

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

# Βιοσύνθεση υδρολυτικών ενζύμων από θερμοφίλους μικροοργανισμούς

Διδακτορική Διατριβή

Παναγιώτα Μ. Σταθοπούλου,  
Βιολόγος

Αθήνα, 2012





ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

---

**ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΑΠΟ  
ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Παναγιώτα Μ. Σταθοπούλου

Βιολόγος

Αθήνα, 2012

Η διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε εν μέρει από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) στο πλαίσιο Μεταπτυχιακού Προγράμματος Εσωτερικού για Πτυχιούχους Πανεπιστημίου.



NATIONAL AND KAPODISTRIAN  
UNIVERSITY OF ATHENS  
FACULTY OF BIOLOGY  
DEPARTMENT OF BOTANY

---

**BIOSYNTHESIS OF HYDROLYTIC ENZYMES FROM  
THERMOPHILIC MICROORGANISMS**

PhD Thesis

Panagiota M. Stathopoulou

Biologist

Athens, 2012

### **Συμβουλευτική Επιτροπή**

Αμαλία Δ. Καραγκούνη, Καθηγήτρια

Γιώργος Διαλλινάς, Αναπληρωτής Καθηγητής

Δημήτρης Γ. Χατζηνικολάου, Επίκουρος Καθηγητής

### **Εξεταστική Επιτροπή**

Κωνσταντίνος Ε. Βοργιάς, Καθηγητής

Βασίλειος Γαλάτης, Καθηγητής

Αμαλία Δ. Καραγκούνη, Καθηγήτρια

Δημήτρης Κέκος, Καθηγητής

Γιώργος Διαλλινάς, Αναπληρωτής Καθηγητής

Κοσμάς Χαραλαμπίδης, Επίκουρος Καθηγητής

Δημήτρης Γ. Χατζηνικολάου, Επίκουρος Καθηγητής

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα»

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

*Στους γονείς μου,  
Μιχάλη & Χρύσα*





---

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας δε θα ήταν εφικτή χωρίς την απαραίτητη συνεργασία με ένα σύνολο καταξιωμένων επιστημόνων, οι οποίοι μου μετέδωσαν τις γνώσεις και την εμπειρία τους με ιδιαίτερη προθυμία. Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια Αμαλία Καραγκούνη για την επιστημονική της καθοδήγηση, τη φιλοξενία στο εργαστήριό της καθώς και τις σπουδαίες συμβουλές της κατά τη σύνταξη του τελικού κειμένου. Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον Επικ. Καθ. Δημήτρη Χατζηνικολάου, συνεπιβλέποντα της παρούσας εργασίας, για την αρχική επιμονή του να συνεχίσω τις σπουδές μου σε μεταπτυχιακό επίπεδο καθώς και για την μεγάλη εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπο μου. Ελπίζω να στάθηκα αντάξια αυτής. Επιθυμώ επίσης να ευχαριστήσω τον Αναπ.Καθ. Γιώργο Διαλλινά, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τις εύστοχες παρατηρήσεις - συμβουλές του και το συνεχές ενδιαφέρον του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων αλλά και της συγγραφής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθ. Κ. Βοργιά για την υλική και ηθική του συμπαράσταση καθώς και την εξαιρετική φιλοξενία στο εργαστήριό του. Ευχαριστώ, επίσης, τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, Καθ. Β. Γαλάτη, Καθ. Δ. Κέκο και Επ. Καθ. Κ. Χαραλαμπίδη για τα ουσιαστικά σχόλια τους και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν.

Ευχαριστώ θερμά, την Δρ Αλεξάνδρα Πατμανίδη για την εκμάθηση των τεχνικών περί ανασυνδυασμένων ιών αλλά και για την απλόχερη αισιοδοξία της εκείνο το δύσκολο καλοκαίρι.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στο Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την οικονομική υποστήριξη την οποία μου παρείχε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω σε όλα τα μέλη της Ομάδας Μικροβιολογίας και σε όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους συνεργάστηκα, ελπίζω επιτυχώς. Επίσης, ευχαριστώ τις συναδέλφους και φίλες Κική Κανινή και Δέσποινα Λυμπεροπούλου για τη συμπόρευση και αλληλοκατανόηση καθώς και το ευχάριστο εργαστηριακό κλίμα.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος, τον αδερφικό μου φίλο Γιώργο Ανασοντζή με τον οποίο μοιράστηκα, σχεδόν τα πάντα, στα χρόνια της υπομονής. Τον ευχαριστώ για την καθαρότητα του μυαλού του, την πίστη και την αγάπη του.

Τέλος, επιτρέψτε μου να ευχαριστήσω τους φίλους μου, και ιδιαίτερος την Ελισάβετ, που ανέχτηκε τις ανασφάλειες ενός υποψήφιου διδάκτορα καθώς και τον Κωστή ο οποίος ήταν συχνά καταφύγιο στις πολύπλοκες και δαιδαλώδεις σκέψεις μου. Ως ελάχιστο ευχαριστώ, αφιερώνω αυτήν την εργασία στην οικογένεια μου για την υποστήριξη και την ανοχή τους στις ατελείωτες ώρες απουσίας μου. Ο θεός του κόσμου να τους έχει όλους καλά.



---

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να επιβιώνουν σε μεγάλη ποικιλία αβιοτικών παραγόντων αντανakλά τα ιδιαίτερα δομικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά τους. Η συστηματική καταγραφή και αξιοποίηση της μικροβιακής γενετικής και λειτουργικής ποικιλότητας ακραίων ενδιαιτημάτων ενδέχεται να δώσει λύσεις σε περιβαλλοντικά και βιομηχανικά προβλήματα. Αναφορικά με τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές της ενζυμικής κατάλυσης, η ανάγκη εξεύρεσης ποικιλόμορφων, αποδοτικών και σταθερών βιοκαταλυτών για συμμετοχή σε μη συμβατικές συνθήκες διεργασιών, έστρεψε το ενδιαφέρον στη μελέτη του μεταβολικού δυναμικού των θερμοφίλων μικροοργανισμών.

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή χρησιμοποιήθηκε ως βιολογική πηγή υδρολυτικών ενζύμων ένα σύνολο 101 θερμοφίλων βακτηριακών στελεχών που είχαν απομονωθεί κατά τη Διδακτορική Διατριβή του Μεϊντάνη Χ. (2005) στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, του Τομέα Βοτανικής, του Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τη διάρκεια μελέτης της συστηματικής καταγραφής και ποικιλότητας επιλεγμένων οικοθέσεων του ηφαιστειακού συμπλέγματος της Σαντορίνης. Τα στελέχη αυτά, στην πλειοψηφία τους εμφάνισαν φυλογενετική συγγένεια με το γένος *Geobacillus* και ομαδοποιήθηκαν με βάση το αποτύπωμα BOX PCR τους σε 3 ομάδες.

Αρχικά, εκτιμήθηκε ποιοτικά το κυτταρινολυτικό και ξυλανολυτικό δυναμικό του συνόλου των θερμοφίλων μικροοργανισμών από το οποίο προέκυψε ένα υψηλό ποσοστό βακτηρίων με ανιχνεύσιμη ενεργότητα ξυλανάσης (80 %) ενώ μόλις το 8 % παρουσίασε ικανότητα ταυτόχρονης υδρόλυσης κυτταρίνης και ξυλάνης. Για την περαιτέρω μελέτη, επιλέχθηκαν 8 στελέχη που εμφάνισαν ταυτόχρονη κυτταρινολυτική και ξυλανολυτική δράση (SP17, SP24, SP37, SP38, SP45, SP46, SP47, SP50) καθώς και επιπλέον 7 με τις υψηλότερες σχετικές ενεργότητες ξυλανάσης (SP8, SP11, SP59, SP68, SP69, SP74, SP87). Ακολούθησε ο φαινοτυπικός και γενετικός χαρακτηρισμός των επιλεγμένων στελεχών καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός της υδρολυτικής τους ικανότητας σε καλλιέργειες διαφορετικών πηγών άνθρακα. Το στέλεχος SP24 (κωδικός NCBI-JN692241) εμφάνισε ταυτόχρονη έκκριση ένδο- ξυλανάσης και κυτταρινάσης καθώς και β-ξυλοζιδάσης και β-γλυκοζιδάσης σε ικανοποιητικά επίπεδα, παρουσία πιτύρου σίτου, και επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη της βιοσύνθεσης των κυτταρινολυτικών και ξυλανολυτικών του ενζύμων. Αναλυτικότερα, μελετήθηκε η επίδραση μικρής ποσότητας συμπληρωματικών πηγών άνθρακα και αζώτου στην ενζυμική επαγωγή υγρών καλλιεργειών του επιλεγμένου στελέχους SP24, καθώς επίσης και η επίδραση της παροχής οξυγόνου στο ρυθμό μικροβιακής αύξησης και της ενζυμικής βιοσύνθεσης. Επιπλέον μελετήθηκε η κυτταρική τοπολογία των ξυλανολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζύμων. Αναφορικά με τη βελτιστοποίηση του μέσου αύξησης, η μέγιστη ενζυμική συμπαραγωγή παρατηρήθηκε παρουσία πιτύρου σίτου ως βασική πηγή άνθρακα και συμπληρωματική πηγή την ξυλάνη σημύδας, μειώνοντας το κόστος της διεργασίας. Τα υψηλά επίπεδα αερισμού της καλλιέργειας ήταν καθοριστικός παράγοντας για τον ταχύ μικροβιακό ρυθμό αύξησης και την ενζυμική βιοσύνθεση εκτός από την περίπτωση της β-γλυκοζιδάσης η οποία εμφάνισε αντίθετο πρότυπο παραγωγής. Παράλληλα, οι ξυλανάσες και οι κυτταρινάσες, ένζυμα που

δρουν σε μεγαλομοριακά υποστρώματα, εντοπίστηκαν εξ ολοκλήρου εκτός του κυττάρου, ενώ οι β-γλυκοζιδικές ενεργότητες εμφανίστηκαν αρχικά στο κυτταρόπλασμα και μόνο στα τελικά στάδια της ζύμωσης ανιχνεύθηκαν εξωκυτταρικά, γεγονός που σχετίστηκε με την αυτόλυση των κυττάρων κατά τη φάση θανάτου. Συμπερασματικά, οι πληροφορίες από τα ανωτέρω αποτελέσματα επιτρέπουν τη μελλοντική αξιοποίηση του υδρολυτικού δυναμικού του επιλεγμένου μικροοργανισμού σε ευρύτερης κλίμακας ζυμώσεις. Συγχρόνως, ο μοριακός εντοπισμός γονιδίων κυτταρινάσης και ξυλανάσης στο γονιδίωμα του στελέχους SP24 επιτρέπει επίσης την υπερέκφραση αυτών σε μεσόφιλα συστήματα.

Το δεύτερο μέρος της παρούσας εργασίας αφορούσε στην εκτίμηση του λιπολυτικού δυναμικού των 101 θερμοφίλων βακτηριακών στελεχών και στην επιλογή ενζύμων (και όχι μικροοργανισμών αυτή τη φορά) με βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμες ιδιότητες για την υπερέκφραση αυτών σε μεσόφιλους δέκτες. Ο προσδιορισμός της λιπολυτικής ικανότητας των θερμοφίλων βακτηρίων πραγματοποιήθηκε τόσο ποιοτικά (στερεές καλλιέργειες) όσο και ποσοτικά (υγρές καλλιέργειες) και επιλέχθηκαν 9 στελέχη (SP14, SP22, SP29, SP73, SP75, SP76, SP79, SP83 και SP93) για την υψηλή υδρολυτική τους δράση. Χαρακτηριστικό ήταν, ότι κανένα επιλεγμένο στέλεχος για την αυξημένη λιπολυτική του ικανότητα δεν εμφάνισε αντίστοιχη κυτταρινολυτική ή ξυλανολυτική δράση. Ακολούθησε φαινοτυπικός και γενετικός χαρακτηρισμός των 9 θερμοφίλων βακτηρίων και μελέτη της βιοσύνθεσης λιπασών σε υγρές και στερεές καλλιέργειες διαφορετικών πηγών άνθρακα. Με δεδομένο ότι τα χαμηλά επίπεδα ενζυμικής παραγωγής δεν επέτρεψαν τον πρωτεϊνικό καθαρισμό από καλλιέργεια των στελεχών φυσικού τύπου, η υπερέκφραση των επιθυμητών γονιδίων σε μεσόφιλα συστήματα ήταν ο επόμενος στόχος. Το γονίδιο λιπάσης που επιλέχθηκε για κλωνοποίηση και υπερέκφραση ήταν το προϊόν ενίσχυσης από το γονιδίωμα του στελέχους SP22 (κωδικός NCBI-JQ808133). Η επιλογή βασίστηκε στην αυξημένη σταθερότητα και θερμική αντοχή καθώς και στην αλκαλοφιλία που επέδειξε η αντίστοιχη λιπάση κατά τη μελέτη των χαρακτηριστικών της συγκριτικά με τις υπόλοιπες 8.

Η απομόνωση και ανάλυση της αλληλουχίας του επιλεγμένου γονιδίου εμφάνισε ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1251 ζ.β και η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης ανέδειξε το χαρακτηριστικό πενταπεπτίδιο Ala-X-Ser-X-Gly καθώς και τη σημαντική για το ενεργό κέντρο, τριάδα His - 42, Ser -141 και Asp-345. Τα παραπάνω αποτελούν ιδιαιτερότητες των θερμοφίλων λιπασών (υποοικογένεια I.5) του γένους *Bacillus*. Αρχικά, η υπερέκφραση του γονιδίου της λιπάσης πραγματοποιήθηκε σε βακτηριακό σύστημα (δεκτικά κύτταρα *E.coli*) υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή T7 (φορέας κλωνοποίησης - pET15b). Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 3 σειρές ξενιστικών κυττάρων (DH5a, BL21(DE3) και BL21(DE3)pLysS) στις οποίες μελετήθηκε η κινητική έκφρασης της θερμοσταθερής λιπάσης. Η υπερέκφραση της θερμοσταθερής λιπάσης του στελέχους SP22 (*Geobacillus* sp.) σε προκαρυωτικό σύστημα εμφάνισε προβλήματα, καθότι σε συνθήκες υψηλής παραγωγής οδήγησε στον σχηματισμό αδιάλυτων συσσωματωμάτων για τα οποία ενδεχομένως ευθύνονται τα βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μορίου όπως η υδροφοβικότητα, το υψηλό ισοηλεκτρικό του ή κάποια απαιτούμενη μεταμεταφραστική τροποποίηση.

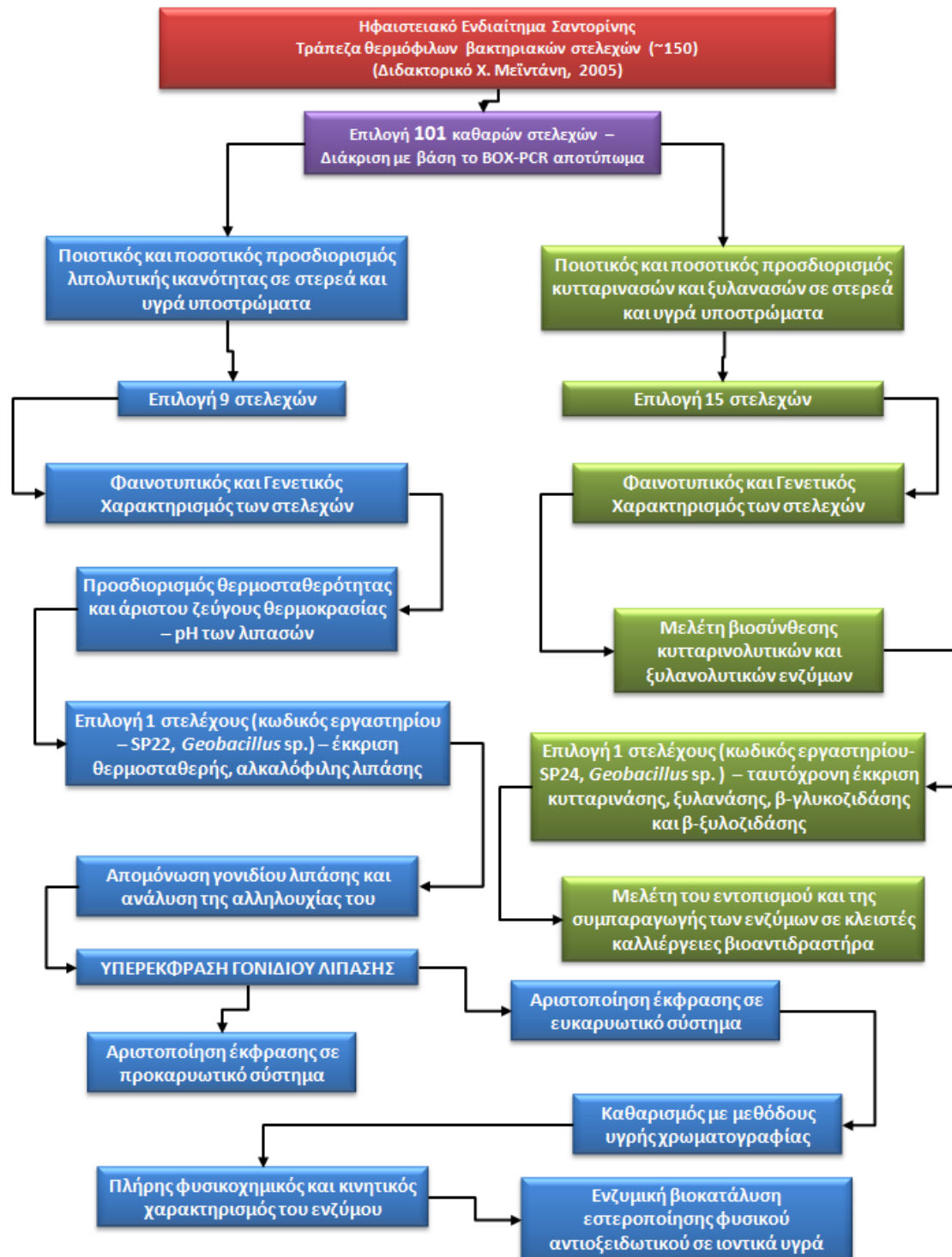
Η ανάγκη εύρεσης ενός πιο αποδοτικού συστήματος υπερέκφρασης της θερμοσταθερής λιπάσης οδήγησε στην επιλογή του *flashBAC*<sup>TM</sup>. Αξίζει να αναφερθεί ότι το σύστημα αυτό ουδέποτε έχει χρησιμοποιηθεί για την υπερέκφραση

βακτηριακής λιπάσης παρά μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις ευκαρυωτικών γονιδίων λιπάσης. Επίσης, οι αναφορές έκφρασης θερμοσταθερών πρωτεϊνών μέσω των βακυλοϊών στη διεθνή βιβλιογραφία είναι ελάχιστες και μάλιστα όχι από βακτήρια. Η υπερέκφραση της λιπάσης με το σύστημα *flashBAC*<sup>TM</sup> οδήγησε σε εξαιρετικά υψηλές τιμές ειδικής ενζυμικής ενεργότητας καθώς επίσης και στην ολοκληρωτική εμφάνιση της πρωτεΐνης σε διαλυτή μορφή. Αναλυτικότερα, τα επίπεδα ειδικής ενζυμικής ενεργότητας εμφανίστηκαν έως και 10000 φορές υψηλότερα από το στέλεχος φυσικού τύπου και ενισχυμένα κατά 5000 φορές συγκριτικά με το ετερόλογο προκαρυωτικό σύστημα έκφρασης. Ακολούθησε η αριστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας μολυσμένων Sf9 κυττάρων και παραγωγής του ενζύμου και ο καθαρισμός της υπερεκφρασμένης λιπάσης από το εξωκυττάριο υγρό με ένα μόνο χρωματογραφικό βήμα.

Η θερμοσταθερή λιπάση παρελήφθη σε ηλεκτροφορητικά καθαρή μορφή (46 kDa) και στη συνέχεια χαρακτηρίστηκε φυσικοχημικά και κινητικά. Εμφάνισε αυξημένη θερμοσταθερότητα έως τους 65 °C (άριστη θερμοκρασία δράσης), σχεδόν χωρίς καμία απώλεια ενεργότητας, και η κινητική θερμοκικής απενεργοποίησης του ενζύμου ήταν 2 τάξεων. Όσον αφορά στο pH, η λιπάση εμφανίστηκε αρκετά σταθερή σε ένα ευρύ φάσμα τιμών και ως άριστη τιμή δράσης ήταν το 9. Επίσης, το ένζυμο επέδειξε σταθερότητα παρουσία διαφορετικών οργανικών διαλυτών ενώ το ασβέστιο φάνηκε να ενισχύει τη λιπολυτική ενεργότητα. Η εξάρτηση του ενζύμου από το ασβέστιο εμφανίστηκε και στην ολοκληρωτική απώλεια δράσης του παρουσία του χηλικού παράγοντα EDTA (μεταλλοένζυμο). Ολοκληρώνοντας τον χαρακτηρισμό της λιπάσης, μελετήθηκε η δράση της έναντι ψευδοϋποστρωμάτων με λιπαρά οξέα διαφορετικών αλυσίδων. Η λιπάση εμφάνισε μεγαλύτερη συγγένεια με το καπρυλικό οξύ (8 άτομα άνθρακα) και μεγαλύτερη ταχύτητα αντίδρασης στη διάσπαση εστέρων με παλμιτικό οξύ (16 άτομα άνθρακα). Ωστόσο, η μεγαλύτερη αποδοτικότητα του μορίου εντοπίστηκε κατά την υδρόλυση του ψευδοϋποστρώματος με λαυρικό οξύ (12 άτομα άνθρακα).

Τέλος, διαπιστώθηκε η ικανότητα της θερμοσταθερής λιπάσης να καταλύει την αντίδραση εστεροποίησης της τυροσόλης παρουσία ιοντικών υγρών. Τα λιπόφιλα παράγωγα της τυροσόλης εμφανίζουν πλήθος εφαρμογών στο πεδίο των φαρμάκων ή των προϊόντων αντιγήρανσης. Η απόδοση της αντίδρασης εστεροποίησης από την υπερεκφρασμένη λιπάση εμφάνισε εξάρτηση τόσο με τη φύση του ιοντικού υγρού όσο και με την κατάσταση του ενζυμικού δείγματος (λυοφιλωμένο ή ακινητοποιημένη λιπάση σε Celite). Η ακινητοποίηση του ενζύμου σε αδρανή φορέα αύξησε κατά 30 % την απόδοση της βιοκατάλυσης συγκριτικά με το λυοφιλωμένο ένζυμο και η ικανότητα αυτή είναι ανάλογη με διάφορα εμπορικά σκευάσματα.

Η ολοκληρωτική πειραματική πορεία της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής συνοψίζεται στο παρακάτω διάγραμμα.



---

## ABSTRACT

---

The ability of microorganisms to grow or thrive in a large variety of environmental conditions reflects their unique structural and metabolic characteristics. The observation and subsequent exploitation of extraordinary microbial, genetic or functional diversity may be the solution to different environmental and industrial problems. Enzyme bioprospecting is a research activity devoted to the search of novel, versatile and efficient biocatalysts and has increased recently the market potential of enzymes. A general biotechnological perspective recognizes thermostability as a desirable feature of the biocatalyst, in order to participate in remarkable and unusual bioprocesses. Consequently, thermophiles are microorganisms of interest for enzyme bioprospecting activities due to their habitat-related characteristics.

In the present PhD Thesis, a collection of 101 thermophilic bacterial strains were used as biological source of hydrolytic enzymes. These strains have been isolated from different ecological niches around Santorini volcano during the study of the prokaryotic diversity of the volcanic island (Meintanis Christos, PhD Thesis, 2005). All the 101 bacterial strains were able to grow at high temperatures (60 °C) and regarding their BOX PCR fingerprinting, they were discriminated into 3 large groups.

Primarily, the cellulose and xylan potential of 101 thermophilic bacterial isolates was thoroughly evaluated. 80 % of the strains showed xylanolytic activity in plate assays and among these 8 % exhibited simultaneously activity towards cellulose hydrolysis (SP17, SP24, SP37, SP38, SP45, SP46, SP47, SP50). The latter strains, along with additional seven (SP8, SP11, SP59, SP68, SP69, SP74, SP87), that showed the highest xylanolytic levels, were selected for further studies. The phenotypic and genotypic characterization (16S rDNA) of the fifteen selected isolates revealed phylogenetic similarity with the genus *Geobacillus* and followed by the assessment of the enzymatic profile in liquid cultures using various carbon sources. Wheat bran proved to be an efficient inducer for both cellulase and xylanase production by the majority of the selected thermophilic bacilli. Strain SP24 was further selected for its ability to produce elevated levels of cellulase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase and was chosen as a representative strain in order to study the physiology of expression of the biomass degrading enzymes. More precisely, the research included the examination of the effect of additional carbon/nitrogen sources as a supplement to wheat bran on enzyme biosynthesis in a series of shake flasks, followed by the study of the effect of aeration conditions in microorganism growth and enzyme production in a series of bioreactor experiments and also, the localization of all enzyme activities in all SP24 cultures. Maximum enzyme production by this strain was obtained using a combination of wheat bran (basic carbon source) and birchwood xylan (supplement) in the growth medium. Additional, aeration levels had a very profound positive effect on viable growth since it affected, both the maximum determined biomass concentration as well as the growth rate. The production of all biomass degrading enzymes was growth associated since it followed more or less the cells' concentration. Cellulase, xylanase and  $\beta$ -xylosidase production was enhanced at high aeration levels while the biosynthesis of  $\beta$ -glucosidase was strongly inhibited.

The cellulase and xylanase activity was localized extracellularly, in agreement with the inability of cellulose and xylan (natural substrates) to penetrate the cell wall and membrane. An interesting observation was the effect of aeration levels in secretion rate of both cellulase and xylanase. At the highest aeration level the corresponding activities were 100 % extracellularly detected, following the faster bacterial growth. On the contrary,  $\beta$ -glucosidase and xylosidase appeared as cell-bound enzymes with most of their activity being detected at the cytosolic cell-bound fraction during the early stages of growth. At the latter stages of growth, the activity of both glucosidases was localized at the culture supernatant, probably as a result of partial autolysis of the cells. All the above data yielded enzyme mixtures suitable for various biotechnological and research applications. Moreover, the amplification of cellulase and xylanase genes, using the genomic DNA of the selected strain as a template, allows the cloning and overexpression of the corresponding genes in mesophilic hosts in the future.

The second part of the present PhD Thesis, included the evaluation of the lipolytic potential of the same collection of 101 thermophilic bacteria. The ability of isolated bacteria to produce lipase was determined on both solid and liquid cultures with olive oil as sole carbon source. This screening resulted in the selection of 9 strains (SP14, SP22, SP29, SP73, SP75, SP76, SP79, SP83 και SP93) capable to produce elevated levels of lipases. None of the above lipolytic bacteria was chosen for its xylanolytic or cellulolytic activity. The phenotypic and genotypic identification (16S rDNA) of the nine selected isolates classified them close to the genus *Geobacillus*. Subsequently, the lipolytic strains were cultured in liquid and solid media using different carbon sources. The assessment of the lipolytic profile showed that the enzyme production was not constant and the best inducers were tributyrin and Tween 20 in the majority of the selected strains. In order to determine the optimum pH and T as well as thermal stabilities of the lipolytic activities in their culture supernatants, the lipolytic strains were grown in liquid cultures. All the enzymes revealed optimal lipolytic activity at 80-100 °C, pH 8-9 and increased thermostability. Nevertheless, the low protein expression level did not allow the enzyme purification from the supernatant of the wild type bacterial cultures. The secreted lipase from strain SP22 had the most desirable biotechnological features and the genomic DNA of this strain was the template for gene amplification. The PCR primers for lipase gene amplification were designed based on conserved DNA sequences of reported lipases from the genus *Geobacillus* and the corresponding gene was amplified (1251 b.p) and fully sequenced (GenBank JN711121) after cloning in pBluescript SK(+) vector. The lipase gene codes for a mature lipase of 416 amino acid residues, corresponding to a molecular weight of 46 kDa. As in other *Bacillus* lipases, an Ala replaces the first Gly in the conserved pentapeptide Gly-X-Ser-X-Gly found in most lipases. Sub-cloning of the lipase orf into pET-15b vector and subsequent transformation into *E. coli* host cells (DH5a, BL21(DE3) and BL21(DE3)pLysS) resulted in low expression levels probably due to the formation of inclusion bodies resulting from the highly hydrophobic nature of the enzyme, the high isoelectric point of the protein or some required posttranslational modifications (improper folding).

Following these results, we attempted for the first time in literature, the overexpression of a thermostable bacterial lipase in baculovirus-infected insect cells (*flashBAC*<sup>TM</sup> expression system). The recombinant lipase was secreted as a highly active enzyme at yields, under optimized conditions (MOI, time course), 10000- and



5000-fold higher than the wild type strain and the heterologous bacterial system, respectively, while the corresponding specific activities were among the highest reported for a lipase gene.

The next step was the purification of the overexpressed lipase from the insect cell culture supernatant in a single chromatographic step (Q-Sepharose Fast Flow) using buffers containing Triton X-100 and gum arabic (emulsion). The recombinant lipase had an optimum temperature and pH of 65 °C and pH 9, respectively and it was stable up to 65 °C at pH 7 and active over a wide pH range (pH 6-11). Moreover, the purified enzyme exhibited stability towards various organic solvents and detergents but it was completely inhibited in the presence of SDS. The lipase activity was promoted in the presence of Ca<sup>2+</sup> and was strongly inhibited by EDTA. With respect to substrate specificity, the lipolytic enzyme showed high affinity towards pNPC (C8) but elevated reaction rate towards pNPP (C16) and was more efficient in the hydrolysis of pNPL (C12).

Finally, the lipase activity was investigated in esterification reactions using the ionic liquids 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate or hexafluorophosphate as reaction media and tyrosol as substrate. The synthesis of tyrosyl lipophilic derivatives is rising lately as a response to the food, cosmetic and pharmaceutical industries' increasing demand for new lipophilic antioxidants. The thermostable recombinant lipase was able to catalyze the esterification of tyrosol with vinyl butyrate. The nature of the ionic liquid and the enzyme condition (lyophilized or immobilized) affected the yield of product. The immobilization of the lipase on Celite increased the reaction rate about 30 % probably due to the higher stability of the enzyme and these yields are comparable with different commercial formulations.



# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

---

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....</b>	<b>19</b>
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ .....</b>	<b>23</b>
1.1.1 ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .....	23
1.1.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .....	24
1.1.3 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ .....	26
<b>1.2 ΤΑ ΓΕΝΗ <i>BACILLUS</i> ΚΑΙ <i>GEOBACILLUS</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>1.3 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ BOX PCR ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ .....</b>	<b>32</b>
<b>1.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rRNA.....</b>	<b>33</b>
<b>1.5 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΑ .....</b>	<b>33</b>
<b>1.6 ΛΙΠΑΣΕΣ .....</b>	<b>35</b>
1.6.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΙΠΑΣΩΝ .....	38
1.6.2 ΜΟΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΛΙΠΑΣΩΝ .....	39
1.6.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ .....	41
1.6.4 ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΛΙΠΑΣΕΣ .....	42
1.6.5 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΛΙΠΑΣΩΝ.....	44
<b>1.7 ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ.....</b>	<b>49</b>
1.7.1 ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ .....	49
1.7.2 ΚΥΤΤΑΡΙΝΟΛΥΤΙΚΟ ΕΝΖΥΜΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .....	50
1.7.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΩΝ .....	53
1.7.4 ΜΟΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΩΝ .....	54
1.7.5 ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ .....	56
1.7.6 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΩΝ.....	58
<b>1.8 ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ .....</b>	<b>59</b>
1.8.1 ΞΥΛΑΝΗ .....	59
1.8.2 ΞΥΛΑΝΟΛΥΤΙΚΟ ΕΝΖΥΜΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	61
1.8.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΞΥΛΑΝΑΣΩΝ .....	63
1.8.4 ΜΟΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΞΥΛΑΝΑΣΩΝ .....	65
1.8.5 ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ.....	67
1.8.6 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΞΥΛΑΝΑΣΩΝ.....	68
<b>1.9 ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ .....</b>	<b>70</b>
1.9.1 ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ T7 .....	70
1.9.2 ΒΑΚΥΛΟΪΟΙ ( <i>BACULOVIRIDAE</i> ).....	72
1.9.2.1 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ – ΣΥΣΤΗΜΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS SYSTEM – BEVS) .....	78
1.9.2.2 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ <i>flashBAC</i> <sup>TM</sup> .....	79
<b>1.10 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....</b>	<b>81</b>
<b>2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>83</b>
<b>2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ .....</b>	<b>83</b>
<b>2.2 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΥΛΙΚΟ.....</b>	<b>83</b>

2.2.1	ΘΕΡΜΟΦΙΛΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	83
2.2.2	ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ <i>E. coli</i> .....	83
2.2.2.1	ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E.coli</i> .....	84
<b>2.3</b>	<b>ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....</b>	<b>84</b>
<b>2.4</b>	<b>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΑΘΑΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ .....</b>	<b>85</b>
2.4.1	ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ DNA .....	86
<b>2.5</b>	<b>ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ .....</b>	<b>86</b>
2.5.1	ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ .....	86
2.5.1.1	ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ GRAM .....	86
2.5.1.2	ΕΝΖΥΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ .....	86
2.5.2	ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ.....	87
2.5.2.1	ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rRNA.....	87
2.5.2.2	ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ DNA.....	87
2.5.2.3	ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ BOX PCR .....	88
<b>2.6</b>	<b>ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....</b>	<b>88</b>
2.6.1	ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ .....	88
2.6.2	ΛΙΠΑΣΕΣ .....	90
<b>2.7</b>	<b>ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ.....</b>	<b>91</b>
2.7.1	ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ .....	91
2.7.1.1	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΗΣ.....	91
2.7.1.2	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ β-ΓΛΥΚΟΖΙΔΑΣΗΣ.....	92
2.7.1.3	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ β-ΞΥΛΟΖΙΔΑΣΗΣ.....	92
2.7.2	ΛΙΠΑΣΕΣ .....	93
<b>2.8</b>	<b>ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ .....</b>	<b>94</b>
2.8.1	ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ .....	94
2.8.2	ΛΙΠΑΣΕΣ .....	96
<b>2.9</b>	<b>ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ.....</b>	<b>98</b>
<b>2.10</b>	<b>ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ pH ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ .....</b>	<b>99</b>
<b>2.11</b>	<b>ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΟΡΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ .....</b>	<b>100</b>
2.11.1	ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ .....	101
2.11.2	ΛΙΠΑΣΕΣ .....	102
<b>2.12</b>	<b>ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΛΙΠΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .....</b>	<b>104</b>
2.12.1	ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ .....	104
2.12.2	ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΓΙΑ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΛΙΠΑΣΗΣ.....	105
2.12.3	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA .....	105
2.12.4	ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ .....	106
2.12.5	ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΔΕΣΜΑΣΗΣ .....	106
2.12.6	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E.coli</i> ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΜΙΚΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ .....	107
2.12.7	ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E.coli</i> ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ .....	108
2.12.8	ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ .....	108
2.12.9	ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ-ΣΤΟΧΟΥ .....	109
2.12.10	ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	110
2.12.11	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS PAGE).....	110
2.12.11.1	ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ .....	111
2.12.12	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟΥΣΙΑ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (NATIVE PAGE).....	113
2.12.12.1	ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ .....	113

2.12.13	ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΑΠΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ .....	114
2.12.13.1	ΧΡΩΣΗ COOMASIE .....	114
2.12.13.2	ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ (SILVER STAINING).....	115
<b>2.13</b>	<b>ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΛΙΠΑΣΗΣ ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....</b>	<b>116</b>
2.13.1	ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ .....	116
2.13.2	ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΛΙΠΑΣΗΣ .....	117
2.13.3	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΕΝΤΟΜΟΥ Sf9.....	117
2.13.3.1	ΜΟΝΟΣΤΡΩΜΗ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ Sf9.....	118
2.13.3.2	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ Sf9 ΥΠΟ ΑΝΑΔΕΥΣΗ .....	119
2.13.3.3	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	120
2.13.3.4	ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ Sf9.....	120
2.13.4	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΙΟΥ ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ <i>flashBAC</i> <sup>TM</sup> .....	121
2.13.5	ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ <i>flashBAC</i> <sup>TM</sup> ΙΟΥ.....	121
2.13.6	ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΙΟΥ (ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΠΛΑΚΩΝ).....	122
<b>2.14</b>	<b>ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΑΣΗΣ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΙΟΥ .....</b>	<b>123</b>
<b>2.15</b>	<b>ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΜΕΝΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ.....</b>	<b>124</b>
2.15.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΙΣΤΟΥ pH ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ .....	124
2.15.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΚΡΑΙΕΣ ΤΙΜΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ pH.....	125
2.15.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ.....	125
2.15.4	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ, ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ .....	125
2.15.5	ΖΥΜΟΓΡΑΦΗΜΑ ΛΙΠΑΣΗΣ .....	126
<b>2.16</b>	<b>ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΜΕΝΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ .....</b>	<b>126</b>
2.16.1	ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ ΣΕ ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ .....	126
2.16.2	ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΟΛΗΣ .....	127
<b>3</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>129</b>
<b>3.1</b>	<b>ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ .....</b>	<b>129</b>
<b>3.2</b>	<b>ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ .....</b>	<b>131</b>
3.2.1	ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΝΟΛΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΟΛΥΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	131
3.2.2	ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ .....	133
3.2.3	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΟΛΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΟΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	135
3.2.4	ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ.....	140
3.2.4.1	ΑΡΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ .....	140
3.2.4.2	ΑΡΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΕΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ .....	142
3.2.4.3	ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ .....	144
3.2.5	ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΗΣ .....	147
<b>3.3</b>	<b>ΛΙΠΑΣΕΣ .....</b>	<b>148</b>
3.3.1	ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	148
3.3.2	ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	151
3.3.3	ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΛΙΠΑΣΩΝ .....	153
3.3.4	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ pH ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ .....	156
3.3.5	ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΛΙΠΑΣΗΣ .....	163
3.3.6	ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΛΙΠΑΣΗΣ.....	165

3.3.7	ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	167
3.3.7.1	ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ.....	169
3.3.8	ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	175
3.3.8.1	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ.....	178
3.3.8.2	ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ .....	180
3.3.8.3	ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΟΛΗΣ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΜΕΝΗ ΛΙΠΑΣΗ ΣΕ ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ.....	190
<b>4</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>193</b>
	<b>ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>211</b>
	<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....</b>	<b>215</b>
<b>5</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>221</b>

---

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1 ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

---

Η μικροβιακή επιβίωση, αύξηση και δραστηριότητα επηρεάζεται σημαντικά από τις φυσικές και χημικές συνθήκες του περιβάλλοντος. Η βιόσφαιρα αποτελείται από ένα σύνολο οικοσυστημάτων με συνεχή εναλλαγή συνθηκών (θερμοκρασία, pH, διαθεσιμότητα νερού και οξυγόνου) η οποία επιβάλλει στους μικροοργανισμούς αντίστοιχη προσαρμογή και οδηγεί στην περιβαλλοντική κατανομή τους. Ο σημαντικότερος παράγοντας ελέγχου της μικροβιακής αύξησης θεωρείται η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, καθώς, οι μικροοργανισμοί δε διαθέτουν κανένα θερμορρυθμιστικό ομοιοστατικό μηχανισμό. Το θερμοκρασιακό εύρος αύξησης και μεταβολικής λειτουργίας των μικροοργανισμών περιλαμβάνει 3 θεμελιώδεις τιμές: την ελάχιστη, την άριστη και τη μέγιστη θερμοκρασία. Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες της ελάχιστης τιμής δεν παρατηρείται αύξηση καθώς η κυτταρική μεμβράνη ημιστερεοποιείται με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της σωστής λειτουργίας της. Κατά την άριστη θερμοκρασία, η οποία είναι συνήθως πλησιέστερη στη μέγιστη τιμή παρά στην ελάχιστη, παρατηρείται ο μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης εξαιτίας της άριστης λειτουργίας του ενζυμικού δυναμικού στο κύτταρο. Σε θερμοκρασίες υψηλότερες της μέγιστης τιμής επηρεάζεται η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών, συνεπώς και η λειτουργία τους, και η αύξηση καθίσταται αδύνατη. Οι μικροοργανισμοί, με κριτήριο τις θεμελιώδεις τιμές θερμοκρασίας ανάπτυξης, διαίρονται σε 5 κατηγορίες: ψυχρόφιλοι, ψυχροανθεκτικοί, μεσόφιλοι, θερμόφιλοι και υπερθερμόφιλοι (Madigan et al., 2006).

Γενικά, το θερμοκρασιακό άριστο των θερμόφιλων μικροοργανισμών κυμαίνεται μεταξύ 45 και 75 °C. Σε μία αναλυτικότερη σύγχρονη διαίρεση, τα θερμόφιλα εμφανίζουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης πάνω από τους 55 °C, τα μέτρια θερμόφιλα πάνω από τους 65 °C, τα ακραία θερμόφιλα πάνω από τους 75 °C και τα υπερθερμόφιλα πάνω από τους 90 °C (Imanaka, 2011). Οι κυριότεροι αντιπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι προκαρυωτικής δομής και οι πλέον θερμόφιλοι ανήκουν στην ομάδα των Αρχαίων Προκαρυωτικών Οργανισμών. Ελάχιστοι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 55 °C, αν και μερικά γένη μυκήτων και πρωτοζώων εμφανίζουν ικανοποιητική μεταβολική δραστηριότητα και ανάπτυξη σε θερμοκρασιακό εύρος 50 – 55 °C (Gottschal and Prins, 1991, Maheshwari et al., 2000). Οι παραπάνω θερμοκρασίες θεωρούνται απαγορευτικές για την επιβίωση πολυκύτταρων φυτικών και ζωικών οργανισμών.

---

### 1.1.1 ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

---

Φυσικά ενδιαίτηματα με σχετικά υψηλές θερμοκρασίες και ιδιαίτερη μικροβιακή ποικιλότητα είναι ευρέως διαδεδομένα στη γη αν και η έκτασή τους είναι συχνά περιορισμένη. Το πρώτο ακραίο περιβάλλον που συγκέντρωσε οικολογικό ενδιαφέρον ήταν αυτό των θερμοπηγών (Brock, 1967, Brock and Freeze, 1969). Πρόκειται για περιοχές με θερμοκρασίες που φτάνουν ή και ξεπερνούν το σημείο βρασμού του νερού και φιλοξενούν θερμόφιλους και υπερθερμόφιλους

μικροοργανισμούς. Επιπροσθέτως, εδάφη που βρίσκονται διαρκώς εκτεθειμένα στην ηλιακή ακτινοβολία μπορεί να αναπτύξουν, κατά τις μεσημβρινές ώρες των θερινών μηνών, θερμοκρασίες άνω των 70 °C. Υψηλές θερμοκρασίες, επίσης, αναπτύσσονται σε υλικά στα οποία λαμβάνουν χώρα ζυμώσεις όπως οι σωροί κομποστοποίησης ή η λάσπη ακατέργαστων αποβλήτων.

Τα ηφαιστειακά περιβάλλοντα θεωρούνται τα πλέον εκτεθειμένα, σε ακραίες φυσικές συνθήκες. Χαρακτηρίζονται από μεγάλες ποσότητες ατμού, διοξειδίου του άνθρακα, υδρόθειου, θείου και ποικίλες ποσότητες μονοξειδίου του άνθρακα, μεθανίου, υδρογόνου, αζώτου και αμμωνίας (Stetter, 1999, King, 2007). Πλήθος θερμοφίλων και υπερθερμοφίλων μικροοργανισμών έχει απομονωθεί από υποβρύχιες και ηπειρωτικές ηφαιστειακές περιοχές (Meintanis et al., 2006, Herrera and Cockell, 2007, Zhang et al., 2010, Edwards et al., 2011, Urbietta et al., 2012).

Θερμόφιλοι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί έχουν επίσης βρεθεί σε τεχνητά θερμά περιβάλλοντα. Μερικά από αυτά είναι οι οικιακοί ή βιομηχανικοί βραστήρες νερού, οι εγκαταστάσεις παραγωγής ηλεκτρικής και πυρηνικής ενέργειας καθώς και οι περιοχές καύσης οργανικής ύλης (de Miguel Bouzas et al., 2006, Madigan et al., 2006).

---

#### 1.1.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

---

Η απάντηση στο ερώτημα γιατί οι θερμοφιλοι μικροοργανισμοί επιβιώνουν και αναπτύσσονται σε αντίξοες, για την πλειοψηφία των οργανισμών, συνθήκες εμφανίζεται κατά την ενδελεχή παρατήρηση της σταθερότητας των κυτταρικών συστατικών τους σε μοριακή βάση.

Η προστασία του DNA από τις υψηλές θερμοκρασίες θεωρείται αναγκαία τόσο για τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας όσο και για τη σωστή εκτέλεση της μεταβολικής λειτουργίας του κυττάρου. Τα θερμοφιλα βακτήρια και Αρχαία εμφανίζουν διαφορετική αναλογία και προτίμηση στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, ευελιξία του σκελετού της διπλής έλικας, μετατροπές στις αζωτούχες βάσεις τους καθώς και πρόσδεση πρωτεϊνών (ιστόνες και μη) συγκριτικά με τους μεσόφιλους μικροοργανισμούς (Trivedi et al., 2005). Αναλυτικότερα, το περιεχόμενο ποσοστό CG στις κωδικές περιοχές τους, εμφανίζεται αυξημένο στα θερμοφιλα, χωρίς όμως σαφή συσχέτιση με την άριστη θερμοκρασία αύξησης τους (Singer and Hickey, 2003). Άλλα χαρακτηριστικά που ενδέχεται να παίζουν ρόλο στη σταθερότητα του μορίου είναι η παρουσία κατιόντων καλίου, τα οποία ουδετεροποιούν το νουκλεϊκό οξύ και διατηρούν τη διπλή έλικα (Kawashima et al., 2000), η μεθυλίωση ορισμένων νουκλεοτιδίων (Ehrlich et al., 1985) και η παρουσία μιας αντίστροφης γυράσης η οποία προσδίδει θετικές υπερελικώσεις στο μόριο. Η παρουσία της τελευταίας, φαίνεται πως παίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στην αντιγραφή όσο και στη γονιδιακή ρύθμιση σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (Bao et al., 2002). Μία ποικιλία πρωτεϊνών που φαίνεται πως σχετίζονται τόσο με το πακετάρισμα του μορίου, όσο και με την επιδιόρθωση των βλαβών εξαιτίας των αντίξοων συνθηκών βοηθούν, επίσης, στη σταθερότητα του DNA (Trivedi et al., 2005).



Όσον αφορά στην αλληλουχία των μορίων RNA, εμφανίζεται πλούσια σε πουρίνες (με προτίμηση στην αδενίνη), γεγονός που οδηγεί στην αποφυγή ανεπιθύμητης υβριδοποίησης με άλλα μόρια RNA καθώς και εμφάνιση ανταγωνισμού με τα αντικωδικόνια tRNA. Επίσης, τα πλούσια σε πουρίνες mRNA μεταγράφονται γρηγορότερα και φυσικά αντιστέκονται στην τυχαία υδρόλυση από τη θερμοκρασία (Paz et al., 2004).

Η προσαρμογή των νουκλεϊκών οξέων σε υψηλές θερμοκρασίες αντικατοπτρίζεται και στη συνέχεια στο επίπεδο της μεταγραφής και μετάφρασης. Τα πρωτεϊνικά μόρια των θερμοφίλων οργανισμών εμφανίζουν θερμοσταθερότητα, αυξημένη αντίσταση στη μετουσίωση και στην πρωτεόλυση (Kumar and Nussinov, 2001). Εξαιτίας της απενεργοποίησης των περισσοτέρων πρωτεϊνών σε υψηλές θερμοκρασίες, η μελέτη των μηχανισμών θερμικής σταθερότητας συγκέντρωσε γρήγορα το επιστημονικό ενδιαφέρον. Η πρώτη παρατήρηση αφορά στην αμινοξική αλληλουχία των θερμοφίλων πρωτεϊνών η οποία δεν εμφάνισε ιδιαίτερη διαφοροποίηση από τα αντίστοιχα μόρια των μεσόφιλων (Vieille and Zeikus, 2001). Ωστόσο, η έκφραση τους σε μεσόφιλα συστήματα οδηγεί και πάλι σε θερμοσταθερό προϊόν, γεγονός που υποδεικνύει ως βασικό παράγοντα σταθερότητας τη κωδική αλληλουχία. Η ενζυμική θερμοσταθερότητα περιλαμβάνει θερμοδυναμική και κινητική σταθερότητα. Θερμοδυναμικά, η σταθερότητα καθορίζεται από την ελεύθερη ενέργεια ( $\Delta G$  stability) και από τη θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) του πρωτεϊνικού μορίου. Η κινητική σταθερότητα καθορίζεται από την ενέργεια ενεργοποίησης αποδιάταξης της πρωτεΐνης (Vieille and Zeikus, 2001). Αύξηση της  $\Delta G$  και της  $T_m$  του μορίου επιτυγχάνεται εύκολα με αμινοξική αντικατάσταση σε μία ή επιπλέον θέσεις του ενζύμου. Η αλλαγή αυτή μπορεί να οδηγήσει σε ιοντικούς ή δεσμούς υδρογόνου καθώς και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που βοηθούν στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών έναντι της θερμικής αποδόμησης (Razvi and Scholtz, 2006). Επίσης, ειδικές πρωτεΐνες που καλούνται μοριακοί συνοδοί βοηθούν, μετά την πρωτεϊνική αποδιάταξη, στην επανασυγκρότηση των μορίων στη φυσική τους δομή και λειτουργία (De Macario and Macario, 2000). Έχει ακόμη παρατηρηθεί ότι οι θερμοσταθερές πρωτεΐνες τείνουν να εμφανίζουν υδρόφοβες περιοχές, εξαιτίας της διαφορετικής μοριακής αναδίπλωσης τους. Γενικά ένα σύνολο διαφορετικών χαρακτηριστικών όπως είναι οι δισουλφιδικές γέφυρες, τα αρωματικά κατάλοιπα ή οι δεσμοί υδρογόνου έχουν σχετιστεί με τη θερμική πρωτεϊνική σταθερότητα. Ωστόσο, δεν μπορεί να εξαχθεί ένας γενικός κανόνας που να αφορά στη μετατροπή μιας μεσόφιλης πρωτεΐνης σε θερμοφιλή καθότι στις περισσότερες περιπτώσεις τα χαρακτηριστικά αυτά είναι εξατομικευμένα για το εκάστοτε μόριο.

Τέλος, οι κυτταρικές μεμβράνες των προκαρυωτικών θερμοφίλων μικροοργανισμών είναι πλούσιες σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, με αποτέλεσμα να διαθέτουν υψηλό σημείο τήξης, διασφαλίζοντας έτσι την ακεραιότητα του κυττάρου (Herbert and Sharp, 1992). Οι Αρχαίοι Προκαρυωτικοί Οργανισμοί, αν και άκρως θερμοφιλοί, δεν περιέχουν λιπαρά οξέα στις μεμβράνες τους αλλά παράγωγα ενός  $C_{20}$ - $C_{20}$  διακυλογλυκερο-διαιθέρα (Gambacorta et al., 1995).

### 1.1.3 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Οι θερμοφιλοι μικροοργανισμοί μελετήθηκαν αρχικά, ως προς τη θεμελιώδη βιολογική τους σημασία και τη στρατηγική επιβίωσης έναντι ακραίων περιβαλλοντικά συνθηκών. Τη μελέτη αυτή, διαδέχτηκε η εφαρμογή τόσο των ίδιων των μικροοργανισμών όσο και των προϊόντων τους σε βιομηχανικές και βιοτεχνολογικές διαδικασίες (Niehaus et al., 1999, Bruins et al., 2001, Turner et al., 2007). Εκτός από το κόστος, ο βασικός ανασταλτικός παράγοντας εκτεταμένης χρήσης βιοκαταλυτών στη βιομηχανία είναι η μειωμένη αντοχή τους στις υψηλές θερμοκρασίες. Ακριβώς για αυτόν το λόγο, αναδείχτηκε η ικανότητα των θερμοφίλων να παράγουν πρωτεΐνες με υψηλή θερμοσταθερότητα (αυξημένος χρόνος ημιζωής σε υψηλές θερμοκρασίες). Η πραγματοποίηση βιοτεχνολογικών διεργασιών με τη χρήση θερμοσταθερών ενζύμων σε υψηλές θερμοκρασίες εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα (Πίνακας 1-1).

**Πίνακας 1-1** Βασικά πλεονεκτήματα χρήσης θερμοσταθερών ενζύμων στις βιομηχανικές διεργασίες

<b>Ιδιότητα</b>	<b>Πλεονεκτήματα</b>
Ενζυμική θερμοσταθερότητα	Αυξημένος χρόνος ημιζωής του ενζύμου, ευκολότερος πρωτεϊνικός καθαρισμός, ανθεκτικότητα στους οργανικούς διαλύτες ή σε μεγάλο εύρος τιμών pH (Kristjansson, 1989, Lasa and Berenguer, 1993)
Αυξημένο άριστο ενζυμικής δράσης	Χαμηλή ενζυμική ενεργότητα σε θερμοκρασία δωματίου, αυξημένος ρυθμός ενζυμικής δράσης, αυξημένος ρυθμός διάχυσης των υποστρωμάτων και των προϊόντων (Mozhaev, 1993, Krahe et al., 1996, Kumar and Nussinov, 2001)
Διαλυτότητα	Αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, αποδοτικότερη ενζυμική διείδυση και αποδόμηση σε ακατέργαστα υλικά, βιοδιαθεσιμότητα και διαλυτότητα των συστατικών των οργανικών μειγμάτων (Lasa and Berenguer, 1993, Becker et al., 1997, Paes and O'Donohue, 2006)
Μειωμένο ιξώδες	Αυξημένος ρυθμός ενζυμικής δράσης, αύξηση ανάδευσης στην καλλιέργεια (Lasa and Berenguer, 1993)
Μικροβιακή μόλυνση	Μείωση της πιθανότητας μόλυνσεων από κοινά μεσόφιλα, μείωση δράσης μη εξειδικευμένων ενζύμων εξαιτίας της απενεργοποίησής τους (Lasa and Berenguer, 1993)

Σημαντικός αριθμός ενζύμων έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί από θερμοφίλους μικροοργανισμούς και απαντά σε ποικίλες εφαρμογές. Η βιομηχανία αμύλου αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα πεδία χρήσης θερμοσταθερών ενζύμων. Η υδρόλυση και η μετατροπή του φυσικού αυτού πολυμερούς σε απλά σάκχαρα απαιτεί τη συνεργιστική δράση αμυλολυτικών ενζύμων σε υψηλές θερμοκρασίες (α-αμυλάση, β-αμυλάση και ισοαμυλάση). Η παρουσία των ενζύμων αυτών στους θερμοφίλους μικροοργανισμούς είναι αρκετά διαδεδομένη αν και στα φυσικά περιβάλλοντά τους υπάρχει πολύ μικρή ποσότητα αμύλου.

Η ύπαρξη των αμυλολυτικών ενζύμων πιθανά σχετίζεται με τη διάσπαση του γλυκογόνου που αποτελεί αποθηκευτική ουσία εντός του κυττάρου (Bertoldo and Antranikian, 2002). Τα επίπεδα παραγωγής των ενζύμων από τα στελέχη φυσικού τύπου συχνά δεν είναι ικανοποιητικά με αποτέλεσμα την κλωνοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων σε άλλα συστήματα έκφρασης. Γενικά, η ενζυμική κατεργασία του αμύλου διακρίνεται σε τρία στάδια: τη διάλυση του αμύλου σε υδατικό διάλυμα με υψηλή θερμοκρασία, τη ρευστοποίηση του διαλύματος με μερική υδρόλυση και τη σακχαροποίηση αυτού με περαιτέρω υδρόλυση (γλυκόζη και μαλτόζη). Η χρήση θερμοσταθερών ενζύμων επιτρέπει την απευθείας υδρόλυση έπειτα από τη διάλυση του αμύλου χωρίς ενδιάμεσο στάδιο μείωσης της θερμοκρασίας του διαλύματος μειώνοντας σε χρόνο και κόστος τη διαδικασία (Niehaus et al., 1999, Haki and Rakshit, 2003, de Miguel Bouzas et al., 2006).

Επίσης, οι θερμοσταθερές πρωτεάσες (ενδοπεπτιδάσες και εξωπεπτιδάσες) αποτελούν βασικά βιομηχανικά ένζυμα με ευρύ πεδίο εφαρμογών (βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων, υφαντουργία και βυρσοδεψία) (Haki and Rakshit, 2003). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και ένζυμα με εξειδικευμένη πρωτεολυτική δράση καθώς βρίσκουν εφαρμογή στην έρευνα (Lee et al., 1992).

Μία άλλη κατηγορία θερμοσταθερών ενζύμων είναι οι χιτινάσες. Η χιτίνη είναι αρκετά διαδομένη στο φυσικό περιβάλλον, εξαιτίας της παρουσίας της στα έντομα, στο κυτταρικό τοίχωμα πολλών μυκήτων καθώς και στον εξωσκελετό ζωικών οργανισμών. Για τη διάσπασή της, απαιτείται μία ομάδα ενζύμων, τα οποία εμφανίζουν εφαρμογές στη βιομηχανία χάρτου και καλλυντικών, στον καθαρισμό του νερού, στην υφαντουργία, στα προϊόντα φωτογραφίας καθώς και στην ιατρική και κτηνιατρική (Majeti and Kumar, 2000). Σπουδαίες εφαρμογές εμφανίζουν και οι θερμοσταθερές λιπάσες, ξυλανάσες και κυτταρινάσες οι οποίες θα αναφερθούν εκτενώς στα παρακάτω κεφάλαια.

Εκτός από τη βιομηχανία, η χρήση των θερμοσταθερών ενζύμων ήταν καθοριστική και στην ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Η ανακάλυψη θερμοσταθερών πολυμερασών, δεσμασών και περιοριστικών ενδονουκλεασών υπερπήδησε το πρόβλημα της αποδιάταξης της δευτεροταγούς δομής του DNA με την αύξηση της θερμοκρασίας (Niehaus et al., 1999, Haki and Rakshit, 2003).

Σε συνδυασμό με τα ένζυμα υδρόλυσης πολυμερών και τροποποίησης του DNA υπάρχουν και θερμοσταθεροί βιοκαταλύτες που εμπλέκονται σε αντιδράσεις εστεροποίησης ή σύνθεσης πεπτιδίων, ολιγοσακχαριτών και φωσφολιπιδίων (ισομεράση της γλυκόζης, εστεράσες κλπ).

Παρόλο που οι θερμοφιλοι μικροοργανισμοί εμφανίζουν πολλές βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμες ιδιότητες αρκετές φορές εμφανίζονται προβλήματα στην εφαρμογή αυτών και των ενζύμων τους στη βιομηχανία (Πίνακας 1-2). Η κλωνοποίηση και ετερόλογη υπερέκφραση των επιθυμητών γονιδίων σε κατάλληλους μεσόφιλους δέκτες μπορεί, συχνά να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα θερμοσταθερών προϊόντων, μειώνοντας συγχρόνως το κόστος καλλιέργειας των στελεχών φυσικού τύπου σε υψηλές θερμοκρασίες παρουσία σύνθετων υποστρωμάτων.

**Πίνακας 1-2** Βασικά προβλήματα εφαρμογής θερμοσταθερών ενζύμων στη βιομηχανία (Lasa and Berenguer, 1993, Holst et al., 1997)

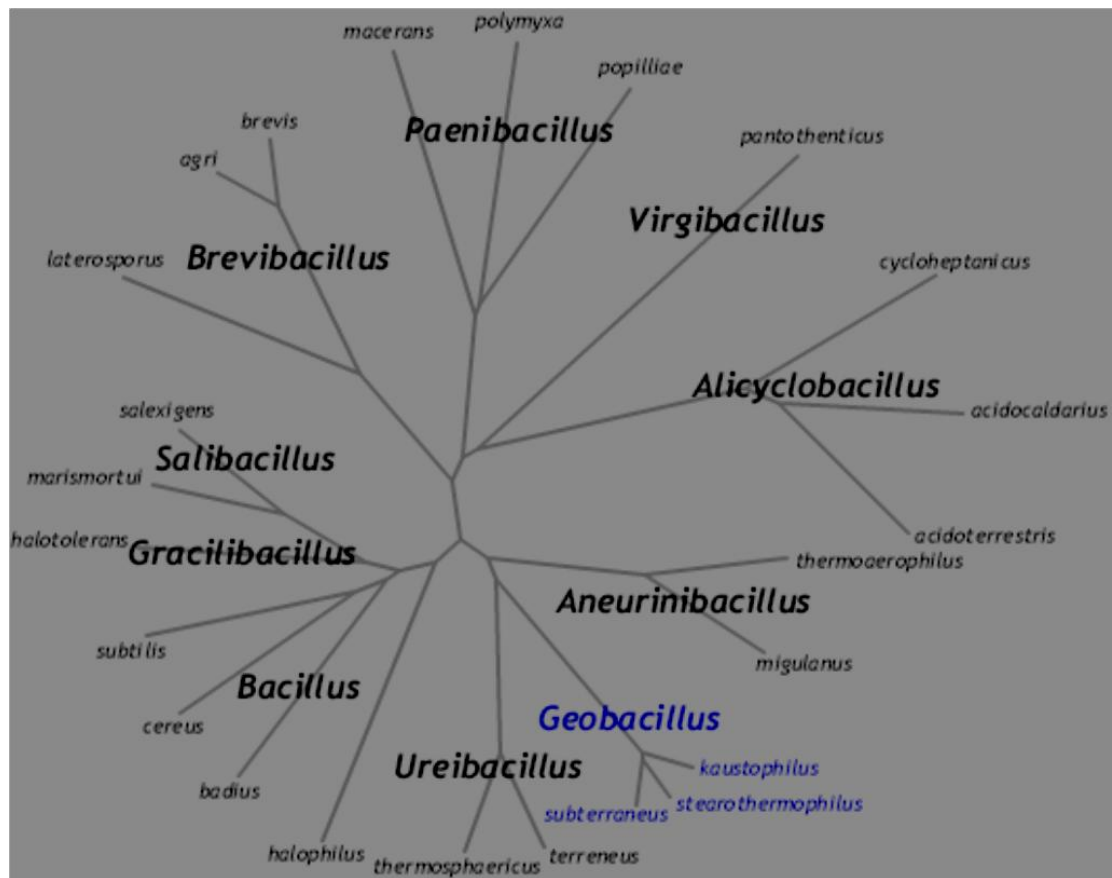
<b>Ιδιότητα</b>	<b>Μειονεκτήματα</b>
Ευαισθησία στην υψηλή θερμοκρασία	Αρκετά υποστρώματα, συμπαράγοντες ή προϊόντα ενδέχεται να μην είναι σταθερά σε υψηλές θερμοκρασίες.
Διαλυτότητα των αερίων	Η μειωμένη διαλυτότητα των αερίων εξαιτίας της αύξησης της θερμοκρασίας μπορεί να είναι περιοριστικός παράγοντας για πολλές αντιδράσεις
Ενζυμική σταθερότητα	Η απενεργοποίηση πολλών ανεπιθύμητων ενζύμων μπορεί να είναι δύσκολη
Εξοπλισμός	Η διαδοχική αύξηση και μείωση της θερμοκρασίας στο βιοαντιδραστήρα οδηγεί σε μεγάλες φθορές
Ρυθμός αύξησης μικροοργανισμών	Τα θερμοφιλα εμφανίζουν χαμηλούς ρυθμούς αύξησης και παραγωγής προϊόντων. Τα τελευταία, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών

## 1.2 ΤΑ ΓΕΝΗ *BACILLUS* ΚΑΙ *GEOBACILLUS*

Το γένος *Bacillus* περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλία αερόβιων και δυνητικά αναερόβιων, ραβδόμορφων, θετικών κατά Gram βακτηρίων, τα οποία επαναταξινομήθηκαν με τη βοήθεια των τεχνικών μεθόδων της Μοριακής Βιολογίας (Ash et al., 1991). Τα στελέχη *Bacillus stearothermophilus*, *B. kaustophilus* και *B. thermoglucosidasius* ανήκουν σε συγγενή φυλογενετικό κλάδο, τα οποία ο Ash και οι συνεργάτες του (1991) τα ομαδοποίησαν ως μία κατηγορία. Χρειάστηκε μία δεκαετία για να αποδειχτεί ότι η αυτή η κατηγορία των στελεχών εμφανίζεται φαινοτυπικά και φυλογενετικά ανεξάρτητη από τους υπόλοιπους βακίλους. Έτσι, εμφανίστηκε ένα νέο ταξόν, το γένος *Geobacillus* (Εικόνα 1-1), το οποίο περιλαμβάνει τα θερμοφιλα βακτήρια της προηγούμενης κατηγορίας (Nazina et al., 2001).

Η καταγραφή των χαρακτηριστικών του γένους πραγματοποιήθηκε από τους Nazina και συνεργάτες (2001) (Πίνακας 1-3). Πρόκειται για ραβδόμορφα κύτταρα, μονά ή σε αλυσίδες τα οποία σχηματίζουν ενδοσπόρια και κινούνται με περίτριχο μαστίγιο. Το κυτταρικό τοίχωμά τους είναι θετικό κατά Gram και θεωρούνται χημειοργανότροφοι μικροοργανισμοί με αερόβια ή δυνητικά αναερόβια αύξηση. Η ταξινόμηση των μικροοργανισμών στο γένος *Geobacillus* πραγματοποιείται συνήθως με βάση τη σύγκριση της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου (Takami et al., 2004, Coorevits et al., 2011). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και άλλα γονίδια δείκτες τα οποία μπορούν να εμφανίσουν καλύτερη διαφοροποίηση των στελεχών εντός του ίδιου γένους (πχ *recN*) (Zeigler, 2005).

Ένα σύνολο γονιδιωμάτων του γένους *Geobacillus* έχει πλήρως αλληλουχηθεί και είναι διαθέσιμο στις διεθνείς βάσεις δεδομένων (Feng et al., 2007, Muhd Sakaff et al., 2012). Η μελέτη αυτών δεν έχει οδηγήσει σε σαφή συμπεράσματα σχετικά με τη θερμοφιλία των μικροοργανισμών. Υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία που να υποστηρίζουν είτε την οριζόντια μεταφορά θερμοφίλων γονιδίων από τα Αρχαία είτε τις γονιδιακές μεταλλάξεις σε προϋπάρχοντα μεσόφιλα γονίδια (Marchant and Banat, 2010).



**Εικόνα 1-1** Φυλογενετικό δέντρο των γεωβακίλλων βασισμένο στις 16S rDNA γονιδιακές ευθυγραμμίσεις

Πίνακας 1-3 Περιγραφή του γένους *Geobacillus* (Nazina et al., 2001)

<b>Μορφολογία</b>	<p><b>Βλαστικά κύτταρα</b> Ραβδόμορφα κύτταρα, μονά ή σε μικρές αλυσίδες, κίνηση με περίτριχο μαστίγιο. Η οργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος είναι κατά Gram θετική αλλά η αντίδραση χρώσης ποικίλει άλλοτε θετικά και άλλοτε αρνητικά.</p> <p><b>Σπόρια</b> Ένα ελλειψοειδές ή κυλινδρικό ενδοσπόριο ανά κύτταρο, ακριανός εντοπισμός σε ελαφρά διογκωμένα ή μη διογκωμένα σποριάγγεια.</p> <p><b>Αποικίες</b> Ποικιλία σχημάτων και μεγεθών, παραγωγή χρωστικών σε συγκεκριμένα θρεπτικά υποστρώματα.</p>
<b>Μεταβολισμός</b>	<p><b>Ενέργεια</b> Χημειοργανότροφα</p> <p><b>Οξυγόνο</b> Αερόβια ή δυνητικά αναερόβια. Οξυγόνο - δέκτης ηλεκτρονίων, αντικατάσταση σε μερικά είδη από νιτρικά</p> <p><b>Θερμοκρασία</b> Δυνητικά θερμοφιλα. Εύρος αύξησης : 37-75 °C με άριστο 55-65 °C.</p> <p><b>pH</b> Αύξηση : 6 - 8,5 Άριστο : 6,2 – 7,5</p> <p><b>Απαιτήσεις</b> Παράγοντες αύξησης, βιταμίνες, NaCl και KCl δεν απαιτούνται στα περισσότερα είδη.</p>
<b>Δοκιμές αναγνώρισης</b>	<p><b>Υδατάνθρακες</b> Οξύ αλλά όχι αέριο παράγεται από γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, μαννόζη, και σουκρόζη. Τα περισσότερα είδη δεν παράγουν οξύ από λακτόζη.</p> <p><b>Ένζυμα</b> Διαθέτουν καταλάση. Η φαινυλαλανίνη δεν απαμινώνεται, η τυροσίνη δεν διασπάται, ινδόλη δεν παράγεται. Ενδέχεται να διαθέτουν οξειδάση.</p> <p><b>Βιοχημεία</b> Κυριότερα κυτταρικά λιπαρά οξέα : ίσο – 15:0, ίσο – 16:0 και ίσο - 17:0, συνιστούν περίπου το 60% του συνόλου.</p>
<b>Χαρακτηρισμός DNA</b>	<p><b>GC περιεχόμενο</b> 48,2 – 58 mol %</p> <p><b>16S rRNA</b> Ομολογία αλληλουχιών μεγαλύτερη από 96,5% μεταξύ των μελών του γένους</p>
<b>Οικολογία</b>	<p>Ευρεία εξάπλωση στο φυσικό περιβάλλον. Αρκετά έχουν απομονωθεί επιτυχώς από θερμές πηγές, ηφαιστειακά ενδαιτήματα και υδροθερμικές αναθυμιάσεις. Ανίχνευση και σε τεχνητούς βιότοπους.</p>

Τα βακτήρια του γένους *Geobacillus* αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 37-75 °C. Η ικανότητά τους αυτή σχετίζεται με την περιβαλλοντική κατανομή τους η οποία είναι κυρίως σε ενδιαιτήματα υψηλής θερμοκρασίας. Ωστόσο δεν εξηγείται η παρουσία τους σε βιώσιμη κατάσταση σε περιοχές που επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες (Marchant et al., 2002α, Marchant et al., 2002β, Banat et al., 2004, Marchant et al., 2008). Η παρουσία θερμοφίλων μικροοργανισμών σε περιβάλλοντα χαμηλών θερμοκρασιών επαναπροσδιορίζει το αρχικό ερώτημα της αντοχής τους στις υψηλές θερμοκρασίες στο γιατί δεν αναπτύσσονται στις χαμηλότερες. Μάλιστα, το ερώτημα αυτό εντείνεται με την ομοιότητα σε επίπεδο ανάλυσης και σύγκρισης γονιδιωμάτων μεταξύ μεσόφιλων και θερμοφίλων, στενά συγγενικών μικροοργανισμών.

Κατά τη μελέτη της φυσιολογίας και ανάπτυξης του γένους *Geobacillus* σε συνθήκες διαφορετικής θερμοκρασίας ανάπτυξης προέκυψε ταχύτερος ρυθμός αύξησης σε υψηλές τιμές ο οποίος όμως συνδυάζεται από επίσης αυξημένο ρυθμό θανάτου (Pavlostathis et al., 2006). Μάλιστα, όταν η θερμοκρασία πλησιάζει τη μέγιστη ανεκτή τιμή της η μορφολογία των κυττάρων αλλάζει (ραβδόμορφοι βάκιλλοι μεγάλου μήκους) και χάνουν την ικανότητα τους για διαίρεση, εξαιτίας ενδεχομένως της περιορισμένης μεταβολικής λειτουργίας (Marchant et al., 2002α).

Τα στελέχη του γένους *Geobacillus* έχουν απομονωθεί από ποικιλία διαφορετικών φυσικών ή τεχνητών ενδιαιτημάτων. Μερικά από αυτά είναι: ρηχές θαλάσσιες ιαματικές πηγές, υπερθερμικά περιβάλλοντα του θαλάσσιου βυθού (Maugeri et al., 2002), ηφαιστειακά εδάφη (Meintanis et al., 2006), πετρελαϊκές δεξαμενές (Nazina et al., 2001), σωληνώσεις κεντρικού συστήματος θέρμανσης (Obojska et al., 2002), σωροί κομποστοποίησης και οργανικής αποικοδόμησης καθώς και μεγάλη ποικιλία εδαφικών περιβαλλόντων (Marchant et al., 2002α, Banat et al., 2004). Ενδιαφέρον εμφανίζει η παρουσία μικροοργανισμών του γένους *Geobacillus* στο βρόχινο νερό (Ιρλανδία), στον ατμοσφαιρικό αέρα υψηλού υψομέτρου καθώς και στα σύννεφα (Marchant et al., 2008). Επίσης, τα βακτήρια αυτά εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, υπεριώδους ακτινοβολίας καθώς και ακτίνων γ, χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ικανά να επιβιώσουν στις ακραίες συνθήκες του διαστήματος (Saffary et al., 2002).

