



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη συνεργιστικής δράσης μίας GH61 οξειδάσης
από το *Sporotrichum thermophile* κατά την υδρόλυση
λιγνινοκυταρινούχων υποστρωμάτων**



ΤΕΗΣΑ ΤΟΥΦΑ

Επιβλέπων καθηγητής : Π. Χριστακόπουλος

ΑΘΗΝΑ 2012

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου από την φοιτήτρια Τεήσα Τούφα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Χριστακόπουλο Πάυλο που δέχτηκε την εποπτεία της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Την διδάκτορα Μαρία Δημαρόγωνα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε , την υπομονή , την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της για την υλοποίηση της διπλωματικής εργασίας.

Την φίλη και συνάδελφο μου Ines Kayange για την άριστη συνεργασία , την ηθική υποστήριξη και την συμβολή της στην ευχάριστη και ομαλή πραγματοποίηση της διπλωματικής εργασίας.

Τον Λέκτορα Ευάγγελο Τόπακα που βοήθησε για την σωστή εκτέλεση μέρους της πειραματικής διαδικασίας.

Τα μέλη του εργαστηρίου για τη διάθεση τους να με βοηθήσουν και να μου λύσουν οποιαδήποτε απορία οποιαδήποτε στιγμή το χρειαζόμουν.

Θα ήθελα επίσης να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου που στήριξαν τις σπουδές μου με διάφορους τρόπους, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωση μου.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου, οι οποίοι μου συμπαραστάθηκαν όλο αυτό τον καιρό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς μπορούν να αποτελέσουν αποτελεσματική λύση της ενεργειακής κρίσης που προκλήθηκε τα τελευταία χρόνια από την εξάντληση των ορυκτών καυσίμων. Για την παραγωγή βιοαιθανόλης απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η χρήση ενζύμων που μετατρέπουν την λιγνινοκυτταρίνη σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Το κόστος της απομόνωσης των ενζύμων αυτών από διάφορους μικροοργανισμούς και της παραγωγής τους είναι ακόμα μεγάλο. Για το σκοπό αυτό γίνονται πολλές έρευνες για την μείωση του ενζυμικού φορτίου και κατά συνέπεια του κόστους παραγωγής βιοκαυσίμων.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη ένους μέλους της οικογένειας των γλυκοζιδικών υδρολασών 61 της CAZy από το *Sporotrichum thermophile*. Εξετάστηκε το συνεργιστικό αποτέλεσμα της StCel61 παρουσία κλασικών κυτταρινασών κατά την υδρόλυση υποστρωμάτων με διαφορετική περιεκτικότητα σε λιγνίνη. Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των υποστρωμάτων και τα αποτελέσματα που προέκυψαν συσχετίστηκαν με τη δραστηριότητα της StCel61. Βρέθηκε ότι ο βαθμός υδρόλυσης σύνθετων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών αυξάνει όταν η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συνδυάζεται με άλλα υδρολυτικά ένζυμα και ότι το ενισχυτικό αποτέλεσμα είναι υψηλότερο στα υποστρώματα με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιγνίνη.

| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ | Σελ. |
|--|-------------|
| I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 6 |
| 1. Εισαγωγή | 7 |
| 2. Φυτική βιομάζα | 8 |
| 2.1 Κυτταρικό τοίχωμα | 8 |
| 2.1.1 Πρωτογενές τοίχωμα του φυτικού κυττάρου (ΠΚΤ) | 8 |
| 2.2.2 Δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα | 10 |
| 3. Ενζυμική αποικοδόμηση φυτικής βιομάζας | 13 |
| 3.1 Γενικά | 13 |
| 3.2 Αποικοδόμηση κυτταρίνης | 15 |
| 3.3 Αποικοδόμηση ημικυτταρίνης | 16 |
| 4. Βιοαιθανόλη | 19 |
| 4.1 Πρώτες ύλες βιοαιθανόλης | 19 |
| 4.2 Πλεονεκτήματα της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων | 20 |
| 4.3 Βιομετατροπή λιγνοκυτταρινούχων υλικών σε βιοαιθανόλη | 22 |
| 5. <i>Sporotrichum thermophile</i> | 23 |
| 6. Οικογένεια GH61 | 25 |
| 6.1 Γενικά | 25 |
| 6.2 Δομικές ιδιότητες των μονοοξυγενασών πολυσακχαριτών (PMOs) | 26 |
| 6.3 Καταλυτική δράση της PMO | 28 |

| | |
|--|----|
| II. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ | 29 |
| 1.Υλικά | 30 |
| 1.1 Όργανα | 30 |
| 1.2 Χημικά αντιδραστήρια , ένζυμα , τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα | 31 |
| 2. Μικροοργανισμοί | 34 |
| 3. Μοριακές τεχνικές | 34 |
| 3.1 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα μετασχηματισμένα κύτταρα <i>P. Pastoris</i> | 34 |
| 3.2 Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών | 35 |
| 3.3 Έλεγχος βαθμού καθαρότητας | 35 |
| 3.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση | 35 |
| 3.3.2 Έλεγχος του βαθμού καθαρότητας | |
| 3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης | 37 |
| 4. Πειραματική διαδικασία | 38 |
| 4.1 Αντιδράσεις υδρόλυσης | 38 |
| 4.2 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων | 38 |
| III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 40 |
| 1. Παραγωγή και καθαρισμός της StCel61 | 41 |
| 2. Συνεργιστικός ρόλος της StCel61 | 42 |
| 3. Ουσίες με αντιοξειδωτική δράση και η επίδρασή τους στη λειτουργία της StCel61 πρωτεΐνης | 50 |
| 4. Συμπεράσματα | 53 |
| IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 55 |
| V. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ | 60 |

Συντμήσεις

- DPPH: 2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl, 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο
- TCEP: Tris (2-CarboxyEthyl)Phosphine, τρις φωσφορικό 2-χλωροαιθυλένιο
- Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane, τρις(υδροξυμεθυλο)-αμινο-μεθάνιο
- DNS ; Dinitrosalicylic acid (δινιτροσαλικυλικό οξύ)
- β-GLUC: β-glucosidase
- CBHI : Cellobiohydrolase
- EGII : Endo-β-glucanase
- PP1 ,PP2: Προϋδρολυμένοι αλκαλικοί πολτοί
- PWS : Pretreated Wheat Straw (Υδροθερμικά κατεργασμένο άχυρο σίτου)
- PS : Steam pretreated under weak acidic conditions spruce

I.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Εισαγωγή

Η λιγνοκυτταρινική βιομάζα είναι μία μεγάλη , ανανεώσιμη και αναξιοποίητη πηγή πόρων για την παραγωγή καυσίμων. Η χρήση των πηγών αυτών ενέργειας υπήρξε θέμα αυξημένου ενδιαφέροντος με αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια να γίνεται μεγάλος αριθμός ερευνών με στόχο την παραγωγή βιοκαυσίμων φιλικών προς το περιβάλλον αλλά με ταυτόχρονη απαίτηση για φθηνή παραγωγική διαδικασία και πρώτες ύλες.

Η διεργασία βιομετατροπής περιλαμβάνει τη χρήση ενζύμων για τη μετατροπή της λιγνοκυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα , τα οποία στη συνέχεια αποτελούν υποστρώματα για περαιτέρω επεξεργασία με τελικό προϊόν κυρίως την αιθανόλη.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη βιοχημικών ιδιοτήτων μιας γλυκοζυδικής υδρολάσης που ανήκει στην οικογένεια GH61 της βάσης δεδομένων CAZy και της αντιοξειδωτικής ικανότητας λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων με διαφορετική περιεκτικότητα σε λιγνίνη . Το συγκεκριμένο ένζυμο προερχόταν από τον νηματοειδή θερμοφιλό μύκητα *Sporotrichum thermophile*.

2. Φυτική βιομάζα

2.1 Κυτταρικό τοίχωμα

Το κυτταρικό τοίχωμα υπάρχει σε κάθε φυτικό κύτταρο και ανάλογα με τον τύπο και την λειτουργική συμπεριφορά του φυτικού κυττάρου διακρίνουμε σημαντικές παραλλαγές στη δομή και την οργάνωση του κυτταρικού τοιχώματός του.

2.1.1 Πρωτογενές τοίχωμα του φυτικού κυττάρου (ΠΚΤ)

Το ΠΚΤ συναντάται σε λειτουργικά φυτικά κύτταρα που βρίσκονται σε αύξηση. Χρησιμεύει ως ένα ανθεκτικό εξωτερικό περίβλημα, το οποίο προορίζεται να συγκρατεί και να προστατεύει το ζωντανό περιεχόμενο του κυττάρου, αντισταθμίζοντας συγχρόνως τις εσωτερικές τάσεις. Συμμετέχει στη διαμόρφωση του ωσμωτικού συστήματος, παρέχοντας μηχανική προστασία σ' αυτό.

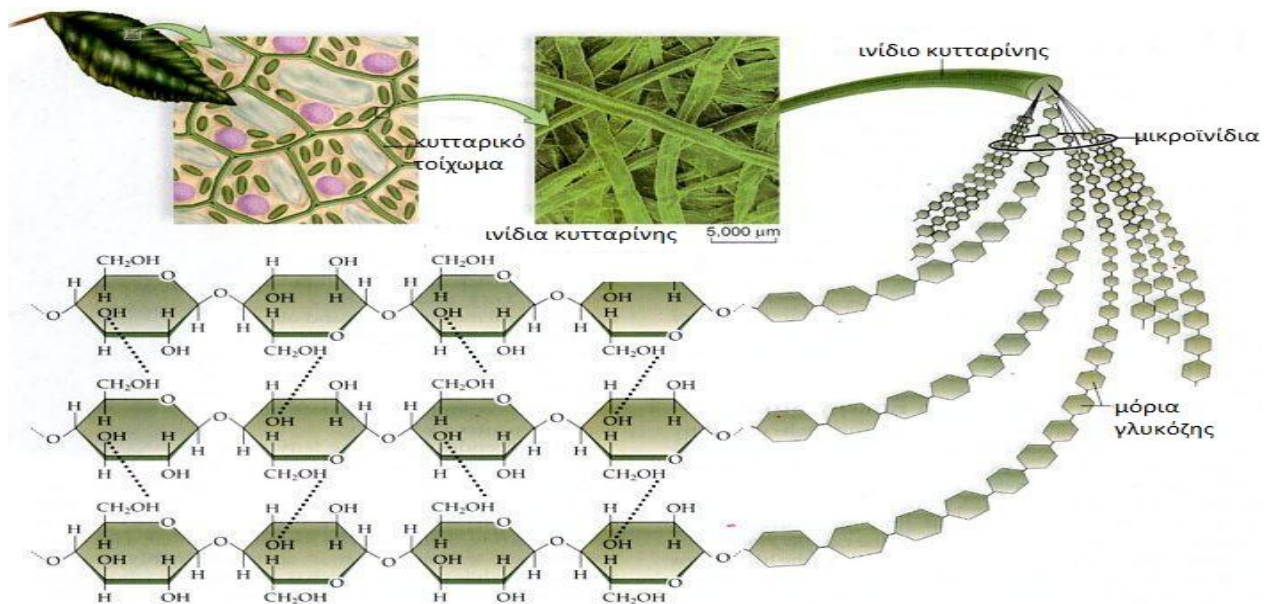
Το ΠΚΤ δεν είναι ένα απλό, συμπαγές, στατικό περίβλημα αλλά αυξάνει και μετασχηματίζεται παρακολουθώντας την πορεία της αύξησης του κυττάρου και την εξέλιξη του ιστού. Κατά τον μετασχηματισμό αυτό αλλάζει σε σχήμα, μέγεθος, σύσταση, δομή και υφή, καθώς νέα υλικά προστίθενται στη δομή του ήδη υπάρχοντος κυτταρικού τοιχώματος. Είναι λεπτό σε πάχος και παρουσιάζει ετερογένεια ως προς τη σύσταση και τη δομή.

Υπάρχουν παραλλαγές στη δομή και την οργάνωση του ΠΚΤ ανάλογα με τους λειτουργικούς σκοπούς των κυττάρων και των ιστών που συμμετέχει.

Σε γενικές γραμμές το ΠΚΤ είναι ένα δίκτυο ινών κυτταρίνης (CMS cellulose microfibrils) που συμπλέκεται και επικαλύπτεται από σταυρωτά συνδεόμενες ημικυτταρίνες. Τα ανωτέρω διαμορφώνουν μια μήτρ πολυσακχαριτών που περιέχουν πληθώρα ενζύμων και δομικών πρωτεϊνών οι οποίες ενισχύουν τη συναρμολόγηση του τοιχώματος.

Οι βασικοί πολυσακχαρίτες που υπάρχουν στον πρωτογενές τοίχωμα είναι:

α. Η **κυτταρίνη** , ένα μη διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, ενωμένων με β-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς, με επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα την κελλοβιόζη. Η δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των γειτονικών μορίων κυτταρίνης καθώς και η επίδραση των δυνάμεων van der Waals, έχουν σαν αποτέλεσμα την παράλληλη ευθυγράμμιση της και το σχηματισμό κρυσταλλικών δομών που συγκροτούν τα μικροϊνίδια .



