



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: Σύνθεση και Ανάπτυξη Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική εργασία

Διερεύνηση συνεργιστικών δράσεων μεταξύ
ημικυτταρινολυτικών ενζύμων για την αποδοτική
αποικοδόμηση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Ευαγγελία – Πηνελόπη Μυλωνά

Επιβλέπων καθηγητής: Ευάγγελος Τόπακας

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2023

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή, κύριου Ευάγγελου Τόπακα, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023. Η ερευνητική εργασία στο σύνολό της αποτέλεσε μία εμπειρία ξεχωριστή και πρωτόγνωρη για εμένα, καθώς μέσω αυτής μου δόθηκε η ευκαιρία να διεξάγω καθημερινά πειράματα σε ένα ζωντανό εργαστήριο, να έρθω σε επαφή με σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης και να αποκομίσω πληθώρα γνώσεων στο πεδίο της Βιοτεχνολογίας. Ολοκληρώνοντας, λοιπόν, τη διαδικασία αυτή, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνεισέφεραν, με τον τρόπο του ο καθένας, στην πραγμάτωσή της.

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ευάγγελο Τόπακα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, εντάσσοντάς με στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας. Με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αντικείμενο, που συγκεντρώνει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας. Παράλληλα, οι συμβουλές και η καθοδήγησή του υπήρξαν καθοριστικές για την απρόσκοπτη υλοποίηση της εργασίας μου.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Χριστίνα Πεντάρη, για την αμέριστη και ειλικρινή βοήθειά της και την απέραντη υπομονή της, καθ' όλη τη διάρκεια υλοποίησης της διπλωματικής εργασίας. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την καθοδήγηση και το ενδιαφέρον της, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε, για όλο τον χρόνο που αφιέρωσε σε εμένα και για την πραγματική της υποστήριξη σε οποιοδήποτε θέμα ανέκυψε, από την αρχή έως το τέλος. Την ευχαριστώ που αναγνώριζε ουσιαδώς και τη δική μου προσπάθεια και συνεισφορά καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου· είναι κάτι που δε θεωρώ δεδομένο και το εκτιμώ βαθύτατα. Η απλόχερη βοήθεια που προσέφερε σε οποιονδήποτε στο εργαστήριο, οι ηθικές της αξίες και η συνολική επαγγελματική της συμπεριφορά δεν μπορούν παρά μόνο να αποτελέσουν παράδειγμα για εμένα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, τα οποία ήταν πάντα πρόθυμα να με βοηθήσουν και να με καθοδηγήσουν εμπράκτως σε ό,τι χρειάστηκα. Η ευκαιρία που μου δόθηκε, να διεξαγάγω τη διπλωματική μου εργασία σε ένα τόσο ζωντανό και δραστήριο περιβάλλον, μετέτρεψε το έργο αυτό από καθαρά επιστημονικό, σε εποικοδομητικό και ευχάριστο για εμένα. Τους ευχαριστώ όλους για το κλίμα που ανέπτυσσαν στο εργαστήριο και για τη θετική ενέργεια που μου μετέδιδαν.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τις επίκουρες καθηγήτριες, κυρίες Διομή Μαμμά και Αιμιλία Πρωτογέρου, για τον χρόνο που διέθεσαν να διαβάσουν τη διπλωματική μου εργασία και για τα χρήσιμα σχόλιά τους επί αυτής.

Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους φίλους μου, που στέκονταν πάντα δίπλα μου· χάρη σε αυτούς, το ταξίδι των φοιτητικών μου χρόνων αποτελεί μοναδική και αξέχαστη εμπειρία για εμένα.

Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες ανήκουν στους γονείς και στην αδερφή μου, για όλη την αληθινή υποστήριξη που μου παρείχαν, όχι μόνο κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Χάρη σε αυτούς, έχω μάθει να μην θεωρώ τίποτα δεδομένο και να προσπαθώ πάντα για το καλύτερο.

Ευαγγελία – Πηνελόπη Μυλωνά

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2023

Περίληψη

Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελεί σημαντική πρώτη ύλη για την ανάπτυξη βιοκαυσίμων και χημικών προϊόντων στα βιοδιυλιστήρια δεύτερης γενιάς, τα οποία προωθούν την εφαρμογή πράσινων διεργασιών, με μία εκ των σημαντικότερων να είναι η ενζυμική υδρόλυση, μέσω της οποίας αξιοποιούνται οι καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων. Η ημικυτταρίνη παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του εύρους εφαρμογών της, αλλά η πολυπλοκότητά της απαιτεί τη συνεργιστική δράση πληθώρας ενζύμων. Υπό αυτό το πρίσμα, η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώθηκε στην αναζήτηση συνεργιστικών σχέσεων μεταξύ ενζύμων, με σκοπό την αποδοτικότερη αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι σχέσεις που αναπτύσσει μία αραβινοφουρανοζιδάση της οικογένειας των γλυκοζιδικών υδρολασών (Glycoside Hydrolases, GH) 43 (*TtAbf43*), ένζυμο που προέρχεται από τον μύκητα *Thermothelomyces thermophilus* και παράχθηκε μέσω ετερόλογης έκφρασης. Μελετήθηκε η δραστικότητα της *TtAbf43* σε πολυμερικά υποστρώματα αραβινοξυλάνης και συγκρίθηκε με αυτήν της αραβινοφουρανοζιδάσης *AnAbf51*, από την οποία εμφανίζει διαφορετική εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Διαπιστώθηκε πως η ενεργότητα αμφότερων των ενζύμων ήταν μεγαλύτερη στη διαλυτή αραβινοξυλάνη σε σχέση με την αδιάλυτη, γεγονός που οφείλεται στις παρεμποδίσεις που υφίστανται από την ύπαρξη φερουλικών οξέων στο δεύτερο υπόστρωμα. Ερευνήθηκε η δράση της ξυλανάσης *TtXyn30A* σε διαλυτή αραβινοξυλάνη, κατόπιν ενζυμικής της προκατεργασίας με τις αραβινοφουρανοζιδάσες και παρατηρήθηκε πως πράγματι απελευθερώθηκε περισσότερη ξυλοβιόζη στο προκατεργασμένο με μία ή και με τις δύο αραβινοφουρανοζιδάσες υπόστρωμα, σε σχέση με το ανεπεξέργαστο. Μάλιστα, η δράση των δύο αραβινοφουρανοζιδασών μαζί είχε πολύ μεγαλύτερο αντίκτυπο στη δράση της *TtXyn30A* σε σχέση με την επίδραση που είχε η καθεμιά μεμονωμένα.

Εξετάστηκε, επιπλέον, η δραστικότητα των αραβινοφουρανοζιδασών και οι συνεργιστικές σχέσεις που αναπτύσσουν με τις ξυλανάσες *TmXyn10*, *AnXyn11* και *TtXyn30A* σε υποστρώματα προκατεργασμένης βιομάζας. Στο πίτυρο σίτου, η απελευθέρωση αραβινόζης από την *TtAbf43* αυξήθηκε κατά 209% όταν έδρασε μαζί με την *TmXyn10*, ενώ η δράση της *AnAbf51* ενισχύθηκε κατά 132% όταν βρέθηκε μαζί με την *TmXyn10*. Από την άλλη, η *TmXyn10* και η *AnAbf51* εμφάνισαν βαθμό συνεργιτισμού ίσο με $1,36 \pm 0,19$ στην απελευθέρωση ξυλοβιόζης, ενώ η *AnXyn11* με την ίδια αραβινοφουρανοζιδάση είχε βαθμό συνεργιτισμού ίσο με $1,57 \pm 0,13$ ως προς την απελευθέρωση του ίδιου σακχάρου. Η *TtXyn30A* συνεργαζόμενη με την *AnAbf51* εμφάνισε βαθμό συνεργιτισμού ίσο με $2,18 \pm 0,19$. Στο πίτυρο καλαμποκιού, η *TtAbf43* απελευθέρωσε 122% περισσότερη αραβινόζη όταν έδρασε μαζί με την *TmXyn10*, ενώ η *AnAbf51* απελευθέρωσε 152% περισσότερη αραβινόζη παρουσία αυτής της ξυλανάσης. Η αμφίδρομη σχέση μεταξύ των ενζύμων ήταν εμφανής και σε αυτό το υπόστρωμα, με τον βαθμό συνεργιτισμού της *TmXyn10*, της *TtAbf43* και της *AnAbf51* ως προς την απελευθέρωση ξυλοβιόζης να ισούται με $5,28 \pm 0,81$. Η *AnXyn11* και η *AnAbf51* εμφάνισαν βαθμό συνεργιτισμού ίσο με $3,87 \pm 0,36$ ως προς την απελευθέρωση ξυλόζης, ενώ η *TtXyn30A* μαζί με τις δύο αραβινοφουρανοζιδάσες εκδήλωσε βαθμό συνεργιτισμού ίσο με $8,55 \pm 1,21$ ως προς την απελευθέρωση ξυλοβιόζης.

Κατόπιν, τα πειράματα επικεντρώθηκαν στις σχέσεις που διαμορφώνονται μεταξύ των αραβινοφουρανοζιδασών και των εστερασών του οξικού οξέος *OCE6* και *TtCE16* σε υδρολύματα πίτυρου σίτου και πίτυρου καλαμποκιού, από τις ξυλανάσες *AnXyn11* και *TmXyn10* αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα

έδειξαν πως η *AnAbf51* παρεμποδίστηκε σε κάποιο βαθμό από την παρουσία των ακετυλιώσεων, ενώ η *TtAbf43* δεν επηρεάστηκε. Η *TtCE16* και η *OCE6* ενδεχομένως εμφανίζουν ενεργότητα σε μονάδες ξυλοπυρανόζης δι-υποκατεστημένες, με αραβινόζη και οξικό οξύ, καθώς στο πίτυρο σίτου η συνδυασμένη δράση των *OCE6-TtCE16* με την *AnAbf51* οδήγησε σε αύξηση στη συγκέντρωση αραβινόζης κατά $21 \pm 4\%$. Στο πίτυρο καλαμποκιού, εκδηλώθηκε σαφής συνεργισμός της *AnAbf51* με την *TtCE16* κατά την απελευθέρωση αραβινόζης (βαθμός συνεργισμού: $1,30 \pm 0,08$).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναδεικνύονται οι συνέργειες που αναπτύσσουν ημικυτταρινολυτικά ένζυμα με διαφορετική ενεργότητα και εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, ενώ αποκαλύπτονται και νέες δυνατότητες κάποιων ενζύμων σχετικά με τον τρόπο δράσης και την ικανότητα πρόσδεσής τους στα υποστρώματα. Ως εκ τούτου, η εργασία διευρύνει τις υπάρχουσες γνώσεις γύρω από τους μηχανισμούς δράσης των ημικυτταρινολυτικών ενζύμων, ενώ παράλληλα αποτελεί αφορμή για περαιτέρω έρευνα στον τομέα αυτόν.

Abstract

Lignocellulosic biomass is an important feedstock for the development of biofuels and chemicals in second-generation biorefineries, which promote the application of green processes, one of the most important being enzymatic hydrolysis, through which the catalytic properties of enzymes are exploited. Hemicellulose is of particular interest due to its wide range of applications, but its complexity requires the synergistic action of a multitude of enzymes. Under this scope, this thesis focused on the search for synergistic relationships between enzymes, in order to more efficiently degrade hemicellulose. Specifically, the relationships developed by an arabinofuranosidase of the family of glycoside hydrolases (Glycoside Hydrolases, GH) 43 (*TtAbf43*), an enzyme derived from the fungus *Thermothelomyces thermophilus* and produced through heterologous expression, were examined. The activity of *TtAbf43* on polymeric arabinoxylan substrates was studied and compared with that of the *AnAbf51* arabinofuranosidase, which exhibits a different substrate specificity. It was found that the activity of both enzymes was greater in the soluble arabinoxylan than in the insoluble one, which is due to the hindrances caused by the presence of ferulic acids in the second substrate. The action of the *TtXyn30A* xylanase on soluble arabinoxylan was investigated, after enzymatic pretreatment with arabinofuranosidases, and it was observed that more xylobiose was indeed released in the substrate pretreated with one or both arabinofuranosidases, compared to the untreated one. In fact, the action of the two arabinofuranosidases together had a much greater impact on the action of *TtXyn30A* than the effect of each one individually.

In addition, the activity of arabinofuranosidases and the synergistic relationships they develop with *TmXyn10*, *AnXyn11* and *TtXyn30A* xylanases in pretreated biomass substrates were examined. In wheat bran, arabinose release from *TtAbf43* was increased by 209% when co-acted with *TmXyn10*, while the activity of *AnAbf51* was enhanced by 132% when co-acted with *TmXyn10*. On the other hand, *TmXyn10* and *AnAbf51* showed a degree of synergism equal to 1.36 ± 0.19 regarding xylobiose release, while *AnXyn11* with the former arabinofuranosidase had a degree of synergism equal to 1.57 ± 0.13 in terms of release of the same sugar. *TtXyn30A* interacting with *AnAbf51* performed a synergy, whose degree equaled to 2.18 ± 0.19 . In corn bran, *TtAbf43* released 122% more arabinose when co-acted with *TmXyn10*, while *AnAbf51* released 152% more arabinose in the presence of this xylanase. The bidirectional relationship between these enzymes was also evident on this substrate, with the degree of synergism of *TmXyn10*, *TtAbf43*, and *AnAbf51* in releasing xylobiose being equal to 5.28 ± 0.81 . *AnXyn11* and *AnAbf51* showed a degree of synergism equal to 3.87 ± 0.36 in terms of xylose release, while *TtXyn30A* together with the two arabinofuranosidases showed a degree of synergism equal to 8.55 ± 1.21 in terms of xylobiose release.

Afterwards, the experiments focused on the relationships formed between the arabinofuranosidases and the acetic acid esterases *OCE6* and *TtCE16* in wheat bran and corn bran hydrolysates, by *AnXyn11* and *TmXyn10* xylanases respectively. The results showed that *AnAbf51* was inhibited to some extent by the presence of acetylations, while *TtAbf43* was not affected. *TtCE16* and *OCE6* possibly show activity on xylopyranose units di-substituted with arabinose and acetic acid, as in wheat bran the combined action of *OCE6-TtCE16* with *AnAbf51* led to an increase in arabinose concentration by $21 \pm 4\%$. In corn bran, *AnAbf51* clearly synergized with *TtCE16* regarding arabinose release (degree of synergism: 1.30 ± 0.08).

In this thesis, the synergies developed by hemicellulolytic enzymes of various functions and properties are highlighted, while new possibilities of some enzymes are revealed regarding their mode of action and their ability to bind to substrates. Therefore, it expands the existing knowledge about the mechanisms of action of hemicellulolytic enzymes, while at the same time it is an occasion for further research in this field.

Πίνακας περιεχομένων

1. Θεωρητικό μέρος.....	16
1.1. Δομή λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.....	16
1.1.1. Κυτταρίνη.....	17
1.1.2. Ημικυτταρίνη	17
1.1.2.1. Ξυλάνη	18
1.1.2.2. Αραβινοξυλάνη.....	19
1.1.3. Λιγνίνη	19
1.2. Δυνατότητες αξιοποίησης της ημικυτταρίνης.....	21
1.2.1. Παραγωγή χημικών προστιθέμενης αξίας	22
1.2.1.1. Φουρφουράλη.....	22
1.2.1.2. Ξυλιτόλη.....	23
1.2.1.3. Βιοιθανόλη	23
1.2.1.4. 2,3-Βουτανοδιόλη.....	24
1.2.2. Αξιοποίηση στη συσκευασία τροφίμων	25
1.2.3. Προοπτικές στη χορήγηση φαρμάκων	25
1.2.3.1. Υδρογέλες	26
1.2.3.2. Νανοσωματίδια ξυλάνης.....	26
1.2.4. Ο ρόλος των ξυλοολιγοσακχαριτών στη φαρμακευτική βιομηχανία	26
1.3. Ενζυμική αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης.....	28
1.3.1. Ξυλανάσες	29
1.3.1.1. Ξυλανάσες των οικογενειών 10 και 11 (GH10, GH11)	29
1.3.1.2. Ξυλανάσες της οικογένειας 30 (GH30).....	30
1.3.2. β-Ξυλοζιδάσες.....	32
1.3.3. Αραβινοφουρανοζιδάσες	32
1.3.3.1. Γλυκοζιδικές υδρολάσες (GH) της οικογένειας 43	33
1.3.4. Γλυκουρονιδάσες.....	34
1.3.5. Υδατανθρακικές εστεράσες (CEs).....	35
1.3.5.1. Εστεράσες του οξικού οξέος (AXEs)	35
1.3.5.2. Εστεράσες του φερουλικού οξέος (FAEs).....	36

1.3.5.3. Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος (GEs)	37
1.3.6. Μηχανισμός κατάλυσης	38
1.4. Συνεργιστική δράση ενζύμων	39
1.4.1. Είδη συνεργιστικού	39
1.4.1.1. Ομοσυνεργισμός	39
1.4.1.2. Ετεροσυνεργισμός	40
1.4.1.3. Αντισυνεργισμός	40
1.4.2. Βαθμός συνεργιστικού	40
1.4.3. Διαδοχικός και ταυτόχρονος συνεργισμός	41
1.5. Σκοπός	42
2. Υλικά και μέθοδοι	43
2.1. Υλικά	43
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια – Αναλώσιμα υλικά	43
2.1.2. Ρυθμιστικά διαλύματα	43
2.1.3. Υποστρώματα	44
2.1.4. Ένζυμα	44
2.1.5. Όργανα και συσκευές	45
2.2. Μέθοδοι	46
2.2.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	46
2.2.2. Χρωματογραφία ανιονεναλλαγής υψηλής απόδοσης (High Performance Anion-Exchange Chromatography, HPAEC)	47
2.2.3. Μέτρηση ολικών αναγωγικών σακχάρων με τη χρήση διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)	47
2.2.4. Προκατεργασία υποστρωμάτων	48
2.2.5. Ετερόλογη έκφραση/παραγωγή της αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TtAbf43</i>	49
2.2.5.1. Παρασκευή τρυβλίων	49
2.2.5.2. Παρασκευή θρεπτικών μέσων και εμβολιασμός προκαλλιιεργειών	50
2.2.5.3. Ανάπτυξη καλλιιεργειών	51
2.2.6. Απομόνωση της αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TtAbf43</i>	52
2.2.6.1. Διήθηση υπό κενό	52

2.2.6.2. Συμπύκνωση με υπερδιήθηση	52
2.2.6.3. Εξισορρόπηση πρωτεϊνικού διαλύματος με διαπίδυση	52
2.2.6.4. Απομόνωση του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (Immobilised Metal Affinity Chromatography – IMAC)	53
2.2.6.5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	54
2.2.6.5.α. Παρασκευή πηκτώματος.....	55
2.2.6.5.β. Προετοιμασία και φόρτωση δειγμάτων.....	56
2.2.6.5.γ. Ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος	57
2.2.6.5.δ. Χρώση του πηκτώματος και εμφάνιση πρωτεϊνικών ζωνών	57
2.2.7. Διερεύνηση συνεργιστικών σχέσεων μεταξύ της <i>TtAbf43</i> και άλλων ημικυτταρινολυτικών ενζύμων.....	58
2.2.7.1. Πολυμερικά υποστρώματα	58
2.2.7.1.α. Διερεύνηση της συνεργιστικής δράσης των <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i>	58
2.2.7.1.β. Επίδραση της προκατεργασίας των υποστρωμάτων στην εξω-δράση της <i>TtXyn30A</i>	58
2.2.7.2. Λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα.....	59
2.2.7.2.α. Διερεύνηση των συνεργιστικών σχέσεων αραβινοφουρανοζιδασών κατά την απευθείας δράση τους στα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα	59
2.2.7.2.β. Διερεύνηση των συνεργιστικών σχέσεων αραβινοφουρανοζιδασών κατά τη δράση τους σε ολιγοσακχαρίτες.....	60
2.2.8. Ανάλυση πρωτεϊνικής δομής με χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων	60
3. Αποτελέσματα	62
3.1. Βιοπληροφορική ανάλυση της αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TtAbf43</i> με χρήση του λογισμικού AlphaFold	62
3.2. Πολυμερικά υποστρώματα αδιάλυτης και διαλυτής αραβινοξυλάνης σίτου	63
3.2.1. Συνδυασμένη δράση των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> για την υδρόλυση πολυμερικών υποστρωμάτων αραβινοξυλάνης.....	63
3.2.2. Επίδραση της ενζυμικής προκατεργασίας του πολυμερούς αραβινοξυλάνης από τις αραβινοφουρανοζιδάσες <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> ως προς την εξω-δράση της ξυλανάσης <i>TtXyn30A</i>	64
3.3. Μελέτη ενζυμικών δράσεων σε προκατεργασμένα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα.....	65
3.3.1. Πίτυρο σίτου	65

3.3.1.1. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> σε συνδυασμό με την ξυλανάση <i>TmXyn10</i>	65
3.3.1.2. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> σε συνδυασμό με την ξυλανάση <i>AnXyn11</i>	67
3.3.1.3. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> σε συνδυασμό με την ξυλανάση <i>TtXyn30A</i>	68
3.3.2. Πίτυρο καλαμποκιού	70
3.3.2.1. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> σε συνδυασμό με την ξυλανάση <i>TmXyn10</i>	70
3.3.2.2. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> σε συνδυασμό με την ξυλανάση <i>AnXyn11</i>	72
3.3.2.3. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> σε συνδυασμό με την ξυλανάση <i>TtXyn30A</i>	73
3.4. Επίδραση των εστερασών του οξικού οξέος <i>OCE6</i> και <i>TtCE16</i> κατά την υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων.....	75
3.4.1. Μελέτη ενζυμικών δράσεων σε πίτυρο σίτου	75
3.4.2. Μελέτη ενζυμικών δράσεων σε πίτυρο καλαμποκιού.....	76
4. Συζήτηση αποτελεσμάτων – συμπεράσματα.....	78
4.1. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> σε πολυμερικά υποστρώματα αραβινοξυλάνης	78
4.2. Επίδραση της ενζυμικής προκατεργασίας του πολυμερούς αραβινοξυλάνης από τις αραβινοφουρανοζιδάσες <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> ως προς την εξω-δράση της ξυλανάσης <i>TtXyn30A</i>	78
4.3. Σύγκριση της δράσης των ημικυτταρινολυτικών ενζύμων και των σχέσεων που αναπτύσσουν στα περίπλοκα υποστρώματα βιομάζας	80
4.4. Επίδραση των εστερασών του οξικού οξέος κατά την υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων.....	82
5. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	84
6. Βιβλιογραφία.....	85
7. Παράρτημα	98
7.1. Χρωματογραφήματα της ανάλυσης περίπλοκων υποστρωμάτων βιομάζας στην ΗΡΑΕC.....	98
7.2. Διαγράμματα από τον αλγόριθμο AlphaFold.....	101
7.3. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>HiAXH43</i>	103

Κατάλογος σχημάτων

Σχήμα 1. Απεικόνιση της οργάνωσης της δομής του κυτταρικού τοιχώματος (Menon and Rao 2012).	16
Σχήμα 2. Δομή κυτταρίνης. Τα μόρια γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς και είναι περιστρεφμένα εναλλάξ κατά 180°, κάνοντας την κελλοβιόζη την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα. Οι δια- και ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου οδηγούν στον σχηματισμό μικροϊνών κυτταρίνης (Χίρος, Τορακάς, and Christakopoulos 2013).....	17
Σχήμα 3. Οι κύριες δομές ετεροξυλανών, καθώς και κατηγορίες ενζύμων που δρουν στους ανάλογους δεσμούς. α) γλυκουρονοξυλάνη, b) αραβινοξυλάνη, c) αραβινογλυκουρονοξυλάνη (Vuong and Master 2022). Οι απεικονίσεις βασίζονται στο σύστημα «Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG)» [1].	20
Σχήμα 4. Δομή της λιγνίνης. Οι βασικές δομικές της μονάδες (μονολιγνόλες) είναι χρωματισμένες: σιναρυλική αλκοόλη (sinaryl alcohol): κόκκινο, κωνοφερυλική αλκοόλη (coniferyl alcohol): πράσινο, <i>p</i> -κουμαρυλική αλκοόλη (<i>p</i> -coumaryl alcohol): μπλε (Karunarathna and Smith 2020).....	21
Σχήμα 5. Δυνατότητες βιομηχανικής αξιοποίησης της ημικυτταρίνης (Naidu, Hlangothi, and John 2018).	22
Σχήμα 6. Συνθετική οδός της φουρφουράλης από ξυλάνη. Γκρι πλαίσιο: προτεινόμενος μηχανισμός της όξινης κατάλυσης της ξυλόζης (Binder et al. 2010).....	23
Σχήμα 7. Απεικόνιση της δομής της ξυλάνης. Η κύρια αλυσίδα αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες β-D-ξυλοπυρανόζης, κάποιες εκ των οποίων ακετυλιωμένες ή υποκατεστημένες με γλυκουρονικό οξύ και αραβινόζη. Με διαφορετικό χρώμα υποδεικνύονται οι διαφορετικοί δεσμοί (ροζ: β-1,4-, κόκκινο: α-1,3-, μπλε: α-1,2-γλυκοζιδικό δεσμοί, πράσινο: εστερικός δεσμός μεταξύ της πρωτοταγούς αλκοόλης του C3 της ξυλοπυρανόζης και του οξικού οξέος και καφέ: εστερικός δεσμός μεταξύ της καρβοξυλομάδας φερουλικού ή <i>p</i> -κουμαρικού οξέος και της πρωτοταγούς αλκοόλης του C5 της αραβινόζης της πλευρικής αλυσίδας των αραβινοξυλανών). Με το αντίστοιχο χρώμα αναφέρεται και το είδος ενζύμου που τους διασπά (Rohman et al. 2019).	29
Σχήμα 8. Ενζυμική διάσπαση γλυκουρονοξυλάνης από ξυλανάσες των οικογενειών GH10 και GH11. Με μπλε βέλη υποδεικνύονται τα σημεία δράσης των ξυλανασών GH10 και με πράσινα τα σημεία δράσης των ξυλανασών GH11. Τα προϊόντα της διάσπασης μπορεί να είναι ουδέτερα ή όξινα, με τα όξινα (αλδουρονικά οξέα) να υδρολύονται σε μονοσακχαρίτες από τη β-ξυλοζιδάση και τις α-γλυκουρονιδάσες των οικογενειών GH67 και GH115 (Biely et al. 2016).....	30
Σχήμα 9. Ενζυμική διάσπαση γλυκουρονοξυλάνης από GH30 ξυλανάσες. Τα προϊόντα της διάσπασης είναι αλδουρονικά οξέα με μία μη υποκατεστημένη ξυλόζη στο αναγωγικό τους άκρο. Τα αλδουρονικά οξέα στη συνέχεια υδρολύονται από τη β-ξυλοζιδάση και τις α-γλυκουρονιδάσες των οικογενειών GH67 και GH115 (Biely et al. 2016).	32
Σχήμα 10. Συνολική ανασκόπηση της αποικοδόμησης της αραβινοξυλάνης. Τα βέλη υποδεικνύουν σημεία διάσπασης από τις εκάστοτε οικογένειες ενζύμων (Lagaert et al. 2014).....	34
Σχήμα 11. Αποακετυλίωση γλυκουρονοξυλάνης από εστεράσες των οικογενειών CE1, 4, 5, 6 και 16. Οι εστεράσες δεν αποακετυλιώνουν μονάδες ξυλοπυρανόζης υποκατεστημένες με γλυκουρονικό οξύ και	

αντίστοιχα οι α-γλυκουρονοζιδάσες απομακρύνουν το γλυκουρονικό οξύ από μη ακετυλιωμένες ξυλοπυρανόζες. Μετά την αποακετυλίωση, οι ξυλανάσες των οικογενειών GH10 και GH11 διασπούν την γλυκουρονοξυλάνη σε ολιγομερή (Biely et al. 2016).....	36
Σχήμα 12. Απεικόνιση αραβινοξυλάνης, διασυνδεδεμένης με διμερή φερουλικού οξέος (ferulic acid dehydrodimers). i: Φερουλικό οξύ εστεροποιημένο σε μόριο αραβινόζης και θέση δράσης της εστεράσης, ii: 8-5' δι-φερουλικό οξύ, με μορφή βενζοφουρανίου (benzofuran form), iii: 8-8' δι-φερουλικό οξύ, iv: 8-8' δι-φερουλικό οξύ, με μορφή αρυλτετραλίνης (aryltetralin form), v: 8-O-4' δι-φερουλικό οξύ, vi: 5-5' δι-φερουλικό οξύ και vii: 8-5' δι-φερουλικό οξύ (Oliveira et al. 2019).....	37
Σχήμα 13. Δομή ενός φυσικού συμπλέγματος λιγνίνης – υδατανθράκων, που αποτελεί υπόστρωμα για τις εστεράσες του γλυκουρονικού. Το μπλε βέλος υποδεικνύει τον εστερικό δεσμό μεταξύ των δύο πολυμερών: ακετυλιωμένης γλυκουρονοξυλάνης, υποκατεστημένης με 4-O-μεθυλ-γλυκουροούλιο και λιγνίνης. Το 4-O-γλυκουροούλιο σχηματίζει εστερικό δεσμό με τη γ-αλκοόλη της λιγνίνης. Κάθε μονάδα ξυλοπυρανόζης ονομάζεται X και αυτή που είναι υποκατεστημένη με το 4-O-γλυκουροούλιο ονομάζεται U ^{m4} (Ernst et al. 2020).....	38
Σχήμα 14. Οι δύο μηχανισμοί κατάλυσης. (a) Μηχανισμός διατήρησης· το πυρηνόφιλο και ο καταλύτης όξινου/βασικού χαρακτήρα συμβολίζονται με B ⁻ και AH αντίστοιχα. (b) Μηχανισμός αναστροφής· ο βασικός και ο όξινος καταλύτης συμβολίζονται με B ⁻ και AB αντίστοιχα. Οι συνήθειες αποστάσεις των υπολειμμάτων της κατάλυσης και στους δύο μηχανισμούς δίνονται σε Å. Στις περισσότερες γλυκοζιδικές υδρολάσες, τα A και B είναι ασπαραγίνη (Asp) ή γλουταμινικό οξύ (Glu) (Rohman et al. 2019).....	39
Σχήμα 15. Σχηματική απεικόνιση του συστήματος HPLC (Czarlicki 2013).	46
Σχήμα 16. Οξειδοαναγωγική αντίδραση DNS. Το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ (κίτρινο χρώμα) ανάγεται από την αλδεϋδο-ομάδα του αναγωγικού σακχάρου σε 3-αμινο-5-σαλικυλικό οξύ (βαθύ πορτοκαλί – κόκκινο χρώμα) (Hu et al. 2008).....	48
Σχήμα 17. Μηχανισμός λειτουργίας εξισορρόπησης με διαπίδυση (dialysis) [4].	53
Σχήμα 18. Διάταξη του συστήματος SDS-PAGE [5].....	56
Σχήμα 19. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης διαλύματος πρότυπων πρωτεϊνών BlueStar Prestained Protein Marker [6].	57
Σχήμα 20. Τρισδιάστατη δομή της TtAbf43, όπως αυτή προβλέφθηκε από το λογισμικό AlphaFold και απεικονίστηκε στο περιβάλλον Chimera. Με κόκκινο σημειώνονται τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης: D116, D241, E289.	62
Σχήμα 21. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της ξυλοβιόζης που απελευθερώθηκε κατά την πέψη πολυμερικού υποστρώματος διαλυτής αραβινοξυλάνης σίτου με την ξυλανάση TtXyn30A και τις αραβινοφουρανοζιδάσες TtAbf43 και AnAbf51. Τα αποσιωπητικά δηλώνουν διαδοχική δράση και η παύλα ταυτόχρονη.	64

Σχήμα 22. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης, της ξυλόζης και της ξυλοβιόζης που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του πίτυρου σίτου με <i>TtAbf43</i> , <i>AnAbf51</i> , <i>TmXyn10</i> , καθώς και συνδυασμούς τους.....	65
Σχήμα 23. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης, της ξυλόζης, της ξυλοβιόζης και της ξυλοτριόζης που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του πίτυρου σίτου με την <i>AnXyn11</i> και συνδυασμούς των <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i>	67
Σχήμα 24. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης, της ξυλόζης και της ξυλοβιόζης που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του πίτυρου σίτου με την <i>TtXyn30A</i> και συνδυασμούς των <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i>	68
Σχήμα 25. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης, της ξυλόζης, της ξυλοβιόζης και της ξυλοτριόζης που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του πίτυρου καλαμποκιού με <i>TtAbf43</i> , <i>AnAbf51</i> και <i>TmXyn10</i> , καθώς και συνδυασμούς τους.....	70
Σχήμα 26. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης, της ξυλόζης και της ξυλοβιόζης που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του υποστρώματος CB με <i>TtAbf43</i> , <i>AnAbf51</i> και <i>AnXyn11</i> , καθώς και συνδυασμούς τους.	72
Σχήμα 27. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης και της ξυλοβιόζης που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του υποστρώματος CB με <i>TtAbf43</i> , <i>AnAbf51</i> και <i>TtXyn30A</i> , καθώς και συνδυασμούς τους.	73
Σχήμα 28. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης του αλδοτριουρονικού και του αλδοτετραουρονικού οξέος που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του πίτυρου καλαμποκιού με <i>TtXyn30A</i> και συνδυασμούς των <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i>	74
Σχήμα 29. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης που απελευθερώθηκε κατά την πέψη του υδρολύματος πίτυρου σίτου με <i>TtAbf43</i> , <i>AnAbf51</i> , <i>OCE6</i> , <i>TtCE16</i> και συνδυασμούς τους. Το υδρόλυμα έχει προκύψει ύστερα από πέψη του υποστρώματος με <i>AnXyn11</i>	75
Σχήμα 30. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης που απελευθερώθηκε κατά την πέψη του υδρολύματος πίτυρου καλαμποκιού με <i>TtAbf43</i> , <i>AnAbf51</i> , <i>OCE6</i> , <i>TtCE16</i> και συνδυασμούς τους. Το υδρόλυμα έχει προκύψει ύστερα από πέψη του υποστρώματος με <i>TmXyn10</i> . .	77
Σχήμα 31. Χρωματογραφήματα ΗΡΑΕC των ενζυμικών δράσεων των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> και της ξυλανάσης <i>TmXyn10</i> σε πίτυρο σίτου.....	98
Σχήμα 32. Χρωματογραφήματα ΗΡΑΕC των ενζυμικών δράσεων των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> και της ξυλανάσης <i>AnXyn11</i> σε πίτυρο σίτου.	98
Σχήμα 33. Χρωματογραφήματα ΗΡΑΕC των ενζυμικών δράσεων των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> και της ξυλανάσης <i>TtXyn30A</i> σε πίτυρο σίτου.	99
Σχήμα 34. Χρωματογραφήματα ΗΡΑΕC των ενζυμικών δράσεων των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> και της ξυλανάσης <i>TmXyn10</i> σε πίτυρο καλαμποκιού.....	99
Σχήμα 35. Χρωματογραφήματα ΗΡΑΕC των ενζυμικών δράσεων των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> και της ξυλανάσης <i>AnXyn11</i> σε πίτυρο καλαμποκιού.....	100

Σχήμα 36. Χρωματογραφήματα ΗΡΑΕC των ενζυμικών δράσεων των αραβινοφουρανοζιδασών <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> και της ξυλανάσης <i>TtXyn30A</i> σε πίτυρο καλαμποκιού.	100
Σχήμα 37. Τρισδιάστατη απεικόνιση του 5 ^{ου} μοντέλου του AlphaFold. Στα αριστερά, το μοντέλο είναι χρωματισμένο με κατεύθυνση από το αμινοτελικό (μπλε) προς το καρβοξυτελικό (κόκκινο) άκρο. Στα δεξιά, είναι χρωματισμένο βάσει του δείκτη rLDDT: κόκκινο χρώμα υποδεικνύει χαμηλή αξιοπιστία και μπλε υψηλή. Επάνω, αναγράφονται οι δείκτες rLDDT και pTMscore του μοντέλου.	101
Σχήμα 38. Ποσοστό IDDT συναρτίζει τον θέσεων των αμινοξέων κατά την πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής της <i>TtAbf43</i>	101
Σχήμα 39. Σφάλμα προβλεπόμενης ευθυγράμμισης (PAE) αναλόγως των θέσεων των αμινοξέων, κατά την πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής της <i>TtAbf43</i>	102
Σχήμα 40. Αριθμός αλληλουχιών συναρτίζει των θέσεων των αμινοξέων της <i>TtAbf43</i>	102
Σχήμα 41. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών (sequence alignment) των αραβινοφουρανοζιδασών <i>HiAXH43</i> (1) και <i>TtAbf43</i> (2). Οι αστερίσκοι αντιστοιχούν στα όμοια ζεύγη. Με κίτρινο σημειώνονται τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου των ενζύμων.	103

Κατάλογος πινάκων

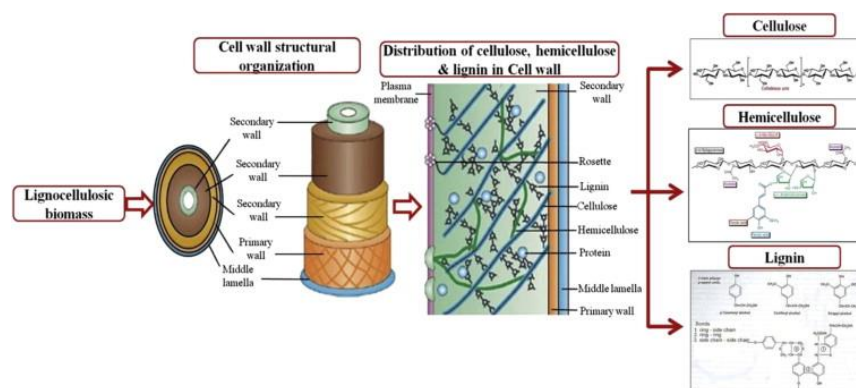
Πίνακας 1. Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων.....	43
Πίνακας 2. Σύσταση θρεπτικού μέσου YPD.....	50
Πίνακας 3. Σύσταση θρεπτικών μέσων BMGY και BMMY για τις προκαλλιέργειες και τις καλλιέργειες του <i>P. pastoris</i>	50
Πίνακας 4. Σύσταση των πηκτωμάτων διαχωρισμού και επιστοίβασης για την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.....	55
Πίνακας 5. Σύσταση των διαλυμάτων χρώσης και αποχρωματισμού του πηκτώματος SDS-PAGE.	57
Πίνακας 6. Σύγκριση δράσης <i>TtAbf43</i> και <i>AnAbf51</i> , σε πολυμερικά υποστρώματα αδιάλυτης και διαλυτής αραβινοξυλάνης σίτου. Οι μέσοι όροι και τα σφάλματα έχουν προκύψει ως αποτελέσματα διπλών μετρήσεων. Η παύλα μεταξύ των ενζύμων υποδεικνύει ταυτόχρονη δράση.	63
Πίνακας 7. Συγκεντρωτικός πίνακας των βαθμών συνεργιτισμού ως προς την απελευθέρωση αραβινόζης που επιτεύχθηκε ανά ενζυμικό συνδυασμό στα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα βιομάζας.	80

1. Θεωρητικό μέρος

1.1. Δομή λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Η βιομάζα αποτελεί ένα στερεό μείγμα οργανικών και ανόργανων συστατικών, προέρχεται από φυσικές ή ανθρωπογενείς διαδικασίες και περιλαμβάνει αφ' ενός τα φυσικά συστατικά που προέρχονται από την ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών ή που παράγονται από την πέψη του ζωικού και του ανθρώπινου πληθυσμού, και αφ' ετέρου περιλαμβάνει και παραπροϊόντα που προκύπτουν από την επεξεργασία των παραπάνω φυσικών συστατικών (Vassilev et al. 2010). Βάσει της ποικιλίας και της προέλευσής της, έχουν δημιουργηθεί έξι ομάδες που αφορούν στα είδη της βιομάζας: το ξύλο και η ξυλώδης βιομάζα, η ποώδης βιομάζα και η βιομάζα προερχόμενη από αγροκαλλιέργειες, η υδρόβια βιομάζα, η βιομάζα ζωικής και ανθρώπινης προέλευσης, η βιομάζα προερχόμενη από δημοτικά και βιομηχανικά απόβλητα και, τέλος, μείγματα των παραπάνω κατηγοριών (Vassilev et al. 2010).

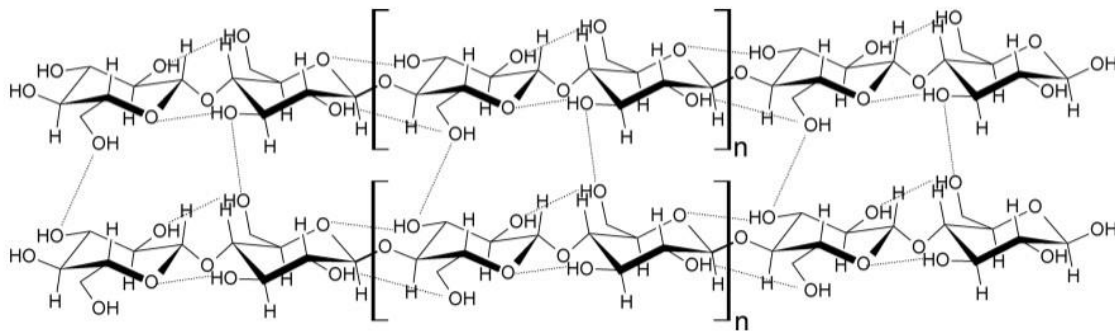
Πρόκειται για μία ανανεώσιμη, φιλική προς το περιβάλλον, άφθονη και χαμηλού κόστους πρώτη ύλη και δύναται να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική πηγή άνθρακα και κατ' επέκταση ως βάση για τον σχεδιασμό βιοδιυλιστηρίων που θα αποσκοπούν στην παραγωγή «πράσινων» καυσίμων και άλλων χημικών προστιθέμενης αξίας (Bajrai 2016). Τα βασικά συστατικά της είναι η κυτταρίνη (30% - 60%), η ημικυτταρίνη (20% - 40%) και η λιγνίνη (10% - 25%), με την περιεκτικότητα της βιομάζας σε καθένα από τα πολυμερή να ποικίλλει αναλόγως της προέλευσής της. Περίπου το 90% της ξηρής λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας αποτελείται από αυτά τα τρία πολυμερή, ενώ το υπόλοιπο 10% συνίσταται από τέφρα και άλλα πρόσθετα υλικά (Kumar, Gautam, and Dutt 2016). Η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη συνδέονται μεταξύ τους με αρωματικούς εστέρες (σύνδεση ημικυτταρίνης – λιγνίνης) και δεσμούς υδρογόνου (σύνδεση ημικυτταρίνης – κυτταρίνης), προσδίδοντας έτσι στη βιομάζα σταθερότητα και ελαστικότητα (Nanda et al. 2015). Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται η δομή του κυτταρικού τοιχώματος ενός φυτικού κυττάρου και φαίνεται πώς αυτά τα τρία πολυμερή διασυνδέονται. Το πρωτεύον και το δευτερεύον κυτταρικό τοίχωμα (primary wall – PW και secondary wall – SW αντίστοιχα) αποτελούν τα δύο κύρια τμήματα στα οποία χωρίζεται το κυτταρικό τοίχωμα· η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη κατανέμονται διαφορετικά σε καθένα από αυτά τα στρώματα. Το δευτερεύον τοίχωμα αποτελείται από τρία μέρη (SW1, SW2 και SW3), με το SW2 να είναι συνήθως παχύτερο από τα άλλα και να περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα της συνολικής κυτταρίνης. Το μεσαίο έλασμα, που συνδέει τα γειτονικά κύτταρα αποτελείται σχεδόν εξ ολοκλήρου από λιγνίνη (Menon and Rao 2012).



Σχήμα 1. Απεικόνιση της οργάνωσης της δομής του κυτταρικού τοιχώματος (Menon and Rao 2012).

1.1.1. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι ένας γραμμικός ομοπολυσακχαρίτης, αποτελούμενος από μονάδες D-γλυκόζης, συνδεδεμένων με β-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς, με μέσο μοριακό βάρος περίπου 100.000 Da (Thara et al. 2020). Η επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα είναι το διμερές γλυκόζης, η κελλοβιόζη, διότι το κάθε μόριο γλυκόζης είναι περιστραμμένο κατά 180° σε σχέση με τα γειτονικά του. Αυτή η περιστροφή προσδίδει στην κυτταρίνη εξαιρετικά συμμετρική μορφή, αφού κάθε πλευρά της αλυσίδας έχει ίδιο αριθμό υδροξυλομάδων (Zhang and Lynd 2004) (Σχήμα 2). Οι κυτταρινικές αλυσίδες συνδέονται ενδομοριακά και διαμοριακά με δεσμούς υδρογόνου, ευθυγραμμίζοντας το μόριο και προσφέροντάς του ακαμψία και σταθερότητα στον χώρο. Η σύνδεση των αλυσίδων με δεσμούς υδρογόνου οδηγεί στη δημιουργία μικροϊνιδίων κυτταρίνης, τα οποία στη συνέχεια συσσωματώνονται και σχηματίζουν ίνες κυτταρίνης (Kumar et al. 2016; Liu et al. 2019; Thara et al. 2020). Οι δεσμοί υδρογόνου ευθύνονται, επίσης, για την κρυσταλλική μορφή της κυτταρίνης, η οποία ωστόσο διακόπτεται από άμορφες, μη κρυσταλλικές περιοχές. Η κυτταρίνη φυσικής προέλευσης παρουσιάζει υψηλό βαθμό πολυμερισμού· ενδεικτικά, ο βαθμός πολυμερισμού του ξύλου μπορεί να κυμανθεί από 5.000 έως και πάνω από 10.000, ενώ του βαμβακιού είναι υψηλότερος από 10.000 (Anwar, Gulfray, and Irshad 2014; Zhang and Lynd 2004). Ακόμη, το υψηλό μοριακό βάρος και η διατεταγμένη τριτοταγής δομή καθιστούν την κυτταρίνη αδιάλυτη στο νερό, αλλά και ανθεκτική στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες (Menon and Rao 2012). Ο συνδυασμός της ινώδους φύσης και των χαρακτηριστικών της προσφέρουν μηχανική αντοχή και θερμική σταθερότητα στα φυτά, βοηθώντας στη διατήρηση της δομής του κυτταρικού τους τοιχώματος (Thara et al. 2020). Η λιγνίνη και η ημικυτταρίνη βρίσκονται στον χώρο μεταξύ των ινιδίων κυτταρίνης στο πρωτογενές και στο δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα και στα ενδιάμεσα ελάσματα (Kumar et al. 2016).



Σχήμα 2. Δομή κυτταρίνης. Τα μόρια γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς και είναι περιστρεφμένα εναλλάξ κατά 180°, κάνοντας την κελλοβιόζη την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα. Οι δια- και ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου οδηγούν στον σχηματισμό μικροϊνών κυτταρίνης (Χίρος, Τορράκας, and Christakopoulos 2013).

1.1.2. Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη είναι ετεροπολυσακχαρίτης, αποτελούμενος από πεντόζες (D-ξυλόζη και L-αραβινόζη) και εξόζες (D-μαννόζη, D-γλυκόζη και D-γαλακτόζη), ενώ στις διακλαδώσεις των αλυσίδων μπορεί να υπάρχουν ουρονικά οξέα (D-γλυκουρονικό, D-γαλακτουρονικό και μεθυλογαλακτουρονικό οξύ) (Kumar et al. 2016). Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η δομή της είναι τυχαία και άμορφη, οπότε έχει χαμηλότερη αντοχή και μπορεί να διασπαστεί ευκολότερα στα μονομερή της απ' ό,τι η κυτταρίνη. Ακόμη,

αποτελείται από μικρότερες αλυσίδες, με μοριακό βάρος χαμηλότερο από 30.000 Da και βαθμό πολυμερισμού περίπου ίσο με 200 (Liu et al. 2019; Nanda et al. 2014). Οι ημικυτταρινικές αλυσίδες παίρνουν την ονομασία τους από το σάκχαρο που κυριαρχεί στην αλυσίδα, οπότε και προκύπτουν οι αλυσίδες ξυλάνης, αραβινάνης, μαννάνης, γλυκάνης και γαλακτάνης αντίστοιχα. Φυσικά, μπορούν να υπάρξουν διάφοροι συνδυασμοί αυτών των σακχάρων σε μία ημικυτταρινική αλυσίδα· οι ξυλογλυκάνες, αποτελούνται από μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα με β -1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς, τα οποία έχουν διακλαδώσεις μορίων ξυλόζης, ενωμένων με α -1,6 γλυκοζιδικούς δεσμούς. Επίσης, οι γαλακτομαννάνες αποτελούνται από μία κύρια αλυσίδα μορίων μαννόζης, με διακλαδώσεις μορίων γλυκόζης συνδεδεμένων με α -1,6 γλυκοζιδικούς δεσμούς. Οι γαλακτογλυκομαννάνες περιέχουν γλυκόζη και μαννόζη στην κύρια αλυσίδα, συνδεδεμένες με β -1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς και διακλαδώσεις γαλακτόζης συνδεδεμένων με α -1,6 γλυκοζιδικούς δεσμούς. Με αντίστοιχο τρόπο σχηματίζονται οι γλυκομαννάνες, οι αραβινογαλακτάνες και οι υπόλοιποι τύποι ημικυτταρινών (Houfani et al. 2020; de Souza and Kawaguti 2021).

Οι ημικυτταρινικές αλυσίδες, παρά την ποικιλία τους, έχουν δομικές ομοιότητες, οι οποίες έγκεινται στην κοινή ισημερινή διαμόρφωση των C1 και C4 των σακχάρων της κύριας αλυσίδας, όπως επίσης και στην ύπαρξη πλευρικών αλυσίδων, αποτελούμενων από οξικό οξύ, πεντόζες, εξαουρονικά οξέα και δεοξυεξόζες, τα οποία ευθύνονται για τη διαλυτότητά τους σε υδατικά και αλκαλικά διαλύματα (Scheller and Ulvskov 2010; de Souza and Kawaguti 2021). Τα ημικυτταρινικά πολυμερή διασυνδέονται συχνά με ομοιοπολικούς δεσμούς και δεσμούς υδρογόνου, ενώ συνδέονται ομοιοπολικά και με τα άλλα δύο συστατικά της βιομάζας (κυτταρίνη, λιγνίνη), συμβάλλοντας στην προστασία της κυτταρίνης από την ενζυμική αποικοδόμησή της (Kumar et al. 2016; Nanda et al. 2015). Η δομή της ημικυτταρίνης είναι θερμικά και χημικά πιο ευαίσθητη και ρόλος της είναι να συνδέει τη λιγνίνη με τις κυτταρινικές ίνες, προσδίδοντας στο συνολικό σύμπλεγμα μεγαλύτερη σταθερότητα, ευελιξία και ελαστικότητα (de Souza and Kawaguti 2021).

1.1.2.1. Ξυλάνη

Η ξυλάνη αποτελεί το κύριο δομικό συστατικό των φυτικών κυττάρων και έπεται της κυτταρίνης σε ό,τι αφορά στην αφθονία (Kumar et al. 2016). Αναλόγως της σύστασής της διακρίνεται σε ομοξυλάνες και ετεροξυλάνες. Οι ομοξυλάνες αποτελούνται από μόρια ξυλόζης συνδεδεμένα γραμμικά, με β -1,4- ή β -1,3-γλυκοζιδικούς δεσμούς ή συνδυασμό τους. Οι ετεροξυλάνες, οι οποίες αποτελούν και τη συνηθέστερη κατηγορία διαθέτουν διακλαδώσεις στην κύρια αλυσίδα τους και κατηγοριοποιούνται εκ νέου βάσει της κύριας διακλάδωσης σε γλυκουρονοξυλάνες, αραβινοξυλάνες, καθώς επίσης και γλυκουρονοαραβινοξυλάνες και αραβινογλυκουρονοξυλάνες, αναλόγως της κυρίαρχης διακλάδωσης. Οι αραβινοξυλάνες διαθέτουν υποκαταστάσεις L-αραβινοφουρανόζης, συνδεδεμένης στον άνθρακα C2 ή C3 της ξυλόζης, ενώ οι γλυκουρονοξυλάνες έχουν το D-γλυκουρονικό οξύ ως υποκαταστάτη, συνδεδεμένο στον άνθρακα C2 της ξυλόζης. Οι γλυκουρονοαραβινοξυλάνες και οι αραβινογλυκουρονοξυλάνες σχηματίζονται παρουσία και των δύο υποκαταστατών. (Malgas et al. 2019; Scheller and Ulvskov 2010). Εκτός της αραβινόζης και του γλυκουρονικού οξέος, τα μόρια της ξυλόζης μπορούν να είναι υποκατεστημένα με 4-O-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ ή να είναι ακετυλιωμένα. Το είδος και το πλήθος υποκαταστάσεων ποικίλλει ανάλογα με το είδος του φυτού, ακόμα και με τον εκάστοτε κυτταρικό ιστό: για παράδειγμα, στα δικοτυλήδονα φυτά η ξυλάνη κυριαρχεί στο δευτερεύον κυτταρικό

τοίχωμα, ενώ στο πρωτεύον υπάρχει σε μικρή ποσότητα. Η ξυλάνη επικαλύπτει τα ινίδια κυτταρίνης και τα συνδέει, με δεσμούς υδρογόνου, μεταξύ τους ή με άλλα πολυμερή, ενώ επίσης μπορεί να συνδεθεί ομοιοπολικά με τη λιγνίνη: μεταξύ λιγνίνης και γλυκουρονικού οξέος μπορούν να σχηματιστούν εστερικοί δεσμοί, ενώ μεταξύ λιγνίνης και ξυλόζης ή αραβινόζης μπορούν να σχηματιστούν αιθερικοί δεσμοί (Rennie and Scheller 2014). Οι κυριότερες ετεροξυλάνες παρουσιάζονται στο [Σχήμα 3](#).

