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση του αμύλου, απελευθερώνοντας σταδιακά δεξτρίνες και μικρότερα πολυμερή μόρια που αποτελούνται από μονάδες γλυκόζης. Για τον πλήρη απο-πολυμερισμό του αμύλου απαιτείται η δράση μιας σειράς αμυλασών, με τις α-αμυλάσες να παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Οι α-αμυλάσες (EC 3.2.1.1) καταλύουν την υδρόλυση των α-D-(1-4) γλυκοζιτικών δεσμών στο άμυλο, παράγονται από μικροοργανισμούς, φυτά και ανώτερους οργανισμούς και κατέχουν κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Οι α-αμυλάσες κατέχουν το μεγαλύτερο μερίδιο της αγοράς ενζύμων (>30%), καθώς χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία του αμύλου, στην αρτοποιία, στα απορρυπαντικά και σε πολλές ακόμα εφαρμογές. (Gupta, Gigras et al. 2003, Sivaramakrishnan, Gangadharan et al. 2006).

Στη συνέχεια αναφέρονται αναλυτικότερα κάποιες από τις κυριότερες εφαρμογές των αμυλασών:

#### ▪ Μετατροπή αμύλου

Η πιο διαδεδομένη εφαρμογή των α-αμυλασών είναι στη βιομηχανία μετατροπής του αμύλου όπου χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση και τη ρευστοποίησή του για την παραγωγή σιροπιών φρουκτόζης και γλυκόζης. Σε αυτές τις βιομηχανικές εφαρμογές μεγάλης κλίμακας, συνήθως χρησιμοποιούνται ένζυμα που ανήκουν στο είδος των βακίλων (*Bacillus*) λόγω της υψηλής τους θερμοσταθερότητας και της ευκολίας παραγωγής τους στα διαθέσιμα συστήματα γονιδιακής υπερέκφρασης (Van Der Maarel, Van Der Veen et al. 2002, Prakash and Jaiswal 2010).

#### ▪ Απορρυπαντικά

Η βιομηχανία των απορρυπαντικών είναι ο κυριότερος «καταναλωτής» ενζύμων αφού τα ένζυμα προστίθενται στα απορρυπαντικά για να ενισχύσουν την ικανότητα τους να απομακρύνουν δύσκολους λεκέδες κάτω από πιο ήπιες συνθήκες, καθιστώντας τη διαδικασία λιγότερο ενεργοβόρα και πιο οικολογική. Το 90% των εμπορικών υγρών απορρυπαντικών περιέχουν αμυλάσες αφού τα ένζυμα αυτά βοηθούν στην απομάκρυνση λεκέδων από αμυλούχα τρόφιμα όπως πατάτα, διάφορες σάλτσες, σοκολάτα κ.α. από υφάσματα και σκεύη (Souza 2010). Πολλές αμυλάσες που μπορούν να δράσουν σε ακραίες συνθήκες όπως υψηλά pH και παρουσία επιφανειοενεργών που υπάρχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα απορρυπαντικά έχουν ανακαλυφθεί. Οι αμυλάσες που χρησιμοποιούνται συνήθως στα εμπορικά απορρυπαντικά προέρχονται από τα γένη των μικροοργανισμών *Aspergillus* και *Bacillus* (Mitidieri, Martinelli et al. 2006).

#### ▪ Παραγωγή βιοαιθανόλης

Η αιθανόλη είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο υγρό βιοκαύσιμο. Το άμυλο είναι η προτιμώμενη πρώτη ύλη λόγω του χαμηλού του κόστους και της υψηλής διαθεσιμότητάς του. Στη διαδικασία παραγωγής της βιο-αιθανόλης, το άμυλο πρέπει να διαλυτοποιηθεί για να ακολουθήσει η ενζυμική κατεργασία του σε δυο βήματα, έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η μετατροπή του σε σάκχαρο. Στη μετατροπή αυτή, κύριο ρόλο έχουν οι αμυλάσες. Και εδώ, οι θερμοανθεκτικές αμυλάσες που χρησιμοποιούνται είτε προέρχονται από οργανισμούς όπως ο *Bacillus licheniformis* στους οποίους εκφράζονται φυσικά, είτε λαμβάνονται μέσω ανασυνδυασμένων βακτηρίων όπως τα *Escherichia coli* ή *Bacillus subtilis*, τα οποία αποτελούν σημαντικό βιοτεχνολογικό εργαλείο (Sanchez and Cardona 2008).

#### ▪ Βιομηχανία τροφίμων

Οι αμυλάσες χρησιμοποιούνται ευρέως σε ποικίλες εφαρμογές τροφίμων όπως στην αρτοποιία, στη ζύμωση των αλκοολούχων ποτών, στην παραγωγή βοηθημάτων πέψης και στην παραγωγή χυμών και αμυλούχων σιροπιών (Couto and Sanromán 2006). Ανάμεσα σε αυτές τις εφαρμογές, ίσως η σημαντικότερη είναι αυτή της προσθήκης των αμυλασών στα ζυμάρια των αρτοσκευασμάτων με σκοπό να υδρολύσουν το περιεχόμενο άμυλο σε μικρότερες δεξτρίνες που στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν υπόστρωμα από τις ζύμες. Αυτό ενισχύει το ρυθμό της ζύμωσης και μειώνει το ιξώδες με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα τελικό προϊόν βελτιωμένου όγκου και υφής. Επίσης, με την προσθήκη των αμυλασών στα ζυμάρια, αυξάνεται ο χρόνος ζωής του προϊόντος και με την αύξηση του περιεχομένου σε σάκχαρα επιτυγχάνεται βελτιωμένη γεύση, χρώμα και συμπεριφορά στο ψήσιμο του τελικού προϊόντος. Σήμερα, μια θερμοανθεκτική αμυλάση που χρησιμοποιείται ευρέως στην αρτοποιία, προέρχεται από το μικροοργανισμό *Bacillus stearothermophilus* (Van Der Maarel, Van Der Veen et al. 2002),(Souza 2010).

#### ▪ Βιομηχανία υφασμάτων

Στη βιομηχανία των υφασμάτων το άμυλο προστίθεται στα νήματα μιας και τους προσφέρει αντοχή και εξασφαλίζει μια πιο γρήγορη και ασφαλή διαδικασία ύφανσης. Λόγω της υψηλής διαθεσιμότητας του και του χαμηλού του κόστους, είναι το πρόσθετο που χρησιμοποιείται κατά κόρον για αυτό το σκοπό. Μετά την ύφανση των νημάτων, το άμυλο αφαιρείται από το ύφασμα με χρήση νερού στο οποίο έχουν προστεθεί αμυλάσες με σκοπό να επιταχυνθεί η διαδικασία, αφού το άμυλο υδρολύεται χωρίς να επιβαρύνεται το ύφασμα. (Feitkenhauer 2003, Souza 2010).

#### ▪ Βιομηχανία χαρτιού

Στη βιομηχανία του χαρτιού οι αμυλάσες χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή του αμύλου που χρησιμοποιείται στη διαδικασία παραγωγής. Το άμυλο χρησιμοποιείται ως παράγοντας επικάλυψης του χαρτιού μιας και αυτή η επεξεργασία προσφέρει στο τελικό προϊόν απαλότητα, αντοχή, καλύτερη ποιότητα γραφής και μεγαλύτερη ικανότητα σβησίματος. Σε αυτή την εφαρμογή, το φυσικό ιξώδες του αμύλου είναι πολύ υψηλό, κάτι που διορθώνεται με την προσθήκη των αμυλασών που οδηγεί σε μερική υδρόλυση (Gupta, Gigras et al. 2003). Υπάρχουν πολλά εμπορικά σκευάσματα αμυλασών που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις εφαρμογές, με μερικά από



αυτά να είναι τα Amizyme® (PMP Fermentation Products, Peoria, USA), Termamyl®, Fungamyl, BAN® (Novozymes, Denmark) και η αμυλάση G9995® (Enzyme Biosystems, USA) (Saxena, Malhotra et al. 2003),(Souza 2010).

### 1.1.2 Ξυλανάσες

Η ξυλάνη ανήκει στην οικογένεια των ημι-κυτταρινών και είναι ένας σύνθετος πολυσακχαρίτης που αποτελείται κυρίως από ξυλόζη και αραβινόζη. Η ξυλάνη είναι βασικό συστατικό των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων, αποτελώντας το 30%-35% του συνολικού ξηρού τους βάρους. Ο βασικός της σκελετός αποτελείται από ξυλόζες ενωμένες μεταξύ τους με 1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς, τους οποίους στοχεύουν οι ενδο-ξυλανάσες, τα ένζυμα που συμμετέχουν στην υδρόλυση της ξυλάνης (Beg, Kapoor et al. 2001, Subramaniyan and Prema 2002).

Οι ενδο-ξυλανάσες παρουσιάζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον με τις κυριότερες εφαρμογές τους να είναι οι εξής:

- Βιομηχανία χαρτιού

Μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές των ξυλανασών είναι η προ-λεύκανση των πολτών χαρτιού. Η προσθήκη του ενζύμου στον πολτό βελτιώνει τη ικανότητα συγκράτησης νερού, βοηθώντας στη δημιουργία ινών και απομακρύνοντας επιλεκτικά την ξυλάνη. Επίσης, βοηθούν στην απομόνωση της κυτταρίνης από τους πολτούς ξύλου. (Bajrai 1999)

- Πτηνοτροφία

Στην πτηνοτροφία η καθυστέρηση στην αύξηση του βάρους των ζώων και η αποτελεσματικότητα της μετατροπής της τροφής έχουν συνδεθεί με το ιξώδες της τροφής στο πεπτικό σύστημα των πτηνών. Με την προθήκη ξυλανασών στις τροφές σικάλεως επιτυγχάνεται η μείωση του ιξώδους και η αύξηση του βάρους του ζώου καθώς και η αύξηση του ρυθμού μετατροπής της τροφής. (Bedford and Classen 1991)

- Αρτοποιία και Ποτοποιία

Οι ξυλανάσες αποτελούν ένα πολύ αποτελεσματικό εργαλείο στη βελτίωση της ποιότητας των αρτοσκευασμάτων, αυξάνοντας τον όγκο του προϊόντος, ειδικά όταν

χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τις αμυλάσες όπως ήδη αναφέρθηκε (Harris and Ramalingam 2010). Παράδειγμα αποτελεί το προϊόν Pangea® της Novozymes το οποίο περιέχει ξυλανάσες και έχει σχεδιαστεί για χρήση στην αρτοποιία. Στην ποτοποιία, οι ξυλανάσες χρησιμοποιούνται στις διεργασίες παραγωγής χυμών και κρασιού, για την επεξεργασία των φλοιών των φρούτων αλλά και για την πρόσδοση αρώματος. (Beg, Karoor et al. 2001)

#### ▪ Διαχείριση αποβλήτων

Η ξυλάνη βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στα απόβλητα των γεωργικών βιομηχανιών και των βιομηχανιών τροφίμων. Έτσι, οι ξυλανάσες χρησιμοποιούνται και εδώ για την απομάκρυνση του πολυμερούς της ξυλάνης από το αποβαλλόμενο νερό. (Rani and Nand 1996)

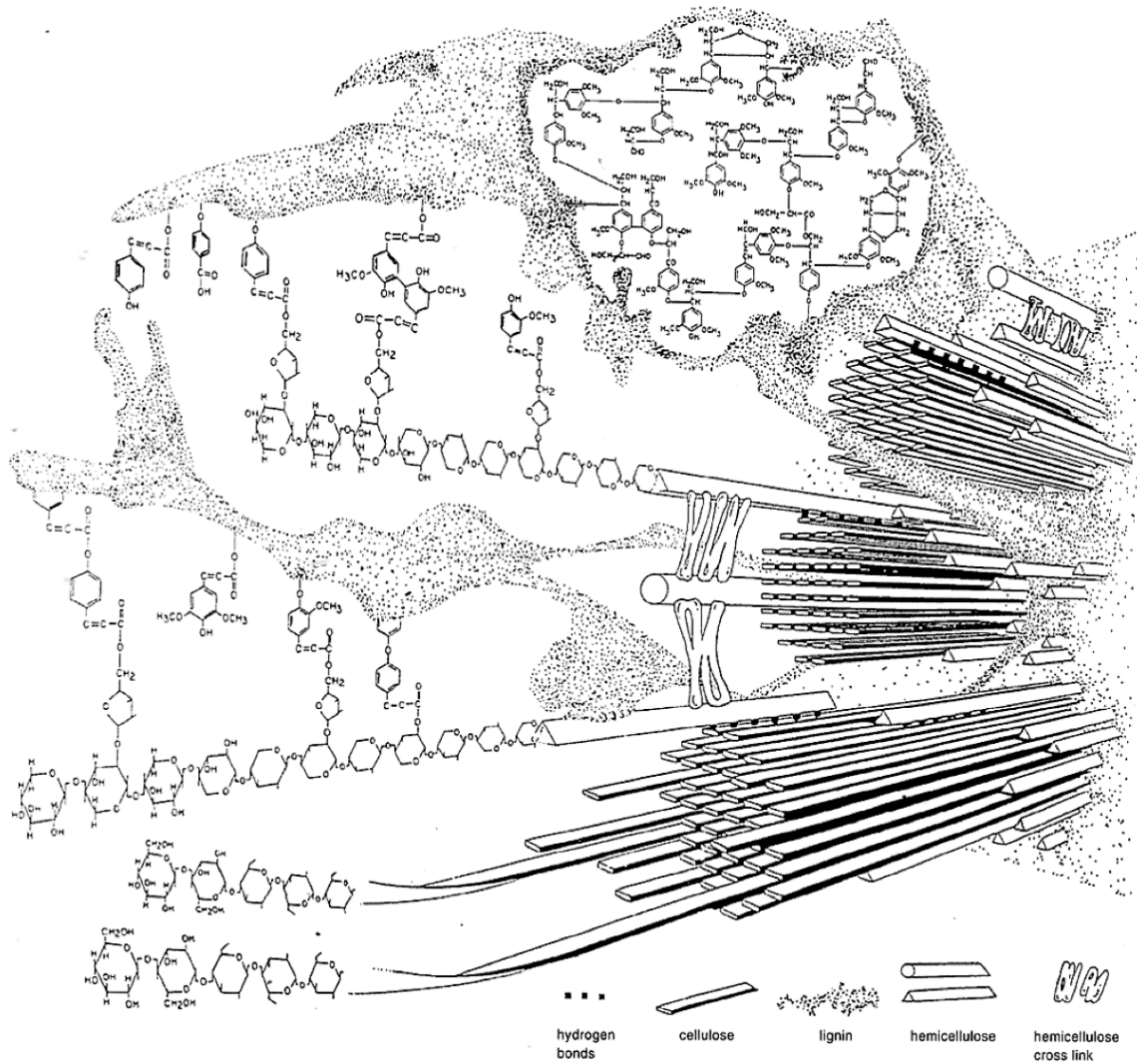
#### ▪ Βιοκαύσιμα

Οι ξυλανάσες, σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα όπως οι μανανάσες, οι ξυλοζιδάσες, οι κυτταρινάσες κ.α χρησιμοποιούνται στις διεργασίες παραγωγής βιοκαυσίμων από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα. Η διαδικασία αυτή απαιτεί την απομάκρυνση της λιγνίνης έτσι ώστε να ελευθερωθεί η κυτταρίνη και η ημι-κυτταρίνη για να ακολουθήσει ο απο-πολυμερισμός τους με τελικό στόχο την παραγωγή ελεύθερων σακχάρων τα οποία στο τελικό στάδιο ζυμώνονται προς την παραγωγή αιθανόλης (Kuhad and Singh 1993).

### **1.1.3 Κυτταρινάσες**

Η κυτταρίνη είναι ένα βιοπολυμερές που βρίσκεται σε αφθονία στη φύση, με περίπου 100-1000 τρισεκατομμύρια τόνους να παράγονται ετησίως σε μορφή φυτικής βιομάζας (Εικόνα 1.2) (Bayer, Chanzy et al. 1998, Klemm, Heublein et al. 2005). Θεωρείται μια πρακτικά ανεξάντλητη πρώτη ύλη που μπορεί να μετατραπεί μέσα από βιοτεχνολογικούς χειρισμούς σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας και ταυτόχρονα φιλικά προς το περιβάλλον, όπως υφάσματα, ζωοτροφές, βιοκαύσιμα και πολλά άλλα (Bhat 2000). Η κυτταρίνη είναι ένα πολυμερές απλής σύστασης, αποτελούμενο από μονάδες D-γλυκόζης συνδεδεμένες μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Klemm, Heublein et al. 2005). Όμως, παρά την απλή της δομή, το ισχυρό «πακετάρισμα» των μορίων της και ο σχηματισμός ισχυρής

κρυσταλλικής δομής καθιστούν την κυτταρίνη ένα πολύ δύσκολο διαχειρίσιμο υλικό που αντιστέκεται στον από-πολυμερισμό. Ο απο-πολυμερισμός της έχει ως στόχο τη δημιουργία μικρότερων, περισσότερο «διαχειρίσιμων» μονάδων που μπορούν μετά από επεξεργασία να μετατραπούν σε χρήσιμα προϊόντα.



**Εικόνα 1.2:** Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης της φυτικής βιομάζας η οποία αποτελείται από 15-25% λιγνίνη, 23-32% ημικυτταρίνη και 38-50% κυτταρίνη. (Bidlack, Malone et al. 1992)

Στη φύση, η κυτταρίνη αποικοδομείται ενζυμικά από τη συντονισμένη δράση τριών τύπων κυτταρινασών: (i) τις ένδο- 1,4-β-γλουκανάσες (ενδογλουκανάσες ή κυτταρινάσες) οι οποίες υδρολύουν τους εσωτερικούς δεσμούς της κυτταρίνης με τυχαία σειρά (ii) τις έξω-1,4-β-γλουκανάσες που στοχεύουν τα αναγωγικά ή μη αναγωγικά άκρα της κυτταρινικής

αλυσίδας, και (iii) τις β-γλυκοζιδάσες που μετατρέπουν την κελλοβιόζη, το κύριο προϊόν των ένδο- και έξω-κυτταρινασών, σε γλυκόζη (Horn, Vaaje-Kolstad et al. 2012). Την τελευταία δεκαετία, οι υδατανθρακικές μονοοξυγενάσες [(Lytic) Polysaccharide Monoxygenases, (L)PMOs], μια οικογένεια ενζύμων που καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση της κυτταρίνης έχουν προστεθεί στη λίστα των βιοκαταλυτών που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της (Villares et al.2016).

Στις βιομηχανικές εφαρμογές, οι κυτταρινούχες πρώτες ύλες μπορούν να αποπολυμεριστούν είτε χημικά είτε ενζυμικά, είτε με συνδυασμό των δυο μεθόδων. Λόγω όμως της ικανότητας των κυτταρινασών να «προσεγγίζουν» την «απρόσιτη» δομή της κυτταρίνης με τρόπο μη-ενεργοβόρο και οικολογικό, η καθαρά χημική επεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας έχει αντικατασταθεί από την ενζυμική επεξεργασία σε πολλές εφαρμογές.

Ένα στοιχείο που αποτυπώνει τη σημαντικότητα των κυτταρινασών για τη βιομηχανία, είναι η πρόβλεψη του Υπουργείου Ενέργειας των Η.Π.Α ότι το ετήσιο μερίδιο της αγοράς των ενζύμων που θα κατέχουν οι κυτταρινάσες μέχρι το 2030 θα αγγίξει το ποσό των 9 δισεκατομμυρίων δολαρίων (Zhang and Zhang 2013). Παρά τη μεγάλη χρησιμότητα τους όμως, ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που περιορίζουν τη χρήση των κυτταρινασών στη βιομηχανία είναι η «ανθεκτικότητα» του ίδιου του ενζύμου. Στις βιομηχανικές διεργασίες συνήθως επικρατούν «αντίξοες» συνθήκες όπως υψηλές θερμοκρασίες, παρουσία οργανικών διαλυτών, αλάτων, απορρυπαντικών, ιόντων μετάλλων κ.α. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η πλειοψηφία των συμβατικών βιοκαταλυτών καθίστανται ανενεργοί. Οι θερμοανθεκτικές κυτταρινάσες από την άλλη είναι ένζυμα που μπορούν να προστεθούν στην επεξεργασία της βιομάζας, όπου αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες, χωρίς να απαιτείται ψύξη του υλικού. Έτσι, η ιδιότητα της θερμοσταθερότητας τους, απαλλάσσει τη βιομηχανία από το τεράστιο κόστος της ψύξης και καθιστά τη χρήση των κυτταρινασών συμφέρουσα και εφαρμόσιμη. Για το λόγο αυτό, οι βιοτεχνολόγοι συνεχώς αναζητούν νέα, βελτιωμένα ένζυμα με την ικανότητα να δρουν κάτω από ακραίες συνθήκες. Σε επόμενο κεφάλαιο θα εξετασθούν οι στρατηγικές που εφαρμόζονται από τους βιοτεχνολόγους προς την ανακάλυψη νέων ενζύμων με τις επιθυμητές λειτουργίες.

Στη συνέχεια παρατίθενται κάποιες από τις σημαντικότερες βιομηχανικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές των κυτταρινασών:

- Βιομηχανία χαρτιού

Το ενδιαφέρον για τη χρήση των κυτταρινασών στη βιομηχανία του χαρτιού έχει αυξηθεί σημαντικά στη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών. Με τη μηχανική επεξεργασία του ξύλου προκύπτουν ξυλοπολτοί υψηλής περιεκτικότητα σε ίνες, μεγάλου όγκου και υψηλής σκληρότητας. Αντιθέτως, η επεξεργασία της πρώτης ύλης με συνδυασμό βιοτεχνολογικών και μηχανικών μεθόδων, η οποία περιλαμβάνει τη χρήση κυτταρινασών, μειώνει το ενεργειακό κόστος κατά 20-40% κατά τη διαδικασία του ραφινάρισματος, βελτιώνοντας ταυτόχρονα τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Mai, Kües et al. 2004, Kuhad, Gupta et al. 2011). Μείγματα κυτταρινασών και ημι-κυτταρινασών χρησιμοποιούνται για τη βιομετατροπή των ινών και τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους όπως της ικανότητας αποστράγγισης και επεξεργασίας στους μύλους χαρτιού πριν και μετά το χτύπημα του πολτού (Dienes, Egyhazi et al. 2004). Οι ενδογλουκανάσες έχουν την ικανότητα να μειώνουν το ιξώδες των ξυλοπολτών με μικρότερο βαθμό υδρόλυσης ενώ οι κυτταρινάσες αυξάνουν την ικανότητα λεύκανσης οδηγώντας σε τελικό προϊόν μεγαλύτερης λευκότητας και καθαρότητας σε σχέση με την επεξεργασία με ξυλανάσες όπως είδαμε νωρίτερα (Kuhad, Gupta et al. 2011). Οι κυτταρινάσες, μόνες του ή σε συνδυασμό με ξυλανάσες, χρησιμοποιούνται επίσης για την απομάκρυνση των μελανιών από τα απόβλητα χαρτιού. Το βασικό πλεονέκτημα της χρήσης αυτών των ενζύμων σε αυτή την εφαρμογή είναι η ελαχιστοποίηση της χρήσης ισχυρών διαλυμάτων βάσεων και οργανικών διαλυτών, η βελτίωση της καθαρότητας των ινών, η ενίσχυση της αντοχής του υλικού και η μείωση της περιεκτικότητας του πολτού σε μικρά σωματίδια (Bhat 2000, Kuhad, Mehta et al. 2010).

- Κλωστοϋφαντουργία

Οι κυτταρινάσες είναι ίσως το ένζυμο «πρωταγωνιστής» στη βιομηχανία των υφασμάτων, ιδιαίτερα στο τελικό στάδιο ραφινάρισματος των κυτταρινούχων υφασμάτων, όπου χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της υφής και της εμφάνισης του τελικού προϊόντος (Hebeish and Ibrahim 2007). Η παραδοσιακή πετρόπλυση των υφασμάτων τύπου jean περιλαμβάνει την απομάκρυνση της αμυλούχας επικάλυψης με τη χρήση αμυλασών όπως είδαμε νωρίτερα, και την επεξεργασία του υφάσματος με ελαφρόπετρες (1-2 κιλά/παντελόνι) σε μεγάλα πλυντήρια. Οι κυτταρινάσες έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην αντικατάσταση αυτής της ενεργοβόρας διαδικασίας αφού το ένζυμο δρα πάνω στο ύφασμα διασπώντας τις μικρές ίνες του νήματος,

απελευθερώνοντας τη βαφή που στη συνέχεια αφαιρείται εύκολα με πλύση. Τα πλεονεκτήματα της αντικατάστασης του πετροπλυσίματος από την ενζυμική επεξεργασία, περιλαμβάνουν μικρότερη φθορά των ινών του υφάσματος και λιγότερο ενεργοβόρα, πιο οικολογική και περισσότερο αποδοτική διαδικασία κατεργασίας (Kirk, Borchert et al. 2002, Kuhad, Gupta et al. 2011). Πέρα από την πετρόπλυση των jean υφασμάτων, οι κυτταρινάσες χρησιμοποιούνται και στην επεξεργασία άλλων υφασμάτων αφού προσδίδουν στιλπνότητα και γυάλισμα στο τελικό προϊόν χωρίς να χρειάζεται η επικάλυψη των ινών με χημικές ουσίες. Αυτό επιτυγχάνεται με την ενζυμική απομάκρυνση των μικροϊνών της κυτταρίνης από την επιφάνεια του υφάσματος που έχει ως αποτέλεσμα τη λείανση, τη βελτίωση του χρώματος, της ανθεκτικότητας και της υδροφιλικότητας του υφάσματος με μια φιλική προς το περιβάλλον διαδικασία. Επίσης οι κυτταρινάσες χρησιμοποιούνται και στον καθαρισμό των νημάτων, αφού με τη δράση τους χαλαρώνουν το κυτταρινούχο πλέγμα και διευκολύνουν την απομάκρυνση υλικών που έχουν παγιδευτεί εκεί. (Sreenath, Shah et al. 1996, Kuhad, Gupta et al. 2011).

- Παραγωγή βιοαιθανόλης

Η χρήση των κυτταρινασών για την ελευθέρωση σακχάρων από τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά προς την παραγωγή βιοκαυσίμων, είναι ίσως η πιο δημοφιλής και πολλά υποσχόμενη εφαρμογή αυτών των ενζύμων σήμερα (Bhat 2000, Lynd, Weimer et al. 2002). Η μετατροπή της βιομάζας σε πιο «διαχειρίσιμα» και υψηλότερης αξίας προϊόντα αποτελείται από μια σειρά σταδίων και διεργασιών που περιλαμβάνουν τη μηχανική, χημική και βιολογική προ-επεξεργασία των βιοπολυμερών, τη βιομετατροπή των σακχάρων που προκύπτουν από την προ-επεξεργασία, το διαχωρισμό και τον καθαρισμό τους. Σήμερα η βιοτεχνολογία προσφέρει λύσεις για όλα τα στάδια επεξεργασίας των λιγνοκυτταρινούχων υλικών προς την παραγωγή αιθανόλης και άλλων προϊόντων αλλά πολλές από αυτές τις λύσεις χρήζουν βελτίωσης έτσι ώστε να γίνουν ανταγωνιστικές σε σχέση με τις συμβατικές χημικές μεθόδους. Η λύση σε αυτό, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι η ανακάλυψη και χρήση ενζύμων με ιδιότητες όπως η θερμοσταθερότητα, η σταθερότητα παρουσία οργανικών διαλυτών, μεταλλικών ιόντων, απορρυπαντικών και άλλων παραγόντων που προκαλούν μετουσίωση των συμβατικών βιοκαταλυτών. Πέρα από την απόδοση των κυτταρινασών υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το κόστος της διαδικασίας, όπως η ικανότητα ανακύκλωσης του

βιοκαταλύτη που συνδέεται άμεσα με το βαθμό της προσρόφησης του στο υπόστρωμα καθώς και το κόστος παραγωγής του ενζύμου (Bon and Ferrara 2007, Kuhad, Gupta et al. 2010).

- Οινοποιία και ζυθοποιία

Οι πολυσακχαρίτες και τα μικροβιακά ένζυμα που τους υδρολύουν, παίζουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες ζύμωσης προς την παραγωγή αλκοολούχων ποτών όπως το κρασί και η μύρα. Τα ένζυμα αυτά, τα οποία είναι σήμερα εμπορικά διαθέσιμα, μπορούν να βελτιώσουν τόσο την ποιότητα του τελικού προϊόντος όσο και την απόδοση της διαδικασίας παραγωγής (Bamforth 2009, Kuhad, Gupta et al. 2011). Οι ενδογλουκανάσες συγκεκριμένα, προστίθενται είτε κατά την σύνθλιψη είτε κατά τα αρχικά στάδια της ζύμωσης για να υδρολύσουν τη γλουκάνη, να μειώσουν το ιξώδες και να διευκολύνουν τη διαδικασία της διήθησης (Canales, Garza et al. 1988). Στην οινοποιία, ένζυμα όπως οι πηκτινάσες και οι κυτταρινάσες χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση του χρώματος, την απομάκρυνση του φλοιού των στέμφυλων, τη διαύγαση και τη σταθεροποίηση του κρασιού (Kuhad, Gupta et al. 2011). Συγκεκριμένα, οι β-γλυκοζιδάσες μπορούν να βελτιώσουν το άρωμα του κρασιού μετασχηματίζοντας της γλυκοζυλιωμένες πρόδρομες πρωτεΐνες. Παρομοίως, η ζυθοποιία βασίζεται στη δράση των ενζύμων που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ζύμωσης. Η μετατροπή του κριθαριού σε μύρα εξαρτάται από τη βλάστηση του σπόρου που πυροδοτεί τη βιοσύνθεση και την ενεργοποίηση των αμυλασών και των β-γλουκανασών που υδρολύουν τα αποθέματα του σπόρου.

- Βιομηχανία τροφίμων

Όπως είδαμε και με άλλες υδρολάσες, οι κυτταρινάσες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη βιομηχανία των τροφίμων. Η παραγωγή διαφόρων χυμών φρούτων και λαχανικών απαιτεί βελτιωμένες μεθόδους εξαγωγής, διαύγασης και σταθεροποίησης τους. Οι κυτταρινάσες κατέχουν σημαντικό ρόλο ως συστατικό των ενζυμικών μειγμάτων που περιέχουν επίσης πηκτινάσες και ξυλανάσες και χρησιμοποιούνται για τη διαβροχή των φρούτων και των λαχανικών (De Carvalho, De Castro et al. 2008, Kuhad, Gupta et al. 2011). Συγκεκριμένα, οι β-γλυκοζιδάσες σε συνδυασμό με πηκτινάσες χρησιμοποιούνται για να μειώσουν την υπερβολικά πικρή γεύση των εσπεριδοειδών και να βελτιώσουν την εξαγωγή του ελαιόλαδου από τον καρπό της ελιάς. (Baker and Wicker 1996, Kuhad, Gupta et al. 2011)

- Βιομηχανία ζωοτροφών

Όπως είδαμε και για τις ξυλανάσες, οι κυτταρινάσες σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές για να αυξήσουν τη διατροφική τους αξία και την απόδοση τους. Τα ένζυμα αυτά μπορούν επίσης να αποικοδομήσουν εκείνα τα συστατικά των τροφών που μειώνουν τη διατροφική αξία της ζωοτροφής καθώς και να δράσουν βοηθητικά στην πέψη. Συγκεκριμένα, οι β-γλουκανάσες και οι ξυλανάσες χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές των μονογαστρικών ζώων για να υδρολύσουν πολυσακχαρίτες εκτός του αμύλου όπως β-γλουκάνες και αραβινοξυλάνες. Η προσθήκη αυτών των ενζύμων μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την ποιότητα του χοιρινού κρέατος και των πουλερικών καθώς μειώνει το ιξώδες των κυτταρινούχων τροφών και υποβοηθά την πέψη και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών (Dhiman, Zaman et al. 2002, Graham and Balnave 2008). Οι περισσότερες ζωοτροφές χαμηλής ποιότητας, περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση κυτταρίνης, και χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και λίπος σε σύγκριση με τις ποιοτικές τροφές. Οι κυτταρινάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προ-επεξεργασία της ζωοτροφής πριν το τάισμα που προσφέρει καλύτερη ποιότητα πέψης και απόδοση ενέργειας σε συνδυασμό με ένα μικρό ποσοστό υδατοδιαλυτών υδρογονανθράκων. Κατά την παραγωγική διαδικασία των ζωοτροφών, συνήθως επιβάλλεται ένα στάδιο θερμικής επεξεργασίας για την απενεργοποίηση πιθανών ιικών και μικροβιακών επιμολύνσεων. Για αυτόν ακριβώς το λόγο, και εδώ η σημαντικότητα των θερμοσταθερών κυτταρινασών γίνεται φανερή αφού επιτρέπει τη θερμική απολύμανση και ζύμωση των ζωοτροφών σε ένα και μόνο στάδιο (Bhat 2000, Kuhad, Gupta et al. 2011). Η συγκεκριμένη εφαρμογή των ενζυμικών μειγμάτων στις ζωικές τροφές έγινε αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνταν στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ali, Hall et al. 1995). Παράλληλα, η χαμηλή πεπτική ικανότητα απέναντι σε αμυλούχες τροφές μπορεί να επάγει την εμφάνιση πεπτικών ασθενειών που προκαλούνται από το μη υδρολυμένο άμυλο που φτάνει στο παχύ έντερο και δρα ως υπόστρωμα για πιθανώς παθογόνα βακτήρια. Και εδώ οι κυτταρινάσες έχουν θετικό αποτέλεσμα, αυξάνοντας την παραγωγή προπιονικού οξέος που δρα ως βακτηριοστατικό και μπορεί να μειώσει την ικανότητα αποίκισης των παθογόνων βακτηρίων (Pascual 2001, Kuhad, Gupta et al. 2011).



- Γεωργικές βιομηχανίες

Πολλά εμπορικά σκευάσματα που αποτελούνται από μείγματα ενζύμων όπως κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και πηκτινάσες χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργία για την ενίσχυση της ανάπτυξης των σιτηρών και τον έλεγχο των φυτικών ασθeneιών (Chet, Benhamou et al. 1998). Οι φυτικοί και μυκητιακοί πρωτοπλάστες που προκύπτουν με τη χρήση μικροβιακών υδρολασών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία υβριδικών στελεχών με επιθυμητές ιδιότητες. Οι κυτταρινάσες και άλλα μυκητιακά ένζυμα είναι ικανές να αποικοδομήσουν το κυτταρικό τοίχωμα των παθογόνων οργανισμών που προσβάλλουν τα φυτά και έτσι χρησιμοποιούνται για την προστασία των καλλιεργειών από αυτούς (Bhat 2000). Πολλοί κυτταρινολυτικοί μύκητες όπως οι *Trichoderma sp.*, *Geocladium sp.*, *Chaetomium sp.*, και *Penicillium sp.* παίζουν σημαντικό ρόλο στη γεωργία, διευκολύνοντας τη βλάστηση των σπόρων, την ανάπτυξη των φυτών, την άνθηση, την εξάπλωση των ριζικών συστημάτων καθώς και την αύξηση της απόδοσης της καλλιέργειας (Bailey and Lumsden 1998, Harman and Björkman 1998).

- Εξαγωγή καροτενοειδών

Τα καροτενοειδή είναι βασική ομάδα φυσικών χρωστικών ουσιών και σε αυτά οφείλονται τα χρώματα από κίτρινο μέχρι και κόκκινο που απαντώνται στη φύση. Η αγορά αυτών των χρωστικών συνεχώς και αυξάνεται κυρίως λόγω της χρήσης τους ως βρώσιμες χρωστικές φυτικής προέλευσης που συνοδεύεται από απουσία τοξικότητας, και υψηλή προσαρμοστικότητα μιας και υπάρχουν τόσο σε υδατοδιαλυτή όσο και λιποδιαλυτή μορφή. Παράλληλα, η δράση της προβιταμίνης Α που συμμετέχει στην οξείδωση των λιπών και παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες είναι μια από τις σημαντικότερες βιολογικές ιδιότητες αυτών των χρωστικών (Çinar 2005). Και εδώ, ο συνδυασμός κυτταρινασών και πηκτινασών επιταχύνει το ρυθμό της υδρόλυσης, επιτυγχάνοντας πλήρη ρευστοποίηση, ξεκινώντας από τη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων του φλοιού του πορτοκαλιού, της γλυκοπατάτας και του καρότου, απελευθερώνοντας τα καροτενοειδή στους χλωροπλάστες και το κυτταρικό υγρό. Η χρωστική παραμένει προσδεμένη σε άλλες πρωτεΐνες, γεγονός που αποτρέπει την οξείδωση της και προσδίδει σταθερότητα στο χρώμα. (Bassi, Pineau et al. 1993, Kuhad, Gupta et al. 2011)

- Βιομηχανία απορρυπαντικών

Η χρήση των κυτταρινασών σε συνδυασμό με πρωτεάσες και λιπάσες είναι η πιο σύγχρονη προσέγγιση στα απορρυπαντικά. Οι κυτταρινάσες, έχοντας πρόσβαση στις ίνες της κυτταρίνης των υφασμάτων μπορούν να βελτιώσουν τη φωτεινότητα του χρώματος, την υφή και την ικανότητα απομάκρυνσης των λεκέδων από αυτές. Πέρα από τα απορρυπαντικά οικιακής χρήσης, και στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται μείγματα αλκαλόφιλων κυτταρινασών που μπορούν να έρθουν σε επαφή με την κυτταρίνη στο εσωτερικό των ινών και να απομακρύνουν το χόμα και άλλα υλικά παρουσία των συμβατικών επιφανειοενεργών (Kuhad, Gupta et al. 2011). Σήμερα, τα υγρά απορρυπαντικά περιέχουν ανιονικά και μη ιονικά επιφανειοενεργά, κιτρικό οξύ, άλατα, πρωτεάσες, κυτταρίνη και μείγματα προπανοδιόλης και βορικού οξέος με σκοπό να σταθεροποιήσουν τις περιεχόμενες κυτταρινάσες (Karmakar and Ray 2011). Είναι προφανές ότι και σε αυτή την εφαρμογή, ένζυμα με ανθεκτικότητα σε ακραίες θερμοκρασίες και σταθερότητα παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων έχουν συμβάλει στην επιτυχημένη ανάπτυξη της τεχνολογίας των απορρυπαντικών.

- Διαχείριση αποβλήτων

Τα απόβλητα και τα παραπροϊόντα που προκύπτουν από τις δασικές και γεωργικές εκτάσεις και τις αγροβιομηχανίες περιέχουν τεράστιες ποσότητες ανεκμετάλλευτης κυτταρίνης η οποία απορρυπτόμενη προκαλεί περιβαλλοντική ρύπανση (Milala, Shugaba et al. 2005). Σήμερα, τα κυτταρινούχα απόβλητα χρησιμοποιούνται προς την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων όπως ένζυμα, σάκχαρα, βιοκαύσιμα, χημικά, φθηνές ύλες ενέργειας, βελτιωμένες ζωοτροφές και θρεπτικά συστατικά. Στη διαδικασία τις επεξεργασίας των αποβλήτων προς αυτή την κατεύθυνση χρησιμοποιούνται και κυτταρινάσες αφού το φυσικό τους υπόστρωμα, η κυτταρίνη, είναι το κύριο συστατικό της πρώτης ύλης (Abdulla and El-Shatoury 2007) (Kuhad, Gupta et al. 2011).

Οι σημαντικότερες εφαρμογές των κυτταρινασών στη βιομηχανία συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

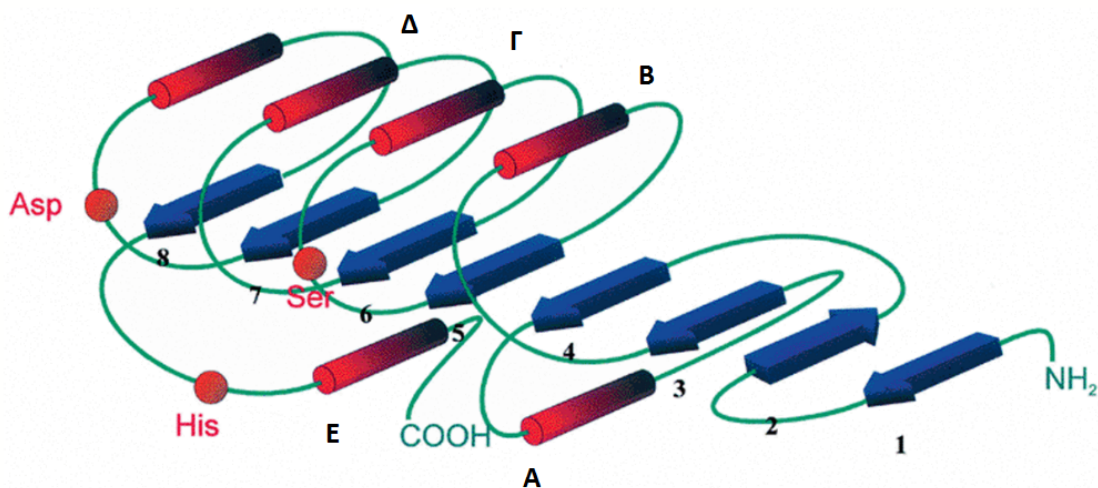
**Πίνακας 1.1: Εφαρμογές των κυτταρινασών σε διάφορες βιομηχανίες (Kuhad, Gupta et al. 2011)**

<b>Βιομηχανία</b>	<b>Εφαρμογή</b>
Γεωργία	Έλεγχος παθογένειας και ασθενειών στα φυτά, δημιουργία φυτικών και μυκητιακών πρωτοπλαστών, ενίσχυση της βλάστησης των σπόρων και της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος, ενίσχυση της ανάπτυξης και της ανθοφορίας, βελτίωση της ποιότητας του εδάφους, έλεγχος μέσω εξάρτηση από μεταλλικά λιπάσματα
Βιομετατροπές	Μετατροπή κυτταρινούχων υλικών σε αιθανόλη/ διαλύτες/ οργανικά οξέα/ λιπίδια, παραγωγή ζωοτροφών υψηλής θερμιδικής περιεκτικότητας και διατροφικής αξίας, βελτίωση της μηρυκαστικής απόδοσης, βελτίωση πέψης και απορρόφησης, διατήρηση υψηλής ποιότητας αχύρου που προορίζεται για ζωτροφή.
Απορρυπαντικά	Απορρυπαντικά με βάση τις κυτταρινάσες, υψηλή απόδοση χωρίς κίνδυνο αλλοίωσης των ινών του υφάσματος, βελτίωση της ικανότητας διατήρησης του χρώματος και της απομάκρυνσης των λεκέδων, απομάκρυνση των τραχειών εξογκωμάτων στα βαμβακερά υφάσματα, παρεμπόδιση της επαναπορρόφησης των μορίων μελανιού
Ζύμωση	Βελτίωση της πολτοποίησης και της ζύμωσης της βύνης, βελτίωση της σύνθλιψης και της εξαγωγής του χρώματος των στέμφυλων, ενίσχυση του αρώματος του κρασιού, βελτίωση της διαδικασίας διαύγασης του μούστου, βελτίωση του ρυθμού φίλτρανης του κρασιού, βελτίωση σταθερότητας του κρασιού, βελτίωση της αρχικής ζύμωσης και της ποιότητας της μύρας
Τρόφιμα	Απελευθέρωση αντιοξειδωτικών από πολτούς φρούτων και λαχανικών, βελτίωση απόδοσης της εξαγωγής αμύλου και πρωτεΐνης, βελτίωση της διαβροχής/ σύνθλιψης/ και απομόνωσης χρώματος από φρούτα και λαχανικά, διαύγαση των φρουτοχυμών, βελτίωση της υφής και της ποιότητας των προϊόντων αρτοποιίας, βελτίωση του ιξώδους των φρουτοπολτών, βελτίωση τη υφής/ γεύσης/ αρώματος των φρούτων και λαχανικών, έλεγχος της πικρής γεύσης των εσπεριδοειδών
Χαρτικά	Χρήση ως πρόσθετο στη λεύκανση των χαρτοπολτών, βελτίωση της αποστράγγισης, ενζυμική απομάκρυνση μελανιού, μείωση ενεργειακού κόστους, μείωση χρήσης χλωριούχων λευκαντικών, βελτίωση της φωτεινότητας και αντοχής των ινών, παραγωγή βιοαποικοδομούμενων χαρτικών προϊόντων
Υφάσματα	Βιο-πετρόπλυση των jean υφασμάτων, βελτίωση της υφής και της γυαλάδας των ινών, βελτίωση της απορροφητικής ικανότητας των ινών, βελτίωση της σταθερότητας των κυταρρινικών ινών, απομάκρυνση της πλεονάζουσας ποσότητας χρώματος από τα υφάσματα, αποκατάσταση της φωτεινότητας των χρωμάτων
Διάφορα	Βελτίωση της εξαγωγής των καροτενοειδών, βελτίωση της οξείδωσης και της χρωματικής σταθερότητας των καροτενοειδών, βελτίωση της εξαγωγής του ελαιόλαδου και της ποιότητας του, μείωση κινδύνου απόρριψης βιομάζας, παραγωγή υβριδικών μορίων, παραγωγή «σχεδιασμένων» κυτταρινωσωμάτων

### 1.1.4 Εστεράσες και λιπάσες

Οι εστεράσες (EC 3.1.1.x) αποτελούν μια ευρεία κατηγορία υδρολασών που καταλύουν την υδρόλυση των εστερικών δεσμών σε ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων. Στη φύση, συναντώνται τόσο στους μικροοργανισμούς όσο και στα φυτά και τα ζώα. Η παρουσία τους σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς αλλά και το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που μπορούν να δεχτούν, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι εστεράσες εξελίχθηκαν έτσι ώστε να προσφέρουν πρόσβαση σε πηγές άνθρακα συμμετέχοντας σε πολλά καταλυτικά μονοπάτια

(Bornscheuer 2002). Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά αυτών των ενζύμων είναι η υψηλή τόπο- και στέreo-εκλεκτικότητα τους, κάτι που τα καθιστά χρήσιμους βιοκαταλύτες για την παραγωγή οπτικά ενεργών ουσιών στη βιομηχανία των ευγενών χημικών. Επιπλέον χαρακτηριστικά των εστερασών όπως η σταθερότητα τους και το ότι δεν απαιτούν συμπαραγοντες, τις καθιστούν ένζυμα πρωταγωνιστές στη βιομηχανία. (Bornscheuer and Kazlauskas 2006). Δύο από τις μεγαλύτερες και πιο ενδιαφέρουσες κατηγορίες υδρολασών είναι οι λιπάσες (EC 3.1.1.1) και οι καρβόξυλ-εστεράσες ή «πραγματικές» εστεράσες (EC 3.1.1.3). Παρότι και οι δυο αυτές οικογένειες ενζύμων στοχεύουν στην υδρόλυση των εστερικών δεσμών, οι λιπάσες διαφοροποιούνται από τις εστεράσες στο γεγονός ότι παρουσιάζουν εκλεκτικότητα απέναντι στα μη υδατοδιαλυτά υποστρώματα. Αυτό αντικατοπτρίζεται και στην τρισδιάστατη δομή των λιπασών, όπου το ενεργό κέντρο συνήθως καλύπτεται με ένα υδρόφοβο πεπτιδικό «κάλυμα» το οποίο ανοίγει όταν το ένζυμο βρεθεί σε μια διεπιφάνεια ελαίου-νερού, επιτρέποντας στο υπόστρωμα να εισέλθει στο καταλυτικό κέντρο. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «διεπιφανειακή ενεργοποίηση» και είναι το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που διαχωρίζει τις λιπάσες από τις υπόλοιπες εστεράσες. Πέρα από αυτό, η τρισδιάστατη δομή των λιπασών μοιράζεται πολλά κοινά χαρακτηριστικά με αυτή των εστερασών όπως την  $\alpha/\beta$  αναδίπλωση των υδρολασών (Εικόνα 1.3) και την καταλυτική τριάδα Ser-Asp-His (Glu αντί Asp σε κάποιες λιπάσες). Η καταλυτική σερίνη στις περισσότερες περιπτώσεις εντοπίζεται σε ένα πενταπεπτίδιο με συντηρημένη την αλληλουχία Gly-x-Ser-x-Gly.



**Εικόνα 1.3:** Σχηματική απεικόνιση της χαρακτηριστικής  $\alpha/\beta$ -αναδίπλωσης των υδρολασών. Τα  $\beta$ -φύλλα (1-8) απεικονίζονται με μπλε βέλη ενώ οι  $\alpha$ -έλικες (A-E) με κόκκινους κυλίνδρους. Οι σχετικές θέσεις των αμινοξέων της καταλυτικής τριάδας αποτυπώνονται με πορτοκαλί σφαίρες. (Bornscheuer 2002)

Η κατηγοριοποίηση των εστερασών και η απόδοση τους στις διάφορες οικογένειες γίνεται είτε με βάση την αλληλουχική ομολογία τους είτε βάσει της λειτουργίας και της εκλεκτικότητας τους απέναντι στα υποστρώματα. Και οι δύο αυτές προσεγγίσεις είναι συμβατικές και δεν είναι λίγες οι φορές που δυο εστεράσες με υψηλή ομολογία παρουσιάζουν διαφορετική καταλυτική συμπεριφορά και αντίστροφα (Bornscheuer 2002).

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των εστερασών όπως η σταθερότητα τους και η υψηλή εκλεκτικότητα τους, τις καθιστούν ένζυμα με υψηλή βιοτεχνολογική αξία. Ας δούμε λοιπόν τις σημαντικότερες εφαρμογές τους:

- Φαρμακοβιομηχανία και βιομηχανία ευγενών χημικών

Η ικανότητα των εστερασών να διατηρούν την καταλυτική τους ικανότητα σε μη υδατικά περιβάλλοντα τις καθιστά ικανές να καταλύουν την αντίστροφη αντίδραση της υδρόλυσης του εστερικού δεσμού, δηλαδή την εστεροποίηση, ακολουθώντας τη θερμοδυναμική αντιστροφή της αντίδρασης λόγω απουσίας του νερού. Οι εστέρες παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση οπτικά ενεργών φαρμάκων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η γνωστή ως NP-καρβοξυλική εστεράση που προέρχεται από το οργανισμό *B. subtilis* και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του μη στεροειδούς αντιφλεγμονώδους φαρμάκου Naproxen (Quax and Broekhuizen 1994) αλλά και πολλών άλλων 2-αρυλοπροπιονικών-οξέων (Margolin 1993). Η ίδια εστεράση χρησιμοποιείται και για τη σύνθεση και το διαχωρισμό των οπτικών μονομερών των (R,S)-ιμπουπροφενικών μεθυλεστέρων προς τη σύνθεση του φαρμάκου Ibuprofen.

- Χημική βιομηχανία

Σε πολλές χημικές βιομηχανικές εφαρμογές όπως στην επεξεργασία του χαρτιού, των υφασμάτων και των δερμάτων αλλά και σε εφαρμογές στα τρόφιμα, οι εστεράσες επιστρατεύονται τόσο για την υδρολυτική τους ικανότητα όσο και για τη συνθετική τους. Για παράδειγμα, μια στερολική εστεράση από τον οργανισμό *Ophiostoma piceae* χρησιμοποιείται στη χαρτοβιομηχανία για τη ικανότητα της να υδρολύει πολύ αποτελεσματικά τόσο τριγλυκερίδια όσο και στερολικούς εστέρες. Και άλλες στερολικές εστεράσες από τους οργανισμούς *Pseudomonas sp.*, *Chromobacterium viscosum* και *Candida rugose* κατέχουν σημαντικό ρόλο στη βιομηχανία λόγω της

ικανότητας τους να υδρολύουν τις ρητίνες που συσσωρεύονται στις σωληνώσεις και προκαλούν πολύ σοβαρά προβλήματα στις μηχανολογικές εγκαταστάσεις (Kontkanen, Tenkanen et al. 2004).

- Σύνθεση αρωματικών ουσιών

Η χρήση των εστερασών ενδείκνυται σε αντιδράσεις όπου η χημειο- και τοπο-εκλεκτικότητα είναι υψηλής σημασίας. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η χρήση των καρβοξυλο -εστερασών στην απελευθέρωση φερουλικού οξέος από τους πολυσακχαρίτες των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων, όπως η πηκτίνη και η ξυλάνη. Στην ξυλάνη, το φερουλικό οξύ είναι προσδεδεμένο στην αραβινόζη που βρίσκεται στη βάση του κορμού του πολυσακχαρίτη. Στις πηκτίνες, το φερουλικό οξύ είναι προσδεδεμένο στη γαλακτόζη ή στην αραβινόζη των πλευρικών αλυσίδων και μπορεί να απομονωθεί ώστε να μετατραπεί ενζυμικά σε βανιλίνη, μια από τις σημαντικότερες αρωματικές ενώσεις (Falconnier, Lapierre et al. 1994).