Τα τελευταία χρόνια το βιοτεχνολογικό δυναμικό των γεωβακίλλων έχει συγκεντρώσει μεγάλο ενδιαφέρον. Βακτήρια του γένους αυτού χρησιμοποιούνται ευρέως ως πηγές θερμοσταθερών ενζύμων όπως πρωτέασες (Hawumba et al., 2002, Chen et al., 2004, Zhu et al., 2007), αμυλάσες (Al-Qodah, 2006, Khemakhem et al., 2009, Dheeran et al., 2010), λιπάσες (Leow et al., 2004, Abdel-Fattah and Gaballa, 2008, Ebrahimpour et al., 2011), DNA πολυμεράσες (Sandalli et al., 2009, Çağlayan and Bilgin, 2011) καθώς και κυτταρινολυτικά (Tai et al., 2004, Rastogi et al., 2010) και ξυλανολυτικά ένζυμα (Wu et al., 2006, Sharma et al., 2007). Επίσης, προϊόντα τους, όπως οι εξωπολυσακχαρίτες, έχουν χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανικές διεργασίες (Schiano Moriello et al., 2003).

Ένας διαφορετικός ρόλος των γεωβακίλλων είναι η παραγωγή τοξινών έναντι στενά συγγενικών, με το γένος *Geobacillus*, μικροοργανισμών αλλά και άλλων παθογόνων (Pokusaeva et al., 2009, Başbülbul Özdemir and Biyik, 2011). Εκτός από τις τοξίνες, τα στελέχη αυτά φαίνεται να παράγουν και άλλες ουσίες οι οποίες επηρεάζουν τον ενδοειδικό ανταγωνισμό κατά τη μικροβιακή αύξηση και είναι δυνατόν να την περιορίσουν (Reading and Sperandio, 2006). Αυτές, οι αντιμικροβιακές ουσίες βρίσκουν εφαρμογές στην ιατρική, στη βιομηχανία τροφίμων καθώς και στη γεωργία.

Παράλληλα, η ικανότητα τους να μεταβολίζουν υδρογονάνθρακες ανέδειξε τον περιβαλλοντικό τους ρόλο (Marchant and Banat, 2010). Αρκετά στελέχη *Geobacillus* εμφάνισαν ικανότητα αποδόμησης μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους αλκανίων, πετρελαίου (φωτιστικού ή εσωτερικής καύσης) καθώς και άλλων ορυκτών καυσίμων (Maugeri et al., 2002). Τέλος, σημαντική εφαρμογή αποτελεί και η μεταβολική ικανότητά τους έναντι των συνθετικών οργανοφωσφορικών ενώσεων όπως είναι τα ζιζανιοκτόνα (Obojska et al., 2002).

### 1.3 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ BOX PCR ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

---

Τα γονιδιώματα των προκαρυωτικών και ορισμένων απλών ευκαρυωτικών οργανισμών διαθέτουν πολυάριθμες μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες παρέχουν στοιχεία για τη γενετική ανάλυση και τυποποίηση πολλών μικροοργανισμών. Οι BOX αλληλουχίες ανήκουν σε μια από τις τρεις οικογένειες (REP, ERIC και BOX) τέτοιων αλληλουχιών που έχουν εντοπιστεί στο προκαρυωτικό γονιδίωμα και περιλαμβάνουν διαφορετικούς συνδυασμούς από τρεις υπομονάδες boxA, boxB και boxC οι οποίες έχουν μήκος 59, 45 και 50 νουκλεοτίδια αντίστοιχα (Martin et al., 1992, Walker et al., 2001). Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης BOX, για τη διάκριση βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιεί μόρια εκκινητές συμπληρωματικά προς υψηλά συντηρημένες, επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες, που απαντώνται σε πολλαπλά αντίγραφα στο γονιδίωμα των περισσότερων αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων. Τα ενισχυμένα τμήματα (διαφορετικών μηκών) μπορούν να ηλεκτροφορηθούν σε πήκτωμα αγαρόζης και να διαχωριστούν, δίνοντας την εικόνα ενός ραβδωτού κώδικα, μοναδικού για κάθε στέλεχος (Versalovic et al., 1994, Koeuth et al., 1995).

Η μέθοδος του BOX-PCR αποτυπώματος αποτελεί μία χαμηλού κόστους και υψηλής ταχύτητας μέθοδο φυλογενετικής διάκρισης και κατάταξης των μικροοργανισμών σε επίπεδο στελέχους (Bruseti et al., 2008, Maiti et al., 2008). Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις φυλογενετικά όμοιων βακτηριακών στελεχών με διαφορετικές μεταβολικές ικανότητες και ιδιότητες. Οι τελευταίες μπορεί να οφείλονται σε μεταλλαγές προσαρμογής ή στην παρουσία πλασμιδίων.



#### 1.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rRNA

---

Η ανάλυση αλληλουχιών του γονιδίου 16S rRNA για τους προκαρυωτικούς και του 18S rRNA για τους ευκαρυωτικούς αποτελεί ορόσημο στη μελέτη της εξέλιξης και ταξινόμησης των οργανισμών. Η στροφή από την παρατήρηση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών στη γονιδιακή αλληλουχία ξεκίνησε 3 περίπου δεκαετίες πριν, από τον Woese και τους συνεργάτες του, και μπήκε στη ρουτίνα της ταξινόμησης των οργανισμών μετά την ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και της αυτοματοποίησης της αλληλουχικής ανάλυσης (Woo et al., 2008).

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων με κριτήριο την ανάλυση συγκεκριμένων γονιδίων είναι περισσότερο αντικειμενική και εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα, με κυριότερο το ότι δεν απαιτεί ιδανική ανάπτυξη μικροοργανισμού ούτε καν βιωσιμότητα (Petti, 2007). Το γονίδιο 16S rRNA θεωρείται από τους σημαντικότερους γενετικούς δείκτες στη φυλογενετική ταξινόμηση καθώς: υπάρχει σχεδόν σε όλα τα βακτήρια (σε πολυγονιδιακές οικογένειες ή οπερόνια), η λειτουργία του στην πορεία του χρόνου δεν έχει αλλάξει επομένως η συσσώρευση τυχαίων μεταλλαγών αντικατοπτρίζει την εξελικτική πορεία και τέλος, το μέγεθος του (περίπου 1500 ζεύγη βάσεων) επιτρέπει βιοπληροφορική επεξεργασία (Patel, 2001).

Ο σημαντικότερος περιορισμός στην χρήση του 16S rRNA γονιδίου ως φυλογενετικό εργαλείο είναι η αδυναμία του να διακρίνει όλα τα διαφορετικά βακτηριακά είδη. Για παράδειγμα, το *Bacillus cereus* και το *Bacillus anthracis* εμφανίζουν όμοια αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου και δεν μπορούν να διακριθούν αξιόπιστα σε μοριακό επίπεδο γονιδιώματος καθότι οι διαφορές τους εντοπίζονται στην παρουσία πλασμιδίων. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούμε διαφορετικά γονίδια – στόχους όπως τα: *rpoB* (β υπομονάδα RNA πολυμεράσης), *tuf* (παράγοντας επιμήκυνσης Tu), *gyrA* ή *gyrB* (γυράση A ή B) και *sodA* (υπεροξειδική δισμουτάση) (Petti, 2007).

#### 1.5 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΑ

---

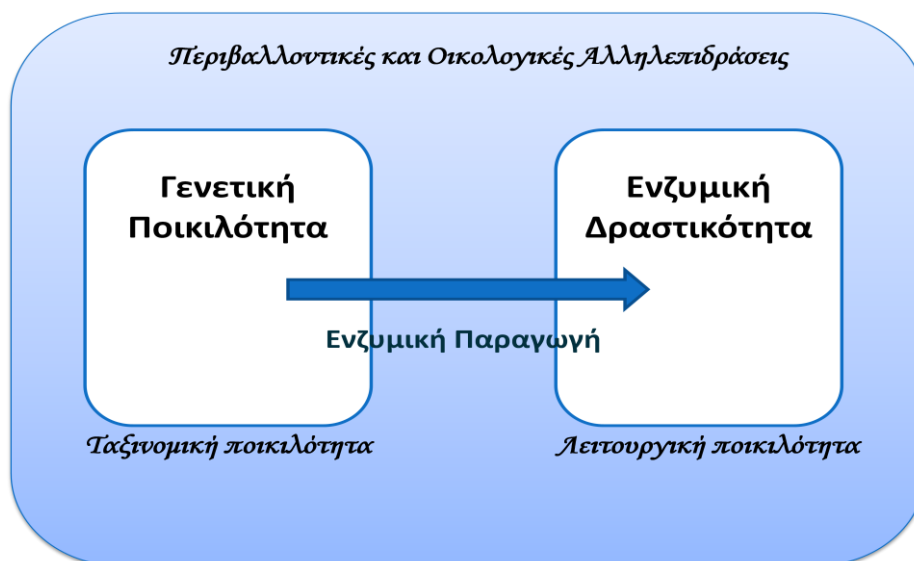
Η μικροβιακή ποικιλότητα περιλαμβάνει τη γενετική σύσταση των μικροοργανισμών, το περιβάλλον (οικοθέσεις) όπου οι μικροοργανισμοί απαντώνται, καθώς και τον οικολογικό ή λειτουργικό ρόλο τους στο οικοσύστημα. Η σημασία της μικροβιακής ποικιλότητας είναι τεράστια τόσο στη διατήρηση της βιόσφαιρας όσο και στην κοινωνία. Συνολικά:

1. Συμβάλει στη διατήρηση της ζωής στον πλανήτη, καθώς συμμετέχει στους βιογεωχημικούς κύκλους των στοιχείων, στη διατήρηση του κλίματος της γης και στην αποικοδόμηση της νεκρής οργανικής ύλης.
2. Η μελέτη της επεκτείνει τα σύνορα της γνώσης σχετικά με τα όρια και τις στρατηγικές επιβίωσης των οργανισμών.
3. Συνιστά ανεξάντλητη δεξαμενή ανακάλυψης νέων βιοτεχνολογικών προϊόντων όπως ένζυμα, φαρμακευτικές ουσίες, μεταβολίτες, οργανικές ενώσεις ή βιοκαύσιμα αλλά και ίδιων μικροοργανισμών ικανών να εκτελέσουν σημαντικές διεργασίες (microbial bioprospecting).

4. Αναδεικνύει μικροοργανισμούς με ρόλο κλειδί στη διατήρηση ανώτερων τροφικών επιπέδων καθώς και στους μηχανισμούς αναγέννησης οικοσυστημάτων με διαταραγμένη ισορροπία.

Οι γνώσεις μας για τη μικροβιακή ποικιλότητα στα διάφορα οικοσυστήματα είναι σχετικά περιορισμένες καθώς είναι πλέον αποδεκτό ότι ένα πολύ μικρό ποσοστό του συνόλου των μικροοργανισμών έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί σε καθαρές καλλιέργειες. Ο ανεξάντλητος μικροβιακός πλούτος αποτελεί μια δεξαμενή αξιόλογων βιοτεχνολογικών προϊόντων με ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Τα ένζυμα συνιστούν μία σημαντική κατηγορία τέτοιων προϊόντων (Εικόνα 1-2) (Marrs et al., 1999). Οι νέες τεχνολογίες ανίχνευσης ενζυμικών ενεργιοτήτων αλλάζουν τους κανόνες στις βιομηχανίες των καταλυτών. Περισσότερα είδη ενζύμων, με βελτιωμένες ιδιότητες και χαμηλότερο κόστος, είναι πλέον διαθέσιμα στην αγορά. Αυτές οι αλλαγές έχουν ανανεώσει το ενδιαφέρον για νέες βιομηχανικές εφαρμογές των ενζύμων αυτών. Η στρατηγική μελέτης και αξιοποίησης της μικροβιακής ποικιλότητας ως προς το ενζυμικό δυναμικό τους περιλαμβάνει τα εξής:

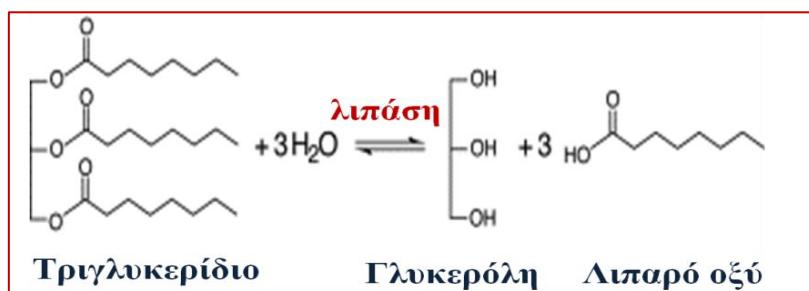
- Δειγματοληψία από περιβάλλοντα με ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ανάκτηση μικροοργανισμών μέσω βελτίωσης των συνθηκών απομόνωσης και καλλιέργειας αυτών.
- Φαινοτυπικός και γονοτυπικός χαρακτηρισμός των απομονωθέντων μικροοργανισμών. Ταξινόμηση και σύγκριση.
- Ανίχνευση επιθυμητών ενζυμικών ενεργιοτήτων. Εντοπισμός των αντίστοιχων γονιδίων.
- Γενετική τροποποίηση του στελέχους φυσικού τύπου (αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης, ανθεκτικότητα στις συνθήκες παραγωγής, μείωση των παραπροϊόντων, ρύθμιση της ενζυμικής παραγωγής, κατανάλωση φθινότερης πηγής άνθρακα και ενέργειας) ή κλωνοποίηση και υπερέκφραση των αντίστοιχων γονιδίων σε πιο αποδοτικά συστήματα.
- Καθαρισμός και εφαρμογή του προϊόντος.



**Εικόνα 1-2** Πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικής ποικιλότητας, ενζυμικής δραστηριότητας, ταξινομικής και λειτουργικής ποικιλότητας (Kandeler et al., 1996)

## 1.6 ΛΙΠΑΣΕΣ

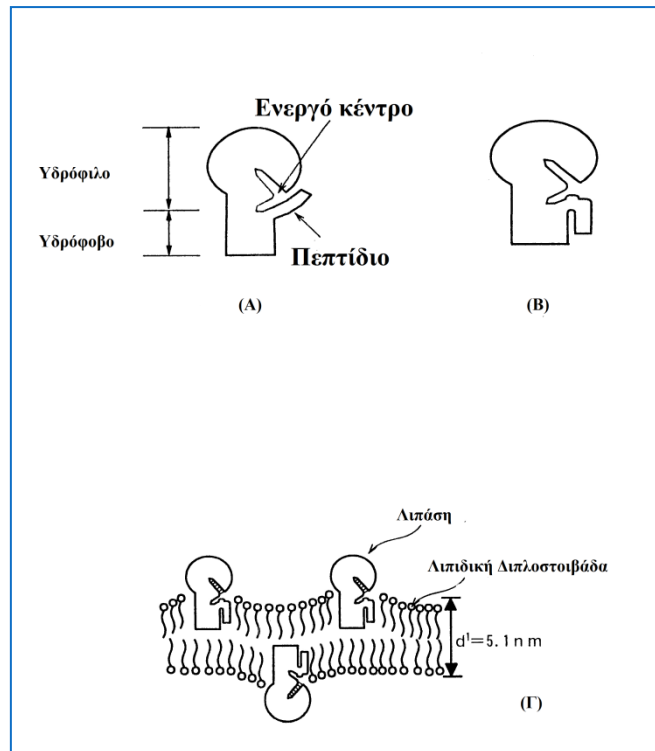
Οι λιπάσες (EC 3.1.1.3) αποτελούν σημαντική κατηγορία βιοκαταλυτών με ικανότητα διεξαγωγής ποικίλων αντιδράσεων απουσία ή παρουσία νερού. Καταλύουν τόσο την υδρόλυση (παρουσία νερού) όσο και τη σύνθεση (απουσία νερού) των εστέρων μεταξύ γλυκερόλης και μακράς αλυσίδας λιπαρών οξέων (Εικόνα 1-3) (Jaeger and Eggert, 2002). Είναι υδρολάσες σερίνης και έχουν ως φυσικά υποστρώματα μακράς αλυσίδας τριακυλογλυκερίδια με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό.



Εικόνα 1-3 Η καταλυτική δράση των λιπασών.

Ένα σύνολο ιδιαίτερων χαρακτηριστικών διαχωρίζουν τις λιπάσες από τις υπόλοιπες υδρολάσες και ιδιαίτερα τις εστεράσες. Οι τελευταίες υδρολύουν διαλυτά υποστρώματα (τριγλυκερίδια μικρής αλυσίδας) ακολουθώντας την κλασική κινητική Michaelis-Menten. Εμφανίζουν χαμηλή υδρολυτική δράση έναντι μακράς αλυσίδας τριγλυκεριδίων (αδιάλυτα) και η μέγιστη ενζυμική ενεργότητα ανιχνεύεται λίγο πριν το σημείο κορεσμού του διαλυτού υποστρώματος. Σε αντίθεση, οι λιπάσες εμφανίζουν ελάχιστη ενζυμική δράση σε διαλυτά υποστρώματα και η ενεργότητα τους αυξάνεται δραματικά σε υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων (γαλακτώματα) (Salameh and Wiegel, 2007a). Η αντίδραση λιπόλυσης πραγματοποιείται στη διεπιφάνεια μεταξύ νερού και λιπιδίων, γεγονός που σημαίνει πως το φαινόμενο δεν μπορεί να περιγραφεί με βάση την κινητική Michaelis-Menten (Ferrato et al., 1997). Η τελευταία έχει εφαρμογή μόνο εάν η ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση πραγματοποιείται σε ομογενή φάση.

Το μοναδικό αυτό φυσικοχημικό χαρακτηριστικό της διεπιφανειακής ενεργοποίησης των λιπασών εξηγήθηκε από την ανάλυση της πρωτεϊνικής στερεοδιάταξής τους. Η τρισδιάστατη απεικόνιση των λιπασών εμφάνισε την ύπαρξη ενός αμφίφιλου πεπτιδίου το οποίο καλύπτει το υδρόφοβο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 1-4). Όταν η λιπάση έρθει σε επαφή με την διεπιφάνεια ελαίου και ύδατος τότε το πεπτίδιο αυτό αναδιατάσσεται εκθέτοντας το ενεργό κέντρο στο υπόστρωμα (λάδι) (Brady et al., 1990, Winkler et al., 1990, Brzozowski et al., 1991). Ωστόσο, έχουν εμφανιστεί και περιπτώσεις λιπασών που δεν δρουν με τον παραπάνω μηχανισμό (Hjorth et al., 1993, Lesuisse et al., 1993). Οι εξαιρέσεις αυτές, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι βασικό κριτήριο διαφοροποίησης μιας λιπάσης από εστεράση δεν είναι η διεπιφανειακή ενζυμική ενεργοποίηση αλλά η υδρόλυση υποστρωμάτων μακράς αλυσίδας (Verger, 1997).



**Εικόνα 1-4** (Α) Εμφάνιση ανενεργούς λιπάσης με κάλυψη του ενεργού κέντρου από το αμφίφιλο πεπτίδιο (Β) Εμφάνιση λιπάσης στην ενεργό μορφή (Γ) Διεπιφανειακή ενεργοποίηση λιπάσης.

Ιστορικά, η ανακάλυψη της ύπαρξης ενζύμων που υδρολύουν τριγλυκερίδια οριοθετείται σε βάθος 300 περίπου ετών. Η ταυτόχρονη ικανότητα εστερικής υδρόλυσης και σύνθεσης, από αυτή την κατηγορία βιοκαταλυτών, είναι πιο πρόσφατη και εμφανίζεται 70 περίπου έτη πριν. Το 1856 ο Claude Bernard ανακάλυψε την παρουσία λιπάσης σε εκχύλισμα παγκρεατικού ιστού. Το ένζυμο αυτό εμφάνιζε την ικανότητα υδρόλυσης αδιάλυτων σταγονιδίων ελαίου σε διαλυτά προϊόντα. Παραδοσιακά, οι λιπάσες απομονώνονταν από ζωικό πάγκρεας και ο ρόλος τους ήταν η ενίσχυση του ανθρώπινου πεπτικού συστήματος είτε ως μείγμα με άλλες υδρολάσες είτε μόνες τους σε καθαρή μορφή. Οι δυσκολίες στη συλλογή του ενζυμικού δείγματος ήταν αρκετές και σε συνδυασμό με την εξάντληση των ζωικών ιστών εμφανίστηκε η ανάγκη εύρεσης διαφορετικών πηγών (Hasan et al., 2006).

Οι λιπάσες είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυσικό περιβάλλον και παράγονται από φυτά, ζώα ή μικροοργανισμούς. Μεγαλύτερο εύρος εφαρμογών εμφανίζουν οι εξωκυτταρικές λιπάσες των μικροοργανισμών κυρίως λόγω της υψηλής διαθεσιμότητάς και σταθερότητάς τους καθώς και της ευκολίας στη γενετική τροποποίηση των μικροβιακών κυττάρων (Rua et al., 1993, Hasan et al., 2006). Οι εμπορικές μικροβιακές λιπάσες προέρχονται κυρίως από βακτήρια, μύκητες και ακτινομύκητες αν και η πλειοψηφία των λιπασών που προορίζονται για βιοτεχνολογικές χρήσεις έχει απομονωθεί από μύκητες (Babu and Rao, 2007). Τα πιο παραγωγικά γένη είναι τα *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* και *Penicillium* (Commenil et al., 1995, Schmid and Verger, 1998). Οι εξωκυτταρικές βακτηριακές λιπάσες έχουν και αυτές εμπορικό ενδιαφέρον, καθότι είναι ευκολότερη η παραγωγή

τους σε μεγάλες ποσότητες (Gupta et al., 2004β). Τα βακτηριακά γένη με τις περισσότερες εφαρμογές παραγωγής λιπάσης είναι τα *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* και *Pseudomonas* (Jaeger et al., 1994, Beisson et al., 2000, Wang et al., 2009, Sangeetha et al., 2011).

Οι βακτηριακές λιπάσες εμφανίζονται ενδοκυτταρικά, εξωκυτταρικά ή προσδεμένες στις μεμβράνες. Μία λιπάση εμφανίζεται με ενδοκυτταρικό εντοπισμό μόνο στο στέλεχος *Bacillus clausii* (Lee and Park, 2008). Στην περίπτωση αυτή, ο μικροοργανισμός μπορεί να αυξηθεί παρουσία γλυκερόλης ή απλών λιπιδίων και όχι μακράς αλυσίδας τριγλυκεριδίων. Η έκκριση των βακτηριακών λιπασών στο εξωκυτταρικό μέσο μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικούς μηχανισμούς. Το εκκριτικό σύστημα τύπου I (T1SS) αποτελείται από ένα σύστημα εξαγωγής 3 πρωτεϊνικών υπομονάδων το οποίο απαιτεί ενέργεια για τη λειτουργία του. Στο εκκριτικό σύστημα τύπου II (T2SS) υπάρχουν 2 μονοπάτια (Sec και Tat). Οι λιπάσες εκκρίνονται στον περιπλασματικό χώρο μέσω του Sec μονοπατιού σε μη διπλωμένη κατάσταση και εκεί με τη βοήθεια πρωτεϊνών συνοδών (Lif) λαμβάνουν τη λειτουργική τρισδιάστατη μορφή τους (Αρνητικά κατά Gram βακτήρια). Στη συνέχεια, εξέρχονται μέσω ενός συστήματος μεταφορέων (Angkawidjaja and Kanaya, 2006, Buist et al., 2006).

Η ταξινόμηση των βακτηριακών λιπολυτικών ενζύμων, με κριτήριο τις συντηρημένες περιοχές και τη βιολογική ενεργότητά τους, περιλαμβάνει 8 οικογένειες όπου η μεγαλύτερη από αυτές υποδιαιρείται σε 6 υποοικογένειες (Arpigny and Jaeger, 1999). Γενικά, οι λιπάσες ανήκουν στην οικογένεια των υδρολασών σερίνης και η ενεργότητά τους βασίζεται στην καταλυτική τριάδα σερίνης, ιστιδίνης και ασπαρτικού καθώς και στην α/β αναδίπλωση τους (de Pascale et al., 2008).

Η οικογένεια I των λιπασών περιλαμβάνει μέλη των γενών *Pseudomonas*, *Bacillus* και *Staphylococcus* και εμφανίζει το χαρακτηριστικό πενταπεπτίδιο Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly. Η οικογένεια II εμφανίζει το μοτίβο Gly-Asp-Ser-Leu στο καταλυτικό ενεργό κέντρο και περιλαμβάνει εστεράσες των γενών *Streptomyces*, *Aeromonas* και *Salmonella* ενώ οι εξωκυτταρικές λιπάσες του γένους *Streptomyces* αποτελούν την οικογένεια III. Τα ένζυμα που εμφανίζουν ομοιότητες με τις θηλαστικές ορμονοεξαρτώμενες λιπάσες εμφανίζονται στην οικογένεια IV ενώ οι λιπάσες των μεσόφιλων μικροοργανισμών (*Haemophilus influenza*) ανήκουν στην οικογένεια V. Οι μικρού μοριακού βάρους εστεράσες σχηματίζουν διμερή και τοποθετούνται στην οικογένεια VI ενώ οι μεγαλύτερου μοριακού βάρους με ομολογία με τις ευκαρυωτικές εστεράσες ακετυλοχολίνης περιλαμβάνονται στην οικογένεια VII. Οι λιπάσες με ομοιότητα με τις β-λακταμάσες εμφανίζονται στην οικογένεια VIII. Τέλος, υπάρχουν ένζυμα που δεν μπορούν να ενταχθούν σε κάποια από τις παραπάνω κατηγορίες και ενδεχομένως στο μέλλον προκύψουν νέες οικογένειες (Sangeetha et al., 2011).

---

### 1.6.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΙΠΑΣΩΝ

---

Η παραγωγή των βακτηριακών λιπασών έχει πραγματοποιηθεί τόσο από υγρές (Chakraborty et al., 2010) όσο και από στερεές καλλιέργειες (Alkan et al., 2007) και επηρεάζεται από ένα σύνολο φυσικοχημικών και θρεπτικών παραγόντων όπως είναι η θερμοκρασία, το pH, η πηγή άνθρακα και αζώτου, η παρουσία λιπιδίων, τα ανόργανα άλατα, η ανάδευση και η διαθεσιμότητα διαλυμένου οξυγόνου (Packter, 1992, Jaeger et al., 1994, Packter, 1994, Kim et al., 1996).

Ένας από τους βασικότερους παράγοντες των μικροβιακών ζυμώσεων είναι η πηγή άνθρακα. Στις περισσότερες περιπτώσεις παραγωγής λιπάσης δεν χρησιμοποιούνται απλά σάκχαρα, ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, αλλά υποστρώματα λιπιδίων (Zhang et al., 2009α, Zhang et al., 2009β). Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις ανάπτυξης μικροοργανισμών καταβολίζοντας απλά σάκχαρα, όπως είναι η γλυκόζη, ενώ η ταυτόχρονη προσθήκη μικρής ποσότητας λιπιδικών υποστρωμάτων λειτουργεί επαγωγικά (Hun et al., 2003). Γενικά, η παραγωγή των ενζύμων αυτών είναι σπάνια συνεχής και κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα (Lee et al., 2001). Ένα σύνολο διαφορετικών ουσιών έχει χρησιμοποιηθεί επαγωγικά και μερικές από αυτές είναι: φυτικά έλαια (Kumar et al., 2005), Tween 20/80 (Li et al., 2004), αλκάνια (Boekema et al., 2007) καθώς και συνθετικά τριγλυκερίδια όπως τριβουτυρίνη και τριπαλμιτίνη. Σε υψηλές συγκεντρώσεις ελεύθερων λιπαρών οξέων ή φυτικών ελαίων η σύνθεση των λιπασών αναστέλλεται. Η πηγή αζώτου δεν εμφανίζει χαρακτηριστικό πρότυπο επίδρασης στην ενζυμική παραγωγή, αν και η πεπτόνη αναφέρεται ως ενισχυτική στη σύνθεση λιπάσης (Gunasekaran et al., 2006). Τέλος, αντίθετα με την πηγή άνθρακα, δεν υπάρχει καμία αναφορά σχετικά με ανασταλτική δράση στην ενζυμική παραγωγή από την πηγή αζώτου (Sangeetha et al., 2011).

Επίσης, η παρουσία δισθενών κατιόντων στο μέσο ανάπτυξης επηρεάζει την παραγωγή των λιπασών. Τα ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου εμφανίζουν σε αρκετές περιπτώσεις ενισχυτική δράση στην ενζυμική σύνθεση (Rathi et al., 2001, Sharma et al., 2002β) ενώ άλλα μεταλλικά ιόντα, όπως ο σίδηρος, απαιτούν αριστοποίηση στη συγκέντρωσή τους για τη μέγιστη ενζυμική παραγωγή (Kanwar et al., 2002).

Επιπροσθέτως με τους διάφορους χημικούς παράγοντες, σημαντικά θεωρούνται για την ενζυμική παραγωγή και τα ακόλουθα: pH, θερμοκρασία, ανάδευση, αερισμός και χρόνος επώασης της καλλιέργειας. Η τιμή pH του αρχικού υποστρώματος είναι καθοριστική για την παραγωγή λιπάσης και στις περισσότερες περιπτώσεις κυμαίνεται στην ουδέτερη έως ελαφρά αλκαλική περιοχή. Η θερμοκρασία επώασης είναι αντίστοιχη της άριστης θερμοκρασίας αύξησης του μικροοργανισμού. Η πλειοψηφία των λιπασών παράγεται από καλλιέργειες εύρους 20-45 °C. Τέλος, ο χρόνος εμφάνισης της μεγαλύτερης παραγωγής ποικίλει από μερικές ώρες έως μέρες και συνήθως συμβαδίζει με τη στατική φάση αύξησης του βακτηρίου (Gupta et al., 2004β).

## 1.6.2 ΜΟΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΛΙΠΑΣΩΝ

Οι λιπάσες εμφανίζουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 19 και 60 kDa και χαρακτηριστικό πακετάρισμα  $\alpha\beta$  υδρολάσης. Το ενεργό κέντρο αποτελείται από μια καταλυτική τριάδα των αμινοξέων σερίνη, ασπαρτικό (ή γλουταμινικό) οξύ και ιστιδίνη (Jaeger and Reetz, 1998).

Το άριστο pH ενζυμικής δράσης των περισσότερων μικροβιακών και ζωικών λιπασών κυμαίνεται στην αλκαλική περιοχή, καθοριστικό χαρακτηριστικό για τη μετέπειτα βιομηχανική εφαρμογή τους (Nawani and Kaur, 2000, Ahmed et al., 2010). Ωστόσο, τροποποιώντας τη σύσταση του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος, τη συγκέντρωση αλάτων και το είδος των γαλακτωματοποιητών, το άριστο pH μπορεί να μετακινηθεί προς την όξινη περιοχή (Mhetras et al., 2009). Ελάχιστες αναφορές υπάρχουν σχετικά με οξεόφιλες λιπάσες οι οποίες είναι κυρίως μυκητιακής προέλευσης (*Aspergillus niger*) εκτός από την περίπτωση του *P. fluorescens* SIK W1 με άριστο pH ενζυμικής δράσης στο 4,8 (Andersson et al., 1979). Οι λιπάσες του γένους *Bacillus* εμφανίζουν ενεργότητα σε μεγάλο εύρος τιμών pH μεταξύ 3-12 (Bradoo et al., 1999, Abada, 2008). Σχετικά με την ενζυμική σταθερότητα, οι βακτηριακής προέλευσης λιπάσες εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα σε τιμές pH μεταξύ 4 και 11 (Wang et al., 1995, Khyami-Horani, 1996, Dong et al., 1999).

Όσον αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας, οι περισσότερες λιπάσες εμφανίζουν άριστη δραστηριότητα μεταξύ 30 και 60 °C (Gupta et al., 2004β). Η θερμοσταθερότητα των λιπασών ποικίλει ανάλογα με την προέλευσή τους: οι ζωικές και φυτικές λιπάσες είναι συνήθως λιγότερο θερμοσταθερές από τις εξωκυτταρικές μικροβιακές. Ο ρυθμός της ενζυμικής αντίδρασης περίπου διπλασιάζεται για κάθε αύξηση 10 °C στη θερμοκρασία. Εάν η σταθερότητα του ενζύμου το επιτρέπει, η πραγματοποίηση των αντιδράσεων σε υψηλότερες θερμοκρασίες αυξάνει κατά πολύ την παραγωγικότητα. Συνεπώς, η θερμοσταθερότητα αποτελεί βασικό πλεονέκτημα για τη βιομηχανική εφαρμογή των λιπασών (Janssen et al., 1994). Τα βακτηριακά γένη τα οποία έχουν αναφερθεί για την παραγωγή θερμοσταθερών λιπασών είναι τα ακόλουθα: *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* και *Staphylococcus* (Gupta et al., 2004β). Η θερμική αντοχή των λιπολυτικών ενζύμων σχετίζεται με τη δομή τους στο χώρο και επηρεάζεται από την παρουσία υποστρώματος, μεταλλικών ιόντων καθώς και από το pH (Zhu et al., 2001). Συχνά αναφέρεται ότι η ενζυμική απενεργοποίηση τους πραγματοποιείται μέσω ενδιάμεσων ενεργών σταδίων χωρίς άμεση μετουσίωση της πρωτεΐνης. Αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει με στόχο την αύξηση της θερμοσταθερότητας των λιπασών και αφορούν μεταλλάξεις στην περιοχή που καλύπτει το ενεργό κέντρο ή πειράματα ακινητοποίησης (Arroyo et al., 1999, Zhu et al., 2001).

Η σταθερότητα των λιπασών στους οργανικούς διαλύτες είναι επιθυμητό χαρακτηριστικό για τις συνθετικές αντιδράσεις (απουσία νερού). Γενικά, τα ένζυμα αυτά, εμφανίζουν σταθερότητα σε περιβάλλον οργανικών διαλυτών και σπάνια αναφέρεται ενίσχυση ή αναστολή της ενεργότητάς τους (Gupta et al., 2004β). Η ευαισθησία των ενζύμων στους διαλύτες σχετίζεται με την πολικότητα των τελευταίων. Οι πολικοί διαλύτες αποσταθεροποιούν σε μεγαλύτερο βαθμό την ενζυμική δράση συγκριτικά με τους μη πολικούς (Ahmed et al., 2010).

Η εμπορική εκμετάλλευση των λιπασών απαιτεί τη μελέτη σταθερότητας τους στους παρακάτω οργανικούς διαλύτες: ισοπροπανόλη, μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, γλυκερόλη, αλκάνια, αλκένια, χλωροφόρμιο, οξικό οξύ κ.α. (Zhang et al., 2009α, Zhang et al., 2009β).

Τα λιπολυτικά ένζυμα συνήθως δεν απαιτούν συμπαράγοντες (Gupta et al., 2004β). Τα δισθενή κατιόντα φαίνεται πως επηρεάζουν την ενεργότητα των λιπασών εξαιτίας του σχηματισμού αλάτων με τα μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα, προϊόντα της λιπόλυσης (Macrae and Hammond, 1985). Αρκετές λιπάσες έχουν χαρακτηριστεί ως μεταλλοένζυμα καθότι παρουσία ασβεστίου εμφανίζουν μεγαλύτερη ενεργότητα και σταθερότητα (Zhang et al., 2009α, Zhang et al., 2009β, Ahmed et al., 2010, Chakraborty et al., 2010). Το γεγονός αυτό, δικαιολογείται από τις δομικές αλλαγές που υφίστανται το μόριο έπειτα από την πρόσδεση του ασβεστίου. Η αναδιπλωμένη λιπάση περιέχει μία περιοχή με αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα η οποία εξαιτίας των ηλεκτροστατικών δυνάμεων επιδρά αρνητικά στη σταθερότητα του μορίου. Το μεταλλικό ιόν, έπειτα από την πρόσδεση του στο μόριο, σχηματίζει μία γέφυρα, η οποία αποδίδει σταθερότητα και ακαμψία στο ένζυμο (Sangeetha et al., 2011). Αντίθετα, έχουν αναφερθεί λιπάσες όπου η δράση και η σταθερότητά τους δεν επηρεάζεται από το ασβέστιο (Kim et al., 2002). Αυτές βρίσκουν εφαρμογή στη βιομηχανία απορρυπαντικών καθότι παρουσία χηλικών παραγόντων λειτουργούν αποτελεσματικά. Επιπροσθέτως, βαρέα μέταλλα όπως κοβάλτιο, νικέλιο, υδράργυρος, κασσίτερος, ψευδάργυρος και μαγγάνιο φαίνεται να αναστέλλουν την ενζυμική ενεργότητα.

Η παρουσία επιφανειοδραστικών ενώσεων στο περιβάλλον της λιπάσης λειτουργεί ενισχυτικά στη διαδικασία της λιπόλυσης, εξαιτίας της αυξημένης διεπιφανειακής ενεργοποίησης του αντίστοιχου ενζύμου. Ωστόσο, η σχέση των ενώσεων με την παραγωγή και δράση των λιπασών δεν είναι αναλογική και εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Για παράδειγμα, υψηλή συγκέντρωση του Tween 80 (1 % w/v) αναστέλλει την παραγωγή λιπάσης από το στέλεχος *B. pumilus* ενώ σε χαμηλότερη συγκέντρωση (0,5 % w/v) εμφανίζεται η μέγιστη ενζυμική παραγωγή (Zhang et al., 2009α, Zhang et al., 2009β). Το SDS παρουσιάζει συνήθως ανασταλτική δράση ενώ το Triton X-100 και το Tween ενισχύει το ρυθμό της ενζυμικής αντίδρασης (Quyen et al., 2003, Lianghua and Liming, 2005).

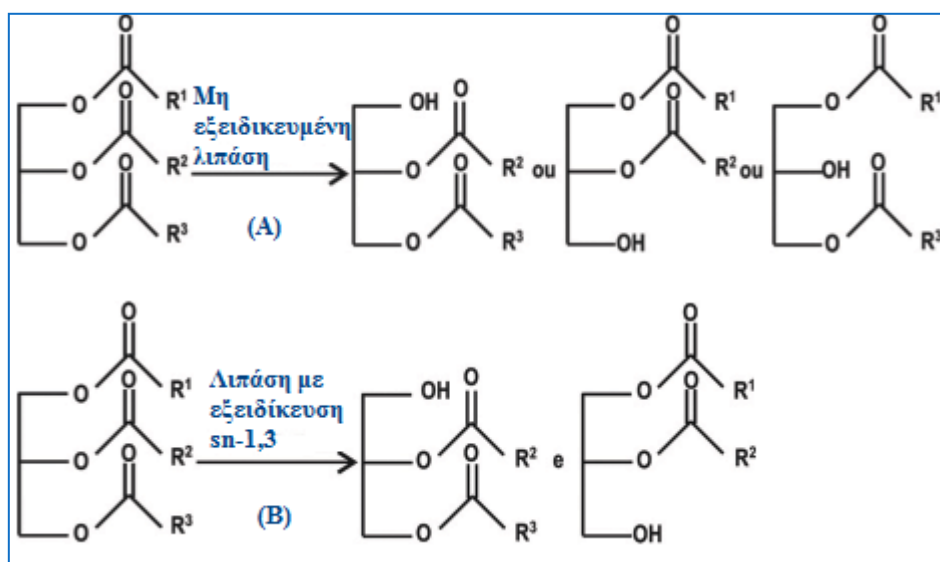
Οι λιπάσες εμφανίζουν μεγάλο εύρος εφαρμογών που απαιτούν ταυτόχρονη χρήση και άλλων ενζύμων, όπως πρωτεάσες και αμυλάσες. Οι πρωτεάσες είναι ένζυμα με ικανότητα υδρόλυσης των πρωτεϊνών που υπάρχουν ταυτόχρονα στο ίδιο μέσο (Aguilar et al., 2002). Υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν πως η παραγωγή λιπασών και πρωτεασών είναι αλληλένδετη (Rajmohan et al., 2002). Σε περιπτώσεις όπου η παραγωγή πρωτεασών περιορίστηκε είτε εξαιτίας φυσικοχημικών παραμέτρων (π.χ. αύξηση παροχής οξυγόνου) είτε λόγω γενετικών τροποποιήσεων η παραγωγή λιπάσης ενισχύθηκε (Lopes et al., 2008). Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν λιπάσες με ανθεκτικότητα στην πρωτεόλυση είτε την ενδογενή είτε τη βιομηχανική (Zhang et al., 2008, Dutta and Ray, 2009, Sangeetha et al., 2010).



### 1.6.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Οι λιπάσες μπορεί να εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς τον βαθμό υποκατάστασης ή τη θέση προσβολής του τριγλυκεριδίου, μπορεί όμως και όχι (Gupta et al., 2004β). Στη δεύτερη περίπτωση, η ενζυμική δράση πάνω στα τριακυλογλυκερίδια είναι τυχαία και οδηγεί σε πλήρη αποδόμηση αυτών σε γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα (Jaeger et al., 1994).

Η περίπτωση κατά την οποία η λιπολυτική ενεργότητα εμφανίζει εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα μπορεί να χωριστεί σε επιμέρους υποκατηγορίες. Στο πλάσμα των ζώων έχουν βρεθεί λιπάσες που εμφανίζουν ιδιαίτερη προτίμηση στην υδρόλυση είτε τριγλυκεριδίων, είτε διγλυκεριδίων, είτε μονογλυκεριδίων. Η λιπάση που παράγεται από το στέλεχος *Penicillium cycloporium* εμφάνισε μεγάλη δραστηριότητα στα μονογλυκερίδια και πολύ χαμηλότερη στα δι- και τριγλυκερίδια. Εκτός από το είδος των λιπιδίων, οι λιπάσες μπορεί να εμφανίσουν εξειδίκευση ως προς τη θέση των εστερικών δεσμών που υδρολύουν. Έτσι υπάρχουν λιπάσες που δεν εμφανίζουν εξειδίκευση θέσης ή παρουσιάζουν ένα ή και τα δύο είδη θεσοειδικότητας: sn-1,3 ειδικότητα ή sn-2 ειδικότητα. Οι μη εξειδικευμένες λιπάσες υδρολύουν και τους 3 εστερικούς δεσμούς των τριγλυκεριδίων με τον ίδιο ρυθμό. Η εξειδίκευση του τύπου sn-1,3 αφορά στην προνομιακή απελευθέρωση των λιπαρών οξέων από τις ακραίες θέσεις του κεντρικού άξονα της γλυκερόλης (Εικόνα 1-5), ενώ η sn-2 εξειδίκευση αναφέρεται στην επιλεκτική απελευθέρωση από το κεντρικό άτομο άνθρακα (Malcata et al., 1992). Οι εξωκυτταρικές βακτηριακές λιπάσες συνήθως εμφανίζουν θεσοειδικότητα (Sugihara et al., 1991, Stránský et al., 2007).



**Εικόνα 1-5** (A) Υδρόλυση των τριών εστερικών δεσμών του τριγλυκεριδίου με τον ίδιο ρυθμό από μη εξειδικευμένη λιπάση (B) Υδρόλυση των ακραίων εστερικών δεσμών στο σκελετό του τριγλυκεριδίου από λιπάση με εξειδίκευση sn-1,3.

Μια άλλη κατηγορία εξειδίκευσης υποστρώματος, περιλαμβάνει λιπάσες που εμφανίζουν ικανότητα να απελευθερώνουν λιπαρά οξέα που το μήκος αλυσίδας ή ο βαθμός ακορεστότητας βρίσκεται μέσα σε σαφώς προσδιορισμένα όρια. Διάφορα πειράματα έδειξαν ότι η ταχύτητα προσβολής των υποστρωμάτων ακολουθεί κωδωνοειδή κατανομή ως προς τον αριθμό των ατόμων άνθρακα των υδρογονανθράκων των ακόρεστων καταλοίπων λιπαρών οξέων. Για το ίδιο μήκος αλυσίδας λιπαρού οξέος, ο ρυθμός της προσβολής από τη λιπάση δείχνει να αυξάνεται με τον αριθμό των διπλών δεσμών που υπάρχουν στο λιπίδιο (Malcata et al., 1992).

Τέλος έχουν απομονωθεί και λιπάσες με ικανότητα να ξεχωρίζουν και να αντιδρούν εκλεκτικά με συγκεκριμένα εναντιομερή ενός ρακεμικού μείγματος. Η εναντιοστερεοειδικότητα εξαρτάται από τον σκελετό του υποστρώματος, τις αντιδράσεις στο ενεργό κέντρο, καθώς και τις συνθήκες της αντίδρασης. Αυτή η τελευταία κατηγορία λιπασών εμφανίζει πλεονέκτημα έναντι των υπόλοιπων, ειδικά στα πεδία της οργανικής σύνθεσης και της φαρμακευτικής βιομηχανίας (Reetz, 2001, Gupta et al., 2004β).

---

#### 1.6.4 ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΛΙΠΑΣΕΣ

---

Οι θερμοφιλοι μικροοργανισμοί αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών με βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμες ιδιότητες. Μερικές από αυτές είναι η υψηλή σταθερότητα στο pH, στη θερμοκρασία, στην ιονική ισχύ και στους οργανικούς διαλύτες. Ανάμεσα στα επιθυμητά χαρακτηριστικά των λιπασών που έχουν εμπορική αξία τα κυριότερα είναι: η θερμοσταθερότητα και η αλκαλοφιλία (Kulkarni and Gadre, 1999). Οι θερμοσταθερές λιπάσες έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς τα μοριακά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους και την τελευταία 20ετία η υπερέκφραση τους σε μεσόφιλα συστήματα είναι διαδεδομένη (Salameh and Wiegel, 2007α).

Οι βιομηχανικές διεργασίες που περιλαμβάνουν λιπολυτικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασίες άνω των 45 °C, εξαιτίας της παρουσίας λιπών με υψηλό σημείο τήξης, και απαιτούν τη χρήση ενζύμων με υψηλό θερμοκρασιακό άριστο (άνω των 50 °C) καθώς και αντοχή στις συνθήκες αυτές (Sharma et al., 2001). Έχουν βρεθεί λιπάσες με ικανότητα να δρουν σε θερμοκρασίες πάνω από 100 °C αλλά ο χρόνος ημιζώης τους στις θερμοκρασίες αυτές είναι αρκετά μικρός (Rathi et al., 2000). Στον Πίνακα 1-4 αναφέρονται ενδεικτικά οι λιπάσες με τις υψηλότερες θερμοκρασίες δράσης καθώς και οι μικροοργανισμοί που τις παράγουν.

**Πίνακας 1-4** Αναφορές λιπασών από τη διεθνή βιβλιογραφία με τις υψηλότερες θερμοκρασίες δράσης

Μικροοργανισμός	Υψηλότερη θερμοκρασία δράσης (°C)	Άριστο pH	Θερμοσταθερότητα	Αναφορά
<i>Thermosyntropha lipolytica</i>	96	9-9,6	LipA : t <sub>1/2</sub> 6 ώρες (100 °C) LipB : t <sub>1/2</sub> 2 ώρες (100 °C)	(Salameh and Wiegel, 2007β)
<i>Burkholderia cepacia</i>	90	11	t <sub>1/2</sub> 13 ώρες (90 °C)	(Rathi et al., 2000)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	75	8	t <sub>1/2</sub> 1 ώρα (60 °C)	(Cho et al., 2000)
<i>Bacillus sp. THLO27</i>	68-70	7	t <sub>1/2</sub> 2 ώρες (75 °C)	(Dharmsthiti and Luchai, 1999)
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	60-70	8-9	t <sub>1/2</sub> 30 λεπτά (60 °C) pH 8	(Luisa Rúa et al., 1997)
<i>Geobacillus stearothermophilus L1</i>	60-65	9-10	30 % εναπομείνασα ενεργότητα (30 λεπτά, 65 °C, pH 8)	(Kim et al., 1998)
<i>Flavobacterium odoratum</i>	60	10	t <sub>1/2</sub> 10,2 λεπτά (70 °C) pH 8,5	(Labuschagne et al., 1997)
<i>Bacillus sp. J33 60</i>	60	8	t <sub>1/2</sub> 12 ώρες (60 °C)	(Nawani and Kaur, 2000)
<i>Bacillus sp. TG4</i>	60	9	80 % εναπομείνασα ενεργότητα (30 λεπτά, 60 °C)	(Bell et al., 1999)
<i>Geobacillus stearothermophilus P1</i>	55	8,5	t <sub>1/2</sub> 2 ώρες (65 °C) pH 8,5	(Sinhaikul et al., 2001)

Σημαντική κατηγορία θερμοσταθερών λιπασών παράγονται από θερμοφίλους αντιπροσώπους των γενών *Bacillus* και *Geobacillus* (Πίνακας 1.4). Οι λιπάσες αυτές ανήκουν στην υποοικογένεια 1.5, το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από τα 40-45 kDa και άνω και εμφανίζουν το χαρακτηριστικό πενταπεπτιδίο Ala-His-Ser-Gln-Gly (Guncheva and Zhiryakova, 2011). Το άριστο pH ενζυμικής δράσης είναι ουδέτερο ή ελαφρά αλκαλικό (8-10) και η άριστη θερμοκρασία ξεπερνά τους 60 °C (Jeong et al., 2002). Το υψηλό μοριακό τους βάρος εξηγείται από την παρουσία ενός υδρόφοβου πεπτιδίου πάνω από το ενεργό κέντρο καθώς και από τις περιοχές πρόσδεσης ιόντων Zn και Ca (Jeong et al., 2002, Choi et al., 2005, Karkhane et al., 2009). Παράλληλα, η παρατήρηση της τρισδιάστατης δομής των ενζύμων αυτών, εμφανίζει στενό πακετάρισμα των πλευρικών αλυσίδων οδηγώντας σε έναν πιο άκαμπτο σκελετό. Αυτό σίγουρα σχετίζεται με την αυξημένη σταθερότητα και αντοχή του μορίου στις υψηλές θερμοκρασίες καθώς και στη μειωμένη ενεργότητα του σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Jeong et al., 2002). Επίσης, οι λιπάσες της υποοικογένειας 1.5 περιέχουν κυστεΐνες, οι οποίες μετέχουν στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών που σταθεροποιούν το ένζυμο έναντι της θερμικής απενεργοποίησης (Nthangeni et al., 2001).

Όσον αφορά στην παραγωγή τους, αυτή έχει επιτευχθεί μέσω υγρών καλλιεργειών των αντίστοιχων μικροοργανισμών (*Bacillus* και *Geobacillus*). Η έκκριση της λιπάσης σχετίζεται με τη μικροβιακή ανάπτυξη και οι υψηλότερες ειδικές ενεργότητες ανιχνεύονται στο τέλος της εκθετικής φάσης αύξησης. Συχνά παρατηρείται μείωση της λιπολυτικής ενεργότητας κατά τη φάση στασιμότητας εξαιτίας της παρουσίας πρωτεασών καθώς και της θερμικής απενεργοποίησης του μορίου (Lee et al., 1999, Castro-Ochoa et al., 2005). Η στρατηγική καθαρισμού των λιπασών της κατηγορίας αυτής, πραγματοποιείται κυρίως με χρωματογραφικές τεχνικές. Ωστόσο, εμφανίζονται συχνά προβλήματα εξαιτίας της υδρόφοβης φύσης τους, τα οποία σχετίζονται με το σχηματισμό συσσωματωμάτων ή με την ισχυρή μη εξειδικευμένη πρόσδεση στις ρητίνες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα χαμηλά επίπεδα ενζυμικής ανάκτησης και εξαιρετικά περίπλοκες διαδικασίες καθαρισμού (Guncheva and Zhiryakova, 2011). Συχνό φαινόμενο αποτελεί η προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων στα ρυθμιστικά διαλύματα των χρωματογραφικών βημάτων. Οι λιπάσες της υποοικογένειας 1.5 εμφανίζουν καλή ανεκτικότητα σε περιβάλλοντα με απορρυπαντικά συγκριτικά με τις υπόλοιπες μικροβιακές. Αυτό συνιστά πλεονέκτημα, καθότι οι επιφανειοδραστικές ενώσεις σταθεροποιούν την ενεργή μορφή της λιπάσης και προστατεύουν από τη δημιουργία συσσωματωμάτων, αυξάνουν τη διαλυτότητα του υποστρώματος και εξασφαλίζουν τη σταθερότητα του γαλακτώματος, συνεπώς και τη διεπιφανειακή ενεργοποίηση της λιπάσης (Helistö and Korpela, 1998).

Σε σχέση με την εξειδίκευση στο υπόστρωμα, οι λιπάσες των γενών *Bacillus* και *Geobacillus* εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία. Η φαινόμενη προτίμηση μήκους αλυσίδας λιπαρού οξέος μπορεί να διαφοροποιείται μεταξύ τριακυλογλυκεριδίων και εστέρων π-νιτροφαινόλης (ψευδοϋπόστρωμα λιπάσης). Γενικά, οι λιπάσες της κατηγορίας αυτής εμφανίζουν καλή υδρολυτική συμπεριφορά έναντι φυσικών υποστρωμάτων (ελαιόλαδο, σογιέλαιο, καλαμποκέλαιο κ.α.), χαρακτηριστικό της ευρείας εξειδίκευσής τους στο μήκος αλυσίδας (Guncheva and Zhiryakova, 2011). Επίσης, η θέση του εστερικού δεσμού στο σκελετό της γλυκερόλης φαίνεται να μην επηρεάζει την υδρόλυση από λιπάσες του γένους *Bacillus* αν και υπάρχουν ελάχιστες αναφορές ενζύμων με sn-1,3 εξειδίκευση (Sugihara et al., 1991, Lesuisse et al., 1993, Dharmsthiti and Luchai, 1999, Lee et al., 2001, Sinchaikul et al., 2001). Τέλος, τα ένζυμα αυτά επιδεικνύουν εναντιοεξειδίκευση σε ρακεμικά μείγματα, ωστόσο η εφαρμογή τους σε τέτοιες αντιδράσεις είναι σχετικά περιορισμένη (Guncheva and Zhiryakova, 2011).

---

#### 1.6.5 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΛΙΠΑΣΩΝ

---

Το μεγάλο βιοτεχνολογικό δυναμικό των μικροβιακών λιπασών προκύπτει ως αποτέλεσμα των παρακάτω βασικών τους χαρακτηριστικών:

- Σταθερότητα παρουσία οργανικών διαλυτών
- Περιορισμένη απαίτηση συμπαραγόντων
- Ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος
- Υψηλή ενάντιο-στερέο-ειδικότητα ως προς το υπόστρωμα

Οι λιπάσες καταλύουν την υδρόλυση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Η αντίστροφη συνθετική πορεία ακολουθείται απουσία νερού ή παρουσία οργανικών διαλυτών και περιλαμβάνει εστεροποίηση, τρανσεστεροποίηση και διερεστεροποίηση. Η τελευταία πραγματοποιείται με ανταλλαγή ενός εστέρα με οξύ (οξεόλυση), ενός εστέρα με αλκοόλη (αλκοόλυση) ή μεταξύ 2 εστέρων (τρανσεστεροποίηση) (Ghazali et al., 1995). Όλες αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να τροποποιούν τα φυσικά χαρακτηριστικά λιπών και ελαίων και να προκύπτουν νέοι εστέρες ως προϊόντα, καθιστώντας τις λιπάσες βασικά βιομηχανικά ένζυμα (Πίνακας 1-5).

Έχει αρχικά μελετηθεί και εκ των υστέρων παραχθεί σε εμπορικά αξιοποιήσιμες ποσότητες ένας σημαντικός αριθμός λιπασών. Η πλειοψηφία τους προέρχεται από μύκητες και βακτήρια (Jaeger and Reetz, 1998) και αρκετές κυκλοφορούν στο εμπόριο από μεγάλες εταιρείες ενζύμων όπως η Novozyme (Δανία), Amano Enzyme Inc (Ιαπωνία), Biocatalysts (Αγγλία), Unilever (Ολλανδία) και Genencor (Αμερική).

Η εφαρμογή των λιπασών στην υδρόλυση ελαίων στοχεύει στον εμπλουτισμό σε λιπαρά οξέα, τα οποία απαιτούνται στην παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας όπως συγκολλητικά, λιπαντικά, χρώματα, καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής φροντίδας. Επίσης, υψηλή ζήτηση εμφανίζουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) για την παραγωγή διατροφικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Τα PUFAs διαιρούνται σε 2 μεγάλες κατηγορίες τα ω3 και ω6 λιπαρά οξέα και παράγονται από άλγη, ιχθυέλαιο και άλλα βρώσιμα έλαια (Chakraborty et al., 2010). Οι βλαβερές επιπτώσεις των ελαίων και των λιπών στην υγεία του ανθρώπου σχετίζονται με την κατανομή των λιπαρών οξέων σε αυτά. Φυτικά έλαια όπως το ηλιέλαιο, το ελαιόλαδο και το καλαμποκέλαιο είναι πλούσια σε ω6 λιπαρά οξέα ενώ το ιχθυέλαιο, το έλαιο λιναρόσπορου, τα καρύδια και το γάλα είναι πλούσια σε ω3 λιπαρά οξέα. Η αναλογία ω6/ω3 πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1 και 4 για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Η καλύτερη στρατηγική διατήρησης της παραπάνω αναλογίας εντός των ορίων είναι η ενζυμική τροποποίηση διεστεροποίησης των προϊόντων με τη χρήση λιπασών (Mitra et al., 2010).

Τα μονο- και διγλυκερίδια είναι επιφανειοδραστικά μόρια που χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές σε τρόφιμα, φάρμακα και προϊόντα προσωπικής υγιεινής. Επίσης, εμφανίζουν θετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου σε αντίθεση με τα τριγλυκερίδια (Cheirsilp et al., 2009, Kahveci et al., 2009). Η παραγωγή τους, παραδοσιακά, περιελάμβανε χημική γλυκερόλυση που οδηγούσε σε προϊόντα με ανεπιθύμητο χρώμα και γεύση. Η γλυκερόλυση, πλέον, πραγματοποιείται ενζυμικά, καταλυόμενη με λιπάσες (Guo and Xu, 2005, Kristensen et al., 2005).

Μία άλλη εφαρμογή των λιπασών είναι η σύνθεση πρόσθετων γεύσης και αρώματος για τρόφιμα. Οι εστέρες γεύσης είναι χαμηλού μοριακού βάρους συστατικά και παράγονται από την ενζυμική εστεροποίηση λιπαρών οξέων αντικαθιστώντας τη μέχρι σήμερα δαπανηρή εξαγωγή τους από φυτά (Sangeetha et al., 2011).

**Πίνακας 1-5** Βιομηχανικές εφαρμογές μικροβιακών λιπασών (Sharma et al., 2011)

<b>Βιομηχανία</b>	<b>Δράση</b>	<b>Προϊόν ή εφαρμογή</b>
Απορρυπαντικά	Υδρόλυση λιπών	Απομάκρυνση λιπαρών λεκέδων από τα υφάσματα
Γαλακτοκομικά	Υδρόλυση λίπους στο γάλα, ωρίμανση τυριού, τροποποίηση του λίπους στο βούτυρο	Ανάπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στο γάλα, το τυρί και το βούτυρο
Αρτοποιία	Εμπλουτισμός γεύσης	Παράταση χρόνου ζωής του προϊόντος
Ποτοποιία	Άρωμα	Προϊόν με διαφορετικό άρωμα
Συνοδευτικά τρόφιμα	Ανάπτυξη ποιότητας	Μαγιονέζα και σάλτσες
Υγιεινή διατροφή	Τρανσεστεροποίηση	Υγιεινά τρόφιμα
Ψάρι και Κρέας	Εμπλουτισμός γεύσης	Χαμηλών λιπαρών προϊόντα
Λίπη και Έλαια	Υδρόλυση, τρανσεστεροποίηση	Βούτυρο κακάο, μαργαρίνη
Χημεία	Εναντιοεξειδίκευση, σύνθεση	Χειρόμορφα χημικά
Φάρμακα	Τρανσεστεροποίηση, Υδρόλυση	Ειδικά λίπη, διατροφικά σκευάσματα
Καλλυντικά	Σύνθεση	Γαλακτώματα, ενυδατικές κρέμες
Βυρσοδεψία	Υδρόλυση	Δερμάτινα προϊόντα
Χαρτί	Υδρόλυση	Καλύτερης ποιότητας χαρτί
Καθαριότητα	Υδρόλυση	Αφαίρεση λίπους

Συνεχίζοντας στη βιομηχανία τροφίμων, ενδιαφέρουσα εφαρμογή των λιπασών αποτελεί η παραγωγή σοκολάτας από διεστεροποίηση ελαίου από σπόρους τσαγιού (παραπροϊόν επεξεργασίας τσαγιού). Το βούτυρο – κακάο αντικαθίστανται με το παραπάνω προϊόν και το κόστος παραγωγής μειώνεται κατά πολύ (Zarringhalami et al., 2010). Στη γαλακτοβιομηχανία, οι λιπάσες συμμετέχουν στην ωρίμανση του τυριού και στην υδρόλυση του συμπυκνωμένου γάλακτος για τη χρήση του ως πρόσθετο σε μαργαρίνη και σοκολάτες (Sangeetha et al., 2011). Επίσης, η ενζυμική επεξεργασία του τυριού οδηγεί στην παραγωγή ενός ενισχυτικού γεύσης που χρησιμοποιείται ως σκόνη σε σούπες, σαλάτες και άλλα συνοδευτικά. Άλλες εφαρμογές είναι, η παραγωγή προϊόντων χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και η δημιουργία βρεφικού γάλακτος που υποκαθιστά το μητρικό (Harwood, 1989, Houde et al., 2004).

Για μεγάλο χρονικό διάστημα η δράση των λιπασών είχε συνδεθεί με αρνητικά αποτελέσματα στην αρτοποιία. Αργότερα διαπιστώθηκε πως η επίδραση των ενζύμων αυτών εξαρτάται από τον τύπο αλεύρου που χρησιμοποιείται καθώς και από τη συνταγή. Έτσι, τα πλεονεκτήματα που μπορούν να εμφανιστούν κατά τη χρήση λιπασών στην αρτοποιία είναι πολλά: αύξηση του όγκου του ψωμιού, αύξηση της εκτατότητας του ζυμαριού, καλύτερη ανάπτυξη του δικτύου της γλουτένης, μείωση του κολλώδους του ζυμαριού, καλύτερη γεύση του ψωμιού κ.α. (Sánchez et al., 2002, Moayedallaie et al., 2010).

Το πιο σημαντικό από οικονομική άποψη, πεδίο εφαρμογής των λιπασών είναι τα απορρυπαντικά (χρήση στα οικιακά και βιομηχανικά πλυντήρια καθώς και στα οικιακά πλυντήρια πιάτων). Οι προκλήσεις, βέβαια, στο πεδίο αυτό είναι μεγάλες καθώς υπάρχει μεγάλη ποικιλία τριγλυκεριδίων στους λιπαρούς λεκέδες (απαίτηση

λιπάσης χωρίς εξειδίκευση υποστρώματος), αντίξοες συνθήκες κατά τη διάρκεια του πλυσίματος (υψηλό pH και θερμοκρασία) και πιθανότητα χημικής μετουσίωσης / πρωτεϊνικής αποδιάταξης εξαιτίας των απορρυπαντικών προσθέτων που χρησιμοποιούνται (πρωτεάσες, χηλικοί παράγοντες) (Sharma et al., 2001, Hasan et al., 2006).

Οι λιπάσες βρίσκουν ακόμα εφαρμογές στη βιομηχανία χάρτου και χαρτοπολλτού. Ο ρόλος τους εδώ είναι η απομάκρυνση των υδρόφοβων συστατικών του ξύλου, όπως τριγλυκερίδια και κηροί, που προκαλούν σοβαρά προβλήματα στη βιομηχανία αυτού του τύπου (Jaeger and Reetz, 1998).

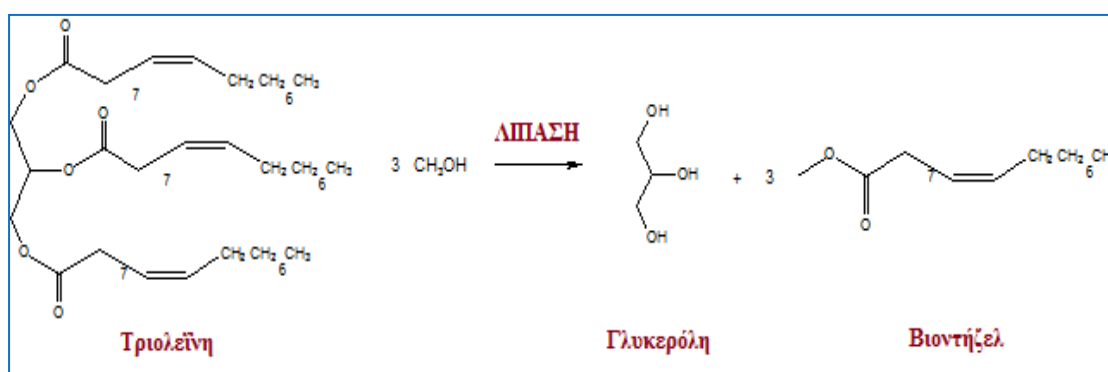
Επίσης, η βυρσοδεψία είναι ένα ακόμα πεδίο εφαρμογής λιπολυτικών ενζύμων. Η χρησιμοποίηση λιπασών στην επεξεργασία του δέρματος (ενυδάτωση, αποτρίχωση και απολίπανση) αποτελεί την πιο περιβαλλοντικά φιλική μέθοδο. Η δράση των λιπασών πάνω στο δέρμα προδίδει σταθερό και ομοιόμορφο χρώμα, συμβάλλοντας σε μία καλύτερη εμφάνιση του τελικού προϊόντος. Επίσης, οι λιπάσες βρίσκουν εφαρμογή στην παραγωγή υδρόφοβων δερμάτων (Hasan et al., 2006).

Όσον αφορά στην υφαντουργία, οι λιπάσες αντικατέστησαν τη χρήση οξέων και οξειδωτικών παραγόντων στην απομάκρυνση της εμποτισμένης κόλλας στα υφάσματα, αποφεύγοντας την καταστροφή του υλικού (κυτταρίνη). Στη συνέχεια, το ύφασμα εμφανίζει καλύτερη απορροφητικότητα στις χρωστικές και βελτιώνεται η διαδικασία βαφής του. Οι βακτηριακές λιπάσες έχουν χρησιμοποιηθεί και σε συνθετικά υφάσματα πολυεστέρων (Lund, 2001).

Στη βιομηχανία φαρμάκων, η βιοκατάλυση εμφανίζει τεράστια πλεονεκτήματα έναντι της χημικής σύνθεσης, δικαιολογώντας και το μεγάλο ενδιαφέρον για νέα ένζυμα (Houde et al., 2004). Οι λιπάσες είναι ικανές να καταλύσουν μια μεγάλη ποικιλία χημιο-, θεσο- και στερεοειδικών μετατροπών. Το 2009 δημοσιεύτηκε ευρεσιτεχνία για τη θεραπεία ασθένειας του τριχωτού της κεφαλής που οδηγεί στην τριχόπτωση, η οποία περιελάμβανε τη χρήση μίας πρωτεάσης, μιας λιπάσης και ενός μεταλλικού άλατος (Miyazaki and Fujikawa, 2009). Επίσης, υπάρχει αναφορά σχετικά με την αντικατάσταση της παγκρεατικής λιπάσης με βακτηριακή, στη θεραπεία της κυστικής ίνωσης και της παγκρεατίτιδας (Sani, 2006). Άλλες εφαρμογές, περιλαμβάνουν τη διαλυτοποίηση των φυσικών φαινολικών αντιοξειδωτικών παρουσία ελαίων (Choo and Birch, 2009), τη σύνθεση φαρμάκων όπως αντιχοληστερινικά, αντιφλεγμονώδη και θρομβολυτικά και τη δράση τους σε ρακεμικά μείγματα για την παραγωγή σημαντικών προϊόντων (αντιμικροβιακοί, αντιαλλεργικοί, αναλγητικοί και αντιπυρετικοί παράγοντες) (Han et al., 2003a, Long et al., 2007, Zhao et al., 2008).

Επιπροσθέτως, οι βακτηριακές λιπάσες έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοαισθητήρες, στην ποσοτική και ποιοτική διάγνωση τριγλυκεριδίων σε κλινικά δείγματα ή τροφίμα, στην ανάλυση ρύπανσης από ζιζανιοκτόνα και στην ανίχνευση φαρμάκων (Pandey et al., 1999). Γενικά, μπορούν να συμμετέχουν και στη σύνθεση πολλών ενδιάμεσων για την παραγωγή ζιζανιοκτόνων, μυκητοκτόνων και εντομοκτόνων.

Οι περιορισμένες πηγές πετρελαϊκών αποθεμάτων σε συνδυασμό με τις περιβαλλοντικές ανησυχίες που προκύπτουν από τη χρήση τους αποτελούν τους κυριότερους λόγους στροφής προς την παραγωγή εναλλακτικών καυσίμων (βιοντίζελ) από φυτικά έλαια (Chen et al., 2009, Dizge et al., 2009, Raita et al., 2010). Η μετατροπή των φυτικών ελαίων σε μέθυλ- ή μικρής αλυσίδας εστεροποιημένες αλκοόλες καταλύεται από λιπάσες, σε περιβάλλον οργανικών διαλυτών (μικρο-υδατικές συνθήκες), μέσω μιας αντίδρασης τρανσεστεροποίησης (Εικόνα 1-6). Η γλυκερόλη, το παραπροϊόν της παραπάνω μετατροπής μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε 1,3 προπανοδιόλη, μονομερές για τη σύνθεση πολλών, νέας γενιάς, πολυμερών (Xu et al., 2009).



**Εικόνα 1-6** Ενζυμική τρανσεστεροποίηση προς παραγωγή βιοντίζελ

Σε πειραματικό στάδιο βρίσκεται και η εφαρμογή των λιπασών στα ενζυμικά κρύσταλλα. Εκτός από την ενζυμική παγίδευση σε κλασσικούς φορείς (αδρανή σώματα) έχουν αναφερθεί νέες μέθοδοι ακινητοποίησης. Μία νέα και αρκετά ενδιαφέρουσα μέθοδος είναι τα CLEC (Cross-Linked Enzyme Crystals). Επίσης, πολλά υποσχόμενη εφαρμογή είναι η επένδυση των ενζύμων με λιπίδια γεγονός που τα κάνει διαλυτά και περισσότερο σταθερά σε οργανικούς διαλύτες (Jaeger and Reetz, 1998).

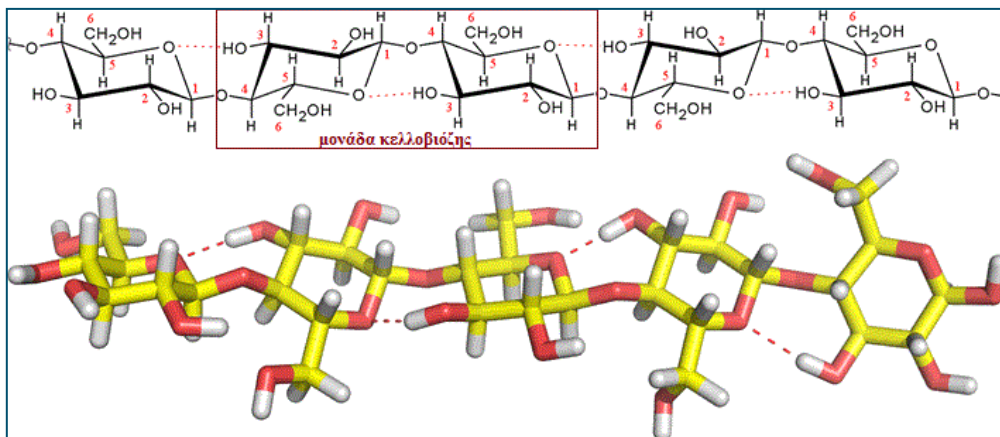
Συνοψίζοντας, οι πληροφορίες που καθημερινά έρχονται στην επιφάνεια από τη βασική έρευνα σχετικά με τη δομή, την εξειδίκευση, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και τον τρόπο δράσης των λιπασών ανοίγουν δρόμους για νέες εφαρμογές στη βιοτεχνολογία που αναμένεται να εντυπωσιάσουν στο μέλλον (Hasan et al., 2006)



## 1.7 ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ

### 1.7.1 ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ

Η κυτταρίνη, ένας από τους πιο άφθονους πολυσακχαρίτες της βιόσφαιρας, συναντάται, σχεδόν αποκλειστικά, στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα (Lynd et al., 2002). Εντοπίζεται κυρίως στα ξυλώδη μέρη του φυτού, προσδίδοντας στήριξη και σκληρότητα, και καθορίζει το σχήμα, το μέγεθος και τη διαφοροποίηση των φυτικών κυττάρων (Saxena and Brown, 2005). Παρά τις σημαντικές διαφορές στη σύνθεση και τη δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων ανάμεσα σε διαφορετικές φυτικές ταξινομικές μονάδες, η περιεκτικότητά τους σε κυτταρίνη κυμαίνεται μεταξύ 35 και 50 % επί του ξηρού βάρους του φυτού (Lynd et al., 1999). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η κυτταρίνη συναντάται μαζί με άλλα δομικά βιοπολυμερή, κυρίως ημικυτταρίνες και λιγνίνη, τα οποία αποτελούν επίσης βασικά στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος και περιορίζουν το ρυθμό και την έκταση της αποικοδόμησης της φυτικής βιομάζας. Κυτταρίνη, υπάρχει επίσης στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων, αποτελεί προϊόν εξειδικευμένων μεταβολικών μονοπατιών σε κάποια βακτήρια, και υπάρχει στο σώμα ορισμένων θαλάσσιων οργανισμών (Lynd et al., 2002).