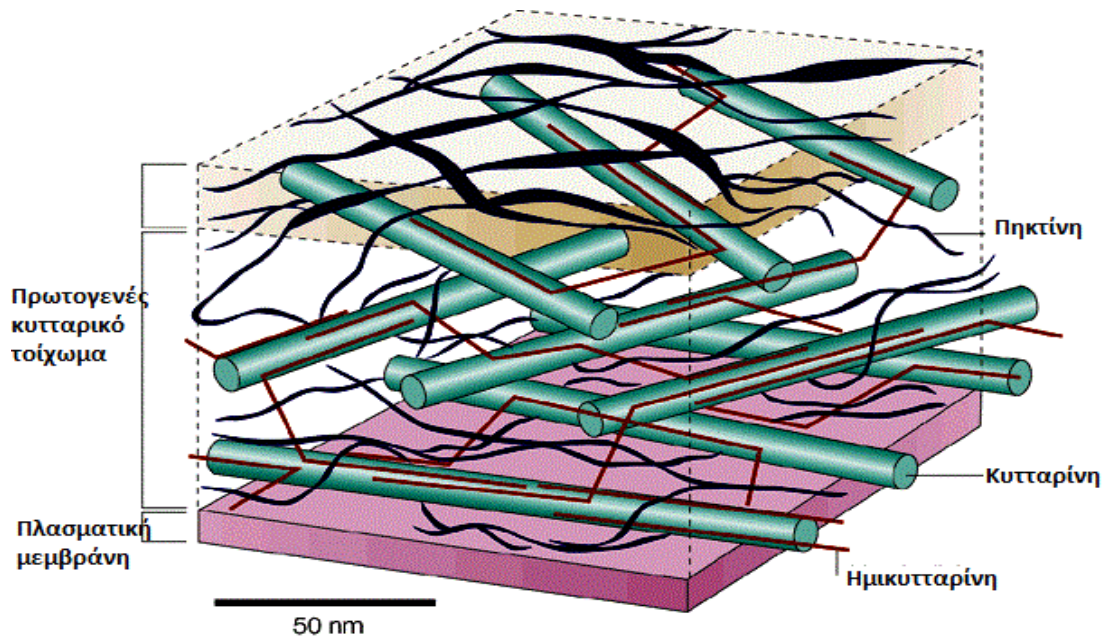
Εικόνα 2.1. Κυτταρίνη

Πηγή : www.joostdevree.nl

β. Η **ημικυτταρίνη** , ένας ετεροπολυσακχαρίτης που περιέχει σάκχαρα όπως εξόζες (D-γαλακτόζη, L-γαλακτόζη, D-μαννόζη, L-ραμνόζη), πεντόζες (D-ξυλόζη, L-αραβινόζη) και ουρονικά οξέα (D-γλυκουρονικό οξύ). Περιέχει επίσης σημαντικές ποσότητες οξικού οξέος (σαν υποκαταστάσεις των μονομερών που απαρτίζουν την κύρια σακχαρική αλυσίδα) καθώς και φαινολικά οξέα, όπως το φερουλικό και το κουμαρικό οξύ που βρίσκονται κυρίως ενωμένα με υποκαταστάτες αραβινόζης .

γ. Η **πηκτίνη** , ένα γραμμικό πολυμερές με επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες (D-γαλακτουρονικού οξέος) ενωμένες με (α-1-4 δεσμούς). Σταθεροποιεί το πλέγμα που

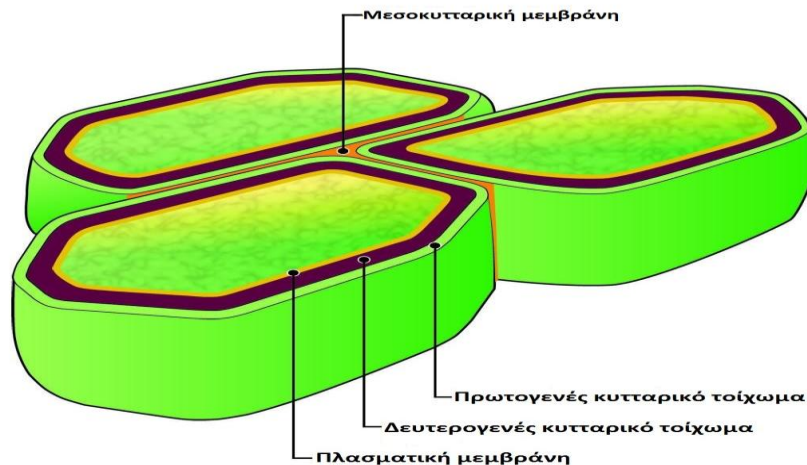
δημιουργείται από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη στο πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα.



Εικόνα 2.2. Πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα

2.1.2 Δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα

Το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα είναι μια δομή που βρίσκεται σε πολλά φυτικά κύτταρα, μεταξύ του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος και της πλασματικής μεμβράνης. Το κύτταρο αρχίζει να παράγει το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα αφότου το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα είναι πλήρες και το κύτταρο έχει σταματήσει να αυξάνεται.



Εικόνα 2.3. Κυτταρικό τοίχωμα του φυτικού κυττάρου

Το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, αλλά και άλλους πολυσακχαρίτες, λιγνίνη και γλυκοπρωτεΐνες.

Η λιγνίνη, είναι ένα αρωματικό πολυμερές που αποτελείται από φαινολικές αλκοόλες και παρεμβάλλεται ανάμεσα στα μικροϊνίδια κυτταρίνης σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς με την ημικυτταρίνη. Είναι εκείνη που ευθύνεται για την ανθεκτικότητα των φυτικών ιστών αλλά και την ξυλώδη υφή τους.

Η περιεκτικότητα σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνης διαφέρει αναλόγως του είδους της φυτικής ύλης. Παραδείγματος χάρη, η κυτταρίνη περιέχεται κατά 40-50% στο ξύλο και στο μπαμπού, κατά 95-99% στο βαμβάκι και κατά 20-30% στο φλοιό των δέντρων. Η περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνη είναι υψηλότερη στα φυλοβόλλα δέντρα (περίπου 36%) απ' ό τι στα αειθαλή δέντρα (περίπου 28%). Στην κατηγορία των φυλλοβόλων δέντρων ανήκουν αγγειόσπερμα φυτά, όπως η λεύκα, η οξιά, η σημύδα, ο ευκάλυπτος κ.ά.

Αντίθετα η λιγνίνη είναι περισσότερη στα αειθαλή δέντρα (περίπου 30%). Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται γυμνόσπερμα φυτά, όπως το πεύκο, το έλατο, το κυπαρίσσι κ.ά. Η κυτταρίνη είναι αδιάλυτη στους περισσότερους διαλύτες και

υδρολύεται δύσκολα υπό την επίδραση οξέων και ενζύμων. Η λιγνίνη αν και διασπάται σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους, δεν είναι ευδιάλυτη στο νερό. Επίσης, κατά την αποδόμησή της στους 525 Κ σχηματίζονται ρίζες φαινοξέος οι οποίες έχουν την τάση να σχηματίζουν ένα στερεό υπόλειμμα δια μέσου συμπύκνωσης ή πολυμερισμού. Η ημικυτταρίνη είναι σε μεγάλο βαθμό διαλυτή σε αλκαλικές συνθήκες και, ως εκ τούτου, πιο εύκολα υδρολύεται. (Πηγή: www.biomassenergy.gr)

Πίνακας 2.1. Περιεκτικότητα σακχάρων στο κλάσμα των υδατανθράκων της φυτικής ύλης (% κ.β.)

| Σάκχαρα | Φυλοβόλλα δέντρα | Αειθαλή δέντρα |
|----------------|-----------------------------|---------------------------|
| Γλυκόζη | 61-65 | 55-73 |
| Ξυλόζη | 9-13 | 20-39 |
| Μανόζη | 7-16 | 0,4-4 |
| Γαλακτόζη | 6-17 | 1-4 |
| Αραβινόζη | <3,5 | <1 |

3. Ενζυμική αποικοδόμηση φυτικής βιομάζας

3.1 Γενικά

Το συστατικό με την μεγαλύτερη αναλογία στα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά είναι κυτταρίνη και ακολουθούν η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη. Η σύνθεση και η αναλογία των ενώσεων αυτών βέβαια ποικίλλουν ανάλογα με τα διάφορα φυτά. Οι περιεκτικότητες μερικών λιγνοκυτταρινούχων σε λιγνίνη (%), σε ημικυτταρίνη (%) και σε κυτταρίνη (%).

Πίνακας 3.1. Σύνθεση μερικών λιγνοκυτταρινικών υλικών

| Λιγνοκυτταρινικά κατάλοιπα | Λιγνίνη(%) | Ημικυτταρίνη(%) | Κυτταρίνη(%) | Πηγή |
|----------------------------|------------|-----------------|--------------|---|
| Hardwood stems | 18-25 | 24-40 | 40-55 | Howard et al.(2003) Malhebre anf Cloete et al.(2002) |
| Softwood stems | 25-35 | 25-35 | 45-50 | Howard et al.(2003) Malhebre anf Cloete et al.(2002) |
| Nut shells | 30-40 | 25-30 | 25-30 | Howard et al.(2003) |
| Corn cobs | 15 | 35 | 45 | Howard et al.(2003) |
| Paper | 0-15 | 0 | 85-99 | Howard et al.(2003) |
| Rice straw | 18 | 24 | 32.1 | Howard et al.(2003) |
| Leaves | 0 | 80-85 | 15-20 | Howard et al.(2003) |
| Wheat straw | 16-21 | 26-32 | 29-35 | Rowell (1992), Prasad et al.(2007) |
| Barley straw | 14-15 | 24-29 | 31-34 | Rowell (1992) |

Η κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές που αποτελείται από μονάδες γλυκόζης ενωμένες με β-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς . Οι μεγάλες αυτές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals . Η κυτταρίνη συνήθως υπάρχει σε κρυσταλλική μορφή και σε μια μικρή ποσότητα μη οργανωμένων αλυσίδων κυτταρίνης που σχηματίζουν την άμορφη κυτταρίνη που είναι και πιο ευαίσθητη στην ενζυμική αποικοδόμηση (Pérez et al., 2002). Η ημικυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης με μικρότερο μοριακό βάρος από την κυτταρίνη. Η λιγνίνη συνδέεται με την ημικυτταρίνη και την κυτταρίνη προσφέροντας έτσι μία φυσική προστασία στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών.

Οι μικροοργανισμοί που κυρίως ευθύνονται για την αποικοδόμηση λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας είναι οι μύκητες και οι πιο αποτελεσματικοί είναι οι βασιδιομύκητες (ten Have and Teunissen, 2001; Bennett et al., 2002; Rabinovich et al., 2004). Υπάρχει η άποψη ότι η αποτελεσματική αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας σχετίζεται με μια συνήθεια μυκηλιακής αύξησης που επιτρέπει στο μύκητα να μεταφέρει θρεπτικές ουσίες όπως άζωτο και σίδηρο σε ένα φτωχό από θρεπτικά στοιχεία υπόστρωμα που αποτελεί και την πηγή άνθρακά του. (Hammel, 1997) .Η διάσπαση με μύκητες συμβαίνει στο εξωτερικό τμήμα του κυττάρου είτε έξω από αυτό λόγω της μη διαλυτότητας της λιγνίνης ,της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης. Τα ενζυμικά εξωκυτταρικά συστήματα των μυκήτων είναι δύο : το υδρολυτικό σύστημα που παράγει υδρολάσες που είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση των πολυσακχαρίτων και ένα μοναδικό οξειδωτικό και εξωκυτταρικό σύστημα που διασπά την λιγνίνη ανοίγοντας δακτυλίους φαινυλίου. Πολλοί και διάφοροι μικροοργανισμοί , κυρίως μύκητες , έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί ως λιγνινοκυτταρολυτικοί οργανισμοί .

3.2 Αποικοδόμηση κυτταρίνης

Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την διάσπαση της κυτταρίνης ονομάζονται κυτταρινάσες και αποτελούν ένα πολύπλοκο μίγμα πρωτεϊνών με διαφορετικές εξειδικεύσεις για την διάσπαση των β-1,4-γλυκοζιδικών δεσμών. Οι κυτταρινάσες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την δράση τους (Goyal et al., 1991; Rabinovich et al., 2002a,b) . Οι κατηγορίες αυτές είναι οι ενδογλουκανάσες ή ενδο-1-4-β-γλουκανάσες (EC 3.2.1.4) , οι κελλοβιοϋδρολάσες (EC 3.2.1.91) και οι β-γλυκοζιδάσες (EC 3.2.1.21) . Οι ενδογλουκανάσες που συχνά αποκαλούνται και καρβοξυ-μεθυλοκυτταρινάσες (λόγω του τεχνητού υποστρώματος που χρησιμοποιείται για την ανιχνεύσή τους) , επιτίθονται σε τυχαίες εσωτερικές θέσεις της άμορφης κυτταρίνης που ανοίγουν ώστε να συνεχίσουν το έργο τους οι κελλοβιοϋδρολάσες (Lynd et al., 1991). Οι κελλοβιοϋδρολάσες που αποκαλούνται και εξωγλουκανάσες , αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των κυτταρινασών με ποσοστό που φτάνει το 40-70% και μπορούν να υδρολύσουν εξαιρετικά κρυσταλλικές κυτταρίνες (Esterbauer et al., 1991; Rowell, 1992). Συγκεκριμένα αφαιρούν διμερή από το άκρο της αλυσίδας της γλυκάνης. Έπειτα οι β-γλυκοζιδάσες υδρολύουν την κελλοβιοζή και σε μερικές περιπτώσεις τους κελλοολιγοσακχαίτες σε γλυκόζη . Γενικά οι ενδογλουκανάσες και κελλοβιοϋδρολάσες λειτουργούν συνεργιστικά στην υδρόλυση της κυτταρίνης

Πίνακας 3.2. Κυτταρινάσες μυκήτων με την υψηλότερη ειδική δραστηριότητα

| Ένζυμο | Οργανισμός | Υποστρώματα | Ειδική δραστηριότητα (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹) | Βέλτιστη θερμοκρασία | Βέλτιστο pH |
|-------------------------------|--------------------------|---|---|----------------------|-------------|
| Mannan endo-1,4-β-mannosidase | <i>Sclerotium rofsii</i> | Galactoglucomannan/ galactomannans/ glucomannan/ mannans | 475 | 72-74 | 3.3 |

| | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|---|------|--------------------------|--------------------------|
| Cellulase | <i>Aspergillus niger</i> | Carboxymethylcellulose / cellohexaose/ cellopentaose/ cellotetraose/cellobiose / cellulose | 194 | 70 | 5 |
| 1,3-β-glucan glucohydrolase | <i>Achlya bisexuales</i> | Glucan/laminarin/ neutral glucan/ phosphoglucan | 7840 | 30 | 6 |
| 1,3-1,4-β-dglucan glucanohydrolase | <i>Orpinomyces sp.</i> | β-d-glucan/lichenin | 3659 | 45 | 5.8 |
| 1,3-β-dglucan glucanohydrolase | <i>Rhizopus chinensis</i> | β-glucan | 4800 | Δεν υπάρχουν στοιχεία | Δεν υπάρχουν στοιχεία |
| 1,6-β-dglucan glucanohydrolase | <i>Penicillium brefeldianum</i> | β-glucan/gentiobiose/ pachyman | 405 | 50 | 4.2 |

Πηγή: Howard et al. (2003).

3.3 Αποικοδόμηση ημικυτταρίνης

Τα ένζυμα που απαιτούνται για να ολοκληρωθεί η διάσπαση της ημικυτταρίνης είναι περισσότερα από αυτά στην κυτταρίνη επειδή έχει μεγαλύτερη ετερογένεια από αυτήν (Malherbe and Cloete, 2002). Οι ημικυτταρίνες βιοδιασπώνται σε μονομερή σάκχαρα και οξικό οξύ. Η ξυλάνη είναι ο κυριότερος υδατάνθρακας που υπάρχει στην ημικυτταρίνη και η επιτυχής αποδόμησή της απαιτεί την συνεργιστική δράση διαφόρων υδρολυτικών ενζύμων.