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται κάποιες από τις εφαρμογές εστερασών στη βιομηχανία:

**Πίνακας 1.2: Εφαρμογές εστερασών στη βιομηχανία (Panda and Gowrishankar 2005)**

Τύπος εστεράσης	Εφαρμογή	Προέλευση
Ακετυλοχολινεστεράση	Ανάπτυξη νέων φαρμάκων για την σχιστοσωμίαση, βιοδείκτης για οργανο-φωσφορικές ενώσεις σε υδάτινα περιβάλλοντα, εκτίμηση επιπέδων δηλητηριασμού λόγω εντομοκτόνων και βαρέων μετάλλων	Αίμα <i>Schistosoma sp.</i> , <i>Mytilus edulis</i> , <i>Drawida willsi</i>
Ακετυλο-εστεράση, Μεθυλο-εστεράση, ακετυλο-γλουκομαναν-εστεράση και ακετυλο- ξυλαν-εστεράση	Απελευθέρωση ακέτυλο- και μέθυλο-κατάλοιπων από το κυτταρικό τοίχωμα, αποικοδόμηση της κυτταρίνης και οξικού οξέος από Ο-ακέτυλ-γάλακτο-γλουκομανάνη και Ο-ακέτυλο-4-Ο-μέθυλο-γλουκονοξυλάνη	<i>Aspergillus</i> , <i>Trichoderma sp</i>
Αρυλ –εστεράση	Ανάπτυξη γέυσης σε τρόφιμα και αλκοολούχα ποτά	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Καρβοξυλο-εστεράση	Αποικοδόμηση διβενζολικού εστέρα αιθυλενογλυκόλης, μείωση τοξικότητας μαλαθείου, υδρόλυση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων, εκτίμηση μεταβολικής ανθεκτικότητας κατά εντομοκτόνων, σύνθεση ρακεμικών εστέρων 1,2-Ο-ισοπρόπυλο-δενεγλυκερόλης, ΡΗΑ αποπολυμεράση	<i>Streptomyces lividans</i> , Ήπαρ ποντικών και ινδικών χοιριδίων, <i>Lucilia cuprina</i> , <i>Pediculus capitis</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
Ακετυλο-εστεράση κεφαλοσπορίνης	Ανίχνευση ακετυλομάδων στα παράγωγα κεφαλοσπορίνης	<i>Burkholderia gladioli</i>

Συνέχεια στην επόμενη σελίδα

Εστεράση χολεστερόλης και ψεύδοχολεστερόλης	Αποικοδόμηση πολύ-έθελ-ουρεθάνης, απαραίτητο για τη λειτουργία των αντλιών νατρίου σε διάφορους ιστούς	Ήπαρ ποντικών και άλλες πηγές
Κινάμυλο-εστεράση	Υδρόλυση φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων	<i>Piromyces equi</i>
Εστεράση ερυθρομυκίνης	Φαρμακευτική χρήση στον άνθρωπο, στα πουλερικά και στα ψάρια	<i>Pseudomonas sp</i>
Εστεράση του ιασμονικού μεθυλεστέρα	Υδρόλυση των μεθυλεστέρων του αμπισισικού οξέος και των λιπαρών οξέων	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Φωσφοτριεστεράση	Υδρόλυση προϊόντων coumarphos και coroxon	<i>Pseudomonas monteilli</i>
Ανασυνδυσασμένη εστεράση PF1-K	Παραγωγή (S)-φλουροπροφένης	<i>Pseudomonas sp</i>
Ηπατική εστεράση χοίρου (PLE) και ανασυνδυσασμένη ηπατική εστεράση χοίρου	Αποσυμμετροποίηση κεντροσυμμετρικού κυκλικού δι-ακετόξυ- εξανίου, εναντιομερής παραγωγή λεβοφλοξακίνης από βουτυλικό εστέρα της οφλοξακίνης, κινητικός διαχωρισμός του (R, S)-1-φαίνυλο-2-πέντυλο-οξικού	<i>Sus scrofa</i>
Εστεράσες του ανθρώπινου συστήματος	Μετατροπή παλμιτικής ρετινόλης σε ρετινόλη, ανθεκτικότητα κατά των λυσοσωμικών ενζύμων των φλεγμονικών κυττάρων, βιοαποικοδόμηση οδοντικών στοιχείων, μεταβολισμός της ασπιρίνης και άλλων μη-ναρκωτικών αναλγητικών, μετατροπή προ-παρακεταμόλης σε παρακεταμόλη, υδρόλυση του αακέτυλο-σαλυκυλικού σε σαλυκυλικό οξύ στο πλάσμα, ενεργοποίηση ετοποσιδικών προ-φαρμάκων	<i>Homo sapiens</i>
Πολυουρεθανάση	Υδρόλυση του πολυεστέρα της πολυουρεθάνης και του πολυεθέρα της πολυουρεθάνης	<i>Comamonas acidovorans, Pseudomonas chlororaphis</i>
Στέρολ-εστεράση, στέρυλ-εστεράση και χολεστεράση	Παραγωγή χαρτιού, μείωση προβλημάτων άντλησης κατά την παραγωγή	<i>Ophiostoma piceae, Pseudomonas sp., Chromobacterium</i>
Εστεράση	Αντιδράσεις μετεστεροποίησης σε οργανικούς διαλύτες, διάκριση (R,S)-β-ακέτυλ-μερκάπτοισοβουτιρικού, μετατροπή (R,S)- εστέρα αιθυλικής κεταπροφένης και οξικού εστέρα λιναλοόλης, επεξεργασία τροφίμων και γαλακτοκομικών, υδρόλυση εστέρων τριτοταγών αλκοολών, πιβοξυλική κεφδιτορένη (πρόδρομο φάρμακο US Patent 4839350), διοξική φλουορεσκεΐνη και 5-(6)-διοξική καρβόξυλ-φλουορεσκεΐνη για την ανίχνευση ζυμών στα τρόφιμα, παραγωγή οξικού εστέρα ισοαμυλικής αλκοόλης και μαννιτόλης, αποτοξίνωση ξενοβιοτικών, έλεγχος φυσιολογικής αποδόμησης ορμονών, υδρόλυση διφθαλικών ενώσεων, έλεγχος μικροβιακής ενεργότητας στο έδαφος, ποιότητα γεύσης σε ποτά και τρόφιμα, παραγωγή λιπαρών οξέων	<i>Fusarium oxysporum, E. coli, Pseudomonas sp., Burkholderia gladioli, Lactobacillus casei, Rhodococcus sp., Saccharomyces cerevisiae, Bacillus sp.,</i>
	Απελευθέρωση φερολικού οξέως,	<i>Pedicoccus pentosaceus, Diabrotica virgifera, Locusta migratoria manilensis, Micrococcus sp</i>
	Σύνθεση φερολικού εστέρα πεντανόλης για χρήση στην κοσμετολογία, βιομηχανία αρωμάτων	<i>Aspergillus niger, Pencillium sp</i>

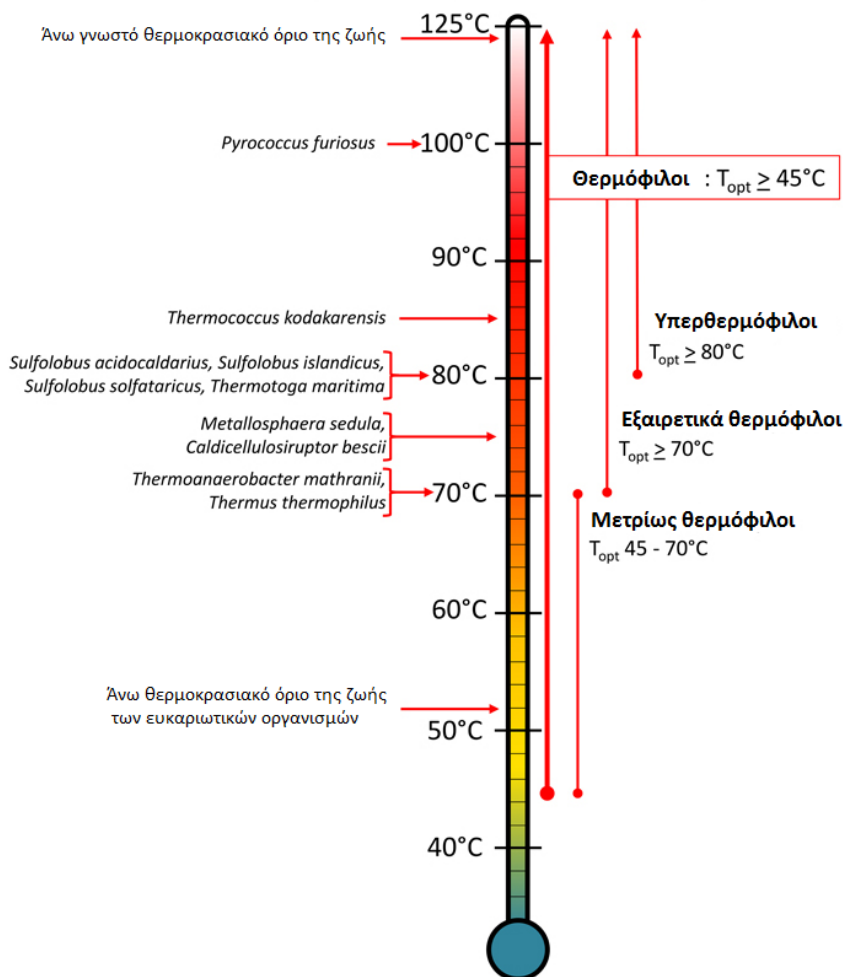
## 1.2 Θερμοανθεκτικά Ένζυμα

Όπως είδαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο, παρότι οι ενζυμικές μετατροπές παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις χημικές, όπως για παράδειγμα μεγαλύτερα καθαρότητα τελικών προϊόντων, πιο οικολογικό αντίκτυπο κ.α., υπάρχουν ακόμα περιορισμοί στη χρήση τους στη βιομηχανία. Συχνότερα, ο λόγος για τον οποίο δεν επιλέγεται η ενζυμική προσέγγιση έναντι της χημικής είναι το υψηλός κόστος του βιοκαταλύτη και το υψηλό λειτουργικό κόστος της διεργασίας στην οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Το λειτουργικό κόστος της ενζυμικής διεργασίας εξαρτάται κυρίως από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του ενζύμου, με κυριότερο ρόλο σε αυτό να κατέχει η θερμοανθεκτικότητά του, μιας και τα συμβατικά, μεσόφιλα ένζυμα καθίστανται ανενεργά στις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται στη βιομηχανία. Κατά συνέπεια, η χρήση μεσόφιλων ενζύμων, πολύ συχνά απαιτεί την ψύξη των υλικών πριν την προσθήκη τους στην παραγωγική διαδικασία, εισάγοντας έτσι ένα ενεργειακό κόστος τις περισσότερες φορές απαγορευτικό. Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον των βιοτεχνολόγων επικεντρώνεται τα τελευταία χρόνια στα θερμοανθεκτικά ένζυμα, που λόγω της ανθεκτικότητάς τους στις υψηλές θερμοκρασίες, και όχι μόνο, υπερνικούν το εμπόδιο αυτό και καθιστούν τη λευκή βιοτεχνολογία ανταγωνιστική. Με τη χρήση θερμοανθεκτικών βιοκαταλυτών, οι βιοτεχνολογικές διεργασίες μπορούν να πραγματοποιούνται σε υψηλές θερμοκρασίες αφού πέρα από την αποφυγή του κόστους ψύξης, αυτό προσφέρει και άλλα πλεονεκτήματα. Αυτά περιλαμβάνουν τη μείωση της πιθανότητας μόλυνσης των υλικών από μεσόφιλους οργανισμούς, την αύξηση της διαλυτότητας και βιοδιαθεσιμότητας των οργανικών στοιχείων, την αύξηση των ρυθμών αντίδρασης λόγω μείωσης του ιξώδους, της αύξησης του συντελεστή διάχυσης, καθώς και τη μείωση του κόστους άντλησης λόγω μειωμένου ιξώδους. (Haki and Rakshit 2003). Στο προηγούμενο κεφάλαιο, είδαμε κάποιες εφαρμογές στις οποίες ήδη χρησιμοποιούνται θερμοανθεκτικά ένζυμα.

Τα ένζυμα, δρουν βιοκαταλυτικά στις βιοχημικές αντιδράσεις και έχουν προσαρμοστεί εξελικτικά στις ιδιαίτερες συνθήκες του περιβάλλοντος του οργανισμού στο οποίο το πρωτεϊνικό σύστημα ανήκουν. Έτσι, ένας ακραιόφιλος οργανισμός που ευδοκimeί σε ένα περιβάλλον υψηλής θερμοκρασίας, όπως για παράδειγμα μια θερμοπηγή, φέρει στο γενετικό του υλικό γονίδια που κωδικοποιούν θερμοανθεκτικά ένζυμα. Ως θερμοφίλοι χαρακτηρίζονται οι οργανισμοί με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης πάνω από τους 45 °C ενώ μέχρι σήμερα, το γνωστό άνω θερμοκρασιακό όριο της ζωής είναι οι 123



°C (Zeldes, Keller et al. 2014). Στο εύρος των 45-123 °C, οι θερμοφιλοι οργανισμοί χωρίζονται σε υποκατηγορίες με βάση τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους. Οι κατηγορίες περιλαμβάνουν τους: μετρίως θερμοφίλους ( $T_{opt}$ : 45-70 °C) , τους εξαιρετικά θερμοφίλους ( $T_{opt} > 70$  °C) και τους υπερθερμοφίλους ( $T_{opt} > 80$  °C) οργανισμούς όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.4 (Zeldes, Keller et al. 2014).



**Εικόνα 1.4:** Γενετικά ανιχνεύσιμοι θερμοφιλοι οργανισμοί και οι βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξής τους. (Zeldes, Keller et al. 2014)

Αναλόγως της φύσης του ενζύμου, η ιδιότητα της θερμοανθεκτικότητας μπορεί να προκύπτει από τα χαρακτηριστικά της δομής του και να διατηρείται ακόμα και όταν το πρωτεϊνικό μόριο υπάρχει αυτόνομο, εκτός του κυτταρικού συστήματος. Τέτοιου είδους ένζυμα που διατηρούν την ιδιότητα της ανθεκτικότητας σε εξωκυτταρικές ακραίες συνθήκες όπως για παράδειγμα σε υψηλές θερμοκρασίες, ακραίες τιμές pH, παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων κ.α αποτελούν βιοτεχνολογικό εργαλείο και βρίσκουν εφαρμογή σε ποικίλες βιομηχανικές διεργασίες, όπως είδαμε στο Κεφάλαιο 1. 1.



Μέσω αυτών των μελετών μπορούν να προταθούν «κανόνες» για τον πρωτεϊνικό σχεδιασμό θερμοανθεκτικών ενζύμων και όχι μόνο. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρότι αρκετοί μοριακοί μηχανισμοί θερμοσταθεροποίησης είναι γνωστοί, κανένας από αυτούς δε φαίνεται να έχει κυριαρχήσει εξελικτικά στις θερμοσταθερές πρωτεΐνες κάτι που ενισχύει την άποψη ότι η θερμοσταθεροποίηση είναι το αποτέλεσμα της συνισταμένης διαφόρων μεμονωμένων «βελτιώσεων» σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μικρής και μεγάλης εμβέλειας (Sen and Nilsson 2011).

Παρακάτω παρουσιάζονται οι σημαντικότεροι μηχανισμοί πρωτεϊνικής θερμοσταθεροποίησης όπως απαντώνται στη βιβλιογραφία.

#### Υδροφοβες αλληλεπιδράσεις

Σε παλαιότερη μελέτη από τους Pace et al. όπου χρησιμοποιήθηκαν 72 μεταλλαγές τεσσάρων πρωτεϊνών που σχετίζονταν με την αντικατάσταση μεγάλων αλειφατικών πλευρικών αλυσίδων με μικρότερες, παρατηρήθηκε ότι για κάθε ομάδα  $-CH_2-$  που «εγκλωβίζεται» στο εσωτερικό της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης, οι πρωτεΐνες «κερδίζουν»  $1.3 (\pm 0.5)$  kcal/mol σε σταθερότητα (Pace 1992). Σε μια άλλη έρευνα, η σύγκριση θερμόφιλων και ομόλογων μεσόφιλων πρωτεϊνών έδειξε ότι τα θερμόφιλα μόρια γενικά χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο βαθμό «βελτιστοποίησης» των υδροφοβικών τους αλληλεπιδράσεων (Spassov, Karshikoff et al. 1995).

#### Δεσμοί υδρογόνου

Οι δεσμοί υδρογόνου χαρακτηρίζονται από τη μικρότερη από  $3 \text{ \AA}$  απόσταση μεταξύ του υδρογονοδότη και του υδρογονοδέκτη, και από μια γωνία μεταξύ αυτών μικρότερη των  $90^\circ$ . Και σε αυτή την περίπτωση, υπάρχουν πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η παρουσία δεσμών υδρογόνου σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες. Σε μελέτη όπου εξετάστηκε η επίδραση των δεσμών υδρογόνου στην T1 RNAάση, η οποία περιέχει 86 δεσμούς υδρογόνου, δείχθηκε ότι η συνεισφορά αυτών των δεσμών είναι περίπου 110 kcal/mol και είναι συγκρίσιμη με εκείνη των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Κάθε δεσμός υδρογόνου προσδίδει κατά μέσο όρο  $1,3$  kcal/mol σταθεροποίησης. Επειδή οι δεσμοί υδρογόνου είναι ανιχνεύσιμοι μόνο πάνω από μια συγκεκριμένη απόσταση και λίγες δομές θερμοσταθερών πρωτεϊνών έχουν λυθεί σε αρκετά υψηλή ανάλυση, η μελέτη της συνεισφοράς των δεσμών υδρογόνου δεν έχει δώσει ακόμα απολύτως σαφή αποτελέσματα (Vieille and Zeikus 2001), (Shirley, Stanssens et al. 1992).

### Ιοντικά ζεύγη

Τα ιοντικά ζεύγη συναντώνται σαν μηχανισμός σταθεροποίησης κυρίως στις υπερθερμόφιλες πρωτεΐνες και λιγότερο στις θερμοφίλες, ενώ απουσιάζουν από τις δομές των μεσόφιλων μορίων (Karshikoff and Ladenstein 2001), αφού είναι ο μηχανισμός που προσδίδει σταθερότητα σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 100 °C (Vetriani, Maeder et al. 1998). Σε μελέτη της T4 λυσοζύμης, ένα μόνο ιοντικό ζεύγος υπολογίστηκε ότι προσφέρει 3 έως 5 kcal/mol σταθεροποίησης (Anderson, Becktel et al. 1990).

### Προλίνες και μείωση της εντροπίας αποδιάταξης

Σε παλαιότερη μελέτη των Matthews et al. (Matthews, Nicholson et al. 1987) προτάθηκε ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να σταθεροποιηθούν μέσω της μείωσης της εντροπίας αποδιάταξής τους. Στην αποδιεταγμένη κατάσταση, η γλυκίνη είναι το αμινοξύ με τη μεγαλύτερη εντροπία. Αντιθέτως, η προλίνη που μπορεί να πάρει μόνο λίγες διαμορφώσεις και παράλληλα περιορίζει τις διαμορφώσεις που μπορεί να υιοθετήσει και το γειτονικό σε αυτή αμινοξύ, είναι εκείνη με τη χαμηλότερη εντροπία. Έτσι, η αντικατάσταση της γλυκίνης με οποιοδήποτε άλλο αμινοξύ και η αντικατάσταση οποιουδήποτε αμινοξέος με προλίνη μειώνει την εντροπία της αποδιεταγμένης πρωτεϊνικής μορφής και κατά επέκταση σταθεροποιεί την πρωτεΐνη με την προϋπόθεση ότι οι μεταλλάξεις αυτές δεν εισάγουν κάποιου άλλου είδους «καταπόνηση» στη δομή του μορίου. Αυτές οι μεταλλαξιγένεσεις εφαρμόστηκαν μετέπειτα σε πολλές περιπτώσεις και οδήγησαν σε πρωτεϊνική σταθεροποίηση, επιβεβαιώνοντας τη θεωρία (Eijsink, Vriend et al. 1993),(Hardy, Vriend et al. 1993).

### Ενδο-υπομοναδικές αλληλεπιδράσεις

Κατά τη μελέτη πολλών πρωτεϊνικών δομών έχουν προταθεί οι ενδο-υπομοναδικές αλληλεπιδράσεις ως σημαντικός μηχανισμός σταθεροποίησης. Η πιο ισχυρή πειραματική ένδειξη όμως που επιβεβαιώνει αυτή τη θεωρία προέκυψε από τη μελέτη των γλουταμικών αφυδρογονασών από τους οργανισμούς *P. kodakaraensis* και *T. litoralis*. Ενώ τα δύο αυτά ένζυμα εμφανίζουν 87 % ομολογία, το πρώτο παρουσιάζει 16 φορές μεγαλύτερη θερμοσταθερότητα στους 104 °C από ότι το δεύτερο. Στη μελέτη παρατηρήθηκε ότι το δίκτυο των ιοντικών ζευγών μεταξύ των πρωτεϊνικών υπομονάδων ήταν μειωμένο στο λιγότερο θερμοσταθερό ένζυμο. Με την εισαγωγή κατάλληλων μεταλλάξεων που αποκαθιστούσαν τα υπολειπόμενα ιοντικά ζεύγη, αυξήθηκε η θερμοσταθερότητα της λιγότερο σταθερής πρωτεΐνης, αποδεικνύοντας ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων μιας πρωτεΐνης αποτελούν σημαντικό μηχανισμό θερμοσταθεροποίησης. (Vetriani, Maeder et al. 1998)

### Εκτόνωση δομικών «τάσεων»

Τα αμινοξέα που σχηματίζουν αριστερόστροφες έλικες έχουν οριακή δομική σταθερότητα και συνήθως σταθεροποιούνται από ενδομοριακές, μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Η «στενή» επαφή του β-άνθρακα και του καρβονυλικού οξυγόνου στη δομή του αμινοξέος με αριστερόστροφη διαμόρφωση έλικας δημιουργεί τοπικά μια ισχυρή τάση στη δομή της πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό, στις θερμοσταθερές και ειδικά στις υπερθερμοσταθερές πρωτεΐνες, τα αμινοξέα αυτά (αμινοξέα εκτός της γλυκίνης που υιοθετούν αριστερόστροφη ελικοειδή διαμόρφωση) αντικαθίστανται με άλλα που δεν εισάγουν τάσεις στη δομή της πρωτεΐνης που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην αποσταθεροποίηση της. Επίσης, στις α-έλικες, αμινοξέα με μικρή τάση σχηματισμού έλικας, συνήθως αντικαθίστανται από αμινοξέα με υψηλή τάση. Τέτοιου είδους αντικαταστάσεις συνήθως συμβαίνουν όταν οι πλευρικές αλυσίδες ενός αμινοξέος δεν «ακολουθούν» την α-ελικοειδή διαμόρφωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παρουσία γλυκίνης στο καρβόξυ-τελικό άκρο της α-έλικας, μιας και το συγκεκριμένο αμινοξύ στερείται πλευρικών αλυσίδων και έτσι έχει τη δυνατότητα να υιοθετεί αριστερόστροφη ελικοειδή διαμόρφωση, ενώ ταυτόχρονα το καρβονυλικό οξυγόνο της κύριας αλυσίδας του μπορεί να σχηματίσει δεσμό υδρογόνου με τα μόρια του διαλύτη. (Vieille and Zeikus 2001), (Kawamura, Kakuta et al. 1996)

### «Αγκίστρωση» των ελεύθερων άκρων

Τα ελεύθερα τελικά άκρα καθώς και οι βρόχοι μιας πρωτεΐνης είναι τα σημεία όπου συσσωρεύονται τα περισσότερα χαρακτηριστικά που προσδίδουν θερμοσταθερότητα, καθώς είναι τα πιο ευάλωτα στην αποσταθεροποίηση. Έτσι, στις θερμοσταθερές πρωτεΐνες, τα άκρα και οι βρόχοι «αγκιστρώνονται» στο κύριο σώμα της πρωτεΐνης μέσω δεσμών υδρογόνου, ιοντικών ζευγών και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. (Vieille and Zeikus 2001)

### Πρόσδεση μετάλλων

Τα προσδεδεμένα μέταλλα αποτελούν έναν ευρέως αποδεκτό και πολυμελετημένο μηχανισμό σταθεροποίησης των πρωτεϊνών. Ένα από τα στοιχεία που επιβεβαιώνουν τη συνεισφορά τους στη θερμοσταθεροποίηση είναι το γεγονός ότι ενώ βρίσκονται προσδεδεμένα στις δομές θερμόφιλων ενζύμων, απουσιάζουν από τη δομή των μεσόφιλων ομολόγων τους. Για παράδειγμα, η φερεδοξίνη του *Sulfolobus sp.* φέρει ένα επιπλέον κομμάτι 40 αμινοξέων στο αμινοτελικό της άκρο, το οποίο συνδέεται με τον πρωτεϊνικό πυρήνα μέσω μιας περιοχής πρόσδεσης ψευδαργύρου. Αυτή η δομή απουσιάζει από τα ομόλογα βακτηριακά πρωτεϊνικά μόρια αλλά είναι διατηρημένα σε όλα τα θερμόφιλα οξεόφιλα στελέχη. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η «διαγραφή» της συγκεκριμένης

πρωτεϊνικής περιοχής ή η αφαίρεση του μετάλλου επηρέασαν αρνητικά τη θερμοσταθερότητα του μορίου αφήνοντας ανέπαφη την καταλυτική του δράση. (Kojoh, Matsuzawa et al. 1999, Vieille and Zeikus 2001)

#### Μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών είναι κοινό χαρακτηριστικό των ενζύμων που προέρχονται και παράγονται από τους ευκαριωτικούς οργανισμούς. Επίσης, κάποια βακτηριακά εξωκυτταρικά ένζυμα γλυκοζυλιώνονται. Λίγα όμως είναι τα παραδείγματα θερμοανθεκτικών πρωτεϊνών με τέτοιες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, και από όσα γνωρίζουμε μέχρι σήμερα φαίνεται ότι αυτά τα ένζυμα διατηρούν τις καταλυτικές και βιοχημικές ιδιότητες τους όταν παράγονται ετερόλογα σε βακτηριακά κύτταρα. Σε κάποιες μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν πρωτεΐνες ευκαρυωτικών κυττάρων δείχθηκε ότι η γλυκοζυλίωση μπορεί να προσδώσει θερμοσταθερότητα μιας και μειώνει την τάση των μορίων να δημιουργούν συσσωματώματα κατά τη θερμική αποδιάταξή τους. (Jaenicke 1998, Vieille and Zeikus 2001)

#### Εξωγενείς παράγοντες

Πέρα από τους ενδομοριακούς μηχανισμούς και τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που μπορούν να προσδώσουν θερμοσταθερότητα σε μια πρωτεΐνη και συζητήθηκαν προηγουμένως, υπάρχουν και εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα ενός πρωτεϊνικού μορίου. Αυτό ισχύει περισσότερο για τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, μιας και τα εξωκυτταρικά πρωτεϊνικά μόρια φέρουν τη θερμοσταθερότητα στα χαρακτηριστικά της δομής τους. Έτσι, μια πρωτεΐνη μπορεί να καθίσταται σταθερή μέσω εσωκυτταρικών παραγόντων όπως τα άλατα, οι υψηλές πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις, τα συνένζυμα, τα υποστρώματα, οι πολυαμίνες, ή ακόμα και μέσω περιβαλλοντικών συνθηκών όπως η πίεση. (Vieille and Zeikus 2001)

### **1.2.2 Στρατηγικές επιλογής και ανάπτυξης θερμοανθεκτικών ενζύμων**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, οι ιδιότητες των θερμοσταθερών και γενικότερα των «ανθεκτικών» ενζύμων επιτρέπουν τη βιομηχανική χρήση τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Παράλληλα επιτρέπουν τη διεξαγωγή των αντιδράσεων με μεγαλύτερους ρυθμούς, μειώνουν τον κίνδυνο επιμολύνσεων, μειώνουν το κόστος άντλησης λόγω μείωσης του ιξώδους κ.α. Για τους λόγους αυτούς, η σταθερότητα των πρωτεϊνών που προορίζονται για βιομηχανική χρήση είναι ύψιστης σημασίας μιας και προκαθορίζει την

οικονομική βιωσιμότητα των ενζυμικών διεργασιών και κατ' επέκταση το κατά πόσο καθίσταται εφικτή η αντικατάσταση των συμβατικών χημικών μεθόδων από αυτές. Είναι λοιπόν φανερό ότι η σταθερότητα των ενζύμων κατέχει τόσο οικονομικές όσο και περιβαλλοντικές προεκτάσεις και για το λόγο αυτό έχει αποτελέσει το επίκεντρο της βιοτεχνολογικής έρευνας τα τελευταία χρόνια. Για την ανακάλυψη νέων βιοκαταλυτών αυξημένης σταθερότητας έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές μέθοδοι που βασίζονται είτε στην απομόνωση τους από τη φύση είτε στο σχεδιασμό νέων ενζύμων. Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικότερα τα χαρακτηριστικά αυτών των στρατηγικών.

#### Κλασσική μικροβιολογική προσέγγιση

Μια στρατηγική απομόνωσης πρωτεϊνών ικανών να δράσουν σε «ακραίες» συνθήκες είναι η απομόνωση και η μελέτη οργανισμών, που μέσω της Δαρβινικής φυσικής επιλογής έχουν εξελιχθεί ώστε να επιβιώνουν σε ακραία περιβάλλοντα. Έτσι, σε οικοσυστήματα όπως οι θερμοπηγές, τα θερμά ρεύματα και οι ηφαιστιογενείς περιοχές που η ζωή (κυρίως αρχαία και βακτήρια) έχει προσαρμοστεί σε ακραίες συνθήκες, υπάρχει ένας γενετικός πλούτος στον οποίο περιέχονται γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες. Ακολουθώντας αυτή την απλή συλλογιστική, οι πρώτες προσπάθειες των επιστημόνων επικεντρώθηκαν στη καλλιέργεια των οργανισμών από τα ακραία περιβάλλοντα και τη μελέτη που πρωτεϊνικού τους προφίλ. Σύντομα όμως έγινε αντιληπτό ότι με την προσέγγιση αυτή αγνοείται ένα τεράστιο κομμάτι της βιοποικιλότητας μιας και το 99% των οργανισμών δε μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο με τις κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους (Lorenz, Liebeton et al. 2002).

#### Μεταγονιδιωματική προσέγγιση

Τη λύση στο πρόβλημα των κλασσικών μικροβιολογικών προσεγγίσεων για την ανακάλυψη ακραιόφιλων βιοκαταλυτών, σύμφωνα με το οποίο μόνο το 1% των οργανισμών μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο, ήρθε να δώσει η μεταγονιδιωματική προσέγγιση, η απομόνωση δηλαδή και η μελέτη του συνόλου του γενετικού υλικού ενός ενδιαιτήματος χωρίς τη μεσολάβηση της καλλιέργειας των οργανισμών που ζουν σε αυτό (Handelsman 2004). Μια συμπληρωματική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για τον εμπλουτισμό του προς απομόνωση μεταγονιδιωματικού υλικού σε γονίδια με επιθυμητή ενζυμική λειτουργία, είναι η εισαγωγή του αντίστοιχου ενζυμικού υποστρώματος στο υπό εξέταση ενδιαίτημα και η συλλογή του γενετικού υλικού των οργανισμών που αναπτύχθηκαν σε αυτό.

- Βιοπληροφορική ανάλυση μεταγονιδιωματικών δεδομένων (bioinformatic screening)

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας αλληλούχισης του DNA έδωσε πρόσβαση στον τεράστιο όγκο γενετικής πληροφορίας που περιέχεται στην συντριπτική πλειοψηφία των μικροβιακών πληθυσμών που δε μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο, και επέτρεψε τη βιοπληροφορική ανάλυση τους. Με συγκριτικές μεθόδους ανάλυσης της ομολογίας γνωστών ενζύμων και άγνωστων αλληλουχιών και με χρήση άλλων εργαλείων που αναπτύχθηκαν προς αυτή την κατεύθυνση, έγινε δυνατός ο εντοπισμός ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης που πιθανώς κωδικοποιούν ενεργά ένζυμα. Το κύριο μειονέκτημα της βιοπληροφορικής ανάλυσης είναι το ότι βασίζεται στην ομοιότητα με γνωστές αλληλουχίες, κάτι που περιορίζει την ανακάλυψη πρωτεϊνών με εντελώς διαφορετικές αλληλουχίες και κατ' επέκταση και λειτουργίες. Παρόλα αυτά, η σάρωση υπερυψηλού ρυθμού απόδοσης (high throughput screening) μεταγονιδιωματικών δεδομένων αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο της βιοτεχνολογίας και έχει δώσει πολλά επιτυχημένα αποτελέσματα. Ένα από τα χαρακτηριστικότερα είναι αυτό των Graham et al. οι οποίοι, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του εμπλουτισμού, που αναφέραμε νωρίτερα, σε άμορφη κρυσταλλική κυτταρίνη, απομόνωσαν από το μεταγονιδιωματικό υλικό ενός γεωθερμικού οικοσυστήματος θερμοκρασίας 90 °C, μια κυτταρινάση ικανή να υδρολύει την αδιάλυτη κυτταρίνη σε βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 109 °C και με χρόνο ημιζωής στο σημείο βρασμού τις 5 ώρες (Graham, Clark et al. 2011). Και στην παρούσα διατριβή, όπως θα δούμε παρακάτω, εφαρμόζοντας βιοπληροφορική σάρωση των δεδομένων αλληλούχισης του μεταγονιδιωματικού υλικού προερχόμενο από Ισλανδική θερμοπηγή απομονώθηκε μια θερμοσταθερή ενδο-κυτταρινάση με βιοχημικά χαρακτηριστικά που την καθιστούν ενδιαφέρουσα για βιοτεχνολογική χρήση (Zarafeta, Kissas et al. 2016).

- *In vivo* λειτουργική σάρωση υπερυψηλού ρυθμού απόδοσης μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών έκφρασης (High-throughput Functional screening of metagenomic expression libraries)

Πέρα από τη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων αλληλούχισης, το μεταγονιδιωματικό υλικό μπορεί να πεπτει τυχαία και τα προκύπτοντα θραύσματα DNA να εισαχθούν σε κατάλληλο φορέα βακτηριακής έκφρασης. Με τον τρόπο αυτό, δημιουργείται μια μεταγονιδιωματική βιβλιοθήκη έκφρασης που μπορεί να



χρησιμοποιηθεί για το μετασχηματισμό βακτηριακών ξενιστών και να παραχθεί ένα σύνολο ετερόλογων πρωτεϊνών μέσα στο οποίο ενδέχεται να περιέχονται λειτουργικά ένζυμα με την επιθυμητή δράση. Η πιθανότητα ανακάλυψης τέτοιων γονιδίων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, αναπόσπαστα συνδεδεμένους. Αυτοί περιλαμβάνουν το σύστημα φορέα έκφρασης-ξενιστή, το μέγεθος του γονιδιακού θραύσματος καθώς και το πλήθος του στο μεταγονιδιωματικό δείγμα, την ευαισθησία της μεθόδου επιλογής, καθώς και την αποτελεσματικότητα του συστήματος ετερόλογης έκφρασης. Η συχνότερη στρατηγική είναι η χρήση του *E. coli* ως οργανισμού έκφρασης που αναπτύσσεται σε τρυβλία με άγαρ όπου περιέχεται το υπόστρωμα της ενζυμικής δράσης η οποία στοχεύεται και ένας «δείκτης» ενζυμικής ενεργότητας που καθιστά ευδιάκριτη την αποικία την οποία παράγει ενεργό ένζυμο (Uchiyama and Miyazaki 2009). Η *in vivo* λειτουργική σάρωση υπερυψηλού ρυθμού απόδοσης των μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών έκφρασης έχει επιφέρει σειρά επιτυχημένων αποτελεσμάτων μεταξύ αυτών και θερμοσταθερές εστεράσες και κυτταρινάσες (Zhu, Li et al. 2013),(Voget, Steele et al. 2006),(Rhee, Ahn et al. 2005),(Alvarez, Paiva et al. 2013),(Tirawongsaroj, Sriprang et al. 2008).

Και σε αυτή τη διατριβή, όπως θα δούμε παρακάτω, παρουσιάζεται η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός μια υπερθερμόφιλης εστεράσης η οποία απομονώθηκε μέσω *in vivo* λειτουργικής σάρωσης μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης έκφρασης που προέκυψε από το γενετικό υλικό θερμοπηγής της περιοχής Γιουνάν της Κίνας (Zarafeta, Szabo et al. 2016).

#### Πρωτεϊνική μηχανική (protein engineering)

Η πρωτεϊνική μηχανική προέκυψε ως αποτέλεσμα της επανάστασης που έφερε στο χώρο της βιοτεχνολογίας η πρόοδος της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, μέσω της οποίας έγινε εφικτή η παρέμβαση στη γονιδιακή αλληλουχία. Καθότι τα χαρακτηριστικά ενός ενζύμου που το καθιστούν ικανό να δράσει σε ένα βιομηχανικό περιβάλλον είναι πολύ διαφορετικά από εκείνα που εξελικτικά έχουν προκύψει στις εκ φύσεως ακραιόφιλες πρωτεΐνες, οι βιοτεχνολόγοι χρησιμοποιούν τα παρακάτω εργαλεία της πρωτεϊνικής μηχανικής ώστε να «σχεδιάσουν» νέους βιομηχανικούς βιοκαταλύτες:

- **Ορθολογικός πρωτεϊνικός σχεδιασμός (rational protein design)**

Οι πρώτες εφαρμογές στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης ολιγονουκλεοτιδίων με στόχο τη μελέτη της πρωτεϊνικής λειτουργίας έγιναν το 1982 από τους Winter et al. (Winter,

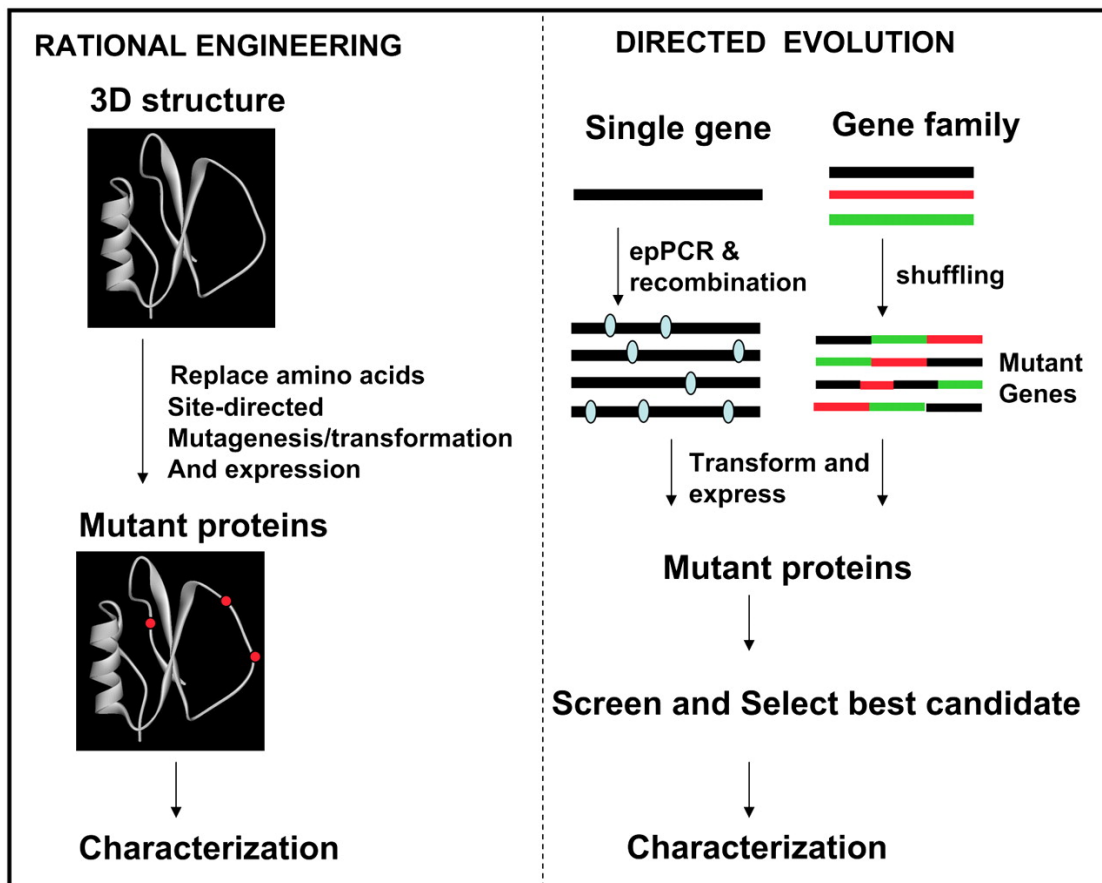
Fersht et al. 1982) οι οποίοι μελέτησαν μεταλλάξεις της τυροσυλ-tRNA συνθετάσης. Ο «ορθολογικός πρωτεϊνικός σχεδιασμός» βασίζεται στη χρήση γενετικών μεταλλάξεων με σκοπό τη μετατροπή της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του υπό μελέτη γονιδίου. Η εισαγωγή αυτών των μεταλλάξεων μπορεί να γίνει είτε με εισαγωγή «σημειακών» μεταλλάξεων (localized mutagenesis) είτε με κατευθυνόμενη τοπική μεταλλαξιγένεση (site-directed mutagenesis) είτε με τη σύνθεση ολόκληρου του μεταλλαγμένου γονιδίου. Μέσω της απομόνωσης και της μελέτης των εκ φύσεως υπερσταθερών πρωτεϊνών, συγκεντρώνονται πληροφορίες που συμβάλουν στην κατανόηση των μηχανισμών της πρωτεϊνικής σταθεροποίησης, κάτι που αποτέλεσε τη βάση για τον «ορθολογικό πρωτεϊνικό σχεδιασμό». Για πολλούς από τους μοριακούς μηχανισμούς σταθεροποίησης των πρωτεϊνών που περιγράψαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο, έχουν γίνει προσπάθειες να «αναπαραχθούν» μέσω δημιουργίας μεταλλάξεων ώστε να προκύψουν σταθερότεροι βιοκαταλύτες. Τα μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας ανήκουν στην προσομοίωση των μηχανισμών όπως η «εντροπική σταθεροποίηση» με την εισαγωγή προλινών και δισουλφιδικών γεφυρών (Κεφάλαιο 1.2.1) (Eijsink, Bjørk et al. 2004). Παρά το γεγονός ότι ο πρωτεϊνικός σχεδιασμός είναι μια μέθοδος βασισμένη στην εκλογίκευση και την εφαρμογή των πληροφοριών σχετικά με τους μηχανισμούς σταθεροποίησης που συλλέγονται μέσω της ανακάλυψης και της μελέτης της τρισδιάστατης δομής όλο και περισσότερων θερμοσταθερών πρωτεϊνών, σχετικά λίγα είναι τα παραδείγματα μελετών που μέσω αυτής της στρατηγικής οδήγησαν στη δημιουργία σταθερότερων ενζύμων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην πολυπλοκότητα των μηχανισμών που δεν καθιστούν δυνατή την «εκλογίκευση» των «παρεμβάσεων» στην πρωτεϊνική αλληλουχία που μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη σταθερότητα διατηρώντας παράλληλα την καταλυτική ικανότητα της πρωτεΐνης (Nemeth, Kamondi et al. 2002). Αυτό συμβαίνει γιατί οι ιδιότητες μιας πρωτεΐνης δεν εντοπίζονται σε μεμονωμένες θέσεις λίγων αμινοξέων αλλά αποτελούν τη «συνισταμένη» πολλών αλληλουχικών στοιχείων της πρωτεΐνης. Ακόμα και όταν μεγάλες λειτουργικές αλλαγές μπορούν να επιτευχθούν με την αντικατάσταση μόνο λίγων αμινοξέων, συνήθως είναι πολύ δύσκολο έως ακατόρθωτο να εντοπιστούν οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις που απαιτούνται για αυτό. Για αυτό, μέχρι και σήμερα τα παραδείγματα όπου ο ορθολογικός πρωτεϊνικός σχεδιασμός επέφερε επιτυχημένα αποτελέσματα περιορίζονται σε πολύ καλά μελετημένες πρωτεΐνες με καταλυτικούς μηχανισμούς πλήρως κατανοητούς (Zhang, Himmel et al. 2006).

Τα ένζυμα στα οποία εστιάζουμε σε αυτή τη διατριβή, όπως οι κυτταρινάσες και οι εστεράσες, δεν ανήκουν σε αυτή την κατηγορία, για αυτό και δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία πολύ μεγάλο πλήθος ανάλογων παραδειγμάτων επιτυχούς πρωτεϊνικού σχεδιασμού.

- **Κατευθυνόμενη εξέλιξη πρωτεϊνών (directed evolution)**

Η «κατευθυνόμενη εξέλιξη» των πρωτεϊνών προς τη δημιουργία νέων και βελτιωμένων βιοκαταλυτών, είναι μια τεχνολογία που στη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών ήρθε να αντικαταστήσει τον «ορθολογικό πρωτεϊνικό σχεδιασμό» απαλείφοντας κάποια από τα μειονεκτήματα του στα οποία και αναφερθήκαμε νωρίτερα. Η «κατευθυνόμενη εξέλιξη» στηρίζεται σε ένα πρωτόκολλο δύο σταδίων κατά το οποίο αρχικά δημιουργείται μια βιβλιοθήκη «μοριακής ποικιλότητας» μιας πρωτεΐνης μέσω τυχαίας μεταλλαξιγένεσης και *in vitro* ανασυνδυασμού, και στη συνέχεια, μέσω σάρωσης, επιλέγονται τα μέλη εκείνα της βιβλιοθήκης που παρουσιάζουν βελτιωμένα χαρακτηριστικά ως προς το φαινότυπο που εξετάζεται (Lutz 2010). Οι βασικές προϋποθέσεις για την επιτυχία των πειραμάτων κατευθυνόμενης εξέλιξης είναι τρεις. Η πρώτη είναι η επιλογή ενός συμβατού συστήματος έκφρασης των γονιδιακών βιβλιοθηκών όπου και γίνεται η παραγωγή των λειτουργικών πρωτεϊνικών μορίων από τους ξενιστές. Η δεύτερη σημαντική προϋπόθεση είναι η ύπαρξη ενός γρήγορου τρόπου σάρωσης και επιλογής (screen) του φαινοτύπου υπό εξέταση και η τρίτη είναι η ύπαρξη μιας καλής στρατηγικής ανάλυσης των πρωτεϊνικών διαμορφώσεων (Kuchner and Arnold 1997). Οι μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εισαγωγή μεταλλάξεων στο γονίδιο και κατ' επέκταση στην πρωτεΐνη της οποίας τα χαρακτηριστικά υπόκεινται σε βελτίωση είναι είτε χημικές είτε βιοχημικές είτε συνδυασμός των δύο. Μια από τις πιο επιτυχημένες είναι η μεταλλαξιγένεση μέσω αντιγραφής του γονιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με επιρρέπεια στα λάθη (error-prone PCR). Επειδή όμως ακόμα και οι πολυμεράσες με χαμηλή ακρίβεια στη αντιγραφή είναι πολύ ακριβείς για να παράξουν μια βιβλιοθήκη μεταλλαξιγένεσης ικανοποιητικής ποικιλότητας, η εισαγωγή «λαθών» συνήθως υποβοηθάται χημικά με την εισαγωγή προσθέτων στην αντίδραση όπως  $Mn^{2+}$  αντί του συμπαραγόνα  $Mg^{2+}$  είτε βιοχημικά μέσω της εισαγωγής εσκεμμένα δυσανάλογης συγκέντρωσης νουκλεοτιδίων (dNTPs). Επίσης, μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους δημιουργίας βιβλιοθηκών μεταλλαξιγένεσης είναι αυτή της «αναδιοργάνωσης» του DNA (DNA shuffling). Η *in vitro* αυτή μέθοδος στηρίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό ενός συνόλου

μεταλλαγμένων γονιδιακών θραυσμάτων που έχουν προκύψει με τυχαία πέψη και την επανένωση τους μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Stemmer 1994). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετά παραδείγματα όπου με τη χρήση της «κατευθυνόμενης εξέλιξης» επιτεύχθηκε η αύξηση της θερμοσταθερότητας ενζύμων όπως κυτταρινάσες και εστεράσες. Οι Wu και Arnold σε μια πρόσφατη μελέτη τους αύξησαν τη θερμοσταθερότητα μια χμαιοτικής κυτταρινάσης χρησιμοποιώντας τυχαία μεταλλαξιγένεση και ανασυνδυασμό των «ωφέλιμων» μεταλλάξεων (Wu and Arnold 2013). Και οι Giver et al., χρησιμοποιώντας τις μεθόδους της «κατευθυνόμενης πρωτεϊνικής εξέλιξης» κατάφεραν να αυξήσουν τη θερμοσταθερότητα μιας μεσόφιλης εστεράσης κατά 14 °C, χωρίς να επηρεάσουν την καταλυτική της ικανότητα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι, εκτός εάν οι δυο ιδιότητες υπόκεινται σε φυσική επιλογή, η «εξέλιξη» της θερμοσταθερότητας με την εισαγωγή μιας μετάλλαξης γίνεται σε βάρος της καταλυτικής ενεργότητας σε χαμηλές θερμοκρασίες ανεξάρτητα από το γεγονός εάν είναι αντιστρόφως συσχετισμένες ή καθόλου συσχετισμένες. (Giver, Gershenson et al. 1998).

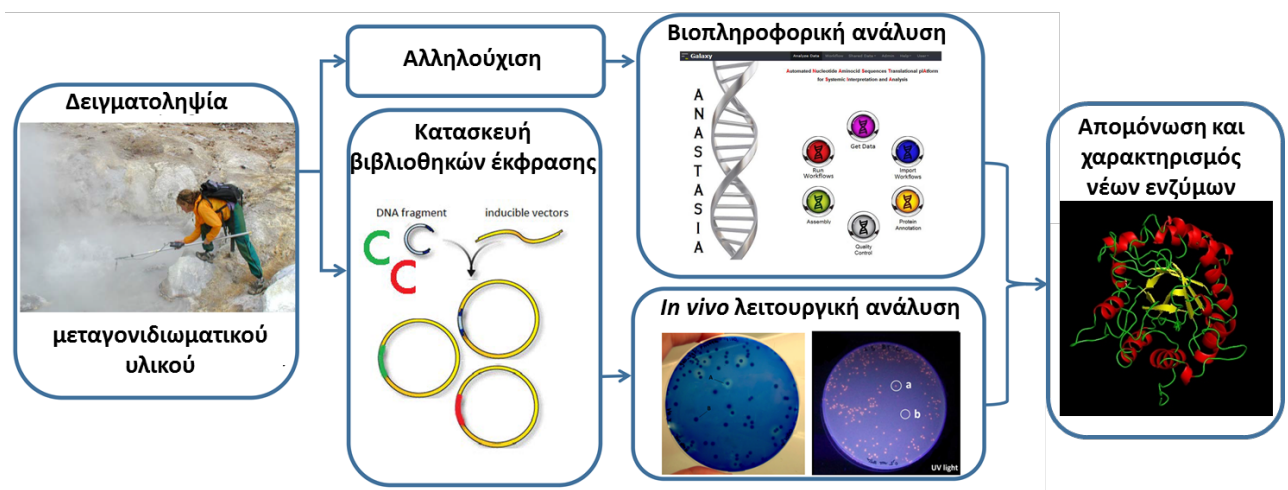


**Εικόνα 1.6: Στρατηγικές πρωτεϊνικής μηχανικής.** Αριστερά παρουσιάζεται σχηματικά η προσέγγιση του ορθολογικού σχεδιασμού ενώ δεξιά η προσέγγιση της κατευθυνόμενης εξέλιξης (Rao 2008).

### 1.3 Ανακάλυψη και χαρακτηρισμός νέων θερμοανθεκτικών υδρολασών- Πλαίσιο εργασίας της παρούσας διατριβής

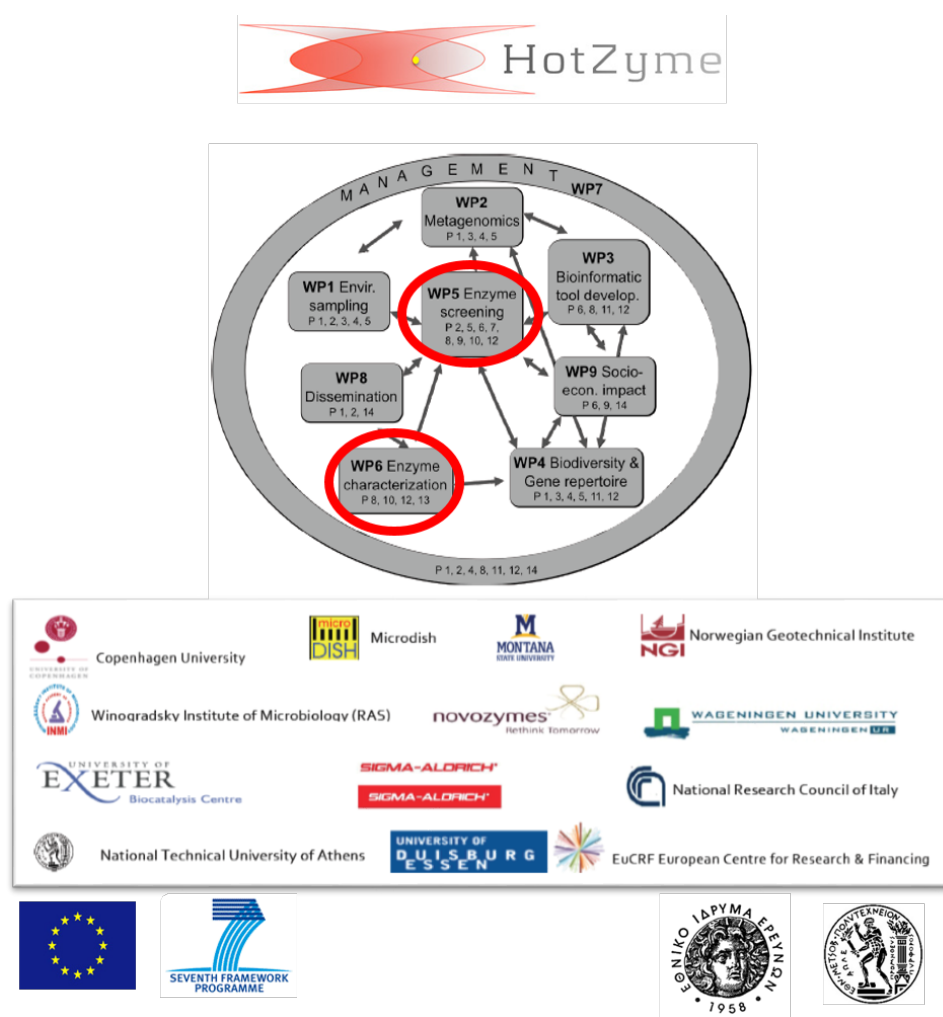
Όπως είδαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο, υπάρχουν διάφορες στρατηγικές μέσω των οποίων μπορούν οι βιοτεχνολόγοι να επιτύχουν την εύρεση νέων θερμοανθεκτικών ενζύμων. Σε αυτή τη διατριβή, με την εφαρμογή *in silico* ή *in vivo* σάρωσης υπερυψηλής απόδοσης επιλέχθηκαν γονίδια-στόχοι που μετά από την ετερόλογη έκφραση τους σε κύτταρα *E. coli* και την απομόνωση των νέων πρωτεϊνών που κωδικοποιούν, οδήγησαν στην ανακάλυψη και τον χαρακτηρισμό νέων θερμοανθεκτικών υδρολασών. Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν κυρίως μεταγονιδιωματική και απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 1.7.

Μέσω αυτής της προσέγγισης, σε αυτή τη διατριβή επιτεύχθηκε η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός τριών νέων θερμοσταθερών υδρολασών, της ενδογλουκανάσης CelDZ1, της εστεράσης EstDZ2 και της εστεράσης EstDZ3. Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της διεθνούς κοινοπραξίας Hotzyme «Systematic screening for novel hydrolases from hot environments», που συστάθηκε με στόχο την ανακάλυψη νέων, θερμοανθεκτικών υδρολασών με βιομηχανικό ενδιαφέρον. Στο πρόγραμμα συμμετείχαν ακαδημαϊκά ιδρύματα από όλο τον κόσμο αλλά και δυο από τις σημαντικότερες εταιρείες βιοτεχνολογίας και βιομηχανικής τεχνολογίας, η Novozymes και η Sigma-Aldrich. Ο επιμερισμός των εργασιών ανάμεσα στα μέλη της κοινοπραξίας φαίνεται στο οργανόγραμμα της Εικόνας 1.8, στο κέντρο του οποίου βρίσκεται το πακέτο εργασίας του οποίου μέρος αποτελεί αυτή η διατριβή.

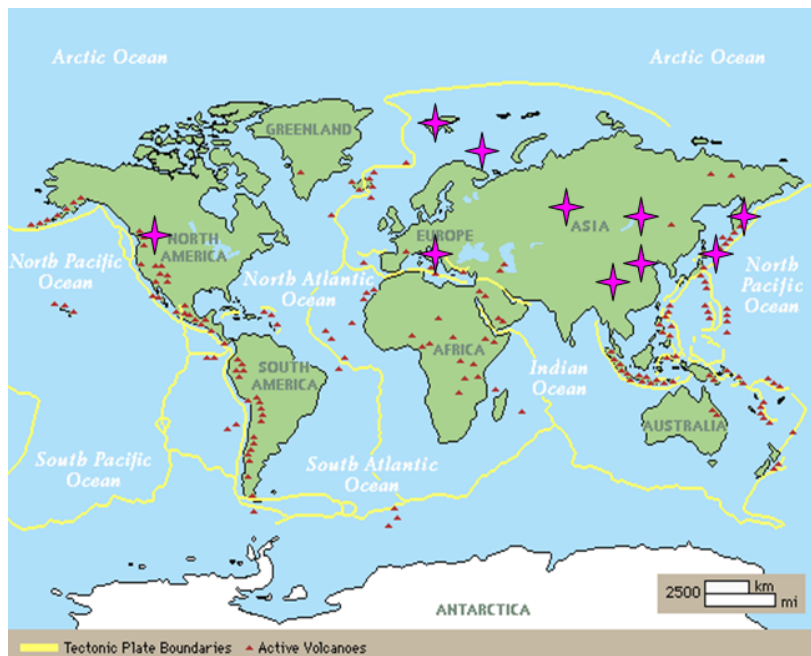


**Εικόνα 1.7:** Διάγραμμα ροής των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας διατριβής με στόχο τον εντοπισμό και το χαρακτηρισμό νέων θερμοανθεκτικών υδρολασών από μεταγονιδιωματικά δείγματα.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η προσέγγιση που ακολουθήθηκε για τον εντοπισμό νέων βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμων βιοκαταλυτών ήταν μεταγονιδιωματική και έτσι το πρώτο πακέτο εργασίας αφορούσε τη συλλογή των μεταγονιδιωματικών δειγμάτων από ακραία ενδιαιτήματα, τα οποία σε δεύτερη φάση και μετά την αλληλούχιση τους ή τη δημιουργία βιβλιοθηκών έκφρασης έρχονταν στα χέρια μας με σκοπό να σαρωθούν είτε βιοπληροφορικά είτε λειτουργικά. Όπως φαίνεται στην Εικόνα, τα σημεία δειγματοληψίας ήταν πολλά και ποικίλα σε μορφή και συνθήκες αφού περιλάμβαναν θερμοπηγές, ηφαιστιογενείς περιοχές, θερμά υποθαλάσσια ρεύματα, κοιτάσματα πετρελαίου κ.α. Όλα τα ενδιαιτήματα είχαν φυσικά ως κοινό χαρακτηριστικό την υψηλή θερμοκρασία αλλά κάποια από αυτά παρουσίαζαν και άλλες ακραίες συνθήκες όπως πολύ χαμηλό pH και υψηλή πίεση. Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν είτε απευθείας είτε μετά από *in situ* εμπλουτισμό σε συγκεκριμένα υποστρώματα των οποίων την αποικοδόμηση στοχεύουν οι υδρολάσες που μας ενδιέφεραν.



**Εικόνα 1.8: Οργανόγραμμα και συνεργάτες της κοινοπραξίας Hotzyme στο πλαίσιο της οποίας πραγματοποιήθηκε η παρούσα διατριβή. Τα πακέτα εργασίας WP5 (σάρωση δειγμάτων για τον εντοπισμό νέων ενζύμων) και WP6 (χαρακτηρισμός νέων ενζύμων) που έχουν σημειωθεί με κόκκινο χρώμα στο οργανόγραμμα της εικόνας, είναι εκείνα στα οποία συνεισέφερε η παρούσα εργασία.**



Hot springs Yellowstone National Park (USA)

Hydrothermal vents (Norway)

Oil reservoir (Western Siberia)

**Geothermal regions :**

Kamchatka (Russia)

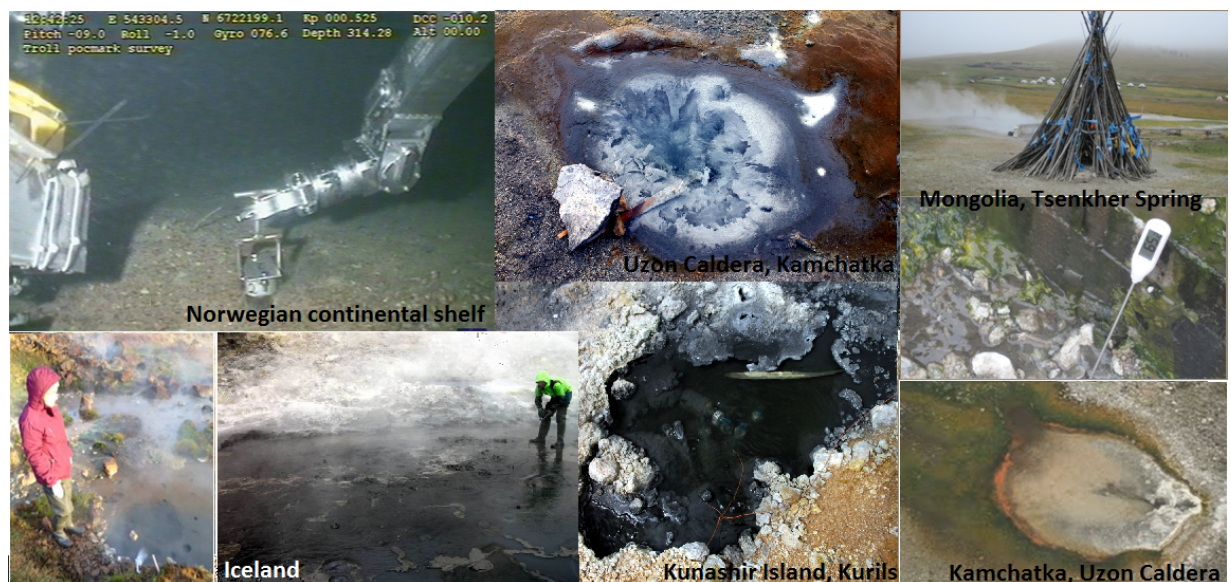
Iceland

Naples/Italy

Tibet and Tengchong (China)

New Zealand

Japan



**Εικόνα 1.9:** Ενδιαστήματα από τα οποία έγινε συλλογή μεταγονιδιαματικού υλικού στο πλαίσιο της κοινοπραξίας “Hotzyme”.

Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες από τις μεταγονιδιαματικές βιβλιοθήκες που δημιουργήθηκαν στο πλαίσιο του Hotzyme με βάση το μεταγονιδιαματικό (ή γονιδιαματικό) υλικό που συλλέχθηκε από τα παραπάνω σημεία δειγματοληψίας.

## A

Όνομα βιβλιοθήκης	Προέλευση DNA	T (°C) pH	Υπόστρωμα εμπλουτισμού	Φορέας	Μέσο μέγεθος ένθετου DNA (kb)	Θεωρητικός αριθμός διαφορετικών κλώνων
CHv	Θερμοπηγή, Ιικό κλάσμα	82 °C όξινο	-	pRhamn	4	75000
CHc	Θερμοπηγή, κυτταρικό κλάσμα	82 °C όξινο	-	pRhamn	6,3	33000
Kam2410	Θερμοπηγή	85 °C, pH 5	PVA	pHot7	4	3000
2312	<i>Planctomyces</i>	55 °C, pH 7	Διάφοροι πολυσακχαρίτες	pRhamn	3	3000
DXG	<i>Dictyoglomus</i>	75 °C, pH 7	Αραβικό κόμμα	pHot7	4	3400

## B

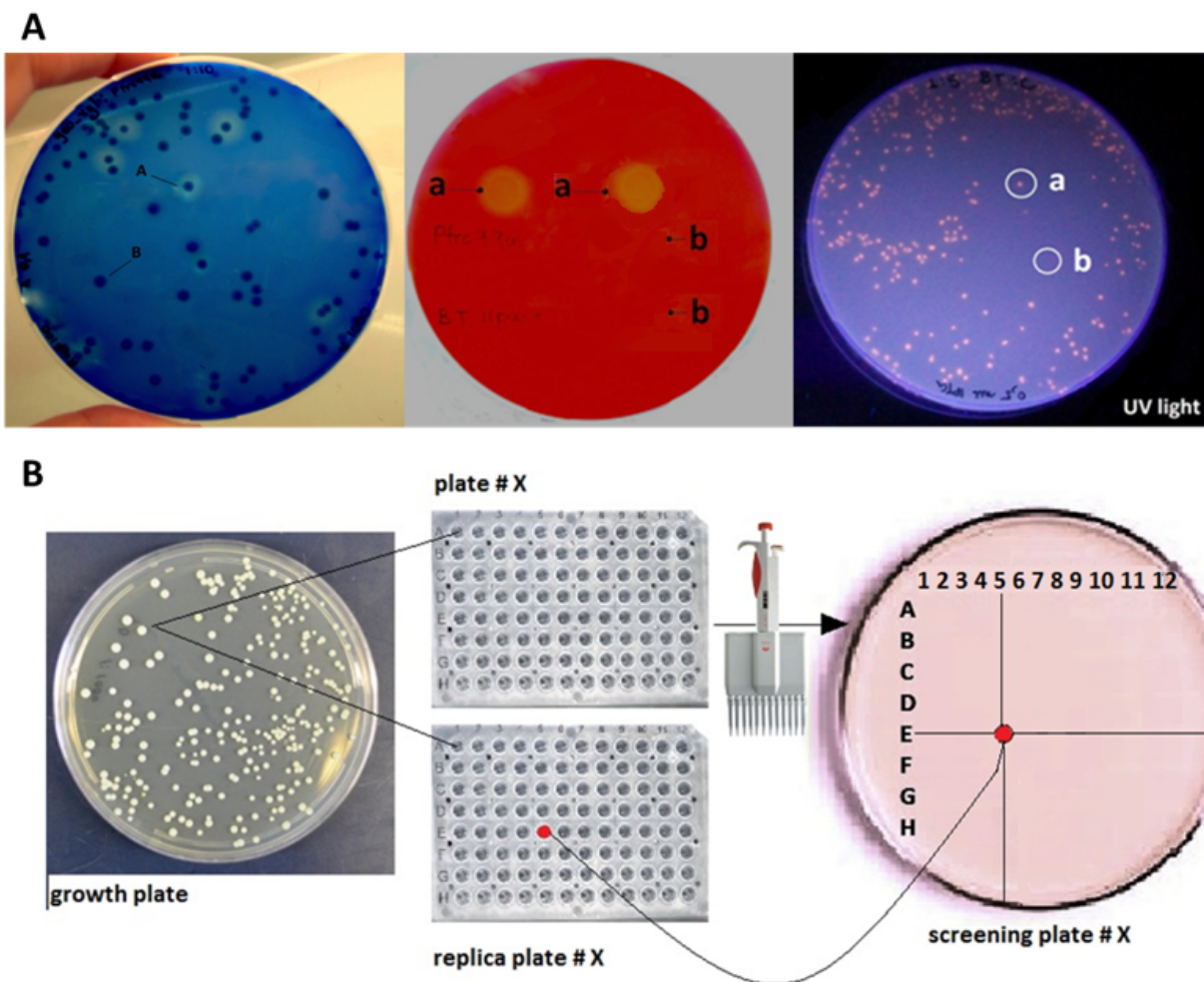
Όνομα βιβλιοθήκης	Σημείο δειγματοληψίας	T (°C) pH	Μέθοδος αλληλούχισης	Αριθμός βάσεων που προέκυψαν από την αλληλούχιση (x10 <sup>6</sup> )
RC-2	Εθνικό Πάρκο Yellowstone, ΗΠΑ (θερμοπηγή)	85 °C, pH 10,2	Illumina	1302
CH1102	Εθνικό Πάρκο Yellowstone, ΗΠΑ (θερμοπηγή)	79,3 °C, pH 1,83	454 Titanium	>1000
Ch2_EY65S	Yunnan, Κίνα (θερμοπηγή)	67 °C, pH 7	454 Titanium	1031
Is3_13	Ισλανδία (θερμοπηγή)	90 °C, pH 3,5-4	Illumina	1005
It_6	Pozzuolli, Ιταλία (θερμοπηγή)	76 °C, pH 3-3,5	Illumina	1006
NGI_7	Adventsdalen, Νορβηγία (Πηγάδι εξόρυξης βάρους 404m)	134 °C	454 Titanium	454

**Εικόνα 1.10: Παραδείγματα μεταγονιδιωμάτων βιβλιοθηκών που δημιουργήθηκαν στο πλαίσιο της κοινοπραξίας Hotzyme. (A)** Μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες το περιεχόμενο των οποίων αλληλουχίστηκε και προορίζονταν για βιοπληροφορική ανάλυση. **(B)** Μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες έκφρασης οι οποίες προορίζονταν για *in vivo* λειτουργική σάρωση.



Τα αποτελέσματα της σάρωσης του μεταγονιδιωματικού υλικού σάρωθηκαν βιοπληροφορικά μέσω της πλατφόρμας ANASTASIA που αναπτύχθηκε για το Hotzyme σε συνεργασία με τη βιοπληροφορική ομάδα της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ και το εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Βιοπληροφορικής του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Δρ. Αριστοτέλης Χατζηγιάννου) (Ladoukakis, Pilalis et al. 2014) και θα περιγράφει αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο 5.2.2. Μέσω αυτού του τύπου της ανάλυσης προέκυψαν τα δύο νέα ένζυμα CelDZ1 και EstDZ2 για τα οποία θα μιλήσουμε στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Όσον αφορά τις μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες έκφρασης όπως αυτές της Εικόνας 1.10B, χρησιμοποιήθηκαν για *in vivo* λειτουργική σάρωση. Ανάλογα με το πλήθος των κλώνων που περιείχαν που συνήθως εξαρτιόταν από το εάν είχαν προκύψει από ένα καθαρά μεταγονιδιωματικό δείγμα ή από δείγμα εμπλουτισμού, η στρατηγική σάρωσης αποτελούνταν είτε από φαινοτυπική ανάλυση των αποικιών (Εικόνα 1.11A) είτε του κυτταρικού υλικού μεμονωμένων αποικιών (Εικόνα 1.11B) σε τρυβλία επιλογής, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα τρυβλία επιλογής ποικίλουν και περιλαμβάνουν τριβουτυρίνη, ελαιόλαδο/ροδαμίνη B, Tween 40 /ροδαμίνη B, πολυουρεθάνη/ροδαμίνη B (για την ανίχνευση λιπολυτικών ενζύμων), ξυλάνη, RBB-ξυλάνη, AZCL-ξυλάνη (για την εύρεση ξυλανασών) καθώς και καρβοξυ-μεθυλο κυτταρίνη, σε συνδυασμό με χρώση Congo Red, Azure-cellulose, AZCL-HE-cellulose και κόμμι ξανθάνης για την εύρεση κυτταρινολυτικών και σχετικών ενζύμων. Ενδεικτικά, κάποια από το τρυβλία επιλογής καθώς και οι αντίστοιχοι θετικοί φαινότυποι φαίνονται στο παρακάτω σχήμα. Μέσω της μεθόδου της λειτουργικής σάρωσης προέκυψε το τρίτο ένζυμο που συμπεριλαμβάνεται στα αποτελέσματα αυτής της διατριβής, και περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4.

Στη διάρκεια αυτής της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές σάρωσης για ποικίλες ενζυμικές ενεργότητες σε πλήθος μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών. Παρακάτω παρουσιάζονται οι μελέτες εκείνες που ολοκληρώθηκαν επιτυχώς και οδήγησαν στην ανακάλυψη και στο χαρακτηρισμό νέων ενζύμων, καθώς και οι σχετικές τους μέθοδοι.



**Εικόνα 1.11: Στρατηγικές *in vivo* λειτουργικής σάρωσης των μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών έκφρασης.** (A) Τρυβλία επιλογής ξυλανάσης, κυτταρινάσης και λιπάσης (από αριστερά προς τα δεξιά: RBB-ξυλάνη, CMC/Congo Red, ελαιόλαδο/ροδαμίνη) στα οποία περιέχεται και ο επαγωγέας της πρωτεϊνοσύνθεσης και διακρίνονται οι θετικοί υδρολυτικοί φαινότυποι (a) και οι αρνητικοί φαινότυποι (b) αποχρωματισμού (RBB-ξυλάνη, CMC/Congo Red) και φθορισμού (ελαιόλαδο/ροδαμίνη) (B) Στρατηγική σάρωσης όπου οι αποικίες της μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης εμπλουτισμού εμβολιάζονται από τρυβλίο ανάπτυξης σε πιάτο πολλαπλών θέσεων όπου περιέχεται υγρό ανάπτυξης και επαγωγέας έκφρασης. Παράλληλα δημιουργείται ένα πιάτο/αντίγραφο όπου δεν περιέχεται επαγωγέας. Αφού οι καλλιέργειες αναπτυχθούν, γίνεται διάτρηση των κυττάρων στο πιάτο επαγωγής και το κυτταρικό υλικό εναποτίθεται σε τρυβλίο επιλογής. Εάν εμφανιστεί θετικός φαινότυπος, επιλέγεται ο κλώνος από το αντίγραφο πιάτο ανάπτυξης.

## **2. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΥΠΕΡ-ΑΛΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΕΝΔΟΓΛΟΥΚΑΝΑΣΗΣ ΑΠΟ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟ ΔΕΙΓΜΑ ΙΣΛΑΝΔΙΚΗΣ ΘΕΡΜΟΠΗΓΗΣ**

### **2.1. Περίληψη**

Ως μέρος της παρούσας διατριβής, τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής σάρωσης των δεδομένων αλληλούχισης εμπλουτισμένου μεταγονιδιωματικού δείγματος Ισλανδικής θερμοπηγής, υπέδειξαν μια αλληλουχία που παρουσίαζε ενδιαφέρον λόγω της ομολογίας της (59%) με μια χαρακτηρισμένη κυτταρίνα από τον οργανισμό *Bacillus akibai* (Fukumori, Kudo et al. 1986). Η αλληλουχία απομονώθηκε, εκφράστηκε σε κύτταρα *E. coli* και η πρωτεΐνη που κωδικοποιούσε χαρακτηρίστηκε ως ενδογλουκανάση της οικογένειας GH5. Η νέα ενδογλουκανάση που ονομάστηκε CelDZ1, έχει βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 70 °C, και βέλτιστο pH 5, ενώ παρουσιάζει πολύ εντυπωσιακή ανθεκτικότητα σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων. Επίσης, η CelDZ1 είναι ανθεκτική σε ένα μεγάλο φάσμα αποδιατακτικών παραγόντων όπως μεταλλικά ιόντα, οργανικοί διαλύτες, επιφανειοενεργά κ.α., γεγονός που την καθιστά ένζυμο ικανό να χρησιμοποιηθεί σε ενζυμικά μίγματα που προορίζονται για χρήση σε βιομηχανικές εφαρμογές υψηλής θερμοκρασίας και αλατότητας. Επίσης, η κρυσταλλική δομή της CelDZ1, παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που την καθιστά ξεχωριστή ανάμεσα στις ομόλογες της πρωτεΐνες, αφού υπολείπεται του δευτερεύοντος σημείου πρόσδεσης των σακχάρων.

### **2.2 Εισαγωγή**

Όπως είδαμε νωρίτερα, η κυτταρίνη είναι το πιο άφθονο βιοπολυμερές στον πλανήτη και αποτελεί το παραπροϊόν πολλών βιομηχανικών διεργασιών, κάτι που την καθιστά μια χαμηλού κόστους πρώτη ύλη. Στη βιομηχανία, η κυτταρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πληθώρας προϊόντων όπως χαρτί, ζωοτροφές, υφάσματα και βιοκαύσιμα, μέσω βιοτεχνολογικών διεργασιών που επιστρατεύουν τη δράση των κυτταρινασών. Οι κυτταρινάσες είναι τα ένζυμα που στη φύση κατέχουν την πρόσβαση στην κατά τα άλλα δύσκολα προσβάσιμη κρυσταλλική δομή της κυτταρίνης. Το μειονέκτημα όμως των συμβατικών, μεσόφιλων ενζύμων είναι ότι δεν μπορούν να δράσουν στις ακραίες βιομηχανικές συνθήκες που συνήθως περιλαμβάνουν υψηλές θερμοκρασίες, παρουσία

μεγάλης συγκέντρωσης αλάτων κ.α. Για το λόγο αυτό, η ανακάλυψη νέων, ακραιόφιλων κυτταρινασών αποτελεί προτεραιότητα των ερευνητών αφού η εκτεταμένη εφαρμογή τους στη βιομηχανία θα φέρει επανάσταση τόσο σε οικονομικό όσο και σε περιβαλλοντικό επίπεδο.

## 2.3 Αποτελέσματα

### 2.3.1 Εμπλουτισμός δείγματος και ταξινομική ανάλυση

Ο εμπλουτισμός και η συλλογή του δείγματος πραγματοποιήθηκαν από τους συνεργάτες μας Sóley R. Gudbergsdottir και Xu Peng (Danish Archaea Centre, Department of Biology, Copenhagen University, Copenhagen, Denmark). Συνοπτικά, το υλικό που συλλέχθηκε από την εκροή θερμοπηγής που βρίσκεται στο Grendalur της Ισλανδίας (64°01'53.4"N, 21°11'50.4"W), εμπλουτίστηκε αναερόβια με 0,5% ξυλάνη σε pH 7 έτσι ώστε να ευνοηθεί η ανάπτυξη οργανισμών με ικανότητα να μεταβολίζουν πολυσακχαρίτες. Το εμπλουτισμένο υλικό, αραιώθηκε σταδιακά έως ότου ήταν δυνατή η απομόνωση ενός μόνο στελέχους. Η ανάλυση 16S rRNA των θραυσμάτων του γονιδιωματικού υλικού αυτού του στελέχους αλληλουχήθηκε και τα αποτελέσματα εξετάστηκαν ως προς τη βάση δεδομένων NCBI, όπου βρέθηκε 99% ομοιότητα με το είδος *Thermoanaerobacterium*. Το πρόγραμμα ταξινομικής ανάλυσης MEGAN (MEtaGenome Analyzer) (Huson, Auch et al. 2007) επίσης κατέταξε το γονιδιωματικό υλικό στα βακτηριακά γένη *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* ή *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*, επιβεβαιώνοντας την αρχική πρόβλεψη.



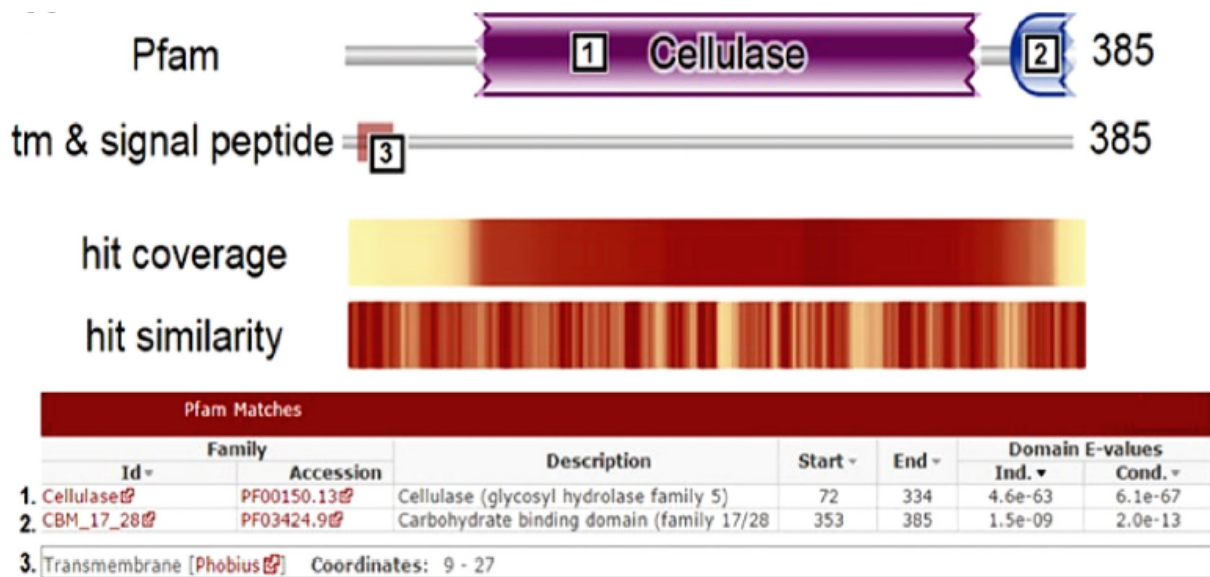
**Εικόνα 2.2:** Το σημείο δειγματοληψίας της Ισλανδικής θερμοπηγής (64°01'53.4"N, 21°11'50.4"W) και το αναερόβιο δείγμα εμπλουτισμού του.

### 2.3.2 Εντοπισμός και ανακάλυψη της ενδογλουκανάσης CelDZ1

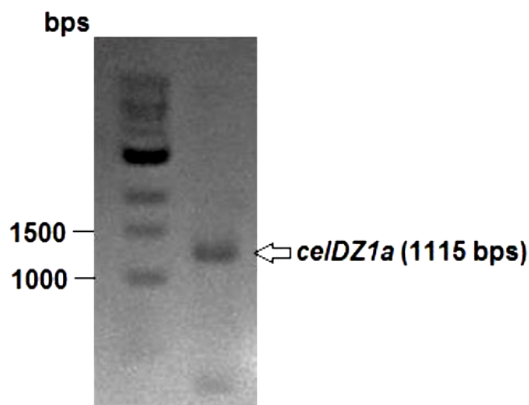
Το γονιδιωματικό υλικό που απομονώθηκε από την εμπλουτισμένη καλλιέργεια που περιγράφηκε νωρίτερα, αλληλουχήθηκε με τη χρήση της πλατφόρμας νέας γενιάς Illumina και τα αποτελέσματα αναρτήθηκαν στην πλατφόρμα ANASTASIA (Ladoukakis, Pilalis et al. 2014) για να ακολουθήσει η βιοπληροφορική τους ανάλυση. Τα θραύσματα του γενετικού υλικού οργανώθηκαν σε μεγάλα σύνολα (contigs) και αναλύθηκαν για την ύπαρξη ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs) με πιθανότητα να κωδικοποιούν κυτταρινολυτικά ένζυμα. Η διαδικασία της βιοπληροφορικής ανάλυσης και της επιλογής των προς μελέτη αλληλουχιών περιγράφεται αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο 5.2.2. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε μεταξύ άλλων μια αλληλουχία που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη 385 αμινοξέων με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 43.2 kDa και ποσοστό ομοιότητας 59% με μια ήδη χαρακτηρισμένη ενδογλουκανάση που προέρχεται από τον οργανισμό *Bacillus akibai* (Fukumori, Kudo et al. 1986). Η αλληλουχία επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη και η ανάλυση της στις πλατφόρμες Pfam-A (Bateman, Coin et al. 2004) και HMMER (Finn, Clements et al. 2011) έδειξε ότι περιέχει δύο διακριτές πρωτεϊνικές περιοχές (domains), μια καταλυτική περιοχή χαρακτηριστική για τις γλυκόζυλ –υδρολάσες της οικογένειας GH5, σύμφωνα με την κατάταξη της ενζυμικής βάσης δεδομένων CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes database) (Cantarel, Coutinho et al. 2009), και μια μονάδα πρόσδεσης υδρογονανθράκων (CBM) τύπου 17/28 (Εικόνα 2.3). Η ανάλυση της αλληλουχίας στην πλατφόρμα εντοπισμού διαμεμβρανικών περιοχών TMHMM (Petersen, Brunak et al. 2011), προέβλεψε την ύπαρξη ενός διαμεμβρανικού αγκίστρου στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, που εκτείνεται στα πρώτα 27 αμινοξέα και συγκρατεί το ενζυμικό μόριο προσαρτημένο στο εξωτερικό του κυττάρου (Εικόνα 2.3).

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, το οποίο στο εξής αναφέρεται ως celDZ1a, απομονώθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) από το γονιδιωματικό υλικό (Εικόνα 2.4) και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pET-28a(+), προς το σχηματισμό του ανασυνδυασμένου φορέα pET-CelDZ1a. Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια Luria-Betrani (LB) στους 37 °C υπό ανάδευση έως ότου η οπτική απορρόφηση στα 600 nm μετρήθηκε στο 0,5. Στο σημείο αυτό, και αφού τα κύτταρα βρίσκονταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης, έγινε η προσθήκη του επαγωγέα IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) σε τελική συγκέντρωση 0,2 mM. Μετά από 4 ώρες από τη

στιγμή της έναρξης της επαγωγής της πρωτεϊνοσύνθεσης, η καλλιέργεια τερματίστηκε, τα κύτταρα απομονώθηκαν, λύθηκαν και οι πρωτεΐνες που περιέχονταν σε 10  $\mu$ L κυτταρικού υλικού διαχωρίστηκαν, χωρίς να προηγηθεί βρασμός, με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS (SDS-PAGE).



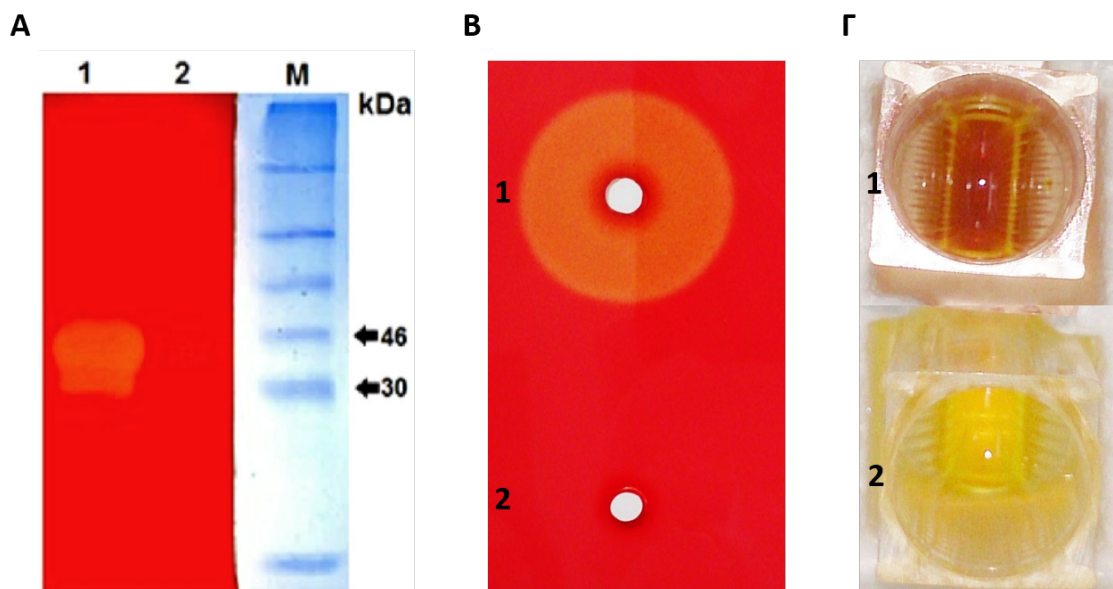
**Εικόνα 2.3:** Ανάλυση της αλληλουχίας-στόχου με το εργαλείο HMMER και εντοπισμός των πρωτεϊνικών περιοχών που περιέχει: (1) καταλυτική περιοχή GH5 (2) μονάδα πρόσδεσης υδρογονανθράκων (CBM) τύπου 17/28 (3) διαμεμβρανικό άγκιστρο.



**Εικόνα 2.4:** Ηλεκτροφόρηση DNA του υλικού της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με μήτρα το μεταγονιδιωματικό υλικό. Το προϊόν που προέκυψε όπως φαίνεται στην εικόνα, εμφανίζεται στο αναμενόμενο μέγεθος (1115 bps) (πρότυπο δείγμα DNA: 1kb DNA ladder, New England Biolabs Inc.)

Η γέλη περιείχε εκτός των άλλων και 0.25% καρβοξυ-μεθυλο κυτταρίνη (CMC) ως πιθανό υπόστρωμα της ενζυμικής δράσης της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης. Μετά από χρώση με Congo Red, η ζώνη αποχρωματισμού που εμφανίστηκε στο ύψος των 42 kDa, αποκάλυψε την κυτταρινολυτική δράση της CelDZ1a (Εικόνα 2.5 A). Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και μετά από εμβολιασμό τρυβλίων με άγαρ στα οποία είχε προστεθεί 1% CMC, με το κυτταρικό περιεχόμενο των ανασυνδυασμένων κυττάρων (Εικόνα 2.5 B). Για την

επιβεβαίωση αυτού του αποτελέσματος, ακόμα ένα ανεξάρτητο πείραμα πραγματοποιήθηκε κατά το οποίο το κυτταρικό υλικό χρησιμοποιήθηκε σε ενζυμική αντίδραση όπου περιέχονταν καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη (CMC). Μετά τα πέρας της αντίδρασης (15 λεπτά στους 50 °C) έγινε ανίχνευση των προϊόντων υδρόλυσης (αναγωγικά σάκχαρα) με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) κατά Miller (Miller 1959) και επιβεβαιώθηκε η κυτταρινολυτική δράση της πρωτεΐνης (Εικόνα 2.5 Γ). Σε όλα τα πειράματα, ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε το κυτταροπλασματικό υλικό των βακτηρίων που έφεραν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

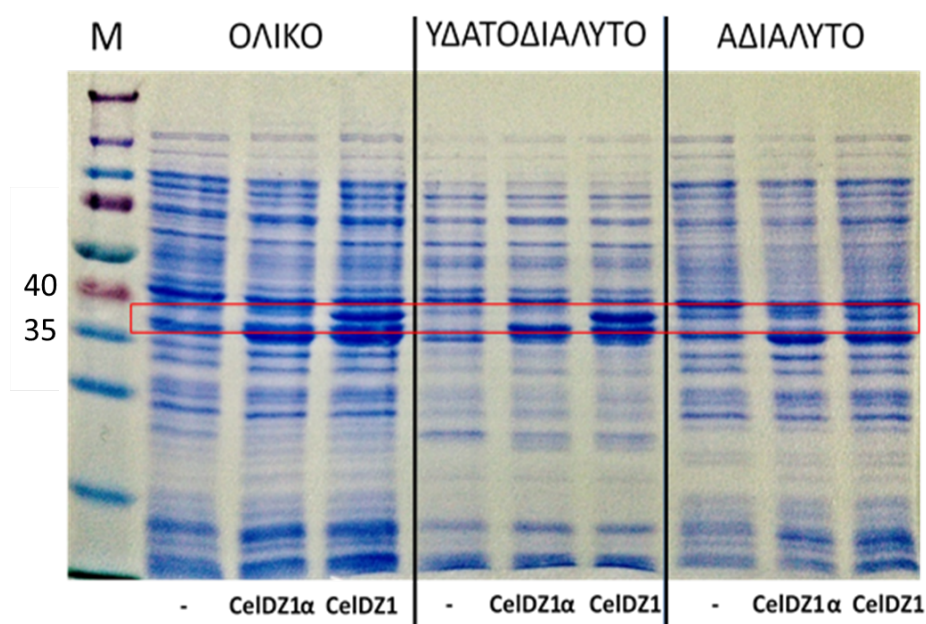


**Εικόνα 2.5:** Έλεγχος κυτταρινολυτικής δράσης της *CelDZ1a*. (A) Ζυμογράφημα του κυτταρικού υλικού βακτηρίων που παράγουν την πρωτεΐνη *CelDZ1* (1) χρησιμοποιώντας ως αρνητικό δείγμα το κυτταροπλασματικό υλικό των βακτηρίων που φέρουν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (2). Δεξιά παρουσιάζεται το πρότυπο πρωτεϊνικό δείγμα (M) (πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών- Prestained Protein Marker, Broad Range 7-175 kDa, New England Biolabs Inc.). (B) Εμβολιασμός τρυβλίων LB-άγαρ στα οποία είχε προστεθεί 1% CMC, με το κυτταρικό περιεχόμενο των ανασυνδυασμένων βακτηρίων που εκφράζουν το γονίδιο *celDZ1a* (1) και που φέρουν άδειο φορέα έκφρασης pET-28a(+) (2). (Γ) Ανίχνευση των προϊόντων υδρόλυσης (αναγωγικά σάκχαρα) με τη μέθοδο του DNS, χρησιμοποιώντας το κυτταρικό υλικό των βακτηρίων που παράγουν την *CelDZa* (1) και κυττάρων που φέρουν κενό πλασμίδιο pET-28a(+) (2).

### 2.3.3 Κλωνοποίηση, καθαρισμός και βιοχημικός χαρακτηρισμός

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η πρωτεΐνη *CelDZ1a* προβλέπεται να είναι προσδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη. Για τη μελέτη της επίπτωσης αυτού του χαρακτηριστικού της στην

παραγωγή και τον καθαρισμό της, δημιουργήθηκε ένα γονίδιο στο οποίο η διαμεμβρανική έλικα (άγκιστρο) αντικαταστάθηκε με ένα επίτοπο έξι ιστιδινών. Το νέο γονίδιο, που ονομάστηκε *celDZ1*, κλωνοποιήθηκε στο φορέα pET-28a(+) και έδωσε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-CelDZ1. Με το πλασμίδιο αυτό μετασηματίστηκαν κύτταρα BL21(DE3) και παράχθηκε η νέα μορφή της πρωτεΐνης CelDZ1α, η CelDZ1. Όταν το κυτταρικό περιεχόμενο βακτηρίων που παρήγαγαν και τις δυο μορφές πρωτεΐνης ηλεκτροφορήθηκε σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και μετά από χρώση με Coomassie Blue, έγινε φανερό ότι το πρωτεϊνικό μόριο από το οποίο αφαιρέθηκε η διαμεμβρανική έλικα παράγεται πολύ αποτελεσματικότερα και συσσωρεύεται κατά μεγαλύτερο βαθμό στο διαλυτό κομμάτι του κυττάρου σε αντίθεση με το αρχικό πρωτεϊνικό μόριο, η παραγωγή του οποίου είναι περιορισμένη και εντοπίζεται κυρίως στο αδιάλυτο κομμάτι του κυττάρου (Εικόνα 2.6)

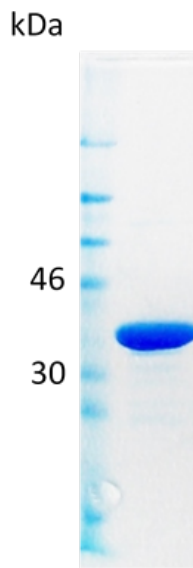


**Εικόνα 2.6:** Ανάλυση SDS-PAGE των κλασμάτων του κυτταρικού υλικού βακτηρίων που φέρουν άδειο φορέα έκφρασης (-), παράγουν την πρωτεΐνη CelDZ1α που φέρει το διαμεμβρανικό τμήμα (CelDZ1α), και την πρωτεΐνη CelDZ1 από την οποία έχει αφαιρεθεί το διαμεμβρανικό τμήμα (CelDZ1). (M= πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder)

Για το λόγο αυτό, το τροποποιημένο πρωτεϊνικό μόριο CelDZ1 επιλέχθηκε για καθαρισμό και χρήση για το βιοχημικό χαρακτηρισμό του νέου ενζύμου. Η πρωτεΐνη καθαρίστηκε με τη χρήση της χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) και απέδωσε 6 mg πρωτεΐνης/λίτρο καλλιέργειας. Η καθαρότητα του προϊόντος εκτιμήθηκε με



ανάλυση SDS-PAGE, όπου η πρωτεΐνη εμφανίστηκε ομοιογενής όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.7.



**Εικόνα 2.7:** Ανάλυση SDS-PAGE του προϊόντος καθαρισμού της CelDZ1. (Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa), New England Biolabs Inc.)

#### Μελέτη εκλεκτικότητας υποστρώματος

Η ενδογλουκανάση CelDZ1, βρέθηκε να είναι καταλυτικά ενεργή απέναντι σε υδατοδιαλυτά υποστρώματα που περιέχουν β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, όπως η καρβοξυ-μεθυλ-κυτταρίνη CMC και η β-D-γλουκάνη. Για αδιάλυτα υποστρώματα όπως η Avicel και το χαρτί, η CelDZ1 δεν παρουσίασε ανιχνεύσιμη καταλυτική ικανότητα. Επίσης, η CelDZ1 δεν παρουσιάζει δράση β-γλυκοζιδάσης αφού δεν ήταν ενεργή απέναντι στην κελλοβιόζη και δεν αναγνωρίζει τους β-1,3 γλυκοζιτικούς δεσμούς αφού δεν υδρολύει τη λαμιναρίνη. Παράλληλα το ένζυμο είναι ανενεργό απέναντι στην ξυλάνη, τη γαλακτομανάνη και την πηκτίνη. (Πίνακας 2.1).

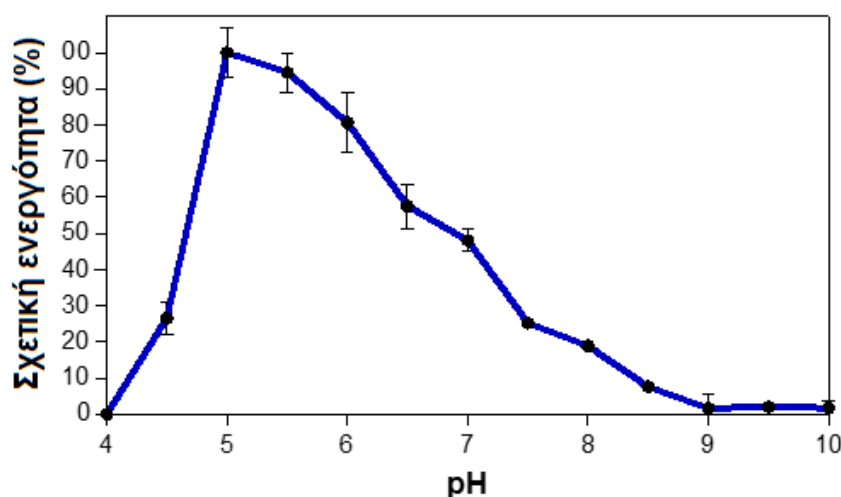
**Πίνακας 2.1:** Μέτρηση της ειδικής ενεργότητας της CelDZ1 έναντι διαφόρων πολυσακχαριτών

Υπόστρωμα	Κύριοι δεσμοί	Υδατοδιαλυτότητα	Ειδική ενεργότητα (U/mg)
CMC	(β-1,4) Glc	Διαλυτό	74 ± 9
β-D-γλουκάνη	(β-1,3/4) Glc	Διαλυτό	589 ± 7
Κελλοβιόζη	(β-1,4) Glc	Διαλυτό	Μη ανιχνεύσιμη
Λαμιναρίνη	(β-1,3) Glc	Διαλυτό	Μη ανιχνεύσιμη
Γαλακτομανάνη	(β-1,4) Man	Διαλυτό	Μη ανιχνεύσιμη
Πηκτίνη	(α-1,4) Gal	Διαλυτό	Μη ανιχνεύσιμη
Ξυλάνη	(β-1,4)Xyl	Διαλυτό	Μη ανιχνεύσιμη
Avicel	(β-1,4) Glc	Αδιάλυτο	Μη ανιχνεύσιμη
Διηθητικό χαρτί	(β-1,4) Glc	Αδιάλυτο	Μη ανιχνεύσιμη

Τα πειράματα βιοχημικού χαρακτηρισμού που ακολούθησαν έγιναν με τη χρήση CMC ως υπόστρωμα της ενζυμικής δράσης σε συνδυασμό με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) κατά Miller (Miller 1959) τόσο για λόγους ευκολίας όσο και για τη δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων με τη βιβλιογραφία, μιας και αυτός ο συνδυασμός υποστρώματος και μεθόδου ανίχνευσης είναι ο πιο συχνός στις αντίστοιχες μελέτες χαρακτηρισμού κυτταρινασών.

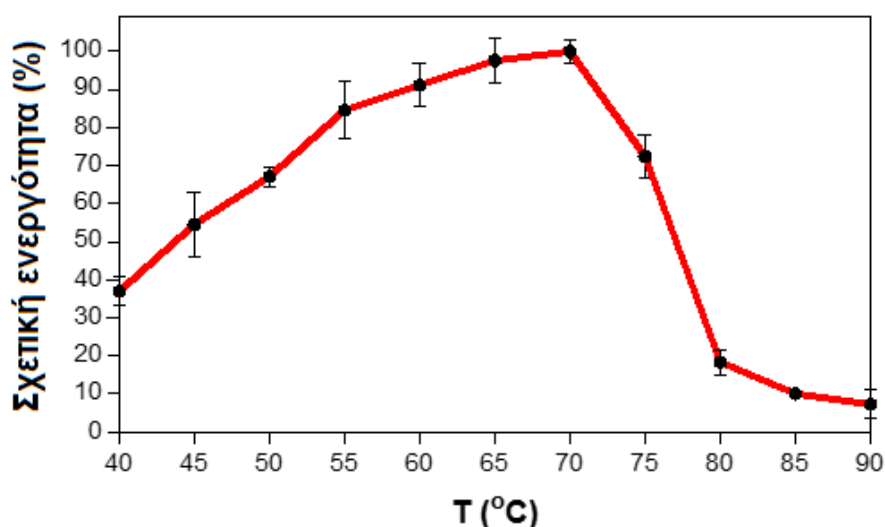
#### Μελέτη της επίδρασης του pH και της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της CelDZ1

Για τη μελέτη της επίδρασης του pH στην ενεργότητα της CelDZ1, η καταλυτική δράση του ενζύμου μετρήθηκε σε εύρος pH 4-10, και σε θερμοκρασία 40 °C. Το pH 5 βρέθηκε να είναι το βέλτιστο (100% σχετική ενεργότητα) ενώ σε pH 6 και 7, η σχετική ενεργότητα της ενδογλουκανάσης ανέρχεται στο 80% και 48% αντίστοιχα (Εικόνα 2.8). Κάτω από το pH 4 και πάνω από το pH 9, η CelDZ1 είναι πρακτικά ανενεργή. Αυτό υποδεικνύει ότι η CelDZ1 είναι μια οξεόφιλη ενδογλουκανάση, κάτι που συμφωνεί με τα ευρήματα άλλων ομόλογων κυτταρινασών όπως η Cel5A από το στέλεχος *Thermoanaerobacter tengcongensis MB4* (Liang, Xue et al. 2011). Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει το γεγονός ότι η πλησιέστερη σε αλληλουχική ομοιότητα κυτταρινάση από το στέλεχος *B. akibai* (Fukumori, Kudo et al. 1986) και η πλησιέστερη δομικά κυτταρινάση CelK από το στέλεχος *Bacillus sp. KSM-635* (Shirai, Ishida et al. 2001), είναι αλκαλόφιλες πρωτεΐνες με βέλτιστες τιμές pH 9 και 9,5 αντίστοιχα.



**Εικόνα 2.8: Μελέτη επίδρασης του pH στην ενεργότητα της ενδογλουκανάσης CelDZ1.** Η ενεργότητα της CelDZ1 μετρήθηκε στη βασική αντίδραση στους 40 °C για 5 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 5. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

Η CelDZ1, έχει ένα ευρύ θερμοκρασιακό φάσμα δράσης, διατηρώντας σημαντικά επίπεδα ενεργότητας σε θερμοκρασίες μεταξύ 40 και 80 °C, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι οι 70 °C (Εικόνα 2.9). Στις βέλτιστες συνθήκες (70 °C, pH 5), η CelDZ1 υδρολύει το κυτταρινούχο υπόστρωμα CMC ακολουθώντας το κινητικό μοντέλο Michaelis-Menten, με τιμές  $K_M$  και  $k_{cat}$   $6,1 \pm 0,9 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  και  $46,3 \text{ s}^{-1}$  αντίστοιχα. Η  $K_M$  εκφράζεται σε μονάδες μάζας αντί moles λόγω της φυσικής ετερογένειας του υποστρώματος. Σύμφωνα με αυτές τις τιμές, η σταθερά καταλυτικής αποδοτικότητας  $k_{cat}/K_M$  υπολογίστηκε στο  $7.6 \text{ mg}^{-1}\cdot\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}$ , τιμή που είναι πολύ κοντά στις αναφερόμενες τιμές της βιβλιογραφίας που αφορούν παρόμοια ένζυμα όπως την CelE1 (Alvarez, Paiva et al. 2013), την Cel5A καθώς και τις μεταλλαγές της που προέκυψαν μετά από κατευθυνόμενη εξέλιξη της (Liang, Fioroni et al. 2011).

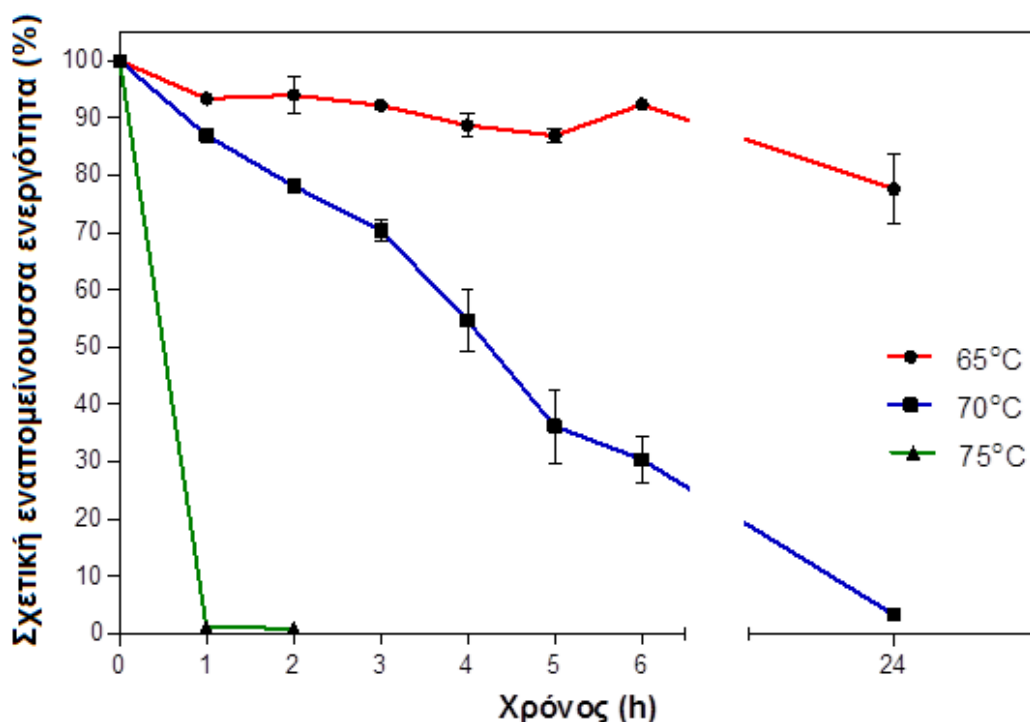


**Εικόνα 2.9:** Μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της ενδογλουκανάσης CelDZ1. Η ενεργότητα της CelDZ1 μετρήθηκε στη βασική αντίδραση στο θερμοκρασιακό εύρος 40-90 °C για 5 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 5. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

#### Θερμοσταθερότητα, αλοανθεκτικότητα, αλοσταθερότητα και επίδραση διαφόρων αποδιατακτικών παραγόντων στην ενεργότητα της CelDZ1

Η ενδογλουκανάση CelDZ1 βρέθηκε να έχει ικανοποιητική θερμοσταθερότητα όταν εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα. Τα πειράματα στα οποία μετρήθηκε η εναπομένουσα ενεργότητα του ενζύμου έδειξαν ότι μικρή αλλαγή στην καταλυτική ικανότητα του ενζύμου σημειώθηκε μετά από επώαση της πρωτεΐνης στους 65 °C για 24 ώρες, ενώ παράλληλα, το ένζυμο διατήρησε το 50% της ενεργότητας τους μετά από έκθεση τεσσάρων ωρών στους 70 °C. Μετά από έκθεση σε θερμοκρασίες

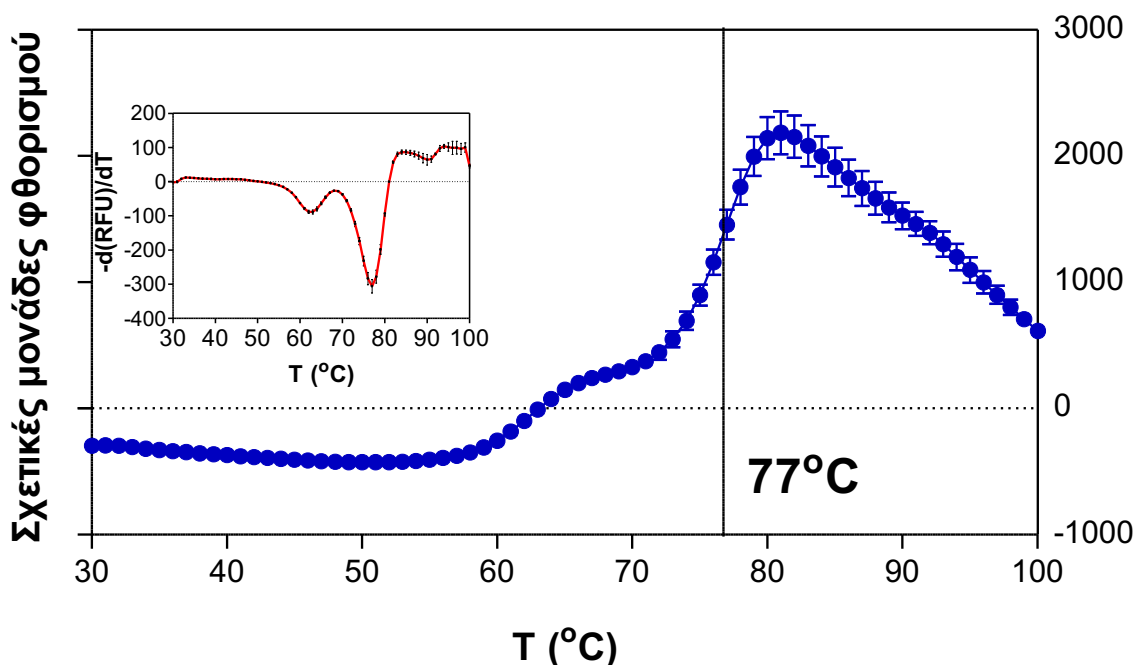
μεγαλύτερες των 75 °C το ένζυμο χάνει την ενεργότητα του μέσα στην πρώτη ώρα της επώασης (Εικόνα 2.10).



**Εικόνα 2.10: Μελέτη θερμοσταθερότητας της CelDZ1.** Η καταλυτική θερμοσταθερότητα της CelDZ1 αξιολογήθηκε μέσω μετρήσεων της σχετικής εναπομένουσας ενεργότητας στη βασική αντίδραση μετά από επώαση του ενζύμου στους 65, 70 και 75 °C έως και 24 ώρες. Ως 100% ορίστηκε η τιμή της εναπομένουσας ενεργότητας του ενζύμου που δεν είχε επωαστεί σε υψηλή θερμοκρασία. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

Η θερμοσταθερότητα των κυτταρινασών είναι μια σημαντική παράμετρος που καθορίζει εάν η βιομηχανική τους χρήση στο δεύτερο στάδιο επεξεργασίας της βιομάζας είναι οικονομικά συμφέρουσα, και άρα βιώσιμη, ή όχι. Τα πειράματα Διαφορικής Φθορισμομετρίας Σάρωσης (Differential Scanning Fluorimetry/ DSF) κατά τα οποία μετρήθηκε το ποσοστό του αποδιαταγμένου ενζύμου σε φάσμα θερμοκρασιών (30-100 °C) έδειξαν ότι το σημείο τήξης του ενζύμου ( $T_m$ ) είναι οι 77 °C (Εικόνα 2.11). Η μέθοδος βασίζεται στη λήψη μετρήσεων φθορισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες, ο οποίος προκύπτει από την πρόσδεση της χρωστικής Sypro Orange στις υδρόφοβες πρωτεϊνικές περιοχές που εκτίθενται στον διαλύτη λόγω θερμικής αποδιάταξης της δομής της πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα της θερμοσταθερότητας και της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της CelDZ1. Το γεγονός ότι από τα πειράματα

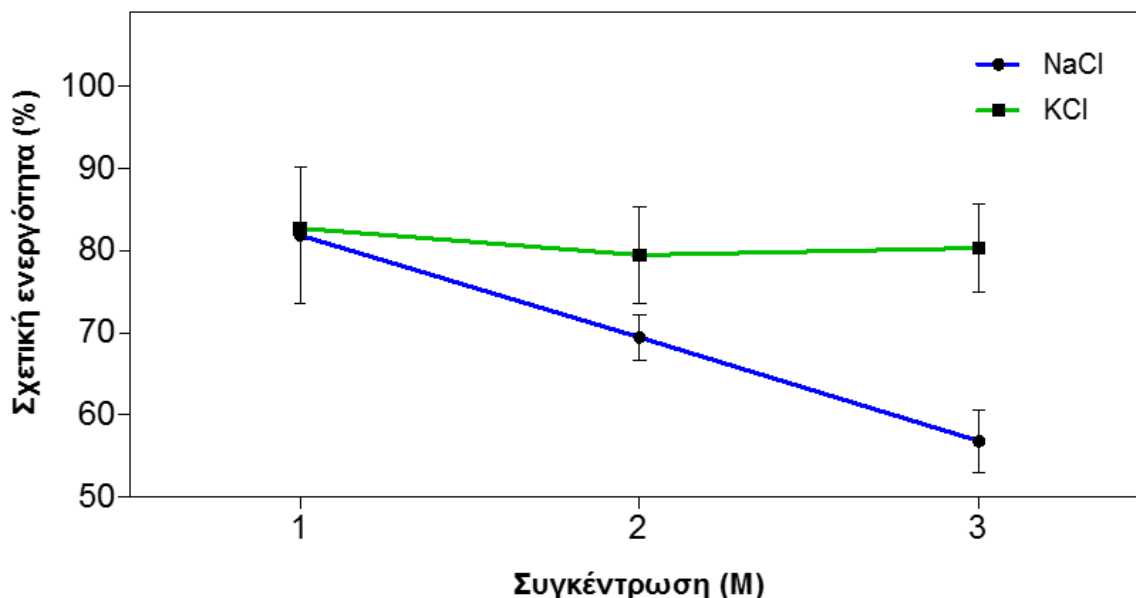
θερμοσταθερότητας φαίνεται ότι σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 65 °C η αποδιάταξη της πρωτεΐνης είναι αναντιστρεπτή, το υπολογισμένο  $T_m$  αντιστοιχεί στο σημείο όπου η μισή πρωτεΐνη έχει αποδιαταχθεί. Μια μεταβατική κορυφή που εμφανίζεται στους 62 °C, μπορεί να αποδοθεί στην αποδιάταξη της πρωτεϊνικής περιοχής CBM (carbohydrate binding module) που αναδιπλώνεται αυτόνομα (Εικόνα 2.11).



**Εικόνα 2.11: Εύρεση του σημείου τήξεως της CelDZ1 μέσω Διαφορικής Φθορισμομετρίας Σάρωσης.** Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση της χρωστικής SYPRO Orange, η οποία προσδένεται στις υδρόφοβες πρωτεϊνικές περιοχές που εκτίθενται στο διαλύτη λόγω θερμικής αποδιάταξης και δίνει φθορισμό. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

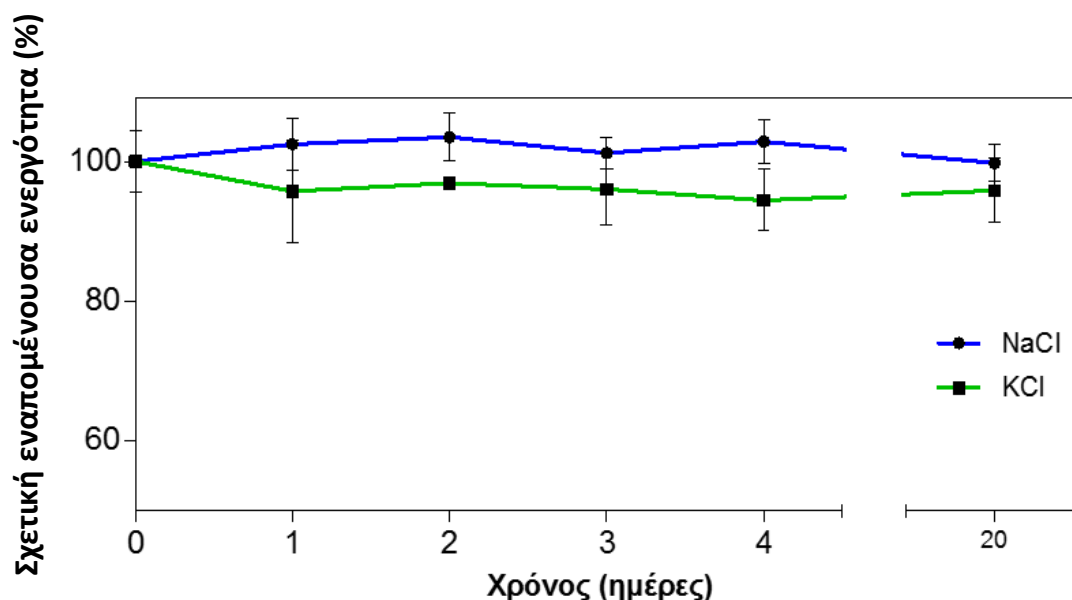
Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά της CelDZ1 είναι η εντυπωσιακή σταθερότητα της παρουσία αλάτων σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Η καταλυτική εναπομένουσα ενεργότητα του ενζύμου παραμένει πρακτικά ανεπηρέαστη μετά από επώαση πολλών ημερών σε πολύ πυκνά διαλύματα NaCl και KCl, ενώ παρουσιάζει υψηλή καταλυτική ικανότητα σε διαλύματα αλάτων συγκέντρωσης έως 3 M. (Εικόνα 2.12). Όπως φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα, το ένζυμο διατηρεί περίπου το 80% της συνολικής του ενεργότητας σε συγκεντρώσεις KCl μεταξύ 1 και 3 M, ενώ στην περίπτωση του NaCl στις ίδιες συγκεντρώσεις παρατηρείται μια βαθμιαία πτώση της ενεργότητας που ακολουθεί την αύξηση της συγκέντρωσης άλατος. Το γεγονός αυτό αποτυπώνει τη διαφοροποιημένη

επίδραση των δυο κατιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$  στη σταθερότητα του πρωτεϊνικού μορίου, κάτι που εξηγείται από την κρυσταλλική δομή του μορίου όπως θα δούμε παρακάτω.