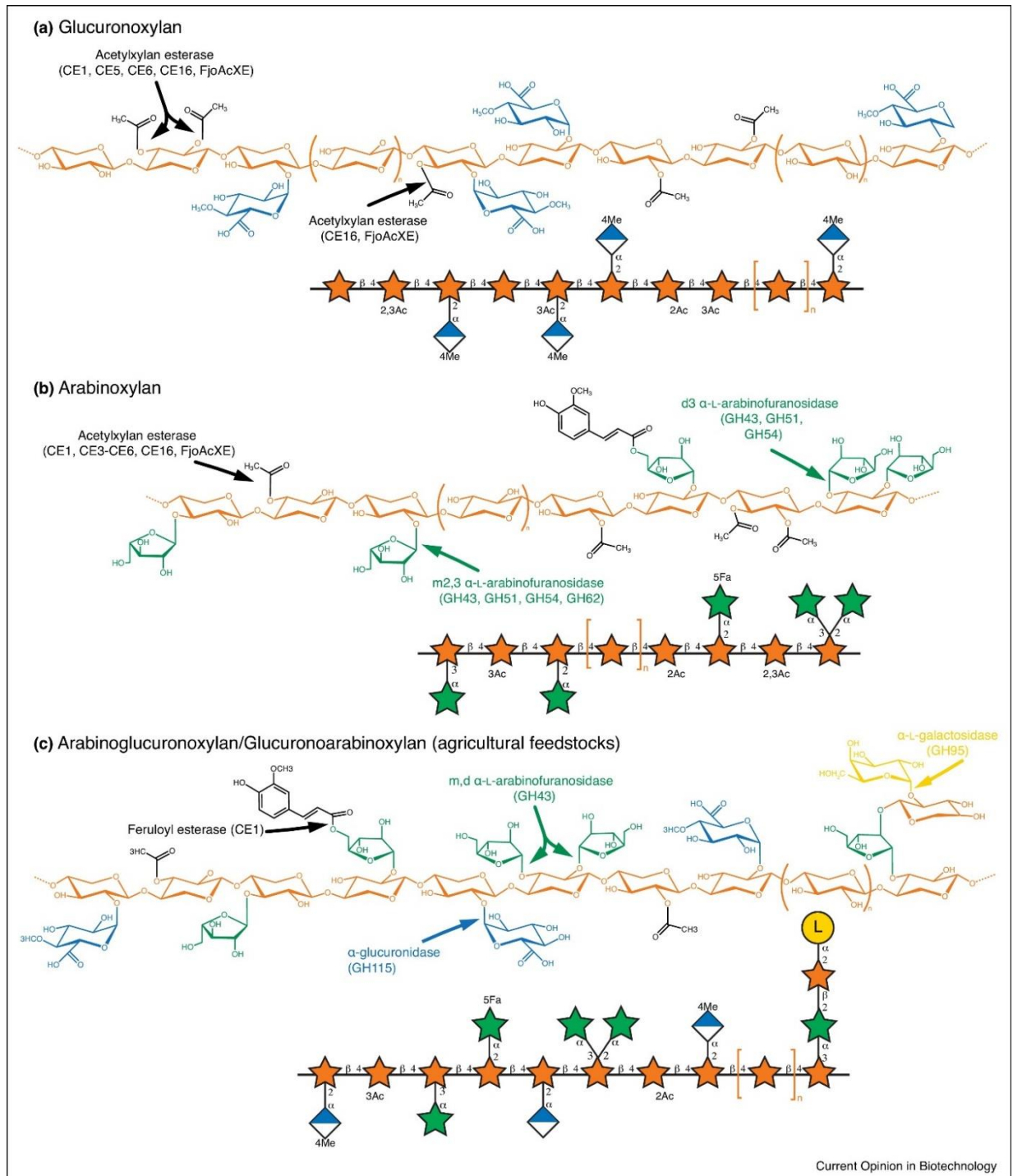
1.1.2.2. Αραβινοξυλάνη

Οι αραβινοξυλάνες προέρχονται κυρίως από δημητριακά (καλαμπόκι, σίκαλη, ρύζι, κριθάρι, βρώμη, σιτάρι) και άλλα φυτά, όπως η μπανάνα, ενώ έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας της δομής των κυτταρικών τοιχωμάτων (Chen et al. 2019). Όπως προαναφέρθηκε, η κύρια αλυσίδα της αραβινοξυλάνης αποτελείται από μονάδες ξυλοπυρανοζυλίου συνδεδεμένες με β-1,4-γλυκοζιδικούς δεσμούς και κάποιες εξ αυτών υποκατεστημένες με μόρια L-αραβινοφουρανόζης στον C2 και/ή στον C3 του φουρανικού δακτυλίου (He et al. 2021). Κάποιες αραβινόζες μάλιστα μπορεί να είναι και οι ίδιες υποκατεστημένες με φερουλικό οξύ (Grootaert et al. 2007). Η αναλογία αραβινόζης/ξυλόζης, δηλαδή ο βαθμός υποκατάστασης, διαφέρει αναλόγως της προέλευσης της αραβινοξυλάνης και φυσικά επηρεάζει τη μοριακή δομή της. Χαμηλός βαθμός υποκατάστασης συνεπάγεται τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μη υποκατεστημένων τμημάτων της ξυλάνης, οπότε και τον σχηματισμό συσσωματωμένων δομών, άρα και τη μείωση της διαλυτότητας του μορίου. (Chen et al. 2019; Köhnke, Östlund, and Brelid 2011). Η διαλυτότητα του μορίου επίσης επηρεάζεται από την παρουσία φερουλικού οξέος, το οποίο διασυνδέει διαφορετικές αλυσίδες αραβινοξυλάνης μεταξύ τους ή και με δομές της λιγνίνης, οδηγώντας σε μείωση της διαλυτότητας (Chen et al. 2019). Τα δομικά χαρακτηριστικά των αραβινοξυλανών επηρεάζουν τις λειτουργικές και βιοδραστικές ιδιότητές τους, όπως η ρεολογική συμπεριφορά, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα και η ρύθμιση της εντερικής μικροχλωρίδας (He et al. 2021).

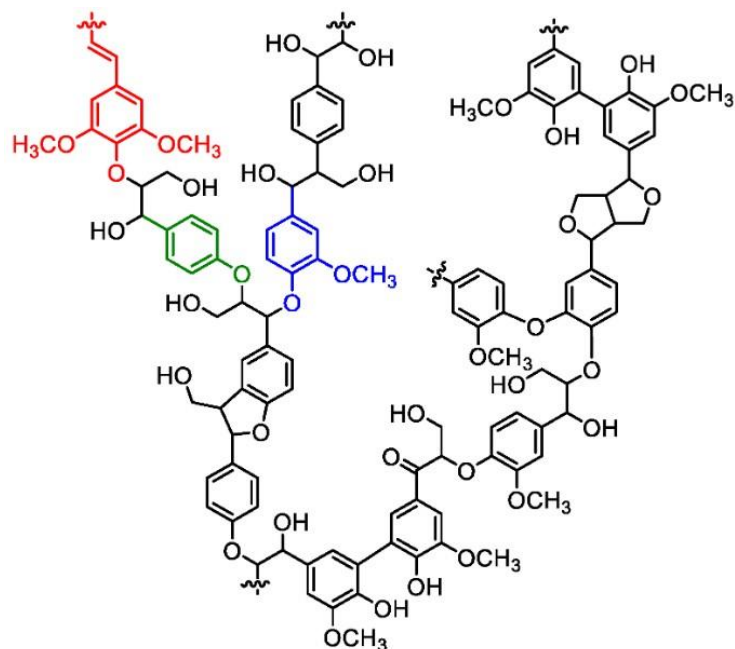
1.1.3. Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα άμορφο, αρωματικό πολυμερές, αποτελούμενο από μονάδες φαινυλοπροπανίου, οργανωμένες σε μία τρισδιάστατη δομή ([Σχήμα 4](#)). Τα βασικά μονομερή του που σχηματίζουν τις επαναλαμβανόμενες μονάδες (μονολιγνόλες) της λιγνίνης είναι η *p*-κουμαρυλική, η κωνοφερυλική και η σιναπυλική αλκοόλη, που συνδέονται με αιθερικούς και απλούς ανθρακικούς δεσμούς, ενώ επίσης περιέχει και μεθοξυλικές, φαινολικές, υδροξυλικές ομάδες και ομάδες αλδεϋδης στις πλευρικές αλυσίδες (Kumar et al. 2016; Liu et al. 2019). Στα φυτικά κύτταρα, η λιγνίνη βρίσκεται κυρίως στο μεσαίο έλασμα και στο δευτερεύον κυτταρικό τοίχωμα, αποτελώντας το 15-35% της ξηρής μάζας του φυτού (Karunaratna and Smith 2020). Λειτουργεί ως συγκολλητικός παράγοντας ανάμεσα στην κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, βοηθά στη μεταφορά νερού στα κύτταρα του φλοιού, αλλά και καθιστά το κυτταρικό τοίχωμα ανθεκτικό σε μικροβιακές και οξειδωτικές προσβολές. Η παρουσία της λιγνίνης καθιστά δυσκολότερη την απελευθέρωση των σακχάρων της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης, καθώς εμποδίζει τα ολοκυταρινολυτικά ένζυμα να προσεγγίσουν τα υποστρώματά τους (Kumar et al. 2016; Thapa et al. 2020). Η λιγνίνη συνδέεται ομοιοπολικά με την ξυλάνη στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα, αφ' ενός γιατί ένζυμα όπως οι λακάσες και οι υπεροξειδάσες εμφανίζουν χαμηλή εξειδίκευση υποστρώματος, οπότε εμφανίζουν οξειδωτικές τάσεις σε ενώσεις παρόμοιες με τις μονολιγνόλες, όπως οι υποκαταστάτες φερουλικού της ξυλάνης. Αφ' ετέρου, για να πολυμεριστεί η λιγνίνη, πραγματοποιείται πυρηνόφιλη προσθήκη στο ενδιάμεσο που προκύπτει μετά τη σύνδεση δύο μονολιγνολών. Το πυρηνόφιλο, εκτός από

μόριο νερού μπορεί να είναι υδροξυλικό ή καρβοξυλικό οξύ οποιουδήποτε πολυσακχαρίτη (Terrett and Dupree 2019).



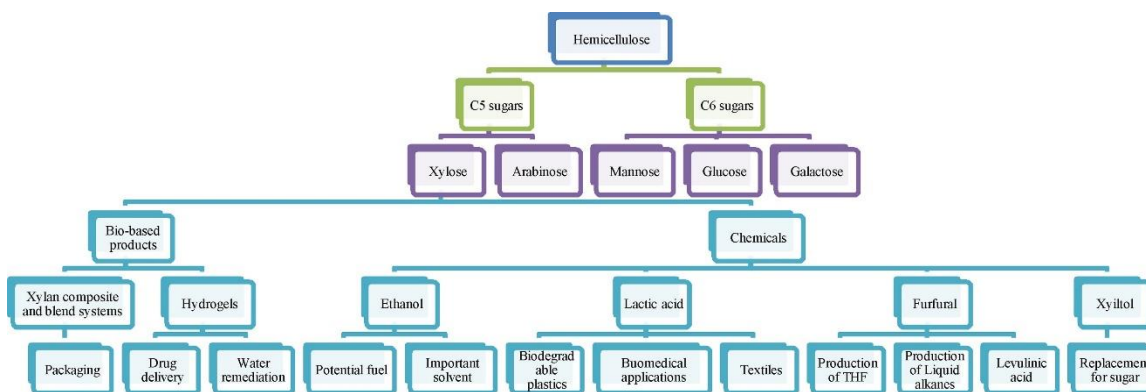
Σχήμα 3. Οι κύριες δομές ετεροξυλάνων, καθώς και κατηγορίες ενζύμων που δρουν στους ανάλογους δεσμούς. a) γλυκουρονοξυλάνη, b) αραβινοξυλάνη, c) αραβινογλυκουρονοξυλάνη (Vuong and Master 2022). Οι απεικονίσεις βασίζονται στο σύστημα «Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG)» [1].



Σχήμα 4. Δομή της λιγνίνης. Οι βασικές δομικές της μονάδες (μονολιγνόλες) είναι χρωματισμένες: σιναπυλική αλκοόλη (sinapyl alcohol): κόκκινο, κωνοφερυλική αλκοόλη (coniferyl alcohol): πράσινο, *p*-κουμαρυλική αλκοόλη (*p*-coumaryl alcohol): μπλε (Karunaratna and Smith 2020).

1.2. Δυνατότητες αξιοποίησης της ημικυτταρίνης

Το φαινόμενο της κλιματικής αλλαγής, που γίνεται εντονότερο με την πάροδο των χρόνων, οδηγεί στην αυστηροποίηση των περιβαλλοντικών κανονισμών και επιβάλλει την εύρεση εναλλακτικών προϊόντων, μη προερχόμενων από το πετρέλαιο και λοιπούς ορυκτούς πόρους. Οι βιομηχανίες υιοθετούν πιο πράσινες τεχνολογίες που στοχεύουν στη χρήση βιώσιμων πόρων για την παραγωγή βιοπροϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τα βιοδιυλιστήρια δεύτερης γενιάς, που χρησιμοποιούν βιομάζα ως πρώτη ύλη, στοχεύουν στην παραγωγή τέτοιων προϊόντων, με χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Μεταξύ των συστατικών της βιομάζας, η ημικυτταρίνη είναι η ένωση με τον χαμηλότερο βαθμό πολυμερισμού, σε σχέση με αυτόν της κυτταρίνης και της λιγνίνης, διευκολύνοντας έτσι την αποδόμησή της. Η άμορφη δομή της και ο μεγάλος αριθμός διακλαδώσεων ευνοούν επίσης την αποικοδόμησή της, καθώς είναι ασταθής όταν υποβληθεί σε θερμική επεξεργασία. Χαρακτηριστικά όπως η βιοαποικοδομησιμότητα, η βιοσυμβατότητα και η βιοενεργότητα της επιτρέπουν να αξιοποιηθεί σε πληθώρα εφαρμογών, στα πεδία των τροφίμων, της ιατρικής, της ενέργειας, των πλαστικών και της χημικής βιομηχανίας εν γένει. (Luo et al. 2019; Pinales-Márquez et al. 2021). Η ξυλάνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πληθώρας προϊόντων, από υδρογέλες μέχρι χημικά προστιθέμενης αξίας, όπως η ξυλιτόλη, τα οποία αξιοποιούνται από τη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων, καυσίμων και χημικών (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Δυνατότητες βιομηχανικής αξιοποίησης της ημικυτταρίνης (Naidu, Hlangothi, and John 2018).

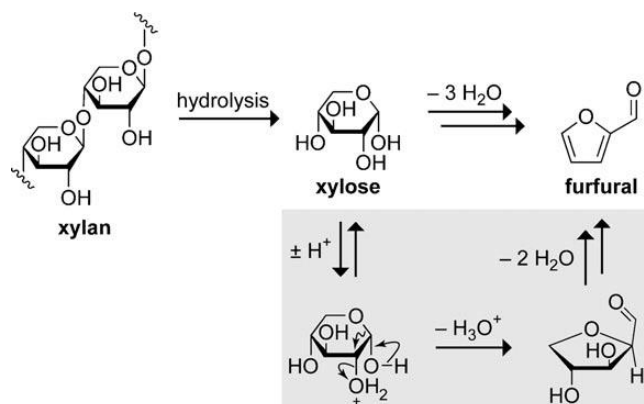
1.2.1. Παραγωγή χημικών προστιθέμενης αξίας

Επί του παρόντος, τα βιοδιυλιστήρια δεύτερης γενιάς επικεντρώνονται σχεδόν αποκλειστικά στην αξιοποίηση της κυτταρίνης με σκοπό την παραγωγή καυσίμων και χημικών προϊόντων, ενώ η χρήση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης περιορίζεται στην παραγωγή βιοαερίου και κατ' επέκταση στην παραγωγή θερμικής και ηλεκτρικής ενέργειας. Η εκμετάλλευση και του κλάσματος της ημικυτταρίνης στην παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας αφ' ενός θα ενισχύει τη βιωσιμότητα των βιοδιυλιστηρίων και αφ' ετέρου θα συμβάλλει στη μείωση των αποβλήτων και λοιπών περιβαλλοντικών ρύπων. Είναι γεγονός πως η ξυλόζη παραμένει σε μεγάλο βαθμό αναξιοποίητη ελλείψει μικροοργανισμών ικανών να τη μεταβολίσουν αποδοτικά, αλλά και λόγω του φαινομένου της καταβολικής καταστολής της ξυλόζης παρουσία γλυκόζης, σε μεικτά μέσα καλλιέργειας (Amraoui et al. 2021; Guragain et al. 2017). Ωστόσο, η γλυκόζη χρησιμοποιείται και στη βιομηχανία τροφίμων και ζωοτροφών, επομένως είναι ακόμα μεγαλύτερη η ανάγκη χρήσης της ξυλόζης ως εναλλακτικού υποστρώματος (Kuenz et al. 2020). Τα τελευταία χρόνια, γίνονται προσπάθειες αξιοποίησης της ημικυτταρίνης, μέσω των βιοδιυλιστηρίων, τα οποία ακολουθούν τη λογική της κυκλικής οικονομίας, όπου τα απόβλητα μίας διεργασίας αποτελούν την πρώτη ύλη μίας άλλης και στοχεύουν σε μηδενικά απόβλητα, σχεδιάζοντας με έναν ορθολογικότερο τρόπο τις διεργασίες που πρέπει να πραγματοποιηθούν. Γι' αυτόν τον λόγο, αναπτύσσονται διεργασίες με σκοπό τον διαχωρισμό της βιομάζας στα επιμέρους κλάσματά της και την καταλληλότερη αξιοποίηση εκάστου. Για παράδειγμα, διαχωρίζοντας την ημικυτταρίνη, από την κυτταρίνη και τη λιγνίνη, υποβοηθείται η επεξεργασία των τελευταίων, ενώ παράλληλα είναι ευκολότερο να σχεδιαστούν «εξατομικευμένοι» τρόποι αξιοποίησης της ημικυτταρίνης (Camarero, Martínez, and Martínez 2014).

1.2.1.1. Φουρφουράλη

Η φουρφουράλη έχει χαρακτηριστεί από το Τμήμα Ενέργειας των Ηνωμένων Πολιτειών ως ένα από τα δώδεκα κορυφαία προϊόντα προστιθέμενης αξίας· χρησιμεύει ως βάση για την παραγωγή άλλων χημικών ενώσεων, όπως το λεβουλινικό οξύ, η γ-βαλερολακτόνη και το ηλεκτρικό οξύ, που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες φαρμάκου, πλαστικών και καυσίμων αντίστοιχα (Luo et al. 2019). Η φουρφουράλη λαμβάνεται αποκλειστικά από τη λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα και ιδιαίτερα από την ξυλόζη (Vuong and Master 2022). Παραδοσιακά, η ξυλόζη υδρολύεται και η ξυλόζη, παρουσία όξινου καταλύτη (αραιού θειικού οξέος), μετατρέπεται σε φουρφουράλη (Σχήμα 6). Ωστόσο, αναπτύσσονται

διαρκώς και καινούριες μέθοδοι, βασισμένες σε πιο βιώσιμες πρώτες ύλες, όπως η χρήση ιονικών υγρών και πράσινων καταλυτών (Binder et al. 2010).



Σχήμα 6. Συνθετική οδός της φουρφουράλης από ξυλάνη. Γκρι πλαίσιο: προτεινόμενος μηχανισμός της όξινης κατάλυσης της ξυλόζης (Binder et al. 2010).

1.2.1.2. Ξυλιτόλη

Η ξυλιτόλη είναι μία υδατανθρακική αλκοόλη που βρίσκεται φυσιολογικά στα φυτά και παράγεται από κάποια βακτήρια και μύκητες. Έχει λευκό χρώμα και κρυσταλλική δομή και είναι διαλυτή στο νερό (Gasmi Benahmed et al. 2020). Έχοντας τον ίδιο βαθμό γλυκύτητας με τη σακχαρόζη, χρησιμοποιείται ευρέως από τη βιομηχανία τροφίμων ως γλυκαντικό υποκατάστατό της, επειδή στη μεταβολική της οδό δε συμμετέχει η ινσουλίνη και επομένως είναι κατάλληλη για διαβητικούς. Επιπλέον, αξιοποιείται σε οδοντικές εφαρμογές, αποτελεί συστατικό σκευασμάτων οδοντόκρεμας και στοματικού διαλύματος, ενώ χρησιμοποιείται και ως επικάλυψη σε τσίχλες και μασώμενα δισκία. Η ξυλιτόλη παράγεται χημικά, με υδρογόνωση της ξυλόζης και των παραγώγων της, σε αλκαλικό περιβάλλον και παρουσία μεταλλικού καταλύτη. Η ανάκτηση ξυλιτόλης από το κλάσμα της ξυλάνης ανέρχεται περίπου σε 50-60%, ήτοι σημαίνει 8-15% της πρώτης ύλης, αναλόγως της σύστασής της σε ξυλάνη. Η χημική διεργασία παραγωγής της απαιτεί υψηλή πίεση και θερμοκρασία (μέχρι και 50 atm και 80-140 °C αντίστοιχα), χρήση ακριβού καταλύτη (Raney – Nickel), αλλά και πολλαπλά στάδια καθαρισμού του τελικού προϊόντος από παραπροϊόντα (Saha 2003). Λόγω αυτών των μειονεκτημάτων, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην παραγωγή ξυλιτόλης μέσω ζύμωσης, η οποία έχει χαμηλότερο κόστος, καθώς δεν πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις και δεν απαιτεί καθαρισμό της ξυλόζης. Η ξυλόζη παράγεται μυκητιακά κυρίως από ζύμες του γένους *Candida*. (Kumar et al. 2016; Okolie et al. 2021; Saha 2003).

1.2.1.3. Βιοαιθανόλη

Η βιοαιθανόλη αποτελεί μία «πράσινη» χημική ουσία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο στη βενζίνη, κάνοντας το εν λόγω καύσιμο φιλικότερο προς το περιβάλλον. Όλα τα οχήματα που κυκλοφορούν σήμερα μπορούν να χρησιμοποιήσουν για την κίνησή τους μείγματα βενζίνης/αιθανόλης, με το ποσοστό σε αιθανόλη να φτάνει μέχρι και το 10% (καύσιμο E10), ενώ, με τροποποίηση του κινητήρα τους, κάποια οχήματα μπορούν να κινηθούν και με καύσιμο που να περιέχει έως και 85% αιθανόλη (καύσιμο E85) (Mosier and Ileleji 2020). Πρόκειται για οξυγονωμένο καύσιμο, που περιέχει 35% οξυγόνο, το οποίο συμβάλλει στη μείωση των εκπομπών σωματιδίων και αερίων του θερμοκηπίου, κατά την

πλήρη καύση· σημειώνεται πως η βιοαιθανόλη δύναται να μειώσει κατά 32% την παγκόσμια κατανάλωση βενζίνης, αν χρησιμοποιείται με τη μορφή καυσίμου E85 (Nanda et al. 2015).

Η βιοαιθανόλη παράγεται από μύκητες που ζυμώνουν τα σάκχαρα, όπως γίνεται και κατά την παραγωγή των οινοπνευματωδών ποτών, και στη συνέχεια συμπυκνώνεται και αναμειγνύεται με άλλες ενώσεις. Η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη μπορούν να αποτελέσουν υποστρώματα κατάλληλα για την παραγωγή βιοαιθανόλης, με την κυτταρίνη να συνιστά ευκολότερη οδό, καθώς μύκητες όπως ο *Saccharomyces cerevisiae* παράγουν αιθανόλη καταναλώνοντας γλυκόζη, από την οποία αποτελείται η κυτταρίνη (Mosier and Ileleji 2020). Ωστόσο, για να είναι οικονομικά βιώσιμη η αιθανόλη που προέρχεται από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα, πρέπει να αξιοποιηθεί και το κλάσμα της ημικυτταρίνης, παράλληλα με αυτό της κυτταρίνης (Girio et al. 2010). Γίνεται λόγος δηλαδή, για βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς, όπου, σε αντίθεση με τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς για την παραγωγή των οποίων χρησιμοποιείται συνήθως βρώσιμο τμήμα της βιομάζας, αξιοποιούνται περισσότερα είδη βιομάζας, κυρίως μη εδώδιμα (Lee and Lavoie 2013). Για παραγωγή βιοαιθανόλης δεύτερης γενιάς μέσω βιοχημικών μονοπατιών πρέπει να χρησιμοποιηθεί κάποιος μικροοργανισμός, ο οποίος ιδανικά θα πρέπει να πληροί τέσσερα κριτήρια: να παράγει σακχαρολυτικά ένζυμα, να μπορεί να διασπάσει τους πολυσακχαρίτες της βιομάζας, να ζυμώνει εξόζες και να ζυμώνει πεντόζες. Παρ' όλο που δεν υπάρχει κάποιος μικροοργανισμός που να διαθέτει και τα τέσσερα αυτά χαρακτηριστικά, κάποια βακτήρια και μύκητες διαθέτουν κάποια εξ αυτών, ενώ επιδέχονται και γενετικών τροποποιήσεων, προκειμένου να βελτιωθεί η απόδοσή τους. Τέτοιοι είναι η *Escherichia coli*, η *Zymomonas mobilis*, ο *S. Cerevisiae* και η *Pichia stipitis* (Girio et al. 2010).

1.2.1.4. 2,3-Βουτανοδιόλη

Η 2,3-βουτανοδιόλη συνιστά μία χημική ένωση ευρείας βιομηχανικής κατανάλωσης, καθώς αποτελεί πρόδρομη ένωση για πολλές άλλες που χρησιμοποιούνται στα πεδία της φαρμακευτικής, των τροφίμων, των πολυμερών και των καυσίμων. Για παράδειγμα, υδρογόνωση της 2,3-βουτανοδιόλης οδηγεί στον σχηματισμό οκτανίου, που χρησιμοποιείται ως καύσιμο στην αεροπορία, ενώ αφυδρογόνωσή της οδηγεί στο 1,3-βουταδιένιο, το οποίο χρησιμοποιείται στη βιομηχανία πολυμερών (Guragain et al. 2017). Η 2,3-βουτανοδιόλη παράγεται κυρίως πετροχημικά, ωστόσο μπορεί να παραχθεί και βιοχημικά, χρησιμοποιώντας τη λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα και ιδιαίτερα το κλάσμα της ημικυτταρίνης, ως βασική πλατφόρμα. Αρκετοί μικροοργανισμοί μπορούν να επιτελέσουν τη συγκεκριμένη ζύμωση, κυρίως των γενών *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterobacter* και *Serratia*, για παράδειγμα τα βακτήρια *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, και *E. ludwigii* (Amraoui et al. 2021; Koutinas et al. 2016). Η βιοχημική οδός περιλαμβάνει τη συμπύκνωση πυροσταφυλικού οξέος προς σχηματισμό α-ακετογαλακτικού οξέος, ακολουθούμενη από αποκαρβοξυλίωση σε ακετοΐνη ή διακετύλιο, τα οποία στη συνέχεια ανάγονται και σχηματίζουν 2,3-βουτανοδιόλη. Τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή τη διεργασία είναι η συνθάση του α-ακετογαλακτικού, η αποκαρβοξυλάση του α-ακετογαλακτικού, η αναγωγή του διακετυλίου και η αφυδρογονάση της βουτανοδιόλης (Amraoui et al. 2021). Κρίσιμο παράγοντα κατά τη διαδικασία της ζύμωσης αποτελούν τα επίπεδα οξυγόνου, καθώς αερόβιες συνθήκες ευνοούν την παραγωγή οξικού οξέος, ενώ αναερόβιες ενισχύουν την παραγωγή γαλακτικού οξέος, οπότε επιλέγονται ενδιάμεσες συνθήκες (Guragain et al. 2017). Αξίζει να σημειωθεί πως το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί και στην καλλιέργεια στελεχών που να τρέφονται με ημικυτταρινικά σάκχαρα, όπως η ξυλόζη (Amraoui et al. 2021; Celińska and Grajek 2009; Guragain et al. 2017; Ji, Huang, and Ouyang 2011).

1.2.2. Αξιοποίηση στη συσκευασία τροφίμων

Η ημικυτταρίνη μπορεί να αποτελέσει πρώτη ύλη και στη βιομηχανία συσκευασίας τροφίμων. Ο κύριος σκοπός της συσκευασίας ενός τροφίμου είναι να το προστατεύει από παράγοντες του εξωτερικού περιβάλλοντος που μπορεί να το βλάψουν, όπως το οξυγόνο, το νερό, η υγρασία, οι οσμές, οι μικροοργανισμοί και οι διάφοροι κραδασμοί που μπορεί να υποστεί κατά τη μεταφορά του. Επιπλέον, πρέπει να συμβάλλει στην κατά το δυνατόν καθυστέρηση εμφάνισης ανεπιθύμητων αλλαγών στο τρόφιμο, εμποδίζοντας και τη διέλευση ουσιών από το τρόφιμο προς το περιβάλλον, ενώ είναι επιθυμητή πλέον και η δυνατότητα ανακύκλωσης ή κομποστοποίησής της. Ως προϊόντα συσκευασίας χρησιμοποιούνται πλαστικά προερχόμενα από πετρέλαιο, ως επί το πλείστον, ενώ τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται και πιο πράσινα βιοπλαστικά, όπως το PLA και το PHA τα οποία είναι βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, παραγόμενα από άμυλο και ζαχαροκάλαμο αντίστοιχα. Ωστόσο, προοπτικές στα υλικά συσκευασίας εμφανίζει και η ημικυτταρίνη που είναι και μη εύπεπτη οπότε δεν τίθεται θέμα ανταγωνισμού ανάμεσα στη χρήση της για την παραγωγή είτε τροφής, είτε υλικού συσκευασίας, όπως συμβαίνει με τους προαναφερθέντες υδατάνθρακες (Mikkonen and Tenkanen 2012).

Οι μεμβράνες που προέρχονται από ξυλάνη παρουσιάζουν χαμηλή διαπερατότητα σε οξυγόνο, οσμές και λίπη και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εσωτερικά στρώματα σε μεμβράνες πολλαπλών στρώσεων, όπου το εξωτερικό στρώμα θα είναι υδρόφοβο για να προστατεύει το τρόφιμο από την υγρασία (Mikkonen and Tenkanen 2012). Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επικάλυψη χάρτινων συσκευασιών, ιδίως σε ευαίσθητα στο οξυγόνο προϊόντα, όπως τα γαλακτοκομικά και τα λιπαρά σνακ, σε τροφές κατοικίδιων, αλλά και σε αρωματικά προϊόντα όπως είναι τα μπαχαρικά και ο καφές. Σημειώνεται, δε, πως η εσωτερική επίστρωση με μεμβράνη ξυλάνης δύναται να παρεμποδίσει την είσοδο ορυκτελαίων ή μελανιών εκτύπωσης από την εξωτερική χάρτινη συσκευασία, στο προϊόν (Nechita, Mirela, and Ciolacu 2021). Ωστόσο, οι μεμβράνες τέτοιου είδους είναι ευαίσθητες στην υγρασία, λόγω της υδροφιλικότητας του μορίου· η υδροφιλικότητα αυτή ωστόσο καθιστά την ξυλάνη χημικά τροποποιήσιμη, με δυνατότητα προσκόλλησης σε αυτήν υδρόφοβων ομάδων, αυξάνοντας έτσι τον υδροφοβικό χαρακτήρα της ένωσης (Nechita, Roman (Iana Roman), and Năstac 2023). Ακόμη, η μηχανική αντοχή των συγκεκριμένων μεμβρανών είναι συγκρίσιμη με αυτή των υλικών που χρησιμοποιούνται τώρα στο εμπόριο, αλλά η ελαστικότητά τους είναι σαφώς χαμηλότερη. Η υδροφοβικότητα και οι μηχανικές ιδιότητες των μεμβρανών από ξυλάνη μπορούν επίσης να βελτιωθούν με συνδυασμένη ανάμειξη άλλων πολυσακχαριτών, όπως η υδροξυ-αιθυλο-κυτταρίνη (παράγωγο της κυτταρίνης), και χημικών ενώσεων, όπως το κιτρικό οξύ (Yang et al. 2019). Νέα τάση αποτελεί η προσθήκη νανοσωματιδίων στις μεμβράνες αυτές, όπως ο άργιλος, τα οποία θα μπορούσαν να επιφέρουν τα επιθυμητά αποτελέσματα σε ό,τι αφορά στη διαπερατότητα των μεμβρανών και στις μηχανικές τους ιδιότητες (Mikkonen and Tenkanen 2012; Naidu et al. 2018).

1.2.3. Προοπτικές στη χορήγηση φαρμάκων

Στον φαρμακευτικό τομέα, η ξυλάνη χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη στην κατασκευή συστημάτων χορήγησης φαρμάκων, δηλαδή σκευασμάτων που εγκλείουν βιοενεργά συστατικά και δραστικές ουσίες, βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητά τους και ελέγχοντας τον ρυθμό, τον χρόνο και τον τόπο αποδέσμευσής τους (Jain 2020). Τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων από ξυλάνη στοχεύουν ιδιαίτερα στο παχύ έντερο, καθώς η πλήρης αποικοδόμησή της απαιτεί τη σύμπραξη πολλών ενζύμων, τα οποία

παράγονται στη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου και πουθενά αλλού στον ανθρώπινο οργανισμό (Cartaxo da Costa Urtiga et al. 2020). Τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων που έχουν ως βάση την ξυλάνη μπορούν να διακριθούν σε υδρογέλες και μικρο- και νανοσωματίδια.

1.2.3.1. Υδρογέλες

Οι υδρογέλες είναι τρισδιάστατα δίκτυα διασυνδεδεμένων πολυμερών, αδιάλυτα στο νερό και ικανά να απορροφήσουν μεγάλες ποσότητες από αυτό, χωρίς να χάσουν την αρχική τους μορφή (Chang et al. 2018). Από την άλλη, αρκετοί πολυσακχαρίτες έχουν εμφανίσει ανοσοτροποποιητικές και αντικαρκινικές δράσεις σε βιολογικές δοκιμές, μεταξύ των οποίων και κάποιες ετεροξυλάνες. Ξυλάνες που περιέχουν γλυκουρονικό οξύ μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη του σαρκώματος-180 και άλλων όγκων, πιθανώς επειδή διεγείρουν έμμεσα τη μη ειδική ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, ενώ αραβινογλυκουρονοξυλάνες και 4-Ο-μεθυλο-γλυκουρονοξυλάνες έχουν παρουσιάσει ανοσοδιεγερτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις αντίστοιχα (Ebringeroná et al. 2002). Εν ολίγοις, η ξυλάνη μπορεί να συνεισφέρει στην αναστολή των κυτταρικών μεταλλάξεων, να προαγάγει την κυτταρική προσκόλληση και πολλαπλασιασμό και την εγγενή ανοσολογική απόκριση, ενώ εμφανίζει και αντικαρκινικές ιδιότητες. Προσφέρεται λοιπόν, για τη δημιουργία υδρογελών με σκοπό είτε τη χορήγηση φαρμάκων είτε τη μηχανική ιστών (Kong et al. 2017). Ενδεικτικά, αναφέρεται η κατασκευή υδρογελών με σκοπό την απελευθέρωση ακετυλοσαλικυλικού οξέος, βιταμίνης B12, αλλά και 5-φθοροουρακίλης, ενός υδρόφιλου φαρμάκου που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση διάφορων τύπων καρκίνου όπως αυτός του μαστού, του παχέος εντέρου, του ήπατος και του εγκεφάλου (Chang et al. 2018).

1.2.3.2. Νανοσωματίδια ξυλάνης

Ακόμη, η ξυλάνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και με τη μορφή νανοσωματιδίων, για τη χορήγηση φαρμάκων, λόγω της βιοαποικοδομησιμότητας, της βιοσυμβατότητας και της μη τοξικότητας που τη χαρακτηρίζει, όπως και τα υπόλοιπα πολυμερή φυσικής προέλευσης. Σε αντίθεση με άλλα νανοσωματίδια, που συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου ή μέσω υδρόφοβης αλληλεπίδρασης, τα ξυλανικά νανοσωματίδια συνδέονται με το φάρμακο μέσω εστερικών δεσμών, δημιουργώντας έτσι μια ισχυρότερη αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Τα νανοσωματίδια αυτά έχουν παίξει τον ρόλο προφαρμάκου, μεταφέρουν δηλαδή τη φαρμακευτική ουσία και αυτή ενεργοποιείται μετά την αποικοδόμηση του νανοσωματιδίου. Τέτοιες φαρμακευτικές ουσίες είναι, μεταξύ άλλων, το 5-αμινοσαλικυλικό οξύ, η 5-φθοροουρακίλη και η ιβουπροφαίνη (Wijaya, Ismadji, and Gunawan 2021).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η συστήματα χορήγησης φαρμάκων με βάση την ξυλάνη ερευνώνται για ασθένειες που πλήττουν το παχύ έντερο, όπως η νόσος του Crohn, η ελκώδης κολίτιδα και ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Αυτό διότι, όπως προαναφέρθηκε, η ξυλάνη δεν αποικοδομείται στο ανώτερο πεπτικό σύστημα, λόγω απουσίας των απαραίτητων ενζύμων (Cartaxo da Costa Urtiga et al. 2020). Καταβολίζεται μόνο στο παχύ έντερο, από την υπάρχουσα μικροχλωρίδα, οπότε και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη συστημάτων χορήγησης φαρμάκων που στοχεύουν τη συγκεκριμένη περιοχή (Khaire et al. 2022).

1.2.4. Ο ρόλος των ξυλοολιγοσακχαριτών στη φαρμακευτική βιομηχανία

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Επιστημονικό Οργανισμό Πρεβιοτικών και Προβιοτικών (ISAAP), ως πρεβιοτικό ορίζεται «ένα υπόστρωμα που χρησιμοποιείται επιλεκτικά από μικροοργανισμούς του

ξενιστή και προσδίδει όφελος στην υγεία», όπου ο ξενιστής μπορεί να είναι ανθρώπινος ή ζωικός οργανισμός (Amorim et al. 2019). Για να μπορεί μια ουσία να θεωρηθεί πρεβιοτικό πρέπει να πληροί τα εξής κριτήρια: να εμφανίζει αντίσταση στη γαστρική οξύτητα και στην υδρόλυση από ένζυμα θηλαστικών, να μπορεί να υποστεί ζύμωση από την εντερική μικροχλωρίδα και να διεγείρει επιλεκτικά την ανάπτυξη ή/και τη δραστηριότητα των εντερικών βακτηρίων που σχετίζονται με την υγεία και την ευεξία του οργανισμού-ξενιστή (Gibson et al. 2004).

Οι ξυλοολιγοσακχαρίτες συνιστούν προϊόντα υδρόλυσης της ξυλάνης και είναι ολιγομερή, αποτελούμενα από δύο έως επτά μονάδες ξυλόζης, ενώ περιλαμβάνουν και διάφορους υποκαταστάτες. (Bhatia et al. 2019). Ανήκουν στις μη εύπεπτες ουσίες, καθώς ο ανθρώπινος οργανισμός δεν διαθέτει τα απαιτούμενα ένζυμα για την υδρόλυση των β-δεσμών, οπότε και φτάνουν άθικτοι στο παχύ έντερο (Carvalho et al. 2013). Διαθέτουν πρεβιοτική δράση, καθώς είναι σε θέση να ευνοούν την ανάπτυξη των ωφέλιμων βακτηρίων (*bifidobacteria* και *lactobacilli*), αλλά και να μειώνουν τις συγκεντρώσεις των χολικών οξέων, που παρουσιάζουν τοξικότητα ανάλογη της συγκέντρωσής τους. Η ελεγχόμενη χορήγηση ξυλοολιγοσακχαριτών μπορεί να βοηθήσει στον περιορισμό της ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων και στην αποφυγή εντερικών διαταραχών όπως δυσκοιλιότητα, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, διάρροια και γαστρίτιδα. Πολύ σημαντική απόρροια της πρεβιοτικής τους δράσης αποτελεί και η μείωση των πιθανοτήτων εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου (Moure et al. 2006).

Εκτός της πρεβιοτικής τους δράσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά φαρμακευτικών σκευασμάτων, καθώς μπορούν να ωφελήσουν με πολλαπλούς τρόπους τον οργανισμό. Προστατεύουν από καρδιαγγειακές παθήσεις, ενισχύουν τον μεταβολισμό των λιπιδίων και προάγουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ εμφανίζουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επιπλέον, έχουν αντιαλλεργική, αντιμικροβιακή και ανοσοτροποποιητική δράση, ενώ εμφανίζουν και εκλεκτική κυτταροτοξικότητα. Ακόμη, μπορούν να δράσουν προληπτικά έναντι του καρκίνου, να χρησιμοποιηθούν σε θεραπείες κατά της αρτηριοσκλήρωσης και να μειώσουν τη συνολική και την LDL χοληστερόλη σε άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (Belorkar and Gupta 2016; Bhatia et al. 2019; Carvalho et al. 2013).

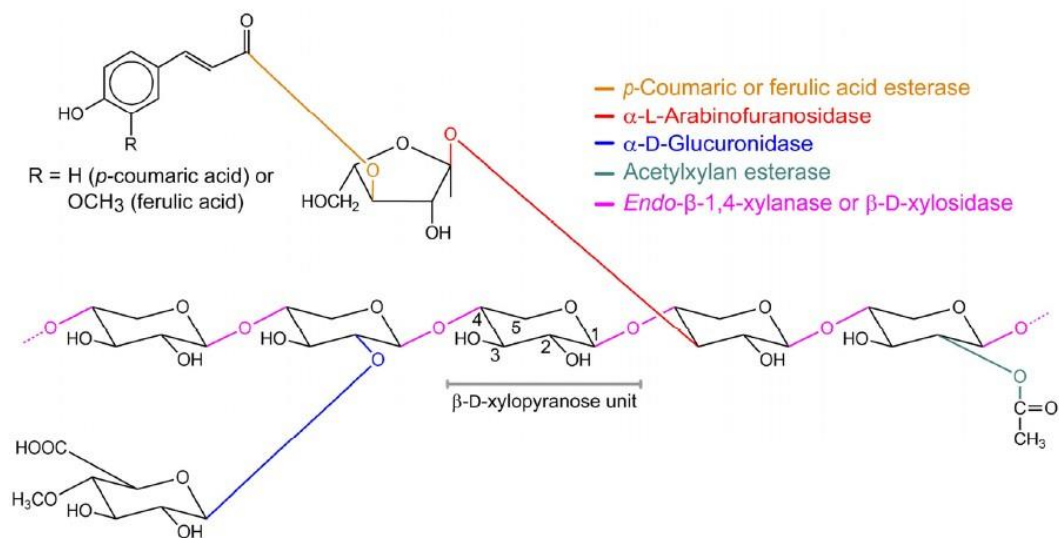
Ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να γίνει στη δράση που επιδεικνύουν οι ξυλοολιγοσακχαρίτες αραβινοξυλάνης, η ζύμωση των οποίων από βακτήρια του παχέος εντέρου ευνοεί τον σχηματισμό λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (short chain fatty acids, SCFA), όπως το οξικό, το προπιονικό, το βουτυρικό και το γαλακτικό, η παρουσία των οποίων συμβάλλει αφ' ενός στη διατήρηση του όξινου περιβάλλοντος της περιοχής και άρα αποτρέπει την εμφάνιση δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών και αφ' ετέρου στην καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα ηλεκτρολυτών, όπως το ασβέστιο και το μαγνήσιο (Broekaert et al. 2011; Mendis and Simsek 2014). Ακόμη, η αραβινοξυλάνη μειώνει την βακτηριακή παραγωγή της β-γλυκουρονιδάσης (ένζυμο το οποίο απελευθερώνει δυνητικά επιβλαβείς ενώσεις) και την παρουσία αμμωνίας στις οδούς απέκκρισης, η οποία θεωρείται πιθανώς καρκινογόνα (Broekaert et al. 2011). Επιπλέον, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες αραβινοξυλάνης μειώνουν τα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης και την απόκριση ινσουλίνης, ενώ αυξάνουν τα μεταγευματικά επίπεδα της γκρελίνης (ορμόνη που παράγεται στα γαστρικά κύτταρα με σκοπό την ενίσχυση της πέψης), οπότε μπορούν να βοηθήσουν και στις θεραπείες ατόμων με διαβήτη τύπου II (Grootaert et al. 2007). Τέλος, αυτοί οι ξυλοολιγοσακχαρίτες εμφανίζουν ανοσοτροποποιητική και αντιφλεγμονώδη δράση· ειδικά, οι

ξυλοολιγοσακχαρίτες που διαθέτουν φερουλικό οξύ έδειξαν να συμβάλλουν στη μείωση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (γεγονός που υποβοηθά την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων) και να έχουν αντινεοπλασματική δράση κατά του καρκίνου του μαστού και του ήπατος (Broekaert et al. 2011).

1.3. Ενζυμική αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης

Όπως προαναφέρθηκε, οι επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες της κύριας αλυσίδας της ημικυτταρίνης συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιδικούς δεσμούς και οι διάφοροι υποκαταστάτες κατά μήκος της αλυσίδας συνδέονται τόσο με γλυκοζιδικούς όσο και με εστερικούς δεσμούς. Συνεπώς, πρόκειται για μια πολύπλοκη δομή, η αποικοδόμηση της οποίας αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αξιοποίηση όλων των κλασμάτων βιομάζας. Η αποικοδόμηση αυτή δύναται να επιτευχθεί μέσω της βιοκατάλυσης, δηλαδή της χρήσης ενζύμων (εξειδικευμένων πρωτεϊνών) που καταλύουν βιοχημικές αντιδράσεις, επιταχύνοντας τη μετατροπή των υποστρώματων σε προϊόντα, στο ενεργό τους κέντρο (Martínez Cuesta et al. 2015). Τα ένζυμα που χρησιμοποιούν ως υποστρώματα υδατάνθρακες (ολιγο- και πολυσακχαρίτες) με στόχο την ένωση, τη διάσπαση ή την τροποποίηση γλυκανών ή γλυκοσυζευγμάτων (glycoconjugates) οργανώνονται και ταξινομούνται στη βάση δεδομένων CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) (Terrapon et al. 2017). Η ταξινόμηση πραγματοποιείται βάσει της αμινοξικής τους ακολουθίας και κατ' επέκταση της τριτοταγούς δομής τους. Έπεται πως τα ένζυμα μίας οικογένειας θα εμφανίζουν παρόμοιους καταλυτικούς μηχανισμούς (Rohman, Dijkstra, and Puspaningsih 2019). Οι υπάρχουσες οικογένειες είναι οι εξής: γλυκοζιδικές υδρολάσες (glycoside hydrolases, GH), γλυκοζυλτρανσφεράσες (glycosyltransferases, GT), πολυσακχαρικές λυάσες (polysaccharide lyases, PL), υδατανθρακικές εστεράσες (carbohydrate esterases, CE), ένζυμα βοηθητικών δράσεων (auxiliary activities, AA) και μονάδες δέσμευσης υδατανθράκων (carbohydrate-binding modules, CBM) (Drula et al. 2022). Το ενδιαφέρον της παρούσας μελέτης επικεντρώνεται κυρίως γύρω από τη δράση των γλυκοζιδικών υδρολασών, οι οποίες υδρολύουν τους γλυκοζιδικούς δεσμούς των υδατανθράκων και των υδατανθρακικών εστερασών, οι οποίες αφαιρούν τους O- ή N-ακυλο υποκαταστάτες των υδατανθράκων, διευκολύνοντας έτσι τη δράση των γλυκοζιδικών υδρολασών σε περίπλοκα υποστρώματα (Terrapon et al. 2017).

Οι ημικυτταρινάσες (τα ένζυμα που ευθύνονται για τη διάσπαση της ημικυτταρίνης) διακρίνονται σε ένζυμα που δρουν στην κύρια αλυσίδα της ημικυτταρίνης (ξυλανάσες, ξυλοζιδάσες, για την περίπτωση της ξυλάνης) και σε ένζυμα που δρουν στις υποκαταστάσεις της (αραβινοφουρανοζιδάσες, γλυκουρονοζιδάσες, εστεράσες). Οι διακλαδώσεις της κύριας αλυσίδας της ημικυτταρίνης εμποδίζουν την άμεση δράση των ξυλανασών, επομένως οι υποκαταστάτες αυτοί πρέπει να απομακρυνθούν από αραβινοφουρανοζιδάσες, εστεράσες και γλυκουρονιδάσες, δίνοντας έτσι πρόσβαση στις ενδο-ξυλανάσες να υδρολύσουν την κύρια αλυσίδα. Τα ένζυμα αυτά δρουν συνεργιστικά, δηλαδή βοηθώντας και υποστηρίζοντας το ένα το άλλο, επιδιώκοντας την κατά το δυνατόν αποδοτικότερη αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης (McKee et al. 2012). Στο [Σχήμα 7](#) παρουσιάζεται μια τυπική αλυσίδα ξυλάνης, με διάφορους υποκαταστάτες, καθώς και κατηγορίες ενζύμων που εμπλέκονται στην αποικοδόμησή της.



Σχήμα 7. Απεικόνιση της δομής της ξυλάνης. Η κύρια αλυσίδα αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες β -D-ξυλοπυρανόζης, κάποιες εκ των οποίων ακετυλιωμένες ή υποκατεστημένες με γλυκουρονικό οξύ και αραβινόζη. Με διαφορετικό χρώμα υποδεικνύονται οι διαφορετικοί δεσμοί (ροζ: β -1,4-, κόκκινο: α -1,3-, μπλε: α -1,2-γλυκοζιδικοί δεσμοί, πράσινο: εστερικός δεσμός μεταξύ της πρωτοταγούς αλκοόλης του C3 της ξυλοπυρανόζης και του οξικού οξέος και καφέ: εστερικός δεσμός μεταξύ της καρβοξυλομάδας φερουλικού ή *p*-κουμαρικού οξέος και της πρωτοταγούς αλκοόλης του C5 της αραβινόζης της πλευρικής αλυσίδας των αραβινοξυλάνων). Με το αντίστοιχο χρώμα αναφέρεται και το είδος ενζύμου που τους διασπά (Rohman et al. 2019).

