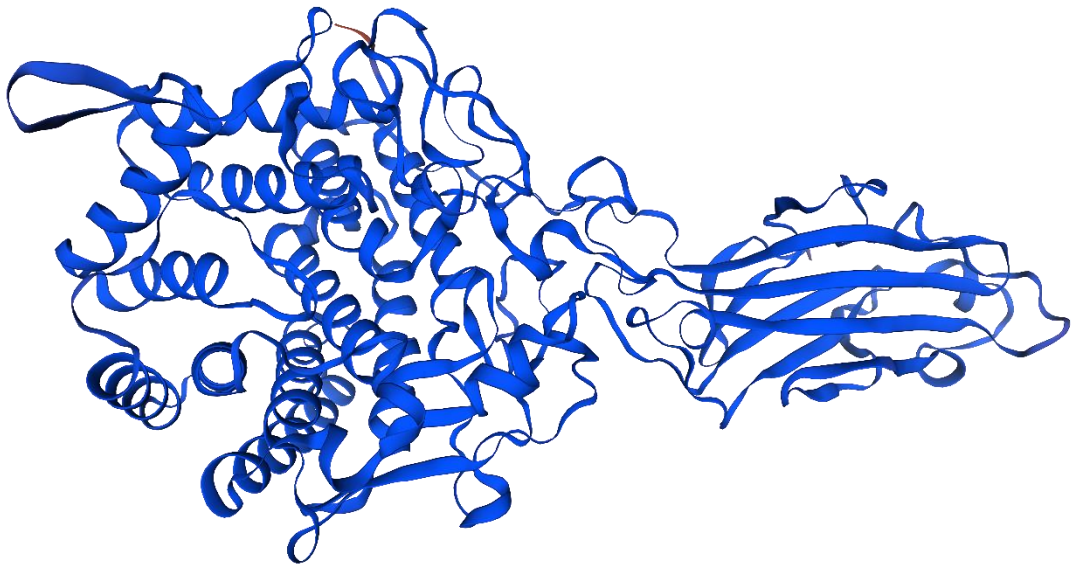




ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

**Υπερέκφραση και χαρακτηρισμός μιας θερμοσταθερής
GH9 κυτταρινάσης από το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus
safensis***



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΙΟΥ
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΔΙΟΜΗ ΜΑΜΜΑ
ΑΘΗΝΑ, 2023

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το έτος 2022-2023 στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και στο εργαστήριο Μικροβιολογίας της σχολής Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Διομή Μαμμά για την καθοδήγηση και την βοήθεια που παρείχε σε κάθε βήμα της εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Η συμβολή και η στήριξή της ήταν καθοριστικές.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας κ. Δημήτρη Χατζηνικολάου για την εμπιστοσύνη που επέδειξε επιτρέποντας σε σειρά πειραμάτων να πραγματοποιηθούν στο εργαστήριο του και την καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια τους.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη δόκτορα Στυλιανή Καλαντζή για την συνεχή επίβλεψη και εξαιρετική συνεργασία σε όλο το διάστημα εκπόνησης και συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη και των δύο παραπάνω εργαστηρίων για την άριστη συνεργασία μας, το ομαδικό πνεύμα και τη βοήθεια που παρείχαν απλόχερα σε οποιοδήποτε ζήτημα ή απορία προέκυψε.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	1
Abstract	2
Θεωρητικό Μέρος	3
1. Εισαγωγή	3
2. Κυτταρίνη	4
3. Ενζυμική Υδρόλυση της Κυτταρίνης.....	5
4. Γλυκοζυλ-υδρολάσες (GH οικογένειες)	8
5. Ενδογλουκανάσες.....	8
6. Η GH9 Οικογένεια.....	9
7. <i>Bacillus safensis</i>	10
8. Βιομηχανικές Εφαρμογές Ενδογλουκανασών	11
8.1 Στην Παραγωγή Βιοκαυσίμων	11
8.2 Στην Βιομηχανία Χαρτοπολτού.....	11
8.3 Στην Βιομηχανία Υφασμάτων	13
Υλικά και Μέθοδοι.....	15
1. Όργανα και Συσκευές	15
2. Αντιδραστήρια και Διαλύματα	15
3. Μικροοργανισμοί	16
4. Ετερόλογη Έκφραση της BsGH9	16
4.1 Καλλιέργεια του <i>B. safensis</i> σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό υλικό	16
4.2 Ενίσχυση του Γονιδίου της GH9 με Τεχνική Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)	18
4.3 Ηλεκτροφόρηση των Προϊόντων της PCR σε Γέλη Αγαρόζης	19
4.4 Απομόνωση Γονιδίου	19
4.5 Ενίσχυση Πλασμιδιακού Φορέα.....	20
4.6 Ανασυνδυασμός του Πλασμιδιακού Φορέα με το Γονίδιο Επιλογής	21
4.7 Επαγωγή Πρωτεΐνης.....	21
5. Απομόνωση και Καθαρισμός της Πρωτεΐνης	22
5.1 Θραύση Κυττάρων με Υπερήχους	22
5.2 Χρωματογραφία Συγγένειας	22
5.3 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών	22
5.4 Αφαλάτωση με Gel Filtration	22
6. Συμπύκνωση Πρωτεΐνης.....	22

7. Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών	23
8. Μέθοδος Δινιτρο-σαλικυλικού Οξέος (DNS Assay)	24
9. Μέτρηση Ενζυμικής Ενεργότητας της BsGH9.....	25
10. Χαρακτηρισμός της BsGH9.....	25
10.1 Επίδραση της Θερμοκρασίας στην Ενεργότητα και τη Σταθερότητα της BsGH9....	25
10.2 Επίδραση του pH στην Ενεργότητα και Σταθερότητα της BsGH9	25
10.3 Επίδραση Ιόντων Μετάλλων, EDTA και SDS στην Ενεργότητα.....	26
10. 4 Εξειδίκευση ως προς το Υπόστρωμα.....	26
10.5 Εύρεση Κινητικών σταθερών.....	27
10.6 Έλεγχος Ρόφησης της BsGH9.....	27
11. Προσδιορισμός προϊόντων υδρόλυσης	27
Αποτελέσματα	30
1. Βιοπληροφορική Μελέτη	30
2. Κλωνοποίηση και Υπερέκφραση του γονιδίου bsgh9.....	35
3. Προσδιορισμός Μοριακού Βάρους.....	38
4. Θερμοκρασία Δράσης	39
4. Θερμική σταθερότητα.....	43
5. Βέλτιστο pH Δράσης	47
6. Σταθερότητα σε Διαφορετικά pH	48
7. Εξειδίκευση ως προς το Υπόστρωμα.....	49
8. Κινητικές Παράμετροι	50
9. Επίδραση Ρυθμιστικών Παραγόντων	52
10. Ρόφηση της BsGH9.....	54
11. Προϊόντα Υδρόλυσης.....	55
Συμπεράσματα	58
Βιβλιογραφία.....	62

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Βιομετατροπή της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας σε βιομηχανικά προϊόντα	4
Εικόνα 2: Η Χημική δομή του μονομερούς της κυτταρίνης	5
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της κλασσικής θεωρίας της υδρόλυσης της κυτταρίνης.....	6
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της δράσης των LPMO's στην κρυσταλλική κυτταρίνη και τα προϊόντα που προκύπτουν	7
Εικόνα 5: Τα δομικά μέρη της GH9 ενδγλουκανάσης του <i>C. thermocellum</i> , GH9-CBM3c.....	10
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας του ενζυμικού εξευγενισμού τζιν υφάσματος από κυτταρινάσες με παραδείγματα οπτικού μικροσκοπίου.....	14
Εικόνα 7: Καλλιέργεια του <i>B. safensis</i> σε στερεό θρεπτικό υλικό LB-Άγαρ.	17
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτροφόρησης του DNA	19
Εικόνα 9: Χάρτης του πλασμιδίου <i>pet15b16s</i>	20
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του συμπυκνωτή πρωτεϊνών από την εταιρεία Thermo Scientific.....	23
Εικόνα 11: Αναπαράσταση της αντίδρασης μεθόδου DNS.	24
Εικόνα 12: Το όργανο HPAEC-PAD που χρησιμοποιήθηκε.....	29
Εικόνα 13: Χάρτης του γονιδίου <i>bsgh9</i>	31
Εικόνα 14: Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής της BsGH9.....	34
Εικόνα 15: Τρισδιάστατη δομή τεσσάρων φυτικών ενδογλουκανασών της οικογένειας GH9 οι οποίες διαθέτουν CBM3 από τέσσερα διαφορετικά ευρέως καλλιεργούμενα φυτά	35
Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εκκινητές τους <i>bsGH9-F-NotI</i> και <i>bsGH9-R-SpeI</i> σε μονήρη αποικία του <i>B. safensis</i>	36
Εικόνα 17: Καλλιέργεια <i>E. coli</i> BL21 μετά την εισαγωγή του ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού φορέα.....	37
Εικόνα 18: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση του εσωκυτταρικού υγρού μετά τη θραύση των κυττάρων.....	38
Εικόνα 19: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση της BsGH9 μετά τις διαδικασίες καθαρισμού και συμπύκνωσης.	39
Εικόνα 20: Χρωματογράφημα της υδρόλυσης της β-γλουκάνης από την BsGH9, για χρόνο επώασης (—) 6 ώρες και (---) 20 ώρες.....	56
Εικόνα 21: Χρωματογράφημα της υδρόλυσης του PASC από την BsGH9, για χρόνο επώασης (—) 6 ώρες και (---) 20 ώρες.	56
Εικόνα 22: Χρωματογράφημα της υδρόλυσης της καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνης (CMC) από την BsGH9, για χρόνο επώασης (—) 6 ώρες και (---) 20 ώρες.	57

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Σύσταση θρεπτικού υλικού LB-Agar.....	17
Πίνακας 2: Σύσταση του Master Mix της Phusion™ DNA πολυμεράσης.	18
Πίνακας 3: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος TAE 10x.	19
Πίνακας 4: Συγκέντρωση και καθαρότητα των απομονωμένων μορίων DNA.	36
Πίνακας 5: Βιοχημικά χαρακτηριστικά βακτηριακών GH9 ενδογλουκανασών.....	41
Πίνακας 6: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης της BsGH9.	44
Πίνακας 7: Θερμοδυναμικές παράμετροι απενεργοποίησης της BsGH9.	46
Πίνακας 8: Σχετική ενεργότητα της BsGH9 σε διάφορα υποστρώματα.	50
Πίνακας 9: Κινητικές Σταθερές της BsGH9 για CMC, PASC και β-γλουκάνη.	52
Πίνακας 10: Αρχική, ελεύθερη και προσροφημένη πρωτεΐνη για χρόνο επώασης 15 λεπτά.	54
Πίνακας 11: Χρόνοι έκλουσης πρότυπων δειγμάτων ολιγομερών της γλυκόζης από το όργανο HPAEC-PAD.	55

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς ισοδύναμων γλυκόζης με τη μέθοδο DNS.	24
Διάγραμμα 2: Μεταβολή συγκεντρώσεων διαλυτών Α και Β κατά την έκλυση των προϊόντων.	28
Διάγραμμα 3: Επίδραση της Θερμοκρασίας στη Δραστικότητα της BsGH9.....	40
Διάγραμμα 4: Θερμική σταθερότητα της BsGH9 σε θερμοκρασία (α) (○) 60 °C, (◆) 70 °C και (■) 80 °C και (β)(□) 40 °C, (●) 50 °C.....	43
Διάγραμμα 5: Διάγραμμα Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης E(a)d.....	45
Διάγραμμα 6: Επίδραση του pH στην δραστικότητα της BsGH9.....	48
Διάγραμμα 7: Σταθερότητα της BsGH9 σε διαφορετικά pH για χρόνο επώασης (α) 24 και (β) 48 ώρες.....	49
Διάγραμμα 8: Διαγράμματα διπλού αντίστροφου Lineweaver-Burk για την μεταβολή της ταχύτητας παραγωγής προϊόντος συναρτήσει της συγκέντρωσης (α) καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνης, (β) PASC και (γ) β-γλουκάνης (barley).....	51
Διάγραμμα 9: Επίδραση μετάλλων στην ενεργότητα της BsGH9 μετά από επώαση μισής (▪) και μίας (■) ώρας.	53

Περίληψη

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η BsGH9, μία ενδογλουκανάση της οικογένειας 9 των γλυκοζυλ-υδρολασών ταυτοποιήθηκε στο βακτήριο *Bacillus safensis* (ATHUBA63). Το γονίδιο της BsGH9 κλωνοποιήθηκε και υπερεκφράστηκε επιτυχώς σε δεκτικά κύτταρα *Escherichia coli* BL21 από τα οποία απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το ένζυμο. Η BsGH9, παρουσιάζει μοριακό βάρος ~69kDa και τρισδιάστατη δομή η οποία περιλαμβάνει ένα καταλυτικό κέντρο και μία βοηθητική μονάδα πρόσδεσης υδατανθράκων (CBM3). Η BsGH9, παρουσιάζει υψηλότερη εξειδίκευση στη β-γλουκάνη (barley), ακολουθούμενη από την κυτταρίνη επεξεργασμένη με φωσφορικό οξύ (PASC) και τη λιχενάνη (Icelandic moss). Παρουσιάζει θερμοκρασιακό βέλτιστο στους 60 °C και βέλτιστή δράση σε pH ίσο με 6. Δοκιμές σταθερότητας έδειξαν ότι η BsGH9, παρουσιάζει χρόνο ημιζωής 74,53 λεπτά στους 60 °C και διατηρεί πάνω από 85% της ενεργότητας της μετά από 48 ώρες στο εύρος τιμών pH 5 έως 8. Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης ($E_{(a)d}$) υπολογίστηκε 198,51 KJ/mol. Με χρήση των υπολογισθαισών τιμών της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης ($E_{(a)d}$) και των σταθερών θερμικής απενεργοποίησης (k_d), υπολογίστηκαν οι μεταβολές των θερμοδυναμικών μεγεθών, ενθαλπία (ΔH^*), εντροπία (ΔS^*) και ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG^*) κατά τη θερμική απενεργοποίηση της BsGH9. Οι κινητικές παράμετροι K_m και v_{max} υπολογίστηκαν για την υδρόλυση της καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνης (CMC), της β-γλουκάνης (barley) και της κυτταρίνης επεξεργασμένης με φωσφορικό οξύ (PASC). Η παρουσία ιόντων μαγγανίου (Mg^{2+}) ενεργοποιεί την BsGH9 ενώ η παρουσία τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) και δισθενούς χαλκού (Cu^{2+}) αναστέλλει την δράση της. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας SDS και ο χηλικός παράγοντας EDTA όπως και τα υπόλοιπα μεταλλικά ιόντα που εξετάστηκαν (K^+ , Na^+ , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}), δεν επηρέασαν σημαντικά τη δράση της. Η ανάλυση των προϊόντων υδρόλυσης των CMC, PASC και β-γλουκάνης, έδειξε ότι τα κυριότερα προϊόντα υδρόλυσης είναι η γλυκόζη και η κελλοβιόζη. Τέλος, η BsGH9 εμφάνισε ικανότητα προσρόφησης στην κρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel).

Abstract

BsGH9, a novel endoglucanase of the Glycoside Hydrolase family 9, detected and identified in *Bacillus safensis* (ATHUBA63) strain. The gene encoding BsGH9 was cloned and successfully overexpressed in *Escherichia coli* BL21 competent cells. The purified BsGH9 shows a molecular mass of ~69kDa and presents a structure that is composed of a catalytic domain and one carbohydrate binding module (CMB3). BsGH9 displayed high enzymatic activity on endoglucanase substrates such as β -glucan (barley), Phosphoric acid swollen cellulose (PASC) and lichenan (Icelandic moss). The optimum temperature was detected at 60 °C and the optimum pH was detected at 6. Stability tests yielded that BsGH9 displays a half-life of 74,53min at 60 °C and retains over 85% of its specific activity after 48 hours in a pH range of 5-8. The thermal inactivation energy ($E_{(a)d}$) on CMC was calculated to be 198,51 KJ/mol. The value of $E_{(a)d}$ and thermal deactivation constant (k_d) were used to also calculate the changes in enthalpy (ΔH^*), entropy (ΔS^*) and Gibbs free energy (ΔG^*) during thermal inactivation. The kinetic parameters K_m and v_{max} were determined on CMC, PASC and β -glucan. The enzyme shows increase in activity when in the presence of Mg^{2+} , is tolerant to the presence of most metal ions (K^+ , Na^+ , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) as well as the chelating agent EDTA and of SDS (an anionic detergent) but shows significant loss of specific activity in the presence of 5mM of Fe^{3+} and Cu^{2+} . Hydrolysis product analysis on CMC, PASC and β -glucan, determined that the main products of BsGH9 are glucose and cellobiose. Finally, BsGH9 displayed docking activity on crystalline cellulose (Avicel).

Θεωρητικό Μέρος

1. Εισαγωγή

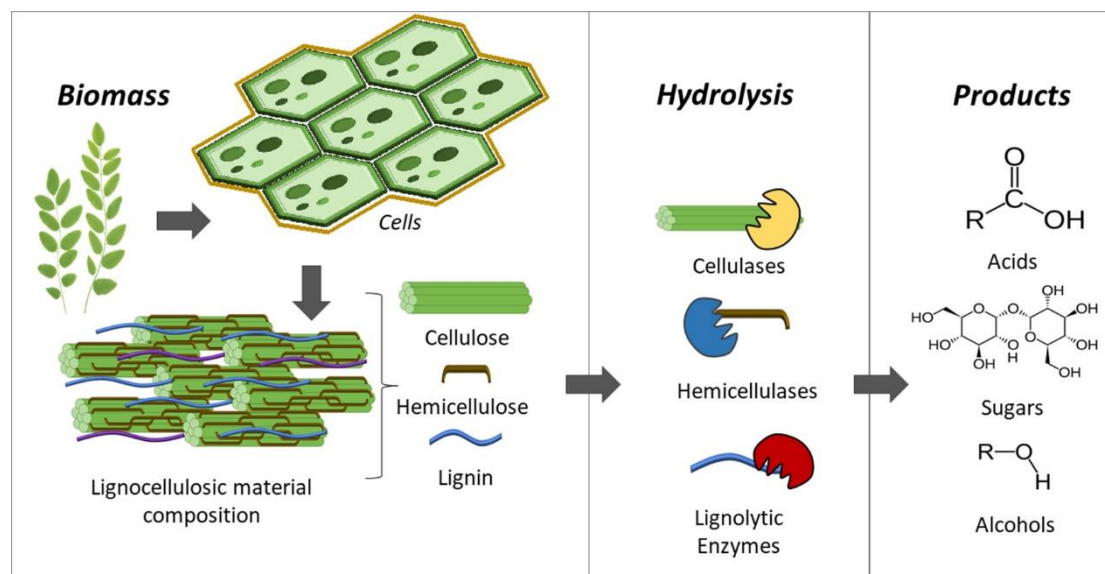
Η διαρκής αύξηση των παγκόσμιων ενεργειακών αναγκών, καθώς και η επιβάρυνση του περιβάλλοντος, η οποία παρατηρείται λόγω της αύξησης των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και άλλων αερίων που επιβαρύνουν το φαινόμενο του θερμοκηπίου, έχει καταστήσει την μεταστροφή σε ανανεώσιμες πηγές αναγκαία (Aich et al., 2017).

Η ταχεία κατανάλωση των μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας προκαλεί μια αναγκαία ανακατεύθυνση του ενδιαφέροντος, προς νέες, ανανεώσιμες πηγές, όπως η παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα (Simmons et al., 2008). Τα βιοκαύσιμα, τα οποία παράγονται από την κατεργασία της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, παρουσιάζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων σε σχέση με τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς, με κυριότερο, την χαμηλότερη εκπομπή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂), η οποία υπολογίζεται ότι μπορεί να αγγίξει μέχρι και το 86% (Gollakota et al., 2018). Ακόμα, παρά το γεγονός ότι η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα αποτελεί πάνω από το 50% της ετήσια παραγόμενης βιομάζας, μόλις το 10% από την ποσότητα αυτή αξιοποιείται αποτελεσματικά (Awasthi et al., 2023). Η αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, σύμφωνα με την Παγκόσμια Επιτροπή Ενέργειας (International Energy Agency, IEA) έχει την δυνατότητα παραγωγής ενέργειας μεγέθους 718 TWh. Αντίστοιχα, η οικονομική αξία της βιομάζας υπολογίζεται στα 127 δισεκατομμύρια δολάρια το 2022 με αναμενόμενη αύξηση πάνω από τα 200 δισεκατομμύρια το 2023.

Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, αποτελείται κυρίως από τα φυσικά βιοπολυμερή κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη και από εκχυλίσματα όπως λίπη, λιπίδια, στερεοειδή, τανίνες, φαινολικές και φλαβονοειδής ενώσεις, με την κυτταρίνη να αποτελεί το βασικότερο συστατικό στην λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα φυτικής προέλευσης (Fatih Demirbas, 2009). Τα τρία βασικά συστατικά της βιομάζας συναντώνται σε διαφορετικές αναλογίες ανάλογα με την προέλευση της. Διαφορετικά μέλη των φυτικών ιστών, περιέχουν διαφορετικές αναλογίες κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης, έτσι ώστε το κυτταρικό τοίχωμα του εκάστοτε ιστού να διαθέτει τις απαιτούμενες δομικές ιδιότητες. Ακόμα, σημαντική διαφορά τόσο στην αναλογία των τριών συστατικών αλλά και στο περιεχόμενο σακχάρων των ημικυτταρινών ανάλογα με το είδος των φυτών και τον τρόπο με τον οποίο η βιομάζα καλλιεργήθηκε και συλλέχθηκε. Σε γενικά πλαίσια, το 90% της ξηρής λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας αποτελείται από 35-55% w/w κυτταρίνη, 20-40% ημικυτταρίνη και 10-25% λιγνίνη.

Η παραγωγή της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, δεν ανταγωνίζεται τον τομέα των τροφίμων γεγονός που καθιστά την παραγωγή καυσίμων μία οικονομικά βιώσιμη εναλλακτική στο μέλλον. Ωστόσο, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, καθώς αποτελεί ετερογενές υλικό είναι δύσκολο να αποπολυμεριστεί (Soni et al., 2018). Για το λόγο αυτό, απαιτούνται ορισμένα στάδια προκατεργασίας, έτσι ώστε οι πολυσακχαρίτες

που αποτελούν τα συστατικά της να μπορούν να διασπαστούν στα μονομερή σάκχαρα από τα οποία αποτελούνται μέσω ενζυμικής υδρόλυσης.



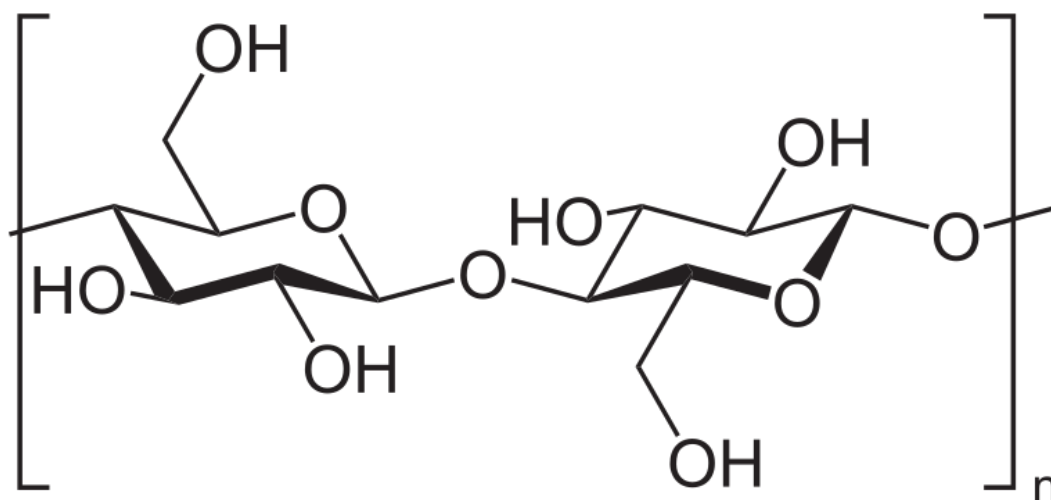
Εικόνα 1: Βιομετατροπή της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας σε βιομηχανικά προϊόντα (Saldarriaga-Hernández et al., 2020).

2. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη, είναι ένα φυσικό βιοπολυμερές το οποίο αποτελείται από μία γραμμική αλυσίδα μορίων D-γλυκόζης, ενωμένα με $\beta(1-4)$ δεσμούς. Ο βαθμός πολυμερισμού του μορίου, κυμαίνεται από εκατοντάδες έως και 10^4 μονομερή. Πρόκειται για το αρχαιότερο και πλέον διαδεδομένο φυσικό πολυμερές στον πλανήτη και αποτελεί μία από τις πολυτιμότερες ανανεώσιμες πρώτες ύλες (Charreau et al., 2013; Kargarzadeh et al., 2018)

Κατά τη βιοσύνθεση της κυτταρίνης, τα μονομερή της γλυκόζης, περιστρέφονται με τακτική διάταξη, οδηγώντας στο σχηματισμό σταθερών δομικών αλυσίδων. Η συγκέντρωση μεγάλου αριθμού αλυσίδων κυτταρίνης, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ινιδίων, τα οποία συνενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Έτσι, σχηματίζονται μεγαλύτερες δομές, οι οποίες ονομάζονται μικροϊνίδια, μήκους από 5-50 nm έως και μερικά μικρόμετρα τα οποία πακτώνονται στις ίνες του πολυμερούς. Το ποσοστό με το οποίο οι αλυσίδες γλουκάνης συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου, είναι ενδεικτικό της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Όταν όλα τα σημεία του πολυμερούς στα οποία μπορεί να δημιουργηθεί δεσμός υδρογόνου πληρωθούν, σχηματίζεται μία πυκνή τρισδιάστατη δομή, μικρής διαπερατότητας σε νερό, η οποία παρουσιάζει και υψηλή αντίσταση σε ένζυμα, γεγονός που καθιστά την υδρόλυση της κυτταρίνης δύσκολη διαδικασία. Παράλληλα ωστόσο, επειδή οι αλυσίδες της γλουκάνης μπορούν να συνδεθούν και με σταυροδεσμούς η κυτταρίνη περιλαμβάνει και μία άμορφη περιοχή η οποία είναι εύκολο να διασπαστεί. Λόγω της ύπαρξης τόσο άμορφων όσο και κρυσταλλικών περιοχών, η κυτταρίνη είναι αδιάλυτη στο νερό και στους περισσότερους κοινούς οργανικούς διαλύτες. Η άτακτη διαδοχή περιοχών υψηλής

στερεοχημικής οργάνωσης (κρυσταλλικές) με περιοχές μικρότερης (άμορφες), έχει ως αποτέλεσμα η κυτταρίνη να εμφανίζει μεγάλο βαθμό πολυμορφισμού.



Εικόνα 2: Η Χημική δομή του μονομερούς της κυτταρίνης

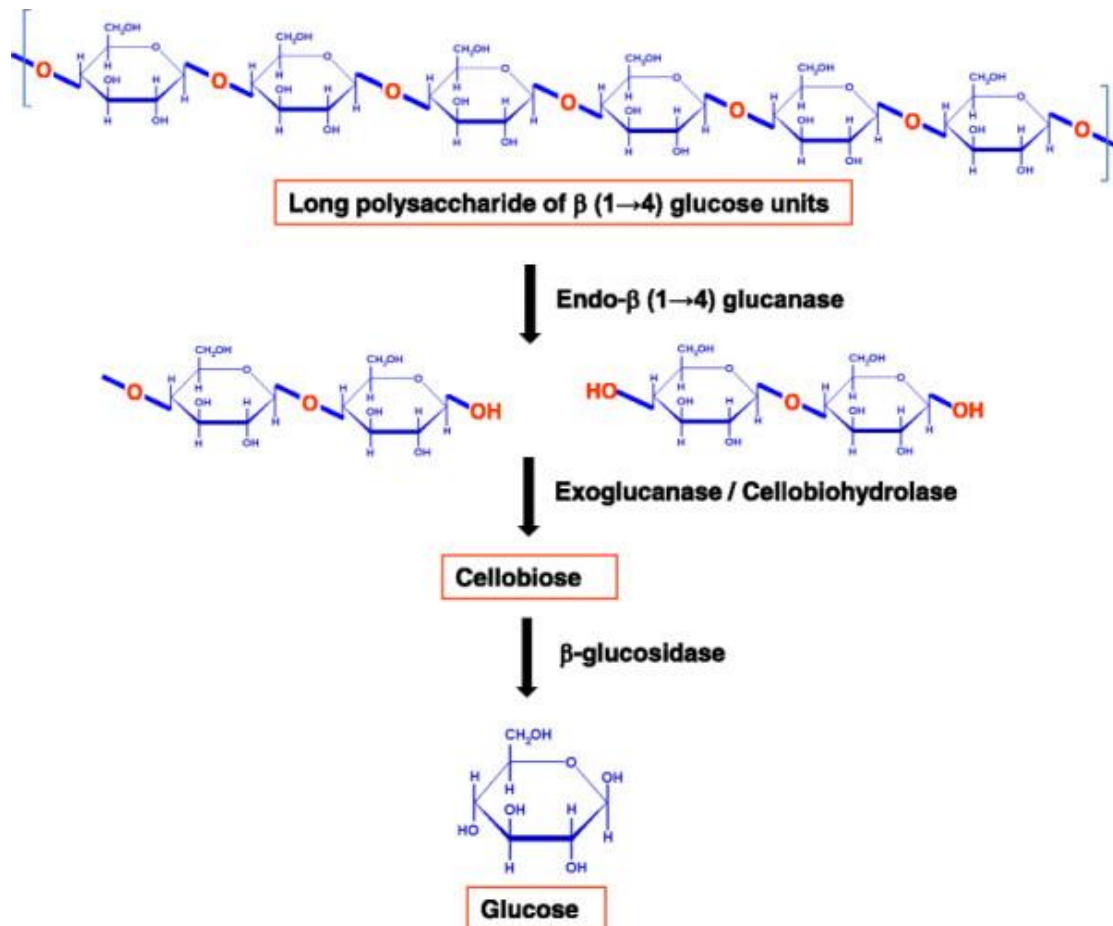
Τα μικροϊνίδια της κυτταρίνης, αποτελούν τα βασικά συστατικά για την κατασκευή του κυτταρικού τοιχώματος, ωστόσο, η ακριβής σύσταση εξαρτάται από την διαδικασία βιοσύνθεσης που ακολουθεί ο εκάστοτε οργανισμός. Το κυτταρικό τοίχωμα φυτικών κυττάρων, διαφοροποιείται από αυτά που συναντώνται σε βακτηρικά κύτταρα, καθώς το πρώτο, εμφανίζει μέση διάμετρο μικροϊνιδίων της τάξης των 2-4 nm ενώ στα βακτηριακά κύτταρα, συναντάται σχετικά μεγαλύτερο πάχος (4-8 nm).

3. Ενζυμική Υδρόλυση της Κυτταρίνης

Τα ένζυμα τα οποία υδρολύουν την κυτταρίνη, χαρακτηρίζονται ως κυτταρινάσες. Η ικανότητα υδρόλυσης της κυτταρίνης, εμφανίζεται σε πληθώρα οργανισμών, όπως βακτήρια, αρχαιοβακτήρια, και μύκητες, το μεγαλύτερο ποσοστό των οποίων αξιοποιεί κυτταρινολυτικά ένζυμα. Η υδρόλυση της κυτταρίνης, πρόκειται για δύσκολη διαδικασία, καθώς το πολυμερές της κυτταρίνης είναι προστατευμένο από ένα πλέγμα ημικυτταρίνης και λιγνίνης, αλλά και λόγω της σταθερότητας της κρυσταλλικής της δομής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να είναι απαραίτητη η συνδυαστική αξιοποίηση πληθώρας ενζύμων κάθε ένα από τα οποία αλληλοεπιδρά με την κυτταρίνη με διαφορετικό τρόπο.

