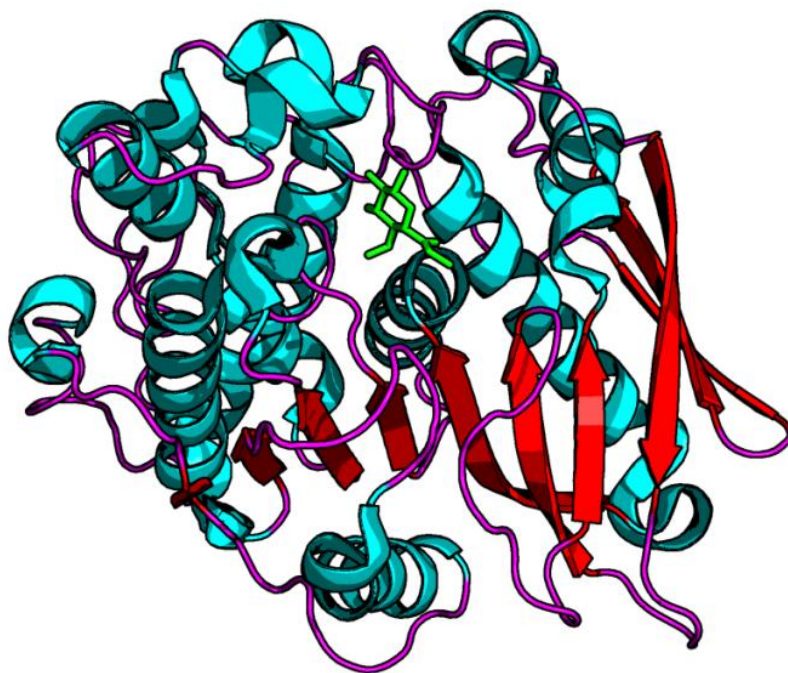


Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας IV: Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

Σύνθεση καινοτόμων υποστρωμάτων για τον
χαρακτηρισμό εστερασών του γλυκουρονικού οξέος της
ημικυτταρίνης



Κατσίμπουρας Κωνσταντίνος

Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος (Λέκτορας Ε.Μ.Π.)

ΑΘΗΝΑ 2013

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών, του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου στα πλαίσια της ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μου στη σχολή.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο της διπλωματικής εργασίας, Λέκτορα του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κ. Ευάγγελο Τόπακα, για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική υποστήριξη, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές στα στάδια εκπόνησης και συγγραφής της διπλωματικής εργασίας.

Θέλω επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Παύλο Χριστακόπουλο για τη δυνατότητα διεξαγωγής των πειραμάτων στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την διδάκτορα Μαρία Δημαρόγκωνα για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον της καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου, την προθυμία της να βοηθήσει στην επίλυση κάθε απορίας μου και το πνεύμα αισιοδοξίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους υποψήφιους διδάκτορες και τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τη βοήθεια και το φιλικό κλίμα που μου προσέφεραν.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου για την πλήρη υποστήριξη που μου προσέφερε όχι μόνο κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου σπουδών μου.

Κατσίμπουρας Κωνσταντίνος,

Αθήνα 2013

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες

Περίληψη i

Abstract.....iii

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Κυτταρικό τοίχωμα των φυτών..... 1

- 1.1. Σύσταση κυτταρικού τοιχώματος των φυτών 1
 - 1.1.1. Κυτταρίνη 3
 - 1.1.2. Ημικυτταρίνη 5
 - 1.1.3. Πηκτίνες 7
 - 1.1.4. Λιγνίνη 9
- 1.2. Ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της ξυλάνης 10
 - 1.2.1. Ένζυμα που αποικοδομούν την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης 10
 - 1.2.2. α-Γλυκουρονοζιδάσες 12
 - 1.2.3. β – ξυλοζιδάσες 13
 - 1.2.4. α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες 14
 - 1.2.5. Ακετυλο – εστεράσες 14
 - 1.2.6. Εστεράσες του φερουλικού και π-κουμαρικού οξέος 14
 - 1.2.7. Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος 14

Κεφάλαιο 2. Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος..... 17

- 2.1. Εισαγωγή 17
- 2.2. Συνθετικά υποστρώματα αναγνωρίσιμα από την εστεράση του γλυκουρονικού οξέος, 18
- 2.3. Εστεράση του γλυκουρονικού οξέος από το μύκητα *Sporotrichum thermophile*..... 20
 - 2.3.1. Χαρακτηρισμός της θερμοφίλης εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από το μύκητα *Sporotrichum thermophile*..... 21
 - 2.3.2. Έκφραση της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από το *Sporotrichum thermophile* στη μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris* 21
- 2.4. Κρυσταλλική δομή των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος 23

Κεφάλαιο 3. Αντιδράσεις σε μη συμβατικά συστήματα 25

- 3.1. Εισαγωγή 25
- 3.2. Λιπάσες..... 25
 - 3.2.1. Λιπάση Β από τον μύκητα *Candida antarctica* 25
 - 3.2.2. Ενζυμική ακινητοποίηση 26
- 3.3. Κινητική των ενζύμων και εξειδίκευση υποστρώματος 27
 - 3.3.1. Εισαγωγή 27
 - 3.3.2. Υπόθεση γρήγορης ισορροπίας 28
 - 3.3.3. Η υπόθεση της ημισταθερής κατάστασης 29

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4. Υλικά και Μέθοδοι..... 33

- 4.1. Υλικά 33
 - 4.1.1. Μικροοργανισμοί 33
 - 4.1.2. Χημικά Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά 33
 - 4.1.3. Υλικά και στήλες Χρωματογραφίας 34
 - 4.1.4. Εμπορικά ένζυμα 34

4.1.5.	Θρεπτικά μέσα.....	34
4.1.6.	Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers).....	35
4.1.7.	Συσκευές και Όργανα	36
4.2.	Καλλιέργειες κυττάρων	37
4.2.1.	Σκοπός.....	37
4.2.2.	Παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>P.pastoris</i>	37
4.2.2.i	Προκαλλιέργειες κυττάρων <i>P.pastoris</i>	37
4.2.2.ii	Κύριες καλλιέργειες κυττάρων <i>P.pastoris</i>	38
4.2.2.iii	Διήθηση, συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας	39
4.2.2.iv	Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)	39
4.2.3.	Ηλεκτροφορητικές τεχνικές.....	42
4.2.3.i	Ηλεκτροφόρηση SDS σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)	42
4.2.3.ii	Εμφάνιση των πρωτεϊνών στην ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμιδίου με χρωστική Coomassie Brilliant Blue	45
4.2.4.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών μορίων	46
4.3.	Ενζυμική σύνθεση φαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος	46
4.3.1.	Σκοπός.....	46
4.3.2.	Ενζυμική σύνθεση.....	46
4.3.2.i	Σύνθεση του εστέρα της 3-φαινυλ-1-προπανόλης με D- γλυκουρονικού οξύ ...	47
4.3.2.ii	Σύνθεση του εστέρα της κινναμικής αλκοόλης με D-γλυκουρονικό οξύ	47
4.3.2.iii	Σύνθεση του εστέρα της 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλης με D-γλυκουρονικό οξύ	48
4.3.3.	Καθαρισμός των εστέρων.....	49
4.3.3.i	Εκχύλιση του μίγματος της αντίδρασης.....	49
4.3.3.ii	Προετοιμασία στήλης Silica gel	51
4.3.3.iii	Φόρτωση του δείγματος, λήψη κλασμάτων και ποιοτικός χαρακτηρισμός τους	52
4.3.4.	Ταυτοποίηση των φαινυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	53
4.3.4.i	Εισαγωγή	53
4.3.4.ii	Προετοιμασία των δειγμάτων.....	54
4.3.4.iii	Ερμηνεία των φασμάτων NMR	55
4.4.	Ποσοτικός προσδιορισμός απελευθέρωσης φαινολικών αλκοολών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	56
4.4.1.	Εισαγωγή	56
4.4.2.	Διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	57
4.4.3.	Επιλογή κινητής και στατικής φάσης.....	59
4.5.	Υπολογισμός κινητικών σταθερών υδρόλυσης των γλυκουρονικών φαινυλεστέρων.....	60
4.5.1.	Σκοπός.....	60
4.5.2.	Κατασκευή καμπυλών αναφοράς για τις αλκοόλες A, B και C.....	60
4.5.3.	Εφαρμογή των καμπυλών αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό των εστέρων	61
4.5.4.	Ενζυμική υδρόλυση των φαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος	62
4.6.	Απομόνωση 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος από γλυκουρονοξυλάνη σημύδας	63
4.6.1.	Σκοπός.....	63

4.6.2.	Διαχωρισμός ουδέτερων και όξινων ολιγοσακχαριτών από το υδρόλυμα της γλυκουρονοξυλάνης σημόδας	63
4.6.3.	Ενζυμική επεξεργασία των όξινων ξυλοολιγοσακχαριτών	65
4.6.4.	Καθαρισμός του MeGlcA από ουδέτερους ολιγοσακχαρίτες και ουδέτερα σάκχαρα 65	
4.6.5.	Απομόνωση του MeGlcA με παρασκευαστική χρωματογραφία στοιβάδας (Preparative Layer Chromatography, PLC)	66
4.7.	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)	67
4.7.1.	Εισαγωγή	67
4.7.2.	Εφαρμογή και ανίχνευση των κηλίδων στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ...	68

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 5. Παραγωγή και απομόνωση της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος

StGE2	73
5.1. Παραγωγή και απομόνωση της StGE2	73
5.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της καθαρής StGE2	74

Κεφάλαιο 6. Ενζυμική σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση φαινυλεστέρων του

γλυκουρονικού οξέος	75
6.1. Παρουσία των φαινυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος στο διάλυμα της αντίδρασης	75
6.1.1 Ενζυμική σύνθεση	75
6.1.2 Χημική υδρόλυση των φαινυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος	76
6.1.3 Ενζυμική υδρόλυση με χρήση StGE2	77
6.2 Απομόνωση των φαινυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος.....	78
6.2.1 Δοκιμή διαχωρισμού με χρήση Silica gel ως στατική φάση.....	78
6.2.2 Επιλογή διαλύτη έκλουσης για την απομόνωση των εστέρων με στήλη Silica gel	80
6.2.3 Επιλογή κλασμάτων που προέκυψαν από διαχωρισμό με στήλη Silica gel με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας	81
6.2.3.i Κλάσματα από το διαχωρισμό του Εστέρα Α από την αλκοόλη Α	81
6.2.3.ii Κλάσματα από το διαχωρισμό του Εστέρα Β από την αλκοόλη Β	82
6.2.3.iii Κλάσματα από το διαχωρισμό του Εστέρα C από την αλκοόλη C	83
6.2.4. Έλεγχος καθαρότητας των διαλυμάτων των εστέρων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	84
6.3. Ταυτοποίηση με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	87

Κεφάλαιο 7. Κινητική μελέτη της δράσης της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος

StGE2	89
7.1. Μέθοδος μέτρησης της απελευθέρωσης αλκοόλης κατά την ενζυμική υδρόλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	89
7.2. Καμπύλες αναφοράς των αλκοολών Α, Β και C.....	91
7.2.1 Καμπύλη αναφοράς της 3-φαινυλ-1-προπανόλης (Α)	91
7.2.2 Καμπύλη αναφοράς της κινναμικής αλκοόλης (Β)	93
7.2.3 Καμπύλη αναφοράς της 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλης (C)	94
7.3. Συνθήκες των ενζυμικών υδρολύσεων	95
7.4. Αποτελέσματα της κινητικής μελέτης της StGE2	96

Κεφάλαιο 8. Απομόνωση MeGlcA από μίγμα ξυλοολιγοσακχαριτών

8.1. Απομόνωση όξινων ολιγοσακχαριτών από το υδρόλυμα της γλυκουρονοξυλάνης σημόδας.....	99
--	----

8.2.	Απελευθέρωση του 4-Ο-μέθυλ- γλυκουρονικού οξέος από τους όξινους ολιγοσακχαρίτες με ενζυμική υδρόλυση	100
8.2.1.	Δοκιμαστική αντίδραση απελευθέρωσης MeGlcA με τη χρήση μόνο α- γλυκουρονοζιδάσης	100
8.2.2.	Τελική αντίδραση ενζυμικής υδρόλυσης των όξινων ξυλοολιγοσακχαριτών	101
8.3.	Καθαρισμός του MeGlcA από το διάλυμα της αντίδρασης	102
8.3.1	Καθαρισμός του διαλύματος της αντίδρασης με στήλη ιοντο-ανταλλαγής.....	102
8.3.2.	Παρασκευαστική χρωματογραφία στοιβάδας για την απομόνωση του MeGlcA.	104

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κεφάλαιο 9. Σύνοψη και συζήτηση των αποτελεσμάτων

9.1.	Συνοπτικά αποτελέσματα και συμπεράσματα διπλωματικής εργασίας	109
9.2.	Μελλοντικές προκλήσεις	112

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η δράση της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από το θερμόφιλο μύκητα *Sporotrichum thermophile* σε συνθετικά ανάλογα των φυσικών υποστρωμάτων και πιο συγκεκριμένα σε φαινυλεστέρες του γλυκουρονικού οξέος.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε παραγωγή και απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης StGE2 από μετασχηματισμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *P. pastoris*. Η παραγωγή πραγματοποιήθηκε με υγρές καλλιέργειες των κυττάρων της ζύμης, η απομόνωση έγινε με στάδια διηθήσεων, συμπύκνωσης και χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) και τέλος το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) στα 43 kDa.

Στη συνέχεια ακολούθησε η ενζυμική σύνθεση και ο καθαρισμός τριών εστέρων του D-γλυκουρονικού οξέος της 3-φαινυλ-1-προπανόλης, της κινναμικής αλκοόλης και της 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλης. Η σύνθεση των εστέρων πραγματοποιήθηκε ενζυμικά χρησιμοποιώντας ως βιοκαταλύτη τη λιπάση Novozym 435, ο καθαρισμός έγινε με εκχύλιση και χρωματογραφία πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (silica gel chromatography), ενώ η ταυτοποίηση των εστέρων πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Η κινητική μελέτη της δράσης της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος StGE2 στα συνθετικά υποστρώματα οδήγησε στον υπολογισμό των σταθερών Michaelis-Menten K_m και k_{cat} , καθώς και του λόγου k_{cat} / K_m ο οποίος αποτελεί ένδειξη για την προτίμηση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα. Ο υπολογισμός πραγματοποιήθηκε με ποσοτικό προσδιορισμό της απελευθέρωσης των φαινολικών αλκοολών 3-φαινυλ-1-προπανόλη, κινναμική αλκοόλη και 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλη κατά την υδρόλυση των υποστρωμάτων από την StGE2 με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Για το σκοπό αυτό καταστρώθηκε αναλυτική μέθοδος HPLC όπου με δοκιμές προέκυψε ο κατάλληλος διαλύτης έκλυσης και έπειτα κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς των αλκοολών. Από την σύγκριση του λόγου k_{cat} / K_m μεταξύ των υποστρωμάτων προσδιορίστηκε ότι ο

εστεράς της κινναμικής αλκοόλης υδρολύεται ταχύτερα χωρίς όμως η εστεράση να επιδεικνύει υψηλή συγγένεια ως προς τα υποστρώματα.

Τέλος, για την παραγωγή νέων συνθετικών υποστρωμάτων τα οποία να βρίσκονται πιο κοντά στα φυσικά, έγινε προσπάθεια απομόνωσης 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος από γλυκουρονοξυλάνη σημύδας προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αντιδρόν στις ενζυμικές συνθέσεις των φαινυλεστέρων αντί του D-γλυκουρονικού οξέος.

Για πρώτη φορά, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της δράσης μιας εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος σε φαινολικούς εστέρες του αντίστοιχου οξέος συμβάλλοντας έτσι στην προσπάθεια διαλεύκανσης του ρόλου αυτών των ενζύμων στην αποικοδόμηση των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων.

Abstract

The present diploma thesis examines the action of a glucuronoyl esterase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* on three synthetic compounds that mimic the ester linkages of natural substrates and more specifically on esters of D-glucuronic acid with phenyl alcohols.

Recombinant glucuronoyl esterase StGE2 was produced in *Pichia pastoris* using liquid cell cultures. For the purification of the recombinant protein, culture broth was centrifuged, filtrated and concentrated and subsequently the protein was purified using immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC). Both the homogeneity and the molecular weight of the purified StGE2 were assessed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) with the latter estimated to be 43 kDa.

Esters of D-glucuronic acid with 3-phenyl-1-propanol, cinnamyl alcohol and 3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol were prepared by using immobilized *Candida antarctica* Lipase B in organic medium. The glucuronates, containing a UV-absorbing chromophore, were purified by filtration, extraction and silica gel chromatography and characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR).

The catalytic properties of the purified glucuronoyl esterase StGE2 on all three substrates were examined by determining the K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m values. The determination of kinetic parameters was carried out on all esters by using a quantitative assay which was based on the measurement of the increase of phenyl alcohols by following the enzymatic de-esterification by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a spectrophotometric detector. The elution solvent was determined through trials and alcohols standard curves were prepared by using the same assay. The StGE2 exhibited higher affinity and catalytic efficiency for cinnamyl glucuronate than for the other esters.

For the synthesis of new, more specialized substrates, purification of 4-O-methyl-D-glucuronic acid from birch glucuronoxylan was carried out in order to take the place of D-glucuronic acid as reactant in enzymatic esterification with each of the three phenyl alcohols.

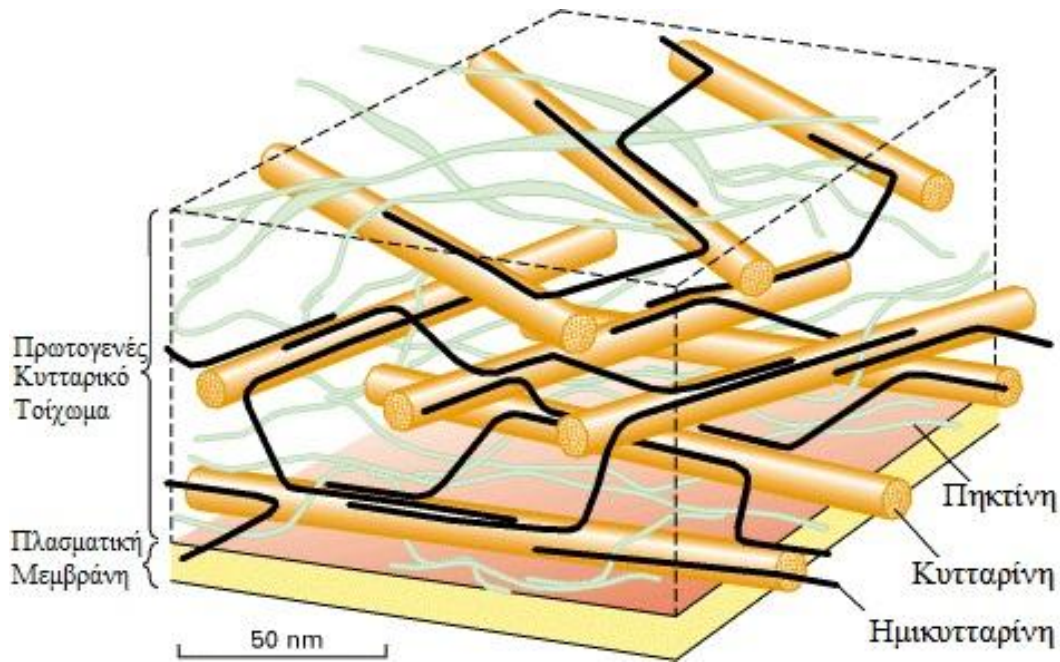
This is the first time that a glucuronoyl esterase's kinetic action on phenyl esters of D-glucuronic acid is examined, making a step towards the unraveling of such enzymes' role in plant cell wall degradation.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Κυτταρικό τοίχωμα των φυτών

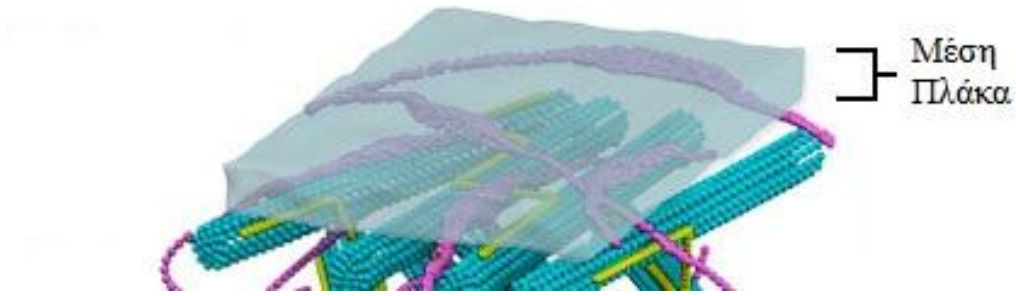
1.1. Σύσταση κυτταρικού τοιχώματος των φυτών

Για το φυτικό κύτταρο, το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί ένα σύνορο όπου το κύτταρο αντιμετωπίζει τις προκλήσεις του περιβάλλοντος του. Αποτελεί μία εξαιρετικά πολύπλοκη δομή η οποία εκτελεί μια μεγάλη ποικιλία λειτουργιών στη ζωή του φυτού. Οι πρώτες λειτουργίες του κυτταρικού τοιχώματος που αναγνωρίστηκαν είχαν σχέση με την ακαμψία, δηλαδή την παροχή αντοχής και σχήματος στο κύτταρο. Επομένως το τοίχωμα είναι ο παράγοντας κλειδί για την επίτευξη μεγάλου μεγέθους και δομικής αντοχής στα φυτά. Ωστόσο το κυτταρικό τοίχωμα κάνει πολλά περισσότερα από αυτά που αναφέρθηκαν. Το κυτταρικό τοίχωμα μπορεί να θέτει κάποιους περιορισμούς στην επικοινωνία κυττάρου-κυττάρου άλλα τέτοια μειονεκτήματα αντισταθμίζονται από τα αντίστοιχα πλεονεκτήματα. Το τοίχωμα προστατεύει το κύτταρο από τη συντριπτική πλειοψηφία των δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών από τη στιγμή που ακόμα και οι μικρότεροι από αυτούς, οι ιοί, δεν μπορούν να διεισδύσουν στο ευαίσθητό εσωτερικό των φυτών (Brett C. & Waldon K., 1996). Οπότε διάφοροι μικροοργανισμοί προσβάλλουν το φυτό διεισδύοντας είτε από ευκαιριακά κενά είτε με ενζυμική αποικοδόμηση. Οι σαπροφυτικοί και οι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί παράγουν ένα εύρος ενζύμων προκειμένου να αποικοδομήσουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών και να εισβάλουν στο εσωτερικό των κυττάρων. Σε κάποια είδη μικροοργανισμών αυτό το σύστημα ενζύμων έχει εξελιχθεί τόσο, ώστε σε κατάλληλες συνθήκες, να μπορούν να διασπάσουν ακόμα και τα πιο ανθεκτικά κυτταρικά τοιχώματα (Τόπακας E., 2004). Η σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών είναι πολύπλοκη και ποικίλλει, τόσο μεταξύ των φυτικών ειδών, όσο και μεταξύ των ιστών το ίδιου φυτού. Ανομοιογένεια παρατηρείται ακόμη κι ανάμεσα σε κυτταρικά τοιχώματα διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων. Τα βασικά συστατικά τους είναι η κυτταρίνη (cellulose), η ημικυτταρίνη (hemicellulose), η πηκτίνη (pectin), η λιγνίνη (lignin), οι πρωτεΐνες και διάφορες φαινολικές ενώσεις.



Σχήμα 1.1. Δομή του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών

Ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτικού οργανισμού, διακρίνονται δύο τύποι κυτταρικών τοιχωμάτων: το πρωτογενές και το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα. Το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα είναι εκείνο που εναποτίθεται στη φάση κατά την οποία το κύτταρο αυξάνει και είναι λεπτό, πλαστικό, περιέχει μεγάλη ποσότητα ύδατος και διασχίζεται από μεγάλο αριθμό πλασμοδεσμών που εξυπηρετούν τη διακυτταρική επικοινωνία. Η χημική του σύσταση ποικίλλει σημαντικά στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα είναι εκείνο που εναποτίθεται όταν το φυτικό κύτταρο έχει ολοκληρώσει την ανάπτυξή του, σχηματίζεται ομοιόμορφα ή τοπικά επί του πρωτογενούς τοιχώματος και περιέχει περισσότερη κυτταρίνη, λιγότερες ημικυτταρίνες και πηκτικές ενώσεις από το πρωτογενές. Τα δευτερογενή τοιχώματα περιέχουν και χημικές ενώσεις οι οποίες δεν ανευρίσκονται στα πρωτογενή τοιχώματα, όπως είναι η λιγνίνη, η σουβερίνη (suberin) και η κουτίνη (cutin). Τα κύτταρα στους φυτικούς ιστούς συγκρατούνται μεταξύ τους με τη βοήθεια της μέσης πλάκας, ένα λεπτό μεσοκυττάριο στρώμα που περιέχει κυρίως πηκτικές ενώσεις (Μουκούλη Μ., 2012).



Σχήμα 1.2. Μέση πλάκα του κυτταρικού τοιχώματος

Από τα συστατικά που συνιστούν το κυτταρικό τοίχωμα, η λιγνίνη, που εμφανίζεται κυρίως στα τοιχώματα σχετικά ώριμων φρούτων, είναι αυτή που αποικοδομείται πιο δύσκολα. Ακολουθούν η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και οι πηκτίνες. Η ανθεκτικότητα ενισχύεται με την παρουσία παράπλευρων αλυσίδων οι οποίες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: σε εκείνες που εμποδίζουν την πρόσβαση των ενζύμων στην κύρια αλυσίδα του πολυσακχαρίτη και σε αυτές που ενώνονται μεταξύ τους με αποτέλεσμα την ενίσχυση της συνοχής και της ανθεκτικότητας του κυτταρικού τοιχώματος.

Οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει ένζυμα, όπως είναι και οι εστεράσες, που διασπούν αυτές τις παράπλευρες αλυσίδες διευκολύνοντας την πρόσβαση των ενζύμων στην κύρια αλυσίδα των πολυσακχαριτών (Τόπακας Ε., 2004).

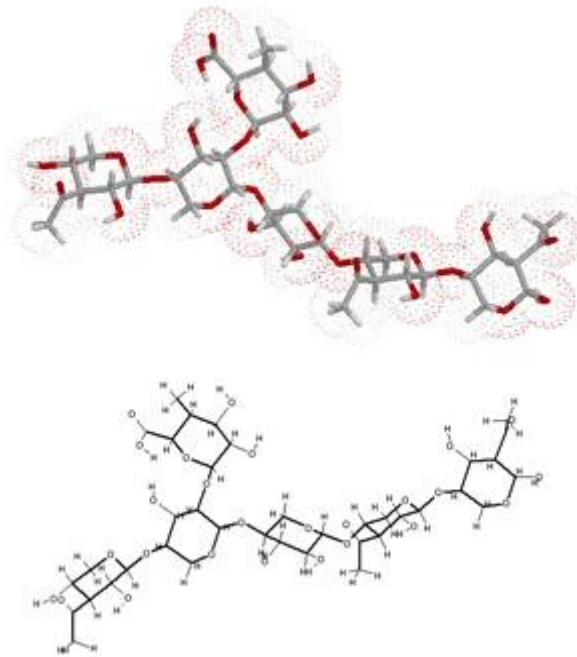
1.1.1. Κυτταρίνη

Το 1830, πρώτος ο Anselme Payen περιέγραψε την κυτταρίνη (cellulose) ως ένα ανθεκτικό, ινώδες στερεό το οποίο παραμένει μετά από την κατεργασία διαφόρων φυτικών ιστών με οξύ και αμμωνία (Brown M. & Saxena I. 2007). Στην πιο απλή της μορφή, η κυτταρίνη αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, μήκους 8000-15000 μορίων, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό.

1.1.2. Ημικυτταρίνη

Οι ημικυτταρίνες είναι κυρίως ετερογενείς πολυσακχαρίτες και αποτελούν τη δεύτερη σε αφθονία οργανική δομή στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών (Collins et al., 2005) και αποτελούνται κυρίως από σάκχαρα όπως εξόζες, πεντόζες και ουρονικά οξέα. Είναι άμορφες (μη κρυσταλλικές), έχουν χαμηλό βαθμό πολυμερισμού, είναι έντονα υγροσκοπικές και παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστηριότητα. Ένα τυπικό πρωτογενές τοίχωμα περιέχει ημικυτταρίνη σε ποσοστό 15-25% επί του ξηρού του βάρους. Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους ένα είδος ημικυτταρίνης κυριαρχεί, με τα υπόλοιπα να εντοπίζονται σε μικρότερες ποσότητες.

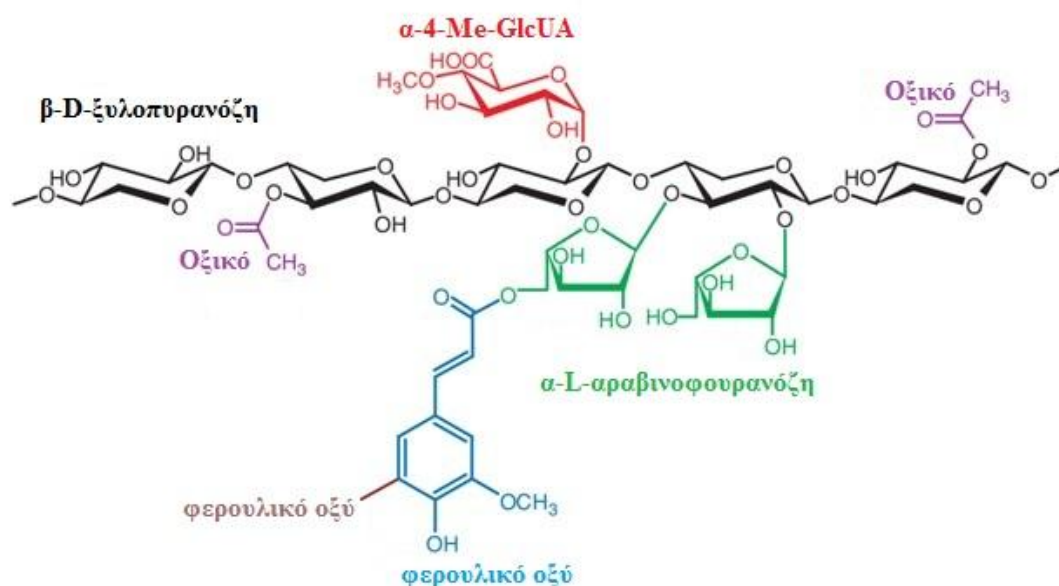
Η ξυλάνη είναι το σημαντικότερο ημικυτταρινούχο πολυμερές που συναντάται στα δημητριακά και το σκληρό ξύλο και αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση μετά την κυτταρίνη. Η υδρόλυση της ξυλάνης παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές.



Σχήμα 1.5. Δομή ξυλάνης από αγγειόσπερμα

Η ξυλάνη αποτελείται από μια κύρια αλυσίδα μονάδων D-ξυλόζης, συνδεδεμένων με β -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό, οι οποίες μπορεί να είναι υποκατεστημένες με διαφορετικές πλευρικές ομάδες, όπως η L-αραβινόζη, η D-

γαλακτόζη, η ακέτυλο ομάδα, η ομάδα του φερουλικού οξέος ή π-κουμαρικού οξέος και, τέλος, οι μονάδες γλυκουρονικού οξέος.



Σχήμα 1.6. Γενική δομή της ξυλάνης όπου φαίνονται διάφορες πλευρικές αλυσίδες που μπορεί να υπάρξουν σε αυτή

Οι ξυλάνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν, με βάση τη φύση των υποκαταστατών της κύριας αλυσίδας σε πέντε οικογένειες, τις ομοξυλάνες, τις γλυκουρονοξυλάνες, τις αραβινοξυλάνες, τις αραβινογλυκουρονοξυλάνες και τις γλυκουρονοαραβινο-ξυλάνες. Στα ξύλα των φυλλοβόλων δέντρων, η ξυλάνη βρίσκεται κυρίως ως Ο-ακετυλ-4-Ο-μέθυλ-D-γλυκουρονοξυλάνη, στα ξύλα των κωνοφόρων δέντρων ως αραβινο-4-Ο-μέθυλ-D- γλυκουρονοξυλάνη, ενώ στο γρασίδι και στα μονοετή φυτά ως αραβινοξυλάνη. Η ξυλάνες των δημητριακών περιέχουν μεγάλες ποσότητες L-αραβινόζης και αναφέρονται ως αραβινοξυλάνες, ενώ οι ξυλάνες του σκληρού ξύλου αναφέρονται ως γλυκουρονοξυλάνες, λόγω της υψηλής ποσότητας D-γλυκουρονικού οξέος που συνδέεται με την κυρία αλυσίδα.

Η οικογένεια των γλυκουρονοξυλανών φέρει ως υποκαταστάτες το α-D-γλυκουρονικό οξύ και το 4-Ο-μεθυλο-αιθερικό παράγωγο του, στις θέσεις 2 ή 3 των ξυλοπυρανοζών της κεντρικής αλυσίδας (Χριστακόπουλος Π., 2011).

Πίνακας 1.1. Σύσταση των διαφόρων ειδών ξυλάνης σε σάκχαρα (Μουκούλη Μ., 2012)

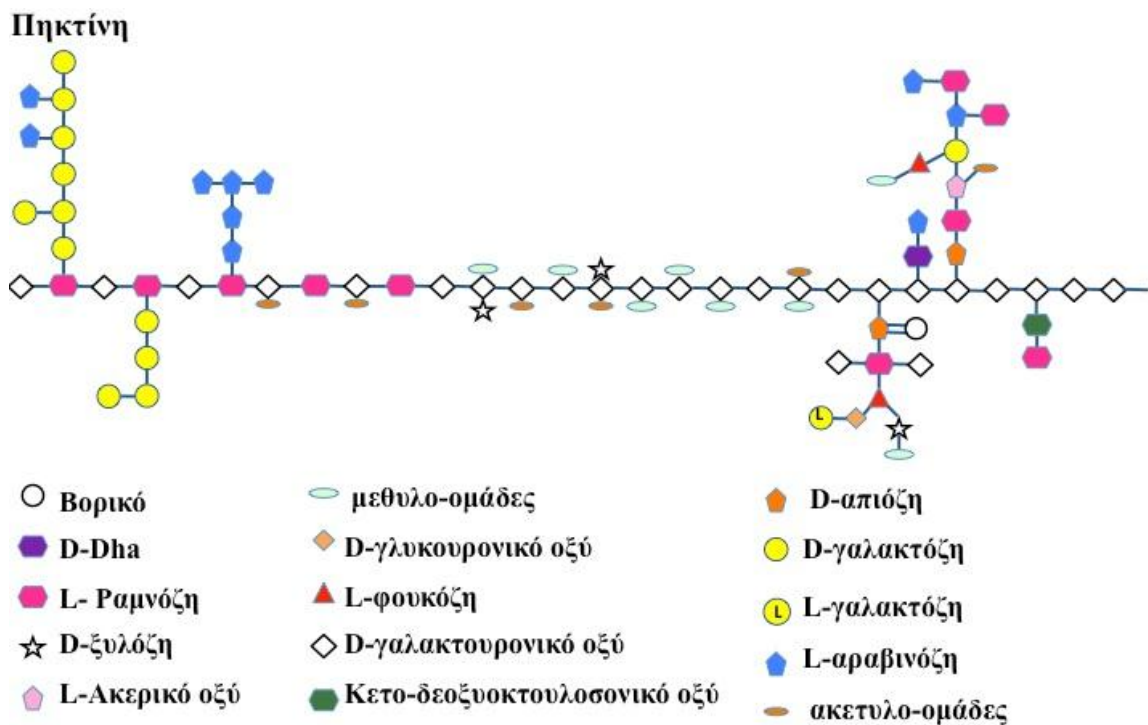
Είδη Ξυλάνης	Ξυλόζη (%)	Αραβινόζη (%)	Γλυκόζη (%)	Γαλακτόζη (%)	Μαννόζη (%)	Γλυκουρονικό οξύ (%)
Ξυλάνη ξύλου σημύδας (Birchwood)	89.3	1.0	1.4	–	–	8.3
Ουδέτερη ξυλάνη πίτυρου ρυζιού	46.0	44.9	1.9	6.1	–	1.1
Αραβινο- ξυλάνη σίτου	65.8	33.5	0.3	0.1	0.1	–
Ξυλάνη από ίνες αραβοσίτου	48 – 54	33 – 35	–	–	–	3 – 6

1.1.3. Πηκτίνες

Οι πηκτίνες αποτελούν μια άλλη ομάδα ετεροπολυσακχαριτών, οι οποίες αποτελούνται από μια κύρια αλυσίδα μονάδων γαλακτουρονικού οξέος συνδεδεμένων με α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Συμμετέχουν σε ποσοστό έως 35% επί του ξηρού βάρους του τοιχώματος και διακρίνονται σε ουδέτερες και όξινες. Οι ουδέτερες ενώσεις περιλαμβάνουν τα ομοιοπολυμερή αραβινόζης και γαλακτόζης, αραβινάνη (arabinan) και γαλακτάνη (galactan) και ένα ετεροπολυμερές, την αραβινογαλακτάνη I. Οι όξινες πηκτίνες περιλαμβάνουν την ομογαλακτουρονάνη (homogalacturonan) που αποτελείται από μονάδες γαλακτουρονικού οξέος, συνδεδεμένων με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς και τις ραμνογαλακτουρονάνες I και II (rhamnogalacturonan I & II) που είναι πολυμερή μονάδων ραμνόζης και γαλακτουρονικού οξέος, συνδεδεμένων με α-1,2 γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Οι πηκτίνες περιλαμβάνουν δύο διαφορετικές καθορισμένες περιοχές: τις "ομαλές" (smooth) και τις "τριχώδεις" (hairy). Οι πρώτες αποτελούνται από μια κύρια αλυσίδα μονάδων γαλακτουρονικού οξέος, συνδεδεμένων με α-1,4 γλυκοζιτικούς

δεσμούς, οι οποίες μπορούν να είναι μεθυλιωμένες ή ακετυλιωμένες. Στις δεύτερες περιοχές οι μονάδες γαλακτουρονικού οξέος της κύριας αλυσίδας διακόπτονται από μονάδες ραμνόζης, ενωμένες με α-1,2 γλυκοζιτικό δεσμό και στις οποίες μακριές αλυσίδες αραβινάνης ή γαλακτάνης ενδέχεται να συνδέονται με το O-4 της ραμνόζης. Οι πολυσακχαρίτες ημικυτταρίνης και πηκτίνης, καθώς επίσης και το αρωματικό πολυμερές της λιγνίνης, αλληλεπιδρούν με τα μικροϊνίδια της κυτταρίνης δημιουργώντας μια άκαμπτη δομή που ενισχύει το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Διαμορφώνουν επίσης τις ομοιοπολικές διασυνδέσεις, οι οποίες θεωρείται ότι εμπλέκονται στον περιορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης και τη μείωση της βιοαποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Η πηκτίνη σταθεροποιεί το πλέγμα που δημιουργείται στην περίπτωση των πρωτογενών κυτταρικών τοιχωμάτων από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη και συμμετέχει στην ρύθμιση της διαπερατότητάς τους από ιόντα και ένζυμα, ενώ επιπλέον, θεωρείται ότι ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την πλαστικότητα τους.



