



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΜΕ ΛΙΓΝΙΝΟΛΥΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Διπλωματική εργασία

Γρηγοράκης Κωνσταντίνος

Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος - Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα

Σεπτέμβριος 2022

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Ε.Μ.Π. Δρ. Ευάγγελου Τόπακα κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021 – 2022.

Πρωτίστως, οφείλω να ευχαριστήσω βαθύτατα τον καθηγητή μου για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και καινοτόμο θέμα, αλλά κυρίως για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Οι συμβουλές της και η εμπιστοσύνη που επέδειξε προς το πρόσωπό μου αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα για την επιτυχή ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά κυρίως συντέλεσαν στο να αγαπήσω το αντικείμενο με το οποίο ασχολήθηκα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω και στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την κα Διόμη Μαμμά και τον κ. Στυλιανό Χαμηλάκη για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν για την κριτική ανάγνωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τις από καρδιάς ευχαριστίες μου στην Χριστίνα Φερούση, μεταδιδακτορική ερευνήτρια του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Ε.Μ.Π., για την άψογη συνεργασία μας, την απεριόριστη στήριξη της και την αδιάκοπη βοήθειά της στην επίλυση οποιουδήποτε προβλήματος κι αν προέκυπτε κατά την εκπόνηση της εργασίας μου χάριν των γνώσεων και της επιστημονικής της κατάρτισης. Η αναζήτηση και η επιλογή των ενζύμων, η επιλογή ξενιστή και η κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα σε αυτό το πείραμα έγινε από εκείνη.

Ακόμη, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Ε.Μ.Π., καθώς και στους υπόλοιπους συμφοιτητές μου που εκπόνησαν τη διπλωματική τους εργασία στο εργαστήριο αυτό, για την αρμονική συνεργασία, το πάντα ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε, την κατανόηση και την στήριξή τους. Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένειά μου και το κοντινό μου φιλικό περιβάλλον για την αγάπη, την ενθάρρυνση, την υπομονή και την στήριξη που μου παρείχαν όλα τα χρόνια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελεί την πιο άφθονη ανανεώσιμη πρώτη ύλη στον πλανήτη.¹ Παράγεται από ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα και νερό με την βοήθεια ηλιακής ενέργειας κατά την φωτοσύνθεση των φυτών. Μεγάλες ποσότητες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας απορρίπτονται ετησίως από διάφορες ανθρώπινες δραστηριότητες και καταλήγουν να καίγονται αναξιοποίητες,² ενώ θα μπορούσαν να βιοαποικοδομηθούν μέσω λιγνολυτικών ενζυμικών συστημάτων. Τέτοια συστήματα μπορούν να αυξήσουν την αξιοποίησή της σε διεργασίες παραγωγής βιοκαυσίμων, βιοπλαστικών και άλλων υλικών, και πιο πρόσφατα ακόμα να αξιοποιηθούν στην βιοαποικοδόμηση πλαστικών, λόγω της πολυμερικής φύσης των τελευταίων.³ Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελείται στο μεγαλύτερο μέρος της από μία ισχυρά σταυροδεμένη ετερογενή μήτρα ημικυτταρίνης και λιγνίνης, που εγκλείει μικροϊνίδια κρυσταλλικής κυτταρίνης. Η μήτρα αυτή συγκρατείται μεταξύ άλλων από β – Ο – 4 αιθερικούς δεσμούς οι οποίοι συνδέουν όχι μόνο ετερομονομερή λιγνίνης μεταξύ τους αλλά και την πολυμερική λιγνίνη με την ημικυτταρίνη. Οι έως τώρα χαρακτηρισμένες βακτηριακές αιθεράσες, που υδρολύουν τέτοιους δεσμούς, δρουν μόνο ενδοκυτταρικά σε διαλυτά ολιγομερή λιγνίνης που προκύπτουν στην φύση κυρίως από μυκητιακή ενζυμική δράση. Πρόσφατα, απομονώθηκε η πρώτη μυκητιακή αιθεράση (PpETH) που δρά εξωκυτταρικά στην αδιάλυτη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα, και άρα παρουσιάζει αυξημένο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον.⁴ Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ετερόλογη έκφραση και η απομόνωση τόσο της παραπάνω αιθεράσης όσο και ενός ομόλογου ενζύμου (TcETH) που προέκυψε από αναζήτηση σε παγκόσμιες βάσεις δεδομένων και περιλαμβάνει μια επιπλέον περιοχή στο καρβοξυτελικό της άκρο. Τα γονίδια ενδιαφέροντος ενσωματώθηκαν στον φορέα pPICZα C που χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό κυττάρων της μεθανότροφης ζύμης *Pichia pastoris* X33, μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Ακολούθησε διαλογή των μετασχηματισμένων στελεχών ως προς την ανάπτυξη και την ικανότητα έκφρασης, και για την απομόνωση των ετερόλογων ενζύμων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου. Τελικά, και τα δύο ένζυμα εκφράστηκαν επιτυχώς σε *P. pastoris* με όγκο καλλιέργειας 500 mL στους 20 °C, αλλά στην δεύτερη περίπτωση υπάρχουν ενδείξεις καταβύθισης.

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is the most abundant resource on the planet. It is produced from atmospheric carbon dioxide and water with the help of the sun's energy during plant photosynthesis. Large quantities of lignocellulosic biomass are wasted every year from human activities and end up being burnt unexploited, while they could be biodegraded with lignolytic enzyme systems. Such systems have the potential to increase conversion of lignocellulosic biomass in the production of biofuels, bioplastics and other value added materials, and more recently be used in the biodegradation of plastics, due to the polymeric nature of them. Lignocellulosic biomass consists mainly of a strongly crosslinked heterogenous matrix of hemicellulose and lignin that encapsulates crystalline cellulose microfibrils. This matrix is held together mainly with β – Ο – 4 ether bonds that bond lignin monomers and lignin with hemicellulose. Up until now bacterial etherases that hydrolyse such bonds act only intracellularly in soluble lignin oligomers that occur in nature mainly from fungi enzymatic activity. Recently, the first fungal etherase (PpETH) that acts extracellularly on insoluble lignocellulosic biomass was isolated and comes with great biotechnological interest. The aim of this study was heterologous expression and isolation of this etherase and a homologous enzyme (TcETH) that was found in global databases and contains an extra domain at its C – terminus. The genes of interest were cloned into the pPICZα C vector that was used to transform methanol-eating *Pichia pastoris* X33 yeast through electroporation. Screening of transformed strains was carried out through growth and protein expression measurements and immobilized metal affinity chromatography was used to purify the heterologous enzymes. In conclusion, both enzymes were successfully expressed by *P. pastoris* in cultures of 500 mL at 20 °C, but there were indications of protein aggregation in the case of TcETH.

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση ενζύμων με βάση την αντίδραση που καταλύουν	19
Πίνακας 2: Κατηγοριοποίηση διεργασιών προκατεργασίας LCB ⁵	33
Πίνακας 3: Αποτελέσματα αναζήτησης ομόλογων πρωτεϊνών της <i>PpETH</i> με το BLASTP	38
Πίνακας 4: Διάλυμα βασικών μεταλλικών ιχνοστοιχείων για <i>P. Pastoris</i> , TES (trace elements solution)	45
Πίνακας 5: Πρωτόκολλο χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη βαρύτητας	53
Πίνακας 6: Υλικά για την Παρασκευή ενός πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 1.5 mm για το σύστημα Mini-PROTEAN της BIORAD	59

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Υπολείμματα του δάσους Donard, Newcastle, Northern Ireland. ¹⁶	14
Εικόνα 2: Υπολείμματα καλλιέργειας καλαμποκιού. ¹⁷	14
Εικόνα 3: <i>Miscanthus floridulus</i> . ¹⁸	14
Εικόνα 4: Brown – rot. ⁴⁹	32
Εικόνα 5: White– rot. ⁵⁰	32
Εικόνα 6: Αποτελέσματα γέλης αгарόζης των φορέων προς μετασχηματισμό της <i>P. pastoris</i> . 1 ^η λωρίδα: Δείκτης μεγέθους σε <i>bp</i> , 2 ^η λωρίδα: TcETH (5356 <i>bp</i>) και 3 ^η λωρίδα: PpETH (4723 <i>bp</i>).	64
Εικόνα 7: Αντιπροσωπευτικά τρυβλία μετά την ηλεκτροδιάτρηση για a. την PpETH, b. την TcETH και c. κύτταρα άγριου τύπου τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλό δείγμα και αντί για ετερόλογο φορέα επώαστηκαν με υπερκίθαρο νερό πριν την ηλεκτροδιάτρηση.	64
Εικόνα 8: Αντιπροσωπευτικές πλίτες με αντιβιοτικό ζεοσίνη για την διαλογή στελεχών από τα τρυβλία της ηλεκτροδιάτρησης a. <i>PpETH</i> και b. <i>TcETH</i> . Τα μετασχηματισμένα κύτταρα (11 – 19) αναπτύσσονται χωρίς πρόβλημα στο στερεό μέσο που περιέχει ζεοσίνη ενώ τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα (20) δεν αναπτύσσονται με ευκολία.....	65
Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης (10%) των προκαλλιεργειών (0a.,0b.,0c.) και της 2 ^{ης} έως 4 ^{ης} μέρας των καλλιεργειών (2a. ... 4c.)	69
Εικόνα 10: Τα υπερκείμενα υγρά των καλλιεργειών a. της PpETH b. της TcETH. Το υπερκείμενο υγρό της TcETH είναι θολό από κάποιο στερεό που δεν καταβυθίστηκε στην φυγοκέντρηση.....	72
Εικόνα 11: Ίζημα πάνω στο φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 μm από τη διήθηση του υπερκείμενου υγρού της TcETH.....	72
Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πηκτώμα πολυακρυλαμίδης (12%) των a. TcETH (~65 <i>kDa</i>) και b. PpETH (~45 <i>kDa</i>). Τα δείγματα είχαν μάλλον τελικά λιγότερο από 30 μg πρωτεΐνης/πηγάδι και άρα τα πηγάδια είναι υποφορτωμένα. Για να είναι πιο ευδιάκριτη η διαφορά τους η εικόνα έχει υποστεί αρκετή επεξεργασία. Τα αποτελέσματα πάλι δεν είναι σίγουρα για την TcETH αλλά υπάρχει ένδειξη παραγωγής της. Για την PpETH είναι ευδιάκριτη η περιοχή στην οποία κάθισε μετά την ηλεκτροφόρηση, ελάχιστα πάνω από τα 45 <i>kDa</i> , πιθανόν λόγω γλυκοζυλιώσεων.	73
Εικόνα 13: Μοντέλο βάσης επώασης falcon 50 mL 24 θέσεων.	82
Εικόνα 14: Η βάση που χρησιμοποιήθηκε για επώσεις στο στάδιο της διαλογής επέτρεψε επαναλήψιμο έλεγχο πολλών στελεχών ταυτόχρονα.	82
Εικόνα 15: Αυτόματες «ταΐστρες» επέτρεψαν την προσθήκη μεθανόλης στις καλλιέργειες ακόμα και τις μέρες που λειτουργούσε το εργαστήριο.	83

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Δομή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. ⁸ (Από το US Department of Energy: Office of Biological and Environmental Research, Public domain, επεξεργασμένη).....	10
Σχήμα 2: Κυτταρίνη, γραμμικό πολυμερές μονάδων D – γλυκόζης συνδεδεμένων με β –(1→4) γλυκοζιπικούς δεσμούς	11
Σχήμα 3: Μικροϊνίδια κυτταρίνης σχηματίζονται από πολλά μόρια κυτταρίνης. ⁸ (Από το US Department of Energy: Office of Biological and Environmental Research, Public domain, επεξεργασμένη)	11
Σχήμα 4: Παράδειγμα μίας ημικυτταρίνης, πιο συγκεκριμένα μίας ξυλογλυκάνης. ⁹	12
Σχήμα 5: πολύ– α -1,4–D–γαλακτουρονικό οξύ, βασικό συστατικό της πηκτίνης. ⁹	12
Σχήμα 6: Ιόντα <i>Ca</i> 2+ και <i>Mg</i> 2+ ενώνουν με ηλεκτροστατικούς δεσμούς τις γειτονικές αλυσίδες πηκτίνης. ⁹	12
Σχήμα 7: Οι τρεις πιο συχνές μονολιγνόλες, τα μονομερή των λιγνινών. ⁹	13
Σχήμα 8: Απλοποιημένη δομή μίας λιγνίνης. Στην πραγματικότητα η δομή είναι τρισδιάστατη. (CC BY-SA 3.0) ¹⁵	13
Σχήμα 9: Γενιές βιοκαυσίμων. ²³	15
Σχήμα 10: Μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης μιας αντίδρασης με τη χρήση ενζύμου. ³¹	17
Σχήμα 11: Μοντέλο κλειδιού κλειδαριάς σε αντίθεση με το μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής. ³⁰	17
Σχήμα 12: Κατάλυση υποστρώματος και διατήρηση του ενζύμου. ³¹	18

Σχήμα 13: (a) Πρωτοταγής δομή. (b) Δευτεροταγής δομή. (c) Τριτοταγής δομή. (d) Τεταρτοταγής δομή. Το παραπάνω παράδειγμα απεικονίζει την αιμογλοβίνη, πρωτεΐνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων που μεταφέρει οξυγόνο στους ιστούς. Παρατηρείται και η ύπαρξη του συμπαραγόνα αίμης. ³³ (CC BY 3.0)	18
Σχήμα 14: Ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης με κινητική Michaelis – Menten ως συνάρτηση της συγκέντρωσης υποστρώματος. ³²	21
Σχήμα 15: Γράφημα Lineweaver – Burk ή γράφημα «διπλού αντιστρόφου» για τον υπολογισμό των παραμέτρων της κινητικής Michaelis – Menten. ³²	22
Σχήμα 16: Προφίλ ενεργότητας ενζύμου συναρτήσει του <i>pH</i> του μέσου. ³²	24
Σχήμα 17: Προφίλ ενεργότητας ενζύμου συναρτήσει της θερμοκρασίας του μέσου. Εδώ θεωρήθηκε $E_a = 11 kcal/g * mol$ και $E_d = 70 kcal/g * mol$. Το καθοδικό τμήμα της καμπύλης οφείλεται στη θερμική μετουσίωση του ενζύμου και υπολογίστηκε θεωρώντας 10 λεπτά έκθεση σε κάθε θερμοκρασία. Η μορφή του διαγράμματος εξαρτάται από το διάστημα που το μείγμα αντίδρασης εκτίθεται στη θερμοκρασία δοκιμής. ³²	24
Σχήμα 18: Σχηματική απεικόνιση της συνολικής διεργασίας ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών, δηλαδή την κλωνοποίηση των ανασυνδυασμένων γονιδίων, την έκφραση και τον καθαρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. ³⁸	26
Σχήμα 19: Χαρακτηριστικά ενός πλασμιδιακού φορέα: 1) Θέση έναρξης αντιγραφής (ORI), 3) Θέση πολυσύνδεσης (MCS) (περιοχή που εισάγεται το γονίδιο ενδιαφέροντος), 2) Επιλέξιμος δείκτης (π.χ. γονίδιο που κωδικοποιεί αντίσταση σε κάποιο αντιβιοτικό), 4) Υποκινητής μεταγραφής.....	27
Σχήμα 20: Σχηματική περιγραφή της χρωματογραφίας συγγένειας ως μέθοδο καθαρισμού ετερόλογα εκφρασμένων πρωτεϊνών/ενζύμων. ⁴⁶	30
Σχήμα 21: L – ιστιδίνη.....	30
Σχήμα 22: Ιμιδαζόλιο	30
Σχήμα 23: Αλληλεπίδραση της πολυϊστιδίνης με το πρόσδεμα (εδώ $Ni2 + -NTA$). Η πολυϊστιδίνη αλληλεπιδρά με ιόντα στοιχείων μετάπτωσης, όπως τα $Cu2 +$, $Co2 +$ και $Ni2 +$. ⁴⁷	31
Σχήμα 24: Παραδείγματα μερικών συχνών προϊόντων χαμηλού μοριακού βάρους από την μερική αποικοδόμηση της λιγνίνης. ¹⁴	35
Σχήμα 25: a. Πολυεστερική πολυουρεθάνη και b. Πολυαιθερική πολυουρεθάνη. ⁵²	37
Σχήμα 26: Πλασμιδιακός χάρτης των φορέων έκφρασης pPICZα A, B και C. ⁶³	41
Σχήμα 27: Ζεοσίνη, $C60H89N21O21S3$, $MW = 1535 g/mol$. ⁶³	42
Σχήμα 28: Οι μορφές και το χρώμα του Coomassie Brilliant Blue G-250 ανάλογα το <i>pH</i> . ⁷⁰	54
Σχήμα 29: Καμπύλες αναφοράς για το αντιδραστήριο Bradford που παρασκευάστηκε a. για 5 μL πρωτεϊνικού δείγματος + 250 μL αντιδραστήριου (εύρος μέτρησης: 0.050 – 1.500 mg/mL) και b. 25 μL πρωτεϊνικού δείγματος + 250 μL αντιδραστήριου (εύρος μέτρησης: 0.020 – 0.170 mg/mL)......	55
Σχήμα 30: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου χρήσης περιστρεφόμενων στηλών για την συμπύκνωση πρωτεϊνικών δειγμάτων. ⁷⁴	56
Σχήμα 31: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου υπερδιήθησης σε εργαστηριακή κλίμακα. ⁷⁵	57
Σχήμα 32: Αποδιάταξη πρωτεΐνης a. με θειικό δωδεκύλιο νάτριο (SDS) και b. με θερμότητα. (CC BY-SA 4.0) ^{78,79}	58
Σχήμα 33: Πολλαπλή ευθυγράμμιση υποψηφίων ενζύμων. Η δευτεροταγής δομή που φαίνεται από πάνω είναι πρόβλεψη αυτής της PpETH. Με μωβ σημειώνονται οι ιστιδίνες που συμμετέχουν στον συντονισμό των δύο $Cu2 +$ στο ενεργό κέντρο των ενζύμων. Με μαύρο σημειώνονται τα διατηρημένα αμινοξέα μεταξύ των ενζύμων.	61
Σχήμα 34: a. PpETH και b. TcETH, προβλέψεις του AlphaFold 2 με την χρήση Amber και προσθήκη του συμπαραγόνα $Cu2 +$ στο ενεργό κέντρο από παρόμοια πρωτεΐνη με λυμένη δομή (PDB: 6Z1S). Οι εικόνες δημιουργήθηκαν στο PyMOL με απεικόνιση cartoon και surface εκτός από τις 6 ιστιδίνες του ενεργού κέντρου που απεικονίζονται ως sticks.....	62
Σχήμα 35: a. PpETH και b. TcETH, εστίαση στο ενεργό κέντρο των παραπάνω πρωτεϊνών. Φαίνονται οι 6 ιστιδίνες που συντονίζουν τους συμπαραγόντες $Cu2 +$ στο ενεργό κέντρο καθώς και η ομοιότητα του ενεργού κέντρου μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.....	62
Σχήμα 36: a. PpETH και b. TcETH, μέτρο IDDT του AlphaFold 2 συναρτήσει της θέσης στην αμινοξική ακολουθία κάθε πρωτεΐνης.....	63
Σχήμα 37: Οπτική πυκνότητα, OD600, των στελεχών στο τέλος των προκαλλιέργειών (~24 hr) μετά από επώαση στους 30°C.....	65
Σχήμα 38: Οπτική πυκνότητα καλλιέργειών, OD600, συναρτήσει του χρόνου. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 30°C για 4 d.....	66
Σχήμα 39: Ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση υπερκείμενου υγρού των καλλιέργειών συναρτήσει του χρόνου. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 30°C για 4 d. Την χρονική στιγμή 0 η πρωτεϊνική συγκέντρωση είναι αυτή του υπερκείμενου στο τέλος της προκαλλιέργειας.	67
Σχήμα 40: Ειδική ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση υπερκείμενου υγρού των καλλιέργειών συναρτήσει του χρόνου. Υπολογίστηκε με βάση την παραπάνω πρωτεϊνική συγκέντρωση και την οπτική πυκνότητα κάθε καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 30°C για 4 d.....	68

Σχήμα 41: Αποτελέσματα αναζήτησης μοτίβων PEST με το εργαλείο «epestfind» α. για την PpETH και β. για την TcETH. Κόψιμο στο σημείο αναγνώρισης που προβλέπεται για την TcETH θα δικαιολογούσε εν μέρη το αποτέλεσμα των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης..... 70

Σχήμα 42: Πρωτεϊνική συγκέντρωση ανά κλάσμα χρωματογραφίας συγγένειας για τα στελέχη P1 και P10 για την PpETH και τα C1 και C2 για την TcETH και από ένα από τα δύο στελέχη άγριου τύπου. Τα κλάσματα είναι τα: Αρχικό (Original), Flowthrough, Equilibration, 3 × Wash (5 mM ιμιδαζόλιο), 3 × Elusion (100 mM ιμιδαζόλιο), και 3 × Elusion (200 mM ιμιδαζόλιο) Το κλάσμα Equilibration δεν συλλέχθηκε και για αυτό δεν υπάρχει μέτρηση..... 71

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	3
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	4
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ	4
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	4
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	6
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
1.1. Εισαγωγή	9
1.2. Λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα (LCB)	10
1.2.1. Δομή – σύσταση	10
1.2.1.1. Κυτταρίνη	10
1.2.1.2. Ημικυτταρίνη	11
1.2.1.3. Πηκτίνη	12
1.2.1.4. Λιγνίνη.....	13
1.2.2. Πηγές	14
1.2.3. Συμβατική διαχείριση	14
1.2.4. Διαχείριση στην σύγχρονη εποχή	14
1.2.4.1. Βιοκαύσιμα.....	14
1.2.4.2. Παραγωγή διαφόρων χρήσιμων υλικών	15
1.3. Ένζυμα	17
1.3.1. Ορισμός	17
1.3.2. Κατηγοριοποίηση και δράσεις των ενζύμων	19
1.3.3. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων	19
1.3.3.1. Υπόθεση γρήγορης ισοροπίας	20
1.3.3.2. Υπόθεση ημισταθερής κατάστασης.....	21
1.3.3.3. Πειραματικός προσδιορισμός των παραμέτρων κινητικής Michaelis – Menten	21
1.3.3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την καταλυτική δράση των ενζύμων	22
1.3.4. Ετερόλογη έκφραση ενζύμων	25
1.3.4.1. Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA	25
1.3.4.2. Πλασμιδιακοί φορείς	27
1.3.4.3. Επιλογή ξενιστή ετερόλογης έκφρασης ενζύμου	27
1.3.4.4. Παράμετροι ετερόλογης έκφρασης ενζύμων με την ζύμη <i>Pichia pastoris</i>	28
1.3.5. Καθαρισμός ενζύμων με χρωματογραφία συγγένειας	29
1.3.5.1. Πολυϊστιδίνη (<i>His6 – tag</i>) ως μόριο σύντηξης	30
1.4. Βιοαποικοδόμηση LCB.....	32
1.4.1. Στην φύση	32
1.4.2. Προκατεργασία στην βιομηχανία	33
1.4.3. Ενζυμική αποικοδόμηση	33
1.4.3.1. Αποικοδόμηση κυτταρίνης.....	33
1.4.3.2. Αποικοδόμηση ημικυτταρίνης.....	34
1.4.3.3. Αποικοδόμηση λιγνίνης	34

1.4.4.	«Αιθεράσες».....	35
1.4.4.1.	Βακτηριακές αιθεράσες.....	35
1.4.4.2.	Μυκητιακές αιθεράσες.....	35
1.5.	Εφαρμογές σε συνθετικά πολυμερή (πλαστικά).....	37
1.5.1.	Γενικά.....	37
1.5.2.	Πιθανός ρόλος των αιθερασών.....	37
2.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	38
2.1.	Επιλογή των ενζύμων (αιθερασών).....	38
2.1.1.	Αναζήτηση σε διεθνείς βάσεις δεδομένων.....	38
2.1.2.	Πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής των υποψηφίων ενζύμων με μηχανική μάθηση.....	38
2.2.	Επιλογή του ξενιστή έκφρασης.....	40
2.2.1.	<i>Escherichia coli</i>	40
2.2.2.	<i>Pichia pastoris</i>	40
2.3.	Επιλογή του φορέα έκφρασης.....	41
2.3.1.	Βασικά.....	41
2.3.2.	Ιδιαιτερότητες του κατασκευασμένου φορέα.....	42
2.4.	Υλικά και Όργανα.....	43
2.4.1.	Βασικός εξοπλισμός.....	43
2.4.2.	Βασικά υλικά.....	43
2.4.3.	Θρεπτικά μέσα.....	44
2.4.3.1.	Για <i>E. coli</i> :.....	44
2.4.3.2.	Για <i>P. pastoris</i>	44
2.5.	Μέθοδοι.....	46
2.5.1.	Παραλαβή και πολλαπλασιασμός πλασμιδιακού φορέα με <i>E. coli</i> TOP 10.....	46
2.5.2.	Απομόνωση πλασμιδιακού φορέα από υγρή καλλιέργεια <i>E. coli</i> TOP 10.....	46
2.5.3.	Γραμμικοποίηση του πλασμιδιακού φορέα με περιοριστική ενδονουκλεάση.....	47
2.5.4.	Καθαρισμός του γραμμικού φορέα.....	47
2.5.5.	Ηλεκτροφόρηση DNA σε γέλη αгарόζης.....	48
2.5.6.	Μετασχηματισμός της ζύμης <i>Pichia Pastoris</i> με ηλεκτροδιάτρηση.....	48
2.5.6.1.	Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i>	49
2.5.6.2.	Ηλεκτροδιάτρηση επιδεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i>	50
2.5.7.	Διαλογή στελεχών.....	50
2.5.7.1.	Σε τρυβλία – «πίτες».....	50
2.5.7.2.	Σε υγρές καλλιέργειες.....	51
2.5.7.3.	Επιλογή καλύτερου στελέχους.....	51
2.5.8.	Ετερόλογη έκφραση.....	51
2.5.9.	Καθαρισμός ενζύμων (down stream processing).....	52
2.5.9.1.	Φυγοκέντρηση.....	52
2.5.9.2.	Διήθηση.....	52
2.5.9.3.	Συμπύκνωση.....	52
2.5.10.	Υψηλός καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας.....	52
2.5.10.1.	Προετοιμασία ρυθμιστικών διαλυμάτων.....	52
2.5.10.2.	Προετοιμασία δειγμάτων.....	53
2.5.10.3.	Πρωτόκολλο καθαρισμού.....	53
2.5.11.	Μέτρηση οπτικής πυκνότητας OD600 κυτταρικών καλλιεργειών.....	53
2.5.11.1.	Σε κυψελίδα.....	53
2.5.11.2.	Σε πλάκα 96 θέσεων.....	54
2.5.12.	Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford (Bradford assay).....	54

2.5.12.1.	Παρασκευή αντιδραστηρίου	55
2.5.12.2.	Χρήση αντιδραστηρίου	55
2.5.12.3.	Καμπύλη αναφοράς	55
2.5.12.4.	Περιορισμοί.....	56
2.5.13.	Τρόποι συμπύκνωσης.....	56
2.5.13.1.	Περιστρεφόμενες στήλες	56
2.5.13.2.	Υπερδιήθηση	56
2.5.14.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE)	57
2.5.14.1.	Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης	58
2.5.14.2.	Προετοιμασία δειγμάτων	59
2.5.14.3.	Ηλεκτροφόρηση.....	59
2.5.14.4.	Χρώση και αποχρωματισμός πηκτώματος.....	60
2.5.15.	Αποθήκευση αποθεμάτων κυττάρων σε γλυκερόλη (glycerol stock).....	60
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
3.1.	Πολλαπλή ευθυγράμμιση υποψηφίων αιθερασών.....	61
3.2.	Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής υποψηφίων ενζύμων με μηχανική μάθηση	62
3.3.	Γέλη αгарόζης των γραμμικοποιημένων φορέων.....	64
3.4.	Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση.....	64
3.5.	Διαλογή στελεχών	65
3.5.1.	Πίτες	65
3.5.2.	Ετερόλογη έκφραση σε υγρές καλλιέργειες	65
3.5.2.1.	Προκαλλιέργειες.....	65
3.5.2.2.	Καλλιέργειες.....	66
3.5.3.	Ηλεκτροφόρηση υπερκείμενων καλλιιεργειών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE).....	69
3.5.4.	Καθαρισμός ενζύμων με χρωματογραφία συγγένειας	70
3.6.	Παραγωγή αιθερασών.....	72
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	74
4.1.	Γενικά	74
4.2.	Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	74
4.2.1.	Άμεσο μέλλον.....	74
4.2.2.	Απώτερο μέλλον	75
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	76
6.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	80
6.1.	Φορείς έκφρασης των <i>PpETH</i> και <i>TcETH</i>	80
6.2.	Τρισδιάστατα εκτυπωμένη βάση επώασης Falcon	82
6.3.	Αυτόματο «τάισμα»	83

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Τεχνολογικές εξελίξεις κυρίως στην βιοτεχνολογία επιτρέπουν πλέον την χρήση των έως τώρα αναξιοποίητων αποβλήτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας ως πρώτη ύλη για την παραγωγή διάφορων προϊόντων όπως τα βιοκαύσιμα και τα βιοπολυμερή. Ωστόσο η απόδοση αυτών των διεργασιών είναι ακόμα πολύ χαμηλή για την εμπορευματοποίηση τους, κυρίως λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας στο ανθεκτικό φυσικό πολυμερές «λιγνίνη». Η αποικοδόμηση της λιγνίνης θα επέτρεπε την πλήρη αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.²

Στην ερευνητική πορεία για την εύρεση αποτελεσματικής και οικονομικής διεργασίας αποικοδόμησης της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας χρησιμοποιούνται διάφορες προσεγγίσεις. Πληθώρα διεργασιών «προκατεργασίας» της LCB με φυσικές, χημικές και φυσικοχημικές μεθόδους έχουν αναπτυχθεί αλλά είτε έχουν μικρή απόδοση είτε χρειάζονται μεγάλα ποσά θερμότητας και υψηλές πιέσεις, είτε ακριβούς διαλύτες και πυκνά οξέα που ανακυκλώνονται με κοστοβόρες και πολύπλοκες αποστάξεις.⁵

Το κλειδί για την βιώσιμη αξιοποίηση της LCB μάλλον προέρχεται από την ίδια την φύση, όπου μετά από εκατομμύρια χρόνια εξέλιξης, εξειδικευμένες μούχλες οξειδώνουν την LCB μέχρι και σε CO_2 με σχετική ευκολία.¹ Αυτό το επιτυγχάνουν με ένα «οπλοστάσιο» εξειδικευμένων ενζυμικών συστημάτων, δηλαδή με βιολογικούς καταλύτες.⁶

Με την μελέτη αυτών των ενζυμικών συστημάτων και την κατανόηση των μηχανισμών αποικοδόμησης της LCB στην φύση είναι δυνατόν να παραχθούν τέτοιοι βιολογικοί καταλύτες στο εργαστήριο και να χρησιμοποιηθούν σε εμπορικό επίπεδο. Η παραγωγή ενζύμων σε εμπορικό και εργαστηριακό επίπεδο γίνεται με την τεχνική της ετερόλογης έκφρασης, δηλαδή την έκφραση των ενζύμων ενδιαφέροντος σε μικροοργανισμούς «εργοστάσια» που κανονικά δεν παράγουν αυτά τα ένζυμα.⁷

Η γνώση που προκύπτει από την έρευνα στην αποικοδόμηση της LCB μπορεί να εφαρμοστεί στην βιοαποικοδόμηση πλαστικών με σκοπό την καταπολέμηση της πλαστικής ρύπανσης και την βελτιστοποίηση των διεργασιών παραγωγής και ανακύκλωσης πλαστικών.³

1.2. Λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα (LCB)

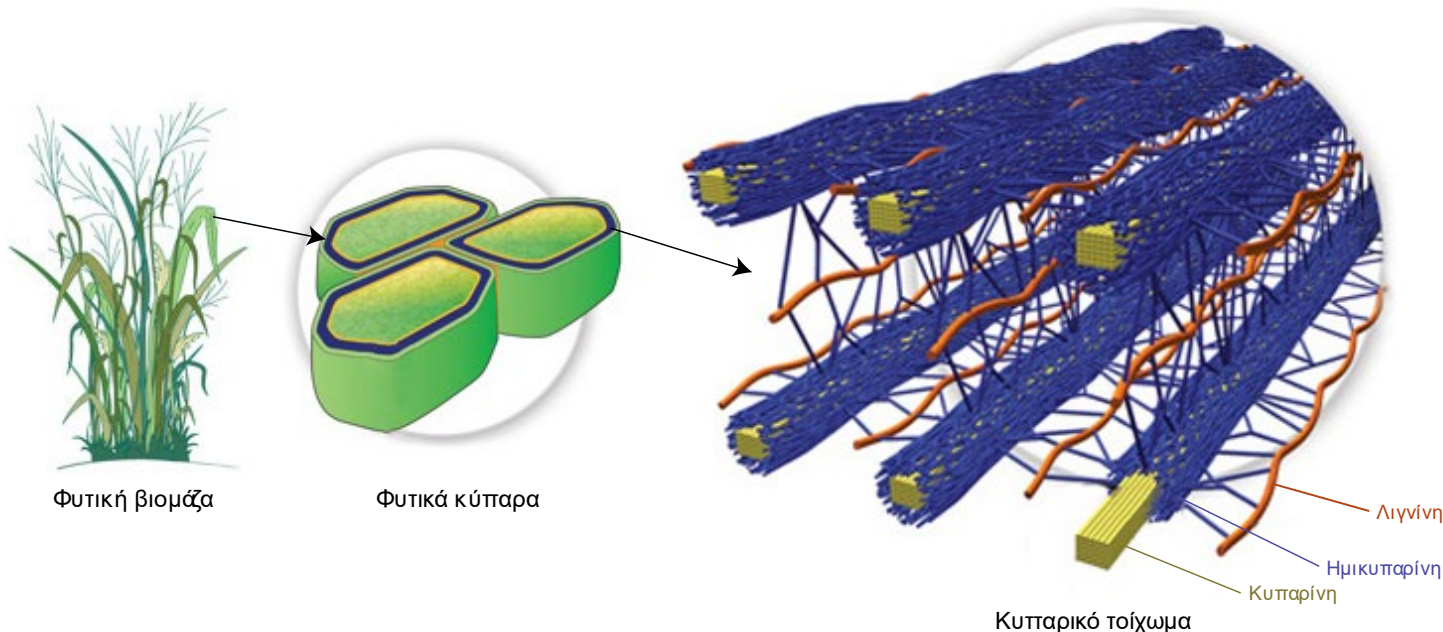
1.2.1. Δομή – σύσταση

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα (LCB, lignocellulosic biomass) συνίσταται κυρίως από πολυσακχαρίτες, φαινολικά πολυμερή και πρωτεΐνες, τα οποία αποτελούν το κυτταρικό τοίχωμα των ανώτερων φυτών.² Η τρισδιάστατη δομή της είναι πολύπλοκη, με την κυτταρίνη να εγκλείεται από την ημικυτταρίνη και την λιγνίνη (Σχήμα 1), καθώς και άλλα συστατικά.^{2,8} Η εξέλιξη έχει προσδώσει στην λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα αντίσταση στην υδρόλυση και δομική ανθεκτικότητα λόγω των σταυροδεσμών μεταξύ των παραπάνω πολυμερών (cross – links).²

Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από το πρωτογενές και το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα.⁹

- Το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από 20% – 30% κυτταρίνη, 25% ημικυτταρίνη, 30% πηκτίνη και 5% – 10% δομικές γλυκοπρωτεΐνες και είναι το πρώτο από τα δύο που δημιουργείται. Είναι διαπερατό στο νερό και ελαστικό λόγω της πηκτίνης. Η πηκτίνη, η ημικυτταρίνη και οι γλυκοπρωτεΐνες δημιουργούν μία ελαστική μήτρα μέσα στην οποία συγκρατούνται μικροϊνίδια κυτταρίνης.⁹
- Το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα δημιουργείται όταν το κύτταρο αποκτά το τελικό του μέγεθος και αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη. Στο δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα ενσωματώνεται και λιγνίνη, η οποία προκαλεί την λιγνίνωση (lignification) αυτών των γερασμένων ιστών όπου τα αντίστοιχα κύτταρα πεθαίνουν και λειτουργούν ως στηρίγματα για την δημιουργία κλαδιών στα ξυλώδη φυτά ή μαλακού βλαστού στις πόες (φυτά με μαλακό και πράσινο βλαστό χωρίς ξυλώδες μέρος).⁹

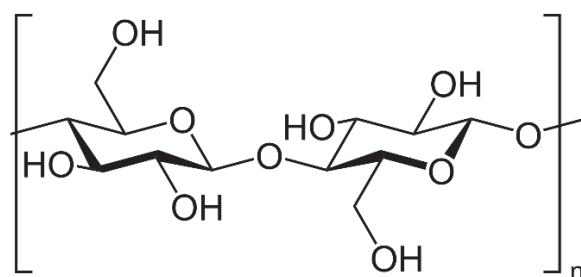
Τα φυτικά κύτταρα συγκολλούνται μεταξύ τους με την μεσοκυττάρια στρώση (middle lamella) που αποτελείται κυρίως από λιγνίνη και πηκτικτικές ουσίες και έχει πάχος 0.2 – 1.0 μm .¹⁰ Ξερά ξύλα αποτελούνται τελικά από περίπου 30% λιγνίνη, 40% κυτταρίνη και 30% ημικυτταρίνη.⁹



Σχήμα 1: Δομή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.⁸ (Από το US Department of Energy: Office of Biological and Environmental Research, Public domain, επεξεργασμένη)

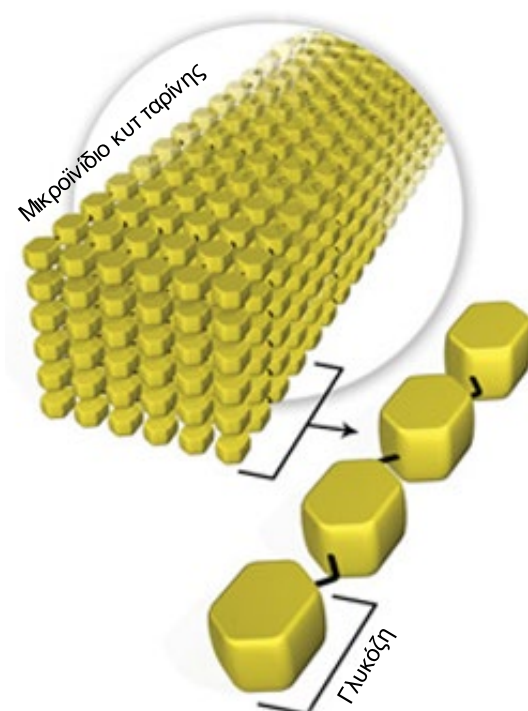
1.2.1.1. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι φυσικό πολυμερές αποτελούμενο από μία αλυσίδα μονάδων D – γλυκόζης συνδεδεμένες με β -(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς (Σχήμα 2) και συνιστά το κυριότερο δομικό συστατικό του κύριου κυτταρικού τοιχώματος των πράσινων φυτών.² Συνήθως έχει βαθμό πολυμερισμού 7000 – 15000.¹⁰ Είναι το πιο διαδεδομένο και διαθέσιμο οργανικό πολυμερές στον κόσμο, όπου και είναι αποθηκευμένο περίπου το 30 – 50% του ολικού οργανικού άνθρακα.^{9,11}



Σχήμα 2: Κυτταρίνη, γραμμικό πολυμερές μονάδων D – γλυκόζης συνδεδεμένων με β–(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς

Μόρια κυτταρίνης, συνήθως 36, ενώνονται με δεσμούς υδρογόνου σε δέσμες με πάχος περίπου 10 – 20 nm, γνωστές ως «μικροϊνίδια» κυτταρίνης (Σχήμα 3).^{9,10} Τα μικροϊνίδια κυτταρίνης είναι κρυσταλλικές περιοχές αδιαπέραστες στο νερό με υψηλή εφελκυστική αντοχή (tensile strength), αντοχή σε χημική και βιολογική υποβάθμιση και αντοχή στην υδρόλυση.⁹



Σχήμα 3: Μικροϊνίδια κυτταρίνης σχηματίζονται από πολλά μόρια κυτταρίνης.⁸ (Από το US Department of Energy: Office of Biological and Environmental Research, Public domain, επεξεργασμένη)

Ωστόσο αρκετά βακτήρια και μύκητες έχουν στην διάθεσή τους κυτταρινάσες, ένζυμα που υδρολύουν την κυτταρίνη, και είναι ικανά να την χρησιμοποιήσουν ως πηγή άνθρακα. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να βρεθούν και στα πεπτικά συστήματα ορισμένων ζώων, όπως ορισμένων φυτοφάγων, επιτρέποντάς τους να τρώνε γρασίδι και άχυρο.⁹

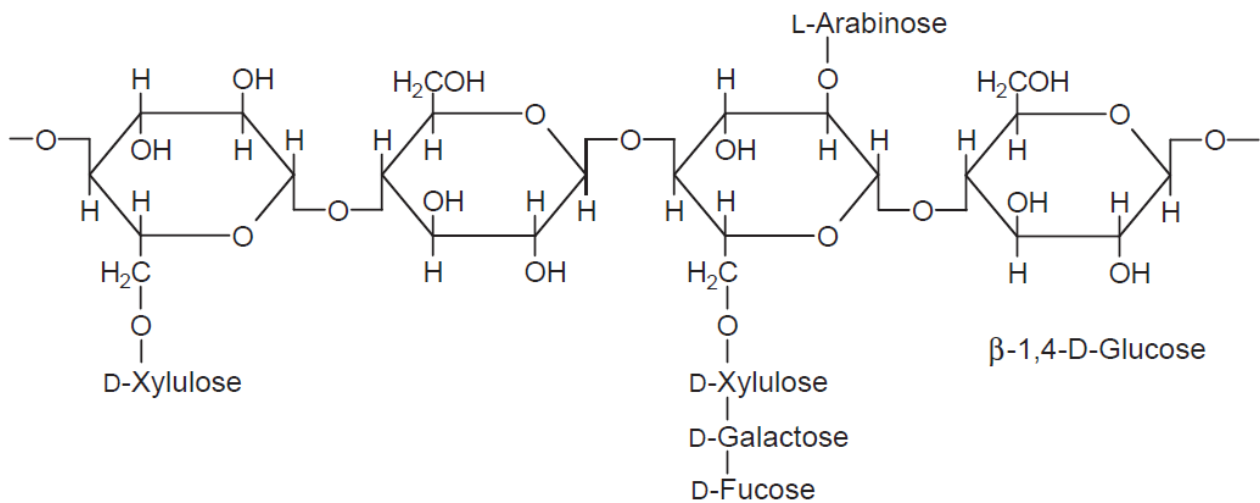
1.2.1.2. Ημικυτταρίνη

Οι ημικυτταρίνες είναι σημαντικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Ορίζονται ως οι πολυσακχαρίτες που μπορούν να ανακτηθούν με αλκαλικά διαλύματα. Αρχικά θεωρήθηκε ότι αποτελούν πρόδρομο της κυτταρίνης και από εκεί προκύπτει το όνομα, ωστόσο αυτό αποδείχθηκε λάθος. Αποτελούνται από διάφορους πολυσακχαρίτες που περιέχουν, εκτός από D – γλυκόζη, τις εξόζες D – μαννόζη, D – γαλακτόζη, D – φουκόζη και άλλες (Σχήμα 4). Μπορεί επίσης να περιέχουν πεντόζες όπως D – ξυλόζη και L – αραβινόζη.⁹

Μέχρι τώρα οι ημικυτταρίνες έχουν χωριστεί σε 4 γενικές υποκατηγορίες:¹²

1. Ξυλάνες
2. Μαννάνες
3. β – γλυκάνες μικτής σύνδεσης (mixed linkage)

4. Ξυλογλυκάνες

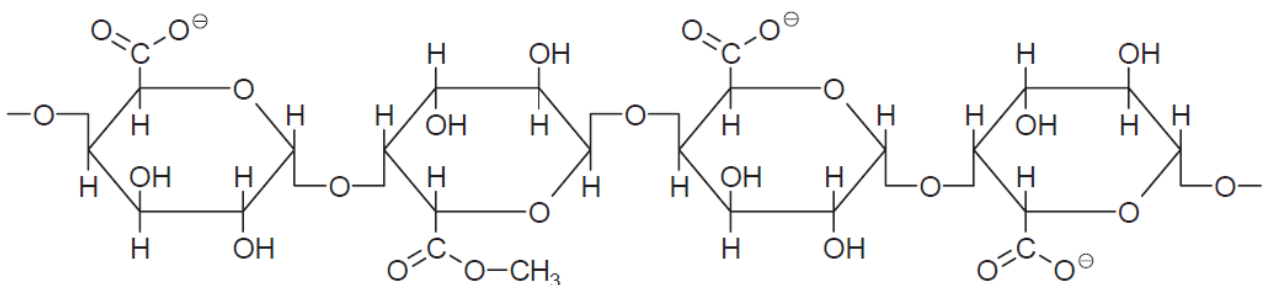


Σχήμα 4: Παράδειγμα μίας ημικυτταρίνης, πιο συγκεκριμένα μίας ξυλογλυκάνης.⁹

Οι ημικυτταρίνες μπορεί να έχουν διάφορες «διακοσμήσεις» που διακλαδίζονται από την κύρια αλυσίδα με αιθερικούς δεσμούς, όπως τα μονομερή: ξυλόζη, γλυκόζη, αραβινόζη και γαλακτόζη. Επίσης συνδέονται με την λιγνίνη με αιθερικούς δεσμούς.¹

