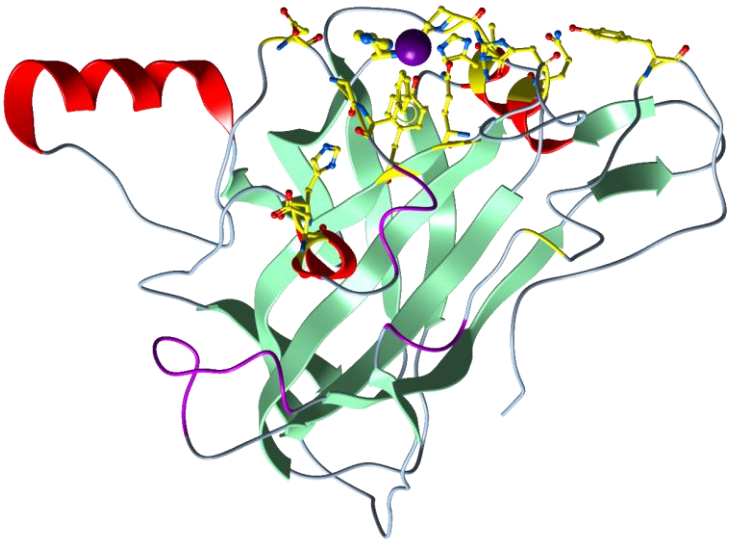
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός μιας GH61 οξειδάσης από το *Sporotrichum thermophile*"



KAYANGE INES

Επιβλέπων καθηγητής : Π. Χριστακόπουλος

ΑΘΗΝΑ 2012

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου.

Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή μου εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή Παύλο Χριστακόπουλο για την ανάθεση του θέματος.

Τον λέκτορα Ευάγγελο Τόπακα για την σωστή εκτέλεση μέρους της πειραματικής διαδικασίας.

Την διδάκτορα Μαρία Δημαρόγονα για την πολύτιμη βοήθεια της, τον χρόνο που αφιέρωσε και την συμβολή της στο να κατανοήσω κρίσιμα θέματα που αφορούν το αντικείμενο της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ την φίλη και συνάδελφη μου Τεήσα Τούφα, που πάντα ήταν δίπλα μου, και συμμετείχε στη καλή εκτέλεση της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους εργάζονται στο Εργαστήριο βιοτεχνολογίας για το ευχάριστο περιβάλλον και τη συνεχή διαθεσιμότητα τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που με στερήσεις, στηρίζει τις προσπάθειες μου καθ’ όλη τη διάρκεια των μαθητικών αλλά και ακαδημαϊκών μου σπουδών καθώς και για τους φίλους μου για την ηθική τους υποστήριξη.

Περίληψη

Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά αποτελούν μια άφθονη και ανανεώσιμη πηγή σακχαρούχων υποστρωμάτων που μπορούν να υδρολυθούν και να υποστούν ζύμωση για μετατροπή τους σε αιθανόλη. Έτσι χρησιμοποιώντας λιγνινοκυτταρικά υλικά όπως τα γεωργικά κατάλοιπα, δασοκομικά και αστικά απόβλητα τα οποία αποτελούν περίπου το 50% της παγκόσμιας βιομάζας, μπορεί να μειωθεί σημαντικά το κόστος των πρώτων υλών για την παραγωγή βιοαιθανόλης.

Η βιοαιθανόλη παράγεται από τη ζύμωση των σακχάρων με τη βοήθεια μικροοργανισμών που αποδομούν τη φυτική βιομάζα σε ολιγοσακχαρίτες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί καθώς και τα ένζυμα που παράγουν παρουσιάζουν συνεπώς αυξημένο ενδιαφέρον για βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ετερόλογη έκφραση και ο χαρακτηρισμός μιας GH61 οξειδάσης από το *Sporotrichum thermophile*. Η έρευνα αυτή εντάσσεται σε μια προσπάθεια κατανόησης της υψηλής απόδοσης με την οποία υδρολύουν το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα οι κυταρρινολυτικοί μύκητες. Κατ'επέκταση, σκοπός ήταν επίσης η χρήση της γνώσης αυτής για τη μείωση του ενδημικού φορτίου που απαιτείται για την υδρόλυση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε βιομηχανικό επίπεδο.

Συγκεκριμένα χαρακτηρίστηκε μια πρωτεΐνη της οικογενείας 61 της βάσης δεδομένων CAZy (Carbohydrate Active enzymes Database).

Η πρωτεΐνη που μελετήθηκε προερχόταν από το μύκητα *Sporotrichum thermophile* (*St*Cel61) και εκφράστηκε στη μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*. Χαρακτηρίστηκε ως προς τη σταθερότητα της σε ένα εύρος θερμοκρασιών και pH, προσδιοριστήκαν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης καθώς και εξετάστηκε η ικανότητα της να υδρολύει ποικιλία πολυσακχαριτών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ Σελίδα

I. ΘΕΩΡΙΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 6

1.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 7

2.ΕΙΣΑΓΩΓΗ 8

2.1 Γενικά στοιχεία για τα βιοκαύσιμα 9

2.2 Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζας 9

Α. κυτταρίνη 11

Β. ημικυτταρίνη 12

Γ. λιγνίνη 12

2.3 Παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα 13

2.4 Ενζυμική υδρόλυση φυτικής βιομάζας 13

2.4.1 Ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης 14

2.4.2 Ενζυμική υδρόλυση ημικυτταρίνης 15

2.4.3 Ενζυμική υδρόλυση λιγνίνης 16

3 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ GH61 17

3.1 Μηχανισμός δράσης ενζύμων της οικογενείας GH61 18

3.2 Δομικές ιδιότητες των μονοοξυγενασών πολυσακχαριτών (PMOs) 18

3.3 Καταλυτική δράση της PMO 20

4 SPOROTRICHUM THERMOPHILE 21

4.1 Το *S. thermophile* ένας θερμόφιλος μύκητας 22

4.2 Συνεισφορά του *S. Thermophile* στην αποικοδόμηση του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού 23

5 PICHIA PASTORIS: Σύστημα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών 24

5.1 Η P. pastoris ως μεθυλότροφη ζύμη 26

5.2 AOX γονίδιο αλκοολικής οξειδάσης 26

5.3 Ο υποκινητής pAOX1 και η ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών 27

5.4 Έκφραση πρωτεϊνών στην *Pichia pastoris* 28

5.5 Μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις 29

5.6 Πλασμιδιακοί φορείς 29

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 34
1.1 Μικροοργανισμοί 34
1.2. Σύσταση θρεπτικών μέσων για την ανάπτυξη της ζύμης *P. Pastoris* 34
1.3. Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας μικροοργανισμών 35
1.4 Όργανα 35
1.5. Υποστρώματα 36

2 . Πειραματική διαδικασία
Ετερόλογη έκφραση
2.1 Μετασχηματισμός κυττάρων Pichia pastoris με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης 36
2.2 Έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας για επιλογή βέλτιστου κλώνου 38
2.3 Έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας για παραγωγή πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες 39
2.4 Φυγοκέντρηση, διήθηση, συμπύκνωση και καθαρισμός 40
2.4. 1. Φυγοκέντρηση 40
2.4.2. Διήθηση υπό κενό 40
2.4.3. Υπερδιήθησης 41
2.4.4. Εξισορρόπηση διαλύματος 42
2.4.5. Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) 43
2.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) 45
2.6 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης (μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης) 49
2.7 Μέθοδος του δινιτροσαλικυλικού (DNS) 50
2.8 Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε διάφορα υποστρώματα 52

α. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα λιχενάνη 52
β. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα β-γλουκάνη του κριθαριού 53

γ. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα λαμιναρίνης 53
δ. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα αραβινοξυλάνη σίτου 54
ε. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνης (CMC) 55
ζ. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα ξυλάνης σημύδας 55
η. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε μικροκρυσταλλική κυτταρίνη 56

2.9 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης και προσδιορισμός σταθερότητα του ενζύμου (T-optimum και T-stability) 56
2.10 Εύρεση βέλτιστου pH δράσης και προσδιορισμός σταθερότητα του ενζύμου (pH-optimum και pH-stability) 56

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
1. Παραγωγή και καθαρισμός της *StCel61* 58
2. Βέλτιστη θερμοκρασία του ενζύμου StCel61 και σταθερότητα του σε διαφορετικές θερμοκρασίες 60
3. Βέλτιστο pH δραστικότητας της StCel61 και σταθερότητα της σε διαφορετικά pH 61
4. Ανίχνευση ενεργότητας σε υποστρώματα πολυσακχαριτών 62

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 64

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 65

6 ΕΥΡΕΤΗΤΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ 70

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΘΕΩΡΙΤΗΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Στόχος εργασίας

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ετερόλογη έκφραση ενός γονιδίου του θερμόφιλου μύκητα *Sporotrichum thermophile*, που κωδικοποιεί ένα ένζυμο της οικογένειας 61 των γλυκοζιδικών υδρολασών(StCel61), και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της αντίστοιχης πρωτεΐνης.
Πιο συγκεκριμένα, StCel61 εκφράστηκε στην μεθυλότροφη ζύμη Pichia pastoris και ακολούθησε καθαρισμός και ανίχνευση της δραστικότητας της σε ποικιλία υποστρωμάτων.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αυξανόμενη εξάρτηση της σύγχρονης κοινωνίας από τα ορυκτά καύσιμα έχει ως αποτέλεσμα την εντατική έρευνα για εναλλακτικές πηγές καυσίμων. Δεδομένου ότι τα ορυκτά καύσιμα αυτά είναι από μη ανανεώσιμες πηγές, χρειάζεται εκατομμύρια χρόνια για να σχηματιστούν και έτσι τα αποθέματα τους μειώνονται πολύ πιο γρήγορα από ό, τι παράγονται. Ακόμη, τα ορυκτά καύσιμα κατά την καύση τους παράγουν το διοξείδιο του άνθρακα, που είναι ένα από τα αέρια του θερμοκηπίου, το οποίο συμβάλλει στην υπερθέρμανση του πλανήτη. Η αναζήτηση ανανεώσιμων μεταφορικών καυσίμων που είναι και οικονομική και περιβαλλοντικά βιώσιμη αποτελεί ένα θέμα ζωτικής σημασίας για την κάλυψη παγκόσμιας ζήτησης ενέργειας και για την μείωση των αερίων του θερμοκηπίου.
Συγκεκριμένα η βιομάζα σε μορφή βιοενέργειας καλύπτει το 10% της παγκόσμιας ενέργειας και είναι η μεγαλύτερη ανανεώσιμη πηγή. Η βιοαιθανόλη παράγεται κυρίως από ζύμωση των σακχάρων που περιέχονται στα φυτά, με την βοήθεια μικροοργανισμών, όπως ζύμες και βακτήρια. Η ενζυμική αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας έχει προκαλέσει για πολλά χρόνια την προσοχή και γίνεται όλο και πιο ελκυστική εναλλακτική λύση σε

χημικές και μηχανικές διεργασίες. Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της δομής του κυτταρικού τοιχώματος, στον χαρακτηρισμό της δραστηριότητας των ενζύμων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του και τα γονίδια των σχετικών μικροοργανισμών που τα κωδικοποιούν.

Για την παραγωγή βιοκαυσίμων, η λιγνινοκυτταρίνη με την βοήθεια ενζύμων μετατρέπεται σε σάκχαρα, τα οποία με περαιτέρω επεξεργασία μετατρέπονται στο τελικό προϊόν που είναι κυρίως αιθανόλη. Πολύ σημαντικά για την συμβολή τους στη διαδικασία αυτή είναι τα κυτταρινολυτικά ένζυμα που είναι και το επίκεντρο μελέτης στην διπλωματική αυτή εργασία. Έγινε έκφραση και χαρακτηρισμός μιας οξειδάσης που ανήκει στην οικογένεια 61 της βάσης δεδομένων CAZy.

2.1 Γενικά στοιχεία για τα βιοκαύσιμα

Με τον όρο βιοκαύσιμα εννοούνται συνήθως καύσιμα υγρά, στερεά ή αέρια που προέρχονται από βιομάζα. Η εξάντληση των αποθεμάτων του πετρελαίου, οι αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον από την χρήση ορυκτών καυσίμων, καθώς και η συνεχής αύξηση του κόστους τους οδήγησε σε αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον γύρω από τα βιοκαύσιμα. Υπάρχουν διάφορες μορφές πόρων βιομάζας στον κόσμο, τα οποία μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες (Yan Lin . Shuzo Tanaka):

- Υπολείμματα ξύλου, που είναι η μεγαλύτερη τρέχουσα πηγή βιομάζας. Προέρχεται από βιομηχανία προϊόντων ξυλείας που περιλαμβάνει εγκαταστάσεις παραγωγής χαρτιού και κατασκευής επίπλων.
- Αστικά στερεά απόβλητα
- Κατάλοιπα της γεωργίας
- Ενεργειακές καλλιέργειες.

Οι λιγνινοκυτταρινούχες ύλες αποτελούν ανεξάντλητη πηγή βιομάζας (Lin and Tanaka 2005) και έχει εκτιμηθεί ότι αντιστοιχούν σε 50% της συνολικής βιομάζας(Clansen et al.1999).

Τα ορυκτά καύσιμα χρειάζονται περίπου 650 εκατομμύρια χρόνια για να δημιουργηθούν (Paul Mann, Lisa Gahagan, and Mark B. Gordon, 2009) και περιέχουν ψηλά ποσοστά άνθρακα. Κατά συνέπεια τα αποθέματα τους μειώνονται πολύ πιο γρήγορα από όσο σχηματίζονται καινούργια. Η καύση των ορυκτών καυσίμων παράγει περίπου 21.3 δισεκατομμύρια τόνους διοξειδίου του άνθρακα (CO2) ετησίως. Εκτιμάται ότι από φυσικές διαδικασίες μπορεί να απορροφηθεί περίπου το μισό του ποσού αυτού, και

μένει 10.65 δισεκατομμυρίων τόνων ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα ανά έτος.
Επομένως τα κύρια πλεονεκτήματα της βιομάζας σε σύγκριση με τα ορυκτά καύσιμα είναι ότι αποτελούν μια ανανεώσιμη και μη- δαπανηρή πηγή ενέργειας και ότι η χρήση τους είναι ουδέτερη όσον αφορά τις εκπομπές CO_2, αφού όσο CO_2 παράγεται κατά την καύση της βιομάζας απορροφάται κατά την παραγωγή της.
Τα πιο σημαντικά βιοκαύσιμα είναι το βιοντίζελ, η βιοαιθανόλη, το βιουδρογόνο, και ο βιοηλεκτρισμός, τα οποία παράγονται με πρωτες ύλες προερχομενες από φυτικές καλλιέργειες, φυτικά υπολείμματα ή απορρίματα. Τα πιο διαδεδομένα είναι η βιοαιθανόλη και το βιοντήζελ.

2.2 Σύσταση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

Κυτταρικό τοίχωμα ονομάζεται το μεμβρανοειδές στρώμα που περιβάλλει εξωτερικά την κυτταρική μεμβράνη ορισμένων κυττάρων, κύριος ρόλος του οποίου είναι να παρέχει στο κύτταρο ακαμψία, στερεότητα και προστασία απέναντι σε μηχανικές καταπονήσεις.
Αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, το αρωματικό πολυμερές λιγνίνη και πηκτίνη. Ωστόσο η περισσότερη μάζα του φυτού αποτελείται από κυτταρίνη που είναι και το σημαντικότερο συστατικό σε περιεκτικότητα (40-60%), και ακολουθούν η ημικυτταρίνη (20-40%) και η λιγνίνη(10-25%). Η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος ποικιλεί και εξαρτάται από την προέλευση του όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πινάκα 1. Σύνθεση διαφόρων τύπων λιγνινοκυτταρινικής βιομάζα (% επί ξυρού βάρους)

Πρώτη υλη	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	λιγνίνη	Στάχτη
Πράσινη άλγη	20- 40	20- 50	-	-
Βαμβάκι	80- 95	5- 20	-	-
Θάμνοι	25- 40	25-50	10 -30	0.6 ± 0.2
Φυλλοβόλα δέντρα	45 ± 2	30± 5	20 ±4	0.8 ± 0.2
Φλοιοί φυλλοβόλων	22- 40	20- 38	30 - 55	0.5 ± 0.1
Κωνοφόρα δέντρα	42± 2	27± 2	28 ± 3	0.8 ± 0.2
Φλοιοί κωνοφόρων	18- 38	15- 33	30 - 60	12- 16
Στελέχη καλαμποκιού	39- 47	26-31	3-5	11- 14
Εφημερίδες	40- 55	25- 40	18-30	-
Άχυρο σιταριού	37- 41	27-32	13- 15	-

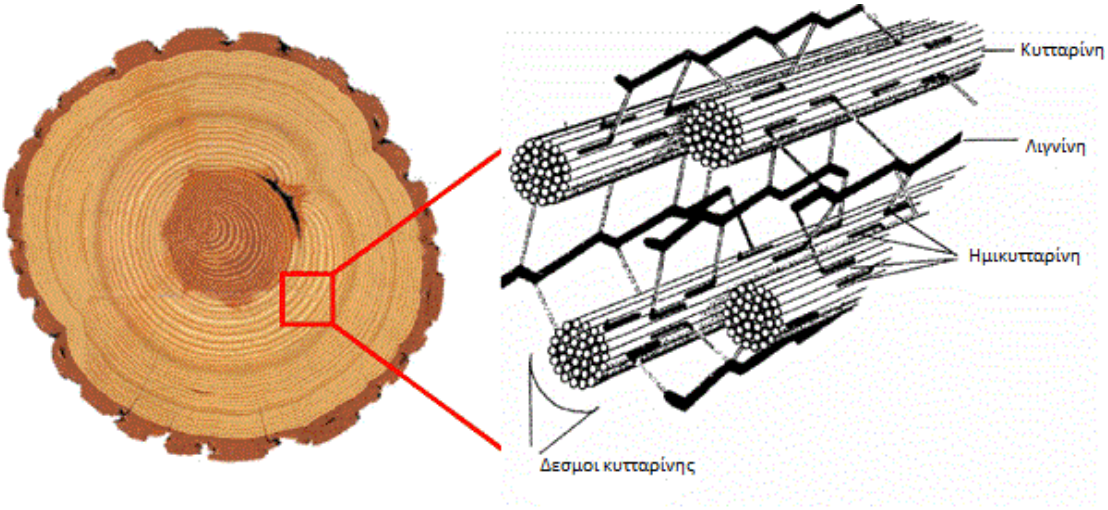
Πηγή : Demirbas 2005

Ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού διακρίνονται το πρωτογενές και το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα. Όταν ένα φυτικό κύτταρο πρώτο δημιουργείται, έχει λεπτό και σχετικά εύκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα. Με αυτό τον τρόπο έχει τη δυνατότητα να αναπτυχθεί. Το αρχικό αυτό τοίχωμα αποκαλείται πρωτογενές (primary) κυτταρικό τοίχωμα το οποίο αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη.

Όταν το κύτταρο ολοκληρώσει την ανάπτυξή του, διατηρεί το αρχικό τοίχωμα, το οποίο συνήθως υφίσταται πάχυνση, ή αποθήκευση νέων στρώσεων διαφορετικού υλικού, δημιουργώντας το δευτερεύον κυτταρικό τοίχωμα. Στα φυτικά κύτταρα το δευτερεύον τοίχωμα αποτελείται κυρίως από λιγνίνη, συστατικό που ισχυροποιεί και στεγανοποιεί το κύτταρο. Η βασική τους διαφορά είναι ότι στο πρωτογενές τοίχωμα τα ινίδια της κυτταρίνης βρίσκονται ακανόνιστα πλεγμένα μεταξύ τους ενώ στο δευτερογενές, που είναι και πιο παχύ από το πρώτο, τα ινίδια είναι παράλληλα τοποθετημένα μεταξύ τους.