Οι ημικυτταρίνες χωρίζονται ανάλογα με την δράση τους σε υποστρώματα σε α) ενδο-1,4-β-ξυλανάσες που ελευθερώνουν ξυλο-ολιγοσακχαρίτες από την διάσπαση της ξυλάνης και β) ξυλοζιδάσες που ελευθερώνουν ξυλόζες από τους ολιγοσακχαρίτες (Jeffries, 1994). Επιπλέον η αποδόμηση της ημικυτταρίνης χρειάζεται και άλλα ένζυμα όπως οι ακετυλ-εστεράσες, οι εστεράσες του φερουλικού οξέος, οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες (α-L-arabinofuranosidases) και οι α-(4-O-μέθυλ) γλυκουρονοζιδάσες (α-(4-O-methyl) glucuronosidases). Όλα αυτά τα ένζυμα δρουν συνεργιστικά για την αποτελεσματική υδρόλυση των ξυλανών και των μαννανών. Στην περίπτωση της Ο-ακετυλ-4-O-μεθυλογλυκουροξυλάνης (O-acetyl-4-O-methylglucuronoxylan), που είναι μία από τις πιο κοινές ημικυτταρίνες, χρειάζονται τέσσερα διαφορετικά ένζυμα για αποικοδόμηση: ενδο-1-4-ξυλανάση (ενδοξυλανάσες), ακετυλο-εστεράση, α-γλυκουρονιδάση και β-ξυλοζιδάση.

Πίνακας 3.3. Ημικυτταρινάσες μυκήτων με την υψηλότερη ειδική δραστηριότητα

| Ένζυμο | Οργανισμός | Υποστρώματα | Ειδική δραστηριότητα (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹) | Βέλτιστη θερμοκρασία | Βέλτιστο pH |
|---------------------|------------------------------------|---|---|----------------------|-------------|
| β-glucosidase | <i>Humicola insolvens</i> | (2-hydroxymethylphenyl)-β-d-glucopyranoside | 267 | 50 | 5 |
| Endo-1,4-β-xylanase | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> | 1,4-β-d-xylan | 6630 | 45 | 5 |
| Endo-galactanase | <i>Aspergillus niger</i> | - | 6593 | 50-55 | 3.5 |
| Endo-β-1,4- | <i>Sclerotium</i> | Galactogluco | | | |

| | | | | | |
|---|--------------------------------------|---|------|-------|---------|
| mannanase | <i>rolfsii</i> | mannan/ mannans/ galactomann ans/ glucomannan s/ | 380 | 72-74 | 2.9/3.3 |
| α -l- Arabinofuranosi dase | <i>Aspergillus</i> <i>Niger</i> | 1,5- α - larabinofuran ohexaose/ 1,5- α - larabinotriose / 1,5-l- arabinan/ α - larabinofuran otriose | 397 | 50-60 | 3.4-4.4 |
| α -Galactosidase | <i>Mortierella</i> <i>vinacea</i> | Melibiose | 2000 | 60 | 4 |

Πηγή: Howard et al. (2003).

4. Βιοαιθανόλη

4.1 Πρώτες ύλες βιοαιθανόλης

Οι πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης χωρίζονται σε 3 κατηγορίες ,τις αμυλούχες ύλες , τις σακχαρούχες ύλες και τις κυτταρινούχες ύλες.

Στις **αμυλούχες** πρώτες ύλες ανήκουν φυτά όπως το σιτάρι , το κριθάρι , η σίκαλη , ο αραβόσιτος ,το σόργο , η κασάβα και οι πατάτες κ.α. Το άμυλο χρησιμοποιείται σαν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης καθώς μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε σάκχαρο και κατόπιν σε αιθανόλη.

Στις **σακχαρούχες πρώτες** ύλες περιέχονται υψηλά ποσοστά σακχάρων που μέσω αλκοολικής ζύμωσης και με την συμβολή μικροοργανισμών μετατρέπονται σε αιθανόλη. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν φυτά όπως το γλυκό σόργο , το ζαχαροκάλαμο , το ζαχαρότευτλο και η μελάσσα (παραπροϊόν της παρασκευής ζάχαρης από ζαχαροκάλαμο και ζαχαρότευτλο) . Το ζαχαρότευτλο χρησιμοποιείται στην Ευρώπη, κυρίως στη Γαλλία και το ζαχαροκάλαμο στη Βραζιλία. Η μελάσσα που περιέχει σημαντικά ποσά σακχαρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης είναι η κύρια πρώτη ύλη παραγωγής βιοαιθανόλης στην Ινδία .(Pandey et al. 2009)

Χαρακτηριστικό των δύο προηγούμενων κατηγοριών είναι ότι μόνο μέρη των πρώτων υλών (άμυλο , σάκχαρο) χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Επίσης οι πρώτες αυτές ύλες ονομάζονται ύλες πρώτης γενιάς και η βιοαιθανόλη, βιοαιθανόλη πρώτης γενιάς.

Στις **λιγνινοκυτταρινούχες** πρώτες ύλες ανήκουν τα υπολείμματα γεωργικών καλλιεργειών (άχυρο , κλαδιά , φύλλα) , τα δασικά υπολείμματα (καυσόξυλα) , τα υπολείμματα επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων (πυρηνόξυλο , πυρήνες φρούτων) , τα στερεά αστικά απόβλητα , τα υπολείμματα από τη βιομηχανία χαρτιού , ενεργειακά φυτά και διάφορα λιγνινοκυτταρινούχα απόβλητα (άχυρο ρυζιού , κοτσάνια καλαμποκιού , switchgrass, βαγάσση φοινικών κ.α)

Σε αντίθεση με τις πρώτες ύλες πρώτης γενιάς, οι λιγνινοκυτταρινούχες ύλες χρησιμοποιούνται εξολοκλήρου για την παραγωγή βιοκαυσίμων και ονομάζονται ύλες δεύτερης γενιάς (Rutz and Janssen 2007). Επειδή το κόστος των πρώτων υλών παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία παραγωγής βιοαιθανόλης μια καλή επιλογή είναι τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά που είναι άφθονα και φθηνά. Το 2007 το Υπουργείο Ενέργειας των ΗΠΑ διέθεσε περισσότερο από 1 δισεκατομμύριο δολάρια για έρευνες που αφορούν λιγνινοκυτταρινούχα υλικά ως πρώτη ύλη με σκοπό να κάνουν το κόστος των καυσίμων ανταγωνιστικό σε 1.33 δολάρια ανά γαλόνι το 2012. Αντίθετα στην ΕΕ η υποστήριξη του ερευνητικού τομέα που ασχολείται με το θέμα αυτό είναι πολύ μικρότερη και ανέρχεται στα 68 εκατομμύρια δολάρια. Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά θα μπορούσαν να παράγουν έως και 442 δισεκατομμύρια λίτρα βιοαιθανόλης /έτος. Το άχυρο ρυζιού είναι ένα από τα πιο άφθονα υλικά απόβλητα στον κόσμο. Ετησίως παράγεται περίπου 731 εκατομμύρια τόνοι και διανέμεται στην Αφρική (20,9 εκατομμύρια τόνοι), στην Ασία (667.6 εκατομμύρια τόνοι), Ευρώπη (3.9 εκατομμύρια τόνοι), Αμερική (37.2 εκατομμύρια τόνοι), και Ωκεανία (1,7 εκατομμύρια τόνοι). Η ποσότητα αυτή του άχυρου ρυζιού μπορεί να παράγει 205 δισεκατομμύρια λίτρα βιοαιθανόλης ανά έτος που είναι η μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας που μπορεί να παραχθεί από ένα υλικό.

4.2 Πλεονεκτήματα της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων

Μερικά από τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα της χρήσης βιοκαυσίμων είναι:

- Η γεωγραφική κατανομή των πηγών για τα υγρά βιοκαύσιμα είναι πιο ομοιόμορφη από τα ορυκτά καύσιμα, έτσι ο εφοδιασμός ενέργειας θα είναι εγχώριος και ασφαλέστερος.
- Οι λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες ελαχιστοποιούν το ενδεχόμενο να υπάρξει ανταγωνισμός ανάμεσα στην καλλιεργήσιμη γη που χρησιμοποιείται

για τα τρόφιμα (και τις ζωοτροφές) και αυτή για την παραγωγή ενέργειας. Αυτή η πρώτη ύλη είναι πιο φθηνή από τις συμβατικές γεωργικές πρώτες ύλες και μπορεί να παραχθεί με λιγότερες ποσότητες φυτοφαρμάκων , λιπασμάτων και ενέργεια.

- ✚ Τα βιοκαύσιμα από λιγνίνη παράγουν λιγότερες εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου μειώνοντας έτσι τις αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον.
- ✚ Τα βιοκαύσιμα μπορούν επίσης να παράσχουν την απασχόληση στις αγροτικές περιοχές

4.3 Βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε βιοαιθανόλη

Τα κύρια στάδια για την βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε βιοαιθανόλη είναι τέσσερα : προκατεργασία, υδρόλυση, ζύμωση και ο διαχωρισμός/καθαρισμός των προϊόντων .

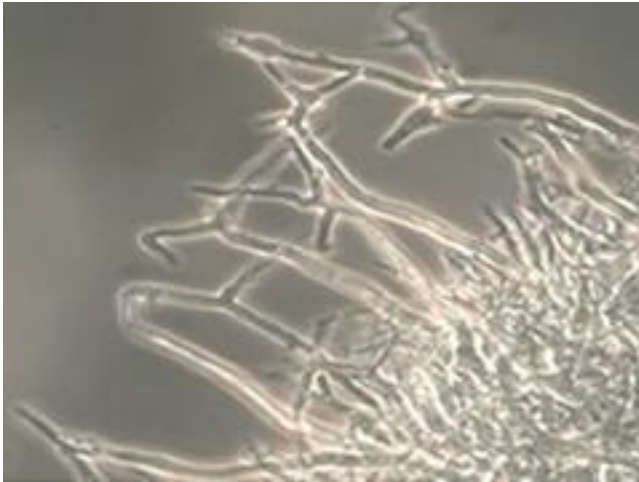
Στο στάδιο της προκατεργασίας μεταβάλλεται η μακροσκοπική και μικροσκοπική δομή του υλικού ώστε το προκύπτον υλικό να καταστεί επιδεκτικότερο στην ενζυμική υδρόλυση (κυρίως με την απελευθέρωση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης από τη λιγνίνη). Στο στάδιο της υδρόλυσης πραγματοποιείται η μετατροπή των πολυμερών κυτταρίνης και ημικυτταρίνης σε άμεσα μεταβολίσιμα σάκχαρα (εξόζες, πεντόζες) κυρίως με την χρήση ενζύμων (κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες). Ακολουθεί το στάδιο της ζύμωσης των παραγόμενων σακχάρων σε βιοαιθανόλη με τη βοήθεια αιθανολοπαραγωγών μικροοργανισμών. Τέλος, η αιθανόλη ανακτάται με απόσταξη ενώ η εναπομένουσα λιγνίνη ανακτάται σαν παραπροϊόν είτε καίγεται για την παραγωγή θερμότητας ή ηλεκτρικής ενέργειας για την διαδικασία αυτή .



Εικόνα 4.1. Βιομετατροπή φυτικής βιομάζας σε αιθανόλη. Πηγή: www.theresilientearth.com

5. *Sporotrichum thermophile*

Μερικά από τα συνώνυμα του μύκητα αυτού είναι *Chrysosporium thermophilum* , *Thielavia heterothallica* , *Corynascus heterothallicus* και αντιπροσωπεύει το εγγενές στάδιο του μύκητα *Myceliophthora thermophila* που είναι ένας ετεροθαλλικός ασκομύκητας που αντιπροσωπεύει το εγγενές στάδιο (τελεομορφή).



Εικόνα 5.1. Μύκητας *Sporotrichum thermophile*

Μολονότι ο μύκητας *S. thermophile* μεγαλώνει βέλτιστα μεταξύ 35-48 ° C, μπορεί να καλλιεργηθεί σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 25-55 ° C και αντέχει σε σύντομη έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες όπως 59 ° C. Αυτός ο θερμόφιλος μύκητας απομονώνεται συχνά από το έδαφος και την λιπασματοποιημένη φυτική ύλη που αυτοθερμαίνεται (Domsch, K.H. et al. 1993) και συμβάλλει στην αποσύνθεση των δομικών πολυσακχαριτών της (Bhat et al. 1987) . Είναι κατάλληλος για την αποδόμηση του ξύλου και άλλων κυτταρινικών υποστρωμάτων. Οι ώριμες αποικίες του έχουν καφέ ανοιχτό χρώμα και μία υφή πούδρας.

Παράγει θερμοσταθερά ένζυμα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανικές βιοδιεργασίες υψηλής θερμοκρασίας. Έχουν χαρακτηριστεί αρκετά εξωκυτταρικά λιγνινο και κυτταρινολυτικά θερμοένζυμα του μύκητα αυτού όπως : ενδογλυκανάση, β-γλυκοζιδάση, εξωγλυκανάση , λακκάση ,ενδοξυλανάση κ.α. Άλλα ένζυμα που απομονώνονται από *S. thermophile* περιλαμβάνουν: β-γλυκοζιδάση , πηκτινάση , οι λιπάσες , αμυλάσες ,φυτάσες κ.α. Επίσης ο *S. thermophile* μπορεί να παράγει μια σειρά

από ενδιαφέροντα βιομόρια όπως : αναστολείς πρωτεάσης θειόλης (thiol protease inhibitors) , αντιμικροβιακούς ξυλο-ολιγοσακχαρίτες , και φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες .

Ο *S.thermophile* παρόλο που αναπτύσσεται περίπου με τον ίδιο ρυθμό και σε υπόστρωμα γλυκόζης (0.1 h^{-1}) και σε υπόστρωμα κυτταρίνης ($0.09-0.16 \text{ h}^{-1}$) οι αποικίες έχουν διαφορετική μορφολογία ανάλογα με το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται. Για παράδειγμα όταν αναπτύσσεται σε κυτταρίνη παρατηρείται αυτόλυση και παραγωγή σπορίων ενώ όταν αναπτύσσεται σε κελλοβιόζη παρατηρείται μακρύ ινώδες μηκύλλιο.

Πίνακας 5.1. Ταξινόμηση του μύκητα *S. thermophile* .