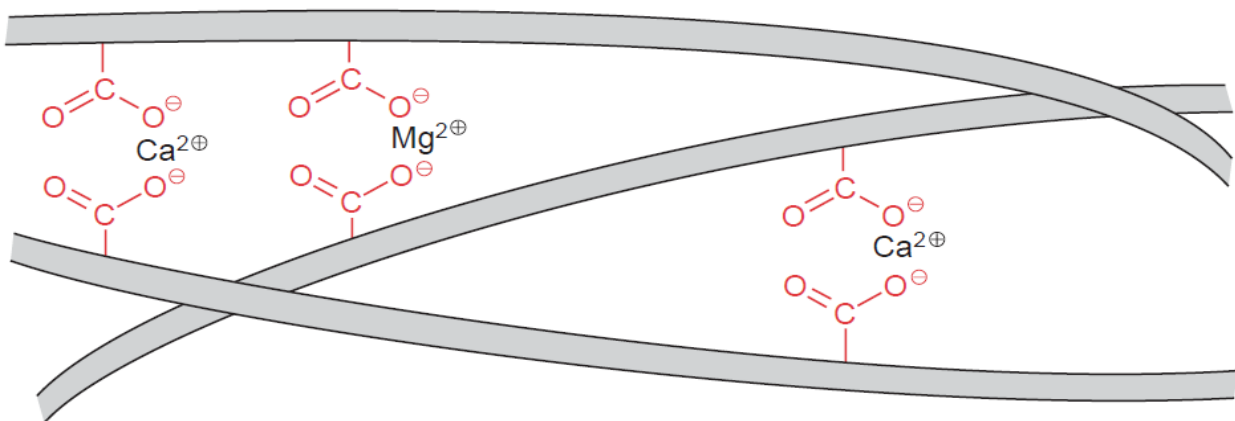
1.2.1.3. Πηκτίνη

Άλλη μία κύρια συνιστώσα του κυτταρικού τοιχώματος αποτελεί η πηκτίνη, μείγμα πολυμερών από όξινα σάκχαρα όπως το D – γαλακτουρονικό οξύ, συνδεδεμένα με $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{4)}$ γλυκοζιτικούς δεσμούς (Σχήμα 5).⁹



Σχήμα 5: πολύ- $\alpha\text{-1,4-D}$ -γαλακτουρονικό οξύ, βασικό συστατικό της πηκτίνης.⁹

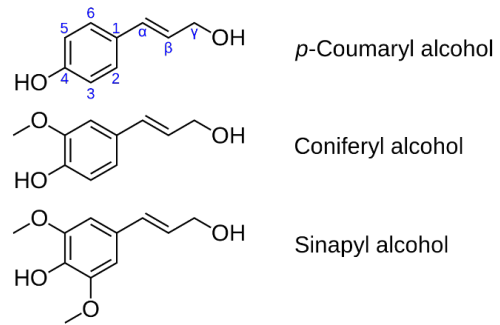
Οι ελεύθερες καρβοξυλικές ομάδες είτε εστεροποιούνται με ομάδες μεθυλίου είτε ενώνουν παρακείμενες αλυσίδες με ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} διαμορφώνοντας μία άμορφη γέλη (Σχήμα 6). Η απουσία αυτών των ιόντων καθιστά την πηκτίνη διαλυτή.⁹



Σχήμα 6: Ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} ενώνουν με ηλεκτροστατικούς δεσμούς τις γειτονικές αλυσίδες πηκτίνης.⁹

1.2.1.4. Λιγνίνη

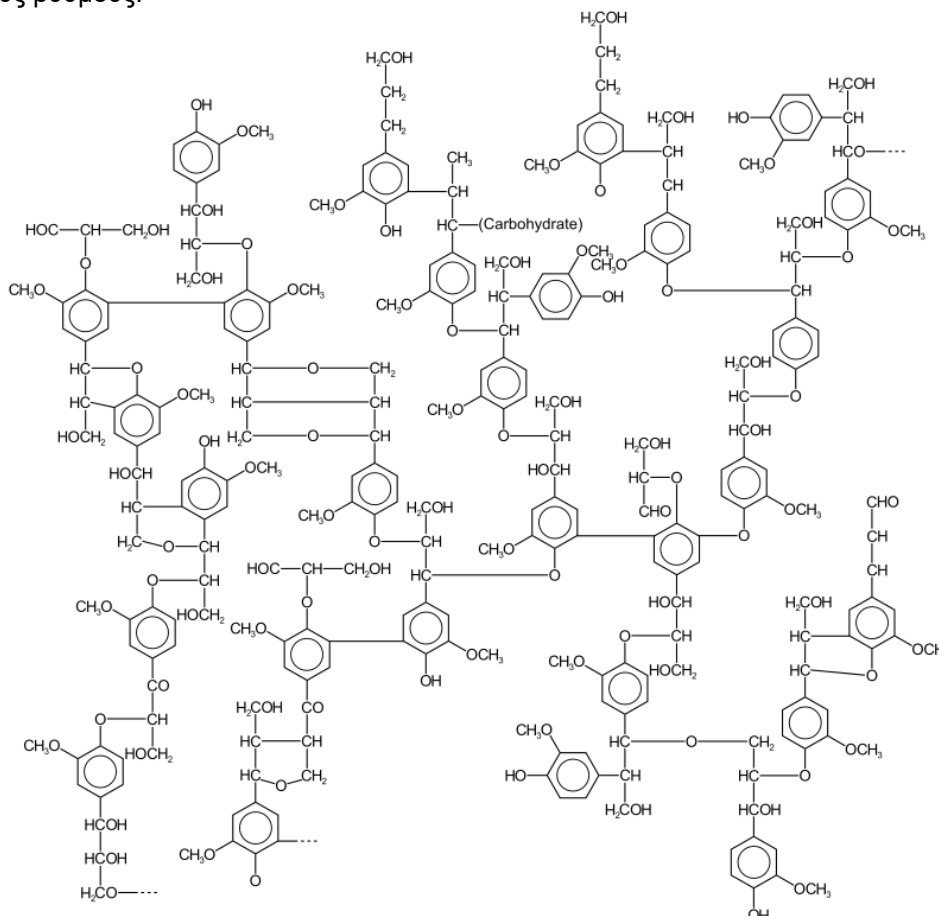
Η λιγνίνη είναι το τρίτο πιο σημαντικό συστατικό της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Διαθέτει σύνθετη άμορφη (μη κρυσταλλική) πολυμερική δομή και είναι σημαντική για την δομή των ανώτερων φυτών και ίσως και κάποιων φυκιών.^{2,13} Οι λιγνίνες είναι σύνθετα αρωματικά ετεροπολυμερή, χωρίς κάποιο επαναλαμβανόμενο μοτίβο, που προσδίδουν σκληρότητα στα δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα των φυτών δημιουργώντας μία μήτρα που ενώνει τα μικροϊνίδια κυτταρίνης με τα υπόλοιπα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος.^{10,13} Η σκληρότητα προκύπτει από τους σταυροδεσμούς μεταξύ μονομερών φαινυλοπροπανίου, τις μονολιγνόλες (Σχήμα 7 & Σχήμα 8).⁹



Σχήμα 7: Οι τρεις πιο συχνές μονολιγνόλες, τα μονομερή των λιγνινών.⁹

Η λιγνίνη είναι ανθεκτική στην υποβάθμιση από τους περισσότερους μικροοργανισμούς αφού παράγεται από τα φυτά ακριβώς για τον σκοπό της προστασίας των υδατανθράκων από αυτούς. Ωστόσο η λιγνίνη όντως αποδομείται στην φύση από μύκητες ελαφράς, καφέ και λευκής σήψης (soft, brown και *white rot fungus* ή *xylophagous fungus*), αλλά η σύνθετη δομή της καθιστά δύσκολη την κατανόηση του μηχανισμού αποικοδόμησης που χρησιμοποιούν. Είναι γνωστό ότι η αποικοδόμηση της λιγνίνης συμβαίνει με οξειδωτικές αντιδράσεις που διασπούν είτε δεσμούς άνθρακα – άνθρακα, είτε αιθερικούς δεσμούς, είτε διάφορες χαρακτηριστικές ομάδες, πλευρικές αλυσίδες και αρωματικούς δακτυλίους από το άμορφο μακρομόριο.¹⁴

Οι μύκητες λευκής σήψης μπορούν να αποδομήσουν πλήρως την λιγνίνη από το ξύλο σε εργαστηριακά πειράματα. Όμως στην φύση συνήθως δεν συμβαίνει αυτό αλλά το τελικό προϊόν αυτής της διεργασίας είναι ένα μείγμα αποσπασμένων κομματιών λιγνίνης μερικώς αποδομημένων, γνωστό ως χούμος (humus) που εισέρχεται στον κύκλο του εδάφους και παραμένει σε στρώματα για πολλά χρόνια. Βακτήρια του εδάφους, μικροπανίδα όπως σκουλήκια και φυσικές διεργασίες συνεχίζουν την διεργασία αποικοδόμησης του χούμος με πολύ αργούς ρυθμούς.¹⁴



Σχήμα 8: Απλοποιημένη δομή μίας λιγνίνης. Στην πραγματικότητα η δομή είναι τρισδιάστατη. (CC BY-SA 3.0)¹⁵

1.2.2. Πηγές

Μερικές από τις πηγές για φτηνή και άφθονη LCB είναι οι εξής:²

- **Ξυλώδης βιομάζα:** Τα δέντρα του δάσους είναι σημαντική πηγή LCB. Κάθε χρόνο 370 εκατομμύρια τόνοι LCB παράγονται από τα δάση στις ΗΠΑ. Άλλες χώρες με μεγάλες δασικές εκτάσεις είναι ο Καναδάς, η Ρωσία, η Κίνα και η Βραζιλία. Από τις βιομηχανίες που σχετίζονται με τα δάση μπορούν να συλλεχθούν τα εξής κλάσματα LCB: φυσικά υπολείμματα του δάσους όπως νεκρά κλαδιά και φλοιοί δέντρων (Εικόνα 1), πριονίδια, ροκανίδια, ξύσματα ξύλων από την βιομηχανία ξυλείας, ξυλεία χαμηλής ποιότητας και απορριφθέντα τμήματα από πριονιστήρια μύλους κόντρα πλακέ και μύλους χαρτοποιίας.
- **Μη ξυλώδης βιομάζα:** Η μη ξυλώδης βιομάζα περιέχει επίσης λιγνίνη σε χαμηλότερη περιεκτικότητα και έχει χαμηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο ανά μονάδα όγκου. Ωστόσο είναι πιο ευρέως διαθέσιμη και φτηνή καθώς μπορεί να συλλεχθεί πλήρως ανανεώσιμα από γεωργικά απόβλητα όπως άχυρα και διάφορα υπολείμματα καλλιέργειών (Εικόνα 2), καθώς και από απόβλητα επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων.
- **Χόρτα:** Τα χόρτα αποφεύγουν το πολυσυζητημένο δίλημμα «τρόφιμα ή καύσιμα» (και όχι μόνο καύσιμα πλέον) καθώς δεν προορίζονται για τρόφιμα και είναι πολύ οικονομικά με μεγάλο ενεργειακό περιεχόμενο. Μερικά από τα άγρια χόρτα που προτείνονται για την παραγωγή LCB είναι τα switchgrass (*Panicum virgatum*), ο μίσχανθος (*Miscanthus*) (Εικόνα 3), canary grass (*Phalaris canariensis*), το giant reed (*Arundo donax*), η μηδική (*Medicago sativa*) και το Napier grass (*Pennisetum purpureum*).



Εικόνα 1: Υπολείμματα του δάσους Donard, Newcastle, Northern Ireland.¹⁶
([CC BY-SA 2.0](#))



Εικόνα 2: Υπολείμματα καλλιέργειας καλαμποκιού.¹⁷
([CC BY-NC-SA 2.0](#))



Εικόνα 3: *Miscanthus floriculatus*.¹⁸
([CC BY-SA 3.0](#))

1.2.3. Συμβατική διαχείριση

Αποδείξεις για την αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας για ενέργεια από πρώιμους ανθρώπους εκτείνονται έως και 2 εκατομμύρια χρόνια στο παρελθόν, οπότε και χρονολογούνται αρχαιολογικά ευρήματα ελεγχόμενης φωτιάς από ξύλα.¹⁹ Από τότε έως και την βιομηχανική επανάσταση τα ξύλα αποτέλεσαν την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη για ελεγχόμενες φωτιές, μέχρι που αντικαταστάθηκαν από τα ορυκτά καύσιμα.²

Δυστυχώς μέρος της συμβατικής διαχείρισης λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας από γεωργικά απόβλητα είναι και η απλή καύση της χωρίς καμία αξιοποίησή του ενεργειακού περιεχομένου της. Αυτή η δραστηριότητα προκαλεί σοβαρή ρύπανση της ατμόσφαιρας σε τοπικό αλλά και σε παγκόσμιο επίπεδο. Επίσης προκαλείται μόλυνση των τοπικών νερών και επηρεάζεται η σύσταση του χώματος καθώς ο άνθρακας, το άζωτο και το θείο που περιέχουν τα γεωργικά απόβλητα χάνονται στην ατμόσφαιρα και δεν αναπληρώνονται.²⁰ Αυτή η πρακτική επιτρέπεται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις και στην Ελλάδα.²¹

1.2.4. Διαχείριση στην σύγχρονη εποχή

1.2.4.1. Βιοκαύσιμα

Η εξάντληση των ορυκτών πόρων στα μέσα του 20^{ου} αιώνα επανέφερε την ζήτηση για βιομάζα με σκοπό την παραγωγή ενέργειας με την μορφή σύγχρονων ανανεώσιμων βιοκαυσίμων.²

Τα πρώτα βιοκαύσιμα που αναπτύχθηκαν, τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς, είναι η βιοαιθανόλη και το βιοντίζελ. Η βιοαιθανόλη χρησιμοποιεί ως πρώτη ύλη άμυλο και σάκχαρα, ενώ το βιοντίζελ λίπη και λάδια. Ωστόσο η διείσδυση στην αγορά αυτών των καυσίμων παραμένει περιορισμένη λόγω του άμεσου ανταγωνισμού με την παραγωγή τροφίμων, δηλαδή το δίλημμα «τροφήμα ή καύσιμα».² Τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς υποστηρίζονται από κρατικές επιδοτήσεις και δεν είναι ανταγωνιστικά με τα υπάρχοντα ορυκτά καύσιμα από άποψη κόστους παραγωγής, ενώ οι καθαρές εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα είναι σε κάποιες περιπτώσεις μεγαλύτερες από αυτές των ορυκτών καυσίμων αν υπολογιστεί η παραγωγή των πρώτων υλών, η επεξεργασία και η μεταφορά τους.²²

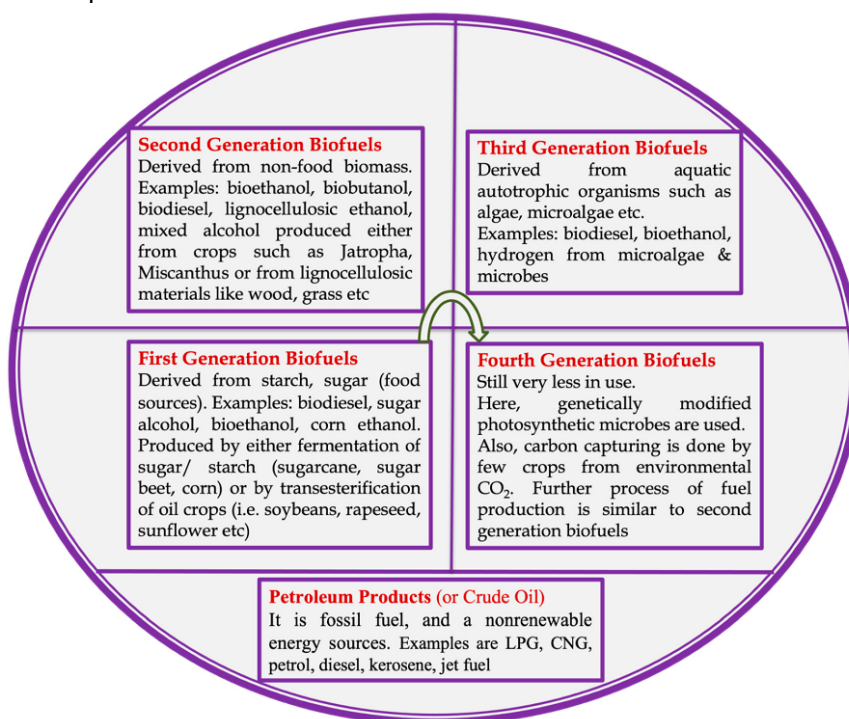
Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς (Σχήμα 9) σκοπεύουν στην μετατροπή της LCB σε υγρά καύσιμα, χρησιμοποιώντας ολόκληρο το φυτό, συμπεριλαμβανόμενου και του ξυλώδους μέρους. Έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν υπολείμματα LCB από διάφορες διεργασίες που θα έμεναν αναξιοποίητα, όπως τα μη βρώσιμα μέρη των τροφίμων, ή αποδοτικότερα ενεργειακά φυτά που έχουν μεγαλύτερο ενεργειακό περιεχόμενο ανά έκταση καλλιέργειας.²

Ανάλογα με την αναλογία C/N και την υγρασία της LCB, ακολουθούνται οι παρακάτω διεργασίες:²

- $C/N < 30$ & $υγρασία > 30\%$: Ακολουθούνται βιοχημικές διεργασίες βασιζόμενες σε ένζυμα και μικροοργανισμούς ή μανιτάρια.
- $C/N > 30$ & $υγρασία < 30\%$: Ακολουθούνται θερμοχημικές διεργασίες.

Υπάρχουν ακόμα τεχνολογικά εμπόδια στην παραγωγή βιοκαυσίμων από LCB, ωστόσο έως τώρα έχουν παραχθεί τα εξής:²

- Βιο – H₂
- Βουτανόλη
- Διμεθυλοφουράνιο
- γ-βαλερολακτόνη



Σχήμα 9: Γενιές βιοκαυσίμων.²³

1.2.4.2. Παραγωγή διαφόρων χρήσιμων υλικών

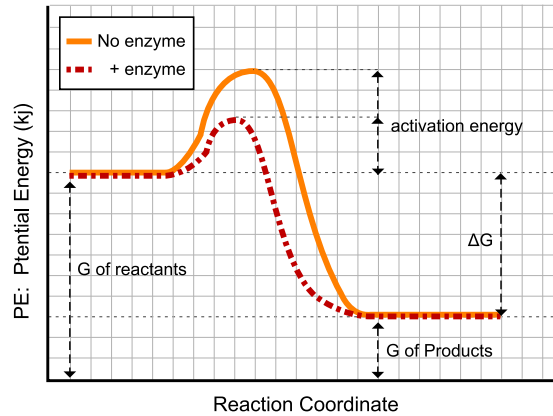
Συνοπτικά αναφέρονται διάφορα προϊόντα προστιθέμενης αξίας (value added products, προϊόντα που διαφέρουν σε φυσικοχημική μορφή από την αρχική πρώτη ύλη, με τρόπο που αυξάνεται η αξία τους) που μπορούν να παραχθούν από τα συστατικά της LCB:

- Ανανεώσιμα συνθετικά βιοπολυμερή (πλαστικά): Τα εξής συνθετικά πολυμερή έχουν παραχθεί από LCB σε εμπορική κλίμακα:²⁴
 - PHAs (Polyhydroxyalkanoates)
 - PHBs (Polyhydroxybutyrates)
 - PHBV (Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate))
 - PLA (Polylactic acid)
 - PBS (Polybutylene succinate)
 - PGA (Polyglycolic acid)
 - Bio – PE (Polyethylene)
 - Bio – PET (Polyethylene terephthalate)
 - Bio – based polyamides
- Μικροβιακά κελιά καυσίμου: Η LCB είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την παραγωγή ενέργειας μέσω μικροβιακών κελιών καυσίμου.²⁵
- Γαλακτωματοποιητές: Από τα συστατικά της LCB μπορούν να παραχθούν γαλακτωματοποιητές τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών σκευών. Επίσης μπορεί να παραχθεί ασφαλτικό γαλάκτωμα για την στεγανοποίηση ταρατσών.²⁶
- Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων: Υδρογέλες βασιζόμενες σε ημικυτταρίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ελεγχόμενη μεταφορά φαρμάκων.²⁷
- Προσροφητικά υλικά: Χαρακτηριστικές ομάδες της LCB μπορούν να προσροφούν ρύπους από την υγρή φάση ή το φυσικό αέριο καθώς και βαρέα μέταλλα (Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+}) χρησιμοποιώντας απλά ανεπεξέργαστα υπολείμματα LCB, όπως φύλλα, φλούδες και υπολείμματα τσαγιού.²⁸
- Καταλυτικά υλικά: Η LCB μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την κατάλυση αντιδράσεων.²⁸
- Ηλεκτρόδια: Η LCB λόγω της μεγάλης επιφάνειάς της μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ηλεκτροδίων με μικρή αντίσταση μεταξύ ηλεκτροδίου και ηλεκτρολύτη.²⁸
- Δομικά υλικά: Απλά δομικά αλλά και σύνθετα υλικά μπορούν να παραχθούν οικονομικά από LCB.²⁸

1.3. Ένζυμα

1.3.1. Ορισμός

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες οι οποίες καταλύουν τις πολυάριθμες και σύνθετες βιοχημικές αντιδράσεις των μικροοργανισμών, των ζώων και των φυτών.^{29,30} Ως καταλύτες μειώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης των αντιδράσεων που καταλύουν, αυξάνοντας την πιθανότητα να αντιδράσουν μόρια τα οποία διαθέτουν την απαραίτητη δυναμική ενέργεια για να υπερβούν τον ενεργειακό φραγμό της επιθυμητής αντίδρασης (Σχήμα 10).³¹

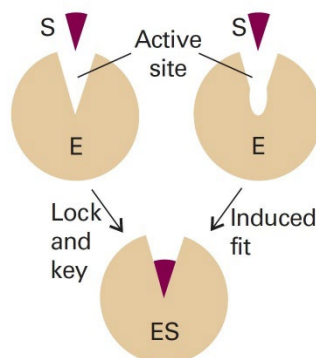


Σχήμα 10: Μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης μιας αντίδρασης με τη χρήση ενζύμου.³¹

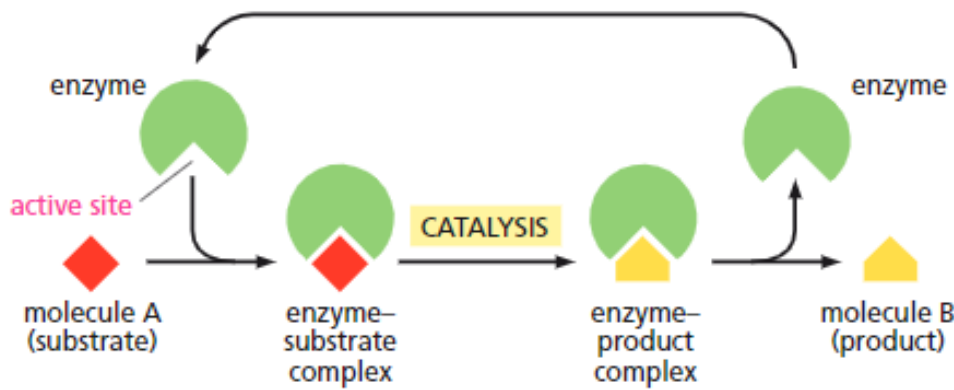
Τα ένζυμα διαθέτουν ένα ή περισσότερα ενεργά κέντρα στα οποία δεσμεύονται ένα ή περισσότερα μόρια που αποκαλούνται υποστρώματα.³¹ Τα υποστρώματα διατάσσονται στο ενεργό κέντρο σε διαμόρφωση που μειώνει σημαντικά την ενέργεια ενεργοποίησης που χρειάζεται για να αντιδράσουν μεταξύ τους ή με άλλα μόρια. Η μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης προκύπτει από την αύξηση της πιθανότητας επιτυχών συγκρούσεων των υποστρωμάτων με τα γειτονικά τους μόρια.³¹ Η πιθανότητα αυτή αυξάνεται από την ικανότητα των ενζύμων να συγκρατούν υποστρώματα με τρόπο τέτοιο ώστε οι αντιδρώντες περιοχές τους να βρίσκονται κοντά, και με τον σωστό προσανατολισμό.^{31,32} Ορισμένα ένζυμα για να είναι λειτουργικά ενσωματώνουν συμπαραγοντες οργανικούς ή ανόργανους ή ενώνονται ασθενώς με άλλα συνένζυμα.^{30,32} Μόρια RNA μπορούν επίσης να καταλύουν βιολογικές αντιδράσεις και ονομάζονται ριβοένζυμα.³⁰

Η δομή του ενεργού κέντρου είναι ειδική για την αντίδραση την οποία καταλύει κάθε ένζυμο. Στο ενεργό κέντρο, χαρακτηριστικές ομάδες του υποστρώματος συνδέονται με χαρακτηριστικές ομάδες του ενζύμου με δεσμούς υδρογόνου, ηλεκτροστατικές δυνάμεις και δεσμούς van der Waals.³⁰

Το πιο απλό μοντέλο για την δέσμευση των υποστρωμάτων από τα ένζυμα είναι το μοντέλο «κλειδιού – κλειδαριάς», όπου θεωρείται ότι το ενεργό κέντρο και το υπόστρωμα έχουν συμπληρωματική τρισδιάστατη δομή και άρα προσδένονται χωρίς την ανάγκη για σημαντική δομική αλλαγή του ενζύμου. Ωστόσο πειραματικές ενδείξεις υποστηρίζουν ότι είναι πιο πιθανό το μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής, στο οποίο η δέσμευση του υποστρώματος ακολουθείται από σημαντική αλλαγή στην δομή του ενεργού κέντρου που επιτρέπει τελικά την στενή πρόσδεσή του στο ενεργό κέντρο (Σχήμα 11).³⁰ Σε κάθε περίπτωση το προϊόν της αντίδρασης αποσυνδέεται από το ένζυμο και το ένζυμο επιστρέφει στην αρχική του διαμόρφωση χωρίς να αλλοιώνεται, επιτρέποντας την κατάλυση πολλών αντιδράσεων σε σειρά από ένα ένζυμο (Σχήμα 12).³¹



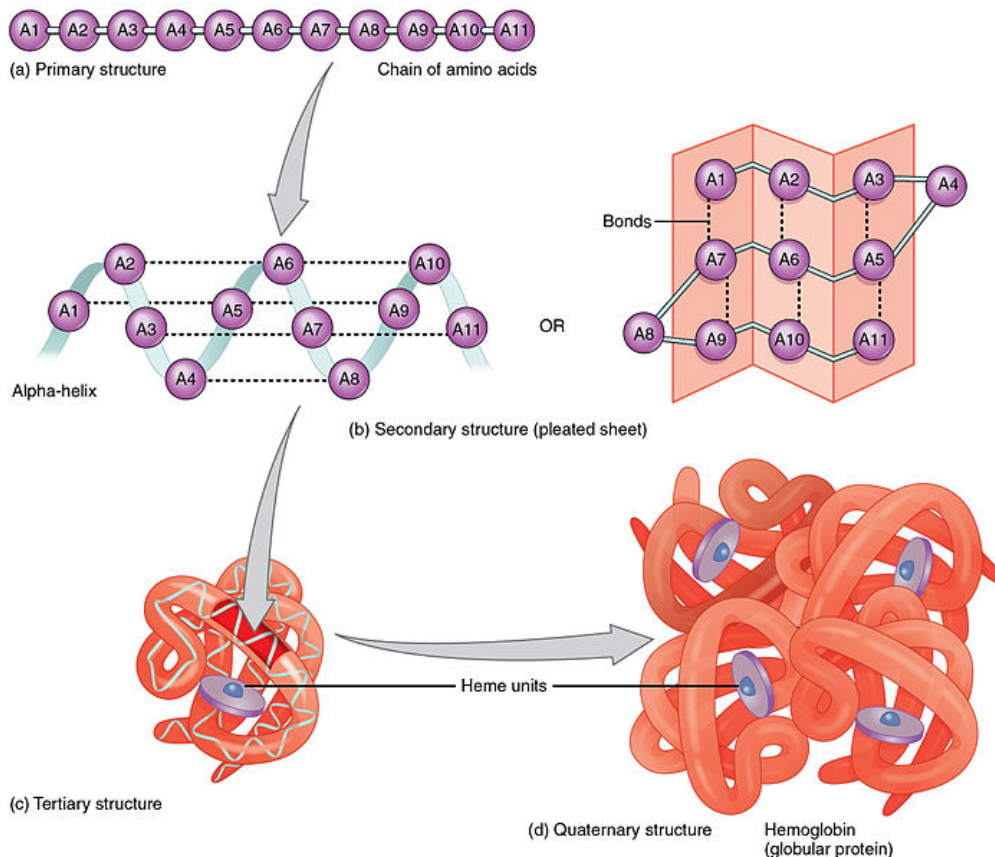
Σχήμα 11: Μοντέλο κλειδιού κλειδαριάς σε αντίθεση με το μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής.³⁰



Σχήμα 12: Κατάλυση υποστρώματος και διατήρηση του ενζύμου.³¹

Τα ένζυμα, όπως όλες οι πρωτεΐνες αποτελούνται από μία ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες και αναλύονται σε τέσσερα επίπεδα οργάνωσης (Σχήμα 13):¹¹

1. Πρωτοταγής δομή: περιγράφει την αμινοξική αλληλουχία της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που διαμορφώνει την πρωτεΐνη.
2. Δευτεροταγής δομή: περιγράφει την τρισδιάστατη μορφή των τοπικών τμημάτων της πρωτεΐνης, δηλαδή τον τρόπο με τον οποίο δημιουργούνται μοτίβα όπως α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ αμινοξέων.
3. Τριτοταγής δομή: περιγράφει την αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στον χώρο δηλαδή το τελικό και λειτουργικό σχήμα που αποκτά.
4. Τεταρτοταγής δομή: Ορισμένες πρωτεΐνες αποτελούνται από πολλαπλές πολυπεπτιδικές αλυσίδες που όλες μαζί συνιστούν την τελική λειτουργική δομή του μακρομορίου.



Σχήμα 13: (a) Πρωτοταγής δομή. (b) Δευτεροταγής δομή. (c) Τριτοταγής δομή. (d) Τεταρτοταγής δομή. Το παραπάνω παράδειγμα απεικονίζει την αιμογλοβίνη, πρωτεΐνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων που μεταφέρει οξυγόνο στους ιστούς. Παρατηρείται και η ύπαρξη του συμπαραγοντα αίμης.³³ (CC BY 3.0)

1.3.2. Κατηγοριοποίηση και δράσεις των ενζύμων

Η κατηγοριοποίηση των ενζύμων βασίζεται στις προτάσεις της Επιτροπής Ονοματολογίας της Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας.³⁴ Με βάση την δράση του κάθε ενζύμου, τα ένζυμα ταξινομούνται σε 7 ανώτερες κατηγορίες (Πίνακας 1):³⁵

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση ενζύμων με βάση την αντίδραση που καταλύουν		
Αριθμός κατηγορίας	Κύρια κατηγορία	Είδος καταλυόμενης αντίδρασης
EC 1.	Οξειδοαναγωγάσες	Οξειδωση και αναγωγή
EC 2.	Μεταφοράσες	Μεταφορά ατόμου ή χαρακτηριστικής ομάδας μεταξύ δύο μορίων
EC 3.	Υδρολάσες	Υδρολύσεις διαφόρων δεσμών
EC 4.	Λυάσες	Απομάκρυνση μιας ομάδας από το υπόστρωμα χωρίς υδρόλυση
EC 5.	Ισομεράσες	Ισομεριώσεις μέσα σε ένα μόριο
EC 6.	Λιγάσες ή συνθετάσες	Συνένωση δύο μορίων με ομοιοπολικό δεσμό
EC 7.	Τρανσλοκάσες	Μεταφορά ιόντων ή μορίων διαμέσω μεμβρανών

Για κάθε κατηγορία από τις παραπάνω υπάρχουν υποκατηγορίες, για κάθε υποκατηγορία υπάρχουν υπο-υποκατηγορίες και τέλος υπάρχουν σειριακοί αριθμοί και προτεινόμενα ονόματα για ένα ένζυμο που ανήκει σε αυτήν την υπο-υποκατηγορία ανάλογα πάλι με την συγκεκριμένη αντίδραση που καταλύει. Οι κατηγορίες και οι υποκατηγορίες τους ανανεώνονται συχνά με καινούργιες προσθήκες και διαγραφές.³⁵

Πριν κατηγοριοποιηθεί ένα ένζυμο με βάση το παραπάνω σύστημα, απαιτούνται άμεσες πειραματικές αποδείξεις ότι πραγματοποιεί την ισχυριζόμενη αντίδραση.³⁵

1.3.3. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι υπάρχουν πολλές διαφορετικές και πολύπλοκες κινητικές ενζυμικών αντιδράσεων με ένα ή και περισσότερα υποστρώματα. Ωστόσο για τον σκοπό αυτής της διπλωματικής εργασίας αναλύεται η απλούστερη περίπτωση κινητικής ενζυμικών αντιδράσεων.

Το απλούστερο μαθηματικό μοντέλο κινητικής των ενζυμικών αντιδράσεων ενός υποστρώματος αναπτύχθηκε το 1913 από τον Leonor Michaelis και την Maud Menten. Η κινητική απλών ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων συνήθως αναφέρεται ως «κινητική Michaelis – Menten» (ή «κινητική κορεσμού») και βασίζεται στην αντίδραση:³²



Γίνεται η υπόθεση ότι η αντίδραση παραγωγής του προϊόντος P είναι μονόδρομη (ή ότι ο ρυθμός της αντίστροφης αντίδρασης είναι αμελητέος). Η παραδοχή αυτή ισχύει όταν η συσσώρευση του προϊόντος είναι αμελητέα στην αρχή της αντίδρασης.³²

Το μοντέλο αυτό βασίζεται σε δεδομένα από αντιδραστήρες διαλείποντος έργου με σταθερό όγκο υγρού, σταθερή συγκέντρωση ενζύμου, $[E_0]$ και σταθερή αρχική συγκέντρωση υποστρώματος $[S_0]$.³²

Η ταχύτητα παραγωγής του προϊόντος P είναι:³²

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 * [ES] \quad (2)$$

Όπου:

- v : η ταχύτητα παραγωγής του προϊόντος (συνήθως σε $\frac{\text{mol}}{L \cdot s}$)
- k_2 : η κινητική σταθερά της αντίδρασης παραγωγής προϊόντος

- $[P], [ES]$: οι συγκεντρώσεις του προϊόντος και του συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος την χρονική στιγμή t .

και ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης του συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος ES είναι:³²

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 * [E] * [S] - k_{-1} * [ES] - k_2 * [ES] \quad (3)$$

Όπου:

- k_1, k_{-1}, k_2 : οι κινητικές σταθερές της αντίδρασης δέσμευσης υποστρώματος S από το ένζυμο E , της αντίστροφης αντίδρασης και της αντίδρασης παραγωγής προϊόντος P
- $[S], [E], [ES]$: οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος, του αδέσμευτου ενζύμου και του συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος την χρονική στιγμή t .

Επίσης, το ένζυμο δεν καταναλώνεται, επομένως με δεδομένο ότι η αρχική του συγκέντρωση είναι $[E_0]$, προκύπτει ότι:³²

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad (4)$$

Όπου:

- $[E_0]$: η συνολική συγκέντρωση του ενζύμου σε όλες τις μορφές του ή αρχική συγκέντρωση
- $[E], [ES]$: οι συγκεντρώσεις του αδέσμευτου ενζύμου και του συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος την χρονική στιγμή t .

Σε αυτό το σημείο χρειάζεται μία παραδοχή για την εξαγωγή αναλυτικής λύσης της διαφορικής εξίσωσης (2). Δύο διαφορετικές παραδοχές έχουν αναπτυχθεί από τις οποίες προκύπτει η ίδια μορφή λύσης.³²

1.3.3.1. Υπόθεση γρήγορης ισορροπίας

Οι Leonor Michaelis και Maud Menten ακολούθησαν κυρίως αυτήν την προσέγγιση. Αν υποθεθεί ότι το σύμπλοκο $[ES]$ δημιουργείται πολύ γρήγορα με την εκκίνηση της αντίδρασης, τότε μπορεί να θεωρηθεί σταθερά ισορροπίας.³²

$$K_m' = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E] * [S]}{[ES]} \quad (5)$$

Όπου:

- K_m' : η σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης δέσμευσης υποστρώματος S από το ένζυμο E ή αλλιώς σταθερά «Michaelis – Menten».

Αντικαθιστώντας στις παραπάνω εξισώσεις προκύπτει (Σχήμα 14):³²

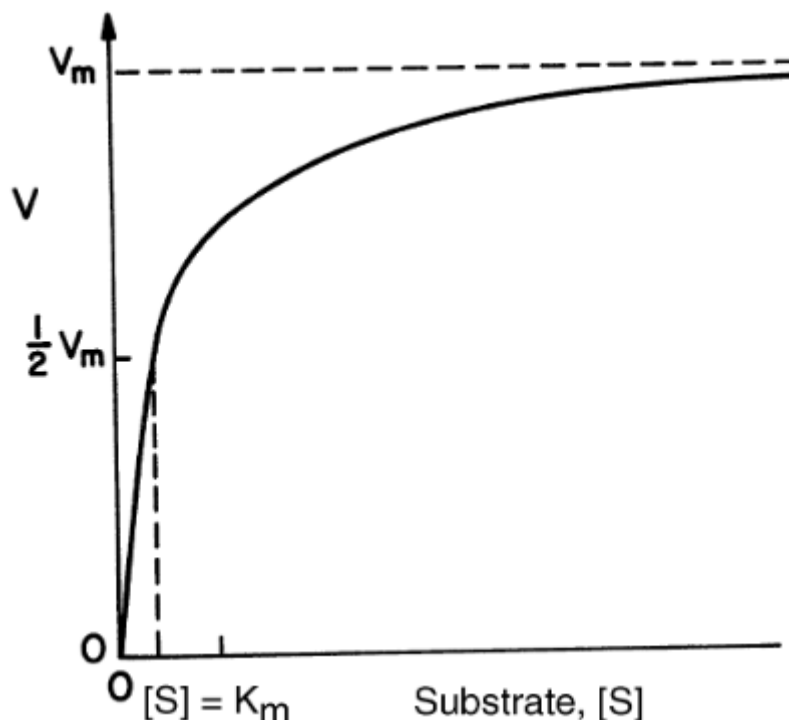
$$v = k_2 * \frac{[E_0] * [S]}{K_m' + [S]} \Rightarrow v = \frac{v_{max} * [S]}{K_m' + [S]} \quad (6)$$

Όπου:

- v : η ταχύτητα παραγωγής του προϊόντος (συνήθως σε $\frac{\text{mol}}{L \cdot s}$).
- K_m' : η σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης δέσμευσης υποστρώματος S από το ένζυμο E ή αλλιώς σταθερά «Michaelis – Menten».
- $v_{max} = k_2 * [E_0]$: η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης.

Συμπεράσματα:

- Από την (6) προκύπτει ότι η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης, v_{max} , αλλάζει με την προσθήκη περισσότερου ενζύμου. Η προσθήκη περισσότερου υποστρώματος μετά τον κορεσμό δεν επηρεάζει την μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης.
- Χαμηλές τιμές της σταθεράς K_m' υποδηλώνουν μεγάλη συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμα.
- Αντίθετα, υψηλές τιμές της σταθεράς K_m' υποδηλώνουν μικρή συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμα.
- Η σταθερά K_m' , η οποία έχει μονάδες συγκέντρωσης, αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία επιτυγχάνεται ταχύτητα αντίδρασης $v = \frac{v_{max}}{2}$.



Σχήμα 14: Ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης με κινητική Michaelis – Menten ως συνάρτηση της συγκέντρωσης υποστρώματος.³²

1.3.3.2. Υπόθεση ημισταθερής κατάστασης

Σε πολλές περιπτώσεις η υπόθεση γρήγορης ισορροπίας δεν ισχύει παρόλο που η μορφή της κινητικής που προκύπτει δείχνει κινητική Michaelis – Menten (Σχήμα 14).³² Οι G. E. Briggs και J. B. S. Haldane, βασισμένοι στο γεγονός ότι στα περισσότερα πειραματικά συστήματα $[E_0] \ll [S]$ (τουλάχιστον 100 φορές μικρότερο), πρότειναν πως:

$$\frac{d[ES]}{dt} \approx 0 \quad (7)$$

Όπου:

- $[ES]$: η συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος την χρονική στιγμή t .

Αντικαθιστώντας στις παραπάνω εξισώσεις προκύπτει (Σχήμα 14):³²

$$v = k_2 * \frac{[E_0] * [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \Rightarrow v = \frac{v_{max} * [S]}{K_m + [S]} \quad (8)$$

Όπου:

- v : η ταχύτητα παραγωγής του προϊόντος (συνήθως σε $\frac{\text{mol}}{L \cdot s}$).
- $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$: η σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης δέσμευσης υποστρώματος S από το ένζυμο E ή αλλιώς σταθερά «Michaelis – Menten».
- $v_{max} = k_2 * [E_0]$: η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης.

Επομένως και αυτή η υπόθεση καταλήγει σε παρόμοια αναλυτική λύση, με την διαφορά ότι οι K_m' και K_m δεν είναι ίδιες. Δεν είναι δυνατόν στα περισσότερα πειράματα να αναδειχτεί ποιος ορισμός της σταθεράς Michaelis – Menten είναι πιο αντιπροσωπευτικός του συστήματος. Αυτή η παραδοχή είναι όμως πιο γενική και για αυτό χρησιμοποιείται συχνότερα ο δεύτερος ορισμός.³²

1.3.3.3. Πειραματικός προσδιορισμός των παραμέτρων κινητικής Michaelis – Menten

Οι παράμετροι της κινητικής Michaelis – Menten είναι η μέγιστη ταχύτητα, v_{max} , και η σταθερά Michaelis – Menten, K_m . Για τον προσδιορισμό τους σε ένα σύστημα ενζύμου – υποστρώματος, τα πειραματικά δεδομένα

λαμβάνονται συνήθως από πειράματα «αρχικού ρυθμού». Σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου σχεδιάζεται ένα σύστημα με γνωστή ποσότητα υποστρώματος $[S_o]$ και ενζύμου $[E_o]$ και λαμβάνονται δεδομένα συναρτήσει του χρόνου για την συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$ ή του προϊόντος $[P]$. Από αυτά τα δεδομένα μπορεί να υπολογιστεί η αρχική ταχύτητα:³²

$$v_o = \left. \frac{d[P]}{dt} \right|_{t=0} = - \left. \frac{d[S]}{dt} \right|_{t=0} \quad (9)$$

Όπου:

- v : η ταχύτητα παραγωγής του προϊόντος (συνήθως σε $\frac{\text{mol}}{L \cdot s}$).
- $[P], [S]$: η συγκέντρωση του προϊόντος και του υποστρώματος αντίστοιχα.

Με πολλά τέτοια πειράματα δημιουργούνται πολλά ζεύγη $v_o = f([S_o])$.

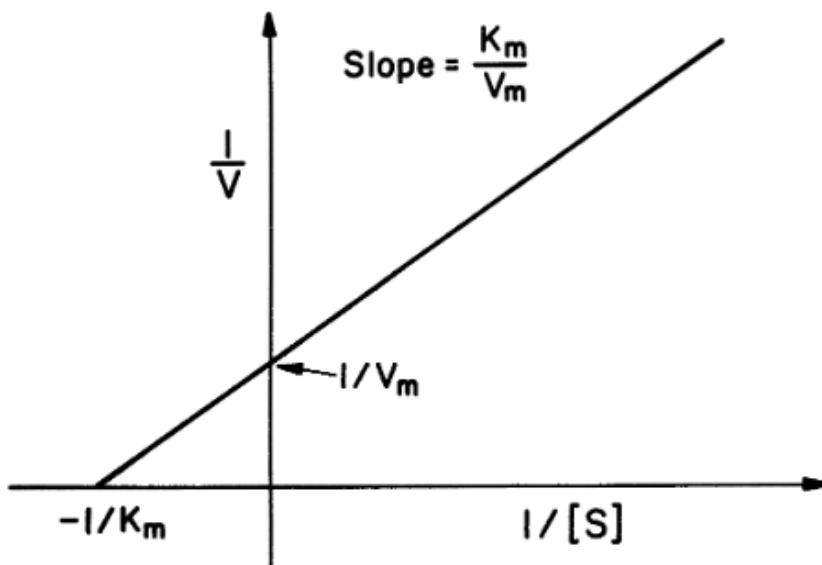
Από την (8) προκύπτει:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}} * \frac{1}{[S]} \quad (10)$$

Όπου:

- v : η ταχύτητα παραγωγής του προϊόντος (συνήθως σε $\frac{\text{mol}}{L \cdot s}$).
- $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$: η σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης δέσμευσης υποστρώματος S από το ένζυμο E ή αλλιώς σταθερά «Michaelis – Menten».
- $v_{max} = k_2 * [E_o]$: η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης.

Η απεικόνιση της (10) σε γράφημα πρόκειται για το γράφημα Lineweaver – Burk ή γράφημα «διπλού αντιστρόφου» (Σχήμα 15):³²



Σχήμα 15: Γράφημα Lineweaver – Burk ή γράφημα «διπλού αντιστρόφου» για τον υπολογισμό των παραμέτρων της κινητικής Michaelis – Menten.³²

Στα πειραματικά ζεύγη $v_o = f([S_o])$ πραγματοποιείται γραμμική προσαρμογή με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων και προκύπτει το παραπάνω γράφημα καθώς και οι τιμές των παραμέτρων της κινητικής Michaelis – Menten. Από το παραπάνω διάγραμμα διπλής αντιστροφής μπορεί να γίνει καλή εκτίμηση της μέγιστης ταχύτητας, v_{max} αλλά το σφάλμα στον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis – Menten, K_m , μπορεί να είναι μεγάλο.