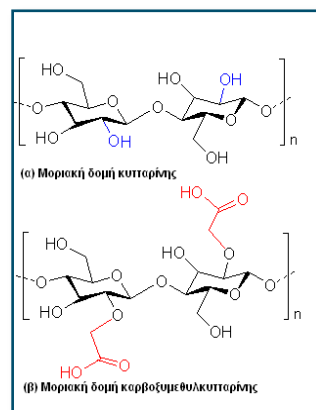


**Εικόνα 1-7** Χημική και τρισδιάστατη δομή της κυτταρίνης, βασική μονάδα της οποίας είναι ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη

Η χημική δομή της κυτταρίνης περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες μονάδες D-άνυδρης γλυκοπυρανόζης (D-γλυκόζης) ενωμένες με β-1,4-γλυκοζιδικούς δεσμούς. Καθένα από τα κατάλοιπα γλυκόζης, έχει περιστραφεί σε σχέση με τα γειτονικά του κατά 180° και για το λόγο αυτό ως βασική μονάδα του πολυμερούς μπορεί να θεωρηθεί η άνυδρη κελλοβιόζη (Εικόνα 1.7), η οποία είναι δισακχαρίτης αποτελούμενος από δύο μόρια ανυδρογλυκοπυρανόζης (Saxena and Brown, 2005). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της κυτταρίνης, γεγονός που τη διαφοροποιεί από τους υπόλοιπους φυσικούς πολυσακχαρίτες, είναι η κρυσταλλική δομή της. Η αρχική της σύνθεση ξεκινά από μεμονωμένες γραμμικές γλυκοζιδικές αλυσίδες οι οποίες συγκροτούνται, με τη βοήθεια ημικυτταρινών, και ακολούθως συναθροίζονται σε

μεγαλύτερες μονάδες, τα βασικά ινίδια ή πρωτοϊνίδια. Αυτά με τη σειρά τους, πακετάρονται σε ακόμα μεγαλύτερες δομές, τα μικροϊνίδια, τα οποία δημιουργούν τις ίνες κυτταρίνης (Brown Jr and Saxena, 2000). Η κρυσταλλική διάταξη, η οποία ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση του πολυσακχαρίτη, σταθεροποιείται με διαμοριακούς και ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου. Μάλιστα, δημιουργείται μία τόσο σφιχτά πακεταρισμένη δομή η οποία είναι δύσκολα προσπελάσιμη όχι μόνο από ένζυμα, αλλά ακόμα και από μικρά μόρια όπως το νερό (Lynd et al., 2002).

Εξαιτίας της πολύπλοκης δομής και της μειωμένης διαλυτότητας της φυσικής κυτταρίνης, σε πολλές ενζυμικές μελέτες χρησιμοποιείται η καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη (CMC). Η CMC φέρει υποκαταστάτες που αυξάνουν τη διαλυτότητα του μορίου αλλά παρουσιάζει σημαντικό μειονέκτημα καθώς οι εξωκυτταρινάσες που δρουν στα άκρα της κρυσταλλικής κυτταρίνης δεν ανιχνεύονται με αυτό το υπόστρωμα (Εικόνα 1-8). Επίσης, ορισμένοι μη κυτταρινολυτικοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι διαθέτουν ένζυμα που διασπούν μη ειδικά β-γλυκονικούς δεσμούς στα διαλυτά παράγωγα της CMC εμφανίζουν ψευδή κυτταρινολυτική δράση (Bisaria and Ghose, 1981, Béguin and Aubert, 1994, Lynd et al., 2002).



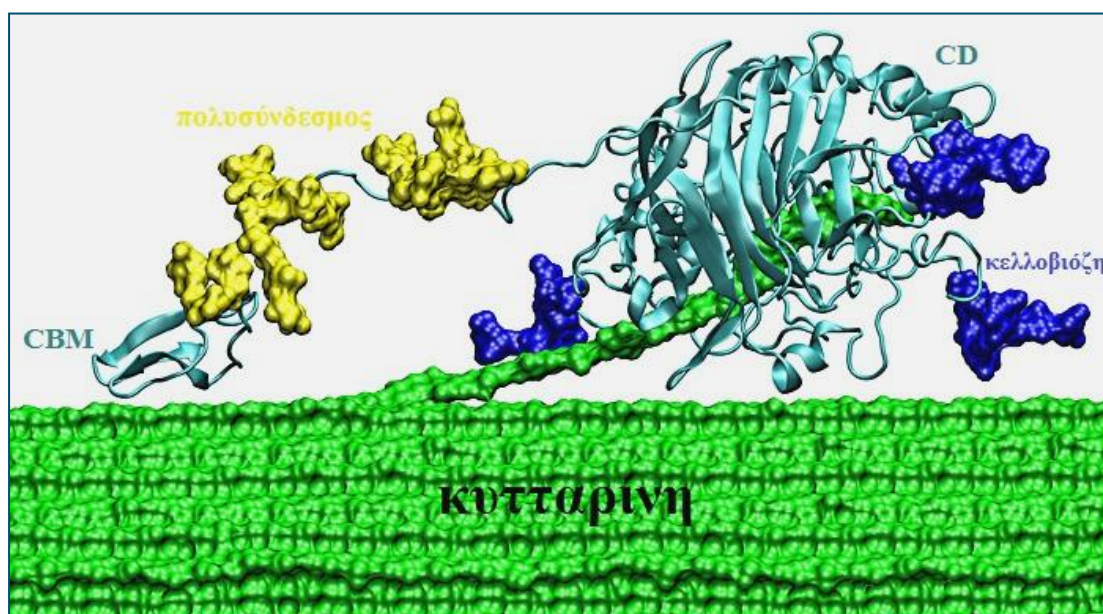
**Εικόνα 1-8** Μοριακή δομή κυτταρίνης και καρβόξυμέθυλ-κυτταρίνης

### 1.7.2 ΚΥΤΤΑΡΙΝΟΛΥΤΙΚΟ ΕΝΖΥΜΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η κυτταρίνη παρουσιάζει εξαιρετική σταθερότητα στο φυσικό περιβάλλον, καθώς η διάσπαση του β-γλυκοζιδικού δεσμού εμφανίζει χρόνο ημιζωής 5-8 εκατομμύρια χρόνια στους 25 °C (Wolfenden and Snider, 2001). Συνεπώς, η ενζυμική διάσπαση του συμπυκνωμένου πολυμερούς κρίνεται απαραίτητη για τη διατήρηση της ροής του βιογεωχημικού κύκλου του άνθρακα (διάσπαση της φυτικής βιομάζας που συνιστά προϊόν οργανοποίησης του ατμοσφαιρικού άνθρακα μέσω της φωτοσύνθεσης) και την επιστροφή του άνθρακα στην ατμόσφαιρα (Berner, 2003). Επίσης, αποτελεί βασική βιοχημική διεργασία στην αγροβιομηχανία, στη διαχείριση αποβλήτων (Angenent et al., 2004, Schloss et al., 2005) καθώς και στον πολλά υποσχόμενο τομέα των βιοκαυσίμων και της βιοενέργειας (Angenent et al., 2004, Demain et al., 2005).

Οι μικροβιακές κυτταρινάσες εστίασαν το ενδιαφέρον γρήγορα, εξαιτίας της πολύπλοκης λειτουργίας τους αλλά και της ευρείας εφαρμογής τους στη βιοτεχνολογία. Η παραγωγή τους είναι επαγόμενη και πραγματοποιείται από μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών (μύκητες και βακτήρια) κατά τη διάρκεια ανάπτυξης τους παρουσία κυτταρινικών υποστρωμάτων. Οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι αερόβιοι ή αναερόβιοι, μεσόφιλοι ή θερμοφιλοί. Ανάμεσα τους, τα γένη *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma*, και *Aspergillus* θεωρούνται οι καλύτερες πηγές κυτταρινασών (Kuhad et al., 2011).

Η βιοχημική συμπεριφορά των κυτταρινολυτικών ενζυμικών συστημάτων στα αερόβια και αναερόβια βακτήρια, καθώς και στους μύκητες, διαφέρει και έχει μελετηθεί εκτενώς τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Εξαιτίας της ιδιαίτερης σύστασης και δομής της κυτταρίνης, οι μικροοργανισμοί που υδρολύουν και μεταβολίζουν το πολυμερές αυτό, παράγουν εξωκυττάριας κυτταρινάσες, οι οποίες είτε είναι ελεύθερες (αερόβια βακτήρια και μύκητες) είτε παραμένουν προσκολλημένες στο κύτταρο (αναερόβια βακτήρια) (Lynd et al., 2002). Δομικά, οι μυκητιακές κυτταρινάσες εμφανίζονται απλούστερες συγκριτικά με τις αντίστοιχες βακτηριακές, και περιλαμβάνουν 2 ξεχωριστές υπομονάδες, την καταλυτική (catalytic domain-CD) και την υπομονάδα πρόσδεσης στην κυτταρίνη (cellulose binding module-CBM). Η ένωση των δύο υπομονάδων γίνεται μέσω ενός πολυσύνδεσμου κοντά στην αμινοτελική περιοχή της καταλυτικής (Εικόνα 1-9).



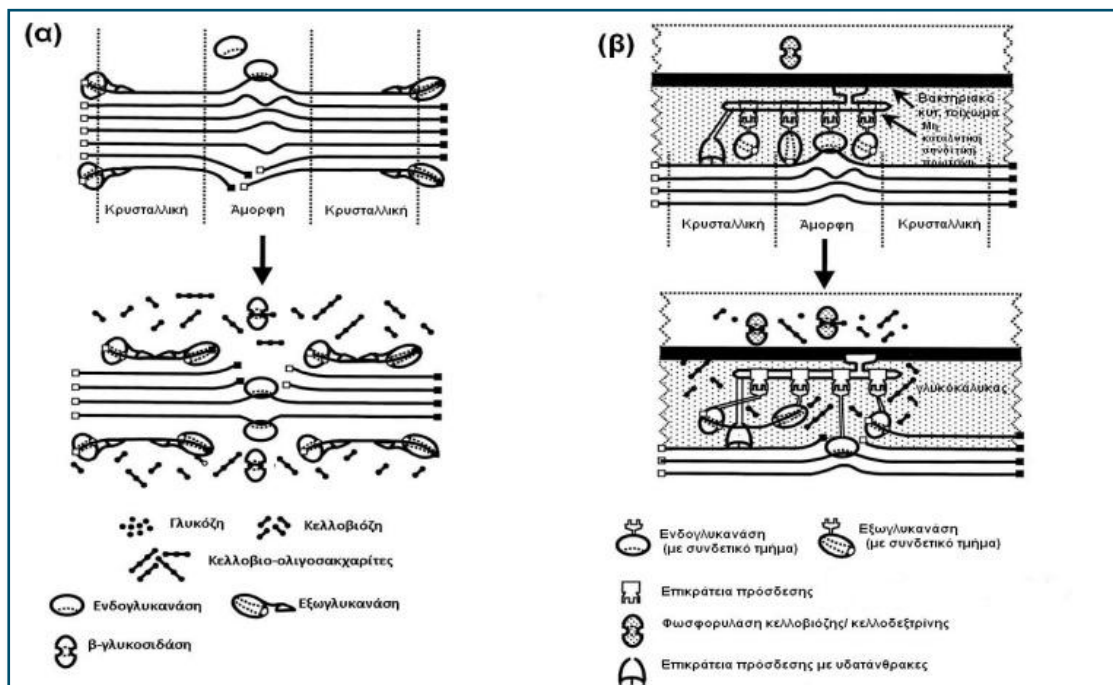
**Εικόνα 1-9** Κυτταρινολυτικός μηχανισμός του *T. reesei*. Η κυτταρινάση αποτελείται από την υπομονάδα πρόσδεσης στην κυτταρίνη (CBM), από τον πολυσύνδεσμο και από την καταλυτική περιοχή (CD). Το προϊόν της διάσπασης είναι η κελλοβιόζη.

Ένας ευρέως αποδεκτός κυτταρινολυτικός μηχανισμός περιλαμβάνει συνεργιστική δράση 3 ενζύμων που μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες (Εικόνα 1-10) (Zhang et al., 2006)

- **Ενδογλυκανάσες (EC 3.2.1.4):** ένζυμα που υδρολύουν δεσμούς σε τυχαίες εσωτερικές θέσεις (περιοχές χαμηλής κρυσταλλικότητας) της πολυσακχαριτικής αλυσίδας, δημιουργώντας ολιγοσακχαρίτες ποικίλου μήκους με νέα διαθέσιμα άκρα (υπόστρωμα των εξωγλυκανασών) (Lynd et al., 2002)
- **Εξωγλυκανάσες (EC 3.2.1.91):** ένζυμα που δρουν επί των αναγωγικών ή μη άκρων της κυτταρινικής αλυσίδας, απελευθερώνοντας είτε γλυκόζη (γλυκανοϋδρολάσες) είτε κελλοβιόζη (κελλοβιοϋδρολάσες) ως κύρια προϊόντα (Zhang et al., 2006)

- **β-γλυκοζιδάσες (EC 3.2.1.21):** ένζυμα που υδρολύουν διαλυτούς ολιγοσακχαρίτες ή κελλοβιόζη. Η ενεργότητα τους μειώνεται όσο αυξάνεται το μήκος της γλυκοζιδικής αλυσίδας. Οι β-γλυκοζιδάσες, ανάλογα με τον οργανισμό από τον οποίο παράγονται, εντοπίζονται εξωκυτταρικά, ενδοκυτταρικά ή ακόμα και στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου (Bisaria and Saroj, 1989).

Η αρχική υδρόλυση πραγματοποιείται στην επιφάνεια της στερεής κυτταρίνης με την ενζυμική δράση των ενδο- και εξωγλυκανασών και απελευθερώνει διαλυτά σάκχαρα με μέγιστο βαθμό πολυμερισμού το 6. Το ενζυμικό στάδιο αποπολυμερισμού καθορίζει την χρονική έκταση της συνολικής υδρολυτικής διεργασίας. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η υδρόλυση της κελλοβιόζης σε γλυκόζη (διαλυτή φάση), από τις β-γλυκοζιδάσες (μερικές υδρολύουν και κυτταρινοδεξτρίνες) (Zhang and Lynd, 2004).



**Εικόνα 1-10** Σχηματική απεικόνιση συνεργιστικής υδρόλυσης άμορφης και κρυσταλλικής κυτταρίνης από απλά (Α) και σύνθετα (Β) κυτταρινολυτικά συστήματα

Κατά τη διάρκεια της κυτταρινολυτικής υδρόλυσης, τα χαρακτηριστικά του στερεού υποστρώματος ποικίλουν, εξαιτίας της συνεχούς αλλαγής του αριθμού των διαθέσιμων άκρων των κυτταρινικών αλυσίδων (αναγέννηση από ενδογλυκανάσες, κατανάλωση από εξωγλυκανάσες) καθώς και της προσβασιμότητας στο υπόστρωμα λόγω του κατακερματισμού της κυτταρίνης. Οι συνδυασμένες ενέργειες των ενδο- και εξωκυτταρινασών τροποποιούν τα επιφανειακά χαρακτηριστικά της κυτταρίνης (τοπογραφία) στην πάροδο του χρόνου, με αποτέλεσμα ταχείες αλλαγές στα ποσοστά υδρόλυσης (Zhang et al., 2006).

Αντίθετα με τα απλά κυτταρινολυτικά συστήματα των αερόβιων μυκήτων και βακτηριών, οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί εμφανίζουν σύνθετα συστήματα διάσπασης της κυτταρίνης, τα οποία εντοπίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου (cellulosomes). Η αναερόβια υδρόλυση της κυτταρίνης πραγματοποιείται από διακριτά πολυενζυμικά συμπλέγματα, τα οποία περιλαμβάνουν πολλαπλές υπομονάδες με λειτουργικές περιοχές, που αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους, όσο και με το υπόστρωμα (Bayer et al., 1994, Bayer et al., 1998, Bayer et al., 2004, Fontes and Gilbert, 2010). Έχει υπολογιστεί ότι η αναερόβια διάσπαση της κυτταρίνης συνιστά μόνο το 5-10 % επί της συνολικής υδρόλυσης, αν και πιθανόν υποεκτιμάται καθώς είναι ο μοναδικός τρόπος ανακύκλωσης του άνθρακα σε ανοξικές περιοχές λιμνών και ωκεανών καθώς και στο πεπτικό σύστημα των μυρμηκαστικών και των τερμιτών (Leschine, 1995). Η μελέτη των μηχανισμών αναερόβιας διάσπασης της κυτταρίνης μέσω σύνθετων συστημάτων είναι σημαντική τόσο για τη βασική έρευνα (εξέλιξη των κυτταρινολυτικών γονιδίων, τρισδιάστατη ενζυμική δομή) όσο και για τη δημιουργία ενεργών υδρολυτικών βιομεμβρανών στην επιφάνεια της κυτταρίνης (Lynd et al., 2009).

---

### 1.7.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΩΝ

---

Η ενεργοποίηση των κυτταρινολυτικών γονιδίων δεν είναι συνεχής και ίσως το μόνο προβληματικό και μεγάλο κόστους εμπόδιο της εμπορικής ενζυμικής παραγωγής είναι η εύρεση του κατάλληλου επαγωγέα. Γενικά, έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλης φύσης κυτταρινολυτικά υποστρώματα αύξησης των μικροοργανισμών, τόσο καθαρής μορφής όσο και ακατέργαστα (Sukumaran et al., 2005).

Η παραγωγή των κυτταριναςών μπορεί να επαχθεί είτε κατά την αύξηση του μικροοργανισμού παρουσία στερεής κυτταρίνης είτε έπειτα από προσθήκη δισακχαριτών όπως η λακτόζη. Και οι δύο παραπάνω στρατηγικές θεωρούνται υψηλού κόστους. Επίσης, ακόμα και παρουσία κυτταρίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα η διεργασία της ενζυμικής παραγωγής είναι αποτέλεσμα της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ επαγωγής και αναστολής. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις κυτταρίνης, η παραγωγή γλυκόζης κρίνεται χαμηλή και ανίκανη να ανταπεξέλθει το ενεργειακό κόστος της αύξησης και λειτουργίας του κυττάρου. Από την άλλη, η σύνθεση κυτταριναςών αναστέλλεται σε περίπτωση που η παραγωγή γλυκόζης υπερβαίνει το ρυθμό κατανάλωσής της. Συνεπώς, υψηλού κόστους έλεγχος της όλης διαδικασίας είναι απαραίτητος και περιλαμβάνει την αργή προσθήκη υποστρώματος και τον ταυτόχρονο έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης. Ένα επιπλέον πρόβλημα στη συνεχή και αργή προσθήκη του υποστρώματος αποτελεί η στερεή φύση των κυτταρινικών πηγών άνθρακα. Οι προκλήσεις στην εμπορική παραγωγή των ενζύμων αυτών είναι μεγάλες και περιλαμβάνουν την ανάπτυξη κατάλληλων βιοδιεργασιών και μέσων των μικροβιακών ζυμώσεων καθώς και την εύρεση φθηνότερων υποστρωμάτων και επαγωγέων. Η γενετική τροποποίηση των κυτταρινολυτικών μικροοργανισμών ίσως είναι η λύση σε όλα τα παραπάνω προβλήματα και η υπόσχεση για την παραγωγή αιθανόλης από βιομάζα (Ju and Afolabi, 1999, Fowler and Mitchinson, 2001, Lemos et al., 2003, Sukumaran et al., 2005).

Αν και στο φυσικό περιβάλλον η ανάπτυξη και η κυτταρινολυτική δράση των μικροοργανισμών εμφανίζεται σε στερεά υποστρώματα, τα πλεονεκτήματα του καλύτερου ελέγχου και επεξεργασίας σχετίζονται σαφώς με τις υγρές καλλιέργειες, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενζυμική παραγωγή. Τα θρεπτικά υποστρώματα των κυτταρινολυτικών ζυμώσεων περιλαμβάνουν είτε κυτταρίνη διαφορετικού βαθμού καθαρότητας (Persson et al., 1991, Domingues et al., 2000) είτε ακατέργαστα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα (πίτυρο, θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού, πριονίδι κ.α.) (Doppelbauer et al., 1987, Aiello et al., 1996). Η χρήση των τελευταίων μπορεί να μειώσει κατά πολύ το κόστος της διαδικασίας εξαιτίας της ιδιαιτερότητας τους να αποτελούν ταυτόχρονη πηγή άνθρακα, αζώτου, αλάτων και άλλων παραγόντων αύξησης (Ojumu et al., 2003, Kang et al., 2004).

Γενικά, η παραγωγή των κυτταρινασών εξαρτάται από την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, η οποία επηρεάζεται και από άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, πέραν της πηγής άνθρακα, όπως το αρχικό pH της καλλιέργειας, η θερμοκρασία, η αλατότητα κ.α. (Immanuel et al., 2006). Επίσης, η αυξημένη ποσότητα εμβολίου (>10%) στην καλλιέργεια φαίνεται να επηρεάζει ανασταλτικά την ενζυμική παραγωγή εξαιτίας της συσσωμάτωσης των κυττάρων που οδηγεί στην περιορισμένη διαθεσιμότητα σε σάκχαρα, ρυθμό πρόσληψης οξυγόνου και απελευθέρωσης των αντίστοιχων ενζύμων (Alam et al., 2005, Omojasola et al., 2008, Azzaz et al., 2012). Όσον αφορά στην περίοδο επώασης, συχνά εμφανίζεται μείωση στα ενζυμικά επίπεδα κατά την παράταση της καλλιέργειας. Αυτό συμβαίνει είτε εξαιτίας της πρωτεϊνικής μετουσίωσης, αποτέλεσμα της συνεχούς διακύμανσης του pH (Krishna, 1999), είτε εξαιτίας της ανασταλτικής δράσης της κελλοβιόζης (προϊόν αρχικής υδρόλυσης κυτταρίνης) στην παραγωγή ενδοκυτταρινάσης και β-γλυκοζιδάσης (Howell and Mangat, 1978).

---

#### 1.7.4 ΜΟΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΩΝ

---

Οι μικροοργανισμοί για να υδρολύσουν την αδιάλυτη κυτταρίνη παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα τα οποία είτε απελευθερώνονται είτε παραμένουν προσκολλημένα στο κύτταρο. Η βιοχημική ανάλυση των αερόβιων και αναερόβιων κυτταρινολυτικών συστημάτων εμφανίζει σαφείς διαφορές. Τα πρώτα αποτελούνται από ελεύθερες εξωκυτταρικές κυτταρινάσες ενώ τα δεύτερα από σύνθετα κυτταρινολυτικά συστήματα (κυτταρινοσώμα) προσκολλημένα στο κύτταρο.

Οι ελεύθερες κυτταρινάσες εμφανίζουν δομή που έχει ήδη αναφερθεί, και περιλαμβάνει την καταλυτική υπομονάδα (catalytic domain-CD) και την υπομονάδα πρόσδεσης στην κυτταρίνη (cellulose binding module-CBM) (Henrissat, 1994). Η πρόσδεση με το μεγαλομοριακό υπόστρωμα επιτελείται με τη βοήθεια των συντηρημένων αρωματικών αμινοξέων και όχι με δεσμούς υδρογόνου ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Το κυτταρινόσωμα είναι ένα σύμπλεγμα ενζυμικών και μη πρωτεϊνών, προσκολλημένο στην κυτταρική επιφάνεια με ικανότητα υδρόλυσης κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και πηκτίνης. Αν και η ονομασία του παραπέμπει μόνο στην υδρόλυση κρυσταλλικής κυτταρίνης στην πραγματικότητα ο ρόλος του περιλαμβάνει την υδρόλυση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Θεωρούνται τα μεγαλύτερα εξωκυτταρικά ενζυμικά συμπλέγματα και η μάζα τους κυμαίνεται μεταξύ 650,000 Da και 2,5 MDa (Doi et al., 2003). Αρχικά χαρακτηρίστηκαν ως «προεξοχές» στην επιφάνεια του *Clostridium thermocellum* (Bayer et al., 1985) και στη συνέχεια μελετήθηκε εκτενώς η δομή τους σε ποικιλία οργανισμών. Ένα κυτταρινόσωμα αποτελείται από έναν πρωτεϊνικό σχηματισμό (scaffoldin) πάνω στον οποίο είναι προσδεμένες ενζυμικές υπομονάδες (κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και ξυλανάσες) μέσω συνδετικών περιοχών (dockerin-cohesin). Ο σχηματισμός αυτός περιέχει επίσης μία περιοχή πρόσδεσης στην κυτταρίνη (CBD) ενώ ταυτόχρονα αγκυροβολεί στην επιφάνεια του κυττάρου (Bayer et al., 1994). Το αναερόβιο κυτταρινολυτικό σύστημα εμφανίζεται πλεονεκτικό λόγω του ότι επιτρέπει τη συντονισμένη ενζυμική δράση εξαιτίας της άμεσης γειτνίασης των ενζύμων και ελαχιστοποιεί την απόσταση που έχουν να διανύσουν τα προϊόντα υδρόλυσης εμφανίζοντας αποδοτικότερη την προσρόφηση ολιγοσακχαριτών από το κύτταρο (Bayer et al., 1994, Schwarz, 2001).

Οι κυτταρινάσες ομαδοποιούνται με αρκετές ημικυτταρινάσες και άλλες πολυσακχαριδάσες ως γλυκοζιδικές υδρολάσες (EC 3.2.1.x), αν και αρκετά βοηθητικά ένζυμα, κυρίως στην υδρόλυση της ημικυτταρίνης, ανήκουν στις γλυκοζυλτρανσφεράσες (EC 2.4.1.x). Αρχικά, η ομαδοποίηση των γλυκοζιδικών υδρολασών σε οικογένειες ήταν ανεπαρκής, καθώς αρκετά ένζυμα τοποθετούσαν ως μοναδικά. Ακολούθως, μία εναλλακτική ταξινόμηση προτάθηκε βασισμένη στην ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας (Henrissat, 1991). Ωστόσο, η εκθετική αύξηση των απομονωθέντων σχετικών ενζύμων οδήγησε στην ανανέωση της ομαδοποίησης αρκετές φορές (Henrissat and Bairoch, 1993, Henrissat and Bairoch, 1996). Σήμερα, η κατηγοριοποίηση των κυτταρινασών πραγματοποιείται σύμφωνα με μία διεθνή βάση δεδομένων (CAZY, Carbohydrate Active Enzymes), η οποία ανανεώνεται διαρκώς (Cantarel et al., 2009). Η τοποθέτηση των ενζύμων σε οικογένειες αντανάκλα τα δομικά χαρακτηριστικά τους καλύτερα από τη μεμονωμένη εξειδίκευση υποστρώματος, βοηθάει στην ανίχνευση των εξελικτικών τους σχέσεων, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση των μηχανισμών δράσης και καταδεικνύει τη δυσκολία που απορρέει μεταξύ των μελών μιας οικογένειας και της εξειδίκευσης στο υπόστρωμα.

Εκτός από την κατάταξη με βάσει την αμινοξική αλληλουχία, πραγματοποιείται και ομαδοποίηση με βάσει την αναδίπλωση της πρωτεΐνης στον χώρο, αυξάνοντας την ακρίβεια των μεθόδων σύγκρισης και εμφανίζοντας ομοιότητα ανάμεσα σε μέλη διαφορετικών οικογενειών (Henrissat and Bairoch, 1996). Στην τελευταία ανανέωση (Μάρτιος 2012), εμφανίζονται 130 οικογένειες και 15 δομικές ομάδες γλυκοζιδικών υδρολασών. Οι ενδογλυκανάσες ομαδοποιούνται σε 17 οικογένειες, οι εξωγλυκανάσες σε 4 και οι β-γλυκοζιδάσες σε 7.

Η υδρόλυση του γλυκοζιδικού δεσμού καταλύεται από την παρουσία 2 αμινοξέων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (μηχανισμός υδρόλυσης οξέος-βάσης), εκ των οποίων το ένα λειτουργεί ως πρωτονιοδότης και το άλλο είναι πυρηνόφιλο (Davies and Henrissat, 1995). Ανάλογα με τη θέση των αμινοξικών καταλοίπων η υδρόλυση πραγματοποιείται είτε έπειτα από συνολική διατήρηση είτε από ανατροπή των ανωμερικών διαμορφώσεων. Σε κάθε οικογένεια, στον παραπάνω μηχανισμό συμμετέχουν διαφορετικά αμινοξέα με αποτέλεσμα διαφορετική στερεοχημική αντίδραση.

Οι περισσότερες κυτταρινάσες εμφανίζουν παρόμοιο άριστο pH δράσης, υδατική διαλυτότητα και ποσοστιαία περιεκτικότητα σε αμινοξέα. Η κυτταρινόλυση εκτελείται ανεκτά σε εύρος pH 3-7 ενώ η άριστη τιμή κυμαίνεται μεταξύ 4 και 5. Η ενζυμική θερμοσταθερότητα και η εξειδίκευση υποστρώματος συνήθως εμφανίζει ποικιλία. Άλλωστε, η συνολική διαδικασία αποικοδόμησης της κυτταρίνης περιλαμβάνει συντονισμένη δράση διαφορετικών ενζύμων η οποία σαφώς επηρεάζει τα χαρακτηριστικά της υδρόλυσης. Όσον αφορά στην άριστη τιμή θερμοκρασίας δράσης, συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 40 και 50 °C. Η ενζυμική δράση αναστέλλεται παρουσία των προϊόντων της αντίδρασης όπως είναι η γλυκόζη και η κελλοβιόζη. Επίσης, πλήρης αναστολή παρατηρείται παρουσία ιόντων Hg, και μερική αναστολή παρουσία ιόντων Mn, Ag, Cu και Zn (Enari and Markkanen, 1977, Singh and Hayashi, 1995).

Τέλος, οι περισσότερες μυκητιακές και αρκετές βακτηριακές κυτταρινάσες είναι γλυκοπρωτεΐνες με προσκολλημένα σακχαρικά κατάλοιπα σε μονάδες ασπαραγίνης (N-γλυκοζυλίωση) ή σε μονάδες σερίνης ή θρεονίνης (O-γλυκοζυλίωση). Η O-γλυκοζυλίωση εμφανίζεται κυρίως στις συνδετικές περιοχές, ενώ η N-γλυκοζυλίωση στην πυρηνική περιοχή του ενζύμου (Kubicek, 1992). Το περιεχόμενο σε υδατάνθρακες στις κυτταρινάσες κυμαίνεται μεταξύ 1-10 % (Enari and Niku-Paavola, 1987) και το αρχικό σάκχαρο που μελετήθηκε ήταν η μαννόζη, ενώ ακολούθησαν η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η ξυλόζη, η N-ακετυλογλυκοζαμίνη και η γαλακτοζαμίνη (Salonvuo, 1987). Η παρουσία των σακχαρικών καταλοίπων έχει λειτουργική σημασία στην κυτταρινόλυση καθώς αυξάνει τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης και την παρουσία υδροξυλομάδων ικανών να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με το υπόστρωμα (Darnell et al., 1986).

---

#### 1.7.5 ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ

---

Οι κυτταρινολυτικοί μικροοργανισμοί έχουν ευρεία αντιπροσώπευση στο φυσικό περιβάλλον και θεωρούνται αποικοδομητές υδρογονανθράκων καθώς είναι ανίκανοι να υδρολύσουν πρωτεΐνες ή λίπη για την επιβίωση τους (Lynd et al., 2002). Ανάμεσα τους ανιχνεύονται θερμόφιλοι μύκητες, βακτήρια και αρχαίοι προκαρυωτικοί οργανισμοί.



Αρκετοί θερμοφιλοί μύκητες έχουν απομονωθεί και χρησιμοποιηθεί ως πηγές θερμοσταθερών κυτταρινασών. Μάλιστα, τα ένζυμα αυτά έχουν αρχικά μελετηθεί για τα δομικά και λειτουργικά τους χαρακτηριστικά και ακολούθως εφαρμοστεί σε διαφορετικά βιοτεχνολογικά πεδία.

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των κυτταρινασών στους θερμοφίλους μύκητες πραγματοποιείται μέσω ενός συστήματος επαγωγής/αναστολής όπου η κυτταρίνη και ορισμένοι ολιγοσακχαρίτες λειτουργούν επαγωγικά ενώ η γλυκόζη και άλλες εύκολα μεταβολίσιμες πηγές άνθρακα ανασταλτικά (Suto and Tomita, 2001β). Το μοριακό βάρος των θερμοφίλων κυτταρινασών κυμαίνεται μεταξύ 30-250 kDa με διαφορετικό περιεχόμενο υδατανθράκων (2-50 %). Επίσης η πλειοψηφία των ενζύμων εμφανίζει ενεργότητα εντός των τιμών pH 4-7 και μέγιστο άριστο θερμοκρασίας μεταξύ 50-80 °C.

Η θερμοσταθερότητα τους είναι αξιοσημείωτη με μεγάλους χρόνους ημιζωής στους 60-90 °C (Li et al., 2011). Τα δομικά χαρακτηριστικά που εξηγούν εν μέρει την παραπάνω σταθερότητα είναι οι αυξημένοι ιοντικοί δεσμοί στη μοριακή επιφάνεια σε αντίθεση με τον υδρόφοβο πυρήνα του ενζύμου (Taylor and Vaisman, 2010).

Η έκκριση μεγάλων ενζυμικών ποσοτήτων σε συνδυασμό με την απλή κυτταρινολυτική δράση οδήγησε στην αρχική εκμετάλλευση των μυκητιακών υδρολασών. Ωστόσο, οι κυτταρινάσες με τις υψηλότερες θερμοκρασίες δράσης έχουν απομονωθεί από αρχαία και βακτήρια και η πλειοψηφία τους είναι αναερόβιοι αντιπρόσωποι (Πίνακας 1-6) (Bergquist et al., 1999).

**Πίνακας 1-6** Κυριότεροι θερμοφιλοί προκαρυωτικοί κυτταρινολυτικοί μικροοργανισμοί

Μικροοργανισμός	Συνθήκες Αύξησης	Κυτταρινάση		Αναφορά
		Άριστη Θερμοκρασία δράσης (°C)	Άριστο pH	
<i>Anaerocellum thermophilum</i>	Αναερόβιο	85-90	5-6,6	(Zverlov et al., 1998)
<i>Bacillus subtilis</i>	Αερόβιο	65-70	5-6,5	(Mawadza et al., 2000)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Αναερόβιο	102-105	5	(Kengen et al., 1993)
<i>Pyrococcus horicoshi</i>	Αναερόβιο	97	5	(Ando et al., 2002)
<i>Rhodothermus marinus</i>	Αερόβιο	70	7	(Hreggvidsson et al., 1996)
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	Αναερόβιο	95	6-7	(Bronnenmeier et al., 1995)
<i>Thermotoga neapolitana</i>	Αναερόβιο	A: 95 B: 106	A: 6 B: 6-6,6	(Bok et al., 1998)
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Αναερόβιο	65	7,2	(Le Ruyet et al., 1985)
<i>Clostridium thermocellum</i>	Αναερόβιο	60	7	(Felix and Ljungdahl, 1993)
<i>Fervidobacterium islandicum</i>	Αναερόβιο	65	7	(Huber et al., 1990)

## 1.7.6 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΩΝ

Οι κυτταρινάσες εμφανίζουν ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών στη βιοτεχνολογία, μερικές εκ των οποίων αναφέρονται ενδεικτικά στον Πίνακα 1-7.

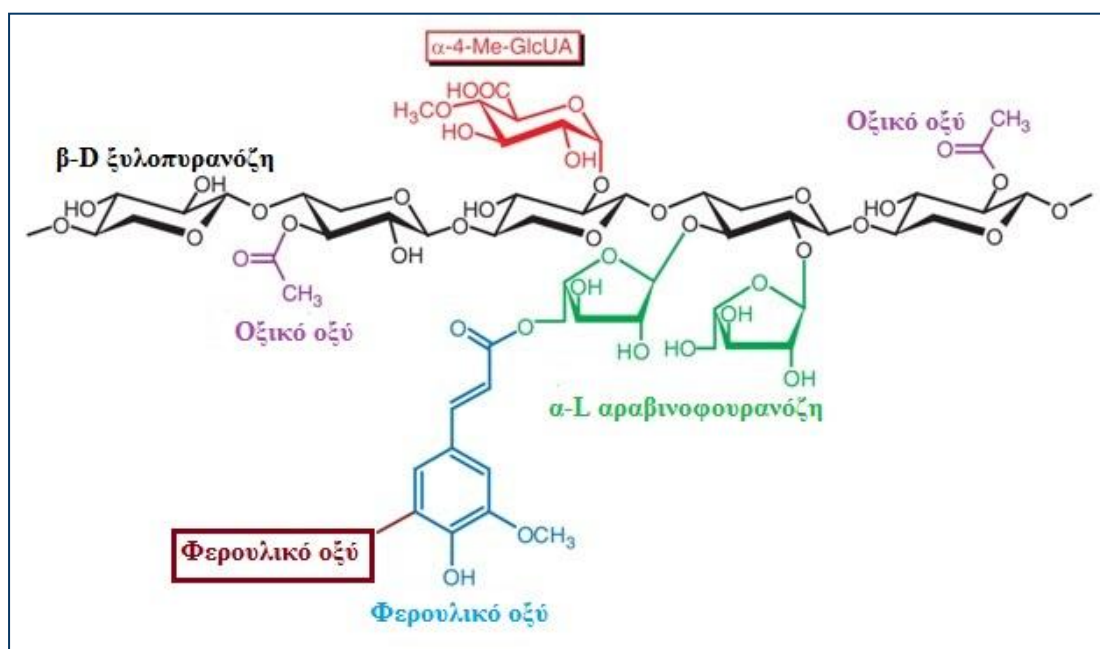
**Πίνακας 1-7** Βιοτεχνολογικές εφαρμογές κυτταρινασών

<b>Βιομηχανία</b>	<b>Εφαρμογή</b>	<b>Πηγή</b>
<b>Τρόφιμα</b>	Βελτίωση στην εξαγωγή χυμών από φρούτα και λαδιού από ελιές. Απελευθέρωση αρωματικών ουσιών, ενζύμων, πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών και αμύλου. Βελτιωμένη διαβροχή, συμπίεση και διατήρηση του χρώματος στα φρούτα και λαχανικά. Εμπλουτισμός στην υφή και ποιότητα των προϊόντων αρτοποιίας. Αυξημένο ιξώδες στον πουρέ και έλεγχος της πικρής γεύσης των εσπεριδοειδών.	(Béguin and Aubert, 1994, Bhat, 2000, De Faveri et al., 2008, Karmakar and Ray, 2011, Kuhad et al., 2011)
<b>Γεωργία</b>	Βιο-έλεγχος φυτοπαθογόνων και ασθενειών, αναγέννηση των φυτικών και μυκητιακών πρωτοπλαστών, ενίσχυση στη φύτευση σπερμάτων και του ριζικού συστήματος, ανάπτυξη φυτικής βιομάζας και ανθοφορίας, βελτίωση της ποιότητας του εδάφους και μειωμένη εξάρτηση από ανόργανα λιπάσματα.	(Bayer et al., 1994, Bhat and Bhat, 1997, Bhat, 2000, Bayer et al., 2004, Abdulla and El-Shatoury, 2007, Han and He, 2010)
<b>Απορρυπαντικά</b>	Καθαριστική δράση χωρίς φθορά των ινών, βελτιωμένη φωτεινότητα των χρωμάτων έπειτα από την αφαίρεση του λεκέ, αφαίρεση εξογκωμάτων από βαμβακερά υφάσματα.	(Bhat, 2000, Sukumaran et al., 2005, Karmakar and Ray, 2011)
<b>Βιοδιεργασίες</b>	Μετατροπή κυτταρινικών υλικών σε αιθανόλη, άλλους διαλύτες, οργανικά οξέα και λίπη, παραγωγή πλούσιων σε ενέργεια και διατροφική ποιότητα ζωοτροφών, καλύτερη απόδοση των μηρυκαστικών και αυξημένη πέψη και απορρόφηση των ζωοτροφών.	(Lee et al., 1995, Dhiman et al., 2002, Mosier et al., 2005, Shrivastava et al., 2011)
<b>Οινοποιία</b>	Βελτίωση ποιότητας, σταθερότητας, φιλτραρίσματος και διαύγειας κρασιού. Εμπλουτισμός σε άρωμα. Βελτιωμένη πρωτογενής ζύμωση της μπίρας και καλύτερη ποιότητα.	(Bamforth, 2009, Guérin et al., 2009)
<b>Βιομηχανία χαρτιού και χαρτοπολτού</b>	Βιολογική-μηχανική πολτοποίηση. Απομάκρυνση μελανιού κατά την ανακύκλωση χάρτου. Βιο-λεύκανση χάρτου. Μείωση απαιτούμενης χλωρίωσης για τη λεύκανση. Καλύτερη αποστράγγιση. Παραγωγή βιοαποικοδομήσιμου χαρτονιού, χαρτιού κουζίνας και υγείας. Βελτιωμένη ποιότητα χαρτιού (φωτεινές ίνες με μεγαλύτερη αντοχή)	(Salkinoja-Salonen, 1990, Dienes et al., 2004, Sindhu et al., 2006, Asha Poorna and Prema, 2007)
<b>Υφαντουργία</b>	Όψη «πετροπλυμένων» τζην. Λείανση υφασμάτων. Καλύτερη ποιότητα, απορροφητικότητα και σταθερότητα των υφασμάτων. Αφαίρεση πλεονάζουσας χρωστικής και επαναφορά της ζωηρότητας των χρωμάτων.	(Cortez et al., 2002, Hebeish and Ibrahim, 2007, Ibrahim et al., 2011, Karmakar and Ray, 2011)
<b>Διάφορες εφαρμογές</b>	Βελτιωμένη παραγωγή, καλύτερη οξειδωση και σταθερότητα στο χρώμα των καροτενοειδών, μειωμένος κίνδυνος απώλειας βιομάζας, παραγωγή υβριδικών μορίων, σχεδιασμός κυτταρινοσωμάτων με επιθυμητές ενζυμικές δράσεις.	(Inci, 2005, Irfan et al., 2011, Kuhad et al., 2011)

## 1.8 ΕΥΛΑΝΑΣΕΣ

### 1.8.1 ΕΥΛΑΝΗ

Ο όρος «ημικυτταρίνη» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1891 από τον Schulze κατά την περιγραφή της αλκαλικής υδρόλυσης φυτικής βιομάζας (Schulze, 1891). Οι ημικυτταρίνες περιλαμβάνουν την ξυλάνη, τη μαννάνη, τη γαλακτάνη και την αραβινάνη ως κύρια ετεροπολυμερή. Η κατηγοριοποίηση των ημικυτταρινικών κλασμάτων εξαρτάται από την παρουσία διαφορετικών τύπων σακχαρικών καταλοίπων. Τα βασικά μονομερή που εμφανίζονται στις περισσότερες ημικυτταρίνες είναι η D-ξυλόζη, η D-μαννόζη, η D-γαλακτόζη και η L-αραβινόζη. Η ξυλάνη συνιστά ένα ετεροπολυμερές, βασική μονάδα του οποίου είναι η D-ξυλόζη και ίχνη L-αραβινόζης (Schulze, 1891). Ο λόγος των καταλοίπων αραβινόζης ως προς τις υπομονάδες ξυλόζης είναι 1:8. Η ξυλάνη και οι υπόλοιπες ημικυτταρίνες, μαζί με την κυτταρίνη, τη λιγνίνη και άλλα πολυμερή αποτελούν τα δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Τα παραπάνω, συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς και μη δεσμούς. Η σύνδεση των ημικυτταρινών με τις ίνες κυτταρίνης βοηθά, πιθανώς, στη σωστή τοποθέτηση των τελευταίων κατά τη μορφογένεση, τη συνοχή και τη σταθερότητα του κυτταρικού τοιχώματος (Collins et al., 2005), καθώς και στην προστασία του ενάντια της διάσπασης από κυτταρινολυτικά ένζυμα (Uffen, 1997).



Εικόνα 1-11 Βασική δομή του σκελετού της ξυλάνης

Ο βασικός σκελετός της ξυλάνης περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες μονάδες β-D ξυλοπυρανόζης ενωμένες με β-1,4 γλυκοζιδικό δεσμό (Εικόνα 1-11). Η παρουσία υποκαταστατών στην αλυσίδα εμφανίζει ποικιλία (οξικό οξύ, φερούλικό οξύ, α-4-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ και α-L-αραβινοφουρανόζη) και εξαρτάται από τον τύπο ιστού ή κυττάρου στον οποίο εμφανίζεται το παραπάνω πολυμερές. Γενικά, η ξυλάνη εμφανίζεται σε μεγάλες ποσότητες στο σκληρό ξύλο των αγγειοσπέρμων (15-30 % επί του συνολικού περιεχομένου στο κυτταρικό τοίχωμα) και στο μαλακό ξύλο των γυμνόσπερμων (7-10 %), αλλά και στα ετήσια φυτά (<30 %) (Singh et al., 2003). Συνήθως εντοπίζεται στο δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα των φυτών αν και μπορεί να βρεθεί στο πρωτογενές, ιδιαίτερα στα μονοκοτυλήδονα φυτά (Wong et al., 1988).

Στην περίπτωση των γυμνόσπερμων φυτών, η ξυλάνη είναι κυρίως αραβινο-4-Ο-μέθυλ-γλυκουροξυλάνη, η οποία εκτός από την προσθήκη 4-Ο-μέθυλ-γλυκουρονικού οξέος, έχει υποκατεστημένες ομάδες α-αραβινοφουρανόζης συνδεδεμένες με α-1,3 δεσμούς στην κεντρική αλυσίδα. Σπάνια, ακετυλικές ομάδες συνδέονται στην ξυλάνη των γυμνόσπερμων φυτών. Αντίθετα, η ξυλάνη από το σκληρό ξύλο εμφανίζει υψηλό βαθμό ακετυλίωσης (πχ η ξυλάνη από ξύλο σημύδας περιέχει περισσότερο από 1 mol οξικού οξέος ανά 2 mol ξυλόζης). Η ακετυλίωση εμφανίζεται συνήθως στις θέσεις C-3 και C-2 και είναι υπεύθυνη για τη μερική διάλυση του πολυμερούς στο νερό. Οι ακετυλικές μονάδες αφαιρούνται εύκολα κατά την αλκαλική υδρόλυση της ξυλάνης (Sunna and Antranikian, 1997, Beg et al., 2001). Η ξυλάνη στα αγρωστώδη και μονοετή φυτά εμφανίζεται κυρίως ως αραβινοξυλάνη (Kulkarni et al., 1999).

Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές και για γραμμικά ομοπολυμερή ξυλάνης με πλήρη απουσία υποκαταστατών. Μερικά είναι τα σπαρτά αγρωστώδη (Chanda et al., 1950), ο καπνός (Eda, 1976) και τα θαλάσσια φύκη (Nunn et al., 1973). Μάλιστα τα τελευταία περιλαμβάνουν μονάδες ξυλοπυρανόζης που συνδέονται με β-1,4 και β-1,3 δεσμούς (Percival and Chanda, 1950, Nunn et al., 1973). Εκτός από τους υποκαταστάτες, ανάμεσα στα φυτικά είδη ποικίλει και ο βαθμός πολυμερισμού. Οι ξυλάνες ξηρού και μαλακού ξύλου εμφανίζουν 150-200 και 70-130 μονάδες ξυλοπυρανόζης, αντίστοιχα (Kulkarni et al., 1999).

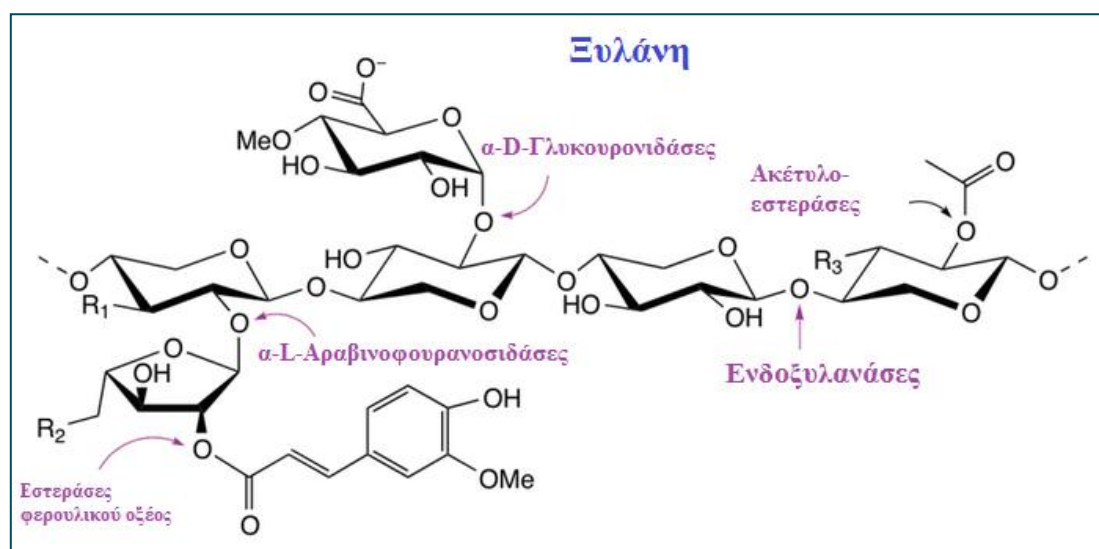
Όσον αφορά στη δευτεροταγή δομή του μορίου, αυτή σχηματίζεται μέσω δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των υπομονάδων της (Kulkarni et al., 1999). Γενικά, η ξυλάνη εμφανίζεται περισσότερο εύκαμπτη από την κυτταρίνη εξαιτίας της μικρότερης ποσότητας δεσμών.

Ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της ξυλάνης μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω (Bastawde, 1992):

- Η μη ακετυλιωμένη ξυλάνη είναι αδιάλυτη στο νερό, αλλά διαλυτή σε αλκαλικές συνθήκες. Επιπροσθέτως, υδρολύεται παρουσία οξέων.
- Η ακετυλιωμένη ξυλάνη εξάγεται έπειτα από επεξεργασία με ζεστό νερό και εμφανίζει καλύτερη διαλυτότητα στα υδατικά διαλύματα.
- Τα διαλύματα ξυλάνης δε δίνουν θετική αντίδραση στη δοκιμή Fehling (ανίχνευση αναγωγικών μονοσακχαριτών).
- Τα διαλύματα ξυλάνης εμφανίζουν υψηλά αρνητική οπτική στροφική ικανότητα.
- Η ακετυλιωμένη ξυλάνη υδρολύεται εύκολα από μικροβιακά ένζυμα.

## 1.8.2 ΞΥΛΑΝΟΛΥΤΙΚΟ ΕΝΖΥΜΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η ημικυτταρίνη μπορεί να υδρολυθεί εύκολα με οξέα στα μονομερή συστατικά της: ξυλόζη, μαννόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη και μικρές ποσότητες ραμνόζης, γλυκουρονικού οξέος, μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος και γαλακτουρονικού οξέος (Khandeparker and Numan, 2008). Η υδρόλυση με οξέα, ωστόσο, πολλές φορές παράγει ανασταλτικούς παράγοντες, όπως η φουρφουράλη (Lee et al., 1986). Η αποικοδόμηση και ο αποπολυμερισμός αυτού του πολυσακχαρίτη σε ξυλοολιγοσακχαρίτες και ξυλόζη μπορεί επίσης να επιτευχθεί ενζυμικά, μέσω της συνεργιστικής δράσης ξυλανάσων (Bastawde, 1992, Kulkarni et al., 1999, Subramaniyan and Prema, 2002). Τα ένζυμα αυτά, έχουν εντοπιστεί σε θαλάσσια και χερσαία βακτήρια, σε βακτήρια του στομάχου μηρυκαστικών, σε μύκητες, φύκη, πρωτόζωα, σαλιγκάρια, οστρακόδερμα, έντομα και φύλλα χερσαίων φυτών (Sunna and Antranikian, 1997).



Εικόνα 1-12 Ξυλανολυτικό ενζυμικό σύστημα.

Αναλυτικότερα, τα ένζυμα που συμμετέχουν στην υδρόλυση της ξυλάνης (Εικόνα 1-12) μπορούν να ομαδοποιηθούν ως εξής:

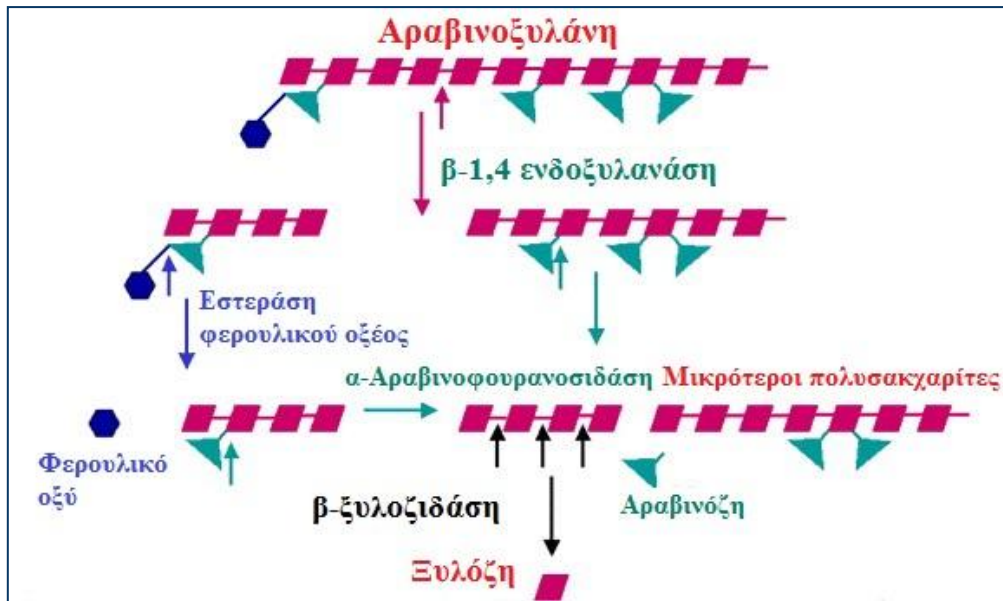
- **$\beta$ -1,4 Ενδοξυλανάσες (EC 3.2.1.8)**: ένζυμα που υδρολύουν τυχαίους εσωτερικούς γλυκοζιδικούς δεσμούς στο βασικό σκελετό της ξυλάνης (Gilbert and Hazlewood, 1993).
- **$\beta$ -1,4 Εξωξυλανάσες (EC 3.2.1.37)**: ένζυμα που απομακρύνουν κατάλοιπα D-ξυλόζης από μη αναγωγικά άκρα ξυλάνης (όχι από ξυλοβιόζη) (Subramaniyan and Prema, 2002).
- **$\beta$ -Ξυλοζιδάσες (EC 3.2.1.37)**: ένζυμα που απελευθερώνουν κατάλοιπα ξυλόζης από ξυλο-ολιγοσακχαρίτες και κυρίως ξυλοβιόζη (Subramaniyan and Prema, 2002).

- **α-Αραβινοφουρανοσιδάσες (EC 3.2.1.55):** ένζυμα που απομακρύνουν υποκαταστάτες αραβινόζης από τα μονομερή ξυλόζης (Gilbert and Hazlewood, 1993). Οι α-1,2 γλυκοζιδικοί δεσμοί, είναι από τους πλέον σταθερούς, και η υδρόλυσή τους αποτελεί καθοριστικό βήμα για την περαιτέρω ενζυμική υδρόλυση της ξυλάνης (Subramaniam and Prema, 2002).
- **α-D Γλυκουρονιδάσες (EC 3.2.1.1):** ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση α-1,2 γλυκοζιδικών δεσμών μεταξύ της ξυλόζης και του D-γλυκουρονικού οξέος ή του 4-O- μεθυλεστερικού δεσμού (Gilbert and Hazlewood, 1993).
- **Εστεράσες:** ένζυμα που καταλύουν την απομάκρυνση οξικών (EC 3.1.1.6), και φαινολικών οξέων όταν αυτά υπάρχουν ως υποκαταστάτες στο βασικό σκελετό. Υπάρχουν πολλές κατηγορίες εστερασών ανάλογα με τον υποκαταστάτη που απομακρύνουν (φερουλικού ή π-κουμαρλικού οξέος) (Subramaniam and Prema, 2002).

Η συνεργιστική δράση των παραπάνω ξυλανολυτικών ενζύμων ενισχύει την υδρόλυση του ετεροπολυμερούς, εξασφαλίζοντας προσβασιμότητα στις ενδοξυλανάσες, κύρια ένζυμα καταστροφής του βασικού σκελετού (van Peij et al., 1997, de Vries et al., 2000). Έτσι, οι ακέτυλο-εστεράσες απελευθερώνουν οξικό οξύ οδηγώντας σε λιγότερο ακετυλιωμένη ξυλάνη με καλύτερη προσβασιμότητα στις ενδοξυλανάσες. Από την άλλη, τα μικρότερου μεγέθους ακετυλιωμένα πολυμερή, προϊόντα της δράσης ενδοξυλανασών, εμφανίζονται ιδανικά υποστρώματα για τις εστεράσες.

Τα σύνθετα υποστρώματα, όπως το πίτυρο, περιέχουν μεγάλες ποσότητες αραβινοξυλάνης και υδρολύονται δύσκολα από τις ενδοξυλανάσες, χωρίς προηγούμενη επεξεργασία με α-αραβινοφουρανοσιδάσες (Εικόνα 1-13). Επίσης, σημαντική είναι η δράση των β-ξυλοζιδασών καθώς υδρολύουν ξυλο-ολιγοσακχαρίτες, τα προϊόντα των οποίων έχουν ανασταλτική δράση στην παραγωγή ξυλανασών. Συνεπώς, βιοτεχνολογικά ιδανικός θεωρείται ο μικροοργανισμός που παράγει επαρκείς ποσότητες ενζύμων όλων των κατηγοριών (Polizeli et al., 2005).

Σε αναλογία με τα «κυτταρινόσωματα», έχουν εμφανιστεί τα «ξυλανόσωματα». Πρόκειται για διακριτά πολυλειτουργικά και πολυενζυμικά συμπλέγματα, υψηλού μοριακού βάρους (500-600 kDa), που μπορούν να περιέχουν περισσότερες από 10 διαφορετικές πρωτεΐνες με ξυλανολυτική δράση (Jiang et al., 2004, Jiang et al., 2006). Σε μερικούς μικροοργανισμούς ένα «ξυλανόσωμα» μπορεί να συνδέεται με ένα «κυτταρινόσωμα», εμφανίζοντας μεγάλα συμπλέγματα με ταυτόχρονη ικανότητα υδρόλυσης κυτταρινών και ημικυτταρινών (Sunna and Antranikian, 1997, Beg et al., 2001).



Εικόνα 1-13 Συνεργιστική ενζυμική υδρόλυση αραβινοξυλάνης.

### 1.8.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΞΥΛΑΝΑΣΩΝ

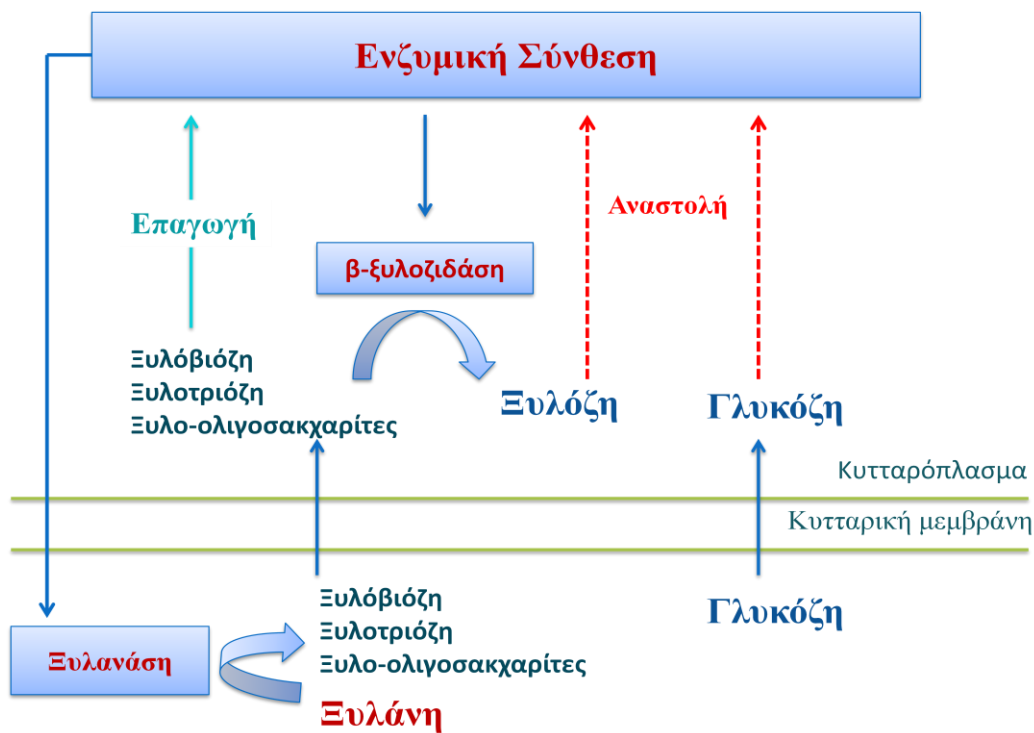
Ο βασικότερος παράγοντας για την αποδοτική παραγωγή μικροβιακών ξυλανάσων θεωρείται η επιλογή του κατάλληλου επαγωγικού υποστρώματος και αριστοποιημένου μέσου ανάπτυξης (Kulkarni et al., 1999). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι νηματοειδείς μύκητες εξαιτίας της ικανότητας ενζυμικής έκκρισης σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά των ζυμών ή των βακτηρίων. Ωστόσο, η παραγωγή των μυκητιακών ξυλανάσων συνδέεται συχνά με την αντίστοιχη των κυτταρινάσων (Steiner et al., 1987), αρνητικό χαρακτηριστικό σε αρκετές βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Τα επίπεδα παραγωγής ξυλανάσων κατά τη διάρκεια στερεών ή υγρών μικροβιακών καλλιέργειών επηρεάζονται από το σύνολο των φυσικοχημικών παραμέτρων. Αναλυτικότερα, στην περίπτωση κατά την οποία η ζύμωση εκτελείται παρουσία σύνθετου ετερογενούς υποστρώματος μερικά σημεία – κλειδιά στην παραγωγή θεωρούνται: η ευκολία πρόσβασης των υδρολυτικών ενζύμων στο υπόστρωμα, ο ρυθμός και η ποσότητα απελευθέρωσης καθώς και η χημική σύσταση των ξυλο-ολιγοσακχαριτών και η ποσότητα της διαθέσιμης ξυλόζης η οποία δρα τόσο ως πηγή ενέργειας για το κύτταρο όσο και ως αναστολέας της σύνθεσης ξυλανάσων. Γενικά, η αργή απελευθέρωση των επαγωγικών ολιγο-σακχαριτών και η ικανότητα μετατροπής τους σε μη μεταβολίσιμα ενδιάμεσα ενδέχεται να ενισχύσει τα επίπεδα παραγωγής (Kulkarni et al., 1999).

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των εξωκυτταρικών ξυλανάσων είναι η ισχυρή πρόσδεση τους στο υπόστρωμα. Το παραπάνω, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικής ενζυμικής ποσότητας η οποία παραμένει προσκολλημένη στο αδιάλυτο υπόστρωμα (Kulkarni et al., 1999). Επιπλέον, τα ένζυμα μεταβολισμού του μικροοργανισμού όπως οι πρωτεάσες ή οι τρανς-γλυκοζιδάσες μπορούν να

επηρεάζουν τα επίπεδα παραγωγής (Hrmoná et al., 1991). Τα ένζυμα αυτά, εκφράζονται στο τελικό στάδιο της εκθετικής φάσης αύξησης, χρονικό σημείο συλλογής των ξυλανασών. Άλλες παράμετροι επιρροής της ενεργότητας και παραγωγής των ξυλανασών είναι το pH του υποστρώματος αύξησης, η θερμοκρασία και η ανάδευση της καλλιέργειας. Τα ακτινοβακτήρια εμφανίζουν άριστη τιμή pH αύξησης και ενζυμικής παραγωγής στην ουδέτερη περιοχή (Ball and McCarthy, 1989) εν αντιθέσει με τους μύκητες που είναι γενικά οξεόφιλοι.

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των ξυλανολυτικών γονιδίων εμφανίζεται σύνθετη και εξατομικευμένη στο εκάστοτε είδος. Γενικά, η παραγωγή των ξυλανασών είναι επαγωγική εκτός από ελάχιστες περιπτώσεις συνεχούς έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων (Srivastava and Srivastava, 1993, Bajaj et al., 2012). Οι επαγωγικές συνθήκες παραγωγής ποικίλουν και σε πολλές περιπτώσεις ένα ενδιάμεσο καταβολικό προϊόν μπορεί να λειτουργεί επαγωγικά για ένα μικροοργανισμό και ανασταλτικά για κάποιον άλλο (Hrmoná et al., 1989, Zeilinger et al., 1996). Σίγουρα, τα αρχικά και τελικά προϊόντα υδρόλυσης του υποστρώματος ρυθμίζουν την ενζυμική σύνθεση.



**Εικόνα 1-14** Υποθετικός μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης του μικροβιακού ξυλανολυτικού συστήματος.



Η ξυλάνη, ως υψηλού μοριακού βάρους πολυμερές, δεν μπορεί να εισέλθει εντός του κυττάρου. Η ρύθμιση της βιοσύνθεσης των ξυλανασών εκτελείται μέσω των προϊόντων αποικοδόμησης της ξυλάνης (ξυλοβιόζη, ξυλοτριόζη και ξυλοολιγοσακχαρίτες), η οποία αρχικά πραγματοποιείται από μικρές ποσότητες συνεχούς έκκρισης ξυλανάσης (Εικόνα 1-14). Επίσης, η κυτταρίνη ενδέχεται να λειτουργεί επαγωγικά στη σύνθεση των ξυλανασών, χωρίς όμως να έχει προσδιοριστεί εάν εξαρτάται από την ίδια ή από την περιορισμένη παρουσία της στην ξυλάνη. Τα αρχικά προϊόντα υδρόλυσης της ξυλάνης θα εισέλθουν στο κύτταρο μέσω μιας περμεάσης και στη συνέχεια θα ενισχύσουν την παραγωγή ξυλανασών και β-γλυκοζιδάσης. Η βιοσύνθεση των ξυλανασών συνεχίζει για αρκετές ώρες έπειτα από τη δράση του επαγωγέα, αντίθετα με την περμεάση και τη β-γλυκοζιδάση που εμφανίζουν μικρές περιόδους επαγωγής (Kulkarni et al., 1999). Αυτό μάλιστα συμφωνεί με την υπόθεση πως τα μόρια mRNA των εκκρινόμενων πρωτεϊνών εμφανίζουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής συγκριτικά με τα αντίστοιχα των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών (Lampen et al., 1972). Η παρουσία γλυκόζης και ξυλόζης λειτουργεί συνήθως ανασταλτικά στη σύνθεση όλων των ξυλανασών καθώς και της περμεάσης και της β-γλυκοζιδάσης. Ωστόσο, σε λίγες περιπτώσεις αναφέρεται επαγωγική δράση της ξυλόζης (Liu et al., 1998, Mach-Aigner et al., 2010) ή ενισχυτική επίδραση του cAMP (Morosoli et al., 1989, Rizzatti et al., 2008).

Τέλος, φθηνές σύνθετες πηγές άνθρακα όπως αγροτικά παραπροϊόντα (πίτυρο, θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού, άχυρα κ.α.) λειτουργούν επαγωγικά στη βιοσύνθεση ξυλανασών από μικροβιακά στελέχη μειώνοντας κατά πολύ το κόστος (Dey et al., 1992, Haltrich et al., 1996).

---

#### 1.8.4 ΜΟΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΞΥΛΑΝΑΣΩΝ

---

Οι μικροβιακές ξυλανάσες εμφανίζονται συχνά ως μονομερή υπομονάδων με μοριακό βάρος που κυμαίνεται στο εύρος των 8-145 kDa (Sunna and Antranikian, 1997). Ωστόσο, υπάρχουν και πολυμερή ένζυμα με τη χαρακτηριστική δομή που εμφανίζουν και οι κυτταρινάσες και αποτελούνται από μία καταλυτική υπομονάδα (CD) και μία περιοχή πρόσδεσης στο υπόστρωμα (CBD) (Gilkes et al., 1991).

Η άριστη θερμοκρασία ενζυμικής δράσης των ενδοξυλανασών ποικίλει μεταξύ των 40 και 60 °C ενώ γενικά οι μυκητιακές ξυλανάσες είναι λιγότερο θερμοσταθερές από τις αντίστοιχες βακτηριακές. Το άριστο pH ενζυμικής ενεργότητας εντοπίζεται μεταξύ 4-7 ενώ σε pH 3-10 εμφανίζουν αρκετά καλή σταθερότητα, περιοχή στην οποία εντοπίζεται και το ισοηλεκτρικό τους σημείο (Kulkarni et al., 1999).

Γενικά, τα βακτήρια παράγουν δύο τύπους ξυλανασών, τις υψηλού μοριακού βάρους με ισοηλεκτρικό σημείο στην όξινη περιοχή και τις χαμηλού μοριακού βάρους ξυλανάσες με βασικό ισοηλεκτρικό σημείο. Τέτοια αναλογία δεν παρατηρείται στους μύκητες αν και ο δεύτερος τύπος είναι αρκετά κοινός. Το αμινοξικό περιεχόμενο των ξυλανασών επιδεικνύει κατά κύριο λόγο την παρουσία ασπαρτικού και γλουταμικού οξέος, γλυκίνης, σερίνης και θρεονίνης. Αρκετές ευκαρυωτικές και προκαρυωτικές ξυλανάσες εμφανίζονται ως γλυκοπρωτεΐνες (Masaki et al., 1985, Dey et al., 1992). Η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται είτε με απευθείας προσθήκη

σακχαρικών καταλοίπων με ιοντικούς δεσμούς είτε έπειτα από τον σχηματισμό υδρογονανθρακικών συμπλεγμάτων που θα συνδεθούν ακολούθως με την ξυλανάση. Γενικά, η γλυκοζυλίωση σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες παρουσία αντίξοων περιβαλλοντικών συνθηκών (Merivuori et al., 1985).

Όσον αφορά στην ενζυμική εξειδίκευση έναντι του υποστρώματος, σημαντικός είναι ο ρόλος της ποικιλίας και ποσότητας υποκατάστασης της κύριας αλυσίδας ξυλάνης, της παρουσίας δεσμών διαφορετικής φύσης καθώς και των τελικών προϊόντων υδρόλυσης. Οι μυκητιακής προέλευσης ξυλανάσες κατηγοριοποιούνται σε αυτές που δρουν σε διακλαδισμένη ξυλάνη και απελευθερώνουν αραβινόζη παράλληλα με την υδρόλυση των δεσμών στη βασική αλυσίδα και σε αυτές που δεν απελευθερώνουν αραβινόζη (Reilly, 1981). Η ποικιλία στην προτίμηση υποστρώματος υποδεικνύει διαφορετικές διαμορφώσεις στο ενεργό κέντρο καθώς και διαφορετικής φύσης τελικά προϊόντα υδρόλυσης (Kulkarni et al., 1999).

Οι γλυκοζιδικές υδρολάσες (EC 3.2.1.x), όπως έχει ήδη αναφερθεί κατά την περιγραφή των κυτταρινασών, τοποθετούνται σε κατηγορίες με βάση τόσο την αμινοξική αλληλουχία τους όσο και με την τρισδιάστατη δομή τους, που υποδεικνύει το μηχανισμό δράσης τους, στη διεθνή βάση δεδομένων CAZY (Cantarel et al., 2009). Οι ξυλανάσες τοποθετούνται στις οικογένειες 10 (F) και 11 (G). Οι δύο οικογένειες περιλαμβάνουν ένζυμα υψηλού μοριακού βάρους / χαμηλού ισοηλεκτρικού σημείου και χαμηλού μοριακού βάρους / υψηλού ισοηλεκτρικού σημείου αντίστοιχα, αλλά εμφανίζονται και αντιπρόσωποι με τελείως διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (Sunna and Antranikian, 1997, Beg et al., 2001). Η οικογένεια 10 εκτός από τις ενδοξυλανάσες περιέχει εξωγλυκανάσες και 1,3 ενδοξυλανάσες ενώ η οικογένεια 11 περιέχει κατά αποκλειστικότητα ξυλανάσες. Τα τελευταία χρόνια μικρός αριθμός ξυλανασών δεν μπορεί να κατηγοριοποιηθεί στις παραπάνω οικογένειες. Μάλιστα, εμφανίζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με τις οικογένειες 5, 7, 8 και 43. Κατά συνέπεια, η επέκταση της ομαδοποίησης κρίνεται αναγκαία για να συμπεριλάβει τα ένζυμα αυτά (Collins et al., 2005).

Η σύγκριση των καταλυτικών χαρακτηριστικών στους αντιπροσώπους των δύο οικογενειών εμφανίζει αρκετές διαφορές. Οι ξυλανάσες της οικογένειας 10 διαθέτουν μικρότερη εξειδίκευση έναντι του υποστρώματος, συμμετέχοντας σε ποικιλία αντιδράσεων. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να υδρολύσουν ακόμα και κυτταρινικά υποστρώματα (Biely et al., 1997). Επίσης, οι ξυλανάσες της οικογένειας 10 έχουν μεγαλύτερη ενεργότητα έναντι μικρού μεγέθους ξυλο-ολιγοσακχαριτών, υποδεικνύοντας την ύπαρξη μικρότερων θέσεων πρόσδεσης του υποστρώματος. Εν αντιθέσει, οι ξυλανάσες της οικογένειας 11 εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση στο υπόστρωμα και υδρολύουν την ξυλάνη σε μεγαλύτερο βαθμό (Kolenová et al., 2006).