1.3.1. Ξυλανάσες

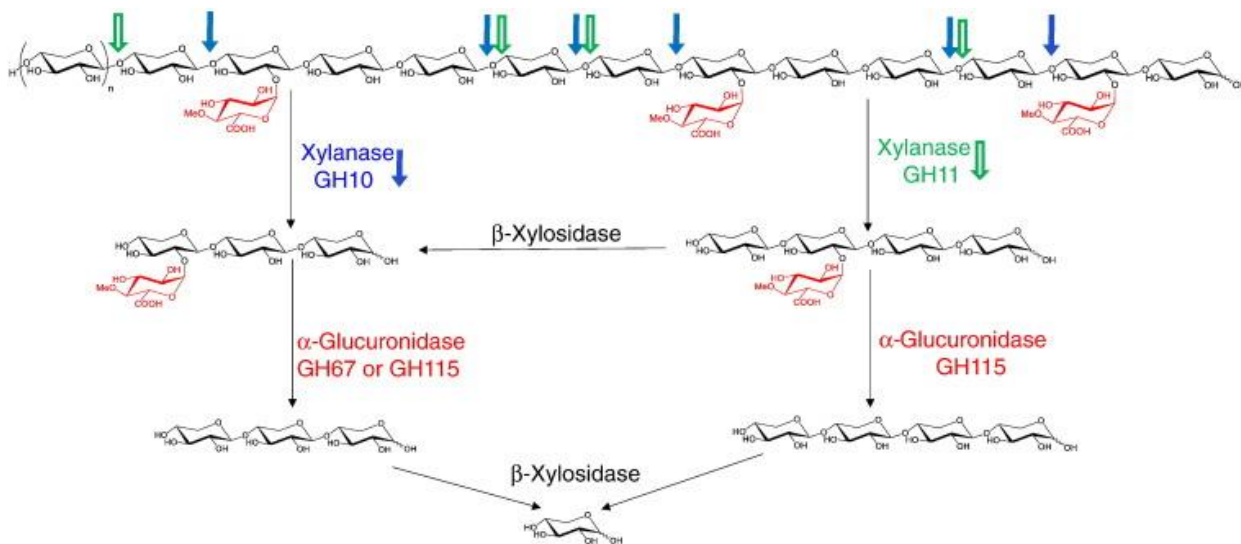
Τα ένζυμα που ευθύνονται για τη διάσπαση της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης είναι οι ενδο-ξυλανάσες, οι οποίες έχουν ταξινομηθεί στις οικογένειες GH5, 8, 10, 11, 16, 30, 43, 51, 98 και 141 των γλυκοζιδικών υδρολασών (Collins, Gerday, and Feller 2005). Οι ξυλανάσες διασπούν τους εσωτερικούς β -1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς μεταξύ των μορίων ξυλόζης, σε συγκεκριμένες ή τυχαίες θέσεις, απελευθερώνοντας έτσι ξυλόζη και άλλους ξυλοολιγοσακχαρίτες, όπως π.χ. ξυλοβιόζη. Έχουν μελετηθεί εκτενώς και δύνανται να αξιοποιηθούν στην παραγωγή υδρολύματος από αγρο-βιομηχανικά απόβλητα, στη διατροφική αναβάθμιση λιγνινοκυτταρινούχων ζωοτροφών, αλλά και στη βιομηχανία τροφίμων και χάρτου. Παράγονται από πλήθος μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ζυμών και νηματοειδών μυκήτων, με τους *Aspergillus* και *Trichoderma sp.* να πρωτοστατούν (Lu et al. 2008).

1.3.1.1. Ξυλανάσες των οικογενειών 10 και 11 (GH10, GH11)

Η πλειονότητα των ενζύμων της οικογένειας 10 δρουν στο εσωτερικό της ημικυτταρινικής αλυσίδας, πρόκειται δηλαδή για ενδο-1,4- β -ξυλανάσες. Έχουν χαμηλή εξειδίκευση υποστρώματος και είναι σε θέση να αποικοδομήσουν αλυσίδες ξυλάνης πολλαπλά υποκατεστημένες (Biely, Singh, and Puchart 2016). Το ενεργό τμήμα αυτών των ξυλανάσων μπορεί να συνδεθεί με τέσσερα ή περισσότερα μόρια ξυλόζης, καθεμιά εκ των οποίων προσδέεται σε μία υποπεριοχή (Vardakou et al. 2008). Σε κάθε υποπεριοχή δίνεται ένας αρνητικός ή θετικός αριθμός, με τους αρνητικούς να εκτείνονται προς το μη αναγωγικό άκρο και τους θετικούς προς το αναγωγικό· η διάσπαση του δεσμού συμβαίνει μεταξύ των υποπεριοχών -1 και +1 (Davies, Wilson, and Henrissat 1997). Αν και γενικά οι ξυλανάσες της οικογένειας GH10 παρεμποδίζονται λιγότερο από πλευρικές αλυσίδες από τις ξυλανάσες άλλων οικογενειών

(υποκατεστημένα μόρια ξυλόζης με 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικό οξύ ή αραβινόζη μπορούν να προσδεθούν στις θέσεις +1 και -3 του ενεργού κέντρου του ενζύμου), απαιτούν να μην είναι υποκατεστημένο το μόριο ξυλόζης που τοποθετείται στη θέση -1 του ενεργού τους κέντρου (Mendonça, Barroca, and Collins 2023). Τα προϊόντα που προκύπτουν από την υδρόλυση αλυσίδων ξυλάνης από τις ξυλανάσες GH10 είναι μικρότερα συγκριτικά με τα προϊόντα άλλων ξυλανάσων, με τα συνηθέστερα να είναι η ξυλοβιόζη και η ξυλοτριόζη (Mendonça et al. 2023).

Από την άλλη, οι ξυλανάσες της οικογένειας 11 υδρολύουν μόνο την ξυλάνη και εμφανίζουν εντονότερη ενδο-δράση (Biely et al. 2016). Χρειάζονται μη υποκατεστημένη ξυλόζη στις θέσεις -1 και +1 του ενεργού κέντρου του ενζύμου για να μπορούν να δράσουν, ενώ υποκαταστάσεις αραβινόζης ή 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικού οξέος μπορούν να υπάρχουν στις υποπεριοχές -3 και +2 του ενεργού κέντρου (Mendonça et al. 2023). Τα βραχύτερα προϊόντα που μπορούν να παραχθούν από τη δράση των ξυλανάσων GH11 είναι η αραβινο-ξυλοτριόζη (από υποστρώματα αραβινοξυλάνης) και η αραβινο-ξυλοτετραόζη (από υποστρώματα γλυκουρονοξυλάνης) (Mendonça et al. 2023). Επομένως, οι ξυλανάσες GH10 παράγουν εν γένει προϊόντα μικρότερα κατά ένα ξυλοπυρανοζύλιο από αυτά των ξυλανάσων GH11. Επιπλέον, οι GH11 ξυλανάσες είναι δραστικότερες σε ξυλοολιγοσακχαρίτες μεγαλύτερου μεγέθους και διαθέτουν περισσότερες θέσεις πρόσδεσης στο υπόστρωμα, ενώ οι GH10 ξυλανάσες λειτουργούν καλύτερα σε ξυλοολιγοσακχαρίτες μικρότερης αλυσίδας (Biely et al. 2013; Morgan et al. 2017). Στο Σχήμα 8 απεικονίζεται ο τρόπος δράσης των ξυλανάσων GH10 και GH11 σε μία ξυλανική αλυσίδα.



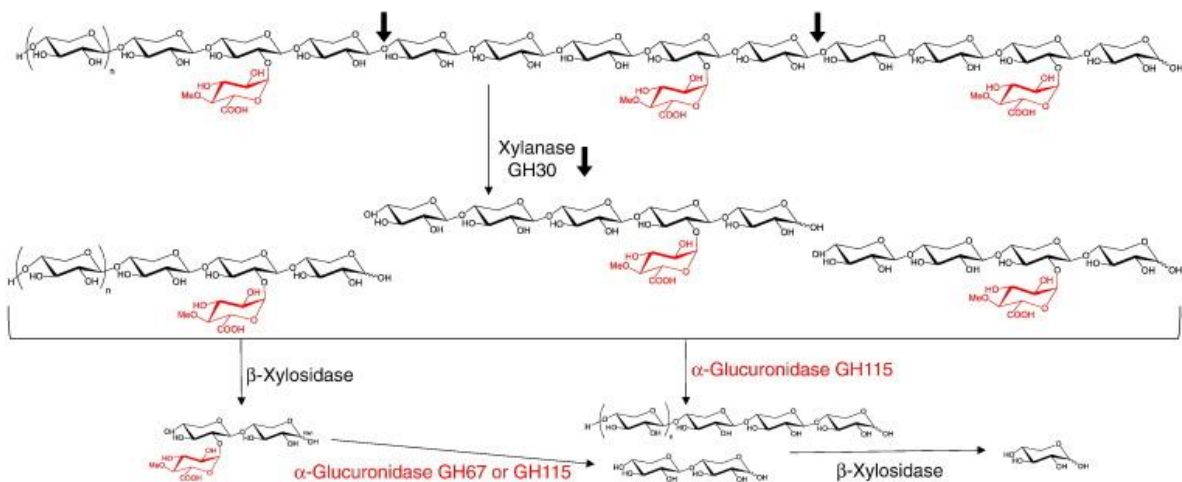
Σχήμα 8. Ενζυμική διάσπαση γλυκουρονοξυλάνης από ξυλανάσες των οικογενειών GH10 και GH11. Με μπλε βέλη υποδεικνύονται τα σημεία δράσης των ξυλανάσων GH10 και με πράσινα τα σημεία δράσης των ξυλανάσων GH11. Τα προϊόντα της διάσπασης μπορεί να είναι ουδέτερα ή όξινα, με τα όξινα (αλδουρονικά οξέα) να υδρολύονται σε μονοσακχαρίτες από τη β-ξυλοζιδάση και τις α-γλυκουρονιδάσες των οικογενειών GH67 και GH115 (Biely et al. 2016).

1.3.1.2. Ξυλανάσες της οικογένειας 30 (GH30)

Η οικογένεια GH30 των γλυκοζιδικών υδρολασών παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία και περιλαμβάνει β-γλυκοζιδάσες, β-γλυκουρονοζιδάσες, β-ξυλοζιδάσες, β-φουκοζιδάσες, β-1,6-γλυκανάσες και ενδο-β-1,6-γαλακτανάσες. Η εν λόγω οικογένεια περιλαμβάνει 9 υποοικογένειες, με την 7^η να περιλαμβάνει ξυλανάσες προερχόμενες από ευκαρυωτικούς οργανισμούς και την 8^η να

περιλαμβάνει κυρίως βακτηριακές ξυλανάσες, ιδιαίτερα γλυκουρονοξυλανάσες (Puchart, Šuchoná, and Biely 2021). Οι βακτηριακές ξυλανάσες διαθέτουν κατά κύριο λόγο γλυκουρονοξυλανολυτική δράση, εξειδικεύονται δηλαδή στην αποικοδόμηση ξυλανών που διαθέτουν 4-Ο-μεθυλ-γλυκουρονικό ή D-γλυκουρονικό οξύ ως πλευρικούς υποκαταστάτες. Διασπούν τον δεύτερο γλυκοζιδικό δεσμό από την υποκατεστημένη με ουρονικό οξύ μονάδα ξυλοπυρανοζυλίου, προς το αναγωγικό άκρο, απελευθερώνοντας έτσι αλδουρονικά οξέα. Αντιθέτως, οι μυκητιακές ξυλανάσες εμφανίζουν ποικιλία δράσεων, καθώς σε αυτήν την υποοικογένεια υπάγονται ένζυμα που δρουν ως εξειδικευμένες γλυκουρονοξυλανάσες, ως μη εξειδικευμένες ενδοξυλανάσες, ως ξυλοβιοϋδρολάσες μη αναγωγικού άκρου και ως ξυλανάσες αναγωγικού άκρου που απελευθερώνουν ξυλόζη (Puchart et al. 2021). Οι γλυκουρονοξυλανάσες αυτής της υποοικογένειας εμφανίζουν παρόμοιο τρόπο δράσης με αυτές της υποοικογένειας GH30_8, ενώ κάποιες μη εξειδικευμένες ενδοξυλανάσες μοιάζουν με ξυλανάσες των οικογενειών 10 και 11 ως προς τον τρόπο δράσης τους, με τα κύρια προϊόντα τους να είναι μονομερή, διμερή και τριμερή ξυλόζης. Κάποια ένζυμα αυτής της υποοικογένειας διαθέτουν και μία εξω-δράση (απελευθερώνουν ξυλοβιόζη από το μη αναγωγικό άκρο του υποστρώματός τους), η οποία μπορεί και να κυριαρχήσει της ενδο-δράσης τους ως ξυλανάσες. Με αντίστοιχο τρόπο, άλλα ένζυμα εμφανίζουν τόσο ενδο- όσο και εξω-δράση, με την εξω-δράση να αφορά την απελευθέρωση μονομερών ξυλόζης από το αναγωγικό άκρο του υποστρώματος (Katsimpouras et al. 2019; Puchart et al. 2021). Οι GH30 ξυλανάσες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ουρονικών ξυλοολιγοσακχαριτών, οι οποίοι μπορούν να αποτελέσουν συστατικά πρεβιοτικών συμπληρωμάτων, συμβάλλοντας στην ισορροπία της μικροχλωρίδας του οργανισμού (Katsimpouras et al. 2019; Mhetras, Mapre, and Gokhale 2019; Nordberg Karlsson et al. 2018). Στο Σχήμα 9 παρουσιάζεται ο τρόπος δράσης μιας τυπικής ξυλανάσης της οικογένειας GH30.

Στα πειράματα που διεξήχθησαν στο πλαίσιο της εν λόγω διπλωματικής, χρησιμοποιήθηκε η ξυλανάση *TtXyn30A*, η οποία προέρχεται από τον μύκητα *Thermothelomyces thermophila* και εκφράστηκε ετερόλογα στον μύκητα *Pichia pastoris*. Η γλυκουρονοξυλάνη πρόκειται για το υπόστρωμα που ευνοεί τη δράση της συγκεκριμένης ξυλανάσης, στο οποίο η κύρια αλυσίδα ξυλάνης έχει υποκαταστάσεις 4-Ο-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος στον C2 της ξυλόζης (Katsimpouras et al. 2019). Η ξυλανάση αναγνωρίζει την υποκατάσταση γλυκουρονικού και υδρολύει τον δεσμό της διπλανής ξυλοπυρανόζης προς το αναγωγικό άκρο. Τα πρώτα προϊόντα υδρόλυσης του συγκεκριμένου υποστρώματος από την *TtXyn30A* συνίστανται από μείγματα ουρονικών ξυλοολιγοσακχαριτών και ξυλοβιόζη, ενώ μετά από περισσότερη ώρα επώασης, οι μακρύτεροι ουρονικοί ξυλοολιγοσακχαρίτες υδρολύονται σε βραχύτερους, με ταυτόχρονη απελευθέρωση ξυλοβιόζης. Τα τελικά προϊόντα επομένως είναι ξυλοβιόζη και διμερή και τριμερή ξυλόζης, υποκατεστημένα με γλυκουρονικό οξύ. Έπεται πως η *TtXyn30A* εμφανίζει συνδυασμένη δράση: δρα ως ενδο-ξυλανάση, εξαρτώμενη από τις υποκαταστάσεις του γλυκουρονικού οξέος στην ξυλανική αλυσίδα, αλλά διαθέτει και εξω-δράση, απελευθερώνοντας μονάδες ξυλοβιόζης από το μη αναγωγικό άκρο, κυρίως γραμμικών ξυλοολιγοσακχαριτών· η εξω-δράση παρεμποδίζεται από υποκαταστάτες, όπως η αραβινόζη (Katsimpouras et al. 2019).



Σχήμα 9. Ενζυμική διάσπαση γλυκουροξυλάνης από GH30 ξυλανάσες. Τα προϊόντα της διάσπασης είναι αλδουρονικά οξέα με μία μη υποκατεστημένη ξυλόζη στο αναγωγικό τους άκρο. Τα αλδουρονικά οξέα στη συνέχεια υδρολύονται από τη β-ξυλοζιδάση και τις α-γλυκουρονιδάσες των οικογενειών GH67 και GH115 (Biely et al. 2016).

1.3.2. β-Ξυλοζιδάσες

Οι β-ξυλοζιδάσες έχουν ως ρόλο την απελευθέρωση μονάδων ξυλόζης από το μη αναγωγικό άκρο της ξυλοβιόζης και άλλων ξυλοολιγοσακχαριτών, εμφανίζουν δηλαδή μία εξω-δράση (Lagaert et al. 2014; Saha 2003). Οι ξυλανάσες υφίστανται παρεμπόδιση από το προϊόν τους, τους ξυλοολιγοσακχαρίτες, επομένως με τη συνεργιστική δράση των β-ξυλοζιδασών δύναται να ελαττωθεί το φαινόμενο αυτής της παρεμπόδισης και να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της αποικοδόμησης (Lagaert et al. 2014; Rohman et al. 2019). Εν τούτοις, η δράση της πλειοψηφίας των ίδιων των β-ξυλοζιδασών αναστέλλεται σε κάποιο βαθμό από το προϊόν τους, την ξυλόζη, που υπάρχει στο υδρόλυμα, αλλά και από μονοσακχαρίτες και υποκαταστάτες ξυλοολιγοσακχαριτών, όπως η αραβινόζη και οι ακετυλομάδες (Rohman et al. 2019). Οι β-ξυλοζιδάσες εμφανίζουν δομική ποικιλομορφία, όπως είναι αναμενόμενο, λόγω και της ποικιλομορφίας των οργανισμών που τις παράγουν. Οι β-ξυλοζιδάσες που εμφανίζουν δραστικότητα σε φυσικά υποστρώματα ταξινομούνται σε 8 οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών, τις GH 3, 5, 30, 39, 43, 51, 52 και 120 (Rohman et al. 2019). Οι β-ξυλοζιδάσες δρουν συνήθως συνεργιστικά με τις ξυλανάσες, καθώς οι δύο αυτές ομάδες ενζύμων διασπούν την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης.

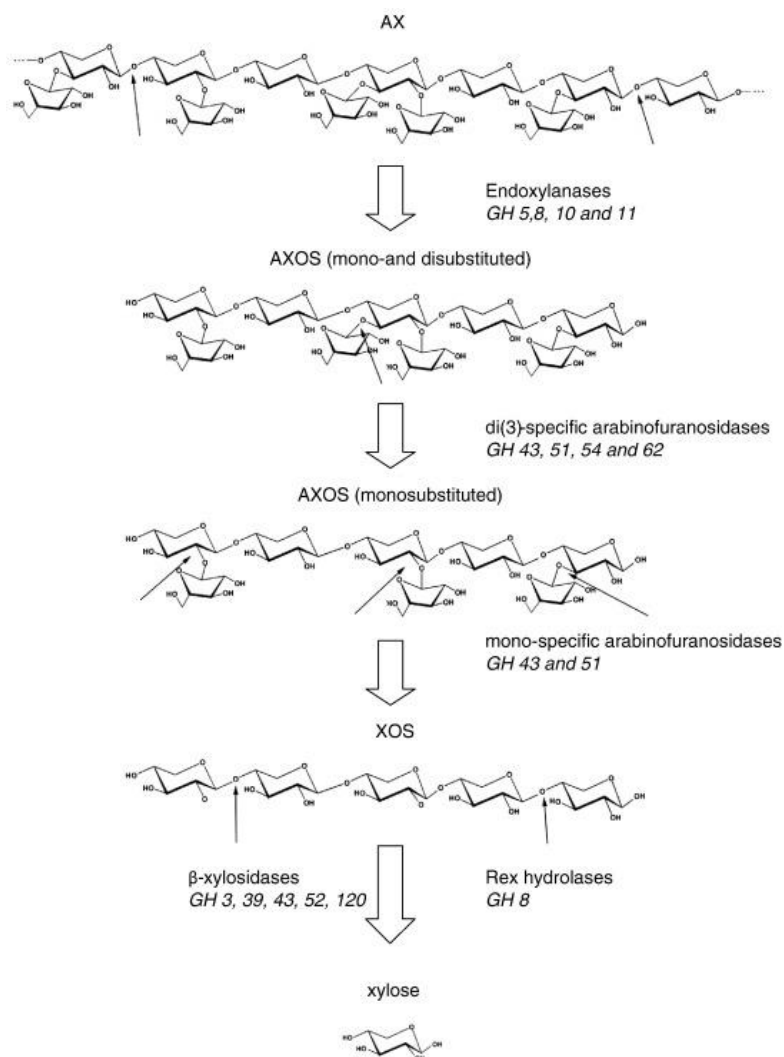
1.3.3. Αραβινοφουρανοζιδάσες

Στις ημικυτταρινικές αλυσίδες, οι μονάδες αραβινόζης συνδέονται με τις μονάδες ξυλοπυρανοζυλίου της κύριας αλυσίδας, στους άνθρακες C2 ή/και C3. Επομένως, μία μονάδα ξυλοπυρανοζυλίου ενδέχεται να φέρει μονές (στον C2 ή στον C3) ή διπλές (στον C2 και στον C3) υποκαταστάσεις αραβινόζης. Οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες παρουσιάζουν τόσο ενδο- όσο και εξω-δράση: η ενδο-α-L-αραβινοφουρανοζιδάση διασπά τους α-1,5-αραβινοφουρανοζιδικούς δεσμούς στις αραβινάνες, ενώ η εξω-α-L-αραβινοφουρανοζιδάση διασπά τους α-1,2-, α-1,3- και α-1,5-γλυκοζιδικούς δεσμούς μεταξύ της πλευρικής και της κύριας αλυσίδας. Οι αραβινοφουρανοζιδάσες ανήκουν στις οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών 2, 3, 43, 51, 54 και 62. Η πολυπληθέστερη υποκατηγορία αραβινοφουρανοζιδασών περιλαμβάνει ένζυμα τα οποία είναι ενεργά σε μονάδες ξυλοπυρανοζυλίου, μονά υποκατεστημένες από αραβινοφουρανόζη, στη θέση 2 ή στη θέση 3 (m2,3 α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες). Στη δεύτερη

υποκατηγορία υπάγονται αραβινοφουρανοζιδάσες που εμφανίζουν δράση σε διπλά υποκατεστημένες με αραβινοφουρανόζη μονάδες ξυλανοπυρανοζυλίου, όπου και διασπούν μόνο τον ένα γλυκοζιδικό δεσμό, συνηθέστερα τον α -1,3 ($d3$ α -L-αραβινοφουρανοζιδάσες) (Biely et al. 2016; Malgas et al. 2019; Thakur, Sharma, and Goyal 2019). Οι αραβινοφουρανοζιδάσες παρεμποδίζονται από τους εστερικούς δεσμούς που δημιουργούνται μεταξύ της αραβινοξυλάνης και του φερουλικού οξέος (Kurakake, Kanbara, and Murakami 2014).

1.3.3.1. Γλυκοζιδικές υδρολάσες (GH) της οικογένειας 43

Η οικογένεια 43 των γλυκοζιδικών υδρολασών περιλαμβάνει 37 υποοικογένειες ενζύμων που ποικίλλουν σε δομή και λειτουργία. Μερικά τέτοια ένζυμα παρουσιάζουν ενεργότητα β -1,4-ξυλοζιδάσης, β -1,3-ξυλοζιδάσης, β -1,4-ενδοξυλανάσης, α -L-αραβινοφουρανοζιδάσης και αραβινάσης (McKee et al. 2012). Αυτό που έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι πως αρκετά μέλη της εν λόγω οικογένειας είναι δι-λειτουργικά, εμφανίζοντας για παράδειγμα τόσο δράση β -ξυλοζιδάσης, όσο και α -αραβινοφουρανοζιδάσης. Δρώντας ως β -ξυλοζιδάσες, υδρολύουν ξυλοολιγοσακχαρίτες που προκύπτουν από τη δράση ενδο-ξυλανασών, ενώ δρώντας ως α -αραβινοφουρανοζιδάσες, απομακρύνουν μόρια αραβινοφουρανόζης από τις υποκατεστημένες ξυλόζες (Morais et al. 2021). Η δράση των ξυλοζιδασών μπορεί να διακριθεί σε τρεις τύπους, εκ των οποίων οι δύο αφορούν την υδρόλυση β -1,3- και β -1,4-γλυκοζιδικών δεσμών από ολιγομερή. Ο τρίτος τύπος αφορά τη δράση ενός ενζύμου που είναι ενεργό σε υποστρώματα ξυλοολιγοσακχαριτών, αλλά και ξυλάνης, παράγοντας ξυλόζη, πρόκειται δηλαδή για μία εξω-1,4-ξυλανάση (Zerva et al. 2021). Σε ό,τι αφορά στις αραβινοφουρανοζιδάσες, αυτές μπορούν να δρουν, όπως προαναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, είτε σε μονά είτε σε διπλά υποκατεστημένες, από αραβινοφουρανόζη, μονάδες ξυλοπυρανοζυλίου (αραβινοφουρανοζιδάσες-m και -d αντίστοιχα). Επίσης, μια τρίτη κατηγορία ενζύμων (αραβινοφουρανοζιδάσες-m,d) εμφανίζουν διπλή δράση, τόσο σε μονο-, όσο και σε δι-υποκατεστημένες μονάδες ξυλόζης, είτε στο εσωτερικό, είτε στα άρα της αλυσίδας (Mroueh et al. 2019). Σημειώνεται πως μόνο μέλη της οικογενειών 43 και 51 έχει παρατηρηθεί πως διαθέτουν την διπλή αυτή δράση (Katsimpouras et al. 2019; Morais et al. 2021; Thakur et al. 2020). Στο Σχήμα 10 παρουσιάζονται ενδεικτικοί δεσμοί μέσα σε μία ημικυτταρινική αλυσίδα, τους οποίους διασπούν ένζυμα της οικογένειας GH43.



Σχήμα 10. Συνολική ανασκόπηση της αποικοδόμησης της αραβινοξυλάνης. Τα βέλη υποδεικνύουν σημεία διάσπασης από τις εκάστοτε οικογένειες ενζύμων (Lagaert et al. 2014).

1.3.4. Γλυκουρονιδάσες

Ο α -1,2 γλυκοζιδικός δεσμός μεταξύ της ξυλόζης και του γλυκουρονικού οξέος αποτελεί έναν από τους σταθερότερους δεσμούς στα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων (Biely et al. 2016). Οι α -D-γλυκουρονιδάσες ανήκουν, όπως και οι αραβινοφουρανοζιδάσες, στα βοηθητικά ένζυμα, καταλύουν την υδρόλυση των εν λόγω α -1,2 γλυκοζιδικών δεσμών και ανήκουν κυρίως στις οικογένειες GH4, GH67 και GH115 (Biely et al. 2016; Malgas et al. 2019, 2021). Στην οικογένεια GH67 εντοπίζονται ένζυμα που διασπούν, εκτός του γλυκουρονικού οξέος, το 4-O-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ και μαζί με τα ένζυμα της GH4 γενικά προτιμούν βραχείς ξυλοολιγοσακχαρίτες, υποκατεστημένους με γλυκουρονικό οξύ (Malgas et al. 2019; Thara et al. 2020). Αντίθετα, γλυκουρονιδάσες της οικογένειας GH115 εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστικότητα σε πολυμερικές γλυκουρονοξυλάνες, ενώ παράγονται κυρίως εξωκυτταρικά (Malgas et al. 2019, 2021; Vuong and Master 2022).

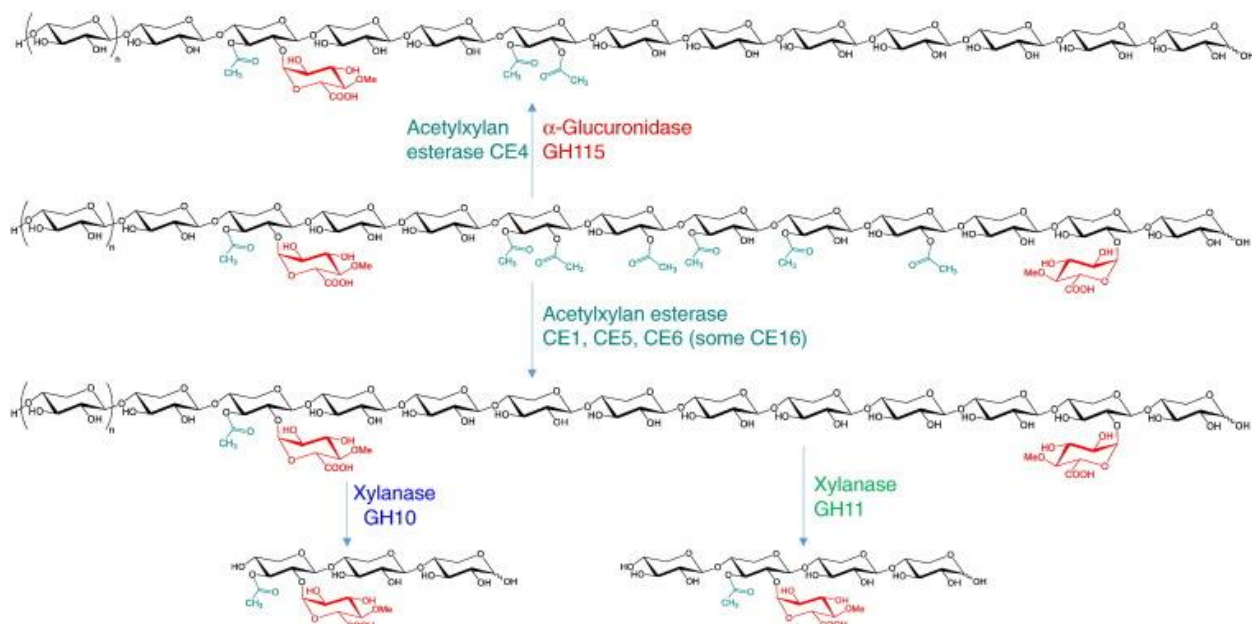
1.3.5. Υδατανθρακικές εστεράσες (CEs)

Οι μονάδες ξυλοπυρανόζης της κύριας ημικυτταρινικής αλυσίδας συνήθως είναι υποκατεστημένες με εστεροποιημένα οξέα. Οξικό οξύ μπορεί να είναι να συνδεδεμένο στον C2 ή στον C3 της ξυλόζης, ενώ μπορεί να βρίσκεται εστεροποιημένο στη θέση O-3 μιας ξυλοπυρανόζης που φέρει ταυτόχρονα υποκατάσταση 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος στον C2 άνθρακα της ξυλόζης. Επιπλέον, η αραβινόζη μπορεί να εστεροποιηθεί με υδροξυκιναμωνικά οξέα, το συνηθέστερο εκ των οποίων είναι το φερουλικό, που συνδέεται είτε στις θέσεις C5 ή C2 της αραβινοφουρανόζης, είτε στη θέση C4 της ξυλοπυρανόζης. Ακόμη, γλυκουρονικό οξύ, μεθυλιωμένο, ή μη, στην O-4 θέση, συνδέεται στην ξυλάνη και εστεροποιείται με τις αλκοόλες που βρίσκονται στη λιγνίνη (Armendáriz-Ruiz et al. 2018; Monrad et al. 2018). Προκειμένου λοιπόν να μπορούν να δράσουν οι ξυλοζιδάσες και οι ξυλανάσες, πρέπει να απομακρυνθούν οι όξινοι αυτοί υποκαταστάτες. Η απομάκρυνση αυτή γίνεται με τη βοήθεια των υδατανθρακικών εστερασών, μιας ομάδας εστερασών (ενζύμων που διασπούν ή συνθέτουν εστερικούς δεσμούς), που απομακρύνουν τους εστερικούς υποκαταστάτες μονο-, ολιγο- και πολυσακχαριτών, διευκολύνοντας έτσι τη δράση των γλυκοζιδικών υδρολασών. Κατηγοριοποιούνται σε 16 οικογένειες στη βάση δεδομένων CAZy (carbohydrate esterase families CE1-16)· η οικογένεια CE10 ωστόσο δεν περιέχει πλέον ένζυμα, καθώς βρέθηκε πως ήταν ανενεργά σε υδατανθρακικά υποστρώματα (Nakamura, Nascimento, and Polikarpon 2017). Οι οικογένειες CE 1-7 και 16 περιλαμβάνουν εστεράσες του οξικού (AXEs), η οικογένεια CE1 περιλαμβάνει εστεράσες του φερουλικού (FAEs) και η οικογένεια CE15 περιλαμβάνει εστεράσες του γλυκουρονικού (GEs).

1.3.5.1. Εστεράσες του οξικού οξέος (AXEs)

Οι υποκαταστάσεις του οξικού οξέος στην ημικυτταρινική αλυσίδα αυξάνουν τη διαλυτότητα των πολυσακχαριτών, επειδή παρεμποδίζουν τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδατανθρακικών αλυσίδων (Zerva et al. 2021). Μία μονάδα ξυλοπυρανόζης μπορεί να είναι 2-O- ή 3-O-ακετυλιωμένη ή 2,3-δι-O-ακετυλιωμένη και αν πρόκειται για μη αναγωγικό άκρο, μπορεί να εμφανίσει ακετυλίωση στη θέση O-4. Το οξικό οξύ εμφανίζει τάση μετανάστευσης στον δακτύλιο της ξυλοπυρανόζης, εναλλάσσοντας τη θέση του, ανάμεσα στις O-2, O-3 και O-4. Η παρουσία ακετυλίωσης παρεμποδίζει ορισμένα ένζυμα, όπως τις ξυλανάσες και τις ξυλοζιδάσες, ωστόσο οι εστεράσες του οξικού μπορεί να εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς συγκεκριμένες θέσεις ακετυλίωσης της ξυλοπυρανόζης (Puchart et al. 2016; Puchart and Biely 2015).

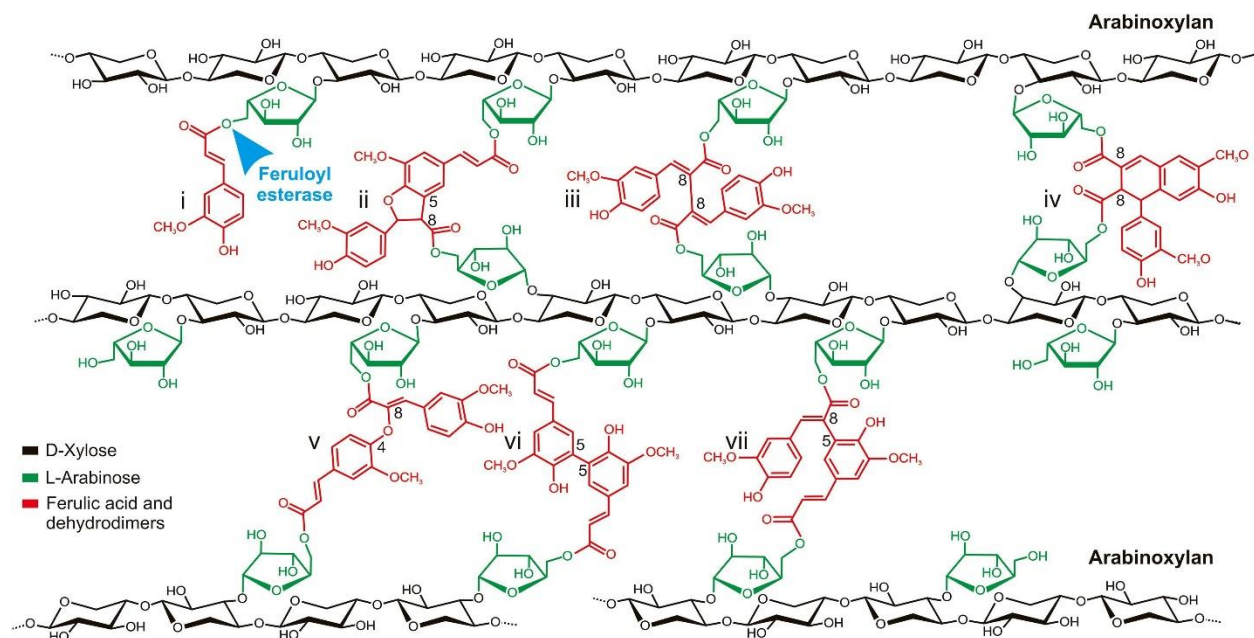
Υπεύθυνες για τη διάσπαση του δεσμού που αναπτύσσεται μεταξύ της ξυλοπυρανόζης και του οξικού οξέος είναι οι εστεράσες του οξικού οξέος, κάνοντας έτσι την αλυσίδα προσβάσιμη σε ξυλανάσες και β-ξυλοζιδάσες (Malgas et al. 2019). Οι εστεράσες της οικογένειας CE6 δρουν στις θέσεις O-2 και O-3 μονά και διπλά υποκατεστημένων ξυλοπυρανοζών, τόσο σε ξυλάνη, όσο και σε ξυλο-ολιγομερή (Biely et al. 2016). Σε αντίθεση με τις CE6 εστεράσες, οι CE16 εστεράσες εμφανίζουν εξω-δράση, αποακετυλιώνοντας την ξυλοπυρανόζη του μη αναγωγικού άκρου ολιγοσακχαριτών, στην οποία το οξικό μπορεί να βρίσκεται στις θέσεις O-2 και O-3, αλλά και στη θέση O-4, λόγω μετανάστευσης (Biely 2012; Neumüller et al. 2015). Επίσης, εστεράσες της οικογένειας CE16 έχει αναφερθεί πως εμφάνισαν δραστηριότητα και σε ξυλοπυρανόζη ακετυλιωμένη στη θέση O-3 και υποκατεστημένη με γλυκουρονικό στη θέση C2 (Neumüller et al. 2015). Στο [Σχήμα 11](#) παρουσιάζεται ο τρόπος δράσης εστερασών του οξικού οξέος διάφορων οικογενειών.



Σχήμα 11. Αποακετυλίωση γλυκουρονοξυλάνης από εστεράσες των οικογενειών CE1, 4, 5, 6 και 16. Οι εστεράσες δεν αποακετυλιώνουν μονάδες ξυλοπυρανόζης υποκατεστημένες με γλυκουρονικό οξύ και αντίστοιχα οι α-γλυκουρονοζιδάσες απομακρύνουν το γλυκουρονικό οξύ από μη ακετυλιωμένες ξυλοπυρανόζες. Μετά την αποακετυλίωση, οι ξυλανάσες των οικογενειών GH10 και GH11 διασπούν την γλυκουρονοξυλάνη σε ολιγομερή (Biely et al. 2016).

1.3.5.2. Εστεράσες του φερουλικού οξέος (FAEs)

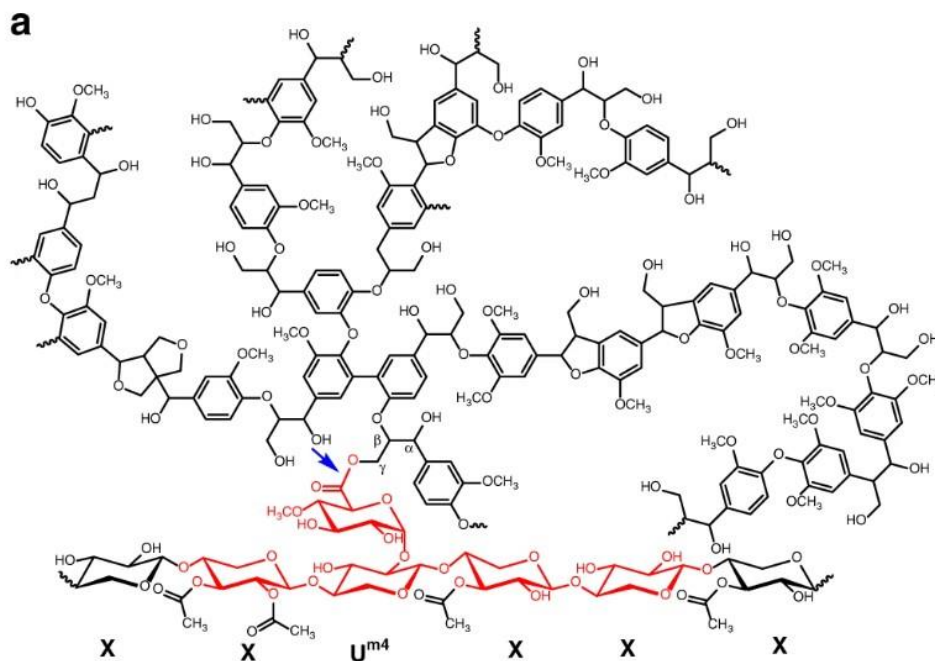
Το φερουλικό οξύ συνήθως δημιουργεί εστερικό δεσμό με το υδροξύλιο του C5 της αραβινόζης, ενώ μπορεί να δημιουργήσει επιπλέον αιθερικούς δεσμούς με τη λιγνίνη ή να σχηματίσει διμερή με άλλα μόρια φερουλικού οξέος, συντελώντας έτσι στη διασύνδεση των ημικυτταρινικών αλυσίδων (Σχήμα 12) (Oliveira et al. 2019). Για τη διάσπαση των δεσμών αυτών, υπεύθυνες είναι οι εστεράσες του φερουλικού, οι οποίες καταλύουν τον εστερικό δεσμό μεταξύ του φερουλικού οξέος και της αραβινόζης, απελευθερώνοντας το οξύ. Έχουν χαρακτηριστεί περίπου 80 FAEs, οι οποίες κατατάσσονται στην οικογένεια CE1, οι περισσότερες εκ των οποίων προέρχονται από βακτήρια ή μύκητες (Zerva et al. 2021). Εκτός του φερουλικού οξέος, εμφανίζουν δράση και σε άλλα υδροξυκιναμωνικά οξέα, όπως το *p*-κουμαρικό (Zerva et al. 2021). Βάσει της υδρολυτικής τους ικανότητας σε τέσσερις εστέρες υδροξυκιναμικών οξέων (φερουλικού, σιναπινικού, *p*-κουμαρικού και καφεϊκού) τεχνητών υποστρωμάτων, οι φερουλικές εστεράσες χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες, A-D. Η κατηγορία A προτιμά το φερουλικό και το σιναπινικό οξύ ως εστερικά υποστρώματα, ενώ η κατηγορία B προτιμά το *p*-κουμαρικό και το καφεϊκό. Οι κατηγορίες C και D δεν είναι τόσο εξειδικευμένες και μπορούν να υδρολύσουν όλα τα παραπάνω. Ωστόσο, μόνο οι κατηγορίες A και D μπορούν να απελευθερώσουν και διμερή φερουλικού οξέος (Armendáriz-Ruiz et al. 2018).



Σχήμα 12. Απεικόνιση αραβινοξυλάνης, διασυνδεδεμένης με διμερή φερουλικού οξέος (ferulic acid dehydromers). i: Φερουλικό οξύ εστεροποιημένο σε μόριο αραβινόζης και θέση δράσης της εστεράσης, ii: 8-5' δι-φερουλικό οξύ, με μορφή βενζοφουρανίου (benzofuran form), iii: 8-8' δι-φερουλικό οξύ, iv: 8-8' δι-φερουλικό οξύ, με μορφή αρυλτετραλίνης (aryltetralin form), v: 8-O-4' δι-φερουλικό οξύ, vi: 5-5' δι-φερουλικό οξύ και vii: 8-5' δι-φερουλικό οξύ (Oliveira et al. 2019).

1.3.5.3. Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος (GEs)

Οι εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος διασπούν τους εστερικούς δεσμούς που σχηματίζονται μεταξύ των αλειφατικών αλκοολών της λιγνίνης και του 4-Ο-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος που είναι συνδεδεμένο στην ξυλάνη, στοχεύουν δηλαδή στη διάσπαση των συμπλόκων υδατανθράκων-λιγνίνης, (lignin-carbohydrate complexes, LCCs) (Malgas et al. 2019; Monrad et al. 2018; Nakamura et al. 2017) (Σχήμα 13). Αυτοί οι εστερικοί δεσμοί αποτελούν μαζί με τους αιθερικούς δεσμούς μεταξύ υδροξυλομάδων των πολυσακχαριτών και αλκοολών της λιγνίνης και με τους δεσμούς που σχηματίζει το *p*-κουμαρικό ή το φερουλικό οξύ με τα δύο πολυμερή (αιθερικό με τη λιγνίνη και εστερικό με την ημικυτταρίνη) τα τρία είδη ομοιοπολικών δεσμών που σχηματίζονται στα σύμπλοκα ημικυτταρίνης-λιγνίνης (Šráňniková and Biely 2006). Οι εστεράσες του γλυκουρονικού προτιμούν ως υποστρώματα βενζοϊκούς ή ογκωδέστερους γλυκουρονοεστέρες, ενώ αλληλεπιδρούν τόσο με το αρωματικό, όσο και με το υδατανθρακικό τμήμα του υποστρώματός τους (Bååth et al. 2019; Larsbrink and Lo Leggio 2023). Όλα τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας ανήκουν στην οικογένεια CE15 και είναι κυρίως βακτηριακής και μυκητιακής προέλευσης (Nakamura et al. 2017). Παρά τη δυσκολία κατασκευής τεχνητών υποστρωμάτων που να προσομοιάζουν στα συμπλέγματα λιγνίνης-υδατανθράκων, έχουν αναδειχθεί συνεργιστικές σχέσεις γλυκουρονικών εστερασών με GH10 ξυλανάσες σε υποστρώματα υψηλής περιεκτικότητας σε λιγνίνη (Larsbrink and Lo Leggio 2023; Mosbech et al. 2018; Zerva et al. 2021).



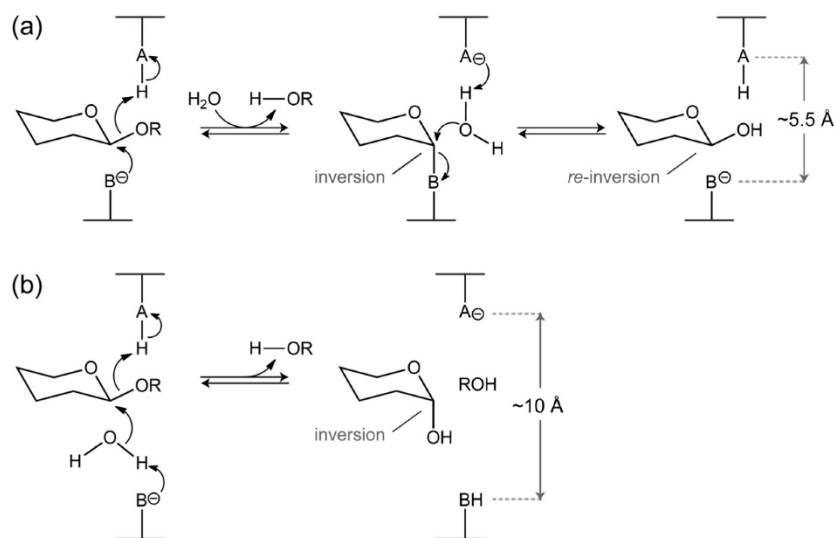
Σχήμα 13. Δομή ενός φυσικού συμπλέγματος λιγνίνης – υδατανθράκων, που αποτελεί υπόστρωμα για τις εστεράσες του γλυκουρονικού. Το μπλε βέλος υποδεικνύει τον εστερικό δεσμό μεταξύ των δύο πολυμερών: ακετυλιωμένης γλυκουρονοξυλάνης, υποκατεστημένης με 4-*O*-μεθυλ-γλυκουρονοϋλίο και λιγνίνης. Το 4-*O*-γλυκουρονοϋλίο σχηματίζει εστερικό δεσμό με τη γ-αλκοόλη της λιγνίνης. Κάθε μονάδα ξυλοπυρανόζης ονομάζεται X και αυτή που είναι υποκατεστημένη με το 4-*O*-γλυκουρονοϋλίο ονομάζεται U^{m4} (Ernst et al. 2020).

1.3.6. Μηχανισμός κατάλυσης

Η κατάλυση που επιτελείται με τη βοήθεια των γλυκοζιδικών υδρολασών μπορεί να γίνει είτε με διατήρηση (retention), είτε με αναστροφή (inversion) της διάταξης του ανωμερικού άνθρακα κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων (Rohman et al. 2019) (Σχήμα 14). Οι περισσότερες ξυλανάσες και β-ξυλοζιδάσες ακολουθούν την πρώτη οδό και εκτελούν αντιδράσεις διπλής αντικατάστασης, αποτελούμενες από ένα στάδιο γλυκοζυλίωσης και ένα στάδιο απογλυκοζυλίωσης, χρησιμοποιώντας δύο καταλυτικές καρβοξυλικές ομάδες που έχουν τον ρόλο του πυρηνόφιλου και έναν καταλύτη οξέος/βάσης. Κατά τη γλυκοζυλίωση, το πυρηνόφιλο προσβάλλει τον ανωμερικό άνθρακα του υποστρώματος, σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο α-γλυκοζυλένζυμο. Ο καταλύτης δρα ως οξύ και δίνει το πρωτόνιό του στο γλυκοζιτικό οξυγόνο, οπότε και αναχωρεί η αποχωρούσα ομάδα. Κατά την απογλυκοζυλίωση, ο καταλύτης δρα ως βάση και ενεργοποιεί ένα μόριο νερού, το οποίο στη συνέχεια προσβάλλει το ενδιάμεσο α-γλυκοζυλένζυμο (Bankeeree et al. 2022; Rohman et al. 2019). Έτσι, προκύπτει προϊόν με την ίδια διαμόρφωση με αυτήν του υποστρώματος (διαμόρφωση β→β), ενώ το μόριο νερού δίνει το επιπλέον πρωτόνιο στον καταλύτη, και το ένζυμο μπορεί να συμμετάσχει στον επόμενο κύκλο αντίδρασης (Bankeeree et al. 2022).

Ένζυμα των οικογενειών GH8 και GH43 δρουν μέσω του δεύτερου μηχανισμού, αναστρέφουν δηλαδή τον ανωμερικό άνθρακα του υποστρώματος. Πρόκειται για αντίδραση μονής αντικατάστασης, που απαιτεί δύο καρβοξυλικές ομάδες ως καταλυτικές ομάδες και όξινο καταλύτη (Bankeeree et al. 2022). Η καρβοξυλομάδα αφαιρεί ένα πρωτόνιο από ένα μόριο νερού, οπότε και ενεργοποιείται ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας του. Στη συνέχεια, αυτό προσβάλλει τον ανωμερικό άνθρακα του

υποστρώματος, ενώ ο όξινος καταλύτης του δίνει ένα πρωτόνιο, σπάζοντας έτσι τον γλυκοζιδικό δεσμό και αναστρέφοντας τη στεreoχημεία του ανωμερικού άνθρακα (διαμόρφωση β→α) (Bankeeree et al. 2022).



Σχήμα 14. Οι δύο μηχανισμοί κατάλυσης. (a) Μηχανισμός διατήρησης· το πυρηνόφιλο και ο καταλύτης όξινου/βασικού χαρακτήρα συμβολίζονται με B⁻ και AH αντίστοιχα. (b) Μηχανισμός αναστροφής· ο βασικός και ο όξινος καταλύτης συμβολίζονται με B⁻ και AH αντίστοιχα. Οι συνήθεις αποστάσεις των υπολειμμάτων της κατάλυσης και στους δύο μηχανισμούς δίνονται σε Å. Στις περισσότερες γλυκοζιδικές υδρολύσεις, τα A και B είναι ασπαραγίνη (Asp) ή γλουταμινικό οξύ (Glu) (Rohman et al. 2019).

1.4. Συνεργιστική δράση ενζύμων

1.4.1. Είδη συνεργισμοῦ

Η ενζυμική υδρόλυση της ημικυτταρίνης αποτελεί μία σύνθετη διεργασία, λόγω της πολυπλοκότητας των ημικυτταρινικών υποστρωμάτων, αλλά και της πληθώρας των ενζύμων που μπορούν να αξιοποιηθούν. Η συνέργεια μεταξύ ενζύμων αντανακλά τον βαθμό συνεργασίας δύο ή περισσότερων ενζύμων, κατά την αποικοδόμηση ενός υποστρώματος (Van Dyk et al. 2013)· διακρίνονται, δε, τρία είδη συνεργισμοῦ μεταξύ ενζύμων: Ο ομοσυνεργισμός αφορά στη συνεργασία δύο ή περισσότερων διαφορετικών τύπων ενζύμων που όλοι στοχεύουν είτε στη διάσπαση της κύριας αλυσίδας, είτε στη διάσπαση πλευρικής αλυσίδας. Ο ετεροσυνεργισμός περιγράφει τη συνεργατική αλληλεπίδραση ενός ενζύμου διάσπασης της κύριας αλυσίδας και ενός ενζύμου διάσπασης της πλευρικής αλυσίδας, ενώ, τέλος, ο αντισυνεργισμός ερμηνεύει την παρεμπόδιση που μπορεί να προκαλέσει η δράση ενός ενζύμου διάσπασης της πλευρικής αλυσίδας στη δράση ενός ενζύμου διάσπασης της κύριας αλυσίδας (Moreira and Filho 2016).