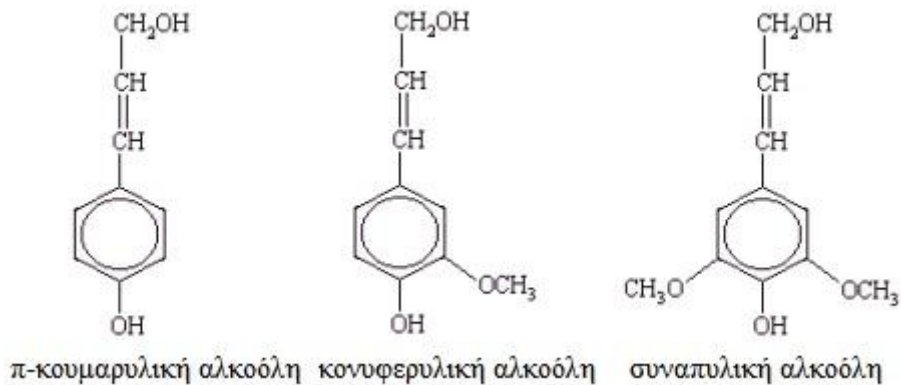
Σχήμα 1.7. Παρουσιάζεται η δομή της πηκτίνης, αναδεικνύοντας την υψηλή χημική ετερογένειά της (Δημαρόγκωνα Μ., 2012)

1.1.4. Λιγνίνη

Στα δευτερογενή τοιχώματα αντίστοιχο ρόλο με αυτόν της πηκτίνης παίζει η λιγνίνη (lignin). Το δευτερογενές τοίχωμα συντίθεται όταν ολοκληρωθεί η αύξηση του κυττάρου, εναποτίθεται ομοιόμορφα ή τοπικά επί του πρωτογενούς τοιχώματος και περιέχει περισσότερη κυτταρίνη και λιγότερες ημικυτταρίνες και πηκτικές ενώσεις από το πρωτογενές. Η λιγνίνη είναι ένα μεγαλομοριακό, υδρόφοβο, αρωματικό πολυμερές και αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο οργανικό πολυμερές στη γη και το 25-35% της ξηρής μάζας του ξύλου. Είναι άμορφη και έχει πολύ υψηλό βαθμό πολυμερισμού (100.000-300.000). Είναι πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο. Τα μονομερή της λιγνίνης είναι τρεις αρωματικές ενώσεις, η κονυφερυλική, η συναπυλική και η π-κουμαρυλική αλκοόλη. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι είναι έντονα υδρόφοβη ουσία, αδιάλυτη στο νερό. Οι δεσμοί στη λιγνίνη είναι αιθερικοί δεσμοί καθώς και δεσμοί άνθρακα-άνθρακα.

Πίνακας 1.2. Σύσταση διαφόρων λιγνινοκυτταρινουχων υλικών (Saha, 2003)

	Σύσταση (% , ξηρής ύλης)		
	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη
Ίνες αραβοσίτου	15	35	8
Στάχυς αραβοσίτου	45	35	15
Στέλεχος αραβοσίτου	40	25	17
Άχυρο ρυζιού	35	25	12
Άχυρο σίτου	30	50	20
Βαγάσση ζαχαροκαλάμου	40	24	25
Switch grass	45	30	12
Αγριόβρομο (Coastal bermuda grass)	25	35	6



Σχήμα 1.8. Αρωματικές αλκοόλες που αποτελούν μονομερή της λιγνίνης

1.2. Ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της ξυλάνης

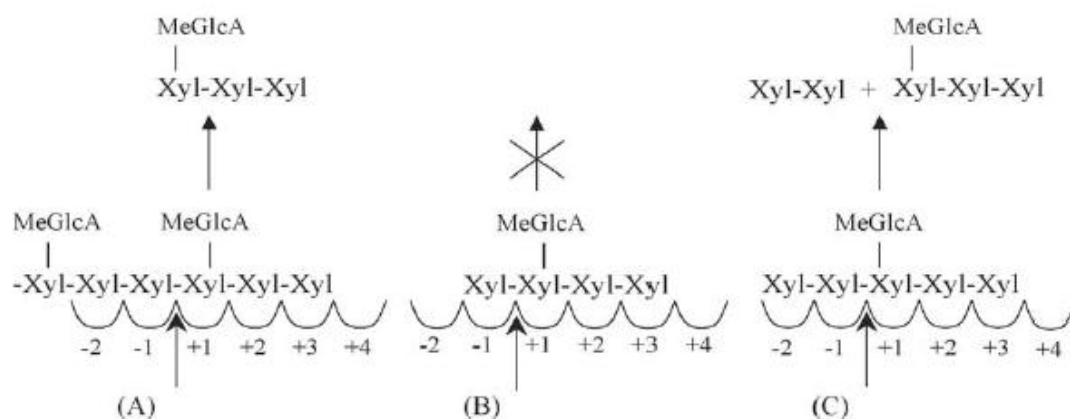
1.2.1. Ένζυμα που αποικοδομούν την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης

Δύο κατηγορίες ενζύμων είναι υπεύθυνες για τη βιοαποικοδόμηση της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης. Η πρώτη αναφέρεται στις ενδοξυλανάσες, οι οποίες είναι σε θέση να διασπούν την αλυσίδα της ξυλάνης σε μικρότερους ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι μπορούν με τη σειρά τους να αποικοδομηθούν περαιτέρω σε ξυλόζη από τη δεύτερη κατηγορία, τις β-ξυλοζιδάσες. Και οι δύο κατηγορίες ενζύμων, καθώς επίσης και τα γονίδια που τις εκφράζουν, έχουν χαρακτηριστεί από πολλούς μικροοργανισμούς. Η σύγκριση της πρωτοταγούς ακολουθίας των αμινοξέων αποκάλυψε ότι πολλές ξυλανάσες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο οικογένειες υδρολασών, την οικογένεια F ή 10 και την οικογένεια G ή 11. Τα μέλη της πρώτης και της δεύτερης οικογένειας παρουσιάζουν ορισμένες πολύ σημαντικές διαφορές. Τα μέλη της πρώτης οικογένειας χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο μοριακό βάρος και από μικρότερη εξειδίκευση σε συνθετικά υποστρώματα. Συγκρινόμενες με τις ενδοξυλανάσες της οικογένειας 11 επιδεικνύουν καλύτερη ικανότητα στο να προσβάλλουν την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης και δεσμούς που βρίσκονται πιο κοντά σε υποκατεστημένα μόρια, σε αντίθεση με τα μέλη της οικογένειας 11 στα οποία η ύπαρξη του πλευρικού υποκαταστάτη δρα προστατευτικά για τους παρακείμενους δεσμούς. Ως αποτέλεσμα, η δράση των ξυλανασών της οικογένειας 10 στα διάφορα είδη ξυλάνης παράγει προϊόντα που έχουν γενικά μικρότερο μοριακό βάρος από τα αντίστοιχα προϊόντα των ξυλανασών της οικογένειας 11 (Τόπακας Ε., 2004).

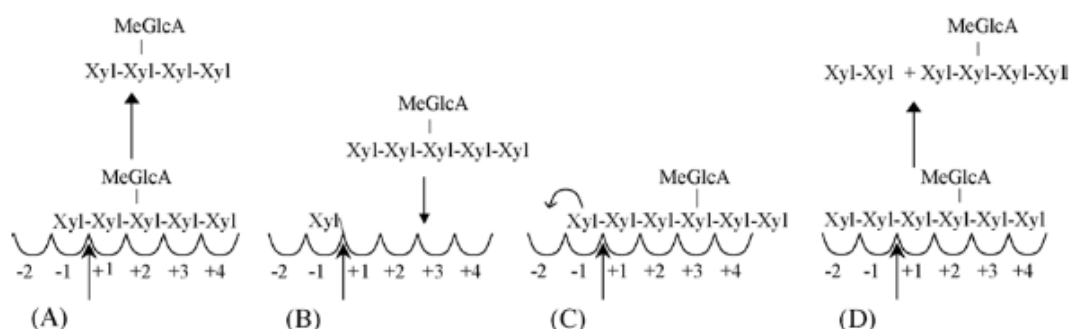
Οι ένδο-β-1,4-ξυλανάσες (EC 3.2.1.8, EXs) προσβάλλουν τυχαία την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης παράγοντας έτσι διάφορους υποκατεστημένους ολιγοσακχαρίτες. Έχουν ταξινομηθεί στις οικογένειες 5, 8, 10, 11 και 43 των γλυκοζιδικών υδρολασών βάση ομοιοτήτων στις ακολουθίες των αμινοξέων τους σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZy.

Η βάση δεδομένων CAZy (Carbohydrate-Active EnZyme; URL: <http://www.cazy.org/>) αποτελεί μια πηγή βασισμένη στη γνώση, με εξειδίκευση στα ένζυμα τα οποία συνθέτουν και διασπούν σύνθετους υδρογονάνθρακες και γλυκοσυζεύγματα (glycoconjugates). Μέχρι σήμερα η βάση δεδομένων CAZy έχει να παρουσιάσει 131 οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών (glycoside hydrolase, GH), 94 οικογένειες γλυκοζυλτρασφερασών (glycosyltransferase, GT), 22 οικογένειες πολυσακχαριτικών λυασών (polysaccharide lyase, PL) και 16 οικογένειες υδατανθρακικών εστερασών (carbohydrate esterase, CE). Οι προαναφερθείσες οικογένειες δημιουργήθηκαν με βάση πειραματικά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες και αποτελούνται από αλληλουχίες, οι οποίες προέρχονται από δημόσιες βάσεις δεδομένων, με σημαντική ομοιότητα. Τα βιοχημικά δεδομένα για τις διάφορες πρωτεΐνες επιμελούνται συνεχώς με βάση διαθέσιμες βιβλιογραφικές και δομικές πληροφορίες. Η κατηγοριοποίηση αυτή αντανάκλα τα δομικά χαρακτηριστικά των ενζύμων, βοηθάει στην αποκάλυψη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ τους και παρέχει ένα βολικό πλαίσιο για την κατανόηση των μηχανιστικών ιδιοτήτων τους (Cantarel B. L. et al., 2009).

Οι δύο πιο γνωστές οικογένειες, GH 10 και GH 11, διαφέρουν τόσο ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (μοριακό βάρος, ισοηλεκτρικό σημείο), όσο και ως προς την τρισδιάστατη δομή τους. Διαφορές έχουν παρατηρηθεί και ως προς την καταλυτική τους δράση όπως έχει ήδη αναφερθεί (Biely et al., 1997). Στην περίπτωση της γλυκουρονοξυλάνης οι ξυλανάσες της οικογένειας 10 απελευθερώνουν αλδοτετραουρονικό οξύ (MeGlcA³Xyl₃) ως το μικρότερο κλάσμα, ενώ αυτές της οικογένειας 11 απελευθερώνουν αλδοπενταουρονικό οξύ (MeGlcA³Xyl₄) (Kolenová K., 2005).



Σχήμα 1.9. Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου δράσης των GH-10 EXs σε 4-O-μεθυλ-D-γλυκουροξυλάνη (A), αλδοπενταουρονικό οξύ (B), αλδοεξαουρονικό οξύ (C) (Kolenová K., 2005)



Σχήμα 1.10. Τρόπος δράσης των GH-11 EXs σε αλδοεξαουρονικό οξύ ($\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_5$): (A) σχηματισμός συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος από το οποίο απελευθερώνεται αλδοπενταουρονικό οξύ, (B) το ομοιοπολικά σχηματισμένο ενδιάμεσο προσβάλλεται από ένα άλλο μόριο υποστρώματος, (C) αλδοεπταουρονικό οξύ σχηματίζεται και μετατοπίζεται, (D) το αλδοεπταουρονικό οξύ διασπάται σε αλδοπενταουρονικό οξύ και ξυλοβιόζη (Kolenová K., 2005)

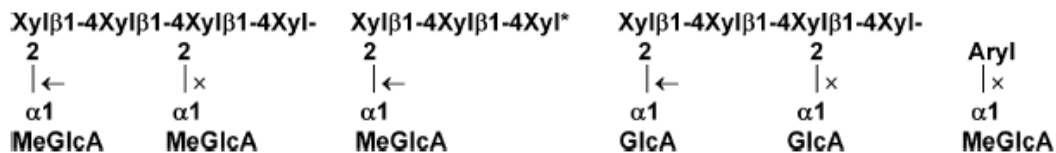
1.2.2. α-Γλυκουρονοζιδάσες

Οι α-D-γλυκουρονοζιδάσες προσβάλλουν τον α-1,2-γλυκοζιδικό δεσμό που ενώνει τις πλευρικές αλυσίδες 4-O-μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος με την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης. Αυτός ο δεσμός είναι γνωστό ότι είναι πολύ σταθερός στην όξινη υδρόλυση, και επιπλέον, το 4-O-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ έχει σταθεροποιητική επίδραση στους γειτονικούς ξυλοζιδικούς δεσμούς (Zaide G., 2001).

Οι α-γλυκουρονοζιδάσες της οικογένειας GH67 δεν λειτουργούν σε πολυμερικά υποστρώματα δηλαδή σε γλυκουρονοξυλάνες. Απελευθερώνουν μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ (MeGlcA) ή γλυκουρονικό οξύ (GlcA) μόνο από τα κλάσματα

γλυκουρονοξυλάνης (αλδουρονικά οξέα), στα οποία το ουρονικό οξύ είναι συνδεδεμένο στις μη αναγωγικές μονάδες ξυλοπυρανόζης. Επίσης οι GH67 α-γλυκουροσιδάσες δεν προσβάλλουν αρυλ γλυκοζίτες (aryl glycosides) του GlcA ή του MeGlcA. Μια α-γλυκουροσιδάση που υδρολύει αρυλ γλυκουροσιτίτες (aryl glucuronides) μπορεί να βρεθεί στην οικογένεια GH4, ωστόσο, αυτό το ένζυμο δεν αναγνωρίζει ως υπόστρωμα την γλυκουρονοξυλάνη ούτε τα κλάσματά της, οπότε κατά συνέπεια δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ημικυτταρινολυτική γλυκοσιδάση.

Η μόνη α-γλυκουροσιδάση που περιγράφεται, μέχρι στιγμής, ως ικανή για απελευθέρωση πλευρικών αλυσίδων MeGlcA από γλυκουρονοξυλάνη σκληρού ξύλου, είναι το ένζυμο του κυτταρινολυτικού συστήματος του μύκητα *Schizophyllum commune* (Ryabova O., 2009).



Σχήμα 1.11. Γλυκοζιδικό δεσμοί σε κλάσματα γλυκουρονοξυλάνης που προσβάλλονται (←) και που δεν προσβάλλονται (x) από τις GH67 α-γλυκουροσιδάσες. Τα ένζυμα δεν υδρολύουν τους άρυλ γλυκουροσιτίτες που εξυπηρετούν ως υποστρώματα για τις μη ημικυτταρινολυτικές α-γλυκουροσιδάσες της οικογένειας 4. Ο αστερίσκος υποδηλώνει το αναγωγικό άκρο (Ryabova O., 2009).

1.2.3. β - ξυλοσιδάσες

Οι β-ξυλοσιδάσες υδρολύουν μικρούς ξυλοολιγοσακχαρίτες και ξυλοβιόζη απελευθερώνοντας μονάδες ξυλόζης από τα μη αναγωγικά άκρα (Lee et al., 1993). Ανήκουν στις οικογένειες 3, 39, 43, 52 και 54. Τα διλειτουργικά ένζυμα (bifunctional enzymes) ξυλοσιδάσες-αραβινοσιδάσες βρίσκονται κυρίως στις οικογένειες 3, 43 και 54. Αποτελούν μεγαλύτερα ένζυμα με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 60 έως 360 kDa. Η συγγένεια των β-ξυλοσιδασών ως προς τους ξυλοολιγοσακχαρίτες μειώνεται αυξανόμενου του βαθμού πολυμερισμού τους (Polizeli et al., 2005; Wong et al., 1988).

1.2.4. α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες

Οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες καταλύουν την υδρόλυση πλευρικών μονάδων L-αραβινόζης, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με α-1,2, α-1,3 και α-1,5-L-αραβινοφουρανοζιδικούς δεσμούς με μονάδες ξυλοπυρανόζης διαφόρων ολιγο- και πολυσακχαριτών της ξυλάνης (Χριστακόπουλος Π. & Τόπακας Ε., 2011). Τα ένζυμα αυτά ανήκουν στις οικογένειες 3, 43, 51,54 και 62 των γλυκοζιδοϋδρολασών (GH). Επίσης υπάρχουν και οι ενδο-1,5-α-L-αραβινάσες (EC 3.2.1.99) οι οποίες παρουσιάζουν ενεργότητα μόνο προς γραμμικές αραβινάνες (van der Veen et al., 1991).

1.2.5. Ακετυλο - εστεράσες

Οι ακετυλο-εστεράσες ή εστεράσες του οξικού οξέος απελευθερώνουν τις Ο-ακετυλομάδες από τις θέσεις 2 και/ή 3 των μονάδων β-D-ξυλοπυρανόζης της ακετυλοξυλάνης. Τα ένζυμα αυτά ανακαλύφθηκαν πρόσφατα, πιθανώς διότι η αλκαλική εκχύλιση η οποία χρησιμοποιείται συχνά σε υψηλά ακετυλιωμένες ξυλάνες, όπως αυτές που υπάρχουν στα σκληρά ξύλα, τείνει να αφαιρέσει τα ακετύλια από την ξυλάνη (Polizeli et al., 2005).

1.2.6. Εστεράσες του φερουλικού και π-κουμαρικού οξέος

Οι εστεράσες του φερουλικού οξέος προσβάλλουν τους εστερικούς δεσμούς μεταξύ των πολυσακχαριτών της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης και μονομερών ή διμερών μορφών του φερουλικού οξέος (Topakas E. et al., 2005). Η δράση τους διευκολύνει την υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος καθώς επιτρέπει την πρόσβαση των γλυκοζιτικών υδρολασών στους πολυσακχαρίτες της κύριας αλυσίδας. Αντίστοιχα οι εστεράσες του π-κουμαρικού οξέος υδρολύουν τον εστερικό δεσμό μεταξύ του π-κουμαρικού οξέος και των κύριων πολυμερών αλυσίδων της ξυλάνης (Χριστακόπουλος Π. & Τόπακας Ε., 2011).

1.2.7. Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος

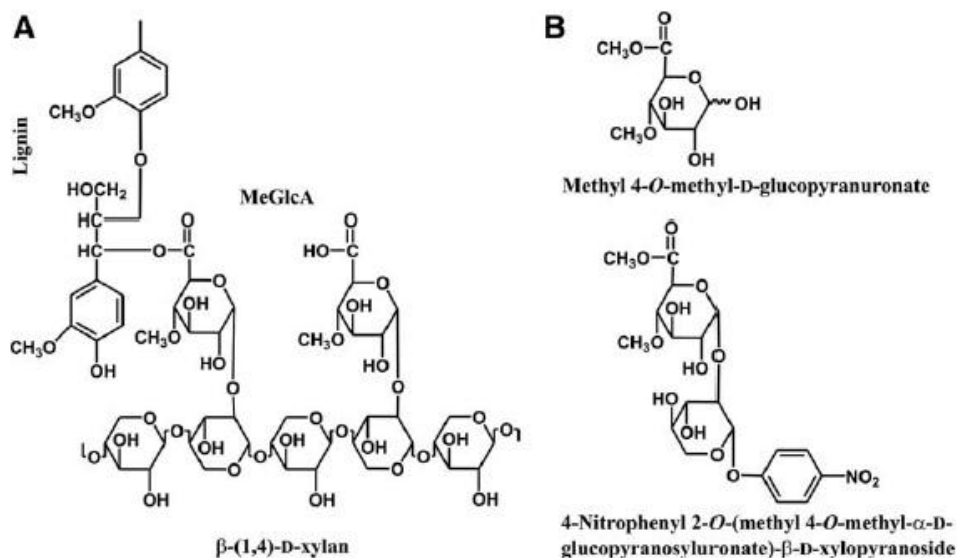
Οι εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος, που αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 2006 από τους Šráníková S. και Biely P., φέρονται να υδρολύουν τον εστερικό δεσμό μεταξύ των μονάδων του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και των αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης. Οι γλυκουρονικές

εστεράσες ανήκουν σε μια νέα οικογένεια ενζύμων στην βάση δεδομένων CAZy, την οικογένεια CE 15 (Špráňíková S., 2007). Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζονται από κινητική σκοπιά και αναλύονται εκτενέστερα στη συνέχεια.

Κεφάλαιο 2. Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος

2.1. Εισαγωγή

Στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών υπάρχουν πληροφορίες για τρεις τύπους δεσμών μεταξύ της λιγνίνης και των ημικυτταρινών. Ο πρώτος τύπος αναφέρεται στον αιθερικό δεσμό μεταξύ του π-κουμαρικού οξέος ή φερουλικού οξέος και της λιγνίνης, και στον εστερικό δεσμό αυτών με τα σάκχαρα της ημικυτταρίνης. Αυτός ο δεσμός θα μπορούσε να διασπασθεί από φερουλικές εστεράσες (feruloyl esterases). Ο δεύτερος τύπος δεσμών αναφέρεται στους αιθερικούς δεσμούς μεταξύ των ομάδων OH των σακχαριτών και των αλκοολών της λιγνίνης. Ο τρίτος τύπος περιλαμβάνει τους εστερικούς δεσμούς μεταξύ των μονάδων του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος (MeGlcA) ή του D-γλυκουρονικού οξέος (GlcA) της γλυκουρονοξυλάνης και των υδροξυλίων των αλκοολών της λιγνίνης. Αυτός ο εστερικός δεσμός έχει αποδειχθεί μόνο έμμεσα. Ενδιαφέρον παρουσιάζεται καθώς η επιστημονική βιβλιογραφία δεν είχε αναφορές στην ύπαρξη εστερασών οι οποίες να προσβάλλουν τους δεσμούς μεταξύ των αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης και της καρβοξυλικής ομάδας των μονάδων MeGlcA ή GlcA. Οι Špráňíková S. και Biely P. ανέφεραν πρώτοι το 2006, την ύπαρξη μιας εστεράσης από το μύκητα *Schizophyllum commune* που πιθανόν να επιτελεί αυτή τη λειτουργία ενώ η πρώτη ακολουθία αμινοξέων που αναφέρθηκε ήταν από την εστεράση Cip2_GE του μύκητα *Hypocrea jecorina* (Li et al., 2007). Το νέο αυτό ένζυμο, που καλείται εστεράση του γλυκουρονικού οξέος (glucuronoyl esterase) έχει αναγνωριστεί βάσει της ικανότητάς του να υδρολύει μεθυλεστέρες ελεύθερου ή γλυκοζιδικά συνδεδεμένου MeGlcA και της αδυναμίας του να προσβάλλει υποστρώματα άλλων ημικυτταρινολυτικών εστερασών (Špráňíková S. & Biely P., 2006). Επομένως ένα ένζυμο με τέτοια μοναδική εκλεκτικότητα θα μπορούσε να παρουσιάζει υψηλό ενδιαφέρον στην ενζυμική υδρόλυση των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων και στη βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας γενικότερα. Ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός του νέου αυτού ενζύμου είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας οικογένειας εστερασών, (CE15, <http://www.cazy.org/fam/CE15.html>) (Špráňíková S., 2007).

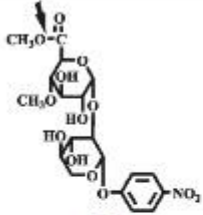
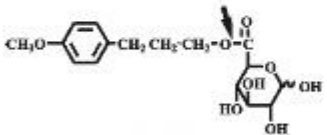
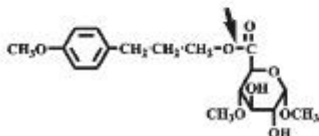


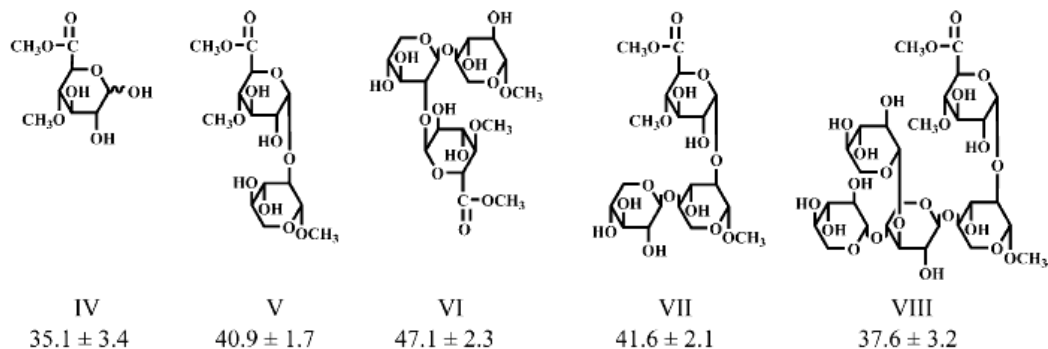
Σχήμα 2.1. (A) Εστερικός δεσμός μεταξύ μονάδων MeGlcA της γλυκουρονοξυλάνης και αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης. (B) Δομές δύο συνθετικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος (Šráníková S., 2006).

2.2. Συνθετικά υποστρώματα αναγνωρίσιμα από την εστεράση του γλυκουρονικού οξέος

Το 2007 ο Peter Biely και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος είναι ικανή να υδρολύει δύο συνθετικές ενώσεις οι οποίες μιμούνται τους εστερικούς δεσμούς που υπάρχουν στα συμπλέγματα λιγνίνης-υδατάνθρακα. Οι δύο αυτές συνθετικές ενώσεις είναι οι εστέρες του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού και D-γλυκουρονικού οξέος με την 3-(4-μεθοξυφαινυλ)προπυλική αλκοόλη. Συγκριτική μελέτη μεταξύ των κινητικών της υδρόλυσης των μεθυλεστέρων και της υδρόλυσης των 3-(4-μεθοξυφαινυλ)προπυλεστέρων έδειξε ότι η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος αναγνωρίζει το τμήμα του ουρονικού οξέος των υποστρωμάτων περισσότερο από την αλκοόλη. Επομένως η καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου ήταν αρκετά υψηλότερη στους εστέρες του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος σε σχέση με αυτούς του D-γλυκουρονικού (Šráníková S., 2007).

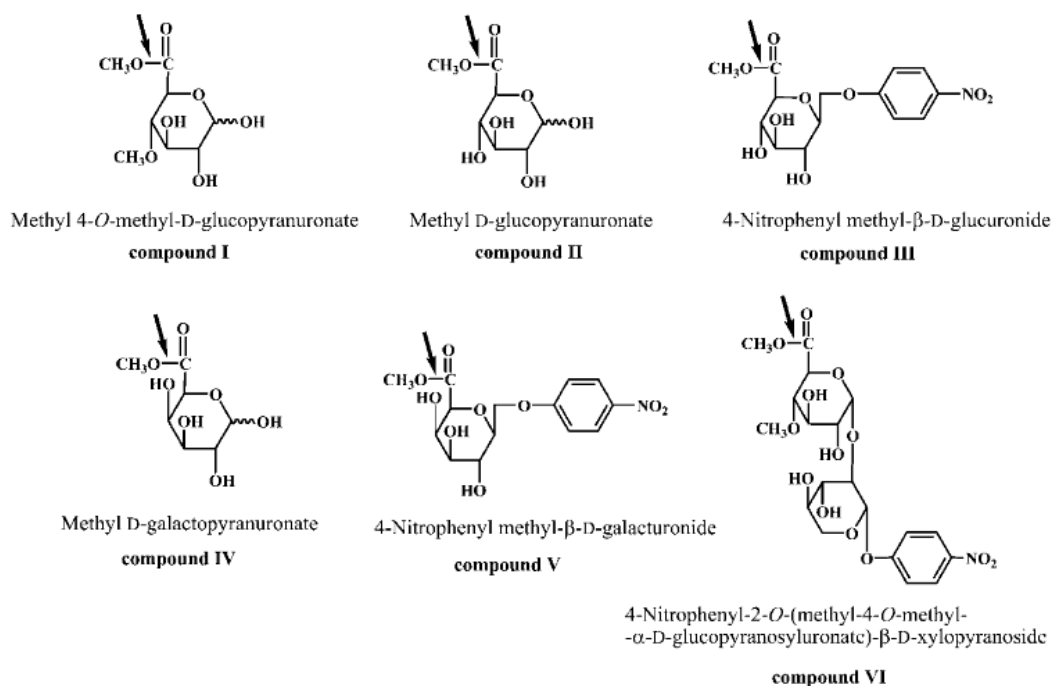
Πίνακας 2.1. Κινητικές παράμετροι της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από τον μύκητα *S. commune* για τρία χρωμογόνα υποστρώματα. Με βέλος παριστάνεται το σημείο δράσης του ενζύμου. (I) 4-nitrophenyl 2-O-(methyl 4-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronate)- β -D-xylopyranoside, (II) 3-(4-methoxyphenyl)propyl D-glucopyranosyluronate, (III) 3-(4-methoxyphenyl)propyl methyl 4-O-methyl- α -D-glucopyranosiduronate (Špráníková S., 2007).

Substrate	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$]
 <p>I</p>	0.31	4.4	3.2	10.32
 <p>II</p>	4.31	0.3	0.2	0.05
 <p>III</p>	1.78	10.9	7.8	4.38



Σχήμα 2.2. Μεθυλεστέρες του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος, ελεύθεροι ή α -1,2-συνδεδεμένοι σε διαφορετικά κλάσματα ανάλογα προς την ξυλάνη (compounds IV – VIII) και ρυθμοί υδρόλυσής τους από την γλυκουρονική εστεράση του *S. commune* εκφρασμένοι ως ειδικές ενεργότητες ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) (Špráníková S., 2007).

Άλλα συνθετικά υποστρώματα που παρασκευάστηκαν προκειμένου να μετρηθεί η ενεργότητα της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από το μικροοργανισμό *Phanerochaete chrysosporium* φαίνονται στο σχήμα 2.3 (Đuranová M., 2009).



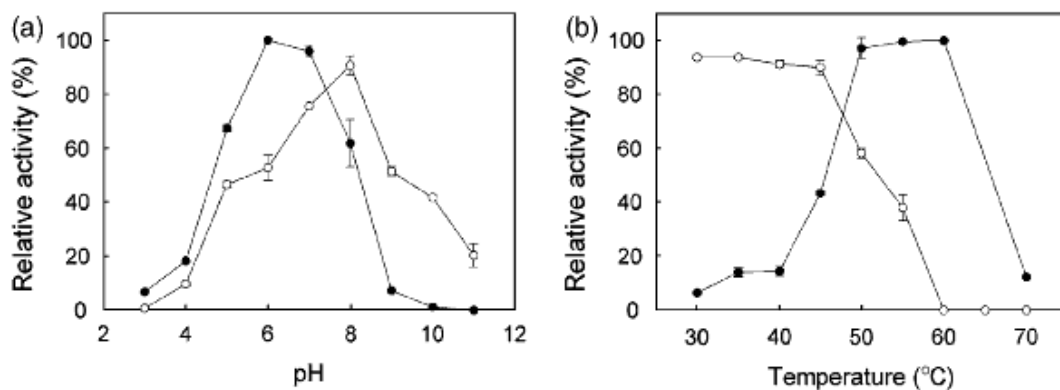
Σχήμα 2.3. Συνθετικά υποστρώματα για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της GE με TLC (compound I), HPLC (compound VI) και με τη διαδικασία Hestrin (compounds I – V) (Đuranová M., 2009).

2.3. Εστεράση του γλυκουρονικού οξέος από το μύκητα *Sporotrichum thermophile*

Το κυτταρινολυτικό σύστημα του θερμόφιλου μύκητα *Sporotrichum thermophile* περιέχει μια πρόσφατα ανακαλυφθείσα εστεράση η οποία πιθανόν υδρολύει τον εστερικό δεσμό μεταξύ του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και των αλκοολών της λιγνίνης. Το πρώτο παράδειγμα καθαρισμού και ταυτοποίησης εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από το *S. thermophile* έγινε το 2009 (Vafiadi et al., 2009).

2.3.1. Χαρακτηρισμός της θερμόφιλης εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από το μύκητα *Sporotrichum thermophile*

Η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος με την ονομασία StGE1 αφού καθαρίστηκε σε βαθμό ομοιογένειας με μοριακή μάζα 58 kDa, βρέθηκε ότι έχει ισοηλεκτρικό σημείο pI 6.7. Η ενζυμική δραστηριότητα είναι μέγιστη σε pH 6.0 και θερμοκρασία 60 °C. Στους 70 °C το 85% της μέγιστης δραστηριότητας χάνεται. Επίσης η εστεράση επέδειξε μικρό εύρος σταθερότητας όσον αφορά στις μεταβολές του pH (Vafiadi et al., 2009).



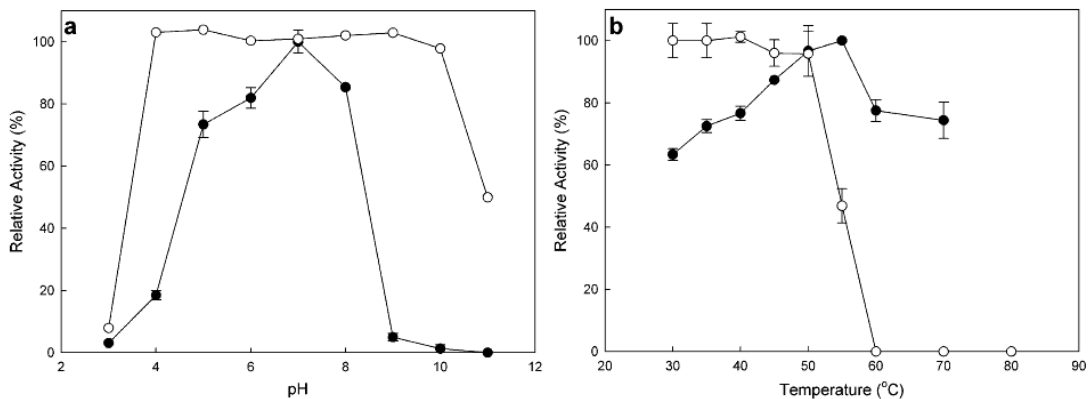
Σχήμα 2.4. Επίδραση του (a) pH και της (b) θερμοκρασίας στη δραστηριότητα (●) και στη σταθερότητα (○) της καθαρής StGE1 από το *S. thermophile* σε εύρη pH και θερμοκρασίας 3 – 11 και 30 – 70 °C αντίστοιχα. Η διάρκεια της επώασης ήταν 6 h για τον έλεγχο σταθερότητας. (Vafiadi et al., 2009).

2.3.2. Έκφραση της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από το *Sporotrichum thermophile* στη μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*

Η υπερέκφραση ανασυνδυασμένων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος (GEs) είναι απαραίτητη για τη διερεύνηση των βιοτεχνολογικών τους δυνατοτήτων και πιθανώς για τη διεκρίνηση του φυσιολογικού τους ρόλου στην αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Για αυτό το σκοπό έχουν μελετηθεί διάφορα συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών για την ετερόλογη έκφραση εστερασών του γλυκουρονικού οξέος. Η μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*, ως ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης, αποτελεί ένα προτιμητέο σύστημα έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών με πολλά πλεονεκτήματα όπως η επεξεργασία πρωτεϊνών, η πρωτεϊνική αναδίπλωση και η μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Επίσης σημαντικό είναι το

γεγονός ότι η ζύμη δύναται να αναπτυχθεί σε μέσα χαμηλού κόστους, καθιστώντας την έναν σημαντικό υποψήφιο για τη βιομηχανική βιοτεχνολογία.

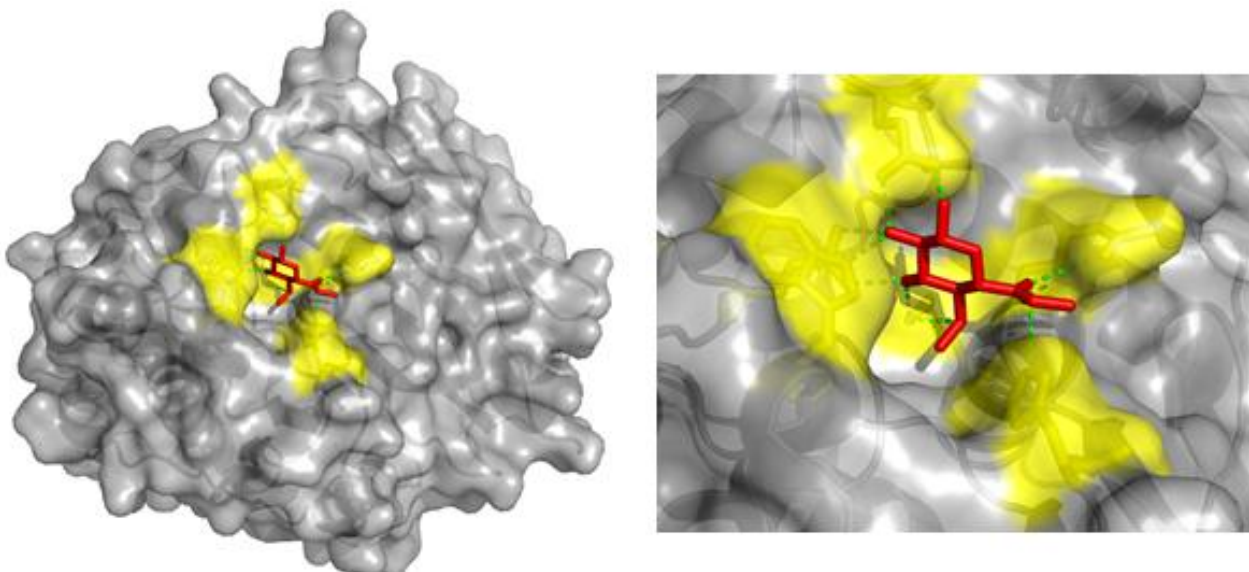
Οι αλληλουχίες του γονιδιώματος γίνονται ταχύτατα μια πηγή πληροφοριών που μπορεί να παρέχει στοιχεία για πρωτοποριακή έρευνα. Έτσι, λοιπόν, το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος, StGE2, από το *S. thermophile*, εκφράστηκε στη ζύμη *P. pastoris*. Το μοριακό βάρος της StGE2 προσδιορίστηκε με SDS-PAGE 43 kDa. Η StGE2 είναι μια διαφορετική εστεράση συγκρινόμενη με την StGE1 (58 kDa, Vafiadi et al., 2009) λόγω σημαντικής διαφοράς στα μοριακά τους βάρη καθώς επίσης και λόγω των πεπτιδίων που ταυτοποιήθηκαν στην StGE1 και που βρέθηκαν στη Cg1 αλλά δεν υπάρχουν στην Cg2 από το *C. globosum*, μια εστεράση του γλυκουρονικού οξέος που παρουσιάζει την υψηλότερη ομολογία ως προς την StGE2. Η StGE2 έχει βέλτιστο pH 7 και βέλτιστη θερμοκρασία 55 °C. Το ανασυνδυασμένο ένζυμο επιδεικνύει σημαντική σταθερότητα σε ευρύ φάσμα θερμοκρασιών μέχρι 50 °C και σε εύρος pH από 4 έως 11 μετά από 24 h επώασης. Η προαναφερθείσα σταθερή συμπεριφορά, καθιστά το ένζυμο ισχυρό υποψήφιο για μελλοντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπου απαιτείται καταλυτική σταθερότητα (Torakas et al., 2010).



