



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Χαρακτηρισμός καινοτόμων βιοκαταλυτών
και μελέτη της συνεργιστικής τους δράσης σε
υποστρώματα ξυλάνης*

Παγουρτζή Χριστίνα

Επιβλέπων καθηγητής: Τόπακας Ευάγγελος

ΑΘΗΝΑ 2021

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή κυρίου Ευάγγελου Τόπακα. Η ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας εν μέσω πανδημίας αποτέλεσε ένα δύσκολο εγχείρημα το οποίο όμως μου προσέφερε αναρίθμητες νέες εμπειρίες. Η πρωτόγνωρη επαφή με την ερευνητική διαδικασία, η καθημερινή τριβή με το εργαστήριο και η διεύρυνση των γνώσεών μου πάνω στην επιστήμη της Βιοτεχνολογίας ήταν ορισμένα από τα οφέλη που αποκόμισα αυτό το διάστημα. Έτσι, ολοκληρώνοντας πλέον τη διπλωματική μου εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην προσπάθεια αυτή.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ευάγγελο Τόπακα για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του. Η καθοδήγηση και οι συμβουλές του ήταν καθοριστικές και συνέβαλαν στην αντιμετώπιση οποιουδήποτε προβλήματος παρουσιαζόταν. Μάλιστα, το αμείωτο ενδιαφέρον του για την επιστήμη της Βιοτεχνολογίας έχει συμβάλει στη δημιουργία ενός τόσο ενεργού εργαστηρίου στο οποίο ήταν τιμή μου που υπήρξα μέλος του.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδάκτορα Αναστασία Ζέρβα για την πολύτιμη βοήθειά της κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Με τις γνώσεις, την εμπειρία και τις συμβουλές της, με βοήθησε ώστε όλα να κυλήσουν όσο πιο ομαλά γίνεται.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Χριστίνα Πεντάρη για την αμέριστη βοήθειά της σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής μου εργασίας. Την ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγησή της, για το ενδιαφέρον της, για τις γνώσεις που μου προσέφερε, για το χρόνο που μου αφιέρωσε, για τη συμβολή της στην αντιμετώπιση οποιασδήποτε δυσκολίας, κυρίως όμως την ευχαριστώ για την ανεξάντλητη υπομονή της και την ανιδιοτελή στήριξή της σε ό,τι χρειάστηκε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας. Όλοι συνέβαλαν ώστε να δημιουργηθεί ένα πολύ φιλικό κλίμα στο οποίο αναπτύσσεται η συνεργασία, το ομαδικό πνεύμα και η ευγενής άμιλλα. Η θετική τους διάθεση, η ευγένειά τους καθώς και η προθυμία τους να βοηθήσουν όπου χρειαζόταν, έκαναν την καθημερινότητα στο εργαστήριο πολύ ευχάριστη.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την καθηγήτρια κυρία Διομμή Μαμμά και τον καθηγητή κύριο Αντώνη Καραντώνη για το χρόνο που διέθεσαν ώστε να διαβάσουν την διπλωματική μου εργασία καθώς και για τις ιδιαίτερα ωφέλιμες συμβουλές τους πάνω σε αυτή.

Ακόμη, ευχαριστώ τους φίλους μου που στάθηκαν δίπλα μου και έκαναν το ταξίδι των φοιτητικών μου χρόνων ξεχωριστό και αξέχαστο.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου που με στηρίζει σε κάθε μου βήμα και κυρίως την αδελφή μου Αναστασία η οποία αποτελεί για εμένα παράδειγμα χάρη στον καθημερινό αγώνα της για ζωή, το ανεξάντλητο θάρρος της, τη δύναμη και την υπομονή της σε εξαιρετικά δύσκολες καταστάσεις. Με έχει μάθει να μη θεωρώ τίποτα δεδομένο, να προσπαθώ για το παραμικρό και να χαίρομαι την κάθε στιγμή αντλώντας το περισσότερο δυνατό από αυτήν.

Παγουρτζή Χριστίνα

Αθήνα 2021

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην ενζυμική υδρόλυση της ξυλάνης, η οποία αποτελεί δομικό συστατικό της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Η υψίστου βαθμού σημασία αυτής της διαδικασίας υποδεικνύεται από τις πολυάριθμες εφαρμογές των μονομερών της ξυλάνης κατά την παραγωγή βιοκαυσίμων, βιοπλαστικών και προϊόντων προστιθέμενης αξίας, στοχεύοντας έτσι στη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και στην κυκλική βιοοικονομία.

Πιο συγκεκριμένα, έγινε πλήρης βιοχημικός χαρακτηρισμός δύο καινοτόμων ενζύμων προερχόμενων από τον μύκητα *Thermothelomyces thermophilus*, μίας αραβινοφουρανοζιδάσης της οικογένειας των γλυκοζιδικών υδρολασών GH43 (*TtAbf43*) καθώς και μίας εστεράσης του οξικού οξέος η οποία ανήκει στην οικογένεια των υδατανθρακικών εστερασών CE16 (*TtCE16*). Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η συνεργιστική δράση των προαναφερθέντων ενζύμων με διαφορετικές ξυλανάσες με σκοπό την μελέτη του μηχανισμού δράσης τους.

Αναφορικά με την αραβινοφουρανοζιδάση *TtAbf43*, βρέθηκε πως οι βέλτιστες συνθήκες δράσης της είναι το pH 5 και η θερμοκρασία 65°C. Η *TtAbf43* διατηρεί το 80% της ενεργότητά της μετά από εικοσιτετράωρη επώαση σε ένα εύρος τιμών pH 2-9 και σε θερμοκρασίες έως και 50°C. Οι κινητικές παράμετροι K_M και u_{max} για την *TtAbf43* είναι ίσες με $5,78 \pm 0,60 \frac{mg}{ml}$ και $0,0234 \pm 0,0009 \frac{mg}{ml \cdot min}$ ως προς το υπόστρωμα αραβινοξυλάνης σιταριού και $3,62 \pm 0,67 \frac{mg}{ml}$ και $0,0175 \pm 0,0010 \frac{mg}{ml \cdot min}$ ως προς την αραβινοξυλάνη σίκαλης. Παρουσία οργανικών διαλυτών (μεθανόλης, αιθανόλης, 1,4-διοξάνης και DMSO) σε περιεκτικότητα 10% v/v ενισχύεται η δράση του ενζύμου, ενώ σε περιεκτικότητα 45% v/v το παρεμποδίζουν. Επιπρόσθετα, η ενεργότητα της *TtAbf43* δεν επηρεάζεται παρουσία της πλειονότητας των διαλυμάτων αλάτων που μελετήθηκαν ($MgSO_4$, $ZnCl_2$, KCl , $CoCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $NiCl_2$, $FeCl_3$ και $FeSO_4$) σε συγκεντρώσεις 0,5 mM και 1 mM, εντούτοις σημαντική παρεμπόδισή της προκαλείται παρουσία 10 mM $NiCl_2$ και 5 mM $FeCl_3$. Επιπλέον, όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* βρέθηκε πως κόβει μία από τις δύο υποκαταστάσεις αραβινόζης από διπλά υποκατεστημένα μόρια ξυλόζης. Το εν λόγω ένζυμο εμφάνισε ενεργότητα στα τεχνητά υποστρώματα 4-νιτροφαίνυλ οξικό, 4-νιτροφαίνυλ α-L-ραμινοπυρανόζη, 4-νιτροφαίνυλ α-L-αραβινοφουρανόζη και 2-νιτροφαίνυλ β-D-ξυλοπυρανόζη, καθώς και σε πολυμερικά υποστρώματα αραβινοξυλάνης σιταριού και σίκαλης.

Όσον αφορά την *TtCE16*, εμφάνισε βέλτιστη δράση σε pH 6 και θερμοκρασία 45°C. Το ένζυμο διατηρεί την ενεργότητά του κατόπιν εικοσιτετράωρης επώασης σε pH 6 και 7 όπως επίσης και στους 45°C. Επιπλέον, οι κινητικές παράμετροι K_M και u_{max} της *TtCE16* είναι ίσες με $0,042 \pm 0,002$ mM και $0,038 \pm 0,000 \frac{\mu mol}{min \cdot ml}$ ως προς το υπόστρωμα 4-νιτροφαίνυλ οξικό. Παρουσία οργανικών διαλυτών (αιθανόλης, 1,4-διοξάνης και DMSO) σε περιεκτικότητα 10% v/v ενισχύεται η δράση της, σε αντίθεση με τη μεθανόλη που φαίνεται να μην έχει επίδραση στην ενεργότητα της *TtCE16*. Αντίθετα, σε περιεκτικότητα

45% v/v όλοι οι διαλύτες την παρεμποδίζουν. Ακόμη, παρουσία των διαλυμάτων αλάτων που προαναφέρθηκαν σε συγκεντρώσεις 0,5 mM και 1 mM δεν επηρεάζεται η ενεργότητα της *TiCE16*, ωστόσο όταν βρίσκονται σε συγκέντρωση 10 mM προκαλούν παρεμπόδιση. Η *TiCE16* είχε δράση στα υποστρώματα 4-νιτροφαίνυλ οξικό, 4-νιτροφαίνυλ βουτυρικό, 4-νιτροφαίνυλ παλμιτικό, 2-νιτροφαίνυλ οξικό καθώς και σε ακετυλιωμένη ξυλάνη η οποία είχε προκατεργαστεί με ξυλανάση της οικογένειας GH10.

Επιπλέον, μελετήθηκε η συνεργιστική δράση της *TiAbf43* με μία ξυλανάση της οικογένειας GH30 (*TiXyn30A*) και παρατηρήθηκε βαθμός συνεργιτισμού $5,0 \pm 2,3$ ως προς την απελευθέρωση αραβινόζης από φυσικό υπόστρωμα ξυλάνης από ξύλο οξιάς προκατεργασμένη με υγρή οξείδωση. Ακόμη, κατά τον συνδυασμό της *TiAbf43*, με τις ξυλανάσες των οικογενειών GH30 και GH10 (E-XYLATM) σε υπόστρωμα στελεχών αραβοσίτου προκατεργασμένα με έκρηξη ατμού παρατηρήθηκε βαθμός συνεργιτισμού $1,4 \pm 0,2$ ως προς την απελευθέρωση ξυλόζης και $1,4 \pm 0,2$ ως προς την αραβινόζη. Τέλος, βαθμός συνεργιτισμού $1,3 \pm 0,1$ προέκυψε και κατά την ταυτόχρονη δράση της *TiCE16* και της ξυλανάσης *TiXyn30A* προς απελευθέρωση ξυλοβιόζης και $1,5 \pm 0,1$ προς την απελευθέρωση οξικού οξέος.

Abstract

This diploma thesis emphasize on the hydrolysis of xylan which is a building block of lignocellulosic biomass. The outstanding importance of this process is indicated by the numerous applications of xylan's monomers in the production of biofuels, bioplastics and value-added products, aiming to a reduction of the environmental impact towards a circular bioeconomy.

More specifically, two innovative enzymes from the fungus *Thermothelomyces thermophilus* were biochemically characterized, a GH43 arabinofuranosidase (*TtAbf43*) as well as a CE16 acetyl esterase (*TtCE16*). Additionally, the synergistic relationship between the aforementioned enzymes with commercial xylanases was studied aiming to a better understanding of their mode of action.

Regarding the arabinofuranosidase *TtAbf43*, it was found that its optimal action conditions are pH 5 and 65 °C. *TtAbf43* retains 80% of its activity after 24 hours of incubation at a range of pH 2-9 and temperatures up to 50 °C. The kinetic parameters K_M and u_{max} are $5,78 \frac{mg}{ml}$ and $0,0234 \frac{mg}{ml \cdot min}$ for wheat arabinoxylan and $3,62 \pm 0,67 \frac{mg}{ml}$ and $0,0175 \pm 0,0010 \frac{mg}{ml \cdot min}$ for rye arabinoxylan. In the presence of organic solvents (methanol, ethanol, 1,4-dioxane and DMSO) at a content of 10% v/v the activity of the enzyme is enhanced, while in the presence of 45% v/v is completely inhibited. In addition, the activity of *TtAbf43* is not affected in the presence of the majority of the salt solutions that were studied ($MgSO_4$, $ZnCl_2$, KCl , $CoCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $NiCl_2$, $FeCl_3$ and $FeSO_4$) at concentrations of 0.5 mM and 1 mM. However, significant inhibition is caused by the presence of 10 mM $NiCl_2$ and 5 mM $FeCl_3$. Moreover, regarding the mechanism of action of arabinofuranosidase *TtAbf43*, it was found that it cleaves one out of the two arabinose substitutions from double substituted xylose residues. This enzyme showed activity in the artificial substrates p-nitrophenyl acetate, p-nitrophenyl α -L-rhamnopyranoside, p-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside and o-nitrophenyl β -D-xylopyranoside, as well as in polymeric substrates of wheat and rye arabinoxylans.

Additionally, *TtCE16* showed optimal activity at pH 6 and 45 °C. The enzyme maintains its activity after twenty-four hours of incubation at pH 6 and 7 as well as at 45 °C. In addition, the kinetic parameters K_M and u_{max} of *TtCE16* are equal to $0,042 \pm 0,002$ mM and $0,038 \pm 0,000 \frac{\mu mol}{min \cdot ml}$ for p-nitrophenyl acetate. The presence of organic solvents (ethanol, 1,4-dioxane and DMSO) at a content of 10% v/v enhances its action, while methanol seems to have no effect on the activity of *TtCE16*. In contrast, all solvents inhibit its action at a concentration of 45% v/v. Furthermore, the presence of the salt solutions mentioned above at concentrations of 0.5 mM and 1 mM does not affect the activity of *TtCE16*, although when they are present at a concentration of 10 mM they cause inhibition. *TtCE16* acted on substrates p-nitrophenyl acetate, p-nitrophenyl butyrate, p-nitrophenyl palmitate, 2-nitrophenyl acetate as well as on acetyl xylan which had been pretreated with a xylanase of the GH10 family.

Furthermore, the synergistic relationship between *TtAbf43* and *TtXyn30A* was studied and a synergistic degree of 5.0 ± 2.3 was observed, regarding the release of arabinose from a natural beechwood xylan substrate pretreated with liquid oxidation. Also, the combined action of *TtAbf43* with the xylanases *TtXyn30A* and E-XYLATM on corn substrate pretreated with steam explosion, showed a degree of synergy of 1.4 ± 0.2 regarding the release of xylose and 1.4 ± 0.2 with respect to arabinose. Finally, a degree of synergy of 1.3 ± 0.1 was obtained during the simultaneous action of *TtCE16* and xylanase *TtXyn30A* concerning the release of xylobiose and 1.5 ± 0.1 of acetic acid.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	i
Abstract	iii
1. Θεωρητικό Μέρος.....	1
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Δομή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.....	2
1.2.1 Κυτταρίνη	3
1.2.2 Ημικυτταρίνη.....	4
1.2.2.1 Ξυλάνη	5
1.2.2.2 Αραβινοξυλάνη.....	6
1.2.3 Λιγνίνη.....	6
1.2.4 Λοιπά συστατικά	7
1.3 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.....	8
1.3.1 Βιοκαύσιμα.....	9
1.3.1.1 Βιοαιθανόλη.....	10
1.3.1.2 Βιοβουτανόλη	11
1.3.1.3 Βιο-υδρογόνο	11
1.3.1.4 Βιοντήζελ.....	11
1.3.1.5 Βιοαέριο	12
1.3.2 Προϊόντα προστιθέμενης αξίας	12
1.3.2.1 Λεβουλινικό οξύ και 5-υδροξυ-μεθυλ-φουρφοουράλη.....	12
1.3.2.2 Ξυλιτόλη	13
1.3.2.3 Βανιλίνη.....	13
1.3.3 Βιοπλαστικά	13
1.3.4 Ολιγοσακχαρίτες με πρεβιοτική δράση.....	15
1.3.4.1 Ξυλοολιγοσακχαρίτες (xylooligosaccharides-XOS)	15
1.3.4.2 Κελλο-ολιγοσακχαρίτες (Cello-oligosaccharides, COS).....	17
1.4 Ενζυμική υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας	18
1.4.1 Διάσπαση κυτταρίνης.....	19
1.4.2 Διάσπαση ημικυτταρίνης.....	20
1.4.2.1 Ξυλανάσες.....	22
1.4.2.2 β-ξυλοζιδάσες	22

1.4.2.3 Βοηθητικά ένζυμα.....	23
1.4.2.3.1 Αραβινοφουρανοζιδάσες.....	23
1.4.2.3.1.1 Γλυκοζιδικές υδρολάσες της οικογένειας 43 (GH43)	23
1.4.2.3.2 Εστεράσες του φερουλικού οξέος.....	24
1.4.2.3.3 Εστεράσες του οξικού οξέος.....	24
1.4.3 Διάσπαση λιγνίνης.....	26
1.5 Συνεργιστική δράση ενζύμων	26
1.5.1 Βαθμός συνεργιτισμού	26
1.6 Σκοπός.....	28
2. Υλικά και μέθοδοι.....	31
2.1 Υλικά.....	31
2.1.1 Χημικά Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά.....	31
2.1.2 Ρυθμιστικά Διαλύματα	31
2.1.3 Ένζυμα.....	31
2.1.4 Όργανα και συσκευές	32
2.2 Μέθοδοι.....	33
2.2.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της <i>TtAbf43</i>	33
2.2.1.1 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας	33
2.2.1.2 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης	34
2.2.1.2.1 Εύρεση βέλτιστης τιμής pH δράσης.....	34
2.2.1.2.2 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης	34
2.2.1.3 Μελέτη σταθερότητας.....	35
2.2.1.3.1 Μελέτη Σταθερότητας σε διαφορετικές τιμές pH.....	35
2.2.1.3.2 Μελέτη Θερμοκρασιακής Σταθερότητας.....	35
2.2.1.4 Προσδιορισμός Κινητικών Σταθερών Michaelis-Menten της <i>TtAbf43</i>	35
2.2.1.4.1 Μελέτη της κινητικής της <i>TtAbf43</i> σε τεχνητό υπόστρωμα ο-NPX ..	38
2.2.1.4.2 Μελέτη της κινητικής της <i>TtAbf43</i> σε υπόστρωμα WA.....	38
2.2.1.4.2.1 Φωτομετρική μέθοδος του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)	38
2.2.1.4.3 Μελέτη της κινητικής της <i>TtAbf43</i> σε υπόστρωμα RA.....	39
2.2.1.5 Επίδραση Οργανικών Διαλυτών στη δράση της <i>TtAbf43</i>	39
2.2.1.6 Επίδραση διαλυμάτων αλάτων στη δράση της <i>TtAbf43</i>	39
2.2.1.7 Μελέτη πιθανών υποστρωμάτων	40

2.2.1.8 Τρόπος δράσης (mode of action) της <i>TtAbf43</i>	42
2.2.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός εστεράσης του οξικού οξέος <i>TtCE16</i>	43
2.2.2.1 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας	43
2.2.2.2 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης	44
2.2.2.2.1 Εύρεση βέλτιστης τιμής pH δράσης.....	44
2.2.2.2.2 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης	44
2.2.2.3 Μελέτη σταθερότητας.....	45
2.2.2.3.1 Μελέτη Σταθερότητας σε διαφορετικές τιμές pH.....	45
2.2.2.3.2 Μελέτη Θερμοκρασιακής Σταθερότητας.....	45
2.2.2.4 Προσδιορισμός Κινητικών Σταθερών Michaelis-Menten της <i>TtCE16</i>	45
2.2.2.5 Επίδραση Οργανικών Διαλυτών στη δράση της <i>TtCE16</i>	46
2.2.2.6 Επίδραση διαλυμάτων αλάτων στη δράση της <i>TtCE16</i>	46
2.2.2.7 Μελέτη πιθανών υποστρωμάτων	46
2.2.3 Συνεργισμοί.....	48
2.2.3.1 Συνεργιστική δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TtAbf43</i> και των ξυλανασών <i>TtXyn30A</i> και E-XYLATM.	48
2.2.3.2 Συνεργιστική δράση της <i>TtCE16</i> με την ξυλανάση <i>TtXyn30A</i>	49
3. Αποτελέσματα.....	52
3.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TtAbf43</i>	52
3.1.1 Βέλτιστες συνθήκες δράσης	52
3.1.1.1 Βέλτιστη τιμή pH δράσης	52
3.1.1.2 Βέλτιστη τιμή θερμοκρασίας δράσης	53
3.1.2 Συνθήκες λειτουργικής σταθερότητας.....	53
3.1.2.1 Σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH.....	53
3.1.2.2 Θερμοκρασιακή σταθερότητα	54
3.1.3 Κινητική μελέτη δράσης της <i>TtAbf43</i>	55
3.1.3.1 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων Michaelis-Menten	55
3.1.4 Επίδραση οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα της <i>TtAbf43</i>	57
3.1.5 Επίδραση διαλυμάτων αλάτων στην ενεργότητα της <i>TtAbf43</i>	58
3.1.6 Εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα	59
3.1.7 Τρόπος δράσης (mode of action) της <i>TtAbf43</i> σε υποστρώματα WA και RA	60
3.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός εστεράσης του οξικού οξέος <i>TtCE16</i>	61
3.2.1 Βέλτιστες συνθήκες δράσης	61

3.2.1.1 Βέλτιστη τιμή pH δράσης	61
3.2.1.2 Βέλτιστη τιμή θερμοκρασίας δράσης	62
3.2.2 Συνθήκες λειτουργικής σταθερότητας.....	63
3.2.2.1 Σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH.....	63
3.2.2.2 Θερμοκρασιακή σταθερότητα	64
3.2.3 Κινητική μελέτη δράσης της <i>TiCE16</i>	64
3.2.3.1 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων Michaelis-Menten	64
3.2.4 Επίδραση οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα της <i>TiCE16</i>	65
3.2.5 Επίδραση διαλυμάτων αλάτων στην ενεργότητα της <i>TiCE16</i>	66
3.2.6 Εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα	67
3.3 Συνεργισμοί	69
3.3.1 Συνεργιστική δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TiAbf43</i> και δύο ξυλανάσων (<i>TiXyn30A</i> και <i>E-XYLATM</i>) κατά την υδρόλυση φυσικών λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων.....	69
3.3.2 Συνεργιστική δράση της <i>TiCE16</i> και της ξυλανάσης <i>TiXyn30A</i> σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης.....	69
4. Συζήτηση αποτελεσμάτων και συμπεράσματα.....	73
4.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TiAbf43</i>	73
4.1.1 Βέλτιστες συνθήκες δράσης	73
4.1.2 Σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH.....	73
4.1.3 Σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες	74
4.1.4 Κινητική μελέτη δράσης της <i>TiAbf43</i>	75
4.1.5 Επίδραση οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα της <i>TiAbf43</i>	76
4.1.6 Επίδραση διαλυμάτων αλάτων στην ενεργότητα της <i>TiAbf43</i>	77
4.1.7 Εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα	78
4.1.8 Mode of action <i>TiAbf43</i> σε υποστρώματα WA και RA.....	79
4.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της εστεράσης του οξικού οξέος <i>TiCE16</i>	80
4.2.1 Βέλτιστες συνθήκες δράσης	80
4.2.2 Σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH και διαφορετικές θερμοκρασίες.....	80
4.2.3 Κινητική μελέτη δράσης της <i>TiCE16</i>	81
4.2.4 Επίδραση οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα της <i>TiCE16</i>	82
4.2.5 Επίδραση διαλυμάτων αλάτων στην ενεργότητα της <i>TiCE16</i>	82

4.2.6 Εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα	83
4.3 Συνεργισμοί	84
4.3.1 Συνεργιστική δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TtAbf43</i> και των ξυλανάσων <i>TtXyn30A</i> και E-XYLATM κατά την υδρόλυση φυσικών λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων.....	84
4.3.2 Συνεργιστική δράση της <i>TtCE16</i> με την ξυλανάση <i>TtXyn30A</i> κατά την υδρόλυση ακετυλιωμένης ξυλάνης.....	85
5. Μελλοντικοί στόχοι.....	89
6. Βιβλιογραφία	92

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1.2.2.2.1: Χημική δομή ξυλάνης υποκατεστημένης με αραβινόζες (Ebringerová & Thomas, 2005)	6
Εικόνα 1.2.3.1: Χημική δομή των τριών βασικών δομικών μονάδων της λιγνίνης (Okolie et al., 2021)	6
Εικόνα 1.2.3.2: Χημική δομή λιγνίνης (Nanda et al., 2014).....	7
Εικόνα 1.2.4.1: Σχηματισμός γέλης μεταξύ των πολυμερικών μονάδων πηκτίνης παρουσία ιόντων ασβεστίου (Castile et al., 2013).....	8
Εικόνα 1.3.1.1: Ο κύκλος του διοξειδίου του άνθρακα (CO ₂) για καύσιμα προερχόμενα από το πετρέλαιο και για βιοκαύσιμα (O. V. Singh & Chandel, 2018).....	10
Εικόνα 1.3.3.1: Κύρια μονοπάτια παραγωγής βιοπλαστικών προερχόμενων από φυτική βιομάζα (Brodin et al., 2017).....	15
Εικόνα 1.3.4.1.1: Χημική δομή ξυλοολιγοσακχαριτών. Ο δείκτης (n), ο οποίος αφορά τις δομικές μονάδες που επαναλαμβάνονται, παίρνει τιμές από 0 έως 5. (Bhatia et al., 2019)	16
Εικόνα 1.3.4.1.2: Μηχανισμός πρεβιοτικής δράσης των λιγνοκυτταρινούχων ολιγοσακχαριτών (Bhatia et al., 2019).....	17
Εικόνα 1.3.4.2.1: Χημική δομή κελλο-ολιγοσακχαρίτη (Ávila et al., 2021).....	17
Εικόνα 1.4.1: Υδρολυτικά ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στη διάσπαση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης (Thara et al., 2020).....	19
Εικόνα 1.4.1.1: Σχηματισμός γλυκόζης και κελλο-ολιγοσακχαριτών μέσω της υδρόλυσης της κυτταρίνης που εμπεριέχεται στη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα από κυτταρινάσες (Ávila et al., 2021).....	20
Εικόνα 1.4.2.2.1: Χημική και τρισδιάστατη δομή ενδοξυλανάσης και β-ξυλοζιδάσης (Zhuo et al., 2018).....	22
Εικόνα 1.4.2.1.1: Μηχανισμός δράσης της πλειονότητας των ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια GH43 μέσω αναστροφής της διαμόρφωσης του ανωμερικού άνθρακα (Morais et al., 2021)	24
Εικόνα 1.4.2.3.3.1: Παρουσίαση της δράσης διάφορων ενζύμων για τη διάσπαση υποκατεστημένης ξυλάνης, όπως εστεράση του φερουλικού οξέος, αραβινοφουρανοζιδάση, α-γλυκουρονιδάση, ξυλανάση. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στον μηχανισμό δράσης της εστεράσης του οξικού οξέος ο οποίος σημειώνεται με κόκκινο κύκλο όταν αφορά τις απακετυλιώσεις στις θέσεις 2 και 3 της ξυλόζης και με πράσινο όταν πρόκειται για ακετυλιωμένη ξυλόζη στη θέση 3, η οποία στη θέση 2 φέρει ως υποκαταστάτη γλυκουρονικό οξύ (Wu et al., 2017).....	25
Εικόνα 2.2.1.1.1: Χημικός τύπος του τεχνητού υποστρώματος o-NPX (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Nitrophenyl-b-D-xylopyranoside)	33
Εικόνα 2.2.1.4.1: Διάγραμμα Michaelis – Menten (Proß et al., 2009)	37
.....	43
Εικόνα 2.2.2.1.2: Υδρόλυση τεχνητού υποστρώματος p-NPA (Huang et al., 2016)	43

Πίνακας διαγραμμάτων

Διάγραμμα 3.1.1.1.1: Προσδιορισμός βέλτιστης τιμής pH δράσης της <i>TtAbf43</i> ύστερα από υπολογισμούς της ενεργότητάς της σε εύρος pH 2-9	52
Διάγραμμα 3.1.1.2.1: Προσδιορισμός βέλτιστης τιμής θερμοκρασίας δράσης της <i>TtAbf43</i> ύστερα από υπολογισμούς της ενεργότητάς της σε εύρος θερμοκρασιών 4°C-90°C	53
Διάγραμμα 3.1.2.1.1: Επίδραση του pH στην λειτουργική σταθερότητα της <i>TtAbf43</i> μετά από επώαση 24 ωρών..	54
Διάγραμμα 3.1.2.2.1: Επίδραση της θερμοκρασίας στη λειτουργική σταθερότητα της <i>TtAbf43</i> μετά από επώαση 24 ωρών.....	55
Διάγραμμα 3.1.3.1.1: Προσαρμογή δεδομένων στο κινητικό μοντέλο Michaelis-Menten για τη δράση της <i>TtAbf43</i> σε υπόστρωμα WA.....	56
Διάγραμμα 3.1.3.1.2: Προσαρμογή δεδομένων στο κινητικό μοντέλο Michaelis-Menten για τη δράση της <i>TtAbf43</i> σε υπόστρωμα RA.....	56
Διάγραμμα 3.1.4.1: Επίδραση τεσσάρων οργανικών διαλυτών (μεθανόλης, αιθανόλης, 1.4-διοξάνης και DMSO) στην ενεργότητα της <i>TtAbf43</i> . Οι συγκεντρώσεις των διαλυτών που μελετήθηκαν ήταν 10%, 20% και 45% v/v.....	57
Διάγραμμα 3.1.5.1: Επίδραση εννέα διαλυμάτων αλάτων στην ενεργότητα της <i>TtAbf43</i>	58
Διάγραμμα 3.2.1.1.1: Προσδιορισμός βέλτιστης τιμής pH δράσης της <i>TtCE16</i> σε εύρος pH 4-9..	62
Διάγραμμα 3.2.1.2.1: Προσδιορισμός βέλτιστης τιμής θερμοκρασίας δράσης της <i>TtCE16</i> ύστερα από υπολογισμούς της ενεργότητάς της σε εύρος θερμοκρασιών 4°C-70°C.....	63
Διάγραμμα 3.2.2.1.1: Επίδραση του pH στην λειτουργική σταθερότητα της <i>TtCE16</i> μετά από επώαση 24 ωρών.....	64
Διάγραμμα 3.2.3.1.1: Προσαρμογή δεδομένων στο κινητικό μοντέλο Michaelis-Menten για τη δράση <i>TtCE16</i> σε υπόστρωμα pNPA.....	65
Διάγραμμα 3.2.4.1: Επίδραση τεσσάρων οργανικών διαλυτών (μεθανόλης, αιθανόλης, 1.4-διοξάνης και DMSO) στην ενεργότητα της <i>TtCE16</i> . Οι συγκεντρώσεις των διαλυτών που απεικονίζονται το διάγραμμα είναι 10%, 20% και 50% v/v για την μεθανόλη, την αιθανόλη, την 1.4-διοξάνη και 10%, 20% και 30% v/v για το DMSO.	66
Διάγραμμα 3.2.5.1: Επίδραση αλάτων στην ενεργότητα της <i>TtCE16</i> . Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων αλάτων που μελετήθηκαν ήταν 0.5 mM, 1mM και 10mM..	67
Διάγραμμα 3.3.2.1: Συγκέντρωση σακχάρων (ξυλόζης και ξυλοβιόζης) μετά από υδρόλυση ακετυλιωμένης ξυλάνης από την εστεράση του οξικού οξέος <i>TtCE16</i> και την ξυλανάση <i>TtXyn30A</i>	70

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 2.1.2.1: Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων.....	31
Πίνακας 2.2.1.7.1: Υποστρώματα για την μελέτη εξειδίκευσης της δράσης της <i>TtAbf43</i>	40
Πίνακας 2.2.1.7.2: Συγκέντρωση υποστρωμάτων για την μελέτη εξειδίκευσης της δράσης της <i>TtAbf43</i>	41
Πίνακας 2.2.2.7.1: Υποστρώματα για την μελέτη εξειδίκευσης της δράσης της <i>TtCE16</i>	47
Πίνακας 2.2.2.7.2: Συγκέντρωση των προς μελέτη υποστρωμάτων στην αντίδραση	47
Πίνακας 2.2.3.1.1 : Επί τοις εκατό σύσταση λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων.....	48
Πίνακας 3.1.6.1: Τιμές ενεργότητας της <i>TtAbf43</i> σε υποστρώματα ολιγοσακχαριτών..	59
Πίνακας 3.1.6.2: Τιμές ενεργότητας <i>TtAbf43</i> σε υποστρώματα πολυσακχαριτών.....	60
Πίνακας 3.1.7.1: Σύγκριση δράσης <i>TtAbf43</i> με εμπορική αραβινοφουρανοζιδάση (E- AFASE) σε υποστρώματα WA και RA.....	60
Πίνακας 3.1.7.2: Σύγκριση δράσης <i>TtAbf43</i> με εμπορική αραβινοφουρανοζιδάση (E- AFAM2) σε υποστρώματα WA και RA.	61
Πίνακας 3.2.6.1: Ενεργότητα <i>TtCE16</i> σε υποστρώματα ολιγοσακχαριτών.	68
Πίνακας 4.1.4.1: Τιμές κινητικών παραμέτρων K_M και u_{max} αραβινοφουρανοζιδασών της οικογένειας GH43 που προέρχονται από το βακτήριο <i>Pseudopedobacter saltans</i> , το <i>Clostridium thermocellum</i> καθώς και από τον μύκητα <i>Thermothelomyces thermophilus</i> (<i>TtAbf43</i>) για υποστρώματα WA και RA.....	75
Πίνακας 4.2.3.1: Τιμές της σταθεράς Michaelis-Menten K_M κατά την υδρόλυση μονοακετυλωμένων παραγώγων του 4-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside από εστεράση του οξικού οξέος της οικογένειας CE16 (<i>TrCE16</i>)	81

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1 Εισαγωγή

Η περιβαλλοντική και οικονομική κρίση που παρατηρούνται παγκοσμίως τις τελευταίες δεκαετίες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στην ανάπτυξη της κυκλικής οικονομίας και την αξιοποίηση πρώτων υλών βιολογικής προέλευσης. Τέτοιο παράδειγμα πρώτης ύλης αποτελεί η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα, η οποία εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων, και είναι μία απολύτως φυσική και ανανεώσιμη πρώτη ύλη, η οποία αφθονεί στη φύση και είναι πολύ οικονομική (Anwar et al., 2014).

Τα κυρίαρχα συστατικά από τα οποία αποτελείται η βιομάζα είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη (κυρίως ξυλάνη) και η λιγνίνη (Guerrigero et al., 2016). Πρωταρχικός στόχος λοιπόν καθίσταται η διάσπαση αυτών των συστατικών στα μονομερή τους είτε μέσω χημικών είτε βιολογικών διεργασιών. Για την αποφυγή της περαιτέρω επιβάρυνσης του περιβάλλοντος, η επιστήμη της βιοτεχνολογίας παρέχει τη δυνατότητα ώστε η υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας να γίνεται ενζυμικά. Ωστόσο, η πολυπλοκότητας της δομής της απαιτεί πληθώρα ενζύμων που δρουν συνεργιστικά ώστε να επιτευχθεί η πλήρης διάσπασή της (Hu et al., 2013).

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την αποικοδόμηση της κυτταρίνης, τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι κυτταρινάσες, ενώ για τη λιγνίνη συνηθίζεται η χρήση υπεροξειδασών και λακκασών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση της ημικυτταρίνης τα οποία είτε μπορεί να διασπούν το σκελετό της ξυλάνης (ξυλανάσες, β-ξυλοζιδιάσες), είτε να απομακρύνουν τους πλευρικούς υποκαταστάτες (α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες, εστεράσες του οξικού και φερουλικού οξέος και α-γλυκουρονιδασές) (Thapa et al., 2020).

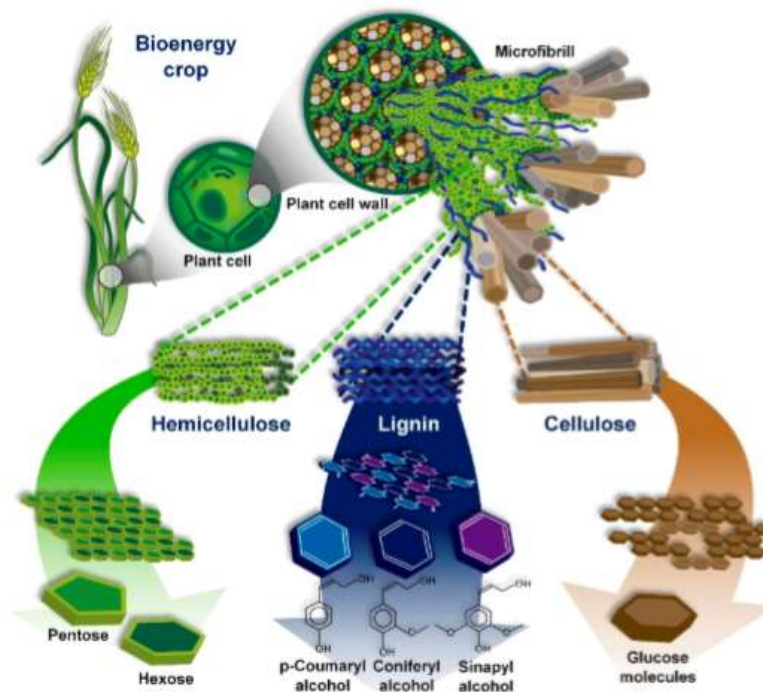
Τα σάκχαρα που παράγονται από την διάσπαση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας μετά την ενζυμική της κατεργασία, βρίσκουν εφαρμογή σε πολυάριθμες βιομηχανικές εφαρμογές. Μπορούν να μετατραπούν σε βιοκαύσιμα όπως βιοαιθανόλη, βιοβουτανόλη, βιοντήζελ, βιο-υδρογόνο και βιοαέριο, σε διάφορα προϊόντα προστιθέμενης αξίας όπως λεβουλινικό οξύ, 5-υδροξυ-μεθυλ-φουρφουράλη, ξυλιτόλη και βανιλίνη, σε βιοπλαστικά, τα οποία μπορούν να αντικαταστήσουν τα συμβατικά πλαστικά προερχόμενα από το πετρέλαιο, καθώς και σε ολιγοσακχαρίτες με πρεβιοτική δράση (Chen, 2014; Kumar et al., 2016; Okolie et al., 2021).

Συνολικά, λαμβάνοντας υπόψη τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις που υφίσταται ο πλανήτης από την εκτεταμένη χρήση ορυκτών καυσίμων και πετροχημικών προϊόντων κρίνεται επιτακτική η ανάγκη περιορισμού της χρήσης τους και αντικατάστασής τους από αντίστοιχα βιολογικής προέλευσης. Αξιοποιώντας τις φυσικές πρώτες ύλες με τα εργαλεία που προσφέρει η βιοτεχνολογία, η αλλαγή αυτή καθίσταται πλέον δυνατή.

1.2 Δομή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Η λιγνοκυτταρίνη αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό της φυτικής βιομάζας και είναι η πιο άφθονη, ανανεώσιμη και φθηνή πρώτη ύλη για βιοτεχνολογικές διεργασίες. Προσδίδει ακαμψία και σκληρότητα στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων, στηρίζοντας έτσι το φυτό. Μάλιστα παρουσιάζει ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας αλλά και βιοκαυσίμων αντικαθιστώντας έτσι τα προϊόντα που προέρχονται από το πετρέλαιο όπως και τα ορυκτά καύσιμα, συνεισφέροντας σε μεγάλο βαθμό στη μείωση του αποτυπώματος άνθρακα στον πλανήτη. Ακόμη, μπορεί να αποτελέσει πηγή ενέργειας για μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για την παραγωγή ενζύμων (Kumar et al., 2016; Yanrong Liu et al., 2019).

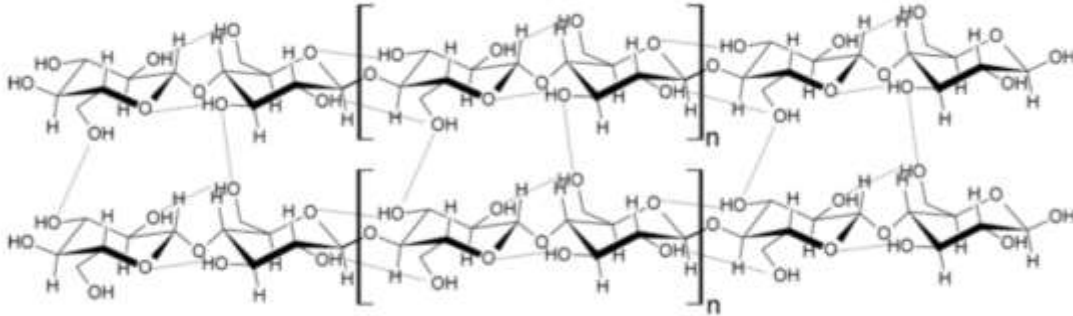
Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελείται κυρίως από τρεις τύπους πολυμερών, την κυτταρίνη σε ποσοστό 40% - 50%, την ημικυτταρίνη σε ποσοστό 25% - 35% και τη λιγνίνη σε ποσοστό 15% - 20%. Ωστόσο, η σύσταση εξαρτάται από τα γενετικά χαρακτηριστικά του φυτού καθώς και από περιβαλλοντικούς παράγοντες που ποικίλουν σημαντικά (Kumar et al., 2016). Επιπρόσθετα, η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα μπορεί να προέρχεται είτε από δασικά απόβλητα όπως υπολείμματα δέντρων, πριονίδια, γεωργικά απόβλητα όπως καλαμποκάλευρο, άχυρο σιταριού, φύκη, βιομηχανικά και οικιακά απόβλητα όπως απόβλητα από φρούτα, λαχανικά και χαρτί (Alonso et al., 2010).



Εικόνα 1.2.1: Σχηματική αναπαράσταση των βιοπολυμερών (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη) από τα οποία αποτελείται η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα (Hernández-Beltrán et al., 2019)

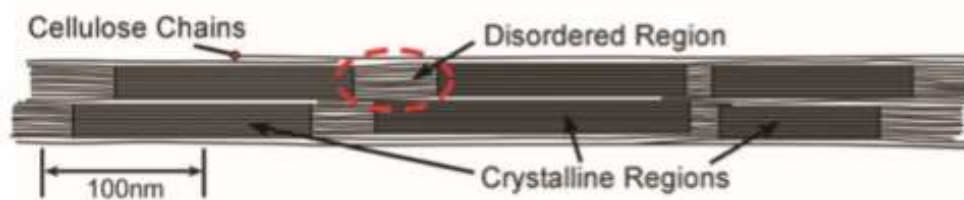
1.2.1 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη ($C_6H_{10}O_5$)_n, η οποία συνιστά το κυρίαρχο συστατικό της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, είναι ένας ομοπολυσακχαρίτης ο οποίος αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες επαναλαμβανόμενων μονάδων β-D-γλυκόζης, με βαθμό πολυμερισμού από μερικές εκατοντάδες έως και πάνω από 10000, ενωμένων με β-(1→4) γλυκοζιδικούς δεσμούς καθώς και πολυάριθμους δεσμούς υδρογόνου οι οποίοι αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων γλυκόζης (Chen, 2014; Kumar et al., 2016; Yanrong Liu et al., 2019; O. V. Singh & Chandel, 2018).