1.4.1.1. Ομοσυνεργισμός

Ως ομοσυνεργισμός ορίζεται η συνεργασία μεταξύ δύο ενζύμων που δρουν στην κύρια αλυσίδα της ξυλάνης (π.χ. β-ξυλοζιδάσης και ξυλανάσης) ή δύο ενζύμων που δρουν σε πλευρικές αλυσίδες (π.χ. α-αραβινοφουρανοζιδάσης και α-γλυκουρονιδάσης) (Duarte et al. 2012; Malgas, Mafa, and Pletschke 2020). Εστιάζοντας στη διάσπαση της κύριας αλυσίδας, απαιτείται η ανάπτυξη συνεργιστικών σχέσεων

μεταξύ των ξυλανολυτικών ενζύμων, δηλαδή των ενδο-ξυλανασών, των εξω-ξυλανασών και των ξυλοζιδικασών, προκειμένου να προκύψουν ολιγομερή ξυλόζη. Οι ξυλανάσες διαφορετικών οικογενειών δύνανται να παρουσιάζουν διαφορετικές προτιμήσεις όσον αφορά στο υπόστρωμα, επομένως συνδυαζόμενες μεταξύ τους, οδηγούν στην παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας ξυλοολιγοσακχαριτών. Επίσης, οι εξω-ξυλανάσες, δρουν από το αναγωγικό ή μη άκρο της ξυλάνης, αλλά και των ξυλοολιγοσακχαριτών που έχουν δημιουργηθεί από τις ξυλανάσες, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μικρότεροι ξυλοολιγοσακχαρίτες και ξυλόζη. Ακόμη, οι ξυλοζιδικάσες υδρολύουν τους ξυλοολιγοσακχαρίτες που έχουν προκύψει από τη δράση των ενδο- και εξω-ξυλανασών, παράγοντας ξυλόζη και παράλληλα αίροντας την παρεμπόδιση που ασκείται στις ξυλανάσες από την παρουσία των ξυλοολιγοσακχαριτών (Malgas et al. 2019). Εν ολίγοις, ο ομοσυνεργισμός βασίζεται αφ' ενός στο γεγονός πως η δράση ενός ενζύμου δημιουργεί προϊόν που λειτουργεί ως υπόστρωμα για τη δράση ενός άλλου και αφ' ετέρου στη διαφορετική εξειδίκευση που μπορεί να παρουσιάζουν ένζυμα με παρόμοια καταλυτική ενεργότητα, ως προς την υδρόλυση διαφορετικών τμημάτων του υποστρώματος, όπως συμβαίνει με ξυλανάσες διαφορετικών οικογενειών.

1.4.1.2. Ετεροσυνεργισμός

Ετεροσυνεργισμός, από την άλλη, παρουσιάζεται όταν ένα ένζυμο που δρα στην κύρια αλυσίδα της ξυλάνης συνεργάζεται με ένα ένζυμο που δρα σε πλευρική της αλυσίδα (π.χ. συνεργατική σχέση μεταξύ ενδο-ξυλανάσης και α-αραβινοφουρανοζιδικάσης ή μεταξύ ενδο-ξυλανάσης και εστεράσης του φερουλικού) (Κονάcs 2009; Malgas et al. 2020). Ένζυμα που δρουν στην πλευρική αλυσίδα, αφαιρούν τους πλαϊνούς υποκαταστάτες, δημιουργώντας, έτσι, χώρο για να δράσουν οι ξυλανάσες στην κύρια αλυσίδα και να παραγάγουν ξυλοολιγοσακχαρίτες. Συνεργισμός επίσης εμφανίζεται όταν ξυλανάσες διασπούν την κύρια αλυσίδα, παράγοντας ξυλοολιγοσακχαρίτες με υποκαταστάτες. Στη συνέχεια, οι υποκατεστημένοι αυτοί ξυλοολιγοσακχαρίτες λειτουργούν ως υποστρώματα για ένζυμα που απομακρύνουν τις πλευρικές υποκαταστάσεις, αλλά προτιμούν μικρότερου μεγέθους υποστρώματα (Malgas et al. 2019). Συνήθης είναι η προσθήκη εστερασών του φερουλικού οξέος, με σκοπό να αφαιρέσουν τα αντίστοιχα οξέα και να κάνουν το υπόστρωμα πιο προσιτό στις ενδο-ξυλανάσες, αυξάνοντας έτσι την απόδοση της υδρόλυσης του υποστρώματος (Schmitz et al. 2022).

1.4.1.3. Αντισυνεργισμός

Ο αντισυνεργισμός αφορά στη δράση ενζύμων με παρόμοια εξειδίκευση, οπότε το ένα δε συνεισφέρει στη δράση του άλλου ή ακόμα μπορεί να ανταγωνιστούν μεταξύ τους για την πρόσδεση στο υπόστρωμα, ή αφορά στη δράση ενζύμων που αφαιρούν πλευρικούς υποκαταστάτες, οι οποίοι όμως είναι απαραίτητοι για τη δράση ενός άλλου ενζύμου (Moreira and Filho 2016; Wong and Maringer 1999). Για παράδειγμα, η απομάκρυνση της αραβινόζης από την α-αραβινοφουρανοζιδικάση παρεμποδίζει τη δράση ενδο-ξυλανάσης με εξειδίκευση στην αραβινοξυλάνη, η οποία διασπά την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης, μόνο παρουσία υποκαταστατών αραβινόζης (Κονάcs 2009).

1.4.2. Βαθμός συνεργισμού

Ο βαθμός συνεργισμού (degree of synergy, DS) ποσοτικοποιεί την ικανότητα δύο ή περισσότερων ενζύμων να συνεργάζονται, έτσι ώστε η συνολική τους δράση σε ένα υπόστρωμα να ενισχυθεί. Ορίζεται ως το πηλίκο της δραστηριότητας των ενζύμων όταν είναι συνδυασμένα προς το άθροισμα των επιμέρους

δραστηριοτήτων τους στο ίδιο υπόστρωμα και μπορεί να υπολογιστεί βάσει της παραγωγής προϊόντος, της μετατροπής του υποστρώματος ή του ρυθμού αντίδρασης (Van Dyk and Pletschke 2012). Βαθμός συνεργισμού μεγαλύτερος της μονάδας υποδηλώνει πως υπάρχει σαφής συνέργεια μεταξύ των ενζύμων και πως ο συνδυασμός τους είχε αυξημένη δραστηριότητα. Ένας βαθμός συνεργισμού ίσος με τη μονάδα υποδεικνύει πως δεν υπήρξε συνεργασία μεταξύ των ενζύμων, αλλά ότι αυτά ήταν σε θέση να δράσουν στο υπόστρωμα, χωρίς η παρουσία του ενός να επηρεάζει τη δραστηριότητα του άλλου. Τέλος, αν ο βαθμός συνεργισμού είναι χαμηλότερος της μονάδας σημαίνει πως αφ' ενός δεν υπήρξε κάποια συνέργεια και αφ' ετέρου τα ένζυμα πιθανόν να ανταγωνίζονταν μεταξύ τους για να δεσμευτούν στο υπόστρωμα (Van Dyk et al. 2013). Ο βαθμός συνεργισμού εξαρτάται από την αναλογία των μοριακών βαρών των ενζύμων που χρησιμοποιούνται, από τη συγκέντρωσή τους στο διάλυμα, από τις ιδιότητες του υποστρώματος και από τη χρονική διάρκεια της αντίδρασης. Ο βαθμός συνεργισμού πρέπει να ερμηνεύεται με γνώμονα τον μηχανισμό κάθε ενζύμου και τη δομή του υποστρώματος (Van Dyk and Pletschke 2012).

1.4.3. Διαδοχικός και ταυτόχρονος συνεργισμός

Θα μπορούσε κανείς να υποθέσει πως, σε ένα υποκατεστημένο υπόστρωμα, όπως η αραβινοξυλάνη, θα μπορούσαν πρώτα να απομακρυνθούν οι υποκαταστάτες από τα ανάλογα ένζυμα και στη συνέχεια να δράσει το ενδο-ένζυμο, προκειμένου να μπορεί ευκολότερα να διασπάσει την κύρια αλυσίδα, αφού θα υπάρχει περισσότερος χώρος, άρα και μεγαλύτερη άνεση πρόσδεσης στο υπόστρωμα (Van Dyk and Pletschke 2012). Ωστόσο, τα αποτελέσματα των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί δεν συγκλίνουν, καθώς σε κάποιες μελέτες συμπεραίνεται πως τα ένζυμα εμφανίζουν μεγαλύτερο βαθμό συνεργισμού όταν προστεθούν ταυτόχρονα στο μείγμα, ενώ σε άλλες συμβαίνει το αντίθετο. Για παράδειγμα, πειράματα που διεξήχθησαν σε αδιάλυτη πεντοζάνη (water insoluble pentosan) από αλεύρι σίτου (πολυσακχαρίτης που περιέχει όλες τις υποκαταστάσεις που συνήθως υπάρχουν στις ξυλάνες, εκτός από τις ακετυλιώσεις) έδειξαν πως περισσότερη ξυλόζη απελευθερώθηκε μετά από ταυτόχρονη δράση ξυλανασών, παρά μετά από διαδοχική τους δράση (de Vries et al. 2000). Αντιθέτως, η διαδοχική δράση πρώτα ενζύμων που δρουν στους υποκαταστάτες (εστεράσης του οξικού και α-L-αραβινοφουρανοζιδάσης) και ύστερα ενζύμων που δρουν στην κύρια αλυσίδα (ξυλανάσης και β-ξυλοζιδάσης) ήταν αυτή που εμφάνισε τον μεγαλύτερο βαθμό συνεργισμού σε ξυλάνη από βρώμη, στάχυα και φλοιό καλαμποκιού (Raweesri, Riangrungrojana, and Pinphanichakarn 2008). Αξίζει, ακόμη, να σημειωθεί πως σε δοκιμές σε ακετυλιωμένη 4-O-γλυκουρονοξυλάνη, τα προϊόντα της υδρόλυσης ποίκιλλαν αναλόγως της ταυτόχρονης ή της διαδοχικής δράσης ενζύμων: ταυτόχρονη δράση ξυλανάσης και εστεράσης του οξικού οδήγησε σε μεγαλύτερη απελευθέρωση οξικού οξέος, ξυλοβιόζης και ξυλοτριόζης, δράση ξυλανάσης και κατόπιν εστεράσης οδήγησε στην παραγωγή διάφορων ξυλοολιγομερών, τόσο ουδέτερων όσο και υποκατεστημένων με ουρονικά οξέα, ενώ τέλος, όταν έδρασε πρώτα η εστεράση και στη συνέχεια η ξυλανάση, τα κύρια προϊόντα ήταν η ξυλοβιόζη και η 4-O-μεθυλ-γλυκουρονοζυλ-ξυλοτριόζη (Puls et al. 1991). Οι διαφορές στα χαρακτηριστικά των ενζύμων και των υποστρωμάτων καθιστούν δύσκολη την πρόβλεψη για το εάν η ταυτόχρονη ή η διαδοχική προσθήκη ενζύμων θα επιτύγχανε τη μεγαλύτερη συνέργεια. Εν τούτοις, ο προσδιορισμός της βέλτιστης μεθόδου (διαδοχικής ή ταυτόχρονης προσθήκης) είναι σημαντικός, προκειμένου να γίνουν πιο κατανοητά τα χαρακτηριστικά των ενζύμων και ο μηχανισμός συνεργασίας μεταξύ τους (Van Dyk and Pletschke 2012).

1.5. Σκοπός

Η εύρεση τρόπων αποικοδόμησης της ημικυτταρίνης, του δεύτερου μεγαλύτερου κλάσματος της βιομάζας, είναι πολύ σημαντική, υπό το πρίσμα ανάπτυξης των βιοδιυλιστηρίων δεύτερης γενιάς. Η χρήση ξυλοολιγοσακχαριτών είτε ως ενδιάμεσα, είτε ως τελικά προϊόντα παρουσιάζει σημαντικές προοπτικές, επομένως πρέπει να δοθεί έμφαση στον σχεδιασμό εναλλακτικών μεθόδων διάσπασης της ημικυτταρίνης, ακολουθώντας πράσινες, βιοκαταλυτικές διεργασίες. Βάση των διεργασιών αυτών αποτελεί ο τρόπος δράσης των ενζύμων, καθώς και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Η παρούσα διπλωματική εργασία στοχεύει στη μελέτη του μηχανισμού δράσης ημικυτταρινολυτικών ενζύμων και στη διερεύνηση τυχόν σχέσεων που αναπτύσσονται κατά τη συνδυασμένη δράση τους. Συγκεκριμένα, μελετάται η επίδραση βοηθητικών ενζύμων, που απομακρύνουν δηλαδή υποκαταστάτες από την κύρια αλυσίδα της ημικυτταρίνης, στην καταλυτική δράση των ξυλανασών, οι οποίες δρουν στην κύρια αλυσίδα, σε πολυμερικά υποστρώματα και σύνθετα δείγματα προκατεργασμένης βιομάζας. Η μελέτη επικεντρώνεται γύρω από τον τρόπο λειτουργίας και τις σχέσεις που αναπτύσσει με άλλα ένζυμα μία αραβινοφουρανοζιδάση της οικογένειας των γλυκοζιδικών υδρολασών GH43 (*TtAbf43*)· ένζυμο που προέρχεται από τον μύκητα *Thermothelomyces thermophilus* και έχει παραχθεί μέσω ετερόλογης έκφρασης.

Η διερεύνηση ξεκινά από πολυμερικά υποστρώματα αραβινοξυλάνης, όπου μελετάται η δραστηριότητα της *TtAbf43* και συγκρίνεται με τη δραστηριότητα της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης *AnAbf51*. Στη συνέχεια, ερευνώνται υποστρώματα βιομάζας, ποικίλης σύστασης και πολυπλοκότητας, όπου εξετάζεται η δραστηριότητα των αραβινοφουρανοζιδασών και οι συνεργιστικές σχέσεις που αναπτύσσουν με ξυλανάσες των οικογενειών GH10, GH11 και GH30 (*TmXyn10*, *AnXyn11* και *TtXyn30A* αντίστοιχα) και προσδιορίζεται το προφίλ των προϊόντων του εκάστοτε ενζυμικού συνδυασμού. Κατόπιν, τα πειράματα επικεντρώνονται στις σχέσεις που διαμορφώνονται μεταξύ των αραβινοφουρανοζιδασών και εστερασών του οξικού οξέος των οικογενειών CE6 και CE16 (*OCE6* και *TtCE16* αντίστοιχα) σε υδρολύματα βιομάζας, τα οποία έχουν προκύψει με χρήση ξυλανάσης.

Η παρούσα διπλωματική εργασία προσφέρει νέα γνώση για τη δράση των εξεταζόμενων ενζύμων στη βιομάζα, αλλά και για τις σχέσεις που διαμορφώνουν μεταξύ τους. Εκτός αυτού, οι παρεμποδίσεις που φαίνεται να αντιμετωπίζουν κάποια ένζυμα από ορισμένους υποκαταστάτες της ημικυτταρίνης, αλλά και η εξειδίκευση που εμφανίζουν ως προς το εκάστοτε υπόστρωμα μπορούν να αποτελέσουν αφορμή για περαιτέρω μελέτη στον τομέα αυτό.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά

2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια – Αναλώσιμα υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της εν λόγω διπλωματικής εργασίας προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και AppliChem (Γερμανία) και έχουν καθαρότητα αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είναι κατασκευασμένα από τις εταιρείες Greiner-Bio One (Γερμανία), SCHOTT AG (Γερμανία), Erpendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.) και ROTH (Η.Π.Α.).

2.1.2. Ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Ρυθμιστικό διάλυμα	pH	Σύσταση
Οξικού οξέος – οξικού νατρίου	5	CH ₃ COOH 200 mM CH ₃ COONa 200 mM
Φωσφορικών	6	KH ₂ PO ₄ 500 mM K ₂ HPO ₄ 500 mM
Οξικού οξέος – οξικού καλίου	6	CH ₃ COOH 200 mM CH ₃ COOK 200 mM
Tris – υδροχλωρίου	8	Tris-base 200 mM HCl (πυκνό) 100 mM
Talon	8	Trizma 500 mM NaCl 3 M
SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης (Running buffer)	8,3	3,03 g/L Tris-base 14,4 g/L γλυκίνη 1 g/L SDS

		0,25 M Tris-base
		1,8 mL γλυκερόλη 50% v/v
SDS-PAGE δείγματος (Sample buffer)	6,8	1,8 mL β-μερκαπτοαιθανόλη
		0,71 g SDS
		2,85 mL μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1% w/v

2.1.3. Υποστρώματα

Τα πολυμερικά υποστρώματα αδιάλυτης αραβινοξυλάνης σίτου (insoluble wheat arabinoxylan) και διαλυτής αραβινοξυλάνης σίτου (wheat arabinoxylan), αγοράστηκαν από την εταιρεία Megazyme (Ιρλανδία). Το λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα βιομάζας από πίτυρο σίτου παρελήφθη από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, έχοντας υποστεί προκατεργασία με αιθανόλη, στους 130 °C. Η σύστασή του είχε ήδη προσδιοριστεί και ήταν η ακόλουθη: 30,4% κυτταρίνη, 10% λιγνίνη και 54% ημικυτταρίνη, με την ημικυτταρίνη να αποτελείται από αραβινόζη κατά 17,44%, από ξυλόζη κατά 35,49% και από γαλακτόζη κατά 1,68%. Το υπόστρωμα από πίτυρο καλαμποκιού παρελήφθη ακατέργαστο από τη βιομηχανία αλεύρων «Μύλοι Καρανίκας» (Αλεξάνδρεια Ημαθίας). Το υπόστρωμα υπέστη προκατεργασία, η οποία αναλύεται στην ενότητα [2.2.4](#), και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασής του, όπως περιγράφεται στην ίδια ενότητα, με τα εξής αποτελέσματα: γλυκόζη 22,0%, ξυλόζη 20,1%, αραβινόζη 9,0%, γαλακτόζη 3,3%, οξικό οξύ 13,5% και αδιάλυτη λιγνίνη 6,4%.

2.1.4. Ένζυμα

Τα εμπορικά ένζυμα που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- Αραβινοφουρανοζιδάση της οικογένειας GH51 (*AnAbf51*), η οποία υδρολύει μονές υποκαταστάσεις αραβινόζης από τον σκελετό της ξυλάνης (Megazyme, Ιρλανδία) [2].
- Ξυλανάση της οικογένειας GH10 (*TmXyn10*) (Megazyme, Ιρλανδία).
- Ξυλανάση της οικογένειας GH11 (*AnXyn11*) (Megazyme, Ιρλανδία).
- Ακετυλεστεράση της οικογένειας CE6, E-AXEAO-3KU (*OCE6*) (Megazyme, Ιρλανδία), η οποία καταλύει την υδρόλυση ακετυλομάδων από πολυμερή ξυλάνης, ακετυλιωμένης ξυλόζης, ακετυλιωμένης γλυκόζης, οξικού α-ναφθυλεστέρα και οξικού 4-νιτροφαιθυλεστέρα [3].
- α-Αμυλάση (Liquozyme, SCDS).
- Αμυλογλυκοζιδάση (Spirizyme, SCDS).

Εκτός των εμπορικών ενζύμων, χρησιμοποιήθηκαν και ένζυμα παραγμένα στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- Αραβινοφουρανοζιδάση της οικογένειας GH43 (*TtAbf43*).
- Ξυλοβιοϋδρολάση/γλυκουρονοξυλανάση της οικογένειας GH30 (*TtXyn30A*).
- Εστεράση του οξικού οξέος της οικογένειας CE16 (*TtCE16*).

Τα ένζυμα αυτά προέρχονται από τον μύκητα *T. thermophila* και εκφράστηκαν ετερόλογα στον ζυμομύκητα *P. pastoris*. συγκεκριμένα, η αραβινοφουρανοζιδάση *TtAbf43* παράχθηκε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα [2.2.5](#).

2.1.5. Όργανα και συσκευές

Καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός, ο οποίος περιλαμβάνει αυτόματες πιπέτες μεταβαλλόμενου όγκου, πιπέτες Pasteur, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, ογκομετρικούς κυλίνδρους, γυάλινα μπουκάλια αποστείρωσης, χωνιά, φιαλίδια Eppendorf (0,5, 1,5 και 2,0 mL), σωλήνες τύπου Falcon (15 και 50 mL), τρυβλία Petri, δοκιμαστικούς σωλήνες και σπαθίδες ανάδευσης και μεταφοράς υλικού.

Εκτός του βασικού εργαστηριακού εξοπλισμού, έγινε χρήση και πιο εξειδικευμένων οργάνων και συσκευών, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

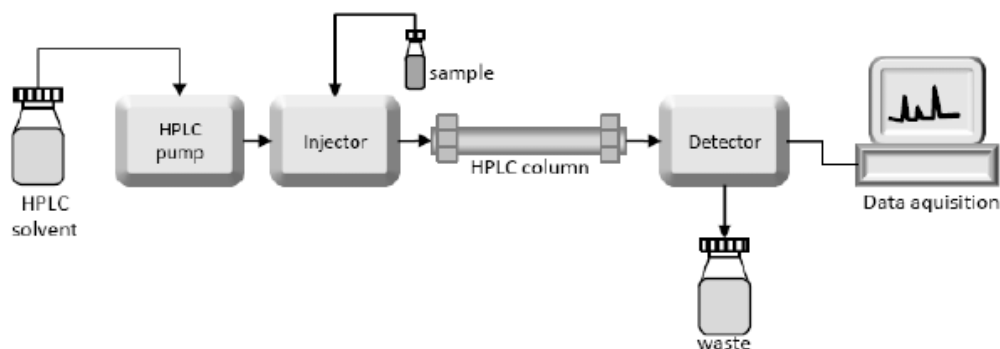
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία).
- Χρωματογράφος υψηλής απόδοσης ανιοεναλλαγής (High Performance Anion Exchange Chromatography - HPAEC, DIONEX), Sunnyvale, CA (Η.Π.Α.).
- Χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC), Shimadzu apparatus (Ιαπωνία).
- Φυγόκεντροι J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.) και φυγόκεντρος Sorval RC28S, DuPont (Η.Π.Α.).
- Επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- Δοχείο υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνες PM-30 και PM-10, Millipore (Η.Π.Α.).
- Συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) SPECTROstar Nano Microplate Reader, BMG Labtech (Γερμανία).
- Φωτόμετρο SpectraMax ABS Plus με λογισμικό SoftMax Pro 7, Molecular Devices (Η.Π.Α.).
- Φωτόμετρο UV2000, Hitachi (Η.Π.Α.).
- Φωτόμετρο HitachiU-2900 spectrophotometer, Hitachi High-Tech (Ιαπωνία).
- Σύστημα παραγωγής υπερκάρθρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.).
- Σύστημα παραγωγής απιονισμένου νερού.
- Αντλία εφαρμογής κενού Model No.DOA-P181-BN, PALL Gelman Laboratory (Η.Π.Α.) και φίλτρα διήθησης 0,45 μm και 0,22 μm, Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο) και Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.).
- Μετρητής pH 537, WTW (Γερμανία).
- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.).
- Ζυγί Mark 2060 και Mark 4065, BEL Engineering (Ιταλία) και ζυγός Abs 120-4, KERN & Sohn GmbH (Γερμανία).
- Αναδευτήρας δοκιμαστικών σωλήνων Vortex-2-Genie (Fisher Scientific, Σουηδία).
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Ηνωμένο Βασίλειο)
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης Nuova II Stir Plate, Thermolyne και Stirrer Magnetic w Hotplate, Bioline scientific (Ελλάδα).
- Ηλεκτρικός μύλος για άλεση στερεών υποστρωμάτων.
- Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο.
- Συσκευή ξήρανσης υπό κενό.

- Στήλη βαρύτητας BIO-RAD με ρητίνη Talon® ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου Clontech (Η.Π.Α.).

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού και χρησιμοποιείται σε πλήθος αναλυτικών εφαρμογών, καθώς είναι ικανή να διαχωρίσει ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των φαρμακευτικών προϊόντων, των τροφίμων, των χημικών της βαριάς βιομηχανίας, καθώς και βιοχημικών ουσιών (Bélanger, Jocelyn Paré, and Sigouin 1997). Βασίζεται στη μεταφορά μάζας μεταξύ μίας σταθερής και μίας κινητής φάσης· η τελευταία είναι υγρή και διαχωρίζει τα συστατικά του μείγματος. Στην HPLC, η υγρή φάση ωθείται μηχανικά διαμέσου μίας στήλης, που περιέχει τη στατική φάση. Επομένως, ένα βασικό σύστημα HPLC αποτελείται από έναν εγχυτήρα, μία αντλία, μία στήλη και έναν ανιχνευτή (Yandamuri and Nagabattula 2013).



Σχήμα 15. Σχηματική απεικόνιση του συστήματος HPLC (Czaplicki 2013).

Το σύστημα της HPLC (Shimadzu LC-20AD) είναι εξοπλισμένο με έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI-Shimadzu RID 10A), με έναν αυτόματο τροφοδότη δειγμάτων, ένα σύστημα διαλυτών και λογισμικό επεξεργασίας δειγμάτων. Η στήλη HPX-87H (300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad) συνδέθηκε με την προσθήκη Cation H Cartridge Micro Guard (Bio-Rad). Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 50 °C και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα H₂SO₄ συγκέντρωσης 0,3 g/L. Ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε σε 0,6 mL/min και η ανάλυση κάθε δείγματος διήρκεσε 40 min. Για την ανάλυση σύστασης του πίτυρου σίτου, χρησιμοποιήθηκε η στήλη HPX-87P, η οποία συνδέθηκε με τη στήλη Carbo-P Micro Guard (Bio-Rad), ενώ αυτή ήταν συνδεδεμένη με δύο προσθήκες De-Ashing Micro Guard. Και σε αυτήν την περίπτωση, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε ισοκρατικά με διαλύτη υπερκάθαρο νερό και ρυθμό ροής ίσο με 0,6 mL/min. Η ανάλυση κάθε δείγματος διήρκεσε 40 min και η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 85 °C.

2.2.2. Χρωματογραφία ανιονεναλλαγής υψηλής απόδοσης (High Performance Anion-Exchange Chromatography, HPAEC)

Η χρωματογραφία ανιονεναλλαγής υψηλής απόδοσης (HPAEC), αποτελεί ένα σύστημα διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης υδατανθράκων, υψηλής ακρίβειας, ευαισθησίας και διαχωριστικής ικανότητας (Lee 1996; Zhang et al. 2012). Ο παλμικός αμπερομετρικός ανιχνευτής (PAD) συμβάλλει περαιτέρω στην ενίσχυση της ευαισθησίας της μεθόδου, ανιχνεύοντας υδατάνθρακες σε συγκεντρώσεις της τάξης των 10 pmol (Lee 1990). Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιούνται κυρίως ισχυρά αλκαλικά διαλύματα, συνήθως NaOH. Σε αυτές τις συνθήκες, οι υδροξυλομάδες των υδατανθράκων μετατρέπονται σε οξυανιόντα, επιτρέποντας στους υδατάνθρακες να χρωματογραφούνται χωρίς την παρουσία προσθέτων, όπως τα βορικά. Οι διαφορετικές αλληλεπιδράσεις αυτών των οξυανιόντων με τη ρητίνη της στήλης (όπου ανταλλάσσονται ανιόντα) συντελούν στους διαφορετικούς χρόνους έκλουσης των σακχάρων από τη στήλη (Lee 1990).

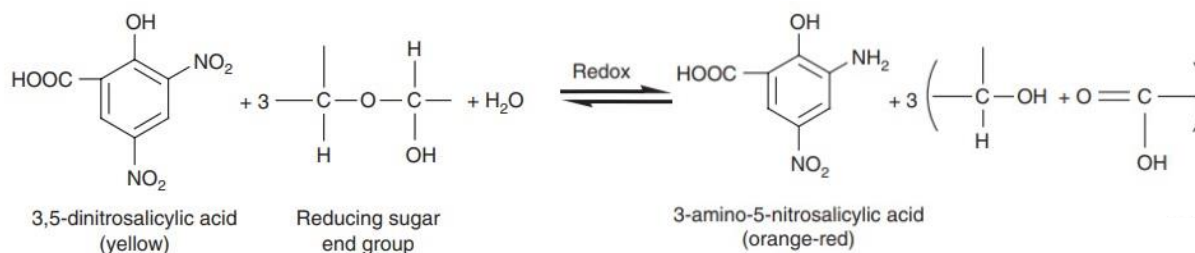
Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, η HPAEC χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό και την ανάλυση γραμμικών και ουρονικών ολιγοσακχαριτών, αφού επιτυγχάνει έναν επιλεκτικό διαχωρισμό σε υψηλό pH, εκμεταλλεύομενη την ανταλλαγή ανιόντων στη στατική φάση. Το χρωματογραφικό σύστημα περιελάμβανε έναν παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή ED40 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) συνδεδεμένο με ένα ηλεκτρόδιο και μία στήλη CarboPac PA-1 (4 x 250 nm), με μία IC CarboPAC PA1 (4 x 50 nm) προστατευτική στήλη. Το κάθε σάκχαρο ταυτοποιήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε βάσει καμπύλης αναφοράς από δείγματα γνωστής συγκέντρωσης των επιθυμητών σακχάρων. Η ανίχνευση των ολιγοσακχαριτών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας σύστημα τριών διαλυτών: 10 mM NaOH (διαλύτης A), 100 mM NaOH (διαλύτης B) και 0,5 M οξικού νατρίου (CH₃COONa) σε 100 mM NaOH (διαλύτης C). Οι συνθήκες έκλουσης ήταν οι εξής:

- 0-3 min: ισοκρατική ροή, 100% διαλύτης A,
- 3-10 min: γραμμικά βαθμωτή ροή, 100% διαλύτης B,
- 10-40 min: γραμμικά βαθμωτή ροή, 70% διαλύτης B και 30% διαλύτης C,
- 40-41 min: εκθετικά βαθμωτή ροή, 100% διαλύτης C,
- 41-45 min: ισοκρατική ροή, 100% διαλύτης C,
- 45-46 min: εκθετικά βαθμωτή ροή, 100% διαλύτης B,
- 46-52 min: ισοκρατική ροή, 100% διαλύτης B,
- 52-53 min: εκθετικά βαθμωτή ροή, 100% διαλύτης A και
- 53-60 min: ισοκρατική ροή, 100% διαλύτης A.

2.2.3. Μέτρηση ολικών αναγωγικών σακχάρων με τη χρήση διαλύματος 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)

Η μέθοδος του δινιτροσαλικυλικού οξέος αποτελεί τακτική ρουτίνας που στοχεύει στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων σε ενζυμικά υδρολύματα. Αποτελεί μία μη εξειδικευμένη μέθοδο, χαμηλότερης ακρίβειας σε σχέση με πιο προηγμένες αναλύσεις HPLC ή GC, ωστόσο χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της αμεσότητας που προσφέρει (Hu et al. 2008; Wood et al. 2012). Πρόκειται για χρωματομετρική τεχνική, όπου το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ, που έχει κίτρινο χρώμα, ανάγεται σε 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ, που διαθέτει βαθύτερο πορτοκαλί χρώμα, από τις αλδεϋδο-

ομάδες των αναγωγικών σακχάρων (Marsden et al. 1982). Ένα σάκχαρο χαρακτηρίζεται αναγωγικό, όταν διαθέτει μία αλδεΐδο-ομάδα, η οποία του επιτρέπει να δράσει ως αναγωγικό μέσο (Patata et al. 2007). Η αντίδραση που πραγματοποιείται αναπαρίσταται στο [Σχήμα 16](#).



Σχήμα 16. Οξειδοαναγωγική αντίδραση DNS. Το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ (κίτρινο χρώμα) ανάγεται από την αλδεΐδο-ομάδα του αναγωγικού σακχάρου σε 3-αμινο-5-σαλικυλικό οξύ (βαθύ πορτοκαλί – κόκκινο χρώμα) (Hu et al. 2008).

Η μέθοδος DNS εφαρμόζεται σε κάθε δείγμα ενζυμικής αντίδρασης, αφού αυτό αραιωθεί σε τέτοιο βαθμό έτσι ώστε το αποτέλεσμα της μέτρησης να βρίσκεται εντός των ορίων βαθμονόμησης του οργάνου, και συγκεκριμένα η απορρόφηση του δείγματος θα πρέπει να κυμαίνεται από 0,100 έως 0,500. 50 μL κάθε δείγματος τοποθετούνται στον αντίστοιχο δοκιμαστικό σωλήνα και στη συνέχεια προστίθενται 50 μL DNS. Επίσης, παρασκευάζεται και ένα τυφλό (blank) διάλυμα, που περιέχει απιονισμένο νερό, αντί δείγματος, και DNS, στην ίδια αναλογία. Κάθε δείγμα παρασκευάζεται εις διπλούν, ώστε να διαβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Τα δείγματα αναδεύονται στη συσκευή Vortex για 5 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια βράζουν για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο απιονισμένου νερού. Μόλις τελειώσει ο βρασμός, προστίθενται 400 μL απιονισμένου νερού σε κάθε δείγμα, προκειμένου να παύσει η αντίδραση και τα δείγματα αναδεύονται ξανά στο Vortex για 5 δευτερόλεπτα. Ύστερα, λαμβάνονται 250 μL από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και τοποθετούνται σε μία κυψελίδα της πλάκας ανάγνωσης, κατάλληλης για τη συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) και πραγματοποιείται μέτρηση στα 540 nm. Χρησιμοποιώντας καμπύλη αναφοράς που έχει κατασκευαστεί βάσει δειγμάτων ξυλόζης γνωστής συγκέντρωσης, η απορρόφηση των δειγμάτων μετατρέπεται σε ανάλογο συγκέντρωσης ξυλόζης στα δείγματα.

2.2.4. Προκατεργασία υποστρωμάτων

Τα διαλύματα από τα πολυμερικά υποστρώματα αραβινοξυλάνης σίτου και σίκαλης παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που παρέχονται από τον προμηθευτή, χωρίς κάποια επιπλέον επεξεργασία. Αντίθετα, το πίτυρο σιταριού που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα αλέστηκε, έτσι ώστε οι ίνες να αποκτήσουν μικρότερο μέγεθος και να είναι πιο προσβάσιμες από τα ημικυτταρινολυτικά ένζυμα. Σε ό,τι αφορά στο πίτυρο καλαμποκιού, αποτελεί το μοναδικό υπόστρωμα που παρελήφθη τελειώς ακατέργαστο, οπότε και ακολουθήθηκε διαδικασία προκατεργασίας, προκειμένου να γίνει περισσότερο επιδεκτικό σε ενζυμική υδρόλυση.

Κατ' αρχάς, 50 g πίτυρου αλέστηκαν για περίπου 5 λεπτά σε κατάλληλη αλεστική μηχανή, προκειμένου να μειωθεί το μέγεθος των κόκκων. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα 200 mM CH₃COOH/CH₃COOK, με pH 6 και σε 300 mL του ρυθμιστικού προστέθηκαν 30 g της αλεσμένης βιομάζας (συγκέντρωση 10%). Προστέθηκαν 3 mL α-αμυλάσης και το μείγμα επώαστηκε σε υδατόλουτρο για 2 ώρες, στους 85 °C. Κατόπιν, το pH του μείγματος ρυθμίστηκε να είναι ίσο με 5, με χρήση καθαρού

οξικού οξέος, ενώ και η θερμοκρασία του ρυθμίστηκε στους 60 °C. Προστέθηκαν 900 mL αμυλογλυκοζιδάσης και το μείγμα επωάστηκε για μία ώρα. Ύστερα, το μείγμα διηθήθηκε με φίλτρα Whatman και πραγματοποιήθηκε τέσσερις φορές έκπλυση με ίσους όγκους ζεστού νερού, θερμοκρασίας 60 °C. Το διήθημα απλώθηκε σε φύλλο αλουμινίου και τοποθετήθηκε για 24ωρη ξήρανση, στους 60 °C. Ελήφθησαν δείγματα από το αρχικό διήθημα, από τα τέσσερα κλάσματα πλύσεων, καθώς και από το υπερκείμενο υγρό μετά την προκατεργασία, με σκοπό τον προσδιορισμό της γλυκόζης και τον υπολογισμό της απώλειας μάζας της βιομάζας. Μετά την ξήρανση της βιομάζας, παρασκευάστηκε αραιό υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 3% και σε αυτό προστέθηκε το απαμυλωμένο, πλέον, πίτυρο καλαμποκιού, σε συγκέντρωση 10% w/v. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε αυτόκαυστο για μία ώρα, στους 100 °C, προκειμένου να σπάσουν οι ίνες λόγω της παρουσίας οξέος και της υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης. Με το πέρας της αποστείρωσης, το υπερκείμενο αποχύθηκε, ενώ στο ίζημα πραγματοποιήθηκαν συνεχείς πλύσεις με απιονισμένο νερό. Το ίζημα που απέμεινε οδηγήθηκε για εκ νέου 24ωρη ξήρανση, στους 60 °C.

Τέλος, η ανάλυση της σύστασης του συγκεκριμένου υποστρώματος πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία, στην HPLC, βάσει της μεθοδολογίας που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1. Για τον προσδιορισμό του οξικού οξέος, 10 mg δείγματος επαναιωρήθηκαν σε 4 mL υδατικού διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 4 M. Το μείγμα επωάστηκε για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ήπια ανάδευση, και το υπερκείμενο οδηγήθηκε για ανάλυση, στην HPLC, χρησιμοποιώντας την H στήλη. Για τον προσδιορισμό των σακχάρων που περιείχε το πίτυρο καλαμποκιού, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα δείγματα γλυκόζης, γαλακτόζης, αραβινόζης, ξυλόζης και μαννόζης, συγκέντρωσης 0,25 και 0,50 mg/mL. Στην HPLC χρησιμοποιήθηκε η P στήλη και με βάση το εμβάδα της κορυφής των δύο συγκεντρώσεων των πρότυπων δειγμάτων, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς κάθε σακχάρου. Στη συνέχεια, εξετάστηκε το χρωματογράφημα του πίτυρου καλαμποκιού και προσδιορίστηκαν τα σάκχαρα που περιείχε βάσει των ανάλογων χρόνων έκλουσης με τα πρότυπα δείγματα, οπότε και βρέθηκε πως το πίτυρο καλαμποκιού δεν περιείχε μαννόζη. Ανάλογα με το εμβάδόν της κάθε κορυφής ποσοτικοποιήθηκε η συγκέντρωση του υποστρώματος σε κάθε σάκχαρο, χρησιμοποιώντας τις καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν από τα πρότυπα δείγματα.

2.2.5. Ετερόλογη έκφραση/παραγωγή της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43*

2.2.5.1. Παρασκευή τρυβλίων

Η αραβινοφουρανοζιδάση *TtAbf43* παράχθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, μέσω ετερόλογης έκφρασης του ζυμομύκητα *P. pastoris*. Όλα τα στάδια παρασκευής και επεξεργασίας των προκαλλιιεργειών και των καλλιιεργειών του ζυμομύκητα πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε αποστειρωμένο χώρο εργασίας UNIFLOW UV1200, πλησίον φλόγας. Αρχικά, παρασκευάστηκαν τρυβλία με θρεπτικό μέσο YPD (Yeast extract Peptone Dextrose medium), του οποίου η σύσταση παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Σύσταση θρεπτικού μέσου YPD.

Συστατικό	Περιεκτικότητα θρεπτικού μέσου (σε απιονισμένο νερό)
Εκχύλισμα ζύμης	1% w/v
Πεπτόνη	2% w/v
Άγαρ	1,5% w/v
Γλυκόζη	2% w/v

Η αποστείρωση του θρεπτικού μέσου πραγματοποιήθηκε σε αυτόκλειστο στους 109 °C για 40 λεπτά. Η γλυκόζη δεν προστίθεται εξαρχής στο διάλυμα, αλλά αποστειρώνεται ξεχωριστά, σε χαμηλότερη θερμοκρασία, προκειμένου να αποφευχθεί η αποδόμησή της.

Ύστερα, στο θρεπτικό μέσο προστέθηκε ζεοσίνη, σε τελική συγκέντρωση 100 µg/mL και το θρεπτικό υλικό μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και αφέθηκε σε ηρεμία, μέχρι να στερεοποιηθεί. Όταν τα τρυβλία ήταν έτοιμα, εμβολιάστηκαν από το κυτταρικό απόθεμα γλυκερόλης, το οποίο διατηρείται σε υπερκατάψυξη (-80 °C) και κατόπιν επωάστηκαν σε σταθερό επωαστήριο στους 28 °C για 2 overnights¹. Ο αναπτυσσόμενος ζυμομύκητας χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για εμβολιασμό των υγρών προκαλλιιεργειών, ενώ τα τρυβλία αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο (4 °C), αφού σφραγίστηκαν με parafilm.

2.2.5.2. Παρασκευή θρεπτικών μέσων και εμβολιασμός προκαλλιιεργειών

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τις προκαλλιιεργειες *P. pastoris* είναι το BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium) και για τις καλλιιεργειες είναι το BMMY (Buffered Methanol-complex Medium). Η σύσταση του καθενός παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Σύσταση θρεπτικών μέσων BMGY και BMMY για τις προκαλλιιεργειες και τις καλλιιεργειες του *P. pastoris*.

Συστατικό	Περιεκτικότητα στο BMGY (σε απιονισμένο νερό)	Περιεκτικότητα στο BMMY (σε απιονισμένο νερό)
Πεπτόνη	2% w/v	2% w/v
Εκχύλισμα ζύμης	1% w/v	1% w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH=6,0	10% w/v	10% w/v
Υδατικό διάλυμα YNB	10% w/v	10% w/v
Βιοτίνη	0,2% w/v	0,2% w/v

¹ Overnight: χρονικό διάστημα ίσο με 24 ώρες.

Μεθανόλη	-	0,5% w/v
Υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 10% v/v	10% w/v	-

Το υδατικό διάλυμα YNB που αναφέρεται ως συστατικό των δύο θρεπτικών μέσων περιέχει 3,4% w/v YNB (Yeast Nitrogen Base) και 10% w/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, σε απιονισμένο νερό.

Οι κωνικές φιάλες που χρησιμοποιήθηκαν στις προ- και στις κύριες καλλιέργειες ασφαλίστηκαν με ειδικά πώματα, περατά στον αέρα, επικαλύφθηκαν με φύλλο αλουμινίου και αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 20 λεπτά.

Το θρεπτικό υλικό BMGY, μετά την αποστείρωσή του, και όταν έφτασε σε θερμοκρασία όπου να μπορούσε να υποστεί επεξεργασία από τον πειραματιστή, μοιράστηκε ομοιόμορφα σε κωνικές φιάλες όγκου 500 mL. Στη συνέχεια, με χρήση αποστειρωμένου ρύγχους (tip), συλλέχθηκε κυτταρικό υλικό από τα τρυβλία που είχαν παρασκευαστεί, βάσει της διαδικασίας που περιεγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, και διαλύθηκε στο θρεπτικό μέσο των κωνικών φιαλών. Οι προκαλλιέργειες επωάστηκαν σε ανακινούμενους επωαστήρες, στους 28 °C και 180 rpm για 24 ώρες.

2.2.5.3. Ανάπτυξη καλλιιεργειών

Για την ανάπτυξη των καλλιιεργειών, αρχικά παρασκευάστηκε το θρεπτικό μέσο BMMY, βάσει της συνταγής που περιγράφεται στον Πίνακα 3. Μετά την αποστείρωσή του, και όταν έφτασε σε διαχειρίσιμη θερμοκρασία, μοιράστηκε ανά 250 mL σε κωνικές φιάλες όγκου 1 L. Ο εμβολιασμός των κωνικών φιαλών πραγματοποιήθηκε ως εξής: από κάθε φιάλη της προκαλλιέργειας λήφθηκε ορισμένη ποσότητα δείγματος (περίπου 1 mL), η οποία αραιώθηκε 1:50 με απιονισμένο νερό, έτσι ώστε η επικείμενη μέτρηση οπτικής πυκνότητας να κυμαίνεται από 0 έως 1. Η οπτική πυκνότητα του δείγματος μετρήθηκε στα 600 nm, χρησιμοποιώντας κυψελίδα όγκου 1 mL, η οποία τοποθετήθηκε σε φωτόμετρο. Οι κωνικές φιάλες της καλλιέργειας εμβολιάστηκαν από την κωνική φιάλη της προκαλλιέργειας που εμφάνισε τη μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα. Ο όγκος εμβολιασμού υπολογίστηκε ως ο όγκος προκαλλιέργειας στον οποίο περιέχονται αρκετά κύτταρα, έτσι ώστε αν αυτά καταβυθιστούν με φυγοκέντρηση και επαναιωρηθούν στο θρεπτικό μέσο των καλλιιεργειών, η οπτική πυκνότητα να ισούται περίπου με τη μονάδα. Ο υπολογισμός του όγκου πραγματοποιήθηκε βάσει του νόμου της αραιώσης:

$$V_{\text{προκαλλιέργειας}} * OD_{\text{προκαλλιέργειας}} = V_{\text{καλλιέργειας}} * OD_{\text{καλλιέργειας}}$$

Όπου το επιθυμητό OD της καλλιέργειας λαμβάνεται ίσο με τη μονάδα, ως όγκος καλλιέργειας λαμβάνεται ο τελικός όγκος της κωνικής φιάλης και η εξίσωση επιλύθηκε ως προς τον όγκο της προκαλλιέργειας, τα κύτταρα του οποίου θα χρησιμοποιηθούν ως εμβόλιο. Αφού υπολογίστηκε ο όγκος εμβολιασμού, μεταφέρεται σε αποστειρωμένα δοχεία falcon για φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο, για 5 λεπτά, στους 4 °C και στις 10.000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε στο νέο θρεπτικό υλικό (BMMY). Οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε ανακινούμενους επωαστήρες, στους 28 °C και 180 rpm για 5 ημέρες. Καθημερινά, παρεχόταν μεθανόλη ως επαγωγικό μέσο για την έκφραση της πρωτεΐνης, σε αναλογία 0,5% v/v.

2.2.6. Απομόνωση της αραβινοφουρανοζιδάσης TtAbf43

2.2.6.1. Διήθηση υπό κενό

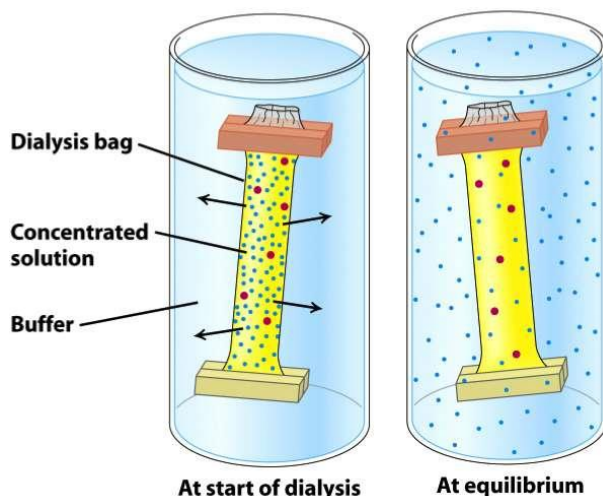
Με το πέρας της περιόδου καλλιέργειας (5 ημέρες), ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης του ενζύμου, που είχε παραχθεί εξωκυτταρικά από τον ζυμομύκητα και απεκκριθεί, επομένως απομακρύνθηκαν αρχικά τα κύτταρα και οποιαδήποτε άλλα στερεά στοιχεία από το υγρό της καλλιέργειας. Η απομάκρυνση πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντρηση: το υγρό της καλλιέργειας αποχύθηκε σε δοχεία falcon, τα οποία στη συνέχεια ισοσταθμίστηκαν και εν τέλει φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο, στους 4 °C, για 15 λεπτά και στις 10.000 rpm. Με το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο υγρό, που ήταν πλέον διαυγές, οδηγήθηκε για διήθηση υπό συνθήκες κενού. Χρησιμοποιώντας διάταξη που περιελάμβανε αντλία κενού, το υγρό διήλθε αρχικά από χάρτινο διηθητικό ηθμό, στη συνέχεια από μικροβιοκρατή ηθμό πόρων διαμέτρου 0,45 μm και τέλος από μικροβιοκρατή ηθμό πόρων διαμέτρου 0,22 μm. Καθ' όλη τη διάρκεια της διήθησης, όλα τα διαλύματα διατηρούνται στον πάγο, προκειμένου να αποφευχθεί η αποδόμηση της πρωτεΐνης.

2.2.6.2. Συμπύκνωση με υπερδιήθηση

Με το πέρας της διήθησης, ακολούθησε συμπύκνωση του πρωτεϊνικού διαλύματος, με χρήση συσκευής υπερδιήθησης Amicon, με ειδική μεμβράνη PM-10, από την οποία διέρχονται όλες οι ενώσεις με μοριακό βάρος μικρότερο των 10 kDa. Στο σύστημα εφαρμόστηκε πίεση 40 Psi, η οποία οδήγησε το διάλυμα να διέλθει της μεμβράνης, οπότε και οι πρωτεΐνες με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10 kDa συμπυκνώθηκαν στο υγρό που παρέμενε εντός της συσκευής. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, όλα τα διαλύματα διατηρούνταν σε πάγο, για την προστασία του ενζύμου. Με χρήση του συστήματος Amicon επετεύχθη συμπύκνωση του αρχικού διαλύματος περί τις 20 φορές. Όταν τελείωσε η συμπύκνωση, η συσκευή καθαρίστηκε διαδοχικά με διάλυμα NaOH 0,1 M και απιονισμένο νερό, ενώ η μεμβράνη αποθηκεύτηκε στους 4 °C, σε υδατικό διάλυμα αιθανόλης 20% v/v.

2.2.6.3. Εξισορρόπηση πρωτεϊνικού διαλύματος με διαπίδυση

Μετά τη συμπύκνωση, σειρά είχε η εξισορρόπηση του διαλύματος σε συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της διαπίδυσης (dialysis) (Σχήμα 17). Η συγκεκριμένη διαδικασία βασίζεται στη φυσική μέθοδο της διάχυσης, κατά την οποία δύο διαλύματα χωρίζονται από μία πορώδη, ημιπερατή μεμβράνη και πραγματοποιείται μεταφορά σωματιδίων μεταξύ των δύο διαλυμάτων, μέσω της μεμβράνης. Έχει ως αρχή το δυναμικό της συγκέντρωσης, δηλαδή τα σωματίδια μεταφέρονται από το διάλυμα με την υψηλότερη συγκέντρωση σε αυτό με τη χαμηλότερη συγκέντρωση και χρησιμοποιείται για τη μεταβολή της συγκέντρωσης του διαλύτη ή των συστατικών του εκάστοτε εξισορροπούμενου διαλύματος. Χρησιμοποιήθηκε ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης 10 kDa (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 10.000 Da, Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.). Σφραγίστηκαν τα άκρα της και στη συνέχεια βυθίστηκε σε δοχείο που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα Talon (1x), όγκου ίσου με 100 φορές τον όγκο του εξισορροπούμενου υγρού. Το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα προέκυψε από την 1:10 αραιώση του πυκνού ρυθμιστικού διαλύματος Talon (10x), η σύσταση του οποίου περιγράφεται στον Πίνακα 1. Στις παρούσες καλλιέργειες το πρωτεϊνικό διάλυμα είχε όγκο 30 mL, οπότε παρασκευάστηκε και χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα όγκου 3 L.



Σχήμα 17. Μηχανισμός λειτουργίας εξισορρόπησης με διαπίδυση (dialysis) [4].

2.2.6.4. Απομόνωση του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (Immobilised Metal Affinity Chromatography – IMAC)

Μετά την εξισορρόπηση, το ένζυμο *TtAbf43* έπρεπε να απομονωθεί από τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και συγκεκριμένα με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (Immobilised Metal Affinity Chromatography/IMAC). Το συγκεκριμένο είδος χρωματογραφίας βασίζεται στη συγγένεια μεταξύ των ιόντων των μετάλλων στοιχειώδους μετάπτωσης (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} και Co^{2+}) και των αμινοξέων ιστιδίνη, κυστεΐνη και τρυπτοφάνη σε υδατικά διαλύματα (Block et al. 2009; Cheung, Wong, and Ng 2012). Επομένως, στήλες στις οποίες βρίσκονται ακινητοποιημένα ιόντα των εν λόγω μετάλλων μπορούν να απομονώσουν μία πρωτεΐνη, η οποία έχει ανασυνδυαστεί, έτσι ώστε να διαθέτει μία ετικέτα-ουρά διαδοχικών ιστιδινών (His-tag) στο καρβοξυτελικό άκρο της αμινοξικής αλληλουχίας, όπως και συμβαίνει στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη της παρούσας εργασίας. Τα ιόντα μπορούν να απελευθερώσουν την πρωτεΐνη, όταν στη στήλη εισέλθει ένας ισχυρότερος χημικός ανταγωνιστής, όπως το ιμιδαζόλιο.