1.3.3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την καταλυτική δράση των ενζύμων

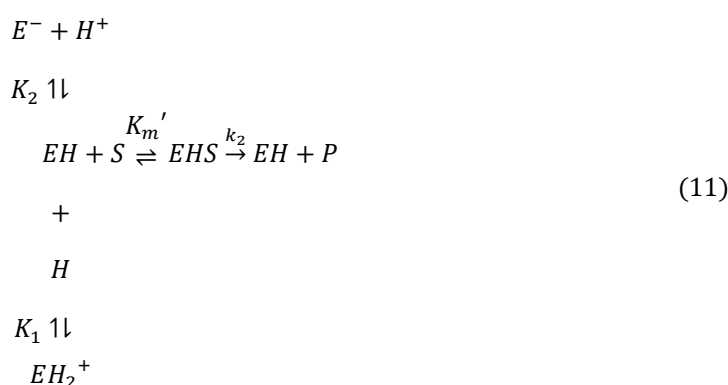
Η ενζυμική κατάλυση επηρεάζεται τόσο από την πρωτοταγή δομή τους, όσο και από την δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους. Η δομή του ενεργού κέντρου και η αναδίπλωση του ενζύμου στο χώρο καθορίζουν την καταλυτική του ικανότητα και την ειδικότητά του να καταλύει μόνο συγκεκριμένες αντιδράσεις. Για αυτό διαφορετικά ένζυμα καταλύουν πολύ διαφορετικές αντιδράσεις.³²

Πέρα από την δομή ενός ενζύμου, την καταλυτική του ικανότητα επηρεάζει το pH και η θερμοκρασία.

1.3.3.4.1. pH

Τα ένζυμα διαθέτουν ιοντικές ομάδες στα ενεργά τους κέντρα και έξω από αυτά, οι οποίες πρέπει να βρίσκονται σε κατάλληλη μορφή (όξινη ή βασική) για να είναι ενεργά. Μεταβολές στο pH του μέσου έχουν αποτέλεσμα αλλαγές στην ιοντική μορφή αυτών των ομάδων μεταβάλλοντας την δραστικότητα του ενζύμου και συνεπώς τον ρυθμό της ενζυμικής αντίδρασης που καταλύει. Οι μεταβολές στο pH μπορεί επίσης να μεταβάλλουν και την τρισδιάστατη μορφή του ενζύμου. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί το υπόστρωμα να περιέχει επίσης ιοντικές ομάδες επηρεάζοντας την συγγένειά του με το ένζυμο. Για τους παραπάνω λόγους τα ένζυμα είναι ενεργά σε συγκεκριμένο εύρος pH . Έξω από αυτό το εύρος επηρεάζεται ο μέγιστος ρυθμός αντίδρασης, v_{max} , η σταθερά Michaelis – Menten, K_m και η σταθερότητα του ενζύμου.³²

Για την περιγραφή της εξάρτησης του ρυθμού των ενζυμικών αντιδράσεων από το pH για ιονιζόμενα ένζυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί το παρακάτω σχήμα:³²



Όπου:

- $K_m' = \frac{[EH] \cdot [S]}{[EHS]}$
- $K_1 = \frac{[EH] \cdot [H^+]}{[EH_2^+]}$
- $K_2 = \frac{[E^-] \cdot [H^+]}{[EH]}$

Επίσης:

- $[E_o] = [E^-] + [EH] + [EH_2^+] + [EHS]$
- $v = k_2 \cdot [EHS]$

Από τα παραπάνω προκύπτει (Σχήμα 16):

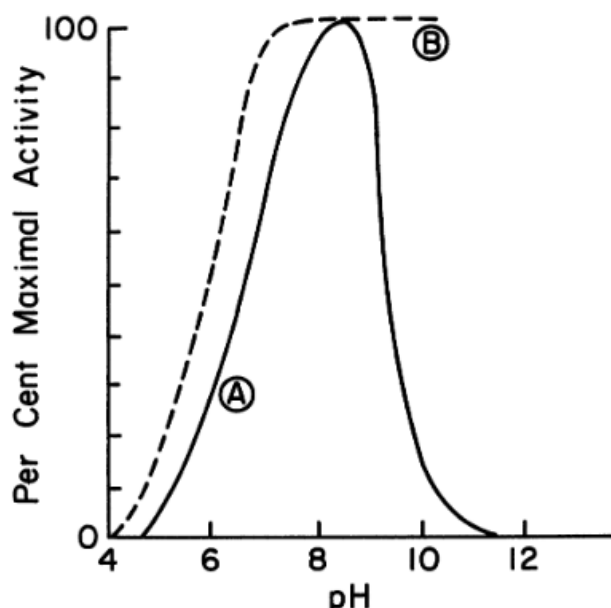
$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m' \cdot \left(1 + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_1}\right) + [S]} \Rightarrow v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_{m,φαινόμενη} + [S]} \tag{12}$$

Όπου:

- v : η ταχύτητα παραγωγής του προϊόντος (συνήθως σε $\frac{mol}{L \cdot s}$).
- $K_{m,φαινόμενη} = K_m' \cdot \left(1 + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_1}\right)$: η φαινόμενη σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης δέσμευσης υποστρώματος S από το ένζυμο EH ή αλλιώς σταθερά «Michaelis – Menten».
- $v_{max} = k_2 \cdot [E_o]$: η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης.

Συμπεράσματα:

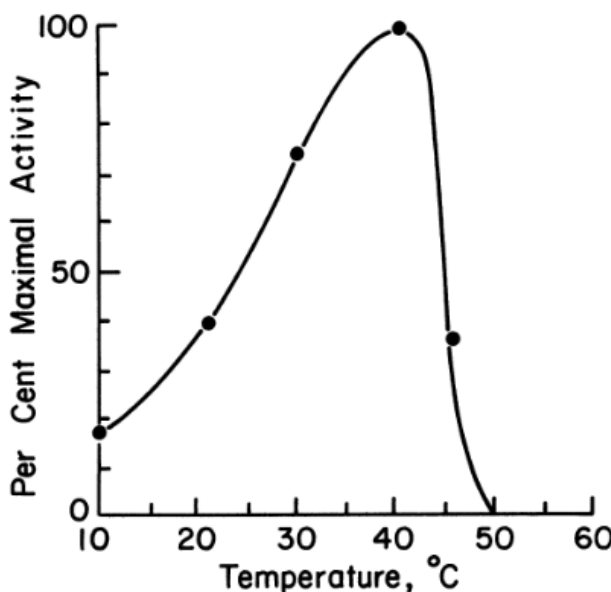
- Από την (12) προκύπτει πως το βέλτιστο pH ενός ενζύμου (ή αλλιώς $pH_{optimum}$) είναι μεταξύ των pK_1 και pK_2 .
- Η ακριβής θεωρητική πρόβλεψη του βέλτιστου pH ενός ενζύμου, $pH_{optimum}$, είναι εξαιρετικά δύσκολη καθώς απαιτεί γνώση της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου και του ενεργού κέντρου του. Για το λόγο αυτό το $pH_{optimum}$ ενός ενζύμου προσδιορίζεται πειραματικά.³²



Σχήμα 16: Προφίλ ενεργότητας ενζύμου συναρτήσει του pH του μέσου.³²

1.3.3.4.2. Θερμοκρασία

Η ταχύτητα των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων αυξάνεται με την θερμοκρασία μέχρι ένα ορισμένο σημείο. Αυτή η αύξηση της ενεργότητας είναι γνωστή ως «θερμοκρασιακή ενεργοποίηση». Πάνω από μία ορισμένη θερμοκρασία η ενζυμική ενεργότητα μειώνεται συναρτήσει της θερμοκρασίας λόγω μετουσίωσης του ενζύμου και είναι γνωστή ως «θερμοκρασιακή απενεργοποίηση» ή «θερμική μετουσίωση» (Σχήμα 17).



Σχήμα 17: Προφίλ ενεργότητας ενζύμου συναρτήσει της θερμοκρασίας του μέσου. Εδώ θεωρήθηκε $E_a = 11 \frac{\text{kcal}}{\text{g}\cdot\text{mol}}$ και $E_d = 70 \frac{\text{kcal}}{\text{g}\cdot\text{mol}}$. Το καθοδικό τμήμα της καμπύλης οφείλεται στη θερμική μετουσίωση του ενζύμου και υπολογίστηκε θεωρώντας 10 λεπτά έκθεση σε κάθε θερμοκρασία. Η μορφή του διαγράμματος εξαρτάται από το διάστημα που το μείγμα αντίδρασης εκτίθεται στη θερμοκρασία δοκιμής.³²

Στην περιοχή της θερμοκρασιακής ενεργοποίησης ο ρυθμός της αντίδρασης, v , μεταβάλλεται σύμφωνα με την εξίσωση Arrhenius:^{32,36}

$$v = k_2 * [E]$$

$$k_2 = A * e^{-\frac{E_a}{R*T}} \tag{13}$$

Όπου:

- v : η ταχύτητα παραγωγής του προϊόντος (συνήθως σε $\frac{\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{s}}$).
- k_2 : η κινητική σταθερά της αντίδρασης παραγωγής προϊόντος.
- $[E]$: η συγκέντρωση του ενεργού ενζύμου.
- E_a : η ενέργεια ενεργοποίησης (Συνήθως $4 - 20 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$).³²
- A : ο προεκθετικός παράγοντας ή παράγοντας συχνότητας.

Η κινητική της θερμικής μετουσίωσης μπορεί να περιγραφεί ως εξής:^{32,36}

$$-\frac{d[E]}{dt} = k_d * [E] \Rightarrow [E] = [E_o] * e^{-k_d * t} \quad (14)$$
$$k_d = A_d * e^{-\frac{E_d}{R * T}}$$

Όπου:

- k_d : η κινητική σταθερά της αντίδρασης απενεργοποίησης ή «σταθερά μετουσίωσης».
- $[E_o]$: η αρχική συγκέντρωση του ενεργού ενζύμου.
- $[E]$: η συγκέντρωση του ενεργού ενζύμου.
- E_a : η ενέργεια «απενεργοποίησης» (Συνήθως $40 - 130 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$).³²
- A_d : ο προεκθετικός παράγοντας ή παράγοντας συχνότητας.

Συμπεράσματα:

- Η ενζυμική απενεργοποίηση είναι πολύ γρηγορότερη από την ενζυμική ενεργοποίηση όπως προκύπτει από τις αντίστοιχες E_a και E_d .
- Οι μεταβολές της θερμοκρασίας μπορεί να επηρεάσουν ακόμα και τις τιμές των v_{max} και K_m .³²

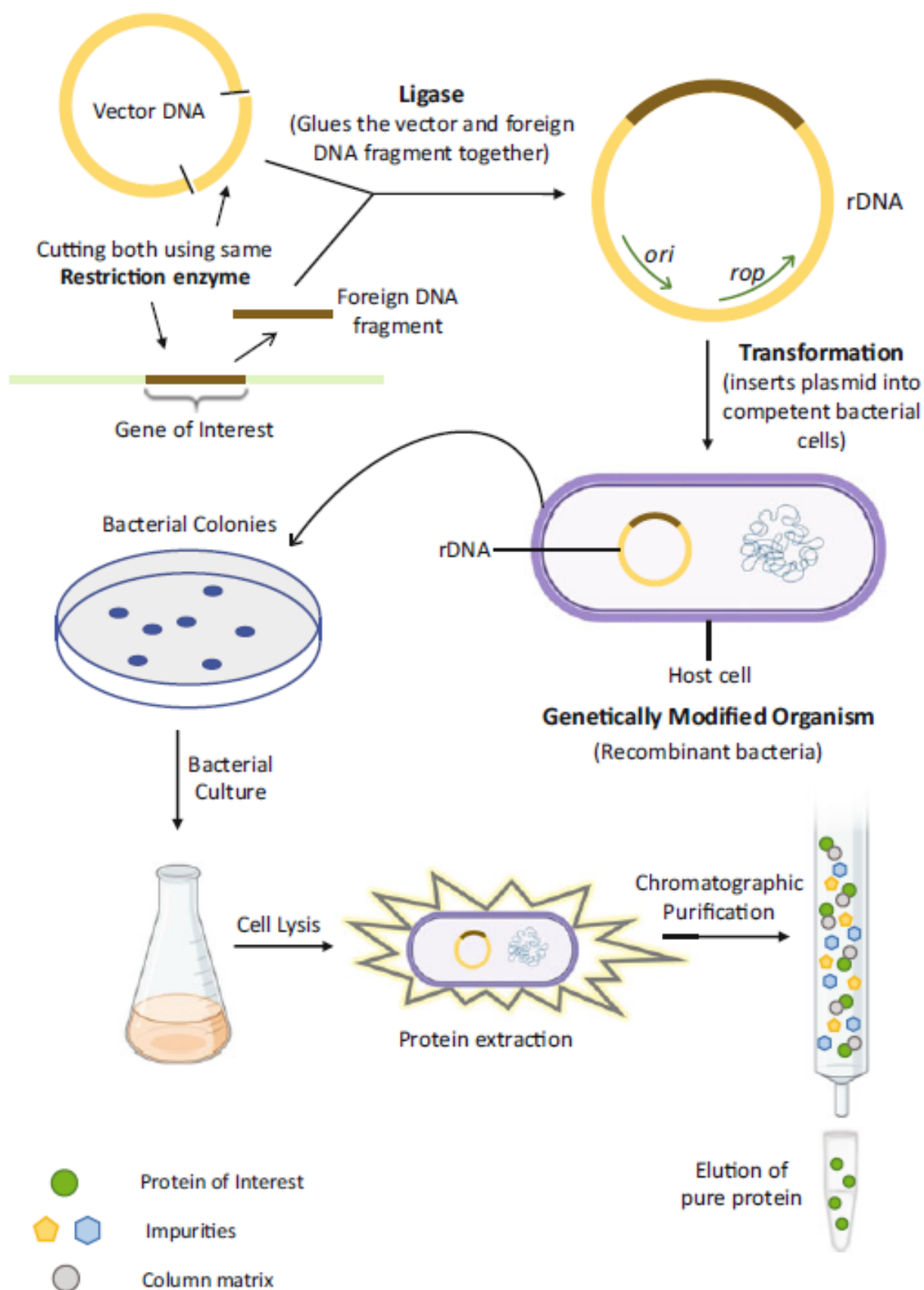
1.3.4. Ετερόλογη έκφραση ενζύμων

Η ετερόλογη έκφραση είναι ένα σημαντικό εργαλείο της γενετικής μηχανικής για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας ενός επιθυμητού ενζύμου.³⁷ Η συνηθέστερη διαδικασία απεικονίζεται στο Σχήμα 18.³⁸ Ο όρος «ετερόλογη έκφραση» αναφέρεται στην έκφραση γονιδίου σε ξενιστή που δεν παράγει κανονικά την πρωτεΐνη (ένζυμο) – στόχο.⁷

1.3.4.1. Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA

Τα DNA που σχεδιάζεται με εργαστηριακές μεθόδους γενετικού ανασυνδυασμού, δηλαδή συνδυάζοντας DNA από διαφορετικούς οργανισμούς, λέγεται «ανασυνδυασμένο DNA».^{38,39} Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA είναι θεμελιώδες εργαλείο της μοριακής βιολογίας και της γενετικής μηχανικής.³⁸

Με την ανακάλυψη του πλασμιδιακού DNA στις αρχές του 1950, σε συνδυασμό με την ανακάλυψη των περιοριστικών ενδονουκλεασών, ένζυμα που καταλύουν την κοπή του DNA σε συγκεκριμένα σημεία, έγινε δυνατή η μεταφορά και ο πολλαπλασιασμός επιθυμητών γονιδίων σε βακτήρια. Αυτό επετεύχθη με τον σχεδιασμό πλασμιδιακών «φορέων». Σε αυτούς τους φορείς εισάγεται «ξένο» γενετικό υλικό, είτε για αρχειοθέτηση, είτε για ετερόλογη έκφραση αν κωδικοποιεί πρωτεΐνη.^{31,38}



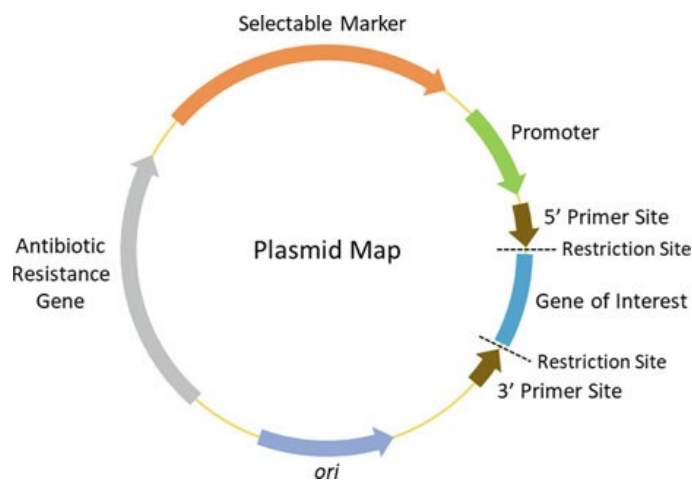
Σχήμα 18: Σχηματική απεικόνιση της συνολικής διεργασίας ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών, δηλαδή την κλωνοποίηση των ανασυνδυασμένων γονιδίων, την έκφραση και τον καθαρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.³⁸

1.3.4.2. Πλασμιδιακοί φορείς

Οι πλασμιδιακοί φορείς μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε φορείς κλωνοποίησης και φορείς έκφρασης. Η διαφορά τους είναι ότι οι φορείς έκφρασης έχουν επιπλέον περιοχές που βοηθάνε στην έκφραση του εισαχθέντος γονιδίου, όπως είναι ο υποκινητής.³⁸

Τα βασικά στοιχεία ενός πλασμιδιακού φορέα έκφρασης (Σχήμα 19).³⁸

1. Θέση έναρξης αντιγραφής (ORI, origin of replication): είναι το σημείο στο οποίο γίνεται η εκκίνηση της αντιγραφής του πλασμιδιακού φορέα από τον ξενιστή που τον πολλαπλασιάζει.
2. Επιλέξιμος δείκτης (selectable marker): πρόκειται για γονίδιο που επιτρέπει την εύκολη επιλογή των κυττάρων που φέρουν τον φορέα από όλα τα υπόλοιπα. Συνήθως κωδικοποιούν αντίσταση σε κάποιο αντιβιοτικό, όπως την αμπικιλίνη (*Amp*). Π.χ. *Amp^R* το γονίδιο που κωδικοποιεί αντίσταση στην *Amp*.
3. Θέση πολυσύνδεσης (MCS, multiple cloning site): μία αλληλουχία DNA με μοναδικές θέσεις αναγνώρισης για πολλές ενδονουκλεάσες. Οι θέσεις αυτές δεν υπάρχουν πουθενά αλλού στον φορέα και επιτρέπουν την είσοδο του γονιδίου προς έκφραση.
4. Υποκινητής (promoter): ο υποκινητής επιτρέπει την σύνδεση της RNA πολυμεράσης και άλλων μεταγραφικών παραγόντων για την εκκίνηση και τον έλεγχο της μεταγραφής. Επομένως η επιλογή του κατάλληλου υποκινητή έχει καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο της έκφρασης.



Σχήμα 19: Χαρακτηριστικά ενός πλασμιδιακού φορέα: 1) Θέση έναρξης αντιγραφής (ORI), 3) Θέση πολυσύνδεσης (MCS) (περιοχή που εισάγεται το γονίδιο ενδιαφέροντος), 2) Επιλέξιμος δείκτης (π.χ. γονίδιο που κωδικοποιεί αντίσταση σε κάποιο αντιβιοτικό), 4) Υποκινητής μεταγραφής.

1.3.4.3. Επιλογή ξενιστή ετερόλογης έκφρασης ενζύμου

Η σημαντικότερη επιλογή κατά τον σχεδιασμό μίας διεργασίας ετερόλογης έκφρασης ενός ενζύμου είναι η επιλογή του ξενιστή έκφρασης. Η επιλογή αυτή είναι καθοριστική και για τον σχεδιασμό και τα οικονομικά της διεργασίας αλλά και για την επιτυχημένη έκφραση λειτουργικού ενζύμου. Διαμορφώνει τόσο την διεργασία έκφρασης όσον αφορά τον τύπο του αντιδραστήρα και τις πρώτες ύλες που απαιτούνται για την σωστή ανάπτυξη του ξενιστή και την έκφραση του ενζύμου από αυτόν, όσο και την διεργασία καθαρισμού και απομόνωσης του ενζύμου (downstream processing). Επίσης κρίνει άμεσα την επιτυχία ή την αποτυχία της διεργασίας καθώς δεν μπορούν όλοι οι ξενιστές να παράγουν οποιοδήποτε ένζυμο.³²

Ο μεγαλύτερος παράγοντας για την επιλογή του ξενιστή έκφρασης είναι οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Αν ένα ένζυμο χρειάζεται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όπως γλυκοζυλιώσεις για να είναι πλήρως λειτουργικό, δεν μπορούν να επιλεγούν τα περισσότερα απλά βακτηριακά συστήματα έκφρασης (με εξαιρέσεις).^{32,40}

Οι ζύμες ή ορισμένοι μύκητες είναι κατάλληλα και φτηνά συστήματα για την έκφραση ενζύμων που χρειάζονται απλές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Για την έκφραση ενζύμων που χρειάζονται πιο σύνθετες γλυκοζυλιώσεις (για παράδειγμα ένζυμα θηλαστικών) χρησιμοποιούνται ακριβότερα και περιπλοκότερα συστήματα έκφρασης όπως κύτταρα θηλαστικών, διαγονιδιακά ζώα, φυτά κ.α.³²

Επίσης σημαντικός οικονομικός αλλά και πρακτικός λόγος για την επιλογή ξενιστών είναι η αναγνώρισή τους ως ασφαλείς στην λίστα «γενικά αναγνωρισμένων ως ασφαλή» (GRAS – generally recognized as safe) του αμερικανικού οργανισμού τροφίμων και φαρμάκων (FDA – Food and Drug Administration), πράγμα που βοηθάει στην έκδοση των απαραίτητων αδειών για την λειτουργία της διεργασίας αλλά και στην χρήση απλούστερων και συγκεκριμένων μέτρων ασφαλείας.^{32,41}

Παραδείγματα ευρέως χρησιμοποιούμενων ξενιστών για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών:³²

- Βακτήριο *Escherichia coli*: Αν δεν χρειάζονται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις για να είναι ένα ένζυμο λειτουργικό, συνήθως επιλέγεται το βακτήριο *E. coli* ως ξενιστής ετερόλογης έκφρασης καθώς αποτελεί το πιο μελετημένο και διαδεδομένο σύστημα από όλα. Μεγαλώνει γρήγορα και σε υψηλές κυτταρικές συγκεντρώσεις και επιτυγχάνει μεγάλα επίπεδα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα είναι πως συνήθως δεν εκκρίνει τις παραγόμενες πρωτεΐνες καθιστώντας την διεργασία καθαρισμού δυσκολότερη και ακριβότερη. Συσσώρευση κάποιων πρωτεϊνών σε συνδυασμό με άλλες συνθήκες ανάπτυξης οδηγεί πολλές φορές στην αποδόμησή τους ή στην δημιουργία «κυτταρικών εγκλείστων» μαζί με άλλα κυτταρικά υλικά, στα οποία η πρωτεΐνη βρίσκεται σε λανθασμένη αναδίπλωση. Επίσης υπάρχει το ενδεχόμενο να χαθεί η γενετική πληροφορία από κάποια κύτταρα της διεργασίας λόγω αποβολής του πλασμιδιακού φορέα, τα οποία στην συνέχεια μεγαλώνοντας πιο γρήγορα από τα κύτταρα που περιέχουν τον πλασμιδιακό φορέα, μειώνουν την παραγωγικότητα της διεργασίας.
- Ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*: Έχει την δυνατότητα να πραγματοποιεί απλές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όπως απλές γλυκοζυλιώσεις, καθώς και την δυνατότητα να εκκρίνει τις πρωτεΐνες που εκφράζει ετερόλογα. Ανήκει στην λίστα GRAS του FDA που καθιστά τον *S. cerevisiae* κατάλληλο για χρήση στην παραγωγή πρωτεϊνών σχετιζόμενες με τρόφιμα. Τα μειονεκτήματα είναι η υπεργλυκοζυλίωση πρωτεϊνών με πολλά μονομερή μανόζης, που μπορεί να μειώνουν την λειτουργικότητα ενός ενζύμου έως και να το απενεργοποιούν.
- Ζύμη *Pichia pastoris*: επίσης γνωστή ως *Komagataella phaffii* και *Komagataella pastoris*,⁴² αναπτύσσεται με μεθανόλη ως πηγή άνθρακα η οποία δρα επίσης και ως υποκινητής της ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών. Λόγω των υψηλών κυτταρικών συγκεντρώσεων και υψηλών επιπέδων έκφρασης που επιτυγχάνει, καθώς και την δυνατότητα εύκολης επαγωγής της ετερόλογης έκφρασης αλλάζοντας την πηγή άνθρακα σε μεθανόλη, η παραγωγικότητα των συστημάτων που χρησιμοποιούν την *P. pastoris* μπορεί να ξεπεράσει αυτήν των αντίστοιχων συστημάτων *E. coli*. Η ένταξη της γενετικής πληροφορίας για την ετερόλογη έκφραση σε χρωμόσωμα του μικροοργανισμού μειώνει σημαντικά την πιθανότητα απώλειάς της όσο περνάει ο χρόνος της διεργασίας, καθώς για να γίνει αυτό θα πρέπει να προκύψει κάποια μετάλλαξη ή σημαντική αλλαγή στο γενετικό υλικό του. Μειονέκτημα αποτελεί η υψηλή απαίτηση σε οξυγόνο και οι ανάγκες ψύξης λόγω μεταβολικής θερμότητας. Επίσης, υψηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης καταστέλλουν την παραγωγικότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης.

1.3.4.4. Παράμετροι ετερόλογης έκφρασης ενζύμων με την ζύμη *Pichia pastoris*

Για τους σκοπούς της ετερόλογης έκφρασης στα πλαίσια αυτής της εργασίας χρησιμοποιείται η μεθανότροφη ζύμη *Pichia pastoris*. Η *Pichia pastoris* έχει πολλές ιδιαιτερότητες και παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της ετερόλογης έκφρασης.

Σημαντική επίπτωση στην παραγωγικότητα της ετερόλογης έκφρασης έχουν οι συνθήκες της καλλιέργειας στην οποία γίνεται έκφραση του ενζύμου ενδιαφέροντος. Οι πιο σημαντικές παράμετροι που καθορίζουν τις συνθήκες της ετερόλογης έκφρασης στην *Pichia pastoris* είναι οι εξής:^{43,44}

- Ο αερισμός της καλλιέργειας: η *P. pastoris* αναπτύσσεται με μεγάλους ρυθμούς και χρειάζεται αερισμό για να υποστηρίξει αυτήν την ανάπτυξη.
- Ο τύπος του βιοαντιδραστήρα, τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του δοχείου της καλλιέργειας και η ανάδευση: Συνήθως το πρώτο στάδιο στην ανάπτυξη στρατηγικής ετερόλογης έκφρασης είναι τα πειράματα μικρής κλίμακας σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου, δηλαδή αναδευόμενες φιάλες. Το σχήμα της φιάλης που χρησιμοποιείται μπορεί να επηρεάσει τον αερισμό και άρα την παραγωγικότητα της ετερόλογης έκφρασης.
- Η θερμοκρασία: Η θερμοκρασία στην φάση επαγωγής, δηλαδή αφού προστεθεί η μεθανόλη που επάγει την ετερόλογη έκφραση, είναι πολύ σημαντική παράμετρος για την απόδοση της διεργασίας καθώς επηρεάζει τόσο την παραγωγή όσο και την πρωτεόλυση, δηλαδή την ενζυμική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης από ενδογενείς πρωτεάσες. Χαμηλότερες θερμοκρασίες (~25 °C) ευνοούν την ανάπτυξη πιο

παραγωγικών κυττάρων με σταθεροποιημένες κυτταρικές μεμβράνες και χαμηλότερη έκκριση πρωτεασών.

- Το pH: Το pH του θρεπτικού μέσου επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης και συνιστάται να είναι μεταξύ 3.0 και 6.0, όπου και μειώνεται η πρωτεόλυση.
- Το θρεπτικό μέσο: Παρουσία πεπτόνης και εκχυλίσματος μαγιάς μειώνεται η πρωτεόλυση. Τα αμμωνιακά ιόντα επίσης μειώνουν σημαντικά την πρωτεόλυση. Η συνεισφορά των τελευταίων φαίνεται να είναι μεγαλύτερη.
- Η συγκέντρωση μεθανόλης στην φάση έκφρασης: Η συγκέντρωση μεθανόλης στην φάση επαγωγής συνιστάται να είναι 0.5% – 1%. Έχουν αναφερθεί όμως και συγκεντρώσεις μέχρι 5% με αυξημένη παραγωγικότητα για κάποιες πρωτεΐνες. Ωστόσο η συσσώρευση μεθανόλης μπορεί να έχει αρνητική επίπτωση στην κυτταρική ανάπτυξη και άρα να εμποδίσει την ετερόλογη έκφραση.
- Ο συνολικός χρόνος επαγωγής: Όσο περνάει ο χρόνος επαγωγής αυξάνεται η πρωτεόλυση και μειώνεται ο αριθμός υγιών, παραγωγικών κυττάρων. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να αποφευχθεί ανανεώνοντας το θρεπτικό μέσο έτσι ώστε να αποφεύγεται η συσσώρευση εξωκυτταρικών πρωτεασών.
- Η παρουσία πρόσθετων σταθεροποιητικών παραγόντων: Για παράδειγμα παρουσία 5 mM EDTA βοηθάει στην σταθεροποίηση μερικών ετερόλογα εκφρασμένων πρωτεϊνών.
- Η παρουσία ιχνοστοιχείων: Ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο και ο χαλκός είναι τα συνηθέστερα ιχνοστοιχεία που προστίθενται σε κυτταρικές καλλιέργειες. Τα ιχνοστοιχεία βοηθάνε σε κάποιες περιπτώσεις την κυτταρική ανάπτυξη.⁴⁵
- Η παρουσία συμπαραγόντα ενζύμου: Για ένζυμα τα οποία χρειάζονται συμπαραγόντα για να είναι λειτουργικά, η παρουσία του στο θρεπτικό μέσο βελτιώνει την παραγωγικότητα της ετερόλογης έκφρασης.

Επίσης συνοπτικά αναφέρονται και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ετερόλογη έκφραση από την *Pichia pastoris*:⁴³

- Το γένος της *Pichia pastoris*
- Ο πλασμιδιακός φορέας που περιλαμβάνει τον υποκινητή της μεταγραφής και το σήμα έκκρισης αν η έκκριση του προϊόντος είναι επιθυμητή
- Η μέθοδος μετασχηματισμού και ένταξης του φορέα στο γονιδίωμα
- Ο αριθμός των αντιγράφων του φορέα στο γονιδίωμα
- Η βελτιστοποίηση κωδικονίων

1.3.5. Καθαρισμός ενζύμων με χρωματογραφία συγγένειας

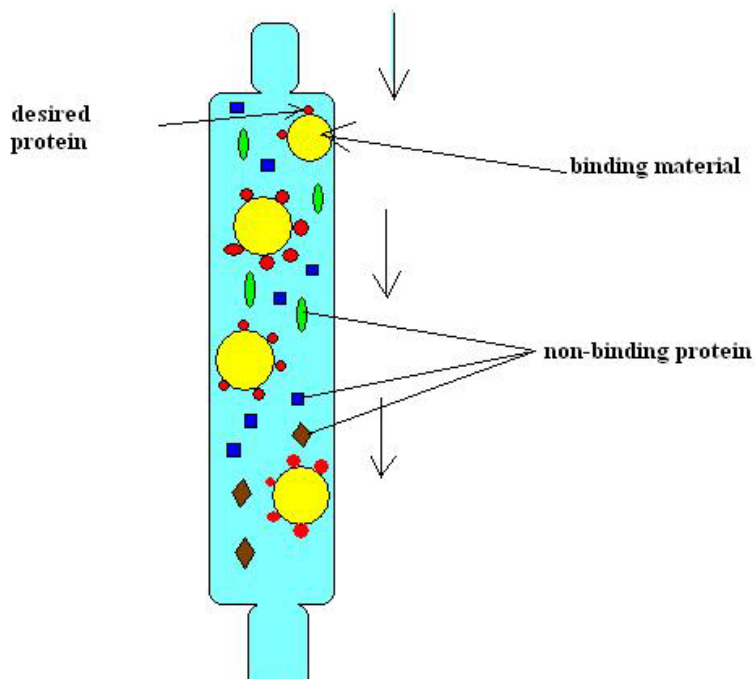
Το τελευταίο στάδιο σε μία ολοκληρωμένη διεργασία ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών είναι ο καθαρισμός τους από το ακατέργαστο προϊόν του βιοαντιδραστήρα. Η χρωματογραφία συγγένειας είναι μία τεχνική που επιτυγχάνει υψηλά ποσοστά καθαρότητας ετερόλογα εκφρασμένων πρωτεϊνών (> 95%) με εύκολο και οικονομικό τρόπο. Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής έναντι άλλων διεργασιών καθαρισμού είναι η υψηλή εκλεκτικότητα, η ευκολία στον χειρισμό και η υψηλή απόδοση. Η βασική αρχή λειτουργίας περιλαμβάνει τα εξής στάδια (Σχήμα 20):³⁸

1. Επώαση σε στήλη βαρύτητας του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας, στο οποίο περιέχεται η ετερόλογη πρωτεΐνη μαζί με άλλες που εκκρίνει φυσικά ο ξενιστής, με την μήτρα στήριξης, στην οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο το «πρόσδεμα» (ligand) όπου και προσδένεται η ετερόλογα εκφρασμένη πρωτεΐνη – στόχος.^{32,38} Η βέλτιστη απόδοση της πρόσδεσης εξαρτάται από το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται και στοχεύει στην πρόσδεσή μόνο της ετερόλογα εκφρασμένης πρωτεΐνης.³⁸
2. Καθαρισμός της στήλης από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες με ρυθμιστικό διάλυμα καθαρισμού, χωρίς να επηρεάζεται η πρόσδεση της πρωτεΐνης – στόχου με το πρόσδεμα.
3. Έκλυση της προσδεμένης πρωτεΐνης με ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης, αποσπώντας την από το πρόσδεμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης ευνοεί την αποσύνδεση της ετερόλογα εκφρασμένης πρωτεΐνης από το πρόσδεμα καθώς η πρόσδεση είναι αντιστρεπτή.

Η αντιστρεπτή αλλά εκλεκτική πρόσδεση της ετερόλογα εκφρασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιείται με «μόρια σύντηξης» (fusion tags), τα οποία και αλληλεπιδρούν με το πρόσδεμα. Ευρέως χρησιμοποιούμενα μόρια σύντηξης είναι τα:³⁸

- *His* (polyhistidine tag)
- *MBP* (maltose-binding protein)
- *GST* (glutathione-S-transferase)

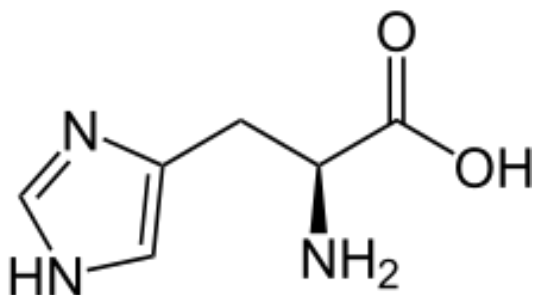
Συνήθως τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος καθορίζουν την επιλογή μορίου σύντηξης.



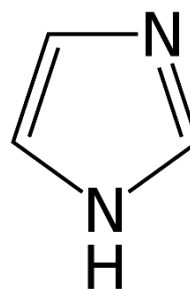
Σχήμα 20: Σχηματική περιγραφή της χρωματογραφίας συγγένειας ως μέθοδο καθαρισμού ετερόλογα εκφρασμένων πρωτεϊνών/ενζύμων.⁴⁶

1.3.5.1. Πολυϊστιδίνη ($His_6 - tag$) ως μόριο σύντηξης

Η «ουρά» πολυϊστιδίνης, εφεξής $His_6 - tag$, δηλαδή η αλληλουχία 6 μορίων ιστιδίνης σε σειρά σε ένα από τα δύο άκρα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μπορεί να λειτουργήσει ως αποτελεσματικό μόριο σύντηξης για τους σκοπούς καθαρισμού πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας. Το μέγεθος $His - tag$ κυμαίνεται μεταξύ 2 και 10 μορίων ιστιδίνης, ωστόσο συνήθως επιλέγονται 6 μόρια ιστιδίνης (Σχήμα 23). Είναι μη τοξική και λόγω του μικρού μεγέθους της συνήθως δεν έχει καμία επίπτωση στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης. Σημειώνεται ότι αν προκαλεί προβλήματα στην απόδοση της ετερόλογης έκφρασης, μπορεί να δοκιμαστεί η αλλαγή της θέσης της από το ένα άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο άλλο.³⁸



Σχήμα 21: L – ιστιδίνη

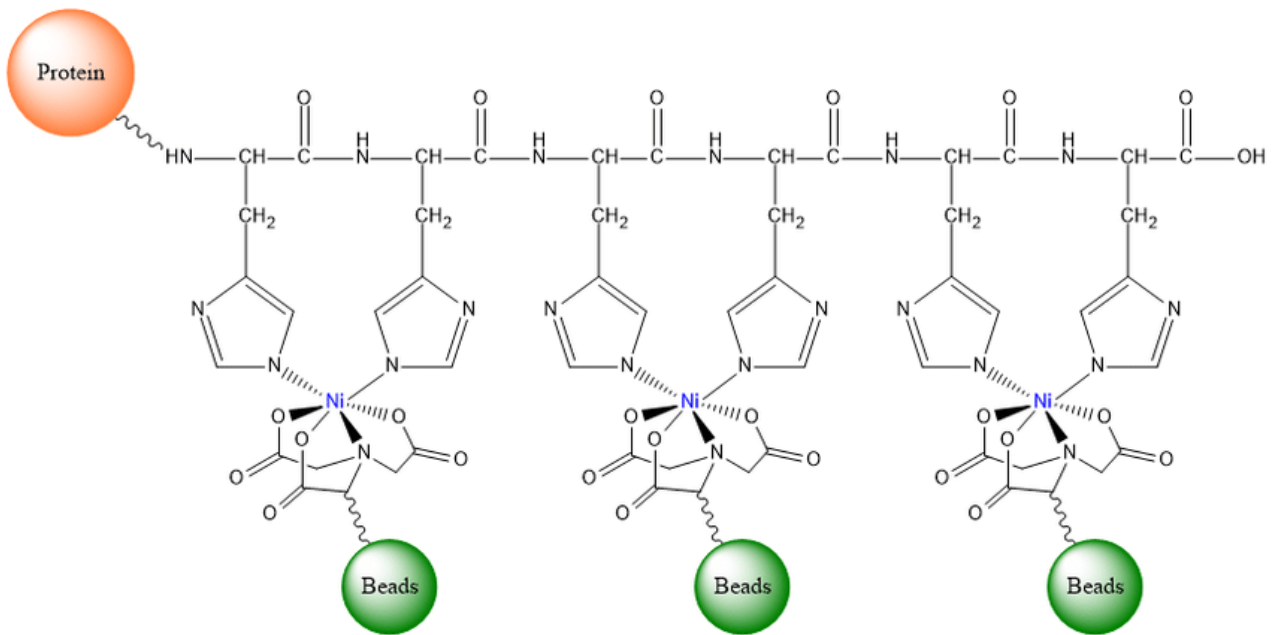


Σχήμα 22: Ιμιδαζόλιο

Σε προκαρυωτικά συστήματα όπως τα βακτηριακά συστήματα έκφρασης, η $His_6 - tag$ αποτελεί έναν από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους καθαρισμού ετερόλογα εκφρασμένων πρωτεϊνών. Ωστόσο σε ευκαρυωτικά συστήματα όπου η ιστιδίνη βρίσκεται σε υψηλά ποσοστά, ο καθαρισμός γίνεται πιο δύσκολος λόγω της μη εκλεκτικής πρόσδεσης διάφορων πρωτεϊνών στην στήλη. Αυτό το πρόβλημα αποφεύγεται με την έκπλυση της χρωματογραφικής στήλης μετά την πρόσδεση της πρωτεΐνης με μικρότερες συγκεντρώσεις του διαλύματος έκλουσης, έτσι ώστε να απαλλαγεί από ασθενέστερα συνδεδεμένες πρωτεΐνες ενώ η πρωτεΐνη – στόχος παραμένει συνδεδεμένη στο πρόσδεμα.³⁸

Η χρωματογραφία συγγένειας με τη χρήση $His_6 - tag$ βασίζεται στην δυνατότητα της ιστιδίνης να αλληλεπιδρά με ιόντα στοιχείων μετάπτωσης, όπως τα Cu^{2+} , Co^{2+} και Ni^{2+} λόγω του ιμιδαζολικού δακτυλίου που δρα ως δότης ηλεκτρονίων επιτρέποντας τον σχηματισμό δεσμών (Σχήμα 21, Σχήμα 22 και Σχήμα 23). Η

αλληλεπίδραση αυτή αντιστρέφεται στο στάδιο έκλουσης της πρωτεΐνης – στόχου από την στήλη με την χρήση διαλύματος ιμιδαζολίου σε υψηλή συγκέντρωση ή αλλάζοντας το pH του διαλύματος έκλουσης.³⁸



Σχήμα 23: Αλληλεπίδραση της πολυϊστιδίνης με το πρόσδεμα (εδώ Ni^{2+} – NTA). Η πολυϊστιδίνη αλληλεπιδρά με ιόντα στοιχείων μετάπτωσης, όπως τα Cu^{2+} , Co^{2+} και Ni^{2+} .⁴⁷

1.4. Βιοαποικοδόμηση LCB

1.4.1. Στην φύση

Ο συνδυασμός της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης δημιουργεί ένα προστατευτικό στρώμα γύρω από την κυτταρίνη. Για την αξιοποίηση της κυτταρίνης αυτό το στρώμα πρέπει να τροποποιηθεί ή να αφαιρεθεί.⁶ Η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης που οργανώνεται σε μικροϊνίδια αποτελεί επίσης ένα ακόμα εμπόδιο στην αξιοποίησή της από τους μικροοργανισμούς, ωστόσο αυτοί έχουν αναπτύξει ενζυμικά συστήματα που το επιτρέπουν με σχετική ευκολία.^{6,9}

Στην φύση η βιοαποικοδόμηση της LCB πραγματοποιείται κυρίως από μύκητες και βακτήρια. Υπάρχουν πολλά γένη βακτηρίων με δυνατότητα υδρόλυσης της κυτταρίνης, όπως τα *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Caldicellulosiruptor*, *Butyrivibrio*, *Acetivibrio*, *Cellulomonas*, *Erwinia*, *Thermobifida*, *Fibrobacter*, *Cytophaga* και *Sporocytophaga*, όμως αυτά περιορίζονται σε LCB με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη. Τέτοια βακτήρια βρίσκονται και στο πεπτικό σύστημα ορισμένων φυτοφάγων ζώων. Την δυνατότητα αξιοποίησης κυτταρίνης κατέχουν σχεδόν όλοι οι μύκητες.⁴⁸

Ορισμένοι μύκητες έχουν σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση θρεπτικών ουσιών από την LCB του δάσους στο χώμα. Κυρίως υπεύθυνοι για την αποικοδόμηση και ανακύκλωση της LCB είναι οι ξυλοφάγοι μύκητες. Για τον σκοπό αυτό, κατά την διάρκεια της ανάπτυξής τους παράγουν μεγάλη ποικιλία ενζύμων με διάφορες καταλυτικές ιδιότητες για την υδρόλυση της LCB, ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: υδρολυτικά, υπεύθυνα για την υδρόλυση πολυσακχαριτών, και οξειδωτικά, υπεύθυνα για την αποικοδόμηση λιγνίνης και άλλων φαινολικών ομάδων.⁶

Μέχρι τώρα έχουν περιγραφεί τρεις ομάδες μυκήτων που διαθέτουν μηχανισμούς υποβάθμισης της LCB, η κάθε μία με διαφορετικό τρόπο:⁶

1. **Μύκητες ελαφράς σύψης** (soft – rot fungi): Είναι κυρίως ασκομύκητες (πχ. *Aspergillus*, *Neurospora*) που μπορούν να αποδομούν πολυσακχαρίτες στην επιφάνεια των φυτών. Η δράση τους μαυρίζει και μαλακώνει το ξύλο. Εκκρίνουν λακκάσες και περοξειδάσες που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης. Τα ένζυμα αυτά δεν έχουν μεγάλη ειδικότητα και έχουν περιορισμένη καταλυτική ικανότητα σε σχέση με αυτά που έχουν απομονωθεί από τις υπόλοιπες κατηγορίες ξυλοφάγων μυκήτων.
2. **Μύκητες καφέ σύψης** (brown – rot fungi): Είναι βασιδιομύκητες (πχ. *Gloeophyllum trabeum*, *Coniophora puteana*, και *Postia placenta*) που μεταβολίζουν πολύ γρήγορα την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, και επεξεργάζονται μερικώς την λιγνίνη. Το ξύλο γίνεται πιο καφέ με χαρακτηριστικό μοτίβο που χαρακτηρίζεται «κυβικό» (Εικόνα 4). Δεν διαθέτουν ειδικά ένζυμα για την αποικοδόμηση της λιγνίνης, αλλά χρησιμοποιούν μηχανισμούς με δραστικά μόρια όπως υπεροξειδίο (H_2O_2) για αυτόν τον σκοπό.
3. **Μύκητες λευκής σύψης** (white– rot fungi): Συμπεριλαμβάνουν βασιδιομύκητες και ασκομύκητες (π.χ., *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete carnosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Botrytis cinerea*, *Stropharia coronilla*, και *Trametes versicolor*). Μπορούν να αποδομήσουν πλήρως όλα τα συστατικά της LCB. Είναι πιο αποδοτικοί στην οξείδωση της λιγνίνης από όλους τους ξυλοφάγους μύκητες και μπορούν να την μετατρέψουν πλήρως σε CO_2 . Έχουν μεγάλο ενδιαφέρον στην έρευνα για ένζυμα με οξειδωτική δράση στην LCB. (Εικόνα 5)



Εικόνα 4: Brown – rot.⁴⁹
(CC BY-SA 3.0)



Εικόνα 5: White– rot.⁵⁰
(CC BY-SA 4.0)

1.4.2. Προκατεργασία στην βιομηχανία

Όπως και στην φύση έτσι και στο εργαστήριο ή την βιομηχανία η ύπαρξη της λιγνίνης στην LCB αποτελεί εμπόδιο για την υδρόλυση της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης. Για τον σκοπό του διαχωρισμού της λιγνίνης από την LCB έχουν αναπτυχθεί διάφορες διεργασίες «προκατεργασίας». Αυτές χωρίζονται σε φυσικές, χημικές, φυσικοχημικές, και βιολογικές. Συνοπτικά αναφέρονται μερικές από τις διεργασίες που χρησιμοποιούνται ήδη σε εμπορικό επίπεδο ή δείχνουν μεγάλο ενδιαφέρον σε ερευνητικό επίπεδο (Πίνακας 2):⁵

Πίνακας 2: Κατηγοριοποίηση διεργασιών προκατεργασίας LCB ⁵			
Φυσικές	Χημικές	Φυσικοχημικές	Βιολογικές
<ul style="list-style-type: none">Μηχανική εξώθησηΆλεσμαΜικροκύματαΥπέρηχοιΠυρόλυσηΠαλμικό ηλεκτρικό πεδίο	<ul style="list-style-type: none">Αραιά οξέαΉπια αλκαλικά διαλύματαΟζονόλυσηΟργανικοί διαλύτεςΙονικά υγράΒαθείς ευτηκτικοί διαλύτες	<ul style="list-style-type: none">Έκρηξη ατμούΖεστό νερόΥγρή οξειδωσηΚατεργασία SPORLΠροκατεργασία αμμωνίαςΈκρηξη CO₂Οξειδωτική προκατεργασία	<ul style="list-style-type: none">Συνδυασμένη βιολογική προκατεργασία

Η επιλογή διεργασίας προκατεργασίας εξαρτάται από το τελικό προϊόν. Ο συνδυασμός περισσότερων από ένα σταδίων προκατεργασίας μπορεί να αυξήσει την απόδοση του διαχωρισμού. Τέλος, οι διεργασίες προκατεργασίας LCB είναι ενεργό πεδίο έρευνας καθώς αποτελούν σημαντικό κομμάτι της τωρινής αλλά και της μελλοντικής χρήσης LCB για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων.⁵

1.4.3. Ενζυμική αποικοδόμηση

Η βιοαποικοδόμηση της LCB καταλύεται από μίγματα ενζύμων, γνωστά ως CAZymes (Carbohydrate – Active enzymes), δηλαδή ένζυμα που έχουν ενεργότητα σε υδατάνθρακες.¹ Το καθένα συνεισφέρει στην υδρόλυση ή την οξειδωση συγκεκριμένων μορίων, καθώς και βελτιώνει την δράση των υπολοίπων μειώνοντας την στερεοχημική παρεμπόδιση της μήτρας ημικυτταρίνης – λιγνίνης.⁶ Σε αυτήν την ενότητα αναφέρονται κάποιες από τις οικογένειες ενζύμων που έχουν ανακαλυφθεί για τον σκοπό της βιοαποικοδόμησης LCB.