Εικόνα 1.2.1.1: Χημική δομή κυτταρίνης (Xiros et al., 2013)

Οι αλυσίδες κυτταρίνης που ενώνονται ισχυρά με τους δεσμούς υδρογόνου, διαμορφώνονται σε μικροϊνες, σχηματίζοντας κρυσταλλική δομή καθιστώντας την ένα ιδιαίτερα σταθερό πολυμερές, ανθεκτικό στην αποικοδόμηση, το οποίο παρέχει μηχανική αντοχή και χημική σταθερότητα στα φυτά, βοηθώντας τα έτσι να διατηρήσουν τη δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος (Thapa et al., 2020). Αυτά τα μικροϊνίδια συσσωρεύονται και σχηματίζουν τις ίνες κυτταρίνης. Ωστόσο, η κυτταρίνη περιλαμβάνει και μία άμορφη περιοχή η οποία είναι εύκολο να διασπαστεί. Συνολικά όμως, η συνύπαρξη των άμορφων και κρυσταλλικών περιοχών καθιστά την κυτταρίνη αδιάλυτη στο νερό καθώς και στους κοινούς οργανικούς διαλύτες. Η λιγνίνη και η ημικυτταρίνη βρίσκονται μεταξύ των μικροϊνών κυτταρίνης στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων (Yanrong Liu et al., 2019).

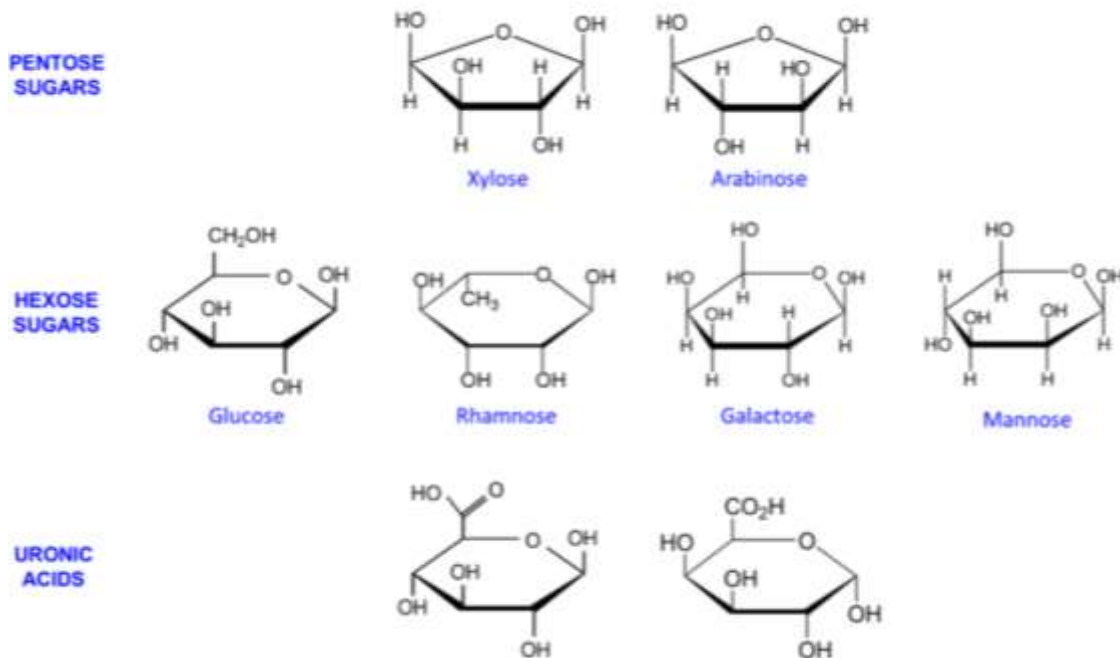


Εικόνα 1.2.1.2: Σχηματική αναπαράσταση μίας μικροϊνας κυτταρίνης στην οποία συνυπάρχουν οι κρυσταλλικές και οι άμορφες περιοχές (Yanrong Liu et al., 2019)

1.2.2 Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη αναφέρεται σε ετερογενείς διακλαδισμένους πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών και συνεισφέρουν στην στήριξη τους. Συγκεκριμένα βρίσκεται ανάμεσα από τη λιγνίνη και τις ίνες κυτταρίνης, αναπτύσσοντας δεσμούς και με τα δύο αυτά συστατικά, και η δομή της είναι τυχαία και άμορφη. Η ημικυτταρίνη αποτελείται από μικρότερες πολυμερικές αλυσίδες συγκριτικά με την κυτταρίνη, αφού εντοπίζονται γύρω στις 500-3000 μονάδες σακχάρων σε κάθε πολυμερές και δεν έχει κρυσταλλική δομή (Yanrong Liu et al., 2019; Thapa et al., 2020). Ωστόσο, εξαίρεση αποτελεί το στρώμα εκείνο της ξυλάνης, οι ξυλόζες του οποίου σχηματίζουν δεσμούς με την κρυσταλλική περιοχή της κυτταρίνης, λαμβάνοντας μια επίπεδη (two-fold) διάταξη πάνω στις ίνες κυτταρίνης, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν κρυσταλλικότητα και να δημιουργούν ένα σκληρό υλικό (Zerva et al., 2020; Grantham et al., 2017).

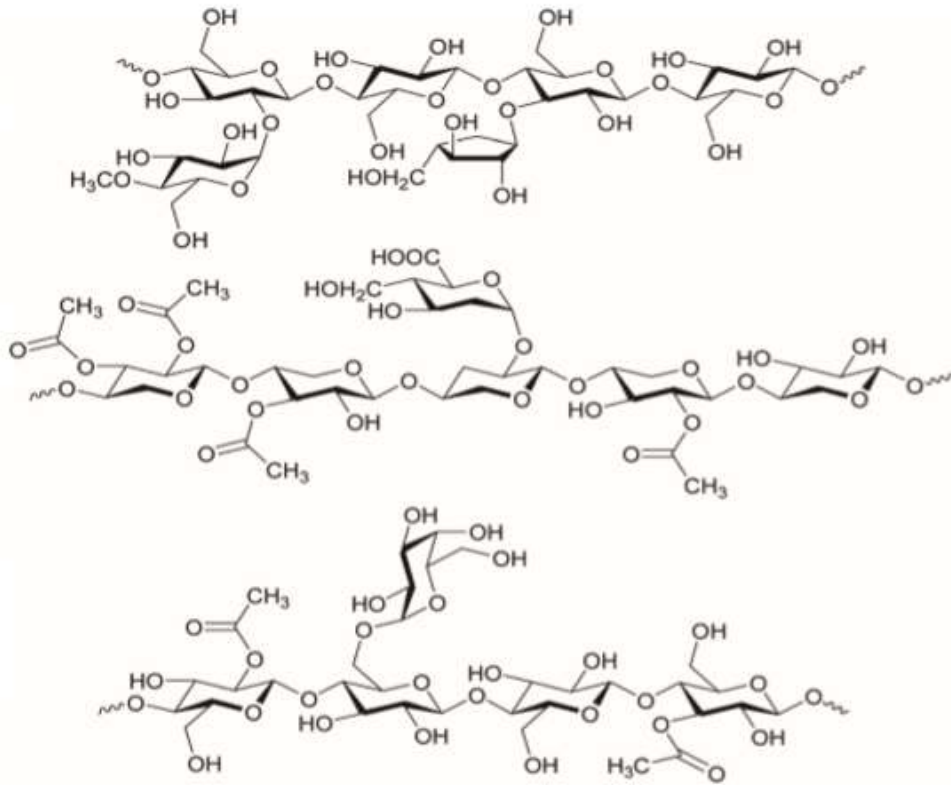
Οι πολυσακχαρίτες οι οποίοι αποτελούν την ημικυτταρίνη, διαφέρουν μεταξύ τους τόσο στη δομή όσο και στις φυσικοχημικές ιδιότητες και αυτό συμβαίνει διότι ο σκελετός τους μπορεί να αποτελείται από πεντόζες όπως β-D-ξυλόζη και α-L-αραβινόζη, εξόζες όπως β-D-μανόζη, β-D-γλυκόζη και α-D-γαλακτόζη καθώς και ουρονικά οξέα όπως γλυκουρονικό οξύ, ωστόσο η ξυλόζη βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία (Vyas et al., 2018).



Εικόνα 1.2.2.1: Χημική δομή σακχάρων (πεντόζες και εξόζες) και ουρονικών οξέων τα οποία αποτελούν δομικές μονάδες της ημικυτταρίνης (Vyas et al., 2018)

Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η υδρόλυση της οποίας είναι εξαιρετικά δύσκολη λόγω της κρυσταλλικότητάς της, η αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης θεωρείται ευκολότερη, είτε αυτή είναι χημική είτε ενζυμική (Nanda et al., 2014). Μάλιστα, οι ημικυτταρίνες μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες διαφορετικών τύπων πολυσακχαριτών που απαντώνται στο κυτταρικό τοίχωμα και αυτές είναι οι ξυλογλυκάνες, οι ξυλάνες, οι

μανάνες και οι β -(1→3, 1→4) γλυκάνες (Ebringerová & Thomas, 2005; Scheller & Ulvskov, 2010).



Εικόνα 1.2.2.3: Χημική δομή ξυλάνης (πάνω), ακετυλιωμένης μεθυλ-γλυκουροξυλάνης (μέση) ακετυλιωμένης γαλακτογλοκομαννάνης (κάτω) (Yanrong Liu et al., 2019)

1.2.2.1 Ξυλάνη

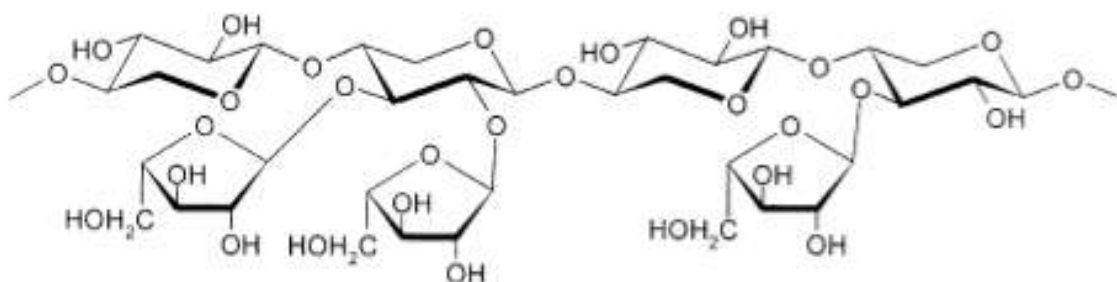
Η ξυλάνη είναι το κύριο δομικό συστατικό της ημικυτταρίνης καθώς επίσης αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο ανανεώσιμο πολυσακχαρίτη μετά την κυτταρίνη. Είναι ένας περίπλοκος πολυσακχαρίτης ο οποίος αποτελείται από έναν σκελετό μορίων ξυλόξης ενωμένων με β -(1→4) γλυκοζιδικό δεσμό, ο οποίος μπορεί να υποκαθίσταται από διάφορες μονάδες σακχάρων όπως η α -αραβινοφουρανόζη, ακετυλομάδες, ή μεθυλιωμένο γλυκουρονικό οξύ. Η δομή της μπορεί να είναι από μια απλή, σχεδόν γραμμική μη υποκατεστημένη αλυσίδα, όπως σε μερικά ποώδη φυτά, μέχρι ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα ετεροπολυσακχαριτών με πολύ υψηλό βαθμό διακλαδώσεων, όπως αυτή που περιέχεται στους σπόρους των δημητριακών (Kumar et al., 2016; Scheller & Ulvskov, 2010).

Ανεξάρτητα από το είδος του κυτταρικού τοιχώματος στο οποίο βρίσκεται, η ξυλάνη αλληλεπιδρά με τα υπόλοιπα δομικά συστατικά του τοιχώματος και συγκεκριμένα με τα μικροϊνίδια κυτταρίνης, με τις πρωτεΐνες, τους πηκτινικούς πολυσακχαρίτες, με άλλα μη κυτταρινικά πολυμερή και τις περισσότερες φορές με τη λιγνίνη. Συνήθως συνδέεται με ομοιοπολικούς δεσμούς με τη λιγνίνη μέσω φαινολικών οξέων και με μη ομοιοπολικούς δεσμούς (δεσμούς υδρογόνου) με τους άλλους πολυσακχαρίτες. Οι ξυλάνες ουσιαστικά λειτουργούν ως συνδετικός ιστός ανάμεσα στην κυτταρίνη και τη λιγνίνη ώστε να

εξασφαλιστεί η συνεκτικότητα και η ακεραιότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων (Kumar et al., 2016; Scheller & Ulvskov, 2010).

1.2.2.2 Αραβινοξυλάνη

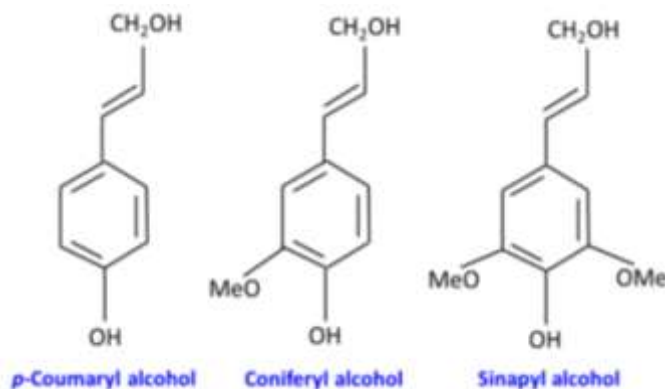
Οι αραβινοξυλάνες αποτελούν την κύρια μορφή ημικυτταρίνης των φυτικών κυττάρων των περισσότερων δημητριακών. Διαθέτουν έναν γραμμικό σκελετό, μερικώς υποκατεστημένο από την α -L-αραβινοφουρανόζη η οποία βρίσκεται είτε στον άνθρακα 2 κάποιων ξυλοζών ενωμένη με α -(1 \rightarrow 2) γλυκοζιδικό δεσμό, είτε στον άνθρακα 3 ενωμένη με α -(1 \rightarrow 3) δεσμό, είτε ως διπλή υποκατάσταση και στις δύο αυτές θέσεις (θέση 2 και 3) μίας ξυλόζης. Ξυλάνες υποκατεστημένες με αραβινόζη μπορούν να βρεθούν στα γεωργικά απόβλητα όπως στο άχυρο σιταριού, στο πίτυρο σίκαλης, και στο φλοιό ρυζιού (Ebringerová & Thomas, 2005).



Εικόνα 1.2.2.2.1: Χημική δομή ξυλάνης υποκατεστημένης με αραβινόζες (Ebringerová & Thomas, 2005)

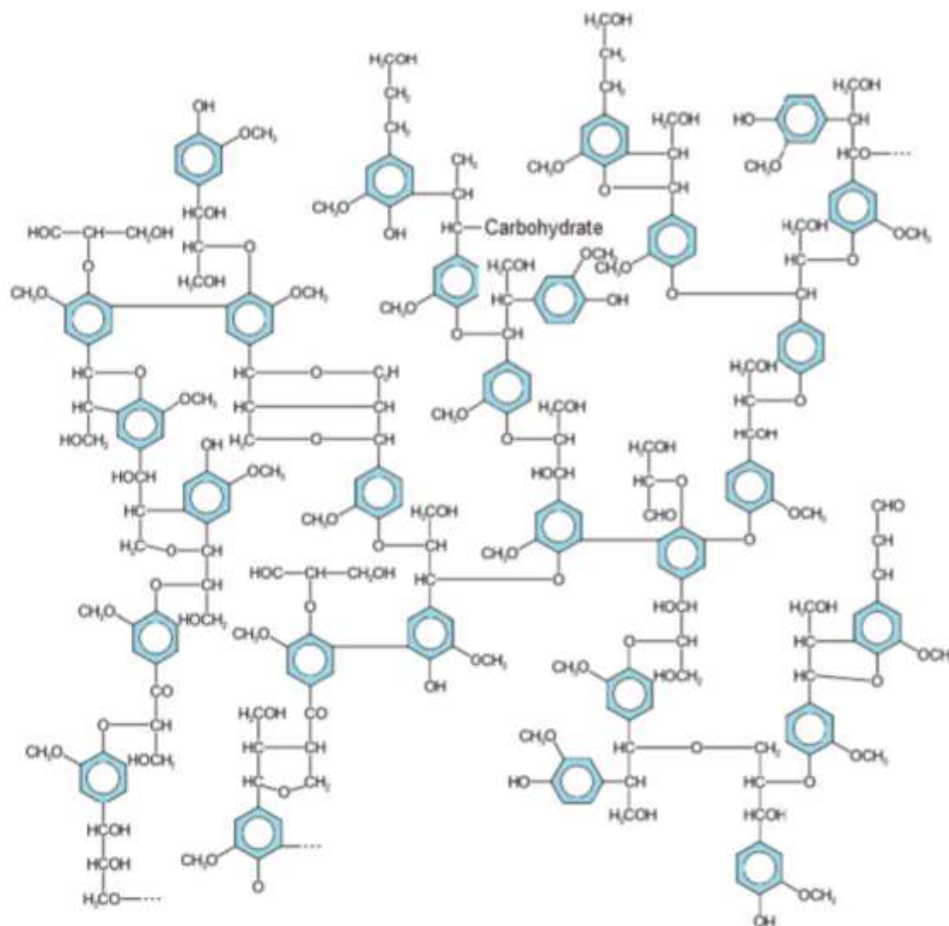
1.2.3 Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα αρωματικό πολυμερές το οποίο αποτελείται από μονάδες φαινυλοπροπανίου ενωμένες με εστερικούς δεσμούς. Η λιγνίνη δρα ως κόλλα και γεμίζει το κενό ανάμεσα και γύρω από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη στη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα (Kumar et al., 2016; Thapa et al., 2020). Αποτελείται από μακρομόρια τα οποία περιέχουν ιδιαίτερα διακλαδισμένες φαινολικές ενώσεις. Τα κύρια συστατικά της λιγνίνης αποτελούν η παρακουμαρυλική αλκοόλη (p-coumaryl alcohol), η κωνιφερυλική αλκοόλη (coniferyl alcohol) και η σιναπυλική αλκοόλη (sinapyl alcohol) (Εικόνα 1.2.3.1) (Nanda et al., 2014).



Εικόνα 1.2.3.1: Χημική δομή των τριών βασικών δομικών μονάδων της λιγνίνης (Okolie et al., 2021)

Παράλληλα, η λιγνίνη περιλαμβάνει φαινολικές ομάδες, υδροξυλομάδες, αλδεΐδομάδες και μεθοξυλομάδες, είναι έντονα υδρόφοβη και αδιάλυτη στους περισσότερους διαλύτες. Η λιγνίνη είναι ένα άμορφο ετεροπολυμερές που καθιστά το κυτταρικό τοίχωμα αδιαπέραστο και ανθεκτικό σε μικροβιακές και οξειδωτικές προσβολές, καθιστώντας δύσκολη την απελευθέρωση των μονομερών σακχάρων από τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα (Thara et al., 2020).



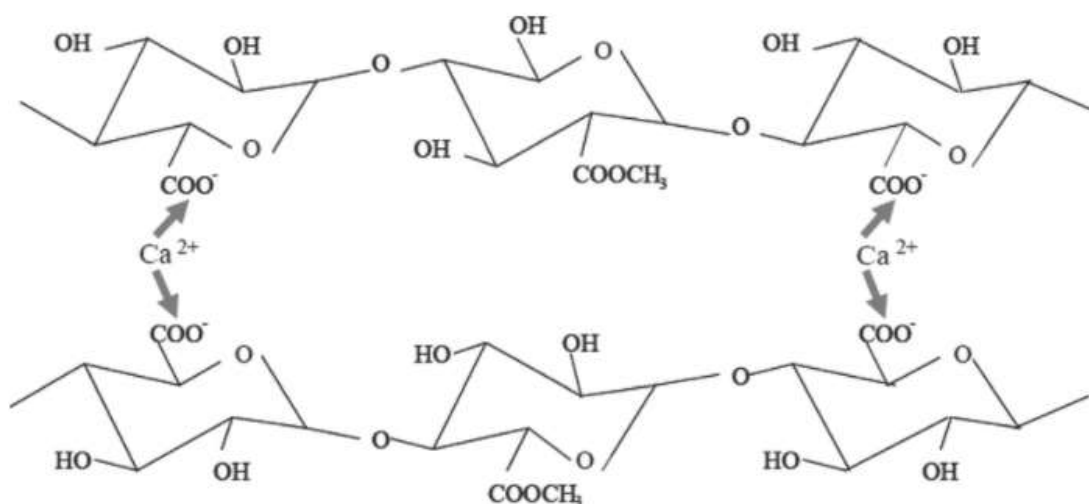
Εικόνα 1.2.3.2: Χημική δομή λιγνίνης (Nanda et al., 2014)

1.2.4 Λοιπά συστατικά

Ακόμη, στη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα εμπεριέχονται ορισμένες ενώσεις μικρού μοριακού βάρους οι οποίες είναι διαλυτές στο νερό ή σε ορισμένους οργανικούς διαλύτες όπως στην αιθανόλη ή στο εξάνιο. Τέτοιες ενώσεις είναι τα τερπενοειδή, τα στεροειδή, τα λιπίδια και τα φαινολικά συστατικά με τη μορφή φλαβονοειδών και τανινών (Kumar et al., 2016; Okolie et al., 2021).

Στη φυτική βιομάζα επιπλέον, εμπεριέχονται γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες οι οποίες συμβάλλουν στην ανάπτυξη του φυτού και στην άμυνα εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών καθώς επίσης σημαντικό ποσοστό κατέχει και η πηκτίνη. Η πηκτίνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης ο οποίος αποτελείται κατά κύριο λόγο από μονάδες

D-γαλακτουρονικού οξέος ενωμένων με α -(1→4) γλυκοζιδικούς δεσμούς. Σχηματίζει μία γέλη (Εικόνα 1.2.4.1) μέσω διασταυρούμενων δεσμών των επιμέρους πολυμερικών μονάδων (cross-linked polysaccharides), λόγω της δημιουργίας μίας γέφυρας ασβεστίου μεταξύ των μορίων της. Η δομή του δικτύου κατέχει έναν πολύ σημαντικό ρόλο καθώς επιτρέπει την ελεύθερη κίνηση του νερού στα κύτταρα και συνεισφέρει στη συγκράτηση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος (Gibson, 2012; Nanda et al., 2014; Okolie et al., 2021).

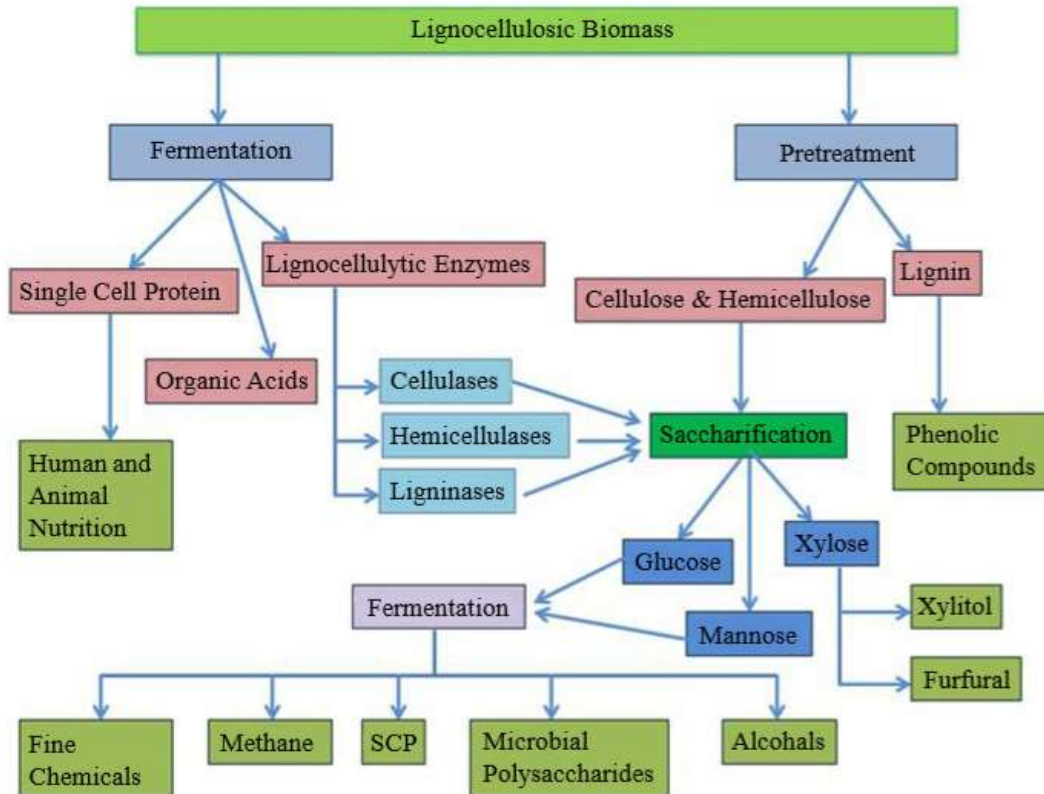


Εικόνα 1.2.4.1: Σχηματισμός γέλης μεταξύ των πολυμερικών μονάδων πηκτίνης παρουσία ιόντων ασβεστίου (Castile et al., 2013)

Μικρό τμήμα της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (περίπου το 1%) κατέχει η ανόργανη ύλη η οποία αποτελείται από τα στοιχεία πυρίτιο (Si), νάτριο (Na), κάλιο (K), μαγνήσιο (Mg), ασβέστιο (Ca), αργύλιο (Al), σίδηρος (Fe), μαγγάνιο (Mn), φωσφόρος (P) και θείο (S) (Kumar et al., 2016; Okolie et al., 2021).

1.3 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα αφθονεί στη φύση και έχει τη δυνατότητα να μετατραπεί σε διάφορα προϊόντα προστιθέμενης αξίας, βιοκαύσιμα, βιοπλαστικά καθώς και σε oligομερή με πρεβιοτική δράση διαθέτοντας έτσι ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών. Η βιοτεχνολογική μετατροπή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε διάφορα βιομηχανικά προϊόντα είναι οικονομικά αποδοτική, περιβαλλοντικά βιώσιμη και στοχεύει κατά κύριο λόγο στην αντικατάσταση των προϊόντων που παρασκευάζονται από ορυκτούς πόρους όπως είναι το πετρέλαιο (O. V. Singh & Chandel, 2018).

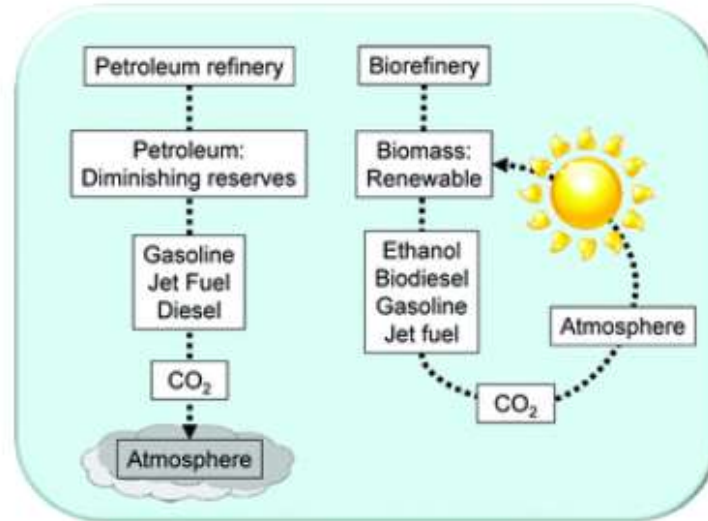


Εικόνα 1.3.1: Βιομετατροπή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας (Kumar et al., 2016)

Γενικότερα έχει παρατηρηθεί πως η μετατροπή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαμέσου θερμοχημικών διεργασιών έχει χαμηλές αποδόσεις και υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Εξαιτίας αυτού, η ανακάλυψη εναλλακτικών διεργασιών αξιοποίησης της βιομάζας προσελκύει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ειδικά τις τελευταίες δεκαετίες. Γι' αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί οι βιοχημικές διεργασίες κατά τις οποίες η βιομάζα υφίσταται μία προκατεργασία ώστε να διασπαστεί στα συστατικά της, τα οποία στη συνέχεια μέσω ζύμωσης ή αναερόβιας χώνευσης μετατρέπονται σε βιοκαύσιμα και βιοπροϊόντα (Chen, 2014; Yanrong Liu et al., 2019; O. V. Singh & Chandel, 2018).

1.3.1 Βιοκαύσιμα

Οι αυξημένες ενεργειακές ανάγκες σε παγκόσμιο επίπεδο έχουν οδηγήσει σε υπερεκτεταμένη χρήση των ορυκτών πόρων γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ποικίλων περιβαλλοντικών προβλημάτων. Για το σκοπό αυτό, η έρευνα και η εφαρμογή εναλλακτικών μορφών ενέργειας στοχεύουν στην αντιμετώπιση τους. Βιώσιμη λύση αποτελεί η δημιουργία ενέργειας και καυσίμων από τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα η οποία αποτελεί μία άφθονη πρώτη ύλη και είναι πολύ οικονομική. Μάλιστα, τα βιοκαύσιμα που προέρχονται από τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα είναι ουδέτερα από άνθρακα (Εικόνα 1.3.1.1) και θεωρούνται βιώσιμες εναλλακτικές λύσεις για τις ενεργειακές ανάγκες έναντι των συνηθισμένων προερχόμενων από το πετρέλαιο (O. V. Singh & Chandel, 2018).



Εικόνα 1.3.1.1: Ο κύκλος του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) για καύσιμα προερχόμενα από το πετρέλαιο και για βιοκαύσιμα (O. V. Singh & Chandel, 2018)

Τα βιοκαύσιμα, τα οποία παράγονται είτε μέσω θερμοχημικών (πυρόλυση, υγροποίηση, αεριοποίηση, εστεροποίηση) είτε μέσω βιοχημικών διεργασιών (ενζυμική υδρόλυση, ζύμωση και αναερόβια χώνευση), παρατηρούνται σε δύο μορφές, την υγρή μορφή όπως είναι η βιοαιθανόλη, η βιοβουτανόλη και το βιοντήζελ και την αέρια μορφή όπως είναι το βιοαέριο και το βιο-υδρογόνο τα οποία αναλύονται παρακάτω.

1.3.1.1 Βιοαιθανόλη

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα είναι μία άφθονα διαθέσιμη πρώτη ύλη σε εξαιρετικά χαμηλό κόστος για παραγωγή βιοαιθανόλης η οποία αποτελεί αντικατάστατο των ορυκτών καυσίμων (Kumar et al., 2016). Η βιολογική διεργασία που ακολουθείται για την μετατροπή της βιομάζας σε βιοαιθανόλη αποτελείται από τρία επιμέρους βήματα. Πρώτο βήμα αποτελεί η προκατεργασία της λιγνοκυτταρινούχου δομής ώστε η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη να μπορούν πλέον να υδρολυθούν. Ακολουθεί η υδρόλυση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα ύστερα από τη δράση λιγνοκυτταρινολυτικών ενζύμων. Τέλος, γίνεται η ζύμωση των σακχάρων για την μετατροπή τους σε αιθανόλη, διαδικασία κατά την οποία χρησιμοποιούνται διάφοροι μικροοργανισμοί όπως ο *Saccharomyces cerevisiae* και ο *Zymomonas mobilis*. Ωστόσο, παραγωγή βιοαιθανόλης από βιομάζα μπορεί να γίνει και θερμοχημικά όπου απαιτείται αεριοποίηση του υποστρώματος και στη συνέχεια ζύμωση ή καταλύσιμη αντίδραση (Chen, 2014).

Η βιοαιθανόλη είναι δυνατό να αναμειχθεί με τη βενζίνη και να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο μεταφοράς. Τα πλεονεκτήματα αυτού του βιοκαυσίμου είναι πολυάριθμα καθώς προέρχεται από φυτική βιομάζα η οποία είναι άφθονη στη φύση και πολύ οικονομική, περιέχει οξυγόνο σε ποσοστό 35%, γεγονός που διευκολύνει την καύση και ελαττώνει τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου όπως μονοξειδίου του άνθρακα, των βλαβερών οξειδίων του αζώτου αλλά και σωματιδίων και υδρογονανθράκων (Okolie et al., 2021).

1.3.1.2 Βιοβουτανόλη

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα μπορεί να αξιοποιηθεί βιοτεχνολογικά για την παραγωγή ενός ακόμη βιοκαυσίμου, ικανού να αντικαταστήσει τη βενζίνη, της βιοβουτανόλης. Η παραγωγή της βιοβουτανόλης βιολογικά γίνεται μέσω ζύμωσης των σακχάρων της βιομάζας (Kumar et al., 2016; Okolie et al., 2021). Η βιοβουτανόλη μάλιστα, αποτελεί εναλλακτική ακόμα και της βιοαιθανόλης χάρη στις καλύτερες ιδιότητες που έχει ως καύσιμο, όπως είναι το χαμηλότερο ιξώδες και η υψηλότερη ενεργειακή πυκνότητα. Η βιοβουτανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε στην καθαρή της μορφή είτε ως μίγμα με βενζίνη σε καθορισμένες αναλογίες χωρίς μηχανική τροποποίηση στους κινητήρες των αυτοκινήτων. Είναι ασφαλής λόγω της χαμηλής τάσης ατμών που έχει καθώς και λόγω του ότι δεν προκαλεί διάβρωση. Ακόμη, χρησιμοποιείται συχνά ως διαλύτης διάφορων προϊόντων όπως φαρμάκων, αντιβιοτικών και καλλυντικών (O. V. Singh & Chandel, 2018).

Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως οι βιο-αλκοόλες όπως είναι η βιοαιθανόλη και η βιοβουτανόλη παρότι παρουσιάζουν πολλαπλά οφέλη, μειώνοντας στο ελάχιστο τη χρήση των ορυκτών καυσίμων, εντούτοις οι διαδικασίες διαχωρισμού τους και κυρίως της βιοβουτανόλης είναι ιδιαίτερα ενεργοβόρες, κοστοβόρες και έχουν χαμηλή απόδοση σε προϊόν (Chen, 2014; O. V. Singh & Chandel, 2018).

1.3.1.3 Βιο-υδρογόνο

Η παραγωγή βιο-υδρογόνου από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα πραγματοποιείται βιοχημικά μέσω ζύμωσης, παρουσία φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών όπως είναι τα μικροφύκη και κατάλληλων ενζύμων (νιτρογονάσες). Παράλληλα, είναι δυνατό να παραχθεί βιο-υδρογόνο μέσω της σκοτεινής ζύμωσης (dark fermentation). Σε αυτή την περίπτωση η διάσπαση των οργανικών υποστρωμάτων πραγματοποιείται με τη βοήθεια αναερόβιων βακτηρίων απουσία φωτός και οξυγόνου. Επιπρόσθετα, μπορεί να παραχθεί υδρογόνο θερμοχημικά μέσω της αεριοποίησης του νερού που εμπεριέχεται στη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα, ωστόσο αυτή η μέθοδος δεν προτιμάται λόγω των μεγάλων ενεργειακών της απαιτήσεων και των περιβαλλοντικών κινδύνων που ελλοχεύουν. Το βιο-υδρογόνο από πολλούς θεωρείται ως το καύσιμο του μέλλοντος διότι παράγει μεγάλα ποσά ενέργειας κατά την καύση του και ως προϊόν σχηματίζει νερό, γεγονός που του αποδίδει τον όρο «καθαρό καύσιμο» (Chen, 2014; Kumar et al., 2016; Okolie et al., 2021; O. V. Singh & Chandel, 2018).

1.3.1.4 Βιοντήζελ

Τα λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή βιοντήζελ μέσω της διαδικασίας της τρανσεστεροποίησης. Η αντίδραση μεταξύ του φυτικού ελαίου με μία αλκοόλη οδηγεί στην παραγωγή αλκυλεστέρων λιπαρών οξέων (βιοντήζελ) και γλυκερόλης. Το βιοντήζελ είναι ένα ανανεώσιμο, μη τοξικό και φιλικό προς το περιβάλλον καύσιμο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε νηζελοκινητήρες χωρίς κάποια τροποποίησή τους ή να χρησιμοποιηθεί ως μίγμα με ντήζελ προερχόμενο από πετρέλαιο σε κατάλληλες αναλογίες (Kumar et al., 2016; Okolie et al., 2021).

1.3.1.5 Βιοαέριο

Η παραγωγή βιοαερίου από λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα μέσω της αναερόβιας χώνευσης προσελκύει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τόσο για την αντιμετώπιση των ολοένα αυξανόμενων ενεργειακών αναγκών όσο και για τον περιορισμό της περιβαλλοντικής ρύπανσης. Μάλιστα, οι ουσίες που παράγονται κατά την αναερόβια χώνευση αποτελούν πολύ χρήσιμα λιπάσματα οργανικής προέλευσης καθώς είναι πλούσια σε άζωτο και φωσφόρο. Επομένως, ενισχύουν την γεωργική παραγωγή και τον έλεγχο της διάβρωσης του εδάφους (Chen, 2014; Wei, 2016).

Το βιομεθάνιο ή βιοαέριο που αποτελείται από μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα, αποδίδει περισσότερη ενέργεια από τη βιοαιθανόλη και το βιοντήζελ και θεωρείται ως ένα πολλά υποσχόμενο βιοκαύσιμο χάρη στη χαμηλή του πυκνότητα, την υψηλή θερμογόνο δύναμη και την μεγάλη θερμική απόδοση. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί πως όταν χρησιμοποιείται το βιομεθάνιο ως καύσιμο σε οχήματα υπάρχει μία μείωση της τάξης του 63% στην εκπομπή ορισμένων τοξικών αερίων σε σχέση με το φυσικό αέριο. Έτσι, το βιοαέριο μπορεί να αντικαταστήσει το φυσικό αέριο που προέρχεται από ορυκτούς πόρους και να έχει εφαρμογή στη παραγωγή θερμότητας και ηλεκτρικής ενέργειας (Okolie et al., 2021).

1.3.2 Προϊόντα προστιθέμενης αξίας

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα μπορεί επίσης να αποτελέσει υπόστρωμα για την παραγωγή χημικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας χάρη στις δομικές μονάδες των κύριων συστατικών της, της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Στη σημερινή εποχή σχεδόν το 75% των χημικών που χρησιμοποιούνται ευρέως για τη σύνθεση πολυμερών και ρητινών αποτελείται από προπυλένιο, βενζένιο, αιθυλένιο και τολουένιο, γεγονός που απαιτεί άμεση δράση για αντικατάσταση αυτών των πετροχημικών προϊόντων από αντίστοιχα βιολογικά προερχόμενα (Chen, 2014; Okolie et al., 2021; O. V. Singh & Chandel, 2018).

1.3.2.1 Λεβουλινικό οξύ και 5-υδροξυ-μεθυλ-φουρφουράλη

Η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή γλυκόζης, η οποία μπορεί να μετατραπεί σε λεβουλινικό οξύ (levulinic acid) και σε 5-υδροξυ-μεθυλ-φουρφουράλη (5-HMF). Το λεβουλινικό οξύ και η 5-HMF αναγνωρίζονται ως πολλά υποσχόμενες χημικές ουσίες για την παραγωγή διάφορων οργανικών χημικών προϊόντων υψηλής αξίας, αρωματικών ενώσεων, πολυμερών και πρόσθετων καυσίμων λόγω των ποικίλων λειτουργιών τους. Το λεβουλινικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση διάφορων χημικών όπως η γ-βαλερολακτόνη (γ-valerolactone), το σουκινικό οξύ (succinic acid), ρητίνες, πολυμερή, φυτοφάρμακα, φαρμακευτικά προϊόντα και ενισχυτικά γεύσης. Η 5-υδροξυ-μεθυλ-φουρφουράλη χρησιμοποιείται για τη σύνθεση τόσο χρήσιμων ενώσεων όπως του 2,5-φουραντι-καρβοξυλικού οξέος (2,5-furandicarboxylic acid, FDCA) το οποίο αποτελεί πρώτη ύλη για τη σύνθεση πολυεστερικών υλικών, όσο και φαρμάκων, ρητινών και πρόσθετων ουσιών που χρησιμοποιούνται στα καύσιμα (Chen, 2014; Kumar et al., 2016; O. V. Singh & Chandel, 2018; Zheng et al., 2016).

1.3.2.2 Ξυλιτόλη

Η διάσπαση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας μπορεί να αξιοποιηθεί και για την παραγωγή ενός ιδιαίτερα σημαντικού προϊόντος, της ξυλιτόλης. Η ξυλιτόλη παράγεται ύστερα από υδρόλυση της ημικυτταρίνης η οποία είναι πλούσια σε ξυλάνη ώστε να παραληφθεί ξυλόζη. Μάλιστα, η σύνθεση της ξυλιτόλης από ημικυτταρίνη προερχόμενη από φυτική βιομάζα έχει προκαλέσει έντονο ενδιαφέρον διότι ως τώρα ο μόνος τρόπος παραγωγής της ήταν μέσω της χημικής διεργασίας αναγωγής της ξυλόζης, διεργασία η οποία απαιτεί υψηλή πίεση, ακριβούς καταλύτες (νικέλιο), μεθόδους διαχωρισμού και καθαρισμού (Chen, 2014; Kumar et al., 2016; Okolie et al., 2021; O. V. Singh & Chandel, 2018).

Έτσι, η μικροβιακή παραγωγή της ξυλιτόλης αποτελεί μία εναλλακτική μέθοδο, ιδιαίτερα ελκυστική, μέσω της οποίας είναι δυνατό να παραχθεί ένα προϊόν υψηλής ποιότητας και όλη η διαδικασία να είναι οικονομικά αποδοτική. Αυτό συμβαίνει διότι μπορεί να επιτευχθεί σε φυσιολογικές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας και χωρίς να είναι απαραίτητος ο καθαρισμός της ξυλόζης. Χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, ζύμες, μύκητες οι οποίοι μεταβολίζουν την ξυλόζη ώστε να τη μετατρέψουν σε ξυλιτόλη. Ωστόσο, οι ζύμες θεωρούνται οι πιο αποτελεσματικοί παραγωγοί ξυλιτόλης (Chen, 2014; Kumar et al., 2016; Okolie et al., 2021; O. V. Singh & Chandel, 2018).

Η ξυλιτόλη μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική της σακχαρόζης ως γλυκαντικό τροφίμων που απευθύνονται σε διαβητικούς καθώς και να χρησιμοποιηθεί στις λεπτές επικαλύψεις των φαρμάκων. Η ξυλιτόλη έχει ευρεία εφαρμογή και στην οδοντιατρική τεχνολογία όπως σε σκευάσματα οδοντόπαστας και στοματικά διαλύματα καθώς επίσης εμπεριέχεται ως συστατικό και στις τσίγλες (Chen, 2014; Kumar et al., 2016; Okolie et al., 2021; O. V. Singh & Chandel, 2018).