Οι κυτταρινάσες, χωρίζονται σε τρεις βασικές ομάδες ενζύμων, οι οποίες είναι ενδογλουκανάσες ή ένδο-1,4-β-D-γλυκανοϋδρολάσες (EC 3.2.1.4), εξωγλουκανάσες ή 1,4-β-D-κελλοβιοϋδρολάσες (EC 3.2.1.91) και β-γλυκοζιδάσες ή β-D-γλυκοζιδογλυκοϋδρολάσες (EC 3.2.1.21). Συνήθως τα τρία είδη ενζύμων αυτά συναντώνται ταυτόχρονα σε ένα σύστημα κυτταρινολυτικής δράσης με χαρακτηριστικό κλειδί το γεγονός, ότι παραμένει προσκολλημένο στο υπόστρωμα για εκτεταμένο χρονικό διάστημα απελευθερώνοντας μόρια όλιγο-γλυκανών και κελλοβιοζης. Υπάρχουν δύο είδη κυτταρινασών που εμφανίζουν αυτό το χαρακτηριστικό, το ένα

χαρακτηρίστηκε ως κελλοβιοϋδρολάσες οι οποίες προσδένονται στα αναγωγικά ή μη-αναγωγικά άκρα της κυτταρινικής αλυσίδας κόβοντας μονομερή κελλοβιοζης, ενώ το δεύτερο χαρακτηρίστηκε ως ενδογλουκανάσες με ενδο/εξω ταυτόχρονη λειτουργία, οι οποίες ταυτόχρονα υδρολύουν την άμροφη περιοχή της κυτταρίνης και παράγουν, ποσοτικά, αναγωγικά σάκχαρα. Συνολικά, ρόλος της συνδυαστικής δράσης των τριών αυτών ενζυμικών ομάδων είναι η βαθμιαία υδρόλυση του πολυμερούς της κυτταρίνης με τελικό προϊόν μονομερή γλυκόζης.

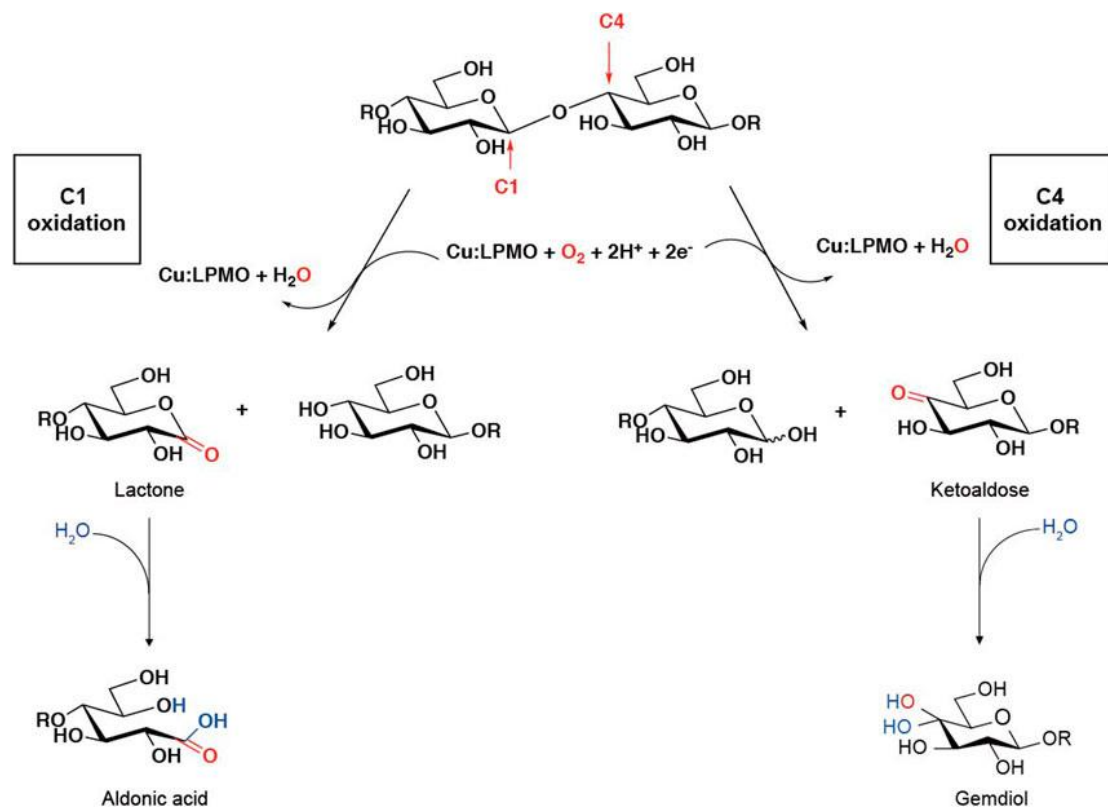


Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της κλασσικής θεωρίας της υδρόλυσης της κυτταρίνης (Lakhundi et al., 2015).

Το κλασικό μοντέλο ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης, αποτελούσε για πολλά χρόνια τη μοναδική θεώρηση του μηχανισμού της αντίδρασης αποπολυμερισμού η οποία ήταν ευρέως αποδεκτή. Ωστόσο, λόγω της δυσκολίας στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι κυτταρινάσες μπορούν να δράσουν στους πολυσακχαρίτες, όταν αυτοί βρίσκονται στο κρυσταλλικό τους περιβάλλον, αναπτύχθηκε η θεωρία ότι υπάρχει κάποιος παράγοντας κατανομής υποστρωμάτων ο οποίος μετασχηματίζει την κρυσταλλική κυτταρίνη, έτσι ώστε να είναι ευκολότερα προσβάσιμη στα κυτταρινολυτικά ένζυμα (Reese et al., 1950).

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι μικροοργανισμοί που διασπούν τη χιτίνη, ένα κρυσταλλικό ανάλογο της κυτταρίνης που απαντάται στα κελύφη των εντόμων και των καρκινοειδών, πράγματι παράγουν μια πρωτεΐνη που αυξάνει την προσβασιμότητα του υποστρώματος και ενισχύει την δραστηριότητα των

υδρολυτικών ενζύμων (Vaaje-Kolstad et al., 2005). Οι πρωτεΐνες αυτές αρχικά χαρακτηρίστηκαν ως μονάδες πρόσδεσης υδατανθράκων (Carbohydrating Binding Modules) και συγκεκριμένα CBM33 σύμφωνα με το πρωτόκολλο ονομασίας της βάση δεδομένων CAZy (Carbohydrate Active Enzymes) (Vaaje-Kolstad et al., 2010), Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μετά το 2010 οδήγησαν στο χαρακτηρισμό των ενζύμων αυτών ως μονοξυγενάσες λυτικών πολυσακχαριτών ή LPMOs (Lytic Polysaccharide Monooxygenases) (Quinlan et al., 2011; Vaaje-Kolstad et al., 2010). Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZy, τα ένζυμα αυτά κατηγοριοποιούνται σε 6 οικογένειες «LPMO's» στις οποίες δόθηκε η ονομασία ένζυμα εξωτερικής δραστηριότητας (Auxiliary Activity enzymes) ή AA (Lo Leggio et al., 2015; Wang et al., 2021). Οι μονοξυγενάσες λυτικών πολυσακχαριτών είναι ένζυμα, η δράση των οποίων εξαρτάται από την ύπαρξη χαλκού και δρουν στην αλυσίδα της κυτταρίνης, αξιοποιώντας μοριακό οξυγόνο και μικρά μόρια φυτικής προέλευσης, πρωτεΐνες ή εξωτερικές πηγές ηλεκτρονίων, για να οξειδώσουν πολυσακχαρίτες στον άνθρακα 1 (C1) ή τον άνθρακα 4 (C4) ενός β(1,4) δεσμού οδηγώντας έτσι στη θραύση της αλυσίδας, η οποία προσδίδει στην κυτταρίνη την κρυσταλλικότητά της και μετασχηματίζοντας έτσι το υπόστρωμα σε μία δομή ευκολότερα προσβάσιμη για τα κυτταρινολυτικά ένζυμα. (Lo Leggio et al., 2015).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της δράσης των LPMO's στην κρυσταλλική κυτταρίνη και τα προϊόντα που προκύπτουν (Wang et al., 2021).

Οι μονοξυγενάσες λυτικών πολυσακχαριτών, παρότι αποτελούν ανακάλυψη των τελευταίων ετών (2010/11), θεωρούνται επαναστατική εξέλιξη στον τομέα της επεξεργασίας της βιομάζας. Η χρήση τους ενδεχομένως μπορεί να οδηγήσει στην

πλήρη αξιοποίηση των πλέων διαδεδομένων πολυσακχαριτών στον πλανήτη, όπως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η χιτίνη, τόσο ενεργειακά όσο και σε χημικό επίπεδο (Lo Leggio et al., 2015).

4. Γλυκοζυλ-υδρολάσες (GH οικογένειες)

Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZy (Carbohydrate-Active enZymes Database, <http://www.cazy.org/>), οι γλυκοζυλοϋδρολάσες ή γλυκοζυλ-υδρολάσες (GH) πρόκειται για τα ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών των υδατανθράκων, οδηγώντας στον σχηματισμό ημιακεταλών και της συμπληρωματικής σε αυτά μη υδατανθρακικής ρίζας. Οι γλυκοζυλοϋδρολάσες, κατηγοριοποιούνται με βάση τα κοινά τους χαρακτηριστικά σε διαφορετικές ομάδες.

Με βάση την ικανότητα των ενζύμων να δρουν στο άκρο ή στο κέντρο της αλυσίδας ενός υποστρώματος, οι γλυκοζυλοϋδρολάσες κατηγοριοποιούνται ένδο και έξω (endo/exo). Εναλλακτικά, με βάση το μηχανισμό τους, τα ένζυμα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε ένζυμα που διατηρούν και σε ένζυμα που αναστρέφουν το υπόστρωμα στο οποίο δρουν, καθώς και σε όλες τις ομάδες οι οποίες εμφανίζουν παραλλαγές αυτών των δύο μηχανισμών. Με στόχο τη μεγαλύτερη ακρίβεια στην κατηγοριοποίηση ενζύμων, έχει ακόμα θεσπιστεί ένας μοναδικός αριθμός για κάθε τύπο ενζύμου, με βάση τη χημική αντίδραση την οποία καταλύει (Enzyme Commission Number, EC αριθμός). Αν δύο διαφορετικά ένζυμα, καταλύουν την ίδια αντίδραση, λαμβάνουν τον ίδιον αριθμό EC, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει σαφής διαφοροποίηση μεταξύ τους, ενώ παράλληλα στην περίπτωση που ένα ένζυμο εμφανίζει την ικανότητα να καταλύσει περισσότερες από μία αντιδράσεις, του προσδίδονται δύο ή και περισσότεροι αριθμοί.

Ο πλέον διαδεδομένος τρόπος χωρισμού των ενζύμων σε κατηγορίες, είναι η οργάνωση τους σε οικογένειες, οι οποίες ονομάζονται GH οικογένειες (GH families). Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση την αλληλουχία των πρωτεϊνών και τη χρήση αλγορίθμων οι οποίοι τις κατηγοριοποιούν στην οικογένεια με την οποία παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με την αμινοξική σύσταση, την τρισδιάστατη αναδίπλωση και δομή. Με αυτόν τον τρόπο, είναι εύκολο να πραγματοποιηθούν προβλέψεις για καινούρια ένζυμα, με βάση το γονίδιο το οποίο μεταφράζεται σε αυτά. Οι γλυκοζυλοϋδρολάσες έχουν κατηγοριοποιηθεί σε περισσότερες από 100 GH οικογένειες. Συνήθως, τα μέλη μίας οικογένειας παρουσιάζουν κοινό μηχανισμό κατάλυσης και κοινά στερεοχημικά χαρακτηριστικά, ωστόσο εμφανίζονται εξαιρέσεις. Όλα τα κυτταρινολυτικά ένζυμα, ανήκουν σε κάποια οικογένεια της βάσης δεδομένων CAZy.

5. Ενδογλουκανάσες

Οι ενδογλουκανάσες (EC 3.2.1.4), οι οποίες αποτελούν ένα από τα είδη των κυτταρινασών, υδρολύουν το εσωτερικό β-γλυκοζιτικό δεσμό στην αλυσίδα της κυτταρίνης μετατρέποντας τα άκρα της κυτταρίνης προσβάσιμα σε κελλοβιο-υδρολάσες. Τα ένζυμα αυτά στη συνέχεια αποκόπτουν δύο μόρια γλυκόζης από τα

άκρα της κυτταρινικής αλυσίδας μειώνοντας το μήκος της. Η κυτταρίνη υδρολύεται περαιτέρω σε μονομερή, από β-γλυκοζιδάσες. Οι ενδογλουκανάσες, σαν ομάδα υδρολυτικών ενζύμων, παρουσιάζουν ιδιαίτερα καλή συνεργιστική δράση με ομάδες κελλοβιο-υδρολασών και β-γλυκοζιδασών (Konar et al., 2022).

Σύμφωνα με την βάση δεδομένων CAZy (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>), ενδογλουκανάσες εμφανίζονται σε δεκατρείς ομάδες γλυκοζιλ-υδρολασών (Glycosyl Hydrolases, GH), οι οποίες συναντώνται σε πληθώρα βακτηρίων, αρχαιοβακτηρίων, μυκήτων, αλλά και άλλων ευκαρυωτικών μικροοργανισμών. Η πληθώρα εμφανίζεται στις οικογένειες GH 5, 6, 7, 9, 12 και 45 αλλά εμφανίζονται σε μικρότερο ποσοστό και στις οικογένειες 44, 124 και 148. Το μεγαλύτερο ποσοστό ενδογλουκανασών.

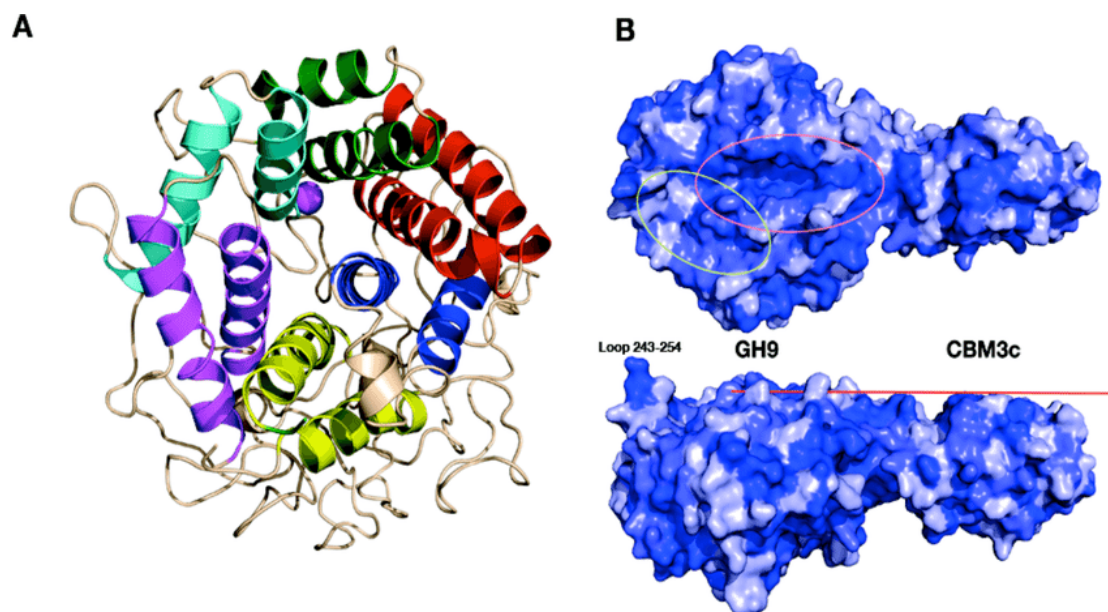
6. Η GH9 Οικογένεια

Η οικογένεια 9 των γλυκοζιλ-υδρολασών όπως έχουν κατηγοριοποιηθεί από τη βάση δεδομένων CAZy, αποτελεί τη δεύτερη μεγαλύτερη οικογένεια GH κυτταρινασών και αποτελείται κατά κύριο λόγο από ενδο-β-1,4-D-γλουκανάσες αρκετές από τις οποίες χαρακτηρίζονται ως ένζυμα επεξεργασίας (processive) αλλά σε αυτή ανήκουν και άλλα είδη ενζύμων όπως κελλοβιοϋδρολάσες, ενδο-ξυλο-γλουκανάσες, ενδογλουκανάσες μικτής δράσης και έξω-β-γλυκοζαμινιδάσες, οι περισσότερες από τις οποίες είναι κυρίως βακτηριακής ή φυτικής προέλευσης (Cantarel et al., 2009). Επιπρόσθετα, η GH9 οικογένεια, αποτελεί την πρώτη GH οικογένεια η οποία ανακαλύφθηκε ενδογενώς σε ζώα και μέλη της συναντώνται σε αρθρόποδα, νηματοειδή και μαλάκια (Sade et al., 2022). Πρόκειται για μία από τις παλαιότερες ομάδες κυτταρινολυτικών ενζύμων που ανακαλύφθηκαν, λαμβάνοντας αρχικά το όνομα "Cellulase Family E" πριν την κατηγοριοποίηση των γλυκοζιλ-υδρολασών με τη σύγχρονη ορολογία.

Όλα τα μέλη της GH9 οικογένειας, λειτουργούν με μηχανισμό αναστροφής της ανομερικής στερεοχημείας. Παρουσιάζουν δομή «(a/a)₆ barrel fold» στο καταλυτικό τους τμήμα, η οποία περιέχει μία ανοιχτή σχισμή ως ενεργό κέντρο, στο οποίο περιέχονται τουλάχιστον έξι υπο-θέσεις πρόσδεσης σακχάρων.

Οι ενδογλουκανάσες GH9 οικογένειας, είναι αρθρωτά ένζυμα, καθώς διαθέτουν βοηθητικές μονάδες όπως ανοσοσφαιρίνη (Ig-like modules), φιβρονεκτίνη III 9 (fibronectin III-like modules) ή μονάδες πρόσδεσης υδατανθράκων (CBMs). Στις περισσότερες «processive» ενδογλουκανάσες της οικογένειας, εμφανίζεται η βοηθητική μονάδα πρόσδεσης υδατανθράκων 3 (CBM3), η οποία βρίσκεται ισχυρά προσδεμένη στο C-τελικό αμινοξύ του καταλυτικού τμήματος. Η λειτουργία αυτής της συμπληρωματικής μονάδας σχετίζεται με την πρόσδεση των ενζύμων στην κυτταρίνη και τρεις υπο-ομάδες (3a, 3b, 3c) ταξινομήθηκαν σε αυτή με βάση την ομοιότητα της πρωτογενούς αλληλουχίας τους (Petkun et al., 2010). Οι υπο-ομάδες 3a και 3b συνδέονται ισχυρά στην επιφάνεια της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης και ενισχύουν το ρυθμό της αντίδρασης υδρόλυσης συγκεντρώνοντας το ένζυμο κοντά στην κυτταρινική επιφάνεια. Αντίθετα, η υπο-ομάδα 3c, συνδέεται με ασθενείς δεσμούς με την κυτταρίνη, διότι δε διαθέτει αρκετές αρωματικές ρίζες που είναι σημαντικές για την ισχυρή σύνδεση με την κυτταρίνη (Gilad et al., 2003). Η

λειτουργία του CBM3c, θεωρείται ότι είναι η μεταφορά μία αλυσίδας κυτταρίνης στο κοντινότερο ενεργό κέντρο, γεγονός που το καθιστά σημαντικό κομμάτι για την λειτουργία των ενζύμων επεξεργασίας (Gilad et al., 2003; Jeng et al., 2019; Petkun et al., 2010). Η ακριβής λειτουργία των βοηθητικών ομάδων της οικογένειας GH9 παραμένει ασαφής, ωστόσο θεωρείται ότι εμπλέκονται στη δομική σταθερότητα και την αύξηση της αποτελεσματικότητας της ενζυμικής υδρόλυσης (Jeng et al., 2019). Η αρθρωτή δομή και λειτουργικότητα των ενδογλυκανασών GH9 απαιτούν εκτενή διερεύνηση, καθώς τα δεδομένα σχετικά με τους λειτουργικούς ρόλους των μεμονωμένων μονάδων κατά την υδρόλυση της κυτταρίνης είναι σπάνια.



Εικόνα 5: Τα δομικά μέρη της GH9 ενδογλυκανάσης του *C. thermocellum*, GH9-CBM3c. Παρουσιάζεται (A) η δομή «(a/a)₆ barrel fold του καταλυτικού κέντρου και (B) το CBM3c (Petkun et al., 2015).

7. *Bacillus safensis*

Πληθώρα μικροοργανισμών όπως βακτήρια, αρχαιοβακτήρια, μύκητες, αλλά ακόμα και ανώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν την ικανότητα να υδρολύουν την λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα.

Ο *Bacillus safensis* είναι βακτηριακό στέλεχος κατά Γκραμ θετικό, το οποίο παράγει σπόρια. Απομονώθηκε για πρώτη φορά σε επιφάνειες από διαστημόπλοια στα κατασκευαστικά τους εργοστάσια στην Καλιφόρνια και τη Φλόριντα (Satomi et al., 2006). Έκτοτε, μέλη αυτού του στελέχους έχουν απομονωθεί από πληθώρα διαφορετικών οικοσυστημάτων, όπως δείγματα χώματος (Ishag et al., 2016), κοιτάσματα πετρελαίου (Rekik et al., 2019) και φυτικά μικροοικοσυστήματα (Wahla et al., 2019). Διάφορα στελέχη του *B. safensis* έχουν παρουσιάσει δράση κατά των μυκήτων (Mayer & Kronstad, 2017), μεταβολισμό των ρύπων του πετρελαίου (Wu et al., 2019), καθώς και ενισχυτική δράση στην ανάπτυξη φυτών (Sarkar et al., 2018). Στον κλάδο της βιοτεχνολογίας, τα βακτήρια που υπάγονται στο γένος των Βάκιλων, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω της ικανότητας τους να παράγουν

μεγάλο αριθμό δομικά ποικιλόμορφων δευτερευόντων μεταβολιτών, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται και αντιμικροβιακές ουσίες (Baindara et al., 2013; Fira et al., 2018).

8. Βιομηχανικές Εφαρμογές Ενδογλουκανασών

8.1 Στην Παραγωγή Βιοκαυσίμων

Η μετατροπή της κυτταρινούχας βιομάζας σε βιοκαύσιμα περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό βημάτων προκατεργασίας, στρατηγικά σχεδιασμένων, έτσι ώστε η μετατροπή να πραγματοποιείται με τον πιο οικονομικό και αποτελεσματικό τρόπο. Μετά τη συλλογή της φυτικής λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας, ένα από τα πρώτα βήματα προετοιμασίας είναι η κατεργασία της σε υψηλές θερμοκρασίες (75°C) και η διάλυση της με θειϊκά οξέα (Tabil et al., 2011). Το στάδιο αυτό στοχεύει στην απελευθέρωση της κυτταρίνης από το προστατευτικό πλέγμα ημικυτταρίνης, λιγνίνης και λουπόν ενώσεων που βρίσκεται γύρω της. Αν το βήμα αυτό δεν πραγματοποιηθεί ή σε περίπτωση που η απελευθέρωση των επιθυμητών ενώσεων δεν γίνει αποτελεσματικά, η μεγάλη συγκέντρωση των βιοπολυμερών μπορεί να οδηγήσει σε παρεμποδίσεις κατά το στάδιο της ενζυμικής κατεργασίας. Μέχρι στιγμής αποδοτικότητα της παραγωγής βιοαιθανόλης παραμένει σε χαμηλά επίπεδα, διότι περιορίζεται τόσο οικονομικά όσο και σε πρακτικά επίπεδο από τα στάδια προκατεργασίας και από την ανάγκη για προσθήκη κυτταρινασών στη βιομάζα. (Yennamalli et al., 2013)

Ο μεγαλύτερος αριθμός κυτταρινασών που χρησιμοποιούνται σήμερα στην επεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας είναι ενδογλουκανάσες οι οποίες προέρχονται κατά κύριο λόγο από βακτήρια και μύκητες και χρησιμοποιούνται στη γραμμή παραγωγής βιοαιθανόλης μετά το τέλος της προκατεργασίας. Η προσθήκη ενός δεύτερου βήματος, καθώς και η απομόνωση και συλλογή αυτών των ενζύμων αποτελούν πρόσθετους παράγοντες που αυξάνουν το κόστος επεξεργασίας της βιομάζας. Για το λόγο αυτό, παρουσιάζεται τεράστιο ενδιαφέρον στο χώρο για την ανάπτυξη και απομόνωση ενδογλουκανασών οι οποίες να παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα, καθώς και υψηλά επίπεδα δραστηρότητας σε ακραίες συνθήκες pH και θερμοκρασίας (Turner et al., 2007).

8.2 Στην Βιομηχανία Χαρτοπολτού

Η παγκόσμια βιομηχανία χαρτοπολτού και χαρτιού αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες στον κόσμο και αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της οικονομικής ανάπτυξης μίας χώρας. Τα κυτταρινολυτικά ένζυμα, παρουσιάζουν πληθώρα εφαρμογών στον τομέα της επεξεργασίας χαρτιού και χαρτοπολτού, καθώς η εφαρμογή τους σε διαδικασίες όπως η βιοπολοτοποίηση, η ενζυμική απομελάνωση, ο βιοχαρακτηρισμός, η βιολεύκανση και η βελτιστοποίηση της απορροής των λυμάτων της βιομηχανίας, έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές μειώσεις στο κόστος αλλά και βελτιώσεις στο ρυθμό παραγωγής και την αποδοτικότητα των μύλων επεξεργασίας χαρτιού (Singh et al., 2016).

Βιοπολτοποίηση ονομάζεται η μικροβιολογική διαδικασία που περιλαμβάνει την εφαρμογή κυτταρινασών και συγγενών ενζύμων σε ακατέργαστα προϊόντα ξυλείας και την εκχύλιση πολτοποιημένων ινών από αυτά. Η βιομηχανική πολτοποίηση με τη βοήθεια κυτταρινασών θεωρείται καλύτερη εναλλακτική σε σχέση τις παραδοσιακές διεργασίες εκχύλισης πολτού, καθώς αυτά τα ένζυμα παρουσιάζουν χαμηλές απαιτήσεις σε ενέργεια για να επιτύχουν την επιθυμητή ελαστικότητα και αντοχή στο προϊόν. Η βιοπολτοποίηση βοηθά επίσης στη βελτίωση της μηχανικής αντοχής του πολτού και του φύλλου χείρως ιδιότητες αντοχής των ινών χαρτοπολτού και ελαχιστοποιεί τις επικίνδυνες περιβαλλοντικές επιπτώσεις των χημικών ή άλλων διεργασιών πολτοποίησης που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες χαρτιού (Singh et al., 2016).

Η απομελάνωση αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στη διαδικασία ανακύκλωσης και περιλαμβάνει την απομάκρυνση των σωματιδίων μελανιού από την επιφάνεια της ίνας του χαρτιού και στη συνέχεια την αφαίρεση των αποκολλημένων σωματιδίων μελανιού με διαδικασίες επίπλευσης και πλύσεων. Οι σύγχρονες εξελίξεις στη διαδικασία απομελάνωσης έχουν βοηθήσει πάρα πολύ τη χρήση δευτερογενών ινών, όπως παλιό χαρτί εφημερίδων και χαρτιά που έχουν χρησιμοποιηθεί για εκτυπώσεις με διάφορα είδη εκτυπωτών για την κατασκευή χαρτιών λευκής ποιότητας (Ibarra et al., 2012). Η απομελάνωση με τη βοήθεια κυτταρινασών έχει αποδειχθεί ότι είναι μια πιθανή οικονομικά αποδοτική και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση σε σχέση με τις συμβατικές διαδικασίες αλκαλικής απομελάνωσης (Pathak et al., 2010).

Η ενζυμική απομελάνωση με χρήση κυτταρινασών βελτιώνει τη λευκότητα των ινών, την αντοχή τους, αυξάνει τη απαλότητα και την καθαρότητα του πολτού, καθώς επίσης μειώνει τα μικροσωματίδια στον πολτό επηρεάζοντας τους δεσμούς των ινών κοντά στα σωματίδια μελανιού. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της ενζυμικής απομελάνωσης από κυτταρινάσες είναι η βελτίωση της ικανότητας απομελάνωσης και αφυδάτωσης διαφόρων πολτών. Προκαλώντας το ξεφλούδισμα των μεμονωμένων ινών και δεσμίδων που έχουν υψηλή συγγένεια με το νερό και τα σωματίδια μελανιού, ενισχύουν την ικανότητα παραγωγής χαρτιού των ανακυκλωμένων ινών. Η χρήση κυτταρινασών στη λεύκανση δεν έχει φθάσει σε εμπορική κλίμακα, καθώς η οικονομική βιωσιμότητα της μεθόδου βρίσκεται ακόμα υπό αμφισβήτηση.

Ο χαρακτηρισμός των ινών του χαρτοπολτού, αποτελεί διαδικασία μεγάλης σημασίας για τον υπολογισμό του ποσοστού ημικυτταρίνης στις ίνες, κάτι το οποίο μπορεί μετέπειτα να χρησιμοποιηθεί με στόχο την πρόβλεψη των ιδιοτήτων τους. Συνήθως τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία αυτή είναι συνδυασμοί ξυλανασών και μαννανασών, δύο κατεξοχήν ημικυτταρινολυτικά ένζυμα. Ωστόσο, ως βοηθητικά ένζυμα στην διαδικασία απομόνωσης της ξυλάνης και της γλυκομαννάνης χρησιμοποιούνται εκτεταμένα και κυτταρινάσες. Καθαρές κυτταρινάσες ή σε μίγμα κυτταρινασών-ξυλανασών χρησιμοποιούνται επίσης για τη μερική ή πλήρη διαλυτοποίηση του πολτού και των προϊόντων της υδρόλυσής του, τα οποία στη συνέχεια ποσοτικοποιούνται με κάποια αναλυτική τεχνική (Singh et al., 2016).

Ο τομέας της βιολεύκανσης, αφορά την αύξηση του βαθμού λαμπρότητας (brightness score) σύμφωνα με τα κριτήρια ISO. Πρόκειται για έναν τομέα ο οποίος τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει αυξημένο ενδιαφέρον, καθώς, οι μέθοδοι

λεύκανσης οι οποίες βρίσκονταν σε ευρεία χρήση, παρουσίαζαν υψηλό αριθμό ρύπων με κυριότερους τις χλωριωμένες διοξίνες. Νομοθεσίες των τελευταίων δύο δεκαετιών που αποσκοπούν στη μείωση των επιβλαβών εκπομπών του βιομηχανικού τομέα, οδηγούν εξαναγκαστικά τη βιομηχανία χαρτιού και χαρτοπολτού προς την εύρεση βιώσιμων εναλλακτικών (Bajrai, 2018). Ο κύριος ρόλος των κυτταρινασών στη διαδικασία της βιολεύκανσης είναι η αύξηση της ευαισθησίας του χαρτοπολτού σε λευκαντικές χημικές ενώσεις με αποτέλεσμα την επίτευξη υψηλότερου βαθμού λαμπρότητας χρησιμοποιώντας μικρότερης ποσότητας λευκαντικών.

Η εφαρμογή κυτταρινολυτικών ενζύμων, έχει παρουσιάσει ακόμα, θετικά αποτελέσματα στον κλάδο απορροής των λυμάτων της βιομηχανίας χαρτοπολτού, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την παραγωγικότητά τους. Η εφαρμογή μιγμάτων κυτταρινολυτικών ενζύμων οδηγεί στην υδρόλυση των ινών της πολτοποιημένης μάζας οδηγώντας έτσι στη διαλυτοποίηση των κolloειδών μερών του χαρτοπολτού, τα οποία αποτελούν το βασικότερο πρόβλημα για την απορροή των εργοστασιακών λυμάτων.