Το κυτταρικό τοίχωμα είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στα φυτικά κύτταρα, επειδή είναι αυτό που τα βοηθά να ανθίστανται στο φαινόμενο της αύξησης της ωσμωτικής πίεσης όποτε εισδύει νερό στο εσωτερικό τους, συμβάλλει στην άμυνα απέναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς και την αποθήκευση θρεπτικών ουσιών. Η καλύτερη κατανόηση της δομής και της σύνθεσης του

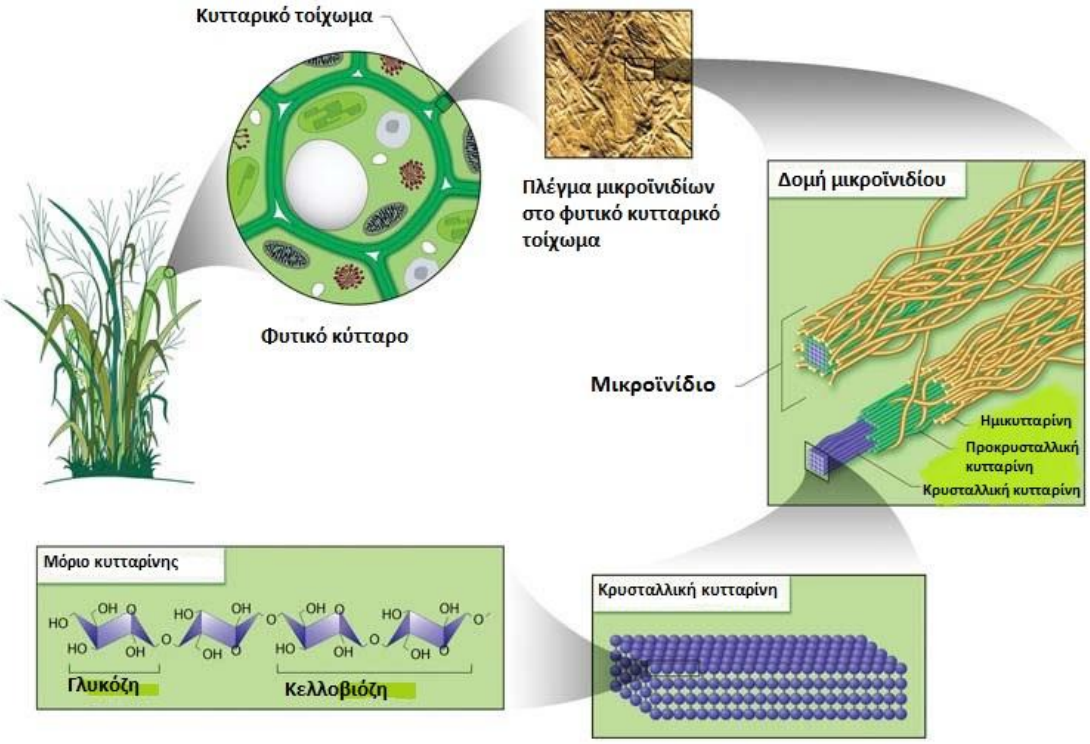
κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη πιο εξελιγμένων βιοτεχνολογικών εφαρμογών κατά την αποικοδόμηση του.



Εικόνα 1. Σύσταση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας (Murphy and McCarthy,2005, Shaw2008)

Α. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι ένας γραμμικός και μην διακλαδισμένος πολυσακχαρίτης με εμπειρικό τύπο ($C_6H_{10}O_5)_v$, αντιπροσωπεύει το βασικό συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων και αποτελείται από μόρια D-γλυκόζης συνδεδεμένα μεταξύ τους με β-1-4 γλυκοζιτικού δεσμούς. Οι αλυσίδες της γλυκόζης στοιχίζονται με άλλες και σχηματίζουν μικροϊνίδια, τα οποία ενώνονται και σχηματίζουν τα ινίδια της κυτταρίνης. Ο βαθμός πολυμερισμού της ποικίλει ανάλογα με το είδος της φυτικός ύλης και μπορεί να φτάσει μέχρι και 10.000. Λόγω της διαμόρφωσης της, η κυτταρίνη αντιστέκεται στην υδρόλυση και εξασφαλίζει την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών.



Εικόνα 2. Δομή της κυτταρίνης στο φυτικό κυτταρικό τοιχώματος. http://www.facstaff.bucknell.edu/mvigeant/thermo_demos/mathiasmetzmetzler/pages/system.htm

Β. Ημικυτταρίνες

Οι ημικυτταρίνες είναι πιο ετερογενείς με βαθμό πολυμερισμού μικρότερο της κυτταρίνης. Είναι άμορφες, διακλαδισμένες και αποτελούνται από σάκχαρα με 6 άτομα άνθρακα (γαλακτόζη, γλυκόζη και μανόζη) και από σάκχαρα με 5 άτομα άνθρακα (ξυλόζη και αραβινόζη). Ομαδοποιούνται ανάλογα με το μόριο της κυρίας αλυσίδας, σε ξυλάνες, μαννάνες και γαλακτάνες. Η ξυλάνη είναι η πιο συνήθης μορφή ημικυτταρίνης και αποτελείται από μια αλυσίδα σακχάρων με 5 άτομα άνθρακα.
Σε αντίθεση με την κυτταρίνη οποία είναι κρυσταλλική και ανθεκτική στην υδρόλυση, η ημικυτταρίνη έχει τυχαία, άμορφη και ασθενή δομή, γεγονός που την κάνει να υδρολύεται πιο εύκολα.

Γ. Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα πολύπλοκο, υδρόφοβο, αρωματικό πολυμερές που αποτελείται από φαινυλοπροπανοικές μονάδες ενωμένες με δεσμούς C-C και C-O-C. Στο φυτό η λιγνίνη δρα ως συγκολλητική ουσία, και συνεισφέρει

στην ανθεκτικότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Επομένως η χαρακτηριστική ιδιότητα της, είναι η δυσκολία που επιδεικνύει στην αποικοδόμηση περιορίζοντας την μετατροπή της βιομάζας. Κατά συνέπεια οι ερευνητικές προσπάθειες αποσκοπούν στο σχεδιασμό φυτών που είτε καταθέσουν λιγότερη λιγνίνη είτε παράγουν λιγνίνη που είναι πιο δεκτική στην χημική αποικοδόμηση. (Sticklen, 2008; Weng et al., 2008a; Mansfield, 2009).

2.3 Παραγωγή αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα

Η παραγωγή αιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχα υλικά περιλαμβάνει κυρίως τα εξής στάδια

- Διάσπαση της δομής των λιγνοκυτταρινούχων σε ζυμώσιμα σάκχαρα
- Ζύμωση σακχάρων από μικροοργανισμούς και παραγωγή αιθανόλης
- Απόσταξη για αποκομιδή διαλύματος 95% αιθανόλης

2.4 Ενζυμική υδρόλυση φυτικής βιομάζας

Με τον όρο υδρόλυση φυτικής βιομάζας (ή κυτταρικού τοιχώματος) εννοείται διάσπαση των πολυσακχαριτών σε εξόζες και πεντόζες, οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να ζυμωθούν για την παραγωγή βιοαιθανόλης.
Ως κύριο στάδιο της υδρόλυσης θεωρείται η υδρόλυση της κυτταρίνης και μπορεί να είναι είτε όξινη με χρήση οξέου, είτε ενζυμική, με χρήση ειδικών ενζύμων, τις κυτταρινάσες. Λόγω της σύνδεσης της κυτταρίνης με την λιγνίνη και την ημικυτταρίνη με δεσμούς υδρογόνου, η ενζυμική υδρόλυση εμποδίζεται αρκετά.
Άλλο εμπόδιο της υδρόλυσης μπορεί να είναι η κρυσταλλικότητα της δομής της κυτταρίνης, ο βαθμός πολυμερισμού. Η ακατέργαστη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζας υδρολύεται με αργό ρυθμό, επομένως συνιστάται προεπεξεργασία ώστε να αφαιρεθεί η λιγνίνη, να υδρολυθεί η ημικυτταρίνη και να τροποποιηθεί η δομή της κυτταρίνης, για να αυξηθεί η προσβασιμότητα των ενζύμων στην κυτταρίνη. (Pandey 2009).
Έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, μια σειρά ενζύμων από μικροοργανισμούς κυρίως μύκητες και βακτήρια. Παρά την εντυπωσιακή συλλογή τους μόνο μερικά έχουν μελετηθεί εκτενώς. Τα ένζυμα έχουν διαχωριστεί ανάλογα με το υπόστρωμα που προσβάλλουν,

αλλά έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις συνδυασμένης δράσης και συνεργιτισμού.

Α. Ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης

Οι κυτταρινάσες είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση της κυτταρίνης, και αποτελούνται από ένα σύμπλοκο μίγμα από ένζυμα με διαφορετικές εξειδικεύσεις για να υδρολύσουν γλυκοσιδικούς δεσμούς. Οι κυτταρινάσες μπορούν να χωριστούν σε τρεις σημαντικές κατηγορίες (Goyal et al., 1991; Rabinovich et al., 2002a,b):

α) ενδογλουκανάσες ,

β) κελλοβιοϋδρολάσες και

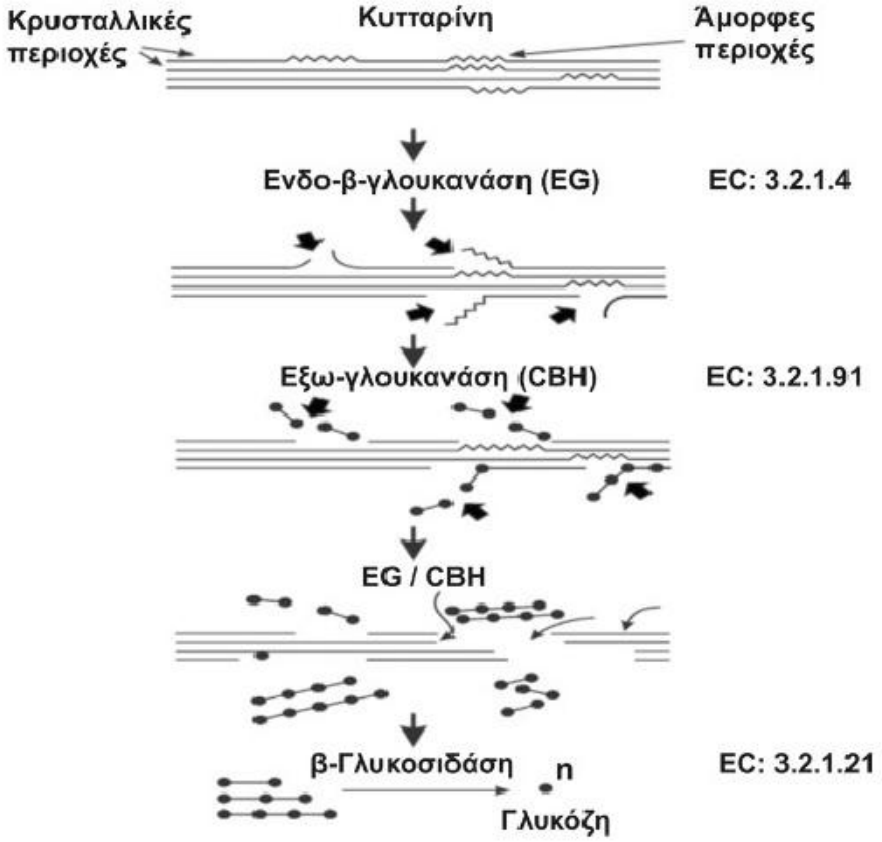
γ) β-γλυκοζιδάσες.

Οι ενδογλουκανάσες (ενδο 1-,4-β-γλουκανάσες EC 3.2.1.4), υδρολύουν την αλυσίδα εσωτερικά σε τυχαίες θέσεις ανοίγοντας έτσι χώρο για τις επόμενες επιθέσεις από τις κελλοβιοϋδρολάσες (Wood, 1991).

Οι κελλοβιοϋδρολάσες ή αλλιώς εξωγλουκανάσες (EC 3.2.1.91) είναι το κύριο συστατικό του συστήματος των κυτταρινασών των μυκήτων, αποτελώντας το 40-70% των ολικών κυτταρινολυτικών πρωτεϊνών. Αποικοδομούν την κυτταρίνη προσβάλλοντας το ελεύθερο άκρο της αλυσίδας και αφαιρούν διμερή γλυκόζης από το άκρο της γλυκοζιτικής αλυσίδας (Esterbauer et al., 1991).

Γενικά, οι ενδογλουκανάσες και οι κελλοβιοϋδρολάσες λειτουργούν συνεργιστικά στην υδρόλυση της κυτταρίνης αλλά οι λεπτομέρειες του μηχανισμού στον οποίο εμπλέκονται είναι ακόμα ασαφείς (Rabinovich et al., 2002b).

Οι β-γλυκοσιδάσες (EC 3.2.1.21) υδρολύουν διμερή γλυκόζης και, σε ορισμένες περιπτώσεις κελλο-ολιγοσακχαρίτες σε γλυκόζη.



Εικόνα 3. Ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης(συνεργατισμός)
http://www.mikrobiokosmos.org/gr/
MBK1/user/image/36.christakopoulos_mbk 1.pdf

Β. Ενζυμική υδρόλυση της ημικυτταρίνης

Οι ημικυτταρινάσες όπως και τα περισσότερα άλλα ένζυμα που υδρολύουν πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος είναι πρωτεΐνες με πολλές καταλυτικές και μη καταλυτικές υπομονάδες. Οι πιο σημαντικές μη-καταλυτικές μονάδες συμπεριλαμβάνουν τους τομείς πρόσδεσης σε πολυσακχαρίτες (carbohydrate binding domains CBD) οι οποίοι κατευθύνουν το ένζυμο στον πολυσακχαρίτη, (Shallom and Shoham, 2003; Prates et al., 2001).
Με βάση τα αμινοξέα των καταλυτικών περιοχών τους, οι ημικυτταρινάσες διακρίνονται σε γλυκοζιδικές υδρολάσες (glycoside hydrolases, GHs) που διασπούν γλυκοζιτικούς δεσμούς και σε εστεράσες πολυσακχαριτών (carbohydrate esterases CEs) που υδρολύουν εστερικούς δεσμούς πλευρικών ομάδων οξικού ή φερουλικού. Επίσης έχουν ομαδοποιηθεί σε διάφορες

οικογένειες σύμφωνα με την ομολογία των πρωτοταγών αλληλουχιών (Henrissat and Bairoch, 1996; Rabinovich et al., 2002a,b).

Οι ξυλανάσες, είναι από τα κυριότερα ημικυτταρινολυτικά ένζυμα που υδρολύουν τον β-1,4 δεσμό στο σκελετό της ξυλάνης παράγοντας μικρά ξυλο-ολιγομερή, τα οποία υδρολύονται περαιτέρω σε μονομερή ξυλόζης από την β-ξυλοδάση . Οι πιο γνωστές ξυλανάσες ανήκουν στις οικογένειες GH 10 και GH 11.

Οι β-μαννανάσες υδρολύουν την ημικυτταρίνη που αποτελείται από μαννάνη.
Οι αραβινοφουρανοζιδάσες και οι α-L-αραβινανάσες υδρολύουν την ημικυτταρίνη που αποτελείται από αραβινοφουρανόζη.

Γ. Ενζυμική υδρόλυση της λιγνίνης

Έχει βρεθεί ότι οι μύκητες αποικοδομούν την λιγνίνη αερόβια μέσω της χρήσης μιας οικογένειας εξωκυτταρικών ενζύμων, οι λιγνινάσες. Δύο οικογένειες λιγνολυτικών ενζύμων ευρέως θεωρούνται ότι παίζουν βασικό ρόλο στην ενζυματική αποικοδόμηση: οι οξειδάσες της φαινόλης,(λακκάση), υπεροξειδάσες της φαινόλης (υπεροξειδάση της λιγνίνης (Lip) και μαγγάνιο υπεροξειδάσης (manganese peroxidase MnP) (Krause et al., 2003; Malherbe and Cloete, 2003).
Άλλα ένζυμα των οποίων ο ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, που παράγουν H_2O_2 είναι οι οξειδάσες γλυοξαλικού, οξειδάσες της γλυκόζης, οξειδάσες της μεθανόλης και οξειδο- αναγωγάσες.

Τα ένζυμα που εμπλέκονται στη διάσπαση της λιγνίνης είναι αρκετά μεγάλα για να διεισδύσουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών και έτσι προκύπτει το ερώτημα, πώς επηρεάζουν οι λιγνινάσες την βιοαποικοδόμηση. Έχει προταθεί ότι τα λιγνολυτικά ένζυμα χρησιμοποιούν διαλυτά δραστικά μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία προκαλούν ορισμένες αρχικές αλλαγές στο υπόστρωμα της λιγνίνης (Call and Mücke, 1997).

3. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ GH61

Η οικογένεια αυτή έχει απασχολήσει τους ερευνητές για πολλά χρόνια καθώς φαίνεται να παίζει σπουδαίο ρόλο στη βιοαποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας. Η πρώτη φορά που μελετήθηκε μέλος της ήταν κατά την απομόνωση μίας GH61 από τον μύκητα *Agaricus bisporus* το 1992 (Raguz et al., 1992). Επειδή παρουσιάζουν κυτταρινολυτική δράση έχουν καταταχθεί ως γλυκοζιδικές υδρολάσες. Όλα τα μέλη της ομάδας GH61 που είναι πάνω από 250 προέρχονται από ευκαρυωτικούς οργανισμούς.
Πρόσφατα με την οικογένεια αυτή ασχολήθηκαν οι Yakovlev et al (2012) που μελέτησαν δέκα γονίδια που κωδικοποιούν GH61 από το μύκητα *H. irregulare.* Έχουν προηγηθεί όμως αρκετές έρευνες και οι οργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :
- *Cryptococcus neoformans* (Chang and Kwon-Chung, 1998),
-*Aspergillus kawachii* (Hara et al., 2003),
-*Cochliobolus heterostrophus* (Lev and Horwitz, 2003),
-*Aspergillus nidulans* (Bauer et al., 2006),),
-*H. jecorina* (Saloheimo et al., 1997; Foreman et al., 2003),
-*Phanerochaete chrysosporium* (Wymelenberg et al., 2002),
-Thermoascus aurantiacus και *T. terrestris* (Harris et al., 2010), και
-*Volvariella volvacea* (Ding et al., 2006).
-*Thermoascus aurantiacus*(Langston et al,2011) ,
-*Phanerochaete chrysosporium* (Westereng et al , 2011).
Αρχικά όπως αναφέραμε η οικογένεια αυτή κατατάχτηκε στις γλυκοζιδικές υδρολάσες δηλαδή σε μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που διασπούν το γλυκοζιδικό δεσμό που ενώνει τις μονάδες των σακχάρων σε έναν πολυσακχαρίτη ή ολιγοσακχαρίτη. Σχεδόν όλα τα ένζυμα που έχουν μελετηθεί ως προς τη δραστικότητά τους σε διάφορα υποστρώματα παρουσιάζουν εξαιρετικά ασθενή κυτταρινολυτική δράση. Εξαίρεση αποτελεί η CEL1 από τον A. bisporus (Armesilla et al., 1994) που δεν παρουσιάζει ανιχνεύσιμη κυτταρινολυτική δράση .

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα ένζυμα της οικογένειας αυτής δεν ανήκουν στις γλυκοζιδικές υδρολάσες. Στην πραγματικότητα φαίνεται να διασπούν την αλυσίδα του πολυσακχαρίτη μέσω ενός οξειδωτικού μηχανισμού που εξαρτάται από έναν εξωτερικό δότη ηλεκτρονίων ενώ για την δράση τους απαιτείται ένα ιόν χαλκού, δεσμευμένο στο ενεργό τους κέντρο. Για το λόγο αυτό ονομάστηκαν μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών που δεσμεύουν το

χαλκό (Cu-dependent polysaccharide monooxygenases PMOs) (Phillips et al. 2011; Quinlan et al. 2011 ; Zifcakova et al. 2012)

3.1 Μηχανισμός δράσης ενζύμων της οικογένειας GH61

Παρά την εκτεταμένη έρευνα για τις GH61 , ο μηχανισμός ενίσχυσης κατά την αποδόμηση της λιγνοκυτταρινούχου υλικό παραμείνει αδιευκρίνιστος. Έχει δειχθεί ότι οι GH61 ενισχύουν τη διάσπαση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών άλλα όχι καθαρών κυτταρινών όπως η μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, η κυτταρίνη που έχει υποστεί κατεργασία με φωσφορικό οξύ (phosphoric acid-swollen cellulose PASC)
Οι κρυσταλλικές δομές δύο πρωτεϊνών της οικογένειας GH61 δεν έδειξαν κάποιο ενεργό κέντρο τυπικό για γλυκοζιδικές υδρολάσες. Και οι δύο κρυσταλλικές δομές διέθεταν ένα δεσμευμένο μέταλλο κοντά σε μια ομάδα επιφανειακών αμινοξέων, παρουσιάζοντας ένα υποθετικό ενεργό κέντρο άγνωστης λειτουργίας.
Μια δομικά ομόλογη περιοχή βρίσκεται στην πρωτεΐνη πρόσδεσης στην χιτίνη CBP21 (chitin binding protein-21). Η CBP21 είναι μια βακτηριακή πρωτεΐνη η οποία πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι διασπά την χιτίνη σε ολιγομερή οξειδωμένα στο αναγωγικό σε μία αντίδραση που εξαρτάται από την παρουσία οξυγόνου (O_2) και αναγωγικούς παράγοντες. Με βάση αυτό το αποτέλεσμα, προτάθηκε ότι η CBP21 αποικοδομεί την χιτίνη με δράση οξυγενάσης χιτίνης με ένα μηχανισμό που καταναλώνεται το οξυγόνο και ο αναγωγικός παράγοντας ως συν-υποστρώματα. Πολύ πρόσφατα, η CelS2, μια άλλη βακτηριακή ομόλογο του GH61, φάνηκε ότι διασπά την κυτταρίνη σε ένα μίγμα οξειδωμένων και μη κελλοδεξτρινών σε μια αντίδραση που εξαρτιόταν από την παρουσία αναγωγικού παράγοντα.
Δεδομένης της δομικής ομοιότητας της CBP21 και της CelS2 με τις GH61, έχει προταθεί ότι και οι τελευταίες δρουν με παρόμοιο μηχανισμό κατά την να αποικοδόμηση της κυτταρίνης (Langton).

