



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

*ΤΟΜΕΑΣ IV: Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών*

*Διαδικασιών*

**ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ, ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΝΕΩΝ  
ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΩΝ ΥΔΡΟΛΑΣΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΜΕΣΟΦΙΛΟ  
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ *BACILLUS SAFENSIS***

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟ ΤΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ

ΓΕΩΡΓΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΔΙΟΜΗ ΜΑΜΜΑ

ΑΘΗΝΑ, 2023

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε κατά το έτος 2022-2023 βάσει του προγράμματος σπουδών της Σχολής Χημικών Μηχανικών σε δύο μέρη. Το πρώτο κομμάτι εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, και έπειτα στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια Διομή Μαμμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντάς μου τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία και δίνοντάς μου την ευκαιρία να ασχοληθώ και να κατανοήσω σε βάθος το αντικείμενο της βιοτεχνολογίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Διομή Μαμμά και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτρη Γ. Χατζηνικολάου για τη βοήθεια που μου προσέφεραν, την εκπαιδευτική καθοδήγηση, τις συμβουλές τους και τις παρεμβάσεις τους καθ' όλη τη διάρκεια της συγκεκριμένης εργασίας, με τη συμβολή τους να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την περάτωση αυτής.

Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω την Δρ Στυλιανή Καλαντζή από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών και τον Υποψήφιο Διδάκτορα Παναγιώτη Γκλέκα από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογίας για τη συνεργασία μας, τη συνεχή επίβλεψή τους καθ' όλο το διάστημα εκπόνησης της εργασίας, την ορθή καθοδήγησή τους, την υπομονή τους, τις χρήσιμες συμβουλές τους και τη θέλησή τους να με βοηθήσουν στα διάφορα προβλήματα που προεκύπταν τόσο πειραματικά, όσο και στο θεωρητικό κομμάτι της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη και των δύο εργαστηρίων για την εξαιρετική συνεργασία μας και την οποιαδήποτε βοήθεια μου παρείχαν, όταν την χρειάστηκα.

# Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη .....	1
Abstract.....	3
1. Θεωρητικό Μέρος.....	5
1.1. Εισαγωγή .....	5
1.2. Κυτταρίνη.....	8
1.3. Ημικυτταρίνη.....	9
1.4. Λιγνίνη .....	9
1.5. β – Γλουκάνη .....	10
1.6. Υδρόλυση Κυτταρίνης .....	12
1.7. Υδρόλυση β-Γλουκάνης.....	15
1.8. Παραγωγικές (Processive) Ενδογλουκανάσες.....	15
1.9. Γένος <i>Bacillus</i> .....	16
1.10. Οικογένειες Γλυκοσιδικών Υδρολασών (GH families) .....	17
1.10.1. Οικογένεια GH5 .....	17
1.11. Βιομηχανικές Εφαρμογές .....	20
2. Μέθοδοι και Υλικά .....	23
2.1. Υλικά.....	23
2.1.1. Όργανα και Συσκευές.....	23
2.1.2. Αντιδραστήρια και Διαλύματα .....	23
2.1.3. Kits.....	24
2.2. Μέθοδοι απομόνωσης και παραγωγής του ενζύμου .....	24
2.2.1. Απομόνωση Γονιδίου από τον Μικροοργανισμό <i>Bacillus safensis</i> .....	25
2.2.2. Υπερέκφραση Πλασμιδιακού DNA .....	26
2.2.3. Πέψη Γονιδιακού και Πλασμιδιακού DNA .....	28
2.2.4. Ανασυνδυασμός Γονιδιακού και Πλασμιδιακού DNA.....	28
2.2.5. Μετασηματισμός και Υπερέκφραση της Πρωτεΐνης .....	29
2.3. Μέθοδος Καθαρισμού της Πρωτεΐνης .....	30
2.4. Μέτρηση Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων.....	33
2.5. Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνών .....	34
2.6. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Γλυκόζης με χρήση εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος.....	35
2.7. Μέθοδος Προσδιορισμού Ενζυμικής Ενεργότητας .....	35
2.8. Ποιοτικός προσδιορισμός προϊόντων υδρόλυσης.....	35
2.9. Μέθοδοι Χαρακτηρισμού της Πρωτεΐνης.....	37
2.9.1. Εύρεση Βέλτιστης Θερμοκρασίας Ενζυμικής Δράσης .....	37
2.9.2. Εύρεση Βέλτιστου pH Δράσης της Ενδογλουκανάσης .....	37
2.9.3. Επίδραση της Θερμοκρασίας στη Σταθερότητα του Ενζύμου .....	37
2.9.4. Επίδραση του pH στη Σταθερότητα του Ενζύμου.....	38
2.9.5. Επίδραση ιόντων μετάλλων, EDTA και SDS στην ενεργότητα του ενζύμου. ....	38
2.9.6. Εξειδίκευση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα .....	38
2.9.7. Κινητικές Σταθερές.....	39
2.9.8. Κινητική Ρόφησης της BsGH5 .....	39
2.9.9. Παραγωγικότητα (Processivity) της BsGH5 .....	40
2.9.10. Βιοπληροφορική Μελέτη.....	40
3. Αποτελέσματα .....	41
3.1. Βιοπληροφορική Μελέτη .....	41
3.2. Απομόνωση και Παραγωγή του Ενζύμου .....	47
3.2.1. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης του Απομονωμένου Γονιδιακού DNA από τον Μικροοργανισμό <i>Bacillus safensis</i> .....	47

3.2.2.	Προσδιορισμός Συγκέντρωσης του Απομονωμένου Πλασμιδιακού DNA.....	48
3.2.3.	Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Προϊόντων Πέψης .....	48
3.2.4.	Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Μετασχηματισμένης και Υπερεκφρασμένης Πρωτεΐνης.....	49
3.3.	Προσδιορισμός Μοριακού Βάρους.....	50
3.4.	Χαρακτηρισμός της BsGH5.....	50
3.4.1.	Εύρεση Θερμοκρασίας Δράσης της BsGH5.....	50
3.4.2.	Θερμική Σταθερότητα .....	54
3.4.3.	Βέλτιστο pH δράσης.....	60
3.4.4.	Σταθερότητα pH.....	61
3.4.5.	Εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα .....	62
3.4.6.	Κινητικές παράμετροι υδρόλυσης της β – γλουκάνης από την BsGH5.....	63
3.4.7.	Επίδραση ιόντων μετάλλων .....	64
3.4.8.	Προϊόντα υδρόλυσης .....	66
3.4.9.	Ρόφηση και Παραγωγικότητα της BsGH5 .....	68
4.	Συμπεράσματα.....	70
	Βιβλιογραφία.....	73

## Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 1.</b> Πορεία προς την απομόνωση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα (Muhammad Mujtaba, 2023).....	7
<b>Εικόνα 2.</b> Πολυμερές κυτταρίνης που περιλαμβάνει μονομερή γλυκόζης συνδεδεμένα με β-1,4-γλυκοζιδικούς δεσμούς (Jude A. Okolie, 2021). .....	8
<b>Εικόνα 3.</b> Πολυμερές της ημικυτταρίνης (Lisong Hu, 2020). .....	9
<b>Εικόνα 4.</b> Δομές των τριών βασικών μονομερών της λιγνίνης (Jude A. Okolie, 2021).....	10
<b>Εικόνα 5.</b> Δομές β – γλουκανών· a) γραμμική, μη διακλαδισμένη β-1,3-d-γλουκάνη, b) γραμμική β-1,3-1,4-d-γλουκάνη, c) διακλαδισμένη β-1,3-1,2-d-γλουκάνη, d) διακλαδισμένη β-1,4-1,6-d-γλουκάνη, e) διακλαδισμένη β-1,3-1,6-d-γλουκάνη, f) β-1,3-1,6-d-γλουκάνη με διακλάδωση πάνω στη διακλάδωση, g) κυκλική δομή μίας β-1,2-γλουκάνης και h) κυκλική δομή μίας β-1,3-1,6-d-γλουκάνης (Laura Barsanti, 2011).....	11
<b>Εικόνα 6.</b> Δομή β-D-γλουκάνης κριθαριού (Misumi Kataoka, 2014).....	12
<b>Εικόνα 7.</b> Σχηματική αναπαράσταση των θέσεων δράσης των τριών κυτταρινασών σε πολυμερές κυτταρίνης.....	14
<b>Εικόνα 8.</b> Φυλογενετικό δέντρο της οικογένειας GH5. Ο κάθε χρωματιστός κλάδος αντιστοιχεί στον αριθμό μίας υποοικογένειας, όπως φαίνεται στον εξωτερικό δακτύλιο. Οι μαύροι κλάδοι δεν έχουν αντιστοιχηθεί σε κάποια υποοικογένεια (Henrik Aspeborg, 2012).....	19
<b>Εικόνα 9.</b> Εφαρμογές των β-γλουκανασών σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας (N. S. Pradeep, 2022).....	21
<b>Εικόνα 10.</b> Επίστρωση του <i>Bacillus safensis</i> σε τρυβλία με θρεπτικό LB Agar με βάση την αρίθμηση και τη φορά των βελών, ώστε να σχηματιστούν απομονωμένες αποικίες. ....	25
<b>Εικόνα 11.</b> Ο πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pET-15b. ....	27
<b>Εικόνα 12.</b> Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της ηλεκτροφόρησης SDS PAGE ((Creative_Proteomics)).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Εικόνα 13.</b> Αντίδραση οξειδοαναγωγής μεταξύ του DNS και ενός αναγωγικού σακχάρου (Kaitlin B. Applegate, 2019). ....	33
<b>Εικόνα 14.</b> Διάταξη χρωματογραφίας ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης με αμπερομετρική παλμική ανίχνευση (HPAEC-PAD). ....	36
<b>Εικόνα 15.</b> Πιθανή τρισδιάστατη πρωτεϊνική δομή της BsGH5.....	43
<b>Εικόνα 16.</b> Τρισδιάστατη πρωτεϊνική δομή της ένδο-1,4-β-μαννοζιδάσης από τον μικροοργανισμό <i>Bacillus licheniformis</i> . ....	44
<b>Εικόνα 17.</b> Ανεπτυγμένες αποικίες του μικροοργανισμού <i>Bacillus safensis</i> σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό μέσο LBR με τη μέθοδο της τριπλής αραιώσης. ....	47
<b>Εικόνα 18.</b> Ανεπτυγμένες αποικίες του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA σε δεκτικά κύτταρα BL21 του μικροοργανισμού <i>Escherichia coli</i> με τη μέθοδο της τριπλής αραιώσης....	49
<b>Εικόνα 19.</b> Ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE για την απομονωμένη BsGH5. Στην εικόνα αριστερά φαίνονται οι δέσμες των πρωτεϊνικών μορίων γνωστών μοριακών βαρών του πρότυπου διαλύματος και δεξιά η ζώνη που αντιστοιχεί στην BsGH5. ....	50
<b>Εικόνα 20.</b> Αποτελέσματα της υδρόλυσης της β-γλουκάνης από την BsGH5 που λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματων. Κάθε χρωματογράφημα αναφέρεται στον αντίστοιχο χρόνο αντίδρασης που φαίνεται στο πάνω αριστερό του μέρος. ....	68

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

<b>Διάγραμμα 1.</b> Καμπύλη αναφοράς ισοδύναμων γλυκόζης με τη μέθοδο DNS.....	34
<b>Διάγραμμα 2.</b> Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστικότητα της BsGH5.....	51
<b>Διάγραμμα 3.</b> Σταθερότητα της BsGH5 στους (α) (●) 40°C, (►) 50°C, (◻) 60°C και (β) 70°C. ..	54
<b>Διάγραμμα 4.</b> Διάγραμμα Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης, $E_{ad}$ . ..	57
<b>Διάγραμμα 5.</b> Υπολογισμός των μεταβολών της ενθαλπίας απενεργοποίησης, $\Delta H^*$ και της εντροπίας απενεργοποίησης, $\Delta S^*$ , της BsGH5 για το εύρος θερμοκρασιών 40 – 70°C.....	59
<b>Διάγραμμα 6.</b> Επίδραση του pH στη δραστικότητα της BsGH5, όπου (●) ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών φωσφορικών σε pH 3 – 5, (►) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε pH 5 – 7 και (◻) ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl σε pH 7 – 9. ....	60
<b>Διάγραμμα 7.</b> Σταθερότητα της BsGH5 σε διάφορες τιμές pH μετά από επώαση στους 4°C για 24 ώρες, με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων κιτρικών – φωσφορικών (c – p), φωσφορικών (p – p) και Tris/HCl.....	61
<b>Διάγραμμα 8.</b> Διάγραμμα Lineweaver – Burk για τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών, $K_m$ και $v_{max}$ .....	64
<b>Διάγραμμα 9.</b> Ραβδόγραμμα της % εναπομείνουσας σχετικής ενεργότητας της BsGH5 ύστερα από την επώασή της σε διάφορα μεταλλοϊόντα αλλά και στις χημικές ενώσεις EDTA και SDS στους 30°C για 30 (κίτρινο) και 60 (κόκκινο) λεπτά.....	65

## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 1.</b> Ποσοστιαία κατανομή κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης σε διάφορα λιγνοκυτταρινικά υλικά (Zahid Anwar, 2014).....	6
<b>Πίνακας 2.</b> Περιεκτικότητα σε β-γλουκάνη με βάση την πηγή προέλευσης. ....	12
<b>Πίνακας 3.</b> Πηγή προέλευσης, χαρακτηριστικά και προϊόντα υδρόλυσης παραγωγικών GH5 ενδογλουκανασών από βακτήρια (Shanshan Wu, 2020). ....	16
<b>Πίνακας 4.</b> Υποοικογένειες της οικογένειας γλυκοσιδικών υδρολασών 5 με μοναδική εξειδίκευση (Henrik Aspeborg, 2012).....	19
<b>Πίνακας 5.</b> Μέταλλα και αντίστοιχα ιόντα που μελετήθηκαν για την επίδρασή τους στην ενεργότητα του ενζύμου. ....	38
<b>Πίνακας 6.</b> Θεωρητικά χαρακτηριστικά της BsGH5, όπως αυτά προκύπτουν από το πρόγραμμα ProtParam. ....	42
<b>Πίνακας 7.</b> Όμοιες αμινοξικές αλληλουχίες με την BsGH5, σύμφωνα με το πρόγραμμα UniProt BLAST. ....	45
<b>Πίνακας 8.</b> Συγκέντρωση απομονωμένου γονιδιακού DNA. ....	47
<b>Πίνακας 9.</b> Συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA. ....	48
<b>Πίνακας 10.</b> Συγκεντρώσεις γονιδιακού και πλασμιδιακού DNA μετά την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BlnI και XhoI. ....	48
<b>Πίνακας 11.</b> Συγκέντρωση ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα, κατόπιν του μετασχηματισμού του σε δεκτικά κύτταρα E. coli DH5a.....	49
<b>Πίνακας 12.</b> Βιοχημικά χαρακτηριστικά ενζύμων της οικογένειας GH5. ....	53
<b>Πίνακας 13.</b> Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης της BsGH5.....	56
<b>Πίνακας 14.</b> Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης της BsGH5.....	58
<b>Πίνακας 15.</b> Σχετική ενεργότητα της BsGH5 σε διάφορα υποστρώματα. ....	62
<b>Πίνακας 16.</b> Αρχική, μη προσροφημένη και προσροφημένη πρωτεΐνη μετά από επώαση στους 40C για 1 ώρα.....	68

## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά στη μελέτη μίας β-γλουκανάσης (BsGH5) της οικογένειας 5 των γλυκοσιδικών υδρολασών (GH5) από το βακτήριο *Bacillus safensis*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση από τον μικροοργανισμό, ανασυνδυασμός και υπερπαραγωγή του συγκεκριμένου ενζύμου. Το γονίδιο του ενζύμου κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pET15b, ο οποίος με θερμοεπαγόμενο μετασχηματισμό εισήχθη σε δεκτικά κύτταρα *E. Coli* BL21. Τα βακτηριακά κύτταρα εκφράζουν το ένζυμο της β-γλουκανάσης και χρησιμοποιούνται ως εμβόλιο στις καλλιέργειες που μελετήθηκαν. Η κυτταρική καλλιέργεια των ανασυνδυασμένων κυττάρων παρήχθη σε μεγαλύτερη κλίμακα, ακολουθούμενη από την απομόνωση, τον καθαρισμό και τον χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με σπάσιμο των κυττάρων με υπερήχους, ενώ ο καθαρισμός περιλάμβανε τη διαβίβαση μέσα από στήλη νικελίου, τη συλλογή των κλασμάτων που περιείχαν την πρωτεΐνη και τη συμπύκνωση με χρήση διάταξης Amicon. Το μοριακό βάρος της BsGH5 προσδιορίστηκε μέσω ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE και βρέθηκε ίσο με 45 kDa. Έπειτα, ακολούθησε χαρακτηρισμός της BsGH5, όπου μελετήθηκαν η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της (60°C), το βέλτιστο pH δράσης της (pH=6), καθώς και η σταθερότητά της σε διαφορετικά pH (3 έως 9) και θερμοκρασίες (40 έως 70°C). Στους 40°C η BsGH5 διατηρεί το 50% της σχετικής της ενεργότητας μετά από επώαση για 7 μέρες με χρόνο ημιζωής ίσο με 11600 λεπτά, ενώ η δραστικότητά της μειώνεται κατά 20% μετά από επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 5-7 για 24 ώρες, στους 4°C. Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου ( $E_{ad}$ ) βρέθηκε ίση με 248.6 kJ/mol και με βάση αυτήν και τις σταθερές θερμικής απενεργοποίησης ( $k_d$ ) υπολογίστηκαν οι μεταβολές των θερμοδυναμικών μεγεθών ενθαλπία ( $\Delta H^*$ ), εντροπία ( $\Delta S^*$ ) καθώς και η ελεύθερη ενέργεια Gibbs ( $\Delta G^*$ ). Η BsGH5 εμφάνισε μέγιστη δράση στο υπόστρωμα της β-γλουκάνης, παρουσίασε μείωση της ενεργότητάς της κατά 40% κατά τη χρήση επεξεργασμένης κυτταρίνης (PASC), ενώ δεν παρατηρήθηκε δραστικότητα σε κυτταρινικά υποστρώματα. Οι κινητικές παράμετροι  $K_m$  και  $v_{max}$  υπολογίστηκαν μέσω της υδρόλυσης της β-γλουκάνης και βρέθηκαν ίσες με 33.38 mg/mL και 9.35 U/mL, αντίστοιχα. Κατόπιν μελέτης επίδρασης διαφόρων μεταλλοϊόντων στην ενεργότητα της BsGH5, αποδείχθηκε, ότι τα ιόντα  $Mn^{2+}$  ( $MnCl_2$ ),  $Mg^{2+}$  ( $MgSO_4$ ),  $Fe^{2+}$  και  $Ba^{2+}$  ενεργοποιούν την BsGH5, ενώ όλα τα υπόλοιπα έχουν ανασταλτική δράση, το καθένα σε διαφορετικό ποσοστό. Εκτός αυτών, ο επιφανειοδραστικός παράγοντας SDS φάνηκε να έχει ελάχιστη επίδραση στο ένζυμο μειώνοντας τη σχετική ενεργότητά του στο 90% της αρχικής, ενώ, κατά την παρουσία του EDTA, η εναπομείνουσα ενεργότητα ήταν περίπου το 75% της αρχικής. Παράλληλα,



εντοπίστηκαν τα προϊόντα υδρόλυσης της αντίδρασης του ενζύμου με το υπόστρωμα β-γλουκάνη, τα οποία ήταν γλυκόζη, κελλοβιόζη, κελλοτριόζη και κελλοτετραόζη. Η BsGH5 μελετήθηκε ως προς την παραγωγικότητά της και την ικανότητά της να ροφάται σε υπόστρωμα μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης Avicel, όπου και παρατηρήθηκε, ότι η ρόφηση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται στο 50% ανεξάρτητα από την αρχική της συγκέντρωση. Τέλος, εντοπίστηκε η πιθανή τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης μέσω του προγράμματος Swiss model tool ExPASy, ενώ, με χρήση του προγράμματος UniProt, έγινε σύγκριση της BsGH5 με ένζυμα διαφορετικών μικροοργανισμών που διαθέτουν παρόμοια αμινοξική αλληλουχία, με τα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας να αντιστοιχούν σε δύο ένδο-1,4-β-μαννοζιδάσες προέρχονται από τους μικροοργανισμούς *Bacillus safensis* (A0A5C0WLE0, 97% ομοιότητα) και *Bacillus licheniformis* (Q65J16, 73% ομοιότητα).

## Abstract

This present diplomatic thesis concerns the study of a  $\beta$ -glucanase (BsGH5) from family 5 of glycosidic hydrolases (GH5) produced by the bacterium *Bacillus safensis*. Initially, isolation from the microorganism, ligation, and overproduction of this specific enzyme were carried out. The enzyme's gene was cloned into a plasmid vector pET15b, which was thermoelectrically transformed into *E. coli* BL21 competent cells. The cell culture of the recombinant cells was produced on a larger scale, followed by isolation, purification, and characterization of the protein. Cells were lysed by sonication on ice, while they were then purified using a nickel column and concentrated using an Amicon device. The molecular mass of BsGH5 was estimated by SDS-PAGE electrophoresis at 45 kDa. Subsequently, characterization of BsGH5 followed, including the study of its optimum operating temperature (60°C), optimum pH (pH=6), as well as its stability at different pH values (3 to 9) and temperatures (40 to 70°C). At 40°C, BsGH5 retains 50% of its initial activity after incubation for 7 days, with a half-life of 11,600 minutes, while its activity decreases by 20% after incubation in a pH range of 5-7 for 24 hours at 4°C. The thermal deactivation energy ( $E_{\alpha_d}$ ) was found 248.6 kJ/mol, and based on this and the thermal deactivation constants ( $k_d$ ), the changes in thermodynamic parameters enthalpy ( $\Delta H^*$ ), entropy ( $\Delta S^*$ ), and Gibbs free energy ( $\Delta G^*$ ) were calculated. BsGH5 exhibited maximum activity on  $\beta$ -glucan, with a 40% decrease in its activity when using processed cellulose (PASC), and showed no activity on cellulose substrates. The kinetic parameters  $K_m$  and  $v_{max}$  were calculated by hydrolysis of  $\beta$ -glucan and were determined equal to 33.38 mg/mL and 9.35 U/mL, respectively. The effect of various metal ions on the activity of BsGH5 was studied, demonstrating that  $Mn^{2+}$  ( $MnCl_2$ ),  $Mg^{2+}$  ( $MgSO_4$ ),  $Fe^{2+}$ , and  $Ba^{2+}$  ions activate BsGH5, while all the others have inhibitory effects. Additionally, the surfactant SDS had minimal effect on the enzyme, reducing its relative activity to 90%, while in the presence of EDTA, the remaining activity was approximately 75% of the initial activity. Meanwhile, the hydrolysis products of the enzyme reaction with the  $\beta$ -glucan substrate were identified as glucose, cellobiose, cellotriose and cellotetraose. BsGH5 was studied for its processivity and its ability to degrade microcrystalline cellulose substrate Avicel, where it was observed that protein degradation occurs at 50%. Finally, the possible three-dimensional structure of the protein was identified using the Swiss model tool ExPASy. BsGH5 was compared with enzymes from different microorganisms with similar amino acid sequences using the UniProt program, with the highest similarity percentages corresponding to two endo-1,4- $\beta$ -mannosidases originating

from the microorganisms *Bacillus safensis* (A0A5C0WLE0, 97% similarity) and *Bacillus licheniformis* (Q65JI6, 73% similarity).

# 1. Θεωρητικό Μέρος

## 1.1. Εισαγωγή

Μία από τις κυριότερες προκλήσεις στις οποίες πρέπει να ανταποκριθούν τα κράτη στη σύγχρονη εποχή είναι η ολοένα αυξανόμενη ζήτηση σε ενέργεια που καταναλώνεται στους διάφορους τομείς. Ένας βιώσιμος τρόπος για να καλυφθούν αυτές οι ενεργειακές απαιτήσεις είναι τα βιοκαύσιμα. Πρόκειται για έναν αντικαταστάτη των συμβατικών καυσίμων, τα οποία πέρα από το γεγονός ότι έχουν μειωθεί σημαντικά από την υπέρμετρη χρήση, ευθύνονται και για ένα πλήθος περιβαλλοντικών επιβαρύνσεων, όπως η εκπομπή των αερίων του θερμοκηπίου, η υπερθέρμανση του πλανήτη και οι υψηλές εκπομπές άνθρακα (Ja Kyong Ko, 2020) (Jitendra Kumar Saini, 2015). Το πιο κοινό βιοκαύσιμο είναι η βιοιθανόλη, η οποία παράγεται από ορισμένα φθηνά υποστρώματα και μπορεί να μειώσει σε σημαντικό ποσοστό την εκπομπή τοξικών αερίων σε σχέση με τη βενζίνη (Jitendra Kumar Saini, 2015).

Τέτοια βιοκαύσιμα μπορούν να παραχθούν με οικολογικό και οικονομικά αποδοτικό τρόπο μέσω της αξιοποίησης βιομάζας, που μπορεί να προέρχεται από λιγνοκυτταρινικά γεωργικά απόβλητα, όπως το άχυρο σίτου και το άχυρο ρυζιού. Αυτό το είδος βιομάζας ονομάζεται λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα και εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων (Jitendra Kumar Saini, 2015) (Panayiotis D. Glekas, 2022).

Σύμφωνα με πρόσφατες στατιστικές μελέτες, η ετήσια παραγωγή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας ανέρχεται περίπου στους 180 δισεκατομμύρια τόνους (Muhammad Mujtaba, 2023). Εκτιμάται, ότι μέχρι το 2025 η βιομάζα αποβλήτων θα προσεγγίζει το 30% των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται στη χημική βιομηχανία (Jude A. Okolie, 2021). Η βιομάζα λιγνοκυτταρίνης μπορεί να μετατραπεί σε βιοενέργεια μέσω κάποιας θερμοχημικής (πυρόλυση, καύση, αεριοποίηση, υδρόλυση) ή βιοχημικής (μικροοργανισμοί και ένζυμα) διεργασίας (Muhammad Mujtaba, 2023). Μάλιστα, τα ταχέως εξελισσόμενα εργαλεία της βιοτεχνολογίας μπορούν να μειώσουν το κόστος της μετατροπής αυτής και να ενισχύσουν την απόδοση του προϊόντος που αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος (Zahid Anwar, 2014). Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελεί έναν φυσικό και ανανεώσιμο πόρο, απαραίτητο για τις σύγχρονες βιομηχανίες (Zahid Anwar, 2014), συμβάλλοντας στη δημιουργία μίας κυκλικής βιοοικονομίας (Jude A. Okolie, 2021). Τα παράγωγά της είναι προϊόντα με υψηλή βιομηχανική συνάφεια, που βρίσκουν εφαρμογή στην παραγωγή

βιοκαυσίμων, βιοχημικών, βιοϋλικών, καλλυντικών, φαρμακευτικών προϊόντων, βιοπλαστικών και γενικότερα υλικών φιλικών προς το περιβάλλον (Jude A. Okolie, 2021).

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη μαζί με μίγματα, όπως λίπη, λιπίδια, ρητίνες, στεροειδή, τανίνες, τερπένια, τερπενοειδή, φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις (Jude A. Okolie, 2021). Η κυτταρίνη αποτελεί τον βασικό σκελετό, ο οποίος επικαλύπτεται από τα άλλα δύο κύρια συστατικά, την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη (Jitendra Kumar Saini, 2015). Ειδικότερα, η κυτταρίνη είναι κύριο δομικό συστατικό των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων που είναι υπεύθυνα για τη μηχανική αντοχή, ενώ η ημικυτταρίνη εντοπίζεται με τη μορφή επαναλαμβανόμενων πολυμερών πεντόζης και εξόζης. Από την άλλη μεριά, η λιγνίνη περιέχει τρεις αρωματικές αλκοόλες και αποτελεί ένα προστατευτικό στρώμα γύρω από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη (Zahid Anwar, 2014). Αν και η σύνθεση της λιγνοκυτταρίνης ποικίλλει ανάλογα με την πηγή προέλευσής της, συνήθως η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη αντιπροσωπεύουν το 70% της ξηρής μάζας της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (30-40% κυτταρίνη, 20-30% ημικυτταρίνη και 10-25% λιγνίνη (Zahid Anwar, 2014) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας (Ja Kyong Ko, 2020).