8.3 Στην Βιομηχανία Υφασμάτων

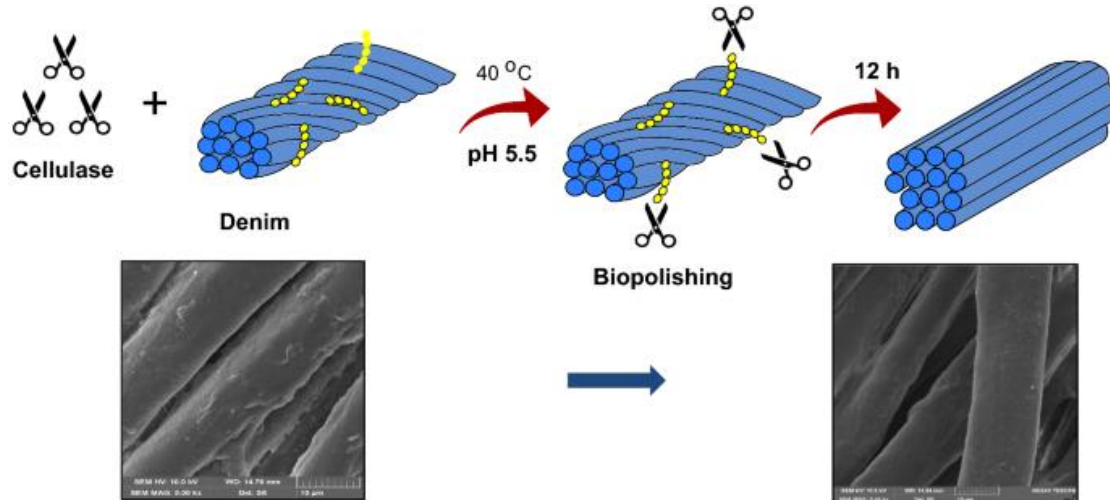
Το τζιν ύφασμα, αποτελεί ένα από τα πλέον διαδεδομένα υφάσματα στην βιομηχανία ρουχισμού. Για το λόγο αυτό διαδικασίες οι οποίες μπορούν να δώσουν διαφορετικές μορφές στο ύφασμα αυτό με τρόπο γρήγορο και οικονομικό βρίσκονται διαρκώς σε υψηλή ζήτηση. Η πλέον επιτυχημένη διαδικασία για την επεξεργασία του τζιν είναι η μέθοδος του ενζυμικού εξευγενισμού, δηλαδή η εφαρμογή κυτταρινασών στο ύφασμα υπό ήπιες συνθήκες, παρομοιάζοντας την παλαιότερη μέθοδο της πλύσης με αλαφρόπετρα. Η μέθοδος αυτή δίνει στο τζιν μία χαρακτηριστική παλαιωμένη εμφάνιση, αφαιρώντας από το ύφασμα την μπλε βαφή, η οποία βρίσκεται παγιδευμένη ανάμεσα στις ίνες του υφάσματος με ανομοιόμορφο τρόπο. (Anish et al., 2007; Bhat, 2000)

Στο παρελθόν, για να επιτευχθεί αυτή η εμφάνιση, το ύφασμα δεχόταν πλύση είτε με φυσική αλαφρόπετρα είτε υποβαλλόταν σε χημική επεξεργασία. Οι μέθοδοι αυτοί σε αντίθεση με την εφαρμογή κυτταρινασών, απαιτούν ακραίες συνθήκες επεξεργασίας και θεωρούνται σε μεγάλο βαθμό μη συμφέρουσες τόσο για οικονομικούς όσο και για οικολογικούς παράγοντες.

Εναλλακτικά, οι κυτταρινάσες, στη βιομηχανία υφασμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην βελτίωση της εμφάνισης κυτταρινικών υφασμάτων, καθώς η κατεργασία τους με συγκεκριμένα ήδη κυτταρίνης οδηγεί στην αφαίρεση συσσωματωμάτων από χνούδι και ύφασμα τα οποία μειώνουν την ποιότητα του προϊόντος. Η επεξεργασία αυτού του τύπου, εστιάζει κυρίως σε περιοχές άμορφης κυτταρίνης όπου παρατηρείται το μεγαλύτερο ποσοστό ατελειών στα υφάσματα. Για το λόγο αυτό, η επεξεργασία με μόνο ένα είδος κυτταρινασών κρίνεται συνηθώς επαρκής. Γίνεται χρήση κατά κύριο λόγο ενδογλουκανασών, καθώς παρουσιάζουν καλύτερη πρόσδεση στις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης. (Sahin et al., 2016)

Ο βασικός μηχανισμός των δύο διαδικασιών, περιλαμβάνει ρόφηση των ενζύμων στην επιφάνεια των κυτταρινικών ινιδίων του υφάσματος. Η διαδικασία αυτή, έχει

παρατηρηθεί πειραματικά (Cavaco-Paulo et al., 1998; Gusakov et al., 2001) ότι επηρεάζεται άμεσα από το pH στο οποίο πραγματοποιείται. Για το λόγο αυτό, ενδογλουκανάσες με καλή δραστηριότητα σε αλκαλικό και ουδέτερο περιβάλλον, οι οποίες να δρουν γρήγορα και χωρίς και επηρεάζουν την αντοχή των υφασμάτων στα οποία υποβάλλονται αποτελούν αντικείμενο υψηλού ενδιαφέροντος για τον τομέα.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας του ενζυμικού εξευγενισμού τζιν υφάσματος από κυτταρινάσες με παραδείγματα οπτικού μικροσκοπίου. (Bussler et al., 2021)

Υλικά και Μέθοδοι

1. Όργανα και Συσκευές

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές και όργανα:

- ✓ Φωτόμετρο Multiskan GO (Thermo Scientific, ΗΠΑ)
- ✓ Φωτόμετρο Hitachi UV 2000
- ✓ Συσκευή PCR TC-1000-S (Drawell, Κίνα)
- ✓ Συσκευή Ηλεκτροφόρησης Πρωτεϊνών (Bio-Rad, ΗΠΑ)
- ✓ pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- ✓ Συσκευή ανάδευσης Orbit LS (Labnet, Μεγάλη Βρετανία)
- ✓ Thermo-Shaker PCMT (Macherey-Nagel, Γερμανία)
- ✓ Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- ✓ Θερμοστατούμενοι ηλεκτρικοί αναδευτήρες
- ✓ Φυγόκεντρος TJ-6 της Beckman Counter (ΗΠΑ) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- ✓ High Performance Anion-Exchange Chromatography with pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD (Thermo scientific)
- ✓ Συσκευή υπερήχων Ultrasonic Processor (Sonics & Materials Inc, Newtown, ΗΠΑ)
- ✓ Στήλη Protino 14mL (Macherey-Nagel)
- ✓ Στήλη συμπύκνωσης πρωτεϊνών Pierce™ PES 6mL, 30K MWCO (Thermo scientific)
- ✓ Στήλη Sephadex G25M PD10 (CYTIVA, Life Sciences, Manassas, VA, ΗΠΑ)

2. Αντιδραστήρια και Διαλύματα

Χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας χημικά αντιδραστήρια των εταιριών Sigma (Η.Π.Α), Merck (Γερμανία), CIBA (Ελβετία)

Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers) και λοιπά διαλύματα

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών: $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50mM σε pH=6, 7, 8
- ✓ Διάλυμα Bradford: 100 mg/L Coomassie Brilliant Blue, 50ml/L $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$, 100ml/L H_3PO_4
- ✓ Διάλυμα Ιμιδαζολίου 1.5M ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$)
- ✓ Διάλυμα Χλωριούχου νατρίου (NaCl) 5M
- ✓ Διάλυμα TAE (Tris/ CH_3COOH /EDTA) 10x
- ✓ 1kb DNA Ladder (BioLabs)
- ✓ Ρυθμιστικό Διάλυμα TGS (10x Tris-Γλυκίνη-SDS)
- ✓ Διάλυμα 30% ακρυλαμιδίου ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$)/0,8 % δισακρυλαμιδίου ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$)
- ✓ Gel Loading Dye 6x (Bio Labs)
- ✓ Pre-Stained SDS Page Protein Ladder (FastGene)
- ✓ Διάλυμα NPI10 (50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 10mM Ιμιδαζόλιο, pH= 8)
- ✓ Διάλυμα NPI250 (50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 250mM Ιμιδαζόλιο, pH= 8)

- ✓ Διάλυμα NPI500 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 500mM Ιμιδαζόλιο, pH= 8)

3. Μικροοργανισμοί

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής βακτηριακά στελέχη:

- Bacillus safensis* (ATHUBA63)
- Escherichia coli* DH5a
- Escherichia coli* BL21(DE3)

Το βακτήριο *B. safensis* που χρησιμοποιήθηκε, προέρχεται από δείγματα χώματος από την περιοχή της Αττικής. Προηγουμένως, το στέλεχος είχε απομονωθεί και χαρακτηριστεί ως *Bacillus pumilus* από την Συλλογή Βακτηρίων και Αρχαιοβακτηρίων του Πανεπιστημίου Αθηνών (ATHUBA), λαμβάνοντας τον κωδικό ATHUBA63. Ακόμα, από το στέλεχος απομονώθηκε και μελετήθηκε μία ενδο-1,4-β-γλουκανάση ανθεκτική σε αλκαλικές συνθήκες (Christakopoulos et al., 1999). Μετά από ανάλυση του γενετικού υλικού, η οποία πραγματοποιήθηκε από το Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, αναγνωρίστηκαν στο στέλεχος επαρκείς ομοιότητες με άλλα μέλη του γένους, ώστε να επανακωδικοποιηθεί ως *Bacillus safensis* ATHUBA63 (Glekas et al., 2022).

Το στέλεχος DH5a πρόκειται για τροποποιημένη μορφή της *E.coli* με στόχο την μεγιστοποίηση της επιτυχίας διαδικασιών μετασχηματισμού. Το στέλεχος επιλέγεται, διότι είναι δεκτικά κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν πολύ καλή λειτουργία σε διαδικασίες μετασχηματισμού χλωριούχου ασβεστίου, όπως η εισαγωγή επιθυμητού πλασμιδιακού φορέα.

Το στέλεχος BL21(DE3) του βακτηρίου *E. coli* χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για υπερέκφραση πρωτεϊνών. Έχει κατασκευαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να μην διαθέτει δύο από τις βασικές πρωτεάσες της *E. Coli* (lon και OmpT) ενώ ταυτόχρονα, περιέχει έναν λ προφάγο, ο οποίος διαθέτει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης. Το γονίδιο αυτό ελέγχεται από ρυθμιστική ακολουθία με αποτέλεσμα να μένει αδρανής απουσία IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) μίας ένωσης που ο είναι επαγωγέας του οπερονίου της λακτόζης, (Studier & Moffatt, 1986).

4. Ετερόλογη Έκφραση της BsGH9

4.1 Καλλιέργεια του *B. safensis* σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό υλικό

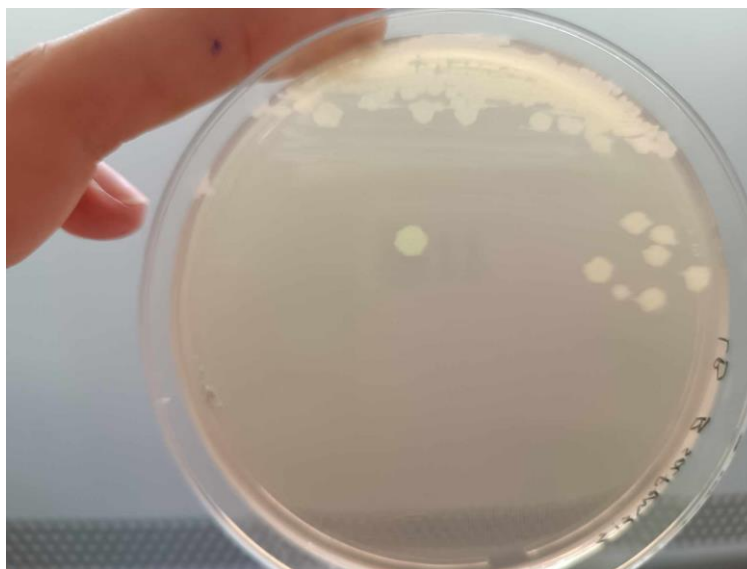
Για την καλλιέργεια του *B. safensis*, επιλέγεται θρεπτικό υλικό Luria-Bertani με χρήση άγαρ ως στερεοποιητή (LB-Agar) (πίνακας 1).

Το pH του θρεπτικού ρυθμίζεται στο 7, με την προσθήκη πυκνού διαλύματος καυστικού νατρίου.

Πίνακας 1: Σύσταση θρεπτικού υλικού LB-Agar.

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση (% w/v)
Yeast Extract	0,5
NaCl	1
Tryptone	1
Agar	1,5

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο σε συνθήκες θερμοκρασίας 121°C και πίεσης ίσης με 1 bar για είκοσι λεπτά και χρησιμοποιείται αφού έχει κρυώσει επαρκώς. Σε στείρες συνθήκες και εντός θαλάμου νηματικής ροής, ποσότητα θρεπτικού υλικού περίπου ίση με 25 mL επιστρώνεται σε τρυβλίο Petri και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια, με αποστειρωμένο δακτύλιο επιστρώνεται ο μικροοργανισμός στο θρεπτικό υλικό χρησιμοποιώντας τεχνική τριπλής αραιώσης με σκοπό να ληφθούν στην τελική αραιώση μονήρεις αποικίες (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Καλλιέργεια του *B. safensis* σε στερεό θρεπτικό υλικό LB-Άγαρ.

Τα τρυβλία αφήνονται σε επωαστήρα σταθερής θερμοκρασίας στους 37°C για 16 ώρες, ώστε να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός.

4.2 Ενίσχυση του Γονιδίου της GH9 με Τεχνική Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Μετά από αλληλούχιση του γονιδιώματος του *B. safensis* και βιβλιογραφική σύγκριση των αποτελεσμάτων με συγγενείς μικροοργανισμούς εντοπίστηκε γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί μία ενδο-1,4-β-γλουκανάση με ομοιότητες με την οικογένεια γλυκοζυλ-υδρολασών 9 (GH9). Μέσω της σύγκρισης αλληλουχιών με άλλα μέλη βακτηριακών GH9 ενδογλουκανασών, σχεδιάστηκαν οι εξής εκκινητές:

bsGH9-F-*NotI*: 5'-GCGCGCGGCCGCATGGCATCTTACAACCTATGTAGAGGTTTC-3'

bsGH9-R-*SpeI*: 5'-GCGCACTAGTTTTGTCTGGAAGTGTGCCAAATAC-3'

Οι εκκινητές παραλήφθηκαν από την εταιρεία Lab Supplies, λυοφιλιωμένοι και αραιώθηκαν πριν τη χρήση τους με υπερκάθαρο νερό (ddH₂O) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας.

Ο πολλαπλασιασμός (ενίσχυση) του γονιδίου bsgh9 πραγματοποιήθηκε με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης κατά την οποία μονήρης αποικία του *B. safensis*, προστέθηκε σε διάλυμα πολυμεράσης Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μL) και του κατάλληλου Master Mix.

Πίνακας 2: Σύσταση του Master Mix της Phusion™ DNA πολυμεράσης.

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση (% v/v)
Phusion™ Πολυμεράση	8,68
dNTPs	2,2
Ρυθμιστικό Διάλυμα Πολυμεράσης 10x*	8,68
Απεικονισμένο Νερό (dH ₂ O)	72,89

*Παρέχεται από τον κατασκευαστή.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20μL. Τα βήματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που ακολουθηθήκαν είναι τα εξής:

Αρχικά το δείγμα θερμάνθηκε στους 98°C για δέκα λεπτά, με στόχο την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και την ταυτόχρονη αναδιάταξη της διπλής έλικας του βακτηριακού DNA. Στη συνέχεια, το δείγμα ψύχεται στους 60°C, θερμοκρασία η οποία υπολογίστηκε με το διαδικτυακό εργαλείο υπολογισμού T_m που παρέχει η εταιρεία New England Biolabs (<https://tmcalsculator.neb.com/#!/main>) και είναι ιδανική για την πρόσδεση των εκκινητών στις άκρες του επιθυμητού γονιδίου. Σε τελικό στάδιο, η θερμοκρασία του συστήματος διατηρείται στους 72°C για 90 δευτερόλεπτα, αφήνοντας την πολυμεράση να δράσει σε ιδανικές συνθήκες παράγοντας υψηλό αριθμό αντιγράφων του επιθυμητού γονιδίου (~10⁶ με 10⁹ - μόρια DNA). Συνολικά η αντίδραση αποτελείται από 25 κύκλους.

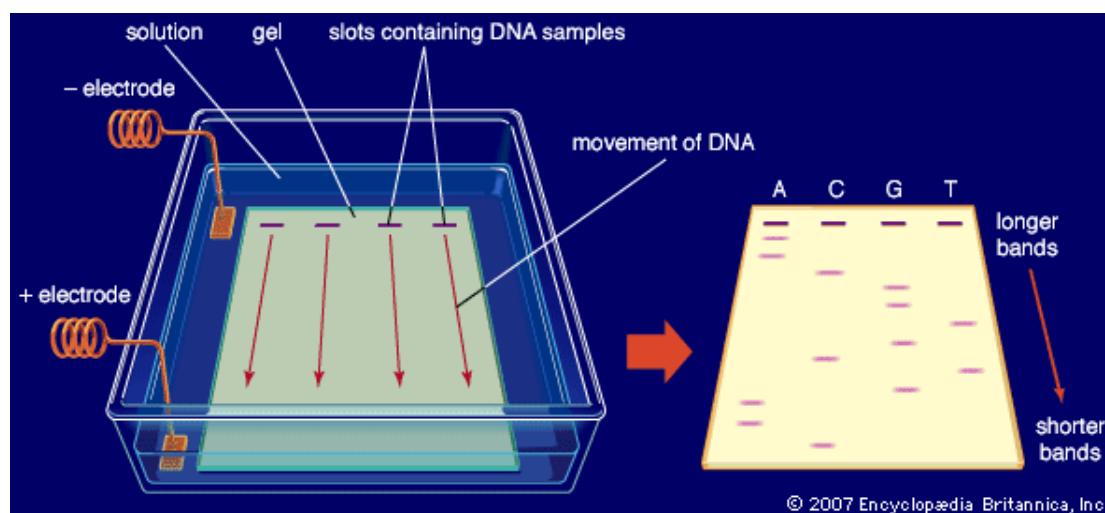
4.3 Ηλεκτροφόρηση των Προϊόντων της PCR σε Γέλη Αγαρόζης

Για την αξιολόγηση και διαγνωστικό έλεγχο της PCR και για τον καθαρισμό του προϊόντος, παρασκευάζεται πηκτή αγαρόζης, συγκέντρωσης 1% w/v, στην οποία προστίθεται μικρή ποσότητα (0,3% v/v) βρωμιούχο αιθίδιο ($C_{21}H_{20}BrN_3$). Η γέλη αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε αυτή προστίθενται τα δείγματα της PCR μαζί με κατάλληλη χρωστική, καθώς και ladder ο οποίος λειτουργεί ως υπόμνημα για την εξακρίβωση της απομόνωσης του γονιδίου, βάση του προβλεπόμενου μεγέθους του.

Πίνακας 3:Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος TAE 10x.

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση (mM)
Tris Base	400
Οξικό οξύ	200
EDTA	1

Η γέλη τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης βυθισμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 10x (πίνακας 3) και έτσι επιτυγχάνεται διαχωρισμός των μορίων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος, με τα βαρύτερα μόρια να κινούνται με μικρότερη ταχύτητα προς τον θετικό πόλο. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120V για περίπου 45min.



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτροφόρησης του DNA (Rogers, 2017)

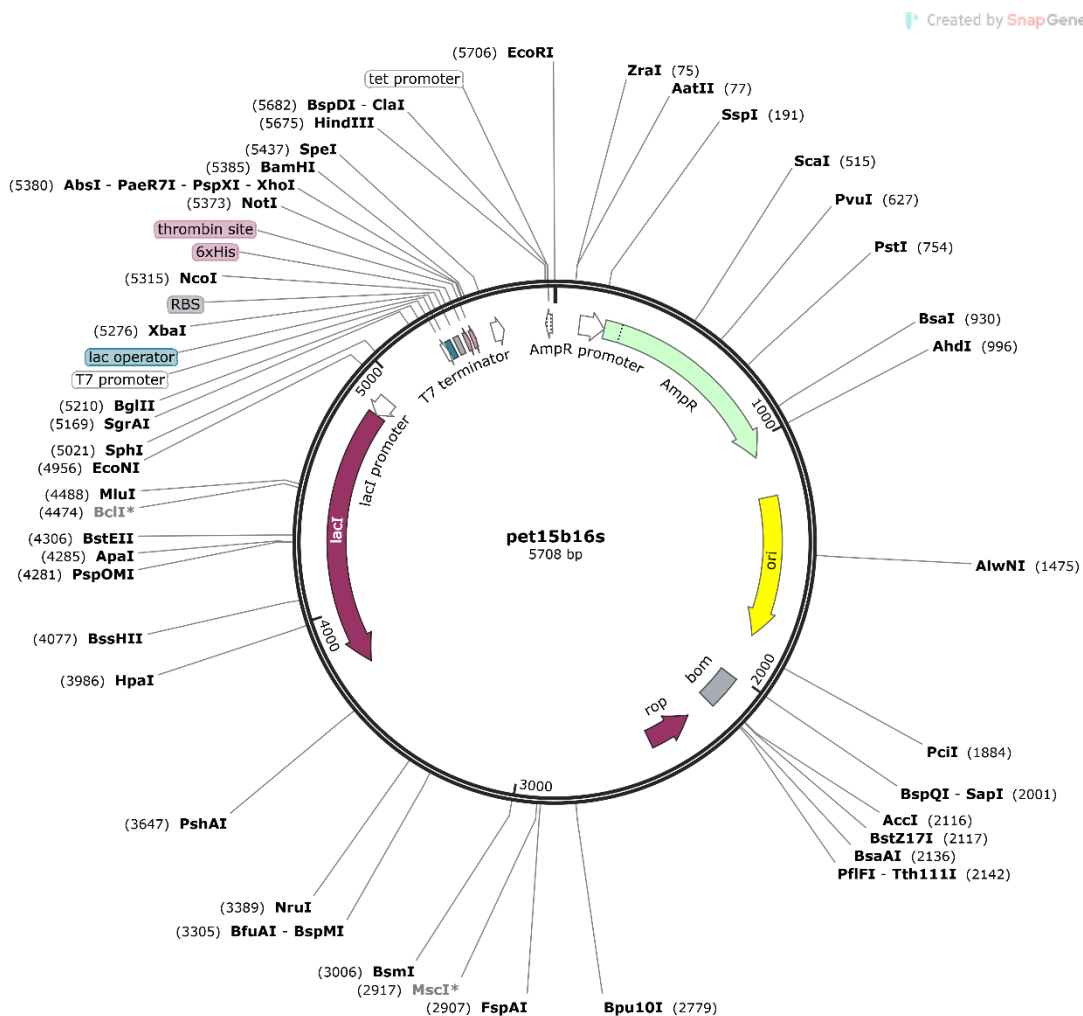
4.4 Απομόνωση Γονιδίου

Πραγματοποιείται απομόνωση του επιθυμητού τμήματος DNA από την πηκτή αγαρόζης με χρήση *kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται από την εταιρεία. Το απομονωμένο τμήμα DNA,

φωτομετράται σε συσκευή Nanodrop σε μήκη κύματος 280, 260 και 230nm και έτσι υπολογίζεται η ποσότητα και η καθαρότητα του.

4.5 Ενίσχυση Πλασμιδιακού Φορέα

Ως φορέας κλωνοποίησης επιλέχθηκε ο pET-15b16s (εικόνα 9), μία τροποποιημένη μορφή του φορέα pET-15b (Addgene) η οποία διαθέτει σημεία πρόσδεσης για τα περιοριστικά ένζυμα *SpeI* και *NotI* και κατασκευάστηκε στο εργαστήριο Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας του τομέα βοτανικής του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Glekas et al., 2022).



Εικόνα 9: Χάρτης του πλασμιδίου pet15b16s (Glekas et al., 2022).

4.5.1 Μετασηματισμός σε DH5a

Το επιλεγμένο πλασμίδιο εισάχθηκε σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5a με μέθοδο μετασηματισμού με θερμικό σοκ (heat shock). Ακολούθησε ανάπτυξη του μετασηματισμένου *E.coli* DH5a σε υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας, με θρεπτικό μέσο LB. Τα μετασηματισμένα κύτταρα, αναπτύχθηκαν σε τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο LB-Άγαρ στο οποίο προστέθηκε το αντιβιοτικό αμικικιλίνη σε συγκέντρωση 100 µg/mL, σε θερμοκρασία 37°C για περίπου 16 ώρες.

4.5.2 Απομόνωση του Πλασμιδιακού Φορέα

Μετά από περίπου 16 h ανάπτυξη των υγρών καλλιιεργειών, για την απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα σε υψηλή συγκέντρωση, έγινε χρήση του *NucleoSpin Plasmid kit for plasmid DNA* (Macherey-Nagel). Η συγκέντρωση του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA υπολογίστηκε με φωτομέτρηση σε Nanodrop.

4.6 Ανασυνδυασμός του Πλασμιδιακού Φορέα με το Γονίδιο Επιλογής

Για να δοθούν στον πλασμιδιακό φορέα και στο επιθυμητό γονίδιο συμπληρωματικά άκρα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης με περιοριστικά ένζυμα. Τα περιοριστικά ένζυμα που επιλέχθηκαν ήταν το *NotI* και το *SpeI*. Στο γονιδιακό DNA που απομονώθηκε από τον *B. safensis* και στο απομονωμένο πλασμίδιο προστίθενται τα περιοριστικά ένζυμα διαλυμένα σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (RcutSmart). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 37°C για 10 λεπτά.

Τα προϊόντα πέψης αναμιγνύονται σε αναλογία 1:3 φορέας προς γονίδιο επιλογής και έπειτα προστίθεται η λιγάση T4 σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η λιγάση αναγνωρίζει τα συμπληρωματικά άκρα που προέκυψαν από την πέψη και σχηματίζει μεταξύ τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται ένα κυκλικό ανασυνδυασμένο μόριο πλασμιδιακού DNA στο οποίο περιέχεται το επιλεγμένο γονίδιο *bsgh9*.

Το προϊόν της αντίδρασης συνένωσης, μετασχηματίστηκε σε δεκτικά κύτταρα DH5a με μέθοδο heat shock τα οποία αναπτύχθηκαν πρώτα σε τρυβλία Petri. Μετά από ανάπτυξη 16 ωρών, απομονώθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων με τη χρήση *NucleoSpin Plasmid kit for plasmid DNA* (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται από την εταιρεία κατασκευής. Τόσο τα μετασχηματισμένα κύτταρα όσο και το πλασμίδιο αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες -20 και -80°C.

4.7 Επαγωγή Πρωτεΐνης

Για την επαγωγή και παραγωγή ποσότητας του ενζύμου, κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) τα οποία έλαβαν το πλασμιδιακό φορέα μαζί με το γονίδιο της BsGH9 με αντίδραση μετασχηματισμού, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (LB) το οποίο περιείχε ποσότητα αμικιλίνης ίση με 100 µg/mL, σε θερμοκρασία 37°C και με συνεχόμενη ανάδευση. Όταν η κυτταρική καλλιέργεια εισήλθε στην εκθετική φάση (παρουσίασε οπτική πυκνότητα μεταξύ 0,6 και 1 στα 600nm) προστέθηκε στην καλλιέργεια ο επαγωγέας IPTG συγκέντρωσης 1mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 37°C για 3 έως 6 ώρες, μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600 nm να φτάσει το 1,6.

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 4.000 rpm για 20 λεπτά σε σταθερή θερμοκρασία 4°C.

5. Απομόνωση και Καθαρισμός της Πρωτεΐνης

5.1 Θραύση Κυττάρων με Υπερήχους

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε από την φυγοκέντρηση, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα NPI10. Για τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε συσκευή υπερήχων και παγόλουτρο, έτσι ώστε να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του κυτταρικού λύματος.

5.2 Χρωματογραφία Συγγένειας

Το ένζυμο απομονώθηκε από το σύνολο του κυτταρικού λύματος με χρήση στήλης χρωματογραφίας συγγένειας νικελίου και αγαρόζης (Ni-NTA column). Μετά από προετοιμασία και εξισορρόπηση της στήλης με χρήση NPI10 για την ενυδάτωση της ρητίνης, το κυτταρικό υγρό, διαβιβάστηκε από τη στήλη με ρυθμό 1-4 mL/min έτσι ώστε να συγκρατηθεί από το νικέλιο η επιθυμητή πρωτεΐνη. Η απομονωμένη πρωτεΐνη εκλύεται από τη στήλη με χρήση του διαλύματος NPI250.

5.3 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών

Το μέγεθος του απομονωμένου ενζύμου υπολογίστηκε με χρήση γέλης (gel) ακριλαμιδίου «SDS-Page».

Παρασκευάστηκαν δύο γέλες, άνω (stacking gel) και κάτω (separating gel) με χρήση διαλύματος 30% ακρυλαμιδίου (C_3H_5NO)/0,8% δισακρυλαμιδίου ($C_7H_{10}N_2O_2$) και τελική συγκέντρωση 0.1 % w/v θειικό αμμώνιο (APS, $(NH_4)_2S_2O_8$). Στο stacking gel προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος TGS μέχρι το διάλυμα να έχει τελική συγκέντρωση 5% w/v SDS. Το separating gel παρασκευάζεται με τελική συγκέντρωση 10% w/v SDS. Και οι δύο πηκτές και πολυμερίζονται με χρήση TEMED (τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη, $C_6H_{16}N_2$).

Τα κλάσματα της χρωματογραφίας συγγένειας τοποθετούνται στο stacking gel μετά από κατάλληλη προετοιμασία και βρασμό για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών, καθώς και χρωματισμό με χρωστική ουσία LAEMMLI 6x (Thermo-Scientific). Η γέλη ηλεκτροφορείται στα 200V για 45 λεπτά καταβυθισμένο σε 1x TGS running buffer.

5.4 Αφαλάτωση με Gel Filtration

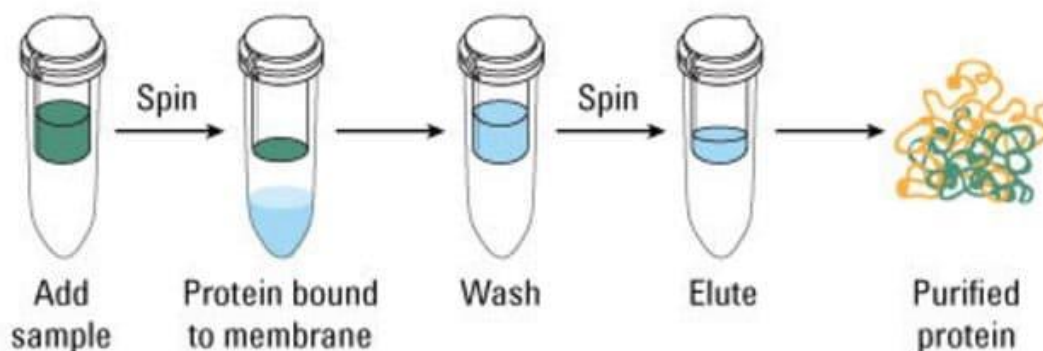
Το απομονωθέν ένζυμο (§ 5.3), διαβιβάστηκε από στήλη Sephadex G25M PD10. Η έκλυση των πρωτεϊνών από τη στήλη, έγινε χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών συγκέντρωσης 100mM με pH 7.

6. Συμπύκνωση Πρωτεΐνης

Το απομονωμένο ένζυμο συμπυκνώθηκε με χρήση στήλης συμπύκνωσης πρωτεϊνών από την εταιρεία ThermoFisher Scientific. Επιλέχθηκε όριο συμπύκνωσης (cut off)

30kDa, με βάση το προβλεπόμενο μοριακό βάρος της επιθυμητής πρωτεΐνης, καθώς από τις οδηγίες του κατασκευαστή απαιτείται το όριο να είναι τουλάχιστον δύο φορές μεγαλύτερο από το βάρος του μορίου το οποίο πρέπει να διατηρηθεί στη στήλη.

Για τη συμπύκνωσή της BsGH9, στη στήλη τοποθετείται η μέγιστη ποσότητα δείγματος και υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για περίπου 20 λεπτά με στόχο την πρόσδεση της πρωτεΐνης στην μεμβράνη της στήλης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι ο τελικός όγκος του πλούσιου σε πρωτεΐνη δείγματος να είναι δέκα φορές μικρότερος από τον αρχικό. Στη συνέχεια προστίθεται στη στήλη ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων συγκέντρωσης 100mM και pH=7 και το δείγμα υποβάλλεται και πάλι σε φυγοκέντρηση μέχρι υποδεκαπλασιασμό του όγκου. Κατά το βήμα αυτό η επιθυμητή πρωτεΐνη εκπλένεται από τη μεμβράνη και βρίσκεται διαλυμένη στο υπερκείμενο υγρό, το οποίο συλλέγεται.



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του συμπυκνωτή πρωτεϊνών από την εταιρεία Thermo Scientific.