3.2 Δομικές ιδιότητες των μονοοξυγενασών πολυσακχαριτών (PMOs)

Είναι μικρές πρωτεΐνες με μοριακή μάζα που κυμαίνεται από 20 έως 50 kDa (Baldrian & Valaskova 2008; Harris et al. 2010). Το 2008,οι Karkehabadi et al. και οι συνεργάτες του, ανέδειξαν μια πρωτεΐνη που αναδιπλώνεται σε β-σάντουιτς με δυο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα και έχει τοπολογία

ανάλογη της ανοσοσφαιρίνης. Η δομή τους παρουσιάζει ομοιότητα με την δομή δύο πρωτεϊνών :

α) *της μονοοξυγενάσης του μεθανίου* (methane monooxygenase Cu-MMO) . Και τα δύο ένζυμα εμπλέκονται με την οξειδωτική χημεία υποδεικνύοντας ότι το στήριγμα χαλκού-ιστιδίνης (copper histidine brace) αντιπροσωπεύει μία ειδική κατηγορία οξειδασών χαλκού. (Quinlan et al. 2011).

β) *της οξυγενάσης CBP21* που υδρολύει την χιτίνη (Vaaje-Kolstad et al. 2010; Quinlan et al. 2011). Και οι δύο πρωτεΐνες απαιτούν δύο μόρια οξυγόνου για την διάσπαση και την οξείδωση του προϊόντος . Το ένα μόριο νερού προέρχεται από το νερό και το άλλο μπαίνει στην αντίδραση με την μορφή μοριακού οξυγόνου που είναι απαραίτητος για την άμεση οξείδωση του υποστρώματος.

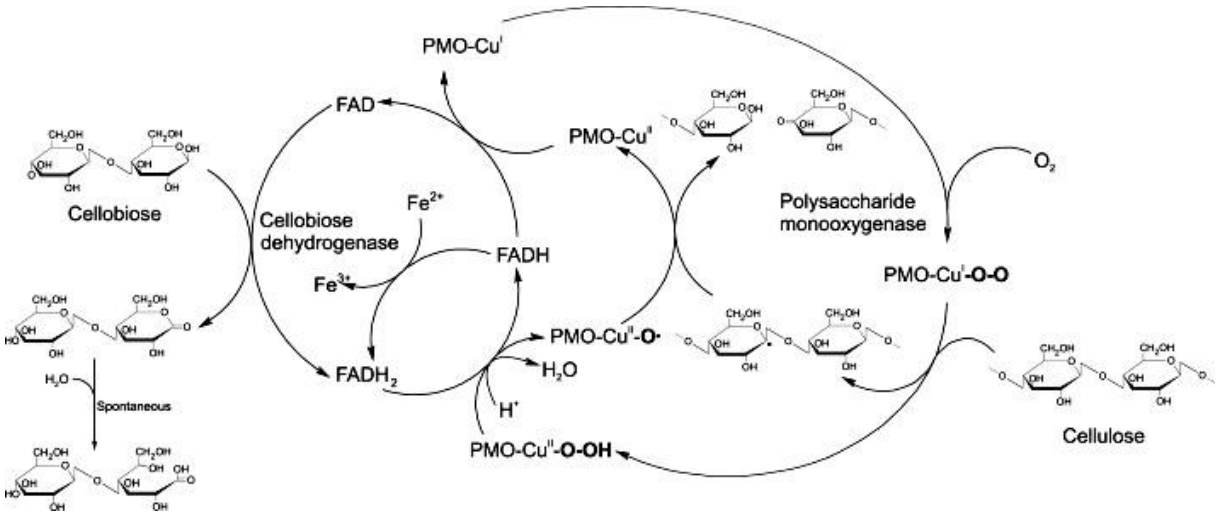
Το ενεργό τους κέντρο δεν μοιάζει με αυτή των γλυκοζιδικών υδρολασών αλλά αποτελείται από μία μεγάλη πολική επιφάνεια με λίγες αρωματικές πλευρικές αλυσίδες

Η σημασία του ατόμου του χαλκού για την δραστικότητα του ενζύμου αποδεικνύεται από το γεγονός ότι το ένζυμο ήταν ανενεργό στην απουσία μετάλλου (Raguz et al. 1992; Saloheimo et al. 1997; Karlsson et al. 2001; Bauer et al. 2006; Koseki et al. 2008) ή μετά από την προσθήκη EDTA ως χηλικό παράγοντα (Hara et al. 2003; Karkehabadi et al. 2008; Harris et al. 2010; Vaaje-Kolstad et al. 2010) και επίσης παρατηρήθηκε ότι η δράση της PMO μετά από την επεξεργασία με EDTA θα μπορούσε να αντικατασταθεί από την προσθήκη χαλκού (Westereng et al. 2011).

Η PMO δεσμεύει τον Cu^2 με στοιχειομετρία 1:1. Ο Cu^2 συνδέεται στον ενεργό κεντρο τόσο ισχυρά που η ολική απομεθυλίωση (demethylation) είναι σχεδόν αδύνατη. Οποιαδήποτε ποσότητα χαλκού από το διάλυμα ή από το υπόστρωμα μπορεί να είναι αρκετή για να ενεργοποιήσει την PMO, ανεξάρτητα από την προσθήκη άλλων μετάλλων (Quinlan et αϊ. 2011). Για παράδειγμα η PcGH61D πρωτεΐνη που απομονώθηκε από τον *P. chrysosporium* έχει από μόνη της Cu στη ενεργό θέση της και οπότε δεν χρειάζεται καμία προσθήκη ιόντων άλλου μετάλλου για την ενζυμική δράση (Westereng et αl. 2011).

3.3 Καταλυτική δράση της PMO

Τελικά όπως αναφέραμε και πιο πάνω τα μέλη της οικογένειας 61 δεν θεωρούνται πλέον ότι δρουν ως γλυκοζιδικές υδρολάσες αλλά ως μονοοξυγενάσες χαλκού που καταλύουν την κυτταρίνη οξειδωτικώς και απελευθερώνουν κελλοδεξτρίνες (cellodextrins) (Langston et al. 2011; Phillips et al. 2011; Quinlan et al. 2011).
Προτείνεται ότι σε κάθε καταλυτικό κύκλο μεταφέρονται δύο ηλεκτρόνια μεταξύ της κελλοβιόζης αφυδρογονάσης (cellobiose dehydrogenase) και της PMO .



Εικόνα 4. Αντιδράσεις που καταλύονται από πολυσακχαρίτη μονοοξυγενάση και την προτεινόμενη συνεργασία των PMO με την κελλοβιόζη αφυδρογονάση. (Baldrian & Valaskova 2008; Phillips et al. 2011).

Αυτές οι δύο δρουν συνεργιστικά στην αύξηση της συνολικης μετατροπης της κυτταρινάσης από κυτταρινάσες (κελλοβιοϋδρολάσης και ενδογλουκανάσης). Παρουσία της κυτταρίνης και της β-γλυκοζιδάσης , η μονοοξυγενάση ενισχύει την δράση της β-γλυκοζιδάσης κατά πολλές φορές (Phillips et αl. 2011. Jordan et αl. 2012). Ο συνεργιτισμός αυτός πιστεύεται ότι προέρχεται κυρίως από την παραγωγή των ελεύθερων άκρων για τις κυτταροβιοϋδρολάσες και συνεπώς για την προαγωγή της δραστηριότητάς τους (Langston et αϊ. 2011).

Ο τρόπος δράσης τους είναι πολύ πιθανό, μια τυχαία χάραξη της κυτταρινικής αλυσίδας, όπου ανοίγονται νέες θέσεις για την δράση της κυτταρινάσες (Langston et al. 2011). Για παράδειγμα η PcGH61D κόβει την κυτταρίνη στο γλυκοζιδικό δεσμό αφήνοντας ένα από τα νέα άκρα της αλυσίδας οξειδωμένα σε μία λακτόνη , η οποία αργότερα μετατρέπεται αυθόρμητα σε διάλυμα αλδονικού οξέος (Westereng et al. 2011).

4 ***Sporotrichum thermophile***

Ο *Sporotrichum thermophile* αποτελεί το στάδιο αγενούς αναπαραγωγής του μύκητα *Thielavia heterothallica* δηλαδή την αναμορφή του ενώ ο *Mycheliophthora thermophila* αποτελεί το εγγενές στάδιο αναπαραγωγής και είναι ετεροθαλικός μύκητας. Απομονώνεται συνήθως από το χώμα ή από αυτοθερμαινόμενα λιπάσματα (Domsch, K.H. et al., 1993) και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι μεταξύ 45°C και 50°C. Παράγει θερμοσταθερά ένζυμα και είναι ένα πολύ καλό αποικοδομητή πολυσακχαριτών.
Ο *Sporotrichum thermophile* παράγει πολλαπλές μορφές β-γλυκοσιδάσες οι οποίες είναι είτε ενδοκυτταρικές είτε δεσμευμένες στο κυτταρικό τοίχωμα. Αναπτύσσεται ταχύτατα και παράγεται σε απλό υπόστρωμα.

Εικόνα 5 *Sporotrichum thermophile* (http://genome.jgi-psf.org/Spoth1/Spoth1.home.html)

Πίνακας 2 Ταξινόμηση του μύκητα *Sporotrichum thermophile* (*Thielavia heterothallica*)

Κωδικός ταξινόμησης (Taxonomy ID): 573728

Βασίλειο:	Μύκητες
Υποβασίλειο:	Δικάρυα
Φύλο:	Ασκομύκητες
Υπόφυλο:	Pezizomycotina
Υπερσυνομοταξία:	*Leotiomyceta*
Συνομοταξία:	*Sordariomyceta*
Ομοταξία:	*Sordariomycetes*
Υφομοταξία:	*Sordariomycetidae*
Τάξη:	*Sordariales*
Οικογένεια:	*Chaetomiaceae*
Γένος:	*Thielavia*
Είδος:	*Thielavia heterothallica*

Μερικές φορές συναντάται στην βιβλιογραφία ως:
-*Myceliophthora thermophila* (A.E. Apinis C.A., van Oorschot 1977)
-*Chrysosporium thermophium* (A.E. Apinis, A. von Klopotek 1974)
-*Thielavia heterothallica* (A. von Klopotek, 1976)
-*Corynascus heterothallicus* (A. von Klopotek, J.A. von Arx et al., 1983)

4.1 Το *S. thermophile* ενας θερμοφιλος μύκητας

Οι θερμόφιλοι μύκητες είναι τα κύρια συστατικά της μικροχλωρίδας που αναπτύσσονται σε μάζες του φυτικού υλικού, σε σωρούς των γεωργικών και δασοκομικών προϊόντων, καθώς και σε άλλες συγκεντρώσεις οργανικής ύλης, όπου το ζεστό, υγρό, και αερόβιο περιβάλλον παρέχουν τις ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη τους.

Αποτελούν τους μόνους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που μπορούν να πολλαπλασιάζονται σε θερμοκρασια πάνω από 45 ^{O}C και γι' αυτό το λόγο αποτελούν πολύτιμα εργαλεία για πειραματικές διεργασίες που γίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, ο μύκητας *Sporotrichum thermophile* αναπτύσσεται βέλτιστα σε θερμοκρασίες 35-48°C, αλλά μπορεί να καλλιεργηθεί και μεταξύ 25-55°C, και παρουσιάζει ανοχή σε σύντομη έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες, π.χ. 59°C (Bhat & Maheshwari, 1987). Στους 30 ^{O}C, ο ρυθμός ανάπτυξης του βρέθηκε 0,11 h^{-1} με το μύκητα να παρουσιάζει μυκήλιο μικρών διαστάσεων και να δημιουργεί πρόωρα σπόρια αγενούς αναπαραγωγής, τα κονίδια (Maheshwari *et al.,* 2000).

Ο ρυθμός ανάπτυξης στους 50 ^{O}C υπολογίζεται σε 0,23 h^{-1}, ενώ στους 30 ^{O}C σε 0,11 h^{-1}. Εκτός από το ρυθμό ανάπτυξης, παρατηρείται διαφορά και στη μορφολογία των αποικιών, καθώς στους 30 ^{O}C ο μύκητας αναπτύσσει μηκύλιο μικρών διαστάσεων και δημιουργεί πρόωρα σπόρια αγενούς αναπαραγωγής (κονίδια) [Maheshwari *et al.,* 2000]. Ίσως πρόκειται για ένα μηχανισμό παραγωγής σπορίων στο συντομότερο χρονικό διάστημα, σε μη ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης.

4.2 Συνεισφορά του *Sporotrichum thermophile* στην αποικοδόμηση του λιγνοκυτταρινούχου υλικού

Για την παραγωγή βιοκαυσίμων, επεξεργάζεται την λιγνοκυτταρινούχα ουσία, υπό υψηλές θερμοκρασίες έτσι ώστε να μειωθεί το ιξώδες των πολτών της βιομάζας. Επομένως χρειάζεται θερμόφιλα ενζυμα, ανθεκτικά σε τέτοιες θερμοκρασίες. Γεγονός ότι το *S. thermophile*, παράγει θερμόφιλα ένζυμα τα οποία είναι και σταθερά κατά την διάρκεια της όλης διαδικασίας, παίζει σημαντικό ρόλο στην βιομηχανική χρήση του μικροοργανισμου.

Έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από το *S. thermophile* διάφορα εξωκυτταρικά θερμοσταθερά ενζυμα που συμμετέχουν στην διάσπαση της βιομάζας όπως

-ενδογλουκανάσες (Bhat, K.M., Maheshwari, R.,1987, Roy, S.K. et al., 1990)
-β-γλυκοζιδάσες , εξωγλουκανάσες (Bhat, K.M., Maheshwari, R.,1987)
-λακάσες (Berka, R. et al. ,1997)
-ενδοξυλανάσες (Katapodis, P. et al.,2003)
-αφυδρογονάσες της σελλοβιόζης (Subramaniam, S. et al.,1999, Canevascini, G. et al., 1991)
-εστεράσες του φερουλικού οξέος (Topakas, E. et al., 2004)

Υπάρχουν βέβαια και άλλα ενδιαφέροντα ενζυμα που έχουν απομονωθεί από το *S. Thermophile* και είναι:
-β-γλυκοζιδάση (Maheshwari, R. et al. (2000))
-πεκτινάσες (Le Nours, J. et al., 2003, Kaur, G. et al., 2004)
-λιπάσες (Johri, B.N. et al., 1990)
-αμυλάσες (Adams, P.A. ,1997, Sadhukhan, R. ,1992)
-φυτάσες(Wyss, M. et al., 1999)
-θειοτρανσφεράση της γλουταθειόνης (Sheehan, D., Casey, J.P., 1993)
-αφυδρογονάση του μηλικού (Wali, A.S. et al., 1979)

5. ***Pichia pastoris*: Σύστημα ετερόλογης υπερέκφρασης πρωτεϊνών**

Η *Pichia pastoris* είναι ένας ευκαρυωτικός μονοκύτταρος μικροοργανισμός, που ανήκει στην ομάδα των ζυμομυκήτων, που χρησιμοποιεί τη μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, για αυτό το λόγο χαρακτηρίζεται ως μεθυλότροφος ζυμομύκητα.
Η Pichia χρησιμοποιείται ευρέως ως κύτταρο ξενιστή στην ετερόλογη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς διαθέτει μία σειρά από πλεονεκτήματα που την καθιστούν οργανισμό-μοντέλο σε αυτή την διαδικασία.
Σε σύγκριση με άλλα ευκαριωτικά συστήματα έκφρασης όπως αυτό του βακυλοϊού ή των καλλιεργειών κυττάρων θηλαστικών η P. pastoris διαθέτει υψηλό ρυθμό ανάπτυξης και είναι σε θέση να αναπτυχθεί σε ένα απλό, φθηνό μέσο, παραδείγματος χάρη μπορεί να αναπτυχθεί είτε σε φιάλες υπό ανάδευση είτε σε ζυμωτήρα, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη τόσο για μικρή όσο και για μεγάλη κλίμακα παραγωγής.
Εκτός το ότι χειρίζεται και καλλιεργείται εύκολα, η *P. Pastoris* ως ευκαρυωτικός μικροοργανισμός παράγει σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες, οι όποιες έχουν υποστεί όλες τις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις που είναι απαραίτητες για τη λειτουργικότητά τους.
Η *P. Pichia* έχει δύο γονίδια αλκοολικής οξειδάσης, τα AOX1 και AOX2, τα οποία έχουν ένα ισχυρό υποκινητή (inducible promoter). Αυτά τα γονίδια επιτρέπουν στην Pichia να χρησιμοποιεί την μεθανόλη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας.
Τέλος, η *P. pastoris*, δεν εκκρίνει πολλές δικές της πρωτεΐνες στον εξωκυττάριο χώρο με αποτέλεσμα να καθίσταται ευκολότερη η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που εκκρίνονται εκεί.

Εικονα 6. Μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris* (http://bioinformatics.psb.ugent.be/genomes/)

Πίνακας 3. Ταξινόμηση της ζύμης *Pichia pastoris*

Ταξινόμηση:

Βασίλειο:	Μύκητες
Υποβασίλειο:	Δικάρυα
Φύλο:	Ασκομύκητες
Ομοταξία:	*Saccharomycetes*
Τάξη:	*Saccharomycetales*
Οικογένεια:	*Saccharomycetaceae*
Γένος:	*Komagataella*
Είδος:	*Komagataella pastoris (Pichia pastoris)*

Μερικές φορές συναντάται στην βιβλιογραφία ως:
-*Komagataella pastoris* (Guillierm)
-*Saccharomyces pastoris* (Guillierm)
-*Zygosaccharomyces pastoris* (Guillierm)

5.1 Η *Pichia pastoris* ως μεθυλότροφη ζύμη

Όπως προαναφέρθηκε, η *Pichia pastoris* χαρακτηρίζεται ως μεθυλότροφη ζύμη, διότι είναι ικανή να μεταβολίζει την μεθανόλη και να την χρησιμοποιεί ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Το πρώτο βήμα στον καταβολισμό της μεθανόλης είναι η οξείδωσή της σε φορμαλδεΰδη, με την κατανάλωση μοριακού οξυγόνου (αερόβιος μεταβολισμός), αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο αλκοολική οξειδάση (AOX, EC 1.1.3.13) παράγεται και υπεροξείδιο του υδρογόνου το οποίο είναι τοξικό προϊόν (Ledeboer et al., 1985). Με σκοπό την αποφυγή της τοξικότητας του υπεροξειδίου, ο καταβολισμός της μεθανόλης λαμβάνει χώρα στα υπεροξεισώματα, τα οποία διαχωρίζουν τα τοξικά υποπροϊόντα από το υπόλοιπο κύτταρο. Όταν η *Pichia pastoris* αναπτύσσεται σε διαφορετικό υπόστρωμα, ανιχνεύονται στο κύτταρο πολύ λίγα υπεροξεισώματα, ενώ παρουσία μεθανόλης τα υπεροξεισώματα μπορεί να περιλαμβάνουν μέχρι και το 80 % του συνολικού όγκου του κυττάρου.

Το γονίδιο της αλκοολικής οξειδάσης υπόκειται αυστηρή ρύθμιση, δηλαδή εάν η *Pichia pastoris* αναπτύσσεται σε γλυκόζη ή αιθανόλη, η αλκοολική οξειδάση δεν ανιχνεύεται στα κύτταρα της ζύμης. Αντιθέτως, όταν η μεθυλότροφη ζύμη αναπτύσσεται σε μεθανόλη, η αλκοολική οξειδάση μπορεί να αποτελεί μέχρι και το 35% των συνολικών πρωτεϊνών του κυττάρου. Ο έλεγχος της ποσότητας της αλκοολικής οξειδάσης γίνεται μεταγραφικά (Cregg et al., 1985).