Στα πειράματα που διεξήχθησαν, χρησιμοποιήθηκε στήλη βαρύτητας Talon® με ρητίνη Talon ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου (TALON Metal Affinity Resin), της οποίας ο όγκος είναι περίπου 4 mL (Column Volume, CV=20 mL). Τα στάδια που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση της πρωτεΐνης είναι τα εξής:

- i. Απομάκρυνση του διαλύματος αιθανόλης 20% v/v, το οποίο περιέχεται στη στήλη κατά τη φύλαξή της.
- ii. Έκπλυση με 1*CV (20 mL) υπερκάθαρου νερού.
- iii. Έκπλυση με 3*CV (60 mL) διαλύματος Talon: εξισορροπείται η μήτρα της στήλης.
- iv. Διέλευση του πρωτεϊνικού διαλύματος: η πρωτεΐνη δεσμεύεται στη ρητίνη, καθώς διαθέτει 6 ιστιδίνες στο άκρο της (6-His Tag), μέσω των οποίων προσδένεται στα κατιόντα κοβαλτίου της στήλης. Το διερχόμενο κλάσμα (flow through) συλλέγεται και τοποθετείται στον πάγο.
- v. Έκπλυση με 10 mL διαλύματος Talon: απομακρύνονται μη επιθυμητά πρωτεϊνικά μόρια. Το διερχόμενο κλάσμα (wash) συλλέγεται και τοποθετείται στον πάγο.

- vi. Έκπλυση με 5 mL διαλύματος Talon/ιμιδαζολίου, με τη συγκέντρωση του ιμιδαζολίου στο διάλυμα Talon να ισούται με 100 mM: απομακρύνονται μη επιθυμητά πρωτεϊνικά μόρια που είχαν προσδεθεί έστω και ελαφρώς στη ρητίνη. Το διερχόμενο κλάσμα συλλέγεται και τοποθετείται στον πάγο.
- vii. Δις έκπλυση με διάλυμα Talon/ιμιδαζολίου 100 mM όγκου 7 mL: η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκλούεται και συλλέγεται. Το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται τα κατάλοιπα ιστιδίνης, προκειμένου να προσδεθεί στα ιόντα κοβαλτίου, οπότε η πρωτεΐνη απελευθερώνεται. Τα κλάσματα συλλέγονται και τοποθετούνται στον πάγο.
- viii. Έκπλυση με 4*CV (80 mL) απιονισμένο νερό, για να καθαριστεί η στήλη.
- ix. Έκπλυση με 1*CV (80 mL) διαλύματος αιθανόλης 20% v/v: εξισορρόπηση με το διάλυμα αποθήκευσης της στήλης.
- x. Πλήρωση της στήλης με διάλυμα αιθανόλης 20% v/v και αποθήκευσή της στους 4 °C.

Τα κλάσματα που προέκυψαν σε καθένα από τα στάδια (iv) έως (vii) και συλλέχθηκαν, φωτομετρήθηκαν στα 280 nm, χρησιμοποιώντας ως τυφλή μέτρηση το σκέτο ρυθμιστικό διάλυμα Talon, με σκοπό να προσδιοριστεί σε ποιο κλάσμα βρίσκεται η κύρια ποσότητα ενζύμου. Τελικά, το καθαρό ένζυμο έχει όγκο περίπου 15 mL.

Μετά τον καθαρισμό του ενζύμου, εξισορροπήθηκε και αυτό σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl και αφαλατώθηκε προκειμένου να αποθηκευτεί. Ακολουθήθηκε και πάλι η διαδικασία της διαπίδυσης από ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης (Dialysis). Δηλαδή, η μεμβράνη που περιείχε το ένζυμο (περίπου 15 mL) βυθίστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (περίπου 1,5 L) συγκέντρωσης 20 mM και pH 8.

2.2.6.5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Προκειμένου να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος του παραγόμενου ενζύμου, αλλά και να ελεγχθεί η καθαρότητά του, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE), μέθοδος που διαχωρίζει και ταυτοποιεί τις πρωτεΐνες βάσει του μοριακού τους βάρους.

Το πολυακρυλαμίδιο πρόκειται για μια χημικά αδρανή ένωση, σταθερή σε μεγάλο εύρος τιμών pH, ιονικής ισχύος και θερμοκρασίας. Το πήκτωμα προκύπτει από τον πολυμερισμό του μονομερούς (ακρυλαμίδιο) σε μακριές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου, καθώς επίσης και από τη δημιουργία εγκάρσιων διακλαδώσεων με ομάδες του δις-ακρυλαμιδίου (cross-linking). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται παρουσία καταλύτη, του υπερθειικού αμμωνίου (APS), και ενεργοποιητή, της N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλενο-διαμίνης (TEMED). Στη μέθοδο χρησιμοποιούνται δύο αντιδραστήρια, η 2-μερκαπτοαιθανόλη και το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS).

Η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται από αναδιπλώσεις τους στον χώρο λόγω της ύπαρξης δισουλφιδικών δεσμών, που αναπτύσσονται μεταξύ δύο ομάδων -SH κυστεϊνών, του ίδιου ή διαφορετικού πολυπεπτιδίου, ενώ οι πρωτεΐνες μπορεί να είναι τόσο αρνητικά, όσο και θετικά φορτισμένες. Η 2-μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, αποδιατάσσοντας έτσι τις πρωτεΐνες. Από την άλλη, το SDS είναι ένα ανιονικό συστατικό, αποτελούμενο από ισχυρά αρνητικά φορτισμένα μόρια, τα οποία περιλαμβάνουν μία υδρόφιλη (πολική) ομάδα και μία υδρόφοβη (μη

πολική). Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στα πολυπεπτίδια (πρωτεϊνικές αλυσίδες), κατά αναλογία ενός μορίου ανά δύο αμινοξέα, δημιουργώντας έτσι ένα σύμπλοκο με ισχυρό αρνητικό φορτίο. Ως εκ τούτου, το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης καθίσταται αμελητέο, οπότε τα σύμπλοκα SDS-αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης, ηλεκτροφορούμενα, κινούνται από την κάθοδο προς την άνοδο. Με αυτόν τον τρόπο, η κινητικότητα των πολυπεπτιδίων είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού τους βάρους, καθώς οι μικρές πρωτεΐνες κινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ οι πρωτεΐνες μεγαλύτερου μεγέθους συναντούν αντίσταση στους πόρους της πηκτής πολυακρυλαμιδίου, οπότε κινούνται βραδύτερα.

Η ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου με SDS πραγματοποιήθηκε σε ένα πολυ-ρυθμιστικό σύστημα (Multi Buffer System, MBS), διαμέσου δύο πηκτωμάτων (επιστοιβάσης και διαχωρισμού), με το ένα να επιστοιβάζεται του άλλου. Το πηκτώμα επιστοιβάσης (stacking gel) επιτρέπει τη δημιουργία μεγάλων πόρων, οπότε τα πολυπεπτίδια μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους έχουν την ίδια κινητικότητα και παρατάσσονται στη γραμμή διαχωρισμού των δύο πηκτωμάτων. Στη συνέχεια, οι μικρότεροι πόροι του πηκτώματος διαχωρισμού (resolving gel) υπαγορεύουν διαφορετική κινητικότητα στα πολυπεπτίδια, αναλόγως του μοριακού τους βάρους. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδρομής (που κρίνεται από το μέτωπο του διαλύτη), οι πρωτεΐνες στο πηκτώμα εμφανίζονται με χρώση κυανού του Coomassie, χρώση αργύρου ή χρώση ειδική για τα σιαλικά οξέα των γλυκοφορινών.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis System (Biorad, Η.Π.Α.), καθώς και το πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους BlueStar Prestained Protein Marker (Nippon Genetics Europe), για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των προς ανάλυση πρωτεϊνικών μορίων.

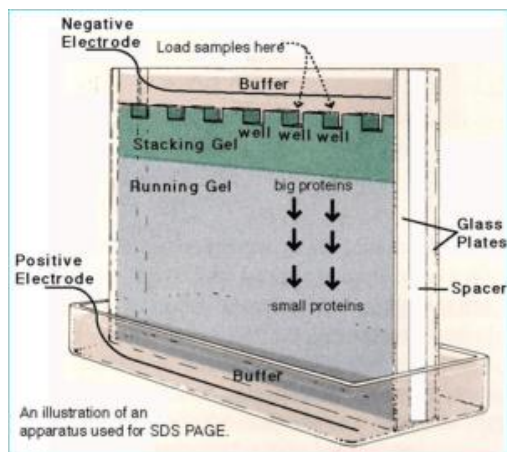
2.2.6.5.α. Παρασκευή πηκτώματος

Όπως προαναφέρθηκε, για την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE χρησιμοποιείται πηκτώμα (gel) αποτελούμενο από δύο επιμέρους πηκτώματα, το πηκτώμα διαχωρισμού (resolving gel) και το πηκτώμα επιστοιβάσης (stacking gel). Η σύσταση του καθενός πηκτώματος παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Σύσταση των πηκτωμάτων διαχωρισμού και επιστοιβάσης για την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

Πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving gel) 12%		Πήκτωμα επιστοιβάσης (Stacking gel)	
Αντιδραστήριο	Όγκος (mL)	Αντιδραστήριο	Όγκος (mL)
Υπερκάθαρο νερό	3,5	Υπερκάθαρο νερό	3
0,75 M Tris 0,2% w/v SDS pH 8,8	9,4	0,25 M Tris 0,2% w/v SDS pH 6,8	3,75
40% bis-acrylamide	5,8	40% bis-acrylamide	0,75
TEMED	0,03	TEMED	0,02
10% w/v APS	0,15	10% w/v APS	0,06

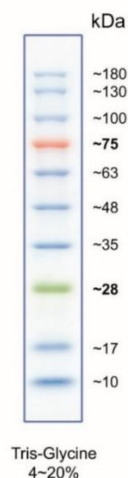
Για τη σταθεροποίηση των δύο πηκτωμάτων χρησιμοποιήθηκε ζεύγος γυάλινων πλακών (10,1 cm x 7,3 cm και 10,1 cm x 8,3 cm), που στερεώθηκαν με τη βοήθεια πλαστικών σφιγκτήρων και σταθεροποιήθηκαν σε κατακόρυφη θέση, με τη βοήθεια κατάλληλης βάσης, δημιουργώντας κενό μεταξύ τους, πάχους 1,5 mm. Στον οριοθετημένο χώρο που δημιουργήθηκε, προστέθηκε απιονισμένο νερό και το σύστημα αφέθηκε για μικρό χρονικό διάστημα (περίπου 5 λεπτά), προκειμένου να ελεγχθεί η στεγανότητά του. Στη συνέχεια, ο χώρος μεταξύ των πλακών πληρώθηκε κατά 70% με το μείγμα του πηκτώματος διαχωρισμού και αφέθηκε περίπου για 20 λεπτά για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός και να σταθεροποιηθεί. Κατόπιν, το πήκτωμα επιστοιβάσας αποχύθηκε στον εναπομείναντα κενό χώρο ανάμεσα στις δύο πλάκες και σε αυτό τοποθετήθηκε ειδικό χτενάκι, το οποίο δημιούργησε τα «πηγάδια», στα οποία μετέπειτα θα τοποθετούνταν τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα. Το πήκτωμα αφέθηκε να πολυμεριστεί για περίπου 20 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το σύστημα των γυάλινων πλακών τοποθετήθηκε στη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, στην οποία προστέθηκαν περίπου 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος SDS-PAGE (Running buffer, [Πίνακας 1](#)), έως τη χαραγή που υποδεικνύεται από τη συσκευή και αφαιρέθηκαν τα χτενάκια. Η διάταξη του συστήματος παρουσιάζεται στο [Σχήμα 18](#).



Σχήμα 18. Διάταξη του συστήματος SDS-PAGE [5].

2.2.6.5.β. Προετοιμασία και φόρτωση δειγμάτων

Σειρά είχε η ετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων. 15 μ L δείγματος (1-5 mg πρωτεΐνης) αναμείχθηκαν με 7 μ L διαλύματος φόρτωσης δείγματος SDS-PAGE (Sample buffer, [Πίνακας 1](#)) και ακολούθησε βρασμός των δειγμάτων για 5 λεπτά. Εκτός από τα δείγματα, στο πήκτωμα τοποθετήθηκαν 7 μ L πρότυπου διαλύματος γνωστού μοριακού βάρους BlueStar Prestained Protein Marker (Nippon Genetics Europe), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως οδηγός για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους της προς διερεύνηση πρωτεΐνης ([Σχήμα 19](#)).



Σχήμα 19. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης διαλύματος πρότυπων πρωτεϊνών BlueStar Prestained Protein Marker [6].

2.2.6.5.γ. Ηλεκτροφόρηση του πήκτωματος

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, αρχικά υπό διαφορά δυναμικού ίση με 50 V, έως ότου τα δείγματα διασχίσουν το πήκτωμα επιστοιβάσης, για περίπου 15 λεπτά. Μετά, η διαφορά δυναμικού αυξήθηκε στα 100 V, μέχρι τα δείγματα να διασχίσουν ολόκληρο το πήκτωμα διαχωρισμού, για περίπου μιάμιση με δύο ώρες. Το πήκτωμα επιστοιβάσης επιτρέπει τη δημιουργία μεγάλων πόρων, λόγω της μικρής ποσότητας ακρυλαμιδίου που περιέχει. Έτσι, πολυπεπτίδια μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους μετατοπίζονται με την ίδια κινητικότητα και παρατάσσονται όλα μαζί σε μια ιδεατή γραμμή, στο όριο των δύο πηκτωμάτων. Κατόπιν, τα μόρια κινούνται στο πήκτωμα διαχωρισμού, διαμέσου πολύ μικρότερων πόρων, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

2.2.6.5.δ. Χρώση του πηκτώματος και εμφάνιση πρωτεϊνικών ζωνών

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα απομακρύνθηκε από τις γυάλινες πλάκες και εμβαπτίσθηκε σε διάλυμα χρώσης (staining solution, Πίνακας 5) για μία ώρα, υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια, το πήκτωμα αποχρωματίστηκε με εμβάπτιση σε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution, Πίνακας 5) και διαδοχικές πλύσεις, μέχρι τον αποχρωματισμό του και την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών. Η μέθοδος στηρίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα και ειδικότερα σε κατάλοιπα αργινίνης (Arg), με αποτέλεσμα την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος (de Moreno, Smith, and Smith 1986).

Πίνακας 5. Σύσταση των διαλυμάτων χρώσης και αποχρωματισμού του πηκτώματος SDS-PAGE.

	Συστατικά	Συγκέντρωση
Διάλυμα χρώσης πηκτώματος SDS-PAGE (staining solution)	Coomasie G-250	0,4% w/v
	Μεθανόλη	40% v/v
	Οξικό οξύ	10% v/v
	Απιονισμένο νερό	50% v/v

Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτώματος SDS-PAGE (destaining solution)	Μεθανόλη	20% v/v
	Οξικό οξύ	10% v/v
	Απιονισμένο νερό	70% v/v

2.2.7. Διερεύνηση συνεργιστικών σχέσεων μεταξύ της *TtAbf43* και άλλων ημικυτταρινολυτικών ενζύμων

2.2.7.1. Πολυμερικά υποστρώματα

2.2.7.1.α. Διερεύνηση της συνεργιστικής δράσης των *TtAbf43* και *AnAbf51*

Σε ό,τι αφορά στα απλά, πολυμερικά υποστρώματα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με στόχο τη σύγκριση της δράσης της *TtAbf43* με αυτή της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης *AnAbf51*, αλλά και η διερεύνηση πιθανού συνεργιτισμού μεταξύ των δύο ενζύμων, σε υπόστρωμα αδιάλυτης αραβινοξυλάνης σίτου (IWA) και διαλυτής αραβινοξυλάνης σίτου (WA). Για τον σκοπό αυτόν, διεξήχθησαν οι παρακάτω αντιδράσεις:

- Δράση καθενός από τα ένζυμα *TtAbf43* και *AnAbf51* ξεχωριστά, στα υποστρώματα IWA και WA για 24 h.
- Ταυτόχρονη δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* και της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης *AnAbf51* στα υποστρώματα IWA και WA για 24 h.

2.2.7.1.β. Επίδραση της προκατεργασίας των υποστρωμάτων στην εξω-δράση της *TtXyn30A*

Επίσης, στα υποστρώματα διαλυτής αραβινοξυλάνης (WA), πραγματοποιήθηκαν πειράματα, με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της προκατεργασίας των υποστρωμάτων στην εξω-δράση της *TtXyn30A* και πιθανού συνεργιτισμού που αναπτύσσεται μεταξύ της ξυλανάσης και των δύο αραβινοφουρανοζιδασών. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν σε καθένα από τα δύο υποστρώματα περιγράφονται παρακάτω:

- Δράση καθενός από τα ένζυμα *TtAbf43*, *AnAbf51* και *TtXyn30A* ξεχωριστά για 24 h.
- Ταυτόχρονη δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* και της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης *AnAbf51* για 24 h.
- Διαδοχική δράση δύο ενζύμων: δράση πρώτα της *TtAbf43* μόνης της και κατόπιν, στο ίδιο υδρόλυμα, δράση της *TtXyn30A* για 24 h.
- Διαδοχική δράση δύο ενζύμων: δράση πρώτα της *AnAbf51* μόνης της και κατόπιν, στο ίδιο υδρόλυμα, δράση της *TtXyn30A* για 24 h.
- Συνδυασμένη δράση: πρώτα ταυτόχρονη δράση της *TtAbf43* και της *AnAbf51* και κατόπιν, στο ίδιο υδρόλυμα, δράση της *TtXyn30A* για 24 h.

Οι αντιδράσεις που περιγράφονται στις υποενότητες 2.2.7.1.α και 2.2.7.1.β είχαν τελικό όγκο τα 500 μL και πραγματοποιήθηκαν σε δοχεία Eppendorf. Το κάθε υπόστρωμα βρισκόταν σε συγκέντρωση 6 mg/mL , καθένα εκ των ενζύμων είχε συγκέντρωση 0,01 mg/mL και χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος με pH 5, συγκέντρωσης 50 mM. Για κάθε συνδυασμό αντίδρασης παρασκευάστηκαν δύο δείγματα, προκειμένου να υπάρξει επαναληψιμότητα στις μετρήσεις. Τα δοχεία επώαστηκαν σε θερμαινόμενο επωαστήρα στους 40 °C, υπό ανάδευση (950 rpm), για 24 ώρες. Κατά τις διαδοχικές

αντιδράσεις, η πρώτη ενζυμική αντίδραση απενεργοποιούταν πριν την έναρξη της δεύτερης, όπως επίσης απενεργοποίηση των αντιδράσεων πραγματοποιούταν και πριν την ανάλυση του υδρολύματος, μέσω βρασμού για 10 λεπτά. Μετά τον βρασμό, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις HPAEC και DNS στα δείγματα, ακολουθώντας τις μεθόδους που περιγράφονται στις ενότητες 2.2.2 και 2.2.3 αντίστοιχα. Για κάθε πειραματικό σετ, παρασκευάστηκε και τυφλό ζεύγος δειγμάτων, το οποίο περιείχε απιονισμένο νερό, αντί για ένζυμο, διατηρώντας ίδιες τις ποσότητες υποστρώματος και ρυθμιστικού διαλύματος.

2.2.7.2. Λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα

2.2.7.2.α. Διερεύνηση των συνεργιστικών σχέσεων αραβινοφουρανοζιδασών κατά την απευθείας δράση τους στα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα

Περνώντας στα δύο πιο σύνθετα υποστρώματα, στο πίτυρο σιταριού και στο πίτυρο καλαμποκιού (WB και CB), στόχο αποτέλεσε και πάλι η σύγκριση της δράσης της *TtAbf43* με αυτήν της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης *AnAbf51*, καθώς και ο πιθανός συνεργισμός τους. Επίσης, μελετήθηκε η δράση των ξυλανασών *TmXyn10*, *AnXyn11* και *TtXyn30A*, ενώ εξετάστηκε αν η δράση των CEs, και συγκεκριμένα των AXEs, μπορεί να ευνοήσει τη δράση των αραβινοφουρανοζιδασών και των ξυλανασών. Για τους σκοπούς αυτούς, πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω αντιδράσεις, για καθένα από τα δύο υποστρώματα:

- i. Δράση καθεμιάς από τις αραβινοφουρανοζιδάσες *TtAbf43* και *AnAbf51* ξεχωριστά στα δύο υποστρώματα για 24 h.
- ii. Δράση καθεμιάς από τις ξυλανάσες *TmXyn10*, *AnXyn11* και *TtXyn30A* ξεχωριστά στα δύο υποστρώματα για 24 h.
- iii. Ταυτόχρονη δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* και της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης *AnAbf51* για 24 h.
- iv. Ταυτόχρονη δράση της *TtAbf43* και καθεμιάς εκ των *TmXyn10*, *AnXyn11* και *TtXyn30A* (τρεις διαφορετικοί συνδυασμοί αντιδράσεων ανά υπόστρωμα) για 24 h.
- v. Ταυτόχρονη δράση της *AnAbf51* και καθεμιάς εκ των *TmXyn10*, *AnXyn11* και *TtXyn30A* (τρεις διαφορετικοί συνδυασμοί αντιδράσεων ανά υπόστρωμα) για 24 h.
- vi. Ταυτόχρονη δράση του συνδυασμού *TtAbf43-AnAbf51* και καθεμιάς εκ των *TmXyn10*, *AnXyn11* και *TtXyn30A* (τρεις διαφορετικοί συνδυασμοί αντιδράσεων ανά υπόστρωμα) για 24 h.

Οι αντιδράσεις αυτές είχαν τελικό όγκο τα 600 μL και πραγματοποιήθηκαν σε δοχεία Eppendorf. Το κάθε υπόστρωμα βρισκόταν σε συγκέντρωση 35 mg/mL και χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος με pH ίσο με 5, συγκέντρωσης 50 mM . Σε ό,τι αφορά στις συγκεντρώσεις των ενζύμων ισχύουν τα εξής: η συγκέντρωση των αραβινοφουρανοζιδασών (*TtAbf43* και *AnAbf51*) ήταν ίση με 0,05 mg/mL και η συγκέντρωση των ξυλανασών (*TmXyn10*, *AnXyn11* και *TtXyn30A*) ήταν ίση με 0,2 mg/mL . Η υπόλοιπη διαδικασία είναι ίδια με αυτήν που ακολουθήθηκε στα πειράματα με υπόστρωμα την αδιάλυτη αραβινοξυλάνη: επώαση των δοχείων σε αναδευόμενο και θερμαινόμενο επωαστήρα (950 rpm , 45 $^{\circ}\text{C}$) για 24 ώρες και βρασμός των δειγμάτων για 10 λεπτά. Τα δείγματα αφέθηκαν να κρυσώσουν και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν (10 λεπτά και 10.000 rpm), προκειμένου να καθιζάνουν τα στερεά κατάλοιπα του υποστρώματος. Ακολούθησαν μετρήσεις DNS και HPAEC στο υπερκείμενο των

αντιδράσεων. Και σε αυτά τα πειράματα παρασκευάστηκαν δύο δείγματα για σκοπούς επαναληψιμότητας.

2.2.7.2.β. Διερεύνηση των συνεργιστικών σχέσεων αραβινοφουρανοζιδασών κατά τη δράση τους σε ολιγοσακχαρίτες

Τέλος, αφού ερευνήθηκε η δράση των αραβινοφουρανοζιδασών σε πολυμερικά και λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα, ερευνήθηκε η δράση τους και σε ολιγοσακχαρίτες, που έχουν παραχθεί ενζυμικά. Αναλυτικότερα, τα δύο λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα υδρολύθηκαν με μία ξυλανάση (το πίτυρο σίτου υπέστη πέψη με την *AnXyl11* και το πίτυρο καλαμποκιού με την *TmXyl10*) για 24 h και στη συνέχεια, δοκιμάστηκαν διάφοροι ενζυμικοί συνδυασμοί, αραβινοφουρανοζιδασών και εστερασών του οξικού οξέος στο υδρόλυμα της αντίδρασης. Συγκεκριμένα:

- i. Δράση της *AnAbf51* ή της *TtAbf43* ή και των δύο μαζί (τρεις διαφορετικοί συνδυασμοί αντιδράσεων, ανά υπόστρωμα) για 24 h.
- ii. Ταυτόχρονη δράση της *TtAbf43* και της *OCE6* ή της *TtCE16* ή της *OCE6* και της *TtCE16* μαζί (τρεις διαφορετικοί συνδυασμοί αντιδράσεων ανά υπόστρωμα) για 24 h.
- iii. Ταυτόχρονη δράση της *AnAbf51* και της *OCE6* ή της *TtCE16* ή της *OCE6* και της *TtCE16* μαζί (τρεις διαφορετικοί συνδυασμοί αντιδράσεων, ανά υπόστρωμα) για 24 h.
- iv. Ταυτόχρονη δράση της *TtAbf43*, της *AnAbf51* και της *OCE6* ή της *TtCE16* ή της *OCE6* και της *TtCE16* μαζί (τρεις διαφορετικοί συνδυασμοί αντιδράσεων, ανά υπόστρωμα) για 24 h.

Αναφορικά με την υδρόλυση των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων, παρασκευάστηκαν διαλύματα τελικού όγκου 1000 μL (1 mL), στα οποία το υπόστρωμα βρισκόταν σε συγκέντρωση 35 mg/mL και το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος με pH 5 σε συγκέντρωση 50 mM. Στα δείγματα αυτά, το κάθε υπόστρωμα υδρολύθηκε με την εκάστοτε ξυλανάση, προς παραγωγή ολιγοσακχαριτών, για 24 ώρες σε αναδευόμενο και θερμαινόμενο επωαστήρα (950 rpm, 45 °C). Στη συνέχεια, τα δείγματα οδηγήθηκαν για βρασμό 10 λεπτών, ύστερα αφέθηκαν να κρυώσουν και φυγοκεντρήθηκαν (10 λεπτά, 10.000 rpm). Το υδρόλυμα των αντιδράσεων αυτών λειτούργησε ως υπόστρωμα των αραβινοφουρανοζιδασών και των εστερασών του οξικού οξέος, που προστέθηκαν κατά το δεύτερο στάδιο.

Οι αντιδράσεις του δεύτερου σταδίου είχαν τελικό όγκο τα 150 μL , ενώ δεν προστέθηκε επιπλέον ρυθμιστικό διάλυμα ή νερό. Η συγκέντρωση των αραβινοφουρανοζιδασών (*TtAbf43* και *AnAbf51*) ισούταν και σε αυτήν την περίπτωση με 0,05 mg/mL και η συγκέντρωση των εστερασών του οξικού (*OCE6* και *TtCE16*) ήταν ίση με 0,04 mg/mL. Ως τυφλά χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που είχαν επωαστεί με τα ένζυμα του πρώτου σταδίου, αλλά στα οποία δεν προστέθηκαν ένζυμα στο δεύτερο στάδιο. Και σε αυτό το στάδιο, η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.

2.2.8. Ανάλυση πρωτεϊνικής δομής με χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων

Η πρωτεϊνική αλληλουχία της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43*, που παρήχθη στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη της δομής της πρωτεΐνης, αλλά και τον εντοπισμό των αμινοξέων του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Για την εύρεση ομόλογων πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος standard protein blast (blastp), που ανήκει στο Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) του Εθνικού Κέντρου Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας, τμήματος της Εθνικής Βιβλιοθήκης Ιατρικής των Η.Π.Α [7]. Στον αλγόριθμο εισήχθη ως δεδομένο η αμινοξική ακολουθία που

εξετάστηκε και ζητήθηκε η εύρεση ομόλογών της, που υπάρχουν στην παγκόσμια πρωτεϊνική βάση δεδομένων (Protein Data Bank, PDB) και των οποίων η δομή έχει προσδιοριστεί πειραματικά. Τα αποτελέσματα κρίθηκαν βάσει της ομολογίας τους και του ποσοστού αλληλοεπικάλυψής τους.

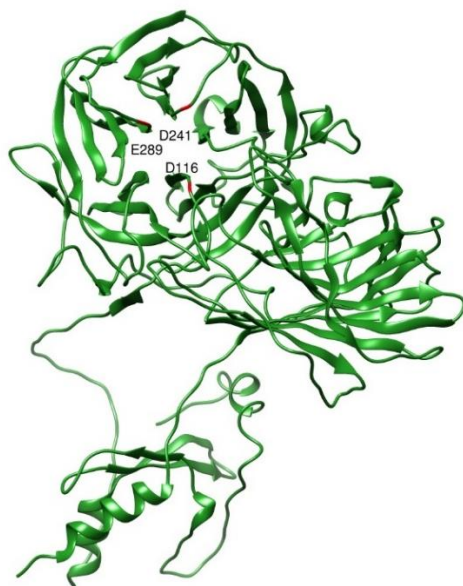
Για την πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος AlphaFold, που έχει αναπτυχθεί από την DeepMind και το Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής του EMBL (EMBL-EBI) (Jumper et al. 2021), ο οποίος εκτελέστηκε σε περιβάλλον Google Colab. Ο αλγόριθμος αυτός είναι σε θέση να προβλέπει την τρισδιάστατη δομή μίας πρωτεΐνης, γνωρίζοντας μόνο την αμινοξική ακολουθία της, αξιοποιώντας την τεχνητή νοημοσύνη (AI). Στον αλγόριθμο εισήχθη η πρωτοταγής δομή της *TtAbf43* και ζητήθηκε να γίνει πρόβλεψη πέντε διαφορετικών μοντέλων της πρωτεΐνης. Επίσης, ο μέγιστος αριθμός των επαναλήψεων τέθηκε ίσος με 24.

Τέλος, για την οπτικοποίηση του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε το περιβάλλον απεικόνισης UCSF Chimera 1.16 (Pettersen et al. 2004).

3. Αποτελέσματα

3.1. Βιοπληροφορική ανάλυση της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* με χρήση του λογισμικού AlphaFold

Ο αλγόριθμος Alpha Fold δημιούργησε πέντε διαφορετικά μοντέλα της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης, με μικρές διαφορές μεταξύ τους. Ως πιο αξιόπιστο λαμβάνεται το πέμπτο, καθώς είναι αυτό που παρουσιάζει την υψηλότερη αξιοπιστία. Συγκεκριμένα, ο δείκτης pLDDT (predicted local-distance difference) ισούται με 93,70 (υψηλή αξιοπιστία) και ο δείκτης pTM-score (predicted template modelling-score) ισούται με 0,91. Ο pLDDT αξιολογεί τη δομική ακρίβεια της πρόβλεψης σε τοπικό επίπεδο, ενώ ο pTM αντιστοιχεί στη συνολική τοπολογική ακρίβεια (Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2022; Yin et al. 2022). Στο παράρτημα (ενότητα 7.2) παρατίθενται τα διαγράμματα που εξάγονται από τον αλγόριθμο και αφορούν στην αξιοπιστία του μοντέλου. Διαπιστώνεται πως χαμηλότερο ποσοστό αξιοπιστίας εμφανίζεται στα πρώτα αμινοξέα της ακολουθίας, που αντιστοιχούν στο αμινοτελικό άκρο του ενζύμου. Η χαμηλότερη αξιοπιστία ενδεχομένως έγκειται στο γεγονός πως το αμινοτελικό άκρο του ενζύμου δεν πρόκειται για σταθερή δομή, αλλά εμφανίζει κινητικότητα. Η αμινοξική αλυσίδα του 5^{ου} μοντέλου εξάγεται ως pdb αρχείο και εισάγεται στο περιβάλλον απεικόνισης Chimera (Σχήμα 20).



Σχήμα 20. Τρισδιάστατη δομή της *TtAbf43*, όπως αυτή προβλέφθηκε από το λογισμικό AlphaFold και απεικονίστηκε στο περιβάλλον Chimera. Με κόκκινο σημειώνονται τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης: D116, D241, E289.

Στην τρισδιάστατη απεικόνιση της πρωτεΐνης είναι εμφανή τα τμήματα στα οποία η πρωτεΐνη σχηματίζει α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα, ενώ επίσης φαίνεται και η διαμόρφωση του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Τα καταλυτικά αμινοξέα (D116, D241 και E289) βρέθηκαν μετά από στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών της *TtAbf43* και της αραβινοφουρανοζιδάσης *HiAXH43*, που προέρχεται από τον μύκητα *Humicola insolens* και έχει εκφραστεί ετερόλογα στο βακτήριο *E.coli* (McKee et al. 2012). Σύμφωνα με το BLAST®, οι δύο αλληλουχίες παρουσιάζουν 71% ομοιότητα στο 94% της αλληλουχίας τους. Η ευθυγράμμιση των δύο πρωτεϊνικών αλληλουχιών παρατίθεται στην ενότητα 7.37.2.

3.2. Πολυμερικά υποστρώματα αδιάλυτης και διαλυτής αραβινοξυλάνης σίτου

3.2.1. Συνδυασμένη δράση των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* για την υδρόλυση πολυμερικών υποστρωμάτων αραβινοξυλάνης

Δεδομένου ότι η *TtAbf43* δρα απομακρύνει την υποκατάσταση αραβινοξυλάνης της θέσης O-3 των δι-υποκατεστημένων ξυλοπυρανοζών (Poungreau et al. 2011) και ότι η *AnAbf51* δρα σε μονά υποκατεστημένες ξυλοπυρανόζες, είτε στη θέση O-2, είτε στη θέση O-3, αναμένεται να αναπτυχθεί συνεργιστική σχέση δράση μεταξύ των δύο ενζύμων. Για την εξακρίβωση αυτής της υπόθεσης, διεξήχθησαν πειράματα σε υποστρώματα αδιάλυτης και διαλυτής αραβινοξυλάνης σίτου (IWA και WA) αντίστοιχα. Τα υποστρώματα υδρολύθηκαν από το κάθε ένζυμο ξεχωριστά, καθώς επίσης πραγματοποιήθηκε και ταυτόχρονη υδρόλυση των δύο ενζύμων. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται το ποσοστό αραβινόζης που υδρολύθηκε σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 6. Σύγκριση δράσης *TtAbf43* και *AnAbf51*, σε πολυμερικά υποστρώματα αδιάλυτης και διαλυτής αραβινοξυλάνης σίτου. Οι μέσοι όροι και τα σφάλματα έχουν προκύψει ως αποτελέσματα διπλών μετρήσεων. Η παύλα μεταξύ των ενζύμων υποδεικνύει ταυτόχρονη δράση.

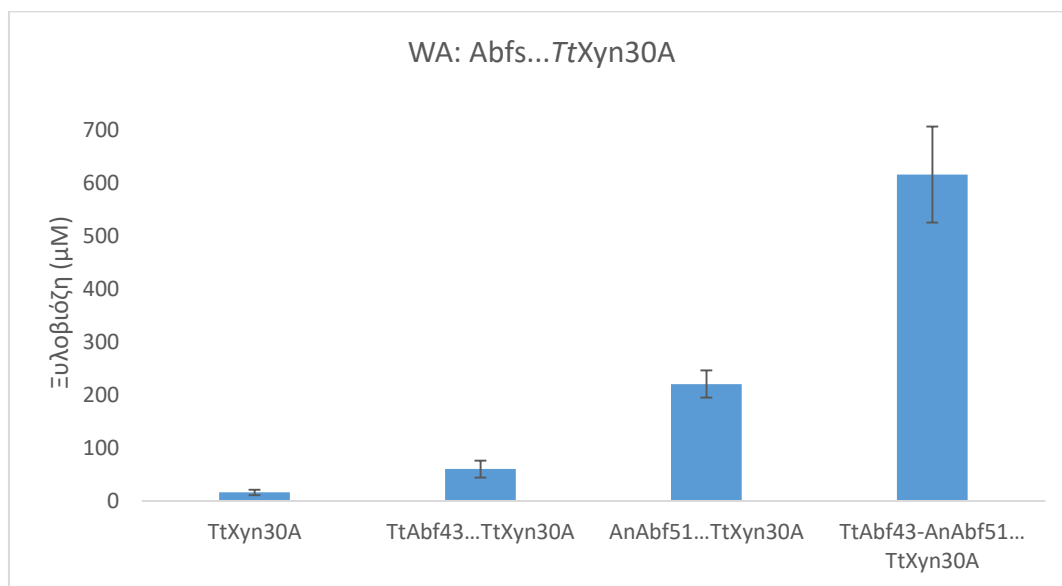
Δείγμα	%Υδρόλυση αραβινοξυλάνης (IWA)	%Υδρόλυση αραβινοξυλάνης (WA)
Τυφλό	0	0
<i>TtAbf43</i>	13 ± 0,0	26,2 ± 0,0
<i>AnAbf51</i>	16 ± 0,0	34,6 ± 0,0
<i>TtAbf43-AnAbf51</i>	24 ± 2,6	63,7 ± 2,2

Συγκρίνοντας της αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης στα δύο υποστρώματα, παρατηρείται πως απελευθέρωση αραβινόζης έχει επιτευχθεί σε μεγαλύτερο βαθμό στο υπόστρωμα της διαλυτής αραβινοξυλάνης. Η μειωμένη ενεργότητα των ενζύμων στην αδιάλυτη αραβινοξυλάνη ενδεχομένως οφείλεται σε παρεμποδίσσεις που υφίστανται από το υπόστρωμα. Κατά την υδρόλυση της αραβινοξυλάνης, τα δύο ένζυμα δεν παρουσιάζουν ουσιαστική συνεργιστική δράση (ο βαθμός συνεργιτισμού ισούται με $1,05 \pm 0,04$), ωστόσο, επιβεβαιώνεται η συμπληρωματική τους δράση, δηλαδή ότι το καθένα δρα σε διαφορετικές μονάδες ξυλοπυρανόζης.

Επιπλέον, παρατηρείται πως η *AnAbf51* είναι αποτελεσματικότερη της *TtAbf43* κατά την υδρόλυση των δύο υποστρωμάτων, και κυρίως της διαλυτής αραβινοξυλάνης, όπου και η αραβινόζη που απελευθερώθηκε είναι κατά 32% περισσότερη σε σχέση με αυτήν που απελευθερώθηκε κατά τη δράση της *TtAbf43*. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη περισσότερων μονά υποκατεστημένων ξυλοπυρανοζών απ' ό,τι διπλά υποκατεστημένων στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

3.2.2. Επίδραση της ενζυμικής προκατεργασίας του πολυμερούς αραβινοξυλάνης από τις αραβινοφουρανοζιδάσες *TtAbf43* και *AnAbf51* ως προς την εξω-δράση της ξυλανάσης *TtXyn30A*

Δεδομένης της έλλειψης ενεργότητας της ξυλανάσης *TtXyn30A* σε υποστρώματα αραβινοξυλάνης (Katsimpouras et al. 2019), σκοπό του συγκεκριμένου πειράματος αποτελεί η διερεύνηση της επίδρασης που μπορεί να έχει η πρότερη πέψη του υποστρώματος με αραβινοφουρανοζιδάσες, στην ενίσχυση της δράσης της ξυλανάσης. Μελετήθηκαν αμφότερες οι αραβινοφουρανοζιδάσες (*TtAbf43* και *AnAbf51*), τόσο μεμονωμένα, όσο και συνδυαστικά και μετρήθηκε η παραγόμενη ξυλοβιόζη, που αποτελεί κύριο προϊόν της υδρόλυσης της *TtXyn30A*.



Σχήμα 21. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της ξυλοβιόζης που απελευθερώθηκε κατά την πέψη πολυμερικού υποστρώματος διαλυτής αραβινοξυλάνης σίτου με την ξυλανάση *TtXyn30A* και τις αραβινοφουρανοζιδάσες *TtAbf43* και *AnAbf51*. Τα αποσιωπητικά δηλώνουν διαδοχική δράση και η παύλα ταυτόχρονη.

Διαπιστώνεται πως η δράση της *TtAbf43* βοήθησε την ξυλανάση στην απελευθέρωση ξυλοβιόζης, καθώς η συγκέντρωσή της αυξήθηκε από $16 \pm 5 \mu\text{M}$ σε $60 \pm 16 \mu\text{M}$, ενώ έχει υδρολυθεί $3,76 \pm 1,62$ φορές περισσότερη ξυλοβιόζη, σε σχέση με το μη προκατεργασμένο υπόστρωμα. Εν τούτοις, η δράση της *AnAbf51* ενίσχυσε πολύ περισσότερο τη δράση της *TtXyn30A*, καθώς απελευθερώθηκε ποσότητα ξυλοβιόζης ίση με $221 \pm 26 \mu\text{M}$, δηλαδή $13,81 \pm 4,92$ φορές περισσότερη ξυλοβιόζη συγκριτικά με το μη προκατεργασμένο υπόστρωμα. Ακόμη, η ταυτόχρονη δράση των δύο αραβινοφουρανοζιδασών, ακολουθούμενη από την *TtXyn30A* είχε πολύ μεγαλύτερη επίδραση από τη δράση της κάθε αραβινοφουρανοζιδάσης ξεχωριστά με την *TtXyn30A*, παράγοντας ξυλοβιόζη συγκέντρωσης $559 \pm 31 \mu\text{M}$, ήτοι σημαίνει 35 φορές περισσότερη από το μη προκατεργασμένο με αραβινοφουρανοζιδάση υπόστρωμα.

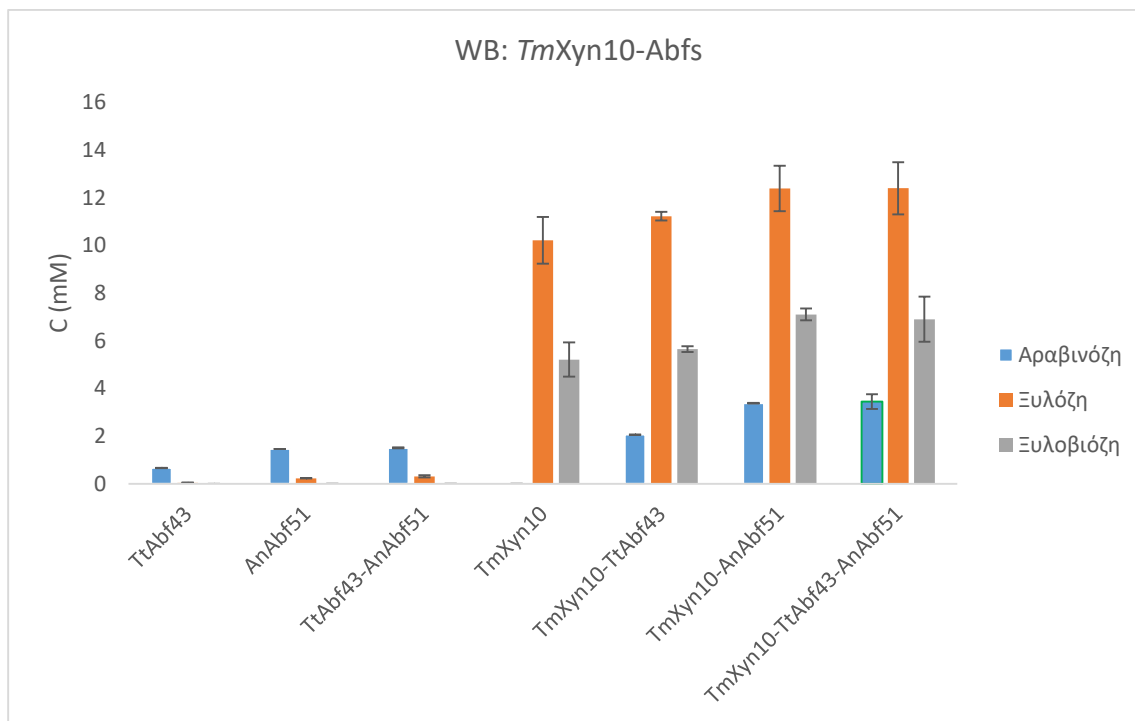
3.3. Μελέτη ενζυμικών δράσεων σε προκατεργασμένα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα

3.3.1. Πίτυρο σίτου

Στο επεξεργασμένο πίτυρο σίτου (WB), μελετήθηκε η δράση των δύο αραβινοφουρανοζιδασών, μεμονωμένων και συνδυασμένων μεταξύ τους και στη συνέχεια εξετάστηκε πιθανή συνεισφορά τους στη δράση των ξυλανασών *TmXyn10*, *AnXyn11* και *TtXyn30A*. Σε αντίθεση με το προηγούμενο υπόστρωμα, σε αυτήν την περίπτωση, η χρωματογραφία ανιόνεναλλαγής έδειξε την απελευθέρωση και άλλων ξυλοολιγοσακχαριτών, πέραν της ξυλοβιόζης.

3.3.1.1. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* σε συνδυασμό με την ξυλανάση *TmXyn10*

Στο παρακάτω σχήμα, απεικονίζεται διαγραμματικά η απελευθέρωση των κυριότερων προϊόντων της υδρόλυσης, που προέκυψαν μετά την πέψη του υποστρώματος με την *TmXyn10* και τις δύο αραβινοφουρανοζιδάσες.



Σχήμα 22. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης, της ξυλόζης και της ξυλοβιόζης που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του πίτυρου σίτου με *TtAbf43*, *AnAbf51*, *TmXyn10*, καθώς και συνδυασμούς τους.

Παρατηρείται πως, αναφορικά με την απελευθέρωση αραβινόζης, η *AnAbf51* απελευθερώνει διπλάσια ποσότητα συγκριτικά με την *TtAbf43*, αλλά όταν οι δύο αραβινοφουρανοζιδάσες δρουν ταυτόχρονα, δεν παρατηρείται ούτε συνεργισμός, αλλά ούτε και αθροιστικό αποτέλεσμα, όπως παρατηρήθηκε στο προηγούμενο, πολυμερικό υπόστρωμα. Παρουσία της ξυλανάσης, η ποσότητα αραβινόζης που απελευθερώνεται από την *TtAbf43* τριπλασιάζεται ($2,065 \pm 0,010$ mM έναντι $0,669 \pm 0,001$ mM), δίνοντας έναν βαθμό συνεργισμού ίσο με $3,09 \pm 0,02$. Χαμηλότερος, αλλά εξίσου έντονος είναι και ο συνεργισμός *AnAbf51-TmGH10* ως προς την απελευθέρωση αραβινόζης, με τον βαθμό

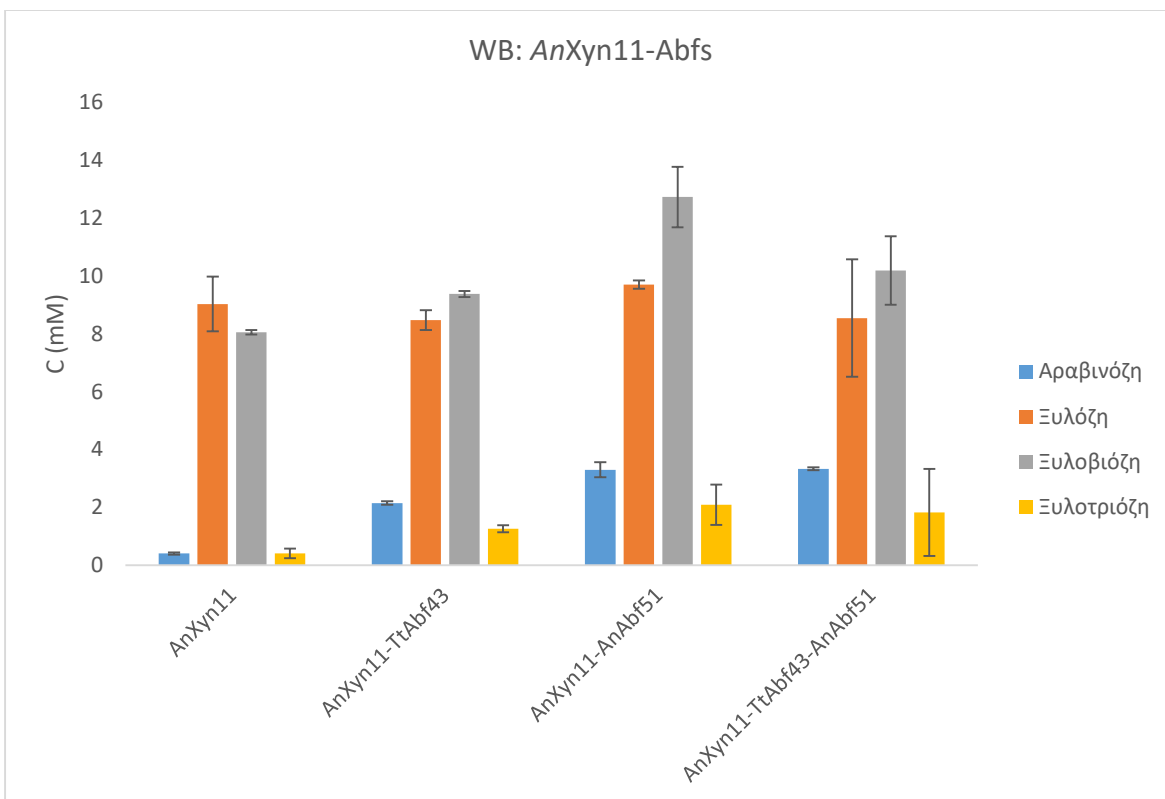
συνεργισμού να ισούται με $2,32 \pm 0,01$. Όταν οι δύο αραβινοφουρανοζιδάσες ενεργούν ταυτόχρονα με την ξυλανάση, η απελευθέρωση αραβινόζης κινείται σε παρόμοια επίπεδα με αυτήν που απελευθερώνεται από τη δράση μόνο της *AnAbf51* και της *TmXyn10*. ο βαθμός συνεργισμού μεταξύ των τριών ενζύμων ισούται με $2,28 \pm 0,21$. Έπεται πως η παρουσία της ξυλανάσης βοηθάει τόσο την κάθε αραβινοφουρανοζιδάση ξεχωριστά, όσο και τη συνδυασμένη δράση τους, κατά την απελευθέρωση αραβινόζης.

Αναφορικά με την απελευθέρωση ξυλόζης και ξυλοβιόζης, των κύριων προϊόντων υδρόλυσης της *TmXyn10*, διαπιστώνεται πως η συνδυασμένη δράση της ξυλανάσης με την *TtAbf43* δεν αυξάνει σημαντικά την ξυλόζη και την ξυλοβιόζη που απελευθερώνονται στο υπόστρωμα, σε σχέση με τα μονομερή και διμερή ξυλόζης που απελευθερώνει η *TmXyn10* μόνη της. Ο βαθμός συνεργισμού των δύο ενζύμων βρίσκεται οριακά πάνω από τη μονάδα· ως προς την απελευθέρωση ξυλόζης ισούται με $1,10 \pm 0,11$ και ως προς την απελευθέρωση ξυλοβιόζης ισούται με $1,08 \pm 0,15$. Δεν παρατηρείται το ίδιο, ωστόσο, κατά τη δράση της ξυλανάσης με την *AnAbf51*, η οποία βοηθάει σημαντικά την ξυλανάση να απελευθερώσει περισσότερη ξυλόζη και ξυλοβιόζη. Συγκεκριμένα, η απελευθέρωση ξυλόζης αυξάνεται κατά 20% όταν η *TmXyn10* δρα μαζί με την *AnAbf51*, ενώ ο βαθμός συνεργισμού των δύο ενζύμων ισούται με $1,21 \pm 0,15$. Ως προς την απελευθέρωση ξυλοβιόζης, αυτή αυξάνεται κατά 35%, κατά τη συνδυασμένη δράση των δύο ενζύμων σε σχέση με τη δράση μόνης της *TmXyn10*. Εν προκειμένω, ο βαθμός συνεργισμού *TmXyn10* και *AnAbf51* ισούται με $1,36 \pm 0,19$. Όταν ενεργούν ταυτόχρονα και τα τρία ένζυμα, η ποσότητα ξυλόζης και ξυλοβιόζης που απελευθερώνεται στο υδρόλυμα κινείται στα ίδια επίπεδα με εκείνη που προκύπτει από τη δράση των *TmXyn10* και *TtAbf51*. Ως προς την απελευθέρωση ξυλόζης, ο βαθμός συνεργισμού των τριών ενζύμων είναι ελάχιστα μεγαλύτερος της μονάδας, ίσως με $1,18 \pm 0,15$.

Εν γένει, η δράση της ξυλανάσης *TmXyn10* ενισχύεται περισσότερο από την παρουσία της αραβινοφουρανοζιδάσης *AnAbf51*, παρά της *TtAbf43*, καθώς, στην απελευθέρωση τόσο ξυλόζης όσο και ξυλοβιόζης, ο συνδυασμός των δύο αραβινοφουρανοζιδασών με την *TmXyn10* δίνει παρόμοια αποτελέσματα με τον συνδυασμό της *AnAbf51* με την *TmXyn10*. Τα χαμηλά επίπεδα συνεργισμού με την *TtAbf43* μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι η υποκατάσταση της αραβινόζης που παραμένει μετά τη δράση της *TtAbf43* παρεμποδίζει τη δράση της ξυλανάσης. Αντιθέτως, η *AnAbf51* αποκόβει τη μονή υποκατάσταση της ξυλόζης και δημιουργεί χώρο στην ξυλανάση για να δράσει με τη σειρά της.