Σχήμα 2.5. Επίδραση του (a) pH και της (b) θερμοκρασίας στη δραστηκότητα (●) και στη σταθερότητα (○) της StGE2 από το *S. Thermophile*. Η διάρκεια της επώασης ήταν 24 h για τον έλεγχο σταθερότητας (Torakas et al. 2010).

2.4. Κρυσταλλική δομή των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος

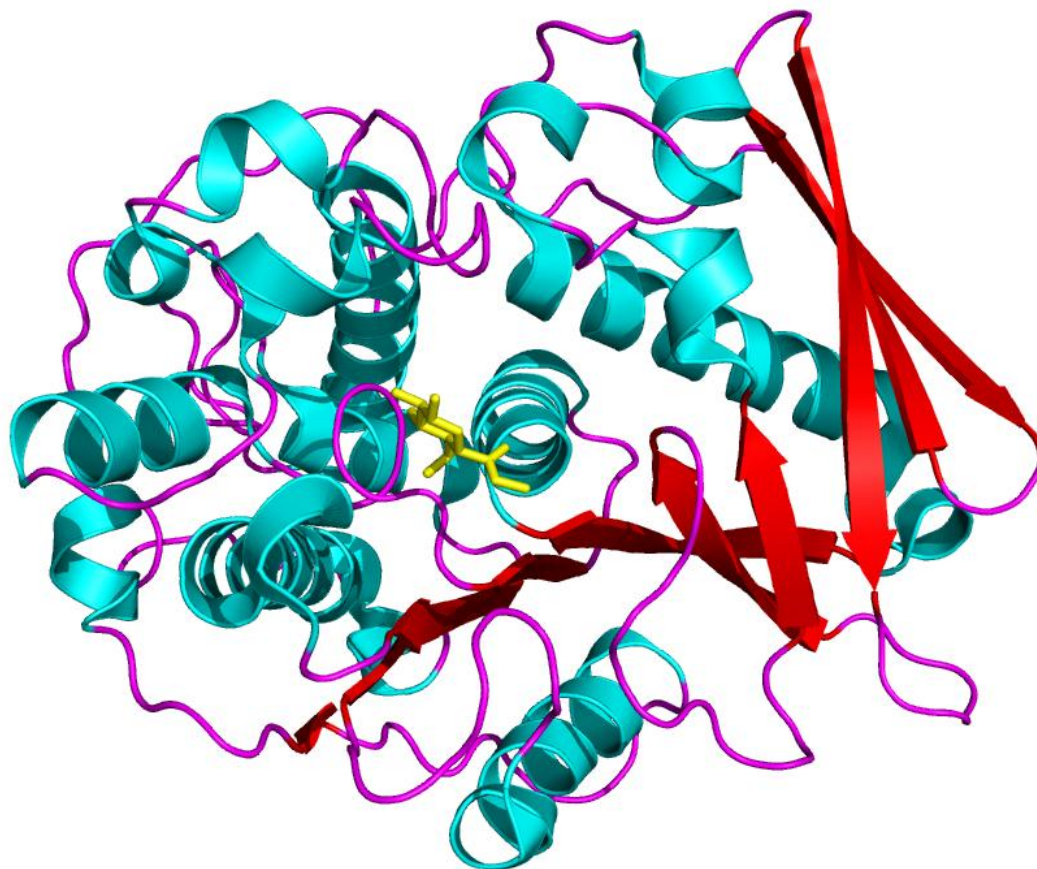
Οι κρυσταλλικές δομές της ανασυνδυασμένης, θερμόφιλης εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος καθώς και οι μορφές της με υπόστρωμα και χωρίς, της εστεράσης με σημειακή μετάλλαξη, S213A, προσδιορίστηκαν σε ανάλυση 1.55, 1.9 και 2.35 Å αντίστοιχα. Η StGE2 είναι μέλος της υπεροικογένειας των α/β υδρολασών και η συνολική της δομή ακολουθεί την τριστηρωματική αναδίπλωση $\alpha\beta$ -σάντουιτς με τοπολογία Rossmann. Τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί, ένας εκ των οποίων βρίσκεται



Σχήμα 2.6. Χωροπληρωτικό μοντέλο της StGE2 με το υπόστρωμα

στην είσοδο της καταλυτικής τσέπης (catalytic pocket), συμβάλλουν στην ακαμψία της δομής και στην αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου. Η χαρτογράφηση του ενεργού κέντρου χρησιμοποιώντας το μέθυλ 4-O-μεθυλ- β -D-γλυκουπιρανοζιτικό υποστρωματικό ανάλογο, αποκάλυψε ότι τα κατάλοιπα των καταλυτικών τριάδων Ser213, Glu236 και His346, συμμετέχουν σε μια σταθερή, έτοιμη για πυρηνόφιλη προσβολή διαμόρφωση. Αυτό συντονίζεται μερικώς από τα σκέλη S6, S7 και S9 του β -φύλλου, τα οποία οδηγούν την His346 και τις ομόλογες τριάδες της σε ένα προσανατολισμό ο οποίος καθιστά δυνατή την αναγνώριση του υποστρώματος. Η σύνθετη δομή, αποκαλύπτει επίσης την έμφυτη ευκαμψία των καταλοίπων που σχηματίζουν την τσέπη, όπως του Glu267, το οποίο αλλάζει την διαμόρφωση της πλευρικής του αλυσίδας έτσι ώστε να δεχτεί το υποστρωματικό ανάλογο (Charavgi et al., 2012).

Η StGE2 και η Cip2_GE (Pokkuluri et al., 2011) είναι οι μόνες χαρακτηρισμένες εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος για τις οποίες έχει προσδιορισθεί η τρισδιάστατη δομή τους μέχρι σήμερα. Η άμεση σύγκριση των δύο ενζύμων, φέρνει στο φως τους βιοχημικούς και δομικούς παράγοντες που καθιστούν την StGE2 ως προτιμότερο στόχο για περαιτέρω διερεύνηση όσον αφορά πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές σε σχέση με τη Cip2_GE. Οι παράγοντες περιλαμβάνουν τη θερμοφιλικότητα της StGE2, την προσβασιμότητα των καταλοίπων των καταλυτικών τριάδων και τη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου για την αναγνώριση υποστρώματος καθώς και την μονομερική μορφή της τόσο στην κρυσταλλική της μορφή όσο και σε διάλυμα (Charavgi et al., 2012).



Σχήμα 2.7. Εστεράση του γλυκουρονικού οξέος από *S.thermophile* (StGE2)

Κεφάλαιο 3. Αντιδράσεις σε μη συμβατικά συστήματα

3.1. Εισαγωγή

Η χρήση οργανικών διαλυτών ως μέσων για βιοκαταλύμενες αντιδράσεις έχει αποδειχθεί μια εξαιρετικά χρήσιμη προσέγγιση για την επέκταση του εύρους και της αποτελεσματικότητας των πρακτικών εφαρμογών της βιοκατάλυσης. Οι οργανικοί διαλύτες παρουσιάζουν πολλαπλά πλεονεκτήματα τα οποία περιλαμβάνουν, για παράδειγμα, την ενζυμική τροποποίηση υποστρωμάτων, δυσδιάλυτων στο νερό, και την μετατόπιση της ισορροπίας των ενζυμικών αντιδράσεων προς τα επιθυμητά προϊόντα (Khmelnitsky Y.L. & Rich J.O., 1999).

3.2. Λιπάσες

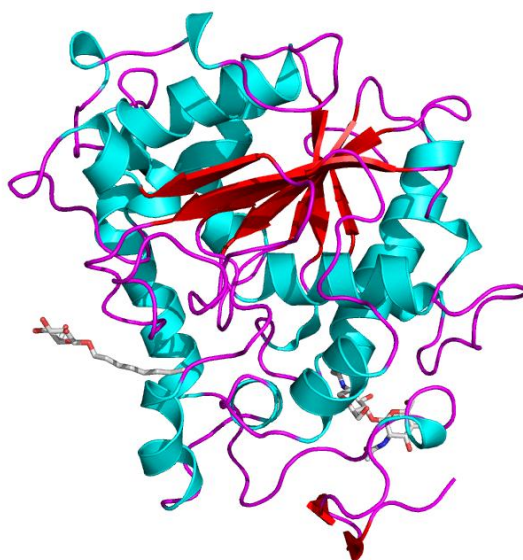
Οι λιπάσες αποτελούν μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση των λιπιδίων στα βιολογικά συστήματα. Στα οργανικά μέσα, η ενζυμική συμπεριφορά τους αλλάζει και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση διαφόρων λιπιδίων. Αυτή η ιδιότητα των ενζύμων οδηγεί σε αρκετές βιομηχανικές εφαρμογές, όπως στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων, στη σύνθεση εστέρων, αμινών και αμιδίων καθώς και καλλυντικών, μεταξύ άλλων. Ένα πολύ χρήσιμο χαρακτηριστικό των λιπάσων αποτελεί η εναντιοεκλεκτικότητά τους. Η φαρμακοβιομηχανία εκμεταλλεύεται αυτό το χαρακτηριστικό για την παρασκευή μόνο-ισομερών χειρόμορφων (chiral) φαρμάκων, είτε από κινητική ανάλυση (kinetic resolution) ρακεμικών αλκοολών, οξέων, εστέρων ή αμινών, είτε από την αποσυμμετροποίηση προχειρόμορφων (prochiral) ενώσεων. Αυτά τα ένζυμα παρουσιάζουν έναν πολύπλοκο καταλυτικό μηχανισμό ο οποίος καλείται μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση (interfacial activation) (Idris A. & Bukhari A., 2012).

3.2.1. Λιπάση Β από τον μύκητα *Candida antarctica*

Η λιπάση Β *C. antarctica* (CALB), ένας βιοκαταλύτης γνωστός για την αποδοτικότητα και υψηλή εκλεκτικότητά του, χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, αντικαθιστώντας βιομηχανικές διεργασίες σύνθεσης όπως κινητική ανάλυση, στην αμινόλυση, εστεροποίηση, μετεστεροποίηση, υδρόλυση σε νερό,

εστεροποίηση σε οργανικούς διαλύτες, εναντιοεκλεκτικές και τοποεκλεκτικές βιομετατροπές πολλών χαμηλού μοριακού βάρους ή πολυμερών υποστρωμάτων τα οποία φέρουν μια ευρεία γκάμα καταλυτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για βιομετατροπές.

Δομικά, η CALB είναι ένα μονομερές που ανήκει στην οικογένεια των α/β υδρολασών και παριστάνεται από μια κεντρική δομή από οκτώ μεμονωμένα, σχεδόν παράλληλα, συστρεφόμενα β -πτυχωτά φύλλα πλαισιωμένα και από τις δύο πλευρές από α -έλικες. Η αναδίπλωση αυτή αποτελεί ένα σταθερό ικρίωμα για τα κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας (Ser-His-Asp/Glu). Αντίθετα με τις περισσότερες λιπάσες, η είσοδος στο ενεργό κέντρο της CALB δεν εμφανίζει εμπόδια και δεν παρουσιάζει μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση.



Σχήμα 3.1. Κρυσταλλική δομή της λιπάσης B *C. antarctica*

3.2.2. Ενζυμική ακινητοποίηση

Αφού ένα ένζυμο αναγνωριστεί ως χρήσιμο για κάποια συγκεκριμένη αντίδραση πρέπει να αντιμετωπιστούν διάφορα προβλήματα που προκύπτουν κατά την εφαρμογή του. Τέτοια προβλήματα αποτελούν η απουσία μακρόχρονης σταθερότητας σε συνθήκες διεργασιών και η αδυναμία επανάκτησης και ανακύκλωσής του. Η λύση δίνεται με περιορισμό της κινητικότητας του ενζύμου σε

συγκεκριμένο χώρο, τεχνική που είναι γνωστή με τον όρο ενζυμική ακινητοποίηση (enzyme immobilization). Η ακινητοποίηση των ενζύμων παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως την επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου, την εξάλειψη των διαδικασιών ανάκτησης και καθαρισμού, τον γρήγορο τερματισμό μιας αντίδρασης και την παροχή ενός καλύτερου περιβάλλοντος για την δράση του ενζύμου (Idris A. & Bukhari A., 2012).

Η λιπάση Novozym 435 παρουσιάζει μικρή μείωση της ενεργότητάς της μετά από ανάκτηση με διήθηση, πλύσεις με τριτοταγή βουτανόλη και ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου. Η μείωση που παρατηρείται πιθανόν να οφείλεται σε απώλεια καταλύτη κατά τη διαδικασία της ανάκτησης (Yadav D. G. & Dhoot B. S., 2009). Επίσης παρουσιάζει υψηλή ανεκτικότητα σε μεταβολές της θερμοκρασίας ενώ χάνει όλη την ενεργότητά της μετά από 24 h στους 150 °C (Frampton M. B., 2012).

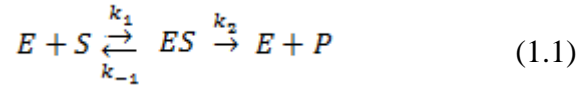
Έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί προκειμένου να εξηγηθούν οι καταλυόμενες από λιπάσες αντιδράσεις. Ο συχνότερα αναφερόμενος είναι ο μηχανισμός πινγκ-πονγκ (ping-pong bi-bi mechanism) (Arcos J.A. et al., 2001; Chulalaksananukul W. et al., 1990; Garcia T. et al., 2000).

3.3. Κινητική των ενζύμων και εξειδίκευση υποστρώματος

3.3.1. Εισαγωγή

Το πρώτο μαθηματικό μοντέλο για την κινητική μιας ενός-υποστρώματος-ενζύμου καταλυόμενης αντίδρασης αναπτύχθηκε από τον V. C. R. Henry το 1902 και από τους L. Michaelis και M.L. Menten το 1913. Η κινητική μιας απλής ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης συχνά αναφέρεται ως κινητική Michaelis – Menten ή κινητική κορεσμού (saturation kinetics). Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της ενζυμικής κινητικής είναι παρόμοια με αυτά της κινητικής Langmuir – Hinshelwood. Τα μοντέλα αυτά βασίζονται σε στοιχεία από αντιδραστήρες διαλείποντος έργου με σταθερό όγκο υγρού, στο οποίο οι αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος $[S_0]$, και ενζύμου $[E_0]$, είναι γνωστές. Στα βιολογικά συστήματα λαμβάνουν χώρα περισσότερο πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις ενζύμου-υποστρώματος, όπως πολύ-υποστρωματικές-πολυενζυμικές αντιδράσεις. Το ενζυμικό διάλυμα έχει συγκεκριμένο αριθμό ενεργών κέντρων στα οποία μπορεί να προσδεθεί το υπόστρωμα. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις υποστρώματος, όλα αυτά τα ενεργά κέντρα είναι κατειλημμένα, οπότε

το ένζυμο θεωρείται κορεσμένο. Η κινητική κορεσμού μπορεί να προκύψει από μια απλή αντίδραση που συμπεριλαμβάνει ένα αντιστρεπτό βήμα για τον σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος και ένα βήμα διάστασης για το σύμπλοκο ES.



Θεωρείται ότι το σύμπλοκο ES δημιουργείται σχετικά γρήγορα και ότι ο ρυθμός της αντιστρεπτής αντίδρασης του δεύτερου βήματος είναι αμελητέος. Η υπόθεση μιας αναντίστρεπτης δεύτερης αντίδρασης συχνά ισχύει μόνο όταν η συσσώρευση του προϊόντος είναι αμελητέα στην αρχή της αντίδρασης.

Ο ρυθμός σχηματισμού του προϊόντος θα είναι

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (1.2)$$

και ο ρυθμός μεταβολής του συμπλόκου ES

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (1.3)$$

3.3.2. Υπόθεση γρήγορης ισορροπίας

Έστω ότι έχουμε μια γρήγορη ισορροπία μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος για το σχηματισμό του συμπλόκου [ES]. Η σταθερά ισορροπίας θα είναι:

$$K'_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (1.4)$$

Εφόσον $[E] = [E_0] - [ES]$ (1.5), στην περίπτωση που το ένζυμο διατηρείται θα έχουμε

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{\left(\frac{k_{-1}}{k_1}\right) + [S]} = \frac{[E_0][S]}{K'_m + [S]} \quad (1.6)$$

Όπου $K'_m = k_{-1}/k_1$

Ο ρυθμός σχηματισμού του προϊόντος θα είναι

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = k_2 \frac{[E_0][S]}{K'_m + [S]} = \frac{V_m[S]}{K'_m + [S]} \quad (1.7)$$

Όπου $V_m = k_2[Eo]$

Όμως σε πολλές περιπτώσεις η υπόθεση της γρήγορης ισορροπίας που ακολουθεί κινητικές δράσης – μαζών δεν ισχύει οπότε ακολουθείται η υπόθεση της ημισταθερής κατάστασης.

3.3.3. Η υπόθεση της ημισταθερής κατάστασης

Η υπόθεση της ημισταθερής κατάστασης ή αλλιώς, υπόθεση Briggs – Haldane, αναφέρει ότι εφόσον η αρχική συγκέντρωση του ενζύμου, $[Eo]$, είναι μικρή δηλαδή $[So] \gg [Eo]$, τότε $d[Eo]/dt \approx 0$.

Εφαρμόζοντας την παραπάνω υπόθεση, έχουμε:

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} \quad (1.8)$$

Αντικαθιστώντας τη συγκέντρωση του ενζύμου από την εξ. 1.5 στην εξ. 1.8, βρίσκουμε,

$$[ES] = \frac{k_1([Eo] - [ES])[S]}{k_{-1} + k_2} \quad (1.9)$$

Λύνοντας την εξ. 1.9 ως προς $[ES]$,

$$[ES] = \frac{[Eo][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (1.10)$$

Αντικαθιστώντας την εξ. 1.10 στην εξ. 1.2,

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2[Eo][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (1.11a)$$

$$v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad (1.11\beta)$$

Όπου $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ και $V_m = k_2[Eo]$

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το K_m (σταθερά Michaelis – Menten) αποτελεί μια εγγενή παράμετρο και μεταβάλλεται μόνο με το pH και τη θερμοκρασία. Αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του υποστρώματος που δίνει το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της αντίδρασης. Επομένως μικρές τιμές του K_m δηλώνουν μεγάλη συγγένεια μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος. Το V_m , η μέγιστη ταχύτητα, είναι μια συνάρτηση της παραμέτρου k_2 (k_{cat}) και της αρχικής συγκέντρωσης του ενζύμου (Shuler L.M. & Kargi F., 2005). Η εξειδίκευση, όπως ορίζεται από το λόγο του ρυθμού κατάλυσης προς τη σταθερά Michaelis – Menten (k_{cat}/K_m), αποτελεί την καλύτερη ένδειξη για την προτίμηση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα (Τόπακας Ε., 2004).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4. Υλικά και Μέθοδοι

4.1. Υλικά

4.1.1. Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διπλωματική εργασία το μετασηματισμένο στέλεχος X33 (γονότυπος: φυσικός τύπος, φαινότυπος: Mut⁺) του ζυμομύκητα *Pichia pastoris* (Invitrogen) χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος StGE2. Ο μονοκύτταρος μεθυλότροφος μικροοργανισμός *P. pastoris* έχει αποτελέσει σύστημα ετερόλογης έκφρασης γονιδίων από ευκαρυωτικούς οργανισμούς καθώς χαρακτηρίζεται από τα ειδικά λειτουργικά πλεονεκτήματα των ανώτερων συστημάτων έκφρασης, όπως είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και γλυκοζιλίωση πρωτεϊνών). Ως σύστημα είναι εύκολο στη χρήση, με υψηλό ρυθμό αύξησης ακόμη και σε θρεπτικά μέσα ιδιαίτερα χαμηλού κόστους. Η δυνατότητά του να αυξάνεται παρουσία μεθανόλης, ως μοναδικής πηγής άνθρακα, αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό του φυσικού στελέχους. Συγκεκριμένα, το ένζυμο αλκοολική οξειδάση, το οποίο κωδικοποιείται από δύο γονίδια με υψηλή ομολογία (97% ομολογία), το *AOX1* και το *AOX2*, καταβολίζει τη μεθανόλη σε φορμαλδεΰδη παρουσία οξυγόνου. Υψηλότερα επίπεδα ενζύμου παράγονται με την έκφραση του γονιδίου *AOX1*, εν αντιθέσει με την έκφραση του *AOX2* που οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα. Τα κύτταρα στα οποία εκφράζονται και τα δύο γονίδια αυξάνονται σε υψηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης (φαινότυπος Mut⁺, methanol utilization plus), ενώ εκείνα στα οποία εκφράζεται μόνο το *AOX2* γονίδιο, έχουν τη δυνατότητα να αυξάνονται σε μικρές συγκεντρώσεις μεθανόλης (φαινότυπος Mut^s, methanol utilization slow). Τέλος, στο συγκεκριμένο ζυμομύκητα διευκολύνεται η απομόνωση υψηλών συγκεντρώσεων ετερόλογων πρωτεϊνικών μορίων λόγω έκκρισης περιορισμένων ποσοτήτων ενδογενών πρωτεϊνών.

4.1.2. Χημικά Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma – Aldrich (Η.Π.Α.), Panreac (Ισπανία), Applichem (Γερμανία), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και Fisher Scientific (Η.Π.Α), και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα

εργαστηριακά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SIMAX (Τσεχία), SCHOTT AG (Γερμανία), BOMEX (Κίνα) και ISO LAB (Γερμανία).

4.1.3. Υλικά και στήλες Χρωματογραφίας

Τα υλικά χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προϊόντα της BioRad (Η.Π.Α.) και πιο συγκεκριμένα η ανιοντική ρητίνη AG 1x2 που χρησιμοποιήθηκε στην απομόνωση του MeGlcA. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη StGE2 απομονώθηκε με τη βοήθεια στηλών χρωματογραφίας υλικού TalonTM (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.). Στη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈ Nucleosil (250 mm x 4.6 mm, Macherey – Nagel, Γερμανία). Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) πραγματοποιήθηκε με φύλλα αλουμινίου TLC Silica gel 60 F₂₅₄ Merck (Γερμανία), η παρασκευαστική χρωματογραφία στοιβάδας (Preparative Layer Chromatography, PLC) με υάλινες πλάκες PLC Silica gel 60 0.5 mm Merck και τέλος η απομόνωση των εστέρων έγινε με τη βοήθεια στήλης (Ace glass, Η.Π.Α.) silica gel με στατική φάση Silica gel 60 (0.040 – 0.063 mm) της Merck.

4.1.4. Εμπορικά ένζυμα

Τα εμπορικά ένζυμα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η α-D-γλυκουρονοζιδάση από το μικροοργανισμό *Geobacillus stearothermophilus* της οικογένειας GH67 της Megazyme (Ιρλανδία), το Cellic HTec2 της Novozymes (Δανία) και το ένζυμο Novozym 435 (ακίνητοποιημένη λιπάση *B. Candida antarctica*) επίσης της Novozymes.

4.1.5. Θρεπτικά μέσα

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min και υπό πίεση 0.1 MPa. Η γλυκόζη αποστειρώνεται ξεχωριστά υπό τη μορφή σκόνης. Η

σύσταση των θρεπτικών μέσων παρουσιάζεται στον πίνακα 4.1. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου γίνεται προσθήκη 2 % άγαρ.

Πίνακας 4.1. Σύσταση χρησιμοποιούμενων θρεπτικών μέσων

Θρεπτικό Μέσο	Σύσταση
YPD + ζεοσίνη	1 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2 % (w/v) πεπτόνη, 2 % (w/v) γλυκόζη + 100 μg/ mL ζεοσίνη
YPD-άγαρ + ζεοσίνη	YPD με 2 % (w/v) άγαρ + 100 μg/ mL ζεοσίνη
BMGY	1 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2 % (w/v) πεπτόνη, 100 mM P-Δ φωσφορικών, pH 6.0, 1,34 % (w/v) YNB, 4×10^{-5} % (w/v) βιοτίνη, 1 % (v/v) γλυκερόλη
BMMY	1 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2 % (w/v) πεπτόνη, 100 mM P-Δ φωσφορικών, pH 6.0, 1,34 % (w/v) YNB, 4×10^{-5} % (w/v) βιοτίνη, 0.5 % (v/v) μεθανόλη

4.1.6. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers)

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία καθώς και η σύστασή τους παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2. Σύσταση χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων (ΡΔ)

Ρυθμιστικό διάλυμα (ΡΔ)	Σύσταση
ΡΔ Talon	0.3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
ΡΔ φωσφορικών	132 mL K_2HPO_4 1M, 868 mL KH_2PO_4 1M, pH 6.0
ΡΔ δείγματος SDS-PAGE (sample buffer)	3.55 mL 0.25M Tris Base pH 6.8, 1.8 mL Γλυκερόλη 50% (v/v), 1.8 mL β -Μερκαπτοαιθανόλη, 0.71 gr SDS, 2.85 mL Βρωμοφαινόλη Blue 0.1 % (w/v)
ΡΔ SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης (running buffer)	3.03 g/L Tris-base, 14.4 g/L γλυκίνη, 1 g/L SDS, pH 8.3

4.1.7. Συσκευές και Όργανα

Παρουσιάζονται οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Κίνα)
- Επωαστήρας Orbital incubator S150, Stuart Scientific (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Περισταλτική αντλία Econo Gradient, BioRad (Η.Π.Α.)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας Rotavapor Buchi RE 111, Buchi (Ελβετία)
- Συλλέκτης κλασμάτων Waters, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying) Christ ALPHA 1-4, B. Braun Biotec. International, Melsungen (Γερμανία)
- Συσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή υπερδιήθησης διαλυμάτων Stirred Cell Model 8400, 400 mL και μεμβράνες PM-10, Amicon, Millipore, (Η.Π.Α.)
- Συσκευή φωτογράφισης σε κλειστό θάλαμο InGenius BioImaging, Syngene (Μ. Βρετανία)
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Σύστημα χρωματογραφίας διαχωρισμού πρωτεϊνών (Econo Gradient Pump, BioRad και Waters 600E, Millipore (Η.Π.Α.) και ανιχνευτής UV ακτινοβολίας (280 nm) για την ανίχνευση των εκλούομένων πρωτεϊνών.
- Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) Jasco (Ιαπωνία) με αντλία PU 987, φωτομετρικό ανιχνευτή UV 975 και λογισμικό διαχείρισης και καταγραφής Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία)
- Φυγόκεντρος Beckman Coulter (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, Labequip (Καναδάς)

4.2. Καλλιέργειες κυττάρων

4.2.1. Σκοπός

Σκοπός αυτής της παραγράφου είναι η περιγραφή της παραγωγής και απομόνωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης StGE2 από μετασχηματισμένα κύτταρα του ζυμομύκητα *P. pastoris* καθώς και ο προσδιορισμός του μοριακού της βάρους. Η παραγωγή πραγματοποιήθηκε με υγρές καλλιέργειες των κυττάρων της ζύμης, η απομόνωση έγινε με στάδια διηθήσεων, συμπύκνωσης και χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) και τέλος ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης επιτεύχθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).

4.2.2. Παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από μετασχηματισμένα κύτταρα *P.pastoris*

Η παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα γονίδια των οποίων έχουν υποκλωνοποιηθεί στο πλασμιδιακό φορέα pPICZαC (Torakas et al., 2010), επάγεται κατά την προσθήκη μεθανόλης στην καλλιέργεια. Η μεθανόλη ενεργοποιεί τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (*AOX1*) και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες οδηγούνται με τη βοήθεια του πεπτιδίου οδηγού (α -factor από τη ζύμη *S. cerevisiae*) προς έκκριση στο υπερκείμενο των κυττάρων, γεγονός που καθιστά εύκολη τη συλλογή και απομόνωσή τους.

4.2.2.i Προκαλλιέργειες κυττάρων *P.pastoris*

Τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο YPD + ζεοσίνη εμβολιάστηκαν με κύτταρα του μετασχηματισμένου στελέχους X33 της ζύμης *P.pastoris* και επώαστηκαν στους 30 °C για 24 h.

Οι αποικίες που σχηματίστηκαν στα τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 300 mL θρεπτικού υλικού BMGY ισόποσα χωρισμένων σε 6 γυάλινες κωνικές φιάλες των 250 mL. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για 16 – 20 h και υπό ανάδευση (200 rpm) σε επωαστήρα ZHWY-211C της Zhicheng (Κίνα). Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση της προκαλλιέργειας για προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας $O.D_{600\text{ nm}}$ σε φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, Labequip (Καναδάς). Από κάθε γυάλινη κωνική φιάλη, έγινε λήψη 100

μL δείγματος. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 900 μL H₂O δηλαδή πραγματοποιήθηκε αραίωση 10 φορές του υγρού της προκαλλιέργειας. Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης καθώς και οι όγκοι που πρέπει να ληφθούν προκειμένου στην κύρια καλλιέργεια να έχουμε O.D_{600nm} = 1 παρουσιάζονται στον πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3. Οπτική πυκνότητα και απαιτούμενοι όγκοι υγρού προκαλλιέργειας για επίτευξη O.D_{600nm} = 1 στις κύριες καλλιέργειες

Φιάλη	Απορρόφηση (ABS)	O.D _{600 nm}	V (mL)
1	0.962	9.6	26
2	0.998	10	25
3	0.844	8.4	30
4	0.922	9.2	27
5	0.771	7.7	32
6	0.748	7.5	33

4.2.2.ii Κύριες καλλιέργειες κυττάρων *P.pastoris*

Οι όγκοι που επιλέχθηκαν φυγοκεντρώνται σε φυγόκεντρο Beckman Coulter (H.P.A.), τα κύτταρα συλλέγονται και επαναιωρούνται σε 1 L του θρεπτικού υλικού BMMY ισόποσα χωρισμένο σε 4 γυάλινες κωνικές φιάλες του 1 L.

Τα κύτταρα της ζύμης παρέμειναν για επώαση υπό ανάδευση (200 rpm) σε θερμοκρασία 30 °C για χρονικό διάστημα 5 ημερών με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης 0.5 % (v/v). Επειδή για την ανάπτυξη του ζυμομύκητα *P.pastoris* απαιτείται καλός αερισμός της καλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες μεγάλης χωρητικότητας και πόματα από βαμβάκι.

Οι εκκρινόμενες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, συλλέχθηκαν αρχικά με φυγοκέντριση, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση, συμπύκνωση και εξיסορρόπηση του υπερκείμενου της καλλιέργειας.

4.2.2.iii Διήθηση, συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας

Το υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά από φυγοκέντριση (5000 rpm, Beckman Coulter, Η.Π.Α.) συλλέχθηκε, προκειμένου να συμπυκνωθεί και να απομονωθεί η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη από τις υπόλοιπες εκκρινόμενες πρωτεΐνες της ζύμης.

Αρχικά, το υπερκείμενο διηθήθηκε υπό κενό, χρησιμοποιώντας διαδοχικά διηθητικό χαρτί Whatman (Μ. Βρετανία) και φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.8 και 0.2 μm (Supor[®] 200, PALL Life Sciences) ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κυτταρικά θραύσματα.

Κατόπιν, με χρήση της συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 και μεμβράνες PM-10 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.) πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση του διαλύματος πρωτεϊνών. Μόρια μεγαλύτερα από τη διάμετρο των πόρων της μεμβράνης, συγκρατούνται ενώ τα μικρότερα μόρια διαφεύγουν μαζί με το διάλυμα. Στο εσωτερικό της συσκευής παρέμεινε τελικά το συμπυκνωμένο διάλυμα (όγκου περίπου 10 mL) των πρωτεϊνών μοριακού βάρους πάνω από 10 kDa.



Σχήμα 4.1. Διάταξη υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.)

4.2.2.iv Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)

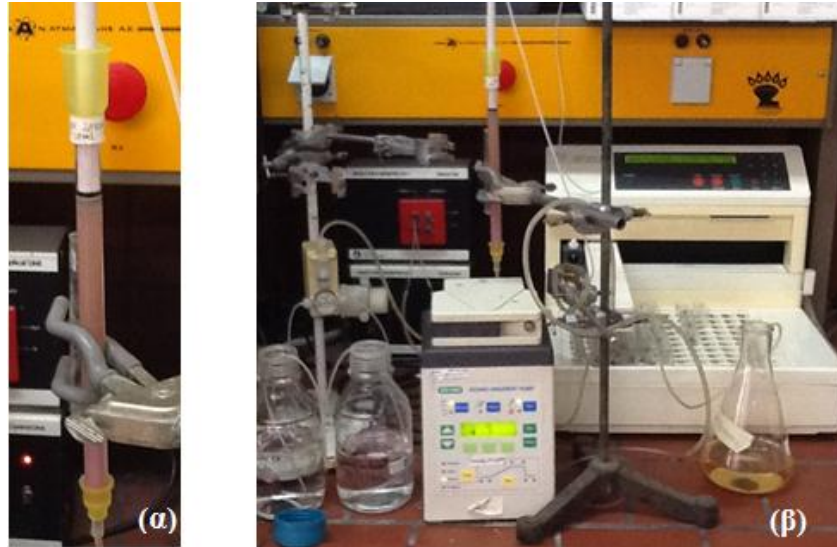
Η χρωματογραφία συγγένειας ακίνητοποιημένου μετάλλου εκμεταλλεύεται τα 6 συνεχόμενα κατάλοιπα ιστιδίνης (His-tag) που είχαν προστεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης και τα οποία έχουν την ιδιότητα να προσδένονται σε κατιόντα μετάλλου (Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) λόγω της αρνητικής φόρτισης των αμινοξικών καταλοίπων.

Αρχικά, το συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό διάλυμα εξισορροπήθηκε με διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl (Talon). Η

διαδικασία της διαπίδυσης έγινε με τη χρήση μεμβρανών κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Daltons, Sigma-Aldrich). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης δηλαδή μικρά μόρια διαλύτη δύνανται να διαπερνούν την ημιπερατή μεμβράνη μέχρι αποκατάστασης ισορροπίας στο σύστημα. Η μεμβράνη πριν τη χρήση βυθίστηκε σε βραστό απιονισμένο νερό για περίπου 30 min, ενώ στη συνέχεια έγινε η μεταφορά του διαλύματος των πρωτεϊνών στο 1/3 περίπου του όγκου του σχηματιζόμενου σωλήνα. Το σύστημα παρέμεινε μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου όγκου ($V_{P\Delta} \geq 100 \times V_{\text{διαλ/τος πρωτεϊνών}}$), για 24 h σε θερμοκρασία 4 °C, υπό ήρεμη ανάδευση.

Εν συνεχεία, το πρωτεϊνικό διάλυμα διαβιβάστηκε σε στήλη Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.). Η λειτουργία της στήλης μπορεί να περιγραφεί ως εξής:

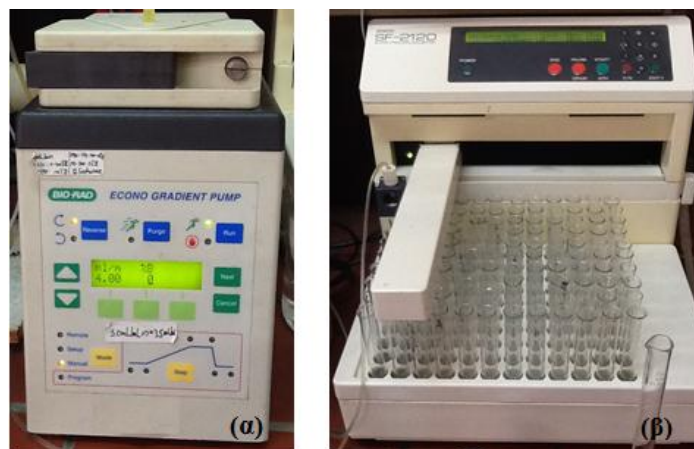
- i. Αρχικά η στήλη εξισορροπείται με 200-300 mL ρυθμιστικού διαλύματος Talon με ροή 2.5 mL/ min.
- ii. Το μίγμα των πρωτεϊνών φορτώνεται στη στήλη με σταθερή ροή 2 mL/ min.
- iii. Ακολουθεί έκπλυση της στήλης με διάλυμα Talon προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες οι οποίες δεν προσδέθηκαν στη στήλη.
- iv. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται η έκλυση των προσδεδεμένων πρωτεϊνών με προσθήκη διαλύματος Talon παρουσία μιδαζολίου, το οποίο ανταγωνίζεται τα κατάλοιπα ιστιδίνης στη μήτρα κοβαλτίου απελευθερώνοντας έτσι τα προσδεδεμένα μόρια. Η συγκέντρωση του άλατος στην κινητή φάση αυξανόταν σταδιακά (gradient) έως 100mM.
- v. Τέλος, η στήλη ξεπλένεται με Talon και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C, βυθισμένη σε διάλυμα EtOH 20 % (v/v).



Σχήμα 4.2. (α) Στήλη Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.), (β) Σύστημα απομόνωσης πρωτεϊνών

Τα κλάσματα που περιείχαν την ζητούμενη πρωτεΐνη συλλέχθηκαν και αφαλατώθηκαν με διαπίδυση έναντι ΡΔ 20 mM Tris-HCl pH 8.0. Ο έλεγχος βαθμού καθαρότητας πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE).

Η ρύθμιση της ροής της κινητής φάσης της χρωματογραφίας στα 2 mL/ min έγινε με χρήση της αντλίας Econo Gradient (Biorad, Η.Π.Α.) ενώ για την ανίχνευση των εκλουόμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής UV (280 nm) με λογισμικό καταγραφής Clarity Version 2.3.3.124 (DataApex, Τσεχία). Τα δείγματα συλλέχθηκαν με τον κλασματοσυλλέκτη Waters, Millipore (Η.Π.Α.).



Σχήμα 4.3. (α) Περισταλτική αντλία Econo Gradient (Biorad, Η.Π.Α.), (β) κλασματοσυλλέκτης Waters, Millipore (Η.Π.Α.).

4.2.3. Ηλεκτροφορητικές τεχνικές

Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και η εμφάνιση των πρωτεϊνών στο πήκτωμα πραγματοποιήθηκε με χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250.

4.2.3.i Ηλεκτροφόρηση SDS σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου ύστερα από κατεργασία με δωδεκυλο-σουλφονικό νάτριο (SDS) αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού πρωτεϊνών με κριτήριο το μέγεθος τους και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών. Το πολυακρυλαμίδιο είναι μια χημικά αδρανής ένωση, σταθερή σε μεγάλο εύρος pH, ιονικής ισχύος και θερμοκρασίας. Το πήκτωμα προκύπτει από τον πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου σε μακριές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου καθώς και από τη δημιουργία εγκάρσιων διακλαδώσεων με ομάδες του δις-ακρυλαμιδίου (cross-linking). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται με την παρουσία μιας χημικής ένωσης που παίζει τον ρόλο του καταλύτη, του υπερθευικού αμμωνίου (APS) και ενός ενεργοποιητή ο οποίος καλείται TEMED. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν καθορίζεται και το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος.

Το SDS αποδιατάσσει τα μόρια των πρωτεϊνών μετά από θέρμανση, καθώς εξουδετερώνει τους δευτερεύοντες δεσμούς και συνδέεται με τα πολυπεπτίδια με σταθερό λόγο βάρους. Με τον τρόπο αυτό εξουδετερώνεται το φορτίο του πολυπεπτιδίου, μιας και το ενδογενές φορτίο του μορίου είναι ελάχιστο σε σύγκριση με το αρνητικό φορτίο του συνδεδεμένου SDS. Έτσι, η κινητικότητα των πολυπεπτιδίων είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους.