Επίσης, η υποκατάσταση στην κύρια αλυσίδα της ξυλάνης φαίνεται να επηρεάζει διαφορετικά τα μέλη των δύο ενζυμικών οικογενειών. Οι ξυλανάσες της οικογένειας 11 μπορούν να δρουν έναντι των μη υποκατεστημένων περιοχών του σκελετού της ξυλάνης, ενώ τα αντίστοιχα ένζυμα της οικογένειας 10 διαθέτουν ικανότητα προσβολής ακόμα και σε διακλαδισμένες περιοχές του πολυσακχαρίτη (Javier et al., 2007).

Ο μηχανισμός κατάλυσης των ξυλανασών περιλαμβάνει διπλή αντικατάσταση με διατήρηση της ανωμερικής διαμόρφωσης στο προϊόν. Αναλυτικότερα, εμφανίζονται, με μεγάλη συντήρηση, κοντά στο ενζυμικό ενεργό κέντρο δύο κατάλοιπα γλουταμικού οξέος. Το ένα από αυτά αρχικά δρα ως οξύ πρωτονιόνοντας το γλυκοζιδικό οξύγονο, ενώ το δεύτερο πραγματοποιεί νουκλεόφιλη προσβολή οδηγώντας στην αποχώρηση τμήματος του υποστρώματος αλλά και στον σχηματισμό ενός ενδιάμεσου ενζύμου και γλυκοζιδικού οξύγονου. Ακολούθως, το πρώτο καταλυτικό γλουταμικό οξύ λειτουργεί ως βάση, προσλαμβάνοντας ένα πρωτόνιο από μόριο νερού, το οποίο επιδρά στον ανωμερικό άνθρακα και υδρολύει το ενδιάμεσο ενζύμου-γλυκοζιδίου. Αυτή η διπλή αντικατάσταση αναγεννά ένα προϊόν με ίδια στερεοχημεία με το αρχικό υπόστρωμα, διατηρώντας την ανωμερική διαμόρφωση (Collins et al., 2005).

---

#### 1.8.5 ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ

---

Ένα σύνολο θερμοφίλων και υπερθερμόφιλων ξυλανολυτικών μικροοργανισμών έχει απομονωθεί από ποικιλία φυσικών οικοσυστημάτων όπως χερσαία ή υδάτινα ηφαιστειακά ενδιαίτηματα, υδροθερμικές πηγές και δεξαμενές καθώς και πεδία οργανικής αποσύνθεσης (Harris et al., 1997, Vieille and Zeikus, 2001, Singh et al., 2003, Sunna and Bergquist, 2003, Cannio et al., 2004). Η πλειοψηφία των θερμοφίλων ξυλανασών ανήκουν στις οικογένειες 10 και 11 και εντοπίζονται εύκολα στο γονιδίωμα με συντηρημένα μόρια εκκινήτες (Sunna and Bergquist, 2003). Εξαιρετική αποτελεί η θερμοσταθερή ξυλανάση (χρόνος ημιζωής στους 100 °C – 8 λεπτά), από τον αρχαίο προκαρυωτικό οργανισμό *Thermococcus zilligii*, η οποία ενδεχομένως ανήκει σε μία καινούρια ενζυμική κατηγορία (Uhl and Daniel, 1999).

Οι κρυσταλλογραφικές αναλύσεις, οι ευθυγραμμίσεις της πρωτοταγούς δομής των γονιδίων και οι τυχαίες ή κατευθυνόμενες μεταλλάξεις εμφάνισαν αρκετά μεγάλη ομολογία των μεσόφιλων και θερμοφίλων ξυλανασών υποδεικνύοντας πως η αυξημένη σταθερότητα είναι αποτέλεσμα μικρών τροποποιήσεων. Οι θερμοσταθερές ξυλανάσες βελτιώνουν τη σταθερότητα τους με στρατηγικές όπως: η αύξηση των δεσμών υδρογόνου και των γεφυρών άλατος (Gruber et al., 1998, Hakulinen et al., 2003), η βελτίωση της εσωτερικής αναδίπλωσης του μορίου (Hakulinen et al., 2003), η αύξηση των επιφανειακών φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων (Turunen et al., 2002), η παρουσία παράλληλων επαναλαμβανόμενων περιοχών (Winterhalter et al., 1995) και η αύξηση των δισουλφιδικών γεφυρών, ιδιαίτερα στο αμινο- και καρβόξυ-τελικό άκρο καθώς και σε περιοχές α-έλικας (Turunen et al., 2001).

Επίσης, το ασβέστιο ενδέχεται να εμφανίζει καθοριστικό ρόλο στη θερμική αντοχή (Abou-Hachem et al., 2003) ενώ ενδιαφέρουσα είναι η στρατηγική σταθερότητας της ξυλανάσης του *Bacillus D3* όπου το μόριο της εμφανίζει μία σειρά επιφανειακών αρωματικών αμινοξέων που σχηματίζουν «κολλώδεις» περιοχές. Οι περιοχές αυτές οδηγούν στην ανάπτυξη διαμοριακών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων αυξάνοντας τη σταθερότητα των ενζύμων (Harris et al., 1997).

Οι πιο διαδεδομένοι θερμοφιλοι ξυλανολυτικοί μύκητες ανήκουν στα γένη: *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola grisea*, *Melanocarpus albomyces*, *Paecylomyces variotii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces emersonii*, *Thermomyces lanuginosus* και *Thermoascus aurantiacus*. Οι ξυλανάσες τους εμφανίζουν άριστη θερμοκρασία δράσης μεταξύ 60 και 80 °C και παράλληλα στο εύρος αυτό είναι αρκετά σταθερές. Επίσης, είναι συνήθως γλυκοπρωτεΐνες, ελαφρώς οξεόφιλες με μοριακό βάρος μεταξύ 6-38 kDa (Polizeli et al., 2005).

Όσον αφορά στους βακτηριακούς ξυλανολυτικούς αντιπροσώπους τα πιο διαδεδομένα γένη είναι τα *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermonospora* και *Thermotoga* (Kulkarni et al., 1999). Οι άριστες θερμοκρασίες δράσης των ξυλανασών τους εμφανίζονται υψηλότερες από τις αντίστοιχες μυκητιακές. Το ίδιο πρότυπο ακολουθεί και η σταθερότητα των μορίων αυτών με μεγάλους χρόνους ημιζωής ακόμα και σε θερμοκρασίες κοντά στους 100 °C.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν οι ξυλανάσες του γένους *Thermotoga* όπου το άριστο θερμοκρασίας ενζυμικής δράσης μπορεί να ξεπερνά τους 100 °C (Simpson et al., 1991). Τα ένζυμα αυτά εμφανίζονται δραστικά σε pH 4-9 και ικανότητα υδρόλυσης διαλυτής ή αδιάλυτης ξυλάνης (Sunna et al., 1997).

---

#### 1.8.6 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΞΥΛΑΝΑΣΩΝ

---

Οι ξυλανάσες, ως βασικός αντιπρόσωπος των ημικυτταρινασών, εμφανίζει ευρύ πεδίο εφαρμογών στη βιομηχανία, οι κυριότερες των οποίων περιέχονται στο Πίνακα 1-8. Άλλες λιγότερο καλά τεκμηριωμένες μελλοντικές εφαρμογές είναι στη ζυθοποιία (Wang et al., 2011), η μείωση της θολερότητας στο τελικό προϊόν, στην εξαγωγή του καφέ (Wong et al., 1988), στα απορρυπαντικά (Kamal Kumar et al., 2004), στους πρωτοπλάστες των φυτικών κυττάρων (Kulkarni et al., 1999), στην παραγωγή βιοενεργών πολυσακχαριτών όπως αντιμικροβιακοί παράγοντες (Christakopoulos et al., 2003) ή αντιοξειδωτικά (Katapodis et al., 2003) και στην παραγωγή επιφανειοδραστικών ενώσεων (Matsumura et al., 1999). Η χρήση των ξυλανασών συνήθως είναι σε συνεργασία με άλλες υδρολάσες, πρωτεάσες, ισομεράσες, οξειδάσες κ.α.

**Πίνακας 1-8** Βασικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές των ξυλανασών

<b>Βιομηχανία</b>	<b>Εφαρμογή</b>	<b>Πηγή</b>
<b>Τρόφιμα</b>	<p><b>Χυμοί φρούτων και λαχανικών, κρασί:</b> βελτίωση στην εξαγωγή αρωματικών ουσιών, διήθηση και διαύγαση, μείωση του ιξώδους, καλύτερη τελική ποιότητα προϊόντος.</p> <p><b>Λάδι:</b> βελτίωση στην εξαγωγή καλαμποκέλαιου ή ελαιόλαδου.</p> <p><b>Αρτοποιία:</b> βελτίωση στην ελαστικότητα και αντοχή της ζύμης, επιτρέποντας καλύτερο χειρισμό, μεγαλύτερες ποσότητες και καλύτερη υφή προϊόντος.</p>	(Bhat, 2000, Haros et al., 2002, Jiang et al., 2005, Polizeli et al., 2005, Zheng et al., 2011)
<b>Ζωοτροφές</b>	Μείωση των περιεχομένων μη αμυλούχων πολυσακχαριτών με αποτέλεσμα το μειωμένο ιξώδες των τροφών στο έντερο και την καλύτερη αξιοποίηση των πρωτεϊνών και του αμύλου. Επίσης, βελτιώνει τις επιδόσεις των ζώων, αυξάνοντας τη θρεπτική αξία τροφών με δύσκολη διάσπαση όπως το κριθάρι.	(Bhat, 2000, Mathlouthi et al., 2002, Mathlouthi et al., 2003a, Mathlouthi et al., 2003β)
<b>Βιομηχανία χαρτιού και χαρτοπολτού</b>	<p><b>Βιολεύκανση:</b> μείωση της χρήσης χλωρίου καθώς και των τοξικών παραπροϊόντων.</p> <p><b>Μηχανική πολτοποίηση:</b> μείωση της χρήσης μηχανικών μεθόδων με υψηλή ενεργειακά απαίτηση.</p> <p><b>Βιο-επεξεργασία ινών:</b> βελτίωση στη δημιουργία ανθεκτικών ινών, αποδοτικότερη διαδικασία.</p> <p><b>Βιο-αφαίρεση μελανιού:</b> περιορισμός της αλκαλικής αφαίρεσης.</p> <p>Χρήση ξυλανάσης, απουσία κυτταρινάσης, καθώς η τελευταία οδηγεί στην υδρόλυση της κυτταρίνης, επιθυμητού προϊόντος ανάκτησης.</p>	(Viikari et al., 1994, Bhat, 2000, Pala et al., 2004)
<b>Υφαντουργία</b>	Ενζυμική αφαίρεση κεριών και αμύλου (κόλλα), βελτίωση απορροφητικότητας του υφάσματος και ζωηρότητας στα χρώματα.	(Csiszár et al., 2006, Dhiman et al., 2008β)
<b>Διάφορες εφαρμογές</b>	<p><b>Ενζυμική παραγωγή τεχνητών γλυκαντικών ουσιών:</b> παραγωγή ξυλιτόλης (γλυκαντικό χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη)</p> <p><b>Βιοδιεργασίες:</b> σακχαροποίηση αγροτικών, αστικών ή βιομηχανικών παραπροϊόντων και αξιοποίηση τους για την παραγωγή βιοκαυσίμων.</p>	(Polizeli et al., 2005, Tabka et al., 2006, Cavka et al., 2011, Juodeikiene et al., 2011)

## 1.9 ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ

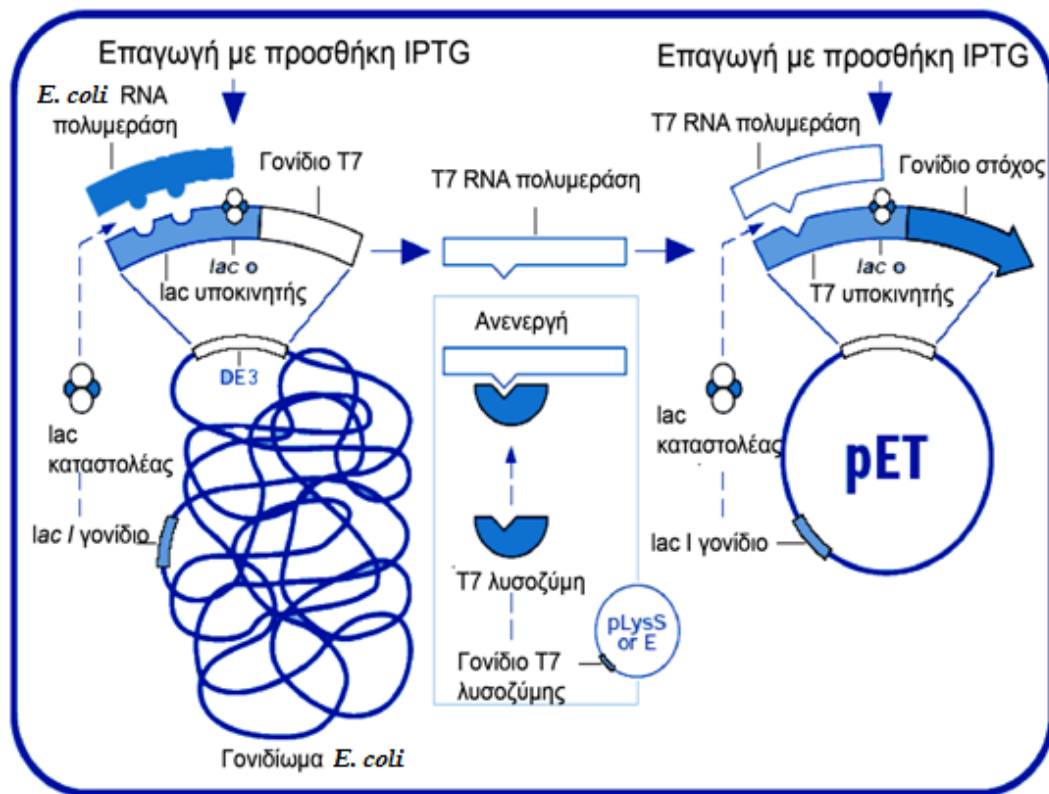
### 1.9.1 ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ T7

Οι πλασμιδιακοί φορείς pET δημιουργήθηκαν με στόχο την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων σε κύτταρα *Escherichia coli* υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή της RNA πολυμεράσης του φάγου T7 (Studier and Moffatt, 1986, Rosenberg et al., 1987). Η πολυμεράση αυτή, αποτελείται από μία υπομονάδα η οποία διαθέτει πολύ μεγάλη εξειδίκευση παρά το πολύ μικρό της μέγεθος (23 ζ.β.). Η δράση της είναι ταχεία και ταυτόχρονα αποτελεσματική και δεν απαιτεί επιπρόσθετους μεταγραφικούς παράγοντες στον ξενιστή.

Η RNA πολυμεράση της *Escherichia coli* δε διαθέτει ικανότητα αναγνώρισης του T7 υποκινητή, συνεπώς, απουσία της T7 RNA πολυμεράσης δε μεταγράφεται το γονίδιο-στόχος και αποσυνδέεται η διαδικασία κλωνοποίησης με τη διαδικασία έκφρασης. Αρχικά τα γονίδια – στόχοι κλωνοποιούνται σε κύτταρα ξενιστές που δε διαθέτουν την πολυμεράση του T7 φάγου με αποτέλεσμα να παραμένουν μεταγραφικώς ανενεργά. Με τον τρόπο αυτό, εξαιρείται η αστάθεια των πλασμιδίων εξαιτίας ενδεχόμενης παραγωγής τοξικών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια τα πλασμίδια μεταφέρονται σε κύτταρα έκφρασης τα οποία διαθέτουν στο χρωμόσωμά τους το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης. Οι ξενιστές αυτοί έχουν ενσωματώσει στο βακτηριακό χρωμόσωμα το γονιδίωμα του φάγου DE3 (λυσιγονικός κύκλος), το οποίο περιλαμβάνει μεταξύ άλλων το γονίδιο *lacI* (lac καταστολέας) και το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης, υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lacUV5*. Η επαγωγή της μεταγραφής της T7 RNA πολυμεράσης γίνεται με την προσθήκη IPTG (Iso-propyl-thio-galactoside), ουσία η οποία εμφανίζει δομικές ομοιότητες με τη γαλακτόζη, αλλά δεν καταβολίζεται εξασφαλίζοντας έτσι συνεχή επαγωγή. Το IPTG δεσμεύεται με την πρωτεΐνη καταστολέα που κωδικοποιείται από το γονίδιο *lacI* και εμποδίζει την αλληλεπίδρασή της με τον υποκινητή *lacUV5*, επιτρέποντας τη μεταγραφή του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης. Η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας IPTG (καθώς σε αυξημένες συγκεντρώσεις η ουσία αυτή εμφανίζεται τοξική για τα κύτταρα) σε αυξανόμενη καλλιέργεια επάγει την παραγωγή T7 RNA πολυμεράσης, η οποία μεταγράφει το γονίδιο στόχο που βρίσκεται στο πλασμίδιο pET (Εικόνα 1-15). Οι πλασμιδιακοί φορείς pET εμφανίζονται σε μεγάλη ποικιλία η οποία περιλαμβάνει:

1. Τον υποκινητή T7 (ορισμένοι διαθέτουν τον T7 lac που περιέχει την αλληλουχία lac χειριστή)
2. Τις ακολουθίες οδηγούς (fusion tags-αλληλουχίες οι οποίες εκφράζονται μαζί με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη διευκολύνοντας τον καθαρισμό της)
3. Τα σήματα έκφρασης
4. Τις θέσεις όπου «κόβουν» οι διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες
5. Τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Επίσης υπάρχουν οι μεταφραστικοί φορείς οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί για την έκφραση γονιδίων – στόχων που περιέχουν κωδικόνιο έναρξης και θέση πρόσδεσης στο προκαρυωτικό ριβόσωμα, και οι μεταγραφικοί φορείς οι οποίοι περιέχουν τη θέση πρόσδεσης στο ριβόσωμα της βασικής πρωτεΐνης του καψιδίου του T7 φάγου. Οι δύο κατηγορίες διαφοροποιούνται στην ονομασία, καθότι οι μεταγραφικοί φορείς περιέχουν μία κατάληξη ενός γράμματος έπειτα από το όνομα τους π.χ. pET-21a(+). Το γράμμα αυτό, υποδεικνύει το πλαίσιο ανάγνωσης σχετικά με τη θέση αναγνώρισης της *Bam*H I (GGATCC). Οι φορείς με το γράμμα “a” εκφράζουν από την τριπλέτα GGA, με το γράμμα “b” από την τριπλέτα GAT και με το γράμμα “c” από την τριπλέτα ATC στην θέση αναγνώρισης της *Bam*H I. Οι φορείς με το γράμμα “d” ακολουθούν το ίδιο πρότυπο τους “c” αλλά αντί για θέση αναγνώρισης από την *Nco*I διαθέτουν θέση αναγνώρισης από την *Nde*I. Η επιλογή του κατάλληλου φορέα pET απαιτεί να ληφθούν υπ’ όψιν αρκετοί παράγοντες όπως: η εφαρμογή για την οποία προορίζεται η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, οι πληροφορίες που είναι γνωστές για τα χαρακτηριστικά της καθώς και η στρατηγική κλωνοποίησης.



Εικόνα 1-15 Το σύστημα γονιδιακής υπερέκφρασης T7.

Όσον αφορά στα κύτταρα ξενιστές των pET φορέων κλωνοποίησης, υπάρχει η δυνατότητα επιλογής ανάλογα με τη βασική μεταγραφική ενεργότητά τους (δηλαδή το επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου - στόχου απουσία επαγωγέα). Υπάρχουν τα κύτταρα με ενσωματωμένο το φάγο λDE3, όπου το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης ελέγχεται από τον υποκινητή lacUV5. Σε αυτά παρατηρείται χαμηλός ρυθμός μεταγραφής του γονιδίου - στόχου ακόμα και απουσία επαγωγής, γεγονός που μπορεί να αποσταθεροποιήσει ανασυνδυασμένα πλασμίδια με βλαβερά για το κύτταρο προϊόντα. Για πιο αυστηρό έλεγχο, υπάρχουν τα κύτταρα με πλασμίδια pLysS και pLysE. Τα κύτταρα αυτά φέρουν το πλασμίδιο pLys το οποίο κωδικοποιεί την T7 λυσοζύμη, φυσικό αναστολέα της T7 RNA πολυμεράσης, εμποδίζοντας τη μεταγραφή του γονιδίου - στόχου απουσία επαγωγής. Τα κύτταρα με πλασμίδια pLysS παράγουν μικρή ποσότητα T7 λυσοζύμης ενώ τα κύτταρα με πλασμίδια pLysE παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα.

Συνοψίζοντας, οι πιο κρίσιμοι παράγοντες κατά την προσπάθεια έκφρασης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτήρια ξενιστές είναι οι ακόλουθοι: η επιλογή κατάλληλης ακολουθίας - οδηγού που θα βοηθήσει στον μετέπειτα καθαρισμό του μορίου, το μέγεθος και η πηγή της ετερόλογης πρωτεΐνης (μέγεθος >100 kDa καθώς και υδρόφοβες πρωτεΐνες εμφανίζουν δυσκολίες), η επιλογή του κατάλληλου βακτηρίου ξενιστή, η αποφυγή καταστροφής της πρωτεΐνης από ενδογενείς πρωτεάσες, ο εντοπισμός του μορίου στο διαλυτό ή στο αδιάλυτο κυτταρικό κλάσμα, η αποφυγή αλληλεπιδράσεων με τα λοιπά συστατικά του κυττάρου καθώς και οι συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας. Όσον αφορά στο τελευταίο, απαιτείται βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας, του αερισμού, του θρεπτικού υποστρώματος ανάπτυξης, της διάρκειας επώασης καθώς και των επαγωγικών, για τη γονιδιακή έκφραση, συνθηκών (συγκέντρωση IPTG) της καλλιέργειας.

---

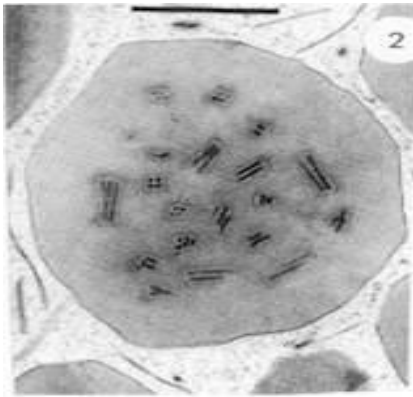
### 1.9.2 ΒΑΚΥΛΟΪΟΙ (*BACULOVIRIDAE*)

---

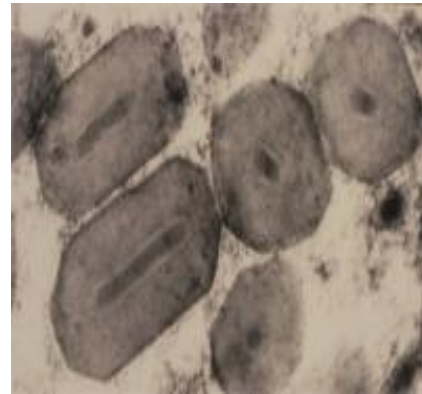
Τα μέλη της οικογένειας *Baculoviridae* συνιστούν ευρέως διαδεδομένη κατηγορία DNA ιών, με εξειδίκευση στη μόλυνση αρθροπόδων και η αρχική τους ταξινόμηση περιελάμβανε 2 μεγάλα γένη: το γένος *Granulovirus* (GVs) και το γένος *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) (Herniou et al., 2004).

Τα τελευταία χρόνια, με κριτήριο τα νέα φυλογενετικά δεδομένα, καθώς και τα βιολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των ιών κρίθηκε αναγκαία η επαναταξινόμησή τους σε 4 γένη (Jehle et al., 2006): ***Alphabaculovirus***, ***Betabaculovirus***, ***Gammabaculovirus*** και ***Deltabaculovirus***.





**Εικόνα 1-17** Εμφάνιση ιών του γένους *Nucleopolyhedrovirus* με πολλαπλά νουκλεοκαψίδια (multiple-nucleopolyhedroviruses, MNPVs)

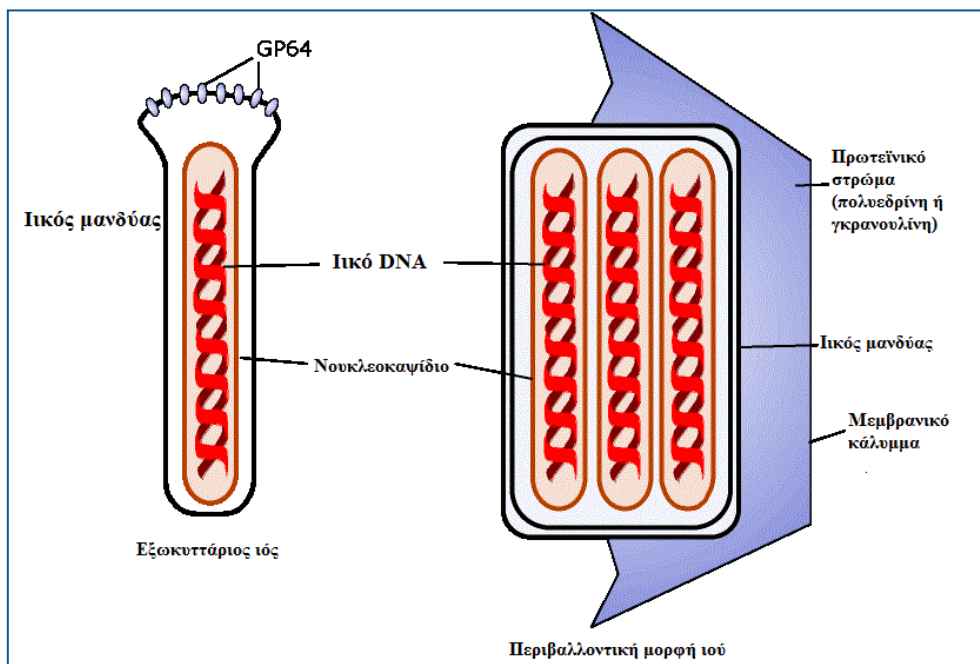


**Εικόνα 1-16** Εμφάνιση ιών του γένους *Granulovirus* (GVs)

Οι βακυλοϊοί περιέχουν ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA του οποίου το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ 80-180.000 ζευγών βάσεων. Η πρώτη ολοκληρωμένη αλληλούχηση γονιδιώματος βακυλοϊού πραγματοποιήθηκε το 1994 στο είδος *Autographa californica* και εμφάνισε 154 μη επικαλυπτόμενα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (Ayres et al., 1994). Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερα γονιδιώματα (53 έως το 2011) κατατίθενται στις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (Herniou et al., 2001, Herniou et al., 2003, Jehle et al., 2006, van Oers, 2011) περιέχοντας 120-160 μη επικαλυπτόμενα γονίδια.

Η δομή των βακυλοϊών περιλαμβάνει διακριτά ραβδόμορφα νουκλεοκαψίδια, ελικοειδούς συμμετρίας, διαμέτρου 30-60 nm και μήκους 250-300 nm. Το σωματίδιο του ιού αποτελείται από ένα ή περισσότερα νουκλεοκαψίδια εγκλεισμένα σε υπομονάδες γκρανουλίνης (κυλινδρικό πρωτεϊνικό στρώμα - GVs) ή πολυεδρικής (πολυεδρικό πρωτεϊνικό στρώμα - NPVs). Τα σωματίδια αυτά, παράγονται και παραμένουν στον πυρήνα του ξενιστικού κυττάρου έως τα τελικά στάδια της μόλυνσης όπου απελευθερώνονται στο περιβάλλον από το νεκρό σώμα του εντόμου (Rosas-Acosta et al., 2001). Ωστόσο, υπάρχει και η εξωκυττάρια μορφή (Budded virus, BV) του ιού που περιλαμβάνει μόνο νουκλεοκαψίδιο, καλυμμένο μόνο από μανδύα και είναι υπεύθυνη για τη μετάδοση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο εντός του ίδιου οργανισμού (Jehle et al., 2006).

Οι βακυλοϊοί εμφανίζουν διφασικό τύπο αντιγραφής (Εικόνα 1-19). Η μόλυνση ξεκινά από την κατάποση της περιβαλλοντικής μορφής του ιού από το έντομο. Το πρωτεϊνικό στρώμα των σωματιδίων υδρολύεται με τη βοήθεια βακτηριακών αλκαλόφιλων πρωτεασών που εντοπίζονται στο έντερο του εντόμου καθώς και με κάποιες ενδοπεπτιδάσες (μεταλλοπρωτεάσες) του ίδιου του ιού (Volkman and Summers, 1977). Τα νουκλεοκαψίδια διασχίζουν την περιτροφική μεμβράνη του εντόμου και ακολουθεί η προσρόφηση του ιικού μανδύα στην πλασματική μεμβράνη των ξενιστικών κυττάρων (Rohrmann, 2011).

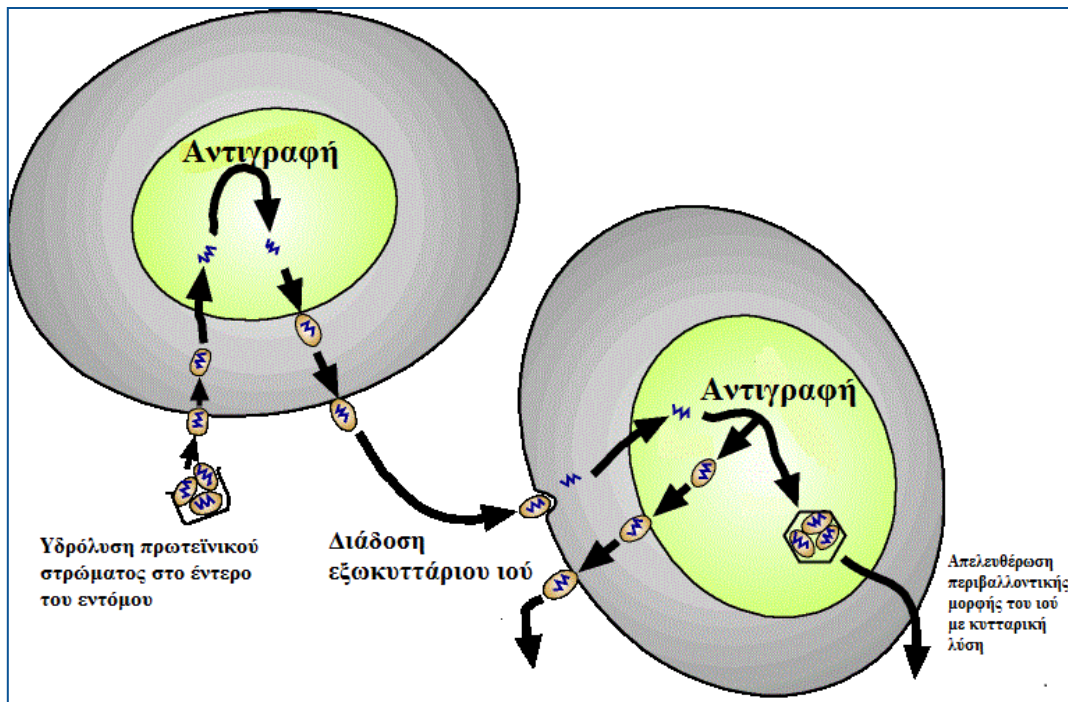


**Εικόνα 1-18** Εμφάνιση της εξωκυττάριας (Budded virus) καθώς και της περιβαλλοντικής μορφής του ιού (Derived virus).

Έπειτα από την είσοδο του ιού στα επιθηλιακά κύτταρα, τα νουκλεοκαψίδια μεταφέρονται στον πυρήνα (διαμέσου των πυρηνικών πόρων) με μία διαδικασία που περιλαμβάνει τον πολυμερισμό της κυτταρικής ακτίνης (Ohkawa et al., 2010). Εκεί απελευθερώνεται το ιικό DNA, το οποίο έπειτα από τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης p6.9, ξετυλίγεται, επιτρέποντας την αντιγραφή και μεταγραφή του. Για τα MNPVs έχει αναφερθεί ότι μπορεί άμεσα να διαπεράσουν τον πυρήνα, χωρίς να διαλυθούν, και ακολούθως να εξέλθουν από το κύτταρο, μολύνοντας γειτονικά κύτταρα, σε μία προσπάθεια ταχείας μετάδοσης του ιού. Όταν τα νουκλεοκαψίδια συγκροτηθούν μέσα στον πυρήνα, εξέρχονται από αυτόν, παρασέρνοντας τμήμα της πυρηνικής μεμβράνης μαζί τους. Η μεμβράνη αυτή φαίνεται πως χάνεται στο κυτταρόπλασμα (Granados and Lawler, 1981) και μία νέα (μανδύας) περιβάλλει το νουκλεοκαψίδιο κατά την έξοδό του από την πλασματική μεμβράνη.

Στην **πρώτη φάση**, η κυρίαρχη μορφή του ιού είναι τα BVs τα οποία είναι υπεύθυνα για την εξάπλωση του ιού μέσα στο έντομο ξενιστή, πιθανώς μέσω της αιμολέμφου (Trudeau et al., 2001). Κατά την εξωκύτωση των σωματιδίων, στην κυτταρική μεμβράνη υπάρχει η γλυκοπρωτεΐνη gp64, η παρουσία της οποίας είναι σημαντική τόσο για την εκβλάστηση των ιών όσο και για τη δευτερογενή μόλυνση (Monisma et al., 1996, Oomens and Blissard, 1999).

Κατά τη **δεύτερη φάση** της μόλυνσης (έπειτα από τη μόλυνση των γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων από τα BVs), η οποία εντοπίζεται αυστηρά μέσα στον πυρήνα, εγκλείονται τα νουκλεοκαψίδια σε πρωτεϊνικό στρώμα. Στον μανδύα των σωματιδίων αυτών απουσιάζει η πρωτεΐνη gp64, ενώ χαρακτηριστική είναι η υπερέκφραση της πολυεδρίνης, η οποία διογκώνει τον πυρήνα του κυττάρου (Braunagel and Summers, 2007).



**Εικόνα 1-19** Διφασικός τύπος αντιγραφής των βακυλοϊών

Τα πρώτα γονίδια (**immediate early genes**) που μεταγράφονται (από την RNA πολυμεράση του ξενιστή) κατά τη διάρκεια του διπλασιασμού των βακυλοϊών, δεν απαιτούν την ύπαρξη ειδικών μεταγραφικών παραγόντων και είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης του ιού. Τα αμέσως επόμενα γονίδια (**early genes**) είναι υπεύθυνα για την αντιγραφή του ιού καθώς και για τον χειρισμό του ξενιστή (Blissard and Rohrmann, 1991). Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η DNA πολυμεράση του ιού, ένα ένζυμο παρόμοιο της DNA δεσμάσης, καθώς και γονίδια που αποτρέπουν την απόπτωση του κυττάρου ξενιστή. Η μεταγραφή των γονιδίων αυτών ολοκληρώνεται περίπου 6 ώρες μετά τη μόλυνση, και ακολουθεί η μεταγραφή της επόμενης κατηγορίας γονιδίων (**late genes**). Στο στάδιο αυτό σταματά ο μεταγραφικός και μεταφραστικός μηχανισμός του κυττάρου ξενιστή και ξεκινά η αντιγραφή του DNA του ιού. Επίσης, η μεταγραφή πραγματοποιείται από την RNA πολυμεράση του ιού (Guarino et al., 1998, Nobiron et al., 2003), η οποία αναγνωρίζει την αλληλουχία TAAG ως υποκινητή. Η χρονική ολοκλήρωση του σταδίου οριοθετείται στις 24 περίπου ώρες καταλήγοντας στον σχηματισμό της εξωκυττάριας μορφής του ιού (BVs).

Τα τελευταία γονίδια που μεταγράφονται (**very late genes**) οδηγούν στην υπερέκφραση (ξεπερνώντας το 50% της συνολικής κυτταρικής πρωτεΐνης) της πολυεδρίνης ή γκρανουλίνης καθώς και στην πρωτεΐνη p10 (Patmanidi et al., 2003, Carpentier et al., 2008). Τα νουκλεοκασιδίδια μέσα στον πυρήνα εγκλείονται σε πρωτεϊνικό στρώμα και η απελευθέρωσή τους πραγματοποιείται με την υγροποίηση του εντόμου (σήψη), η οποία συντελείται με τη βοήθεια μίας πρωτεάσης (καθεψίνη) και μίας χιτινάσης του ίδιου του ιού. Μολυσμένα κύτταρα από ιούς, στους οποίους είχαν απενεργοποιηθεί τα αντίστοιχα γονίδια για την υδρόλυση του σώματος της προνύμφης, παρέμειναν άθικτα, ακόμα και μετά την παρέλευση ημερών από τη στιγμή της μόλυνσης (Hawtin et al., 1997). Οι βασικές πρωτεΐνες που μετέχουν στη διαδικασία της εισόδου και αντιγραφής των βακυλοϊών περιγράφονται εν συντομία στον Πίνακα 1-9.

Κατά τα τελικά στάδια μόλυνσης του ιού παρατηρείται υψηλός μεταγραφικός ρυθμός συγκεκριμένων γονιδίων του ικού γονιδιώματος, γεγονός που οφείλεται σε 5 παράγοντες:

1. Η διφασική αντιγραφή των βακυλοϊών επιτρέπει την εκμετάλλευση της βιοσυνθετικής ικανότητας όλων των συστημάτων του εντόμου.
2. Η απενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων του ξενιστικού κυττάρου και η επιλεκτική μεταγραφή των γονιδίων του ιού κατά τη διάρκεια της μόλυνσης απελευθερώνουν την RNA πολυμεράση.
3. Η υψηλή συγκέντρωση ικού γενετικού υλικού σε μη πακεταρισμένη μορφή στον πυρήνα του κυττάρου αποτελεί μήτρα πολλαπλών γονιδιακών αντιγράφων.
4. Η παραμονή ποσότητας γενετικού υλικού στον πυρήνα μέχρι τα τελικά στάδια αντιγραφής. Το παραπάνω DNA δεν θα εγκλειστεί ουδέποτε σε νουκλεοκασιδίδιο και ο ρόλος του περιορίζεται στη διάθεση πολλών γονιδιακών αντιγράφων στην RNA πολυμεράση (Vanarsdall et al., 2006).
5. Η ενεργοποίηση των γονιδίων της τελικής φάσης και η υψηλή μεταγραφική τους ικανότητα σχετίζεται με την εξειδίκευση της RNA πολυμεράσης με τους αντίστοιχους υποκινητές και την παρουσία ποικιλίας μεταγραφικών παραγόντων (Merrington et al., 1996, Yang and Miller, 1999).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το βιοσυνθετικό δυναμικό των βακυλοϊών προέρχεται από το σταυροδρόμι της μόλυνσης και της ανάπτυξης του ξενιστικού κυττάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκμετάλλευση όλου του μακρομοριακού και ενεργειακού εργοστασίου του κυττάρου προς όφελος του ιού. Η δυνατότητα αναπαραγωγής των συνθηκών αυτών στο εργαστήριο κατέστη δυνατή έπειτα από την απομόνωση και καλλιέργεια κυτταρικών σειρών εντόμων που επιτρέπουν τη μόλυνση από τους ιούς αυτούς. Η ποικιλία σειρών με διαφορετικά χαρακτηριστικά και η αριστοποίηση των συνθηκών αύξησής τους, οδήγησαν στην αξιοποίηση της μέγιστης συνθετικής ικανότητας των ιών.

**Πίνακας 1-9** Βασικές πρωτεΐνες βακυλοϊών.

<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Λειτουργία</b>
<b>Πολυεδρίνη (NPVs) ή Γκρανουλίνη (GVs)</b>	Υπερεκφρασμένη και υψηλά συντηρημένη δομική πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στη συγκρότηση της περιβαλλοντικής μορφής του ιού, επιτρέποντας την επιβίωση του στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα (Perera et al., 2006, Ji et al., 2010).
<b>GP64</b>	Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνη – υποδοχέα που εντοπίζεται στον ικό μανδύα της εκβλαστημένης μορφής (BVs). Ενεργοποιείται σε χαμηλό pH και είναι υπεύθυνη για την εξειδικευμένη πρόσδεση του ιού στο κύτταρο ξενιστή (Hefferon et al., 1999, Zhou and Blissard, 2008, Wu and Wang, 2012).
<b>EGT</b>	Ένζυμο το οποίο εκκρίνεται στην αιμολέμφο, καταλύοντας τη γλυκοζυλίωση των εκδυστεροειδών (ορμόνες που οδηγούν το έντομο στο θάνατο), επιτρέποντας τα μολυσμένα έντομα να συνεχίζουν να σιτίζονται και να μεγαλώνουν, παράγοντας τεράστιες ποσότητες εξωκυττάρια ιών. (Macedo Rodrigues et al., 2001, Tumilasci et al., 2003, Si et al., 2007)
<b>P35 IAP-1, -2, -3, -4</b>	Το γονίδιο p53 κωδικοποιεί μία ευρέως διαδεδομένη πρωτεΐνη η οποία αναστέλει τις κασπάσες, αναβάλλοντας τον κυτταρικό θάνατο στο έντομο έπειτα από τη μόλυνση. Αντι-αποπτωτικό ρόλο έχουν και οι IAP (inhibitors of apoptosis) συνιστώντας ένα σύνολο εξελικτικά συντηρημένων πρωτεϊνών που ελέγχουν τον κυτταρικό θάνατο από τις ζύμες έως τα θηλαστικά (Miller, 1997, Robertson et al., 1997, Sahdev et al., 2010, Yu, 2010).
<b>DNA πολυμεράση</b>	Οι περισσότεροι ιοί που μολύνουν ζωικά κύτταρα φέρουν τις δικές τους DNA πολυμεράσες. Οι πολυμεράσες των βακυλοϊών εμφανίζουν δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης καθώς και επιδιορθωτικές ικανότητες (Hang and Guarino, 1999, McDougal and Guarino, 1999).
<b>IE-0, -1, -2, PE38</b>	Πρωτεΐνες που ελέγχουν την αλυσίδα μεταγραφής των γονιδίων του ιού και παράγονται κατά τα πρώτα στάδια μόλυνσης (Prikhod'ko et al., 1999, Prikhod'ko and Miller, 1999, Olson et al., 2002, Schultz et al., 2009).
<b>LEFs (Late expression factors - το λιγότερο 18)</b>	Οι πρωτεΐνες της κατηγορίας αυτής συνιστούν βασικά συστατικά για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Η πρωτεΐνη LEF1 δρα ως DNA πριμάση και συνιστά μαζί με τη LEF2 απαραίτητα στοιχεία για την αντιγραφή του DNA (Mikhailov and Rohrmann, 2002). Επίσης, απαραίτητη θεωρείται η LEF3 η οποία ζετυλίγει τη δίκλωνη έλικα του ιικού DNA και στη συνέχεια προσδέεται συμπληρωματικά, αντιδρώντας με ποικιλία άλλων ενζύμων όπως η ελικάση ή μία αλκαλική νουκλεάση (Mikhailov et al., 2005, Yu and Carstens, 2010). Οι LEF4, 6 και 9 βοηθούν στη συγκρότηση της RNA πολυμεράσης του ιού κατά τα τελικά στάδια της μεταγραφής (Guarino et al., 1998).
<b>P6.9</b>	Η πρωτεΐνη P6.9 εμφανίζει ομοιότητες με τις πρωταμίνες, οι οποίες βοηθούν στη συμπύκνωση του DNA στο σπέρμα ψαριών, πτηνών και θηλαστικών. Η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της προσδέεται με ένα μη εξειδικευμένο πρότυπο στο DNA, και βοηθά στην οργάνωσή του. Η φωσφορυλίωσή της, έπειτα από την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή οδηγεί, στο ζετύλιγμα του γενετικού υλικού (Wang et al., 2010).
<b>Ουβικουΐτινη</b>	Ο βασικός ρόλος της περιλαμβάνει τον έλεγχο του μηχανισμού πρωτεόλυσης (μεγάλη ομοιότητα με τις αντίστοιχες ευκαρυωτικές) (Blankenship et al., 2009).
<b>P10</b>	Πολυπεπτίδιο που εκφράζεται στα τελικά στάδια της μεταγραφής μαζί με την πολυεδρίνη ή τη γκρανουλίνη (van Oers et al., 1994, Patmanidi et al., 2003, Carpentier et al., 2008).
<b>Χιτινάση και Καθεψίνη</b>	Τα υδρολυτικά αυτά ένζυμα είναι υπεύθυνα για την καταστροφή του μολυσμένου σώματος του εντόμου και την απελευθέρωση των ικών σωματιδίων. Η χιτινάση, αρχικά βοηθά την είσοδο του ιού μέσω της περιτροφικής μεμβράνης στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και αργότερα μαζί με την καθεψίνη υδρολύουν τον εξωσκελετό του εντόμου οδηγώντας στην υγροποίηση του. Η χιτινάση φαίνεται να εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου ξενιστή και η παραμονή της εκεί δίνει χρόνο για τον πολλαπλασιασμό του ιού (Thomas et al., 1998).

### 1.9.2.1 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ – ΣΥΣΤΗΜΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS SYSTEM – BEVS)

---

Οι βακυλοϊοί αρχικά χρησιμοποιήθηκαν ως φυσικοί παράγοντες ελέγχου των εντόμων, γεγονός που εμφάνιζε μειονεκτήματα εξαιτίας της μεγάλης εξειδίκευσής τους έναντι του ξενιστή και της χαμηλής ταχύτητας εξάπλωσης (μεγάλο προσδόκιμο ζωής του εντόμου) (Inceoglu et al., 2001, Szewczyk et al., 2006). Γενικά, είχαν χρησιμοποιηθεί 2 στρατηγικές χρήσης των εντομοκτόνων από βακυλοϊούς. Κατά την πρώτη, οι περιοχές ψεκάζονταν με εναιώρημα υψηλής συγκέντρωσης ιών για την άμεση καταπολέμηση των εντόμων, ενώ στη δεύτερη οι ψεκασμοί περιελάμβαναν χαμηλότερες συγκεντρώσεις ιών για να εξασφαλιστεί η εδραίωση και η παρουσία του ιού για περισσότερες από μία γενιές (Fuxa, 2004). Με στόχο την αύξηση της αποτελεσματικότητάς του ιού στην καταπολέμηση των εντόμων η γενετική τροποποίησή του ήταν το επόμενο βήμα. Δημιουργήθηκαν στελέχη τα οποία περιείχαν ξένα γονίδια υπό τον έλεγχο ισχυρών υποκινητών και τα οποία εμφάνιζαν καλή συμβατότητα με τα λοιπά εντομοκτόνα, ήταν φιλικά στο περιβάλλον και επέτρεπαν τη βιομηχανική παραγωγή (Inceoglu et al., 2001). Σήμερα ένας μεγάλος αριθμός (περισσότερα από 50) εντομοκτόνων με βακυλοϊούς κυκλοφορούν στην αγορά υπό διαφορετικές εμπορικές ονομασίες, ανάλογα με το κράτος που διατίθεται.

Η προσπάθεια δημιουργίας ενός γενετικά τροποποιημένου ιού, με σκοπό τη χρήση του ως αποτελεσματικό εντομοκτόνο, διαλεύκανε τον κύκλο ζωής και τη μοριακή βιολογία των βακυλοϊών και ανέδειξε την ικανότητά τους να χρησιμοποιηθούν ως φορείς έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών. Το είδος *Autographa californica* (AcMNPV) αποτελεί τον πιο διαδεδομένο φορέα. Ο σχεδιασμός του συστήματος υπερέκφρασης πρωτεϊνών με βακυλοϊούς βασίζεται στην εκμετάλλευση του ισχυρού υποκινητή του γονιδίου της πολυεδρίνης. Το γονίδιο αυτό, αν και στο φυσικό στέλεχος μεταγράφεται διαρκώς, δεν είναι απαραίτητο για την αντιγραφή του ιού (Smith et al., 1983). Έτσι λογικά επιλέχθηκε η αντικατάσταση του γονιδίου της πολυεδρίνης με το προς υπερέκφραση γονίδιο το οποίο θα βρισκόταν υπό την επίδραση του ισχυρού υποκινητή. Για το λόγο αυτό, οι ανασυνδυασμένοι ιοί εναλλακτικά καλούνται «αρνητικοί για πολυεδρίνη ιοί».

Το σύστημα υπερέκφρασης πρωτεϊνών σε κύτταρα εντόμου με τη χρήση ανασυνδυασμένων βακυλοϊών συνιστά μία πολλά υποσχόμενη και ευρέως διαδεδομένη επιλογή ανάμεσα στα ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης. Μερικά από τα πλεονεκτήματά του είναι τα παρακάτω:

- ✓ Ασφαλές σύστημα
- ✓ Δυνατότητα έκφρασης μεγάλων και σύνθετων γονιδίων
- ✓ Δυνατότητα χρήσης ποικιλίας υποκινητών με ενεργοποίηση σε διαφορετικά χρονικά σημεία στην πορεία της μόλυνσης
- ✓ Παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών σε πολύ υψηλά επίπεδα (έως 0,5 γραμμάρια ανά λίτρο καλλιέργειας)
- ✓ Οι πρωτεΐνες στις περισσότερες περιπτώσεις εκκρίνονται υπό πλήρη λειτουργικότητα

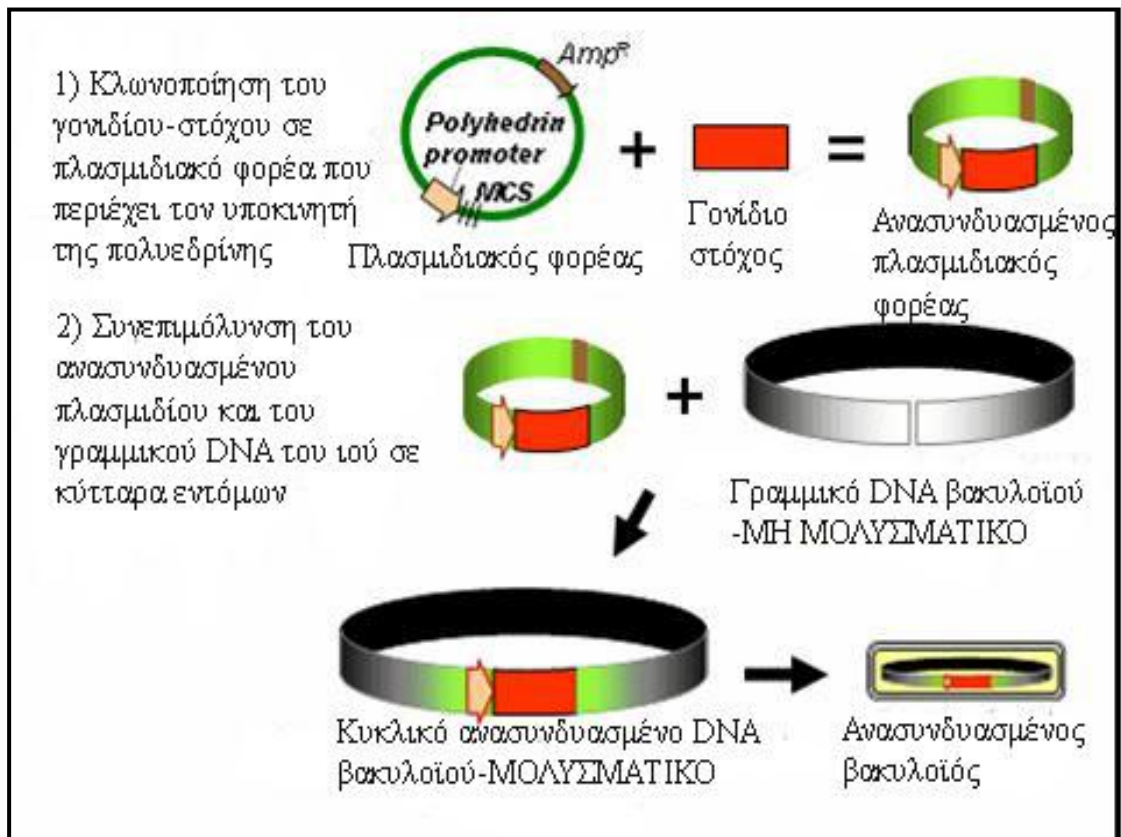
- ✓ Δυνατότητα μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων (αποκοπή πεπτιδίων, γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση, ακυλίωση)
- ✓ Περιορισμένος χρόνος εκτέλεσης
- ✓ Δυνατότητα καλλιέργειών μεγάλου μεγέθους
- ✓ Μικρότερο κόστος από άλλα συστήματα

Το γονιδίωμα των βακυλοϊών εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους του δεν επιτρέπει την απευθείας ενσωμάτωση του ετερόλογου γονιδίου. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται ένας πλασμιδιακός φορέας (π.χ. pOET) ο οποίος ανασυνδυάζεται ομόλογα με το γονιδίωμα του ιού και ενσωματώνει επιτυχώς το επιθυμητό γονίδιο. Οι ανασυνδυασμένοι ιοί είναι ικανοί να σχηματίζουν μόνο την εξωκυτταρική μορφή του ιού (BVs) κατά την αντιγραφή τους, καθότι απουσία της πολυεδρίνης δεν μπορούν να σχηματίσουν πρωτεϊνικό στρώμα.

Στα περισσότερα συστήματα βακυλοϊών που χρησιμοποιούν ομόλογο ανασυνδυασμό για τη μεταφορά του γονιδίου, ο πρώτος γύρος αντιγραφής καταλήγει σε ένα μείγμα φυσικών και ανασυνδυασμένων ιών. Συνεπώς, το επόμενο βήμα θα έπρεπε να είναι η διαλογή των ανασυνδυασμένων ιών με χρονοβόρες τεχνικές. Μία προσπάθεια επίλυσης του προβλήματος αυτού περιελάμβανε την εισαγωγή του γονιδίου της *Escherichia coli*, *lacZ* έπειτα από το επιθυμητό γονίδιο, με αποτέλεσμα η προσθήκη του X-gal στο θρεπτικό υπόστρωμα να οδηγεί σε πλάκες των ανασυνδυασμένων ιών χρώματος μπλε. Όμως, η χαμηλή ευαισθησία κατά τον ανασυνδυασμό και η επιμόλυνση της επιθυμητής πρωτεΐνης από τη β-γαλακτοζιδάση αποτέλεσαν ανασταλτικούς παράγοντες. Ακολούθησαν προσπάθειες οι οποίες περιελάμβαναν τον περιορισμό του ιικού γονιδιώματος με μία καινούρια ενδονουκλεάση (*Bsu36I*) και την ακόλουθη ευθυγράμμιση του. Κατά την πέψη αφαιρείται τμήμα του ORF 1629, γονίδιο βασικό για την αντιγραφή, το οποίο αντικαθίστανται μετά τον ανασυνδυασμό με τον πλασμιδιακό φορέα. Συνεπώς, μόνο οι ανασυνδυασμένοι ιοί είναι ικανοί να αντιγραφούν (Εικόνα 1-20).

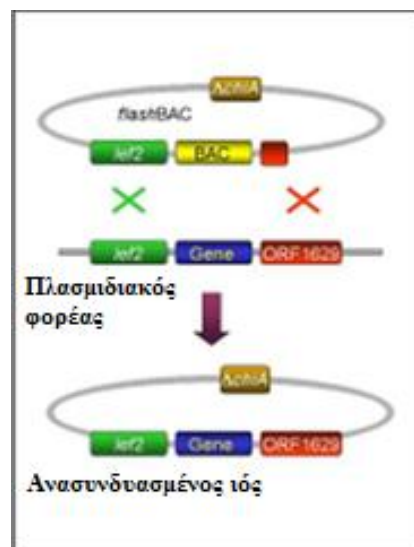
#### 1.9.2.2 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ *flashBAC*<sup>TM</sup>

Η τεχνολογία του συστήματος *flashBAC*<sup>TM</sup> (Patent applications EP1144666, WO0112829& AU6460800) περιλαμβάνει το γονιδίωμα AcMNPV στο οποίο έχει αφαιρεθεί τμήμα του βασικού, για την αντιγραφή, γονιδίου ORF 1629 και περιέχει ένα τεχνητό βακτηριακό χρωμόσωμα (BAC) στην περιοχή του γονιδίου της πολυεδρίνης (*flashBAC* DNA). Η απουσία του ORF 1629 αποτρέπει την αντιγραφή του ιού σε κύτταρα εντόμου και η παρουσία του BAC επιτρέπει την αντιγραφή του κυκλικού γονιδιώματος σε βακτηριακά κύτταρα.



Εικόνα 1-20 Πορεία δημιουργίας ανασυνδυασμένου ιού

Ο ανασυνδυασμένος ιός προκύπτει από τη συνεπιμόλυνση του πλασμιδίου με το επιθυμητό προς υπερέκφραση γονίδιο και του γραμμικού *flashBAC*<sup>TM</sup> DNA. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός οδηγεί στην αντικατάσταση του ORF 1629, με αποτέλεσμα την ανάκτηση της μολυσματικότητας του ιού, και στην αφαίρεση του BAC αφού στη θέση του ενσωματώνεται το επιθυμητό γονίδιο. Παράλληλα, στο σύστημα αυτό έχει αφαιρεθεί από το γονιδίωμα του ιού το γονίδιο *chiA*, προϊόν του οποίου αποτελεί μία χιτινάση που υποβοηθά την υγροποίηση του εντόμου στο τέλος της μόλυνσης. Η αφαίρεση αυτή οδηγεί στην αποφόρτιση του ενδοπλασματικού δικτύου και στην αυξημένη έκκριση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (Thomas et al., 1998, Saville et al., 2004). Συμπερασματικά, πρόκειται για σύστημα ενός βήματος, καθότι δεν επιβάλλει καθαρισμό των ανασυνδυασμένων ιών, με ευκολία στη χρήση, συμβατό με ποικιλία διαφορετικών πλασμιδιακών φορέων και αποτελεσματικό στα επίπεδα έκκρισης.



Εικόνα 1-21 Δημιουργία ανασυνδυασμένων ιών με το σύστημα *flashBAC*



## 1.10 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

---

Η ανάγκη για ανακάλυψη ενζύμων με βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμες ιδιότητες οδηγεί στην εξερεύνηση του φυσικού μικροβιακού πλούτου και την ακόλουθη εμπορική εκμετάλλευσή του. Η ανθεκτικότητα των πρωτεϊνικών μορίων σε ακραίες συνθήκες, όπως η αυξημένη θερμοκρασία ή οι ακραίες τιμές pH, αποτελεί τις περισσότερες φορές τον πιο κρίσιμο παράγοντα στην επιτυχία μιας τέτοιας εφαρμογής και οι θερμοφιλοί μικροοργανισμοί, εδώ και αρκετά χρόνια, αποτελούν την πιο σημαντική πηγή θερμοσταθερών και αποδοτικών βιοκαταλυτών. Με βάση τα παραπάνω οι στόχοι της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής μπορούν να συνοψιστούν στα ακόλουθα:

- Ομαδοποίηση και αξιολόγηση της ικανότητας παραγωγής λιπολυτικών, ξυλανολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζύμων των 101 θερμοφίλων βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν κατά τη Διδακτορική Διατριβή του Μείντάνη Χ. (2005). Η απομόνωση των μικροβιακών στελεχών πραγματοποιήθηκε από επιλεγμένες οικοθέσεις κατά την εποχιακή καταγραφή της προκαρυωτικής ποικιλότητας στο ηφαιστειακό σύμπλεγμα της Σαντορίνης.
- Σύγκριση και αξιολόγηση των μεθόδων ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού υδρολυτικών ενεργοτήτων στο υπό μελέτη σύνολο απομονωθέντων βακτηρίων.
- Επιλογή στελεχών με ταυτόχρονη ξυλανολυτική και κυτταρινολυτική δράση. Φαινοτυπικός και γενετικός χαρακτηρισμός των επιλεγμένων θερμοφίλων βακτηρίων και μελέτη της ενζυμικής βιοσύνθεσης και συμπαραγωγής σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας με στόχο τη βελτιστοποίηση της ενζυμικής παραγωγής (αριστοποίηση θρεπτικού υποστρώματος και παροχής αερισμού, ενζυμική τοπολογία). Μοριακός εντοπισμός των υπεύθυνων γονιδίων.
- Επιλογή θερμοφίλων στελεχών με υψηλή λιπολυτική ικανότητα και μελέτη της βιοσύνθεσης λιπασών σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Φαινοτυπικός και γενετικός χαρακτηρισμός των επιλεγμένων βακτηρίων. Μερικός ενζυμικός καθαρισμός και προσδιορισμός θερμοσταθερότητας και άριστου ζεύγους θερμοκρασίας – pH των υπό μελέτη λιπασών. Μοριακός εντοπισμός των υπεύθυνων γονιδίων.
- Επιλογή λιπάσης με αξιοποιήσιμα βιοτεχνολογικά χαρακτηριστικά (θερμική αντοχή, υψηλή θερμοκρασία δράσης και αλκαλοφιλία). Απομόνωση υπεύθυνου γονιδίου για την παραγωγή λιπάσης και ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του. Υπερέκφραση σε προκαρυωτικό και ευκαρυωτικό μεσόφιλο σύστημα και ακόλουθη αριστοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης.
- Ενζυμικός καθαρισμός της υπερεκφρασμένης λιπάσης με χρωματογραφικές τεχνικές. Πλήρης φυσικοχημικός και κινητικός χαρακτηρισμός του ενζύμου.

- Σύγκριση διαφορετικών συστημάτων πρωτεϊνικής έκφρασης καθώς και των ιδιοτήτων του φυσικού και ετερόλογα εκφρασμένου ενζύμου.
- Μελέτη της συνθετικής ικανότητας της υπερεκφρασμένης λιπάσης σε ιοντικά υγρά. Εφαρμογή σε αντιδράσεις εστεροποίησης φυσικού αντιοξειδωτικού.

---

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

---

Το πειραματικό μέρος της Διδακτορικής Διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τομέα Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο εξοπλισμός του εργαστηρίου, καθώς και τα αναγκαία υλικά.

Η καλλιέργεια κυτταρικής σειράς εντόμου (Sf9) και η παραγωγή ανασυνδυασμένου ιού με το σύστημα *flashBAC*<sup>TM</sup> εκτελέστηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, του καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Βοργιά.

Το πειραματικό μέρος της βιοκατάλυσης σε ιοντικά υγρά, ως εφαρμογή της υπερεκφρασμένης λιπάσης, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Αναπληρωτή Καθηγητή Χαράλαμπου Σταμάτη στο Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

---

### 2.2 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΥΛΙΚΟ

---

#### 2.2.1 ΘΕΡΜΟΦΙΛΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

---

Κατά την καταγραφή της μικροβιακής ποικιλότητας, σε επιλεγμένες οικοθέσεις του ηφαιστειακού συμπλέγματος της Σαντορίνης, απομονώθηκε ένας σημαντικός αριθμός μικροβιακών στελεχών (Μεϊντάνης, 2005). Τα στελέχη αυτά ταυτοποιήθηκαν, ομαδοποιήθηκαν και αποτελούν τράπεζα βακτηριακών στελεχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας (Τμήμα Βιολογίας – ΕΚΠΑ). Στην πλειοψηφία τους παρατηρήθηκε θερμοφιλή συμπεριφορά και φυλογενετική συγγένεια με τα γένη *Bacillus* και *Geobacillus* (Μεϊντάνης, 2005). Στην παρούσα πειραματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν και τα 103 θερμοφιλά βακτηριακά στελέχη της παραπάνω τράπεζας τα οποία συντηρήθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 30 % (w/v) και σε θερμοκρασία -20 °C, ως πηγές υδρολυτικών ενζύμων (λιπάσες, κυτταρινάσες και ξυλανάσες).

**Διάλυμα Γλυκερόλης 30% (w/v):** 30 g γλυκερόλης διαλυμένα σε αποστειρωμένο και απεσταγμένο H<sub>2</sub>O, τελικού όγκου 100 ml.

---

#### 2.2.2 ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ *E. coli*

---

Τα κύτταρα ξενιστές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα *E.coli* DH5a, BL21(DE3) και τα BL21(DE3)pLysS. Τα DE3 κύτταρα περιέχουν το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης υπό τον έλεγχο του *lacUV5* υποκινητή (φάγος λDE3). Επίσης τα παραπάνω στελέχη δεν παράγουν τις πρωτεάσες *Ion* και *ompT*, προστατεύοντας τις πρωτεΐνες που παράγονται από ανεπιθύμητη πρωτεολυτική πέψη. Τα κύτταρα pLysS περιέχουν ένα ενδογενές πλασμίδιο που κωδικοποιεί την T7

λυσοζύμη, φυσικό αναστολέα της T7 RNA πολυμεράσης. Με τον τρόπο αυτό περιορίζεται η έκφραση του γονιδίου-στόχου, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλους ξενιστές σε περιπτώσεις τοξικών γονιδίων. Τα επιδεκτικά κύτταρα DH5a προήλθαν από τη βιβλιοθήκη στελεχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας (ΕΚΠΑ) ενώ τα BL21(DE3) και τα BL21(DE3)pLysS (NOVAGEN, STRATAGENE) παραχωρήθηκαν από τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Κ. Βοργιά.

### 2.2.2.1 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. COLI*

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τα παρακάτω βήματα:

- Εμβολιασμός μιας αποικίας από το τρυβλίο LB-άγαρ σε 5 mL LB, με το κατάλληλο αντιβιοτικό.
- Μεταφορά 750  $\mu$ L της βακτηριακής καλλιέργειας σε 1,5 mL δοκιμαστικού σωλήνα και προσθήκη 750  $\mu$ L αποστειρωμένου διαλύματος 100 % (v/v) γλυκερόλης. Ζωηρή ανακίνηση, ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη διασπορά της γλυκερόλης.
- Ταχεία κατάψυξη σε υγρό άζωτο (-150 °C) και αποθήκευση στους -80 °C.

**Διάλυμα:** Θρεπτικό υπόστρωμα LB: 1% (w/v) τρυπτόνη, 0,5 % (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 170 mM NaCl

Αξίζει να αναφερθεί πως στα κύτταρα pLySs για τη σταθερότητα του ενδογενούς πλασμιδίου οι υγρές καλλιέργειες τους, εκτός του αντιβιοτικού, περιείχαν και χλωραμφενικόλη σε τελική συγκέντρωση 50  $\mu$ g/mL.

### 2.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα θερμοφιλά βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν τόσο σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα (τρυβλία Petri) όσο και σε υγρές καλλιέργειες (κωνικές φιάλες διαφορετικού ενεργού όγκου). Κυτταρικό εναιώρημα προκαθορισμένης συγκέντρωσης αποτελούσε το εμβόλιο τόσο στις υγρές όσο και στις στερεές καλλιέργειες. Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης των εμβολίων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ ) ή την εκτίμηση των βιώσιμων μονάδων ανά μονάδα όγκου (cfu/mL). Τα βασικά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το Θρεπτικό Άγαρ {Nutrient Agar – (Atlas, 1993)} και το Θρεπτικό υπόστρωμα για θερμοφίλους βακίλους {Thermophile *Bacillus* Medium – (Atlas, 1993)}. Η θερμοκρασία επώασης ήταν οι 60 °C.

Πίνακας 2-1 Θρεπτικό Άγαρ (Nutrient Agar)

Σύσταση ανά λίτρο	
Πεπτόνη	5 g
Εκχύλισμα κρέατος (μόσχου)	3 g
NaCl	8 g
Άγαρ	30 g

**Πίνακας 2-2** ATCC Θρεπτικό υπόστρωμα 1232 για θερμοφίλους βακίλους (Thermophile *Bacillus* Medium)

<b>Σύσταση ανά λίτρο</b>	
Πεπτόνη	8 g
Εκχύλισμα ζύμης	4 g
NaCl	3 g

## 2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΑΘΑΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

Η απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου των Haught et al. (Haught et al., 1994) και περιελάμβανε τα παρακάτω βήματα:

- Εμβολιασμός στερεής καλλιέργειας (θρεπτικό άγαρ) είτε από διάλυμα γλυκερόλης είτε από καθαρή βακτηριακή αποικία και επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία για 24 ώρες.
- Μεταφορά, μέσω αποστειρωμένου κρίκου, ποσότητας κυττάρων σε φυγοκεντρικούς σωλήνες που περιείχαν 500  $\mu$ L διαλύματος  $MgSO_4$  10 mM και φυγοκέντρωση σε 11000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Διατήρηση ιζήματος και προσθήκη διαλύματος λύσης. Ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 37 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα SDS 10 % (w/v) και το μίγμα επώαστηκε στους 65 °C για 20 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 15 °C.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρούς σωλήνες και προσθήκη διαλύματος οξικού καλίου 5 M με άμεση μεταφορά των σωλήνων σε πάγο. Παραμονή στο παγόλουτρο για 30 λεπτά και ακόλουθη φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C. Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρούς σωλήνες με ιδιαίτερη προσοχή.
- Προσθήκη ισοπροπανόλης (καταβύθιση DNA) για 30 λεπτά στους 21 °C και φυγοκέντρωση για 20 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C. Στο ίζημα προστέθηκε διάλυμα αιθανόλης 70 % (v/v) και μετά από φυγοκέντρωση για 5 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C, το ίζημα ξηράνθηκε και αναδιαλυτοποιήθηκε σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.
- Το DNA που απομονώθηκε, ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8 % (w/v) και παρατηρήθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία.

**Διάλυμα Λύσης:** 25 mM Tris, 25 mM EDTA, 10,3 % σακχαρόζη, 10 mg/mL λυσοζύμη (Η προσθήκη της λυσοζύμης πραγματοποιήθηκε λίγο πριν την έναρξη της διαδικασίας σε αποστειρωμένο διάλυμα λύσης).

---

## 2.4.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ DNA

---

**Διάλυμα ΤΑΕ (1x):** 0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA, pH 8,0. Το διάλυμα παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 50 φορές μεγαλύτερη (50x) από το διάλυμα εργασίας (1x) και φυλάχτηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκε λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με ανάλογη αραίωση του 50x πυκνού διαλύματος.

**Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου:** 10 mg/mL βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma) σε αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό. Το φιαλίδιο όπου φυλάχτηκε το διάλυμα διατηρήθηκε καλυμμένο με αλουμινόχαρτο σε θερμοκρασία δωματίου.

**Ρυθμιστικό διάλυμα Φόρτωσης:** 0,25 % (w/v) κυανού βρωμοφαινόλης (Sigma), 0,25 % (w/v) κυανολικό ξυλένιο (Sigma), 30 % (w/v) γλυκερόλη. Το διάλυμα φυλάχτηκε στους 4 °C.

---

## 2.5 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

---

---

### 2.5.1 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

---

Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών βασίζεται όχι μόνο στην παρατήρηση των μικροσκοπικών και μακροσκοπικών χαρακτηριστικών τους (μορφολογία) αλλά και σε βιοχημικές, φυσιολογικές και ορολογικές δοκιμές καθώς και στα μοριακά και γενετικά τους πρότυπα.

---

#### 2.5.1.1 ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ GRAM

---

Η δοκιμασία της χρώσης κατά Gram (Gerhardt, 1981) εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στις Σημειώσεις Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας (Καραγκούνη, 2001).

---

#### 2.5.1.2 ENZYMA ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ

---

Απαραίτητα ένζυμα για την αναγωγή του ατμοσφαιρικού οξυγόνου είναι η καταλάση και η οξειδάση. Η καταλάση, παράγεται από πολλά βακτήρια, και καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, απελευθερώνοντας οξυγόνο. Η παρουσία της δράσης του ενζύμου αυτού εκτιμήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στις Σημειώσεις Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας (Καραγκούνη, 2001).

Η ανίχνευση οξειδάσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εμπορικών ταινιών (Oxidase strips-FLUKA) και την εμφάνιση χρωματιστών προϊόντων οξειδωσης σε αυτές.

---

## 2.5.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

---

### 2.5.2.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rRNA

---

Η ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA μεταξύ των βάσεων 8 και 1510 (αρίθμηση κατά *E.coli*) πραγματοποιήθηκε κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τα μόρια εκκινητές (primers) pA και R1492 (Edwards et al., 1989, Lane, 1991). Η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης PCR περιελάμβανε τα παρακάτω: 40 ng γενωμικού DNA, ρυθμιστικό διάλυμα KaraTaq με  $Mg^{2+}$ , 1 Unit KaraTaq DNA πολυμεράση, 0,2 mM dNTPs, 0,4  $\mu$ M pA primer και 0,4  $\mu$ M R1492 primer.

Ένα αρχικό στάδιο 2 λεπτών στους 95 °C, ακολουθήθηκε από 30 κύκλους που περιελάμβαναν 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 53 °C, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 2 λεπτά στους 72 °C, όπου σχηματίστηκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολουθεί ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 2 λεπτά. Τελικά τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τα PCR προϊόντα διαχωρίστηκαν από τους εκκινητές και τα ελευθέρως νουκλεοτίδια με τη χρήση του Nukleosprin Kit (MN, Γερμανία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και χρησιμοποιήθηκαν απευθείας για ανάλυση αλληλουχίας ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com), Κορέα).