3.3.1.2. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* σε συνδυασμό με την ξυλανάση *AnXyn11*

Στο παρακάτω σχήμα, απεικονίζεται διαγραμματικά η απελευθέρωση των κυριότερων προϊόντων της υδρόλυσης, που προέκυψαν μετά την πέψη του υποστρώματος με κάθε ενζυμικό συνδυασμό.



Σχήμα 23. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης, της ξυλόζης, της ξυλοβιόζης και της ξυλοτριόζης που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του πίτουρου σίτου με την *AnXyn11* και συνδυασμούς των *TtAbf43* και *AnAbf51*.

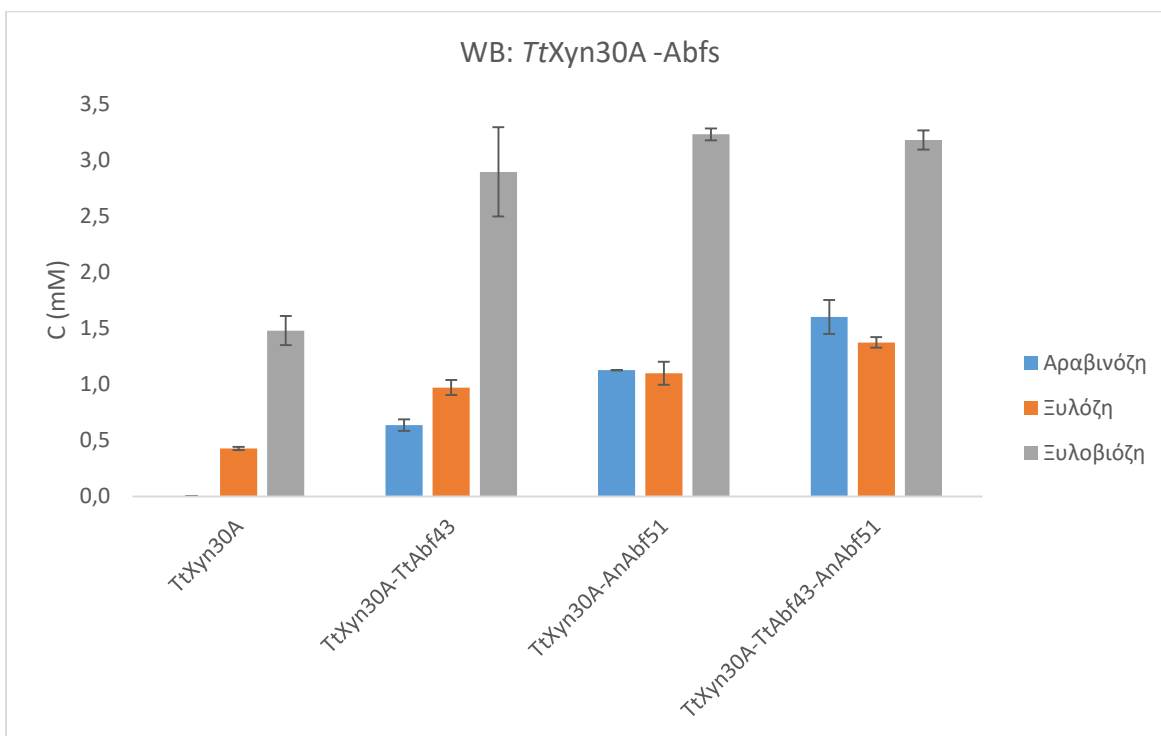
Ως προς την επίδραση της *AnXyn11* στην απελευθέρωση αραβινόζης, η παρουσία της βοηθάει τις δύο αραβινοφουρανοζιδάσες, τόσο τη δράση καθεμιάς ξεχωριστά, όσο και τον συνδυασμό τους. Αναλυτικότερα, η συγκέντρωση αραβινόζης στο υδρόλυμα αυξάνεται κατά 130% όταν η *TtAbf43* δρα παρουσία της *AnXyn11* σε σχέση με όταν η αραβινοφουρανοζιδάση δρα μόνη της, ενώ ο αντίστοιχος βαθμός συνεργιτισμού ισούται με $1,59 \pm 0,07$. Στην περίπτωση συνδυασμένης δράσης της *AnAbf51* με την *AnXyn11*, η αραβινόζη που απελευθερώνεται αυξάνεται κατά 79% συγκριτικά με αυτή που απελευθερώνεται όταν η *AnAbf51* δρα μόνη της, με τον βαθμό συνεργιτισμού των δύο ενζύμων να ισούται με $1,46 \pm 0,12$. Ακόμη, το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και κατά τη δράση των τριών ενζύμων, όπου η συγκέντρωση αραβινόζης είναι αυξημένη κατά 34% σε σχέση με αυτήν που απελευθερώθηκε κατά τη δράση των δύο αραβινοφουρανοζιδασών, απουσία της ξυλανάσης. Ο βαθμός συνεργιτισμού και των τριών ενζύμων ως προς την απελευθέρωση αραβινόζης ισούται με $1,15 \pm 0,10$. Άρα, συμπεραίνεται πως η παρουσία της *AnXyn11* βοηθάει το έργο των αραβινοφουρανοζιδασών σε κάθε περίπτωση.

Αντίστοιχα, η παρουσία της κάθε αραβινοφουρανοζιδάσης ωφελεί τη δράση της ξυλανάσης, γεγονός που παρατηρείται κατευθείαν από την αύξηση συγκέντρωσης ξυλοβιόζης και ξυλοτριόζης. Ως προς την ξυλοβιόζη, η παρουσία της *TtAbf43* ενισχύει τη δράση της *AnXyn11*, αυξάνοντας κατά 16% τη

συγκέντρωση του διμερούς στο υδρόλυμα, με τον βαθμό συνεργισμού των δύο ενζύμων να ισούται με $1,15 \pm 0,02$. Εμφανέστερη είναι η συνεργιστική δράση της *AnXyn11* με την *AnAbf51*, όπου η απελευθέρωση ξυλοβιόζης κατά τη συνδυασμένη δράση των δύο ενζύμων είναι κατά 58% αυξημένη, συγκριτικά με αυτή που απελευθερώθηκε κατά τη δράση μόνης της *AnXyn11*. ο βαθμός συνεργισμού των δύο ενζύμων, δε, ισούται με $1,57 \pm 0,13$. Η συνέργεια της *AnXyn11* με την *AnAbf51* είναι εμφανής και κατά την απελευθέρωση ξυλόζης και ξυλοτριόζης. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση ξυλόζης αυξάνεται κατά 7%, ενώ η ξυλοτριόζη τετραπλασιάζεται όταν η ξυλανάση δρα μαζί με την *AnAbf51* συγκριτικά με όταν δρα μόνη της. Επιπλέον, η συνδυασμένη δράση και των τριών ενζύμων οδήγησε στην κατά 26% αύξηση ξυλοβιόζης στο υδρόλυμα, σε σχέση με αυτήν που απελευθέρωσε η *AnXyn11*, όταν έδρασε μόνη της. Ο βαθμός συνεργισμού που εμφάνισαν και τα τρία ένζυμα μαζί, ως προς την απελευθέρωση ξυλοβιόζης ισούται με $1,21 \pm 0,14$. Το εντονότερο φαινόμενο συνεργειών, που παρουσιάζεται μεταξύ της *AnXyn11* και της *AnAbf51*, υποδεικνύει πως η απομάκρυνση των μονών υποκαταστάσεων αραβινόζης, η οποία εκτελείται από την *AnAbf51*, δημιουργεί νέες περιοχές δράσης της *AnXyn11*, ενώ οι διπλές υποκαταστάσεις προκαλούν μεγαλύτερου βαθμού παρεμπόδιση.

3.3.1.3. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* σε συνδυασμό με την ξυλανάση *TtXyn30A*

Η διαγραμματική απεικόνιση των προϊόντων της υδρόλυσης, χρησιμοποιώντας την *TtXyn30A* ως ξυλανάση, έπεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 24. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης, της ξυλόζης και της ξυλοβιόζης που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του πίτυρου σίτου με την *TtXyn30A* και συνδυασμούς των *TtAbf43* και *AnAbf51*.

Παρατηρείται πως η ξυλανάση δεν βοηθάει τη δράση των δύο αραβινοφουρανοζιδασών, ούτε όταν δρουν μεμονωμένες, ούτε κατά τη συνδυασμένη δράση τους, όπως φαίνεται από τη συγκέντρωση της

αραβινόζης που υπάρχει στο κάθε υδρόλυμα. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση αραβινόζης μετά τη δράση της *TtAbf43* ($0,669 \pm 0,001$ mM) κινείται στα ίδια επίπεδα με αυτήν του απελευθερώθηκε μετά από συνδυασμένη δράση της *TtAbf43* με την *TtXyn30A* ($0,635 \pm 0,051$ mM). Το ίδιο συμβαίνει και για τη συνδυασμένη δράση των δύο αραβινοφουρανοζιδασών, παρουσία και απουσία ξυλανάσης ($1,51 \pm 0,02$ mM και $1,60 \pm 0,15$ mM απουσία και παρουσία της *TtXyn30A* αντίστοιχα). Αντιθέτως, η δράση της *AnAbf51* μόνης της είναι αποτελεσματικότερη από τη δράση της συνδυαστικά με την ξυλανάση. Το γεγονός ότι οι αραβινοφουρανοζιδάσες δεν εμφανίζουν βελτιωμένη δράση παρουσία της ξυλανάσης στην απελευθέρωση αραβινόζης μπορεί να οφείλεται στο ότι τα τελικά προϊόντα υδρόλυσης της *TtXyn30A* είναι βραχείς ουρονικοί ξυλοολιγοσακχαρίτες και ξυλοβιόζη, επομένως οι αραβινοφουρανοζιδάσες ενδεχομένως να δυσκολεύονται να προσδεθούν σε βραχύτερα υποστρώματα και να απελευθερώσουν αραβινόζη.

Από την άλλη μεριά, οι αραβινοφουρανοζιδάσες βοηθούν το έργο της ξυλανάσης, κάτι που φάνηκε και στα πολυμερικά υποστρώματα, κατά τη μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων με DNS, όπου και οι βαθμοί συνεργιτισμού των αραβινοφουρανοζιδασών (είτε μεμονωμένες, είτε συνδυασμένες) με την *TtXyn30A* κυμαίνονται σε σημαντικά μεγαλύτερα της μονάδας επίπεδα, της τάξης του 1,30-1,60. Συγκεκριμένα, ως προς την απελευθέρωση ξυλόζης, ο βαθμός συνεργιτισμού που προσδιορίστηκε με DNS μεταξύ της *TtXyn30A* και *TtAbf43* ισούται με $1,42 \pm 0,10$, μεταξύ της ξυλανάσης και της *AnAbf51* ισούται με $1,58 \pm 0,21$, ενώ ο βαθμός συνεργιτισμού μεταξύ και των τριών ενζύμων προσδιορίστηκε ίσος με $1,47 \pm 0,19$.

Περνώντας στα αποτελέσματα της HPAEC, υπάρχει επιβεβαίωση της παραπάνω παρατήρησης, καθώς οι συγκεντρώσεις ξυλόζης και ξυλοβιόζης στο υδρόλυμα αυξάνονται σημαντικά παρουσία, πέραν της ξυλανάσης, και μίας ή και των δύο αραβινοφουρανοζιδασών. Αναλυτικότερα, ο βαθμός συνεργιτισμού *TtXyn30A-TtAbf43* κατά την απελευθέρωση ξυλόζης ισούται με $2,27 \pm 0,17$ ενώ η συγκέντρωση του σακχάρου στο υδρόλυμα αυξήθηκε κατά 126% σε σχέση με την ξυλόζη που απελευθερώθηκε κατά την πέψη του υποστρώματος μόνο με *TtXyn30A*. Υψηλός βαθμός συνεργιτισμού στην απελευθέρωση ξυλόζης επιτεύχθηκε επίσης, κατά τη συνέργεια *AnAbf51* και *TtXyn30A* ($2,56 \pm 0,26$), όπου η συγκέντρωση της ξυλόζης είναι μιάμιση φορά μεγαλύτερη συγκριτικά με αυτήν που απελευθερώθηκε κατά τη δράση της ξυλανάσης. Πολύ υψηλός συνεργιτισμός παρατηρείται και κατά τη συνδυασμένη δράση και των τριών ενζύμων, όπου ο βαθμός που σημειώθηκε ισούται με $3,21 \pm 0,15$, ενώ η συγκέντρωση της ξυλόζης στο υδρόλυμα υπερδιπλασιάστηκε.

Ανάλογα αποτελέσματα προκύπτουν και στην απελευθέρωση ξυλοβιόζης, όπου η δράση της *TtXyn30A* βελτιώνεται από την παρουσία των αραβινοφουρανοζιδασών, μεμονωμένα και συνδυαστικά. Η συγκέντρωση της ξυλοβιόζης αυξήθηκε κατά 95% όταν το υπόστρωμα υπέστη πέψη με την *TtXyn30A* και την *TtAbf43*, ενώ ο αντίστοιχος βαθμός συνεργιτισμού των δύο ενζύμων ισούται με $1,95 \pm 0,32$. Παρουσία της *AnAbf51* και της *TtXyn30A*, η υπήρξε αύξηση της συγκέντρωσης της ξυλοβιόζης της τάξης του 118%, σε σχέση με αυτήν που απελευθερώθηκε παρουσία μόνο της ξυλανάσης. Παράλληλα, τα ένζυμα παρουσίασαν και πολύ υψηλό βαθμό συνεργιτισμού, ίσο με $2,18 \pm 0,19$. Όταν έδρασαν και τα τρία ένζυμα μαζί, η συγκέντρωση της ξυλοβιόζης αυξήθηκε κατά 115%, περίπου όσο κατά τη συνέργεια της *TtXyn30A* με την *TtAbf51*. Ο βαθμός συνεργιτισμού της δράσης των τριών ενζύμων ως προς την απελευθέρωση ξυλοβιόζης ισούται με $2,15 \pm 0,20$.

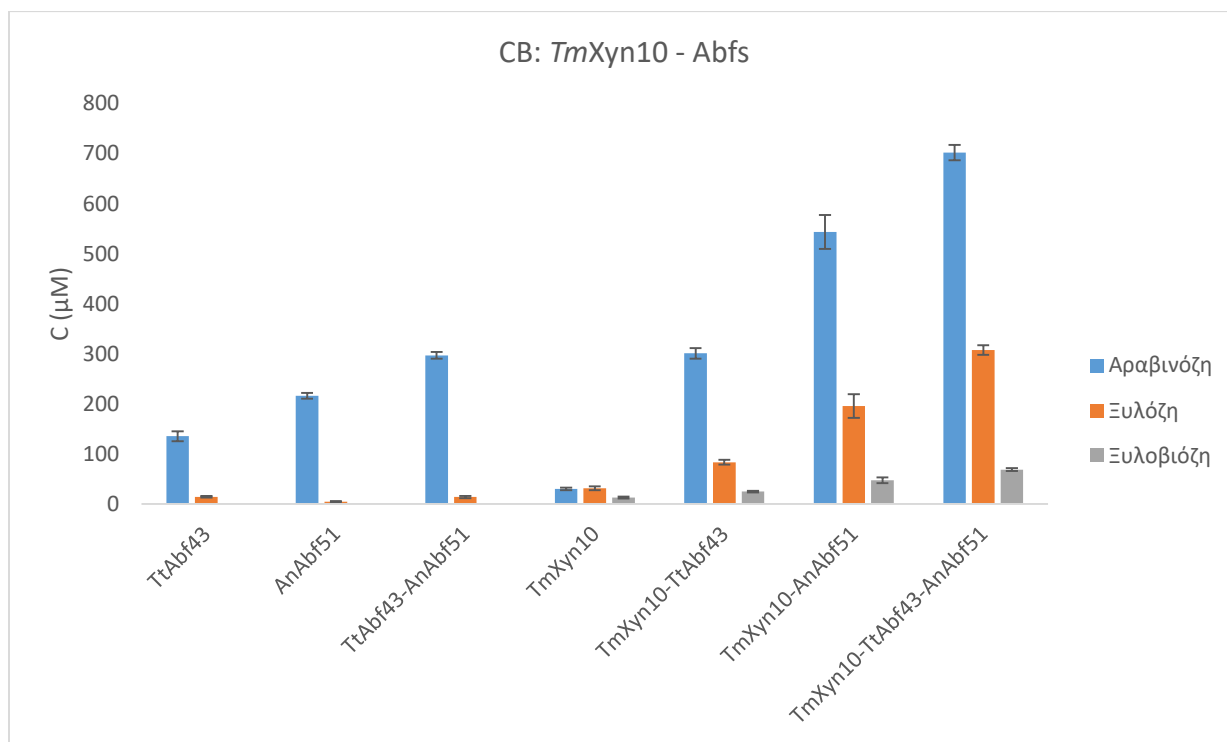
Μελετώντας αυτούς τους ενζυμικούς συνδυασμούς, διαπιστώνεται ότι η *TtXyn30A* δεν βοηθάει τη δράση των *TtAbf43* και *AnAbf51*, ενώ από την άλλη οι αραβινοφουρανοζιδάσες ενισχύουν το έργο της ξυλανάσης, δηλαδή την απελευθέρωση ολιγομερών ξυλόζης. Η μονοσήμαντη αυτή συνέργεια μπορεί να οφείλεται στην επικράτηση της εξω-δράσης της *TtXyn30A*, ελλείψει υποκαταστάσεων γλυκουρονικού οξέος. Δρώντας στα άκρα του πολυμερούς και όχι στο εσωτερικό του, η ξυλανάση δεν δημιουργεί μικρότερες ημικυτταρινικές αλυσίδες, στις οποίες να μπορούν να δράσουν ευκολότερα οι αραβινοφουρανοζιδάσες.

3.3.2. Πίτυρο καλαμποκιού

Στο κατεργασμένο πίτυρο καλαμποκιού (CB), μελετήθηκε η δράση των δύο αραβινοφουρανοζιδασών, μεμονωμένων και συνδυασμένων μεταξύ τους και στη συνέχεια εξετάστηκε πιθανή συνεισφορά τους στη δράση των ξυλανασών *TmXyn10*, *AnXyn11* και *TtXyn30A*, όπως και στο προηγούμενο υπόστρωμα.

3.3.2.1. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* σε συνδυασμό με την ξυλανάση *TmXyn10*

Η ποσότητα των ολιγοσακχαριτών που απελευθερώθηκαν κατά την υδρόλυση του υποστρώματος παρουσιάζονται και διαγραμματικά, στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 25. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης, της ξυλόζης, της ξυλοβιόζης και της ξυλοτριόζης που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του πίτυρου καλαμποκιού με *TtAbf43*, *AnAbf51* και *TmXyn10*, καθώς και συνδυασμούς τους.

Παρατηρείται πως, αναφορικά με την απελευθέρωση αραβινόζης, οι δύο αραβινοφουρανοζιδάσες δεν εμφανίζουν συνεργιστικό και επιπλέον η αραβινόζη που απελευθερώνεται κατά τη συνδυασμένη δράση τους είναι λιγότερη από το άθροισμα αυτής που απελευθερώνεται κατά τη δράση καθεμιάς

ξεχωριστά. Ωστόσο, η παρουσία της *TmXyn10* βοηθάει τις αραβινοφουρανοζιδάσες στην απελευθέρωση αραβινόζης, τόσο όταν δρα η καθεμία μόνη της, όσο και όταν δρουν μαζί. Συγκεκριμένα, η αραβινόζη που απελευθερώνεται κατά τη δράση των *TtAbf43* και *TmXyn10* είναι διπλάσια σε σχέση με αυτήν που απελευθερώνεται κατά τη δράση της *TtAbf43* μόνης της. Ο βαθμός συνεργιτισμού μεταξύ των δύο ενζύμων ισούται με $1,82 \pm 0,13$. Αντίστοιχα, η *TmXyn10* βελτιώνει τη δράση της *AnAbf51*, με τον βαθμό συνεργιτισμού μεταξύ των δύο ενζύμων να ισούται με $2,21 \pm 0,15$ και τη συγκέντρωση του σακχάρου να αυξάνεται κατά 150% σε σχέση με αυτό που υδρόλυσε η *AnAbf51* χωρίς την παρουσία άλλου ενζύμου. Η ίδια διαπίστωση σημειώνεται και κατά τη δράση των δύο αραβινοφουρανοζιδασών μαζί με την ξυλανάση, όπου υπάρχει αύξηση στη συγκέντρωση αραβινόζης κατά 135%, συγκριτικά με αυτήν που απελευθερώθηκε κατά τη δράση των *TtAbf43-AnAbf51*. Ο βαθμός συνεργιτισμού των τριών ενζύμων ως προς την απελευθέρωση αραβινόζης ισούται με $2,14 \pm 0,07$.

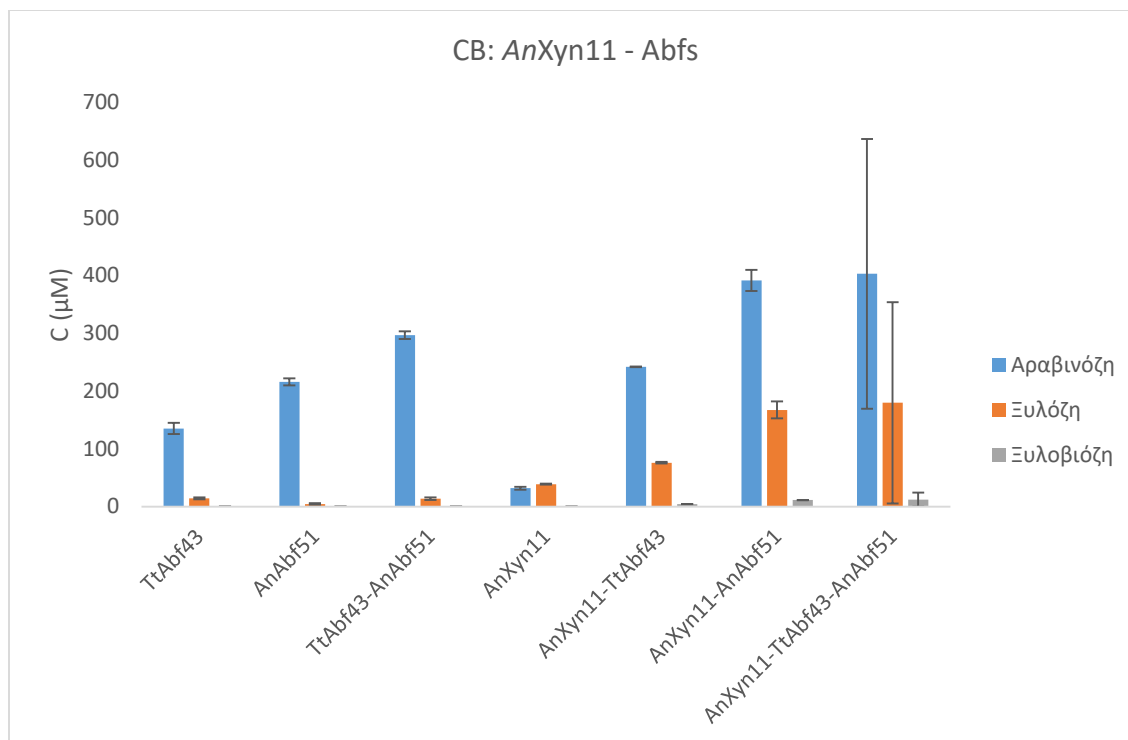
Από την άλλη πλευρά, η δράση της *TmXyn10* ενισχύεται από την παρουσία των αραβινοφουρανοζιδασών, κατά την απελευθέρωση ξυλόζης και ξυλοβιόζης. Αναλυτικότερα, η ποσότητα ξυλόζης που απελευθερώνεται κατά τη δράση των *TmXyn10* και *TtAbf43* είναι υπερδιπλάσια αυτής που απελευθερώνεται στο υδρόλυμα κατά τη δράση αποκλειστικά της ξυλανάσης· ο αντίστοιχος βαθμός συνεργιτισμού των δύο ενζύμων ισούται με $1,82 \pm 0,20$. Επιπλέον, η συγκέντρωση του μονομερούς στο υδρόλυμα είναι πενταπλάσια, όταν η ξυλανάση ενεργεί μαζί με την *AnAbf51*, με τον αντίστοιχο βαθμό συνεργιτισμού των δύο ενζύμων να ισούται με $5,45 \pm 0,93$. Ακόμη εντονότερη είναι η συνεισφορά των δύο αραβινοφουρανοζιδασών στη δράση της ξυλανάσης, όταν τα τρία ένζυμα δρουν ταυτόχρονα: η συγκέντρωση ξυλόζης είναι εννέα φορές μεγαλύτερη σε σχέση με αυτήν που απελευθερώθηκε μόνο από την *TmXyn10*. Ο βαθμός συνεργιτισμού των τριών ενζύμων ισούται με $6,78 \pm 0,73$.

Διαπιστώνεται πως και στην περίπτωση της ξυλοβιόζης παρουσιάζεται το ίδιο μοτίβο. Αν και η συγκέντρωση της ξυλοβιόζης είναι χαμηλή σε κάθε περίπτωση, αυξάνεται παρουσία των αραβινοφουρανοζιδασών. Όταν η *TmXyn10* δρα μαζί με την *TtAbf43*, η συγκέντρωση της ξυλοβιόζης διπλασιάζεται, όταν η ξυλανάση δρα μαζί με την *AnAbf51* τριπλασιάζεται, ενώ όταν η ξυλανάση δρα και με τις δύο αραβινοφουρανοζιδάσες μαζί, η συγκέντρωση της ξυλοβιόζης είναι πέντε φορές υψηλότερη εν συγκρίσει με αυτήν που απελευθέρωσε η ξυλανάση. Οι βαθμοί των αντίστοιχων ενζυμικών δράσεων είναι επίσης υψηλοί· ο βαθμός συνεργιτισμού *TmXyn10-TtAbf43* ισούται με $1,82 \pm 0,20$, ο βαθμός συνεργιτισμού του συνδυασμού *TmXyn10-AnAbf51* ισούται με $3,64 \pm 0,69$, ενώ ο βαθμός συνεργιτισμού της συνδυασμένης δράσης των τριών ενζύμων ισούται με $5,28 \pm 0,81$. Η ίδια παρατήρηση ισχύει και για την απελευθέρωση ξυλοτριόζης, η συγκέντρωση της οποίας αυξάνεται με τη συνδυασμένη δράση της *TmXyn10* και των αραβινοφουρανοζιδασών με τη περισσότερη ποσότητα να απελευθερώνεται κατά τη συνδυασμένη δράση και των τριών ενζύμων.

Έπεται λοιπόν πως οι δύο ομάδες ενζύμων παρουσιάζουν αμφίδρομη συνέργεια: από τη μία πλευρά, η ξυλανάση βοηθάει τη δράση των αραβινοφουρανοζιδασών στην απελευθέρωση αραβινόζης και από την άλλη πλευρά, οι αραβινοφουρανοζιδάσες, απομακρύνοντας αραβινόζη, δημιουργούν χώρο στην *TmXyn10* για να προσδεθεί στο υπόστρωμα και να απελευθερώσει ξυλοολιγοσακχαρίτες.

3.3.2.2. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* σε συνδυασμό με την ξυλανάση *AnXyn11*

Στο ακόλουθο διάγραμμα παρουσιάζονται τα προϊόντα της υδρόλυσης του πίτυρου καλαμποκιού από την *AnXyn11* και από τις αραβινοφουρανοζιδάσες *TtAbf43* και *AnAbf51*.



Σχήμα 26. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης, της ξυλόζης και της ξυλοβιόζης που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του υποστρώματος CB με *TtAbf43*, *AnAbf51* και *AnXyn11*, καθώς και συνδυασμούς τους.

Αναφορικά με την απελευθέρωση αραβινόζης, η δράση των αραβινοφουρανοζιδασών ενισχύεται από την παρουσία της *AnXyn11*, όπως συνέβη και στην περίπτωση της *TmXyn10*. Κατά τη συνδυασμένη δράση *AnXyn11-TtAbf43*, απελευθερώνεται μιάμιση φορά περισσότερη αραβινόζη σε σχέση με αυτήν που απελευθερώθηκε, όταν το υδρόλυμα υπέστη επεξεργασία μόνο με την *TtAbf43*. Παράλληλα, ο βαθμός συνεργισμού των δύο ενζύμων ισούται με $1,44 \pm 0,09$. Όταν η ξυλανάση έδρασε με την *AnAbf51*, τότε απελευθερώθηκε 80% περισσότερη αραβινόζη, συγκριτικά με αυτήν που απελευθέρωσε μόνη της η *AnAbf51*, με τον αντίστοιχο βαθμό συνεργισμού των ενζύμων να ισούται με $1,58 \pm 0,08$.

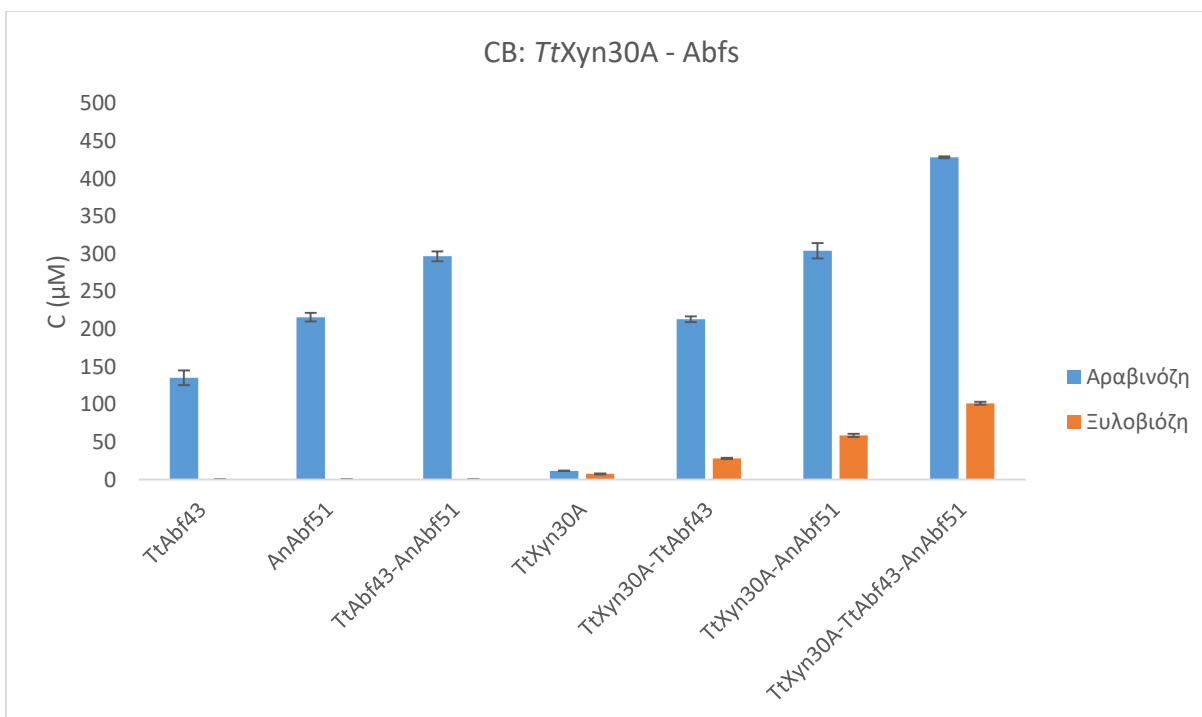
Εξετάζοντας την απελευθέρωση των προϊόντων υδρόλυσης της ξυλανάσης, παρατηρείται πως η ξυλόζη είναι αυτή που ανιχνεύεται σε μεγαλύτερο βαθμό. Μάλιστα, οι αραβινοφουρανοζιδάσες φαίνεται να διευκολύνουν τη δράση της *AnXyn11*: όταν η ξυλανάση δρα μαζί με την *TtAbf43*, απελευθερώνεται 95% περισσότερη ξυλόζη σε σχέση με αυτήν που απελευθερώθηκε όταν η *AnXyn11* έδρασε μόνη της, ενώ ο βαθμός συνεργισμού των δύο ενζύμων ισούται με $1,43 \pm 0,05$. Επίσης, όταν η *AnXyn11* ενεργεί από κοινού με την *AnAbf51*, τότε υδρολύεται τριπλάσια ποσότητα ξυλόζης από αυτή που υδρόλυσε μόνη της η ξυλανάση. Ο αντίστοιχος βαθμός συνεργισμού που επιτεύχθηκε ισούται με $3,87 \pm 0,37$. Σημειώνεται πως η ταυτόχρονη δράση των δύο αραβινοφουρανοζιδασών με την *AnXyn11*

παρουσιάζει μεγάλα σφάλματα, τόσο στην απελευθέρωση αραβινόζης, όσο και ξυλοβιόζης και δεν λαμβάνεται υπ' όψιν στην ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Παρ' όλο που δεν σημειώνεται μεγάλη απελευθέρωση ολιγομερών ξυλόζης, των κύριων προϊόντων υδρόλυσης της *AnXyn11*, υπάρχει μεγάλη αύξηση στην απελευθέρωση αραβινόζης, σε κάθε περίπτωση. Αυτό υποδηλώνει πως η *AnXyn11* δρα στο υποστρώμα, απελευθερώνοντας μεγαλύτερου πολυμερισμού προϊόντα, αποκαλύπτοντας έτσι νέες θέσεις πρόσδεσης για τις αραβινοφουρανοζιδάσες.

3.3.2.3. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* σε συνδυασμό με την ξυλανάση *TtXyn30A*

Η τελευταία ξυλανάση που χρησιμοποιήθηκε είναι η *TtXyn30A*. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται διαγραμματικά στο σχήμα που ακολουθεί.



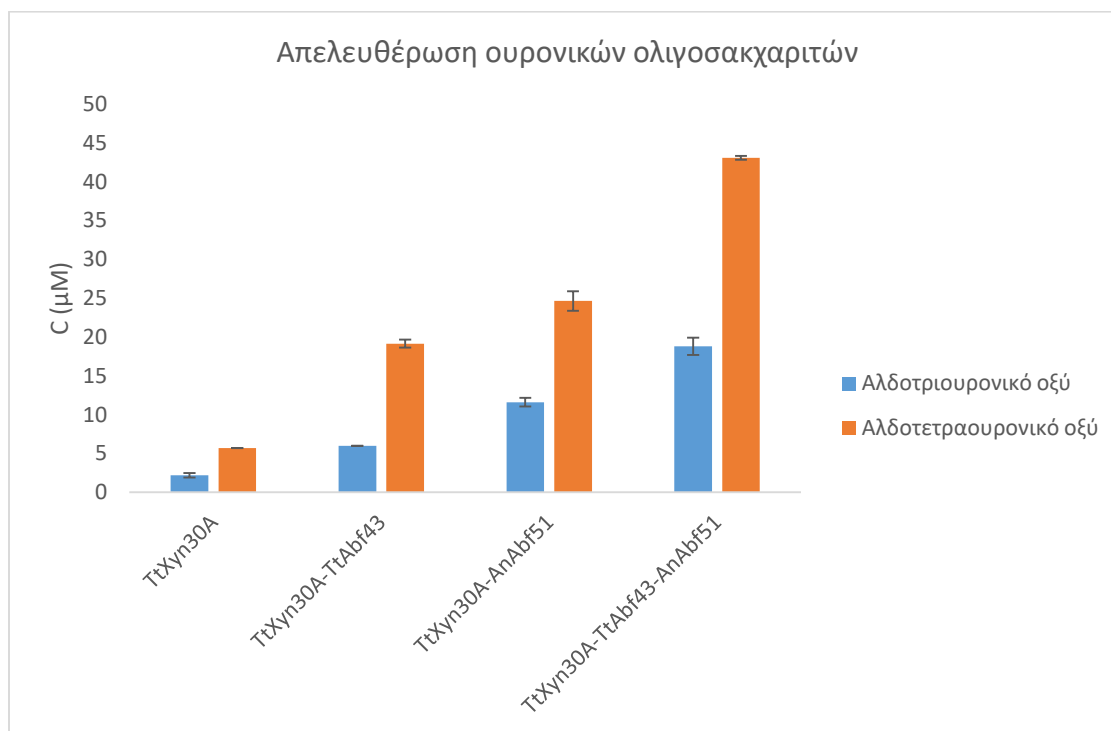
Σχήμα 27. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης και της ξυλοβιόζης που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του υποστρώματος CB με *TtAbf43*, *AnAbf51* και *TtXyn30A*, καθώς και συνδυασμούς τους.

Οι μετρήσεις υποδηλώνουν πως υπάρχει αμοιβαία συνέργεια μεταξύ των αραβινοφουρανοζιδασών και της ξυλανάσης. Κατά την απελευθέρωση αραβινόζης, η *TtXyn30A* βοηθάει τις δύο αραβινοφουρανοζιδάσες, τόσο κατά τη μεμονωμένη, όσο και κατά τη συνδυασμένη δράση τους, εμφανίζοντας έντονο φαινόμενο συνεργιστικού, σε όλους τους ενζυμικούς συνδυασμούς. Συγκεκριμένα, η *TtXyn30A* ανέπτυξε έντονη συνεργιστική σχέση με την *TtAbf43* ως προς την απελευθέρωση αραβινόζης, με βαθμό συνεργιστικού που ισούται με $1,45 \pm 0,10$, ενώ η ποσότητα του σακχάρου αυξήθηκε κατά 57%, όταν τα ένζυμα έδρασαν μαζί, σε σχέση με όταν η *TtAbf43* έδρασε μόνη της. Εξίσου έντονη είναι η συνεργιστική σχέση της *TtXyn30A* με την *AnAbf51*, καθώς ο βαθμός συνεργιστικού των δύο ενζύμων ισούται με $1,33 \pm 0,06$. Μάλιστα η συγκέντρωση αραβινόζης κατά τη συνδυασμένη δράση των ενζύμων είναι κατά 40% υψηλότερη σε σχέση με αυτήν που απελευθέρωσε η *AnAbf51*. Επίσης, όταν έδρασαν και

τα τρία ένζυμα μαζί απελευθέρωσαν σχεδόν 45% περισσότερη αραβινόζη σε σχέση με την ποσότητα σακχάρου που υδρολύθηκε από τον συνδυασμό *TtAbf43-AnAbf51*. Ο βαθμός συνεργιτισμού που εμφάνισαν τα τρία ένζυμα ισούται με $1,39 \pm 0,03$.

Σε ό,τι αφορά στην απελευθέρωση ξυλοβιόζης, οι αραβινοφουρανοζιδάσες ενισχύουν τόσο την ενδο-όσο και την εξω-δράση της ξυλανάσης· η συγκέντρωση ξυλοβιόζης όταν η *TtXyn30A* έδρασε με την *TtAbf43* τετραπλασιάστηκε σε σχέση με αυτήν που μετρήθηκε από τη δράση μόνο της ξυλανάσης, με τον αντίστοιχο βαθμό συνεργιτισμού των ενζύμων να ισούται με $3,68 \pm 0,31$. Αντίστοιχα, η *TtXyn30A*, όταν συνεργάστηκε με την *AnAbf51* απελευθέρωσε οκτώ φορές περισσότερη ξυλοβιόζη, ενώ όταν συνεργάστηκαν και τα τρία ένζυμα, τότε η ξυλοβιόζη που παράχθηκε ήταν δεκατρείς φορές περισσότερη. Ο βαθμός συνεργιτισμού του συνδυασμού *TtXyn30A-AnAbf51* ισούται με $7,68 \pm 0,66$ και ο βαθμός συνεργιτισμού της δράσης των τριών ενζύμων μαζί είναι ίσος με $13,19 \pm 1,05$.

Ακόμη, οι αραβινοφουρανοζιδάσες ενισχύουν τη δράση της *TtXyn30A* στην απελευθέρωση ουρονικών ολιγοσακχαριτών, τόσο αλδοτριουρονικού οξέος ($\text{MeGlcA}^2\text{Xyl}_2$, UX) όσο και αλδοτετραουρονικού οξέος ($\text{MeGlcA}^2\text{Xyl}_3$, XUX) (Σχήμα 28). Μαζί με την ξυλοβιόζη, οι ουρονικοί ολιγοσακχαριτές αποτελούν τα κύρια προϊόντα υδρόλυσης της *TtXyn30A* (Katsimpouras et al. 2019).



Σχήμα 28. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης του αλδοτριουρονικού και του αλδοτετραουρονικού οξέος που απελευθερώθηκαν κατά την πέψη του πίτυρου καλαμποκιού με *TtXyn30A* και συνδυασμούς των *TtAbf43* και *AnAbf51*.

Παρατηρείται πως αμφότερες οι αραβινοφουρανοζιδάσες ενισχύουν τη δράση της *TtXyn30A* στην απελευθέρωση ουρονικών ολιγοσακχαριτών. Συγκεκριμένα, η δράση της *TtAbf43* συνέβαλε στην απελευθέρωση 170% περισσότερου αλδοτριουρονικού και 235% περισσότερου αλδοτετραουρονικού οξέος (με βαθμούς συνεργιτισμού ίσους με $2,72 \pm 0,35$ και $3,34 \pm 0,09$ αντίστοιχα), ενώ η παρουσία της *AnAbf51* αύξησε τη συγκέντρωση του UX πάνω από 400% και του XUX κατά 330% (βαθμοί

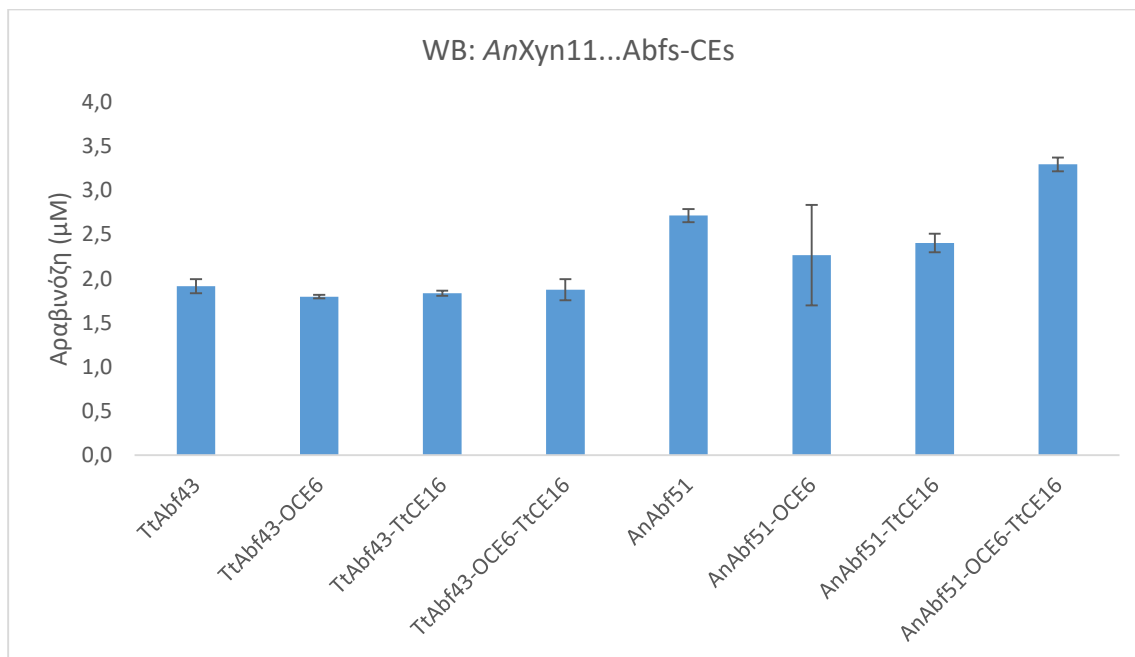
συνεργισμού: $5,27 \pm 0,72$ για το UX και $4,34 \pm 0,22$ για το ΧUX). Η δράση και των δύο αραβινοφουρανοζιδασών ταυτόχρονα με την TtXyn30A οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης του αλδοτριουρονικού οξέος από $2,2 \pm 0,3$ μM σε $18,8 \pm 1,1$ μM και του αλδοτετραουρονικού από $5,7 \pm 0,0$ μM σε $43,1 \pm 0,3$ μM , με τους αντίστοιχους βαθμούς συνεργισμού να ισούνται με $8,54 \pm 1,21$ και $7,59 \pm 0,04$.

3.4. Επίδραση των εστερασών του οξικού οξέος OCE6 και TtCE16 κατά την υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων

Οι αραβινοφουρανοζιδάσες παρεμποδίζονται από την ύπαρξη φερουλικών οξέων στο υπόστρωμα (Luonteri et al. 1999; Saha 2000), εν τούτοις ενδέχεται να υπάρχουν και άλλου είδους παρεμποδίσεις εναντίον των συγκεκριμένων ενζύμων. Με αφορμή τη δράση που φαίνεται να έχουν ακετυλεστεράσες των οικογενειών CE6 και CE16 σε δι-υποκατεστημένες μονάδες ξυλοπυρανόζης, με αραβινόζη και οξικό οξύ (Bella, Polάková, and Puchart 2023), διερευνάται η επίδραση των εστερασών του οξικού οξέος, αυτών των οικογενειών, σε ολιγοσακχαρίτες ακετυλιωμένης αραβινοξυλάνης.

3.4.1. Μελέτη ενζυμικών δράσεων σε πίτυρο σίτου

Μεταξύ των τριών ξυλανασών που χρησιμοποιήθηκαν, αυτή που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα στο πίτυρο σίτου είναι η AnXyn11, οπότε και χρησιμοποιήθηκε για την αρχική πέψη του υποστρώματος. Στη συνέχεια, προστέθηκαν οι διάφοροι συνδυασμοί αραβινοφουρανοζιδασών και εστερασών στο υδρόλυμα της αντίδρασης, όπως περιγράφεται στην ενότητα [602.2.7.2.β](#). Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.



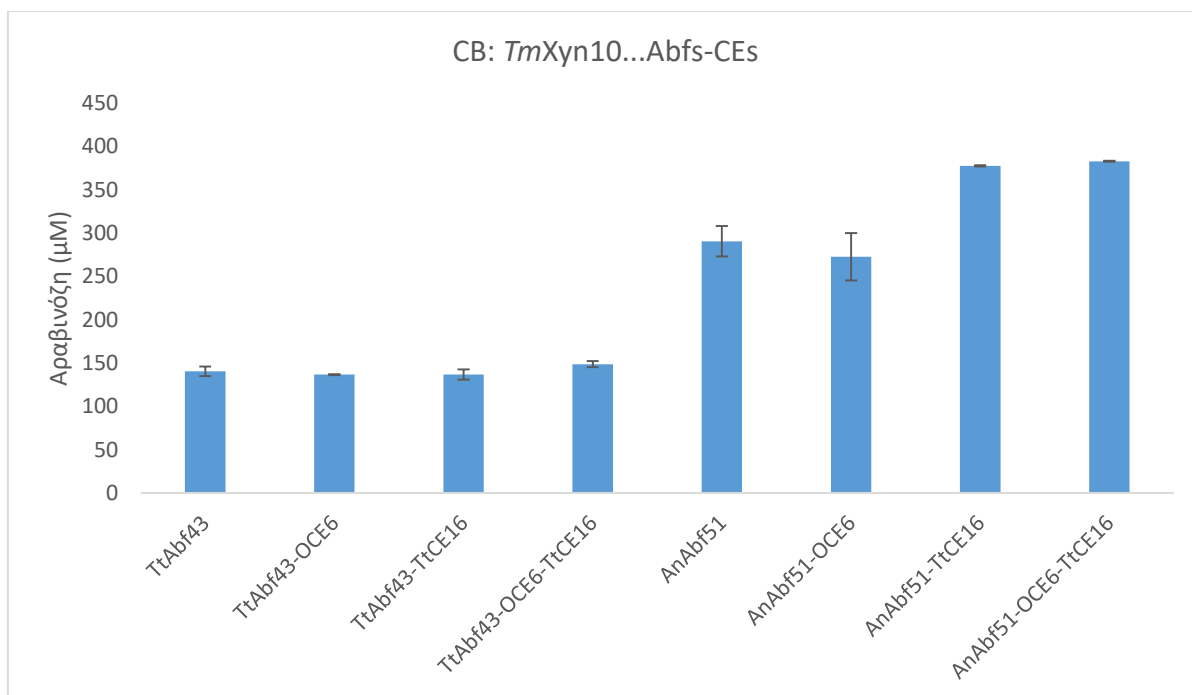
Σχήμα 29. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης που απελευθερώθηκε κατά την πέψη του υδρόλυματος πίτυρου σίτου με TtAbf43, AnAbf51, OCE6, TtCE16 και συνδυασμούς τους. Το υδρόλυμα έχει προκύψει ύστερα από πέψη του υποστρώματος με AnXyn11.

Παρατηρείται πως παρ' όλο που η κάθε εστεράση μόνη της δεν φαίνεται να ενισχύει τη δράση της *AnAbf51*, δεν ισχύει το ίδιο κατά τη συνδυασμένη δράση των εστερασών με την εμπορική αραβινοφουρανοζιδάση. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση στην απελευθέρωση αραβινόζης κατά 21%, γεγονός που υποδηλώνει πως η *AnAbf51* υφίσταται παρεμπόδιση από κάποιες θέσεις του οξικού στο υπόστρωμα. Από τη στιγμή, όμως, που ο συνδυασμός εστερασών οδήγησε σε αύξηση στην απελευθέρωση αραβινόζης, σε αύξηση του σακχάρου πρέπει να έχει οδηγήσει και η μεμονωμένη δράση της καθεμίας με την *AnAbf51*, σε πολύ μικρότερο ποσοστό, τέτοιο που να μην είναι προσδιορίσιμο. Το γεγονός πως δεν φαίνεται συνεργισμός ανάμεσα στις εστεράσες και την *TtAbf43* ενδεχομένως να μπορεί να αποδοθεί στη φύση του ενεργού της κέντρου. Η *TtAbf43* στοχεύει διπλά υποκατεστημένες ξυλοπυρανόζες, επομένως όταν η μία θέση είναι κατειλημμένη από το οξικό οξύ, που είναι λιγότερο ογκώδης υποκαταστάτης, δέχεται μικρότερη παρεμπόδιση, αλλά μπορεί να προσδεθεί στο υπόστρωμα.

Στο παρόν πείραμα, η αύξηση στην απελευθέρωση αραβινόζης, που παρατηρείται κατά τη δράση της *AnAbf51* σε συνδυασμό με τις δύο εστεράσες, έρχεται σε συμφωνία με την προαναφερθείσα ικανότητα των *OCE6* και *TtCE16* να προσδένονται σε δι-υποκατεστημένες ξυλοπυρανόζες, με οξικό οξύ και αραβινόζη, και να καταλύουν την αποακετυλίωσή τους. Απομακρύνοντας την ακετυλομάδα, δημιουργούν χώρο στην *AnAbf51*, να προσδεθεί στο υπόστρωμα και να απομακρύνει την αραβινόζη από τις, μονά πλέον, υποκατεστημένες μονάδες ξυλοπυρανόζης. Αντίστοιχα, η δράση της *TtAbf43* δεν επηρεάζεται από την παρουσία των εστερασών, καθώς ούτως ή άλλως στοχεύει σε διπλά υποκατεστημένες ξυλοπυρανόζες.

3.4.2. Μελέτη ενζυμικών δράσεων σε πίτυρο καλαμποκιού

Στη συνέχεια, τα ίδια πειράματα διεξήχθησαν και στο πίτυρο καλαμποκιού, χρησιμοποιώντας ωστόσο διαφορετική ξυλανάση για την αρχική πέψη του υποστρώματος, την *TmXyn10*, η οποία έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα μεταξύ των τριών που μελετήθηκαν. Στη συνέχεια, προστέθηκαν οι διάφοροι συνδυασμοί αραβινοφουρανοζιδασών και εστερασών στο υδρόλυμα της αντίδρασης, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.7.2.β. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.



Σχήμα 30. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της αραβινόζης που απελευθερώθηκε κατά την πέψη του υδρόλυματος πίτυρου καλαμποκιού με *TtAbf43*, *AnAbf51*, *OCE6*, *TtCE16* και συνδυασμούς τους. Το υδρόλυμα έχει προκύψει ύστερα από πέψη του υποστρώματος με *TmXyn10*.

Σε αντίθεση με το προηγούμενο υπόστρωμα, όπου παρατηρήθηκε συνεργισμός μεταξύ της *AnAbf51* και του συνδυασμού εστερασών, *OCE6-TtCE16*, εδώ παρατηρείται συνεργιστική σχέση της *AnAbf51* μόνο με την *TtCE16*. Συγκεκριμένα, ο βαθμός συνεργισμού της *AnAbf51* με την *TtCE16* ισούται με $1,30 \pm 0,08$ και η συγκέντρωση της αραβινόζης αυξάνεται κατά 30% σε σχέση με αυτή που μετράται στο υδρόλυμα όταν δρα η αραβινοφουρανοζιδάση μόνη της. Η *OCE16* φαίνεται να μην επηρεάζει τη δράση των υπόλοιπων ενζύμων, καθώς ο βαθμός συνεργισμού των *AnAbf51-OCE6-TtCE16* ισούται με $1,32 \pm 0,08$, κυμαίνεται δηλαδή ακριβώς στα ίδια επίπεδα με τη δράση των *AnAbf51-TtCE16*.