1.3.2.3 Βανιλίνη

Επιπλέον, από τον αποπολυμερισμό της λιγνίνης που εμπεριέχεται στη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα είναι δυνατή η παραγωγή βανιλίνης (4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζαλδεΰδη) μίας ένωσης η οποία αποτελεί δομικό στοιχείο για τη σύνθεση πολυμερών όπως πολυεστέρων, ρητινών και πολυανθρακικών φύλλων (polycarbonates). Για τον αποπολυμερισμό της λιγνίνης σε βανιλίνη χρησιμοποιούνται οξειδωτικά μέσα σε υδατικό διάλυμα της λιγνίνης σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες καθώς και αλκαλικό pH. Η βανιλίνη βρίσκεται εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων ως γλυκαντική ουσία όπως και στις φαρμακοβιομηχανίες για την σύνθεση φαρμάκων και εντομοκτόνων (Okolie et al., 2021).

1.3.3 Βιοπλαστικά

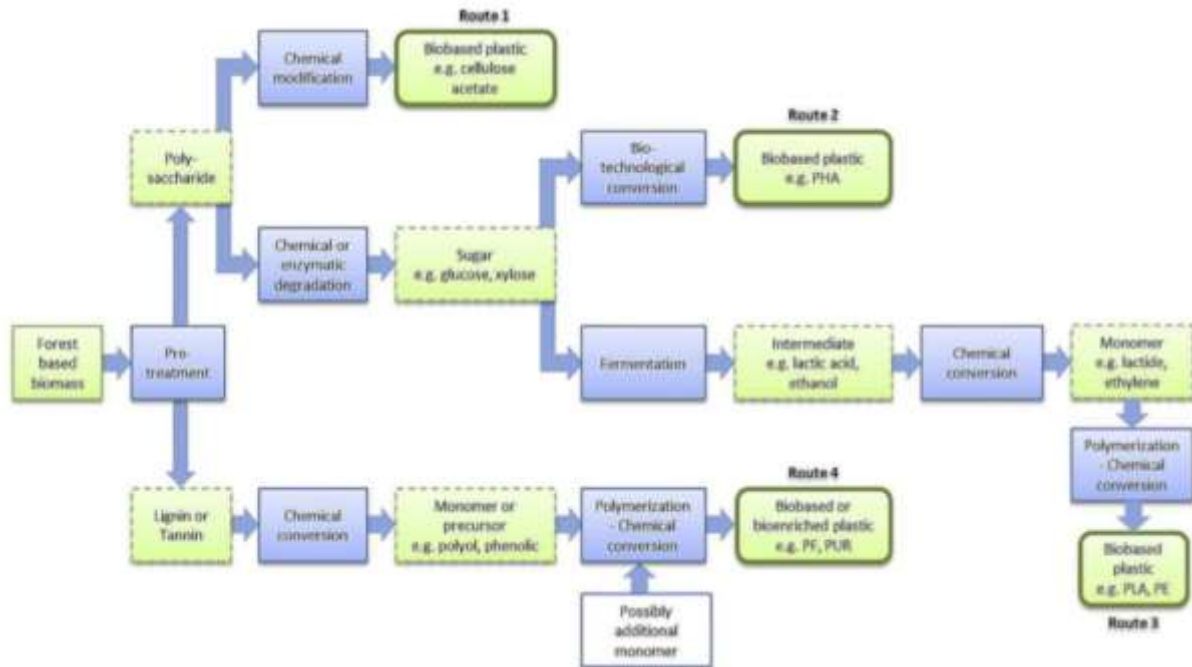
Τα βιοπλαστικά αποτελούν βιώσιμη εναλλακτική έναντι των συνηθισμένων πλαστικών που προέρχονται από το πετρέλαιο και έχουν ευρεία χρήση σε πολυάριθμες εφαρμογές της καθημερινής ζωής. Τα βιοπλαστικά σε αντίθεση με τα πετροχημικά προερχόμενα ανάλογά τους, μπορούν να παραχθούν χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα, μειώνοντας αισθητά το οικολογικό αποτύπωμά τους. Αξίζει μάλιστα να αναφερθεί πως για κάθε 1 κιλό πλαστικού που καίγεται, 2,8 κιλά CO₂ απελευθερώνονται

στην ατμόσφαιρα. Όλοι οι περιβαλλοντικοί περιορισμοί έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον προς τα βιοπλαστικά, τα οποία συμβάλλουν στην αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών προκλήσεων που προκαλούνται κατά την παραγωγή, χρήση και διάθεση συνθετικών πλαστικών (Brodin et al., 2017; Okolie et al., 2021).

Τα βιοπλαστικά συντίθενται μεν από κάποια ανανεώσιμη πρώτη ύλη ωστόσο αυτό δεν τα καθιστά απαραίτητα και βιοαποικοδομήσιμα. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το βιοπολυαιθυλένιο, το οποίο δεν είναι βιοαποικοδομήσιμο όμως μπορεί να ανακυκλωθεί. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν βιοπλαστικά, όπως το PHA, τα οποία είναι βιολογικής προέλευσης και παράλληλα είναι βιοαποικοδομήσιμα (Jambunathan & Zhang, 2016).

Για την παραγωγή βιοπολυμερών έχοντας ως πρώτη ύλη τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα απαιτείται μία σειρά από διεργασίες. Αρχικά θα πρέπει να γίνει διάσπαση της φυτικής βιομάζας στα συστατικά της, διαχωρισμός και καθαρισμός τους. Στη συνέχεια ακολουθεί ο σχηματισμός των βιοπλαστικών είτε μέσω μεταβολικών μονοπατιών μικροοργανισμών (PHA), είτε μέσω χημικών αντιδράσεων πολυμερισμού (PBS, PLA). Πιο συγκεκριμένα, το βιολογικά προερχόμενο γαλακτικό οξύ για παράδειγμα, παράγεται με ζύμωση των σακχάρων που σχηματίζονται από διάσπαση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Έπειτα, για τη σύνθεση του πολυγαλακτικού οξέος ακολουθείται η αντίδραση πολυμερισμού μέσω ανοίγματος δακτυλίου. Το PHA αποτελεί ένα παράδειγμα βιολογικά προερχόμενου πλαστικού το οποίο μπορεί να χρησιμοποιήσει τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα ως πρώτη ύλη και παράγεται διαμέσου βιοτεχνολογικών μονοπατιών (Brodin et al., 2017; Jambunathan & Zhang, 2016; Okolie et al., 2021).

Επιπλέον, ορισμένα βιοπλαστικά χρησιμοποιούν για την παραγωγή τους όλες τις υποδομές και τα μονοπάτια που ακολουθούνται για την παραγωγή των αντίστοιχων πετροχημικών ωστόσο η πρώτη ύλη για τη παραγωγή τους είναι η φυτική βιομάζα. Στη κατηγορία αυτή ανήκουν τα βιοπροπυλένιο (bio-PP), το βιο-τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (bio-PET) και το βιοπολυαιθυλένιο (bio-PE) (Brodin et al., 2017).



Εικόνα 1.3.3.1: Κόρια μονοπάτια παραγωγής βιοπλαστικών προερχόμενων από φυτική βιομάζα (Brodin et al., 2017)

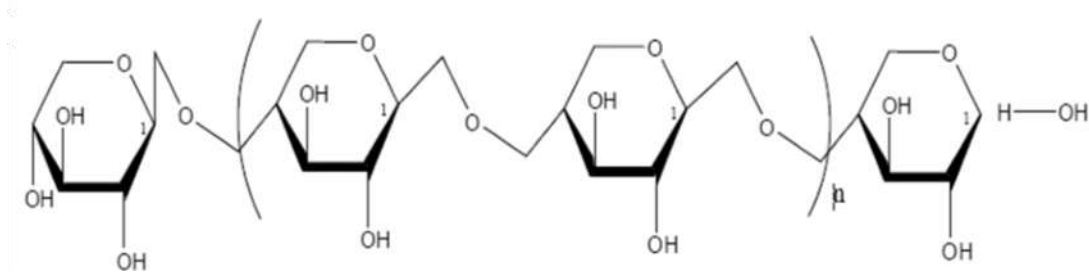
Τα βιοπλαστικά που παράγονται έχοντας ως πρώτη ύλη τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών και να αντικαταστήσουν τα πετροχημικά πλαστικά όπως είναι οι συσκευασίες, τα υφάσματα, τα ιατρικά εμφυτεύματα και οι 3D εκτυπώσεις (Brodin et al., 2017; Okolie et al., 2021).

1.3.4 Ολιγοσακχαρίτες με πρεβιοτική δράση

Τα πρεβιοτικά είναι ουσίες μη εύπεπτες για τον άνθρωπο, οι οποίες ενισχύουν την ανάπτυξη του μικροβιώματος του εντέρου προσφέροντας έτσι πολυάριθμα οφέλη στον ξενιστή όσον αφορά το ανοσοποιητικό σύστημα, την εντερική λειτουργία και την αντιοξειδωτική δράση. Κατά τη διάσπαση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας είτε αυτή πραγματοποιείται θερμοχημικά είτε ενζυμικά, απελευθερώνονται ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι έχουν πρεβιοτική δράση. Συγκεκριμένα σχηματίζονται ξυλοολιγομερή από τη διάσπαση της ημικυτταρίνης και κυτταριοολιγομερή ύστερα από διάσπαση της κυτταρίνης τα οποία είναι πλούσια σε ξυλάνη και γλυκάνη αντίστοιχα (R. D. Singh et al., 2015; O. V. Singh & Chandel, 2018).

1.3.4.1 Ξυλοολιγοσακχαρίτες (xylooligosaccharides-XOS)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ξυλοολιγοσακχαρίτες οι οποίοι μπορούν να παραχθούν από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα πλούσια σε ξυλάνη. Πιο συγκεκριμένα, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες είναι προϊόντα υδρόλυσης της ξυλάνης, ολιγομερή δηλαδή τα οποία αποτελούνται από δύο έως επτά μονάδες ξυλόζης ενωμένων με β -(1→4) δεσμούς και περιλαμβάνουν διάφορους υποκαταστάτες (Bhatia et al., 2019).

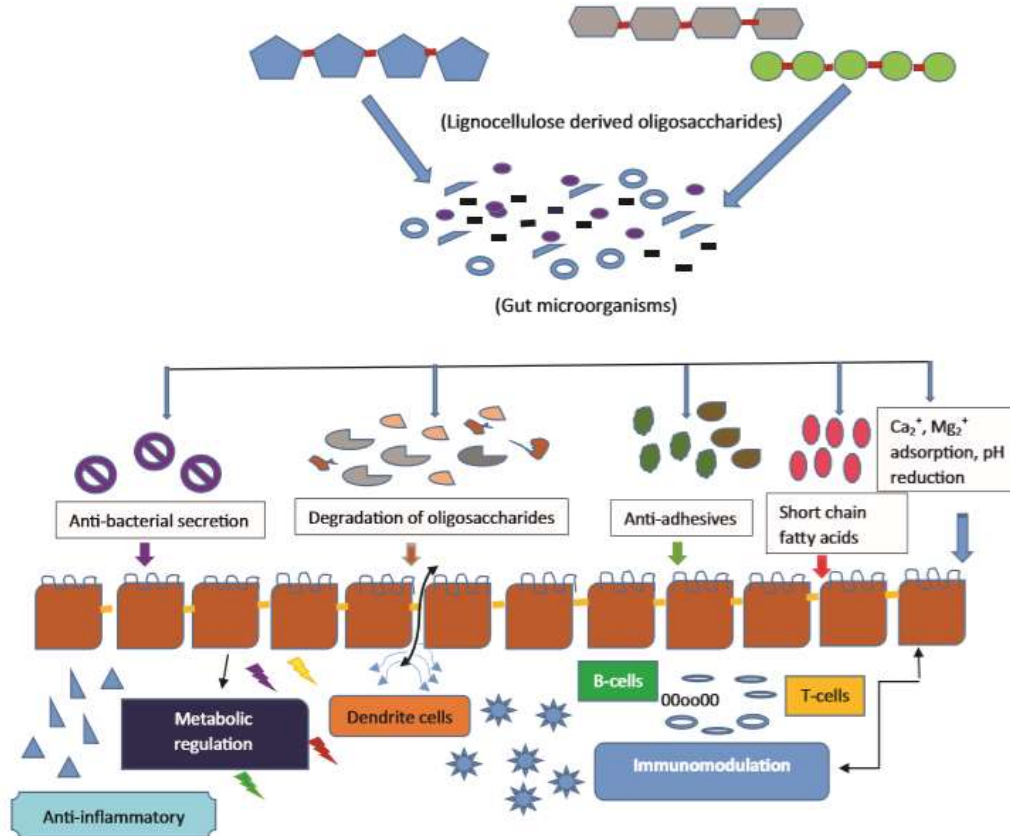


Εικόνα 1.3.4.1.1: Χημική δομή ξυλοολιγοσακχαριτών. Ο δείκτης (n), ο οποίος αφορά τις δομικές μονάδες που επαναλαμβάνονται, παίρνει τιμές από 0 έως 5. (Bhatia et al., 2019)

Στη φύση, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες παρατηρούνται στα λαχανικά, στα φρούτα, στο μέλι, στο γάλα και στις ρίζες μπαμπού. Μπορούν να απομονωθούν ύστερα από ενζυμική υδρόλυση της ξυλάνης, από χημική υδρόλυση ή συνδυασμό των δύο αυτών μεθόδων από διάφορες πηγές φυτικής βιομάζας. Μάλιστα, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ξυλοολιγοσακχαριτών όπως είναι η ιδιαίτερα διευρυμένη σταθερότητα του pH τους, η θερμική σταθερότητά τους και η γλυκιά γεύση, τους προσδίδει τη δυνατότητα να χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων (Bhatia et al., 2019).

Η παραγωγή των ξυλοολιγοσακχαριτών είναι εφικτή μέσω της διάσπασης των συστατικών της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας και συγκεκριμένα της ημικυτταρίνης. Η εν λόγω διαδικασία είναι περίπλοκη και επιτυγχάνεται είτε με φυσικές, χημικές ή βιολογικές διεργασίες. Όσον αφορά τη βιολογική προσέγγιση, γίνεται χρήση ειδικών ενζύμων, των ξυλανάσων για τη διάσπαση της ημικυτταρίνης, αλλά και κυτταρινασών και υπεροξειδασών για τη διάσπαση της κυτταρίνης και της λιγνίνης αντιστοίχως. Η συγκεκριμένη διεργασία προτιμάται έναντι των φυσικοχημικών, διότι δεν έχει υψηλές ενεργειακές ανάγκες, είναι οικονομικότερη μέθοδος και είναι ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον (R. D. Singh et al., 2015).

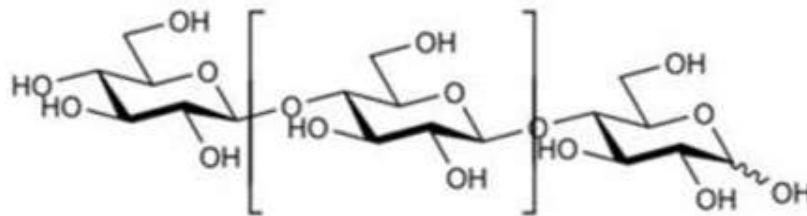
Οι ξυλοολιγοσακχαρίτες έχουν αξιοσημείωτες δυνατότητες ως καινοτόμα πρεβιοτικά. Μάλιστα, οι μοναδικές βιολογικές ιδιότητες των ξυλοολιγοσακχαριτών οδηγούν στην ανάπτυξη νέων λειτουργικών τροφίμων που έχουν τη δυνατότητα να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής ατόμων με παχυσαρκία, γαστρεντερικές διαταραχές, σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και ορισμένων τύπων καρκίνου. Επιπλέον, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες παρουσιάζουν ποικίλα οφέλη όπως αύξηση της απορρόφησης ασβεστίου, κυτταροτοξική δράση έναντι της λευχαιμίας, βελτίωση της λειτουργίας του εντέρου, ελαχιστοποίηση της πιθανότητας καρκίνου του παχέος εντέρου καθώς και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Bhatia et al., 2019; Chen, 2014). Ακόμη, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες βρίσκουν εφαρμογή και στη φαρμακοβιομηχανία χάρη στις ποικίλες δράσεις τους όπως είναι η αντιαλλεργική δράση, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδης δράση (Bhatia et al., 2019; R. D. Singh et al., 2015).



Εικόνα 1.3.4.1.2: Μηχανισμός πρεβιοτικής δράσης των λιγνοκυτταρινούχων ολιγοσακχαριτών (Bhatia et al., 2019)

1.3.4.2 Κελλο-ολιγοσακχαρίτες (Cello-oligosaccharides, COS)

Οι κελλο-ολιγοσακχαρίτες είναι γραμμικά ολιγομερή που αποτελούνται από δύο έως έξι μονάδες D-γλυκόζης ενωμένες με β -(1 \rightarrow 4) δεσμούς. Για την παραγωγή τους είναι απαραίτητη η υδρόλυση της κυτταρίνης, η οποία επιτυγχάνεται είτε χημικά (όξινη υδρόλυση), είτε ενζυμικά. Η ενζυμική υδρόλυση σαφώς προτιμάται καθώς χρησιμοποιεί πιο ήπιες συνθήκες αντίδρασης, παρατηρείται λιγότερη παραγωγή μονομερών (παραπροϊόντων), έχει μικρότερες ενεργειακές απαιτήσεις και επιπλέον, δεν χρειάζεται να γίνει χρήση ακριβών καταλυτών όπως κατά τις φυσικοχημικές μεθόδους (Ávila et al., 2021).



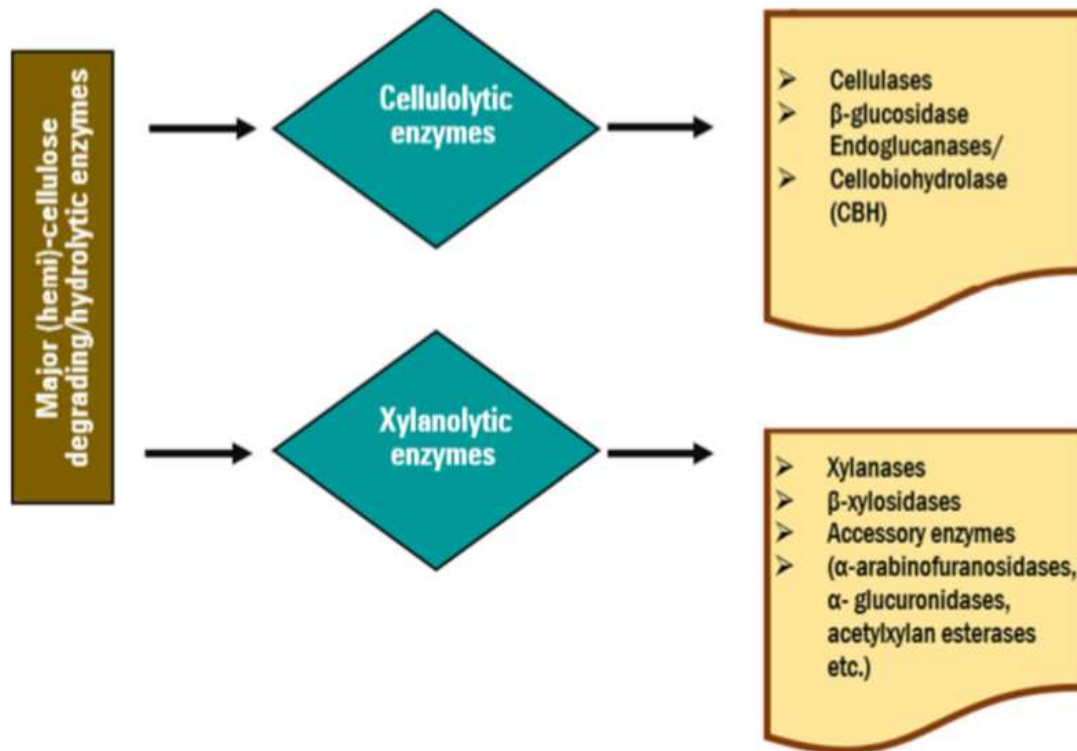
Εικόνα 1.3.4.2.1: Χημική δομή κελλο-ολιγοσακχαρίτη (Ávila et al., 2021)

Οι κελλο-ολιγοσακχαρίτες έχουν ορισμένες φυσικοχημικές, ρεολογικές και λειτουργικές ιδιότητες, με βάση τις οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων, καλλυντικών και χημικών, καθώς και στην παραγωγή ζωοτροφών και βιοενέργειας. Πιο συγκεκριμένα, (Ávila et al., 2021):

- Έχουν πρεβιοτική δράση ενισχύοντας έτσι την ανάπτυξη των ιδιαίτερα ωφέλιμων προβιοτικών καλλιιεργειών και όταν εισαχθούν σε τρόφιμα όπως σε αρτοσκευάσματα, γαλακτοκομικά προϊόντα, γλυκά, καθώς και ζωοτροφές αλλά και συμπληρώματα διατροφής βοηθούν στην καλή λειτουργία του εντερικού μικροβιώματος.
- Σχηματίζουν σκόνες υψηλής ρευστότητας, έχουν καλή αντοχή στη συμπίεση και την ελατότητα, έχουν σημαντική αντοχή στη θερμότητα, και παραμένουν πρακτικά άθικτοι σε όξινα pH.
- Παρεμποδίζουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δυνατότητα χρήσης τους σε ορισμένα αντιβιοτικά.
- Μπορούν να αποτελέσουν υποστρώματα ζύμωσης για την παραγωγή αιθανόλης και μάλιστα προτιμώνται σε σχέση με τη γλυκόζη εξαιτίας του μειωμένου κινδύνου μόλυνσης, την ταχύτερη κατανάλωση του υποστρώματος άρα και το συνολικό μικρότερο χρόνο ζύμωσης, καθώς και εξαιτίας της αποφυγής της παρεμπόδισης που είναι πιθανό να συμβεί από την υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης.

1.4 Ενζυμική υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Τα τελευταία χρόνια η χρήση ενζύμων διευρύνεται συνεχώς καθώς κάνουν πιο αποτελεσματικές τις χημικές αντιδράσεις ενώ ταυτόχρονα δεν αποτελούν κίνδυνο για το περιβάλλον. Τα υδρολυτικά ένζυμα αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό μέρος της παγκόσμιας αγοράς ενζύμων και ως εκ τούτου, έχουν μεγάλη σημασία από βιομηχανική και βιοτεχνολογική σκοπιά. Τέτοια ένζυμα όπως είναι οι κυτταρινάσες και οι ξυλανάσες αποικοδομούν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη σε γλυκόζη και ξυλόζη αντίστοιχα, μονομερή τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή διάφορων βιομηχανικών προϊόντων. Όσον αφορά την υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, πρόκειται για μία ιδιαίτερα περίπλοκη διαδικασία κατά την οποία απαιτείται η αλληλεπίδραση μίας ποικιλίας ενζύμων (Thara et al., 2020).

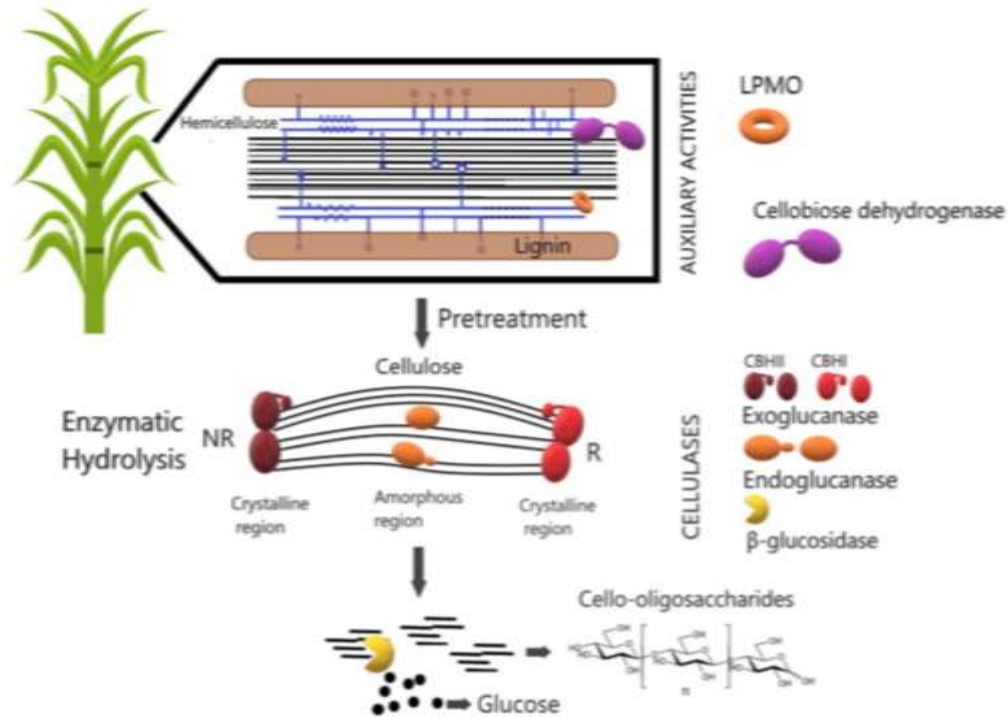


Εικόνα 1.4.1: Υδρολυτικά ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στη διάσπαση της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης (Thara et al., 2020)

1.4.1 Διάσπαση κυτταρίνης

Η υδρόλυση των β -(1→4) δεσμών μεταξύ των μορίων της γλυκόζης στην κυτταρίνη πραγματοποιείται μέσω συνεργιστικής δράσης διάφορων ενζύμων, με κυριότερα τις κυτταρινάσες. Τα συγκεκριμένα ένζυμα ανάλογα με τη δράση τους χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, τις ενδογλυκανάσες, τις εξωγλυκανάσες και τις β -γλυκοζιδάσες. Οι ενδο- β -1,4-γλυκανάσες διασπών τους εσωτερικούς δεσμούς που βρίσκονται στην άμορφη περιοχή των κυτταρινικών ινών απελευθερώνοντας έτσι ολιγομερή διαφόρων μηκών. Οι εξωγλυκανάσες (ή κελλοβιοϋδρολάσες) δρουν στην κρυσταλλική περιοχή της κυτταρίνης και απελευθερώνουν ολιγομερή όπως η κελλοβιόζη (cellobiose, δισακχαρίτης αποτελούμενος από δυο μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα μεταξύ τους με β -(1→4) γλυκοζιδικό δεσμό. Τέλος, οι β -γλυκοζιδάσες διασπών τα προϊόντα που δημιουργούν οι ένδο και εξωγλυκανάσες σε μόρια γλυκόζης (Ávila et al., 2021; Van Dyk & Pletschke, 2012).

Lignocellulosic Biomass

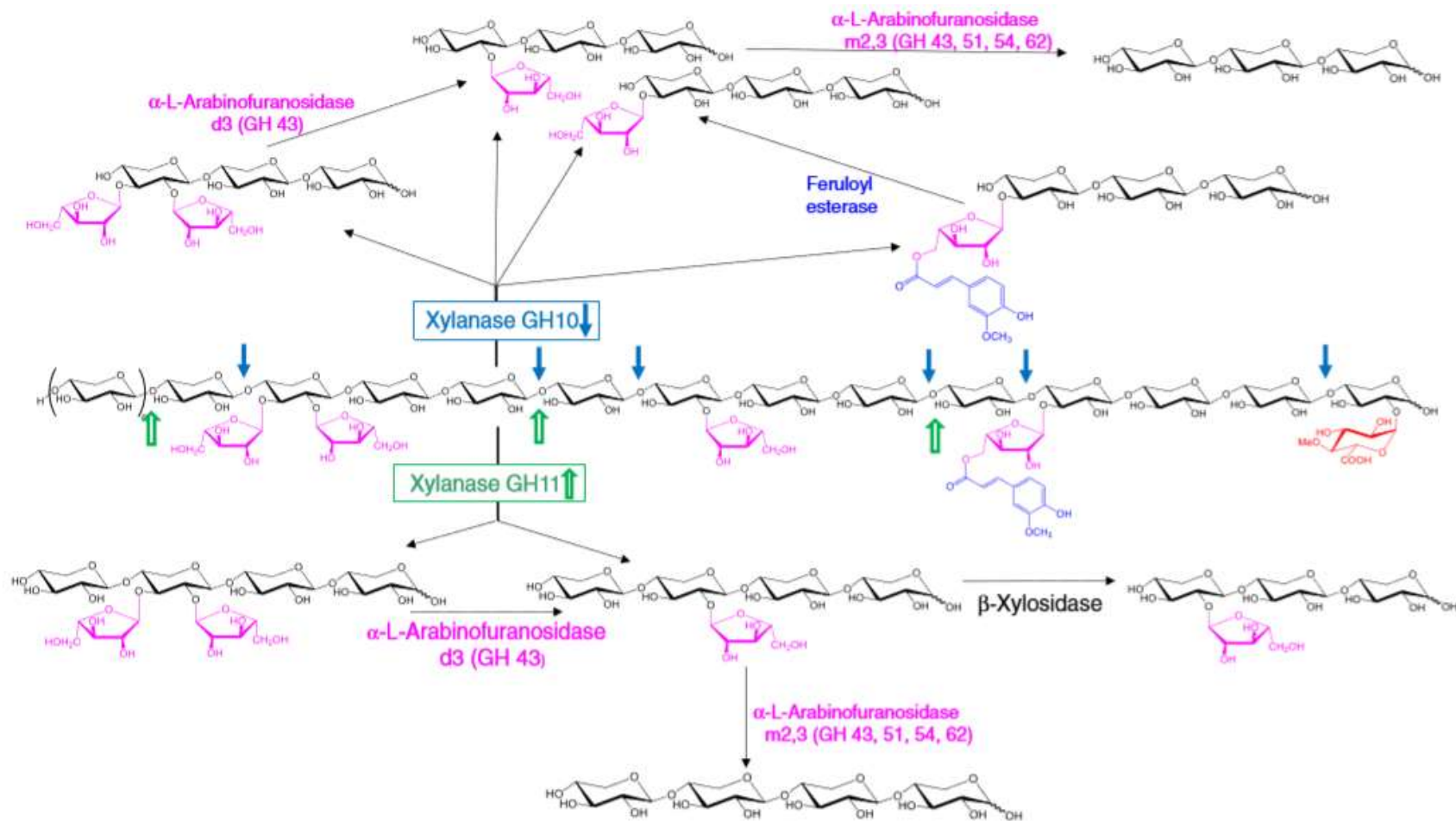


Εικόνα 1.4.1.1: Σχηματισμός γλυκόζης και κελλο-ολιγοσακχαριτών μέσω της υδρόλυσης της κυτταρίνης που περιέχεται στη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα από κυτταρινάσες (Ávila et al., 2021)

1.4.2 Διάσπαση ημικυτταρίνης

Για την ενζυμική υδρόλυση της ημικυτταρίνης απαιτείται η συνεργιστική δράση πολλών ξυλανολυτικών ενζύμων εξαιτίας της μεγάλης ετερογένειας που εμφανίζει. Μάλιστα, τα εν λόγω ένζυμα διακρίνονται σε αυτά που διασπούν το σκελετό του πολυμερούς και αυτά που απομακρύνουν τους πλευρικούς υποκαταστάτες. Τα ένζυμα που δρουν για τη διάσπαση της ημικυτταρίνης είναι τα ακόλουθα (Van Dyk & Pletschke, 2012):

- ξυλανάσες
- β-ξυλοζιδάσες
- α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες
- εστεράσες του οξικού οξέος
- εστεράσες του φερουλικού οξέος
- α-L-γλυκουρονιδάσες



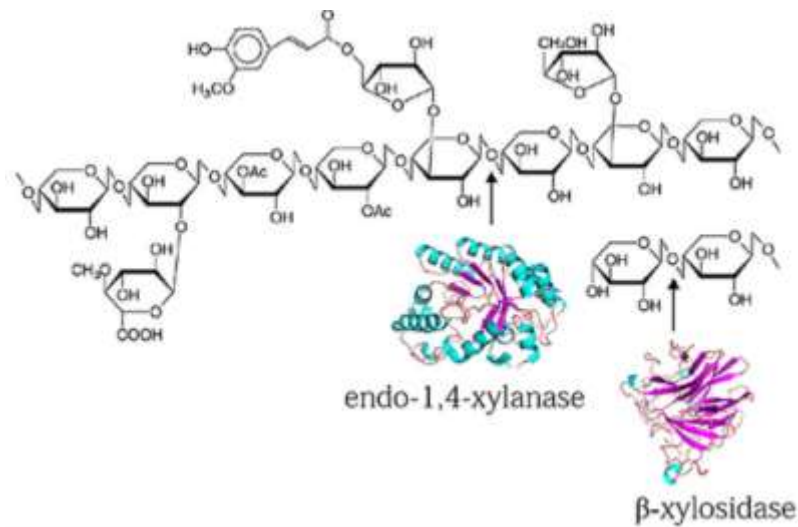
Εικόνα 1.4.2.1: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης ξυλανάσων των οικογενειών GH10 και GH11, α -L-αραβινοφουρανοζιδασών, εστερασών του φερουλικού οξέος και β -ξυλοζιδασών κατά την προσπάθεια διάσπασης μίας υποκατεστημένης ξυλάνης (Biely et al., 2016)

1.4.2.1 Ξυλανάσες

Οι ξυλανάσες είναι υδρολυτικά ένζυμα τα οποία καταλύουν την αποικοδόμηση του σκελετού των ξυλανών διασπώντας τους β-(1→4) γλυκοζιδικούς δεσμούς μεταξύ των μονάδων ξυλόζης (Yang et al., 2014). Τα προϊόντα αυτής της διάσπασης περιλαμβάνουν ξυλόζη ως μονομερές αλλά και ολιγοσακχαρίτες όπως ξυλοβιόζη. Οι ξυλανάσες στην πλειονότητά τους ταξινομούνται κυρίως σε τρεις οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών και αυτές είναι η GH10, η GH11 και η GH30 ενώ μικρός αριθμός ξυλανασών ανήκει στις οικογένειες 5, 8, 18, 51, 98 και 141 (η ταξινόμηση γίνεται από τη βάση δεδομένων CAZY, <http://www.cazy.org/>). Αξίζει να σημειωθεί πως οι ξυλανάσες έχουν προσελκύσει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς πρόκειται για βιομόρια φιλικά προς το περιβάλλον τα οποία βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορες βιομηχανικές διαδικασίες που περιλαμβάνουν την ενίσχυση των θρεπτικών ιδιοτήτων των ζωοτροφών, τα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα, τη λεύκανση του χαρτοπολτού και την παραγωγή βιοκαυσίμων (Rohman et al., 2019).

1.4.2.2 β-ξυλοζιδάσες

Οι β-ξυλοζιδάσες διευκολύνουν τη διάσπαση της ξυλάνης διασπώντας τους ξυλοολιγοσακχαρίτες ώστε να απελευθερωθεί ξυλόζη από το μη αναγωγικό τους άκρο, ενώ ταυτόχρονα αποτρέπουν την παρεμπόδιση της δράσης των ξυλανασών από τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης (Zhuo et al., 2018). Οι β-ξυλοζιδάσες οι οποίες καταλύουν φυσικά υποστρώματα κατατάσσονται σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZY στις οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών 3, 5, 30, 39, 43, 51, 52 και 120. Παρατηρούνται β-ξυλοζιδάσες και σε άλλες οικογένειες όπως στη GH1 και στη GH54 διότι υδρολύουν τεχνητά υποστρώματα όπως το υπόστρωμα νιτροφαίνυλ-β-D-ξυλοπυρνόζη (nitrophenyl-β-D-xylopyranoside) χωρίς όμως να είναι βέβαιο πως απελευθερώνουν ξυλόζη από τα φυσικά υποστρώματα (Rohman et al., 2019).



Εικόνα 1.4.2.2.1: Χημική και τρισδιάστατη δομή ενδοξυλανάσης και β-ξυλοζιδάσης (Zhuo et al., 2018)

1.4.2.3 Βοηθητικά ένζυμα

Τα βοηθητικά ένζυμα όπως είναι οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες, οι α-L-γλυκουρονιδάσες, οι εστεράσες του οξικού οξέος και οι εστεράσες του φερουλικού οξέος απομακρύνουν τους πλευρικούς υποκαταστάτες συνδράμοντας έτσι στην ολοκληρωτική υδρόλυση της ημικυτταρίνης (Biely et al., 2016).

1.4.2.3.1 Αραβινοφουρανοζιδάσες

Οι αραβινοφουρανοζιδάσες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα (m-2,3,5 α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες) αποτελείται από ένζυμα που δρουν σε ξυλόζες της κύριας αλυσίδας που διαθέτουν μονή υποκατάσταση αραβινόζης στη θέση 2, 3 ή 5. Τα συγκεκριμένα ένζυμα ανήκουν στις οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών 2, 3, 43, 51, 54 και 62. Η δεύτερη ομάδα (d-3 α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες) περιλαμβάνει ένζυμα τα οποία δρουν σε δι-υποκατεστημένες ξυλόζες απελευθερώνοντας τον α-(1→3) δεσμό αραβινόζης, ενώ αφήνουν τον α-(1→2) δεσμό στην κύρια αλυσίδα της ξυλάνης. Τέτοια ένζυμα απαντώνται στις οικογένειες GH43 και GH51 (Biely et al., 2016; Malgas et al., 2019; Thakur et al., 2020; Van Dyk & Pletschke, 2012). Η τρίτη ομάδα υδρολύει την αραβινόζη από μονοϋποκατεστημένες ξυλόζες αλλά και ξυλόζες οι οποίες διαθέτουν διπλές υποκαταστάσεις αραβινόζης μόνο σε ακραία θέση (Mechelke et al., 2017).

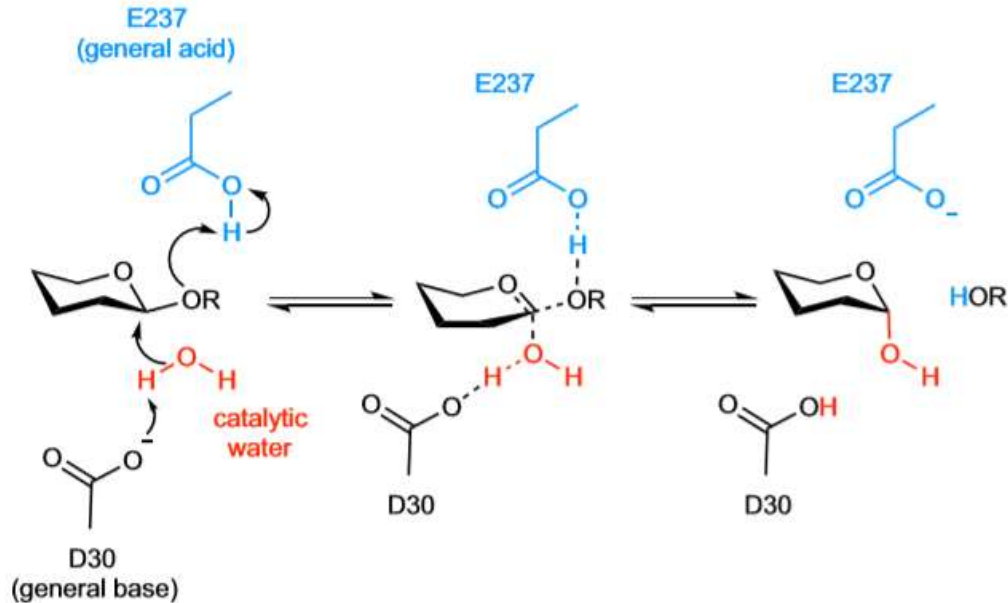
1.4.2.3.1.1 Γλυκοζιδικές υδρολάσες της οικογένειας 43 (GH43)

Η οικογένεια ενζύμων GH43 αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών οι οποίες έχουν δράση πάνω στην ημικυτταρίνη. Η οικογένεια χωρίζεται σε 37 υπο-οικογένειες με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων τους, τις βιοχημικές ιδιότητες και τα δομικά τους χαρακτηριστικά, παρουσιάζοντας όμως διαφορές τόσο ως προς τη δομή όσο και ως προς τη λειτουργία (Thakur et al., 2020). Σημειώνεται πως τα μέλη της ίδιας υπο-οικογένειας μπορεί να εμφανίζουν διαφορετικούς τρόπους δράσης, αναγνώρισης του υποστρώματος καθώς και διαφορετική τεταρτοταγή δομή. Αξίζει να αναφερθεί μάλιστα πως τα περισσότερα ένζυμα της οικογένειας GH43 που έχουν χαρακτηριστεί έως σήμερα έχουν διπλή λειτουργία β-ξυλοζιδάσης και α-L-αραβινοφουρανοζιδάσης. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί πως η δράση πολλών ενζύμων της οικογένειας GH43 εξαρτάται από δισθενή ιόντα και κυρίως από τα ιόντα ασβεστίου (Ca^{+2}), χωρίς να αποτελεί κανόνα για όλα τα ένζυμα αυτής της οικογένειας (Morais et al., 2021). Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZY τα ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοζιδικών υδρολασών 43 διαθέτουν τουλάχιστον μία από τις ακόλουθες δράσεις:

- β-1,4-ξυλοζιδάση
- β-1,3-ξυλοζιδάση
- β-1,4-ενδοξυλανάση
- α-L-αραβινοφουρανοζιδάση
- αραβινανάση
- 1,3-β-γαλακτοζιδάση της γαλακτάνης

Ο μηχανισμός δράσης της πλειονότητας των ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια GH43 πραγματοποιείται διαμέσου πλήρους αναστροφής της διαμόρφωσης του ανωμερικού

άνθρακα (Εικόνα 1.4.2.1.1) ύστερα από την υδρόλυση των ξυλοολιγοσακχαριτών προς ξυλόζη, αποτρέποντας έτσι τη σύνθεση μακρών ολιγοσακχαριτών μέσω της τρανσγλυκοζυλίωσης (Ontañon et al., 2018). Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός οξέος και μίας βάσης. Πιο συγκεκριμένα, το οξύ πρωτονιώνει το γλυκοζιδικό άτομο οξυγόνου ενώ η βάση αποπρωτονιώνει το πυρηνόφιλο μόριο νερού (Morais et al., 2021; Rohman et al., 2019).