**Εικόνα 2.12: Μελέτη αλοανθεκτικότητας της CelDZ1.** Η σχετική ενεργότητα της CelDZ1 μετρήθηκε στη βασική αντίδραση παρουσία συγκέντρωσης 1, 2 και 3 M αλάτων. Ως 100% ορίζεται η ενεργότητα του ενζύμου σε αντίδραση όπου δεν έχουν προστεθεί άλατα. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

Πέραν της αλοανθεκτικότητας, και η σταθερότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων είναι πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό για τα βιομηχανικά ένζυμα που προορίζονται για την προσθήκη τους σε μείγματα ενζύμων αποικοδόμηση της βιομάζας, μιας και στο πρώτο στάδιο της διεργασίας γίνεται επεξεργασία της κυτταρίνης με τη χρήση ισχυρών οξέων και βάσεων. Μετά την ολοκλήρωση αυτού του σταδίου, τα ισχυρά οξέα ή βάσεις εξουδετερώνονται, με αποτέλεσμα να προκύπτουν υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και στη συνέχεια προστίθεται το ενζυμικό μείγμα. (Klinke, Thomsen et al. 2004). Παρότι ένας μεγάλος αριθμός θερμοανθεκτικών κυτταρινασών είναι ανθεκτικές σε υψηλές αλατότητες, λίγες είναι σταθερές και καταλυτικά ενεργές σε αυτές και μπορούν να δράσουν ικανοποιητικά παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων αλάτων. Η CelDZ1 είναι ένα τέτοιο παράδειγμα ενζύμου παρότι δεν έχει απομονωθεί από περιβάλλον υψηλής αλατότητας.



**Εικόνα 2.13: Μελέτη αλостаθερότητας της CelDZ1.** Η μέτρηση της εναπομένουσας ενεργότητας της CelDZ1 έγινε στη βασική αντίδραση με χρήση ενζύμου μετά από επώαση σε 3 M NaCl και 4 M KCl έως και 20 ημέρες. Ως 100% ορίστηκε η ενεργότητα μη επωασμένου ενζύμου. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση μεταλλικών ιόντων, επιφανειοενεργών, οργανικών διαλυτών και άλλων αποδιατακτικών παραγόντων στην καταλυτική ενεργότητα της ενδογλουκανάσης CelDZ1. Σχετικά με τα μεταλλικά ιόντα, όταν τα άλατα  $\text{LiCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$  και  $\text{ZnCl}_2$  προστέθηκαν σε συγκέντρωση 1 mM στην ενζυμική αντίδραση, η καταλυτική ικανότητα της CelDZ1 δεν επηρεάστηκε, ενώ η προσθήκη  $\text{FeCl}_2$  προκάλεσε μικρή πτώση της σχετικής ενεργότητας της ενδογλουκανάσης. Με την προσθήκη  $\text{MnCl}_2$  στην ίδια συγκέντρωση, αυξήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου, κάτι που αρχικά ανέγειρε ερωτήματα για το εάν η CelDZ1 είναι ένα μεταλλοένζυμο, κάτι όμως που δεν επιβεβαιώθηκε από τη μελέτη της κρυσταλλικής της δομής, αλλά και από το γεγονός ότι το EDTA δεν περιορίσε την ενζυμική δραστηριότητα της. Η παρουσία μη ιονικών επιφανειοενεργών όπως τα Tween 20 και Tween 40 σε συγκέντρωση 1%, δεν επηρέασαν την ενεργότητα του ενζύμου, ενώ η προσθήκη Triton X-100 οδήγησε σε σημαντική μείωση της καταλυτικής του ικανότητας. Επίσης, με την προσθήκη του ανιονικού απορρυπαντικού SDS (Sodium dodecyl sulfate) στην ίδια συγκέντρωση, το ένζυμο διατήρησε το 20% της ενεργότητας του (Πίνακας 2.2). Περιέργως, η προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης προκάλεσε τον διπλασιασμό της ενζυμικής ενεργότητας. Αυτό το φαινόμενο έχει καταγραφεί πολλές φορές στη βιβλιογραφία για άλλες υδρολάσες και αποδίδεται συνήθως στην αναγωγική δράση της μερκαπτοαιθανόλης στους δισουλφιδικούς δεσμούς της πρωτεΐνης (Sá-Pereira,

Mesquita et al. 2002, Dutta, Sengupta et al. 2007, Silva, Guimarães et al. 2013). Στην περίπτωση όμως της CelDZ1, κάτι τέτοιο δε μπορεί να ισχύει αφού η πρωτεϊνική της αλληλουχία δεν περιέχει κυστεΐνες έτσι ώστε να είναι δυνατός ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών. Έτσι, η αύξηση της ενεργότητάς της παρουσία μερκαπτοαιθανόλης μπορεί να οφείλεται στην «προστατευτική» δράση της ουσίας κατά της οξειδωσης των αμινοξέων της μεθειονίνης (Caldwell, Luk et al. 1978).

**Πίνακας 2.2: Μελέτη της επίδρασης αποδιατακτικών παραγόντων στην ενεργότητα της CelDZ1**

Πρόσθετο	Συγκέντρωση	Σχετική ενεργότητα (%)
-	-	100 ± 1
K <sup>+</sup>	1 mM	98 ± 1
Mn <sup>2+</sup>	1 mM	175 ± 1
Ca <sup>2+</sup>	1 mM	107 ± 2
Zn <sup>2+</sup>	1 mM	91 ± 6
Li <sup>2+</sup>	1 mM	97 ± 1
Mg <sup>2+</sup>	1 mM	102 ± 2
Na <sup>+</sup>	1 mM	95 ± 4
Fe <sup>3+</sup>	1 mM	27 ± 1
Cu <sup>2+</sup>	1 mM	75 ± 1
EDTA	1% (w/v)	105 ± 6
β-Μερκαπτοαιθανόλη	1%(v/v)	229 ± 17
Triton X-100	1%(v/v)	64 ± 5
Tween 20	1%(v/v)	102 ± 8
Tween 40	1%(v/v)	102 ± 12
SDS	1%(w/v)	21 ± 1
Μεθανόλη	1%(v/v)	94 ± 1
Μεθανόλη	5%(v/v)	68 ± 6
Μεθανόλη	10 %(v/v)	23 ± 2
Αιθανόλη	1 %(v/v)	89 ± 4
Αιθανόλη	5%(v/v)	57 ± 5
Αιθανόλη	10%(v/v)	15 ± 1

Τέλος, η CelDZ1 βρέθηκε να είναι σταθερή παρουσία διαφόρων οργανικών διαλυτών. Με την προσθήκη στην αντίδραση αιθανόλης και μεθανόλης σε συγκέντρωση 1% (v/v) η ενεργότητα της ενδογλουκανάσης δεν επηρεάστηκε ενώ το ένζυμο διατήρησε σημαντικό ποσοστό της καταλυτικής του ικανότητας παρουσία συγκέντρωσης 5% των ίδιων διαλυτών. Σε υδατικά διαλύματα όπου περιέχονταν 10% των ίδιων αλκοολών, η CelDZ1 παρουσιάστηκε ως οριακά ενεργή (Πίνακας 2.2).

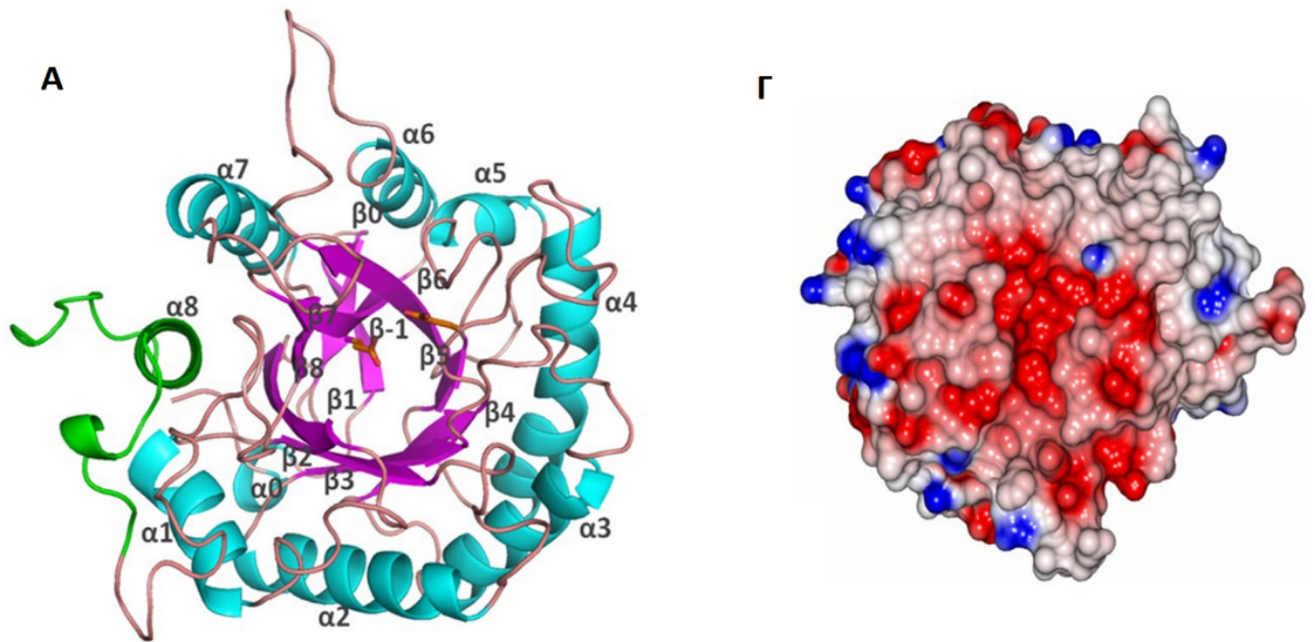


### 2.3.4 Δομικές μελέτες

Οι δομικές μελέτες της CelDZ1 πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο του Hotzyme από τους συνεργάτες μας Christopher Sayer, Michail N. Isupov και Jennifer A. Littlechild (Henry Wellcome Building for Biocatalysis, Biosciences, College of Life and Environmental Sciences, University of Exeter, United Kingdom).

Από τη μελέτη της δομής, παρατηρήθηκε ότι παρότι η ασύμμετρη πρωτεϊνική μονάδα της CelDZ1 αποτελείται από τέσσερα μονομερή, αυτά δε σχηματίζουν ολιγομερή στον κρύσταλλο (Krissinel and Henrick 2007). Αυτό επιβεβαιώνεται και από το ότι στα πειράματα ηλεκτροφόρησης κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες, η πρωτεΐνη εμφανίζεται στο αναμενόμενο για μονομερή πρωτεΐνη μέγεθος. Η CelDZ1 έχει τη χαρακτηριστική δομή (β/α)<sub>8</sub>-βαρελιού με δυο επιπλέον δυάδες β-φύλων, μία στο αμινοτελικό άκρο και μια να προηγείται της α<sub>6</sub> έλικας (Εικόνα 2.14 Α). Η έλικα α<sub>8</sub> στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης εμπλέκεται στο σχηματισμό της περιοχής πρόσδεσης των υδρογονανθράκων (CBM). Η αναδίπλωση της είναι παρόμοια με τη δομή άλλων μελών της οικογένειας 5-2 στην οποία ανήκει η CelDZ1, και περιλαμβάνει την καταλυτική μονάδα της αλκαλικής κυτταρινάσης CelK του *Bacillus sp. KSM-635* (κωδικός PDB 1G0C; 58% ομοιότητα αμινοξικής αλληλουχίας) (Shirai, Ishida et al. 2001) και της Cel5A κυτταρινάσης από τον *Bacillus agaradherans* (κωδικός PDB 1H5V; 44% ομοιότητα αμινοξικής αλληλουχίας) (Varrot, SchuËlein et al. 2001). Η Cel5A είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη με κάπως μικρότερη περιοχή CBM στο καρβοξυτελικό άκρο της. Πολλές δομές της Cel5A με προσδέτες και αναστολείς έχουν δημοσιευτεί έτσι ώστε να οδηγηθούμε στην αποσαφήνιση του καταλυτικού της μηχανισμού. Η κυτταρινάση CelK αποτελεί ένα μέρος μιας σύνθετης πρωτεϊνικής μονάδας που έχει προσαρμοστεί στην κατάλυση σε αλκαλικά περιβάλλοντα. Και για αυτή την πρωτεΐνη έχει δημοσιευτεί δομή με προσδέτη (κελλοβιόζη) (Shirai, Ishida et al. 2001).

Οι τρεις πρωτεΐνες, Cel5A, CelK και CelDZ1, διαφέρουν, με την πρώτη να είναι ένα υδατοδιαλυτό ένζυμο μειωμένο στα τελικά του άκρα, το δεύτερο να αποτελεί μέρος μιας σύνθετης πρωτεΐνης και το τρίτο να είναι εκ φύσεως ένα ένζυμο με μεμβρανικό άγκιστρο. Δομικά υπάρχουν τρεις περιοχές στις οποίες αυτά τα τρία ένζυμα διαφέρουν. Η πρώτη είναι μια μικρή περιοχή σύνδεσης της Cel5A μεταξύ των περιοχών β<sub>4</sub> και α<sub>4</sub> όπου στην CelDZ1 έχει αντικατασταθεί με ένα μεγαλύτερο βρόγχο, που αυξάνεται ακόμα περισσότερο σε μέγεθος στην περίπτωση της CelK.



**Εικόνα 2.14: Η τρισδιάστατη δομή της CelDZ1 (A)** Απεικόνιση της αναδίπλωσης της μονομερούς πρωτεΐνης όπως φαίνεται από την πλευρά του διαλύτη προς την κοιλότητα του ενεργού κέντρου που σχηματίζεται από β-πτυχωτά φύλλα του καρβοξυλικού άκρου και τη δομή (β/α)8-βαρελιού. Οι α-έλικες, τα β-φύλλα και οι βρόγχοι απεικονίζονται με γαλάζιο, μωβ και ροζ χρώμα αντίστοιχα. Η μονάδα πρόσδεσης των υδρογονανθράκων που περιέχει την έλικα α8 στο καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης απεικονίζεται με πράσινο χρώμα. Τα καταλυτικά αμινοξέα απεικονίζονται με πορτοκαλί ράβδους. **(B)** Υπέρθωση των μονομερών δομών της CelDZ1, CelK και Cel5a. Οι τρεις διαφορετικές ένθετες περιοχές έχουν τονιστεί με κόκκινο χρώμα για την CelDZ1, με μωβ για την CelK και με πράσινο για την Cel5a. Η προσδεμένη στη CelK κελλοβιοζή απεικονίζεται με μωβ ράβδους. **(Γ)** Το ηλεκτρονιακό νέφος της επιφάνειας της CelDZ1 γύρω από την κοιλότητα του ενεργού κέντρου όπως φαίνεται από την περιοχή του διαλύτη. Το θετικό φορτίο απεικονίζεται με μπλε χρώμα ενώ το αρνητικό με κόκκινο. Η εκτεταμένη κοιλότητα του ενεργού κέντρου που «διασχίζει» τη δομή από αριστερά προς τα δεξιά είναι αρνητικά φορτισμένη, μη ευνοώντας την πρόσδεση ιόντων άλατος κάτι που εξηγεί την υψηλή αλοανθεκτικότητα του ενζύμου. (Zarafeta, Kissas et al. 2016)

Στην αρχή της έλικας α6 της CelDZ1, υπάρχει μια μικρή περιοχή επιπλέον αμινοξέων παρόμοια με εκείνη της Cel5A, που σχηματίζει μια β-αναδίπλωση με κατεύθυνση προς τον διαλύτη, ενώ η CelK διαθέτει έναν πιο εκτεταμένο βρόγχο σε αυτή τη θέση που καλύπτει τις έλικες α5 και α6 από τον διαλύτη. Επίσης, μετά τα φύλα β8, η συνδετική περιοχή που εκτείνεται έως την περιοχή πρόσδεσης CBM είναι πιο εκτενής στην περίπτωση των CelK και CelDZ1, σε αντίθεση με την πιο «περιορισμένη» δομή της Cel5A. Και οι τρεις *cis*-πεπτιδικοί δεσμοί στην CelDZ1 είναι διατηρημένοι και στην CelK και μόνο ένας από τους δεσμούς, ο Trp262-Ser263 (αντίστοιχοι των Trp328-Ser329 στη CelDZ1), είναι διατηρημένος στην Cel5A. Αυτό το συγκεκριμένο Trp αμινοξύ σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το υπόστρωμα σακχάρου στην υποπεριοχή\_2. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το αμινοξύ *cis*-Pro306 βρίσκεται στον βρόγχο που σχηματίζουν τα αμινοξέα 298–306, την αντίστοιχη δηλαδή περιοχή που υποβάλλεται σε σημαντική αλλαγή της διαμόρφωσης της με την πρόσδεση του υποστρώματος στην υποπεριοχή\_1 και στην Cel5A. Παρόμοια με την CelK, αυτός ο βρόγχος υιοθετεί την «ενεργή» διαμόρφωση απουσία του προσδέτη με το αμινοξύ *cis*-Pro να διατηρεί αυτή τη δομή. Όλα τα καταλυτικά αμινοξέα είναι συντηρημένα με τα Glu192 και Glu294 να βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης στα φύλα β4 και β7 της διαμόρφωσης του «βαρελιού», και συμμετέχουν στο μηχανισμό της κατάλυσης. Το υπόστρωμα κελλοβιόζη που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση του σημείου πρόσδεσης, αναμένεται να προσδέεται στις υποπεριοχές \_2 και \_3 κατά παρόμοιο τρόπο που αυτό συμβαίνει στις δομές των CelK και Cel5A. Επίσης, το αμινοξύ Trp91 παρέχει σταθεροποιητική αλληλεπίδραση με τη μονάδα γλυκόζης στην υποπεριοχή\_3. Παρόμοια, το συντηρημένο αμινοξύ Trp237 αναμένεται να δημιουργεί παρόμοια αλληλεπίδραση με τη μονάδα γλυκόζης στην υποπεριοχή\_1. Τα συντηρημένα αμινοξέα Trp328, Lys333, Glu335, His87, Tyr118 και Glu121 αναμένεται να παρέχουν όλα δεσμούς υδρογόνου στη μονάδα της γλυκόζης του μορίου της κυτταρίνης κατά τον ίδιο τρόπο με εκείνον που φαίνεται στα ένζυμα CelK και Cel5A.

Παρότι και τα δύο ένζυμα CelK και Cel5A φέρουν την χαρακτηριστική υποπεριοχή\_2, όπου τα αμινοξέα Glu180 και His206 (αρίθμηση Cel5A) σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τη μονάδα της γλυκόζης, κανένα από αυτά τα αμινοξέα δεν είναι συντηρημένο στη δομή της CelDZ1, και έχουν αντικατασταθεί από τα αμινοξέα Thr239 και Ala265 αντίστοιχα. Αυτά τα δύο αμινοξέα της CelDZ1, δεν μπορούν να σχηματίσουν υποπεριοχή πρόσδεσης σακχάρων και δεν υπάρχουν άλλα προφανή γειτονικά αμινοξέα ικανά να δημιουργήσουν παρόμοιο σχηματισμό. Έτσι, η CelDZ1 φαίνεται να είναι η πρώτη δομή ενδογλουκανάσης από την οποία απουσιάζει η υποπεριοχή πρόσδεσης σακχάρων 2.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μόνο η πιο στενά συγγενική, μη χαρακτηρισμένη γλυκοζιδική υδρολάση της οικογένειας 5 από το θερμοφίλο αναερόβιο βακτήριο *Thermoanaerobacterium aotearoense* με αλληλουχική ομοιότητα 95% με τη CelDZ1, φαίνεται επίσης να μη διαθέτει το αμινοξικό ζεύγος Gln/His όπως έδειξε η ανάλυση της αλληλουχίας της. Όλες οι άλλες ομόλογες πρωτεΐνες της CelDZ1 στη βάση δεδομένων NCBI, συμπεριλαμβανομένης της αμέσως συγγενέστερης, μη χαρακτηρισμένης κυτταρινάσης από το βακτήριο *Caldanaerobacter subterraneus* MB4 (78% ομοιότητα), περιέχουν το αμινοξικό ζεύγος Gln/His που σχηματίζει την υποπεριοχή πρόσδεσης 2.

Η κυτταρινάση CelK έχει προσαρμοστεί εξελικτικά να είναι σταθερή και ενεργή σε αλκαλικό περιβάλλον ενώ η CelDZ1, παρότι έχει υψηλή αλληλουχική ομοιότητα με την CelK, είναι ανενεργή σε pH υψηλότερα του 8. Η σύγκριση της αμινοξικής σύστασης των δυο ενζύμων αποκάλυψε μια σημαντική αύξηση στις θετικά φορτισμένες αργινίνες και λυσίνες στην περίπτωση της CelDZ1 σε σύγκριση με την CelK (39 αντί 24 αντίστοιχα), γεγονός που οδηγεί σε υψηλότερη τιμή ισοηλεκτρικού σημείου (pI) που στην περίπτωση της CelDZ1 είναι 5,7 ενώ για την CelK είναι 4,5. Πολλά από αυτά τα επιπλέον θετικά φορτισμένα αμινοξέα που περιέχονται στην CelDZ1, βρίσκονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, ενώ τα επτά αμινοξικά ζεύγη Arg-Asp που ευθύνονται για τη προσαρμογή της CelK σε αλκαλικό περιβάλλον, είναι μειωμένα σε πέντε στην περίπτωση της CelDZ1. Ένα από τα αμινοξέα που συμμετέχουν στο φαινόμενο της προσαρμογής σε αλκαλικό περιβάλλον στην πρωτεΐνη CelK, φαίνεται να είναι και η His333, που βρίσκεται στη θέση της Leu155 στην CelDZ1 και στην Cel5A επίσης. Η αποπρωτονίωση αυτού του αμινοξέος καθιστά μη ευνοϊκές τις συνθήκες για την πρόσδεση μονάδας γλυκόζης στην υποπεριοχή\_1 σε pH 7 ή χαμηλότερο.

Όπως είπαμε και νωρίτερα, ενώ η ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων είναι πιο συνήθης για πολλά ένζυμα, η σταθερότητα παρουσία αυτών είναι μια πιο σπάνια ιδιότητα που είναι όμως ζωτικής σημασίας για πρωτεΐνες που από τη φύση τους δρουν εξωκυτταρικά και είναι εκτεθειμένες στο περιβάλλον, όπως η CelDZ1. Μια τέτοια ιδιότητα μπορεί να οφείλεται στη μειωμένη συγγένεια των ιόντων χλωρίου και νατρίου/καλίου με το ένζυμο. Ο υπολογισμός της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην επιφάνεια της CelDZ1 δείχνει ξεκάθαρα μια συνολική αρνητική φόρτιση στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου, γεγονός που δεν ευνοεί την πρόσδεση ιόντων χλωρίου (Εικόνα 2.14 Γ).

## 2.4 Σχολιασμός

Η πρώτη υδρολάση που απομονώθηκε και μελετήθηκε σε αυτή τη διατριβή είναι η ενδογλουκανάση CelDZ1 της οικογένειας GH5. Το ένζυμο αυτό είναι θερμοανθεκτικό και εξαιρετικά αλοσταθερό και εντοπίστηκε σε μεταγονιδιωματικό δείγμα εμπλουτισμού Ισλανδικής θερμοπηγής.

Η CelDZ1 βρέθηκε να είναι ισχυρά ενεργή απέναντι σε υδατοδιαλυτά υποστρώματα που περιέχουν  $\beta$ , -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς όπως η CMC και  $\beta$ -D-γλουκάνη ενώ δεν υδρολύει την ξυλάνη, μη υδατοδιαλυτά υποστρώματα και υποστρώματα που περιέχουν  $\beta$ , -1,3 γλυκοζιτικούς δεσμούς καθώς και την κελλοβιόζη κάτι που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μια ένδο-κυτταρινάση. Η CelDZ1 εμφανίζει τη μέγιστη σχετική ενεργότητα στο pH 5, χαρακτηριστικό που συναντάται και στην ομόλογη κυτταρινάση Cel5A από το θερμοφίλο αναερόβιο βακτήριο *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4. Αντιθέτως, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ομοιότερη σε αλληλουχία κυτταρινάση από τον βάκιλο *B. akibai* και η πλησιέστερη δομικά CelK κυτταρινάση από τον βάκιλο *Bacillus sp. KSM-635* είναι και οι δύο αλκαλόφιλες αφού παρουσιάζουν βέλτιστη ενεργότητα σε pH 9 και 9,5 αντίστοιχα. Η CelDZ1 εμφανίζει υψηλή υδρολυτική δράση σε μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος από τους 40 έως 80°C, με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 70°C.

Στις βέλτιστες συνθήκες (pH 5 και 70 °C) η υδρόλυση του υποστρώματος CMC από τη CelDZ1 ακολουθεί το κινητικό μοντέλο Michaelis-Menten με τιμές  $K_M$  και  $k_{cat}$   $6,1 \pm 0,9$   $mg \cdot ml^{-1}$  και  $46,3 s^{-1}$  αντίστοιχα. Η καταλυτική απόδοση  $k_{cat}/K_M$  του ενζύμου μετρήθηκε σε  $7,6 mg^{-1} \cdot ml \cdot s^{-1}$ , τιμή που είναι πολύ κοντά σε εκείνες άλλων ομόλογων κυτταρινασών όπως της CelE, της Cel5A και των μεταλλαγών της που προέκυψαν μέσω πρωτεϊνικής μηχανικής.

Το νέο ένζυμο παρουσιάζει επίσης πολύ καλή θερμοσταθερότητα έως τους 75 °C, με χρόνο ημιζωής πάνω από 4 ώρες στους 70 °C και σημείο τήξης τους 77 °C. Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά της CelDZ1, είναι η εξαιρετική αλοσταθερότητα της, αφού μετά από αρκετές ημέρες επώασης σε πολύ πυκνά διαλύματα αλάτων διατηρεί ανέπαφη την ενεργότητα της.

Παρουσία NaCl και KCl, η CelDZ1 δεν έχασε την υδρολυτική της ικανότητα, αφού λειτούργησε στο 80% της ενεργότητας της παρουσία KCl από 1 M έως 3 M, ενώ παρουσία NaCl στις ίδιες συγκεντρώσεις η ενεργότητα μετρήθηκε από 80% έως 60% αντίστοιχα.

Πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η CelDZ1 είναι αλοανθεκτική και όχι μόνο αλοσταθερή όπως πολλά πολυακραιόφιλα ένζυμα παρότι δεν απομονώθηκε από περιβάλλον υψηλής αλατότητας. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν την CelDZ1 έναν υποψήφιο βιοκαταλύτη για την προσθήκη του σε ενζυμικά μείγματα που προστίθενται στο δεύτερο στάδιο της επεξεργασίας της βιομάζας όπου εφαρμόζονται υψηλές θερμοκρασίες και παράλληλα υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων λόγω της εξουδετέρωσης των ισχυρών βάσεων που έχουν χρησιμοποιηθεί στο πρώτο στάδιο κατεργασίας.

Παράλληλα, η μελέτη της κρυσταλλικής δομής της νέας ενδογλουκανάσης έδωσε απαντήσεις για το φαινόμενο της υψηλής αλοανθεκτικότητας και αλοσταθερότητας του ενζύμου μέσω της παρατήρησης των στοιχείων της, και οδήγησε επίσης στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα ιδιαίτερο δομικά ένζυμο αφού από την αναδίπλωση του απουσιάζει η υπομονάδα πρόσδεσης\_2 των σακχάρων, κάτι που δεν ισχύει για τις υπόλοιπες γνωστές πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας (Zarafeta, Kissas et al. 2016).

### **3. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΠΟΥ ΕΓΚΑΙΝΙΑΖΕΙ ΜΙΑ ΝΕΑ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΑΠΟ ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ ΡΩΣΙΚΗΣ ΘΕΡΜΟΠΗΓΗΣ**

#### **3.1 Περίληψη**

Σε αυτή τη μελέτη περιγράφεται η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός μίας νέας θερμοανθεκτικής εστεράσης που προέκυψε μετά από βιοπληροφορική ανάλυση του μεταγονιδιώματος Ρωσικής θερμοπηγής. Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της εστεράσης EstDZ2 περιλαμβάνουν την ικανότητα της να υδρολύει πολύ αποτελεσματικά υποστρώματα με μικρού και μεσαίου μήκους ανθρακικές αλυσίδες σε θερμοκρασίες 25 με 60 °C και pH 7-8. Το νέο αυτό ένζυμο παρουσιάζει χρόνο ημιζωής έξι ώρες μετά την επώαση του στους 60 °C, και πολύ καλή σταθερότητα παρουσία οργανικών διαλυτών. Η φυλογενετική ανάλυση της αλληλουχίας του νέου ενζύμου έδειξε ότι η εστεράση EstDZ2 πιθανότατα ανήκει στο υποψήφιο βακτηριακό φύλο *Acetothermia* και εγκαινιάζει μια καινούργια οικογένεια λιπολυτικών ενζύμων, για την οποία έχουμε προτείνει την αρίθμηση XV. Χαρακτηριστικό της καινούργιας οικογένειας είναι η παρουσία του πενταπεπτιδίου GHSAG, που ακολουθεί το καταλυτικό μοτίβο GX SXG. Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της EstDZ2 με αυτές άλλων εστερασών της κοντινότερης οικογένειας καθώς και η μελέτη του μοντέλου της δομής της, μας οδήγησαν στην παρατήρηση ότι πιθανότατα, η EstDZ2 δε φέρει το μεγαλύτερο κομμάτι της πρωτεϊνικής περιοχής που δημιουργεί το υδρόφοβο «κάλυμα» που είναι χαρακτηριστικό της πλησιέστερης οικογένεια IV των λιπολυτικών ενζύμων.

#### **3.2 Εισαγωγή**

Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 1.1.4, τα λιπολυτικά ένζυμα (EC 3.1.1.x) έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον των βιοτεχνολόγων λόγω της δυνατότητας εφαρμογής τους σε βιομηχανικές και όχι μόνο βιομετατροπές. Η υπερ-οικογένεια των εστερασών περιλαμβάνει τις καρβόξυλ-εστεράσες (EC 3.1.1.1) και τις λιπάσες (EC 3.1.1.3) οι οποίες υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς που περιέχονται σε μικρά υδατοδιαλυτά και μεγάλα αδιάλυτα υποστρώματα αντίστοιχα. Κατά κανόνα, οι εστεράσες αυτές είναι καταλύτες σερίνης, και φέρουν στην αμινοξική τους αλληλουχία το χαρακτηριστικό πενταπεπτιδίο G-

X-S-X-G στο οποίο περιέχεται το καταλυτικό αμινοξύ της σερίνης. Το αμινοξύ αυτό σε συνδυασμό με ένα όξινο αμινοξύ (ασπαρτικό ή γλουταμινικό) και μια ιστιδίνη με την οποία το όξινο αμινοξύ είναι συνδεδεμένο με δεσμό υδρογόνου, σχηματίζουν την καταλυτική τριάδα η οποία είναι ισχυρά συντηρημένη στα λιπολυτικά ένζυμα. Επιπλέον, οι εστεράσες μοιράζονται κάποια δομικά χαρακτηριστικά όπως την χαρακτηριστική αναδίπλωση της  $\alpha/\beta$  υδρολάσης για την οποία μιλήσαμε στο Κεφάλαιο 1 καθώς και βιοχημικά χαρακτηριστικά όπως τη μη εξάρτηση τους από καταλυτικούς συμπαραγόντες.

Βάσει της ομολογίας της αμινοξικής τους αλληλουχίας και των βασικών βιοχημικών χαρακτηριστικών τους, οι βακτηριακές εστεράσες είχαν αρχικά ταξινομηθεί σε οκτώ διακριτές οικογένειες μέσω μιας δημοσίευσης- ορόσημο του 1999 από τους Arpingy και Jaeger (Arpigny and Jaeger 1999). Σύμφωνα με αυτή την ταξινόμηση, η Οικογένεια I αποτελείται από λιπάσες και περιλαμβάνει έξι υποοικογένειες. Οι υπόλοιπες επτά οικογένειες (Οικογένειες II-VIII) περιλαμβάνουν καρβοξυλεστεράσες. Παρά το γεγονός ότι η ταξινόμηση αυτή είχε προταθεί για τα βακτηριακά λιπολυτικά ένζυμα, περιλαμβάνει τόσο ευκαριωτικής όσο και αρχαϊκής προέλευσης πρωτεΐνες. Η πρόσφατη ανακάλυψη της όμοιας με λιπάση πόλυ-[(R)-3-υδροξυβουτυρική]-αποπολυμεράση PhaZ7 (Handrick, Reinhardt et al. 2001), της υπερθερμόφιλης εστεράσης EstD (Levisson, van der Oost et al. 2007), καθώς και ενός μεγάλου αριθμού μεταγονιδιωμικά ανακτημένων εστερασών (Lee, Lee et al. 2006, Kim, Oh et al. 2009, Montoro-García, Martínez-Martínez et al. 2009, Rao, Xue et al. 2011) έχουν διευρύνει την αρχική ταξινόμηση ώστε να περιλαμβάνει έξι νέες οικογένειες (Οικογένειες IX-XIV). Οι πιο πρόσφατες μελέτες όπου οδήγησαν στην ανακάλυψη πολλών νέων εστερασών μέσω μεταγονιδιωμικής ανάλυσης έχουν ορίσει επιπλέον οικογένειες οι οποίες όμως δεν ακολουθούν την αρχική ταξινόμηση. Παραδείγματα τέτοιων ενζύμων είναι η εστεράσες Est10 (Rodríguez, Loaces et al. 2015), EstWSD (Wang, Wang et al. 2013) και άλλες.

Όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1.1.4, οι εστεράσες είναι πολύτιμοι βιοκαταλύτες για τη βιομηχανία λόγω της υδρολυτικής φύσης τους έναντι ενός μεγάλου εύρους υποστρωμάτων καθώς και της υψηλής τοπο-, και στερεο- εκλεκτικότητάς τους (Brockerhoff 2012). Επίσης, πέρα από την εγγενή ικανότητα τους να υδρολύουν τα υποστρώματα σε υδατικό περιβάλλον, πολλές εστεράσες διαθέτουν την ικανότητα κατάλυσης της αντίστροφης αντίδρασης, δηλαδή της σύνθεσης, όταν βρεθούν σε μη συμβατικά (μη υδατικά) συστήματα. Αυτή τους η ιδιότητα τις καθιστά πολύ ελκυστικές για τη φαρμακοβιομηχανία, τη βιομηχανία των αρωμάτων και των προσθέτων γεύσης, του



βιοντίζελ, της κοσμετολογίας καθώς και άλλες τις οποίες είδαμε αναλυτικά στο Κεφάλαιο 1.1.4. Η σημαντικότητα τους για τις βιοδιεργασίες αντικατοπτρίζεται άλλωστε και στο γεγονός ότι αρκετές εταιρίες βιοτεχνολογίας όπως οι Fluka, Novozymes, Amano, Diversa, Roche Diagnostics, Thermogen και άλλες έχουν εισάγει στην αγορά εστεράσες σε μορφή εμπορικών σκευασμάτων.

Σήμερα, μια σημαντική τροχοπέδη στην ευρεία χρήση των εστερασών στη βιομηχανία είναι το ότι απαιτείται να λειτουργούν στις αντίξοες συνθήκες που απαντώνται στις διεργασίες, όπως υψηλές θερμοκρασίες, μεγάλη συγκέντρωση οργανικών διαλυτών και αλάτων, μετάλλων και επιφανειενεργών. Για το λόγο αυτό, η θερμοανθεκτικότητα και η γενικότερη σταθερότητα των εστερασών είναι προαπαιτούμενο για την εκβιομηχάνιση τους. Όμως, όπως συζητήθηκε και νωρίτερα, η δυσκολία της ανακάλυψης νέων θερμοανθεκτικών ενζύμων, έγκειται στο γεγονός ότι τα θερμοφιλά είδη τα οποία πιθανώς να τα εκφράζουν δεν μπορούν να καλλιεργηθούν με τις κλασσικές εργαστηριακές τεχνικές σε ποσοστό 99%. Η μεταγονιδιωματική ανάλυση δίνει τη λύση στο πρόβλημα, ξεπερνώντας αυτόν τον περιορισμό αφού αποτελεί μια μέθοδο ανάλυσης που δεν εξαρτάται από την καλλιέργεια των οργανισμών.

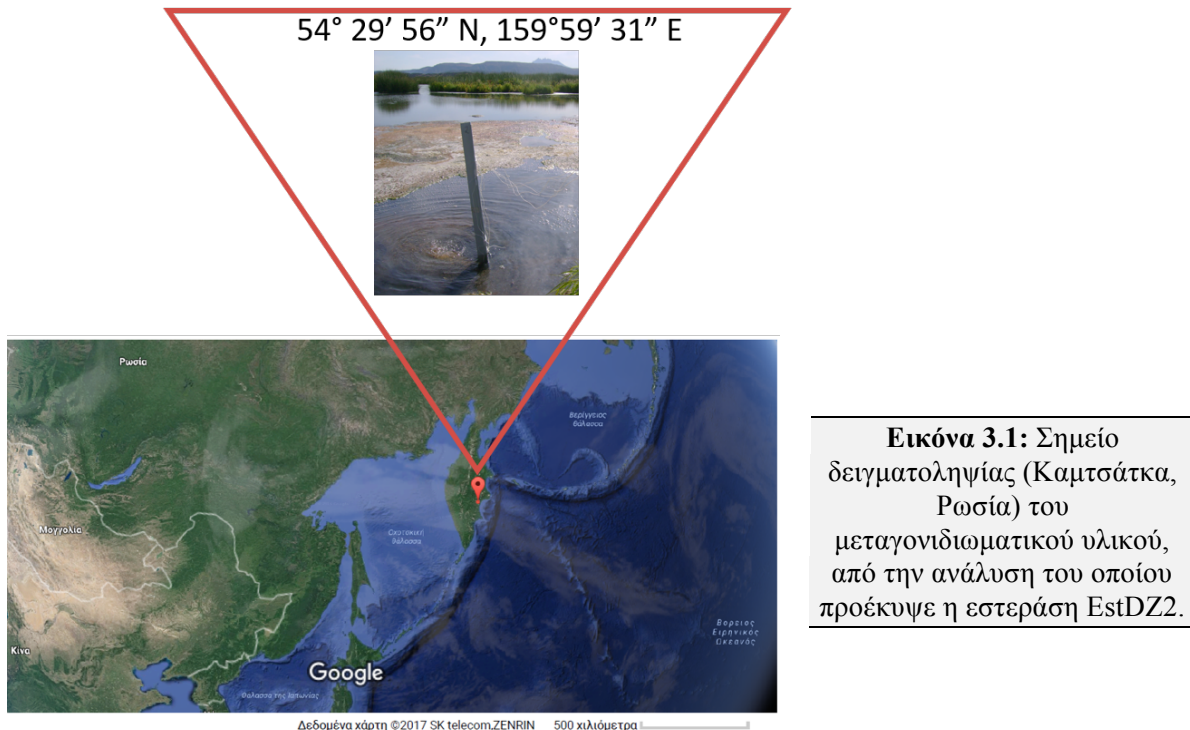
Σε αυτή τη μελέτη ανακαλύψαμε και χαρακτηρίσαμε μια νέα θερμοανθεκτική εστεράση που εγκαινιάζει μια νέα οικογένεια εστερασών. Η εστεράση EstDZ2 προέρχεται από το μεταγονιδίωμα Ρωσικής θερμοπηγής. Η φυλογενετική ανάλυση που οδήγησε στην ανακάλυψη της νέας οικογένειας, οι βιοχημικές ιδιότητες της νέας εστεράσης καθώς και το μοντέλο της τριτοταγούς δομής της μελετήθηκαν και περιγράφονται παρακάτω.

### **3.3 Αποτελέσματα**

#### **3.3.1 Δειγματοληψία μεταγονιδιωματικού υλικού και βιοπληροφορική ανάλυση**

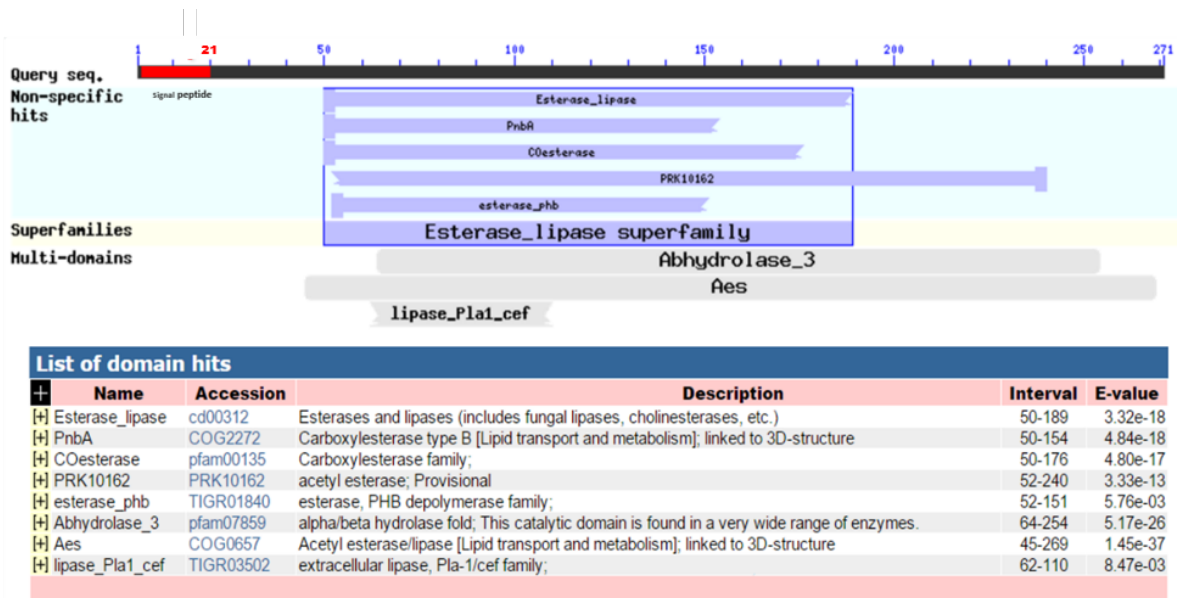
Το μεταγονιδιωματικό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη συλλέχθηκε από τη θερμοπηγή Sun Spring η οποία βρίσκεται στην Καμτσάτκα της Ρωσίας (συντεταγμένες: 54° 29' 56" N, 159° 59' 31" E) (Εικόνα 3.1) το Σεπτέμβριο του 2011 από τους συνεργάτες μας (Winogradsky Ινστιτούτο Μικροβιολογίας, Κέντρο Βιοτεχνολογικών Ερευνών της Ρωσικής Ακαδημίας, Μόσχα). Τη στιγμή της δειγματοληψίας η θερμοκρασία του σημείου ήταν 61-64 °C και το pH 5,8-6,0. Αναλυτική περιγραφή του σημείου δίνεται στην μελέτη από τους Menzel et al.(Menzel, Gudbergsdóttir et al. 2015). Η θερμοπηγή βρίσκεται σε γεωθερμικό έλος που αποτελείται από μικρές λίμνες που εκπέμπουν CO<sub>2</sub>. Ο βυθός είναι

καλυμμένος με παχύ στρώμα υπολειμμάτων φυτών θαμμένο σε λάσπη πλούσια σε οξειδία σιδήρου και περιβάλλεται από στοματολύτες. Στο πλούσιο σε οργανικό περιεχόμενο ενδιαίτημα, λαμβάνουν χώρα διαδικασίες αποσύνθεσης της οργανικής ύλης, κάτι που το καθιστά καλό υποψήφιο σημείο δειγματοληψίας για την ανακάλυψη υδρολυτικών ενζύμων. Η πρόσφατη προαναφερθείσα μελέτη του σημείου αποκάλυψε την παρουσία κατά πλειοψηφία βακτηριακών ειδών, το 40% των οποίων δε μπορούν να αποδοθούν σε κάποιο ήδη γνωστό φύλλο.



Το μεταγονιδιωματικό DNA που συλλέχθηκε από την προαναφερθείσα πηγή, αλληλοχρήθηκε μέσω της πλατφόρμας Roche/454 Titanium FLX από τους συνεργάτες μας (Sergey Gavrilov και Ilya Kublanov, Winogradsky Ινστιτούτο Μικροβιολογίας, Κέντρο Βιοτεχνολογικών Ερευνών της Ρωσικής Ακαδημίας, Μόσχα). Η βιοπληροφορική ομάδα του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ (Υποψήφιος Διδάκτορας: Ευθύμιος Λαδουκάκης) σε συνεργασία με το εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Βιοπληροφορικής του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Δρ. Αριστοτέλης Χατζηγιάννου) επεξεργάστηκαν τα αποτελέσματα της αλληλούχισης μέσω της πλατφόρμας ANASTASIA και τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που προέκυψαν αναλύθηκαν μέσω της βάσης δεδομένων του NCBI για συντηρημένες περιοχές (Marchler-Bauer A et al. (2015)) που σχετίζονται με εστερολυτική δράση (βλ. Κεφάλαιο 5.2.2). Μέσω αυτής της ανάλυσης επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη μία αλληλουχία που κωδικοποιούσε την

πρωτεΐνη EstDZ2a η οποία αποδόθηκε στην υπερ-οικογένεια των εστερασών/λιπασών (Εικόνα 3.2).



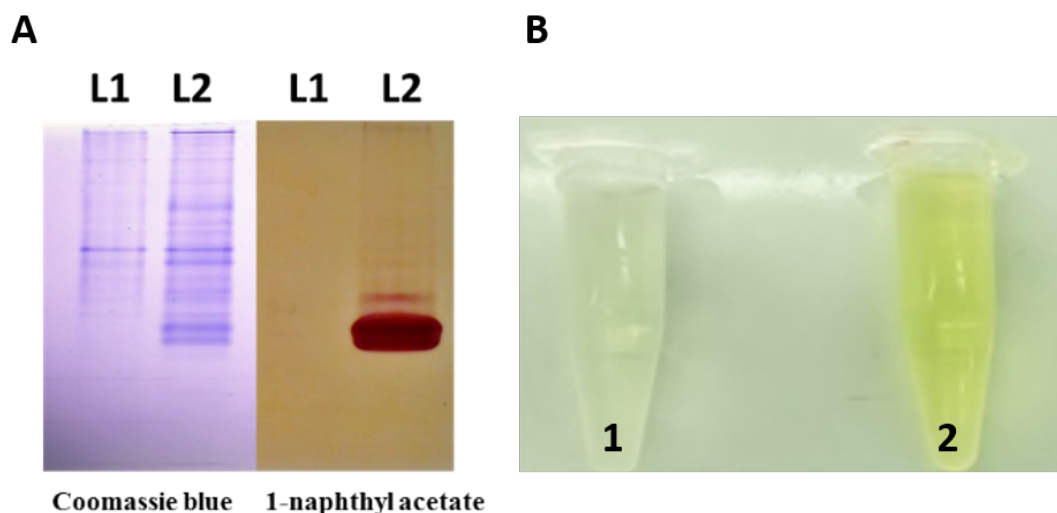
**Εικόνα 3.2: Εντοπισμός συντηρημένων πρωτεϊνικών περιοχών στην αλληλουχία της EstDZ2a.** Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της EstDZ2a μέσω του ενσωματωμένου στην πλατφόρμα BlastP εργαλείου αναζήτησης συντηρημένων πρωτεϊνικών περιοχών (conserved domains) της βάσης δεδομένων NCBI (Marchler-Bauer, Bo et al. 2016). Με κόκκινο χρώμα υποδεικνύεται η αλληλουχία του πεπτιδίου οδηγού (αμινοξέα 1-21). Στον πίνακα φαίνονται οι συντηρημένες πρωτεϊνικές περιοχές που ανιχνεύτηκαν, τα αμινοξέα της EstDZ2a στα οποία εκτείνονται (interval) καθώς και η πιθανότητα να πρόκειται για στατιστικό λάθος (E-value).

Η αλληλουχία της EstDZ2a αποτελείται από 272 αμινοξέα με θεωρητικό μοριακό βάρος 29,4 kDa. Ακόμα, ανιχνεύτηκαν δύο συντηρημένα μοτίβα: το GX SXG, το χαρακτηριστικό μοτίβο των εστερασών που περιέχει κατά πάσα πιθανότητα την καταλυτική σερίνη καθώς και το τετραπεπτίδιο HGGG το οποίο έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στο σχηματισμό της οξυανιοντικής οπής που είναι απαραίτητη για την κατάλυση (Wei, Contreras et al. 1999). Ανάλυση μέσω της πλατφόρμας Delta-BlastP αποκάλυψε ότι η μεγαλύτερη αλληλουχική ομολογία με γνωστές πρωτεΐνες είναι 23% (με 90% κάλυψη) με μια ίσο-πρένυλ-κυστεϊνική μεθυλεστεράση από το φυτό *Arabidopsis thaliana* (Tabata, Kaneko et al. 2000). Επίσης, όταν η πρωτεϊνική αλληλουχία της EstDZa αναλύθηκε στην πλατφόρμα SignalP (Petersen, Brunak et al. 2011) αποκαλύφθηκε η ύπαρξη ενός πεπτιδίου-οδηγού (signal sequence) που απαρτίζεται από τα πρώτα 21 αμινοξέα της αλληλουχίας (Εικόνα 3.2) και η παρουσία του οποίου υποδηλώνει ότι η EstDZ2 είναι μια φυσικά εκκρινόμενη ή προσαρτημένη εξωκυτταρικά πρωτεΐνη.

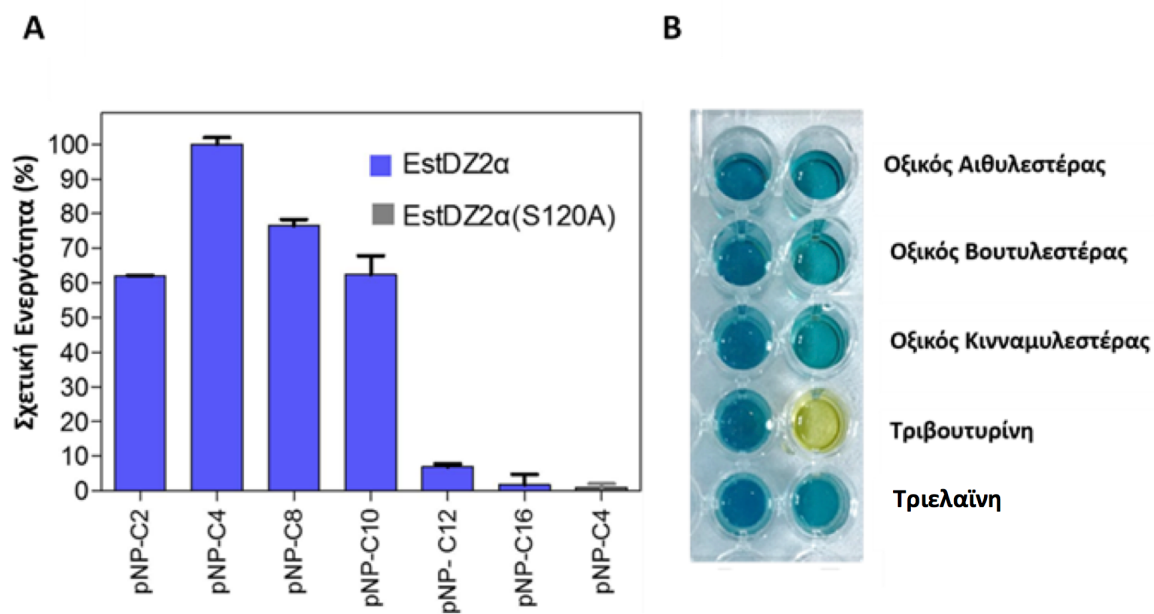
### 3.3.2 Απομόνωση, κλωνοποίηση και επιβεβαίωση της εστερολυτικής δράσης της EstDZ2

Η αλληλουχία-στόχος απομονώθηκε από το μεταγονιδιωματικό δείγμα μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών και κλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pET-28a(+). Η κλωνοποίηση αυτή έδωσε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-EstDZ2a. Επιδεκτικά κύτταρα BL21(DE3) μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες θρεπτικού υλικού στους 37 °C υπό ανάδευση έως ότου η οπτική απορρόφηση στα 600 nm να φτάσει στο 0,5. Στο σημείο αυτό, έγινε προσθήκη του IPTG επαγωγέα σε τελική συγκέντρωση 0,2 mM και η καλλιέργεια συνεχίστηκε για 4 ώρες. Μετά το πέρας της διαδικασίας της υπερέκφρασης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, και το κυτταρικό υλικό μετά από διάτρηση με υπερήχους χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση εστερολυτικής δράσης, χρησιμοποιώντας ως τυφλό δείγμα κυτταρικό υλικό από βακτήρια που έφεραν άδειο τον φορέα έκφρασης pET-28a(+) και είχαν υποβληθεί στη ίδια διαδικασία. Τα κυτταρικά υλικά χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση υδρόλυσης του συνθετικού υποστρώματος pNP-butyrate (εστέρας της παρανιτροφαινόλης με βουτυρικό οξύ) έτσι ώστε να διαπιστωθεί η εστερολυτική δράση της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης, όπως και έγινε. Η αντίδραση στην οποία χρησιμοποιήθηκε το κυτταρικό υλικό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης εμφάνισε στα πρώτα λεπτά μετά την ανάμειξη ένα έντονο κίτρινο χρώμα λόγω της απελευθέρωσης της παρανιτροφαινόλης από το υπόστρωμα λόγω της υδρόλυσης του εστερικού δεσμού, κάτι που δεν έγινε στην περίπτωση χρήσης του τυφλού δείγματος (Εικόνα 3.3). Παράλληλα, τα κυτταρικά κλάσματα μελετήθηκαν με ζυμογράφημα και χρήση 1-naphthyl acetate με χρώση Fast Red, όπου επιβεβαιώθηκε ότι η νέα πρωτεΐνη έχει εστερολυτική δράση αφού εμφάνισε μία καφεκόκκινη ζώνη όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

Στη συνέχεια το κυτταρικό υλικό των βακτηρίων που παρήγαγαν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη EstDZ2a χρησιμοποιήθηκε σε ενζυμικές αντιδράσεις με υπόστρωμα άλλους εστέρες παρανιτροφαινόλης με λιπαρά οξέα πέραν του βουτυρικού. Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν να εκτιμηθεί η εκλεκτικότητα του νέου ενζύμου και να επιλεγεί το υπόστρωμα με το οποίο θα συνεχίζονταν οι μελέτες.

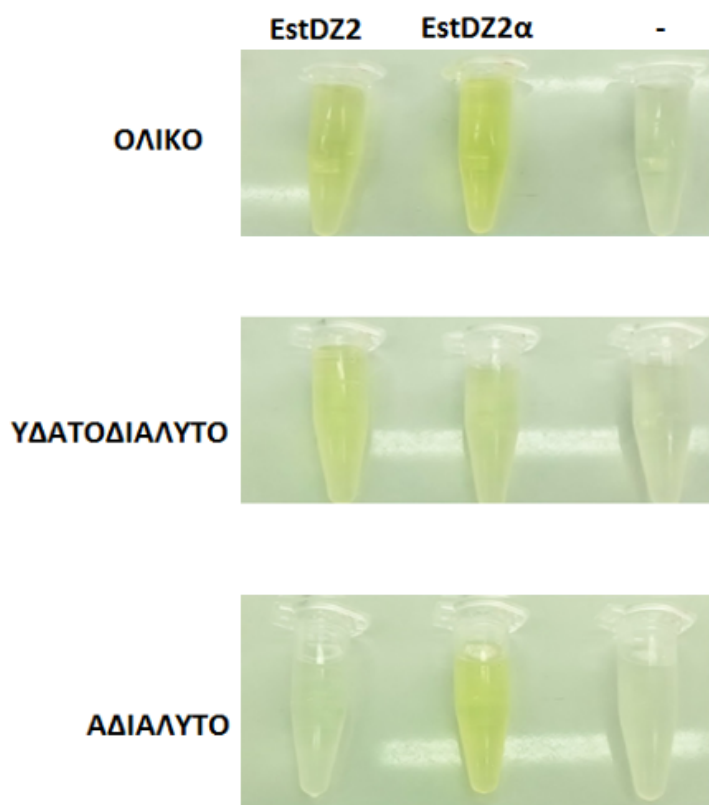


**Εικόνα 3.3:** Έλεγχος εστερολυτικής δράσης της πρωτεΐνης EstDZ2a. (A) Ηλεκτροφόρηση ακρυλαμιδίου και χρώση με Coomassie (αριστερά) και ζυμογράφημα (δεξιά) όπου φορτώθηκαν δείγματα κυτταρικού υλικού βακτηρίων που έφεραν άδειο πλασμίδιο (L1) και πλασμίδιο pET-EstDZ2a (L2) μετά από επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης. (B) Τα ίδια κυτταρικά υλικά χρησιμοποιήθηκαν σε ενζυμική αντίδραση με υποστρώμα το pNP-C4. Η εμφάνιση κίτρινου χρώματος υποδηλώνει την υδρόλυση του εστερικού δεσμού και κατ' επέκταση την απελευθέρωση του pNP.