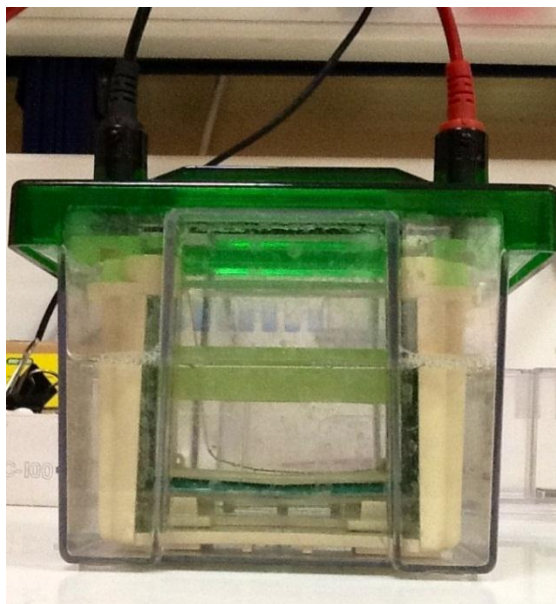
Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE είναι ασυνεχής καθώς επιτελείται συνήθως σε ένα πολυ-ρυθμιστικό σύστημα (Multi Buffer System, MBS) δια μέσου δύο πηκτωμάτων, με το ένα να επιστοιβάζεται του άλλου. Χρησιμοποιούνται τρία ρυθμιστικά διαλύματα: το ΡΔ ηλεκτροφόρησης (running buffer), το ΡΔ του πηκτώματος επιστοιβάσης (stacking gel) και το ΡΔ του πηκτώματος διαχωρισμού (separating gel). Η διαδικασία περιγράφεται ως εξής:

- i. Αρχικά καθαρίζονται δύο γυάλινες πλάκες (10,1 cm × 7,3 cm και 10,1 cm × 8,3 cm) με διάλυμα 70 % (v/v) αιθανόλης, ενώνονται με τη βοήθεια μεταλλικών σφιγκτήρων και σταθεροποιούνται πάνω στη συσκευή.
- ii. Παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού και μεταφέρεται προσεκτικά ανάμεσα στις δύο γυάλινες πλάκες, έως περίπου 1.5 cm κάτω από την κορυφή τους. Το διάλυμα καλύφθηκε με μια στοιβάδα νερού προκειμένου να εξομαλυνθεί η επιφάνεια του gel και αφέθηκε να πολυμερισθεί για περίπου 30 min.
- iii. Απομακρύνεται το νερό και προστίθεται το πήκτωμα επιστοιβάσης ανάμεσα στις δύο πλάκες. Η σύσταση τόσο του πηκτώματος επιστοιβάσης όσο και του πηκτώματος διαχωρισμού περιγράφεται στον πίνακα 4.4. Άμεσα τοποθετείται το ειδικό χτενάκι (comb) στην κορυφή των πηκτωμάτων έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι θήκες φόρτωσης των δειγμάτων.

Πίνακας 4.4. Ακριβής σύσταση των πηκτωμάτων διαχωρισμού και επιστοιβάσης για την παρασκευή 1 gel

Πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving gel)	(12.5 %) Σύσταση για 1 gel
dH₂O	1.75 mL
0,75M Tris/SDS 0,2% (pH 8,8)	4.70 mL
40 % acrylamide	2.90 mL
TEMED	15 μL
10 % (w/w) APS	45 μL
Πήκτωμα επιστοιβάσης (Stacking gel)	
dH₂O	1.5 mL
0,25M Tris/SDS 0,2% (pH 8,8)	1.9 mL
40 % acrylamide	0.38 mL
TEMED	10 μL
10 % (w/w) APS	30 μL


- iv. Οι πλάκες στερεώθηκαν στα ειδικά δοχεία της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης, αφού πολυμερίστηκε και το πήκτωμα επιστοίβασης, και προστέθηκαν 400-500 mL ρυθμιστικού διαλύματος SDS 1x. Το ειδικό χτενάκι απομακρύνεται και τα δείγματα τοποθετούνται στη θήκες που σχηματίστηκαν. Εκτός από τα δείγματα, τοποθετήθηκαν και 5-7 μL πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, Πίνακας 4.5).
- v. Τέλος, πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με ένταση ηλεκτρικού ρεύματος 35 mA/πήκτωμα για 1 h περίπου.



Σχήμα 4.4. Συσκευή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE

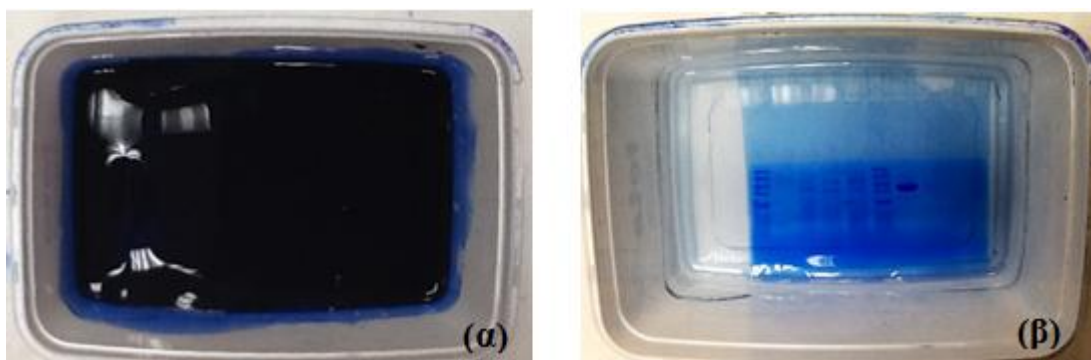
Η κατεργασία των δειγμάτων έγινε με την προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (sample buffer, 7 μL) στο πρωτεϊνικό διάλυμα (15 μL) ενώ ακολούθησε βρασμός του μίγματος για 7 min.

Πίνακας 4.5. Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas)

	MW, kDa	Πρωτεΐνη	Προέλευση
	116,0	β-γαλακτοσιδάση	<i>E. coli</i>
	66,2	Αλβουμίνη ορού βοδινού	Πλάσμα βοδινού αίματος
	45,0	Ωαλβουμίνη	Ασπράδι αυγού κότας
	35,0	Γαλακτική αφυδρογονάση	Μύες χοίρων
	25,0	REase Bsp98I	<i>E. coli</i>
	18,4	β-λακτογλοβουλίνη	Γάλα αγελάδος
	14,4	Λυσοζύμη	Ασπράδι αυγού κότας

4.2.3.ii Εμφάνιση των πρωτεϊνών στην ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμίδιου με χρωστική Coomassie Brilliant Blue

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η χρώση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB). Η χρώση των πρωτεϊνών με CBB βασίζεται στην αλληλεπίδραση των όξινων και βασικών ομάδων των αμινοξέων των πρωτεϊνών με τις οργανικές ομάδες των χρωστικών, σχηματίζοντας έτσι χρωματισμένα ιζήματα. Το πήκτωμα μεταφέρεται προσεκτικά σε διάλυμα χρώσης (staining solution) Coomassie Brilliant Blue G-250 για 20 min και στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) μέχρι οι ζώνες των πρωτεϊνών να γίνουν ευδιάκριτες. Το διάλυμα αποχρωματισμού ανανεωνόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (20-30 min). Καθ' όλη τη διάρκεια χρωματισμού – αποχρωματισμού, το πήκτωμα αναδεύονταν σε ειδική συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Σχήμα 4.5. (α) Το πήκτωμα σε διάλυμα χρώσης CBB, (β) Το πήκτωμα σε διάλυμα αποχρωματισμού

4.2.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών μορίων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών μορίων πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μήκος κύματος 280 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης μιας καθαρής πρωτεΐνης σε διάλυμα γίνεται με τη βοήθεια του παρακάτω μαθηματικού μοντέλου:

$$C_{mg/mL} = \frac{O \cdot D_{280\text{ nm}} \cdot M \cdot W}{\epsilon}$$

Όπου $C_{mg/mL}$: η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε mg/mL

$O \cdot D_{280\text{ nm}}$: η τιμή της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος

$M \cdot W$: το μοριακό βάρος του πρωτεϊνικού μορίου όπως αυτό προσδιορίστηκε από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

ϵ : ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας (M^{-1}/cm^{-1}) της πρωτεΐνης

4.3. Ενζυμική σύνθεση φαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος

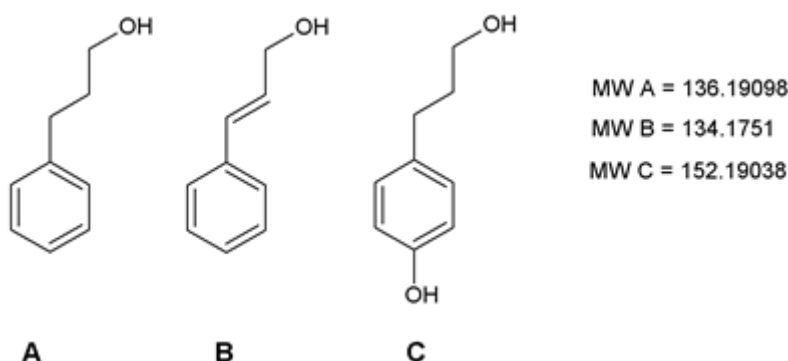
4.3.1. Σκοπός

Σκοπός αυτής της παραγράφου είναι η περιγραφή της παραγωγής και καθαρισμού τριών φαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος καθώς και της ταυτοποίησής τους. Η παραγωγή των εστέρων πραγματοποιήθηκε με ενζυμική εστεροποίηση με βιοκαταλύτη τη λιπάση Novozym 435, ο καθαρισμός έγινε με εκχύλιση και χρωματογραφία προσρόφησης με στήλη silica gel ενώ η ταυτοποίηση των εστέρων πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

4.3.2. Ενζυμική σύνθεση

Η σύνθεση των φαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις όγκου 50 mL σε οργανικό διαλύτη (τριτοταγής βουτανόλη) με χρήση του ενζύμου Novozym 435 (ακινητοποιημένη λιπάση B *C.antarctica*). Οι φαινολικές αλκοόλες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής τρεις: η

3-φαινυλ-1-προπανόλη (A), η κινναμική αλκοόλη (B) και η 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλη (C).



Σχήμα 4.6. (A) 3-φαινυλ-1-προπανόλη, (B) κινναμική αλκοόλη, (C) 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλη

4.3.2.i Σύνθεση του εστέρα της 3-φαινυλ-1-προπανόλης με D-γλυκουρονικού οξύ

Αρχικά ζυγίζονται 0.681 g 3-φαινυλ-1-προπανόλης (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.) έτσι ώστε στον όγκο της αντίδρασης (50 mL) να επιτευχθεί συγκέντρωση 100 mM. Επίσης ζυγίζεται η ποσότητα του D-γλυκουρονικού οξέος (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.) προκειμένου να επιτευχθεί η ίδια συγκέντρωση με παραπάνω (0.971 g) και η ποσότητα του ενζύμου Novozym 435 (ακίνητοποιημένη λιπάση B *C.antarctica*) (0.5 g). Στην αντίδραση προστίθενται 2.5 g ενεργοποιημένων μοριακών κοσκίων (molecular sieves) για την προσρόφηση του παραγόμενου νερού κατά την εστεροποίηση. Αντιδρώντα, ένζυμο και μοριακά κόσκινα προστίθενται σε 50 mL τριτοταγούς βουτανόλης σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 250 mL. Η φιάλη πωματίζεται καλά για αποφυγή απωλειών του διαλύτη κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η εστεροποίηση έλαβε χώρα σε αναδευόμενο επωαστήρα Orbital incubator S150, (Stuart Scientific, M. Βρετανία) σε θερμοκρασία 60 °C και ανάδευση 150 rpm για 48 h.

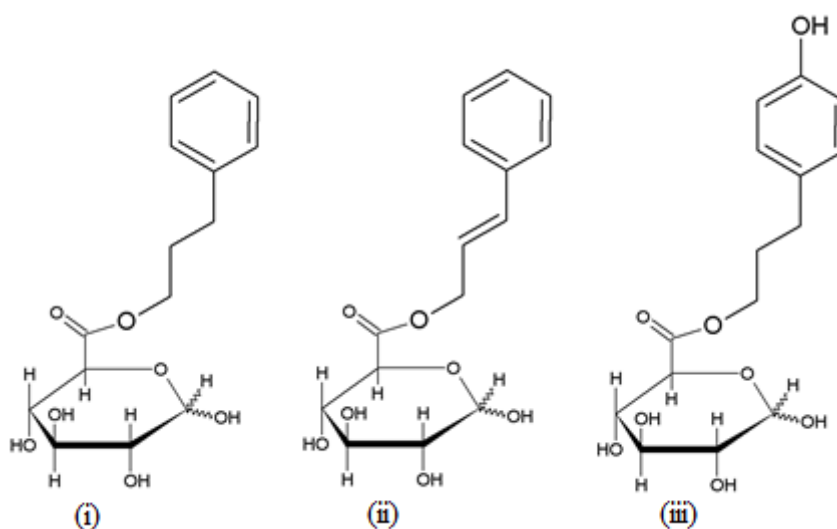
4.3.2.ii Σύνθεση του εστέρα της κινναμικής αλκοόλης με D-γλυκουρονικό οξύ

Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL προστίθενται 0.971 g D-γλυκουρονικού οξέος, 0.671 g αλκοόλης B, 0.5 g ενζύμου Novozym 435 και 2.5 g ενεργοποιημένων μοριακών κοσκίων. Προστίθενται επιπλέον 50 mL τριτοταγούς βουτανόλης και η

φιάλη μπαίνει σε αναδεδόμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 60 °C και 150 rpm για 48 h.

4.3.2.iii Σύνθεση του εστέρα της 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλης με D-γλυκουρονικό οξύ

Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL προστίθενται 0.971 g D-γλυκουρονικού οξέος, 0.761 g αλκοόλης C, 0.5 g ενζύμου Novozym 435 και 2.5 g ενεργοποιημένων μοριακών κοσκίνων. Προστίθενται επιπλέον 50 mL τριτοταγούς βουτανόλης και η φιάλη μπαίνει σε αναδεδόμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 60 °C και 150 rpm για 48 h.



Σχήμα 4.7. (i) Εστέρας της 3-φαινυλ-1-προπανόλης με D- γλυκουρονικό οξύ, (ii) Εστέρας της κινναμικής αλκοόλης με D-γλυκουρονικό οξύ, (iii) Εστέρας της 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλης με D-γλυκουρονικό οξύ

Η πρόοδος των αντιδράσεων ελεγχόταν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), σε πλάκες αλουμινίου με επίστρωση silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Γερμανία), χρησιμοποιώντας διαλύτη ανάπτυξης μίγμα χλωροφορμίου: μεθανόλης: απιονισμένου νερού 65: 15: 2 (v/v/v).

4.3.3. Καθαρισμός των εστέρων

4.3.3.i Εκχύλιση του μίγματος της αντίδρασης

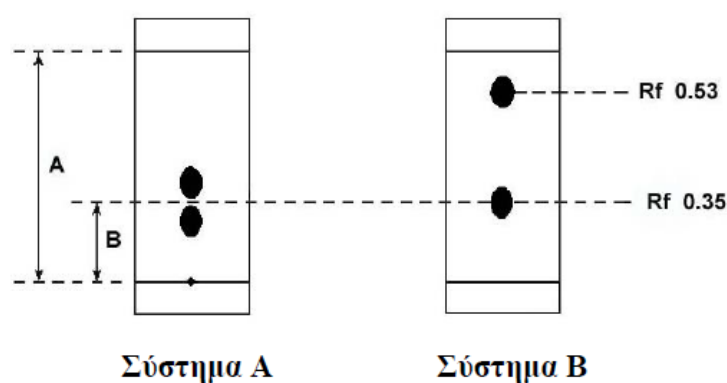
Σε πρώτο στάδιο, το ακινητοποιημένο ένζυμο και τα μοριακά κόσκινα απομακρύνονται με διήθηση. Στη συνέχεια το διήθημα αραιώνεται με 100 mL απιονισμένο νερό και εκχυλίζεται με 3 x 100 mL διχλωρομεθάνιο (liquid-liquid extraction). Η διαδικασία της εκχύλισης πραγματοποιείται σε διαχωριστική χοάνη των 500 mL, με έντονη ανακίνηση, όπου με την προσθήκη του διχλωρομεθανίου παρατηρείται διαχωρισμός φάσεων. Δημιουργούνται δύο φάσεις από τις οποίες η ελαφρύτερη αποτελείται από το νερό, το οποίο παρασύρει το ελεύθερο D-γλυκουρονικό οξύ, και η βαρύτερη από διχλωρομεθάνιο, η οποία παρασύρει τον εστέρα και την αλκοόλη. Μετά από κάθε εκχύλιση η οργανική φάση συλλέγεται και στο συνολικό όγκο προστίθεται κατάλληλη ποσότητα άνυδρου θεικού νατρίου (Na_2SO_4) το οποίο λειτουργεί ως αφυδατικός παράγοντας. Ακολουθεί διήθηση για την απομάκρυνση του θεικού νατρίου και το διήθημα, αφού ελέγχεται για την ύπαρξη προϊόντος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό μειωμένη πίεση σε περιστροφικό εξατμιστήρα Buchi RE 111 (Ελβετία) σε θερμοκρασία 30 °C.



Σχήμα 1.8. (α) Διήθηση του μίγματος της αντίδρασης για απομάκρυνση του ενζύμου και των μοριακών κοσκίων, (β) Διαχωρισμός των φάσεων κατά την εκχύλιση, (γ) Εξάτμιση της οργανικής φάσης σε περιστροφικό εξατμιστήρα

Το ξηρό υπόλειμμα διαχωρίζεται από την ελεύθερη αλκοόλη με χρωματογραφία προσρόφησης. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιείται στήλη πακεταρισμένη με Silica gel 60 (0.040-0.063 mm) και ως διαλύτης έκλουσης μίγμα οξικού αιθυλεστέρα: μεθανόλης 9:1 (v/v). Ο διαχωρισμός ελέγχεται ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).

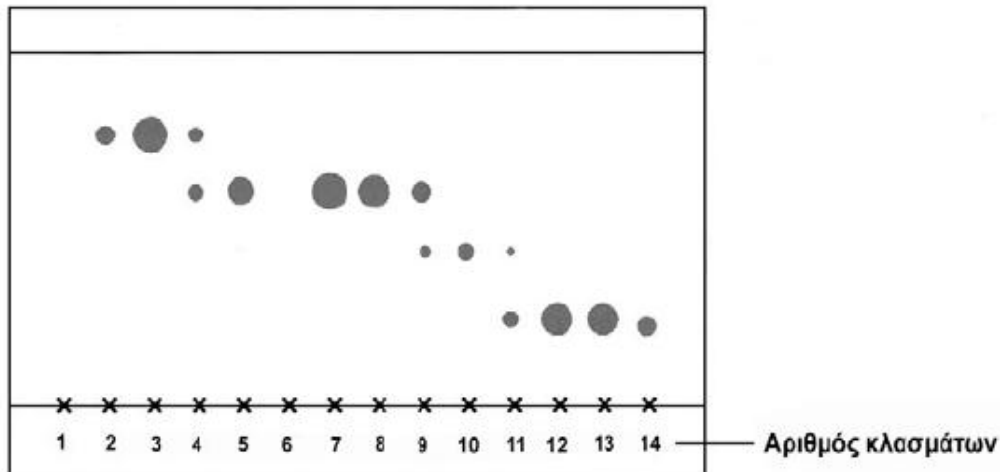
Για την εύρεση του κατάλληλου συστήματος έκλουσης γίνονται δοκιμές με τη μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC). Για να επιτευχθεί καλός διαχωρισμός θα πρέπει τα R_f των συστατικών του μίγματος να διαφέρουν τουλάχιστον κατά 0.2-0.3.



(ακατάλληλο για έκλουση της στήλης) (κατάλληλο για έκλουση της στήλης)

Σχήμα 4.9. Επιλογή συστήματος έκλουσης μιας χρωματογραφικής στήλης για το διαχωρισμό μίγματος δύο συστατικών

Όταν οι ενώσεις του δείγματος είναι έγχρωμες, τότε είναι δυνατή η παρακολούθηση του διαχωρισμού με γυμνό μάτι και η συλλογή των κατάλληλων κλασμάτων. Στην περίπτωση όπου οι ουσίες είναι άχρωμες συλλέγονται κλάσματα συγκεκριμένου όγκου. Μετά τη συλλογή των κλασμάτων γίνεται ανάλυση αυτών για να προσδιοριστεί σε ποια από αυτά υπάρχει ουσία. Ένας απλός και γρήγορος τρόπος ελέγχου της καθαρότητας των κλασμάτων αποτελεί η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.



Σχήμα 4.10. Έλεγχος της καθαρότητας των κλασμάτων μιας χρωματογραφικής στήλης με TLC

4.3.3.ii Προετοιμασία στήλης Silica gel

Όπως προαναφέρθηκε η διαδικασία διαχωρισμού του εστέρα από την ελεύθερη αλκοόλη πραγματοποιείται με χρωματογραφία προσρόφησης όπου ο χρόνος διαχωρισμού λόγω του πολύ μικρού μεγέθους σωματιδίων της στατικής φάσης και σε συνδυασμό με την εξαναγκασμένη προώθηση του διαλύτη έκλουσης με πεπιεσμένο αέρα (χρωματογραφία στήλης με πίεση, flash column chromatography) είναι πολύ μικρότερος σε σχέση με τις στήλες όπου ο διαλύτης κινείται μόνο με τη βοήθεια της βαρύτητας. Ο διαλύτης έκλουσης που χρησιμοποιείται είναι μίγμα οξικού αιθυλεστέρα: μεθανόλης 9:1 (v/v) και η διάμετρος και το ύψος της στήλης 2.5 cm και 50 cm αντίστοιχα. Η στήλη πρέπει να διαθέτει στο κάτω μέρος της ειδικό πορώδη δίσκο ο οποίος επιτρέπει το πακετάρισμά της.

Αρχικά σε ποτήρι ζέσεως προστίθεται ποσότητα silica gel 60 (0.040 – 0.063 mm) και κατάλληλη ποσότητα από το διαλύτη έκλουσης και αναδεύεται μέχρι να σχηματιστεί ιλύς. Η στήλη πληρώνεται με την ιλύ από silica gel και στη συνέχεια προστίθεται επιπλέον διαλύτης ο οποίος υπόκειται σε εξαναγκασμένη ροή υπό την πίεση του αέρα διαμέσου της στατικής φάσης. Ο διαλύτης προστίθεται πάντα προσεκτικά προκειμένου να μην διαταραχθεί η επιφάνεια της στατικής φάσης η οποία δεν πρέπει να αφηθεί να έρθει σε επαφή με τον αέρα. Ο διαλύτης συλλέγεται σε ποτήρι ζέσεως προκειμένου να επαναχρησιμοποιηθεί. Η στήλη είναι πια έτοιμη όταν

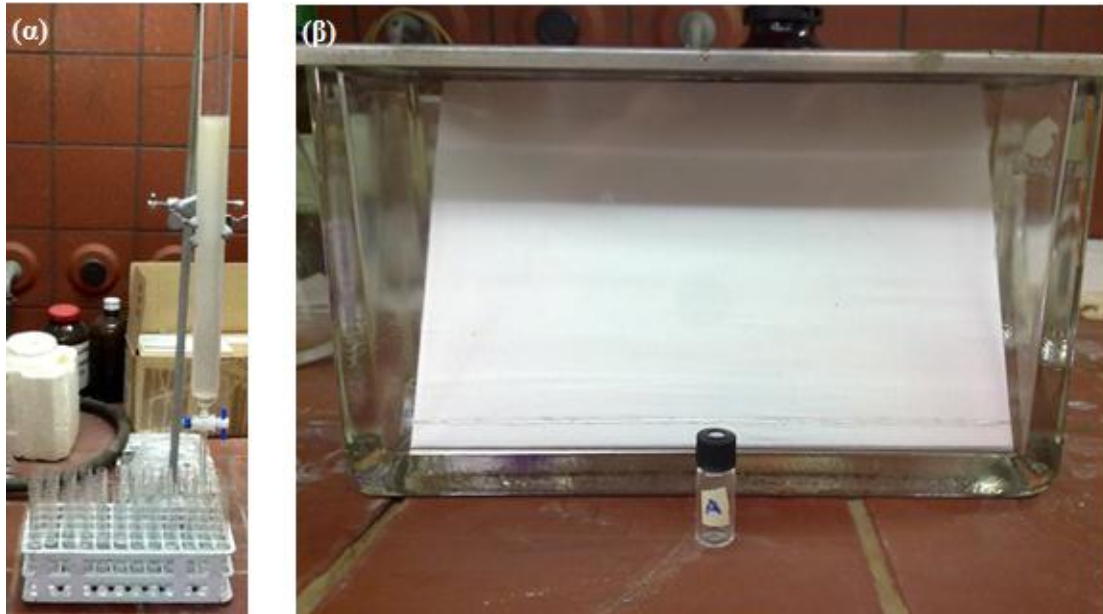
η στάθμη του υλικού φτάσει περίπου στα 2/3 του ύψους της και σταματήσει να κατεβαίνει, ενώ το υλικό έχει αποκτήσει μια ημιδιάφανη όψη.

4.3.3.iii Φόρτωση του δείγματος, λήψη κλασμάτων και ποιοτικός χαρακτηρισμός τους

Η φόρτωση του δείγματος πραγματοποιείται ως εξής:

- i. Αρχικά αφήνεται να τρέξει ο διαλύτης από τη στήλη μέχρι η στάθμη του να βρίσκεται ακριβώς πάνω από την ελεύθερη επιφάνεια της Silica gel και κλείνεται η στρόφιγγα.
- ii. Το ξηρό πια δείγμα στην σφαιρική φιάλη έπειτα από εξάτμιση επαναδιαλύεται σε 1-2 mL του χρησιμοποιούμενου διαλύτη.
- iii. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας μια πιπέτα Pasteur προστίθεται προσεκτικά το δείγμα στην ελεύθερη επιφάνεια της Silica gel.
- iv. Η φιάλη ξεπλένεται με 3 x 1 mL φρέσκου διαλύτη και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της φόρτωσης του δείγματος.
- v. Η στρόφιγγα ανοίγει και ο διαλύτης αφήνεται να τρέξει μέχρι το δείγμα να απορροφηθεί από την επιφάνεια της Silica gel.
- vi. Τέλος προστίθεται περισσότερος διαλύτης στη στήλη προσέχοντας να μην διαταραχθεί η ελεύθερη επιφάνεια του υλικού. Η προσθήκη περισσότερου διαλύτη γίνεται όποτε χρειάζεται ώστε η ελεύθερη επιφάνεια να παραμένει βυθισμένη.

Με παροχή αέρα πραγματοποιείται η εξαναγκασμένη ροή του διαλύτη έκλουσης και συλλέγονται τα κλάσματα. Η λήψη των κλασμάτων έγινε σε δοκιμαστικούς σωλήνες 13x120 mm σε περίπου 10 mL όγκο το κάθε κλάσμα. Τα κλάσματα που ελήφθησαν ελέγχονται ποιοτικά για την ύπαρξη του εστέρα με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και διαλύτη ανάπτυξης μίγμα χλωροφορμίου: μεθανόλης: απιονισμένου νερού 65:15:2 (v/v/v).



Σχήμα 4.11. (α) Χρωματογραφία με στήλη Silica gel και λήψη κλασμάτων, (β) Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) για τον προσδιορισμό των κλασμάτων που περιέχουν τον εστέρα

Τα κλάσματα τα οποία περιέχουν τον ζητούμενο εστέρα συγκεντρώνονται και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το ξηρό υπόλειμμα λαμβάνεται ποσοτικά από τη σφαιρική φιάλη με επαναδιάλυση σε ποσότητα – επαρκή για την πλήρη διαλυτοποίησή του – οξικού αιθυλεστέρα και φυλάσσεται σε υάλινα φιαλίδια (vials) σε θερμοκρασία 4 °C.

4.3.4. Ταυτοποίηση των φαιθυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

4.3.4.i Εισαγωγή

Η φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια μορφή φασματομετρίας απορρόφησης, όπου το δείγμα που βρίσκεται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (4 έως 900 MHz) και οι προσανατολισμένοι πυρήνες των ατόμων από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας μεταβαίνουν στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με αναστροφή του σπιν. Ενδεικτικά ένας περιστρεφόμενος πυρήνας ^1H ή ^{13}C (και κάθε πυρήνας με περιττό αριθμό πρωτονίων και κάθε πυρήνας με περιττό αριθμό νετρονίων) όταν τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, μπορεί να αποκτήσει τέτοιο προσανατολισμό ώστε το δικό του μικρό μαγνητικό πεδίο να διαταχθεί είτε παράλληλα προς το εξωτερικό πεδίο είτε αντιπαράλληλα. Ο

παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας, ευνοώντας σχετικά αυτή την κατάσταση του spin έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού. Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, απ' όπου προκύπτει και ο όρος συντονισμός.

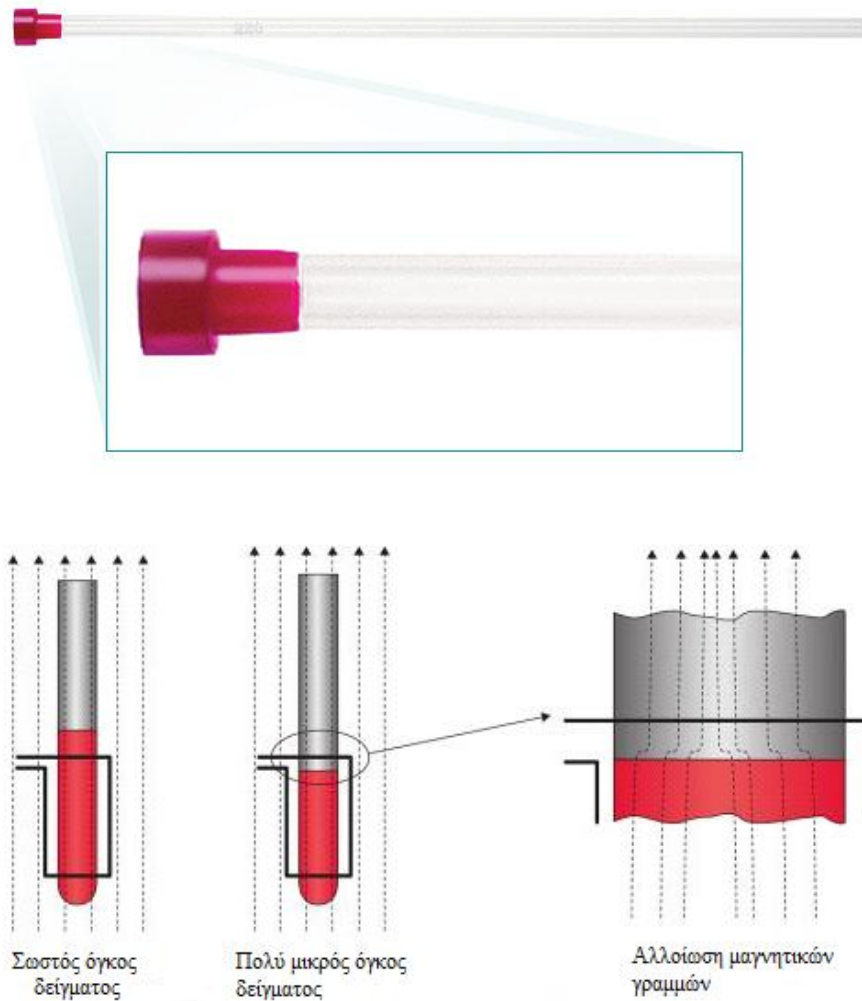
Επίσης οι πυρήνες περιβάλλονται από ηλεκτρόνια και, όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό. Συνεπώς, οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Επειδή κάθε πυρήνας ενός μορίου βρίσκεται σε διαφορετικό ηλεκτρονικό περιβάλλον, προστατεύεται και σε κάπως διαφορετική έκταση, με αποτέλεσμα το πραγματικό εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο να μην είναι ίδιο για κάθε πυρήνα. Έτσι λαμβάνουμε διαφορετικό σήμα NMR για κάθε διακριτό πυρήνα άνθρακα ή υδρογόνου κάποιου μορίου (Mc Murry J., 2005).

Η συχνότητα απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που παρατηρείται από την αλληλεπίδραση της με τους πυρήνες του αναλυτή, είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα, με αποτέλεσμα η μέθοδος NMR να αποτελεί μία αποτελεσματική μέθοδο για την ταυτοποίηση της δομής οργανικών ενώσεων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους και για το χημικό «περιβάλλον» των πυρήνων των ατόμων στα μόρια των χημικών ενώσεων. Οι πυρήνες που εξετάζονται ως επί το πλείστον στο NMR για την οργανική ανάλυση είναι το υδρογόνο (^1H) και ο άνθρακας-13 (^{13}C) (Οξενκιουν-Πετροπούλου Μ., 2006).

4.3.4.ii Προετοιμασία των δειγμάτων

Αρχικά λαμβάνονται ποσότητες οι οποίες περιέχουν περίπου 10 mg από κάθε εστέρα και ξηραίνονται υπό την ομαλή ροή αέρα. Στη συνέχεια επαναδιαλύονται σε κατάλληλο όγκο δευτεριωμένου DMSO και τοποθετούνται στα ειδικά σωληνάκια NMR που είναι στενοί και μακριοί υάλινοι σωλήνες με διάμετρο περίπου 5 mm και κάθε σωληνάκι με ένα κατάλληλο μηχανισμό φέρεται στο διάκενο των δύο πόλων του NMR οργάνου όπου και περιστρέφεται. Το εισαγόμενο στο σωλήνα δείγμα

πρέπει να είναι ελεύθερο από προσμείξεις που προκαλούν διεύρυνση των κορυφών συντονισμού.



Σχήμα 4.12. Απεικόνιση ορθής στάθμης πλήρωσης σωλήνα NMR

4.3.4.iii Ερμηνεία των φασμάτων NMR

Σε ένα φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Σχήμα 4.2), ο οριζόντιος άξονας καταγράφει το πραγματικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο που υφίστανται οι πυρήνες, ενώ ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την ένταση απορρόφησης της ενέργειας. Κάθε κορυφή στο φάσμα αντιστοιχεί σε έναν χημικά διακριτό πυρήνα του μορίου (Mc Murry J., 2005).

Η ισχύς του εφαρμοζόμενου πεδίου, σε ένα φάσμα $^1\text{H-NMR}$, αυξάνεται από αριστερά προς τα δεξιά. Έτσι, το αριστερό τμήμα του γραφήματος είναι η πλευρά

χαμηλού πεδίου και το δεξιό η πλευρά υψηλού πεδίου. Γενικά τα υδρογόνα δίπλα σε κορεσμένα κέντρα εμφανίζονται σε μικρές τιμές (δεξιά πλευρά φάσματος), λόγω της μεγαλύτερης προστασίας τους από τα περιβάλλοντα ηλεκτρόνια. Για το συντονισμό αυτών των υδρογόνων απαιτείται ισχυρότερο μαγνητικό πεδίο. Αντίθετα, τα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα με άνθρακες που έχουν δίπλα τους ηλεκτραρνητικά άτομα (π.χ. N, O) προστατεύονται λιγότερο αποτελεσματικά και χρειάζονται ασθενέστερο εφαρμοζόμενο πεδίο για να συντονισθούν και απορροφούν στην αριστερή πλευρά του φάσματος.

Το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή. Μετρώντας ηλεκτρονικά, δηλαδή ολοκληρώνοντας το εμβαδόν κάθε κορυφής, είναι δυνατό να μετρήσουμε τον σχετικό αριθμό των κάθε είδους πρωτονίων σε ένα μόριο.

Συχνό φαινόμενο αποτελεί, ωστόσο, η απορρόφηση ενός πρωτονίου (μια κορυφή ενός πυρήνα) να διασπάται σε πολλές στενές κορυφές. Το φαινόμενο αυτό αποκαλείται σχάση spin-spin και προκαλείται από την αλληλεπίδραση ή σύζευξη των πυρηνικών spin γειτονικών χημικά ισοδύναμων ατόμων (Οξενκιουν-Πετροπούλου Μ., 2006).

4.4. Ποσοτικός προσδιορισμός απελευθέρωσης φαινολικών αλκοολών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

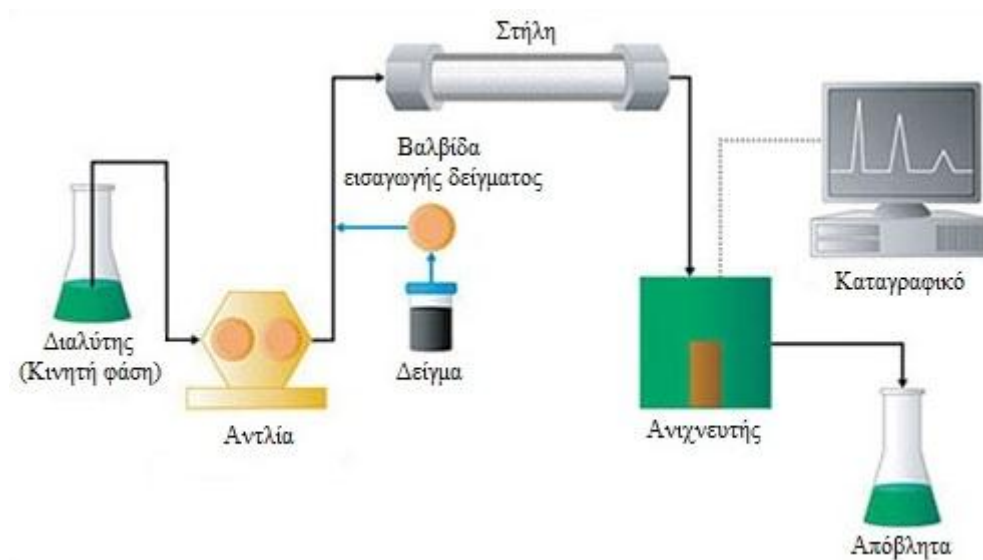
4.4.1. Εισαγωγή

Η εμφάνιση της HPLC, που είναι η τεχνολογική εξέλιξη της υγρής χρωματογραφίας στήλης, έγινε στο τέλος της δεκαετίας του '60, κυρίως χάριν στην ανακάλυψη του DNA καθώς ήταν ανάγκη να βρεθεί μια αξιόπιστη και ταχεία τεχνική για τον διαχωρισμό και την ανάλυση των νουκλεοτιδίων στην τάξη των δεκάτων του ng. Η θεωρητική ανάπτυξη της HPLC στηρίχθηκε στις βασικές αρχές της υγρής χρωματογραφίας, ενώ η ανάπτυξη της οργανολογίας της στην αέρια χρωματογραφία (GC), η οποία ήταν η πιο δημοφιλής τεχνική στην δεκαετία του '60 (Παππά Α., 2004).

