

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Απομόνωση και χαρακτηρισμός μιας GH10 ξυλανάσης από μετασχηματισμένο βακτηριακό στέλεχος *Ε. coli* BL21



Ντάλιος Ανάργυρος

Επιβλέπουσα: Διομή Μαμμά

Επικ. Καθηγητρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Φεβρουάριος 2022

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών κατά το έτος 2021-2022 βάσει του προγράμματος σπουδών της σχολής, υπό την επίβλεψη της Επικ. καθηγήτριας Διομής Μαμμά.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια Διομή Μαμμά για όλη τη βοήθεια, τις χρήσιμες συμβουλές και παρεμβάσεις της οποτεδήποτε και αν της ζητήθηκε κατά τη διαδικασία περάτωσης της συγκεκριμένης εργασίας. Η συμβολή της ήταν καθοριστική.

Δε θα μπορούσα να μην εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη Δρ Στυλιανή Καλαντζή για τη συνεργασία μας, για τη συνεχή επίβλεψή της καθ' όλο το διάστημα εκπόνησης της εργασίας, για την υπομονή της, τη διάθεση να με βοηθήσει σε κάθε τι που προέκυπτε είτε αυτό άπτονταν του εργαστηριακού σκέλους είτε αφορούσε το θεωρητικό υπόβαθρο των ζητημάτων που ψηλαφήθηκαν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας, το ομαδική πνεύμα που τους διέπει αλλά και την καθ΄ ουσίαν βοήθεια στα εκάστοτε σκέλη της διαδικασίας που προέκυψαν (εργαστηριακός εξοπλισμός, συγκεκριμένα όργανα μέτρησης, εξειδικευμένες γνώσεις).

Περιεχόμενα

	Σελ.
Περίληψη	i
Abstract	iii
1.Θεωρητικό Μέρος	1
1.1 Εισαγωγή	2
1.2 Κυτταρίνη	5
1.3 Ημικυτταρίνη	7
1.4 Λιγνίνη	8
1.5 Ενζυμική υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας	10
1.5.1 Κυτταρινάσες	10
1.5.2 Ξυλανολυτικά ένζυμα	12
1.6 Πηγές παραγωγής ξυλανασών	15
1.7 Θερμοσταθερές ξυλανάσες	17
1.8 Γλυκοζυλοϋδρολάσες (GH οικογένειες)	17
1.9 Ταξινόμηση ξυλανασών	18
1.9.1 Ξυλανάσες GH10	20
1.10 Βιομηχανικές εφαρμογές ξυλανασών	22
1.10.1 Οι ξυλανάσες στη βιομηχανία άρτου και στη ζυθοποιία	22
1.10.2 Οι ξυλανάσες στις τροφές των ζώων	24
1.10.3 Παραγωγή ξυλιτόλης	24
1.10.4 Βιομηχανία χαρτοπολτού- Κλωστοϋφαντουργίας	25
2.Μέθοδοι και υλικά	28
2.1 Όργανα και Συσκευές	29
2.2 Ρυθμιστικά διαλύματα	29
2.3 Ένζυμο	30
2.4 Μέθοδος Δινιτρο-σαλικυλικού Οξέος (DNS)	30
2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	31
2.6 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας ξυλανάσης	32
2.7 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός προϊόντων υδρόλυσης	32
ξυλάνης	2.4
2.8 Χαρακτηρισμος της BSXyn10	34 24
2.8.1 Επιορασή θερμοκρασίας στην ενεργοτήτα και τη σταθεροτήτα του	34
282 Επίδοαση του ηΗ στην ενεονότητα και τη σταθερότητα του	34
Ενζύμου	51
2.8.3 Επίδραση ιόντων μετάλλων, EDTA και SDS στην ενεργότητα του	34
ενζύμου	
2.8.4 Εξειδίκευση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα	35
2.8.5 Εύρεση κινητικών σταθερών	35
2.8.6 Υδρόλυση ξυλάνης βρώμης	36
3. Αποτελέσματα	38
3.1 Προσδιορισμός μοριακού βάρους	39

3.2 Θερμοκρασία δράσης της ξυλανάσης BsXyn10	39
3.3 Θερμική σταθερότητα της ξυλανάσης BsXyn10	47
3.4 Βέλτιστο pH δράσης της BsXyn10	54
3.5 Σταθερότητα της BsXyn10 σε διαφορετικά pH	55
3.6 Εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα	57
3.7 Κινητικές παράμετροι Υδρόλυσης ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10	58
3.8 Επίδραση ιόντων μετάλλων	60
3.9 Προϊόντα υδρόλυσης ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10	61
Συμπεράσματα	65
Βιβλιογραφία	71

Περίληψη

Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε μια ξυλανάση (BsXyn10) της οικογένειας 10 των γλυκοσιδικών υδρολασών (GH10) από το βακτήριο Bacillus safensis. Πραγματοποιήθηκε βιοχημικός χαρακτηρισμός της BsXyn10, ο οποίος περιελάμβανε την εύρεση του μοριακού της βάρους, των συνθηκών pH και θερμοκρασίας που επηρεάζουν τη σταθερότητα και δράση της, την εύρεση των κινητικών σταθερών, την μελέτη της επίδρασης ιόντων μετάλλων στη δράση του ενζύμου και τη διερεύνηση των προϊόντων υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης. Το μοριακό βάρος της BsXyn10 προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και βρέθηκε ίσο με 48 kDa. Η BsXyn10 δεν εμφανίζει δράση σε κυτταρινούχα υποστρώματα και μεταξύ των εξετασθέντων ξυλανών εμφανίζει εξειδίκευση στην υδρόλυση της αραβινοξυλάνης. Οι κινητικές παράμετροι K_m και v_{max} υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης βρέθηκαν ίσες με 19.6 g/L και 8.8 mmole/mg protein/min. Η τιμή του αριθμού μετατροπής k_{cat} βρέθηκε ίση με 7038 sec⁻¹. Οι βέλτιστες τιμές pH και θερμοκρασίας για τη δράση του ενζύμου βρέθηκαν ίσες με 7.0 και 60°C αντίστοιχα. Η ενέργεια ενεργοποίησης του ενζύμου (Ε_a) βρέθηκε ίση με 39.8 kJ·mol⁻¹. Με τη βοήθεια των υπολογισθέντων τιμών του αριθμού μετατροπής k_{cat} και της ενέργειας ενεργοποίησης Εα υπολογίσθηκαν οι μεταβολές των θερμοδυναμικών μεγεθών, ενθαλπία (ΔΗ*), εντροπία (ΔS*) και ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG*) κατά την υδρόλυση του αμύλου, καθώς και το θερμοκρασιακό πηλίκο Q₁₀. Το ένζυμο διατηρεί ποσοστό μεγαλύτερο του 60% της ενεργότητάς του κατά την επώασή του σε pH 5.0-8.0 στους 4°C για 24 ώρες. Η BsXyn10 εμφανίζει χρόνο ημιζωής στους 50°C ίσο με 315 min. Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης (E_{(a)d}) βρέθηκε ίση με 195.4 kJ·mol⁻¹. Με τη βοήθεια των υπολογισθέντων τιμών της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης (E_{(a)d}) και των σταθερών θερμικής απενεργοποίησης (kd) υπολογίσθηκαν οι μεταβολές των θερμοδυναμικών μεγεθών, ενθαλπία (ΔΗ*), εντροπία (ΔS*) και ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG*) κατά τη θερμική απενεργοποίηση της BsXyn10. Η παρουσία K⁺ ενεργοποιεί την BsXyn10 ενώ τα υπόλοιπα εξετασθέντα ιόντα (Na⁺, Fe³⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺) δρουν ανασταλτικά στη δράση της σε διαφορετική έκταση το καθένα από αυτά. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας SDS ανέστειλε πλήρως τη δράση της BsXyn10, ενώ ο χηλικός παράγοντας EDTA έδρασε

ανασταλτικά στη δράση της BsXyn10. Τα κύρια προϊόντα (οι ξυλοολογοσακχαρίτες) της υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10 ήταν η ξυλοβιόζη (X2), ξυλοτριόζη (X3) και ξυλοτετραόζη (X4).

Abstract

In the present thesis, a GH10 xylanse (BsXyn10) was characterized. The molecular mass of the isolated BsXyn10 was estimated by SDS-PAGE at 75 kDa. BsXyn10 does not hydrolyze cellulosic substrates. Among the xylans tested, i.e. oat spelt xylan, beechwood xylan, birchwood xylan, arabinoxylan and arabinan, BsXyn10 exhibited maximum activity on arabinoxylan. The kinetic parameters K_m and v_{max} were determined equal to 19.6 g/L and 8.8 µmole/mg protein/min using oat spelt xylan as the substrate, while turnover number k_{cat} was found equal to 7038 sec⁻¹. The enzyme is optimally active at 60 °C and pH 7.0. Enzyme's activation energy (E_a) was found to be 39.8 kJ mol⁻¹, during oat spelt hydrolysis. The enzyme retained about 60% of its initial activity in the pH range of 5.0-8.0 after 24h incubation in 4°C. Half life of BsXyn10 in 50°C was found 315 min. Thermal deactivation energy (E_{(a)d}) was found 195.4 kJ·mol⁻¹. From the calculated value of thermal deactivation energy ($E_{(a)d}$) and thermal deactivation constant (k_d), the changes in enthalpy (ΔH^*), entropy (ΔS^*) and Gibbs free energy (ΔG^*) were calculated. The effect of metal ions K⁺, Na⁺, Fe³⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, of a chelating agent EDTA and of SDS (an anionic detergent) on BsXyn10 activity was investigated. All metal ions, except K⁺, and EDTA inhibited enzyme action in a different extent. BsXyn10 action was completely inhibited by the presence of SDS. During oat spelt xylan the products indetified were xylose, xylobiose, xylotriose, xylotetraose, xylopentaose and xylohexaose. The major end products were xylobiose, xylotriose, xylotetraose.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Θεωρητικό μέρος

1.1 Εισαγωγή

Η επερχόμενη εξάντληση των συμβατικών καυσίμων σε συνδυασμό με τα περιβαλλοντικά προβλήματα που έχουν δημιουργηθεί από την χρήση τους, έχει οδηγήσει τα κράτη στην επιλογή των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και την επιστημονική κοινότητα εν γένει στην βελτιστοποίηση των πηγών αυτών. Οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (ΑΠΕ), αποτελούν έναν τομέα, όχι ιδιαίτερα καινούριο που έρχεται να συμβάλει στην απεξάρτηση από τα πετρελαιοειδή. Ανανεώσιμες πηγές ονομάζονται όλες εκείνες οι πηγές που δεν εξαντλούνται, όπως για παράδειγμα είναι η αιολική, η υδροηλεκτρική, η γεωθερμική ενέργεια, όπως επίσης και τα βιοκαύσιμα. Τα βιοκαύσιμα, όπως η βιοαιθανόλη και το βιοντίζελ, είναι αποτέλεσμα αξιοποίησης της βιομάζας και μπορούν να συνεισφέρουν στην κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων. Το υπολειμματικό μέρος της βιομάζας, κυρίως της αγροτικής και δασικής ονομάζεται λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα. Η ετήσια παγκόσμια παραγωγή φυτικής βιομάζας φτάνει τα 200 δισεκατομμύρια τόνους με το 90% της ποσότητας αυτής να είναι λιγνοκυτταρίνη (Saini et.al., 2015). Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα, η οποία εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων, είναι μία απολύτως φυσική και ανανεώσιμη πρώτη ύλη (Anwar et. al., 2014) και αποτελεί τη βάση για ενεργειακές εφαρμογές εξαιτίας της υψηλής διαθεσιμότητάς της, δίχως την ανάγκη επιπρόσθετης καλλιέργειας και του χαμηλού κόστους της (Lynd et. al., Βέβαια, η υδρόλυσή της είναι πιο απαιτητική από τα προϊόντα των 1999). συμβατικών καλλιεργειών τροφίμων (απλά σάκχαρα, φυτικά έλαια, άμυλο), καθιστώντας έτσι τις διαδικασίες μετατροπής της πιο περίπλοκες (Ho et. al., 2014).

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα προσελκύει το παγκόσμιο ενδιαφέρον ως μια βιώσιμη εναλλακτική λύση έναντι των ορυκτών οργανικών πηγών με σκοπό τη παραγωγή δεύτερης γενιάς βιοκαυσίμων αλλά και πολλών άλλων χημικών προϊόντων (Menon et.al., 2012; Chandel et.al., 2018). Μεταξύ των διάφορων βιομηχανικών χρήσεων των λιγνοκυτταρινούχων προϊόντων συμπεριλαμβάνονται εκτός των βιοκαυσίμων και προϊόντα βιοιατρικής, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα, βιοπλαστικά , πολυλειτουργικά οργανικά προϊόντα αλλά και άλλα φιλικά προς το περιβάλλον υλικά (Okolie et.al., 2019). Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά ορισμένα προϊόντα που παραγόνται με βάση τη λιγνοκυτταρινούχο βιομαζα:



Εικόνα 1 : Αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας με σκοπό την παραγωγή πληθώρας προϊόντων (Okolie et.al., 2019).

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελεί ένα ανθεκτικό και ετερογενές υλικό και είναι δύσκολο να αποπολυμεριστεί (Soni et. al., 2018). Αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη που σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο πολυμερών με φυσική αντοχή σε ενζυμική μετατροπή. Για το λόγο αυτό ορισμένα βήματα προκατεργασίας είναι επιτακτικά ούτως ώστε να καταστεί η κυτταρίνη πιο 'προσιτή' με την αλλαγή της φυσικής ή/και της χημικής δομής της κυτταρίνης διευκολύνοντας τη μετατροπή των πολυσακχαριτών στα μονομερή τους σάκχαρα (Zhao et.al., 2012; Kumar et.al., 2017). Η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη βρίσκονται σε διαφορετικές αναλογίες στα διάφορα μέρη του φυτού και συνδέονται ώστε να σχηματίσουν τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος. Η κατανομή της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης αλλά και το περιεχόμενο των διάφορων σακχάρων των 2007). Η ακριβής σύσταση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφέρει από πηγή σε πηγή ανάλογα με το είδος του φυτού, τις συνθήκες κάτω από τις οποίες αναπτύχθηκε, την ωριμότητα των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων αλλά τον τύπο του φυτικού ιστού. Τις περισσότερες πάντως φορές περιέχει 35-50% κυτταρίνη, 20-35% ημικυτταρίνη και 10-25% λιγνίνη (Al-Battashi, et. al., 2019)

Πίνακας 1: Παρουσιάζεται ενδεικτικά η κατανομή της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης από διαφορετικές πηγές βιομάζας. Όπου (1) κάτω από το όριο ανίχνευσης και όπου (2) δεν έχει καθοριστεί (Η Jørgensen et.al. ,2007)

	Γλυκόζη	Ξυλόζη	Αραβινόζη	Μαννόζη	Λιγνίνη
Υλικό	% συνολικού ξηρού βάρους				
Σκληρή ξυλεία					
Σημύδα	38,2	18,5	1	1,2	22,8
Ιτιά	43,0	24,9	1,2	3,2	24,2
Μαλακή ξυλεία					
Έλατο	43,4	4,9	1,1	12,0	28,1
Πεύκο	46,4	8,8	2,4	11,7	29,4
Αγρωστώδη (ποώδη)					
Άχυρο Σίτου	38,2	21,2	2,5	0,3	23,4
Άχυρο Ρυζιού	34,2	24,5			11,9
	·	ŕ	ž	ž	
Φύλλα/Μίσχοι Καλαμποκιού	35,6	18,9	2,9	0,3	12,3



Εικόνα 2: Δομή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (Quiroz et.al., 2013)

1.2 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από γραμμική αλυσίδα μορίων γλυκόζης ενωμένα με β-1,4- γλυκοσιδικούς δεσμούς με βαθμό πολυμερισμού από μερικές εκατοντάδες έως πάνω από 10.000 μονομερή. Η κυτταρίνη αποτελεί το πιο διαδεδομένο οργανικό πολυμερές στη γη. Εξαιτίας της δομής της κυτταρίνης, μεγάλη ποσότητα ομάδων υδροξυλίων αναπτύσσονται στον κορμό της (Sun et. al., 2005). Οι αλυσίδες κυτταρίνης συνδέονται με τους δεσμούς υδρογόνου, σχηματίζοντας ένα δίκτυο από μικροΐνες, δημιουργώντας έτσι την κρυσταλλική δομή της και καθιστώντας την ένα ιδιαίτερα σταθερό πολυμερές. Εξαιτίας λοιπόν της κρυσταλλικής της δομής η κυτταρίνη είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στην αποδόμηση, παρέχει μηχανική αντοχή και χημική σταθερότητα στα φυτά, βοηθώντας τα έτσι να διατηρήσουν τη δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος (Thapa et.al., 2020).

Εξαιτίας της δομής της, τα συστατικά των επιμέρους μικροϊνιδίων είναι στενά στριμωγμένα μεταξύ τους, και εμποδίζουν τη διείσδυση νερού και ενζύμων (Chen et.

al., 2017). Η κυτταρίνη περιλαμβάνει και μία άμορφη περιοχή η οποία είναι εύκολο να διασπαστεί. Συνολικά όμως, ο συνδυασμός άμορφων και κρυσταλλικών περιοχών καθιστά την κυτταρίνη αδιάλυτη στο νερό καθώς και στους κοινούς οργανικούς διαλύτες (Liu et. al., 2019).

Η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης δίνει μεγάλο σθένος και ανθεκτικότητα απέναντι σε χημικές και ενζυμικές επιθέσεις ως εκ τούτου η αποδόμηση της κυτταρίνης μπορεί να γίνει από ελάχιστους οργανισμούς, κυρίως από βακτήρια ή μύκητες. Τα ένζυμα τα οποία διασπούν την κυτταρίνη ονομάζονται κυτταρινάσες και χωρίζονται σε 3 κατηγορίες, την ενδο-γλυκανάση (1,4-β-D-γλουκάνη γλουκανοϋδραλάση EC 3.2.1.4) η οποία συνήθως δρα στην άμορφη περιοχή μειώνοντας τον βαθμό πολυμερισμού της, την εξω-γλουκανάση (1,4-β-D-γλουκάνη κελλοβιοϋδρολάση EC. 3.2.1.91), η οποία δρα στα ελεύθερα άκρα του κρυσταλλικού μέρους της αλυσίδας σχηματίζοντας κελλοβιόζη και την β-γλυκοζιδάση(β-D γλυκοζίδιο γλυκοϋδρολάση, EC 3.2.1.21) η οποία υδρολύει την κελλοβιόζη σε γλυκόζη. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να λειτουργήσουν αυτόνομα ή συνεργιστικά με το καθένα να επιτελεί το έργο του (Saini et.al., 2015).



Cellulose fibers

Εικόνα 3 :Χημική δομή κυτταρίνης (https://alevelbiology.co.uk/notes/cellulose/)

1.3 Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη είναι ένα ετερογενές πολυμερές που αποτελείται από πολλά σάκχαρα , όπως η ξυλόζη, η αραβινόζη, η μαννόζη και η γαλακτόζη (σάκχαρα που αποτελούνται από 5 και 6 μόρια άνθρακα). Οι σημαντικότερες ημικυτταρίνες είναι οι ξυλάνες, οι γλυκάνες και οι μαννάνες, με τις ξυλάνες να είναι οι πλέον άφθονες (Gírio, 2010). Η ημικυτταρίνη είναι γνωστή ως ο δεύτερος πιο άφθονος υδρογονάνθρακας και αποτελεί το 25%–35% ξηρού βάρους του ξύλου. Η ημικυτταρίνη – ως ένα από τα υποστηρικτικά υλικά του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος – παράγεται μέσω διαφορετικών βιοσυνθετικών μονοπατιών από ότι η κυτταρίνη. Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί με αντικείμενο την εκμετάλλευση της ημικυτταρίνης από τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα για χρήση της σε προϊόντα με ποικίλες βιομηχανικές εφαρμογές, όπως τα καύσιμα, τα τρόφιμα και τα φαρμακευτικά προϊόντα(Saha et.al., 2003).