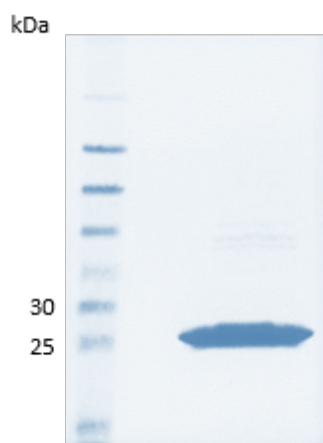
**Εικόνα 3.4:** Έλεγχος δραστηριότητας του κυτταρικού υλικού βακτηρίων που παράγουν την EstDZ2a έναντι (A) των συνθετικών υποστρωμάτων εστέρων παρανιτροφαινόλης με λιπαρά οξέα και (B) φυσικών υποστρωμάτων. Και στις δυο περιπτώσεις, ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε κυτταρικό υλικό βακτηρίων που έφεραν κενό πλασμίδιο pET-28a(+). Στο ένθετο A, ως EstDZ2a(S120A) αναφέρεται η μεταλλαγή της πρωτεΐνης EstDZ2a όπου έχει γίνει αντικατάσταση του καταλυτικού αμινοξέος της σερίνης με αλανίνη, όπως θα δούμε παρακάτω. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

Το πείραμα αυτό έδειξε ότι η εστεράση EstDZ2α παρουσιάζει εκλεκτικότητα σε υποστρώματα με μικρού προς μεσαίου μεγέθους ανθρακική αλυσίδα. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε ο παρανιτροφαινολικός εστέρας του βουτυρικού οξέος (pNP-C4) για τη συνέχιση των πειραμάτων. Να σημειωθεί εδώ, ότι η πραγματική εκλεκτικότητα του ενζύμου μελετήθηκε όπως φαίνεται παρακάτω με τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών της υδρόλυσης των υποστρωμάτων. Παράλληλα, μελετήθηκε η δράση της EstDZ2α έναντι διαφόρων φυσικών υποστρωμάτων. Το ένζυμο έδειξε να υδρολύει την τριβουτυρίνη στα πρώτα λεπτά της αντίδρασης ενώ τα υπόλοιπα υποστρώματα δεν έδωσαν θετικά φαινόμενο (Εικόνα 3.4 Β). Στη συνέχεια, λόγω της ανίχνευσης του πεπτιδίου οδηγού, μελετήθηκε η επίδραση του στον τρόπο ετερόλογης έκφρασης. Το συνολικό κυτταρικό υλικό (ολικό δείγμα) καθώς και τα επιμέρους κλάσματα (υδατοδιαλυτό και αδιάλυτο δείγμα) των κυττάρων που παρήγαγαν το ένζυμο με και χωρίς το πεπτιδίιο οδηγό μελετήθηκαν σε αντίδραση με pNP-C4. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5, η αφαίρεση του πεπτιδίου οδηγού, έδωσε περισσότερη ενεργή πρωτεΐνη στο υδατοδιαλυτό κλάσμα των κυττάρων.



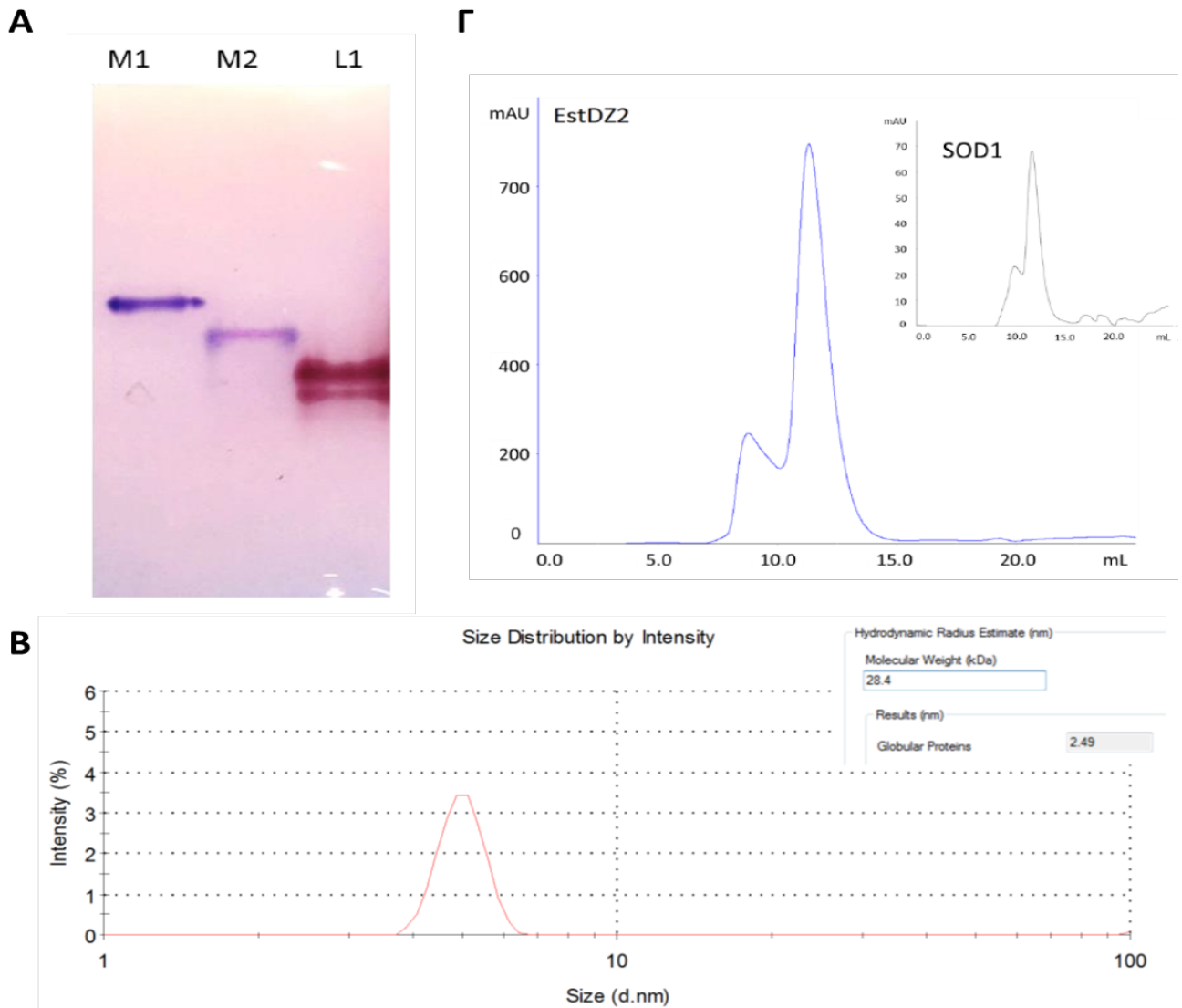
**Εικόνα 3.5: Έλεγχος επίδρασης της παρουσίας του πεπτιδίου οδηγό στην αποτελεσματικότητα της ετερόλογης έκφρασης της εστεράσης EstDZ2α.** Μετά την κλασμάτωση του κυτταρικού υλικού κανονικοποιημένων καλλιιεργειών, τα επιμέρους κλάσματα χρησιμοποιήθηκαν στη βασική αντίδραση σε ίσους όγκους και η εστερόλυση αξιολογήθηκε οπτικά. [(EstDZ2)=πρωτεΐνη στην οποία έχει αντικατασταθεί το πεπτιδίιο οδηγός με εξαπετίδιο ιστιδινών, (EstDZ2α)=πρωτεΐνη που φέρει το πετίδιο οδηγό, (-) = τυφλή αντίδραση που δεν περιέχει κυτταρικό υλικό]

Ο κλώνος του οποίου το πεπτίδιο-οδηγός αφαιρέθηκε και αντικαταστάθηκε από επίτοπο ιστιδινών, ονομάστηκε EstDZ2 και χρησιμοποιήθηκε για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό, αφού καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Ο καθαρισμός οδήγησε σε οπτικά ομοιογενές προϊόν στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (~29 kDa), όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6.



**Εικόνα 3.6:** Ανάλυση SDS-PAGE του προϊόντος καθαρισμού της EstDZ2. (Διάλυμα πρότυπων πρωτεϊνών: Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa), New England Biolabs Inc.)

Στη συνέχεια, για να μελετήσουμε το βαθμό ολιγομερισμού της νέας πρωτεΐνης, διεξήγαμε τα παρακάτω πειράματα. Αρχικά, μέσω ζυμογραφήματος και χρησιμοποιώντας απομονωμένη EstDZ2 πρωτεΐνη καθώς και πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους παρατηρήσαμε ότι η ζώνη που αντιστοιχεί στην ενεργή EstDZ2, το μονομερές της οποίας έχει θεωρητικό μοριακό βάρος 28,4 kDa, εμφανίζεται στη γέλη κάτω από τις πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 66,5 kDa και 32,5 kDa γεγονός που υποδηλώνει ότι η EstDZ2 είναι μονομερής πρωτεΐνη (Εικόνα 3.7 Α). Το ίδιο συμπέρασμα προέκυψε και μετά από πείραμα Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering- DLS) κατά το οποίο η ακτίνα του μορίου που ανιχνεύτηκε αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος σφαιρικής πρωτεϊνικής δομής 28,7 kDa, κάτι που είναι σε συμφωνία με το θεωρητικό μοριακό βάρος της μονομερούς EstDZ2 (28,4 kDa) (Εικόνα 3.7 Β). Τέλος, μετά από πειράματα Χρωματογραφίας Αποκλεισμού Μεγέθους (Size Exclusion Chromatography- SEC) της EstDZ2 και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase 1 - SOD1) η οποία έχει παρόμοιο μοριακό βάρος (32,5 kDa) παρατηρήσαμε ότι τα δυο χρωματογραφήματα παρουσιάζουν πανομοιότυπη εικόνα, γεγονός που επιβεβαιώνει την υπόθεσή μας ότι η EstDZ2 είναι ένα μονομερές πρωτεϊνικό μόριο (Εικόνα 3.7 Γ).



**Εικόνα 3.7. Μελέτη του βαθμού ολιγομερισμού της EstDZ2. (Α)** Γέλη ζυμογραφήματος η οποία υποβλήθηκε σε χρώση με Coomassie. M1: αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) (MW: 66,5 kDa) M2: Υπεροξειδική δισμουτάση Cu/Zn (SOD 1) (MW: 32,5 kDa) L1: Απομονωμένη EstDZ2 (εκτιμώμενο MW: 28,4 kDa). **(Β)** Μελέτη της απομονωμένης EstDZ2 μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Η ακτίνα του μορίου μετρήθηκε στα 4,98 nm, μέτρηση που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος σφαιρικής πρωτεϊνικής δομής 28,7 kDa, γεγονός που είναι σε συμφωνία με το εκτιμώμενο μοριακό βάρος της EstDZ2 (28,4 kDa). Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στο όργανο Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) το οποίο ήταν εξοπλισμένο με He-Ne λέιζερ (632,8 nm). Συνθήκες πειράματος: 25 °C, πρωτεϊνική συγκέντρωση 0.45 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 8. **(Γ)** Μελέτη Χρωματογραφίας Αποκλεισμού Μεγέθους (SEC) των πρωτεϊνών EstDZ2 και SOD1 (ένθετο). Το χρωματογράφημα της SOD1 (MW: 32,5 kDa) χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για την εκτίμηση του μοριακού βάρους της EstDZ2 (εκτιμώμενο MW: 28,4 kDa). Όπως φαίνεται στο γράφημα, η έκλυση της EstDZ2 από τη στήλη GE Superdex 75 10/300 GL έγινε με πανομοιότυπο τρόπο με εκείνον της SOD1 υπό τις ίδιες συνθήκες (ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM pH 8, 4 °C, ταχύτητα ροής: 0,5 mL/min)



### 3.3.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης EstDZ2

#### Μελέτη επίδρασης του pH και της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της EstDZ2

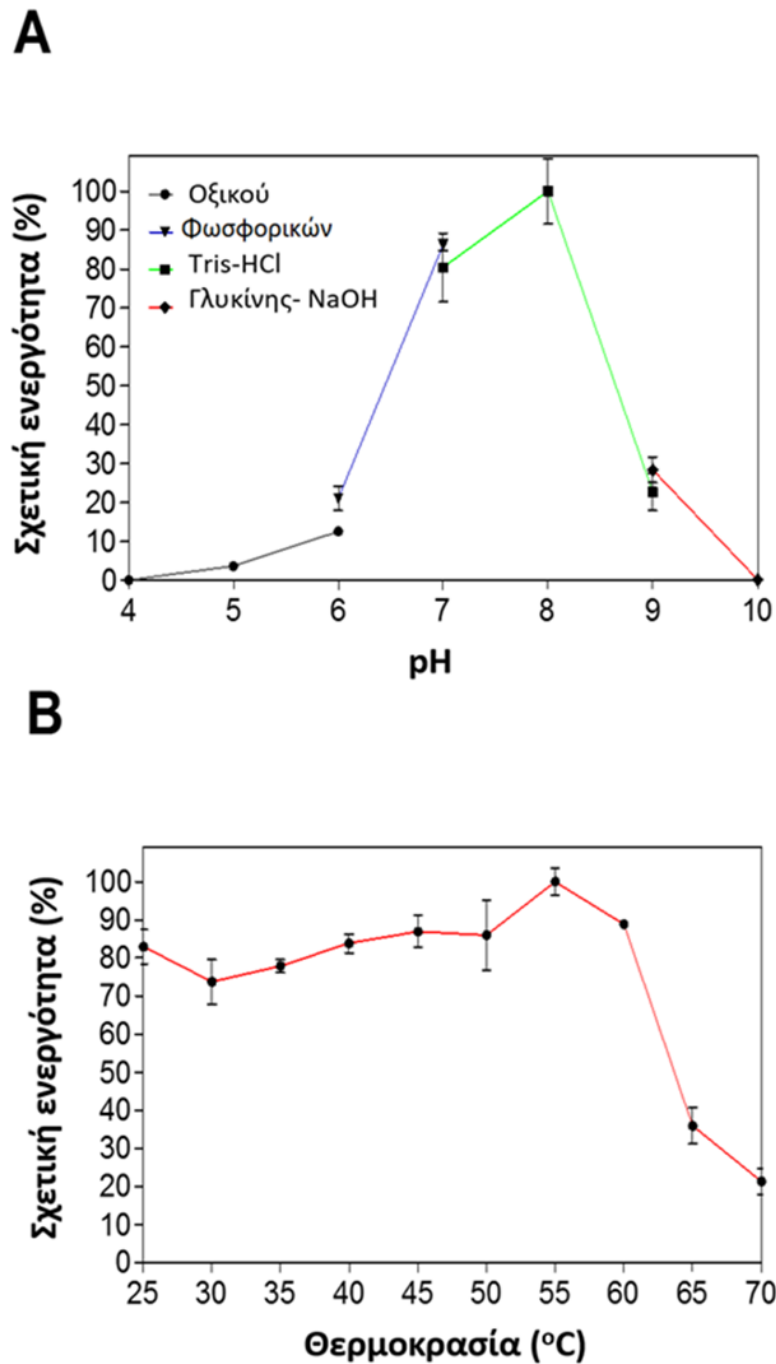
Για τη μελέτη της επίδρασης του pH στην ενεργότητα της EstDZ2, το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις με εύρος pH 4-10 και θερμοκρασία 40 °C. Η μέγιστη ενεργότητα παρατηρήθηκε για τιμές pH 7-8, ενώ για τιμές κάτω του 7 και πάνω του 8, η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται σημαντικά (Εικόνα 3.8 A). Η επίδραση της θερμοκρασίας μελετήθηκε μετά από μετρήσεις ενεργότητας του ενζύμου στο θερμοκρασιακό εύρος 25-70 °C και pH 8. Η βέλτιστη θερμοκρασία βρέθηκε να είναι οι 55 °C, με το ένζυμο παρουσιάζει σταθερά υψηλή ενεργότητα από τη θερμοκρασία των 25 °C έως και τους 60 °C (Εικόνα 3.8 B).

#### Προσδιορισμός καταλυτικών παραμέτρων

Με σκοπό να διερευνήσουμε την εστερολυτική δράση του νέου ενζύμου EstDZ2, πραγματοποιήσαμε τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών της αντίδρασης υδρόλυσης εστέρων της παρανιτροφαινόλης με διαφορετικά καρβοξυλικά οξέα. Η υδρόλυση των υποστρώματων που μελετήθηκαν ακολουθεί το κινητικό μοντέλο Michaelis-Menten και τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνονται στον Πίνακα 3.1. Το υπόστρωμα για το οποίο μετρήθηκε η μεγαλύτερη καταλυτική απόδοση ( $k_{cat}/K_M$ ) είναι ο εστέρας του βουτυρικού οξέος (pNP-C4), παρότι δεν παρουσίασε το μικρότερο  $K_M$ . Αυτό ίσως υποδηλώνει ότι το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου μοιάζει με μια μεγαλύτερη δομή.

**Πίνακας 3.1:** Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της αντίδρασης υδρόλυσης εστέρων της παρανιτροφαινόλης με διαφορετικά λιπαρά οξέα που καταλύεται από την εστεράση EstDZ2.

Εστέρας pNP	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ )
Οξικός (C2)	0,67± 0,15	36,8 ± 5,2	1.226	1.757
Βουτυρικός (C4)	0,32 ± 0,09	139,6 ± 13,3	4.653	14.375
Καπριλικός (C8)	0,20 ± 0,02	61,8 ± 3,3	2.060	10.437
Καπρικός (C10)	0,12 ± 0,01	28,1 ± 0,5	936	7.551



**Εικόνα 3.8: Μελέτη επίδρασης του pH και της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της EstDZ2.** (A) Η επίδραση του pH στην ενεργότητα του ενζύμου μετρήθηκε στη βασική αντίδραση στους 40 °C για 5 λεπτά, σε τιμές pH που κυμαίνονταν από 4 έως 10 με χρήση των ρυθμιστικών διαλυμάτων που φαίνονται στο διάγραμμα. (B) Η επίδραση της θερμοκρασίας στην εστερολυτική δράση του ενζύμου μετρήθηκε στη βασική αντίδραση σε θερμοκρασιακό εύρος 25 με 70 °C και pH 8. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

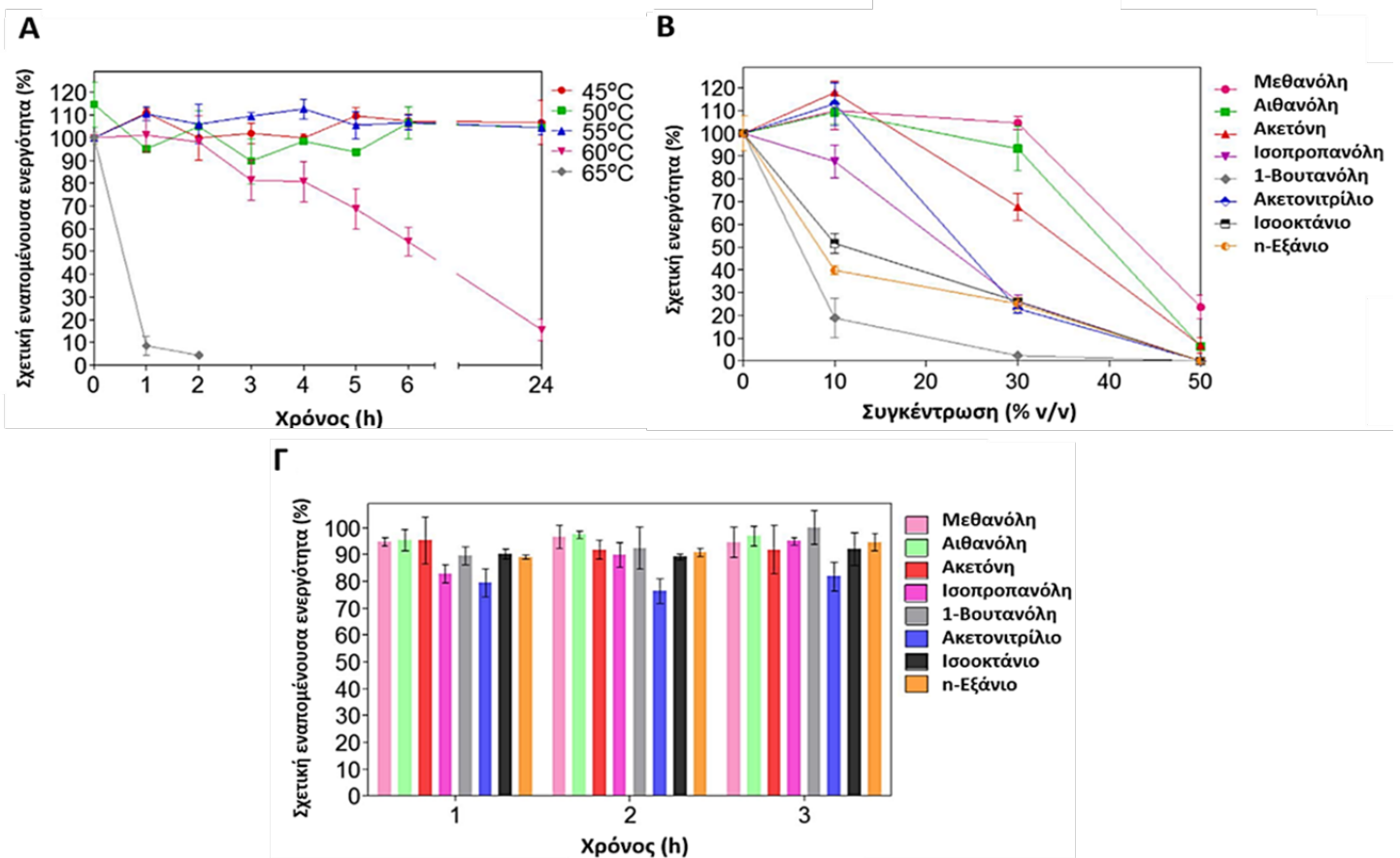
### Θερμοσταθερότητα και ανθεκτικότητα σε μεταλλικά ιόντα, επιφανειενεργά και οργανικούς διαλύτες

Για να μελετηθεί η θερμοσταθερότητα της EstDZ2, το ένζυμο επώαστηκε σε υψηλές θερμοκρασίες για παρατεταμένο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια μετρήθηκε η εναπομένουσα ενεργότητα του. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.9 Α, καμία σημαντική πτώση στην ενεργότητα του ενζύμου δεν παρατηρήθηκε μέχρι τους 55 °C, ακόμα και μετά από 24 ώρες επώασης. Όταν το ένζυμο εκτέθηκε στους 60 °C, διατήρησε πάνω από το 50 % της αρχικής του ενεργότητας μετά από τουλάχιστον 6 ώρες επώασης, ενώ στους 65 °C η EstDZ2 απενεργοποιήθηκε εντός της πρώτης ώρας επώασης.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ανθεκτικότητα του ενζύμου παρουσία διάφορων οργανικών διαλυτών. Η εστεράση EstDZ2 παρουσίασε ανθεκτικότητα παρουσία μεθανόλης, αιθανόλης και ακετόνης αφού διατήρησε υψηλά καταλυτικά επίπεδα όταν οι οργανικοί διαλύτες προστέθηκαν στην αντίδραση σε ποσοστό 30% (v/v) ή περισσότερο (Εικόνα 3.9 Β). Παρουσία ακετονιτριλίου και ισοπροπανόλης το ένζυμο παρουσίασε σχετικά ήπια ανθεκτικότητα ενώ παρουσία ισοοκτανίου, n-εξανίου και 1-βουτανόλης η καταλυτική ικανότητα της EstDZ2 άρχισε να επηρεάζεται αρνητικά από τη συγκέντρωση 10%. Μια σημαντική ιδιότητα που παρουσίασε το νέο ένζυμο είναι η σταθερότητα του όταν επωάζεται σε διαλύματα οργανικών διαλυτών συγκέντρωσης 50% (v/v), αφού διατήρησε σχεδόν όλη την αρχική ενεργότητα του ακόμα και μετά από 3 ώρες επώασης (Εικόνα 3.9 Γ).

Ακολούθως, μελετήθηκε η ανθεκτικότητα της EstDZ2 στην παρουσία μεταλλικών ιόντων, αναγωγικών παραγόντων και επιφανειενεργών. Παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη 1 mM Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Li<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, και Mg<sup>2+</sup> δεν επηρέασε την καταλυτική ικανότητα της εστεράσης, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2. Ανεπηρέαστη έμεινε η ενεργότητα του ενζύμου και μετά την προσθήκη EDTA σε συγκέντρωση 1 mM, γεγονός που υποδηλώνει ότι η καταλυτική δράση της εστεράσης πιθανώς δεν εξαρτάται από κάποιο μεταλλικό συμπάραγοντα. Η προσθήκη μη ιοντικών επιφανειενεργών ουσιών όπως το Tween 20 και το Tween 80 δεν είχε σημαντική επίδραση στην ενζυμική δράση της EstDZ2 όταν αυτές προστέθηκαν σε συγκέντρωση 1% (v/v). Αντιθέτως, η προσθήκη Triton X-100 στην ίδια συγκέντρωση επέφερε σημαντική πτώση στη σχετική ενεργότητα του ενζύμου ενώ η προσθήκη του ιοντικού επιφανειενεργού δωδέκυλο-θεικού νατρίου (SDS) προκάλεσε πλήρη απενεργοποίηση του καταλύτη. Παράλληλα, η προσθήκη 1 mM PMSF (phenylmethane sulfonyl fluoride) που δρα ως αναστολέας σερίνης, προκάλεσε σημαντική μείωση της ενεργότητας της εστεράσης, κάτι που βρίσκεται σε συμφωνία με την *in silico*

πρόβλεψη ότι η EstDZ2 είναι μια υδρολάση σερίνης (Bornscheuer 2002, Rashamuse, Ronneburg et al. 2009).



**Εικόνα 3.9:** Μελέτη θερμοσταθερότητας ανθεκτικότητας και σταθερότητας της EstDZ2 σε οργανικούς διαλύτες. (Α) Η θερμοσταθερότητα του ενζύμου αξιολογήθηκε με μετρήσεις της εναπομένουσας ενεργότητας του μετά από επώαση του στους 45, 50, 55, 60 και 65 °C μέχρι και 24 ώρες. (Β) Η ανθεκτικότητα της EstDZ2 σε διάφορους οργανικούς διαλύτες αξιολογήθηκε μέσω των μετρήσεων της ενεργότητας του ενζύμου στη βασική αντίδραση, παρουσία 10, 30 and 50% (v/v) του εκάστοτε διαλύτη. (Γ) Η σταθερότητα του ενζύμου στους οργανικούς διαλύτες αξιολογήθηκε μέσω μετρήσεων της εναπομένουσας ενεργότητας στη βασική αντίδραση ενζύμου που είχε επωαστεί σε 50% (v/v) διαλύματα οργανικών διαλυτών για 1-3 ώρες. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

**Πίνακας 3.2: Επίδραση αποδιατακτικών παραγόντων στην ενεργότητα της EstDZ2**

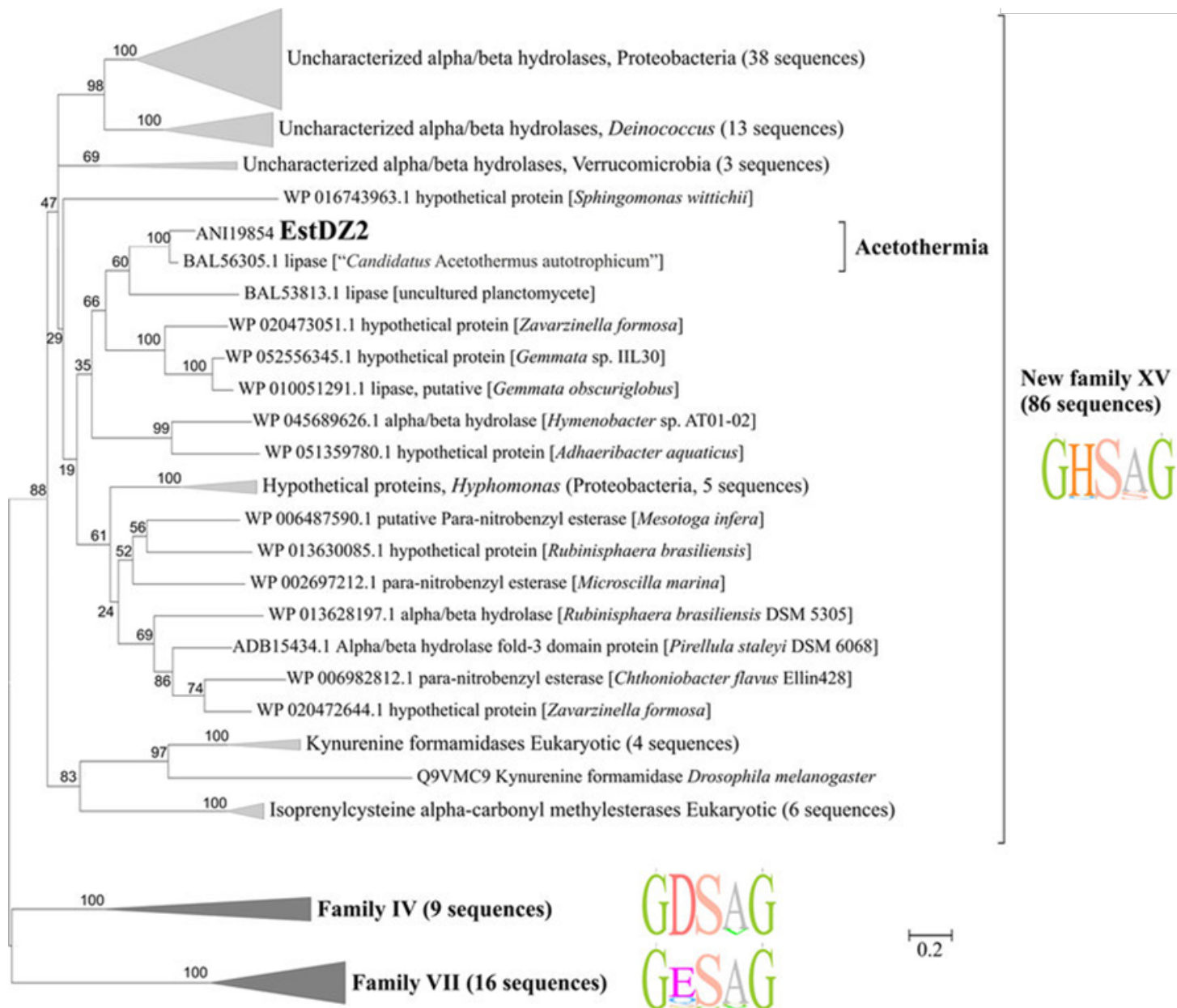
Πρόσθετο	Συγκέντρωση	Σχετική ενεργότητα (%)
-	-	100,0 ± 7,8
K <sup>+</sup>	1 mM	102,5 ± 9,2
Mn <sup>2+</sup>	1 mM	106,7 ± 5,0
Ca <sup>2+</sup>	1 mM	93,9 ± 5,4
Zn <sup>2+</sup>	1 mM	87,8 ± 1,3
Li <sup>2+</sup>	1 mM	112,9 ± 9,2
Mg <sup>2+</sup>	1 mM	104,6 ± 4,0
Na <sup>+</sup>	1 mM	99,3 ± 5,9
Fe <sup>3+</sup>	1 mM	95,9 ± 9,6
Cu <sup>2+</sup>	1 mM	109,8 ± 8,8
EDTA	1 mM	103,4 ± 7,0
PMSF	1 mM	31,0 ± 5,6
Triton X-100	1% (v/v)	55,0 ± 8,0
Tween 20	1%(v/v)	104,1 ± 9,1
Tween 80	1% (v/v)	95,9 ± 5,3
SDS	1% (w/v)	2,0 ± 1,4
Μεθανόλη	10% (v/v)	110,0 ± 8,4
Μεθανόλη	30% (v/v)	104,6 ± 2,8
Μεθανόλη	50% (v/v)	23,7 ± 5,3
Αιθανόλη	10% (v/v)	109,3 ± 5,0
Αιθανόλη	30% (v/v)	93,3 ± 9,7
Αιθανόλη	50% (v/v)	6,3 ± 0,8
Ακετόνη	10% (v/v)	118,7 ± 4,8
Ακετόνη	30% (v/v)	67,7 ± 6,0
Ακετόνη	50% (v/v)	6,8 ± 3,4
Ισοπροπανόλη	10% (v/v)	86,7 ± 7,1
Ακετόνη	30% (v/v)	26,3 ± 2,6
1-Βουτανόλη	10% (v/v)	18,9 ± 8,5
1-Βουτανόλη	30% (v/v)	2,3 ± 0,7
Ακετονιτρίλιο	10% (v/v)	113,3 ± 9,4
Ακετονιτρίλιο	30% (v/v)	23,0 ± 2,0
Ισοοκτάνιο	10% (v/v)	51,7 ± 4,4
Ισοοκτάνιο	30% (v/v)	26,1 ± 1,4
n-Εξάνιο	10% (v/v)	39,9 ± 1,9
n-Εξάνιο	30% (v/v)	25,1 ± 2,9

### 3.3.4 Φυλογενετική Ανάλυση

Με σκοπό να κατανοήσουμε την προέλευση και τη φύση του νέου ενζύμου, πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τους εταίρους μας (Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center for Biotechnology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation) φυλογενετική ανάλυση της αλληλουχίας της νέας πρωτεΐνης. Αναλυτική περιγραφή της μεθόδου ανάλυσης περιλαμβάνεται στη σχετική μας μελέτη (Zarafeta, Moschidi et al. 2016). Συνοπτικά, τα 100 πρώτα αποτελέσματα που προέκυψαν

από την ανάλυση ομοιότητας αλληλουχίας μέσω του εργαλείου BlastP στη βάση δεδομένων UniProt, χρησιμοποιήθηκαν για την εν λόγω ανάλυση. Όπως φαίνεται στο φυλογενετικό δέντρο της Εικόνας 3.10, η EstDZ2 μαζί με άλλες ομόλογες και μη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες σχηματίζουν έναν μεγάλο μήκους βραχίονα (κλάδο). Μεταξύ των αλληλουχιών που μαζί με την EstDZ2 σχηματίζουν αυτό τον κλάδο, σε εκείνες που έχουν βακτηριακή προέλευση δεν έχει αποδοθεί κάποια λειτουργία καθώς έχουν καταχωρηθεί ως υποθετικές εστεράσες/λιπάσες είτε ως  $\alpha/\beta$  υδρολάσες. Οι μόνες χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες αυτού του βραχίονα είναι ζωικής και φυτικής προέλευσης και περιλαμβάνουν μια ισο-πρένυλ-κυστεϊνική εστεράση από το φυτό *Arabidopsis thaliana* [Q94AS5.2] και δύο κυνουρινικές φορμαμιδάσες από τον ποντικό *Mus musculus* [Q8K4H1] και τη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster* [Q9VMC9.1]. Η παρουσία των κυνουρινικών φορμαμιδασών σε αυτό τον κλάδο δεν είναι παράδοξη, μιας και τα ένζυμα αυτά είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν περισσότερα κοινά χαρακτηριστικά με τις εστεράσες από ότι με τις αμιδάσες (Pabarcus and Casida 2002). Αυτό είναι εμφανές, τόσο σε επίπεδο αλληλουχίας, καθώς περιέχουν το χαρακτηριστικό πενταπεπτίδιο των εστερασών GX SXG όπως έχουμε αναφέρει νωρίτερα, όσο και σε επίπεδο αναδίπλωσης αφού είναι γνωστό το ότι υιοθετούν τη χαρακτηριστική  $\alpha/\beta$  αναδίπλωση των υδρολασών όπως και οι εστεράσες. (Han, Robinson et al. 2012). Ακόμα, κάποιες κυνουρινικές φορμαμιδάσες έχειδειχθεί ότι παρουσιάζουν και εστερολυτική δράση εκτός από αμιδολυτική (Pabarcus and Casida 2002). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πιο παρόμοια σε αλληλουχία πρωτεΐνη της EstDZ2 (ομοιότητα 82%, κάλυψη 99%) είναι μια μη χαρακτηρισμένη λιπάση από τον οργανισμό *Candidatus Acetothermus autotrophicus*, ένα μη καλλιεργήσιμο στέλεχος του φύλου Acetothermia (παλαιότερα γνωστού ως OP1), που θεωρείται ως μία από τις πιο πολυδιακλαδισμένες γενεαλογικές σειρές (Jumas-Bilak, Roudiere et al. 2009, Takami, Noguchi et al. 2012). Η EstDZ2 μαζί με την υποθετική λιπάση του υποψηφίου βακτηριακού φύλου Acetothermia βρίσκονται σε κλάδο όπου επικρατούν κυρίως πρωτεΐνες του βακτηριακού φύλου Planctomycetes, γεγονός που υποδηλώνει οριζόντια μεταβίβαση από Planctomycetes σε Acetothermia. Το βασικό χαρακτηριστικό των ομόλογων στην EstDZ2 αλληλουχιών είναι ότι φέρουν, με υψηλό βαθμό συντήρησης, το καταλυτικό μοτίβο GHSAG, που δεν συναντάται συχνά ως συντηρημένο σε άλλες γνωστές οικογένειες βακτηριακών λιπολυτικών ενζύμων.

Συνολικά, τα αποτελέσματά αυτά υποδηλώνουν ότι η EstDZ2 ανήκει σε μία νέα οικογένεια εστερολυτικών ενζύμων, για την οποία προτείνουμε την αρίθμηση XV. Από την ανάλυση προκύπτει ότι η πλησιέστερη γνωστή οικογένεια είναι η IV και σε μικρότερο βαθμό η VII.



**Εικόνα 3.10: Φυλογενετική ανάλυση της αλληλουχίας της *EstDZ2* και σχετικών αλληλουχιών.** Το φυλογενετικό δέντρο των οικογενειών XV (παρούσα μελέτη), IV και VII των λιπολυτικών ενζύμων όπως προέκυψε από την ανάλυση που περιγράφεται στο κεφάλαιο των Μεθόδων. Οι τιμές bootstrap εκφράζονται ως ποσοστό στις 100 επαναλήψεις και απεικονίζονται δίπλα στους κλάδους. Το δέντρο έχει σχεδιαστεί σε κλίμακα, με το μήκος των κλάδων να μετράται σε αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Τα λογότυπα που φαίνονται δίπλα στους κλάδους αντιστοιχούν στο υψηλά συντηρημένο μοτίβο GX SXG της κάθε οικογένειας. (Zarafeta, Moschidi et al. 2016)

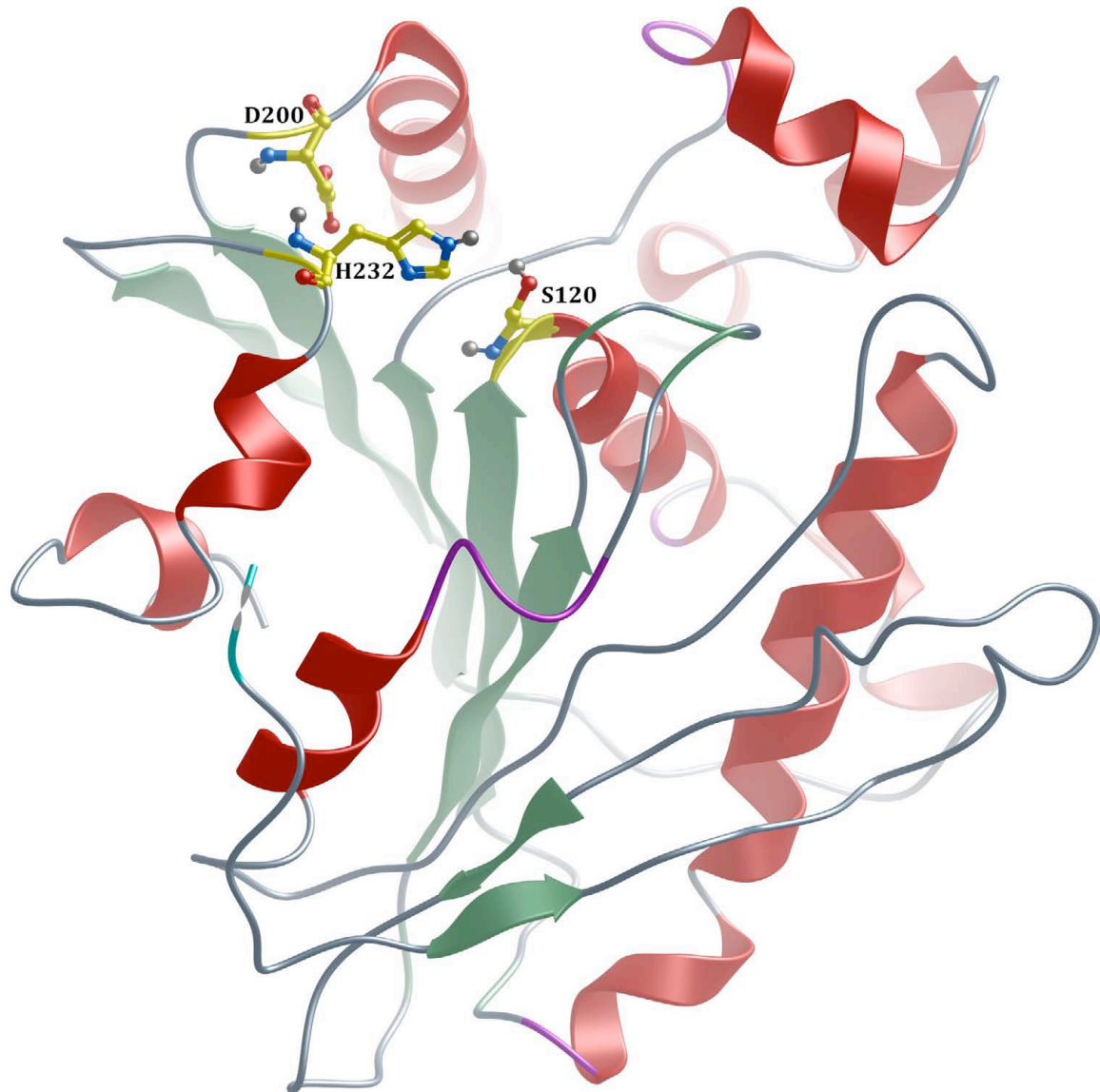
### 3.3.5 Μοντέλο τρισδιάστατης δομής EstDZ2

Το μοντέλο της δομής της EstDZ2 κατασκευάστηκε σε συνεργασία με τη Δρ. Ευαγγελία Χρυσίνα (Εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τα εργαλεία SWISS-MODEL M4T, InFOLD2, Phyre2 and I-TASSER που περιέχονται στην πλατφόρμα «Protein Model Portal» (Haas, Roth et al. 2013), με χρήση των βασικών παραμέτρων. Η σύγκριση των μοντέλων που προέκυψαν έδειξε ότι η αρχιτεκτονική του καταλυτικού τμήματος είναι υψηλά συντηρημένη και οι διαφορές μεταξύ των μοντέλων εντοπίζονται μόνο στις περιοχές των βρόγχων. Για το λόγο αυτό επιλέξαμε να παρουσιάσουμε ένα εκ των μοντέλων, αυτό που προέκυψε από την πλατφόρμα I-TASSER (Yang, Yan et al. 2015), καθώς είναι το πιο πρόσφατα ανεπτυγμένο εργαλείο. Οι δέκα πρώτες δομές που χρησιμοποιήθηκαν από το εργαλείο ως εκμαγείο για την «ύφανση» του μοντέλου της EstDZ2, περιλάμβαναν μικροβιακές εστεράσες καθώς και την κυνουρενική φορμαμιδάση από τη φρουτόμυγα *D. melanogaster* που αναφέραμε παραπάνω. Οι δομές αυτές εμφάνισαν αλληλουχική ομοιότητα σε ποσοστά που κυμαίνονται από 23 έως 34% με κάλυψη από 92 έως 96%. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε πλήρη συμφωνία με τη φυλογενετική ανάλυση που κατέταξε την EstDZ2 μεταξύ υποθετικών εστερασών και υπέδειξε την κυνουρενική φορμαμιδάση από τη *D. melanogaster* ως την πιο συγγενή πρωτεΐνη με χαρακτηρισμένη δράση.

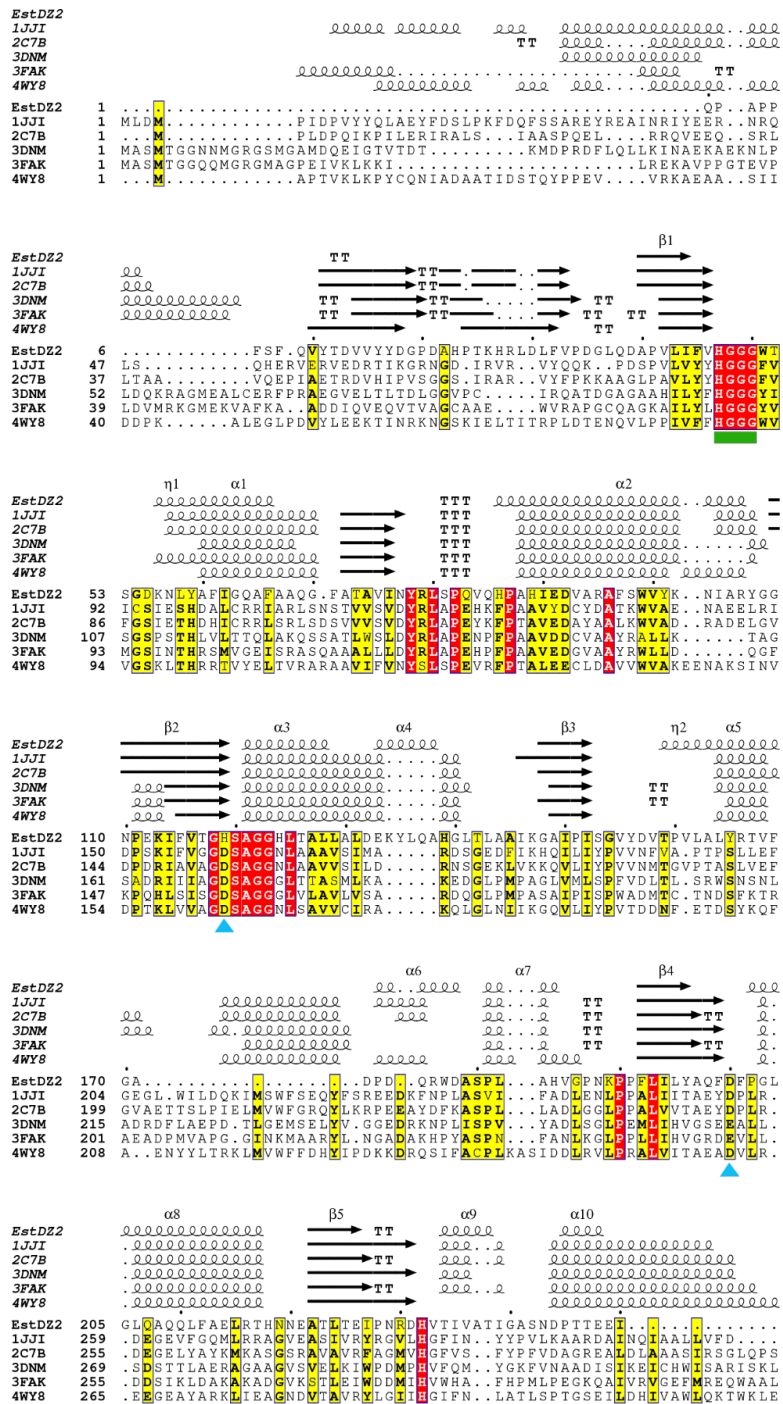
Το μοντέλο της δομής της EstDZ2 ακολουθεί τη χαρακτηριστική  $\alpha/\beta$  αναδίπλωση που υιοθετούν τα εστερολυτικά ένζυμα, σχηματίζοντας ένα ανεστραμμένο  $\beta$ - πτυχωτό φύλλο κλεισμένο ανάμεσα σε δυο στρώματα από έλικες (Εικόνα 3.11). Τα αμινοξέα Ser120, Asp200 και His232 προβλέφθηκε ότι αποτελούν την καταλυτική τριάδα και βρίσκονται σε κοντινή απόσταση όπως φαίνεται στο μοντέλο. Η θέση των ατόμων του κορμού τους φάνηκε να είναι απόλυτα συντηρημένη σε όλες τις δομές που χρησιμοποιήθηκαν ως βάση για την «ύφανση» του μοντέλου. Η σερίνη Ser120 περιέχεται στο μοτίβο GX SXG, κάτι που φαίνεται και στην πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών άλλων μελών της συγγενούς ομάδας IV με γνωστή δομή και της EstDZ2 (Εικόνα 3.12). Η συμμετοχή της Ser120 στον καταλυτικό μηχανισμό της EstDZ2 επιβεβαιώθηκε με τη μελέτη μεταλλαξιγένεσης που πραγματοποιήσαμε στο συγκεκριμένο αμινοξύ το οποίο αντικαταστήσαμε με αλανίνη, δημιουργώντας τον κλώνο EstDZ2(S120A), ο οποίος όταν χρησιμοποιήθηκε στη βασική αντίδραση, δεν έδωσε ενεργότητα (Εικόνα 3.4A). Το τετραπεπτίδιο HGGG (αμινοξέα 54–57 στην αρίθμηση της EstDZ2), που συμμετέχει στο σχηματισμό της οξυανιοντικής οπής, είναι επίσης απόλυτα συντηρημένο (Εικόνα 3.12). Άλλωστε, η απενεργοποίηση του



ενζύμου από την προσθήκη του PMSF (Πίνακας 3.2), το οποίο είναι αναστολέας πρωτεασών σερίνης, αποτελεί μια επιπλέον ένδειξη ότι η EstDZ2 είναι μια υδρολάση σερίνης.

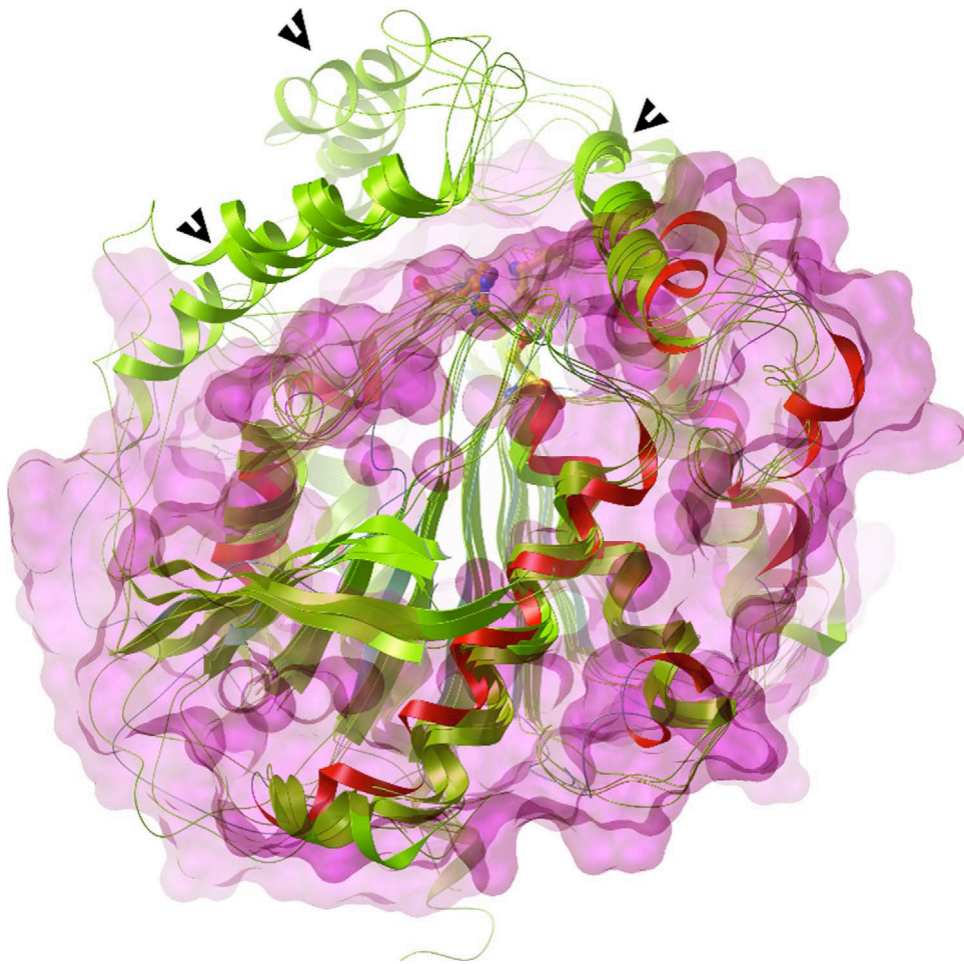


**Εικόνα 3.11:** Το μοντέλο της τρισδιάστατης δομής της EstDZ2. Τα αμινοξέα Ser120, Asp200 και His232, που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο απεικονίζονται ως ράβδοι και σφαίρες. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα MolSoft (MolSoft 2000). (Zarafeta, Moschidi et al. 2016)



**Εικόνα 3.12:** Πολλαπλή στοίχιση της αλληλουχίας της EstDZ2 με επιλεγμένες αλληλουχίες εστερασών που ανήκουν στην πλησιέστερη οικογένεια IV και έχουν γνωστή τρισδιάστατη δομή. Τα απολύτως συντηρημένα αμινοξέα είναι σημασμένα με κόκκινο χρώμα ενώ τα παρόμοια με κίτρινο. Το συντηρημένο τετραπεπίδιο HGGG (αμινοξέα 47–50) έχει σημασθεί με πράσινο παραλληλόγραμμο, ενώ τα καταλυτικά αμινοξέα (Ser120, Asp200, His232) με μπλε τρίγωνα. Στοιχεία της δευτεροταγούς δομής όλων των πρωτεϊνών έχουν επίσης στοιχηθεί πάνω από τις αλληλουχίες. Η στοίχιση δημιουργήθηκε με τα προγράμματα Clustal Omega (Sievers, Wilm et al. 2011) και ESPript (Gouet, Courcelle et al. 1999).

Με σκοπό να συγκρίνουμε τη δομή της EstDZ2 και των πιο κοντινών σε αυτή δομών βακτηριακών εστερασών που ανήκουν στις οικογένειες IV και XV, υπερθέσαμε τις δομές τους με το μοντέλο της EstDZ2 (Εικόνα 3.13). Σύμφωνα με συμπεράσματα προηγούμενων μελετών (Wei, Contreras et al. 1999, De Simone, Galdiero et al. 2000, Mandrich, Merone et al. 2005), οι δομές των εστερασών της οικογένειας IV χαρακτηρίζονται γενικά από την παρουσία πολλαπλών πεπτιδίων στο αμινο- και καρβόξυ- τελικό άκρο που σχηματίζουν δομικά συντηρημένες  $\alpha$ -έλικες διαφόρων μεγεθών δημιουργώντας ένα εκτεταμένο «κάλυμμα» πάνω από το ενεργό κέντρο (Εικόνα 3.11).



**Εικόνα 3.13:** Υπέρθωση του μοντέλου της δομής της EstDZ2 με δομές πέντε αντιπροσωπευτικών εστερασών της οικογένειας IV. Το μοντέλο της EstDZ2 φαίνεται με κόκκινο, ενώ οι δομές της οικογένειας IV με πράσινο. Οι πέντε δομές που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την υπέρθεση είναι οι ίδιες που περιλαμβάνονται και στην ανάλυση πολλαπλή στοίχισης όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.10. Η μοριακή επιφάνεια της EstDZ2 απεικονίζεται με μωβ χρώμα και δείχνει ότι το συντηρημένο στις υπόλοιπες εστεράσες «κάλυμμα» του ενεργού κέντρου (μαύρα βέλη) που σχηματίζεται από τις αμινοτελικές έλικες των άλλων πρωτεϊνών, απουσιάζει από το μοντέλο της δομής της EstDZ2. Μόνο ένα μικρό κομμάτι του καρβοξυλικού άκρου της EstDZ2 συμμετέχει στο σχηματισμό τμήματος αυτού.

Η δομή αυτή είναι χαρακτηριστική μεταξύ των μελών της οικογένειας IV, δρα ως ασπίδα στο ενεργό κέντρο πολλών εστερολυτικών ενζύμων και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλά λειτουργικά χαρακτηριστικά των εστερασών της οικογένειας IV, όπως ενεργότητα, εκλεκτικότητα υποστρώματος, θερμοσταθερότητα κ.α. (De Simone, Galdiero et al. 2000). Αντιθέτως, τα πεπτίδια αυτά φαίνονται να απουσιάζουν από το αμινοτελικό άκρο της αλληλουχίας της EstDZ2 ενώ μέρος αυτών υπάρχει στο καρβοξυλικό άκρο, προσφέροντας μια άλλου τύπου κάλυψη στο ενεργό κέντρο σε σύγκριση με αυτή των υπολοίπων εστερασών της οικογένειας IV (Εικόνα 3.12 και 3.13). Αυτή η χαρακτηριστική διαφορά που εντοπίζεται στο περιβάλλον του ενεργού κέντρο του μοντέλου της EstDZ2, αποτυπώνεται σχηματικά στη Εικόνα 3.13, όπου έχουν υπερτεθεί γνωστές δομές της οικογένειας IV των εστερασών (πράσινη απεικόνιση) με το μοντέλο της EstDZ2 (κόκκινη απεικόνιση), και υποδηλώνει ότι η EstDZ2 μπορεί να διαφέρει από τα ένζυμα της πιο κοντινής φυλογενετικά οικογενείας, τόσο σε επίπεδο αλληλουχίας όσο και σε επίπεδο δομής.

### 3.4 Σχολιασμός

Η EstDZ2 βρέθηκε να είναι ικανοποιητικά θερμοσταθερή, με χρόνο ημιζωής πάνω από έξι ώρες στους 60 °C. Παράλληλα παρουσίασε εξαιρετική σταθερότητα έναντι υψηλών συγκεντρώσεων οργανικών διαλυτών, αφού συγκριτικά με την πρόσφατα ανακαλυφθείσα εστεράση EstOF456 (Rao, Xue et al. 2013), η EstDZ2 επέδειξε μεγαλύτερη σταθερότητα σε όλους τους κοινούς διαλύτες στους οποίους μελετήθηκαν. Το ίδιο ισχύει και για τη σύγκριση με τις πρόσφατα μελετηθείσες εστεράσες Pf\_Est από το ακραιόφιλο αρχαιοβακτήριο *Pyrococcus furiosus* (Mandelli, Gonçalves et al. 2016) και EstLiu από το θαλάσσιο βακτήριο *Zunongwangia profunda* (Rahman, Culsum et al. 2016) όπου η EstDZ2 είναι πιο σταθερή παρουσία μεθανόλης, αιθανόλης και ισοπροπανόλης. Συγκεκριμένα, ενώ η ενεργότητα της EstDZ2 παρέμεινε ποιοτικά ανεπηρέαστη σε διαλύματα 50% των παραπάνω διαλυτών για πάνω από τρεις ώρες, η έκθεση της Pf\_Est στις ίδιες συνθήκες προκάλεσε την απώλεια της μισής ενεργότητας της μόλις σε μισή ώρα επώασης. Παρομοίως, όταν η EstLiu επώαστηκε σε παρόμοιες συνθήκες, το 40% έως 80% της ενεργότητας της χάθηκε μέσα στα πρώτα σαράντα λεπτά της επώασης.