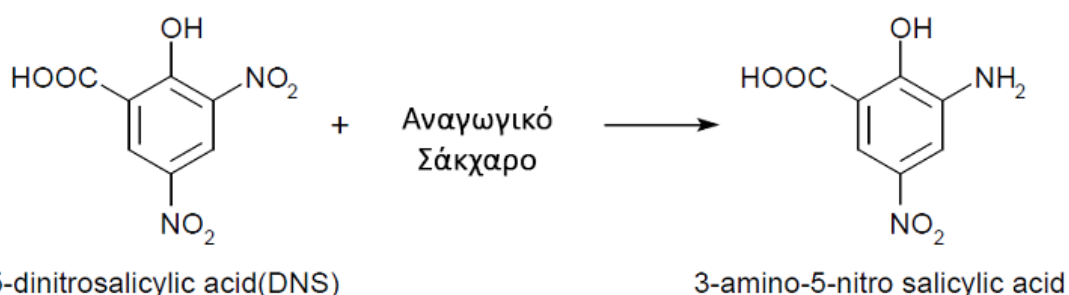
7. Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford και το αντίστοιχο αντιδραστήριο για 0.1 – 1.4 mg/mL πρωτεΐνης (Coomassie dye binding protein assay). Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για μία εύκολη, γρήγορη και με ικανοποιητική ευαισθησία μέθοδο, που περιλαμβάνει τη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στην πρωτεΐνη, λόγω όξινων ή βασικών ομάδων των αμινοξέων. Η χρωστική υπάρχει σε δύο διαφορετικές χρωματικές μορφές, καθώς η καστανή μορφή που έχει αρχικά μετατρέπεται σε μπλε κατά την πρόσδεσή της στην πρωτεΐνη και τη δημιουργία του αντίστοιχου συμπλόκου. Η αντίδραση πραγματοποιείται στις ειδικές θέσεις μίας μικροπλάκας και το διάλυμα υπόκειται σε έντονη ανάδευση. Η σύνδεση της χρωστικής με την πρωτεΐνη προκαλεί μία μετατόπιση στο μέγιστο απορρόφησης της βαφής από 465 σε 595 nm. Έτσι, με βάση την απορρόφηση στα 595 nm και με χρήση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, υπολογίζεται η τιμή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, που ισούται με $y=1.9484 \cdot \text{ABS}_{595}$ ($R^2=0.998$), κατασκευάστηκε μέσω διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων μιας πρότυπης πρωτεΐνης (Bovine Serum Albumin, Bovine γ -globulin) και εν συνεχεία προστέθηκε διάλυμα Bradford και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm.

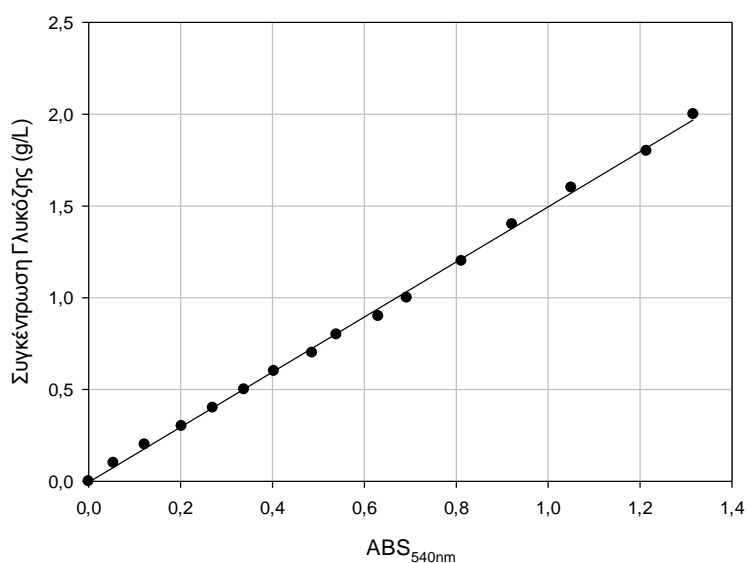
8. Μέθοδος Δινιτρο-σαλικυλικού Οξέος (DNS Assay)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό αναγωγικών σακχάρων, εφαρμόστηκε η μέθοδος DNS. Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται στην ανίχνευση του ελεύθερου καρβονυλίου το οποίο χαρακτηρίζει τα αναγωγικά σάκχαρα, μέσω οξείδωσης του με παράλληλη ποσοτική μετατροπή του δινιτρο-σαλικυλικού οξέος σε 3-άμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ. Το τελευταίο έχει χαρακτηριστικό πορτοκαλοκίτρινο χρώμα σε αλκαλικές συνθήκες, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της ποσότητας του αναγωγικού σακχάρου που είναι παρόν στο αρχικό δείγμα. Το 3-άμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ, ανιχνεύεται από την απορρόφηση του στα 540 nm (Miller, 1959).



Εικόνα 11: Αναπαράσταση της αντίδρασης μεθόδου DNS.

Για τον υπολογισμό της ποσότητας, κατασκευάζεται καμπύλη ισοδυνάμων γλυκόζης (διάγραμμα 1) για διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης (g/L) και τις αντίστοιχες απορροφήσεις που εμφανίζουν στα 540nm.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς ισοδυνάμων γλυκόζης με τη μέθοδο DNS.

9. Μέτρηση Ενζυμικής Ενεργότητας της BsGH9

Στον προσδιορισμό της ενεργότητας της *BsGH9* ενδογλουκανάσης, χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα καρβοξυμεθυλ κυτταρίνη (Carboxyl methylcellulose, CMC) χαμηλού ιξώδους σε συγκέντρωση 1% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) το pH του οποίου ρυθμίστηκε στο 6. Τα δείγματα επώαστηκαν για 15 λεπτά σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 60°C. Ακολουθεί προσθήκη ποσότητας DNS ίση με τον αρχικό όγκο του δείγματος, βρασμός για 5 min και προσθήκη ποσότητας απιονισμένου νερού. Έπειτα τα δείγματα φωτομετρούνται στα 540nm.

Μία μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit), ισοδυναμεί με την ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την παραγωγή 1μmol προϊόντος ανά λεπτό ανά μονάδα όγκου δείγματος.

10. Χαρακτηρισμός της BsGH9

10.1 Επίδραση της Θερμοκρασίας στην Ενεργότητα και τη Σταθερότητα της BsGH9

Μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην δραστικότητα του ενζύμου σε θερμοκρασιακό εύρος από 30 έως 90°C εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο αντίδρασης που παρουσιάζεται στην παράγραφο 9, μεταβάλλοντας μόνο την θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκε η εκάστοτε αντίδραση.

Η σταθερότητα του ενζύμου, ελέγχθηκε με επώαση ενζυμικού διαλύματος σε θερμοκρασίες 30 έως 90°C. Λαμβάνονται δείγματα σε τακτά χρονικά διαστήματα και εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο αντίδρασης που παρουσιάζεται στην παράγραφο 9, προσδιορίστηκε η εναπομείνουσα ενεργότητα του ενζύμου σε κάθε θερμοκρασία.

10.2 Επίδραση του pH στην Ενεργότητα και Σταθερότητα της BsGH9

Η επίδραση του pH στην ενεργότητα του ενζύμου, μελετήθηκε με σειρά αντιδράσεων στις οποίες το pH του υποστρώματος ρυθμίστηκε σε pH 4 έως και 10. Για να επιτευχθεί αυτό η ίδια ποσότητα CMC διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος /φωσφορικού νατρίου ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 100 mM σε έκταση pH 4.0 έως 7.0, ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 100 mM σε έκταση pH 7.0 έως 9.0 και ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης/Καυστικό Νάτριο ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2/\text{NaOH}$) 100 mM σε έκταση pH 9.0 έως 10.0.

Η σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH μελετήθηκε, επώαζοντας δείγμα ενζύμου αραιωμένο στα παραπάνω ρυθμιστικά διαλύματα για 48 ώρες σε θερμοκρασία 4 °C και στη συνέχεια μέτρηση της εναπομείνουσας ενεργότητας του.

10.3 Επίδραση Ιόντων Μετάλλων, EDTA και SDS στην Ενεργότητα

Μελετήθηκε η επίδραση μεταλλικών ιόντων στην δραστικότητα του ενζύμου με επώαση δείγματος ενζύμου παρουσία των παρακάτω ουσιών σε συγκέντρωση 5mM για 60 λεπτά στους 30 °C και κατόπιν μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο αντίδρασης που παρουσιάζεται στην παράγραφο 9,

Τα ιόντα που εξετάστηκαν:

1. Mn^{2+} από την ένωση $MnSO_4 \cdot H_2O$ και $MnCl_2$
2. Mg^{2+} από την ένωση $MgCl_2$ και $MgSO_4$
3. Na^+ από την ένωση $NaCl$
4. K^+ από την ένωση KCl
5. Ca^{2+} από την ένωση $CaCl_2$
6. Cu^{2+} από την ένωση $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ και $CuSO_4$
7. Co^{2+} από την ένωση $CoCl_2$
8. Fe^{3+} από την ένωση $FeCl_3$
9. Fe^{2+} από την ένωση $FeSO_4$
10. Zn^{2+} από την ένωση $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
11. Ba^{2+} από την ένωση $BaCl_2 \cdot 2H_2O$
12. Ni^{2+} από την ένωση $NiSO_4$

Επίσης με τον ίδιο τρόπο μελετήθηκαν και οι επιδράσεις των παρακάτω ουσιών.

13. EDTA
14. SDS

10.4 Εξειδίκευση ως προς το Υπόστρωμα

Μελετήθηκε η ικανότητα της BsGH9, να δράσει σε φυσικά και συνθετικά υποστρώματα. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η δράση του ενζύμου στα φυσικά υποστρώματα: ξυλάνη βρώμης (oat spelt), μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel), κυτταρίνη διογκωμένη με φωσφορικό οξύ (PASC), λιχενάνη, β-γλουκάνη, α-κυτταρίνη και αραβινοξυλάνη. Ακόμα, εξετάστηκε η δράση στα εξής συνθετικά υποστρώματα: 4-Νιτροφαινυλ-β-D-Γλυκοπυρανοζίδιο και 4-Νιτροφαινυλ-α-D-Γλυκοπυρανοζίδιο (PNPG), 4-Νιτροφαινυλ-α-D-Γαλακτοπυρανοζίδιο (pNPGal), 2-Νιτροφαινυλ-β-D-Γαλακτοπυρανοζίδιο (oNPGal) και 4-Νιτροφαινυλ-β-D-Ξυλοπυρανοζίδιο (pNPX).

Τα φυσικά υποστρώματα διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων με pH=6 σε τελική συγκέντρωση 1% w/v, ενώ τα συνθετικά υποστρώματα διαλύθηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, αλλά σε τελική συγκέντρωση 1mM. Σε αυτά ακολούθησε προσθήκη ενζύμου και επώαση σε υδατόλουτρο για 15 λεπτά στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της BsGH9. Ακολουθεί προσδιορισμός των συνολικών αναγωγικών ομάδων με τη μέθοδο DNS για τα φυσικά υποστρώματα (Ξυλάνη βρώμης (oat spelt), μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel), κυτταρίνη διογκωμένη με φωσφορικό οξύ (PASC), λιχενάνη, β-γλουκάνη, α-κυτταρίνη και αραβινοξυλάνη). Στην περίπτωση των συνθετικών υποστρωμάτων προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της p-Νιτροφαινόλης με φωτομέτρηση στα 410nm.

10.5 Εύρεση Κινητικών σταθερών

Ο προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων K_m και v_{max} της BsGH9 χρησιμοποιήθηκε σε β-γλουκάνη, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης και PASC. Η β-γλουκάνη μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις από 1 έως 20 mg/mL. Το PASC μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις 0,1 έως και 2% w/v ενώ το CMC μελετήθηκε από 10 έως και 90 mg/mL. Ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο αντίδρασης που παρουσιάζεται στην παράγραφο 9,.

10.6 Έλεγχος Ρόφησης της BsGH9

Μελετήθηκε η ρόφηση της BsGH9 σε μικροκρυσταλλική κυτταρίνης (Avicell). Παρασκευάστηκαν διαλύματα του μελετώμενου ενζύμου συγκεντρώσεων 1 και 2 mg/mL, τελικού όγκου 1,5 mL. Στη συνέχεια τα ενζυμικά σκευάσματα προστέθηκε μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicell) συγκέντρωσης 20mg/mL. Τα διαλύματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία 4 °C, για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και συλλογή του υπερκείμενου υγρού. Σε αυτό, μετρήθηκε η συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης με το μέθοδο Bradford.

11. Προσδιορισμός προϊόντων υδρόλυσης

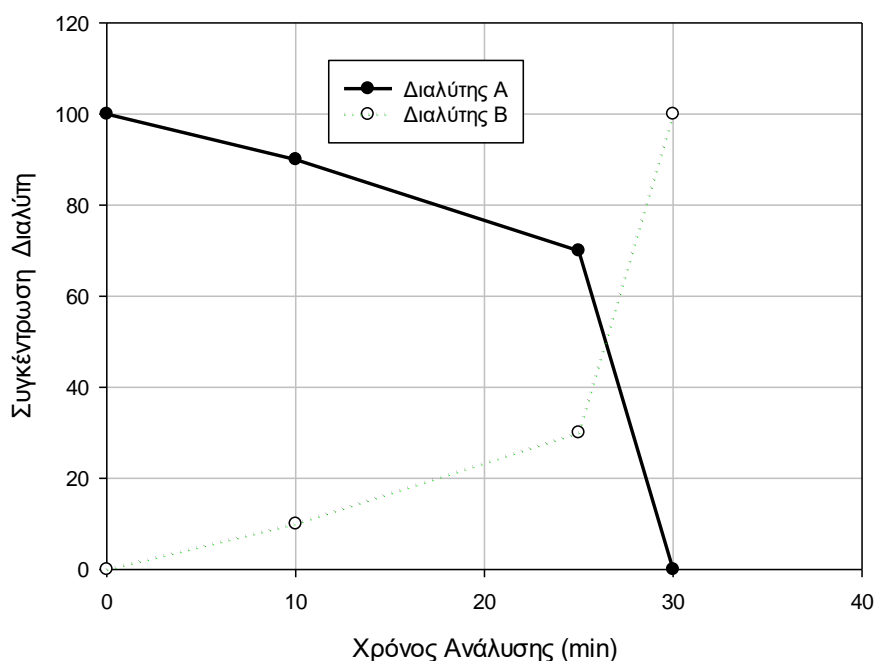
Για τον προσδιορισμό των προϊόντων που προκύπτουν από την υδρόλυση της καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνης, του PASC και της β-γλουκάνης από την BsGH9, έγινε χρήση χρωματογραφίας ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης με αμπερομετρική παλμική ανίχνευση (High Performance Anion- exchange Chromatography with pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD). Αναλυτικότερα, κατάλληλα αραιωμένο ένζυμο, προστέθηκε σε μικρή ποσότητα υποστρώματος συγκέντρωσης 1% w/v με διαλύτη ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων συγκέντρωσης 100mM και pH=6. Το μείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία 50 °C για 6 και 20 ώρες υπό διαρκή ανάδευση. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης τα δείγματα συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση (11000rpm για 10 λεπτά) και το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αραιώθηκε πριν αναλυθεί. Τα δείγματα που περιείχαν το μη υδατοδιαλυτό υπόστρωμα (PASC) πριν αναλυθούν καθαρίστηκαν από φίλτρο 0,2μm για να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη ακρίβεια μέτρησης και για την καλύτερη λειτουργία της συσκευής.

Η μέθοδος HPAEC-PAD πρόκειται για χρωματογραφική τεχνική, η οποία εφαρμόζεται εκτενώς για την ανίχνευση υδατανθρακικών μορίων και συγκεκριμένα ολιγοσακχαριτών. Βασίζεται στο γεγονός ότι, οι περισσότεροι υδατάνθρακες έχουν ουδέτερο φορτίο σε ουδέτερο pH (7) και διαχωρίζονται με ανταλλαγή ανιόντων λόγω του ιονισμού που λαμβάνει χώρα στις καρβοξυλικές ομάδες τους σε συνθήκες υψηλών pH (>11). Τα ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται από την αντίδραση οξείδωσης αυτή, μπορούν να ανιχνευτούν από ένα ηλεκτρόδιο εργασίας ως μετατροπή τάσης, η οποία στη συνέχεια σχεδιάζεται σε διάγραμμα ως προς το χρόνο.

Όλες οι μέθοδοι HPAEC-PAD διαθέτουν μία στατική φάση, η οποία είναι θετικά φορτισμένη και μία κινητή φάση η οποία εκλούει τα προϊόντα με χρήση υδατικών

διαλυμάτων NaOH και CH₃COONa. Το διάλυμα NaOH, εξασφαλίζει το υψηλό pH της στήλης, ενώ η βαθμιαία προσθήκη CH₃COONa στο διαλύτη έκλουσης, εξασφαλίζει τον καλύτερο διαχωρισμό και έτσι ανίχνευση των ισχυρά δεσμευμένων ανιόντων από τη σταθερή φάση. Ο διαχωρισμός γίνεται ανάλογα με το μέγεθος και το είδος των δεσμών των ολιγοσακχαριτών, καθώς ιονίζονται οι καρβοξυλικές ομάδες τους με αποτέλεσμα την παραγωγή ασθενών ανιόντων.

Για την ανάλυση των ολιγοσακχαριτών (γλυκανών), έγινε χρήση αναλυτικής στήλης Dionex CarboPac PA1 (250 mm x 4 mm) εφοδιασμένη με προστήλη. Η μεταφορά της κινητής φάσης πραγματοποιήθηκε από σύστημα αντλίας-μικροεπεξεργαστή GS50 Gradient Pump. Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα 100 nM NaOH (Διαλύτης A) και 10 mM NaOH/1 M CH₃COONa (Διαλύτης B). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με αμπερομετρικό ανιχνευτή (ηλεκτρόδιο χρυσού, Gold pH-Ag-AgCl) το οποίο είναι συζευγμένο στη στήλη. Όλες οι επιμέρους μονάδες του συστήματος χρωματογραφίας, κατασκευάστηκαν από την εταιρεία Thermoscientific (Η.Π.Α.). Με χρήση του λογισμικού Chromeleon 7.0, η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε να διατηρείται σταθερή στους 30 °C, η ροή των διαλυτών έκλουσης ρυθμίστηκε σε ρυθμό 1mL/min και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ανά δείγμα ρυθμίστηκε στα 40 λεπτά. Επίσης, ρυθμίστηκε ο χρόνος μεταβολής της συγκέντρωσης των διαλυτών A και B στην κινητή φάση (διάγραμμα 2), ώστε να επιτευχθεί βέλτιστος διαχωρισμός των προϊόντων.



Διάγραμμα 2: Μεταβολή συγκεντρώσεων διαλυτών A και B κατά την έκλουση των προϊόντων



Εικόνα 12: Το όργανο ΗΡΑΕC-PAD που χρησιμοποιήθηκε.

Αποτελέσματα

1. Βιοπληροφορική Μελέτη

Μετά από μελέτη και κατηγοριοποίηση του στελεχούς *B. safensis* (ATHUBA63) από το Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, μέσω διαδικασίας 16s rRNA αλληλούχισης, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στη βάση δεδομένων NCBI για την παρουσία ενδο-β-1,4-γλουκανασών σε συγγενή στελέχη. Το αποτέλεσμα της αναζήτησης ήταν η ανακάλυψη ενός γονιδίου με προϊόν μία εσωκυτταρική ενδογλουκανάση στο χρωμόσωμα του *B. safensis* PgKB20 (Gene ID: 61770493, (FX981_03754)). Με βάση τα παραπάνω και περαιτέρω σύγκριση του στελεχούς με άλλες μορφές του *B. safensis* και άλλων συγγενών ειδών, σχεδιάστηκαν οι εκκινητές που αναφέρονται στο κεφάλαιο 4.2 (Υλικά και Μέθοδοι).

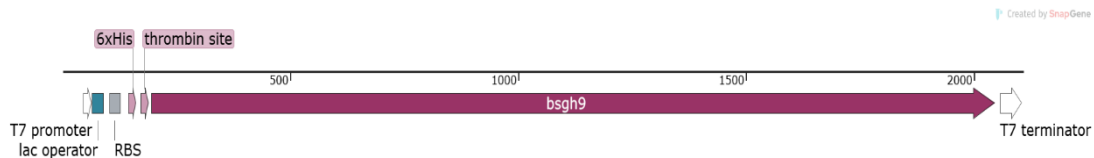
Μετά από αλληλούχιση του γονιδίου bsgh9 του *B. safensis* από το οποίο απομονώθηκε η μελετώμενη πρωτεΐνη, προκύπτει η εξής νουκλεοτιδική αλληλουχία:

> bsgh9 Sequenced Gene

```
CGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGG
GGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCTCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATA
TACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCG
GCCGCATGGCATCTTACAACATGTAGAGGTTCTACAAAATCCATGCTGTTTTATGAAGCACA
GCGGTCAGGCCGGCTCCGGAAAGTAATCGTCTTAACTGGCGGGGAGATTCTGGACTAGAG
GACGGGAAGGATGTTGGGCATGACTTAACTGGCGGCTGGTATGATGCAGGAGATCATGTGAA
ATTTGGACTTCCGATGGCTTACTCAGCAGCCGTGCTTGCATGGACAGTATATGAATATCGAGAA
GCTTATGAAGAGCGGAGCTGCTTGTATGAGATACTAGATCAAATCAAGTGGGCAACGGATTA
TTTCTTGAAAGCACATACAGGACCGAATGAATTTGGGCGCAAGTCGGTGATGGAAACGCCG
ATCACGCTTGGTGGGGGCCAGCAGAAGTGATGCCGATGAACCGGCCAGCTTTAAAATTGAT
GAACATTGTCCTGGAACAGAAGTAGCTGCACAACTGCGGCGGCTTTAGCAGCAGGTTCTAT
TATTTTTAAAGAAACAGATGCGTCTTATGCAGCAAAGCTTTTGACGCACGCCAAACAGCTATAT
GCATTTGCTGACAGGTATCGCGCAAATATACAGATTGTGTACCAATGCGCAGCCATTTTACA
ACTCCTGGAGCGGCTATGTTGACGAACTTATTTGGGCGGAATCTGGCTGTACTTGGCCACAA
ATGAAGAAACGTATTTAAACCAAGCATTAAAAGCGGTAGAGGAATGGCCGAAGGATTGGGAT
TATACGTTTACAATGTCATGGGACAATACTTTTTTTGCTTACAAATTTTACTTGCAAGAATCAC
GAAAGAGAACAGATTTATAGAATCGACTGAGCGTAATCTTGATTACTGGACCACAGGTCTTGT
TCAAAATGGAAAAGTAGAAAGAATCACCTATACGCCTGGCGGTTTGGCATGGCTGGATCAATG
GGTTCACTTCGTTATGCCGCCAATGCAGCATTTTTAGCCTTTGTATATGCTGATTGGGTATCTG
ATCAAGAAAAGAAGAATCGATACCAATCGTTTTCGATCAAGCAAACCTCACTATATGCTAGGTG
ACAATCCGCTGAATAGAAGCTACGTCGTTGGTTTTGGCCAGAATCCGCCGAAGCATCCGCACC
ATCGTACTGCACACGGCTCATGGTTCGAACCAGCTGACAAATCCTTCAGTTCATCGGCACACAC
TTTATGGAGCGCTTGTGGGGGCCCTAATGCACAGGATCAATATGACGATGACATCTCGGATTA
TATATCAAACGAGGTGGCGACCGATTATAATGCCGCCTTTACTGGAAATATCGCCAAAATGGTG
CAGCTGTTTGGTCAAGGACAATCAAACCTGCCAAATTTCCCGCCTAAAGAACAGGTGGAGGA
AGAATTTTTGTAGAGGCAGCTGTGATGCATAACGATACAACATCTACTCAAGTGAAAGCAGT
GCTTTACAACAGGTCCGGCTGGCCGGCAAGAAGCAGTCAAACACTGTCATTTAGATATTACGT
```

CAATCTGAGTGAGGTCTTTGCAAAGGGATTCACTGAAAAGGATATTCAAGTGACAGCAGCCT
 ACAATGAAGGCGCTTCCTTATCGCCTTTAAAGGTATATGACGCATCAAGCCGCGTCTATTTTGC
 AGAGATCGATTTTACGGGCGTAGCTATTTTCCCTGGAGGAGAATCTGAGCATAAGAAGGAAAT
 ACAATTTGATTATCTGCTCCAATGGATCGAATATATGGGATGCCTCAAATGATTATTCCTATCA
 AGGGTTAACATCCAATATGCAAAAAACACCGAAGATTCTGTCTTTGACGATGGTGTTTTAGTA
 TTTGGCACACTTCCAGACAAATAAACTAGTCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAAC
 GGGTCTTGAGGGGTTTTTTGC

Η αλληλουχία έχει μήκος 2106 βάσεις και σε αυτήν παρατηρούνται τα εξής σημεία ενδιαφέροντος:



Εικόνα 13: Χάρτης του γονιδίου bsgh9.

1. T7 υποκινητής (T7 Promoter)
2. Lac (Lac Operator)
3. Αλληλουχία πρόσδεσης σε ριβόσωμα (RBS)
4. 6 Ιστιδίνες (6xHis)
5. Θέση Θρομβίνη (Thrombin Site)
6. T7 τερματιστής (T7 Terminator)

Με βάση την παραπάνω νουκλεοτιδική αλληλουχία, προκύπτει η εξής αμινοξική.

> BsGH9 Sequencing Protein

MASYNYVEVLQKSMFLFYEAQRSGRLPESNRLNWRGDSGLEDGKDVGHDLTGGWYDAGDHVK
 FGLPMAYSAAVLAWTVYREAYEEAELLDEILDQIKWATDYFLKAHTGPNEFWAQVGDGNAD
 HAWWGPAEVMPMNRPFAFKIDEHCPGTEVAAQTAAALAAGSIIFKETDASYAAKLLTHAKQLYAF
 ADRYRGKYTDCVTNAQPFYNSWSGYVDELIWGGIWLYLATNEETYLNQALKAVEEWPKDWDY
 TFTMSWDNTFFASQILLARITKENRFIESTERNLDYWTGLVQNGKVERITYTPGGGLAWLDQWG
 SLRYAANAFLAFVYADWVSDQEKKNRYQSFAIKQTHYMLGDNPLNRSYVVGFGQNPPKHPHH
 RTAHGSWSNQLTNPSVHRHTLYGALVGGPNAQDQYDDDISDYISNEVATDYNAAFTGNIKMN
 QLFGQGQSKLPNFPKQVEEEFFVEAAVMHNDTTSTQVKAVLYNRSWGPASSQTLFRYVYV
 NLSEVFAKGFTEKDIQVTAAYNEGASLSPLKVDASSRVYFAEIDFTGVAFPPGGESEHKKEIQFRLS
 APNGSNIWDASNDYSYQGLTSNMQKTPKIPVFDDGVLVFGTLPDK

Με χρήση αυτής της αλληλουχίας και του προγράμματος ProtParam ExPASy tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) προκύπτουν τα εξής δεδομένα:

Number of amino acids: 616

Molecular weight: 69601,31 Da (69,601 kDa)

Theoretical pI: 5.03

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 77

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 52

Formula: C₃₁₅₁H₄₆₅₆N₈₂₄O₉₄₆S₁₂

Total number of atoms: 9589

Με χρήση του ηλεκτρονικού εργαλείου UniProt BLAST (<https://www.uniprot.org/blast>) στο οποίο καταχωρήθηκε η αμινοξική αλληλουχία της μελετώμενης πρωτεΐνης, παρατηρήθηκε βαθμός συγγένειας 98,4% με την ενδο 1,4-β-γλουκανάση του *B.safensis* με κωδικό όνομα PgKB20 (Hong et al., 2018), πολύ υψηλός βαθμός συγγένειας (97,8%) παρουσιάζεται και με την πρωτεΐνη *EgI/A* του βακτηρίου *B.pumilus*, στέλεχος CL16, η οποία πρόκειται επίσης για ενδο 1,4-β-γλουκανάση της οικογένειας GH9 (Lima et al., 2005). Ακόμα, βαθμός συγγένειας άνω του 90% εμφανίζεται και με την ενδο 1,4-β-γλουκανάση EG-IV από το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus subtilis* KSM-522 (Hitomi et al., 1997).