Η ημικυτταρίνη έχει μικρότερη αλυσίδα συγκριτικά με τη κυτταρίνη. Τα μόρια της ημικυτταρίνης είναι μικρότερα, με βαθμό πολυμερισμού μεταξύ 150 και 200 μονομερών και αποτελούνται από διαφορετικά σάκχαρα ετερογλυκάνης λιγότερο διακλαδισμένα σε σχέση με τη κυτταρίνη. Συνεπώς, η ημικυτταρίνη αποδομείται πιο εύκολα κατά τη διεργασία της υδρόλυσης. Επιπλέον, η ημικυτταρίνη έχει άμορφη δομή που οδηγεί σε εύκολη υδρόλυση (McKenzie et.al., 2012). Η υδρόλυση της ημικυτταρίνης παράγει πεντόζες (ξυλόζη, αραβινόζη) και εξόζες (γαλακτόζη, μαννόζη, γλυκόζη) (Jönsson et.al., 2016). Η ημικυτταρίνη μπορεί να αποδομηθεί γρηγορότερα υπό συνθήκες θέρμανσης (Agbor et. al., 2011).

Οι πολυσακχαρίτες που αποτελούν την ημικυτταρίνη διαφοροποιούνται με βάση τόσο τη δομή όσο και τις φυσικοχημικές ιδιότητες, γεγονός που οφείλεται στη δόμηση του σκελετού τους, ο οποίος μπορεί να αποτελείται από πεντόζες όπως β-Dξυλόζη και α-L-αραβινόζη, εξόζες όπως β- D-μανόζη, β-D-γλυκόζη και α-D-γαλακτόζη καθώς και ουρονικά οξέα όπως γλυκουρονικό οξύ. Η ξυλόζη βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία (Vyas et. al., 2018).

Η ξυλάνη είναι ένας από τους κυρίαρχους πολυσακχαρίτες του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος ενώ αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση, μετά την κυτταρίνη. Αποτελείται από μία κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλοπυρανόζης ενωμένων με β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Είναι διακλαδισμένη και φέρει ποικίλους σακχαρικούς υποκαταστάτες. Ο βαθμός και το είδος υποκατάστασης εξαρτώνται από το φυτό από το οποίο προέρχεται (Thomson et.al., 1993).



Εικόνα 4: Μονοσακχαρίτες παρουσιάζονται ως μονομερή των ημικυτταρινών (Pereira et.al., 2007). Cork: Chapter 3 _ The chemical composition of cork; Biology, Production and Uses (pp. 55_99). Amsterdam: Elsevier Publications)

1.4 Λιγνίνη

Η λιγνίνη αποτελεί ένα πολύπλοκο, υδρόφοβο, αρωματικό πολυμερές με πολλές διακλαδώσεις. Συνίσταται από ένα ετερογενές, κρυσταλλικό δικτυωτό πλέγμα πολυφαινολικών ενώσεων (Rahmanpour et.al., 2015). Αυτό σχηματίζεται από επαναλαμβανόμενες μονάδες φαινυλ-προπανίου που ενώνονται μεταξύ τους μέσω

Page 9

αιθερικών δεσμών ή δεσμών άνθρακα-άνθρακα και στερούνται κανονικότητας (Chen et.al., 2017). Είναι το χημικό συστατικό που διακρίνει το ξύλο από τις άλλες κυτταρικές ουσίες που παράγονται στη φύση. Η λιγνίνη βρίσκεται πάντοτε μαζί με την κυτταρίνη, ενώ η κυτταρίνη εμφανίζεται και χωρίς τη λιγνίνη. Παίζει το ρόλο της συγκολλητικής ουσίας τόσο στο ξύλο όσο και σε όλους τους φυτικούς ιστούς. Το ποσοστό της λιγνίνης στο ξύλο κυμαίνεται μεταξύ 17-35%. Ο βιολογικός προορισμός της είναι η ενίσχυση της μηχανικής αντοχής των κυτταρικών τοιχωμάτων αλλά ταυτόχρονα και η εξασφάλιση ελαστικότητας. Η λιγνίνη συγκεντρώνεται κυρίως στη μεσοκυττάρια στρώση, συγκρατεί τα μικροϊνίδια της κυτταρίνης και βελτιώνει την αντοχή τους σε θλίψη. Η απόθεση της λιγνίνης (λιγνοποίηση) συμπληρώνεται μέχρι την πλήρη ανάπτυξη των κυττάρων (Gillet et. al., 2017).

Τρεις αλκοόλες λειτουργούν ως μονομερής της λιγνίνης : η κωνυφερυλική αλκοόλη , η κουμαρυλική αλκοόλη και η σιναπυλική αλκοόλη.



Εικόνα 5 : Μονομερή της λιγνίνης : (1)κουμαρυλική αλκοόλη , (2) κωνυφερυλική αλκοόλη, (3) σιναπυλική αλκοόλη (Wikimedia Commons / Yikrazuul)



Εικόνα 6 :Σχηματική απεικόνιση του σύνθετου δικτύου της λιγνίνης (KIT-IKFT, Marcus Breunig)

1.5 Ενζυμική Υδρόλυση Λιγνοκυτταρινούχου Βιομάζας

Η υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας αποτελεί μία ιδιαίτερα σύνθετη διαδικασία κατά την οποία απαιτείται η αλληλεπίδραση μίας ποικιλίας ενζύμων (Thapa et. al., 2020).

1.5.1 Κυτταρινάσες

Η ικανότητα παραγωγής ενζύμων για την υδρόλυση της κυτταρίνης έχει ταυτοποιηθεί για ένα μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών, στον οποίο περιλαμβάνονται βακτήρια, ακτινομύκητες και μύκητες, πολλοί από τους οποίους χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κυτταρινασών. Λόγω του γεγονότος ότι η κυτταρίνη βρίσκεται προστατευμένη μέσα σε ένα πλέγμα ημικυτταρίνης και λιγνίνης ενώ η ίδια η οργανώνεται σε μια αδιάλυτη και καλά οργανωμένη «κρυσταλλική» δομή, απαιτεί τη συνδυασμένη χρήση, πολλών διαφορετικών ενζύμων που αλληλεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο με την κυτταρίνη (Palonen et. al., 2004).

Η υδρόλυση της κυτταρίνης πραγματοποιείται συνεργιστικά από τρία βασικά ένζυμα: τις ενδογλυκανάσες ή ένδο-1,4-β-D-γλυκάνο γλυκανοϋδρολάσες (EC 3.2.1.4), τις εξωγλυκανάσες ή 1,4-β-D- γλυκανο κελλοβιοϋδρολάσες (EC 3.2.1.91) και τις βγλυκοσιδάσες ή β-D-γλυκοσιδο γλυκοϋδρολάσες (EC 3.2.1.21).

Οι ενδογλυκανάσες υδρολύουν τυχαία σε εσωτερικές άμορφες περιοχές της κυτταρίνης, παράγωντας ολιγοσακχαρίτες διαφορετικών μηκών. Λόγω της παραγωγής ολιγοσακχαριτών, αυξάνεται ο αριθμός των διαθέσιμων άκρων πάνω στα οποία μπορούν να δράσουν οι εξωγλουκανάσες. Οι εξωγλουκανάσες ή κελλοβιοϋδρολάσες διασπούν τους β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς αυτών των ολιγοσακχαριτών σχηματίζοντας μόρια κελλοβιόζης. Μάλιστα, υπάρχουν δύο είδη εξωγλουκανασών, ανάλογα με το αν δρουν στο αναγωγικό ή στο μη αναγωγικό άκρο της αλυσίδας. Τέλος, οι β-γλυκοσιδάσες υδρολύουν τη κελλοβιόζη σε γλυκόζη (Lynd et.al., 2002; Bhalla et.al., 2013; Juturu et.al., 2014).

Συχνά οι ενδογλουκανάσες και οι εξωγλουκανάσες αναφέρονται ως κυτταρινάσες (Blumer et. al., 2008). Οι κυτταρινάσες διακρίνονται από άλλες γλυκοσιδικές υδρολάσες λόγω της ικανότητάς τους να υδρολύουν β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων γλυκοζυλίου. Η ενζυμική θραύση των β-1,4-γλυκοσιδικών δεσμών στην κυτταρίνη προχωρεί μέσω ενός μηχανισμού όξινης υδρόλυσης, χρησιμοποιώντας έναν δότη πρωτονίων και ένα πυρηνόφιλο ή βάση. Τα προϊόντα υδρόλυσης προκύπτουν με αναστροφή ή τη συγκράτηση (μηχανισμός διπλής αντικατάστασης) της ανωμερικής διαμόρφωσης του άνθρακα-1 στο αναγωγικό άκρο (Birsan et.al., 1998; Withers, 2001)



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης των τριών κυτταρινολυτικών ενζύμων(https://www.researchgate.net/figure/Cellulose-hydrolysis-by-the-three-types-of-cellulases-enduglucanase-breaks-the_fig1_236088767)

1.5.2 Ξυλανολυτικά Ένζυμα

Η ημικυτταρίνη μπορεί να υδρολυθεί εύκολα με οξέα στα μονομερή συστατικά της που είναι τα εξής : ξυλόζη, μαννόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη αλλά και μικρές ποσότητες ραμνόζης, γλυκουρονικού οξέος, μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος και γαλακτουρονικού οξέος (Khandeparker et.al., 2008). Η όξινη υδρόλυση όμως πολλές φορές παράγει ανασταλτικούς παράγοντες, όπως η φουρφουράλη (Lee et. al., 1986). Η αποικοδόμηση και ο αποπολυμερισμός αυτού του πολυσακχαρίτη σε ξυλοολιγοσακχαρίτες και ξυλόζη μπορεί επομένως να επιτευχθεί ενζυμικά, μέσω της συνεργιστικής δράσης των ξυλανασών (Bastawde et.al., 1992; Kulkarni et.al., 1999; Subramaniyan et.al., 2002).

Λόγω της σύνθετης χημικής δομής και της ετερογένειας της ξυλάνης η ολική αποδόμηση της απαιτεί τη συνεργιστική δράση διάφορων ενζύμων με διαφορετική ενζυμική εξειδίκευση και δράση. Η πλήρης ενζυμική υδρόλυση της ημικυτταρίνης απαιτεί τη συνεργιστική δράση αρκετών ενζύμων συμπεριλαμβανομένων των ενδοβ-1,4-ξυλανασών, των β-1,4-ξυλοσιδασών, των α-L-αραβινοφουρανοζιδασών, των αγλυκουρονιδασών, των ακετυλοξυλανικών εστερασών, των εστερασών φερουλικού οξέος, των ενδο-1,4-β-μαννανασών, των β-1,4-μαννοσιδασών και των ενδο-1,5-α-Lαραβινοσιδασών (Bhalla et. al., 2013). Όλα αυτά τα ένζυμα δρουν συνεργιστικά και μετατρέπουν την ξυλάνη στα μονομερή της (Beg et.al., 2001).

Η ενδο-β-1,4-ξυλανάση αποπολυμερίζει την ξυλάνη μέσω τυχαίας υδρόλυσης της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης και η β-1,4-ξυλοσιδάση απομακρύνει μονομερή ξυλόζης από τα μη αναγωγικά άκρα των ξυλ-ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν και από την ξυλοβιόζη. Όταν το ξυλόλιο υποστεί αρκετές διαδοχικές υδρολύσεις από ξυλανάση συσσωρεύονται ολιγομερή β-D-ξυλοπυρανοζυλίου, τα οποία μπορούν να αναστείλουν την ενδοξυλανάση. Η β-ξυλοζιδάση στη συνέχεια υδρολύει αυτά τα προϊόντα, αφαιρώντας την αιτία της αναστολής και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης προς ξυλάνη (Andrade et.al., 2004).

Τα υπόλοιπα ένζυμα συμμετέχουν στην απομάκρυνση των πλευρικών αλυσίδων από την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης. Η α-L-αραβινοφουρανοσιδάση και η αγλυκουρονιδάση αφαιρούν τους υποκαταστάτες αραβινόζης και 4-Ο-μεθυλγλυκουρονικού οξέος, αντιστοίχως, από τον κορμό ξυλάνης. Οι εστεράσες υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς μεταξύ των υπομονάδων ξυλόζης και του οξικού οξέος (ακετυλοξυλανική εστεράση) ή μεταξύ καταλοίπων πλευρικής αλυσίδας της αραβινόζης και φαινολικών οξέων, όπως φερουλικό οξύ (εστεράση φερουλικού οξέος) και ρ-κουμαρικό οξύ (εστεράση ρ-κουμαρικού οξέος) (Saha et.al., 2003; Subramaniyan et.al., 2002; Collins et. al., 2005).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της δομής της ξυλάνης, το ξυλανολυτικό σύστημα ενζύμων και ο τρόπος που επιδρά το κάθε ένζυμο (Khan ,2013)



Εικόνα 9: Τρισδιάστατη απεικόνιση της ενδο – β 1,4- ξυλανάσης (https://www.mrc-Imb.cam.ac.uk/genomes/date/1bg4.html)

Συστήματα ξυλανολυτικών ενζύμων εντοπίζονται σε αρκετούς μύκητες, ακτινομύκητες και βακτήρια. Κύριες πηγές των παραπάνω ενζύμων αποτελούν τα παρακάτω γένη: Aspergilli, Trichodermi, Streptomycetes, Phanerochaetes, Chytridiomycetes, Ruminococci, Fibrobacteres, Clostridia και Bacilli (Collins et.al., 2005). Επίσης ξυλανολυτικά ένζυμα έχουν βρεθεί και σε άλλους οργανισμούς, όπως έντομα, θαλάσσια φύκη, πρωτόζωα, σαλιγκάρια και φυτικά σπέρματα (Gírio et.al., 2010).

1.6 Πηγές Παραγωγής ξυλανασών

Οι ξυλανάσες είναι πανταχού παρούσες στη φύση και η παρουσία τους έχει παρατηρηθεί σε μια ευρεία γκάμα ζώντων οργανισμών όπως σε θαλάσσια βακτήρια, βακτήρια εδάφους αλλά και σε βακτήρια μεγάλης κοιλίας (Chakdar et. al., 2016), σε θερμόφιλους και μεσόφιλους μύκητες (Chadha et.al., 2019; Singh et.al., 2019), σε πρωτόζωα (Devillard et. al., 1999; Maillet et. al., 2005), σε μαλακόστρακα (Izumi et. al., 1997), σε σαλιγκάρια (Suzuki et.al., 1991), σε έντομα (Brennan et. al., 2004), σε φύκη (Jensen et. al., 2018), σε φυτά και σπόρους (σε σπόρους αγγουριού που δεν έχουν ωριμάσει και σε βλάστηση κριθαριού) (Bae et. al., 2008; Sizova et. al., 2011). Τα βακτήρια και οι μύκητες είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα για βιομηχανική παραγωγή ξυλανασών.

Ανάμεσα στα βακτήρια, τα διάφορα είδη του Bacillus έχουν αναφερθεί ευρέως ως οι πιο ισχυρές πηγές παραγωγής ξυλανολυτικών ενζύμων όπως οι Bacillus sp., Bacillus halodurans (Gupta et. al., 2015), Bacillus pumilus (Thomas et. al., 2014), Bacillus subtilis (Banka et. al., 2014), Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus circulans και Bacillus stearothermophilus (Chakdar et. al., 2016). Ξυλανάσες με υψηλή θερμοκρασιακή σταθερότητα, αλκαλική/ όξινη σταθερότητα και προσαρμοστικότητα στο κρύο έχουν απομονωθεί και καθαριστεί από πολλά βακτήρια σε ακραία περιβάλλοντα. Η δράση θερμοανθεκτικής ξυλανάσης σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες 60-70 °C έχει αναφερθεί από : Bacillus spp. (Thomas et.al., 2014), Bacillus Halodurans TSEV1 (Kumar et.al., 2014), Clostridium thermocellum (Fernandes et. al., 2015), Rhodothermus marinus (Karlsson et.al., 2004), Streptomyces sp. (Sukhumsirichart et. al., 2014), Stenotrophomonas maltophila (Raj et.al., 2013), Thermotoga thermarum (Shi et. al., 2013). Ψυχρόφιλες ξυλανάσες δεν είναι πολύ συνηθισμένες αλλά βρίσκονται και απομονώνονται από μερικά βακτήρια όπως τα *Clostridium* sp. PXLY1 (Akila et.al., 2003), *Flavobacterium* sp. MSY-2 και *Flavobacterium frigidarium* (Humphry et.al., 2001; Dornez et.al., 2011), *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAH3A (Van Petegem et. al., 2002). Τέλος μερικές ξυλανάσες σταθερές σε αλκαλικό περιβάλλον έχουν απομονωθεί από τον *Bacillus pumilus* (Thomas et. al., 2014), *Bacillus halodurans* TSEV1 (Kumar et.al., 2014) και τον *Geobacillus thermoleovorans* (Verma et.al., 2012) αλλά και από ακτινομύκητες όπως ο *Actinomadura* sp. Cpt20 (Taibi et. al., 2012) και ο *Streptomyces althioticus* LMZM (Luo et. al., 2016).

Οι μεσόφιλοι μύκητες του γένους Aspergillus και Trichoderma είναι γνωστοί ως καλοί παραγωγοί ξυλανασών και ευρέως χρησιμοποιούμενοι για εμπορική παραγωγή. Οι Thielavia terrestris (Garcia et. al., 2017), Talaromyces thermophilus (Maalej et. al., 2009), Paecilomyces thermophile (Fan et. al., 2012), Achaetomium sp. X2-8 (Chadha et.al., 2019), Rhizomucor pusillus (Hóttner et. al., 2018), Rasamsonia emersonii (Martvnez et. al., 2016), T. Leycettanus (Wang et. al., 2017), Melanocarpus albomyces (Gupta et. al., 2013) και Aspergillus oryzae LC1 (Bhardwaj et. al., 2019) έχουν βρεθεί ότι παράγουν υπερ- θερμόφιλες ξυλανάσες. Μερικές ξυλανάσες σταθερές σε αλκαλικό περιβάλλον έχουν ανακτηθεί από διαφορετικούς μύκητες όπως οι Paenibacillus barcinonensis (Valenzuela et.al., 2010), Aspergillus fumigatus MA28 (Bajaj et.al., 2011), Cladosporium oxysporum (Guan et. al., 2016) και Aspergillus oryzae LC1 (Bhardwaj et.al., 2019).