Η σύγκριση της EstDZ2 με άλλα εστερολυτικά ένζυμα υψηλής βιοτεχνολογικής σημασίας έδειξε ότι το καταλυτικό της προφίλ προσομοιάζει αυτό του λιπολυτικού

ενζύμου-ορόσημο Novozym 435, όπως αυτό καταγράφεται στη βάση δεδομένων BRENDA (Schomburg, Chang et al. 2004). Η εστεράση Novozym 435, όπως και η EstDZ2 έχουν ως βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 50 °C και διατηρούν υψηλά επίπεδα ενεργότητας στο θερμοκρασιακό εύρος 40-70°C και σε pH από 7 έως 9. Παράλληλα, η τριβουτυρίνη αναφέρεται ως το φυσικό υπόστρωμα της Novozym435, κάτι που όπως είδαμε νωρίτερα ισχύει και για την EstDZ2. Επίσης, η EstDZ2 διατηρεί υψηλά επίπεδα ενεργότητας σε διαλύματα υψηλών συγκεντρώσεων οργανικών διαλυτών, κάτι που ισχύει επίσης και για τη Novozym435 η οποία έχει χρησιμοποιηθεί πολλές φορές σε ενζυμικές αντιδράσεις μη συμβατικής βιοκατάλυσης (Morrone, Nicolosi et al. 1995, Danieli, Luisetti et al. 1997, Du, Xu et al. 2004).

Ίσως το πιο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της EstDZ2 είναι η φυλογενετική της κατάταξη, μέσω της οποίας η EstDZ2 φαίνεται να εγκαινιάζει μια νέα οικογένεια λιπολυτικών ενζύμων την οποία και ονομάσαμε οικογένεια XV. Χαρακτηριστικό της νέας οικογένειας είναι η ύπαρξη του πεπτιδίου GHSAG στο οποίο περιέχεται η καταλυτική σερίνη και το οποίο δεν έχει έως σήμερα αποδοθεί σε κάποια άλλη οικογένεια λιπολυτικών ενζύμων (Rao, Xue et al. 2011) (Πίνακας 3.3). Η συγγενέστερη οικογένεια της XV είναι η IV, όπου το αμινοξύ His (ιστιδίνη) του καταλυτικού μοτίβου έχει αντικατασταθεί με το αμινοξύ Asp (ασπαρτικό οξύ) σχηματίζοντας το πεπτίδιο GDSAG.

Η πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών αλλά και η υπέρθεση των δομών της EstDZ2 και άλλων εστερασών της οικογένειας IV, έδειξαν ότι το νέο ένζυμο υπολείπεται ενός μεγάλου πρωτεϊνικού κομματιού, γνωστού ως «κάλυμμα», των λιπολυτικών ενζύμων, το οποίο υπάρχει στις εστεράσες της οικογένειας IV (Wei, Contreras et al. 1999, Mandrich, Merone et al. 2005, Byun, Rhee et al. 2007, Yang, Qin et al. 2015). Αυτή η παρατήρηση ενισχύεται από το γεγονός ότι το PMSF προκάλεσε την απενεργοποίηση του ενζύμου, κάτι που συνήθως δε συμβαίνει με το ένζυμο των οποίων το ενεργό κέντρο προστατεύεται από την ύπαρξη του «καπακιού» (Das, Bellizzi et al. 2000, De Simone, Menchise et al. 2001, Peng, Zhang et al. 2011). Παρόμοια με την EstDZ2, και άλλα ένζυμα που φέρουν «μειωμένη» αυτή τη δομή έχουν μελετηθεί, όπως μια λιπάση από τον στρεπτομύκητα *Streptomyces exfoliates* (Wei, Swenson et al. 1998) και δύο εστεράσες από τους οργανισμούς *Lactobacillus plantarum* (Benavente, Esteban-Torres et al. 2013) και *Thermogutta terrifontis* (Sayer, Szabo et al. 2015).

**Πίνακας 3.3:** Λίστα των αμινοξικών αλληλουχιών που αντιστοιχούν στο συντηρημένο καταλυτικό μοτίβο GXSXG, και είναι το χαρακτηριστικότερο των έως τώρα ορισμένων οικογενειών λιπολυτικών ενζύμων. Η αρίθμηση ακολουθεί την κατά Arpigny and Jaeger κατάταξη (Arpigny and Jaeger 1999) (Οικογένειες I-XIV) και έχει συμπληρωθεί με τις μεταγενέστερα χαρακτηρισμένες εστεράσες που δεν την ακολουθούν. Η λίστα ενδέχεται να μην είναι εξαντλητική.

<b>Οικογένεια λιπολυτικών ενζύμων</b>	<b>Χαρακτηριστικό αμινοξικό μοτίβο</b>	<b>Αναφορά</b>
Family I	GHSQG	(Arpigny and Jaeger 1999)
Family II	GDSL	(Arpigny and Jaeger 1999)
Family III	GXSMG	(Arpigny and Jaeger 1999)
Family IV	GDSAGG	(Arpigny and Jaeger 1999)
Family V	GXSMGG	(Arpigny and Jaeger 1999)
Family VI	GFSQG	(Arpigny and Jaeger 1999)
Family VII	GESAG	(Arpigny and Jaeger 1999)
Family VIII	GGSVG	(Arpigny and Jaeger 1999)
PhaZ7 (Family IX)	AHSMG	(Braaz, Handrick et al. 2003)
EstD (Family X)	GHSLG	(Levisson, van der Oost et al. 2007)
LipG (Family XI)	GHSLGG	(Lee, Oh et al. 2006)
LipEH166 (Family XII)	GHSLG	(Kim, Oh et al. 2009)
Est30 (Family XIII)	GLSLGG	(Montoro-García, Martínez-Martínez et al. 2009)
EstA3 (Family XIV)	CHSMG	(Elend, Schmeisser et al. 2006)
EstA	GHSMG	(Chu, He et al. 2008)
VLip509	GHSLGG	(Park, Kim et al. 2007)
EstD2	GHSLGG	(Lee, Hong et al. 2010)
EstZ3, EstGK1	XHSQX	(Bayer, Kunert et al. 2010)
FLS18	AHGMG	(Hu, Fu et al. 2010)
EM3L4	GHSQG	(Jeon, Kim et al. 2011)
EstWSD	GHSQG	(Wang, Wang et al. 2013)
EstLiu	GFSAG	(Rahman, Culsum et al. 2016)
<b>Family XV</b>	<b>GHSAG</b>	<b>(Zarafeta, Moschidi et al. 2016)</b>

## 4. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΥΠΕΡ-ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ *in vivo* ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ

### 4.1 Περίληψη

Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, τα λιπολυτικά ένζυμα που έχουν την ικανότητα να διατηρούν την καταλυτική τους δράση όταν εκτίθενται σε αποδιατακτικές συνθήκες όπως η πολύ υψηλή θερμοκρασία, παρουσιάζουν σημαντικό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Με σκοπό την ανακάλυψη υπερθερμοσταθερών ενζύμων, σε αυτή τη μελέτη στοχεύσαμε στην εύρεση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα με εστερολυτική δράση στο *in situ* εμπλουτισμένο δείγμα DNA Κινεζικής θερμοπηγή. Μετά την εφαρμογή *in vivo* λειτουργικής σάρωσης της βιβλιοθήκης έκφρασης που δημιουργήθηκε από το γονιδίωμα ενός οργανισμού του γένους *Dictyoglomus* και απομονώθηκε από το δείγμα εμπλουτισμού, ταυτοποιήθηκε μια νέα υπερθερμοσταθερή εστεράση, την οποία και ονομάσαμε EstDZ3. Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός έδειξε ότι η EstDZ3 είναι μια ελαφρώς αλκαλόφιλη και ισχυρά ενεργή εστεράση έναντι εστέρων μικρού και μεσαίου μήκους ανθρακικής αλυσίδας. Η σημαντικότερη ιδιότητα της EstDZ3 είναι η εξαιρετική της θερμοσταθερότητα, αφού διατηρεί υψηλά επίπεδα καταλυτικής δράσης μετά από έκθεση ακόμα και στους 95 °C για πολλές ώρες. Ακόμα, το νέο ένζυμο παρουσιάζει πολύ καλή σταθερότητα κατά την έκθεση του σε πλήθος οργανικών διαλυτών. Η βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε ότι η EstDZ3 παρουσιάζει χαμηλή ομοιότητα με ήδη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες, ενώ η παρατήρηση του μοντέλου της δομής της οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη υιοθετεί την κλασσική α/β αναδίπλωση στην οποία περιλαμβάνεται ένα ένθετο κομμάτι παρόμοιο με αυτό που περιγράφεται στη δομή της πλησιέστερης αλληλουχικά πρωτεΐνης γνωστής λειτουργίας και δομής, την εστεράσης του Lj0536 από τον γαλακτοβάκιλο *Lactobacillus johnsonii*. Όπως στην περίπτωση της Lj0536, το πεπτιδικό αυτό ένθετο προβλέπεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στη λειτουργία της EstDZ3. Η εξαιρετική θερμοσταθερότητα του νέου ενζύμου, σε συνδυασμό με τη σταθερότητα του στην παρουσία οργανικών διαλυτών και η υψηλή του ενεργότητα, το καθιστούν έναν υποψήφιο βιοκαταλύτη για βιομηχανικές εφαρμογές.

## 4.2 Εισαγωγή

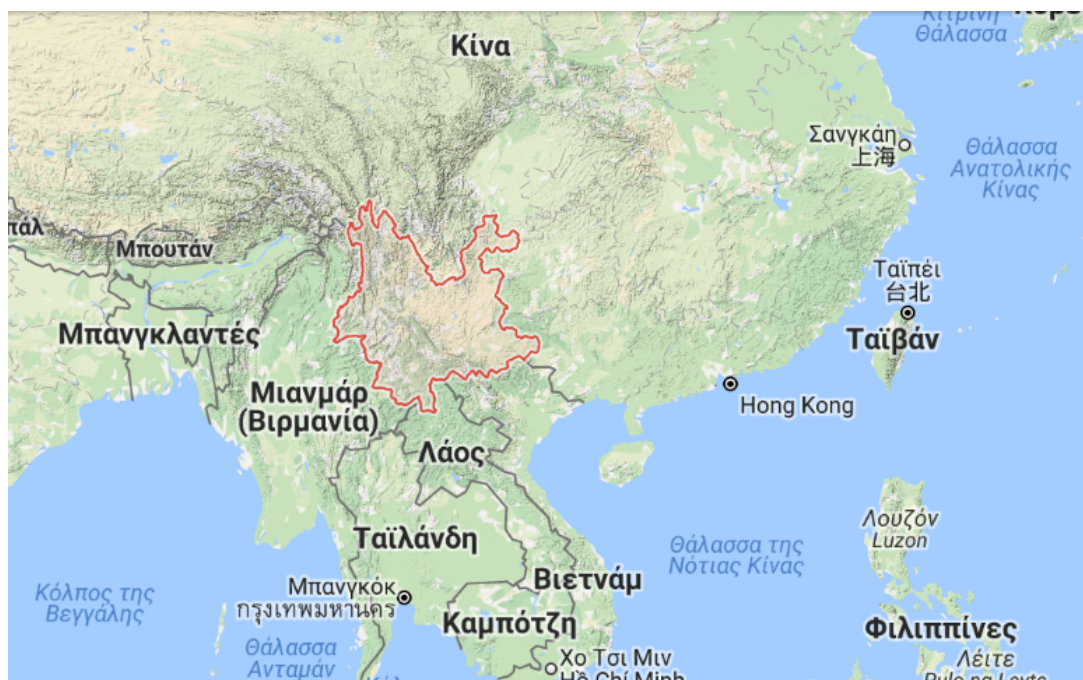
Όπως αναφέραμε και σε προηγούμενα κεφάλαια, τα λιπολυτικά ένζυμα παρουσιάζουν βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, τόσο για την φυσιολογική υδρολυτική τους ικανότητα όσο και για την ικανότητά τους να καταλύουν την αντίστροφη της υδρόλυσης αντίδραση, δηλαδή τη σύνθεση εστερικών δεσμών ή τη μετεστεροποίηση (Bornscheuer and Kazlauskas 2006). Κάποιες από τις βιοδιεργασίες στις οποίες χρησιμοποιούνται εστεράσες περιλαμβάνουν τη σύνθεση οπτικά ενεργών ουσιών, την εξαγωγή μελανίων από πολτούς χαρτιού, την αποικοδόμηση των πλαστικών, τη σύνθεση αρωμάτων και ενισχυτικών γεύσης και άλλες (Zamost, Nielsen et al. 1991, Vieille and Zeikus 2001, Kirk, Borchert et al. 2002). Ίσως η πιο χαρακτηριστική βιοτεχνολογική εφαρμογή ενός τέτοιου βακτηριακού ενζύμου είναι αυτή της εστεράσης από τον βάκιλο *Bacillus subtilis*, που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ευρέως γνωστού, μη στεροειδούς φαρμάκου της ναπροξένης (Quax and Broekhuizen 1994). Στη βιομηχανία, πολύ συχνά οι εστεράσες καλούνται να συμμετέχουν σε διεργασίες που πραγματοποιούνται κάτω από αντίξοες συνθήκες όπως υψηλή θερμοκρασία, παρουσία οργανικών διαλυτών, μεταλλικών ιόντων και απορρυπαντικών. Κατ' επέκταση, η ευρεία εκβιομηχάνιση των ενζύμων προαπαιτεί την ανθεκτικότητα του σε αποδιατακτικές συνθήκες. Τις τελευταίες δεκαετίες, ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός θερμοανθεκτικών εστερολυτικών ενζύμων έχουν ανακαλυφθεί, κυρίως μέσω μεταγονιδιωματικών αναλύσεων. Παρόλα αυτά, τα υπερ-θερμοσταθερά ένζυμα, δηλαδή τα ένζυμα που δρουν σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80 °C, είναι σπανιότερα και λίγα από αυτά έχουν χαρακτηριστεί βιοχημικά.

## 4.3 Αποτελέσματα

### 4.3.1 Δειγματοληψία, κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης και *in vivo* σάρωση της βιβλιοθήκης έκφρασης

Σε μια προηγούμενη μελέτη των συνεργατών μας με σκοπό να απομονωθούν θερμοφιλοι μικροοργανισμοί που μπορούν να αποικοδομήσουν τη βιομάζα, πραγματοποιήθηκε *in situ* εμπλουτισμός δείγματος σε κόμμι ξανθάνης σε θερμοπηγή που βρισκόταν στην πόλη ErYuan της Κίνας (Menzel, Gudbergsdóttir et al. 2015). Οι συνθήκες του σημείου τη στιγμή της δειγματοληψίας ήταν 83 °C και pH 7.

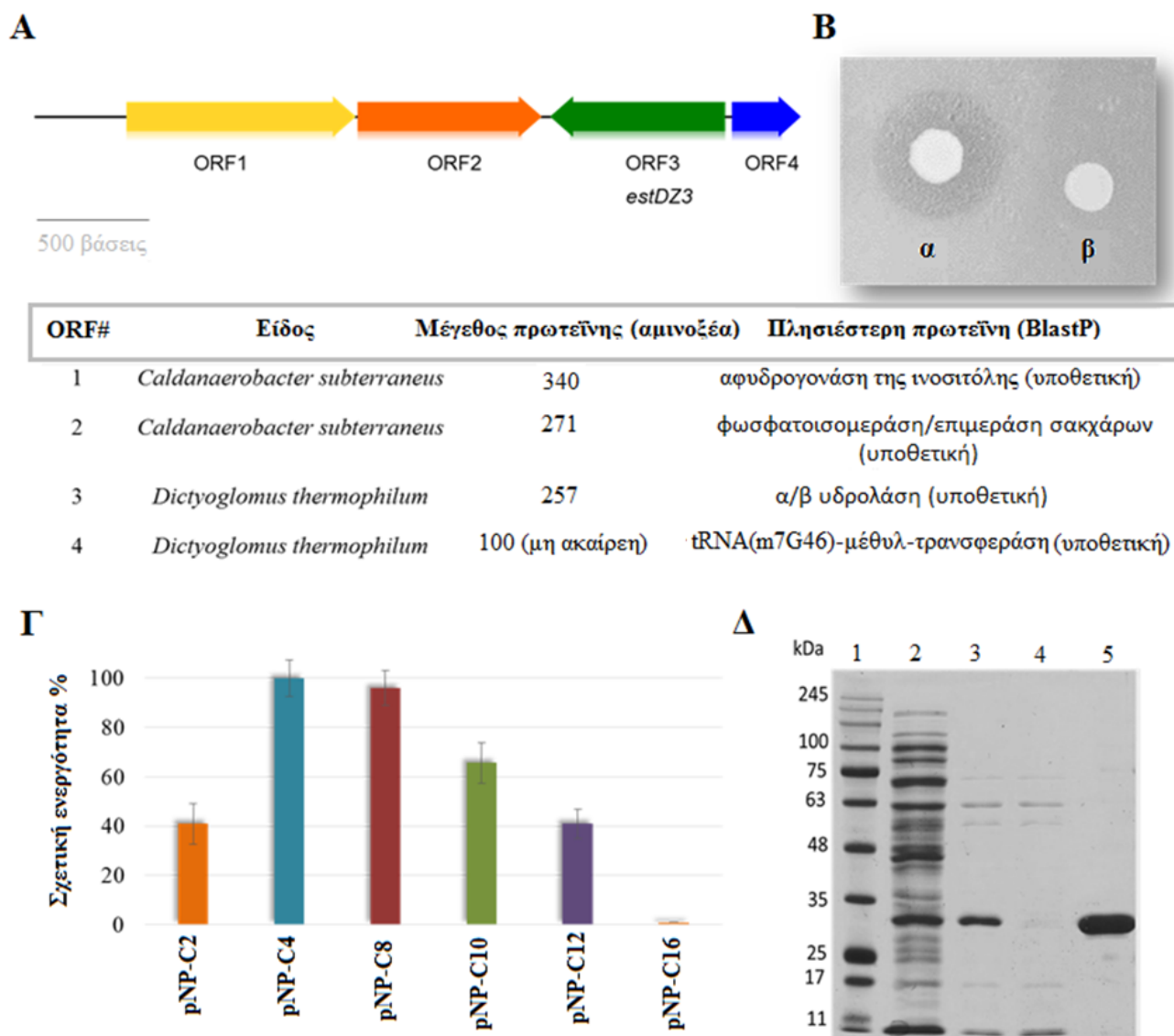




**Εικόνα 4.1:** Σημείο δειματοληψίας του μεταγονιδιωματικού δείγματος (ErYuan, Κίνα) από το οποίο προέκυψε η πρωτεΐνη EstDZ3.

Μετά από 10 ημέρες *in situ* επώασης του υποστρώματος εμπλουτισμού, έγινε δειματοληψία της μικροβιακής χλωρίδας η οποία είχε αναπτυχθεί σε αυτό και ακολούθησε ανακαλλιέργεια στο εργαστήριο σε αναερόβιες συνθήκες στους 78 και 83 °C. Μετά από τρεις διαδοχικές αραιώσεις της καλλιέργειας σε νέο θρεπτικό υλικό, η καλλιέργεια έδειχνε μορφολογικά ομοιογενής καθώς κάτω από το μικροσκόπιο φαίνονταν μόνο ραβδοειδή κύτταρα ίδιου μεγέθους. Η καλλιέργεια αραιώθηκε διαδοχικά έως ότου προέκυψαν απομονωμένες αποικίες. Μία από αυτές επιλέχθηκε, ανακαλλιεργήθηκε κάτω από αναερόβιες συνθήκες και στη συνέχεια απομονώθηκε το γονιδιωματικό υλικό. Η ανάλυση αυτού με αλληλούχιση 16S rRNA έδειξε ομολογία βάσεων σε ποσοστό 98% με το βακτήριο *Dictyoglomus thermophilum*, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο κλώνος που απομονώθηκε ανήκει στο γένος *Dictyoglomus*. Για την κατασκευή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης έκφρασης, έγινε ατελής πέψη του DNA σε αλληλουχίες μεγαλύτερες των δύο κιλοβάσεων, οι οποίες στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pUC18. Το εκτιμώμενο πλήθος των διαφορετικών κλώνων της βιβλιοθήκης ανέρχονταν στις 300.000 όπως εκτιμήθηκε μετά από καταμέτρηση των αποικιών που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων.

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* και οι κλώνοι σαρώθηκαν για τη παρουσία λιπολυτικής δράσης, με τη επίστρωση τους πάνω σε τρυβλία με άγαρ-θρεπτικό υλικού που περιείχαν 0,1% τριβουτυρίνη (τρυβλία επιλογής). Μετά από τρεις ημέρες επώασης στους 37 °C, μια ζώνη διαύγασης παρατηρήθηκε γύρω από δύο αποικίες, γεγονός που υποδηλώνει την υδρόλυση της τριβουτυρίνης. Μετά από μετασπορά των αποικιών με γραμμωτή ράβδωση σε νέα τρυβλία επιλογής, ο λιπολυτικός φαινότυπος επαναλήφθηκε για μια από αυτές. Στη συνέχεια, το πλασμίδιο που έφεραν τα κύτταρα που έδωσαν το θετικό φαινότυπο απομονώθηκε και το γονίδιο της βιβλιοθήκης που περιέχονταν σε αυτό αλληλουχίστηκε. Η ανάλυση της ένθετης αλληλουχίας των 3,3 κιλοβάσεων η οποία ονομάστηκε ch2, έδειξε ότι απαρτιζόταν από τέσσερα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που κωδικοποιούν για τις παρακάτω πρωτεΐνες 1) μια πιθανή αφυδρογονάση της ινοσιτόλης από το βακτήριο *Caldanaerobacter subterraneus* (ORF1), 2) μια υποθετική φωσφατοϊσομεράση/ επιμεράση σακχάρων από *C. subterraneus* (ORF2), 3) μια υποθετική α/β υδρολάση από *D. thermophilum* (ORF3), και 4) μέρος μιας υποθετικής tRNA(m7G46)-μέθυλ-τρανσφεράσης από *D. thermophilum* (ORF4) (Εικόνα 4.2 Α). Από τη στιγμή που το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της α/β υδρολάση περιεχόταν ακέραιο στην αλληλουχία και κρίθηκε ως το πιθανότερο για τη έκφραση της λιπολυτικής δράσης, το γονίδιο της ονομάστηκε *estDZ3*, απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pLATE52 προς το σχηματισμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pLATE52-EstDZ3. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση της EstDZ3 σε βακτηριακά κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν σε τρυβλία επιλογής όπου παρατηρήθηκε η επανάληψη του λιπολυτικού φαινοτύπου και επιβεβαιώθηκε η υπόθεση ότι το γονίδιο *estDZ3* κωδικοποιεί για ένα εστερολυτικό ένζυμο (Εικόνα 4.2 Β). Παράλληλα, όταν το κυτταρικό υλικό των ανασυνδυασμένων βακτηρίων που παρήγαγαν την EstDZ3 εξετάστηκε ως προς την ικανότητα του να υδρολύει εστέρες της παρανιτροφαινόλης διαφορετικού μήκους ανθρακικής αλυσίδας, διαπιστώθηκε ότι η EstDZ3 πιθανότατα παρουσιάζει εκλεκτικότητα σε μικρού προς μεσαίου μεγέθους υποστρώματα (Εικόνα 4.2 Γ)



**Εικόνα 4.2: Εντοπισμός, επιλογή και καθαρισμός της EstDZ3.** (A) Γονιδιακός χάρτης του ενθέματος ch2 (3,3 kb) Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) που σημαίνονται με βέλη προέκυψαν από ανάλυση BlastP, και τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα. (B) *E. coli* BL21(DE3) που φέρουν πλασμίδιο pLATE52-EstDZ3 (α) και μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (β) μετά την ανάπτυξη τους σε LB-άγαρ τρυβλία που περιείχαν τον επαγωγέα της πρωτεϊνοσύνθεσης της EstDZ3 (0.1mM IPTG). (Γ) Φαινοτυπική μελέτη εκλεκτικότητας υποστρώματος με τη χρήση του κυτταρικού υλικού των βακτηρίων που παράγουν την EstDZ3. Το κυτταρικό υλικό χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις με εστέρες rNP με καρβοξυλικά οξέα ανθρακικής αλυσίδας από C2 έως C16. Η σχετική ενεργότητα μετρήθηκε φωτομετρικά στα 410 nm. (Δ) Ανάλυση SDS-PAGE και χρώση με Coomassie της EstDZ3 μετά από θερμική επεξεργασία και καθαρισμό IMAC. (1) Πρότυπο πρωτεϊνικό διάλυμα (2) Υδατοδιαλυτό κλάσμα κυττάρων που παράγουν την εστεράση (3) Το ίδιο κλάσμα μετά από θερμική επεξεργασία (4) Δείγμα εκροής από τη στήλη καθαρισμού μετά την φόρτωση του δείγματος (5) Δείγμα τελικής έκλουσης της EstDZ3.

### 4.3.2 Απομόνωση και Βιοχημικός Χαρακτηρισμός της EstDZ3

Για το βιοχημικό χαρακτηρισμό της EstDZ3, η πρωτεΐνη παράχθηκε ετερόλογα σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3), και απομονώθηκε από το υδατοδιαλυτό κλάσμα των κυττάρων μετά από επώαση σε υψηλή θερμοκρασία με την τεχνική της χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Ο καθαρισμός έδωσε προϊόν με οπτική ομοιογένεια όπως κρίθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε γέλη ακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 4.2 Δ).

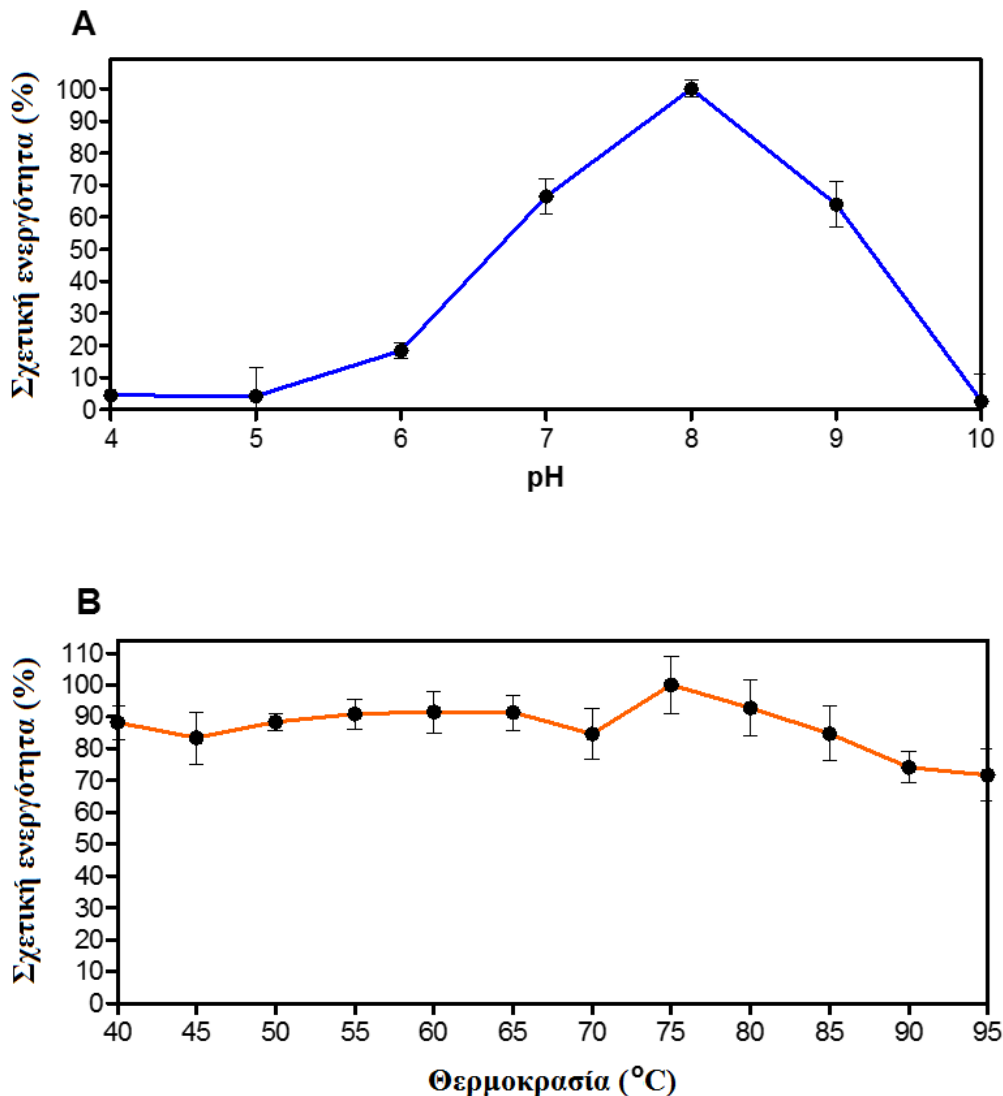
#### Μελέτη της επίδρασης του pH και της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της EstDZ3

Για το βιοχημικό χαρακτηρισμό χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ο εστέρας της παρανιτροφαινόλης με το βουτυρικό οξύ (pNP-C4). Για τη μελέτη της επίδρασης του pH στην ενεργότητα του ενζύμου, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σε pH που κυμαινόταν από 4 έως 10 στους 40 °C. Υψηλή σχετική ενεργότητα μετρήθηκε στις τιμές 7-9 με το pH 8 να είναι το βέλτιστο. Για τιμές κάτω του 7 και πάνω του 9, η εστερολυτική ικανότητα της EstDZ3 μειώθηκε δραματικά. Για τη μελέτη της συμπεριφοράς του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις στο εύρος των 40 με 95 °C (Εικόνα 4.3). Το ένζυμο παρουσίασε μια ευθύγραμμη απόκριση με την αύξηση της θερμοκρασίας, διατηρώντας πολύ υψηλά επίπεδα σχετικής ενεργότητας μέχρι και τους 95 °C, με ιδανική θερμοκρασία δράσης τους 75 °C. Αυτή η ευθύγραμμη απόκριση σε συγκεκριμένο θερμοκρασιακό εύρος είναι σπάνια αλλά έχει παρατηρηθεί ξανά και για άλλα υδρολυτικά ένζυμα (Aygan, Arıkan et al. 2008, Novototskaya-Vlasova, Petrovskaya et al. 2012).

#### Μελέτη εκλεκτικότητας υποστρώματος της EstDZ3

Με σκοπό τη μελέτη της εκλεκτικότητας του ενζύμου ως προς τα υποστρώματα, προβήκαμε στον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων της αντίδρασης υδρόλυσης εστέρων της παρανιτροφαινόλης με λιπαρά οξέα διαφορετικού μήκους ανθρακικής αλυσίδας. Η υδρόλυση των υποστρωμάτων από την EstDZ3 ακολουθεί το κινητικό μοντέλο κατά Michaelis–Menten και διαπιστώθηκε ότι το νέο ένζυμο παρουσιάζει εκλεκτικότητα στα υποστρώματα μικρού και μεσαίου μεγέθους ανθρακικής αλυσίδας (Πίνακας 4.1). Η υψηλότερη καταλυτική αποδοτικότητα ( $k_{cat}/K_M$ ) καταγράφηκε για το υπόστρωμα pNP-C4 με τιμή  $12.464 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  και μειώνεται με την αύξηση του μεγέθους της ανθρακικής αλυσίδας του υποστρώματος από C8 σε C10, ενώ το ένζυμο δεν είναι ενεργό έναντι των

υποστρωμάτων με αριθμό ανθράκων στην αλυσίδα τους μεγαλύτερο του δώδεκα. Ακόμα παρατηρήθηκε μια σχετικά υψηλή τιμή καταλυτικής αποδοτικότητας για το υπόστρωμα pNP- C12, κάτι που μπορεί να οφείλεται στην παρουσία του πεπτιδικού επίτοπου των έξι ιστιδινών που έχει προσαρτηθεί στην πρωτεΐνη και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Lee, Su et al. 1999, Peng, Zhang et al. 2011) μπορεί να προκαλεί την μετατόπιση της εκλεκτικότητας του ενζύμου προς πιο υδρόφοβα υποστρώματα



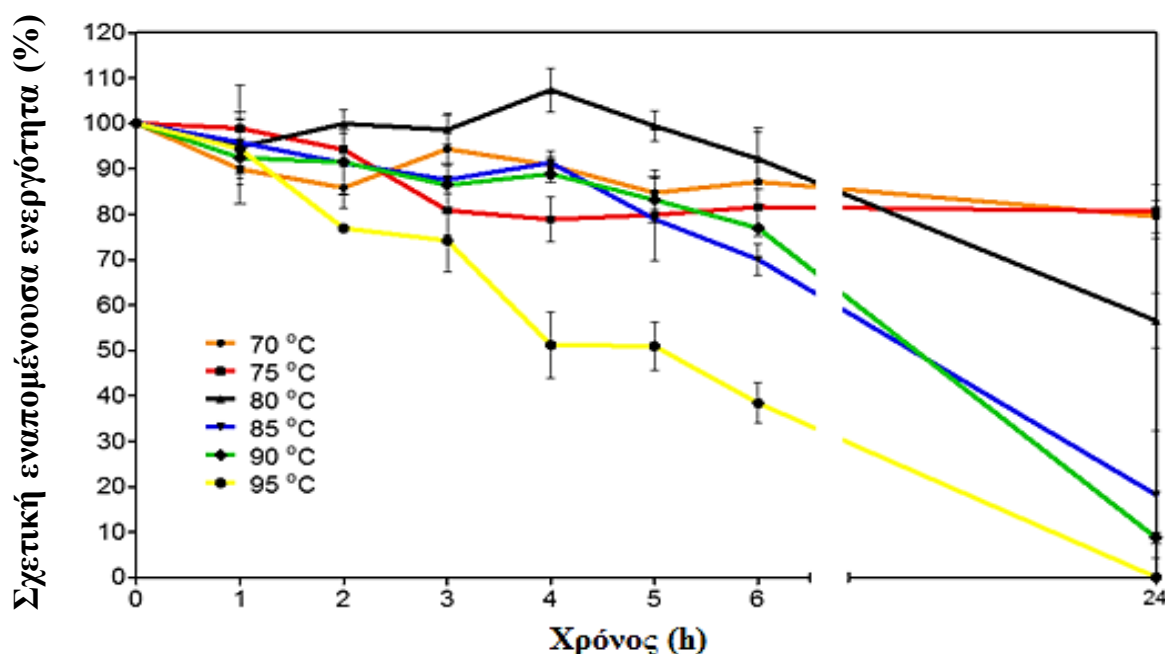
**Εικόνα 4.3: Μελέτη επίδρασης του pH και της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της EstDZ3. (A) Η επίδραση του pH στην ενεργότητα του ενζύμου μετρήθηκε στη βασική αντίδραση στους 40 °C για 5 λεπτά, σε τιμές pH που κυμαίνονταν από 4 έως 10 (B) Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ένζυμο μετρήθηκε στη βασική αντίδραση σε θερμοκρασιακό εύρος 40 με 95 °C και pH 8. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.**

**Πίνακας 4.1.** Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της αντίδρασης υδρόλυσης εστέρων της παρανιτροφαινόλης με διαφορετικά λιπαρά οξέα που καταλύεται από την εστεράση EstDZ3.

Υπόστρωμα (Εστέρας pNP)	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ )
Οξικός (C2)	$0,30 \pm 0,07$	$355,3 \pm 32,9$	740	2.428
Βουτυρικός (C4)	$0,15 \pm 0,02$	$906,4 \pm 46,0$	1.888	12.464
Οκτανοϊκός (C8)	$0,19 \pm 0,01$	$500,6 \pm 11,6$	104	557
Δεκανοϊκός (C10)	$0,17 \pm 0,01$	$386,7 \pm 8,2$	80	471
Δωδεκανοϊκός (C12)	$0,61 \pm 0,14$	$357,1 \pm 45,1$	743	1.268

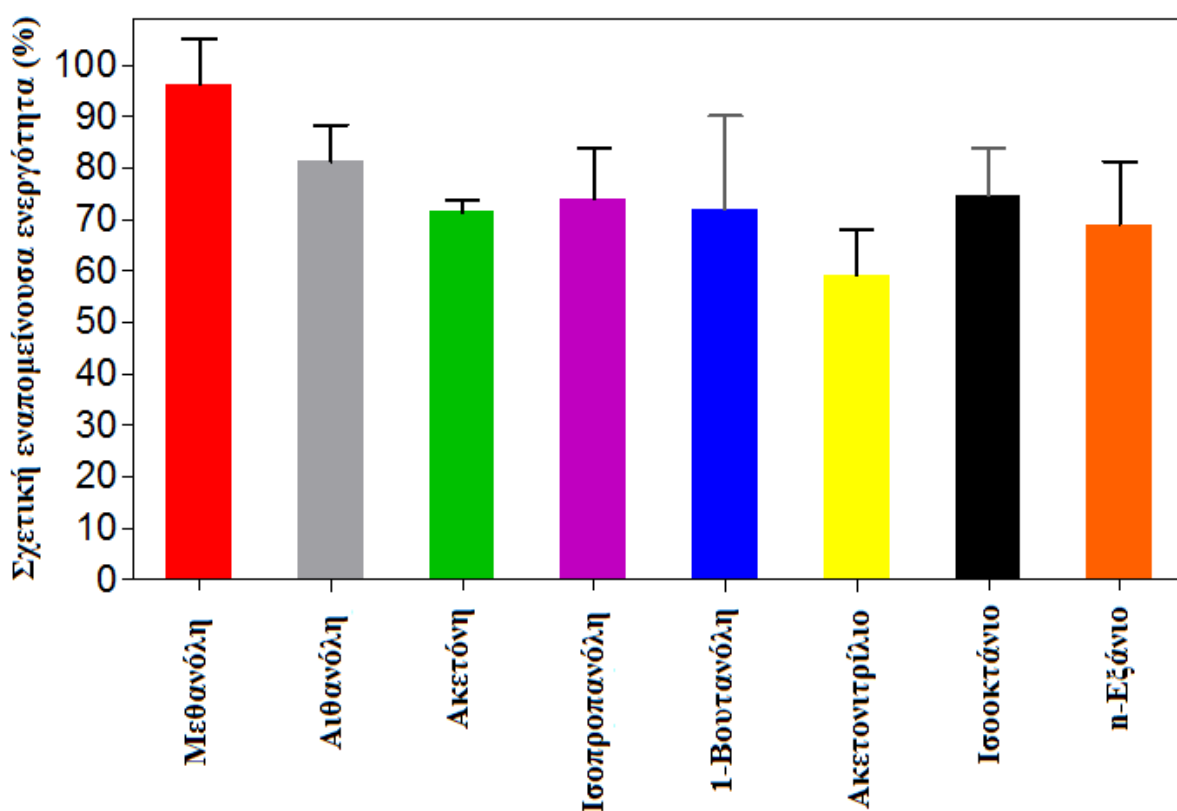
Θερμοσταθερότητα και σταθερότητα της EstDZ3 σε οργανικούς διαλύτες και άλλους αποδιατακτικούς παράγοντες

Όταν η εστεράση EstDZ3 εκτέθηκε σε υψηλές θερμοκρασίες για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα, επέδειξε εξαιρετική θερμοσταθερότητα, διατηρώντας υψηλά επίπεδα σχετικής ενεργότητας. Στους 70 και 75 °C η EstDZ3 διατήρησε σχεδόν άθικτη την ενεργότητα της μετά από 24 ώρες επώασης, ενώ μετά από επώαση στους 80 °C ο χρόνος ημιζωής της ήταν πάνω από 24 ώρες (Εικόνα 4.4). Ακόμα και μετά από επώαση στους 95 °C για πολλές ώρες, το ένζυμο διατήρησε σε μεγάλο βαθμό την ενεργότητα του, με χρόνο ημιζωής πάνω από πέντε ώρες (Εικόνα 4.4).



**Εικόνα 4.4:** Μελέτη θερμοσταθερότητας της EstDZ3. Η σταθερότητα του ενζύμου αξιολογήθηκε με μετρήσεις της εναπομένουσας ενεργότητας του στην πρότυπη αντίδραση, μετά από επώαση του στους 70, 75, 80, 85, 90 και 95 °C μέχρι και 24 ώρες. Ως 100% ορίστηκε η τιμή της ενεργότητας του ενζύμου που δεν είχε υποστεί επώαση σε υψηλή θερμοκρασία. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

Παράλληλα, η EstDZ3 επέδειξε εξαιρετική σταθερότητα κατά την επώαση της σε υψηλές συγκεντρώσεις μεγάλου εύρους οργανικών διαλυτών. Συγκεκριμένα, η σχετική ενεργότητα του ενζύμου παρέμεινε ποιοτικά σταθερή μετά την επώαση του σε μεθανόλη συγκέντρωσης 50% (v/v) για 12 ώρες (Εικόνα 4.5). Παρόμοια συμπεριφορά παρουσίασε το ένζυμο όταν επώαστηκε στην ίδια συγκέντρωση αιθανόλης, ακετόνης, 1-βουτανόλης, ισοοκτανίου, ισοπροπανόλης και n-εξάνιου για το ίδιο χρονικό διάστημα, αφού η εναπομένουσα ενεργότητα του παρέμεινε πάνω από το 70% ενώ μετά από επώαση σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 50% (v/v), η ενεργότητα της EstDZ3 μειώθηκε κατά 40% (Εικόνα 4.5).



**Εικόνα 4.5: Μελέτη σταθερότητας της EstDZ3 κατά την επώαση σε οργανικούς διαλύτες.** Η σταθερότητα του ενζύμου στους οργανικούς διαλύτες αξιολογήθηκε μέσω μετρήσεων της εναπομένουσας ενεργότητας στη βασική αντίδραση, ενζύμου που είχε επωαστεί σε 50% (v/v) διαλύματα οργανικών διαλυτών για 12 ώρες. Ως 100% ορίστηκε η τιμή της ενεργότητας του ενζύμου που δεν είχε υποστεί επώαση σε οργανικούς διαλύτες. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση ενός εύρους μεταλλικών ιόντων, επιφανειοενεργών και αποδιατακτικών παραγόντων στην καταλυτική ενεργότητα της EstDZ3. Με την προσθήκη μονοσθενών και δισθενών ιόντων όπως  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ , και  $\text{Mg}^{+2}$  σε συγκέντρωση 1 mM, η σχετική ενεργότητα του ενζύμου δεν επηρεάστηκε ποιοτικά, ενώ η προσθήκη  $\text{Ca}^{+2}$  και  $\text{Fe}^{+2}$  στην ίδια συγκέντρωση προκάλεσε μείωση της ενεργότητας της EstDZ3 κατά περίπου 20% (Πίνακας 4.2). Επίσης, η παρουσία  $\text{Cu}^{+2}$  και  $\text{Zn}^{+2}$  προκάλεσε σημαντική μείωση στην καταλυτική ενεργότητα κατά 60% και 50% αντίστοιχα.

Όταν προστέθηκε στη αντίδραση ο χηλικός παράγοντας EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) σε τελική συγκέντρωση 1 mM, δεν παρατηρήθηκε πτώση της σχετικής ενεργότητας του ενζύμου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αναδίπλωση του πρωτεϊνικού μορίου της EstDZ3 δεν εξαρτάται από την πρόσδεση κάποιου μεταλλικού ιόντος, όπως έχει παρατηρηθεί για κάποια εστερολυτικά ένζυμα που προσομοιάζουν τις μεταλλοεξαρτούμενες β-λακταμάσες (Hermoso, Lagartera et al. 2005). Η προσθήκη διαφόρων επιφανειοενεργών όπως Triton X-100, Tween 20 και Tween 80 με 1% (v/v) συγκέντρωση προκάλεσε τη μείωση της σχετικής ενεργότητας του ενζύμου κατά περίπου 30%, ενώ η προσθήκη 1% (w/v) SDS επέφερε πλήρη απενεργοποίηση του ενζύμου. Τέλος, η προσθήκη του αναστολέα σερίνης PMSF προκάλεσε δραματική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της συμμετοχής σερίνης στον καταλυτικό μηχανισμό της EstDZ3.

Παράλληλα, μελετήθηκε η ανθεκτικότητα της νέας εστεράσης στην παρουσία διαφόρων οργανικών διαλυτών. Παρουσία αιθανόλης, ακετόνης και ακετονιτριλίου σε συγκέντρωση 10% (v/v), η σχετική ενεργότητα της EstDZ3 αυξήθηκε ελαφρώς, ενώ η προσθήκη μεθανόλης στην ίδια συγκέντρωση προκάλεσε μικρή πτώση (Πίνακας 4.2). Στην περίπτωση της βουτανόλης, του εξανίου και του ισοοκτανίου, το ένζυμο διατήρησε περίπου το μισό της αρχικής του ενεργότητα μετά την προσθήκη τους σε συγκέντρωση 10% (v/v), ενώ η ισοπροπανόλη στις ίδιες συνθήκες απενεργοποίησε το ένζυμο. Με την αύξηση της συγκέντρωσης της μεθανόλης, της αιθανόλης, της ακετόνης, του ακετονιτριλίου, του ισοοκτανίου και του εξανίου από 10 σε 30%, το ένζυμο διατήρησε χαμηλά αλλά μετρήσιμα επίπεδα ενεργότητας, ενώ η προθήκη βουτανόλης στην ίδια συγκέντρωση επέφερε ολοκληρωτική απώλεια της καταλυτικής ικανότητας του ενζύμου (Πίνακας 4.2).



**Πίνακας 4.2. Μελέτη επίδρασης αποδιατακτικών παραγόντων στην ενεργότητα της EstDZ3**

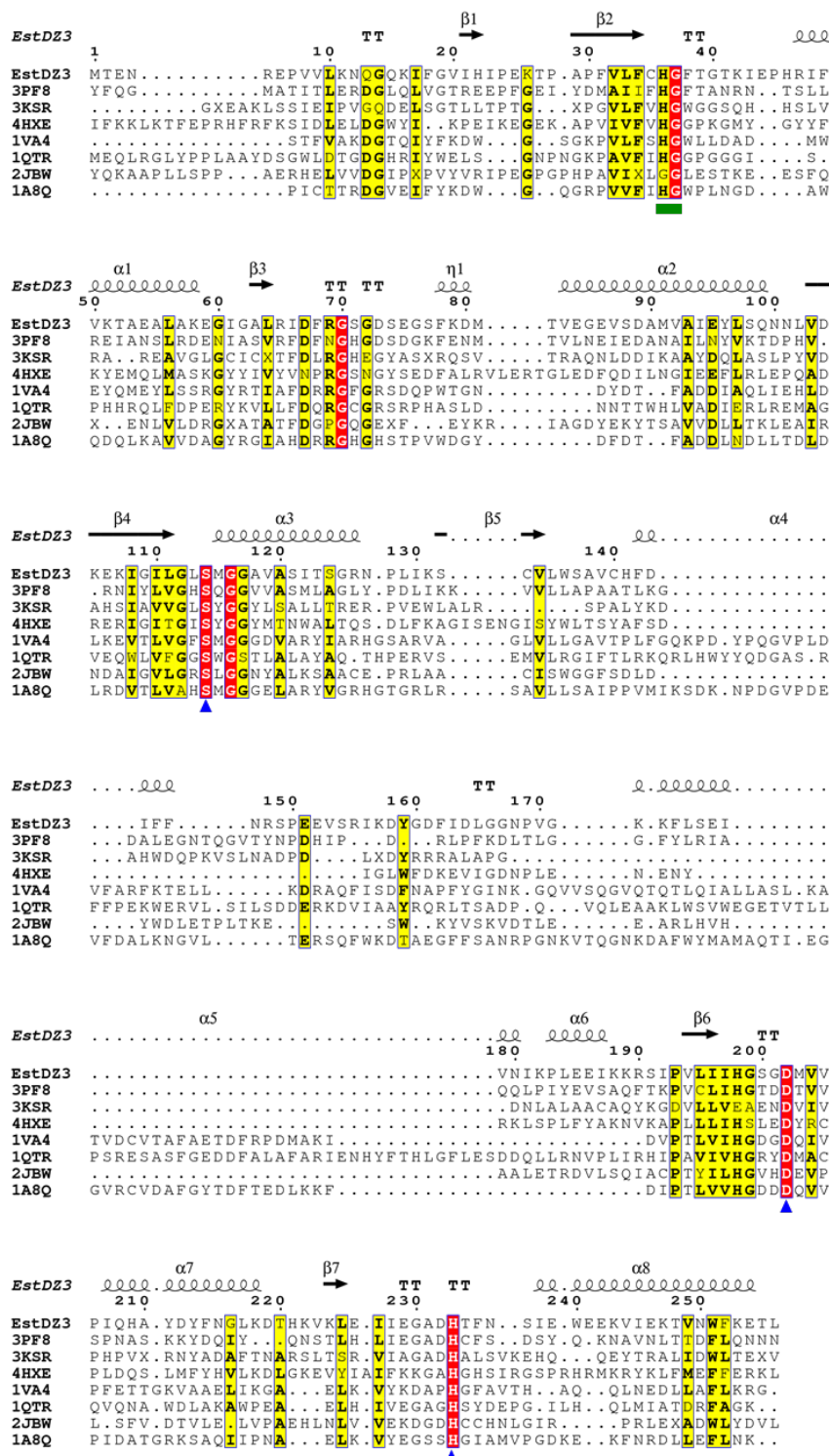
Πρόσθετο	Συγκέντρωση	Σχετική Ενεργότητα (%)
-	-	100,0 ± 4,1
K <sup>+</sup>	1 mM	93,1 ± 6,7
Mn <sup>2+</sup>	1 mM	101,4 ± 6,2
Ca <sup>2+</sup>	1 mM	78,4 ± 3,0
Zn <sup>2+</sup>	1 mM	45,7 ± 5,7
Li <sup>2+</sup>	1 mM	90,8 ± 3,7
Mg <sup>2+</sup>	1 mM	90,1 ± 4,2
Na <sup>+</sup>	1 mM	90,4 ± 5,5
Fe <sup>3+</sup>	1 mM	78,3 ± 3,5
Cu <sup>2+</sup>	1 mM	40,6 ± 3,4
EDTA	1 mM	96,7 ± 5,1
Triton-X100	1% (v/v)	67,4 ± 1,5
Tween 20	1% (v/v)	70,5 ± 5,4
Tween 80	1% (v/v)	73,2 ± 4,7
SDS	1% (w/v)	21,4 ± 2,5
PMSF	1 mM	33,8 ± 5,8
Μεθανόλη	10% (v/v)	93,0 ± 6,7
Μεθανόλη	30% (v/v)	26,5 ± 8,3
Αιθανόλη	10% (v/v)	114,1 ± 8,7
Αιθανόλη	30% (v/v)	23,8 ± 1,5
Ακετόνη	10% (v/v)	109,6 ± 3,3
Ακετόνη	30% (v/v)	28,1 ± 7,3
Ισοπροπανόλη	10% (v/v)	2,8 ± 9,1
1-Βουτανόλη	10% (v/v)	50,4 ± 7,9
1-Βουτανόλη	30% (v/v)	8,3 ± 4,6
Ακετονιτρίλιο	10% (v/v)	109,6 ± 9,2
Ακετονιτρίλιο	30% (v/v)	29,5 ± 5,4
Ισοοκτάνιο	10% (v/v)	53,6 ± 2,9
Ισοοκτάνιο	30% (v/v)	33,6 ± 7,1
n-Εξάνιο	10% (v/v)	51,2 ± 2,1
n-Εξάνιο	30% (v/v)	25,8 ± 7,1

#### 4.3.3 Μελέτη σύγκρισης της αλληλουχίας και του δομικού μοντέλου της EstDZ3 με τις αλληλουχίες και τις δομές των πλησιέστερων δομικά εστερασών.

Αρχικά έγινε ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της EstDZ3 με τη χρήση του εργαλείου SignalP (Petersen, Brunak et al. 2011) έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν η πρωτεΐνη περιέχει κάποιο πεπτιδιο-οδηγό που στοχεύει στην έκκριση της ή στην εξωκυτταρική προσάρτηση της στον οργανισμό προέλευσης. Τέτοιου είδους πεπτιδιο δεν ανιχνεύτηκε, γεγονός που υποδηλώνει ότι η EstDZ3 δεν είναι ένα εκκρινόμενο ή εντοπισμένο στη μεμβράνη ένζυμο. Στη συνέχεια, η αλληλουχία της νέας πρωτεΐνης αναλύθηκε με το εργαλείο BlastP έναντι της βάσης δεδομένων NR (Non-Redundant protein sequences database) όπου περιέχονται

όλες οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες που έχουν καταγραφεί αλλά όχι και χαρακτηριστεί, αλλά και έναντι της βάσης δεδομένων UniProtKB/SwissProt με τις χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες. Το ενσωματωμένο στο BlastP εργαλείο εντοπισμού πρωτεϊνικών περιοχών προέβλεψε ότι η EstDZ3 ανήκει στην υπερικογένεια 5 των α/β υδρολασών (a/b hydrolase family 5) ενώ η NR ανάλυση αποκάλυψε ότι η νέα πρωτεΐνη είναι πανομοιότυπη με την καταχωρημένη ως *Dictyoglomus thermophilum* α/β υδρολάση (Accession no. WP\_012548346). Αντίστοιχα, η ανάλυση στη UniProt/SwissProt έδειξε ότι η πλησιέστερη σε αλληλουχία χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη είναι μια αρυλ-εστεράση από τον οργανισμό *Pseudomonas fluorescens* (Accession no. P22862.4) (ομοιότητα 23%, κάλυψη 78%), της οποίας η κρυσταλλική δομή έχει μελετηθεί (PDB code: 1VA4). Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που προέκυψαν από την ανάλυση στην UniProt/SwissProt περιλάμβαναν την υποθετική πεπτιδάση YtmA από τον βάκιλο *Bacillus subtilis str. 168* (Lapidus, Galleron et al. 1997) (27% ομοιότητα, 88% κάλυψη) μια υδρολάση ψευδο-οξυτοκίνης από το βακτήριο *Raenarthrobacter nicotinovorans* (Baitsch, Sandu et al. 2001) (23% ομοιότητα, 47% κάλυψη), και άλλες μη χαρακτηρισμένες ή με πολύ χαμηλή ομοιότητα (<17%) αλληλουχίες. Συγχρόνως, η ανάλυση στην BlastP έναντι της βάσης δεδομένων PDB, όπου περιέχονται όλες οι πρωτεΐνες με μελετημένη δομή, έδειξε ότι η πλησιέστερη στην EstDZ3 πρωτεΐνη είναι η εστεράση του κινναμικού οξέος Lj0536 από τον λακτοβάκιλο *Lactobacillus johnsonii* (Lai, Stogios et al. 2011) (ομοιότητα 29%, κάλυψη 96%, PDB code: 3PF8). Τα υπόλοιπα αποτελέσματα περιλαμβάνουν εστεράσες και πεπτιδάσες βακτηριακής και αρχαϊκής προέλευσης όπως την προαναφερθείσα αρυλεστεράση και μια άκυλο-αμινοάκυλο-πεπτιδάση από τον οργανισμό *Pyrococcus horikoshii* (PDBcode: 4HXE).

Η μελέτη πολλαπλής στοίχισης της αμινοξικής αλληλουχίας της EstDZ3 με τις πλησιέστερες σε αλληλουχία πρωτεΐνες γνωστής δομής και φυσικής προέλευσης, έδειξε ότι η νέα εστεράση φέρει μια καταλυτική τριάδα που αποτελείται από τα αμινοξέα Ser114, Asp202, και His233 (αρίθμηση EstDZ3) και είναι απόλυτα συντηρημένη (Εικόνα 4.5). Παράλληλα, στην αλληλουχία του νέου ενζύμου περιέχεται πεπτίδιο με μοτίβο GX SXG που είναι χαρακτηριστικό για τα εστερολυτικά ένζυμα όπως έχουμε δει και προηγουμένως, και περιέχει την καταλυτική σερίνη. Τέλος, στην αλληλουχία περιέχεται ακόμα και ένα διπεπτίδιο ιστιδίνης-γλυκίνης που είναι γνωστό ότι συμμετέχει στο σχηματισμό της οξυανιοντικής οπής κατά την υδρόλυση (Wei, Contreras et al. 1999, Kim, Park et al. 2013) (Εικόνα 4.5).