4.4.2. Διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Τα βασικά τμήματα ενός συστήματος HPLC είναι:

- σύστημα παροχής κινητής φάσεως
- σύστημα εισαγωγής δείγματος,
- στήλη
- ανιχνευτής και
- καταγραφείας



Σχήμα 4.13. Οργανολογία HPLC

Όταν η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση έχουμε ισοκρατική έκλουση (isocratic elution), ενώ όταν μεταβάλλεται βαθμιαία έχουμε βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution). Για τις ανάγκες του διαχωρισμού των φαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος από τις αντίστοιχες αλκοόλες χρησιμοποιούνται ισοκρατικές συνθήκες.

Το σύστημα παροχής κινητής φάσεως αποτελείται από μία αντλία υψηλής πίεσεως PU 987 Jasco (Ιαπωνία) και ένα σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της συστάσεως της κινητής φάσεως. Το σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συμπληρώνεται από φωτομετρικό ανιχνευτή UV 975 και λογισμικό διαχείρισης και καταγραφής Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία).



Σχήμα 4.14. (α) Αντλία υψηλής πίεσεως PU 987 Jasco (Ιαπωνία) και mixer, (β) Φωτομετρικός ανιχνευτής UV 975, (γ) Σύστημα γρήρης χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Το σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector) είναι μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσεως, με βρόχο δείγματος. Στη θέση “φορτώσεως” η κινητή φάση προωθείται προς τη στήλη χωρίς να περνά από το βρόχο ο οποίος έχει πληρωθεί με το προς ανάλυση διάλυμα του δείγματος, ενώ στη θέση “εισαγωγής” η κινητή φάση παρασύρει ποσοτικά τον όγκο του δείγματος και τον προωθεί προς τη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος στην βαλβίδα Rheodyne πραγματοποιείται με σύριγγα 250 μL Hamilton (Η.Π.Α.).



Σχήμα 4.15. (α) Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος (Rheodyne), (β) Σύριγγα εισαγωγής δείγματος (Hamilton)

4.4.3. Επιλογή κινητής και στατικής φάσης

Η κινητή φάση στην HPLC συμμετέχει ενεργά στο διαχωρισμό. Η επιτυχία ενός υγρού χρωματογραφικού διαχωρισμού εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δείγματος, ακίνητης φάσης και διαλύτη έκλουσης. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη έκλουσης γίνεται με βάση τη δύναμη (solvent strength) και την εκλεκτικότητα (selectivity) του διαλύτη. Η δύναμη του διαλύτη θα πρέπει να έχει τέτοια τιμή ώστε τα συστατικά του δείγματος να εκλούνται σε χρόνο διάφορο του νεκρού χρόνου της στήλης.

Στην περίπτωση εκείνη, όπου η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή φάση και τα πολικότερα συστατικά του δείγματος προσκολλώνται ασθενέστερα στην στατική φάση και επομένως εκλούνται γρηγορότερα από τα λιγότερο πολικά συστατικά, η τεχνική ονομάζεται υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσεως (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC). Κατά την RP-HPLC χρησιμοποιούνται υλικά πληρώσεως (κυρίως μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου) με χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις (chemically bonded stationary phases). Τα σωματίδια αυτά είναι συνήθως διαμέτρου 5-10 μm με πόρους 20 nm και διαθέτουν μεγάλη επιφάνεια επαφής στην οποία συνδέονται ομοιοπολικά οι στατικές φάσεις (αλκυλομάδες και άλλες δραστικές ομάδες). Στατικές φάσεις αλκυλομάδων με αλυσίδες C_8H_{17} (octyl) και $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ (octadecyl) δεσμευμένες στη silica είναι ευρέως διαδεδομένες και βρίσκουν εφαρμογές σε διαχωρισμούς αμινοξέων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών, βιταμινών, λιπών, στεροειδών, αντιβιοτικών, νουκλεοτιδίων, σακχάρων κ.ά. Κατά την RP-HPLC η ισχύς έκλουσης αυξάνει με την παράλληλη μείωση της πολικότητας του διαλύτη, διότι έτσι ελαττώνεται η συγκράτηση μιας ουσίας στη στατική φάση. Στην περίπτωση ουσιών που μπορούν να υποστούν ιονισμό, μια αλλαγή στο pH μπορεί να επηρεάσει την συγκράτηση και την εκλεκτικότητά τους.

Αφού επιλεγθεί η κατάλληλη αναλογία του διαλύτη έκλουσης μεθανόλης : νερού έτσι ώστε εστέρας και αλκοόλη να εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους, κατασκευάζονται οι καμπύλες αναφοράς των φαινολικών αλκοολών A, B και C προκειμένου να εξαχθούν οι σχέσεις οι οποίες συνδέουν την επιφάνεια των κορυφών των αλκοολών με τη συγκέντρωσή τους. Οι σχέσεις αυτές θα χρησιμοποιηθούν για

τον ποσοτικό προσδιορισμό των απελευθερούμενων αλκοολών κατά την ενζυμική υδρόλυση των εστέρων με χρήση του ενζύμου StGE2.

4.5. Υπολογισμός κινητικών σταθερών υδρόλυσης των γλυκουρονικών φαινυλεστέρων

4.5.1. Σκοπός

Σκοπός αυτής της παραγράφου είναι ο υπολογισμός των κινητικών σταθερών που προκύπτουν από την υδρόλυση των φαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος με χρήση της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος StGE2. Ο υπολογισμός πραγματοποιήθηκε με ποσοτικό προσδιορισμό της απελευθέρωσης των φαινολικών αλκοολών A, B και C με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

4.5.2. Κατασκευή καμπυλών αναφοράς για τις αλκοόλες A, B και C

Η κατασκευή των καμπυλών αναφοράς έγινε με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων των φαινολικών αλκοολών σε μεθανόλη. Αρχικά παρασκευάζονται διαλύματα 500 mg/L για κάθε μια από τις τρεις αλκοόλες. Για την κατασκευή κάθε μιας από τις καμπύλες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικά σημεία που αντιστοιχούν σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 4.6. Η μέτρηση των αλκοολών πραγματοποιήθηκε με χρήση συστήματος HPLC (Jasco PU 987) με στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈ Nucleosil (250 mm x 4.6 mm, Macherey – Nagel, Γερμανία), ροή 0.4 mL/ min και διαλύτη μίγμα CH₃OH:H₂O 7:3 (v/v) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι αλκοόλες A και C μετρήθηκαν φωτομετρικά (Jasco UV 975) στα 220 nm και η αλκοόλη B στα 250 nm. Η καταγραφή και η ολοκλήρωση των κορυφών των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογισμικό Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία).

Πίνακας 4.6. Οι συγκεντρώσεις των αλκοολών A, B και C που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς.

	Συγκέντρωση A (mg/L)	Συγκέντρωση B (mg/L)	Συγκέντρωση C (mg/L)
1	10	1	5
2	50	5	10
3	100	10	25
4	200	20	40
5	250	25	50
6	500	40	60

4.5.3. Εφαρμογή των καμπυλών αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό των εστέρων

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των εστέρων στα αρχικά τους διαλύματα έγινε χημική υδρόλυση τους με καυστικό νάτριο (NaOH) 0.3 M και μέτρηση της απελευθέρωσης αλκοόλης με HPLC. Η χημική υδρόλυση των εστέρων πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- i. Λαμβάνονται 20 μL από κάθε εστέρα και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε τρία erpendorf του 1.5 mL με ομαλή διοχέτευση αέρα.
- ii. Προστίθενται 500 μL ΡΔ φωσφορικών pH 6 σε κάθε erpendorf και αναδεύονται έντονα σε Vortex μέχρι πλήρους διαλύσεως των εστέρων.
- iii. Από τα 500 μL λαμβάνονται 250 μL και τοποθετούνται σε τρία νέα erpendorf τα οποία θα αποτελέσουν τα τυφλά δείγματα (controls).
- iv. Στα erpendorf όπου θα γίνει η χημική υδρόλυση προστίθενται 250 μL NaOH 0.3 M ενώ στα τυφλά προστίθενται 250 μL ΡΔ φωσφορικών.
- v. Όλα τα erpendorf επωάζονται σε Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία) σε θερμοκρασία 30 °C υπό ήπια ανάδευση για 15 min. Σκοπός είναι η πλήρης υδρόλυση των εστέρων.
- vi. Οι αντιδράσεις και τα τυφλά μετρώνται με HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της απελευθέρωσης των αλκοολών με διαλύτη έκλουσης μεθανόλη: νερό 7:3 (v/v), ροή 0.4 mL/min ενώ ο ανιχνευτής UV ρυθμίζεται

στα 220 nm για τις αλκοόλες A και C και τους αντίστοιχους εστέρες τους και στα 250 nm για την αλκοόλη B και τον εστέρα της.

- vii. Η ολοκλήρωση των κορυφών γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία).

Αφού προσδιοριστεί η σχέση μεταβολής των επιφανειών των κορυφών του χρωματογραφήματος μεταξύ εστέρα και αλκοόλης, στη συνέχεια με χρήση των καμπυλών αναφοράς που έχουν ήδη κατασκευαστεί και τις κατάλληλες αναγωγές προσδιορίζεται η συγκέντρωση του εστέρα στο αρχικό του διάλυμα.

4.5.4. Ενζυμική υδρόλυση των φαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος

Υπολογίζονται οι ποσότητες που πρέπει να ληφθούν από τα αρχικά διαλύματα των εστέρων για την επίτευξη των επιθυμητών συγκεντρώσεων σε αντιδράσεις των 500 μL για τα κινητικά πειράματα.

- i. Αρχικά λαμβάνονται οι κατάλληλες ποσότητες του εστέρα και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε erpendorf του 1.5 mL με ομαλή διοχέτευση αέρα.
- ii. Προστίθενται 470 μL ΡΔ φωσφορικών pH 6 και ακολουθεί έντονη ανάδευση σε Vortex μέχρι ο εστέρας να διαλυθεί πλήρως.
- iii. Στη συνέχεια, λαμβάνονται 235 μL και τοποθετούνται σε νέα erpendorf τα οποία θα αποτελέσουν τα τυφλά δείγματα (controls).
- iv. Στα erpendorf όπου θα γίνει η ενζυμική υδρόλυση προστίθενται 15 μL ενζύμου StGE2 (αραιωμένο 10 φορές για τους εστέρες των αλκοολών A και B, και 4 φορές για τον εστέρα της αλκοόλης C) ενώ στα τυφλά προστίθενται 15 μL ΡΔ φωσφορικών.
- v. Όλα τα erpendorf επάζονται σε Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία) σε θερμοκρασία 50 °C υπό ανάδευση (750 rpm) για 30 min.
- vi. Ο τερματισμός των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με παγόλουτρο για τον εστέρα της αλκοόλης A, με 50 μL πυκνού CH_3COOH για τον εστέρα της αλκοόλης B και με 50 μL HCl 6 M για τον εστέρα της αλκοόλης C. Δοκιμή τερματισμού της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε και με βρασμό των δειγμάτων για 7 min.

- vii. Οι αντιδράσεις και τα τυφλά μετρώνται με HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της απελευθέρωσης των αλκοολών με διαλύτη έκλυσης μεθανόλη : νερό 7:3 (v/v), ροή 0.4 mL/ min ενώ ο ανιχνευτής UV ρυθμίζεται στα 220 nm για τις αλκοόλες A και C και τους αντίστοιχους εστέρες τους και στα 250 nm για την αλκοόλη B και τον εστέρα της.
- viii. Η ολοκλήρωση των κορυφών γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία).

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την υδρόλυση των φαινυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος, υπολογίστηκαν οι σταθερές Michaelis-Menten K_m και k_{cat} , καθώς και ο λόγος k_{cat} / K_m ο οποίος αποτελεί ένδειξη για την προτίμηση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα. Η προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση Michaelis-Menten έγινε με την εφαρμογή DataAnalysis της Data Evaluation Systems (Evan Kantrowitz).

4.6. Απομόνωση 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος από γλυκουρονοξυλάνη σημύδας

4.6.1. Σκοπός

Σκοπός αυτής της παραγράφου είναι η περιγραφή της απομόνωσης 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος από 2 g ξυλάνης σημύδας (birch) η οποία έχει προηγουμένως επεξεργαστεί με ενδοξυλανάσες. Οι ξυλοολιγοσακχαρίτες, προϊόντα της υδρόλυσης της ξυλάνης από ενδοξυλανάση της οικογένειας 11, λαμβάνονται σε λυοφιλιωμένη μορφή. Ο διαχωρισμός όξινων και ουδέτερων ξυλοολιγοσακχαριτών πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ιοντο-ανταλλαγής, η περαιτέρω επεξεργασία των όξινων ολιγοσακχαριτών έγινε με τα ένζυμα α -γλυκουρονοζιδάση (Megazyme) και Cellic[®] HTec2 (Novozymes) και ο τελικός διαχωρισμός με παρασκευαστική χρωματογραφία (Preparative Layer Chromatography, PLC).

4.6.2. Διαχωρισμός ουδέτερων και όξινων ολιγοσακχαριτών από το υδρόλυμα της γλυκουρονοξυλάνης σημύδας

Κατά τη δράση των ενδοξυλανασών, η κύρια αλυσίδα της ξυλάνης προσβάλλεται σε τυχαία σημεία με αποτέλεσμα την παραγωγή ποικίλα

υποκατεστημένων ξυλοολιγοσακχαριτών. Το ενδιαφέρον εστιάζεται στους όξινους ολιγοσακχαρίτες που προέρχονται από την υδρόλυση της 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονοξυλάνης και έχουν ως υποκαταστάτη το 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικό οξύ. Το δείγμα το οποίο περιέχει τους ζητούμενους ξυλοολιγοσακχαρίτες λαμβάνεται λυοφιλωμένο και προστίθεται σε αυτό 10 mL υπερκαθαρού νερού προκειμένου να επαναδιαλυθεί.

Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ιοντο-ανταλλαγής με τη βοήθεια στήλης χρωματογραφίας (27 x 2.5 cm) και στατική φάση τη ρητίνη AG 1x2 της BioRad Laboratories. Η στήλη ήταν συνδεδεμένη με περισταλτική αντλία Econo Gradient, BioRad (H.Π.Α.). Αφού η στήλη εξισορροπήθηκε με υπερκαθαρό νερό το δείγμα εκλούστηκε χρησιμοποιώντας διαδικασία καθαρισμού δύο σταδίων. Αρχικά το δείγμα φορτώνεται στη στήλη και η ρητίνη ξεπλένεται με ροή 2.5 mL/ min υπερκαθαρού νερού μέχρι να εκλουστούν όλοι οι ουδέτεροι ολιγοσακχαρίτες. Ο έλεγχος έγινε με λήψη κλασμάτων σε falcon των 50 mL και χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Στη συνέχεια, οι όξινοι ολιγοσακχαρίτες εκλούνται με διάλυμα οξικού αμμωνίου 3 M. Κλάσματα συλλέγονται κάθε 20 min με ροή 2.0 mL/ min και αναλύονται με TLC για τον προσδιορισμό των όξινων ολιγοσακχαριτών. Τα κλάσματα που περιέχουν τους ζητούμενους ξυλοολιγοσακχαρίτες συγκεντρώνονται και ξηραίνονται υπό κατάψυξη (freeze drying).



Σχήμα 4.16. (α) Στήλη ιοντο-ανταλλαγής, (β) Σύστημα απομόνωσης όξινων ξυλοολιγοσακχαριτών

4.6.3. Ενζυμική επεξεργασία των όξινων ξυλοολιγοσακχαριτών

Το λυοφιλιωμένο δείγμα το οποίο περιέχει τους όξινους ξυλοολιγοσακχαρίτες επαναδιαλύεται σε 50 mL διαλύματος οξικού αμμωνίου ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 20 mM και τοποθετείται σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 250 mL. Στη σφαιρική φιάλη προστίθενται επίσης 0.5 mL ενζύμου Cellic HTec2 (Novozymes) και 0.5 mL α-γλυκουρονοζιδάσης (Megazyme). Η αντίδραση αφήνεται 12 h σε αναδεδυόμενο επωαστήρα Orbital incubator S150, (Stuart Scientific, M. Βρετανία) σε θερμοκρασία 50 °C και ανάδευση 150 rpm. Μετά το πέρας των 12 h, στην αντίδραση προστίθεται επιπλέον 0.1 mL α-γλυκουρονοζιδάσης, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 70 °C και αφήνεται στον επωαστήρα για ακόμα 4 h. Επιπλέον το pH αυξάνεται στο 6.4 με την προσθήκη καυστικού νατρίου.

Η ύπαρξη MeGlcA στο διάλυμα της αντίδρασης ελέγχεται με TLC όπου φορτώνονται 3 μL πρότυπου διαλύματος D-γλυκουρονικού οξέος 20 mM, 3 μL του δείγματος που περιέχει τους όξινους ξυλοολιγοσακχαρίτες πριν την υδρόλυση και 3 μL του διαλύματος της αντίδρασης. Το διάλυμα της αντίδρασης στη συνέχεια ξηράνθηκε υπό κατάψυξη.

4.6.4. Καθαρισμός του MeGlcA από ουδέτερους ολιγοσακχαρίτες και ουδέτερα σάκχαρα

Το ξηρό διάλυμα της αντίδρασης επαναδιαλύεται σε 10 mL υπερκαθαρού νερού και φορτώνεται σε στήλη όμοια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό ουδέτερων και όξινων ολιγοσακχαριτών από το υδρόλυμα της γλυκουρονοξυλάνης σημύδας και περιγράφεται στην παράγραφο 4.6.2. Τα κλάσματα τα οποία περιέχουν MeGlcA συγκεντρώνονται, ξηραίνονται υπό κατάψυξη και οδηγούνται σε επιπλέον καθαρισμό.

Ο επιπλέον καθαρισμός πραγματοποιείται πάλι με χρωματογραφία ιοντο-ανταλλαγής με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται μικρότερη στήλη των 10 mL και η έκλυση γίνεται με βαθμίδωση της συγκέντρωσης του διαλύτη $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (από 0 σε 3 M) και ροή 2 mL/ min . Η συλλογή των κλασμάτων όγκου 2 mL/ σωλήνα γίνεται με τη βοήθεια κλασματοσυλλέκτη Waters, Millipore (Η.Π.Α.). Τα κλάσματα τα οποία περιέχουν το MeGlcA προσδιορίζονται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, συγκεντρώνονται και ξηραίνονται υπό κατάψυξη.

4.6.5. Απομόνωση του MeGlcA με παρασκευαστική χρωματογραφία στοιβάδας (Preparative Layer Chromatography, PLC)

Η τελική απομόνωση του MeGlcA πραγματοποιείται με παρασκευαστική χρωματογραφία στοιβάδας (PLC) με υάλινες πλάκες PLC Silica gel 60 0.5 mm (Merck) και διαλύτη ανάπτυξης οξικό αιθυλεστέρα: οξικό οξύ: 1-προπανόλη: φορμικό οξύ: νερό (25:10:5:1:15). Αρχικά προετοιμάζεται η πλάκα PLC (20 x 20 cm) χαράσσοντας την γραμμή βάσης σε απόσταση 2 cm από την κάτω πλευρά της πλάκας και παρασκευάζεται ο διαλύτης ανάπτυξης. Το λυοφιλωμένο δείγμα MeGlcA το οποίο προέκυψε από τον τελευταίο καθαρισμό επαναδιαλύεται σε ποσότητα – κατάλληλη για την πλήρη παραλαβή του – υπερκαθαρού νερού. Στη συνέχεια το δείγμα φορτώνεται προσεκτικά με τη βοήθεια μικροπιπέτας κατά μήκος της γραμμής βάσης η οποία έχει ήδη χαραχτεί στην πλάκα PLC. Ομοίως με την διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τις αναλύσεις TLC, η πλάκα βυθίζεται στο διαλύτη ανάπτυξης σε ειδικό βάζο προκειμένου να ξεκινήσει ο διαχωρισμός.

Μετά από περίπου 3 h και αφού διαπιστώνεται ότι ο διαλύτης ανάπτυξης απέχει 1-2 cm από την πάνω πλευρά της πλάκας, αυτή αφαιρείται και αφήνεται στον απαγωγό έως ότου εξατμιστεί πλήρως ο διαλύτης. Για τον προσδιορισμό της θέσης καθενός από τα συστατικά του δείγματος η πλάκα PLC τοποθετείται σε συσκευή φωτογράφισης σε κλειστό θάλαμο InGenius BioImaging, Syngene (M. Βρετανία) υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Προσδιορίζονται τέσσερις ζώνες, οι οποίες λαμβάνονται με απόξεση του υλικού επίστρωσης των πλακών (Silica gel), τοποθετούνται ξεχωριστά σε υάλινα φιαλίδια (vials) και ακολουθεί εκχύλιση για την παραλαβή των συστατικών.

Η εκχύλιση των ζωνών που ελήφθησαν πραγματοποιείται με 4x5 mL υπερκαθαρό νερό υπό μαγνητική ανάδευση. Τα εκχυλίσματα των ζωνών ελέγχονται με TLC για τον προσδιορισμό της σύστασής τους και κατόπιν, αφού τοποθετηθούν σε προζυγισμένα υάλινα φιαλίδια, ξηραίνονται υπό κατάψυξη σε συσκευή εξάχνωσης υπό κενό Christ L-1 (Christ, Γερμανία).

4.7. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)

4.7.1. Εισαγωγή

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) ακολουθεί τις βασικές αρχές της χρωματογραφίας περιλαμβάνοντας τη χρήση μιας λεπτής ροφητικής στοιβάδας, πάχους συνήθως 0.10 με 0.25 mm ως στατική φάση. Η στατική φάση επιστρώνεται με κατάλληλο τρόπο επάνω σε γυαλί, πλαστικό ή αλουμίνιο που αποτελούν το φορέα επίστρωσης. Το γυαλί είναι το δημοφιλέστερο από τα τρία αλλά με το αλουμίνιο και το πλαστικό να προσφέρουν το πλεονέκτημα της ελαστικότητας και του εύκολου κοψίματος χωρίς απώλειες και καταστροφή της επίστρωσης (Wall P.E., 2005). Ως υλικά επίστρωσης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διοξείδιο του πυριτίου (Silica gel), τριοξείδιο του αργιλίου (Alumina), κυτταρίνη σε μορφή σκόνης ή ακόμα και ρητίνες με όξινες ή βασικές ομάδες. Τα υλικά αυτά είναι συνήθως αναμεμιγμένα με μικρή ποσότητα γύψου (10-15%) για καλύτερη προσκόλληση πάνω στο φορέα επίστρωσης. Για τον διαχωρισμό σχετικώς μη πολικών μορίων όπως, υδρογονανθράκων, αιθέρων, αλδευδών, κετονών κ.α. ως υλικό επίστρωσης προτιμάται η Alumina, ενώ για τον διαχωρισμό περισσότερο πολικών μορίων όπως, αλκοολών, οξέων, αμινών, κ.α., η Silica gel. Ως διαλύτη ανάπτυξης (κινητή φάση) χρησιμοποιούνται διαλύτες (εξάνιο, τολουόλιο, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη κ.ά.) ή μίγματα διαλυτών (Κορδοπάτης Π. & Μαγκαφά Β., 2005).

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αποτελεί μια γρήγορη και απλή μέθοδο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τεχνική καθοδήγησης για:

- τον έλεγχο της καθαρότητας μιας ενώσεως (εμφάνιση μιας ή περισσότερων κηλίδων σε διαφορετικά χρωματογραφήματα με διαφορετικούς διαλύτες ανάπτυξης) ή της πολυπλοκότητας ενός μίγματος
- τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των εφαρμοζομένων μεθόδων διαχωρισμού και καθαρισμού μιας ενώσεως
- τον καθορισμό των ιδανικών συνθηκών για τον καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος σε μεγάλη κλίμακα (π.χ. με υγρή χρωματογραφία στήλης)

- την ποιοτική μελέτη της πορείας μιας χημικής αντίδρασης και τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών πραγματοποίησής αυτής
- για την ταυτοποίηση φαρμάκων, εκχυλισμάτων φυτών και βιοχημικών παρασκευασμάτων ή για την ανίχνευση νοθειών και μολύνσεων τροφίμων

4.7.2. Εφαρμογή και ανίχνευση των κηλίδων στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Η διαδικασία εφαρμογής της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας έχει ως εξής:

- i. Αρχικά τα φύλλα TLC Silica gel 60 F₂₅₄ Merck (Γερμανία) κόβονται στις επιθυμητές διαστάσεις ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να φορτωθούν.
- ii. Στη συνέχεια, με ένα μολύβι, χαράσσεται η γραμμή βάσης (base line) σε απόσταση 1 cm από τη κάτω πλευρά της πλάκας TLC και σημειώνονται οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων οι οποίες πρέπει να απέχουν περίπου 1-1.5 cm μεταξύ τους αλλά και από τα άκρα.
- iii. Σε ειδικό βάζο ανάπτυξης TLC προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύτη έτσι ώστε όταν τοποθετηθεί η πλάκα TLC σε αυτό, η στάθμη του διαλύτη να είναι αρκετά πιο κάτω από την γραμμή βάσης. Το βάζο κλείνεται με καπάκι και αφήνεται μέχρι ο χώρος μέσα σε αυτό να κορεστεί σε ατμούς του διαλύτη. Σε αυτό μπορεί να βοηθήσει η προσθήκη ενός φύλλου διηθητικού χαρτιού το οποίο θα εφάπτεται στα τοιχώματα.
- iv. Τα δείγματα φορτώνονται στις προσημειωμένες θέσεις προσέχοντας η διάμετρος της κηλίδας που σχηματίζεται να είναι όσον το δυνατό μικρότερη. Το φύλλο TLC βυθίζεται ομοιόμορφα στον διαλύτη του βάζου και αφήνεται να ανέβει ο διαλύτης χάριν στις τριχοειδείς δυνάμεις.
- v. Τέλος, όταν ο διαλύτης έχει φτάσει σε ύψος 1 cm περίπου κάτω από το τέλος του φύλλου, αυτό αφαιρείται και σημειώνεται με μια γραμμή το ύψος που έφτασε ο διαλύτης. Αφού εξατμιστεί ο διαλύτης από το φύλλο TLC ακολουθεί η ανίχνευση των κηλίδων.

Για την ανίχνευση και οπτικοποίηση των κηλίδων των δειγμάτων χρησιμοποιούνται:

1. **Φυσικές μέθοδοι**, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (χρησιμοποιούνται ειδικές πλάκες φθορίζουσες στο υπεριώδες φως οπότε στις θέσεις όπου υπάρχει ουσία η οποία απορροφά εμφανίζονται σκούρες κηλίδες) .
2. **Χημικές μέθοδοι**, όπως ο ψεκασμός με ειδικά αντιδραστήρια, όταν οι ουσίες οι οποίες χρωματογραφούνται μπορούν να δώσουν έγχρωμα παράγωγα με τα αντιδραστήρια αυτά και η έκθεση σε χώρο ο οποίος περιέχει ατμούς ενός αερίου αντιδραστηρίου, π.χ. NH_3 , I_2 , H_2S .

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της διαδικασίας απομόνωσης του MeGlcA, για τον έλεγχο της προόδου των αντιδράσεων εστεροποίησης των φαινολικών αλκοολών με το D-γλυκουρονικό οξύ καθώς και της καθαρότητας των εστέρων μετά τα στάδια καθαρισμού τους και για την εύρεση κατάλληλων συνθηκών διαχωρισμού για εφαρμογή τους σε στήλη.

Οι διαλύτες ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας παρουσιάζονται στον πίνακα 4.7.

Πίνακας 4.7. Διαλύτες ανάπτυξης TLC

Διαλύτες ανάπτυξης TLC	Σύσταση
Διαλύτης για τον διαχωρισμό του MeGlcA	οξικός αιθυλεστέρας: οξικό οξύ: 1-προπανόλη: φορμικό οξύ: νερό (25:10:5:1:15)
Διαλύτης για τον διαχωρισμό των εστέρων από τις αντίστοιχες αλκοόλες τους	χλωροφόρμιο: μεθανόλη: νερό (65:15:2)

Η ανίχνευση των σακχάρων πραγματοποιείται με ένα διάλυμα συγκέντρωσης 6.5mM N-(1-Naphthyl)ethylenediamine Dihydrochloride σε μεθανόλη που περιέχει 3% θειικό οξύ (Bounias M., 1980). Το φύλλο TLC διαβρέχεται με τη βαφή και αφήνεται για περίπου 5-10 min στους 100 °C. Οι κηλίδες εμφανίζονται όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 4.8 σε λευκό υπόβαθρο το οποίο μπορεί να εμφανίζεται ελαφρά ροζ σε περιπτώσεις υπερβολικής ποσότητας βαφής ή θέρμανσης. Οι

χρωματικοί τόνοι μπορούν να διατηρηθούν σταθεροί μέχρι και ένα έτος εάν τα φύλλα καταψυχθούν ή για λίγες μέρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η δράση της βαφής οφείλεται σε αντιδράσεις αφυδρογόνωσης μεταξύ των N-υδρογόνων και των υδροξυλικών ομάδων των σακχάρων και των κυκλιτολών (cyclitols).

Πίνακας 4.8. Χρωματικές αντιδράσεις σακχαριτών μετά από ψεκασμό με βαφή N-(1-Naphthyl)ethylenediamine Dihydrochloride και θέρμανση στους 100 °C (Bounias M., 1980) .

Σάκχαρο	Χρόνος έναρξης εμφάνισης	Χρώμα μετά από 4 min
Δεοξυγλυκόζη	40 s	Γκρι-μπλε
Δεοξυριβόζη	50 s	Γκρι-μωβ
Σακχαρόζη	1 min 20 s	Ιώδες
Φρουκτόζη	1 min με 1 min 30 s	Κόκκινο-ιώδες
Μαλτόζη και τρεχαλόζη	1 min 15 s με 1 min 45 s	Ιώδες
Ριβόζη	1 min 35 s με 1 min 50 s	Μπλε με πράσινο-γκρι
Ραμνόζη	1 min 30 s με 2 min	Κόκκινο-κόκκινο βαθύ
Γλυκόζη	1 min 40 s με 3 min	Γκρι-ιώδες
Ασκορβικό οξύ	2 με 3 min	Καφέ-κοκκινωπό

Οι κηλίδες που οφείλονται στις φαινολικές αλκοόλες ή στους αντίστοιχους εστέρες τους με D-γλυκουρονικό οξύ ανιχνεύονται με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) στα 254 nm.

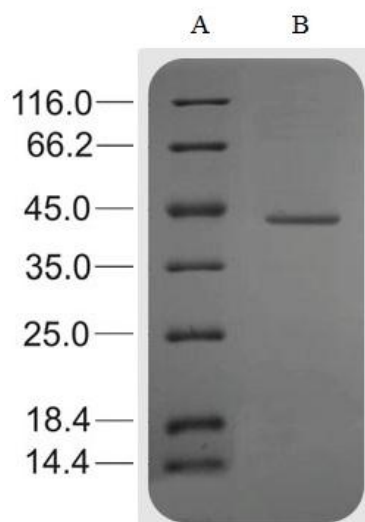
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 5. Παραγωγή και απομόνωση της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος StGE2

5.1. Παραγωγή και απομόνωση της StGE2

Για την παραγωγή της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος StGE2 αρχικά εμβολιάστηκαν τρυβλία με κύτταρα του μετασχηματισμένου στελέχους X33 της ζύμης *P.pastoris* και οι αποικίες που σχηματίστηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή προκαλλιεργειών. Οι προκαλλιεργείες επώαστηκαν για περίπου 20 h και στη συνέχεια τα κύτταρα της ζύμης παρέμειναν για επώαση στις κύριες καλλιέργειες για χρονικό διάστημα 5 ημερών σε θερμοκρασία 30 °C.

Η ανασυνδυασμένη εστεράση του γλυκουρονικού οξέος StGE2 απομονώθηκε από το υγρό καλλιέργειας με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Η παρασκευή τόσο των προκαλλιεργειών όσο και των κύριων καλλιέργειών καθώς και τα στάδια καθαρισμού και απομόνωσης περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 4.2. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, καθώς και ο βαθμός καθαρότητας που προέκυψε από τη διαδικασία καθαρισμού της, προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) με βαθμό πολυμερισμού 12.5%. Η εμφάνιση των ζωνών πραγματοποιήθηκε με χρώση Coomassie Brilliant Blue G-250. Όπως φαίνεται και από το σχήμα 5.1 το μοριακό βάρος της ανασυνδυασμένης εστεράσης StGE2 προσδιορίστηκε στα 43 kDa που είναι παρόμοιο με τη θεωρητική τιμή η οποία υπολογίστηκε με τη βοήθεια του εργαλείου ProtParam μέσω του διακομιστή ExPASy (42881 Da; Gasteiger et al., 2005) συνυπολογίζοντας την παρουσία του επιτόπου myc και της επισήμανσης πολυιστιδίνης (His-tag), η οποία συνεισφέρει 2.8 kDa στο συνολικό μοριακό βάρος της StGE2.



Σχήμα 5.1. SDS-PAGE της StGE2 του *S.thermophile*. Στήλες: (A) Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas), (B) StGE2 μετά από πλήρη καθαρισμό.

5.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της καθαρής StGE2

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της καθαρής StGE2 πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μήκος κύματος 280 nm σε φωτόμετρο UV-Vis με χρήση κυψελίδας από χαλαζία. Το μοριακό βάρος (M.W.) προσδιορίστηκε 43000 Da (παράγραφος 5.1.), η απορρόφηση του διαλύματος στα 280 nm ,αραιωμένου 3:100, 0.059 και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας ϵ (molar absorptivity) υπολογίζεται από το πρόγραμμα Protparam της ExPASy ίσος με $50795 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης μιας καθαρής πρωτεΐνης σε διάλυμα γίνεται με τη βοήθεια του παρακάτω μαθηματικού μοντέλου:

$$C_{mg/mL} = \frac{O \cdot D_{280 \text{ nm}} \cdot M \cdot W}{\epsilon}$$

Οπότε

$$C_{\frac{mg}{mL}} = \frac{0.059 \cdot 43000 \cdot \left(\frac{3}{100}\right)}{50795} = 1.665 \frac{mg}{mL}$$

Επομένως η συγκέντρωση της καθαρής StGE2 στο διάλυμα είναι 1.665 mg/ mL.

Κεφάλαιο 6. Ενζυμική σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση φαινυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος

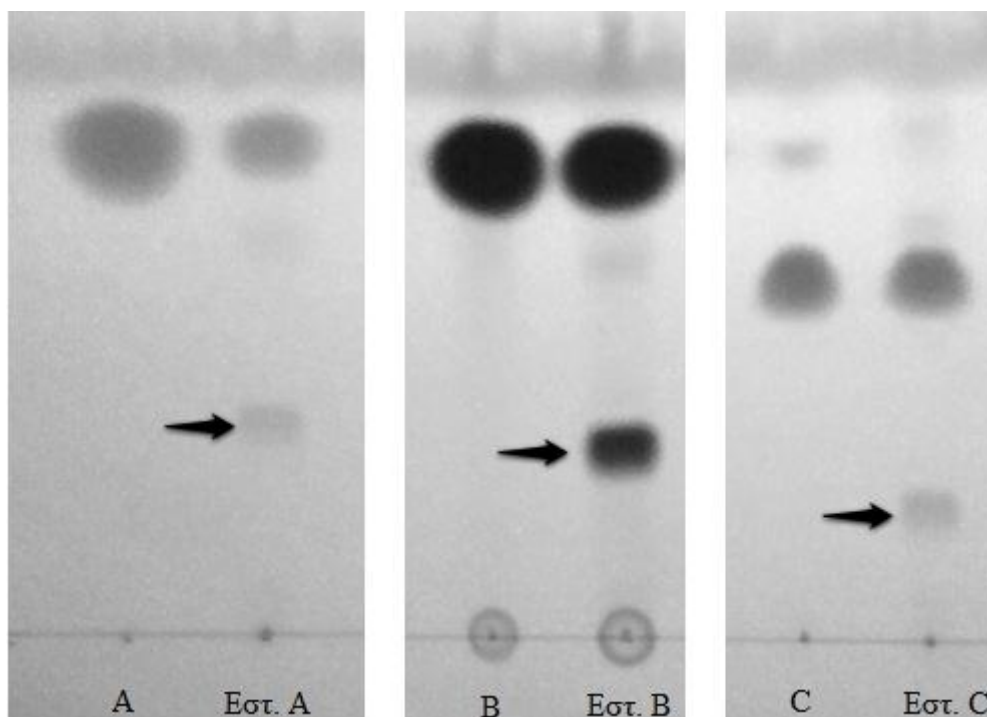
6.1. Παρουσία των φαινυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος στο διάλυμα της αντίδρασης

6.1.1 Ενζυμική σύνθεση

Η ενζυμική σύνθεση περιελάμβανε την σύνθεση τριών φαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος, οι οποίοι επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την κινητική μελέτη της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από τη ζύμη *S.thermophile* (StGE2). Πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις όγκου 50 mL σε οργανικό διαλύτη (τριτοταγής βουτανόλη) με χρήση του ενζύμου Novozym 435 (ακίνητοποιημένη λιπάση Β *C.antarctica*) σε θερμοκρασία 60 °C και ανάδευση 150 rpm για 48 h.

Οι εστέρες οι οποίοι συντέθηκαν είναι οι εξής: ο εστέρας της 3-φαινυλ-1-προπανόλης με D- γλυκουρονικού οξύ (Εστέρας Α), ο εστέρας της κινναμικής αλκοόλης με D-γλυκουρονικό οξύ (Εστέρας Β) και ο εστέρας της 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλης με D-γλυκουρονικό οξύ (Εστέρας C).

Ο προσδιορισμός της παρουσίας των εστέρων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε πλάκες αλουμινίου με επίστρωση silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Γερμανία), χρησιμοποιώντας διαλύτη ανάπτυξης μίγμα χλωροφορμίου: μεθανόλης: απιονισμένου νερού 65:15:2 (v/v/v). Η ανίχνευση και οπτικοποίηση των κηλίδων που οφείλονται στις φαινολικές αλκοόλες και στους αντίστοιχους εστέρες τους με D-γλυκουρονικό οξύ έγινε με τη βοήθεια λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) στα 254 nm.



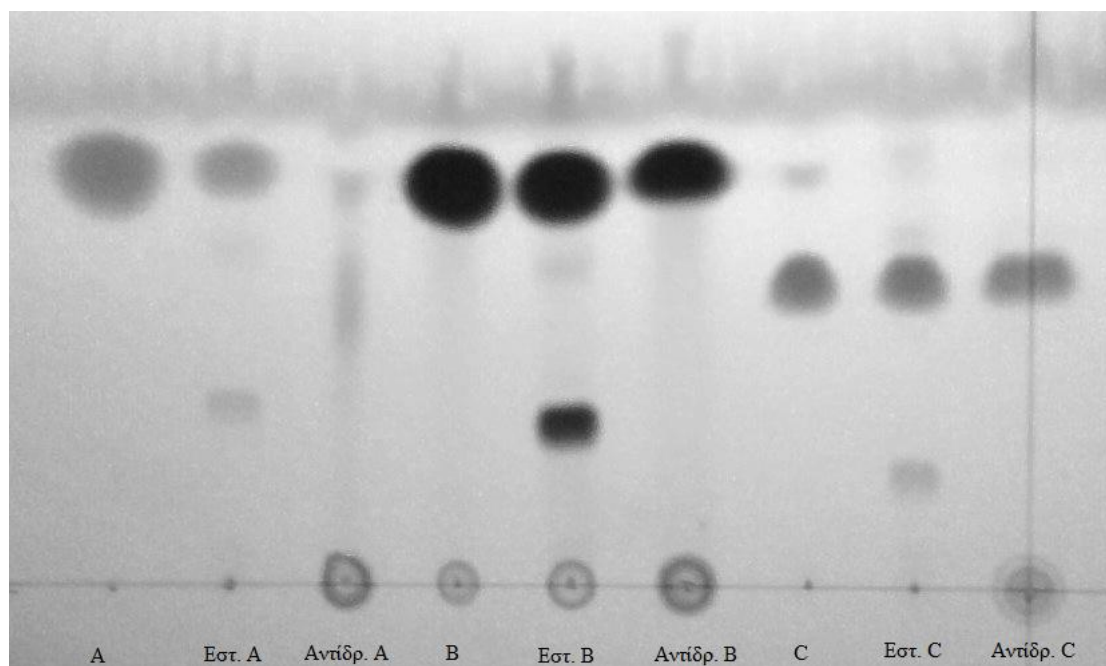
Σχήμα 6.1. TLC των διαλυμάτων των αντιδράσεων ενζυμικής σύνθεσης. Στα TLC παρατηρούνται οι φαινολικές αλκοόλες A, B και C (controls) καθώς και τα δείγματα των διαλυμάτων των αντιδράσεων Εστ. A, Εστ. B και Εστ. C. Με βέλη καταδεικνύεται το προϊόν της αντίδρασης.