Πίνακας 2: Απεικονίζονται τα βακτήρια και τα είδη αυτών που παράγουν ξυλανάσες (Bhardwaj et.al., 2019)

Major group	Genus	Species	References
Bacteria	Arthrobacter	Arthrobacter sp.	Murugan et al. (<u>2011</u>)
	Geobacillus	Geobacillus thermoleovorans, Geobacillus stearothermophilus Geobacillus thermodenitrificans	Gerasimova and Kuisiene (<u>2012</u>), Verma and Satyanarayana (<u>2012a</u> , <u>b</u>), Bibi et al. (<u>2014</u>)
	Pediococcus	Pediococcus acidilactici	Adiguzel et al. (<u>2019</u>)
Bacillus Clostridi Dictyogl Paenibad Rhodoth Staphylo Pseudor Thermoo	Bacillus	Bacillus firmus, Bacillus arseniciselenatis, Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis	John et al. (<u>2006</u>), Bajaj and Manhas (<u>2012</u>), Kamble and Jadhav (<u>2012</u>), Amore et al.(<u>2015</u>)
	Clostridium	Clostridium thermocellum, Clostridium papyrosolvens	Pohlschroder et al. (<u>1994</u>), Heinze et al. (<u>2017</u>)
	Dictyoglomus	Dictyoglomus thermophilum	Zhang et al. (<u>2010b</u>)
	Paenibacillus	Paenibacillus sp., Paenibacillus xylanilyticus, Paenibacillus terrae, Paenibacillus barcinonensis, Paenibacillus macquariensis	Shi et al. (<u>2010</u>), Valenzuela et al. (<u>2010</u>), Sharma et al. (<u>2013</u>), Song et al. (<u>2014</u>)
	Rhodothermus	Rhodothermus marinus	Abou Hachem et al. (2000)
	Staphylococcus	Staphylococcus aureus, Staphylococcus sp.	Gupta et al. (<u>2000</u>), lloduba et al. (<u>2016</u>)
	Pseudomonas	Pseudomonas sp., Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens subsp. cellulose, Pseudomonas boreopolis, Pseudomonas stutzeri	Raghothama et al. (<u>2000</u>), Xu et al. (<u>2005</u>), lloduba et al. (<u>2016</u>), Lin et al. (<u>2017</u>), Purkan et al. (<u>2017</u>), Lee et al. (<u>2018</u>)
	Thermoactinomyces	Thermoactinomyces thalophilus, Thermoactinomyces vulgaris	Kohli et al. (<u>2001</u>), Selim (<u>2016</u>)
	Thermotoga	Thermotoga maritima Thermotoga thermarum Thermotoga neapolitana	Velikodvorskaya et al. (<u>1997</u>), Shi et al. (<u>2013</u>), Yoon et al. (<u>2014</u>)

1.7 Θερμοσταθερές Ξυλανάσες

Οι κύριοι παραγωγοί θερμοσταθερών ξυλανασών είναι τα βακτήρια και οι μύκητες. Βέβαια, οι βακτηριακές ξυλανάσες γενικά προτιμούνται για την υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων συγκριτικά με τις μυκητιακές, λόγω της υψηλότερης βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης τους και της έντονης θερμοσταθερότητάς τους (Yeoman et. al., 2010; Liao et. al., 2011).

Χαρακτηριστικά γένη βακτηρίων με έντονη παραγωγή θερμοσταθερών ξυλανασών είναι τα παρακάτω: Bacillus, Geobacillus, Thermotoga, Acidothermus, Cellulomonas, Paenibacillus, Thermoanaerobacterium, Actinomadura, Alicyclobacillus, Anoxybacillus, Nesterenkonia, Enterobacter (Bhalla et. al., 2013).

1.8 Γλυκοζυλοϋδρολάσες (GH οικογένειες)

Η ανομοιογένεια και η συνθετότητα της δομής της ξυλάνης οδήγησε σε ένα πλήθος διαφορετικών ξυλανασών με ιδιαιτερότητες, πρωτογενείς ακολουθίες και πτυχώσεις, και συνεπώς δημιούργησε περιορισμούς στην κατάταξη των ενζύμων αυτών από την ιδιαιτερότητα του υποστρώματος και μόνο. Αρχικά οι ξυλανάσες είχαν ταξινομηθεί με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, δηλαδή ανάλογα τη μοριακή τους μάζας και το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Το μοντέλο αυτό περιλαμβάνει πάρα πολλές εξαιρέσεις και το σύστημα αυτό έχει πλέον ξεπεραστεί (Collins et. al, 2005).

Οι γλυκοσιδικές υδρολάσες (GH) είναι μία ευρέως διαδεδομένη κατηγορία ενζύμων που υδρολύουν τον γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ δύο ή περισσότερων υδατανθράκων ή μεταξύ ενός υδατανθρακικού τμήματος και ενός μη υδατανθρακικού τμήματος.

Για την κατηγοριοποίηση των γλυκοσιδικών υδρολασών έχει καθιερωθεί ένα πρότυπο σύστημα το οποίο βασίζεται σε συγκρίσεις της πρωτοταγούς δομής των καταλυτικών περιοχών των ενζύμων και στην ομαδοποίηση οικογενειών με παρόμοια αμινοξική αλληλουχία.

Αρχικά οι κυτταρινάσες και ξυλανάσες είχαν ταξινομηθεί σε 6 οικογένειες με τις ονομασίες από τα γράμματα Α έως F (Henrissat et.al., 1989) ενώ σήμερα περιλαμβάνουν 145 οικογένειες που όλο και αναπτύσσονται, καθώς εντοπίζονται νέες αλληλουχίες γλυκοσιδασών (Coutinho et.al, 1998).

Τα ένζυμα που ανήκουν στην ίδια οικογένεια έχουν παρόμοια τρισδιάστατη δομή και παρόμοιο μοριακό μηχανισμό δράσης. Τέλος, μέσω αυτής της ταξινόμησης αποκαλύπτονται οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των ενζύμων (Henrissat et.al, 2001). Επειδή σε πολλές περιπτώσεις η αναδίπλωση του μορίου στον χώρο είναι περισσότερο συντηρημένη από την αμινοξική αλληλουχία, κάποιες από αυτές τις οικογένειες ομαδοποιούνται περαιτέρω σε υπεροικογένειες (clans).

Για την παρουσίαση των ταξινομικών σχέσεων των ενζύμων έχει δημιουργηθεί μια ελεύθερης πρόσβασης τράπεζα δεδομένων (CAZy: Carbohydrate-Active enZYmes Database - http://www.cazy.org).

1.9 Ταξινόμηση ξυλανασών

Οι κυριότερες οικογένειες GH που περιλαμβάνουν ξυλανάσες είναι 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 και 62. Οι οικογένειες 5, 7, 8, 10, 11 και 43 εμφανίζουν μια ξεχωριστή, μοναδική καταλυτική δράση ενώ τα ένζυμα που ταξινομούνται στις οικογένειες 16, 51 και 62 έχουν δύο καταλυτικές περιοχές με πολυλειτουργικές ιδιότητες (Collins et. al., 2005).Τα ένζυμα που ταξινομούνται στις οικογένειες GH 9, 12, 26, 30 και 44 έχουν δευτερεύουσα ξυλανολυτική δράση.

Τα ένζυμα με ενεργότητα ξυλανάσης έχουν καταταχθεί στις οικογένειες GH 5, 7, 8, 10, 11 και 43, ενώ οι β-ξυλοσιδάσες βρίσκονται στις οικογένειες GH 3, 39, 43 και 52 (http://www.cazy.org).

Οι δύο κυριότερες οικογένειες ξυλανασών είναι οι οικογένειες 10 και 11. Οι διαφορές ανάμεσα σε αυτές τις δύο ομάδες είναι ιδιαίτερα σημαντικές. Τα μέλη της πρώτης οικογένειας έχουν την ικανότητα να προσβάλλουν την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης και τους δεσμούς που βρίσκονται πιο κοντά σε υποκατεστημένα μόρια, σε αντίθεση με τα μέλη της οικογένειας 11, στα οποία η ύπαρξη πλευρικού υποκατάστατη δρα προστατευτικά για τους παρακείμενους δεσμούς. Ως αποτέλεσμα, η δράση των ξυλανασών της οικογένειας 10 στα διάφορα είδη ξυλάνης παράγει προϊόντα που έχουν γενικά μικρότερο μοριακό βάρος από τα αντίστοιχα προϊόντα των ξυλανασών της οικογένειας 11 (Topakas et.al., 2013).



Typical GH10 Xylanase



Typical GH11 Xylanase

Εικόνα 10 :Κλασσική απεικόνιση των ξυλανασών της οικογένειας 10 και 11 (https://en.engormix.com/bioresource-international-inc/xylamax sh15138_pr37682.htm).



Εικόνα 11: Ξυλανάσες (https://academic.oup.com/femsre/article/29/1/3/584031)

1.9.1 Ξυλανάσες GH10

Ανάμεσα σε όλες τις προαναφερθείσες οικογένειες ξυλανασών, η οικογένεια της GH10 συμπεριλαμβάνει τις ενδοξυλανάσες, όπως για παράδειγμα τις ενδο-β-1,4ξυλανάσες, τις ενδο-β-1,3-ξυλανάσες και τις κυτταρινοϋδρολάσες (Collins et.al., 2005). Οι ενδο-β-1,4-ξυλανάσες ή ξυλανάσες συμπεριλαμβάνονται κυρίως στην οικογένεια των GH10. Η οικογένεια αυτή συνήθως αποτελείται από ξυλανάσες με υψηλό μοριακό βάρος, χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο ενώ εμφανίζουν διαμόρφωση (α/β)₈-barrel (Zhang et.al, 2016). Παρόλα αυτά αυτές οι δύο κατηγορίες είναι σχετικά ίδιες διότι κατά μήκος της κοινής μοιραζόμενης δομής, μοιράζονται ταυτόχρονα και ορισμένα κοινά μονομερή και έχουν παρόμοιους καταλυτικούς μηχανισμούς. Οι ξυλανάσες που ανήκουν στην οικογένεια GH10 έχουν χαμηλή εξειδίκευση υποστρώματος, ωστόσο παρουσιάζουν υψηλή καταλυτική προσαρμοστικότητα από ότι οι ξυλανάσες της οικογένεις GH11. Οι ξυλανάσες GH10 παρουσιάζουν μεγαλύτερη καταλυτική δράση και χαμηλότερη εξειδίκευση υποστρώματος συγκρινόμενες με τις ξυλανάσες GH11 (Biely et. al., 1997; Faulds et. al., 2006; Motta et.al., 2013). Οι GH10 ξυλανάσες επιτίθενται στους δεσμούς της ξυλόζης οι οποίοι είναι πιο κοντά στα μονομερή των πλευρικών αλυσίδων (Dodd et.al.,2009). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί με το ότι τα μονομερή της ξυλόζης συνδέονται τμήματα της ξυλανάσης προκαλώντας διάσπαση του δεσμού των μονομερών καταλοίπων μεταξύ του μηαναγωγικού άκρου (-1) και του αναγωγικού άκρου (+1) του υποστρώματος του πολυσακχαρίτη (Davies et. al., 1997).

Σύμφωνα με τους Malsen et.al. (2007) ,όταν η αραβινοξυλάνη υδρολύονταν με ξυλανάση της οικογένειας GH10 και GH11 τα προιόντα που παράγονταν είχαν μονομερή αραβινόζης υποκαθιστώντας την ξυλόζη στο άκρο +1 και -1 αντίστοιχα. Κατά αυτόν τον τρόπο οι ξυλανάσες από τις οικογένειες GH10 και GH11 κατά προτίμηση διασπούν τις μη-υποκατεστημένες περιοχές του σκελετού της αραβινοξυλάνης και τις ανεμπόδιστες υποκατεστημένες περιοχές κατά μήκος του σκελετού της ξυλάνης (Biely et. al., 1997; Motta et. al., 2013). Ο βαθμός των μορίων που πλαισιώνουν τις πλευρικές αλυσίδες επηρεάζει την εξειδίκευση του ενζύμου στα εκάστοτε υποστρώματα και συνεπώς έχει σημαντική επίπτωση στο σχηματισμό του προϊόντος υδρόλυσης κατά την αποδόμηση της ξυλάνης (Dodd et.al., 2009).

Ερευνητές έχουν καταδείξει σε προηγούμενες έρευνες ότι οι ενδοξυλανάσες GH10 εμφανίζουν καλύτερη δράση από αυτή που έχουν οι GH11 συνεργιστικά με τα ένζυμα των κυτταρινασών για την προκατεργασία με σκοπό την υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό ίσως είναι ότι οι GH11 ενδοξυλανάσες έχουν χαμηλότερη προσβασιμότητα απέναντι στον ακετυλιωμένο σκελετό της ξυλάνης (Faulds et. al., 2006). Οι Hu et. al. (2011) προτείναν ένα μοντέλο υποστρώματος ολοκυτταρίνης -για παράδειγμα μια μίξη καθαρής κυτταρίνης και 10% προ-αποακετυλιωμένης βιομηχανική ξυλάνης από ξύλο σημύδας (birchwood)- για να καταλάβουν το συνεργιτισμό μεταξύ των δύο οικογενειών ξυλανασών και των κυτταρινασών κατά τη διάρκεια της αποδόμησης της ξυλάνης. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η αποακετυλίωση του υποστρώματος αύξησε την υδρολυτική ικανότητα της GH11

καθώς η ακετυλιωμένη ομάδα εμπόδιζε την προσβασιμότητα της ξυλάνης περισσότερο για την GH11 από ότι την GH10 ξυλανάση. Η θερμοσταθερότητα είναι ένας δεύτερος παράγοντας για καλύτερη απόδοση της GH10 ενδοξυλανάσης έναντι της GH11 γιατί η υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας πραγματοποιείται καλύτερα σε υψηλή θερμοκρασία (50°C) και σε διάρκεια δύο-τριών ημερών.



Εικόνα 12 : Σχηματική αναπαράσταση του σημείου επίθεσης της ξυλανάσης GH10 στην ξυλάνη (Nisha et.al., 2019)

1.10 Βιομηχανικές Εφαρμογές Ξυλανασών

1.10.1 Οι Ξυλανάσες Στη Βιομηχανία Άρτου Και Στη Ζυθοποιία

Η εφαρμογή των ξυλανολυτικών ενζύμων έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες εξαιτίας της κρίσιμης αποτελεσματικότητας τους στη παραγωγή ψωμιού (Butt et. al., 2008). Η ενζυμική υδρόλυση των μη αμυλούχων πολυσακχαριτών οδηγεί σε βελτίωση των ρεολογικών ιδιοτήτων της ζύμης, στον ειδικό όγκο του ψωμιού αλλά και στη σταθερότητα της ψίχας (Anaya et.al., 1997). Οι ξυλανάσες όπως και οι υπόλοιπες ημικυτταρινάσες διασπούν την ημικυτταρίνη στο αλεύρι σίτου βοηθώντας την ανακατανομή του νερού και παράγοντας μαλακότερη ζύμη, πιο εύκολα ζυμώσιμη. Κατά τη διάρκεια της διεργασίας παραγωγής ψωμιού καθυστερούν το σχηματισμό ψίχας επιτρέποντας στη ζύμη να μεγαλώσει (Polizeli et. al., 2005). Με τη χρήση ξυλανασών, έχει παρατηρηθεί αύξηση στον όγκο των ψωμιών , μεγαλύτερη απορρόφηση νερού και βελτιωμένη αντίσταση στη διόγκωση (Maat et. al., 1992; Harbak et.al., 2002; Camacho et.al., 2003). Επιπλέον μια μεγαλύτερη ποσότητα από αραβινο-ξυλο ολισακχαρίτες στο ψωμί θα ήταν επωφελής για λόγους υγείας (Polizeli et. al., 2005).

Η ξυλανάση μετατρέπει την αδιάλυτη στο νερό ημικυταρίνη σε διαλυτή μορφή προσδένοντας μόρια νερού στη ζύμη μειώνοντας έτσι τη σταθερότητα της, αυξάνοντας τον όγκο και δημιουργώντας καλύτερη και πιο ομοιόμορφη ψίχα (Butt et. al., 2008). Οι ξυλανάσες και τα υπόλοιπα ένζυμα που υδρολύουν το σύνθετο κυτταρικό τοίχωμα χρησιμοποιούνται για να βελτιώσουν τις ιδιότητες μορφοποίησης της ζύμης, να ενισχύσουν τη ποιότητα του ψωμιού και να αυξήσουν τη διατηρισιμότητα μειώνοντας το ρυθμό που αυτό 'μπαγιατεύει' (Wang et.al., 2004; Sorensen et. al., 2001; Monfort et. al., 1997).

Διάφορα ένζυμα όπως είναι οι πρωτεάσες, οι ξυλανάσες και οι κυτταρινάσες ενισχύουν τη δύναμη του δικτύου της γλουτένης βελτιώνοντας τη ποιότητα των προιόντων του άρτου (Gray et.al., 2003).

Για την παρασκευή των μπισκότων επίσης, η ξυλανάση συστήνεται για την κατασκευή λεπτότερων cream crackers και για τη βελτίωση της σύστασης, της ωραίας γεύσης και την ομοιομορφία των γκοφρετών (Polizeli et. al., 2005).

Κατά τη διάρκεια της κατασκευής της μπύρας, το κυψελοειδές τοίχωμα του κριθαριού υδρολύεται απελευθερώνοντας μακριές αλυσίδες των αραβινοξυλανών που αυξάνουν το ιξώδες της μπύρας το οποίο το καθιστά κολλώδες στην εμφάνιση. Κατά συνέπεια, οι ξυλανάσες χρησιμοποιούνται για να υδρολύσουν τις αραβινοξυλάνες στους μικρότερους ολιγοσακχαρίτες που μικραίνουν το ιξώδες της μπύρας και συνεπώς αποβάλλουν τη λασπώδη πτυχή του (Debyser et. al., 1997; Dervilly et. al., 2002). Οι κύριες επιθυμητές ιδιότητες των ξυλανασών για τη χρήση στη βιομηχανία τροφίμων είναι η υψηλή σταθερότητα και βέλτιστη ενεργότητα σε ένα όξινο pH (Polizeli et. al., 2005). Σήμερα, οι ξυλανάσες, από κοινού με τις κυτταρινάσες, τις αμυλάσες και τις πηκτινάσες, οδηγούν σε βελτιωμένη παραγωγή των χυμών με τη βοήθεια της ρευστοποίησης των φρούτων και των λαχανικών, στην ασωμάτων, βιταμινών, ορυκτών αλάτων, εδώδιμων χρωστικών ουσιών, στην μείωση του ιξώδους, στην υδρόλυση των ουσιών που εμποδίζουν τον φυσικό ή τον χημικό καθαρισμό του χυμού (Polizeli et. al., 2005).

1.10.2 Οι Ξυλανάσες Στις Τροφές Των Ζώων

Οι ξυλανάσες βρίσκουν εφαρμογή στον τομέα των ζωικών τροφών σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα: τις γλυκανάσες, τις πηκτινάσες, τις κυτταρινάσες, τις πρωτεάσες, τις αμυλάσες, τις φυτάσες, τις γαλακτοζιδάσες και τις λιπάσες. Αυτά τα ένζυμα διασπούν τις αραβινοξυλάνες των συστατικών της τροφής, που μειώνουν το ιξώδες της πρώτης ύλης. Όταν η ξυλανάση προστίθεται στην τροφή που περιέχει αραβόσιτο και σόργο, όπου και τα δύο είναι τρόφιμα με χαμηλό ιξώδες, μπορεί να βελτιώσει την πέψη των θρεπτικών ουσιών στο αρχικό μέρος της πεπτικής οδού, με αποτέλεσμα την αποδοτικότερη κατανάλωση της ενέργειας που απελευθερώνεται από την τροφή. Τα μικρά των πτηνών και των χοίρων παράγουν ενδογενή ένζυμα σε μικρότερες ποσότητες από τις αντίστοιχες των ενηλίκων, για αυτό τα συμπληρώματα τροφών που περιέχουν εξωγενή ένζυμα θα πρέπει να έχουν βελτιωμένη απόδοση. Επιπλέον, η προσθήκη των εξωγενών ενζύμων έχει τη δυνατότητα να μειώνει τα ανεπιθύμητα υπολείμματα στα περιττώματα (φώσφορος, άζωτο, χαλκός και ψευδάργυρος), μια επίδραση που θα μπορούσε να έχει έναν ρόλο στη μείωση της περιβαλλοντικής μόλυνσης (Polizeli et. al., 2005).