Taxonomy ID:573728 ,σύμφωνα με το NCBI και τη Uniprot ,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> και <http://www.uniprot.org/taxonomy/>].

| | |
|-----------------|--------------------------|
| Επικράτεια | Eukaryota |
| Βασίλειο | Fungi |
| Υποβασίλειο | Dikarya |
| Φύλο | Ascomycota |
| Υπόφυλο | Pezizomycotina |
| Υπερσυνομοταξία | Leotiomyceta |
| Συνομοταξία | Sordariomyceta |
| Ομοταξία | Sordariomycetes |
| Υφομοταξία | Sordariomycetidae |
| Τάξη | Sordariales |
| Οικογένεια | Chaetomiaceae |
| Γένος | Thielavia |
| Είδος | Thielavia heterothallica |

7. Οικογένεια GH61

7.1 Οικογένεια GH61

Η οικογένεια 61 γλυκοζιδικών υδρολασών (GH) παρόλο που αποτελεί μία πολύ υποσχόμενη οικογένεια πρωτεϊνών, οι πληροφορίες που έχουμε για την δραστικότητα και τον μηχανισμό τους παραμένουν αδιευκρίνιστες για τα περισσότερα μέλη της. Περιλαμβάνει πάνω από 240 μέλη και όλα προέρχονται από ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μέχρι πρόσφατα έχουν βρεθεί η δομή 5 μελών και έχουν χαρακτηριστεί μόνο 2.

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής είναι γνωστές πάνω από 20 χρόνια αλλά έχουν προκαλέσει σύγχυση στους επιστήμονες. Η πρώτη GH61 πρωτεΐνη που περιγράφηκε γνωστή ως CEL1 είχε απομονωθεί από τον μύκητα *Agaricus bisporus* το 1992 [Raguz et al. 1992]. Από τότε μέχρι και πρόσφατα επικρατούσε λανθασμένα η άποψη ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής παρουσίαζαν ασθενή κυτταρινολυτική δράση και έτσι είχαν κατηγοριοποιηθεί στις γλυκοζιδικές υδρολάσες.

Η Cel61A από τον νηματοειδή μύκητα *Hypocrea jecorina* είναι το μέλος της οικογένειας αυτής που είχε μελετηθεί καλύτερα και ήταν γνωστό ότι είναι μια ενδογλουκανάση αλλά δεν ήταν σαφές αν αυτή είναι κύρια δραστηριότητα ή λειτουργία αυτής της οικογένειας *in vivo*. Άλλοι οργανισμοί από τους οποίους έχουν μελετηθεί πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής είναι οι *Agaricus bisporus* (Raguz et al., 1992), *Cryptococcus neoformans* (Chang and Kwon-Chung, 1998), *Aspergillus kawachii* (Hara et al., 2003), *Cochliobolus heterostrophus* (Lev and Horwitz, 2003), *Aspergillus nidulans* (Bauer et al., 2006), *H. jecorina* (Saloheimo et al., 1997; Foreman et al., 2003), *Phanerochaete chrysosporium* (Wymelenberg et al., 2002), *Thermoascus aurantiacus* και *T. terrestris* (Harris et al., 2010), και *Volvariella volvacea* (Ding et al., 2006). *Thermoascus aurantiacus* (Langston et al., 2011), *Phanerochaete chrysosporium* (Westereng et al., 2011), *H. irregular* (Yakovlev et al., 2012)

Πρόσφατες μελέτες όμως έδειξαν ότι ο τρόπος που πραγματικά λειτουργούν οι GH61 δεν συμπίπτει αυτή των γλυκοζιδικών υδρολασών . Το 2005 , μία πρωτεΐνη (CBP21) από την οικογένεια CBM33 (carbohydrate module 33 family) χωρίς εμφανή ενζυματική δραστικότητα έδειξε ότι ενισχύει το βαθμό υδρόλυσης της χιτίνης (Vaaje-Kolstad et al. 2005a; Vaaje-Kolstad et al. 2005b).

Η δομική ομοιότητα των πρωτεϊνών της οικογένειας GH61 με την CBM33 οδήγησε στην υπόθεση ότι και οι GH61 αποτελούν ενισχυτικούς παράγοντες κατά την υδρόλυση της κυτταρίνης . Αυτό επιβεβαιώθηκε και από τους Harris et al. το 2010 που πρώτοι έδειξαν με πειράματα μεταλλαξογένεσης ότι η ενισχυτική αυτή δράση απαιτεί την παρουσία μετάλλου . Πιο πρόσφατη μελέτη των Vaaje-Kolstad et al το 2010 έδειξε ότι οι CBM33s που ενεργούν στη χιτίνη είναι πράγματι μεταλλοένζυμα που διασπούν την αλυσίδα του πολυσακχαρίτη μέσω ενός οξειδωτικού μηχανισμού που εξαρτάται από έναν εξωτερικό δότη ηλεκτρονίων.

Μετά τις δημοσιεύσεις αυτές για τις CBM33s πρωτεΐνες αποδείχθηκε ότι ο οξειδωτικός αυτός μηχανισμός ισχύει και για τα GH61 ένζυμα και ότι το συγκεκριμένο μέταλλο που απαιτείται είναι ο χαλκός και έτσι ταξινομήθηκαν στην ομάδα ενζύμων γνωστών πια ως μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών που δεσμεύουν το χαλκό (Cu-dependent polysaccharide monooxygenases PMOs) (Phillips et al. 2011; Quinlan et al. 2011 ; Zifcakova et al. 2012)

7.2 Δομικές ιδιότητες των μονοοξυγενασών των πολυσακχαριτών (PMOs)

Είναι μικρές πρωτεΐνες με μοριακή μάζα που κυμαίνεται από 20 εως 50 kDa. Η πρώτη δομή προσδιορίστηκε από τους Karkehabadi et al το 2008 και ανέδειξε μία πρωτεΐνη που αναδιπλώνεται σε β-σάντουιτς με δύο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα και έχει τοπολογία ανάλογη της ανοσοσφαιρίνης . Η δομή τους αυτή παρουσιάζει ομοιότητα με

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

Το ενεργό τους κέντρο δεν μοιάζει με αυτή των γλυκοζιδικών υδρολασών αλλά αποτελείται από μία μεγάλη πολική επιφάνεια με λίγες αρωματικές πλευρικές αλυσίδες και μοιάζει με αυτό της μονοοξυγενάσης του μεθανίου (methane monoxygenase Cu-MMO) . Και τα δύο ένζυμα εμπλέκονται με την οξειδωτική χημεία υποδεικνύοντας ότι το στήριγμα χαλκού-ιστιδίνης (copper histidine brace) αντιπροσωπεύει μία ειδική κατηγορία οξειδασών χαλκού. (Quinlan et al. 2011).

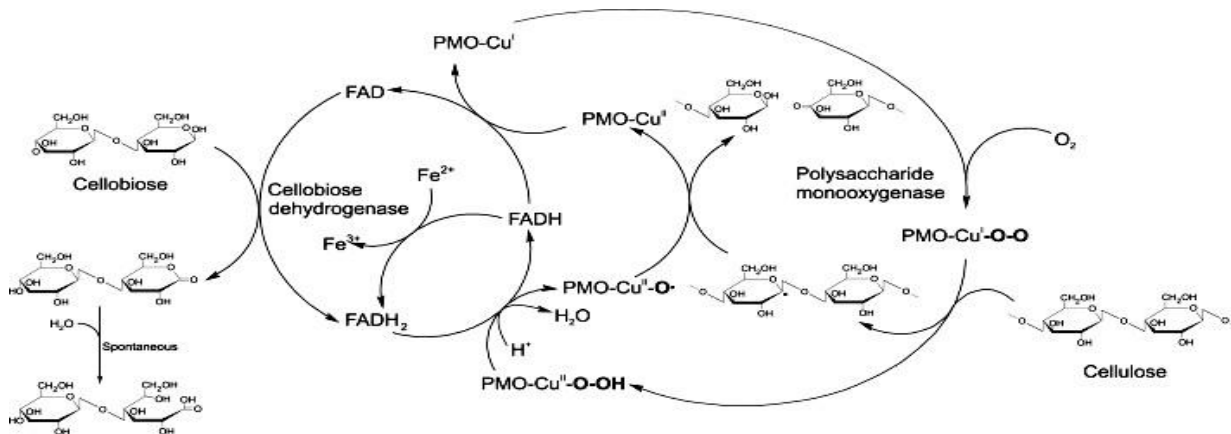
Η σημασία του ατόμου του χαλκού για την δραστικότητα του ενζύμου αποδεικνύεται από το γεγονός ότι το ένζυμο ήταν ανενεργό στην απουσία μετάλλου (Koseki et al. 2008) ή μετά από την προσθήκη EDTA ως χηλικός παράγοντας (Vaaje-Kolstad et al. 2010) και επίσης παρατηρήθηκε ότι η δράση της PMO μετά από την επεξεργασία με EDTA θα μπορούσε να αποκατασταθεί από την προσθήκη χαλκού (Westereng et al. 2011).

Η PMO δεσμεύει τον Cu^2 με στοιχειομετρία 1:1. Ο Cu^2 συνδέεται στο ενεργό κέντρο τόσο ισχυρά που η ολική απομάκρυνσή του είναι σχεδόν αδύνατη. Οποιαδήποτε ποσότητα χαλκού από το διάλυμα ή από το υπόστρωμα μπορεί να είναι αρκετή για να ενεργοποιήσει την PMO, ανεξάρτητα από την προσθήκη άλλων μετάλλων (Quinlan et al. 2011). Για παράδειγμα η PcGH61D πρωτεΐνη που κλωνοποιήθηκε από τον *P. chrysosporium* έχει από μόνη της Cu στο ενεργό κέντρο έτσι δεν χρειάζεται καμία προσθήκη ιόντων άλλου μετάλλου για την ενζυμική δράση (Westereng et al. 2011).

7.3 Καταλυτική δράση της PMO

Οι PMO πρωτεΐνες καταλύουν την κυτταρίνη οξειδωτικώς και απελευθερώνουν κελλοδεξτρίνες (Langston et al. 2011; Phillips et al. 2011; Quinlan et al. 2011).

Προτείνεται ότι σε κάθε καταλυτικό κύκλο μεταφέρονται δύο ηλεκτρόνια μεταξύ της κελλοβιόζης αφυδρογονάσης (cellobiose dehydrogenase) και της PMO .



Εικόνα 7.1. Αντιδράσεις που καταλύονται από την PMO και η συνεργασία της με την κελλοβιόζη αφυδρογονάσης .

Αυτές οι δύο δρουν συνεργιστικά και αυξάνουν την συνολική μετατροπή της κυτταρίνης από τις κυτταρινάσες (κελλοβιοϋδρολάσες και ενδογλουκανάσες). Παρουσία της κυτταρίνης και της β-γλυκοζιδάσης , η μονοοξυγενάση ενισχύει την δράση της β-γλυκοζιδάσης κατά πολλές φορές (Phillips et al. 2011. Jordan et al. 2012).

Ο συνεργιστισμός αυτός πιστεύεται ότι προέρχεται κυρίως από την παραγωγή των ελεύθερων άκρων για τις κελλοβιοϋδρολάσες και συνεπώς για την προαγωγή της δραστηριότητάς τους (Langston et al. 2011). Για παράδειγμα η PcGH61D κόβει την κυτταρίνη στο γλυκοζιδικό δεσμό αφήνοντας ένα από τα νέα άκρα της αλυσίδας οξειδωμένα σε μία λακτόνη , η οποία αργότερα μετατρέπεται αυθόρμητα σε αλδονικό οξύ (Westereng et al. 2011)

II.ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

1. Υλικά

1.1 Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την επιτυχή έκβαση των πειραμάτων σ' αυτήν την εργασία είναι τα παρακάτω.

Καλλιέργεια :

- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα).
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία).
- Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying), Christ ALPHA 1-4, B. Braun Biotec. International, Melsungen, Γερμανία.
- Φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, (Labequip, Καναδάς)

Καθαρισμός πρωτεΐνης:

- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή συμπύκνωσης Amicon: Amicon chamber 8400 με μεμβράνη Diaflo PM-10, μέγεθος αποκλεισμού 10 kDa, Millipore, Billerica, USA.
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Milli-Q (Millipore, ΗΠΑ).
- Συλλέκτης κλασμάτων (Waters, Millipore, Η.Π.Α.).
- Μονάδα ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό πρωτεϊνών Mini-PROTEAN 3 (BIORAD, Η.Π.Α).

Αντιδράσεις υδρόλυσης :

- Θερμαινόμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία).
- Φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, (Labequip, Καναδάς)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες

Αντιδράσεις οξείδωσης:

- Φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, (Labequip, Καναδάς)
- Soxhlet

Άλλα

- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Ιξωδόμετρο Ostwald.
- Πιπέτες
- Ζυγαριές

1.2 Χημικά αντιδραστήρια , ένζυμα , τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα

Τα **εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα** που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις υδρόλυσης ήταν :

1. β-γλυκοζιδάση (BLUC) από το μύκητα *Aspergillus niger*
2. κελλοβιοϋδρολάση I (CBHI) από το μύκητα *Trichoderma longibrachiatum* (Megazyme , Ιρλανδία)
3. ενδο-β-γλουκανάση (EGII) από το μύκητα *Trichoderma longibrachiatum* (Megazyme , Ιρλανδία)
4. πολυενζυμικό κυτταρινολυτικό μίγμα Celluclast από το μύκητα *Trichoderma reesei* (Novozymes , Δανία)

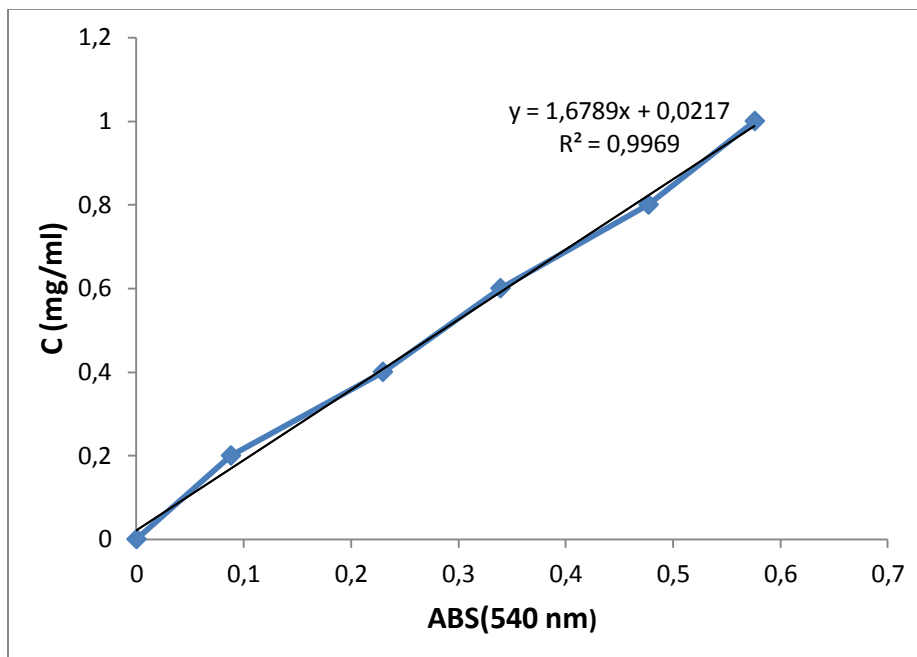
Τα **λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα** που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα (συνεργιτισμού και μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας) ήταν:

1. PP1 και PP2 που ήταν δύο προϋδρολυμένοι αλκαλικοί πολτοί από μαλακό ξύλο και αποτελούνται 60% από έλατο και 40% από μικρά κομμάτια πεύκου. Το καθένα είχε διαφορετική ποσότητα λιγνίνης ,δηλαδή η συστασή τους ήταν 79.3% γλουκάνη, 13.4% ημικυτταρίνη, 6.9% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 0.4% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ για το PP1 και 96.3% γλουκάνη, 2.5% ημικυτταρίνη, 1.0% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 0.2% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ για το PP2. Ο πολτός PP2 είχε λιγότερη λιγνίνη καθώς είχε υποβληθεί σε ένα επιπλέον στάδιο απολιγνινοποίησης παρουσία οξυγόνου.
2. Υδροθερμικά κατεργασμένο άχυρο σίτου (Pretreated Wheat Straw, PWS) από την εταιρία Inbicon (Skaerbaek, Δανία). Ο χρόνος παραμονής στον υδροθερμικό αντιδραστήρα ήταν κατά μέσο όρο 12 min ενώ η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή στους 190 °C με παροχή ατμού (Thomsen, Thygesen et al. 2006). Η σύστασή του PWS (50.2% γλουκάνη, 3.8% ημικυτταρίνη, 25.5% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ, 2.8% άμυλο) προσδιορίστηκε με βάση τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Xiros and co-workers (Xiros, Katapodis et al. 2009).
3. Έλατο προκατεργασμένο με ατμό (190°C, 5 min) υπό ήπιες όξινες συνθήκες (Steam pretreated under weak acidic conditions spruce, PS) από την εταιρεία SEKAB E-Technology (Örnsköldsvik, Sverige), με σύσταση 51.4% γλουκάνη, 7.0% ημικυτταρίνη, 39.7% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 1.6% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ

Στα πειράματα αυτά επίσης χρησιμοποιήθηκε ο αναγωγικός παράγοντας τρις-φωσφορικό 2-χλωροαιθυλένιο, (Tris (2-CarboxyEthyl) Phosphine, TCEP) και η προκατεργασμένη κυτταρίνη ευκαλύπτου.

Η μέτρηση αναγωγικών σακχάρων (σάκχαρα με ελεύθερο το ημιακεταλικό υδροξύλιο) πραγματοποιήθηκε με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Η

μέθοδος αυτή βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο προαναφερθέν υδροξύλιο και το δινιτροσαλικυλικό οξύ κατά την θέρμανση σε θερμοκρασία πάνω από 70°C. Το σύμπλοκο αυτό , εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540 nm. Από τους μέσους όρους των μετρήσεων υπολογίστηκε η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης και με την βοήθειά της υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των σακχάρων των διαλυμάτων. Παρακάτω δίνεται η καμπύλη αναφοράς γλυκόζης.



Διάγραμμα 1.1 Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης.

Τέλος στα πειράματα για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αδιάλυτων λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε η ελεύθερη ρίζα DPPH· από την εταιρεία SIGMA.

2.Μικροοργανισμοί

Ο θεرمόφιλος μύκητας *Sporotrichum thermophile* ή *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464 από την εταιρεία DSMZ (DSM No:1799, Γερμανία). Η συντήρηση του μικροοργανισμού γινόταν στους 4 °C σε δοκιμαστικούς σωλήνες με στερεό υπόστρωμα υπό κλίση (slant) μετά από επώαση στους 45 °C για 5-6 ημέρες. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν κάθε 20-30 ημέρες προς αποφυγή μολύνσεων.

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών προμηθεύτηκαν από την εταιρία Invitrogen (Η.Π.Α). Δηλαδή για την ετερόλογη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος X-33 της μεθυλότροφης ζύμης *Pichia pastoris* (γονότυπος: άγριος τύπος, φαινότυπος: Mut+).

3.Μοριακές τεχνικές

3.1 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα μετασηματισμένα κύτταρα *P. pastoris*

Καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας

Μετά την επιλογή του κατάλληλου κλώνου , χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 6 κωνικών των 250 ml που περιείχαν το καθένα 50 ml BMGY. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση 1 ημέρα. Οπότε μετά από 24h επιλέχθηκαν 4 από τις κωνικές (με βάση το OD) και έγινε η μεταφορά των ανασυνδυασμένων κυττάρων σε 1 lt μέσου BMMG με $OD_{600}=1$. Η επαγωγή έγινε για το προκαθορισμένο χρονικό διάστημα με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης σε τελική συγκέντρωση 0.5% (v/v). Μετά από το διάστημα 5 ημερών οι καλλιέργειες συλλέχθηκαν , φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 1500 xg, 4 °C και το υπερκείμενο φυλάχθηκε για το επόμενο στάδιο του καθαρισμού.

3.2 Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Μετά την φυγοκέντριση το υπερκείμενο της καλλιέργειας διηθούταν αρχικά με διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια υπό κενό χρησιμοποιώντας φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.8 και 0.2 μm (Pall Supor Membrane Disc Filters, Pall Filters). Ακολούθησε συμπύκνωση με τη βοήθεια της συσκευής Amicon (Amicon chamber 8400, Millipore, Billerica, Η.Π.Α με μεμβράνη που επέτρεπε τη δίοδο μακρομορίων μικρότερων από 10 kDa) μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει στους 20 με 30 ml. Το συμπύκνωμα εξισοροπήθηκε με διαπίδυση έναντι ρ. δ. 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl (διάλυμα Talon) και στη συνέχεια φορτώθηκε σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (Talon, Clontech; εσωτερική διάμετρος 1.0 cm, μήκος 15 cm) εξισοροπημένη σε δ. Talon. Ακολούθησε έκπλυση της στήλης με 60 ml ίδιου δ/τος για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων ουσιών και έκλουση της επιθυμητής πρωτεΐνης με εφαρμογή δ/τος Talon με γραμμικά αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (0-100 mM). Τα κλάσματα που περιείχαν πρωτεΐνη συλλέχθηκαν και αφαλατώθηκαν με διαπίδυση έναντι ρ. δ. 20 mM Tris-HCl pH 8.

3.3 Ελεγχος βαθμού καθαρότητας

3.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση

Αφού αναμείχθηκαν 15 ml των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων (~1-5 μg πρωτεΐνης) με 7 ml διαλύματος φόρτωσης (1 g SDS, 5 ml 0.25 M Tris pH 6.8, 2.5 ml 50% (w/w) γλυκερόλη, 2.5 ml μερκαπτοαιθανόλη, 4 ml 0.1% (w/v) κυανούν βρωμοφαινόλης) ακολούθησε βρασμός για 5-7 min. Στη συνέχεια τα δείγματα καθώς και 5-7 ml πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) φορτώθηκαν στις υποδοχές δειγμάτων και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση με 35 mA/πήκτωμα για περίπου 1 h. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή απομακρύνθηκε από τις γυάλινες πλάκες και εμβαπτίστηκε στο διάλυμα χρωματισμού (40% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ, 0.4% (w/v)

Coomassie G-250) όπου παρέμενε για περίπου 20 min υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια έγινε αποχρωματισμός και εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με συνεχείς πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού (40% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ).

3.3.2 Ο έλεγχος του βαθμού καθαρότητας

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

Τα μέρη της πηκτής πολυακρυλαμιδίου ήταν η πηκτή διαχωρισμού (resolving gel) και η πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel). Οι αναλογίες των συστατικών τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.1. Αναλογίες συστατικών της πηκτής διαχωρισμού και επιστοιβάξης.

| | Πηκτή διαχωρισμού (resolving gel) 12.5% | Πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) 4% |
|----------------------------|--|---|
| Υπερκαθαρό νερό | 3.5 ml | 3 ml |
| 0.25 M Tris 0.2% (w/v) SDS | 9.4 ml (pH 8.8) | 3.75 ml (pH 6.8) |
| 40 % ακρυλαμίδιο | 5.8 ml | 0.75 ml |
| TEMED | 30 μl | 20 μl |
| 10% (w/v) APS | 90 μl | 60 μl |

Αρχικά δυο γυάλινες πλάκες καθαρίστηκαν με αιθανόλη και τοποθετήθηκαν σε κάθετη θέση ώστε να τοποθετηθεί πρώτα η πηκτή διαχωρισμού και μετά από 30 min η πηκτή επιστοιβάξης. Οι δύο πηκτές τοποθετήθηκαν με χρονική διαφορά για να ολοκληρωθεί αρχικά ο πολυμερισμός της πηκτής διαχωρισμού. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε μια ειδική πλαστική χτένα για τον σχηματισμό των θέσεων φόρτωσης των δειγμάτων. Όταν η πηκτή ήταν έτοιμη οι γυάλινες πλάκες μεταφέρθηκαν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (εικόνα 3.1) και η χτένα απομακρύνθηκε. Στη συσκευή προστέθηκαν περίπου 500 ml δ/τος ηλεκτροφόρησης (30.3 g/l Tris, 144 g/l γλυκίνη, 1% (w/v) SDS, pH 8.3).



Εικόνα 3.1 Συσκευή ηλεκτροφόρησης

3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951) η οποία στηρίζεται στην αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin και την οξείδωση των αρωματικών αμινοξέων (κυρίως τρυπτοφάνης και τυροσίνης). Η συγκέντρωση του ανηγμένου αντιδραστηρίου Folin μετρείται με την απορρόφηση στα 750 nm. Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης αλβουμίνης ορού βοδιού (Bovine Serum Albumin).

4. Πειραματική διαδικασία

4.1 Αντιδράσεις υδρόλυσης

Κατά τις αντιδράσεις υδρόλυσης προστέθηκαν σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 3% (w/v) 1.5 ml ενζυμικού μίγματος διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=5 παρουσία 0.02 % (w/v) NaN_3 . Σε μερικά πειράματα προστέθηκε TCEP σε τελική συγκέντρωση 5 mM και σε άλλα 31 mg λιγνίνης πάνω από τα υποστρώματα ώστε να δούμε τι επίδραση είχαν οι αναγωγικές ουσίες στην δραστηριότητα των ενζύμων που μελετήθηκαν. Τα εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα και οι αντίστοιχες ποσότητες τους που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά εκφρασμένες σε mg πρωτεΐνης / g υποστρώματος ήταν οι ακόλουθες: 11, 2.5 και 14 για τα Celluclast, EGII and CBHI, αντίστοιχα. Ακόμα κάθε φορά γινόταν προσθήκη β-γλυκοζιδάσης σε ποσοστό ~3% (w/w) επί του συνολικού πρωτεϊνικού φορτίου. Όλες οι αντιδράσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν σε σωλήνες τύπου erpendorf των 2 ml οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενο επωαστήρα Erpendorf Thermomixer Comfort (Erpendorf, Γερμανία) υπό ανάδευση 1000 rpm και σε συγκεκριμένη θερμοκρασία. Τέλος σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα των 60 μl από τις αντιδράσεις και μετρούνταν τα αναγωγικά σάκχαρα με την μέθοδο DNS. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από δύο φορές .

4.2 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων

Για να μελετήσουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα χρησιμοποιήθηκαν λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα σε στερεή μορφή καθώς και το εκχύλισμα μεθανόλης αυτών. Η εκχύλιση με μεθανόλη πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Soxhlet (η μεθανόλη πέρασε από το υπόστρωμα 10 φορές, διαδικασία που διήρκεσε περίπου 5 h) και ακολούθησε ξήρανση υπό κενό (Suzuki et al., 2008). Για τη μέτρηση της

αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η ελεύθερη ρίζα DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο).

Πίνακας 4.1. Οι ποσότητες ανά υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας

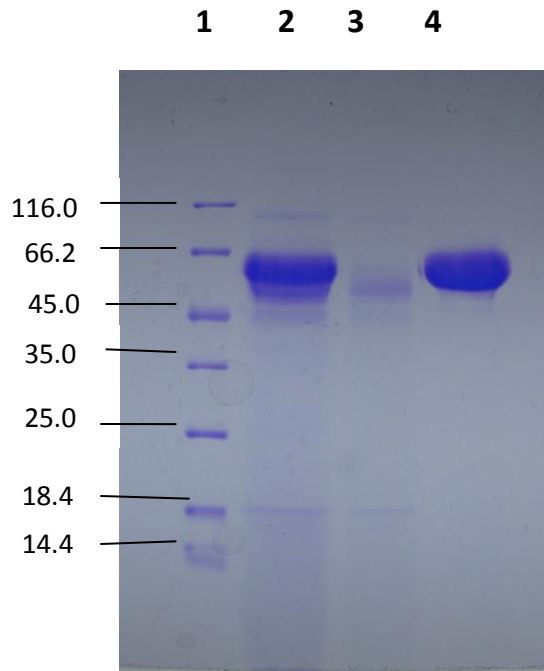
| Υπόστρωμα | Ποσότητα (mg) |
|-----------|--------------------|
| PWS, PS | 1, 2, 3, 4 |
| PP1 | 10, 20, 30, 40 |
| PP2 | 100, 200, 300, 400 |

Η ελεύθερη ρίζα DPPH· απορροφά στα 517 nm και από τη μείωση στην τιμή της μετρούμενης απορρόφησης κατά τη δέσμευσή της από την υπό μελέτη ουσία γίνεται η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης της ουσίας. Δηλαδή , αρχικά μετρήθηκε η απορρόφηση στα 517 nm διαλύματος DPPH· σε μεθανόλη συγκέντρωσης 0.01 mg/ml και μετά έγινε προσθήκη υποστρώματος σε 20 ml του διαλύματος DPPH·. Στη συνέχεια το μίγμα αναδεύτηκε για 10 min και κατόπιν μετρήθηκε η απορρόφηση στα 517 nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμήθηκε από την ποσότητα του υποστρώματος που απαιτούνταν για την κατανάλωση του 50% της αρχικής ποσότητας DPPH· (EC₅₀).