5.2 AOX γονίδιο αλκοολικής οξειδάσης

Το γονιδίωμα της *Pichia* περιλαμβάνει δύο γονίδια, το AOX1 και AOX2, που κωδικοποιούν για ένζυμα με ενεργότητα αλκοολικής οξειδάσης (Cereghino JL, Cregg JM,2000). Όμως το γονίδιο AOX1 είναι υπεύθυνο για την πλειοψηφία των δράσεων της αλκοολικής οξειδάσης στο κύτταρο.

Το γονίδιο AOX1 μπορεί να αποδίδει το 30% των διαλυτών πρωτεϊνών, όταν η *Pichia pastoris* αναπτύσσεται σε υπόστρωμα που περιέχει μόνο μεθανόλη, κάτι που αποδεικνύει πόσο ισχυρός είναι ο υποκινητής του, pAOX1 (Couderc R, Baratti J, 1980). Εν αντιθέσει, το γονίδιο AOX2 βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός λιγότερο ισχυρού υποκινητή, pAOX2, και κατά συνέπεια

αντιπροσωπεύει μόνο το 15% της συνολικής ενεργότητας της αλκοολικής οξειδάσης στο κύτταρο (Cregg,1989).
Οι κωδικές περιοχές των γονιδίων αυτών παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους, συγκεκριμένα 92% ομολογία σε νουκλεοτίδια και 97% ομολογία σε αμινοξέα (Ohi,1994), και συνεπώς παρουσιάζουν και τα δύο κοινή ενεργότητα αλκοολικής οξειδάσης, ενώ οι υποκινητές τους δεν παρουσιάζουν καμία ομολογία, και για αυτό το λόγο παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις στις ιδιότητές τους.
Το γονίδιο AOX1 έχει απομονωθεί και ο υποκινητής του χρησιμοποιείται για να οδηγήσει την έκφραση οποιουδήποτε ανασυνδυασμένου γονιδίου πρόκειται να μελετηθεί (Ellis et al., 1985, Koutz et al., 1989, Tschopp et al., 1987a).
Διακρίνονται τρεις φαινότυποι *Pichia pastoris*, ανάλογα με τη δυνατότητα του κάθε στελέχους να καταβολίζει την μεθανόλη. Ο φαινότυπος Mut^+ (Methanol utilization plus), όπου και τα δύο γονίδια, AOX1 και AOX2, είναι ενεργά και λειτουργικά, ο φαινότυπος Mut^S (Methanol utilization Slow), όπου το γονίδιο AOX1 έχει απενεργοποιηθεί, και κατά συνέπεια η μεθανόλη καταβολίζεται μόνο από το AOX2 με πιο αργούς ρυθμούς, και τέλος, ο φαινότυπος Mut^- (Methanol utilization minus), στον οποίο έχουν απενεργοποιηθεί και τα δύο γονίδια αλκοολικής οξειδάσης, με συνέπεια το στέλεχος αυτό να μην επιβιώνει σε υπόστρωμα που περιέχει μόνο μεθανόλη, καθώς δεν μπορεί να την καταβολίσει (Cereghino & Cregg,2000). Κατά την πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιούνται οι φαινότυποι Mut^+ και Mut^S για την αξιολόγηση των μετασχηματισμένων κυττάρων *Pichia pastoris*.

5.3 υποκινητής pAOX1 και η ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών

Ο υποκινητής pAOX1 έχει καταλυτικό ρόλο στην ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών στην *Pichia pastoris*, καθώς τοποθετείται μπροστά από το ανασυνδυασμένο γονίδιο, του οποίου η έκφραση εξαρτάται πλέον από αυτόν. Επιλέγεται αυτός ο υποκινητής διότι ενεργοποιείται μόνο παρουσία μεθανόλης και κατά συνέπεια, η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι απόλυτα ελεγχόμενη από το θρεπτικό υπόστρωμα (Cereghino & Cregg, 2000). Παρουσία μεθανόλης, παράγονται μεγάλες ποσότητες ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, ενώ όταν στο θρεπτικό υπόστρωμα περιέχονται επιπλέον ποσότητες γλυκερόλης ή γλυκόζης, η έκφραση του υποκινητή καταστέλλεται. Συγκεκριμένα, η γλυκερόλη καταστέλλει το μονοπάτι καταβολισμού της μεθανόλης. Γενικά, η δυνατότητα καταστολής

της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι πολύ χρήσιμη σε περίπτωση που αυτές είναι τοξικές για το κύτταρο σε υψηλά επίπεδα.
Επιλέγεται ο υποκινητής AOX1, διότι ο υποκινητής AOX2 προκαλεί την παραγωγή χαμηλότερων επιπέδων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.
Πρόσφατα, έγινε δυνατή η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί για το ένζυμο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής-γλυκερυναλδεΰδης (GAP). Ο υποκινητής αυτός, μπορεί να αντικαταστήσει την λειτουργία του υποκινητή AOX1, σε περιπτώσεις που οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που παράγονται δεν είναι τοξικές, αλλά επειδή η λειτουργία του δεν εξαρτάται από την παρουσία μεθανόλης στο υπόστρωμα, συχνά αυτό προκαλεί προβλήματα στην πειραματική διαδικασία.

5.4 Έκφραση πρωτεϊνών στην *Pichia pastoris*

Η ετερόλογη έκφραση στην *Pichia pastoris* μπορεί να είναι είτε ενδοκυτταρική είτε εξωκυτταρική. Στη δεύτερη περίπτωση, πρέπει η αλληλουχία του γονιδίου που εκφράζεται να περιέχει και μία σηματοδοτική αλληλουχία που θα οδηγήσει την πρωτεΐνη έξω από το κύτταρο. Η πιο διαδεδομένη σηματοδοτική αλληλουχία που χρησιμοποιείται στην ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών είναι ο παράγοντας α που απομονώνεται από τον *Saccharomyces cerevisiae* (Cregg et al., 1993, Scorer et al., 1993).
Το βασικό πλεονέκτημα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών που εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο είναι το γεγονός ότι η *Pichia pastoris* εκκρίνει πολύ χαμηλά επίπεδα δικών της πρωτεϊνών στο εξωκυττάριο υγρό και επίσης το θρεπτικό μέσο στο οποίο καλλιεργείται δεν περιέχει επιπλέον πρωτεΐνες, με συνέπεια οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες να αποτελούν την συντριπτική πλειονότητα των συνολικών πρωτεϊνών στον εξωκυττάριο χώρο, κάνοντας πιο εύκολη την απομόνωσή τους. Έτσι, η έκκριση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στον εξωκυττάριο χώρο αποτελεί και το πρώτο βήμα καθαρισμού τους, καθώς διαχωρίζονται από το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών της *Pichia pastoris.*

5.5 Μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Η *Pichia pastoris*, ως ευκαρυωτικός οργανισμός, έχει τη δυνατότητα να πραγματοποιεί πολλές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, ανάλογες με αυτές που πραγματοποιούνται σε ανώτερους οργανισμούς. Αυτές περιλαμβάνουν την επεξεργασία των αλληλουχιών που κωδικοποιούν για πεπτίδια οδηγούς, το δίπλωμα της πρωτεΐνης, τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, καθώς και την Ο- και Ν-γλυκοζυλίωση.
Στην *Pichia pastoris* συμβαίνει Ν-γλυκοζυλίωση μόνο με ολιγοσακχαρίτες που περιλαμβάνουν λίγα κατάλοιπα μαννόζης (8-14 κατάλοιπα μαννόζης σε κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα), γι΄αυτό το λόγο οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που παράγονται δεν υπεργλυκοζυλιώνονται (Grinna & Tschopp, 1989), σε αντίθεση με τον *Saccharomyces cerevisiae*, όπου μπορεί να συμβεί υπεργλυκοζυλίωση λόγω του ότι υπάρχει η δυνατότητα πρόσδεσης πολλών καταλοίπων μαννόζης (50-150). Γενικά, στην *Pichia pastoris* δεν παρατηρείται Ο-γλυκοζυλίωση. Σε αντίθεση με τον *Saccharomyces cerevisiae*, η *Pichia pastoris* δεν μπορεί να σχηματίσει α 1,3 δεσμούς γλουκάνης στα τελικά άκρα ολιγοσακχαριτών (Cregg et al.,1993).
Η Pichia pastoris έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς ως ευκαρυωτικός οργανισμός, σε αντίθεση με τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, που εξαιτίας του αναγωγικού δυναμικού του κυτταροπλάσματος δεν μπορούν να σχηματίσουν τέτοιους δεσμούς (White et al., 1994).

5.6 Πλασμιδιακοί φορείς

Για να εισέλθει το επιθυμητό γονίδιο στην *Pichia pastoris*, πρέπει πρώτα να συνενωθεί με έναν πλασμιδιακό φορέα έκφρασης. Οι πλασμωδιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται στην ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών στην *Pichia pastoris* έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, έχουν μία κοινή κασσέτα έκφρασης του ξένου γονιδίου που περιλαμβάνει τον υποκινητή AOX1 (pAOX1), ακολουθουμένου από μία σειρά θέσεων που αναγνωρίζουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες (restriction sites), όπου και εισάγεται το ξένο γονίδιο, η οποία ακολουθείται από μία αλληλουχία λήξης της μεταγραφής του γονιδίου AOX1, που κατευθύνει τον σχηματισμό της 3΄μη μεταφραζόμενης περιοχής και την πολυαδενυλίωση του mRNA. Έπίσης, κάποιοι πλασμιδιακοί φορείς περιλαμβάνουν και γειτονικές αλληλουχίες του γονιδίου AOX1, που προέρχονται από το γονιδίωμα της *Pichia pastoris*, και

χρησιμοποιούνται για να κατευθύνουν την αντικατάσταση του γονιδίου AOX1 με το ξένο γονίδιο. Επιπλέον χαρακτηριστικά που υπάρχουν σε ορισμένους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης εξυπηρετούν συγκεκριμένες λειτουργίες στη διαδικασία της ετερόλογης έκφρασης. Για παράδειγμα, όταν η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, ο πλασμιδιακός φορέας που θα χρησιμοποιηθεί, πρέπει να περιλαμβάνει μία αλληλουχία DNA που θα βρίσκεται μετά τον υποκινητή AOX1 (pAOX1) και θα κωδικοποιεί ένα σηματοδοτικό μήνυμα που θα επιτρέπει στην πρωτεΐνη να εξέλθει από το κύτταρο. ΄Οπως προαναφέρθηκε, συνήθως χρησιμοποιείται ο παράγοντας α του *Saccharomyces cerevisiae*, όμως σε ορισμένους πλασμιδιακούς φορείς, χρησιμοποιείται η σηματοδοτική αλληλουχία του γονιδίου της όξινης φωσφατάσης της *Pichia pastoris*. Οι περισσότεροι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης, περιέχουν ένα γονίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, κάτι ο οποίο προσφέρει τη ικανότητα επιλογής και εμπλουτισμού των κλώνων της *Pichia pastoris* που έχουν δεχτεί το ξένο γονίδιο.

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης στην *Pichia pastoris* είναι οι εξής:

α) Οι πλασμιδιακοί φορείς *pPIC3K* (ενδοκυτταρική έκφραση) και pPIC9K (εξωκυτταρική έκφραση), που περιέχουν το βακτηριακό γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη

β) Οι πλασμιδιακοί φορείς *pPICZ* (εξωκυτταρική έκφραση), που περιέχουν το Sh ble γονίδιο από τον μικροοργανισμό Streptoalloteichus hindustanus, ένα μικρό γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στη ζεοσίνη σε οργανισμούς όπως η Escherichia coli, σε ζύμες όπως η *Pichia pastoris*, αλλά και σε άλλους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Λόγω του ότι το Sh ble γονίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διαλογή των μετασχηματισμένων κλώνων και στην *Escherichia coli* και στην *Pichia pastoris*, οι πλασμιδιακοι φορείς που προσδίδουν ανθεκτικότητα στη ζεοσίνη είναι πιο μικροί (~3kb) και γι΄ αυτό είναι πιο εύκολο να τους χειριστεί κανείς, συγκριτικά με άλλους πλασμιδιακούς φορείς που χρησιμοποιούνται στον μετασχηματισμό κυττάρων *Pichia pastoris*. Οι φορείς αυτοί περιέχουν επίσης μία πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (multiple cloning site, MCS) που περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές αλληλουχίες στις οποίες δρουν διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες, έτσι ώστε να είναι εύκολη η εισαγωγή πληθώρας ξένων γονιδίων.Επίσης περιλαμβάνουν 6 αμινοξικά κατάλοιπα ιστιδίνης στη σειρά και ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για το πολυπεπτίδιο-επίτοπο myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) , τα οποία χρησιμοποιούνται ως

σηματοδότες για την ανίχνευση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και βρίσκονται στο καρβοξυτελικό της άκρο.

Για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών στην *Pichia pastoris*, συχνά χρησιμοποιούνται στελέχη της μεταλλαγμένα σε ένα γονίδιο (π.χ. *his4*, *arg4*), τα οποία μετασχηματίζονται με πλασμιδιακούς φορείς οι οποία φέρουν το επικρατές γονίδιο (HIS4, ARG4), με συνέπεια να γίνεται επιχιασμός σε εκείνη τη γονιδιακή θέση και τα μετασχηματισμένα κύτταρα να μετατρέπονται σε αγρίου τύπου. Για παράδειγμα, το γονίδιο HIS4 κωδικοποιεί για την αφυδρογονάση της ιστιδινόλης. Το μεταλλαγμένο στέλεχος στερείται αυτού του ενζύμου με συνέπεια να μην μπορεί να διασπά την ιστιδίνη και να μην μπορεί να αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας με ιστιδίνη. Κατά τον μετασχηματισμό των στελεχών αυτών με κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, τα στελέχη που δέχθηκαν το πλασμίδιο (με γονότυπο HIS4) και το ενσωμάτωσαν στο γονιδίωμά τους αντιστρέφουν την μεταλλαγή και μπορούν να αναπτυχθούν σε μέσο με ιστιδίνη. Έτσι γίνεται και η επιλογή τους.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *Pichia pastoris* αγρίου τύπου (X33). Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *pPICZaC,* το οποίο αφού γραμμικοποιείται, μετασχηματίζεται στα κύτταρα της *Pichia pastoris* που έχουν προηγουμένως καταστεί επιδεκτικά. Συνήθως, το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο εντάσσεται στο γονιδίωμα της *Pichia pastoris* με ομόλογο ανασυνδυασμό στην 5' AOX1 περιοχή. Με αυτό τον τρόπο εισάγεται ο υποκινητής AOX1 στο γονιδίωμα της *Pichia pastoris* με συνέπεια, σε υπόστρωμα μεθανόλης να παράγονται μεγάλες ποσότητες αλκοολικής οξειδάσης από τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν επιτυχώς. Παράλληλα όμως, παρουσία μεθανόλης, παράγονται και μεγάλες ποσότητες ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, οι οποίες οδηγούνται από το πεπτίδιο οδηγό του παράγοντα α και εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο. Σε αυτό το γεγονός βασίζεται και ο τρόπος διαλογής τους (Κεφάλαιο 2, 2ε). Ο φαινότυπος των μετασχηματισμένων στελεχών με ομόλογο ανασυνδυασμό είναι Mut^+, δηλαδή και τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα με ενεργότητα αλκοολικής οξειδάσης είναι ενεργά.

Πιο σπάνια όμως, σε ποσοστό 5-25% των μετασχηματισμών, μπορεί να συμβεί και διπλός ανασυνδυασμός στις περιοχές 5' AOX1 και 3' AOX1 (Romanos,1995) , κάτι που έχει ως αποτέλεσμα να αντικαθίσταται το γονίδιο της αλκοολικής οξειδάσης AOX1 από το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο, και κατά συνέπεια να μην μπορεί να εκφραστεί. Έτσι, εκφράζεται μόνο το γονίδιο AOX2, με αποτέλεσμα το στέλεχος να μπορεί να μεταβολίζει μικρές ποσότητες μεθανόλης και να έχει φαινότυπο Mut^S. Πολύ σπάνια, σε ποσοστό

1-10% των περιπτώσεων του ομόλογου ανασυνδυασμού μπορεί να συμβεί και πολλαπλή εισαγωγή πλασμιδίου.

5.7 Σύγκριση μεταξύ σύστημα έκφρασης της *Pichia pastoris* και του *E. Coli*

Για τις τρεις τελευταίες δεκαετίες χρησιμοποιείται το *E. Coli* ως κύτταρο ξενιστή για την έκφραση πρωτεϊνών αλλά η χρήση του είναι προβληματική όταν πρόκειται να εκφραστούν πρωτεΐνες από ευκαριωτικά γονιδιώματα, τα οποία απαιτούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Μπορεί επίσης να ληφθεί αδιάλυτες και μη-διπλωμένες πρωτεΐνες, και τότε απαιτείται διάλυση και αναδίπλωση.

Η εσφαλμένη αναδίπλωση μπορεί να είναι αποτέλεσμα ανεπαρκής ενδοκυτταρική συγκέντρωση η το αναγωγικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος. Η *E. Coli* είναι ακατάλληλη για την έκφραση πρωτεϊνών που περιέχουν υψηλό επίπεδο δισουλφικού δεσμό (disulphide connectivity) η που απαιτούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως γλυκοζυλίωση, cis/trans ισομερισμού προλίνη, δισουλφίδιο ισομερισμού, λιπίδωση, θείωση η φωσφορυλίωση. Ακόμη οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες τείνουν να διατηρήσουν στα άκρα τους την μεθειονίνη, που μπορεί να επηρεάσει την σταθερότητα και την ανοσογονικότητα τους.

Συνεπώς η επιτυχή έκφραση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την δομή και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης και έτσι περιορίζεται η χρήση του.

Μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών που δεν μπορούν να εκφραστούν στην *E. Coli* παράγονται στην μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris.*

Αυτό οφείλεται αναμφίβολα σε διαφορές όσον αφορά την αναδίπλωση της πρωτεΐνης και στην ανικανότητα της *E. Coli* να εκτελέσει μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Εκτός το ότι το σύστημα έκφρασης της P. Pastoris επιτρέπει την αυθεντική πρωτεΐνη να εκκρίνεται σε διαλυτή μορφή, έχει και την ικανότητα να παράγει μεγάλες ποσότητες της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Για την επιτυχής έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πρέπει να λαμβάνονται υπόψη μερικοί παράγοντες, ειδικά όταν πρόκειται για πολύπλοκα συστήματα όπως συνδυασμό γονιδίων η πολλαπλά πειράματα αντιγραφή γονιδίου. Οι παράγοντες είναι οι έξης

- Επιλογή στελεχών έκφρασης
- Επιλογή φορέων έκφρασης
- Μέθοδος μετατροπής/ενσωματωση μέσα στο γονιδίωμα
- Επιλογή υποκινητή

- Μέθοδοι για την επίτευξη πολλαπλών αντιγραφών
- Χρήση φαινοτύπων Mutþ και Muts
- Έλεγχο ενδοκυτταρικής έκφρασης
- Αναδίπλωση, κλπ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μικροοργανισμοί

1. Ο θερμόφιλος μύκητας *Sporotrichum thermophile* ή *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464 που προμηθεύτηκε από την εταιρεία DSMZ (DSM No:1799, Γερμανία). Η συντήρηση του γινόταν στους 4 ^{o}C σε δοκιμαστικούς σωλήνες με στερεό υπόστρωμα υπό κλίση (slant) μετά από επώαση στους 45 ^{o}C για 5-6 ημέρες. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν κάθε 20-30 ημέρες προς αποφυγή μολύνσεων.
2. Η μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris* στέλεχος X-33 (γονότυπος: άγριος τύπος, φαινότυπος: Mut+) για την ετερόλογη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση και έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών προμηθεύτηκαν από την εταιρία Invitrogen (Η.Π.Α).

1.2 Σύσταση θρεπτικών μέσων για την ανάπτυξη της ζύμης *P. Pastoris*

Για την ανάπτυξη της ζύμης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής συστατικά

- YPD (Yeast Peptone Dextrose medium): 1%(w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 2% (w/v) δεξτρόζη

- YPDS (Yeast Peptone Dextrose Sorbitol medium)): 1%(w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 2% (w/v) δεξτρόζη, 1M σορβιτόλη

- MD (Minimal Dextrose): 1.34 % (w/v) YNB(Yeast Nitrogen Base), 2% (w/v) δεξτρόζη (MD), $4x10^{-5}$ (w/v) βιοτίνη και 1.5% άγαρ

- MM (Minimal Methanol): 1.34 % (w/v) YNB, 0.5% μεθανόλη (M/M) (*v/v*), $4x10^{-5}$ (w/v) βιοτίνη και 1.5% άγαρ

- BMGY (Buffered Glycerol complex medium): 1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης , 2% (w/v) πεπτόνη , 100 m*M* ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικό κάλιο pH 6.0, 1.34% (w/v) YNB , $4x10^{-5}$ (w/v) βιοτίνη , 1% (v/v) γλυκερόλη.