### 2.5.2.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ DNA

---

Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Macrogen Inc. (Κορέα). Η διαδικασία ταυτοποίησης της νουκλεοτιδικής ή αμινοξικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ηλεκτρονικού προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), (Altschul et al., 1990) το οποίο εντοπίζει τμήματα από τις διεθνείς τράπεζες δεδομένων, που παρουσιάζουν ομοιότητα με τμήματα της άγνωστης αλληλουχίας και διαθέτει τις παρακάτω εναλλακτικές δυνατότητες:

**BLAST p:** Συγκρίνει την αμινοξική ακολουθία με πρωτεϊνικά τμήματα, γνωστών πρωτεϊνών.

**BLAST n:** Συγκρίνει μια νουκλεοτιδική ακολουθία με γνωστές νουκλεοτιδικές ακολουθίες από διεθνείς τράπεζες δεδομένων.

**BLAST x:** Συγκρίνει μια νουκλεοτιδική ακολουθία, μεταφρασμένη σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης, με πρωτεϊνικά τμήματα γνωστών πρωτεϊνών.

**TBLAST n:** Συγκρίνει μια αμινοξική ακολουθία, με τις νουκλεοτιδικές ακολουθίες από διεθνείς τράπεζες δεδομένων, μεταφρασμένες σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης.

**TBLAST x:** Συγκρίνει μια νουκλεοτιδική ακολουθία, μεταφρασμένη σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης με μια επίσης μεταφρασμένη σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης, νουκλεοτιδική ακολουθία από διεθνείς τράπεζες δεδομένων.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση του προγράμματος BLAST περιλαμβάνουν τις ακολουθίες (νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές) που ανιχνεύονται στις διεθνές τράπεζες δεδομένων και παρουσιάζουν ομοιότητα με την άγνωστη αλληλουχία. Σε κάθε συστοιχία αναγράφεται η τιμή του αθροιστικού σκορ (high score) και της πιθανότητας λάθους (probability). Το αθροιστικό σκορ αποτελεί το βαθμό ομοιότητας των αμινοξέων που βρίσκονται απέναντι στη συστοιχία. Υποδηλώνει το πόσο συχνά συναντάτε ένα αμινοξύ απέναντι από ένα άλλο σε πραγματικές στοιχίσεις. Η πιθανότητα λάθους εκφράζει την πιθανότητα να είναι τυχαίο το αθροιστικό σκορ.

### 2.5.2.3 ANTIΔΡΑΣΗ BOX PCR

---

Με δεδομένο ότι οι BOX αλληλουχίες βρίσκονται διάσπαρτες στο προκαρυωτικό γονιδίωμα ως παλινδρομες επαναλήψεις, για την ενίσχυση των μεταξύ τους τμημάτων χρησιμοποιείται ένα μόνο εκκινητικό μόριο. Στον σχεδιασμό του (κωδικός BOXA1R) βοηθούν οι ήδη γνωστές αλληλουχίες BOX και η αλληλουχία του είναι η εξής:

5' - CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC C - 3' (Versalovic et al., 1994)

Η σύσταση του μείγματος της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση των τμημάτων μεταξύ των BOX αλληλουχιών του προκαρυωτικού γονιδιώματος ήταν η εξής : 40 ng γενωμικού DNA, 10 mM KCl, 10 mM Tris – HCl (pH 9), 0,1 % (w/v) Triton X-100, 1 Unit Taq DNA πολυμεράση (Hyttest, Φινλανδία), 0,2 mM dNTPs, 3,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 nM του εκκινητικού μορίου BOXA1R και 4 % (v/v) DMSO. Ένα αρχικό στάδιο 10 λεπτών στους 94 °C, ακολουθήθηκε από 35 κύκλους που περιλαμβάνουν 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, 1 λεπτό σε θερμοκρασία 53 °C, κατά το οποίο το εκκινητικό μόριο σχημάτισε δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 8 λεπτά στους 65 °C, όπου σχηματιστήκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 65 °C για 16 λεπτά. Τελικά τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν 50 V και η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ήταν 5 ώρες.

## 2.6 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ENZYMΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

---

### 2.6.1 ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ

---

Ο ποιοτικός προσδιορισμός παραγωγής κυτταρινασών και ξυλανασών, πραγματοποιήθηκε σε στερεά υποστρώματα με μοναδική πηγή άνθρακα καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη (Πίνακας 2-3, CMC agar medium) και ξυλάνη (Πίνακας 2-4, Xylan agar medium) αντίστοιχα. Ο εμβολιασμός του θρεπτικού υποστρώματος έγινε με κυτταρικό εναιώρημα συγκεκριμένης και προκαθορισμένης συγκέντρωσης. Η διάρκεια επώασης είναι 48 ώρες σε θερμοκρασία 60 °C.



Η ενδεχόμενη ενζυμική υδρόλυση των υποστρωμάτων (CMC και ξυλάνη) πιστοποιήθηκε ύστερα από χρώση των τρυβλίων με διάλυμα χρωστικής ερυθρό του Κονγκό (Congo Red) συγκέντρωσης 1 mg/mL. Η χρωστική αυτή αλληλεπιδρά με πολυσακχαρίτες που περιέχουν β-1,3 και β-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς και σχηματίζει σύμπλοκο χαρακτηριστικής ερυθρής απόχρωσης (Εικόνα 2-1). Τόσο η καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη (CMC) όσο και η ξυλάνη περιέχουν τέτοιους δεσμούς με αποτέλεσμα η ενζυμική τους υδρόλυση να καταστέλλει τη σύνδεση της χρωστικής με το υπόστρωμα και να παρατηρείται ζώνη αποχρωματισμού (Sharma et al., 1986).

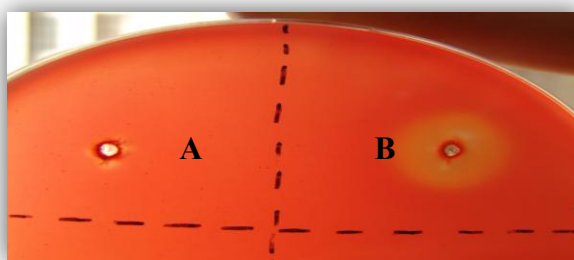
Ακολούθησε σύγκριση της ενζυμικής παραγωγής και έκκρισης μέσω μέτρησης της ακτίνας της ζώνης αποχρωματισμού που δημιουργήσε το κάθε στέλεχος, λαμβάνοντας υπόψη τη βιωσιμότητά του. Πρέπει να σημειωθεί πως λόγω της χρήσης καρβοξυ-μεθυλ-κυτταρίνης (η οποία είναι διαλυτή άμορφη κυτταρίνη) ήταν δυνατή η ανίχνευση της δράσης μόνο των ενδοκυτταρινασών.

**Πίνακας 2-3** Θρεπτικό υπόστρωμα καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνης

<b>Σύσταση ανά λίτρο (Kar et al., 2006)</b>	
Καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη (CMC)	5 g
NaNO <sub>3</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
KCl	1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
Εκχύλισμα μαγιάς	0,5 g
Άγαρ	30 g

**Πίνακας 2-4** Θρεπτικό υπόστρωμα ξυλάνης

<b>Σύσταση ανά λίτρο (Anuradha et al., 2007)</b>	
Ξυλάνη σημόδας	5 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
MgSO <sub>4</sub>	2 g
Εκχύλισμα μαγιάς	1 g
Άγαρ	30 g



**Εικόνα 2-1** Ποιοτικός προσδιορισμός ζυλανάσης έπειτα από χρώση με ερυθρό του Κονγκό A: απουσία ζώνης αποχρωματισμού B: Εμφάνιση ζώνης αποχρωματισμού - ένδειξη ενζυμικής υδρόλυσης ζυλάνης

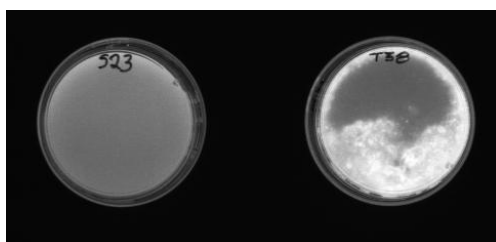
## 2.6.2 ΛΙΠΑΣΕΣ

Η αντίχνευση λιπολυτικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε τριγλυκερίδια ως μοναδική πηγή άνθρακα (ελαιόλαδο) καθώς και τη φθορίζουσα χρωστική Ροδαμίνη Β (Πίνακας 2-5). Ο εμβολιασμός του θρεπτικού υποστρώματος έγινε με κυτταρικό εναιώρημα συγκεκριμένης και προκαθορισμένης συγκέντρωσης και ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 60 °C. Η ενδεχόμενη υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, εξαιτίας της έκκρισης λιπάσης, προκαλεί την εμφάνιση πορτοκαλί φθορισμού, γύρω από τις αποικίες των βακτηρίων (αντίδραση λιπαρών οξέων με τη χρωστική), κατά την παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Kouker and Jaeger, 1987).

**Πίνακας 2-5** Θρεπτικό υπόστρωμα με Ροδαμίνη Β

### Σύσταση ανά λίτρο (Schmidt-Dannert et al., 1994)

Θρεπτικός ζωμός	13 g
Ελαιόλαδο	10 g
Ροδαμίνη Β	0,001 %
Άγαρ	30 g



**Εικόνα 2-2** Ποιοτικός προσδιορισμός λιπάσης. Εμφάνιση φθορισμού κατά την παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ένδειξη λιπολυτικής ενεργότητας του αντίστοιχου στελέχους.

## 2.7 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

### 2.7.1 ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ

#### 2.7.1.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΗΣ

Η εξωκυτταρική ενεργότητα ξυλανάσης και κυτταρινάσης εκτιμήθηκε έμμεσα προσδιορίζοντας την ποσότητα των παραγόμενων αναγωγικών σακχάρων με το 3,5 - δινιτροσαλικυλικό οξύ (Πίνακας 2-6, DNS). Αναλυτικότερα, συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος επώαστηκε (15 λεπτά σε θερμοκρασία 60 °C) με υπόστρωμα που περιείχε καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη 4 % (w/v) για την ανίχνευση της κυτταρινάσης και ξυλάνη 1 % (w/v) για την ανίχνευση της ξυλανάσης. Παρουσία ενζύμου, τα προϊόντα της αντίδρασης είναι αναγωγικά σάκχαρα, των οποίων τα αναγωγικά άκρα (ελεύθερα ημιακεταλικά υδροξύλια) αντιδρούν με το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ και παράγεται 3-άμινο5-νιτροσαλικυλικό οξύ. Το τελευταίο είναι ανιχνεύσιμο φωτομετρικά στα 500 nm. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στα 540 nm καθότι εξαιτίας των παράπλευρων αντιδράσεων και της φύσης του παραγόμενου σακχάρου το βέλτιστο μήκος κύματος απορρόφησης μπορεί να μεταβάλλεται ελαφρά (Miller, 1959).

Αναλυτικά η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε:

- Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  δείγματος σε 150  $\mu\text{L}$  υποστρώματος και επώαση 15 λεπτών στους 60 °C με ήπια ανάδευση.
- Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  αντιδραστήριου δινιτροσαλικυλικού οξέος (τερματισμός της ενζυμικής αντίδρασης).
- Ακολούθησε βρασμός διάρκειας 5 λεπτών και προσθήκη 1600  $\mu\text{L}$  απεσταγμένου νερού.
- Φωτομέτρηση στα 540 nm.
- Υπολογισμός της συγκέντρωσης των αναγόμενων σακχάρων μέσω πρότυπων καμπυλών αναφοράς για τα συγκεκριμένα σάκχαρα (γλυκόζη για τη κυτταρινάση και ξυλόζη για την ξυλανάση).

**Υπόστρωμα κυτταρινάσης:** 4 g καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνης σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$  (100 mM, pH 7)

**Υπόστρωμα ξυλανάσης:** 1 g ξυλάνης σημύδας σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$  (100 mM, pH 7)

**Πίνακας 2-6** Αντιδραστήριο Δινιτροσαλικυλικού οξέος

	Σύσταση ανά λίτρο
NaOH 2 M	200 mL
3,5 – δινιτροσαλικυλικό οξύ	10 g
Τρυγικό καλιονάτριο (60 % w/v)	500 mL

### 2.7.1.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ Β-ΓΛΥΚΟΖΙΔΑΣΗΣ

Η β-γλυκοζιδάση υδρολύει υδατοδιαλυτά ολιγομερή γλυκόζης (κυρίως κελλοβιόζη), τα οποία είναι ενωμένα με β-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς, προς γλυκόζη. Η εκτίμηση της ενεργότητας της, πραγματοποιήθηκε έμμεσα, ανιχνεύοντας την παραγόμενη γλυκόζη (προϊόν της αντίδρασης) με την μέθοδο οξειδάσης της γλυκόζης - υπεροξειδάσης (GOD-PAP). Αναλυτικότερα, το εξωκυτταρικό δείγμα επώαστηκε σε υπόστρωμα κελλοβιόζης 2 % (w/v) για 15 λεπτά στους 60 °C. Παρουσία ενζύμου, ακολουθεί παραγωγή γλυκόζης η οποία με την οξειδάση της γλυκόζης μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το τελευταίο, παρουσία της υπεροξειδάσης, αντιδρά με την αμινοφαιναζόνη και ένα φαινολικό παράγωγο δίνοντας προϊόν ερυθρού χρώματος που απορροφά στα 510 nm. Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τα εξής:

- Προσθήκη 50 μL δείγματος σε 150 μL υποστρώματος και επώαση 15 λεπτών στους 60 °C με ήπια ανάδευση.
- Προσθήκη σε 20 μL του παραπάνω διαλύματος 2 mL αντιδραστήριου οξειδάσης της γλυκόζης – υπεροξειδάσης (Πίνακας 2-7, GOD – PAP) και επώαση 15 λεπτών στους 37 °C.
- Φωτομέτρηση στα 510 nm και υπολογισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

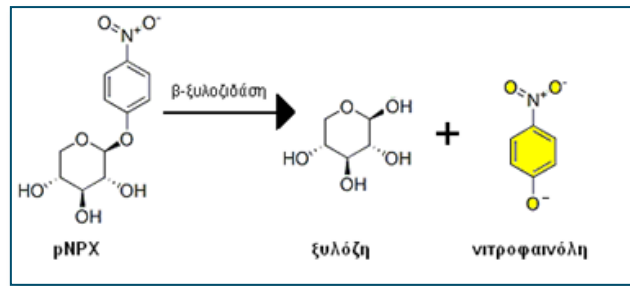
**Υπόστρωμα:** 2 g κελλοβιόζης σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$  (100 mM, pH 7)

**Πίνακας 2-7** Αντιδραστήριο οξειδάσης της γλυκόζης – υπεροξειδάσης (GOD – PAP)

<b>Τελική Συγκέντρωση (Biosis)</b>	
Οξειδάση της γλυκόζης	18 IU/ml
Υπεροξειδάση	10 IU/ml
Αμινοφαιναζόνη	0,25 mM
Παράγωγο φαινόλης	10 mM
Ρυθμιστικό διάλυμα pH 8	0,2 M

### 2.7.1.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ Β-ΞΥΛΟΖΙΔΑΣΗΣ

Η εκτίμηση της ενεργότητας της β-ξυλοζιδάσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός ψευδοϋποστρώματος, του 4-νιτροφαινυλ-β-D-ξυλοσιδίου (pNPX). Η β-ξυλοζιδάση υδρολύει τον β-1,4 δεσμό του ψευδοϋποστρώματος σε νιτροφαινόλη και ξυλόζη. Η νιτροφαινόλη, απορροφά στα 410 nm και επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της ενζυμικής αντίδρασης (Εικόνα 2-3). Η επώαση του δείγματος με την pNPX πραγματοποιήθηκε στους 60 °C για 15 λεπτά (Lama et al., 2004).



**Εικόνα 2-3** Υδρόλυση pNPP από τη β-ξυλοζιδάση

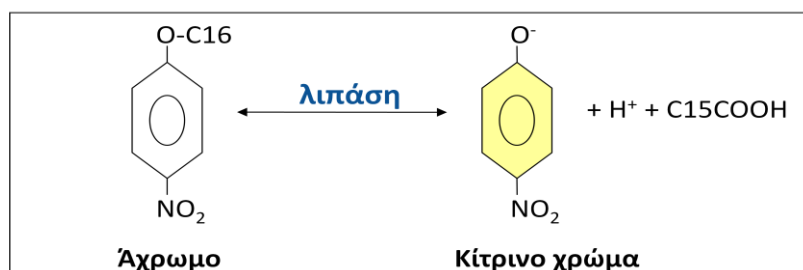
Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε:

- Προσθήκη 0,1 mL δείγματος σε 0,1 mL υποστρώματος και 0,8 mL ρυθμιστικού διαλύματος K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM, pH 8) και επώαση 15 λεπτών στους 60 °C.
- Τερματισμός της αντίδρασης με προσθήκη 1 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
- Προσθήκη 3 mL απεσταγμένου H<sub>2</sub>O και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 410 nm.
- Υπολογισμός της παραγόμενης νιτροφαινόλης βάσει πρότυπης καμπύλης.

**Υπόστρωμα:** Διάλυμα 4-νίτρο-φαινυλ-β-D-ξυλοσίδης (pNPP) με συγκέντρωση 5 mM

### 2.7.2 ΛΙΠΑΣΕΣ

Η ποσοτική εκτίμηση της λιπολυτικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά με τη χρήση του ψευδουποστρώματος πάρα-νίτρο-φαινυλο παλμιτικό οξύ (pNPP). Η λιπάση αναγνωρίζει την αλυσίδα λιπαρού οξέος στο μόριο του pNPP και το αποκόπτει, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται κίτρινο χρώμα στο διάλυμα της αντίδρασης (410 nm), που οφείλεται στο ανιόν της νιτροφαινόλης και το οποίο μπορεί να προσδιοριστεί με τη βοήθεια φωτομέτρου (Εικόνα 2-4) (Vargas et al., 2004, Prazeres et al., 2006). Επομένως, καταγράφοντας την απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος στην πορεία του χρόνου είναι δυνατόν να υπολογιστεί η ενεργότητα του ενζύμου.



**Εικόνα 2-4** Υδρόλυση pNPP παρουσία λιπάσης.

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε:

- Προσθήκη 0,05 mL δείγματος σε 0,095 mL υποστρώματος και 0,855 mL ρυθμιστικού διαλύματος pNPP (Πίνακας 2-8) και επώαση 5-15 λεπτών στους 60 °C (ή άριστη θερμοκρασία του ενζύμου).
- Τερματισμός της αντίδρασης με τοποθέτηση του διαλύματος αντίδρασης στον πάγο για 10 λεπτά.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 410 nm.
- Υπολογισμός της παραγόμενης νιτροφαινόλης βάσει πρότυπης καμπύλης ανάλογου pH.

**Υπόστρωμα:** Διάλυμα πάρα-νίτρο-φαίνυλο παλμιτικού οξέος (pNPP) με συγκέντρωση 20 mM.

**Πίνακας 2-8** Ρυθμιστικό Διάλυμα pNPP (pH 8)

	<b>Σύσταση</b>
Tris (50 mM)	6,057 g/L
HCl (50 mM)	203 φορές αραιώση δ. HCl 37% σε dH2O
Αραβικό κόμμι	1,11 g/L
Triton X-100	4,44 g/L

Σε όλες τις ενζυμικές εκτιμήσεις, η ενεργότητα κάθε ενζύμου υπολογίστηκε σε Unit/mL. Ως Unit (U) ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει την μετατροπή ενός μολ υποστρώματος σε ένα λεπτό, υπό τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες.

## 2.8 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

### 2.8.1 ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ

Ο ποιοτικός προσδιορισμός κυτταρινάσων και ξυλανάσων στα 101 θερμοφιλα βακτήρια ανέδειξε 15 στελέχη ικανά να εκκρίνουν υψηλές ποσότητες είτε ξυλανάσης-απουσία κυτταρινάσης είτε και των 2 υδρολυτικών ενζύμων. Τα επιλεγμένα στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες παρουσία διαφορετικών πηγών άνθρακα με στόχο τη μελέτη της ενζυμικής επαγωγής σε συνδυασμό με τη μείωση του κόστους της διαδικασίας.

Αναλυτικότερα, για κάθε στέλεχος πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες που περιείχαν βασικό υπόστρωμα BM1 (Πίνακας 2-9) και διαφορετική πηγή άνθρακα (ξυλόζη, ξυλάνη σημύδας, κελλοβιόζη, καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη, πίτυρο σιταριού ή θρυμματισμένο σπάδικα καλαμποκιού) συγκέντρωσης 2 % (w/v). Οι καλλιέργειες (ενεργός όγκος 40 mL) επώαστηκαν στους 60 °C, υπό συνεχή ανάδευση 200 rpm και λήφθηκαν δείγματα στις 2 και 7 ημέρες. Έπειτα από φυγοκέντρηση των δειγμάτων (8000 στροφές/15 λεπτά), για την απομάκρυνση των κυττάρων, ακολούθησε ενζυμικός προσδιορισμός της ενεργότητας κυτταρινάσης, ξυλανάσης, β-γλυκοζιδάσης και β-ξυλοζιδάσης. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ποσότητα του εκάστου δείγματος, η οποία είχε υποστεί βρασμό για 20 λεπτά, πριν από την εκτέλεση των ενζυμικών προσδιορισμών.

**Πίνακας 2-9** Βασικό υπόστρωμα (BM1)

<b>Σύσταση ανά λίτρο (Haba et al., 2000)</b>	
NaNO <sub>3</sub>	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g
CaCl <sub>2</sub>	0,01 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02 g
Εκχύλισμα ζύμης	1 g
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Πίνακας 2-10)	1 mL
Πηγή Άνθρακα (Πίνακας 2-11)	20 g

**Πίνακας 2-10** Διάλυμα Ιχνοστοιχείων

<b>Σύσταση ανά λίτρο (Atlas, 1993)</b>	
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	500 µg
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1 mg
MnSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	7 µg
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	7 µg
MoO <sub>3</sub>	1 mg
CoSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	18 µg

**Πίνακας 2-11** Ποσοστιαία σύσταση σύνθετων πηγών άνθρακα

<b>Σύσταση (w/w)</b>	
Θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού	42 % κυτταρίνη 38 % ημικυτταρίνη 8 % λιγνίνη
Πίτυρο Σίτου	12 % κυτταρίνη 35 % ημικυτταρίνη 29 % άμυλο 11 % πρωτεΐνη 5 % λιγνίνη

Από τις καλλιέργειες των 15 επιλεγμένων στελεχών σε 6 διαφορετικές πηγές άνθρακα προέκυψε 1 στέλεχος ικανό να συμπαράγει και τα 4 προαναφερθέντα υδρολυτικά ένζυμα. Το στέλεχος αυτό επανακαλλιεργήθηκε σε υγρές καλλιέργειες με σταθερή πηγή άνθρακα το πίτυρο σίτου και επιπρόσθετες μικρές ποσότητες πηγών άνθρακα ή αζώτου (Πίνακας 2-12). Για κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε σταθερό εμβόλιο 1% (v/v) και ο τελικός όγκος της καλλιέργειας ήταν 40 mL. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν σε θάλαμο με θερμοκρασία 60 °C και ανάδευση 200 rpm. Από κάθε καλλιέργεια ελήφθησαν δείγματα στις 8, 24, 48 και 72 ώρες. Η εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας, πραγματοποιήθηκε στο εξωκυτταρικό διάλυμα το οποίο λήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 λεπτά στις 8.000 στροφές ανά λεπτό. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε ποσότητα του κάθε δείγματος, η οποία είχε υποστεί βρασμό για 30 λεπτά πριν από την εκτέλεση των ενζυμικών προσδιορισμών.

**Πίνακας 2-12** Σύσταση θρεπτικών μέσων με στόχο την ενζυμική υδρολυτική επαγωγή

<b>Σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων</b>	
BM1 πίτυρο σίτου 2 % (w/v)	
BM1 πίτυρο σίτου 2 % (w/v) + 0,125% (w/v) ξυλάνη σημύδας	Πηγή άνθρακα
BM1 πίτυρο σίτου 2 % (w/v) + 0,125% (w/v) άμυλο	
BM1 πίτυρο σίτου 2 % (w/v) + 0,125% (w/v) καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη (CMC)	
BM1 πίτυρο σίτου 2 % (w/v) + 0,03% (w/v) καζεΐνη	Πηγή αζώτου
BM1 πίτυρο σίτου 2 % (w/v) + 0,03% (w/v) τρυπτόνη	
BM1 πίτυρο σίτου 2 % (w/v) + 0,03% (w/v) φωσφορικό αμμώνιο	

Ο συνδυασμός 2% (w/v) πίτυρου σίτου με 0,125% (w/v) ξυλάνη σημύδας χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα σε κλειστές καλλιέργειες του επιλεγμένου στελέχους. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα (B. BRAUN, BIOSTAT® B) ενεργού όγκου 2,3 L με συνεχή ρύθμιση του pH, της θερμοκρασίας και του αερισμού. Το δοχείο πληρώθηκε με 2,25 L βασικού υποστρώματος BM1 και τις προαναφερθείσες πηγές άνθρακα και αποστειρώθηκε στους 121 °C για 20 λεπτά. Το εμβόλιο (50 mL) περιελάμβανε κυτταρικό εναιώρημα σε βασικό υπόστρωμα BM1 από πρόσφατη καλλιέργεια του μικροοργανισμού ώστε να εξασφαλίζεται στο δοχείο του βιοαντιδραστήρα τελική συγκέντρωση ίση με 10<sup>6</sup> cfu/mL. Η θερμοκρασία επώασης ήταν σταθερή στους 60 °C, το pH στο 7, ο ρυθμός ανάδευσης ήταν 300 στροφές το λεπτό, ενώ η παροχή του οξυγόνου διέφερε σε κάθε καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες με μηδενική παροχή οξυγόνου, με παροχή ίση με 0,15 nvm, 0,37 nvm και 0,6 nvm. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε ασηπτικά σε διαφορετικά χρονικά σημεία της καλλιέργειας και ακολούθησε εκτίμηση της βιομάζας (συγκέντρωση cfu) και ποσοτικός προσδιορισμός των ενζύμων.

### 2.8.2 ΛΙΠΑΣΕΣ

Με κριτήριο τη λιπολυτική ικανότητα του συνόλου των θερμοφίλων βακτηρίων επιλέχθηκαν 9 στελέχη που παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκκρισης του ενζύμου. Η εύρεση της άριστης πηγής άνθρακα πραγματοποιήθηκε έπειτα από στερεές και υγρές καλλιέργειες των παραπάνω στελεχών σε διαφορετικές πηγές άνθρακα (ελαιόλαδο, γλυκερόλη και ελαιόλαδο, τριβουτυρίνη και Tween 20).

Οι υγρές καλλιέργειες (50 mL) πραγματοποιήθηκαν σε βασικό υπόστρωμα BM1 (Πίνακας 2-9) και πηγή άνθρακα 2 % (w/v), επώαστηκαν σε θερμοκρασία 60 °C, υπό ανάδευση 200 περίπου στροφών ανά λεπτό και η συλλογή των δειγμάτων ήταν καθημερινή για 4 ημέρες. Το εξωκυτταρικό κλάσμα διαχωρίστηκε από τη βιομάζα με φυγοκέντρηση (8000 στροφές/15 λεπτά) και ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των λιπασών με το ψευδοϋπόστρωμα pNPP (2.7.2).

Ο προσδιορισμός λιπάσης στις στερεές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη μίας χρωμογόνου ουσίας-δείκτη (ερυθρό του μεθυλίου) στο θρεπτικό μέσο (Πίνακας 2-13). Η ουσία αυτή εμφανίζει κόκκινο χρώμα σε τιμές pH κάτω του 4,4 και κίτρινο σε τιμές μεγαλύτερες του 6,2 (Εικόνα 2-5). Αναλυτικότερα, η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μείωση του pH εξαιτίας της απελευθέρωσης των λιπαρών



οξέων, προϊόντων της λιπόλυσης. Γενικά, οι μέθοδοι αυτού του τύπου εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία καθώς μπορεί να μην γίνουν ανιχνεύσιμες μικρές αλλαγές στο pH. Το παραπάνω μειονέκτημα μπορεί να περιοριστεί ρυθμίζοντας το pH του θρεπτικού υποστρώματος κοντά στη τιμή αλλαγής χρώματος της ουσίας-δείκτη (Singh et al., 2006, Kambiz Morabbi et al., 2008).

Τέλος, η επιλογή της τριβουτυρίνης, ως πηγή άνθρακα, επέτρεψε τον διαχωρισμό της δράσης των λιπασών από τις εστεράσες. Και οι δύο ενζυμικές κατηγορίες υδρολύουν δεσμό ίδιας φύσης με μοναδική διαφορά το μήκος της αλυσίδας του λιπαρού οξέος. Το παραπάνω γεγονός οδηγεί συχνά στη σύγχυση των δύο ενζύμων και μπορεί να αποφευχθεί χρησιμοποιώντας τριγλυκερίδια με λιπαρά οξέα διαφορετικού αριθμού ατόμων άνθρακα.

**Πίνακας 2-13** Στερεό Θρεπτικό Υπόστρωμα Ερυθρού του Μεθυλίου

<b>Σύσταση ανά λίτρο (Singh et al., 2006)</b>	
Πηγή άνθρακα (ελαιόλαδο, γλυκερόλη και ελαιόλαδο, τριβουτυρίνη ή Tween 20)	10 g
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Ερυθρό του μεθυλίου	0,1 g
Άγαρ	30 g



**Εικόνα 2-5** Ζώνη χρωματικής αλλαγής του ερυθρού του μεθυλίου εξαιτίας πτώσης του pH, που αποτελεί ένδειξη λιπολυτικής δράσης του μικροοργανισμού

## 2.9 ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ENZYMΩΝ

Η εξωκυτταρική ενζυμική δράση προσδιορίστηκε άμεσα έπειτα από την απομάκρυνση της βιομάζας με φυγοκέντρηση (8000 rpm/15 λεπτά) σε όλες τις κλειστές καλλιέργειες που διεξήχθησαν. Επιπρόσθετα, για τις κυτταρινάσες και ξυλανάσες έγινε περαιτέρω μελέτη της τοπολογίας τους σύμφωνα με το ελαφρά τροποποιημένο πρωτόκολλο των Prathumpai και συνεργατών (Prathumpai et al., 2004). Ο ενζυμικός εντοπισμός πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα κλειστών καλλιεργειών από τη σειρά βιοαντιδραστήρων που αφορούσαν στην επίδραση του αερισμού κατά την παραγωγή ξυλανασών και κυτταρινασών.

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τα εξής:

- Συλλογή δείγματος από μικροβιακή καλλιέργεια. Απομάκρυνση των αδιάλυτων υποστρωμάτων (πίτυρο σίτου, ξυλάνη) με διήθηση σε ηθμό (250 μm). Συλλογή του διηθήματος και φυγοκέντρηση αυτού στις 9000 για 10 λεπτά για την απομάκρυνση της βιομάζας από το εξωκυτταρικό κλάσμα. Παραλαβή **εξωκυτταρικού κλάματος** και ενζυμικός προσδιορισμός.
- Έκπλυση του ιζήματος με απεσταγμένο νερό και φυγοκέντρηση στις 9000 rpm για 10 λεπτά. Απόρριψη υπερκείμενου και αναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (50 mM, pH 7) με 1 mM EDTA και 20 μM PMSF. Ακολούθησε διάρρηξη των κυττάρων με υπερήχους (Vibra Cell™, Sonics & Materials Inc. USA) για 3 λεπτά σε διαστήματα 30 sec με ενδιάμεση παραμονή του δείγματος στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 9000 rpm για 10 λεπτά και παραλαβή του υπερκείμενου **ενδοκυτταρικού κλάματος** (ενζυμικός προσδιορισμός).
- Παραλαβή ιζήματος και αναδιαλυτοποίηση του σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (50 mM, pH 7) με 1 mM EDTA, 20 μM PMSF και 1% (v/v) Triton X-100. Η ήπια επιφανειοδραστική ένωση επέτρεψε την απομάκρυνση των **χαλαρά προσδεμένων ενζύμων από τις μεμβράνες** του διερρηγμένου κυττάρου. Επομένως, έπειτα από φυγοκέντρηση (9000 rpm για 10 λεπτά) συλλέχθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε ενζυμικός προσδιορισμός.
- Παραλαβή του ιζήματος και αναδιαλυτοποίηση του σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (50 mM, pH 7) με 1 mM EDTA, 20 μM PMSF και 1% (w/v) SDS. Η έντονη δράση της επιφανειοδραστικής ένωσης επέτρεψε την απομάκρυνση των **ισχυρά προσδεμένων ενζύμων από τις μεμβράνες** τα οποία προσδιορίστηκαν στο υπερκείμενο φυγοκέντρωσης (9000 rpm για 10 λεπτά).

## 2.10 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ pH ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ

---

Η μελέτη του άριστου ζεύγους θερμοκρασίας και pH καθώς και της θερμοσταθερότητας των λιπολυτικών ενζύμων από τα επιλεγμένα θερμοφιλα βακτήρια πραγματοποιήθηκε σε ενζυμικό δείγμα υγρών καλλιιεργειών με βασικό υπόστρωμα BM1 και μοναδική πηγή άνθρακα το ελαιόλαδο 2 % (w/v).

Οι καλλιέργειες είχαν όγκο 800 mL και επωάστηκαν για 5 ημέρες στους 60 °C και στις 200 rpm. Την έξοδό τους ακολούθησε διήθηση σε χαρτί Whatman για την αφαίρεση του ελαιολάδου, το οποίο εξαιτίας της φύσης του δημιουργεί δυσχέρεια στο χειρισμό του ενζυμικού δείγματος. Στο διήθημα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για τον διαχωρισμό της βιομάζας από το εξωκυτταρικό και καταβύθιση των πρωτεϊνών υπό την επίδραση θειικού αμμωνίου.

Η καταβύθιση με θειικό αμμώνιο βασίζεται στην αλλαγή της ιονικής ισχύος. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλάτων η διαλυτότητα των πρωτεϊνών αυξάνει με την αύξηση της ιονικής ισχύος (εφαλάτωση), ενώ σε υψηλές συνθήκες αλατότητας η διαλυτότητα των πρωτεϊνών μειώνεται κατά την αύξηση της ιονικής ισχύος (εξαλάτωση). Κατά την εξαλάτωση η πρωτεΐνη θα καταβυθιστεί από το διάλυμα. Η μέθοδος βασίζεται στη σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του θειικού αμμωνίου και παράλληλη φυγοκέντρηση για καταβύθιση και απομάκρυνση των πρωτεϊνών σε κάθε στάδιο. Τα ιζήματα που θα προκύψουν επαναδιαλυτοποιούνται σε διάλυμα χαμηλής ιονικής ισχύος (πιθανόν μικρότερου όγκου για συμπύκνωση) και γίνεται έλεγχος ενζυμικής ενεργότητας. Στόχος είναι η εύρεση εκείνου του εύρους κορεσμού σε θειικό αμμώνιο που θα έχουμε τη μέγιστη καταβύθιση της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Οι υπολογισμοί κατά την προσθήκη του άλατος γίνονται με βάση ειδικό πίνακα. Μεγάλη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στη συνεχή αύξηση του όγκου του διαλύματος κατά την εξέλιξη της διαδικασίας. Η παραπάνω μέθοδος είναι χρήσιμη για την εύκολη αφαίρεση των μη επιθυμητών βιομοριών και πολύ συχνά χρησιμοποιείται κατά τα πρώτα στάδια ενζυμικού καθαρισμού.

Τα λιπολυτικά ένζυμα που μελετήθηκαν στην πλειοψηφία τους καταβυθίστηκαν στο εύρος 0-60 % κορεσμού θειικού αμμωνίου. Η πληροφορία αυτή προέκυψε κατά την αύξηση της ιονικής ισχύος ανά 5 % και την ακόλουθη εκτίμηση των ενζυμικών ενεργοτήτων στο ιζήμα και το διάλυμα. Το εύρος κορεσμού 0-60 % απαιτεί την προσθήκη 361 g/L θειικού αμμωνίου στο εξωκυτταρικό διάλυμα μικροβιακής καλλιέργειας στους 25 °C. Η κρυσταλλική μορφή του άλατος θρυμματίστηκε (γουδί) και προστέθηκε με εξαιρετικά αργό ρυθμό στο διάλυμα υπό συνεχή ανάδευση ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη καταβύθιση των πρωτεϊνών. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 9000 rpm για 20 λεπτά και συλλογή του ιζήματος. Το ιζήμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS-Πίνακας 2-14) μικρότερου όγκου (συμπύκνωση).

**Πίνακας 2-14** Ρυθμιστικό διάλυμα PBS με pH 7,4

Σύσταση ανά λίτρο	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g

Αρχικά, τα συμπυκνωμένα με θειικό αμμώνιο δείγματα αποτέλεσαν ενζυμική πηγή για τη μελέτη της άριστης θερμοκρασίας δράσης. Η ενζυμική αντίδραση έγινε με τη χρήση του ψευδοϋποστρώματος pNPP σε διαφορετικές θερμοκρασίες (40, 50, 60, 70, 80, 90 και 100 °C).

Αντίστοιχη διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για την εύρεση του αρίστου pH δράσης της λιπάσης. Κατά τη διάρκεια μελέτης μίας παραμέτρου όπως η θερμοκρασία ή το pH όλες οι υπόλοιπες παρέμειναν σταθερές.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ενζυμική θερμοσταθερότητα. Αυτό κατέστη δυνατό με την επώαση των υπό μελέτη ενζυμικών δειγμάτων σε ακραίες θερμοκρασίες (70-100 °C) για συγκεκριμένες χρονικές περιόδους και ακολούθως εκτίμηση της ενζυμικής τους ενεργότητας. Σε όλες τις περιπτώσεις η μέτρηση της λιπολυτικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκε ποσοτικά με το ψευδοϋπόστρωμα pNPP.

## 2.11 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΟΡΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

Η προσπάθεια ενίσχυσης τμήματος ή ολόκληρου του γονιδίου θερμοσταθερών υδρολυτικών ενζύμων στα επιλεγμένα στελέχη πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας είτε την KaraTaq είτε την Phusion πολυμεράση.

Η KaraTaq πολυμεράση (Kara Biosystems, Inc., US), μη διαθέτοντας ικανότητα 3'→ 5' εξωνουκλεάσης, δε χαρακτηρίζεται από υψηλής πιστότητας ενίσχυση. Ωστόσο, μπορεί να αντικαταστήσει οποιαδήποτε κοινή Taq πολυμεράση. Το αντιδρόν μείγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει: 40 ng γενωμικού DNA, ρυθμιστικό διάλυμα KaraTaq με Mg<sup>2+</sup>, 1 Unit KaraTaq DNA πολυμεράση, 0,2 M dNTPs και 0,4 μM από κάθε εκκινητή. Ένα αρχικό στάδιο 2 λεπτών στους 95 °C, ακολουθείται από 25-30 κύκλους που περιλαμβάνουν 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία μικρότερη κατά 5 °C από την T<sub>m</sub> των εκκινητών, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 1 λεπτό / 1000 ζ.β. στους 72 °C, όπου σχηματίζονται οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολουθεί ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 2 λεπτά.

Η Phusion πολυμεράση (FINNZYMES, Finland) διαθέτει ικανότητα 3'→5' εξωνουκλεάσης, δημιουργεί τυφλά άκρα στα προϊόντα της αντίδρασης και είναι ιδανική για ενίσχυση τμημάτων με πολλά ζεύγη βάσεων. Το αντιδρόν μείγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει: 40 ng γενωμικού DNA, ρυθμιστικό διάλυμα Phusion HF, 0,02 Unit / mL Phusion DNA πολυμεράση, 0,2 mM dNTPs και 0,5 μM από κάθε εκκινητή. Ένα αρχικό στάδιο 30 δευτερολέπτων στους 98 °C, ακολουθείται από 25-30 κύκλους που περιλαμβάνουν 5-10 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 98 °C, 10-30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία μεγαλύτερη κατά 3 °C από την μικρότερη  $T_m$  των εκκινητών, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 15-30 δευτερόλεπτα / 1000 ζ.β. στους 72 °C, όπου σχηματίζονται οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολουθεί ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 5-10 λεπτά.

### 2.11.1 ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ

Ο σχεδιασμός εκκινητικών μορίων για την ανίχνευση κυτταρινολυτικών και ξυλανολυτικών ενζύμων προέκυψε από την ευθυγράμμιση των 5' και 3' συντηρημένων περιοχών θερμοσταθερών αντίστοιχων γονιδίων του γένους *Geobacillus* (Πίνακας 2-15 και 2-16).

**Πίνακας 2-15** Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση κυτταρινολυτικών και ξυλανολυτικών γονιδίων.

Γονίδιο	Εκκινητικά Μόρια
<b>Κυτταρινάση</b>	<b>GeoCel_F:</b> 5'-ATGGCGAAGTTGGACGAAACG -3' <b>GeoCel_R:</b> 5'-TTATTCGTCAAACGTCAGTTGTTTC-3'
<b>Ένδοξυλανάση</b>	<b>GeoXyl_F:</b> 5'-ATGAACAGCTCCCTCCCTCCCTCC-3' <b>GeoXyl_R:</b> 5'-TCAGACACTCACTGCCCGCCAAA-3'
<b>β-Γλυκοζιδάση</b>	<b>GeoGlu_F:</b> 5'-ATGGAACAACAATCGAAGCAACC-3' <b>GeoGlu_R:</b> 5'-TTAAAATCCATTGTTTTCCGCC-3'

Το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης από την PCR για την κυτταρινάση αναμένεται στα 1089 ζεύγη βάσεων, για την ξυλανάση στα 996 ζεύγη βάσεων και για τη β-γλυκοζιδάση στα 1413 ζεύγη βάσεων.

Τέλος, ένα σύνολο διαφορετικών συνθηκών εφαρμόστηκαν κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων με στόχο την αριστοποίηση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών στη μήτρα DNA για κάθε συνδυασμό εκκινητικών μορίων-μικροβιακού γονιδιώματος.

**Πίνακας 2-16** Χαρακτηριστικά εκκινητικών μορίων για θερμοσταθερές κυτταρινάσες και ξυλανάσες

Εκκινητικό μόριο	Αριθμός βάσεων	T <sub>m</sub> (°C)	Περιεχόμενο GC (%)	Σχεδιασμός με βάσει τα γονίδια (Αριθμός κατάθεσης στη διεθνή τράπεζα δεδομένων NCBI)
<b>GeoCel_F</b>	<b>21</b>	<b>64</b>	<b>52</b>	CP002050.1 (832405..833493)
<b>GeoCel_R</b>	<b>25</b>	<b>61</b>	<b>35</b>	CP002442.1 (2804822..2805910) CP001794.1 (796647..797735) CP003125.1 BA000043.1 (2735400..2736488) CP001638.1 (2687755..2688840) CP002835.1 (898027..899112)
<b>GeoXyl_F</b>	<b>22</b>	<b>67,5</b>	<b>63</b>	CP002050.1 (1736513..173750)
<b>GeoXyl_R</b>	<b>23</b>	<b>69</b>	<b>56</b>	CP002442.1 (1894475..1895470) CP001794.1(2754537..2755532) DQ143882.1 HQ687479.1 CP002835.1 (2185445..2186440) D28121.1
<b>GeoGlu_F</b>	<b>23</b>	<b>63</b>	<b>46</b>	CP002050.1 (1786028..1787440)
<b>GeoGlu_R</b>	<b>22</b>	<b>61</b>	<b>36</b>	CP002442.1 (1845707..1847119) CP001794.1 (2705769..2707181) EU740982.1 CP000557.1 (1847541..1848953)

### 2.11.2 ΛΙΠΑΣΕΣ

Η πρώτη προσπάθεια σχεδιασμού εκκινητών για λιπάσες έγινε με βάση γνωστές αλληλουχίες γονιδίων θερμοσταθερών λιπασών από στελέχη του γένους *Geobacillus*. Τα oligονουκλεοτίδια είχαν υψηλή ομολογία με συντηρημένες περιοχές στο εσωτερικό των γονιδίων που επιλέχθηκαν για ευθυγράμμιση με εργαλεία πληροφορικής (Πίνακας 2-18). Αναλυτικότερα, επιλέχθηκε η ενίσχυση μιας περιοχής περίπου 948 ζ.β. μεταξύ των θέσεων 302 και 1286 γνωστών γονιδίων λιπάσης (Πίνακας 2-17).

Τα προϊόντα ενίσχυσης που προέκυψαν από τα εσωτερικά εκκινητικά μόρια αναλύθηκαν και με βάση την αλληλουχία τους ακολούθησαν δύο προσπάθειες σχεδιασμού μορίων εκκινητών με στόχο την ενίσχυση ολόκληρου του πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου θερμοσταθερής λιπάσης των επιλεγμένων στελεχών (Πίνακας 2-19). Και εδώ, πραγματοποιήθηκε συνδυασμός διαφορετικών συνθηκών κατά την εκτέλεση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την αριστοποίηση της διαδικασίας.

**Πίνακας 2-17** Μόρια εκκινητές για την ενίσχυση εσωτερικού τμήματος λιπάσης

	<b>Αλληλουχία</b>	<b>Αριθμός βάσεων</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>Περιεχόμενο GC (%)</b>
<b>5'Lip+300</b>	5' GCT GAA CGA CAA CGG TTA TCG 3'	<b>21</b>	<b>60,7</b>	<b>52</b>
<b>3'Lip+1270</b>	5' CGG ATT CGG GTC AAC GC 3'	<b>17</b>	<b>60</b>	<b>65</b>

**Πίνακας 2-18** Γονίδια θερμοσταθερών λιπασών που ευθυγραμμίστηκαν για το σχεδιασμό των εσωτερικών εκκινητικών μορίων.

**Γονίδια Θερμοσταθερών Λιπασών  
(Αριθμός Κατάθεσης στη διεθνή τράπεζα δεδομένων NCBI)**

<b>BA000043</b> (2029871..2031127)
<b>CP000557</b> (1032241..1033059)
<b>DQ298518</b>
<b>AY095260</b>
<b>EF042975</b>
<b>AY786185</b>
<b>AF237623</b>
<b>AY855077</b>

**Πίνακας 2-19** Εκκινητικά μόρια για ενίσχυση ολόκληρου του πλαισίου ανάγνωσης θερμοσταθερής λιπάσης

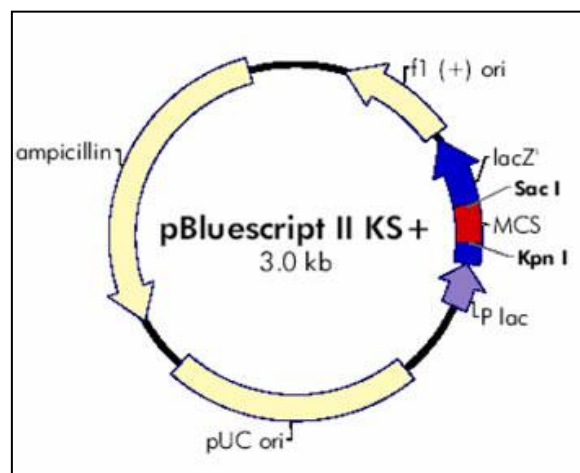
	<b>Αλληλουχία</b>	<b>Αριθμός βάσεων</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>Περιεχόμενο GC (%)</b>
<b>GeoLipF1</b>	5' -AG(GC) (AG)TG ATG AAA (GT)GC TG(CT) GGG CT(GT) ATG (GT) -3'			
<b>GeoLipR2</b>	5' -(GT)(CT)(AT) TTA AGG C(CT)G CAA (AG)CT CGC CA- 3'			
<b>GeoLipF2</b>	5'-ATG AAA TGC TGT CGG GTT ATG-3'	<b>21</b>	<b>58</b>	<b>43</b>
<b>GeoLipR2</b>	5'-TTA AGG CTG CAA GCT CGC-3'	<b>18</b>	<b>57,5</b>	<b>56</b>

## 2.12 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΛΙΠΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

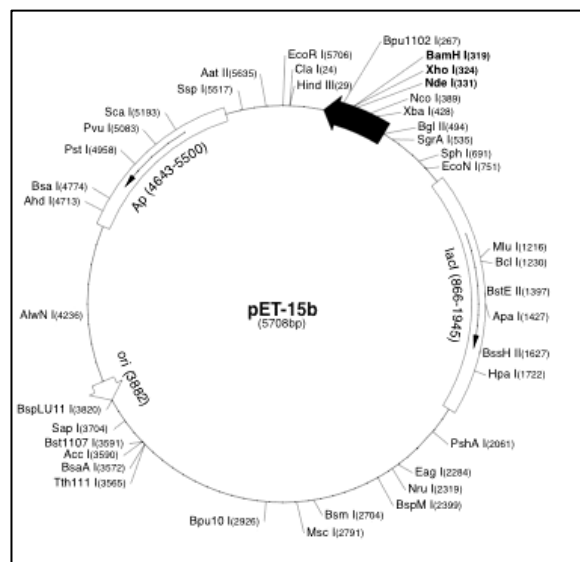
### 2.12.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση γονιδίου θερμοσταθερής λιπάσης από επιλεγμένο θερμόφιλο στέλεχος ήταν ο pBluescript II SK(+), ευγενική προσφορά του Επίκουρου Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας Ανάπτυξης Φυτών κ. Κοσμά Χαραλαμπίδη (Εικόνα 2-6).

Η υπερέκφραση της θερμοσταθερής λιπάσης σε διαφορετικές σειρές δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* πραγματοποιήθηκε μέσω του φορέα κλωνοποίησης pET15b, ευγενική προσφορά του Καθηγητή Βιοχημείας κ. Κ. Βοργιά (Εικόνα 2-7).



Εικόνα 2-6 Χάρτης του πλασμιδίου pBluescript II SK



Εικόνα 2-7 Χάρτης του πλασμιδίου pET15b.



---

## 2.12.2 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΓΙΑ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΛΙΠΑΣΗΣ

---

Ο σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητικών μορίων για τον εντοπισμό του γονιδίου της λιπάσης στο βακτηριακό γονιδίωμα αναφέρθηκε στην §2.11.2. Η ανάλυση ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδίου πραγματοποιήθηκε έπειτα από την ενσωμάτωσή του στον φορέα κλωνοποίησης pBluescript II SK (+). Για την ενίσχυση του γονιδίου της θερμοσταθερής λιπάσης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα εκκινητικά μόρια τα όποια διέθεταν θέσεις περιορισμού από ενδονουκλεάσες:

**LipF-*ClaI*** (29 ζ.β.,  $T_m$  67,87 °C)

5'- **TAA**T**CG**A**TATGAAATGCTGTCGGGTTATG** -3'

**LipR-*XbaI*** (26 ζ.β.,  $T_m$  66,16 °C)

5'- **AT**T**CTAG**A**TTAAGGCTGCAAGCTCGC**-3'

Οι πρώτες δύο βάσεις κάθε εκκινητή (πράσινο χρώμα) βοηθούν στη σταθεροποίηση της πολυμεράσης πάνω στο ολιγονουκλεοτίδιο κατά την έναρξη της αντιγραφής, αλλά και της ενδονουκλεάσης κατά τον περιορισμό του προϊόντος της αντίδρασης PCR στην επόμενη φάση της διαδικασίας. Η επόμενη αλληλουχία (κόκκινο χρώμα) είναι η θέση – στόχος του αντίστοιχου περιοριστικού ενζύμου και η τελευταία είναι, στην περίπτωση των εκκινητών (F) για το 5' άκρο, η αρχή του γονιδίου, και στην περίπτωση των εκκινητών (R) για το 3' άκρο, η αντίστροφη και συμπληρωματική αλληλουχία της λήξης του γονιδίου. Επιδιώκεται, οι τελευταίες αλληλουχίες να έχουν σχετικά υψηλό ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης ( $GC\% > 50$ ) και σχετικά παρόμοιο και υψηλό σημείο τήξης,  $T_m$ .

Με την ίδια λογική ακολούθησε ο σχεδιασμός εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση του γονιδίου – στόχου και την ακόλουθη υπερέκφραση του μέσω του φορέα κλωνοποίησης pET15b:

**LipF-*NdeI*** (26 ζ.β.,  $T_m$  72 °C)

5'- **CC**C**A**T**A**T**GAAATGCTGTCGGGTTATG**-3'

**LipR-*BamHI*** (26 ζ.β.,  $T_m$  72,5 °C)

5'- **TT**G**G**A**T**C**CTTAAGGCTGCAAGCTCGC**-3'

---

## 2.12.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

---

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, έγινε με εφαρμογή του πρωτοκόλλου Nucleospin<sup>®</sup> Plasmid (Macherey-Nagel, Γερμανία) ή με καταβύθιση παρουσία ισοπροπανόλης (Sambrook et al., 1989).

Η τελευταία διαδικασία περιελάμβανε τα παρακάτω:

- Ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο LB [1% (w/v) τρυπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 170 mM NaCl] με προσθήκη κατάλληλου αντιβιοτικού για 16 ώρες στους 37 °C.

- Φυγοκέντρηση 2 mL βακτηριακής καλλιέργειας στις 6000 rpm για 5 λεπτά.
- Προσθήκη στο ίζημα 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος P1 (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 7,5). Ανάδευση με στόχο την ολοκληρωτική αναδιαλυτοποίηση του ιζήματος.
- Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος P2 (1 % (w/v) SDS, 0,2N NaOH) και ήπια ανάδευση.
- Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος P3 (3M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , pH 5,3) και ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 λεπτά.
- Παραλαβή του υπερκείμενου με ιδιαίτερη προσοχή και προσθήκη σε αυτό 600  $\mu\text{L}$  ισοπροπανόλης. Ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 λεπτά.
- Παραλαβή του ιζήματος και ξέπλυμα αυτού με 300  $\mu\text{L}$  διαλύματος 70 % (v/v) αιθανόλης. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 λεπτά.
- Ξήρανση του ιζήματος στους 37 °C για περίπου 10 λεπτά και επαναδιάλυση σε 50  $\mu\text{L}$  αποστειρωμένου νερού.
- Προσθήκη RNAσης για 15 λεπτά στους 37 °C.

---

#### 2.12.4 ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

---

Η διαδικασία πέψης του πλασμιδιακού DNA (ή προϊόντος PCR αντίδρασης) με περιοριστική ενδονουκλεάση περιελάμβανε τα παρακάτω βήματα:

Προσθήκη σε ένα μικρό δοκιμαστικό σωλήνα όγκου 1,5 mL:

- 1-3  $\mu\text{g}$  πλασμιδιακού DNA (ή προϊόντος PCR αντίδρασης)
- 5-20 Units περιοριστικής ενδονουκλεάσης
- 2  $\mu\text{L}$  καταλλήλου ρυθμιστικού διαλύματος για τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης (διατίθεται από την εταιρία και είναι ειδικό για κάθε ένζυμο).
- απιονισμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών, έως 20  $\mu\text{L}$  τελικού όγκου.

☞ Ακολούθησε επώαση στην κατάλληλη για την περιοριστική ενδονουκλεάση θερμοκρασία, επί 1-3 ώρες (Sambrook et al., 1989).

---

#### 2.12.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΔΕΣΜΑΣΗΣ

---

Με σκοπό την κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA σε κοινούς πλασμιδιακούς φορείς, για τυπικές αντιδράσεις συρραφής, εφαρμόστηκε η ακόλουθη διαδικασία.

Προσθήκη σε μικρό δοκιμαστικό σωλήνα όγκου 1,5 mL:

- 1  $\mu\text{L}$  πλασμιδιακού φορέα συγκέντρωσης 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , μετά από επώαση με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και αποφωσφορυλίωση των άκρων του.
- 2-3  $\mu\text{L}$  καθαρού τμήματος DNA συγκέντρωσης 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Η αναλογία τμήμα DNA / πλασμιδιακός φορέας πρέπει να είναι 2:1 ή 3:1).
- 1  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος της T4 DNA δεσμάσης (50 mM Tris-HCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5).

- 1  $\mu\text{L}$  T4 DNA δεσμάσης συγκέντρωσης 2 Units/ $\mu\text{L}$ .
- Απιονισμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 10  $\mu\text{L}$ .

Επώαση σε υδατόλουρο σταθερής θερμοκρασίας 16 °C, για 16 ώρες (Sambrook et al., 1989)

---

### 2.12.6 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E.coli* ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΜΙΚΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ

---

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τα παρακάτω βήματα:

- Προετοιμασία βακτηριακής καλλιέργειας σε 10 mL θρεπτικού LB από παγωμένο (-80 °C) δείγμα κυττάρων
- ⊗ Επώαση για 16 ώρες.
- Αραιώση της βακτηριακής καλλιέργειας σε 1 L θρεπτικού SOB, έως 1:100
- ⊗ Επώαση στους 18 °C, επί 12-24 ώρες, στις 250 rpm, μέχρι OD<sub>600nm</sub> = 0,6.
- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 8000 g, στους 4 °C, επί 10 λεπτά
- Έκπλυση-επαναιώρηση, με ήπια, προσεκτική ανάμιξη, του κυτταρικού ιζήματος σε 80 mL παγωμένου (4 °C) ρυθμιστικού διαλύματος TB.
- ⊗ Επώαση του κυτταρικού αιωρήματος σε παγόλουτρο, για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως, επανάληψη της έκπλυσης σε 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος TB και διατήρηση στον πάγο.
- Προσθήκη διαλύματος DMSO έως τελικής συγκέντρωσης 7% (v/v) και άμεση, ήπια προσεκτική ανάμιξη, επώαση στον πάγο, για 10 λεπτά.
- Ταχεία κατάψυξη σε υγρό άζωτο (-150 °C) και αποθήκευση στους -80 °C.

#### Διαλύματα

- Θρεπτικό υπόστρωμα LB: 1% (w/v) τρυπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 170 mM NaCl
- Θρεπτικό υπόστρωμα SOB: 2% (w/v) τρυπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 2,5 mM KCl
- Ρυθμιστικό διάλυμα μετασχηματισμού TB (Transformation Buffer): 10 mM PIPES, pH 6,7, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl

---

### 2.12.7 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E.coli* ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ

---

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τα παρακάτω βήματα:

- Ταχεία απόψυξη του καταλλήλου στελεχούς επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* και επώαση στον πάγο.
- Προσθήκη 1 ng υπερελικωμένου πλασμιδίου ή 2,5-20  $\mu\text{L}$  του μίγματος της αντίδρασης της δεσμάσης σε 50-100  $\mu\text{L}$  αιωρήματος επιδεκτικών κυττάρων, με ήπια και προσεκτική ανάμιξη.
- ⌘ Επώαση του μίγματος κυττάρων-DNA στον πάγο, για 30 λεπτά.
- ⌘ Επώαση του μίγματος σε υδατόλουτρο των 42 °C, για 90 δευτερόλεπτα.
- ⌘ Άμεση μεταφορά στον πάγο και επώαση, για 2 λεπτά.
- Προσθήκη 1 mL θρεπτικού μέσου LB.
- ⌘ Επώαση στους 37 °C, επί 1 ώρα, με ζωνρή ανακίνηση στις 225 rpm για αποτελεσματικό αερισμό.
- Φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 2 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου, αφήνοντας περίπου 200  $\mu\text{L}$ .
- Ακολουθεί ελαφρά ανάμειξη με μικρο-σιφόνιο.
- Εμβολιασμός περίπου 200  $\mu\text{L}$  από κάθε καλλιέργεια σε πλάκες θρεπτικού-άγαρ, παρουσία του καταλλήλου αντιβιοτικού (προσθήκη IPTG και Xgal, εάν απαιτείται).
- ⌘ Επώαση των τριβλίων στους 37 °C, για 16 ώρες μέχρι να εμφανιστούν αποικίες καταλλήλου μεγέθους (Sambrook et al., 1989).

#### Διάλυμα

- Θρεπτικό μέσο LB: 1% (w/v) τρυπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 170 mM NaCl

---

### 2.12.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

---

#### 1ος τρόπος. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- Επιλογή θετικών αποικιών από τον μετασχηματισμό και ανάπτυξή τους σε 5 mL θρεπτικού υποστρώματος LB με προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού.
  - Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.
- Προσθήκη σε δοκιμαστικό σωλήνα όγκου 1,5 mL:
- 2-3  $\mu\text{L}$  πλασμιδιακού DNA συγκέντρωσης 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
  - 2 Units περιοριστικής ενδονουκλεάσης, που κόβει εκατέρωθεν του τμήματος DNA που έχει κλωνοποιηθεί

- 1  $\mu\text{L}$  κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης (διατίθεται από την εταιρία και είναι ειδικό για κάθε ένζυμο)
- Απιονισμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών έως τελικού όγκου 10  $\mu\text{L}$
- ⌘ Επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία για την περιοριστική ενδονουκλεάση, επί 1-3 ώρες.
- Προσθήκη 2ης περιοριστικής ενδονουκλεάσης και του καταλλήλου ρυθμιστικού διαλύματος, εάν απαιτείται, και επανάληψη της διαδικασίας.
- Έλεγχος του μοριακού βάρους του τμήματος DNA από την παραπάνω πέψη με ηλεκτροφόρηση αгарόζης.

### 2ος τρόπος. Έλεγχος με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

- Επιλογή μερικών θετικών αποικιών από τον μετασχηματισμό, εμβολιασμός τους σε νέο τρυβλίο LB-άγαρ και διαλυτοποίηση κάθε αποικίας σε 20  $\mu\text{L}$  απιονισμένου νερού ελεύθερου νουκλεασών.
- Βράσιμο κάθε διαλύματος αποικίας σε υδατόλουτρο 100 °C, επί 1 λεπτό.
- Φυγοκέντρηση στις 16000 g, σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 λεπτό
- Συλλογή 10  $\mu\text{L}$  από το υπερκείμενο του διαλύματος αποικίας και χρήση του ως υπόστρωμα σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, με ειδικούς εκκινητές που αναγνωρίζουν αλληλουχίες του πλασμιδίου εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης.
- Έλεγχος του μοριακού βάρους του τμήματος DNA από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ηλεκτροφόρηση αгарόζης.

---

#### 2.12.9 ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ-ΣΤΟΧΟΥ

---

Για τη μελέτη της επαγωγής του γονιδίου –στόχου ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Εμβολιασμός μιας αποικίας μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* από τρυβλίο σε 10 mL LB, με αμπικιλίνη συγκέντρωσης 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Επώαση στους 37 °C, υπό ανάδευση στις 250 rpm, για 16 ώρες.
- Έλεγχος ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας με μέτρηση  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ .
- Αραίωση της βακτηριακής καλλιέργειας 1:100 σε LB που περιέχει αμπικιλίνη συγκέντρωσης 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και επώαση στους 37 °C, υπό ανάδευση, στις 250 rpm, μέχρι τη λογαριθμική φάση αύξησης της καλλιέργειας ( $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,6-0,7$ ).
- Προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του επαγωγέα IPTG (προς εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης)
- Επώαση της καλλιέργειας, για 3 ώρες, στους 25 ή 37 °C, υπό ανάδευση, στις 250 rpm.
- Φυγοκέντρηση της βακτηριακής καλλιέργειας στις 8000 g, στους 4°C.
- Εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας στο ενδοκυτταρικό και εξοκυτταρικό κλάσμα και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.

Το ενδοκυτταρικό εκχύλισμα παραλήφθηκε μετά από θραύση των κυττάρων σε συσκευή υπερήχων (Sonics and Materials, Vibra-Cell, 400W). Η διαδικασία περιελάμβανε την υποβολή του κυτταρικού εναιωρήματος σε 2 κύκλους θραύσης των 30 sec στα 180 Watt, με ενδιάμεση ψύξη σε παγόλουτρο.

---

#### 2.12.10 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

---

Η μέτρηση ολικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη σταθεροποίηση της ανιονικής μορφής της χρωστικής (Coomassie Brilliant Blue), η οποία προκαλεί ορατή αλλαγή χρώματος, λόγω των υδρόφοβων και ιονικών δεσμών με τις πρωτεΐνες. Πρόκειται για μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο η οποία συγκεντρώνει αρκετά πλεονεκτήματα όπως η ευκολία και η ταχύτητα στην εκτέλεση. Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε προσθήκη γνωστού όγκου δείγματος (5-50  $\mu\text{L}$ ) σε 2 mL αντιδραστηρίου Bradford, ανάδευση και φωτομέτρηση στα 595 nm. Η απορρόφηση εξέφραζε τη συγκέντρωση πρωτεϊνών μέσω επεξεργασίας πρότυπης καμπύλης αναφοράς γνωστών συγκεντρώσεων πρωτεϊνών.

#### Αντιδραστήριο Bradford (Bradford, 1976)

Σε 50 mL αιθανόλης (95%) προστέθηκε 100 mL  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%) και 100 mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Ακολούθησε ανάδευση 15 λεπτών. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 850 mL απεσταγμένο  $\text{H}_2\text{O}$  και ακολούθησε ανάδευση επί 40 λεπτά. Το τελευταίο βήμα της παρασκευής του αντιδραστηρίου ήταν η διήθηση σε απλό διηθητικό χαρτί για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων χρωστικής.

---

#### 2.12.11 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS PAGE)

---

Κατά την ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος. Η χρήση του θειϊκού δωδεκυλικού νατρίου (SDS) συντελεί στη μερική αποδιάταξη των πρωτεϊνών και στη δέσμευση αρνητικά φορτισμένων θειϊκών δωδεκυλικών ιόντων σε ποσότητα ανάλογη του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η οποία έτσι φορτίζεται αρνητικά. Επειδή η ποσότητα του SDS που δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες είναι σταθερή (1,4 g SDS/g πρωτεΐνης), η κινητικότητα των πρωτεϊνών στο ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται μόνο από το μοριακό βάρος τους. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με χρήση ασυνεχών ρυθμιστικών διαλυμάτων σε αποδιατακτικές και αναγωγικές συνθήκες.

Η διάμετρος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από δύο παράγοντες: από το ποσοστό παρουσίας ακρυλαμίδης και από την ποσότητα του παράγοντα διασύνδεσης και επιλέγεται με βάση το μοριακό βάρος των υπό μελέτη δειγμάτων. Παρασκευάστηκαν δύο διαφορετικά πηκτώματα, το πήκτωμα συμπίκνωσης και αυτό του διαχωρισμού. Το πήκτωμα συμπίκνωσης είχε μεγάλης διαμέτρου πόρους ακρυλαμίδης (3%). Παρασκευάστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl pH 6,8 περίπου 2 μονάδες χαμηλότερο από το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris/γλυκίνη). Ο βασικός του ρόλος ήταν η συγκέντρωση των δειγμάτων σε ένα ενιαίο μέτωπο ανεξάρτητα από το μοριακό τους βάρος.

Το πήκτωμα διαχωρισμού αποτελείτο από μικρής διαμέτρου πόρους ακρυλαμίδης (3-30%) και παρασκευάστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl pH 8,8 (Πίνακας 2-20). Ο βασικός ρόλος του ήταν ο διαχωρισμός των μακρομορίων με βάση το μοριακό τους βάρος.

**Πίνακας 2-20** Επιλογή ποσοστού ακρυλαμίδης στο πήκτωμα διαχωρισμού με βάση το μοριακό βάρος των υπό διαχωρισμό πρωτεϊνών.

<b>% πήκτωμα ακρυλαμίδης</b>	<b>Εύρος M.B.</b>
7	50-500 kDa
10	20-300 kDa
12	10-200 kDa
15	3-100 kDa

Τα πρωτεϊνικά δείγματα επώαστηκαν στους 100 °C, επί 5-10 λεπτά σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε σταθερή τάση 100V στο πήκτωμα διαχωρισμού και 120V στο πήκτωμα συμπύκνωσης, επί 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Στην παράγραφο 2.12.11.1 αναφέρεται αναλυτικά η σύσταση των πηκτωμάτων και διαλυμάτων (Laemmli, 1970).

#### 2.12.11.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ

**Πίνακας 2-21** Αποδιατακτικό πήκτωμα συμπύκνωσης (3%)

	<b>Σύσταση (mL)</b>
Ακρυλαμίδη- Μπις-ακρυλαμίδη (30:0,8 %)	1,3
1M Tris/HCl pH 6,8	1,25
10% SDS	0,1
dH <sub>2</sub> O	7,4
10% APS	0,05
TEMED	0,02
<i>Διάρκεια Πολυμερισμού</i>	<i>40 λεπτά</i>

**Πίνακας 2-22** Αποδιατακτικό πήκτωμα διαχωρισμού διαφορετικών συγκεντρώσεων

<b>Ποσοστό Ακρυλαμίδης %</b>	<b>7,5</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>18 (mL)</b>
Ακρυλαμίδη - Μπις-ακρυλαμίδη (30:0,8%)	2,5	3,33	4,0	5,0	6,0
1M Tris/HCl pH 8,8	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
10% SDS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
dH <sub>2</sub> O	4,85	4	3,35	2,35	1,35
10% APS	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
<i>Διάρκεια Πολυμερισμού</i>	<i>40 λεπτά</i>				

**Πίνακας 2-23** Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης SDS PAGE (X4)

	<b>Σύσταση</b>
1M Tris/HCl pH 6,8	2,5 mL
20% SDS	4 mL
Γλυκερόλη	3 g
Μπλε της βρωμοφαινόλης 1%	0,2 mL
Μερκαπτοαιθανόλη	1 mL

**Πίνακας 2-24** Ρυθμιστικό διάλυμα SDS ηλεκτροφόρησης

	<b>Σύσταση (1x)</b>
Tris	25 mM
Γλυκίνη	200 mM
SDS	0,1 %



---

## 2.12.12 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟΥΣΙΑ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (NATIVE PAGE)

---

Κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης απουσία αποδιατακτικού παράγοντα ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με βάση το φορτίο τους. Αν και δεν εκτιμήθηκε με ακρίβεια το μοριακό τους βάρος οι πληροφορίες που παρήχθησαν με την τεχνική αυτή ήταν χρήσιμες όσον αφορά στο συνολικό πρωτεϊνικό φορτίο καθώς και στην παρουσία ίδιων ή διαφορετικών υπομονάδων στα μόρια. Επίσης, η ηλεκτροφόρηση NATIVE PAGE διαχωρίζει πρωτεϊνικά μόρια με το ίδιο μοριακό βάρος (αδυναμία της SDS PAGE) και μετά τη διαδικασία οδηγεί στην ανάκτηση βιολογικά ενεργών πρωτεϊνών. Το τελευταίο παρέχει πλεονέκτημα στην εξειδικευμένη ανίχνευση ενζυμικών μορίων σε ένα σύνολο πρωτεϊνών (ζυμογράφημα). Η κατασκευή του μη αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης και του διαλύματος ηλεκτροφόρησης ακολούθησε τα ίδια βήματα, όπως και στην αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, με παράλειψη του SDS (Davis, 1964). Η επιλογή του pH των διαλυμάτων ήταν κρίσιμη και υπολογίστηκε με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο της υπό μελέτη πρωτεΐνης.

---

### 2.12.12.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ

---

**Πίνακας 2-25** Μη αποδιατακτικό πήκτωμα συμπύκνωσης (3%)

	<b>Σύσταση (mL)</b>
Ακρυλαμίδη- Μπις-ακρυλαμίδη (30:0,8 %)	1,02
1M Tris/HCl pH 6,8	0,75
dH <sub>2</sub> O	4,14
10% APS	0,06
TEMED	0,006
<i>Διάρκεια Πολυμερισμού</i>	<i>40 λεπτά</i>

**Πίνακας 2-26** Μη αποδιατακτικό πήκτωμα διαχωρισμού (10%)

	<b>Σύσταση (mL)</b>
Ακρυλαμίδη- Μπις-ακρυλαμίδη (30:0,8 %)	4
1M Tris/HCl pH 8,8	3
dH <sub>2</sub> O	4,88
10% APS	0,12
TEMED	0,0048
<i>Διάρκεια Πολυμερισμού</i>	<i>40 λεπτά</i>

---

**Πίνακας 2-27** Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης NATIVE PAGE

<b>Σύσταση (1X)</b>	
0,1 M Tris/HCl pH 8,6	10 mL
Γλυκερόλη	1 g
Μπλε της βρωμοφαινόλης	0,0025 % (w/v)

**Πίνακας 2-28** Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης NATIVE

<b>Σύσταση (1X)</b>	
Tris	30,3 g/L
Γλυκίνη	144 g/L

---

## 2.12.13 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΑΠΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

---

### 2.12.13.1 ΧΡΩΣΗ COOMASIE

---

Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue όπως έχει ήδη αναφερθεί στην παράγραφο 2.12.10 χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών και εμφανίζεται σε 2 μορφές. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 διαφέρει από την αντίστοιχη R-250 εξαιτίας της προσθήκης 2 μεθυλομάδων. Το γράμμα G προέρχεται από την πράσινη χροιά στο μπλε χρώμα της χρωστικής ενώ το R από την κόκκινη. Στο διάλυμα χρώσης των πηκτωμάτων χρησιμοποιείται η Coomassie Brilliant Blue R -250 με όριο ανίχνευσης τα 500 ng πρωτεΐνης.

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε:

- Αφαίρεση του πηκτώματος από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό. Προσθήκη του διαλύματος χρώσης Coomassie (Πίνακας 2-29) στο πηκτώμα (εμβάπτιση). Τοποθέτηση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 λεπτό στη μέγιστη ισχύ.
- Επώαση του πηκτώματος για 30 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Εάν δεν είχε προηγηθεί το προηγούμενο βήμα, η επώαση ήταν το λιγότερο μία ώρα.
- Αφαίρεση του διαλύματος χρώσης. Ξέπλυμα του πηκτώματος με απεσταγμένο νερό και προσθήκη του διαλύματος αποχρωματισμού (Πίνακας 2-30). Εναλλαγή του τελευταίου με φρέσκο διάλυμα ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η χρήση χαρτιού Whatman που απορροφά τη χρωστική βοήθησε στον γρήγορο αποχρωματισμό.