Όπως συνέβη και στο πίτυρο σίτου, η *TtCE16* δείχνει να μπορεί να προσδεθεί σε μονάδες ξυλοπυρανόζης ακόμα κι αν βρίσκεται υποκατάσταση αραβινόζης σε γειτονική θέση, εξηγώντας έτσι την παρατηρούμενη αύξηση στην απελευθέρωση αραβινόζης. Η διαφορά σε σχέση με τη δράση των ενζύμων στο πίτυρο σίτου εντοπίζεται στη μη δράση της *OCE6* στο πίτυρο καλαμποκιού. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στη διαφορετική φύση του υποστρώματος και στον μεγαλύτερο αριθμό υποκαταστατών, γεγονός που δυσκολεύει την *OCE6* να προσδεθεί στο υπόστρωμα.

4. Συζήτηση αποτελεσμάτων – συμπεράσματα

4.1. Δράση των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* σε πολυμερικά υποστρώματα αραβινοξυλάνης

Οι αραβινοφουρανοζιδάσες διαθέτουν εξω-δράση και υδρολύουν τις υποκαταστάσεις αραβινόζης (που βρίσκονται στις θέσεις *O*-2 και/ή *O*-3) σε υποστρώματα αραβινογαλακτάνης και αραβινοξυλάνης (Taylor et al. 2006). Σε αντίθεση με τις περισσότερες αραβινοφουρανοζιδάσες που υδρολύουν αποκλειστικά μονά υποκατεστημένες ξυλοπυρανόζες, η *TtAbf43* αποκόβει την αραβινόζη της *O*-3 θέσης διπλά υποκατεστημένων μονάδων ξυλοπυρανοζών (Poungreau et al. 2011). Το καταλυτικό της κέντρο δεν έχει τη μορφή στενών θυλάκων, όπως συμβαίνει στα ένζυμα που στοχεύουν μονά υποκατεστημένες ξυλοπυρανόζες, αλλά είναι ευρύτερο και περιέχει έναν βοηθητικό θύλακα στον οποίο συνδέεται η *O*-2 αραβινόζη, ενώ η *O*-3 αραβινόζη κατευθύνεται στην ενεργό θέση (McKee et al. 2012).

Μελετήθηκε η δράση της *TtAbf43* και της *AnAbf51* σε πολυμερικά υποστρώματα αδιάλυτης και διαλυτής αραβινοξυλάνης και διαπιστώθηκε πως οι δύο αραβινοφουρανοζιδάσες είναι αποτελεσματικότερες στη διαλυτή αραβινοξυλάνη, όπου και παρουσιάστηκαν μεγαλύτερα ποσοστά υδρόλυσης. Η παρεμπόδιση που υφίστανται οι αραβινοφουρανοζιδάσες στην αδιάλυτη αραβινοξυλάνη οφείλεται στην ύπαρξη μορίων φερουλικού οξέος, τα οποία δημιουργούν σταυροδεσμούς (cross-linking) μεταξύ τους (Kiszonas, Fuerst, and Morris 2013; Luonteri et al. 1999; Saha 2000; Sørensen et al. 2007). Μεταξύ των δύο αραβινοφουρανοζιδασών, αποτελεσματικότερη υπήρξε η *AnAbf51*, η οποία υδρόλυσε το $34,6 \pm 0,0\%$ της διαλυτής αραβινοξυλάνης έναντι του $26,2 \pm 0,0\%$ που υδρόλυσε η *TtAbf43*. Ανάλογο, αλλά σε μικρότερο βαθμό, είναι το αποτέλεσμα υδρόλυσης της αδιάλυτης αραβινοξυλάνης, όπου η *AnAbf51* υδρόλυσε το $16,0 \pm 0,0\%$ του υποστρώματος και η *TtAbf43* το $13,0 \pm 0,0\%$. Η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της *AnAbf51* ενδεχομένως έγκειται στο είδος των υποκαταστάσεων του υποστρώματος· στη διαλυτή αραβινοξυλάνη υπάρχουν περισσότερες μονά υποκατεστημένες μονάδες ξυλοπυρανόζης (21%), έναντι διπλά υποκατεστημένων (13%) (Saulnier et al. 2007). Οπότε, η *AnAbf51*, η οποία υδρολύει μονά υποκατεστημένες ξυλοπυρανόζες, απομακρύνοντας την αραβινόζη (από τις θέσεις *O*-2 ή *O*-3), έχει μεγαλύτερο πεδίο δράσης, σε αντίθεση με την *TtAbf43*, η οποία αποκόβει την αραβινόζη που είναι συνδεδεμένη στη θέση *O*-3 αποκλειστικά διπλά υποκατεστημένων ξυλοπυρανοζών (Poungreau et al. 2011). Κατά την πέψη των δύο υποστρωμάτων και με τις δύο αραβινοφουρανοζιδάσες, δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική συνεργιστική δράση μεταξύ των ενζύμων, με τον βαθμό συνεργιτισμού να είναι κοντά στη μονάδα σε αμφότερα τα υποστρώματα ($0,97 \pm 0,14$ στην αδιάλυτη και $1,05 \pm 0,04$ στη διαλυτή αραβινοξυλάνη). Ο βαθμός συνεργιτισμού επιβεβαιώνει, ωστόσο, τη συμπληρωματική τους δραστηριότητα.

4.2. Επίδραση της ενζυμικής προκατεργασίας του πολυμερούς αραβινοξυλάνης από τις αραβινοφουρανοζιδάσες *TtAbf43* και *AnAbf51* ως προς την εξω-δράση της ξυλανάσης *TtXyn30A*

Γνωρίζοντας πως η ξυλανάση *TtXyn30A* δεν έχει ενεργότητα σε υποστρώματα αραβινοξυλάνης (Katsimpouras et al. 2019), εξετάστηκε αν παρουσιάζει ενεργότητα σε διαλυτή αραβινοξυλάνη σίτου, μετά από πέψη αυτής με τις αραβινοφουρανοζιδάσες *TtAbf43* και *AnAbf51*. Πράγματι, οι αραβινοφουρανοζιδάσες ενίσχυσαν τη δράση της ξυλανάσης, η οποία εν τέλει απελευθέρωσε $3,8 \pm 1,6$

φορές περισσότερη ξυλοβιόζη παρουσία της *TtAbf43* σε σχέση με το μη προκατεργασμένο υπόστρωμα, $13,8 \pm 4,9$ φορές περισσότερη ξυλοβιόζη παρουσία της *AnAbf51* και $35,0 \pm 12,4$ φορές περισσότερη ξυλοβιόζη παρουσία και των δύο αραβινοφουρανοζιδασών. Συμπεραίνεται λοιπόν, πως η δράση των δύο αραβινοφουρανοζιδασών μαζί έχει πολύ μεγαλύτερο αντίκτυπο στη δράση της *TtXyn30A* σε σχέση με την επίδραση που έχει η καθεμιά μεμονωμένα.

Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν υποκαταστάσεις γλυκουρονικού οξέος στη διαλυτή αραβινοξυλάνη σίτου, η *TtXyn30A* εμφανίζει κυρίως εξω-δράση, απελευθερώνοντας ξυλοβιόζη από το μη αναγωγικό άκρο του υποστρώματος (Katsimpouras et al. 2019). Η αύξηση στην απελευθέρωση ξυλοβιόζης που σημειώθηκε όταν το υπόστρωμα είχε προηγουμένως υποστεί πέψη τόσο με την *TtAbf43*, όσο και με την *AnAbf51*, υποδηλώνει πως η ξυλανάση δέχεται παρεμπόδιση από την *O-3* υποκατάσταση των δι-υποκατεστημένων ξυλοπυρανοζών (που απομακρύνεται από την *TtAbf43*), αλλά και από τις μονές υποκαταστάσεις αραβινόζης (που απομακρύνονται από την *AnAbf51*), επηρεάζοντας, ενδεχομένως, διαφορετικές θέσεις στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Επιπλέον, η αθροιστική δράση μεμονωμένων των αραβινοφουρανοζιδασών με την *TtXyn30A* είναι πολύ μικρότερη από τη συνδυασμένη τους δράση στην αδιάλυτη αραβινοξυλάνη. Η *TtXyn30A* προσδένεται σε μία μονάδα ξυλοπυρανόζης υποκατεστημένη στη θέση *O-2* με 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικό οξύ στην υποπεριοχή -2 του ενεργού κέντρου του υποστρώματος (Katsimpouras et al. 2019). Η απουσία δράσης σε αραβινοξυλάνη υποδηλώνει πως η -2 υποπεριοχή δεν ανέχεται ούτε μονές ούτε διπλές υποκαταστάσεις. Επιπλέον, η υποπεριοχή +1 του ενεργού κέντρου δέχεται *O-2* υποκατάσταση 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικού οξέος, οπότε ενδεχομένως η ενεργότητα που φαίνεται μετά την κατεργασία με την *TtAbf43* να οφείλεται στο ότι η *TtAbf43* απομακρύνει την *O-3* υποκατάσταση αραβινόζης και η εναπομένουσα *O-2* υποκατάσταση μπορεί να φιλοξενηθεί στη θέση +1 (Katsimpouras et al. 2019). Επομένως, το ένζυμο δύναται να απελευθερώσει την ξυλοβιόζη που έχει προσδεθεί στις -2 και -1 υποπεριοχές. Αντίστοιχα, η *AnAbf51* αφαιρεί τις μονές υποκαταστάσεις που μπορεί να παρεμποδίζουν την πρόσδεση του ενζύμου στις -2, -1 ή και +1 υποπεριοχές. Άρα, η *TtXyn30A* μπορεί να εμφανίζει ανοχή στην αραβινόζη όταν αυτή προσδένεται στην υποπεριοχή +1 του ενεργού κέντρου της, εξηγώντας έτσι την ποσότητα ξυλοβιόζης που απελευθερώνεται.

Παρόμοια διπλή δράση, γλυκουρονοξυλανάσης και ξυλοβιοϋδρολάσης, έχει επιδείξει και η GH30 ξυλανάση προερχόμενη από τον ζυμομύκητα *Sugiyamaella lignohabitans*, η *S/Xyn30A* (Šuchová et al. 2022). Η στοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών της *S/Xyn30A* και της *TtXyn30A* με το εργαλείο BLAST® έδειξε πως εμφανίζουν ομοιότητα (similarity) κατά 65,5% (Šuchová et al. 2022). Κατ' επέκταση εμφανίζουν ομοιότητα και στις καταλυτικές τους ιδιότητες· η *S/Xyn30A* προσδένεται σε υποκαταστάσεις 4-*O*-μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος στην υποπεριοχή -2 και απαιτεί μη υποκατεστημένη ξυλόζη στην υποπεριοχή -1 του ενεργού της κέντρου, όπως και η *TtXyn30A*. Τα τελικά προϊόντα υδρόλυσης γλυκουρονοξυλάνης με *S/Xyn30A* είναι αλδουρονικά οξέα, από τα οποία, στη συνέχεια, η *S/Xyn30A* απελευθερώνει ξυλοβιόζη από το μη αναγωγικό άκρο. Σε αυτό το σημείο έγκειται και η διαφορά της με την *TtXyn30A*: η *TtXyn30A* απελευθερώνει ταυτόχρονα όξινους ολιγοσακχαρίτες και ξυλοβιόζη, με τα τελικά προϊόντα υδρόλυσης να είναι η ξυλοβιόζη, το αλδοτριουρονικό και το αλδοτετραουρονικό οξύ. Από την άλλη πλευρά, τα προϊόντα υδρόλυσης της *S/Xyn30A* απελευθερώνονται διαδοχικά και όχι ταυτόχρονα, ενώ στο υδρόλυμα παραμένουν και αλδουρονικά οξέα μεγαλύτερου μεγέθους (Šuchová et

αl. 2022). Επιπλέον, η *S/Χγν30Α* εμφανίζει μειωμένη δραστηριότητα, όταν στην υποπεριοχή 3 του ενεργού κέντρου προσδένεται αραβινόζη, σε αντίθεση με την *TtΧγν30Α*, η οποία εμφανίζει ανοχή στην αραβινόζη, όπως φάνηκε στα πειράματα που διενεργήθηκαν σε αυτήν τη διπλωματική εργασία.

4.3. Σύγκριση της δράσης των ημικυτταρινολυτικών ενζύμων και των σχέσεων που αναπτύσσονται στα περίπλοκα υποστρώματα βιομάζας

Προκειμένου να εξεταστεί πληρέστερα η επίδραση που έχει η κάθε ξυλανάση στο έργο των αραβινοφουρανοζιδασών, παρουσιάζεται ο βαθμός συνεργισμού ως προς την απελευθέρωση αραβινόζης, του κύριου προϊόντος υδρόλυσης των αραβινοφουρανοζιδασών, που επιτεύχθηκε ανά ενζυμικό συνδυασμό, στο πίτυρο σίτου και στο πίτυρο καλαμποκιού.

Πίνακας 7. Συγκεντρωτικός πίνακας των βαθμών συνεργισμού ως προς την απελευθέρωση αραβινόζης που επιτεύχθηκε ανά ενζυμικό συνδυασμό στα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα βιομάζας.

	Πίτυρο σίτου			Πίτυρο καλαμποκιού		
	<i>TmΧγν10</i>	<i>AnΧγν11</i>	<i>TtΧγν30Α</i>	<i>TmΧγν10</i>	<i>AnΧγν11</i>	<i>TtΧγν30Α</i>
<i>TtAbf43</i>	3,09 ± 0,02	1,59 ± 0,07	0,95 ± 0,08	1,81 ± 0,13	1,45 ± 0,09	1,45 ± 0,10
<i>AnAbf51</i>	2,32 ± 0,01	1,46 ± 0,12	0,77 ± 0,00	2,21 ± 0,15	1,58 ± 0,08	1,34 ± 0,06
<i>TtAbf43-AnAbf51</i>	2,28 ± 0,21	1,15 ± 0,10	1,05 ± 0,10	2,14 ± 0,07	1,23 ± 0,71	1,39 ± 0,03

Στο πίτυρο σίτου, διαπιστώνεται πως οι αραβινοφουρανοζιδάσες επέδειξαν σαφώς μεγαλύτερη συνέργεια με την ξυλανάση *TmΧγν10*, παρά με την *AnΧγν11*. Συγκεκριμένα, η δράση της *TtAbf43* με την *TmΧγν10* είχε βαθμό συνεργισμού 3,09 ± 0,02 και η αντίστοιχη δράση της *TtAbf43* με την *AnΧγν11* παρουσίασε βαθμό συνεργισμού ίσο με 1,59 ± 0,07. Ακόμη, ο βαθμός συνεργισμού των δύο αραβινοφουρανοζιδασών με την *TmΧγν10* ισούται με 2,28 ± 0,21, ενώ αυτός των δύο αραβινοφουρανοζιδασών με την *AnΧγν11* ισούται με 1,15 ± 0,10. Η *TmΧγν10* έχει μεγαλύτερη ανοχή σε υποκαταστάσεις, οπότε δρα ευκολότερα στο πολυμερές, δημιουργώντας υποκατεστημένους ξυλοολιγοσακχαρίτες, στους οποίους μπορούν να δράσουν οι αραβινοφουρανοζιδάσες στη συνέχεια. Η *TtΧγν30Α* δεν βοήθησε τη δράση των δύο αραβινοφουρανοζιδασών, το οποίο αποτυπώνεται από τους χαμηλούς βαθμούς συνεργισμού. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην έλλειψη υποκαταστάσεων γλυκουρονικού οξέος στο συγκεκριμένο υπόστρωμα, στο οποίο προσδένεται η *TtΧγν30Α*.

Στο πίτυρο καλαμποκιού, διαπιστώνεται μεγαλύτερη απελευθέρωση αραβινόζης κατά τη δράση των αραβινοφουρανοζιδασών με την *TmΧγν10*, ακολουθούμενη από τις άλλες δύο ξυλανάσες. Η *TmΧγν10* και *AnΧγν11* επέδειξαν μεγαλύτερο συνεργισμό με την *AnAbf51*, με τους αντίστοιχους βαθμούς να ισούνται με 2,21 ± 0,15 και 1,58 ± 0,08. Όπως και στο πίτυρο σίτου, η *TmΧγν10* παρουσιάζει μεγαλύτερους βαθμούς συνεργισμού απ' ό,τι η *AnΧγν11*, οι οποίοι εξηγούνται λόγω της μεγαλύτερης ανοχής που έχει η πρώτη σε υποκαταστάσεις. Από την άλλη, στο πίτυρο καλαμποκιού η *TtΧγν30Α* έδειξε σαφή συνεργισμό, σε αντίθεση με το πίτυρο σίτου, και με τις δύο αραβινοφουρανοζιδάσες, αφού σε όλες τις δράσεις ο βαθμός συνεργισμού των ενζύμων κυμαίνεται μεταξύ 1,30-1,55. Το πίτυρο

καλαμποκιού πρόκειται για ένα υπόστρωμα με πολλές υποκαταστάσεις, οπότε η *TtXyn30A* προσδέεται στο γλυκουρονικό οξύ και υδρολύει την ξυλόζη.

Η *TtXyn30A* συνιστά μία ξυλανάση της οικογένειας GH30, με επιπλέον δράση ξυλοβιοϋδρολάσης. Χαρακτηρίζεται από ενδο-ενεργότητα, εξαρτώμενη από τις υποκαταστάσεις 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικού οξέος της ημικυτταρινικής αλυσίδας, αλλά επίσης διαθέτει και μία εξω-δράση έναντι γραμμικών και υποκατεστημένων ξυλοολιγοσακχαριτών, απελευθερώνοντας ξυλοβιόζη από το μη αναγωγικό άκρο (Katsimpouras et al. 2019). Για να εμφανίσει την ενδο-δράση της, η υποκατεστημένη με 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικό οξύ ξυλοπυρανόζη προσδέεται στην -2 υποπεριοχή του ενεργού κέντρου του ενζύμου και έπειτα η ξυλανάση διασπά τον δεύτερο, προς το αναγωγικό άκρο γλυκοζιδικό δεσμό. Αντίστοιχα, η εξω-δράση του ενζύμου αφορά στην απελευθέρωση ξυλοβιόζης από το μη αναγωγικό άκρο του υποστρώματος· η ξυλανάση υδρολύει τον αντίστοιχο γλυκοζιδικό δεσμό (Katsimpouras et al. 2019; Mendonça et al. 2023). Παρ' όλο που δε συνεισφέρει στην απελευθέρωση αραβινόζης από τις αραβινοφουρανοζιδάσες στο πίτυρο σίτου, δεν συμβαίνει στο ίδιο στο πίτυρο καλαμποκιού, στο οποίο φαίνεται πως βοηθάει την κάθε αραβινοφουρανοζιδάση όταν δρα μεμονωμένα, αλλά κι όταν δρουν αμφότερες. Μάλιστα, βοηθάει τόσο την *TtAbf43*, όσο και την *AnAbf51* στον ίδιο βαθμό, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις διαπιστώνεται αύξηση της αραβινόζης κατά 140-150%. Αυτό ενδεχομένως σημαίνει πως το υπόστρωμα καλαμποκιού έχει υποκαταστάσεις γλυκουρονικού οξέος, οπότε και η *TtXyn30A* εμφανίζει εντονότερη ενδο-δράση, υδρολύοντας εσωτερικά την ημικυτταρίνη· οι μικρότερου μεγέθους ολιγοσακχαρίτες που προκύπτουν είναι πιο προσβάσιμοι τόσο από την *TtAbf43* όσο και από την *AnAbf51*.

Τα ένζυμα της οικογένειας GH10 παρουσιάζουν χαμηλή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, ενώ μπορούν να δράσουν τόσο σε γραμμικές, όσο και σε υποκατεστημένες ημικυτταρινικές αλυσίδες (Biely et al. 2016). Το ενεργό τους κέντρο μπορεί να διαθέτει από τέσσερις έως επτά υποπεριοχές, σε καθένα εκ των οποίων προσδέεται ένα μόριο ξυλοπυρανόζης (Vardakou et al. 2008). Οι ξυλανάσες της οικογένειας GH10 υφίστανται μικρή παρεμπόδιση από υποκαταστάτες (υποκατεστημένα μόρια ξυλόζης με 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικό οξύ ή αραβινόζη μπορούν να προσδεθούν στις θέσεις +1 και -3 του ενεργού κέντρου του ενζύμου), αλλά απαιτούν να μην είναι υποκατεστημένα τα μόρια ξυλόζης που τοποθετούνται στη θέση -1 του ενεργού τους κέντρου (Mendonça et al. 2023). Τα προϊόντα που προκύπτουν από την υδρόλυση αλυσίδων ξυλάνης από τις ξυλανάσες GH10 είναι μικρότερα συγκριτικά με τα προϊόντα άλλων ξυλανασών, με τα συνηθέστερα να είναι η ξυλοβιόζη και η ξυλοτριόζη (Mendonça et al. 2023). Από την άλλη, οι ξυλανάσες της οικογένειας GH11 χρειάζονται μη υποκατεστημένη μονάδα ξυλοπυρανόζης στις θέσεις -1 και +1 της υποπεριοχής του ενεργού κέντρου του ενζύμου για να μπορούν να δράσουν, ενώ υποκαταστάσεις αραβινόζης ή 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικού οξέος μπορούν να υπάρχουν στις θέσεις -3 και +2 (Mendonça et al. 2023). Τα βραχύτερα προϊόντα που μπορούν να παραχθούν από τη δράση των ξυλανασών GH11 είναι η αραβινο-ξυλοτριόζη (από υποστρώματα αραβινοξυλάνης) και η αραβινο-ξυλοτετραόζη (από υποστρώματα γλυκουρονοξυλάνης) (Mendonça et al. 2023).

Στα συγκεκριμένα πειράματα, η δράση της *TmXyn10* έχει την ίδια συνεισφορά με αυτή της *AnXyn11* κατά την απελευθέρωση αραβινόζης στο πίτυρο σίτου. Ωστόσο, αυτό δεν ισχύει στο πίτυρο καλαμποκιού, όπου *TmXyn10* βοηθάει πολύ περισσότερο την *TtAbf43* και την *AnAbf51*, σε σχέση με την *AnXyn11*, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη φύση των υποστρωμάτων και τον βαθμό

υποκατάστασής τους. Αναλυτικότερα, το ποσοστό αραβινόζης είναι περίπου το ίδιο στα δύο υποστρώματα (9%), οπότε η ύπαρξή της ως υποκαταστάτης επηρεάζει τη δράση των ξυλανασών στον ίδιο βαθμό στα δύο υποστρώματα. Εν τούτοις, το πίτυρο καλαμποκιού ενδεχομένως να έχει περισσότερες υποκαταστάσεις 4-Ο-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος συγκριτικά με το πίτυρο καλαμποκιού, οπότε και η *AnXyn11* να δέχεται μεγαλύτερη παρεμπόδιση από το υπόστρωμα και να μην μπορεί να προσδεθεί σε κάποιες μονάδες ξυλοπυρανόζης. Αντίθετα, η *TmXyn10* καταφέρνει και υδρολύει περισσότερους γλυκοζιδικούς δεσμούς, απελευθερώνοντας υποκατεστημένα διμερή και τριμερή, τα οποία στη συνέχεια λειτουργούν ως υπόστρωμα για τις αραβινοφουρανοζιδάσες. Από την άλλη, το πίτυρο σίτου είναι πιθανό να έχει ελάχιστες έως μηδενικές υποκαταστάσεις γλυκουρονικού. Υπέρ αυτού συνηγορούν και τα αποτελέσματα των πειραμάτων σχετικά με την *TtXyn30A* που περιεγράφηκαν σε προηγούμενη παράγραφο· η *TtXyn30A* εμφανίζει εντονότερη συνέργεια με τις αραβινοφουρανοζιδάσες στο υπόστρωμα καλαμποκιού, ενώ στο υπόστρωμα σίτου δεν τις βοηθά καθόλου ίσως λόγω της μη ύπαρξης υποκαταστάσεων γλυκουρονικού οξέος, μέσω των οποίων προσδένεται στο υπόστρωμα.

4.4. Επίδραση των εστερασών του οξικού οξέος κατά την υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων

Πέρα από τα φερουλικά οξέα που παρεμποδίζουν τη δράση των αραβινοφουρανοζιδασών (Kiszonas et al. 2013; Luonteri et al. 1999; Saha 2000; Sørensen et al. 2007), ερευνήθηκε η ύπαρξη και άλλων μορίων, εν δυνάμει παρεμποδιστών. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε πως οι εστεράσες του οξικού οξέος των οικογενειών CE6 και CE16 φαίνεται να εμφανίζουν ενεργότητα σε μονάδες ξυλοπυρανόζης δι-υποκατεστημένες, με αραβινόζη και οξικό οξύ (Bella et al. 2023). Με αφορμή αυτή τη διαπίστωση, διενεργήθηκαν πειράματα σε ολιγοσακχαρίτες ακετυλιωμένης αραβινοξυλάνης, προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτή η δράση, αλλά και να εντοπιστούν πιθανοί συνεργισμοί μεταξύ των αραβινοφουρανοζιδασών και των εστερασών του οξικού οξέος.

Η εστεράση του οξικού οξέος OCE6 ανήκει στην οικογένεια CE6 των υδατανθρακικών εστερασών, οι οποίες στοχεύουν τις ακετυλιώσεις μονά ή διπλά υποκατεστημένων ξυλοπυρανοζών, στις θέσεις O-2 ή/και O-3, ολιγομερών, αλλά και πολυμερικών αλυσίδων (Neumüller et al. 2015). Η OCE6 πρόκειται για εστεράση τύπου σερίνης (serine-type esterase), δηλαδή η καταλυτική τριάδα αμινοξέων της είναι η σερίνη – ιστιδίνη – ασπαρτικό οξύ και ο μηχανισμός δράσης της είναι ο εξής: στο πρώτο στάδιο, η ακετυλομάδα μεταφέρεται στο υδροξύλιο της σερίνης, σχηματίζοντας ένα ασταθές τετραεδρικό ενδιάμεσο και στο δεύτερο στάδιο, το τετραεδρικό ενδιάμεσο υδρολύεται απελευθερώνοντας αλκοόλη και η σερίνη επανασυνδέεται με τα υπόλοιπα αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Biely 2012). Η OCE6 δύναται να καταλύει την αποακετυλίωση αμφότερων των θέσεων O-2 και O-3 των ξυλοπυρανοζών πιθανώς λόγω έλλειψης προσανατολισμού της ως προς το υπόστρωμα, και να σχηματίζει, εν ολίγοις, δύο διαφορετικά σύμπλοκα ενζύμου-υποστρώματος που να οδηγούν σε προϊόν (Biely 2012). Η OCE6 δεν μπορεί να αποακετυλώσει το O-3 όταν η συγκεκριμένη ξυλοπυρανόζη είναι υποκατεστημένη στο γειτονικό O-2 με 4-Ο-μεθυλ-D-γλυκουρονικό οξύ, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης (Biely et al. 2013). Ενδεχομένως, παρόμοια παρεμπόδιση θα μπορούσε να παρουσιαστεί και λόγω της ύπαρξης υποκατάστασης αραβινόζης στο O-3 της ξυλοπυρανόζης· δηλαδή, εν προκειμένω η εστεράση να μην μπορεί να αποακετυλώσει το O-2 (Biely et al. 2016). Εν τούτοις, νέες μελέτες έδειξαν

πως η OCE6 εμφάνισε μέτρια δραστηριότητα σε διμερές ξυλόζη, στο οποίο η μία μονάδα ξυλοπυρανόζης, ακετυλιωμένη στη θέση 2' και υποκατεστημένη με αραβινόζη στη θέση 3', ενώ όταν οι υποκαταστάτες βρίσκονταν στις αντίστροφες θέσεις (3'-ακετυλιωμένη και 2'-υποκατεστημένη με αραβινόζη), σχεδόν ολοκλήρωσε την αποακετυλίωση εντός μίας ώρας (Bella et al. 2023).

Σε αντίθεση με τις εστεράσες της οικογένειας CE6, οι περισσότερες CE16 εστεράσες εμφανίζουν εξω-δράση, αποακετυλιώνοντας την ξυλοπυρανόζη του μη αναγωγικού άκρου ολιγοσακχαριτών, στην οποία το οξικό μπορεί να βρίσκεται στις θέσεις O-2 και O-3, αλλά και στη θέση O-4, λόγω μετανάστευσης (Biely 2012; Neumüller et al. 2015). Αν και ο μηχανισμός κατάλυσής τους δεν είναι βέβαιος, πιθανόν πρόκειται για εστεράσες τύπου σερίνης, όπως και της οικογένειας CE6, ωστόσο παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά (Bella et al. 2023; Biely 2012). Η εστεράση AnCE16 ήταν σε θέση να υδρολύσει ακετυλομάδες στην O-3 ή στις O-2 και O-3 θέσεις μονά και διπλά ακετυλιωμένων ξυλοπυρανοζών αντίστοιχα, αλλά και να καταλύσει την υδρόλυση της O-3 ακετυλομάδας ξυλοπυρανόζης που ήταν υποκατεστημένη και με 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικό οξύ στη θέση O-2, σε υποστρώματα ξυλοολιγοσακχαριτών (Neumüller et al. 2015). Επιπλέον, η PaCE16A έχει υδρολύσει ακετυλομάδες μονά και διπλά υποκατεστημένων ξυλοπυρανοζών εσωτερικά της πολυμερικής αλυσίδας, έχει παρουσιάσει δηλαδή και ενδο-δράση, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ένζυμα της εν λόγω οικογένειας που διαθέτουν εξω-δράση (Puchart et al. 2015). Η TtCE16, που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διπλωματική εργασία, έχει επιδείξει δράση σε δι-υποκατεστημένες μονάδες ξυλοπυρανόζης, με οξικό οξύ στη θέση 3' και αραβινόζη στη θέση 2' (Bella et al. 2023). Παράλληλα, η TtCE16, μπόρεσε να προσδεθεί στην ξυλοπυρανόζη του μη αναγωγικού άκρου, η οποία ήταν ακετυλιωμένη στη θέση 4' και είχε υποκατάσταση 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος στην O-2 θέση, καθώς επίσης και αραβινόζης στη θέση O-3 (Bella et al. 2023).

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την παρούσα διπλωματική εργασία βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τα πρόσφατα προαναφερθέντα ευρήματα. Αναλυτικότερα, στο πίτυρο σίτου, παρ' όλο που η κάθε εστεράση μόνη της δεν έχει ορατό αποτέλεσμα ενίσχυσης της ενεργότητας της AnAbf51, αφού δεν υπάρχει αύξηση στην απελευθέρωση αραβινόζης, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για κάτι τέτοιο, από τη στιγμή που η συνδυασμένη δράση των OCE6-TtCE16 με την AnAbf51 οδήγησε σε αύξηση στη συγκέντρωση αραβινόζης κατά $21 \pm 4\%$. Αυτό σημαίνει πως η AnAbf παρεμποδίζεται από τις ακετυλίωσεις του υποστρώματος· η πρόσδεση της OCE6 και TtCE16 σε δι-υποκατεστημένες ξυλοπυρανόζες και η αποακετυλίωσή τους δημιουργεί πρόσβαση στην AnAbf51 να προσδεθεί στο υπόστρωμα και να καταλύσει την υδρόλυση της αραβινόζης από τις μονά, πλέον, υποκατεστημένες ξυλοπυρανόζες. Από την άλλη πλευρά, στο πίτυρο καλαμποκιού φαίνεται σαφέστατος συνεργισμός της AnAbf51 μόνο με την TtCE16. Τα δύο ένζυμα παρουσίασαν βαθμό συνεργισμού $1,30 \pm 0,08$ και η συγκέντρωση της αραβινόζης στο υδρόλυμα αυξήθηκε κατά $30 \pm 6\%$. Αυτό υποδεικνύει πως η TtCE16 μπόρεσε να προσδεθεί σε ακετυλιωμένες ξυλοπυρανόζες, υποκατεστημένες με αραβινόζη. Η μη δράση της OCE6 έγκειται στη φύση του υποστρώματος, καθώς το πίτυρο καλαμποκιού έχει περισσότερους υποκαταστάτες, δυσκολεύοντας την OCE6 να προσδεθεί σε αυτό.

5. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η ημικυτταρίνη και οι ξυλοολιγοσακχαρίτες που προκύπτουν κατά την αποικοδόμησή της παρουσιάζουν πολλές προοπτικές αξιοποίησης στις βιομηχανίες, μεταξύ άλλων, τροφίμων, φαρμάκων, καυσίμων και παραγωγής προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Η ενζυμική αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης αποτελεί μία πράσινη μέθοδο επεξεργασίας της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, καθώς πραγματοποιείται υπό ήπιες συνθήκες και δεν απαιτεί χρήση επιβλαβών διαλυτών και άλλων ουσιών. Λόγω της περιπλοκότητας των ημικυτταρινικών υποστρωμάτων, κρίνεται αναγκαία η χρήση πληθώρας ενζύμων με διαφορετικές ιδιότητες και λειτουργίες, προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση της διεργασίας. Υπό αυτό το πρίσμα, είναι σημαντική η γνώση γύρω από τις συνεργιστικές σχέσεις των ημικυτταρινολυτικών ενζύμων και πώς αυτά αλληλεπιδρούν με το εκάστοτε υπόστρωμα. Στην εν λόγω διπλωματική εργασία παρουσιάζονται νέα ευρήματα σχετικά με τη δράση κάποιων ενζύμων, ωστόσο το αντικείμενο χρήζει περαιτέρω μελέτης, για να μπορέσει, εν τέλει, να κλιμακωθεί.

Συγκεκριμένα, προτείνεται η διερεύνηση ενδεχόμενης συνεργιστικής δράσης που αναπτύσσει η αραβινοφουρανοζιδάση *TtAbf43* με εστεράσες του φερουλικού και του γλυκουρονικού οξέος σε υποστρώματα βιομάζας. Οι εστεράσες του φερουλικού οξέος διασπούν τον εστερικό δεσμό μεταξύ φερουλικού οξέος και αραβινόζης, ενώ οι εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος διασπούν τον εστερικό δεσμό μεταξύ της λιγνίνης και του 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικού οξέος που είναι συνδεδεμένο στην ξυλάνη. Αφ' ενός η δράση των εστερασών του φερουλικού αναμένεται να ενισχύσει τη δράση της *TtAbf43*, η οποία παρεμποδίζεται από υποκαταστάσεις φερουλικού και αφ' ετέρου, η διάσπαση των συμπλεγμάτων λιγνίνης-υδατανθράκων θα ελευθερώσει χώρο για τη δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης.

Επιπλέον, θα μπορούσε να ερευνηθεί η συνεργιστική δράση της εστεράσης του οξικού οξέος *TtCE16* με γλυκουρονιδάσες, οι οποίες διασπούν τους γλυκοζιδικούς δεσμούς μεταξύ των μονάδων ξυλοπυρανόζης και του γλυκουρονικού οξέος, σε υποστρώματα γλυκουρονοξυλάνης. Η δράση των εστερασών του οξικού οξέος φαίνεται να παρεμποδίζεται από υποκαταστάτες γλυκουρονικού οξέος και αντιστρόφως, οι ακετυλιώσεις της ημικυτταρινικής αλυσίδας παρεμποδίζουν τη δράση των γλυκουρονιδασών. Τέλος, προτείνεται η μελέτη της δράσης που εμφανίζει η ξυλανάση *TtXyn30A* σε υπόστρωμα αδιάλυτης αραβινοξυλάνης, που περιέχει φερουλικό οξύ, το οποίο να έχει υποστεί προκατεργασία με εστεράσες του φερουλικού οξέος. Θα διαπιστωθεί, έτσι, αν η ξυλανάση εμφανίζει εξω-δράση και αν υφίσταται παρεμπόδιση από υποκαταστάσεις φερουλικού.

6. Βιβλιογραφία

- Amorim, Cláudia, Sara C. Silvério, Kristala L. J. Prather, and Lígia R. Rodrigues. 2019. 'From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides'. *Biotechnology Advances* 37(7):107397. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.05.003.
- Amraoui, Yassin, Vivek Narisetty, Frederic Coulon, Deepti Agrawal, Anuj Kumar Chandel, Sofia Maina, Apostolis Koutinas, and Vinod Kumar. 2021. 'Integrated Fermentative Production and Downstream Processing of 2,3-Butanediol from Sugarcane Bagasse-Derived Xylose by Mutant Strain of *Enterobacter Ludwigii*'. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 9(30):10381–91. doi: 10.1021/acssuschemeng.1c03951.
- Anwar, Zahid, Muhammad Gulfraz, and Muhammad Irshad. 2014. 'Agro-Industrial Lignocellulosic Biomass a Key to Unlock the Future Bio-Energy: A Brief Review'. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7(2):163–73. doi: 10.1016/j.jrras.2014.02.003.
- Armendáriz-Ruiz, Mariana, Jorge Alberto Rodríguez-González, Rosa María Camacho-Ruíz, and Juan Carlos Mateos-Díaz. 2018. 'Carbohydrate Esterases: An Overview'. Pp. 39–68 in *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, edited by G. Sandoval. New York, NY: Springer.
- Bååth, Jenny Arnling, Scott Mazurkewich, Jens-Christian Navarro Poulsen, Lisbeth Olsson, Leila Lo Leggio, and Johan Larsbrink. 2019. 'Structure–Function Analyses Reveal That a Glucuronoyl Esterase from *Teredinibacter Turneræ* Interacts with Carbohydrates and Aromatic Compounds'. *Journal of Biological Chemistry* 294(16):6635–44. doi: 10.1074/jbc.RA119.007831.
- Bajpai, Pratima. 2016. 'Structure of Lignocellulosic Biomass'. Pp. 7–12 in *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production, SpringerBriefs in Molecular Science*, edited by P. Bajpai. Singapore: Springer.
- Bankeeree, Wichanee, Sehanat Prasongsuk, Pongtharin Lotrakul, Suraini Abd-Aziz, and Hunsá Punnapayak. 2022. 'Enzymes for Hemicellulose Degradation'. Pp. 199–220 in *Biorefinery of Oil Producing Plants for Value-Added Products*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Bélanger, Jacqueline M. R., J. R. Jocelyn Paré, and Michel Sigouin. 1997. 'Chapter 2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles and Applications'. Pp. 37–59 in *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. Vol. 18, *Instrumental Methods in Food Analysis*, edited by J. R. J. Paré and J. M. R. Bélanger. Elsevier.
- Bella, Maroš, Monika Poláková, and Vladimír Puchart. 2023. 'Deacetylation of Arabinofuranosylated Xylopyranosyl Residues Related to Plant Xylan: Significant Differences Between Xylan Deacetylases Classified into Various Carbohydrate Esterase Families'. *ChemBioChem* 24(9):e202200743. doi: 10.1002/cbic.202200743.
- Belorkar, Seema A., and A. K. Gupta. 2016. 'Oligosaccharides: A Boon from Nature's Desk'. *AMB Express* 6(1):82. doi: 10.1186/s13568-016-0253-5.

- Bhatia, Latika, Ashutosh Sharma, Rakesh K. Bachheti, and Anuj K. Chandel. 2019. 'Lignocellulose Derived Functional Oligosaccharides: Production, Properties, and Health Benefits'. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 49(8):744–58. doi: 10.1080/10826068.2019.1608446.
- Biely, Peter. 2012. 'Microbial Carbohydrate Esterases Deacetylating Plant Polysaccharides'. *Biotechnology Advances* 30(6):1575–88. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.04.010.
- Biely, Peter, Mária Ciszárová, Iveta Uhliaríková, Jane W. Agger, Xin-Liang Li, Vincent G. H. Eijsink, and Bjorge Westereng. 2013. 'Mode of Action of Acetylxylyl Esterases on Acetyl Glucuronoxylan and Acetylated Oligosaccharides Generated by a GH10 Endoxylanase'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830(11):5075–86. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.07.018.
- Biely, Peter, Suren Singh, and Vladimír Puchart. 2016. 'Towards Enzymatic Breakdown of Complex Plant Xylan Structures: State of the Art'. *Biotechnology Advances* 34(7):1260–74. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.09.001.
- Binder, Joseph B., Jacqueline J. Blank, Anthony V. Cefali, and Ronald T. Raines. 2010. 'Synthesis of Furfural from Xylose and Xylan'. *ChemSusChem* 3(11):1268–72. doi: 10.1002/cssc.201000181.
- Block, Helena, Barbara Maertens, Anne Spriestersbach, Nicole Brinker, Jan Kubicek, Roland Fabis, Jörg Labahn, and Frank Schäfer. 2009. 'Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review'. Pp. 439–73 in *Methods in Enzymology*. Vol. 463, *Guide to Protein Purification, 2nd Edition*, edited by R. R. Burgess and M. P. Deutscher. Academic Press.
- Broekaert, Willem F., Christophe M. Courtin, Kristin Verbeke, Tom Van de Wiele, Willy Verstraete, and Jan A. Delcour. 2011. 'Prebiotic and Other Health-Related Effects of Cereal-Derived Arabinoxylans, Arabinoxylan-Oligosaccharides, and Xylooligosaccharides'. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51(2):178–94. doi: 10.1080/10408390903044768.
- Camarero, Susana, María Jesús Martínez, and Angel T. Martínez. 2014. 'Understanding Lignin Biodegradation for the Improved Utilization of Plant Biomass in Modern Biorefineries'. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 8(5):615–25. doi: 10.1002/bbb.1467.
- Cartaxo da Costa Urtiga, Silvana, Henrique Rodrigues Marcelino, Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito, and Elquio Eleamen Oliveira. 2020. 'Xylan in Drug Delivery: A Review of Its Engineered Structures and Biomedical Applications'. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 151:199–208. doi: 10.1016/j.ejpb.2020.04.016.
- Carvalho, Ana Flávia Azevedo, Pedro de Oliva Neto, Douglas Fernandes da Silva, and Gláucia Maria Pastore. 2013. 'Xylo-Oligosaccharides from Lignocellulosic Materials: Chemical Structure, Health Benefits and Production by Chemical and Enzymatic Hydrolysis'. *Food Research International* 51(1):75–85. doi: 10.1016/j.foodres.2012.11.021.
- Celińska, E., and W. Grajek. 2009. 'Biotechnological Production of 2,3-Butanediol—Current State and Prospects'. *Biotechnology Advances* 27(6):715–25. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.05.002.
- Chang, Minmin, Xinxin Liu, Ling Meng, Xiaohui Wang, and Junli Ren. 2018. 'Xylan-Based Hydrogels as a Potential Carrier for Drug Delivery: Effect of Pore-Forming Agents'. *Pharmaceutics* 10(4):261. doi: 10.3390/pharmaceutics10040261.

- Chen, Zhuoyun, Shanshan Li, Yuanfang Fu, Cheng Li, Daiwen Chen, and Hong Chen. 2019. 'Arabinoxylan Structural Characteristics, Interaction with Gut Microbiota and Potential Health Functions'. *Journal of Functional Foods* 54:536–51. doi: 10.1016/j.jff.2019.02.007.
- Cheung, Randy Chi Fai, Jack Ho Wong, and Tzi Bun Ng. 2012. 'Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography: A Review on Its Applications'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96(6):1411–20. doi: 10.1007/s00253-012-4507-0.
- Collins, Tony, Charles Gerday, and Georges Feller. 2005. 'Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases'. *FEMS Microbiology Reviews* 29(1):3–23. doi: 10.1016/j.femsre.2004.06.005.
- Czaplicki, Sylwester. 2013. 'Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds'. Pp. 99–122 in.
- Davies, G. J., K. S. Wilson, and B. Henrissat. 1997. 'Nomenclature for Sugar-Binding Subsites in Glycosyl Hydrolases'. *Biochemical Journal* 321(Pt 2):557–59.
- Drula, Elodie, Marie-Line Garron, Suzan Dogan, Vincent Lombard, Bernard Henrissat, and Nicolas Terrapon. 2022. 'The Carbohydrate-Active Enzyme Database: Functions and Literature'. *Nucleic Acids Research* 50(D1):D571–77. doi: 10.1093/nar/gkab1045.
- Duarte, Gilvan C., Leonora Rios S. Moreira, Paula Marcela D. Jaramillo, and Edivaldo Ximenes F. Filho. 2012. 'Biomass-Derived Inhibitors of Holocellulases'. *BioEnergy Research* 5(3):768–77. doi: 10.1007/s12155-012-9182-6.
- Ernst, Heidi A., Caroline Mosbech, Annette E. Langkilde, Peter Westh, Anne S. Meyer, Jane W. Agger, and Sine Larsen. 2020. 'The Structural Basis of Fungal Glucuronoyl Esterase Activity on Natural Substrates'. *Nature Communications* 11(1):1026. doi: 10.1038/s41467-020-14833-9.
- Gasmi Benahmed, Asma, Amin Gasmi, Maria Arshad, Mariia Shanaida, Roman Lysiuk, Massimiliano Peana, Irena Pshyk-Titko, Stepan Adamiv, Yurii Shanaida, and Geir Bjørklund. 2020. 'Health Benefits of Xylitol'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(17):7225–37. doi: 10.1007/s00253-020-10708-7.
- Gibson, Glenn R., Hollie M. Probert, Jan Van Loo, Robert A. Rastall, and Marcel B. Roberfroid. 2004. 'Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Updating the Concept of Prebiotics'. *Nutrition Research Reviews* 17(2):259–75. doi: 10.1079/NRR200479.
- Gírio, F. M., C. Fonseca, F. Carvalheiro, L. C. Duarte, S. Marques, and R. Bogel-Lukasik. 2010. 'Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review'. *Bioresource Technology* 101(13):4775–4800. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.088.
- Grootaert, Charlotte, Jan A. Delcour, Christophe M. Courtin, Willem F. Broekaert, Willy Verstraete, and Tom Van de Wiele. 2007. 'Microbial Metabolism and Prebiotic Potency of Arabinoxylan Oligosaccharides in the Human Intestine'. *Trends in Food Science & Technology* 18(2):64–71. doi: 10.1016/j.tifs.2006.08.004.
- Guragain, Yadhu N., Dolly Chitta, Mukunda Karanjikar, and Praveen V. Vadlani. 2017. 'Appropriate Lignocellulosic Biomass Processing Strategies for Efficient 2,3-Butanediol Production from

- Biomass-Derived Sugars Using *Bacillus Licheniformis* DSM 8785'. *Food and Bioproducts Processing* 104:147–58. doi: 10.1016/j.fbp.2017.05.010.
- He, Hong-Ju, Jinli Qiao, Yan Liu, Qingbin Guo, Xingqi Ou, and Xiaochan Wang. 2021. 'Isolation, Structural, Functional, and Bioactive Properties of Cereal Arabinoxylan—A Critical Review'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69(51):15437–57. doi: 10.1021/acs.jafc.1c04506.
- Houfani, Aicha Asma, Nico Anders, Antje C. Spiess, Petr Baldrian, and Said Benallaoua. 2020. 'Insights from Enzymatic Degradation of Cellulose and Hemicellulose to Fermentable Sugars— a Review'. *Biomass and Bioenergy* 134:105481. doi: 10.1016/j.biombioe.2020.105481.
- Hu, Ruofei, Lu Lin, Tingjun Liu, Pingkai Ouyang, Beihai He, and Shijie Liu. 2008. 'Reducing Sugar Content in Hemicellulose Hydrolysate by DNS Method: A Revisit'. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 2(2):156–61. doi: 10.1166/jbmb.2008.306.
- Jain, Kewal K. 2020. 'An Overview of Drug Delivery Systems'. Pp. 1–54 in *Drug Delivery Systems, Methods in Molecular Biology*, edited by K. K. Jain. New York, NY: Springer.
- Ji, Xiao-Jun, He Huang, and Ping-Kai Ouyang. 2011. 'Microbial 2,3-Butanediol Production: A State-of-the-Art Review'. *Biotechnology Advances* 29(3):351–64. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.007.
- Jumper, John, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, Russ Bates, Augustin Židek, Anna Potapenko, Alex Bridgland, Clemens Meyer, Simon A. A. Kohl, Andrew J. Ballard, Andrew Cowie, Bernardino Romera-Paredes, Stanislav Nikolov, Rishub Jain, Jonas Adler, Trevor Back, Stig Petersen, David Reiman, Ellen Clancy, Michal Zielinski, Martin Steinegger, Michalina Pacholska, Tamas Berghammer, Sebastian Bodenstern, David Silver, Oriol Vinyals, Andrew W. Senior, Koray Kavukcuoglu, Pushmeet Kohli, and Demis Hassabis. 2021. 'Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold'. *Nature* 596(7873):583–89. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- Karunarathna, Menisha S., and Rhett C. Smith. 2020. 'Valorization of Lignin as a Sustainable Component of Structural Materials and Composites: Advances from 2011 to 2019'. *Sustainability* 12(2):734. doi: 10.3390/su12020734.
- Katsimpouras, Constantinos, Grigorios Dedes, Nikolaos S. Thomaidis, and Evangelos Topakas. 2019. 'A Novel Fungal GH30 Xylanase with Xylobiohydrolase Auxiliary Activity'. *Biotechnology for Biofuels* 12(1):120. doi: 10.1186/s13068-019-1455-2.
- Khaire, Kaustubh C., Premeshworii D. Maibam, Abhijeet Thakur, and Arun Goyal. 2022. 'Biomedical and Pharmaceutical Applications of Xylan and Its Derivatives'. Pp. 447–65 in *Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio-Based Products and Bioenergy, Clean Energy Production Technologies*, edited by M. Brienzo. Singapore: Springer Nature.
- Kiszonas, Alecia M., E. Patrick Fuerst, and Craig F. Morris. 2013. 'Wheat Arabinoxylan Structure Provides Insight into Function'. *Cereal Chemistry* 90(4):387–95. doi: 10.1094/CHEM-02-13-0025-FI.
- Köhnke, Tobias, Åsa Östlund, and Harald Brelid. 2011. 'Adsorption of Arabinoxylan on Cellulosic Surfaces: Influence of Degree of Substitution and Substitution Pattern on Adsorption Characteristics'. *Biomacromolecules* 12(7):2633–41. doi: 10.1021/bm200437m.

- Kong, Wei-Qing, Cun-Dian Gao, Shu-Feng Hu, Jun-Li Ren, Li-Hong Zhao, and Run-Cang Sun. 2017. 'Xylan-Modified-Based Hydrogels with Temperature/pH Dual Sensitivity and Controllable Drug Delivery Behavior'. *Materials* 10(3):304. doi: 10.3390/ma10030304.
- Koutinas, Apostolis A., Bernardo Yepez, Nikolaos Kopsahelis, Denise M. G. Freire, Aline Machado de Castro, Seraphim Papanikolaou, and Ioannis K. Kookos. 2016. 'Techno-Economic Evaluation of a Complete Bioprocess for 2,3-Butanediol Production from Renewable Resources'. *Bioresource Technology* 204:55–64. doi: 10.1016/j.biortech.2015.12.005.
- Kovács, Krisztina. 2009. 'Production of Cellulolytic Enzymes with *Trichoderma Atroviride* Mutants for the Biomass-to-Bioethanol Process: Cellulase Production, Enzymatic Hydrolysis and Simultaneous Saccharification and Fermentation'.
- Kuenz, Anja, Malee Jäger, Harri Niemi, Mari Kallioinen, Mika Mänttari, and Ulf Prüße. 2020. 'Conversion of Xylose from Birch Hemicellulose Hydrolysate to 2,3-Butanediol with *Bacillus Vallismortis*'. *Fermentation* 6(3):86. doi: 10.3390/fermentation6030086.
- Kumar, Amit, Archana Gautam, and Dharm Dutt. 2016. 'Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview'. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 7(3):149–68. doi: 10.4236/abb.2016.73014.
- Kurakake, Masahiro, Yoshikazu Kanbara, and Yoshiki Murakami. 2014. 'Characteristics of α -L-Arabinofuranosidase from *Streptomyces* Sp I10-1 for Production of L-Arabinose from Corn Hull Arabinoxylan'. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172(5):2650–60. doi: 10.1007/s12010-013-0691-3.
- Lagaert, Stijn, Annick Pollet, Christophe M. Courtin, and Guido Volckaert. 2014. ' β -Xylosidases and α -L-Arabinofuranosidases: Accessory Enzymes for Arabinoxylan Degradation'. *Biotechnology Advances* 32(2):316–32. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.005.
- Larsbrink, Johan, and Leila Lo Leggio. 2023. 'Glucuronoyl Esterases – Enzymes to Decouple Lignin and Carbohydrates and Enable Better Utilization of Renewable Plant Biomass'. *Essays in Biochemistry* 67(3):493–503. doi: 10.1042/EBC20220155.
- Lee, Roland Arthur, and Jean-Michel Lavoie. 2013. 'From First- to Third-Generation Biofuels: Challenges of Producing a Commodity from a Biomass of Increasing Complexity'. *Animal Frontiers* 3(2):6–11. doi: 10.2527/af.2013-0010.
- Lee, Y. C. 1990. 'High-Performance Anion-Exchange Chromatography for Carbohydrate Analysis.' *Analytical Biochemistry* 189(2):151–62.
- Lee, Y. C. 1996. 'Carbohydrate Analyses with High-Performance Anion-Exchange Chromatography'. *Journal of Chromatography A* 720(1):137–49. doi: 10.1016/0021-9673(95)00222-7.
- Liu, Yanrong, Yi Nie, Xingmei Lu, Xiangping Zhang, Hongyan He, Fengjiao Pan, Le Zhou, Xue Liu, Xiaoyan Ji, and Suojiang Zhang. 2019. 'Cascade Utilization of Lignocellulosic Biomass to High-Value Products'. *Green Chemistry* 21(13):3499–3535. doi: 10.1039/C9GC00473D.