Από το πρόγραμμα Clustal omega multiple alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση και σύγκριση των παραπάνω τεσσάρων αμινοξικών αλληλουχιών. Οι αλληλουχίες παρουσιάζονται ως εξής:

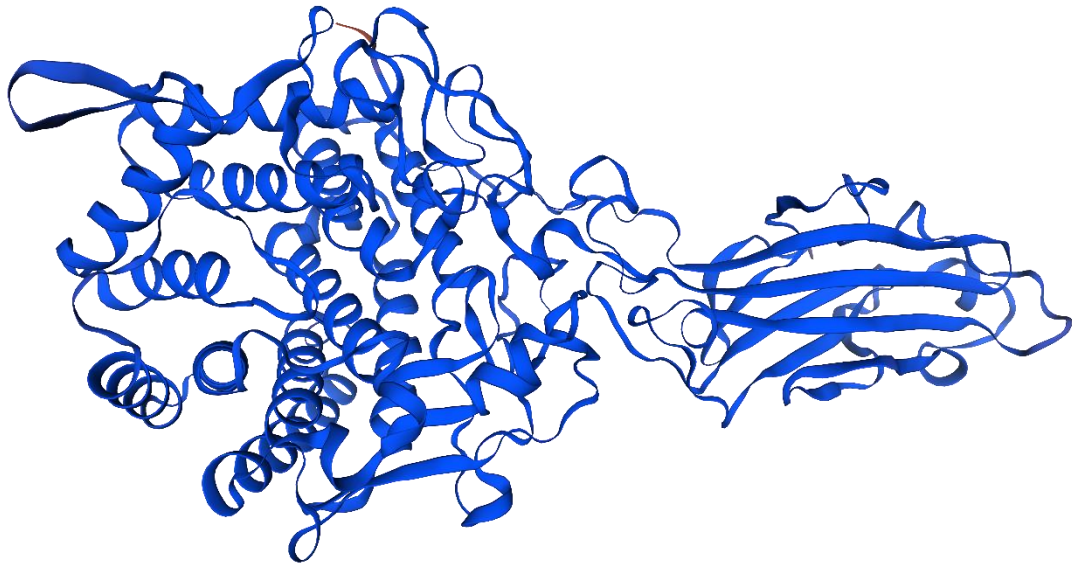
1. Η μη χαρακτηρισμένη ενδογλουκανάση του *B.safensis* PgKB20 (tr|A0A5C0WN54|A0A5C0WN54_BACIA).
2. Η BsGH9 από τον *B.safensis* που εξετάζεται στην παρούσα διπλωματική.
3. Η *EgI/A* του *B.pumilus* CL16 (sp|Q5YLG1|GUNA_BACPU).
4. Η EG-IV του *B. subtilis* KSM-522 (sp|P28622|GUN4_BACS5).

sp P28622 GUN4_BACS5	-----MTRRWSFLVQCFTFKKKEGVRSRYSYSDYNYVEVLQKSIIL	39
BSGH9	-----MASYNYVEVLQKSM	15
tr A0A5C0WN54 A0A5C0WN54_BACIA	-----MASYNYVEVLQKSM	15
sp Q5YLG1 GUNA_BACPU	MLIFETYLILFKTVQITKRRRIERRRLRLLNQCF--TKKEGVSNREMASYNYVEVLQKSM	58
	*.:*****:*	
sp P28622 GUN4_BACS5	FYEAQRSGLPESNRLNWRGDSGLEDKDVGHDLTGGWYDAGDHVKFGLPMAYSAAVLAW	99
BSGH9	FYEAQRSGLPESNRLNWRGDSGLEDKDVGHDLTGGWYDAGDHVKFGLPMAYSAAVLAW	75
tr A0A5C0WN54 A0A5C0WN54_BACIA	FYEAQRSGLPESNRLNWRGDSGLEDKDVGHDLTGGWYDAGDHVKFGLPMAYSAAVLAW	75
sp Q5YLG1 GUNA_BACPU	FYEAQRSGLPESNRLNWRGDSGLKDKDVGHDLTGGWYDAGDHVKFGLPMAYSAAVLAW	118
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
sp P28622 GUN4_BACS5	TVYREAYEAEALLDDMLDQIKWATDYFLKAHTGPNEFWAQVGDGNADHGWGPAEVM	159
BSGH9	TVYREAYEAEALLDEILDQIKWATDYFLKAHTGPNEFWAQVGDGNADHAWGPAEVM	135
tr A0A5C0WN54 A0A5C0WN54_BACIA	TVYREAYEAEALLDEILDQIKWATDYFLKAHTGPNEFWAQVGDGNADHAWGPAEVM	135
sp Q5YLG1 GUNA_BACPU	TVYREAYEAEALLDEILDQIKWATDYFLKAHTGPNEFWAQVGDGNADHAWGPAEVM	178
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
sp P28622 GUN4_BACS5	MNRPAFKIDEHCPGTEVAQAATAALAAGSIIIFKETDAPYAAKLLTHAKQLYAFADRYRGE	219
BSGH9	MNRPAFKIDEHCPGTEVAQAATAALAAGSIIIFKETDASYAAKLLTHAKQLYAFADRYRGK	195
tr A0A5C0WN54 A0A5C0WN54_BACIA	MNRPAFKIDEHCPGTEVAQAATAALAAGSIIIFKETDASYAAKLLTHAKQLYAFADRYRGK	195
sp Q5YLG1 GUNA_BACPU	MNRPAFKIDEHCPGTEVAQAATAALAAGSIIIFKETDASYAAKLLTHAKQLYAFADRYRGK	238
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
sp P28622 GUN4_BACS5	YTDVNTAQPFYNSWSGYIDELIWGGIWLYLATNDQTYLNKALKAVEEWPKDWDYTFMTS	279
BSGH9	YTDVNTAQPFYNSWSGYVDELIWGGIWLYLATNEETYLNLKALKAVEEWPKDWDYTFMTS	255
tr A0A5C0WN54 A0A5C0WN54_BACIA	YTDVNTAQPFYNSWSGYVDELIWGGIWLYLATNEETYLNLKALKAVEEWPKDWDYTFMTS	255
sp Q5YLG1 GUNA_BACPU	YTDVNTAQPFYNSWSGYVDELIWGGIWLYLATNEETYLNLKALKAVEEWPQDWDYTFMTS	298
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
sp P28622 GUN4_BACS5	WDNTFFLSQILLARITKEKRFIESTERNLDYWTSTGVQNGKVERITYTPGGLAWLDQWGS	339
BSGH9	WDNTFFASQILLARITKENRFIESTERNLDYWTGLVQNGKVERITYTPGGLAWLDQWGS	315
tr A0A5C0WN54 A0A5C0WN54_BACIA	WDNTFFASQILLARITKENRFIESTERNLDYWTGLVQNGKVERITYTPGGLAWLDQWGS	315
sp Q5YLG1 GUNA_BACPU	WDNTFFASQILLARITKENRFIESTERNLDYWTGLVQNGKVERITYTPGGLAWLDQWGS	358
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
sp P28622 GUN4_BACS5	LRYTANAFLAFVYADWVSDQEKKNRYQTFAIRQTHYMLGDNPNRSYVVGFGKNPMP	399

BSGH9	LRYAANAFLAFVYADWVSDQEKKRYSFAIKQTHYMLGDNPLNRSYVVGFGQNPCKHP	375
tr A0A5C0WN54 A0A5C0WN54_BACIA	LRYAANAFLAFVYADWVSDQEKKRYSFAIKQTHYMLGDNPLNRSYVVGFGQNPCKHP	375
sp Q5YLG1 GUNA_BACPU	LRYAANAFLAFVYADWVSDQEKKRYSFAIKQTHYMLGDNPLNRSYVVGFGQNSPKHP	418
	:**:***:***** *	
sp P28622 GUN4_BACS5	HHRTAHGSWSNQLTTPSSHRHTLYGPLVGGPNRQDQYDDDISDYVSNVATDYNAFTGN	459
BSGH9	HHRTAHGSWSNQLTNPSVHRHTLYGALVGGPNAQDQYDDDISDYISNEVATDYNAFTGN	435
tr A0A5C0WN54 A0A5C0WN54_BACIA	HHRTAHGSWSNQLTNPFSSHRHTLYGALVGGPNAQDQYDDDISDYISNEVATDYNAFTGN	435
sp Q5YLG1 GUNA_BACPU	HHRTAHGSWSNQLTNPFSSHRHTLYGALVGGPNAQDQYDDDISDYISNEVATDYNAFTGN	478
	*****.* ** ** ***** ** *****:*****	
sp P28622 GUN4_BACS5	GAAV---WSGQSKLPNFPKQVEDEFFVEAAVMSNDTSTQIKAILYNRSGWPARSSQ	515
BSGH9	IAKMQVLFQGGQSKLPNFPKQVEDEFFVEAAVMHNDTSTQVKAVLYNRSGWPARSSQ	495
tr A0A5C0WN54 A0A5C0WN54_BACIA	IAKMQVLFQGGQSKLPNFPKQVEDEFFVEAAVMHNDTSTQVKAVLYNRSGWPARSSQ	495
sp Q5YLG1 GUNA_BACPU	IAKMQVLFQGGQSKLPNFPKQVEDEFFVEAAVMHNDTSTQVKAVLYNRSGWPARSSQ	538
	* : .*****:***:***** *****:***:*****	
sp P28622 GUN4_BACS5	SLSFRYYVNLSEIFAKGFTDKDIQVTAAYNEGASLSPLTVYDASSHIYFTEIDFTGVVAF	575
BSGH9	TLSFRYYVNLSEVFAKGFTEKDIQVTAAYNEGASLSPLKVYDASSRVYFAEIDFTGVVAF	555
tr A0A5C0WN54 A0A5C0WN54_BACIA	TLSFRYYVNLSEVFAKGFTEKDIQVTAAYNEGASLSPLKVYDASSRVYFAEIDFTGVVAF	555
sp Q5YLG1 GUNA_BACPU	TLSFRYYVNLSEVFAKGFTEKDIQVTAAYNEGASLSPLKVYDASSRVYFAEIDFTGVVIS	598
	:*****:*****:*****.*****.*****:***:*****.*	
sp P28622 GUN4_BACS5	PGGESLHKKEIQFRLSAPNGANIWDASNDYSYQGLTSNMQKTARIPVFDQGDVLFVFTLPN	635
BSGH9	PGGESEHKKEIQFRLSAPNGNSNIWDASNDYSYQGLTSNMQKTPKIPVFDGVLVFTLPD	615
tr A0A5C0WN54 A0A5C0WN54_BACIA	PRGESEHKKEIQFRLSAPNGNSNIWDASNDYSYQGLTSNMQKTKIPVFDGVLVFTLPD	615
sp Q5YLG1 GUNA_BACPU	PRGESEHKKEIQFRLSAPNGNSNIWDASNDYSYQGLTSNMQKTKIPVFDGVLVFTLPD	658
	* ** *****:*****:***** .***:*** *****:	
sp P28622 GUN4_BACS5	K 636	
BSGH9	K 616	
tr A0A5C0WN54 A0A5C0WN54_BACIA	K 616	
sp Q5YLG1 GUNA_BACPU	K 659	
	*	

Οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ της BsGH9 και των άλλων τριών αλληλουχιών είναι ελάχιστες. Συγκεκριμένα, μεταξύ της αλληλουχίας της BsGH9 και της A0A5C0WN54, εμφανίζεται ποσοστό ομοιότητας ίση με 98,4%. Μεταξύ της EglA και της BsGH9, εμφανίζεται ποσοστό ομοιότητας 97,9% και μεταξύ EG-IV και της επιθυμητής αλληλουχίας εμφανίζεται ποσοστό ομοιότητας 90,3%.

Με χρήση του διαδικτυακού εργαλείου Swiss Model Tool ExPASy (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) και πρότυπο μοντέλο τριτοταγούς δομής την GH9 ενδογλουκανάση του στελέχους SAFR-032 του *B. pumilus* (Gioia et al., 2007), προκύπτει πρόβλεψη της δομής του μονομερούς της BsGH9 με ακρίβεια 94,32%.

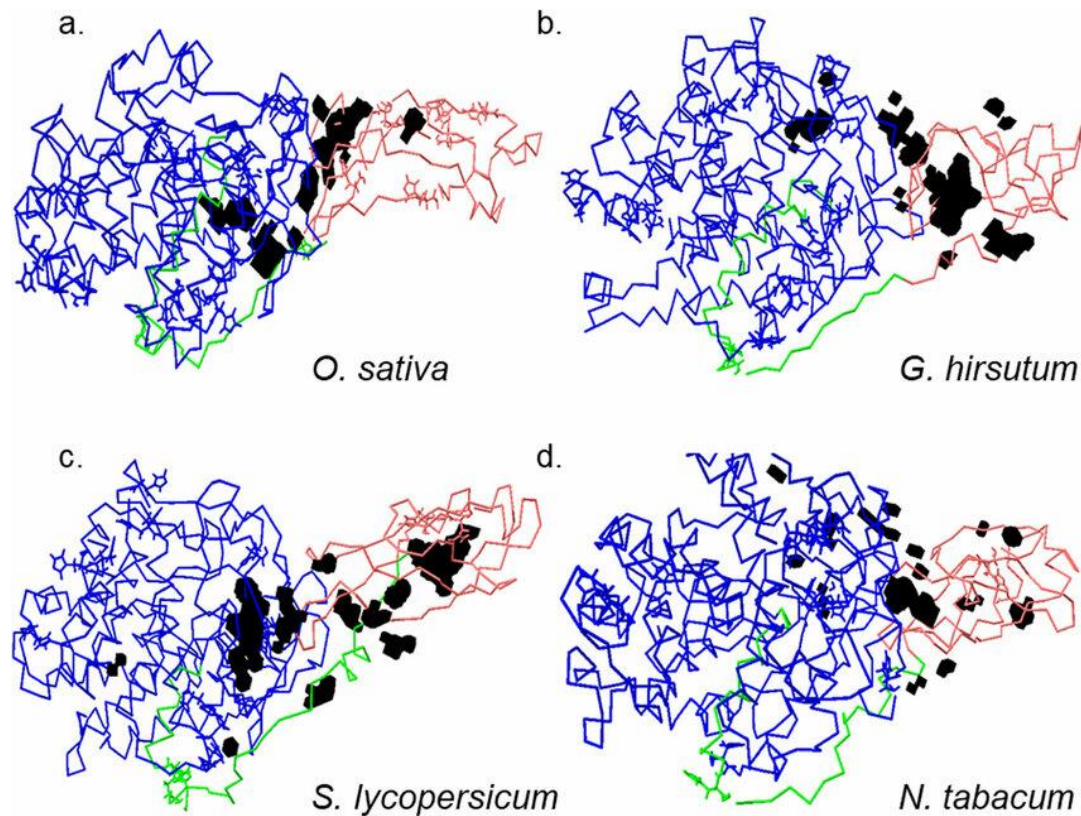


Εικόνα 14: Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής της BsGH9

Η τρισδιάστατη δομή της BsGH9, παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την προβλεπόμενη δομή της H1AD14 του *B. licheniformis* (Konar et al., 2022) καθώς επίσης και με την Cel9A του *Thermobifida fusca* (Li et al., 2007), την EglA του *B. pumilus* (Lima et al., 2005) καθώς επίσης και με τις δομές των GH9 φυτικών ενδογλουκανασών που απομονώθηκαν από τους *Oryza sativa* (κοινό ρύζι), *Gossypium hirsutum* (βαμβάκι), *Solanum lycopersicum* (τομάτα), *Nicotiana tabaccum* (καπνός) (εικόνα 15). Μέσω του διαδικτυακού εργαλείου UniProt BLAST (<https://www.uniprot.org/blast>) και σύγκριση της αλληλουχίας της μελετώμενης πρωτεΐνης με τις τέσσερις πρωτεΐνες υψηλής συγγένειας που αναφέρονται παραπάνω, ερμηνεύτηκε ότι η BsGH9, παρουσιάζει τρία σημεία τα οποία συνολικά αποτελούν το ενεργό κέντρο (active sight) και εμφανίζονται στις θέσεις 376, 414 και 423 τα οποία αποτελούν τυπικό χαρακτηριστικό της GH9 οικογένειας ενδογλουκανασών.

Ακόμα, παρατηρείται ότι η BsGH9, διαθέτει πέρα από το καταλυτικό ενεργό κέντρο της και μία βοηθητική μονάδα πρόσδεσης υδατανθράκων (Carbohydrate Binding Module-CBM) το οποίο εκτείνεται από το 458^ο αμινοξύ μέχρι το 615^ο ξεκινώντας από το N-τελικό αμινοξύ (N-terminus) και συνδεόμενη με το C-τελικό αμινοξύ (C-terminus) μέσω αλυσίδας Linker. Με βάση τη συγγένεια της πρωτεΐνης και τα αποτελέσματα του BLAST, το τμήμα χαρακτηρίζεται ως CBM3. Η κρυσταλλική δομή του CBM3 είναι γνωστή. Αποτελείται από εννέα β-κλώνους που σχηματίζουν μια συμπαγή περιοχή που έχει ένα συνολικό πρισματικό σχήμα. Είναι διατεταγμένο σε δύο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα που στοιβάζονται πρόσωπο με πρόσωπο για να σχηματίσουν μία δομή «β sandwich» με τοπολογία «jelly roll». Δύο καθορισμένες επιφάνειες, που βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές του μορίου, περιέχουν διατηρημένα πολικά και αρωματικά υπολείμματα που πιθανώς εμπλέκονται στη

δέσμευση της κυτταρίνης στο CBM. Η πρώτη σχηματίζει μια επίπεδη λωρίδα ενώ η δεύτερη μια ρηχή αυλάκωση (Shimon et al., 2000; Tormo et al., 1996).

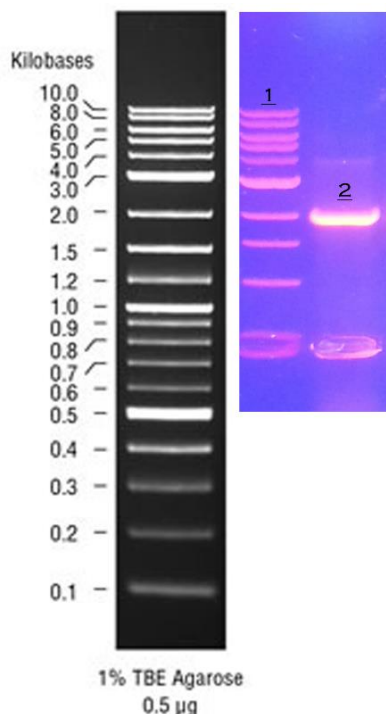


Εικόνα 15: Τρισδιάστατη δομή τεσσάρων φυτικών ενδογλουκανασών της οικογένειας GH9 οι οποίες διαθέτουν CBM3 από τέσσερα διαφορετικά ευρέως καλλιεργούμενα φυτά (Kundu, 2019).

2. Κλωνοποίηση και Υπερέκφραση του γονιδίου *bsgh9*

Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με χρήση των εκκινητών *bsGH9-F-NotI* και *bsGH9-R-SpeI* σε μονήρη αποικία του *B. safensis* (ATHUBA63) έδειξε ότι το γονίδιο της GH9 το οποίο είχε προβλεφθεί με βάση συγγενείς μικροοργανισμούς υπάρχει και έχει μέγεθος ~2000 βάσεις (εικόνα 16), γεγονός που επιβεβαιώνει την βιοπληροφορική πρόβλεψη των 2106 βάσεων DNA. Το μόριο DNA που απομονώθηκε από την παραπάνω γέλη αгарόζης, φωτομετρήθηκε σε συσκευή nanodrop και έγινε ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης και καθαρότητάς του. Ακόμα, απομονώθηκε ο πλασμιδιακός φορέας *ret-15b16s*, από καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* DH5a σε στερεό θρεπτικό υλικό LB-Άγαρ, σε μεγάλη ποσότητα με τη μέθοδο που αναφέρεται στο κεφάλαιο 4.5.2 στα Υλικά και Μέθοδοι. Τα δύο απομονωμένα μόρια DNA, συνδυάστηκαν με τεχνικές ενζυμικής πέψης (digestion) και συνένωσης (ligation) και αναπτύχθηκαν σε κύτταρα *E. coli* DH5a από τα οποία πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα σε μεγάλη ποσότητα με τη μέθοδο που αναφέρεται στο κεφάλαιο 4.6 των Υλικών και Μεθόδων. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του

πλασμιδιακού φορέα πριν και μετά τον ανασυνδυασμό του με το γονίδιο *bsgh9*, ποσοτικοποιήθηκαν μετά από κατάλληλη φωτομέτρηση σε όργανο nanodrop και παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 4.



Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εκκινητές τους *bsGH9-F-NotI* και *bsGH9-R-SpeI* σε μονήρη αποικία του *B. safensis*. Φαίνονται οι ζώνες (1) πρότυπου διαλύματος (ladder) και η αντιστοιχία με την πρότυπη δέσμη που παρέχεται από την εταιρεία κατασκευής, αριστερά και (2) η ζώνη που αντιστοιχεί στο επιθυμητό γονίδιο.

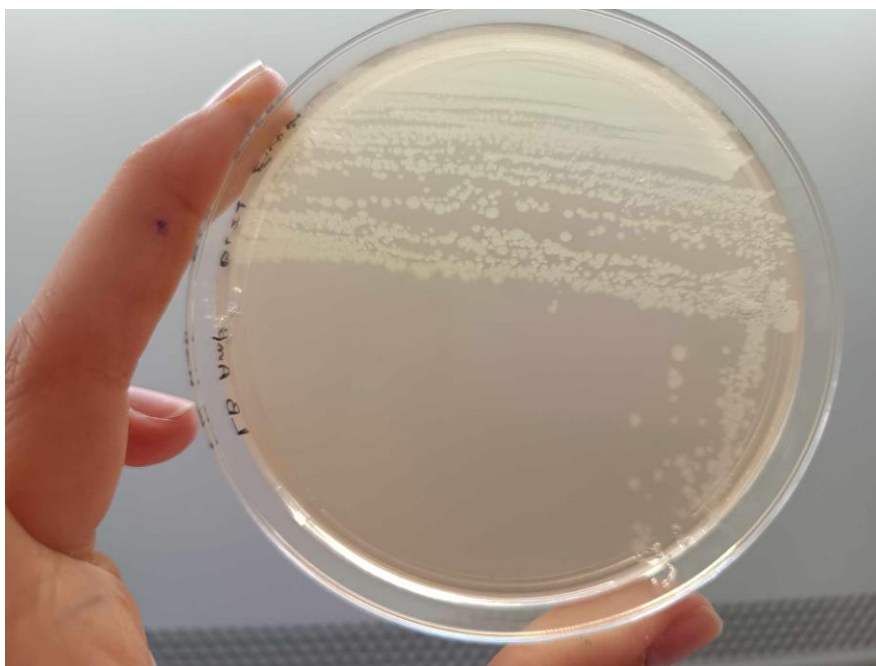
Πίνακας 4: Συγκέντρωση και καθαρότητα των απομονωμένων μορίων DNA.

	Συγκέντρωση DNA (mg/µL)	260/280
<i>bsgh9</i>	54,8	1,89
<i>pet-15b16s</i>	70,25	1,70
<i>pet-15b16s + bsgh9</i>	344,60	1,78

Ο λόγος της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280nm, εκφράζει την καθαρότητα του μορίου DNA το οποίο μελετάται. Τιμές περίπου ίσες με 1,8 μεταφράζονται σε υψηλή καθαρότητα του μορίου, ενώ τιμές άνω του 1,6, θεωρούνται αποδεκτές (Lucena-Aguilar et al., 2016).

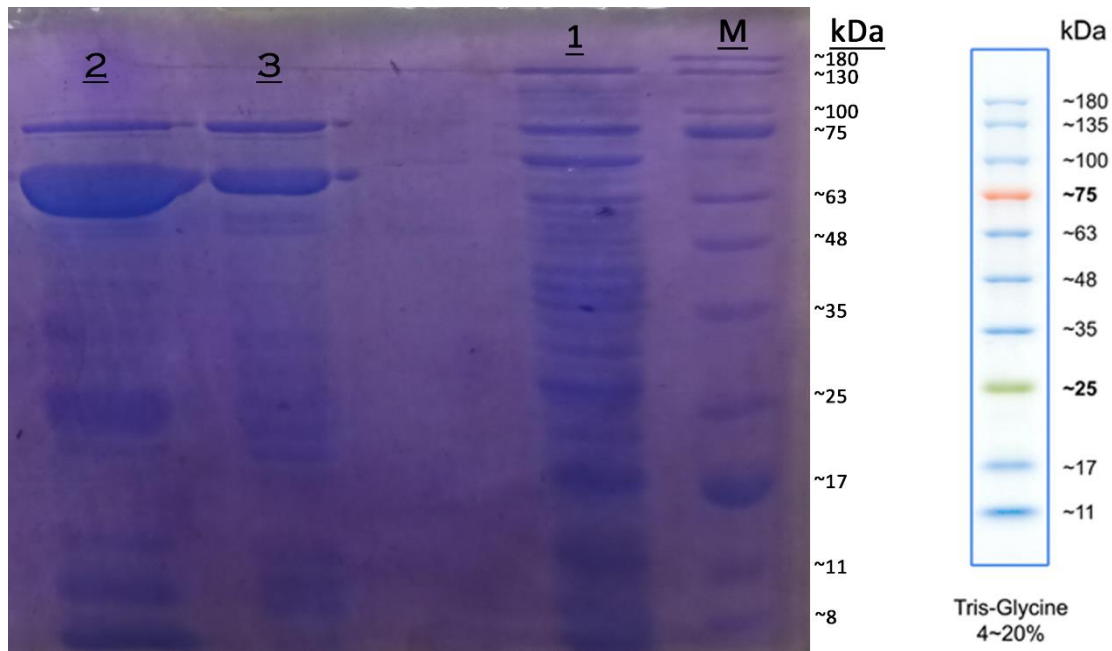
Από τον πίνακα, παρατηρείται ότι τόσο το γονίδιο *bsgh9*, όσο και πλασμίδιο *pet-15b16s* απομονώθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις και με αποδεκτή καθαρότητα. Η

διαδικασία της πέψης δεν ελάττωσε την καθαρότητα των μορίων και μετά τη συνένωση τους (ligation) εισάχθηκαν στα δεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21 ανασυνδυασμένοι φορείς με συγκέντρωση 344,60 mg/μL. Τα δεκτικά κύτταρα αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό LB-Άγαρ, παρουσία αντιβιοτικού αμπικιλίνης, με στόχο να αναπτυχθούν αποικίες μόνο από κύτταρα τα οποία είχαν προσλάβει τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα και κατ' επέκταση και το επιθυμητό γονίδιο (εικόνα 17).



Εικόνα 17: Καλλιέργεια *E. coli* BL21 μετά την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα.

Μονήρης αποικία της καλλιέργειας των ανασυνδυασμένων BL21, εμβολιάστηκε σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες υγρού θρεπτικού μέσου LB με αντιβιοτικό αμπικιλίνη έως ότου η οπτική πυκνότητα λάβει την τιμή 0.6. Ακολούθησε προσθήκη του επαγωγέα (IPTG, 1 mM) και η ανάπτυξη συνεχίστηκε για 3 έως 6 ώρες σε θερμοκρασία 37°C. Μετά τη θραύση κυττάρων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση γέλης SDS-Page στο κυτταρικό υγρό, τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 18.

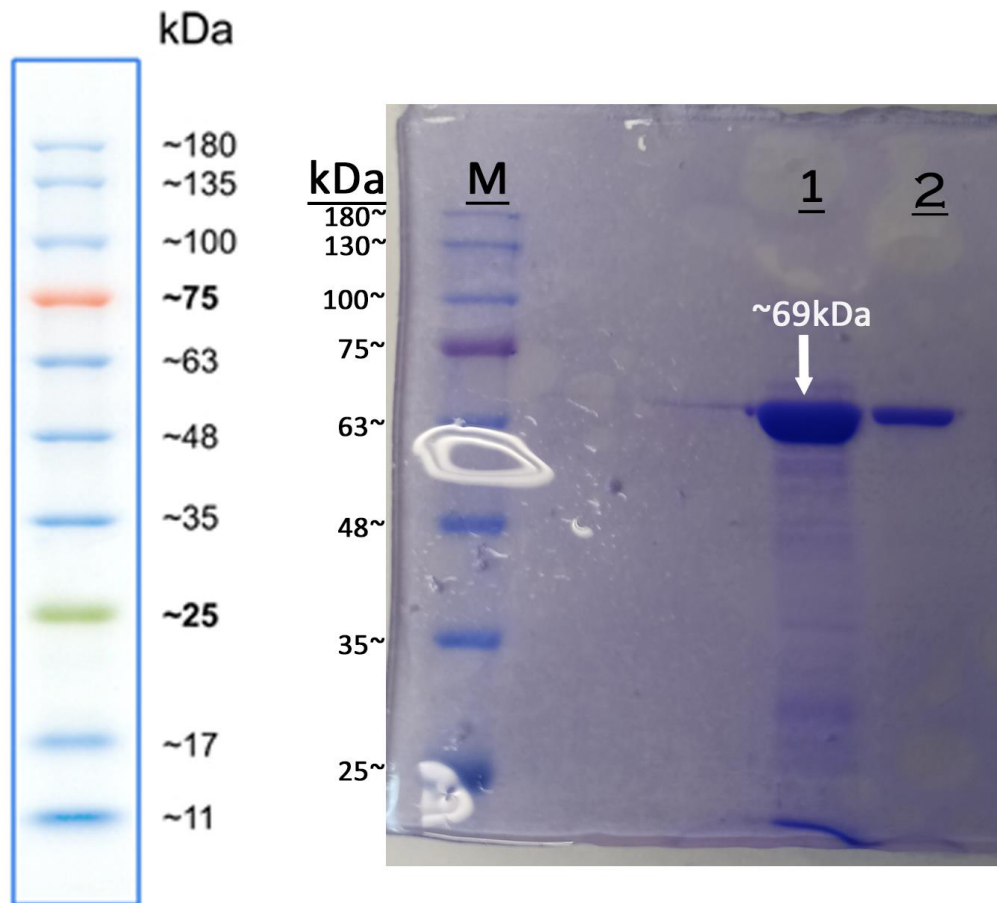


Εικόνα 18: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση του εσωκυτταρικού υγρού μετά τη θραύση των κυττάρων. Φαίνονται οι ζώνες (1) τυφλού ιχνηθέτη *E. coli* BL21, (2) *E. coli* BL21 στα οποία εισάχθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και (3) *E. coli* BL21 στα οποία εισάχθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μετά από αραίωση. Στα δεξιά φαίνεται (M) η δέσμη των πρωτεϊνικών μορίων του πρότυπου διαλύματος (marker) και η αντιστοίχιση με την πρότυπη δέσμη που παρέχεται από την εταιρεία κατασκευής.

Παρατηρείται ότι η γραμμή η οποία αντιστοιχεί στο προβλεπόμενο μοριακό βάρος της BsGH9, εμφανίζεται έντονα έναντι των πρωτεϊνικών μορίων που παράγονται από το μη ανασυνδυασμένο στέλεχος BL21, γεγονός το οποίο μπορεί να χαρακτηρίσει την υπερέκφραση του φορέα ως επιτυχημένη. Γνωρίζοντας ότι η επιθυμητή πρωτεΐνη, έχει παραχθεί σε υψηλή ποσότητα, απομονώθηκε και καθαρίστηκε με χρήση στήλης συγγένειας και αφαλάτωση.

3. Προσδιορισμός Μοριακού Βάρους

Από την ηλεκτροφόρηση SDS-Page, με χρήση χρωστικής Coomassie Brilliant Blue του προϊόντος που απομονώθηκε από την χρωματογραφία συγγένειας και τη μετέπειτα χρωματογραφία gel filtration, το μοριακό βάρος της BsGH9 βρέθηκε στα ~69 kDa, γεγονός που επιβεβαιώνει την βιοπληροφορική πρόβλεψη (εικόνα 19).

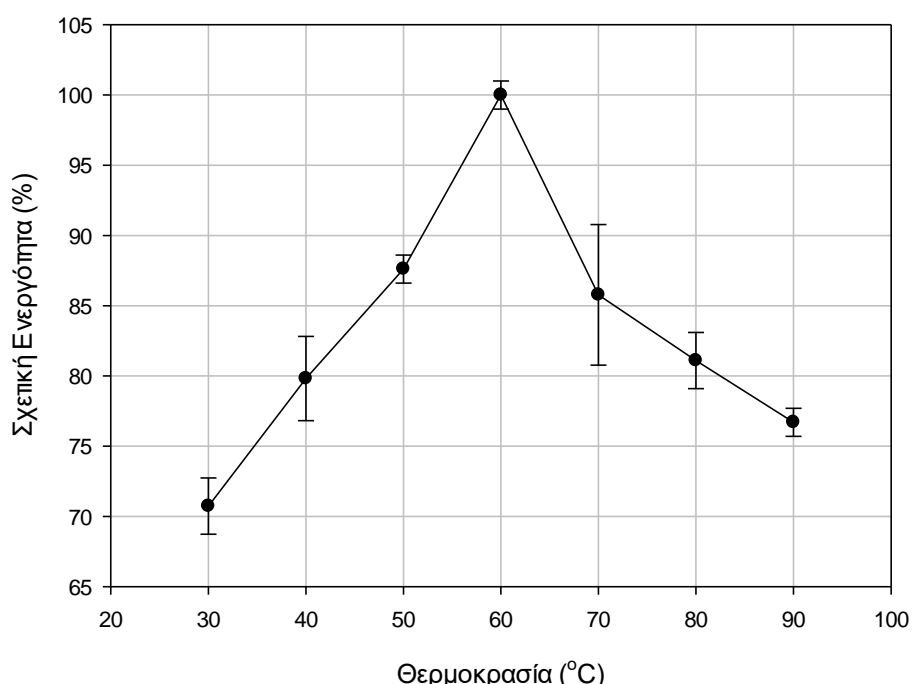


Εικόνα 19: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση της BsGH9 μετά τις διαδικασίες καθαρισμού και συμπύκνωσης. Φαίνεται (M) η δέσμη των πρωτεϊνικών μορίων του πρότυπου διαλύματος (marker), (1) και (2) Η ζώνη που αντιστοιχεί στην BsGH9 σε δείγματα δύο αραιώσεων και αριστερά η αντιστοίχιση με την πρότυπη δέσμη που παρέχεται από την εταιρεία κατασκευής.

Παρόμοιο μοριακό βάρος με την BsGH9, παρουσιάζεται σε μεγάλο αριθμό βακτηριακών ενδογλουκασών, οι οποίες κυμαίνονται συνήθως στο εύρος μοριακών βαρών 60 έως 90kDa (πίνακας 5). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η πρωτεΐνη H1AD14 του *b.licheniformis*, εμφανίζει μοριακό βάρος 71kDa, η Cel9A-90 του *T. fusca* εμφανίζει μοριακό βάρος 68 kDa, η CelT του *C. thermocellum* εμφανίζει μοριακό βάρος 68kDa και η UmCel9A του *Uncultured bacterium* εμφανίζει μοριακό βάρος 70 (Duan et al., 2017; Konar et al., 2022; Kurokawa et al., 2002; Zhou et al., 2004). Αυτές αποτελούν τις βακτηριακές ενδογλουκανάσες με τα πλησιέστερα μοριακά βάρη στην BsGH9.

4. Θερμοκρασία Δράσης

Η μέγιστη δραστηριότητα της BsGH9 παρουσιάστηκε σε θερμοκρασία 60°C (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3: Επίδραση της Θερμοκρασίας στη Δραστικότητα της BsGH9

Σε θερμοκρασίες κοντά στη βέλτιστη, δηλαδή 50 και 70 °C, η BsGH9, εμφανίζει το 88% και 86% της μέγιστης ενεργότητάς της αντίστοιχα. Επιπλέον, στους 90 °C διατηρεί το 77% της ενεργότητάς της σε σχέση με τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης. Παρόμοια συμπεριφορά, παρατηρείται και στην H1AD14, η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Bacillus licheniformis* για την οποία η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 65°C, ενώ στους 80 °C, διατηρεί το 75% περίπου ενεργότητάς της σε σχέση με τη βέλτιστη θερμοκρασία (Konar et al., 2022).

Η μελέτη της δραστικότητας της BsGH9 στο εύρος θερμοκρασιών 30 έως 90 °C οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το ένζυμο παρουσιάζει ικανοποιητική δραστικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Η GH9 οικογένεια βακτηριακών ενδογλουκανασών παρουσιάζει βέλτιστη δραστικότητα στο θερμοκρασιακό εύρος 25 με 100 °C με το μεγαλύτερο ποσοστό των ενζύμων να εμφανίζουν βέλτιστο σε δύο θερμοκρασιακά διαστήματα, 30 με 37 °C και 60 με 70 °C, όπως εμφανίζει και η BsGH9 (Πίνακας 5). Εξαιρέσεις αποτελούν η Q308B9, η οποία εμφανίζει βέλτιστο στους 25 °C (Pang et al., 2009) και η P96311 του *Caldicellulosiruptor bescii*, η οποία εμφανίζει βέλτιστο στους 95-100 °C (Zverlov et al., 1998).