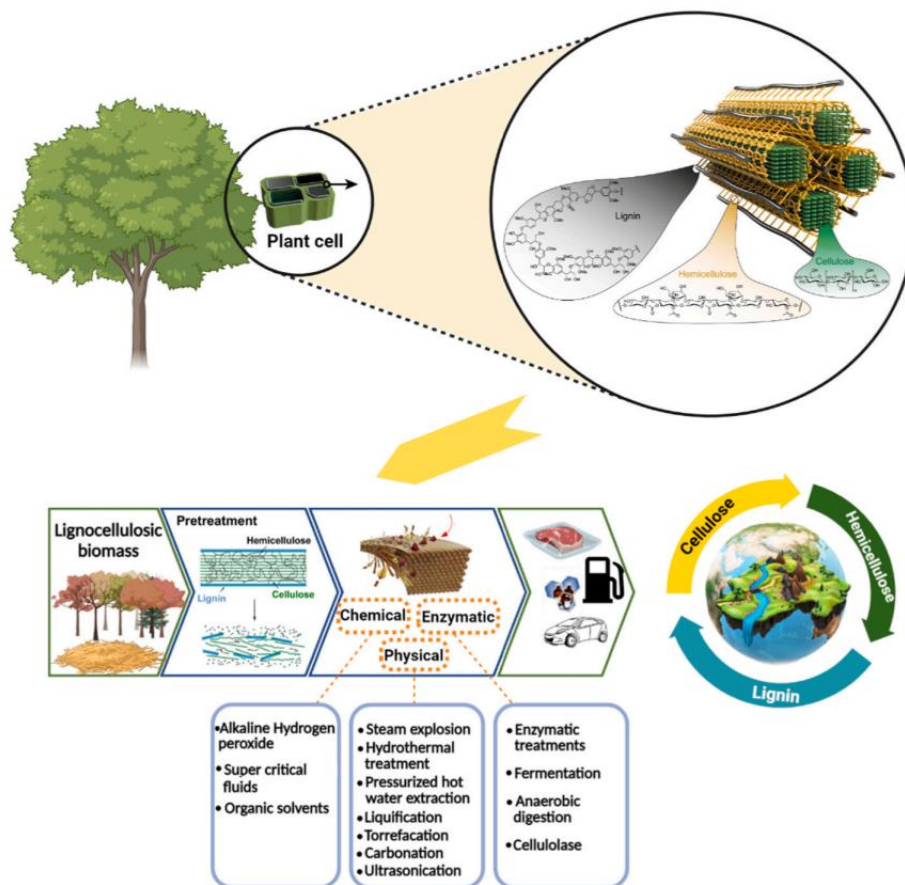
Στον Πίνακα 1, παρουσιάζονται οι τυπικές χημικές συνθέσεις των τριών αυτών συστατικών σε διάφορα λιγνοκυτταρινούχα υλικά.

Πίνακας 1. Ποσοστιαία κατανομή κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης σε διάφορα λιγνοκυτταρινικά υλικά (Zahid Anwar, 2014).

	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Λιγνίνη (%)
Πολτός ζαχαροκάλαμου	42	25	20
Ζαχαρόχορτο	45	27	21
Σκληρό ξύλο	40 – 55	24 – 40	25 – 18
Μαλακό ξύλο	45 – 50	25 – 35	25 – 35
Καρπός αραβοσίτου	45	35	15
Άχυρο ρυζιού	32.1	24	18
Φλούδα ξηρών καρπών	25 – 30	25 – 30	30 – 40
Εφημερίδα	40 – 55	25 – 40	18 – 30
Γρασίδι	25 – 40	25 – 50	10 – 30
Άχυρο σίτου	29 – 35	26 – 32	16 – 21
Απόβλητα μπανάνας	13.2	14.8	14
Ίνες σφουγγαριού Λούφα	66.59	17.44	15.46

Ένα βασικό πρόβλημα που έχει εντοπιστεί σχετικά με την επεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας είναι η αντίσταση που παρουσιάζει στην αλλαγή της φυσικής και της χημικής δομής της. Ο συνδυασμός διαφόρων παραγόντων, όπως η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και ο υψηλός βαθμός πολυμερισμού μεταξύ των πολυσακχαριτών,

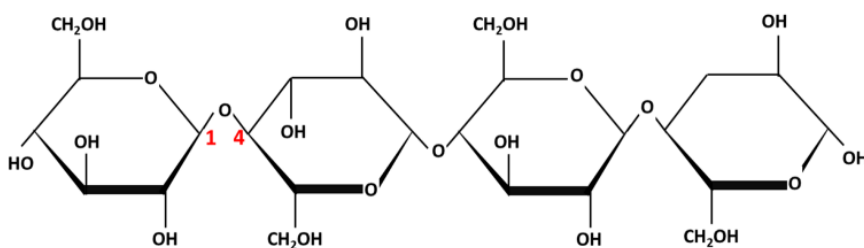
καθιστούν το ετερογενές αυτό υλικό ανθεκτικό στην αποικοδόμηση (Ja Kyong Ko, 2020). Σε αυτό συνεισφέρει και η παρουσία της λιγνίνης, η οποία δεν αποπολυμερίζεται σχεδόν καθόλου από ενζυμικές διεργασίες (Muhammad Mujtaba, 2023). Για να επιτευχθεί αποτελεσματική βιομετατροπή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε βιοκαύσιμα, έχουν αναπτυχθεί μικροβιακά στελέχη με υψηλότερες ανοχές, ευρύτερα φάσματα υποστρωμάτων και βελτιωμένες μεταβολικές ροές (Ja Kyong Ko, 2020). Αυτά, σε συνδυασμό με κατάλληλη προεπεξεργασία (χρήση οργανικών διαλυτών, έκρηξη ατμού, αλκαλικό υπεροξείδιο του υδρογόνου), θα οδηγήσουν στο άνοιγμα των συμπαγών δομών, ώστε τα ένζυμα να έρθουν σε επαφή με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη (Muhammad Mujtaba, 2023).



Εικόνα 1. Πορεία προς την απομόνωση κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα (Muhammad Mujtaba, 2023).

## 1.2. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι το πιο άφθονο, βιοαποικοδομήσιμο και ανανεώσιμο προϊόν υδατανθράκων στη βιόσφαιρα. Αποτέλεσμα αυτού είναι η διεξαγωγή προσπαθειών μετατροπής της σε ζυμώσιμα σάκχαρα, γεγονός που θα οδηγούσε στη δημιουργία ανανεώσιμων πηγών ενέργειας σε μεγάλη κλίμακα. Η κυτταρίνη έχει χημικό τύπο  $(C_6H_{10}O_5)_n$  (Zahid Anwar, 2014) και αποτελείται από γραμμικά πολυμερή  $n$  μορίων γλυκόζης, που συνδέονται μεταξύ τους με  $\beta$ -1,4-γλυκοζιδικό δεσμό και είναι οργανωμένα σε μία δομή υψηλής κρυσταλλικότητας (Cong Zhang, 2014). Ο βαθμός πολυμερισμού των γραμμικών αυτών αλυσίδων μπορεί να προσεγγίσει τα 12000 μονομερή (Zahid Anwar, 2014).



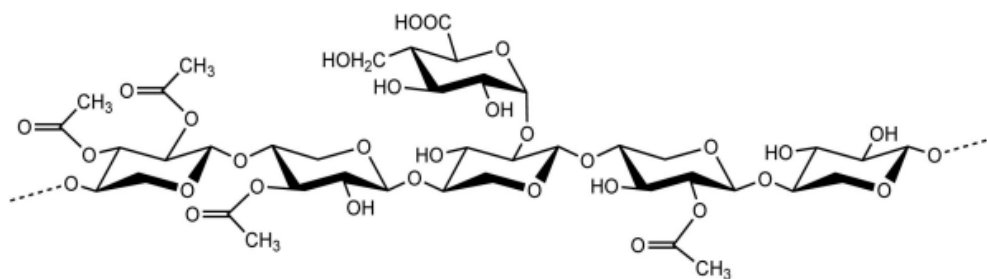
Εικόνα 2. Πολυμερές κυτταρίνης που περιλαμβάνει μονομερή γλυκόζης συνδεδεμένα με  $\beta$ -1,4-γλυκοζιδικούς δεσμούς (Jude A. Okolie, 2021).

Τα μόρια κυτταρίνης έχουν την τάση να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, τόσο ενδομοριακά όσο και διαμοριακά, γεγονός που αυξάνει την ακαμψία του συστήματος, συμβάλλοντας στην ανθεκτικότητά του έναντι των περισσότερων οργανικών διαλυτών. Στη φυσική τους μορφή τα μόρια αυτά υπάρχουν ως δέσμες, οι οποίες συσσωματώνονται σχηματίζοντας ένα δίκτυο μικροϊνών (διαμέτρου 5-50nm και μήκους πολλών μικρομέτρων, (Jude A. Okolie, 2021)), που αντικατοπτρίζουν κρυσταλλικές και άμορφες περιοχές (Zahid Anwar, 2014).

Εξαιτίας της παρουσίας κρυσταλλικών περιοχών αλλά και του γεγονότος, ότι η κυτταρίνη είναι πρακτικά αδιάλυτη, η διαδικασία βιομετατροπής της κυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα ενέχει αρκετά εμπόδια (Cong Zhang, 2014). Ένας τρόπος για να μπορέσει να σπάσει η κρυσταλλική αυτή μήτρα και να αυξηθεί το κλάσμα της άμορφης κυτταρίνης είναι η μέθοδος της ενζυμικής υδρόλυσης ή ενζυμικής σακχαροποίησης. Τα ένζυμα που συμβάλλουν στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης ονομάζονται κυτταρινάσες και ανήκουν σε τάξεις της κατηγορίας EC 3.2.1.X (Jitendra Kumar Saini, 2015).

### 1.3. Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη είναι το δεύτερο σε αφθονία ετερογενές πολυμερές που αποτελείται κυρίως από γλυκουρονοξυλάνη, γλυκομαννάνη και ίχνη άλλων πολυσακχαριτών (Zahid Anwar, 2014). Ειδικότερα, τα κύρια σάκχαρα που εντοπίζονται στα ημικυτταρινικά υλικά είναι η αραβινόζη, η ξυλόζη, η γαλακτόζη, η γλυκόζη και η μαννόζη (Zahid Anwar, 2014), (Jitendra Kumar Saini, 2015). Οι πολυμερικές αλυσίδες της ημικυτταρίνης είναι άμορφες και περιέχουν βραχείες διακλαδώσεις, γεγονός που τις καθιστά διαλυτές στο νερό (Lisong Hu, 2020). Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα περιέχει 25-35% ημικυτταρίνη με το μέσο μοριακό της βάρος να κυμαίνεται σε τιμές μικρότερες των 30,000 (Zahid Anwar, 2014). Η δομή της ημικυτταρίνης παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.

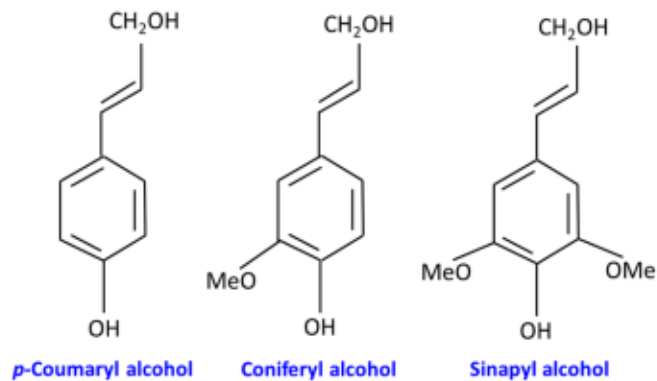


Εικόνα 3. Πολυμερές της ημικυτταρίνης (Lisong Hu, 2020).

### 1.4. Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι το πιο πολύπλοκο ετερογενές πολυμερές της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, που αντοπροσωπεύει μόλις το 10-25% w/w αυτής (Zahid Anwar, 2014). Αποτελείται από μονάδες φαινυλοπροπανίου, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους τυχαία και μη γραμμικά με εστερικούς δεσμούς (Jude A. Okolie, 2021). Τα τρία βασικά μονομερή φαινυλοπροπανίου που εντοπίζονται στη λιγνίνη φαίνονται στην Εικόνα 4. Ρόλος της είναι να γεμίζει τα κενά γύρω από τα πολυμερή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης, προσδίδοντας αντοχή και ακαμψία στα φυτά (Jude A. Okolie, 2021).

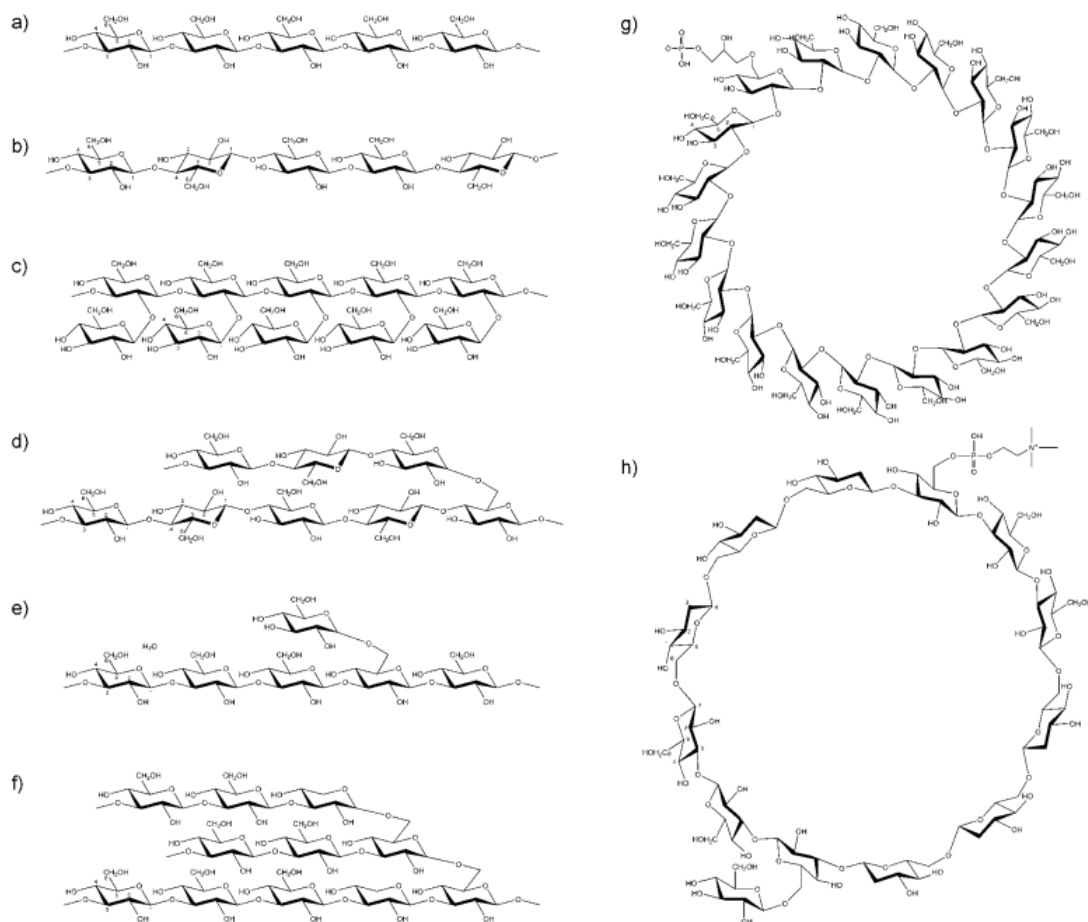




Εικόνα 4. Δομές των τριών βασικών μονομερών της λιγνίνης (Jude A. Okolie, 2021).

## 1.5. β – Γλουκάνη

Ένα άλλο είδος βιομάζας, που βρίσκεται στο επίκεντρο της συνεχώς αναπτυσσόμενης αγοράς τα τελευταία χρόνια, είναι οι γλουκάνες. Οι γλουκάνες είναι πολυμερή γλυκόζης με υψηλά μοριακά βάρη, τα οποία ταξινομούνται ως α- ή β- με βάση τον δεσμό μεταξύ των αλυσίδων τους (Laura Barsanti, 2011). Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα των β-γλουκανών ανήκουν χημικά ετερογενείς πολυσακχαρίτες, οι οποίοι εντοπίζονται ευρέως σε βακτήρια, φύκια, μύκητες και φυτά. Πρόκειται για πολυμερή D-γλυκόζης που χαρακτηρίζονται από μία κοινή δομή, η οποία περιλαμβάνει μία κύρια αλυσίδα με β-1,3- ή/και β-1,4-d- μονάδες γλυκοπυρανοσυλίου μαζί με πλευρικές αλυσίδες διαφόρων μηκών (Laura Barsanti, 2011) (Misumi Kataoka, 2014). Οι διαφορετικοί δομικοί τύποι των β-γλουκανών παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.



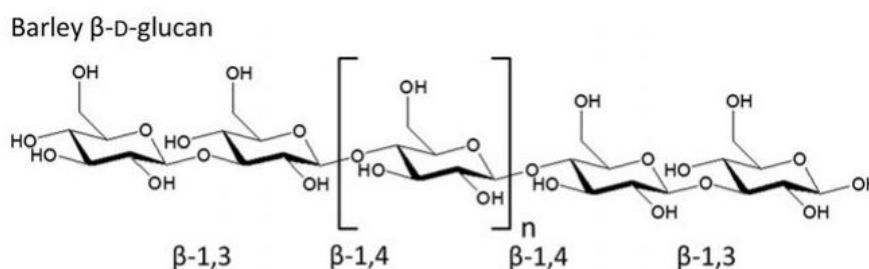
Εικόνα 5. Δομές β-γλουκανών: α) γραμμική, μη διακλαδισμένη β-1,3-d-γλουκάνη, β) γραμμική β-1,3-1,4-d-γλουκάνη, γ) διακλαδισμένη β-1,3-1,2-d-γλουκάνη, δ) διακλαδισμένη β-1,4-1,6-d-γλουκάνη, ε) διακλαδισμένη β-1,3-1,6-d-γλουκάνη, ς) β-1,3-1,6-d-γλουκάνη με διακλάδωση πάνω στη διακλάδωση, ζ) κυκλική δομή μίας β-1,2-γλουκάνης και η) κυκλική δομή μίας β-1,3-1,6-d-γλουκάνης (Laura Barsanti, 2011).

Η β-γλουκάνη αποτελεί μία διαλυτή ίνα, η οποία προσελκύει το ενδιαφέρον διαφόρων μελετών, καθώς διαθέτει βιοδραστικές ιδιότητες και πολλαπλή λειτουργικότητα. Εντοπίζεται στο εσωτερικό κυτταρικό τοίχωμα (αρευρόνη και υποαλευρόνη) των κόκκων βρώμης και κριθαριού και βασική της λειτουργία είναι να επιβραδύνει την απορρόφηση της γλυκόζης (Laura Barsanti, 2011). Η περιεκτικότητα σε β-γλουκάνη (Πίνακας 2) ποικίλλει ανάλογα τις περιβαλλοντικές συνθήκες, κατά τις οποίες αναπτύσσεται το ενδοσπέρμιο και ρυθμίζεται από 1,3-1,4-β-γλουκανάσες (γνωστές και ως λιχενινάσες), οι οποίες αποικοδομούν το κυτταρικό τοίχωμα του ενδοσπερμίου κατά τη βλάστηση (D. El Khoury, 2012).

Πίνακας 2. Περιεκτικότητα σε β-γλουκάνη με βάση την πηγή προέλευσης.

Δημητριακά	g β-γλουκάνης/100 g ξηρού βάρους
Κριθάρι	2 – 20
Βρώμη	3 – 8
Σίκαλη	1.3 – 2.7
Καλαμπόκι	0.8 – 1.7
Σιτάρι	0.5 – 1.0
Ρύζι	0.13

Η αναλογία των β-1,4- δεσμών προς τους β-1,3- στη β-D-γλουκάνη κριθαριού είναι 3:1 (Εικόνα 6). Η αναλογία των δεσμών αυτών μπορεί να διαφέρει από είδος σε είδος, καθώς και από ιστό σε ιστό μέσα στο ίδιο είδος, με αποτέλεσμα να ποικίλλουν και οι αναλογίες των ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν από την υδρόλυση της β-γλουκάνης (Maria Hrmova, 2023). Τα συστατικά της ημικυτταρίνης περιλαμβάνουν σύνθετες γλουκάνες, όπως η β-d-γλουκάνη κριθαριού και η λιχενάνη, ενώ η κυτταρίνη αντίθετα αποτελείται αποκλειστικά από β-1,4- δεσμούς (Misumi Kataoka, 2014).



Εικόνα 6. Δομή β-D-γλουκάνης κριθαριού (Misumi Kataoka, 2014).

Η γλουκάνη είναι χρήσιμη λόγω της αυξημένης διαλυτότητάς της στο νερό (Zhongcun Pang, 2005). Για την ιδιότητά της αυτή είναι, εν μέρει, υπεύθυνη η ανομοιομορφή κατανομή και οι τυχαίες αποστάσεις μεταξύ των β-1,3- δεσμών κατά μήκος της αλυσίδας (Maria Hrmova, 2023). Αντίθετα, αρνητικές επιπτώσεις μπορεί να επιφέρει το ιξώδες των β-γλουκανών, το οποίο εμποδίζει τα θρεπτικά αποτελέσματα αυτών των πολυσακχαριτών. Έτσι, κρίνεται απαραίτητη η ενζυμική υδρόλυση της β-γλουκάνης, ώστε να βελτιωθούν οι πεπτικές ιδιότητες των τροφών στις οποίες εμπεριέχεται.

## 1.6. Υδρόλυση Κυτταρίνης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η κλασική υδρόλυση της κυτταρίνης πραγματοποιείται από ένζυμα που ονομάζονται κυτταρινάσες. Η παραγωγή ενζύμων αυτού του είδους αποτελεί ιδιότητα διαφόρων μικροοργανισμών, με πρωτεύοντες τους μύκητες και τα βακτήρια. Πιο

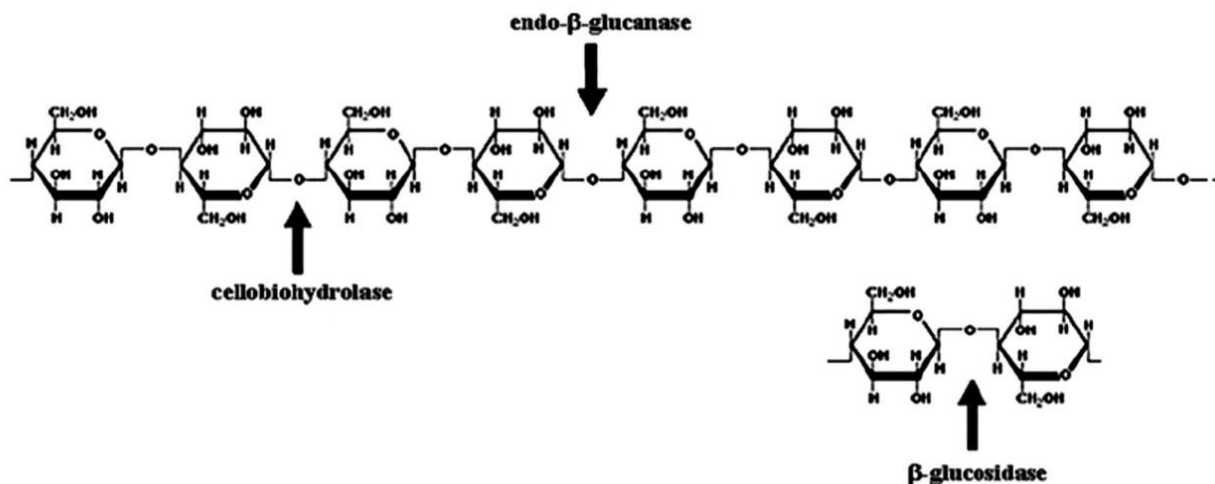
συγκεκριμένα, τόσο οι μύκητες όσο και τα βακτήρια αποτελούν κυτταρολυτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να αποικοδομούν την κυτταρίνη σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Αυτή η διαδικασία μπορεί να διεκπεραιωθεί είτε από αερόβιους είτε από αναερόβιους μικροοργανισμούς (Bin Wu, 2018). Η βιοϋδρόλυση της κυτταρίνης από τέτοιους κυτταρολυτικούς μικροοργανισμούς προτιμάται σε σχέση με μία αντίστοιχη χημική αποικοδόμηση, καθώς η δεύτερη διαπιστωμένα συμβάλλει στη ρύπανση του περιβάλλοντος (J. K. Seo, 2013). Κύριο πρόβλημα στη διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης αποτελεί η ύπαρξη της λιγνίνης, η οποία ενισχύει τη μη παραγωγική προσρόφηση των κυτταρινασών, παρεμποδίζοντας την πρόσβαση των ενζύμων στην κυτταρίνη (Xianqin Lu, 2018). Για να αποφευχθεί η μειωμένη αποτελεσματικότητα του συστήματος της σακχαροποίησης, απαιτείται η συνδυασμένη χρήση ενζύμων με διαφορετικούς τρόπους δράσης.

Οι κυτταρινάσες ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες (Shweta Singh, 2020):

- I. Ενδογλουκανάσες (EC 3.2.1.4)
- II. Εξωγλουκανάσες – Κελλοβιοϋδρολάσες (EC 3.2.1.91)
- III. Β – γλυκοζιδάσες (EC 3.2.1.21)

Οι τρεις τύποι κυτταρινασών δρουν συνεργιστικά, ώστε να υδρολύσουν την κρυσταλλική κυτταρίνη και να την μετατρέψουν σε γλυκόζη [56408].

Οι ενδογλουκανάσες ή αλλιώς ένδο-1,4-β-D-γλυκανο-4-γλυκανοϋδρολάσες χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να υδρολύουν τυχαία τους β-1,4-γλυκοζιδικούς δεσμούς. Η ταχεία διάσπαση των παραγώγων κυτταρίνης οδηγεί και σε ταχεία μείωση του μήκους της αλυσίδας, με αποτέλεσμα να παράγονται ολιγοσακχαρίτες διαφορετικών μοριακών βαρών (Jitendra Kumar Saini, 2015). Οι εξωγλουκανάσες ή αλλιώς 1,4-β-D-γλυκανο-κελλοβιοϋδρολάσες δρουν στα μη αναγωγικά άκρα των μορίων κυτταρίνης που έχουν δημιουργήσει οι ενδογλουκανάσες, σχηματίζοντας μόρια κελλοβιόζης ή γλυκόζης (J. K. Seo, 2013). Τέλος, οι β – γλυκοζιδάσες ή αλλιώς β-D-γλυκοζιδικές γλυκοϋδρολάσες υδρολύουν ολιγοσακχαρίτες με μικρή ανθρακική αλυσίδα, από κελλοβιόζη έως και κελλοεξαόζη, για να παράξουν γλυκόζη. Οι β – γλυκοζιδάσες διαφοροποιούνται από τις εξωγλουκανάσες, καθώς οι δεύτερες στοχεύουν σε υποστρώματα μεγαλύτερου μοριακού βάρους (Jitendra Kumar Saini, 2015).



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση των θέσεων δράσης των τριών κυτταρινασών σε πολυμερές κυτταρίνης.

Μέχρι πρότινος, τα λιγνοκυτταρολυτικά ένζυμα συνηθιζόταν να παράγονται από φλεγμονώδεις μύκητες. Ωστόσο, μέσω ερευνών αποδείχθηκε, ότι η χρήση των βακτηρίων έναντι των μυκήτων μπορεί να αποβεί περισσότερο κερδοφόρα. Αυτό στηρίζεται στο γεγονός, ότι τα βακτήρια αποτελούν πολύ ισχυρές πηγές κυτταρινασών, οι οποίες έχουν πιο πολύπλοκη δομή, μεγαλύτερη ποικιλότητα και αναπτύσσονται με πολύ υψηλούς ρυθμούς (Bin Wu, 2018).

Η ενζυμική αποικοδόμηση που διεξάγεται από πολυσακχαρίτες, που προέρχονται από τη βιολογική βιομάζα είναι απαραίτητη, όχι μόνο για τον παγκόσμιο κύκλο του άνθρακα, αλλά και για τη θεμελιώδη τεχνολογία που στηρίζει βιομηχανίες πολλών δισεκατομμυρίων δολαρίων. Ωστόσο, το κλασικό αυτό μοντέλο αποικοδόμησης πολυσακχαριτών, σύμφωνα με το οποίο δρουν συνεργιστικά οι εξω-γλουκανάσες με τις ενδογλουκανάσες, ανατράπηκε πρόσφατα από την ανακάλυψη των λυτικών πολυσακχαριτών μονοοξυγενασών (LPMOs ή αλλιώς PMOs), τα οποία ταξινομούνται ως ένζυμα βοηθητικής δράσης (AA). Πιο συγκεκριμένα, τα LPMOs χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο για την οξειδωτική θραύση της αλυσίδας του πολυσακχαρίτη, με αποτέλεσμα το υπόστρωμα να γίνεται πιο ευαίσθητο σε υδρόλυση από ότι με τις συμβατικές γλυκοσιδικές υδρολάσες. Παρά το γεγονός, ότι ανακαλύφθηκαν σχετικά πρόσφατα, έχουν συμβάλει ήδη στην πρόοδο της διαδικασίας παραγωγής της βιοαιθανόλης (Leila Lo Leggio, 2015).

## 1.7. Υδρόλυση β-Γλουκάνης

Τα προαναφερθέντα ένζυμα, που εμπλέκονται στην υδρόλυση της κυτταρίνης, παρουσιάζουν, επίσης, ενεργότητα και σε β-γλουκάνες μαζί με λιχενάσες (EC 3.2.1.73) και β-1,3/1,4-γλουκανάσες (EC 3.2.1.6) (Silvina Ghio, 2020). Οι β-1,3-1,4-γλουκανάσες πιθανότατα προήλθαν από τις β-1,3-γλουκανάσες, οι οποίες είναι ευρύτερα κατανεμημένες σε όλο το φυτικό βασίλειο και συμβάλλουν σε πολλαπλές λειτουργίες των φυτών (Maria Hrgona, 2023). Κατά τη δράση των ενζύμων αυτών στα μόρια της β – γλουκάνης απελευθερώνεται D-γλυκόζη ως πηγή άνθρακα (N. S. Pradeep, 2022). Οι β-γλουκανάσες μπορούν να λειτουργήσουν ως έξω- ή ένδο-υδρολάσες. Οι πρώτες υδρολύουν σειριακά του γλυκοσιδικούς δεσμούς των μη αναγωγικών άκρων της αλυσίδας της β – γλουκάνης, ενώ οι δεύτερες υδρολύουν αυθαίρετα τους εσωτερικούς δεσμούς (N. S. Pradeep, 2022). Οι γλουκανάσες με ένδο- και έξω- δράση, όπως, επίσης, και οι λιχενάσες αποτελούν ως επί των πλείστων μέλη των οικογενειών γλυκοσιδικών υδρολασών 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45 και 48 (Silvina Ghio, 2020).