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Παραγωγή και καθαρισμός της StCel61

Καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας του 1lt ήταν υπό συνεχή ανάδευση για 6 ημέρες στους 180 rpm και προστέθηκαν καθημερινά 5 ml μεθανόλη . Στη συνέχεια απομονώθηκε η StCel61 και ακολούθησε ο καθαρισμός της με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Κατόπιν η καθαρότητά της αξιολογήθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE . Τέλος με τη μέθοδο Lowry η συγκέντρωσή της βρέθηκε 1.47 mg/ml



Εικόνα 1.1. SDS-PAGE της StCel61. 1/ πρότυπο διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών χαμηλών MB ,2/ εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας ανασυνδιασμένης *P. Pastoris* , 3/ έξοδος στήλης TALON και 4/καθαρή StCel61.

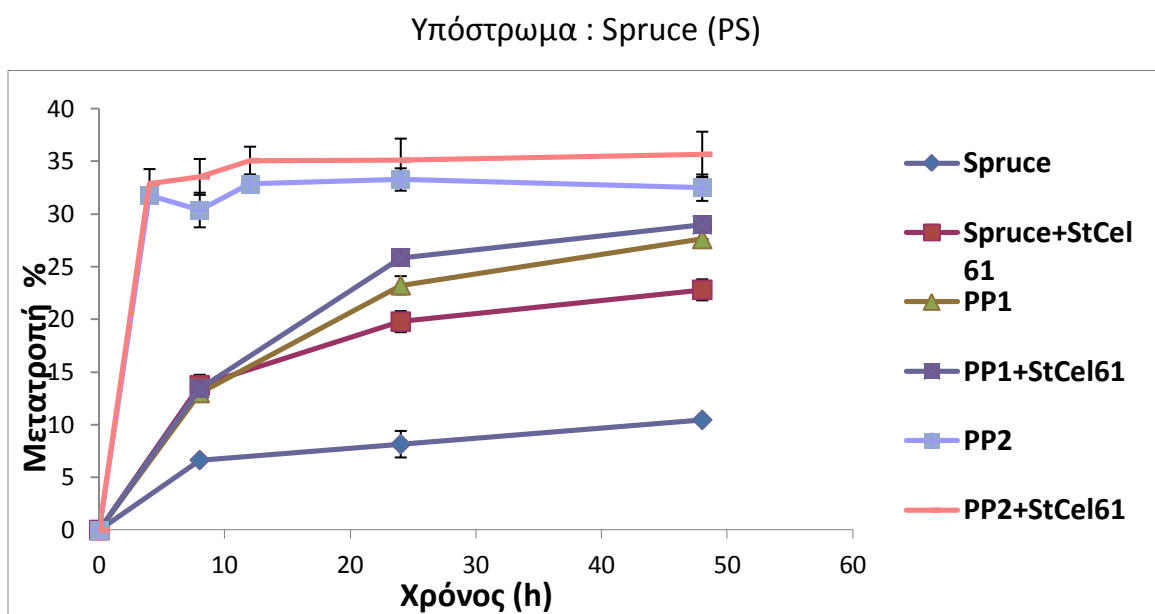
2. Πειράματα συνεργιτισμού με την StCel61

Με σκοπό να διευκρινιστεί το πως δρα η StCel61 σε συνεργασία με άλλες κυτταρινάσες ή και μόνη της πραγματοποιήθηκαν μια σειρά πειραμάτων σε διάφορα υποστρώματα. Για το σκοπό αυτό συνδυάστηκε με μίγμα καθαρών κυτταρινασών αλλά και με το εμπορικό κυτταρινολυτικό σκεύασμα Celluclast από το μύκητα *T.reesei*. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δύο ειδών : α) καθαρές κυτταρίνες και β) σύνθετα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα .

Συγκεκριμένα η καθαρή κυτταρίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η προκατεργασμένη κυτταρίνη ευκαλύπτου. Ενώ τα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το PS(προκατεργασμένο έλατο σε ήπιες όξινες συνθήκες) ,τα PP1 και PP2 (δύο προϋδρολυμένοι αλκαλικοί πολτοί από αγγειόσπερμα-αιθαλή δέντρα). Τα ένζυμα διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών/φωσφορικών 100 mM pH 5 παρουσία 1 mM $MnCl_2$ και 0.02% (w/v) NaN_3 .

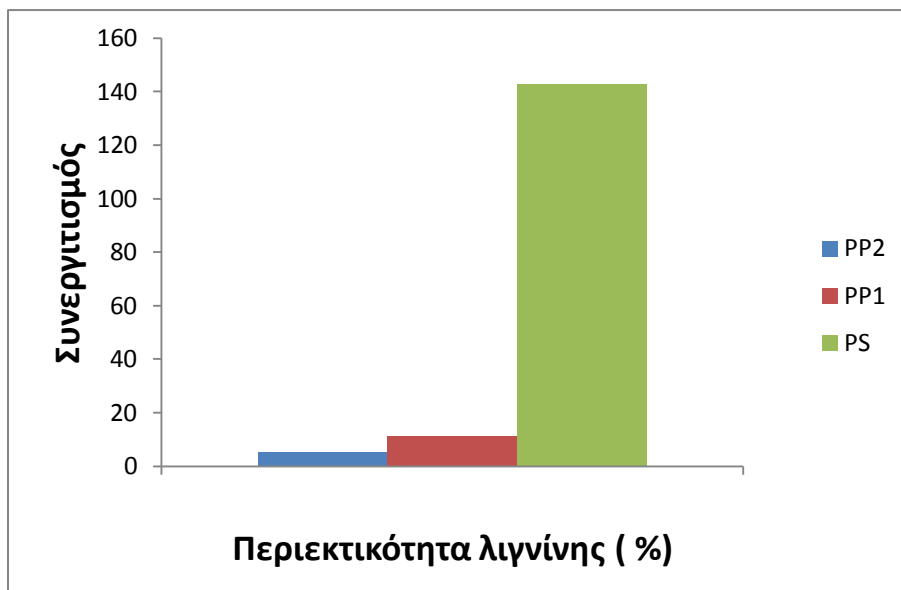
Προσδιορίστηκε η % μετατροπή της κυτταρίνης για τα διάφορα ενζυμικά μίγματα θεωρώντας τα μετρούμενα αναγωγικά σάκχαρα ως ανάλογα γλυκόζης . Τα αποτελέσματα των πειραμάτων και οι αντίστοιχες ποσότητες υποστρωμάτων και ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά φαίνονται παρακάτω :

🌱 *StCel61* σε συνδυασμό με το εμπορικό κυτταρινολυτικό σκεύασμα *Celluclast*



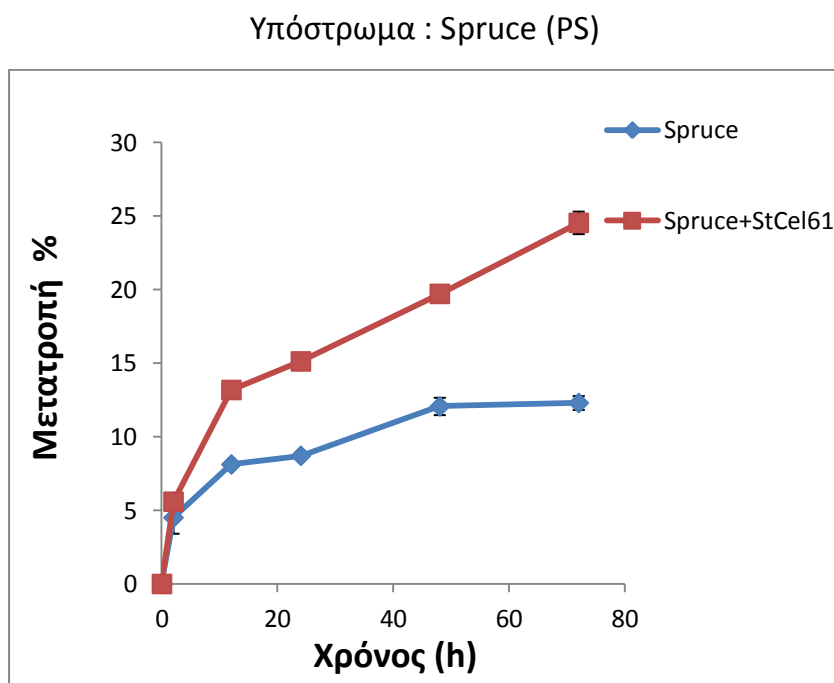
Διάγραμμα 2.1. Συνεργιστικό αποτέλεσμα της *StCel61* με *Celluclast* κατά την υδρόλυση στο Spruce (PS) , στο PP1 και στο PP2.

Στο διάγραμμα 2.1 βλέπουμε ότι στα υποστρώματα που η περιεκτικότητα σε λιγνίνη ήταν μεγαλύτερη παρατηρήθηκε υψηλότερη ενίσχυση μετατροπής %. Για παράδειγμα στις 24 h με την προσθήκη *StCel61* για το PS η συνολική μετατροπή διπλασιάστηκε ενώ η αντίστοιχη βελτίωση για το PP1 και το PP2 ήταν πολύ χαμηλότερη (11.24 % και 5.4 % αντίστοιχα). Αυτό φαίνεται και από το παρακάτω διάγραμμα όπου όσο η περιεκτικότητα σε λιγνίνη αυξάνεται τόσο αυξάνει και ο συνεργισμός.



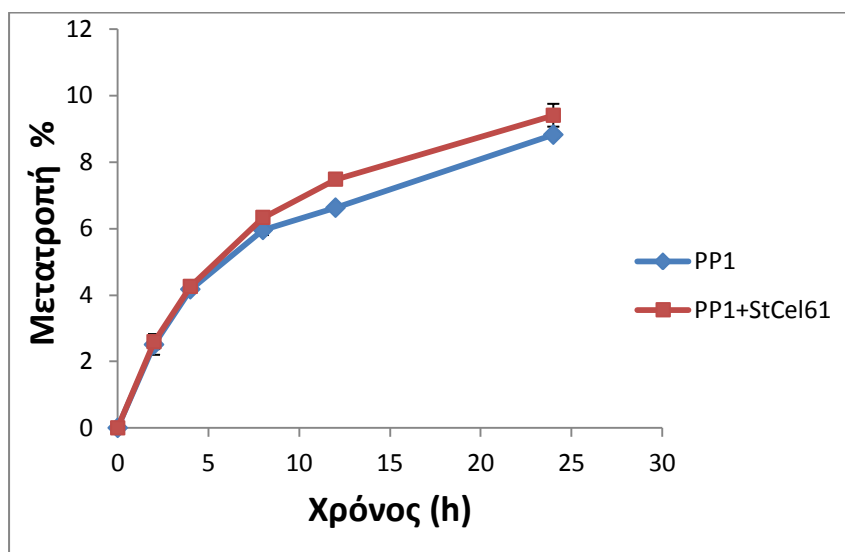
Διάγραμμα 2.2. Συνεργισμός ανάλογα με την περιεκτικότητα λιγνίνης (%) στο PS , στο PP1και στο PP2.

🌱 *StCel61* σε συνδυασμό με το μίγμα καθαρών κυτταρινασών



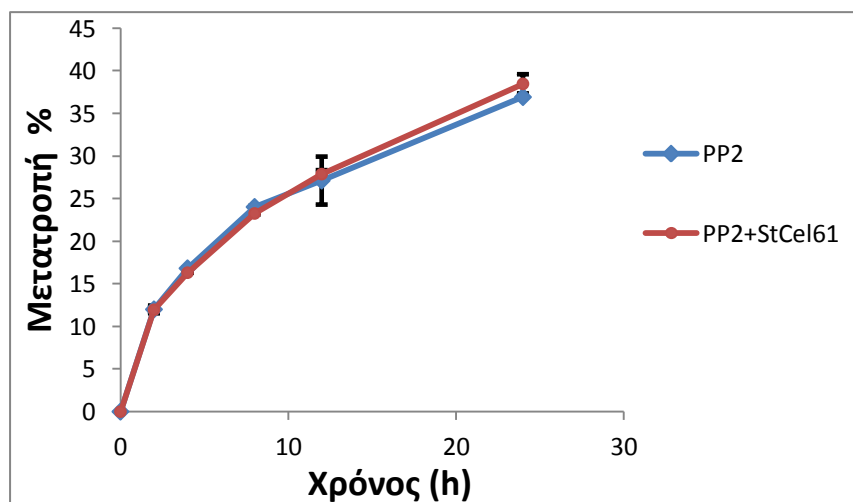
Διάγραμμα 2.3. Συνεργιστικό αποτέλεσμα της *StCel61* με EGII και CBHI.

Υπόστρωμα : PP1



Διάγραμμα 2.4. Συνεργιστικό αποτέλεσμα της StCel61 με EGII και CBHI.

Υπόστρωμα : PP2

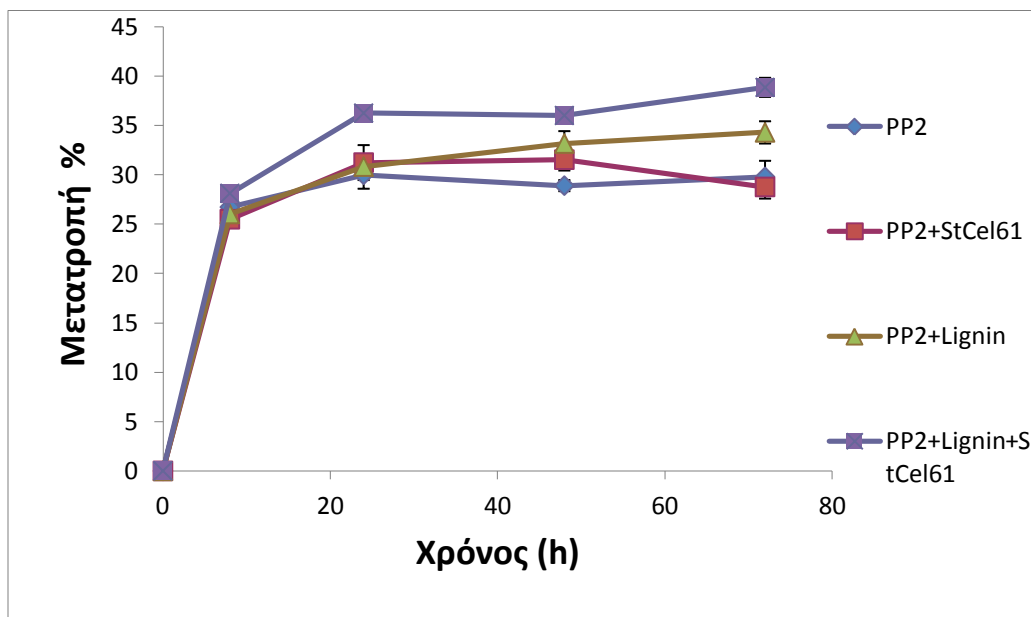


Διάγραμμα 2.5. Συνεργιστικό αποτέλεσμα της StCel61 με EGII και CBHI.