1.10.3 Παραγωγή Ξυλιτόλης

Η ξυλιτόλη – ανήκει στην οικογένεια των πολυαλκοολών- είναι μια γλυκαντική ουσία η οποία έχει πολλαπλά οφέλη: δεν προκαλεί τερηδόνα, αποτελεί ουσία χωρίς κινδύνους για διαβητικούς, προλαμβάνει προβλήματα που γεννά η οστεοπόρωση και κάποιες αναπνευστικές μολύνσεις, 'παρακάμπτει' αναταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων αλλά και νεφρικά και τα παρεντερικά τραύματα. Υπάρχουν διάφορα προϊόντα στο εμπόριο με συστατικό την ξυλιτόλη όπως για παράδειγμα η τσίχλα. Αν και η ενζυμική υδρόλυση της ξυλάνης είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος, αυτή τη στιγμή η εμπορική ξυλιτόλη παράγεται μαζικά μέσω της χημικής κατάλυσης. Αυτή η διεργασία είναι υψηλού κόστους γιατί περιλαμβάνει τον καθαρισμό της ξυλόζης ενώ παράλληλα παράγονται τοξικές ουσίες ως παραπροϊόντα στη ζύμωση, προκαλώντας περιβαλλοντικά προβλήματα (Zeng et.al., 2007).



Εικόνα 13: Παραγωγή ξυλιτόλης με τη χρήση ξυλανασών (https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.06.009)

1.10.4 Βιομηχανία χαρτοπολτού - Κλωστοϋφαντουργία

Μια βασική βιομηχανική εφαρμογή των ξυλανασών συνίσταται στη λεύκανση του πολτού κυτταρίνης. Σε πολλές χώρες βέβαια προτιμάται η χημική μέθοδος από την ενζυμική υδρόλυση, διαδικασία με την ονομασία Kraft. Η διαδικασία λεύκανσης Kraft απαιτεί την εφαρμογή μεγάλων ποσοτήτων ισχυρών οξειδωτικών μέσων για την λεύκανση του χαρτοπολτού. Η χρήση χλωρίνης οδηγεί στην παραγωγή χλωριωμένων υδρογονανθράκων οι οποίοι έχουν προέλθει από την αποικοδόμηση της λιγνίνης και είναι εξαιρετικά τοξικοί και μεταλαξιογόνοι. Οι περιβαλλοντικοί κανονισμοί έχουν θέσει περιορισμό στη χρήση των ενώσεων χλωρίου σε διαδικασίες λεύκανσης χαρτιού, ιδιαίτερα στη Δυτική Ευρώπη και στην Βόρεια Αμερική. Ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί στη χρήση ξυλανασών στο στάδιο της προ-λεύκανσης, η οποία μπορεί να μειώσει την ποσότητα των ενώσεων χλωρίου που χρησιμοποιούνται έως και 30%, ενώ μείωση κατά 15-20% μπορεί να επιτευχθεί στα υγρά απόβλητα (Buchert et.al., 1992).

Οι ξυλανάσες που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία χαρτοπολτού πρέπει να δρουν σε υψηλές θερμοκρασίες, σε αλκαλικό pH ενώ δεν θα πρέπει να περιέχουν κυτταρολυτικά ένζυμα για την αποφυγή της αποικοδόμησης των ινών της κυτταρίνης.

Η αποδοτικότητα των μικροβιακών ξυλανασών στην λεύκανση του χαρτοπολτού έχει διερευνηθεί από πολλούς ερευνητές. Υπάρχουν δύο υποθέσεις για τη δράση των ξυλανασών κατά τη διεργασία της λευκανσης. Η πρώτη υπόθεση βασίζεται στο γεγονός ότι οι ξυλανάσες αποικοδομούν την ξυλάνη η οποία έχει κατακρυμνιστεί πάνω στην λιγνίνη θέτοντάς την πιο εκτεθειμένη στις χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στο στάδιο της λεύκανσης. Η δεύτερη υπόθεση βασίζεται στην ικανότητα της λιγνίνης να σχηματίζει σύμπλοκα με πολυσακχαρίτες όπως, για παράδειγμα με την ξυλάνη ορισμένοι δεσμοί είναι ανθεκτικοί στα αλκάλια και μπορεί να μην έχουν υδρολυθεί κατά την Kraft διαδικασία (Buchert et.al., 1992). Οι ξυλανάσες δρουν αποικοδομώντας τις υπόλοιπες γέφυρες μεταξύ της λιγνίνης και ξυλάνης, χαλαρώνοντας τη δομή της κυτταρίνης και οδηγώντας στην αποικοδόμησή της (Paice et. al., 1992).

Το ξυλανολυτικό σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης στη βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας για την επεξεργασία φυτικών ινών, όπως βαμβακερών, λινάτσας ή λινού (Polizeli et.al., 2005). Για παράδειγμα, μία από τις τεχνολογίες που εφαρμόζεται στην κλωστοϋφαντουργία είναι η υδρόλυση της ημικυτταρίνης του υφάσματος ραμί (ινδικό βαμβακερό ύφασμα) με ξυλανάσες με σκοπό τον καθαρισμό των ινών της κυτταρίνης. Η ενζυμική αυτή μέθοδος εξαλείφει τη χρήση των ισχυρών οξειδωτικών μέσων κατά το στάδιο της λεύκανσης διότι η υπάρχουσα λιγνίνη δεν έχει υποστεί οξειδωση γεγονός που θα οδηγούσε σε ίνες με πιο σκούρα εμφάνιση (Brühlmann et. al., 2000 ; Csiszár et. al., 2001).



Εικόνα 14 :Μια συνολική περιγραφή των εφαρμογών των ξυλανασών σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας (https://bioresourcesbioprocessing.springeropen.com/articles/10.1186/s40643-019-

0276-2)

ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ

2.Μέθοδοι και Υλικά

2.1 Όργανα και Συσκευές

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

- Φωτόμετρο Hitachi UV 2000
- Φωτόμετρο SPECTRAmax 250 (Molecular Devices, USA)
- pH-μετρο 537 της εταιρείας WTW (Γερμανία).
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία)
- Για την αποστείρωση αντιδραστηρίων και διαφόρων γυαλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε αυτόκαυστο Labo Autoclave του οίκου SANYO.
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Θερμοστατούμενοι ηλεκτρικοί αναδευτήρες
- Φυγόκεντρος ΤJ-6 της Beckman Counter (ΗΠΑ) και μικροφυγόκεντρος πάγκου
 Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- High Performance Anion-Exchange Chromatography with pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD (Thermo-scientific)

2.2 Ρυθμιστικά διαλύματα

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

- Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών φωσφορικών 50mM σε pH=7.5, pH=7, pH=6.5, pH=6, pH=5.5, pH=5 pH=4 και pH=3
- Ρυθμιστικό διάλυμα Γλυκίνης/NaOH 50mM σε pH=10 και pH=9
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 50mM σε pH=9, pH=8 και pH=7
2.3 Ένζυμο

Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι μία ενδοξυλανάση της οικογένειας 10 των γλυκοζυλ-υδρολασών (glucoside hydrolase family 10, GH10) από τον βάκιλλο *Bacillus safensis* (BsXyn10). Η ετερόλογη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (BsXyn10) πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστήμιου Αθηνών

2.4 Μέθοδος δινιτρο-σαλικυλικού οξέος (DNS)

Χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό αναγωγικών σακχάρων. Βασίζεται στην αναγωγή του DNS από την ελεύθερη αλδεϋδομάδα των αναγωγικών σακχάρων και την ποσοτική μετατροπή του σε 3-άμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ (πορτοκαλοκόκκινο χρώμα) υπό αλκαλικές συνθήκες. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας αναγωγικού σακχάρου που υπάρχει στο διάλυμα. Το 3άμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ απορροφά στα 540 nm (Miller, 1959).



Εικόνα 15: Σχηματική αντίδραση μεθόδου DNS

Στο Διάγραμμα 1, παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα ξυλόζης.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς ισοδύναμων ξυλόζης με τη μέθοδο DNS

2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

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



Εικόνα 16: Μέθοδος Bradford (http://www.qcbio.com/pierce/23236.htm)

2.6 Μέτρηση Ενζυμικής Ενεργότητας Ξυλανάσης

Η εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας γίνεται με τη μέτρηση των παραγόμενων αναγωγικών σακχάρων που προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου. Αυτά προσδιορίζονται ποσοτικά μέσω της μεθόδου DNS. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ξυλάνη από ξύλο βρώμης (xylan oat spelt) σε συγκέντρωση 2% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών φωσφορικών pH=7. Η επώαση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 60°C για 15 min. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος DNS, φυγοκέντρηση και φωτομέτρηση του υπερκειμένου στα 540 nm.

Ως **μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit)** ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου η οποία παράγει 1 μmol προϊόντος ανά λεπτό υπό τις συνθήκες του πρωτοκόλλου της ενζυμικής αντίδρασης.

2.7 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός προϊόντων υδρόλυσης ξυλάνης

Για τα προϊόντα υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης χρησιμοποιείται χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης με αμπερομετρική παλμική ανίχνευση (High Performance Anion-Exchange Chromatography with pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD). Η στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης είναι θετικά φορτισμένη, ενώ ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιούνται υδατικά διαλύματα NaOH και NaOH σε συνδυασμό με CH₃COONa.

Το υψηλό pH στη στήλη, λόγω της παρουσίας του NaOH, έχει ως αποτέλεσμα τον ιονισμό των καρβοξυλικών ομάδων και την παραγωγή ασθενών όξινων ανιόντων, που αλληλεπιδρούν με τη θετικά φορτισμένη στατική φάση και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος, τη σύνθεση και το είδος των δεσμών τους. Η προσθήκη του CH3COONa επιταχύνει την έκλουση των ισχυρά δεσμευμένων ανιόντων στη στατική φάση, ενώ βοηθά στον διαχωρισμό και την ανίχνευση των μεγαλύτερων σε μέγεθος ολιγοσακχαριτών, καθώς εμφανίζουν καλύτερη διαλυτότητα στον συνδυασμό των διαλυτών NaOH και CH₃COONa.

Για την ανάλυση των ξυλο-ολογοσακχαριτών χρησιμοποιήθηκε στήλη Carbopac PA1 (4x250 mm) με προστήλη Carbopac PA1 (4x50 mm). Οι διαλύτες έκλουσης ήταν 100 mM NaOH (διαλύτης A) και 10 mM NaOH/1 M CH₃COONa. Η ροή ρυθμίστηκε στο 1 mL/min και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 30 min. Χρησιμοποιήθηκε αμπερομετρικός ανιχνευτής (ηλεκτρόδιο χρυσού, Gold pH-Ag-AgCl). Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 30°C. Η στήλη εκλούστηκε με το παρακάτω gradient :



Διάγραμμα 2: Μεταβολή συγκεντρώσεων διαλυτών Α και Β κατά την έκλουση της στήλης.

2.8 Χαρακτηρισμός της BsXyn10

2.8.1 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα και την σταθερότητα του ενζύμου Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίσθηκε με μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας σε θερμοκρασίες από 20°C έως 80°C σύμφωνα με τον προσδιορισμό ενζυμικής ενεργότητας που περιγράφεται παραπάνω.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην σταθερότητα του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με επώαση της BsXyn10 στην εκάστοτε θερμοκρασία για διάφορους χρόνους σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – φωσφορικού νατρίου 50 mM (pH 7.0) και η εναπομείνουσα ενεργότητα σύμφωνα με τον προσδιορισμό ενζυμικής ενεργότητας που περιγράφεται παραπάνω.

2.8.2 Επίδραση του pH στην ενεργότητα και την σταθερότητα του ενζύμου

Η επίδραση του pH στην ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίσθηκε με μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας σε διάφορες τιμές pH σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού που περιγράφεται νωρίτερα. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – φωσφορικού νατρίου 50 mM (pH 3.0 - 7.5), ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 100 mM (pH 7.5 - 9.0) και ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης/NaOH (pH 9.0-10.0).

Η σταθερότητα του ενζύμου μελετήθηκε στα παραπάνω pH μετρώντας την εναπομένουσα ενζυμική ενεργότητα ύστερα από 24 ώρες, σε θερμοκρασία 4°C.

2.8.3 Επίδραση ιόντων μετάλλων, EDTA και SDS στην ενεργότητα του ενζύμου

Μελετήθηκε η επίδραση ιόντων μετάλλων, EDTA και SDS στην ενεργότητα της ξυλανάσης. Η συγκέντρωση των ιόντων ήταν 5 mM. Τα ιόντα μετάλλων που εξετάσθηκαν ήταν:

- 1. Mn^{2+} από την ένωση $MnSO_4H_2O$
- 2. Mg^{2+} από την ένωση $MgCl_2$
- 3. Na⁺ από την ένωση NaCl
- 4. Κ⁺ από την ένωση KCl

5. Ca²⁺ από την ένωση CaCl₂

6. Cu^{2+} από την ένωση $CuCl_22H_2O$

7. Co²⁺ από την ένωση CoCl₂

8. Fe³⁺ από την ένωση FeCl₃

9. Zn²⁺ από την ένωση ZnSO₄7H₂O

10. Ba^{2+} από την ένωση $BaCl_22H_20$

Καθώς επίσης και οι ουσίες:

11. EDTA

12. SDS

Το ένζυμο μαζί με το μεταλλοϊόν, SDS και EDTA επωάστηκαν για 60 λεπτά στους 30°C και μετρήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου με τη μέθοδο προσδιορισμού που περιγράφεται νωρίτερα.

2.8.4 Εξειδίκευση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα

Τα υποστρώματα που εξετάστηκαν ήταν: ξυλάνη βρώμης (Oat Spelts), ξυλάνη σημύδας (Birchwood), ξυλάνη οξιάς (Beechwood), αραβινοξυλάνη (Arabinoxylane), αραβινάνη (Arabinane), καρβοξυμέθυλ- κυτταρίνη (CMC) και μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (avicel). Τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 2% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών, pH=7. Μετά την προσθήκη του ενζύμου ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 60°C για 15 λεπτά. Ακολουθεί προσδιορισμός των συνολικών αναγωγικών ομάδων με τη μέθοδο DNS.

2.8.5 Εύρεση κινητικών σταθερών

Για την κινητική μελέτη της BsXyn10 χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η ξυλάνη βρώμης. Μετρήθηκε η ενζυμική ενεργότητα για διάφορες συγκεντρώσεις ξυλάνης από 1 έως 40 g/L.

2.8.6 Υδρόλυση ξυλάνης βρώμης

Η αντίδραση υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης πραγματοποιήθηκε υπό τις συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας. Σε τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες, τα δείγματα αραιώθηκαν με υπερκάθαρο νερό και ακολούθησε προσδιορισμός των προϊόντων υδρόλυσης με HPAEC-PAD.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων υδρόλυσης (ξυλόζη, ξυλοβιόζη, ξυλοτριόζη, ξυλοτετραόζη, ξυλοπενταόζη και ξυλοεξαόζη) χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς οι οποίες παρατίθενται στη συνέχεια.





Διάγραμμα 3: Καμπύλες αναφοράς (α) ξυλόζης, (β) ξυλοβιόζης, (γ) ξυλοτριόζης, (δ) ξυλοτετραόζης, (ε) ξυλοπενταόζης και (στ) ξυλοεξαόζης

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Προσδιορισμός μοριακού βάρους

Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του ενζύμου πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Η χρώση της πηκτής έγινε με Coomassie Brilliant Blue. Το μοριακό βάρος της BsXyn10 βρέθηκε ~48 kDa (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση BsXyn10 και χρώση με Coomassie Brilliant Blue – στο πήκτωμα φαίνεται στα δεξιά η δέσμη των πρωτεϊνικών μορίων του πρότυπου διαλύματος (marker) και στα αριστερά η ζώνη που αντιστοιχεί στην BsXyn10

Γενικά οι ξυλανάσες της οικογένειας GH10 εμφανίζουν μοριακό βάρος >30 kDa (Torronen et.al., 1997). Το μοριακό βάρος της BsXyn10 είναι στο εύρος των μοριακών βαρών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για τις GH10 ξυλανάσες (Πίνακας 3). Ενδεικτικά, η ξυλανάση του *Bacillus sp*.KW1 έχει μοριακό βάρος 50 kDa (Wang et.al., 2019), η ξυλανάση που απομονώθηκε από *Bacillus sp*. HJ14 45 kDa (Zhou et.al.,2014) ενώ η ξυλανάση του *Bacillus halodurans* TSEV1 έχει μοριακό βάρος 40 kDa (Kumar et.al.,2013). Επίσης οι ξυλανάσες των *Bacillus firmus, Bacillus halodurans* S7, *Bacillus sp*. N16-5, *Bacillus sp*. HJ2 και *Bacillus sp*. SN5 έχουν μοριακά βάρη 45, 43, 48, 46 και 45 kDa αντίστοιχα (Chang et.al.,2004; Mamo et.al.,2006 ; Zhang et.al.,2010 ; Zhou et.al.,2012 ; Bai et.al.,2012). Τέλος, το μοριακό βάρος της ξυλανάσης από το βακτήριο *Marinifilaceae bacterium SPP2* είναι ίσο με 51 kDa (Han et.al., 2019).

3.2 Θερμοκρασία δράσης της ξυλανάσης BsXyn10

Η θερμοκρασία στην οποία παρουσίασε τη μέγιστη δραστικότητα η BsXyn10 ήταν 60 °C (Διάγραμμα 4). Στην θερμοκρασία αυτή, η BsXyn10 παρουσιάζει το 100% της σχετικής ενεργότητάς της, και με βάση αυτήν ορίστηκαν τα ποσοστά σχετικής ενεργότητας στις υπόλοιπες θερμοκρασίες.



Διάγραμμα 4: Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστικότητα της BsXyn10

Στο διάγραμμα 4 παρατηρείται ότι για τις θερμοκρασίες εκτός των 60°C, ακόμα και για αυτές πλησίον των 60, δηλαδή αυτές των 50, 65 και των 70°C η σχετική ενεργότητα μειώνεται απότομα. Από το 100 % δηλαδή για τους 60 °C, παρατηρείται ότι πέφτει στο 30 % για τους 65°C, σε θερμοκρασιακή διαφορά μόνο 5 °C. Αντίστοιχα για τη θερμοκρασία των 50 η σχετική ενεργότητα κυμαίνεται στο 48 %. Για όλες τις υπόλοιπες θερμοκρασίες παρατηρούνται χαμηλές τιμές σχετικής ενεργότητας.

Παρόμοια συμπεριφορά, αναφορικά με την ενεργότητα του ενζύμου συναρτήσει της θερμοκρασίας δράσης του, εμφανίζει μία GH10 ξυλανάση από το βακτήριο *Roseithermus sacchariphilus* όπου παρατηρείται απότομη μείωση της σχετικής ενεργότητας (από 100% στο 40 %) για θερμοκρασιακή διαφορά 10°C (Teo et.al., 2019). Επιπλέον, αναφέρεται η μείωση της σχετικής ενεργότητας του ενζύμου -με βέλτιστη θερμοκρασίας δράσης τους 80°C -κατά 50% περίπου στη θερμοκρασία των 85°C (Fredriksen et.al., 2019). Παρόλο που η βέλτιστη θερμοκρασία για την δραστικότητα της ενδοξυλανάσης από το *G. stearothermophilus* KIBGE-Ib29 ήταν οι 60°C, σχεδόν η μισή ενεργότητα του ενζύμου χάθηκε όταν η θερμοκρασία έφτασε τους 70°C. Ορισμένες μέτρια θερμόφιλες ξυλανάσες όπως για παράδειγμα η Xyn10B από *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 και η CbXyn10B από *C. bescii,* εμφανίζουν υψηλή βέλτιστη θερμοκρασία (περίπου στους 70°C). Παρόλα αυτά η ενεργότητα τους μειώνεται σημαντικά στους 80°C (Gavaseraei et.al., 2021).