Εικόνα 1.4.2.1.1: Μηχανισμός δράσης της πλειονότητας των ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια GH43 μέσω αναστροφής της διαμόρφωσης του ανωμερικού άνθρακα (Morais et al., 2021)

1.4.2.3.2 Εστεράσες του φερουλικού οξέος

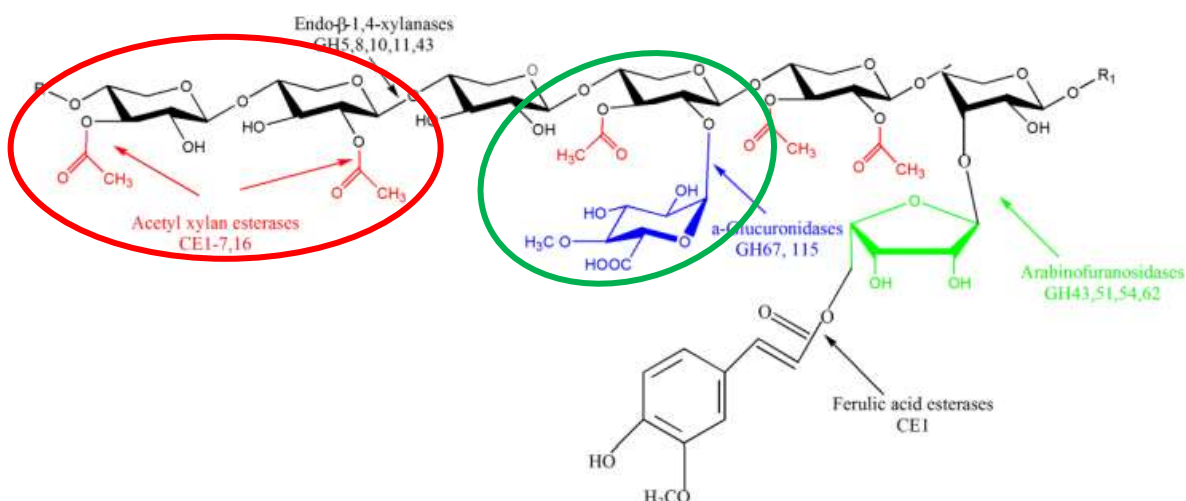
Οι εστεράσες του φερουλικού οξέος ταξινομούνται στην οικογένεια εστερασών CE1 σύμφωνα με την αλληλουχία των αμινοξέων τους και τον τρόπο δράσης τους, όπως προκύπτει από τη βάση δεδομένων CAZy. Οι εστεράσες του φερουλικού οξέος χρησιμοποιούνται για να απομακρύνουν φερουλικό οξύ που βρίσκεται υποκατεστημένο στο σκελετό της ξυλάνης και συνδέει ομοιοπολικά τα σάκχαρα της ημικυτταρίνης με τη λιγνίνη. Τα ένζυμα αυτά συνήθως δρουν σε ολιγοσακχαρίτες διευκολύνοντας τη δράση ξυλανάσων και άλλων ενζύμων για την πλήρη διάσπαση της ξυλάνης (Nakamura et al., 2017; Oliveira et al., 2019; Terrett & Dupree, 2019).

1.4.2.3.3 Εστεράσες του οξικού οξέος

Τα συγκεκριμένα ένζυμα ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των υδατανθρακικών εστερασών (carbohydrate esterases, CEs) και ταξινομούνται κατά κύριο λόγο σε οκτώ οικογένειες σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZy (CE2, CE3, CE4, CE5, CE6, CE7 και CE16) (Nakamura et al., 2017). Απελευθερώνουν οξικό οξύ από τις θέσεις 2 και 3 σε μόνο και δι-ακετυλιωμένα μόρια ξυλόζης, μετατρέποντας έτσι την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης προσβάσιμη σε ξυλανάσες και β-ξυλοζιδάσες ώστε να επιτευχθεί η πλήρης διάσπαση στα μονομερή της. Μάλιστα η παρουσία του οξικού οξέος στην ημικυτταρίνη αυξάνει τη

διαλυτότητα των πολυσακχαριτών που την αποτελούν διότι εμποδίζει τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδατανθρακικών αλυσιδών. Εξαιτίας αυτού, η απομάκρυνση τους κρίνεται καθοριστικής σημασίας για τη διευκόλυνση της δράσης των ημικυτταρινασών (Biely et al., 2014; Koutaniemi et al., 2013).

Η θέση των συγκεκριμένων υποκαταστατών ποικίλει ανάλογα με το είδος του φυτού καθώς σε ορισμένες ξυλόζες μπορεί να υπάρχει μονή υποκατάσταση οξικού οξέος είτε στη θέση 2 είτε στη θέση 3 αυτής, ενώ κάποια άλλη μπορεί να φέρει διπλές υποκαταστάσεις στις αντίστοιχες θέσεις (Biely et al., 2014; Koutaniemi et al., 2013). Ωστόσο, τα ένζυμα της οικογένειας CE16, τα οποία παρουσιάζουν μία προτίμηση στους ακετυλιωμένους ολιγοσακχαρίτες περισσότερο από τα πολυμερικά υποστρώματα, μπορούν να δράσουν και στη θέση 4 του μη αναγωγικού άκρου των ξυλοολιγοσακχαριτών, θέση όπου μεταναστεύει εύκολα η ακετυλομάδα που βρίσκεται στη θέση 3 (Biely et al., 2014).



Εικόνα 1.4.2.3.3.1: Παρουσίαση της δράσης διάφορων ενζύμων για τη διάσπαση υποκατεστημένης ξυλάνης, όπως εστεράση του φερουλικού οξέος, αραβινοφουρανοζιδάση, α-γλυκουρονιδάση, ξυλανάση. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στον μηχανισμό δράσης της εστεράσης του οξικού οξέος ο οποίος σημειώνεται με κόκκινο κύκλο όταν αφορά τις απακετυλιώσεις στις θέσεις 2 και 3 της ξυλόζης και με πράσινο όταν πρόκειται για ακετυλιωμένη ξυλόζη στη θέση 3, η οποία στη θέση 2 φέρει ως υποκαταστάτη γλυκουρονικό οξύ (Wu et al., 2017).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η απομάκρυνση οξικού οξέος από τη θέση 3 ξυλόζης η οποία φέρει υποκατάσταση μεθυλιωμένου γλυκουρονικού οξέος (MeGlcA) στη θέση 2 μέσω των εστερασών του οξικού οξέος που ανήκουν στην οικογένεια CE16 (Εικόνα 1.4.2.3.3.1). Από τις έρευνες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα παρατηρείται πως μόνο εστεράσες του οξικού οξέος της οικογένειας CE16 μπορούν να διασπάσουν το συγκεκριμένο εστερικό δεσμό γεγονός το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει σε πλήρη απακετυλίωση της ξυλάνης αν αυτά τα ένζυμα δράσουν συνεργιστικά με άλλες εστεράσες καθώς και ολοκληρωτική μετατροπή της γλυκουρονοξυλάνης στα μονομερή της αφού πλέον δεν θα παρεμποδίζεται η δράση των γλυκουρονιδασών και των ξυλανασών (Mai-Gisondi et al., 2017; Neumüller et al., 2015; Razeq et al., 2018).

1.4.3 Διάσπαση λιγνίνης

Όσον αφορά τη λιγνίνη, η ιδιαίτερα σύνθετη και ανομοιογενής δομή της, εξαιτίας των πολυάριθμων δεσμών άνθρακα-άνθρακα και άνθρακα-οξυγόνου που περιέχει, κάνει εξαιρετικά δύσκολη την αποικοδόμησή της. Παρόλα αυτά είναι δυνατή η υδρόλυση της σε μικρά αρωματικά μόρια παρουσία διάφορων οξειδωτικών ενζύμων μυκητιακής προέλευσης, όπως λακκασών, υπεροξειδασών της λιγνίνης (LiP), υπεροξειδασών του μαγγανίου (MnP) και ευπροσάρμοστων υπεροξειδασών (versatile peroxidases, VP). Οι λακκάσες οξειδώνουν τις φαινολικές ενώσεις της λιγνίνης διαμέσου αναγωγής του οξυγόνου σε νερό. Οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης διασπούν τις μη φαινολικές μονάδες της λιγνίνης, ενώ αυτές του μαγγανίου οξειδώνουν τις φαινολικές και μη φαινολικές μονάδες. Οι VP φαίνεται πως συνδυάζουν τις δράσεις των προαναφερθέντων υπεροξειδασών (Bugg et al., 2011; C. Li et al., 2019; Zhang et al., 2020).

1.5 Συνεργιστική δράση ενζύμων

Η ενζυμική υδρόλυση αποτελεί την πλέον κατάλληλη τεχνολογία για την μετατροπή της βιομάζας στα μονομερή της σάκχαρα. Η βιολογική αποικοδόμηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας πληθώρα ενζύμων σε καθορισμένες αναλογίες εξαιτίας της πολυπλοκότητάς της όπως προαναφέρθηκε, τα οποία δρουν συνεργιστικά ως προς το υπόστρωμα με στόχο την πλήρη διάσπασή του. Για το σκοπό αυτό επιδιώκεται η χρήση όσο το δυνατόν μικρότερου αριθμού ενζύμων τα οποία παράλληλα θα προκαλούν τη μέγιστη υδρόλυση καθώς αυτό θα αποτελούσε και την πιο οικονομικά αποδοτική μέθοδο (Hu et al., 2013; Van Dyk & Pletschke, 2012; Vyas et al., 2018).

1.5.1 Βαθμός συνεργισισμού

Ως βαθμός συνεργισισμού (Degree of synergy, DS) ορίζεται η αναλογία της ποσότητας του προϊόντος που απελευθερώνεται από ένζυμα όταν αυτά χρησιμοποιούνται μαζί, προς το άθροισμα της ποσότητας αυτών των προϊόντων όταν τα ένζυμα χρησιμοποιούνται ξεχωριστά στο ίδιο υπόστρωμα και στις ίδιες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στο μείγμα. Ο βαθμός συνεργισισμού ποσοτικοποιεί τη δράση δύο ή περισσότερων ενζύμων σε ένα υπόστρωμα δίνοντας πληροφορίες τόσο σχετικά με τη δομή ενός υποστρώματος όσο και σχετικά με τον τρόπο δράσης ενός ενζύμου. Όταν ο βαθμός συνεργισισμού παίρνει την τιμή 1 ή χαμηλότερη από αυτή υποδεικνύεται πως δεν υπάρχει συνεργιστική δράση μεταξύ των ενζύμων ή ότι τα ένζυμα ανταγωνίζονται για να καταλάβουν τις ίδιες θέσεις στο υπόστρωμα, οδηγούμενα τελικά σε παρεμπόδιση. Στην περίπτωση όπου δεν βρεθεί συνεργισμός δε σημαίνει αυτομάτως πως κάποιο από τα ένζυμα δεν απαιτείται για την υδρόλυση του συγκεκριμένου υποστρώματος, αλλά ότι τα ένζυμα δεν χρειάζεται να συνεργαστούν καθώς μπορούν να δράσουν ανεξάρτητα (Hu et al., 2013; Van Dyk & Pletschke, 2012; Vyas et al., 2018).

Αξίζει να αναφερθεί πως παρατηρείται διαφορά στη συνεργιστική δράση μεταξύ δύο ενζύμων όταν αυτά χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα ή διαδοχικά κατά την υδρόλυση του υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να καθοριστούν ορισμένα χαρακτηριστικά

των ενζύμων που συμμετέχουν αλλά και να διαμορφωθεί μία πιο ολοκληρωμένη άποψη σχετικά με τη συνεργιστική δράση τους. Μάλιστα, η ταυτόχρονη δράση των ενζύμων που αποικοδομούν την κύρια αλυσίδα και αυτών που απομακρύνουν τους υποκαταστάτες στις αραβινοξυλάνες εμφανίζει τον υψηλότερο βαθμό υδρόλυσης ενώ γενικότερα στις ξυλάνες έχει βρεθεί πως η χρήση των ενζύμων που απομακρύνουν τους υποκαταστάτες πριν από αυτά που αποικοδομούν την κύρια αλυσίδα εμφανίζει τον υψηλότερο συνεργιστισμό (Van Dyk & Pletschke, 2012).

Όσον αφορά τα ημικυτταρινολυτικά ένζυμα, παρατηρούνται δύο τύποι συνεργισμών μεταξύ τους και αυτοί είναι οι εξής (Malgas et al., 2019; Van Dyk & Pletschke, 2012):

- Ομοσυνεργισμός, ο οποίος παρατηρείται μεταξύ των ενζύμων που διασπών την κύρια αλυσίδα των πολυσακχαριτών που αποτελούν την ημικυτταρίνη ή μεταξύ δύο ενζύμων που απομακρύνουν τους υποκαταστάτες
- Ετεροσυνεργισμός, μεταξύ ενζύμων που διασπών την κύρια αλυσίδα του πολυμερούς και ενζύμων που απομακρύνουν τους υποκαταστάτες Υπάρχει και η περίπτωση του αντισυνεργισμού, κατά τον οποίο ένα ένζυμο παρεμποδίζει τη δράση ενός άλλου ενζύμου. Κάτι τέτοιο μπορεί να συμβεί για παράδειγμα όταν ένα ένζυμο που διασπά την κύρια αλυσίδα χρειάζεται έναν υποκαταστάτη για να δράσει και ο υποκαταστάτης αυτός έχει απομακρυνθεί από κάποιο άλλο ένζυμο

Έτσι, για την πλήρη διάσπαση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, αυτού του ιδιαίτερα πολύπλοκου υποστρώματος, η συνεργιστική δράση μίας ποικιλίας ενζύμων καθίσταται απαραίτητη. Για να επιτευχθεί η αποικοδόμηση της κυτταρίνης θα πρέπει να δράσουν συνεργιστικά εξωγλυκανάσες, ενδογλυκανάσες και β-γλυκοζιδάσες (η δράση τους αναφέρεται στην παράγραφο 1.4.1). Πληθώρα ενζύμων όπως ξυλανάσες, β-ξυλοζιδάσες, εστεράσες του οξικού και του φερουλικού οξέος, α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες, β-μανανάσες και β-μανανοζιδάσες, α-γαλακτοζιδάσες και α-γλυκουρονιδάσες δρουν συνεργιστικά (ανάλογα και με τον τύπο του υποστρώματος) ώστε να επιτύχουν τη διάσπαση των πολυσακχαριτών που αποτελούν την ημικυτταρίνη. Μάλιστα, όταν πρόκειται για πολύπλοκα υποστρώματα όπως για παράδειγμα το προκατεργασμένο καλαμπόκι, μπορεί να πραγματοποιηθεί συνεργιστική δράση μεταξύ κυτταρινασών και ημικυτταρινασών όπως εξωγλυκανασών, ενδοξυλανασών, εστερασών του οξικού και του φερουλικού οξέος ώστε να επιτευχθεί πλήρης διάσπαση του υποστρώματος (Van Dyk & Pletschke, 2012; Vyas et al., 2018).

1.6 Σκοπός

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη της καταλυτικής δράσης δύο καινοτόμων ενζύμων ως προς την αποικοδόμηση της ξυλάνης, η οποία αποτελεί δομικό συστατικό της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας και συγκεκριμένα της ημικυτταρίνης. Τα ένζυμα που μελετήθηκαν ήταν μία αραβινοφουρανοζιδάση η οποία ανήκει στην οικογένεια γλυκοζιδικών υδρολασών (Glycoside Hydrolases, GH) 43 (*TtAbf43*) καθώς και μία εστεράση του οξικού οξέος η οποία ανήκει στην οικογένεια των υδατανθρακικών εστερασών (Carbohydrate Esterases, CE) 16 (*TtCE16*). Τα ένζυμα αυτά προέρχονται από τον μύκητα *Thermothelomyces thermophilus* και παράχθηκαν μέσω ετερόλογης έκφρασης στο ζυμομύκητα *Pichia pastoris* στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ.

Στο πρώτο μέρος αυτής της εργασίας πραγματοποιήθηκε πλήρης βιοχημικός χαρακτηρισμός των προαναφερθέντων ενζύμων κατά τον οποίο προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης των ενζύμων, η σταθερότητά τους, ο τρόπος δράσης τους, η επίδραση από οργανικούς διαλύτες και άλατα καθώς επίσης έγινε και μελέτη της κινητικών τους παραμέτρων. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η συνεργιστική δράση των εν λόγω ενζύμων με διάφορα υδρολυτικά ένζυμα (ξυλανάσες των οικογενειών GH10 και GH30) με στόχο τη διάσπαση πολυμερικών ημικυτταρινικών υποστρωμάτων και προκατεργασμένης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Χημικά Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και AppliChem (Γερμανία), και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), SCHOTT AG (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.) και ROTH (Η.Π.Α.).

2.1.2 Ρυθμιστικά Διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1.2.1.

Πίνακας 2.1.2.1: Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα	pH	Συστατικά	Συγκέντρωση (M)
HCl - γλυκίνης	2	HCl (πυκνό) γλυκίνη	200 mM 200 mM
οξικού οξέος- οξικού νατρίου	3-6	CH ₃ COONa CH ₃ COOH (Glacial acid)	200 mM 200 mM
κιτρικού – φωσφορικών	3-6	Na ₂ HPO ₄ Κιτρικό οξύ	200 mM 200 mM
φωσφορικών	6-7	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄	200 mM 200 mM
Tris/HCl	8-9	Tris Base HCl (πυκνό)	200 mM 200 mM

2.1.3 Ένζυμα

Τα εμπορικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα εξής:

- αραβινοφουρανοζιδάση E-AFASE, η οποία απομακρύνει μονές υποκαταστάσεις αραβινόζης από το σκελετό της ξυλάνης
- αραβινοφουρανοζιδάση E-AFAM2, η οποία εντοπίζει διπλές υποκαταστάσεις αραβινόζης από το σκελετό της ξυλάνης και απομακρύνει αυτήν που βρίσκεται στη θέση 3 της ξυλόζης

- Ξυλανάση της οικογένειας GH10, E-XYLATM, η οποία διασπά την ξυλάνη σε ολιγοσακχαρίτες

Όλα τα παραπάνω ένζυμα ανήκουν στην εταιρεία Megazyme.

Εκτός από τα εμπορικά ένζυμα, χρησιμοποιήθηκε και μία ξυλανάση η οποία ανήκει στην οικογένεια GH30 (*TtXyn30A*) η οποία προέρχεται από τον μύκητα *Thermothelomyces thermophilus* και έχει εκφραστεί ετερόλογα σε *Pichia pastoris* στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ.

2.1.4 Όργανα και συσκευές

- Μετρητής pH 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο
- Σύστημα παραγωγής απιονισμένου νερού
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Συσκευή ξήρανσης υπό κενό
- Φυγόκεντρος δοκιμαστικών σωλήνων Vortex-2-Genie
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης
- Ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) και αναλυτικός ζυγός ABS 120-4 (KERN & Sohn GmbH)
- Συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, Spectra Max 250 (Molecular Devices) SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG Labtech)
- Χρωματογράφος Υψηλής απόδοσης (HPLC) Shimadzu apparatus, Kyoto, Japan

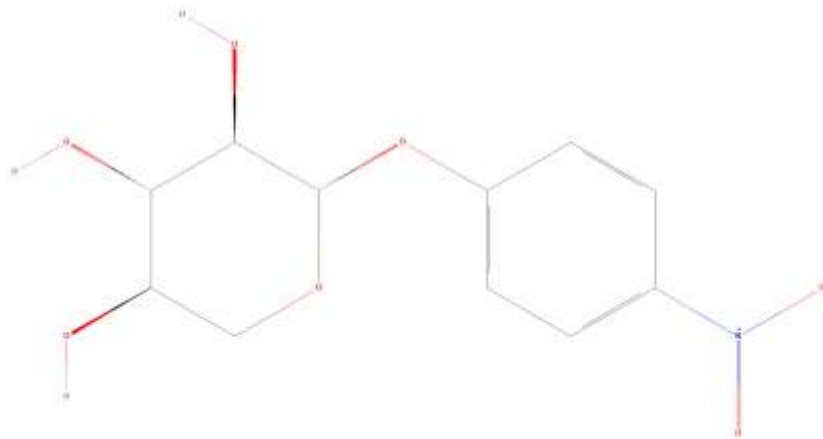
Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε τυπικός εργαστηριακός εξοπλισμός, όπως ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, σπαθίδες, δοκιμαστικοί σωλήνες, ογκομετρικοί κύλινδροι, πιπέτες διαφορετικών όγκων και tips πιπετών, δοχεία Eppendorf και δοχεία falcon.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της *TtAbf43*

2.2.1.1 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας

Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της *TtAbf43* χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το *o*-NPX (*o*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside). Κατά την αντίδραση του ενζύμου με το τεχνητό αυτό υπόστρωμα απελευθερώνεται η ομάδα της 2-νιτροφαινόλης η οποία είναι άχρωμη. Στη συνέχεια, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ανθρακικού νατρίου ώστε να δημιουργηθεί αλκαλικό περιβάλλον. Έτσι, η νιτροφαινόλη ιοντίζεται αρνητικά και δίνει κίτρινο χρωματισμό και μέγιστο απορρόφησης στα 410 nm.



Εικόνα 2.2.1.1.1: Χημικός τύπος του τεχνητού υποστρώματος *o*-NPX
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Nitrophenyl-beta-D-xylopyranoside>)

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol *o*-NP (ο-νιτροφαινόλη) ανά 1 λεπτό αντίδρασης υπό καθορισμένες συνθήκες (pH 5, T 60 °C).

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος (pH 5) συγκέντρωσης 50 mM προστίθεται ενζυμικό διάλυμα συγκέντρωσης $1.17 \frac{mg}{ml}$ και υπόστρωμα (*o*-NPX) 4 mM στον αντιδρών όγκο. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 500 μL, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 60°C και η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 410 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Η συνολική διάρκεια της αντίδρασης ήταν 10 λεπτά. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης με τη μόνη διαφορά ότι αντί για ένζυμο χρησιμοποιούνταν ίση ποσότητα από Tris-HCl 20 mM.

Η ποσοτικοποίηση της ενεργότητας του ενζύμου έγινε μέσω κατασκευής πρότυπων καμπυλών αναφοράς του *o*-NP χρησιμοποιώντας ρυθμιστικά διαλύματα διάφορων pH όπως αυτά που αναφέρονται στον πίνακα 2.1.2.1.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου, χρησιμοποιείται ο νόμος των Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

όπου

A: η απορρόφηση του δείγματος

ε: ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας εκφρασμένος σε $M^{-1} \cdot cm^{-1}$

b: η απόσταση της διαδρομής της ακτινοβολίας μέσα στο δείγμα εκφρασμένη σε cm

c: η συγκέντρωση της ουσίας εκφρασμένη σε M

μέσω του οποίου είναι δυνατός ο συσχετισμός των απορροφήσεων των αντιδράσεων με τη συγκέντρωση του ενζύμου.

2.2.1.2 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης

2.2.1.2.1 Εύρεση βέλτιστης τιμής pH δράσης

Για την εύρεση της τιμής pH στην οποία το ένζυμο εμφανίζει βέλτιστη δράση μελετήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου σε εύρος pH μεταξύ των τιμών 2-9. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα HCl-γλυκίνης για το pH 2, οξικού οξέος για τα pH 3, 4, 5 και 6, φωσφορικών για το pH 7, και Tris-HCl για τα pH 8 και 9 όπως φαίνεται και στον πίνακα 2.1.2.1. Τα ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 50 mM στην αντίδραση. Επιπλέον, οι αντιδράσεις είχαν συνολικό όγκο 500 μ L, εκτός των προαναφερθέντων ρυθμιστικών διαλυμάτων περιείχαν ένζυμο σε συγκέντρωση $1,17 \frac{mg}{ml}$ και υπόστρωμα σε συγκέντρωση 4 mM. Το τυφλό δείγμα (blank) είχε την ίδια σύσταση με αυτή της αντίδρασης, ωστόσο αντί για ένζυμο χρησιμοποιήθηκε ίση ποσότητα από Tris-HCl 20 mM. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα στους 50 °C και υπό ανάδευση 950 rpm εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort. Ύστερα από το πέρας δέκα λεπτών προστέθηκαν 100 μ L ανθρακικού νατρίου συγκέντρωσης 1 M ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο. Ο προσδιορισμός της ενεργότητας έγινε με το πολυφωτόμετρο microplate στα 410 nm λαμβάνοντας διπλές μετρήσεις για κάθε δείγμα.

2.2.1.2.2 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της *TiAbf43* μελετήθηκε υπολογίζοντας την ενεργότητα της σε θερμοκρασιακές τιμές 4-20-30-40-45-50-55-60-65-70-80-90°C. Κατά την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος στη βέλτιστη τιμή pH και σε συγκέντρωση 50 mM, ένζυμο συγκέντρωσης $1,17 \frac{mg}{ml}$ καθώς επίσης και υπόστρωμα με συγκέντρωση 4 mM. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν υπό ανάδευση 950 rpm εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στις μελετώμενες θερμοκρασίες για δέκα λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστέθηκαν 100 μ L ανθρακικού νατρίου συγκέντρωσης 1 M και η μέτρηση της ενεργότητας τόσο των τυφλών,

όσο και των διπλών δειγμάτων των 250 μL πραγματοποιήθηκε σε συσκευή φωτομέτρησης microplate.

2.2.1.3 Μελέτη σταθερότητας

Για την μελέτη της σταθερότητας της αραβινοφουρανοζιδάσης σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και pH, το ένζυμο επώαστηκε σε καθορισμένες συνθήκες για 24 h και ανά τακτά χρονικά διαστήματα ($t=0, 0.5 \text{ h}, 1 \text{ h}, 2 \text{ h}, 4 \text{ h}, 8 \text{ h} \ \& \ 24 \text{ h}$) πραγματοποιούνταν μέτρηση της ενεργότητάς του. Οι μετρήσεις ενεργότητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν όπως ορίζει η μέθοδος της παραγράφου 2.2.1.1.

2.2.1.3.1 Μελέτη Σταθερότητας σε διαφορετικές τιμές pH

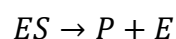
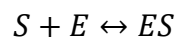
Για τη μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH πραγματοποιήθηκε επώαση του ενζύμου σε τιμές pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 και 9 χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό σύστημα που αποτελείται από τα ρυθμιστικά διαλύματα HCl – γλυκίνης (pH 2), οξικού οξέος (pH 3-6), φωσφορικών (pH 7) και Tris-HCl (pH 8 και 9) και καθένα από αυτά χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 50 mM. Για κάθε τιμή pH το ένζυμο αραιώθηκε σε σωληνάκι erppendorf με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος σε τελικό όγκο 800 μL ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση ενζύμου $1,17 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$. Η επώαση του ενζύμου στα διαφορετικά pH πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4°C. Στους χρόνους επώασης 0-0,5-1-2-4-8 και 24 h ελήφθη δείγμα από κάθε τιμή pH και μετρήθηκε άμεσα η ενζυμική ενεργότητα όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.2.1.1 χρησιμοποιώντας στην αντίδραση ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος στο βέλτιστο pH σε συγκέντρωση 50 mM.

2.2.1.3.2 Μελέτη Θερμοκρασιακής Σταθερότητας

Για τη μελέτη της θερμοκρασιακής σταθερότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε επώαση του ενζύμου σε θερμοκρασίες 4-30-40-50-60 °C. Για κάθε θερμοκρασία ο τελικός όγκος της αντίδρασης επώασης ήταν 600 μL , το ένζυμο αραιώθηκε σε σωληνάκι erppendorf με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος στο βέλτιστο pH και σε συγκέντρωση 50 mM και είχε συγκέντρωση κατά την επώαση $1,17 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$. Η επώαση πραγματοποιήθηκε εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort. Στους χρόνους επώασης 0-0,5-1-2-4-8-24 h ελήφθησαν διπλά δείγματα από κάθε θερμοκρασία και μετρήθηκε άμεσα η ενζυμική ενεργότητα όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.1 ωστόσο σε αυτή την περίπτωση το ένζυμο είχε συγκέντρωση $0,875 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$.

2.2.1.4 Προσδιορισμός Κινητικών Σταθερών Michaelis-Menten της *TtAbf43*

Το μοντέλο Michaelis – Menten όσο αφορά την κινητική απλής αναντίστρεπτης δράσης με ένα υπόστρωμα περιγράφεται από τις παρακάτω δύο αντιδράσεις (Λυμπεράτος, 2018; Κέκος, 2010):



Όπου

S: το υπόστρωμα του ενζύμου

E: το ένζυμο

P: το προϊόν ενζυμικής δράσης

Οι βασικότερες παραδοχές που γίνονται είναι οι εξής:

- i. Υπάρχει μόνο ένα υπόστρωμα
- ii. Το ένζυμο δεν διαθέτει κάποια άλλη μορφή δραστηριότητας
- iii. Η συμπληρωματικότητα της γεωμετρίας υποστρώματος - ενζύμου οδηγεί στο σχηματισμό ενδιάμεσου συμπλόκου ES με την πρόσφυση του υποστρώματος στην αντίστοιχη ενεργό περιοχή του E
- iv. Η διάσπαση του ενδιάμεσου συμπλόκου ES οδηγεί στο σχηματισμό του προϊόντος χωρίς δυνατότητα επανασηματισμού του ES, γεγονός που εξασφαλίζεται για πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις του προϊόντος από το υπόστρωμα. Έτσι, η ταχύτητα της ενζυμικής δράσης εξετάζεται κατά το αρχικό της στάδιο.
- v. Η συγκέντρωση του ενζύμου είναι πολύ μικρότερη από αυτή του υποστρώματος, οπότε και η συγκέντρωση του συμπλόκου ES θα είναι πολύ μικρότερη από του υποστρώματος. Δηλαδή, ο σχηματισμός του ενδιάμεσου δεν αλλοιώνει σημαντικά τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Άρα επιδιώκουμε χαμηλές συγκεντρώσεις ενζύμου.
- vi. Η συγκέντρωση του συμπλόκου δεν παρουσιάζει μεταβολή, δηλαδή η ταχύτητα σχηματισμού του ισούται με την ταχύτητα εξαφάνισής του

Η εξίσωση που περιγράφει την κινητική Michaelis – Menten είναι η εξής:

$$u = \frac{u_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Όπου

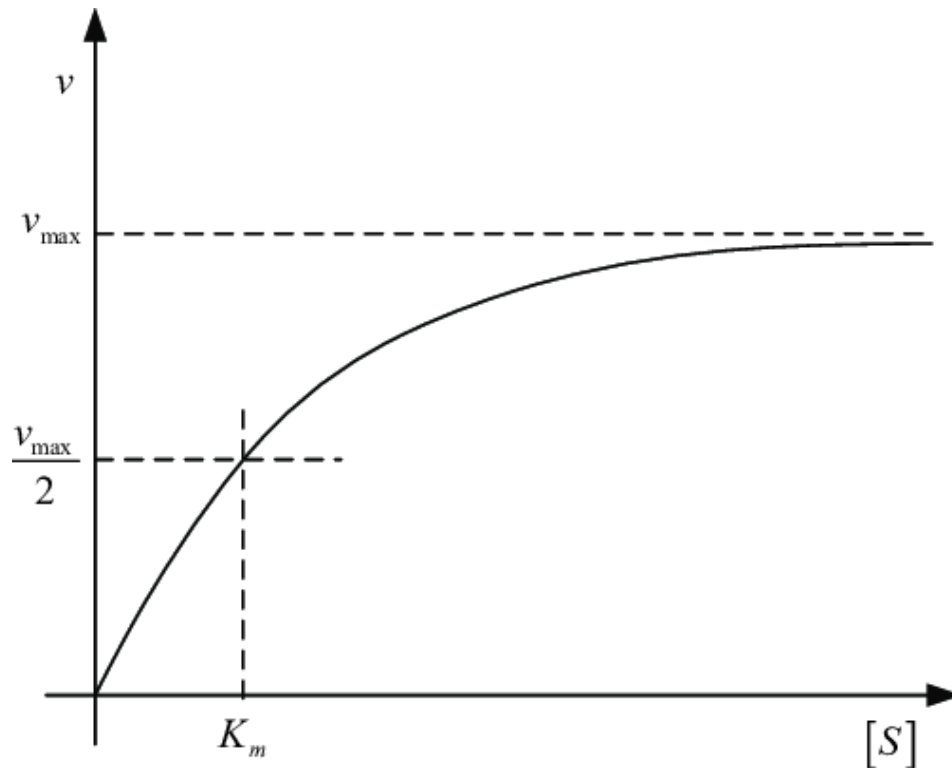
u: η ταχύτητα της αντίδρασης

u_{max} : η μέγιστη τιμή που μπορεί να πάρει η ταχύτητα u όταν όλο το ένζυμο έχει μετατραπεί σε ενδιάμεσο σύμπλοκο

K_M : η σταθερά Michaelis – Menten

[S]: η συγκέντρωση του υποστρώματος

Η γραφική παράσταση της εξίσωσης αυτής παρουσιάζει την ταχύτητα της αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος και φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 2.2.1.4.1: Διάγραμμα Michaelis – Menten (Proβ et al., 2009)

Η σταθερά Michaelis – Menten (K_M) αντιπροσωπεύει εκείνη την τιμή του υποστρώματος στην οποία η τιμή της ταχύτητας της αντίδρασης ισούται με το μισό της μέγιστης ταχύτητας και ορίζεται από την εξίσωση:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

όπου

k_1 : η σταθερά ταχύτητας σχηματισμού του συμπλόκου ES

k_{-1} : η σταθερά ταχύτητας διάσπασης του συμπλόκου ES προς E και S

k_2 : η σταθερά ταχύτητας διάσπασης του συμπλόκου ES προς E και P

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα, μικρή τιμή της σταθεράς K_M σημαίνει ότι για μικρότερη τιμή υποστρώματος η ταχύτητα της αντίδρασης έχει φτάσει το μισό της μέγιστης, γεγονός που υποδεικνύει μεγάλη συγγένεια μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος. Το αντίθετο ισχύει όταν η τιμή της K_M είναι μεγάλη.

Η μέγιστη ταχύτητα u_{max} ορίζεται από τη σχέση:

$$u_{max} = k_2 \cdot [E_T]$$

Όπου

k_2 : η σταθερά ταχύτητας διάσπασης του συμπλόκου ES προς E και P

[E_T]: η αρχική ολική συγκέντρωση του ενζύμου

Ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών του ενζύμου (K_M και u_{max}) έγινε για τρία διαφορετικά υποστρώματα. Αρχικά μελετήθηκε η κινητική στο συνθετικό υπόστρωμα ο-NPX και στη συνέχεια σε αραβινοξυλάνη σιταριού (wheat arabinoxylan, WA) και αραβινοξυλάνη σίκαλης (rye arabinoxylan, RA).

2.2.1.4.1 Μελέτη της κινητικής της *TtAbf43* σε τεχνητό υπόστρωμα ο-NPX

Όσον αφορά το τεχνητό υπόστρωμα ο-NPX, για τη μελέτη της κινητικής του ενζύμου *TtAbf43* ως προς αυτό, οι αντιδράσεις περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, στο βέλτιστο pH (pH 5) με συγκέντρωση στην αντίδραση 50 mM, ενζυμικό διάλυμα το οποίο δοκιμάστηκε σε διάφορες αραιώσεις ($0,875 \frac{mg}{ml}$, $0,35 \frac{mg}{ml}$, $0,07 \frac{mg}{ml}$ καθώς και $0,0175 \frac{mg}{ml}$) και υπόστρωμα στις συγκεντρώσεις 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, , 8, 10, 20, 40 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 500 μ L. Ο προσδιορισμός της μεταβολής της απορρόφησης λόγω σχηματισμού έγχρωμων προϊόντων έγινε με το πολυφωτόμετρο microplate στα 410 nm. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης με τη μόνη διαφορά ότι αντί για ένζυμο χρησιμοποιούνταν ίση ποσότητα από Tris-HCl 20 mM.

2.2.1.4.2 Μελέτη της κινητικής της *TtAbf43* σε υπόστρωμα WA

Για τη μελέτη της κινητικής του ενζύμου *GH43* σε υπόστρωμα WA, οι αντιδράσεις διέθεταν ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος στο βέλτιστο pH (pH 5) με συγκέντρωση στην αντίδραση 50 mM, αραιωμένο ενζυμικό διάλυμα σε συγκέντρωση $0,0175 \frac{mg}{ml}$ και υπόστρωμα στις συγκεντρώσεις 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 20 mM, σε τελικό όγκο αντίδρασης τα 250 μ L. Η αντίδραση είχε διάρκεια 30 λεπτών, έλαβε χώρα στους 60°C και υπό ανάδευση 950 rpm. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, ελήφθησαν δείγματα τόσο από τις ενζυμικές αντιδράσεις όσο και από τα αντίστοιχα τυφλά διαλύματα και έγινε μέτρηση αναγωγικών σακχάρων με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

2.2.1.4.2.1 Φωτομετρική μέθοδος του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)

Κατά τη μέθοδο αυτή σχηματίζεται σύμπλοκο ανάμεσα στο ημιακεταλικό υδροξύλιο του αναγωγικού σακχάρου και του δινιτροσαλικυλικού οξέος κατά τη θέρμανση σε θερμοκρασία πάνω από τους 70°C. Γι' αυτό, 60 μ L από το δείγμα αναμειγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος DNS και ακολουθεί βρασμός τους για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται στο δείγμα 480 μ L απιονισμένο νερό, γίνεται ανάμειξη του περιεχομένου των δοκιμαστικών σωλήνων με vortex και λαμβάνονται δείγματα των 250 μ L τα οποία φωτομετρούνται στα 540 nm, όπου και εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης το σύμπλοκο.

2.2.1.4.3 Μελέτη της κινητικής της *TtAbf43* σε υπόστρωμα RA

Για τη μελέτη της κινητικής του ενζύμου *TtAbf43* σε υπόστρωμα RA, οι αντιδράσεις περιελάμβαναν ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος στο βέλτιστο pH (pH 5) με συγκέντρωση στην αντίδραση 50 mM, ενζυμικό διάλυμα σε συγκέντρωση $0,0175 \frac{mg}{ml}$ και υπόστρωμα στις συγκεντρώσεις 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 40 mM, σε τελικό όγκο της αντίδρασης 250 μ L. Η αντίδραση είχε διάρκεια 30 λεπτών, έλαβε χώρα στους 60°C και υπό ανάδευση 950 rpm. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, ελήφθησαν δείγματα τόσο από τις αντιδράσεις όσο και από τα τυφλά και έγινε μέτρηση αναγωγικών σακχάρων με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.4.2.1.

Τέλος, για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των τιμών των κινητικών παραμέτρων K_M και u_{max} γίνεται χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 5. Με αυτό τον τρόπο οι τιμές ενεργότητας που ελήφθησαν από τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόζονται στο μοντέλο Michaelis-Menten με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων.

2.2.1.5 Επίδραση Οργανικών Διαλυτών στη δράση της *TtAbf43*

Μελετήθηκε η επίδραση που έχουν οι οργανικοί διαλύτες μεθανόλη, αιθανόλη, 1,4-διοξάνη και διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide, DMSO) στην ενεργότητα της *TtAbf43* όταν βρίσκονται σε συγκεντρώσεις στο αντιδρών μείγμα 10, 20 και 45% v/v.

Η μέτρηση της ενεργότητας παρουσία οργανικού διαλύτη πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις δοκιμής ενεργότητας, όπως περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.1.1 με τη συσκευή φωτομέτρησης micropate στα 410 nm. Σε τελικό όγκο αντίδρασης 500 μ L η συγκέντρωση του ενζύμου στην αντίδραση ήταν $0,875 \frac{mg}{ml}$ και του υποστρώματος 4 mM, σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 5 και συγκέντρωση 50 mM. Για κάθε διαφορετικό διαλύτη υπήρχε και το αντίστοιχο τυφλό διάλυμα, του οποίου η απορρόφηση λαμβάνεται ως μηδενική, και παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.1. Τέλος, σε κάθε σετ αντιδράσεων εκτός από τις αντιδράσεις στις οποίες έχει προστεθεί διαλύτης υπάρχει και μια αντίδραση όπως και τυφλό δείγμα, όπου δεν περιέχεται καθόλου διαλύτης και θεωρείται ως «αντίδραση ελέγχου», δηλαδή σε αυτή την αντίδραση το ένζυμο δρα χωρίς να δέχεται επίδραση από το διαλύτη.

2.2.1.6 Επίδραση διαλυμάτων αλάτων στη δράση της *TtAbf43*

Εκτός από την επίδραση των οργανικών διαλυτών στην δράση της *TtAbf43*, μελετήθηκε επιπρόσθετα και η επίδραση εννέα διαλυμάτων αλάτων $MgSO_4$, $ZnCl_2$, KCl , $CoCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $NiCl_2$, $FeCl_3$, $FeSO_4$, σε συγκεντρώσεις στον αντιδρών όγκο 0.5, 1 και 10 mM για την πλειονότητα αυτών. Τα διαλύματα $CoCl_2$, $FeCl_3$ και $FeSO_4$ σε συγκέντρωση 10 mM προκαλούσαν καθίζηση του ενζύμου, γι' αυτό το λόγο, τα δύο πρώτα μελετήθηκαν σε συγκέντρωση 5 mM ενώ το τελευταίο σε συγκέντρωση 2 mM στις οποίες δεν εμφανίστηκε καθίζηση.

Η μέτρηση της ενεργότητας παρουσία των διαλυμάτων αλάτων πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις δοκιμής ενεργότητας, όπως περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.1.1 με τη συσκευή φωτομέτρησης microplate στα 410 nm. Σε τελικό όγκο αντίδρασης 500 μL και σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 5 και συγκέντρωση 50 mM, η τελική συγκέντρωση του ενζύμου στην αντίδραση ήταν $0,875 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ και του υποστρώματος 4 mM. Όπως συνέβη και με τους οργανικούς διαλύτες, για κάθε διάλυμα άλατος υπήρχε και το αντίστοιχο τυφλό διάλυμα, του οποίου η απορρόφηση λαμβάνεται ως μηδενική, και παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.1. Τέλος, σε κάθε σει αντίδρασεων εκτός από τις αντιδράσεις στις οποίες έχει προστεθεί το διάλυμα του άλατος υπάρχει και μια αντίδραση όπως και τυφλό δείγμα, όπου δεν περιέχεται καθόλου άλας και θεωρείται ως «αντίδραση ελέγχου», δηλαδή σε αυτή την αντίδραση το ένζυμο δρα χωρίς να δέχεται επίδραση από το άλας.