1.4.3.1. Αποικοδόμηση κυτταρίνης

Ο βαθμός πολυμερισμού, η κρυσταλλικότητα, το μέγεθος και η επιφάνεια των μικροϊνιδίων κυτταρίνης καθορίζουν την αποδοτικότητα της ενζυματικής υδρόλυσης. Σε ενζυμικά συστήματα μυκητιακής προέλευσης η υποβάθμιση της κυτταρίνης επιτυγχάνεται από γλυκοσιδάσες (GH, glucoside hydrolases), ένζυμα με συνεργητικές δράσεις. Συγκεκριμένα χωρίζονται σε 3 κατηγορίες:⁶

1. Ενδογλυκανάσες (EC 3.2.1.4): καταλύουν την υδρόλυση των β–(1→4) γλυκοζυτικών δεσμών στις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης.
2. Εξωγλυκανάσες (EC 3.2.1.91): επίσης γνωστές ως κελλοβιοϋδρολάσες (cellobiohydrolases), αφαιρούν διμερή, δηλαδή κελλοβιοζή, από τα άκρα της αλυσίδας κυτταρίνης.
3. β – γλυκοσιδάσες (EC 3.2.1.21): υδρολύουν την κελλοβιοζή σε μόρια γλυκόζης.

Επίσης πρόσφατη ανακάλυψη αποτελούν οι LPMOs (Lytic polysaccharide monoxygenases) οι οποίες έχουν την δυνατότητα απευθείας οξειδωσης κρυσταλλικών υποστρωμάτων, αυξάνοντας την ταχύτητα αποικοδόμησης της κυτταρίνης.

1.4.3.2. Αποικοδόμηση ημικυτταρίνης

Η υδρόλυση της ημικυτταρίνης απαιτεί επίσης συνεργητική δράση διαφόρων ενζύμων λόγω της πολυπλοκότητάς της αλλά και του ρόλου της ως μήτρα σύνδεσης διαφορετικών μορίων μεταξύ τους. Οι κύριες κατηγορίες ενζύμων που υδρολύουν την ημικυτταρίνη είναι οι:⁶

- Ένδο-1,4-β-ξυλανάσες (EC 3.2.1.8): υδρολύουν τις αλυσίδες β-(1→4)-ξυλάνης παράγοντας ολιγοσακχαρίτες.
- Έξω-1,4-β-ξυλοσιδάσες (EC 3.2.1.37): υδρολύουν τους παραπάνω ολιγοσακχαρίτες και απελευθερώνουν ξυλόζη.
- Ένδο-β-1,4-μαννάσες (EC 3.2.1.78): υδρολύουν τις αλυσίδες β-(1→4)-μαννάνης παράγοντας ολιγοσακχαρίτες.
- Έξω-β-1,4-μαννοσιδάσες (EC 3.2.1.25): υδρολύουν τους παραπάνω ολιγοσακχαρίτες και απελευθερώνουν β-D-μαννάση.
- Άλλα βοηθητικά ένζυμα όπως:
 - acetylxytan esterase (EC 3.1.1.72)
 - feruloyl esterase (EC 3.1.1.73)
 - p-coumaroyl esterase (EC 3.1.1.B10)
 - α-l-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)
 - xytan α-1,2-glucuronosidase (EC 3.2.1.131)
 - α-glucuronidase (EC 3.2.1.139)
 - LPMOs³

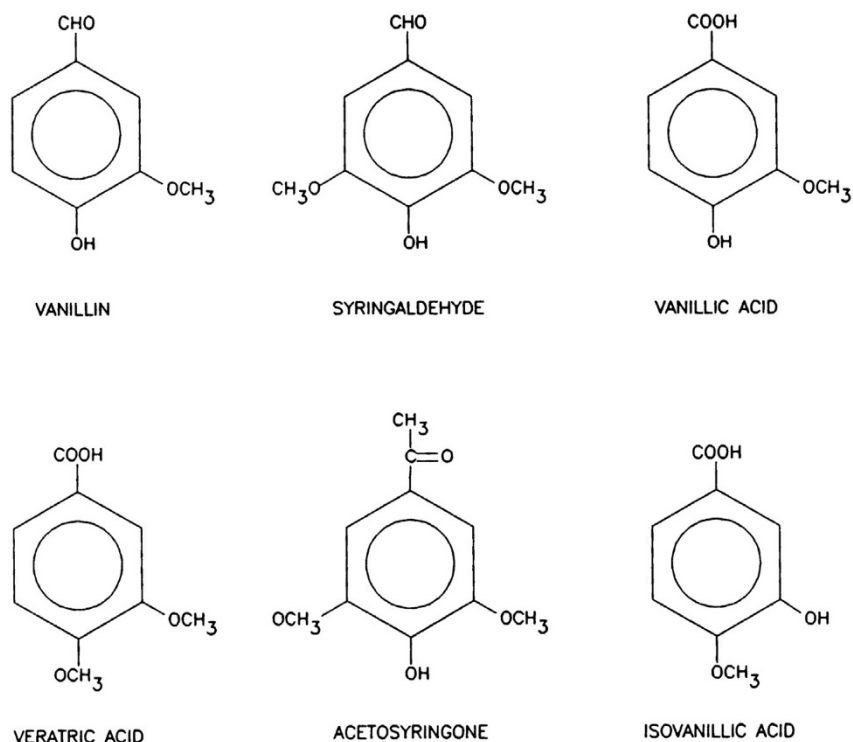
1.4.3.3. Αποικοδόμηση λιγνίνης

Η αποικοδόμηση της λιγνίνης είναι οξειδωτική διεργασία και αποδίδεται στον δευτερογενή μεταβολισμό ή στην περιορισμένη διαθεσιμότητα άνθρακα, αζώτου ή θείου. Ωστόσο κάποια είδη μυκήτων λευκής σήψης προτιμάνε την αποικοδόμηση λιγνίνης από την ημικυτταρίνη ή την κυτταρίνη, όπως τα *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phellinus pini*, *Phlebia sp.*, *Pleurotus sp.*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Heterobasidion annosum*, και *Irpex lacteus*. Αυτοί οι μύκητες παράγουν λιγνολυτικά ένζυμα που καταλύουν την οξείδωση αρωματικών υποστρωμάτων. Μερικά από αυτά τα ένζυμα που είναι γνωστά είναι τα εξής:⁶

- Λακκάσες (Laccases, EC 1.10.3.2): είναι μεταλλοένζυμα με συμπάροντα χαλκό με δυνατότητα οξείδωσης φαινολικών και μη φαινολικών υποστρωμάτων. Είναι μονομερείς, διμερείς ή και τετραμερείς γλυκοπρωτεΐνες με συνήθως 4 άτομα χαλκού ανά μονομερές στην μορφή Cu^{2+} . Οξειδώνουν φαινολικά υποστρώματα δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες που είτε επαναπολυμερίζονται είτε αποσπώνται.
- Περοξειδάσες: Οι περοξειδάσες είναι πολύ μεγάλες για να περάσουν την λιγνοκυτταρινική μήτρα και για αυτό πιστεύεται ότι δημιουργούν μικρές ελεύθερες ρίζες που καταλύουν την οξείδωση της λιγνίνης. Χωρίζονται σε:
 - Εξαρτώμενες από μαγγάνιο (MnP, manganese – dependent peroxidases EC 1.11.1.13): Οξειδώνουν ένα ιόν Mn^{2+} σε Mn^{3+} παρουσία H_2O_2 και αυτό με την βοήθεια χηλικού παράγοντα διαχέεται στην LCB οξειδώνοντας φαινολικά και μη φαινολικά μόρια.
 - Λιγνινικές περοξειδάσες (LiP, lignin peroxidases, EC 1.11.1.14): Οξειδώνουν μη φαινολικούς μεθοξυλικούς υποκαταστάτες παρουσία H_2O_2 .
 - Ευέλικτες περοξειδάσες (VP, versatile peroxidases EC 1.11.1.16): Συνδυάζουν τις δράσεις των παραπάνω.
- Άλλα βοηθητικά ένζυμα όπως:
 - Aryl alcohol oxidases (EC1.1.3.7): Οξειδώνουν πρωτοταγείς αλκοόλες με αρωματικό δακτύλιο.
 - Glyoxylate oxidase (EC 1.2.3.5)

- pyranose 2-oxidase (EC1.1.3.4)
- cellobiose dehydrogenase (EC 1.1.99.18)
- aryl-alcohol dehydrogenases (EC 1.1.1.90)
- quinone reductases (EC 1.6.99.2)
- tyrosinases (EC.1.14.18.1)
- catechol oxidases (EC 1.10.3.1)

Μερικά από τα προϊόντα διάσπασης της λιγνίνης είναι τα εξής (Σχήμα 24):¹⁴



Σχήμα 24: Παραδείγματα μερικών συχνών προϊόντων χαμηλού μοριακού βάρους από την μερική αποικοδόμηση της λιγνίνης.¹⁴

1.4.4. «Αιθεράσες»

1.4.4.1. Βακτηριακές αιθεράσες

Ένζυμα που έχουν ενεργότητα β – αιθεράσης και μπορούν να αποδομούν συνθετική και φυσική λιγνίνη έχουν απομονωθεί στο παρελθόν από βακτήρια. Ωστόσο πρόκειται για ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες εξαρτώμενες από γλουταθειόνη ή NAD^+ δείχνοντας ότι η δράση τους στην φύση περιορίζεται στην αποικοδόμηση ολιγομερών λιγνίνης που εισέρχονται μέσα στο κύτταρο.⁴ Για αυτόν τον λόγο προκύπτει η ανάγκη αναζήτησης εξωκυτταρικών αιθερασών που δρουν στο αδιάλυτο πολυμερές της LCB.

1.4.4.2. Μυκητιακές αιθεράσες

Όπως είναι ήδη προφανές, οι ξυλοφάγοι μύκητες αποτελούν την καλύτερη πηγή ενζύμων με ενεργότητα στην LCB.⁶ Πρόσφατα απομονώθηκε ένα ένζυμο – λιγνινάση με ενεργότητα β – O – 4 αιθεράσης από τον μύκητα ελαφράς σήψης *Parascedosporium putredinis*. Χρησιμοποιώντας αλληλούχιση ολικού mRNA σε κομπόστ άχυρου – σίτου παρατηρήθηκε ότι τα βακτήρια αποτελούσαν το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού με βάση τις αναγνώσεις mRNA με μικρές αλλαγές στις σχετικές αφθονίες τους στον χρόνο της καλλιέργειας. Ωστόσο όσον αφορά τις αναγνώσεις ευκαρυωτικών mRNA, στο τέλος της καλλιέργειας ένας ασκομύκητας είχε πολύ μεγαλύτερη σχετική αφθονία σε σχέση με τα υπόλοιπα ευκαρυωτικά είδη, λογικά λόγω της εξάντλησης του εύκολα προσβάσιμου άνθρακα.⁴

Αυτός ο μικροοργανισμός απομονώθηκε και έδειξε ότι μπορεί να μεγαλώνει σε τρυβλία petri με στερεό άγαρ που περιείχε λιγνίνη από χαρτοπολλτό ως την μοναδική πηγή άνθρακα. Με την χρήση συνθετικού ανάλογου της λιγνίνης που παράγει φθορίζοντα προϊόντα κατά την οξειδωσή του, ανιχνεύτηκε ενεργότητα β – O – 4 αιθεράσης στο υπερκείμενο καλλιέργειας του *Parascedosporium putredinis* όταν αυτός αναπτυσσόταν με πηγή

άνθρακα άχυρο – σίτου αλλά όχι όταν αναπτυσσόταν με πηγή άνθρακα γλυκόζη. Χρησιμοποιώντας τεχνικές κλασμάτωσης των πρωτεϊνών τελικά κατέληξαν στην ταυτοποίηση του ενζύμου που ήταν υπεύθυνο για αυτήν την ενεργότητα.⁴

Αυτή η «αιθεράση» υπολογίστηκε με βιοπληροφορικές μεθόδους ότι έχει ομολογία με ένα σύνηθες ενεργό κέντρο τυροσινάσης, με 6 χαρακτηριστικά κατάλοιπα ιστιδίνης που δεσμεύουν ένα ζευγάρι ιόντων Ca^{2+} στο ενεργό κέντρο. Ενώ οι τυροσινάσες από μανιτάρια έχουν μερική ενεργότητα β – Ο – 4 αιθεράσης σε μικρά συνθετικά ολιγομερή, δεν έχει αναφερθεί τέτοια ενεργότητα στο αδιάλυτο φυσικό πολυμερές.⁴

Στην συνέχεια το ένζυμο εκφράστηκε ετερόλογα στο βακτήριο *E. coli* και επιβεβαιώθηκε η δράση β – Ο – 4 αιθεράσης, την οποία δεν διαθέτει το συγκεκριμένο βακτήριο από μόνο του. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι απουσία οξυγόνου η ενεργότητα του ενζύμου ήταν πολύ χαμηλή. Την βέλτιστη ενεργότητα είχε σε $pH_{opt} = 10$ και $T_{opt} = 60^{\circ}C$.⁴

Αυτό το ένζυμο καθώς και ομόλογά του από άλλα είδη που αναζητήθηκαν με βιοπληροφορικές μεθόδους είναι το επίκεντρο αυτής της εργασίας.

1.5. Εφαρμογές σε συνθετικά πολυμερή (πλαστικά)

1.5.1. Γενικά

Εκτός από την προφανή αξία της μελέτης ενζύμων αποικοδόμησης LCB στην μελλοντική αξιοποίηση αυτής για την παραγωγή βιοκαυσίμων, βιοπλαστικών και άλλων προϊόντων προστιθέμενης αξίας που αναφέρονται παραπάνω, η καταπολέμηση της παγκόσμιας πλαστικής ρύπανσης καθώς και η ανάγκη για αναβάθμιση των συνθετικών πολυμερών έχει δημιουργήσει νέες προοπτικές για την αξιοποίηση τέτοιου είδους υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων.^{1,3}

Τα πλαστικά μίας χρήσης, συνήθως PE, PP, PVC, PS και PU, συνεισφέρουν σημαντικά στην πλαστική ρύπανση καθώς πολλές φορές δεν ανακυκλώνονται. Έτσι συσσωρεύονται στο περιβάλλον και αποτελούν κίνδυνο για το οικοσύστημα αλλά και για την ανθρώπινη υγεία.¹

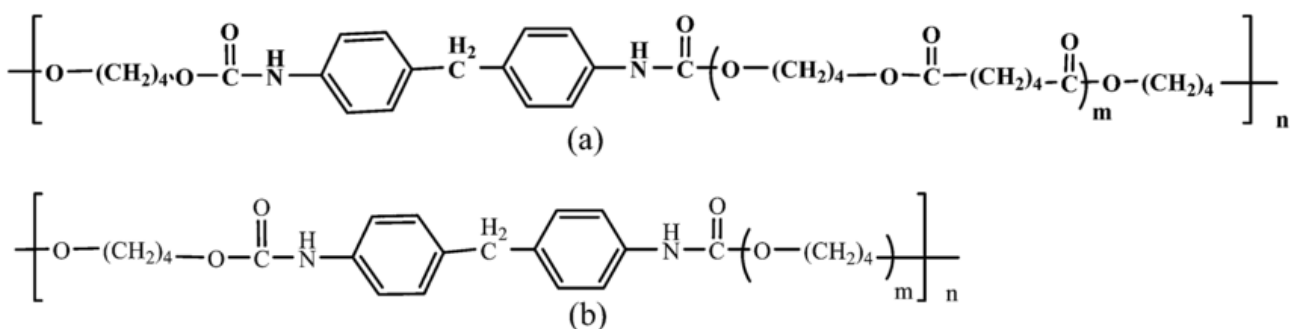
Οι μικροοργανισμοί που υποβαθμίζουν την LCB έχουν αναπτύξει ενζυμικά συστήματα που μπορούν να αποδομήσουν μεγάλες φυσικές πολυμερικές αλυσίδες, που μπορεί να έχουν κρυσταλλικές και υδροφοβικές περιοχές. Είναι λοιπόν εύλογη η υπόθεση πως τέτοια ενζυμικά συστήματα, και ειδικά τα ένζυμα που έχουν ενεργότητα στα μη υδατανθρακικά συστατικά της LCB, όπως την λιγνίνη, μπορούν να προσαρμοστούν στις ανάγκες αποικοδόμησης συνθετικών πολυμερών είτε όπως είναι είτε με κατευθυνόμενη εξέλιξη.¹

Σημαντική τεχνική στην αναζήτηση ενζύμων για την βιοαποικοδόμηση πλαστικών είναι η αναζήτησή τους σε οικοσυστήματα που έχουν πλαστική ρύπανση για πολλές δεκαετίες καθώς και ο ορθολογικός σχεδιασμός ενζύμων. Υπάρχουν ήδη παραδείγματα επιτυχίας αυτών των τεχνικών.⁵¹ Ένζυμα σχετιζόμενα με την βιοαποικοδόμηση πλαστικών συμπεριλαμβάνουν τις λακκάσες, τις περοξειδάσες και τις εστεράσες, ειδικότερα τις κουτινάσες (cutinases (EC 3.1.1.74)).³

Παρόλα τα παραπάνω είναι σημαντική η παρατήρηση ότι τα πετρελαϊκά πλαστικά έχουν γενικά μεγαλύτερη αντίσταση στην υδρόλυση από την LCB. Αυτό συμβαίνει εν μέρη επειδή δεν υπάρχουν εύκολα υδρολύσιμες χαρακτηριστικές ομάδες ή και μερικώς οξειδωμένες ομάδες. Η ενέργεια διάσπασης δεσμών (BDE, bond dissociation energy) για τα μονομερή της λιγνίνης υπολογίζεται μεταξύ $160 - 300 \frac{kJ}{mol}$ για τους αιθερικούς δεσμούς C - O, και $240 - 425 \frac{kJ}{mol}$ για τους δεσμούς C - C. Στα πλαστικά όπως PE, PP, PS και PVC η BDE είναι $330 - 370 \frac{kJ}{mol}$ για τους δεσμούς C - C των σκελετών τους, και $350 - 470 \frac{kJ}{mol}$ για τους δεσμούς C - H. Αυτό το ενεργειακό φράγμα είναι αρκετά μεγάλο για τις μικητιακές οξειδοαναγωγάσες. Ωστόσο θεωρητικά υπάρχουν βιοχημικές αντιδράσεις υποβάθμισης αλκανίων και για αυτό το PE είναι θεωρητικά βιοδιασπώμενο. Αυτή η λογική μπορεί να επεκταθεί και στο PP με την χρήση απομεθυλάσης (demethylase) ή στο PVC με αποαλογονάσες (dehalogenase).³

1.5.2. Πιθανός ρόλος των αιθερασών

Γίνεται η υπόθεσή ότι οι αιθεράσες που καταλύουν την διάσπαση αιθερικών δεσμών της LCB μπορεί να έχουν ενεργότητα και σε αιθερικούς δεσμούς συνθετικών πολυμερών, όπως η πολυαιθερική πολυουρεθάνη (Σχήμα 25 b.).



Σχήμα 25: a. Πολυεστερική πολυουρεθάνη και b. Πολυαιθερική πολυουρεθάνη.⁵²

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Επιλογή των ενζύμων (αιθερασών)

Εκτός από την πρόσφατα ανακαλυμμένη μυκητιακή αιθεράση που αναφέρεται παραπάνω, εφεξής **PpETH** (από τον μικροοργανισμό *Parascedosporium putredinis*), αναζητούνται και άλλα ομόλογα ένζυμα που πιθανώς να καταλύουν επίσης την διάσπαση β – O – 4 αιθερικών δεσμών, και αξιολογούνται με διάφορα κριτήρια.

2.1.1. Αναζήτηση σε διεθνείς βάσεις δεδομένων

Εισάγοντας την αμινοξική ακολουθία της *PpETH* (NCBI: CAH2727177.1) στο εργαλείο «BLASTP» (Basic Local Alignment Search Tool Protein) του NCBI (National Center for Biotechnology Information), βρίσκονται, μεταξύ άλλων, οι παρακάτω πρωτεΐνες (Πίνακας 3), ταξινομημένες από το μεγαλύτερο στο μικρότερο E–value, δηλαδή την αναμενόμενη τιμή ή αλλιώς τον αριθμό των αποτελεσμάτων που θα μπορούσαν να έχουν τυχαία παρόμοια αμινοξική ακολουθία (δεν φαίνεται στον πίνακα):⁵³

Πρωτεΐνη	Όνομα	Μικροοργανισμός προέλευσης	Ταξινόμηση	% ταυτοσημία	% επικάλυψη	SP	MW	pI
CAH2727177.1	<i>PpETH</i>	<i>Parascedosporium putredinis</i>	Ασκομύκητας	100	100	Y	44.5	6
PKS12997.1	<i>Lpro</i>	<i>Lomentospora prolificans</i>	Ασκομύκητας	87.5	100	Y	44.4	6
XP_016642676.1	<i>Sapi</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Ασκομύκητας	82.4	100	Y	44.7	6
XP_030991802.1	<i>TcETH</i>	<i>Thyridium curvatum</i>	Ασκομύκητας	67.6	93	Y	65.5	7
XP_001227696.1	<i>Cglo</i>	<i>Chaetomium globosum CBS 148.51</i>	Ασκομύκητας	62.8	80	Y	43	6
XP_003664995.1	<i>Tthe</i>	<i>Thermothelomyces thermophilus</i>	Ασκομύκητας	55.5	86	N	40.4	6

Όλα τα παραπάνω ένζυμα ανήκουν στην κατηγορία ενζύμων παρόμοιων με τυροσινάσες, οι οποίες διαθέτουν χαρακτηριστικό ενεργό κέντρο με συμπράγοντα χαλκό τύπου III (type-III-copper enzymes) και ανήκουν στις οξειδάσες πολυφαινολών (PPOs, polyphenol oxidases).⁵⁴

Η ταυτοσημία (identity) και η επικάλυψη (query coverage) είναι βασικά κριτήρια επιλογής καθώς είναι σημαντικό να μην διαφέρουν πολύ τα ένζυμα ώστε να υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να έχουν παρόμοια ενεργότητα. Όμως είναι επίσης επιθυμητή η αναζήτηση αρκετά διαφορετικών ενζύμων έτσι ώστε να βρεθούν ένζυμα με ελαφρώς διαφορετικές ή και νέες ενεργότητες.

Η ύπαρξη σήματος έκκρισης (signal peptide, SP στον παραπάνω πίνακα) είναι επίσης σημαντική καθώς αναζητούνται εξωκυτταρικές πρωτεΐνες. Η ύπαρξή του και η θέση του προβλέπεται από το «SignalP – 6.0» διαδικτυακό πρόγραμμα του DTU, του Τεχνικού Πανεπιστημίου της Δανίας.⁵⁵

Το μοριακό βάρος υπολογίζεται από το υπολογιστικό εργαλείο «Compute pI/Mw» του Expassy (διαδικτυακό πρόγραμμα του ελβετικού ινστιτούτου βιοπληροφορικής) με βάση την αμινοξική ακολουθία, ωστόσο το πραγματικό μοριακό βάρος των ενζύμων μπορεί να διαφέρει λόγω μετα – μεταφραστικών τροποποιήσεων όπως γλυκοζυλιώσεις καθώς και ελάχιστα λόγω της ύπαρξης των δύο χαλκών, Cu^{2+} που είναι συμπράγοντες στο ενεργό κέντρο των παραπάνω ενζύμων. Το ισοηλεκτρικό σημείο, *pI*, προβλέπεται από το ίδιο εργαλείο.⁵⁶

Από τις παραπάνω πρωτεΐνες/ένζυμα επιλέχθηκαν τα 4 πρώτα στοιχεία του πίνακα, δηλαδή της *PpETH* που είναι η ήδη μελετημένη β – O – 4 αιθεράση και οι *Lpro*, *Sapi* και *TcETH*. Λόγω οικονομικών περιορισμών επιλέχθηκαν τελικά για παραγγελία οι *PpETH* και *TcETH* με τον φορέα έκφρασης pPICZα C (βλ. «2.3. Επιλογή του φορέα έκφρασης»). Η επιλογή της *TcETH* έγινε λόγω της σχετικά μεγάλης διαφοράς της από την *PpETH* με την ελπίδα ότι μπορεί να έχει διαφορετική ενεργότητα από αυτό, καθώς και από το γεγονός ότι τα παραπάνω αμινοξέα που έχει στο καρβοξυτελικό άκρο μπορεί να του προσδίδουν νέες ιδιότητες που σχετίζονται είτε με την πρόσδεση στο υπόστρωμα είτε με την κατάλυση. Πολλαπλή στοιχίση παρουσιάζεται στα αποτελέσματα.

2.1.2. Πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής των υποψηφίων ενζύμων με μηχανική μάθηση

Η τρισδιάστατη δομή των παραπάνω ενζύμων δεν είναι διαθέσιμη, αλλά θα ήταν μία χρήσιμη πληροφορία για την επιβεβαίωση της παρόμοιας αναδίπλωσης του ενεργού κέντρου και γενικότερα της στερεοχημείας των ενζύμων και της ομοιότητάς τους.

Μπορεί όμως να προβλεφθεί με ικανοποιητική ακρίβεια από το νέο ανοιχτού κώδικα εργαλείο μηχανικής μάθησης, AlphaFold 2 της DeepMind. Η εκμάθηση του AlphaFold 2 έγινε με βάση τις ήδη λυμένες πρωτεϊνικές δομές της PDB (Protein Data Bank) και εξάγει ικανοποιητικές προβλέψεις ακόμα και για πρωτεΐνες για τις οποίες δεν υπάρχουν παρόμοιες στο σύνολο δεδομένων εκπαίδευσής του.⁵⁷

Εισάγονται οι αμινοξικές ακολουθίες των παραπάνω ενζύμων στο ColabFold, (υλοποίηση του AlphaFold2 σε συνδυασμό με το MMseqs2 (πρόγραμμα διαχείρισης μεγάλων πρωτεϊνικών βάσεων δεδομένων)) στην διαδικτυακή πλατφόρμα cloud compute, Colab, της Google Research.⁵⁷⁻⁵⁹ Επιλέγεται επίσης η χρήση Amber, πακέτου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής και οι υπόλοιπες επιλογές παραμένουν στις προεπιλογές τους.⁶⁰

2.2. Επιλογή του ξενιστή έκφρασης

Οι πιθανοί ξενιστές έκφρασης είναι οι:

2.2.1. Escherichia coli

Η *Escherichia coli* έδειξε στην αρχική έρευνα της *PpETH* ότι μπορεί να την παράγει στους 11 °C με δυσκολία, αφού η πρωτεΐνη καταβυθίστηκε και παράχθηκαν κυτταρικά έγκλειστα.⁴ Επίσης δεν πραγματοποιεί μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που μπορεί να βοηθήσει στην σταθερότητα ή την ενεργότητα του ενζύμου.³²

2.2.2. Pichia pastoris

Η ζύμη *Pichia pastoris* χρησιμοποιείται κατά κόρον στο εργαστήριο βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ. Η μυκητιακή προέλευση των ενζύμων ενδιαφέροντος, η δυνατότητά της να εκκρίνει τις ετερόλογα εκφρασμένες πρωτεΐνες, η υψηλή συνήθως παραγωγικότητα και η δυνατότητα της να πραγματοποιεί μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις οδηγούν στην επιλογή της ως φορέα έκφρασης για αυτό το πείραμα.³²

Η χρήση της *Pichia pastoris* ως ξενιστή έκφρασης τυροσινάσης στο παρελθόν (η οποία έχει παρόμοια δομή με τα ένζυμα ενδιαφέροντος) με υψηλή παραγωγικότητα (από 2.5 mg/L έως και 24 mg/L) και χωρίς μεγάλες δυσκολίες ενισχύει το επιχειρήμα χρήσης της για τον σκοπό αυτού του πειράματος.⁶¹

Ο διαθέσιμος τύπος *Pichia pastoris* στο εργαστήριο είναι ο X33, δηλαδή η *Pichia pastoris* άγριου τύπου, που διατίθεται σε κιτ έκφρασης πρωτεϊνών της εταιρείας Invitrogen™.⁶²

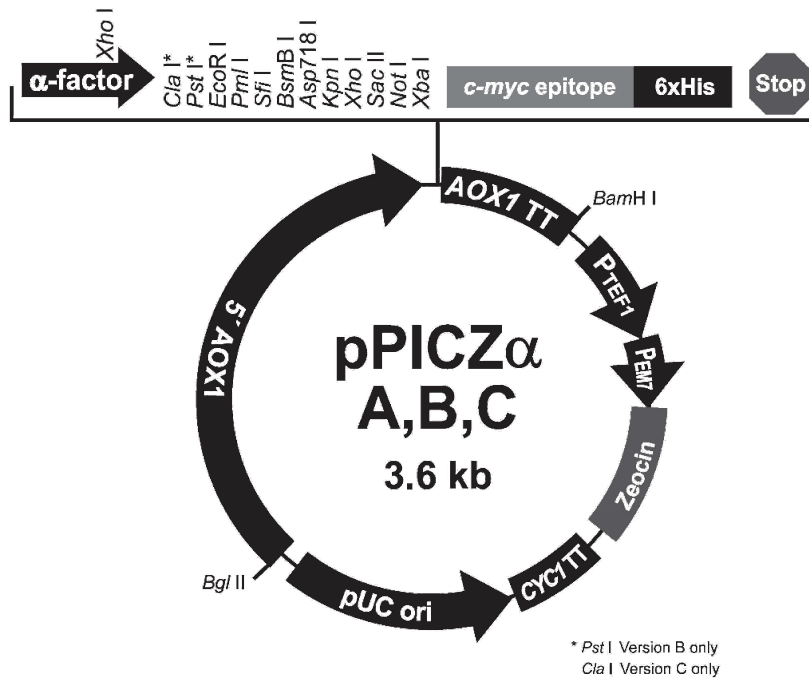
2.3. Επιλογή του φορέα έκφρασης

2.3.1. Βασικά

Το κιτ έκφρασης πρωτεϊνών της Invitrogen™ με το οποίο διατίθεται η *Pichia pastoris* X33 περιέχει και τους προτεινόμενους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης. Οι επιλογές για εξωκυτταρική έκφραση είναι οι φορείς:⁶³

- ρPICZα A (3593 bp)
- ρPICZα B (3597 bp)
- ρPICZα C (3598 bp)

Ο πλασμιδιακός χάρτης των ρPICZα A, B και C (Σχήμα 26):



Σχήμα 26: Πλασμιδιακός χάρτης των φορέων έκφρασης ρPICZα A, B και C.⁶³

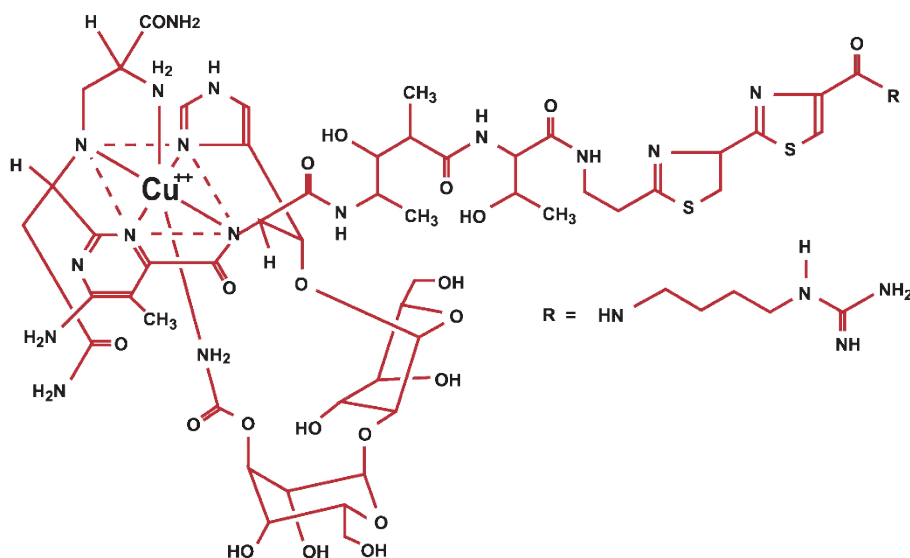
Η διαφορά των ρPICZα A, B και C είναι κυρίως στο πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου που κλωνοποιείται στον φορέα, καθώς αυτό θα πρέπει να είναι στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά γύρω από την θέση πολυσύνδεσης, δηλαδή το σήμα έκκρισης και την ουρά πολυϊσιτιδίνης. Σε σχέση με το A, το B έχει άλλη μία πρόσθετη θέση για περιοριστική ενδονουκλεάση στην θέση πολυσύνδεσης και το C έχει επίσης άλλη μία πρόσθετη θέση για περιοριστική ενδονουκλεάση αλλά διαφορετική από το B.⁶³

Επεξήγηση των χαρακτηριστικών:⁶³

- 5' AOX1 υποκινητής: Ο υποκινητής της ετερόλογα εκφραζόμενης πρωτεΐνης, επαγόμενος με την προσθήκη μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας.
- Παράγοντας – α: Σήμα έκκρισης της πρωτεΐνης από το κύτταρο με προέλευση από τον *Saccharomyces cerevisiae*.
- Θέση πολυσύνδεσης: Η θέση στην οποία κλωνοποιούνται τα γονίδια προς έκφραση.
- c-myc epitope: Επιτρέπει τον εκλεκτικό καθαρισμό της ετερόλογης πρωτεΐνης με την χρήση *anti-myc* αντισωμάτων.
- His₆ tag: Επιτρέπει τον εκλεκτικό καθαρισμό της ετερόλογης πρωτεΐνης με την μέθοδο χρωματογραφίας συγγένειας που περιγράφεται παραπάνω.
- AOX1 transcription termination: αλληλουχία τερματισμού μεταγραφής.
- TEF1 υποκινητής: Υποκινητής μεταγραφής του γονιδίου που προσδίδει αντίσταση στο αντιβιοτικό ζεοσίνη, με προέλευση από τον *Saccharomyces cerevisiae*.
- EM7 υποκινητής: Προκαρυωτικός υποκινητής μεταγραφής του γονιδίου που προσδίδει αντίσταση στο αντιβιοτικό ζεοσίνη.
- Γονίδιο αντίστασης στην ζεοσίνη: Επιτρέπει την επιλογή μετασχηματισμένων στελεχών *E. coli* και *P. pastoris*.

- CYC1 transcription termination: αλληλουχία τερματισμού μεταγραφής.
- pUC origin: θέση έναρξης αντιγραφής του *E. coli*.

Ως επιλέξιμος δείκτης χρησιμοποιείται το αντιβιοτικό ζεοσίνη (Σχήμα 27). Η ζεοσίνη είναι αντιβιοτικό από την οικογένεια της μπλεομυκίνης/φλεομυκίνης των στρεπτομυκήτων. Τα αντιβιοτικά αυτής της οικογένειας έχουν ισχυρή τοξικότητα σε βακτήρια, μύκητες (συμπεριλαμβανομένων και των ζυμών), φυτά και θηλαστικά κύτταρα. Η πρωτεΐνη αντίστασης στην ζεοσίνη είναι μία πρωτεΐνη 13.7 *kDa* απομονωμένη από το βακτήριο *Streptoalloteichus hindustanus* που δεσμεύει την ζεοσίνη και αναστέλλει την διάσπαση του DNA από αυτήν. Η έκφραση αυτής της πρωτεΐνης από ξενιστές προσφέρει αντίσταση στην ζεοσίνη.⁶³



Σχήμα 27: Ζεοσίνη, $C_{60}H_{89}N_{21}O_{21}S_3$, $MW = 1535 \text{ g/mol}$.⁶³

2.3.2. Ιδιαιτερότητες του κατασκευασμένου φορέα

Για τους φορείς που κατασκευάστηκαν, η θέση πολυσύνδεσης διαμορφώθηκε με τον εξής τρόπο (βλ. «6.1. Φορείς έκφρασης των PrETH και TcETH» για τους πλήρεις φορείς):

1. Παράγοντας α
2. XXXX για διόρθωση πλαισίου ανάγνωσης
3. Γονίδιο
4. Θέση αναγνώρισης TEV
5. XXXX για διόρθωση πλαισίου ανάγνωσης
6. Myc
7. Συνδέτης
8. His₆ tag

Αξιοσημείωτη είναι η θέση αναγνώρισης TEV. Η TEV (EC 3.4.22.44) είναι μία πρωτεάση από τον ιό «tobacco etch virus» (TEV) με μεγάλη ειδικότητα στην διάσπαση μίας συγκεκριμένης αμινοξικής ακολουθίας. Έχει προστεθεί τέτοια θέση αναγνώρισης στις ετερόλογες πρωτεΐνες προς έκφραση με σκοπό στο μέλλον να μπορεί να αφαιρεθεί η His₆ tag.

2.4. Υλικά και Όργανα

2.4.1. Βασικός εξοπλισμός

Χρησιμοποιείται βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός, δηλαδή: αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου, πιπέτες Pasteur, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες (100 mL, 250 mL, 2 L), ογκομετρικοί κύλινδροι (25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L), γυάλινα μπουκάλια αποστείρωσης (50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L, 2 L), χωνιά, Eppendorf tubes (1.5 mL, 2.0 mL), σωλήνες τύπου falcon tubes (15 mL, 50 mL), αποστειρωμένες σύριγγες μιας χρήσης, φίλτρα σύριγγας Micron (0.22 mm), αποστειρωμένα τρυβλία Petri, σπαθίδες ανάδευσης και μεταφοράς υλικού και σπαθίδες διανομής κυτταρικού υλικού (spreaders).

Τα εργαστηριακά όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιούνται συμπεριλαμβάνουν τα:

- Αναλυτικός ζυγός Abs 120-4N, KERN & Sohn GmbH
- Ζυγοί Mark 2060, Mark 4065, BEL Engineering
- Ανακινούμενοι επωαστικοί θάλαμοι ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd
- Αποστειρωμένος χώρος εργασίας UNIFLOW UV1200
- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO
- Θερμαινόμενοι και ανακινούμενοι επωαστήρες Eppendorf Thermomixer Comfort (1.5 mL, 2.0 mL), Eppendorf
- Θερμαινόμενες πλάκες με μαγνητικούς αναδευτήρες
- Μετρητή pH (pH-meter 537), WTW
- Φυγόκεντρο πάγκου Eppendorf 3200
- Στήλη βαρύτητας Econo-Pac, Biorad με ρητίνη TalonR ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου, Clontech
- Στήλες – φίλτρα φυγοκέντρωσης Amicon® Ultra – 0,5 mL Centrifugal Filters Ultracel® - 10 K Regenerated Cellulose, Merck Millipore Ltd
- Συσκευή παραγωγής gel SDS – PAGE, BIO-RAD
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης κυττάρων MicroPulser Electroporator, BIORAD
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης για διαχωρισμό πρωτεϊνών Mini-PROTEAN® Tetra System, BIO-RAD
- Συσκευή ανάδευσης gel Orbit LS, Labnet
- Συσκευή παραγωγής απιονισμένου νερού
- Συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore
- Φίλτρα υπερδιήθησης Ultracel® 10 kDa Ultrafiltration Discs, Merck Millipore
- Συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, Spectra Max ABS Plus, Molecular Devices
- Συσκευή φωτομέτρησης UV-1280, Shimadzu
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού
- Υπερκατάψυξη FORMA SCIENTIFIC FULL SIZE –86°C BIO FREEZER, THERMO FISCHER SCIENTIFIC
- Φυγόκεντρο Beckman Model TJ-6 Centrifuge, Beckman Coulter
- Φυγόκεντρο Beckman Model J2-21 Centrifuge, Beckman Coulter
- Φυγόκεντρο High Speed Refrigerated Centrifuge 4239R, ALC
- Φυγόκεντρο ROTANTA 460R, Hettich ZENTRIFUGEN
- Τροφοδοτικό για ηλεκτροφόρηση E863, Consort

2.4.2. Βασικά υλικά

Τα βασικά υλικά που χρησιμοποιούνται:

- Υπερκάθαρο και απιονισμένο νερό
- *Glycerol stock E. coli* TOP10
- *Glycerol stock P. pastoris* X33 (άγριου τύπου)
- Πλασμιδιακοί φορείς pPICZα C με τα γονίδια για την έκφραση των *PpETH* και *TcETH*, GenScript
- Περιοριστικά ένζυμα *Sac I* και *Pme I*, της NEB
- Συστατικά των θρεπτικών μέσων (βλ. «2.4.3. Θρεπτικά μέσα»)
- Συστατικά για παραγωγή γέλης αгарόζης
- Συστατικά για παραγωγή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης
- Ρητίνη TALON® Superflow για χρωματογραφία συγγένειας
- Γλυκερόλη για την αποθήκευση κυττάρων
- Διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα

2.4.3. Θρεπτικά μέσα

2.4.3.1. Για *E. coli*:

- Low salt LB (Τρυπτόνη 1% w/v, Εκχύλισμα ζύμης 0.5% w/v, NaCl 0.5% w/v, pH 7.5)

Τα παραπάνω διαλύονται σε απιονισμένο νερό, προσαρμόζεται το pH σε 7.5 και προστίθεται νερό μέχρι τελικού όγκου. Αν είναι επιθυμητή η παρασκευή στερεού μέσου προστίθεται και άγαρ σε συγκέντρωση 15 g/L. Αποστειρώνεται στους 121 °C για 20 min και αφού κρυώσει στους ~55°C μπορεί να προστεθεί αντιβιοτικό ζεοσίνη.

2.4.3.2. Για *P. pastoris*

- YPD (Πεπτόνη 2% w/v, Εκχύλισμα ζύμης 1% w/v, Γλυκόζη 2% w/v)

Τα παραπάνω διαλύονται σε απιονισμένο νερό και προστίθεται νερό μέχρι τελικού όγκου. Αν είναι επιθυμητή η παρασκευή στερεού μέσου προστίθεται και άγαρ σε συγκέντρωση 2 % w/v. Αποστειρώνεται στους 109 °C για 40 min και αφού κρυώσει στους ~55°C μπορεί να προστεθεί αντιβιοτικό ζεοσίνη. Εναλλακτικά μπορεί να αποστειρωθεί ξεχωριστά η γλυκόζη και να ενωθούν μετά, επιτρέποντας αποστείρωση στους 121 °C για 20 min.

- YPDS (Πεπτόνη 2% w/v, Εκχύλισμα ζύμης 1% w/v, Γλυκόζη 2% w/v, σορβιτόλη 1 M)

Το ίδιο με το παραπάνω με προσθήκη σορβιτόλης σε συγκέντρωση 1 M.