- BMMY (Buffered Methanol complex medium): 1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης , 2% (w/v) πεπτόνη , $4x10^{-5}$ (w/v) βιοτίνη , 0.5% (v/v) μεθανόλη.

Σύσταση διαλύματος YNB :34g YNB + 100g θειικό αμμώνιο/lt

1.3 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας μικροοργανισμών

Για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν με απιονισμένο νερό και αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 121 ^{o}C για 15 min και υπό πίεση 0.1 Mpa. Οι βιταμίνες και τα αντιβιοτικά αποστειρώνονταν με διήθηση σε φίλτρα διαμέτρου 0.2 μm επειδή είναι ευαίσθητα και προστίθενταν στα θρεπτικά μετά από ψύξη των τελευταίων στους 60 ^{o}C. Η δεξτρόζη αποστειρωνόταν ξεχωριστά σε μορφή σκόνης.

1.4Όργανα

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν, αναγράφονται παρακάτω:

- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser ^{TM} BIORAD (Η.Π.Α).
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή συμπύκνωσης Amicon: Amicon chamber 8400 με μεμβράνη Diaflo PM-10, μέγεθος αποκλεισμού 10 kDa, Millipore, Billerica, USA.
- Μονάδα ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό πρωτεινών Mini-PROTEAN 3 (BIORAD, Η.Π.Α.).
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Milli-Q (Millipore, ΗΠΑ).
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες.
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία).
- Θερμαινόμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία).
- Φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, (Labequip, Καναδάς).
- Αυτόκαυστος Labo Autoclave του οίκου SANYO

- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα).
- Συλλέκτης κλασμάτων (Waters, Millipore, Η.Π.Α.).

1.5 Υποστρώματα

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανίχνευση ενεργότητας της StCel61 είναι :

1. λαμιναρίνη (laminarin)
2. λιχενάνη (lichenan)
3. β-γλουκάνη κριθαριού (barley β-glucan)
4. αραβικό κόμμι (Arabic gum)
5. Αραβινοξυλάνη σίτου (wheat arabinoxylan)
6. μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel)
7. καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνη (carboxymethyl-cellulose ,CMC)
8. υδροξυπροπυλ-μεθυλ-κυτταρίνη (hydroxypropyl-methylcellulose HPMC)
9. υδροξυαιθυλ-κυτταρίνη (hydroxyethyl-cellulose HEC)
10. ξυλάνη βρώμης (oat spelt xylan)
11. ξυλάνη σημύδας
12. ξυλάνη οξιάς (beechwood xylan)
13. διηθητικό χαρτί

2. Πειραματική διαδικασία
Ετερόλογη έκφραση

2.1 Μετασχηματισμός κυττάρων Pichia pastoris με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης

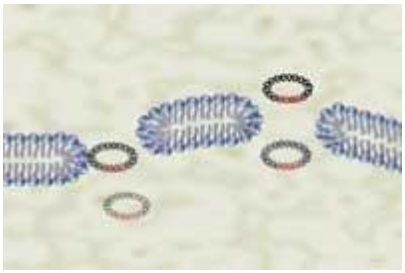
Δημιουργήθηκαν επιδεκτικά κύτταρα *Pichia pastoris* πρώτα και γραμματικοποιήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο για να εφαρμοστεί η τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης.
Η κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών αποτελεί μία διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, με υδρόφιλα μόρια στο εξωτερικό και υδρόφοβα στο εσωτερικό. Η δομή της αυτή, δεν επιτρέπει σε πολικά μόρια, όπως στο DNA και τις πρωτεΐνες, να διαπερνούν ελεύθερα την μεμβράνη (Farabee, 2001).

Η ηλεκτροδιάτρηση αποτελεί μία τεχνική, η οποία αναπτύχθηκε με σκοπό να ξεπεραστεί το φράγμα της δομής της διπλοστιβάδας, ώστε να καθίσταται δυνατή η είσοδος DNA και άλλων μορίων στα κύτταρα. Η τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης αξιοποιεί την σχετικά ασθενή φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υδροφιλικών και των υδροφοβικών μορίων στην φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα και την ικανότητά τους να επανασυνδέονται μετά από μία διαταραχή (Purves et al. , 2001).

Κατά την ηλεκτροδιάτρηση, τα κύτταρα δέχονται ηλεκτροσόκ με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σύντομης χρονικής διάρκειας, που διαταράσσει προσωρινά την συνέχεια της μεμβράνης, δημιουργώντας στιγμιαία μικρούς πόρους σε αυτή (40-120 nm). Κατά τη διαδικασία αυτή, η μεμβράνη αυξάνει την ηλεκτρική της αγωγιμότητα και γίνεται παροδικά διαπερατή σε πολικά μόρια. Στη συνέχεια, η κυτταρική μεμβράνη επανακάμπτει γρήγορα και το κύτταρο παραμένει ανέπαφο.

Τα πλεονεκτήματα της μέθοδος είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων και οργανισμών, και είναι πολύ αποτελεσματική στην είσοδο DNA και άλλων μορίων στα κύτταρα. Επίσης, απαιτείται μικρό ποσό του DNA σε σχέση με άλλες μεθόδους. Τέλος, η ηλεκτροδιάτρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί in vivo σε ζωντανούς ιστούς.

Το μειονέκτημα της όμως είναι ότι εάν το πλάτος ή η ένταση του παλμού δεν εφαρμοστούν σωστά, υπάρχει κίνδυνος να μεγαλώσουν πολύ οι πόροι και να μην έχουν τη δυνατότητα να ξανακλείσουν, με αποτέλεσμα να καταστρέφεται το κύτταρο. Επιπλέον όταν η μεμβράνη είναι ηλεκτρικά διαπερατή, η μεταφορά μορίων από και προς το κύτταρο είναι μη ειδική. Αυτό, μπορεί να οδηγήσει σε ανισορροπία της συγκέντρωσης ιόντων, που ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα την κακή λειτουργία των κυττάρων, μέχρι και τον θάνατό τους.



Εικόνα 7. Είσοδος πλασμιδίων σε επιδεκτικά κύτταρα *Pichia pastoris.*

Για την εισαγωγή του γραμμικοποιουμένου πλασμιδίου στο χρωμοσωμικό

DNA της *P. Pastoris* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν βασισμένη στο πρωτόκολλο του EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen).
Αναλυτικά, 80 μL εναιωρήματος των επιδεκτικών κυττάρων Pichia pastoris αναμειγνύονται με 30μL από το γραμμικοποιημένο, ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZaC. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε κυψελίδα ειδική για την εφαρμογή της ηλεκτροδιάτρησης, η οποία προηγουμένως είχε ψυχθεί και πλυθεί με 70% αιθανόλη. Το μείγμα στην κυψελίδα επωάστηκε στους 4°C για 5 περίπου λεπτά. Στην συνέχεια με χρήση την συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser ™ της BIORAD εφαρμόστηκε ηλεκτρικού παλμού 2 kV για 4 ms στο μίγμα και αμέσως μετά, προσθήκη 1 mL διαλύματος σορβιτόλης συγκέντρωσης 1M.
Το μείγμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα τύπου Falcon, ο οποίος πριν έχει αποστειρωθεί, και επωάστηκε στους 30°C για 1-2 ώρες.

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό YPDS, που περιείχε ζεοσίνη, και επωάστηκαν στους30°C . Η ζεοσίνη γενικά χρησιμοποιείται γιατί τα μετασχηματισμένα κύτταρα της ζύμης έχουν ανθεκτικότητα, την οποία προσδίδει στο κύτταρο το πλασμίδιο pPICZaC, το οποίο περιέχει στο DNA του γονίδιο ανθεκτικότητας της ζεοσίνης. Οι ανασυνδυασμένες αποικίες εμφανίστηκαν μετά από επώαση 3-10 ημερών στους 30°C

2.2Έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας για επιλογή βέλτιστου κλώνου

Μετά την επιλογή αποικιών που φέρουν το ζητούμενο γονίδιο της πρωτεΐνης έγινε εμβολιασμό σε 50ml θρεπτικού μέσου BMGY που περιέχει γλυκερόλη, με τις επιλεγμένες αποικίες σε ισάριθμες κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer των 250 ml. Ακολουθούσε επώαση υπό ανάδευση (200 rpm) στους 28-30 ^{o}C, για 16-20 h, μέχρι το OD_{600} να φτάσει την τιμή 2-6. Αυτή η διαδικασία λέγεται προκαλλιέργεια.
Στην συνέχεια για κάθε φιάλη έγινε φυγοκέντρηση του κατάλληλου όγκου προκειμένου να απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό που περιείχε γλυκερόλη, και επαναδιαλύθηκε σε 50 ml θρεπτικού υλικού BMMY έτσι ώστε να φτάσει η τελική συγκέντρωση κυττάρων, σε τιμή OD_{600} (οπτική πυκνότητα) ίση με 1. Το θρεπτικό υλικό BMMY περιέχει μεθανόλη, η οποία επάγει την έκφραση των

ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, ενεργοποιώντας τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (AOX1).
Οι καλλιέργειες τοποθέτηκαν για 5 μέρες στους 30 ^{o}C, υπό ανάδευση (200 rpm) ενώ προστίθενταν 250 μl μεθανόλης (και η τελική συγκέντρωση παρέμεινε 0.5% (*v/v*)). Η προσθήκη μεθανόλης γινόταν για να διατηρηθεί η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.
Επίσης λαμβάνονταν κάθε μέρα από το υπερκείμενο καλλιεργειών μικρά δείγματα προκειμένου να ελεγθεί η ανάπτυξη της ζύμης και η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Με αυτό τον τρόπο επιλέχθηκε ο κλώνος που έκφραζε την ζητούμενη πρωτεΐνη καθώς και την διάρκεια καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας. Το συγκεκριμένο ανακαλλιεργήθηκε σε τρυβλία YPD με ζεοσίνη και φυλάσσονταν στους 4 ^{o}C.
Για αποθήκευση μεγαλύτερου χρονικό διάστημα (μήνες έως έτη), γινόταν προκαλλιέργεια των κλώνων σε υγρό μέσο YPD για 16 h στους 30 ^{o}C και ακολουθούσε φυγοκέντρηση και επαναιώρηση των κυττάρων σε YPD εμπλουτισμένο με 15 % (*v/v*) γλυκερόλη σε τελικό OD_{600}=50-100. Τα κύτταρα καταψύχονταν με εμβάπτιση σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονταν στους -80 ^{o}C.

2.3 Έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας για παραγωγή πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες

Για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακας καλλιέργειες, ο κλώνος που επιλέχθηκε εμβολιάστηκε σε θρεπτικό υλικό BMGY όγκου 50 ml σε 6 κωνικές φιάλες των 250 ml. Στην συνέχεια επωάστηκαν στους 30 ^{o}C, για 16-20 ώρες, υπό ανάδευση (200 rpm). Για κάθε φιάλη φυγοκεντρήθηκε κατάλληλος όγκος προκειμένου να απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό που περιείχε γλυκερόλη και επαναδιαλύθηκε σε 500 ml θρεπτικού υλικού BMMY έτσι ώστε το OD_{600} να ισούται με την μονάδα. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε μεγάλες κωνικές φιάλες (1lt) για να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες αερισμού. Τα κύτταρα της ζύμης παρέμειναν υπό ανάδευση στους 30 ^{o}C για κατάλληλο χρονικό διάστημα με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης σε τελική συγκέντρωση 0.5% (*v/v*). Κατά την διάρκεια της καλλιέργειας δεν συλλέχτηκε κανένα δείγμα για να αποφευχθούν οι μολύνσεις.
Μετά το κατάλληλο χρονικό διάστημα οι καλλιέργειες συλλέχθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 1500 xg, 4 ^{o}C και το υπερκείμενο φυλάχτηκε για το επόμενο στάδιο.

2.4 Φυγοκέντρηση, διήθηση, συμπύκνωση και καθαρισμός

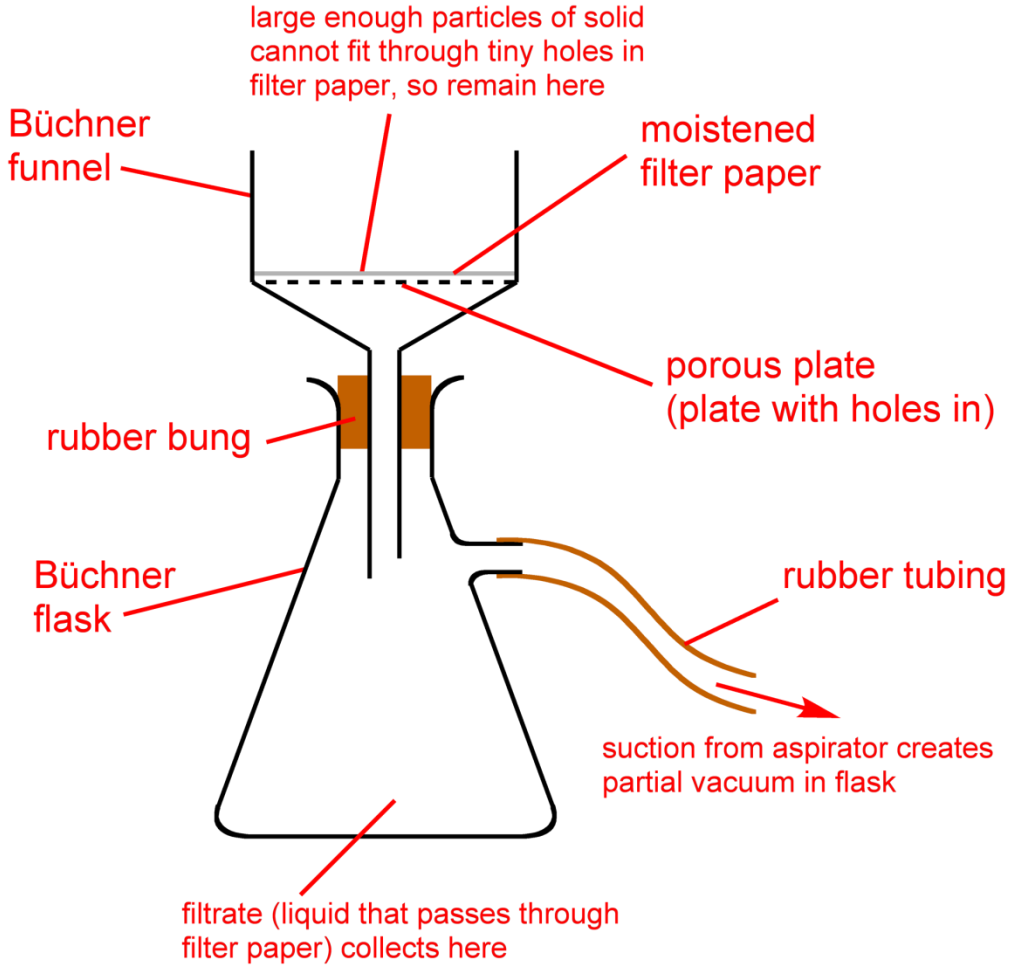
2.4.1 Φυγοκέντρηση

Το υπερκείμενο της καλλιέργειας προκειμένου να συμπυκνωθεί και να απομακρυνθεί η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη από τις υπόλοιπες εκκρινόμενες πρωτεΐνες, χωρίστηκε σε ειδικές φιάλες και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 1000 rpm, για 10 λεπτά στους 4 ^{o}C .

2.4.2 Διήθηση υπό κενό

Διήθηση καλείται η διεργασία διαχωρισμού αιωρούμενων στερεών από ένα ρευστό διάλυμα, συνήθως υγρό, κατά τη διαβίβαση του αιωρήματος μέσα από στρώμα πορώδους υλικού (διάφραγμα), που συγκρατεί τα στερεά και επιτρέπει τη διέλευση μόνο του ρευστού διαλύματος. Η διήθηση υπό κενό επιταχύνει την διαδικασία συγκριτικά με την απλή διήθηση λόγω βαρύτητας. Στο εργαστήριο, πραγματοποιήθηκε με την χρήση της φιάλης Büchner η οποία είναι κωνική και επιτρέπει την δημιουργία κενού στο εσωτερικό της. Φέρει παχύ πλευρικό τοίχωμα ώστε να αντέχει στις διαφορές πιέσεως που δημιουργούνται μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού της περιβάλλοντος. Επιπλέον περιλαμβάνει μία διακλάδωση στον λαιμό της οπού συνδέεται μία πηγή κενού. Συνδυάζεται με χωνί διήθησης ή χωνί Büchner που προσαρμόζεται στον λαιμό της φιάλης με την βοήθεια ελαστικών δακτυλίων που στεγανοποιούν την φιάλη και επιτρέπουν την διατήρηση του κενού.

Το συλλεγμένο υπερκείμενο διήθηκε υπό κενό χρησιμοποιώντας διαδοχικά διηθητικό χαρτί και φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.8, 0.45, και 0.2 μm (Pall Supor Membrane Disc Filters, Pall Filters) και έτσι απομακρύνονται με αυτό τον τρόπο τα κυτταρικά υπολείμματα.

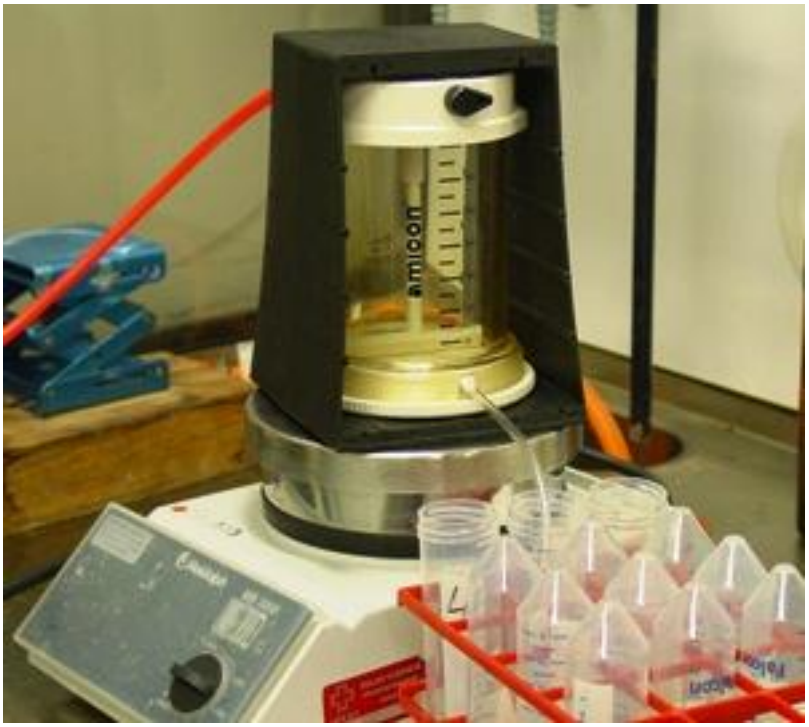


Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της φιάλης Büchner.

2.4.3 Υπερδιήθηση

Η υπερδιήθηση αποτελεί ένα είδος διήθησης μέσω μεμβράνης, κατά την οποία υδροστατική πίεση αναγκάζει το υγρό να κινηθεί προς μία ημιπερατή μεμβράνη. Όμως από την μεμβράνη δεν διαπερνούν στερεά αιωρούμενα και διαλυτές ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους, μόνο χαμηλού βάρους.
Το διάλυμα που διαπερνά την ημιπερατή μεμβράνη διοχετεύεται σε μια κωνική φιάλη με την βοήθεια ενός σωλήνα μικρής διαμέτρου. Το συλλεγμένο διάλυμα καλείται flow-through. Όσο περισσότερο flow-through συλλέγουμε τόσο συμπυκνώνεται το διάλυμα στην συσκευή υπερδιήθησης.
Συμπυκνώθηκε το διάλυμα μέχρι τελικό όγκο περίπου 30 ml. Αυτό έγινε με χρήση συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 και μεμβράνες PM-10(Amicon Millipore, Η.Π.Α.) που επιτρέπει τη δίοδο μορίων μικρότερων από

10 kDa. Κρατήθηκε το flow-through, με σκοπό τον έλεγχο διαφυγής πρωτεϊνών σε αυτό με την μέθοδο Bradford. Η μεμβράνη AMICON πλύθηκε με διάλυμα NaOH 0,1 M και μετά με νερό προκειμένου να επαναχρησιμοποιηθεί.