Παρόλο που κυτταρίνη αποτελεί κύριο δομικό πολυσακχαρίτη των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών, β-1,4- παράγωγα γλυκόζης έχουν εντοπιστεί σε βακτήρια, μύκητες, φύκια, πρώτιστα και ασπόνδυλα. Επιπρόσθετα, η β-D-γλουκάνη αποτελεί σχεδόν το 75% των ολικών υδατανθράκων που υπάρχουν στα κυτταρικά τοιχώματα του ενδοσπερμίου (MICHAEL W. BAUER, 1999).

## 1.8. Παραγωγικές (Processive) Ενδογλουκανάσες

Τα τελευταία χρόνια, πολλές παραγωγικές ενδογλουκανάσες έχουν εντοπιστεί σε ορισμένα βακτήρια και μύκητες, όπως τα *Cytophaga hutchinsonii*, *Hahella chejuensis* και άλλα (Mujunqi Wu, 2022). Ο μηχανισμός της παραγωγικής δράσης των κυτταρινασών είναι το στοιχείο κλειδί για την υδρόλυση της φυσικής κρυσταλλικής κυτταρίνης. Τα παραγωγικά ένζυμα ορίζονται ως τα ένζυμα που παραμένουν προσδεδεμένα στο υπόστρωμα, απελευθερώνοντας κελλοβιόζη ή άλλες ολιγογλουκάνες. Στη συνέχεια, απομακρύνονται από αυτό και η διαδικασία επαναλαμβάνεται (Shanshan Wu, 2020). Υπάρχουν δύο τύποι παραγωγικών κυτταρινασών, οι εξωγλουκανάσες (κελλοβιοϋδρολάσες) και οι ενδογλουκανάσες. Οι εξωγλουκανάσες είναι τυπικά παραγωγικά ένζυμα και έχουν μελετηθεί λεπτομερώς, ώστε ο τρόπος δράσης και ο μηχανισμός τους να θεωρούνται επαρκώς χαρακτηρισμένα (Shanshan Wu, 2020). Η δράση τους στηρίζεται στην προσβολή του τέλους μίας αλυσίδας κυτταρίνης και στην αποκοπή των υπολειμμάτων κυτταρίνης

διαδοχικά από ένα αναγωγικό ή μη αναγωγικό άκρο της αλυσίδας. Από την άλλη μεριά, οι παραγωγικές ενδογλουκανάσες χαρακτηρίζονται λιγότερο καλά, λόγω της μη καθολικότητάς και της δομικής τους ποικιλομορφίας. Μέσω μελετών έχει εντοπιστεί, ότι έχουν ένδο-/έξω-διπλή λειτουργία, γεγονός που βεβαιώνει, ότι δεν έχουν μόνο την ικανότητα να προσβάλλουν και να υδρολύουν γλυκοσιδικούς δεσμούς από την άμορφη περιοχή της κυτταρίνης, αλλά μπορούν και να παράγουν διαλυτά αναγωγικά ζάχαρα (Shanshan Wu, 2020). Αξίζει να αναφερθεί, ότι οι παραγωγικές ενδογλουκανάσες έχουν ορισμένα χαρακτηριστικά, που στερούνται οι εξωγλουκανάσες, όπως η ποικιλία των προϊόντων υδρόλυσης και η ανεξάρτητη υδρόλυση της φυσικής κρυσταλλικής κυτταρίνης (Shanshan Wu, 2020). Ωστόσο, και τα δύο είδη επεξεργαστικών κυτταρινασών, εμφανίζουν ουσιαστικό ρόλο στην υδρόλυση της κρυσταλλικής κυτταρίνης (Cong Zhang, 2014).

Οι περισσότερες από τις παραγωγικές ενδογλουκανάσες ανήκουν στην οικογένεια GH9. Ωστόσο, πρόσφατα ορισμένες ενδογλουκανάσες της οικογένειας GH5 από τον μικροοργανισμό *Saccharophagus degradans* βρέθηκαν, επίσης, να είναι παραγωγικές κυτταρινάσες. Εκτός αυτού, δύο κυτταρινάσες GH5 που προέρχονται από τον μικροοργανισμό *C. Hutchinsonii* (CHU\_1107 και CHU\_2103) έχουν αρκετά παρόμοια αλληλουχία με τις παραγωγικές κυτταρινάσες του μικροοργανισμού *S. Degradans* (Cong Zhang, 2014). Οι συγκεκριμένες ενδογλουκανάσες έχουν εκφραστεί λειτουργικά σε *Escherichia coli*, με την καταλυτική περιοχή της μεγάλης ενδογλουκανάσης, CHU\_1107, να παρουσιάζει τη δράση μιας τυπικής ενδογλουκανάσης, υδρολύοντας την αδιάλυτη κυτταρίνη με κύρια προϊόντα την κελλοβιόζη και κελλοτριόζη (Πίνακας 3) (Cong Zhang, 2014).

Πίνακας 3. Πηγή προέλευσης, χαρακτηριστικά και προϊόντα υδρόλυσης παραγωγικών GH5 ενδογλουκανασών από βακτήρια (Shanshan Wu, 2020).

Γένος	Είδος	Ονομασία ενζύμου	Προϊόντα υδρόλυσης
<i>Clostridiaceae</i>	AN-C16 KBRB	CelEdx16	G2
<i>Cytophaga</i>	<i>C. hutchinsonii</i>	CHU_2103	G2, G3
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> BS-5	EG5C-1	G2, G3
<i>Saccharophagus</i>	<i>S. degradans</i> 2-40	Cel5H, Cel5G, Cel5J	G2
<i>Hahella</i>	<i>H. chejuensis</i> KCTC 2396	Cel5	G2

## 1.9. Γένος *Bacillus*

Στο γένος *Bacillus* ανήκει μία μεγάλη ομάδα θετικών κατά Gram βακτηρίων, από τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 142 είδη, ένας αριθμός που συνεχώς αυξάνεται (Djordje

Fira, 2018). Τα βακτήρια αυτού του γένους έχουν σχήμα ράβδου, σχηματίζουν ενδοσπόρια και εντοπίζονται σε αφθονία στο έδαφος, το νερό, τον αέρα, τα φυτά αλλά και σε διάφορα άλλα ακραία περιβάλλοντα. Έχει αποδειχθεί, ότι τα μέλη του γένους *Bacillus* έχουν τη δυνατότητα να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης έναντι πολλών παθογόνων μικροβίων (Chandra Datta Sumi, 2015).

Το ένζυμο που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία απομονώθηκε από βακτήριο που ανήκει στα είδη *Bacillus* και συγκεκριμένα από τον μικροοργανισμό *Bacillus safensis*. Το στέλεχος του βακίλου που φέρει το DNA ενδιαφέροντος ελήφθη από έδαφος της Αττικής και εντάχθηκε στη συλλογή πολιτισμού ATHUBA με αριθμό προσχώρησης ATHUBA63 (Panayiotis D. Glekas, 2022).

## 1.10. Οικογένειες Γλυκοσιδικών Υδρολασών (GH families)

Η ανάγκη κατηγοριοποίησης των κυτταρινασών (EC 3.2.1.4) σε διακριτές δομικές οικογένειες οδήγησε στη δημιουργία οικογενειών γλυκοσιδικών υδρολασών (GH families), στις οποίες αρχικά εντοπίζονταν 35 διαφορετικές οικογένειες (Henrik Aspeborg, 2012). Μέχρι το 2012 ο αριθμός των οικογενειών στη βάση CAZy είχε φτάσει τις 130.

Η ταξινόμηση CAZymes με βάση την αλληλουχία των πρωτεϊνών ξεκίνησε το 1991 ως συμπλήρωμα του μακροχρόνιου συστήματος αριθμών Enzyme Commission (EC) (Henrik Aspeborg, 2012). Αυτός ο τρόπος ταξινόμησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικό εργαλείο για την εκτίμηση της δομής ενός ενζύμου, της εξειδίκευσης και του μηχανισμού δράσης του.

### 1.10.1. Οικογένεια GH5

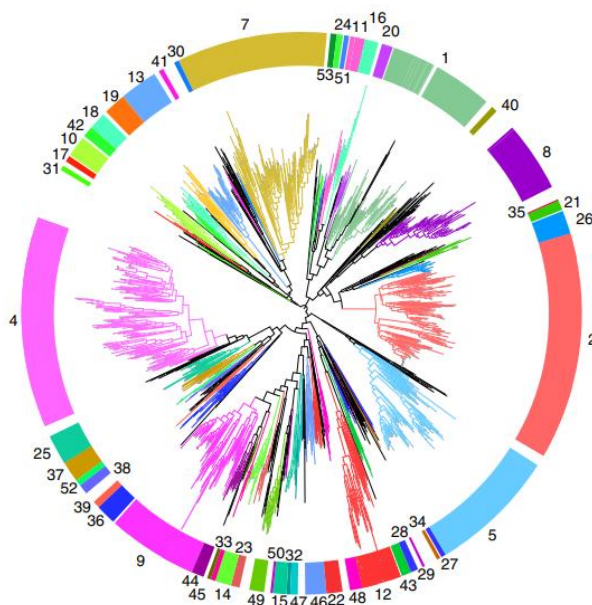
Μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες γλυκοσιδικών υδρολασών (GHs) είναι η GH5. Πρόκειται για την πρώτη οικογένεια που μελετήθηκε και για αυτό είναι γνωστή και ως Α' οικογένεια κυτταρινασών (Henrik Aspeborg, 2012). Στη συγκεκριμένη οικογένεια έχουν εντοπιστεί πολλές κατηγορίες ενζύμων που σχετίζονται με την ανάλυση και τη μετατροπή της βιομάζας, καθώς και ένζυμα με βιοϊατρικές εφαρμογές (Henrik Aspeborg, 2012). Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZy τα ένζυμα που έχουν καταταχθεί στη GH5 οικογένεια μπορεί να είναι μεταξύ άλλων ενδογλουκανάσες, ενδοξυλανάσες, β-



γλυκοζιδάσες, β-μαννοζιδάσες, ενδογαλακτανάσες, λιχενινάσες, λαμιναρινάσες, χιτοζανάσες και μαννανάσες (<http://www.cazy.org/GH5.html>).

Με βάση μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει διαπιστωθεί, ότι οι κυτταρινάσες της οικογένειας GH5 είναι, κυρίως, ενδογλουκανάσες, που κατέχουν βασικό ρόλο στην αποικοδόμηση διαφορετικών πολυσακχαριδικών υποστρωμάτων και χρησιμοποιούνται σε μίγματα ενζύμων για τη διάσπαση της βιομάζας στη βιομηχανία (Fei Zheng, 2019). Μελέτες δομής των ένδο-β-1,4-γλουκανασών από την οικογένεια GH5 έδειξαν, ότι η καταλυτική περιοχή έχει μορφή βαρελιού ((β/α)<sub>8</sub> TIM – barrel), όπου 8 παράλληλες α-έλικες και 8 παράλληλα β-πτυχωτά φύλλα συνδέονται με αβ ή βα βρόγχους (Shweta Singh, 2020). Ουσιαστικά, υπάρχει μία επανάληψη του μοτίβου βαβ, όπου οι β-κλώνοι ακολουθούνται από α-έλικες, που εναλλάσσονται σε σειρά και δομή. Ο βρόγχος αβ συμβάλλει στην σταθερότητα, ενώ ο βα στην λειτουργία/δραστικότητα του ενζύμου (Rajashekar Varma Kadumuri, 2018).

Η οικογένεια GH5 αναφέρεται ως μία υπεροικογένεια γλυκοσιδικών υδρολασών, οι οποίες παρουσιάζουν ένα μοτίβο στη συνολική δομή και τον μηχανισμό τους, αλλά διαφοροποιούνται όσον αφορά στην αλληλουχία των αμινοξέων και στην εξειδίκευση υποστρώματος (Leila Lo Leggio, 2002). Για αυτόν τον λόγο, είναι σημαντικό η κύρια οικογένεια να διαιρεθεί σε υποοικογένειες, ώστε να παρέχεται με αυτόν τον τρόπο μία καλύτερη εικόνα σχετικά με την εξειδίκευση των ενζύμων ως προς το υπόστρωμα. Βιοπληροφορική προσέγγιση επέτρεψε τη διαίρεση της οικογένειας GH5 σε 51 διακριτές υποοικογένειες, όπως φαίνεται στο παγκόσμιο φυλογενετικό δέντρο (Henrik Aspeborg, 2012).



Εικόνα 8. Φυλογενετικό δέντρο της οικογένειας GH5. Ο κάθε χρωματιστός κλάδος αντιστοιχεί στον αριθμό μίας υποοικογένειας, όπως φαίνεται στον εξωτερικό δακτύλιο. Οι μαύροι κλάδοι δεν έχουν αντιστοιχηθεί σε κάποια υποοικογένεια (Henrik Aspeborg, 2012).

Οι υποκατηγορίες της οικογένειας GH5 έχουν δημιουργηθεί με βάση δεδομένα που έχουν συλλεχθεί όσον αφορά στην εξειδίκευση υποστρώματος, τη δραστικότητα του κάθε ενζύμου και την τρισδιάστατη δομή του (Henrik Aspeborg, 2012). Σε πολλές από αυτές τις υποοικογένειες εντοπίζονται ενζυμικά μέλη, τα οποία εμφανίζουν μοναδική εξειδίκευση ως προς κάποιο υπόστρωμα (Πίνακας 4). Ωστόσο, υπάρχουν και υποοικογένειες, στις οποίες κατατάσσονται ένζυμα με πολλαπλή εξειδίκευση (Henrik Aspeborg, 2012).

Πίνακας 4. Υποοικογένειες της οικογένειας γλυκοσιδικών υδρολασών 5 με μοναδική εξειδίκευση (Henrik Aspeborg, 2012).

GH5 Υποοικογένεια	Είδος Ενζύμου
5	endo-β-1,4-glucanases (EC 3.2.1.4)
8	endo-β-1,4-mannanase (EC 3.2.1.78)
14	exo-β-1,3-glucosidase (EC 3.2.1.58)
15	(endo-)β-1,6-glucanases (EC 3.2.1.75)
16	endo-β-1,6-galactanase (EC 3.2.1.164)
21	endo-β-1,4-xylanase (EC 3.2.1.8)

22	
31	
34	single $\beta$ -glycanase
39	characterizations
53	
27	endo-glycosylceramidases
28	(EC 3.2.1.123)
29	
52	cellodextrinases
	(EC 3.2.1.74)

Παρόλη την υφιστάμενη ταξινόμηση των ενζύμων στις διάφορες GH5 υποοικογένειες, δεν παύουν να πραγματοποιούνται μελέτες σχετικά με την τρισδιάστατη δομική ανάλυση των ενζυμικών ακολουθιών που έχουν ενταχθεί στη συγκεκριμένη οικογένεια, καθώς είναι πιθανό να οδηγήσουν σε νέα δεδομένα και επακολούθως στην επαναδιάταξη αρκετών ενζύμων (Henrik Aspeborg, 2012).

### 1.11. Βιομηχανικές Εφαρμογές

Οι ενδογλουκανάσες, ως περιβαλλοντικά κατάλληλοι καταλύτες που δρουν ειδικά σε κυτταρινικά υποστρώματα, είναι σημαντικές για τη βιομηχανική μετατροπή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας και την τροποποίηση των προϊόντων κυτταρίνης. Καταλύουν αποτελεσματικά την αποικοδόμηση της φυσικής κυτταρίνης, έτσι ώστε να χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλές βιομηχανίες, όπως αυτές των ζωοτροφών, του πετροπλισίματος των ενδυμάτων, της κλωστοϋφαντουργίας, των τροφίμων και της χαρτοποιίας (Shanshan Wu, 2020). Ωστόσο, η διαδικασία της ενζυμικής σακχαροποίησης επηρεάζεται από παράγοντες, όπως η συγκέντρωση υποστρώματος, το ενζυμικό φορτίο, η θερμοκρασία και ο χρόνος σακχαροποίησης (Jitendra Kumar Saini, 2015). Οι ενδογλουκανάσες της οικογένειας GH5 έχουν οικονομικά σημαντικές βιομηχανικές εφαρμογές στον τομέα επεξεργασίας τροφίμων και για τον λόγο αυτόν, έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από ένα ευρύ φάσμα οργανισμών (Stefano Costanzo, 2007). Βασικό χαρακτηριστικό αυτών των ενδογλουκανασών είναι η θερμοσταθερότητά τους, η οποία μπορεί να ποικίλλει από ένζυμο σε ένζυμο, αλλά δεν παύει να είναι επιθυμητή ιδιότητα για την αξιοποίηση των ενζύμων σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές (Fei Zheng, 2019).

Ωστόσο, η εκμετάλλευση πολυσακχαριτών εκτός της κυτταρίνης, όπως η  $\beta$ -γλουκάνη, είναι σημαντική για την αποτελεσματικότητα των λιγνοκυτταρικών βιοδιυλιστηρίων (Silvina Ghio, 2020). Η  $\beta$ -γλουκάνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανικές διεργασίες, όπως

παραδείγματος χάριν στην παραγωγή βιοαιθανόλης, καθώς και σε σχετικές διαδικασίες βιομετατροπής για την παραγωγή ανανεώσιμων πηγών ενέργειας (Maria Hrtmona, 2023). Ειδικότερα, οι β-γλουκανάσες έχουν ευρεία εφαρμογή σε διαφορετικούς βιομηχανικούς τομείς (Εικόνα 9), όπως στη ζυθοποιία και την παραγωγή κρασιού, στη βιομηχανία ζωοτροφών, στην κλωστοϋφαντουργία, στην επεξεργασία καφέ, στην παραγωγή βιοκαυσίμων, στην επεξεργασία αποβλήτων, καθώς και στη γεωργία (Lekshmi K. Edison, 2018).



Εικόνα 9. Εφαρμογές των β-γλουκανασών σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας (N. S. Pradeep, 2022).

Πιο συγκεκριμένα, στη βιομηχανία ζυθοποιίας, τα εν λόγω ένζυμα χρησιμοποιούνται για τη μείωση της συγκέντρωσης της β-γλουκάνης στους καρπούς των δημητριακών, συντελώντας στην αύξηση του ρυθμού διήθησης, στη μείωση ιζημάτων, όπως, επίσης, και στη μείωση του πολτού και της θολερότητας (ένζυμα απολάσπωσης) (Klecus R Silveira Celestino, 2006). Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, η προσθήκη β-γλουκανάσης ενισχύει το χρώμα του κρασιού, τη διαύγηση του γλεύκους, το μαλάκωμα του φλοιού, τη διήθηση και, τέλος, την ποιότητα του οίνου (Ramesh Chander Kuhad, 2011). Επίσης, οι ζωοτροφές είναι πλούσιες σε β-γλουκάνες, οι οποίες λόγω του αυξημένου ιξώδους εμποδίζουν την απελευθέρωση των θρεπτικών συστατικών και την απορρόφησή τους από τα ζώα. Έτσι, η ενσωμάτωση β-γλουκανασών σε ζωοτροφές πλούσιες σε κριθάρι, μειώνει την αντιθρεπτική επίδραση της β-γλουκάνης, αυξάνοντας την πεπτικότητα, τους ρυθμούς διέλευσης της τροφής και την απελευθέρωση των θρεπτικών συστατικών (N. S. Pradeep, 2022). Εκτός

αυτών, β-γλουκανάσες εφαρμόζονται και ως παράγοντες βιοελέγχου στους τομείς της γεωργίας, όταν υπάρχει προσβολή από φυτοπαθογόνους μύκητες, αποικοδομώντας το κυτταρικό τοίχωμά τους (Stefano Costanzo, 2007).

Παράλληλα, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν μελετηθεί εκτενώς τα οφέλη των β-γλουκανών για την υγεία. Η β-γλουκάνη κατέχει ευεργετικό ρόλο στην αντιμετώπιση προβλημάτων που σχετίζονται με το υπερβολικό σωματικό βάρος, όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη, η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση, ο διαβήτης τύπου 2, η στεφανιαία νόσος και το εγκεφαλικό επεισόδιο. Δοκιμές έχουν δείξει, ότι οι β-γλουκάνες είναι ιδιαίτερα σημαντικές έναντι των δύο πιο συμβατικών αιτιών θανάτου στις βιομηχανικές χώρες, οι οποίες είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος (Laura Barsanti, 2011). Έχει αποδειχθεί ότι διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των λευκών αιμοσφαιρίων, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα, με αποτέλεσμα να επιδιώκεται η χρήση τους τόσο ως συμπληρώματα διατροφής, αλλά και ως φάρμακο (Vaclav Vetvicka, 2020).

## 2. Μέθοδοι και Υλικά

### 2.1. Υλικά

#### 2.1.1. Όργανα και Συσκευές

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι όργανα και συσκευές του εργαστηριακού εξοπλισμού της σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ και του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ.

- Φωτόμετρο Multiskan GO (Thermo Scientific, Η.Π.Α.)
- Φωτόμετρο Hitachi UV 2000
- Πεχάμετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Θερμοστατούμενος ηλεκτρικός αναδευτήρας (TS-100, BOECO, Γερμανία)
- Thermo-Shaker PCMT (Macherey-Nagel, Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS (Labnet, Μεγάλη Βρετανία)
- Αυτόκαυστο για την αποστείρωση αντιδραστηρίων και διαφόρων γυαλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα εργασία
- Φυγόκεντρος T J-6 της Beckman Counter (Η.Π.Α.)
- Μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Συσκευή PCR TC-1000-S (Drawell, Κίνα)
- Συσκευή Ηλεκτροφόρησης Πρωτεϊνών (Bio-Rad, Η.Π.Α.)
- Συσκευή Υπερήχων Ultrasonic Processor (Sonics & Materials Inc, Newtown, Η.Π.Α.)
- Στήλη συμπύκνωσης πρωτεϊνών Pierce™ PES 6mL, 30K MWCO (Thermo scientific)
- Στήλη Protino 14mL (Macherey-Nagel)
- Στήλη Sephadex G25M PD10 (CYTIVA, Life Sciences, Manassas, VA, Η.Π.Α.)
- Συσκευή Amicon chamber 8400 (Millipore, Billerica, Η.Π.Α.)
- High Performance Anion-Exchange Chromatography with pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD (Thermo scientific)

#### 2.1.2. Αντιδραστήρια και Διαλύματα

Παρακάτω αναφέρονται τα αντιδραστήρια και τα λοιπά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

- Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Luria-Bertani Medium) (LB): 1% w/v Tryptone, 0.5% w/v Yeast Extract, 1% w/v NaCl σε pH=7

- Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Luria-Bertani Medium) με άγαρ (LBR): 1% w/v Tryptone, 0.5% w/v Yeast Extract, 1% w/v NaCl, 1.5% Agar σε pH=7
  - Gel αγαρόζης 1% w/v (αγαρόζη διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x)
  - Αντιβιοτικό αμπικιλίνη συγκέντρωσης 100 µg/mL
  - Γλυκερόλη, που δρα ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας
  - Διαλύματα, που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρωματογραφία συγγένειας:
    - ▶ Αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM) σε pH=8 (Phosphate Buffer).
    - ▶ NaCl 5M
    - ▶ Ιμιδαζόλιο 1.5M
- Με βάση αυτά παρασκευάστηκαν διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου:
- ▶ NPI – 10 → 0.7% v/v σε ιμιδαζόλιο
  - ▶ NPI – 250 → 17% v/v σε ιμιδαζόλιο
  - ▶ NPI – 500 → 56% v/v σε ιμιδαζόλιο
- Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών/φωσφορικών 100 mM (c – p) σε pH=3, pH=4, pH=5
  - Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM (p – p) σε pH=5, pH=6, pH=7
  - Ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 100 mM σε pH=7, pH=8, pH=9

### 2.1.3. Εμπορικά σκευάσματα (Kits)

Τα τυποποιημένα χημικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

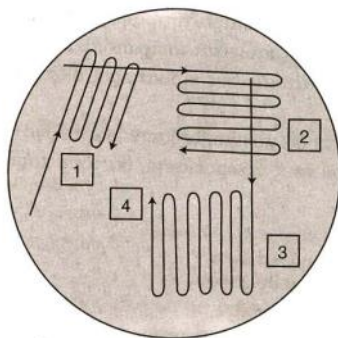
- Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up Column
- Plasmid isolation from E. coli, Nucleo Spin Plasmid / Plasmid NOLid Column
- Kit Γλυκόζης

## 2.2. Μέθοδοι απομόνωσης και παραγωγής του ενζύμου

Το ένζυμο που μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι μία γλυκοσιδική υδρολάση της οικογένειας 5 (Glucoside Hydrolase family 5, GH5) που απομονώθηκε από τον μικροοργανισμό *Bacillus safensis*. Ο ανασυνδυασμός της πρωτεΐνης και η ετερόλογη έκφρασή της πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου χρησιμοποιήθηκαν στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli*.

### 2.2.1. Απομόνωση Γονιδίου από τον Μικροοργανισμό *Bacillus safensis*

Αρχικά, πραγματοποιείται καλλιέργεια του μικροοργανισμού *B. safensis* σε τρυβλίο Petri που περιέχει 25 mL αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης LBR. Η επίστρωση του μικροοργανισμού γίνεται σύμφωνα με την Εικόνα 10, ώστε στο τελευταίο στάδιο να έχει πραγματοποιηθεί τριπλή αραιώση του DNA του μικροοργανισμού και έτσι να ληφθούν μονήρεις αποικίες.



Εικόνα 10. Επίστρωση του *Bacillus safensis* σε τρυβλία με θρεπτικό LB Agar με βάση την αρίθμηση και τη φορά των βελών, ώστε να σχηματιστούν απομονωμένες αποικίες.

Τα τρυβλία αφήνονται να επωαστούν στους 37°C για 16 ώρες.

Στη συνέχεια, ακολουθεί ενίσχυση/πολλαπλασιασμός του γονιδίου ενδιαφέροντος, η οποία πραγματοποιείται μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR). Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται για την συγκεκριμένη PCR είναι η Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μL) από την εταιρεία New England Biolabs. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιούνται:

- a. **18μL** Phusion Mastermix το οποίο περιλαμβάνει:
  - ▶ 16μL πολυμεράση Phusion υψηλής πιστότητας (1:100 αραιωμένη με το buffer της)
  - ▶ 4μL dNTPs (τριφωσφορικά νουκλεοτίδια: dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
  - ▶ 16μL Phusion Buffer (10x)
  - ▶ 134.4μL υπερκάρθαρο νερό (ddH<sub>2</sub>O)
- b. **1μL** εκκινήτη που προσδένεται στο 5' άκρο της αλληλουχίας του DNA (forward primer) και **1μL** εκκινήτη που προσδένεται στο 3' άκρο (reverse primer). Οι εκκινήτες είναι λυοφιλιωμένοι. Πριν την χρήση τους αραιώνονται ξανά 1:10. Οι εκκινήτες που έχουν επιλεγεί για το συγκεκριμένο γονίδιο είναι:
  - ▶ T7 Pro Forward: 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AAT TGT G – 3'



► GH5 – Bpu1102I: 5' – GCG CGC TCA GCC TAT TTG GAA AAT CGG TTC TTT TC –  
3'

c. Μικρό ποσοστό μίας μονήρους αποικίας από κάθε ένα τρυβλίο.

Για την αντίδραση πραγματοποιείται Colony PCR σε θερμικό κυκλοποιητή με τα εξής χαρακτηριστικά:

Μετουσίωση στους 98°C

Επαναδιάταξη στους  $T_m=57.5^\circ\text{C}$

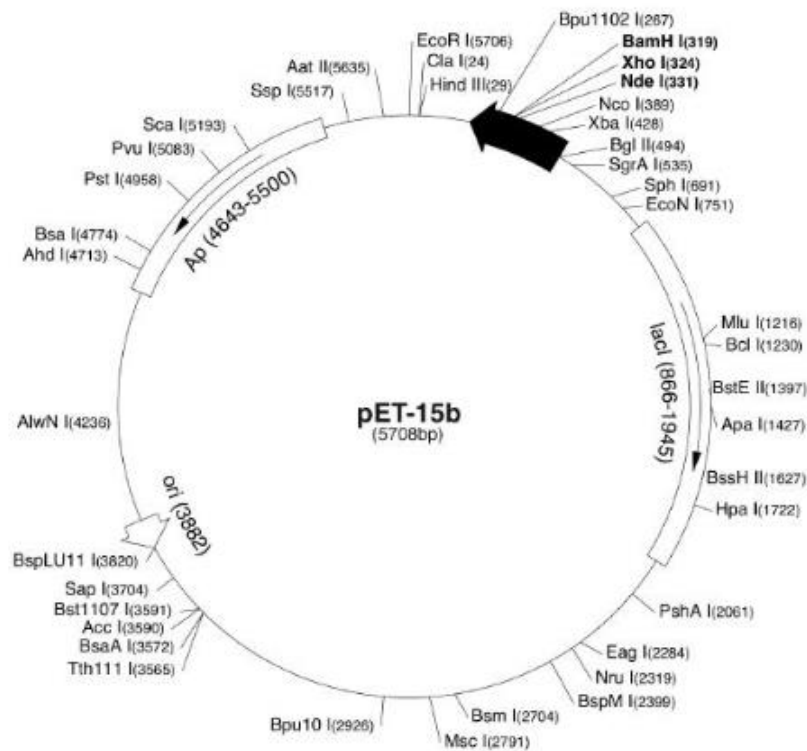
Επέκταση (Extension) στους 72°C για 1 min

Κατά την Colony PCR, ο χρόνος παραμονής στους 98°C είναι τόσο μεγάλος, ώστε να επιτευχθεί διάσπαση του μικροοργανισμού, που είναι Gram<sup>+</sup> (έχει διπλή μεμβράνη) και παράλληλα να μην επέλθει αποδιάταξη της πολυμεράσης. Συνολικά η PCR διαρκεί 1h και 30'.