Όταν αντί για το Celluclast χρησιμοποιήθηκε μίγμα καθαρών κυτταρινασών τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια. Παρατηρήθηκε υψηλότερη αύξηση του βαθμού υδρόλυσης στα υποστρώματα με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιγνίνη. Συγκεκριμένα στις 12 h είχαμε για το spruce 62 % ενίσχυση της μετατροπής % , 13 % για το PP1 και μόλις 2.8 για το PP2.

☀ Υδρόλυση υποστρωμάτων με προσθήκη λιγνίνης από συνδυασμό Celluclast-GH61

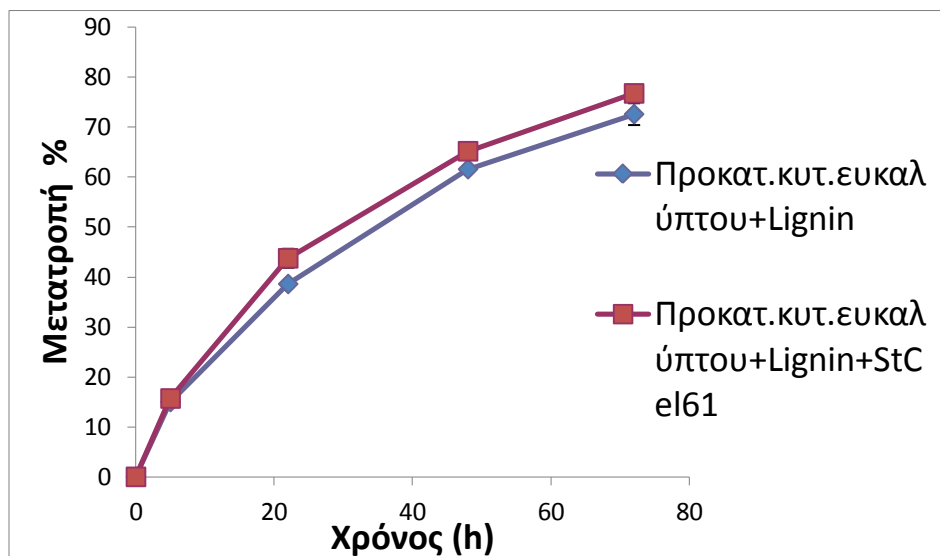
Υπόστρωμα : PP2 και λιγνίνη.



Διάγραμμα 2.6 Επίδραση της προσθήκης λιγνίνης κατά την υδρόλυση του PP2 από το Celluclast παρουσία ή χωρίς StCel61.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αφορούν την προσθήκη της StCel61 σε PP2 με μικρή περιεκτικότητα σε λιγνίνη και σε PP2 με επιπλέον καθαρή λιγνίνη. Παρατηρήθηκε ότι μετά από 72h στα δείγματα που η λιγνίνη υπήρχε σε μικρή περιεκτικότητα η ενίσχυση της μετατροπή% ήταν ελάχιστη έως και μηδενική σε αντίθεση με αυτά που προστέθηκε λιγνίνη όπου ο βαθμός μετατροπή % ήταν σημαντικός.

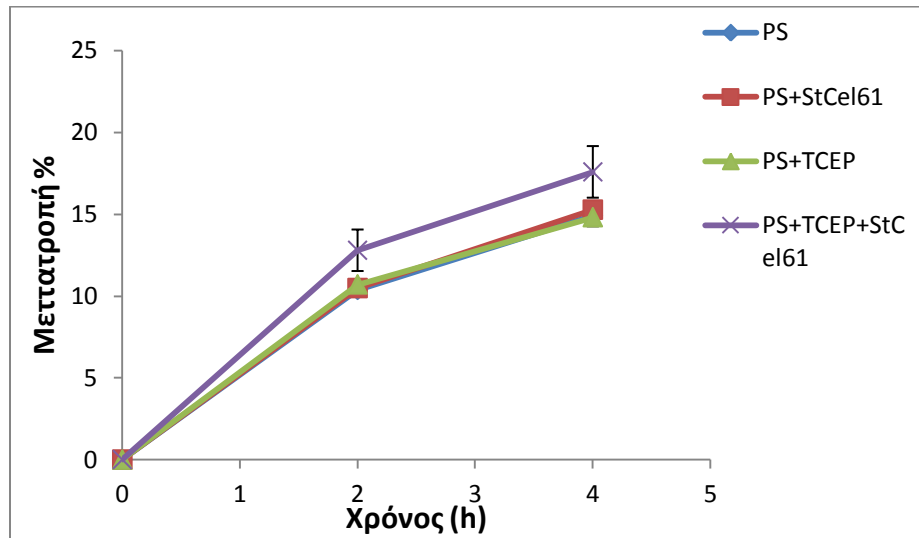
Υπόστρωμα : Προκατεργασμένη κυτταρίνη ευκαλύπτου και λιγνίνη



Διάγραμμα 2.7. Συνεργιστικό αποτέλεσμα της StCel61 με Celluclast κατά την υδρόλυση υποστρώματος προκατεργασμένης κυτταρίνης ευκαλύπτου και λιγνίνης.

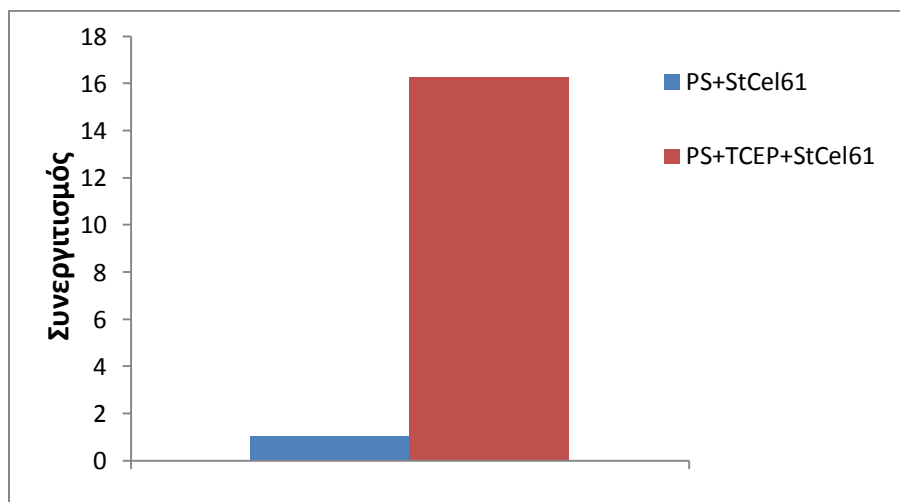
Στο παραπάνω πείραμα έγινε προσθήκη λιγνίνης σε προκατεργασμένη κυτταρίνη ευκαλύπτου που είναι καθαρή κυτταρίνη, σε αντίθεση με τα προηγούμενα υποστρώματα (PS, PP1, PP2) που περιέχουν από μόνα τους κάποια ποσότητα λιγνίνης. Και εδώ τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μετά από 72 h αποδεικνύουν το καθοριστικό ρόλο της λιγνίνης στις αντιδράσεις υδρόλυσης παρουσία GH61.

Υπόστρωμα : Spruce (PS) και TCEP



Διάγραμμα 2.8. Επίδραση της προσθήκης TCEP κατά την υδρόλυση του PS από το Celluclast παρουσία StCel61.

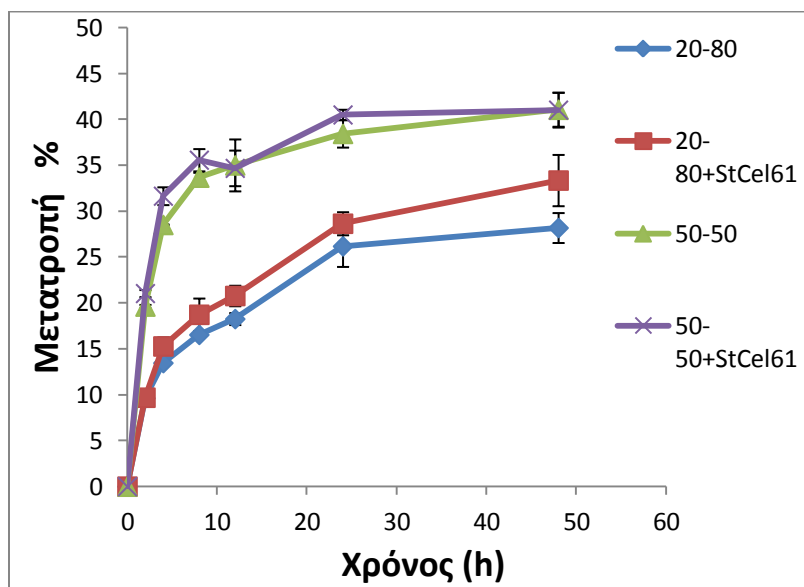
Με την αντικατάσταση της λιγνίνης με μία άλλη ουσία με αναγωγικό χαρακτήρα όπως το TCEP παρατηρήθηκε ίδια επίδραση στο PP2. Παρουσία μόνο StCel61 η αύξηση του βαθμού υδρόλυσης ήταν ελάχιστη, ενώ κατά την προσθήκη TCEP η αύξηση αυτή ήταν σημαντική. Μέγιστη ενίσχυση μετατροπής % παρατηρήθηκε στις 2 h που ήταν είναι 19%. Αυτό φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα όπου ο υψηλότερος συνεργισμός σημειώνεται με την παρουσία TCEP.



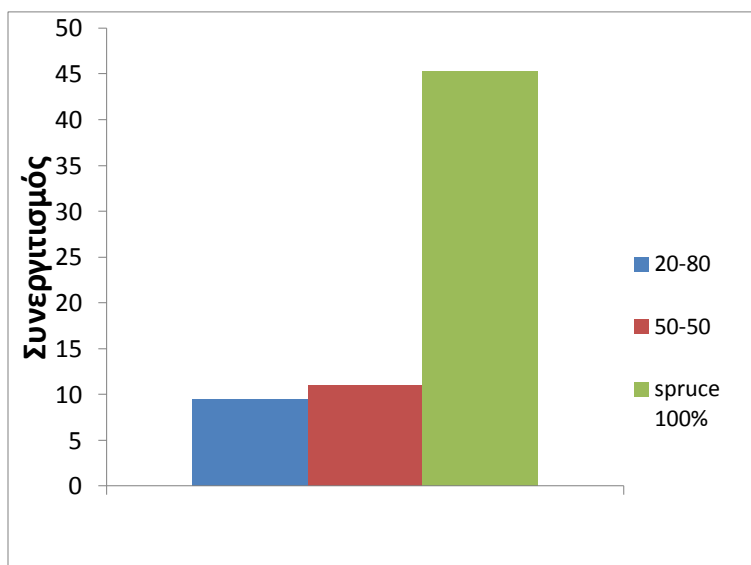
Διάγραμμα 2.9. Συνεργισμός με και χωρίς TCEP.

- ⊕ Πειράματα συνεργιτισμού σε υδρόλυση μίγματος PP2-PS σε αναλογίες 20-80 , 50-50 αντίστοιχα.

Οι υδρολύσεις πραγματοποιήθηκαν με 11 mg/g υποστρώματος Celluclast και 0.45 mg/g υποστρώματος β-γλυκοζιδάση. Τα δείγματα με επιπλέον GH61 περιείχαν 9 mg/g υποστρώματος GH61.



Διάγραμμα 2.10.. Μελέτη της υδρόλυσης μίγματος PP2-PS σε διαφορετικές αναλογίες από το Celluclast σε συνδυασμό με την StCel61



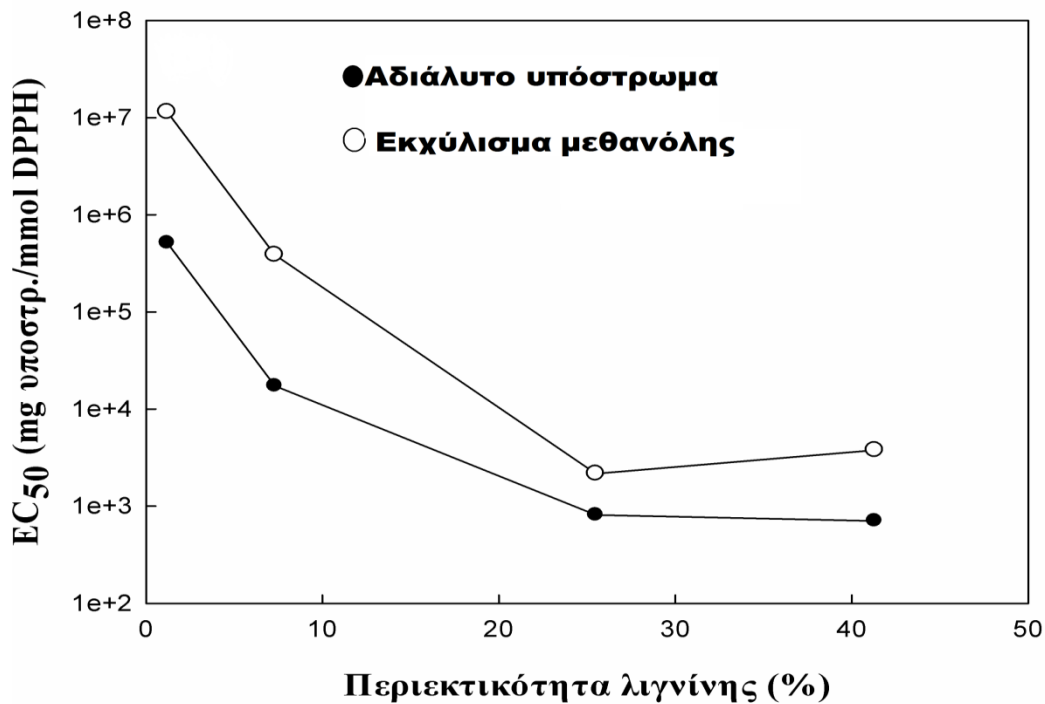
Διάγραμμα 2.11.. Συνεργιτισμός κατά την υδρόλυση μίγματος PP2-PS σε αναλογίες 20-80 , 50-50 και 100 % PS.

Τέλος στο παραπάνω πείραμα σημειώθηκε για άλλη μία φορά η σημασία της λιγνίνης για την ενισχυτική δράση της StCel61. Μέγιστος συνεργισμός στις 24 h παρατηρήθηκε κατά αύξουσα σειρά στις αναλογίες 20-80 , 50-50 , 100 % PS.