2.2.1.7 Μελέτη πιθανών υποστρωμάτων

Για την μελέτη της εξειδικευμένης δράσης του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σε ένα εύρος υποστρωμάτων, τόσο ολιγοσακχαριτών όσο και πολυσακχαριτών, και προσδιορίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου σε κάθε μία από αυτές. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.2.1.7.1: Υποστρώματα για την μελέτη εξειδίκευσης της δράσης της *TiAbf43*

Υποστρώματα ολιγοσακχαριτών	Υποστρώματα πολυσακχαριτών
4-νιτροφαίνυλ β-D-γλυκοπυρανόζη (4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside)	καθαρή κυτταρίνη (avicel)
4-νιτροφαίνυλ α-D-γλυκοπυρανόζη (4 nitrophenyl α-D-glucopyranoside)	ακετυλιωμένη ξυλάνη (acetyl xylan)
ο-νιτροφαίνυλ β-D-γλυκοπυρανόζη (o-nitrophenyl β-D-glucopyranoside)	ξυλογλυκάνη (xyloglucan)
4-νιτροφαίνυλ β-D-λακτοπυρανόζη (4-nitrophenyl β-D-lactopyranoside)	λιχενάνη (lichenan)
4-νιτροφαίνυλ α-D-γαλακτοπυρανόζη (4-nitrophenyl α-D-galactopyranoside)	αραβινοξυλάνη σιταριού (wheat arabinoxylan)
4-νιτροφαίνυλ β-D-γαλακτοπυρανόζη (4 nitrophenyl β-D-galactopyranoside)	αραβινοξυλάνη σίκαλης (rye arabinoxylan)
ο-νιτροφαίνυλ α-D-γαλακτοπυρανόζη (o-nitrophenyl α-D-galactopyranoside)	γαλακτομαννάνη (carob galactomannan)
2-νιτροφαίνυλ β-D-γαλακτοπυρανόζη (2-nitrophenyl β-D-galactopyranoside)	γλυκομαννάνη (konjac glucomannan)
4-νιτροφαίνυλ α-D-μαλτοπεντόζη (p-nitrophenyl α-D-maltopentaoside)	ξυλάνη από ξύλο οξειάς (beechwood xylan)
ο-νιτροφαίνυλ-οξικό (p-nitrophenyl acetate)	μαννάνη (mannan)

4-νιτροφαίνυλ β-D-N,N'- διακετυλοχιτοβιόζη (p-nitrophenyl β-D-N,N'- diacetylchitobiose)	αδιάλυτη αραβινοξυλάνη σιταριού (insoluble wheat arabinoxylan)
4-νιτροφαίνυλ ραμνοπυρανόζη (p-nitrophenyl α-L-rhamnopyranoside)	
4-νιτροφαίνυλ β-D-κελλοβιόζη (p-nitrophenyl β-D-cellobioside)	
4-νιτροφαίνυλ α-L-αραβινοφουρανόζη (p-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside)	
ο-νιτροφαίνυλ β-D-ξυλοπυρανόζη (o-nitrophenyl β-D-xylopyranoside)	

Η μέτρηση ενεργότητας του ενζύμου έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.1, ωστόσο οι συγκεντρώσεις των εκάστοτε υποστρωμάτων διαφέρουν. Η συγκέντρωση των υποστρωμάτων στις αντιδράσεις φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.2.1.7.2: Συγκέντρωση υποστρωμάτων για την μελέτη εξειδίκευσης της δράσης της TtAbf43

Υποστρώματα ολιγοσακχαριτών	Συγκέντρωση (mM)
4-νιτροφαίνυλ β-D-γλυκοπυρανόζη (4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside)	0,5
4-νιτροφαίνυλ α-D-γλυκοπυρανόζη (4 nitrophenyl α-D-glucopyranoside)	0,4
ο-νιτροφαίνυλ β-D-γλυκοπυρανόζη (o-nitrophenyl β-D-glucopyranoside)	0,4
4-νιτροφαίνυλ β-D-γλυκοπυρανόζη (4-nitrophenyl β-D-lactopyranoside)	0,6
4-νιτροφαίνυλ α-D-γαλακτοπυρανόζη (4-nitrophenyl α-D-galactopyranoside)	0,6
4-νιτροφαίνυλ β-D-γαλακτοπυρανόζη (4 nitrophenyl β-D-galactopyranoside)	0,6
ο-νιτροφαίνυλ α-D-γαλακτοπυρανόζη (o-nitrophenyl α-D-galactopyranoside)	0,6
2-νιτροφαίνυλ β-D-γαλακτοπυρανόζη (2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)	0,5
4-νιτροφαίνυλ α-D-μαλτοπεντόζη (p-nitrophenyl α-D-maltopentai-side)	0,5
4-νιτροφαίνυλ-οξικό (p-nitrophenyl acetate)	0,5
p-nitrophenyl β-D-N,N'-diacetylchitobiose	0,6
4-νιτροφαίνυλ α-L- ραμνοπυρανόζη (p-nitrophenyl α-L-rhamnopyranoside)	0,7
4-νιτροφαίνυλ β-D-κελλοβιόζη (p-nitrophenyl β-D-cellobioside)	0,8

4-νιτροφαίνυλ α-L-αραβινοφουρανόζη (p-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside)	1,4
ο-νιτροφαίνυλ β-D-ξυλοπυρανόζη (o-nitrophenyl β-D-xylopyranoside)	4

2.2.1.8 Τρόπος δράσης (mode of action) της *TtAbf43*

Για να προσδιοριστεί ο τρόπος με τον οποίο δρα το συγκεκριμένο ένζυμο πραγματοποιήθηκε σύγκριση της δράσης του με τη δράση δύο εμπορικών αραβινοφουρανοζιδασών, την E-AFASE και την E-AFAM2. Η πρώτη αραβινοφουρανοζιδάση απελευθερώνει μονές υποκαταστάσεις αραβινόζης από τη θέση O-2 ή O-3 στο σκελετό των ξυλανών ενώ η δεύτερη απελευθερώνει την O-3 υποκατάσταση από διπλά υποκατεστημένες ξυλόζες. Η δράση των ενζύμων αυτών εξετάστηκε ως προς δύο υποστρώματα, την WA και τη RA. Οι αντιδράσεις που έλαβαν χώρα περιλάμβαναν:

- τη δοκιμή δράσης καθενός από τα ένζυμα *TtAbf43*, E-AFASE και E-AFAM2 ξεχωριστά στα υποστρώματα για 16 ώρες.
- τη χρήση πρώτα της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43*, η οποία έδρασε για 16 ώρες, ακολούθησαν 5 λεπτά βρασμού ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο και στη συνέχεια προσθήκη της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης E-AFASE.
- τη χρήση πρώτα της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης E-AFASE, η οποία έδρασε για 16 ώρες, ακολούθησαν 5 λεπτά βρασμού ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο και στη συνέχεια προσθήκη της *TtAbf43*.
- τη χρήση πρώτα της *TtAbf43*, η οποία έδρασε για 16 ώρες, ακολούθησαν 5 λεπτά βρασμού ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο και στη συνέχεια προσθήκη της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης E-AFAM2.
- τη χρήση πρώτα της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης E-AFAM2, η οποία έδρασε για 16 ώρες, ακολούθησαν 5 λεπτά βρασμού ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο και στη συνέχεια προσθήκη της *TtAbf43*.

Όλες οι παραπάνω αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 500 μL και πραγματοποιήθηκαν σε Thermomixer Comfort στους 40°C, υπό ανάδευση 950 rpm. Στις αντιδράσεις αυτές, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος με pH 5 σε συγκέντρωση 50 mM στην αντίδραση, τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονταν σε συγκέντρωση 0,01 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ και το εκάστοτε υπόστρωμα σε συγκέντρωση 6 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$.

Μετά το πέρας των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε μέτρηση αναγωγικών σακχάρων (αραβινόζης) για κάθε δείγμα με τη μέθοδο του DNS (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.4.2.1) καθώς και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) για μεγαλύτερη ακρίβεια. Οι αναλύσεις στην HPLC πραγματοποιήθηκαν με χρήση διαλύτη 0,3 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ H₂SO₄ σε υπερκάθαρο νερό, με ροή 1 $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$ ισοκρατικά για 30 λεπτά σε στήλη Aminex HPX-87H και ανιχνευτή RID. Επιπλέον,

σημειώνεται πως σε κάθε άλλη περίπτωση που έγινε ποσοτικοποίηση με χρήση της HPLC χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος.

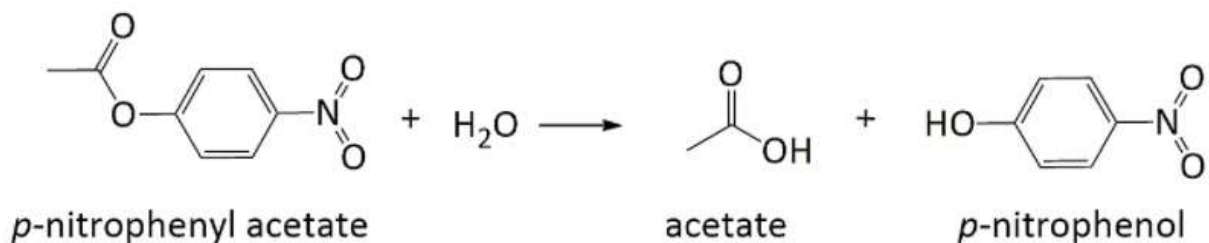
2.2.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός εστεράσης του οξικού οξέος *TiCE16*

2.2.2.1 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας

Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της εστεράσης *TiCE16* χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το *p*-NPA (4-nitrophenyl acetate). Κατά την υδρόλυση του τεχνητού αυτού υποστρώματος απελευθερώνεται η ομάδα της 4-νιτροφαινόλης. Αυτό μπορεί να συμβεί σε ουδέτερα ή ελαφρώς βασικά pH και η απορρόφησή της μπορεί να μετρηθεί στα 410 nm.



Εικόνα 2.2.2.1.1: Χημικός τύπος του τεχνητού υποστρώματος *p*-NPA (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Nitrophenyl-acetate>)



Εικόνα 2.2.2.1.2: Υδρόλυση τεχνητού υποστρώματος *p*-NPA (Huang et al., 2016)

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol *p*-NP, ανά 1 λεπτό αντίδρασης υπό καθορισμένες συνθήκες (pH 6, 45 °C).

Η μέτρηση ενεργότητας πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7) συγκέντρωσης 50 mM με ενζυμικό διάλυμα σε τελική συγκέντρωση $0,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ και υπόστρωμα συγκέντρωσης $0,045 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ στον αντιδρών όγκο. Τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν τα 600 μL , η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 45 °C και η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 410 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate. Η συνολική διάρκεια της αντίδρασης ήταν 10 λεπτά. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης με τη μόνη διαφορά ότι αντί για ένζυμο χρησιμοποιούνταν ίση ποσότητα από Tris-HCl 20 mM.

Η ποσοτικοποίηση της ενεργότητας του ενζύμου έγινε μέσω κατασκευής πρότυπων καμπυλών αναφοράς του p-NP χρησιμοποιώντας ρυθμιστικά διαλύματα διάφορων pH όπως αυτά που αναφέρονται στον πίνακα 2.1.2.1.

2.2.2.2 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης

2.2.2.2.1 Εύρεση βέλτιστης τιμής pH δράσης

Για την εύρεση της τιμής pH στην οποία το ένζυμο εμφανίζει βέλτιστη δράση μελετήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου σε εύρος pH μεταξύ των τιμών 4-9. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικού – φωσφορικού για τα pH 4-6.5, φωσφορικών για το pH 7 και 7.5 και Tris-HCl για τα pH 8 και 9. Τα προαναφερθέντα ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση σε συγκέντρωση 50 mM. Επιπλέον, οι αντιδράσεις είχαν συνολικό όγκο 600 μL και περιείχαν ένζυμο σε συγκέντρωση $0,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ και υπόστρωμα σε συγκέντρωση 0,5 mM. Το τυφλό δείγμα (blank) είχε την ίδια σύσταση με αυτή της αντίδρασης, ωστόσο αντί για ένζυμο χρησιμοποιήθηκε ίση ποσότητα από Tris-HCl 20 mM. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα στους 45 °C, είχαν διάρκεια 10 λεπτών και ήταν υπό ανάδευση 950 rpm εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort. Τέλος, ελήφθησαν διπλά δείγματα των 250 μL τόσο για τα τυφλά όσο και για τις αντιδράσεις και ο προσδιορισμός της ενεργότητας έγινε με το πολυφωτόμετρο microplate στα 410 nm.

2.2.2.2.2 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της εστεράσης του οξικού οξέος TtCE16 μελετήθηκε υπολογίζοντας την ενεργότητά της για θερμοκρασιακές τιμές 4-20-30-40-45-50-55-60-65-70°C. Κατά την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 7 και συγκέντρωση 50 mM, ένζυμο συγκέντρωσης $0,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ καθώς επίσης και υπόστρωμα με συγκέντρωση 0,25 mM. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν υπό ανάδευση 950 rpm εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στις μελετώμενες θερμοκρασίες για δέκα λεπτά. Η μέτρηση της ενεργότητας των διπλών δειγμάτων των 250 μL που ελήφθησαν πραγματοποιήθηκε σε συσκευή φωτομέτρησης microplate στα 410 nm.

2.2.2.3 Μελέτη σταθερότητας

Για την μελέτη της σταθερότητας της εστεράσης του οξικού οξέος *Tt*CE16 σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και pH, το ένζυμο επώαστηκε σε καθορισμένες συνθήκες για 24 h και ανά τακτά χρονικά διαστήματα (t=0, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h & 24 h) πραγματοποιούνταν μέτρηση της ενεργότητάς του. Οι μετρήσεις ενεργότητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν όπως ορίζει η μέθοδος της παραγράφου 2.2.2.1.

2.2.2.3.1 Μελέτη Σταθερότητας σε διαφορετικές τιμές pH

Για τη μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH πραγματοποιήθηκε επώαση του ενζύμου σε τιμές pH 2-9 χρησιμοποιώντας τα ρυθμιστικά συστήματα HCl – γλυκίνης (pH 2), κιτρικού-φωσφορικού (pH 3-6), φωσφορικών (pH 7) και Tris-HCl (pH 8 και 9) σε συγκέντρωση 50 mM στην αντίδραση. Για κάθε τιμή pH το ένζυμο επώαστηκε σε συγκέντρωση $0,6 \frac{\mu g}{ml}$. Η επώαση του ενζύμου στα διαφορετικά pH πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4°C. Στους χρόνους επώασης 0-0,5-1-2-4-8 και 24 h ελήφθη δείγμα από κάθε τιμή pH και μετρήθηκε άμεσα η ενζυμική ενεργότητα όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.2.2.1. Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7 σε συγκέντρωση 50 mM και έλαβαν χώρα στη βέλτιστη θερμοκρασία (45 °C).

2.2.2.3.2 Μελέτη Θερμοκρασιακής Σταθερότητας

Μελετήθηκε η σταθερότητα του ενζύμου ύστερα από επώαση 24 ωρών σε θερμοκρασία 45°C (θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιούνται και οι εικοσιτετράωρες αντιδράσεις όπου χρησιμοποιούνταν το ένζυμο). Κατά την επώαση το ένζυμο είχε συγκέντρωση $6 \frac{mg}{ml}$ και το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε (Tris-HCl pH 8) είχε συγκέντρωση 50 mM. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η ενζυμική ενεργότητα όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.1. Στην αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα (pH6) και η συγκέντρωσή του στην αντίδραση ήταν 50 mM. Επιπλέον, η συγκέντρωση του ενζύμου στην αντίδραση ήταν $0,3 \frac{\mu g}{ml}$ και η συγκέντρωση του υποστρώματος στον αντιδρών όγκο (600 μ L) ήταν 0,25 mM.

2.2.2.4 Προσδιορισμός Κινητικών Σταθερών Michaelis-Menten της *Tt*CE16

Ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών του ενζύμου (K_M και u_{max}) έγινε για το υπόστρωμα p-NPA. Για τη μελέτη της κινητικής της εστεράσης εξετάστηκε η ενεργότητα ενός εύρους συγκεντρώσεων υποστρώματος, 0.005-0.3 mM. Οι αντιδράσεις περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών στο βέλτιστο pH (pH 6) με συγκέντρωση στην αντίδραση 50 mM και ένζυμο σε συγκέντρωση $0,6 \frac{\mu g}{ml}$, σε τελικό όγκο 600 μ L. Ο προσδιορισμός της μεταβολής της απορρόφησης λόγω σχηματισμού έγχρωμων προϊόντων έγινε με το πολυφωτόμετρο microplate στα 410 nm. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης με τη μόνη διαφορά ότι αντί για ένζυμο χρησιμοποιούνταν ίση ποσότητα από Tris-HCl 20 mM.

Τέλος, για τον προσδιορισμό των τιμών των κινητικών παραμέτρων K_M και u_{max} γίνεται χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 5. Με αυτό τον τρόπο οι τιμές ενεργότητας που ελήφθησαν από τα πειράματα προσαρμόζονται στο μοντέλο Michaelis-Menten με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων.

2.2.2.5 Επίδραση Οργανικών Διαλυτών στη δράση της *TiCE16*

Μελετήθηκε η επίδραση που έχουν οι οργανικοί διαλύτες μεθανόλη, αιθανόλη, 1,4-διοξάνη και DMSO στην ενεργότητα της *TiCE16* όταν βρίσκονται σε περιεκτικότητα στο αντιδρών μείγμα 10, 20 και 50% v/v. Σημειώνεται πως κατά τη χρήση του διαλύτη DMSO σε συγκέντρωση 50% παρατηρήθηκε καθίζηση του ενζύμου. Εξαιτίας αυτού επιλέχθηκε η συγκέντρωση 30% ως η μεγαλύτερη δυνατή για τη μελέτη της επίδρασης του συγκεκριμένου διαλύτη στην ενεργότητα του ενζύμου, συγκέντρωση στην οποία δεν εμφανίστηκε καθίζηση.

Η μέτρηση της ενεργότητας παρουσία οργανικού διαλύτη πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις δοκιμής ενεργότητας, όπως περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.2.1 με τη συσκευή φωτομέτρησης microplate στα 410 nm. Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7 σε τελικό όγκο αντίδρασης 600 μ L και η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος στην αντίδραση ήταν 0,125 mM. Για κάθε διαφορετικό διαλύτη υπήρχε και το αντίστοιχο τυφλό διάλυμα, του οποίου η απορρόφηση λαμβάνεται ως μηδενική, και παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.1. Τέλος, σε κάθε σετ αντιδράσεων εκτός από τις αντιδράσεις στις οποίες έχει προστεθεί διαλύτης υπάρχει και μια αντίδραση όπως και τυφλό δείγμα, όπου δεν περιέχεται καθόλου διαλύτης και θεωρείται ως «αντίδραση ελέγχου», δηλαδή σε αυτή την αντίδραση το ένζυμο δρα χωρίς να δέχεται επίδραση από το διαλύτη.

2.2.2.6 Επίδραση διαλυμάτων αλάτων στη δράση της *TiCE16*

Εκτός από την επίδραση των οργανικών διαλυτών στην δράση της εστεράσης του οξικού οξέος, μελετήθηκε επιπρόσθετα και η επίδραση των εξής εννέα διαλυμάτων αλάτων $MgSO_4$, $ZnCl_2$, KCl , $CoCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $NiCl_2$, $FeCl_3$, $FeSO_4$, σε συγκεντρώσεις στον αντιδρών όγκο 0.5, 1, 10 mM.

Η μέτρηση της ενεργότητας παρουσία των διαλυμάτων αλάτων πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις δοκιμής ενεργότητας, όπως περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.2.1 με τη συσκευή φωτομέτρησης microplate στα 410 nm. Για κάθε διάλυμα άλατος υπήρχε και το αντίστοιχο τυφλό διάλυμα, του οποίου η απορρόφηση λαμβάνεται ως μηδενική, και παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.1. Τέλος, σε κάθε σετ αντιδράσεων εκτός από τις αντιδράσεις στις οποίες έχει προστεθεί το διάλυμα του άλατος υπάρχει και μια αντίδραση όπως και τυφλό δείγμα, όπου δεν περιέχεται καθόλου άλας και θεωρείται ως «αντίδραση ελέγχου», δηλαδή σε αυτή την αντίδραση το ένζυμο δρα χωρίς να δέχεται επίδραση από το άλας.

2.2.2.7 Μελέτη πιθανών υποστρωμάτων

Για την μελέτη της εξειδικευμένης δράσης της εστεράσης *TiCE16* χρησιμοποιήθηκαν διάφορα υποστρώματα και προσδιορίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου για καθένα από

αυτά τα υποστρώματα. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.2.2.7.1: Υποστρώματα για την μελέτη εξειδίκευσης της δράσης της TtCE16

Υποστρώματα
4-νιτροφαίνυλ-βουτυρικό (p-nitrophenyl butyrate)
4-νιτροφαίνυλ-παλμιτικό (p-nitrophenyl palmitate)
4-νιτροφαίνυλ-οξικό (p-nitrophenyl acetate)
2-νιτροφαίνυλ-οξικό (2-nitrophenyl acetate)
n-ακετυλ-D-γαλακτοζαμίνη (n-acetyl-D-galactosamine)
n-ακετυλ-β-D-μαννοζαμίνη (n-acetyl-β-D-mannosamine)
n-ακετυλ-L-αιθυλεστέρας φαινυλαλανίνης (n-acetyl-L-phenylalanine ethyl ester)
n-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη (n-acetyl-D-glucosamine)
n-ακετυλ-L-φαινυλαλανίνη (n-acetyl-L-phenylalanine)
ξυλοβιόζη (xylobiose)
ξυλοεξαόζη (xylohexaose)
ακετυλιωμένη ξυλάνη από ξύλο σημύδας (birchwood xylan)

Σημειώνεται πως η ενεργότητα του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης από ξύλο σημύδας υπολογίστηκε ύστερα από κατεργασία του υποστρώματος με μία εμπορική ξυλανάση της οικογένειας GH10 (E-XYLATM). Αυτό συνέβη επειδή το ένζυμο δεν εμφάνισε ενεργότητα στο πολυμερικό υπόστρωμα.

Η μέτρηση ενεργότητας του ενζύμου για τα υποστρώματα p-nitrophenyl butyrate, p-nitrophenyl palmitate, p-nitrophenyl acetate και 2-Nitrophenyl acetate έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.1, ωστόσο οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων διαφέρουν και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.2.2.7.2: Συγκέντρωση των προς μελέτη υποστρωμάτων στην αντίδραση

Υποστρώματα	Συγκέντρωση ($\frac{mg}{ml}$)
p-nitrophenyl butyrate	0,26
p-nitrophenyl palmitate	0,47
p-nitrophenyl acetate	0,09

2-Nitrophenyl acetate	0,09
n- acetyl-D-galactosamine	0,276
n-acetyl-D-glucosamine	0,276
n-acetyl-β-D-mannosamine	0,276
n-acetyl-L-phenylalanine ethyl ester	0,29
n-acetyl-L-phenylalanine	0,259

Όσον αφορά τα υποστρώματα n-acetyl-D-galactosamine, n-acetyl-β-D-mannosamine, n-acetyl-L-phenylalanine ethyl ester, n-acetyl-D-glucosamine, n-acetyl-L-phenylalanine, σε αυτά η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν $0,06 \frac{mg}{ml}$. Για αυτά τα υποστρώματα, η διάρκεια της αντίδρασης ήταν 15 λεπτά, έλαβε χώρα στους 45°C υπό ανάδευση 950 rpm και στη συνέχεια ακολούθησαν 5 λεπτά βρασμού ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο και η ενεργότητα μετρήθηκε μέσω της υγρής χρωματογραφίας HPLC.

2.2.3 Συνεργισμοί

2.2.3.1 Συνεργιστική δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* και των ξυλανασών *TtXyn30A* και E-XYLATM.

Για την υδρόλυση των φυσικών (επεξεργασμένων) λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων, η σύσταση των οποίων αναγράφεται αναλυτικά στον πίνακα 2.2.3.1.1, έγινε μελέτη της συνεργιστικής δράσης της αραβινοφουρανοζιδάσης με δύο ξυλανάσες, μία της οικογένειας GH30 (*TtXyn30A*) και μία της οικογένειας GH10 (E-XYLATM). Για το σκοπό αυτό αρχικά υπολογίστηκε η ενεργότητα του καθενός από τα παραπάνω ένζυμα ξεχωριστά και στη συνέχεια ακολούθησαν δοκιμές με συνεργιστικούς ενζύμων (*TtAbf43* - E-XYLATM, *TtAbf43* - *TtXyn30A*, *TtXyn30A* - E-XYLATM και *TtAbf43* - *TtXyn30A* - E-XYLATM). Για τη διεξαγωγή καθεμίας αντίδρασης οι συγκεντρώσεις των ενζύμων στην αντίδραση ήταν για την *TtAbf43* $0,1 \frac{mg}{ml}$ και για τις ξυλανάσες των *TtXyn30A* και E-XYLATM $0,2 \frac{mg}{ml}$. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος με pH 5 σε συγκέντρωση 50 mM και λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα που αναφέρονται στον πίνακα 2.2.3.1.1 σε συγκέντρωση $0,7 \frac{mg}{ml}$. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στους 45°C, υπό ανάδευση 950 rpm για 24 ώρες.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η επί τοις εκατό σύσταση των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στους προαναφερθέντες συνεργιστισμούς.

Πίνακας 2.2.3.1.1: Επί τοις εκατό σύσταση λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων

	Υπόστρωμα	Κυτταρίνη	Ξυλάνη	Αραβινόζη	Λιγνίνη
A	Ξυλάνη από ξύλο οξιάς προκατεργασμένη με υγρή οξείδωση (H ₂ O /Ακετόνη 25/75)	78.7 %	7.8 %	1.1 %	9.6 %
B	Στελέχη αραβοσίτου προκατεργασμένα με έκρηξη ατμού	52.6 %	6.8 %	0.7 %	28.6 %

Η απελευθέρωση σακχάρων μετρήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC για την επίτευξη μεγαλύτερης ακρίβειας.

2.2.3.2 Συνεργιστική δράση της *TiCE16* με την ξυλανάση *TiXyn30A*

Για την υδρόλυση ακετυλιωμένης ξυλάνης μελετήθηκε η συνεργιστική δράση της εστεράσης του οξικού οξέος *TiCE16* με μία ξυλανάση της οικογένειας GH30 (*TiXyn30A*). Αρχικά υπολογίστηκε η ενεργότητα του καθενός από τα παραπάνω ένζυμα ξεχωριστά και στη συνέχεια ακολούθησαν δοκιμές της συνεργιστικής δράσης των ενζύμων *TiCE16* - *TiXyn30A*. Πραγματοποιήθηκαν δύο σερ από τις προαναφερθείσες αντιδράσεις οι οποίες είχαν τελικό όγκο 0,5 mL. Κατά το πρώτο σερ χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος με pH 5 σε συγκέντρωση 50 mM, ενώ στο δεύτερο χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών με pH 5 και συγκέντρωση 50 mM στην αντίδραση. Η συγκέντρωση της *TiCE16* στην αντίδραση ήταν $0,12 \frac{mg}{ml}$ και της ξυλανάσης $0,04 \frac{mg}{ml}$, ενώ το υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση $0,7 \left(\frac{mg}{ml}\right)$. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στους 45°C, υπό ανάδευση 950 rpm και είχαν διάρκεια 24 ωρών. Η απελευθέρωση σακχάρων και οξικού οξέος μετρήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία HPLC.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

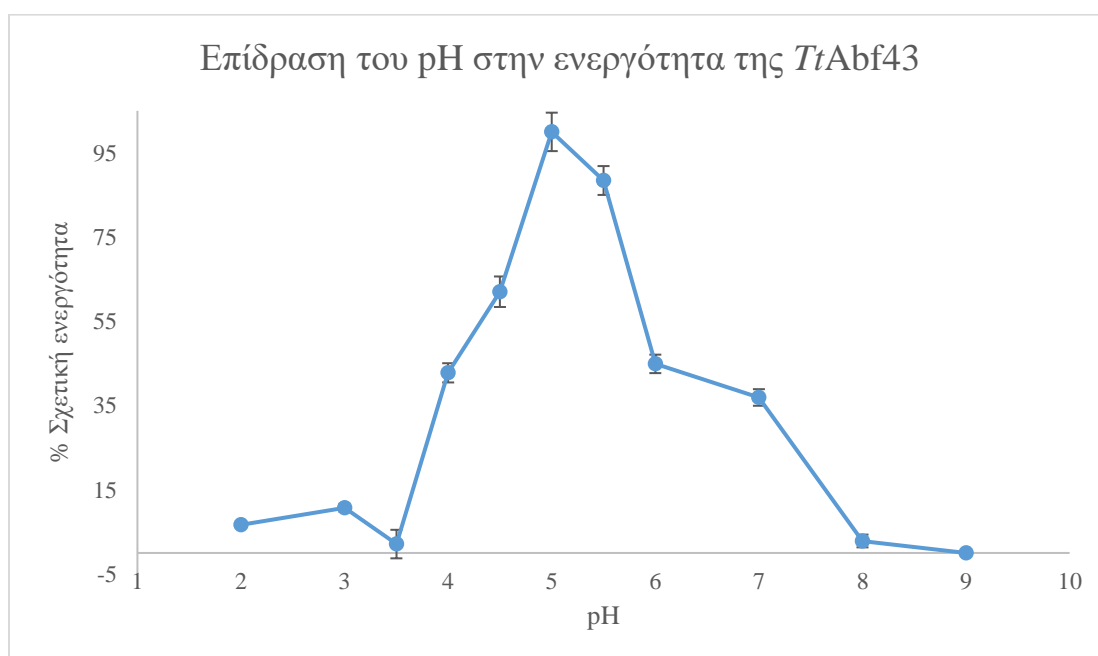
3. Αποτελέσματα

3.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43*

3.1.1 Βέλτιστες συνθήκες δράσης

3.1.1.1 Βέλτιστη τιμή pH δράσης

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές της ενεργότητας της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* οι οποίες υπολογίστηκαν για εύρος τιμών pH 2 – 9 όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.2.1. Σημειώνεται πως οι τιμές ενεργότητας που φαίνονται στο διάγραμμα είναι οι σχετικές τιμές ενεργότητας του ενζύμου που προσδιορίστηκαν θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου στη βέλτιστη τιμή pH.

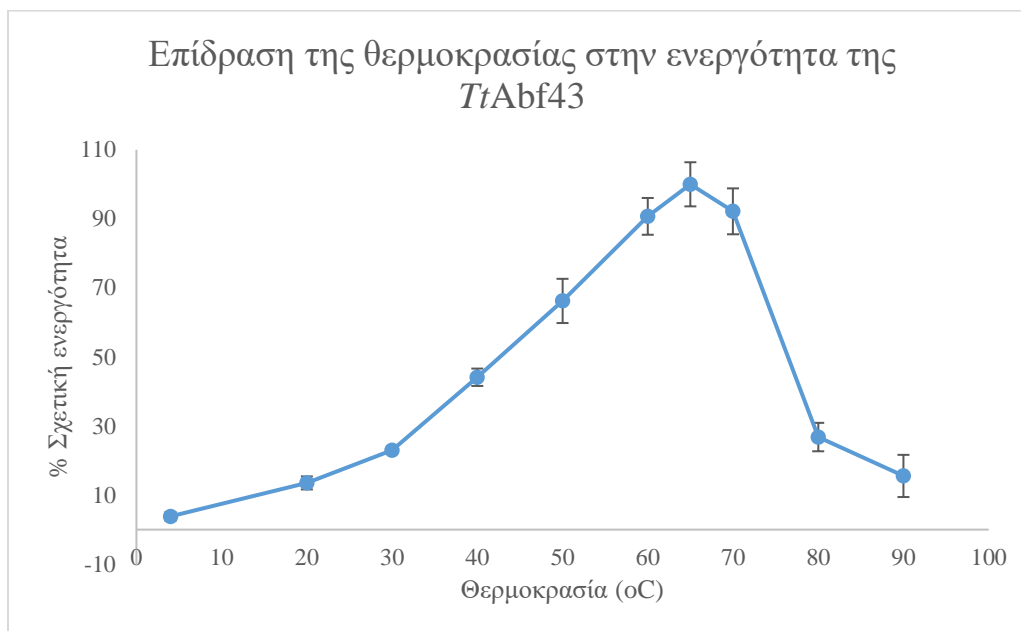


Διάγραμμα 3.1.1.1.1: Προσδιορισμός βέλτιστης τιμής pH δράσης της *TtAbf43* ύστερα από υπολογισμούς της ενεργότητάς της σε εύρος pH 2-9. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Όπως παρατηρείται από το παραπάνω διάγραμμα, το βέλτιστο pH δράσης της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* εμφανίζεται στην τιμή 5. Στις πολύ όξινες τιμές pH παρατηρούνται χαμηλές τιμές ενεργότητας και πιο συγκεκριμένα για τιμές pH 2-3.5 η σχετική ενεργότητα είναι χαμηλότερη του 10%. Στη συνέχεια, ακολουθεί αύξηση της ενεργότητας μεταξύ των pH 4 και 4,5 όπου βρίσκεται στο 43 και 62 % αντίστοιχα. Στο pH 5 παρατηρείται η υψηλότερη τιμή ενεργότητας, η οποία στην πορεία έχει πτωτική τάση καθώς για pH 5,5 βρίσκεται στο 88%, για pH 6 στο 45% και για pH 7 στο 40%. Ακολουθεί απότομη πτώση στα βασικά pH όπως στο pH 8 όπου η ενεργότητα είναι 2,8% ενώ στο pH 9 μηδενίζεται.

3.1.1.2 Βέλτιστη τιμή θερμοκρασίας δράσης

Στο διάγραμμα που παρατίθεται παρακάτω παρουσιάζονται οι τιμές σχετικής ενεργότητας της *TtAbf43* οι οποίες υπολογίστηκαν για θερμοκρασιακό εύρος 4°C έως 90°C.



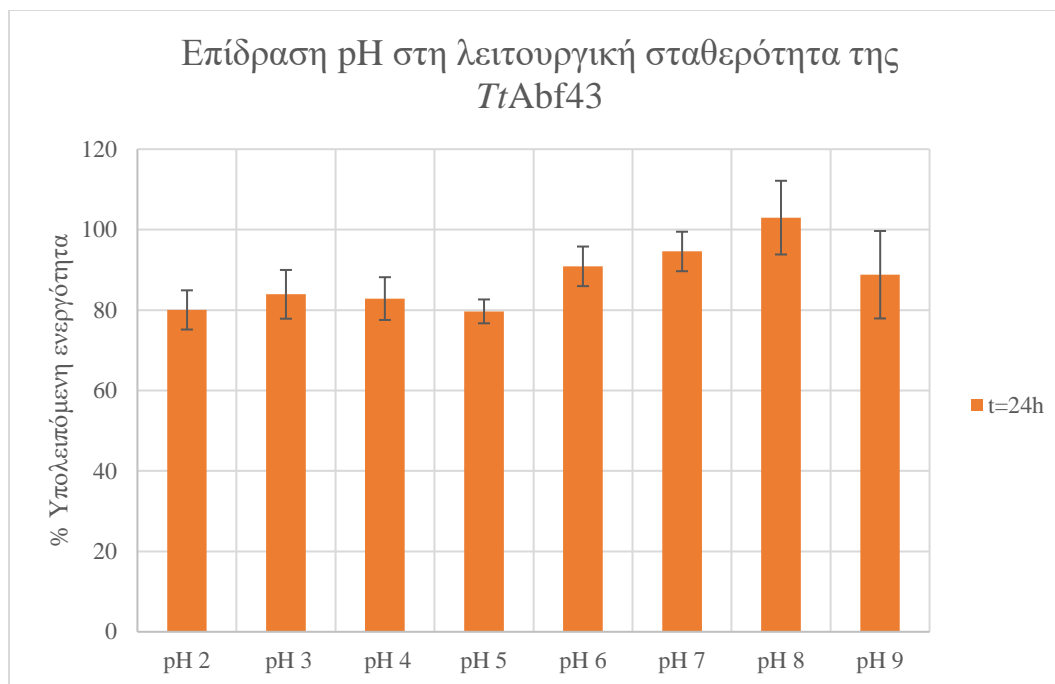
Διάγραμμα 3.1.1.2.1: Προσδιορισμός βέλτιστης τιμής θερμοκρασίας δράσης της *TtAbf43* ύστερα από υπολογισμούς της ενεργότητάς της σε εύρος θερμοκρασιών 4°C-90°C. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Η *TtAbf43* εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 65 °C όπως γίνεται αντιληπτό από το παραπάνω διάγραμμα. Ξεκινώντας από τους 4°C, η ενεργότητα είναι αρκετά χαμηλή, ωστόσο καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία της αντίδρασης έως και 65 °C παρατηρείται αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου, ενώ για θερμοκρασίες υψηλότερες των 65 °C παρατηρείται μείωση της ενεργότητας. Μάλιστα απότομη μείωση φαίνεται να συμβαίνει μεταξύ 70°C και 80°C όπου η ενεργότητα από το 92% μεταπίπτει στο 27%.

3.1.2 Συνθήκες λειτουργικής σταθερότητας

3.1.2.1 Σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές ενεργότητας οι οποίες υπολογίστηκαν ύστερα από την επώαση του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH για 24 ώρες στους 4°C όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.3.1, ώστε να προσδιορισθεί η σταθερότητα της *TtAbf43* σε αυτές τις τιμές pH. Ως 100% ενεργότητα λαμβάνεται η ενεργότητα που μετράται στο χρόνο 0.

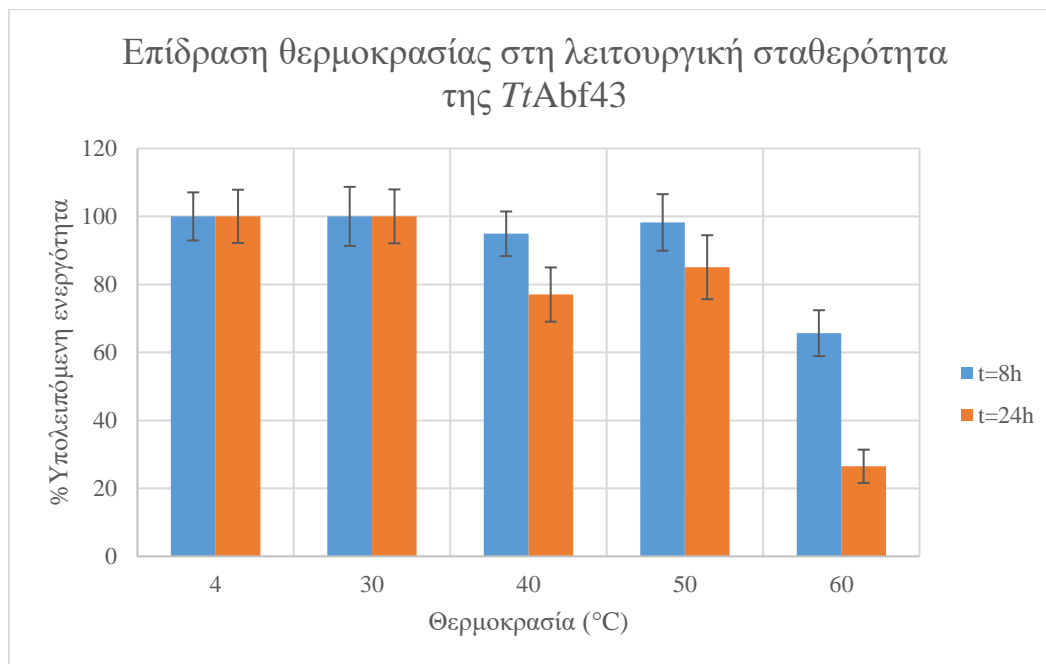


Διάγραμμα 3.1.2.1.1: Επίδραση του pH στην λειτουργική σταθερότητα της *TtAbf43* μετά από επώαση 24 ωρών. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Μετά το πέρας 24 ωρών, παρατηρείται πως το ένζυμο παρουσιάζει ικανοποιητική σταθερότητα στο εύρος pH που μελετήθηκε καθώς φαίνεται να διατηρεί πάνω από το 80% της ενεργότητάς του για όλες τις τιμές pH. Πιο συγκεκριμένα, η *TtAbf43* διατηρεί πάνω από 94% την ενεργότητα στα pH 7 και 8 μετά το πέρας 24 ωρών. Ακόμη, στα pH 6 και 9 έχει επίσης καλή σταθερότητα με τιμή της ενεργότητας να βρίσκεται περίπου στο 90%. Μικρή πτώση της ενεργότητας παρατηρείται στα pH 2-5 όπου κυμαίνεται γύρω στο 80%, τιμή η οποία και πάλι θεωρείται ικανοποιητική.

3.1.2.2 Θερμοκρασιακή σταθερότητα

Στο διάγραμμα που παρατίθεται στη συνέχεια παρουσιάζονται οι τιμές της ενεργότητας της *TtAbf43* που υπολογίστηκαν ύστερα από επώαση του ενζύμου σε θερμοκρασίες 4°C, 30°C, 40°C, 50°C και 60°C για 24 ώρες διατηρώντας το pH των αντιδράσεων που έλαβαν χώρα σταθερό στη βέλτιστη τιμή του (pH 5). Όπως προαναφέρθηκε, ως 100% ενεργότητα λαμβάνεται η ενεργότητα που μετράται στον χρόνο 0.



Διάγραμμα 3.1.2.2.1: Επίδραση της θερμοκρασίας στη λειτουργική σταθερότητα της *TtAbf43* μετά από επώαση 24 ωρών. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

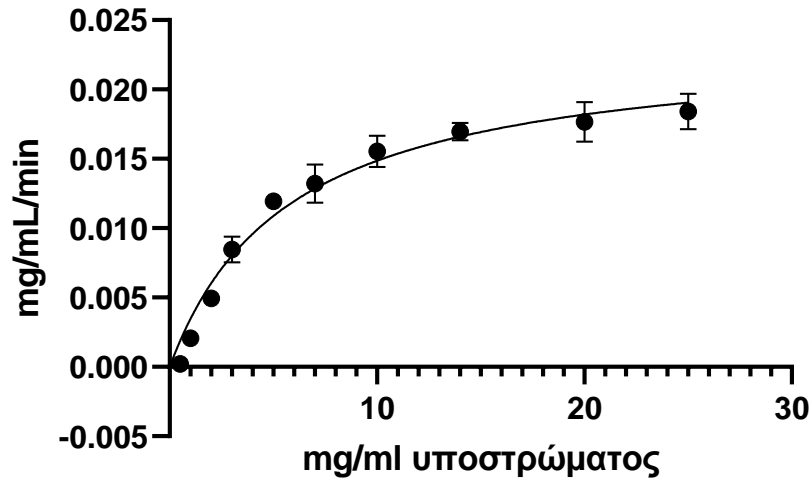
Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα το ένζυμο διατηρεί το 100% της ενεργότητάς του μετά το πέρας 24 ωρών όταν επωάζεται στους 4°C και στους 30°C. Όταν επωάζεται στους 40°C, μέχρι τις πρώτες 8 ώρες διατηρεί την ενεργότητα του πάνω από το 90% ενώ μετά από αυτό το χρονικό διάστημα μειώνεται σταδιακά έως ότου φτάσει το 77% της βέλτιστης τιμής στις 24 ώρες. Ομοίως και στους 50°C, όπου παρατηρείται μία ομαλή πτωτική τάση της ενεργότητας του ενζύμου στο 85% μετά το πέρας 24 ωρών, ενώ έως τις πρώτες 8 ώρες διατηρεί την ενεργότητα πάνω από το 90%. Ωστόσο, απότομη πτώση εμφανίζεται για επώαση του ενζύμου στους 60°C μετά τις 8 ώρες, όπου η ενεργότητα φτάνει στο 26% σε διάστημα 24 ωρών.