Το προϊόν της PCR υπόκειται σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1% w/v. Ακολουθεί απομόνωση του DNA του γονιδίου από το gel αγαρόζης, όπως αναγράφεται στο πρωτόκολλο του kit «Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up Column», ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωσή του.

### 2.2.2. Υπερέκφραση Πλασμιδιακού DNA

Ο πλασμιδιακός φορέας που έχει επιλεγεί για το συγκεκριμένο γονίδιο είναι ο pET-15b, ο οποίος έχει εκτιμώμενο μήκος 5708 βάσεις (addgene).



Εικόνα 11. Ο πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pET-15b.

Η υπερέκφραση του πλασμιδιακού DNA, πραγματοποιείται σε 3 στάδια, όπως θα αναλυθούν παρακάτω.

► **1<sup>ο</sup> Στάδιο:** Μετασηματισμός (Transformation)

Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης εισάγεται εντός στελέχους του μικροοργανισμού *Escherichia coli*, για να υπερεκφραστεί. Πιο συγκεκριμένα, σε 100 μL δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a εισάγεται 1 μL από το πλασμίδιο και το διάλυμα αφήνεται για 30 λεπτά σε πάγο. Ακολουθεί θερμικό σοκ (heat shock), όπου το διάλυμα τοποθετείται για 90 δευτερόλεπτα στους 42°C και έπειτα απευθείας στον πάγο για 5 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 2 φορές. Ακολούθως στο διάλυμα προστίθενται 900 μL θρεπτικό μέσο LB και αφήνονται να επωαστούν σε οριζόντια θέση και υπό ανάδευση στους 37°C για 1 ώρα. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται καλύτερη οξυγόνωση και ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 5 λεπτά, ώστε να απορριφθεί η μεγαλύτερη ποσότητα του υπερέκφραστου. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται και επιστρώνεται σε τρυβλία που περιέχουν 25 mL θρεπτικό μέσο LBR και 25 μL αντιβιοτικό αμικικιλίνη (100 μg/mL). Αφήνονται να επωαστούν στους 37°C για 16 ώρες.

► **2<sup>ο</sup> Στάδιο:** Υπερέκφραση

Από την προαναφερθείσα στερεή καλλιέργεια λαμβάνεται μία αποικία και εμβολιάζεται σε κωνική φιάλη των 100 mL, που περιέχει 20 mL θρεπτικό LB και 20 mL αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Η καλλιέργεια επωάζεται υπό ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες. Το θρεπτικό μέσο καταλαμβάνει το 1/5 του όγκου της κωνικής φιάλης, καθώς με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνονται αερόβιες συνθήκες λειτουργίας και κατά συνέπεια καλύτερη οξυγόνωση της καλλιέργειας.

► **3<sup>ο</sup> Στάδιο:** Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από την καλλιέργεια γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο στο οποίο βασίζεται το kit «Plasmid isolation from *E. coli*, Nucleo Spin Plasmid / Plasmid NOLid Column», ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωσή του.

### 2.2.3. Πέψη Γονιδιακού και Πλασμιδιακού DNA

Για την πέψη του γονιδιακού και πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιούνται δύο περιοριστικά ένζυμα, τα *BspI* και *XhoI*, τα οποία διασπούν το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις μέσω της αναγνώρισης των αλληλουχιών. Τα περιοριστικά ένζυμα είναι ίδια και στις δύο πέψεις, ώστε να δημιουργηθούν συμπληρωματικά άκρα στα μόρια του γονιδιακού και του πλασμιδιακού DNA.

Οι αντιδράσεις πέψης των δειγμάτων περιλαμβάνουν:

- Δείγμα DNA
- Διάλυμα επώασης (Buffer Tango 10x with BSA)
- Περιοριστικά ένζυμα
- ddH<sub>2</sub>O

Τα διαλύματα επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C. Τα προϊόντα των πέψεων υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί απομόνωση και καθαρισμός του γονιδιακού και πλασμιδιακού DNA από το gel, όπως αναφέρεται παραπάνω. Έπειτα υπολογίζεται η συγκέντρωσή τους.

### 2.2.4. Ανασυνδυασμός Γονιδιακού και Πλασμιδιακού DNA

Ο ανασυνδυασμός (ligation) του γονιδιακού και πλασμιδιακού DNA, που έχουν υποστεί πέψη, πραγματοποιείται με χρήση του ενζύμου λιγάση. Το διάλυμα της αντίδρασης αφήνεται να επωαστεί για 2 ώρες στους 25°C.

Στη συνέχεια, ακολουθεί μετασχηματισμός του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a. Η διαδικασία είναι αντίστοιχη με αυτή της υπερέκφρασης του πλασμιδιακού DNA (μετασχηματισμός – υπερέκφραση – απομόνωση DNA)

### 2.2.5. Μετασχηματισμός και Υπερέκφραση της Πρωτεΐνης

Το ανασυνδυασμένο DNA εισάγεται εντός άλλου στελέχους του μικροοργανισμού *Escherichia coli*, το οποίο εξειδικεύεται στην υπερέκφραση πρωτεϊνών. Σε αυτήν την περίπτωση το DNA εισάγεται σε δεκτικά κύτταρα BL21. Ο μετασχηματισμός (transformation) πραγματοποιείται, ακολουθώντας τα βήματα που αναλύθηκαν παραπάνω.

Οι αποικίες, που αναπτύχθηκαν μετά τον μετασχηματισμό, αντιπροσωπεύουν τα ανασυνδυασμένα κύτταρα που φέρουν το γονίδιο της BsGH5 και είναι ανθεκτικά στην αμπικιλίνη. Στη συνέχεια, ακολουθεί προκαλλιέργεια του τροποποιημένου γονιδίου, η οποία πραγματοποιείται σε κωνική φιάλη των 100 mL. Με τη λογική του αερόβιου συστήματος, προστίθενται 20 mL θρεπτικού μέσου LB και 20 μL αντιβιοτικού αμπικιλίνης για την αποφυγή μόλυνσης και εμβολιάζεται μία απομονωμένη αποικία. Η προκαλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί για 16 ώρες σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα στους 37°C, στα 180 rpm, έως ότου η οπτική πυκνότητα των κυττάρων μετρημένη στα 600 nm να φτάσει την τιμή 1.5-2.

Στη συνέχεια, σε κωνικές φιάλες των 3 λίτρων προστίθενται 600 mL θρεπτικό μέσο LB (1/5 του ενεργού όγκου) και 600 μL αμπικιλίνη (100 μg/mL). Με βάση τον τύπο της αραιώσης  $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$ , υπολογίζεται ο όγκος που πρέπει να εμβολιαστεί από την προκαλλιέργεια, ώστε η συγκέντρωση του γονιδίου στη νέα καλλιέργεια να γίνει 0.05. Η κύρια καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C, στα 180 rpm, ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα μετράται η τιμή της οπτικής της πυκνότητας. Μόλις αυτή φτάσει περίπου την τιμή 0.6, όπου η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιείται με εκθετικό ρυθμό, προστίθενται 600 μL από τον επαγωγέα IPTG συγκέντρωσης 1M. Έτσι, αρχίζει η παραγωγή της πρωτεΐνης, με την καλλιέργεια να επωάζεται στους 18°C για 16 ώρες. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, η οπτική πυκνότητα θα έχει μειωθεί, γεγονός που επιβεβαιώνει την κατανάλωση του θρεπτικού μέσου και την έναρξη του κυτταρικού θανάτου.

## 2.3. Απομόνωση της BsGH5

Η καλλιέργεια διαμοιράζεται σε 12 μέρη των 50 mL και φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο για 15 λεπτά, ώστε να συλλεχθούν τα κύτταρα ως ίζημα (12 pellets). Ανά 4 τα ιζήματα επαναδιαλυτοποιούνται με 35 mL από το NPI – 10 buffer. Τα δείγματα, τοποθετημένα σε παγόλουτρο, υπόκεινται σε ρήξη των κυττάρων με χρήση υπερήχων (3 sec υπέρηχοι – 9 sec παύση), καθώς η πρωτεΐνη είναι εσωκυτταρική. Το παγόλουτρο εξισορροπεί τις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται κατά τη χρήση των υπερήχων και οι οποίες μπορούν να αδρανοποιήσουν το ένζυμο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 2 φορές για κάθε δείγμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά και συλλογή του υπερκευμένου. Η απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης (BsGH5) πραγματοποιείται με χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιώντας στήλη νικελίου.

Πρόκειται για μία στήλη ρητίνης (στατική φάση), η οποία είναι φορτισμένη με ιόντα νικελίου. Αυτά έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με τις 6 ιστοιδίνες (His – tag), οι οποίες είχαν προστεθεί στο καρβοξυ-τελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης και οι οποίες προσδένονται στα ιόντα νικελίου. Η κινητή φάση ρυθμίζεται στα 3 mL/min με χρήση αντλίας.

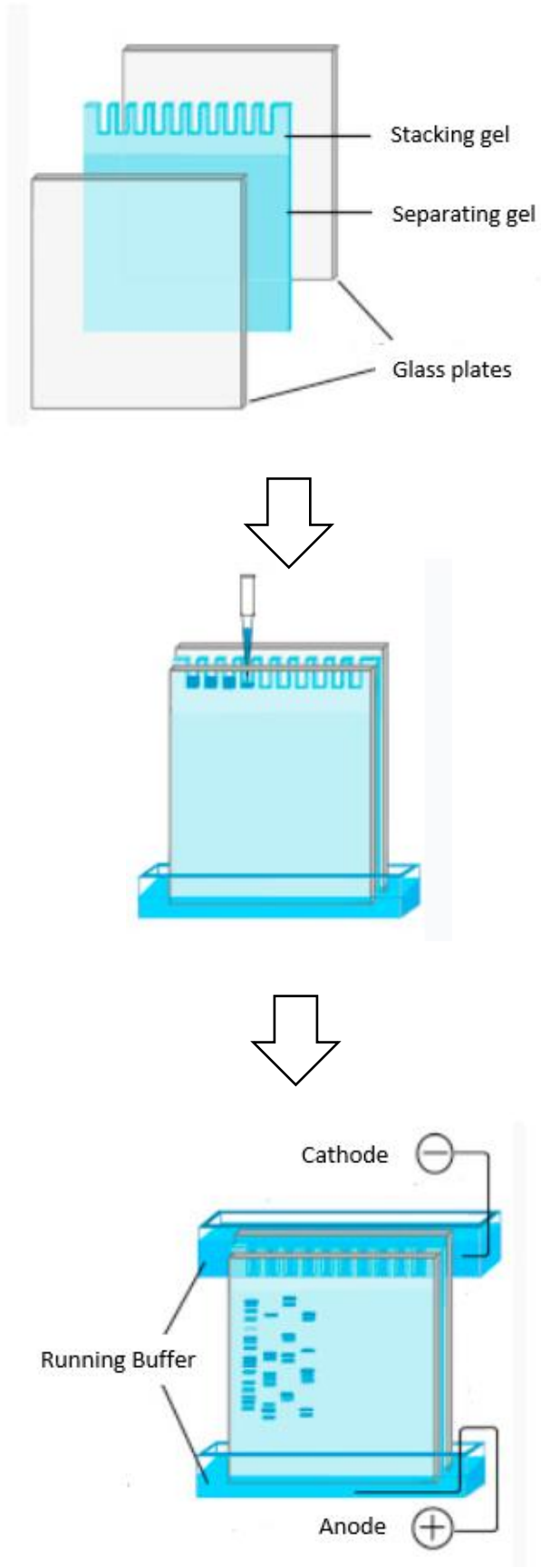
Ειδικότερα, η στήλη εκλούεται με 10 όγκους στήλης απιονισμένο νερό και έπειτα με 10 όγκους στήλης buffer NPI – 10. Στη συνέχεια, διαβιβάζεται το δείγμα στη στήλη, ώστε να προσδεθεί η πρωτεΐνη στα ιόντα νικελίου της στατικής φάσης. Έπειτα, για την αποδέσμευσή της από αυτήν, χρησιμοποιείται το buffer NPI – 250 συγκέντρωσης 16.6% σε ιμιδαζόλιο 1.5M, το οποίο διέρχεται από τη στήλη, ενώ παράλληλα συλλέγονται δείγματα ανά 2 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιείται έκπλυση της στήλης με το buffer NPI – 500 και με απιονισμένο νερό.

Για τον προσδιορισμό των κλασμάτων, τα οποία περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (**SDS – PAGE**) (Εικόνα 12). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του υπερθειικού αμμωνίου (APS), που μπορεί να καταλύσει τον πολυμερισμό μονοπροπυλίου και διπροπυλενίου σε πολυακρυλαμίδιο και του σταθεροποιητή ελευθέρων ριζών, TEMED, ο οποίος επιταχύνει αυτήν την κατάλυση. Μέσα στο πήκτωμα, η κίνηση των πρωτεϊνικών μορίων γίνεται μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος.

Το συγκεκριμένο gel αποτελείται από δύο διαφορετικά πηκτώματα. Στο πάνω μέρος βρίσκεται το πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel), στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα,

καθώς έχει χαμηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου που θα ωφελήσει στην ταυτόχρονη έναρξη της κίνησης των πρωτεϊνικών μορίων. Στο κάτω μέρος υπάρχει το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel), το οποίο καταλαμβάνει μεγαλύτερο όγκο, έχει υψηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου και σε αυτό πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των δειγμάτων με βάση το μοριακό τους βάρος. Τα δύο gel τοποθετούνται σειριακά ανάμεσα σε δύο ειδικές γυάλινες πλάκες. Πρώτα εισάγεται το separating gel και αφού πολυμεριστεί, τοποθετείται από πάνω το stacking gel, στο οποίο δημιουργούνται οι θέσεις φόρτωσης με ειδικό «χτενάκι». Οι πλάκες μαζί με τα gel τοποθετούνται σε κατάλληλη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, στην οποία προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα με SDS (running buffer), μέχρι το σημείο πλήρωσής της.

10 μL από κάθε κλάσμα που έχει συλλεχθεί από τη στήλη αναμιγνύεται με 6 μL απιονισμένο νερό και 6 μL χρωστική LAEMIL 4X. Τα μίγματα επωάζονται υπό συνθήκες βρασμού για 5 min και στη συνέχεια εισάγονται στις θέσεις που έχουν διαμορφωθεί στο πήκτωμα επιστοίβαξης. Παράλληλα, τοποθετείται ένα πρότυπο διάλυμα (ladder) γνωστών μοριακών βαρών, ώστε να υπάρξει σωστή εκτίμηση των ζωνών που θα προκύψουν.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της ηλεκτροφόρησης SDS PAGE ((Creative\_Proteomics)).

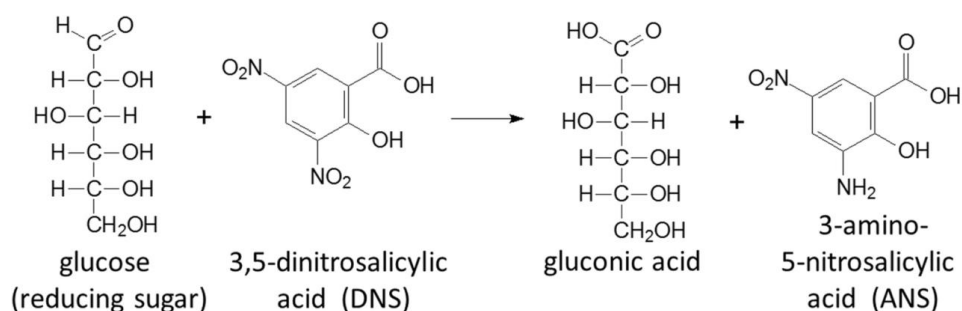
Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 200V για 30 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί επαρκής διαχωρισμός των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στο δείγμα.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης είναι εμφανή τα κλάσματα, τα οποία περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη, καθώς με χρωματισμό και εν συνεχεία αποχρωματισμό του gel, εμφανίζονται οι ζώνες με το αναμενόμενο μοριακό βάρος. Ακολουθεί αφαλάτωση με ταυτόχρονη συμπύκνωση με υπερδιήθηση σε τελικό όγκο 10 mL με χρήση της συσκευής Amicon. Η συσκευή περιλαμβάνει μεμβράνη μέσα από την οποία διέρχονται τα μακρομόρια που είναι μικρότερα από 10 kDa. Όταν το δείγμα φτάσει στον επιθυμητό όγκο, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM (p - p) σε pH=7 και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία έως ότου ο τελικός όγκος να γίνει ξανά ίσος με 10 mL.

Η συμπυκνωμένη πρωτεΐνη αποθηκεύεται στους -20°C σε γλυκερόλη (αναλογία 1:1), που δρα ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας.

## 2.4. Μέτρηση Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων

Η ποσοτικοποίηση των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5 - δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Πιο συγκεκριμένα, τα αναγωγικά σάκχαρα έχουν ελεύθερο το ημιακεταλικό υδροξύλιο. Αυτό σε υψηλή θερμοκρασία (>70°C) δημιουργεί σύμπλοκο με το DNS, το οποίο ανάγεται προς 3 - άμινο - 5 - νιτροσαλικυλικό οξύ (ANS) (MILLER, 1959). Η αντίδραση που πραγματοποιείται φαίνεται στην Εικόνα 13. Το DNS έχει χρώμα κίτρινο έως και ελαφρώς πορτοκαλί, ενώ το ANS κόκκινο έως και καφέ. Το δεύτερο έχει κορυφή απορρόφησης τα 540 nm, με την ένταση του χρώματος να είναι ανάλογη της περιεκτικότητας του δείγματος σε αναγωγικά σάκχαρα.

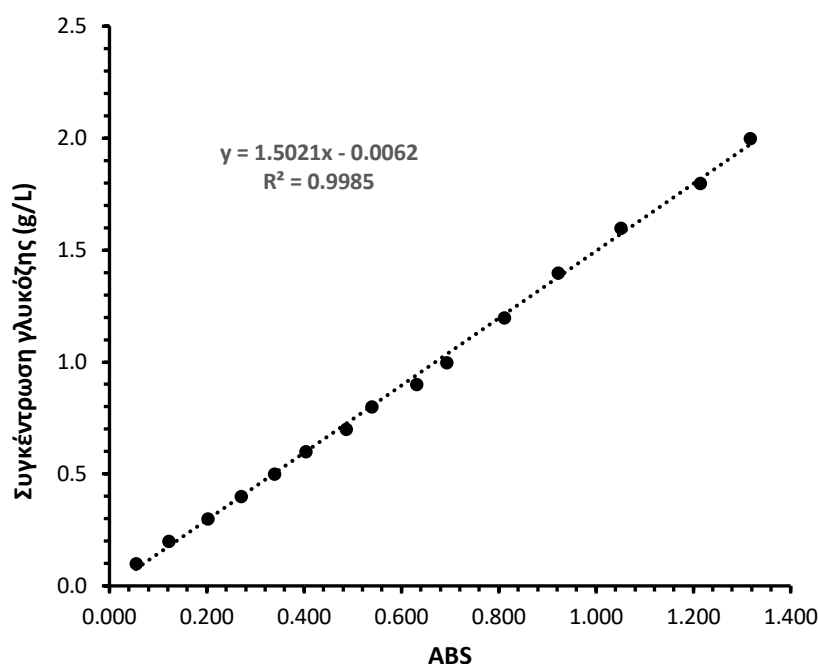


Εικόνα 13. Αντίδραση οξειδοαναγωγής μεταξύ του DNS και ενός αναγωγικού σακχάρου (Kaitlin B. Applegate, 2019).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναγωγικών σακχάρων απαιτείται η κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης με χρήση τυπικών διαλυμάτων αναγωγικών σακχάρων γνωστών



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



Διάγραμμα 1. Καμπύλη αναφοράς ισοδύναμων γλυκόζης με τη μέθοδο DNS.

## 2.5. Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford και το αντίστοιχο αντιδραστήριο για 0.1 – 1.4 mg/mL πρωτεΐνης (Coomassie dye binding protein assay). Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για μία εύκολη, γρήγορη και με ικανοποιητική ευαισθησία μέθοδο, που περιλαμβάνει τη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στην πρωτεΐνη, λόγω όξινων ή βασικών ομάδων των αμινοξέων. Η χρωστική υπάρχει σε δύο διαφορετικές χρωματικές μορφές, καθώς η καστανή μορφή που έχει αρχικά μετατρέπεται σε μπλε κατά την πρόσδεσή της στην πρωτεΐνη και τη δημιουργία του αντίστοιχου συμπλόκου. Η αντίδραση πραγματοποιείται στις ειδικές θέσεις μίας μικροπλάκας και το διάλυμα υπόκειται σε έντονη ανάδευση. Η σύνδεση της χρωστικής με την πρωτεΐνη προκαλεί μία μετατόπιση στο μέγιστο απορρόφησης της βαφής από 465 σε 595 nm. Έτσι, με βάση την απορρόφηση στα 595 nm και με χρήση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, υπολογίζεται η τιμή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, που ισούται με  $y = 1.9484 * ABS_{595}$  ( $R^2 = 0.998$ ), κατασκευάστηκε μέσω διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων μίας πρότυπης πρωτεΐνης (Bovine Serum

Albumin, Bovine  $\gamma$ -globulin) και εν συνεχεία προστέθηκε διάλυμα Bradford και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm. Στη συνέχεια, μετριέται η απορρόφηση καθενός από τα δείγματα και κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της απορρόφησης A προς την ποσότητα πρωτεΐνης.

## 2.6. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Γλυκόζης με χρήση εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος

Ο προσδιορισμός συγκέντρωσης της γλυκόζης πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (glucose assay kit). Το συγκεκριμένο σκεύασμα έχει ως βάση την οξειδάση και την υπεροξειδάση της γλυκόζης. Πιο συγκεκριμένα, η οξειδάση της γλυκόζης οξειδώνει τη γλυκόζη δημιουργώντας γλυκονικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Στη συνέχεια, αυτό με τη δράση της υπεροξειδάσης μετατρέπεται σε προϊόν ερυθρού χρώματος με μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm.

## 2.7. Μέθοδος Προσδιορισμού Ενζυμικής Ενεργότητας

Ως υπόστρωμα για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα  **$\beta$ -γλουκάνης** 1% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1M σε pH=6.

Σε 300  $\mu$ L διαλύματος  $\beta$  - γλουκάνης προστίθενται 150  $\mu$ L κατάλληλα αραιωμένου ενζύμου. Τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 60°C για 90 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 450  $\mu$ L διαλύματος DNS και ακολουθείται βρασμός για 5 λεπτά. Τέλος, μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 540 nm.

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (U) ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση ή την υδρόλυση 1  $\mu$ mol προϊόντος ή υποστρώματος, αντίστοιχα, στη μονάδα του χρόνου, σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και pH.

## 2.8. Ποιοτικός προσδιορισμός προϊόντων υδρόλυσης

Για τον προσδιορισμό των προϊόντων υδρόλυσης, που προκύπτουν κατά την αντίδραση της BsGH5 με το υπόστρωμα  $\beta$ -γλουκάνη (1% w/v), χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης με αμπερομετρική παλμική ανίχνευση (High Performance Anion-Exchange Chromatography with pulsed amperometric detection,

HPAEC-PAD) (Εικόνα 14). Το συγκεκριμένο όργανο χρωματογραφίας αποτελείται από ένα σύστημα αντλίας-μικροεπεξεργαστή (GS50 Gradient Pump), για τη μεταφορά των διαλυτών έκλουσης (κινητή φάση), συνδεδεμένο με μια αναλυτική στήλη Dionex CarboPac PA1 (250 mm x 4 mm) εφοδιασμένη με προστήλη. Η στήλη είναι συζευγμένη με αμπερομετρικό ανιχνευτή παλμού (PAD) με ηλεκτρόδιο χρυσού. Όλες οι επιμέρους μονάδες του συστήματος χρωματογραφίας είναι της εταιρείας Thermoscientific (Η.Π.Α.). Η ρύθμιση των μεταβλητών λειτουργίας του συστήματος καθώς και η λήψη των διαγραμμάτων ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό Chromeleon 7.0. Η στήλη Dionex CarboPac PA1 μπορεί να διαχωρίσει αποτελεσματικά μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και ορισμένους πολυσακχαρίτες με χρωματογραφία εναλλαγής ιόντων υψηλού pH (High-pH Anion-Exchange chromatography HPAE). Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 100 mM NaOH (Διαλύτης Α) και 100 mM NaOH / 1 M CH<sub>3</sub>COONa (Διαλύτης Β), η ροή των οποίων ρυθμίστηκε στο 1 mL/min.



Εικόνα 14. Διάταξη χρωματογραφίας ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης με αμπερομετρική παλμική ανίχνευση (HPAEC-PAD).

Αναλύθηκαν διαφορετικοί χρόνοι επώασης του ενζύμου μαζί με το υπόστρωμα, με σκοπό τη λήψη καλύτερων αποτελεσμάτων ανάλυσης των προϊόντων. Έτσι, λήφθηκαν δείγματα στις 0, 2, 6, 10, 24 και 48 ώρες, τα οποία υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση (11000rpm για 10 λεπτά) και το υπερκείμενο διηθήθηκε (0.22 μm), ώστε να εξασφαλιστεί η ακρίβεια και η καλή λειτουργία του οργάνου. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 30°C, ενώ ο χρόνος ανάλυσης ανά δείγμα ήταν 40 λεπτά.

## 2.9. Χαρακτηρισμός της BsGH5

### 2.9.1. Εύρεση Βέλτιστης Θερμοκρασίας Δράσης

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της BsGH5 προσδιορίστηκε με μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητάς του σε θερμοκρασίες 30°C έως 90°C, σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού της ενζυμικής ενεργότητας που αναφέρθηκε παραπάνω. Το ένζυμο επώαστηκε στην εκάστοτε θερμοκρασία σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, σε pH=6 για 90 min και έπειτα μετρήθηκε η εναπομείνουσα ενεργότητά του με τη μέθοδο του DNS.

### 2.9.2. Εύρεση Βέλτιστου pH Δράσης

Το βέλτιστο pH δράσης της BsGH5 προσδιορίστηκε με μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας σε ένα εύρος τιμών pH (από 3 έως 9), σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού της ενζυμικής ενεργότητας που αναφέρθηκε παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα, έγινε χρήση των κάτωθι ρυθμιστικών διαλυμάτων:

- Citrate – Phosphate (c – p), 100 mM, σε pH=3, pH=4, pH=5
- Phosphate – Phosphate (p – p), 100 mM, σε pH=5, pH=6, pH=7
- Tris/HCl, 100 mM, σε pH=7, pH=8, pH=9

Σε κάθε ένα ρυθμιστικά διαλύματα διαλύθηκε η απαιτούμενη ποσότητα β – γλουκάνης, ώστε να παρασκευαστεί αντίστοιχο υπόστρωμα περιεκτικότητας 1% w/v. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις υδρόλυσης του υποστρώματος της β – γλουκάνης για 90 min σε θερμοκρασία 60°C, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

### 2.9.3. Επίδραση της Θερμοκρασίας στη Σταθερότητα του Ενζύμου

Μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ενζύμου. Το ένζυμο επώαστηκε στους 40, 50, 60 και 70°C για διάφορα χρονικά διαστήματα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM και pH=6 και στη συνέχεια μετρήθηκε η εναπομείνουσα ενζυμική ενεργότητά του.

#### 2.9.4. Επίδραση του pH στη Σταθερότητα του Ενζύμου

Για τον έλεγχο της επίδρασης των διαφορετικών τιμών pH στη σταθερότητα του ενζύμου, μετρήθηκε η εναπομείνουσα ενεργότητά του στα διαφορετικά pH (c – p, p – p, Tris/HCl) ύστερα από 24 ώρες σε θερμοκρασία 4°C.

#### 2.9.5. Επίδραση ιόντων μετάλλων, EDTA και SDS στην ενεργότητα του ενζύμου.

Μελετήθηκε η επίδραση ιόντων μετάλλων, του χηλικού υποκαταστάτη EDTA και του αποδιατακτικού παράγοντα SDS στην ενεργότητα του ενζύμου. Τα ιόντα (Πίνακας 5) και οι ουσίες (EDTA, SDS) που εξετάστηκαν παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 5 mM.

Πίνακας 5. Μέταλλα και αντίστοιχα ιόντα που μελετήθηκαν για την επίδρασή τους στην ενεργότητα του ενζύμου.