Η BsXyn10 που μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική προέρχεται από τον Bacillus safensis, και εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 60 °C. Παρατηρώντας και τον Πίνακα 3 που αναφέρεται σε ξυλανάσες που ανήκουν στην οικογένεια GH10, και ειδικότερα αυτές που προέρχονται από τα διάφορα γένη του Bacillus η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης είναι μεταξύ 60 και 80° C. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης για τον Bacillus sp. KW1 και τον Thermobacillus composti βρέθηκε 65°C (Wang et.al., 2019; Sepulchro et.al., 2020), για τον Bacillus sp. HJ14 ήταν 62.5°C (Zhou et.al., 2014) ενώ για τους B. firmus, B. halodurans S7, Bacillus sp. N16-5 και Bacillus sp. NG-27 οι 70°C (Chang et.al., 2004; Mamo et.al., 2006; Zhang et.al., 2010; Bhardwaij et.al., 2008). Για τους δε βάκιλλους Bacillus sp TAR-1 και B. halodurans TSEV 1 οι βέλτιστες θερμοκρασίες δράσης είναι 75 και 80°C αντίστοιχα (Nakamura et.al., 1994; Kumar et.al., 2013). Υπάρχουν και οι περιπτώσεις των Bacillus sp. HJ2 και Bacillus sp. SN5 με βέλτιστες θερμοκρασίες δράσης χαμηλές, 35 και 40°C αντίστοιχα (Zhou et.al., 2012; Bai et.al., 2012). Για τις υπόλοιπες ξυλανάσες της οικογένειας GH10 εκτός των διάφορων γενών βάκιλλων η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης κυμαίνεται από 30 έως 80°C. Ορισμένες ξυλανάσες από στελέχη του γένους Streptomyces όπως οι Streptomyces fradie, S. halstedi, και S. olivaceoviridi έχουν παρόμοια βέλτιστη θερμοκρασία δράσης (60°C) (Meng et.al., 2008).

Μικροοργανισμός	MW (kDa)	Βέλτιστο pH	Βέλτιστη Θερμοκρασί α (°C)	Θερμική Σταθερότητα	pH σταθερότητα	Km (g/L)	Αναφορά
Bacillus safensis	48	7	60	t _{1/2} =25 min/60 °C	5-8.0 (4°C, 24h)	19.6	Παρούσα εργασία
Bacillus sp. KW1	50	6.0	65	t _{1/2} =12hr/65 °C	6 - 11 (25 °C, 12 h)	-	Wang et.al, (2019)
Bacilus sp. HJ14	45	6.5	62.5	t _{1/2} =/ 75 °C	4-11 (65°C, 1h)	5.6	Zhou et. al., (2014)
B. halodurans TSEV1	40	9,0	80	t _{1/2} =35min /80 °C	-	2.05	Kumar et. al, (2013)
B. firmus	45	7,5	70,0	t _{1/2 =} 4hr /72 °C	-	-	Chang et.al.,(2004)
B. halodurans S7	43	9,0-9,5	70,0	t _{1/2} <3,5hr/ 65 °C	5-10.5 (50°C, 12 h)	4.37	Mamo et.al.,(2006)
Bacillus sp. N16-5	48	7,0	70,0	t _{1/2} < 10min /70 °C	5.4-10.6 (70°C, 10 min)	-	Zhang et.al.,(2010)
Bacillus sp. HJ2	46	6,5	35,0	50%, >45°C, 5 min	6–10 (25°C 1 hr)	0,5	Zhou et. al., (2012)
Bacillus sp. SN5	45	7,0	40,0	48%, 40°C, 30 min	5.6–9.6 (4°C, 24h)	0,6	Bai et. al., (2012)
Thermoanaerobacterium	50	7,5	65,0-75,0	-	-	25,0	Zarafeta et. al., (2020)
Thermobacillus composti	50	6,0- 8,0	65,0	56 hr στους 50 °C	-	1,8	Sepulchro et.al.,(2020)
Penicillium funiculosum	41	4,0- 5,5	80,0	>180 min στους 70 °C	-	3,7	Lafond et.al.,(2020)
Marinifilaceae bacterium SPP2	51	6,0	50,0	88%, 40 °C, 1 hr	80%, pH 4–11, 1 hr	0,97	Han et.al.,(2019)
Cellulosimicrobium sp. strain HY-13	42	6,0	55,0	50%, 55 °C, 20 min	-	-	Kim et al., (2009)
Geobacillus thermoleovorans	45	9,0	70,0	50%, 80°C, 10 min	90%, pH 8–10, 3 hr	0,63	Verma et.al.,(2012)
Cohnella laeviribosi HY-21	40	7,5	50,0	50%, 50°C, 15 min	-	-	Kim et. al., (2010)
Sorangium cellulosum So9733-1	-	7,0	30,0-35,0	20%, 50°C, 20 min	60%, pH 6–9, 1 hr	25,8	Wang et. al.,(2012)
Flavobacterium johnsoniae	52	8,0	30,0	50%, 40 °C, 2 hr	55%, pH 5–9, 1 hr	5	Chen et al., (2013)

Πίνακας 3: Βιοχημικά χαρακτηριστικά GH10 ξυλανασών

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της BsXyn10 βρίσκεται στο θερμοκρασιακό εύρος των βέλτιστων θερμοκρασιών δράσης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για ξυλανάσες της οικογένειας GH10.

Η ενέργεια ενεργοποίησης (E_a , kJ·mol⁻¹) της υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10 στο θερμοκρασιακό εύρος 30-60°C, προσδιορίστηκε από το διάγραμμα Arrhenius (Διάγραμμα 5) και βρέθηκε ίση με 39.8 kJ·mol⁻¹.



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης (Ε_α) της υδρόλυσης ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10.

Παρόμοια τιμή E_a εμφανίζει η GH10 ξυλανάση από τον *B. halodurans* TSEV1 (30.51 kJ·mol⁻¹) (Kumar et.al.,2013), ενώ η ενέργεια ενεργοποίησης για τη GH10 ενδοξυλανάση από *Thermotoga naphthophila* RKU-10T βρέθηκε ίση με 65.5 kJ·mol⁻¹ (Haq et.al.,2019). Οι τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης για την υδρόλυση της ξυλάνης οξιάς και σημύδας από την GH10 ξυλανάση του *Arthrobacter* sp. GN16 βρέθηκαν ίσες με 27.08 και 29.74 kJ·mol⁻¹ αντίστοιχα (Zhou et.al., 2015).

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης εκφράστηκε με όρους θερμοκρασιακού πηλίκου Q₁₀ (temperature quotient). Το θερμοκρασιακό πηλίκο Q₁₀ είναι ο παράγοντας κατά τον οποίο αυξάνεται ο ρυθμός μιας αντίδρασης με αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10°C. Ο παράγοντας Q₁₀ υπολογίστηκε από την εξίσωση 1 (Dixon & Webb, 1979).

$$Q_{10} = antilog \left(\frac{E_a \cdot 10}{R \cdot T}\right)$$
 (E§. 1)

όπου

Ea, (kJ/mol): η ενέργεια ενεργοποίησης

Τ (Κ): η απόλυτη θερμοκρασία

R (8.314 J mol⁻¹ K⁻¹): η παγκόσμια σταθερά των αερίων

Ο παράγοντας Q₁₀ για την BsXyn10 βρέθηκε ίσος με 1.5. Ο παράγοντας Q₁₀ από την GH10 ξυλανάση που απομονώθηκε από το *Arthrobacter* sp. GN16 για την υδρόλυση της ξυλάνης οξιάς ισούται με 1.39 και για τη ξυλάνη σημύδας ίσος με 1.44 (Zhou et.al., 2015). Επίσης, ο παράγοντας Q₁₀ για τη ξυλανάση GH10 από τον *B. halodurans* TSEV1 είναι ίσος με 1.29 (Kumar et.al., 2013).

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι της υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις 2-7(Eyring & Stearn, 1939) και συνοψίζονται στον Πίνακα 4.

$$k_{cat} = \left(\frac{k \cdot T}{h}\right) \cdot e^{(-\Delta H^*/RT)} \cdot e^{(\Delta S^*/R)} \quad (E\xi. 2)$$

όπου

kcat (sec⁻¹): αριθμός μετατροπής (turnover number)

Τ (Κ): η απόλυτη θερμοκρασία

ΔΗ* (kJ·mol⁻¹) η μεταβολή της ενθαλπίας ενεργοποίησης

ΔS* (kJ·mol^{-1.}K⁻¹) η μεταβολή εντροπίας ενεργοποίησης

h (1.104x10⁻³⁵J·min): η σταθερά Plank

κ (1.38x10⁻²³J·K⁻¹): η σταθερά Boltzmann

R (8.314 J·mol^{-1.}K⁻¹): η παγκόσμια σταθερά των αερίων

$$\Delta H^* = E_{\alpha} - R \cdot T \quad (E\xi. 3)$$

όπου

Ea (kJ/mol): η ενέργεια ενεργοποίησης

$$\Delta G^*(\epsilon \lambda \epsilon \dot{\nu} \theta \epsilon \rho \eta \epsilon \nu \dot{\epsilon} \rho \gamma \epsilon \iota \alpha \epsilon \nu \epsilon \rho \gamma \sigma n o (\eta \sigma \eta \varsigma) = -R \cdot T \cdot ln \left(\frac{k_{cat} \cdot h}{\kappa \cdot T}\right) \quad (E\xi. 4)$$
$$\Delta S^* = \frac{\Delta H^* - \Delta G^*}{T} \quad (E\xi. 5)$$

Η ελεύθερη ενέργεια της πρόσδεσης του υποστρώματος και του σχηματισμού του μεταβατικού σταδίου (transition state formation) υπολογίστηκε από τις ακόλουθες εξισώσεις:

 $\Delta G^*_{E-S}(ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης υποστρώματος) = -R \cdot T \cdot lnK_{\alpha}$ (Εξ. 6) όπου

$$K_{\alpha} = \frac{1}{K_{m}}$$

$$\Delta G^*_{E-T}$$
(ελεύθερη ενέργεια μεταβατικού σταδίου) = $-R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)$ (Εξ. 7)

όπου

K_m: σταθερά Michaelis-Menten

Οι τιμές των ΔH^{*}, ΔG^{*} και ΔS^{*} στους 60°C (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης) για την υδρόλυση ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10 βρέθηκαν ίσες με 37.0 kJ·mol⁻¹, 57.6 kJ·mol⁻¹ και -61.9 J·mol⁻¹ K⁻¹, αντίστοιχα. Η τιμή της ΔH^{*} βρέθηκε συγκρίσιμη με τις τιμές των GH10 ξυλανασών που απομονώθηκαν από *Bacillus halodurans* TSEV1H, *Thermomyces lanuginosus, Arthrobacter* sp. GN16 ενώ ήταν μικρότερη της τιμής που προέκυψε για την ξυλανάση από *Thermotoga naphthophila* RKU-10^T (Πίνακας 4). Χαμηλή τιμή ΔH^{*} υποδεικνύει ότι ο σχηματισμός του μεταβατικού σταδίου ή του ενεργοποιημένου συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (E-S^{*}) είναι αποτελεσματικής τιμή της ΔS^{*} για την BsXyn10 υποδεικνύει τη δημιουργία μεταβατικού σταδίου του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος το οποίο εμφανίζει μικρότερη "αταξία" (Bokhari et. al. 2009; Haq et.al.,2019; Zhou et. al., 2015; Kumar et.al.,2013).

Παράμετρος	BsXyn10 ¹	Bacillus halodurans TSEV1 ²	Thermotoga naphthophila RKU-10 ^{™3}	Thermomyces Ianuginosus⁴	<i>Arthrobacter</i> sp. GN16⁵
E _α (kJ [·] mol ⁻¹)	39.8	30.51	65.5	30.71	27.08* & 29.74**
ΔH* (kJ·mol⁻¹)	37.0	27.56	62.56	27.94	24.73 & 27.38
∆G* (kJ·mol⁻¹)	57.6	197.65	70.11	57.1	65.19 & 65.40
ΔS* (J [.] mol ^{-1.} K ⁻¹)	-61.9	-198.5	-21.39	-87.77	-143 &-134.42
ΔG^*_{E-S} (kJ·mol ⁻¹)	6.0	21.15	-	-29.2	-
ΔG^*_{E-T} (kJ·mol ⁻¹)	-18.2	-24.84	-	-5.88	-

Πίνακας 4: Θερμοδυναμικές παράμετροι υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10 στους 60°C και αντίστοιχες τιμές GH10 ξυλανασών.

¹Οι θερμοδυναμικές παράμετροι υπολογίστηκαν στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης (60°C), παρούσα εργασία

²Οι θερμοδυναμικές παράμετροι αφορούν σε θερμοκρασία 80°C (Kumar et.al.,2013)

³Οι θερμοδυναμικές παράμετροι αφορούν σε θερμοκρασία 80°C (Haq et.al.,2019)

⁴Οι θερμοδυναμικές παράμετροι αφορούν σε θερμοκρασία 60°C (Bokhari et.al.,2009)

⁴Οι θερμοδυναμικές παράμετροι αφορούν σε θερμοκρασία 10°C (Zhou et. al., 2015)

*Υδρόλυση ξυλάνης οξιάς (beechwood xylan)

**Υδρόλυση ξυλάνης σημύδας (birchwood xylan

Η πιθανότητα να πραγματοποιηθεί μία χημική αντίδραση καθορίζεται από τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά Gibbs (ΔG^*) και ειδικότερα στην περίπτωση μίας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης του σταδίου μετατροπής του συμπλόκου ενζύμου υποστρώματος (E-S) σε προϊόντα. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή της ΔG^* τόσο ευκολότερα πραγματοποιείται η αντίδραση (δηλ. η μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν). Η τιμή της ΔG^* για την BsXyn10 δηλώνει ότι κατά την υδρόλυση της ξυλάνης βρώμης, η μετατροπή του μεταβατικού συμπλόκου σε προϊόντα είναι περισσότερο "αυθόρμητη" συγκριτικά με την αντίδραση υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης, που απομονώθηκε από τον *Bacillus halodurans* TSEV1H (Kumar et.al.,2013). Η αρνητική τιμή της ΔG^*_{E-T} για την BsXyn10 υποστρώματος (Kumar et.al.,2013; Bokhari et.al., 2009).

3.3 Θερμική σταθερότητα της ξυλανάσης BsXyn10

Η θερμική απενεργοποίηση των ενζύμων γίνεται σε δύο στάδια:

Φυσική μορφή (N) → Ασταθής ενδιάμεση μορφή (U) → Ανενεργή μορφή (I) Όταν το ένζυμο εκτίθεται σε υψηλή θερμοκρασία, σχηματίζεται ένα ασταθές ενδιάμεσο (U) όσο η ενέργεια που παρέχεται στο ένζυμο παραμένει μικρότερη από την ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης (E_{a(d)}). Σε αυτή την περίπτωση η ασταθής ενζυμική μορφή (U) θα μπορούσε να επανέλθει στη φυσική μορφή του ενζύμου με ψύξη. Στην αντίθετη περίπτωση, δηλ. όταν η ενέργεια ξεπεράσει το κατώφλι της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης, με παρατεταμένη έκθεση στη θερμότητα, τότε το ένζυμο οδηγείται σε «ξεδίπλωμα» (unfolding) (καταστροφή της τριτοταγούς δομής) (Kumar et. al., 2013).

Η σταθερότητα του ενζύμου μελετήθηκε για τις θερμοκρασίες 40, 50, 60, 70 και 80°C. Η απενεργοποίηση ενός ενζύμου μπορεί να περιγραφεί με κινητική πρώτης τάξης. Η ενζυμική ενεργότητα μειώνεται γραμμικά συναρτήσει του χρόνου όπως περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = -k_d t$$
 (E§. 8)

Όπου

 A_t (Units/ mg πρωτεΐνης): η ενεργότητα του ενζύμου στο χρόνο t A_0 (Units/ mg πρωτεΐνης): η αρχική ενεργότητα του ενζύμου t (min): είναι ο χρόνος επώασης k_d (min⁻¹): η σταθερά θερμικής απενεργοποίησης της α-αμυλάσης

Από την προσαρμογή της εξίσωσης 8 στα δεδομένα του Διαγράμματος 6 προέκυψαν οι σταθερές θερμικής απενεργοποίησης της BsXyn10 για κάθε θερμοκρασία (Πίνακας 5).



Διάγραμμα 6: Θερμική σταθερότητα της BsXyn10 σε θερμοκρασία **(α)** (●) 40°C, και **(β)** (Ο) 50°C, (Δ) 70°C και (▼) 80°C.

Για τη θερμοκρασία των 80 °C, που είναι και η μέγιστη που μελετήθηκε, η ενεργότητα του ενζύμου μηδενίζεται ταχύτατα (εντός 3 min) ενώ για τους 70°C εντός 15 min. Η BsXyn10 διατηρεί το 53% της αρχικής της ενεργότητάς της μετά από επώαση στους 60°C για 15 min. Σε θερμοκρασία 50°C η BsXyn10 διατηρεί το 54% της αρχικής της ενεργότητας για χρόνο επώασης 6 h. Τέλος στους 40° C η ενεργότητα μειωνεται στο 61% της αρχικής μετά από 3 ημέρες. Η GH10 ξυλανάση από τον *Thermobacillus composti* βρέθηκε σταθερή στους 50°C για 56 h (Sepulchro et.al., 2020) ενώ η ξυλανάση από *Penicillium funiculosum* είναι σταθερή περισσότερο από 180 min στους 70°C (Lafond et.al.,2020). Η ξυλανάση από το βακτήριο *Marinifilaceae bacterium* SPP2 διατηρεί το 88% της ενεργότητας της για 1 h στους 40 °C. Οι ξυλανάσες που απομονώθηκαν από *Geobacillus* sp. MT-1 (Wu et.al., 2006) και *Streptomyces* sp. S9 (Meng et.al., 2008) απενεργοποιούνται μετά από 30 min επώαση στους 70°C. Η ξυλανάση XynAM6 από τον *S. megasporus* DSM 41476 έχασε το 40% της ενεργότητας της μετά από 1 h επώαση στους 70°C και η ενεργότητα της μηδενίστηκε στους 80 °C μετά από 20 min (Qiu et.al.,2010).

Ο χρόνος ημίσειας ζωής (t_{1/2}) ενός ενζύμου, σε δεδομένη θερμοκρασία, είναι ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση της ενεργότητάς του στο ήμισυ της αρχικής και υπολογίζεται από την Εξ. 9 (Gouzi et. al., 2011; Olusesan et. al., 2011; Bhosale et. al., 2016).

$$t_{1/2} = \frac{0.6931}{k_d}$$
 (E§. 9)

όπου

 $t_{1/2}$ (min:) ο χρόνος ημιζωής k_d (min⁻¹): η σταθερά απενεργοποίησης του ενζύμου

Ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού D (Decimal reduction time, D-value) ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται σε δεδομένη θερμοκρασία προκειμένου να μειωθεί κατά 90% η αρχική ενεργότητα του ενζύμου και υπολογίζεται από την Εξ. 10 (Gouzi et al., 2011; Olusesan et. al., 2011; Bhosale et. al., 2016).

$$D = \frac{2.303}{k_d}$$
 (E§. 10)

όπου

D (min): ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού, k_d (min⁻¹): η σταθερά απενεργοποίησης του ενζύμου

Οι τιμές του χρόνου ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) και του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value) παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

<u>Πίνακας 5</u>: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης BsXyn10.