3. Σύνδεση αντιοξειδωτικής δράσης των υποστρωμάτων με τη δραστικότητα της StCel61

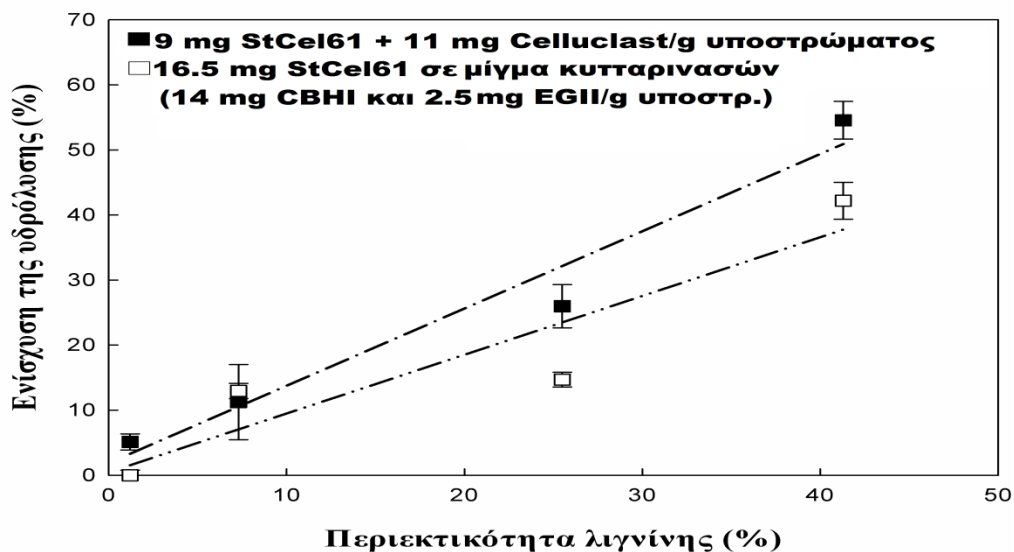
Όπως είδαμε παραπάνω η περιεκτικότητα των υποστρωμάτων σε λιγνίνη ήταν καθοριστική στο παρατηρούμενο βελτιωτικό αποτέλεσμα παρουσία GH61. Οπότε σε συνδυασμό με τη γνώση για την εξάρτηση της δράσης των GH61 από ουσίες με αναγωγικό χαρακτήρα, εξετάστηκε το ενδεχόμενο η λιγνίνη να επιτελεί το ρολό δότη ηλεκτρονίων μέσω της μέτρησης του αντιοξειδωτικού της χαρακτήρα.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ήταν ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των στερεών λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων αλλά και των μεθανολικών εκχυλίσμάτων τους μέσω του προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών με τη μέθοδο του DPPH. Προσδιορίστηκε το EC₅₀ δηλαδή ποσοστό δείγματος απαραίτητου για να μειωθεί η αρχική συγκέντρωση του DPPH κατά 50% σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα λιγνίνης στα υποστρώματα PP2 , PP1 , PWS , PS .



Διάγραμμα 3.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα των υποστρωμάτων PP2,PP1,PWS,PS.

Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό το διαγραμμα 3.2 όπου συσχετίζει το βελτιωτικό αποτέλεσμα με την περιεκτικότητα σε λιγνίνη, έδειξαν ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η αντιοξειδωτική ικανότητα των υποστρωμάτων (PP2,PP1,PWS,PS) τόσο μεγαλύτερη ήταν η ενίσχυση της υδρόλυσης. Το τελευταίο επιβεβαίωσε την υπόθεση που κάναμε στην αρχή πως η λιγνίνη παίζει το ρόλο του δότη ηλεκτρονίων κατά τη δράση της StCel61 .



Διάγραμμα 3.2. Η ενίσχυση της υδρόλυσης % ανάλογα με την περιεκτικότητα λιγνίνης στα διάφορα υποστρώματα PP2 (1.0% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 0.2% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ) ,PP1 (6.9% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 0.4% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ) , PWS (25.5% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ) , PS(39.7% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 1.6% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ).

4. Συμπεράσματα

Η λιγνινοκυτταρίνη αποτελεί το πιο κατάλληλο οργανικό πολυμερές για βιοτεχνολογικές εφαρμογές καθώς υπάρχει άφθονο στη φύση και είναι μία φτηνή πηγή άνθρακα. Κατά συνέπεια η απομόνωση νέων ενζύμων που συμβάλλουν στην αποικοδόμηση κυτταρινούχων υλικών κρίνεται απαραίτητη.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η δράση ενός μέλους της οικογένειας 61 της βάσης δεδομένων CAZy από το μύκητα *Sporotrichum thermophile* (StCel61). Παρά το γεγονός ότι η οικογένεια αυτή παρουσιάζει αυξημένο ενδιαφέρον, οι πληροφορίες που έχουμε για τη δραστηριότητα και το μηχανισμό των περισσότερων μελών της παραμένουν περιορισμένες. Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η άποψη ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής κατηγοριοποιούνται στις γλυκοζιδικές υδρολάσες (GH) καθώς παρουσιάζουν ασθενή κυτταρινολυτική δράση. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια έρευνες έδειξαν ότι ένζυμα της οικογένειας αυτής σε συνδυασμό με άλλες κυτταρινάσες οδηγούν στην αύξηση της αποικοδόμησης λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά στάθηκαν η αφορμή ώστε να μελετηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης των GH61.

Συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία αναδείχθηκε η συνεργιστική αυτή δράση με το συνδυασμό της StCel61 με μίγμα κυτταρινασών κατά την εφαρμογή τους σε υποστρώματα με διαφορετική περιεκτικότητα σε λιγνίνη. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αύξηση του βαθμού μετατροπής στα υποστρώματα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιγνίνη. Ταυτόχρονα εξετάστηκε ο ρόλος και άλλων ουσιών όπως η λιγνίνη που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία τους είναι απαραίτητη για την εκδήλωση του ενισχυτικού χαρακτήρα των GH61.

Πρόσφατα ευρήματα για μία πρωτεΐνη της οικογένειας CBM33 που παρουσιάζει δομική ομοιότητα με τις GH61 οδήγησε στην υπόθεση ότι οι GH61 αποικοδομούν οξειδωτικά την κυτταρίνη. Συγκεκριμένα οι Vaaje-Kolstad et al το 2010 έδειξαν ότι οι

CBM33s που ενεργούν στη χιτίνη είναι μεταλλοένζυμα που διασπούν την αλυσίδα του πολυσακχαρίτη μέσω ενός οξειδωτικού μηχανισμού που εξαρτάται από έναν εξωτερικό δότη ηλεκτρονίων. Ο οξειδωτικός αυτός μηχανισμός ισχύει και για τα GH61 ένζυμα και το συγκεκριμένο μέταλλο που απαιτείται είναι ο χαλκός και έτσι ταξινομήθηκαν στην ομάδα ενζύμων ως μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών που δεσμεύουν το χαλκό (Cu-dependent polysaccharide monoxygenases, PMOs). Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας έρχονται σε συμφωνία με τα νέα αυτά ευρήματα, με τη λιγνίνη να παίζει το ρόλο του εξωτερικού δότη ηλεκτρονίων κατά την οξειδωτική αποικοδόμηση της κυτταρίνης από την StCel61.

IV.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Zhang, Y.-H.P.^a, Lynd, L.R.^{ab} (2004). Kinetics and Relative Importance of Phosphorolytic and Hydrolytic Cleavage of Cellodextrins and Cellobiose in Cell Extracts of *Clostridium thermocellum* .

Prasad S, Singh A, Joshi HC. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour Conserv Recycl* 2007;50:1–39.)

McKendry P. Energy production from biomass: overview of biomass. *Bioresour Technol* 2002;83:37–43.

John F, Monsalve G, Medina PIV, Ruiz CAA. Ethanol production of banana shell and cassava starch. *Dyna Universidad Nacional de Colombia* 2006;73:21–7.

Stewart D, Azzini A, Hall A, Morrison I. Sisal fibers and their constituent non-cellulosic polymers. *Ind Crops Prod* 1997;6:17–26.

Pérez-Díaz N, Márquez-Montesinos F, Autié PM. Obtención del carbón activado a partir del residual sólido generado en el beneficio húmedo del café. Pinar del Río: CIGET; 2005 (www.ciget.pinar.cu/No.2005-2/beneficio.htm).

ten Have R, Teunissen PJM. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem Rev* 2001;11:3397–414.

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

Rabinovich ML, Bolobova AV, Vasil'chenko. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Appl Biochem Microbiol* 2004;40:1–17.

Rabinovich ML, Melnik MS, Bolobova AV. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry-Moscow+* 2002b;68:850–71.

Lynd L, Cushman JH, Nichols RJ, Wyman CE. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science* 1991;15:1318–23

Pérez J, Muñoz-Dorado J, De-la-Rubia T, Martínez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol* 2002;5:53–63.

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

Howard RL, Abotsi E, Jansen van Rensburg EL, Howard S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr J Biotechnol* 2003;2:602–19.

Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbiol Technol* 2006;40:138–44.

Randy M. Berka, Palle Schneider, Elizabeth J. Golightly, Stephen H. Brown, Mark Madden, Kimberly M. Brown, Torben Halkier, Kristine Mondorf, and Feng Xu. Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* (1997) 63(8), 3151-3157.

Katapodis, P. Vrsanska, M. Kekos, D. Nerinckx, W. Biely, P. Claeysens, M. Macris, B.J. Christakopoulos, Paul (Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum thermophile* *Carbohydrate Res.* 2003.338, 1881-1890.

Jérôme Le Nours, Carsten Ryttersgaard, Leila Lo Leggio, Peter Rahbek Østergaard, Torben Vedel Borchert, Lars Lehmann Hylling Christensen and Sine Larsen . Structure of two fungal β -1,4-galactanases: Searching for the basis for temperature and pH optimum *Protein Sci.* (2003) 12, 1195-1204.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Koseki T, Mese Y, Fushinobu S, Masaki K, Fujii T, Ito K, Shiono Y, Murayama T, Iefuji H, 2008. Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 1279 -1285

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

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

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

V. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Πίνακες

Σελ.

Θεωρητικό Μέρος

Πίνακας 2.1. Περιεκτικότητα σακχάρων στο κλάσμα των υδατανθράκων

της φυτικής ύλης (% κ.β.).....12

Πίνακας 3.1. Σύνθεση μερικών λιγνοκυτταρινικών υλικών.....13

Πίνακας 3.2. Κυτταρινάσες μυκήτων με την υψηλότερη ειδική δραστικότητα.....15

Πίνακας 3.3. Ημικυτταρινάσες μυκήτων με την υψηλότερη ειδική δραστικότητα.....17

Πίνακας 5.1. Ταξινόμηση του μύκητα *S. thermophile*24

Μέθοδοι και υλικά

Πίνακας 3.1. Αναλογίες συστατικών της πηκτής διαχωρισμού και επιστοίβαξης.....36

Πειραματική διαδικασία

Πίνακας 4.1. Οι ποσότητες ανά υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό

της αντιοξειδωτικής ικανότητας.....39

Εικόνες

Θεωρητικό Μέρος

Εικόνα 2.1. Κυτταρίνη 9

Εικόνα 2.2. Πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα10

Εικόνα 2.3. Κυτταρικό τοίχωμα του φυτικού κυττάρου 11

Εικόνα 4.1. Βιομετατροπή φυτικής βιομάζας σε αιθανόλη.22

Εικόνα 5.1. Μύκητας *Sporotrichum thermophile*.....23

Εικόνα 7.1. Αντιδράσεις που καταλύονται από την ΡΜΟ και η συνεργασία της με την
κελλοβιόζη αφυδρογονάσης28

Μέθοδοι και Υλικά

Εικόνα 3.1 Συσκευή ηλεκτροφόρησης37

Αποτελέσματα

| | |
|---|----|
| Εικόνα 1.1. SDS-PAGE της StCel61. 1/ πρότυπο διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών χαμηλών MB ,2/ εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας ανασυνδιασμένης <i>P. Pastoris</i> , 3/ έξοδος στήλης TALON και 4/καθαρή StCel61. | 41 |
|---|----|

Διαγράμματα

Μέθοδοι και Υλικά

| | |
|--|----|
| Διάγραμμα 1.1 Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης. | 33 |
|--|----|

Αποτελέσματα

| | |
|--|----|
| Διάγραμμα 2.1. Συνεργιστικό αποτέλεσμα της StCel61 με Celluclast κατά την υδρόλυση στο Spruce (PS) , στο PP1 και στο PP2. | 43 |
| Διάγραμμα 2.2. Συνεργισμός ανάλογα με την περιεκτικότητα λιγνίνης (%) στο PS , στο PP1και στο PP2. | 44 |
| Διάγραμμα 2.3. Συνεργιστικό αποτέλεσμα της StCel61 με EGII και CBHI..... | 44 |
| Διάγραμμα 2.4. Συνεργιστικό αποτέλεσμα της StCel61 με EGII και CBHI. | 45 |
| Διάγραμμα 2.5. Συνεργιστικό αποτέλεσμα της StCel61 με EGII και CBHI..... | 45 |
| Διάγραμμα 2.6 Επίδραση της προσθήκης λιγνίνης κατά την υδρόλυση του PP2 από το Celluclast παρουσία ή χωρίς StCel61. | 46 |
| Διάγραμμα 2.7. Συνεργιστικό αποτέλεσμα της StCel61 με Celluclast κατά την υδρόλυση υποστρώματος προκατεργασμένης κυτταρίνη ευκαλύπτου και λιγνίνης..... | 47 |
| Διάγραμμα 2.8. Επίδραση της προσθήκης TCEP κατά την υδρόλυση του PS από το Celluclast παρουσία StCel61. | 48 |
| Διάγραμμα 2.9. Συνεργισμός με και χωρίς TCEP. | 48 |
| Διάγραμμα 2.10.. Μελέτη της υδρόλυσης μίγματος PP2-PS σε διαφορετικές αναλογίες από το Celluclast σε συνδυασμό με την StCel61. | 49 |
| Διάγραμμα 2.11.. Συνεργισμός κατά την υδρόλυση μίγματος PP2-PS σε | |

| | |
|--|----|
| αναλογίες 20-80 , 50-50 και 100 % PS. | 49 |
| Διάγραμμα 3.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα των υποστρωμάτων PP2,PP1,PWS,PS..... | 51 |
| Διάγραμμα 3.2. Η ενίσχυση της υδρόλυσης % ανάλογα με την περιεκτικότητα Λιγνίνης στα διάφορα υποστρώματα PP2 (1.0% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 0.2% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ) ,PP1 (6.9% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 0.4% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ) , PWS (25.5% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ) , PS(. 39.7% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 1.6% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ). | 52 |