	Μέταλλο	Ιόν
1.	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	Mn <sup>2+</sup>
2.	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Mn <sup>2+</sup>
3.	MgCl <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup>
4.	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Mg <sup>2+</sup>
5.	NaCl	Na <sup>+</sup>
6.	KCl	K <sup>+</sup>
7.	CaCl <sub>2</sub>	Ca <sup>2+</sup>
8.	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Cu <sup>2+</sup>
9.	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Cu <sup>2+</sup>
10.	CoCl <sub>2</sub>	Co <sup>2+</sup>
11.	FeCl <sub>3</sub>	Fe <sup>3+</sup>
12.	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Fe <sup>2+</sup>
13.	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Zn <sup>2+</sup>
14.	BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Ba <sup>2+</sup>

Το ένζυμο μαζί με το ιόν του κάθε μετάλλου, το EDTA και το SDS επώαστηκαν στους 30°C για 30 και 60 λεπτά και στη συνέχεια μετρήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου με βάση τη μέθοδο προσδιορισμού ενζυμικής ενεργότητας που περιγράφεται παραπάνω.

#### 2.9.6. Εξειδίκευση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα

Εξετάστηκε η δράση του ενζύμου στα εξής διαφορετικά υποστρώματα:

1. β – γλουκάνη
2. Λιχενάνη

3. Ξυλάνη βρώμης (Oat Spelt Xylan)
4. Αραβινοξυλάνη (Arabinoxylan)
5. Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel)
6. Επεξεργασμένη κυτταρίνη με φωσφορικό οξύ (PASC)
7. Καρβοξυμέθυλ – κυτταρίνη (CMC)
8. p – nitrophenyl – β – D – Glycopyranoside
9. p – nitrophenyl – α – D – Glycopyranoside
10. p – nitrophenyl – α – D – Galactopyranoside
11. o – nitrophenyl – β – D – Galactopyranoside
12. p – nitrophenyl – β – D – Xylopyranoside

Τα φυσικά υποστρώματα διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων με pH=6 σε τελική συγκέντρωση 1% w/v, ενώ τα συνθετικά υποστρώματα διαλύθηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, αλλά σε τελική συγκέντρωση 1mM. Το κάθε φυσικό υπόστρωμα μαζί με το ένζυμο επώαστηκαν στους 60°C για 90 λεπτά και στη συνέχεια ακολούθησε μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS. Στην περίπτωση των συνθετικών υποστρωμάτων προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της νιτροφαινόλης με φωτομέτρηση στα 410nm.

### 2.9.7. Κινητικές Σταθερές

Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων  $K_m$  και  $v_{max}$  της BsGH5 πραγματοποιήθηκε σε β-γλουκάνη. Παρασκευάστηκαν διαλύματα του υποστρώματος συγκεντρώσεων από 2.5 έως 30 g/L, στα οποία μετρήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου, όπως περιγράφεται παραπάνω.

### 2.9.8. Ρόφηση της BsGH5

Η μελέτη της ρόφησης της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με έλεγχο της πρόσδεσης αυτής σε καθαρή κυτταρίνη. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν διαλύματα μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (Avicel) σταθερής συγκέντρωσης 20 mg/mL και ενζύμου συγκεντρώσεων 1 και 2 mg/mL. Το υπόστρωμα μαζί με το ένζυμο επώαστηκαν στους 4°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων, ώστε να διαχωριστούν και να συλλεχθούν το

υπερκείμενο και το ίζημα. Με χρήση της μεθόδου Bradford που περιγράφεται παραπάνω, μετρήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο υγρό.

### 2.9.9. Παραγωγικότητα (Processivity) της BsGH5

Η παραγωγικότητα ενός ενζύμου αντιπροσωπεύεται από τον λόγο των αναγωγικών σακχάρων στο υπερκείμενο μίας αντίδρασης υδρόλυσης στερεού υποστρώματος προς τα αναγωγικά σάκχαρα στο αντίστοιχο στερεό υπόλειμμα. Πιο συγκεκριμένα, η παραγωγικότητα της BsGH5 μελετήθηκε μέσω της υδρόλυσης διαλύματος PASC συγκέντρωσης 1% w/v. Το υπόστρωμα μαζί με το ένζυμο επώαστηκαν στους 60°C για 90 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος στις 13000 στροφές για 10 λεπτά, ώστε το στερεό υπόστρωμα να καθιζάνει ως ίζημα. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων σύμφωνα με τη μέθοδο DNS που περιγράφηκε παραπάνω, στο υπερκείμενο και το ίζημα. Ειδικότερα, το στερεό ίζημα εκπλύθηκε δύο φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=5 πριν τον προσδιορισμό των συνολικών αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS.

### 2.9.10. Βιοπληροφορική Μελέτη

Για τη βιοπληροφορική μελέτη χρησιμοποιήθηκε η αμινοξική αλληλουχία της BsGH5, η οποία εισήχθη στο πρόγραμμα ProtParam ExPASy tool, ώστε να προκύψουν δεδομένα σχετικά με τον αριθμό των αμινοξέων, το μοριακό βάρος και τον χημικό τύπο του ενζύμου.

Επιπλέον, με χρήση του προγράμματος UniProt εντοπίστηκαν τα ένζυμα διαφορετικών μικροοργανισμών, τα οποία διαθέτουν παρόμοια αμινοξική αλυσίδα με την BsGH5.

Η απεικόνιση της δομής του ενζύμου πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Swiss model tool ExPASy, το οποίο απεικονίζει την πιθανή τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης.

Τέλος, με το πρόγραμμα Crystal omega πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των ενζύμων ενδιαφέροντος.

## 3. Αποτελέσματα

### 3.1. Βιοπληροφορική Μελέτη

Μετά από αλληλούχηση του γονιδίου της bsgH5 του μικροοργανισμού *Bacillus safensis*, προέκυψε η εξής νουκλεοτιδική αλληλουχία:

```
GATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAgaATA
ATTTTGTTTAACTTtaAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCaTCATCATCACaGCAGCG
GCCTGGTGCCGCGCGgCAGCCATATGCTCGAGGcTTATGTGCAgACGTCTGGTAcCaATTTACGCTG
AAcAAtCAACCaTTTTaCTTCGCCgGCACaAATAATTACTACTTCCATTACAAATCTAAAAAGATGGTAG
ATGCTGTGTTTCGATGATATGAAAGCAATGAATTTAAAGTCATCAGGATATGGGGCTTTCATGACGG
TGCCCTCAAGAAAACCTCAGTCTTACAATCTAGTCCAGGGTCTATGAAGAATCGGGTTTTCAaAAaC
TAgATTATGCGATTTATAAAGCAGGACAAGAAGgAATAAAGCTTGTATCCcaCTAgTGAACAATTGG
GATGACTTTGGCGGTATGAATCAATACGTAAGGTGGTTCGAGGCAGGATCGCATGATGCCTTCTATA
CAGATCCTCGTATTCAAAATGCTTACAAAAATTATGTGCGCTATGTATTAGAAAGAACCAATACGTAT
ACAGGTGTTCAATATAAAGACGATCCAGCTATTATGACTTGGGAATTGGCCAATGAGCCGCGTGTTTC
AGTCAGATCCAACGGGAAATGTACTAGTCAAAATGGGCAGATGAAATGAGTAAATGGATCAAAATCGC
TGGATCGTCACCATCTTGTTCAGTAGGAGATGAAGGGTCTTTCGCATACCAGGGCATGAAGATTG
GTTTTACGGAGGCGGAGAAGGCGTCGATTGGGACCGTTTGACGGCTCTTCTAATATCAATTATGGG
ACSTATCATCTGTACCCAGATCACTGGAACAAATCTGCTCCTTGGGGAGTGAAATGGATTGAAGACC
ATATCACCCGCGGAACTCAATCGGAAAACAGTTGTTTTAGAAAGAGTTGGCTATCAAAATCAATC
AGCACGTCCTGACGTATATCAAAGCTGGCTGTCAGCGGTTGAGCGGCTCGGAGGGGCTGGCAGTCA
ATTTGGATTTAACTAGCATTACAGGACGATAACTCGCTTATCCAGATTATGACGGTTTCCGCATCAT
AAAAGGGAGCAGGGAGGCAGCACTTATCAGTGAACATGCGAAAAGAATGAATGAAAAGAACCGAT
TTCCAAATAGGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTT
TTTGCT
```

Στη νουκλεοτιδική αλληλουχία παρουσιάζονται:

1. T7 υποκινητής (T7 Promoter) → κίτρινο
2. Lac χειριστής (Lac Operator) → πράσινο
3. Αλληλουχία πρόσδεσης σε ριβόσωμα (RBS) → γαλάζιο
4. 6 Ιστιδίνες (6xHis) → μωβ
5. Θέση Θρομβίνης (Thrombin Site) → κόκκινο
6. T7 καταστολέας (T7 Terminator) → μπλε



Με χρήση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της BsGH5 προκύπτει η αντίστοιχη αμινοξική, όπως φαίνεται παρακάτω:

Blast Protein

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLEAYVQTSQTFLNNQPFYFAGTNNYFHYKSKKMVDAVFDDMK  
 AMNLKVIRIWGFHDGAPQENSVLQSSPGVYEEESGFQKLDYAIYKAGQEGIKLVIPLVNNWDDFGGMNQ  
 YVWFEAGSHDAFYTDPRIQKAYKNYVRYVLERNTNTYTGQYKDDPAIMTWELANEPVQSDPTGNVL  
 VKWADEMSKWIKSLDRHHLVAVGDEGFFRIPGHEDWFYGGGEGVDWDRLTALPNIDYGTYHLYPDH  
 WNKSAPWGVKWIEDHITRGNISIGKPVVLEEFYQNSARPDVYQSWLSAVERLGGAGSQFWILTSIQD  
 DNSLYPDYDGFRIIKGSREAALISEHAKRMNEKNRFSK

Sequencing Protein

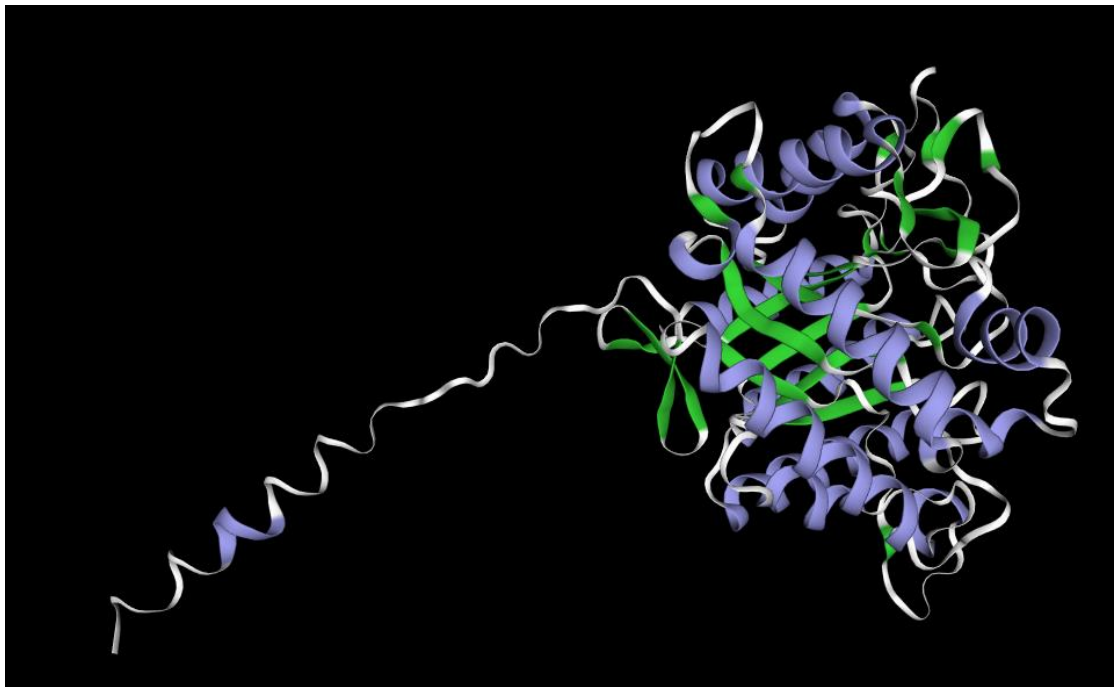
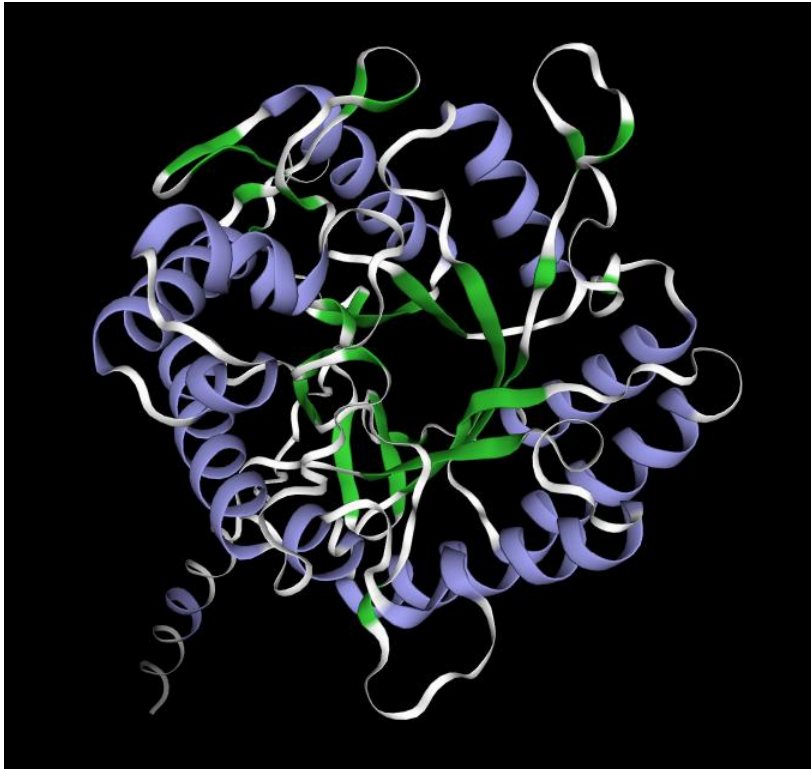
MLEAYVQTSQTFLNNQPFYFAGTNNYFHYKSKKMVDAVFDDMKAMNLKVIRIWGFHDGAPQENS  
 VLQSSPGVYEEESGFQKLDYAIYKAGQEGIKLVIPLVNNWDDFGGMNQYVWFEAGSHDAFYTDPRIQN  
 AYKNYVRYVLERNTNTYTGQYKDDPAIMTWELANEPVQSDPTGNVLVWFEAGSHDAFYTDPRIQN  
 AVGDEGFFRIPGHEDWFYGGGEGVDWDRLTALPNINITYGTYHLYPDHWNKSAPWGVKWIEDHITRGNIS  
 IGKPVVLEEFYQNSARPDVYQSWLSAVERLGGAGSQFWILTSIQDDNSLYPDYDGFRIIKGSREAALIS  
 EHAKRMNEKNRFSK

Η αλληλουχία των πρωτεϊνών της BsGH5 εισάγεται στο πρόγραμμα ProtParam ExPASy tool και προκύπτουν τα δεδομένα που φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Θεωρητικά χαρακτηριστικά της BsGH5, όπως αυτά προκύπτουν από το πρόγραμμα ProtParam.

Αριθμός αμινοξέων	374
Μοριακό βάρος (Da)	43016.96
Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)	6.09
Συνολικός αριθμός αρνητικά φορτισμένων υπολειμμάτων (γλουταμικό και ασπαρτικό οξύ)	46
Συνολικός αριθμός θετικά φορτισμένων υπολειμμάτων (αργινίνη και λυσίνη)	38
Χημικός τύπος	C <sub>1948</sub> H <sub>2871</sub> N <sub>527</sub> O <sub>566</sub> S <sub>9</sub>
Αριθμός ατόμων	5921

Εισάγοντας την αμινοξική αλληλουχία στο πρόγραμμα Swiss model tool ExPASy και χρησιμοποιώντας ως πρότυπο μοντέλο τριτοταγούς δομής την GH5 ένδο-1,4-β-μαννοζιδάση του μικροοργανισμού *Bacillus altitudinis*, προκύπτει η πιθανή δομή του μονομερούς της πρωτεΐνης με ακρίβεια 85% (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Πιθανή τρισδιάστατη πρωτεϊνική δομή της BsGH5.

Σύμφωνα με το συγκεκριμένο πρόγραμμα, η τρισδιάστατη δομή της BsGH5 παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα (72%) με την προβλεπόμενη δομή μίας μαννάνης ένδο-1,4-β-μαννοζιδάσης (A0A8B5YAD3\_BACLI), που έχει απομονωθεί από τον μικροοργανισμό *Bacillus licheniformis* (Εικόνα ).



Εικόνα 16. Τρισδιάστατη πρωτεϊνική δομή της ένδο-1,4-β-μαννοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Bacillus licheniformis*.

Επιπλέον, μέσω του προγράμματος εντοπίζεται και μία δεύτερη πρωτεΐνη με ποσοστό ομοιότητας 53% με την BsGH5. Και σε αυτήν την περίπτωση πρόκειται για μία ένδο-1,4-β-μαννανάση από τον μικροοργανισμό *Thermotoga retrophila*, η οποία ανήκει στην οικογένεια γλυκοσιδικών υδρολασών 5.

Η πρωτεϊνική δομή της BsGH5, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, φαίνεται να ακολουθεί τη μορφή βαρελιού με τις 8 παράλληλες α-έλικες και τα 8 παράλληλα β-πτυχωτά φύλλα, που έχει μία τυπική ένδο-β-1,4-γλουκανάση από την οικογένεια GH5. Βιβλιογραφικά, παρόμοια τυπική αναδίπλωση φαίνεται να εντοπίστηκε κατά τη μοντελοποίηση της ενδογλουκανάσης Cel5A από τον μικροοργανισμό *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 (Chaoning Liang, 2011). Επιπρόσθετα, μία ενδοκυτταρινάση από το αρχαίο *Pyrococcus horikoshii*, η οποία κατατάσσεται στην οικογένεια GH5 (EGPh, Gene ID: PH1171, EC 3.2.1.4) παρουσιάζει τρισδιάστατη δομή της μορφής ογκώδους (β/α)<sub>8</sub> TIM-βαρελιού.

Η αμινοξική αλληλουχία της BsGH5 εισάγεται στο πρόγραμμα UniProt, ώστε να προκύψουν ένζυμα με παρόμοια αμινοξική αλληλουχία μέσω της εντολής BLAST. Ποσοστό ομοιότητας με την BsGH5 μεγαλύτερο του 70% παρουσιάζουν μόνο δύο καταχωρημένες πρωτεΐνες, οι οποίες αναφέρονται ως ένδο-1,4-β-μαννοζιδάσες και προέρχονται από τους μικροοργανισμούς *Bacillus safensis* (AOA5COWLE0, 97% ομοιότητα) και *Bacillus licheniformis* (Q65JI6, 73% ομοιότητα) (Πίνακας 7). Εκτός από αυτές, υπάρχουν, επιπλέον, 5 πρωτεΐνες που φέρουν ποσοστό ομοιότητας της αμινοξικής αλληλουχίας πάνω από 55% (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Όμοιες αμινοξικές αλληλουχίες με την BsGH5, σύμφωνα με το πρόγραμμα UniProt BLAST.

Entry	Protein Names	Gene Names	Organism	Length	Amino acid sequence similarity
AOA5COWLE0	mannan endo-1,4-beta-mannosidase, 3.2.1.78	FX981_03751	<i>Bacillus safensis</i>	377 AA	97.4%
Q65JI6	mannan endo-1,4-beta-mannosidase, 3.2.1.78	celD, BL01229	<i>Bacillus licheniformis</i> (strain ATCC 14580 / DSM 13 / JCM 2505 / CCUG 7422 / NBRC 12200 / NCIMB 9375 / NCTC 10341 / NRRL NRS-1264 / Gibson 46)	395 AA	72.7%
AOA328VPK6	mannan endo-1,4-beta-mannosidase, 3.2.1.78	A4R35_19330	<i>Thermogemmatispora tikiterensis</i>	423 AA	57.1%
M1MH21	mannan endo-1,4-beta-mannosidase, 3.2.1.78	Cspa_c18630	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4(HMT)	472 AA	57%
D1CIL5	mannan endo-1,4-beta-mannosidase, 3.2.1.78	Tter_2698	<i>Thermobaculum terrenum</i> (strain ATCC BAA-798 / YNP1)	390 AA	56.2%
AOA078KM41	Endoglucanase, 3.2.1.4	CCDG5_1678	<i>[Clostridium] cellulosi</i>	636 AA	56.2%
AOA1S8TPB5	mannan endo-1,4-beta-mannosidase, 3.2.1.78	celS, CLPUN_15290	<i>Clostridium puniceum</i>	458 AA	55.4%

Παρατηρείται, ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών, που έχουν παρόμοια αμινοξική αλληλουχία με την BsGH5, έχουν χαρακτηριστεί ως ένδο-β-1,4-μαννοζιδάσες. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει, ότι και η BsGH5 πιθανότατα ανήκει σε αυτό το είδος ενζύμων.

Με χρήση του προγράμματος Clustal Omega Multiple Sequence Alignment (MSA) πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των ενζύμων που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ομοιότητα με την BsGH5, σύμφωνα με το πρόγραμμα BLASTp.

WP_144470504.1	MKKWAQRVSCFILVAVIWSGWFSLTIKAAAYVQTSQTQFTLNNQPFYFAGTNNYFFHYKS	60
WP_263640203.1	MKKWAQRVSCFILVAVIWSGWFSLTIKAAAYVQTSQTQFTLNNQPFYFAGTNNYFFHYKS	60
WP_095408497.1	MKKWAQRVSCFILVAVIWSGWFSLTIKAAAYVQTSQTQFTLNNQPFYFAGTNNYFFHYKS	60
WP_272510176.1	MKKWAQRVSCFILVAVIWSGWFSLTIKAAAYVQTSQTQFTLNNQPFYFAGTNNYFFHYKS	60
*****		
WP_144470504.1	KKMVDVAVFDDMKAMNLKVIIRIWFHGDGAPQENSVLQSSPCVYEEESGFQKLDYAIYKAQLE	120
WP_263640203.1	KKMVDVAVFDDMKAMNLKVIIRIWFHGDGAPQENSVLQSSPCVYEEESGFQKLDYAIYKAQLE	120
WP_095408497.1	KKMVDVAVFDDMKAMNLKVIIRIWFHGDGAPQENSVLQSSPCVYEEESGFQKLDYAIYKAQLE	120
WP_272510176.1	KKMVDVAVFDDMKAMNLKVIIRIWFHGDGAPQENSVLQSSPCVYEEESGFQKLDYAIYKAQLE	120
*****		
WP_144470504.1	GIKLVIPLVNNWDDFGGMNQYVKWFEAGSHDAFYTDPRIQKAYKNYVRYVLERNTNTYGV	180
WP_263640203.1	GIKLVIPLVNNWDDFGGMNQYVKWFEAGSHDAFYTDPRIQKAYKNYVRYVLERNTNTYGV	180
WP_095408497.1	GIKLVIPLVNNWDDFGGMNQYVKWFEAGSHDAFYTDPRIQKAYKNYVRYVLERNTNTYGV	180
WP_272510176.1	GIKLVIPLVNNWDDFGGMNQYVKWFEAGSHDAFYTDPRIQKAYKNYVRYVLERNTNTYGV	180
*****		
WP_144470504.1	QYKDDPAIMTWELANEPRVQSDPTGNVLVKWADEMSKWIKS LDRHHLVAVGDEGFFRIPG	240
WP_263640203.1	QYKDDPAIMTWELANEPRVQSDPTGNVLVKWADEMSKWIKS LDRHHLVAVGDEGFFRIPG	240
WP_095408497.1	QYKDDPAIMTWELANEPRVQSDPTGNVLVKWADEMSKWIKS LDRHHLVAVGDEGFFRIPG	240
WP_272510176.1	QYKDDPAIMTWELANEPRVQSDPTGNVLVKWADEMSKWIKS LDRHHLVAVGDEGFFRIPG	240
*****		
WP_144470504.1	HEDWFGGGEGVDWDRLTALPNIDYGTYHLYPDHWNK SAPWGKWI EDHITRGNSIGKPV	300
WP_263640203.1	HEDWFGGGEGVDWDRLTALPNIDYGTYHLYPDHWNK SAPWGKWI EDHITRGNSIGKPV	300
WP_095408497.1	HEDWFGGGEGVDWDRLTALPNIDYGTYHLYPDHWNK SAPWGKWI EDHITRGNSIGKPV	300
WP_272510176.1	HEDWFGGGEGVDWDRLTALPNIDYGTYHLYPDHWNK SAPWGKWI EDHITRGNSIGKPV	300
*****		
WP_144470504.1	VLEEFQYQNSARPDVYQSWLSAVERLGGAGSQFWILTSIQDDNSLYPDYDGFRIIHGSR	360
WP_263640203.1	VLEEFQYQNSARPDVYQSWLSAVERLGGAGSQFWILTSIQDDNSLYPDYDGFRIIHGSR	360
WP_095408497.1	VLEEFQYQNSARPDVYQSWLSAVERLGGAGSQFWILTSIQDDNSLYPDYDGFRIIHGSR	360
WP_272510176.1	VLEEFQYQNSARPDVYQSWLSAVERLGGAGSQFWILTSIQDDNSLYPDYDGFRIIHGSR	360
*****		
WP_144470504.1	EAALISEHAKRMNEKNRFSN	380
WP_263640203.1	EAALISEHAKRMNEKNRFSK	380
WP_095408497.1	EAALISEHAKRMNEKNRFSK	380
WP_272510176.1	EAALISEHAKRMNEKNRFSK	380
*****		

Τα 4 ένζυμα αναφέρονται ως γλυκοσιδικές υδρολάσες που προέρχονται από το γένος *Bacillus*, ενώ ειδικότερα οι WP\_272510176.1, WP\_263640203.1 και WP\_144470504.1 προέρχονται από τον μικροοργανισμό *Bacillus safensis*. Η BsGH5 παρουσιάζει 100% ομοιότητα με την WP\_095408497.1, ενώ με τις υπόλοιπες το ποσοστό ομοιότητας πέφτει στο 99.43%. Οι διαφορές στα αμινοξέα που εντοπίζονται είναι οι εξής:

- WP\_272510176.1: στις θέσεις 101 (αλανίνη αντί για βαλίνη) και 312 (θρεονίνη αντί για αλανίνη)
- WP\_263640203.1: στις θέσεις 112 (ασπαραγίνη αντί για τυροσίνη) και 184 (ασπαραγίνη αντί για ασπαραγινικό οξύ)

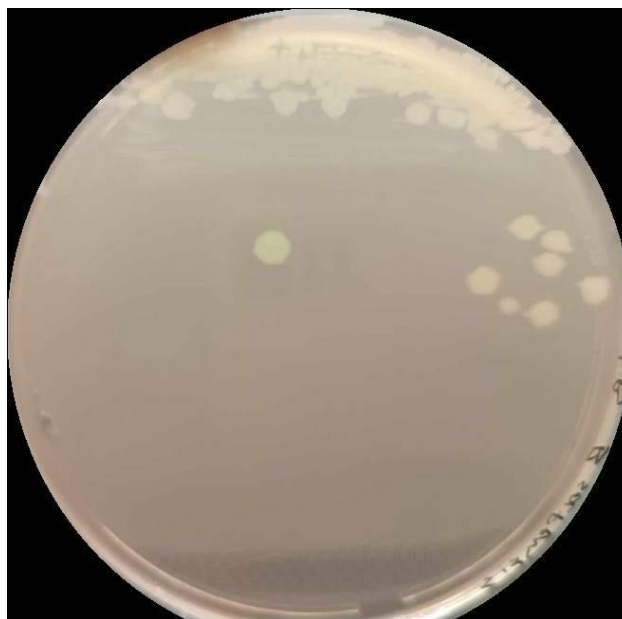
- WP\_144470504.1: στις θέσεις 119 (λευκίνη αντί για γλουταμίνη), 358 (γλουταμινικό οξύ αντί για γλυκίνη) και 380 (ασπαραγίνη αντί για λυσίνη)

### 3.2. Απομόνωση και Παραγωγή του Ενζύμου

#### 3.2.1. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης του Απομονωμένου Γονιδιακού

##### DNA από τον Μικροοργανισμό *Bacillus safensis*

Οι αποικίες που προέκυψαν μετά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Bacillus safensis* σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό μέσο LBR φαίνονται στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17. Ανεπτυγμένες αποικίες του μικροοργανισμού *Bacillus safensis* σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό μέσο LBR με τη μέθοδο της τριπλής αραιώσης.

Το γονίδιο απομονώθηκε από το gel αгарόζης σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit «Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up Column» και στη συνέχεια υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του με χρήση φασματοφωτομέτρου nanodrop (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Συγκέντρωση απομονωμένου γονιδιακού DNA.

	Concentration (ng/μL)	A <sub>260/280</sub>
GH5	98.5	1.74
	101	1.8
Μέσος όρος	99.8	1.77

Η τιμή  $A_{260/280}$  εκφράζει τον λόγο των απορροφήσεων στα 260 προς 280 nm. Η αναλογία αυτή χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της καθαρότητας του DNA. Τιμές που βρίσκονται εντός του εύρους 1.7-2.0 υποδηλώνουν υψηλή καθαρότητα του DNA, ενώ τιμές κοντά στο 2.0 επιβεβαιώνουν την υψηλή καθαρότητα του RNA. Χαμηλότερες αναλογίες απορρόφησης πιθανότατα σημαίνουν, ότι στο δείγμα υπάρχει κάποια άλλη πρωτεΐνη, φαινόλη ή γενικότερα κάποιος ρύπος, που έχει απορρόφηση κοντά στα 280 nm.