- BMGY (Πεπτόνη 2% w/v, Εκχύλισμα ζύμης 1% w/v, 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα KPi 100 mM pH 6.0, 1.34% w/v yeast nitrogen base, 4×10^{-5} % w/v βιοτίνη, 1% w/v γλυκερόλη)

Διαλύεται η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης σε απιονισμένο νερό ίσο με 70% του τελικού όγκου και αποστειρώνονται στους 121 °C για 20 min.

Παρασκευάζονται επίσης και αποστειρώνονται στους 121 °C για 20 min τα εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα KPi 1 M: αναμιγνύονται 132 mL K_2HPO_4 1 M με 868 mL KH_2PO_4 1 M και επιβεβαιώνεται ότι το pH είναι 6.0. Αν δεν είναι, διορθώνεται με φωσφορικό οξύ ή KOH.
- 10X yeast nitrogen base (10X YNB): Διαλύονται 34 g YNB (χωρίς αμινοξέα) και 100 g θειικό αμμώνιο σε 1000 mL νερό.
- 10% γλυκερόλη: διάλυμα γλυκερόλης 10% w/v.

Επίσης παρασκευάζεται και αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (με κατάλληλο φίλτρο 0.22 μm):

- 500X βιοτίνη: διαλύονται 20 mg βιοτίνης σε 100 mL νερό

Όταν τα παραπάνω κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου αναμιγνύονται ως εξής (για 1 L BMGY):

1. Στο κύριο διάλυμα (με την πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης) προστίθενται 100 mL του ρυθμιστικού διαλύματος KPi 1 M.
2. Προστίθενται επίσης 100 mL 10X YNB
3. Προστίθενται επίσης 100 mL 10% γλυκερόλης
4. Τέλος προστίθενται 2 mL 500X βιοτίνης

- BMMY (Πεπτόνη 2% w/v, Εκχύλισμα ζύμης 1% w/v, 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα KPi 100 mM pH 6.0, 1.34% w/v yeast nitrogen base, 4×10^{-5} % w/v βιοτίνη, 0.5% w/v μεθανόλη)

Το ίδιο με το παραπάνω όμως αντί για γλυκερόλη προστίθεται μεθανόλη σε συγκέντρωση 0.5% w/v. Προσαρμόζεται επίσης ο όγκος του κύριου μείγματος, δηλαδή η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης σε απιονισμένο νερό ίσο με 80% του τελικού όγκου.

- BMMY + TE

Τα ένζυμα που επιχειρήθηκε να εκφραστούν είναι μεταλλοπρωτεΐνες, καθώς στο ενεργό τους κέντρο έχουν χαλκό. Για τον λόγο αυτό προστέθηκε και ένα μίγμα ιχνοστοιχείων που περιέχει επίσης ιόντα χαλκού, σε συγκέντρωση 24 μM που έχει δειχθεί στην βιβλιογραφία ότι βοηθάει την έκφραση μίας τυροσινάσης (η οποία όπως αναφέρθηκε είναι στην ίδια ενζυμική οικογένεια με τις αιθεράσες που εκφράστηκαν) στην *P. pastoris*.⁶¹

Το μίγμα που ονομάστηκε TES (trace elements solution) και προστέθηκε στο BMMY σε αναλογία 400 $\mu L/L$ είναι το εξής (μερικώς τροποποιημένο από την πηγή) (Πίνακας 4):⁶⁴

Πίνακας 4: Διάλυμα βασικών μεταλλικών ιχνοστοιχείων για <i>P. Pastoris</i> , TES (trace elements solution)	
Συστατικό	Σύσταση (mM)
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	24
NaI	0.53
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	19.87
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10
$ZnCl_2$	10
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.83
H_3BO_3	0.32
$CoCl_3 \cdot 6H_2O$	2.10
+ προσθήκη 1 mL/L πυκνό H_2SO_4	

2.5. Μέθοδοι

Περιγράφεται η διαδικασία από την παραλαβή των πλασμιδιακών φορέων μέχρι την απομόνωση των ενζύμων *PpETH* και *TcETH*. Οι παρακάτω ποσότητες αναφέρονται σε κάθε πλασμίδιο ξεχωριστά.

2.5.1. Παραλαβή και πολλαπλασιασμός πλασμιδιακού φορέα με *E. coli* TOP 10

Οι πλασμιδιακοί φορείς pPICZα C με ενσωματωμένα τα γονίδια για την έκφραση των *PpETH* και *TcETH* αποκτήθηκαν με παραγγελία από την GenScript σε σωληνάκια.

Για κάθε πλασμιδιακό φορέα:

1^η μέρα

1. Προσθήκη 15 μL αποστειρωμένου υπερκάθαρο νερό.
2. Ανάμιξη 0.5 μL πλασμιδίου με 100 μL επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* TOP 10 σε σωληνάκι Eppendorf 1.5 mL και αφήνονται στον πάγο για 30 min .
3. Επώαση στους 42 °C για 1.5 min σε θερμαινόμενο επωαστήρα Eppendorf Thermomixer.
4. Επώαση των κυττάρων σε παγόλουτρο.
5. Προσθήκη 200 μL θρεπτικού υλικού low salt LB
6. Επώαση των κυττάρων στους 37 °C για 50 – 60 min σε θερμαινόμενο επωαστήρα Eppendorf Thermomixer.
7. Επίστρωση τρυβλίου low salt LB (20 mL /τρυβλίο) με αντιβιοτικό ζεοσίνη σε συγκέντρωση 25 $\mu\text{g}_{\text{ζεοσίνης}}/\text{mL}$ με τα παραπάνω κύτταρα. Τα μετασηματισμένα κύτταρα επιβιώνουν στο θρεπτικό μέσο που περιέχει αντιβιοτικό.
8. Επώαση τρυβλίου στους 37 °C ολονύκτια.

2^η μέρα

9. Διαλογή αποικίας από το τρυβλίο για υγρή καλλιέργεια 5 mL low salt LB με αντιβιοτικό ζεοσίνη 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε falcon tube των 50 mL .
10. Επώαση υγρής καλλιέργειας στους 30 – 37 °C ολονύκτια

3^η μέρα

11. Απομόνωση μεγάλης ποσότητα πλασμιδίου από την υγρή καλλιέργεια με την χρήση του kit απομόνωσης πλασμιδίου «NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)».

2.5.2. Απομόνωση πλασμιδιακού φορέα από υγρή καλλιέργεια *E. coli* TOP 10

Το kit απομόνωσης πλασμιδίου «NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)» διαθέτει στήλες δέσμησης πλασμιδίου, και 6 ρυθμιστικά διαλύματα, τα Buffer A1, A2, A3, A4, AW και AE, οι συστάσεις των οποίων είναι γνωστές και παρατίθενται στις οδηγίες. Τα Buffer A1 και A4 χρειάζονται προσθήκη RNAάσης (διατίθεται με το kit) και 80 mL αιθανόλης αντίστοιχα πριν την πρώτη χρήση, το Buffer AW προθερμαίνεται στους 50 °C και το Buffer A2 χρειάζεται προθέρμανση στους 30 – 40 °C και έπειτα ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να είναι διαλυμένα όλα τα συστατικά του (κυρίως το SDS). Η διαδικασία απομόνωσης πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε, ελάχιστα τροποποιημένη από τις οδηγίες του kit είναι η εξής:⁶⁵

1. Καλλιέργεια πλασμιδίου: 5 mL κορεσμένης καλλιέργειας *E. Coli* φυγοκεντρώνται για 10 min στα 11000 $\times g$. Έπειτα αφαιρείται το μεγαλύτερο δυνατό μέρος του υπερκείμενου υγρού έτσι ώστε να μείνουν μόνο τα κύτταρα.
2. Λύση κυττάρων: Προστίθενται 250 μL Buffer A1 και τα κύτταρα επαναιωρούνται πλήρως αναρροφώντας και εκροφώντας το υγρό με πιπέτα, και μεταφέρονται σε Eppendorf των 1.5 mL . Έπειτα προστίθενται 250 μL Buffer A2 και έπειτα από ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας το σωληνάκι, αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min . Το διάλυμα λαμβάνει μπλε χρώμα, το χρώμα του Buffer A2. Τέλος με την προσθήκη 300 μL Buffer A3 και ήπια ανάδευση με τον ίδιο τρόπο, εξουδετερώνεται το Buffer A2 και το μπλε δείγμα γίνεται πλήρως άχρωμο, με σκοπό να έχουν καταβυθιστεί όλες οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA.
3. Διαχωρισμών λύματος κυττάρων: Το παραπάνω άχρωμο δείγμα φυγοκεντρείται για 15 min στα 11000 $\times g$ σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι το υπερκείμενο υγρό να είναι διαυγές.

4. Δέσμευση πλασμιδίου στην στήλη: Το υπερκείμενο υγρό (μέγιστο 750 μL κάθε φορά) μεταφέρεται σε στήλη NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) στην οποία προσαρμόζεται δοχείο συλλογής από κάτω. Το σύστημα φυγοκεντρείται για 1 *min* στα 11000 $\times g$. Απορρίπτεται το υγρό που πέρασε από την στήλη και επαναλαμβάνεται αυτό το βήμα αν υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα αρχικού υπερκείμενου υγρού.
5. Έκπλυση της στήλης: Η στήλη αρχικά εκπλένεται με 500 μL Buffer AW προθερμασμένου στους 50 °C και φυγοκεντρείται για 1 *min* στα 11000 $\times g$. Απορρίπτεται το υγρό που πέρασε από την στήλη και εκπλένεται επίσης με 600 μL Buffer A4, που ακολουθείται με φυγοκέντρηση για 1 *min* στα 11000 $\times g$ και απόρριψη του υγρού που πέρασε από την στήλη.
6. Στέγνωμα της στήλης: Η στήλη στεγνώνει πλήρως με φυγοκέντρηση για 2 *min* στα 11000 $\times g$. Απορρίπτεται το δοχείο συλλογής.
7. Έκλυση πλασμιδίου από την στήλη: Προσαρμόζεται ως δοχείο συλλογής Eppendorf 1.5 *mL* στην στήλη. Προστίθενται 50 μL Buffer AE στην στήλη και ακολουθεί επώαση 1 *min*. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 *min* στα 11000 $\times g$. Το υγρό που περνάει από την στήλη περιέχει το πλασμίδιο που παράγεται. Επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά το παραπάνω βήμα σε διαφορετικό δοχείο συλλογής για την λήψη επιπλέον ποσότητας πλασμιδίου, σε πιο αραιό διάλυμα.

2.5.3. Γραμμικοποίηση του πλασμιδιακού φορέα με περιοριστική ενδονουκλεάση

Γραμμικό γενετικό υλικό μετασχηματίζει με μεγαλύτερη απόδοση από το κυκλικό πλασμίδιο την *P. pastoris*, μέσω του μηχανισμού ομόλογου ανασυνδυασμού. Για αυτόν τον λόγο ο κυκλικός φορέας έκφρασης pPICZa C διαθέτει τρεις προτεινόμενες θέσεις περιοριστικών ενδονουκλεασών που διασπούν το κυκλικό πλασμίδιο χωρίς να επηρεάζουν το γονίδιο ενδιαφέροντος και το γονίδιο που προσδίδει αντίσταση στην ζεοσίνη. Αυτές οι περιοριστικές ενδονουκλεάσεις είναι οι:⁶²

- *Sac I*
- *Pme I*
- *BstX I*

Στην περίπτωση των πειραμάτων αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα δύο πρώτα, και κυρίως το δεύτερο, λόγω διαθεσιμότητας στο εργαστήριο. Η πέψη του κυκλικού φορέα με τα παραπάνω ένζυμα από την εταιρεία NEB (New England Biolabs) έγινε με τον εξής τρόπο:⁶⁶

Σε αποστειρωμένο Eppendorf 1.5 *mL* προστέθηκαν τα εξής:

1. 50 μL ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZa C
2. 39 μL υπερκάθαρο νερό
3. 10 μL ρυθμιστικό διάλυμα περιοριστικού ενζύμου 10X (διατίθεται με το ένζυμο)
4. 1 μL περιοριστική ενδονουκλεάση

Το αντιδρόν μείγμα επώαστηκε στους 37 °C. Η εταιρεία NEB προτείνει επώαση 5 – 15 *min*, ωστόσο τα παραπάνω ένζυμα είναι ασφαλή για ολονύχτια επώαση. Έτσι λοιπόν πραγματοποιήθηκε ολονύχτια επώαση στους 37 °C με σκοπό την γραμμικοποίηση όλης της ποσότητας του πλασμιδιακού φορέα. Την επόμενη εργαστηριακή μέρα η περιοριστική ενδονουκλεάση απενεργοποιήθηκε θερμικά, επωάζοντας το σύστημα στους 65 °C για 15 mins.

2.5.4. Καθαρισμός του γραμμικού φορέα

Ο γραμμικοποιημένος φορέας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον μετασχηματισμό απευθείας από το προηγούμενο στάδιο. Ωστόσο για την αύξηση της απόδοσης μετασχηματισμένων κυττάρων *P. pastoris* στο στάδιο της ηλεκτροδιάτρησης (βλ. «2.5.6. Μετασχηματισμός της ζύμης *P. Pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση»), χρησιμοποιήθηκε ένα kit καθαρισμού του γενετικού υλικού, το «NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up». Αυτό το kit αποτελείται από στήλες δέσμευσης γενετικού υλικού, και 2 ρυθμιστικά διαλύματα, τα Buffer NT1 και NT3 (το οποίο απαιτεί προσθήκη 200 *mL* αιθανόλης πριν την πρώτη χρήση) οι συστάσεις των οποίων είναι γνωστές και παρατίθενται στις οδηγίες. Η διαδικασία καθαρισμού είναι η εξής:⁶⁷

1. Προσαρμογή των συνθηκών δέσμευσης του DNA: Αναμιγνύεται 1 όγκος δείγματος (100 μL) με 2 όγκους διαλύματος NT1 (200 μL).

2. Δέσμευση του DNA στην στήλη: Το υγρό (μέγιστο 700 μL κάθε φορά) μεταφέρεται σε στήλη «NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column» στην οποία προσαρμόζεται δοχείο συλλογής από κάτω. Το σύστημα φυγοκεντρείται για 30 *sec* στα 11000 $\times g$. Απορρίπτεται το υγρό που πέρασε από την στήλη.
3. Έκπλυση της στήλης: Προστίθενται 700 μL Buffer NT3 στην στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 *sec* στα 11000 $\times g$. Απορρίπτεται το υγρό που πέρασε από την στήλη και επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά η έκπλυση.
4. Στέγνωμα της στήλης: Η στήλη στεγνώνει πλήρως με φυγοκέντρηση για 1 *min* στα 11000 $\times g$. Απορρίπτεται το δοχείο συλλογής.
5. Έκλουση του γραμμικού DNA από την στήλη: Προσαρμόζεται ως δοχείο συλλογής Eppendorf 1.5 *mL* στην στήλη. Προστίθενται 30 μL αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό στην στήλη και γίνεται επώαση 1 *min* σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 *min* στα 11000 $\times g$. Το υγρό που περνάει από την στήλη περιέχει το καθαρό DNA που χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό της *P. pastoris*. Επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά το παραπάνω βήμα σε διαφορετικό δοχείο συλλογής για την λήψη επιπλέον ποσότητας καθαρού DNA, σε πιο αραιό διάλυμα.

2.5.5. Ηλεκτροφόρηση DNA σε γέλη αгарόζης

Για την επιβεβαίωση της πλήρους γραμμικοποίησης του πλασμιδιακού φορέα και γενικότερα τον έλεγχο του δείγματος πριν τον μετασχηματισμό της *P. pastoris* με αυτόν, πραγματοποιήθηκε διαγνωστική ηλεκτροφόρηση μέρους τους δείγματος σε γέλη αгарόζης. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης DNA σε γέλη αгарόζης είναι η εξής:

1. Παρασκευή γέλης: 0.5 *g* αгарόζης προστίθενται σε 50 *mL* TBE (Tris base 0.1 *M*, Βορικό οξύ 0.1 *M*, EDTA 0.2 *mM*). Το μίγμα ζεσταίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων ή θερμαινόμενη πλάκα έτσι ώστε να διαλυθεί η αгарόζη. Όταν ψυχθεί σε θερμοκρασία που είναι εύκολος ο χειρισμός του προστίθενται 4 μL χρωστικής midori green. Το διάλυμα αποχύνεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, τοποθετείται το «χτενάκι» που δημιουργεί τα πηγάδια για την φόρτωση των δειγμάτων από την πλευρά του αρνητικού πόλου, και έπειτα από περίπου 20 *min* η γέλη είναι έτοιμη.
2. Προετοιμασία δειγμάτων: 5 μL από το παραπάνω δείγμα καθαρού DNA που χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό της *P. pastoris* αναμιγνύονται με 1.5 μL ρυθμιστικού διαλύματος «φόρτωσης» δείγματος DNA (loading buffer 10X) και 8.5 μL υπερκάθαρου νερού.
3. Φόρτωση δειγμάτων: Στην συσκευή ηλεκτροφόρησης προστίθενται περίπου 60 – 70 *mL* TBE, αρκετά δηλαδή για να κλείσουν το κύκλωμα. Έπειτα φορτώνονται τα δείγματα στα πηγάδια της γέλης αгарόζης. Φορτώνεται επίσης και δείκτης ζευγών βάσεων σε ένα πηγάδι.
4. Ηλεκτροφόρηση: Εφαρμόζεται τάση 50 *V* για περίπου 30 – 60 *min*
5. Εξέταση αποτελεσμάτων: τα αποτελέσματα κρίνονται με οπίσθιο φωτισμό UV ποιοτικά ως προς την ύπαρξη, την θέση και την ένταση της αναμενόμενης «μπάντας» η οποία αναμένεται σε συγκεκριμένο μέγεθος ανάλογα με τον φορέα έκφρασης. Αναμένεται επίσης να μην υπάρχουν άλλες μπάντες σε υψηλότερο μέγεθος καθώς αυτό μπορεί να σημαίνει ότι δεν πραγματοποιήθηκε πλήρως η γραμμικοποίηση του φορέα. Το μέγεθος κρίνεται από τον δείκτη ζευγών βάσεων που προστέθηκε μαζί με τα δείγματα. Ο χειρισμός της πλάκας UV απαιτεί προστασία για τα μάτια.

2.5.6. Μετασχηματισμός της ζύμης *Pichia Pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση

Η βασική αρχή της μεθόδου ηλεκτροδιάτρησης είναι η αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης κατά την εφαρμογή εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου και χρησιμοποιείται ως τρόπος εισαγωγής ουσιών στο κύτταρο. Κατά την εφαρμογή υψηλής τάσης, δημιουργούνται στιγμιαίοι πόροι στην κυτταρική μεμβράνη (40 – 120 *nm*) διαμέσου των οποίων είναι δυνατή η είσοδος του γραμμικοποιημένου ετερόλογου φορέα. Οι πόροι δημιουργούνται παροδικά όταν το δυναμικό κατά μήκος της μεμβράνης ξεπεράσει τη διηλεκτρική της σταθερά. Αν η δύναμη και η διάρκεια του ηλεκτρικού πεδίου επιλεγθούν κατάλληλα τότε οι πόροι που δημιουργούνται από τον ηλεκτρικό παλμό ξανακλείνουν έπειτα από κάποιο χρονικό διάστημα. Ωστόσο η υπερβολική έκθεση των ζωντανών κυττάρων σε ηλεκτρικά πεδία μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο.

Η μέθοδος μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση είναι πιο αποδοτική και πιο απλή από αντίστοιχες χημικές μεθόδους. Η απόδοση του μετασχηματισμού είναι της τάξεως των $10^3 - 10^4 \frac{\text{κύτταρα}}{\mu\text{g γραμμικού φορέα}}$. Απαιτείται όμως προετοιμασία των κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση. Η διαδικασία είναι η εξής:

2.5.6.1. Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*

Για την προετοιμασία ηλεκτροδεκτικών κυττάρων:

1. Ανάπτυξη σε τρυβλίο: Αναπτύσσονται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο YPD/αγαρ κύτταρα *P. pastoris* X33 για περίπου 20 hr με ολονύχτια επώαση στους 30 °C.
2. Υγρές προκαλλιέργειες: Από το τρυβλίο αυτό εμβολιάζονται 2 υγρές προκαλλιέργειες των 50 mL με θρεπτικό μέσο YPD. Για τον σκοπό αυτόν αποστειρώνονται στους 121 °C για 20 min:
 - a. 2 κωνικές φιάλες όγκου 250 mL με 1 g γλυκόζης σε σκόνη στην κάθε μία (δηλαδή η γλυκόζη που αποτελεί την πηγή άνθρακα του YPD αποστειρώνεται χωριστά). Οι φιάλες καλύπτονται με ταπόνες (ή βαμβάκι) και αλουμινόχαρτο.
 - b. 1 μπουκάλι αποστείρωσης με το υπόλοιπο θρεπτικό μέσο YPD (2 × 50 mL = 100 mL YPD χωρίς την γλυκόζη).
 - c. Ογκομετρικός κύλινδρος των 50 mL για να μοιραστεί το θρεπτικό στις φιάλες.
 - d. Ακροφύσια (tips) πιπέτας μικρά (10 μL), κίτρινα (200 μL), μπλε (1000 mL), μεγάλα (5 mL).

Με κίτρινο tip συλλέγεται μία αποικία από το τρυβλίο και ελευθερώνεται το tip μέσα στο θρεπτικό μέσο που έχει μοιραστεί στις κωνικές φιάλες. Αυτό επαναλαμβάνεται και για την 2^η κωνική η οποία ουσιαστικά αποτελεί εφεδρική προκαλλιέργεια. Οι προκαλλιέργειες ακολουθούν ολονύχτια επώαση στους 30 °C.

3. Υγρή καλλιέργεια: Από την υγρή προκαλλιέργεια που έχει αναπτυχθεί περισσότερο σύμφωνα με την οπτική πυκνότητά της (OD_{600}) λαμβάνονται 12 mL και εμβολιάζεται καλλιέργεια των 250 mL με θρεπτικό μέσο YPD. Για τον σκοπό αυτόν αποστειρώνονται στους 121 °C για 20 min:
 - a. 1 κωνική φιάλη όγκου 1 L με 5 g γλυκόζης σε σκόνη (δηλαδή η γλυκόζη που αποτελεί την πηγή άνθρακα του YPD αποστειρώνεται χωριστά). Η φιάλη καλύπτεται με ταπόνα (ή βαμβάκι) και αλουμινόχαρτο.
 - b. 1 μπουκάλι αποστείρωσης με το υπόλοιπο θρεπτικό μέσο YPD (1000 mL YPD χωρίς την γλυκόζη).
 - c. Ακροφύσια (tips) πιπέτας μικρά (10 μL), κίτρινα (200 μL), μπλε (1000 mL), μεγάλα (5 mL).
 - d. Προαιρετικά: Υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 30% v/v, falcon tube των 50 mL και Eppendorfs των 1.5 mL, για την δημιουργία glycerol stock των κυττάρων *P. pastoris* X33 για μελλοντική χρήση (βλ. «2.5.15. Αποθήκευση αποθεμάτων κυττάρων σε γλυκερόλη (glycerol stock)»).

Λαμβάνεται μέτρηση OD_{600} (βλ. «2.5.11. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας OD_{600} κυτταρικών καλλιεργειών») και από την προκαλλιέργεια με την μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα ($OD_{600\text{ preculture}} \approx 7.5 - 10$) λαμβάνονται 12 mL και εμβολιάζεται η καλλιέργεια των 250 mL. Η νέα καλλιέργεια επωάζεται στους 30 °C για περίπου 3 - 4 hr έτσι ώστε η οπτική της πυκνότητα να είναι $OD_{600\text{ culture}} \approx 1.3 - 1.6$.

4. Προετοιμασία τρυβλίων επιλογής: Κατά την διάρκεια της καλλιέργειας παρασκευάζονται τρυβλία YPDS/άγαρ/ζεοσίνη $100 \mu\text{g/mL}$, $20 \frac{\text{mL}}{\text{τρυβλίο}}$. Για να γίνει αυτό το μέσο YPDS/άγαρ αποστειρώνεται στους 109 °C για 40 min σε μπουκάλι αποστείρωσης και όταν η θερμοκρασία του είναι αρκετά χαμηλή ώστε να είναι εύκολος ο χειρισμός του προστίθεται με αποστειρωμένο tip η κατάλληλη ποσότητα ζεοσίνης (Invitrogen Zeocin™ stock: 100 mg/mL) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της ζεοσίνης στο θρεπτικό μέσο να είναι $100 \mu\text{g/mL}$. Παρασκευάζονται 3 τρυβλία για κάθε ξεχωριστό μετασχηματισμό, επομένως στην περίπτωση 2 μετασχηματισμών όπως σε αυτό το πείραμα, παρασκευάζονται 6 τρυβλία και 3 ακόμα για τυφλό δείγμα (ηλεκτροδιάτρηση χωρίς ετερόλογο φορέα για να ελεγχθεί ότι πράγματι η *P. pastoris* X33 δεν αναπτύσσεται σε τρυβλία με $100 \mu\text{g/mL}$ ζεοσίνης).
5. Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων: Μόλις η καλλιέργεια φτάσει την επιθυμητή οπτική πυκνότητα ($OD_{600\text{ culture}} \approx 1.3 - 1.6$) τα κύτταρα πρέπει να γίνουν ηλεκτροδεκτικά. Η τελευταία αποστείρωση (στους 121 °C για 15 min) συμπεριλαμβάνει τα εξής:
 - a. 1 μπουκάλι αποστείρωσης με 1 L υπερκάθαρο νερό
 - b. 50 mL διάλυμα σορβιτόλης 1 M
 - c. 2 tubes μεγάλης φυγόκεντρου καλυμμένα με αλουμινόχαρτο και τα καπάκια τους ξεχωριστά σε ποτήρι ζέσεως καλυμμένο με αλουμινόχαρτο.

- d. 1 falcon tube 15 mL για κάθε μετασχηματισμό (σε αυτήν την περίπτωση 2 ετερόλογα γονίδια + 1 τυφλό δείγμα = 3).
 - e. 2 falcon tubes 50 mL για φυγοκεντρήσεις.
- Αποστειρώνονται επίσης σε 70% αιθανόλη ειδικές κυψελίδες για ηλεκτροδιάτρηση, μεγέθους 0.2 cm.

Μετά την αποστείρωση το υπερκάθαρο νερό, το διάλυμα σορβιτόλης και οι κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης τοποθετούνται σε παγόλουτρο.

Παραλαμβάνεται η καλλιέργεια και ακολουθούν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις ($\sim 4000 \times g$ για 5 min στους 4 °C):

- 1) Φυγοκεντρείται η καλλιέργεια σε μεγάλα tubes και αφαιρείται όλο το υπερκείμενο υγρό.
- 2) Το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε 250 mL προψυγμένου υπερκάθαρου νερού και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση
- 3) Το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε 150 mL προψυγμένου υπερκάθαρου νερού και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση
- 4) Το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε 12 mL προψυγμένου διαλύματος σορβιτόλης 1 M, μεταφέρεται σε falcon των 50 mL και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση
- 5) Το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε 0.6 – 1.2 mL προψυγμένου διαλύματος σορβιτόλης 1 M έτσι ώστε ο όγκος του μίγματος να είναι περίπου 1.5 mL. Τα κύτταρα είναι πλέον ηλεκτροδεκτικά και παραμένουν στον πάγο μέχρι τον μετασχηματισμό τους. Δεν μπορούν να αποθηκευτούν για μελλοντική χρήση και πρέπει να χρησιμοποιηθούν άμεσα.

2.5.6.2. Ηλεκτροδιάτρηση επιδεικτικών κυττάρων *P. pastoris*

Τα επιδεικτικά κύτταρα είναι έτοιμα για μετασχηματισμό και ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- 1) 80 μ L εναιωρήματος επιδεικτικών κυττάρων *P. pastoris* X33 αναμιγνύονται με 25 μ L γραμμικού ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pPICZα στο Eppendorf 1.5 mL που τον περιέχει. Ο γραμμικοποιημένος πλασμιδιακός φορέας περιέχει το επιθυμητό ετερόλογο γονίδιο και το γονίδιο αντίστασης στην ζεοσίνη. Πραγματοποιείται επώαση για 5 min στον πάγο και τακτικά πολύ ήπια ανάδευση σε vortex.
- 2) Το μείγμα μεταφέρεται σε προψυγμένη κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης 0.2 cm.
- 3) Ακολουθεί μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση στην συσκευή «MicroPulser Electroporator» της BIORAD, επιλέγοντας τις προεπιλογές για *P. pastoris*.
- 4) Μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού προστίθεται αμέσως 1 mL διαλύματος προψυγμένης σορβιτόλης 1 M.
- 5) Το μείγμα μεταφέρεται σε στείρο σωλήνα falcon 15 mL και επωάζεται στους 30 °C για 2 hr χωρίς ανάδευση.
- 6) Μετά την επώαση γίνεται επίστρωση 3 τρυβλίων YPDS/άγαρ/ζεοσίνη 100 μ g/mL ανά μετασχηματισμό με 300 μ L από το παραπάνω μίγμα στο καθένα. Τα τρυβλία επωάζονται στους 30 °C για 3 – 4 d. Οι αποικίες που αναπτύσσονται στο στερεό θρεπτικό μέσο εξετάζονται για την παρουσία του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου είτε με PCR είτε ακολουθώντας την μέθοδο της ετερόλογης έκφρασης.

2.5.7. Διαλογή στελεχών

2.5.7.1. Σε τρυβλία – «πίτες»

Οι αποικίες που προέκυψαν στα παραπάνω τρυβλία αποτελούνται θεωρητικά μόνο από μετασχηματισμένα κύτταρα, τα οποία έχουν ενσωματώσει μία ή περισσότερες φορές τον γραμμικοποιημένο πλασμιδιακό φορέα στο γονιδιώμά τους με ομόλογο ανασυνδυασμό. Για την καλύτερη οργάνωση αυτών των στελεχών και την προετοιμασία τους για υγρή καλλιέργεια δημιουργήθηκαν τρυβλία – «πίτες», με θρεπτικό μέσο YPD (ή YPDS)/άγαρ/ζεοσίνη 100 μ g/mL.

Τα τρυβλία αυτά χωρίστηκαν σε 10 ίσες περιοχές, σε κάθε μία από τις οποίες επιστρώθηκε μία από τις μετασχηματισμένες αποικίες. Έτσι επιλέχθηκαν έως και 30 στελέχη που επιστρώθηκαν σε 3 τέτοια τρυβλία, για κάθε ένζυμο. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 30 °C για 1 – 2 d. Τα στελέχη που φάνηκε να είχαν μεγαλύτερη ανάπτυξη επιλέχθηκαν για περαιτέρω έλεγχο.

2.5.7.2. Σε υγρές καλλιέργειες

Για τον έλεγχο της ύπαρξης του ετερόλογου γονιδίου, της παραγωγικότητας έκφρασης και γενικότερα τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των στελεχών που δημιουργούνται, πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες ακολουθώντας τροποποιημένο πρωτόκολλο ετερόλογης έκφρασης ενζύμων σε *P. pastoris*:

1. Ανάπτυξη σε τρυβλίο: Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε τρυβλίο YPD/άγαρ/ζεοσίνη 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ πριν την υγρή καλλιέργεια. Αυτό το τρυβλίο ήταν το τρυβλίο με τις πίτες όταν τα στελέχη χρησιμοποιούνταν εντός μίας εβδομάδας. Σε διαφορετική περίπτωση προετοιμάζονταν καινούργια τρυβλία.
2. Υγρή προκαλλιέργεια: Ακολούθησε υγρή προκαλλιέργεια σε 10 mL θρεπτικού μέσου BMGY μέσα σε αποστειρωμένους σωλήνες falcon 50 mL με τρύπα διαμέτρου περίπου 2.5 mm στο καπάκι για αερισμό και καλυμμένα με αλουμινοχαρτό. Ο εμβολιασμός με το κάθε στέλεχος έγινε με αποστειρωμένο κίτρινο tip πιπέτας με το οποίο συλλέχθηκε αρκετό κυτταρικό υλικό από το τρυβλίο και ελευθερώθηκε μέσα στο θρεπτικό μέσο. Για την εξασφάλιση ικανοποιητικής ανάδευσης τα falcon τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα με κλίση 45° σε βάση 24 θέσεων που κατασκευάστηκε για αυτόν τον σκοπό με τρισδιάστατη εκτύπωση (βλ. «6.2. Τρισδιάστατα εκτυπωμένη βάση επώασης Falcon 50 mL»). Επιλέχθηκαν 11 μετασχηματισμένα στελέχη και 1 μη μετασχηματισμένο στέλεχος άγριου τύπου για κάθε ετερόλογο ένζυμο. Οι προκαλλιέργειες επωάστηκαν για περίπου 24 h στους 30 °C με ανάδευση 180 rpm.
3. Υγρή καλλιέργεια: Με παρόμοιο τρόπο πραγματοποιήθηκαν οι καλλιέργειες σε 15 mL θρεπτικού μέσου BMMY+TE. Για τον εμβολιασμό των καλλιεργειών μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα, OD_{600} , των προκαλλιεργιών σε πλάκα 96 θέσεων (βλ. «2.5.11. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας OD_{600} κυτταρικών καλλιεργιών»), και υπολογίστηκε ο όγκος κυτταρικού εναιωρήματος που χρειαζόταν από κάθε προκαλλιέργεια έτσι ώστε όλες οι καλλιέργειες να έχουν αρχική οπτική πυκνότητα $OD_{600,0} = 1$. Ο όγκος αυτός μεταφέρθηκε σε falcon 15 mL τα οποία φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο συλλέχθηκε για μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford (βλ. «2.5.12. Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford») και ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE (βλ. «2.5.14. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης»). Τα κύτταρα επανεωρήθηκαν σε BMMY+TE και εμβολιάστηκαν οι καλλιέργειες. Έπειτα επωάστηκαν για 4 d στους 30 °C με ανάδευση 180 rpm, με ημερήσια λήψη δείγματος 1.1 mL και προσθήκη καθαρής μεθανόλης ίσης με το 0.5% του όγκου της καλλιέργειας μετά την δειγματοληψία. Τα δείγματα συλλέχθηκαν για μετρήσεις οπτικής πυκνότητας OD_{600} σε πλάκα 96 θέσεων πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford και ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE.

2.5.7.3. Επιλογή καλύτερου στελέχους

Με βάση την καμπύλη ανάπτυξης που προκύπτει από τις μετρήσεις οπτικής πυκνότητας OD_{600} , την πρωτεϊνική συγκέντρωση στο υπερκείμενο υγρό όπως προκύπτει από την μέθοδο Bradford, την ειδική πρωτεϊνική συγκέντρωση διαιρώντας την πρωτεϊνική συγκέντρωση με την οπτική πυκνότητα και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE επιλέχθηκαν 2 ενδιαφέροντα στελέχη από κάθε γονίδιο και 1 μη μετασχηματισμένο στέλεχος άγριου τύπου για καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας (βλ. «2.5.10. Υψηλός καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας»).

Στα κλάσματα του καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας μετρήθηκε η πρωτεϊνική συγκέντρωση με τη μέθοδο Bradford (βλ. «2.5.12. Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford»). Από τα αποτελέσματα αυτά επιλέχθηκε το τελικό στέλεχος για κάθε γονίδιο.

2.5.8. Ετερόλογη έκφραση

Τα επιλεγμένα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν για μεγαλύτερες υγρές καλλιέργειες με σκοπό την παραγωγή μεγάλης ποσότητας των ενζύμων. Η διαδικασία ήταν η εξής:

4. Ανάπτυξη σε τρυβλίο: Κάθε στέλεχος αναπτύχθηκε σε τρυβλίο YPD/άγαρ/ζεοσίνη 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ πριν την υγρή καλλιέργεια.
5. Υγρή προκαλλιέργεια: Ακολούθησε υγρή προκαλλιέργεια σε 50 mL θρεπτικού μέσου BMGY σε κωνική φιάλη 250 mL κλεισμένη με ταπόνα για αερισμό διατηρώντας τις αποστειρωμένες συνθήκες. Ο εμβολιασμός με το κάθε στέλεχος έγινε με αποστειρωμένο κίτρινο tip πιπέτας με το οποίο συλλέχθηκε αρκετό κυτταρικό υλικό από το τρυβλίο και ελευθερώθηκε μέσα στο θρεπτικό μέσο. Οι προκαλλιέργειες επωάστηκαν για περίπου 24 h στους 30 °C με ανάδευση 180 rpm.

6. Υγρή καλλιέργεια: Παρόμοια πραγματοποιήθηκαν οι καλλιέργειες σε 500 mL θρεπτικού μέσου BMMY+TE. Για τον εμβολιασμό των καλλιιεργειών μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα, OD_{600} , των προκαλλιιεργειών σε κυβελίδα (βλ. «2.5.11. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας OD_{600} κυτταρικών καλλιιεργειών»), και υπολογίστηκε ο όγκος κυτταρικού εναιωρήματος που χρειαζόταν έτσι ώστε η κάθε καλλιιεργεια να έχει αρχική οπτική πυκνότητα $OD_{600_0} = 1$. Ο όγκος αυτός μεταφέρθηκε σε falcon 50 mL, το οποίο φυγοκεντρήθηκε και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Τα κύτταρα επανεωρήθηκαν σε BMMY+TE και εμβολιάστηκαν οι καλλιιεργειες. Έπειτα επωάστηκαν για 4 d στους 20 °C με ανάδευση 180 rpm. Καθημερινά γινόταν προσθήκη 2.5 mL μεθανόλης (ίσης δηλαδή με το 0.5 % του όγκου της καλλιιεργειας) είτε με πιπέτα είτε με αντλία – σύριγγας που κατασκευάστηκε για αυτό το πείραμα (βλ. «6.3. Αυτόματο τίσμα»).

2.5.9. Καθαρισμός ενζύμων (down stream processing)

Μετά την ετερόλογη έκφραση ακολούθησε το λεγόμενο «down stream processing» που περιγράφει τις διεργασίες που συμβαίνουν μετά την κυτταρική καλλιιεργεια. Σε αυτό ανήκουν και οι διεργασίες αρχικού καθαρισμού (φυγοκέντρηση, διήθηση), που έχουν σκοπό την απομάκρυνση αιωρούμενων στερεών από το δείγμα, η συμπύκνωση του δείγματος έτσι ώστε να είναι πιο διαχειρίσιμος ο όγκος του και συμβατός με τις υπόλοιπες διεργασίες και τέλος ο υψηλός καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας.

2.5.9.1. Φυγοκέντρηση

Αρχικά τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 7500 × g για 15 min στους 4 °C. Με αυτόν τον τρόπο διαχωρίστηκαν τα κύτταρα από το εξωκυτταρικό υγρό που περιείχε τα ένζυμα ενδιαφέροντος.

2.5.9.2. Διήθηση

Έπειτα τα δείγματα φιλτραρίστηκαν σε συσκευή διήθησης με την βοήθεια αντλίας κενού σε τρία στάδια:

1. Διηθητικό χαρτί για την αφαίρεση μεγάλων σωματιδίων όπως σκόνη.
2. Φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 μm και διάμετρο 47 mm.
3. Φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.22 μm και διάμετρο 47 mm.

2.5.9.3. Συμπύκνωση

Για την πραγματοποίηση χρωματογραφίας συγγένειας σε εργαστηριακή κλίμακα με τον τρόπο που περιγράφεται παρακάτω, απαιτείται η συμπύκνωση των δειγμάτων σε όγκο περίπου 50 mL. Επομένως χρησιμοποιήθηκε υπερδιήθηση (βλ. «2.5.13.2. Υπερδιήθηση») για την συμπύκνωση των δειγμάτων που είχαν όγκο περίπου 500 mL.

2.5.10. Υψηλός καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας

Η βασική αρχή της μεθόδου περιγράφεται παραπάνω (βλ. «1.3.5. Καθαρισμός ενζύμων με χρωματογραφία συγγένειας»). Χρησιμοποιήθηκε στήλη βαρύτητας «Econo-Pac» της εταιρείας BIORAD, πακεταρισμένη με περίπου 5 mL ρητίνης «TALON® Superflow» της εταιρείας Clontech Laboratories που αποτελείται από μπίλιες αгарόζης με ακινητοποιημένο χηλικό παράγοντα φορτισμένο με ιόντα Co^{2+} και χωρητικότητα $5 - 18 \frac{mg \text{ πρωτεΐνης}}{mL \text{ μέσου}}$ ^{68,69}.

2.5.10.1. Προετοιμασία ρυθμιστικών διαλυμάτων

Για τον καθαρισμό χρειάζονται 3 ρυθμιστικά διαλύματα: το ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης (binding buffer), το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (wash buffer) και το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (elution buffer). Χρειάζεται επίσης για την προετοιμασία των δειγμάτων το πυκνότερο ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης 10X. Οι συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (ελαφρώς τροποποιημένες από τις προτεινόμενες) είναι:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης 10X: 500 mM Tris/HCl, 3 M NaCl, pH 8.0
2. Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης: 50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0
3. Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης: 50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο, pH 8.0
4. Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης: 50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 100 mM ιμιδαζόλιο, pH 8.0

Το πρώτο παρασκευάζεται με απλή διάλυση των συστατικών του σε υπερκάθαρο νερό και ρύθμιση του pH και τα υπόλοιπα προκύπτουν από την αραιώση αυτού και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ιμιδαζολίου αν χρειάζεται.

2.5.10.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Μετά από φιλτράρισμα σε φίλτρα με πόρους 0.45 μm και 0.22 μm , και αν χρειάζεται και συμπίκνωση με υπερδιήθηση ή περιστρεφόμενες στήλες (βλ. «2.5.13.1. Περιστρεφόμενες στήλες») τα δείγματα πρέπει να προσαρμοστούν στις συνθήκες του ρυθμιστικού διαλύματος δέσμησης είτε με την προσθήκη του πυκνότερου ρυθμιστικού διαλύματος δέσμησης 10X, είτε με εναλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος με διαπίδυση (dialysis). Επιλέχθηκε το πρώτο που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι πιο απλό χωρίς κάποιο μειονέκτημα.

2.5.10.3. Πρωτόκολλο καθαρισμού

Εφόσον τα παραπάνω είναι έτοιμα μπορεί να ξεκινήσει η διαδικασία καθαρισμού των ετερόλογων ενζύμων με χρωματογραφία συγγένειας. Τα παρακάτω συστατικά προστίθενται σε σειρά στην στήλη σε συγκεκριμένο όγκο (CV = όγκος στήλης), με προσεκτική απόχυση στα τοιχώματα, ώστε να μην επαναιωρηθεί η ρητίνη (Πίνακας 5). Επίσης σημειώνονται τα κλάσματα που συλλέγονται και το όνομα με το οποίο αναφέρονται.

Πίνακας 5: Πρωτόκολλο χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη βαρύτητας		
Συστατικό	Όγκος (CV)	Συλλογή
Υπερκάθαρο νερό	10	–
Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης	10	–
Εξισοροπημένο δείγμα (Sample)	Το πολύ 10	Συλλογή ως «Flowthrough»
Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης (Equilibration)	6	Συλλογή ως «Equilibration»
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (Wash)	3	Συλλογή 3 κλασμάτων ξεχωριστά ως «Wash 1, 2 και 3»
Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (Elusion)	3	Συλλογή 3 κλασμάτων ξεχωριστά ως «Elusion 1, 2 και 3»
Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης	5	–
Υπερκάθαρο νερό	2	–
20% Αιθανόλη	1.5	–

2.5.11. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας OD_{600} κυτταρικών καλλιιεργειών

Για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, OD_{600} , κυτταρικών καλλιιεργειών κατά την διάρκεια των πειραμάτων αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές μέθοδοι ανάλογα με το αν η μέτρηση γίνεται σε κυψελίδα με μήκος διαδρομής 1 cm ή σε πλάκα 96 θέσεων. Σε κάθε περίπτωση ως τυφλό δείγμα (blank) χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό αντί για το κυτταρικό εναιώρημα. Ακόμα καλύτερο τυφλό δείγμα είναι το ίδιο το θρεπτικό μέσο χωρίς τα κύτταρα. Ωστόσο σε όλα τα στάδια αυτού του πειράματος δεν χρειάστηκε μεγάλη ακρίβεια στις μετρήσεις οπτικής πυκνότητας και δεν χρησιμοποιήθηκε διόρθωση.