Εικόνα 9. Διάταξη της συσκευής υπερδιήθησης

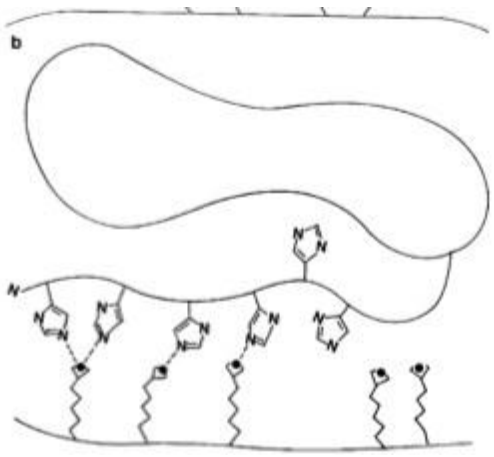
2.4.4 Εξισορρόπηση διαλύματος

Το συμπυκνωμένο διάλυμα πρωτεϊνών υποβλήθηκε σε εξισορρόπηση με ρυθμιστικό διάλυμα Talon(500 m*M* Tris-HCl, 3*M* NaCl, pH 8.0), το οποίο χρησιμοποιείται και στην διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης από την στήλη χρωματογραφίας. Σε αυτή την διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης οι οποίες είχαν βυθιστεί προηγουμένως σε καυτό απιονισμένο νερό για 15 λεπτά υπό ανάδευση για να μαλακώσουν και

να μην κολλήσουν, και έγινε η μεταφορά του διαλύματος πρωτεϊνών σε αυτές. Το σύστημα παρέμεινε μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα όγκου 3 λίτρα για 24 ώρες, στους 4 ^{o}C, υπό ήρεμη ανάδευση.
Συνεπώς, η διαδικασία της εξισορρόπησης πραγματοποιήθηκε με σκοπό το δείγμα που έχουμε να έχει τις ίδιες συνθήκες περιβάλλοντος με τη στήλη χρωματογραφίας η οποία έχει κατεργαστεί με TALON buffer πριν εισάγουμε το συμπυκνωμένο διάλυμα των πρωτεϊνών.

2.4.5 Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC)

Η χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου είναι μια τεχνική διαχωρισμού-απομόνωσης, βασισμένη στην αναστρέψιμη αλληλεπίδραση των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων των πρωτεϊνών με ιόντα μετάλλων που βρίσκονται ακινητοποιημένα σε μια στήλη ρητίνης (Porath et al., 1975). Έτσι διαχωρίζεται και απομονώνεται μια ομάδα πρωτεϊνών που πρόκειται να μελετηθεί. Ανάλογα με το ποιό ακινητοποιημένο ιόν χρησιμοποιείται, διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες συμμετέχουν στην διαδικασία της προσρόφησης. Εμπλέκονται συχνά πλευρικές ομάδες ιστιδίνης, τρυπτοφάνης και κυστεϊνης. Η τεχνική χρησιμοποιείται κυρίως για τον καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, εφοδιασμένο με His-tag επειδή οι περισσότερες φυσικές πρωτεΐνες δεν έχουν συγγένεια για μεταλλικά ιόντα.
Στις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που εκφράζονται από το πλασμίδιο pPICZaC, παρατηρείται στο καρβοξυλικό τους άκρο, 6 συνεχόμενα μόρια ιστιδίνης (6x His tag) τα οποία έχουν αρνητικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες με συνέπεια να προσδένονται ισχυρά σε θετικά ιόντα (Ni^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}). Επιλέχτηκε στην παρούσα εργασία το ιόν του κοβαλτίου επειδή εμφανίζει την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ως προς την ακολουθία των ιστιδινών.
Το διάλυμα που απομονώθηκε από την υπερδιήθηση μεταφέρθηκε στην στήλη του κοβαλτίου και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που περιείχαν την ακολουθία της πολυιστιδίνης συγκρατήθηκαν, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που παράχθηκαν από την *Pichia pastoris* εκλούθηκαν από την στήλη. Αφού απομακρύνθηκαν οι ανεπιθύμητες πρωτεΐνες, το επόμενο στάδιο ήταν η συλλογή της ανασυνδυασμένες πρωτεΐνης. Για αυτό εισήχθηκε στην στήλη διαδοχικά αυξανομένη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (0-100mM) που ανταγωνίζεται τις πρωτεΐνες ως την θέση πρόσδεσης τους στο κοβάλτιο, με αποτέλεσμα να απομακρύνονται σταδιακά από τις θέσεις αυτές.



Εικόνα 10 . Πρόσδεση πολυϊστιδίνης σε θετικά φορτισμένα ιόντα.

Συνοπτικά η διαδικασία ήταν η εξής:

- Εξισορρόπηση της στήλης με 300 mL ρυθμιστικού διαλύματος TALON buffer 1x με ροή 2.5 mL/min.
- Φόρτωση του συμπυκνωμένου διαλύματος από την διαδικασία της υπερδιήθησης, που περιείχε τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, με ροη 2 mL/min.
- Πρόσδεση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που περιείχαν την ακολουθία της πολυϊστιδίνης στα ιόντα κοβαλτίου και έκλουση των υπόλοιπων πρωτεϊνών από τη στήλη. Η έκλουση προκλήθηκε με έκπλυση της στήλης με 60 mL TALON buffer 1x.
- Έκλουση των πρωτεϊνών που συγκρατήθηκαν στη στήλη με την προσθήκη TALON buffer 1x, παρουσία ιμιδαζολίου.
- Συλλογή κλασμάτων που περιείχαν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη και αφαλάτωση τους με τη μέθοδο της διαπίδυσης από ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης με πόρους διαμέτρου 25mm (Dialysis tubing cellulose membrane, Sigma-Aldrich).
- Έκπλυση της στήλης με 300 mL TALON buffer 1x, ώστε να είναι έτοιμη για επαναχρησιμοποίηση και αποθήκευσή της στους 4°C μέσα σε διάλυμα αιθανόλης 20% v/v.

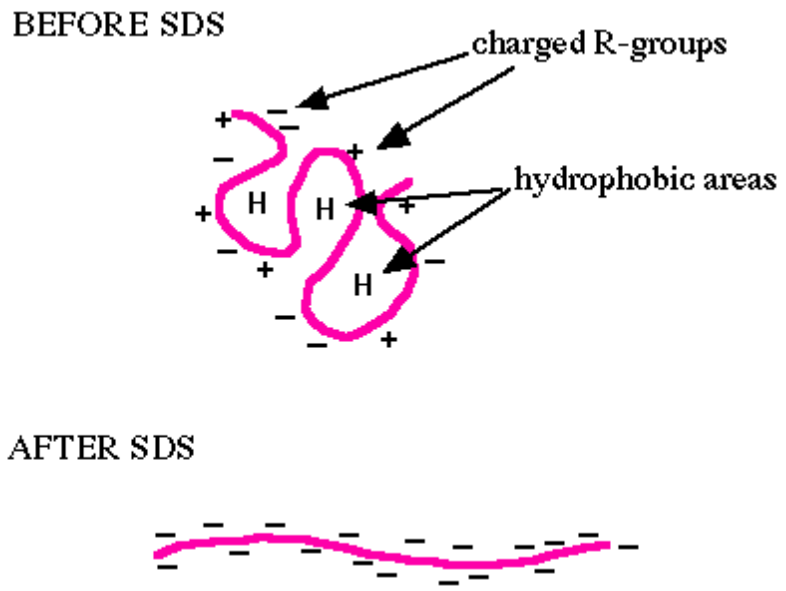
Όλα τα στάδια του καθαρισμού πραγματοποιήθηκαν στους 4 ^{o}C για την επιβράδυνση της δράσης των πρωτεασών που υπάρχουν στο ενδοκυτταρικό υγρό και την καλύτερη συντήρηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Ο έλεγχος του βαθμού καθαρότητας έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE).

2.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) περιγράφει μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία, εγκληματολογία, γενετική και στην μοριακή βιολογία για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με την ηλεκτροφορητική κυνικότητα τους, (δηλαδή μια συνάρτηση μήκους της πολυπεπτιδικής αλυσίδα και φορτίου της πρωτεΐνης), και κανένα άλλο φυσικό χαρακτηριστικό.

Το αντιδραστήριο SDS (θειικό δωδεκυλικό νάτριο) αρχικά, γραμματικοποιεί τα πρωτεϊνικά μόρια και έτσι αποκτούν πρωτοταγή δομή. Είναι αρνητικά φορτισμένο και συνδέεται σταθερά στα πρωτεϊνικά μόρια, αποδιατάσσει τις τριτοταγείς δομές τους και εξουδετερώνει όλες τις θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες των αμινοξέων, με τελικό αποτέλεσμα ένα γραμμικό αρνητικά φορτισμένο πρωτεϊνικό μόριο. Έτσι με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, όλα τα μόρια θα κινούνται προς τον θετικό πόλο.



Εικόνα 11. **Αποδιάταξη πρωτεϊνικών μορίων με το αντιδραστήριο SDS**

Η δημιουργία του πηκτώματος της ηλεκτροφορητικής συσκευής προκύπτει από τον πολυμερισμό μονομερών ακρυλαμιδίου. Το πολυακρυλαμίδιο είναι μια χημικά αδρανής ένωση, σταθερή σε μεγάλο εύρος pH, ιονικής ισχύος και

θερμοκρασίας. Το υπερθειικό αμμώνιο (APS) παίζει τον ρόλο του καταλύτη στην αντίδραση του πολυμερισμού, ενώ η N,N,N,'N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) παίζει το ρόλο του ενεργοποιητή.
Το πήκτωμα του πολυακρυλαμιδίου που σχηματίζεται δεν είναι συμπαγές αλλά αποτελείται από έναν λαβύρινθο πόρων διαφορετικής διαμέτρου που σχηματίζονται από πλέγματα ινών. Το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που πρέπει να διαχωριστούν.
Κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, οι πρωτεΐνες περνούν πρώτα από το πήκτωμα επιστοίβασης το οποίο έχει χαμηλή περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου. Στόχος της χρήσης του πηκτώματος αυτού, είναι η δημιουργία μεγάλων πόρων από τους οποίους περνούν πρωτεΐνες κάθε μοριακού βάρους με την ίδια κινητικότητα. Αποτέλεσμα αυτού είναι όλες οι πρωτεΐνες να συγκεντρώνονται στο όριο των δύο πηκτωμάτων σε μία γραμμή. Οι πρωτεΐνες συνεχίζουν την πορεία τους στο πήκτωμα διαχωρισμού, το οποίο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδιο, οπότε οι πόροι που σχηματίζονται είναι μικρότεροι και έτσι γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος τους.
Άρα η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο μέρη: την πηκτή επιστοίβασης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel) με διαφορετικές αναλογίες συστατικών όπως φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 4. Σύσταση πηκτής επιστοίβαξης στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) 4%	
Υπερκάθαρο νερό	3 ml
0.25 *M* Tris 0.2% (*w/v*) SDS pH 6.8	3.75 ml
40 % ακρυλαμίδιο	0.75 ml
TEMED	20 μl
10% (*w/v*) APS	60 μl

Πίνακας 5. Σύσταση πηκτής διαχωρισμού στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Πηκτή διαχωρισμού (resolving gel) 12.5%	
Υπερκάθαρο νερό	3.5 ml
0.25 *M* Tris 0.2% (*w/v*) SDS pH 8.8	9.4 ml
40 % ακρυλαμίδιο	5.8 ml
TEMED	30 μl
10% (*w/v*) APS	90 μl

Πρωτίστως δυο ζεύγη γυάλινων πλακών καθαριστήκαν με αιθανόλη 70% και τοποθετήθηκαν σε ειδική διάταξη ώστε να ταυτίζονται πλήρως οι πλευρές τους ανά ζεύγος. Κάθε ζεύγος σε αυτή τη διάταξη συγκρατούνταν από δύο μεταλλικούς σφιγκτήρες πάνω στη συσκευή. Στην συνέχεια παρασκευάστηκε το διάλυμα διαχωρισμού το οποίο η σύσταση του αναφέρεται παραπάνω. Διοχετεύτηκε στο κενό μεταξύ του κάθε ζεύγους πλακών, διατηρώντας περίπου 1.5cm απόσταση από την κορυφή τους. Με πιπέτα προστέθηκε μικρή ποσότητα νερού προκειμένου να ευθυγραμμιστεί το διάλυμα. Αφέθηκε περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό να πολυμεριστεί και να πήξει.
Μετά παρασκευάστηκε το μίγμα της πηκτής επιστοίβαξης με την παραπάνω αναφερομενη σύσταση, και διοχετεύτηκε στο διάκενο μεταξύ του κάθε ζεύγους πλακών, πάνω από το μίγμα διαχωρισμού. Τοποθετήθηκε η ειδική χτένα η οποία βοηθά στον σχηματισμό οπών, στις οποίες θα φορτωθούν τα πρωτεϊνικά δείγματα. Όταν η πηκτή εστοίβασης είχε πήξει, δηλαδή ήταν έτοιμη, οι πλάκες μεταφέρθηκαν στο ειδικό δοχείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής, όπου στερεώθηκαν κάθετα, και η χτένα απομακρυνόταν προσεκτικά. Στο δοχείο αυτό προστέθηκαν επιπλέον 500 mL διαλύματος ηλεκτροφόρησης (30.3 g/l Tris, 144 g/l γλυκίνη, 1% (*w/v*) SDS, pH 8.3).

Αφού είχε απομακρυνθεί η χτένα, τοποθέτηκαν τα δείγματα στις οπές. Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση (1-5 μg πρωτεΐνης) όγκου 15 μl αναμιχτήκαν με 7 μl διαλύματος φόρτωσης (1 g SDS, 5 ml 0.25 *M* Tris pH 6.8, 2.5 ml 50% (*w/w*) γλυκερόλη, 2.5 ml μερκαπτοαιθανόλη, 4 ml 0.1% (*w/v*) κυανούν βρωμοφαινόλης) και ακολουθούσε βρασμός για 5-7 min. Εκτός από τα δείγματα τοποθετήθηκαν 5-7 μl πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρος (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των

άγνωστων διαλυμάτων πρωτεϊνών. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με 35 mA/ πήκτωμα για περίπου μια ώρα.

Χρώση Coomassie

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, τα πηκτώματα απομακρύνθηκαν από τα ζεύγη πλακών και ακολούθησε χρωματισμό του πηκτώματος με την χρωστική Coomassie G-250, με ήπια ανάδευση, σε διάλυμα χρωματισμού(40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 50% dH_2O, 0,4% Coomassie G-250) για περίπου 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα πραγματοποιήθηκε αποχρωματισμό του πηκτώματος σε διάλυμα αποχρωματισμό (40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) έως ότου απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής (περίπου 1 ώρα). Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πλαστικά δοχεία .
Σκοπός του βήματος αυτού ήταν η χρώση των δειγμάτων προκειμένου να συγκριθούν οι ζώνες που σχηματιστήκαν, με τις ζώνες του μάρτυρα.

Εικόνα 12. Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Πίνακας 6. Η σύσταση του διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ΜΒ των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

MW (kDa)	Πρωτεΐνη	Προέλευση
116.0	β –γαλακτοζιδάση	*E. coli*
66.2	αλβουμίνη ορού βοδινού	πλάσμα βοδινού αίματος
45.0	ωαλβουμίνη	ασπράδι αυγού κότας
35.0	γαλακτική αφυδρογονάση	μύες χοίρων
25.0	REase Bsp98I	*E. coli*
18.4	β-λακτογλοβουλίνη	γάλα αγελάδος
14.4	λυσοζύμη	ασπράδι αυγού κότας

2.6 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης (μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης έγινε με την μέθοδο Lowry η οποία συνδυάζει τις αντιδράσεις των ιόντων χαλκού(Cu^+) με τους πεπτιδικούς δεσμούς υπό αλκαλικές συνθήκες, και την οξείδωση των αρωματικών καταλοίπων πρωτεΐνης.

Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση Cu^+ που παράγονται από την οξείδωση των πεπτιδικών δεσμών, με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (ένα μίγμα φωσφοροβολφραμικού οξέος και φωσφομολυβδικού οξέος στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αντίδραση).

Ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν έχει κατανοηθεί καλά, αλλά περιλαμβάνει την αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin και οξείδωση των αρωματικών καταλοίπων (κυρίως τρυπτοφάνη και τυροσίνη). Η συγκέντρωση του ανηγμένου αντιδραστηρίου Folin υπολογίζεται μέσω την τιμή της απορρόφησης στα 750 nm με βάση το νόμο του Lambert Beer.

Αναλυτικά για τον προσδιορισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης, παρασκευάστηκαν 4 διαφορετικά διαλύματα, τα οποία πρέπει να χρησιμοποιούνται φρέσκα κάθε φορά που πραγματοποιείται αυτή η πειραματική διαδικασία. Τα 4 διαλύματα ήταν τα εξής:

A: 1% w/v θειικός χαλκός $CuSO_4.5H_2O$

B: 2% w/v sodium potassium tartare
C: 0,2M υδροξείδιο του νατρίου
D: 4% w/v sodium carbonate

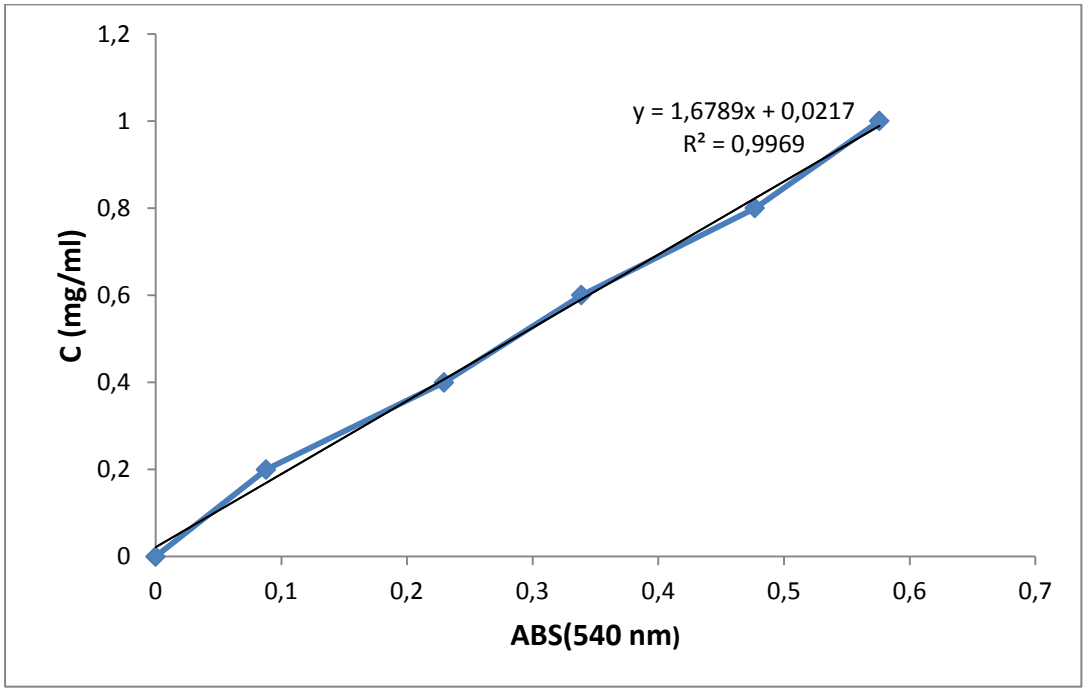
1. Σε 49 mL C προστέθηκαν 49mL D, 1mL A και 1mL B. Έτσι σχηματίζεται το διάλυμα E.
2. Σε 10 mL αντιδραστηρίου του Folin-Giocolteam προσθέτουμε 10 mL H_2O και σχηματίζεται το διάλυμα F.
3. Σε 0,5 mL δείγματος του άγνωστου πρωτεϊνικού διαλύματος προστίθενται 2,5 mL του διαλύματος E. Το διάλυμα ανακινείται σε συσκευή Vortex και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
4. Στο παραπάνω μείγμα προστίθενται 0,25 mL F, αυτό ανακινείται σε συσκευή Vortex και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
5. Γίνεται φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 750nm.

2.7 Μέθοδος του δινιτροσαλικυλικού (DNS)

Το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ (DNS) ή 2-υδροξυ-3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ (DNSA) κατά την ονομασία της IUPAC είναι μια αρωματική ένωση που αντιδρά με αναγωγικά σάκχαρα και άλλα μόρια για να σχηματίσουν το ανηγμενο 3-αμινο-5-νιτρο σαλικυλικό οξύ, το οποίο απορροφά έντονα τη ακτινοβολία στα 540 nm. Εισήχθη για πρώτη φορά ως μέθοδο για την ανίχνευση αναγωγικών ουσιών στα ούρα και από τότε χρησιμοποιείται ευρέως, για παράδειγμα, για ποσοτικοποίηση επιπέδων υδατανθράκων στο αίμα. (Miller, Gail Lorenz 1959).