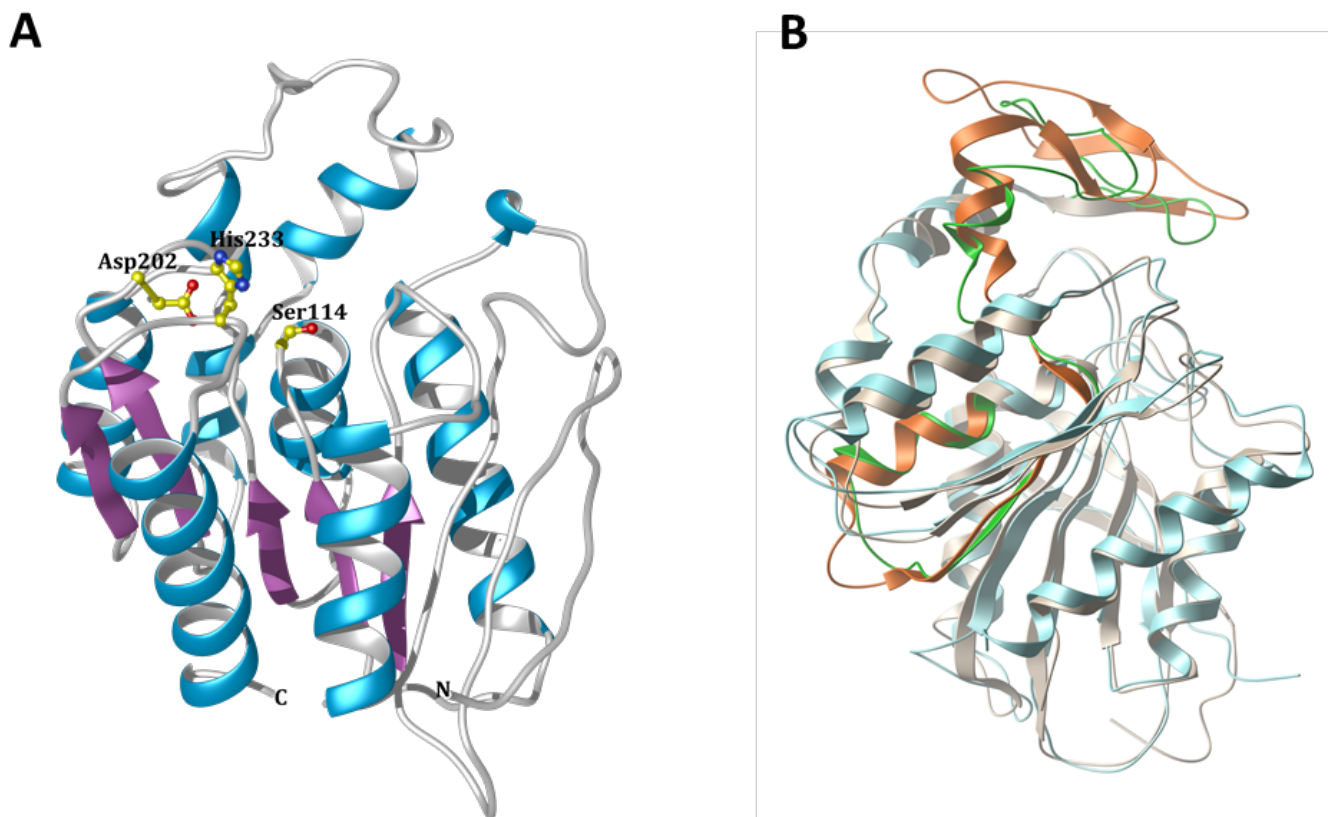


**Εικόνα 4.5: Πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών της EstDZ3 και επιλεγμένων ομόλογων πρωτεϊνών με χαρακτηρισμένη δομή.** Τα απολύτως συντηρημένα αμινοξέα φαίνονται με κόκκινο, ενώ τα παρόμοια με κίτρινο χρώμα. Τα καταλυτικά αμινοξέα, Ser14, Asp202, και His233 απεικονίζονται με μπλε τρίγωνα, ενώ το συντηρημένο διπεπτιδίο His36-Gly37 με πράσινο παραλληλόγραμμο. Τα στοιχεία του μοντέλου της δευτεροταγούς δομής της EstDZ3 φαίνονται πάνω από τις αλληλουχίες ως α (α- έλικες), β (β- φύλλα), η (τυχαία σπειράματα), και T (β στροφές). Η στοίχιση έγινε με τη χρήση των προγραμμάτων ClustalOmega (Sievers, Wilm et al. 2011) και ESPript (Gouet, Courcelle et al. 1999).

Το μοντέλο της δομής της EstDZ3 δημιουργήθηκε με τη χρήση του εργαλείου I-TASSER (Yang, Yan et al. 2015) και μελετήθηκε σε συνεργασία με τη Δρ. Ευαγγελία Χρυσίνα, (Εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών). Για τη δημιουργία του μοντέλου, χρησιμοποιήθηκαν από την πλατφόρμα άλλες γνωστές δομές ως εκμαγεία «ύφανσης» (threading templates). Αυτά περιλάμβαναν εστεράσες και πεπτιδάσες όπως την ακυλο-αμινοπεπτιδάση από το αναερόβιο αρχαίο *P. horikoshii* (PDB code:4HXE) που αναφέρθηκε προηγουμένως, την εστεράση του φερουλικού Est1E από το βακτήριο *Butyrivibrio proteoclasticus* (PDB code: 2WTM), μια ακυλο-αμινοπεπτιδάση από το ακραιόφιλο αρχαίο *Aeropyrum pernix* (PDB code:2HU8) με αλληλουχικές ομοιότητες που κυμαινόταν από 16 έως 24% και κάλυψη από 84 έως 96%. Η παρουσία άκυλο-αμινοάκυλο-πεπτιδασών στα εκμαγεία ύφανσης δεν είναι παράδοξη, αφού τα ένζυμα αυτά μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά, τόσο σε αλληλουχία όσο και σε δομή με τις εστεράσες. Συγκεκριμένα, τα ένζυμα αυτά περιέχουν το συντηρημένο στις εστεράσες μοτίβο GX SXG και έχουν α/β αναδίπλωση υδρολάσης, καθώς και την καταλυτική τριπλέτα αμινοξέων Ser-Asp-His με την ίδια σειρά που συναντώνται στις λιπάσες (Polgár 1992). Παράλληλα, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, οι άκυλο-αμινοάκυλο-πεπτιδάσες συχνά παρουσιάζουν και εστερολυτική δράση ακόμη και ισχυρότερη από ότι αμινοπεπτιδική (Polgár 1992, Wang, Yang et al. 2006). Αυτή η καταλυτική «ελαστικότητα» έχει αποδοθεί βιβλιογραφικά στο γεγονός ότι τα ένζυμα αυτά συνδέονται εξελικτικά με τις μικροβιακές εστεράσες (Polgár 1992). Η παρατήρηση του μοντέλου της δομής της EstDZ3 έδειξε ότι πρόκειται για μια α/β υδρολάση, τυπική αναδίπλωση για τα εστερολυτικά ένζυμα. Τα αμινοξέα Ser114, Asp202 και His233 φαίνεται να αποτελούν την καταλυτική τριάδα, με τη σερίνη να βρίσκεται στο κέντρο του μοτίβου GX SXG, όπως φάνηκε και από τη μελέτη στοίχισης, και το γεγονός ότι ο αναστολέας σερίνης PMSF κατέστειλε τη δράση της EstDZ3.

Η υπέρθεση της μοντελοποιημένης δομής του νέου ενζύμου με τη δομή της πλησιέστερης αλληλουχικά πρωτεΐνη γνωστής λειτουργίας, την εστεράση του κινναμικού οξέος Lj0536 (PDB code:3PF8), έδειξε ότι διαθέτουν παρόμοια αρχιτεκτονική (Εικόνα 4.6 B). Σε σύγκριση με τα ένζυμα της ίδιας οικογένειας, η δομή της Lj0536 χαρακτηρίζεται από ένα ένθετο κομμάτι δομής α/β υδρολάσης που έχει αναφερθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο καταλυτικό προφίλ του εστερολυτικού ενζύμου (Lai, Stogios et al. 2011). Αυτό το ένθετο κομμάτι φαίνεται να υπάρχει και στο μοντέλο της δομής της EstDZ3, και φαίνεται να έχει την ίδια αναδίπλωση και στις δυο πρωτεΐνες (Εικόνα 4.6 B). Στην περίπτωση της Lj0536 έχει αναφερθεί ότι η αναδίπλωση του ένθετου τμήματος είναι καθοριστική για την εκλεκτικότητα του ενζύμου προς τα υποστρώματα. Συγκεκριμένα, όταν το ένζυμο

συγκρίθηκε με τα πλησιέστερα δομικά ομόλογα όσον αφορά τα υποστρώματα, φάνηκε να μοιάζει στην προαναφερθείσα εστεράση Est1E από τον *B. proteoclasticus* (PDB code: 2WTM), που επίσης περιείχε έναν συνδυασμό υποτμημάτων  $\alpha/\beta$  υδρολάσης με παρόμοια αναδίπλωση. Αντιθέτως, τα υπόλοιπα πλησιέστερα δομικά ομόλογα που περιείχαν υπομονάδες μόνο  $\alpha$ -ελικών παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές στην «τοπική» τους αναδίπλωση από ότι αυτή της Lj0536 και κατ' επέκταση διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς τα υποστρώματα (Lai, Stogios et al. 2011). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η ύπαρξη του ένθετου υποτμήματος στην EstDZ3 και η τοπική αναδίπλωση που προκύπτει λόγω αυτού, αναμένεται να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τις καταλυτικές ιδιότητες του νέου ενζύμου. Βέβαια, η μοντελοποίηση αυτής της περιοχής ενδέχεται να μην είναι ακριβής αφού βασίζεται σε χαμηλής ομολογίας πρότυπα, κάτι που αναμένεται να διαλευκανθεί με τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου.



**Εικόνα 4.6: Μελέτη του δομικού μοντέλου της EstDZ3.** (A) Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου της δομής της EstDZ3 όπου φαίνονται με απεικόνιση σφαίρας-ράβδου τα καταλυτικά αμινοξέα Ser114, Asp202 και His233. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Chimera (Pettersen, Goddard et al. 2004). (B) Υπέρθωση του δομικού μοντέλου της EstDZ3 (γαλάζιο) με τη δομή της πλησιέστερης δομικά πρωτεΐνης, της Lj0536 εστεράσης του κινναμικού οξέος (γκρι). Η «ένθετη περιοχή» της Lj0536 σημαίνεται με πορτοκαλί χρώμα, ενώ η αντίστοιχη περιοχή της EstDZ3 με πράσινο. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα MolSoft (MolSoft 2000).

Ο προσδιορισμός των μοριακών χαρακτηριστικών της EstDZ3 στα οποία οφείλεται η εξαιρετική θερμοσταθερότητα της, είναι δύσκολος σε αυτή τη φάση αφού τα χαρακτηριστικά που έχουν συνδεθεί με τη θερμοσταθερότητα όπως η παρουσία αυξημένου ποσοστού τυροσινών και αργινινών δεν ισχύουν στην περίπτωση της νέας εστεράσης που περιέχει αυτά τα αμινοξέα σε ποσοστό 1,4 και 3,2%, ποσοστό μικρότερο του μέσου όρου των μεσόφιλων πρωτεϊνών (Kumar, Tsai et al. 2000). Από δομικής πλευράς, η ύπαρξη δεσμών υδρογόνου και γεφυρών άλατος σε εκτεθειμένα στο διαλύτη σημεία καθώς και η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών είναι γνωστό ότι σταθεροποιούν θερμοκρασιακά τις πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η κρυσταλλογραφική μελέτη της EstDZ3 θα ρίξει φως στη δομική βάση της υψηλής θερμοσταθερότητας της νέας εστεράσης.

#### 4.4 Σχολιασμός

Το τρίτο ένζυμο που ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε σε αυτή τη διατριβή είναι η υπερθερμόφιλη εστεράση EstDZ3. Το νέο αυτό ένζυμο προήλθε από την *in vivo* λειτουργική σάρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης στελέχους του γένους *Dictyoglomus* που απομονώθηκε από *in situ* δείγμα εμπλουτισμού Κινεζικής θερμοπηγής. Η EstDZ3 παρουσιάζει χαμηλή ομολογία με γνωστά ένζυμα μιας και η πλησιέστερη αλληλουχικά σε αυτή πρωτεΐνη που έχει χαρακτηριστεί τόσο λειτουργικά όσο και δομικά είναι η εστεράση του κινναμικού οξέος Lj053 (Lai, Stogios et al. 2011) από τον οργανισμό *L. Johnsonii* (ομοιότητα 29%, κάλυψη 96%, PDBcode: 3PF8). Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της EstDZ3 έδειξε ότι το νέο ένζυμο παρουσιάζει εκλεκτικότητα προς εστέρες της παρανιτροφαινόλης με μικρά έως μεσαίου μεγέθους λιπαρά οξέα. Όπως και η συντριπτική πλειοψηφία των θερμοσταθερών εστερασών, έτσι και η EstDZ3 λειτουργεί βέλτιστα σε βασικό pH. Στις βέλτιστες συνθήκες της, η EstDZ3 υδρολύει τον εστέρα της παρανιτροφαινόλης με το βουτυρικό οξύ με καταλυτική αποδοτικότητα  $k_{cat}/K_m = 12.464 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ . Σε σύγκριση με τις τιμές καταλυτικής αποδοτικότητας είκοσι εστερασών που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων BRENDA (Schomburg, Chang et al. 2004) και έχουν μελετηθεί με το ίδιο υπόστρωμα, η απόδοση της EstDZ3 είναι από τις πιο υψηλές. Συγκεκριμένα, οι δεκαέξι από τις είκοσι εστεράσες έχουν καταλυτική αποδοτικότητα που κυμαίνεται από μία έως δυο τάξεις μεγέθους μικρότερη από αυτή της EstDZ3. Οι υπόλοιπες τέσσερις εστεράσες

εμφανίζουν τιμές  $k_{cat}/K_M$  μόνο δύο έως τρεις φορές μεγαλύτερη από αυτή της EstDZ3. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της EstDZ3 όπως εκλεκτικότητα σε μικρού και μεσαίου μεγέθους ανθρακικής αλυσίδας υποστρώματα όπως οι εστέρες του βουτυρικού οξέος, σε συνδυασμό με υψηλή καταλυτική αποδοτικότητα και εξαιρετική θερμοσταθερότητα, καθιστούν το νέο ένζυμο υποψήφιο για χρήση στη βιομηχανία των τροφίμων και συγκεκριμένα στην παραγωγή πρόσθετων γεύσης (Saerens, Descamps et al. 2008).

Πολλά ένζυμα χάνουν την καταλυτική τους ικανότητα παρουσία οργανικών διαλυτών, φαινόμενο που συνήθως οφείλεται στην μετουσίωση της πρωτεΐνης από το διαλύτη (Klibanov 2001). Παρόλα αυτά, τα θερμοσταθερά ένζυμα συχνά είναι ικανά να διατηρούν την ακεραιότητα της δομής τους και κατ' επέκταση και την ενεργότητα τους παρουσία διαλυτών λόγω της εγγενούς σταθερότητας που φέρουν (Sayer, Finnigan et al. 2016). Έτσι και στην περίπτωση της EstDZ3, το ένζυμο βρέθηκε να είναι πολύ σταθερό στην έκθεση του σε οργανικούς διαλύτες, αφού ήταν ικανό να διατηρήσει πάνω από το 60% της σχετικής ενεργότητας του μετά από επώαση σε μεγάλες συγκεντρώσεις μεθανόλης, αιθανόλης, ακετόνης, ισοπροπανόλης, 1-βουτανόλης, ακετονιτριλίου ισοοκτανίου και n-εξανίου για δώδεκα ώρες. Συγκρίνοντας αυτά τα αποτελέσματα με αντίστοιχης μελέτης της εστεράσης Pf\_Est (Mandelli, Goncalves et al. 2016) από το αρχαιοβακτήριο *Pyrococcus furiosus*, μία από τις πιο πρόσφατα ανακαλυφθείσες υπερθερμοσταθερές εστεράσες, η EstDZ3 επέδειξε μεγαλύτερη σταθερότητα στην έκθεση της σε μεθανόλη, αιθανόλη και ισοπροπανόλη (σχετική ενεργότητα 96, 81 και 74% μετά από 12 ώρες για την EstDZ3 έναντι 39, 51 και 52% μετά από 30 λεπτά για την Pf\_Est, αντίστοιχα). Το προφίλ της σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες του νέου ενζύμου προσομοιάζει αυτό της πρόσφατα ανακαλυφθείσας λιπάσης LipXO, η οποία έχει χαρακτηριστεί ως σταθερή σε οργανικούς διαλύτες (Mo, Liu et al. 2016).

Η σημαντικότερη ίσως ιδιότητα της EstDZ3 είναι η εξαιρετική της θερμοσταθερότητα, αφού πρόκειται για ένα υπερθερμοσταθερό ένζυμο που παρουσιάζει υψηλά επίπεδα καταλυτικής ενεργότητας μετά από πολύωρη έκθεση σε θερμοκρασία τόσο υψηλή όσο οι 95 °C. Σε σύγκριση με άλλες εστεράσες που συμπεριλαμβάνονται σε μια εκτεταμένη μελέτη των Levisson et al. που απαριθμεί τα ένζυμα που έχουν προέλθει από υπερθερμόφιλους οργανισμούς, η EstDZ3 φαίνεται να είναι μέσα στις δέκα πιο θερμοσταθερές πρωτεΐνες (Levisson, van der Oost et al. 2009). Μόνο εστεράσες αρχαϊκής προέλευσης όπως μια εστεράση/άκυλ-πέπτιδο-υδρολάση από το αρχαιοβακτήριο *Aeropyrum pernix* (Gao, Feng

et al. 2003), οι εστεράσες EstA και EstB από το αρχαιοβακτήριο *Picrophilus torridus* (Hess, Katzer et al. 2008) και τέσσερις εστεράσες από τα γένη *Pyrococcus* και *Sulfolobus* (Huddleston, Yallop et al. 1995, Cornec, Robineau et al. 1998, Ikeda and Clark 1998, Park, Yoon et al. 2008) καταγράφονται ως περισσότερο θερμοσταθερές από την EstDZ3. Επίσης, ανάμεσα στις βακτηριακές εστεράσες της λίστας, η EstDZ3 φαίνεται να κατέχει τη μεγαλύτερη καταλυτική αποδοτικότητα.

Τα τελευταία χρόνια, και άλλες υπέρ-θερμοσταθερές εστεράσες έχουν ανακαλυφθεί και χαρακτηριστεί. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η λιπάση από τον βάκιλο *Bacillus sonorensis* 4R που παρουσιάζει χρόνο ημιζωής περίπου δύο ώρες στους 90 °C (Bhosale, Shaheen et al. 2016), η εστεράση της ξυλάνης AxeA από τον θερμοφιλο βακτήριο *Thermotoga maritima* με χρόνο ημιζωής περίπου δεκατρείς ώρες στους 98 °C (Drzewiecki, Angelon et al. 2010) και την εστεράση EstW από το γεωβακτήριο *Streptomyces lividans* TK64 με χρόνο ημιζωής 12 ώρες στους 95 °C (Wang, Wang et al. 2015). Η τελευταία εστεράση της οποίας τα βιοχημικά χαρακτηριστικά έχουν μελετηθεί, επέδειξε 50 φορές χαμηλότερη καταλυτική αποδοτικότητα σε σχέση με την EstDZ3 έναντι του ίδιου υποστρώματος (pNP-butyrate) και δέκα φορές χαμηλότερη έναντι του υποστρώματος pNP-acetate, που είναι και το βέλτιστο υπόστρωμα της EstW.

Το μοντέλο της δομής της EstDZ3 που κατασκευάστηκε και μελετήθηκε, ανέδειξε κάποια βασικά χαρακτηριστικά της νέας πρωτεΐνης που ενδέχεται να αποτελούν σημαντικό παράγοντα και για τη λειτουργία της.



## 5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 5.1 Υλικά

Τα σημαντικότερα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε επιμέρους μελέτη των πρωτεϊνών *CelDZ1*, *EstDZ2* και *EstDZ3* έχουν ήδη αναφερθεί στα Κεφάλαια 2, 3 και 4 αντίστοιχα. Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις μελέτες είχαν αγοραστεί από την εταιρεία Sigma-Aldrich και ήταν της υψηλότερης διαθέσιμης καθαρότητας εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά. Επίσης όλα τα αντιδραστήρια μοριακής βιολογίας (πχ. περιοριστικά ένζυμα, πολυμεράσες, λιγάσες κλπ) είχαν αγοραστεί από την εταιρεία New England BioLabs Inc.

### 5.2 Μέθοδοι

#### 5.2.1 Δειγματοληψίες μεταγονιδιωματικού και γονιδιωματικού υλικού

Όπως είδαμε στο Κεφάλαιο 1.3, στο πλαίσιο της κοινοπραξίας Hotzyme ([www.hotzyme.com](http://www.hotzyme.com)), συλλέχθηκε από τους συνεργάτες μας μεταγονιδιωματικό υλικό από ακραία ενδιαίτηματα σε όλο τον κόσμο. Από τα δείγματα αυτά, τα οποία μελετήθηκαν σε μορφή βιβλιοθηκών έκφρασης ή δεδομένων αλληλούχισης, σε αυτή τη διατριβή παρουσιάζονται εκείνα από τα οποία προέκυψαν θετικά αποτελέσματα. Έτσι, ασχοληθήκαμε με τα δείγματα από τις θερμοπηγές της Ισλανδίας, της Ρωσίας και της Κίνας, από τη μελέτη των οποίων προέκυψαν η ενδογλουκανάση *CelDZ1* και οι εστεράσες *EstDZ2* και *EstDZ3* αντίστοιχα,

Όσον αφορά στην αλληλουχία *celDZ1*, λεπτομερής περιγραφή της διαδικασίας δειγματοληψίας του μεταγονιδιωματικού υλικού και αλληλούχιση του που πραγματοποιήθηκε από τους συνεργάτες μας, μπορεί να βρεθεί στη δημοσιευμένη μελέτη από τους Menzel et al. (Menzel, Gudbergsdóttir et al. 2015).

Σχετικά με την απομόνωση της αλληλουχίας της *estDZ2*, οι συνεργάτες μας, με τη χρήση ειδικής αδείας που εκδόθηκε από την Εθνική Αρχή Ενέργειας της Ισλανδίας, συνέλεξαν υλικό από την εκροή της θερμοπηγής που βρίσκεται στο Grensdalur της Ισλανδίας (64°01'53.4"N, 21°11'50.4"W). Η θερμοκρασία του νερού τη στιγμή της δειγματοληψίας ήταν 40 °C και το pH του στο 7. Το δείγμα εμπλουτίστηκε αναεροβίως στους 55 °C και pH 7 με 0,01% εκχύλισμα ζύμης και 0,5% ξυλάνη ως μόνη πηγή άνθρακα. Μετά την ανάπτυξη της καλλιέργειας από την οποία απομονώθηκε το γενετικό υλικό,

ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις και απομονώθηκαν μόνο ραβδοειδείς μικροοργανισμοί ορατοί στο μικροσκόπιο.

Τέλος, σχετικά με το γονίδιο *estDZ3*, οι διαδικασίες της περιβαλλοντικής δειγματοληψίας και της απομόνωσης του κλώνου που περιέχονταν στο δείγμα εμπλουτισμού διεξήχθησαν από τους συνεργάτες μας στη MicroDish B.V, Ουτρέχτη, Ολλανδία, και περιεγράφηκαν συνοπτικά νωρίτερα, στο Κεφάλαιο 4.3. Η αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας και των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν συμπεριλαμβάνεται στη δημοσίευση (Zarafeta, Szabo et al. 2016).

### 5.2.2 Βιοπληροφορική ανάλυση

Όπως είδαμε στα Κεφάλαια 2 και 3, ο εντοπισμός των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης που οδήγησαν στην απομόνωση των γονιδίων *celDZ1* και *estDZ2* αντίστοιχα έγινε μέσω της πλατφόρμας ANASTASIA, η οποία αναπτύχθηκε από τη μονάδα βιοπληροφορικής ανάλυσης της Σχολής Χημικών Μηχανικών (Υποψήφιος διδάκτορας: Ευθύμιος Λαδουκάκης) σε συνεργασία με το εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Βιοπληροφορικής του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Δρ. Αριστοτέλης Χατζηγιάννου) στο πλαίσιο της κοινοπραξίας Hotzyme. Τα δεδομένα αλληλούχησης των μεταγονιδιωμάτων (raw reads) και της συναρμογής (assembly) αυτών, αποθηκεύτηκαν τοπικά στον server του πανεπιστημίου της Κοπενχάγης και έγιναν διαθέσιμα διαμέσου της διαδικτυακής εφαρμογής ANASTASIA, με τη σχετική μελέτη να είναι υπό επεξεργασία προς δημοσίευση (Ladoukakis, Pilalis et al. 2014).



**Εικόνα 5.1:** Διαδικτυακός τόπος ANASTASIA ([http://motherbox.chemeng.ntua.gr/anastasia\\_dev/](http://motherbox.chemeng.ntua.gr/anastasia_dev/))

Μέσα από την εφαρμογή αυτή εφαρμόστηκε μία αυτοματοποιημένη ροή εργασιών (pipeline) που αποτελούνταν από διασυνδεδεμένα βιοπληροφορικά εργαλεία ως δομοστοιχεία της και η οποία είχε σχεδιαστεί για την πλήρη επεξεργασία και ανάλυση μεταγονιδιωματικών δεδομένων. Η ανάλυση αυτή περιλάμβανε:

- i) Τον εντοπισμό ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (Rice, Longden et al. 2000) μέσα στις συναρμολογημένες μεταγονιδιωματικές αλληλουχίες (contigs) για την εύρεση πιθανών γονιδίων
- ii) Τη σύγκριση ομολογίας (Altschul, Madden et al. 1997, Finn, Clements et al. 2011) των πιθανών γονιδίων με βάσεις δεδομένων γνωστών αλληλουχιών (π.χ. NCBI-nr) και γνωστών διατηρημένων πρωτεϊνικών περιοχών (domains) γνωστής λειτουργικότητας (π.χ. Pfam)
- iii) Την πρόβλεψη πρωτεϊνικής λειτουργίας μέσω αλγορίθμων μηχανικής μάθησης (Chandrasekharaiah, Thulasi et al. 2012)
- iv) Την αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης σε τοπική βάση δεδομένων MariaDB (San Pedro, Gonzalez-Lopez et al. 2014) και δημιουργία αρχείων εξόδου (dump files) για κάθε σετ δεδομένων.

Το τελευταίο στάδιο της ροής εργασιών επέτρεψε την εισαγωγή των αποτελεσμάτων σε περιβάλλον σχεσιακών βάσεων δεδομένων (MariaDB) μέσα στο οποίο μπορούσαν να γίνουν, με την χρήση κατάλληλων εντολών, εξεζητημένες αναζητήσεις και φιλτράρισμα δεδομένων για τον εντοπισμό αλληλουχιών υψηλού ενδιαφέροντος. Έτσι με τον σχεδιασμό και εφαρμογή εξειδικευμένων αλγορίθμων σε γλώσσα MariaDB/MySQL τα δεδομένα από τις αναλύσεις ομολογίας κατηγοριοποιήθηκαν στη βάση δεδομένων σύμφωνα με τον αριθμό EC της πρωτεΐνης με την οποία είχαν υψηλότερο σκορ ομοιότητας. Αυτό ήταν δυνατό μόνο για τις αναλύσεις ομολογίας σε βάση δεδομένων πλήρως ταυτοποιημένων αλληλουχιών (Uniprot/SwissProt) (Arweiler, Bairoch et al. 2004). Τελικά με τη χρήση των παραπάνω αλγορίθμων κατηγοριοποίησης σχηματίστηκαν πίνακες αποτελεσμάτων ομολογίας (Εικόνα 5.2 Α) για την κάθε αλληλουχία που εντοπίστηκε να έχει ομοιότητα με συγκεκριμένα ένζυμα αριθμού EC υψηλής προτεραιότητας. Τα αποτελέσματα ομολογίας περιλάμβαναν την αλληλουχία με το υψηλότερο σκορ ομοιότητας από τη βάση δεδομένων Uniprot/SwissProt (πλήρως χαρακτηρισμένες αλληλουχίες) καθώς και την αλληλουχία με το υψηλότερο σκορ ομοιότητας από τη βάση δεδομένων NCBI-nr (βάση δεδομένων μη χαρακτηρισμένων αλληλουχιών). Επιπροσθέτως, πάλι με φιλτράρισμα των αποτελεσμάτων

ομολογίας με την βάση δεδομένων Pfam, σχηματίστηκαν πίνακες δεδομένων για τις εν λόγω αλληλουχίες που περιλάμβαναν τις εντοπισμένες πρωτεϊνικές περιοχές γνωστής λειτουργικότητας (Εικόνα 5.2 Β) για την περαιτέρω αξιολόγηση τις ενζυμικής τους δράσης. Μέσω αυτών των πινάκων και λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα ομολογίας από τρεις διαφορετικές βάσεις δεδομένων και συγκρίνονταν με τα συμπληρωματικά αποτελέσματα πρόβλεψης από τους αλγόριθμους μηχανικής μάθησης, έγινε η αξιολόγηση και η επιλογή των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης που απομονώθηκαν για να μελετηθούν.

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της CelDZ1, το σχετικό γενετικό υλικό που απομονώθηκε από το σημείο δειγματοληψίας υποβλήθηκε σε αλληλούχηση με τη χρήση της πλατφόρμας Illumina (BGI, China) δίνοντας >6 εκατομμύρια αναγνώσματα (reads) μεγέθους των 90:90 βάσεων. Τα δεδομένα αυτά τροφοδοτήθηκαν στην πλατφόρμα ANASTASIA (Automated Nucleotide Aminoacid Sequences Translational pLAtform for Systemic Interpretation and Analysis) που όπως αναφέρθηκε νωρίτερα σχεδιάστηκε αποκλειστικά για τις ανάγκες του προγράμματος, και αποτελεί μια μηχανή ανάλυσης μεταγονιδιωματικών δεδομένων με σκοπό την ανακάλυψη νέων υδρολυτικών ενζύμων μέσω της εφαρμογής σύνθετων μεθόδων ανάλυσης (Μελέτη υπό δημοσίευση από E.Ladoukakis et. al). Η ανάλυση απέδωσε την υπόδειξη 3000 ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης που στη συνέχεια αναλύθηκαν ως προς την ομολογία τους με γνωστές πρωτεΐνες με τη χρήση του εργαλείου BLASTp στη βάση δεδομένων NCBI-nr και UniProt/Swiss-Prot. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εισήχθησαν στην «τοπική» βάση δεδομένων MySQL που επικοινωνεί με την πλατφόρμα ANASTASIA μέσω Python scripts. Όπως είδαμε, η διαδικασία αυτή έδωσε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συγκριτικών πινάκων που περιλαμβάνουν δεδομένα και «βαθμολογία» ομολογίας για κάθε μια αλληλουχία καθώς και μια πρόβλεψη για την ενζυμική τους δράση που συνδέεται με τον αριθμό E.C. Οι αλληλουχίες αυτές ελέγχθηκαν για την περιεκτικότητά τους σε συντριμμένες πρωτεϊνικές περιοχές στη βάση δεδομένων Pfam μέσω του εργαλείου HMMER (HMMscan). Μέσω των αποτελεσμάτων αυτών, οι αλληλουχίες με υψηλή «βαθμολογία» στις οποίες αποδόθηκαν σε αριθμό E.C 3.2.1.4 που αντιστοιχεί στις ενδο-κυτταρινάσες και ταυτόχρονα βρέθηκε να περιέχουν συντηρημένες πρωτεϊνικές περιοχές σχετικές με κυτταρινολυτικές δράσεις, επιλέχθηκαν για περεταίρω μελέτη.

# A

Query_ID	Uniprot_ID	Uniprot_%	E.C number	NR	NR_%
contig00018_start=64_stop=906_strand=-	sp Q02104 LIP1_PSYIM	24,22	3.1.1.3	gi 374855682 dbj BAL58537.1	95,45
contig00018_start=64_stop=906_strand=-	sp P24640 LIP3_MORS1	24,19	3.1.1.3	gi 374855682 dbj BAL58537.1	95,45
contig00054_start=3669_stop=4547_strand=-	sp Q05489 LIP_BURGL	25,45	3.1.1.3	gi 220905660 ref YP_002480971.1	49,3
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp P22760 AAAD_HUMAN	41,11	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp Q0P5B7 AAAD_BOVIN	37,63	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp Q7M370 AAAD_RABIT	37,63	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp P24484 LIP2_MORS1	33,33	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp Q9QZH8 AAAD_RAT	33	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp Q99PG0 AAAD_MOUSE	32,22	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp P32946 LIP2_CANRU	31,07	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp Q99156 LIP1_YARLI	30,19	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp P22394 LIP2_GEOCN	29,46	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp P79066 LIP1_GEOFE	29,46	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp P17573 LIP1_GEOCN	29,46	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp P32949 LIP5_CANRU	26,8	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp P32948 LIP4_CANRU	26,8	3.1.1.3	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	sp P26223 XYNB_BUTFI	25,58	3.2.1.8	gi 374853396 dbj BAL56305.1	81,55
contig00428_start=1886_stop=2833_strand=-	sp P26223 XYNB_BUTFI	29,87	3.2.1.8	gi 374853391 dbj BAL56300.1	92,7
contig00589_start=1303_stop=2235_strand=+	sp P41773 LIPB_PSEFL	37,5	3.1.1.3	gi 374855450 dbj BAL58306.1	90,62
contig00826_start=1471_stop=2180_strand=+	sp P24640 LIP3_MORS1	27,69	3.1.1.3	gi 374857097 dbj BAL59950.1	91,53
contig00826_start=1471_stop=2180_strand=+	sp Q02104 LIP1_PSYIM	25,62	3.1.1.3	gi 374857097 dbj BAL59950.1	91,53
contig01305_start=271_stop=1176_strand=-	sp P40308 TGL3_YEAST	36,76	3.1.1.3	gi 365893728 ref ZP_09431897.1	44,29
contig01305_start=271_stop=1176_strand=-	sp Q9LZA6 SDP1_ARATH	23,85	3.1.1.3	gi 365893728 ref ZP_09431897.1	44,29

[Συνέχεια εικόνας στην επόμενη σελίδα]

**B**

Target_name	Target_accession	Query_ID	E value	Description
Abhydro_lipase	PF04083.11	contig14559_start=2_stop=469_strand=+	0,11	Partial a/b-hydrolase lipase region
LIP	PF03583.9	contig00512_start=2097_stop=2654_strand=-	0,00089	Secretory lipase
Lipase_3	PF01764.20	contig00106_start=3268_stop=4083_strand=-	0,0029	Lipase (class 3)
Lipase_3	PF01764.20	contig13375_start=2_stop=439_strand=-	0,033	Lipase (class 3)
LIP	PF03583.9	contig13375_start=2_stop=439_strand=-	0,11	Secretory lipase
Lipase_GDSL_2	PF13472.1	contig00359_start=985_stop=2295_strand=-	0,0063	GDSL-like Lipase/ Acylhydrolase family
Lipase_3	PF01764.20	contig05897_start=1_stop=615_strand=-	0,11	Lipase (class 3)
Lipase_GDSL_2	PF13472.1	contig02472_start=3_stop=992_strand=-	0,15	GDSL-like Lipase/ Acylhydrolase family
Lipase_GDSL	PF00657.17	contig03744_start=466_stop=1113_strand=-	0,092	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase
Lipase_2	PF01674.13	contig06394_start=1_stop=619_strand=-	0,0000012	Lipase (class 2)

**Εικόνα 5.2: Παράδειγμα πίνακα αποτελεσμάτων που προέκυψε μετά τη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων αλληλούχισης των μεταγονιδιωματικών δειγμάτων. (Α)** Πίνακας αποτελεσμάτων ομολογίας των εντοπισμένων ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης με το υψηλότερο σκορ ομοιότητας από τη βάση δεδομένων Uniprot/SwissProt (πλήρως χαρακτηρισμένες αλληλουχίες) καθώς και την αλληλουχία με το υψηλότερο σκορ ομοιότητας από τη βάση δεδομένων NCBI-nr (μη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες) [Query\_ID: αναγνωριστικό αλληλουχίας, Uniprot\_hit: κωδικός αλληλουχίας με την υψηλότερη ομοιότητα στη βάση δεδομένων Uniprot, Uniprot\_%: ποσοστό ομοιότητας του Uniprot\_hit, NR\_hit: κωδικός αλληλουχίας με την υψηλότερη ομοιότητα στη βάση δεδομένων NR, NR\_%: ποσοστό ομοιότητας του NR\_hit] **(Β)** Πίνακας αποτελεσμάτων εντοπισμού πρωτεϊνικών περιοχών γνωστής λειτουργικότητας (protein domains). των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης μέσω της βάσης δεδομένων Pfam. Τα σημασμένα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης αντιστοιχούν στο γονίδιο *estDZ2*. [Target\_name: χαρακτηριστικό όνομα της συντηρημένης πρωτεϊνικής περιοχής, Target\_accession: κωδικός της συντηρημένης πρωτεϊνικής περιοχής, Query\_ID: αναγνωριστικό αλληλουχίας, E-value: πιθανότητα στατιστικού λάθους, Description: σύντομη περιγραφή της λειτουργίας της ανιχνευμένης πρωτεϊνικής περιοχής]

Μια από αυτές τις αλληλουχίες ήταν και η CelDZ1 που παρουσιάζει 59% ομοιότητα (e-value <0.001, query coverage 92%, positive percentage 73%) με τη χαρακτηρισμένη ως ενδο-κυτταρινάση πρωτεΐνη από τον βάκιλο *Bacillus akibai* (JCM9157) στη βάση δεδομένων UniProt (Accession number: P06564.1). Η αλληλουχία-στόχος παρουσιάζει επίσης 95% ομοιότητα (e-value<0.001, query coverage 99%, positive percentage 97%) με μια θεωρητική γλυκόζυλ-υδρολάση της οικογένειας 5 από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermoanaerobacterium aotearoense* (Accession number: WP\_014757289.1). Επίσης περιέχει δύο συντηρημένες πρωτεϊνικές περιοχές. Η πρώτη είναι μια καταλυτική περιοχή κυτταρινάσης (glycosyl hydrolase family 5—ID: PF00150.13) και η δεύτερη μια περιοχή πρόσδεσης υδρογονανθράκων (CBM) της οικογένειας 17/28—(ID: PF03424.9).

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της CelDZ1, το σχετικό γενετικό υλικό που απομονώθηκε από το σημείο δειγματοληψίας υποβλήθηκε σε αλληλούχιση με τη χρήση της πλατφόρμας Illumina (BGI, China) δίνοντας >6 εκατομμύρια αναγνώσματα (reads) μεγέθους των 90:90 βάσεων. Τα δεδομένα αυτά τροφοδοτήθηκαν στην πλατφόρμα ANASTASIA (Automated Nucleotide Aminoacid Sequences Translational plAtform for Systemic Interpretation and Analysis) που όπως αναφέρθηκε νωρίτερα σχεδιάστηκε αποκλειστικά για τις ανάγκες του προγράμματος, και αποτελεί μια μηχανή ανάλυσης μεταγονιδιωματικών δεδομένων με σκοπό την ανακάλυψη νέων υδρολυτικών ενζύμων μέσω της εφαρμογής σύνθετων μεθόδων ανάλυσης (Μελέτη υπό δημοσίευση από E. Ladoukakis et. al). Η ανάλυση απέδωσε την υπόδειξη 3000 ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης που στη συνέχεια αναλύθηκαν ως προς την ομολογία τους με γνωστές πρωτεΐνες με τη χρήση του εργαλείου BLASTp στη βάση δεδομένων NCBI-nr και UniProt/Swiss-Prot. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εισήχθησαν στην «τοπική» βάση δεδομένων MySQL που επικοινωνεί με την πλατφόρμα ANASTASIA μέσω Python scripts. Όπως είδαμε, η διαδικασία αυτή έδωσε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συγκριτικών πινάκων που περιλαμβάνουν δεδομένα και «βαθμολογία» ομολογίας για κάθε μια αλληλουχία καθώς και μια πρόβλεψη για την ενζυμική τους δράση που συνδέεται με τον αριθμό E.C. Οι αλληλουχίες αυτές ελέγχθηκαν για την περιεκτικότητα τους σε συντηρημένες πρωτεϊνικές περιοχές στη βάση δεδομένων Pfam μέσω του εργαλείου HMMER (HMMscan). Μέσω των αποτελεσμάτων αυτών, οι αλληλουχίες με υψηλή «βαθμολογία» στις οποίες αποδόθηκαν σε αριθμό E.C 3.2.1.4 που αντιστοιχεί στις ενδο-κυτταρινάσες και ταυτόχρονα βρέθηκε να περιέχουν συντηρημένες πρωτεϊνικές περιοχές σχετικές με κυτταρινολυτικές δράσεις, επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη. Μια από αυτές

τις αλληλουχίες ήταν και η CelDZ1 που παρουσιάζει 59% ομοιότητα (e-value <0.001, query coverage 92%, positive percentage 73%) με τη χαρακτηρισμένη ως ενδο-κυτταρινάση πρωτεΐνη από τον βάκιλο *Bacillus akibai* (JCM9157) στη βάση δεδομένων UniProt (Accession number: P06564.1). Η αλληλουχία-στόχος παρουσιάζει επίσης 95% ομοιότητα (e-value<0.001, query coverage 99%, positive percentage 97%) με μια θεωρητική γλυκόζυλ-υδρολάση της οικογένειας 5 από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermoanaerobacterium aotearoense* (Accession number: WP\_014757289.1). Επίσης περιέχει δύο συντηρημένες πρωτεϊνικές περιοχές. Η πρώτη είναι μια καταλυτική περιοχή κυτταρινάσης (glycosyl hydrolase family 5—ID: PF00150.13) και η δεύτερη μια περιοχή πρόσδεσης υδρογονανθράκων (CBM) της οικογένειας 17/28—(ID: PF03424.9).

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που αντιστοιχούσε στο γονίδιο *estDZ2a*, αποδόθηκε σε EC: 3.1.1.x, και περιείχε αλληλουχικό τμήμα (domain)  $\alpha/\beta$  υδρολάσης<sub>3</sub> (PF07859). Το γονίδιο *estDZ2a* παρουσίασε 23% αλληλουχική ομοιότητα (κάλυψη 90%) με μια ήδη χαρακτηρισμένη ισοπρένυλ-κυστειν-α-καρβονυλική μεθυλεστεράση (κωδικός UniProt Q94AS5.1) και ομοιότητα 82% (κάλυψη 88%) με αλληλουχία καταχωρημένη στη βάση δεδομένων ως πιθανή λιπάση από τον μη καλλιεργημένο οργανισμό *Acetothermia bacterium* (κωδικός: BAL56305.1).

### **5.2.3 Κατασκευή μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών έκφρασης και επιλογή γονιδίου**

Για τη λειτουργική σάρωση του γονιδιωματικού υλικού που οδήγησε στην απομόνωση του γονιδίου *estDZ3*, η κατασκευή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης έκφρασης, η *in vivo* ανάλυση της και η επιλογή του θετικού κλώνου διεξήχθησαν από τους συνεργάτες μας στη MicroDish B.V, Ουτρέχτη, Ολλανδία, και περιεγράφηκαν συνοπτικά νωρίτερα, στο Κεφάλαιο 4.3.1. Για αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας και των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν παρακαλώ ανατρέξτε στην κοινή μας δημοσίευση (Zarafeta, Szabo et al. 2016).

### **5.2.4 Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων**

Το πλασμίδιο pET-CelDZ1a σχηματίστηκε με την εισαγωγή στον φορέα pET-28a(+) του γονιδίου *celDZ1a*. Το γονίδιο απομονώθηκε από το γονιδιωματικό υλικό που αναφέρθηκε



νωρίτερα με τη μέθοδο της PCR και τη χρήση του εμπρόσθιου εκκινητή 5'-  
 AAAAATCTAGAAAGGAGGAAACGATGAATAAATGGCATATTAACAAATGGTAC  
 TTTTTGTAGG-3' ο οποίος σχεδιάστηκε να φέρει σημείο περιορισμού της  
 ενδονουκλεάσης XbaI (υπογραμμισμένο) και ανάστροφου εκκινητή  
 5' AAAAACTCGAGTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTTTTTCCCATCGTCTCGCGAG  
 AAATAGGTTTATAAGGAATCCCC-3' ο οποίος φέρει σημείο περιορισμού της  
 ενδονουκλεάσης XhoI (υπογραμμισμένο), καθώς και ένα επίτοπο έξι ιστιδινών (διπλά  
 υπογραμμισμένο). Το πλασμίδιο pET-CelDZ1 που σχεδιάστηκε για την παραγωγή της  
 πρωτεΐνης χωρίς τη διαμεμβρανική έλικα, δημιουργήθηκε με την αντικατάσταση των 27  
 πρώτων αμινοξέων της CelDZ1α από ένα επίτοπο έξι ιστιδινών. Για το σκοπό αυτό,  
 πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με τη χρήση του εμπρόσθιου εκκινητή 5'-  
 AAAAATCTAGAAAGGAGGAAACGATG  
CACCACCACCACCACCACAAAGATACATCTTTAACCTTTAGTAGTTATGATCG  
 GG -3' που περιέχει περιοριστική αλληλουχία XbaI (υπογραμμισμένη) και τα κωδικόνια  
 που κωδικοποιούν τις ιστιδίνες (διπλά υπογραμμισμένη). Ως εκμαγείο της αντιγραφής  
 χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pET-CelDZ1 και ο αντίστροφος εκκινητής 5'-  
 AAAAACTCGAGTTATTTCCCATCGTCTCGCGAGAAATAGGTTTATAAGGAAT  
 TCCC-3' που φέρει αλληλουχία περιορισμού για την ενδονουκλεάση XhoI  
 (υπογραμμισμένη). Η επαλήθευση των της αλληλουχίας όλων των ανασυνδυασμένων  
 μορίων επιβεβαιώθηκε μετά από αλληλούχιση τους.

Το πλασμίδιο pET-EstDZ2α δημιουργήθηκε με συνένωση του γονιδίου *estDZ2α* με  
 τον φορέα pET-28a(+), κάνοντας χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών XbaI και  
 HindIII. Το γονίδιο απομονώθηκε από το μεταγονιδιωματικό υλικό με ενίσχυση του μέσω  
 αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με χρήση των ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών (5'-  
 AAAAATCTAGAAAGGAGGAAACGATGCGCACAATACTCTATGCAACTCTAGC-  
 3') (εμπρόσθιος) και  
 (5'-AAAAAAAGCTTTTAAATCTCTTCGGTCGTGGGATCATTAGACGCTCCAATG  
 GTGGCG -3') (ανάστροφος), οι οποίοι φέρουν τις αλληλουχίες περιορισμού XbaI και  
 HindIII αντίστοιχα (υπογραμμισμένες), και κλωνοποιήθηκε με αντίδραση συνένωσης. Το  
 πλασμίδιο pET-EstDZ2 δημιουργήθηκε με αντικατάσταση της αλληλουχίας DNA που  
 κωδικοποιεί για τα αμινοξέα 2-21 της EstDZ2α με την αλληλουχία που κωδικοποιεί το  
 επίτοπο έξι ιστιδινών. Για την κλωνοποίηση αυτή χρησιμοποιήθηκε ο εμπρόσθιος

εκκινητής (5'-AAAAATCTAGAAGGAGGAAACGAT

GCACCACCACCACCACCACCACCACGCGCCGCGTTCTCGTTCC-3')

(αλληλουχία XbaI υπογραμμισμένη και αλληλουχία επιτόπου ιστιδινών διπλά υπογραμμισμένη) και ο ανάστροφος εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε παραπάνω. Η δημιουργία του μεταλλαγμένου κλώνου EstDZ2α(S120A) έγινε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με επικάλυψη (overlap PCR) με τη χρήση των εκκινητών (5'-GAAGATCTTCGTGACGGGGCACGCAGCTGGGGGACATCTGACGGCT-3') (εμπρόσθιος)

και (5'-AGCCGTCAGATGTCCCCCAGCTGcGTGCCCCGTCACGAAGATCTTC-3') (ανάστροφος) σε συνδυασμό με τους προαναφερθείς εξωτερικούς εκκινητές. Η κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου γονιδίου στον φορέα pET-28a(+) έγινε με τον ίδιο τρόπο όπως προηγουμένως και έδωσε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-EstDZ2α(S120A).

Η κατασκευή του πλασμιδίου έκφρασης pLATE52-EstDZ3 για τη μελέτη της EstDZ3 διεξήχθη από τους συνεργάτες μας στη MicroDish B.V, Ουτρέχτη, Ολλανδία, και περιεγράφηκαν συνοπτικά νωρίτερα, στο Κεφάλαιο 4.3.1. Για αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας και των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν παρακαλώ ανατρέξτε στην κοινή μας δημοσίευση (Zarafeta, Szabo et al. 2016).

### 5.2.5 Υπερέκφραση γονιδίων και πρωτεϊνικός καθαρισμός

Η υπερέκφραση των γονιδίων *celDZ1*, *estDZ2* και *estDZ3* που απομονώθηκαν και μελετήθηκαν σε αυτή τη διατριβή έγινε με χρήση των κυττάρων έκφρασης BL21 (DE3) τα οποία μετασχηματίστηκαν με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pET-CelDZ1, pET-EstDZ2 και pLATE52-EstDZ3 αντίστοιχα. Η επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης έγινε σε όλες τις περιπτώσεις με χρήση του επαγωγέα IPTG σε συγκέντρωση 0,2 mM ο οποίος προστίθεται στις καλλιέργειες όταν αυτές έφταναν την τιμή οπτικής απορρόφησης στα 600 nm ( $OD_{600nm}$ ) 0,4-0,5. Οι καλλιέργειες που προορίζονταν για πρωτεϊνική απομόνωση αναπτύχθηκαν στους 25 °C μετά την επαγωγή υπό ανάδευση για 12-16 ώρες και στη συνέχεια οι πρωτεΐνες-στόχοι απομονώθηκαν με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου νικελίου σύμφωνα με το πρωτόκολλο και τα υλικά του κατασκευαστή (Ni-NTA kit, Qiagen).

Για τον καθαρισμό της EstDZ2, η μόνη διαφοροποίηση στο IMAC πρωτόκολλο καθαρισμού, ήταν η προσθήκη Triton X-100 σε συγκέντρωση 1% (v/v) στο διάλυμα NPI-10 και NPI-20 και η προσθήκη ενός επιπλέον βήματος έκπλυσης της στήλης με διπλάσιο

όγκο στήλης διαλύματος NPI-20 χωρίς Triton X-100. Επίσης, μετά τη λύση των κυττάρων και τη συλλογή του υδατοδιαλυτού μέρους, αυτό επώαστηκε για 1 ώρα στους 60 °C έτσι ώστε να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες του κυτταρικού φορέα. Τα επόμενα βήματα καθαρισμού έγιναν με βάση το βασικό πρωτόκολλο.

Η ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον καθαρισμό της EstDZ2, ακολουθήθηκε και για τον καθαρισμό της EstDZ3 με την εξής διαφοροποίηση. Μετά τη λύση των κυττάρων και τη συλλογή του υδατοδιαλυτού μέρους, αυτό επώαστηκε για 30 λεπτά στους 80 °C έτσι ώστε να αποδιαταχθούν και να καθιζάνουν οι μη θερμοανθεκτικές πρωτεΐνες του βακτηριακού κυττάρου, που στη συνέχεια απομακρύνθηκαν με μια επιπλέον φυγοκέντρηση.

Μετά το πέρας κάθε καθαρισμού, η μιδαζόλη απομακρυνόταν από το διάλυμα της πρωτεΐνης με τη χρήση στηλών αφαλάτωσης PD-10 της GE Healthcare, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **5.2.6 Ενζυμικές αντιδράσεις**

Για το βιοχημικό χαρακτηρισμό της CelDZ1 η κυτταρινολυτική της δράση αξιολογήθηκε μέσω της ποσοτικής μέτρησης των αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώνονται από το υπόστρωμα με τη μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Μια μονάδα ενεργότητας (unit, U) ορίστηκε ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1  $\mu\text{mol}$  αναγωγικών σακχάρων ανά λεπτό. Η βασική ενζυμική αντίδραση αποτελούνταν από ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων συγκέντρωσης 50 mM, pH 5, 1% (w/v) CMC ως υπόστρωμα και 3  $\mu\text{g/mL}$  ένζυμο. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή στους 70 °C για 5 λεπτά εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά. Οι αντιδράσεις τερματίζονταν με την προσθήκη ίσου όγκου DNS και το τελικό μείγμα υποβάλλονταν σε βρασμό για 5 λεπτά έτσι ώστε να συμπλοκοποιηθεί το DNS και να αναπτυχθεί το χαρακτηριστικό χρώμα. Στη συνέχεια, η ενζυμική ενεργότητα μετρούνταν μέσω της απορρόφησης στα 540 nm. Για τη μελέτη της επίδρασης του pH στην ενεργότητα της CelDZ1, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 40°C σε ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 50 mM οξικών αλάτων, φωσφορικών αλάτων, Tris-HCl, και γλυκίνης-NaOH για τις τιμές pH 4–6, 7, 8–9 και 10 αντίστοιχα. Η μελέτη του θερμοκρασιακού προφίλ της CelDZ1 έγινε με την επώαση της βασικής αντίδρασης στο θερμοκρασιακό εύρος 40 με 90 °C. Οι κινητικές παράμετροι του ενζύμου καθορίστηκαν με τη εισαγωγή συγκεντρώσεων CMC από 0,3 έως 3% στη βασική αντίδραση. Η επεξεργασία

των δεδομένων για την προσαρμογή των κινητικών καμπυλών έγινε με τη χρήση του προγράμματος Graphpad Prism 5.

Για τη μελέτη της εκλεκτικότητας της CelDZ1 ως προς το υπόστρωμα, αντικαταστάθηκε στη βασική αντίδραση η CMC με άλλους υδατοδιαλυτούς πολυσακχαρίτες. Για τα αδιάλυτα υποστρώματα όπως η Avicel και το διηθητικό χαρτί, ο χρόνος της αντίδρασης αυξήθηκε στις 24 ώρες καθώς χρησιμοποιήθηκε και δεκαπλάσια συγκέντρωση ενζύμου. Στα πειράματα για τον καθορισμό της θερμοσταθερότητας, το ένζυμο αντικαταστάθηκε στη βασική αντίδραση από προεπωασμένο σε διάφορες θερμοκρασίες και για ποικίλους χρόνους βιοκαταλύτη. Η αλοσταθερότητα και η αλοανθεκτικότητα της CelDZ1 μελετήθηκαν και αυτές με τη χρήση της βασικής αντίδρασης με μόνη διαφορά την προσθήκη των αλάτων σε αυτή. Το ίδιο ισχύει και για τη μελέτη της σταθερότητας έναντι των μετάλλων και των υπολοίπων αποδιατακτικών παραγόντων. Όλες οι μετρήσεις που παρουσιάζονται προέκυψαν από τριπλά δείγματα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Η μελέτη εύρεσης του σημείου τήξης της CelDZ1 έγινε μέσω διαφορικής φθορισμομετρίας σάρωσης με τη χρήση του αντιδραστηρίου SYPRO Orange (Thermo Scientific) σε μείγμα με 10 µg/mL ένζυμο σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου συγκέντρωσης 50 mM. Τα δείγματα επώαστηκαν στο θερμοκρασιακό εύρος 30–100 °C με τη χρήση συσκευής Biorad IQ5 real time PCR. Η ένταση του φθορισμού καταγράφηκε παράλληλα με την αύξηση της θερμοκρασίας ανά 1 °C με ενδιάμεσα διαστήματα παύσης τους ενός λεπτού. Το σημείο τήξης ( $T_m$ ) καθορίστηκε από μέσο της καμπύλης τήξης. Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν μέσω του προγράμματος Biorad iQ5 Optical System Software.

Σχετικά με τις ενζυμικές αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη της EstDZ2, για τις αρχικές μελέτες ενεργότητας χρησιμοποιήθηκε το κυτταρικό υλικό των κυττάρων που εξέφραζαν τις ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες. Για τη μελέτη των φυσικών υποστρωμάτων το κυτταρικό υλικό χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις που περιείχαν τα υποστρώματα της Εικόνας 3.4 Β σε συγκέντρωση 5 mM σε αντιδράσεις 100 µL σε ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Tris-HCl pH 7,3 που περιείχε 0,01% μπλε της βρωμοθυμόλης ως δείκτη pH. Η αντίδραση έγινε υπό ανάδευση για 15 λεπτά. Για το βιοχημικό χαρακτηρισμό, η καταλυτική ικανότητα της EstDZ2 κρίθηκε από την ποσοτικοποίηση της απελευθερωμένης παρανιτροφαινόλης (pNP) από τα υποστρώματα μετά από την μέτρηση

της απορρόφησης που δίνει στο 410 nm. Η βασική αντίδραση αποτελούνταν από 100  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος 25 mM Tris-HCl pH 8 με 0.05% Triton X-100 (v/v), στο οποίο περιέχονταν 2 mM pNP-C4 και 1  $\mu$ g καθαρού ενζύμου. Η αντίδραση πραγματοποιούνταν για 10 λεπτά στους 50 °C σε θερμοκυκλοποιητή με ρύθμιση προεπώασης στη θερμοκρασία της αντίδρασης που ακολουθούνταν από προσθήκη του ενζύμου. Με το πέρας της αντίδρασης η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε άμεσα στα 410 nm.

Για τη μελέτη της εκλεκτικότητας των υποστρωμάτων, στη βασική αντίδραση προστέθηκαν οι εστέρες παρανιτροφαινόλης με τα λιπαρά οξέα σε συγκεντρώσεις από 0,1 έως 1 mM. Για τη μελέτη του ιδανικού pH οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 40 °C σε ρυθμιστικά διαλύματα οξικών αλάτων, φωσφορικών, Tris-HCl, γλυκίνη-NaOH για pH 4–6, 6–7, 7–9 και 9–10 αντίστοιχα. Η ενεργότητα μετρήθηκε στα 348 nm όπου είναι το ισοβεστικό σημείο της παρανιτροφαινόλης και η μέτρηση της συγκέντρωσης δεν επηρεάζεται από το pH του διαλύματος. Η καμπύλη θερμοκρασίας έγινε με την επώαση της βασικής αντίδρασης σε θερμοκρασίες από 25 έως 70 °C. Στα πειράματα σταθερότητας στα μεταλλικά ιόντα, απορρυπαντικά, οργανικούς διαλύτες και παράγοντες αποδιάταξης, ο εξεταζόμενος παράγοντας προστίθενται κάθε φορά στη βασική αντίδραση. Η ενεργότητα που μετρήθηκε από την αντίδραση στην οποία δεν περιέχονταν κάποιος παράγοντας, ορίστηκε ως 100%, ενώ οι αντιδράσεις που περιείχαν τους παράγοντες αλλά όχι ένζυμο, χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλό. Η σταθερότητα του ενζύμου στους οργανικούς διαλύτες μετρήθηκε μετά από επώαση του σε 50% οργανικού διαλύτη για 1, 2 και 3 ώρες. Στη συνέχεια το υλικό επώασης αραιώθηκε ώστε να αφαιρεθεί ο οργανικός διαλύτης και το ένζυμο προστέθηκε στη βασική αντίδραση. Ως 100% ορίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου που δεν είχε προεπωαστεί σε οργανικό διαλύτη. Όλα τα πειραματικά αποτελέσματα προέκυψαν από την επανάληψη τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης.