3.1.3 Κινητική μελέτη δράσης της *TtAbf43*

3.1.3.1 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων Michaelis-Menten

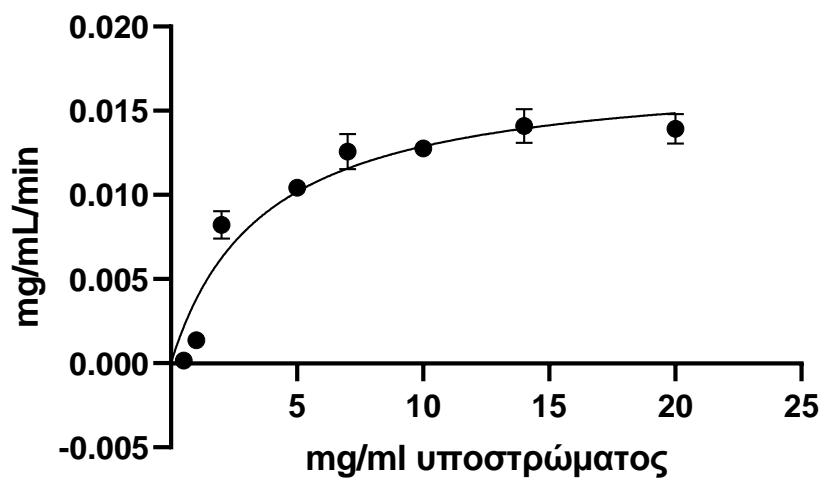
Η προσαρμογή των δεδομένων των αντιδράσεων στην εξίσωση Michaelis-Menten και ο υπολογισμός των κινητικών σταθερών έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 για κάθε ένα από τα τρία υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η κινητική του ενζύμου. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα στα οποία απεικονίζεται η συγκέντρωση υποστρώματος συναρτήσει της ενεργότητας του ενζύμου.

Κινητική Michaelis-Menten της TtAbf43 σε Αραβινοξυλάνη Σιταριού



Διάγραμμα 3.1.3.1.1: Προσαρμογή δεδομένων στο κινητικό μοντέλο Michaelis-Menten για τη δράση της TtAbf43 σε υπόστρωμα WA ($R^2 = 0,96$)

Κινητική Michaelis-Menten της TtAbf43 σε Αραβινοξυλάνη Σίκαλης



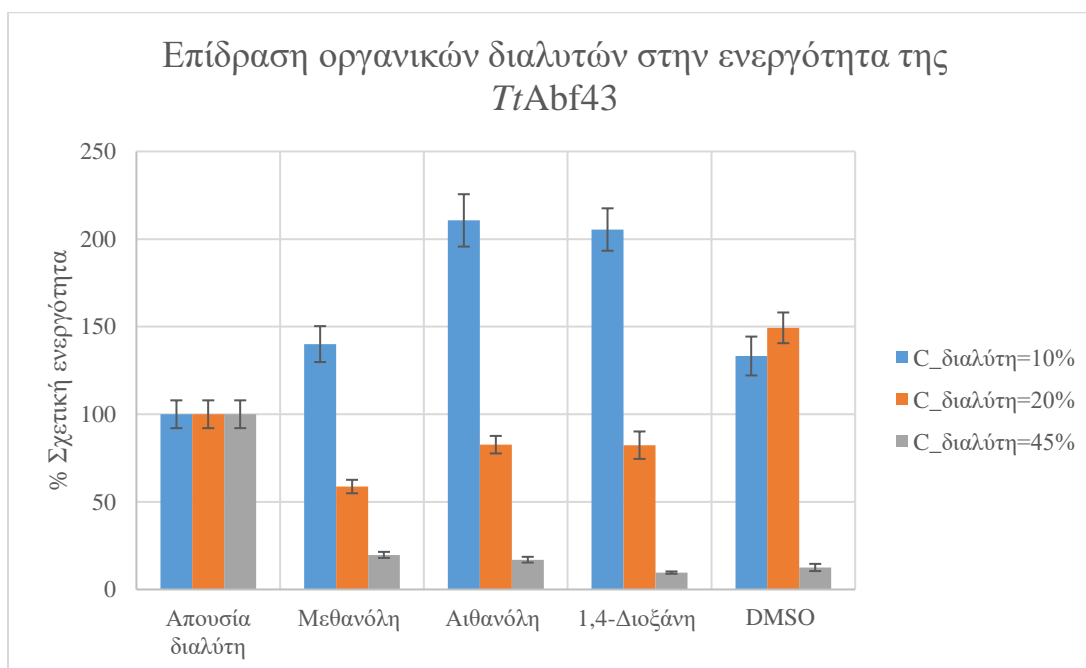
Διάγραμμα 3.1.3.1.2: Προσαρμογή δεδομένων στο κινητικό μοντέλο Michaelis-Menten για τη δράση της TtAbf43 σε υπόστρωμα RA ($R^2 = 0,92$)

Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Michaelis-Menten, δηλαδή η σταθερά Michaelis-Menten (K_M) και η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης (u_{max}) βρέθηκαν για την WA $5,78 \pm 0,60 \frac{mg}{ml}$ και $0,0234 \pm 0,0009 \frac{mg}{ml \cdot min}$ αντίστοιχα, και για τη RA $3,62 \pm 0,67 \frac{mg}{ml}$ και $0,0175 \pm 0,0010 \frac{mg}{ml \cdot min}$.

Όσον αφορά το υπόστρωμα ο-NPX, παρότι μελετήθηκε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων δεν επετεύχθη ο σχηματισμός πλατό στο γράφημα της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, ακόμη και όταν οι συγκεντρώσεις ήταν αρκετά υψηλές με αποτέλεσμα το μοντέλο που προέκυψε να μην προσομοιάζει αυτό των Michaelis-Menten.

3.1.4 Επίδραση οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα της *TtAbf43*

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές της ενεργότητας του ενζύμου κατά την αντίδραση παρουσία τεσσάρων διαφορετικών οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, αιθανόλη, 1,4-Διοξάνη και DMSO) όταν αυτοί βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 10%, 20% και 45% v/v. Ως 100% ενεργότητα θεωρείται αυτή που υπολογίστηκε από την αντίδραση ελέγχου του ενζύμου, η οποία έγινε απουσία διαλυτών ώστε να επιτευχθεί σύγκριση.



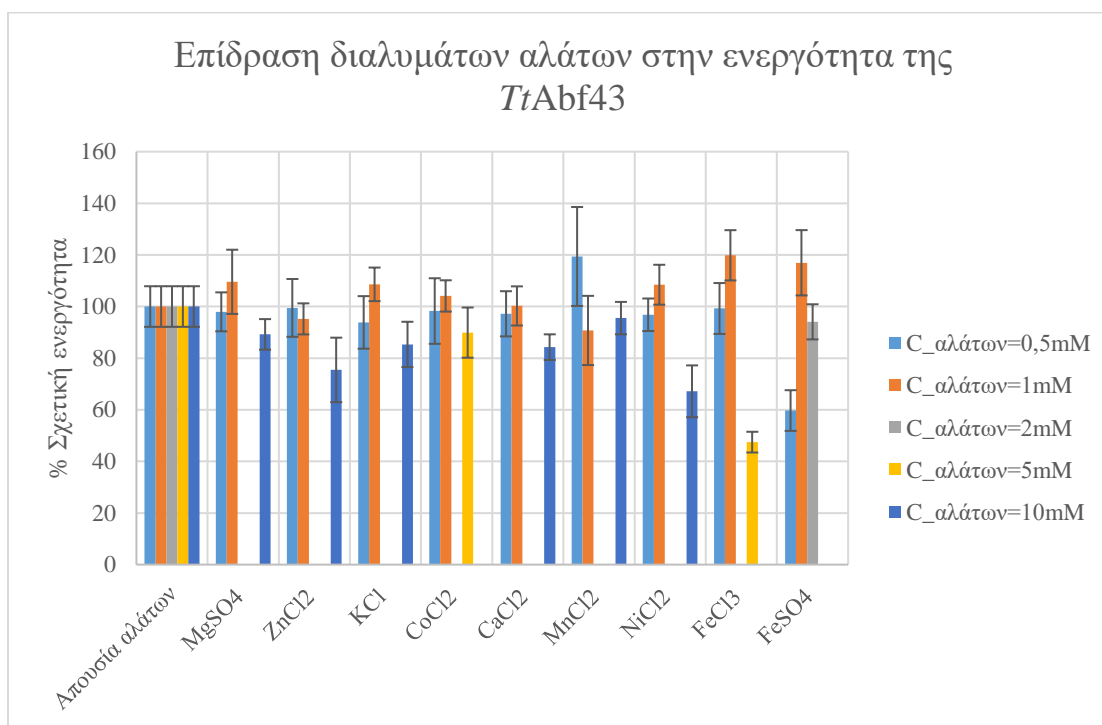
Διάγραμμα 3.1.4.1: Επίδραση τεσσάρων οργανικών διαλυτών (μεθανόλης, αιθανόλης, 1,4-διοξάνης και DMSO) στην ενεργότητα της *TtAbf43*. Οι συγκεντρώσεις των διαλυτών που μελετήθηκαν ήταν 10%, 20% και 45% v/v. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Όταν οι διαλύτες βρίσκονται σε περιεκτικότητα 10% v/v παρατηρείται πως ενισχύουν τη δράση του ενζύμου. Το ίδιο συμβαίνει και παρουσία του διαλύτη DMSO όταν αυτός βρίσκεται σε συγκέντρωση 20% v/v. Στην ίδια συγκέντρωση οι διαλύτες αιθανόλη και 1,4-διοξάνη φαίνεται μειώνουν την ενεργότητα του ενζύμου στο 80%, ενώ παρουσία

μεθανόλης προκαλείται ακόμα μεγαλύτερη παρεμπόδιση και η ενεργότητα του ενζύμου φτάνει το 60%. Επιπρόσθετα, όπως μπορεί να παρατηρηθεί από το διάγραμμα, η υψηλή συγκέντρωση των διαλυτών (45% v/v) παρεμποδίζει τη δράση του ενζύμου καθώς παρατηρείται απότομη μείωση της ενεργότητας, η οποία κυμαίνεται μεταξύ 10% και 20%.

3.1.5 Επίδραση διαλυμάτων αλάτων στην ενεργότητα της *TtAbf43*

Στο ακόλουθο διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές της ενεργότητας του ενζύμου κατά την αντίδραση παρουσία εννέα διαφορετικών διαλυμάτων αλάτων ($MgSO_4$, $ZnCl_2$, KCl , $CoCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $NiCl_2$, $FeCl_3$ και $FeSO_4$) σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0,5 mM έως 10 mM. Ως 100% ενεργότητα θεωρείται αυτή που υπολογίστηκε από την αντίδραση ελέγχου του ενζύμου, η οποία έγινε απουσία διαλυμάτων αλάτων ώστε να επιτευχθεί σύγκριση.



Διάγραμμα 3.1.5.1: Επίδραση εννέα διαλυμάτων αλάτων στην ενεργότητα της *TtAbf43*. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Η επίδραση των αλάτων φαίνεται να μην είναι αρκετά σημαντική στη δράση της *TtAbf43*, ειδικά όταν πρόκειται για χαμηλές συγκεντρώσεις 0,5 mM και 1 mM όπου η επίδραση είναι ανεπαίσθητη. Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρείται παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου από τα διαλύματα των αλάτων χωρίς και πάλι να είναι αξιοσημείωτη καθώς για την πλειονότητα των διαλυμάτων αλάτων σε συγκέντρωση 10 mM το ένζυμο διατηρεί την ενεργότητά του πάνω από το 80%. Εξάιρεση αποτελούν το διάλυμα του διχλωριούχου νικελίου ($NiCl_2$) το οποίο σε συγκέντρωση 10 mM προκαλεί πτώση της ενεργότητας του ενζύμου στο 67% και το διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου ($FeCl_3$) το οποίο για συγκέντρωση 5 mM ωθεί την ενεργότητα σε πτώση κάτω από το 50%.

3.1.6 Εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα

Από τις αντιδράσεις της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* με τα διάφορα υποστρώματα που εξετάστηκαν και προσδιορίστηκε η ενεργότητα της σε αυτά προκύπτει πως το ένζυμο δεν είχε δράση στα τεχνητά υποστρώματα 4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside, 4 nitrophenyl α-D-glucopyranoside, o-nitrophenyl β-D glucopyranoside, 4-nitrophenyl β-D-lactopyranoside, 4-nitrophenyl α-D-galactopyranoside, 4-nitrophenyl β-D-galactopyranoside, o-nitrophenyl α-D-galactopyranoside, 2-nitrophenyl α-D galactopyranoside, p-nitrophenyl α-D-maltopenta-side, p-nitrophenyl β-D-N,N'-diacetylchitobiose και p- nitrophenyl β-D-cellobioside. Αντιθέτως, τα υποστρώματα στα οποία παρουσίασε δράση είναι τα p-nitrophenyl acetate, p-nitrophenyl α-L-rhamnopyranoside, p-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside και o-nitrophenyl β-D-xylopyranoside.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων ενεργότητας που είχε το ένζυμο στα υποστρώματα αυτά, εκφρασμένη σε $\frac{units}{mg \text{ ενζύμου}}$, καθώς και η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 3.1.6.1: Τιμές ενεργότητας της *TtAbf43* σε υποστρώματα ολιγοσακχαριτών. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Υπόστρωμα	Ενεργότητα ενζύμου ($\frac{units}{mg \text{ ενζύμου}}$)
4-νιτροφαίνυλ-οξικό (p-nitrophenyl acetate)	0,865 ±0,023
ο-νιτροφαίνυλ- ραμνοπυρανόζη (p-nitrophenyl α-L- rhamnopyranoside)	0,003±0,000
ο-νιτροφαίνυλ- αραβινοφουρανόζη (p-nitrophenyl α-L- arabinofuranoside)	0,374±0,006
ο-νιτροφαίνυλ- ξυλοπυρανόζη (o-nitrophenyl β-D- xylopyranoside)	0,188±0,011

Όσον αφορά τους πολυσακχαρίτες στους οποίους μελετήθηκε η δράση αυτού του ενζύμου, παρατηρήθηκε πως το ένζυμο δεν εμφάνισε δράση στα υποστρώματα καθαρής κυτταρίνης (avicel), ξυλογλυκάνης (xyloglucan), λιχενάνης (lichenan), γαλακτομαννάνης (galactomannan), γλυκομαννάνης (konjac glucomannan) και 1,4-β-D-μαννάνης (mannan).

Η αραβινοφουρανοζιδάση *TtAbf43* εμφάνισε ενεργότητα στους πολυσακχαρίτες αραβινοξυλάνη σιταριού (wheat arabinoxylan, WA), αδιάλυτη αραβινοξυλάνη σιταριού (insoluble wheat arabinoxylan) και αραβινοξυλάνη σίκαλης (rye arabinoxylan, RA). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων ενεργότητας που είχε το ένζυμο σε αυτούς τους πολυσακχαρίτες, εκφρασμένη σε $\frac{units}{mg \text{ ενζύμου}}$, καθώς και η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 3.1.6.2: Τιμές ενεργότητας *TtAbf43* σε υποστρώματα πολυσακχαριτών. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Υπόστρωμα	Ενεργότητα ενζύμου ($\frac{units}{mg \text{ ενζύμου}}$)
WA	94,8±2,4
RA	87,8±5,2
αδιάλυτη WA	34,9±1,3

3.1.7 Τρόπος δράσης (mode of action) της *TtAbf43* σε υποστρώματα WA και RA

Όπως επισημαίνεται στην παράγραφο 2.2.1.8 για να προσδιοριστεί ο τρόπος δράσης του ενζύμου και πιο συγκεκριμένα εάν αυτό απομακρύνει μονές ή διπλές υποκαταστάσεις αραβινόζης από το σκελετό της ξυλάνης, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της δράσης του με αντίστοιχα εμπορικά ένζυμα. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι ποσοστιαίες μετρήσεις αραβινόζης που υδρολύεται ύστερα από τη χρήση της *TtAbf43* όπως και μετά τη χρήση του αντίστοιχου εμπορικού ενζύμου. Παράλληλα αναγράφονται οι αντίστοιχες μετρήσεις όταν τα ένζυμα δρουν συνεργιστικά.

Πίνακας 3.1.7.1: Σύγκριση δράσης *TtAbf43* με εμπορική αραβινοφουρανοζιδάση (E-AFASE) σε υποστρώματα WA και RA. Σημειώνεται πως οι μέσοι όροι και τα σφάλματα προκύπτουν ως τυπική απόκλιση τριπλών μετρήσεων.

	% υδρόλυση αραβινόζης σε WA	(DS)	% υδρόλυση αραβινόζης σε RA	(DS)
GH43	33,9±0,6	-	20,1±0,3	-
E-AFASE	33,3±0,8	-	42,9±0,3	-
1 ^η GH43 2 ^η E- AFASE	83,8±4,5	1,2±0,1	76,3±1,6	1,2±0,0

1 ^η E- AFASE 2 ^η GH43	67,9±4,3	1,0±0,1	64,8±1,8	1,0±0,0
---	----------	---------	----------	---------

Πίνακας 3.1.7.2: Σύγκριση δράσης *TtAbf43* με εμπορική αραβινοφουρανοζιδάση (E-AFAM2) σε υποστρώματα WA και RA. Σημειώνεται πως οι μέσοι όροι και τα σφάλματα προκύπτουν ως τυπική απόκλιση τριπλών μετρήσεων.

	% υδρόλυση αραβινόζης σε WA	(DS)	% υδρόλυση αραβινόζης σε RA	(DS)
GH43	32,7±0,1	-	18,2±0,3	-
E-AFAM2	26,4±0,5	-	15,0±0,2	-
1 ^η GH43 2 ^η E-FAM2	32,5±0,3	0,5±0,0	19,7±0,3	0,6±0,0
1 ^η E- AFAM2 2 ^η GH43	33,3±0,0	0,6±0,0	19,1±0,3	0,6±0,0

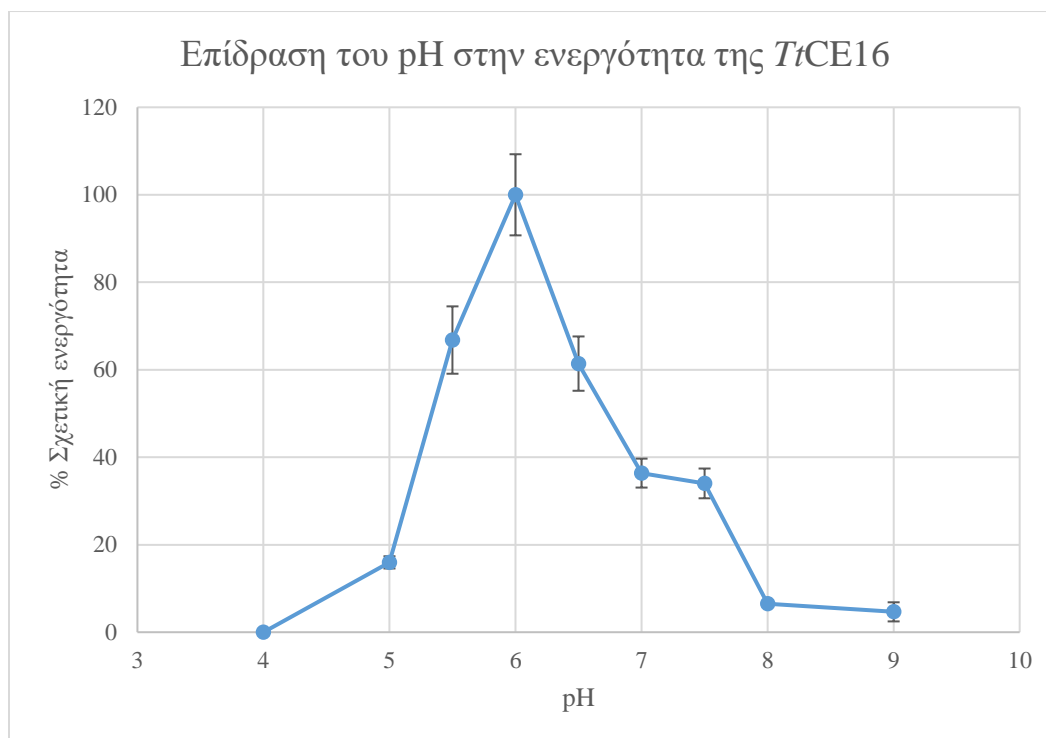
Τα δύο ένζυμα, *TtAbf43* και E-AFAM2, φαίνεται να δρουν με τον ίδιο τρόπο, καθώς απελευθερώνουν από κάθε υπόστρωμα ίδια ποσοστά αραβινόζης ενώ με διαδοχική προσθήκη των ενζύμων δεν αυξάνεται σημαντικά η απελευθέρωση αραβινόζης. Παρατηρείται επίσης πως στην WA απελευθερώνεται περισσότερη αραβινόζη συγκριτικά με τη RA, πιθανώς διότι η WA περιέχει περισσότερες διπλές υποκαταστάσεις αραβινόζης από τη RA. Αντίθετα, η *TtAbf43* και η E-AFASE φαίνεται να έχουν συμπληρωματικές δράσεις και μάλιστα όταν η *TtAbf43* προηγείται της E-AFASE παρατηρείται συνέργεια. Αυτό ίσως συμβαίνει επειδή η *TtAbf43* εντοπίζει τις διπλές υποκαταστάσεις και απομακρύνει αυτή που βρίσκεται στη θέση 3 της ξυλόζης απελευθερώνοντας περισσότερες θέσεις δράσης για την E-AFASE.

3.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός εστεράσης του οξικού οξέος *TtCE16*

3.2.1 Βέλτιστες συνθήκες δράσης

3.2.1.1 Βέλτιστη τιμή pH δράσης

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές της σχετικής ενεργότητας της εστεράσης του οξικού οξέος όπως προκύπτουν για εύρος τιμών pH 4 – 9 όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.2.1. Σημειώνεται πως ως 100% σχετική ενεργότητα θεωρούμε την ενεργότητα του ενζύμου στη βέλτιστη τιμή pH, όπου η ενεργότητα είναι μέγιστη.

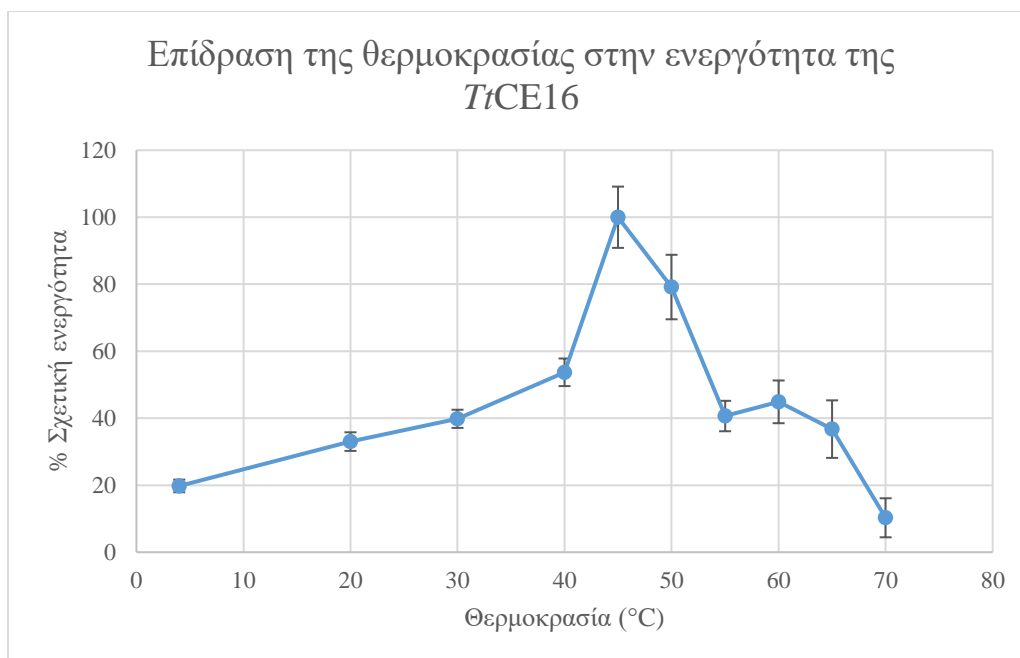


Διάγραμμα 3.2.1.1.1: Προσδιορισμός βέλτιστης τιμής pH δράσης της *Ti*CE16 σε εύρος pH 4-9. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει πως το συγκεκριμένο ένζυμο εμφανίζει βέλτιστη δράση για τιμή pH 6. Σε πιο όξινες τιμές pH όπως στο 4 και 5, η ενεργότητα του ενζύμου είναι πολύ χαμηλή όμως σταδιακά αυξάνεται και στο pH 5,5 ξεπερνάει το 60% της βέλτιστης τιμής. Για τιμές pH μεγαλύτερες από το βέλτιστο η ενεργότητα του ενζύμου είναι συνεχώς μειούμενη.

3.2.1.2 Βέλτιστη τιμή θερμοκρασίας δράσης

Στο διάγραμμα που παρατίθεται παρακάτω παρουσιάζονται οι τιμές σχετικής ενεργότητας της εστεράσης του οξικού οξέος *Ti*CE16 οι οποίες υπολογίστηκαν για θερμοκρασιακό εύρος 4°C έως 70°C όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.2.2.2.



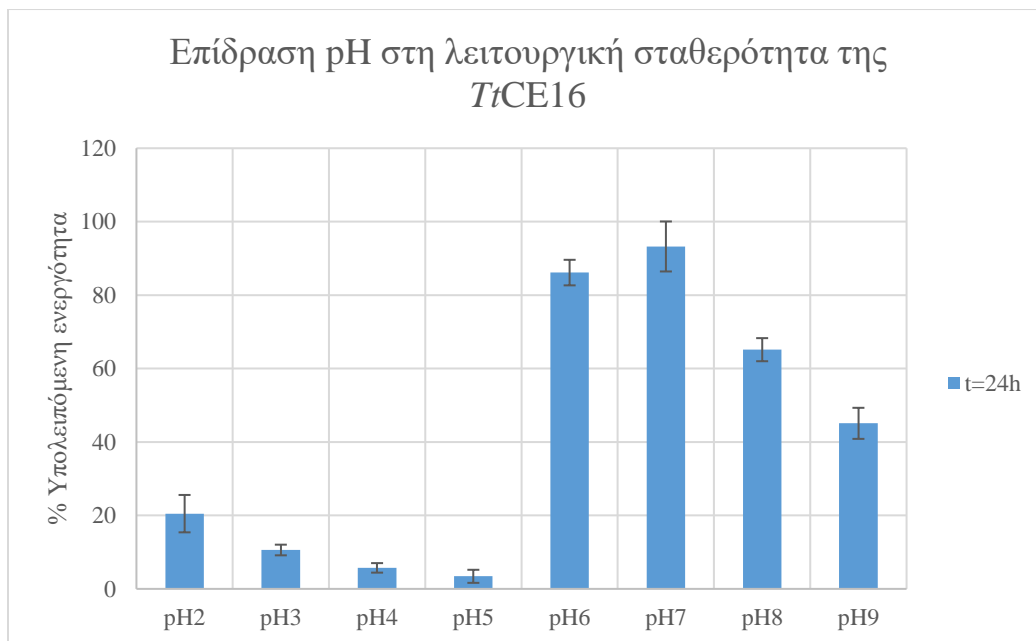
Διάγραμμα 3.2.1.2.1: Προσδιορισμός βέλτιστης τιμής θερμοκρασίας δράσης της TiCE16 ύστερα από υπολογισμούς της ενεργότητάς της σε εύρος θερμοκρασιών 4°C-70°C. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Όπως προκύπτει από το παραπάνω διάγραμμα, η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του συγκεκριμένου ενζύμου είναι οι 45 °C. Στις θερμοκρασίες 4 °C, 20 °C και 30 °C η ενεργότητα του ενζύμου βρίσκεται κάτω από το 50% της βέλτιστης τιμής ενώ στους 40°C οριακά το ξεπερνάει. Στους 50 °C φαίνεται πως η ενεργότητα του ενζύμου είναι στο 80%, ενώ για τις θερμοκρασίες 55 °C, 60°C και 65 °C η ενεργότητα κυμαίνεται γύρω στο 40%. Τέλος στους 70°C παρατηρείται απότομη πτώση της ενεργότητας η οποία αγγίζει μόλις το 10%.

3.2.2 Συνθήκες λειτουργικής σταθερότητας

3.2.2.1 Σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές υπολειπόμενης ενεργότητας οι οποίες υπολογίστηκαν ύστερα από την επώαση του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH για 24 ώρες στους 4°C όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.3.1. Ως 100% ενεργότητα λαμβάνεται η ενεργότητα που μετριέται στο χρόνο 0.



Διάγραμμα 3.2.2.1.1: Επίδραση του pH στην λειτουργική σταθερότητα της *TiCE16* μετά από επώαση 24 ωρών. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει πως η εστεράση του οξικού οξέος *TiCE16* διατηρεί την ενεργότητά της σε ελαφρώς όξινα έως ουδέτερα pH μετά το πέρας 24 ωρών. Σε πιο βασικά pH όπως στο 8 και στο 9 παρατηρείται πτώση της ενεργότητας στο 60% και 40% αντίστοιχα, ενώ σε πολύ όξινα pH (pH 2- pH 5) το ένζυμο δεν διατηρεί την ενεργότητά του και επομένως δεν είναι σταθερό σε αυτά τα pH ύστερα από 24 ώρες.

3.2.2.2 Θερμοκρασιακή σταθερότητα

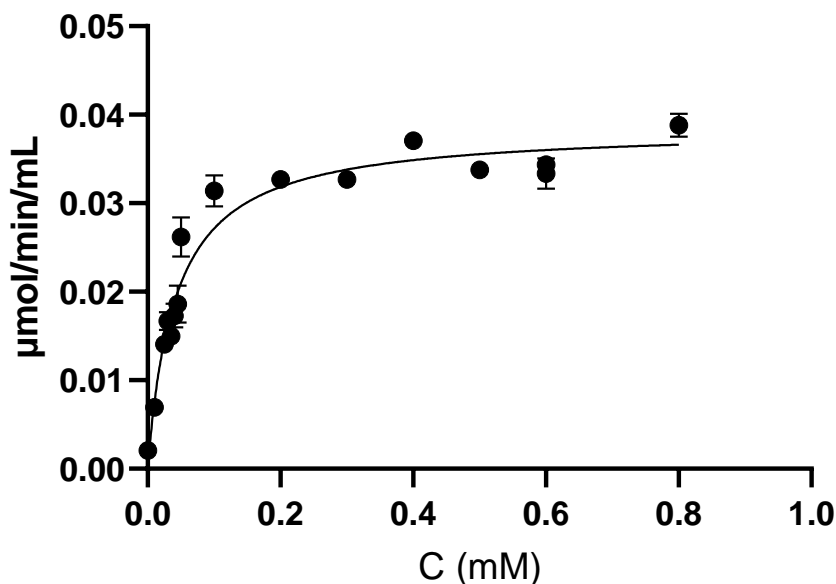
Από τα αποτελέσματα της μελέτης της λειτουργικής σταθερότητας της *TiCE16* σε θερμοκρασία 45°C μετά το πέρας 24 ωρών, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.2.2.3.2, προκύπτει πως το ένζυμο διατηρεί πάνω από το 80% της ενεργότητάς του στις συγκεκριμένες συνθήκες επώασης.

3.2.3 Κινητική μελέτη δράσης της *TiCE16*

3.2.3.1 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων Michaelis-Menten

Η προσαρμογή των δεδομένων των αντιδράσεων στην εξίσωση Michaelis-Menten και ο υπολογισμός των κινητικών σταθερών έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 για υπόστρωμα p-nitrophenyl acetate. Στη συνέχεια παρουσιάζεται το διάγραμμα στο οποίο απεικονίζεται η συγκέντρωση υποστρώματος συναρτήσει της ενεργότητας του ενζύμου.

Κινητική Michaelis-Menten της TtCE16 σε p-NP Acetate



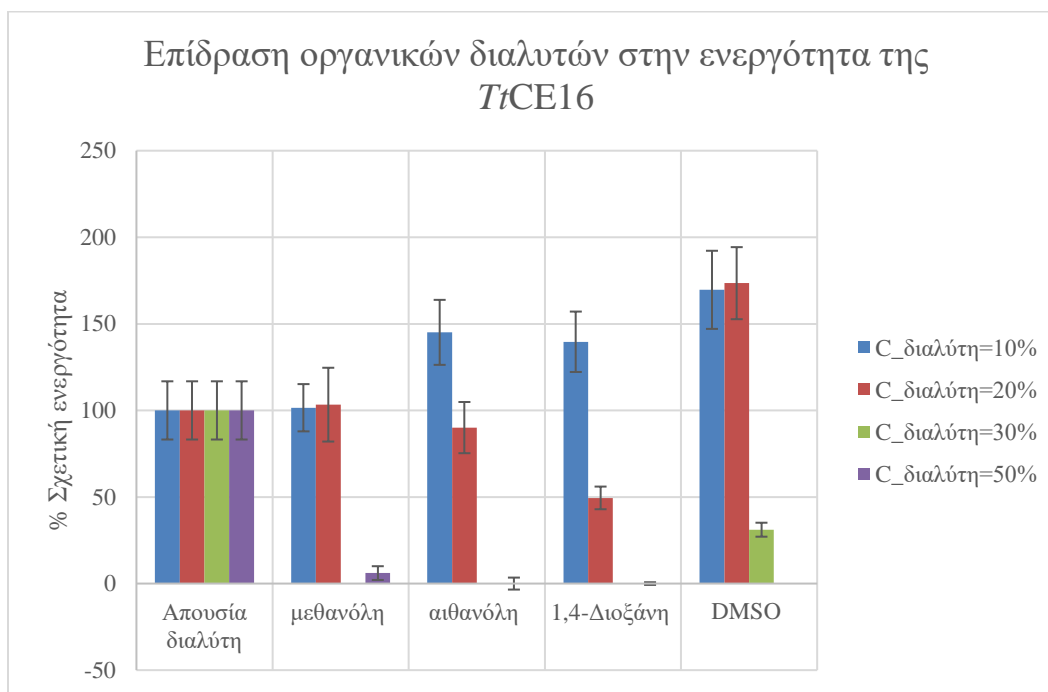
Διάγραμμα 3.2.3.1.1: Προσαρμογή δεδομένων στο κινητικό μοντέλο Michaelis-Menten για τη δράση TtCE16 σε υπόστρωμα pNPA ($R^2 = 0,95$)

Οι κινητικές παράμετροι σταθερά Michaelis-Menten (K_M) και μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης (u_{max}) του μοντέλου Michaelis-Menten που υπολογίστηκαν για την εστεράση TtCE16 ήταν $0,042 \pm 0,002$ mM και $0,038 \pm 0,000 \frac{\mu mol}{min \cdot ml}$ αντίστοιχα.

Από την τιμή της σταθεράς Michaelis-Menten (K_M), η οποία αποτελεί ένδειξη της συγγένειας που έχει το ένζυμο με το υπόστρωμα, φαίνεται πως η TtCE16 εμφανίζει μεγάλη συγγένεια με το υπόστρωμα p-NPA. Αυτή η παρατήρηση προκύπτει καθώς η τιμή της K_M είναι αρκετά μικρή, γεγονός που υποδηλώνει πως χρειάζεται μικρή τιμή υποστρώματος ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης να φτάσει το μισό της μέγιστης ταχύτητας.

3.2.4 Επίδραση οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα της TtCE16

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι τιμές της ενεργότητας του ενζύμου κατά την αντίδραση παρουσία τεσσάρων διαφορετικών οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, αιθανόλη, 1,4-διοξάνη και DMSO) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ως 100% ενεργότητα λαμβάνεται από την αντίδραση ελέγχου του ενζύμου, η οποία έγινε απουσία διαλυτών.

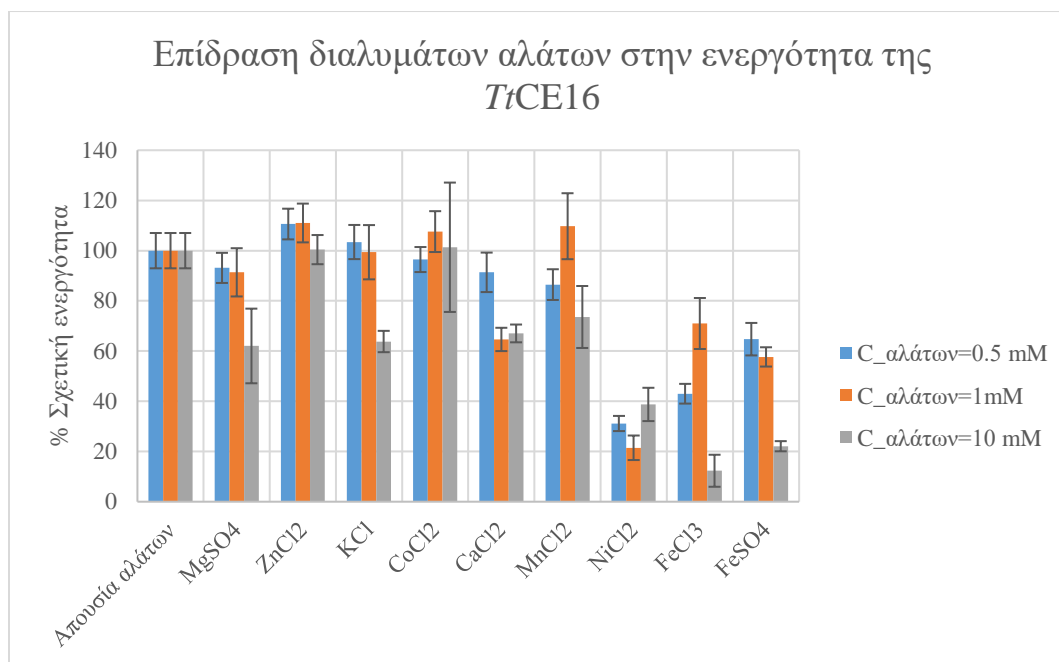


Διάγραμμα 3.2.4.1: Επίδραση τεσσάρων οργανικών διαλυτών (μεθανόλης, αιθανόλης, 1,4-διοξάνης και DMSO) στην ενεργότητα της *TiCE16*. Οι συγκεντρώσεις των διαλυτών που απεικονίζονται το διάγραμμα είναι 10%, 20% και 50% v/v για την μεθανόλη, την αιθανόλη, την 1,4-διοξάνη και 10%, 20% και 30% v/v για το DMSO. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Οι διαλύτες αιθανόλη, 1,4-διοξάνη και DMSO όταν βρίσκονται σε συγκέντρωση 10% v/v φαίνεται πως ενισχύουν τη δράση του ενζύμου, ενώ η μεθανόλη στην ίδια συγκέντρωση δεν προκαλεί κάποια επίδραση σε αυτό. Παρουσία μεθανόλης και αιθανόλης σε συγκέντρωση 20%, η *TiCE16* διατηρεί τη δράση της, ενώ στην ίδια συγκέντρωση η 1,4-διοξάνη παρεμποδίζει το ένζυμο, καθώς μειώνει την ενεργότητά του στο 50%. Αντίθετα, το DMSO σε αυτή τη συγκέντρωση φαίνεται να ενισχύει τη δράση του ενζύμου. Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (50% v/v) οι διαλύτες παρεμποδίζουν πλήρως τη δράση του ενζύμου. Σημειώνεται μάλιστα όταν ο διαλύτης DMSO χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη συγκέντρωση παρατηρήθηκε καθίζηση και ως εκ τούτου έγινε δοκιμή σε μικρότερη συγκέντρωση (30% v/v) στην οποία φαίνεται να παρεμποδίζει τη δράση του ενζύμου.

3.2.5 Επίδραση διαλυμάτων αλάτων στην ενεργότητα της *TiCE16*

Στο ακόλουθο διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές της ενεργότητας του ενζύμου κατά την αντίδραση παρουσία εννέα διαφορετικών διαλυμάτων αλάτων ($MgSO_4$, $ZnCl_2$, KCl , $CoCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $NiCl_2$, $FeCl_3$ και $FeSO_4$) τα οποία μελετήθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0,5 mM έως 10 mM. Ως 100% ενεργότητα θεωρείται αυτή που υπολογίστηκε από την αντίδραση ελέγχου του ενζύμου, η οποία έγινε απουσία διαλυμάτων αλάτων.



Διάγραμμα 3.2.5.1: Επίδραση αλάτων στην ενεργότητα της *TiCE16*. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων αλάτων που μελετήθηκαν ήταν 0.5 mM, 1 mM και 10 mM. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται στην επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα προκύπτει πως για χαμηλή συγκέντρωση των διαλυμάτων αλάτων (0,5 mM), η ενεργότητα του ενζύμου παραμένει πάνω από το 80% παρουσία των ιόντων Mg^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} και Mn^{2+} . Τα ιόντα Fe^{2+} , Fe^{3+} και Ni^{2+} φαίνεται να μειώνουν την ενεργότητα του ενζύμου στο 65%, 43% και 31% αντίστοιχα. Όταν η συγκέντρωση των διαλυμάτων αλάτων είναι 1 mM, παρουσία των ιόντων Mg^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , Co^{2+} και Mn^{2+} , το ένζυμο διατηρεί την ενεργότητά του. Αντίθετα, σημειώνεται πτώση της ενεργότητας του ενζύμου στο 70% και 60%, παρουσία ιόντων Fe^{3+} και Fe^{2+} αντίστοιχα. Τέλος, μεγάλη μείωση της ενεργότητας της *TiCE16* στο 20% παρατηρείται παρουσία ιόντων Ni^{2+} . Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αλάτων (10 mM), τα ιόντα Zn^{2+} και Co^{2+} φαίνεται πως δεν επηρεάζουν τη δράση του ενζύμου. Αντιθέτως, τα ιόντα Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} και Mn^{2+} προκαλούν μείωση της ενεργότητας της εστεράσης *TiCE16*, η οποία κυμαίνεται μεταξύ 60%-70%. Τέλος, αρκετά μεγάλη παρεμπόδιση στη δράση του ενζύμου εμφανίζουν τα ιόντα Ni^{2+} , Fe^{3+} και Fe^{2+} , καθώς παρατηρείται πτώση της ενεργότητας κάτω από το 40%, το 25% και το 15% αντίστοιχα.

3.2.6 Εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα

Από τις αντιδράσεις της εστεράσης του οξικού οξέος *TiCE16* με τα διάφορα υποστρώματα που εξετάστηκαν, όπου και προσδιορίστηκε η ενεργότητα της σε αυτά, προκύπτει πως το ένζυμο δεν είχε δράση στα υποστρώματα n-acetyl-D-galactosamine, n-acetyl-β-D-mannosamine, n-acetyl-L-phenylalanine ethyl ester, n-acetyl-L-phenylalanine και n-

acetyl-D-glucosamine. Αντίθετα, εμφάνισε δράση στα p-nitrophenyl acetate, p-nitrophenyl butyrate, p-nitrophenyl palmitate και 2-nitrophenyl acetate.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων ενεργότητας που είχε το ένζυμο στα υποστρώματα αυτά, εκφρασμένη σε $\frac{units}{mg \text{ ενζύμου}}$, καθώς και η τυπική απόκλιση αυτών.