Θερμοκρασία (°C)	k _d (min⁻¹)	t _{1/2} (min)	D (min)
40	2.0 x 10 ⁻⁴	3466	11515
50	2.2 x 10 ⁻³	315	1047
60	2.8 x 10 ⁻²	25	83
70	2.7 x 10 ⁻¹	3	8

				-	•
80	7.2 x 10 ⁻¹	1	3		

Page | 50

Σύμφωνα με τους Zhang et.al. (2010) η GH10 ξυλανάση από τον *Bacillus* sp. N16-5 εμφανίζει χρόνο ημιζωής ($t_{1/2}$) μικρότερο των 10 min στους 70°C. Οι Kumar et.al., (2013) αναφέρουν ότι η GH10 ξυλανάση από *B. halodurans* TSEV1 εμφανίζει $t_{1/2}$ ίσο με 58 και 53 min στους 70°C και 80°C, αντίστοιχα. Επιπλέον στους 70°C, ο χρόνος ημιζωής της GH10 ξυλανάση που προέρχεται από *Bacillus* sp. TAR-1, βρέθηκε μικρότερος από 15 min (Nakamura et.al., 1994). Οι GH10 ξυλανάσες που απομονώθηκαν από *Bacillus* sp. KW1, *Bacillus* sp.HJ14 και *Bacillus* sp. NG-27 εμφανίζουν $t_{1/2}$ ίσο με 5, 25 και μικρότερο των 15 min, αντίστοιχα στους 75°C (Wang et.al., 2019; Zhou et. al., 2014; Bhardwaj et. al., 2008). Στους 72°C απαιτούνται 4 h ώστε η GH10 ξυλανάση του *Bacillus firmus* να απωλέσει το 50% της αρχικής της ενεργότητας (Chang et.al.,2004). Τέλος, ο χρόνος ημιζωής στους 65°C μίας GH10 ξυλανάση που απομονώθηκε από *Bacillus halodurans* S7 βρέθηκε μικρότερος από 3.5 h (Mamo et.al.,2006).

Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης είναι η ενέργεια που απαιτείται προκειμένου να αλλάξει η διαμόρφωση του ενζύμου. Υψηλές τιμές της Ε_{(α)d} υποδεικνύουν ότι το ένζυμο είναι συμπαγές και απαιτείται περισσότερη ενέργεια προκειμένου να αλλάξει η διαμόρφωση του ενζύμου.

Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης της BsXyn10 ($E_{(\alpha)d}$, kJ·mol⁻¹) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius (Διάγραμμα 7) και βρέθηκε ίση με 195.4 kJ·mol⁻¹. Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης για τις ενδοξυλανάσες από *T. lanuginosus* και *B. halodurans* TSEV1 βρέθηκαν ίσες με 169.92 και 98.80 kJ·mol⁻¹, αντίστοιχα (Bokhari et. al., 2009; Kumar et. al., 2013), ενώ η τιμή για την ξυλανάση από *T. naphthophila* RKU- 10^T βρέθηκε πολύ υψηλότερη και ίση με 516.3 kJ·mol⁻¹ (Haq et.al., 2019). Επιπλέον, η τιμή της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης για την GH10 ξυλανάση από το βακτήριο *Cohnella* sp.A01 βρέθηκε περίπου 232.8 kJ·mol⁻¹ (Gavaseraei et.al., 2021).



Διάγραμμα 7. Διάγραμμα Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης (Ε_{(α)d}).

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι της θερμικής απενεργοποίησης της BsXyn10 υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις 2-7 (Eyring & Stearn, 1939). Στην εξίσωση 3 χρησιμοποιήθηκε η τιμή της $E_{(\alpha)d}$ αντί της E_{α} και στην εξίσωση 2 η τιμή της k_d αντί της k_{cat} .

$$k_d = \left(\frac{k \cdot T}{h}\right) \cdot e^{\left(-\Delta H^*/RT\right)} \cdot e^{\left(\Delta S^*/R\right)} \quad (E\xi. \ 11)$$

ή

$$ln\left(\frac{k_d}{T}\right) = ln\left(\frac{k}{h}\right) + \frac{\Delta S^*}{R} - \frac{\Delta H^*}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (E\xi. 12)$$

όπου

k_d (min⁻¹): η σταθερά θερμικής απενεργοποίησης της α-αμυλάσης
T (K): η απόλυτη θερμοκρασία
ΔH* (kJ·mol⁻¹): η μεταβολή της ενθαλπίας απενεργοποίησης
ΔS* (kJ·mol⁻¹.K⁻¹): η μεταβολή εντροπίας απενεργοποίησης
κ (1.38x10⁻²³J·K⁻¹): η σταθερά Boltzmann
h (1.104x10⁻³⁵J·min): η σταθερά Plank
R (8.314 J·mol^{-1.K⁻¹)}: η παγκόσμια σταθερά των αερίων

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

T (°C)	∆G* (kJ mole⁻¹)	Δ <i>S</i> * (J [.] mole ^{−1} ·K ^{−1})	Δ <i>H</i> * (kJ·mole⁻¹)
40	109,6	265,8	192,8
50	106,7	266,1	192,7
60	103,1	268,7	192,6
70	99,8	270,4	192,5
80	99,9	262,1	192,5

Πίνακας 6: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης της BsXyn10

Οι τιμές των ΔΗ* και ΔS* για εύρος θερμοκρασιών 40-80°C υπολογίστηκαν από την εξίσωση 12 και βρέθηκαν ίσες με ΔΗ* = 192.6 kJ·mol⁻¹ και ΔS* = 266.7 J·mol⁻¹·K⁻¹ (Διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 8: Υπολογισμός ΔΗ* και ΔS* απενεργοποίησης της BsXyn10 στο εύρος θερμοκρασιών 40-80°C.

Ο υπολογισμός των θερμοδυναμικών παραμέτρων απενεργοποίησης παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου. Η σταθερότητα μιας πρωτεΐνης είναι αποτέλεσμα ισορροπίας μεταξύ σταθεροποιητικών και αποσταθεροποιητικών τάσεων οι οποίες επηρεάζονται από υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, από δεσμούς υδρογόνου και δισουλφιδικούς δεσμούς καθώς και από τον βαθμό αναδίπλωσης του μορίου (Ortega et.al., 2004; Movahedi et.al., 2016).

Η μεταβολή της ενθαλπίας (ΔΗ*) συνδέεται με τον αριθμό των μη ομοιοπολικών δεσμών που διασπώνται κατά τη διάρκεια της θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου (Olusesan et. al., 2011; Batista et. al., 2014). Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της ΔΗ*, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μη ομοιοπολικών δεσμών που είναι παρόντα στο μόριο με αποτέλεσμα να είναι περισσότερο σταθερό (Gouzi et. al., 2011). Οι τιμές της ΔΗ* για την BsXyn10, σε εύρος θερμοκρασιών 40-80°C ήταν 192.5-192.8 kJ·mol⁻¹ (Πίνακας 6). Σύμφωνα με τον Pace (1992) η ενέργεια που απαιτείται ώστε να απομακρυνθεί μία -CH2 ομάδα από έναν υδρόφοβο δεσμό είναι περίπου 5.4 kJ·mole⁻¹ και κατά συνέπεια η δημιουργία του μεταβατικού σταδίου που οδηγεί στην απενεργοποίηση της BsXyn10 υποδηλώνει τη διάσπαση κατά μέσο όρο 36 μηομοιπολικών δεσμών. Η τιμή της ΔΗ* για την GH10 ξυλανάση από B. halodurans TSEV1, στο εύρος θερμοκρασιών 65-85 °C δεν μεταβάλλεται σημαντικά και βρέθηκε ίση με 251.70 kJ·mol⁻¹ (Kumar et. al., 2013). Στους 55 °C η τιμή της ΔΗ* για την ξυλανάση από T. lanuginosus και από Cohnella sp.A01 ήταν 167.2 και 230.07 kJ·mol⁻ ¹, αντίστοιχα (Bokhari et. al., 2009; Gavaseraei et.al. ,2021). Πολύ υψηλές τιμές ΔΗ* αναφέρθηκαν για την GH10 ξυλανάση από T. naphthophila RKU-10^T (στις θερμοκρασίες 96, 97 και 98 °C ήταν 513.23, 513.22 και 513.21 kJ·mol⁻¹ αντίστοιχα) (Haq et.al., 2019).

Μία παράμετρος που επηρεάζει τη θερμική απενεργοποίηση ενός ενζύμου είναι η μεταβολή της εντροπίας (Δ*S**). Η Δ*S** αποτελεί την μεταβολή της δομικής διαταραχής (structural disorder) κατά την αναδίπλωση ενός ενζύμου και υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ των ΔH* και ΔS* ως προς τη σταθερότητα του ενζύμου (Subhedar & Gogate, 2014). Οι υψηλές τιμές του ΔH* συνδέονται με την αυξημένη θερμική σταθερότητα του ενζύμου, εκτός εάν συνδυάζονται παράλληλα και με μεγάλη αύξηση της τιμής του ΔS*, η οποία λειτουργεί αποσταθεροποιητικά. Θετικές τιμές της ΔS* υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχουν διαδικασίες συσσωμάτωσης κατά τη θερμική απενεργοποίηση (Ortega et.al., 2004). Γενικά, η σταθερότητα ενός ενζύμου ενισχύεται όταν τα επίπεδα των τιμών ΔH* είναι υψηλά και τα επίπεδα των τιμών ΔS* είναι χαμηλά (Ariahu et. al., 2000; Olusesan et. al., 2011). Η τιμή της ΔS* για την BsXyn10, στου εύρος θερμοκρασιών 40-80°C είναι 266.7 J·mol^{-1.}K⁻¹ (Πίνακας 6). Η τιμή αυτή είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτή που αναφέρθηκε για την θερμική απενεργοποίηση της ξυλανάσης από *T. lanuginosus* (178.9 J·mol^{-1.}K⁻¹) (Bokhari et. al., 2009). Πολύ υψηλότερες τιμές ΔS* παρατηρήθηκαν κατά τη θερμική απενεργοποίηση της ξυλανάσης που προέρχεται από *B. halodurans* TSEV1 (1037 J·mole^{-1.}K⁻¹ στους 65°C) (Kumar et. al., 2013) και από *T. naphthophila* RKU-10^T (1073 J·mole^{-1.}K⁻¹ στους 96°C) (Haq et. al., 2019).

Εφόσον η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG*) περιλαμβάνει την συνεισφορά της μεταβολής της ενθαλπίας (ΔH*) όσο και της εντροπίας (ΔS*), αποτελεί το καλύτερο μέτρο για την εκτίμηση της σταθερότητας ενός πρωτεϊνικού μορίου. Μια μικρή τιμή της ΔG* υποδηλώνει ότι η αντίδραση είναι πιο αυθόρμητη, πράγμα που σημαίνει ότι η σταθερότητα του ενζύμου μειώνεται, επομένως υφίσταται εύκολα μετουσίωση. Οι τιμές της ΔG* για την BsXyn10 παρουσίασαν μείωση αυξανομένης της θερμοκρασίας έως τους 70°C (Πίνακας 6). Παρόμοια τάση με αύξηση της θερμοκρασίας παρουσίασε και η ξυλανάση από *Cohnella* sp.A01 (Gavaseraei et.al., 2021).

Η τιμή της ΔG*, για την BsXyn10 στους 50°C βρέθηκε ίση με 106.7 kJ·mol⁻¹, τιμή συγκρίσιμη με αυτή της ξυλανάσης από *T. lanuginosus* (108.5 J·mol^{-1.}K⁻¹ στους 55°C) (Bokhari et. al., 2009) και από *Cohnella* sp.A01 (103.42 J·mol^{-1.}K⁻¹ στους 55°C) (Gavaseraei et.al., 2021). Επιπλέον η ξυλανάση από *T. naphthophila* RKU-10^T εμφάνισε τιμή ΔG* ίση με 116.92 στους 96°C (Haq et. al., 2019).

3.4 Βέλτιστο pH δράσης της BsXyn10

Το βέλτιστο pH της BsXyn10 βρέθηκε ίσο με 7.0, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9.



Διάγραμμα 9: Επίδραση του pH στην δραστικότητα της BsXyn10 (●) ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών φωσφορικών (pH 3.0–7.5), (Ο) ρυθμιστικό διάλυμα Tris–HCI (pH 7.0–9.0) και (■) ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνη/NaOH (pH 9.0–10.0)

GH10 ξυλανάσες από γένη βάκιλων παρουσιάζουν βέλτιστο pH δράσης από 6 έως 9 (Πίνακας 3). Ειδικότερα οι GH10 ξυλανάσες από τους βάκιλους *Bacillus* sp. KW1, *Bacillus* sp. HJ14, *B. halodurans* TSEV1, *Bacillus* sp.TAR-1, *Bacillus* NG -27, *B. firmus*, *Bacillus* sp.N16-5 έχουν βέλτιστο pH δράσης 6, 6.5, 9, 6, 8.4, 7.5 και 7 αντίστοιχα (Wang et.al.,2019 ; Zhou et.al.,2014 ; Kumar et.al., 2013 ; Chang et.,al., 2004 ; Zhang et.al., 2010). Οι περισσότερες ξυλανάσες προερχόμενες από μύκητες έχουν βέλτιστη δραστικότητα στο εύρος pH 4-7. Εξαίρεση αποτελεί το ένζυμο από τον *Aspergillus nidulans* KK-99 το οποίο εμφανίζει μέγιστη ενεργότητα σε pH 8 (Taneja et.al., 2002).H ξυλανάση GH10 από τον μύκητα *Penicillium funiculosum* εμφάνισε βέλτιστο pH δράσης στο εύρος 4 -5.5 (Lafond et.al.,2020).

3.5 Σταθερότητα της BsXyn10 σε διαφορετικά pH

Η BsXyn10 παρουσιάζει ικανοποιητική σταθερότητα στο εύρος τιμών pH 5 έως 8 διατηρώντας το άνω του 60% της αρχικής της ενεργότητας μετά από επώαση για 24 ώρες στους 4°C (Διάγραμμα 10).



Διάγραμμα 10: Σταθερότητα BsXyn10 σε διάφορα pH. Η επώαση έγινε για 24 ώρες στους 4°C. Σύμβολα (●) ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών φωσφορικών (pH 5.0–7.5), (Ο) ρυθμιστικό διάλυμα Tris–HCl (pH 7.0–9.0) και (▲) ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνη/NaOH (pH 9.0)

Σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών και pH=7.0 η BsXyn10 διατηρεί το 95% της ενεργότητάς της μετά το πέρας 24 ωρών.

Μερικές ξυλανάσες της οικογένειας 10 όπως οι ξυλανάσες από τους *T. naphthophila* (χρόνος επώασης: 3 ώρες), από τον *T. thermarum* (χρόνος επώασης: 1 ώρα) και από τον *F. commune* (χρόνος επώασης: 1 ώρα) καθίστανται ανενεργές σε όξινα pH (<5) ή σε αλκαλικά (>9) μένοντας σταθερές μόνο σε στενό εύρος pH (Gavaseraei et.al.,2021). Αντίθετα η GH10 ξυλανάση από *Bacillus* sp. KW1 εμφανίζει σταθερότητα σε ένα εύρος pH από 6 έως 11 (Wang et.al., 2019). Η GH10 ξυλανάση από τον Bacillus sp. SN5 διατηρεί το 80% της ενεργότητας της μετά από επώαση 14 ωρών στο εύρος pH 5.5-9.9 (Bai et.al., 2012) ενώ η GH10 ξυλανάση από επώαση μόλις μιας ώρας σε pH 6-10 (Zhou et.al., 2012).

3.6 Εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα

Μελετήθηκε η ικανότητα της ξυλανάσης να δράσει σε διαφορετικά υποστρώματα. Τα υποστρώματα που μελετήθηκαν είναι οι ξυλάνες βρώμης (oat spelt xylan), σημύδας (birchwood xylan), οξιάς (beechwood xylan), η αραβινοξυλάνη η αραβινάνη καθώς και καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνη (CMC), μικροκυσταλλική κυτταρίνη (Avicel). Η σχετική ενεργότητα του ενζύμου για το υπόστρωμα της αραβινοξυλάνης θεωρήθηκε ως 100%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7:

Υπόστρωμα	Σχετική ενεργότητα (%)
Αραβινοξυλάνη	100
Ξυλάνη βρώμης	44.9
Ξυλάνη οξιάς	39.7
Ξυλάνη σημύδας	37.6
Αραβινάνη	0.24
Καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνη	0
Μικροκυσταλλική κυτταρίνη	0

Πίνακας 7 : Σχετική ενεργότητα ενζύμου σε διάφορα υποστρώματα

Στη συγκεκριμένη μελέτη η αραβινοξυλάνη ήταν το υπόστρωμα όπου η BsXyn10 εμφάνισε τη μέγιστη δραστικότητα. Η σειρά προτίμησης της BsXyn10 στα διάφορα υποστρώματα είναι:

Αραβινοξυλάνη> Ξυλάνη βρώμης> Ξυλάνη οξιάς> Ξυλάνη σημύδας> Αραβινάνη Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν εμφάνισε δράση σε κυτταρινικά υποστρώματα.

Η αραβινοξυλάνη ήταν το υπόστρωμα στο οποίο η GH10 ξυλανάση από *B. halodurans* TSEV1 εμφάνιζε τη μέγιστη δραστικότητα ενώ δεν παρουσίασε δραστικότητα σε καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνη (CMC) και μικροκυσταλλική κυτταρίνη (Avicel) (Kumar et. al., 2013). Όμοια η αραβινοξυλάνη σίτου ήταν το προτιμώμενο υπόστρωμα των GH10 ξυλανασών από *Bacillus* sp. KW1 και *Bacillus* sp. HJ14, ενώ καμμία από τις δύο δεν εμφάνισε δράση σε καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνη ή μικροκυσταλλική κυτταρίνη (Wang et. al., 2019; Zhou et. al., 2014). Γενικά λόγω της απλούστερης δομής, οι αραβινοξυλάνες υδρολύονται από τις ξυλανάσες ευκολότερα σε σχέση με την ξυλάνη βρώμης και τις ξυλάνες που προέρχονται από σκληρά ξύλα. Σύμφωνα με τους Haq et.al., (2019) τα προτιμώμενα υποστρώματα για τη δράση της ξυλανάσης που απομονώθηκε από *Τ. naphthophila* RKU-10^T ήταν οι ξυλάνες οξιάς και σημύδας. Επιπλέον το συγκεκριμένο ένζυμο μπορούσε να δράσει σε ξυλάνη βρώμης, βγλυκάνη κριθής και καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνη, ενώ δεν εμφάνισε δραστικότητα σε μικροκυσταλλική κυτταρίνη (Haq et.al., 2019). Μεταξύ των υποστρωμάτων που εξετάστηκαν, η ξυλανάση του θερμόφιλου βακτηρίου Cohnella sp.A01 εμφάνισε εξιδίκευση στην ξυλάνη βρώμης, ενώ δεν εμφάνισε δράση σε καρβοξυμέθυλκυτταρίνη (CMC) και μικροκυσταλλική κυτταρίνη (Gavaseraei et.al., 2021). Η ξυλάνη βρώμης βρέθηκε να είναι η πιο κατάλληλη για τη δράση της GH10 ξυλανάσης προερχόμενη από το θερμόφιλο γένος Thermoanaerobacterium (Zarafeta et. al., 2020), ενώ η GH10 ξυλανάση από Kitasatospora sp., εμφάνισε βέλτιστη δραστικότητα σε ξυλάνη οξιάς (Rahmani et. al., 2019).