### 3.2.2. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης του Απομονωμένου Πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε από την καλλιέργεια σύμφωνα με το πρωτόκολλο στο οποίο βασίζεται το kit «Plasmid isolation from *E. coli*, Nucleo Spin Plasmid / Plasmid NOLid Column» και κατόπιν υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του με χρήση φασματοφωτομέτρου nanodrop (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA.

	Concentration (ng/μL)	$A_{260/280}$
pET-15b	140	1.6
	146	1.6
Μέσος όρος	143	1.6

Στον παραπάνω Πίνακα φαίνεται, ότι η τιμή της αναλογίας  $A_{260/280}$  είναι ελάχιστα χαμηλότερη από το όριο του 1.7, το οποίο ενδεχομένως οφείλεται σε προσμίξεις που έχουν απορρόφηση κοντά στα 280 nm και επηρεάζουν την καθαρότητα του DNA.

### 3.2.3. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Προϊόντων Πέψης

Τα προϊόντα των πέψεων απομονώθηκαν από το gel αγαρόζης και εν συνεχεία υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους με χρήση φασματοφωτομέτρου nanodrop (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Συγκεντρώσεις γονιδιακού και πλασμιδιακού DNA μετά την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BlnI και XhoI.

	Concentration (ng/μL)	$A_{260/280}$
GH5	6.5	1.7
pET-15b	3.0	1.8

Οι τιμές των συγκεντρώσεων που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν, ώστε να υπολογιστούν οι ποσότητες του γονιδίου και του πλασμιδίου που απαιτούνται για τον ανασυνδυασμό

(ligation) των δύο ειδών DNA. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η συγκέντρωση του πλασμιδίου στο τελικό μίγμα της αντίδρασης ανασυνδυασμού πρέπει να είναι αρκετά μικρότερη από αυτή του γονιδίου, με επικρατέστερη αναλογία την 1:3, αντίστοιχα.

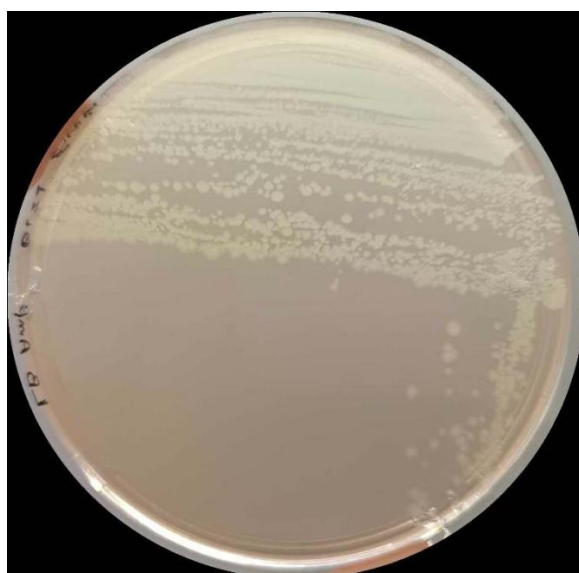
### 3.2.4. Προσδιορισμός Συγκέντρωση Μετασηματισμένης και Υπερεκφρασμένης Πρωτεΐνης

Ο ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός φορέας μετασηματίστηκε σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a και εφόσον υπερεκφράστηκε, απομονώθηκε από την καλλιέργεια σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit «Plasmid isolation from *E. coli*, Nucleo Spin Plasmid / Plasmid NOLid Column» και μετρήθηκε η συγκέντρωσή του (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Συγκέντρωση ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα, κατόπιν του μετασηματισμού του σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a.

	Concentration (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260/280</sub>
GH5/pET-15b	81.5	1.59
	82.8	1.57
Μέσος όρος	82.2	1.58

Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν κατά τον μετασηματισμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA σε δεκτικά κύτταρα BL21 του μικροοργανισμού *Escherichia coli* φαίνονται στην Εικόνα 18.

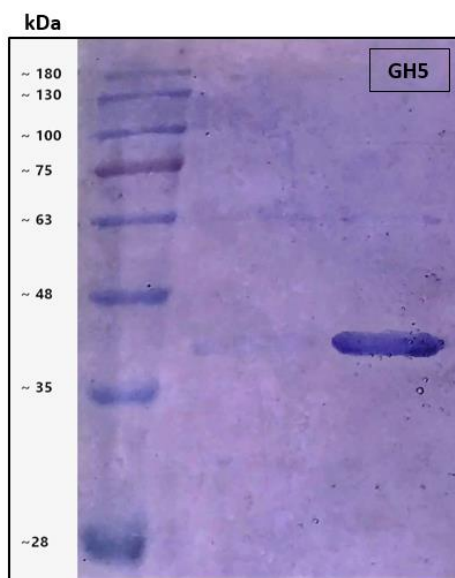


Εικόνα 18. Ανεπτυγμένες αποικίες του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA σε δεκτικά κύτταρα BL21 του μικροοργανισμού *Escherichia coli* με τη μέθοδο της τριπλής αραιώσης.



### 3.3. Προσδιορισμός Μοριακού Βάρους

Το μοριακό βάρος του ενζύμου προσδιορίζεται από την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS – PAGE) της απομονωμένης πρωτεΐνης. Από το πήκτωμα που προέκυψε (Εικόνα 19) διαπιστώνεται, ότι το μοριακό βάρος της BsGH5 είναι περίπου 45 kDa.



Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE για την απομονωμένη BsGH5. Στην εικόνα αριστερά φαίνονται οι δέσμες των πρωτεϊνικών μορίων γνωστών μοριακών βαρών του πρότυπου διαλύματος και δεξιά η ζώνη που αντιστοιχεί στην BsGH5.

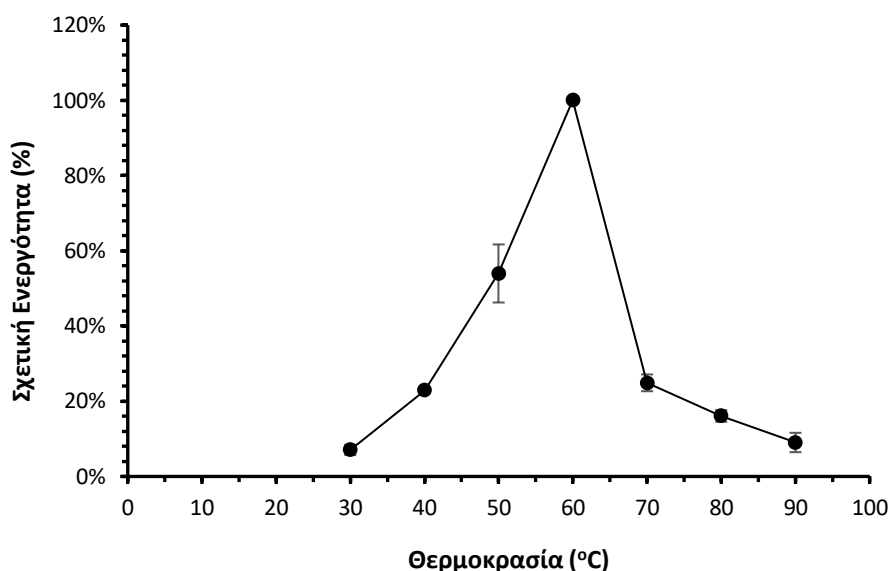
Βιβλιογραφικά, η β-μαννανάση rMan5HJ14, που απομονώθηκε από τον μικροοργανισμό *Bacillus* sp. HJ14, εμφάνισε μοριακό βάρος περίπου 40 kDa (Rui Zhang, 2016). Ακόμη, η ανασυνδυασμένη β-1,4-μαννανάση rManH, που εντοπίστηκε και απομονώθηκε από το στέλεχος HY-13 του βακτηρίου *Cellulosimicrobium* sp. του εντέρου της *Eisenia fetida*, υπολογίστηκε ότι είχε μοριακό βάρος ίσο με 44 kDa (Do Young Kim, 2011).

### 3.4. Χαρακτηρισμός της BsGH5

#### 3.4.1. Εύρεση Θερμοκρασίας Δράσης της BsGH5

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της BsGH5 προσδιορίστηκε με την μέτρηση της ενεργότητας του σε υπόστρωμα β-γλουκάνης 1% w/v, σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 30° έως 90°C.

Η BsGH5 παρουσίασε μέγιστη δραστικότητα στους 60°C (Διάγραμμα 2). Στη θερμοκρασία αυτή παρουσιάζει το 100% της ενεργότητάς του και με βάση αυτήν ορίζονται τα ποσοστά σχετικής ενεργότητας και στις υπόλοιπες θερμοκρασίες.



Διάγραμμα 2. Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστικότητα της BsGH5.

Παρατηρείται, ότι στους 50°C υφίσταται μία πτώση της σχετικής ενεργότητας της τάξης του 50%, ενώ τόσο στους 40°C όσο και στους 70°C η εναπομείνουσα ενεργότητα ανέρχεται περίπου στο 20%. Πρόκειται για μία μεγάλη διαφορά στις τιμές των ποσοστών για θερμοκρασιακή απόκλιση μόλις 10°C.

Βιβλιογραφικά, παρόμοια συμπεριφορά με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, παρουσιάζει η GH5 β-μαννανάση (Man5HJ14) από τον βάκιλο *Bacillus* sp. HJ14, η οποία έχει βέλτιστη δραστικότητα σε θερμοκρασία ίση με 65°C (Rui Zhang, 2016), ενώ η β-1,4-μαννανάση (rManH) από τον μικροοργανισμό *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 εμφανίζει μέγιστη δραστικότητα στους 50°C (Do Young Kim, 2011). Επιπλέον, μία μεσόφιλη ενδογλουκανάση Cel5 από τον μικροοργανισμό *Stegonsporium oralus* (SoCel5) έχει βέλτιστη θερμοκρασία τους 60°C (Fei Zheng, 2019). Γενικότερα, τα περισσότερα ένζυμα από την οικογένεια GH5, που έχουν χαρακτηριστεί, παρουσιάζουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης μικρότερη ή ίση με 70°C. Κάποια από αυτά, που ανήκουν και στην κατηγορία των μυκητιακών ενζύμων, είναι ο Cel5A (70°C) από τον μικροοργανισμό *Thermoascus aurantiacus* (TaCel5A), το Cel5A (60°C) από τον μικροοργανισμό *Ganoderma lucidum* (GlCel5A) και το Cel5 (70°C) από τον μικροοργανισμό *Aspergillus niger* (AnCel5) (Fei Zheng, 2019). Ωστόσο, υπάρχουν και εξαιρέσεις, όπως παραδείγματος χάριν, η ενδογλουκανάση Egl5A από το *Talaromyces*

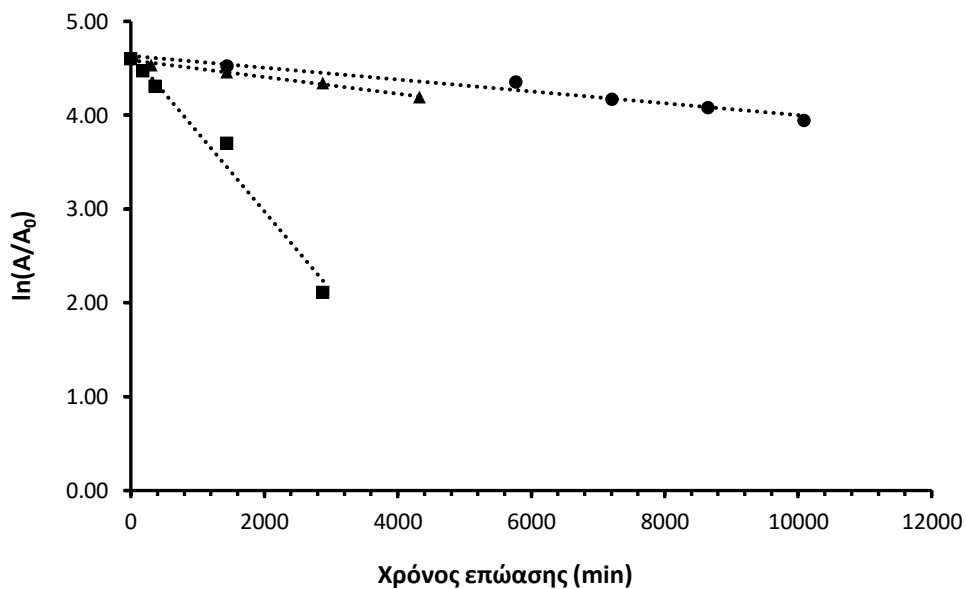
*emersonii* (TeEgI5A), η οποία παρουσιάζει την υψηλότερη σταθερότητα που είναι γνωστή μέχρι στιγμής για αυτήν την οικογένεια, με βέλτιστη θερμοκρασία 90°C (Fei Zheng, 2019). Εκτός αυτών, η GH5 ενδογλουκανάση BaGH5-WT από τον βάκιλο *Bacillus amyloliquefaciens* SS35 παρουσίασε βέλτιστη δράση σε θερμοκρασία ίση με 55°C (Shweta Singh, 2020).

Πίνακας 12. Βιοχημικά χαρακτηριστικά ενζύμων της οικογένειας GH5.

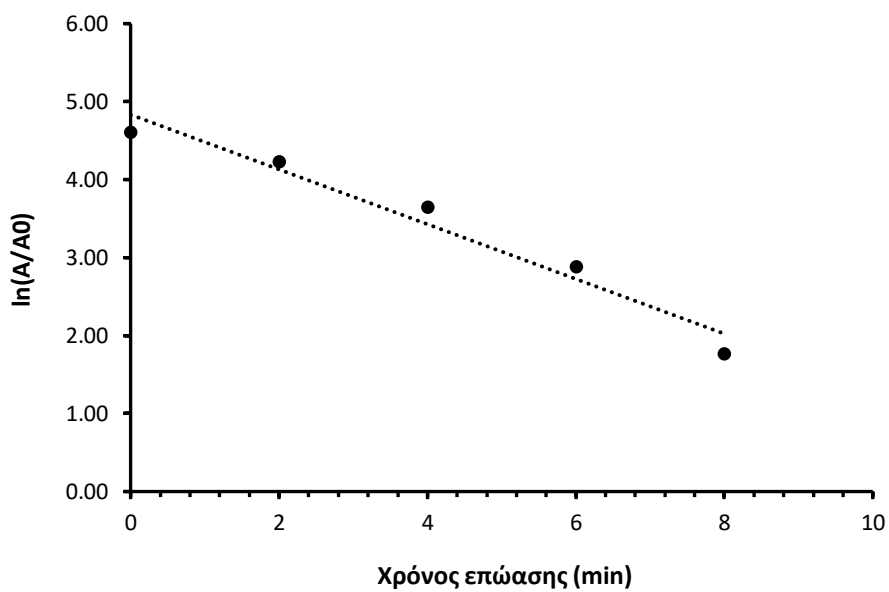
Ταυτότητα Ενζύμου	Μικροοργανισμός Προέλευσης	MW (kDa)	Βέλτιστο pH	Σταθερότητα pH	Βέλτιστη Θερμοκρασία (°C)	Km	Αναφορά
-	<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	81.3	5.5	6	55-65	0.49%	(K.K. Cho, 2000)
Cel5A	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4	-	6.5	7	75 – 80	1.39 ± 0.12 g/L	(Chaoning Liang, 2011)
Tm_Cel5A	<i>Thermotoga maritima</i>	-	4.8	-	80	-	(Jose H. Pereira, 2010)
BaGH5-WT	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SS35	57.6	5.5 – 6	7 – 7.5	55	-	(Shweta Singh, 2020)
rMan5HJ14	<i>Bacillus</i> sp. HJ14	43.2	6.5	4 – 8	65	2.2 mg/mL	(Rui Zhang, 2016)
rManH	<i>Cellulosimicrobium</i> sp. strain HY-13	44.0	6	5.5 – 9	50	-	(Do Young Kim, 2011)
CHU_2103	<i>C. hutchinsonii</i>	-	6.2	-	40	-	(Cong Zhang, 2014)
SoCel5	<i>Stegonsporium opalus</i>	35	5	4-7	60	4.9 ± 0.3 mg/mL	(Fei Zheng, 2019)
-	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	33.7	4-5	-	50-60	22.39 mg/mL	(Klecius R Silveira Celestino, 2006)

### 3.4.2. Θερμική σταθερότητα

Η σταθερότητα του ενζύμου μελετήθηκε για θερμοκρασίες 40, 50, 60 και 70°C και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.



(α)



(β)

Διάγραμμα 3. Σταθερότητα της B<sub>s</sub>GH5 στους (α) (●) 40°C, (▲) 50°C, (◻) 60°C και (β) 70°C.

Παρατηρείται, ότι για τη θερμοκρασία των 70°C, που είναι και η μέγιστη που μελετήθηκε, η ενεργότητα του ενζύμου σχεδόν μηδενίζεται στα πρώτα 8 λεπτά. Στους 60°C η BsGH5 διατηρεί περίπου το 40% της ενεργότητάς της μετά από 24 ώρες, ενώ φαίνεται, ότι σχεδόν απενεργοποιείται στις 48 ώρες. Επιπλέον, η εναπομείνουσα ενεργότητα του ενζύμου στους 50°C διατηρείται στο 66% της αρχικής μετά από επώαση για 3 μέρες. Τέλος, στους 40°C η BsGH5 διατηρεί το 50% της σχετικής της ενεργότητας μετά από επώαση για 7 μέρες, γεγονός που υποδηλώνει σημαντική σταθερότητα του ενζύμου στη συγκεκριμένη θερμοκρασία.

Για να προσδιοριστεί το πιο κατάλληλο μοντέλο για το συγκεκριμένο ένζυμο θεωρείται, ότι η απενεργοποίηση του ενζύμου ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης ως προς την ενεργότητά του. Αυτό σημαίνει, ότι η ενζυμική ενεργότητα μειώνεται γραμμικά σύμφωνα με την ακόλουθη Εξίσωση 1 (Panayiotis D. Glekas, 2022):

$$A_t = A_0 e^{-k_d t} \Rightarrow \ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = -k_d t \quad (\text{Εξ. 1})$$

Όπου

$A_t \left(\frac{\text{Units}}{\text{mg πρωτεΐνης}}\right)$ : η ενεργότητα του ενζύμου σε χρόνο επώασης  $t$

$A_0 \left(\frac{\text{Units}}{\text{mg πρωτεΐνης}}\right)$ : η αρχική ενεργότητα του ενζύμου

$k_d \text{ (min}^{-1}\text{)}$ : σταθερά θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου

$t \text{ (min)}$ : ο χρόνος επώασης του ενζύμου

Ο χρόνος ημιζωής ( $t_d$ ) είναι ο χρόνος που απαιτείται, ώστε η δραστηριότητα του ενζύμου να μειωθεί στο 50% της αρχικής και υπολογίζεται από την Εξίσωση 2 (Natividad Ortega, 2022).

$$t_d = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (\text{Εξ. 2})$$

Όπου

$t_d \text{ (min)}$ : ο χρόνος ημιζωής

$k_d \text{ (min}^{-1}\text{)}$ : η σταθερά θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου

Ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού  $D$  ( $D$  – value, decimal reduction of time) ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται, ώστε η αρχική ενεργότητα του ενζύμου να μειωθεί κατά 90%, σε μία

συγκεκριμένη θερμοκρασία και υπολογίζεται σύμφωνα με την Εξίσωση 3 (Natividad Ortega, 2022).

$$D = \frac{\ln 10}{k_d} \quad (\text{Εξ. 3})$$

Όπου

D (min): ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού

$k_d$  ( $\text{min}^{-1}$ ): σταθερά θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου

Η Εξίσωση 1 προσαρμόστηκε στα δεδομένα, όπως αυτά παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3, για τις τέσσερις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν και προέκυψαν οι αντίστοιχες σταθερές θερμικής απενεργοποίησης της BsGH5 για την κάθε θερμοκρασία (Πίνακας 13). Με βάση τις σταθερές αυτές υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες τιμές του χρόνου ημιζωής και του χρόνου υποδεκαπλασιασμού, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.

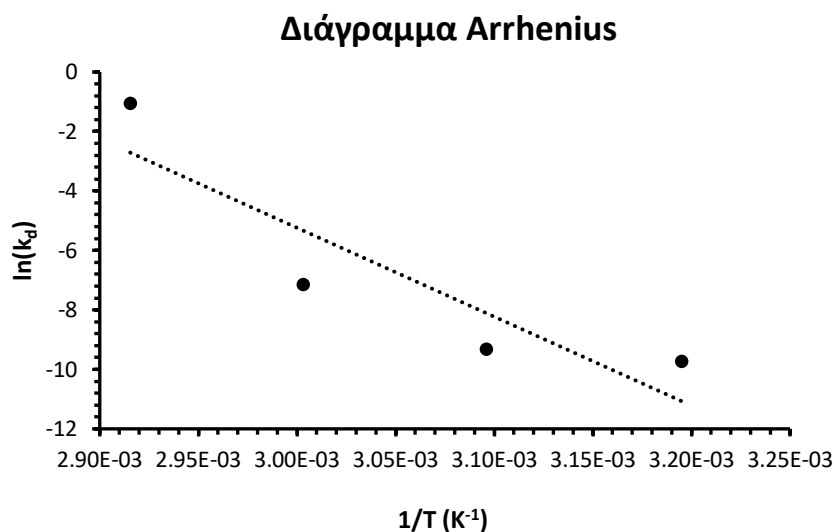
Πίνακας 13. Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης της BsGH5.

Θερμοκρασία (°C)	$k_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_d$ (min)	D (min)
40	$6.0 \cdot 10^{-5}$	11600	38400
50	$9.0 \cdot 10^{-5}$	7700	25600
60	$8.0 \cdot 10^{-4}$	866	2880
70	$3.51 \cdot 10^{-1}$	1.97	6.56

Παρατηρείται, ότι ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου μειώνεται με αύξηση της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης, η οποία οφείλεται στην άνοδο της θερμοκρασίας. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 13, υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ της μέγιστης και της ελάχιστης θερμοκρασίας. Πιο συγκεκριμένα, ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου στους 70°C είναι περίπου 2 λεπτά (στα 8 λεπτά απενεργοποιείται), ενώ στους 40°C είναι 11600 λεπτά ή αλλιώς 193 ώρες (8 περίπου ημέρες). Κατά αντιστοιχία, στους 50°C ο χρόνος ημιζωής είναι 7700 λεπτά ή αλλιώς 128 ώρες (5 περίπου ημέρες). Οι τιμές αυτές υποδηλώνουν, ότι η BsGH5 είναι μία μεσόφιλη πρωτεΐνη.

Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης της BsGH5 ( $E_{\alpha_d}$ ) προκύπτει από την προσαρμογή των δεδομένων του Πίνακα 13 στην εξίσωση του Arrhenius (Εξίσωση 4) και την κατασκευή του αντίστοιχου διαγράμματος (Διάγραμμα 4).

$$\ln(k_d) = \frac{E_{\alpha_d}}{R} \left( \frac{1}{T} \right) \quad (\text{Εξ. 4})$$



Διάγραμμα 4. Διάγραμμα Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης,  $E_{\alpha_d}$ .

Έτσι, υπολογίζεται, ότι  $E_{\alpha_d} = 248.6 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ . Η υψηλή τιμή της ενέργειας αυτής υποδηλώνει, ότι απαιτούνται μεγάλα ποσά ενέργειας, ώστε να καταστραφεί η τριτοταγής/τεταρτοταγής δομή της πρωτεΐνης και να επέλθει η μετουσίωσή της.

Για την κατανόηση της διαδικασίας της απενεργοποίησης και της συμπεριφοράς των μορίων του ενζύμου είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη άλλων θερμοδυναμικών παραμέτρων. Πιο συγκεκριμένα, οι θερμοδυναμικές παράμετροι της θερμικής απενεργοποίησης της BsGH5 υπολογίστηκαν με βάση τις Εξισώσεις 5-9 (Henry. Eyring, 1939).

$$k_d = \left( \frac{k_b \cdot T}{h} \right) \cdot e^{-\frac{\Delta H^*}{RT}} \cdot e^{\frac{\Delta S^*}{R}} \quad (\text{Εξ. 5})$$

Όπου

$k_d$  (min<sup>-1</sup>): η σταθερά θερμικής απενεργοποίησης της BsGH5

$k_b$  ( $1.4 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}$ ): η σταθερά του Boltzmann

$T$  (K): η απόλυτη θερμοκρασία

$h$  ( $1.1 \cdot 10^{-35} \text{ J} \cdot \text{min}$ ): η σταθερά του Plank

$\Delta H^*$  ( $\frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ ): η μεταβολή της ενθαλπίας απενεργοποίησης

$\Delta S^*$  ( $\frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$ ): η μεταβολή της εντροπίας απενεργοποίησης



$R \left( 8.314 \frac{\text{J}}{\text{mol}\cdot\text{K}} \right)$ : η παγκόσμια σταθερά των αερίων

$$\Delta H^* = E_{\alpha_d} - R \cdot T \quad (\text{Εξ. 6})$$

Όπου

$E_{\alpha_d} \left( \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$ : η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης

Η ελεύθερη ενέργεια απενεργοποίησης δίνεται από την Εξίσωση 7.

$$\Delta G^* = -R \cdot T \cdot \ln \left( \frac{k_d h}{k_b T} \right) \quad (\text{Εξ. 7})$$

Συνεπώς,

$$\Delta S^* = \frac{\Delta H^* - \Delta G^*}{T} \quad (\text{Εξ. 8})$$

Τα αποτελέσματα των υπολογισμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης της B5GH5.

T (°C)	$\Delta H^*$ (kJ·mole <sup>-1</sup> )	$\Delta G^*$ (kJ·mole <sup>-1</sup> )	$\Delta S^*$ (J·mole <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
40	246.0	112.7	425.6
50	245.9	115.3	404.1
60	245.8	113.0	398.9
70	245.7	99.1	427.5

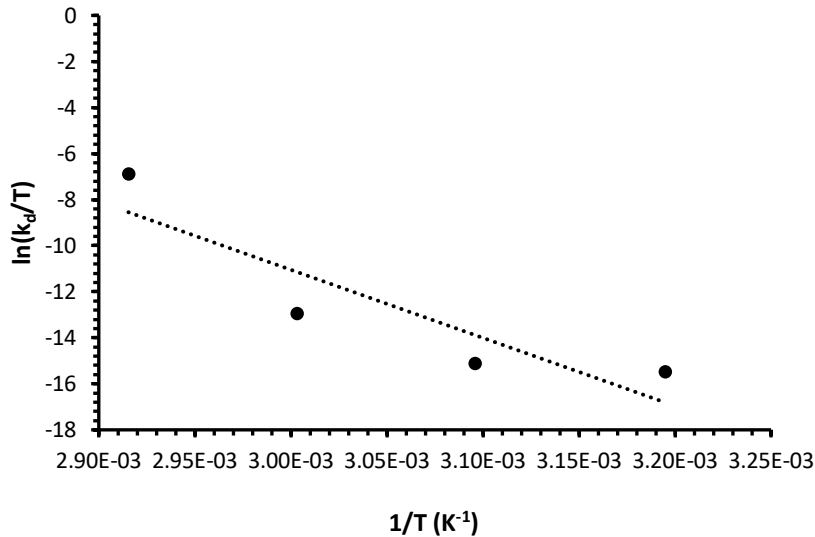
Με τροποποίηση της Εξίσωσης 4, λαμβάνεται η Εξίσωση 9.

$$\ln \left( \frac{k_d}{T} \right) = \ln \left( \frac{k_b}{h} \right) + \frac{\Delta S^*}{R} - \frac{\Delta H^*}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (\text{Εξ. 9})$$

Έτσι, με προσαρμογή της εξίσωσης στα δεδομένα για το εύρος θερμοκρασιών 40 – 70°C (Διάγραμμα 5), υπολογίστηκαν οι τιμές των  $\Delta H^*$  και  $\Delta S^*$  και βρέθηκαν ίσες με:

$$\Delta H^* = 245.8 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

$$\Delta S^* = 414.0 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$$



Διάγραμμα 5. Υπολογισμός των μεταβολών της ενθαλπίας απενεργοποίησης,  $\Delta H^*$  και της εντροπίας απενεργοποίησης,  $\Delta S^*$ , της BsGH5 για το εύρος θερμοκρασιών 40 – 70°C.

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τις τιμές αυτές θα μπορούσαν να αποτελέσουν υπόβαθρο για την επιλογή των συνθηκών λειτουργίας μίας βιομηχανικής εφαρμογής, ώστε να επιτευχθούν τα βέλτιστα επίπεδα δραστηριότητας (N. Ortega, 2004).