Εικόνα 13. Αναγωγή του δινιτροσαλικυλικού οξέου παρουσία αναγωγικών σακχάρων

Επομένως η μέτρηση αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος . Ως αναγωγικό σάκχαρο ορίζεται το σάκχαρο εκείνο που έχει ελεύθερο το ημιακεταλικό υδροξύλιο.
Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο προαναφερθέν υδροξύλιο και το δινιτροσαλικυλικό οξύ κατά την θέρμανση πάνω από 70°C . Το σύμπλοκο αυτό, εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540nm. Η γλυκόζη είναι αναγωγικό σάκχαρο και κατά συνέπεια είναι δυνατό να μετρηθεί με την μέθοδο αυτή.
Προκειμένου να μετρηθούν τα αναγωγικά σάκχαρα προστέθηκαν σε 125 μl DNS, 125 μl δείγματος (σε διάφορες αραιώσεις 1:5, 1:10, 1:20). Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε επίσης ένα διάλυμα που περιείχε μόνο 125 μl DNS και 125 μl νερό (τυφλό) . Στη συνέχεια ακολούθησε βρασμός των διαλυμάτων για 5 λεπτά. Μετά τον βρασμό έγινε προσθήκη 1 ml νερού σε όλα τα δείγματα. Τέλος έγινε η φωτομέτρηση στα 540 nm αφού πρώτα μηδενίστηκε το φωτόμετρο με το τυφλό.

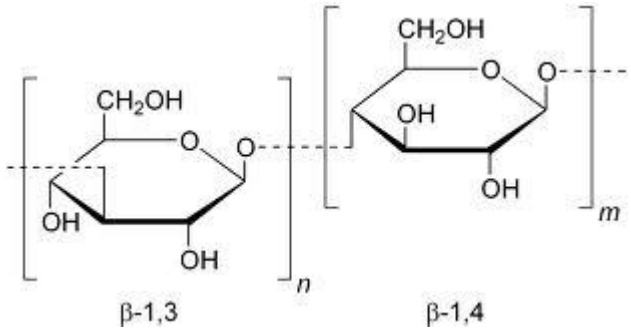


Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων γλυκόζης που συσχετίζει μονάδες οπτικής απορρόφησης στα 540 nm με συγκέντρωση ανηγμένων σακχάρων στο δείγμα με την μέθοδο DNS.

2.8 <u>Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε διάφορα υποστρώματα</u>

α .Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα λιχενάνη

η λιχενάνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές με δομή παρόμοιας με εκείνη των γλουκαννών που προέρχονται από το κριθάρι και την βρώμη. Περιέχει δεσμούς β-1,3 και β-1,4 με αναλογία 1 προς 2.
Παρακάτω φαίνεται η δομή του μορίου της λιχενάνης:

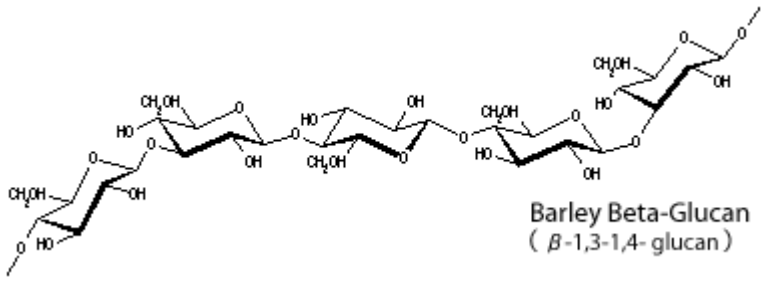


Εικόνα 14. Δομή της λιχενάνης

Η παρασκευή του υποστρώματος έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα (ρ.δ) κιτρικών φωσφορικών 50 mM pH 5. 0.1 g λιχενάνης προστέθηκαν σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος υπό τη μορφή σκόνης. Ακολούθησε ανάδευση και βρασμός.
Στη συνέχεια αναμείχτηκαν 20 μL διαλύματος StCel61 1.47mg/ml με 480 μL υποστρώματος και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 50°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων και κρατήθηκε το υπερκείμενο προκειμένου να προσδιοριστεί ο βαθμός υδρόλυσης με την μέτρηση των απελευθερούμενων αναγωγικών σακχάρων.
Για τον προσδιορισμού αναγωγικών σακχάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.
Με βάση την καμπύλη αναφοράς οι οποία κατασκευάστηκε με διαδοχικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκόζης συγκέντρωσης 2 mg/ml, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των απελευθερούμενων αναγωγικών σακχάρων.

β. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα β-γλουκάνη του κριθαριού

Οι β-γλουκανες είναι μη διακλαδισμένα πολυμερή της γλυκόζης με αναλογία δεσμών β-1,3 / β-1,4 ίση με 1 / 3. Οι β-γλουκανες σχηματίζουν μακριά κυλινδρικά μόρια που περιέχουν περίπου 250.000 μονάδες γλυκόζης.
Παρακάτω φαίνεται η δομή του μορίου της β-γλουκανης :

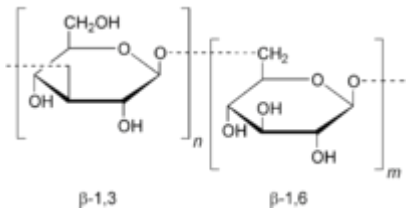


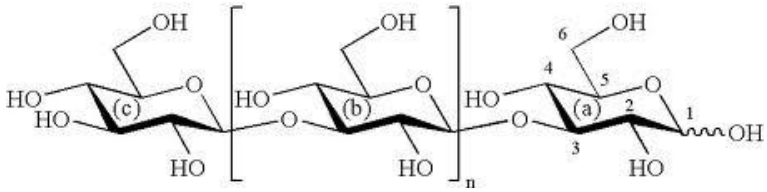
Εικόνα 15. Δομή της β-γλουκανης

Για την παρασκευή του υποστρώματος, 0.1 g β-γλουκανης διαβρέχθηκαν με 0.6 ml αιθανόλης 100% και προστέθηκαν 9 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολούθησε βρασμό και ανάδευση. Η απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων προσδιορίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.7.

γ. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα λαμιναρίνης

Η λαμιναρίνη γνωστή και ως λαμιναράνη είναι μια αποθηκευτική γλουκάνη, η οποία είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης, και βρίσκεται σε καφέ άλγη. Δημιουργείται κατά την φωτοσύνθεση και αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές με β-1,3 δεσμούς στο οποίο εμφανίζονται διακλαδώσεις β-1,6 δεσμών. Η αναλογία δεσμών β-1,3 προς β-1,6 είναι 1 προς 3.
Παρακάτω φαίνεται η δομή του μορίου της λαμιναρίνης :



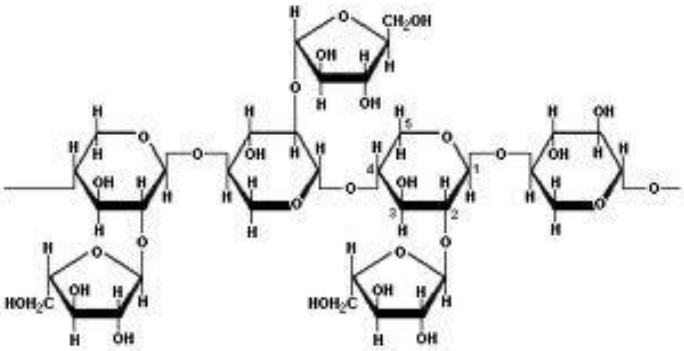


Εικόνα 16. Δομή της λαμιναρίνης

Για την παρασκευή του υποστρώματος, σε 20 ml διαλύματος προστέθηκαν 0.2 g λαμιναρίνης. Ακολούθησε βρασμός και ανάδευση. Η απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων προσδιορίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.7.

δ. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα αραβινοξυλάνη σίτου

Οι αραβινοξυλάνες αποτελούνται από έναν βασικό σκελετό ξυλάνης με μονάδες L-αραβινοφουρανόζης ενωμένες τυχαία στα κατάλοιπα ξυλόζης με α-1,2 και α-1,3 δεσμούς.
Παρακάτω φαίνεται η δομή του μορίου της αραβινοξυλάνης σίτου :

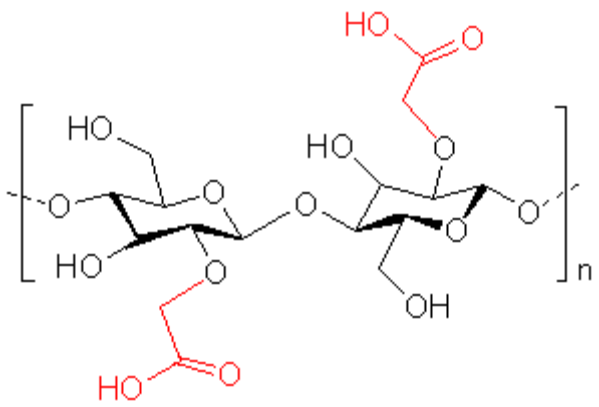


Εικόνα 17. Δομή της αραβινοξυλάνη σίτου.

Για την παρασκευή του υποστρώματος, 0.2 g αραβινοξυλάνης διαβρέχθηκαν με1.6 ml αιθανόλης 95% και προστέθηκαν 18 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολούθησε θέρμανση και ανάδευση. Η απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων προσδιορίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.7.

ε. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνης (CMC)

Η καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνη (CMC) είναι ένα παράγωγο της κυτταρίνης στο οποίο υπάρχουν καρβοξυμεθυλομάδες (-CH_2-COOH) ενωμένες σε ομάδες των μονομερών της γλυκόζης της κεντρικής αλυσίδας.
Παρακάτω φαίνεται η δομή του μορίου της CMC :



Εικόνα 18. Δομή της CMC

Για την παρασκευή του υποστρώματος 0.2 g καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνης προστεθήκαν σε20 ml ρυθμιστικού. Η διαλυτοποίηση έγινε προσεκτικά και σε μικρές δόσεις επειδή η καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνη (CMC) διαλύεται δύσκολα. Η απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων προσδιορίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.7.

ζ. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα ξυλάνης σημύδας

Η ξυλάνη παρασκευάστηκε με προσθήκη 0.5g ουσίας σε 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος σε θερμοκρασία 80 ° C και ανάδευση 10 λεπτών. Στη συνέχεια αυξήθηκε η θερμοκρασία μέχρι να βράσει το διάλυμα, μετά απομακρύνθηκε από την θέρμανση και έμεινε υπό ανάδευση όλο το βράδυ.
Στην συνέχεια με την ίδια διαδικασία προσδιοριστήκαν τα αναγωγικά σάκχαρα.

η. Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε μικροκρυσταλλική κυτταρίνη

Για το υπόστρωμα μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel), η ενεργότητα μετρήθηκε με προσθήκη 36 μL ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε 864 μL Avicel 1% w/v και επώαση για 20 ώρες υπό ανάδευση στους 50°C. Μετά έγινε φυγοκέντρηση, μεταφέρθηκαν 125 μL από το υπερκείμενο και προσδιοριστήκαν τα αναγωγικά σάκχαρα με την μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.9 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης και προσδιορισμός θερμοσταθερότητας του ενζύμου (T-optimum και T-stability)

Για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα (ρ.δ) φωσφορικών 50 mM pH 7 και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- 200 μl διαλύματος λιχενάνης 0.5% (w/v) σε ρ.δ προστέθηκαν σε eppendorf και αναμίχθηκαν με 50 μl διαλύματος *StCel61* συγκέντρωσης 10μM.
- Τα eppendorf τοποθέτηκαν στις διαφορετικές θερμοκρασίες των 30,40,50,60,70,80 και 90°C. Τα πειράματα για κάθε θερμοκρασία πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Μετρήθηκαν επίσης δείγματα με απενεργοποιημένο ενζυμο για κάθε θερμοκρασία ξεχωριστά.
- Επωάστηκε το μίγμα για 5 ώρες και
- Μετρήθηκαν τα αναγωγικά σάκχαρα με την μέθοδο DNS και προσδιορίστηκε η σχετική ενεργότητα σε κάθε θερμοκρασία ως ποσοστό επί της μέγιστης μετρούμενης υδρολυτικής δράσης.

Για την εύρεση της θερμοκρασιακής σταθερότητας η πρωτεΐνη παρέμεινε στο θερμοκρασιακό εύρος 30-90°C για 1,8 και 24 ώρες και στην συνέχεια προσδιορίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα.

2.10 Εύρεση βέλτιστου pH δράσης και προσδιορισμός σταθερότητας του ενζύμου σε διάφορα pH (pH-optimum και pH-stability)

Για την εύρεση του βέλτιστου pH δράσης, η λιχενάνη διαλυτοποιηθηκε σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα με pH 3-11. Συγκεκριμένα για pH 3-7 χρησιμοποιήθηκε ρ.δ 0.1 M κιτρικό-φωσφορικό για pH 7-9 χρησιμοποιήθηκε

ρ.δ 0.1 M Tris-HCl και τέλος, για pH 9-11 χρησιμοποιήθηκε ρ. δ 0.1 M γλυκίνης-NaOH.
Ακολούθησε επώαση με την πρωτεΐνη για 5 ώρες στους 60°C και στη συνέχεια μετρήθηκαν τα αναγωγικά σάκχαρα με την μέθοδο DNS.
Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας σε διαφορετικά pH, η πρωτεΐνη επωαστηκε σε θερμοκρασία 4 °C για 1,8 και 24 ώρες στα ρυθμιστικά διαλύματα που αναφέρθηκαν και πιο πάνω (pH 3-11). Ακολούθησε μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας στις βέλτιστες συνθήκες δράσης.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε προηγούμενη εργασία που είχε πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου είχε γίνει αναζήτηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της οικογενείας GH61 (*StCel61)* στο γονιδίωμα του *S.thermophile.* Μετά η νουκλεοτιδική αλληλουχία ενισχύθηκε με την τεχνική PCR χρησιμοποιώντας γονιδιακό DNA του *S. Thermophile*, κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακούς φορείς, έγινε μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris* και τέλος επιλέχτηκε ο κατάλληλος κλώνος για την έκφραση και την παραγωγή της *StCel61*.

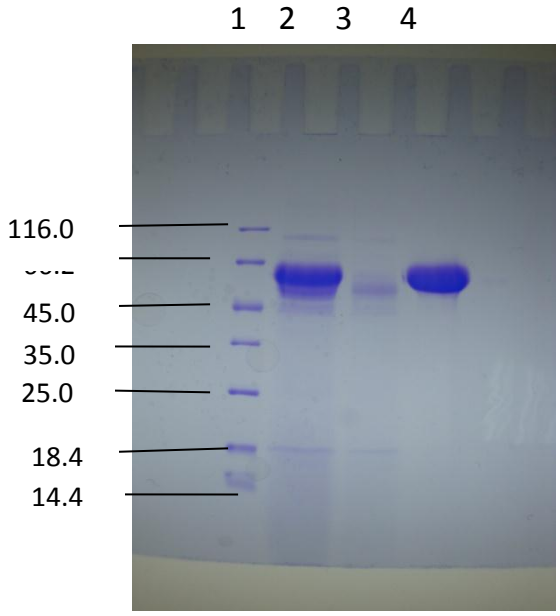
1. Παραγωγή και καθαρισμός της *StCel61*

Μετά την παραγωγή του ενζύμου σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer χωρητικότητας 1L. Οι καλλιέργειες αυτές διήρκησαν 5 μέρες, χρόνος που θεωρήθηκε επαρκής για την παραγωγή ικανοποιητικής ποσότητας ενζύμου. Μετά τις 5 ημέρες, οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν και συλλέχτηκε το υπερκείμενο. Το υπερκείμενο διηθήθηκε υπό κενό με 3 φίλτρα κατά σειρά ελλατούμενης διαμέτρου πόρων προκειμένου να απορριφθούν τυχόν κυτταρικά θραύσματα που παρέμειναν από την φυγοκέντρηση. ακολούθησε υπερδιήθηση, προκειμένου να συμπυκνωθεί το διάλυμα και να απομακρυνθούν από αυτό μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες (κάτω των 10kDa) και άλλες διαλυτές ενώσεις όπως σάκχαρα, νουκλεοτίδια και μη υδατικοί διαλύτες. Μετά το πέρας της υπερδιήθησης, το συμπυκνωμένο διάλυμα πρωτεϊνών, εξισορροπήθηκε με διάλυμα TALON με τη μέθοδο διαπίδυσης από ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στην χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου που ακολούθησε, διαδικασία η οποία έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη απομόνωση και καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη περιέχει 6 κατάλοιπα ιστιδίνης τα οποία έχουν αρνητικό φορτίο. Η χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε παρουσία ιμιδαζολίου, σε στήλη κοβαλτίου που έχει αρνητικό φορτίο. Έτσι, υπήρξε

ισχυρή έλξη μεταξύ του αρνητικού και του θετικού φορτίου, γεγονός που οδήγησε την πρωτεΐνη StCel61 να προσδεθεί ισχυρά στη στήλη, ενώ όλες οι υπόλοιπες πρωτεΐνες εκλούθηκαν από αυτήν. Στη συνέχεια, το ανασυνδυασμένο ένζυμο εκλούθηκε από τη στήλη με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (0-100mM), λόγω του ότι το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ως προς τις θέσεις πρόσδεσης στη στήλη.

Στη συνέχεια αφού ολοκληρώθηκε η χρωματογραφία ακινητοποιημένου μετάλλου, πραγματοποιήθηκε κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) σε δείγμα που συλλέχτηκε από το συμπυκνωμένο διάλυμα πρωτεϊνών μετά την υπερδιήθηση και σε δείγμα που συλλέχτηκε από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που εκλούστηκε από την στήλη κοβαλτίου.



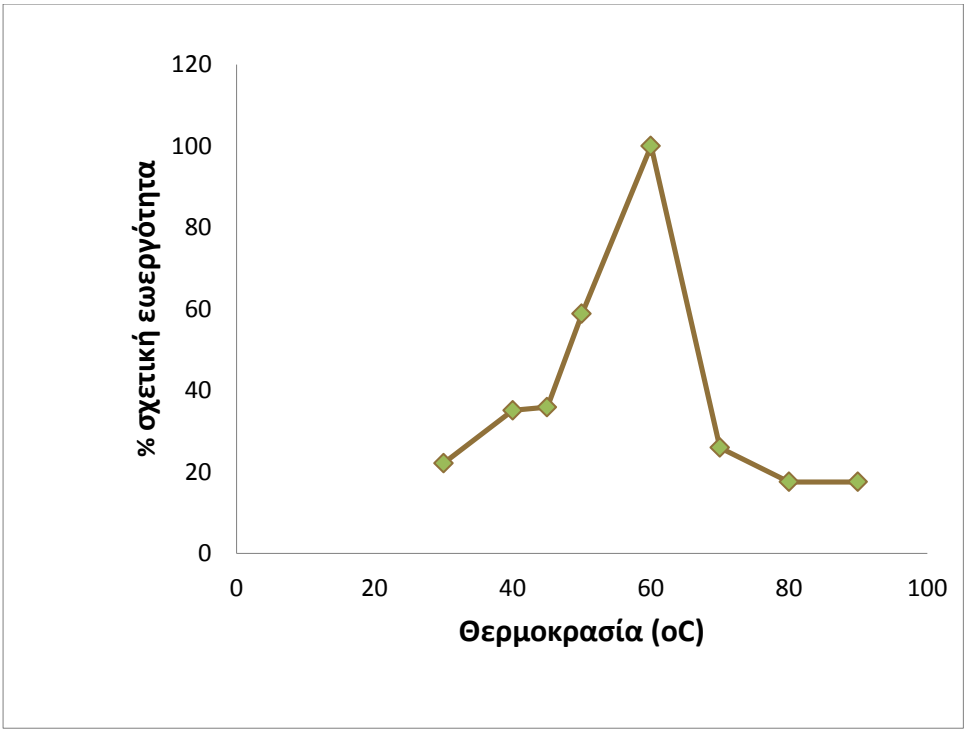
Εικόνα 19. SDS-PAGE της StCel61. 1/ πρότυπο διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρος, 2/εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας ανασυνδυασμένης *P. Pastoris,* 3/ έξοδος στήλης TALON και 4/ καθαρή StCel61.

Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, που φαίνονται παραπάνω, το μοριακό βάρος είναι περίπου 60 kDa. Παρουσιάζει σημαντική διαφορά από το θεωρητικό υπολογιζόμενο που είναι 33.2 kDa. Το γεγονός αυτό οφείλεται

στην γλυκοζυλίωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από την *P. Pastoris* κατά την διάρκεια μετά-μεταφραστικων τροποποιήσεων.
Το φαινόμενο της γλυκοζυλίωσης έχει αναφερθεί και σε άλλες εργασίες που χρησιμοποιούν ως σύστημα ετερόλογης έκφρασης την *P. Pastoris* όπως στην έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της γλυκοαμυλάσης από τον Aspergillus awamori (*Heimo* et al., *1997).*
Με την βοήθεια προγραμμάτων πρόβλεψης θέσεων γλυκοζυλίωσης διαθέσιμων στο διαδίκτυο (NetOGlyc 3.1 Server + Net Glyc) διακρίθηκαν 1 πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωση και 23 O-γλυκοζυλίωση στην αλληλουχία της πρωτεΐνης γεγονός που εξηγεί την γλυκοζυλίωση και κατά συνέπεια αύξηση του μοριακού της βάρος.
Ακόμη με την μέθοδο Lowry προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, και ήταν 1.477 mg/ml.

2. Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης και θερμοσταθερότητα της *St*Cel61 και σταθερότητα του σε διαφορετικές θερμοκρασίες

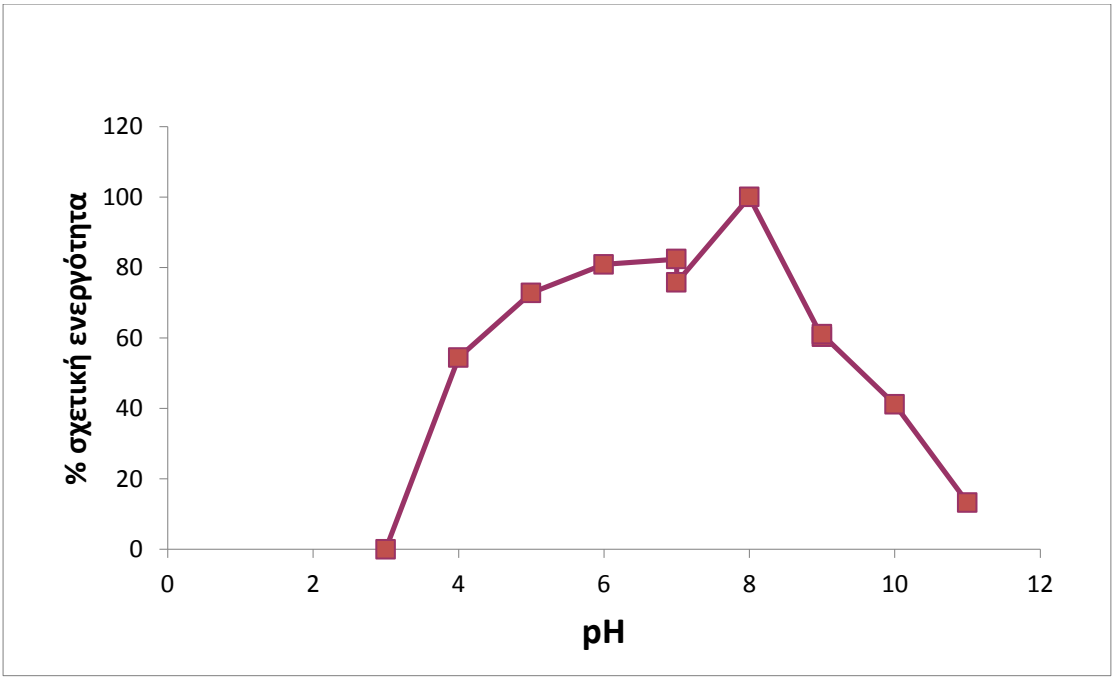
Για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της *St*Cel61, πραγματοποιήθηκε αντίδραση της με λιχενάνη 0.5% (w/v) σε διαφορετικές θερμοκρασίες (30-90°C). Η αντίδραση διήρκησε 5 ώρες και η μέγιστη θερμοκρασία παρατηρήθηκε στους 65°C. Θεωρήθηκε ότι η *St*Cel61 σε αυτή τη θερμοκρασία παρουσιάζει το 100% της δραστικότητας της και με βάση αυτήν ορίστηκαν τα ποσοστά σχετικής δραστικότητας της στις υπόλοιπες θερμοκρασίες.
Όσον αφορά τη σταθερότητα της πρωτεΐνης μετά από επώαση 5 ωρών στις διαφορετικές θερμοκρασίες 40, 50,60,65 και 70°C οι σχετικές ενεργότητες ήταν αντίστοιχα 30,53,97,100 και 22%.



Διάγραμμα 2 . Σχετική ενεργότητας(%) της *St*Cel61 σε υπόστρωμα λιχενάνης και σε θερμοκρασίες 30-90°C

3. Βέλτιστο pH δραστικότητας της StCel61 και σταθερότητα σε διαφορετικά pH

Μετά τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στο υπόστρωμα της λιχενάνης παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη StCel61 παρουσιάζει μέγιστη δραστικότητα σε pH= 8. Στο pH αυτό, θεωρήθηκε ότι η StCel61 παρουσιάζει το 100% της σχετικής δραστικότητας της, και με βάση αυτό ορίστηκαν τα ποσοστά σχετικής δραστικότητας της στα υπόλοιπα pH. Ακόμη, παρατηρήθηκε σταδιακη μείωση της δραστικότητας της πρωτεΐνης εκατέρωθεν του pH 8.
Σε ότι αφορά τη σταθερότητα σε εύρος pH, μετά από 5 ώρες επώασης σε pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 και 10 τα αντίστοιχα ποσοστά σχετικής ενεργότητας ήταν 54, 73, 81, 82, 100, 61 και 41%.



Διάγραμμα 3. Σχετική ενεργότητα(%) της *St*Cel61 σε υπόστρωμα λιχενάνης σε pH 3-11

4. **<u>Ανίχνευση ενεργότητας σε υποστρώματα πολυσακχαριτών</u>**

Η ενζυμική ενεργότητα μετρήθηκε με την ποσότητα απελευθερωμένων αναγωγικών σακχάρων από αντίδραση σε πολυσακχαριτικά υποστρώματα με την μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος. Για την ανίχνευση της ενεργότητας της *StCel61* χρησιμοποιήθηκε μια μεγάλη ποικιλία πολυσακχαριτών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πινάκα

Πινάκας 7. Προσδιορισμός δραστικότητας της *StCel61* σε μια ποικιλία πολυσακχαριτών

υπόστρωμα	Αναγωγικά σάκχαρα (μmol/min.g protein)
CMC	27±0.2
HEC	3±0.3
HPMC	0
Β-γλουκανη κριθαριού	28±1.6
λιχενάνη	27.6±0.2
λαμιναρίνη	0
Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη	0
Αραβινοξυλάνη σίτου	26±4.8
Ξυλάνη οξιάς	20.4±1.2
Αραβικό κόμμι	0
χιτίνη	0

Παρατηρήθηκε ασθενής υδρολυτική δράση στα υποστρώματα CMC, β-γλουκάνη κριθαριού, λιχενάνη, αραβινοξυλάνη σίτου και ξυλάνη οξιάς. Δεν ανιχνεύτηκε καμία δράση στα υποστρώματα λαμιναρίνη , μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, αραβικό κόμμι, χιτίνη και HPMC.

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενζύμων, με κύρια δράση την αποικοδόμηση των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, είναι μεγάλης σημασίας δεδομένου ότι η κυτταρίνη αντιπροσωπεύει την πιο άφθονη πηγή οργανικού άνθρακα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Για παράδειγμα μπορεί να μετατραπεί σε αιθανόλη η οποία χρησιμοποιείται ως καύσιμο. Οι θερμόφιλοι κυτταρινολυτικοί μύκητες αποτελούν σημαντική πηγή βιοκαταλυτών που είναι θερμοσταθεροί και ανθεκτικοί σε υψηλές θερμοκρασίες. Αυτό το γεγονός τους καθιστά κατάλληλους στη βιομηχανία για βιοδιεργασίες που απαιτούν τέτοιες συνθήκες λειτουργίας.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μια GH61 από το θερμόφιλο μύκητα *Sporotrichum thermophile*, η *St*Cel61, κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε στην μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*. Ο χαρακτηρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ανέδειξε ένα ένζυμο με αυξημένη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες και pH. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παρουσίαζε μέγιστη δραστικότητα σε θερμοκρασία 65°C και σε τιμή pH 8. Αυτές οι ιδιότητες εξασφαλίζουν την χρήση ενζύμου σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες και υψηλό pH. Επιπρόσθετα, η ανθεκτικότητα σε διάφορες τιμές θερμοκρασιών ανέδειξε ένα θερμοσταθερό ένζυμο, το οποίο μετά από 5 ώρες επώασης στους 60°C διατηρεί το 97% της ενεργότητας του.

Επίσης εξετάστηκε η ικανότητα της *St*Cel61 να υδρολύει ποικιλία πολυσακχαριτών. Βρέθηκε ασθενής υδρολυτική δράση σε ορισμένους πολυσακχαρίτες (CMC, β-γλουκάνη κριθαριού, λιχενάνη, αραβινοξυλάνη σίτου και ξυλάνη οξιάς), και σε σύγκριση με αυτή άλλων γλυκοζυλ-υδρολασών κρίθηκε πολύ χαμηλή. Για παράδειγμα, η δραστικότητα σε καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνη (CMC) είναι περίπου 1000 φορές χαμηλότερη από αυτή άλλων χαρακτηρισμένων ενδογλουκανασών από το μύκητα T. Reesei (Δημαρόγονα).

Η ανιχνευμένη υδρολυτική ικανότητα της *St*Cel61, κατά συνέπεια δεν μπορεί να θεωρηθεί ως η βασική δραστικότητα της στην φύση.

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bennett JW, Wunch KG, Faison BD. Use of fungi in biodegradation. In: Hurst CJ, editor.Manual of Environmental Microbiology.Washington DC: AMS press; 2002. p. 960–71.

Brondyk WH (2009). "Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein".*Meth. Enzymol.*. Methods in Enzymology **463**: 131–47. doi:10.1016/S0076-6879(09)63011-1.ISBN 978-0-12-374536-1. PMID 19892171.

Carmen Sánchez. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnology Advances 27 (2009) 185–194

Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T (2009). "Expression in the yeast Pichia pastoris". *Meth. Enzymol.*. Methods in Enzymology **463**: 169–89.doi:10.1016/S0076-6879(09)63013-5. ISBN 978-0-12-374536-1. PMID 19892173.

Chang, Y. 1967. The fungi of wheat straw compost. II. Biochemical and physiological studies. Trans. Br. Mycol. Soc. 50:667-677.

Cooney, D. G., and R. Emerson. 1964. Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification. W. H. Freeman & Co., San Francisco.

Daly R, Hearn MT (2005). "Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production". *J. Mol. Recognit.* **18** (2): 119–38.doi:10.1002/jmr.687. PMID 15565717.

De Schutter K., Lin Y.-C., Tiels P, *et al.* (2009). "Genome sequence of the recombinant protein production host Pichia pastoris". *Nature Biotechnology* **27** (6): 561–566.doi:10.1038/nbt.1544. PMID 19465926.

Ding SJ, Ge W, Buswell JA, 2006. Cloning of multiple cellulase cDNAs from Volvariella volvacea and their differential expression during substrate colonization and fruiting. FEMS Microbiology Letters 263: 207-213.

Eastwood DC, Floudas D, Binder M, Majcherczyk A, Schneider P, Aerts A, Asiegbu FO, Baker SE, Barry K, Bendiksby M, Blumentritt M, Coutinho PM, Cullen D, de Vries RP, Gathman A, Goodell B, Henrissat B, Ihrmark K, Kauserud H, Kohler A, LaButti K, Lapidus A, Lavin JL, Lee YH, Lindquist E, Lilly W, Lucas S, Morin E, Murat C, Oguiza JA, Park J, Pisabarro AG, Riley R, Rosling A, Salamov A, Schmidt O, Schmutz J, Skrede I, Stenlid J, Wiebenga A, Xie XF, Kues U, Hibbett DS, Hoffmeister D, Hogberg N, Martin F, Grigoriev IV, Watkinson SC, 2011. The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. Science 333: 762-765.

Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Poulsen JCN, Brown K, Salbo R, Ding HS, Vlasenko E, Merino S, Xu F, Cherry J, Larsen S, Lo Leggio L, 2010. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. Biochemistry 49: 3305-3316

Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, *et al.* (September 2006). "Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins". *Science* **313** (5792): 1441–3.doi:10.1126/science.1130256. PMID 16960007.

Hara Y, Hinoki Y, Shimoi H, Ito K, 2003. Cloning and sequence analysis of endoglucanase genes from an industrial fungus, Aspergillus kawachii. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 67: 2010-2013.

Igor Yakovlev & Gustav Vaaje-Kolstad & Ari M. Hietala & Emil Stefańczyk & Halvor Solheim & Carl Gunnar Fossdal. Substrate-specific transcription of the enigmatic GH61 family of the pathogenic white-rot fungus Heterobasidion irregular during growth on lignocellulose.2012. Appl Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s00253-012-4206-x

Miller, Gail Lorenz (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Anal. Chem.* **31** (3): 426–428.doi:10.1021/ac60147a030.

Paul Mann, Lisa Gahagan, and Mark B. Gordon, "Tectonic setting of the world's giant oil and gas fields," in Michel T. Halbouty (ed.) *Giant Oil and Gas Fields of the Decade, 1990–1999*, Tulsa, Okla.: American Association of Petroleum Geologists, p.50, accessed 22 June 2009.

Yan Lin . Shuzo Tanaka "Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects" Appl Microbiol Biotechnol (2006) 69: 627–642

DOI 10.1007/s00253-005-0229-x
Pernilla Turner, Gashaw Mamo and Eva N Karlsson" Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining"

Lucia Zifcakova, Petr Baldrian, Fungal polysaccharide monooxygenases: new players. in the decomposition of cellulose. Mini-review. Fungal Ecology,2012.2-6

Raguz S, Yague E, Wood DA, Thurston CF, 1992. Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from Agaricus bisporus. Gene 119: 183e190. (Chang and Kwon-Chung, 1998)

Lev S, Horwitz BA, 2003. A mitogen-activated protein kinase pathway modulates the expression of two cellulase genes in Cochliobolus heterostrophus during plant infection. Plant Cell 15: 835-844.

Bauer S, Vasu P, Persson S, Mort AJ, Somerville CR, 2006. Development and application of a suite of polysaccharidedegrading enzymes for analyzing plant cell walls. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 103: 11417-11422.

Saloheimo M, NakariSetala T, Tenkanen M, Penttila M, 1997. cDNA cloning of a Trichoderma reesei cellulase and demonstration off endoglucanase activity expression in yeast. European Journal of Biochemistry 249: 584-591.

Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn- Coleman NS, Goedegebuur F, Houfek TD, England GJ, Kelley AS, Meerman HJ, Mitchell T, Mitchinson C, Olivares HA, Teunissen PJM, Yao J, Ward M, 2003. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus Trichoderma reesei. Journal of Biological Chemistry 278: 31988-31997.

Wymelenberg AV, Denman S, Dietrich D, Bassett J, Yu XC,Atalla R, Predki P, Rudsander U, Teeri TT, Cullen D, 2002.Transcript analysis of genes encoding a family 61 endoglucanase and a putative membrane-anchored family 9 glycosyl

hydrolase from Phanerochaete chrysosporium. Applied and Environmental Microbiology 68: 5765-5768.

Westereng B, Ishida T, Vaaje-Kolstad G, Wu M, Eijsink VGH,Igarashi K, Samejima M, Stahlberg J, Horn SJ, Sandgren M,2011. The putative endoglucanase PcGH61D from Phanerochaete chrysosporium is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose. PLoS One 6: e27807.

Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, van Aalten DMF, Synstad B, Eijsink VGH, 2005. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from Serratia marcescens is essential for chitin degradation. Journal of Biological Chemistry 280: 28492-28497.

Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu ZL, Zhai H, Sorlie M, Eijsink VGH, 2010. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. Science 330: 219-222.

Reese ET, Siu RGH, Levinson HS, 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. Journal of Bacteriology 59: 485-497.

Karkehabadi S, Hansson H, Kim S, Piens K, Mitchinson C, Sandgren M, 2008. The first structure of a glycoside hydrolase family 61 member, Cel61B from Hypocrea jecorina, at 1.6A resolution. Journal of Molecular Biology 383: 144-154.

Quinlan RJ, Sweeney MD, Lo Leggio L, Otten H, Poulsen JCN, Johansen KS, Krogh K, Jorgensen CI, Tovborg M, Anthonsen A, Tryfona T, Walter CP, Dupree P, Xu F, Davies GJ, Walton PH, 2011. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 108: 15079-15084.

Baldrian P, Valaskova V, 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS Microbiology Reviews 32: 501-521.

Raguz S, Yague E, Wood DA, Thurston CF, 1992. Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from Agaricus bisporus. Gene 119: 183-190.

Karlsson J, Saloheimo M, Siika-aho M, Tenkanen M, Penttila M, Tjerneld F, 2001. Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of Trichoderma reesei. European Journal of Biochemistry 268: 6498-6507

Koseki T, Mese Y, Fushinobu S, Masaki K, Fujii T, Ito K, Shiono Y, Murayama T, Iefuji H, 2008. Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61

endoglucanase from Aspergillus kawachii. Applied Microbiology and Biotechnology 77: 1279 -1285

Langston JA, Shaghasi T, Abbate E, Xu F, Vlasenko E, Sweeney MD, 2011. Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. Applied and Environmental Microbiology 77: 7007-7015.

Phillips CM, Beeson WT, Cate JH, Marletta MA, 2011. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by Neurospora crassa. ACS Chemical Biology 6: 1399-1406.

Jordan DB, Bowman MJ, Braker JD, Dien BS, Hector RE, Lee CC, Mertens JA, Wagschal K, 2012. Plant cell walls to ethanol.Biochemical Journal 442: 241-252.

VI. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Πίνακες

Πινάκας 1. Σύνθεση διαφόρων τύπων λιγνινοκυτταρινικής βιομάζα (% επί ξυρού βάρους
Πίνακας 2 Ταξινόμηση του μύκητα *Sporotrichum thermophile*
Πίνακας 3 Ταξινόμηση της ζύμης *Pichia pastoris*
Πίνακας 4. Σύσταση πηκτής επιστοίβαξης στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE
Πίνακας 5. Σύσταση πηκτής διαχωρισμού στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE
Πίνακας 6. Η σύσταση του διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ΜΒ των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών
Πινάκας 7. Προσδιορισμός δραστικότητας της *StCel61* σε μια ποικιλία πολυσακχαριτών

Εικόνες

Εικόνα 1. Σύσταση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας
Εικόνα 2. Δομή της κυτταρίνης στο φυτικό κυτταρικό τοιχώματος.
Εικόνα 3. Ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης(συνεργιτισμός)
Εικόνα 4. Αντιδράσεις που καταλύονται από πολυσακχαρίτη μονοοξυγενάση και την προτεινόμενη συνεργασία των PMO με την κελλοβιόζη αφυδρογονάση
Εικόνα 5. *Sporotrichum thermophile*
Εικόνα 6. Μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*
Εικόνα 7. Είσοδος πλασμιδίων σε επιδεκτικά κύτταρα *Pichia pastoris.*
Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της φιάλης Büchner.
Εικόνα 9. Διάταξη της συσκευής υπερδιήθησης
Εικόνα 10 . Πρόσδεση πολυϊστιδίνης σε θετικά φορτισμένα ιόντα.
Εικόνα 11. Αποδιάταξη πρωτεϊνικών μορίων με το αντιδραστήριο SDS

Εικόνα 12. Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Εικόνα 13. Αναγωγή του δινιτροσαλικυλικού οξέου παρουσία αναγωγικών σακχάρων
Εικόνα 14. Δομή της λιχενάνης

Εικόνα 15. Δομή της β-γλουκανης
Εικόνα 16. Δομή της λαμιναρίνης
Εικόνα 17. Δομή της αραβινοξυλάνη σίτου.
Εικόνα 18. Δομή της CMC
Εικόνα 19. SDS-PAGE της StCel61. 1/ πρότυπο διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρος, 2/εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας ανασυνδυασμένης *P. Pastoris,* 3/ έξοδος στήλης TALON και 4/ καθαρή *St*Cel61.

<u>Διαγράμματα</u>

Διάγραμμα 1 . Πρότυπη καμπύλη διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων γλυκόζης που συσχετίζει μονάδες οπτικής απορρόφησης στα 540 nm με συγκέντρωση ανηγμένων σακχάρων στο δείγμα με την μέθοδο DNS.
Διάγραμμα 2 . Σχετική ενεργότητα (%) της StCel61 σε υπόστρωμα λιχενάνης και σε θερμοκρασίες 30-90°C
Διάγραμμα3. Σχετική δραστικότητα(%) της *St*Cel61 σε υπόστρωμα λιχενάνης σε pH 3-11