3.7 Κινητικές παράμετροι υδρόλυσης ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των κινητικών σταθερών K_m και V_{max} της BsXyn10 ήταν η ξυλάνη βρώμης. Οι τιμές K_m και V_{max} υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση Michaelis - Menten. Η μεταβολή της ταχύτητας παραγωγής του προϊόντος συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος (1-40 g/L) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 11.



Διάγραμμα 11: Μεταβολή της ταχύτητας παραγωγής προϊόντος συναρτήσει της συγκέντρωσης της ξυλάνης βρώμης (διάγραμμα Michaelis - Menten)

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των κινητικών παραμέτρων (K_m, v_{max} και k_{cat}) καθώς και ο λόγος k_{cat}/K_m (απόδοση κατάλυσης).

Πίνακας 8 : Κινητικές	σταθερές της BsX	vn10 κατά την υδι	ρόλυση της	ξυλάνης βρώμης
		/		3 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·

K _m (g/L)	V _{max} (mmole/mg protein/min)	k _{cat} (sec ⁻¹)	k _{cat} /K _m
19.6 ± 0.43	8.80 ± 0.51	7038	359

Η τιμή της Km για τις GH10 ξυλανάσες είναι στο εύρος 0.5 έως 25 g/L (Πίνακας 3). Επομένως η τιμή της Km για την υδρόλυση της ξυλάνης βρώμης που βρέθηκε είναι μέσα στα βιβλιογραφικά πλαίσια. Πιο συγκεκριμένα, όλες οι τιμές της Km κυμαίνονται από 0.5 g/L έως 5.6 g/L με εξαίρεση την GH10 ξυλανάση από το *Thermoanaerobacterium* με τιμή 25 g/L σε υπόστρωμα ξυλάνης βρώμης (Zarafeta et.al., 2020) και τη ξυλανάση από τον *Sorangium cellulosum* So9733-1 με Km ίση με 25.8 g/L σε ξυλάνη οξιάς (Wang et.al.,2012). Αναφέρονται ενδεικτικά τιμές Km για ξυλανάσες που έχουν απομονωθεί από βάκιλλους : 5.6 g/L σε υπόστρωμα ξυλάνη οξιάς για την ξυλανάση του *Bacillus* sp. HJ14 (Zhou et.al.,2014), 2.05 g/L σε υπόστρωμα ξυλάνη σημύδας για την ξυλανάση του *B. halodurans* TSEV1 (Kumar et.al., 2013), 4.37 g/L σε υπόστρωμα ξυλάνη βρώμης για την ξυλανάση του *B. halodurans* S7 (Mamo et.al., 2006). Χαμηλότερες ήταν οι τιμές της Km για τις ξυλανάσες από *Bacillus sp.* SN5 (0.6 g/L σε υπόστρωμα ξυλάνης οξιάς) (Bai et.al.,2012) και από *Bacillus sp.* HJ2 (0.5 g/L σε ξυλάνη σημύδας) (Zhou et.al., 2012).

3.8 Επίδραση ιόντων μετάλλων

Η επίδραση των μεταλλοϊόντων και των χημικών ενώσεων EDTA και SDS στην δραστικότητα του ενζύμου φαίνονται στο διάγραμμα 12.

Όπως φαίνεται και διάγραμμα 12, η παρουσία K⁺ ενεργοποιεί την BsXyn10 ενώ τα υπόλοιπα εξετασθέντα ιόντα έχουν ανασταλτική δράση σε διαφορετική έκταση το καθένα από αυτά. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η παρουσία Zn²⁺ αδρανοποιεί πλήρως την BsXyn10, ενώ παρουσία Fe³⁺ και Ca²⁺ η BsXyn10 διατηρεί το 65% και 60% της αρχικής της ενεργότητας, αντίστοιχα. Παρουσία ιόντων Na⁺, Ba²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, και Co²⁺ η BsXyn10 διατηρεί κάτω του 40% της αρχικής της ενεργότητας.

Το επιφανειδραστικό μόριο SDS απενεργοποιεί πλήρως την BsXyn10. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας SDS συνδέεται στα πρωτεϊνικά μόρια, προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα να αποδιατάσσει την πρωτεΐνη. Έτσι είναι λογικό να μειώνεται η δραστικότητά της. Τέλος παρουσία του χηλικού παράγοντα EDTA η BsXyn10 διατηρεί το 42% της αρχικής της ενεργότητας



Διάγραμμα 12 :Ραβδόγραμμα της % εναπομένουσας σχετικής ενεργότητας της ξυλανάσης για διάφορα μεταλλοϊόντα αλλά και για τις χημικές ενώσεις EDTA και SDS ύστερα από επώαση στους 35 °C για 60 λεπτάς

Σε συγκέντρωση 1 mM τα Ca²⁺, Ba²⁺, Cu²⁺ και Mg²⁺ μειώνουν την δραστικότητα της GH10 ξυλανάσης του *B. halodurans* TSEV1 ενώ τα Na⁺, το EDTA και το SDS ενεργοποιούν το συγκεκριμένο ένζυμο (Kumar et. al., 2013). Σύμφωνα με τους Haq et. al., (2019) η δράση της GH10 ξυλανάσης του *T. naphthophilaRKU-10*^T δεν επηρεάζεται από την παρουσία Ca²⁺, Ba²⁺, Mn²⁺, Na⁺, Mg²⁺, Cu²⁺ και Co²⁺ (παρατηρήθηκε ελαφρά ενεργοποίηση του ενζύμου), ενώ το SDS λειτουργεί ανασταλτικά στη δράσης της (διατηρείται το 25% της αρχικής της ενεργότητας). Τέλος η παρουσία του EDTA διατηρεί τη δραστικότητα του ενζύμου (Haq et. al., 2019). H ξυλανάση του *Cohnella* sp.A01 ενεργοποιείται παρουσία ιόντων Ba²⁺, Na⁺, Fe³⁺, Co²⁺ , Mn²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ και SDS ενώ τα Ca²⁺ λειτουργούν ανασταλτικά της δράσης της (Gavaseraei et. al., 2021). Η ξυλανάση του *Bacillus* sp. KW1 ενεργοποιείται παρουσία Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ και Co²⁺, ενώ τα Zn²⁺ και Cu²⁺ αναστέλλουν τη δράση της (Wang et. al., 2019).

3.9 Προϊόντα υδρόλυσης ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10

Μελετήθηκε η υδρόλυση της ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10 για διάστημα 24 h με σκοπό την εύρεση των κύριων προϊόντων που προκύπτουν από την υδρόλυση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 13. Τα προϊόντα υδρόλυσης που ταυτοποιήθηκαν ήταν ξυλόζη (X1), ξυλοβιόζη (X2), ξυλοτριόζη (X3), ξυλοτετραόζη (X4), ξυλοπενταόζη (X5) και ξυλοεξαόζη (X6).



Διάγραμμα 13: Υδρόλυση ξυλάνης βρώμης (oat spelt xylan) από την BsXyn10. Σύμβολα: (●) ξυλόζη (X₁), (Ο) ξυλοβιόζη (X₂), (▲) ξυλοτριόζη (X₃), (Δ) ξυλοτετραόζη (X₄), (▼) ξυλοπενταόζη (X₅) και (∇) ξυλοεξαόζη (X₆)

Μετά από 24 h υδρόλυσης οι συγκεντρώσεις των X1, X2, X3, X4, X5, και X6 βρέθηκαν ίσες με 81.7 mg/L (0.5 mM), 288.5 mg/L (1.0 mM), 506.7 mg/L (1.2 mM), 458.2 mg/L (0.8 mM), 195.2 mg/L (0.3 mM) και 52.6 mg/L (0.1 mM) αντίστοιχα (Διάγραμμα 14). Η αναλογία σε moles των προϊόντων που προκύπτουν από την υδρόλυση της ξυλάνης βρώμης είναι X1:X2:X3:X4:X5:X6 = 8:16:19:13:4:1. Τα κύρια προϊόντα (οι ξυλοολογοσακχαρίτες) της υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10 ήταν η ξυλοβιόζη (X2), ξυλοτριόζη (X3) και ξυλοτετραόζη (X4).



Διάγραμμα 14: Συγκέντρωση ξυλο-ολιγοσακχαριτών μετά από 24 h υδρόλυση της ξυλάνης βρώμης (oat spelt xylan) από την BsXyn10

Οι Wang et.al., (2019) μελέτησαν τα προϊόντα υδρόλυσης των ξυλανών σημύδας και οξιάς από την GH10 ξυλανάση του *Bacillus* sp. KW1, τα οποία ήταν ξυλόζη (X1), ξυλοβιόζη (X2), ξυλοτριόζη (X3) και μικρή ποσότητα ξυλοτετραόζης (X4). Και στα δύο είδη ξυλανών το κύριο προϊόν ήταν η ξυλοβιόζη (X2). Σύμφωνα με τους Zarafeta et.al., (2020) η υδρόλυση ξυλάνης βρώμης από την GH10 ξυλανάση έδωσε ως προϊόντα ξυλόζη (X1), ξυλοβιόζη (X2), ξυλοτριόζη (X3), ξυλοτετραόζη (X4) με κύρια προϊόντα υδρόλυσης ξυλόζη (X1) και ξυλοβιόζη (X2). Τα κύρια προϊόντα υδρόλυσης ξυλάνης από την ξυλανάση του *Bacillus halodurans* TSEV1, ήταν ξυλοβιόζη (X2) και ξυλοτριόζη (X3), ενώ απουσίαζε η ξυλόζη (X1) (Kumar et. al., 2013). Κατά την υδρόλυση της ξυλάνης βρώμης από την GH10 ξυλανάση του *Roseithermus sacchariphilus* παρήχθησαν ξυλόζη (X1), ξυλοβιόζη (X2), ξυλοτριόζη (X3), ξυλοτετραόζη (X4), ξυλοπενταόζη (X5) και ξυλοεξαόζη (X6). Πιο συγκεκριμένα η ξυλόζη ξεκίνησε να παράγεται μετά τη πρώτη 1 ώρα της αντίδρασης με βασικό προϊόντα υδρόλυσης της ξυλάνης από την ξυλανάση του μικροοργανισμού *Cohnella* sp.A01 ήταν ξυλοτετραόζη (X4), ξυλοβιόζη (X2) και ξυλόζη (X1) (Gavaseraei et.al., 2021). Κατά την υδρόλυση της ξυλάνης οξιάς από την GH10 ξυλανάση (Xyl1) του *Penicillium chrysogenum* P33 τα προϊόντα υδρόλυσης ήταν κυρίως ξυλοτριόζη (X3), ξυλοτετραόζη (X4), ξυλοπενταόζη (X5) και μικρή ποσότητα ξυλοβιόζης (X2). Τα κύρια προϊόντα υδρόλυσης από μία δεύτερη GH10 ξυλανάση (Xyl2) προερχόμενη από τον ίδιο μικροοργανισμό ήταν ξυλοβιόζη (X2) και ξυλοπενταόζη (X5), ενώ μια GH11 ξυλανάση του ίδιου μικροοργανισμό έδωσε ως προϊόντα υδρόλυσης ξυλοβιόζη (X2), ξυλοτετραόζη (X4) και ίχνη ξυλόζης (X1) δείχνοντας ότι τα προϊόντα υδρόλυσης από την ξυλανάση GH11 είχαν μικρότερο βαθμό πολυμερισμού από αυτά που προέκυψαν από την ξυλανάση GH10 (Xyl2) (Yang et.al., 2019). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα προϊόντα υδρόλυσης των GH10 ξυλανασών είναι κατά ένα μόριο ξυλόζης μικρότερα αυτών που παράγονταν από τις GH11 ξυλανάσες (Biely et. al., 2016).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ
Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν ο πλήρης βιοχημικός χαρακτηρισμός της ξυλανάσης GH10 από τον Bacillus safensis.

Αρχικά προσδιορίσθηκε το μοριακό βάρος της BsXyn10 με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και βρέθηκε ~48 kDa. Γενικά οι ξυλανάσες της οικογένειας GH10 εμφανίζουν μοριακό βάρος >30 kDa (Torronen et.al., 1997). Το μοριακό βάρος της BsXyn10 είναι στο εύρος των μοριακών βαρών που αναφέρεται στη βιβλιογραφία για ξυλανάσες της οικογένειας GH10.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της BsXyn10 που ήταν οι 60 °C η οποία είναι συγκρίσιμη με τις αντίστοιχες θερμοκρασίες δράσεις GH10 ξυλανασών της βιβλιογραφίας. Ενδεικτικά, η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της ξυλανάσης του Bacillus sp. KW1 ήταν 65°C (Wang et.al., 2019) και του Bacillus sp. HJ14 ήταν 62.5°C (Zhou et.al., 2014). Η ενέργεια ενεργοποίησης (E_a , kJ·mol⁻¹) της υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10 στο θερμοκρασιακό εύρος 30-60°C βρέθηκε ίση με 39.8 kJ·mol⁻¹ τιμή παρόμοια με αυτή της GH10 ξυλανάσης από τον B. halodurans TSEV1 (30.51 kJ·mol⁻¹) (Kumar et.al., 2013), ενώ υψηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης παρατηρήθηκε για τη GH10 ενδοξυλανάση από Thermotoga *naphthophila* RKU-10^T (65.5 kJ·mol⁻¹) (Hag et.al., 2019). Το θερμοκρασιακό πηλίκο Q_{10} είναι ο παράγοντας κατά τον οποίο αυξάνεται ο ρυθμός μιας αντίδρασης με αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10°C. Το θερμοκρασιακό πηλίκο Q₁₀ βρέθηκε ίσο με 1.5. Παρόμοιες τιμές για τον παράγοντα Q10 βρέθηκαν για την GH10 ξυλανάση που απομονώθηκε από το Arthrobacter sp. GN16 για την υδρόλυση της ξυλάνης οξιάς που ισούται με 1.39 και για τη ξυλάνη σημύδας ίσος με 1.44 (Zhou et.al., 2015). Οι τιμές των ΔΗ*, ΔG* και ΔS* στους 60°C (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης) για την υδρόλυση ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10 βρέθηκαν ίσες με 37.0 kJ·mol⁻¹, 57.6 kJ·mol⁻¹ και -61.9 J·mol⁻¹ K⁻¹, αντίστοιχα. Χαμηλή τιμή ΔH^* υποδεικνύει ότι ο σχηματισμός του μεταβατικού σταδίου ή του ενεργοποιημένου συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (E-S*) είναι αποτελεσματικός (Bokhari et al. 2009; Hag et.al., 2019; Zhou et al., 2015). Επιπλέον η αρνητική τιμή της ΔS* για την BsXyn10 υποδεικνύει τη δημιουργία μεταβατικού σταδίου του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος το οποίο εμφανίζει μικρότερη "αταξία" (Bokhari et al. 2009; Haq et.al., 2019; Zhou et al., 2015; Kumar et.al.,2013). Η τιμή της ΔG* για την BsXyn10 δηλώνει ότι κατά την υδρόλυση της

ξυλάνης βρώμης, η μετατροπή του μεταβατικού συμπλόκου σε προϊόντα είναι περισσότερο "αυθόρμητη" συγκριτικά με την αντίδραση υδρόλυσης της ξυλάνης από την GH10 ξυλανάσης που απομονώθηκε από τον *Bacillus halodurans* TSEV1H (Kumar et.al.,2013). Οι τιμές των ΔG^*_{E-T} και ΔG^*_{E-S} βρέθηκαν ίσες με -18.2 και 6 kJ·mol⁻¹ αντίστοιχα. Οι τιμές για τις ίδιες παραμέτρους για τη ξυλανάση GH10 από τον *Bacillus halodurans* TSEV 1 είναι -24.84 και 21.15 kJ·mol⁻¹ αντίστοιχα ενώ για τη ξυλανάση από τον *Thermomyces lanuginosus* -5.88 και -29.2 kJ·mol⁻¹ αντίστοιχα. Η αρνητική τιμή της ΔG^*_{E-T} για την BsXyn10 υποδεικνύει την αυθόρμητη δημιουργία των προϊόντων μετά την πρόσδεση του υποστρώματος (Kumar et.al.,2013; Bokhari et al. 2009).

Έπειτα, μελετήθηκε η θερμοκρασιακή σταθερότητα της BsXyn10 στο εύρος θερμοκρασιών 40-80 °C. Για τη θερμοκρασία των 80 °C, που είναι και η μέγιστη που μελετήθηκε, η ενεργότητα του ενζύμου μηδενίζεται ταχύτατα (εντός 3 min) ενώ για τους 70°C εντός 15 min. Η BsXyn10 διατηρεί το 53% της αρχικής της ενεργότητάς της μετά από επώαση στους 60°C για 15 min. Σε θερμοκρασία 50°C η BsXyn10 διατηρεί το 54% της αρχικής της ενεργότητας για χρόνο επώασης 6 h. Τέλος στους 40° C η ενεργότητα μειώνεται στο 61% της αρχικής μετά από 3 ημέρες. Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης της BsXyn10 ($E_{(\alpha)d}$, kJ·mol⁻¹) βρέθηκε ίση με 195.4 kJ·mol⁻¹ υψηλότερη της $E_{(\alpha)d}$ της ξυλανάσης από τον *B. halodurans* TSEV1 (98.80 kJ·mol⁻¹) και συγκρίσιμη με αυτή της ενδοξυλανάσης από *T. lanuginosus* (169.92 kJ·mol⁻¹) (Bokhari et al., 2009; Kumar et al., 2013). Υψηλές τιμές της $E_{(\alpha)d}$ υποδεικνύουν ότι το ένζυμο είναι συμπαγές και απαιτείται περισσότερη ενέργεια προκειμένου να αλλάξει η διαμόρφωση του ενζύμου.

Επιπρόσθετα προσδιορίστηκαν οι τιμές για τις μεταβολές των θερμοδυναμικών μεγεθών, ενθαλπία (ΔΗ*), εντροπία (ΔS*) και ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG*) κατά τη θερμική απενεργοποίηση της BsXyn10, που παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου. Η μεταβολή της ενθαλπίας (ΔΗ*) συνδέεται με τον αριθμό των μη ομοιοπολικών δεσμών που διασπώνται κατά τη διάρκεια της θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου (Olusesan et. al., 2011; Batista et. al., 2014). Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της ΔΗ*, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μη ομοιοπολικών δεσμών που είναι παρόντα στο μόριο με αποτέλεσμα να είναι περισσότερο σταθερό. (Gouzi et. al., 2011). Οι τιμές της ΔΗ* για την BsXyn10, σε εύρος θερμοκρασιών 40-80°C ήταν 192.5-192.8 kJ·mol⁻¹. Η ενέργεια που απαιτείται ώστε να απομακρυνθεί μία -CH₂ ομάδα από έναν υδρόφοβο δεσμό είναι περίπου 5.4 kJ·mole⁻¹ (Pace 1992) και κατά συνέπεια η δημιουργία του μεταβατικού σταδίου που οδηγεί στην απενεργοποίηση της BsXyn10 υποδηλώνει τη διάσπαση κατά μέσο όρο 36 μη-ομοιπολικών δεσμών. Η Δ*S** αποτελεί την μεταβολή της δομικής διαταραχής (structural disorder) κατά την αναδίπλωση ενός ενζύμου (Subhedar & Gogate, 2014). Η τιμή της ΔS* για την BsXyn10, στου εύρος θερμοκρασιών 40-80°C είναι 266.7 J·mol⁻ ¹·K⁻¹. Η θετική τιμή της Δ*S** υποδεικνύει ότι δεν υπάρχουν διαδικασίες συσσωμάτωσης κατά τη θερμική απενεργοποίηση της BsXyn10 (Ortega et. al., 2004). Γενικά, η σταθερότητα ενός ενζύμου ενισχύεται όταν τα επίπεδα των τιμών ΔH* είναι υψηλά και τα επίπεδα των τιμών ΔS* είναι χαμηλά (Ariahu et. al., 2000; Olusesan et. al., 2011). Με βάση τα προηγούμενα η BsXyn10 είναι ένζυμο με ικανοποιητική θερμική σταθερότητα.