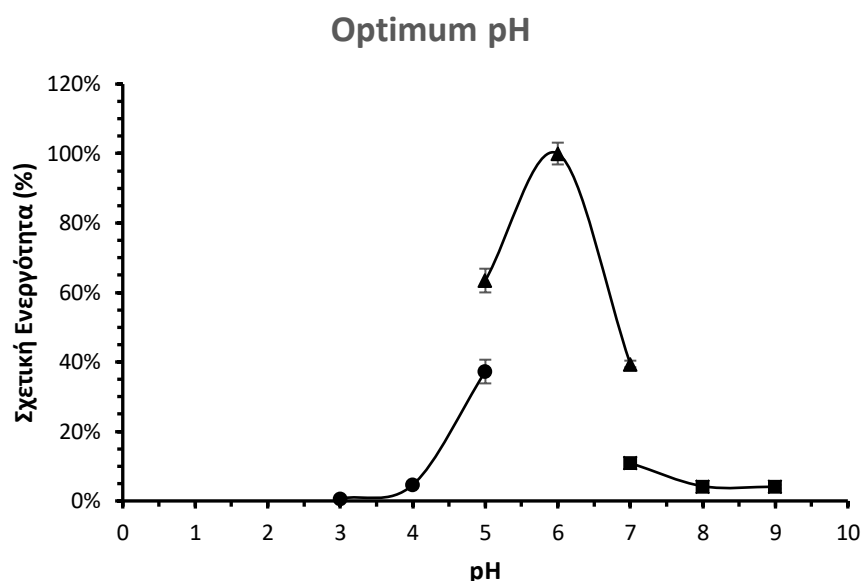
Η χρήση των ενζύμων σε βιομηχανικές διεργασίες μπορεί να απαιτεί τη διεξαγωγή αντιδράσεων σε υψηλές θερμοκρασίες για τη βελτίωση της παραγωγικότητας και τη μείωση των μικροβιακών μολύνσεων. Έτσι, προτιμάται τα ένζυμα αυτά να είναι σχετικά θερμοσταθερά ή σε αντίθετη περίπτωση να υπάρχει το ενδεχόμενο βελτίωσης της σταθερότητάς τους σε υψηλές θερμοκρασίες, μέσω μελέτης του μηχανισμού θερμικής απενεργοποίησής τους (N. Ortega, 2004).

Η διαδικασία απενεργοποίησης του ενζύμου λαμβάνει χώρα σε δύο βήματα. Το πρώτο είναι αναστρέψιμο και αφορά στον σχηματισμό της μεταβατικής κατάστασης της ξεδιπλωμένης πρωτεΐνης, ενώ το δεύτερο είναι η μη αναστρέψιμη μετουσίωση της πρωτεΐνης (M.A. Mohamed, 2021). Κατά τη διάρκεια της θερμικής απενεργοποίησης γίνονται διάφορες αλλαγές στην διαμόρφωση του ενζύμου και στις αλληλεπιδράσεις των μορίων του με το εξωτερικό περιβάλλον. Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με τη μεταβολή της εντροπίας ( $\Delta S$ ), με την πτώση αυτής σε ορισμένες θερμοκρασίες να σημαίνει μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα του ενζύμου. Η μεταβολή της ενθαλπίας παρέχει μία εικόνα του αριθμού των μη ομοιοπολικών δεσμών που διασπώνται. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της, τόσο περισσότεροι ομοιοπολικοί δεσμοί υπάρχουν και άρα τόσο πιο σταθερό είναι το μόριο. Η ελεύθερη ενέργεια Gibbs ( $\Delta G$ ) εκφράζει το κατά πόσο η αντίδραση

απενεργοποίησης συμβαίνει αυθόρμητα. Μία πολύ μεγάλη τιμή αυτής υποδηλώνει, ότι η αντίδραση είναι λιγότερο αυθόρμητη και συνεπώς, η αντοχή του ενζύμου στην εκάστοτε θερμοκρασία είναι αυξημένη (M.A. Mohamed, 2021).

### 3.4.3. Βέλτιστο pH δράσης

Το βέλτιστο pH δράσης της BsGH5 βρέθηκε ίσο με 6, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 6.

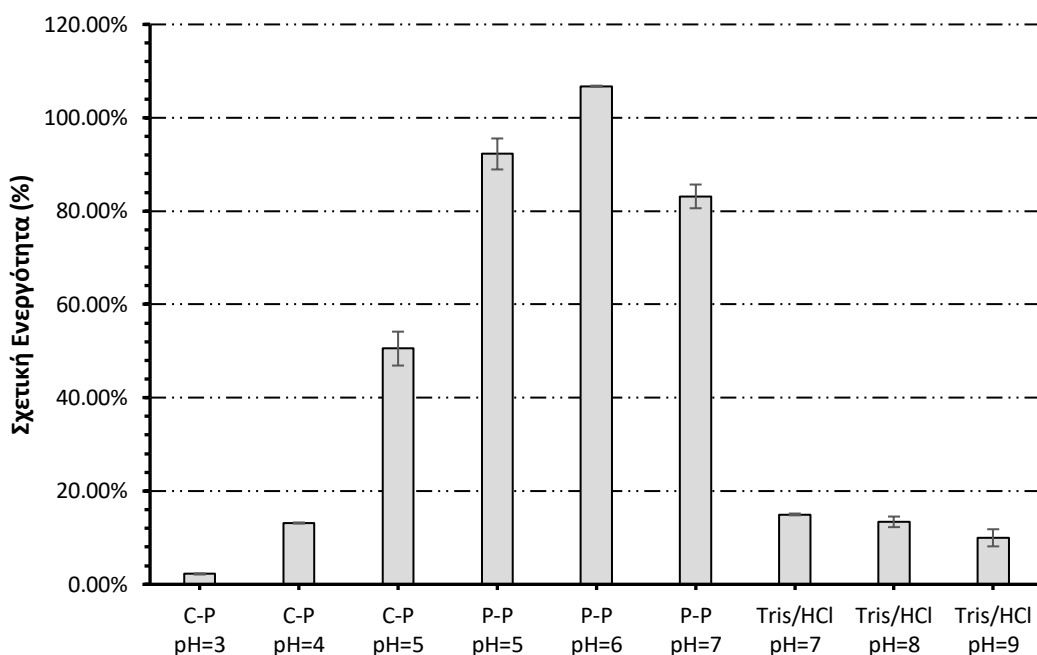


Διάγραμμα 6. Επίδραση του pH στη δραστικότητα της BsGH5, όπου (●) ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών φωσφορικών σε pH 3 – 5, (▲) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε pH 5 – 7 και (■) ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl σε pH 7 – 9.

Παρατηρείται, ότι η BsGH5 διατηρεί το 63% της αρχικής της ενεργότητας σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 5, ενώ σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών φωσφορικών με το ίδιο pH η δραστικότητα της έχει μειωθεί στο 37%. Παρόμοια μείωση εντοπίζεται κατά την επώαση του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 7. Περαιτέρω αύξηση ή ελάττωση του pH φαίνεται να οδηγεί σχεδόν στην απενεργοποίηση της BsGH5. Μία GH5 β-μαννανάση (Man5HJ14) από τον βάκιλο *Bacillus* sp. HJ14 παρουσιάζει βέλτιστη δραστικότητα σε pH ίσο με 6.5 (Rui Zhang, 2016), ενώ η GH5 ενδογλουκανάση (BaGH5-WT) από τον βάκιλο *Bacillus amyloliquefaciens* SS35 έχει μέγιστη δράση σε τιμές pH 5.5-6.0 (Shweta Singh, 2020).

### 3.4.4. Σταθερότητα pH

Η BsGH5 παρουσιάζει ικανοποιητική σταθερότητα σε τιμές pH από 5 έως 7, καθώς, με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, η σχετική ενεργότητά της διατηρείται πάνω από το 80% της αρχικής, μετά από επώαση στους 4°C για 24 ώρες (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7. Σταθερότητα της BsGH5 σε διάφορες τιμές pH μετά από επώαση στους 4°C για 24 ώρες, με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων κιτρικών – φωσφορικών (c – p), φωσφορικών (p – p) και Tris/HCl.

Πιο συγκεκριμένα, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=5 το ένζυμο διατηρεί το 92% της αρχικής ενεργότητάς του μετά το πέρας των 24 ωρών, ενώ στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε pH=7 η εναπομείνουσα ενεργότητα προσεγγίζει το 83% της αρχικής. Αντίθετα, παρατηρείται, ότι μετά την επώαση στα άλλα δύο είδη ρυθμιστικών διαλυμάτων, η BsGH5 χάνει σημαντικό μέρος της ενεργότητάς της και στις περισσότερες περιπτώσεις σχεδόν απενεργοποιείται. Στα ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικών – φωσφορικών με pH ίσο με 3, 4 και 5, η εναπομείνουσα ενεργότητα του ενζύμου είναι το 2%, 13% και 51% της αρχικής, ενώ σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl με pH 7, 8 και 9 το ένζυμο έχει χάσει το 85%, 87% και 90% της ενεργότητάς του.

### 3.4.5. Εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα

Μελετήθηκε η ικανότητα της BsGH5 να δράσει σε διαφορετικά υποστρώματα. Τα υποστρώματα που μελετήθηκαν ήταν τα εξής:

13. β – γλουκάνη
14. Λιχενάνη
15. Ξυλάνη βρώμης (Oat Spelt Xylan)
16. Αραβινοξυλάνη (Arabinoxylan)
17. Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel, εξωγλουκανάση)
18. Επεξεργασμένη κυτταρίνη με φωσφορικό οξύ (PASC)
19. Καρβοξυμέθυλ – κυτταρίνη (CMC, ενδογλουκανάση)
20. p – nitrophenyl – β – D – Glycopyranoside
21. p – nitrophenyl – α – D – Glycopyranoside
22. p – nitrophenyl – α – D – Galactopyranoside
23. o – nitrophenyl – β – D – Galactopyranoside
24. p – nitrophenyl – β – D – Xylopyranoside
25. Filter paper (ολική ενεργότητα κυτταρινασών)

Η σχετική ενεργότητα του ενζύμου για το υπόστρωμα της β – γλουκάνης θεωρήθηκε ως το 100% και με βάση αυτήν υπολογίστηκε η εναπομείνουσα ενεργότητα μετά τη χρήση των υπολοίπων υποστρωμάτων (Πίνακας 15).

Πίνακας 15. Σχετική ενεργότητα της BsGH5 σε διάφορα υποστρώματα.

Υπόστρωμα	Σχετική Ενεργότητα (%)
β – γλουκάνη	100.00 ± 8.00
PASC	56.00 ± 4.80
Ξυλάνη βρώμης	15.68 ± 2.08
Λιχενάνη	9.76 ± 1.12
p – nitrophenyl – β – D – Glycopyranoside	4.56 ± 0.72
p – nitrophenyl – α – D – Glycopyranoside	2.56 ± 0.32
p – nitrophenyl – β – D – Xylopyranoside	2.48 ± 0.56
o – nitrophenyl – β – D – Galactopyranoside	2.16 ± 0.88
p – nitrophenyl – α – D – Galactopyranoside	1.52 ± 0.24
Καρβοξυμέθυλ – κυτταρίνη (CMC)	0
Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel)	0
Αραβινοξυλάνη	0
Filter paper	0

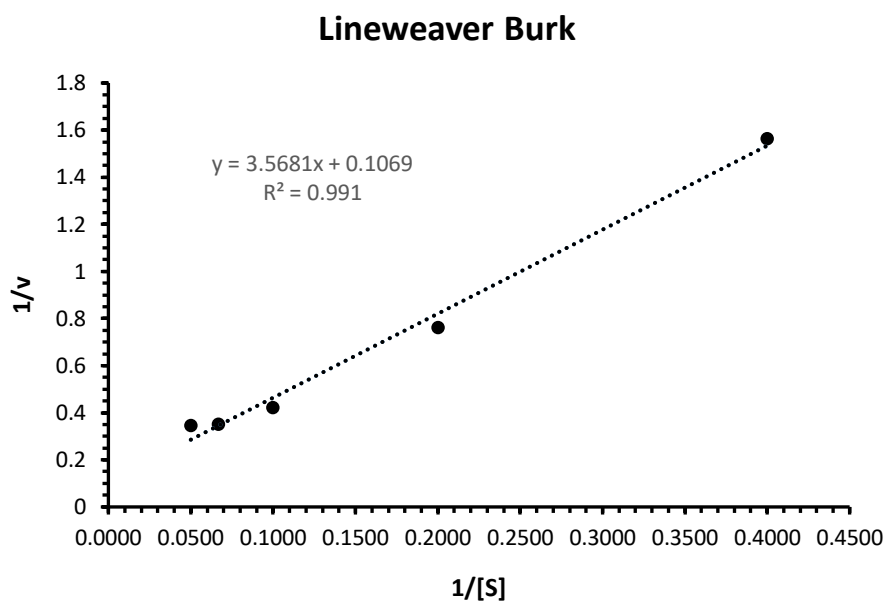
Στην παρούσα μελέτη, η BsGH5 εμφάνισε τη μέγιστη δραστικότητα στο υπόστρωμα της β-γλουκάνης. Σημειώνεται, ότι δεν παρατηρήθηκε δραστικότητα σε κυτταρινούχα υποστρώματα, ενώ κατά τη χρήση επεξεργασμένης κυτταρίνης (PASC) το ένζυμο παρουσίασε μείωση της ενεργότητάς του κατά 40% περίπου.

Κατόπιν συγκρίσεως με ένζυμα που έχουν μελετηθεί, η ενδογλουκανάση BaGH5-WT από τον μικροοργανισμό *Bacillus amyloliquefaciens* SS35 έδειξε την υψηλότερη ειδική ενεργότητα στο υπόστρωμα της β – D – γλουκάνης κριθαριού, ακολουθούμενη από λιχενάνη, CMC και κρυσταλλικό κυτταρινικό υπόστρωμα Avicel. Αντίθετα, δεν έδειξε καμία ανιχνεύσιμη δράση έναντι της κελλοβιόζης, της λαμιναρίνης και της ξυλάνης βρώμης (Shweta Singh, 2020). Το Cel5A από τον μικροοργανισμό *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 εμφάνισε υψηλή δραστικότητα στο υπόστρωμα της β – γλουκάνης από κριθάρι, ενώ δεν φάνηκε να υδρολύει το Avicel (Chaoning Liang, 2011).

### 3.4.6. Κινητικές παράμετροι υδρόλυσης της β – γλουκάνης από την BsGH5

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών  $K_m$  (σταθερά Michaelis – Menten) και  $v_{max}$  της BsGH5 ήταν η β – γλουκάνη. Οι δύο σταθερές προέκυψαν με προσαρμογή της εξίσωσης (Εξ. 10) στα δεδομένα, στην οποία στηρίζεται η διαφορική μέθοδος Lineweaver – Burk και την κατασκευή του αντίστοιχου διαγράμματος (Διάγραμμα 8).

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (\text{Εξ. 10})$$



Διάγραμμα 8. Διάγραμμα Lineweaver – Burk για τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών,  $K_m$  και  $v_{max}$ .

Συνεπώς, οι κινητικές σταθερές έχουν τιμές:

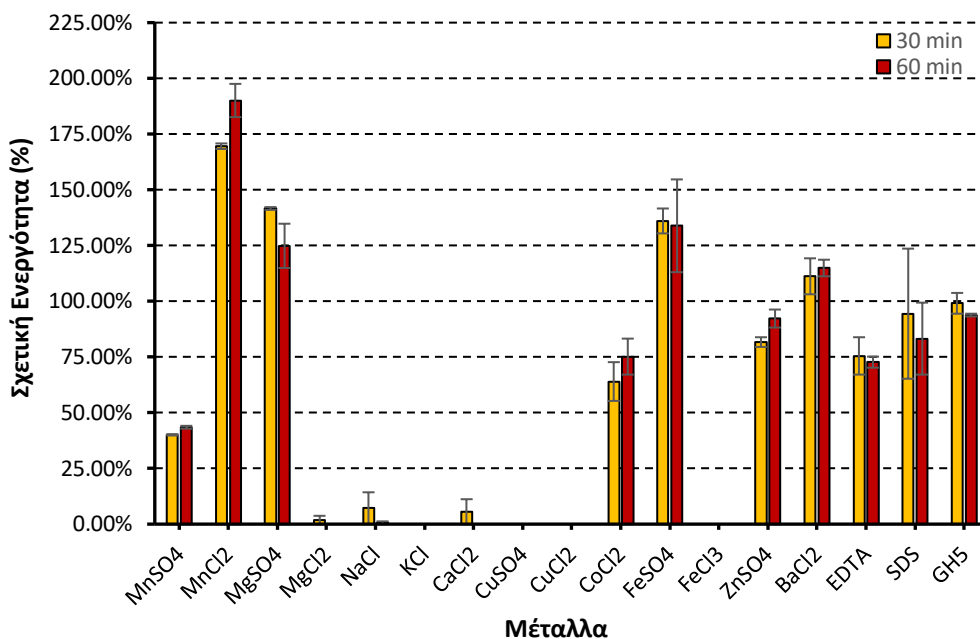
$$K_m = 33.38 \text{ (mg/mL)}$$

$$v_{max} = 9.35 \text{ U/mL}$$

Για την ενδογλουκανάση BaGH5-WT από τον μικροοργανισμό *Bacillus amyloliquefaciens* SS35 υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες κινητικές σταθερές, με χρήση δύο διαφορετικών υποστρωμάτων, του CMC-Na και της β-D-γλουκάνης. Έτσι, προκύπτουν οι τιμές  $K_{m\text{CMC-Na}} = 0.38 \pm 0.11 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ ,  $K_{m\beta\text{-D-glucan}} = 0.15 \pm 0.04 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ ,  $v_{\text{maxCMC-Na}} = 6.0 \pm 0.6 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$ ,  $v_{\text{max}\beta\text{-D-glucan}} = 11.71 \pm 0.9 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$  (Shweta Singh, 2020).

### 3.4.7. Επίδραση ιόντων μετάλλων

Η επίδραση των μεταλλοϊόντων και των χημικών ενώσεων EDTA και SDS στη δραστηριότητα του ενζύμου παρουσιάζονται σε ραβδόγραμμα (Διάγραμμα 9).



Διάγραμμα 9. Ραβδόγραμμα της % εναπομείνουσας σχετικής ενεργότητας της BsGH5 ύστερα από την επώαση της σε διάφορα μεταλλοϊόντα αλλά και στις χημικές ενώσεις EDTA και SDS στους 30°C για 30 (κίτρινο) και 60 (κόκκινο) λεπτά.

Παρατηρείται, ότι η παρουσία των ιόντων  $Mn^{2+}$  ( $MnCl_2$ ),  $Mg^{2+}$  ( $MgSO_4$ ),  $Fe^{2+}$  και  $Ba^{2+}$  ενεργοποιούν την BsGH5 και για τους δύο χρόνους επώασης, ενώ όλα τα υπόλοιπα ιόντα έχουν ανασταλτική δράση. Το ένζυμο φαίνεται να αδρανοποιείται πλήρως υπό την επίδραση των ιόντων  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  (και στα δύο είδη μετάλλων),  $Fe^{3+}$  αλλά και του  $Mg^{2+}$  από το μέταλλο  $MgCl_2$ , το οποίο έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τη συμπεριφορά που έχει το ένζυμο κατά την παρουσία του  $MgSO_4$ . Παρόμοια συμπεριφορά εντοπίζεται και κατά τη χρήση του  $Mn^{2+}$ , όπου, όπως αναφέρθηκε, όταν αυτό προέρχεται από το μέταλλο  $MnCl_2$ , η ενεργότητα σχεδόν διπλασιάζεται, ενώ όταν προέρχεται από το  $MnSO_4$ , η εναπομείνουσα ενεργότητα προσεγγίζει το 40% της αρχικής. Παρουσία των ιόντων  $Co^{2+}$  και  $Zn^{2+}$  η BsGH5 διατηρεί το 60 – 70% και το 80 – 90% της αρχικής ενεργότητάς της.

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας SDS φαίνεται να έχει ελάχιστη επίδραση στο ένζυμο, καθώς η σχετική ενεργότητά του ανέρχεται περίπου στο 90% της αρχικής, ενώ κατά την παρουσία του EDTA η εναπομείνουσα ενεργότητα είναι περίπου το 75% της αρχικής.

Όσον αφορά στην ενδογλουκανάση CHU\_2103 από τον μικροοργανισμό *Cytophaga hutchinsonii*, υπό την παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$  και  $Zn^{2+}$  η ενεργότητά της αυξήθηκε κατά 30%, ενώ υπό την παρουσία ιόντων  $Mg^{2+}$  και  $Mn^{2+}$  μειώθηκε κατά 50% (Cong Zhang, 2014). Επιπρόσθετα, η καταλυτική δραστηριότητα της  $\beta$ -1,4-μαννανάσης rManH από τον



μικροοργανισμό *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 αυξήθηκε από την παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  και  $\text{Ba}^{2+}$ , ενώ το  $\text{I}$ ;on  $\text{Mg}^{2+}$  δεν είχε καμία επίδραση σε αυτήν. Σημαντική αναστολή της δράσης του ενζύμου παρατηρήθηκε από τα ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  και  $\text{Fe}^{2+}$  (Do Young Kim, 2011).

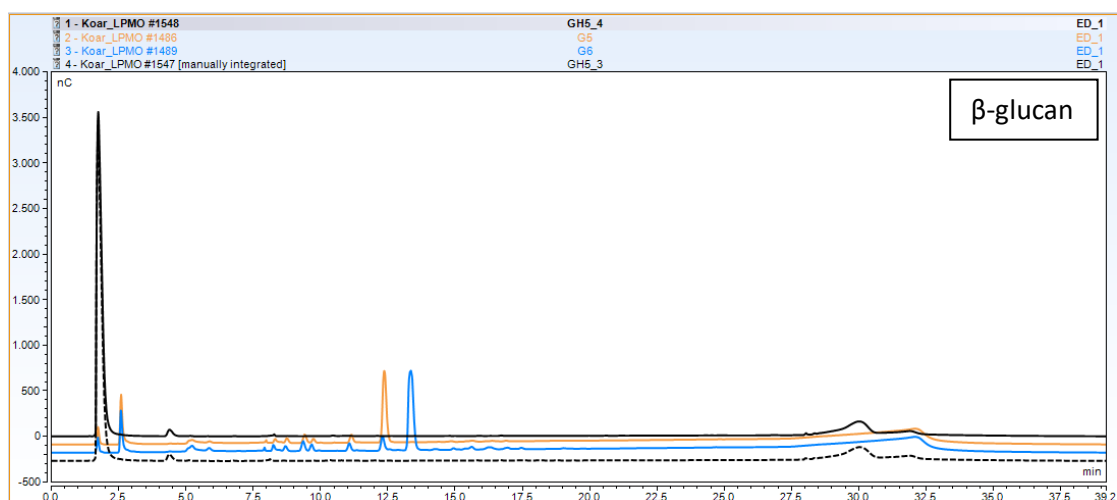
### 3.4.8. Προϊόντα Υδρόλυσης

Μελετήθηκε η υδρόλυση της β-γλουκάνης, με σκοπό τον προσδιορισμό των κύριων προϊόντων που προκύπτουν μετά από 2, 6, 10, 24 και 48 ώρες υδρόλυσης. Τα αποτελέσματα της υδρόλυσης λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφημάτων, όπου κάθε κορυφή αντιστοιχεί και σε ένα προϊόν. Για την ερμηνεία της εκάστοτε κορυφής, απαιτείται σύγκριση με πρότυπα χρωματογραφήματα προϊόντων με γνωστούς χρόνους έκλυσης των σακχάρων.

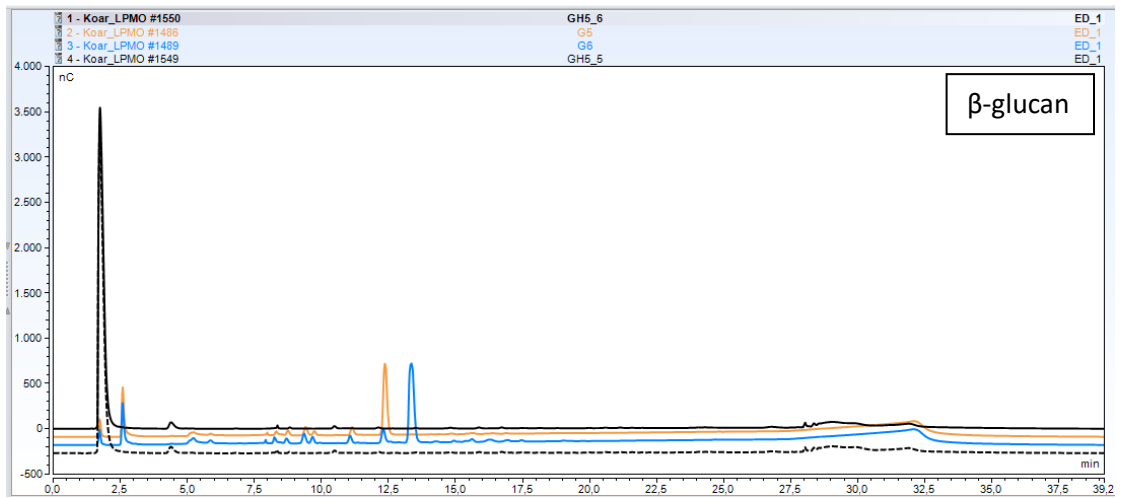
Οι κορυφές των γραφημάτων που εμφανίζονται πριν τα 2.5 λεπτά ανάλυσης δεν αντιστοιχούν σε κάποιο προϊόν υδρόλυσης, καθώς πρόκειται για το ίδιο το ένζυμο, το οποίο εκλύεται από το δείγμα. Η έκλυση των φυσικών σακχάρων πραγματοποιείται μεταξύ των πρώτων 5-15 λεπτών ανάλυσης, ενώ σε χρόνους μεγαλύτερους των 30 λεπτών υφίσταται έκλυση αλάτων που πιθανώς προέρχονται από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH=6), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί για την αραίωση του ενζύμου.

Στα παρακάτω χρωματογραφήματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα προϊόντα υδρόλυσης μετά από αντίστοιχους χρόνους επώασης (Εικόνα 20).

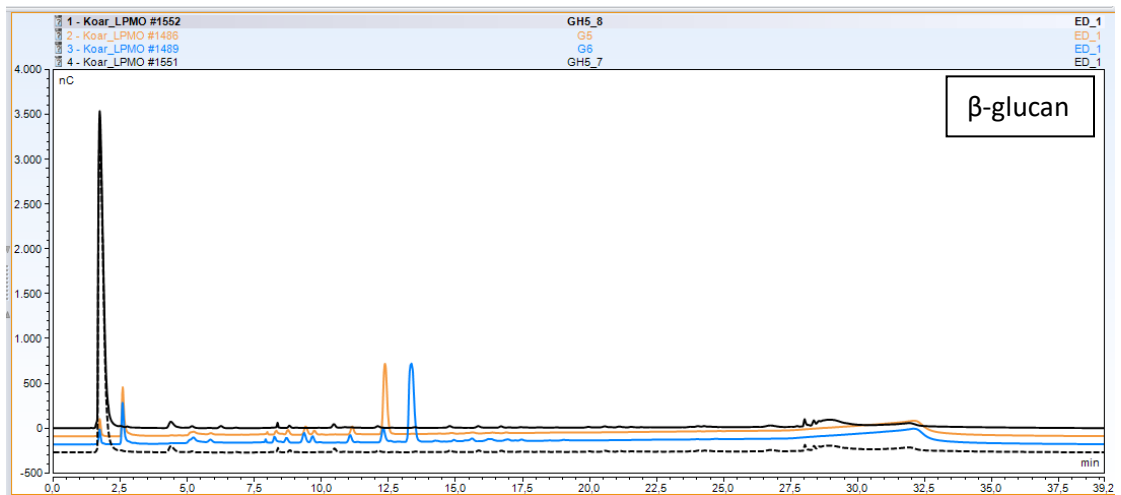
#### ► 2 ώρες αντίδρασης



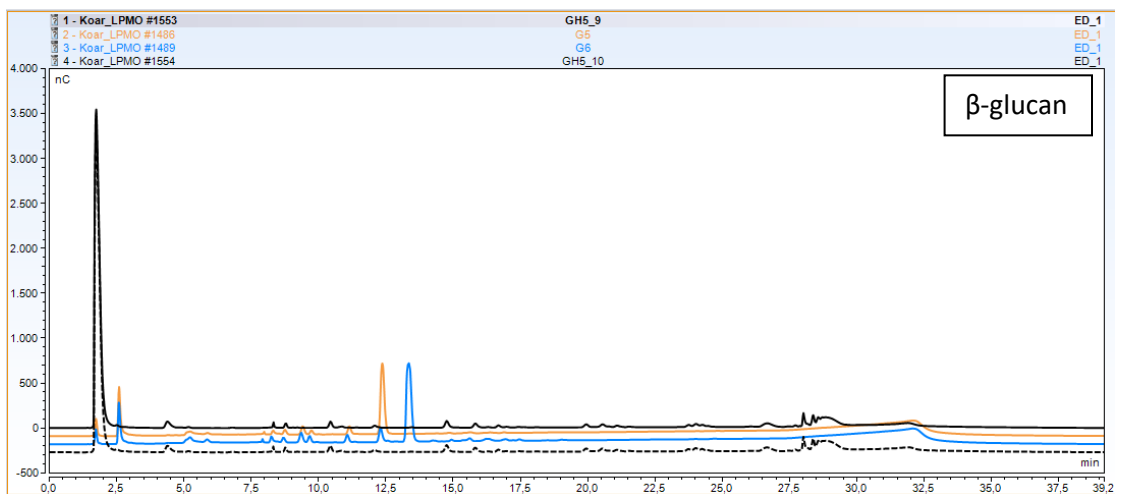
► 6 ώρες αντίδρασης



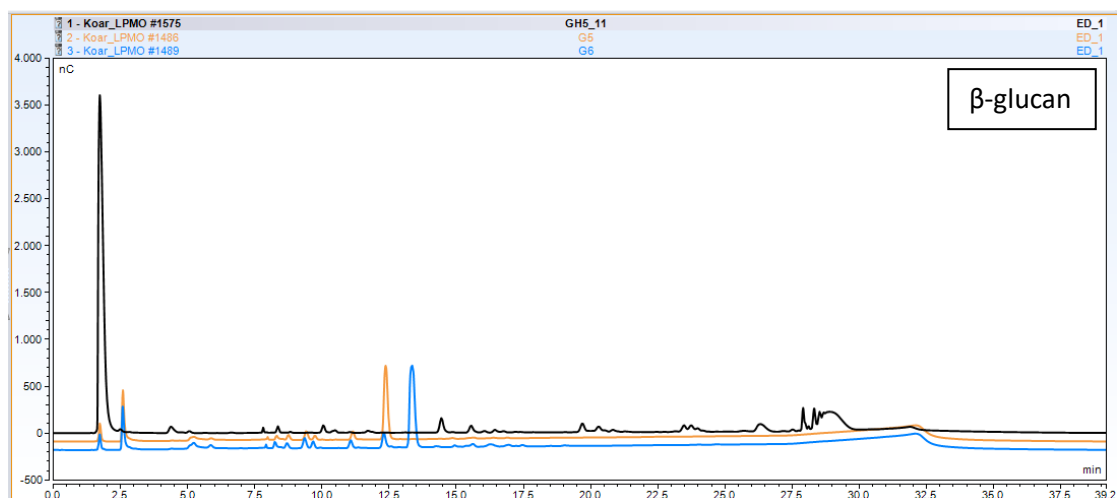
► 10 ώρες αντίδρασης



► 24 ώρες αντίδρασης



► 48 ώρες αντίδρασης



Εικόνα 20. Αποτελέσματα της υδρόλυσης της β-γλουκάνης από την BsGH5 που λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματων. Κάθε χρωματογράφημα αναφέρεται στον αντίστοιχο χρόνο αντίδρασης που φαίνεται στο πάνω αριστερό του μέρος.