Πίνακας 3.2.6.1: Ενεργότητα *TiCE16* σε υποστρώματα ολιγοσακχαριτών. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται στην επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Υπόστρωμα	Ενεργότητα ενζύμου ($\frac{units}{mg \text{ ενζύμου}}$)
p-nitrophenyl acetate	119,1±3,8
p-nitrophenyl butyrate	2,1±0,5
p-nitrophenyl palmitate	23,9±3,8
2-nitrophenyl acetate	22,6±2,0

Όσον αφορά τους πολυσακχαρίτες στους οποίους μελετήθηκε η δράση της *TiCE16*, παρατηρήθηκε πως το ένζυμο δεν εμφάνισε δράση σε ξυλοβιόζη και ξυλοεξάζη.

Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της επίδρασης του ενζύμου σε ακετυλιωμένη ξυλάνη η οποία υπέστη προηγουμένως κατεργασία με ξυλανάση της οικογένειας GH10. Μάλιστα, παρατηρήθηκε πως η εστεράση έχει καλύτερη δράση όταν χρησιμοποιήθηκε κατόπιν της κατεργασίας με την ξυλανάση σε σχέση με το μη υδρολυμένο πολυμερικό υπόστρωμα. Το γεγονός αυτό προκύπτει καθώς η ξυλανάση έκοψε το πολυμερικό υπόστρωμα σε ολιγοσακχαρίτες στους οποίους η εστεράση *TiCE16* δρα καλύτερα και πιο αποτελεσματικά.

Σε δείγματα ακετυλιωμένης ξυλάνης στα οποία έχει προηγηθεί κατεργασία με την ξυλανάση της οικογένειας GH10, παρατηρείται περίπου 74% ± 15% αύξηση στην απελευθέρωση του οξικού οξέος, συγκριτικά με τα δείγματα όπου η εστεράση δρα στο μη υδρολυμένο πολυμερές, κατά τη διάρκεια εικοσιτετράωρων αντιδράσεων.

3.3 Συνεργισμοί

3.3.1 Συνεργιστική δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης *TiAbf43* και δύο ξυλανασών (*TiXyn30A* και *E-XYLATM*) κατά την υδρόλυση φυσικών λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων

Κατά την μελέτη υδρόλυσης του φυσικού (προκατεργασμένου) υποστρώματος Α (πίνακας 2.2.3.1.1) δεν παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση των ενζύμων για την απελευθέρωση ξυλόζης και ξυλοβιόζης. Ωστόσο, φαίνεται πως η αραβινοφουρανοζιδάση *TiAbf43* δρα συνεργιστικά με την ξυλανάση *TiXyn30A*, όσον αφορά την απελευθέρωση αραβινόζης. Ο βαθμός συνεργιστισμού (DS) των δύο ενζύμων ήταν $5,0 \pm 2,3$. Σημειώνεται πως η τιμή αυτή καθώς και η τυπική απόκλιση προκύπτουν από επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

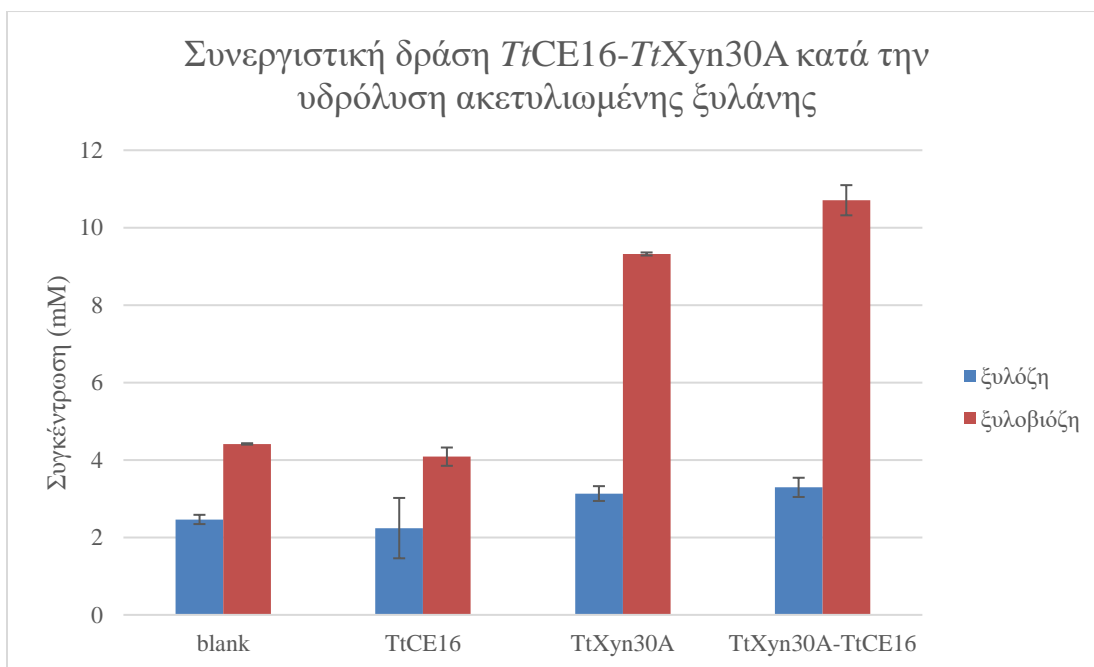
Με την ταυτόχρονη δράση των δύο αυτών ενζύμων παρατηρείται σημαντική αύξηση της αραβινόζης που απομακρύνεται, συγκριτικά με όταν η αραβινοφουρανοζιδάση *TiAbf43* δρα μόνη της. Φαίνεται πως η δράση του ενός ενζύμου δημιουργεί νέες θέσεις πρόσδεσης ώστε να δράσει το δεύτερο και το αντίστροφο.

Αναφορικά με το υπόστρωμα Β (πίνακας 2.2.3.1.1) παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση και των τριών ενζύμων (αραβινοφουρανοζιδάση *TiAbf43*, ξυλανάσες *TiXyn30A* και *E-XYLATM*) όταν αυτά δρουν ταυτόχρονα κατά την απελευθέρωση ξυλόζης αλλά και αραβινόζης. Ο βαθμός συνεργιστισμού (DS) των τριών αυτών ενζύμων ως προς την απελευθέρωση ξυλόζης αλλά και ως προς την αραβινόζη ήταν $1,4 \pm 0,2$. Σημειώνεται πως η τιμή αυτή καθώς και η τυπική απόκλιση βασίζονται στην επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

3.3.2 Συνεργιστική δράση της *TiCE16* και της ξυλανάσης *TiXyn30A* σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης

Κατά το πρώτο σετ πειραμάτων υδρόλυσης ακετυλιωμένης ξυλάνης πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση των προϊόντων της ξυλανάσης *TiXyn30A*, ξυλόζη και ξυλοβιόζη. Από τις πειραματικές μετρήσεις παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση της εστεράσης του οξικού οξέος *TiCE16* και της ξυλανάσης κατά την απελευθέρωση ξυλοβιόζης, κάτι το οποίο ωστόσο δε συνέβη κατά την απελευθέρωση ξυλόζης. Ο βαθμός συνεργιστισμού (DS) των δύο ενζύμων ως προς την απελευθέρωση ξυλοβιόζης ήταν $1,3 \pm 0,1$. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η τιμή αυτή καθώς και η τυπική απόκλιση βασίζονται στην επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται ένα γράφημα το οποίο απεικονίζει τη συγκέντρωση των σακχάρων ξυλόζη και ξυλοβιόζη που προκύπτει μετά από τη δράση της εστεράσης *TiCE16* και της ξυλανάσης *TiXyn30A*, όταν τα δύο ένζυμα δρουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, αλλά και τη συνεργιστική τους δράση ως προς την υδρόλυση της ακετυλιωμένης ξυλάνης.



Διάγραμμα 3.3.2.1: Συγκέντρωση σακχάρων (ξυλόζης και ξυλοβιόζης) μετά από υδρόλυση ακετυλιωμένης ξυλάνης από την εστεράση του οξικού οξέος *Ti*CE16 και την ξυλανάση *Ti*Xyn30A.

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει πως η δράση της ξυλανάσης ενισχύεται από την *Ti*CE16, η οποία απακετυλιώνοντας την ξυλάνη δημιουργεί νέες θέσεις ώστε να δράσει η ξυλανάση και να απελευθερώσει ξυλοβιόζη.

Στο δεύτερο σετ πειραμάτων υδρόλυσης ακετυλιωμένης ξυλάνης παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση της εστεράσης *Ti*CE16 και της ξυλανάσης *Ti*Xyn30A κατά την απελευθέρωση οξικού οξέος. Ο βαθμός συνεργισμού (DS) των δύο ενζύμων ως προς την απελευθέρωση οξικού οξέος ήταν $1,5 \pm 0,1$. Αναφέρεται εκ νέου πως η τιμή αυτή καθώς και η τυπική απόκλιση βασίζονται στην επεξεργασία τριπλών μετρήσεων.

Σημειώνεται πως η ξυλανάση ενισχύει τη δράση της εστεράσης *Ti*CE16 κόβοντας το πολυμερικό υπόστρωμα σε ολιγοσακχαρίτες στους οποίους η εστεράση μπορεί να δράσει καλύτερα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ
& ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4. Συζήτηση αποτελεσμάτων και συμπεράσματα

4.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43*

4.1.1 Βέλτιστες συνθήκες δράσης

Όπως προσδιορίστηκε από την πειραματική μελέτη, το βέλτιστο pH δράσης της *TtAbf43* είναι το pH 5 (Διάγραμμα 3.1.1.1.1) και η βέλτιστη θερμοκρασία οι 65 °C (Διάγραμμα 3.1.1.2.1). Όσον αφορά β-ξυλοζιδάσες της οικογένειας GH43 οι οποίες προέρχονται από μύκητες όπως ο *Rhizophlyctis rosea* (Huang et al., 2019) και ο *Neocallimastix californiae* (Stabel et al., 2021), αλλά και αραβινοφουρανοζιδάσες της ίδιας οικογένειας από τον *Humicola insolens Y1* (Yang et al., 2015) και τον *Penicillium chrysogenum* (Shinozaki et al., 2014), τα δύο πρώτα παρουσιάζουν βέλτιστο pH στην τιμή 7 και 6 αντίστοιχα, ενώ τα επόμενα σε pH 5. Επιπλέον, εμφανίζουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης σε θερμοκρασία 25°C, 32°C, 50°C και 35°C αντίστοιχα.

Ακόμη, πηγές που αναφέρονται σε πολυλειτουργικά ένζυμα με δράση β-ξυλοζιδάσης και α-L-αραβινοφουρανοζιδάσης που προέρχονται από βακτήρια όπως από το βακτήριο *Bacillus pumilus* (Yihan Liu et al., 2019), το *Clostridium sp* (T. Li et al., 2018) και το *Massilia sp.* (Xu et al., 2019) επισημαίνουν πως τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν βέλτιστο pH δράσης στην τιμή 7, 6 και 6,5 αντίστοιχα. Επίσης, η μέγιστη θερμοκρασία δράσης τους εντοπίζεται στους 30°C, 40°C και 50°C αντίστοιχα.

Παρατηρείται συνεπώς για τα ένζυμα της οικογένειας GH43 πως οι βέλτιστες συνθήκες δράσης εντοπίζονται σε ελαφρώς όξινα έως ουδέτερα pH (5-7), και σε θερμοκρασιακό εύρος 30°C-50°C, τιμές οι οποίες είναι μικρότερες σε σχέση με τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της *TtAbf43*.

Ωστόσο, επισημαίνεται πως οι βέλτιστες συνθήκες δράσης εξαρτώνται σε ένα βαθμό και από το υπόστρωμα το οποίο χρησιμοποιείται κατά τη δοκιμή ενεργότητας. Για αυτό το λόγο, στη σύγκριση βέλτιστων συνθηκών δράσης μεταξύ ενζύμων είναι σημαντικό οι δοκιμές ενεργότητας να έχουν γίνει χρησιμοποιώντας το ίδιο υπόστρωμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση κάτι τέτοιο δεν συνέβη καθώς κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το (o-nitrophenyl-xylopyranoside) o-NPX και κατά τις βιβλιογραφικές αναφορές το υπόστρωμα 4-nitrophenyl-xylopyranoside (pNPX) για όσα είχαν διπλή λειτουργία, και το 4-nitrophenyl arabinofuranoside (p-NPArf) για όσα ένζυμα είχαν κυρίως δράση αραβινοφουρανοζιδάσης.

4.1.2 Σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH

Το ένζυμο που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία (*TtAbf43*) μετά το πέρας μίας ώρας επώασης σε ένα εύρος pH 2-8 διατηρεί την ενεργότητά του πάνω από το 90%, ενώ στο pH 9 η ενεργότητα του ενζύμου βρίσκεται στο 77%.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η β-ξυλοζιδάση της οικογένειας GH43 η οποία προέρχεται από τον μύκητα *Rhizophlyctis rosea* (Huang et al., 2019) διατηρεί τη δράση της για τιμές pH 5-8 ύστερα από την επώαση του ενζύμου για μία ώρα. Η β-ξυλοζιδάση από τον μύκητα *Neocallimastix californiae* (Stabel et al., 2021) διατηρεί την ενεργότητά της για pH 5.5-7 μετά την παρέλευση του ίδιου χρόνου καθώς επίσης και η α-αραβινοφουρανοζιδάση από τον μύκητα *Humicola insolens Y1* (Yang et al., 2015) παραμένει σταθερή σε εύρος pH 4-8 ύστερα από επώαση μίας ώρας.

Η αραβινοφουρανοζιδάση της οικογένειας GH43 από τον μύκητα *Penicillium chrysogenum* (Shinozaki et al., 2014) διατηρεί πάνω από το 80% της ενεργότητάς της σε ένα εύρος τιμών pH 4-9 μετά από 16 ώρες επώασης. Όμοια αποτελέσματα προκύπτουν και για την *TtAbf43* μετά από τον ίδιο χρόνο επώασης.

Αναφορικά με τα βακτηριακής προέλευσης ένζυμα, η β-ξυλοζιδάση από το βακτήριο *Bacillus pumilus* (Yihan Liu et al., 2019) σημειώνεται πως διατηρεί πάνω από το 80% της ενεργότητάς της σε pH 7 και πάνω από το 30% σε pH 8 μετά από 6 ώρες επώασης. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της *TtAbf43* για την οποία μετά την παρέλευση 6 ωρών η ενεργότητα της βρίσκεται πάνω από το 80% για όλες τις μελετώμενες τιμές pH. Αντίστοιχο ένζυμο (β-ξυλοζιδάση) που παράγεται από το βακτήριο *Clostridium sp.* (T. Li et al., 2018) διατηρεί τη δράση του σε εύρος pH 6-9 μετά από 2 ώρες επώασης, όπως συμβαίνει και με την αραβινοφουρανοζιδάση *TtAbf43* στην οποία ύστερα από 2 ώρες επώασης η ενεργότητά της είναι πάνω από το 87% στα συγκεκριμένα pH. Τέλος, η δι-λειτουργική β-ξυλοζιδάση/α-L-αραβινοφουρανοζιδάση από το βακτήριο *Massilia sp.* (Xu et al., 2019) διατηρεί πάνω από το 80% της ενεργότητάς της για τιμές pH 5-10, γεγονός με το οποίο και πάλι συνάδουν τα αποτελέσματα του πειράματος.

Εκτός από τις ώρες επώασης που εξετάστηκαν στη βιβλιογραφία, στην παρούσα εργασία η επώαση του ενζύμου μελετήθηκε για 24 ώρες και βρέθηκε πως το ένζυμο διατηρεί πάνω από το 80% της ενεργότητάς του σε ένα εύρος τιμών pH 2-9 μετά το πέρας αυτού του διαστήματος. Μάλιστα, διατηρεί πάνω από το 94% της ενεργότητάς του στα pH 7 και 8 στον ίδιο χρόνο, δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν τη σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικά pH επώασης (Διάγραμμα 3.1.2.1.1).

4.1.3 Σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες

Σύμφωνα με τη μελέτη της β-ξυλοζιδάσης της οικογένειας GH43 που προέρχεται από τον μύκητα *Rhizophlyctis rosea* (Huang et al., 2019), παρατηρείται πως μετά από επώαση μίας ώρας στους 40°C η ενεργότητα βρίσκεται στο 72%. Οι Stabel et al. (2021) αναφέρουν πως επώαση μίας ώρας στους 30°C είχε ως αποτέλεσμα την πώση της ενεργότητας της β-ξυλοζιδάσης της οικογένειας GH43 από τον μύκητα *Neocallimastix californiae* στο 76%, στους 35°C η ενεργότητα πέφτει στο 52%, ενώ στους 40°C μειώνεται μόλις στο 20%. Επιπλέον, με βάση τη βιβλιογραφική πηγή των Yang et al., (2015) η αραβινοφουρανοζιδάση της οικογένειας GH43, *HiAbf43*, διατηρεί πάνω από το 40% της ενεργότητας της για επώαση μίας ώρας σε θερμοκρασία 45°C, ενώ για επώαση σε θερμοκρασίες 50°C και 55°C η ενεργότητα μειώνεται κάτω από το 20%. Τέλος, οι

Shinozaki et al., (2014) αναφέρουν πως μετά από επώαση μίας ώρας στους 30°C διατηρείται πάνω από το 90% της ενεργότητας της PcAbf43A, ενώ χάνει το 70% αυτής μετά από μία ώρα επώασης στους 40°C.

Σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες πηγές, η TtAbf43 διατηρεί πάνω από το 80% της ενεργότητάς της μετά από επώαση μίας ώρας σε θερμοκρασίες 4°C, 30°C, 40°C, 50°C και 60°C. Αντίστοιχα, η δι-λειτουργική β-ξυλοζιδάση/α-L-αραβινοφουρανοζιδάση η οποία προέρχεται από το βακτήριο *Massilia sp.* (Xu et al., 2019) διατηρεί την ενεργότητά της ύστερα από επώαση μίας ώρας στους 45°C και 50°C, γεγονός το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα της TtAbf43. Ωστόσο, μετά την επώαση μίας ώρας σε θερμοκρασίες 55°C και 60°C το ένζυμο έχει χάσει εντελώς την ενεργότητά του, κάτι το οποίο δεν ισχύει για την TtAbf43 η οποία για επώαση υπό αντίστοιχες συνθήκες διατηρεί πάνω από το 90% της δράσης της.

Επιπλέον, στην παρούσα εργασία η επώαση του ενζύμου μελετήθηκε για 24 ώρες και βρέθηκε πως η TtAbf43, διατηρεί την ενεργότητά της ύστερα από επώαση 24 ωρών στις θερμοκρασίες 4°C και 30°C. Σε θερμοκρασίες επώασης 40°C και 50°C η ενεργότητα πέφτει στο 77% και 85% αντίστοιχα για τον ίδιο χρόνο, ενώ για επώαση στους 60°C μετά το πέρας 24 ωρών η δράση του ενζύμου πέφτει κάτω από το 30% (Διάγραμμα 3.1.2.2.1). Μάλιστα, οι Thakur et al. (2020), οι οποίοι εξετάζουν μία α-L-αραβινοφουρανοζιδάση από το βακτήριο *Pseudopedobacter saltans*, αναφέρουν πως η ενεργότητα του ενζύμου μετά από επώαση 24 ωρών στους 50°C είχε μειωθεί στο 50% της μέγιστης τιμής της, γεγονός το οποίο έρχεται σε αντίθεση με την TtAbf43 η οποία στις ίδιες συνθήκες είχε διατηρήσει την ενεργότητά της πάνω από το 85%. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν την θερμοκρασιακή σταθερότητα της TtAbf43, η οποία δίνει το πλεονέκτημα στο ένζυμο να μπορεί να αξιοποιηθεί σε βιοτεχνολογικές διεργασίες.

4.1.4 Κινητική μελέτη δράσης της TtAbf43

Στον πίνακα που ακολουθεί οι κινητικές σταθερές του μοντέλου Michaelis-Menten, K_M και v_{max} , αραβινοφουρανοζιδασών της οικογένειας GH43 που προέρχονται από το βακτήριο *Pseudopedobacter saltans* (Thakur et al., 2020) και το *Clostridium thermocellum* (Ahmed et al., 2013) συγκρίνονται με τις αντίστοιχες τιμές της TtAbf43 (η οποία προέρχεται από τον μύκητα *Thermothelomyces thermophilus*, όπως έχει προαναφερθεί) για υποστρώματα WA και RA.

Πίνακας 4.1.4.1: Τιμές κινητικών παραμέτρων K_M και v_{max} αραβινοφουρανοζιδασών της οικογένειας GH43 που προέρχονται από το βακτήριο *Pseudopedobacter saltans*, το *Clostridium thermocellum* καθώς και από τον μύκητα *Thermothelomyces thermophilus* (TtAbf43) για υποστρώματα WA και RA.

Μικροοργανισμός	K_M ($\frac{mg}{ml}$)	v_{max} ($\frac{U}{mg}$)	K_M ($\frac{mg}{ml}$)	v_{max} ($\frac{U}{mg}$)
	WA		RA	
<i>Pseudopedobacter saltans</i>	3,04±0,11	99,3±1,9	3,02±0,12	102±2,1
<i>Clostridium thermocellum</i>	0,072±0,003	-	0,082±0,005	-

<i>Thermothelomyces thermophilus</i>	5,78±0,60	178,58±6,7	3,62±0,67	133,6±7,8
--------------------------------------	-----------	------------	-----------	-----------

Καθώς η τιμή της K_M υποδεικνύει την συγγένεια του υποστρώματος με το ένζυμο σημειώνεται πως οι τιμές σταθεράς Michaelis-Menten (K_M) της *TtAbf43* θεωρούνται αρκετά υψηλές, με αποτέλεσμα το ένζυμο να μην έχει πολύ καλή συγγένεια με τα υποστρώματα που εξετάστηκαν και κυρίως με την αραβινοξυλάνη σιταριού (WA). Το γεγονός αυτό προκύπτει καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η σταθερά K_M τόσο μεγαλύτερη τιμή υποστρώματος απαιτείται ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης να φτάσει τη μέγιστη ταχύτητα.

Από τον πίνακα 4.1.4.1 φαίνεται πως η σταθερά K_M της *TtAbf43* σε υπόστρωμα WA και RA είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτή της αραβινοφουρανοζιδάσης *PsGH43_12* (Thakur et al., 2020) συμπεραίνοντας πως υπάρχουν ένζυμα που αλληλεπιδρούν παρόμοια με την *TtAbf43* στα συγκεκριμένα υποστρώματα. Ακόμη, αναφέρεται πως το ένζυμο της προαναφερθείσας βιβλιογραφίας αλληλεπιδρά καλύτερα με την WA σε σχέση με τη δράση που έχει η *TtAbf43* στο εν λόγω υπόστρωμα με βάση τη τιμή της K_M . Ωστόσο η σταθερά K_M των ενζύμων *TtAbf43* και *PsGH43_12* και για τα δύο εξεταζόμενα υποστρώματα διαφέρει σημαντικά από τα αποτελέσματα της πηγής Ahmed et al. (2013), για την αραβινοφουρανοζιδάση *Ct43Araf* η οποία αλληλεπιδρά καλύτερα και με τα δύο υποστρώματα, συγκριτικά με τα δύο άλλα ένζυμα που αναφέρθηκαν.

Σημειώνεται πως ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου που μελετάται σε υποστρώματα αραβινοξυλάνης σιταριού και σίκαλης θεωρείται δύσκολος κυρίως στις υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος καθώς τα υποστρώματα αυτά σε αυτές τις συγκεντρώσεις έχουν μία πολύ παχύρρευστη μορφή. (Rasmussen et al., 2012)

Ιδιαίτερα σύνηθες είναι να παρουσιάζεται στη βιβλιογραφία η διεξαγωγή κινητικής μελέτης σε συνθετικό υπόστρωμα 4-nitrophenyl-xylopyranoside (p-NPX). Για παράδειγμα, για τις β-ξυλοζιδάσες της οικογένειας GH43 οι οποίες προέρχονται από τους μύκητες *Neocallimastix californiae* (Stabel et al., 2021) και *Rhizophlyctis rosea* (Huang et al., 2019), οι κινητικές παράμετροι K_M και u_{max} είναι ίσες με $0,108 \frac{mg}{ml}$ και $46,97 \frac{U}{mg}$ και $0,201 \frac{mg}{ml}$ και $34,61 \frac{U}{mg}$ αντίστοιχα, εκδηλώνοντας καλή αλληλεπίδραση με το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται κατά τη μελέτη κινητικής της *TtAbf43* στο τεχνητό υπόστρωμα o-NPX. Πιο συγκεκριμένα, σε αυτό το υπόστρωμα δεν επετεύχθη ο σχηματισμός πλατό ακόμη και όταν οι συγκεντρώσεις ήταν αρκετά υψηλές με αποτέλεσμα το μοντέλο που προέκυψε να μην προσομοιάζει αυτό των Michaelis-Menten. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι το ένζυμο *TtAbf43* δεν εμφανίζει την κύρια δράση του στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

4.1.5 Επίδραση οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα της *TtAbf43*

Η παρουσία οργανικών διαλυτών σε ενζυμικά συστήματα επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη δράση και τη σταθερότητα ενός ενζύμου. Για τα ένζυμα της οικογένειας GH43

συγκεκριμένα, οι Matsuzawa et al. (2015) αναφέρουν πως οργανικοί διαλύτες όπως η αιθανόλη και το DMSO προκαλούν σημαντική μείωση της ενεργότητας μίας δι-λειτουργικής β-ξυλοζιδάσης/α-L-αραβινοφουρανοζιδάσης της οικογένειας GH43. Πιο συγκεκριμένα, η αιθανόλη όταν βρίσκεται σε περιεκτικότητα 10% v/v μειώνει την ενεργότητα του ενζύμου στο 25%, ενώ όταν η περιεκτικότητά της είναι 25%, παρατηρείται πτώση της ενεργότητας του ενζύμου στο 8%. Αντίστοιχα το DMSO όταν βρίσκεται σε περιεκτικότητα 10% μειώνει την ενεργότητα του ενζύμου στο 58%, ενώ σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (25%), η ενεργότητα του ενζύμου φτάνει στο 9%.

Τα παραπάνω έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της επίδρασης των συγκεκριμένων διαλυτών στην *TtAbf43*, διότι σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.1.4.1, όταν οι οργανικοί διαλύτες αιθανόλη και DMSO βρίσκονται σε συγκέντρωση 10% ενισχύουν τη δράση του ενζύμου. Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, 20%, τιμή κοντινή με αυτή της βιβλιογραφίας, παρατηρήθηκε πτώση της ενεργότητας στο 80% παρουσία αιθανόλης, ενώ στην ίδια συγκέντρωση το DMSO φαίνεται και πάλι να ενισχύει τη δράση του ενζύμου.

Επιπλέον, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση δύο ακόμη οργανικών διαλυτών, της μεθανόλης και της 1,4-διοξάνης στη δράση της *TtAbf43* ωστόσο δεν βρέθηκε σχετικός χαρακτηρισμός στη βιβλιογραφία. Οι συγκεκριμένοι διαλύτες όταν βρίσκονται σε συγκέντρωση 10% φαίνεται να ενισχύουν τη δράση του ενζύμου, ενώ σε συγκέντρωση 20% προκαλούν παρεμπόδιση. Μάλιστα, η 1,4-διοξάνη μειώνει την ενεργότητα του ενζύμου στο 80% ενώ η μεθανόλη στο 60%. Ακόμη, όλοι οι προαναφερθέντες οργανικοί διαλύτες εξετάστηκαν και σε υψηλότερη συγκέντρωση (45%) κατά την οποία παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στη δράση του ενζύμου, αφού οι τιμές της ενεργότητάς του κυμαίνονταν μεταξύ 10%-20%.

4.1.6 Επίδραση διαλυμάτων αλάτων στην ενεργότητα της *TtAbf43*

Η επίδραση αλάτων στη δράση των ενζύμων της οικογένειας GH43 φαίνεται από την βιβλιογραφία να ποικίλει, άλλοτε προκαλώντας αύξηση και άλλοτε απώλεια ενεργότητας. Σύμφωνα με τη δημοσίευση των Agrawal et al. (2021) η δράση του δι-λειτουργικού ενζύμου β-ξυλοζιδάσης/α-L-αραβινοφουρανοζιδάσης της οικογένειας GH43 προερχόμενου από τον μύκητα *Scytalidium thermophilum* δεν ενισχύθηκε παρουσία μεταλλικών ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) και κοβαλτίου (Co^{2+}) τα οποία βρίσκονταν σε συγκέντρωση 5 mM. Ωστόσο, τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}), χαλκού (Cu^{2+}) και ψευδαργύρου (Zn^{2+}) στην ίδια συγκέντρωση είχαν σημαντική επίδραση στην ενζυμική ενεργότητα καθώς παρατηρήθηκε απώλεια αυτής κατά 60%.

Επιπρόσθετα, η πηγή των Stabel et al. (2021) αναφέρει πως η δράση μίας β-ξυλοζιδάσης από τον μύκητα *Neocallimastix californiae* δεν εξαρτάται από τα μεταλλικά ιόντα που εξετάστηκαν σε συγκέντρωση 1 mM και 10 mM. Το μόνο που επισημαίνει είναι μία πτώση της ενεργότητας στο 70% ύστερα από την επίδραση ιόντων κοβαλτίου (Co^{2+}) συγκέντρωσης 1mM στο ένζυμο, ενώ σε συγκέντρωση 10 mM το αντίστοιχο ιόν προκάλεσε μικρότερη πτώση στην ενεργότητα. Οι Matsuzawa et al. (2015) αναφέρουν πως τα ιόντα μαγγανίου (Mn^{2+}) και ασβεστίου (Ca^{2+}) συνέβαλαν στην ενίσχυση της δράσης του ενζύμου σε 1 mM και 5 mM MnCl και 0,01 mM και 0,1 mM CaCl_2 και του CaSO_4 .

Ακόμη, διάλυμα $ZnSO_4$ και $CuSO_4$ σε συγκεντρώσεις 1 mM και 5 mM προκάλεσαν πολύ μεγάλη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας, διάλυμα $FeSO_4$ στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας περίπου στο 65% ενώ διάλυμα $MgCl_2$ δε φαίνεται να επηρέασε πολύ τη δράση του ενζύμου.

Όσον αφορά αντίστοιχο με το προς μελέτη ένζυμο (αραβινοφουρανοζιδάση της οικογένειας GH43) το οποίο ωστόσο είναι βακτηριακής προέλευσης (Thakur et al., 2020), η παρουσία ιόντων μαγνησίου, ασβεστίου και νατρίου σε συγκέντρωση 10 mM ενίσχυσε τη δράση του ενζύμου κατά 54%, 27% και 15% αντίστοιχα. Αντιθέτως, μείωση της ενεργότητας του ενζύμου παρατηρείται παρουσία ιόντων τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}), κοβαλτίου (Co^{2+}), ψευδαργύρου (Zn^{2+}), χαλκού (Cu^{2+}) και νικελίου (Ni^{2+}). Παρόμοια επίδραση από τα αντίστοιχα μεταλλικά ιόντα εμφανίζει και η α -αραβινοφουρανοζιδάση από το βακτήριο *Clostridium thermocellum* (Ahmed et al., 2013).

Σχετικά με την αραβινοφουρανοζιδάση *TtAbf43*, τα διαλύματα αλάτων που εξετάστηκαν στην πλειονότητά τους δεν είχαν επίδραση στη δράση του ενζύμου, όταν βρίσκονταν σε συγκέντρωση 0,5 mM. Εξαιρέση αποτελούν τα ιόντα Mn^{2+} και Fe^{2+} . Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από το Διάγραμμα 3.1.5.1, τα μεν πρώτα ενισχύουν τη δράση του ενζύμου, ενώ τα δεύτερα την παρεμποδίζουν με την ενεργότητα να φτάνει το 60%. Στη συνέχεια, αναφορικά με τη μελέτη των διαλυμάτων αλάτων σε υψηλότερη συγκέντρωση (1 mM), φαίνεται να μην προκαλούν κάποια επίδραση στη δράση του ενζύμου, με εξαίρεση να αποτελούν τα άλατα $FeCl_3$ και $FeSO_4$ τα οποία ελαφρώς βοηθούν τη δράση.

Επιπρόσθετα, όταν τα άλατα $MgSO_4$ και $MnCl_2$ βρίσκονται σε συγκέντρωση 10mM, το ένζυμο διατηρεί την ενεργότητά του. Μικρή πτώση αυτής παρατηρείται παρουσία των αλάτων KCl και $CaCl_2$, ενώ μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιούνται τα άλατα $ZnCl_2$ και $NiCl_2$, με την ενεργότητα να πέφτει στο 75% και 70% αντίστοιχα. Αξίζει να αναφερθεί πως ορισμένα άλατα ($CoCl_2$, $FeCl_3$ και $FeSO_4$) παρουσίασαν καθίζηση όταν μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη συγκέντρωση. Εξαιτίας αυτού έγινε δοκιμή εκ νέου σε μικρότερη συγκέντρωση (5mM για τα $CoCl_2$ και $FeCl_3$ και 2mM για το $FeSO_4$) στην οποία παρουσία των $CoCl_2$ και $FeSO_4$ φαίνεται το ένζυμο να διατηρεί την ενεργότητά του ενώ με το $FeCl_3$ η δράση της *TtAbf43* παρεμποδίζεται και η ενεργότητα πέφτει στο 40%.

4.1.7 Εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα

Τα υποστρώματα ως προς τα οποία το ένζυμο δεν παρουσίασε δράση παρουσιάζονται στην παράγραφο 3.1.6. Σύμφωνα με το άρθρο των Agrawal et al. (2021) μία β -ξυλοζιδάση από το μύκητα *Scytalidium thermophilum* είχε ενεργότητα σε υπόστρωμα p-nitrophenyl-xylopyranoside και σε p-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside όπως συμβαίνει και με το ένζυμο που μελετάται στην παρούσα εργασία. Και τα δύο ένζυμα δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτη τιμή ενεργότητας για τα υποστρώματα p-NP- α -D-galactopyranoside, p-NP- β -D-galactopyranoside, p-NP- β -D-glucopyranoside και p-NP- β -D-cellobioside. Ωστόσο, το ένζυμο που εξετάζει η βιβλιογραφία δεν εμφάνισε ενεργότητα σε πολυμερικά υποστρώματα ξυλάνης, σε αντίθεση με την *TtAbf43*, η οποία όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 3.1.6.2 έχει ενεργότητα σε αραβινοξυλάνη σιταριού (διαλυτή και αδιάλυτη) και αραβινοξυλάνη σίκαλης. Ούτε το ένζυμο που αναφέρεται στην πηγή αλλά ούτε και η

TtAbf43 εμφάνισαν ενεργότητα στους πολυσακχαρίτες λιχενάνη, καθαρή κυτταρίνη και ξυλογλυκάνη.

4.1.8 Mode of action *TtAbf43* σε υποστρώματα WA και RA

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική πηγή (Thakur et al., 2020) το προϊόν υδρόλυσης της RA ύστερα από δράση του ενζύμου μελετήθηκε με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και προέκυψε πως το προϊόν αντιστοιχεί σε αραβινόζη, γεγονός που διαβεβαιώνει πως το συγκεκριμένο ένζυμο υδρολύει μόνο τις πλευρικές αλυσίδες της αραβινοξυλάνης απελευθερώνοντας αραβινόζη. Όμοια διαδικασία ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης έλαβε χώρα για το ένζυμο που μελετάται στην παρούσα εργασία (*TtAbf43*). Από τη μελέτη του τρόπου δράσης της αραβινοφουρανοζιδάσης *PsGH43_12* που αναφέρει η πηγή, βρέθηκε πως μπορεί να απομακρύνει τόσο τις μονές όσο και τις διπλές υποκαταστάσεις αραβινόζης δρώντας είτε στη θέση 2 είτε στη θέση 3 (είτε και στις δύο) της ξυλόζης.

Για την εύρεση του μηχανισμού δράσης της *TtAbf43* πραγματοποιήθηκε σύγκριση της δράσης της με δύο εμπορικές αραβινοφουρανοζιδάσες. Αρχικά, συγκρίνοντας τη δράση της *TtAbf43* με αυτή της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης E-AFAM2 (όπως φαίνεται στον πίνακα 3.1.7.2) η οποία απομακρύνει την O-3 υποκατάσταση από ξυλόζες με διπλές υποκαταστάσεις αραβινόζης, βρέθηκε πως το ποσοστό υδρόλυσης αραβινόζης σε υποστρώματα WA και RA είναι της ίδιας τάξης μεγέθους για τα δύο ένζυμα, με την *TtAbf43* να εμφανίζει οριακά μεγαλύτερα ποσοστά. Επιπλέον, παρατηρείται πως όταν τα δύο ένζυμα χρησιμοποιούνται διαδοχικά, το ποσοστό υδρόλυσης αραβινόζης είναι σχεδόν το ίδιο με αυτό που απελευθερώνεται όταν η *TtAbf43* δρα μόνη της. Συμπεραίνεται λοιπόν, πως το εμπορικό ένζυμο E-AFAM2 δεν προσθέτει κάποια επιπλέον δράση και επομένως γίνεται αντιληπτό πως η *TtAbf43* έχει παρόμοια δράση με την E-AFAM2, οπότε και απομακρύνει την O-3 υποκατάσταση αραβινόζης από δι-υποκατεστημένα μόρια ξυλόζης.

Για επιβεβαίωση του προαναφερθέντος ισχυρισμού, η δράση της *TtAbf43* συγκρίνεται και με την εμπορική αραβινοφουρανοζιδάση E-AFASE η οποία απομακρύνει μονές υποκαταστάσεις αραβινόζης από τον σκελετό της ξυλόζης. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 3.1.7.1, όταν τα δύο ένζυμα δρουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο απελευθερώνουν το ίδιο ποσοστό αραβινόζης σε υπόστρωμα WA, ενώ η *TtAbf43* υδρολύει μικρότερο ποσοστό αραβινόζης συγκριτικά με την E-AFASE σε υπόστρωμα RA.

Ωστόσο, όταν τα ένζυμα δρουν διαδοχικά σημειώνεται συνεργισμός και αυτό συμβαίνει και για τα δύο μελετώμενα υποστρώματα. Μάλιστα, στην περίπτωση που η *TtAbf43* δρα πρώτη πάνω στο υπόστρωμα, οι διπλές υποκαταστάσεις μετατρέπονται σε μονές O-2 υποκαταστάσεις αραβινόζης, οι οποίες αποτελούν εκ νέου υπόστρωμα για την E-AFASE. Ως εκ τούτου η *TtAbf43* ενισχύει τη δράση της E-AFASE με αποτέλεσμα να παρατηρείται υδρόλυση της αραβινόζης σε ποσοστό πάνω από το 80% για την WA και πάνω από το 75% για την RA. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιείται πρώτα η E-AFASE κάθε ένζυμο απομακρύνει αραβινόζη ανεξάρτητα από το άλλο, στοχεύοντας σε διαφορετικές θέσεις της αραβινοξυλάνης, με αποτέλεσμα το συνολικό ποσοστό υδρολυμένης αραβινόζης να ισούται με το άθροισμά των ποσοστών από τις επιμέρους δράσεις των ενζύμων.

Συνολικά προκύπτει πως η *TtAbf43* ανήκει στη δεύτερη ομάδα αραβινοφουρανοζιδασών όπως αναγράφεται στην παράγραφο 1.4.2.4.1, στις αραβινοφουρανοζιδάσες δηλαδή που δρουν σε δι-υποκατεστημένες ξυλόζες απελευθερώνοντας τον α-(1→3) δεσμό αραβινόζης, ενώ αφήνουν τον α-(1→2) δεσμό στην κύρια αλυσίδα της ξυλάνης.

4.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της εστεράσης του οξικού οξέος *TtCE16*

4.2.1 Βέλτιστες συνθήκες δράσης

Οι βέλτιστες συνθήκες δράσης των εστερασών του οξικού οξέος συνήθως κυμαίνονται σε ουδέτερα και ελαφρώς αλκαλικά περιβάλλοντα και σχετικά ήπιες θερμοκρασίες δράσης στο εύρος 40-50 °C. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική πηγή Kato et al. (2021) η εστεράση του οξικού οξέος *AoAXEC* από τον μύκητα *Aspergillus oryzae* είχε βέλτιστο pH δράσης στην τιμή 7. Παρόμοια αποτελέσματα επιδεικνύουν και οι εστεράσες του οξικού οξέος *AfAXE*, *AlAXEA* και *AxeA* οι οποίες προέρχονται από τους μύκητες *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus luchuensis* και *Podospora anserina* αντίστοιχα (X. Li et al., 2020). Η βέλτιστη θερμοκρασία της εστεράσης *AoAXEC* (Kato et al., 2021) είναι οι 50°C, ενώ στην βιβλιογραφική αναφορά (X. Li et al., 2020) σημειώνεται πως εστεράσες του οξικού οξέος *AfAXE*, *AlAXEA* και *AxeA* εμφανίζουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 37°C, 45°C και 40°C αντίστοιχα.

Συνολικά, οι βέλτιστες συνθήκες δράσης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για μυκητιακές εστεράσες του οξικού οξέος μπορούν να θεωρηθούν παρόμοιες με αυτές του ενζύμου *TtCE16* ($pH_{\text{optimum}} = 6$, $T_{\text{optimum}} = 45^{\circ}\text{C}$) που μελετάται στην παρούσα διπλωματική εργασία (Διάγραμμα 3.2.1.1.1, Διάγραμμα 3.2.1.2.1).

4.2.2 Σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH και διαφορετικές θερμοκρασίες

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα η *TtCE16* επιδεικνύει μια καλή σταθερότητα αναφορικά με τα διάφορα θερμοκρασιακά περιβάλλοντα και τις συνθήκες pH. Η εστεράση του οξικού οξέος της οικογένειας CE16 από τον μύκητα *Myceliophthora thermophila*, όπως περιγράφεται από τους Mai-Gisondi et al. (2017) διατηρεί πάνω από το 90% της ενεργότητάς της σε pH 6 μετά από επώαση 24 ωρών. Ομοίως, η *TtCE16* όπως παρατηρείται από το Διάγραμμα 3.2.2.1.1, ύστερα από επώαση στις προαναφερθείσες συνθήκες διατηρεί την ενεργότητά της στο 86%.

Ωστόσο, στην παρούσα εργασία δεν μελετήθηκε η επίδραση μόνο του pH 6 (το οποίο αποτελεί τη βέλτιστη τιμή pH του ενζύμου) στη λειτουργική σταθερότητα του ενζύμου, αλλά ένα εύρος τιμών pH το οποίο κυμαινόταν από το pH 2 έως το pH 9 και για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Πιο συγκεκριμένα, στα όξινα pH (2-5) η *TtCE16* δεν παραμένει σταθερή μετά το πέρας 24 ωρών, καθώς παρατηρείται πολύ μεγάλη πτώση της ενεργότητας σε τιμές 20% για το pH 2, αλλά και τιμές κάτω από 10% για τα pH 3, 4 και 5. Αντιθέτως, σε ελαφρώς όξινα (pH 6) και ουδέτερα (pH 7) pH, το ένζυμο φαίνεται να διατηρείται σταθερό για το χρονικό διάστημα των 24 ωρών, ενώ σε βασικά pH όπως στο pH 8 και 9 παρατηρείται μείωση της ενεργότητας του ενζύμου στο 65% και 45% αντίστοιχα (Διάγραμμα 3.2.2.1.1).