Το βέλτιστο pH της BsXyn10 βρέθηκε ίσο με 7.0, το οποίο είναι στο εύρος των τιμών pH για τη δράση ξυλανασών της οικογένειας GH10 (Πίνακας 3). Η BsXyn10 παρουσιάζει ικανοποιητική σταθερότητα στο εύρος τιμών pH 5 έως 8 διατηρώντας το άνω του 60% της αρχικής της ενεργότητας μετά από επώαση για 24 ώρες στους 4°C.

Η σειρά προτίμησης της BsXyn10 στα διάφορα υποστρώματα είναι:

Αραβινοξυλάνη> Ξυλάνη βρώμης> Ξυλάνη οξιάς> Ξυλάνη σημύδας> Αραβινάνη Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν εμφάνισε δράση σε κυτταρινικά υποστρώματα. Η αραβινοξυλάνη ήταν το υπόστρωμα στο οποίο η GH10 ξυλανάση από *B. halodurans* TSEV1 εμφάνιζε τη μέγιστη δραστικότητα ενώ δεν παρουσίασε δραστικότητα σε καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνη (CMC) και μικροκυσταλλική κυτταρίνη (Avicel) (Kumar et al., 2013). Όμοια η αραβινοξυλάνη σίτου ήταν το προτιμώμενο υπόστρωμα των GH10 ξυλανασών από *Bacillus* sp. KW1 και *Bacillus* sp. HJ14, ενώ καμμία από τις δύο δεν εμφάνισε δράση σε καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνη ή μικροκυσταλλική κυτταρίνη (Wang et. al., 2019; Zhou et. al., 2014).

Κατά τη μελέτη των κινητικών παραμέτρων της BsXyn10 για την υδρόλυση της ξυλάνης βρώμης υπολογίστηκε η σταθερά Km ίση με 19.6 g/L , η V_{max} ίση με 8.80

mmole/mg protein/min, η τιμή της k_{cat} 7038 sec⁻¹ και ο λόγος k_{cat}/K_m ίσος με 359. Η τιμή της Km είναι στο εύρος τιμών που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Πίνακας 3).

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση των ιόντων Mn²⁺, Mg²⁺, Na⁺,K⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Ba²⁺ καθώς και των χημικών ενώσεων EDTA και SDS στη δράση του ενζύμου. Η παρουσία K⁺ ενεργοποιεί την BsXyn10 ενώ τα υπόλοιπα εξετασθέντα ιόντα έχουν ανασταλτική δράση σε διαφορετική έκταση το καθένα από αυτά. Το επιφανειδραστικό μόριο SDS απενεργοποιεί πλήρως την BsXyn10. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας SDS συνδέεται στα πρωτεϊνικά μόρια, προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα να αποδιατάσσει την πρωτεΐνη. Τέλος παρουσία του χηλικού παράγοντα EDTA η BsXyn10 διατηρεί το 42% της αρχικής της ενεργότητας.

Η υδρόλυση της ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10 έδωσε ως κύρια προϊόντα ξυλοβιόζη (X2), ξυλοτριόζη (X3) και ξυλοτετραόζη (X4), ενώ μετρήθηκαν μικρές ποσότητες ξυλόζης (X1), ξυλοπενταόζης (X5) και ξυλοεξαόζης (X6). Το είδος των προϊόντων υδρόλυσης της ξυλάνης βρώμης από την BsXyn10 συνάδει με το είδος των προϊόντων που παράγονται από άλλες ξυλανάσες της οικογένειας GH10.

Η ενζυμική υδρόλυση των ξυλανών οδηγεί σε ένα ευρύ φάσμα προϊόντων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος μεταξύ των οποίων στα πλαίσια ενός βιοδιυλιστηρίου τα βιοκαύσιμα και οι ξυλο-ολογοσακχαρίτες. Η ενζυμική υδρόλυση για την αξιοποίηση της βιομάζας εξακολουθεί να είναι ένα τεχνολογικό βήμα υψηλού κόστους. Συνεπώς η εύρεση ενζύμων με βελτιωμένες ιδιότητες σε ότι αφορά στον αποπολυμερισμό του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος είναι ζωτικής σημασίας για την αγορά των βιοκαυσίμων, δεδομένου ότι η αγορά βιοαιαθανόλης προβλέπεται ότι θα καταγράψει σύνθετο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης (CAGR) 5,3 % έως το 2022, φθάνοντας σε αξία 68.95 δισεκατομμυρίων USD. Από την άλλη πλευρά η παραγωγή ξυλοολιγοσακχαριτών (XOS), που προκύπτουν από την υδρόλυση αγροτικών πραραπροϊόντων και άλλων χαμηλού κόστους πρώτων υλών με τη δράση των ξυλανασών, και η πιθανή χρήση τους ως πρεβιοτικά είναι γνωστή. Η δομική ποικιλομορφία του παραγόμενου ξυλοολιγοσακχαρίτη εξαρτάται από τον τύπο του υποστρώματος, την προεπεξεργασία και τη δομή/λειτουργία του ενζύμου ή των ενζύμων που χρησιμοποιούνται. Εκτιμάται ότι η παγκόσμια αγορά πρεβιοτικών θα καταγράψει έναν σύνθετο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης (CAGR) 10,4 % έως το 2023, φθάνοντας σε αξία 7,37 δισεκατομμυρίων USD (Sepulchro et al., 2020).

Με βάση τα προαναφερθέντα, οι μελλοντικές προτάσεις για την BsXyn10 περιλαμβάνουν τον περαιτέρω χαρακτηρισμό της αλλά και εφαρμογές:

- (a) Μελέτη της σταθερότητας της BsXyn10 σε οργανικούς διαλύτες (π.χ. αιθανόλη), της ενδεχόμενης αναστολής της δράσης της από σάκχαρα (ξυλόζη), των προϊόντων υδρόλυσης άλλων ξυλανών (π.χ. αραβινοξυλάνη, ξυλάνη συμήδας)
- (b) Μελέτη της συνεργιστικής δράσης της BsXyn10 με β-ξυλοζιδάσες σε ξυλάνες αλλά και αγροτικά παραπροϊόντα (π.χ. άχυρο σίτου, σπάδικα αραβόσιτου) με στόχο την παραγωγή μονομερών σακχάρων
- (c) Μελέτη της παραγωγής ξυλο-ολογασακχαριτών από αγροτικά παραπροϊόντα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adigózel AO, Tunner M (2017) Production and characterization of partially purified thermostable endoxylanase and endoglucanase from novel *Actinomadura geliboluensis* and the biotechnological applications in the saccharification of lignocellulosic biomass. BioResources 12:2528–2547

Ahmed S, Jabeen A, Jamil A (2007) Xylanase from *Trichoderma harzianum*: enzyme characterization and gene isolation. J Chem Soc Pak 29:176–182

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

Bai W, Xue Y, Zhou C, Ma Y. Cloning, expression and characterization of a novel salttolerant xylanase from *Bacillus* sp. SN5. Biotechnol Lett. 2012;34:2093–9.

Basit, A., Liu, J., Rahim, K., Jiang, W., and Lou, H. (2018). Thermophilic xylanases: from bench to bottle. Crit. Rev. Biotechnol. 38, 989–1002.

Beg QK, Bhushan B, Kapoor M, Hoondal GS (2000a) Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a Streptomyces sp. QG-11-3. J Ind Microbiol Biotechnol 24:396–402

Bhalla A, Bischoff KM, Uppugundla N, Balan V, Sani RK. Novel thermostable endoxylanase cloned and expressed from bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1. Bioresour Technol. 2014;165:314

Biely P (1985) Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol 3:286–290

Biely, P., Singh, S., & Puchart, V. (2016). Towards enzymatic breakdown of complex

Biswas, S.R., S.C. Jana, A.K. Mishra and G. Nanda. 1990. Production, purification and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of Aspergillus ochraceus. Biotechnol. Bioengg. 35: 244–251.

Blanco A, Vidal T, Colon JF, Pastor FIJ (1995) Purification and properties of xylanase a from alkali-tolerant Bacillus sp. Strain BP-23. Appl Environ Microbiol 61:4468–4470

Bonnin E, Daviet S, Sorensen JF, Sibbesen O, Goldson AJ, Juge N, Saulnier L: Behaviour of family 10 and 11 xylanases towards arabinoxylans with varying structure. J Sci Food Agr 2006, 86:1618-1622.

Boonchuay, P., Takenaka, S., Kuntiya, A., Techapun, C., Leksawasdi, N., Seesuriyachan, P., et al. (2016). Purification, characterization, and molecular cloning of the xylanase from Streptomyces thermovulgaris TISTR1948 and its application to xylooligosaccharide production. Mol. Catal. B: Enzym. 129, 61–68.

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem, 248–254.

Brodin, M., Vallejos, M., Opedal, M. T., Area, M. C., & Chinga-Carrasco, G. (2017). Bugg, T.D.H. et al., 2011. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural Product Reports*, 28(12), p.1883

Carvalho EA, dos Santos Gσes LM, Uetanabaro APT et al (2017) Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum*: application in bread making and manufacturing xylo-oligosaccharides. Food Chem 221:1499–1506

Chadha BS, Kaur B, Basotra N et al (2019) Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: current perspective. Bioresour Technol 277:195–203

Chakdar H, Kumar M, Pandiyan K et al (2016) Bacterial xylanases: biology to biotechnology. 3 Biotech 6:1–15

Chang P, Tsai WS, Tsai CL, Tseng MJ. Cloning and characterization of two thermostable xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. Biochem Biophys Res Commun. 2004;319:1017–25

Chanwicha N, Katekaew S, Aimi T, Boonlue S (2015) Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. levisporus KKU-PN-I2-1 cultivated by solid-state fermentation. Mycoscience 56:309–318.

Charles E. Wyman, Stephen R. Decker, John W. Brady, Liisa Viikari, and M.E.H., 2004. *Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose* 2nd ed. S. Dumitriu, ed., CRC Press.

Chen C-C, Ko T-P, Huang J-W, Guo R-T (2015) Heat- and alkaline-stable xylanases: application, protein structure and engineering. ChemBioEng Rev 2:95–106.

Chen S, Kaufman MG, Miazgowicz KL, Bagdasarian M, Walker ED. Molecular characterization of a coldactive recombinant xylanase from Flavobacterium johnsoniae and its applicability in xylan hydrolysis. Bioresource Technol 2013; 128:145-55

Chen Z, Zaky AA, Liu Y et al (2019) Purification and characterization of a new xylanase with excellent stability from *Aspergillus flavus* and its application in hydrolyzing pretreated corncobs. Protein Expr Purif 154:91–97

Chen, H. (2014). Biotechnology of Lignocellulose. In Biotechnology of Lignocellulose.

Chavez R, Bull P, Eyzaguirre J (2006) The xylanolytic enzyme system from the genus Penicillium. J Biotechnol 123:413–433 Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol Rev 2005; 29:3-23; PMID:15652973

Collins T, Meuwis M-A, Stals I et al (2002) A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. J Biol Chem 277:35133–35139

Da Costa AC, Cavalheiro GF, de Queiroz Vieira ER et al (2019) Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application as additives in bovine feeding. Biocatal Agric Biotechnol 19:101161 degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(12), 1–13.

Dornez, E.; Verjans, P.; Arnaut, F.; Delcour, J.A.; Courtin, C.M. Use of psychrophilic xylanases provides insight into the xylanase functionality in bread making. J. Agr. Food Chem. 2011, 59, 9553–9562.

Ebringerová, A., & Thomas, H. (2005). *Hemicellulose*. August, 1–67.

Ellis, J. T., and Magnuson, T. S. (2012). Thermostable and alkalistable xylanases produced by the thermophilic bacterium Anoxybacillus flavithermus TWXYL3. ISRN Microbiol. 2012:517524

Evangelista, D.E.; Kadowaki, M.A.S.; Mello, B.L.; Polikarpov, I. Biochemical and biophysical characterization of novel GH10 xylanase prospected from a sugar cane bagasse compost-derived microbial consortia. Int. J. Biol. Macromol. 2018, 109, 560–568

Fan, G., Yang, S., Yan, Q., Guo, Y., Li, Y., & Jiang, Z. (2014). Characterization of a highly thermostable glycoside hydrolase family 10 xylanase from Malbranchea cinnamomea. International Journal of Biological Macromolecules, 70, 482–489

Goldstein, I. S. 1981. Organics Chemicals from Biomass. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html

https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.09.001

Hu JG, Saddler JN. Why does GH10 xylanase have better performance than GH11 xylanase for the deconstruction of pretreated biomass? Biomass Bioenergy. 2018;110:13–6.

Ichinose H, Diertavitian S, Fujimoto Z, Kuno A, Lo Leggio L, Kaneko S. Structure-based engineering of glucose specificity in a family 10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. Process Biochem. 2012;47:358–65.

Juturu, V.; Wu, J.C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. Biotechnol. Adv. 2012, 30, 1219–1227

Khasin, A.; Alchanati, I.; Shoham, Y. Purification and characterization of a thermostable xylanase from Bacillus stearothermophilus T-6. Appl. Environ. Microbiol. 1993, 59, 1725–1730.

Kim, D. Y., Lee, S. H., Lee, M. J., Cho, H. Y., Lee, J. S., Rhee, Y. H., & Park, H. Y. (2018). Genetic and functional characterization of a novel GH10 endo- β - 1,4-xylanase with a ricin-type β -trefoil domain-like domain from Luteimicrobium xylanilyticum HY-24. International Journal of Biological Macromolecules, 106, 620–628

Junpei Zhou, Yu Liu, Jidong Shen, Rui Zhang, Xianghua Tang, Junjun Li, Yiyan Wang, and Zunxi Huang: Kinetic and thermodynamic characterization of a novel lowtemperature-active xylanase from Arthrobacter sp. GN16 isolated from the feces of Grus nigricollis, , Bioengineered 6:2, 111--114; March/April 2015; © 2015 Taylor & Francis Group, LLC Koshland, D. E. (1953). Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. Biological Reviews, 28(4), 416–436.

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

Kumar, V.; Marin-Navarro, J.; Shukla, P. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: Trends, applications and further perspectives. World J. Microb. Biotechnol. 2016, 33, 1870–1874.

Lee Y. E., Lowe S. E., Zeikus J. G. (1992). Regulation and Characterization of Xylanolytic Enzymes of Thermoanaerobacterium saccharolyticum B6A-RI. Applied and Environmental Microbiology

Li, Q.; Sun, B.; Li, X.; Xiong, K.; Xu, Y.; Yang, R.; Hou, J.; Teng, C. Improvement of the catalytic characteristics of a salt-tolerant GH10 xylanase from Streptomyce rochei L10904. Int. J. Biol. Macromol. 2018, 107, 1447–1455

Lignocellulosics as sustainable resources for production of bioplastics – A review. M. L. T. M. Polizeli , A. C. S. Rizzatti , R. Monti , H. F. Terenzi , J. A. Jorge , D. S. Amorim (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications , Appl Microbiol Biotechnol

Maitan-Alfenas, G. P., Oliveira, M. B., Nagem, R. A. P., de Vries, R. P., & Guimarães, V. M. (2016). Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from Aspergillus nidulans. International Journal of Biological Macromolecules, 91, 60–67

Malgas, S., Mafa, M. S., Mkabayi, L., & Pletschke, B. I. (2019). A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during heteroxylan

Meng X, Shao Z, Hong Y, Lin L, Li C, Liu Z. A novel pH-stable, bifunctional xylanase isolated from a deep-sea microorganism, *Demequina* sp. JK4. J Microbiol Biotechnol. 2009;19:1077–84

Okolie, J. A., Nanda, S., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2021). Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. *Waste and Biomass*

Pell, G., Taylor, E. J., Gloster, T. M., Turkenburg, J. P., Fontes, C. M. G. A., Ferreira, L. M. A., & Gilbert, H. J. (2004). The mechanisms by which family 10 glycoside hydrolases bind decorated substrates. The Journal of Biological Chemistry, 279(10), 9597–9605.

plant xylan structures: State of the art. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1260–1274.

Pollet, A., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2010). Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. Critical Reviews in Biotechnology, 30(3), 176–191.

Q. K. Beg, M. Kapoor, L. Mahajan, G. S. Hoondal, Appl Microbiol Biotechnol (2001), Microbial xylanases and their industrial applications: a review.

Saha BC. (2003). Hemicellulose bioconversion. J Ind Microbiol Biot.

Singh, O. V., & Chandel, A. K. (2018). Sustainable biotechnology-enzymatic resources of renewable energy. In *Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy*

Tan H, Miao R, Liu T, Yang L, Yang Y, Chen C, et al. A bifunctional cellulasexylanase of a new *Chryseobacterium* strain isolated from the dung of a straw-fed cattle. Microb Biotechnol. 2018;11:381–98.

Terrapon, N.; Lombard, V.; Drula, E.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B. The CAZy Database/the Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) Database: Principles and Usage

Guidelines. In A Practical Guide to Using Glycomics Databases; Aoki-Kinoshita, K.F., Ed.; Springer: Tokyo, Japan, 2017; pp. 117–131.

Terrett, O. M., & Dupree, P. (2019). Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls. *Current Opinion in Biotechnology*, *56*, 97–104

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

Thomson, J.A., 1993. Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 104, pp.65–82.

Topakas, E., Panagiotou, G. & Christakopoulos, P. (2013). "Chapter 9. Xylanases: characteristics, sources, production and applications" in Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals and polymers. Editors Yang, S.-T., El-Enshasy, H.A.El., Thongchul, N., John Wiley & Sons, Inc, pp.147-166

Torronen A, Rouvinen J: Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-beta-xylanases. J Biotechnol. 1997, 57: 137-149. 10.1016/S0168-1656(97)00095-3.

Uffen R. L. (1997). Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 19

Vardakou, M., Flint, J., Christakopoulos, P., Lewis, R. J., Gilbert, H. J., & Murray, J. W. (2005). A family 10 Thermoascus aurantiacus xylanase utilizes arabinose decorations of xylan as significant substrate specificity determinants. Journal of Molecular Biology, 352(5), 1060–1067

Wong KKY, Saddler JN: Trichoderma Xylanases, Their Properties and Application. Crit Rev Biotechnol 1992, 12:413-435.

Zhang G, Mao L, Zhao Y, Xue Y, Ma Y. Characterization of a thermostable xylanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Biotechnol Lett. 2010;32:1915–20.

Zhang J., Tang M., V.L., 2011. Thermostable recombinant xylanases from Nonomuraea flexuosa and Thermoascus aurantiacus show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. *Biotechnology Biofuels*, 4(12).

Zhang Y, An J, Yang G et al (2016b) Structure features of GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii*: implication for its thermophilic adaption and substrate binding preference. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 48:948–957

Zhang, G. M., Huang, J., Huang, G. R., Huang, J. H., Guang, R. M., and Li, X. E. (2017). Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from Plectosphaerella cucumerina. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, 339–346

Zhou J, Wu Q, Zhang R, Mo M, Tang X, Li J, et al. A thermo-halo-tolerant and proteinase-resistant endoxylanase from *Bacillus* sp. HJ14. Folia Microbiol. 2014;59:423–31.