Με βάση τα χρωματογραφήματα λαμβάνονται κορυφές περίπου στα 5, 8, 8.5 και 10.5 λεπτά, οι οποίες αντιστοιχούν στους πολυσακχαρίτες γλυκόζη, κελλοβιόζη (διμερές γλυκόζης), κελλοτριόζη (τριμερές γλυκόζης) και κελλοτετραόζη (τετραμερές γλυκόζης), αντίστοιχα. Παρατηρείται, ότι η κορυφή της γλυκόζης έχει σταθερό ύψος από τις 2 ώρες αντίδρασης και έπειτα, γεγονός που υποδηλώνει, ότι η συγκέντρωση της παραμένει σταθερή, χωρίς να παράγεται περαιτέρω ποσότητα αυτής. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις των άλλων σακχάρων αυξάνονται όσο μεγαλώνει ο χρόνος της υδρόλυσης της β-γλουκάνης. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί, ότι όλες οι κορυφές, ανεξάρτητα από τον χρόνο αντίδρασης, είναι αρκετά χαμηλές, το οποίο μπορεί να οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση της β-γλουκάνης στο αρχικό μίγμα της αντίδρασης υδρόλυσης.

### 3.4.9. Ρόφηση και Παραγωγικότητα της BsGH5

Η ικανότητα ρόφησης της BsGH5 στη μικροκρυσταλλική κυτταρίνη Avicel μελετήθηκε για δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16. Αρχική, μη προσροφημένη και προσροφημένη πρωτεΐνη μετά από επώαση στους 40°C για 1 ώρα.

Αρχική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης (mg/mL)	Μη Προσροφημένη Πρωτεΐνη (mg/mL)	Προσροφημένη πρωτεΐνη (mg/mL)
1	0.58	0.42
2	1.16	0.84

Παρατηρείται, ότι και για τις δύο αρχικές συγκεντρώσεις του ενζύμου, η δέσμευση της πρωτεΐνης στην κυτταρίνη πραγματοποιείται κατά ποσοστό ελαφρώς μικρότερο από 50%. Αξίζει να αναφερθεί, ότι κατά τον διπλασιασμό της αρχικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, προκαλείται ανάλογη μεταβολή και στην ποσότητα αυτής που έχει προσροφηθεί.

Ωστόσο, η προσπάθεια προσδιορισμού της παραγωγικότητας της BsGH5 μέσω υδρόλυσης διαλύματος PASC, οδήγησε σε έναν εξαιρετικά υψηλό λόγο αναγωγικών σακχάρων στο υπερκείμενο προς τα αναγωγικά σάκχαρα του ιζήματος, γεγονός που υποδηλώνει τη μη παραγωγικότητα του συγκεκριμένου ενζύμου.

Βιβλιογραφικά αναφέρεται, ότι τόσο η παραγωγικότητα, όσο και η ικανότητα πρόσδεσης ενός ενζύμου σε κάποια κυτταρίνη, εξαρτώνται άμεσα από την ύπαρξη μίας καταλυτικής περιοχής και διαφορετικών περιοχών δέσμευσης κυτταρίνης (Cong Zhang, 2014) (Diana C. Irwin, 1993). Συνεπώς, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, είτε η BsGH5 στερείται αυτού του είδους την καταλυτική περιοχή είτε αυτή υπάρχει, αλλά είναι εξαιρετικά ασθενής.

## 4. Συμπεράσματα

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η κλωνοποίηση, η απομόνωση, η υπερέκφραση και ο πλήρης βιοχημικός χαρακτηρισμός της β-γλουκανάσης της οικογένειας GH5 από τον μικροοργανισμό *Bacillus safensis* (ATHUBA63) της εθνικής βιβλιοθήκης στελεχών του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Το γονίδιο της BsGH5 απομονώθηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) από καλλιεργημένα κύτταρα του μικροοργανισμού *Bacillus safensis* και κατόπιν αλληλουχισής του προέκυψε η νουκλεοτιδική και η αμινοξική του αλληλουχία. Στη συνέχεια, ακολούθησε ανασυνδυασμός και μετασχηματισμός του γονιδίου, με χρήση του πλασμιδίου pET-15b, σε δεκτικά κύτταρα *E. Coli* DH5a και ύστερα σε δεκτικά κύτταρα *E. Coli* BL21. Η απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε μέσω χρωματογραφίας συγγένειας λόγω των 6 ιστιδίνων στο τέλος του μορίου της και καθαρίστηκε περαιτέρω.

Μέσω βιοπληροφορικής μελέτης της αμινοξικής αλληλουχίας της BsGH5, προέκυψε η πιθανή τριτοταγής δομή της ((β/α)<sub>8</sub> TIM – barrel), το μοριακό της βάρος (43.016 kDa) και ο χημικός της τύπος (C<sub>1948</sub>H<sub>2871</sub>N<sub>527</sub>O<sub>566</sub>S<sub>9</sub>). Επιπλέον, με χρήση του προγράμματος UniProt πραγματοποιήθηκε σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της ενδογλουκανάσης με άλλες καταχωρημένες αλληλουχίες πρωτεϊνών και προέκυψε, ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας κατέχουν δύο ένδο-1,4-β-μαννοζιδάσες που προέρχονται από τους μικροοργανισμούς *Bacillus safensis* (A0A5C0WLE0, 97% ομοιότητα) και *Bacillus licheniformis* (Q65J16, 73% ομοιότητα).

Στη συνέχεια, η απομονωμένη πρωτεΐνη υπέστη ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-Page και προσδιορίστηκε το μοριακό της βάρος (≈45 kDa), το οποίο είναι αρκετά κοντά με αυτό που προέκυψε από τη βιοπληροφορική μελέτη. Κατά αντιστοιχία, η GH5 β-μαννανάση Man5HJ14 από τον βάκιλο *Bacillus* sp. HJ14 εμφανίζεται να έχει μοριακό βάρος ίσο με 43.2 kDa (Rui Zhang, 2016), ενώ η GH5 β-μαννανάση rManH από το βακτήριο *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 έχει μοριακό βάρος γύρω στα 44 kDa.

Έπειτα, προσδιορίστηκε η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της BsGH5, η οποία είναι ίση με 60°C. Παρόμοια συμπεριφορά με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, παρουσιάζουν η μεσόφιλη ενδογλουκανάση Cel5 από τον μικροοργανισμό *Stegonsporium opalus* (SoCel5) με βέλτιστη θερμοκρασία τους 60°C (Fei Zheng, 2019), η GH5 ενδογλουκανάση BaGH5-WT από τον βάκιλο *Bacillus amyloliquefaciens* SS35 με βέλτιστη δράση σε θερμοκρασία ίση με 55°C

(Shweta Singh, 2020) και η GH5 β-μαννανάση Man5HJ14 από τον βάκιλο *Bacillus* sp. HJ14 με βέλτιστη θερμοκρασία τους 65°C (Rui Zhang, 2016).

Ακολούθως, μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα του ενζύμου για θερμοκρασίες εντός του εύρους 40-70°C. Για τη θερμοκρασία των 70°C η ενεργότητα της BsGH5 σχεδόν μηδενίζεται στα πρώτα 8 λεπτά της επώασης, στους 60°C το ένζυμο απενεργοποιείται μετά από 48 ώρες, στους 50°C η ενεργότητα διατηρείται στο 66% της αρχικής μετά από επώαση για 3 μέρες, ενώ τέλος, στους 40°C η BsGH5 διατηρεί το 50% της σχετικής της ενεργότητας μετά από επώαση για 7 μέρες, γεγονός που υποδηλώνει σημαντική σταθερότητα του ενζύμου στη συγκεκριμένη θερμοκρασία. Ο μέγιστος χρόνος ημιζωής υπολογίστηκε ίσος με 11600 λεπτά (40°C), ενώ ο ελάχιστος βρέθηκε να είναι ίσος με περίπου 2 λεπτά (70°C). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα και με χρήση της εξίσωσης Arrhenius, υπολογίστηκε η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης, η οποία είναι ίση με 248.6 kJ/mol. Η τιμή αυτή υποδηλώνει, ότι απαιτείται μεγάλο ποσό ενέργειας, ώστε το ένζυμο να απενεργοποιηθεί. Εν συνεχεία, για την κατανόηση της διαδικασίας της απενεργοποίησης και της συμπεριφοράς των μορίων του ενζύμου μελετήθηκαν και τα θερμοδυναμικά μεγέθη  $\Delta H^*$  (μεταβολή ενθαλπίας),  $\Delta S^*$  (μεταβολή εντροπίας) και  $\Delta G^*$  (ελεύθερη ενέργεια Gibbs) (Πίνακας 14).

Εκτός αυτών, μελετήθηκε η BsGH5 ως προς το pH βέλτιστης δράσης της, το οποίο βρέθηκε ίσο με 6. Η τιμή αυτή είναι παρόμοια με το βέλτιστο pH δράσης της GH5 β-μαννανάσης (Man5HJ14) από τον βάκιλο *Bacillus* sp. HJ14 (Rui Zhang, 2016) και της GH5 ενδογλουκανάσης (BaGH5-WT) από τον βάκιλο *Bacillus amyloliquefaciens* SS35 (Shweta Singh, 2020), που είναι αντίστοιχα 6.5 και 5.5-6.0. Όσον αφορά στη σταθερότητα της BsGH5 σε εύρος τιμών pH 3-9, αυτή διατηρεί πάνω από το 80% της αρχικής της ενεργότητας σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 5-7, μετά από 24 ώρες επώασης στους 4°C. Αντίθετα, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών με pH ίσο με 3 το ένζυμο σχεδόν απενεργοποιείται, στις ίδιες συνθήκες επώασης.

Η BsGH5 εμφάνισε τη μέγιστη δραστηριότητα σε υπόστρωμα β-γλουκάνη. Σημειώνεται, ότι δεν παρατηρήθηκε δραστηριότητα σε κυτταρινούχα υποστρώματα, ενώ κατά τη χρήση επεξεργασμένης κυτταρίνης (PASC) το ένζυμο παρουσίασε δραστηριότητα ίση με το 40% περίπου, της δραστηριότητας που εμφανίζει σε β-γλουκάνη. Οι κινητικές παράμετροι σε υπόστρωμα β-γλουκάνης βρέθηκαν ίσες με  $K_m = 33.38$  mg/mL και  $v_{max} = 9.35$  U/mL. Η τιμή της  $K_m$  είναι σχετικά χαμηλή, γεγονός που υποδηλώνει την μεγάλη συγγένεια του ενζύμου ως προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Κατά τη μελέτη της επίδρασης των ιόντων μετάλλων στο ένζυμο παρατηρήθηκε, ότι η παρουσία των ιόντων  $Mn^{2+}$  ( $MnCl_2$ ),  $Mg^{2+}$  ( $MgSO_4$ ),  $Fe^{2+}$  και  $Ba^{2+}$  ενεργοποιούν την BsGH5, ενώ όλα τα υπόλοιπα ιόντα έχουν ανασταλτική δράση. Το ένζυμο φαίνεται να αδρανοποιείται πλήρως υπό την επίδραση των ιόντων  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ . Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας SDS φαίνεται να έχει ελάχιστη επίδραση στο ένζυμο, καθώς η σχετική ενεργότητά του ανέρχεται περίπου στο 90% της αρχικής, ενώ, κατά την παρουσία του EDTA, η εναπομείνουσα ενεργότητα είναι περίπου το 75% της αρχικής.

Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκαν τα προϊόντα υδρόλυσης του υποστρώματος της β-γλουκάνης από την BsGH5, τα οποία είναι η γλυκόζη, η κελλοβιόζη, η κελλοτριόζη και η κελλοτετραόζη. Η συγκέντρωση της γλυκόζης φάνηκε να παραμένει σταθερή από τις 2 ώρες αντίδρασης και έπειτα, ενώ οι κορυφές που αντιστοιχούσαν στους άλλους τρεις πολυσακχαρίτες αυξάνονταν με την αύξηση του χρόνου υδρόλυσης.

Τέλος, διερευνήθηκε η ικανότητα ρόφησης της BsGH5 σε μικροκρυσταλλική κυτταρίνη Avicel και η παραγωγικότητά της μέσω υδρόλυσης διαλύματος PASC. Παρατηρήθηκε, ότι η ρόφηση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται στο 50%, ανεξάρτητα από την αρχική της συγκέντρωση, ενώ είναι αξιοσημείωτο, ότι με διπλασιασμό της αρχικής συγκέντρωσης της BsGH5, διπλασιάζεται και η ποσότητα της προσροφημένης πρωτεΐνης. Αντίθετα, ο εξαιρετικά υψηλός λόγος αναγωγικών σακχάρων στο υπερκείμενο προς τα αναγωγικά σάκχαρα του ιζήματος πιστοποίησε τη μη παραγωγικότητα του συγκεκριμένου ενζύμου.

Εν κατακλείδι, συμπεραίνεται, ότι η απομόνωση και η υπερέκφραση της BsGH5 ήταν αρκετά εύκολες και αποτελεσματικές διαδικασίες, που οδήγησαν στη λήψη καθαρής πρωτεΐνης. Μέσω του βιοχημικού χαρακτηρισμού του ενζύμου, αποδείχθηκε, ότι πρόκειται για ένα μεσόφιλο ένζυμο, το οποίο παρουσιάζει εξαιρετική σταθερότητα σε θερμοκρασίες μικρότερες της βέλτιστής του και σε ένα ικανοποιητικό εύρος pH. Ωστόσο, ορισμένα σημεία είναι αμφιλεγόμενα, αναφορικά με την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, την παραγωγικότητα, την ικανότητα πρόσδεσης σε κυτταρίνη και τα προϊόντα υδρόλυσης αυτού, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την περαιτέρω μελέτη του συγκεκριμένου ενζύμου. Μία πιθανή κατεύθυνση έρευνας θα ήταν η εφαρμογή προσεγγίσεων πρωτεϊνικής μηχανικής, όπως ο ορθολογικός σχεδιασμός και η κατευθυνόμενη εξέλιξη, που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση των θερμικών ιδιοτήτων μεσόφιλων κυτταρινασών (SCHEMA (Fei Zheng, 2019)). Παράλληλα κρίνεται σημαντική η αναλυτικότερη μελέτη της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου, μέσω της οποίας θα μπορούσαν να συλλεχθούν παραπάνω πληροφορίες σχετικά με το ενεργό του κέντρο, καθώς και την ύπαρξη ή μη καταλυτικής περιοχής και περιοχής πρόσδεσης κυτταρίνης. Τέλος, απαιτείται η μελέτη της

BsGH5 ως προς τη συνεργιστική της δράση με μίγματα άλλων κυτταρινασών, ώστε να προσδιοριστεί αν αυτό οδηγεί σε βελτίωση ή όχι της δράσης της.

## Βιβλιογραφία

(Creative\_Proteomics), CP. *The Principle of SDS-PAGE*.

**Bin Wu, Shan Zheng, Marcelo Monteiro Pedroso, Luke W. Guddat, Siyuan Chang, Bingfang He, Gerhard Schenk. 2018.** Processivity and enzymatic mechanism of a multifunctional family 5 endoglucanase from *Bacillus subtilis* BS-5 with potential applications in the saccharification of cellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels*. 2018.

**Chandra Datta Sumi, Byung Wook Yang, In-Cheol Yeo, Young Tae Hahm. 2015.** Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can. J. Microbiol.* 2015, 61, σσ. 93-103.

**Chaoning Liang, Marco Fioroni, Francisco Rodríguez-Ropero, Yanfen Xue, Ulrich Schwaneberg, Yanhe Ma. 2011.** Directed evolution of a thermophilic endoglucanase (Cel5A) into highly active Cel5A variants with an expanded temperature profile. *Journal of Biotechnology*. 2011, 154, σσ. 46-53.

**Cong Zhang, Ying Wang, Zhe Li, Xiangru Zhou, Weican Zhang, Yue Zhao, Xuemei Lu. 2014.** Characterization of a multi-function processive endoglucanase CHU\_2103 from *Cytophaga hutchinsonii*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014, 98, σσ. 6679-6687.

**D. El Khoury, C. Cuda, B. L. Luhovyy, G. H. Anderson. 2012.** Beta Glucan: Health Benefits in Obesity and Metabolic Syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012.

**Diana C. Irwin, Michael Spezio, Larry P. Walker, David B. Wilson. 1993.** Activity Studies of Eight Purified Cellulases: Specificity, Synergism, and Binding Domain Effects. *Biotechnology and Bioengineering*. 1993, 42, σσ. 1002-1013.

**Djordje Fira, Ivica Dimkić, Tanja Berić, Jelena Lozo, Slaviša Stanković. 2018.** Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*. 2018, 285, σσ. 44-55.

**Do Young Kim, Su-Jin Ham, Hyun Ju Lee, Han-Young Cho, Ji-Hoon Kim, Yi-Joon Kim, Dong-Ha Shin, Young Ha Rhee, Kwang-Hee Son, Ho-Yong Park. 2011.** Cloning and characterization



of a modular GH5 b-1,4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13. *Bioresource Technology*. 2011, 102, σσ. 9185-9192.

**Fei Zheng, Josh V. Vermaas, Jie Zheng, Yuan Wang, Tao Tu, Xiaoyu Wang, Xiangming Xie, Bin Yao, Gregg T. Beckham, Huiying Luo. 2019.** Activity and Thermostability of GH5 Endoglucanase *Chimeras* from Mesophilic and Thermophilic Parents. *Applied and Environmental Microbiology*. 2019, Τόμ. 85, 5.

**Henrik Aspeborg, Pedro M Coutinho, Yang Wang, Harry Brumer III, Bernard Henrissat. 2012.** Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC Evolutionary Biology*. 2012, Τόμ. 12, 186.

**Henry. Eyring, Allen E. Stearn. 1939.** The Application of the Theory of Absolute Reaction Rates to Proteins. *Chemical Reviews*. 1939, Τόμ. 24, 2, σσ. 253-270.

<http://www.cazy.org/GH5.html>.

**J. K. Seo, T. S. Park, I. H. Kwon, M. Y. Piao, C. H. Lee, Jong K. Ha. 2013.** Characterization of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 Isolated from the Rumen of a Native Korean Goat. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2013, Τόμ. 26, 1, σσ. 50-58.

**Ja Kyong Ko, Jae Hoon Lee, Je Hyeong Jung, Sun-Mi Lee. 2020.** Recent advances and future directions in plant and yeast engineering to improve lignocellulosic biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2020, 134.

**Jitendra Kumar Saini, Reetu Saini, Lakshmi Tewari. 2015.** Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*. 2015, 5, σσ. 337–353.

**Jose H. Pereira, , Zhiwei Chen, Ryan P. McAndrew, Rajat Sapra, Swapnil R. Chhabra, Kenneth L. Sale, Blake A. Simmons, Paul D. Adams. 2010.** Biochemical characterization and crystal structure of endoglucanase Cel5A from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima*. *Journal of Structural Biology*. 2010, 172, σσ. 372-379.

**Jude A. Okolie, Sonil Nanda, Ajay K. Dalai, Janusz A. Kozinski. 2021.** Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. *Waste and Biomass Valorization*. 2021, 12, σσ. 2145-2169.

**K.K. Cho, S.C. Kim, J.H. Woo, J.D. Bok, Y.J. Choi. 2000.** Molecular cloning and expression of a novel family A endoglucanase gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 27, σσ. 475-481.

- Kaitlin B. Applegate, Patrick R. Cheek, Jennifer K. Inlow. 2019.** Analysis of kombucha to teach biochemical concepts and techniques to undergraduate students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2019, σσ. 363-484.
- Klecius R Silveira Celestino, Ricardo B Cunha, Carlos R Felix. 2006.** Characterization of a  $\beta$ -glucanase produced by *Rhizopus microsporus var. microsporus*, and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochemistry*. 2006, Τόμ. 7, 23.
- Laura Barsanti, Vincenzo Passarelli, Valtere Evangelista, Anna Maria Frassanito, Paolo Gualtieri. 2011.** Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of  $\beta$ -glucans. *Nat. Prod. Rep.* 2011, 28, σσ. 457-466.
- Leila Lo Leggio, Sine Larsen. 2002.** The 1.62 Å structure of *Thermoascus aurantiacus* endoglucanase: completing the structural picture of subfamilies in glycoside hydrolase family 5. *FEBS Letters* 523. 2002, σσ. 103-108.
- Leila Lo Leggio, Thomas J. Simmons, Jens-Christian N. Poulsen, Kristian E.H. Frandsen, Glyn R. Hemsworth, Mary A. Stringer, Pernille von Freiesleben, Morten Tovborg, Katja S. Johansen, Leonardo De Maria, Paul V. Harris, Chee-Leong Soong, Paul Dupree, Theodora Tryfona, Nicolas Lenfant, Bernard Henrissat, Gideon J. Davies, Paul H. Walton. 2015.** Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monoxygenase. *NATURE COMMUNICATIONS*. 2015.
- Lekshmi K. Edison, S. Shiburaj, N. S. Pradeep. 2018.** Microbial Beta Glucanase in Agriculture. *Advances in Microbial Biotechnology*. 2018, 2.
- Lisong Hu, Xuezhi Fang, Menghao Du, Fan Luo, Shaohai Guo. 2020.** Hemicellulose-Based Polymers Processing and Application. *American Journal of Plant Sciences*. 2020, 11, σσ. 2066-2079.
- M.A. Mohamed, Hassan M. Awad, El-Sayed E. Mostafa. 2021.** Purification, catalytic, kinetic, thermodynamic characterization and stability profile of alkalophilic lipase from *Streptomyces* sp. SBLWN\_MH2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2021, 37.
- Maria Hrmova, Jochen Zimmer, Vincent Bulone, Geoffrey B. Fincher. 2023.** Enzymes in 3D: Synthesis, remodelling, and hydrolysis of cell wall (1,3;1,4)- $\beta$ -glucans. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2023, σσ. 1-18.
- MICHAEL W. BAUER, LANCE E. DRISKILL, WALTER CALLEN, MARJORY A. SNEAD, ERIC J. MATHUR, ROBERT M. KELLY. 1999.** An Endoglucanase, EglA, from the *Hyperthermophilic*

*Archaeon Pyrococcus furiosus* Hydrolyzes b-1,4 Bonds in Mixed-Linkage (1-3),(1-4)-b-D-Glucans and Cellulose. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 1999, Τόμ. 181, 1, σσ. 284-290.

**MILLER, GAIL LORENZ. 1959.** Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *ANALYTICAL CHEMISTRY*. 1959, Τόμ. 31, 3.

**Misumi Kataoka, Kazuhiko Ishikawa. 2014.** Complete saccharification of  $\beta$ -glucan using hyperthermophilic endocellulase and  $\beta$ -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014, Τόμ. 78, 9, σσ. 1537-1541.

**Muhammad Mujtaba, Leonardo Fernandes Fraceto, Mahyar Fazeli, Sritama Mukherjee, Susilaine Maria Savassa, Gerson Araujo de Medeiros, Anderson do Espírito Santo Pereira, Sandro Donnini Mancini, Juha Lipponen, Francisco Vilaplana. 2023.** Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. *Journal of Cleaner Production*. 2023, 402.

**Mujunqi Wu, Kemin Lv, Jiahuang Li, Bin Wu, Bingfang He. 2022.** Coevolutionary analysis reveals a distal amino acid residue pair affecting the catalytic activity of GH5 processive endoglucanase from *Bacillus subtilis* BS-5. *Biotechnol Bioengineering*. 2022, 119, σσ. 2105-2114.

**N. Ortega, S. de Diego, M. Perez-Mateos, M.D. Busto. 2004.** Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*. 2004, 88, σσ. 209-217.

**N. S. Pradeep, Lekshmi K. Edison. 2022.** *Microbial Beta Glucanases: Molecular Structure, Functions and Applications*. s.l. : Interdisciplinary Biotechnological Advances, 2022.

**Natividad Ortega, Laura Sáez, David Palacios, María D. Busto. 2022.** Kinetic Modeling, Thermodynamic Approach and Molecular Dynamics Simulation of Thermal Inactivation of Lipases from *Burkholderia cepacia* and *Rhizomucor miehei*. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, Τόμ. 23, 6828.

**Panayiotis D. Glekas, Styliani Kalantzi, Anargiros Dalios, Dimitris G. Hatzinikolaou, Diomi Mamma. 2022.** Biochemical and Thermodynamic Studies on a Novel Thermotolerant GH10 Xylanase from *Bacillus safensis*. *Biomolecules*. 2022, Τόμ. 12, 790.

**Rajashekar Varma Kadumuri, Ramakrishna Vadrevu. 2018.** Diversity in ab and ba Loop Connections in TIM Barrel Proteins: Implications for Stability and Design of the Fold. *Interdiscip Sci Comput Life Sci*. 2018, 10, σσ. 805-812.

- Ramesh Chander Kuhad, Rishi Gupta, Ajay Singh. 2011.** Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*. 2011.
- Rui Zhang, Zhifeng Song, Qian Wu, Junpei Zhou, Junjun Li, Yuelin Mu, Xianghua Tang, Bo Xu, Junmei Ding, Shucan Deng, Zunxi Huang. 2016.** A novel surfactant-, NaCl-, and protease-tolerant  $\beta$ -mannanase from *Bacillus* sp. HJ14. *Folia Microbiol.* 2016, 61, σσ. 233-242.
- Shanshan Wu, Shufang Wu. 2020.** Processivity and the Mechanisms of Processive Endoglucanases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2020, 190, σσ. 448-463.
- Shweta Singh, Krishan Kumar, Priyanka Nath, Arun Goyal. 2020.** Role of glycine 256 residue in improving the catalytic efficiency of mutant endoglucanase of family 5 glycoside hydrolase from *Bacillus amyloliquefaciens* SS35. *Biotechnology and Bioengineering*. 2020, 117, σσ. 2668-2682.
- Silvina Ghio, María B. Bradanini, Mercedes M. Garrido, Ornella M. Ontañón, Florencia E. Piccinni, Ruben Marrero Diaz de Villegas, Paola M. Talia, Eleonora Campos. 2020.** Synergic activity of Cel8Pa  $\beta$ -1,4 endoglucanase and Bg1Pa  $\beta$ -glucosidase from *Paenibacillus xylanivorans* A59 in beta-glucan conversion. *Biotechnology Reports*. 2020, 28.
- Stefano Costanzo, Manuel D. Ospina-Giraldo, Kenneth L. Deahl, C. Jacyn Baker, Richard W. Jones. 2007.** Alternate intron processing of family 5 endoglucanase transcripts from the genus *Phytophthora*. *Curr Genet*. 2007, 52, σσ. 115-123.
- Vaclav Vetvicka, Jana Vetvickova. 2020.**  $\beta$ -Glucan Improves Conditions of Chronic Fatigue in Mice by Stimulation of Immunity. *The Open Biochemistry Journal*. 2020, 14, σσ. 1-8.
- Xianqin Lu, Xiaoting Feng, Xuezhi Li, Jian Zhao. 2018.** Binding and hydrolysis properties of engineered cellobiohydrolases and endoglucanases. *Bioresource Technology*. 2018, 267, σσ. 235-241.
- Zahid Anwar, Muhammad Gulfranz, 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*. 2014, Τόμ. 7, σσ. 163-173.
- Zhongcun Pang, Kodo Otaka, Takashi Maoka, Kumi Hidaka, Sumio Ishijima, Masayuki Oda, Masatake Ohnishi. 2005.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005, Τόμ. 69, 3, σσ. 553-558.