Πρέπει να σημειωθεί ότι τα διαλύματα των αντιδράσεων μετά το πέρας του χρόνου της αντίδρασης και αφού επιβεβαιωθεί η παρουσία επιπλέον συστατικού εκτός αυτής των αντιδρώντων με TLC, υπόκεινται σε διήθηση, για την απομάκρυνση του ακινητοποιημένου ενζύμου και των μοριακών κοσκίνων, και εκχύλιση για την απομάκρυνση του D-γλυκουρονικού οξέος. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα εξατμίζονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα και οι εστέρες επαναδιαλύονται σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη (οξικός αιθυλεστέρας). Με βάση αυτά τα διαλύματα πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις χημικής και ενζυμικής υδρόλυσης που περιγράφονται στις παραγράφους 6.1.2 και 6.1.3 αντίστοιχα.

6.1.2 Χημική υδρόλυση των φαινυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος

Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι οι κηλίδες που βρίσκονται κάτω από αυτές των φαινολικών αλκοολών (Σχήμα 6.1), ανήκουν στους εστέρες A, B και C, πραγματοποιείται χημική υδρόλυση με καυστικό νάτριο σε αντιδράσεις του 1 mL. Πιο συγκεκριμένα σε erpendorf προστίθενται 500 μ L από το διάλυμα της αντίδρασης

και 500 μL NaOH 1 N. Για κάθε αντίδραση παρασκευάζεται και ένα τυφλό διάλυμα με απιονισμένο νερό αντί του NaOH και όλα μαζί τοποθετούνται σε thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία) σε θερμοκρασία 30 °C για 15 min υπό ανάδευση. Ακολουθεί χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για τον έλεγχο του αποτελέσματος των αντιδράσεων.



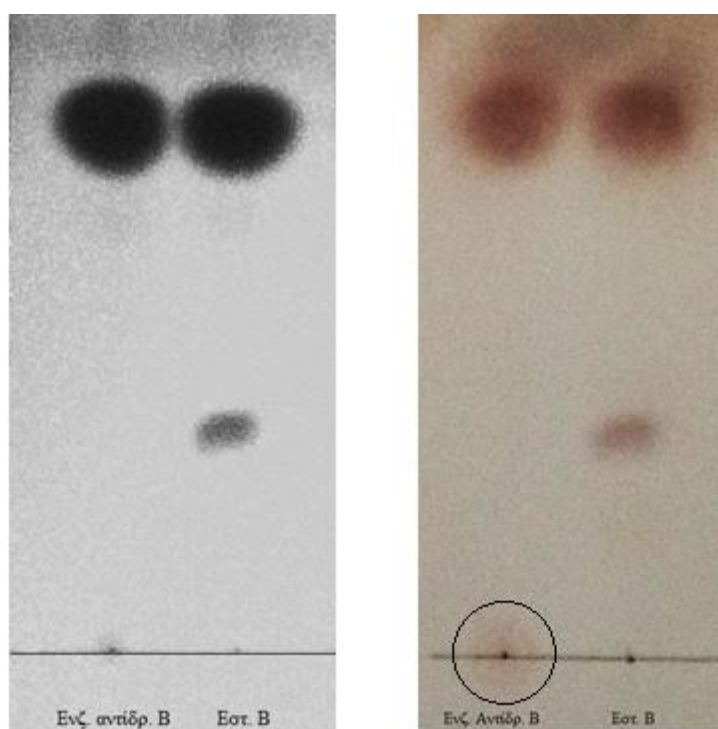
Σχήμα 6.2. TLC όπου εμφανίζονται οι φαινολικές αλκοόλες (A, B και C), τα τυφλά των αντιδράσεων χημικής υδρόλυσης με NaOH (Εστ. A, Εστ. B και Εστ. C) και οι αντιδράσεις χημικής υδρόλυσης με NaOH (Αντίδρ. A, Αντίδρ. B και Αντίδρ. C).

Στα αποτελέσματα της TLC (Σχήμα 6.2) η απουσία της κηλίδας του άγνωστου συστατικού οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για τον επιθυμητό εστέρα καθώς έχει επιτευχθεί η υδρόλυσή του. Το παραπάνω συμπέρασμα επιβεβαιώνεται και από την ταυτοποίηση του με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αφού έχει απομονωθεί πρώτα από το διάλυμα της αντίδρασης.

6.1.3 Ενζυμική υδρόλυση με χρήση StGE2

Πριν το στάδιο καθαρισμού των εστέρων πραγματοποιήθηκε δοκιμαστική, ενζυμική αυτή τη φορά, υδρόλυση του Εστέρα B με χρήση της γλυκουρονικής εστεράσης από τη ζύμη *S.thermophile* StGE2. Η αντίδραση πραγματοποιείται ως εξής: σε eppendorf προστίθενται 30 μL Εστέρα B και 30 μL ενζύμου συγκέντρωσης

1.665 mg/ mL. Σε δεύτερο erpendorf, το οποίο θα αποτελέσει το τυφλό, προστίθενται επίσης 30 μ L Εστέρα Β και 30 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Tris HCl 20 mM με pH: 8. Τα δύο erpendorf τοποθετούνται σε Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία) σε θερμοκρασία 50 °C για 1.5 h υπό ήπια ανάδευση. Με TLC (Σχήμα 6.3) προσδιορίζεται το αποτέλεσμα της ενζυμικής υδρόλυσης.



Σχήμα 6.3. TLC ενζυμικής υδρόλυσης του Εστέρα Β με χρήση StGE2. Αριστερά: ανίχνευση και οπτικοποίηση του TLC με υπεριώδη ακτινοβολία UV στα 254 nm. Η παρουσία μόνο της κηλίδας της αλκοόλης Β οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πραγματοποιήθηκε υδρόλυση του Εστέρα Β. Δεξιά: Οπτικοποίηση του TLC με βαφή (Bounias M., 1980). Παρατηρείται με καφέ χρώμα (κηλίδα σε κύκλο) η παρουσία γλυκουρονικού οξέος στη γραμμή βάσης

Από την οπτικοποίηση του TLC και με τις δύο μεθόδους – υπεριώδη ακτινοβολία και βαφή – φαίνεται ότι ο εστέρας αναγνωρίζεται από την εστεράση του γλυκουρονικού οξέος StGE2 και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα.

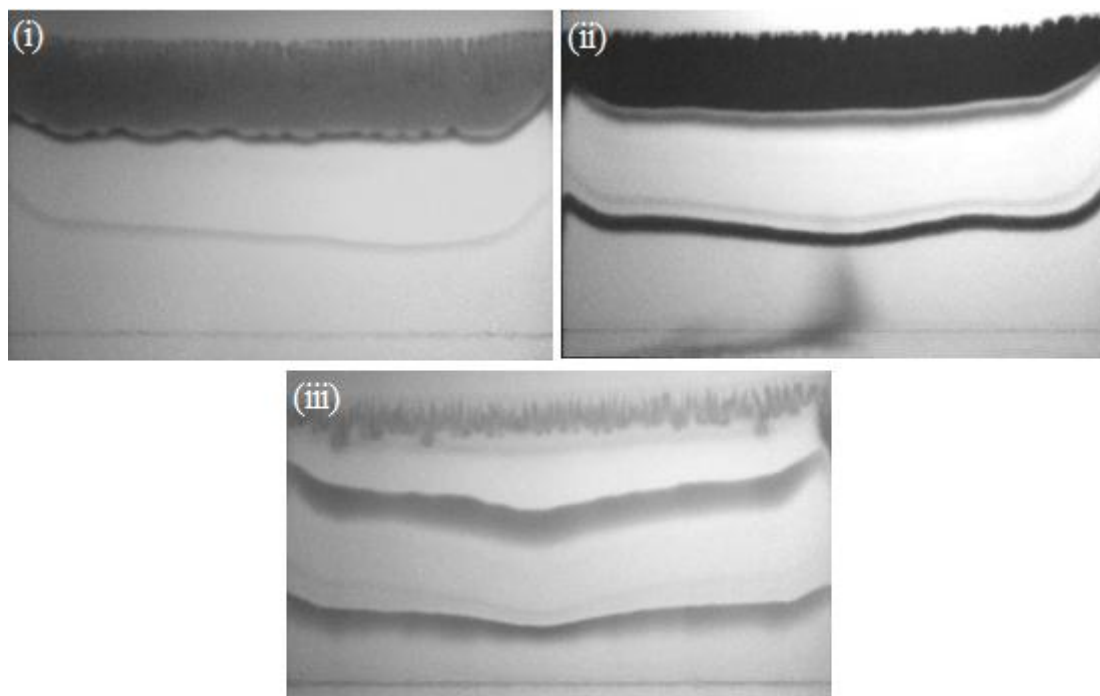
6.2 Απομόνωση των φαινυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος

6.2.1 Δοκιμή διαχωρισμού με χρήση Silica gel ως στατική φάση

Αρχικά πραγματοποιείται δοκιμή απομόνωσης των φαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος από αντιδράσεις εστεροποίησης των φαινολικών αλκοολών Α,

B και C με D-γλυκουρονικό οξύ, όγκου 5 mL, με χρήση του ενζύμου λιπάση Novozym 435 (ακίνητοποιημένη λιπάση *B Candida antarctica*) με τη βοήθεια πλακών TLC. Οι αντιδράσεις αυτές είναι πρόδρομος των αντιδράσεων που περιγράφονται στην παράγραφο 4.3.2 και αποτέλεσαν τη βάση για την πραγματοποίησή τους.

Τα διαλύματα των αντιδράσεων περνούν από τα πρώτα στάδια καθαρισμού τα οποία περιλαμβάνουν διήθηση και εκχύλιση, τα εκχυλίσματα εξατμίζονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα και επαναδιαλύονται σε οξικό αιθυλεστέρα και το δείγμα φορτώνεται κατά μήκος της γραμμής βάσης σε φύλλο TLC Silica gel 60 F₂₅₄. Ακολουθεί η ανάπτυξη του TLC με διαλύτη ανάπτυξης χλωροφόρμιο: μεθανόλη: νερό 65:15:2 (v/v/v). Η ανίχνευση των ζωνών που περιέχουν τον εστέρα πραγματοποιείται με υπεριώδη ακτινοβολία στα 254 nm. Με απόξεση του υλικού επιστρώσης στα σημεία όπου εμφανίζεται η ζώνη παραλαμβάνεται ο εστέρας μαζί με Silica gel και εκχυλίζεται με υπερκαθαρό νερό. Η καθαρότητα του εστέρα επιβεβαιώνεται με TLC.



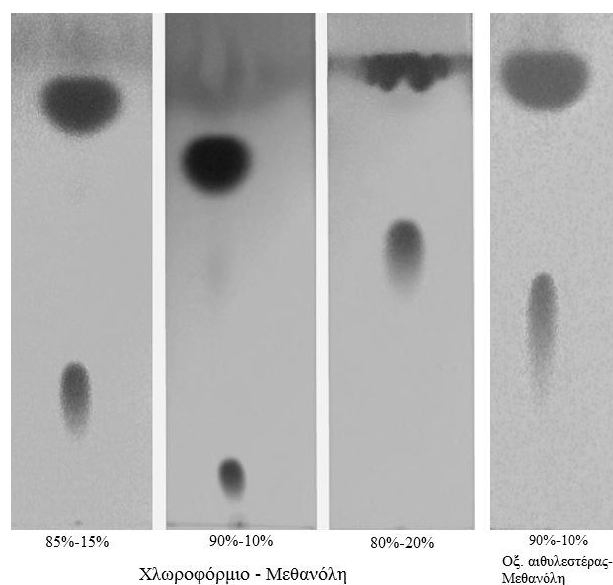
Σχήμα 6.4. (i) TLC για τον διαχωρισμό του Εστέρα A από την αλκοόλη A, (ii) TLC για τον διαχωρισμό του Εστέρα B από την αλκοόλη B, (iii) TLC για τον διαχωρισμό του Εστέρα C από την αλκοόλη C.

Στον διαχωρισμό με silica gel δεν χρησιμοποιείται νερό στο διαλύτη λόγω της δυσκολίας εξάτμισής του κατά την εξάτμιση των κλασμάτων αλλά και λόγω πιθανής υδρόλυσης του εστέρα.

6.2.2 Επιλογή διαλύτη έκλουσης για την απομόνωση των εστέρων με στήλη Silica gel

Για την απομόνωση των φαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος που παρασκευάστηκαν με τις μεγαλύτερες αντιδράσεις των 50 mL χρησιμοποιήθηκε στήλη πακεταρισμένη με Silica gel 60 (0.040-0.063 mm) και ως διαλύτης έκλουσης μίγμα οξικού αιθυλεστέρα: μεθανόλης 9:1 (v/v). Ο διαχωρισμός ελέγχθηκε ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).

Ο διαλύτης έκλουσης οξικός αιθυλεστέρας: μεθανόλη 9:1 (v/v) επιλέχθηκε μετά από δοκιμές αυτού και του διαλύτη χλωροφόρμιο: μεθανόλη σε αναλογίες 9:1 (v/v), 8.5:1.5 (v/v) και 8:2 (v/v). Η σύγκριση έγινε με βάση τη διαφορά των τιμών R_f μεταξύ εστέρα και αλκοόλης. Η τιμή του παράγοντα κατακράτησης R_f (Retention factor) χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της κίνησης των συστατικών κατά μήκος της πλάκας TLC και παίρνει τιμές μεταξύ 0 και 1. Ο προσδιορισμός της τιμής R_f πραγματοποιείται με διαίρεση της απόστασης που διένυσε το συστατικό προς την απόσταση που διένυσε ο διαλύτης.



Σχήμα 6.5. TLC για τον προσδιορισμό της αναλογίας των συστατικών διαλυτών έκλουσης για την επίτευξη του καλύτερου διαχωρισμού μεταξύ φαιθυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος και της αντίστοιχης φαινολικής αλκοόλης. Η δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με εστέρα και αλκοόλη Β.

Οι τιμές R_f καθώς και οι διαφορές τους παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1. Τιμές R_f της αλκοόλης και του εστέρα Β με χρήση των διαλυτών χλωροφόρμιο-μεθανόλη (80%-20%, 85%-15% & 90%-10%) και οξικός αιθυλεστέρας-μεθανόλη (90%-10%).

	Χλωροφόρμιο – Μεθανόλη			Οξικός αιθυλεστέρας - Μεθανόλη
	80% - 20%	85% - 15%	90% - 10%	(90% - 10%)
Αλκοόλη Β	0.61	0.31	0.12	0.48
Εστέρας Β	0.99	0.94	0.85	0.93
Διαφορά	0.38	0.63	0.73	0.45

Η καλύτερη αναλογία για τον διαλύτη χλωροφόρμιο-μεθανόλη είναι 80% - 20% καθώς έχει ικανοποιητική διαφορά των τιμών R_f μεταξύ εστέρα και αλκοόλης. Οι υπόλοιπες δύο αναλογίες απορρίπτονται καθώς εμφανίζουν αρκετά υψηλές διαφορές των τιμών R_f γεγονός το οποίο οδηγεί σε μεγάλους χρόνους διαχωρισμού. Ο διαλύτης οξικός αιθυλεστέρας-μεθανόλη εμφανίζει ικανοποιητική διαφορά R_f σε αναλογία 90%-10%.

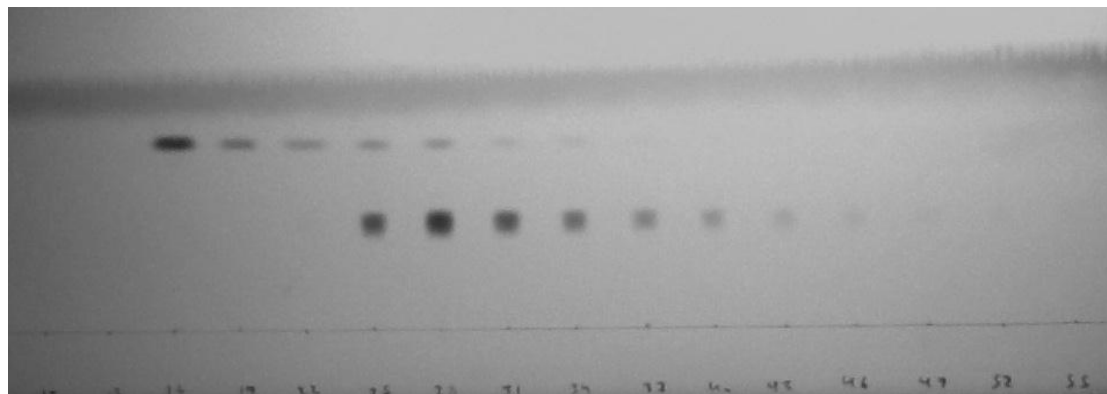
6.2.3 Επιλογή κλασμάτων που προέκυψαν από διαχωρισμό με στήλη *Silica gel* με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Η λήψη των κλασμάτων, τα οποία προέκυψαν κατά το διαχωρισμό, έγινε σε δοκιμαστικούς σωλήνες 13x120 mm σε περίπου 10 mL όγκο το κάθε κλάσμα. Τα κλάσματα που ελήφθησαν ελέγχθηκαν ποιοτικά για την ύπαρξη του εστέρα με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και διαλύτη ανάπτυξης μίγμα χλωροφορμίου: μεθανόλης: απιονισμένου νερού 65:15:2 (v/v/v).

6.2.3.i Κλάσματα από το διαχωρισμό του Εστέρα Α από την αλκοόλη Α

Τα κλάσματα τα οποία προέκυψαν από το διαχωρισμό του Εστέρα Α από την αλκοόλη Α με χρωματογραφική στήλη ελέγχθηκαν για την καθαρότητά τους με TLC. Η ανίχνευση έγινε με τη βοήθεια λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας στα 254 nm. Στη συνέχεια τα κλάσματα που περιέχουν τον Εστέρα Α (25-60, Σχήμα 6.6)

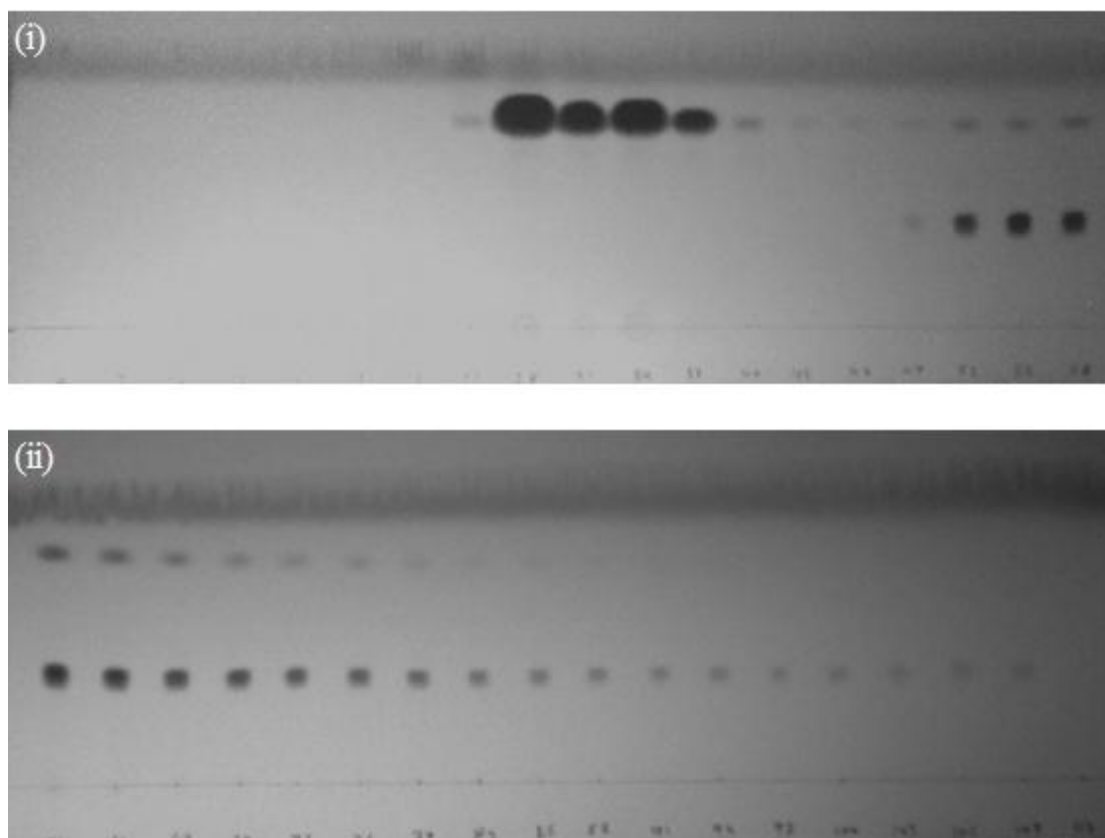
συγκεντρώνονται και εξατμίζονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα Rotavapor Buchi RE 111 (Buchi , Ελβετία). Το υπόλειμμα παραλαμβάνεται από τη σφαιρική φιάλη με κατάλληλη ποσότητα διχλωρομεθανίου και φυλάσσεται σε υάλινο φιαλίδιο.



Σχήμα 6.6. Έλεγχος της καθαρότητας κλασμάτων κατά τον διαχωρισμό Εστέρα Α από την αλκοόλη Α με TLC

6.2.3.ii Κλάσματα από το διαχωρισμό του Εστέρα Β από την αλκοόλη Β

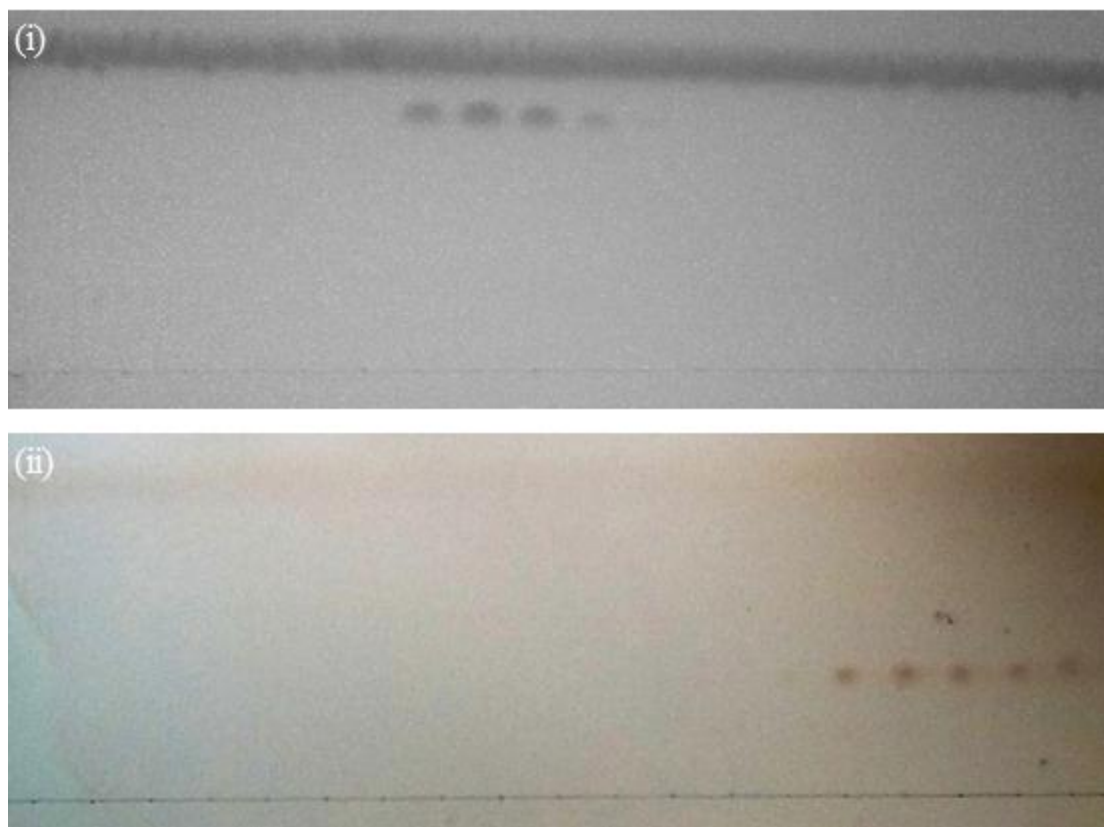
Τα κλάσματα τα οποία προέκυψαν από το διαχωρισμό του Εστέρα Β από την αλκοόλη Β με χρωματογραφική στήλη ελέγχθηκαν για την καθαρότητά τους με TLC. Η ανίχνευση έγινε με τη βοήθεια λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας στα 254 nm. Στη συνέχεια τα κλάσματα που περιέχουν τον Εστέρα Β (52-110, Σχήμα 6.7) συγκεντρώνονται και εξατμίζονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα Rotavapor Buchi RE 111 (Buchi , Ελβετία). Το υπόλειμμα παραλαμβάνεται από τη σφαιρική φιάλη με κατάλληλη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και φυλάσσεται σε υάλινο φιαλίδιο. Παρότι η μεγαλύτερη ποσότητα αλκοόλης φαίνεται να παραλαμβάνεται στα κλάσματα 28-37, παρατηρείται η παρουσία μικρής ποσότητας αλκοόλης για αρκετά κλάσματα μετά. Το γεγονός, πιθανώς, οφείλεται στη μεγάλη συγκέντρωση αλκοόλης με αποτέλεσμα τη δημιουργία «ουράς» κατά το διαχωρισμό.



Σχήμα 6.7. Έλεγχος της καθαρότητας κλάσμάτων κατά τον διαχωρισμό Εστέρα Β από την αλκοόλη Β με TLC: (i) Τα πρώτα 60 με λήψη δείγματος ανά τρία κλάσματα, (ii) 60 επιπλέον κλάσματα ελεγχόμενα με τον ίδιο τρόπο

6.2.3.iii Κλάσματα από το διαχωρισμό του Εστέρα C από την αλκοόλη C

Τα κλάσματα τα οποία προέκυψαν από το διαχωρισμό του Εστέρα C από την αλκοόλη C με χρωματογραφική στήλη ελέγχθηκαν για την καθαρότητά τους με TLC. Η ανίχνευση έγινε με τη βοήθεια λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας στα 254 nm και χρήση βαφής για την οπτικοποίηση των κηλίδων που οφείλονται στον Εστέρα C (καφέ χρώμα που οφείλεται στη χρώση του D-γλυκουρονικού οξέος) καθώς αυτές δεν έγιναν εμφανής με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Στη συνέχεια τα κλάσματα που περιέχουν τον Εστέρα C (46-58, Σχήμα 6.8), καθώς και 25 επιπλέον (επίσης περιέχουν Εστέρα C) συγκεντρώνονται και εξατμίζονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα Rotavapor Buchi RE 111 (Buchi, Ελβετία). Το υπόλειμμα παραλαμβάνεται από τη σφαιρική φιάλη με κατάλληλη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και φυλάσσεται σε υάλινο φιαλίδιο.

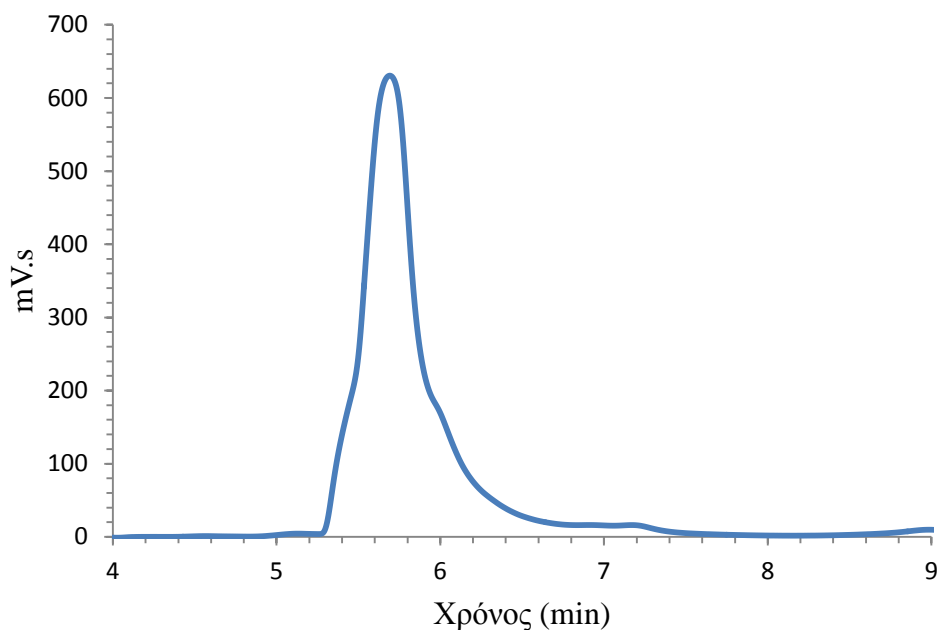


Σχήμα 6.8. Έλεγχος της καθαρότητας κλασμάτων κατά τον διαχωρισμό Εστέρα C από την αλκοόλη C με TLC: (i) Ανίχνευση των κηλίδων με UV στα 254 nm (22 – 31 τα κλάσματα που περιέχουν αλκοόλη C) (ii) Οπτικοποίηση των κηλίδων με βαφή. Με καφέ χρώμα εμφανίζονται οι κηλίδες του Εστέρα C (46 – 58).

6.2.4. Έλεγχος καθαρότητας των διαλυμάτων των εστέρων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

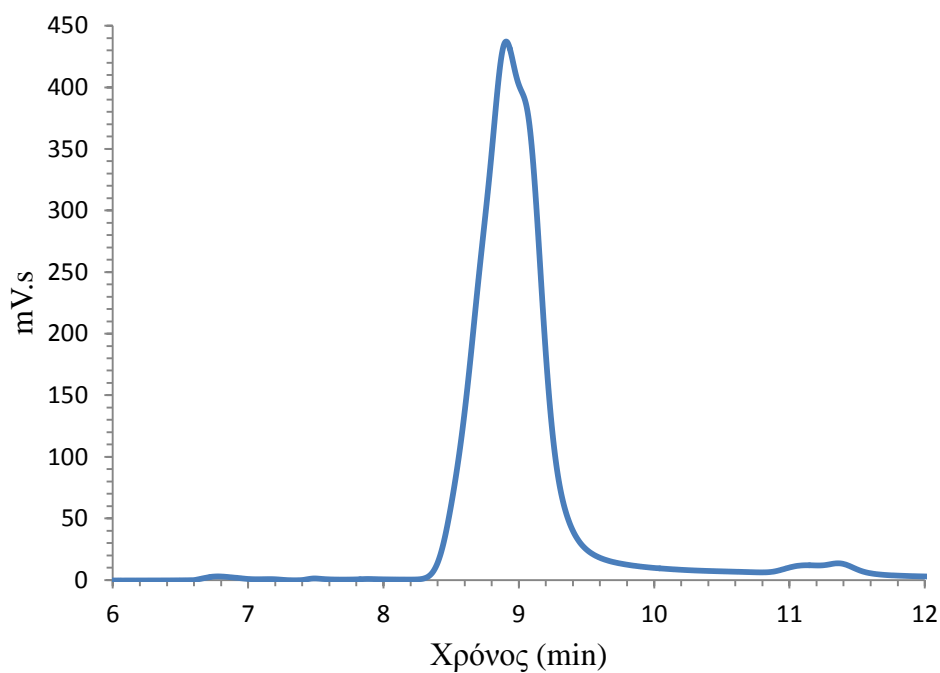
Ο τελικός έλεγχος της καθαρότητας των διαλυμάτων των εστέρων πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈ Nucleosil (250 mm x 4.6 mm, Macherey – Nagel, Γερμανία), ροή 0.7 mL/ min για τον εστέρα A η οποία μειώθηκε στα 0.4 mL/ min για τους εστέρες B και C λόγω αύξησης της πίεσης της στήλης και διαλύτη μίγμα CH₃OH:H₂O 7:3 (v/v) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ο Εστέρας A μετρήθηκε στα 220 nm με ροή 0.7 mL/ min και εμφάνισε κορυφή στο χρωματογράφημα στα 5.7 min (Σχήμα 6.9). Η απουσία άλλων κορυφών υποδεικνύει τον ικανοποιητικό διαχωρισμό που επιτεύχθηκε με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας προσρόφησης.



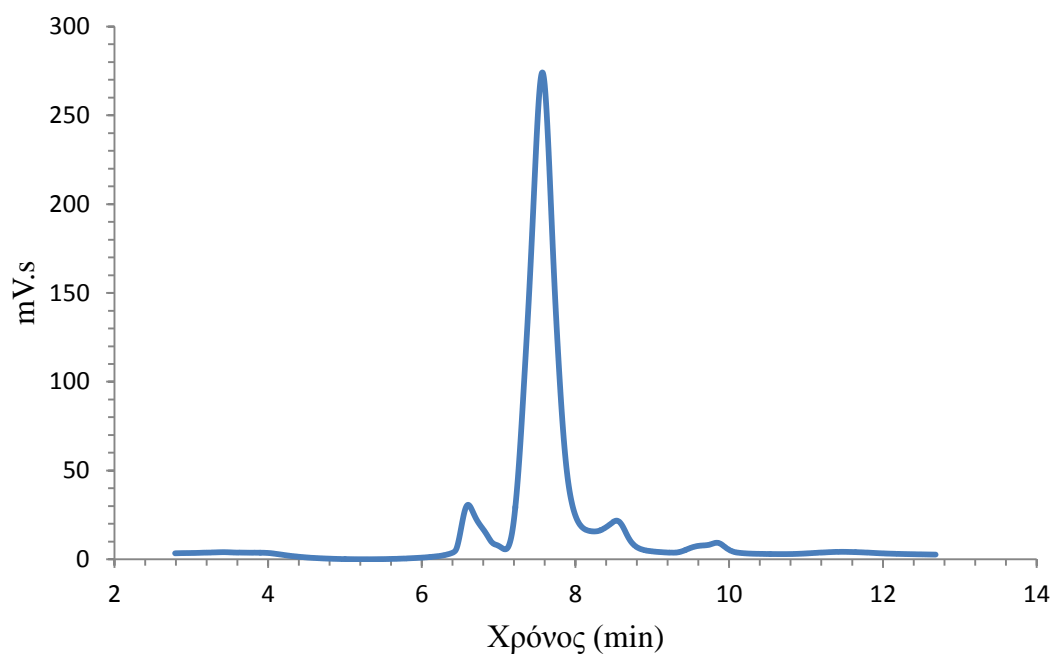
Σχήμα 6.9. Χρωματογράφημα διαλύματος Εστέρα Α με ροή 0.7 mL/ min στα 220 nm

Ο Εστέρας Β μετρήθηκε στα 250 nm με ροή 0.4 mL/ min και εμφάνισε κορυφή στο χρωματογράφημα στα 8.9 min (Σχήμα 6.10). Η απουσία άλλων κορυφών υποδεικνύει τον ικανοποιητικό διαχωρισμό που επιτεύχθηκε με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας προσρόφησης.



Σχήμα 6.10. Χρωματογράφημα διαλύματος Εστέρα Β με ροή 0.4 mL/ min στα 250 nm

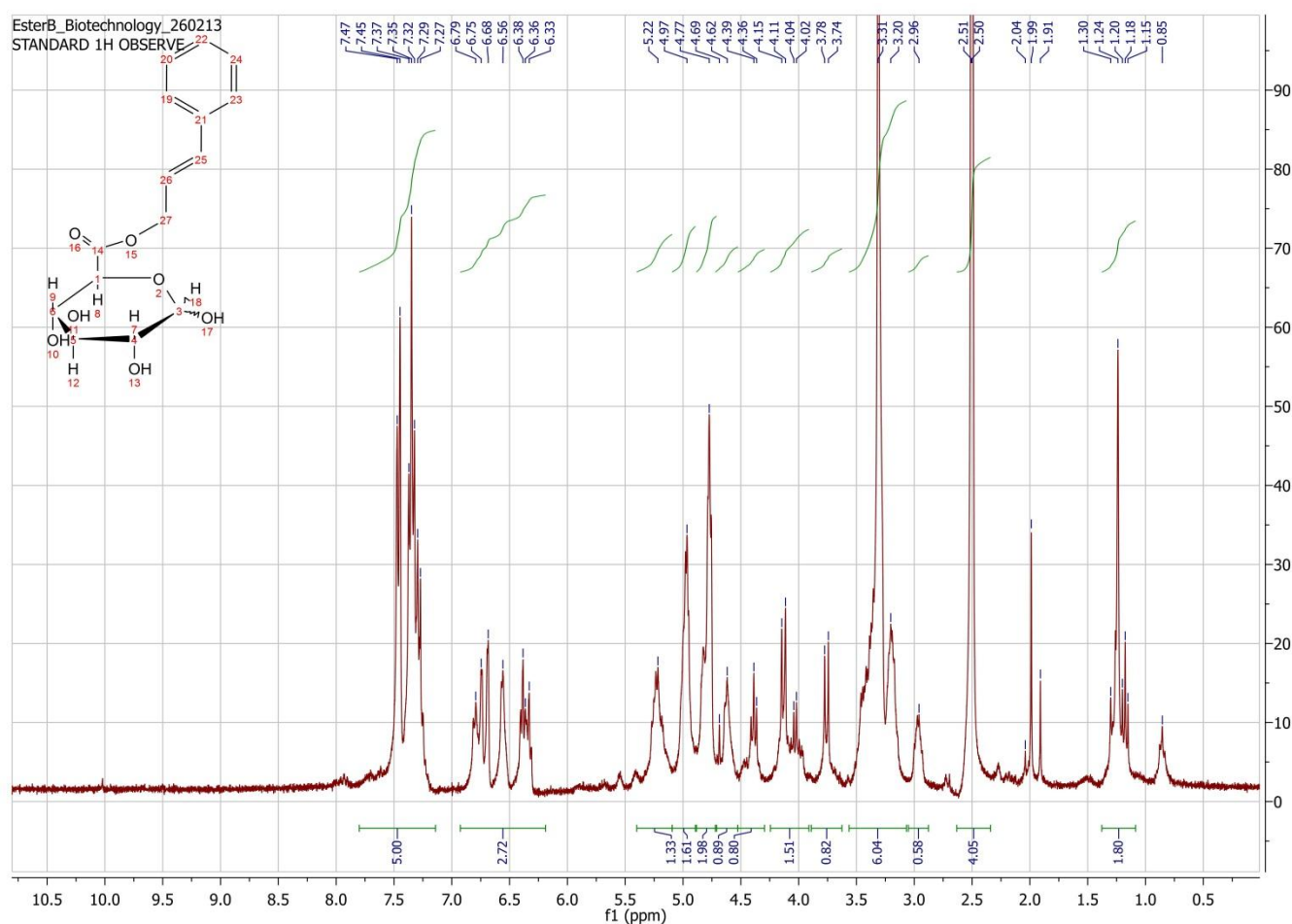
Ο Εστέρας C μετρήθηκε στα 220 nm με ροή 0.4 mL/ min και εμφάνισε κορυφή στο χρωματογράφημα στα 7.5 min (Σχήμα 6.11). Ο διαχωρισμός ο οποίος επιτεύχθηκε κρίνεται ικανοποιητικός καθώς οι κορυφές που εμφανίζονται έχουν σχεδόν αμελητέο ύψος σε σχέση με την κορυφή του εστέρα. Πιο συγκεκριμένα η κορυφή που βρίσκεται πριν από αυτή του εστέρα πιθανώς να οφείλεται σε ακαθαρσίες της στήλης ενώ αυτή αμέσως μετά στην αλκοόλη.