Στην περίπτωση της EstDZ3, η βασική αντίδραση αποτελούνταν από ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Tris-HCl, pH 8 εμπλουτισμένο με 0.05% (v/v) Triton X-100, 2 mM pNP εστέρα του βουτυρικού και 2  $\mu$ g/mL ενζύμου. Η αντίδραση διεξάγονταν στους 75 °C, για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή όπου το διάλυμα της αντίδρασης επωαζόταν πριν την προσθήκη του ενζύμου. Η ποσοτικοποίηση της ενεργότητας του ενζύμου γινόταν μέσω μέτρησης της απορρόφησης στα 410 nm. Για τη δημιουργία της καμπύλης του pH, είχαν δημιουργηθεί καμπύλες αναφοράς pNP για κάθε τιμή pH που χρησιμοποιήθηκε. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν, διάλυμα οξικών αλάτων, PIPES, Tris-HCl και ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης- NaOH για τιμές pH 4–6, 7, 8–9, και 10 αντίστοιχα. Για τις αρχικά πειράματα εκλεκτικότητας όπου χρησιμοποιούνταν το υδατοδιαλυτό κλάσμα

των κυττάρων, οι τυφλές αντιδράσεις περιείχαν κυτταρικό υλικό μετασχηματισμένων κυττάρων με άδειο πλασμιδιακό φορέα.

### 5.2.7 Ζυμογραφία

#### Ζυμογράφημα κυτταρινασών

Για την ανίχνευση υδρολυτικής ενεργότητας ως προς την κυτταρίνη, στη βασική συνταγή προετοιμασίας της γέλης ακριλαμιδίου με SDS, προστίθεται καρβόξυλ- μέθυλ- κυτταρίνης (CMC) σε συγκέντρωση 0,25% (w/v). Για τα δείγματα που φορτώνονται στη γέλη ζυμογραφίας δεν προηγείται βρασμός για να μην αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες και χάσουν την ενζυμική τους ενεργότητα. Μετά την ηλεκτροφόρηση, η γέλη ξεπλένεται και επώαζεται σε διάλυμα pH 7 Tris-HCl συγκέντρωσης 50 mM για 2 ώρες. Στη συνέχεια, η γέλη εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης Congo Red 0,5% (w/v) για 40 λεπτά, ξεπλένεται και μεταφέρεται σε διάλυμα αποχρωματισμού συγκέντρωσης 1 M Tris-HCl pH 7. Η γέλη ξεπλένεται ξανά και εμβαπτίζεται σε διάλυμα σταθεροποίησης χρώματος με 1 M MgCl<sub>2</sub>. Οι ζώνες που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνη με κυτταρινολυτική δράση, γίνονται ορατές αφού έχουν αποχρωματιστεί και διακρίνονται από την υπόλοιπη γέλη που είναι χρωματισμένη κόκκινη.

#### Ζυμογράφημα εστερασών

Και στην περίπτωση των εστερασών, είναι δυνατή η ανίχνευση της εστερολυτικής δράσης μέσω ζυμογραφίας. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η παρασκευή γέλης Native-PAGE στην οποία δεν έχουν προστεθεί αποδιατακτικοί παράγοντες όπως SDS, μερκαπτοαιθανόλη και βρασμός των δειγμάτων, και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάτω από ήπιες συνθήκες όπως 120 V και 35 mA, ενώ η συσκευή που περιέχει τη γέλη και το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης εμβαπτίζεται σε νερό με πάγο κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Μετά το πέρας της διαδικασίας, η γέλη ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και επώαζεται για 30 λεπτά στις βέλτιστες σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και θερμοκρασία, αναλόγως τις απαιτήσεις του ενζύμου που μελετάται. Στο ρυθμιστικό διάλυμα έχει προστεθεί 0,1 % χρωστικής Fast Red TR-άλατος και προστίθεται επίσης 2% (v/v) διαλύματος 1% (v/v) οξικού 1-ναφθυλεστέρα (1-naphthyl acetate) διαλυμένου σε ακετόνη. Η απεικόνιση της εστερολυτικής δράσης γίνεται με την εμφάνιση κόκκινου-καφέ χρώματος στη ζώνη ηλεκτροφόρηση που αντιστοιχεί στο ένζυμο.

### **5.2.8 Κρυσταλλογραφία**

Οι δομικές μελέτες της CelDZ1 πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο του Hotzyme από τους συνεργάτες Christopher Sayer, Michail N. Isupov και Jennifer A. Littlechild (Henry Wellcome Building for Biocatalysis, Biosciences, College of Life and Environmental Sciences, University of Exeter, United Kingdom). Αναλυτική περιγραφή των σχετικών μεθόδων μπορείτε να βρείτε στην κοινή μας δημοσίευση (Zarafeta, Kissas et al. 2016).

### **5.2.9 Φυλογενετική ανάλυση**

Η φυλογενετική ανάλυση του της αλληλουχίας της EstDZ2 πραγματοποιήθηκε από τους συνεργάτες μας (Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center for Biotechnology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation). Η διαδικασία έχει περιγράψει συνοπτικά στο αντίστοιχο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Αναλυτική περιγραφή της μεθόδου ανάλυσης περιλαμβάνεται στη σχετική κοινή μας μελέτη (Zarafeta, Moschidi et al. 2016).

### **5.2.10 Πολλαπλή στοίχιση και δημιουργία δομικών μοντέλων**

Η πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών της EstDZ2 και EstDZ3 έγινε με τη χρήση του εργαλείου Clustal Omega (Sievers, Wilm et al. 2011) και η απεικόνιση τους δημιουργήθηκε με το ESPript (Gouet, Courcelle et al. 1999). Οι επιμέρους διαδικασίες που αφορούν το κάθε ένζυμο έχουν ήδη περιγράψει στα αντίστοιχα κεφάλαια των αποτελεσμάτων.

Τα μοντέλο της δομής της EstDZ2 και EstDZ3 δημιουργήθηκε μέσω του εργαλείου I-TASSER (Yang, Yan et al. 2015) και μελετήθηκε σε συνεργασία με τη Δρ. Ευαγγελία Χρυσίνα, (Εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών). Οι επιμέρους παράμετροι τη κάθε μελέτης περιγράφονται στα αντίστοιχα κεφάλαια των αποτελεσμάτων.

## 6. ΕΠΙΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερα θερμοσταθερά ένζυμα έρχονται στο φως, κυρίως μέσω της χρήσης εργαλείων μεταγονιδιωματικής σάρωσης που επέτρεψε την πρόσβαση στο γονιδίωμα οργανισμών που δε μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο. Το ποσοστό αυτών των οργανισμών ανέρχεται στο 99% της βιοποικιλότητας, κάτι που καθιστά σαφή τη χρησιμότητα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης. Παραδόξως, παρότι όπως είδαμε στα προηγούμενα κεφάλαια, η σημαντικότητα των θερμοανθεκτικών βιοκαταλυτών είναι τεράστια για τη βιοτεχνολογία, πολύ λίγα από αυτά τα ένζυμα χρησιμοποιούνται σήμερα στις βιομηχανικές διεργασίες. Τα περισσότερα ένζυμα που έχουν ενσωματωθεί στη βιομηχανία είναι μεσόφιλα, πιθανότατα λόγω του ότι είναι αυτά που απομονώθηκαν πρώτα και μελετήθηκαν εκτεταμένα (Levisson, van der Oost et al. 2009). Τα νέα ένζυμα με βελτιωμένες ιδιότητες που συνεχώς ανακαλύπτονται τα τελευταία χρόνια, εισάγονται στη βιομηχανία με πολύ αργούς ρυθμούς. Σε μια αναλυτική ανασκόπηση των Ferrer et al. (Ferrer, Martínez-Martínez et al. 2016) στην οποία οι συγγραφείς επεδίωξαν να δώσουν εξήγηση σε αυτό το παράδοξο φαινόμενο, οι συγγραφείς υποδεικνύουν τρεις βασικούς λόγους για τους οποίους οι νέοι βιοκαταλύτες δεν αξιοποιούνται άμεσα. Ο πρώτος λόγος αφορά το ότι το στάδιο της βελτιστοποίησης των ενζύμων που προορίζονται για βιομηχανική χρήση είναι χρονοβόρο και δαπανηρό. Ο δεύτερος λόγος είναι ότι τα κριτήρια που εισάγει η βιομηχανία για την επιλογή των βιοκαταλυτών είναι πολύ αυστηρά ενώ ο τρίτος λόγος αφορά την παράβαση των δικαιωμάτων χρήσης και αξιοποίησης που ορίζονται από τις διεθνείς πατέντες. Παρόλα αυτά, όσο η λίστα των θερμοφίλων, υπερθερμοφίλων και γενικώς ακραιόφιλων ενζύμων μεγαλώνει, όλο και περισσότεροι καινοτόμοι βιοκαταλύτες που πληρούν τα κριτήρια της βιομηχανίας θα εισάγονται στις βιοτεχνολογικές διεργασίες. Πέραν της βιοτεχνολογικής τους σημασίας, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός νέων ενζύμων που διαθέτουν την εγγενή ικανότητα να λειτουργούν βέλτιστα κάτω από ακραίες συνθήκες θα διευρύνουν τη βασική γνώση μας για την εξελικτική πορεία των βιοκαταλυτών και των μοριακών μηχανισμών πρωτεϊνικής σταθεροποίησης και κατ' επέκταση θα κατευθύνουν τις μελλοντικές προσπάθειες για τον σχεδιασμό νέων ενζύμων.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η εφαρμογή μεθόδων ανάλυσης υπερυψηλού ρυθμού σάρωσης με απώτερο στόχο την ανακάλυψη τέτοιων νέων θερμοανθεκτικών υδρολασών. Η μελέτη αυτή αποτελεί την αφετηρία για τη χρήση των νέων βιοκαταλυτών



σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές αλλά και τη διεύρυνση της γνώσης μας πάνω στις ακραιόφιλες πρωτεΐνες και τα χαρακτηριστικά τους.

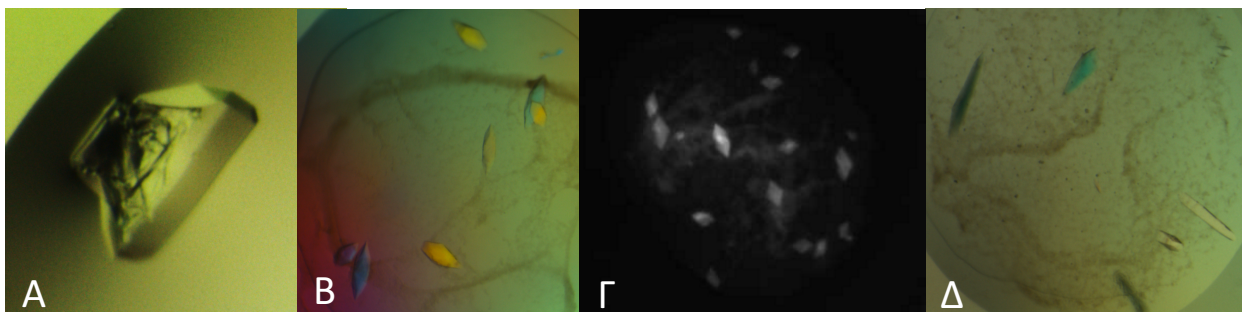
Οι πειραματικές διαδικασίες που εφαρμόστηκαν στη διάρκεια αυτής της διατριβής κάλυψαν ένα ευρύ φάσμα καθώς περιλάμβαναν τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, τροποποίηση και καλλιέργεια βακτηρίων, *in vivo* αλλά και *in silico* ανάλυση (μετα)γονιδιωματικών βιβλιοθηκών και δεδομένων αλληλούχισης καθώς και βιοχημικές και κινητικές μελέτες. Στο πλαίσιο μιας διεθνούς ερευνητικής κοινοπραξίας, μέσω της οποίας έγινε ανταλλαγή υλικών, απόψεων, τεχνικών και γνώσης επιτεύχθηκε η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός τριών νέων θερμοσταθερών υδρολασών, των CelDZ1, EstDZ2 και EstDZ3 με ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά που τις καθιστούν υποψήφιους βιοκαταλύτες για βιομηχανική χρήση αλλά και μοριακά μοντέλα για την μελέτη των μηχανισμών θερμοσταθεροποίησης των πρωτεϊνών.

Η ανακάλυψη και η μελέτη των βασικών χαρακτηριστικών αυτών των τριών νέων υδρολασών θέτει τη βάση για περαιτέρω μελέτες. Συγκεκριμένα, η CelDZ1 λόγω της θερμοσταθερότητας και της πολύ υψηλής αλοσταθερότητας και αλοανθεκτικότητας που παρουσιάζει θα μπορούσε να δοκιμαστεί σε ενζυμικά μείγματα που προορίζονται για την υδρόλυση της βιομάζας κάτω από υψηλές θερμοκρασίες και χωρίς να αφαιρούνται τα προϊόντα της εξουδετέρωσης των ισχυρών οξέων και βάσεων του πρώτου σταδίου επεξεργασίας. Ακόμα, θα μπορούσε να εξεταστεί η χρησιμότητα της στη βιομηχανία των απορρυπαντικών για παράδειγμα εξετάζοντας τη σταθερότητα της παρουσία πρωτεασών που συνυπάρχουν στα μείγματα του προϊόντος, καθώς και στη βιομηχανία των τροφίμων και συγκεκριμένα στην αρτοποιία για την ενίσχυση της υφής και της γεύσης του τελικού προϊόντος. Παραδείγματα σχετικών ενζύμων που αποτελούν εμπορικά σκευάσματα περιλαμβάνουν τα Celluclean®, Carezyme®, Celluclast®, Cellic® από την κορυφαία εταιρία βιοτεχνολογίας Novozymes τα οποία έχουν ως βάση βακτηριακές και μυκητιακές κυτταρινάσες (EC 3.2.1.4) και προορίζονται για χρήση σε μείγματα απορρυπαντικών (Celluclean®, Carezyme®,) και μείγματα επεξεργασίας της λιγνοκυτταρικής βιομάζας (Celluclast®, Cellic®).

Όσον αφορά τη θερμοανθεκτική εστεράση EstDZ2, η οποία όπως είδαμε εγκαινιάζει μια νέα οικογένεια λιπολυτικών ενζύμων, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η μελέτη της εκλεκτικότητας των υποθετικών υδρολασών και εστερασών που εμφανίζονται σε αυτή την ίδια φυλογενετική οικογένεια, ως προς τα υποστρώματα, καθώς και η μελέτη της EstDZ2 προς άλλα φυσικά και μη υποστρώματα με σκοπό την αποσαφήνιση του φυσικού ρόλου αυτού του ενζύμου και τη διερεύνηση της βιοτεχνολογικής του χρησιμότητας. Μεγάλες

εταιρείες βιοτεχνολογίας όπως η Fluka, Novozymes, Amano, Diversa, Roche Diagnostics, Thermogen και άλλες έχουν εμπορευματοποιήσει εστερολυτικά ένζυμα. Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι αυτό του ενζύμου-ορόσημο Novozyme 435<sup>®</sup>, ενός μετρίως θερμοανθεκτικού λιπολυτικού ενζύμου με μη ειδική δράση που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολλές εφαρμογές τόσο υδρολυτικές όσο και συνθετικές. Συμπληρωματικά, χρήσιμες πληροφορίες θα προσφέρει και η μελέτη της κρυσταλλικής δομής της EstDZ2, η οποία θα ρίξει φως τόσο στα καταλυτικά όσο και στα εξελικτικά χαρακτηριστικά του ενζύμου. Προς αυτή την κατεύθυνση, ήδη έχουν γίνει τα πρώτα πειράματα διερεύνησης της ενεργότητας του νέου ενζύμου έναντι διαφόρων εστερικών υποστρωμάτων αλλά και τα πρώτα βήματα της κρυστάλλωσης και τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά.

Παρομοίως, σχετικά με την υπερθερμόφιλη εστεράση EstDZ3, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε σε μελλοντικές μελέτες να διερευνηθεί η πραγματική λειτουργία του ενζύμου έτσι ώστε να κατανοηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό η βιοτεχνολογική χρησιμότητα του και οι βιοκαταλυτικές δυνατότητες του. Φυσικά, η μελέτη της κρυσταλλικής δομής και σε αυτή την περίπτωση που είτε θα επιβεβαιώσει είτε θα διαψεύσει τη μελέτη του μοντέλου της νέας εστεράση θα δώσει σημαντικές πληροφορίες τόσο για τη φύση του ενζύμου όσο και για τους μηχανισμούς θερμοσταθεροποίησης του. Και σε αυτή την περίπτωση, με σκοπό να μελετηθεί η πραγματική δομή του ενζύμου, έχει ήδη ξεκινήσει η διαδικασία παρασκευής πρωτεϊνικών κρυστάλλων και ήδη υπάρχουν τα πρώτα ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Εικόνα 6.1).



**Εικόνα 6.1:** Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι της εστεράσης EstDZ2 (A) και της εστεράσης EstDZ3 (B, Γ, Δ).

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdulla, H. M. and El-Shatoury, S. A. (2007). "Actinomycetes in rice straw decomposition." Waste Management, **27**(6): 850-853.

Adler-Nissen, J. (1982). "Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases." Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **32**(1): 138-156.

Ali, S., Hall J., Soole K. L., Fontes, C. M., Hazlewood, G. P., Hirst, B. H., and Gilbert H. J. (1995). "Targeted expression of microbial cellulases in transgenic animals." Progress in Biotechnology, **10**: 279-293.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, **25**(17), 3389-3402.

Alvarez, T. M., Paiva, J. H., Ruiz, D. M., Cairo, J. P. L., Pereira, I. O., Paixão, D. A., and Squina, F. M. (2013). Structure and function of a novel cellulase 5 from sugarcane soil metagenome. PloS one, **8**(12), e83635.

Anderson, D. E., Bechtel, W. J. and Dahlquist, F. W. (1990). "pH-induced denaturation of proteins: a single salt bridge contributes 3-5 kcal/mol to the free energy of folding of T4 lysozyme." Biochemistry **29**(9): 2403-2408.

Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H. Z., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M. J., Natale, D. A., O'Donovan, C., Redaschi N. and Yeh L. S. L. (2004). "UniProt: the Universal Protein knowledgebase." Nucleic Acids Research, **32**: D115-D119.

Arpigny, J. L. and Jaeger, K. E. (1999). "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties." Biochemical Journal, **343**(1): 177-183.

Aygan, A., Arıkan, B., Korkmaz, H., Dinçer, S. and Çolak, Ö. (2008). "Highly thermostable and alkaline  $\alpha$ -amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68." Brazilian Journal of Microbiology, **39**(3): 547-553.

Bailey, B. and Lumsden, R. (1998). "Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens." Trichoderma and Gliocladium, **2**: 185-204.

Baitsch, D., Sandu, C., Brandsch, R. and Igloi, G. L. (2001). "Gene cluster on pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* involved in degradation of the plant alkaloid nicotine: cloning, purification, and characterization of 2, 6-dihydroxypyridine 3-hydroxylase." Journal of Bacteriology, **183**(18): 5262-5267.

Bajpai, P. (1999). "Application of enzymes in the pulp and paper industry." Biotechnology Progress, **15**(2): 147-157.

Baker, R. A. and Wicker, L. (1996). "Current and potential applications of enzyme infusion in the food industry." Trends in Food Science & Technology, **7**(9): 279-284.

Bamforth, C. (2009). "Current perspectives on the role of enzymes in brewing." Journal of Cereal Science, **50**(3): 353-357.

Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P. and Marquardt, J. (1993). "Carotenoid-binding proteins of photosystem II." European Journal of Biochemistry, **212**(2): 297-303.

Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S. and Studholme, D. J. (2004). "The Pfam protein families database." Nucleic Acids Research, **32**(suppl 1), D138-D141.

Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed R. and Shoham Y. (1998). "Cellulose, cellulases and cellulosomes." Current Opinion in Structural Biology, **8**(5): 548-557.

Bayer, S., Kunert, A., Ballschmiter M. and Greiner-Stoeffele T. (2010). "Indication for a new lipolytic enzyme family: isolation and characterization of two esterases from a metagenomic library." Journal of Molecular Microbiology And Biotechnology, **18**(3): 181-187.

Eijsink, V. G., Bjørk, A., Gåseidnes, S., Sirevåg, R., Synstad, B., van den Burg, B., & Vriend, G. (2004). Rational engineering of enzyme stability. Journal of Biotechnology, **113**(1), 105-120.

Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan L. and Hoondal G. (2001). "Microbial xylanases and their industrial applications: a review." Applied Microbiology and Biotechnology, **56**(3-4): 326-338.

Benavente, R., Esteban-Torres, M., Acebrón, I., las Rivas, B., Muñoz, R., Álvarez, Y., and Mancheño, J. M. (2013). Structure, biochemical characterization and analysis of the pleomorphism of carboxylesterase Cest-2923 from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. FEBS Journal, **280**(24), 6658-6671.

Bhat, M. K. (2000). "Cellulases and related enzymes in biotechnology." Biotechnology Advances, **18**(5): 355-383.

Bhosale, H., Shaheen U. and Kadam T. (2016). "Characterization of a Hyperthermostable Alkaline Lipase from *Bacillus sonorensis* 4R." Enzyme Research, **2016**. Article ID 4170684

Bidlack, J. (1992). "Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants." Proceedings of the Oklahoma Academy of Science, **72**, pp. 51-56.

Bon, E. P. and Ferrara M. A. (2007). "Bioethanol production via enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass." The Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries. FAO, **12**.

Bornscheuer, U. T. (2002). "Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis." FEMS Microbiology Reviews, **26**(1): 73-81.

Bornscheuer, U. T. and Kazlauskas R. J. (2006). Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations, John Wiley & Sons.

Braaz, R., Handrick R. and Jendrossek D. (2003). "Identification and characterisation of the catalytic triad of the alkaliphilic thermotolerant PHA depolymerase PhaZ7 of *Paucimonas lemoignei*." FEMS Microbiology Letters, **224**(1): 107-112.

Brockerhoff, H. (2012). Lipolytic enzymes, Elsevier.

Byun, J.-S., Rhee, J.-K., Kim, N. D., Yoon, J., Kim, D.-U., Koh, E., Oh, J.-W. and Cho H.-S. (2007). "Crystal structure of hyperthermophilic esterase EstE1 and the relationship between its dimerization and thermostability properties." BMC Structural Biology, **7**(1): 1.

Caldwell, P., Luk, D. C., Weissbach H. and Brot N. (1978). "Oxidation of the methionine residues of *Escherichia coli* ribosomal protein L12 decreases the protein's biological activity." Proceedings of the National Academy of Sciences, **75**(11): 5349-5352.

Canales, A., Garza, R. J. Sierra and Arnold R. (1988). "The application of a beta-glucanase with additional side activities in brewing." Technical Quarterly-Master Brewers Association of the Americas (USA).

Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard V. and Henrissat B. (2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics." Nucleic Acids Research, **37**(suppl 1): D233-D238.

Chandrasekharaiah, M., Thulasi, A., Bagath M., Kumar, D. P., Santosh, S. S., Palanivel, C., Jose V. L. and Sampath K. T. (2012). "Identification of cellulase gene from the metagenome of *Equus burchelli* fecal samples and functional characterization of a novel bifunctional cellulolytic enzyme." Applied Biochemistry and Biotechnology, **167**(1): 132-141.

Chet, I., Benhamou N. and Haran S. (1998). "Mycoparasitism and lytic enzymes." Trichoderma and Gliocladium, **2**: 153-172.

Chu, X., He, H., Guo C., and Sun B. (2008). "Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea." Applied Microbiology and Biotechnology, **80**(4): 615-625.

Çinar, I. (2005). "Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids." Process Biochemistry, **40**(2): 945-949.

Cornec, L., Robineau, J., Rolland, J. L., Dietrich J. and Barbier G. (1998). "Thermostable esterases screened on hyperthermophilic archaeal and bacterial strains isolated from deep-sea hydrothermal vents: characterization of esterase activity of a hyperthermophilic archaeum, *Pyrococcus abyssi*." Journal of Marine Biotechnology, **6**(2): 104-110.

Couto, S. R. and Sanromán M. A. (2006). "Application of solid-state fermentation to food industry—a review." Journal of Food Engineering, **76**(3): 291-302.

Dalmaso, G. Z. L., Ferreira D. and Vermelho A. B. (2015). "Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications." Marine drugs, **13**(4): 1925-1965.

Danieli, B., Luisetti, M., Sampognaro, G., Carrea G. and Riva S. (1997). "Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **3**(1): 193-201.

Das, A. K., Bellizzi, J. J., Tandel, S., Biehl, E., Clardy, J. and Hofmann S. L. (2000). "Structural basis for the insensitivity of a serine enzyme (palmitoyl-protein thioesterase) to phenylmethylsulfonyl fluoride." Journal of Biological Chemistry, **275**(31): 23847-23851.

De Carvalho, L. M. J., I. M. De Castro and C. A. B. Da Silva (2008). "A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merrill) by micro-and ultra-filtration." Journal of Food Engineering, **87**(4): 447-454.

De Simone, G., S. Galdiero, G. Manco, D. Lang, M. Rossi and C. Pedone (2000). "A snapshot of a transition state analogue of a novel thermophilic esterase belonging to the subfamily of mammalian hormone-sensitive lipase." Journal of Molecular Biology, **303**(5): 761-771.

De Simone, G., Menchise, V., Manco, G., Mandrich, L., Sorrentino, N., Lang, D., Rossi M. and Pedone C. (2001). "The crystal structure of a hyper-thermophilic carboxylesterase from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*." Journal of Molecular Biology, **314**(3): 507-518.

Dhiman, T., Zaman, M., Gimenez, R., Walters, J. and Treacher R. (2002). "Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding." Animal Feed Science and Technology, **101**(1): 115-125.

Dienes, D., Egyhazi, A. and Reczey K. (2004). "Treatment of recycled fiber with *Trichoderma cellulases*." Industrial Crops and Products, **20**(1): 11-21.

Drzewiecki, K., Angelov, A., Ballschmiter, M., Tiefenbach, K. J., Sterner, R. and Liebl, W. (2010). "Hyperthermostable acetyl xylan esterase." Microbial Biotechnology, **3**(1): 84-92.

Du, W., Xu, Y., Zeng, J. and Liu, D. H. (2004). "Novozym 435-catalysed transesterification of crude soya bean oils for biodiesel production in a solvent-free medium." Biotechnology and Applied Biochemistry, **40**(2): 187-190.

Dutta, T., Sengupta, R., Sahoo, R., Sinha Ray, S., Bhattacharjee, A., & Ghosh, S. (2007). A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization. Letters in Applied Microbiology, **44**(2), 206-211

Eijsink, V. G., Veltman, O. R., Aukema, W., Vriend, G., & Venema, G. (1995). Structural determinants of the stability of thermolysin-like proteinases. Nature Structural & Molecular Biology, **2**(5), 374-379.

Eijsink, V. G., Bjørk, A., Gåseidnes, S., Sirevåg, R., Synstad, B., van den Burg, B., & Vriend, G. (2004). Rational engineering of enzyme stability. Journal of Biotechnology, **113**(1), 105-120.

Elend, C., Schmeisser, C., Leggewie, C., Babiak, P., Carballeira, J. D., Steele, H. L. and Streit, W. R. (2006). Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. Applied and Environmental Microbiology, **72**(5), 3637-3645.

Falconnier, B., Lapierre, C., Lesage-Meessen, L., Yonnet, G., Brunerie, P., Colonna-Ceccaldi, B., and Asther, M. (1994). Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: identification of metabolic pathways. Journal of Biotechnology, **37**(2), 123-132.

Feitkenhauer, H. (2003). "Anaerobic digestion of desizing wastewater: influence of pretreatment and anionic surfactant on degradation and intermediate accumulation." Enzyme and Microbial Technology, **33**(2): 250-258.

Fernández-Arrojo, L., Guazzaroni, M.-E., López-Cortés, N., Beloqui A. and Ferrer M. (2010). "Metagenomic era for biocatalyst identification." Current Opinion in Biotechnology, **21**(6): 725-733.

Ferrer, M., Martínez-Martínez, M., Bargiela, R., Streit, W. R, Golyshina O. V. and Golyshin P. N. (2016). "Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends." Microbial Biotechnology, **9**(1): 22-34.

Finn, R. D., Clements J. and Eddy S. R. (2011). "HMMER web server: interactive sequence similarity searching." Nucleic Acids Research: gkr367.

Fukumori, F., Kudo, T., Narahashi Y. and Horikoshi K. (1986). "Molecular cloning and nucleotide sequence of the alkaline cellulase gene from the alkalophilic *Bacillus* sp. strain 1139." Journal of General Microbiology, **132**(8): 2329-2335.

Gao, R., Feng, Y., Ishikawa, K., Ishida, H., Ando, S., Kosugi Y. and Cao S. (2003). "Cloning, purification and properties of a hyperthermophilic esterase from archaeon *Aeropyrum pernix* K1." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **24**: 1-8.

Giver, L., Gershenson, A., Freskgard P.-O. and Arnold F. H. (1998). "Directed evolution of a thermostable esterase." Proceedings of the National Academy of Sciences, **95**(22): 12809-12813.

Gouet, P., Courcelle E. and Stuart D. I. (1999). "ESPrict: analysis of multiple sequence alignments in PostScript." Bioinformatics, **15**(4): 305-308.

Graham, H. and Balnavel D. (2008). "15 Dietary enzymes for increasing energy availability." Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding, **95**.

Graham, J. E., Clark, M. E., Nadler, D. C., Huffer, S., Chokhawala, H. A., Rowland, S. E., Blanch, H. W., Clark, D. S. and Robb F. T. (2011). "Identification and characterization of a multidomain hyperthermophilic cellulase from an archaeal enrichment." Nature Communications, **2**: 375.

- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. and Chauhan B. (2003). "Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective." Process Biochemistry, **38**(11): 1599-1616.
- Haas, J., Roth, S., Arnold, K., Kiefer, F., Schmidt, T., Bordoli L. and Schwede T. (2013). "The Protein Model Portal—a comprehensive resource for protein structure and model information." Database, **2013**: bat031.
- Haki, G. and Rakshit, S. (2003). "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review." Bioresource Technology, **89**(1): 17-34.
- Han, Q., Robinson, H. and Li, J. (2012). "Biochemical identification and crystal structure of kynurenine formamidase from *Drosophila melanogaster*." Biochemical Journal, **446**(2): 253-260.
- Handelsman, J. (2004). "Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms." Microbiology and Molecular Biology Reviews, **68**(4): 669-685.
- Handrick, R., Reinhardt, S., Focarete, M. L., Scandola, M., Adamus, G., Kowalczyk, M., and Jendrossek, D. (2001). "A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids." Journal of Biological Chemistry, **276**(39): 36215-36224.
- Hardy, F., Vriend, G., Veltman, O., Van der Vinne, B., Venema, G. and Eijsink, V. (1993). "Stabilization of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease by introduction of prolines." FEBS Letters, **317**(1): 89-92.
- Harman, G. and Björkman, T. (1998). "Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement." Trichoderma and Gliocladium, **2**: 229-265.
- Harris, A. D. and Ramalingam, C. (2010). "Xylanases and its application in food industry: a review." Journal of Experimental Sciences, **1**(7).
- Hebeish, A. and Ibrahim, N. (2007). "The impact of frontier sciences on textile industry." Colourage **54**(4): 41-55.
- Hermoso, J. A., Lagartera, L., González, A., Stelter, M., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J. L., and Menéndez, M. (2005). "Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce." Nature Structural & Molecular Biology, **12**(6): 533-538.
- Hess, M., Katzer, M. and Antranikian, G. (2008). "Extremely thermostable esterases from the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus*." Extremophiles, **12**(3): 351-364.
- Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B. and Eijsink, V. G (2012). "Novel enzymes for the degradation of cellulose." Biotechnology for Biofuels, **5**(1): 1-13.



Hu, Y., Fu, C., Huang, Y., Yin, Y., Cheng, G., Lei, F., ... & Zhu, B. (2010). "Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment." FEMS Microbiology Ecology, **72**(2), 228-237.

Huddleston, S., Yallop, C. A., and Charalambous, B. M. (1995). "The identification and partial characterization of a novel inducible extracellular thermostable esterase from the archaeon *Sulfolobus shibatae*." Biochemical and Biophysical Research Communications, **216**(2), 495-500.

Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J. and Schuster, S. C. (2007). "MEGAN analysis of metagenomic data." Genome Research, **17**(3): 377-386.

Ikeda, M. and Clark, D. S. (1998). "Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*." Biotechnology and Bioengineering, **57**(5): 624-629.

Jaenicke, R. (1998). "What ultrastable globular proteins teach us about protein stabilization." Biochemistry, **63**(3): 312-321.

Jeon, J. H., Kim, J. T., Lee, H. S., Kim, S. J., Kang, S. G., Choi, S. H., & Lee, J. H. (2011). "Novel lipolytic enzymes identified from metagenomic library of deep-sea sediment." Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, **2011**.

Jumas-Bilak, E., Roudiere, L. and Marchandin, H. (2009). "Description of 'Synergistetes' phyl. nov. and emended description of the phylum 'Deferribacteres' and of the family Syntrophomonadaceae, phylum 'Firmicutes'." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **59**(5): 1028-1035.

Karmakar, M. and Ray, R. (2011). "Current trends in research and application of microbial cellulases." Research Journal of Microbiology, **6**(1): 41-53.

Karshikoff, A. and Ladenstein, R. (2001). "Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a 'traffic rule' for hot roads." Trends in Biochemical Sciences, **26**(9): 550-557.

Kawamura, S., Kakuta, Y., Tanaka, I., Hikichi, K., Kuhara, S., Yamasaki N. and Kimura, M. (1996). "Glycine-15 in the bend between two  $\alpha$ -helices can explain the thermostability of DNA binding protein HU from *Bacillus stearothermophilus*." Biochemistry, **35**(4): 1195-1200.

Kim, E. Y., Oh, K. H., Lee, M. H., Kang, C. H., Oh, T. K., & Yoon, J. H. (2009). "Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases." Applied and Environmental Microbiology, **75**(1), 257-260.

Kim, Y. O., Park, I. S., Kim, H. K., Nam, B. H., Kong, H. J., Kim, W. J., and Lee, S. J. (2013). "Shewanella sp. Ke75 esterase with specificity for p-nitrophenyl butyrate: Gene cloning and characterization." Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, **56**(1), 55-62.

Kirk, O., Borchert, T. V. and Fuglsang, C. C. (2002). "Industrial enzyme applications." Current Opinion in Biotechnology, **13**(4): 345-351.

Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P. and Bohn A. (2005). "Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material." Angewandte Chemie International Edition, **44**(22): 3358-3393.

Klibanov, A. M. (2001). "Improving enzymes by using them in organic solvents." Nature, **409**(6817): 241-246.

Klinke, H. B., Thomsen, A. and Ahring, B. K. (2004). "Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass." Applied Microbiology and Biotechnology, **66**(1): 10-26.

Kojoh, K., Matsuzawa, H. and Wakagi T. (1999). "Zinc and an N-terminal extra stretch of the ferredoxin from a thermoacidophilic archaeon stabilize the molecule at high temperature." European Journal of Biochemistry, **264**(1): 85-91.

Kontkanen, H., Tenkanen, M., Fagerström, R. and Reinikainen, T. (2004). "Characterisation of steryl esterase activities in commercial lipase preparations." Journal of Biotechnology, **108**(1): 51-59.

Krissinel, E. and Henrick, K. (2007). "Inference of macromolecular assemblies from crystalline state." Journal of Molecular Biology, **372**(3): 774-797.

Kuchner, O. and Arnold, F. H. (1997). "Directed evolution of enzyme catalysts." Trends in Biotechnology, **15**(12): 523-530.

Kuhad, R., Gupta, R. and Khasa, Y. (2010). "Bioethanol production from lignocellulosic biomass: an overview" Teri Press, New Delhi, India.

Kuhad, R. C., Gupta, R. and Singh, A. (2011). "Microbial cellulases and their industrial applications." Enzyme research, **2011**.

Kuhad, R. C., Mehta, G., Gupta R., and Sharma, K. K. (2010). "Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*." Biomass and Bioenergy, **34**(8): 1189-1194.

Kuhad, R. C. and Singh, A. (1993). "Lignocellulose biotechnology: current and future prospects." Critical Reviews in Biotechnology, **13**(2): 151-172.

Kumar, S., Tsai, C.-J. and Nussinov, R. (2000). "Factors enhancing protein thermostability." Protein Engineering, **13**(3): 179-191.

Ladoukakis, E., Pilalis, E., Chatziioannou A., and Kolisis F. (2014). "ANASTASIA a versatile web platform for metagenomic analysis." New Biotechnology **31**: S170.

Lai, K.-K., Stogios, P. J., Vu, C., Xu, X., Cui, H., Molloy, S., Savchenko, A., Yakunin, A. and Gonzalez, C. F. (2011). "An inserted  $\alpha/\beta$  subdomain shapes the catalytic pocket of *Lactobacillus johnsonii* cinnamoyl esterase." PloS one, **6**(8): e23269.

- Lapidus, A., Galleron, N., Sorokin, A. and Ehrlich, S. D. (1997). "Sequencing and functional annotation of the *Bacillus subtilis* genes in the 200 kb *rrnB-dnaB* region." Microbiology, **143**(11): 3431-3441.
- Lee, M.-H., Lee, C.-H., Oh, T.-K., Song, J. K. and Yoon, J.-H. (2006). "Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases." Applied and Environmental Microbiology, **72**(11): 7406-7409.
- Lee, M. H., K. S. Hong, S. Malhotra, J.-H. Park, E. C. Hwang, H. K. Choi, Y. S. Kim, W. Tao and S.-W. Lee (2010). "A new esterase EstD2 isolated from plant rhizosphere soil metagenome." Applied Microbiology and Biotechnology **88**(5): 1125-1134.
- Lee, Y.-L., M.-S. Su, T.-H. Huang and J.-F. Shaw (1999). "C-terminal His-tagging results in substrate specificity changes of the thioesterase I from *Escherichia coli*." Journal of the American Oil Chemists' Society **76**(10): 1113-1118.
- Levisson, M., J. van der Oost and S. W. Kengen (2007). "Characterization and structural modeling of a new type of thermostable esterase from *Thermotoga maritima*." FEBS Journal **274**(11): 2832-2842.
- Levisson, M., J. van der Oost and S. W. Kengen (2009). "Carboxylic ester hydrolases from hyperthermophiles." Extremophiles **13**(4): 567-581.
- Liang, C., M. Fioroni, F. Rodríguez-Ropero, Y. Xue, U. Schwaneberg and Y. Ma (2011). "Directed evolution of a thermophilic endoglucanase (Cel5A) into highly active Cel5A variants with an expanded temperature profile." Journal of Biotechnology **154**(1): 46-53.
- Liang, C., Xue, Y., Fioroni, M., Rodríguez-Ropero, F., Zhou, C., Schwaneberg, U. and Ma, Y. (2011). "Cloning and characterization of a thermostable and halo-tolerant endoglucanase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4." Applied Microbiology and Biotechnology, **89**(2): 315-326.
- Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F. and Eck, J. (2002). "Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space." Current Opinion in Biotechnology, **13**(6): 572-577.
- Lutz, S. (2010). "Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design." Current Opinion in Biotechnology, **21**(6): 734-743.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zyl, W. H. and Pretorius, I. S. (2002). "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology." Microbiology and Molecular Biology Reviews, **66**(3): 506-577.
- Mai, C., Kües, U. and Militz, H. (2004). "Biotechnology in the wood industry." Applied Microbiology and Biotechnology, **63**(5): 477-494.

- Mandelli, F., Gonçalves, T., Gandin, C., Oliveira, A., Neto, M. O. and Squina, F. (2016). "Characterization and Low-Resolution Structure of an Extremely Thermostable Esterase of Potential Biotechnological Interest from *Pyrococcus furiosus*." Molecular Biotechnology, 1-10.
- Mandrich, L., Merone, L., Pezzullo, M., Cipolla, L., Nicotra, F., Rossi, M. and Manco G. (2005). "Role of the N terminus in enzyme activity, stability and specificity in thermophilic esterases belonging to the HSL family." Journal of Molecular Biology, **345**(3): 501-512.
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C. and Gonzales, N. R. (2016). "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures." Nucleic Acids Research: gkw1129.
- Marchler-Bauer, A. et al. (2015), C. N. s. c. d. d., Nucleic Acids Res.43(D)222-6. "CDD: NCBI's conserved domain database." Nucleic Acids Research, **43**(D)222-6.
- Margolin, A. L. (1993). "Enzymes in the synthesis of chiral drugs." Enzyme Microbiology and Technology, **15**(4): 266-280.
- Matthews, B., Nicholson H., and Becktel, W. (1987). "Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding." Proceedings of the National Academy of Sciences, **84**(19): 6663-6667.
- Menzel, P., S. R. Gudbergsdóttir, A. G. Rike, L. Lin, Q. Zhang, P. Contursi, M. Moracci, J. K. Kristjansson, B. Bolduc and S. Gavrillov (2015). "Comparative metagenomics of eight geographically remote terrestrial hot springs." Microbial Ecology **70**(2): 411-424.
- Milala, M. A., Shugaba, A., Gidado, A., Ene, A. C., & Wafar, J. A. (2005). "Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme production by *Aspergillus niger*." Research Journal of Agricultural and Biological Sciences **1**(4), 325-328.
- Miller, G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." Analytical Chemistry **31**(3): 426-428.
- Mitidieri, S., Martinelli, A. H. S., Schrank, A. and Vainstein, M. H. (2006). "Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations." Bioresource Technology, **97**(10): 1217-1224.
- Mo, Q., Liu, A., Guo, H., Zhang, Y. and Li M. (2016). "A novel thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* YB103: screening, purification and characterization." Extremophiles, **20**(2): 157-165.
- MolSoft, I. (2000). "2.8 Program Manual." MolSoft LLC, San Diego.
- Montoro-García, S., Martínez-Martínez, I., Navarro-Fernández, J., Takami, H., García-Carmona, F., & Sánchez-Ferrer, Á. (2009). "Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 shows the existence of a new carboxylesterase family." Journal of Bacteriology, **191**(9), 3076-3085

Morrone, R., Nicolosi, G., Patti, A. and Piattelli, M. (1995). "Resolution of racemic flurbiprofen by lipase-mediated esterification in organic solvent." Tetrahedron: Asymmetry, **6**(7): 1773-1778.

Nemeth, A., Kamondi, S., Szilagyi, A., Magyar, C., Kovari, Z. and Zavodszky, P. (2002). "Increasing the thermal stability of cellulase C using rules learned from thermophilic proteins: a pilot study." Biophysical Chemistry, **96**(2): 229-241.

Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Yakimov, S., & Gilichinsky, D. (2012). "Cloning, purification, and characterization of a cold-adapted esterase produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5T from Siberian cryopeg." FEMS Microbiology and Ecology, **82**(2), 367-375

Pabarcus, M. K. and Casida, J. E. (2002). "Kynurenine formamidase: determination of primary structure and modeling-based prediction of tertiary structure and catalytic triad." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology , **1596**(2): 201-211.

Pace, C. N. (1992). "Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability." Journal of Molecular Biology, **226**(1): 29-35.

Panda, T. and Gowrishankar, B. (2005). "Production and applications of esterases." Applied Microbiology and Biotechnology ,**67**(2): 160-169.

Eijsink, V. G., Bjørk, A., Gåseidnes, S., Sirevåg, R., Synstad, B., van den Burg, B., & Vriend, G. (2004). "Rational engineering of enzyme stability." Journal of Biotechnology, **113**(1), 105-120

Park, Y. J., Yoon, S. J. and Lee, H. B. (2008). "A novel thermostable arylesterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1: purification, characterization, and expression." Journal of Bacteriology, **190**(24), 8086-8095.

Pascual, M., Soler, M. D., Cervera, C., Pla, M., Pascual, J. J. and Blas, E. (2014). "Feeding programmes based on highly-digestible fibre weaning diets: Effects on health, growth performance and carcass and meat quality in rabbits." Livestock Science, **169**, 88-95.

Peng, Q., Zhang, X., Shang, M., Wang, X., Wang, G., Li, B., Guan, G., Li, Y. and Wang, Y. (2011). "A novel esterase gene cloned from a metagenomic library from neritic sediments of the South China Sea." Microbial Cell Factories, **10**(1): 1.

Petersen, T. N., Brunak, S., Heijne, G. von, and Nielsen, H. (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." Nature Methods, **8**(10): 785-786.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. and Ferrin, T. E. (2004). "UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis." Journal of Computational Chemistry, **25**(13): 1605-1612.

Polgár, L. (1992). "Structural relationship between lipases and peptidases of the prolyl oligopeptidase family." FEBS Letters, **311**(3): 281-284.

- Prakash, O. and Jaiswal, N. (2010). " $\alpha$ -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes." Applied Biochemistry and Biotechnology, **160**(8): 2401-2414.
- Quax, W. and Broekhuizen, C. (1994). "Development of a new Bacillus carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs." Applied Microbiology and Biotechnology, **41**(4): 425-431.
- Rahman, M. A., Culsum, U., Tang, W., Zhang, W. S., Wu G., and Liu, Z. (2016). "Characterization of a novel cold active and salt tolerant esterase from *Zunongwangia profunda*." Enzyme and Microbial Technology, **85**: 1-11.
- Rani, S. and Nand, K. (1996). "Development of cellulase-free xylanase-producing anaerobic consortia for the use of lignocellulosic wastes." Enzyme and Microbial Technology, **18**(1): 23-28.
- Rao, A. G. (2008). "The outlook for protein engineering in crop improvement." Plant Physiology, **147**(1): 6-12.
- Rao, L., Xue, Y., Zheng, Y., Lu J. R. and Ma, Y. (2013). "A novel alkaliphilic Bacillus esterase belongs to the 13 th bacterial lipolytic enzyme family." PloS one, **8**(4): e60645.
- Rao, L., Xue, Y., Zhou, C., Tao, J., Li, G., Lu, J. R. and Ma, Y. (2011). "A thermostable esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* opening up a new family of bacterial lipolytic enzymes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, **1814**(12), 1695-1702.
- Rashamuse, K., Ronneburg, T., Hennessy, F., Visser, D., Van Heerden, E., Piater, L., Litthauer, D., Möller, C. and Brady, D. (2009). "Discovery of a novel carboxylesterase through functional screening of a pre-enriched environmental library." Journal of Applied Microbiology, **106**(5): 1532-1539.
- Rhee, J. K., Ahn, D. G., Kim, Y. G., & Oh, J. W. (2005). "New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library." Applied and Environmental Microbiology, **71**(2), 817-825.
- Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000). "EMBOSS: The European molecular biology open software suite." Trends in Genetics, **16**(6): 276-277.
- Rodríguez, M. C., Loaces, I., Amarelle, V., Senatore, D., Iriarte A., Fabiano E. and Noya, F. (2015). "Est10: A novel alkaline esterase isolated from bovine rumen belonging to the new family XV of lipolytic enzymes." PloS one, **10**(5): e0126651.
- Sá-Pereira, P., Mesquita, A., Duarte, J. C., Barros, M. R. A. and Costa-Ferreira, M. (2002). "Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties." Enzyme and Microbial Technology, **30**(7): 924-933.

Saerens, K., Descamps, D. and Dewettinck, K. (2008). "Release of short chain fatty acids from cream lipids by commercial lipases and esterases." Biotechnology Letters, **30**(2): 311-315.

San Pedro, A., Gonzalez-Lopez, C. V., Acien, F. G. and Molina-Grima E. (2014). "Outdoor pilot-scale production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in tubular photobioreactors." Bioresource Technology, **169**: 667-676.

Sanchez, O. J. and Cardona, C. A. (2008). "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks." Bioresource Technology, **99**(13): 5270-5295.

Saxena, R. K., Malhotra, B. and Batra, A. (2003). "Commercial importance of some fungal enzymes." Handbook of Fungal Biotechnology. New York: Marcel Dekker, 287-295.

Sayer, C., Finnigan, W., Isupov, M. N., Levisson, M., Kengen, S. W., van der Oost, J., Harmer, N. J. and Littlechild, J. A. (2016). "Structural and biochemical characterisation of *Archaeoglobus fulgidus* esterase reveals a bound CoA molecule in the vicinity of the active site." Scientific Reports, **6**.

Sayer, C., Szabo, Z., Isupov, M. N., Ingham C. and Littlechild, J. A. (2015). "The Structure of a Novel Thermophilic Esterase from the Planctomycetes Species, *Thermogutta terrifontis* Reveals an Open Active Site Due to a Minimal 'Cap' Domain." Frontiers in Microbiology, **6**.

Schomburg, I., Chang, A., Ebeling, C., Gremse, M., Heldt, C., Huhn, G. and Schomburg, D. (2004). "BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments." Nucleic Acids Research, **32**(suppl 1): D431-D433.

Sen, L. and Nilsson, S. (2011). "Thermostable proteins: structural stability and design" CRC Press.

Shirai, T., Ishida, H., Noda, J.-I., Yamane, T., Ozaki, K., Hakamada, Y. and Ito, S. (2001). "Crystal structure of alkaline cellulase K: insight into the alkaline adaptation of an industrial enzyme." Journal of Molecular Biology, **310**(5): 1079-1087.

Shirley, B. A., Stanssens, P., Hahn, U. and Pace, C. N. (1992). "Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1." Biochemistry, **31**(3): 725-732.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M. and Söding, J. (2011). "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega." Molecular Systems Biology, **7**(1).

Silva, J. C. R., Guimarães, L. H. S., Salgado, J. C. S., Furriel, R. P. M., Polizeli, M. L. T., Rosa, J. C. and Jorge, J. A. (2013). "Purification and biochemical characterization of glucose–cellobiose-tolerant cellulases from *Scytalidium thermophilum*." Folia Microbiologica, **58**(6): 561-568.

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R. and Pandey A., (2006). "α-Amylases from microbial sources—an overview on recent developments." Food Technology and Biotechnology, **44**(2): 173-184.

Souza, P. M. (2010). "Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-A review." Brazilian Journal of Microbiology, **41**(4): 850-861.

Spassov, V. Z., Karshikoff, A. D. and Ladenstein, R. (1995). "The optimization of protein-solvent interactions: Thermostability and the role of hydrophobic and electrostatic interactions." Protein Science, **4**(8): 1516-1527.

Sreenath, H. K., Shah, A. B., Yang, V. W., Gharia M. M., and Jeffries, T. W. (1996). "Enzymatic polishing of jute/cotton blended fabrics." Journal of Fermentation and Bioengineering, **81**(1): 18-20.

Stemmer, W. P. (1994). "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling." Nature, **370**(6488): 389-391.

Subramanian, S. and Prema, P. (2002). "Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application." Critical Reviews in Biotechnology, **22**(1): 33-64.

Tabata, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Kotani, H., Kato, T., Asamizu, E., Miyajima, N., Sasamoto, S., Kimura, T. and Hosouchi, T. (2000). "Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*." Nature, **408**(6814): 823-826.

Takami, H., Noguchi, H., Takaki, Y., Uchiyama, I., Toyoda, A., Nishi, S., Chee, G.-J., Arai, W., Nunoura, T. and Itoh, T. (2012). "A deeply branching thermophilic bacterium with an ancient acetyl-CoA pathway dominates a subsurface ecosystem." PloS one, **7**(1): e30559.

Tirawongsaroj, P., Sriprang, R., Harnpicharnchai, P., Thongaram, T., Champreda, V., Tanapongpipat, S., Pootanakit K., and Eurwilaichitr, L. (2008). "Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library." Journal of Biotechnology, **133**(1): 42-49.

Uchiyama, T. and Miyazaki K. (2009). "Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening." Current Opinion in Biotechnology, **20**(6): 616-622.

Van Der Maarel, M. J., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H. and Dijkhuizen L. (2002). "Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family." Journal of Biotechnology, **94**(2): 137-155.

Varrot, A., SchuÈlein, M., Fruchard, S., Driguez, H. and Davies, G. J. (2001). "Atomic resolution structure of endoglucanase Cel5A in complex with methyl 4, 4II, 4III, 4IV-tetrathio- $\alpha$ -cellopentoside highlights the alternative binding modes targeted by substrate mimics." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, **57**(11): 1739-1742.

Vetriani, C., Maeder, D. L., Tolliday, N., Yip, K. S.-P., Stillman, T. J., Britton, K. L., Rice, D. W., Klump, H. H. and Robb, F. T. (1998). "Protein thermostability above 100 C: a key role for ionic interactions." Proceedings of the National Academy of Sciences, **95**(21): 12300-12305.



Vieille, C. and Zeikus, G. J. (2001). "Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability." Microbiology and Molecular Biology Reviews, **65**(1): 1-43.

Villares, A., Moreau, C., Bennati-Granier, C., Garajova, S., Foucat, L., Falourd, X., and Cathala, B. (2017). Lytic polysaccharide monoxygenases disrupt the cellulose fibers structure. Scientific Reports, **7**, 40262.

Voget, S., Steele, H. and Streit, W. (2006). "Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase." Journal of Biotechnology, **126**(1): 26-36.

Wang, B., Wang, A., Cao, Z., & Zhu, G. (2016). "Characterization of a novel highly thermostable esterase from the Gram-positive soil bacterium *Streptomyces lividans* TK64." Biotechnology and Applied Biochemistry, **63**(3), 334-343.

Wang, Q., Yang, G., Liu, Y. and Feng, Y. (2006). "Discrimination of esterase and peptidase activities of acylaminoacyl peptidase from hyperthermophilic *Aeropyrum pernix* K1 by a single mutation." Journal of Biological Chemistry, **281**(27): 18618-18625.

Wang, S., Wang K., Li, L. and Liu, Y. (2013). "Isolation and characterization of a novel organic solvent-tolerant and halotolerant esterase from a soil metagenomic library." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **95**: 1-8.

Wei, Y., Contreras, J. A., Sheffield, P., Osterlund, T., Derewenda, U., Kneusel, R., Matern, U., Holm, C. and Derewenda, Z. S. (1999). "Crystal structure of brefeldin A esterase, a bacterial homolog of the mammalian hormone-sensitive lipase." Nature Structural and Molecular Biology, **6**(4): 340-345.

Wei, Y., Swenson, L., Castro, C., Derewenda, U., Minor, W., Arai, H., Aoki, J., Inoue, K., Servin-Gonzalez, L. and Derewenda, Z. S. (1998). "Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution." Structure, **6**(4): 511-519.

Winter, G., Fersht, A. R., Wilkinson, A. J., Zoller, M. and Smith, M. (1982). "Redesigning enzyme structure by site-directed mutagenesis: tyrosyl tRNA synthetase and ATP binding." Nature, **299**(5885): 756-758.

Wu, I. and Arnold, F. H. (2013). "Engineered thermostable fungal Cel6A and Cel7A cellobiohydrolases hydrolyze cellulose efficiently at elevated temperatures." Biotechnology and Bioengineering, **110**(7): 1874-1883.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson J. and Zhang, Y. (2015). "The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction." Nature Methods, **12**(1): 7-8.

Yang, S., Qin, Z., Duan, X., Yan Q., and Jiang, Z. (2015). "Structural insights into the substrate specificity of two esterases from the thermophilic *Rhizomucor miehei*." Journal of Lipid Research, **56**(8): 1616-1624.

Zamost, B. L., Nielsen H. K. and Starnes, R. L. (1991). "Thermostable enzymes for industrial applications." Journal of Industrial Microbiology, **8**(2): 71-81.

Zarafeta, D., Kissas, D., Sayer, C., Gudbergsdottir, S. R., Ladoukakis E., Isupov, M. N., Chatziioannou, A., Peng, X., Littlechild J. A. and Skretas, G. (2016). "Discovery and Characterization of a Thermostable and Highly Halotolerant GH5 Cellulase from an Icelandic Hot Spring Isolate." PloS one **11**(1).

Zarafeta, D., Moschidi, D., Ladoukakis E., Gavrillov S., Chrysina E. D., Chatziioannou, A., Kublanov, I., Skretas G. and Kolisis F. N. (2016). "Metagenomic mining for thermostable esterolytic enzymes uncovers a new family of bacterial esterases." Scientific Reports **6**.

Zarafeta, D., Szabo Z., Moschidi D., Phan H., Chrysina, E. D., Peng X., Ingham, C. J., Kolisis, F. N. and Skretas G. (2016). "EstDZ3: a new esterolytic enzyme exhibiting remarkable thermostability." Frontiers in Microbiology **7**.

Zeldes, B. M., Keller, M. W., Loder, A. J., Straub, C. T., Adams, M. and Kelly, R. M. (2014). "Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals." Frontiers in microbiology, **6**: 1209-1209.

Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., and Mielenz, J. R. (2006). "Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies." Biotechnology Advances, **24**(5), 452-481.

Zhang, X.-Z. and Zhang Y.-H. P. (2013). "Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications." Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers, 131-146.

Zhu, Y., Li, J., Cai, H., Ni, H., Xiao, A. and Hou, L. (2013). "Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library." Microbiological Research, **168**(9): 589-597.