Η βέλτιστη θερμοκρασία της BsGH9, βρίσκεται στο θερμοκρασιακό εύρος που προβλέπεται βιβλιογραφικά για ενδο-1,4-β-D-γλουκανάσες της οικογένειας GH9.

Πίνακας 4: Βιοχημικά χαρακτηριστικά βακτηριακών GH9 ενδογλουκανασών

Μικροοργανισμός (ID) ⁽¹⁾	MW (kDa)	T _{opt}	pH _{opt}	K _m ⁽²⁾	t _{1/2}	Αναφορά
<i>Bacillus safensis</i> (BsGH9)	69	60	6,0	283,46 mg/ml	74 λεπτά, 60°C	Η παρούσα εργασία
<i>Bacillus licheniformis</i> (H1AD14)	71	65	6,5	31,41 mg/ml	74% μετά από 10 ήμερες, 65°C	(Konar et al., 2022)
<i>B. licheniformis</i> (Q65J19)	65,8	60	7,0	-	6 ώρες, 60°C	(de Araújo et al., 2019)
<i>Clostridium cellulolyticum</i> (Cel9M)	54,6	37	6,0	-	-	(Belaich et al., 2002)
<i>Paenibacillus barcinonensis</i> (Cel9B)	100	53	5,5	-	2 ώρες	(Chiriach et al., 2010)
<i>Clostridium phytofermentans</i> (CpCel9)	90	65	6,5	-	-	(X. Z. Zhang et al., 2010)
<i>Hungateiclostridium cellulolyticum</i> (Q70DK3)	75	78,5	6,0	-	-	(Zverlov et al., 2005)
<i>Clostridium thermocellum</i> (CelQ)	82	60	5,5	-	-	(Kurokawa et al., 2002)
<i>Fibrobacter succinogenes</i> (Q59442)	67	37	7,0	-	-	(Béra et al., 1996)
<i>Cellulomonas favigena</i> (Q3ZMA8)	105	60	7,5	-	-	(Mejia-Castillo et al., 2008)
<i>Clostridium thermocellum</i> (CelT)	68	70	7,0	16,7 mg/mL	-	(Kurokawa et al., 2002)
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> (Q9AJS0 -Cel9A)	59	70	5,5	-	30 λεπτά, 75 °C	(Eckert et al., 2002)
<i>Bacillus sp.</i> (A6Y862)	75,9	70	7,5	-	90% μετά από 1 ώρα, 50 °C	(S. Zhang et al., 2007)
<i>F. succinogenes</i> (A7UG67)	67,4	35	6,5	9,20 ± 0,83 mg/mL	-	(Qi et al., 2007)
<i>R. cellulolyticum</i> (Q46002)	96,8	35	6,0	-	-	(Gaudin et al., 2000)
<i>F. succinogenes</i> (P77864)	72	35	5,5	-	-	(Malburg et al., 1996)
<i>Bacillus pumilus</i> (Q5YLG1)	73	60	5,0-8,0	-	53% μετά από 3 ώρες, 60 °C	(Lima et al., 2005)

<i>Paenibacillus sp.</i> (B7U9C9)	60	35	6,5	13,24 mg/mL	70% μετά από 30 λεπτά, 50 °C	(Fu et al., 2010)
<i>Paenibacillus sp.</i> (Q9Z4I1)	107	53	5,5	-	Σταθερή για 24 ώρες, 50 °C	(Pastor et al., 2001)
<i>Uncultured bacterium</i> (Q308B9)	66	25	7,0	-	-	(Pang et al., 2009)
<i>Caldicellulosiruptor bescii</i> (P96311)	190	95-100	5,0-6,0	-	40 λεπτά, 95 °C	(Zverlov et al., 1998)
<i>F. succinogenes</i> (P23665)	50	37-39	5,0	-	2,5 ώρες, 50°C	(Cavicchioli & Watson, 1991)
<i>Myxobacter sp.</i> (Q9RAI8)	73	65	7,5-8,0	-	12 ώρες, 60 °C	(Avitia et al., 2000)
<i>Thermobifda fusca</i> (Cel9A-90)	68	55	5,5	-	-	(Li et al., 2007; Zhou et al., 2004)
<i>Clostridium thermocellum</i> (Cel9I)	105	50	7,0	-	-	(Lee et al., 2011)
<i>Thermobifda halotolerans</i> (Thcel9A)	98,9	50-55	8,0	12,02 mg/mL	-	(F. Zhang et al., 2011)
<i>Clostridium cellulovorans</i> (D9SRK9 - EngZ)	78	42,5	7,0	-	-	(Kim et al., 2016)
<i>Clostridium cellulolyticum</i> (P37700-Cel9G)	80	30	7,0	-	-	(Ravachol et al., 2014)
<i>C. cellulolyticum</i> (D4LDI8 - Cel9E)	82	30	7,0	0,8 ± 0,04 mg/ mL	-	(Ravachol et al., 2014)
<i>Uncultured bacterium</i> (Umcel9A)	70	40	6,5	47,11 mg/mL	-	(Duan et al., 2017)
<i>H. thermocellum</i> (HtGH9)	71,7	90	6,5	-	-	(K. Kumar et al., 2019)
<i>Achatina fulica</i> (AfEG66)	66	45	6,0-6,5	12,69 ± 0,44 mg/mL	30% μετά από 1 ώρα, 45 °C	(Sade et al., 2022)
<i>C. thermocellum</i> (CenC)	137,1	70	6,0	7,14 mM	24 λεπτά	(Haq et al., 2015)

⁽¹⁾ Δίπλα σε κάθε στέλεχος, αναγράφεται ο κωδικός καταχώρησης της εκάστοτε πρωτεΐνης στη διεθνή βάση δεδομένων UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

⁽²⁾ Όλοι οι υπολογισμοί της K_m πραγματοποιήθηκαν σε υπόστρωμα CMC στην ιδανική θερμοκρασία δράσης της κάθε πρωτεΐνης.

4. Θερμική σταθερότητα

Η σταθερότητα της BsGH9, μελετήθηκε στο θερμοκρασιακό εύρος 40 έως 80 °C. Η απενεργοποίηση του ενζύμου περιγράφεται με κινητική πρώτης τάξης. Η θερμική απενεργοποίηση περιγράφεται μαθηματικά από την εξίσωση 1.

$$\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = -k_d \cdot t \quad (\text{Εξίσωση 1})$$

Όπου:

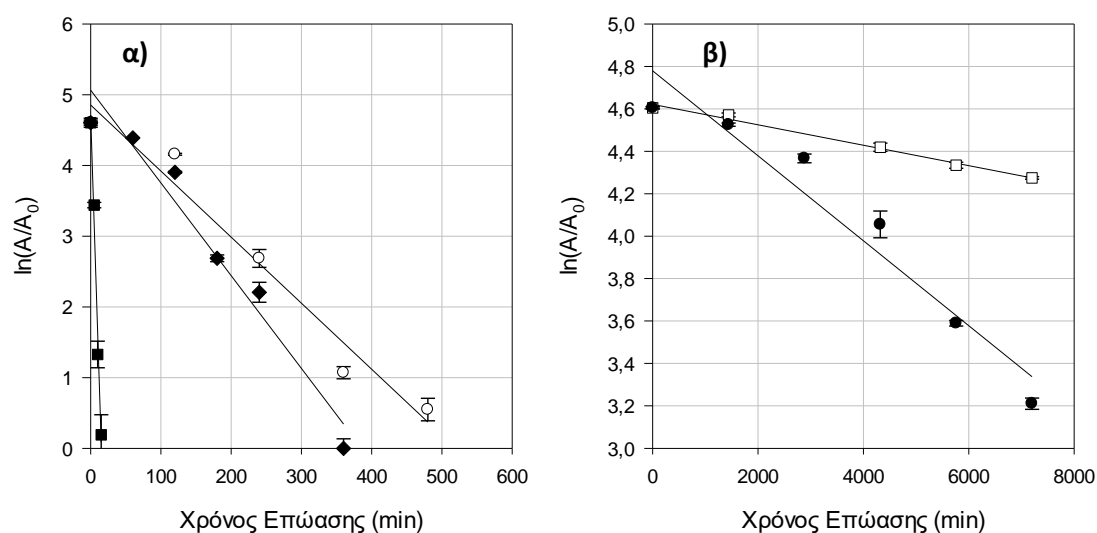
A_t (Units/ mg πρωτεΐνης): η ενεργότητα του ενζύμου στο χρόνο t

A_0 (Units/ mg πρωτεΐνης): η αρχική ενεργότητα του ενζύμου

t (min): ο χρόνος επώασης

k_d (min^{-1}): η σταθερά θερμικής απενεργοποίησης της BsGH9

Προσαρμόζοντας την εξίσωση 1 στα πειραματικά δεδομένα (διάγραμμα 4), προκύπτουν οι σταθερές θερμικής απενεργοποίησης της BsGH9 οι οποίες παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 6.



Διάγραμμα 4: Θερμική σταθερότητα της BsGH9 σε θερμοκρασία (α) (ο) 60 °C, (◆) 70 °C και (■) 80 °C και (β) (□) 40 °C, (●) 50 °C

Η θερμική απενεργοποίηση της BsGH9 εκφράζεται με τρία διαφορετικά μεγέθη: τη σταθερά θερμικής απενεργοποίησης (k_d), το χρόνο ημιζωής ή χρόνο ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) και το χρόνο υποδεκαπλασιασμού D (Decimal reduction time/ D-value).

Ο χρόνος ημιζωής εκφράζει το χρόνο που απαιτείται ώστε η ενεργότητα ενός ενζύμου να μειωθεί στο ήμισυ της αρχικής σε δεδομένη θερμοκρασία και υπολογίζεται με βάση την εξίσωση 2.

$$t_{1/2} = \frac{0.6931}{k_d} \quad (\text{Εξίσωση 2})$$

Όπου:

$t_{1/2}$ (min): ο χρόνος ημιζωής

k_d (min^{-1}): η σταθερά απενεργοποίησης του ενζύμου

Ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού (D) ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται ώστε να εμφανιστεί μείωση ενζυμικής ενεργότητας 90% σε σχέση με την αρχική. Ο υπολογισμός του D γίνεται με χρήση της εξίσωσης 3.

$$D = \frac{2.303}{k_d} \text{ (Εξίσωση 3)}$$

Όπου:

D (min): ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού.

k_d (min^{-1}): η σταθερά απενεργοποίησης του ενζύμου

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στις εξισώσεις 1 έως 3, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 6.

Πίνακας 5: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης της BsGH9.

Θερμοκρασία (°C)	K_d (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	D(min)
40	$5,00 \times 10^{-5}$	13862	$4,61 \times 10^4$
50	$2,00 \times 10^{-4}$	3465,5	$1,15 \times 10^4$
60	$9,30 \times 10^{-3}$	74,53	$2,48 \times 10^2$
70	$1,31 \times 10^{-2}$	52,91	$1,76 \times 10^2$
80	$3,07 \times 10^{-1}$	2,26	7,50

Η θερμική απενεργοποίηση της BsGH9 παρουσίασε μεγάλες διαφορές μεταξύ της υψηλότερης θερμοκρασίας που μελετήθηκε (80°C) και της χαμηλότερης (40°C), γεγονός το οποίο ερμηνεύεται παρατηρώντας τις σταθερές θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου, οι οποίες εμφανίζουν διαφορά σχεδόν μία τάξης μεγέθους για αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10 °C.

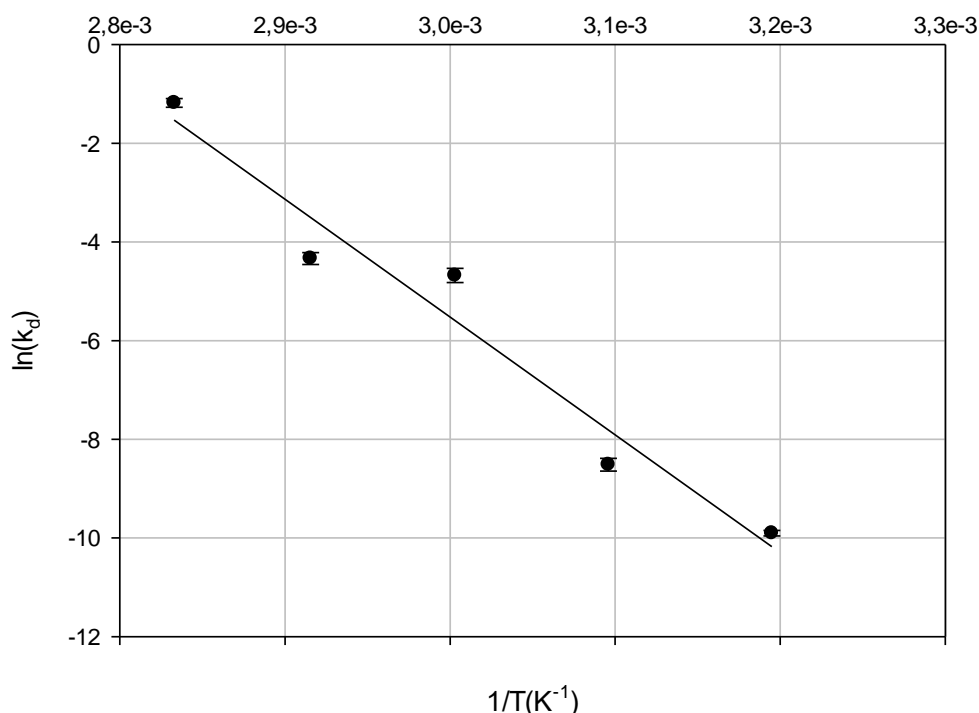
Αναλυτικότερα, σε θερμοκρασία 80°C, παρατηρήθηκε πλήρης απενεργοποίηση του ενζύμου μετά από χρόνο επώασης 15 λεπτών ενώ ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης, υπολογίστηκε στα περίπου 2,3 λεπτά. Παράλληλα, στους 40 °C, το ένζυμο διατήρησε το 70% της ενεργότητάς του μετά από πάροδο 5 ημερών (120 ώρες) κάτι που μεταφράζεται σε χρόνο ημιζωής περίπου ίσο με 13862 λεπτά ή 231 ώρες. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζεται και στους 50 °C, όπου μετά από την πάροδο 5 ημερών, το ένζυμο διατήρησε σχεδόν 25% της ενεργότητάς του με χρόνο ημιζωής ίσο με 3465 λεπτά ή 57,8 ώρες. Στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης (60 °C), η BsGH9 εμφάνισε χρόνο ημιζωής 74,5 λεπτά ενώ στους 70 °C 52,9 λεπτά.

Οι χαρακτηρισμένες ενδογλουκανάσες της GH9 οικογένειας, εμφανίζουν διαφοροποιήσεις στην σταθερότητα τους ως προς τη θερμοκρασία με την H1AD14

του *B. licheniformis* να εμφανίζει διατηρεί το 74% της αρχικής της ενεργότητας μετά από δέκα μέρες επώαση στους 65 °C (Konar et al., 2022) ενώ η P23665 του *F. succinogenes*, εμφανίζει χρόνο ημιζωής 2,5 ωρών στους 50°C (Qi et al., 2007). Επιπλέον, η Q65J19 του *B. licheniformis* εμφανίζει σταθερότητα 6 ωρών στους 60 °C (de Araújo et al., 2019).

Η θερμική απενεργοποίηση ενός ενζύμου ακολουθεί δύο στάδια, καθώς η έκθεση μίας πρωτεΐνης σε υψηλή θερμοκρασία έχει αρχικά ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ασταθούς ενδιάμεσου (U), το οποίο εμφανίζει μειωμένη δραστηριότητα, αλλά παρουσιάζει την ικανότητα να επανέλθει στην αρχική του μορφή μετά από μείωση της θερμοκρασίας έκθεσης. Αντίθετα, η παρατεταμένη έκθεση μιας πρωτεΐνης σε υψηλή θερμοκρασία έχει ως αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή καταστροφή της τριτοταγούς δομής του ενζύμου (μετουσίωση) και το σχηματισμό μιας ασταθούς μορφής (M) (V. Kumar & Satyanarayana, 2013). Η ενέργεια που απαιτείται ώστε να καταστραφεί η τριτοταγής δομή του ενζύμου με αποτέλεσμα να μηδενιστεί η δραστηριότητά του ονομάζεται ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης ($E_{(a)d}$). Υψηλές τιμές της $E_{(a)d}$, υποδηλώνουν ότι το ένζυμο διαθέτει συμπαγή και σταθερή δομή, καθώς απαιτείται μεγάλο ποσό ενέργειας ώστε να χαθεί η συνοχή του.

Η $E_{(a)d}$ της BsGH9, υπολογίστηκε με βάση την γραμμική παράσταση της εξίσωσης Arrhenius (Διάγραμμα 5) και βρέθηκε ίση με 198,51 KJ/mol.



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης $E_{(a)d}$.

Χρησιμοποιώντας την ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης, υπολογίζονται και οι θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης της BsGH9 με χρήση των εξισώσεων 4 έως 7 (Εξισώσεις Eyring & Stearn). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 7.

k_d (sec^{-1}) η σταθερά θερμικής απενεργοποίησης, υπολογίζεται με βάση την εξίσωση 4.

$$k_d = \left(\frac{k \cdot T}{h}\right) \cdot e^{(-\Delta H^*/R \cdot T)} \cdot e^{(\Delta S^*/R)} \text{ (Εξίσωση 4)}$$

Όπου:

- **T** (K): η απόλυτη θερμοκρασία
- **R** ($8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$): η παγκόσμια σταθερά των αερίων
- **h** ($1.104 \times 10^{-35} \text{ J} \cdot \text{min}$): η σταθερά Plank
- **k** ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$): η σταθερά Boltzmann

ΔH^* ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) η μεταβολή της ενθαλπίας απενεργοποίησης, η οποία υπολογίζεται από την εξίσωση 5.

$$\Delta H^* = E_{(a)d} - R \cdot T \text{ (Εξίσωση 5)}$$

Όπου:

- **T** (K): η απόλυτη θερμοκρασία
- **E_{(a)d}**: η σταθερά θερμικής απενεργοποίησης
- **R** ($8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$): η παγκόσμια σταθερά των αερίων
- **ΔS^*** ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) η μεταβολή εντροπίας ενεργοποίησης η οποία υπολογίζεται από την εξίσωση 6.

$$\Delta S^* = \frac{\Delta H^* - \Delta G^*}{T} \text{ (Εξίσωση 6)}$$

ΔG^* ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) η ελεύθερη ενέργεια Gibbs απενεργοποίησης η οποία υπολογίζεται από την εξίσωση 7.

$$\Delta G^* = -R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{k_d \cdot h}{k \cdot T}\right) \text{ (Εξίσωση 7)}$$

Πίνακας 6: Θερμοδυναμικές παράμετροι απενεργοποίησης της BsGH9.

Θερμοκρασία (°C)	ΔH^* ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔG^* ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔS^* ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
40	195,91	113,22	264,19
50	195,83	113,20	255,82
60	195,75	106,16	269,03
70	195,66	108,45	254,26
80	195,58	102,44	263,85

Ο υπολογισμός των θερμοδυναμικών παραμέτρων απενεργοποίησης παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου. Η σταθερότητα μιας πρωτεΐνης είναι αποτέλεσμα ισορροπίας μεταξύ σταθεροποιητικών και αποσταθεροποιητικών τάσεων οι οποίες επηρεάζονται από υδρόφοβες και

ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, από δεσμούς υδρογόνου και δισουλφιδικούς δεσμούς καθώς και από τον βαθμό αναδίπλωσης του μορίου (Ortega et.al., 2004; Movahedi et.al., 2016).

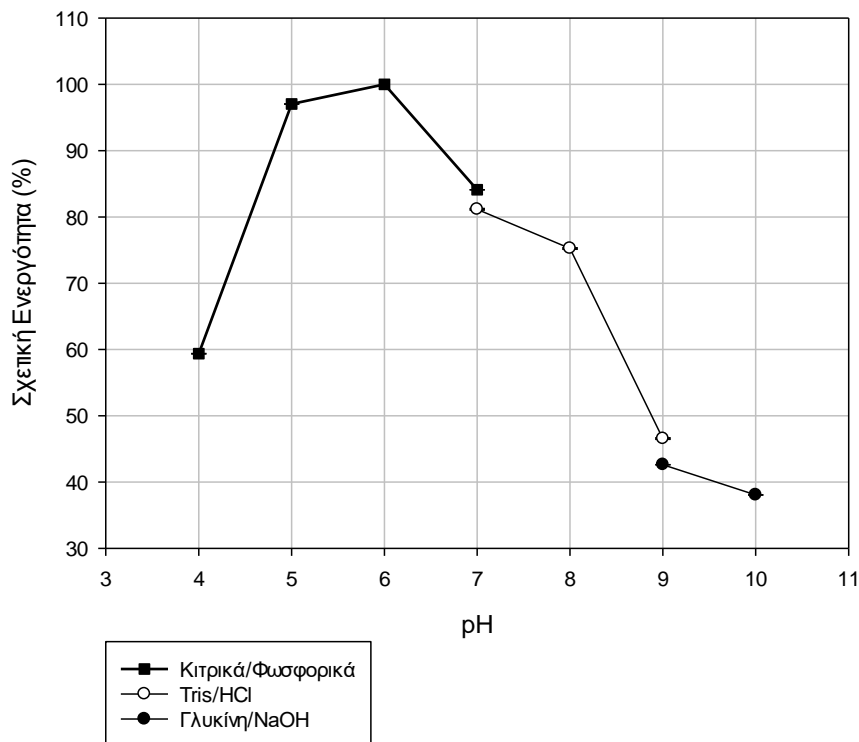
Η θερμική απενεργοποίηση των ενζύμων, συνδέεται με ταυτόχρονη διάσπαση μη-ομοιοπολικών δεσμών (υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις). Η μεταβολή της ενθαλπίας απενεργοποίησης (ΔH^*) εκφράζει τον αριθμό των ομοιοπολικών δεσμών οι οποίοι διασπώνται κατά το σχηματισμό μίας μεταβατικής κατάστασης κατά τη διάρκεια της θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου (Gummadi, 2003). Υψηλές τιμές της ΔH^* , συνδέονται με μεγάλο αριθμό ομοιοπολικών δεσμών στο πρωτεϊνικό μόριο, γεγονός το οποίο αυξάνει την σταθερότητά του. Η μεταβολή της ενθαλπίας απενεργοποίησης (ΔH^*) για την BsGH9, στο θερμοκρασιακό εύρος 40 έως 80°C, υπολογίστηκε από 195,91 έως 195,58 kJ·mol⁻¹ (πίνακας 7). Η ενέργεια η οποία απαιτείται για τη διάσπαση μίας ρίζας μεθυλίου (-CH₂) από έναν υδρόφοβο δεσμό είναι ίση με 5,4 kJ·mole⁻¹ (Pace, 1992) επομένως η δημιουργία του μεταβατικού σταδίου που οδηγεί στην απενεργοποίηση της BsGH9 υποδηλώνει τη διάσπαση κατά μέσο όρο 36 μη-ομοιοπολικών δεσμών.

Η μεταβολή της εντροπίας απενεργοποίησης (ΔS^*) συνδέεται άμεσα με την μεταβολή ενθαλπίας, καθώς και με την σταθερότητα του ένζυμου. Η ΔS^* εκφράζει τη μεταβολή της δομικής διαταραχής (structural disorder) που παρουσιάζεται κατά την αναδίπλωση ενός ενζύμου στο χώρο. Χαμηλές τιμές της ΔS^* σε συνδυασμό με υψηλές τιμές της ΔH^* εκφράζουν υψηλή θερμική σταθερότητα ενός ενζύμου. Παράλληλα, θετικές τιμές της ΔS^* αποτελούν δείγμα ότι κατά την θερμική απενεργοποίηση δεν εμφανίζονται φαινόμενα συσσωμάτωσης (Ortega et al., 2004). Η μεταβολή της εντροπίας απενεργοποίησης (ΔS^*) της BsGH9, στο θερμοκρασιακό εύρος 40 έως 80°C παίρνει τιμές από 264,19 έως 263,85 J·mol⁻¹K⁻¹ (πίνακας 7).

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG^*), χρησιμοποιείται ως συγκεντρωτικός δείκτης της θερμικής σταθερότητας ενός ενζύμου, καθώς σε αυτήν συμπεριλαμβάνονται και τα άλλα δύο θερμοδυναμικά μεγέθη. Χαμηλές τιμές της ΔG^* μεταφράζονται σε χαμηλότερη σταθερότητα, καθώς η απενεργοποίηση του ενζύμου πραγματοποιείται αυθόρμητα. Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG^*) της BsGH9, εμφανίζει μείωση κατά την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης (πίνακας 7), γεγονός το οποίο θεωρείται αναμενόμενο, καθώς η θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου λαμβάνει χώρα ευκολότερα (και ταχύτερα) όσο αυξάνεται η θερμοκρασία στην οποία εκτίθεται.

5. Βέλτιστο pH Δράσης

Παρατηρήθηκε ότι η BsGH9 παρουσιάζει μέγιστη σχετική ενεργότητα σε pH = 6. (διάγραμμα 6) Παράλληλα, παρατηρείται ότι εμφανίζει 97% της μέγιστης ενεργότητας στο pH = 5. Σε pH = 7, η ενεργότητα του ενζύμου, παρουσιάζει πτώση στο 84% του μέγιστου για το ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών/φωσφορικών και στο 81% για το ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl. Περαιτέρω αύξηση του pH της αντίδρασης οδήγησε σε βαθμιαία πτώση της ενεργότητας, η οποία μετρήθηκε 75% σε pH 8, 43% σε pH 9 και 38% σε pH = 10. Αντίστοιχα σε pH = 4, η BsGH9, εμφάνισε 59% της μέγιστης ενεργότητάς της.



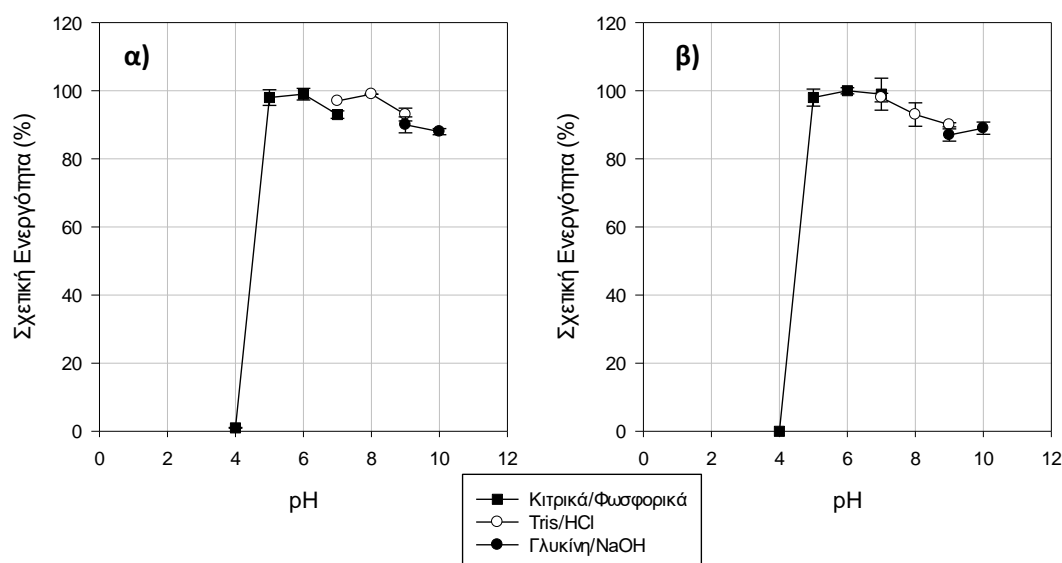
Διάγραμμα 6: Επίδραση του pH στην δραστικότητα της BsGH9.

Η BsGH9 δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως αλκαλόφιλη, παρότι εμφανίζει σχετική ενεργότητα περίπου ίση με το 75% της μέγιστης σε pH = 8, διότι εμφανίζει πτώση ενεργότητας πάνω από 50% στα βασικότερα pH (<9).

GH9 ενδογλουκανάσες από βακτηριακά στελέχη εμφανίζουν βέλτιστο pH σε εύρος από 5 έως 8 (Πίνακας 5) με το μεγαλύτερο ποσοστό από αυτές να εμφανίζουν βέλτιστο σε pH 6 έως 7.

6. Σταθερότητα σε Διαφορετικά pH

Η BsGH9 παρουσιάζει πολύ καλή σταθερότητα στην έκταση pH από 5 έως 10, διατηρώντας πάνω από το 85% της ενεργότητας της ακόμα και μετά από 48 ώρες επώασης στους 4°C. Αντίθετα, το ένζυμο χάνει σχεδόν το 100% της ενεργότητάς του μετά από επώαση 24 ωρών σε όξινα pH (διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Σταθερότητα της BsGH9 σε διαφορετικά pH για χρόνο επώασης (α) 24 και (β) 48 ώρες.

Οι βακτηριακές ενδγλουκανάσες της οικογένειας GH9 εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα σε ευρύ φάσμα τιμών pH (pH=5 – 10). Σημαντική μείωση της δραστηριότητας σε pH = 4 εμφανίζουν η CenC του *C. thermocellum* (Haq et al., 2015) και η CalkIGH9T του *C. alkalicellulosi* (Phitsuwan et al., 2021), οι οποίες όπως και η BsGH9 διατηρούν πάνω από 80% της ενεργότητάς τους στο εύρος pH 6 με 10.

7. Εξειδίκευση ως προς το Υπόστρωμα

Μελετήθηκε η ικανότητα της BsGH9 να δράσει σε διαφορετικά υποστρώματα. Τα υποστρώματα που μελετήθηκαν είναι ξυλάνη βρώμης (oat spelt), μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel), κυτταρίνη διογκωμένη με φωσφορικό οξύ (PASC), λιχενάνη, β-γλουκάνη, α-κυτταρίνη και αραβινοξυλάνη, 4-Νιτροφαινυλ-β-D-Γλυκοπυρανοζίδιο και 4-Νιτροφαινυλ-α-D-Γλυκοπυρανοζίδιο (PNPG), 4-Νιτροφαινυλ-α-D-Γαλακτοπυρανοζίδιο (pNPGal), 2-Νιτροφαινυλ-β-D-Γαλακτοπυρανοζίδιο (oNPGal) και 4-Νιτροφαινυλ-β-D-Ξυλοπυρανοζίδιο (pNPX).

Η ενεργότητα του ενζύμου σε υπόστρωμα της καρβοξυ-μεθυλ-κυτταρίνη θεωρήθηκε ως 100% (πίνακας 7).

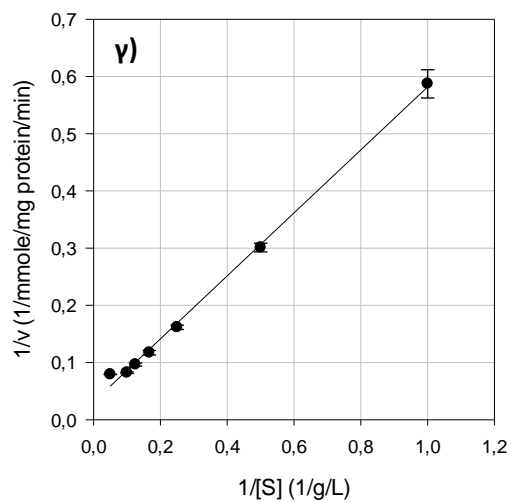
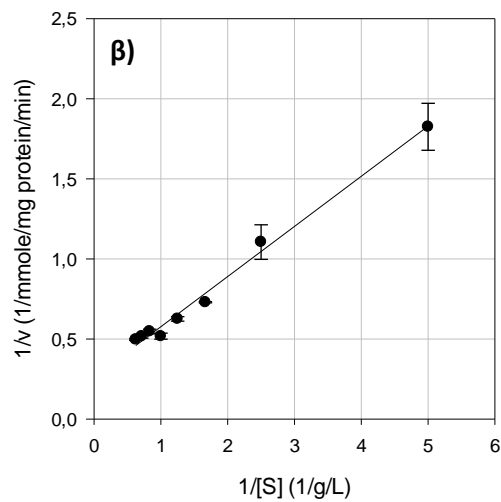
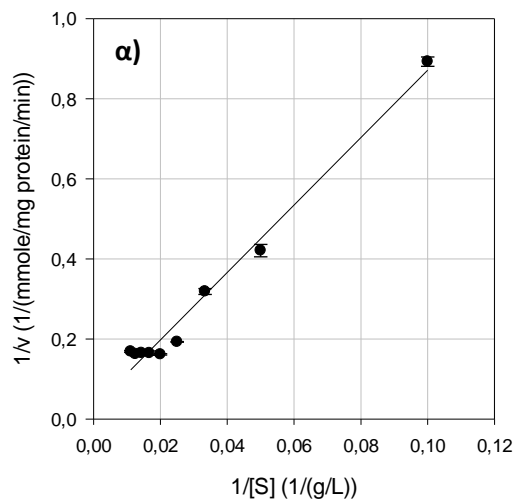
Πίνακας 7: Σχετική ενεργότητα της BsGH9 σε διάφορα υποστρώματα.