2.5.11.1. Σε κυψελίδα

Λαμβάνεται δείγμα 100 μL από την κυτταρική καλλιέργεια και με την προσθήκη 900 μL απιονισμένου νερού αραιώνεται μέσα στην κυψελίδα 10 φορές. Η απορρόφηση της κυψελίδας στα 600 nm μετρείται σε φωτόμετρο Shimadzu UV-1280 και είναι τελικά:

$$OD_{600\text{corrected}} = \left(OD_{600\text{cuvette}} - OD_{600\text{cuvetteblank}} \right) * \frac{1000 \mu\text{L}}{100 \mu\text{L}} \quad (2.1)$$

Όπου:

- $OD_{600\text{corrected}}$: Η διορθωμένη οπτική πυκνότητα
- $OD_{600\text{cuvette}}$: Η οπτική πυκνότητα που μετρείται
- $OD_{600\text{cuvetteblank}}$: Η οπτική πυκνότητα του κενού δείγματος, συνήθως 0

- $\frac{1000 \mu L}{100 \mu L}$: Παράγοντας αραίωσης

2.5.11.2. Σε πλάκα 96 θέσεων

Λαμβάνεται δείγμα 25 μL από την κυτταρική καλλιέργεια και τοποθετείται σε πηγάδι πλάκας 96 θέσεων. Έπειτα πραγματοποιείται αραίωση με 225 μL απιονισμένου νερού. Η πλάκα τοποθετείται σε φωτόμετρο Spectra Max ABS Plus, Molecular Devices, επιλέγεται ανακίνηση για 5 sec και μετρείται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm. Η μέτρηση διορθώνεται στην αντίστοιχη που θα προέκυπτε σε κυψελίδα 1 cm ως εξής:

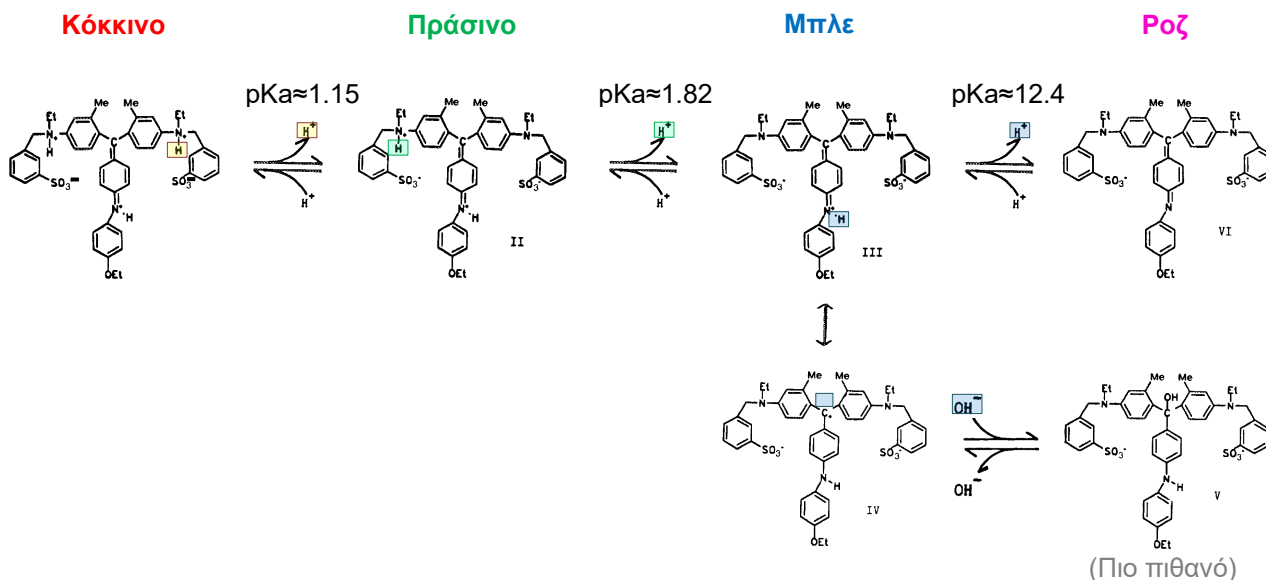
$$OD_{600_{corrected}} = (OD_{600_{plate}} - OD_{600_{plate_{blank}}}) * \frac{250 \mu L}{25 \mu L} * \frac{10 mm}{6.7 mm} \quad (2.2)$$

Όπου:

- $OD_{600_{corrected}}$: Η διορθωμένη οπτική πυκνότητα
- $OD_{600_{plate}}$: Η οπτική πυκνότητα που μετρείται
- $OD_{600_{plate_{blank}}}$: Η οπτική πυκνότητα του κενού δείγματος, συνήθως 0
- $\frac{250 \mu L}{25 \mu L}$: Παράγοντας αραίωσης
- $\frac{10 mm}{6.7 mm}$: Διόρθωση μήκους διαδρομής από τα 6.7 mm που είναι στην πλάκα στα 10 mm που είναι στην κυψελίδα

2.5.12. Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford (Bradford assay)

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (συντ. Coomassie G-250). Σε όξινες συνθήκες το Coomassie G-250 είναι κόκκινο, σε ουδέτερες συνθήκες πράσινο και σε αλκαλικές μπλέ ή ροζ (Σχήμα 28).⁷⁰



Σχήμα 28: Οι μορφές και το χρώμα του Coomassie Brilliant Blue G-250 ανάλογα το pH.⁷⁰

Για να δεσμευτεί το Coomassie G-250 από πρωτεΐνη πρέπει να είναι διπλά πρωτονιωμένο (κόκκινη μορφή). Σε επαφή με πρωτεΐνη μεταφέρεται ένα e^- από το Coomassie G-250 σε κάποια φορτισμένη ομάδα της πρωτεΐνης αλλάζοντας την μορφή της και δημιουργώντας υδρόφοβες περιοχές πάνω της. Η χρωστική δεσμεύεται από αυτές τις περιοχές με τις ομάδες σουλφονικού οξέος να δεσμεύονται από θετικά φορτισμένες αμίνες. Η σταθερά δεσμευμένη χρωστική Coomassie G-250 είναι αποπρωτονιωμένη (μπλε μορφή).⁷¹

2.5.12.1. Παρασκευή αντιδραστηρίου

Η παρασκευή του αντιδραστηρίου Bradford είναι πολύ απλή, ωστόσο θέλει **προσοχή** να προστίθεται αργά το οξύ στο νερό και όχι το αντίθετο, καθώς και βασικά μέτρα προστασίας (γυαλιά, γάντια). Για 1 L αντιδραστηρίου:

1. Διαλύονται 50 mg Coomassie G-250 σε 50 mL μεθανόλη.
2. Προστίθενται 100 mL 85% H_3PO_4 (φωσφορικό οξύ) στο παραπάνω διάλυμα.
3. Το παραπάνω διάλυμα **αποχύνεται αργά** σε 500 mL υπερκάθαρο νερό.
4. Το παραπάνω διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο 0.22 μm .
5. Προστίθενται επιπλέον 350 mL υπερκάθαρου νερού.

Το αντιδραστήριο Bradford είναι έτοιμο και αποθηκεύεται στους 4 °C.

2.5.12.2. Χρήση αντιδραστηρίου

Σε πλάκα 96 θέσεων προστίθενται 250 μL του παραπάνω αντιδραστηρίου σε όσα πηγάδια πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δείγματος. Προστίθενται επίσης 250 μL σε κάποιο πηγάδι για τυφλό δείγμα (blank).

Στα πηγάδια που περιέχουν το αντιδραστήριο Bradford προστίθενται 5 μL ή 25 μL πρωτεϊνικού δείγματος, ανάλογα την αναμενόμενη πρωτεϊνική συγκέντρωση και το εύρος της καμπύλης αναφοράς που χρησιμοποιείται. Στο πηγάδι με το τυφλό δείγμα προστίθενται 5 μL ή 25 μL υπερκάθαρου νερού αντίστοιχα.

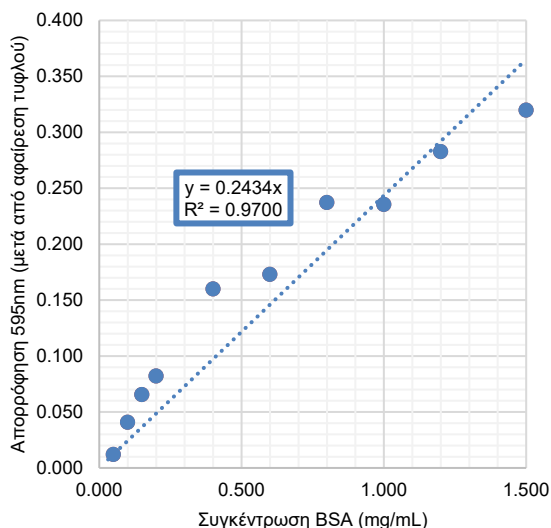
Η πλάκα τοποθετείται σε φωτόμετρο Spectra Max ABS Plus, Molecular Devices, επιλέγεται ανακίνηση για 5 sec και μετρείται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. Από την τιμή της απορρόφησης, προκύπτει η πρωτεϊνική συγκέντρωση με βάση την καμπύλη αναφοράς.

2.5.12.3. Καμπύλη αναφοράς

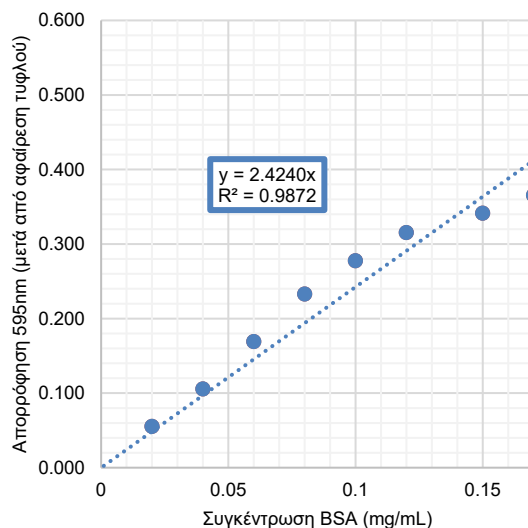
Δημιουργήθηκαν καμπύλες αναφοράς για 5 μL και 25 μL πρωτεϊνικού δείγματος για τις ανάγκες του πειράματος (Σχήμα 29). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) για την παρασκευή πρωτεϊνικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης:

- 0.050, 0.100, 0.150, 0.200, 0.400, 0.600, 0.800, 1.000, 1.200 και 1,500 $\frac{mg\ BSA}{mL}$ για τα 5 μL
- 0.020, 0.040, 0.060, 0.080, 0.100, 0.120, 0.150 και 0.170 $\frac{mg\ BSA}{mL}$ για τα 25 μL

a.



b.



Σχήμα 29: Καμπύλες αναφοράς για το αντιδραστήριο Bradford που παρασκευάστηκε a. για 5 μL πρωτεϊνικού δείγματος + 250 μL αντιδραστηρίου (εύρος μέτρησης: 0.050 – 1.500 mg/mL) και b. 25 μL πρωτεϊνικού δείγματος + 250 μL αντιδραστηρίου (εύρος μέτρησης: 0.020 – 0.170 mg/mL).

2.5.12.4. Περιορισμοί

Ενώ η μέθοδος Bradford για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης είναι εύκολη και γρήγορη με μεγάλη ευαισθησία και συμβατότητα με πολλά ρυθμιστικά διαλύματα, υπάρχουν και ορισμένα μειονεκτήματα που είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψιν:⁷²

- Είναι μη συμβατή μέθοδος με επιφανειοδραστικές ουσίες, όπως πολλά απορρυπαντικά.
- Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πρωτεΐνες με χαμηλή διαλυτότητα σε όξινα διαλύματα.
- Η απορρόφηση μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνών της ίδιας συγκέντρωσης.
- Έχει υψηλή ευαισθησία στα αλκαλικά αμινοξέα: αργινίνη, ιστιδίνη και λυσίνη. Πρωτεΐνες με πολλά από αυτά τα αμινοξέα στην επιφάνειά τους μπορεί να έχουν μεγαλύτερη απορρόφηση ή και το αντίθετο.
- Λερώνει γυάλινα σκεύη, κυψελίδες χαλαζία, ρούχα και δέρμα.

2.5.13. Τρόποι συμπύκνωσης

Ανάλογα με τον όγκο και τον αριθμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε διαφορετική μέθοδος για την συμπύκνωσή τους. Όταν χρειαζόταν συμπύκνωση για την προετοιμασία δειγμάτων που προορίζονταν για ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE), γινόταν χρήση περιστροφικών στηλών του 0.5 mL. Όταν ο όγκος του δείγματος ήταν πολύ μεγάλος (π.χ. 500 mL) χρησιμοποιούνταν η μέθοδος της υπερδιήθησης. Επίσης δοκιμάστηκε σε ένα πείραμα και η καθίζηση θειικού αμμωνίου με σκοπό την γρήγορη συμπύκνωση 30 δειγμάτων των 50 mL. Η συμπύκνωση αποτελεί και μέθοδο αλλαγής ρυθμιστικού διαλύματος.

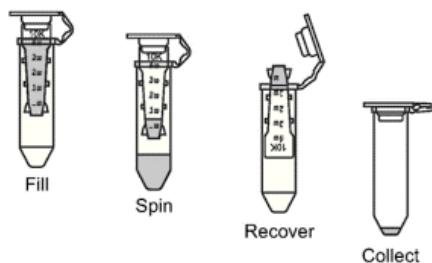
2.5.13.1. Περιστρεφόμενες στήλες

Για την συμπύκνωση μικρών όγκων δειγμάτων (έως 1 mL) χρησιμοποιήθηκαν περιστρεφόμενες στήλες «Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit, Ultracel-10 regenerated cellulose membrane» με όριο μοριακού βάρους 10 kDa, της εταιρείας Merck Millipore. Συνήθως αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE) (βλ. «2.5.14. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης»).

Η χρήση τους είναι πολύ απλή (Σχήμα 30):

1. Αρχικά ξεπλένονται οι στήλες με απιονισμένο νερό αν έχουν χρησιμοποιηθεί ξανά.
2. Έπειτα φορτώνονται έως και 500 μL δείγματος.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14000 $\times g$ σε θερμοκρασία 4 °C για την σταθερότητα των πρωτεϊνών.
4. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 2 και 3 αν είναι επιθυμητή η συμπύκνωση επιπλέον δείγματος.
5. Το συμπυκνωμένο δείγμα ανακτάται με πιπέτα ή με φυγοκέντρηση τοποθετώντας την στήλη ανάποδα.
6. Η στήλη ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και αποθηκεύεται με 20% αιθανόλη για μελλοντική χρήση.

Τυπικά ο τελικός όγκος είναι 20 μL .⁷³

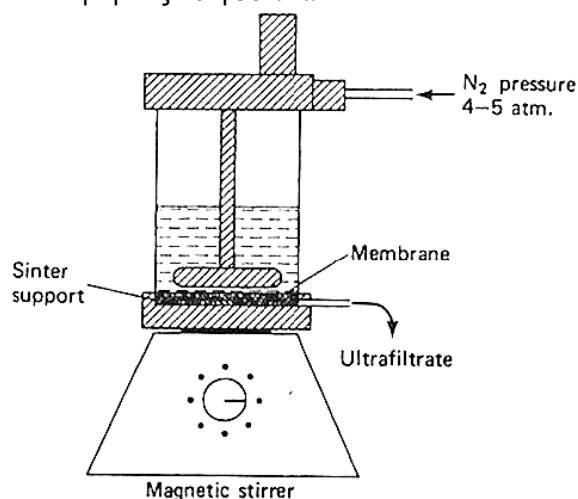


Σχήμα 30: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου χρήσης περιστρεφόμενων στηλών για την συμπύκνωση πρωτεϊνικών δειγμάτων.⁷⁴

2.5.13.2. Υπερδιήθηση

Η υπερδιήθηση είναι μέθοδος συμπύκνωσης στην οποία μόρια με χαμηλό μοριακό βάρος όπως το νερό αφαιρούνται από το πρωτεϊνικό δείγμα διαπερνώντας μία μεμβράνη με την βοήθεια διαφοράς πίεσης (Σχήμα 31). Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος κατακρατείται και δεν διαπερνά την μεμβράνη με αποτέλεσμα την συμπύκνωσή της.

Στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε συσκευή «Amicon stirred cell» της εταιρείας Merck Millipore, με μεμβράνες της ίδιας εταιρείας με όριο μοριακού βάρους 10 ή 30 *kDa*.



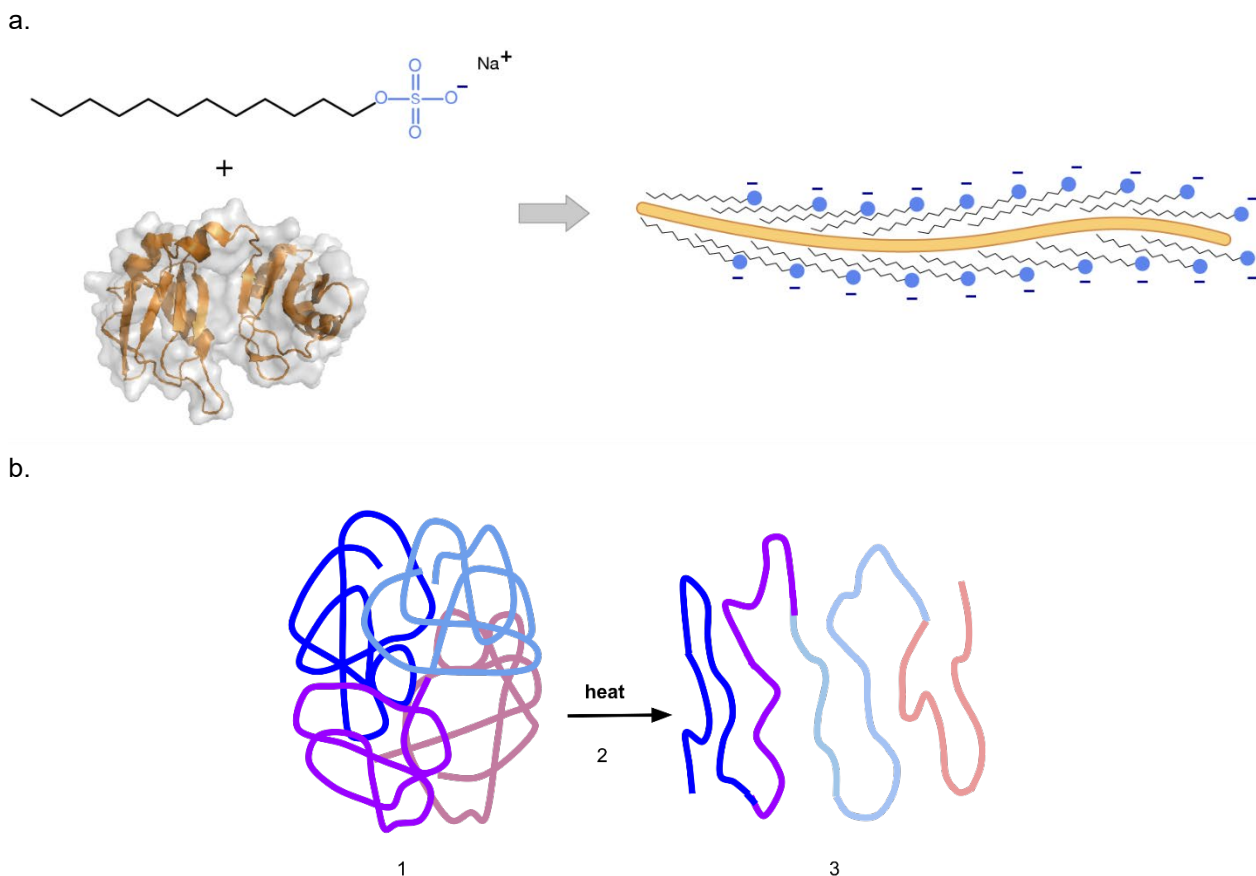
Σχήμα 31: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου υπερδιήθησης σε εργαστηριακή κλίμακα.⁷⁵

Η χρήση της συσκευής είναι πολύ απλή:

1. Συναρμολογείται η συσκευή με την επιθυμητή μεμβράνη 10 ή 30 *kDa*.
2. Ακολουθεί ξέπλυμα της μεμβράνης που μπορεί να έχει χρησιμοποιηθεί ξανά με αραιό διάλυμα *NaOH* και έπειτα απιονισμένο νερό.
3. Φορτώνεται πρωτεϊνικό δείγμα έως και 400 *mL*.
4. Η συσκευή συνδέεται με το δίκτυο αέρα υψηλής πίεσης μέσω μειωτήρα και επιλέγεται η μέγιστη πίεση που συνιστά ο κατασκευαστής της μεμβράνης.
5. Φορτώνεται επιπλέον δείγμα αν δεν χωρούσε όλο στην αρχή.
6. Παραλαμβάνεται το συμπυκνωμένο δείγμα και ξεπλένεται η μεμβράνη με αραιό διάλυμα *NaOH* και απιονισμένο νερό και φυλάσσεται σε 20% αιθανόλη.

2.5.14. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis) είναι μία τεχνική για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό βάρος τους.⁷⁶ Η μήτρα πολυακρυλαμίδης βρίσκεται ανάμεσα σε δύο γυάλινες πλάκες, κλειστή σε 2 απέναντι πλευρές και ανοιχτή στις άλλες 2 όπου βρίσκονται η άνοδος και η κάθοδος αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται με SDS (ή και με θερμότητα αν είναι ανθεκτικές σε αυτό) και σχηματίζουν αρνητικά φορτισμένο γραμμικό σύμπλεγμα (Σχήμα 32). Έτσι και οι πρωτεΐνες με όξινο και οι πρωτεΐνες με αλκαλικό ή ουδέτερο ισοηλεκτρικό σημείο, *pI*, μπορούν να διαχωριστούν με βάση μόνο το μεγεθός τους. Περίπου 1.4 *g* SDS δεσμεύεται από 1 *g* πρωτεΐνης.⁷⁷



Σχήμα 32: Αποδιάταξη πρωτεΐνης a. με θειικό δωδεκύλιο νάτριο (SDS) και b. με θερμότητα. (CC BY-SA 4.0)^{78,79}

Οι πρωτεΐνες τοποθετούνται σε πηγάδια στο πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) που βρίσκεται στην κάθοδο (–) και με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου μεταναστεύουν προς την άνοδο (+), η κάθε μία με διαφορετική ταχύτητα. Έτσι διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος στο πήκτωμα διαχωρισμού (resolving/separating gel).⁷⁷

2.5.14.1. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Στα πλαίσια αυτού του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμίδης μεγέθους $8.3\text{ cm} \times 7.3\text{ cm} \times 1.5\text{ mm}$ με το σύστημα ηλεκτροφόρησης «Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell» της BIORAD, και συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης στο πήκτωμα διαχωρισμού 10% *v/v* και στο πήκτωμα πακεταρίσματος 4% *v/v*.

Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στην διαχείριση των συστατικών του πηκτώματος, επομένως απαιτούνται βασικά μέτρα ασφαλείας (γυαλιά, γάντια). Η διαδικασία παρασκευής πηκτώματος πολυακρυλαμίδης που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

Αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού με την προσθήκη των παρακάτω συστατικών σε σειρά (Πίνακας 6) και απόχυσης του μείγματος στον γυάλινο θάλαμο μέχρι την γραμμή πλήρωσης. Μετά από περίπου 30 *min* το πήκτωμα διαχωρισμού είναι έτοιμο. Ετοιμάζεται το μείγμα για το πήκτωμα πακεταρίσματος, το οποίο προστίθεται πάνω από το προηγούμενο μέχρι την γραμμή πλήρωσης και τοποθετείται το «χτενάκι» που διαμορφώνει τα πηγάδια για τα πρωτεϊνικά δείγματα. Μετά από περίπου 30 *min* το πήκτωμα είναι έτοιμο.

Πίνακας 6: Υλικά για την Παρασκευή ενός πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 1.5 mm για το σύστημα Mini-PROTEAN της BIORAD				
	Stacking gel	Resolving gel		
	4%	7.5%	10%	12.5%
dH ₂ O	1.5 mL	2.9 mL	2.3 mL	1.7 mL
0.75 M Tris/SDS 0.2% w/v (pH 8.8)	-	4.7 mL	4.7 mL	4.7 mL
0.25 M Tris/SDS 0.2% w/v (pH 6.8)	1.9 mL	-	-	-
40% v/v bis-acrylamide	0.38 mL	1.76 mL	2.35 mL	2.94 mL
TEMED	7.5 μL	10 μL	10 μL	10 μL
10% w/v APS (fresh)	25 μL	50 μL	50 μL	50 μL

2.5.14.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Ιδανικά γίνονται οι απαραίτητες συμπυκνώσεις (ή αραιώσεις) έτσι ώστε κάθε δείγμα να έχει περίπου 30 μg πρωτεΐνης και μέγιστο όγκο 40 μL , τα οποία μετά την προετοιμασία αντιστοιχούν σε 30 μg πρωτεΐνης/πηγάδι. Σε κάποιες περιπτώσεις σε αυτό το πείραμα δεν έγινε αυτό και φορτώθηκε μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης. Δεν είναι λάθος, απλά δυσκολεύει την ανάλυση των αποτελεσμάτων η υπερφόρτωση δείγματος. Αντίστοιχα η φόρτωση μικρότερης ποσότητας δείγματος δεν επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνών χαμηλής συγκέντρωσης. Χρειάζεται επίσης η παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων 5X (SDS sample buffer 5X). Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στην διαχείριση της β – μερκαπτοαιθανόλης, η οποία προστίθεται για το σπάσιμο των δισουλφιδικών δεσμών.⁸⁰

Το SDS sample buffer 5X αποτελείται από:

1. 312.5 mM Tris-Cl pH 6.8
2. 10% w/v SDS
3. 50% v/v γλυκερόλη
4. 25% v/v β -μερκαπτοαιθανόλη
5. 0.25% w/v μπλε της βρωμοθυμόλης

Τα παραπάνω συστατικά προστίθενται σε σειρά από αντίστοιχα διαλύματα έτσι ώστε να επιτευχθούν οι παραπάνω συγκεντρώσεις.

Στην συνέχεια, σε Eppendorf 1.5 mL προστίθενται 40 μL πρωτεϊνικού δείγματος και 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων 5X. Τα δείγματα είτε επωάζονται ολονυχτίς στο διάλυμα είτε ζεσταίνονται στους 100 °C σε βραστό νερό για 15 min. Έπειτα είναι έτοιμα για φόρτωση.

2.5.14.3. Ηλεκτροφόρηση

Για την ηλεκτροφόρηση χρειάζεται η παρασκευή ενός ακόμα αντιδραστήριου, του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (SDS running buffer 1X). Συνήθως παρασκευάζεται πυκνότερο διάλυμα 10X και αραιώνεται πριν την χρήση.

Το SDS running buffer 10X αποτελείται από:

1. 250 mM Tris pH 8.3
2. 1.92 M Glycine
3. 1% w/v SDS

Τα δύο πρώτα προστίθενται σε σκόνη, ρυθμίζεται το pH, και προστίθεται το τελευταίο σε σκόνη.

Στην συνέχεια τοποθετείται το πήκτωμα σε ειδικό κελί της συσκευής το οποίο εξασφαλίζει την μόνωση της καθόδου (-) από την άνοδο (+) και το κλείσιμο του κυκλώματος μέσω του πηκτώματος. Τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγάδια και τοποθετείται επίσης δείκτης μοριακού βάρους σε ένα από αυτά.

Η ηλεκτροφόρηση κρατάει 2 hr και αρχίζει με την εφαρμογή τάσης 50 V για 30 min και τάσης 100 V για τα επόμενα 90 min.

2.5.14.4. Χρώση και αποχρωματισμός πηκτώματος

Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης το σύστημα αποσυναρμολογείται, και το πήκτωμα τοποθετείται για επώαση σε δοχείο με διάλυμα χρώσης (coomassie brilliant blue stain, 0.25% w/v CBB G250 ή R250, 40% v/v μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) για τουλάχιστον 2 hr, αλλά καλύτερα ολονυκτίς.

Μετά την χρώση, όλο το πήκτωμα είναι μονόχρωμο βαθύ μπλε λόγω του CBB. Ωστόσο στις περιοχές που υπάρχουν πρωτεΐνες αυτό δεσμεύεται με ισχυρούς δεσμούς σε αντίθεση με τις υπόλοιπες όπου δεσμεύεται μη – ειδικά. Για την αφαίρεση της χρωστικής από αυτές τις περιοχές χρησιμοποιείται το διάλυμα αποχρωματισμού (destain, 20% v/v μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) στο οποίο και επωάζεται το πήκτωμα για τουλάχιστον 2 hr μέχρι να είναι ορατές οι πρωτεϊνικές «μπάντες» στις περιοχές όπου υπάρχουν πρωτεΐνες. Με συχνή αλλαγή του διαλύματος αποχρωματισμού επιταχύνεται η διεργασία. Μετά από τουλάχιστον ολονύκτια επώαση το πήκτωμα έχει αποχρωματιστεί πλήρως και είναι ευδιάκριτες οι πρωτεϊνικές μπάντες.

2.5.15. Αποθήκευση αποθεμάτων κυττάρων σε γλυκερόλη (glycerol stock)

Η αποθήκευση κυττάρων πραγματοποιείται συνήθως στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε διάλυμα γλυκερόλης.⁸¹ Κατά την διάρκεια του πειράματος ήταν σημαντική η αποθήκευση διαφόρων στελεχών *E. coli* και *P. pastoris*. Η αποθήκευση των στελεχών *E. coli* χρειάστηκε για την μακροχρόνια αποθήκευση των πλασμιδίων και η αποθήκευση των στελεχών *P. pastoris* χρειάστηκε για την μακροχρόνια αποθήκευση των τελικών στελεχών αλλά και άλλων στην πορεία του πειράματος.

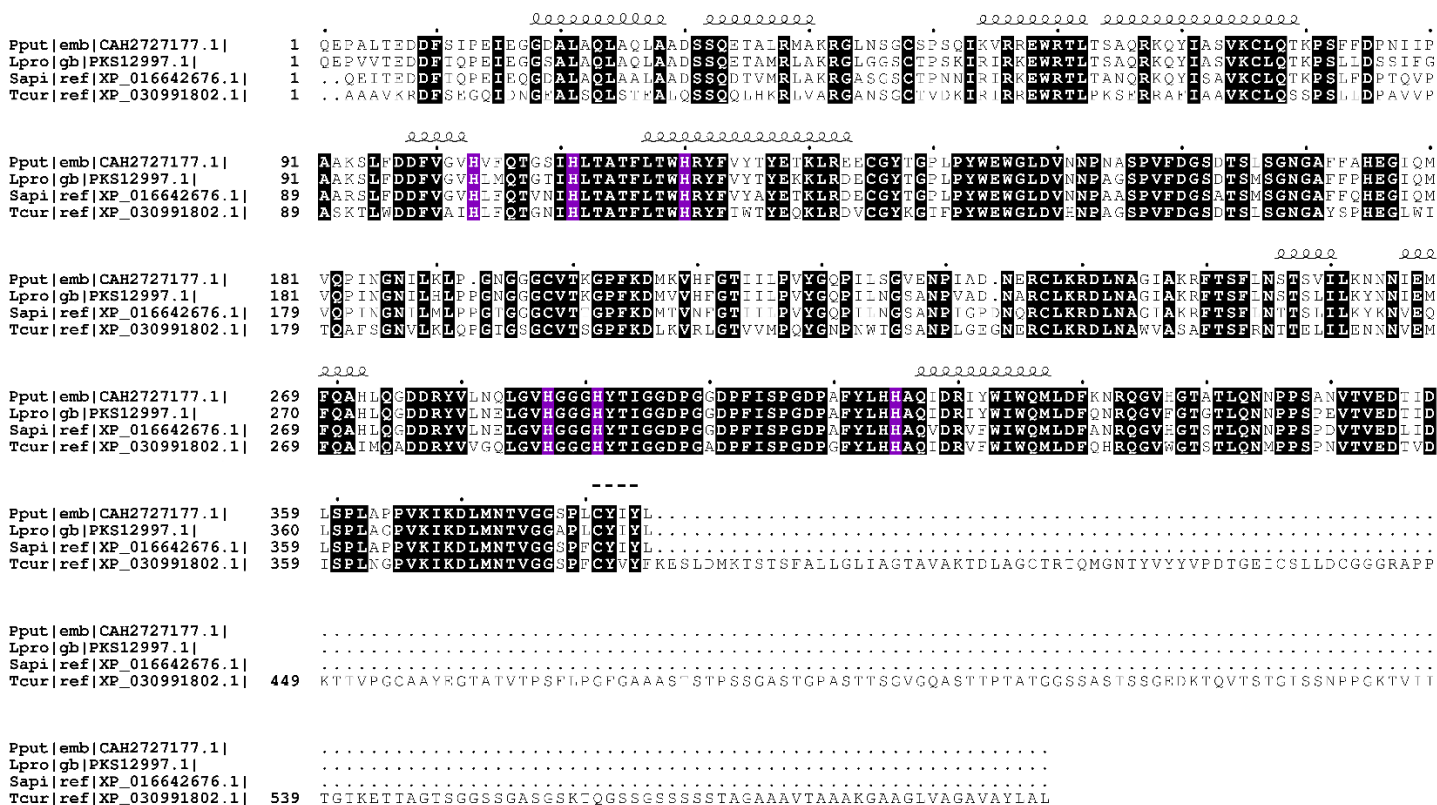
Η διαδικασία είναι η εξής (όλα τα σκεύη και τα υλικά είναι αποστειρωμένα στους $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 15 min):^{62,81}

1. Σε falcon 15 mL ή 50 mL προστίθενται το πολύ 7.5 mL ή 25 mL κυτταρικής καλλιέργειας αντίστοιχα.
2. Συμπληρώνεται ίδιος όγκος διαλύματος γλυκερόλης 50% v/v για *E. coli* ή 30% v/v για *P. pastoris* και ακολουθεί ήπια ανάδευση κλείνοντας και αναποδογυρίζοντας το σωλήνα 5 – 6 φορές έως ότου το μείγμα να είναι ομοιόμορφο.
3. Το μείγμα μοιράζεται σε Eppendorfs 1.5 mL με 0.5 – 1.0 mL στο καθένα.
4. Τα παραπάνω αποθηκεύονται στην υπερκατάψυξη στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Πολλαπλή ευθυγράμμιση υποψήφιων αιθερασών

Οι αιθεράσες *PpETH*, *Lpro*, *Sapi* και *TcETH* ευθυγραμμίστηκαν με τον αλγόριθμο CLUSTALW χωρίς το φυσικό τους σήμα έκκρισης, αφού αυτό αφαιρέθηκε με το εργαλείο SignalP 6.0.^{55,82} Επίσης προβλέφθηκε η δευτεροταγής δομή της *PpETH* με το NPS@.⁸³ Το αποτέλεσμα της πολλαπλής ευθυγράμμισης και της πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα που δημιουργήθηκε με την βοήθεια του ESPript 3.0 (Σχήμα 33):⁸⁴



Σχήμα 33: Πολλαπλή ευθυγράμμιση υποψηφίων ενζύμων. Η δευτεροταγής δομή που φαίνεται από πάνω είναι πρόβλεψη αυτής της *PpETH*. Με **μωβ** σημειώνονται οι ιστιδίνες που συμμετέχουν στον συντονισμό των δύο Cu^{2+} στο ενεργό κέντρο των ενζύμων. Με **μαύρο** σημειώνονται τα διατηρημένα αμινοξέα μεταξύ των ενζύμων.

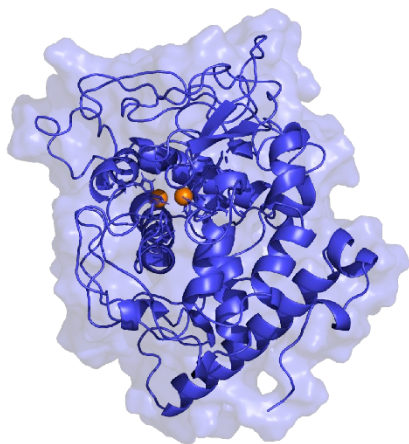
Στο παραπάνω σχήμα φαίνεται η μεγάλη ομοιότητα που έχουν αυτά τα ένζυμα αλλά και τα πολλά περισσότερα αμινοξέα που διαθέτει η *TcETH* στο C – τελικό άκρο της. Είναι λοιπόν πολύ πιθανόν να έχουν παρόμοια δράση και μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι η *TcETH* μπορεί να έχει επιπλέον ενεργό κέντρο ή να είναι διαφορετική με κάποιον άλλο τρόπο.

3.2. Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής υποψηφίων ενζύμων με μηχανική μάθηση

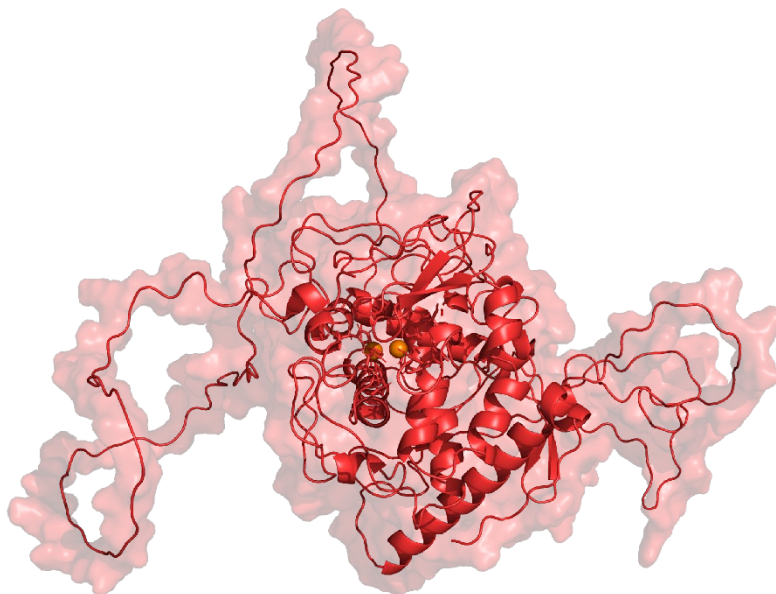
Οι προβλέψεις του μοντέλου μηχανικής μάθησης AlphaFold 2 για τις αιθεράσες *PpETH* και *TcETH* (χωρίς το φυσικό του σήμα έκκρισης), επεξεργασμένες με το πακέτο Amber μοριακής δυναμικής και ευθυγραμμισμένες ως προς την *PpETH* παρατίθενται στα παρακάτω σχήματα (Σχήμα 34, Σχήμα 35).

Σημειώνεται ότι το AlphaFold 2 δεν προβλέπει συμπαραγόντες όπως το Cu^{2+} . Για την προσθήκη του συμπαραγόντα στις παρακάτω εικόνες ευθυγραμμίστηκε με την πρόβλεψη της *PpETH* και κρύφτηκε μία πολυφαινολική οξειδάση (PPO) που έχει μελετηθεί στο εργαστήριο βιοτεχνολογίας του Ε.Μ.Π., η 6Z1S, η οποία διαθέτει επίσης ενεργό κέντρο χαλκού τύπου III και η δομή της είναι λυμένη.

a.



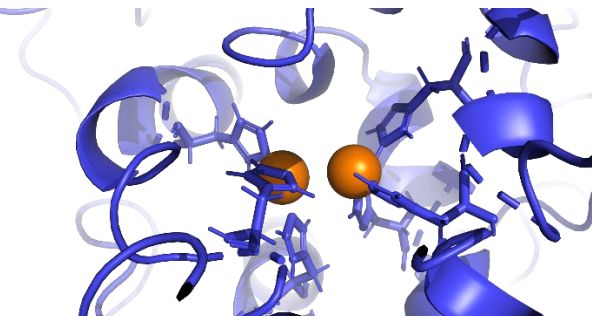
b.



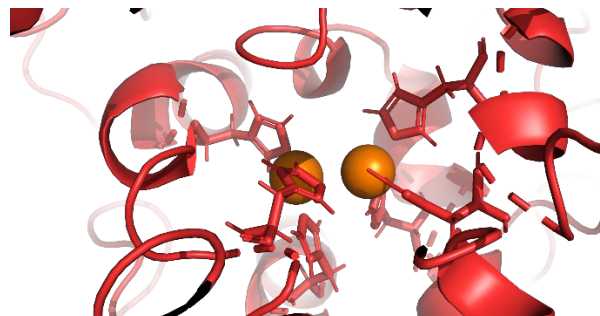
Σχήμα 34: a. *PpETH* και b. *TcETH*, προβλέψεις του AlphaFold 2 με την χρήση Amber και προσθήκη του συμπαραγόντα Cu^{2+} στο ενεργό κέντρο από παρόμοια πρωτεΐνη με λυμένη δομή (PDB: 6Z1S). Οι εικόνες δημιουργήθηκαν στο PyMOL με απεικόνιση cartoon και surface εκτός από τις 6 ιστιδίνες του ενεργού κέντρου που απεικονίζονται ως sticks.

Φαίνεται η μεγάλη ομοιότητα των *PpETH* και *TcETH* οι οποίες έχουν σχεδόν ίδια δομή στην περιοχή που υπάρχει επικάλυψη των αμινοξικών αλληλουχιών. Μετά από αυτήν την περιοχή τα επιπλέον αμινοξέα της *TcETH* δεν μπορούν να διπλωθούν από το AlphaFold 2.

a.



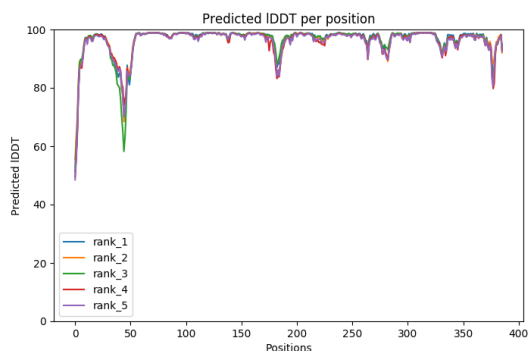
b.



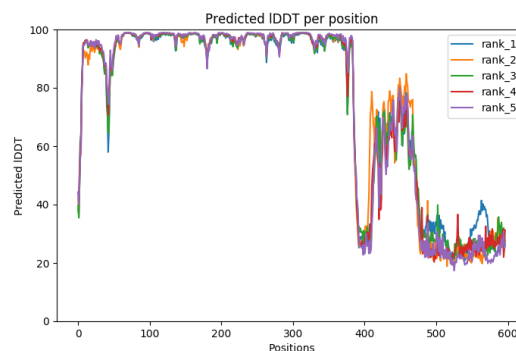
Σχήμα 35: a. *PpETH* και b. *TcETH*, εστίαση στο ενεργό κέντρο των παραπάνω πρωτεϊνών. Φαίνονται οι 6 ιστιδίνες που συντονίζουν τους συμπαραγόντες Cu^{2+} στο ενεργό κέντρο καθώς και η ομοιότητα του ενεργού κέντρου μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.

Η «σιγουριά» του AlphaFold 2 για την δομή σε όλο το μήκος της αμινοξικής ακολουθίας εκφράζεται με το μέτρο Local Distance Difference Test (IDDT).⁸⁵ Δημιουργήθηκαν 5 προβλέψεις για κάθε πρωτεΐνη με την πιο σίγουρη να είναι η rank_1, που εικονίζεται παραπάνω. Στο ακόλουθο σχήμα παρατίθεται το μέτρο pIDDT συναρτήσει της θέσης στην αμινοξική ακολουθία (Σχήμα 36):

a.



b.

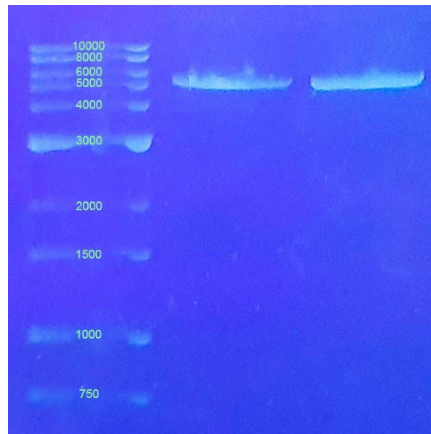


Σχήμα 36: a. PpETH και b. TcETH, μέτρο IDDT του AlphaFold 2 συναρτήσει της θέσης στην αμινοξική ακολουθία κάθε πρωτεΐνης.

Οι προβλέψεις rank_1 που έχουν το μεγαλύτερο μέσο IDDT εικονίζονται στα παραπάνω σχήματα. Φαίνεται η υψηλή «σιγουριά» του AlphaFold 2 για την δομή της TcETH μέχρι το επιπλέον κομμάτι που διαθέτει όπου και πέφτει. IDDT > 90 σημαίνει υψηλή ακρίβεια στην πρόβλεψη. 70 < IDDT < 90 σημαίνει καλή πρόβλεψη. 50 < IDDT < 70 σημαίνει ότι η πρόβλεψη δεν είναι σίγουρη. IDDT < 50 είναι κακή πρόβλεψη ή σημαίνει ότι η πρωτεΐνη είναι κανονικά αδόμητη σε εκείνη την περιοχή ή ίσως να είναι μέρος συμπλόκου πρωτεϊνών, είτε με άλλη μία ή περισσότερες ίδιες είτε με κάποια διαφορετική πρωτεΐνη.⁸⁶

3.3. Γέλη αгарόζης των γραμμικοποιημένων φορέων

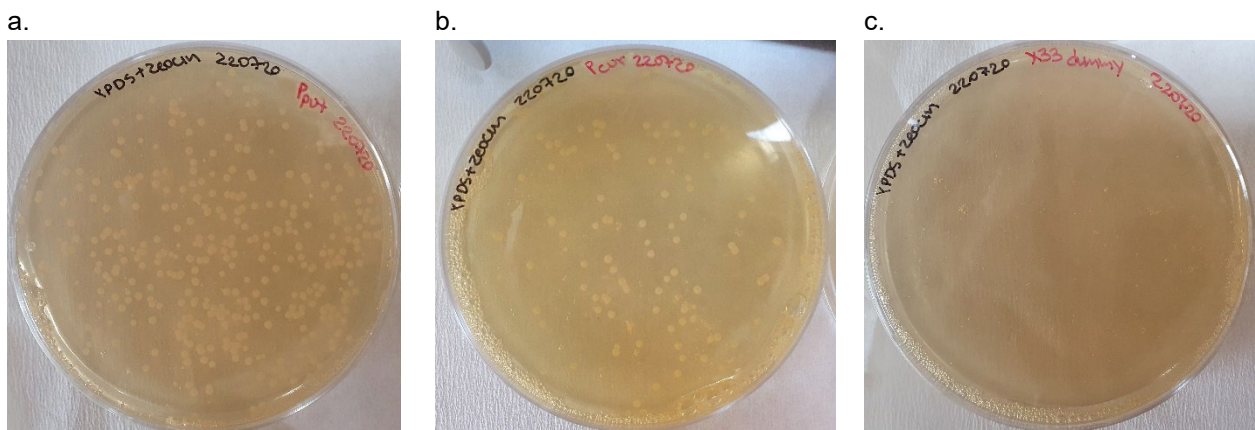
Ο έλεγχος των γραμμικοποιημένων πλασμιδιακών φορέων έδειξε ότι οι φορείς ήταν πλήρως γραμμικοποιημένοι (με το *Pme I*) και στο σωστό μέγεθος (*Tcur* (5356 bp), *PrETH* (4723 bp)) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Αποτελέσματα γέλης αгарόζης των φορέων προς μετασχηματισμό της *P. pastoris*. 1^η λωρίδα: Δείκτης μεγέθους σε bp, 2^η λωρίδα: *TcETH* (5356 bp) και 3^η λωρίδα: *PrETH* (4723 bp).