Σχήμα 6.11. Χρωματογράφημα διαλύματος Εστέρα C με ροή 0.4 mL/ min στα 220 nm

6.3. Ταυτοποίηση με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

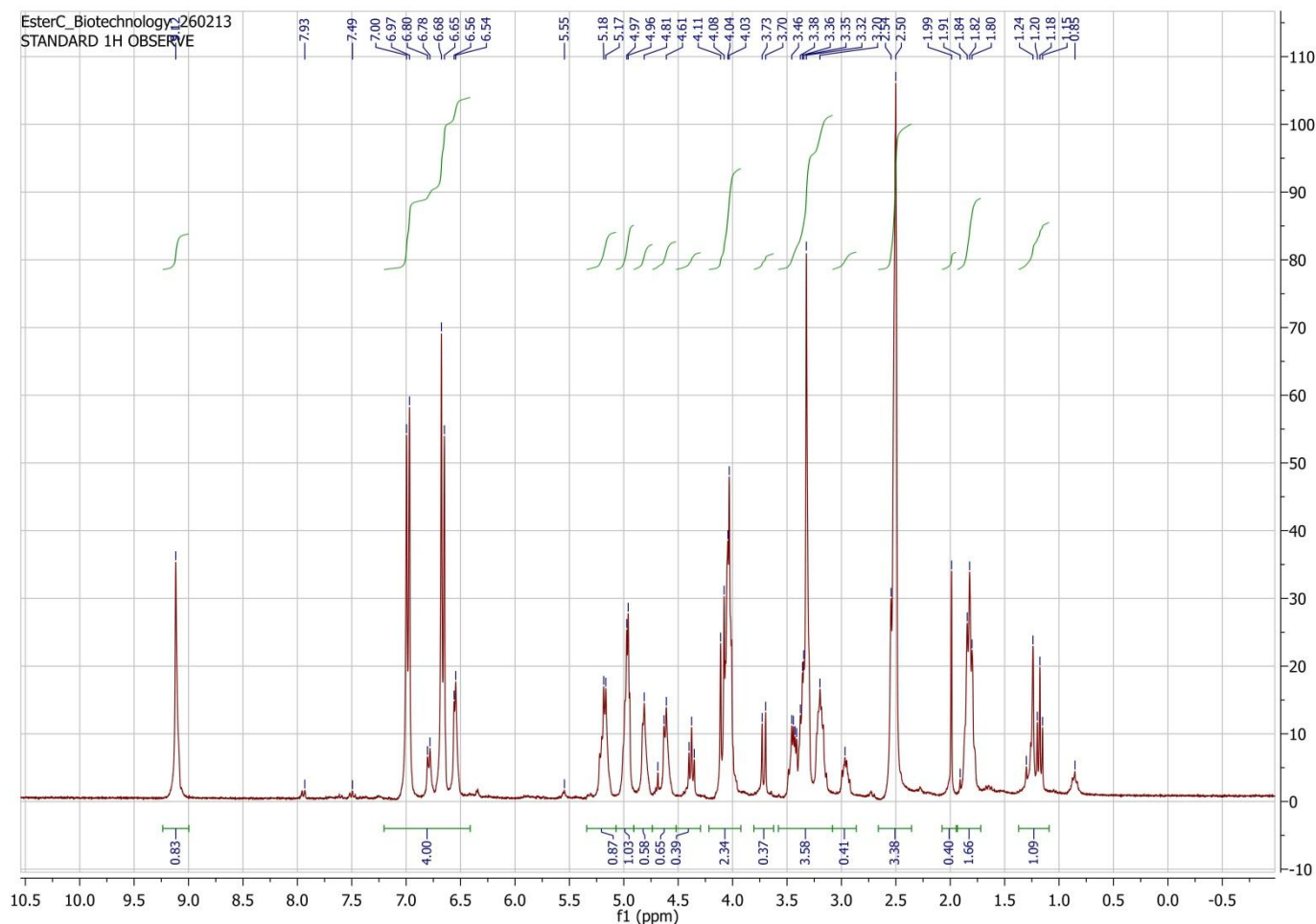
Ποσότητες οι οποίες περιέχουν περίπου 10 mg από κάθε εστέρα ξηραίνονται υπό την ομαλή ροή αέρα και στη συνέχεια επαναδιαλύονται σε κατάλληλο όγκο δευτεριωμένου DMSO και τοποθετούνται στα ειδικά σωληνάκια NMR. Κάθε σωληνάκι, με ένα κατάλληλο μηχανισμό, φέρεται στο διάκενο των δύο πόλων του NMR οργάνου. Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ για τους εστέρες Β και C.



Σχήμα 6.12. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ για τον εστέρα Β

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του σχήματος 6.12 στο διάστημα 7.0 με 7.5 παρατηρούνται οι κορυφές που οφείλονται στα πρωτόνια του φαινολικού δακτυλίου όπου δεν παρουσιάζεται συμμετρία καθώς είναι μη υποκατεστημένος σε σχέση με τον C στη θέση 21. Στο διάστημα 6.25 με 6.75 παρουσιάζονται οι κορυφές που οφείλονται στα

πρωτόνια που βρίσκονται στις θέσεις 25, 26, δηλαδή στα πρωτόνια του διπλού δεσμού τα οποία βρίσκονται σε μίγμα με το *cis* ισομερές, όπως απεικονίζονται στο σχήμα. Οι υπόλοιπες κορυφές οφείλονται στα πρωτόνια του σακχάρου.



Σχήμα 6.13. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ για τον εστέρα C

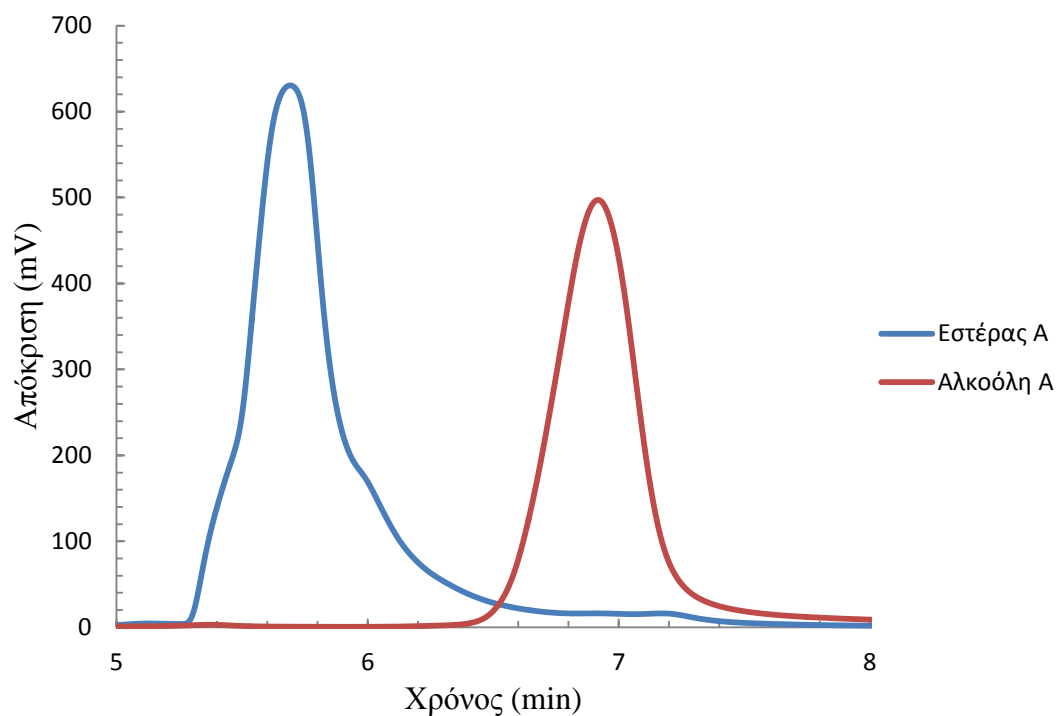
Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του σχήματος 6.13 παρατηρούνται στο διάστημα 6.5 με 7.0 τα πρωτόνια τα οποία οφείλονται στο φαινολικό δακτύλιο. Οι δύο υψηλές κορυφές που εμφανίζονται δικαιολογούνται από τη συμμετρία των πρωτονίων στο δακτύλιο λόγω της ύπαρξης του $-\text{OH}$ στη πάρα θέση. Η διαφορά μεταξύ του υποκατεστημένου και του μη υποκατεστημένου δακτυλίου γίνεται εμφανής με τη σύγκριση των φασμάτων του σχήματος 6.13 και 6.12. Οι υπόλοιπες κορυφές του φάσματος οφείλονται στα πρωτόνια της αλυσίδας και του σακχάρου.

Κεφάλαιο 7. Κινητική μελέτη της δράσης της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος StGE2

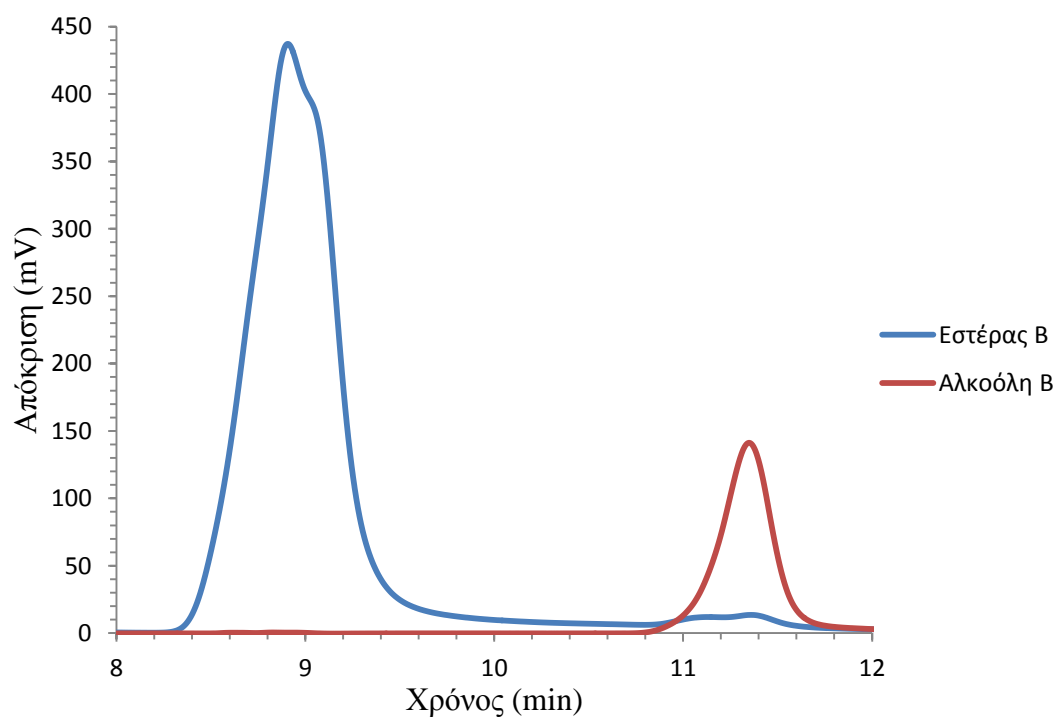
7.1. Μέθοδος μέτρησης της απελευθέρωσης αλκοόλης κατά την ενζυμική υδρόλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Η υδρόλυση του κάθε υποστρώματος από την εστεράση του γλυκουρονικού οξέος StGE2 προσδιορίστηκε ποσοτικά με την απελευθέρωση της αντίστοιχης αλκοόλης στο διάλυμα της αντίδρασης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της κάθε αλκοόλης πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο διαλύτης επιλέχθηκε έτσι ώστε να επιτυγχάνεται διαχωρισμός μεταξύ εστέρα και αλκοόλης και η ολοκλήρωση των κορυφών να γίνεται με ευκολία. Η καταγραφή και η ολοκλήρωση των κορυφών των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογισμικό Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία).

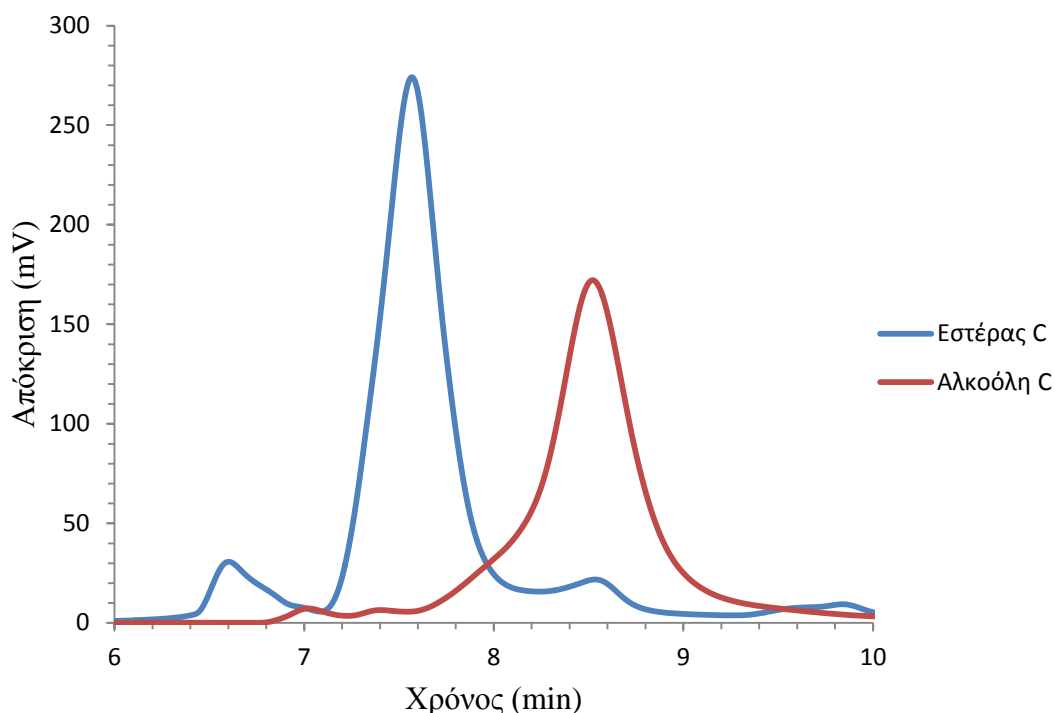
Μετά από δοκιμές σε διάφορες αναλογίες, ο διαχωρισμός κρίθηκε ικανοποιητικός με τη χρήση του διαλύτη μεθανόλη: νερό 7:3 (v/v). Η ροή αρχικά ρυθμίστηκε στα 0.7 mL/ min αλλά στη συνέχεια άλλαξε στα 0.4 mL/ min λόγω αυξημένης πίεσης στη στήλη. Η κορυφές εστέρα και αλκοόλης εμφανίζονται με διαφορά 1.2 min για τον εστέρα και την αλκοόλη A (Σχήμα 7.1), 2.5 min για τον εστέρα και την αλκοόλη B (Σχήμα 7.2) και 1 min για τον εστέρα και την αλκοόλη C (Σχήμα 7.3).



Σχήμα 7.1. Χρωματογραφήματα εστέρα και αλκοόλης Α από HPLC με διαλύτη έκλουσης $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 7:3 (v/v) και ροή 0.7 mL/ min



Σχήμα 7.2. Χρωματογραφήματα εστέρα και αλκοόλης Β από HPLC με διαλύτη έκλουσης $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 7:3 (v/v) και ροή 0.4 mL/ min



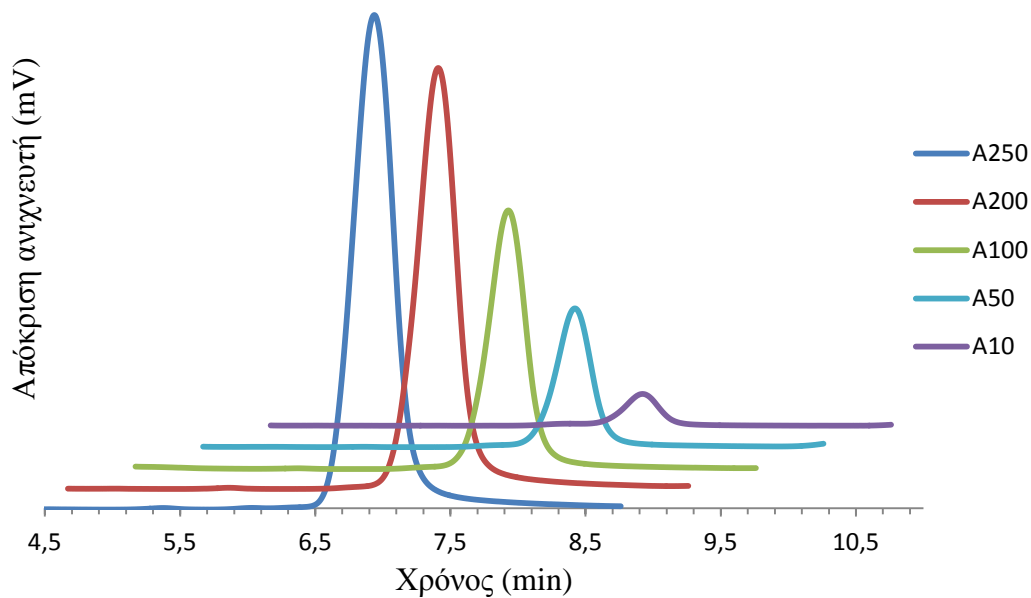
Σχήμα 7.3. Χρωματογραφήματα εστέρα και αλκοόλης C από HPLC με διαλύτη έκλουσης CH₃OH:H₂O 7:3 (v/v) και ροή 0.4 mL/ min

7.2. Καμπύλες αναφοράς των αλκοολών A, B και C

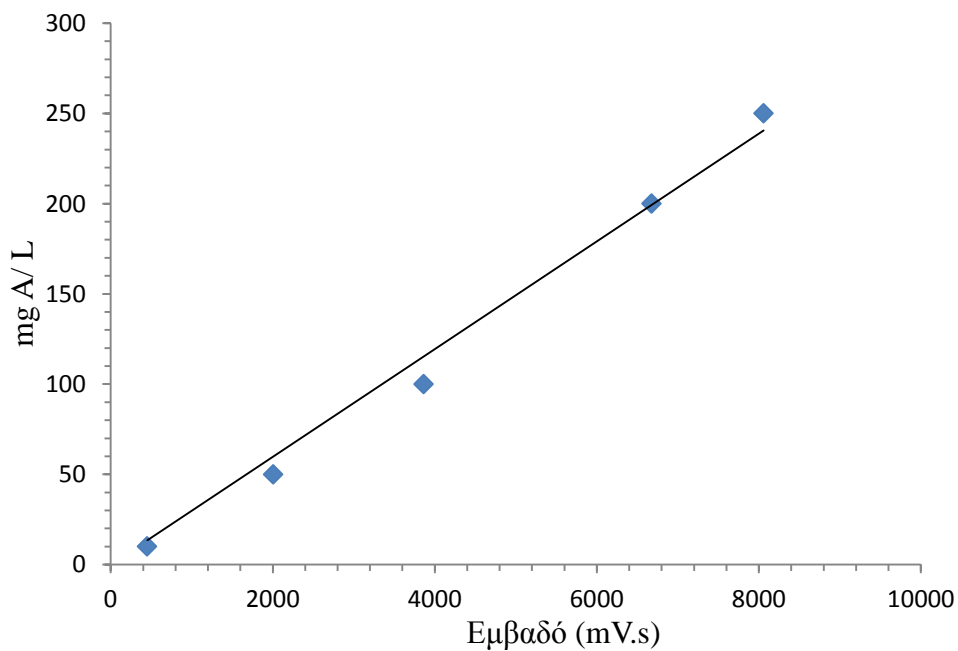
Η μέτρηση των αλκοολών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις προκειμένου να κατασκευαστούν οι καμπύλες αναφοράς πραγματοποιήθηκε με χρήση συστήματος HPLC (Jasco PU 987) με στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈ Nucleosil (250 mm x 4.6 mm, Macherey – Nagel, Γερμανία), ροή 0.4 mL/ min και διαλύτη μίγμα CH₃OH:H₂O 7:3 (v/v) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η καταγραφή και η ολοκλήρωση των κορυφών των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογισμικό Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία).

7.2.1 Καμπύλη αναφοράς της 3-φαινυλ-1-προπανόλης (A)

Η αλκοόλη A μετρήθηκε φωτομετρικά (Jasco UV 975) στα 220 nm με ροή 0.7 mL/ min. Έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν και επομένως έξι διαφορετικά σημεία για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς. Από αυτά τα έξι σημεία, αυτό που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 500 mg A/ L απορρίπτεται λόγω απόκλισής του από την γραμμικότητα. Με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων η καμπύλη αναφοράς της αλκοόλης A είναι $y = 0.0298 \cdot x$ με $R^2 = 0.9893$.



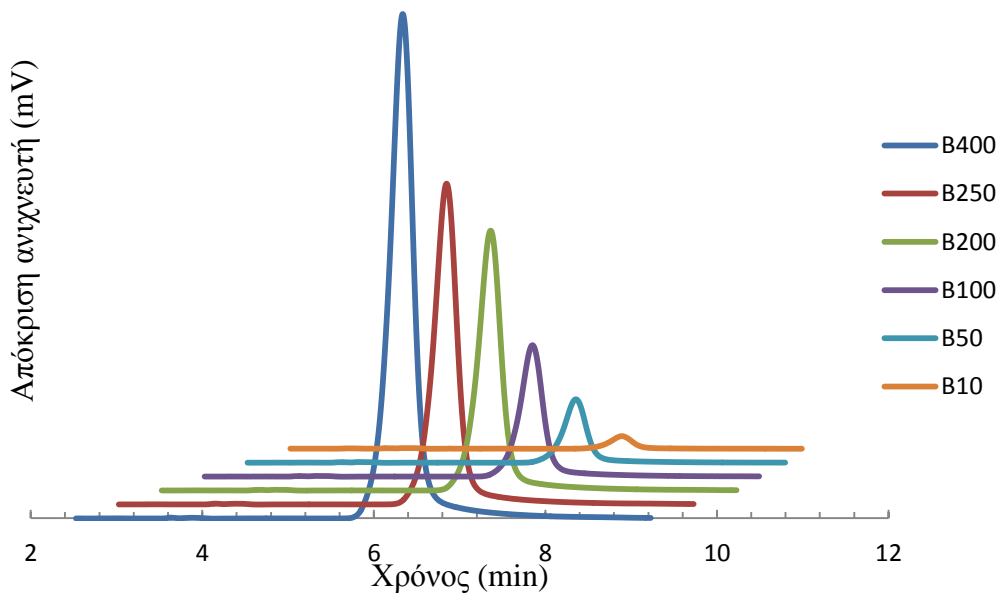
Σχήμα 7.4. Χρωματογραφήματα της αλκοόλης Α σε συγκεντρώσεις 250 mg/L, 200 mg/L, 100 mg/L, 50 mg/L και 10 mg/L



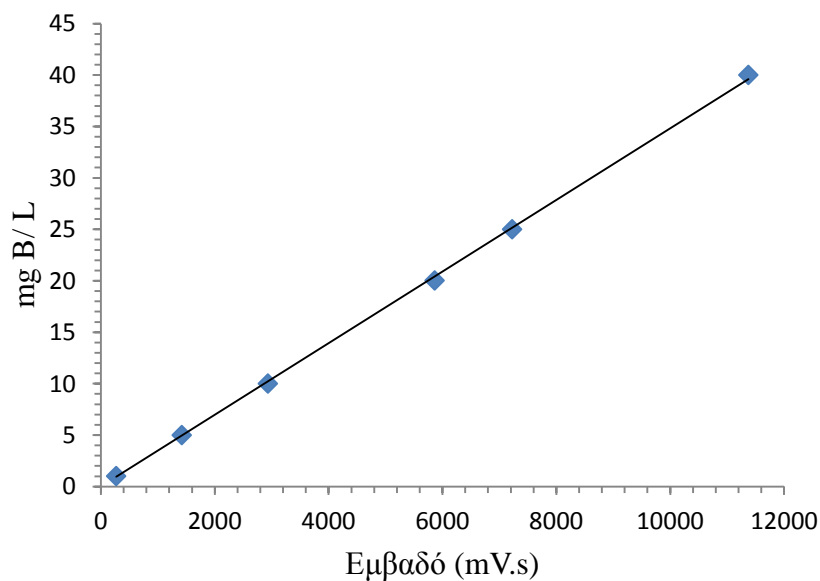
Σχήμα 7.5. Καμπύλη αναφοράς της αλκοόλης Α

7.2.2 Καμπύλη αναφοράς της κινναμικής αλκοόλης (B)

Η αλκοόλη B μετρήθηκε φωτομετρικά (Jasco UV 975) στα 250 nm με ροή 0.7 mL/ min. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης έξι συγκεντρώσεις για τη λήψη των πειραματικών σημείων για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς η οποία είναι $y=0.0035 \cdot x$ με $R^2 = 0.996$.



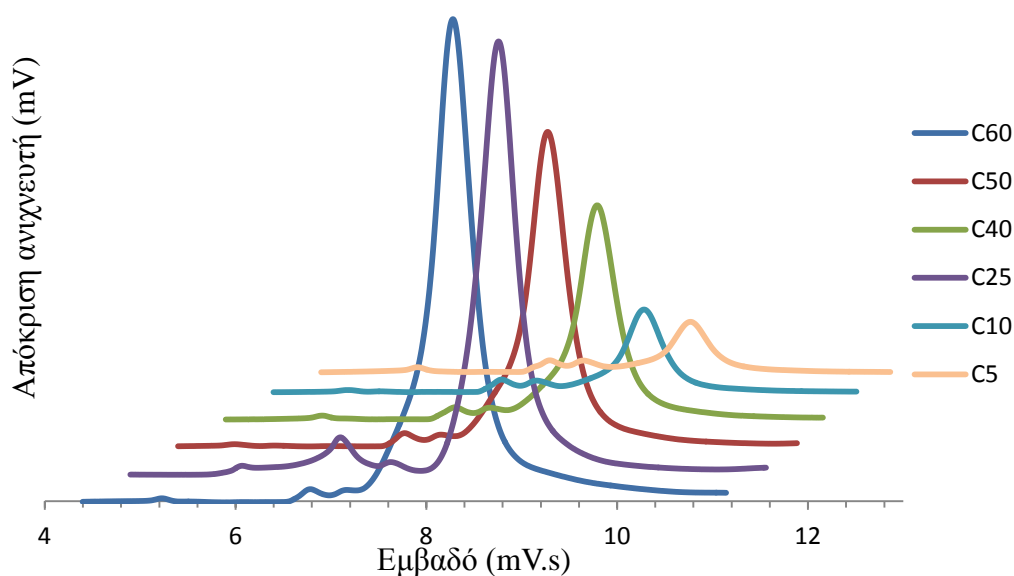
Σχήμα 7.6. Χρωματογραφήματα της αλκοόλης B σε συγκεντρώσεις 400 mg/L, 250 mg/L, 200 mg/L, 100 mg/L, 50 mg/L και 10 mg/L



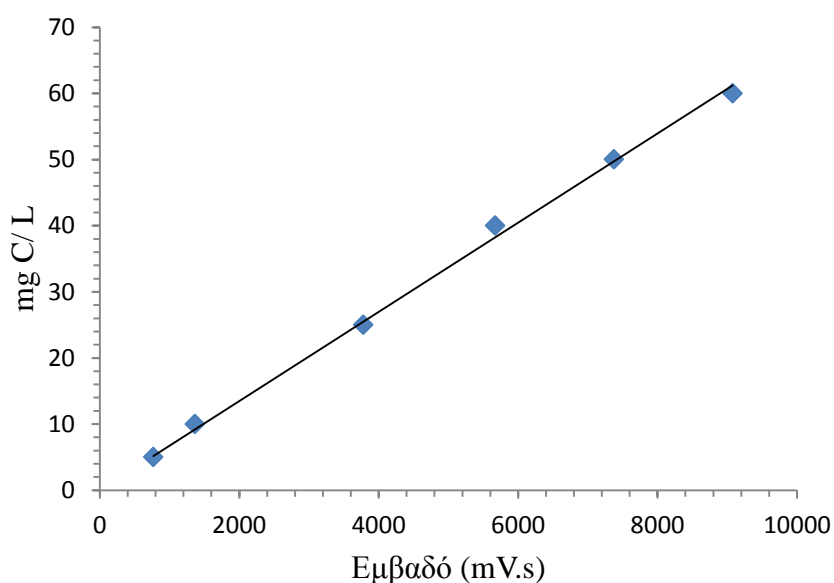
Σχήμα 7.7. Καμπύλη αναφοράς της αλκοόλης B

7.2.3 Καμπύλη αναφοράς της 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλης (C)

Η αλκοόλη C μετρήθηκε φωτομετρικά (Jasco UV 975) στα 220 nm με ροή 0.4 mL/ min. Η καμπύλη αναφοράς που προσδιορίστηκε με χρήση έξι πειραματικών σημείων είναι $y = 0.0067 \cdot x$ με $R^2 = 0.9978$.



Σχήμα 7.8. Χρωματογραφήματα της αλκοόλης C σε συγκεντρώσεις 60 mg/L, 50 mg/L, 40 mg/L, 25 mg/L, 10 mg/L και 5 mg/L



Σχήμα 7.9. Καμπύλη αναφοράς της αλκοόλης C

Με πειράματα πλήρους χημικής υδρόλυσης των τριών φαινυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος με καυστικό νάτριο (NaOH) 0.3 M και μέτρηση της απελευθέρωσης αλκοόλης με HPLC προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των εστέρων στα αρχικά τους διαλύματα (Πίνακας 7.1). Παρατηρήθηκε ότι το εμβαδό της κορυφής που αντιστοιχεί στην αλκοόλη είναι ίδιο με το εμβαδό της κορυφής του αντίστοιχου εστέρα πριν την πλήρη υδρόλυση. Επομένως εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι καμπύλες αναφοράς των αλκοολών A, B και C είναι και καμπύλες αναφοράς των Εστέρων A, B και C αντίστοιχα.

Πίνακας 7.1. Συγκεντρώσεις των Εστέρων A, B και C στα αρχικά τους διαλύματα

Φαινολικός εστέρας του γλυκουρονικού οξέος	Συγκέντρωση (mM)
A	14.7
B	14.3
C	26.9

7.3. Συνθήκες των ενζυμικών υδρολύσεων

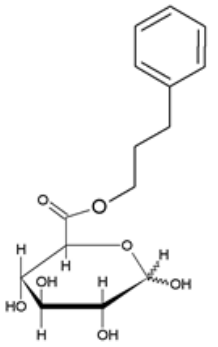
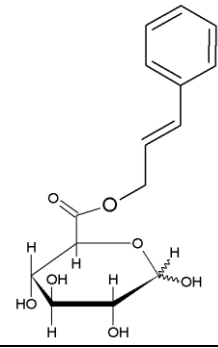
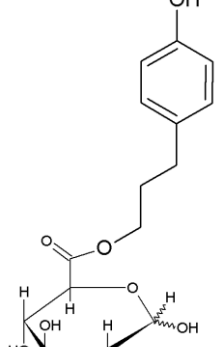
Οι αντιδράσεις των ενζυμικών υδρολύσεων πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλον pH 6 με χρήση ΡΔ φωσφορικών καθώς σε περιβάλλον pH 7 στο οποίο η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος StGE2 παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα παρατηρήθηκε έντονη υδρόλυση του υποστρώματος στα τυφλά διαλύματα. Η θερμοκρασία στην οποία έλαβαν χώρα οι ενζυμικές υδρολύσεις ήταν 50 °C όπου η StGE2 παρουσιάζει βέλτιστη δραστηριότητα και υψηλή σταθερότητα (Topakas et al., 2010).

Ο τερματισμός των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με παγόλυτρο για τον εστέρα της αλκοόλης A, με 50 μ L πυκνού CH₃COOH για τον εστέρα της αλκοόλης B και με 50 μ L HCl 6 M για τον εστέρα της αλκοόλης C. Ο βρασμός των δειγμάτων δεν επιλέχθηκε ως μέθοδος τερματισμού καθώς παρατηρήθηκε έντονη υδρόλυση του υποστρώματος η οποία δεν επέτρεπε την ασφαλή εξαγωγή αποτελεσμάτων.

7.4. Αποτελέσματα της κινητικής μελέτης της StGE2

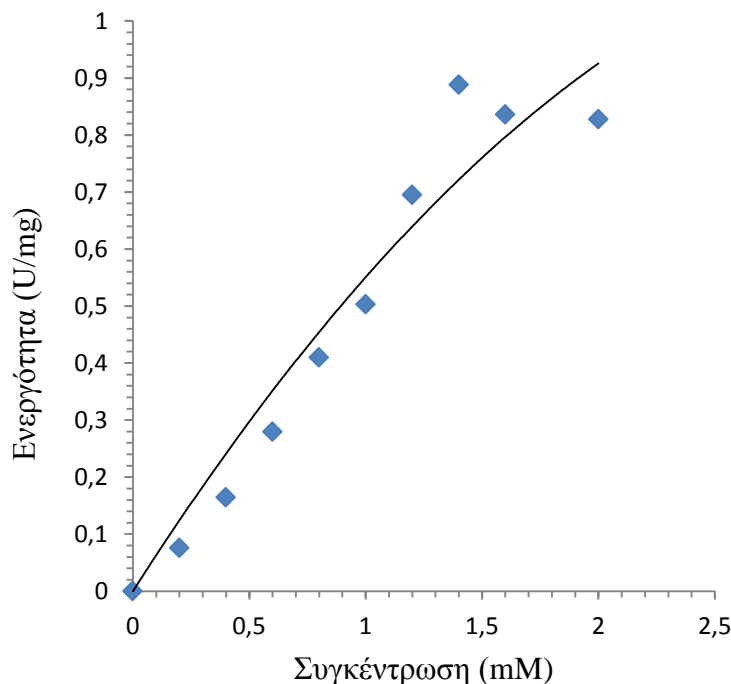
Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος StGE2 με τους φαινολικούς εστέρες του γλυκουρονικού οξέος παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 7.2. Η προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση Michaelis-Menten έγινε με την εφαρμογή DataAnalysis της Data Evaluation Systems (Evan Kantrowitz).

Πίνακας 7.2. Κινητικά δεδομένα που προέκυψαν από τη δράση της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος StGE2 στους φαινυλεστέρες του γλυκουρονικού οξέος A, B και C.

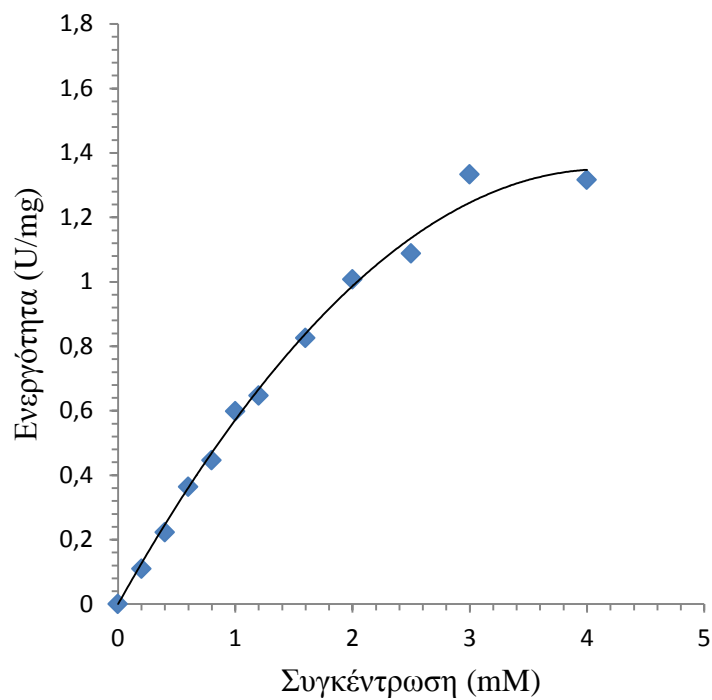
Δομή	Όνομα	K_m (mM)	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
	3-φαινυλ-1-προπανυλεστέρας του γλυκουρονικού οξέος	6.1587	166.3	27.0
	κινναμιλεστέρας του γλυκουρονικού οξέος	3.6341	115.9	31.9
	3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανυλεστέρας του γλυκουρονικού οξέος	-	-	-

Η ύπαρξη συγγένειας του ενζύμου ως προς τους φαινυλεστέρες του γλυκουρονικού οξέος εξετάστηκε υπολογίζοντας τις τιμές της σταθεράς K_m . Η σύγκριση του λόγου του ρυθμού κατάλυσης προς τη σταθερά Michaelis – Menten (k_{cat}/K_m) δεν έδειξε υψηλή εξειδίκευση της εστεράσης ως προς τους φαινυλεστέρες του γλυκουρονικού οξέος A και B. Για το υπόστρωμα C δεν ήταν δυνατό να εξαχθούν κινητικά δεδομένα λόγω υψηλού σφάλματος κατά την προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση Michaelis-Menten. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να οφείλεται στο υδροξύλιο που βρίσκεται στην –πάρα θέση του φαινολικού δακτυλίου της αλκοόλης C για λόγους στερεοχημικής παρεμπόδισης.

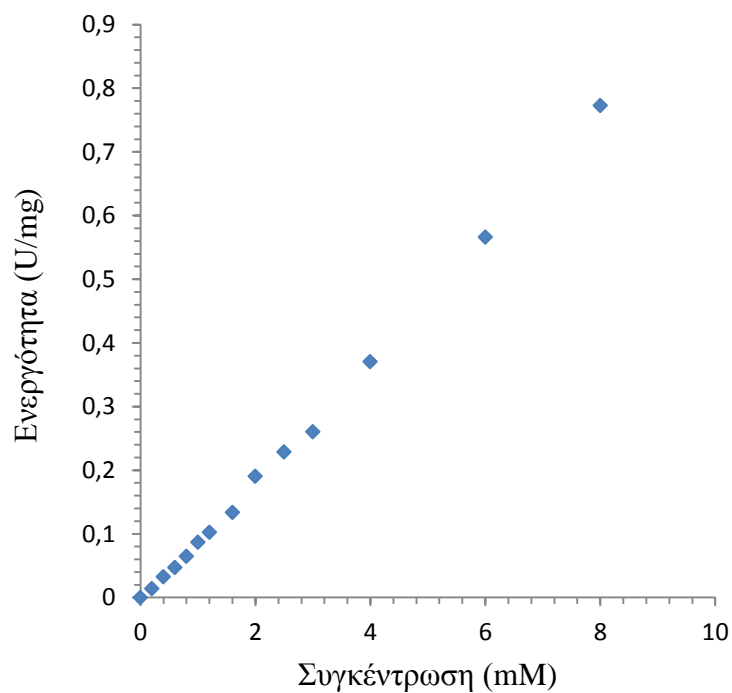
Η StGE2 παρουσιάζει υψηλότερη εξειδίκευση στον κινναμιλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος σε σχέση με τον 3-φαινυλ-1-προπανυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος, γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο διπλός δεσμός που υπάρχει πριν τον φαινολικό δακτύλιο παίζει ρόλο στην αναγνώριση του υποστρώματος από το ένζυμο.