Υπόστρωμα	Σχετική Ενεργότητα (%)
Καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνη (CMC)	100 ± 0,91
PASC	298,63 ± 9,13
β-γλουκάνη (Barley)	574,20 ± 1,60
Μικροκρυσταλλική Κυτταρίνη (Avicel)	∅
α-κυτταρίνη	∅
Λιχενάνη (Icelandic Moss)	146,58 ± 0,00
Ξυλάνη Βρώμης (Oat Spelt)	∅
Αραβινοξυλάνη	3,20 ± 0,46
Filter Paper	57,53 ± 8,90
pNP-a-D-Galactopyranozide	∅
pNP-a-D-Glucopyranozide	7,53 ± 0,23
pNP-b-D-Glucopyranozide	∅
pNP-b-D-Xylopyranozide	∅
oNP-b-D-Galactopyranozide	∅

Υψηλότερη ενεργότητα παρατηρείται στο υπόστρωμα β-γλουκάνης, στην οποία το ένζυμο φαίνεται να δρα σχεδόν έξι φορές καλύτερα συγκριτικά με το CMC. Υψηλή δραστικότητα επίσης εμφανίζεται και στη λιχενάνη, στην οποία το ένζυμο φαίνεται να δρα 46% περισσότερο σε σχέση με το CMC αλλά και στο PASC, στο οποίο η δραστικότητα είναι σχεδόν τρεις φορές μεγαλύτερη από αυτή στο CMC. Παράλληλα, το ένζυμο δεν εμφάνισε δράση σε ημικυτταρινικά υποστρώματα και σε υποστρώματα τα οποία εμφανίζουν πολύ μεγάλο βαθμό δομικής σταθερότητας όπως η α-κυτταρίνη και το Avicel. Επιπλέον, στα νιτροφαινυλ-πυρανοζιδικά υποστρώματα, η BsGH9 δεν εμφάνισε ενεργότητα με μοναδική εξαίρεση το PNP-γαλακτοπυρανοζίδιο στο οποίο εμφάνισε σχετική ενεργότητα 7,54% σε σχέση με την ενεργότητα που εμφάνισε στο CMC (πίνακας 8).

8. Κινητικές Παράμετροι

Οι κινητικές παράμετροι της BsGH9, προσδιορίστηκαν σε τρία διαφορετικά υποστρώματα, CMC, PASC και β-γλουκάνη, για κάθε ένα από τα οποία υπολογίστηκαν ξεχωριστά οι σταθερές K_m και v_{max} . Ο υπολογισμός των σταθερών πραγματοποιήθηκε με βάση το διάγραμμα διπλού αντίστροφου Lineweaver-Burk η οποία ποσοτικοποιεί την εξίσωση ενζυμικής κινητικής Michaelis-Menten με μεγαλύτερη ακρίβεια. Στο διάγραμμα 8, παρουσιάζεται το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (διάγραμμα Lineweaver-Burk) για κάθε ένα από τα τρία υποστρώματα που ελέγχθηκαν.



Διάγραμμα 8: Διαγράμματα διπλού αντίστροφου Lineweaver-Burk για την μεταβολή της ταχύτητας παραγωγής προϊόντος συναρτήσει της συγκέντρωσης (α) καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνης, (β) PASC και (γ) β-γλουκάνης (barley).

Τα αποτελέσματα των κινητικών παραμέτρων που υπολογίστηκαν με βάση τη γραμμική παρεμβολή Lineweaver-Burk παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

Στις βακτηριακές ενδογλουκανάσες της οικογένειας GH9 παρατηρείται, ότι η τιμή της K_m στο CMC κυμαίνεται στο εύρος 0,8 έως 47,11mg/mL, ενώ η σταθερά της BsGH9 υπολογίστηκε 283,46mg/mL. Στην κρυσταλλική κυτταρίνη επεξεργασμένη με φωσφορικό οξύ (PASC) και στη β-γλουκάνη (barley) η BsGH9 παρουσίασε χαμηλότερες τιμές K_m (Πίνακας 9).

Πίνακας 8: Κινητικές Σταθερές της BsGH9 για CMC, PASC και β-γλουκάνη.

Υπόστρωμα	K_m (g/L)	v_{max} (mmole/mg protein/min)
CMC	283,46±11,56	25,25±4,61
PASC	1,19±0,10	3,79±0,31
Β-γλουκάνη	23,38±0,15	41,67±5,12

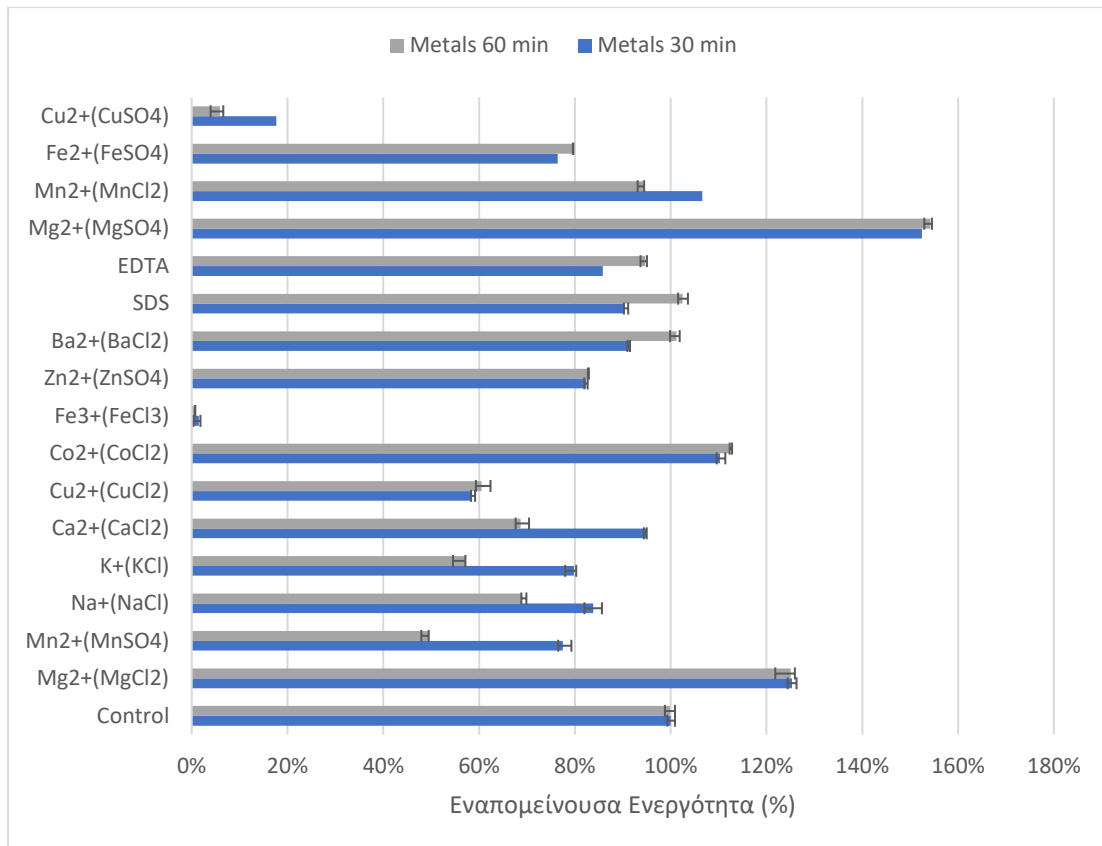
Η τιμή K_m όταν ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνης από την BsGH9 είναι η υψηλότερη που έχει παρουσιαστεί από βακτηριακή ενδογλουκανάση της GH9 οικογένειας. Αποτελεί δείκτη ότι το μελετώμενο ένζυμο εμφανίζει χαμηλή συγγένεια με το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

9. Επίδραση Ρυθμιστικών Παραγόντων

Η επίδραση ιόντων μετάλλων καθώς και των οργανικών ενώσεων SDS και EDTA, για επώαση μισής και μίας ώρας, παρουσιάζεται στο διάγραμμα 9.

Η παρουσία μεταλλικών ιόντων επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα καθώς μπορούν να δράσουν ως αποδέκτες ηλεκτρονίων, ηλεκτρόφιλα, νουκλεόφιλα, ως σύνδεσμοι μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος ή ακόμα και ως σταθεροποιητικοί παράγοντες της αντίδρασης κατάλυσης (V. Kumar & Satyanarayana, 2013).

Στην περίπτωση της BsGH9 παρατηρείται ότι η παρουσία ιόντων μαγνησίου (Mg^{2+}) προερχόμενων από την ένωση $MgSO_4$, ενισχύουν σημαντικά την δραστηριότητα του ενζύμου. Ιόντα μαγνησίου προερχόμενα από την ένωση $MgCl_2$ αυξάνουν την ενεργότητα του ενζύμου κατά 25% μετά από επώαση μίας ώρας. Η παρουσία των ιόντων μαγγανίου (Mn^{2+}) προερχόμενων από την ένωση $MnSO_4$, μειώνουν τη δραστηριότητα του ενζύμου ενώ η παρουσία των ιόντων μαγγανίου που προέρχονται από την ένωση $MnCl_2$ δεν φαίνεται να επιδρούν σημαντικά στην ενεργότητα της BsGH9. Ενίσχυση της δραστηριότητας παρατηρείται επίσης παρουσία ιόντων κοβαλτίου (Co^{2+}) μετά από επώαση μισής και μίας ώρας. Τα ιόντα βαρίου (Ba^{2+}) δεν φαίνεται να επιδρούν σημαντικά στην ενεργότητα της BsGH9.



Διάγραμμα 9: Επίδραση μετάλλων στην ενεργότητα της BsGH9 μετά από επώαση μισής (■) και μίας (■) ώρας.

Τα ιόντα ψευδαργύρου (Zn^{2+}), δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}), ασβεστίου (Ca^{2+}), καλίου (K^+), νατρίου (Na^+) και το θεϊκό μαγνήσιο ($MnSO_4$), φαίνεται να μην επηρεάζουν σημαντικά την δραστηριότητα της BsGH9, καθώς το ένζυμο παρουσιάζει κατά μέσο όρο ενεργότητα ίση με το 86% της αρχικής μετά από επώαση μισής ώρας και 77% της αρχικής μετά από επώαση μίας ώρας.

Η παρουσία τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) αναστέλλει πλήρως τη δράση της BsGH9. Μεγάλη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας εμφανίζεται και παρουσία του δισθενούς ιόντος χαλκού (Cu^{2+}), όταν εκείνος προέρχεται από την ένωση θεϊκού χαλκού ($CuSO_4$), κάτι το οποίο δεν εμφανίζεται όταν το ιόν του χαλκού προέρχεται από χλωριούχο χαλκό ($CuCl_2$).

Το ιόν του δισθενούς χαλκού φαίνεται να επηρεάζει έντονα τις ενδογλουκανάσες της οικογένειας GH9, καθώς παρόμοια αποτελέσματα με την BsGH9, παρουσίασαν και η H1AD14 του *B. licheniformis* (Konar et al., 2022), η οποία εμφάνισε μείωση της ενεργότητας της κατά 80% παρουσία Cu^{2+} συγκέντρωσης 10mM, η *CalkGH9T C. alkalicellulosi* (Phitsuwan et al., 2021), στην οποία η εναπομείνουσα ενεργότητα παρουσία χαλκού είναι μηδενική και η AfEG66 του *A. fulica*, η οποία εμφανίζει δραστικά ελλατωμένη δραστηριότητα παρουσία χαλκού, ψευδραργύρου, τρισθενούς σιδήρου (Sade et al., 2022). Έχει αναφερθεί από τους Schröder et al., (2018) καθώς και από τους Yu & Li (2015) ότι για τα ένζυμα της οικογένειας GH9 είναι απαραίτητη η παρουσία ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}), καθώς εμπλέκεται στη διαμορφωτική

σταθερότητα και στην καταλυτική τους ικανότητα. Επιπλέον, ένζυμα της οικογένειας GH9 τα οποία διαθέτουν βοηθητικές μονάδες πρόσδεσης υδατανθράκων (CBM) απαιτούν την παρουσία Ca^{2+} για να διατηρήσουν την τρισδιάστατη δομή τους (Artzi et al., 2017; Petkun et al., 2010). Τα ένζυμα τα οποία εμφανίζουν βοηθητικές μονάδες πρόσδεσης υδατανθράκων (CBM) όπως η CenC (Haq et al., 2015), η H1AD14 (Konar et al., 2022), η *CalkGH9T* (Phitsuwan et al., 2021) και η BsGH9, όλες παρουσιάζουν διατήρηση υψηλού ποσοστού της ενεργότητας τους παρουσία ασβεστίου.

10. Ρόφηση της BsGH9

Μελετήθηκε η ικανότητα ρόφησης στην μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel) σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 9: Αρχική, ελεύθερη και προσροφημένη πρωτεΐνη για χρόνο επώασης 15 λεπτά.

Αρχική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης (mg/mL)	Ελεύθερη Πρωτεΐνη (mg/mL)	Προσροφημένη Πρωτεΐνη (mg/mL)
1	0,93	0,07
2	1,51	0,49

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι όταν το δείγμα έχει αρχική συγκέντρωση 1 mg/mL, η ποσότητα της πρωτεΐνης που προσροφάται στην μικροκρυσταλλική κυτταρίνη είναι ίση με 0,07 mg/mL, ενώ όταν η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος αυξάνεται στα 2 mg/mL, η ποσότητα προσροφημένης πρωτεΐνης, αυξάνεται στα 0,49 mg/mL. Παρατηρείται δηλαδή 7 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση προσροφημένης πρωτεΐνης, για αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο δείγμα κατά μία μονάδα.

Η ύπαρξη μίας βοηθητική μονάδας πρόσδεσης υδατανθράκων (CBM) στην τρισδιάστατη δομή της BsGH9, εξηγεί την ικανότητα της πρόσδεσης του ενζύμου στην μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, παρότι δεν παρουσιάζεται καταλυτική δράση σε αυτό το υπόστρωμα (πίνακας 8). Το αποτέλεσμα αυτό, μπορεί επίσης να θεωρηθεί δείγμα ταυτοποίησης της βοηθητικής μονάδας πρόσδεσης υδατανθράκων (CBM) της BsGH9 ως CBM3c, καθώς η συγκεκριμένη οικογένεια CBM3, δημιουργεί ασθενείς δεσμούς με την κρυσταλλική κυτταρίνη έτσι ώστε το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου να έχει καλύτερη πρόσβαση στην άμορφη αλυσίδα, η οποία ωστόσο απουσιάζει από το Avicel.

11. Προϊόντα Υδρόλυσης

Μελετήθηκε η υδρόλυση των υποστρωμάτων: καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνη (CMC), κρυσταλλική κυτταρίνη επεξεργασμένη με φωσφορικό οξύ (PASC) και της β-γλουκάνης (Barley) από την BsGH9 για διάστημα 6 και 24 ωρών με σκοπό την εύρεση των κύριων προϊόντων υδρόλυσης.

Από το όργανο μέτρησης HPAEC-PAD λαμβάνονται χρωματογραφήματα (εικόνες 20 έως 22) τα οποία για να ερμηνευτούν μελετήθηκαν σε αντιδιαστολή με χρωματογραφήματα πρότυπων ουσιών. Οι κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν σε κάθε προϊόν της κυτταρίνης εμφανίζονται σε χρόνους έκλυσης οι οποίοι παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 11.

Πίνακας 10: Χρόνοι έκλυσης πρότυπων δειγμάτων ολιγομερών της γλυκόζης από το όργανο HPAEC-PAD.

Υδατάνθρακας	Χρόνος Έκλυσης (min)
Γλυκόζη	5,16
Κελλοβιόζη	8,03
Κελλοτριόζη	8,33
Κελλοτετραόζη	11,66
Κελλοπενταόζη	13,05

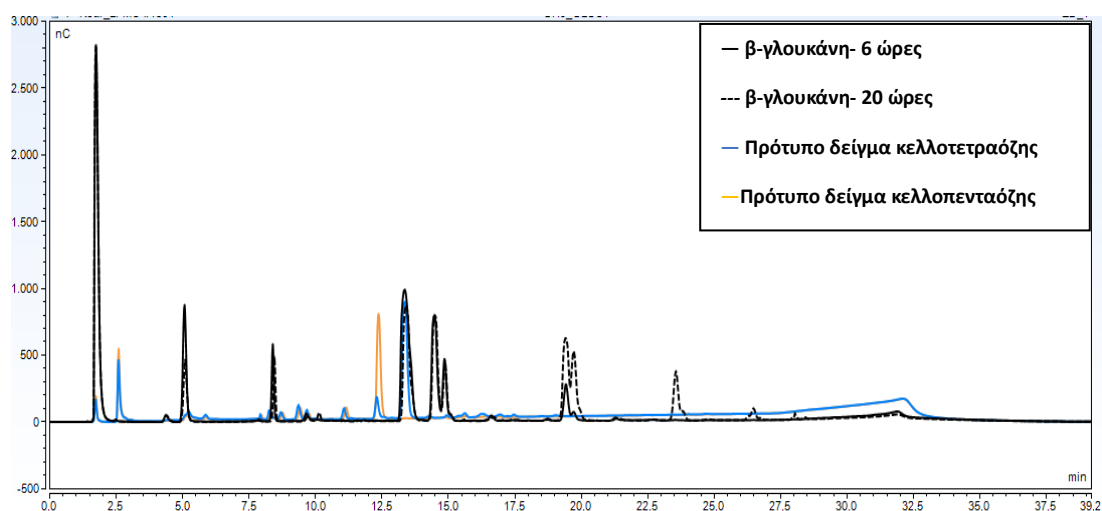
Πρέπει να σημειωθεί ότι οι κορυφές των γραφημάτων που εμφανίζονται πριν τα 2,5 λεπτά ανάλυσης δεν αντιστοιχούν σε κάποιο προϊόν της υδρόλυσης των υποστρωμάτων, αλλά πρόκειται για το ίδιο το ένζυμο το οποίο εκλύεται πρώτο από το δείγμα. Τα φυσικά σάκχαρα εκλύονται μεταξύ 5 και 15 λεπτών του χρόνου ανάλυσης, ενώ μετά τα 30 λεπτά, παρατηρείται έκλυση των αλάτων του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποία είναι διαλυμένα τα δείγματα (φωσφορικών αλάτων 100mM).

- **Προϊόντα υδρόλυσης της β-Γλουκάνης (Barley)**

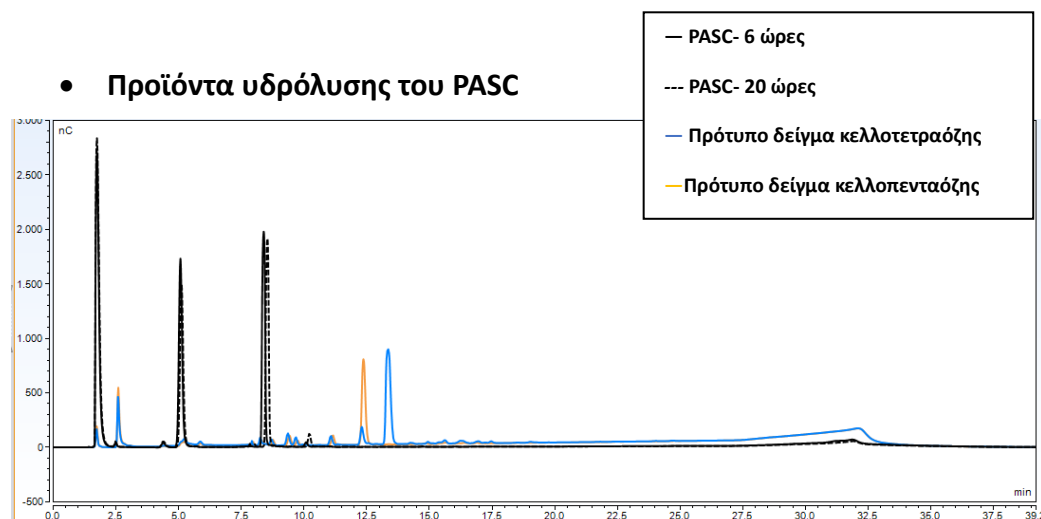
Η υδρόλυση της β-γλουκάνης (barley) από την BsGH9 μελετήθηκε σε χρόνους επώασης έξι και είκοσι ωρών. Τα προϊόντα που προέκυψαν από την αντίδραση υδρόλυσης παρουσιάζονται στην εικόνα 20. Η έκλυση των ταυτοποιημένων ολιγομερών της γλυκόζης λαμβάνει χώρα μέχρι περίπου τα δεκαπέντε λεπτά, μετά ακολουθεί έκλυση μεγαλύτερων μορίων τα οποία δεν έχουν ταυτοποιηθεί με βάση κάποιο πρότυπο. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ιδιότητα της BsGH9 να υδρολύει τυχαία τους β(1,4) δεσμούς μίας αλυσίδας της κυτταρίνης, με αποτέλεσμα τα προϊόντα που προκύπτουν από την αντίδραση να εμφανίζουν μεγάλο εύρος μοριακών βαρών.

Μεταξύ των δύο χρόνων επώασης, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές. Τα προϊόντα που εμφανίζονται κυρίως είναι η γλυκόζη, το διμερές της γλυκόζης (κελλοβιόζη) και το πενταμερές της γλυκόζης (κελλοεξαόζη). Οι ίδιες κορυφές εμφανίζονται και στο χρωματογράφημα του εικοσάωρου χρόνου επώασης (εικόνα

20) με τις κορυφές να εμφανίζουν ελαφρώς μεγαλύτερη ένταση, γεγονός που ερμηνεύεται ως υψηλότερη συγκέντρωση των σακχάρων στο δείγμα. Παράλληλα, κάποιες από τις κορυφές των μη ταυτοποιημένων μεγαλύτερων μορίων εμφανίζουν μειώσεις στην έντασή τους, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στην υδρόλυση τους από την BsGH9 προς προϊόντα μικρότερου μοριακού βάρους, κάτι το οποίο εξηγεί τις μικρές αυξήσεις των κορυφών της γλυκόζης, κελλοβιοόζης και κελλοπενταόζης στο δείγμα των είκοσι ωρών.



Εικόνα 20: Χρωματογράφημα της υδρόλυσης της β-γλουκάνης από την BsGH9, για χρόνο επώασης (—) 6 ώρες και (---) 20 ώρες.

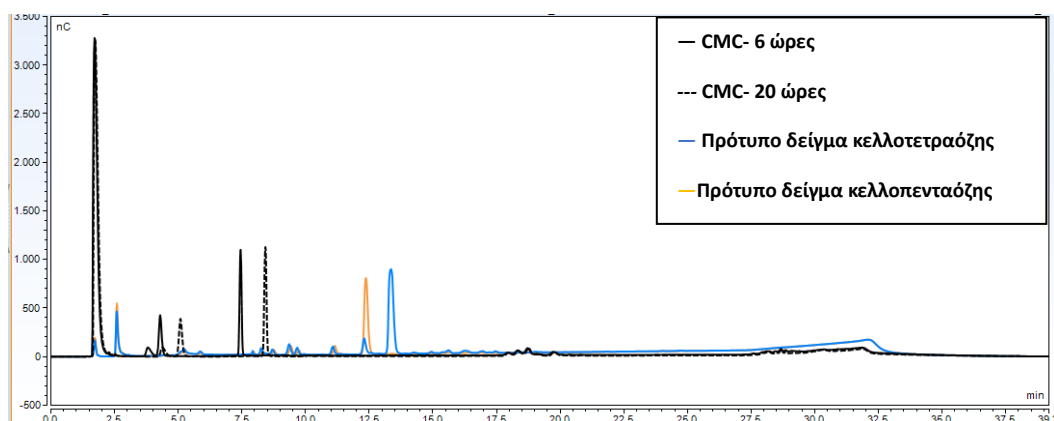


Εικόνα 21: Χρωματογράφημα της υδρόλυσης του PASC από την BsGH9, για χρόνο επώασης (—) 6 ώρες και (---) 20 ώρες.

Η υδρόλυση του PASC τόσο στις έξι όσο και στις είκοσι ώρες επώασης εμφανίζει τα ίδια προϊόντα, συγκεκριμένα κορυφές εμφανίζονται στα σημεία που, με βάση τα πρότυπα διαγράμματα αντιστοιχούν στη γλυκόζη και στην κελλοβιοόζη (~5 και ~8 λεπτά αντίστοιχα). Οι δύο κορυφές αυτές ταυτίζονται με τις δύο πρώτες κορυφές του χρωματογραφήματος που προκύπτει από την υδρόλυση της β-γλουκάνης, απουσιάζει όμως η τρίτη κορυφή (κελλοπενταόζη, έκλυση στα ~13 λεπτά). Ακόμα,

απουσιάζουν οι κορυφές που εμφανίζονται μετά τα δεκαπέντε λεπτά στο χρωματογράφημα της β-γλουκάνης, γεγονός που αποδίδεται στο ότι το PASC είναι μια επεξεργασμένη κρυσταλλική κυτταρίνη. Οι ενδο-β-1,4-D-ενδογλουκανάσες δεν έχουν την ικανότητα να υδρολύσουν τα κρυσταλλικά τμήματα της κυτταρίνης, αλλά μόνο τα άμορφα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να υδρολύουν ολιγομερή της γλυκόζης από τα ελεύθερα και μικρού μήκους άκρα της κυτταρινικής αλυσίδας του PASC, παρουσιάζοντας έτσι μόνο προϊόντα μικρού μοριακού βάρους.

- Προϊόντα υδρόλυσης της καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνης (CMC)



Εικόνα 22: Χρωματογράφημα της υδρόλυσης της καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνης (CMC) από την BsGH9, για χρόνο επώασης (—) 6 ώρες και (---) 20 ώρες.

Στο χρωματογράφημα που προέκυψε από την αντίδραση υδρόλυσης του CMC παρουσιάζονται οι κορυφές της γλυκόζης και της κελλοβιόζης, ωστόσο είναι εμφανής μία σημαντική μετατόπιση των κορυφών στον άξονα του χρόνου, με τις δύο κορυφές να εμφανίζονται ταχύτερα στα δείγματα επώασης των 20 ωρών σε σχέση με αυτά που επώαστηκαν για έξι ώρες.

Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η κλωνοποίηση, απομόνωση, υπερέκφραση καθώς και ο πλήρης βιοχημικός χαρακτηρισμός μίας ενδο-1,4-β-D-γλουκανάσης της οικογένειας GH9 από τον μικροοργανισμό *Bacillus safensis* ATHUBA63 της εθνικής βιβλιοθήκης στελεχών του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, ο οποίος συλλέχθηκε από δείγματα χώματος από την περιοχή της Αττικής.

Απομονωμένα κύτταρα του *B. safensis* καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό LB-Άγαρ και με τεχνική PCR απομονώθηκε από αυτά το γονίδιο *bsgh9*, που κωδικοποιεί το επιθυμητό ένζυμο. Μετά από αλληλούχιση του απομονωμένου γονιδίου βρέθηκε ότι έχει μέγεθος 2106 βάσεις. Στη συνέχεια, το απομονωμένο γονίδιο μετασχηματίστηκε με χρήση του κατασκευασμένου από το τμήμα Βιολογίας πλασμιδιακού φορέα pET-15b16s, σε δεκτικά κύτταρα *Escherichia coli* DH5a, καθώς το στέλεχος αυτό είναι κατάλληλα κατασκευασμένο ώστε να πολλαπλασιάζει σε μεγάλο αριθμό τους πλασμιδιακούς φορείς που δέχεται. Μετά από απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε υψηλή συγκέντρωση, το γονίδιο μετασχηματίστηκε σε κύτταρα *E. coli* BL21, τα οποία επιλέχθηκαν λόγω της ταχύτητας με την οποία αναπτύσσονται, ιδιότητα που τα καθιστά κατάλληλα για παραγωγή και υπερέκφραση πρωτεϊνικών μορίων. Τα δεκτικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Luria-Bertani και επάχθηκαν με IPTG με στόχο την παραγωγή του επιθυμητού ενζύμου. Το επιθυμητό ένζυμο απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

Με βιοπληροφορική έρευνα και χρήση διαδικτυακών εργαλείων και της γνωστής αμινοξικής αλληλουχίας της μελετώμενης πρωτεΐνης εκτιμήθηκε η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης και το μοριακό της βάρος (69,601 kDa). Ακόμα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της αλληλουχίας με άλλες οι οποίες βρίσκονται καταχωρημένες σε διεθνείς βιβλιοθήκες (<https://www.uniprot.org/>). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι πέρα από την καταλυτική περιοχή με μορφή «(a/a)₆ barrel fold», η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό της οικογένειας GH9, η BsGH9 παρουσιάζει και μία βοηθητική περιοχή πρόσδεσης σε υδατάνθρακες η οποία με χρήση του διαδικτυακού εργαλείου Prosite της ExPASy (<https://prosite.expasy.org/>) προσδιορίστηκε ως CBM3.

Το μοριακό βάρος της BsGH9 προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-Page και βρέθηκε ~69 kDa κάτι το οποίο επαλήθευσε το αποτέλεσμα της βιοπληροφορικής εκτίμησης. Οι ενδογλουκανάσες της οικογένειας GH9 εμφανίζουν εύρος μοριακών βαρών από 50 έως 190 kDa με την H1AD14 από τον *Bacillus licheniformis* να έχει μέγεθος ~71 kDa (Konar et al., 2022), την EglA του *Bacillus pumilus* να εμφανίζει μοριακό βάρος ~66 kDa (Lima et al., 2005), ενώ η CenC του βακτηρίου *Clostridium thermocellum* εμφανίζει σχεδόν το διπλάσιο βάρος 137,11 kDa (Haq et al., 2015). Το μοριακό βάρος της BsGH9 βρίσκεται εντός του αναμενόμενου εύρους για μία GH9.

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της BsGH9, βρέθηκε ίση με 60 °C και είναι εντός του αναμενόμενου για μία ενδογλουκανάση της οικογένειας GH9, καθώς είναι όμοια με τις βέλτιστες θερμοκρασίες που εμφανίζουν οι Q8VV73 (CelQ) του *Hungateiclostridium cellulolyticum* (Kurokawa et al., 2002), η Q3ZMA8 του

Cellulomonas favigena (Mejia-Castillo et al., 2008) και η Q5YLG1 του *Bacillus pumilus* (Lima et al., 2005). Επιπλέον, ενδογλουκανάσες από τους οργανισμούς *Bacillus licheniformis*, *Myxobacter sp.* και *Clostridium phytofermentans* εμφανίζουν βέλτιστη θερμοκρασία στους 65 °C (Avitia et al., 2000; Konar et al., 2022; X. Z. Zhang et al., 2010).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα της BsGH9 στο θερμοκρασιακό εύρος 40 έως 80 °C. Για τη μέγιστη θερμοκρασία που μελετήθηκε, 80 °C, η BsGH9 εμφανίζει χρόνο ημιζωής 2,25 λεπτά. Παράλληλα, σε θερμοκρασίες 60 και 70 °C, η BsGH9, εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα, καθώς η ενεργότητα της μηδενίστηκε μετά από 8 και 6 ώρες αντίστοιχα. Στις θερμοκρασίες 40 και 50 °C, η BsGH9, εμφάνισε σταθερότητα της τάξης ημερών, με το ένζυμο να απενεργοποιείται μετά τις 5 μέρες στην περίπτωση των 50 °C και να διατηρεί 71% της ενεργότητας του μετά από τον ίδιο χρόνο στους 40 °C. Οι χαρακτηρισμένες ενδογλουκανάσες της GH9 οικογένειας, εμφανίζουν διαφοροποιήσεις στην σταθερότητα τους ως προς τη θερμοκρασία με την H1AD14 του *B. licheniformis* να εμφανίζει διατηρεί το 74% της αρχικής της ενεργότητας μετά από δέκα μέρες επώαση στους 65 °C (Konar et al., 2022) ενώ η P23665 του *F. succinogenes*, εμφανίζει χρόνο ημιζωής 2,5 ωρών στους 50°C (Qi et al., 2007). Επιπλέον, η Q65J19 του *B. licheniformis* εμφανίζει σταθερότητα 6 ωρών στους 60 °C (de Araújo et al., 2019).