**Πίνακας 2-29** Διάλυμα χρώσης Coomasie

	<b>Σύσταση</b>
Coomasie Brilliant Blue R-250	0,75 g/L
dH <sub>2</sub> O	135 mL
Μεθανόλη	135 mL
Κρυσταλλικό Οξικό Οξύ	30 mL

**Πίνακας 2-30** Διάλυμα αποχρωματισμού Coomasie

	<b>Σύσταση</b>
Μεθανόλη	30 % (v/v)
Κρυσταλλικό Οξικό Οξύ	10 % (v/v)
dH <sub>2</sub> O	60 % (v/v)

#### 2.12.13.2 ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ (SILVER STAINING)

Η αρχή της μεθόδου περιελάμβανε την πρόσδεση των ιόντων αργύρου στις πρωτεΐνες και την ακόλουθη αναγωγή τους σε μεταλλικά ιόντα από τη φορμαλδεΰδη σε αλκαλικό pH. Χρησιμοποιήθηκε σε περιπτώσεις δειγμάτων χαμηλής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης καθώς θεωρείται πιο ευαίσθητη χρώση από την Coomasie και το όριο ανίχνευσης της φτάνει τα 50 ng πρωτεΐνης. Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε επώαση και εναλλαγή διαλυμάτων στο πήκτωμα για συγκεκριμένους χρόνους (Πίνακας 2-31).

Τα διαλύματα ευαισθητοποίησης (χωρίς γλουταραλδεΰδη), νιτρικού αργύρου και εμφάνισης (χωρίς φορμαλδεΰδη) διατηρήθηκαν έως 2 μήνες ενώ τα διαλύματα τερματισμού και συντήρησης διατηρήθηκαν έως και 6 μήνες.

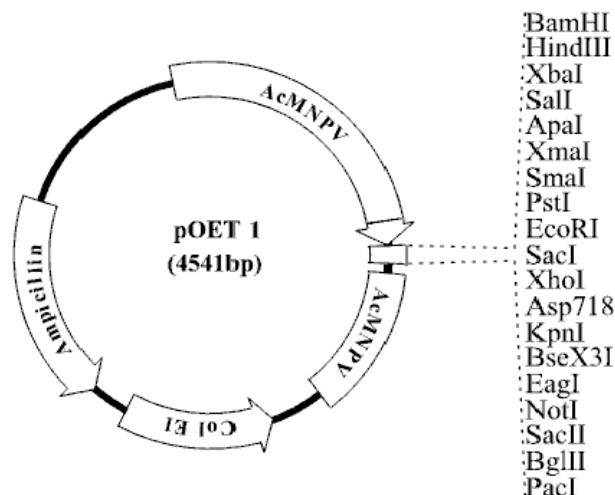
**Πίνακας 2-31** Διαλύματα και διαδικασία χρώσης πηκτώματος με νιτρικό άργυρο.

Διαδικασία	Διάλυμα	Χρόνος
<b>Μονιμοποίηση</b>	40 % (v/v) αιθανόλη, 10 % (v/v) κρυσταλλικό οξικό οξύ, 50% (v/v) dH <sub>2</sub> O	30 min
<b>Ευαισθητοποίηση</b>	30 % (v/v) αιθανόλη, 6,8 % (w/v) άνυδρο οξικό νάτριο, 0,2 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O, 70% (v/v) dH <sub>2</sub> O, 0,125% (v/v) γλουταραλδεϋδη (προσθήκη πριν τη χρήση)	30 min
<b>Ξέπλυμα</b>	dH <sub>2</sub> O	5 min (3 φορές)
<b>Νιτρικός Άργυρος</b>	0,25 % (w/v) νιτρικός άργυρος, 0,04 % (v/v) φορμαλδεϋδη 37% (προσθήκη πριν τη χρήση)	20 min
<b>Ξέπλυμα</b>	dH <sub>2</sub> O	1 min (2 φορές)
<b>Εμφάνιση</b>	2,5 % (w/v) άνυδρο ανθρακικό νάτριο, 0,02 % (v/v) φορμαλδεϋδη 37% (προσθήκη πριν τη χρήση)	3-5 min
<b>Τερματισμός</b>	1,5 % (w/v) Na <sub>2</sub> EDTA	10 min
<b>Συντήρηση</b>	30 % (v/v) αιθανόλη, 4 % (v/v) γλυκερόλη	30 min

## 2.13 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΛΙΠΑΣΗΣ ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

### 2.13.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ

Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε για τη συνεπιμόλυνση με το ικό DNA των Sf9 κυττάρων ήταν το πλασμίδιο pOET1 (Εικόνα 2-8). Το πλασμίδιο pOET1 χρησιμοποιείται σε συστήματα υπερέκφρασης ετερόλογων γονιδίων με τη χρήση βακυλοϊών. Το γονίδιο στόχος εκφράζεται κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή της AcMNPV πολυεδρίνης (*polh*) οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα πρωτεϊνικού προϊόντος. Πρόκειται για έναν μικρού μεγέθους φορέα (4541 ζ.β.) που περιέχει ένα σημείο έναρξης της αντιγραφής Col E1 καθώς και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη για επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων. Το γονίδιο της πολυεδρίνης έχει αντικατασταθεί από 14 θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες με στόχο την ένθεση του γονιδίου στόχου στην σωστή κατεύθυνση. Έπειτα από τη τελευταία θέση περιορισμού υπάρχουν κωδικόνια λήξης και για τα 3 πλαίσια ανάγνωσης. Τέλος, η αλληλουχία AcMNPV επιτρέπει τον ανασυνδυασμό του pOET1 με το DNA του ιού στη θέση του γονιδίου της πολυεδρίνης, εμφανίζοντας συμβατότητα με κάθε σύστημα έκφρασης βακυλοϊού το οποίο χρησιμοποιεί ομόλογο ανασυνδυασμό στα κύτταρα των εντόμων.



Εικόνα 2-8 Πλασμιδιακός χάρτης του pOET1

### 2.13.2 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΛΙΠΑΣΗΣ

Το γονίδιο της λιπάσης ενισχύθηκε με τα ακόλουθα μόρια εκκινήτες:

**LipF-BamHI** (30 ζ.β.,  $T_m$  58)

5' - **GCGG** | **GATC** | CATGAAATGCTGTTCGGGTTATG – 3'

**LipR-XbaI** (26 ζ.β.,  $T_m$  66,16 °C)

5'-**ATT**|**CTAGA**|TTAAGGCTGCAAGCTCGC-3'

Οι πρώτες δύο βάσεις κάθε εκκινήτη (πράσινο χρώμα) βοηθούν στη σταθεροποίηση της πολυμεράσης πάνω στο ολιγονουκλεοτίδιο κατά την έναρξη της αντιγραφής, αλλά και της ενδονουκλεάσης κατά τον περιορισμό του προϊόντος της αντίδρασης PCR στην επόμενη φάση της διαδικασίας. Η επόμενη αλληλουχία (κόκκινο χρώμα) είναι η θέση – στόχος των περιοριστικών ενδονουκλεασών *BamHI* και *XbaI* με τα οποία θα γίνει πέψη τόσο του προϊόντος PCR όσο και του πλασμιδίου pOET1.

### 2.13.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ENTOMOY Sf9

Η κυτταρική σειρά Sf9 περιλαμβάνει κύτταρα ωθήκης που έχουν απομονωθεί από το είδος *Spodoptera frugiperda* και χρησιμοποιείται ευρέως στα συστήματα υπερέκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με τη χρήση βακυλοϊών. Πρόκειται για σφαιρικά, μεσαίου μεγέθους κύτταρα, με ευκολία προσκόλλησης σε επιφάνειες και χρόνο διπλασιασμού τις 72 περίπου ώρες. Εμφανίζουν καλή ανάπτυξη τόσο σε μονοστοιβάδες, προσκολλημένα σε ειδικά επεξεργασμένη πλαστική επιφάνεια, όσο και σε εναιώρημα υπό ανάδευση. Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις καλλιέργειες είναι το SF900 II (Invitrogen).

### 2.13.3.1 ΜΟΝΟΣΤΡΩΜΗ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ Sf9

Οι βασικοί κανόνες καλής εργαστηριακής πρακτικής σε αυτού του τύπου τις καλλιέργειες, οι οποίοι τηρήθηκαν πιστά, ήταν οι ακόλουθοι (Murphy et al., 2001):

1. Καθημερινή παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο έως σχηματισμού ενιαίας μονοστοιβάδας και αραίωση αυτών σε νέες καλλιέργειες (passage).
2. Η μετάβαση των κυττάρων σε νέες καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε στο χρονικό σημείο όπου εξαιτίας του κορεσμού τους, μερικά αιωρούταν στο θρεπτικό υπόστρωμα. Το γεγονός αυτό υποβοήθησε την εύκολη αποκόλλησή τους από την επιφάνεια της φιάλης χωρίς επιρροή στη βιωσιμότητά τους.
3. Η αργοπορημένη αραίωση της καλλιέργειας οδήγησε σε μεγαλύτερους χρόνους διπλασιασμού και σε χαμηλότερη βιωσιμότητα.
4. Η αραίωση της καλλιέργειας σε χαμηλές συγκεντρώσεις κορεσμού (<20%) στη μονοστοιβάδα ανέστειλε την ανάπτυξή τους. Τα υγιέστερα κύτταρα βρίσκονταν πάντοτε στην εκθετική φάση αύξησης.
5. Η καταγραφή του αριθμού των διαιρέσεων των καλλιιεργειών ήταν επιτακτική καθώς όταν ξεπέρασαν τον αριθμό 30 τα κύτταρα εμφάνισαν χαμηλότερη βιωσιμότητα. Στην περίπτωση αυτή έγινε έναρξη νέας σειράς καλλιιεργειών από κύτταρα αποθηκευμένα στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .
6. Παρατίθεται συμβουλευτικός Πίνακας (Πίνακας 2-32) σχετικά με τη συγκέντρωση κυττάρων σε μονόστρωμη ιστοκαλλιέργεια.

**Πίνακας 2-32** Ενδεικτική συγκέντρωση κυττάρων σε μονόστρωμη ιστοκαλλιέργεια

Μέγεθος Φιάλης ( $\text{cm}^2$ )	Ενεργός Όγκος (mL)	Αριθμός Κυττάρων σε Μονόστρωμη Καλλιέργεια
25	5-10	$4.0 \cdot 10^6$
75	15-20	$1.2 \cdot 10^7$
150	40-50	$2.4 \cdot 10^7$

Η διαδικασία έναρξης μονόστρωμης καλλιέργειας από αποθηκευμένα κύτταρα Sf9 περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

- Αφαίρεση ενός φιαλιδίου αποθηκευμένων κυττάρων από το υγρό άζωτο (ή τους  $-80^{\circ}\text{C}$ ) και τοποθέτηση στον πάγο.
- Έξοδος του θρεπτικού υποστρώματος από το ψυγείο και επαναφορά του σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τοποθέτηση του φιαλιδίου με το εναιώρημα κυττάρων σε υδατόλουτρο ( $37^{\circ}\text{C}$ ) με σταδιακή ήπια ανάδευση. Το καπάκι αυστηρά παρέμεινε εκτός του ύδατος για αποφυγή μόλυνσης. Κατά τη χρονική στιγμή που το περιεχόμενο έχει ξεπαγώσει ολοκληρωτικά, το φιαλίδιο εξήλθε από το υδατόλουτρο και άμεσα ψεκάστηκε σχολαστικά με 70 % (v/v) αιθανόλη.

- Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο σιφόνιο αναδεύτηκε το περιεχόμενο των κυττάρων και ακολούθως μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα των 15 mL. Ακολούθησε προσθήκη 10 mL θρεπτικού υποστρώματος σε θερμοκρασία δωματίου.
  - Έπειτα από φυγοκέντρηση (1000 rpm / 5 λεπτά) αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 10 mL φρέσκου θρεπτικού υποστρώματος.
  - Τα 10 mL εναιωρήματος κυττάρων τοποθετήθηκαν σε φιάλη προσθέτοντας κατάλληλο όγκο θρεπτικού διαλύματος ανάλογα με το μέγεθός της.
- ☒ Επώαση στους 28 °C για 3-4 ημέρες.

### 2.13.3.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ Sf9 ΥΠΟ ΑΝΑΔΕΥΣΗ

Οι καλλιέργειες υπό ανάδευση της κυτταρικής σειράς Sf9 προέκυψαν από την αραιώση προ-καλλιιεργειών που διένυαν την εκθετική φάση αύξησης και περιελάμβαναν κύτταρα υψηλής βιωσιμότητας (>95%). Η χαμηλότερη κυτταρική συγκέντρωση σε όλες τις καλλιέργειες διατηρήθηκε ίση με  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα / mL καλλιέργειας. Επίσης, τα πώματα των κωνικών φιαλών παρέμεναν ελαφρώς ανοιχτά με στόχο την επάρκεια του αερισμού για την κυτταρική αύξηση (Murphy et al., 2001). Ο αερισμός ήταν κρίσιμος παράγοντας για την ανάπτυξη των κυττάρων και το μέγιστο ύψος της υγρής καλλιέργειας ήταν 1 cm. Ενδεικτικά, αναφέρεται ο μέγιστος ενεργός όγκος σε διαφορετικού μεγέθους πλαστικές φιάλες (Πίνακας 2-33).

**Πίνακας 2-33** Προτεινόμενες τιμές ενεργών όγκων σε φιάλες διαφορετικού όγκου

Όγκος Κωνικής Φιάλης (mL)	Ενεργός Όγκος Καλλιέργειας Sf9 (mL)
<b>100</b>	30
<b>250</b>	80
<b>500</b>	200
<b>1000</b>	300

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τα εξής:

- Σε μονόστρωμη καλλιέργεια αφαιρέθηκαν τα κύτταρα από την επιφάνεια είτε χτυπώντας με την παλάμη τον πάτο της φιάλης είτε χρησιμοποιώντας ειδικό αποστειρωμένο αποξεστικό εργαλείο. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με αποστειρωμένο σιφόνιο και ακολούθησε εκτίμηση του αριθμού και της βιωσιμότητάς τους.
  - Τα κύτταρα αραιώθηκαν σε τελική συγκέντρωση  $5 \cdot 10^5$  κύτταρα / mL και από αυτά τοποθετήθηκε κατάλληλος όγκος στις κωνικές φιάλες
- ☒ Ακολούθησε επώαση στους 28 °C , 125-150 rpm για 3-4 ημέρες.

Μετά τον τερματισμό των καλλιιεργειών, οι κωνικές φιάλες αποστειρώθηκαν σχολαστικά αφού είχε προηγηθεί τοποθέτηση Virkon 1% (w/v) και ακολούθως διάλυμα SDS 5% (w/v) ή 10% οξικό οξύ (v/v). Αξίζει να σημειωθεί πως δεν χρησιμοποιήθηκε ουδέποτε σαπούνι στο στάδιο καθαρισμού γιατί τα ίχνη του μπορεί να επηρεάσουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων

### 2.13.3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκε μέσω της χρωστικής Trypan Blue, η οποία είναι αρνητικά φορτισμένη και δε μπορεί να εισαχθεί στα κύτταρα παρά μόνο από διαρρηγμένη κυτταρική μεμβράνη. Συνεπώς τα νεκρά κύτταρα παρατηρούνται με μπλε χρώμα στο μικροσκόπιο καθώς έχουν απορροφήσει την χρωστική (Strober, 2001).

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τα εξής:

- Προσθήκη σε 450  $\mu\text{L}$  διαλύματος Trypan Blue 50  $\mu\text{L}$  κυτταρικού εναιωρήματος και ήπια ανάδευση.
- Μεταφορά 10  $\mu\text{L}$  σε πλάκα Neubauer και καταμέτρηση των βιώσιμων κυττάρων.
- Η καταμέτρηση στην πλάκα Neubauer αφορά τα μεγάλα τετράγωνα τα οποία αντιστοιχούν σε 1  $\text{mm}^2$  έκαστος. Για να ανάγουμε τον αριθμό των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας πολλαπλασιάζουμε τον αριθμό των κυττάρων σε ένα μεγάλο τετράγωνο με  $10^4$ .

**Διάλυμα:** 0,1% (w/v) Trypan Blue σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

### 2.13.3.4 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ Sf9

Η επιλογή κυττάρων με πολύ καλή βιωσιμότητα αποτέλεσε κρίσιμο παράγοντα για την επιτυχή αποθήκευσή τους. Για την κατάψυξη 25 περίπου φιαλιδίων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Συλλογή καλλιέργειας όγκου 100 mL κατά την εκθετική φάση αύξησης ( $4-6 \cdot 10^6$  κύτταρα / mL). Διαίρεση της καλλιέργειας σε 2 σωλήνες 50 mL και φυγοκέντρωση αυτών στις 1000 rpm για 5 λεπτά. Το κάθε ίζημα περιείχε περίπου  $1,8 \cdot 10^8$  συνολικά κύτταρα.
- Σε ένα άδειο σωλήνα διατηρήθηκαν 14 mL από το υπερκείμενο της προηγούμενης φυγοκέντρωσης.
- Στα 14 mL παλαιού θρεπτικού υποστρώματος προστέθηκαν 14 mL φρέσκου θρεπτικού υποστρώματος και 2,3 mL DMSO. Ακολούθησε αποστείρωση με ηθμό 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore PVDF Durapore membrane). Το διάλυμα αυτό αποτέλεσε το υπόστρωμα αποθήκευσης των κυττάρων.
- Σε κάθε ίζημα κυττάρων προστέθηκαν 12 mL του υποστρώματος αποθήκευσης και επαναιωρήθηκε αναδεύοντας ήπια. Η τελική συγκέντρωση υπολογίστηκε περί τα  $2 \cdot 10^7$  κύτταρα / mL.
- Ακολούθησε τοποθέτηση 1 mL εναιωρήματος κυττάρων σε κάθε φιαλίδιο αναφέροντας τις ακόλουθες πληροφορίες: τύπος κυττάρων, αριθμός διαιρέσεων καλλιέργειών (passage), ημερομηνία και συνολικός αριθμός κυττάρων.
- Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν αρχικά σε δοχείο ισοπροπανόλης στους  $-80^\circ\text{C}$  για αργή ψήξη και έπειτα από 24-72 ωρών μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο.



---

#### 2.13.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΙΟΥ ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ *flashBAC*<sup>TM</sup>

---

Οι παρακάτω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν κάτω από αυστηρά ασηπτικές συνθήκες καθότι τα λιπώματα εισήλθαν σε καλλιέργεια κυττάρων εντόμου δίχως αντιβιοτικό.

Η διαδικασία συνεπιμόλυνσης των κυττάρων Sf9 ήταν η ακόλουθη:

- 24 ώρες πριν τη συνεπιμόλυνση πραγματοποιήθηκε προσθήκη περίπου  $0,5 \cdot 10^6$  κυττάρων Sf9 ανά τρυβλίο μεγέθους 35 mm. Τα κύτταρα ήταν στην εκθετική φάση αύξησης και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο υγρή και με σωστή κατανομή ως μονοστοιβάδα. Ο ενεργός όγκος του τρυβλίου ήταν τα 2 mL.
- Έπειτα το πέρας των 24 ωρών τα κύτταρα πλησίαζαν σε αριθμό τα  $1 \cdot 10^6$ .
- Σε αποστειρωμένο σωλήνα προστέθηκε 1 mL θρεπτικού υποστρώματος (απουσία ορού και αντιβιοτικού) και 5  $\mu$ L αντιδραστηρίου διαμόλυνσης (Turbofect<sup>TM</sup>, Fermentas, Canada) και ακολούθησε ανάδευση.
- Στη συνέχεια προστέθηκε 100 ng *flashback*<sup>TM</sup> DNA ιού (Oxford Expression Technologies Ltd, UK) και 500 ng ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (pOET) ή φορέα θετικού μάρτυρα και ακολούθησε έντονη ανάδευση.
- ⊗ Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30 λεπτά.
- Στην καλλιέργεια των κυττάρων αφαιρέθηκε το θρεπτικό υγρό με προσοχή και προστέθηκε στάγδην το 1 mL του συμπλέγματος λιπωμάτων – DNA περιμετρικά του τρυβλίου. Η καλλιέργεια τοποθετήθηκε στους 28 °C και σε 5-24 ώρες προστέθηκε επιπλέον 1 mL θρεπτικού υποστρώματος.
- ⊗ Επώαση στους 28 °C για πέντε περίπου ημέρες.
- Παραλαβή του θρεπτικού υποστρώματος της καλλιέργειας σε αποστειρωμένο σωλήνα και διατήρηση στους 4 °C και στο σκοτάδι. Εκεί, περιέχονταν ο ανασυνδυασμένος ιός που χρησιμοποιήθηκε για διεύρυνση της συγκέντρωσης του στα επόμενα βήματα.
- 

---

#### 2.13.5 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ *FLASHBAC*<sup>TM</sup> ΙΟΥ

---

Σε καλλιέργεια Sf9 κυττάρων υπό ανάδευση, συγκέντρωσης  $1-2 \cdot 10^6$  κύτταρα / ml, προστέθηκε 0,5 mL ανασυνδυασμένου ιού από το προηγούμενο βήμα (§ 2.13.4).

⊗ Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση 100-150 rpm για 4-5 ημέρες.

- Φυγοκέντρηση (3000 rpm, 4 °C, 15 λεπτά) και συλλογή του υπερκείμενου.

Το υπερκείμενο τιτλοποιήθηκε και αποθηκεύτηκε στους  $-80$  °C, σε αποστειρωμένους σωλήνες, έπειτα από προσθήκη 10 % (v/v) βοείου εμβρυϊκού ορού (FBS –Fetal Bovine Serum).

---

### 2.13.6 ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΙΟΥ (ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΠΛΑΚΩΝ)

---

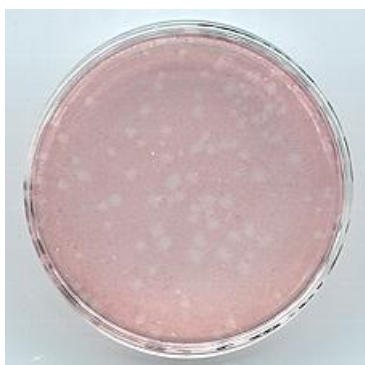
Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε:

- Σε τρυβλία διαμέτρου 35 mm τοποθετήθηκαν  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα και ακολούθησε επώαση μίας ώρας για την πρόσφυση των κυττάρων στην επιφάνεια.
- Κατά τη διάρκεια της επώασης πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις στο υπό τιτλοποίηση διάλυμα ιού σε θρεπτικό υπόστρωμα (από  $10^{-1}$  έως  $10^{-7}$ ).
- Παρατηρήθηκαν τα κύτταρα στο μικροσκόπιο ως προς τη δημιουργία μονόστρωμης καλλιέργειας και ακολούθως αφαιρέθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα από την επιφάνεια τους.
- Προστέθηκαν 100  $\mu$ L από τις διαφορετικές αραιώσεις του ιού στην επιφάνεια των κυττάρων στάγδην και περιμετρικά. Ακολούθησε επώαση για περίπου 30 λεπτά.
- 15 λεπτά πριν το τέλος της επώασης προετοιμάστηκε το διάλυμα αγαρόζης και τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για να υγροποιηθεί και διατηρήθηκε σε ανεκτή για τα κύτταρα θερμοκρασία (50 °C).
- Ακολούθησε αφαίρεση του ιού από την επιφάνεια των κυττάρων και προσθήκη 1 mL θρεπτικού υποστρώματος και 1 mL διαλύματος αγαρόζης. Η τελική συγκέντρωση αυτής είναι 1 % (w/v). Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου έως στερεοποίησης.
- Προσθήκη 1 mL θρεπτικού υποστρώματος στην επιφάνεια της αγαρόζης
- ⌘ Επώαση για 4 ημέρες στους 28 °C.
- Αφαίρεση του θρεπτικού από την επιφάνεια της αγαρόζης και προσθήκη του διαλύματος της χρωστικής.
- Επώαση για 2-4 ώρες στους 28 °C.
- Αφαίρεση της χρωστικής, και επώαση των τρυβλίων στο σκοτάδι για 2-4 ώρες προς σχηματισμό πλακών (Εικόνα 2-9).
  
- Εκτίμηση του τίτλου του ιού με βάση τον τύπο:

$$\text{Τίτλος ιού (pfu/mL)} = \text{μέσος όρος πλακών} * \text{παράγοντας αραιώσης} * 10$$

#### Διαλύματα

- 2 % (w/v) διάλυμα LGT (Low gelling temperature) αγαρόζης σε αποστειρωμένο νερό.
- 0,1 % (w/v) διάλυμα χρωστικής Neutral Red σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Αποστείρωση με φίλτρο 0,22  $\mu$ m.



**Εικόνα 2-9** Παρατήρηση σχηματισμού πλακών από ανασυνδυασμένο βακυλοϊό

## 2.14 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΑΣΗΣ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΙΟΥ

---

Η υπερεκφρασμένη λιπάση εντοπίστηκε στο εξωκυτταρικό υγρό μολυσμένων Sf9 κυττάρων, το οποίο αποτέλεσε την πρώτη ύλη για τον μετέπειτα καθαρισμό. Το εξωκυτταρικό υγρό παρελήφθη έπειτα από φυγοκέντρηση (3000 rpm, 4 °C, 15 λεπτά) καλλιέργειας κυττάρων και στη συνέχεια αφαλατώθηκε σε στήλη μοριακής διήθησης PD-10 (Pharmacia) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl (10 mM, pH 8).

Η αρχή της αφαλάτωσης εκμεταλλεύεται το διαφορετικό μέγεθος αλάτων και πρωτεϊνών. Τα άλατα εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους εμφανίζουν μεγαλύτερο χρόνο έκλουσης από τις πρωτεΐνες οι οποίες δεν εισέρχονται στη στατική φάση και εκλούνται γρηγορότερα. Η στατική φάση αποτελείται από αδρανές πορώδες υλικό (Sephadex<sup>TM</sup> G-25, ρητίνη).

Αναλυτικά η διαδικασία περιελάμβανε τα παρακάτω:

- Εξισορρόπηση της ρητίνης αρχικά σε ρυθμιστικό διάλυμα επιθυμητής συγκέντρωσης και pH.
- Προσθήκη 2,5 mL δείγματος. Μετά την είσοδο ολόκληρης της ποσότητας του δείγματος, ακολούθησε προσθήκη 3,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος.
- Συλλογή των 3,5 mL, τα οποία περιείχαν όλες τις πρωτεΐνες του αρχικού δείγματος εν διαλύσει στο επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα.
- Έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα ή νερό για την έκλυση των αλάτων του δείγματος.
- Η στήλη διατηρήθηκε σε 20 % (v/v) διαλύματος αιθανόλης ή σε 0,02% (w/v) αζίδιο του νατρίου.

Κατά την πειραματική διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης από τα λοιπά βιομόρια χρησιμοποιήθηκε η ανιοντοανταλλακτική ρητίνη Q-Sepharose Fast Flow. Αναλυτικά η πορεία καθαρισμού περιελάμβανε τα εξής:

- Εξισορρόπηση της ρητίνης αρχικά σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl, 100 mM, pH 8 και στη συνέχεια με αραιότερο ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 10 mM
- Εξισορρόπηση του πρωτεϊνικού δείγματος στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα (100 mM)
- Προσθήκη του εξισορροπημένου πρωτεϊνικού δείγματος στη στήλη
- Έκπλυση της στήλης (10 όγκοι) με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (10 mM) – Έκλουση μη προσδεσμένων πρωτεϊνών
- Έκπλυση της στήλης (10 όγκοι) με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης στο οποίο έχει προστεθεί NaCl τελικής συγκέντρωσης 1M. – Έκλουση πρωτεϊνών με μέτρια ισχύ πρόσδεσης στη ρητίνη
- Έκπλυση της στήλης (10 όγκοι) με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης στο οποίο έχει προστεθεί NaCl τελικής συγκέντρωσης 2M. – Έκλουση πρωτεϊνών με ισχυρή ισχύ πρόσδεσης στη ρητίνη
- Έκπλυση της στήλης (10 όγκοι) με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (10 mM) – Έκλουση του εναπομείναντος άλατος (NaCl)
- Έκπλυση της στήλης (6 όγκοι) με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM, pH 8), 0,5 % (w/v) Triton X-100 και 0,1 % (w/v) αραβικό κόμμι – Έκλουση λιπάσης

Η πρόσδεση της λιπάσης στη ρητίνη εμφανίστηκε εξαιρετικά ισχυρή εξαιτίας της υψηλής υδροφοβικότητας του μορίου. Το γεγονός αυτό πιστοποιήθηκε και σε ποικιλία άλλων ρητινών (μοριακής διήθησης ή υδρόφοβες). Η λιπάση εκλούστηκε από τη στήλη σε ηλεκτροφορητικά καθαρή μορφή μόνο έπειτα από προσθήκη γαλακτώματος (Triton – κόμμι).

Το καθαρό ενζυμικό δείγμα συμπυκνώθηκε σε συσκευή υπερδιήθησης Amicon με μεμβράνη Diaflo PM-10 (μέγεθος πόρων 10kDa).

---

## 2.15 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΜΕΝΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ

---

### 2.15.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΙΣΤΟΥ pH ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ

---

Ο προσδιορισμός της άριστης θερμοκρασίας δράσης της λιπάσης πραγματοποιήθηκε εκτελώντας την ενζυμική δοκιμή [χρήση ψευδοϋποστρώματος πάρα – νίτρο – φαίνυλο παλμιτικό οξύ (pNPP)] σε θερμοκρασιακό εύρος 30-90 °C με βήμα 5 °C, διατηρώντας το pH σταθερό στο 8.

Η εκτίμηση του άριστου pH δράσης πραγματοποιήθηκε με την εκτέλεση της ενζυμικής δοκιμής σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Για τις τιμές pH 7,8 και 9 χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό Tris/HCl, για τη τιμή 5 το CH<sub>3</sub>COONa/CH<sub>3</sub>COOH και για τη τιμή 6 το K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Σε όλες τις περιπτώσεις η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στην άριστη τιμή. Τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν τόσο στο ακατέργαστο ενζυμικό δείγμα όσο και στο ηλεκτροφορητικά καθαρό κλάσμα.

---

### 2.15.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΚΡΑΙΕΣ ΤΙΜΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ pH

---

Η θερμοσταθερότητα του ενζύμου εκτιμήθηκε έπειτα από την επώαση τόσο του ακατέργαστου όσο και του καθαρού πρωτεϊνικού διαλύματος σε υψηλές θερμοκρασίες και την ενζυμική δοκιμή σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Οι θερμοκρασίες επώασης ήταν οι 60, 65, 70, 80, 90 και 100 °C.

Η σταθερότητα της λιπάσης σε ακραίες τιμές pH μελετήθηκε έπειτα από την επώαση του πρωτεϊνικού δείγματος σε ρυθμιστικά διαλύματα με τιμές pH 3, 4, 5, 8, 9, 10 και 11 και την πραγματοποίηση της ενζυμικής ενεργότητας σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Για τις τιμές 3, 4 και 5 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος CH<sub>3</sub>COONa/CH<sub>3</sub>COOH, για το 8 το Tris/HCl και για τις τιμές 9, 10 και 11 το ζεύγος Γλυκίνη / NaOH όλα σε συγκέντρωση 0,1 M.

---

### 2.15.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

---

Οι κινητικές σταθερές K<sub>m</sub> και V<sub>max</sub> προσδιορίστηκαν από την ενζυμική ενεργότητα της λιπάσης στους 70 °C και στο pH 8 σε διαλύματα που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ψευδοϋποστρωμάτων. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα: πάρα-νίτρο-φαίνυλο-καπρυλικό οξύ (pNPC), πάρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ (pNPL) και πάρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ (pNPP).

---

### 2.15.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ, ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ

---

Σε πρωτεϊνικό δείγμα (ακατέργαστο και καθαρό) προστέθηκαν τα ακόλουθα υδατικά διαλύματα και ακολούθησε επώαση 1 και 2 ωρών, με στόχο την εκτίμηση της επίδρασης τους:

NaCl (50 mM), KCl (50 mM), CaCl<sub>2</sub> (1 mM), CoCl<sub>2</sub> (1 mM), MnCl<sub>2</sub> (1 mM), Triton X-100 (0,05 % w/v), Tween 20 (0,05 % w/v), EDTA (10 mM) ή SDS (0,10 % w/v).

Για την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης του CaCl<sub>2</sub> στην ενζυμική δράση οι ενζυμικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν υπό την παρουσία στο μείγμα της αντίδρασης συγκεντρώσεις άλατος από 1 έως 100 mM.

Η επίδραση των οργανικών διαλυτών εκτιμήθηκε έπειτα από την προσθήκη 40% (v/v) διαλύματος διαλύτη στο ενζυμικό δείγμα και την επώαση 1 και 2 ωρών. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι: μεθανόλη, προπανόλη, αιθανόλη, ισοβουτανόλη, διαιθυλεθέρας, ακετονιτρίλιο και ισοοκτάνιο.

---

### 2.15.5 ΖΥΜΟΓΡΑΦΗΜΑ ΛΙΠΑΣΗΣ

---

Η πειραματική διαδικασία του ζυμογραφήματος λιπάσης (Castro-Ochoa et al., 2005, Cadirci and Yasa, 2010) απαιτήσε τα παρακάτω διαλύματα:

- **Διάλυμα αναγέννησης** : Tris/HCl 100 mM, pH 8 με προσθήκη Triton X-100 (0,5 % w/v)
- **Υπόστρωμα** : άγαρ (2 % w/v), ελαιόλαδο (3 % w/v) και χρωστική Ροδαμίνη B (0,001 % w/v)

Αναλυτικά η διαδικασία περιελάμβανε:

- Το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης απουσία αποδιατακτικού παράγοντα (NATIVE PAGE) τοποθετήθηκε στο διάλυμα αναγέννησης για περίπου 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολούθως, τοποθετήθηκε στην επιφάνεια του υποστρώματος και επώαστηκε για 12 περίπου ώρες στους 60 °C, θερμοκρασία δράσης της λιπάσης. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτήσε ο έλεγχος εξάτμισης του νερού από το υπόστρωμα εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας.
- Στο τέλος της επώασης το υπόστρωμα μαζί με το πήκτωμα παρατηρήθηκε στην υπεριώδη ακτινοβολία. Τα προϊόντα της λιπολυτικής δράσης εμφάνισαν χαρακτηριστικό φθορισμό εξαιτίας της χρωστικής.

---

## 2.16 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΜΕΝΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ

---

### 2.16.1 ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ ΣΕ ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ

---

Τα ιοντικά υγρά είναι υγρά άλατα σε μία περιοχή θερμοκρασιών από -85 °C έως 223 °C, ενώ τα συνηθισμένα άλατα είναι υγρά μόνο στη θερμοκρασία τήξεώς τους, που είναι αρκετά υψηλή (πχ, NaCl σ.τ. 801 °C και LiCl σ.τ. 604 °C). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν τα ιοντικά υγρά που διατηρούν την υγρή κατάσταση τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η δομή τους εμφανίζει την ιδιαιτερότητα να περιλαμβάνει ένα μεγάλο οργανικό κατιόν και ένα συνήθως μικρό ανόργανο ανιόν, ενώ σε πιο σπάνιες περιπτώσεις το μικρό ανιόν είναι επίσης οργανικό. Έτσι, η τελική δομή που προκύπτει είναι μη κρυσταλλική αφού δεν υπάρχει δυνατότητα συμμετρικής διάταξης, επομένως σε αντίθεση με τα συνηθισμένα άλατα που είναι στερεά, είναι υγρά ακόμα και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα περισσότερα κοινά κατιόντα είναι βασισμένα στα παράγωγα ιμιδαζολίου (imidazolium), πυριδινίου (pyridinium), πυρρολιδίου (pyrrolidinium), αμμονίου (ammonium) και φωσφονίου (phosphonium). Τα ανιόντα αποτελούνται είτε από πολυπυρηνικά ιόντα, όπως  $Al_2Cl_7^-$ ,  $Al_3Cl_{10}^-$ , είτε μονοπυρηνικά ιόντα, όπως  $BF_4^-$ ,  $PF_6^-$ ,  $SbF_6^-$ ,  $ZnCl_3^-$ ,  $CuCl_2^-$ , τα οποία οδηγούν σε ουδέτερα στοιχειομετρικά ιοντικά υγρά.

Οι ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες των ιοντικών υγρών, όπως η χαμηλή τάση ατμών, η υψηλή θερμική σταθερότητά τους και η μειωμένη σε πολλές περιπτώσεις τοξικότητά τους, δικαιολογούν τον τίτλο τους ως εναλλακτικοί «πράσινοι» διαλύτες (Park and Kazlauskas, 2003, van Rantwijk et al., 2003). Επίσης, έχουν την ικανότητα

να διαλυτοποιούν μεγάλο εύρος ενώσεων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό διφασικών συστημάτων με πολλούς διαλύτες, ενώ παράλληλα η ιοντική τους φύση επιτρέπει την προσαρμογή και σχεδιασμό των ιδιοτήτων τους μέσω κατάλληλης επιλογής των ιοντικών ειδών που τα αποτελούν (Kragl et al., 2002, Wilkes, 2004). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν πιθανή και δυνατή τη χρήση των ιοντικών υγρών ως διαλύτες σε ποικίλες εφαρμογές (ηλεκτροχημικές συσκευές, χημική σύνθεση και κατάλυση, διαχωριστικές τεχνικές, σύνθεση πολυμερών, διάλυση δυσδιάλυτων υλικών όπως η κυτταρίνη κ.α.) μεταξύ των οποίων και οι βιοκαταλυτικές διαδικασίες. Γενικά, υπάρχουν τρεις τρόποι εφαρμογής των ιοντικών υγρών στην βιοκατάλυση: α) χρήση ως μοναδικών διαλυτών της αντίδρασης, β) χρήση σε μονοφασικά υδατικά συστήματα, γ) χρήση σε διφασικά συστήματα νερού ή οργανικού διαλύτη/ιοντικού υγρού (Kragl et al., 2002). Τα ένζυμα που έχουν χρησιμοποιηθεί σε διαδικασίες αυτού του τύπου συμμετέχουν σε ποικιλία αντιδράσεων (λιπάσες, πρωτεάσες, αμιδάσες πεπτιδίων, γλυκοσιδάσες, λυάσες και οξειδοαναγωγάσες) και διατηρούν την ενεργότητά και τη σταθερότητα τους στα ιοντικά υγρά επιδεικνύοντας μάλιστα υψηλότερη απόδοση συγκριτικά με τους οργανικούς διαλύτες (Katsoura et al., 2006, van Rantwijk and Sheldon, 2007, Katsoura et al., 2009).

---

## 2.16.2 ENZYMΙΚΑ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΟΛΗΣ

---

Τα ιοντικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προαφυδατωμένα. Η αφυδάτωση πραγματοποιήθηκε μέσω επώασης των ιοντικών υγρών για 48 ώρες σε μοριακά κόσκινα 4 Å.

### Ιοντικά Υγρά

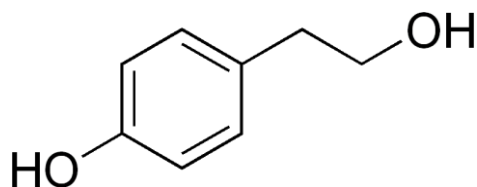
- 1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [bmim]BF<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich)
- 1-n-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [bmim]PF<sub>6</sub> (Alpha Aesar)

Η ακινητοποίηση της λιπάσης βασίστηκε στην προσρόφιση τους ενζύμου σε ένα στερεό φορέα όπως ο Celite. Η ακινητοποίηση έγινε με την προσθήκη 200 μL διαλύματος του ακατέργαστου ενζύμου σε 50 mg celite. Το παρασκεύασμα αφυδατώθηκε σε ξηραντήρα υπό κενό για 24 ώρες.

### Υλικό Ακινητοποίησης : Celite<sup>®</sup> 560 coarse (Fluka)

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις εστεροποίησης της τυροσόλης με το βινυλεστέρα του βουτυρικού οξέος σε άνυδρα ιοντικά υγρά [bmim]PF<sub>6</sub> και [bmim]BF<sub>4</sub> σύμφωνα με τη γενική μεθοδολογία που περιγράφεται σε προγενέστερη εργασία (Katsoura et al., 2009). Ο τελικός όγκος του ιοντικού υγρού ήταν 250 μL, ενώ η συγκέντρωση της τυροσόλης ήταν 20 mM, και του άκυλο δότη (βινυλεστέρας του βουτυρικού οξέος) ήταν 100 mM. Τα ενζυμικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν είτε λυοφυλιωμένα σκόνη ενζυμικού σκευάσματος (που προέκυψε μετά τη λυοφιλίωση 0,2 ml σκευάσματος) είτε ακινητοποιημένο ένζυμο (50 mg) σε celite. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 50 °C υπό ανάδευση 650 rpm και για χρόνο επώασης 72 ώρες.

**Υποστρώματα:** Τυροσόλη, βινυλεστέρας του βουτυρικού οξέος από τη Sigma.



**Εικόνα 2-10** Χημική δομή τυροσόλης.

Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε υγρός χρωματογράφος της εταιρείας Shimadzu (Kyoto, Ιαπωνία), με ανιχνευτή Diode array της Shimadzu (Ιαπωνία), ο οποίος ελέγχεται από το λογισμικό Shimadzu Class-vp, v.6.1. και σε στήλη Bondapak™ C18 ανάστροφης φάσης της εταιρείας Waters (Ιρλανδία) με διαστάσεις 3,9 x 300 mm, μέγεθος σωματιδίων 10μm και μέγεθος πόρων 125 Å. Ο διαχωρισμός των ουσιών επιτυγχάνεται με βάση το μέγεθος και το βαθμό λιποφιλικότητάς τους.

Οι μέθοδοι και οι διαλύτες που εφαρμόστηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων ήταν οι εξής:

A: νερό (H<sub>2</sub>O):οξικό οξύ (HCOOH) 0,1 %

B: Μεθανόλη

T=35 °C και χρόνος ανάλυσης 18 λεπτά.

A-B	55 %-45 %	20 %-80 %	20 %-80 %	55 %-45 %
Χρόνος (min)	3	6	15	18



### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

#### 3.1 ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

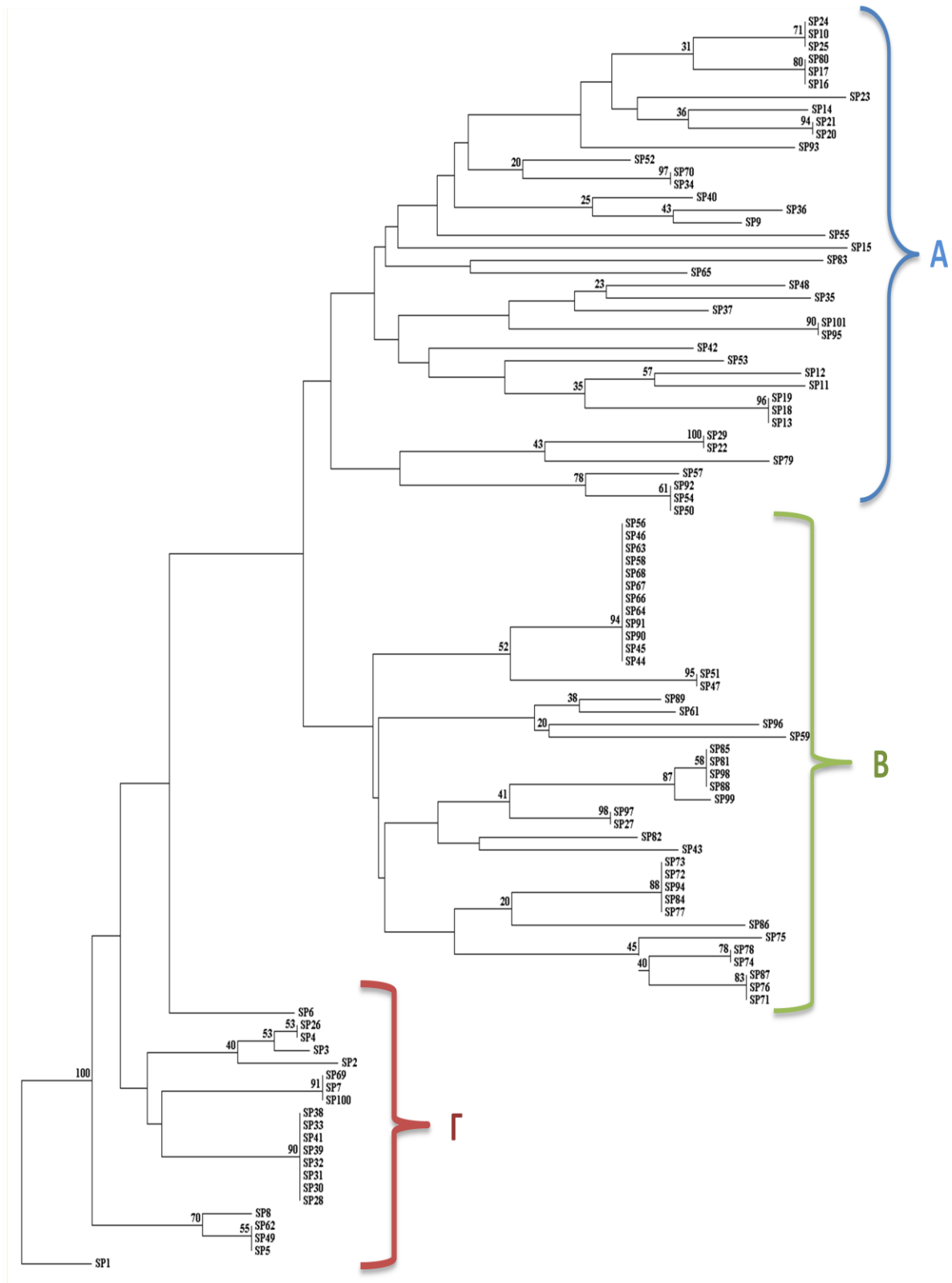
---

Κατά τη Διδακτορική Διατριβή του Μείντάνη Χ. (2005) στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, του Τομέα Βοτανικής, του Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών απομονώθηκαν μικροβιακά στελέχη από επιλεγμένες οικοθέσεις του ηφαιστειακού συμπλέγματος της Σαντορίνης. Πρόκειται για θερμοφιλά, στην πλειοψηφία τους, βακτήρια που ταξινομήθηκαν στα γένη *Bacillus* και *Geobacillus*.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του ενζυμικού δυναμικού του συνόλου των βακτηρίων και τα επιλεγμένα στελέχη για την υδρολυτική τους ικανότητα (15 για την ξυλανολυτική και κυτταρινολυτική δράση τους και 9 για το υψηλό λιπολυτικό δυναμικό τους) χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά και γενετικά και κατατέθηκαν σε διεθνείς τράπεζες μικροοργανισμών (§ 2.5).

Η ανάλυση και σύγκριση της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου των επιλεγμένων μικροοργανισμών εμφάνισε υψηλά ποσοστά ομοιότητας στις περισσότερες περιπτώσεις και η διάκριση σε επίπεδο στελέχους πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της BOX PCR. Το BOX PCR αποτύπωμα των 101 θερμοφίλων στελεχών αναλύθηκε με το πρόγραμμα PhotoCapt και καταγράφηκαν συνολικά 37 διαφορετικού μοριακού βάρους ζώνες σε όλα τα στελέχη (§ 2.5.2.3). Στη συνέχεια ο ραβδωτός κώδικας κάθε στελέχους μεταφράστηκε σε γλώσσα 0 και 1 όπου το 0 αντιπροσωπεύει την απουσία ζώνης και το 1 την παρουσία. Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα TREECON (Van de Peer and De Wachter, 1994) και κατασκευάστηκε δενδρόγραμμα (Εικόνα 3-1) με τη μέθοδο του πλησιέστερου γείτονα (neighbor-joining method).

Η παρατήρηση του δενδρογράμματος (Εικόνα 3-1) αναδεικνύει τη μεγάλη ποικιλότητα εντός του γένους στα αποτυπώματα των στελεχών. Ομοιότητα εμφανίζουν τα στελέχη SP44, SP45, SP46, SP56, SP58, SP63, SP64, SP66, SP67, SP68, SP90 και SP91, τα στελέχη SP81, SP85, SP88, SP98 και SP99, τα στελέχη SP72, SP73, SP77, SP84 και SP94 καθώς και τα στελέχη SP28, SP30, SP31, SP32, SP33, SP38, SP39 και SP41. Με χαλαρά κριτήρια ομοιότητας τα στελέχη ομαδοποιούνται σε τρεις μεγάλες ομάδες Α (40 μέλη), Β (40 μέλη) και Γ (21 μέλη).



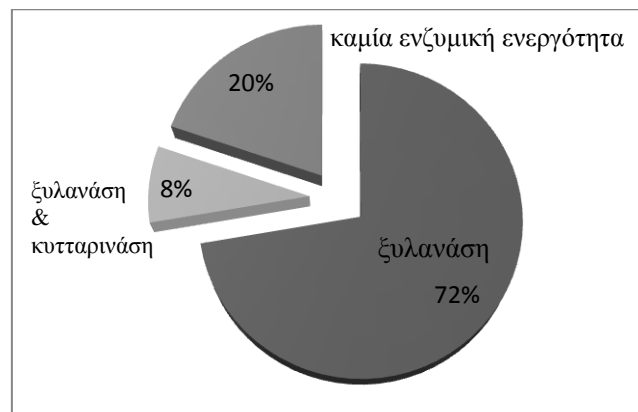
**Εικόνα 3-1** Δενδρόγραμμα με το σύνολο των 101 θερμόφιλων βακτηριακών στελεχών, με βάση το BOX PCR αποτύπωμα τους (TREECON software, neighbor-joining method) και ομαδοποίηση σε 3 ομάδες A, B και Γ. Στο δέντρο τοποθετήθηκε ως ρίζα το SP1. Οι τιμές bootstrap εκφράζονται ως ποσοστό στις 100 επαναλήψεις.

## 3.2 ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ

### 3.2.1 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΝΟΛΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΟΛΥΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Η ποιοτική εκτίμηση του κυτταρινολυτικού και ξυλανολυτικού δυναμικού των 101 θερμοφίλων στελεχών πραγματοποιήθηκε σε στερεές καλλιέργειες με μοναδικές πηγές άνθρακα καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη (CMC) και ξυλάνη σημύδας αντίστοιχα, καθώς και ακόλουθη χρώση με Ερυθρό του Κονγκό (§2.6.1). Η υδρόλυση του υποστρώματος οδηγεί στην εμφάνιση ζώνης αποχρωματισμού η οποία και καταμετρήθηκε. Μάλιστα, με στόχο τη σαφή διάκριση των στελεχών με υψηλά επίπεδα ενζυμικής έκκρισης συνυπολογίστηκε η βιωσιμότητα του αρχικού εμβολίου και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως διάμετρος ζώνης αποχρωματισμού ανά  $10^6$  cfu εμβολίου. Η σύγκριση των αντίστοιχων σχετικών ενεργοτήτων εμφανίζεται στον Πίνακα 3-1.

Ένα υψηλό ποσοστό (80%) των θερμοφίλων βακτηρίων εμφάνισε ξυλανολυτική δράση με επίπεδα έκκρισης να ποικίλλουν από  $0,11 \text{ mm} \cdot 10^{-6}$  cfu για το στέλεχος SP44 έως  $27,8 \text{ mm} \cdot 10^{-6}$  cfu για το στέλεχος SP68. Ανάμεσα σε αυτά, 8 στελέχη εμφάνισαν ταυτόχρονη κυτταρινολυτική δράση. Ωστόσο, η υδρόλυση της CMC κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα και δεν ξεπέρασε το  $1 \text{ mm} \cdot 10^{-6}$  cfu. Αξιοσημείωτο, επίσης είναι ότι κανένα στέλεχος δεν παρουσίασε μόνο κυτταρινολυτική δράση στις στερεές καλλιέργειες.



**Εικόνα 3-2** Ποσοστιαία ποιοτική εκτίμηση ξυλανολυτικής και κυτταρινολυτικής ικανότητας θερμοφίλων βακτηρίων.

Με βάση τα αποτελέσματα της εκτίμησης του υδρολυτικού δυναμικού των θερμοφίλων στελεχών επιλέχθηκαν 15 στελέχη για περαιτέρω μελέτη. Τα 8 από αυτά εμφάνισαν ταυτόχρονη ξυλανολυτική και κυτταρινολυτική δράση (SP17, SP24, SP37, SP38, SP45, SP46, SP47, SP50) ενώ τα υπόλοιπα 7 παρουσίασαν τις υψηλότερες σχετικές ενεργότητες ξυλανάσης (SP8, SP11, SP59, SP68, SP69, SP74, SP87).

**Πίνακας 3-1** Σύγκριση του υδρολυτικού δυναμικού των θερμοφίλων βακτηριακών στελεχών σε υποστρώματα CMC και ξυλάνης κατά τη διάρκεια στερεών καλλιεργειών. Οι τιμές αντιστοιχούν στη διάμετρο αποχρωματισμού (mm) ανά  $10^6$  βιώσιμες μονάδες εμβολίου. Για όλα τα στελέχη η τυπική απόκλιση (SD) κυμαίνεται μεταξύ 1,3 και 17,1 %. Τα επιλεγμένα στελέχη για περαιτέρω μελέτη εμφανίζονται σκιασμένα.

Στέλεχος	Ένζυμο		Στέλεχος	Ένζυμο		Στέλεχος	Ένζυμο	
	Ξυλάνη	CMC		Ξυλάνη	CMC		Ξυλάνη	CMC
SP1	0.00	0.00	SP35	0.00	0.00	SP69	21.25	0.00
SP2	6.33	0.00	SP36	0.00	0.00	SP70	1.71	0.00
SP3	0.00	0.00	SP37	3.71	0.81	SP71	0.00	0.00
SP4	0.30	0.00	SP38	0.66	0.15	SP72	0.67	0.00
SP5	0.64	0.00	SP39	0.43	0.00	SP73	0.58	0.00
SP6	0.00	0.00	SP40	0.52	0.00	SP74	9.50	0.00
SP7	5.36	0.00	SP41	0.00	0.00	SP75	0.00	0.00
SP8	10.40	0.00	SP42	6.94	0.00	SP76	2.29	0.00
SP9	0.00	0.00	SP43	0.18	0.00	SP77	2.09	0.00
SP10	1.46	0.00	SP44	0.11	0.00	SP78	4.56	0.00
SP11	11.43	0.00	SP45	0.14	0.18	SP79	2.80	0.00
SP12	7.57	0.00	SP46	0.14	0.60	SP80	2.19	0.00
SP13	0.33	0.00	SP47	0.08	0.23	SP81	1.81	0.00
SP14	0.00	0.00	SP48	0.29	0.00	SP82	2.50	0.00
SP15	6.25	0.00	SP49	1.28	0.00	SP83	0.21	0.00
SP16	0.75	0.00	SP50	0.93	0.37	SP84	0.00	0.00
SP17	0.17	0.09	SP51	2.16	0.00	SP85	0.00	0.00
SP18	0.40	0.00	SP52	0.00	0.00	SP86	0.00	0.00
SP19	1.25	0.00	SP53	1.24	0.00	SP87	8.53	0.00
SP20	1.34	0.00	SP54	1.02	0.00	SP88	3.21	0.00
SP21	0.94	0.00	SP55	3.21	0.00	SP89	0.00	0.00
SP22	0.44	0.00	SP56	3.91	0.00	SP90	4.10	0.00
SP23	0.15	0.00	SP57	0.58	0.00	SP91	0.54	0.00
SP24	0.29	0.12	SP58	0.40	0.00	SP92	2.50	0.00
SP25	0.32	0.00	SP59	10.08	0.00	SP93	7.50	0.00
SP26	0.00	0.00	SP60	1.29	0.00	SP94	1.19	0.00
SP27	0.23	0.00	SP61	0.92	0.00	SP95	0.47	0.00
SP28	1.04	0.00	SP62	0.41	0.00	SP96	1.78	0.00
SP29	0.00	0.00	SP63	1.91	0.00	SP97	0.00	0.00
SP30	0.34	0.00	SP64	5.19	0.00	SP98	0.00	0.00
SP31	0.58	0.00	SP65	0.79	0.00	SP99	0.00	0.00
SP32	4.03	0.00	SP66	8.10	0.00	SP100	0.65	0.00
SP33	1.53	0.00	SP67	7.73	0.00	SP101	0.46	0.00
SP34	1.56	0.00	SP68	27.78	0.00			

### 3.2.2 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ

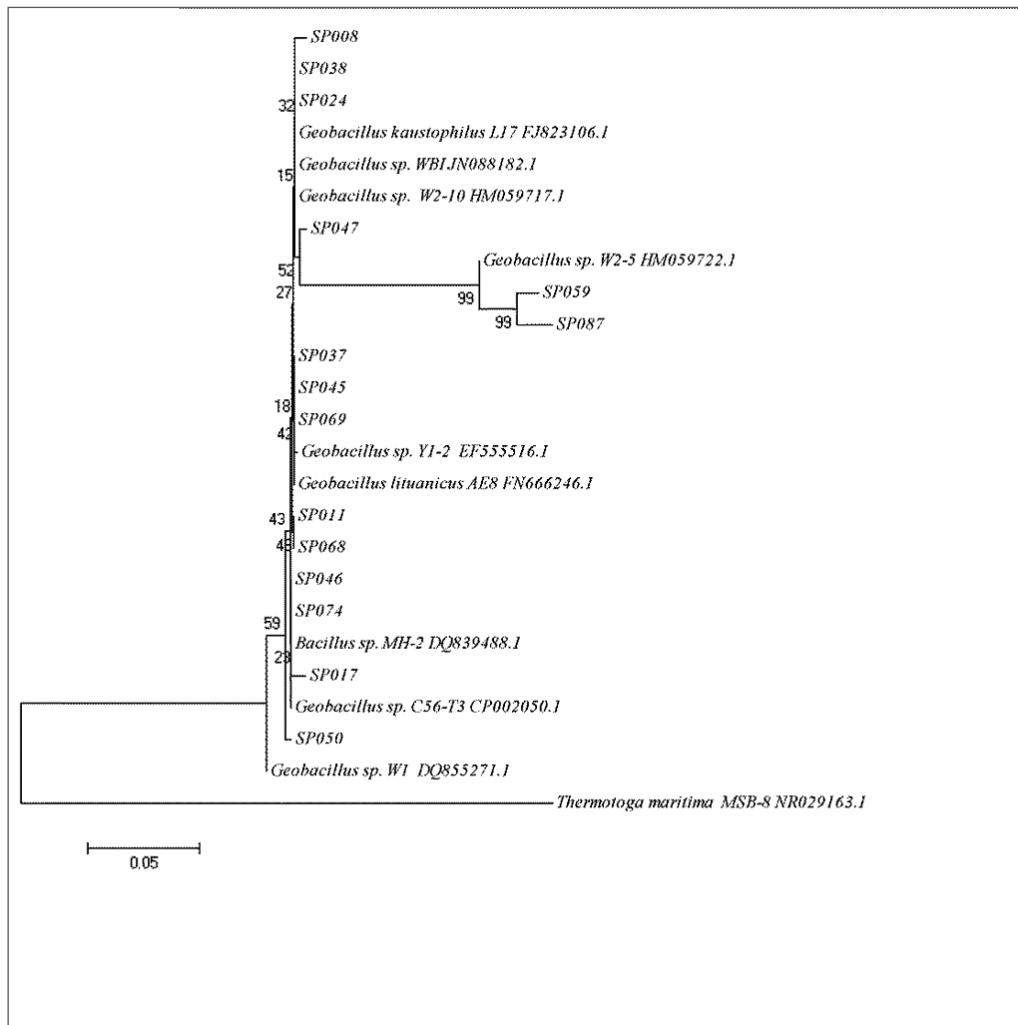
Τα αποτελέσματα της ποιοτικής εκτίμησης της κυτταρινολυτικής και ξυλανολυτικής ικανότητας των 101 θερμοφίλων στελεχών οδήγησαν στην επιλογή 15 εξ αυτών για περαιτέρω μελέτη (Πίνακας 3-1). Αρχικά, στα επιλεγμένα στελέχη πραγματοποιήθηκαν απλές βιοχημικές δοκιμές στις οποίες και τα 15 βακτήρια εμφάνισαν θετική χρώση κατά Gram καθώς και παρουσία των ενζύμων οξειδάση και καταλάση, χαρακτηριστικά των θερμοφίλων βακίλων (§ 2.5.1). Στη συνέχεια, απομονώθηκε το ολικό γενετικό υλικό τους, το οποίο αποτέλεσε μήτρα για την ενίσχυση τμήματος του 16S rRNA γονιδίου και ακολούθησε αλληλούχηση του ενισχυμένου προϊόντος PCR (§ 2.5.2). Η ανάλυση της αλληλουχίας του τμήματος 16S rDNA ανέδειξε υψηλή φυλογενετική ταυτότητα (95-99,5 %) της πλειοψηφίας των στελεχών με το γένος *Geobacillus* ενώ στα στελέχη SP47, SP50 και SP74 με το γένος *Bacillus* (Πίνακας 3-3). Κατά τη μεταξύ τους σύγκριση, τα 13 από τα 15 στελέχη εμφανίστηκαν στενά συγγενικά με μεγάλη ομοιότητα στην αλληλουχία των κομματιών 16S rDNA. Αντίθετα, τα στελέχη SP59 και SP87 εμφάνισαν ποσοστό ομοιότητας μικρότερο από 90 % με τα υπόλοιπα επιλεγμένα στελέχη (Πίνακας 3-2) και ομαδοποιήθηκαν στον ίδιο κλάδο στο φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 3-3). Τα ίδια στελέχη παρουσίασαν και τα χαμηλότερα ποσοστά ταυτότητας με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες αντίστοιχων γονιδίων στη διεθνή τράπεζα δεδομένων. Αξιοσημείωτο επίσης είναι, πως εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά στις στερεές καλλιέργειες με υψηλά επίπεδα ξυλανολυτικής δράσης και μη ανιχνεύσιμη κυτταρινολυτική ενεργότητα. Τέλος, τα ενισχυμένα τμήματα του γονιδίου 16S rRNA κατατέθηκαν στη διεθνή βάση δεδομένων NCBI (Πίνακας 3-3).

**Πίνακας 3-2** Σύγκριση αλληλουχιών των τμημάτων 16S rDNA μεταξύ των επιλεγμένων στελεχών. Με σκίαση εμφανίζονται τα στελέχη με ταυτόχρονη κυτταρινολυτική και ξυλανολυτική δράση.

Στέλεχος	Ποσοστό Ταυτότητας Αλληλουχίας Τμήματος 16S rDNA														
	SP08	SP11	SP17	SP24	SP37	SP38	SP45	SP46	SP47	SP50	SP59	SP68	SP69	SP74	SP87
<b>SP08</b>	100														
<b>SP11</b>	98.1	100													
<b>SP17</b>	98.0	99.1	100												
<b>SP24</b>	98.4	99.2	98.8	100											
<b>SP37</b>	98.3	98.8	98.8	98.8	100										
<b>SP38</b>	98.4	99.4	98.8	99.0	98.6	100									
<b>SP45</b>	97.8	98.7	98.3	97.8	98.4	98.3	100								
<b>SP46</b>	97.9	98.7	99.3	98.8	98.3	98.8	98.5	100							
<b>SP47</b>	97.7	98.4	98.5	97.3	97.7	97.7	97.3	98.4	100						
<b>SP50</b>	97.7	98.4	98.3	96.7	97.6	96.6	96.9	98.4	96.0	100					
<b>SP59</b>	89.1	89.0	89.0	89.5	89.4	89.3	89.0	88.8	89.3	88.6	100				
<b>SP68</b>	98.3	99.3	99.1	99.1	99.2	99.4	99.0	99.0	98.1	98.7	88.9	100			
<b>SP69</b>	98.0	98.8	98.5	99.3	99.4	99.4	99.0	98.8	98.3	98.3	89.4	99.0	100		
<b>SP74</b>	98.2	98.8	98.9	98.6	99.1	98.7	98.2	99.0	97.0	97.1	89.2	98.9	99.5	100	
<b>SP87</b>	89.2	89.7	89.3	88.9	88.7	88.2	88.7	89.7	87.8	88.3	95.5	89.1	89.4	88.5	100

**Πίνακας 3-3** Βιοχημικός, γενετικός χαρακτηρισμός και κωδικοί κατάθεσης στην τράπεζα δεδομένων NCBI των επιλεγμένων στελεχών για την κυτταρινολυτική και ξυλανολυτική τους ικανότητα.

Στέλεχος	Κωδικός Κατάθεσης NCBI	Βιοχημικός Χαρακτηρισμός			Γενετικός Χαρακτηρισμός 16S rDNA		
		Gram	Οξειδάση	Καταλάση	Πλησιέστερος φυλογενετικά γείτονας	%Ταυτότητα	Τμήμα 16S rDNA (βάσεις)
<b>SP08</b>	JN692238	+	+	+	<i>Geobacillus</i> sp. KTL04, JF276453.1	98.7	888
<b>SP11</b>	JN692239	+	+	+	<i>Geobacillus</i> sp. W2-10, HM059717.1	99.3	896
<b>SP17</b>	JN692240	+	+	+	<i>Geobacillus</i> sp. ABRII9, JN315635.1	99.1	884
<b>SP24</b>	JN692241	+	+	+	<i>Geobacillus</i> sp. WBI, JN088182.1	99.1	895
<b>SP37</b>	JN692242	+	+	+	<i>Geobacillus</i> sp. W2-10, HM059717.1	99.0	900
<b>SP38</b>	JN692243	+	+	+	<i>Geobacillus</i> sp. W2-10, HM059717.1	99.4	896
<b>SP45</b>	JN692244	+	+	+	<i>Geobacillus</i> sp. Y1-2, EF555516.1	98.4	885
<b>SP46</b>	JN692245	+	+	+	<i>Geobacillus</i> sp. ABRII9, JN315635.1	99.3	898
<b>SP47</b>	JN692246	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp. MH-2, DQ839488.1	97.5	895
<b>SP50</b>	JN692247	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp. MH-2, DQ839488.1	96.4	897
<b>SP59</b>	JN692248	+	+	+	<i>Geobacillus</i> sp. W2-5, HM059722.1	95.5	855
<b>SP68</b>	JN692249	+	+	+	<i>Geobacillus</i> sp. 71, JN021318.1	99.5	897
<b>SP69</b>	JN692250	+	+	+	<i>Geobacillus</i> sp. XT15, HQ891030.1	99.5	812
<b>SP74</b>	JN692251	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp. MH-2, DQ839488.1	98.6	893
<b>SP87</b>	JN692252	+	+	+	<i>Geobacillus</i> sp. W2-5, HM059722.1	95.0	900



Εικόνα 3-3 Φυλογενετικό δέντρο των 15 επιλεγμένων στελεχών για την κυτταρινολυτική και ξυλανολυτική τους δράση. (MEGA5 software, neighbor-joining method). Οι τιμές bootstrap εκφράζονται ως ποσοστό στις 100 επαναλήψεις.

### 3.2.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΟΛΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΟΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα 15 επιλεγμένα στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες διαφορετικών πηγών άνθρακα (ξύλοζη, ξυλάνη, κελλοβιόζη, καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη, πίτυρο και θρυμματισμένο σπάδικα καλαμποκιού). Η ενζυμική ενεργότητα κυτταρινασών, ξυλاناσών και επιπλέον β-γλυκοσιδασών και β-ξυλοσιδασών προσδιορίστηκε έμμεσα με ποσοτικό προσδιορισμό του παραγόμενου προϊόντος της αντίστοιχης ενζυμικής αντίδρασης σε κάθε υπόστρωμα (§ 2.7.1) και συσχετίστηκε με τη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών (cfu/mL). Με την παραπάνω διαδικασία, έγινε προσπάθεια μελέτης του επαγωγικού ρόλου του κάθε υποστρώματος στην ενζυμική έκφραση καθώς και εύρεση της άριστης πηγής άνθρακα (Πίνακας 3-4).

**Πίνακας 3-4** Ποιοτικός προσδιορισμός παραγωγής και έκκρισης κυτταρινασών και ξυλανασών και προσδιορισμός ενεργότητας κυτταρινάσης, ξυλανάσης, γλυκοζιδάσης και ξυλοζιδάσης σε υγρές καλλιέργειες των 15 επιλεγμένων στελεχών. Στη δεύτερη περίπτωση οι αναγραφόμενες τιμές προκύπτουν από το μέσο όρο των τιμών στις 2 και 7 ημέρες καλλιέργειας και οι μονάδες αντιστοιχούν σε U / cfu \* 10<sup>-6</sup>. Οι μπλε ράβδοι στο εσωτερικό των κελιών είναι ανάλογες των ενζυμικών ενεργοτήτων.