Σχήμα 7.10. Επίδραση της συγκέντρωσης του Εστέρα A στην ενεργότητα ανά mg ενζύμου StGE2 μετά από 30 min επώασης στους 50 °C.



Σχήμα 7.11. Επίδραση της συγκέντρωσης του Εστέρα Β στην ενεργότητα ανά mg ενζύμου StGE2 μετά από 30 min επώασης στους 50 °C



Σχήμα 7.12. Επίδραση της συγκέντρωσης του Εστέρα C στην ενεργότητα ανά mg ενζύμου StGE2 μετά από 30 min επώασης στους 50 °C

Κεφάλαιο 8. Απομόνωση MeGlcA από μίγμα ξυλοολιγοσακχαριτών

8.1. Απομόνωση όξινων ολιγοσακχαριτών από το υδρόλυμα της γλυκουρονοξυλάνης σημύδας

Η απομόνωση των όξινων ολιγοσακχαριτών πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ιοντο-ανταλλαγής με τη βοήθεια στήλης χρωματογραφίας (27 x 2.5 cm) και στατική φάση τη ρητίνη AG 1x2 της BioRad Laboratories. Αφού προετοιμαστεί το δείγμα, το οποίο λαμβάνεται σε λυοφιλιωμένη μορφή, φορτώνεται στη στήλη και η ρητίνη ξεπλένεται με ροή 2.5 mL/ min υπερκαθαρού νερού μέχρι να εκλουστούν όλοι οι ουδέτεροι ολιγοσακχαρίτες. Ο έλεγχος έγινε με λήψη κλασμάτων σε falcon των 50 mL ανά 30 min και χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).



Σχήμα 8.1. Κλάσματα που περιέχουν ουδέτερους πολυσακχαρίτες μετά από έκλυση της στήλης ιοντο-ανταλλαγής με υπερκαθαρό νερό. Η εμφάνισή τους πραγματοποιείται σε φύλλο TLC με χημική ανίχνευση.

Οι ουδέτεροι ολιγοσακχαρίτες απομακρύνθηκαν από τη στήλη στο 2^ο κλάσμα το οποίο αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα 30-60 min με ροή 2.5 mL/ min, όπως φαίνεται στο σχήμα 8.1.

Ακολουθεί η έκλυση των όξινων ολιγοσακχαριτών με διάλυμα οξικού αμμωνίου 3 M. Κλάσματα συλλέγονται κάθε 20 min με ροή 2.0 mL/ min και αναλύονται με TLC για τον προσδιορισμό των όξινων ολιγοσακχαριτών.



Σχήμα 8.2. Κλάσματα που περιέχουν όξινους ολιγοσακχαρίτες μετά από έκλυσή τους με διάλυμα οξικού αμμωνίου 3 M. Η εμφάνισή τους πραγματοποιείται σε φύλλο TLC με χημική ανίχνευση.

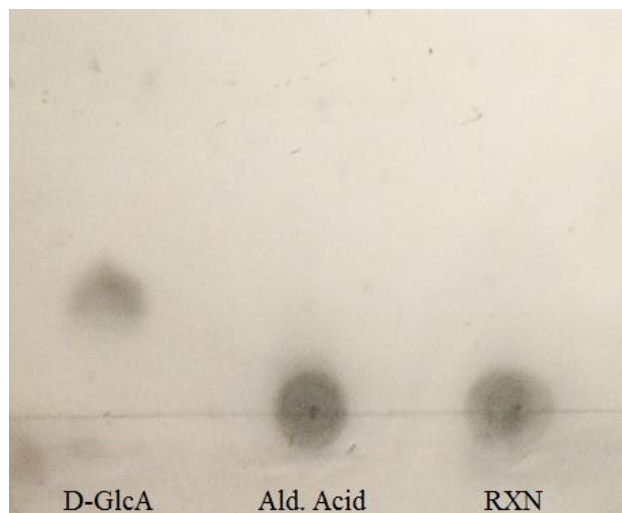
Οι όξινοι ολιγοσακχαρίτες εκλούνται στο 3^ο κλάσμα όπως παρατηρείται στο σχήμα 8.2 που αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα 40-60 min με ροή 2.0 mL/ min. Μαζί με το 3^ο, λαμβάνεται και το 4^ο κλάσμα προκειμένου να ληφθεί τυχόν ποσότητα που υπάρχει σε αυτό. Τα δύο παραπάνω κλάσματα που περιέχουν τους ζητούμενους ξυλοολιγοσακχαρίτες συγκεντρώνονται και ξηραίνονται υπό κατάψυξη (freeze drying).

8.2. Απελευθέρωση του 4-O-μέθυλ- γλυκουρονικού οξέος από τους όξινους ολιγοσακχαρίτες με ενζυμική υδρόλυση

Η απελευθέρωση του 4-O-μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος (MeGlcA) από τους όξινους πολυσακχαρίτες, οι οποίοι απομονώθηκαν σε προηγούμενο στάδιο όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.6.2, πραγματοποιείται με τη χρήση του ενζύμου α-γλυκουρονοζιδάση (Megazyme) η οποία προσβάλλει τον α-1,2-γλυκοζιδικό δεσμό που ενώνει τις πλευρικές αλυσίδες 4-O-μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος με την κύρια αλυσίδα της γλυκουρονοξυλάνης. Καθότι οι α-γλυκουρονοζιδάσες της οικογένειας GH67 δεν λειτουργούν σε πολυμερικά υποστρώματα, δηλαδή σε γλυκουρονοξυλάνες, με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν MeGlcA μόνο από κλάσματα γλυκουρονοξυλάνης (αλδουρονικά οξέα), στα οποία το ουρονικό οξύ είναι συνδεδεμένο στις μη αναγωγικές μονάδες ξυλοπυρανόζης, στην ενζυμική επεξεργασία συμπεριλαμβάνεται το Cellic HTec2 της Novozymes (Δανία) προκειμένου να παράσχει τα κατάλληλα κλάσματα για την δράση της α-γλυκουρονοζιδάσης.

8.2.1. Δοκιμαστική αντίδραση απελευθέρωσης MeGlcA με τη χρήση μόνο α-γλυκουρονοζιδάσης

Η δράση της α-γλυκουρονοζιδάσης επιβεβαιώνεται με την εξής δοκιμαστική αντίδραση: σε erpendorf προστίθενται 1 mL από το λυοφιλωμένο δείγμα το οποίο περιέχει τους όξινους ολιγοσακχαρίτες και έχει προηγουμένως επαναδιαλυθεί σε κατάλληλη ποσότητα οξικού αμμωνίου 20 mM και 20 μL α-γλυκουρονοζιδάσης (Megazyme). Η αντίδραση αφήνεται σε Thermomixer Comfort, (Eppendorf, Γερμανία) για 1 h και σε θερμοκρασία 70 °C. Το αποτέλεσμα της ενζυμικής υδρόλυσης προσδιορίζεται με ανάλυση TLC.



Σχήμα 8.3. TLC της δοκιμαστικής αντίδρασης με χρήση μόνο α -γλυκουρονοζιδάσης. Φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά το διάλυμα D-γλυκουρονικού οξέος 20 mM (standard), διάλυμα όξινων ολιγοσακχαριτών πριν την αντίδραση και διάλυμα της αντίδρασης.

Από την ανάλυση με TLC προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αντίδραση δεν προχώρησε προς απελευθέρωση MeGlcA.

8.2.2. Τελική αντίδραση ενζυμικής υδρόλυσης των όξινων ξυλοολιγοσακχαριτών

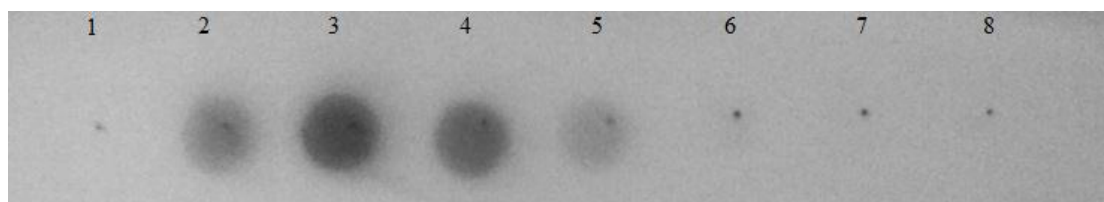
Αφού προσδιορίστηκε η αναγκαιότητα κλασμάτων στα οποία το MeGlcA είναι συνδεδεμένο σε μη αναγωγικές μονάδες, στην αντίδραση πλέον προστίθεται και το Cellic HTec2 (Novozymes). Το λυοφιλωμένο δείγμα το οποίο περιέχει τους όξινους ξυλοολιγοσακχαρίτες επαναδιαλύεται σε 50 mL διαλύματος οξικού αμμωνίου ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 20 mM και τοποθετείται σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 250 mL. Στη σφαιρική φιάλη προστίθενται επίσης 0.5 mL ενζύμου και 0.5 mL α -γλυκουρονοζιδάσης (Megazyme). Η αντίδραση αφήνεται 12 h σε αναδευόμενο επωαστήρα Orbital incubator S150, (Stuart Scientific, M. Βρετανία) σε θερμοκρασία 50 °C και ανάδευση 150 rpm. Μετά το πέρας των 12 h, στην αντίδραση προστίθεται επιπλέον 0.1 mL α -γλυκουρονοζιδάσης, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 70 °C και αφήνεται στον επωαστήρα για ακόμα 4 h. Επιπλέον το pH αυξάνεται στο 6.4 με την προσθήκη καυστικού νατρίου. Η ύπαρξη MeGlcA στο διάλυμα της αντίδρασης ελέγχεται με TLC.

Πιθανόν να μην χρειάζεται η προσθήκη του Cellic HTec2 αν η αρχική επεξεργασία της γλυκουρονοξυλάνης σημύδας πραγματοποιηθεί με ενδοξυλανάση της οικογένειας 10.

8.3. Καθαρισμός του MeGlcA από το διάλυμα της αντίδρασης

8.3.1 Καθαρισμός του διαλύματος της αντίδρασης με στήλη ιοντο-ανταλλαγής

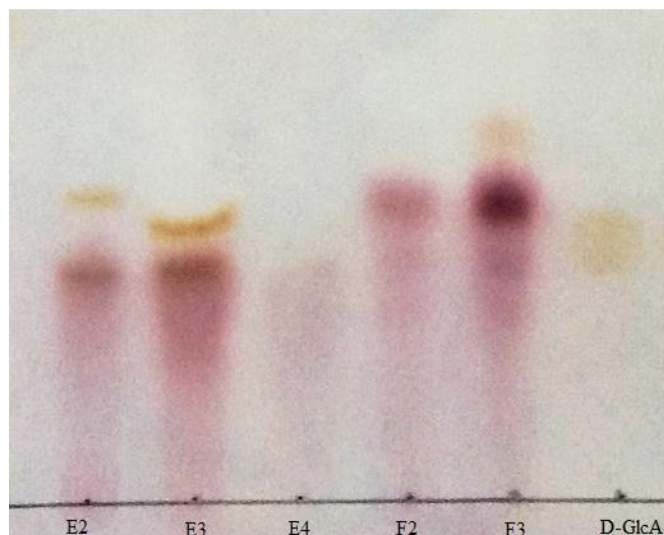
Το διάλυμα της αντίδρασης, το οποίο έχει ξηρανθεί υπό κατάψυξη, επαναδιαλύεται σε 10 mL υπερκαθαρού νερού και φορτώνεται στη στήλη με ροή 2.5 mL/ min. Ο καθαρισμός πραγματοποιείται σε δύο στάδια: αρχικά η στήλη ξεπλένεται με υπερκαθαρό νερό για την απομάκρυνση των ουδέτερων σακχάρων και στη συνέχεια το MeGlcA εκλύεται με διάλυμα οξικού αμμωνίου 3 M με ροή 2.0 mL/ min. Τα στάδια καθαρισμού ελέγχονται με TLC. Λαμβάνονται 8 κλάσματα (flow through) κατά το πρώτο στάδιο του καθαρισμού, των 50 mL έκαστο, και ελέγχονται για την παρουσία σακχάρων.



Σχήμα 8.4. Κλάσματα που περιέχουν σάκχαρα μετά από έκλυση της στήλης ιοντο-ανταλλαγής με υπερκαθαρό νερό. Η εμφάνισή τους πραγματοποιείται σε φύλλο TLC με χημική ανίχνευση.

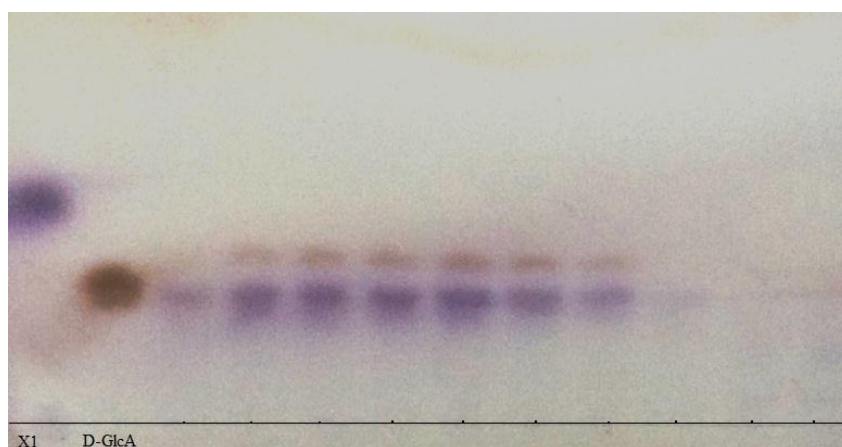
Η παρουσία των σακχάρων είναι έντονη στα κλάσματα 2, 3, 4 και 5 επομένως η διαδικασία καθαρισμού μπορεί να προχωρήσει στο στάδιο της έκλυσης.

Κατά το στάδιο της έκλυσης λαμβάνονται 6 κλάσματα των 50 mL τα οποία ελέγχονται αρχικά για την ύπαρξη σακχάρων. Παρουσία σακχάρων παρατηρήθηκε στα κλάσματα 2, 3 και ελάχιστα στο 4. Ακολουθεί χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με διαλύτη ανάπτυξης οξικό αιθυλεστέρα: οξικό οξύ: 1-προπανόλη: φορμικό οξύ: νερό (25:10:5:1:15). Στο φύλλο TLC φορτώνονται τα κλάσματα 2, 3 και 4 της έκλυσης και τα κλάσματα 2 και 3 του flow through σε κηλίδες των 5 μ L.



Σχήμα 8.5. E2, E3 και E4 τα κλάσματα από έκλυση, F2, F3 τα κλάσματα από το flow through και D-GlcA το standard διάλυμα D-γλυκουρονικού οξέος. Στα E2 και E3 με καφέ χρώμα εμφανίζεται το MeGlcA ενώ μωβ ο όξινος ολιγοσακχαρίτης. Στα F2 και F3 με μωβ χρώμα εμφανίζεται η ξυλόζη.

Όπως παρατηρείται στο σχήμα 8.5 απελευθερωμένο MeGlcA υπάρχει στα κλάσματα E2 και E3 τα οποία και συγκεντρώνονται για επιπλέον καθαρισμό καθώς υπάρχει και δεσμευμένο MeGlcA, πιθανώς με ξυλόζη. Τα δύο κλάσματα ξηραίνονται υπό κατάψυξη (freeze drying) και στη συνέχεια το λυοφιλωμένο δείγμα επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα υπερκαθαρού νερού προκειμένου να καθαριστεί περαιτέρω με χρωματογραφία ιοντο-ανταλλαγής όπου όμως η έκλυση γίνεται με βαθμίδωση της συγκέντρωσης του διαλύτη $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (από 0 σε 3 M) και ροή 2 mL/ min. Τα κλάσματα ελέγχονται με TLC προκειμένου να προσδιοριστούν αυτά που περιέχουν το καθαρό MeGlcA.



Σχήμα 8.6. X1: διάλυμα ξυλόζης, D-GlcA: διάλυμα D-γλυκουρονικού (control). Τα κλάσματα τα οποία περιέχουν MeGlcA φαίνονται δεξιά του control.

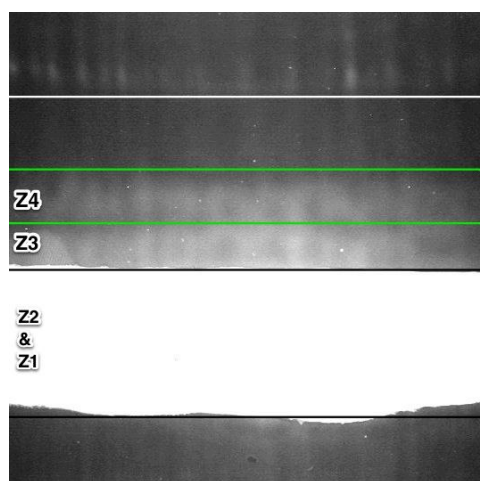
Διαχωρισμός μεταξύ ελεύθερου και δεσμευμένου 4-O-μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος δεν επιτεύχθηκε ούτε με αυτή τη μέθοδο διαχωρισμού. Επομένως, ακολουθεί το τελικό στάδιο καθαρισμού με παρασκευαστική χρωματογραφία στοιβάδας (PLC).

8.3.2. Παρασκευαστική χρωματογραφία στοιβάδας για την απομόνωση του MeGlcA

Η παρασκευαστική χρωματογραφία στοιβάδας αποτέλεσε το τελευταίο στάδιο καθαρισμού και απομόνωσης του 4-O-μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος. Πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πλάκας PLC και χρήση του διαλύτη ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε στην χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 4.6.5.

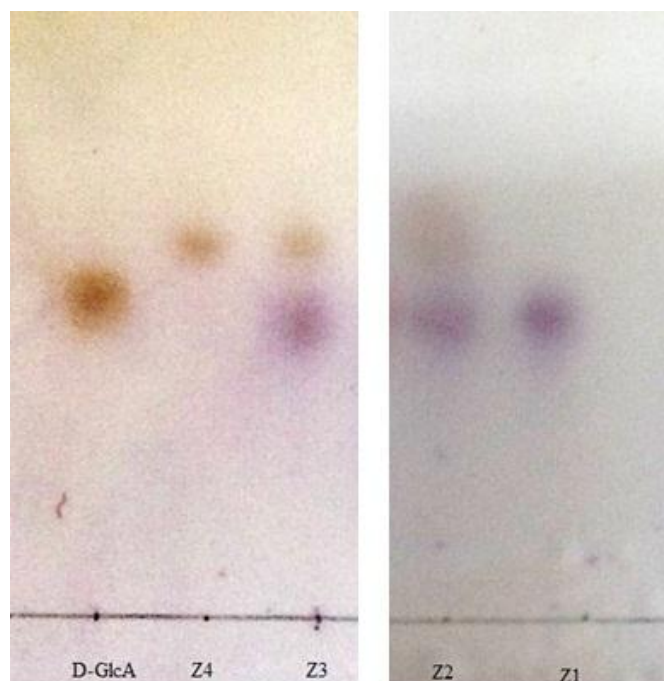
Προκειμένου να προσδιορισθεί η θέση καθενός από τα συστατικά του δείγματος η πλάκα PLC εξετάζεται υπό υπεριώδη ακτινοβολία, αρχικά, με λάμπα χειρός UV. Προσδιορίζονται δύο ζώνες: η ζώνη 1 (Z1) και η ζώνη 2 (Z2). Οι Z1 και Z2 λαμβάνονται με απόξεση του υλικού επίστρωσης της πλάκας PLC.

Στη συνέχεια η πλάκα PLC τοποθετείται σε συσκευή φωτογράφισης σε κλειστό θάλαμο InGenius BioImaging, Syngene (M. Βρετανία) υπό υπεριώδη ακτινοβολία (Σχήμα 6.7). Προσδιορίζονται ακόμα δύο ζώνες: η ζώνη 3 (Z3) και η ζώνη 4 (Z4). Οι Z3 και Z4, επίσης, λαμβάνονται με απόξεση του υλικού επίστρωσης των πλακών (Silica gel), τοποθετούνται ξεχωριστά σε υάλινα φιαλίδια (vials) και ακολουθεί εκχύλιση για την παραλαβή των συστατικών.



Σχήμα 8.7. Φωτογραφία από θάλαμο InGenius BioImaging. Παρουσιάζονται οι ζώνες Z3 και Z4, καθώς και το τμήμα που περιείχε τις ζώνες Z1 και Z2 το οποίο έχει ήδη αποξεθεί.

Τα εκχυλίσματα των ζωνών ελέγχονται με TLC για τον προσδιορισμό της σύστασής τους και κατόπιν, αφού τοποθετηθούν σε προζυγισμένα υάλινα φιαλίδια, ξηραίνονται υπό κατάψυξη σε συσκευή εξάχνωσης υπό κενό. Από τα αποτελέσματα της TLC (Σχήμα 8.8) προκύπτουν τα εξής: η ζώνη 4 περιέχει καθαρό και ελεύθερο MeGlcA, οι ζώνες 3 και 2 περιέχουν ελεύθερο και δεσμευμένο MeGlcA και η ζώνη 1 περιέχει δεσμευμένο MeGlcA.



Σχήμα 8.8. TLC των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τις 4 ζώνες (Z1, Z2, Z3, Z4) της πλάκας PLC. Με καφέ χρώμα εμφανίζεται το D-γλυκουρονικό οξύ που λειτουργεί ως control και το ελεύθερο MeGlcA, ενώ με μωβ το συνδεδεμένο MeGlcA με ξυλόζη.

Το εκχύλισμα της ζώνης 4 τοποθετήθηκε σε προζυγισμένο υάλινο φιαλίδιο (13.2608 g). Μετά την ξήρανση υπό κατάψυξη το φιαλίδιο ζύγιζε 13.2865 g. Επομένως απομονώθηκαν 25.7 mg 4-O-μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κεφάλαιο 9. Σύνοψη και συζήτηση των αποτελεσμάτων

9.1. Συνοπτικά αποτελέσματα και συμπεράσματα διπλωματικής εργασίας

Η μελέτη της καταλυτικής δράσης της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από τον ζυμομύκητα *S.thermophille*, *StGE2*, προϋποθέτει την παραγωγή του εν λόγω ενζύμου μέσω του μεθυλότροφου συστήματος ετερόλογης έκφρασης *P.pastoris* καθώς και την σύνθεση των φαινυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος που αποτελούν τα υποστρώματα.

Η παραγωγή του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με υγρές καλλιέργειες των κυττάρων της ζύμης και η απομόνωση έγινε με στάδια διηθήσεων, συμπύκνωσης και χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Το μοριακό βάρος της ανασυνδυασμένης εστεράσης *StGE2* προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) με βαθμό πολυμερισμού 12.5% στα 43 kDa και η συγκέντρωσή της στο διάλυμα, η οποία πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μήκος κύματος 280 nm και συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας $50795 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, υπολογίστηκε στα 1.665 mg/mL.

Ως υποστρώματα για τη μελέτη της καταλυτικής δράσης της *StGE2* συντέθηκαν ενζυμικά οι εστέρες του D-γλυκουρονικού οξέος με 3-φαινυλ-1-προπανόλη (Εστέρας A), με κινναμική αλκοόλη (Εστέρας B) και με 3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλη (Εστέρας C) σε αντιδράσεις όγκου 50 mL σε οργανικό διαλύτη (τριτοταγής βουτανόλη) με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου ενζύμου Novozym 435 (ακινητοποιημένη λιπάση B της *C.antarctica*). Οι ενζυμικές συνθέσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 60 °C και ανάδευση 150 rpm για 48 h και παρουσίασαν σχετικά μικρές αποδόσεις της τάξης του 10%. Η απομόνωση των φαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (Silica gel chromatography) με πίεση (flash column chromatography) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το μίγμα οξικού αιθυλεστέρα:μεθανόλης 9:1 (v/v).

Η καθαρότητα των εστέρων μετρήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈ και ανιχνευτή υπεριώδους/ορατού. Για τη δημιουργία μιας μεθοδολογίας ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των εστέρων και των αντίστοιχων φαινολικών αλκοολών τους με HPLC, έγιναν δοκιμές και ως κατάλληλος διαλύτης έκλουσης κρίθηκε το μίγμα μεθανόλης: νερού 7:3 (v/v), με ροή έκλουσης στα 0.4 mL/ min και μήκος κύματος στα 220 nm για τους Εστέρες Α και C και στα 250 nm για τον Εστέρα Β. Στις συνθήκες αυτές, ο Εστέρας Α εμφάνισε κορυφή στο χρωματογράφημα στα 5.7 min (μήκος κύματος 220 nm, ροή 0.7 mL/ min), ο Εστέρας Β στα 8.9 min (μήκος κύματος 250 nm, ροή 0.4 mL/ min) και ο Εστέρας C στα 7.5 min (μήκος κύματος 220 nm, ροή 0.4 mL/ min).

Η υδρόλυση του κάθε υποστρώματος από την εστεράση του γλυκουρονικού οξέος StGE2 προσδιορίστηκε ποσοτικά με την απελευθέρωση της αντίστοιχης αλκοόλης στο διάλυμα της αντίδρασης. Οι καμπύλες αναφοράς των αλκοολών Α, Β και C που κατασκευάστηκαν με τη βοήθεια της παραπάνω μεθόδου είναι $y = 0.0298 \cdot x$ με $R^2 = 0.9893$ για την αλκοόλη Α, $y = 0.0035 \cdot x$ με $R^2 = 0.996$ για την αλκοόλη Β και $y = 0.0067 \cdot x$ με $R^2 = 0.9978$ για την αλκοόλη C. Οι καμπύλες αναφοράς των αλκοολών δείχθηκε ότι αποτελούν και καμπύλες αναφοράς των εστέρων αποδεικνύοντας ότι έχουν τον ίδιο συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας.

Οι αντιδράσεις των ενζυμικών υδρολύσεων πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλον pH 6 και θερμοκρασία 50 °C υπό ανάδευση για 30 min. Ο τερματισμός των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με παγόλουτρο για τον εστέρα της αλκοόλης Α, με 50 μL πυκνού CH₃COOH για τον εστέρα της αλκοόλης Β και με 50 μL HCl 6 M για τον εστέρα της αλκοόλης C. Ο βρασμός των δειγμάτων δεν επιλέχθηκε ως μέθοδος τερματισμού καθώς παρατηρήθηκε έντονη υδρόλυση του υποστρώματος η οποία δεν επέτρεπε την ασφαλή εξαγωγή αποτελεσμάτων. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την υδρόλυση των φαινυλεστέρων του γλυκουρονικού οξέος, υπολογίστηκαν οι σταθερές Michaelis-Menten K_m και k_{cat}, καθώς και ο λόγος k_{cat} / K_m ο οποίος αποτελεί ένδειξη για την προτίμηση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα. Η StGE2 παρουσιάζει υψηλότερη προτίμηση στον κινναμιλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος με τιμή του λόγου k_{cat} / K_m 31.9 mM⁻¹·min⁻¹ σε σχέση με τον 3-

φαινυλ-1-προπανυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος με τιμή $27.0 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Η τιμή K_m του Εστέρα Β (3.63 mM) είναι επίσης χαμηλότερη από αυτή του Εστέρα Α (6.16 mM). Σύγκριση των κινητικών δεδομένων, από την παρούσα διπλωματική εργασία, για τον Εστέρα Β με κινητικά δεδομένα από εργασία των Šráníková et al. για παρόμοιο υπόστρωμα επέδειξε παραπλήσιες τιμές της K_m (Εστέρας Β: 3.63 mM; 3-(4-methoxyphenyl)propyl D-glucopyranosyluronate: 4.31 mM). Για το υπόστρωμα C δεν ήταν δυνατό να εξαχθούν κινητικά δεδομένα λόγω υψηλού σφάλματος κατά την προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση Michaelis-Menten. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να οφείλεται στο υδροξύλιο που βρίσκεται στην –πέρα θέση του φαινολικού δακτυλίου της αλκοόλης C για λόγους στερεοχημικής παρεμπόδισης.

Για την παραγωγή πιο εξειδικευμένων υποστρωμάτων για την εστεράση του γλυκουρονικού οξέος έγινε η προσπάθεια απομόνωσης 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος από γλυκουρονοξυλάνη σημύδας προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αντιδρόν στις ενζυμικές συνθέσεις των φαινυλεστέρων αντί του D-γλυκουρονικού οξέος. Η διαφορά στο συγκεκριμένο υπόστρωμα εστιάζεται στην παρουσία μίας μέθοξυ ($\text{CH}_3\text{O}-$) ομάδας στη θέση 4 του γλυκουρονικού δακτυλίου η οποία πιθανώς να παίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι Šráníková et al. σε μελέτες τους με την εστεράση του γλυκουρονικού οξέος από το μύκητα *S. commune* έδειξαν ότι το ένζυμο επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για τους εστέρες του 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος με τιμές k_{cat}/K_m σχεδόν 90 φορές υψηλότερες σε σχέση με αυτές των αντίστοιχων εστέρων με D-γλυκουρονικό οξύ (Šráníková S. et al., 2007).

Αρχικά οι ξυλοολιγοσακχαρίτες, προϊόντα της υδρόλυσης της ξυλάνης από ενδοξυλανάση της οικογένειας 11, λαμβάνονται σε λυοφιλιωμένη μορφή. Ο διαχωρισμός όξινων και ουδέτερων ξυλοολιγοσακχαριτών πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ιοντο-ανταλλαγής, η περαιτέρω επεξεργασία των όξινων ολιγοσακχαριτών έγινε με τα ένζυμα α -γλυκουρονοζιδάση (Megazyme) και Cellic[®] HTec2 (Novozymes) και ο τελικός διαχωρισμός με παρασκευαστική χρωματογραφία (Preparative Layer Chromatography, PLC).

Πιθανόν να μην χρειάζεται η προσθήκη του Cellic[®] HTec2 αν η αρχική επεξεργασία της γλυκουρονοξυλάνης σημύδας πραγματοποιηθεί με ενδοξυλανάση

της οικογένειας 10, καθότι οι α -γλυκουρονοζιδάσες της οικογένειας GH67 δεν λειτουργούν σε πολυμερικά υποστρώματα, δηλαδή σε γλυκουρονοξυλάνες, με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν MeGlcA μόνο από κλάσματα γλυκουρονοξυλάνης (αλδουρονικά οξέα), στα οποία το ουρονικό οξύ είναι συνδεδεμένο στις μη αναγωγικές μονάδες ξυλοπυρανόζης.

Τελικά απομονώθηκαν 25.7 mg καθαρού 4-O-μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος από τα 166 mg MeGlcA που θεωρητικά περιείχαν τα 2 g γλυκουρονοξυλάνης που χρησιμοποιήθηκε αρχικά. Η μικρή απόδοση της απομόνωσης (15.5%) οφείλεται στη δυσκολία διαχωρισμού του μίγματος MeGlcA-ξυλόζης.

9.2. Μελλοντικές προκλήσεις

Μελλοντικές προκλήσεις όπως αυτές προκύπτουν από την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι οι εξής:

- ▶ Σύνθεση φαινυλεστέρων του 4-O-μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα στην κινητική μελέτη της δράσης των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος για τη διαλεύκανση του ρόλου αυτών των ενζύμων στην αποικοδόμηση των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων.
- ▶ Χρήση των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος σε μη συμβατικά συστήματα για τη σύνθεση εστέρων του γλυκουρονικού οξέος με τοποεκλεκτικότητα.
- ▶ Βελτιστοποίηση των αντιδράσεων ενζυμικής σύνθεσης των εστέρων του γλυκουρονικού οξέος με τη λιπάση Novozym 435 ώστε να έχουν υψηλότερη απόδοση και κατ' επέκταση μειωμένο κόστος.
- ▶ Αποδοτικότερος καθαρισμός και απομόνωση 4-O-μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος από γλυκουρονοξυλάνη.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arcos J.A., Hill C.G. Jr., Otero C.** 2001. Kinetics of the Lipase-Catalyzed Synthesis of Glucose Esters in Acetone. *Biotechnol. Bioeng.* **73**: 104–110
- Biely P., Vršanská M., Tenkanen M., Kluepfel D.** (1997). Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* **57**: 151 – 166
- Bounias M.** 1980. N-(1-Naphthyl)ethylenediamine Dihydrochloride as a New Reagent for Nanomole Quantification of Sugars on Thin-Layer Plates by a Mathematical Calibration Process. *Analytical Biochemistry* **106**: 291-295
- Brett C., Waldon K.** (1996). Physiology and biochemistry of plant cell walls. Second Edition. London: Chapman Hall
- Brown R.Malcolm Jr., Saxena Inder M.** (2007). Cellulose: Molecular and structural Biology. The Netherlands: Springer
- Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B.** (2008). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research, Vol. 37, Database issue D233-D238*
- Charavgi M., Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P., Chrysinia E.** (2012). The structure of a novel glucuronoyl esterase from *Myceliophthora thermophila* gives new insights into its role as a potential biocatalyst.
- Chulalaksananukul W., Condoret J.S., Delorme P., Willemot R.M.** 1990. Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. *FEBS* **276**: 181-184
- Ďuranová M., Hirsch J., Kolenová K., Biely P.** (2009). Fungal Glucuronoyl Esterases and Substrate Uronic Acid Recognition. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 2483 – 2487
- Frampton M. B., Séguin J. P., Marquardt D., Harroun T. A., Zelisko P. M.** 2012. Synthesis of polyesters containing disiloxane subunits: Structural characterization, kinetics, and an examination of the thermal tolerance of Novozym-435. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **85– 86** :149– 155

Garcia T., Coteron A., Martinez M., Aracil J. 2000. Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst *Chem. Eng. Sci.* **55**: 1411–1423.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM (ed) The proteomics protocols handbook. *Humana Press*, New Jersey, Totowa, pp 571–607

Idris A., Bukhari A. 2012. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology Advances* **30**: 550-563

Khmelnitsky Y.L. & Rich J.O. 1999. Biocatalysis in nonaqueous solvents. *Chemical Biology* **3**: 47-53

Kolenová K., Vršanská M., Biely P. (2005). Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *Journal of Biotechnology* **121**: 338 – 345

Lee Y.E., Lowe S.E., Henrissat B. (1993). Characterization of the active site and thermostability regions of endoxylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. *Journal of Bacteriology* Vol.**175**: 5890 – 5898

Li X.-L., Špáníková S., de Vries R. P., Biely P. (2007). Identification of genes encoding microbial glucuronoyl esterases. *FEBS Letters.* **581**: 4029–4035

Mc Murry J. 2005. Οργανική χημεία Τόμος I, *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*. Σελ. 560-587

Pokkuluri P., Duke N. E. C., Wood S. J., Cotta M. A., Li X.-L., Biely P., Schiffer M. 2011. Structure of the catalytic domain of glucuronoyl esterase Cip2 from *Hypocrea jecorihna*. *Proteins* **79**: 2588–2592.

Polizeli M.L.T.M., Rizzatti A.C.S., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., Amorim D.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 577–591.

Richards S.A., Hollerton J.C. 2010. Essential NMR for Organic Chemistry. New Jersey: Wiley & Sons

Ryabova O., Vršanská M., Kaneko S., Willem H. van Zyl, Biely P. (2009). A novel family of hemicellulolytic α -glucuronidase. *FEBS Letters* **583**: 1457 – 1462

Saha B.C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 279–291.

Shuler L.M., Kargi F. (2005). Μηχανική Βιοδιεργασιών. Αθήνα: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ε.Μ.Π. σελ 79 – 87

Špáníková S., Biely P. (2006). Glucuronoyl esterase – Novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune*. *FEBS Letters* **258**: 4597 – 4601

Špáníková S., Poláková M., Joniak D., Hirsch J., Biely P. (2007). Synthetic esters recognized by glucuronoyl esterase from *Schizophyllum commune*. *Arch Microbiol* **188**: 185 – 189

Topakas E., Christakopoulos P., Faulds C. B. (2005). Comparison of mesophilic and thermophilic feruloyl esterases: Characterization of their substrate specificity for methyl phenylalkanoates. *Journal of Biotechnology* **115**: 355 – 366

Topakas E., Moukouli M., Dimarogona M., Vafiadi C., Christakopoulos P. (2010). Functional expression of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*: identification of the nucleophilic serine. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 1765 – 1772

Vafiadi C., Topakas E., Biely P., Christakopoulos P. (2009). Purification, characterization and mass spectrometric sequencing of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*. *FEMS Microbiol Lett* **296**: 178 – 184

van der Veen, P., Flipphi, M. J., Voragen, A. G. & Visser, J. (1991). Induction, purification and characterisation of arabinases produced by *Aspergillus niger*. *Arch Microbiol* **157**: 23–28

Wall P. E. (2005). Thin – Layer Chromatography: A modern practical approach. *The Royal Society of Chemistry*, UK

Wong K.K., Tan L.U., Saddler J. (1988). Multiplicity of β -1-4 xylanase in microorganism: functions and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **52**: 305 – 317

Yadav D. G., Dhoot B. S. 2009. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **57**: 34-39

Zaide G., Shallom D., Shulami S., Zolotnitsky G., Golan G., Baasov T. Shoham G. and Shoham Y. (2001). Biochemical characterization and identification of catalytic residues in α -glucuronidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Eur. J. Biochem.* **268**: 3006 – 3016

Δημαρόγκωνα Μ. 2012. Δομική και μοριακή μελέτη βιοκαταλυτών που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης. *Διδακτορική διατριβή Ε.Μ.Π.* Αθήνα. Σελ. 12

Κορδοπάτης Π. & Μαγκαφά Β. (2005). Μεθοδολογία απομόνωσης και ταυτοποίησης φυσικών προϊόντων II. Οδηγός Εργαστηριακών Ασκήσεων. *Πανεπιστήμιο Πατρών*

Μουκούλη Μ. (2012). Χρήση Μοριακών εργαλείων για τη μελέτη της καταλυτικής εξειδίκευσης των εστερασών του φερουλικού οξέος. *Διδακτορική διατριβή Ε.Μ.Π.* Αθήνα. Σελ. 9 – 17

Παππά Α. 2004. Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης. *Εκδόσεις Ε.Μ.Π.* Σελ. 48

Όξενκιουν-Πετροπούλου Μ. 2006. Φασματομετρικές Μέθοδοι. Αθήνα: *Εκδόσεις Συμμετρία.* Σελ. 383-407

Τόπακας Ε. (2004). Παραγωγή, Χαρακτηρισμός και τεχνολογική αξιολόγηση μικροβιακών εστερασών του φερουλικού οξέος της ημικυτταρίνης. *Διδακτορική διατριβή Ε.Μ.Π.* Αθήνα.

Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε. (2011). Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων. Αθήνα. *Εκδόσεις Ε.Μ.Π.* Σελ. 30 – 43