Με βάση τα αποτελέσματα της θερμικής σταθερότητας και με χρήση της εξίσωσης Arrhenius, προσδιορίστηκε η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης $E_{(a)d}$ η οποία είναι ίση με 198,513 KJ/mol. Η υψηλή τιμή της θερμικής ενέργειας απενεργοποίησης σημαίνει ότι απαιτείται περισσότερη ενέργεια έτσι ώστε το ένζυμο να οδηγηθεί σε μετουσίωση ή απενεργοποίηση (Mainer et al., 1997).

Προσδιορίστηκαν οι τιμές των πρότυπων θερμοδυναμικών μεγεθών τα οποία εκφράζουν τη θερμική απενεργοποίηση της BsGH9 σε υπόστρωμα CMC. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η πρότυπη μεταβολή ενθαλπίας (ΔH^*), εντροπίας (ΔS^*) και ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG^*) (πίνακας 7). Οι τιμές των πρότυπων θερμοδυναμικών σταθερών που υπολογίστηκαν αποτελούν χαρακτηριστικό δείκτη της θερμικής σταθερότητας ενός ενζύμου, καθώς η πρότυπη μεταβολή ενθαλπίας (ΔH^*) εκφράζει τον αριθμό των μη ομοιοπολικών δεσμών που διασπώνται κατά τη διάρκεια της θερμικής απενεργοποίησης, η πρότυπη μεταβολή εντροπίας (ΔS^*) συνδέεται με την δομική διαταραχή κατά την αναδίπλωση ενός μορίου και λειτουργεί αποσταθεροποιητικά ενώ σαν συνολικός δείκτης, η πρότυπη ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG^*) εκφράζει την τάση της θερμικής απενεργοποίησης ενός ενζύμου. Για την BsGH9, παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμός των προαναφερθέντων τριών μεγεθών της προσδίδει υψηλό βαθμό σταθερότητας, η οποία μειώνεται σταδιακά όσο αυξάνεται η θερμοκρασία επώασης.

Μελετήθηκε η επίδραση του pH στην δραστηριότητα της BsGH9 και βρέθηκε ότι το βέλτιστο pH δράσης της είναι ίσο με 6. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται εντός του εύρους των ιδανικών pH δράσης των βακτηριακών GH9 ενδογλουκανασών, τα οποία βρίσκονται μεταξύ 5 και 8, με το μεγαλύτερο αριθμό ενζύμων να παρουσιάζουν μεγιστοποίηση της δράσης τους σε pH 6 και 6,5 (πίνακας 5). Παράλληλα, η BsGH9 παρουσιάζει πολύ καλή σταθερότητα στο εύρος pH 5-10 διατηρώντας σχεδόν 90%

της ενεργότητάς της μετά από 48 ώρες επώασης στους 4 °C. Αντίθετα, η δραστικότητα της σε pH ίσο με 4 μηδενίζεται στις 24 ώρες επώασης.

Η BsGH9 εμφάνισε σαφή σειρά προτίμησης στα κυτταρινικά υποστρώματα:

β-γλουκάνη> PASC> Λιχενάνη> CMC> Filter Paper> Avicel> α-κυτταρίνη

Δεν εμφανίστηκε δραστικότητα στα ημικυτταρινούχα υποστρώματα ούτε στα συνθετικά. Παρόμοια συμπεριφορά με την BsGH9, εμφανίζουν η H1AD14 του *B. licheniformis*, η οποία παρουσιάζει μέγιστη δράση στη β-γλουκάνη και στη Λιχενάνη (Konar et al., 2022), η AfEG66 του μικροοργανισμού *Achatina fulica*, η οποία εμφανίζει 2,9 φορές μεγαλύτερη ενεργότητα στη β-γλουκάνη σε σχέση με το CMC και 1,3 φορές μεγαλύτερη ενεργότητα στη Λιχενάνη σε σχέση με το CMC, ενώ παράλληλα δεν υδρολύει το Avicel και τα pNPG και pNPC (Sade et al., 2022). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι παρόμοια εκλεκτικότητα με την BsGH9 εμφανίζουν ακόμα η CenC, η Thcel9A και άλλες (Haq et al., 2015; F. Zhang et al., 2011).

Η μελέτη των κινητικών παραμέτρων της BsGH9 πραγματοποιήθηκε σε τρία διαφορετικά υποστρώματα, CMC, PASC και β-γλουκάνη, για τα οποία υπολογίστηκαν το K_m και v_{max} (πίνακας 9). Η τιμή K_m όταν ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η καρβοξυμέθυλ-κυτταρίνης από την BsGH9 είναι η υψηλότερη που έχει παρουσιαστεί από βακτηριακή ενδογλουκανάση της GH9 οικογένειας. Αποτελεί δείκτη ότι το μελετώμενο ένζυμο εμφανίζει χαμηλή συγγένεια με το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Το αντίθετο έγινε εμφανές για τη β-γλουκάνη και το PASC για τα οποία η BsGH9 εμφάνισε ιδιαίτερα χαμηλές τιμές K_m .

Η μελέτη της επίδρασης ρυθμιστικών παραγόντων στην δραστικότητα της BsGH9, έδειξε ότι το ένζυμο απενεργοποιείται πλήρως παρουσία τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}), εμφανίζει μεγάλη πτώση στη δραστικότητα του παρουσία $CuSO_4$ και εμφανίζει σε γενικές γραμμές μικρή σχετικά πτώση της ενεργότητάς του παρουσία μετάλλων Mn^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} (Διάγραμμα 9). Εμφανή εξαίρεση αποτελεί το μαγγάνιο (Mg^{2+}) το οποίο προερχόμενο από τις ενώσεις χλωριούχο μαγγάνιο ($MgCl_2$) και θεικό μαγγάνιο ($MgSO_4$), παρουσίασε σημαντική αύξηση στην ενεργότητα του ενζύμου τόσο μετά από επώαση μίας ώρας όσο και μετά από επώαση μισής ώρας. Παρουσία του επιφανειοδραστικού μορίου SDS, η BsGH9 εμφανίζει μικρή έως αμελητέα μείωση της ενεργότητάς της ενώ μείωση εμφανίζει παρουσία EDTA.

Ο προσδιορισμός των προϊόντων υδρόλυσης των υποστρωμάτων CMC, PASDC και β-γλουκάνης από την BsGH9, έδωσε ως κυριότερα προϊόντα την γλυκόζη και την κελλοβιόζη, οι οποίες ήταν και τα μόνα προϊόντα τα οποία εμφανίστηκαν κατά τη μελέτη του CMC και του PASC, τόσο σε συνθήκες 6 αλλά και 24 ωρών. Στην υδρόλυση της β-γλουκάνης, ανιχνεύτηκε ακόμα και η κελλοπενταόζη.

Ρόλος της ενδογλουκανάσης στη υδρόλυση της κυτταρίνης είναι η πρόσδεση στο υπόστρωμα με στόχο την υδρόλυση των β 1,4 γλυκοζιτικών δεσμών και την απελευθέρωση τυχαίων προϊόντων τα οποία στη συνέχεια θα υδρολυθούν περαιτέρω προς κελλοβιόζη από τις κελλοβιοϋδρολάσες (εξωγλουκανάσες) ή προς γλυκόζη από τις β-γλυκοζιδάσες (Rahman et al., 2018). Επομένως, η παρουσία τόσο μικρών όσο και μεγάλων oligo-σακχαριτών στα δείγματα υδρόλυσης κυτταρινούχων υποστρωμάτων είναι αναμενόμενη, ωστόσο, η έλλειψή τους από τα

δείγματα CMC και PASC μπορεί να οφείλεται σε αλληπάλληλη υδρόλυση των προϊόντων από την BsGH9 λόγω του μεγάλου χρόνου επώασης. Στην περίπτωση της β-γλουκάνης, όπου η αλληλουχία 1,3-1,4 δεσμών δεν επιτρέπει την υδρόλυση σε πολύ μικρά μόρια, το αποτέλεσμα που λαμβάνουμε κρίνεται ότι συνάδει με τη βιβλιογραφική μελέτη των ενδο-1,4-β-D-γλουκανασών.

Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα της BsGH9, να ροφάται στη μικροκρυσταλλική κυτταρίνη Avicel και διαπιστώθηκε ότι με διπλασιασμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο δείγμα, εμφανίζεται σχεδόν διπλασιασμός και στη συνολική προσροφημένη πρωτεΐνη. Το φαινόμενο αυτό, μπορεί να εξηγηθεί από την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου, η οποία εμφανίζει μία βοηθητική περιοχή πρόσδεσης σε υδατάνθρακες, η οποία χαρακτηρίζεται ως CBM3, ρόλος του οποίου είναι η πρόσδεση του ενζύμου στο κρυσταλλικό πλέγμα της κυτταρίνης.

Η BsGH9 αποτελεί ένα ένζυμο το οποίο μπορεί να παραχθεί και να απομονωθεί με σχετική ευκολία, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία στις συνθήκες στις οποίες μπορεί να δράσει με ικανοποιητική σταθερότητα. Ειδικότερα, η ικανότητα του ενζύμου να διατηρεί την ενεργότητά του σε υψηλές θερμοκρασίες και να παραμένει σταθερό σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH ενώ παράλληλα δεν επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία μεταλλών ή άλλων ρυθμιστικών παραγόντων χρήζει τεράστιου ενδιαφέροντος για τις βιομηχανικές εφαρμογές της. Με βάση αυτό, προτείνεται για μελλοντική έρευνα γύρω από την BsGH9 και για περαιτέρω χαρακτηρισμό της, η μελέτη της σταθερότητάς της σε οργανικούς διαλύτες, καθώς επίσης και η μελέτη ενδεχόμενης αναστολής της δράσης της από τα προϊόντα υδρόλυσης της κυτταρίνης. Τέλος, προτείνεται η μελέτη της συνεργιστικής της δράσης με εξωγλουκανάσες και β-γλυκοζιδάσες του ίδιου ή διαφορετικού μικροοργανισμού.

Βιβλιογραφία

- Aich, S., Singh, R. K., Kundu, P., Pandey, S. P., & Datta, S. (2017). Genome-wide characterization of cellulases from the hemi-biotrophic plant pathogen, *Bipolaris sorokiniana*, reveals the presence of a highly stable GH7 endoglucanase. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0822-0>
- Anish, R., Rahman, M. S., & Rao, M. (2007). Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims. *Biotechnology and Bioengineering*, *96*(1). <https://doi.org/10.1002/bit.21175>
- Artzi, L., Bayer, E. A., & Morais, S. (2017). Cellulosomes: Bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.164>
- Avitia, C. I., Castellanos-Juárez, F. X., Sánchez, E., Téllez-Valencia, A., Fajardo-Cavazos, P., Nicholson, W. L., & Pedraza-Reyes, M. (2000). Temporal secretion of a multicellulolytic system in *Myxobacter* sp. AL-1: Molecular cloning and heterologous expression of cel9 encoding a modular endocellulase clustered in an operon with cel48, an exocellobiohydrolase gene. *European Journal of Biochemistry*, *267*(24). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01804.x>
- Awasthi, M. K., Sar, T., Gowd, S. C., Rajendran, K., Kumar, V., Sarsaiya, S., Li, Y., Sindhu, R., Binod, P., Zhang, Z., Pandey, A., & Taherzadeh, M. J. (2023). A comprehensive review on thermochemical, and biochemical conversion methods of lignocellulosic biomass into valuable end product. *Fuel*, *342*. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.127790>
- Baindara, P., Mandal, S. M., Chawla, N., Singh, P. K., Pinnaka, A. K., & Korpole, S. (2013). Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. *AMB Express*, *3*. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-2>
- Bajpai, P. (2018). Biotechnology for pulp and paper processing. In *Biotechnology for Pulp and Paper Processing*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-7853-8>
- Belaich, A., Parsieglä, G., Gal, L., Villard, C., Haser, R., & Belaich, J. P. (2002). Cel9M, a new family 9 cellulase of the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome. *Journal of Bacteriology*, *184*(5). <https://doi.org/10.1128/JB.184.5.1378-1384.2002>
- Béra, C., Broussolle, V., Forano, E., & Gaudet, G. (1996). Gene sequence analysis and properties of EGC, a family E (9) endoglucanase from *Fibrobacter succinogenes* BL2. *FEMS Microbiology Letters*, *136*(1). [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00496-3](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00496-3)
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, *18*(5). [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00041-0)
- Bussler, L., Jacomini, D., Corrêa, J. M., Kadowaki, M. K., Maller, A., & Simão, R. de C. G. (2021). Recombinant cellulase of *Caulobacter crescentus*: potential applications for biofuels and textile industries. *Cellulose*, *28*(5). <https://doi.org/10.1007/s10570-021-03700-5>

- Cantarel, B. I., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, *37*(SUPPL. 1).
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
- Cavaco-Paulo, A., Morgado, J., Almeida, L., & Kilburn, D. (1998). Indigo Backstaining During Cellulase Washing. *Textile Research Journal*, *68*(6).
<https://doi.org/10.1177/004051759806800602>
- Cavicchioli, R., & Watson, K. (1991). Molecular cloning, expression, and characterization of endoglucanase genes from *Fibrobacter succinogenes* AR1. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*(2). <https://doi.org/10.1128/aem.57.2.359-365.1991>
- Charreau, H., L. Foresti, M., & Vazquez, A. (2013). Nanocellulose Patents Trends: A Comprehensive Review on Patents on Cellulose Nanocrystals, Microfibrillated and Bacterial Cellulose. *Recent Patents on Nanotechnology*, *7*(1).
<https://doi.org/10.2174/1872210511307010056>
- Chiriac, A. I., Cadena, E. M., Vidal, T., Torres, A. L., Diaz, P., & Pastor, F. I. J. (2010). Engineering a family 9 processive endoglucanase from *Paenibacillus barcinonensis* displaying a novel architecture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(4).
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2350-8>
- Christakopoulos, P., Hatzinikolaou, D. G., Fountoukidis, G., Kekos, D., Claeysens, M., & Macris, B. J. (1999). Purification and mode of action of an alkali-resistant endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus pumilus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *364*(1). <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1102>
- de Araújo, E. A., de Oliveira Neto, M., & Polikarpov, I. (2019). Biochemical characterization and low-resolution SAXS structure of two-domain endoglucanase BICel9 from *Bacillus licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(3). <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9508-1>
- Duan, C. J., Huang, M. Y., Pang, H., Zhao, J., Wu, C. X., & Feng, J. X. (2017). Characterization of a novel theme C glycoside hydrolase family 9 cellulase and its CBM-chimeric enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(14).
<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8320-7>
- Eckert, K., Zielinski, F., Lo Leggio, L., & Schneider, E. (2002). Gene cloning, sequencing, and characterization of a family 9 endoglucanase (CelA) with an unusual pattern of activity from the thermoacidophile *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC27009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*(4). <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1131-4>
- Fatih Demirbas, M. (2009). Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. *Applied Energy*, *86*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.04.043>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, *285*.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

- Fu, X., Liu, P., Lin, L., Hong, Y., Huang, X., Meng, X., & Liu, Z. (2010). A novel endoglucanase (Cel9P) from a marine bacterium *Paenibacillus* sp. BME-14. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *160*(6). <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8648-2>
- Gaudin, C., Belaich, A., Champ, S., & Belaich, J. P. (2000). CelE, a multidomain cellulase from *Clostridium cellulolyticum*: A key enzyme in the cellulosome? *Journal of Bacteriology*, *182*(7). <https://doi.org/10.1128/JB.182.7.1910-1915.2000>
- Gilad, R., Rabinovich, L., Yaron, S., Bayer, E. A., Lamed, R., Gilbert, H. J., & Shoham, Y. (2003). Cell, a noncellulosomal family 9 enzyme from *Clostridium thermocellum*, is a processive endoglucanase that degrades crystalline cellulose. *Journal of Bacteriology*, *185*(2). <https://doi.org/10.1128/JB.185.2.391-398.2003>
- Gioia, J., Yerrapragada, S., Qin, X., Jiang, H., Igboeli, O. C., Muzny, D., Dugan-Rocha, S., Ding, Y., Hawes, A., Liu, W., Perez, L., Kovar, C., Dinh, H., Lee, S., Nazareth, L., Blyth, P., Holder, M., Buhay, C., Tirumalai, M. R., ... Weinstock, G. M. (2007). Paradoxical DNA repair and peroxide resistance gene conservation in *Bacillus pumilus* SAFR-032. *PLoS ONE*, *2*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000928>
- Glekas, P. D., Kalantzi, S., Dalios, A., Hatzinikolaou, D. G., & Mamma, D. (2022). Biochemical and Thermodynamic Studies on a Novel Thermotolerant GH10 Xylanase from *Bacillus safensis*. *Biomolecules*, *12*(6). <https://doi.org/10.3390/biom12060790>
- Gollakota, A. R. K., Kishore, N., & Gu, S. (2018). A review on hydrothermal liquefaction of biomass. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 81). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.178>
- Gummadi, S. N. (2003). What is the role of thermodynamics on protein stability? In *Biotechnology and Bioprocess Engineering* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/BF02932892>
- Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Markov, A. V., Sinitsyna, O. A., Ankudimova, N. V., & Berlin, A. G. (2001). Study of protein adsorption on indigo particles confirms the existence of enzyme-indigo interaction sites in cellulase molecules. *Journal of Biotechnology*, *87*(1). [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00234-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00234-6)
- Haq, I. ul, Akram, F., Khan, M. A., Hussain, Z., Nawaz, A., Iqbal, K., & Shah, A. J. (2015). CenC, a multidomain thermostable GH9 processive endoglucanase from *Clostridium thermocellum*: cloning, characterization and saccharification studies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(11). <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1920-4>
- Hitomi, L., Hatada, Y., Kawaminami, S., Kawai, S., & Ito, S. (1997). Amino acid sequence and stereoselective hydrolytic reaction of an endo-1,4- β -glucanase from a bacillus strain. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *61*(12). <https://doi.org/10.1271/bbb.61.2004>
- Hong, C. E., Jo, S. H., Jo, I. H., & Park, J. M. (2018). Diversity and antifungal activity of endophytic bacteria associated with *Panax ginseng* seedlings. *Plant Biotechnology Reports*, *12*(6). <https://doi.org/10.1007/s11816-018-0504-9>

- Ibarra, D., Monte, M. C., Blanco, A., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (2012). Enzymatic deinking of secondary fibers: Cellulases/hemicellulases versus laccase-mediator system. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(1). <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0991-y>
- Ishag, A. E. S. A., Abdelbagi, A. O., Hammad, A. M. A., Elsheikh, E. A. E., Elsaid, O. E., Hur, J. H., & Laing, M. D. (2016). Biodegradation of Chlorpyrifos, Malathion, and Dimethoate by Three Strains of Bacteria Isolated from Pesticide-Polluted Soils in Sudan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(45). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03334>
- Jeng, W. Y., Liu, C. I., Lu, T. J., Lin, H. J., Wang, N. C., & Wang, A. H. J. (2019). Crystal Structures of the C-Terminally Truncated Endoglucanase Cel9Q from *Clostridium thermocellum* Complexed with Cellodextrins and Tris. *ChemBioChem*, 20(2). <https://doi.org/10.1002/cbic.201800789>
- Kargarzadeh, H., Mariano, M., Gopakumar, D., Ahmad, I., Thomas, S., Dufresne, A., Huang, J., & Lin, N. (2018). Advances in cellulose nanomaterials. In *Cellulose* (Vol. 25, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1723-5>
- Kim, S. J., Joo, J. E., Jeon, S. D., Hyeon, J. E., Kim, S. W., Um, Y. S., & Han, S. O. (2016). Enhanced thermostability of mesophilic endoglucanase Z with a high catalytic activity at active temperatures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.068>
- Konar, A., Aich, S., Katakojwala, R., Datta, S., & Mohan, S. V. (2022). A processive GH9 family endoglucanase of *Bacillus licheniformis* and the role of its carbohydrate-binding domain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(18). <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12117-4>
- Kumar, K., Singal, S., & Goyal, A. (2019). Role of carbohydrate binding module (CBM3c) of GH9 β -1,4 endoglucanase (Cel9W) from *Hungateiclostridium thermocellum* ATCC 27405 in catalysis. *Carbohydrate Research*, 484. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107782>
- Kumar, V., & Satyanarayana, T. (2013). Biochemical and thermodynamic characteristics of thermo-alkali-stable xylanase from a novel polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1. *Extremophiles*, 17(5). <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0565-1>
- Kundu, S. (2019). Insights into the mechanism(s) of digestion of crystalline cellulose by plant class C GH9 endoglucanases. *Journal of Molecular Modeling*, 25(8). <https://doi.org/10.1007/s00894-019-4133-1>
- Kurokawa, J., Hemjinda, E., Arai, T., Kimura, T., Sakka, K., & Ohmiya, K. (2002). *Clostridium thermocellum* cellulase CelT, a family 9 endoglucanase without an Ig-like domain or family 3c carbohydrate-binding module. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4–5). <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1048-y>
- Lakhundi, S., Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2015). Cellulose degradation: A therapeutic strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections. In *Parasites and Vectors* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0642-7>

- Lee, H. L., Chang, C. K., Teng, K. H., & Liang, P. H. (2011). Construction and characterization of different fusion proteins between cellulases and β -glucosidase to improve glucose production and thermostability. *Bioresource Technology*, *102*(4). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.114>
- Li, Y., Irwin, D. C., & Wilson, D. B. (2007). Processivity, substrate binding, and mechanism of cellulose hydrolysis by *Thermobifida fusca* Cel9A. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(10). <https://doi.org/10.1128/AEM.02960-06>
- Lima, A. O. S., Quecine, M. C., Fungaro, M. H. P., Andreote, F. D., Maccheroni, W., Araújo, W. L., Silva-Filho, M. C., Pizzirani-Kleiner, A. A., & Azevedo, J. L. (2005). Molecular characterization of a β -1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*(1). <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1740-1>
- Lo Leggio, L., Simmons, T. J., Poulsen, J. C. N., Frandsen, K. E. H., Hemsworth, G. R., Stringer, M. A., Von Freiesleben, P., Tovborg, M., Johansen, K. S., De Maria, L., Harris, P. V., Soong, C. L., Dupree, P., Tryfona, T., Lenfant, N., Henrissat, B., Davies, G. J., & Walton, P. H. (2015). Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms6961>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, *14*(4). <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Mainer, G., Sánchez, L., Ena, J. M., & Calvo, M. (1997). Kinetic and thermodynamic parameters for heat denaturation of bovine milk IgG, IgA and IgM. *Journal of Food Science*, *62*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15032.x>
- Malburg, L. M., Iyo, A. H., & Forsberg, C. W. (1996). A novel family 9 endoglucanase gene (celD), whose product cleaves substrates mainly to glucose, and its adjacent upstream homolog (celE) from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(3). <https://doi.org/10.1128/aem.62.3.898-906.1996>
- Mayer, F. L., & Kronstad, J. W. (2017). Disarming fungal pathogens: *Bacillus safensis* inhibits virulence factor production and biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *MBio*, *8*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01537-17>
- Mejia-Castillo, T., Hidalgo-Lara, M. E., Brieba, L. G., & Ortega-Lopez, J. (2008). Purification, characterization and modular organization of a cellulose-binding protein, CBP105, a processive β -1,4-endoglucanase from *Cellulomonas flavigena*. *Biotechnology Letters*, *30*(4). <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9589-x>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3). <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

- Ortega, N., De Diego, S., Perez-Mateos, M., & Busto, M. D. (2004). Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, *88*(2). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.035>
- Pace, C. N. (1992). Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *Journal of Molecular Biology*, *226*(1). [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90121-Y](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90121-Y)
- Pang, H., Zhang, P., Duan, C. J., Mo, X. C., Tang, J. L., & Feng, J. X. (2009). Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase. *Current Microbiology*, *58*(4). <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9346-y>
- Pastor, F. I. J., Pujol, X., Blanco, A., Vidal, T., Torres, A. L., & Díaz, P. (2001). Molecular cloning and characterization of a multidomain endoglucanase from *Paenibacillus* sp BP-23: Evaluation of its performance in pulp refining. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *55*(1). <https://doi.org/10.1007/s002530000470>
- Pathak, P., Bhardwaj, N. K., & Singh, A. K. (2010). Enzymatic deinking of office waste paper: An overview. In *IPPTA: Quarterly Journal of Indian Pulp and Paper Technical Association* (Vol. 22, Issue 2).
- Petkun, S., Grinberg, I. R., Lamed, R., Jindou, S., Burstein, T., Yaniv, O., Shoham, Y., Shimon, L. J. W., Bayer, E. A., & Frolow, F. (2015). Reassembly and co-crystallization of a family 9 processive endoglucanase from its component parts: Structural and functional significance of the intermodular linker. *PeerJ*, *2015*(9). <https://doi.org/10.7717/peerj.1126>
- Petkun, S., Jindou, S., Shimon, L. J. W., Rosenheck, S., Bayer, E. A., Lamed, R., & Frolow, F. (2010). Structure of a family 3b' carbohydrate-binding module from the Cel9V glycoside hydrolase from *Clostridium thermocellum*: Structural diversity and implications for carbohydrate binding. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *66*(1). <https://doi.org/10.1107/S0907444909043030>
- Phitsuwan, P., Lee, S., San, T., & Ratanakhanokchai, K. (2021). Calkgh9t: A glycoside hydrolase family 9 enzyme from *Clostridium alkalicellulosi*. *Catalysts*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/catal11081011>
- Qi, M., Jun, H. S., & Forsberg, C. W. (2007). Characterization and synergistic interactions of *Fibrobacter succinogenes* glycoside hydrolases. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01037-07>
- Quinlan, R. J., Sweeney, M. D., Lo Leggio, L., Otten, H., Poulsen, J. C. N., Johansen, K. S., Krogh, K. B. R. M., Jørgensen, C. I., Tovborg, M., Anthonsen, A., Tryfona, T., Walter, C. P., Dupree, P., Xu, F., Davies, G. J., & Walton, P. H. (2011). Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(37). <https://doi.org/10.1073/pnas.1105776108>
- Rahman, M. S., Fernando, S., Ross, B., Wu, J., & Qin, W. (2018). Endoglucanase (eg) activity assays. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1796). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7877-9_13

- Ravachol, J., Borne, R., Tardif, C., De Philip, P., & Fierobe, H. P. (2014). Characterization of all family-9 glycoside hydrolases synthesized by the cellulosome-producing bacterium *Clostridium cellulolyticum*. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(11). <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545046>
- REESE, E. T., SIU, R. G., & LEVINSON, H. S. (1950). The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, *59*(4). <https://doi.org/10.1128/jb.59.4.485-497.1950>
- Sade, Y. B., Gonçalves, C. S., Scapin, S. M. N., Pinheiro, G. L., Flatschart, R. B., de Souza, W., Heise, N., & de Alcantara Machado, E. (2022). Identification and Characterization of a Glycoside Hydrolase Family 9 Member from the Digestive Gland of the Snail *Achatina fulica*. *Bioenergy Research*, *15*(1). <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10303-2>
- Sahin, S., Ozmen, I., & Biyik, H. (2016). Industrial applications of endoglucanase obtained from novel and native *Trichoderma atroviride*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, *30*(2). <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2130>
- Saldarriaga-Hernández, S., Velasco-Ayala, C., Leal-Isla Flores, P., de Jesús Rostro-Alanis, M., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H. M. N., & Carrillo-Nieves, D. (2020). Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 161). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.047>
- Sarkar, J., Chakraborty, B., & Chakraborty, U. (2018). Plant Growth Promoting Rhizobacteria Protect Wheat Plants Against Temperature Stress Through Antioxidant Signalling and Reducing Chloroplast and Membrane Injury. *Journal of Plant Growth Regulation*, *37*(4). <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9789-8>
- Satomi, M., La Duc, M. T., & Venkateswaran, K. (2006). *Bacillus safensis* sp.nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(8). <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64189-0>
- Shimon, L. J. W., Pagès, S., Belaich, A., Belaich, J. P., Bayer, E. A., Lamed, R., Shoham, Y., & Frolow, F. (2000). Structure of a family IIIa scaffoldin CBD from the cellulosome of *Clostridium cellulolyticum* at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *56*(12). <https://doi.org/10.1107/S0907444900012889>
- Simmons, B. A., Loque, D., & Blanch, H. W. (2008). Next-generation biomass feedstocks for biofuel production. *Genome Biology*, *9*(12). <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-12-242>
- Singh, S., Singh, V. K., Aamir, M., Dubey, M. K., Patel, J. S., Upadhyay, R. S., & Gupta, V. K. (2016). Cellulase in Pulp and Paper Industry. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00013-7>

- Soni, S. K., Sharma, A., & Soni, R. (2018). Cellulases: Role in lignocellulosic biomass utilization. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1796).
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7877-9_1
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1). [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Tabil, L., Adapa, P., & Kashaninej, M. (2011). Biomass Feedstock Pre-Processing – Part 2: Densification. In *Biofuel's Engineering Process Technology*.
<https://doi.org/10.5772/18495>
- Tormo, J., Lamed, R., Chirino, A. J., Morag, E., Bayer, E. A., Shoham, Y., & Steitz, T. A. (1996). Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: A general mechanism for attachment to cellulose. *EMBO Journal*, 15(21).
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00960.x>
- Turner, P., Mamo, G., & Karlsson, E. N. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*, 6.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-9>
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Van Aalten, D. M. F., Synstad, B., & Eijsink, V. G. H. (2005). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(31).
<https://doi.org/10.1074/jbc.M504468200>
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørli, M., & Eijsink, V. G. H. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*, 330(6001). <https://doi.org/10.1126/science.1192231>
- Wahla, A. Q., Iqbal, S., Anwar, S., Firdous, S., & Mueller, J. A. (2019). Optimizing the metribuzin degrading potential of a novel bacterial consortium based on Taguchi design of experiment. *Journal of Hazardous Materials*, 366.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.054>
- Wang, D., Li, Y., Zheng, Y., & Hsieh, Y. S. Y. (2021). Recent Advances in Screening Methods for the Functional Investigation of Lytic Polysaccharide Monoxygenases. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 9).
<https://doi.org/10.3389/fchem.2021.653754>
- Wu, T., Xu, J., Liu, J., Guo, W. H., Li, X. Bin, Xia, J. B., Xie, W. J., Yao, Z. G., Zhang, Y. M., & Wang, R. Q. (2019). Characterization and initial application of endophytic *Bacillus safensis* strain ZY16 for improving phytoremediation of oil-contaminated saline soils. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00991>
- Yennamalli, R. M., Rader, A. J., Kenny, A. J., Wolt, J. D., & Sen, T. Z. (2013). Endoglucanases: Insights into thermostability for biofuel applications. In *Biotechnology for Biofuels* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-136>
- Zhang, F., Chen, J. J., Ren, W. Z., Nie, G. X., Ming, H., Tang, S. K., & Li, W. J. (2011). Cloning, expression and characterization of an alkaline thermostable GH9

endoglucanase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462 T. *Bioresource Technology*, 102(21). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.019>

Zhang, S., Yin, Q. Y., Li, Y. H., Ding, M., Xu, G. J., & Zhao, F. K. (2007). Molecular and biochemical characterization of Ba-EGA, a cellulase secreted by *Bacillus* sp. AC-1 from *Ampullaria crosseans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(6). <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0961-5>

Zhang, X. Z., Sathitsuksanoh, N., & Zhang, Y. H. P. (2010). Glycoside hydrolase family 9 processive endoglucanase from *Clostridium phytofermentans*: Heterologous expression, characterization, and synergy with family 48 cellobiohydrolase. *Bioresource Technology*, 101(14). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.152>

Zhou, W., Irwin, D. C., Escovar-Kousen, J., & Wilson, D. B. (2004). Kinetic studies of *Thermobifida fusca* Cel9A active site mutant enzymes. *Biochemistry*, 43(30). <https://doi.org/10.1021/bi049394n>

Zverlov, V., Mahr, S., Riedel, K., & Bronnenmeier, K. (1998). Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (Cela) from the extreme thermophile "*Anaerocellum thermophilum*" with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains. *Microbiology*, 144(2). <https://doi.org/10.1099/00221287-144-2-457>

Zverlov, V. V., Schantz, N., & Schwarz, W. H. (2005). A major new component in the cellulosome of *Clostridium thermocellum* is a processive endo- β -1,4-glucanase producing cellotetraose. *FEMS Microbiology Letters*, 249(2). <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.037>