3.4. Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση

Αξιοσημείωτα είναι τα αποτελέσματα στα τελικά τρυβλία της ηλεκτροδιάτρησης, στα οποία δημιουργήθηκαν αποικίες μόνο στα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με τους ετερόλογους φορείς που προσδίδουν αντίσταση στην ζεοσίνη (Εικόνα 7 a., b.). Καμία αποικία δεν δημιουργήθηκε από κύτταρα άγριου τύπου (Εικόνα 7 c.).



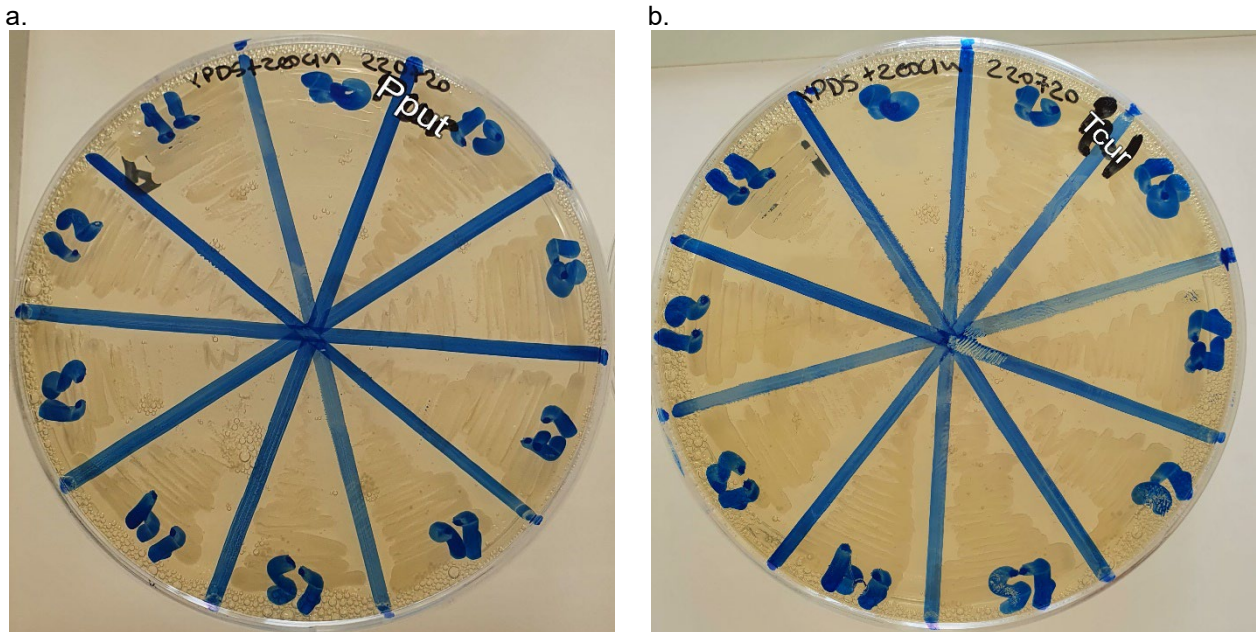
Εικόνα 7: Αντιπροσωπευτικά τρυβλία μετά την ηλεκτροδιάτρηση για a. την *PrETH*, b. την *TcETH* και c. κύτταρα άγριου τύπου τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλό δείγμα και αντί για ετερόλογο φορέα επώαστηκαν με υπερκάθαρο νερό πριν την ηλεκτροδιάτρηση.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το γονίδιο για την *PrETH* δημιούργησαν αρκετά περισσότερες αποικίες από αυτά που μετασχηματίστηκαν με την *TcETH*. Αυτό πολύ πιθανόν να οφείλεται στην διαφορετική συγκέντρωση των πλασμιδιακών φορέων στο μείγμα μετασχηματισμού, με τον φορέα της *PrETH* να βρίσκεται σε ελάχιστη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Μπορεί επίσης να οφείλεται και στο μικρότερο μέγεθος του φορέα της *PrETH* (4723 bp) από αυτόν της *TcETH* (5356 bp). Θεωρητικά οι πρωτεΐνες αυτές δεν πρέπει να εκφράζονται απουσία μεθανόλης, η οποία επάγει την ετερόλογη έκφραση, άρα η διαφορά δεν πρέπει να οφείλεται στα ένζυμα.

3.5. Διαλογή στελεχών

3.5.1. Πίτες

Επίσης αξιοσημείωτη είναι η διαλογή ξεκινώντας από τις πίτες. Στα παρακάτω αντιπροσωπευτικά τρυβλία (Εικόνα 8) φαίνεται πως τα μετασχηματισμένα στελέχη (11 – 19) αναπτύσσονται στο στερεό μέσο που περιέχει αντιβιοτικό ενώ τα κύτταρα άγριου τύπου (20) αναπτύσσονται ελάχιστα μόνο στο πάνω μέρος όπου ξεκίνησε το άπλωμά τους στην πίτα.



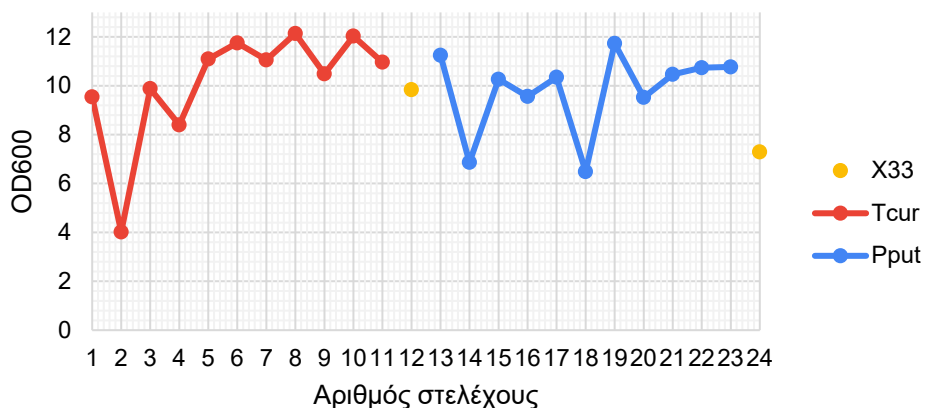
Εικόνα 8: Αντιπροσωπευτικές πίτες με αντιβιοτικό ζεοσίνη για την διαλογή στελεχών από τα τρυβλία της ηλεκτροδιάτρησης a. *PpETH* και b. *TcETH*. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα (11 – 19) αναπτύσσονται χωρίς πρόβλημα στο στερεό μέσο που περιέχει ζεοσίνη ενώ τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα (20) δεν αναπτύσσονται με ευκολία.

3.5.2. Ετερόλογη έκφραση σε υγρές καλλιέργειες

3.5.2.1. Προκαλλιέργειες

Από τις παραπάνω πίτες επιλέχθηκαν τα 11 στελέχη για κάθε γονίδιο που φαίνεται να μεγάλωσαν με μεγαλύτερη ευκολία και πραγματοποιήθηκε περαιτέρω έλεγχος σε υγρές καλλιέργειες όγκου 15 mL με προκαλλιέργειες των 10 mL.

Η οπτική πυκνότητα των προκαλλιεργείων, μετά από ~24 hr επώασης στους 30°C (Σχήμα 1):



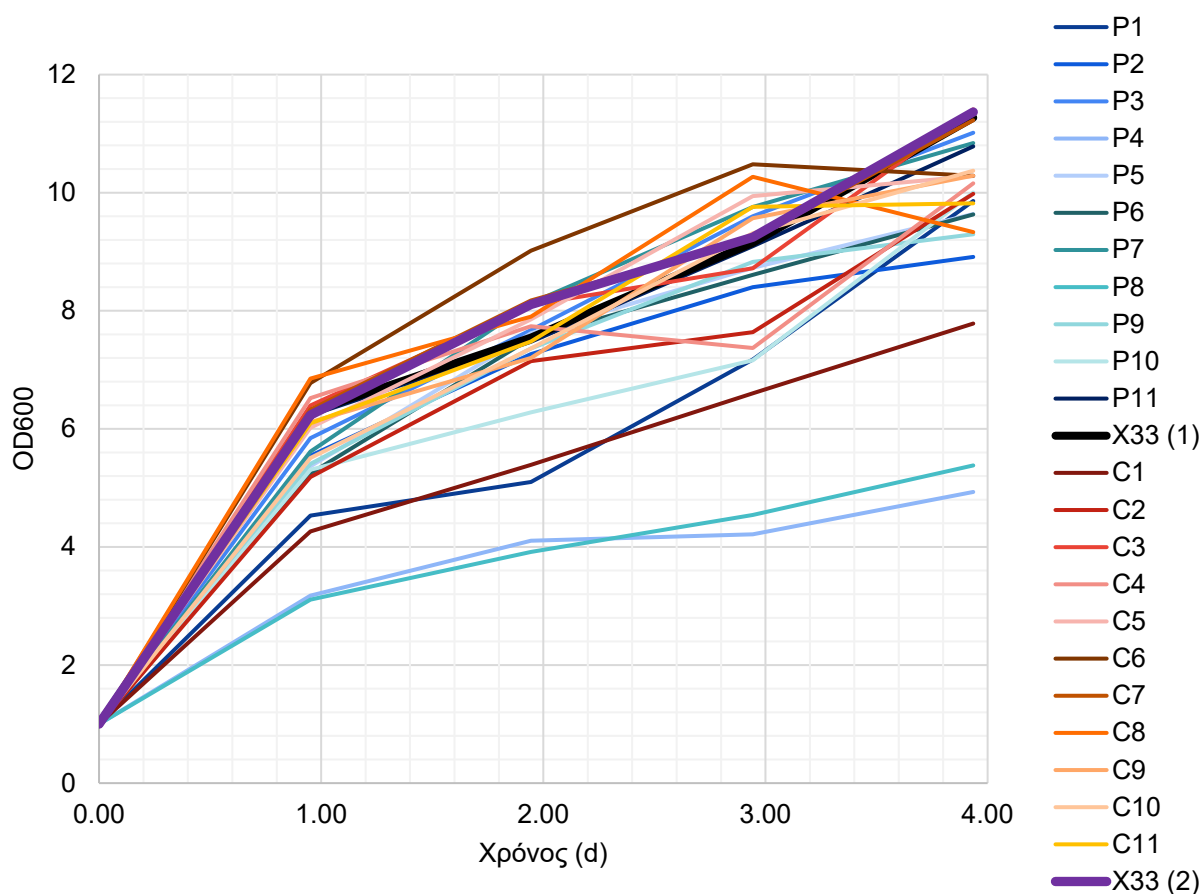
Σχήμα 37: Οπτική πυκνότητα, OD_{600} , των στελεχών στο τέλος των προκαλλιεργείων (~24 hr) μετά από επώαση στους 30°C.

Δεν προκύπτει κάποιο συμπέρασμα για την ικανότητα των στελεχών να παράγουν την ετερόλογη πρωτεΐνη, το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς στις προκαλλιέργειες το θρεπτικό υλικό BMMY δεν έχει μεθανόλη που επάγει την ετερόλογη έκφραση (μάλιστα η γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα την καταστέλλει, ακόμα και αν υπάρχει μεθανόλη στο θρεπτικό μέσο).

Από τις παραπάνω μετρήσεις OD_{600} προέκυψε ο όγκος κυτταρικού εναιωρήματος που χρειαζόταν για τον εμβολιασμό των καλλιεργειών έτσι ώστε η αρχική οπτική πυκνότητα να είναι $OD_{600} = 1$.

3.5.2.2. Καλλιέργειες

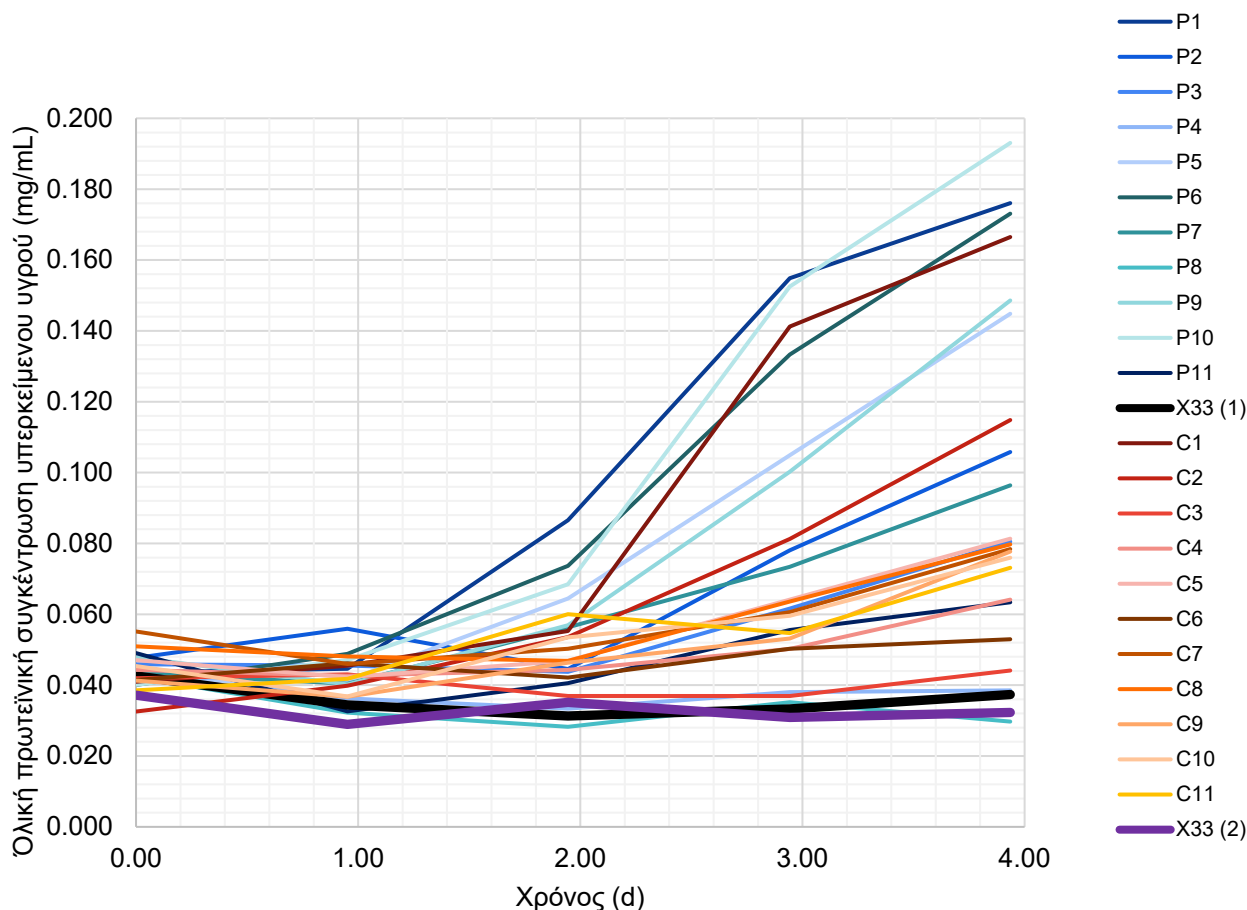
Από τις καθημερινές μετρήσεις οπτικής πυκνότητας OD_{600} των στελεχών προκύπτει το Σχήμα 38:



Σχήμα 38: Οπτική πυκνότητα καλλιεργειών, OD_{600} , συναρτήσει του χρόνου. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30°C για 4 d.

Από την οπτική πυκνότητα συμπεραίνεται ότι τα μη μετασχηματισμένα στελέχη (X33 (1) και X33 (2)) αναπτύσσονται γενικά πιο γρήγορα στο θρεπτικό μέσο BMMY + TE από τα μετασχηματισμένα στελέχη καθώς δεν καταπονούνται από ετερόλογη έκφραση πρωτεΐνης που πιθανότατα δεν συνεισφέρει στην ανάπτυξή τους. Αυτό είναι αναμενόμενο και σημαντική ένδειξη της ικανότητας ετερόλογης έκφρασης από τα υπόλοιπα στελέχη.

Η άλλη σημαντική ένδειξη ετερόλογης έκφρασης προκύπτει από την ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας μετά από φυγοκέντρηση, που μετρήθηκε με την μέθοδο Bradford κάθε $\sim 24 \text{ hr}$ (Σχήμα 39).



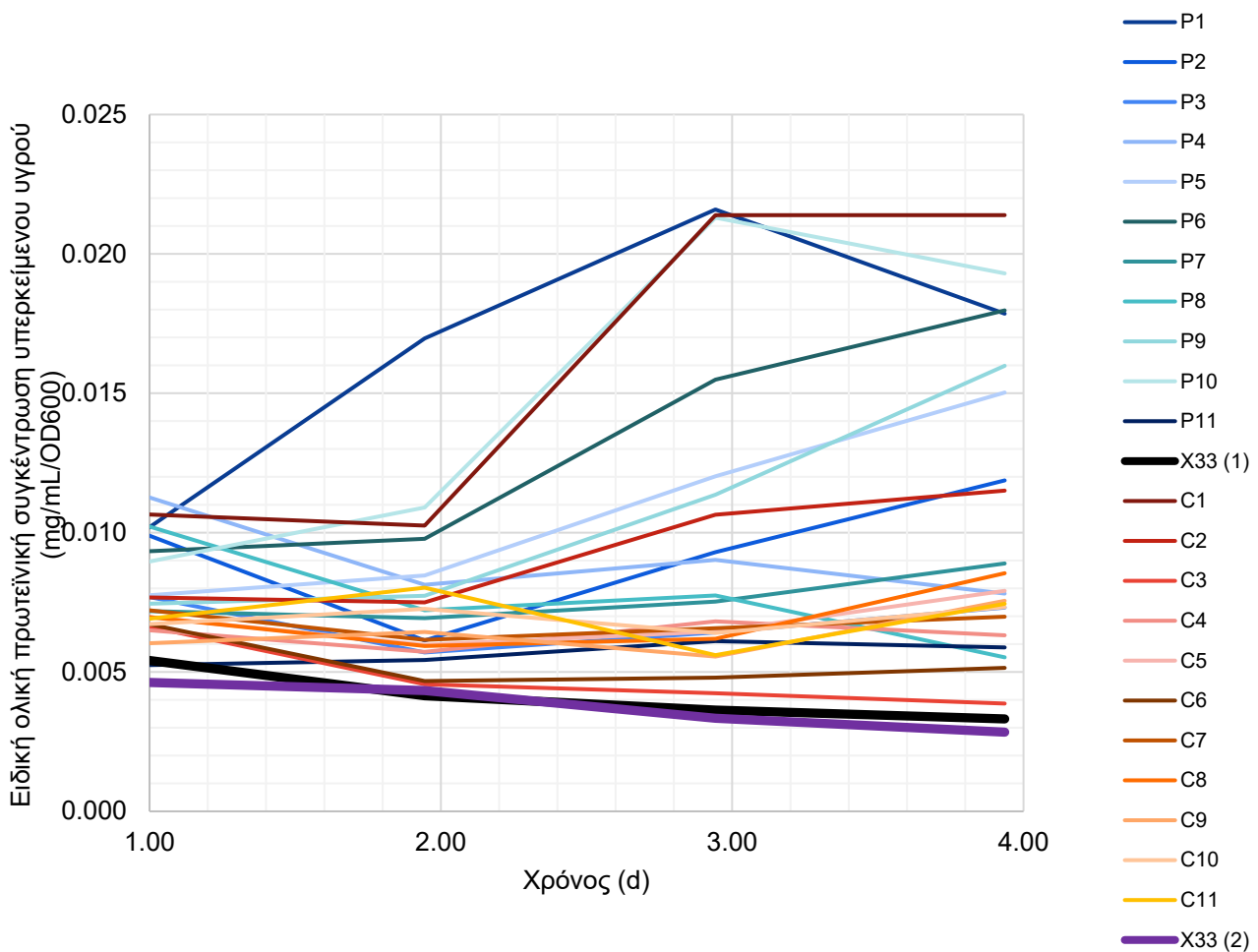
Σχήμα 39: Ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση υπερκείμενου υγρού των καλλιέργειών συναρτήσει του χρόνου. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 30°C για 4 d. Την χρονική στιγμή 0 η πρωτεϊνική συγκέντρωση είναι αυτή του υπερκείμενου στο τέλος της προκαλλιέργειας.

Από τον ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση του υπερκείμενου υγρού των καλλιέργειών προκύπτουν πολλά συμπεράσματα:

1. Όλα τα στελέχη είχαν περίπου την ίδια πρωτεϊνική συγκέντρωση στο τέλος των προκαλλιέργειών (ημέρα 0)
2. Και οι δύο καλλιέργειες – τυφλά δείγματα των μη μετασχηματισμένων κυττάρων είχαν σταθερή πρωτεϊνική συγκέντρωση $\sim 35 \text{ mg/mL}$ καθ' όλη τη διάρκεια των καλλιέργειών ενώ οι περισσότερες από τις υπόλοιπες καλλιέργειες των μετασχηματισμένων στελεχών είχαν πολύ μεγαλύτερη πρωτεϊνική συγκέντρωση μέχρι το τέλος των καλλιέργειών.
3. Το πρώτο 24ωρο δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των στελεχών. Μάλιστα η ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση έπεσε από αυτήν της προκαλλιέργειας ενώ τα κύτταρα αναπτύσσονταν και προσαρμόζονταν στο θρεπτικό υλικό.
4. Οι διαφορές στην πρωτεϊνική συγκέντρωση άρχισαν να είναι εμφανείς μετά την 2^η μέρα της καλλιέργειας.
5. Μεταξύ της 2^{ης} και της 3^{ης} μέρας ο ρυθμός της ετερόλογης έκφρασης ήταν ο μέγιστος για τα στελέχη με τις μεγαλύτερες γενικά πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις.
6. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση αυξήθηκε γενικά στα μετασχηματισμένα στελέχη μέχρι και την 4^η μέρα που ολοκληρώθηκε ο έλεγχος.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα αξιοσημείωτα είναι τα στελέχη P1 και P10 για την *PpETH* και τα C1 και C2 για την *TcETH* αφού έχουν την υψηλότερη ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση στο τέλος του 4^{ου} 24ώρου επώασης.

Οι παραπάνω μετρήσεις μπορούν να συνδυαστούν και τα στελέχη να αξιολογηθούν με την ειδική ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση υπερκείμενου υγρού διαιρώντας την πρωτεϊνική συγκέντρωση με την οπτική πυκνότητα (Σχήμα 40):



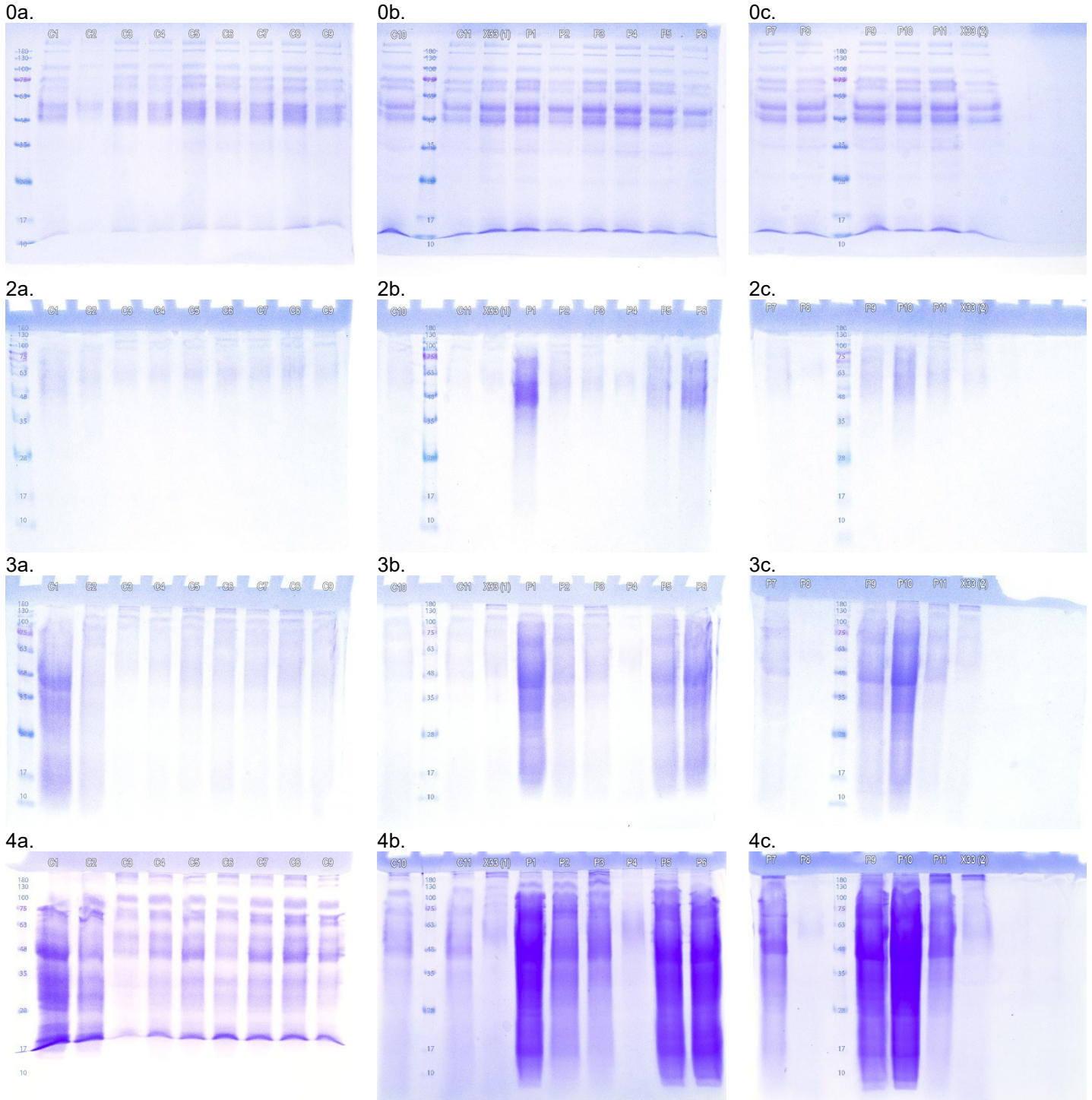
Σχήμα 40: Ειδική ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση υπερκείμενου υγρού των καλλιιεργειών συναρτήσεως του χρόνου. Υπολογίστηκε με βάση την παραπάνω πρωτεϊνική συγκέντρωση και την οπτική πυκνότητα κάθε καλλιιεργείας. Οι καλλιιεργείες επωάστηκαν στους 30°C για 4 d.

Συμπεράσματα:

1. Είναι φανερό ότι τα μη μετασχηματισμένα στελέχη παρήγαγαν γενικά λιγότερες ολικές πρωτεΐνες στο θρεπτικό τους μέσο λόγω της απουσίας ετερόλογης έκφρασης.
2. Προκύπτει η πληροφορία ότι στα στελέχη P1 και P10, που είχαν την μεγαλύτερη πρωτεϊνική συγκέντρωση από τα στελέχη της *PpETH* την 4^η μέρα, έπεσε η ειδική πρωτεϊνική συγκέντρωση. Αυτό μπορεί να σημαίνει είτε ότι μεταξύ της 3^{ης} και της 4^{ης} μέρας ο ρυθμός ανάπτυξής τους ήταν μεγαλύτερος από τον ρυθμό ετερόλογης έκφρασης είτε ότι έχουν αρχίσει να καταστρέφουν την ετερόλογη πρωτεΐνη.
3. Με βάση την ειδική πρωτεϊνική συγκέντρωση το P6 ήταν πιο παραγωγικό από το P1 την 4^η μέρα.
4. Το C1 ήταν πολύ πιο παραγωγικό από το C2.

3.5.3. Ηλεκτροφόρηση υπερκείμενων καλλιεργείων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE)

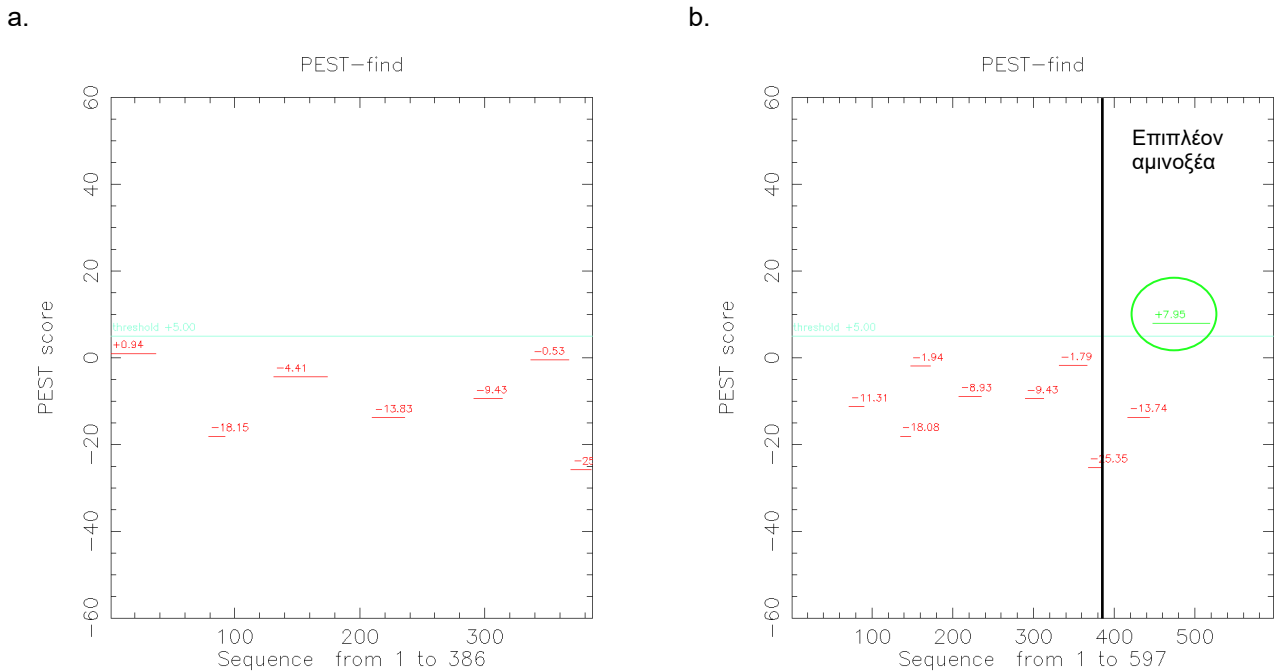
Επειδή οι προκαλλιέργειες και τα τυφλά δείγματα των μη μετασχηματισμένων κυττάρων είχαν σταθερή πρωτεϊνική συγκέντρωση $\sim 0.035 \text{ mg/mL}$ καθ' όλη τη διάρκεια των καλλιεργείων επιλέχθηκε η συμπύκνωση 1 mL υπερκείμενου που αντιστοιχεί σε λίγο παραπάνω από $30 \mu\text{g}$ πρωτεϊνών/πηγάδι. Επιλέχθηκε το 1 mL να παραμείνει σταθερό για όλα τα δείγματα ανεξάρτητα της πρωτεϊνικής τους συγκέντρωσης κατά την διάρκεια των καλλιεργείων, ωστόσο αυτό μετά οδήγησε σε υπερφορτωμένα πηγάδια σε κάποιες περιπτώσεις και δυσκόλευσε την ανάγνωση των τελευταίων κυρίως πηκτωμάτων. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης που προέκυψαν για τα υπερκείμενα των προκαλλιεργείων και την 2^η έως την 4^η μέρα καλλιεργείων είναι τα εξής (Εικόνα 9):



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης (10%) των προκαλλιεργείων (0a.,0b.,0c.) και της 2^{ης} έως 4^{ης} μέρας των καλλιεργείων (2a. ... 4c.)

Όπως ήδη αναφέρθηκε ορισμένα πηγάδια ήταν υπερφορτωμένα (π.χ. το P10 στο 4c.). Δυστυχώς τα αποτελέσματα δεν ήταν ξεκάθαρα καθώς υπήρχαν ήδη φυσικές πρωτεΐνες της *P. pastoris* κοντά στα μοριακά βάρη που αναμενόταν οι ετερόλογες πρωτεΐνες (~45 kDa και ~65 kDa για την *PpETH* και την *TcETH* αντίστοιχα). Ωστόσο οι περιοχές στις οποίες αναμενόταν οι ετερόλογες πρωτεΐνες ήταν ελαφρώς πιο έντονα χρωματισμένες, όπως για παράδειγμα στο 3b. P1, και αυτό αποτελεί επίσης ένδειξη για την παραγωγή τους από την *P. pastoris*.

Η ύπαρξη όμως της ίδιας χρωματισμένης περιοχής στα ~45 kDa στα στελέχη που εξέφρασαν την *TcETH* δείχνει ότι η πρωτεΐνη μπορεί να κόβεται στην επιπλέον περιοχή της από κάποια πρωτεάση της *P. pastoris*. Με την χρήση του εργαλείου «*epestfind*», το οποίο εντοπίζει μοτίβα PEST (potential proteolytic cleavage sites) τα οποία είναι πιθανόν να στοχεύουν πρωτεάσες, βρέθηκε ότι υπάρχει τέτοιο σημείο στην *TcETH* σε σημείο που θα εξηγούσε το παραπάνω αποτέλεσμα (Σχήμα 41):⁸⁷

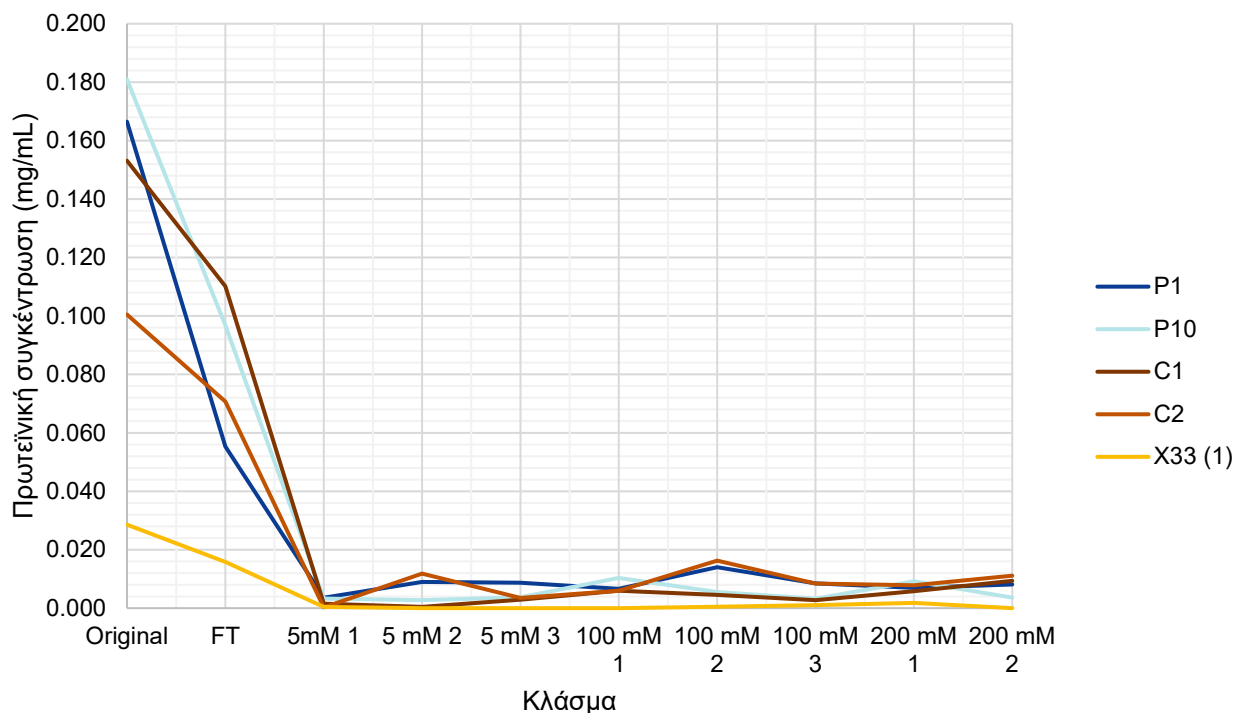


Σχήμα 41: Αποτελέσματα αναζήτησης μοτίβων PEST με το εργαλείο «*epestfind*» a. για την *PpETH* και b. για την *TcETH*. Κόψιμο στο σημείο αναγνώρισης που προβλέπεται για την *TcETH* θα δικαιολογούσε εν μέρη το αποτέλεσμα των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης.

Είναι δυνατόν να περιοριστεί η έκφραση και η δράση των πρωτεασών με την μείωση της θερμοκρασίας στην οποία πραγματοποιούνται οι καλλιέργειες. Για αυτό οι επόμενες καλλιέργειες που έγιναν σε μεγαλύτερη κλίμακα (500 mL) επωάστηκαν στους 20 °C.

3.5.4. Καθαρισμός ενζύμων με χρωματογραφία συγγένειας

Τα υπερκείμενα υγρά από τα δύο στελέχη με την μεγαλύτερη πρωτεϊνική συγκέντρωση για κάθε γονίδιο (τα στελέχη P1 και P10 για την *PpETH* και τα C1 και C2 για την *TcETH*) καθώς και από ένα από τα δύο στελέχη άγριου τύπου ακολούθησαν καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν η ετερόλογη πρωτεΐνη είναι δυνατόν να καθαριστεί και τα κλάσματα στα οποία εκκλούεται (Σχήμα 42). Τα δείγματα είχαν όγκο ~10 mL μετά την καλλιέργεια και χρησιμοποιήθηκε στήλη με 5 mL ρητίνης ενώ τα κλάσματα περιγράφονται παραπάνω (βλ. «2.5.10.3 Πρωτόκολλο καθαρισμού»).



Σχήμα 42: Πρωτεϊνική συγκέντρωση ανά κλάσμα χρωματογραφίας συγγένειας για τα στελέχη P1 και P10 για την PpETH και τα C1 και C2 για την TcETH και από ένα από τα δύο στελέχη άγριου τύπου. Τα κλάσματα είναι τα: Αρχικό (Original), Flowthrough, Equilibration, 3 × Wash (5 mM ιμιδαζόλιο), 3 × Elusion (100 mM ιμιδαζόλιο), και 3 × Elusion (200 mM ιμιδαζόλιο) Το κλάσμα Equilibration δεν συλλέχθηκε και για αυτό δεν υπάρχει μέτρηση.

Τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα:

1. Αναμενόταν η έκλυση του μεγαλύτερου μέρους των ετερόλογων πρωτεϊνών στο κλάσμα Elusion 2, πράγμα το οποίο φαίνεται να έγινε για τα P1 και C2 σε μικρό βαθμό.
2. Το κλάσμα Flowthrough έχει μικρότερη πρωτεϊνική συγκέντρωση από το αρχικό δείγμα το οποίο σημαίνει ότι πρωτεϊνική ποσότητα κατακρατήθηκε στην στήλη.
3. Δυστυχώς δεν συλλέχθηκε το κλάσμα Equilibration το οποίο θα έδινε πλήρη εικόνα στο που κατέληξε η κατακρατημένη πρωτεΐνη.

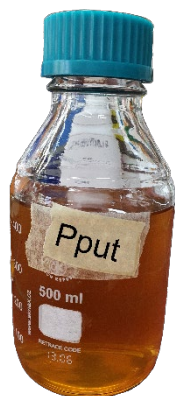
Τα στελέχη P1 και C2 επιλέχθηκαν για την ετερόλογη έκφραση των PpETH και TcETH αντίστοιχα.

3.6. Παραγωγή αιθερασών

Έπειτα τα στελέχη P1 και C2 επιλέχθηκαν για την ετερόλογη έκφραση των *PpETH* και *TcETH* αντίστοιχα και πλέον αναφέρονται απλά ως στελέχη P και C. Οι καλλιέργειες έγιναν στους 20 °C για 4 d.

Το πρώτο αξιοσημείωτο αποτέλεσμα ήταν η εμφάνιση του υπερκείμενου υγρού μετά την φυγοκέντρηση, το οποίο ήταν αρκετά θολό στην περίπτωση της *TcETH* (Εικόνα 10 b.):

a.



b.



Εικόνα 10: Τα υπερκείμενα υγρά των καλλιεργειών a. της *PpETH* b. της *TcETH*. Το υπερκείμενο υγρό της *TcETH* είναι θολό από κάποιο στερεό που δεν καταβυθίστηκε στην φυγοκέντρηση.

Μετά τη διήθηση σε φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 μm η θολούρα έφυγε και στο φίλτρο κατακάθισε ίζημα (Εικόνα 11):

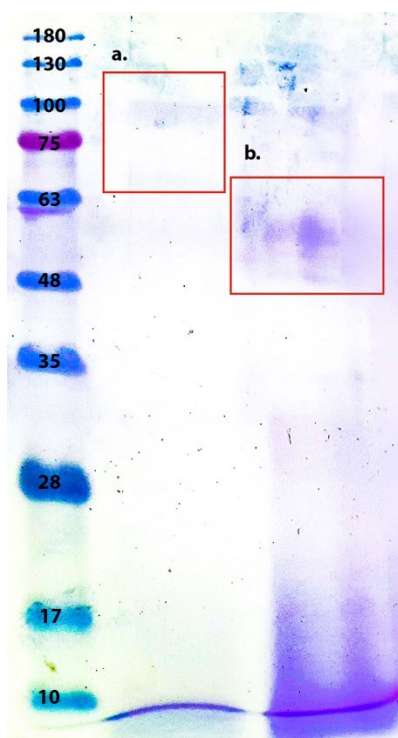


Εικόνα 11: Ίζημα πάνω στο φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 μm από τη διήθηση του υπερκείμενου υγρού της *TcETH*.

Είναι πολύ πιθανό αυτό το ίζημα να αποτελείται από καταβυθισμένη πρωτεΐνη *TcETH*, λόγω μη σωστής δίπλωσής της από τον ξενιστή *P. pastoris*.

Οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων μετρήθηκαν μετά την διήθηση και βρέθηκαν 0.380 mg/mL για την *PpETH* και 0.044 mg/mL για την *TcETH*. Επομένως το στέλεχος P εξέφρασε περισσότερη πρωτεΐνη στην καλλιέργεια των 500 mL (σε κωνική φιάλη των 2 L) από αυτήν των 15 mL (σε falcon 50 mL) πιθανόν λόγω καλύτερου αερισμού που είναι κρίσιμος για καλλιέργειες της *P. pastoris*.

Μετά την διήθηση τα δείγματα συμπυκνώθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (12%) των *a.* TcETH (~65 kDa) και *b.* PrETH (~45 kDa). Τα δείγματα είχαν μάλλον τελικά λιγότερο από 30 μ g πρωτεΐνης/πηγάδι και άρα τα πηγάδια είναι υποφορτωμένα. Για να είναι πιο ευδιάκριτη η διαφορά τους η εικόνα έχει υποστεί αρκετή επεξεργασία. Τα αποτελέσματα πάλι δεν είναι σίγουρα για την TcETH αλλά υπάρχει ένδειξη παραγωγής της. Για την PrETH είναι ευδιάκριτη η περιοχή στην οποία κάθισε μετά την ηλεκτροφόρηση, ελάχιστα πάνω από τα 45 kDa, πιθανόν λόγω γλυκοζυλιώσεων.

Έπειτα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη. Μετά το ξεπάγωμα περίπου 2 εβδομάδες μετά, παρατηρήθηκαν αρκετά καταβυθισμένα στερεά. Ακολούθησε διήθηση των δειγμάτων από φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.22 μ m και τα ιζήματα και από τα δύο δείγματα που συλλέχθηκαν πάνω στα φίλτρα αναμίχθηκαν με αντιδραστήριο Bradford, το οποίο πήρε μπλε χρώμα, υποδεικνύοντας ότι μαζί με τα υπόλοιπα στερεά που καταβυθίστηκαν υπήρχαν και πρωτεΐνες.

Ακολούθησε υπερσυμπύκνωση και υψηλός καθαρισμός χρωματογραφία συγγένειας. Παρόμοια με την χρωματογραφία συγγένειας στην φάση της διαλογής, ούτε σε αυτό το στάδιο, με πολύ πιο συμπυκνωμένα δείγματα από καλλιέργειες των 500 mL, δεν παρατηρήθηκε κατακράτηση των πρωτεϊνών στην στήλη. Επομένως υπάρχει ανάγκη για την εύρεση άλλης διεργασίας υψηλού διαχωρισμού όπως χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής ή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Γενικά

Οι αιθεράσες αποτελούν πολύ υποσχόμενα ένζυμα στην έρευνα για την αποικοδόμηση της LCB αλλά ίσως και στην αποικοδόμηση πλαστικών. Είναι σημαντικό να μελετηθούν μόνες τους αλλά και σε συνεργασία με άλλα ένζυμα που αποικοδομούν την LCB.

Η βιοπληροφορική μελέτη και εύρεση των αιθερασών για αυτό το πείραμα έδωσε ενδιαφέρουσες πληροφορίες για την πιθανή δράση των μη μελετημένων ενζύμων. Επίσης προέκυψε από τον AlphaFold 2 ότι ίσως η *TcETH* να είναι διμερές, είτε με μία ίδια είτε με κάποια άλλη πρωτεΐνη, λόγω των επιπλέον αμινοξέων σε σχέση με την *PpETH* στο C – τελικό άκρο της για τα οποία ο αλγόριθμος προβλέπει την δομή τους με χαμηλό IDDT – «σιγουριά».

Όσον αφορά το πείραμα, το κύριο συμπέρασμα είναι ότι η *P. pastoris* μπορεί τελικά να παράξει αυτά τα ένζυμα υπό τις παραπάνω συνθήκες. Ωστόσο η λειτουργικότητά τους μένει να ελεγχθεί καθώς η *TcETH* κατά πάσα πιθανότητα καταβυθίστηκε.