- Lu, Fengxia, Mei Lu, Zhaoxin Lu, Xiaomei Bie, Haizhen Zhao, and Yi Wang. 2008. 'Purification and Characterization of Xylanase from *Aspergillus Ficum* AF-98'. *Bioresource Technology* 99(13):5938–41. doi: 10.1016/j.biortech.2007.10.051.
- Luo, Yiping, Zheng Li, Xiaoling Li, Xiaofeng Liu, Jiajun Fan, James H. Clark, and Changwei Hu. 2019. 'The Production of Furfural Directly from Hemicellulose in Lignocellulosic Biomass: A Review'. *Catalysis Today* 319:14–24. doi: 10.1016/j.cattod.2018.06.042.
- Luonteri, Elina, Paul A. Kroon, Maija Tenkanen, Anita Teleman, and Gary Williamson. 1999. 'Activity of an *Aspergillus Terreus* α -Arabinofuranosidase on Phenolic-Substituted Oligosaccharides'. *Journal of Biotechnology* 67(1):41–48. doi: 10.1016/S0168-1656(98)00164-3.
- Malgas, Samkelo, Mpho S. Mafa, Brian N. Mathibe, and Brett I. Pletschke. 2021. 'Unraveling Synergism between Various GH Family Xylanases and Debranching Enzymes during Hetero-Xylan Degradation'. *Molecules* 26(22):6770. doi: 10.3390/molecules26226770.
- Malgas, Samkelo, Mpho S. Mafa, Lithalethu Mkabayi, and Brett I. Pletschke. 2019. 'A Mini Review of Xylanolytic Enzymes with Regards to Their Synergistic Interactions during Hetero-Xylan Degradation'. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35(12):187. doi: 10.1007/s11274-019-2765-z.
- Malgas, Samkelo, Mpho S. Mafa, and Brett I. Pletschke. 2020. 'The Effects of Xylanase Synergistic Interactions During Lignocellulose Degradation and Their Significance for Industry'. Pp. 229–46 in *Industrial Applications of Glycoside Hydrolases*, edited by S. Shrivastava. Singapore: Springer.
- Marsden, Warwick L., Peter P. Gray, Greg J. Nippard, and Mark R. Quinlan. 1982. 'Evaluation of the DNS Method for Analysing Lignocellulosic Hydrolysates'. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 32(7–12):1016–22. doi: 10.1002/jctb.5030320744.
- Martínez Cuesta, Sergio, Syed Asad Rahman, Nicholas Furnham, and Janet M. Thornton. 2015. 'The Classification and Evolution of Enzyme Function'. *Biophysical Journal* 109(6):1082–86. doi: 10.1016/j.bpj.2015.04.020.
- McKee, Lauren S., Maria J. Peña, Artur Rogowski, Adam Jackson, Richard J. Lewis, William S. York, Kristian B. R. M. Krogh, Anders Viksø-Nielsen, Michael Skjøt, Harry J. Gilbert, and Jon Marles-Wright. 2012. 'Introducing Endo-Xylanase Activity into an Exo-Acting Arabinofuranosidase That Targets Side Chains'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(17):6537–42. doi: 10.1073/pnas.1117686109.
- Mendis, M., and S. Simsek. 2014. 'Arabinoxylans and Human Health'. *Food Hydrocolloids* 42:239–43. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.07.022.
- Mendonça, Mauro, Mário Barroca, and Tony Collins. 2023. 'Endo-1,4- β -Xylanase-Containing Glycoside Hydrolase Families: Characteristics, Singularities and Similarities'. *Biotechnology Advances* 65:108148. doi: 10.1016/j.biotechadv.2023.108148.
- Menon, Vishnu, and Mala Rao. 2012. 'Trends in Bioconversion of Lignocellulose: Biofuels, Platform Chemicals & Biorefinery Concept'. *Progress in Energy and Combustion Science* 38(4):522–50. doi: 10.1016/j.peccs.2012.02.002.

- Mhetras, Nutan, Vidhyashri Mapre, and Digambar Gokhale. 2019. 'Xylooligosaccharides (XOS) as Emerging Prebiotics: Its Production from Lignocellulosic Material'. *Advances in Microbiology* 9(1):14–20. doi: 10.4236/aim.2019.91002.
- Mikkonen, Kirsi S., and Maija Tenkanen. 2012. 'Sustainable Food-Packaging Materials Based on Future Biorefinery Products: Xylans and Mannans'. *Trends in Food Science & Technology* 28(2):90–102. doi: 10.1016/j.tifs.2012.06.012.
- Monrad, Rune Nygaard, Jens Eklöf, Kristian B. R. M. Krogh, and Peter Biely. 2018. 'Glucuronoyl Esterases: Diversity, Properties and Biotechnological Potential. A Review'. *Critical Reviews in Biotechnology* 38(7):1121–36. doi: 10.1080/07388551.2018.1468316.
- Morais, Mariana A. B., Joan Coines, Mariane N. Domingues, Renan A. S. Pirolla, Celisa C. C. Tonoli, Camila R. Santos, Jessica B. L. Correa, Fabio C. Gozzo, Carme Rovira, and Mario T. Murakami. 2021. 'Two Distinct Catalytic Pathways for GH43 Xylanolytic Enzymes Unveiled by X-Ray and QM/MM Simulations'. *Nature Communications* 12(1):367. doi: 10.1038/s41467-020-20620-3.
- Moreira, L. R. S., and E. X. F. Filho. 2016. 'Insights into the Mechanism of Enzymatic Hydrolysis of Xylan'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(12):5205–14. doi: 10.1007/s00253-016-7555-z.
- de Moreno, Miriam R., Jean F. Smith, and Robert V. Smith. 1986. 'Mechanism Studies of Coomassie Blue and Silver Staining of Proteins'. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75(9):907–11. doi: 10.1002/jps.2600750919.
- Morgan, Natalie K., Andrew Wallace, Michael R. Bedford, and Mingan Choct. 2017. 'Efficiency of Xylanases from Families 10 and 11 in Production of Xylo-Oligosaccharides from Wheat Arabinoxylans'. *Carbohydrate Polymers* 167:290–96. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.03.063.
- Mosbech, Caroline, Jesper Holck, Anne S. Meyer, and Jane Wittrup Agger. 2018. 'The Natural Catalytic Function of CuGE Glucuronoyl Esterase in Hydrolysis of Genuine Lignin–Carbohydrate Complexes from Birch'. *Biotechnology for Biofuels* 11(1):71. doi: 10.1186/s13068-018-1075-2.
- Mosier, Nathan S., and Klein E. Ileleji. 2020. 'Chapter 26 - How Fuel Ethanol Is Made from Corn'. Pp. 539–44 in *Bioenergy (Second Edition)*, edited by A. Dahiya. Academic Press.
- Moure, Andrés, Patricia Gullón, Herminia Domínguez, and Juan Carlos Parajó. 2006. 'Advances in the Manufacture, Purification and Applications of Xylo-Oligosaccharides as Food Additives and Nutraceuticals'. *Process Biochemistry* 41(9):1913–23. doi: 10.1016/j.procbio.2006.05.011.
- Mroueh, Mohamed, Marion Aruanno, Romain Borne, Pascale de Philip, Henri-Pierre Fierobe, Chantal Tardif, and Sandrine Pagès. 2019. 'The Xyl-Doc Gene Cluster of *Ruminiclostridium Cellulolyticum* Encodes GH43- and GH62- α -L-Arabinofuranosidases with Complementary Modes of Action'. *Biotechnology for Biofuels* 12(1):144. doi: 10.1186/s13068-019-1483-y.
- Naidu, Darrel Sarvesh, Shanganyane Percy Hlangothi, and Maya Jacob John. 2018. 'Bio-Based Products from Xylan: A Review'. *Carbohydrate Polymers* 179:28–41. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.09.064.

- Nakamura, Aline M., Alessandro S. Nascimento, and Igor Polikarpov. 2017. 'Structural Diversity of Carbohydrate Esterases'. *Biotechnology Research and Innovation* 1(1):35–51. doi: 10.1016/j.biori.2017.02.001.
- Nanda, Sonil, Ramin Azargohar, Ajay K. Dalai, and Janusz A. Kozinski. 2015. 'An Assessment on the Sustainability of Lignocellulosic Biomass for Biorefining'. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50:925–41. doi: 10.1016/j.rser.2015.05.058.
- Nanda, Sonil, Javeed Mohammad, Sivamohan N. Reddy, Janusz A. Kozinski, and Ajay K. Dalai. 2014. 'Pathways of Lignocellulosic Biomass Conversion to Renewable Fuels'. *Biomass Conversion and Biorefinery* 4(2):157–91. doi: 10.1007/s13399-013-0097-z.
- Nechita, Petronela, Roman Mirela, and Florin Ciolacu. 2021. 'Xylan Hemicellulose: A Renewable Material with Potential Properties for Food Packaging Applications'. *Sustainability* 13(24):13504. doi: 10.3390/su132413504.
- Nechita, Petronela, Mirela Roman (Iana Roman), and Silviu Marian Năstac. 2023. 'Green Approaches on Modification of Xylan Hemicellulose to Enhance the Functional Properties for Food Packaging Materials—A Review'. *Polymers* 15(9):2088. doi: 10.3390/polym15092088.
- Neumüller, Klaus G., Adriana Carvalho de Souza, Jozef HJ van Rijn, Hugo Streekstra, Harry Gruppen, and Henk A. Schols. 2015. 'Positional Preferences of Acetyl Esterases from Different CE Families towards Acetylated 4-O-Methyl Glucuronic Acid-Substituted Xylo-Oligosaccharides'. *Biotechnology for Biofuels* 8(1):7. doi: 10.1186/s13068-014-0187-6.
- Nordberg Karlsson, Eva, Eva Schmitz, Javier A. Linares-Pastén, and Patrick Adlercreutz. 2018. 'Endo-Xylanases as Tools for Production of Substituted Xylooligosaccharides with Prebiotic Properties'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(21):9081–88. doi: 10.1007/s00253-018-9343-4.
- Okolie, Jude A., Sonil Nanda, Ajay K. Dalai, and Janusz A. Kozinski. 2021. 'Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass'. *Waste and Biomass Valorization* 12(5):2145–69. doi: 10.1007/s12649-020-01123-0.
- Oliveira, Dyonis M., Thatiane R. Mota, Bianca Oliva, Fernando Segato, Rogério Marchiosi, Osvaldo Ferrarese-Filho, Craig B. Faulds, and Wanderley D. dos Santos. 2019. 'Feruloyl Esterases: Biocatalysts to Overcome Biomass Recalcitrance and for the Production of Bioactive Compounds'. *Bioresource Technology* 278:408–23. doi: 10.1016/j.biortech.2019.01.064.
- Pataca, Luiz C. M., Waldomiro Borges Neto, Maria C. Marcucci, and Ronei J. Poppi. 2007. 'Determination of Apparent Reducing Sugars, Moisture and Acidity in Honey by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectrometry'. *Talanta* 71(5):1926–31. doi: 10.1016/j.talanta.2006.08.028.
- Pettersen, Eric F., Thomas D. Goddard, Conrad C. Huang, Gregory S. Couch, Daniel M. Greenblatt, Elaine C. Meng, and Thomas E. Ferrin. 2004. 'UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis'. *Journal of Computational Chemistry* 25(13):1605–12. doi: 10.1002/jcc.20084.

- Pinales-Márquez, César D., Rosa M. Rodríguez-Jasso, Rafael G. Araújo, Araceli Loredó-Treviño, Debora Nabarlatz, Beatriz Gullón, and Héctor A. Ruiz. 2021. 'Circular Bioeconomy and Integrated Biorefinery in the Production of Xylooligosaccharides from Lignocellulosic Biomass: A Review'. *Industrial Crops and Products* 162:113274. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113274.
- Pouvreau, Laurice, Rob Joosten, Sandra W. A. Hinz, Harry Gruppen, and Henk A. Schols. 2011. 'Chryso sporium Lucknowense C1 Arabinofuranosidases Are Selective in Releasing Arabinose from Either Single or Double Substituted Xylose Residues in Arabinoxylans'. *Enzyme and Microbial Technology* 48(4):397–403. doi: 10.1016/j.enzmictec.2011.01.004.
- Puchart, Vladimír, Jane W. Agger, Jean-Guy Berrin, Anikó Várnai, Bjørge Westereng, and Peter Biely. 2016. 'Comparison of Fungal Carbohydrate Esterases of Family CE16 on Artificial and Natural Substrates'. *Journal of Biotechnology* 233:228–36. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.003.
- Puchart, Vladimír, Jean-Guy Berrin, Mireille Haon, and Peter Biely. 2015. 'A Unique CE16 Acetyl Esterase from Podospora Anserina Active on Polymeric Xylan'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(24):10515–26. doi: 10.1007/s00253-015-6934-1.
- Puchart, Vladimír, and Peter Biely. 2015. 'Redistribution of Acetyl Groups on the Non-Reducing End Xylopyranosyl Residues and Their Removal by Xylan Deacetylases'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(9):3865–73. doi: 10.1007/s00253-014-6160-2.
- Puchart, Vladimír, Katarína Šuchová, and Peter Biely. 2021. 'Xylanases of Glycoside Hydrolase Family 30 – An Overview'. *Biotechnology Advances* 47:107704. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107704.
- Puls, Jürgen, Maija Tenkanen, Hans E. Korte, and Kaisa Poutanen. 1991. 'Products of Hydrolysis of Beechwood Acetyl-4-O-Methylglucuronoxylan by a Xylanase and an Acetyl Xylan Esterase'. *Enzyme and Microbial Technology* 13(6):483–86. doi: 10.1016/0141-0229(91)90006-V.
- Raweesri, P., P. Riengrunrojana, and P. Pinphanichakarn. 2008. 'α-L-Arabinofuranosidase from Streptomyces Sp. PC22: Purification, Characterization and Its Synergistic Action with Xylanolytic Enzymes in the Degradation of Xylan and Agricultural Residues'. *Bioresource Technology* 99(18):8981–86. doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.016.
- Rennie, Emilie A., and Henrik Vibe Scheller. 2014. 'Xylan Biosynthesis'. *Current Opinion in Biotechnology* 26:100–107. doi: 10.1016/j.copbio.2013.11.013.
- Rohman, Ali, Bauke W. Dijkstra, and Ni Nyoman Tri Puspaningsih. 2019. 'β-Xylosidases: Structural Diversity, Catalytic Mechanism, and Inhibition by Monosaccharides'. *International Journal of Molecular Sciences* 20(22):5524. doi: 10.3390/ijms20225524.
- Saha, Badal C. 2000. 'α-L-Arabinofuranosidases: Biochemistry, Molecular Biology and Application in Biotechnology'. *Biotechnology Advances* 18(5):403–23. doi: 10.1016/S0734-9750(00)00044-6.
- Saha, Badal C. 2003. 'Hemicellulose Bioconversion'. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30(5):279–91. doi: 10.1007/s10295-003-0049-x.

- Saulnier, Luc, Pierre-Etienne Sado, Gérard Branlard, Gilles Charmet, and Fabienne Guillon. 2007. 'Wheat Arabinoxylans: Exploiting Variation in Amount and Composition to Develop Enhanced Varieties'. *Journal of Cereal Science* 46(3):261–81. doi: 10.1016/j.jcs.2007.06.014.
- Scheller, Henrik Vibe, and Peter Ulvskov. 2010. 'Hemicelluloses'. *Annual Review of Plant Biology* 61(1):263–89. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315.
- Schmitz, Eva, Savvina Leontakianakou, Siri Norlander, Eva Nordberg Karlsson, and Patrick Adlercreutz. 2022. 'Lignocellulose Degradation for the Bioeconomy: The Potential of Enzyme Synergies between Xylanases, Ferulic Acid Esterase and Laccase for the Production of Arabinoxyloligosaccharides'. *Bioresource Technology* 343:126114. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126114.
- Sørensen, Hanne R., Sven Pedersen, Christel T. Jørgensen, and Anne S. Meyer. 2007. 'Enzymatic Hydrolysis of Wheat Arabinoxylan by a Recombinant "Minimal" Enzyme Cocktail Containing β -Xylosidase and Novel Endo-1,4- β -Xylanase and α -L-Arabinofuranosidase Activities'. *Biotechnology Progress* 23(1):100–107. doi: 10.1021/bp0601701.
- de Souza, Thaiza S. P., and Haroldo Yukio Kawaguti. 2021. 'Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry'. *Food and Bioprocess Technology* 14(8):1446–77. doi: 10.1007/s11947-021-02678-z.
- Špániková, Silvia, and Peter Biely. 2006. 'Glucuronoyl Esterase – Novel Carbohydrate Esterase Produced by *Schizophyllum commune*'. *FEBS Letters* 580(19):4597–4601. doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.033.
- Šuchová, Katarína, Andrej Chyba, Zuzana Hegyi, Martin Rebroš, and Vladimír Puchart. 2022. 'Yeast GH30 Xylanase from *Sugiyamaella lignohabitans* Is a Glucuronoxylanase with Auxiliary Xylobiohydrolase Activity'. *Molecules* 27(3):751. doi: 10.3390/molecules27030751.
- Taylor, Edward J., Nicola L. Smith, Johan P. Turkenburg, Simone D'Souza, Harry J. Gilbert, and Gideon J. Davies. 2006. 'Structural Insight into the Ligand Specificity of a Thermostable Family 51 Arabinofuranosidase, Araf51, from *Clostridium thermocellum*'. *Biochemical Journal* 395(Pt 1):31–37. doi: 10.1042/BJ20051780.
- Terrapon, Nicolas, Vincent Lombard, Elodie Drula, Pedro M. Coutinho, and Bernard Henrissat. 2017. 'The CAZy Database/the Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) Database: Principles and Usage Guidelines'. Pp. 117–31 in *A Practical Guide to Using Glycomics Databases*, edited by K. F. Aoki-Kinoshita. Tokyo: Springer Japan.
- Terrett, Oliver M., and Paul Dupree. 2019. 'Covalent Interactions between Lignin and Hemicelluloses in Plant Secondary Cell Walls'. *Current Opinion in Biotechnology* 56:97–104. doi: 10.1016/j.copbio.2018.10.010.
- Thakur, Abhijeet, Kedar Sharma, and Arun Goyal. 2019. ' α -L-Arabinofuranosidase: A Potential Enzyme for the Food Industry'. Pp. 229–44 in *Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing, Energy, Environment, and Sustainability*, edited by B. Parameswaran, S. Varjani, and S. Raveendran. Singapore: Springer.

- Thakur, Abhijeet, Kedar Sharma, Sumitha Banu Jamaldeen, and Arun Goyal. 2020. 'Molecular Characterization, Regioselective and Synergistic Action of First Recombinant Type III α -L-Arabinofuranosidase of Family 43 Glycoside Hydrolase (PsGH43_12) from Pseudopedobacter Saltans'. *Molecular Biotechnology* 62(9):443–55. doi: 10.1007/s12033-020-00263-x.
- Thapa, Santosh, Jitendra Mishra, Naveen Arora, Priya Mishra, Hui Li, Joshua O'Hair, Sarabjit Bhatti, and Suping Zhou. 2020. 'Microbial Cellulolytic Enzymes: Diversity and Biotechnology with Reference to Lignocellulosic Biomass Degradation'. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 19(3):621–48. doi: 10.1007/s11157-020-09536-y.
- Van Dyk, J. S., R. Gama, D. Morrison, S. Swart, and B. I. Pletschke. 2013. 'Food Processing Waste: Problems, Current Management and Prospects for Utilisation of the Lignocellulose Component through Enzyme Synergistic Degradation'. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 26:521–31. doi: 10.1016/j.rser.2013.06.016.
- Van Dyk, J. S., and B. I. Pletschke. 2012. 'A Review of Lignocellulose Bioconversion Using Enzymatic Hydrolysis and Synergistic Cooperation between Enzymes—Factors Affecting Enzymes, Conversion and Synergy'. *Biotechnology Advances* 30(6):1458–80. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.002.
- Varadi, Mihaly, Stephen Anyango, Mandar Deshpande, Sreenath Nair, Cindy Natassia, Galabina Yordanova, David Yuan, Oana Stroe, Gemma Wood, Agata Laydon, Augustin Židek, Tim Green, Kathryn Tunyasuvunakool, Stig Petersen, John Jumper, Ellen Clancy, Richard Green, Ankur Vora, Mira Lutfi, Michael Figurnov, Andrew Cowie, Nicole Hobbs, Pushmeet Kohli, Gerard Kleywegt, Ewan Birney, Demis Hassabis, and Sameer Velankar. 2022. 'AlphaFold Protein Structure Database: Massively Expanding the Structural Coverage of Protein-Sequence Space with High-Accuracy Models'. *Nucleic Acids Research* 50(D1):D439–44. doi: 10.1093/nar/gkab1061.
- Vardakou, Maria, Claire Dumon, James W. Murray, Paul Christakopoulos, David P. Weiner, Nathalie Juge, Richard J. Lewis, Harry J. Gilbert, and James E. Flint. 2008. 'Understanding the Structural Basis for Substrate and Inhibitor Recognition in Eukaryotic GH11 Xylanases'. *Journal of Molecular Biology* 375(5):1293–1305. doi: 10.1016/j.jmb.2007.11.007.
- Vassilev, Stanislav V., David Baxter, Lars K. Andersen, and Christina G. Vassileva. 2010. 'An Overview of the Chemical Composition of Biomass'. *Fuel* 89(5):913–33. doi: 10.1016/j.fuel.2009.10.022.
- de Vries, Ronald P., Harry C. M. Kester, Charlotte H. Poulsen, Jacques A. E. Benen, and Jaap Visser. 2000. 'Synergy between Enzymes from *Aspergillus* Involved in the Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides'. *Carbohydrate Research* 327(4):401–10. doi: 10.1016/S0008-6215(00)00066-5.
- Vuong, Thu V., and Emma R. Master. 2022. 'Enzymatic Upgrading of Heteroxylans for Added-Value Chemicals and Polymers'. *Current Opinion in Biotechnology* 73:51–60. doi: 10.1016/j.copbio.2021.07.001.
- Wijaya, Christian J., Suryadi Ismadji, and Setiyo Gunawan. 2021. 'A Review of Lignocellulosic-Derived Nanoparticles for Drug Delivery Applications: Lignin Nanoparticles, Xylan Nanoparticles, and Cellulose Nanocrystals'. *Molecules* 26(3):676. doi: 10.3390/molecules26030676.

- Wong, Ken. K. Y., and Ute Maringer. 1999. 'Substrate Hydrolysis by Combinations of Trichoderma Xylanases'. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15(1):23–26. doi: 10.1023/A:1008865100607.
- Wood, Ian P., Adam Elliston, Peter Ryden, Ian Bancroft, Ian N. Roberts, and Keith W. Waldron. 2012. 'Rapid Quantification of Reducing Sugars in Biomass Hydrolysates: Improving the Speed and Precision of the Dinitrosalicylic Acid Assay'. *Biomass and Bioenergy* 44:117–21. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.05.003.
- Xiros, Charilaos, Evangelos Topakas, and Paul Christakopoulos. 2013. 'Hydrolysis and Fermentation for Cellulosic Ethanol Production'. *WIREs Energy and Environment* 2(6):633–54. doi: 10.1002/wene.49.
- Yandamuri, Narayudu, and K. R. Srinivas Nagabattula. 2013. 'Comparative Study of New Trends in HPLC: A Review'.
- Yang, Yue-Chao, Xiu-Wen Mei, Ya-Jie Hu, Li-Yuan Su, Jing Bian, Ming-Fei Li, Feng Peng, and Run-Cang Sun. 2019. 'Fabrication of Antimicrobial Composite Films Based on Xylan from Pulping Process for Food Packaging'. *International Journal of Biological Macromolecules* 134:122–30. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.021.
- Yin, Rui, Brandon Y. Feng, Amitabh Varshney, and Brian G. Pierce. 2022. 'Benchmarking AlphaFold for Protein Complex Modeling Reveals Accuracy Determinants'. *Protein Science* 31(8):e4379. doi: 10.1002/pro.4379.
- Zerva, Anastasia, Christina Pentari, Christina Ferousi, Efstratios Nikolaivits, Anthi Karnaouri, and Evangelos Topakas. 2021. 'Recent Advances on Key Enzymatic Activities for the Utilisation of Lignocellulosic Biomass'. *Bioresource Technology* 342:126058. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126058.
- Zhang, Yi-Heng Percival, and Lee R. Lynd. 2004. 'Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems'. *Biotechnology and Bioengineering* 88(7):797–824. doi: 10.1002/bit.20282.
- Zhang, Zhenqing, Nazeer M. Khan, Karen M. Nunez, Edward K. Chess, and Christina M. Szabo. 2012. 'Complete Monosaccharide Analysis by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection'. *Analytical Chemistry* 84(9):4104–10. doi: 10.1021/ac300176z.

Ιστοσελίδες

[1] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfg.html>

[2] <https://www.megazyme.com/alpha-l-arabinofuranosidase-aspergillus-niger?sSearch=E-afase>

[3] <https://www.megazyme.com/acetylxyln-esterase-orpinomyces-sp>

[4] https://comis.med.uvm.edu/vic/coursefiles/MD540/MD540-Protein_Methods_Learning_Module_10400_593281210/Protein-methods/Protein_Methods4.html

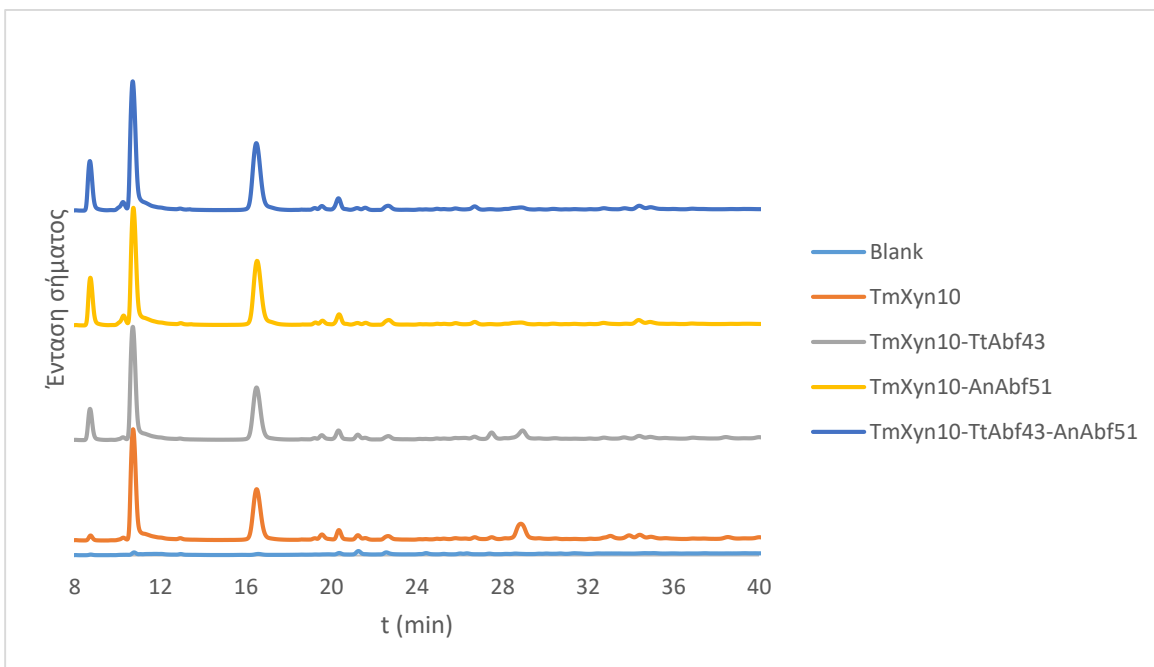
[5] <https://microbiologynotes.org/sds-page-introduction-principle-working-and-steps/>

[6] <https://www.nippongenetics.eu/en/products/protein-electrophoresis/protein-ladder/triple-coloured-ladder/bluestar-prestained-protein-marker-500-%C2%B5/>

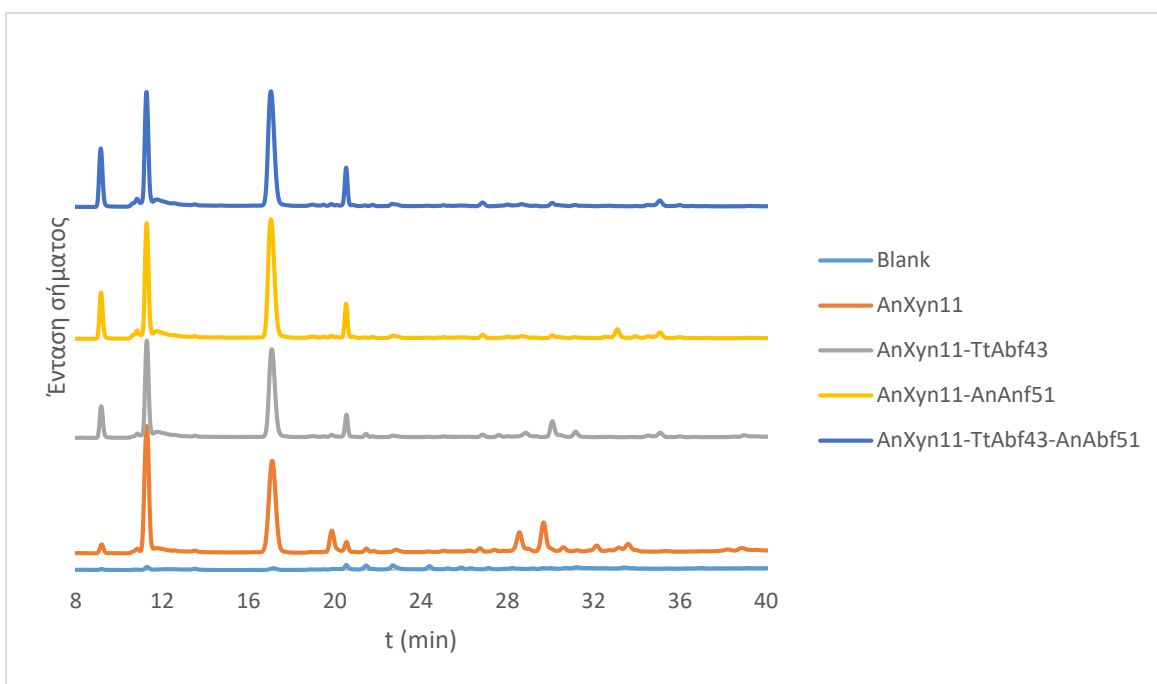
[7] <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

7. Παράρτημα

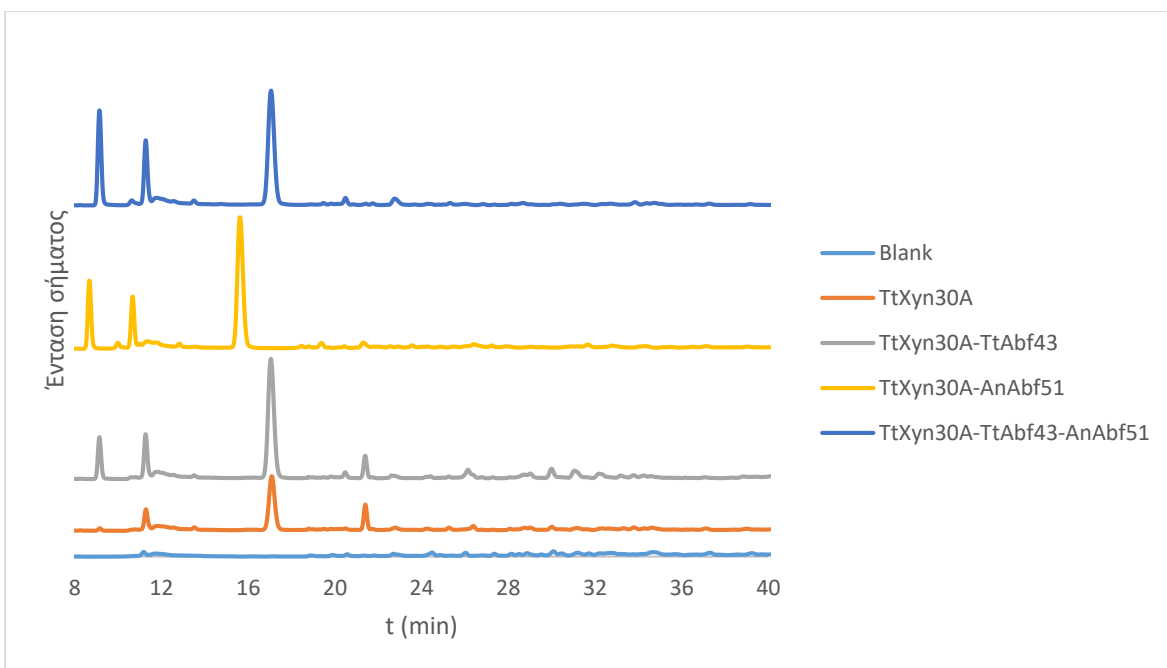
7.1. Χρωματογραφήματα της ανάλυσης περίπλοκων υποστρωμάτων βιομάζας στην ΗΡΑΕC



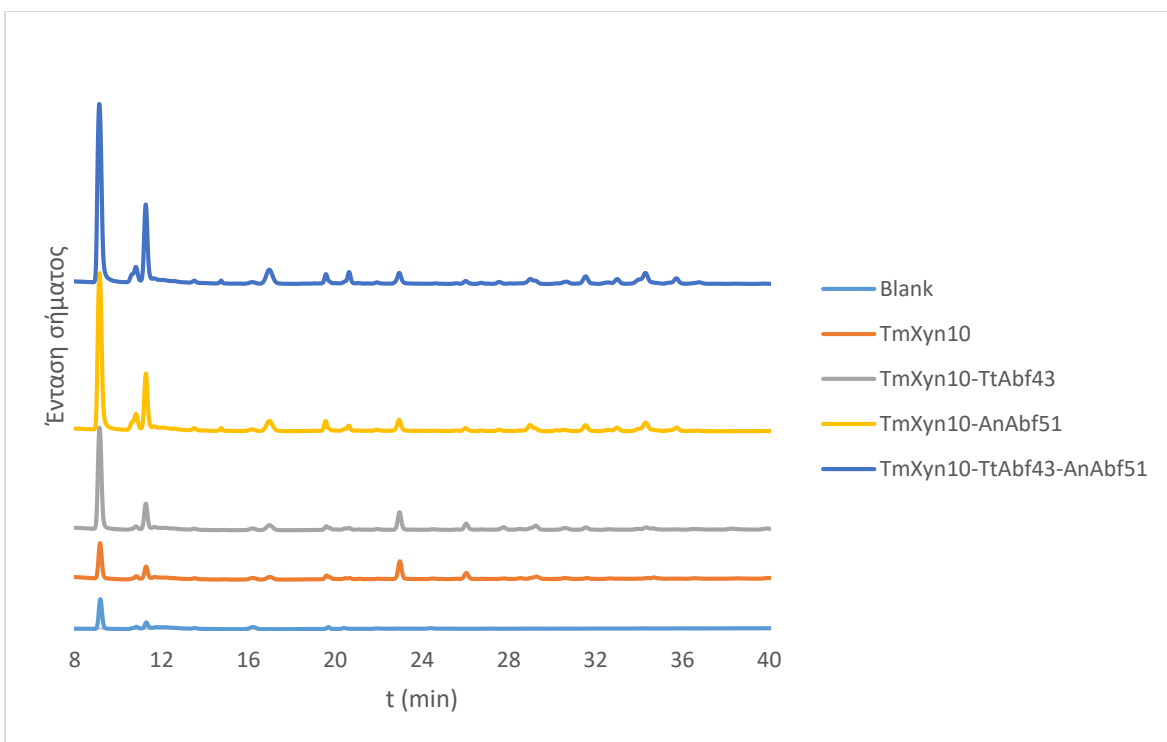
Σχήμα 31. Χρωματογραφήματα ΗΡΑΕC των ενζυμικών δράσεων των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* και της ξυλανάσης *TmXyn10* σε πίτυρο σίτου.



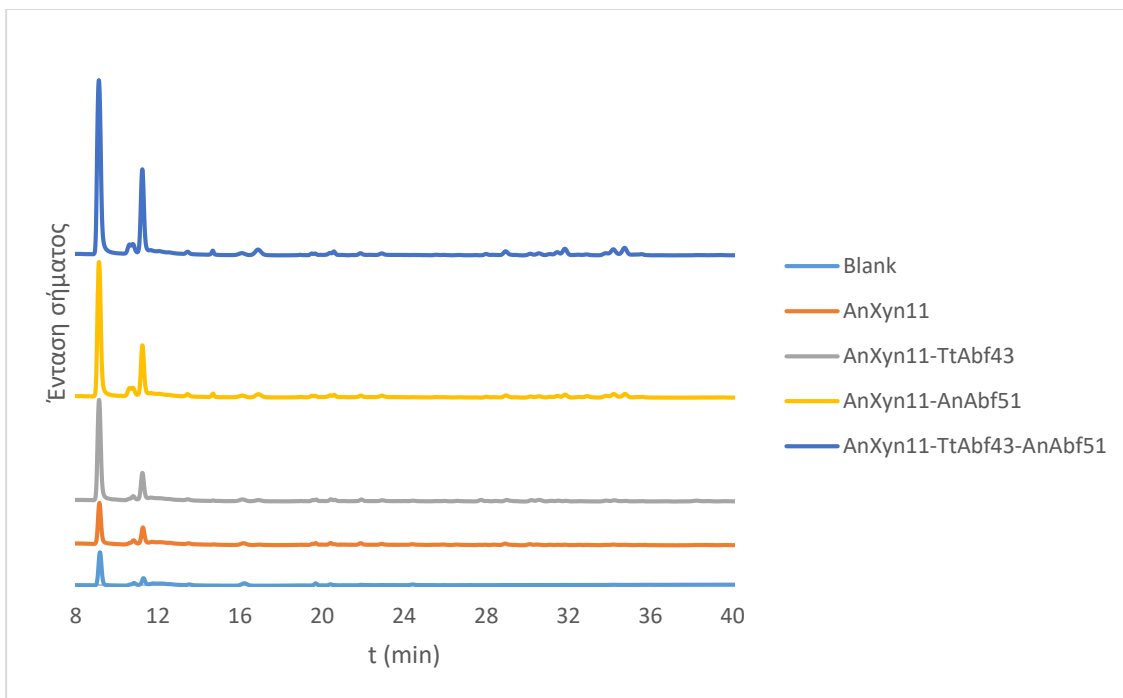
Σχήμα 32. Χρωματογραφήματα ΗΡΑΕC των ενζυμικών δράσεων των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* και της ξυλανάσης *AnXyn11* σε πίτυρο σίτου.



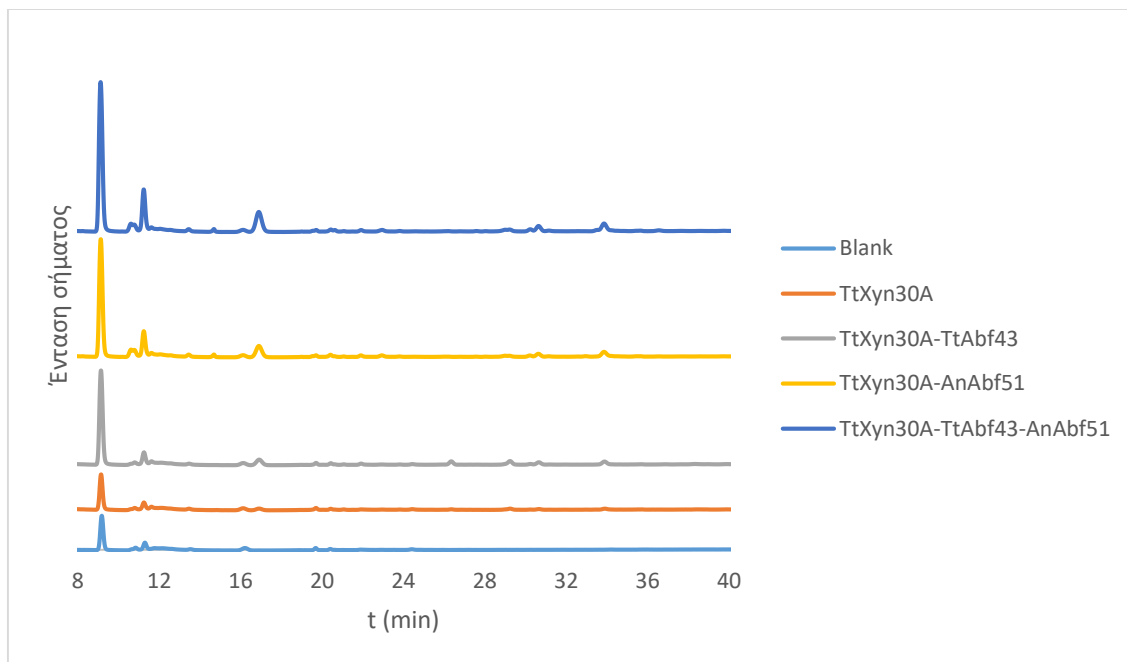
Σχήμα 33. Χρωματογραφήματα ΗΡΑΕC των ενζυμικών δράσεων των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* και της ξυλανάσης *TtXyn30A* σε πίτυρο σίτου.



Σχήμα 34. Χρωματογραφήματα ΗΡΑΕC των ενζυμικών δράσεων των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* και της ξυλανάσης *TmXyn10* σε πίτυρο καλαμποκιού.



Σχήμα 35. Χρωματογραφήματα ΗΡΑΕC των ενζυμικών δράσεων των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* και της ξυλανάσης *AnXyn11* σε πίτυρο καλαμποκιού.



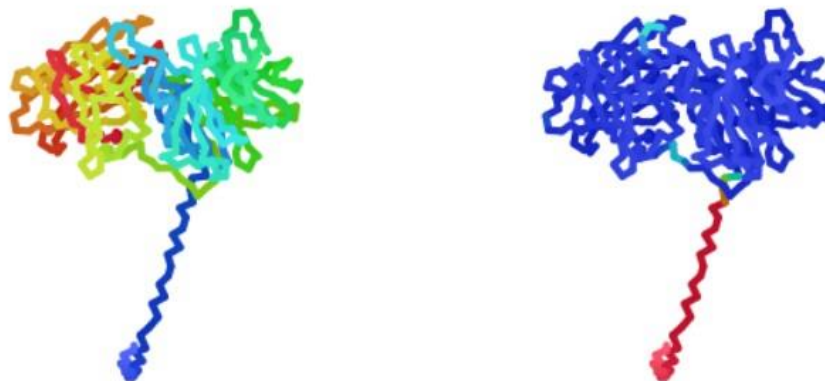
Σχήμα 36. Χρωματογραφήματα ΗΡΑΕC των ενζυμικών δράσεων των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *AnAbf51* και της ξυλανάσης *TtXyn30A* σε πίτυρο καλαμποκιού.

7.2. Διαγράμματα από τον αλγόριθμο AlphaFold

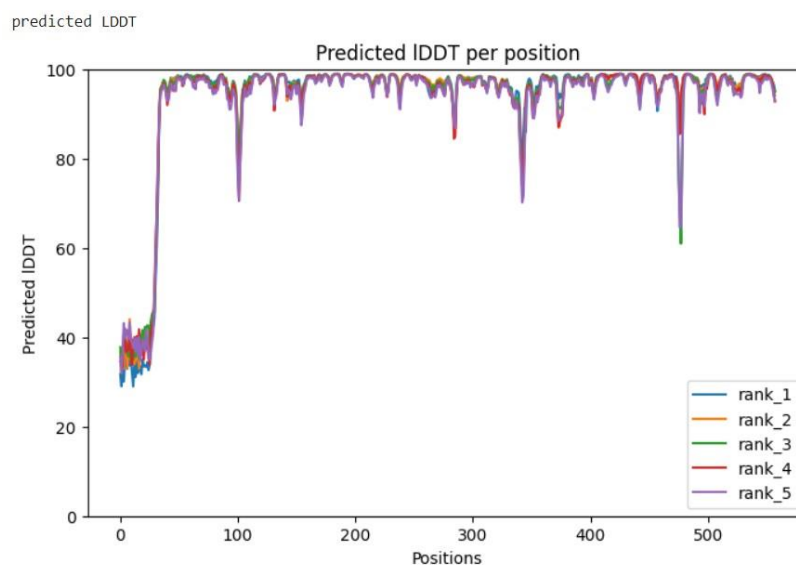
model_5_ptm_seed_0 recycles:24 tol:0.00 pLDDT:93.70 pTMscore:0.91

colored by N→C

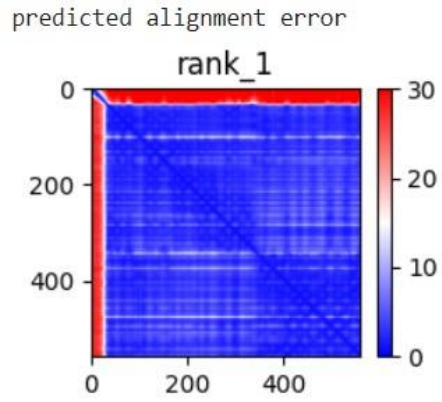
colored by pLDDT



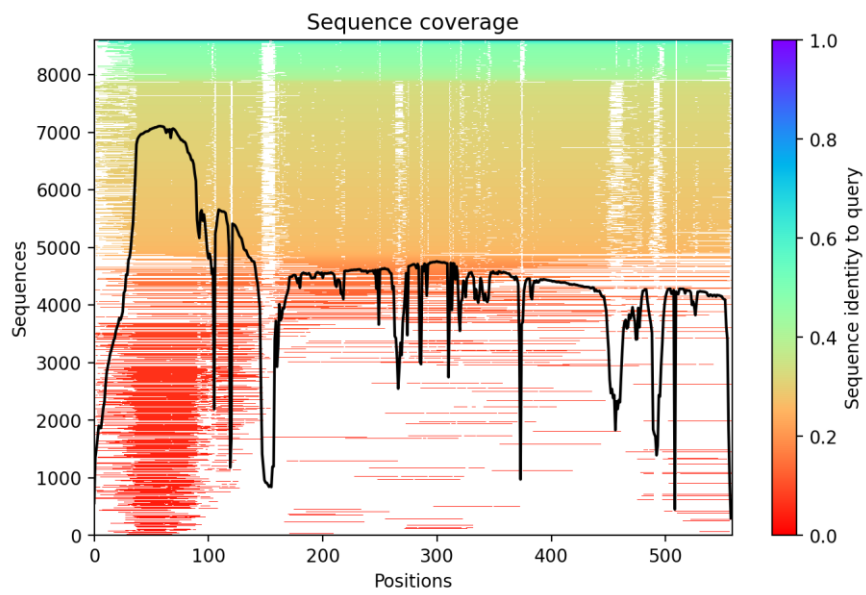
Σχήμα 37. Τρισδιάστατη απεικόνιση του 5^{ου} μοντέλου του AlphaFold. Στα αριστερά, το μοντέλο είναι χρωματισμένο με κατεύθυνση από το αμινοτελικό (μπλε) προς το καρβοξυτελικό (κόκκινο) άκρο. Στα δεξιά, είναι χρωματισμένο βάσει του δείκτη pLDDT: κόκκινο χρώμα υποδεικνύει χαμηλή αξιοπιστία και μπλε υψηλή. Επάνω, αναγράφονται οι δείκτες pLDDT και pTMscore του μοντέλου.



Σχήμα 38. Ποσοστό IDDT συναρτήσσει τον θέσεων των αμινοξέων κατά την πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής της TtAbf43.



Σχήμα 39. Σφάλμα προβλεπόμενης ευθυγράμμισης (PAE) αναλόγως των θέσεων των αμινοξέων, κατά την πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής της *TtAbf43*.



Σχήμα 40. Αριθμός αλληλουχιών συναρτήσει των θέσεων των αμινοξέων της *TtAbf43*.

7.3. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των αραβινοφουρανοζιδασών *TtAbf43* και *HiAXH43*

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

1  -----MPRQASTFTNPVLWEDHPDLEVFRVGSVFFYYS 32
2  MMGRNLNDLIALLALLSGSATSAAVRNTASQARAAEFNNPVLWEDYPDLDVFRVGSTFFYYS 60
   *: * .*****:***:*****:****

1  SSTFAYSPGAPVLKSYDLVHWTPVTHSVPRLNFGSNYDLPSGTPGAYVKGIWASTLRYP 92
2  SSTFAYSPGAPVLKSYDLVNWTPVTHSVPTLNFGDRYNLTGGTPAGYVKGIWASTLRYP 120
   *****:*****:***:*. * .**.:*****:*****

1  SNDRFYWYGCVE-GRTYLWTPSGGNALANNGEVPPSAWNWQHTATIDNCYYDAGLLIDDD 151
2  SNDKFYWYGCVEFGKTYIWTSSGTRAGDRDGEVDPADWVWEPHPPIDRCYYDSGLLIDDD 180
   ***:*****:*.***:*** * . * .:*** *: * *: * .*****:*****

1  DTMYIAYGNPTINVAQLSPDGTRQVRVQQRVYAHQPQGTVEGARMYKIRGNYYILVTRPA 211
2  DKMYIAYGNPKIEVAELSDGGLTEVS-SRVVYTPPAGTTIEGSRMYKVGDAYYILVTRPA 239
   * .*****:*.***:*** * . * .:*** *: * *: * .*****:*****

1  DAEYVLRSTTGGSPFGPYEARTLVSRIQGPLANAGFAHQGGIVDAPDG-TWHYVAFMDAYP 270
2  DAEWVLRSTS-GPFGPYEQRELVSRINGPLSNAGFAHQGGMVDTPDGRSWYYVAFMDAYP 298
   ***:*****: .***** * *****:***:*****:***:***:*.*****:*****

1  GGRIPVAVPLRWADGWPEVVTDSQGRWGTSPYIPVKGAKNATEGLASTDLDEFRTGRFS 330
2  GGRIPVAVPLRWTDGWPEVVTDAQGGWASYPVPEVETGKTVPD--DGWELDEFRTGRFS 356
   *****:*****:***:***:***:*. * .: .:*****:*. *

1  EHWEWNHNPDTSKFTLLGGNEGGLILRTATVTGDLFAARNTLRRIRGPKASGIFRLDVR 390
2  HHWEWNHNPDPARFALAGGDEGLVLQAATVTEDLFAARNTLRRIRGPKSSGTFRLDVS 416
   .*****:*. * . * .***:***:*. * .***:*****:*****:***:*. * .*****

1  GMRDGDRAVAVLFRDRAAYIGVWKQGNearIVMVDDLRLNEDGWRRTASTGRVAANGPVID 450
2  RMRDGDRAVAVLFRDRAAYIGVWKQGNearIVVVVDGLLALSSWTTVSTGRVAETGPTLS 476
   *****:*****:***:***:***:*. * . * .: * . * .*****:*. * .:

1  TNAQQDIWLRIDADITPAFGTNTERTTTFYYSIDGGRYTRLGPAFAMTNSWRYFTGYRF 510
2  --STQDVWLRIEADITPAFGTNTARTTTFSYVDGGKTFVRLGPAFMSNTWQYFTGYRF 534
   : * .***:*****:*****:***:***:*. * .***:***:*. * .*****

1  GVFNSTKSLGGEVKVKGFKMMNILEHHHHH 542
2  GVFNFATKELGGEVKVKSFMQPL----- 558
   *****:***:*****:*. * .:

```

Σχήμα 41. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών (sequence alignment) των αραβινοφουρανοζιδασών *HiAXH43* (1) και *TtAbf43* (2). Οι αστερίσκοι αντιστοιχούν στα όμοια ζεύγη. Με κίτρινο σημειώνονται τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου των ενζύμων.