		Υγρές Καλλιέργειες						Στερεές καλλιέργειες		
		Πηγές Άνθρακα						Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκίου	ξυλάνη	CMC		
κυτταρινάση	0,02631	0,00000	0,11302	0,00000	0,00045	0,00000		*	SP08	
ξυλανάση	0,00000	0,00000	0,13018	0,00000	0,00517	0,00082	✓			
γλυκοζιδάση	0,00006	0,00013	0,00165	0,00006	0,00098	0,00008				
ξυλοζιδάση	0,00019	0,00021	0,00002	0,00001	0,00005	0,00052				
		Υγρές Καλλιέργειες						Στερεές καλλιέργειες		
		Πηγές Άνθρακα						Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκίου	ξυλάνη	CMC		
κυτταρινάση	0,12494	0,01922	0,12650	0,00000	0,00074	0,00000		*	SP11	
ξυλανάση	0,28199	0,12013	0,21200	0,00000	0,00101	0,00000	✓			
γλυκοζιδάση	0,00031	0,00028	0,00001	0,00013	0,00004	0,00310				
ξυλοζιδάση	0,00021	0,00074	0,00032	0,00010	0,00001	0,00062				
		Υγρές Καλλιέργειες						Στερεές καλλιέργειες		
		Πηγές Άνθρακα						Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκίου	ξυλάνη	CMC		
κυτταρινάση	0,14910	0,00000	0,09216	0,00000	0,00041	0,00033		✓	SP17	
ξυλανάση	0,36319	0,00000	0,00000	0,00000	0,01074	0,00000	✓			
γλυκοζιδάση	0,00010	0,00001	0,00014	0,00022	0,01287	0,00049				
ξυλοζιδάση	0,00037	0,00128	0,00009	0,00061	0,00001	0,00081				
		Υγρές Καλλιέργειες						Στερεές καλλιέργειες		
		Πηγές Άνθρακα						Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκίου	ξυλάνη	CMC		
κυτταρινάση	0,39129	0,18189	0,12126	0,06622	0,07170	0,02580		✓	SP24	
ξυλανάση	1,50369	0,29160	0,48132	0,04567	0,15350	0,24593	✓			
γλυκοζιδάση	0,00096	0,00044	0,00015	0,00066	0,35180	0,00000				
ξυλοζιδάση	0,00005	0,00073	0,00016	0,00008	0,06000	0,00013				
		Υγρές Καλλιέργειες						Στερεές καλλιέργειες		
		Πηγές Άνθρακα						Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκίου	ξυλάνη	CMC		
κυτταρινάση	0,37991	0,00000	0,00000	0,00000	0,00033	0,11001		✓	SP37	
ξυλανάση	0,00000	0,15790	0,00000	0,00000	0,00217	1,10803	✓			
γλυκοζιδάση	0,00057	0,00000	0,00051	0,00068	0,00000	0,00040				
ξυλοζιδάση	0,00000	0,00137	0,00055	0,00091	0,00014	0,00209				
		Υγρές Καλλιέργειες						Στερεές καλλιέργειες		
		Πηγές Άνθρακα						Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκίου	ξυλάνη	CMC		
κυτταρινάση	0,1798	0,0224	0,0589	0,0000	0,0951	0,0000		✓	SP38	
ξυλανάση	0,8502	0,5200	0,3345	0,0567	0,1315	0,0000	✓			
γλυκοζιδάση	0,0001	0,0000	0,0001	0,0001	0,0008	0,0001				
ξυλοζιδάση	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000	0,0076	0,0004				



Συνέχεια του Πίνακα 3-4

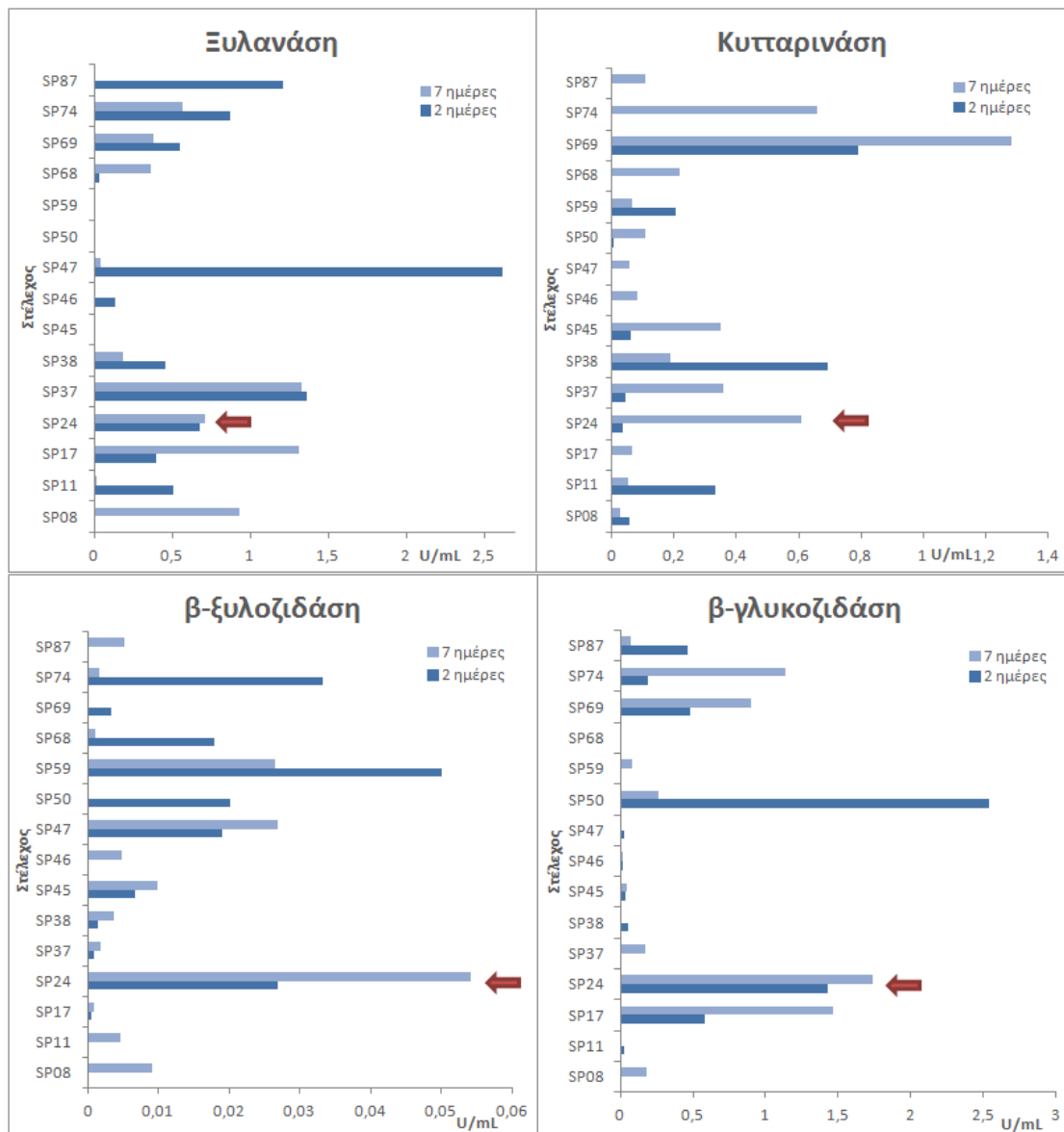
Υγρές Καλλιέργειες							Στερεές καλλιέργειες		SP45
Πηγές Άνθρακα							Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού	ξυλάνη	CMC	
κνταρινάση	0,1993	0,0225	0,0000	0,0000	0,0071	0,0000		✓	
ξυλανάση	0,3724	0,3877	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	✓		
γλυκοζιδάση	0,0001	0,0002	0,0001	0,0001	0,0003	0,0000			
ξυλοζιδάση	0,0000	0,0018	0,0000	0,0001	0,0013	0,0001			
Υγρές Καλλιέργειες							Στερεές καλλιέργειες		SP46
Πηγές Άνθρακα							Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού	ξυλάνη	CMC	
κνταρινάση	0,348	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000		✓	
ξυλανάση	0,732	0,160	0,000	0,000	0,002	0,020	✓		
γλυκοζιδάση	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000			
ξυλοζιδάση	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
Υγρές Καλλιέργειες							Στερεές καλλιέργειες		SP47
Πηγές Άνθρακα							Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού	ξυλάνη	CMC	
κνταρινάση	0,000	0,030	0,000	0,000	0,001	0,000		✓	
ξυλανάση	0,000	0,063	0,055	0,000	0,042	0,000	✓		
γλυκοζιδάση	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
ξυλοζιδάση	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000			
Υγρές Καλλιέργειες							Στερεές καλλιέργειες		SP50
Πηγές Άνθρακα							Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού	ξυλάνη	CMC	
κνταρινάση	0,03888	0,00000	0,02809	0,00306	0,02372	0,00000		✓	
ξυλανάση	0,18240	0,10309	0,16395	0,00000	0,00000	0,00000	✓		
γλυκοζιδάση	0,00006	0,00005	0,00101	0,00003	0,59670	0,00001			
ξυλοζιδάση	0,00020	0,00107	0,00000	0,00000	0,00432	0,00009			
Υγρές Καλλιέργειες							Στερεές καλλιέργειες		SP59
Πηγές Άνθρακα							Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού	ξυλάνη	CMC	
κνταρινάση	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00090	0,00000		*	
ξυλανάση	0,18332	0,07738	0,14996	0,00011	0,00000	0,02812	✓		
γλυκοζιδάση	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00028	0,00001			
ξυλοζιδάση	0,00003	0,00001	0,00001	0,00000	0,00025	0,00000			
Υγρές Καλλιέργειες							Στερεές καλλιέργειες		SP68
Πηγές Άνθρακα							Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού	ξυλάνη	CMC	
κνταρινάση	0,00000	0,00640	0,06655	0,00000	0,00453	0,00000		*	
ξυλανάση	0,00000	0,00000	0,22615	0,00000	0,00817	0,00000	✓		
γλυκοζιδάση	0,00006	0,00005	0,00101	0,00003	0,00009	0,00001			
ξυλοζιδάση	0,00125	0,00027	0,00134	0,00029	0,00039	0,00037			
Υγρές Καλλιέργειες							Στερεές καλλιέργειες		SP69
Πηγές Άνθρακα							Πηγές Άνθρακα		
Ένζυμο	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού	ξυλάνη	CMC	
κνταρινάση	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,02519	0,00000		*	
ξυλανάση	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,01111	0,00000	✓		
γλυκοζιδάση	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,01651	0,00000			
ξυλοζιδάση	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00004	0,00000			

Συνέχεια του Πίνακα 3-4

Ένζυμο	Υγρές Καλλιέργειες						Στερεές καλλιέργειες		SP74
	Πηγές Άνθρακα						Πηγές Άνθρακα		
	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού	ξυλάνη	CMC	
κυτταρινάση	0,05442	0,00000	0,00000	0,00000	0,54994	0,00000		*	
ξυλανάση	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,25343	0,00000	✓		
γλυκοζιδάση	0,00001	0,00003	0,00000	0,00001	0,01346	0,00004			
ξυλοζιδάση	0,00000	0,00017	0,00005	0,00004	0,50962	0,00011			
Ένζυμο	Υγρές Καλλιέργειες						Στερεές καλλιέργειες		SP87
	Πηγές Άνθρακα						Πηγές Άνθρακα		
	ξυλόζη	ξυλάνη	κελλοβιόζη	CMC	πίτυρο	θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού	ξυλάνη	CMC	
κυτταρινάση	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00221	0,00000		*	
ξυλανάση	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00019	0,00000	✓		
γλυκοζιδάση	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00001	0,00000			
ξυλοζιδάση	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00098	0,00112			

Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 3-4 και της Εικόνας 3-4 έδωσαν τις απαραίτητες πληροφορίες για το επόμενο πειραματικό βήμα. Στην πλειοψηφία των στελεχών, εντοπίστηκε ξυλανάση και κυτταρινάση ενώ η εξωκυτταρική ενεργότητα γλυκοζιδάσης και ξυλοζιδάσης ήταν περιορισμένη, καθότι τα ένζυμα αυτά ενδεχομένως εντοπίζονται ενδοκυτταρικά ή βρίσκονται προσδεμένα στην κυτταρική μεμβράνη.

Αναλυτικότερα, όσον αφορά στην ξυλανάση η υψηλότερη, σχετική με τη βιωσιμότητα ενεργότητα, εμφανίστηκε παρουσία ξυλόζης στο στέλεχος SP24 ( $1,5 \text{ U/cfu} \cdot 10^{-6}$ ), στην κυτταρινάση, εντοπίστηκε στο στέλεχος SP74 παρουσία πτύρου ( $0,5 \text{ U/cfu} \cdot 10^{-6}$ ), στη γλυκοζιδάση, παρουσία πτύρου στα στελέχη SP24 και SP50 ( $0,4$  και  $0,59 \text{ U/cfu} \cdot 10^{-6}$  αντίστοιχα) και στην ξυλοζιδάση παρουσία πτύρου στο στέλεχος SP74 ( $0,5 \text{ U/cfu} \cdot 10^{-6}$ ). Η ξυλόζη, ως βασική πηγή άνθρακα, εμφάνισε επαγωγική επίδραση στην έκκριση ξυλανάσης σε τουλάχιστον 8 στελέχη (SP11, SP17, SP24, SP38, SP45, SP46, SP50, SP59), όχι όμως ανάλογη συμπεριφορά στα υπόλοιπα 3 ένζυμα των οποίων οι ενεργότητες κυμάνθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Η ξυλάνη, προώθησε την ταυτόχρονη έκκριση κυτταρινάσης και ξυλανάσης σε 5 στελέχη (SP11, SP24, SP38, SP45, SP47) ενώ ανιχνεύθηκε μόνο ξυλανολυτική δράση σε 2 στελέχη (SP37, SP50). Η καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη (CMC) εμφανίστηκε ως η χειρότερη επαγωγική πηγή άνθρακα για τα υπό μελέτη ένζυμα στην παρούσα εργασία εν αντιθέσει με το πτύρο σίτου, παρουσία του οποίου ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα και τα 4 ένζυμα στην πλειοψηφία των στελεχών (SP08, SP11, SP17, SP24, SP38, SP68, SP69, SP74, SP87). Με το δεύτερο σύνθετο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε, (θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού) εμφανίστηκε ταυτόχρονη έκκριση των αντίστοιχων ενζύμων μόλις σε 1 στέλεχος (SP37).



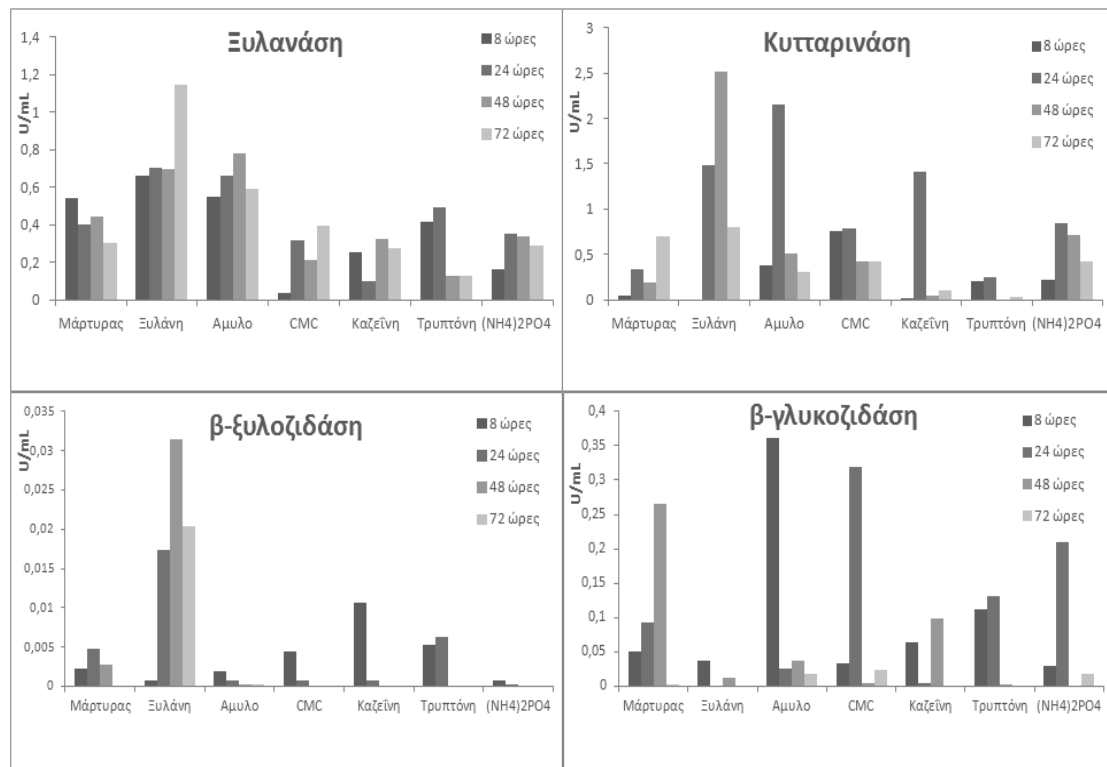
**Εικόνα 3-4** Ποσοτική εκτίμηση ενζυμικής ενεργότητας στο εξωκυτταρικό υγρό έπειτα από υγρή καλλιέργεια με μοναδική πηγή άνθρακα το πίτυρο στα 15 επιλεγμένα στελέχη (2 και 7 ημέρες). Επιλογή στελέχους SP24 εξαιτίας της ικανότητας ταυτόχρονης έκκρισης και των 4 υδρολυτικών ενζύμων σε ικανοποιητικά επίπεδα (ανάλογη συμπεριφορά και στις στερεές καλλιέργειες).

Με δεδομένο το χαμηλό κόστος του πτύρου σίτου και σε συνδυασμό με το ότι εμφανίστηκε ως η καλύτερη επαγωγικά πηγή άνθρακα για την ταυτόχρονη μεγάλη έκκριση ξυλανασών και κυτταρινασών επιλέχθηκε ως βασική πηγή για τις περαιτέρω καλλιέργειες. Παρατηρώντας την πορεία ενζυμικής έκκρισης των 15 στελεχών στις υγρές καλλιέργειες με μοναδική πηγή το πίτυρο (Εικόνα 3-4), το στέλεχος SP24 εμφάνισε ταυτόχρονη έκκριση και των 4 υδρολυτικών ενζύμων σε ικανοποιητικές ποσότητες σε όλα τα χρονικά στάδια δειγματοληψίας. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί και με τις στερεές καλλιέργειες όπου το εν λόγω στέλεχος εμφάνισε υδρόλυση και των δύο υποστρωμάτων (ξυλάνη και CMC). Συνεπώς, το στέλεχος SP24 επιλέχθηκε για την περαιτέρω μελέτη της ενζυμικής βιοσύνθεσης.

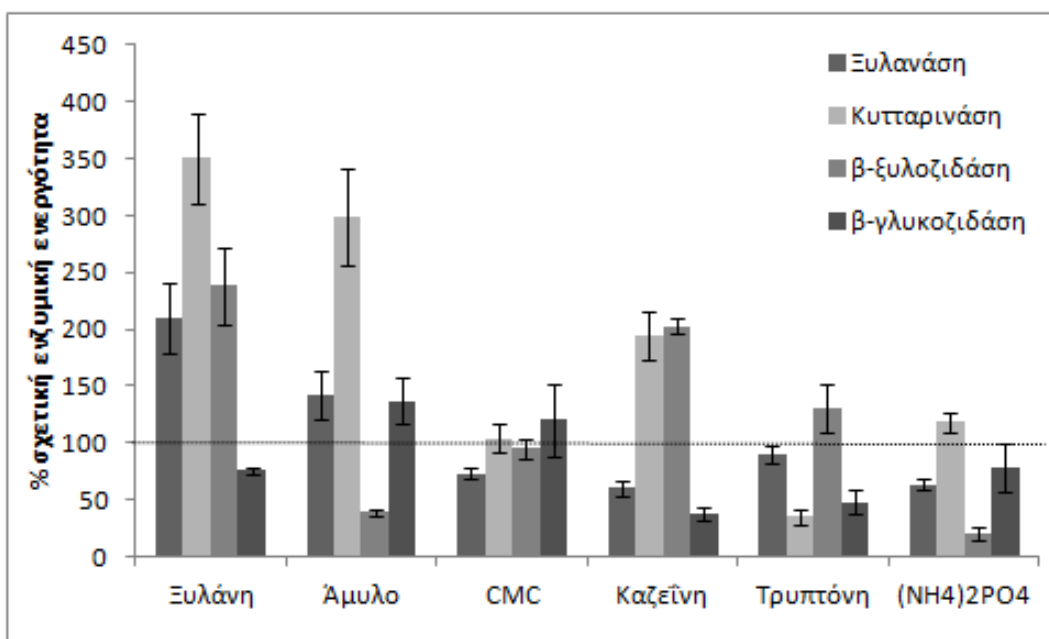
## 3.2.4 ENZYMIKH BIOUSYNΘΕΣΗ

### 3.2.4.1 ΑΡΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Το στελέχος SP24 (Κωδικός κατάθεσης 16S rDNA NCBI, JN088182.1) επιλέχθηκε ως αντιπροσωπευτικός μικροοργανισμός για τη λεπτομερή μελέτη της φυσιολογίας της ταυτόχρονης έκκρισης ενζύμων με ικανότητα υδρόλυσης βιομάζας. Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση μιας επιπλέον πηγής άνθρακα ή αζώτου, ως πρόσθετο στο πίτυρο σίτου, στην ανάπτυξη και έκκριση των υδρολυτικών ενζύμων. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε σειρά καλλιεργειών σε βασικό υπόστρωμα BM1 με πηγή άνθρακα το πίτυρο (2 % w/v) και πρόσθετες πηγές άνθρακα (ξυλάνη, άμυλο, CMC) ή αζώτου (καζεΐνη, τρυπτόνη, φωσφορικό αμμώνιο) σε σταθερή συγκέντρωση 0,125 % (w/v). Η ενζυμική ενεργότητα των υπό μελέτη ενζύμων ( ξυλανάση, κυτταρινάση, β-ξυλοζιδάση και β-γλυκοζιδάση) εκτιμήθηκε σε δείγματα των 8, 24, 48 και 72 ωρών επώασης των καλλιεργειών στους 60 °C οι οποίες για κάθε συνθήκη ήταν τριπλές. Οι μέσοι όροι των τιμών απεικονίζονται στις Εικόνες 3-5 και 3-6.



**Εικόνα 3-5** Επίδραση πρόσθετων πηγών άνθρακα και αζώτου στο βασικό υπόστρωμα με πίτυρο (μάρτυρας) στην ενζυμική παραγωγή κυτταρινάσης, ξυλανάσης, β-ξυλοζιδάσης και β-γλυκοζιδάσης σε κλειστές καλλιέργειες του στελέχους SP24 (δείγματα 8, 24, 48 και 72 ωρών). Οι ενζυμικές ενεργότητες προκύπτουν από το μέσο όρο τριπλών καλλιεργειών για την κάθε συνθήκη.

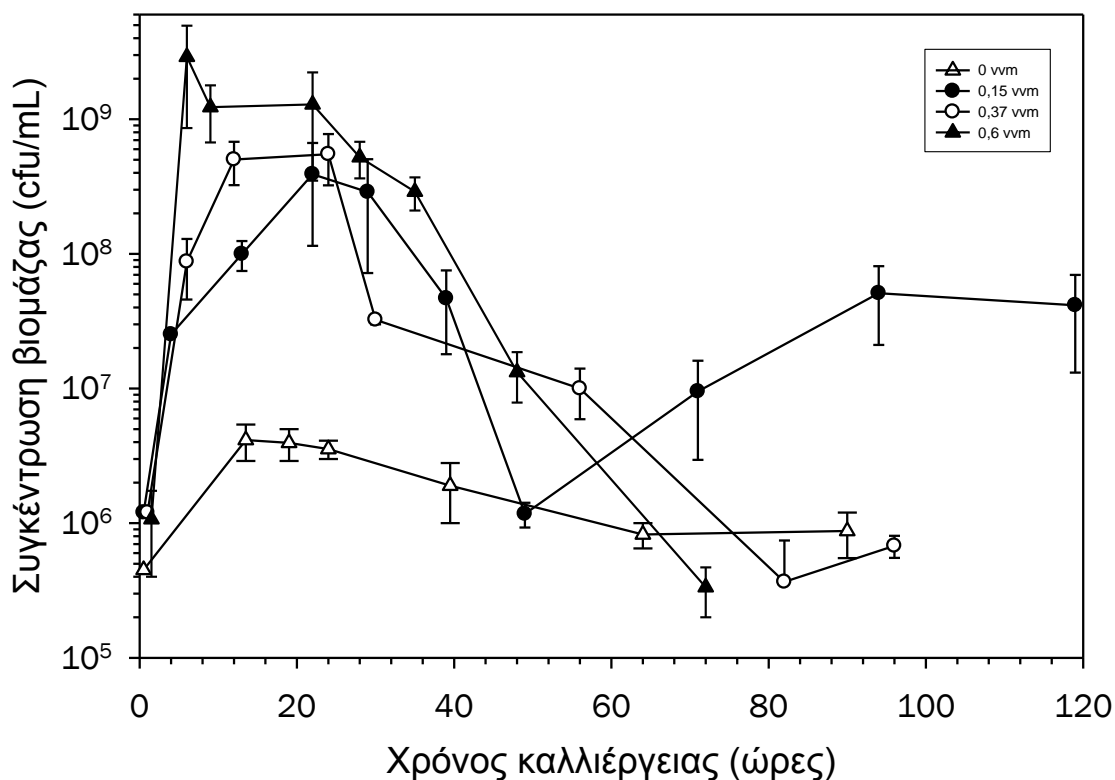


**Εικόνα 3-6** Μέγιστη σχετική ενζυμική ενεργότητα έπειτα από επιπλέον προσθήκη διαφορετικών πηγών άνθρακα και αζώτου (0,125 % w/v) στο βασικό υπόστρωμα BM1 (πίτυρο 2 % w/v). Το 100% αντιστοιχεί στην καλλιέργεια μάρτυρα, με πίτυρο ως μοναδική πηγή. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριπλών καλλιεργειών και στην εικόνα εμφανίζονται οι γραμμές σφάλματος ( $\pm$  SD).

Η προσθήκη συμπληρωματικής πηγής αζώτου (καζεΐνη, τρυπτόνη, φωσφορικό αμμώνιο) στο εκχύλισμα ζύμης και στο νιτρικό νάτριο που υπάρχουν στο βασικό υπόστρωμα BM1, δεν είχε ευεργετική επίδραση στην ενζυμική παραγωγή στις καλλιέργειες πίτυρου. Μάλιστα, η τρυπτόνη και το φωσφορικό αμμώνιο προκάλεσαν μείωση των ενζυμικών ενεργοτήτων στα 3 από τα 4 υπό μελέτη ένζυμα (Εικόνα 3-6). Σε αντίθεση, η προσθήκη συμπληρωματικών πηγών άνθρακα λειτούργησε επαγωγικά στις περιπτώσεις του αμύλου και της ξυλάνης, ιδιαίτερα για την κυτταρινάση η οποία εμφάνισε 3 και 3,5 φορές υψηλότερες τιμές αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο, είναι πως και τα 2 επιπρόσθετα οργανικά πολυμερή περιόρισαν σε μεγάλο βαθμό την έκκριση ενζύμων χωρίς εξειδίκευση υδρόλυσης των μονομερών τους. Δηλαδή, η προσθήκη αμύλου περιόρισε την έκκριση της β-ξυλοζιδάσης και η προσθήκη ξυλάνης της β-γλυκοζιδάσης. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, επιλέχθηκε ως βέλτιστη, για την ενζυμική παραγωγή πηγή άνθρακα, ο συνδυασμός μικρής ποσότητας ξυλάνης 0,125 % (w/v) και πίτυρου 2 % (w/v) στο βασικό υπόστρωμα αύξησης του στελέχους SP24.

### 3.2.4.2 ΑΡΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΕΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

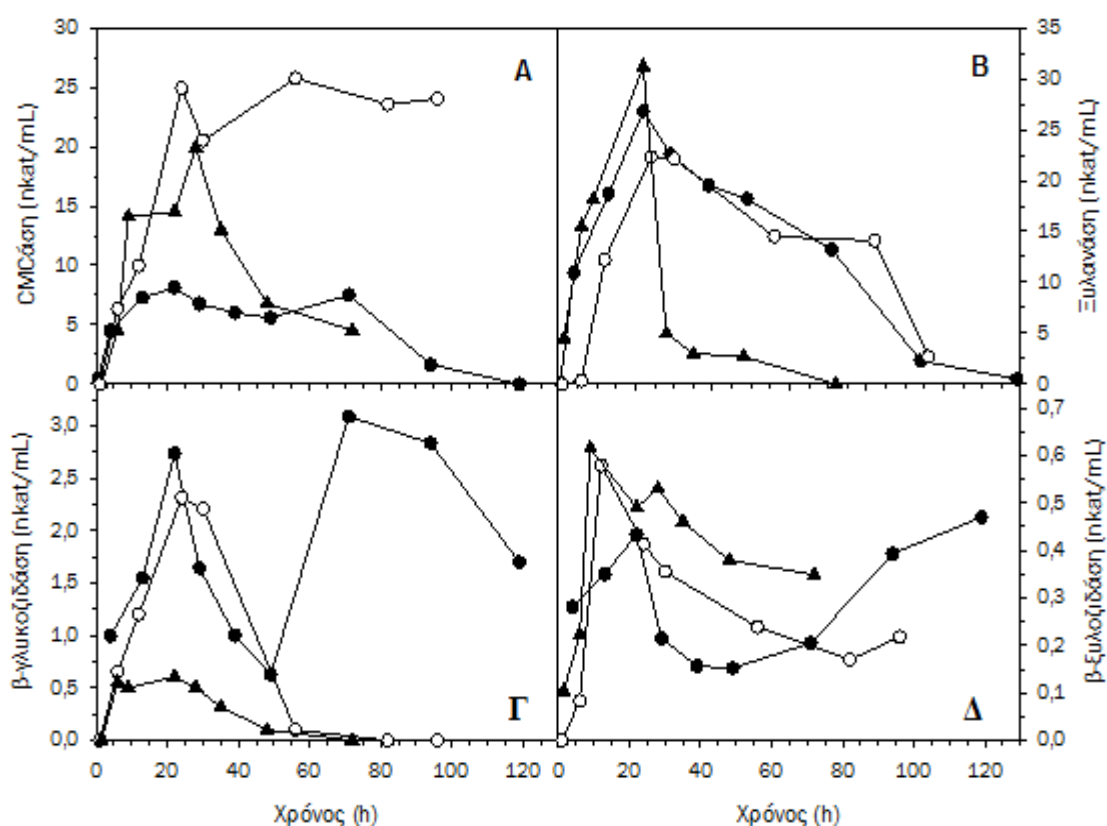
Με στόχο τη μελέτη της επίδρασης των συνθηκών αερισμού στη μικροβιακή αύξηση και ενζυμική παραγωγή ακολούθησε σειρά κλειστών καλλιέργειών του επιλεγμένου στελέχους SP24 σε βιοαντιδραστήρα, με το βελτιστοποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα, στις οποίες η μοναδική μεταβαλλόμενη συνθήκη ήταν η παροχή οξυγόνου. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες με μηδενικό αερισμό και με παροχή οξυγόνου ίση με 0,15 vvm, 0,37 vvm και 0,6 vvm. Σε όλες τις περιπτώσεις η δειγματοληψία αφορούσε διαφορετικά χρονικά σημεία της καλλιέργειας του μικροοργανισμού και ακολούθησε η εκτίμηση της βιωσιμότητας καθώς και των ενζυμικών ενεργοτήτων. Μάλιστα σε κάθε δείγμα προσδιορίστηκε και η τοπολογία των 4 υδρολυτικών ενζύμων.



**Εικόνα 3-7** Καμπύλες αύξησης των κλειστών καλλιέργειών (βιοαντιδραστήρας) του στελέχους SP24 σε διαφορετικές συνθήκες αερισμού (0, 0,15, 0,37 και 0,6 vvm). Η συγκέντρωση βιομάζας εκφράζεται σε cfu/mL και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση ( $\pm$ SD) από τουλάχιστον 3 τρυβλία (όχι απαραίτητα ίδιας αραιώσης).

Κατά την παρατήρηση των καμπυλών αύξησης του στελέχους SP24, παρουσία διαφορετικών συνθηκών αερισμού, αναδεικνύεται η προφανής εξάρτηση της βιωσιμότητας του μικροοργανισμού από την παροχή οξυγόνου (Εικόνα 3-7). Μολονότι, οι αντιπρόσωποι του γένους *Geobacillus* θεωρούνται δυναμικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί το υπό μελέτη στέλεχος εμφάνισε πολύ χαμηλά επίπεδα αύξησης παρουσία ανοξικών συνθηκών (ελάττωση πληθυσμού κατά 2 τάξεις μεγέθους).

Αντίθετα, ο ταχύτερος ρυθμός αύξησης και η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας παρατηρήθηκε στη μέγιστη παροχή οξυγόνου. Αναλυτικότερα, σε παροχή οξυγόνου ίση με 0,6 nvm ο μικροοργανισμός εμφάνισε  $3 \cdot 10^9$  cfu/mL μόλις 6 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Στις καλλιέργειες με τις υψηλότερες συνθήκες αερισμού (0,37 και 0,6 nvm) η βιωσιμότητα εμφάνισε πτώση από τη μέγιστη τιμή της και έφτασε τα αρχικά επίπεδα εμβολιασμού περίπου έπειτα από 60 ώρες αύξησης. Στη χαμηλότερη παροχή οξυγόνου (0,15 nvm) παρατηρήθηκε το φαινόμενο της διαύξεσης καθότι εντοπίστηκαν 2 μέγιστα μικροβιακής συγκέντρωσης στις 14 και 90 ώρες, αντίστοιχα. Το τελευταίο ενδεχομένως δικαιολογείται από τη σύνθετη φύση του υποστρώματος (πίτυρο) σε συνδυασμό με τους χαμηλούς ρυθμούς αύξησης, απόρροια της περιορισμένης παροχής οξυγόνου.



**Εικόνα 3-8** Συνολική ενζυμική παραγωγή στην πορεία του χρόνου σε βιοαντιδραστήρες διαφορετικών συνθηκών παροχής οξυγόνου. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριπλών εκτιμήσεων, εμφανίζοντας μικρό σφάλμα (τυπική απόκλιση <5 %). Α. Κυτταρινάση, Β. Ξυλανάση, Γ. β-γλυκοζιδάση, Δ. β-ξυλοζιδάση.

[● 0,15 nvm, ○ 0,37 nvm, ▲ 0,6 nvm]

Γενικά, η παραγωγή των 4 υπό μελέτη ενζύμων ακολούθησε τον ίδιο ρυθμό με τη μικροβιακή ανάπτυξη (Εικόνα 3-8). Όσον αφορά στην επίδραση του αερισμού, δεν παρατηρήθηκε παρόμοιο πρότυπο σε όλα τα υδρολυτικά ένζυμα. Σχετικά με τα κυτταρινολυτικά ένζυμα, τα επίπεδα κυτταρινάσης ενισχύθηκαν περισσότερο από 3 φορές κατά την αύξηση του αερισμού από τα 0,15 στα 0,37 vvm. Δεν εμφανίστηκε όμως η ίδια συμπεριφορά στην περαιτέρω αύξηση του αερισμού στα 0,6 vvm. Η β-γλυκοζιδάση διαφοροποιήθηκε από τα υπόλοιπα ένζυμα, καθώς η σχέση της με τα επίπεδα αερισμού ήταν αντίστροφη. Συγκεκριμένα, σε χαμηλή παροχή οξυγόνου τα επίπεδα της ήταν έως και 6 φορές ενισχυμένα συγκριτικά με τα αντίστοιχα της υψηλής παροχής. Αναφορικά με τα ξυλανολυτικά ένζυμα, οι τιμές των μέγιστων ενεργοτήτων δεν εμφάνισαν αξιοσημείωτη εξάρτηση από τα επίπεδα αερισμού της μικροβιακής καλλιέργειας και κατά την αύξηση από τα 0,15 στα 0,6 vvm οι ενζυμικές τιμές δεν είχαν σε καμία περίπτωση διαφορά μεγαλύτερη από 30 %.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προξενεί το γεγονός, ότι το φαινόμενο της διαύξεσης που παρατηρήθηκε στην καμπύλη αύξησης με αερισμό 0,15 vvm αντικατοπτρίστηκε στο ρυθμό παραγωγής της β-γλυκοζιδάσης και β-ξυλοζιδάσης. Αντίθετα, η παραγωγή κυτταρινάσης και ξυλανάσης ακολούθησε το ίδιο πρότυπο με τα άλλα δύο επίπεδα αερισμού και παρατηρήθηκε η μέγιστη ενεργότητα μεταξύ της 15<sup>ης</sup> και 25<sup>ης</sup> ώρας μικροβιακής αύξησης, την οποία διαδέχθηκε σταδιακή μείωση. Μάλιστα, ο ρυθμός μείωσης των ενζυμικών ενεργοτήτων ήταν ανάλογος των επιπέδων αερισμού με αποτέλεσμα την αδυναμία ενζυμικής ανίχνευσης έπειτα από 60 ώρες αύξησης σε 0,6 vvm αερισμό.

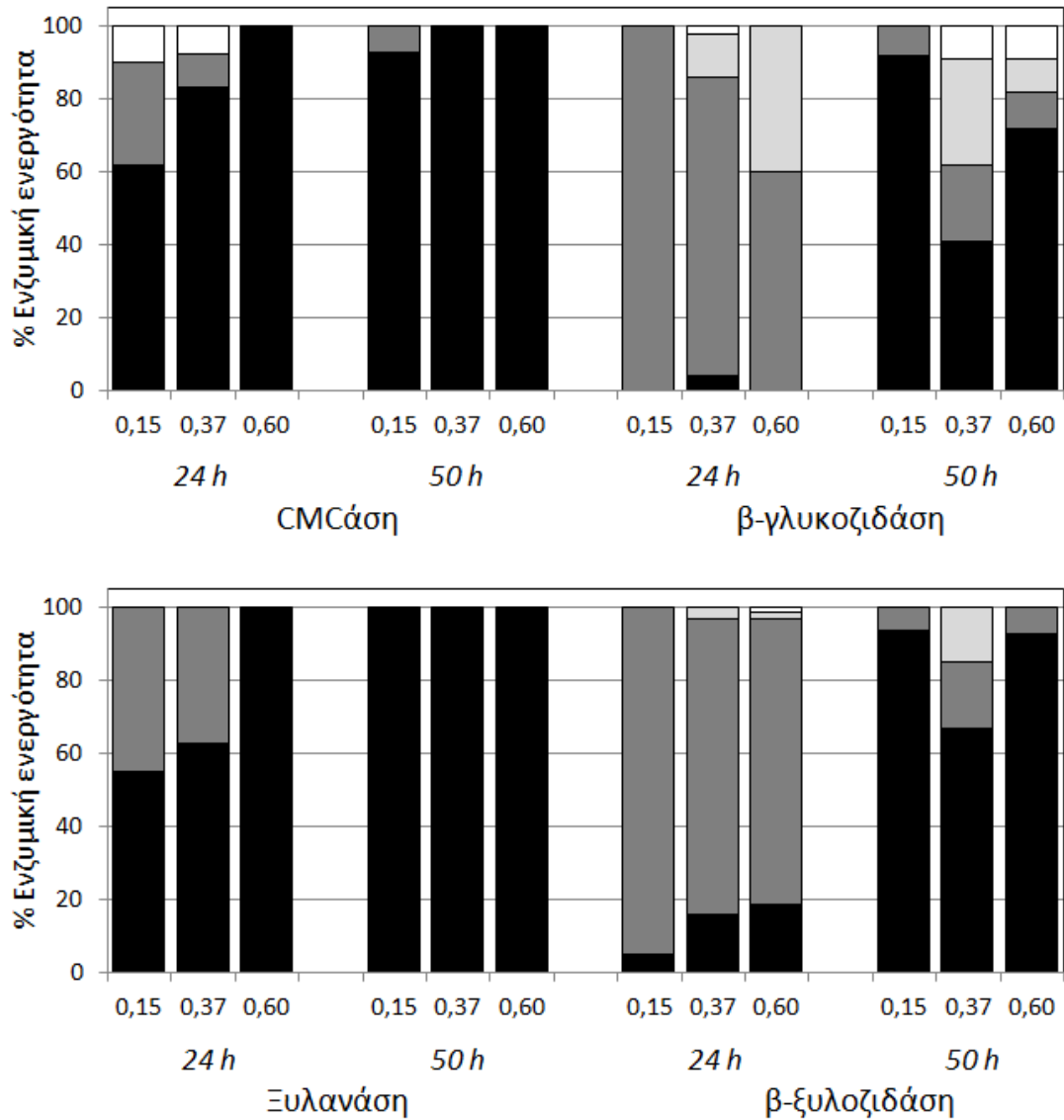
Στον βιοαντιδραστήρα με ανοξικές συνθήκες, τα χαμηλά επίπεδα αύξησης του μικροοργανισμού συνοδεύτηκαν από μη ανιχνεύσιμες ενζυμικές ενεργότητες καθώς κανένα από τα 4 υπό μελέτη υδρολυτικά ένζυμα δεν παρήχθη στις συνθήκες αυτές.

### 3.2.4.3 ENZYMIKH TOΠΟΛΟΓΙΑ

---

Ο προσδιορισμός της τοπολογίας των υδρολυτικών ενζύμων πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα από τις μικροβιακές καλλιέργειες διαφορετικών συνθηκών αερισμού σε βιοαντιδραστήρα (§ 3.2.4.2). Η επεξεργασία των δειγμάτων, η οποία έχει αναφερθεί αναλυτικά στα Υλικά και Μέθοδοι (§ 2.9), οδήγησε σε 4 διακριτά κλάσματα (εξωκυτταρικό, ενδοκυτταρικό, χαλαρά προσδεμένο στις μεμβράνες, ισχυρά προσδεμένο στις μεμβράνες) στα οποία προσδιορίστηκε η ενζυμική ενεργότητα κυτταρινάσης, β-γλυκοζιδάσης, ξυλανάσης και β-ξυλοζιδάσης.

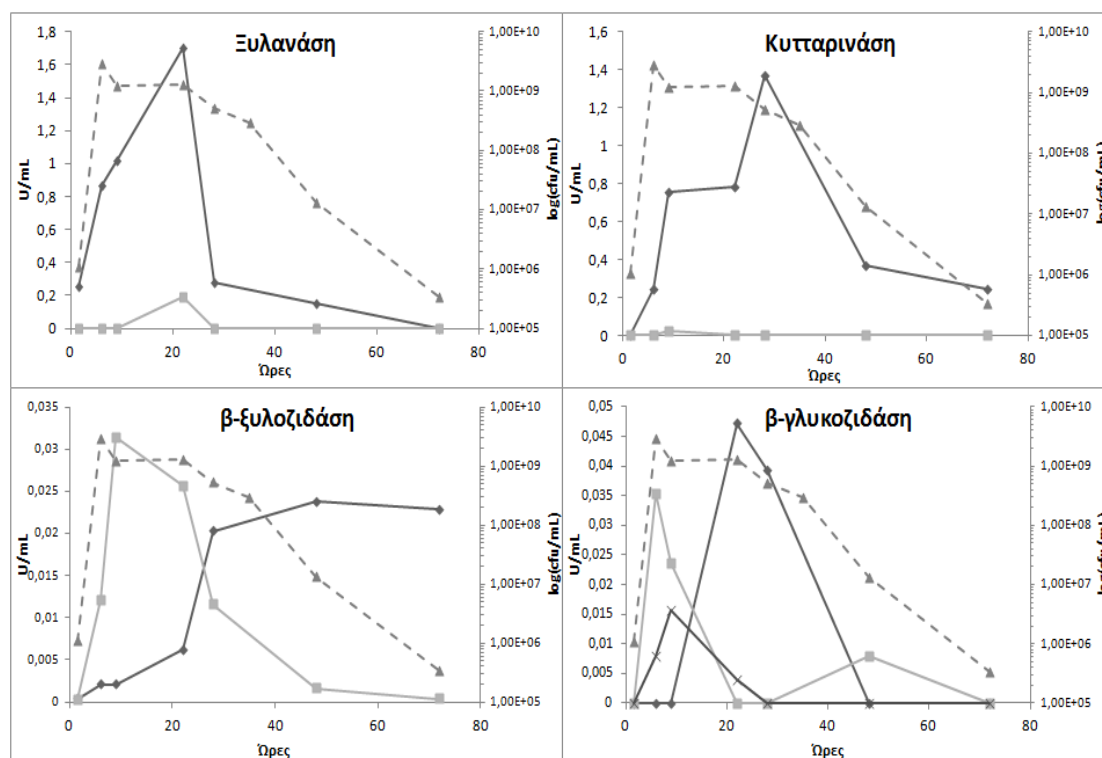




**Εικόνα 3-9** Τοπολογία υδρολυτικών ενζύμων σε καλλιέργειες διαφορετικού αερισμού (0,15, 0,37 και 0,6 vvm), εκφρασμένη σε ποσοστό % της συνολικής ενζυμικής ενεργότητας. Τα χρονικά σημεία αντιστοιχούν στην εκθετική φάση αύξησης (24 ώρες) και στο τέλος της φάσης στασιμότητας (50 ώρες). Με μαύρο απεικονίζεται το εξωκυτταρικό κλάσμα, με σκούρο γκρι το ενδοκυτταρικό, με ανοιχτό γκρι το χαλαρά προσδεμένο στις μεμβράνες και με λευκό το ισχυρά προσδεμένο στις μεμβράνες κλάσμα.

Η μελέτη της ενζυμικής τοπολογίας ανέδειξε αρχικά, την ξεκάθαρη εξωκυτταρική φύση των κυτταρινασών και ξυλανασών (Εικόνα 3-9). Χαρακτηριστικό είναι, πως ακόμα και στα πρώτα στάδια της ζύμωσης, περισσότερο από το 50 % της συνολικής ενεργότητας των ενζύμων εντοπίστηκε εκτός του κυττάρου, ενώ το υπόλοιπο σε χαλαρή πρόσδεση στις κυτταρικές μεμβράνες. Μάλιστα, ο ρυθμός έκκρισης των σχετικών ενζύμων στο εξωκυτταρικό μέσο αυξανόταν ανάλογα με τα επίπεδα αερισμού, ακολουθώντας την ταχύτερη μικροβιακή αύξηση. Για παράδειγμα, στην παροχή οξυγόνου ίση με 0,6 nvm σχεδόν η συνολική ενεργότητα ξυλανάσης και κυτταρινάσης εντοπίστηκε εξωκυτταρικά (Εικόνα 3-10).

Αντίθετα, η β-γλυκοζιδάση και η β-ξυλοζιδάση εντοπίστηκαν στο κυτταρόπλασμα κατά την εκθετική φάση μικροβιακής αύξησης. Επιπλέον, η β-γλυκοζιδάση εμφανίστηκε σε χαλαρή πρόσδεση με τις κυτταρικές μεμβράνες, ιδιαίτερα σε υψηλές συνθήκες αερισμού. Κατά τα τελικά στάδια αύξησης, τα 2 ένζυμα εντοπίστηκαν εξωκυτταρικά, αποτέλεσμα που πιθανόν σχετίζεται με τη μερική autólυση των κυττάρων. Επίσης, σε συνθήκες υψηλού αερισμού παρατηρήθηκε η χρονική διαδοχή εμφάνισης μέγιστων ενεργοτήτων η οποία ήταν: ενδοκυτταρική β-ξυλοζιδάση, εξωκυτταρική ξυλανάση, εξωκυτταρική β-ξυλοζιδάση (Εικόνα 3-10). Ακριβώς το ίδιο πρότυπο εμφανίστηκε και στις κυτταρινάσες καθώς επίσης και στις υπόλοιπες 2 παροχές οξυγόνου.



**Εικόνα 3-10** Εντοπισμός ενζυμικών ενεργοτήτων σε καλλιέργεια βιοαντιδραστήρα με παροχή οξυγόνου 0,6 nvm κατά την πορεία της μικροβιακής αύξησης.  
 [ ▲ - log (cfu/mL), ◆ - Εξωκυτταρική ενεργότητα (U/mL), ■ - Ενδοκυτταρική ενεργότητα (U/mL), × Ενεργότητα χαλαρά προσδεμένη στις μεμβράνες (U/mL) ]

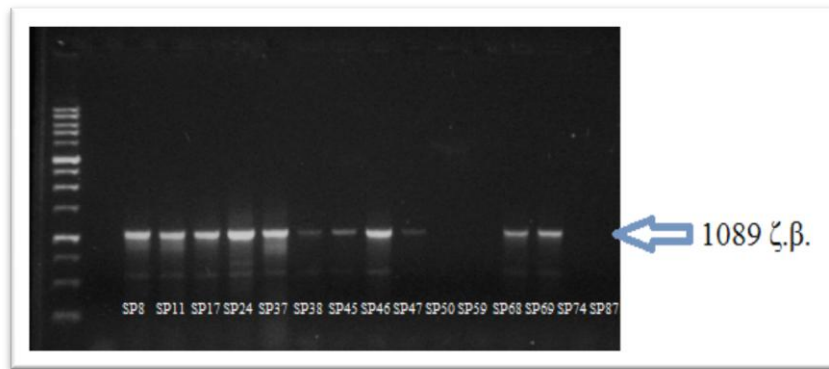
### 3.2.5 ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΗΣ

Η ευθυγράμμιση της αλληλουχίας των γονιδίων από θερμοσταθερά κυτταρινολυτικά και ξυλανολυτικά ένζυμα οδήγησε στον σχεδιασμό εκκινητικών μορίων με στόχο την ενίσχυση των αντίστοιχων ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης στα 15 επιλεγμένα θερμοφιλα στελέχη. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 3 ζεύγη μορίων εκκινητών για τον εντοπισμό γονιδίων ένδο-κυτταρινάσης, ένδο-ξυλανάσης και β-γλυκοζιδάσης και τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων ενίσχυσης ήταν 1089 ζ.β., 996 ζ.β. και 1413 ζ.β. αντίστοιχα. Κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων εφαρμόστηκαν διαφορετικές συνθήκες με στόχο την αριστοποίηση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών στη μήτρα DNA για κάθε μικροβιακό γονιδίωμα.

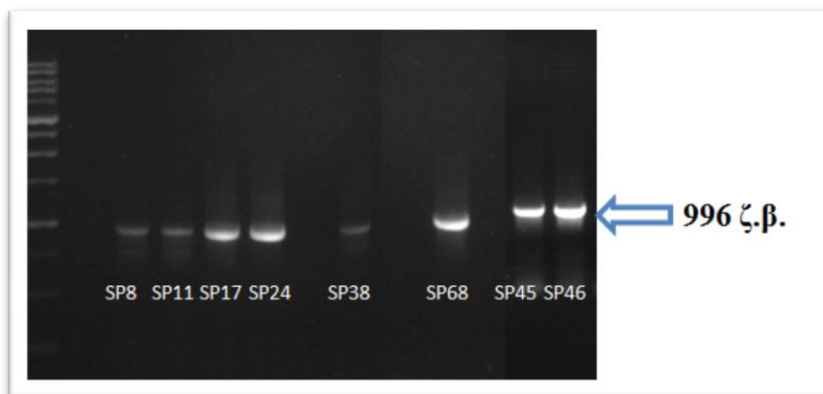
Μολονότι, τα 15 θερμοφιλα στελέχη επιλέχθηκαν με κριτήριο την ξυλανολυτική τους ικανότητα, μόλις τα 8 από αυτά εμφάνισαν θετική αντίδραση PCR για το συγκεκριμένο γονίδιο. Για την κυτταρινάση, ανιχνεύθηκε προϊόν ενίσχυσης αναμενόμενου μεγέθους σε 11 στελέχη (Εικόνα 3-11). Μάλιστα, 4 στελέχη με μη ανιχνεύσιμη κυτταρινολυτική δράση στις στερεές καλλιέργειες εμφάνισαν θετική αντίδραση PCR για το αντίστοιχο γονίδιο. Όσον αφορά στη β-γλυκοζιδάση, σε καμία περίπτωση δεν κατέστη εφικτός ο μοριακός εντοπισμός του γονιδίου στα 15 θερμοφιλα βακτηριακά στελέχη.

**Πίνακας 3-5** Εντοπισμός γονιδίων ένδο-ξυλανάσης και ένδο-κυτταρινάσης στα 15 θερμοφιλα στελέχη. Με σκίαση εμφανίζονται τα στελέχη που εμφάνισαν ταυτόχρονη κυτταρινολυτική και ξυλανολυτική δράση στις στερεές καλλιέργειες.

Κωδικός Στελέχους	Κωδικός Κατάθεσης NCBI	Αντίδραση PCR	
		Ξυλανάση	Κυτταρινάση
SP08	JN692238	+	+
SP11	JN692239	+	+
SP17	JN692240	+	+
SP24	JN692241	+	+
SP37	JN692242	-	+
SP38	JN692243	+	+
SP45	JN692244	+	+
SP46	JN692245	+	+
SP47	JN692246	-	+
SP50	JN692247	-	-
SP59	JN692248	-	-
SP68	JN692249	+	+
SP69	JN692250	-	+
SP74	JN692251	-	-
SP87	JN692252	-	-



**Εικόνα 3-11** Ενίσχυση με PCR του γονιδίου ένδο-κυτταρινάσης στα 15 θερμοφιλα στελέχη.



**Εικόνα 3-12** Θετική ενίσχυση με PCR του γονιδίου ένδο-ξυλανάσης.

### 3.3 ΛΙΠΑΣΕΣ

#### 3.3.1 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Η εκτίμηση του λιπολυτικού δυναμικού των 101 θερμοφίλων στελεχών πραγματοποιήθηκε ποιοτικά (στερεές καλλιέργειες) και ποσοτικά (υγρές καλλιέργειες) χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας το ελαιόλαδο (περιέχει τριγλυκερίδια του ολεϊκού, λινολεϊκού, παλμιτικού, στεαρικού και λινολενικού οξέος). Τα σχετικά αποτελέσματα εμφανίζονται στον Πίνακα 3-6.

Όσον αφορά στον ποιοτικό προσδιορισμό λιπάσης, σε στερεές καλλιέργειες 24 ωρών μόλις το 8,9 % των στελεχών εμφάνισε φθορίζουσα ζώνη, αποτέλεσμα της ενζυμικής υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων του ελαιολάδου και της ακόλουθης απελευθέρωσης λιπαρών οξέων. Το ποσοστό αυτό αυξήθηκε στο επόμενο 24ωρο φτάνοντας το 16,8 % (Εικόνα 3-13).



**Εικόνα 3-13** Ποσοστιαίος ποιοτικός προσδιορισμός λιπάσης στο σύνολο των θερμοφίλων βακτηριακών στελεχών σε στερεές καλλιέργειες 24 και 48 ωρών.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της λιπάσης πραγματοποιήθηκε με την εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας (ψευδοϋπόστρωμα pNPP, φωτομετρική ανίχνευση) στο εξωκυτταρικό διάλυμα υγρών καλλιεργειών 24 και 72 ωρών επώασης (60 °C υπό συνεχή ανάδευση). Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του ποιοτικού ελέγχου, το ποσοστό των στελεχών με ανιχνεύσιμη λιπολυτική ενεργότητα ξεπέρασε το 70 % (Εικόνα 3-14). Ανάμεσα σε αυτά βέβαια, το 25 % περίπου εμφάνισε σχετικά χαμηλά επίπεδα ενζυμικών ενεργοτήτων (<0,05 nkat/mL).



**Εικόνα 3-14** Ποσοστιαίος ποσοτικός προσδιορισμός λιπάσης στο σύνολο των θερμοφίλων βακτηριακών στελεχών σε υγρές καλλιέργειες 24 και 72 ωρών.

Παρατηρώντας τις δύο διαφορετικές μεθόδους εντοπισμού λιπολυτικών ενζύμων στο σύνολο των 101 θερμοφίλων βακτηριακών στελεχών, δεν προέκυψε καμία ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ τους. Για παράδειγμα, τα στελέχη SP6 και SP71 εμφάνισαν μεγάλη υδρόλυση του ελαιολάδου στις στερεές καλλιέργειες ενώ τα επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας στις υγρές κυμάνθηκαν χαμηλά. Διαφορετικός λιπολυτικός φαινότυπος εμφανίστηκε στα στελέχη SP14, SP22, SP76 και SP79 με υψηλές τιμές ενεργοτήτων στο εξωκυτταρικό διάλυμα και μη ανιχνεύσιμη ενζυμική δράση στις στερεές καλλιέργειες.

**Πίνακας 3-6** Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λιπολυτικής ικανότητας των 101 θερμόφιλων στελεχών. Η ενζυμική εξωκυτταρική ενεργότητα στις υγρές καλλιέργειες εκφράζεται σε nkat / mL και με σκίαση εμφανίζονται τα επιλεγμένα στελέχη (9).

Κωδικός	Στερεές καλλιέργειες		Υγρές καλλιέργειες		Κωδικός	Στερεές καλλιέργειες		Υγρές καλλιέργειες		Κωδικός	Στερεές καλλιέργειες		Υγρές καλλιέργειες	
	24 h	48 h	48 h	72 h		24 h	48 h	48 h	72 h		24 h	48 h	48 h	72 h
SP1	-	-	-	-	SP35	-	-	0,095	0,258	SP69	-	-	-	-
SP2	-	-	0,040	0,063	SP36	-	-	-	-	SP70	-	-	0,043	0,070
SP3	-	-	-	-	SP37	-	-	-	-	SP71	+	+	0,043	0,052
SP4	-	+	0,062	0,102	SP38	-	-	0,178	0,767	SP72	-	-	0,208	0,244
SP5	-	-	-	-	SP39	-	-	-	-	SP73	+	++	1,083	0,740
SP6	+	+	0,058	0,073	SP40	-	-	0,063	0,115	SP74	-	-	0,088	0,000
SP7	-	-	0,250	0,085	SP41	-	-	-	-	SP75	+	++	1,540	1,667
SP8	-	-	0,250	0,270	SP42	-	-	0,450	0,192	SP76	-	-	1,297	1,317
SP9	-	-	0,307	0,167	SP43	-	-	0,120	0,072	SP77	-	-	0,483	0,228
SP10	-	-	0,500	0,200	SP44	-	-	0,120	0,123	SP78	-	-	0,220	0,150
SP11	-	-	0,358	0,217	SP45	-	-	0,153	0,088	SP79	-	-	1,167	1,245
SP12	-	-	0,350	0,142	SP46	-	-	-	-	SP80	+	+	0,137	0,110
SP13	-	-	0,583	0,175	SP47	-	-	0,038	0,045	SP81	-	-	0,543	0,293
SP14	-	-	1,070	2,367	SP48	-	-	0,043	0,027	SP82	-	+	0,235	0,250
SP15	-	-	0,108	0,147	SP49	-	-	0,033	0,032	SP83	+	+	0,625	1,433
SP16	-	-	0,022	0,065	SP50	-	-	0,042	0,037	SP84	-	+	0,167	0,133
SP17	-	-	-	-	SP51	-	-	0,058	0,032	SP85	-	-	0,077	0,000
SP18	-	-	0,200	0,067	SP52	-	-	-	-	SP86	-	-	0,063	0,070
SP19	-	-	0,217	0,248	SP53	-	-	-	-	SP87	-	+	0,058	0,000
SP20	-	-	0,153	0,055	SP54	-	-	0,037	0,045	SP88	-	-	-	-
SP21	-	-	0,550	0,427	SP55	-	-	0,035	0,062	SP89	-	-	-	-
SP22	-	-	1,618	0,450	SP56	-	-	0,052	0,000	SP90	-	+	0,593	0,233
SP23	-	-	0,567	0,192	SP57	-	-	0,038	0,183	SP91	-	-	0,517	0,767
SP24	-	-	0,217	0,133	SP58	-	-	-	-	SP92	+	+	0,517	0,522
SP25	-	+	0,044	0,092	SP59	-	-	0,000	0,085	SP93	++	++	0,610	0,633
SP26	-	-	-	-	SP60	-	-	-	-	SP94	-	-	0,550	0,257
SP27	+	+	0,150	0,288	SP61	-	-	0,040	0,037	SP95	-	-	1,027	0,600
SP28	-	-	-	-	SP62	-	-	-	-	SP96	-	-	0,073	0,085
SP29	-	-	0,967	0,620	SP63	-	-	0,038	0,053	SP97	-	-	-	-
SP30	-	+	0,422	1,027	SP64	-	-	0,057	0,000	SP98	-	-	-	-
SP31	-	-	-	-	SP65	-	-	0,045	0,043	SP99	-	-	-	-
SP32	-	+	0,011	0,085	SP66	-	-	0,115	0,047	SP100	-	-	0,400	0,642
SP33	-	-	-	-	SP67	-	-	0,053	0,075	SP101	-	-	0,000	0,122
SP34	-	-	-	-	SP68	-	-	-	-					

Μόνο τέσσερα από τα 101 στελέχη (SP73, SP75, SP83 και SP93) εντοπίστηκαν με ίδιο πρότυπο λιπόλυσης και στις δύο διαφορετικές μεθόδους εντοπισμού. Επιπροσθέτως, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε στέλεχος με θετικό αποτέλεσμα στις στερεές καλλιέργειες και μη ανιχνεύσιμη ενζυμική ενεργότητα στις υγρές. Συμπερασματικά, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λιπάσης ανέδειξε στελέχη με εμφάνιση έντονης φθορίζουσας ζώνης στις στερεές καλλιέργειες και άλλα με ικανότητα έκκρισης υψηλών ενζυμικών επιπέδων ( $>0,75$  nkat/mL, μέσος όρος ενζυμικών ενεργοτήτων). Τα 9 στελέχη που πληρούσαν το ένα ή και τα δύο παραπάνω κριτήρια επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη και είναι τα SP14, SP22, SP29, SP73, SP75, SP76, SP79, SP83, και SP9. Αξίζει να σημειωθεί ότι, κανένα από τα παραπάνω στελέχη δεν είχε επιλεγεί για την κυτταρινολυτική ή ξυλανολυτική του δράση.

### 3.3.2 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα 9 επιλεγμένα στελέχη για τη λιπολυτική τους ικανότητα χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά και γενετικά (γονίδιο 16S rRNA). Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός (Πίνακας 3-7) περιελάμβανε παρατήρηση της κυτταρικής μορφολογίας, χρώση κατά Gram και ανίχνευση ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας (οξειδάση και καταλάση). Ακολούθησε ο γενετικός χαρακτηρισμός κατά τον οποίο απομονώθηκε τμήμα του γονιδίου 16S rRNA και αναλύθηκε ολόκληρη η αλληλουχία του. Η πρωτοταγής δομή των τμημάτων αυτών, συγκρίθηκε με ανάλογες και κατατέθηκε ακολούθως στη διεθνή βάση δεδομένων NCBI (Πίνακας 3-8).

**Πίνακας 3-7** Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός επιλεγμένων για τη λιπολυτική τους ικανότητα θερμόφιλων στελεχών.

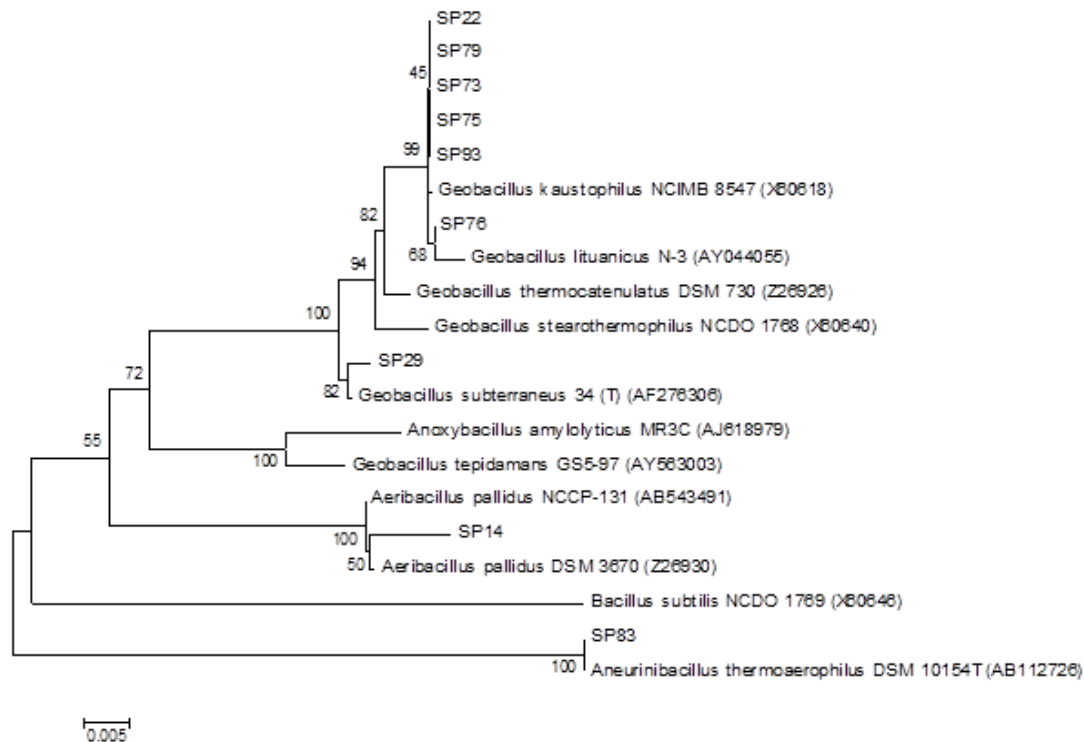
Κωδικός Στελέχους	Φαινοτυπικός Χαρακτηρισμός			
	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	ΟΞΕΙΔΑΣΗ	ΚΑΤΑΛΑΣΗ	ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ GRAM
SP14	Βάκιλος	+	+	θετική
SP22	Βάκιλος	+	+	θετική
SP29	Βάκιλος	-	+	θετική
SP73	Βάκιλος	+	+	θετική
SP75	Βάκιλος	+	+	θετική
SP76	Βάκιλος	+	+	θετική
SP79	Βάκιλος	+	+	θετική
SP83	Βάκιλος	+	+	θετική
SP93	Βάκιλος	-	-	θετική

**Πίνακας 3-8** Γενετικός χαρακτηρισμός επιλεγμένων για τη λιπολυτική τους ικανότητα θερμοφίλων στελεχών.

Στέλεχος	Κωδικός κατάθεσης NCBI	Αριθμός βάσεων	Πλησιέστερος Φυλογενετικά Γείτονας (Κωδικός NCBI)	Επικάλυψη (%)	Ταυτότητα (%)
SP14	JQ808132	1442	<i>Geobacillus pallidus</i> , NCCP-131 (AB543491)	99,72	99,30
SP22	JQ808133	1441	<i>Geobacillus</i> sp. Iso5 (GQ140232)	99,86	99,86
SP29	JQ808134	1442	<i>Geobacillus kaue</i> BGSC W9A78 (AY608975)	99,79	99,93
SP73	JQ808135	1444	<i>Geobacillus</i> sp. A27 (FJ685616)	100	100
SP75	JQ808136	1448	<i>Geobacillus</i> sp. A27 (FJ685616)	100	100
SP76	JQ808137	1445	<i>Geobacillus lituanicus</i> AE8 (FN666246)	100	99,86
SP79	JQ808138	1439	<i>Geobacillus</i> sp. Iso5 (GQ140232)	100	99,86
SP83	JQ808139	1433	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> (AB112726)	99,37	99,92
SP93	JQ808140	1444	<i>Geobacillus</i> sp.SBS-4S (AB306519)	100	100

Ο γενετικός χαρακτηρισμός των επιλεγμένων για τη λιπολυτική τους ικανότητα θερμοφίλων στελεχών εμφάνισε υψηλή φυλογενετική ταυτότητα με το γένος *Geobacillus* ή άλλα στενά συγγενικά είδη (*Aneurinibacillus*). Τα στελέχη SP22, SP73, SP75, SP79 και SP93 ομαδοποιήθηκαν με το είδος *Geobacillus kaustophilus*, το στέλεχος SP76 εμφανίστηκε κοντά στο είδος *Geobacillus lituanicus* και το στέλεχος SP29 φαίνεται συγγενικό με τα είδη *Geobacillus kaue* και *Geobacillus subterraneus*. Διαφορετική ομαδοποίηση ακολούθησαν τα στελέχη SP14 και SP83 όπου το πρώτο εμφανίστηκε κοντά στο γένος *Aeribacillus* και το δεύτερο στο γένος *Aneurinibacillus* (Εικόνα 3-15).



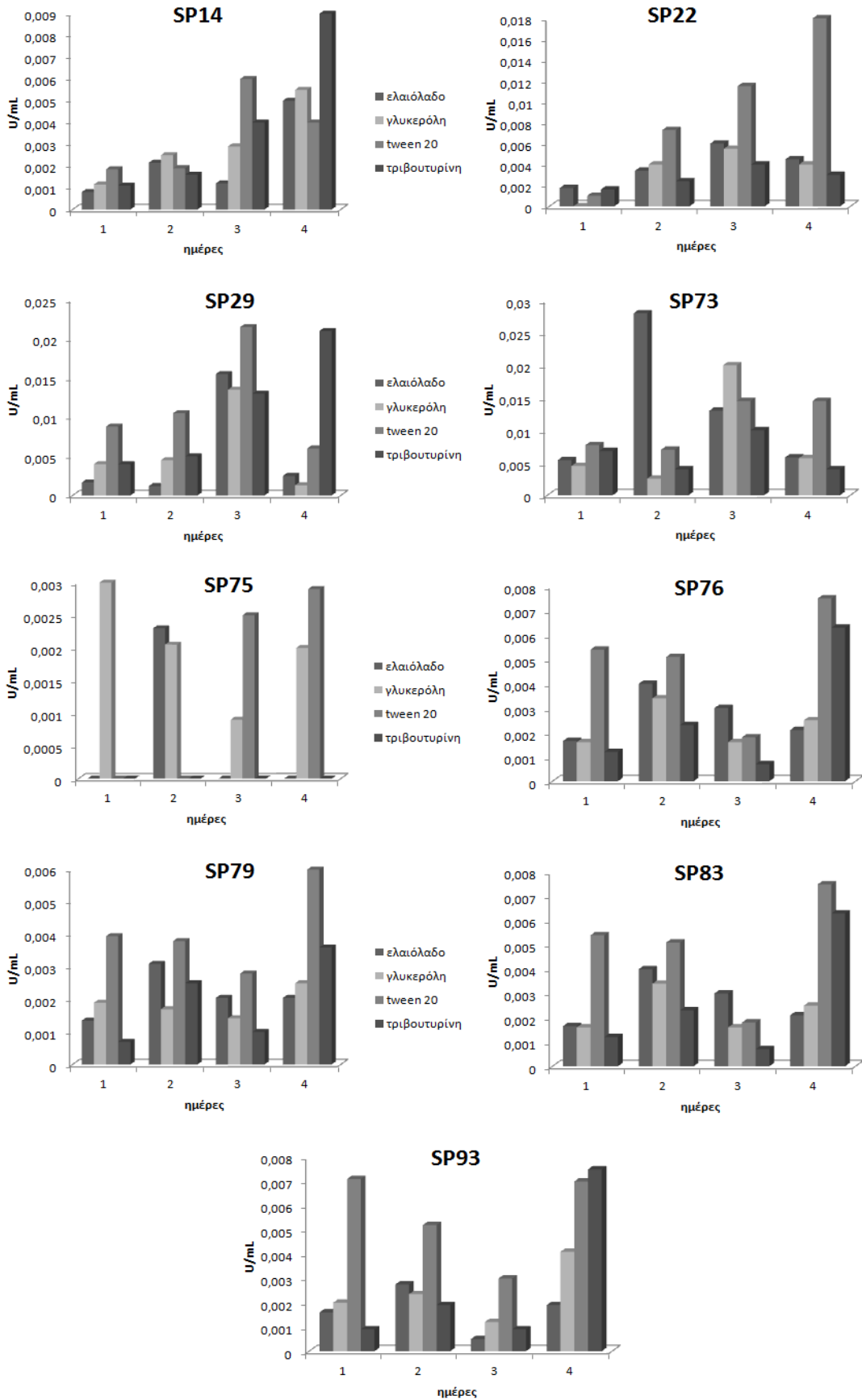


**Εικόνα 3-15** Φυλογενετικό δέντρο με βάση τα ενισχυμένα τμήματα 16S rDNA από τα επιλεγμένα λιπολυτικά στελέχη και τα αντίστοιχα γονίδια των φυλογενετικά πλησιέστερων μικροοργανισμών. (MEGA5 software, neighbor-joining method). Οι τιμές bootstrap εκφράζονται ως ποσοστό στις 100 επαναλήψεις.

### 3.3.3 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΛΙΠΑΣΩΝ

Τα θερμοφιλά βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν με κριτήριο την υψηλή λιπολυτική τους ικανότητα επανακαλλιεργήθηκαν σε υγρά και στερεά θρεπτικά υποστρώματα παρουσία διαφορετικών πηγών άνθρακα (ελαιόλαδο, γλυκερόλη, τριβουτυρίνη και Tween 20). Υπενθυμίζεται ότι, στην περίπτωση των στερεών καλλιέργειών, για την ενζυμική ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε διαφορετική χρωμογόνο ουσία (Ερυθρό του Μεθυλίου) από τη φθορίζουσα που είχε χρησιμοποιηθεί κατά τον αρχικό εντοπισμό λιπασών στο σύνολο των θερμοφίλων βακτηρίων (Ροδαμίνη).

Αναφορικά με την άριστη πηγή άνθρακα κατά την οποία εμφανίζονται οι μεγαλύτερες ενζυμικές ενεργότητες, τα εννέα στελέχη δεν επέδειξαν ίδιο πρότυπο. Γενικά, η τριβουτυρίνη και το Tween 20 παρουσιάστηκαν ως τα καταλληλότερα υποστρώματα για την έκκριση λιπασών στην πλειοψηφία των επιλεγμένων θερμοφίλων βακτηρίων (Εικόνα 3-16 και Πίνακας 3-9). Συσχετίζοντας την άριστη πηγή άνθρακα με τη φύση του υποστρώματος (υγρό ή στερεό), παρατηρήθηκε ότι τα μισά περίπου στελέχη επέδειξαν ίδια συμπεριφορά και στους δύο τρόπους καλλιέργειας (Πίνακας 3-10).



**Εικόνα 3-16** Εκτίμηση εξωκυτταρικής λιπολυτικής ενεργότητας σε υγρές καλλιέργειες των επιλεγμένων στελεχών παρουσία διαφορετικής πηγής άνθρακα.

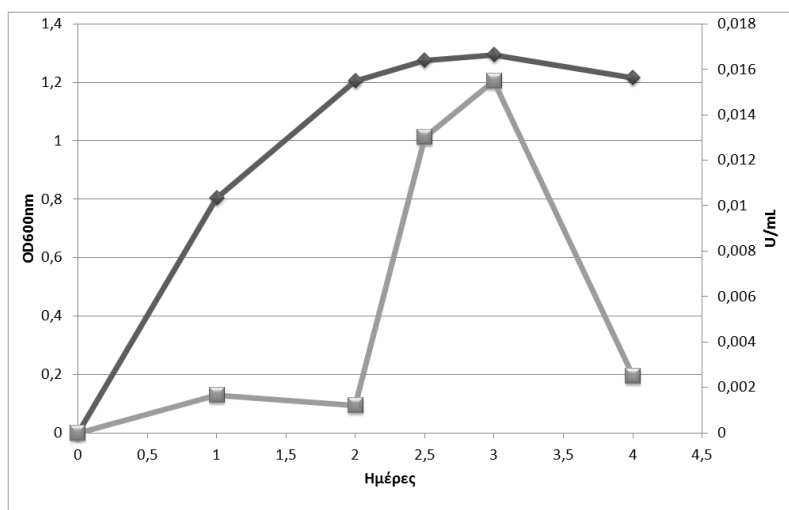
**Πίνακας 3-9** Εκτίμηση λιπολυτικής ενεργότητας των επιλεγμένων θερμοφίλων στελεχών σε στερεές καλλιέργειες με θρεπτικό υπόστρωμα ερυθρού του μεθυλίου και διαφορετική πηγή άνθρακα. Οι αναγραφόμενες τιμές αφορούν τη διάμετρο της ζώνης αποχρωματισμού – ένδειξη λιπόλυσης.

Κωδικός στελέχους	Πηγές Άνθρακα			
	Ελαιόλαδο (cm)	Γλυκερόλη (cm)	Τριβουτυρίνη (cm)	Tween 20 (cm)
SP14	0	0	2	0
SP22	1	0	0	1,5
SP29	0	0	1,5	0
SP73	2	0	3	0
SP75	2,5	0	1,75	0
SP76	1,1	0	1,75	0
SP79	0	2,25	1,9	0
SP83	2	0	2	2
SP93	2	0	1,25	0

**Πίνακας 3-10** Προσδιορισμός άριστης πηγής άνθρακα σε στερεές και υγρές καλλιέργειες των επιλεγμένων στελεχών ως προς την έκκριση λιπάσης.

Κωδικός στελέχους	Στερεές Καλλιέργειες		Υγρές καλλιέργειες	
	Άριστη πηγή άνθρακα	Μέγιστη διάμετρος ζώνης (cm)	Άριστη πηγή άνθρακα	Μέγιστη ενζυμική ενεργότητα (U/L)
SP14	τριβουτυρίνη	2	τριβουτυρίνη	9
SP22	Tween20	1,5	Tween20	18
SP29	τριβουτυρίνη	1,5	τριβουτυρίνη	21
SP73	τριβουτυρίνη	3	ελαιόλαδο	28
SP75	ελαιόλαδο	2,5	γλυκερόλη	3
SP76	τριβουτυρίνη	1,75	Tween20	4
SP79	γλυκερόλη	2,25	Tween20	6
SP83	Tween20	2	Tween20	7,5
SP93	ελαιόλαδο	2	τριβουτυρίνη	7,5

Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός πως τα στελέχη SP14 και SP83, τα οποία ομαδοποιήθηκαν ξεχωριστά κατά τον γενετικό χαρακτηρισμό, εμφάνισαν ίδιο πρότυπο λιπολυτικού φαινοτύπου και στις στερεές και στις υγρές καλλιέργειες. Επίσης, αξιοσημείωτη παρατήρηση σε αυτή τη σειρά αποτελεσμάτων, αποτέλεσε το γεγονός εμφάνισης της μέγιστης λιπολυτικής ικανότητας κατά το τέλος της εκθετικής φάσης αύξησης σε όλες τις κλειστές καλλιέργειες των 9 επιλεγμένων στελεχών (Εικόνα 3-17).