Η μέθοδος διαλογής που χρησιμοποιήθηκε τελικά και είχε αναπτυχθεί μετά από πολλά παρόμοια πειράματα τα οποία δεν έδωσαν κάποιο αποτέλεσμα ήταν πολύ αποτελεσματική και έδωσε πολλές πληροφορίες για τα μετασχηματισμένα στελέχη. Ιδιαίτερα η ημερήσια μέτρηση ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των υπερκείμενων υγρών των καλλιεργειών παρήγαγε ξεκάθαρα αποτελέσματα για την επιλογή των καλύτερων στελεχών.

Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE) ενώ αναμενόταν να εξάγει ξεκάθαρο αποτέλεσμα σχετικά με την παραγωγή ή όχι των ετερόλογων ενζύμων στις καλλιέργειες τελικά δεν ήταν πολύ χρήσιμη καθώς υπήρχαν άγνωστα προβλήματα κατά την ηλεκτροφόρηση και τα πηγάδια ήταν υπερφορτωμένα ή υποφορτωμένα σε πολλές περιπτώσεις, για το οποίο αυτό μπορεί να οφείλεται και η κατάσταση των περιστροφόμενων στηλών συμπύκνωσης. Ωστόσο το γεγονός ότι προέκυψε μπάντα στα ~45 kDa σε καλλιέργεια της *TcETH* βοήθησε στην αναγνώριση θέσης διάσπασής της από πρωτεάση που είναι χρήσιμη πληροφορία για την συνέχεια αυτού του πειράματος ακόμα και αν τελικά προκύψει ότι δεν συμβαίνει τέτοια διάσπαση.

Ο καθαρισμός των καλλιεργειών και της διαλογής (15 mL) αλλά και της παραγωγής (500 mL) προβληματίζει, καθώς οι ετερόλογες πρωτεΐνες δεν εκλούστηκαν στο κλάσμα που έπρεπε. Αυτό μπορεί να σημαίνει πως ίσως το μόριο σύντηξης *His₆* δεν είναι ελεύθερο σε αυτήν την περίπτωση για να δεθεί με το πρόσδεμα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη *Cu²⁺* ως συμπάραγοντα στο ενεργό κέντρο, με αποτέλεσμα να συντονίζεται με κάποιο τρόπο με το μόριο σύντηξης *His₆* και να το δεσμεύει, αλλά αυτό πρόκειται για υπόθεση και πρέπει να μελετηθεί.

Οι μεγάλες καλλιέργειες (500 mL) έδειξαν μεγαλύτερη παραγωγικότητα από τις μικρές καλλιέργειες της διαλογής (15 mL), πιθανότατα λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειας που είναι σε επαφή με αέρα στην κωνική φιάλη των 2 L αλλά και της καλύτερης ανάδευσης που συμβαίνει σε αυτήν.

Το ίζημα που συλλέγεται από την μεγάλη καλλιέργεια της *TcETH*, το οποίο σε αντίθεση με τα κύτταρα και το μεγαλύτερο μέρος των στερεών δεν καταβυθίστηκε στην φυγοκέντρηση αλλά διαχωρίστηκε μόνο όταν πραγματοποιήθηκε διήθηση σε φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 μm, παραπέμπει σε καταβυθισμένη ετερόλογη πρωτεΐνη, πιθανότατα λόγω της αδίπλωτης περιοχής που προέβλεψε το AlphaFold 2.

4.2. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Από τα παραπάνω προκύπτει η ανάγκη για περισσότερη έρευνα για τις αιθεράσες που μελετήθηκαν αλλά και για το σύστημα έκφρασης σε *P. pastoris* που χρησιμοποιήθηκε.

4.2.1. Άμεσο μέλλον

Αρχικά, σχετικά με την έκφραση και την απομόνωση των πρωτεϊνών πρέπει να ερευνηθεί η χρήση διαφορετικών χρωματογραφικών τεχνικών καθαρισμού, καθώς η χρωματογραφία συγγένειας με μόριο σύντηξης *His₆* δεν έδειξε μεγάλη απόδοση. Προτείνεται να δοκιμαστούν άλλες μέθοδοι υψηλού καθαρισμού όπως χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής ή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Μπορεί επίσης να διερευνηθεί η αποκοπή του μορίου σύντηξης *His₆* με την πρωτεάση TEV, καθώς το γεγονός ότι αυτή μπορεί να ήταν προβληματική είχε προβλεφθεί πριν την κατασκευή των πλασμιδιακών φορέων.

Επίσης πρέπει να διερευνηθεί σε περισσότερες συνθήκες θερμοκρασίας και θρεπτικού μέσου η έκφραση της *TcETH*. Σε πειραματικό στάδιο μπορούν να δοκιμαστούν ακόμα χαμηλότερες θερμοκρασίες από 20 °C, μειώνοντας πολύ την παραγωγή αλλά επιτρέποντας ίσως καλύτερο δίπλωμα της πρωτεΐνης και λιγότερη έκκριση πρωτεασών από τον ξενιστή. Μπορούν να προστεθούν επιπλέον πρόσθετα, όπως EDTA σε συγκέντρωση 5 mM, τα οποία μπορεί να σταθεροποιούν την πρωτεΐνη.⁴³ Το EDTA ωστόσο μπορεί να μην αποτελεί καλή επιλογή σταθεροποιητικού παράγοντα καθώς η *TcETH* πρόκειται για μεταλλοπρωτεΐνη. Άλλες επιλογές είναι τα μη ιονικά επιφανειοδραστικά όπως το Tween 20 και Tween 80, σε συγκέντρωση μικρότερη από το κρίσιμο σημείο σχηματισμού μυκηλίων.⁸⁸

4.2.2. Απώτερο μέλλον

Οι αιθεράσες πρέπει να μελετηθούν είτε μόνες τους είτε και σε συνεργασία με άλλα ένζυμα σε διάφορα συστήματα. Αυτά είναι τα εξής:

- Συνθετικά μόρια – ανάλογα της λιγνίνης: Είναι σημαντικό να διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης αυτών των ενζύμων και η ενεργότητά τους πάνω σε διάφορα συνθετικά μόρια ανάλογα με αυτά που βρίσκονται στην LCB με ελεγχόμενο τρόπο.
- Φυσικά πολυμερή (LCB): Πρέπει να επιβεβαιωθεί η δράση αυτών των ενζύμων σε φυσική LCB και ειδικότερα η δράση τους σε συνεργασία με άλλα ένζυμα.
- Πλαστικά: Ο βασικός στόχος για την αξιοποίηση αυτών των ενζύμων είναι η χρήση τους σε συνθετικά πολυμερή, όπως η πολυαιθερική πολυουρεθάνη (Σχήμα 25 b.). Ένα ένζυμο που θα μπορούσε είτε όπως είναι είτε με τυχαίες ή ορθολογικές μεταλλάξεις να διασπάσει τέτοιους δεσμούς θα ήταν πολύ χρήσιμο στην μάχη κατά της πλαστικής ρύπανσης αλλά και στην ανακύκλωση αυτών πολλών πολυμερών.

Τέλος πρέπει για τα παραπάνω ένζυμα να γίνει πλήρης βιοχημικός χαρακτηρισμός όσον αφορά τα βέλτιστα pH_{opt} , T_{opt} και μόνα τους αλλά και σε συνεργασία με άλλα ένζυμα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Zerva, A.; Pentari, C.; Ferousi, C.; Nikolaivits, E.; Karnaouri, A.; Topakas, E. Recent Advances on Key Enzymatic Activities for the Utilisation of Lignocellulosic Biomass. *Bioresour Technol* **2021**, *342*, 126058. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126058>.
- (2) Yousuf, A.; Sannino, F.; Pirozzi, D. *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*; Elsevier Science, 2019.
- (3) Daly, P.; Cai, F.; Kubicek, C. P.; Jiang, S.; Grujic, M.; Rahimi, M. J.; Sheteiwy, M. S.; Giles, R.; Riaz, A.; de Vries, R. P.; Akcapinar, G. B.; Wei, L.; Druzhinina, I. S. From Lignocellulose to Plastics: Knowledge Transfer on the Degradation Approaches by Fungi. *Biotechnol Adv* **2021**, *50*, 107770. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107770>.
- (4) Oates, N. C.; Abood, A.; Schirmacher, A. M.; Alessi, A. M.; Bird, S. M.; Bennett, J. P.; Leadbeater, D. R.; Li, Y.; Dowle, A. A.; Liu, S.; Tymokhin, V. I.; Ralph, J.; McQueen-Mason, S. J.; Bruce, N. C. A Multi-Omics Approach to Lignocellulolytic Enzyme Discovery Reveals a New Ligninase Activity from *Parascedosporium Putredinis* NO1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2021**, *118* (18). <https://doi.org/10.1073/pnas.2008888118>.
- (5) Kumar, A. K.; Sharma, S. Recent Updates on Different Methods of Pretreatment of Lignocellulosic Feedstocks: A Review. *Bioresour Bioprocess* **2017**, *4* (1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>.
- (6) Andlar, M.; Rezić, T.; Mardetko, N.; Kracher, D.; Ludwig, R.; Šantek, B. Lignocellulose Degradation: An Overview of Fungi and Fungal Enzymes Involved in Lignocellulose Degradation. *Engineering in Life Sciences*. Wiley-VCH Verlag November 1, 2018, pp 768–778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>.
- (7) Heterologous Expression. *Encyclopedia of Neuroscience* **2009**, 1830–1830. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_2190.
- (8) *Making Cellulose More Accessible for Bioconversion*. U.S. Department of Energy Office of Biological and Environmental Research. <https://science.osti.gov/ber/Highlights/2014/BER-2014-07-p> (accessed 2022-08-30).
- (9) Heldt, H. W.; Heldt, F.; Piechulla, B. *Plant Biochemistry*; Updte and Transl; Elsevier Science, 2005.
- (10) Mleziva, M. M.; Wang, J. H. Paper. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference*; Elsevier, 2012; pp 397–410. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00274-0>.
- (11) McMurry, J. E. *Organic Chemistry*; Cengage Learning, 2015.
- (12) Heinze, T.; Basset, H.; Ebringerová, A.; Harding, S. E.; Heinze, T.; Hromádková, Z.; Muzzarelli, C.; Muzzarelli, R. A. A.; Paulsen, B. S.; ElSeoud, O. A. *Polysaccharides I: Structure, Characterisation and Use*; Advances in Polymer Science; Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- (13) Martone, P. T.; Estevez, J. M.; Lu, F.; Ruel, K.; Denny, M. W.; Somerville, C.; Ralph, J. Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Current Biology* **2009**, *19* (2), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.031>.
- (14) Zabel, R. A.; Morrell, J. J. *Wood Microbiology: Decay and Its Prevention*; Elsevier Science, 2020.
- (15) Głęb Karol. *File:Lignin structure.svg*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lignin_structure.svg (accessed 2022-09-06).
- (16) Jones, E. *Forest debris on clear fell site in Donard Forest*. Geograph Ireland. <https://www.geograph.ie/photo/2895852> (accessed 2022-09-06).
- (17) CIMMYT. *Maize crop residues*. Flickr. <https://www.flickr.com/photos/cimmyt/4688665449> (accessed 2022-09-06).
- (18) Tau'olunga. *File:Miscanthus floridulus.jpg*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Miscanthus_floridulus.jpg (accessed 2022-09-06).
- (19) James, S. R.; Dennell, R. W.; Gilbert, A. S.; Lewis, H. T.; Gowlett, J. A. J.; Lynch, T. F.; McGrew, W. C.; Peters, C. R.; Pope, G. G.; Stahl, A. B.; James, S. R. Hominid Use of Fire in the Lower and Middle Pleistocene: A Review of the Evidence [and Comments and Replies]. *Curr Anthropol* **1989**, *30* (1), 1–26. <https://doi.org/10.1086/203705>.
- (20) Kumar, P.; Joshi, L. Pollution Caused by Agricultural Waste Burning and Possible Alternate Uses of Crop Stubble: A Case Study of Punjab; 2013; pp 367–385. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36143-2_22.
- (21) Υπουργική Απόφαση 15005 Οικ. Φ.700.9/2021 (Πυροσβεστική Διάταξη 9/2021). *ΦΕΚ 1923/Β/13-5-2021*. Εφημερίς της Κυβερνήσεως της Ελληνικής Δημοκρατίας: Αθήνα September 2021.
- (22) Dahman, Y.; Syed, K.; Begum, S.; Roy, P.; Mohtasebi, B. Biofuels: Their Characteristics and Analysis. *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy: Construction, Biomedical, and other Industrial Applications* **2019**, 277–325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102426-3.00014-X>.
- (23) Rai, A. K.; al Makishah, N. H.; Wen, Z.; Gupta, G.; Pandit, S.; Prasad, R. Recent Developments in Lignocellulosic Biofuels, a Renewable Source of Bioenergy. *Fermentation* **2022**, *8* (4), 161. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040161>.

- (24) Raj, T.; Chandrasekhar, K.; Naresh Kumar, A.; Kim, S.-H. Lignocellulosic Biomass as Renewable Feedstock for Biodegradable and Recyclable Plastics Production: A Sustainable Approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2022**, *158*, 112130. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112130>.
- (25) Shrivastava, A.; Sharma, R. K. Lignocellulosic Biomass Based Microbial Fuel Cells: Performance and Applications. *J Clean Prod* **2022**, *361*, 132269. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132269>.
- (26) Safian, M. T.; Sekeri, S. H.; Yaqoob, A. A.; Serrà, A.; Jamudin, M. D.; Mohamad Ibrahim, M. N. Utilization of Lignocellulosic Biomass: A Practical Journey towards the Development of Emulsifying Agent. *Talanta* **2022**, *239*, 123109. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123109>.
- (27) Sun, X. F.; Wang, H. H.; Jing, Z. X.; Mohanathas, R. Hemicellulose-Based PH-Sensitive and Biodegradable Hydrogel for Controlled Drug Delivery. *Carbohydr Polym* **2013**, *92* (2), 1357–1366. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.10.032>.
- (28) Zhou, C.; Wang, Y. Recent Progress in the Conversion of Biomass Wastes into Functional Materials for Value-Added Applications. *Sci Technol Adv Mater* **2020**, *21* (1), 787–804. <https://doi.org/10.1080/14686996.2020.1848213>.
- (29) *protein - Enzymes* | *Britannica*. <https://www.britannica.com/science/protein/Enzymes#ref72579> (accessed 2022-08-22).
- (30) Atkins, P. W.; de Paula, J.; Keeler, J. *Atkins' Physical Chemistry*; Oxford University Press, 2018.
- (31) Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A. D.; Lewis, J.; Roberts, K. *Essential Cell Biology*; Garland Science, 2014.
- (32) Shuler, M. L.; Kargi, F. *Bioprocess Engineering*, 2nd ed.; Prentice Hall international series in the physical and chemical engineering sciences; Prentice Hall: Philadelphia, PA, 2000.
- (33) *File:225 Peptide Bond-01.jpg*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:225_Peptide_Bond-01.jpg (accessed 2022-09-17).
- (34) *Enzyme Classification*. <https://www.rcsb.org/docs/search-and-browse/browse-options/enzyme-classification> (accessed 2022-08-22).
- (35) IUBMB. *Enzyme Nomenclature: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse*. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/> (accessed 2022-08-22).
- (36) *The Arrhenius Law - Pre-exponential Factors*. Chemistry LibreTexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/06%3A_Modeling_Reaction_Kinetics/6.02%3A_Temperature_Dependence_of_Reaction_Rates/6.2.03%3A_The_Arrhenius_Law/6.2.3.06%3A_The_Arrhenius_Law_-_Pre-exponential_Factors](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/06%3A_Modeling_Reaction_Kinetics/6.02%3A_Temperature_Dependence_of_Reaction_Rates/6.2.03%3A_The_Arrhenius_Law/6.2.3.06%3A_The_Arrhenius_Law_-_Pre-exponential_Factors) (accessed 2022-08-23).
- (37) Sørensen, H.; Mortensen, K. Soluble Expression of Recombinant Proteins in the Cytoplasm of *Escherichia Coli*. *Microb Cell Fact* **2005**, *4* (1), 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-1>.
- (38) Bose, K. *Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins*; Springer Nature Singapore, 2022.
- (39) Daly, M. J.; Minton, K. W. Interchromosomal Recombination in the Extremely Radioresistant Bacterium *Deinococcus Radiodurans*. *J Bacteriol* **1995**, *177* (19), 5495–5505. <https://doi.org/10.1128/jb.177.19.5495-5505.1995>.
- (40) Ding, N.; Yang, C.; Sun, S.; Han, L.; Ruan, Y.; Guo, L.; Hu, X.; Zhang, J. Increased Glycosylation Efficiency of Recombinant Proteins in *Escherichia Coli* by Auto-Induction. *Biochem Biophys Res Commun* **2017**, *485* (1), 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.037>.
- (41) *Generally Recognized as Safe (GRAS)* | *FDA*. <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras> (accessed 2022-08-28).
- (42) Heisteringer, L.; Gasser, B.; Mattanovich, D. Microbe Profile: *Komagataella Phaffii*: A Methanol Devouring Biotech Yeast Formerly Known as *Pichia Pastoris*. *Microbiology (United Kingdom)* **2020**, *166* (7), 614–616. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.000958/CITE/REFWORKS>.
- (43) Daly, R.; Hearn, M. T. W. Expression of Heterologous Proteins in *Pichia Pastoris*: A Useful Experimental Tool in Protein Engineering and Production. *J Mol Recognit* **2005**, *18* (2), 119–138. <https://doi.org/10.1002/JMR.687>.
- (44) Westerholm-Parvinen, A.; Selinheimo, E.; Boer, H.; Kalkkinen, N.; Mattinen, M.; Saloheimo, M. Expression of the *Trichoderma Reesei* Tyrosinase 2 in *Pichia Pastoris*: Isotopic Labeling and Physicochemical Characterization. *Protein Expr Purif* **2007**, *55* (1), 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.04.014>.
- (45) Wuest, A. *The good and the bad impurities: Trace elements*. Xell AG. <https://www.xell.ag/the-good-and-the-bad-impurities-trace-elements/technical-notes/> (accessed 2022-08-29).
- (46) *File:Affinity Chromatography Technique.jpg*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Affinity_Chromatography_Technique.jpg (accessed 2022-09-19).

- (47) Pacesa, M. Purification of Recombinant Adenoviral Hexon Proteins for Generation of Virus-Specific Antibodies & Next-Generation Sequencing of Adenoviral Genomes, 2016. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20211.53282>.
- (48) de Souza, W. R. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. In *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*; InTech, 2013. <https://doi.org/10.5772/54325>.
- (49) Mätes II. *File: Braunfaeule Holz FI20070208.jpg*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File: Braunfaeule_Holz_FI20070208.jpg (accessed 2022-09-07).
- (50) Auró. *File: White rot on oak.JPG*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File: White_rot_on_oak.JPG (accessed 2022-09-07).
- (51) Austin, H. P.; Allen, M. D.; Donohoe, B. S.; Rorrer, N. A.; Kearns, F. L.; Silveira, R. L.; Pollard, B. C.; Dominick, G.; Duman, R.; el Omari, K.; Mykhaylyk, V.; Wagner, A.; Michener, W. E.; Amore, A.; Skaf, M. S.; Crowley, M. F.; Thorne, A. W.; Johnson, C. W.; Woodcock, H. L.; McGeehan, J. E.; Beckham, G. T. Characterization and Engineering of a Plastic-Degrading Aromatic Polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2018**, *115* (19). <https://doi.org/10.1073/pnas.1718804115>.
- (52) Mahajan, N.; Gupta, P. New Insights into the Microbial Degradation of Polyurethanes. *RSC Adv* **2015**, *5* (52), 41839–41854. <https://doi.org/10.1039/C5RA04589D>.
- (53) *The E-value*. https://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/650/_E_value.html (accessed 2022-09-14).
- (54) Pretzler, M.; Rompel, A. What Causes the Different Functionality in Type-III-Copper Enzymes? A State of the Art Perspective. *Inorganica Chim Acta* **2018**, *481*, 25–31. <https://doi.org/10.1016/J.ICA.2017.04.041>.
- (55) *SignalP - 6.0 - Services - DTU Health Tech*. <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP> (accessed 2022-09-14).
- (56) *ExPASy - Compute pI/Mw tool*. https://web.expasy.org/compute_pi/ (accessed 2022-09-14).
- (57) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596* (7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- (58) Steinegger, M.; Söding, J. MMseqs2 Enables Sensitive Protein Sequence Searching for the Analysis of Massive Data Sets. *Nature Biotechnology* **2017**, *35* (11), 1026–1028. <https://doi.org/10.1038/nbt.3988>.
- (59) *AlphaFold2.ipynb* - *Colaboratory*. <https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb> (accessed 2022-09-14).
- (60) Salomon-Ferrer, R.; Case, D. A.; Walker, R. C. An Overview of the Amber Biomolecular Simulation Package. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci* **2013**, *3* (2), 198–210. <https://doi.org/10.1002/wcms.1121>.
- (61) Westerholm-Parvinen, A.; Selinheimo, E.; Boer, H.; Kalkkinen, N.; Mattinen, M.; Saloheimo, M. Expression of the Trichoderma Reesei Tyrosinase 2 in Pichia Pastoris: Isotopic Labeling and Physicochemical Characterization. *Protein Expr Purif* **2007**, *55* (1), 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.04.014>.
- (62) *File: EasySelect™ Pichia Expression Kit: For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZα in Pichia Pastoris*. Invitrogen. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf (accessed 2022-09-14).
- (63) *File: pPICZα A, B and C: Pichia expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of secreted, recombinant proteins*. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf (accessed 2022-09-14).
- (64) Eck, A.; Schmidt, M.; Hamer, S.; Ruff, A. J.; Förster, J.; Schwaneberg, U.; Blank, L. M.; Wiechert, W.; Oldiges, M. Improved Microscale Cultivation of Pichia Pastoris for Clonal Screening. *Fungal Biol Biotechnol* **2018**, *5* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S40694-018-0053-6/FIGURES/6>.
- (65) *File: Plasmid DNA Purification: User Manual, NucleoSpin® Plasmid, NucleoSpin® Plasmid (NoLid), NucleoSpin® Plasmid QuickPure*. MACHEREY-NAGEL. <https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/PT4022/PT4022-1.pdf> (accessed 2022-09-14).
- (66) GmbH, M. *Time Saver Qualified Restriction Enzymes | NEB*. <https://international.neb.com/products/restriction-endonucleases/hf-nicking-master-mix-time-saver->

- other/time-saver-qualified-restriction-enzymes/time-saver-qualified-restriction-enzymes (accessed 2022-09-14).
- (67) GmbH, M. File:PCR Clean-up Gel Extraction User Manual NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up. **2017**.
- (68) Laboratories, C. File:TALON® Metal Affinity Resins User Manual.
- (69) *Purification of Histidine-Tagged Proteins using TALON® Superflow*. <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-purification/purification-using-talon-superflow> (accessed 2022-09-17).
- (70) Chial, H. J.; Thompson, H. B.; Splittgerber, A. G. A Spectral Study of the Charge Forms of Coomassie Blue G. *Anal Biochem* **1993**, *209* (2), 258–266. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1117>.
- (71) *Bradford Assay (Bradford Reagent) | Bio-Rad*. <https://www.bio-rad.com/featured/en/bradford-assay.html> (accessed 2022-09-16).
- (72) *BCA or Bradford Protein Assay: Choosing Between the Two*. <https://info.gbiosciences.com/blog/bca-or-bradford-protein-assay-choosing-between-the-two> (accessed 2022-09-16).
- (73) File:Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices for Volumes up to 500 ML User Guide Spin. **2009**.
- (74) Edge, M. E. Interleukin-1 Signalling in Disease; 2015.
- (75) Khader Varadaraj, V. M. File:Biochemistry Protein Biochemistry and Enzymology Purification of Enzymes Description of Module Subject Name Biochemistry Paper Name 08 Protein Biochemistry and Enzymology Module Name/Title 23 Purification of Enzymes-I.
- (76) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- (77) Smith, B. J. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In *Proteins*; Humana Press: New Jersey; pp 41–56. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:41>.
- (78) *File:Process of Denaturation.svg*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Process_of_Denaturation.svg (accessed 2022-09-16).
- (79) *File:Protein-SDS interaction.png*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein-SDS_interaction.png (accessed 2022-09-16).
- (80) *Beta-Mercaptoethanol | HSCH₂CH₂OH*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Beta-Mercaptoethanol> (accessed 2022-09-16).
- (81) *Addgene: Protocol - How to Create a Bacterial Glycerol Stock*. <https://www.addgene.org/protocols/create-glycerol-stock/> (accessed 2022-09-16).
- (82) *Multiple Sequence Alignment - CLUSTALW*. <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw> (accessed 2022-09-17).
- (83) Combet, C.; Blanchet, C.; Geourjon, C.; Deléage, G. NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *Trends Biochem Sci* **2000**, *25* (3), 147–150. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01540-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01540-6).
- (84) Robert, X.; Gouet, P. Deciphering Key Features in Protein Structures with the New ENDscript Server. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42* (W1), W320–W324. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU316>.
- (85) Mariani, V.; Biasini, M.; Barbato, A.; Schwede, T. LDDT: A Local Superposition-Free Score for Comparing Protein Structures and Models Using Distance Difference Tests. *Bioinformatics* **2013**, *29* (21), 2722. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTT473>.
- (86) *AlphaFold Protein Structure Database*. <https://alphafold.ebi.ac.uk/faq> (accessed 2022-09-18).
- (87) Schuster K. Michael; Grabner Martin. *EMBOSS: epestfind*. Austrian National EMBnet node. <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind> (accessed 2022-09-18).
- (88) Chou, D. K.; Krishnamurthy, R.; Randolph, T. W.; Carpenter, J. F.; Manning, M. C. Effects of Tween 20 and Tween 80 on the Stability of Albutropin during Agitation. *J Pharm Sci* **2005**, *94* (6), 1368–1381. <https://doi.org/10.1002/JPS.20365>.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

6.1. Φορείς έκφρασης των *PpETH* και *TcETH*

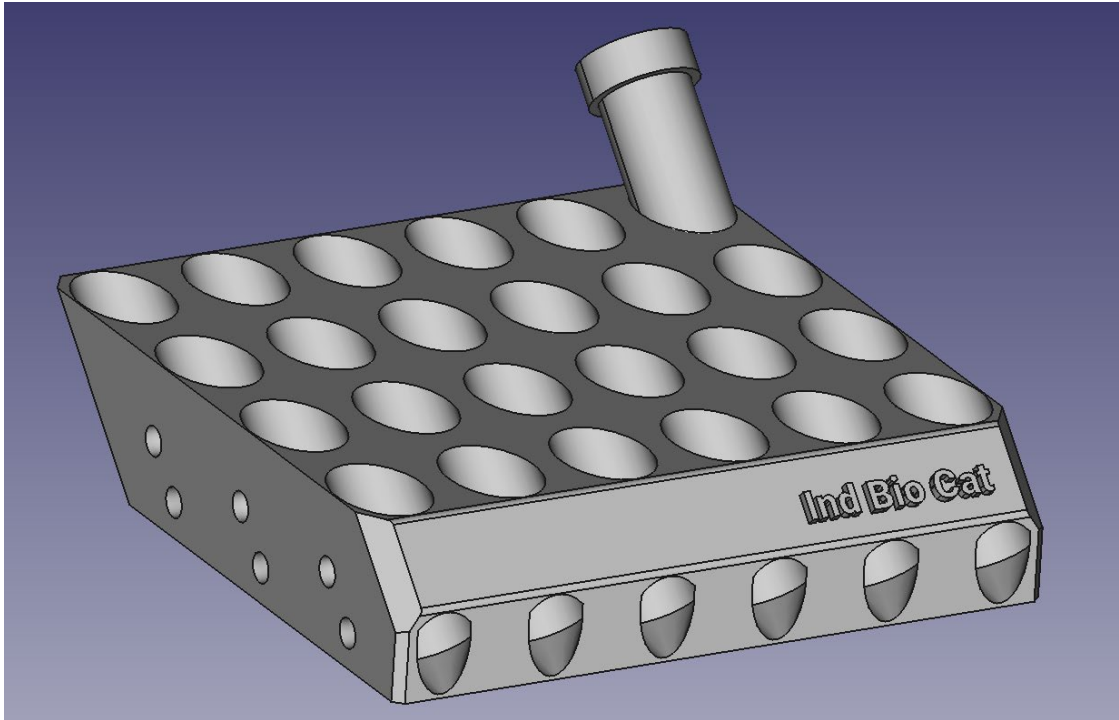
>PpETH in pPICZαC; EcoRI at 5-end and XbaI at 3-end / A after EcoRI:Gly / GC before XbaI:Ala

AGATCTAAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAGGTCATTCTCACACATAAGT
GCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACAC
CCACTTTTCCATCGAAAAACCAGCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCCTTCTATTAGGCTAC
TAAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTGATGTTTGTATTCCGAATGCAACAAGC
TCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAAATGGC
CCAAAACCTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGT
CGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAAACTTCCAAAAGTCGGCATACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTG
ACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTATCGCTTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAA
CGCAAATGGGAAACACCCGCTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATA
CTGCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTAACCTGTTCTAACCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCT
GCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTCCAATTGACAAGCTTTTGT
TTTAAACGACTTTTAAACGACAACTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTTCGAAAACGATGAGATTTCCCTCAATTTTTACT
GCTGTTTTATTCCGACGATCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAAATCCGGC
TGAAGCTGCTACGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAATAACG
GGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAA
GCATCGATGAATTCACAAGAGCCAGCTCTGACTGAAGACGACTTTAGCATCCAGAAATTGAAGGAGGTGATGCACTGG
CTCAATTGGCCCAATTGGCTGCAGACTCTTCTCAAGAGACTGCTCTGAGGATGGCCAAACGAGGTCTGAACTCGGGGTG
TAGTCTTCTCAGATCAAAGTTAGAAGAGAATGGAGAACTCTACAAGTGTCAACGAAAACAGTATATAGCTTCGGTTA
AATGTCTGCAAACAAAGCCTTTTTTTGACCCCAATATTACCGCCGCTAAGTCTCTGTTTGTGATGATTTTTGTGGAG
TTTCATGTTTTTCAAACAGGTTTCGATCCATTTAAACAGCTACTTTTTCTGACCTGGCACAGATATTTCTGTATACATATGAGA
CAAAGCTGAGAGAGGAATGCGGTTACACCCGACCATTACCATACTGGGAATGGGGTTAGATGTCAACAACCCAAACGC
CAGCCCCGTCTTCGATGGTTCGACACATCGCTTTCTGGAAATGGAGCTTTTTTGCACACGAGGGAATCCAGATGGTC
CAACCCATTAATGGGAATATCCTTAAGCTGCCACCTGGAATGGGGTGGATGTGTTACTAAGGGCCCATCAAGATAT
GAAGTTCATTTTGAACAATTATACTACCAGTCTATGGTCAACCAATCTTACCGCGCTCGAGAATCCAATTGCAGATAA
TGAGAGATGCTTAAAAAGGGACTTGAACGCTGGAATTGCTAAAAGGTTTACATCCTTTTTGAACCTGACAAGCGTCATA
TCAAGAACAATAATATTGAGATGTTTCAAGCCCATTGCAAGGCGATGATAGATACGCTTGAACCAGCTTGGTGTTCAT
GGAGGTGGGCACATACAATTGGTGGGGACCCAGGAGGTGACCCTTTTATTTCCCGGGCGACCCAGCTTTTTACCTG
CATCATGCACAGATAGACAGGATATACTGGATCTGGCAGATGCTGGACTTAAAAACAGACAAGGAGTGCATGGTACAG
CTACATTGCAAAAACAACCCCTCTGCCAATGTTACTGTAGAAGATACAATAGACCTCTCGCCTCTGGCTCCACCAGTT
AAGATTAAGATTTGATGAACACTGTAGGTGGGTCTCCTTTGTGTTATATATATTTGGAGAATCTCTATTTTTAGGGCGG
CTAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGCTCGACCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCT
TAGACATGACTGTTCTCAGTTCAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAG
AATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGACTTTTTTATTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTTGTC
ATTTTTGTTTCTCTCGTACGAGCTTGTCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTGGGA
AAATCATTCCGAGTTTGTGATTTTTCTTGGTATTTCACCTCTCTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAACCTTCTGTTGT
GCGGATCCCCACACACCATAGCTTCAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGCATCG
CCGTACCCTTCAAACACCCAAAGCACAGCATACTAAATTTTCCCTCTTTCTTCTCTAGGGTGTCTGTTAATTACCCGTAC
TAAAGTTTTGAAAAGAAAAAGAGACCCGCTCGTTTCTTTTCTTCTGCGAAAAGGCAATAAAAAATTTTTATCACGTTT
CTTTTTCTGAAATTTTTTTTTTATGTTTTTCTTTTCTTTCAGTGACCTCCATTGATATTTAAGTTAATAAACGGTCTTCAATTT
CTCAAGTTTTCAGTTTCAATTTTTCTTGTCTATTACAATTTTTTACTTCTTGTTCATTAGAAAAGAAAGCATAGCAATCTAAT
CTAAGGGCGGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCAT
GGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGTCCACCGCGCGACGTCGCCGGAGCGGTGAGATTCTGGACCGACCCGGC
TCGGTCTCCCGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCG
GTCCAGGACCAGGTGGTGC CGGACAACACCTGGCCTGGGTGTGGTGC CGCGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGT
GGTCCGAGGTGCTGTCCACGAACCTCCGGGACGCTCCGGGCCCGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGG
GCCGGAGTTCCGCCCTGCGGACCCGCGCGCAACTGCTGCACCTTCTGGCCGAGGAGCAGACTGACACGTCCGA
CGGCGGCCACGGGTCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCCCTTTTCTTTGTGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGC
TTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGATAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTA
TTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCAT
GTAACATTAATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTAATTTGCAAGCTGGAGACCAATG
TGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTT
GACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGGCTTTCC
CCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCCGGAA
GCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCA
CGAACCCCGCTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAAGTCCAACCCGGTAAAGACACGACTTA
TCGCCACTGGCAGCAGCTGTTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGG
TGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG
TTGGTAGCTCTTGTATCCGGCAAAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAG
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAAACGAAAACCTACGTTAAGGGA
TTTTGGTCATGAGATC

>Pcur in pPIC2αC; EcoRI at 5-end and XbaI at 3-end / A after EcoRI:Gly / GC before XbaI:Ala

AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAGGTCATTCTCACACATAAGT
GCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACAC
CCACTTTTGGCATTGCAAAAACCCAGTATTGGGCTTATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCTTATTAGGTAC
TAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTTGTATTTCCGAATGCAACAAGC
TCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAAATGGC
CCAAACTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCAAGATGAACTAAGTTTGGT
CGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAAACTTCCAAAAGTCGGCATACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTG
ACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTATCGTTCTGAACCCGGTGCACCTGTGCCGAAA
CGCAAATGGGAAACACCCGCTTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATA
CTGCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCT
GCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAAATTGCGACTGGTCCAATTGACAAGCTTTTGT
TTTAAACGACTTTTAAACGACAACTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTTCGAAAACGATGAGATTTCCCTCAATTTTTACT
GCTGTTTTATTTCGAGCATCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGC
TGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCAAAATAACG
GGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAA
GCATCGATGAATTCAGCTGCAGCTGTGAAACGTGATTTCTCAGAAGGACAAATTGATAACGGCGAGGCTCTATCGCAATT
GTCCACTGAGGCTTCAATCCTCTCAACAATTACATAAGCGTTTGGTGCCACGTGGTGCTAATTCTGGATGTACAGTAG
ATAAGATTAGGATAAGGCGTGAAGTGGAGAACTTCCCAAAATCCGAAAGAAGGGCTTTTATAGCAGCTGTTAAATGTTTG
CAAAGTTCCCGTCCCTGTTGGATCCAGCTGCTGATCCAGCTTCAAGACGTTGTGGACGTTTGTGGGACGTTTCTGCTATCCATT
GTTCCAAACTGGTAACATACATCTCACTGCTACTTTCTTAACTGGCACCGGATATTTACATGGACTTACGACAAAAAAT
GAGAGATGTCTGTGGATATAAAGGTACATTTCCCTACTGGGAGTGGGGTCTCGATGTTTATAATCCAGCCGGTTCGCCA
GTGTTTCGATGGTTCGATACTTCGTTGTCTGGAAACGGTGCCTATTCGCCTCACGAAGGACTGTGGATAACTCAGGCTTT
CTCTGGAAACGTTTTGAAATTGCAGCCAGGAAGTGGTCTGGTGTGTGACAAGCGGGCCCTTAAAGGACTTAAAGGTG
CGCTAGGAACCCGTAGTGATGCCTCAGTACGGAATCCTAATTGGACTGGATCTGCCAATCCTTTGGGTGAAGGAATG
AGAGATGTTTAAAGAGAGACTTGAACGCCTGGGTGGCAAGCGCTTTCACCTTCTTCCAGAAACACAACCCGAACCTTCCCT
GAGAACAATAATGTCGAGATGTTCCAAGCCATTATGCAAGCTGACGATAGGTACGTCGTCGGGCAATTGGGTGTACATG
GTGGTGGTCACTACACAAATCGGTGGAGACCCTGGTGGCAGCCATTTATTTCCCTGGGGACCCTGGCTTTTACCTTCA
TCATGCACAGATTGACCGTGTCTGGATTGGCAAATGTTGGATTTTCAGCATCGTCAGGGTGTGGGGTACGTCTA
CATTACAGAATATGCCACCTTCTCCTAATGTTACCGTAGAAGACAGATGACATTTCCCACTAAATGGACCAGTAAAAA
TCAAGGATCTCATGAAACCCGTTGGTGGTCCCATTTTGGTATGATGTTTAAAGGAGTCTTAGATATGAAGACAAGTA
CATCCTTCGCACTGCTTGGACTCATTGCTGGTACCGCTGTTGCCAAAACAGATTTAGCCGGTGTACTCGTACACAAATG
GGTAATACTTATGTGATTACGTACCCGATACCGGTGAGATCTGTTCTTACTTGACTGTGGTGGAGGTAGGGCTCCACC
GAAAACCACTGTCCCGGTTGTGCTGCTTACGAGGGGACCCTACCGTCCAGCCTTCTGTTCTTGCCTGGATTGGCGC
CGCTGCTAGTACTTCCACTCCATCAGGAGCATACAGGTCCTGCTTACCCTTCCGGTGTGGGGCAGGCGATCT
ACTACACCCACCGCTACAGGGGTAGTTCTGATCTCCACATCGTCTGGCAGGACAAGACACAAGTAACTCAACGGTA
TTTTCTTAATCCACCTGGTAAGACAGTTATCATCACCGGCACAAAGGAAACCACTGCTGACTAGCGGAGGATCATCA
GGTGTCTTGGCTCAAAAACCAAGGGTTCATCTGGATCCTCCTCAAGCAGCACTGCCGGAGCTGCTGCAGTTACTGCTG
CTGCTAAGGGAGCCGCTGGACTTGTGCTGGTGTGCTGCTGCATACCTTGCATTAGAGAATCTCTATTTTCAGGGCGGCT
AGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTA
GACATGACTGTCTCAGTTCAGTTCAAGTTGGGCACCTACGAGAAGACCGGCTTGTCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTGAGAA
TGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTATTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTGTCTATT
TTGTTTCTTCTCGTACGAGCTTGTCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTTGGGAAAA
TCATTTCGAGTTTGTATGTTTTCTTGGTATTTCCACTCCTCTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTGCG
GATCCCCACACACCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTCCAGATTTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCCG
TACCCTTCAAAACACCAAGCACAGCATACTAAATTTCCCTCTTCTTCCCTTAGGGTGTGTTAATTACCCGTAATAA
AGGTTTGGAAAAAGAAAAAGAGACCCTCGTTTTTTTTCTCGTCAAAAAGGCAATAAAAATTTTTATCACGTTTCTT
TTTTCTGAAATTTTTTTTTTATGTTTTTCTCTTTCAGTGACCTCCATTGATTTAAGTTAATAAACGGTCTTCAATTTCTC
AAGTTTTCAGTTTCAATTTTCTTGTCTATTACAATTTTTTACTTCTTGTTCATTAGAAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTA
AGGGGCGGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACATAACCATGG
CCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGTCAACGCGCGCGACGTCGCCGGAGCGGTGCGATTCTGGACCGACCGGCTC
GGTTCCTCCGGGACTTCTGTGGAGGACGACTTCCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTCACCTGTTTCATCAGCGCGGT
CCAGGACCAGGTGGTGGCGGACAACACCTTGGCCTGGGTGTGGTGGCGGCGCCTGGACGACTGTACGCCGAGTGG
TCGGAGGTGCTGTCCACGAACCTCCGGGACGCTCCGGGCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGC
GGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCATCTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTCCGACG
GCGGCCACGGTCCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCCCTTTTCTTGTGATATCATGTAATTAAGTTATGTCACGCTT
ACATTCAGCCCTCCCCACATCCGCTCAACCGAAAAGGAAGGATTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATT
TTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATTTTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGT
AACATTATACTGAAAACCTTGTGAGAAAGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTAAATTTGCAAGCTGGAGACCAACATGTG
AGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGA
CGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTT
GGAAGCTCCCTCGTGCCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCAGTACCTGTCGCTTCTCCCTTCCCTTCCGGGAAGC
GTGGCGCTTTCTCAAGTGTACGCTGATGATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGACCG
AACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAAAGACACGACTTATC
GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT
GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTGCTGTAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTT
GGTAGCTCTTGTCCGGCAAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAA
AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACACGTTAAGGGATT
TTGGTCATGAGATC

6.2. Τρισδιάστατα εκτυπωμένη βάση επώασης Falcon

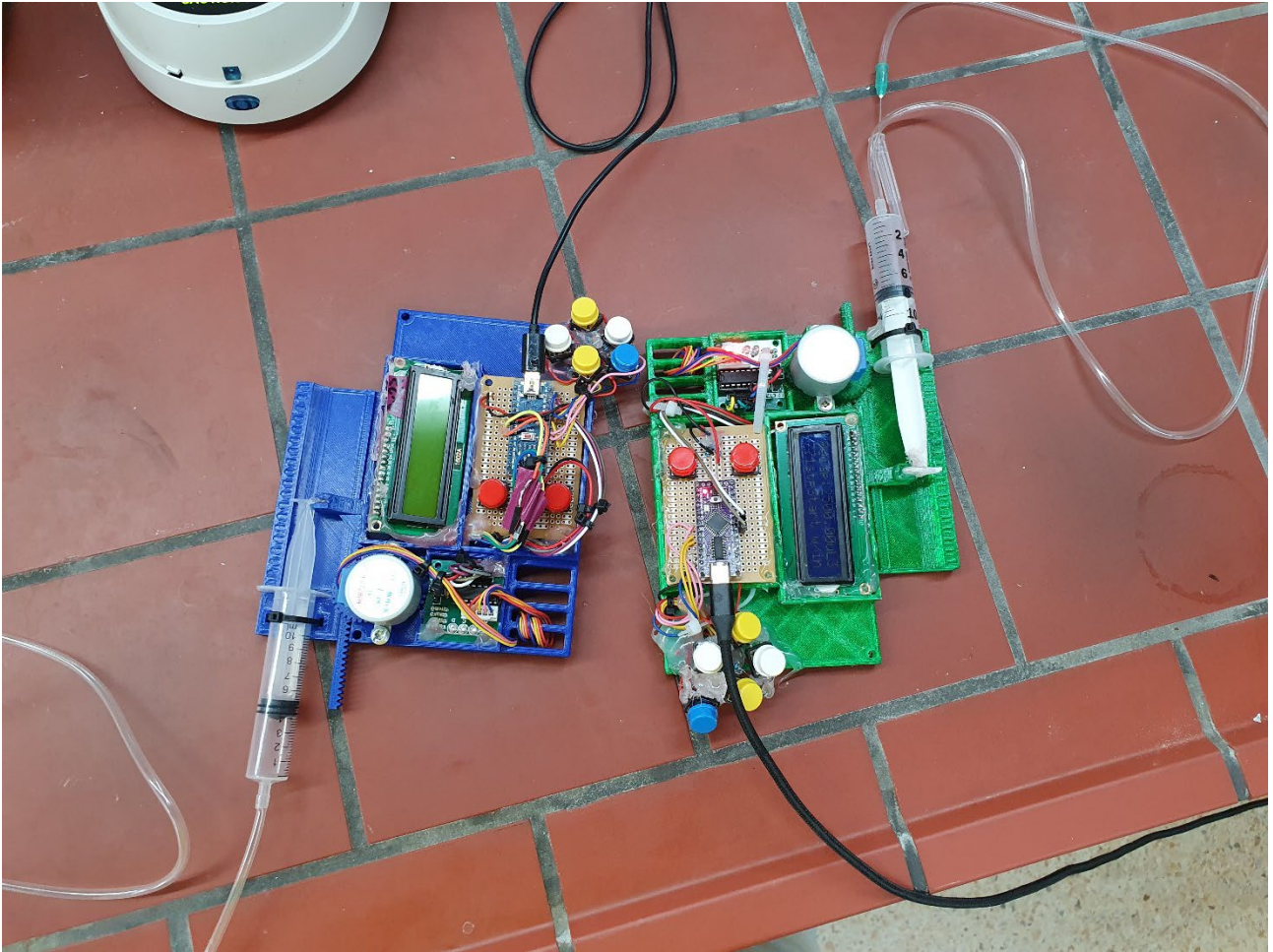


Εικόνα 13: Μοντέλο βάσης επώασης falcon 50 mL 24 θέσεων.



Εικόνα 14: Η βάση που χρησιμοποιήθηκε για επώσεις στο στάδιο της διαλογής επέτρεψε επαναλήψιμο έλεγχο πολλών στελεχών ταυτόχρονα.

6.3. Αυτόματο «τάισμα»



Εικόνα 15: Αυτόματες «τάιστρες» επέτρεψαν την προσθήκη μεθανόλης στις καλλιέργειες ακόμα και τις μέρες που λειτουργούσε το εργαστήριο.

Μοντέλο και κώδικας [εδώ](#).