Η θερμοκρασιακή σταθερότητα του ενζύμου AοAXEC μελετήθηκε κατόπιν επώασης σε θερμοκρασίες 50°C και 60°C για διάστημα τεσσάρων ωρών (Kato et al., 2021). Παρατηρείται πως κατά την πρώτη ώρα επώασης στους 50°C η ενεργότητα του ενζύμου παραμένει πάνω από το 80% ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους η ενεργότητα μειώνεται και στις 4 ώρες φτάνει το 40%. Στους 60°C φαίνεται πως το ένζυμο δεν είναι σταθερό καθώς εντός της πρώτης ώρας επώασης του ενζύμου η ενεργότητά του πέφτει στο 20% και στις 4 ώρες σχεδόν μηδενίζεται. Τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία έρχονται σε αντίθεση με τα πειραματικά καθώς βρέθηκε πως η εστεράση TrCE16 διατηρεί πάνω από το 80% της ενεργότητάς της ύστερα από επώαση 24 ωρών σε θερμοκρασία 45 °C.

4.2.3 Κινητική μελέτη δράσης της TrCE16

Οι παράμετροι K_M και u_{max} της εστεράσης του οξικού οξέος TrCE16 για τη δράση της σε υπόστρωμα p-NP-acetate παρουσιάζονται στην παράγραφο 3.2.3.1. Ωστόσο, μίας και δεν βρέθηκε βιβλιογραφία που να αφορά την μελέτη της κινητικής παρόμοιου ενζύμου στο ίδιο υπόστρωμα, πραγματοποιείται σύγκριση με αντίστοιχες παραμέτρους της εστεράσης του οξικού οξέος TrCE16 από τον μύκητα *Trichoderma reesei* σε υποστρώματα τα οποία αποτελούν μονοακετυλιωμένα παράγωγα του 4-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside (Biely, 2012).

Πίνακας 4.2.3.1: Τιμές της σταθεράς Michaelis-Menten K_M κατά την υδρόλυση μονοακετυλιωμένων παραγώγων του 4-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside από εστεράση του οξικού οξέος της οικογένειας CE16 (TrCE16)

Υπόστρωμα	K_M (mM)
2-Ac-NPh-Xylp	1,1
3-Ac-NPh-Xylp	0,60
4-Ac-NPh-Xylp	0,68

Οι συγκεκριμένες τιμές K_M είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτή που προκύπτει για την TrCE16 ωστόσο η σύγκριση δεν μπορεί να είναι απολύτως ορθή εφόσον πρόκειται για διαφορετικά υποστρώματα. Ωστόσο, αποτελεί μία ένδειξη των τιμών K_M που προκύπτουν από τη δράση μίας εστεράσης του οξικού οξέος της οικογένειας CE16.

Εντούτοις, παρατίθενται κινητικές παράμετροι που αφορούν το υπόστρωμα 4-νιτροφαίνυλ-οξικό (p-nitrophenyl acetate), όμως στη βιβλιογραφία κάτι τέτοιο μελετάται μόνο για εστεράσες μυκητιακής προέλευσης που ανήκουν σε άλλες οικογένειες από την CE16, όπως η εστεράση του οξικού οξέος που ανήκει στην οικογένεια CE1 (Wu et al., 2017). Για το εν λόγω ένζυμο η τιμή της σταθεράς Michaelis-Menten K_M βρέθηκε 7,24 mM. Η συγκεκριμένη τιμή διαφέρει σημαντικά από την αντίστοιχη της TrCE16 (0,042 mM), η οποία φαίνεται να έχει καλύτερη συγγένεια με το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

4.2.4 Επίδραση οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα της *TiCE16*

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.2.4.1, η δράση της *TiCE16* φαίνεται να διατηρείται παρουσία οργανικών διαλυτών. Όταν η συγκέντρωση των μελετώμενων οργανικών διαλυτών είναι σχετικά χαμηλή (10%), η μεθανόλη φαίνεται πως δεν έχει επίδραση στη δράση του ενζύμου, ενώ η αιθανόλη, η 1,4-διοξάνη και το DMSO ενισχύουν αρκετά τη δράση της εστεράσης *TiCE16*. Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (20%), δεν παρατηρείται επίδραση από τη μεθανόλη και την αιθανόλη. Αντίθετα, το DMSO φαίνεται να ενισχύει τη δράση του ενζύμου, ενώ η 1,4-διοξάνη να την παρεμποδίζει καθώς η ενεργότητα μειώνεται στο 50%. Όταν η συγκέντρωση των οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, αιθανόλη και 1,4-διοξάνη) ήταν 50% παρατηρήθηκε πλήρης παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου. Τέλος, το DMSO όταν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 50% παρατηρήθηκε καθίζηση του ενζύμου και έτσι δοκιμάστηκε μικρότερη συγκέντρωση (30%) στην οποία η δράση του ενζύμου παρεμποδίζεται καθώς παρατηρείται πτώση της ενεργότητας στο 30%.

Σύμφωνα με τους Gu et al. (2015) η εστεράση EstGX2 διατηρεί την ενεργότητά της όταν οι οργανικοί διαλύτες μεθανόλη και DMSO βρίσκονται σε συγκέντρωση 15% v/v και μάλιστα παρουσία αιθανόλης στην ίδια συγκέντρωση η δράση του ενζύμου ενισχύεται. Ωστόσο, όταν οι διαλύτες χρησιμοποιούνται σε περιεκτικότητα 30% v/v παρατηρείται παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου. Συγκεκριμένα για την επίδραση οργανικών διαλυτών σε εστεράση του οξικού οξέος της οικογένειας CE16 όπως αυτή από τον μύκητα *T.reesei*, στη βιβλιογραφία έχει μελετηθεί μόνο η επίδραση του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) το οποίο δεν επιδρά στη δράση του ενζύμου (Biely, 2012).

4.2.5 Επίδραση διαλυμάτων αλάτων στην ενεργότητα της *TiCE16*

Σχετικά με την επίδραση διαλυμάτων αλάτων σε εστεράση του οξικού οξέος η οποία ανήκει στην οικογένεια CE16, δεν βρέθηκε ανάλογη βιβλιογραφική αναφορά. Για το λόγο αυτό η εν λόγω επίδραση στην ενεργότητα της *TiCE16* συγκρίνεται με αντίστοιχες τιμές της εστεράσης του οξικού οξέος *AnAxe* από τον μύκητα *Aspergillus niger* η οποία ανήκει στην οικογένεια CE1.

Σύμφωνα λοιπόν με τους Wu et al. (2017) η παρουσία μεταλλικών ιόντων σε συγκέντρωση 5 mM είχε μικρή επίδραση στην ενεργότητα του ενζύμου καθώς αυτή ήταν πάνω από 70% για όλα τα άλατα που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , K^+ και Cu^{2+} η ενεργότητα του ενζύμου ήταν πάνω από 80%, ενώ τα ιόντα Ca^{2+} , Zn^{2+} και Mg^{2+} μείωσαν περαιτέρω την ενεργότητα του ενζύμου η οποία κυμαινόταν μεταξύ 70%-80%.

Για την εστεράση του οξικού οξέος *TiCE16* φαίνεται από το Διάγραμμα 3.2.5.1 πως για χαμηλή συγκέντρωση των διαλυμάτων αλάτων (0,5 mM), η ενεργότητα του ενζύμου παραμένει πάνω από το 80% παρουσία των ιόντων Mg^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} και Mn^{2+} . Τα ιόντα Fe^{2+} φαίνεται να μειώνουν την ενεργότητα κοντά στο 60%, ενώ τα ιόντα Fe^{3+} προκαλούν περαιτέρω μείωση της ενεργότητας η οποία πλησιάζει το 40%. Τέλος, παρουσία ιόντων Ni^{2+} η ενεργότητα του ενζύμου πέφτει σχεδόν στο 30%.

Όταν η συγκέντρωση των διαλυμάτων αλάτων είναι 1 mM από το Διάγραμμα 3.2.6.1. μπορεί να παρατηρηθεί πως παρουσία των ιόντων Mg^{2+} και K^+ η ενεργότητα του ενζύμου παραμένει πάνω από το 80%, ενώ τα ιόντα Zn^{2+} , Co^{2+} και Mn^{2+} φαίνεται πως ενισχύουν τη δράση του ενζύμου. Αντίθετα, σημειώνεται πτώση της ενεργότητας του ενζύμου στο 70% και 60%, παρουσία ιόντων Fe^{3+} και Fe^{2+} αντίστοιχα. Τέλος, μεγάλη μείωση της ενεργότητας της *TiCE16* στο 20% παρατηρείται παρουσία ιόντων Ni^{2+} .

Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αλάτων (10 mM), τα ιόντα Zn^{2+} και Co^{2+} φαίνεται πως δεν επηρεάζουν τη δράση του ενζύμου. Αντιθέτως, τα ιόντα Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} και Mn^{2+} προκαλούν μείωση της ενεργότητας της εστεράσης (60%-70% υπολειπόμενη ενεργότητα). Τέλος, αρκετά μεγάλη παρεμπόδιση στη δράση του ενζύμου εμφανίζουν τα ιόντα Fe^{3+} και Fe^{2+} , καθώς παρατηρείται πτώση της ενεργότητας κάτω από το 25% και το 15% αντίστοιχα.

Επιπροσθέτως, βιβλιογραφική πηγή η οποία μελετά μία εστεράση του οξικού οξέος που προέρχεται από το βακτήριο *Caldanaerobacter subterraneus* (Moriyoshi et al., 2013) αναφέρει πως με την παρουσία μεταλλικών ιόντων σε συγκέντρωση 1 mM δεν υπήρξε κάποια επίδραση στην ενεργότητα του ενζύμου. Ενώ μελέτες σε υψηλότερη συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων (Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} και Cu^{2+} σε συγκέντρωση 5 mM) παρεμποδίζουν τη δράση της εστεράσης *EstGX1* (Gu et al., 2015).

4.2.6 Εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα

Οι εστεράσες του οξικού οξέος της οικογένειας *CE16* οι οποίες προέρχονται από τους μύκητες *Myceliophthora thermophila* (Koutaniemi et al., 2013) και *Aspergillus niger* (Neumüller et al., 2015) δεν εμφανίζουν δράση σε πολυμερή κάτι το οποίο παρατηρείται και στην εστεράση *TiCE16*. Αντιθέτως, το ένζυμο *PaCE16A* το οποίο προέρχεται από τον μύκητα *Podopsisora anserina* (Puchart et al., 2015) απομακρύνει τους εστερικούς δεσμούς αποτελεσματικά σε πολυμερή ακετυλιωμένης ξυλάνης. Επιπλέον, η εστεράση του οξικού οξέος της οικογένειας *CE16* από τον μύκητα *T. reesei* (Biely, 2012) δεν μπορεί να δράσει σε πολυμερικά υποστρώματα όπως ακετυλιωμένη γλυκουλονοξυλάνη, ωστόσο δρα αποτελεσματικά σε ακετυλιωμένους ξυλοολιγοσακχαρίτες, όπως ακριβώς και η *TiCE16*.

Οι εστεράσεις του οξικού οξέος που μελετώνται στη βιβλιογραφία (*AnCE16A*, *TrCE16*, *PaCE16A*) εμφανίζουν την υψηλότερη ενεργότητα στο υπόστρωμα 4-nitrophenyl acetate όπως συμβαίνει και με την εστεράση *TiCE16*. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα ένζυμα δεν εμφανίζουν ενεργότητα ως προς το υπόστρωμα p-nitrophenyl butyrate, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την εστεράση *TiCE16* (Puchart et al., 2016). Όσον αφορά την ακετυλιωμένη γλυκουρονοξυλάνη, το ένζυμο *TrCE16* δεν εμφανίζει ενεργότητα ως προς αυτό το υπόστρωμα ενώ οι τιμές της ενεργότητας των ενζύμων *AnCE16A* και *PaCE16* ως προς αυτό είναι $2 \frac{U}{mg}$ και $2,8 \frac{U}{mg}$ αντίστοιχα. Η *TiCE16* δεν παρουσιάζει δράση στο πολυμερές υπόστρωμα της ακετυλιωμένης ξυλάνης. Όταν όμως αυτό υποστεί εικοσιτετράωρη κατεργασία με την εμπορική ξυλανάση της οικογένειας *GH10* (*E-XYLATM*), τότε παρατηρείται πως η *TiCE16* δρα στους ακετυλιωμένους ξυλοολιγοσακχαρίτες που προκύπτουν. Μάλιστα, παρατηρείται $74\% \pm 15\%$ αύξηση στην

απελευθέρωση του οξικού οξέος, συγκριτικά με τα δείγματα όπου η εστεράση δρα στο μη υδρολυμένο πολυμερές, κατά τη διάρκεια εικοσιτετράωρων αντιδράσεων.

4.3 Συνεργισμοί

4.3.1 Συνεργιστική δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* και των ξυλανασών *TtXyn30A* και *E-XYLATM* κατά την υδρόλυση φυσικών λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συνεργιστική δράση μεταξύ αραβινοφουρανοζιδάσης (*TtAbf43*) και ξυλανασών με σκοπό την υδρόλυση υποστρωμάτων ξυλάνης. Κάτι παρόμοιο έχει συναντηθεί ξανά στη βιβλιογραφία όπως αναφέρεται στην πηγή Valls et al. (2016), όπου μελετάται η συνεργιστική δράση μίας αραβινοφουρανοζιδάσης, η οποία προέρχεται από το βακτήριο *Bacillus sp.*, και τριών ξυλανασών των οικογενειών GH10, GH11 και GH30 οι οποίες προέρχονται από το βακτήριο *Paenibacillus barcinonensis*, κατά τον αποπολυμερισμό αραβινοξυλάνης σίκαλης (RA). Η αραβινοφουρανοζιδάση εμφάνισε συνεργιστικό με την ξυλανάση της οικογένειας GH11, όχι όμως με αυτές των οικογενειών GH10 και GH30.

Οι ξυλανάσες της οικογένειας GH11 (Guerfali et al., 2011; Valls et al., 2016) προτιμούν τις μη υποκατεστημένες περιοχές στην αλυσίδα της ξυλάνης και χρειάζονται τρεις συνεχόμενες, μη υποκατεστημένες μονάδες ξυλόζης για να δράσουν. Έτσι, η απομάκρυνση των υποκαταστάσεων αραβινόζης κάνει προσβάσιμο το σκελετό της ξυλάνης στη ξυλανάση GH11.

Όσον αφορά την ξυλανάση GH30 μάλιστα σημειώνεται πως δεν φαίνεται να δρα στο υπόστρωμα RA καθώς είναι μία ξυλανάση η οποία εμφανίζει την κυρίως δράση της σε γλυκουρονοξυλάνη. Αυτό συμβαίνει με τις περισσότερες ξυλανάσες της οικογένειας GH30 διότι η δράση τους εξαρτάται συνήθως από την υποκατάσταση μεθυλιωμένου γλυκουρονικού οξέος στο σκελετό της ξυλάνης. Επομένως, αφού χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα RA, η οποία περιέχει ορισμένη ποσότητα γλυκουρονικού οξέος (καθώς στην πραγματικότητα είναι γλυκουρονοαραβινοξυλάνη) θεωρήθηκε πως η δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης στην απομάκρυνση των υποκαταστατών αραβινόζης θα βοηθούσε τη δράση της ξυλανάσης GH30 ώστε να απομακρυνθούν τα γλυκουρονικά οξέα. Ωστόσο, η συνδυασμένη δράση των δύο ενζύμων παρουσίασε πολύ μικρή αύξηση κατά την απελευθέρωση σακχάρων σε σχέση με αυτά που απελευθερώνονται όταν η αραβινοφουρανοζιδάση δρα μόνη της. Το γεγονός πως η αύξηση ήταν πολύ μικρή μπορεί να οφείλεται είτε στις λίγες υποκαταστάσεις γλυκουρονικού οξέος που περιέχει η RA, είτε σε διπλές υποκαταστάσεις αραβινόζης που περιέχονται στην ξυλάνη οι οποίες δεν μπορούν να απομακρυνθούν από την αραβινοφουρανοζιδάση και έτσι εξακολουθεί να παρεμποδίζεται η πρόσβαση της ξυλανάσης GH30.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, ομοίως με τη βιβλιογραφία δεν παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση των δύο αυτών ενζύμων (*TtAbf43* και ξυλανάση *TtXyn30*) αναφορικά με την απελευθέρωση ξυλοολιγοσακχαριτών, όταν μελετήθηκε σε φυσικά υποστρώματα (ξυλάνη από ξύλο οξιάς προκατεργασμένη με υγρή οξειδωση, A, και στελέχη αραβοσίτου

προκατεργασμένα με έκρηξη ατμού, B, Πίνακας 2.2.3.1.1). Ωστόσο, συνεργισμός εμφανίστηκε κατά την ταυτόχρονη δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* με την ξυλανάση *TtXyn30A* καθώς και τη συνδυαστική δράση των τριών ενζύμων μαζί (*TtAbf43*, *TtXyn30A* και E-XYLATM). Κατά τη συνεργιστική δράση των ενζύμων *TtAbf43* και *TtXyn30A*, η απελευθέρωση αραβινόζης πενταπλασιάστηκε σε σχέση με όταν η *TtAbf43* δρα μεμονωμένα. Επιπλέον, ο συνεργισμός των τριών ενζύμων (*TtAbf43*, *TtXyn30A* και E-XYLATM) αφορούσε την απελευθέρωση ξυλόζης και αραβινόζης στο υπόστρωμα B. Μάλιστα, η ξυλόζη που απομακρύνεται είναι δεκαπέντε φορές περισσότερη από αυτή που απελευθερώνει η ξυλανάση *TtXyn30A* όταν δρα μόνη της και σχεδόν 1,5 φορά περισσότερη από αυτή που απελευθερώνει η E-XYLATM. Όσον αφορά την απελευθέρωση αραβινόζης από αυτό το υπόστρωμα, η *TtAbf43* δεν παρήγαγε προϊόν, ωστόσο όταν έδρασε συνεργιστικά με τις ξυλανάσες απελευθερώθηκαν $0,7 \frac{mg \text{ αραβινόζης}}{ml}$. Σημειώνεται πως κάτι παρόμοιο (συνεργισμός των τριών αυτών ενζύμων) δεν βρέθηκε στη βιβλιογραφία.

Επιπλέον, σύμφωνα με τη βιβλιογραφική πηγή Shi et al. (2013) μία αραβινοφουρανοζιδάση της οικογένειας GH43 και μία ξυλανάση της οικογένειας GH10 οι οποίες προέρχονται από το βακτήριο *Paenibacillus sp.* δρουν συνεργιστικά σε φυσικά υποστρώματα ξυλάνης. Παρατηρήθηκε μάλιστα πως η προσθήκη αρχικά της αραβινοφουρανοζιδάσης ενίσχυσε τη δράση της ξυλανάσης και το ποσοστό υδρόλυσης ξυλοβιόζης και ξυλόζης ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με όταν το ένζυμο δρα μόνο του. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από αραβινοφουρανοζιδάσες που προέρχονται από τον μύκητα *Penicillium sp.* αλλά και από το βακτήριο *Streptomyces sp.* Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε κάποια παρόμοια συνεργιστική δράση μεταξύ των αντίστοιχων ενζύμων που εξετάστηκαν σε αυτή τη διπλωματική εργασία (*TtAbf43* και εμπορική ξυλανάση E-XYLATM) σχετικά με την απελευθέρωση ξυλοολιγοσακχαριτών και αραβινόζης.

4.3.2 Συνεργιστική δράση της *TtCE16* με την ξυλανάση *TtXyn30A* κατά την υδρόλυση ακετυλιωμένης ξυλάνης

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η συνεργιστική δράση της εστεράσης του οξικού οξέος *TtCE16* και της ξυλανάσης της οικογένειας GH30 *TtXyn30A* σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε συνέργεια των δύο ενζύμων όσον αφορά την απελευθέρωση ξυλοβιόζης (Διάγραμμα 3.3.2.1), η οποία ήταν κατά 1,15 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με όταν η *TtXyn30A* δρα μόνη της, συμπεραίνοντας πως η δράση της ξυλανάσης ενισχύεται από αυτήν της εστεράσης. Το γεγονός αυτό είναι δυνατό να συμβεί καθώς η εστεράση απομακρύνοντας τις ακετυλιώσεις της ξυλάνης δημιουργεί νέες θέσεις δράσης για την ξυλανάση. Επιπλέον, συνεργιστική δράση των εν λόγω ενζύμων παρατηρήθηκε και ως προς την απελευθέρωση οξικού οξέος η οποία ήταν κατά 1,4 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με όταν η *TtCE16* δρα μεμονωμένα. Μάλιστα, η δράση της ξυλανάσης η οποία κόβει το πολυμερές της ξυλάνης σε ολιγοσακχαρίτες ενισχύει τη δράση της *TtCE16* να απομακρύνει τις ακετυλιώσεις από τα ολιγομερή στα οποία έχει αποδεδειγμένα καλύτερη δράση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρόμοιο αποτέλεσμα συνεργιτισμού έχει παρατηρηθεί μεταξύ εστεράσης του οξικού οξέος από τον μύκητα *Aspergillus oryzae* και ξυλανάσης από τον μύκητα *Aspergillus niger* για την υδρόλυση ξυλάνης από ξύλο σημύδας (Koseki et al., 2006). Ο εν λόγω συνεργιτισμός αύξησε την απελευθέρωση οξικού οξέος 15 φορές συγκριτικά με τη μεμονωμένη δράση της εστεράσης. Σε αντίθεση με όσα προαναφέρθηκαν, υπάρχουν και περιπτώσεις όπως αυτή των Kato et al. (2021), όπου δεν παρατηρήθηκε σημαντικός βαθμός συνεργιτισμού μεταξύ των δύο ενζύμων (μίας ξυλανάσης από τον μύκητα *Thermomyces lanuginosus* και μίας εστεράσης του οξικού οξέος από τον μύκητα *Aspergillus oryzae*) για την αποδόμηση της WA. Μάλιστα, η απελευθέρωση οξικού οξέος όταν τα ένζυμα έδρασαν συνεργιστικά ήταν η μισή από όταν η εστεράση έδρασε μόνη της.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

5. Μελλοντικοί στόχοι

Για να είναι δυνατή η εφαρμογή της παρούσας ερευνητικής μελέτης σε βιομηχανική κλίμακα αποτελώντας μία βιώσιμη διεργασία απαιτείται περαιτέρω έρευνα ώστε να επιτευχθεί πλήρης κατανόηση της δομής και της λειτουργίας των ενζύμων που εξετάστηκαν, της αραβινοφουρανοζιδάσης *TiAbf43* και της εστεράσης του οξικού οξέος *TiCE16*. Επίσης χρειάζεται διερεύνηση περισσότερων πιθανών συνεργιστικών δράσεων των εν λόγω ενζύμων με άλλα ημικυτταρινολυτικά ένζυμα με σκοπό την ολοκληρωτική διάσπαση της ξυλάνης στα μονομερή της. Η χρήση αυτών των μονομερών σε πολυάριθμες βιομηχανικές εφαρμογές όπως κατά την παραγωγή βιοκαυσίμων, βιοπλαστικών, προϊόντων προστιθέμενης αξίας ακόμη και καινοτόμων τροφίμων θα οδηγήσει στην ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων αλλά και στην ανάπτυξη μίας κυκλικής βιο-οικονομίας.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την αραβινοφουρανοζιδάση *TiAbf43* θα ήταν χρήσιμη η μελέτη της κινητικής του ενζύμου σε υπόστρωμα 4-νιτροφαίνυλ α-L-αραβινοφουρανόζης (p-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside) στο οποίο εμφανίζει αρκετά καλή ενεργότητα.

Σχετικά με την εστεράση του οξικού οξέος *TiCE16*, ενδείκνυται να μελετηθεί ο τρόπος δράσης (mode of action) του συγκεκριμένου ενζύμου, καθώς επίσης να γίνει μελέτη της λειτουργικής σταθερότητας του ενζύμου ως προς τη θερμοκρασία, ώστε να υπάρχει μία ολοκληρωμένη εικόνα αναφορικά με τη δράση και τη σταθερότητα του ενζύμου.

Επιπλέον, στο κομμάτι των συνεργιστισμών, θα μπορούσε να διερευνηθεί η συνεργιστική δράση της εστεράσης του οξικού οξέος *TiCE16* με μία γλυκουρονιδάση σε υποστρώματα γλυκουρονοξυλάνης καθώς φαίνεται η δράση των εστερασών να παρεμποδίζεται από την ύπαρξη υποκαταστάσεων γλυκουρονικού οξέος όπως επίσης και η δράση των γλυκουρονιδασών παρεμποδίζεται από υποκαταστάσεις οξικού οξέος στο σκελετό της ξυλάνης. Ακόμη, θα ήταν χρήσιμη η περαιτέρω μελέτη συνδυασμού εστερασών από διαφορετικές οικογένειες ώστε να εξετασθεί η συμπληρωματική δράση που πιθανώς έχουν. Ομοίως, θα μπορούσε να μελετηθεί συνεργιστισμός μεταξύ της *TiAbf43* και άλλων αραβινοφουρανοζιδασών. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα εμφάνιζε η διερεύνηση συνεργιστικής δράσης της *TiAbf43* με εστεράσες του οξικού και του φερουλικού οξέος σε προκατεργασμένα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6. Βιβλιογραφία

- Agrawal, D., Tsang, A., & Chadha, B. S. (2021). Economizing the lignocellulosic hydrolysis process using heterologously expressed auxiliary enzymes feruloyl esterase D (CE1) and β -xylosidase (GH43) derived from thermophilic fungi *Scytalidium thermophilum*. *Bioresource Technology*, 339(June), 125603. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125603>
- Ahmed, S., Luis, A. S., Bras, J. L. A., Ghosh, A., Gautam, S., Gupta, M. N., Fontes, C. M. G. A., & Goyal, A. (2013). A Novel α -L-Arabinofuranosidase of Family 43 Glycoside Hydrolase (Ct43Araf) from *Clostridium thermocellum*. *PLoS ONE*, 8(9), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073575>
- Alonso, D. M., Bond, J. Q., & Dumesic, J. A. (2010). Catalytic conversion of biomass to biofuels. *Green Chemistry*, 12(9), 1493–1513. <https://doi.org/10.1039/c004654j>
- Anwar, Z., Gulfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>
- Ávila, P. F., Silva, M. F., Martins, M., & Goldbeck, R. (2021). Cello-oligosaccharides production from lignocellulosic biomass and their emerging prebiotic applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03041-2>
- Bhatia, L., Sharma, A., Bachheti, R. K., & Chandel, A. K. (2019). Lignocellulose derived functional oligosaccharides: production, properties, and health benefits. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(8), 744–758. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1608446>
- Biely, P. (2012). Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1575–1588. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.010>
- Biely, P., Singh, S., & Puchart, V. (2016). Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1260–1274. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.09.001>
- Biely, P., Westereng, B., Puchart, V., de Maayer, P., & A. Cowan, D. (2014). Recent Progress in Understanding the Mode of Action of Acetylxylan Esterases. *Journal of Applied Glycoscience*, 61(2), 35–44. https://doi.org/10.5458/jag.jag.jag-2013_018
- Brodin, M., Vallejos, M., Opedal, M. T., Area, M. C., & Chinga-Carrasco, G. (2017). Lignocellulosics as sustainable resources for production of bioplastics – A review. *Journal of Cleaner Production*, 162, 646–664. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.209>
- Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Rahmanpour, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural Product Reports*, 28(12), 1883–1896. <https://doi.org/10.1039/c1np00042j>

- Castile, J., Cheng, Y. H., Simmons, B., Perelman, M., Smith, A., & Watts, P. (2013). Development of in vitro models to demonstrate the ability of PecSys®, an in situ nasal gelling technology, to reduce nasal run-off and drip. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(5), 816–824. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.707210>
- Chen, H. (2014). Biotechnology of Lignocellulose. In *Biotechnology of Lignocellulose*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7>
- Ebringerová, A., & Thomas, H. (2005). *Hemicellulose*. August, 1–67.
- Gibson, L. J. (2012). The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of the Royal Society Interface*, 9(76), 2749–2766. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0341>
- Gu, X., Wang, S., Wang, S., Zhao, L. X., Cao, M., & Feng, Z. (2015). Identification and Characterization of Two Novel Esterases from a Metagenomic Library. *Food Science and Technology Research*, 21(5), 649–657. <https://doi.org/10.3136/fstr.21.649>
- Guerfali, M., Gargouri, A., & Belghith, H. (2011). Catalytic properties of *Talaromyces thermophilus* α -L-arabinofuranosidase and its synergistic action with immobilized endo- β -1,4-xylanase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.003>
- Guerriero, G., Hausman, J. F., Strauss, J., Ertan, H., & Siddiqui, K. S. (2016). Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Engineering in Life Sciences*, 16(1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400196>
- Hernández-Beltrán, J. U., Hernández-De Lira, I. O., Cruz-Santos, M. M., Saucedo-Luevanos, A., Hernández-Terán, F., & Balagurusamy, N. (2019). Insight into pretreatment methods of lignocellulosic biomass to increase biogas yield: Current state, challenges, and opportunities. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(18). <https://doi.org/10.3390/app9183721>
- Hu, J., Arantes, V., Pribowo, A., & Saddler, J. N. (2013). The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-112>
- Huang, Y., Zheng, X., Pilgaard, B., Holck, J., Muschiol, J., Li, S., & Lange, L. (2019). Identification and characterization of GH11 xylanase and GH43 xylosidase from the chytridiomycetous fungus, *Rhizophlyctis rosea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2), 777–791. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9431-5>
- Jambunathan, P., & Zhang, K. (2016). Engineered biosynthesis of biodegradable polymers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(8), 1037–1058. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1785-z>
- Kato, T., Shiono, Y., & Koseki, T. (2021). Identification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*,

xxx(xxx). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.06.014>

- Koseki, T., Miwa, Y., Akao, T., Akita, O., & Hashizume, K. (2006). An *Aspergillus oryzae* acetyl xylan esterase: Molecular cloning and characteristics of recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, *121*(3), 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.07.015>
- Koutaniemi, S., van Gool, M. P., Juvonen, M., Jokela, J., Hinz, S. W., Schols, H. A., & Tenkanen, M. (2013). Distinct roles of carbohydrate esterase family CE16 acetyl esterases and polymer-acting acetyl xylan esterases in xylan deacetylation. *Journal of Biotechnology*, *168*(4), 684–692. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.009>
- Kumar, A., Gautam, A., & Dutt, D. (2016). Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *07*(03), 149–168. <https://doi.org/10.4236/abb.2016.73014>
- Li, C., Chen, C., Wu, X., Tsang, C. W., Mou, J., Yan, J., Liu, Y., & Lin, C. S. K. (2019). Recent advancement in lignin biorefinery: With special focus on enzymatic degradation and valorization. *Bioresource Technology*, *291*(July), 121898. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121898>
- Li, T., Wu, Y. R., & He, J. (2018). Heterologous expression, characterization and application of a new β -xylosidase identified in solventogenic *Clostridium* sp. strain BOH3. *Process Biochemistry*, *67*(June 2017), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.02.003>
- Li, X., Griffin, K., Langeveld, S., Frommhagen, M., Underlin, E. N., Kabel, M. A., de Vries, R. P., & Dilokpimol, A. (2020). Functional Validation of Two Fungal Subfamilies in Carbohydrate Esterase Family 1 by Biochemical Characterization of Esterases From Uncharacterized Branches. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00694>
- Liu, Yanrong, Nie, Y., Lu, X., Zhang, X., He, H., Pan, F., Zhou, L., Liu, X., Ji, X., & Zhang, S. (2019). Cascade utilization of lignocellulosic biomass to high-value products. *Green Chemistry*, *21*(13), 3499–3535. <https://doi.org/10.1039/c9gc00473d>
- Liu, Yihan, Huang, L., Zheng, D., Xu, Z., Li, Y., Shao, S., Zhang, Y., Ge, X., & Lu, F. (2019). Biochemical characterization of a novel GH43 family β -xylosidase from *Bacillus pumilus*. *Food Chemistry*, *295*(December 2018), 653–661. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.163>
- Mai-Gisondi, G., Maaheimo, H., Chong, S. L., Hinz, S., Tenkanen, M., & Master, E. (2017). Functional comparison of versatile carbohydrate esterases from families CE1, CE6 and CE16 on acetyl-4-O-methylglucuronoxylan and acetyl-galactoglucomannan. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1861*(9), 2398–2405. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.06.002>
- Malgas, S., Mafa, M. S., Mkabayi, L., & Pletschke, B. I. (2019). A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(12), 1–13.

<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2765-z>

- Matsuzawa, T., Kaneko, S., & Yaoi, K. (2015). Screening, identification, and characterization of a GH43 family β -xylosidase/ α -arabinofuranosidase from a compost microbial metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(21), 8943–8954. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6647-5>
- Mechelke, M., Koeck, D. E., Broecker, J., Roessler, B., Krabichler, F., Schwarz, W. H., Zverlov, V. V., & Liebl, W. (2017). Characterization of the arabinoxylan-degrading machinery of the thermophilic bacterium *Herbinix hemicellulosilytica*—Six new xylanases, three arabinofuranosidases and one xylosidase. *Journal of Biotechnology*, *257*(April), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.023>
- Morais, M. A. B., Coines, J., Domingues, M. N., Pirolla, R. A. S., Tonoli, C. C. C., Santos, C. R., Correa, J. B. L., Gozzo, F. C., Rovira, C., & Murakami, M. T. (2021). Two distinct catalytic pathways for GH43 xylanolytic enzymes unveiled by X-ray and QM/MM simulations. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20620-3>
- Moriyoshi, K., Koma, D., Yamanaka, H., Sakai, K., & Ohmoto, T. (2013). Expression and characterization of a thermostable acetylxylyl esterases from *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis* involved in the degradation of insoluble cellulose acetate. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *77*(12), 2495–2498. <https://doi.org/10.1271/bbb.130568>
- Nakamura, A. M., Nascimento, A. S., & Polikarpov, I. (2017). Structural diversity of carbohydrate esterases. *Biotechnology Research and Innovation*, *1*(1), 35–51. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.02.001>
- Nanda, S., Mohammad, J., Reddy, S. N., Kozinski, J. A., & Dalai, A. K. (2014). Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *4*(2), 157–191. <https://doi.org/10.1007/s13399-013-0097-z>
- National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 82481, 2-Nitrophenyl b-D-xylopyranoside. Retrieved September 28, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Nitrophenyl-b-D-xylopyranoside>
- National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 13243, 4-Nitrophenyl acetate. Retrieved September 28, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Nitrophenyl-acetate>
- Neumüller, K. G., De Souza, A. C., Van Rijn, J. H. J., Streekstra, H., Gruppen, H., & Schols, H. A. (2015). Positional preferences of acetyl esterases from different CE families towards acetylated 4-O-methyl glucuronic acid-substituted xylo-oligosaccharides. *Biotechnology for Biofuels*, *8*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0187-6>
- Okolie, J. A., Nanda, S., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2021). Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. *Waste and Biomass*

- Valorization*, 12(5), 2145–2169. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01123-0>
- Oliveira, D. M., Mota, T. R., Oliva, B., Segato, F., Marchiosi, R., Ferrarese-Filho, O., Faulds, C. B., & dos Santos, W. D. (2019). Feruloyl esterases: Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production of bioactive compounds. *Bioresource Technology*, 278(January), 408–423. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.064>
- Proß, S., Bachmann, B., Hofestädt, R., Niehaus, K., Ueckerdt, R., Vorhölter, F.-J., & Lutter, P. (2009). Modelling a Bacterium's Life: A Petrin-Net Library in Modelica. *Proceedings of the 7 International Modelica Conference Como, Italy*, 43, 463–472. <https://doi.org/10.3384/ecp09430015>
- Puchart, V., Agger, J. W., Berrin, J. G., Várnai, A., Westereng, B., & Biely, P. (2016). Comparison of fungal carbohydrate esterases of family CE16 on artificial and natural substrates. *Journal of Biotechnology*, 233, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.003>
- Puchart, V., Berrin, J. G., Haon, M., & Biely, P. (2015). A unique CE16 acetyl esterase from *Podospira anserina* active on polymeric xylan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(24), 10515–10526. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6934-1>
- Rasmussen, L. E., Xu, C., Sørensen, J. F., Nielsen, M. K., & Meyer, A. S. (2012). Enzyme kinetics and identification of the rate-limiting step of enzymatic arabinoxylan degradation. *Biochemical Engineering Journal*, 69, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.004>
- Razeq, F. M., Jurak, E., Stogios, P. J., Yan, R., Tenkanen, M., Kabel, M. A., Wang, W., & Master, E. R. (2018). A novel acetyl xylan esterase enabling complete deacetylation of substituted xylyns. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1074-3>
- Rohman, A., Dijkstra, B. W., & Puspaningsih, N. N. T. (2019). β -xylosidases: Structural diversity, catalytic mechanism, and inhibition by monosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 7–11. <https://doi.org/10.3390/ijms20225524>
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Shi, P., Chen, X., Meng, K., Huang, H., Bai, Y., Luo, H., Yang, P., & Yao, B. (2013). Distinct actions by *Paenibacillus* sp. strain E18 α -L-arabinofuranosidases and xylanase in xylan degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), 1990–1995. <https://doi.org/10.1128/AEM.03276-12>
- Shinozaki, A., Kawakami, T., Hosokawa, S., & Sakamoto, T. (2014). A novel GH43 α -L-arabinofuranosidase of *Penicillium chrysogenum* that preferentially degrades single-substituted arabinosyl side chains in arabinan. *Enzyme and Microbial Technology*, 58–59, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.03.005>
- Singh, R. D., Banerjee, J., & Arora, A. (2015). Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioactive Carbohydrates and Dietary*

- Fibre*, 5(1), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.11.003>
- Singh, O. V., & Chandel, A. K. (2018). Sustainable biotechnology-enzymatic resources of renewable energy. In *Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-95480-6>
- Stabel, M., Hagemester, J., Heck, Z., Aliyu, H., & Ochsenreither, K. (2021). Characterization and Phylogenetic Analysis of a Novel GH43 β -Xylosidase From *Neocallimastix californiae*. *Frontiers in Fungal Biology*, 2(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.692804>
- Taylor, E. J., Gloster, T. M., Turkenburg, J. P., Vincent, F., Brzozowski, A. M., Dupont, C., Shareck, F., Centeno, M. S. J., Prates, J. A. M., Puchart, V., Ferreira, L. M. A., Fontes, C. M. G. A., Biely, P., & Davies, G. J. (2006). Structure and activity of two metal ion-dependent acetylxytan esterases involved in plant cell wall degradation reveals a close similarity to peptidoglycan deacetylases. *Journal of Biological Chemistry*, 281(16), 10968–10975. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513066200>
- Terrett, O. M., & Dupree, P. (2019). Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.10.010>
- Thakur, A., Sharma, K., Jamaldeen, S. B., & Goyal, A. (2020). Molecular Characterization, Regioselective and Synergistic Action of First Recombinant Type III α -L-arabinofuranosidase of Family 43 Glycoside Hydrolase (PsGH43_12) from *Pseudopedobacter saltans*. *Molecular Biotechnology*, 62(9), 443–455. <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00263-x>
- Thapa, S., Mishra, J., Arora, N., Mishra, P., Li, H., O'Hair, J., Bhatti, S., & Zhou, S. (2020). Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 19(3), 621–648. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09536-y>
- Valls, A., Diaz, P., Pastor, F. I. J., & Valenzuela, S. V. (2016). A newly discovered arabinoxytan-specific arabinofuranohydrolase. Synergistic action with xylanases from different glycosyl hydrolase families. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), 1743–1751. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7061-8>
- Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
- Vyas, P., Kumar, A., & Singh, S. (2018). Biomass breakdown: A review on pretreatment, instrumentations and methods. *Frontiers in Bioscience - Elite*, 10(1), 155–174. <https://doi.org/10.2741/e815>
- Wei, S. (2016). The application of biotechnology on the enhancing of biogas production from lignocellulosic waste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 9821–9836. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7926-5>

- Wu, H., Xue, Y., Gan, L., Liu, J., Long, M., & Li, H. (2017). Heterologous Expression of a New Acetyl Xylan Esterase from *Aspergillus niger* BE-2 and its Synergistic Action with Xylan-Degrading Enzymes in the Hydrolysis of Bamboo Biomass. *BioResources*, 12(1), 434–447. <https://doi.org/10.15376/biores.12.1.434-447>
- Xiros, C., Topakas, E., & Christakopoulos, P. (2013). Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment*, 2(6), 633–654. <https://doi.org/10.1002/wene.49>
- Xu, B., Dai, L., Zhang, W., Yang, Y., Wu, Q., Li, J., Tang, X., Zhou, J., Ding, J., Han, N., & Huang, Z. (2019). Characterization of a novel salt-, xylose- and alkali-tolerant GH43 bifunctional β -xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase from the gut bacterial genome. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128(4), 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.03.018>
- Yang, X., Shi, P., Huang, H., Luo, H., Wang, Y., Zhang, W., & Yao, B. (2014). Two xylose-tolerant GH43 bifunctional β -xylosidase/ α - arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan. *Food Chemistry*, 148, 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.062>
- Yang, X., Shi, P., Ma, R., Luo, H., Huang, H., Yang, P., & Yao, B. (2015). A New GH43 α -Arabinofuranosidase from *Humicola insolens* Y1: Biochemical Characterization and Synergistic Action with a Xylanase on Xylan Degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(4), 1960–1970. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1416-y>
- Zerva, A., Pentari, C., Grisel, S., Berrin, J. G., & Topakas, E. (2020). A new synergistic relationship between xylan-active LPMO and xylobiohydrolase to tackle recalcitrant xylan. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01777-x>
- Zhang, S., Xiao, J., Wang, G., & Chen, G. (2020). Enzymatic hydrolysis of lignin by ligninolytic enzymes and analysis of the hydrolyzed lignin products. *Bioresource Technology*, 304(December 2019), 122975. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122975>
- Zhuo, R., Yu, H., Qin, X., Ni, H., Jiang, Z., Ma, F., & Zhang, X. (2018). Heterologous expression and characterization of a xylanase and xylosidase from white rot fungi and their application in synergistic hydrolysis of lignocellulose. *Chemosphere*, 212, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.062>
- Κέκος, Δ., Καλογεράς, Ε. (2010). Στοιχεία Βιοχημικής Μηχανικής. Εκδόσεις ΕΜΠ, 1, 2-7
- Λυμπεράτος, Γ., Παύλου, Σ. (2018). Εισαγωγή στη Βιοχημική Μηχανική. Εκδόσεις Τζιόλα, 4, 99-107