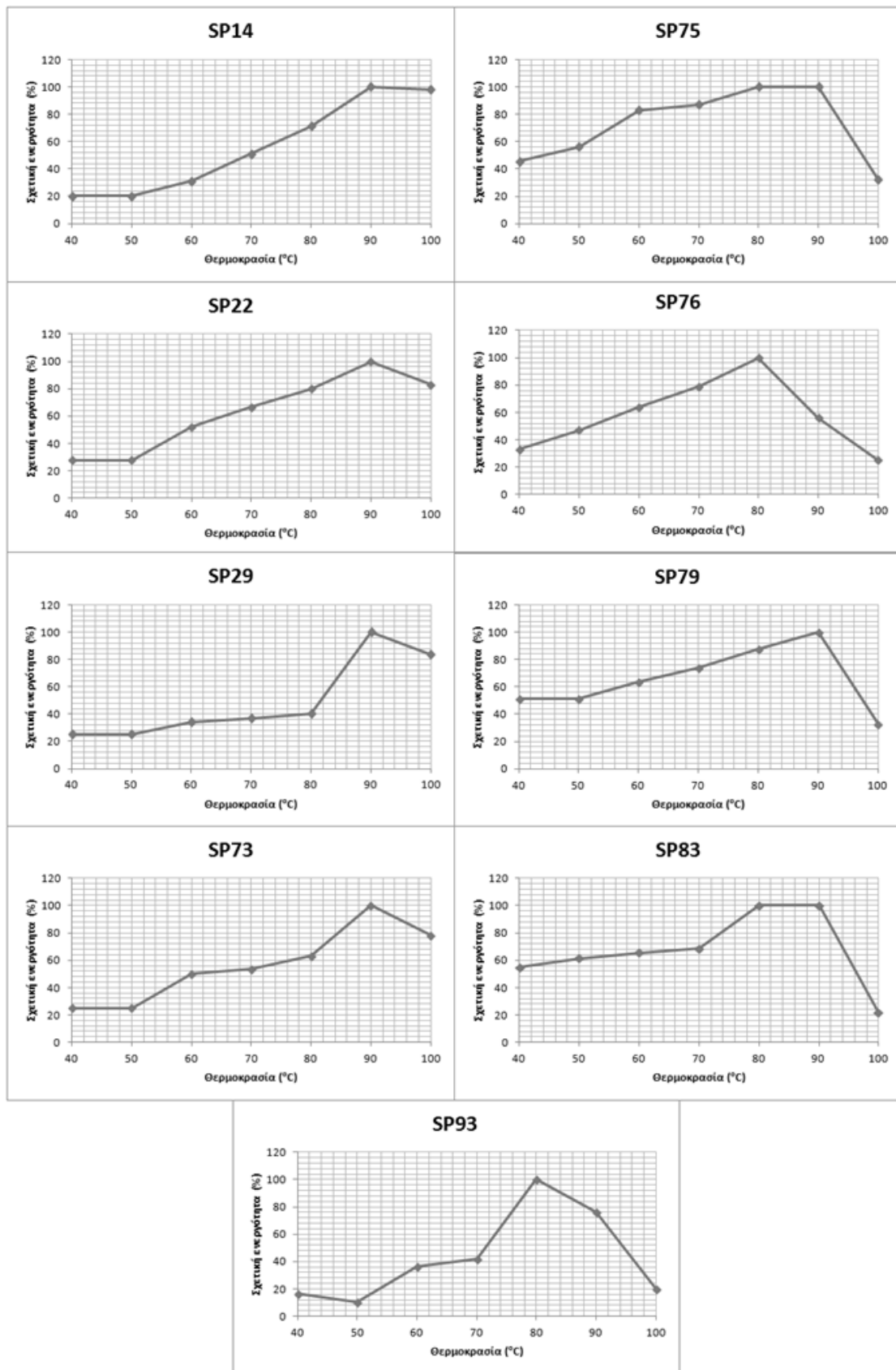


**Εικόνα 3-17** Καμπύλη αύξησης και έκκρισης εξωκυτταρικής λιπάσης κλειστής καλλιέργειας του στελέχους SP29 παρουσία ελαιολάδου ως πηγή άνθρακα. Με μαύρη γραμμή απεικονίζεται η οπτική απορρόφηση στα 600 nm και με γκρι η ενζυμική ενεργότητα σε U/mL.

### 3.3.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ pH ΣΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ

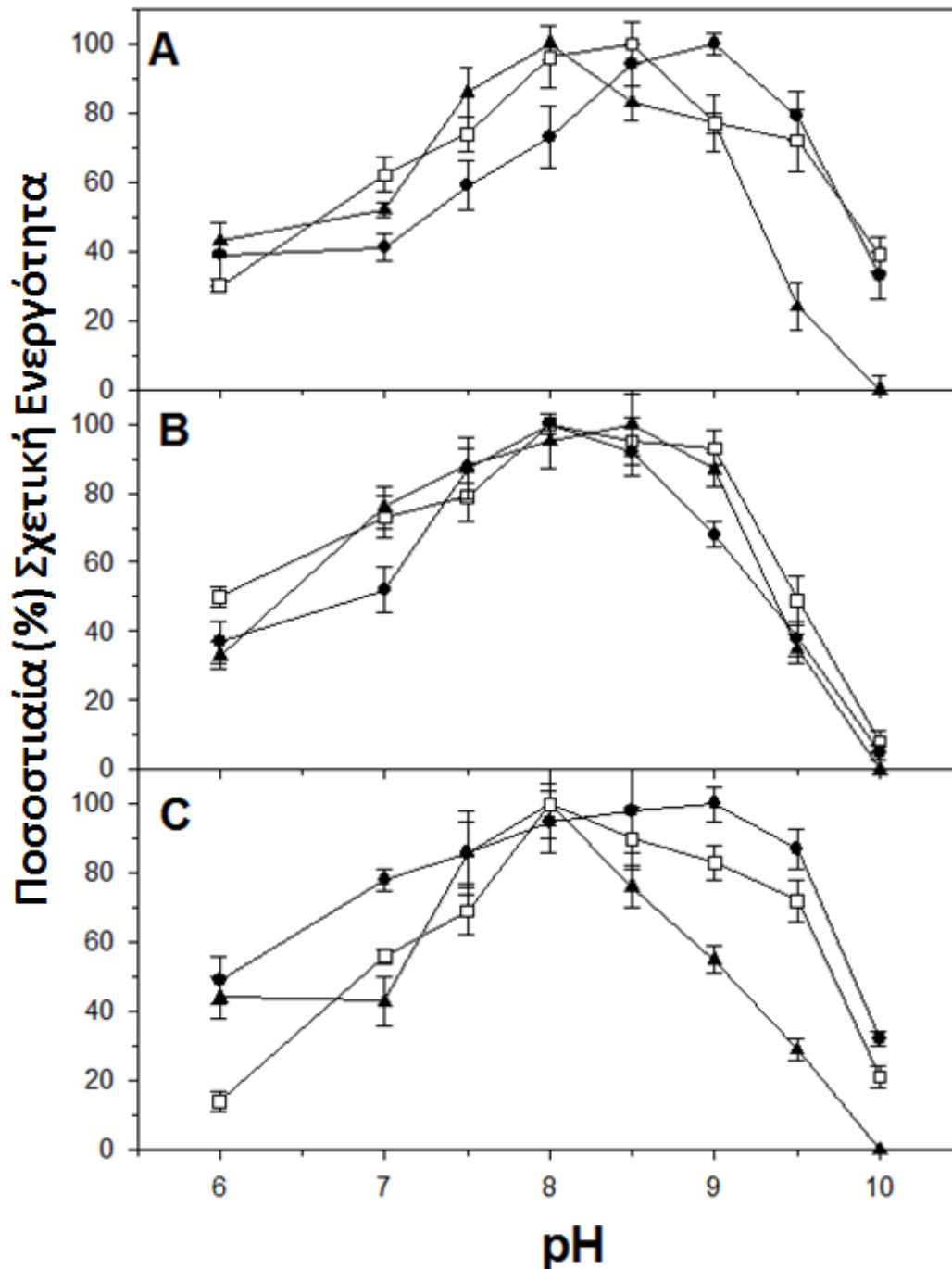
Η μελέτη του άριστου ζεύγους θερμοκρασίας και pH καθώς και της θερμοσταθερότητας των λιπολυτικών ενζύμων από τα επιλεγμένα θερμοφιλα βακτήρια πραγματοποιήθηκε σε ενζυμικό δείγμα υγρών καλλιιεργειών με βασικό υπόστρωμα BM1 και μοναδική πηγή άνθρακα το ελαιολάδο 2 % (w/v). Με δεδομένο την καθυστερημένη έκκριση των λιπασών κατά τη φάση στασιμότητας της μικροβιακής αύξησης, οι μέρες επώασης ήταν 5. Το ενζυμικό δείγμα προέκυψε έπειτα από διήθηση της αρχικής καλλιέργειας σε χαρτί τύπου Whatman (αφαίρεση ελαιολάδου), φυγοκέντρηση (απομάκρυνση βιομάζας) και καταβύθιση των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο σε εύρος κορεσμού 0-60 % (w/v). Το πρωτεϊνικό ίζημα αναδιαλυτοποιήθηκε σε μικρότερο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7,4).

Αρχικά, τα συμπυκνωμένα με θειικό αμμώνιο δείγματα αποτέλεσαν ενζυμική πηγή για τη μελέτη της άριστης θερμοκρασίας δράσης. Η ενζυμική αντίδραση έγινε με τη χρήση του ψευδοϋποστρώματος pNPP (§2.7.2) σε διαφορετικές θερμοκρασίες (40, 50, 60, 70, 80, 90 και 100 °C). Το pH διατηρήθηκε σταθερό στο 8 και τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην Εικόνα 3-18.



**Εικόνα 3-18** Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δράση των μερικώς καθαρισμένων λιπασών στα 9 επιλεγμένα θερμοφίλα στελέχη.

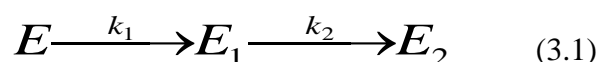
Στο ίδιο ενζυμικό δείγμα ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης του pH στη λιπολυτική δράση. Σε όλες τις περιπτώσεις οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στην άριστη θερμοκρασία δράσης η οποία προσδιορίστηκε στην προηγούμενη σειρά πειραμάτων. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην Εικόνα 3-19.



**Εικόνα 3-19** Επίδραση του pH στην ενεργότητα των μερικώς καθαρισμένων λιπασών από τα 9 επιλεγμένα στελέχη (A): ▲, SP14; ●, SP22; □, SP29. (B): ▲, SP73; ●, SP75; □, SP76. (C): ▲, SP79; ●, SP83; □, SP93.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η θερμοσταθερότητα των λιπασών. Αυτό κατέστη δυνατό έπειτα από επώαση των δειγμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες (70-100 °C) και τον προσδιορισμό της εναπομεινάσης ενεργότητας. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 3-20.

Μαθηματική προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων σε διάφορα πρότυπα απενεργοποίησης έδειξε πως ο κινητικός μηχανισμός απενεργοποίησης των λιπασών σε υψηλές θερμοκρασίες είναι 2<sup>ης</sup> τάξης.



Σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτό, η απενεργοποίηση του ενζύμου (E) πραγματοποιείται μέσω μιας ενδιάμεσης μορφής (E<sub>1</sub>) και στη συνέχεια οδηγείται στην ανενεργό μορφή (E<sub>2</sub>). Οι συντελεστές απενεργοποίησης k<sub>1</sub> και k<sub>2</sub> θεωρούνται πρώτης τάξης. Εάν οριστεί ως E<sub>0</sub> η συνολική ποσότητα του ενζύμου, στην πρώτη φάση της αντίδρασης ισχύει:

$$E_0 = E \text{ και } E_1 = E_2 = 0 \quad (3.2)$$

$$\text{Σε χρόνο } t \text{ ισχύει : } E_0 = E + E_1 + E_2 \quad (3.3)$$

$$\frac{dE}{dt} = -k_1 E \quad (3.4)$$

$$\frac{dE_1}{dt} = k_1 E - k_2 E_1 \quad (3.5)$$

Από την ολοκλήρωση της διαφορικής (3.4) προκύπτει η σχέση που περιγράφει την ελάττωση της αρχικής ενζυμικής συγκέντρωσης:

$$E = E_0 \cdot e^{-k_1 t} \quad (3.6)$$

Αντικατάσταση της (3.6) στην (3.5) :

$$\frac{dE_1}{dt} = -k_2 \cdot E_1 + k_1 \cdot E_0 \cdot e^{-k_1 t} \quad (3.7)$$

Από την (3.7) προκύπτει η σχέση που περιγράφει την εξάρτηση της ενζυμικής μορφής E<sub>1</sub> από τον χρόνο:

$$E_1 = \frac{k_1 \cdot E_0}{k_2 - k_1} \cdot (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (3.8)$$

Ορίζοντας ως α<sub>1</sub> το λόγο της ειδικής ενεργότητας της ενζυμικής μορφής E<sub>1</sub> προς την ειδική ενεργότητα της μορφής E, η συνολική μετρούμενη ενζυμική ενεργότητα κάθε χρονική στιγμή t, α, δίνεται από τη σχέση:

$$\alpha = \frac{E + a_1 E_1}{E_0} \quad (3.9)$$

Αντικατάσταση των E και E1 από τις (3.6) και (3.8) στην (3.9) προκύπτει:

$$a = \left[ 1 + \frac{a_1 k_1}{k_2 - k_1} \right] \exp(-k_1 t) - \left[ \frac{a_1 k_1}{k_2 - k_1} \right] \exp(-k_2 t) \quad (3.10)$$

Τα αποτελέσματα απενεργοποίησης των θερμοσταθερών λιπασών σε υψηλές θερμοκρασίες προσαρμόστηκαν με τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης (Λογισμικό Πακέτο, SigmaStat/SigmaPlot – SPSS Science Inc.) στο παραπάνω πρότυπο με αποτέλεσμα τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων  $a_1$ ,  $k_1$  και  $k_2$  (Πίνακας 3-11).

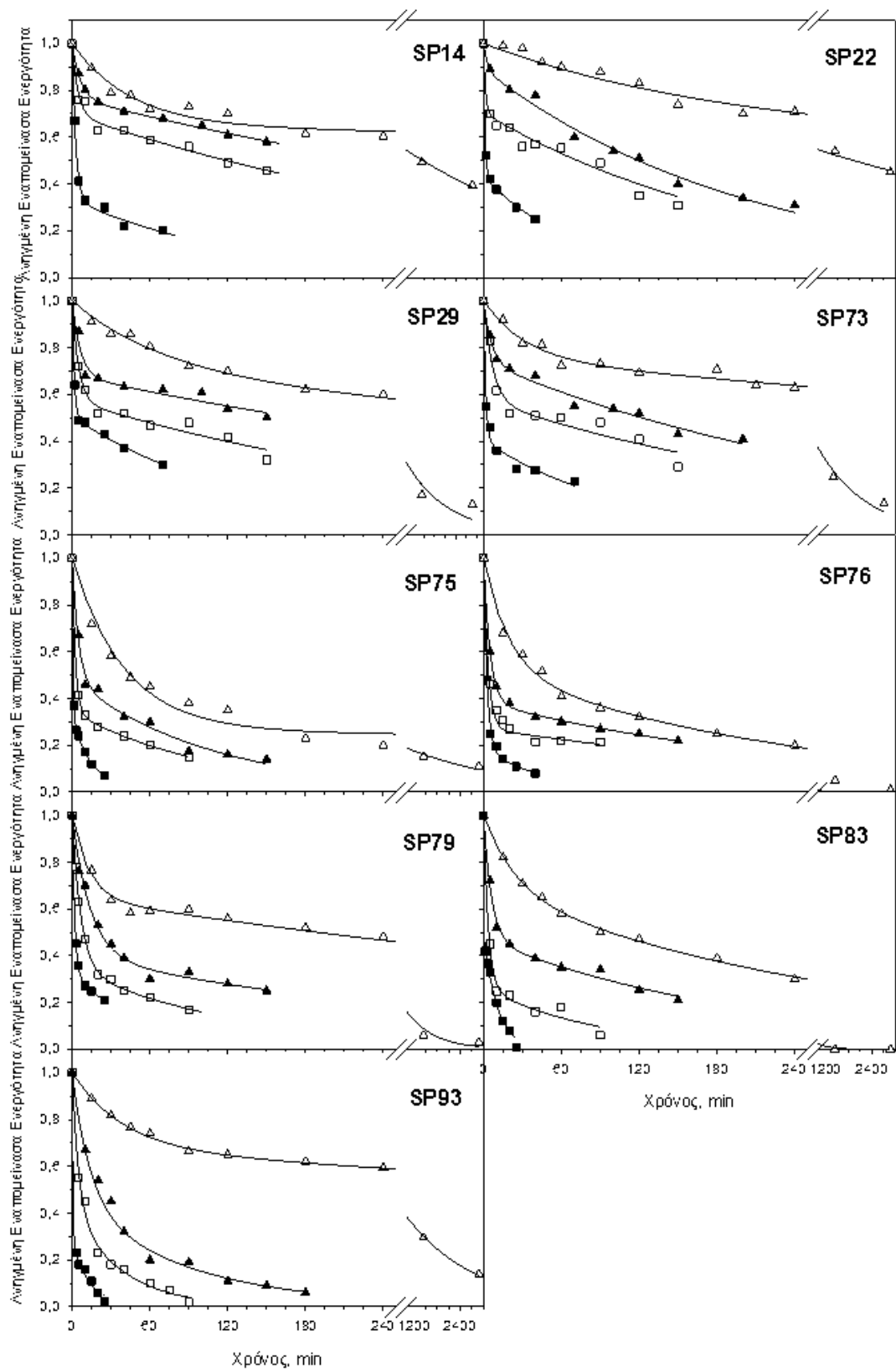
**Πίνακας 3-11** Τιμές κινητικών παραμέτρων θερμικής απενεργοποίησης μερικώς καθαρισμένων λιπασών από τα 9 επιλεγμένα στελέχη σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η τιμή  $a_1$  αντιπροσωπεύει το λόγο  $E_1/E$  και οι σταθερές  $k_1$  και  $k_2$  εκφράζονται σε  $\text{min}^{-1}$ .

SP14	70 °C	$a_1$	$0,647 \pm 0.021$	SP22	70 °C	$a_1$	$0,589 \pm 0.060$
		$k_1$	$2,24 \pm 0.37 \times 10^{-2}$			$k_1$	$5,06 \pm 1.14 \times 10^{-3}$
		$k_2$	$1,82 \pm 0.27 \times 10^{-4}$			$k_2$	$9,42 \pm 1.49 \times 10^{-5}$
	80 °C	$a_1$	$0,759 \pm 0.007$	SP22	80 °C	$a_1$	$0,879 \pm 0.035$
		$k_1$	$1,54 \pm 0.12 \times 10^{-1}$			$k_1$	$3,45 \pm 0.36 \times 10^{-1}$
		$k_2$	$1,83 \pm 0.10 \times 10^{-3}$			$k_2$	$4,85 \pm 0.31 \times 10^{-4}$
	90 °C	$a_1$	$0,690 \pm 0.026$	SP22	90 °C	$a_1$	$0,687 \pm 0.026$
		$k_1$	$2,30 \pm 0.65 \times 10^{-1}$			$k_1$	$5,33 \pm 0.36 \times 10^{-1}$
		$k_2$	$2,81 \pm 0.45 \times 10^{-3}$			$k_2$	$4,96 \pm 0.56 \times 10^{-3}$
	100 °C	$a_1$	$0,328 \pm 0.027$	SP22	100 °C	$a_1$	$0,432 \pm 0.006$
		$k_1$	$3,59 \pm 0.40 \times 10^{-1}$			$k_1$	$8,81 \pm 0.37 \times 10^{-1}$
		$k_2$	$7,84 \pm 2.32 \times 10^{-3}$			$k_2$	$1,45 \pm 0.07 \times 10^{-2}$
SP29	70 °C	$a_1$	$0,662 \pm 0.055$	SP73	70 °C	$a_1$	$0,740 \pm 0.021$
		$k_1$	$1,43 \pm 0.44 \times 10^{-2}$			$k_1$	$3,21 \pm 0.74 \times 10^{-2}$
		$k_2$	$8,26 \pm 1.13 \times 10^{-4}$			$k_2$	$7,06 \pm 0.62 \times 10^{-4}$
	80 °C	$a_1$	$0,673 \pm 0.040$	SP73	80 °C	$a_1$	$0,726 \pm 0.028$
		$k_1$	$1,57 \pm 0.54 \times 10^{-1}$			$k_1$	$1,66 \pm 0.47 \times 10^{-1}$
		$k_2$	$1,76 \pm 0.64 \times 10^{-3}$			$k_2$	$3,21 \pm 0.35 \times 10^{-3}$
	90 °C	$a_1$	$0,566 \pm 0.031$	SP73	90 °C	$a_1$	$0,562 \pm 0.059$
		$k_1$	$2,04 \pm 0.45 \times 10^{-1}$			$k_1$	$1,45 \pm 0.52 \times 10^{-1}$
		$k_2$	$3,05 \pm 0.66 \times 10^{-3}$			$k_2$	$3,27 \pm 1.22 \times 10^{-3}$
	100 °C	$a_1$	$0,500 \pm 0.011$	SP73	100 °C	$a_1$	$0,399 \pm 0.034$
		$k_1$	$6,47 \pm 0.54 \times 10^{-1}$			$k_1$	$6,27 \pm 1.27 \times 10^{-1}$
		$k_2$	$7,43 \pm 0.68 \times 10^{-4}$			$k_2$	$9,42 \pm 2.68 \times 10^{-3}$



SP75	70 °C	$\alpha_1$	$0,267 \pm 0.030$	SP76	70 °C	$\alpha_1$	$0,493 \pm 0.055$
		$k_1$	$2,54 \pm 0.30 \times 10^{-1}$			$k_1$	$5,36 \pm 1.21 \times 10^{-2}$
		$k_2$	$3,59 \pm 1.33 \times 10^{-4}$			$k_2$	$4,21 \pm 0.82 \times 10^{-3}$
	80 °C	$\alpha_1$	$0,459 \pm 0.044$		80 °C	$\alpha_1$	$0,377 \pm 0.008$
		$k_1$	$2,07 \pm 0.45 \times 10^{-1}$			$k_1$	$2,02 \pm 0.08 \times 10^{-1}$
		$k_2$	$9,20 \pm 1.48 \times 10^{-3}$			$k_2$	$3,77 \pm 0.25 \times 10^{-3}$
	90 °C	$\alpha_1$	$0,335 \pm 0.005$		90 °C	$\alpha_1$	$0,270 \pm 0.048$
		$k_1$	$3,96 \pm 0.13 \times 10^{-1}$			$k_1$	$2,90 \pm 0.68 \times 10^{-1}$
		$k_2$	$9,09 \pm 0.34 \times 10^{-3}$			$k_2$	$3,23 \pm 0.35 \times 10^{-2}$
	100 °C	$\alpha_1$	$0,302 \pm 0.009$		100 °C	$\alpha_1$	$0,176 \pm 0.054$
		$k_1$	$1,42 \pm 0.08 \times 10^0$			$k_1$	$3,68 \pm 0.58 \times 10^{-1}$
		$k_2$	$6,19 \pm 0.32 \times 10^{-2}$			$k_2$	$2,06 \pm 1.50 \times 10^{-2}$
SP79	70 °C	$\alpha_1$	$0,639 \pm 0.013$	SP83	70 °C	$\alpha_1$	$0,627 \pm 0.026$
		$k_1$	$8,01 \pm 1.63 \times 10^{-2}$			$k_1$	$4,12 \pm 0.53 \times 10^{-2}$
		$k_2$	$1,39 \pm 0.16 \times 10^{-3}$			$k_2$	$3,30 \pm 0.24 \times 10^{-3}$
	80 °C	$\alpha_1$	$0,384 \pm 0.047$		80 °C	$\alpha_1$	$0,458 \pm 0.029$
		$k_1$	$7,23 \pm 1.17 \times 10^{-2}$			$k_1$	$1,64 \pm 0.23 \times 10^{-1}$
		$k_2$	$3,04 \pm 0.64 \times 10^{-3}$			$k_2$	$4,88 \pm 0.80 \times 10^{-3}$
	90 °C	$\alpha_1$	$0,330 \pm 0.022$		90 °C	$\alpha_1$	$0,254 \pm 0.053$
		$k_1$	$1,48 \pm 0.10 \times 10^{-1}$			$k_1$	$2,77 \pm 0.60 \times 10^{-1}$
		$k_2$	$7,81 \pm 1.43 \times 10^{-3}$			$k_2$	$1,12 \pm 0.49 \times 10^{-2}$
	100 °C	$\alpha_1$	$0,313 \pm 0.013$		100 °C	$\alpha_1$	$0,491 \pm 0.052$
		$k_1$	$5,05 \pm 0.27 \times 10^{-1}$			$k_1$	$1,19 \pm 0.47 \times 10^1$
		$k_2$	$1,77 \pm 0.27 \times 10^{-2}$			$k_2$	$9,49 \pm 0.88 \times 10^{-2}$
SP93	70 °C	$\alpha_1$	$0,662 \pm 0.006$	SP93	90 °C	$\alpha_1$	$0,366 \pm 0.083$
		$k_1$	$2,57 \pm 0.12 \times 10^{-2}$			$k_1$	$2,02 \pm 0.05 \times 10^{-2}$
		$k_2$	$5,63 \pm 0.13 \times 10^{-4}$			$k_2$	$2,62 \pm 0.61 \times 10^{-3}$
	80 °C	$\alpha_1$	$0,380 \pm 0.011$		100 °C	$\alpha_1$	$0,271 \pm 0.065$
		$k_1$	$7,22 \pm 0.23 \times 10^{-2}$			$k_1$	$1,87 \pm 0.46 \times 10^0$
		$k_2$	$1,09 \pm 0.03 \times 10^{-2}$			$k_2$	$7,24 \pm 1.50 \times 10^{-2}$

Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 3-11 και της Εικόνας 3-20 αναδεικνύει τη λιπάση του στελέχους SP22 ως ένα από τα πιο θερμοσταθερά ένζυμα συγκριτικά με τα υπόλοιπα 8. Χαρακτηριστικό είναι πως οι σταθερές  $k_1$  και  $k_2$  στους 70 °C είναι τουλάχιστον μία τάξη μικρότερες από τις αντίστοιχες των υπολοίπων στελεχών, γεγονός που υποδεικνύει την αργή θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου στις συνθήκες αυτές.



**Εικόνα 3-20** Θερμοσταθερότητα των 9 μερικώς καθαρισμένων λιπασών στους 70 °C (Δ), 80 °C (▲), 90 °C (□) και 100 °C (■).

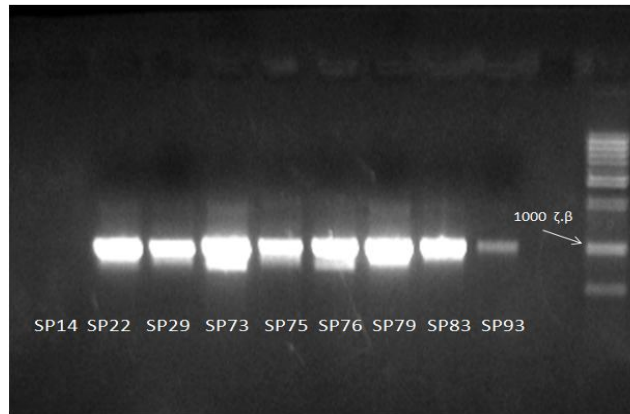
**Πίνακας 3-12** Επίδραση θερμοκρασίας και pH στη λιπολυτική ενεργότητα των 9 επιλεγμένων θερμοφίλων στελεχών. Με σκίαση εμφανίζεται το στέλεχος SP22 το οποίο εμφάνισε τα πιο ενδιαφέροντα βιοτεχνολογικά χαρακτηριστικά (αλκαλοφιλία, υψηλή άριστη θερμοκρασία δράσης και θερμοσταθερότητα).

Στέλεχος	Άριστη θερμοκρασία δράσης (°C)	Άριστο pH δράσης	Εναπομείνασα Ενεργότητα (%)			
			100 °C	90 °C	80 °C	70 °C
			25 min	90 min	150 min	240 min
SP14	90	8	21,7	73,9	89,1	60,3
SP22	90	9	36,6	62,2	84,4	94
SP29	90	8,5	56,9	51,9	96,2	25,2
SP73	90	8,5	28,3	56,6	90	31,5
SP75	85	8	17,7	15	14,3	49,5
SP76	80	8	23,7	21,2	11	64,3
SP79	90	8	29,7	30,9	23	63,1
SP83	85	9	25,4	23,9	25,9	61
SP93	80	8	14	16	8,5	69,4

Η θερμοσταθερότητα και η αλκαλοφιλία θεωρούνται βασικές προϋποθέσεις για την εφαρμογή των λιπασών σε ποικίλες βιοτεχνολογικές διεργασίες. Τα στελέχη SP14, SP22, SP29 και SP73 εμφάνισαν εξαιρετικής σταθερότητας λιπάσες σε συνδυασμό με υψηλή άριστη θερμοκρασία και αλκαλικό pH δράσης (Πίνακας 3-12). Ωστόσο, τα χαμηλά επίπεδα έκκρισης τους από τα στελέχη φυσικού τύπου σε συνδυασμό με το υψηλό κόστος καλλιέργειας των θερμοφίλων μικροοργανισμών αποτελεί πρόβλημα για τον απευθείας ενζυμικό καθαρισμό και χαρακτηρισμό, πόσο μεγαλύτερο δε για κάθε προσπάθεια εμπορικής αξιοποίησης. Συνεπώς, η ετερόλογη πρωτεϊνική υπερέκφραση σε μεσόφιλα συστήματα αποτελεί μία λογική απάντηση στην αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος.

### 3.3.5 ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΛΙΠΑΣΗΣ

Η πρώτη προσπάθεια εντοπισμού των θερμοφίλων λιπολυτικών γονιδίων στα εννέα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη πραγματοποιήθηκε με το σχεδιασμό ολιγονουκλεοτιδίων (5'Lip+300, 3'Lip+1270) για την ενίσχυση συντηρημένης εσωτερικής περιοχής του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης. Έπειτα από αντίδραση PCR με την KaraTaq πολυμεράση επιτεύχθηκε η ενίσχυση μιας περιοχής περίπου 948 ζ.β. στα 8 από τα 9 επιλεγμένα στελέχη (Εικόνα 3-21). Η εμφάνιση ζωνών στο αναμενόμενο μέγεθος στο πήκτωμα αγαρόζης αναδεικνύει την παρουσία γονιδίου θερμοσταθερής λιπάσης στο γονιδίωμα, που εμφανίζει ομολογία με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον σχεδιασμό των μορίων εκκινητών (§ 2.11.2). Αν και χρησιμοποιήθηκαν ποικιλία διαφορετικών συνθηκών κατά την PCR ουδέποτε δεν ανιχνεύθηκε προϊόν ενίσχυσης από το γονιδίωμα του στέλεχος SP14.

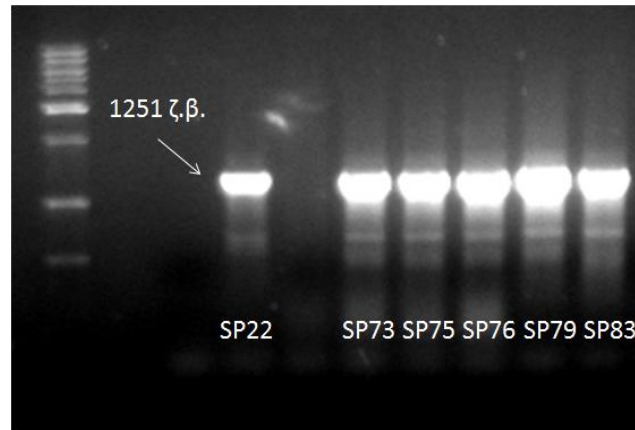


**Εικόνα 3-21** Ενίσχυση εσωτερικού τμήματος γονιδίου θερμοσταθερής λιπάσης στα οχτώ από τα εννέα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη (PCR με oligονουκλεοτίδια '5 Lip+300 και '3 Lip+1270).

Τα PCR προϊόντα διαχωρίστηκαν από τους εκκινητές και τα ελεύθερα νουκλεοτίδια και χρησιμοποιήθηκαν απευθείας για ανάλυση αλληλουχίας ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com), Κορέα). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών με τη διεθνή βάση δεδομένων (αλγόριθμος BLAST) και βρέθηκαν τα γονίδια με τη μεγαλύτερη ταυτότητα αλληλουχίας. Τα 7 από τα 8 προϊόντα ενίσχυσης εμφάνισαν υψηλή ταυτότητα (98%) με το γονίδιο της λιπάσης του στελέχους *Geobacillus stearothermophilus* TW1 (Κωδικός NCBI: AY786185.1). Μόνο το προϊόν PCR από το στέλεχος SP29 διαφοροποιήθηκε και παρουσίασε γενετική ταυτότητα (86%) με γονίδιο του στελέχους *Geobacillus thermodenitrificans* (Κωδικός NCBI: CP000557.1).

Με στόχο την απομόνωση ολόκληρου του πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου θερμοσταθερής λιπάσης στα επιλεγμένα στελέχη πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με μόρια εκκινητές τα GeoLipF1 και GeoLipR1 (§ 2.11.2) σε ποικιλία διαφορετικών συνθηκών. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα, και πιθανολογήθηκε πως ευθύνεται το γεγονός ότι τα μόρια εκκινητές αποτελούσαν μείγμα διαφορετικών αλληλουχιών.

Ακολούθησε σχεδιασμός των μορίων εκκινητών GeoLipF2 και GeoLipR2 (§ 2.11.2) με βάση τις αλληλουχίες των γονιδίων που εμφάνισαν μεγαλύτερη συγγένεια κατά την πρώτη αντίδραση PCR εσωτερικά του γονιδίου και άλλες γνωστές κατατεθειμένες. Και σε αυτή τη περίπτωση δοκιμάστηκε ποικιλία διαφορετικών συνθηκών. Μόνο στα 6 από τα 9 επιλεγμένα στελέχη εμφανίστηκε στο πήκτωμα αγαρόζης ζώνη αναμενόμενου μεγέθους (Εικόνα 3-22).



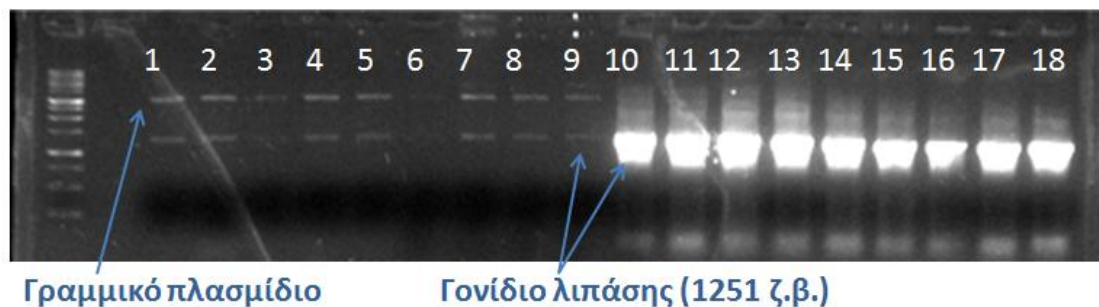
**Εικόνα 3-22** Ενίσχυση ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης γονιδίου λιπάσης στα έξι από τα εννέα επιλεγμένα θερμοφιλα στελέχη (PCR με ολιγονουκλεοτίδια GeoLipF2-GeoLipR2).

### 3.3.6 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΛΙΠΑΣΗΣ

Ο εκτενής ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των εκκρινόμενων λιπασών από ένα σύνολο θερμοφίλων απομονωθέντων βακτηρίων ανέδειξε 9 στελέχη με ικανότητα έκκρισης λιπάσης με σημαντικά βιοτεχνολογικά χαρακτηριστικά όπως η υψηλή θερμοσταθερότητα και η αλκαλοφιλία. Μολονότι τα θερμοφιλα βακτήρια συνιστούν τις συχνότερες πηγές θερμοσταθερών ενζύμων, σπάνια χρησιμοποιούνται φυσικού τύπου στελέχη για την παραγωγή των ενζύμων αυτών, εξαιτίας των χαμηλών ρυθμών μικροβιακής αύξησης και ενζυμικής έκκρισης και η πλέον συνήθης στρατηγική είναι η υπερέκφραση των αντίστοιχων γονιδίων σε μεσόφιλα συστήματα. Για το σκοπό αυτό, στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε το γονίδιο της λιπάσης που εντοπίστηκε στο γονιδίωμα του στελέχους SP22 για κλωνοποίηση και υπερέκφραση. Η επιλογή βασίστηκε κυρίως στην αυξημένη σταθερότητα και θερμική αντοχή καθώς και στην αλκαλοφιλία του ενζύμου συγκριτικά με τα υπόλοιπα 8.

Η ανάλυση ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδίου πραγματοποιήθηκε έπειτα από την ενσωμάτωσή του στο φορέα κλωνοποίησης pBluescript II SK (+). Αυτό κατέστη δυνατό έπειτα από ενίσχυση του γονιδίου θερμοσταθερής λιπάσης με τα μόρια εκκινητές LipF-*Clal* και LipR-*Xbal* (§ 2.12.2) με μήτρα το γονιδίωμα του στελέχους SP22. Τα παραπάνω ολιγονουκλεοτίδια διαθέτουν θέσεις περιορισμού από τις ενδονουκλεάσες *Clal* και *Xbal*. Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε με την Phusion DNA πολυμεράση και τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη πέψη με τα ένζυμα *Clal* και *XbaI* τόσο του γονιδίου όσο και του φορέα pBluescript II SK (+) για να δημιουργηθούν μονόκλιωνα άκρα και να ενσωματωθεί το γονίδιο στον φορέα κατά την αντίδραση δεσμάσης. Τέλος, ο ανασυνδυασμένος φορέας κλωνοποιήθηκε σε κύτταρα *E. coli* DH5a και επιλέχθηκαν αποικίες με βάση την ανθεκτικότητά τους στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Οι αποικίες (στο σύνολο 9) επανακαλλιιεργήθηκαν και απομονώθηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Η επιτυχία της κλωνοποίησης πιστοποιήθηκε έπειτα από θετική αντίδραση PCR για το γονίδιο της λιπάσης στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια καθώς και από κατάλληλες πέψεις αυτών (Εικόνα 3-23).



**Εικόνα 3-23** Έλεγχος επιτυχούς κλωνοποίησης του γονιδίου της λιπάσης (SP22) με το φορέα pBluescript σε *E. coli* DH5a. Στις πρώτες 9 θέσεις παρατηρούνται οι πέψεις ανασυνδυασμένων pBluescript με *XbaI* και *Clal* όπου καταλήγουν στο γραμμικό πλασμίδιο και στο γονίδιο της λιπάσης και στις επόμενες 9 οι θετικές αντιδράσεις PCR για το γονίδιο της λιπάσης (1251 ζ.β.). Οι αντιδράσεις αφορούν πλασμίδια από ανθεκτικές στην αμικικιλίνη αποικίες.

Η ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου της θερμοσταθερής λιπάσης πραγματοποιήθηκε (Macrogen, Κορέα) στον ανασυνδυασμένο φορέα χρησιμοποιώντας τους διεθνείς εκκινητές T3 και T7 οι οποίοι προσδένονται πριν και μετά το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Στην Εικόνα 3-24 εμφανίζεται η πρωτοταγής δομή του γονιδίου της λιπάσης (1251 ζ.β.).

```

ATGAAATGCTGTCGGGTTATGTTTTGTGTTGCTCGGATTATGGCTTGTATTTCGGCCTATCGGTCCCGGGAGGGCGAGCTGAAGC
GGCAGTTTCACGCGCCAACGATGCGCCGATTGTAATTCCTCATGGCTTACTGGCTGGGAAGAGAAGAAATGTTTTGGGTTCA
AGTACTGGGGCGGCGTGCAGCGGATATCGAACAATGGCTGAACGACAACGGTTATCGAACTTATACGCTGGCGGTCCGGACC
GCTCTCGAGCAACTGGGACCGGGCGTGTGAAGCGTATGCTCAGCTTGTTCGGCGGGACGGTTCGATTATGGGGCAGCCCATGCG
GCAAAGCACGGCCATGCGCGGTTTGGCCGCACTTATCCCGGCCTGTTGCCGGAATTGAAAAGGGGTGGCCGCATCCATATCAT
CGCCACAGCCAAGGGGGGACAGCGGCCCGCATGCTTGTCTCGCTCCTAGAGAACGGAAGCCAAGAAGAGCGGGAGTACGC
CAAGGCGCACAACTGTCGTTGTCACCGTTGTTGAAGGTGGACATCATGTTGTGTTGAGTGTGACGACCATCGCCACTCCTC
ATGACGGGACGACGCTTGTCAACATGGTTGATTCACCGATCGCTTTTTGACTTGCAAAAAGCGGTGTGAAAAGCGGGCGGT
GTCGCCAGCAACGTTGCCGTACACGAGTCAAGTATACGATTTTAAGCTCGACCAATGGGGACTGCGCCGCCAGCCGGGTGAAT
CGTTCGACCATTATTTTGAACGGCTCAAGCGCTCCCTGTTTGGACGTCGACAGATACCGCCCGCTACGATTATCCGTTTCCG
GAGCTGAGAAGTTGAATCAATGGGTGCAAGCAAGCCCGAATACGTATTATTTGAGCTTGGCCACAGAACGGACGTATCGCGG
AGCGCTCACAGGCAACTATTTATCCCGAACTCGGAATGAATGCATTCAGCGCGGTTCGTATGCGCTCCGTTTCTCGGTTTCGTACC
GCAATCCGACGCTCGGCATTGACGACCGCTGGCTTGA AAAACGATGGTATTGTCAATACGGTTTCCATGAACGGTCCAAAAGCGT
GGATCAAGCGATCGGATCGTACCGTATGACGGGGCGTTGAAAAAAGGGGTTTGAATGACATGGGAACGTACAATGTGCACC
ATTTGGAAATCATCGCGGTTGACCCGAATCCGTCATTTGATATTTCGGCCTTTTATTTCGCACTTGGCCAGCAATTGGCGAGCT
TGCAGCCTTAA
    
```

**Εικόνα 3-24** Ανάλυση αλληλουχίας κωδικής αλυσίδας γονιδίου θερμοσταθερής λιπάσης (στέλεχος SP22). Με πράσινο εμφανίζεται το κωδικόνιο έναρξης και με κόκκινο το κωδικόνιο λήξης.

Η λιπάση (M.B. 46 kDa, 416 αμινοξέα, θεωρητικό pI 6,3) ανήκει στην υποοικογένεια 1.5 και εμφάνισε ομοιότητα με ανάλογες λιπάσες από *Geobacillus* και *Bacillus*. Μάλιστα έναντι του συντηρημένου, στις μικροβιακές και θηλαστικές λιπάσες, πενταπεπτιδίου του ενεργού κέντρου Gly-X-Ser-X-Gly το εν λόγω ένζυμο εμφανίζει το πεπτίδιο Ala-X-Ser-X-Gly που είναι διαδεδομένο στους βακίλους (Εικόνα 3-25).

10 MKCCRVMFVL	20 LGLWLVFGLS	30 VPGGRAEAAV	40 SRANDAPIVL	50 LIGFTGWGRE	60 EMFGFKYWGG
70 VRGDIEQWLN	80 DNGYRYYTLA	90 VGPLSSNWDR	100 ACEAYAQLVG	110 GTVDYGAAHA	120 AKHGHRFGR
130 TYPGLLPELK	140 RGGRIHIIAH	150 SQGGQTARML	160 VSLENGSQE	170 EREYAKAHNV	180 SLSPLFEGGH
190 HVVLSTVTIA	200 TPHDGTTLVN	210 MVDFTDRFFD	220 LQKAVLKAAA	230 VASNVPYTSQ	240 VYDFKLDQWG
250 LRRQPGESFD	260 HYFERLKRSP	270 VWTSTDTARY	280 DLSVSGAEKL	290 NQWVQASPNT	300 YYLSFATERT
310 YRGALTGNYY	320 PELGMNAFSA	330 VVCAPFLGSY	340 RNPTLGIDDR	350 WLENIGIVNT	360 VSMNGPKRGS
370 SDRIVPYDGA	380 LKKGVWNDMG	390 TYNVDHLEII	400 GVDPNPSFDI	410 RAFYLRLAEQ	LASLQP

**Εικόνα 3-25** Πρωτοταγής δομή της θερμοσταθερής λιπάσης. Με μωβ χρώμα εμφανίζεται το χαρακτηριστικό πενταπεπτίδιο Ala-X-Ser-X-Gly και με μπλε τα αμινοξέα που συμμετέχουν στην καταλυτική τριάδα μαζί με τη σερίνη-141.

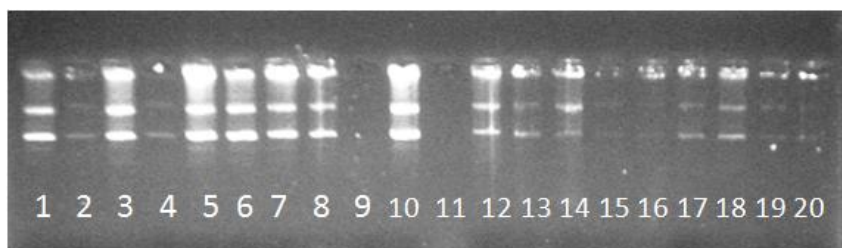
### 3.3.7 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η υπερέκφραση της θερμοσταθερής λιπάσης σε διαφορετικές σειρές δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* πραγματοποιήθηκε μέσω του φορέα κλωνοποίησης pET15b. Το πλασμίδιο αυτό φέρει τον ισχυρό υποκινητή T7 (επαγωγή με IPTG) καθώς και μία αμινοτελική ακολουθία 6 ιστιδινών. Διαθέτει 2 θέσεις κλωνοποίησης (*NdeI/BamHI*) και φέρει ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη.

Τα κύτταρα ξενιστές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα *E.coli* DH5a, BL21(DE3) και τα BL21(DE3)pLysS. Τα DE3 κύτταρα περιέχουν το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης υπό τον έλεγχο του lacUV5 υποκινητή (φάγος λDE3). Επίσης τα παραπάνω στελέχη δεν παράγουν τις πρωτεάσες lon και ompT, προστατεύοντας τις πρωτεΐνες που παράγονται από ανεπιθύμητη πρωτεολυτική πέψη. Τα κύτταρα pLysS περιέχουν ένα ενδογενές πλασμίδιο που κωδικοποιεί την T7 λυσοζύμη, φυσικό αναστολέα της T7 RNA πολυμεράσης. Με τον τρόπο αυτό περιορίζεται η έκφραση του γονιδίου-στόχου, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλους ξενιστές σε περιπτώσεις τοξικών γονιδίων.

Η ενίσχυση του γονιδίου-στόχου αυτή τη φορά πραγματοποιήθηκε με τα εκκινητικά μόρια LipF-*NdeI* και LipR-*BamHI* (§ 2.12.2) που διαθέτουν θέσεις περιορισμού για τα ένζυμα *NdeI* και *BamHI*.

Το προϊόν PCR καθώς και το πλασμίδιο pET15b υπέστησαν πέψη με τα αντίστοιχα περιοριστικά ένζυμα *NdeI* και *BamHI* και προέκυψαν νουκλεϊκά οξέα με κολλώδη άκρα (§ 2.12.4). Ακολούθησε σύνδεση του περιορισμένου πλασμιδίου και του γονιδίου της λιπάσης (§ 2.12.5) και μετασχηματισμός (§ 2.12.7) των κυττάρων ξενιστών (αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα DH5a). Η επιλογή των αποικιών πραγματοποιήθηκε με βάση την ανθεκτικότητά τους στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Ακολούθησαν υγρές καλλιέργειες των 20 επιλεγμένων αποικιών DH5a από τις οποίες απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA (Εικόνα 3-26) και ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v).



**Εικόνα 3-26** Ηλεκτροφόρηση των πλασμιδίων που απομονώθηκαν από τα ανθεκτικά στην αμικικιλίνη στελέχη του *E. coli* που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό τους με τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης (ligation) του πλασμιδίου pET15b με το γονίδιο της λιπάσης

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επιτυχίας της κλωνοποίησης (§ 2.12.8) με πέψη του πλασμιδιακού DNA του κλώνου 1 με *NdeI* και *BamHI* και PCR αντίδραση για το γονίδιο της λιπάσης (Εικόνα 3-27).



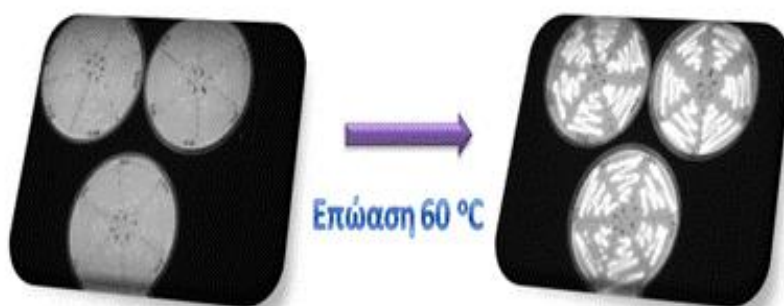
**Εικόνα 3-27** Α. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης πλασμιδιακού DNA κλώνου 1 με *NdeI* και *BamHI*. Στη θέση 1 παρατηρείται ο κυκλικός ανασυνδυασμένος φορέας και στη θέση 2 ο γραμμικός φορέας και το γονίδιο της λιπάσης. Β. Αντίδραση PCR για το γονίδιο της λιπάσης στο πλασμιδιακό DNA του κλώνου 1.

Έπειτα από την πιστοποίηση του επιτυχούς ανασυνδυασμού του πλασμιδίου pET15b με το γονίδιο της λιπάσης ακολούθησε ο μετασχηματισμός των κυττάρων ξενιστών BL21(DE3) και BL21(DE3)pLysS και η μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης σε διαφορετικές συνθήκες επαγωγής. Η αποθήκευση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων δεν πραγματοποιήθηκε σε BL21 κύτταρα καθότι εμφανίζουν αστάθεια.



Ο έλεγχος του επιτυχούς μετασχηματισμού των BL21 κυττάρων πραγματοποιήθηκε άμεσα με την επίστρωση των επιλεγμένων αποικιών σε τρυβλία που περιείχαν ελαιόλαδο και τη χρωστική Ροδαμίνη Β (§ 2.6.2). Σε αυτά είχε προστεθεί αμπικιλίνη (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) καθώς και ο επαγωγέας IPTG (50 mM). Τα τρυβλία εμβολιάστηκαν και επώαστηκαν για 16 ώρες στους 37 °C για την ανάπτυξη των κύτταρων *E. coli* και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 60 °C (16 ώρες) για τη δράση της θερμοσταθερής λιπάσης (Εικόνα 3-28).

Ακολούθησαν καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων σε διαφορετικές συνθήκες επαγωγής (θερμοκρασία ανάπτυξης, συγκέντρωση IPTG) με στόχο την παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης και την αποφυγή συσσωματώσεων.



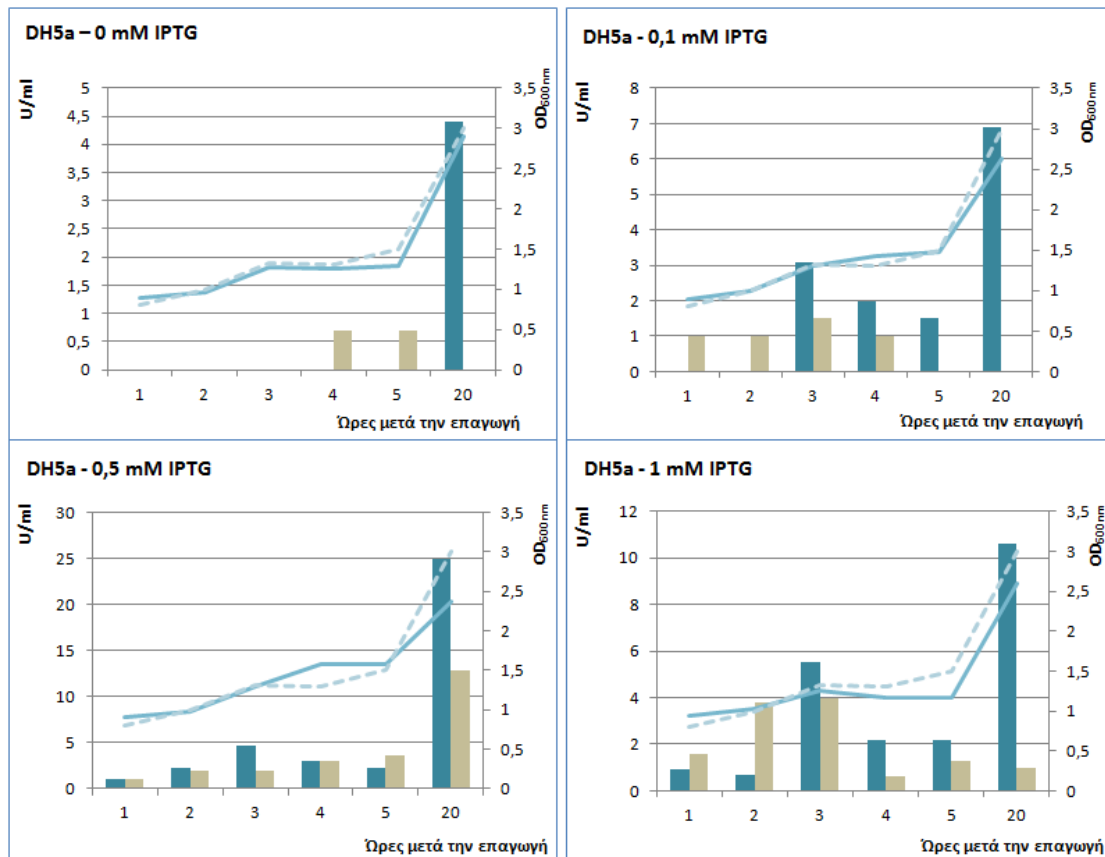
**Εικόνα 3-28** Μετασχηματισμός σε *E. coli* και ακόλουθος ποιοτικός εντοπισμός ενζυμικής ενεργότητας σε στερεές καλλιέργειες LB-Ροδαμίνης με πηγή άνθρακα ελαιόλαδο και επιπλέον αμπικιλίνη.

### 3.3.7.1 ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ

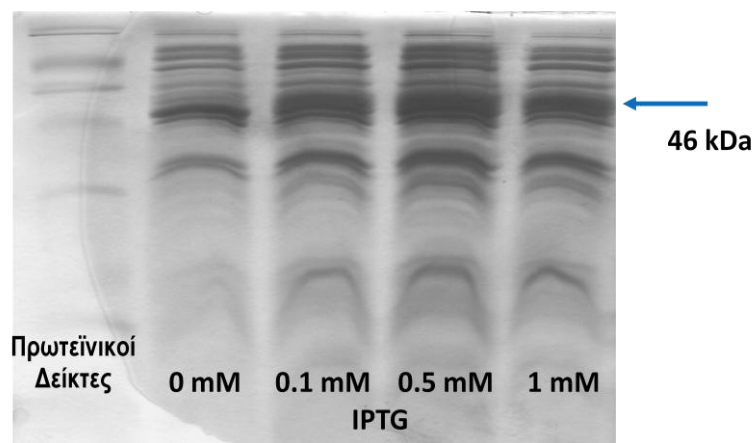
---

Τα πρώτα κύτταρα ξενιστές στα οποία μελετήθηκε η έκφραση, η τοπολογία και η πιθανή τοξικότητα της ανασυνδυασμένης λιπάσης ήταν τα *E. coli* DH5a. Κατά την εκθετική φάση αύξησης (χρόνος 0,  $\text{OD}_{600} = 0,600$ ) σε καλλιέργεια των μετασχηματισμένων βακτηρίων προστέθηκε διαφορετικής συγκέντρωσης επαγωγέας (IPTG) και ακολούθησε συλλογή δειγμάτων και εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν στους 37 °C. Το ενδοκυτταρικό εκχύλισμα παραλήφθηκε μετά από θραύση των κυττάρων σε συσκευή υπερήχων (Sonics and Materials, Vibra-Cell, 400W). Η διαδικασία περιελάμβανε την υποβολή του κυτταρικού εναιωρήματος σε 2 κύκλους θραύσης των 30 sec στα 180 Watt, με ενδιάμεση ψύξη στον πάγο.

Στην Εικόνα 3-29 απεικονίζονται οι ενζυμικές ενεργότητες (θερμοκρασία αντίδρασης 70 °C και pH 8) στην πορεία του χρόνου, έπειτα από την προσθήκη του επαγωγέα, καθώς και η εκτίμηση της βακτηριακής αύξησης (OD<sub>600</sub>) σε μετασηματισμένους και μη μικροοργανισμούς.



**Εικόνα 3-29** Κινητική ετερόλογης έκφρασης θερμοσταθερής λιπάσης σε κύτταρα *E. coli* DH5a σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα (IPTG). Με καφέ μπάρες απεικονίζεται η λιπολυτική ενεργότητα στο εξωκυτταρικό και με γαλάζιο στο ενδοκυτταρικό κλάσμα. Η οπτική απορρόφηση (600nm) της καλλιέργειας απεικονίζεται για τα μη μετασηματισμένα βακτήρια με διακεκομμένη γραμμή και για τα μετασηματισμένα με γαλάζια συμπαγή γραμμή.



**Εικόνα 3-30** SDS PAGE ενδοκυτταρικών κλασμάτων από καλλιέργεια μετασηματισμένων DH5a, 20 ωρών έπειτα από επαγωγή με διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG στους 37 °C.

Η μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου - στόχου στα κύτταρα DH5a παραμένει σε χαμηλά επίπεδα καθότι απουσιάζει από το γονιδίωμα τους η T7 RNA πολυμεράση, ειδική για τον T7 υποκινητή. Σε συνθήκες μη επαγωγής (0 mM IPTG) δεν υπάρχουν ανιχνεύσιμες ενζυμικές ενεργότητες. Παράλληλα, παρατηρήθηκε η μέγιστη ενζυμική ενεργότητα σε συγκέντρωση 0,5 mM IPTG έπειτα από την παρέλευση 20 ωρών από την επαγωγή και το ένζυμο εντοπίστηκε στο ενδοκυτταρικό κλάσμα. Επίσης, η σύγκριση της χρονικής εξέλιξης της κυτταρικής συγκέντρωσης μεταξύ των μετασχηματισμένων και μη βακτηρίων δεν εμφανίζει διαφορές, γεγονός που αποδεικνύει τη μη τοξικότητα της ετερόλογης πρωτεΐνης (Εικόνες 3-29 και 3-30).

Χρησιμοποιώντας τις άριστες συνθήκες έκφρασης της θερμοσταθερής λιπάσης (0,5 mM IPTG, 20 ώρες επαγωγής) πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες μετασχηματισμένων DH5a σε χαμηλότερες θερμοκρασίες επώασης. Η εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας (θερμοκρασία αντίδρασης 70 °C και pH 8) έγινε στο ενδοκυτταρικό εκχύλισμα (Πίνακας 3-13).

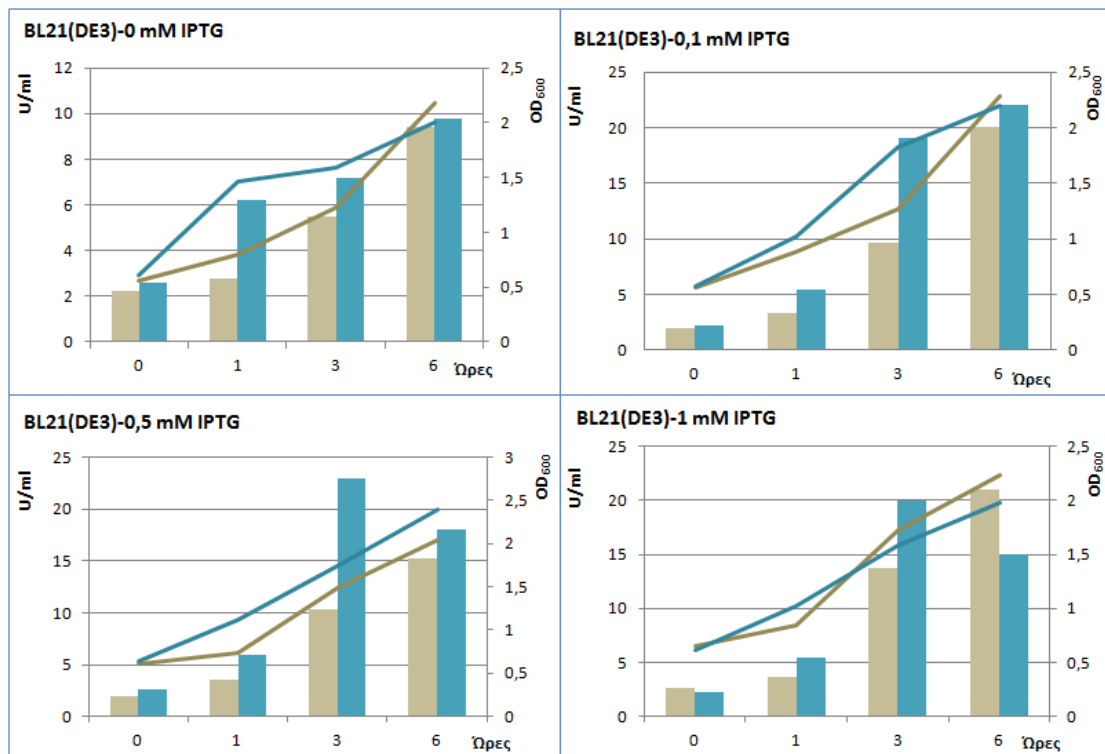
**Πίνακας 3-13** Εκτίμηση ειδικής ενζυμικής ενεργότητας σε καλλιέργειες μετασχηματισμένων DH5a οι οποίες επώαστηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Θερμοκρασία Επώασης	Ειδική Ενεργότητα Λιπάσης (U/g πρωτεΐνης)
22 °C	12
25 °C	19
37 °C	5,9

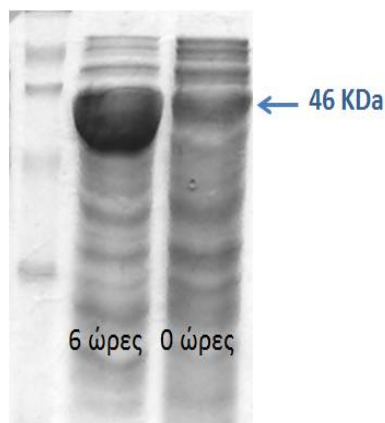
Η ειδική λιπολυτική ενεργότητα εμφανίζεται 3πλάσια στους 25 °C και 2πλάσια στους 22 °C συγκριτικά με τους 37 °C, άριστη θερμοκρασία αύξησης της *E. coli*. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με τον βραδύτερο ρυθμό αύξησης του βακτηρίου που παρατηρείται ίσως σε χαμηλότερες θερμοκρασίες επώασης, δίνοντας τη δυνατότητα καλύτερης αναδίπλωσης της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης και την ελάττωση του ρυθμού σχηματισμού ανεπιθύμητων συσσωματωμάτων.

Ακολούθησε ο μετασχηματισμός κυττάρων ξενιστών BL21(DE3) και BL21(DE3)pLysS με τον ανασυνδυασμένο φορέα pET15b. Οι μετασχηματισμένοι κλώνοι καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης και συνθήκες επαγωγής. Η εκτίμηση της ενζυμικής τους ενεργότητας (θερμοκρασία αντίδρασης 70 °C και pH 8) πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικά χρονικά σημεία έπειτα από την έναρξη της επαγωγής (Χρόνος 0, OD<sub>600</sub>=0,600) μόνο στο εσωκυτταρικό εκχύλισμα.

Τα αποτελέσματα για τα BL21(DE3) εμφανίζονται στις Εικόνες 3-31 και 3-32.



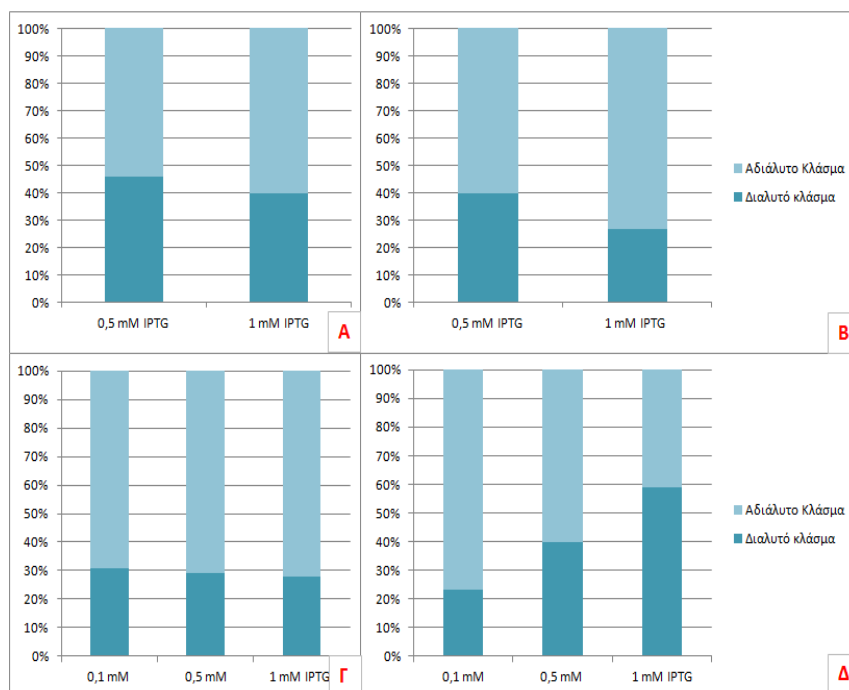
**Εικόνα 3-31** Κινητική ετερόλογης έκφρασης θερμοσταθερής λιπάσης σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα (IPTG) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης. Με καφέ μπάρες απεικονίζεται η λιπολυτική ενεργότητα (U/mL) στους 25 °C ενώ με μπλε στους 37 °C. Με καφέ γραμμή η οπτική απορρόφηση στα 600 nm στην καλλιέργεια των 25 °C ενώ με μπλε στους 37 °C.



**Εικόνα 3-32** SDS PAGE ενδοκυτταρικών κλασμάτων από καλλιέργεια μετασηματισμένων BL21(DE3) στους 37 °C κατά την προσθήκη IPTG (0,5mM) και έπειτα από 6 ώρες από αυτήν.

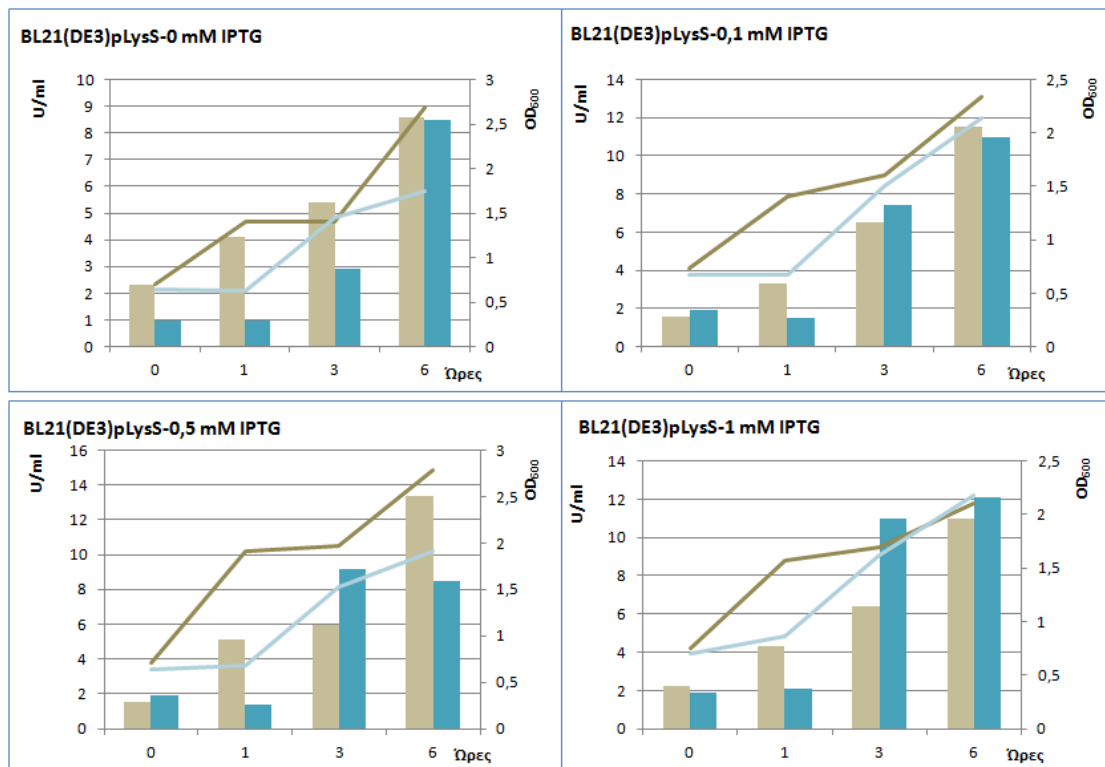
Στα BL21(DE3) παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα μεταγραφής και απουσία επαγωγής (0 mM IPTG) και εξαιρετικά υψηλή μεταγραφική ικανότητα (Εικόνα 3-32) παρουσία του επαγωγέα. Ωστόσο, η ενζυμική ενεργότητα δεν συνάδει με τα υψηλά αυτά επίπεδα γεγονός που δικαιολογείται ενδεχομένως από τον σχηματισμό αδιάλυτων μη ενεργών συσσωματωμάτων εξαιτίας της υψηλής έκφρασης σε συνδυασμό με την υδροφοβικότητα του μορίου. Το παραπάνω παρατηρήθηκε και κατά τη διάρρηξη των

κυττάρων με υπερήχους, όπου το ενδοκυτταρικό κλάσμα δεν ήταν διαυγές. Η εικόνα βελτιώθηκε ελάχιστα μειώνοντας τη θερμοκρασία αύξησης των κυττάρων. Σε μία προσπάθεια μελέτης της διαλυτότητας της λιπάσης, τα μη διαυγή ενδοκυτταρικά εκχυλίσματα επαναφυγοκεντρήθηκαν σε υψηλότερες στροφές και ακολούθησε εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας στο υπερκείμενο. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην Εικόνα 3-33.

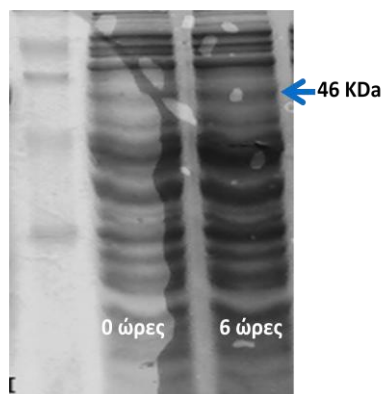


**Εικόνα 3-33** Δοκιμή διαλυτότητας λιπάσης. Α. Κατανομή της ενζυμικής ενεργότητας στο διαλυτό και στο αδιάλυτο κλάσμα σε συνθήκες επαγωγής 3 ωρών στους 25 °C από τα BL21(DE3) Β. Κατανομή της ενζυμικής ενεργότητας στο διαλυτό και στο αδιάλυτο κλάσμα σε συνθήκες επαγωγής 6 ωρών στους 25 °C από τα BL21(DE3) Γ. Κατανομή της ενζυμικής ενεργότητας στο διαλυτό και στο αδιάλυτο κλάσμα σε συνθήκες επαγωγής 3 ωρών στους 37 °C από τα BL21(DE3) Δ. Κατανομή της ενζυμικής ενεργότητας στο διαλυτό και στο αδιάλυτο κλάσμα σε συνθήκες επαγωγής 6 ωρών στους 37 °C από τα BL21(DE3).

Η έκφραση της θερμοσταθερής λιπάσης από τα κύτταρα BL21(DE3) κατέληξε στον σχηματισμό μη διαλυτών μορίων και δεν αποτέλεσε επιτυχές σύστημα παραγωγής της συγκεκριμένης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Το επόμενο βήμα ήταν ο μετασχηματισμός των BL21(DE3)pLysS τα οποία διαθέτουν ένα πιο αυστηρό σύστημα ελέγχου της μεταγραφής παράγοντας την T7 λυσοζύμη, φυσικό αναστολέα της T7 RNA πολυμεράσης. Σε καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων ξενιστών ( $OD_{600}=0,6$ ) προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα και ακολούθησε εκτίμηση της ενεργότητας της λιπάσης σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Η ενζυμική δράση προσδιορίστηκε στο ενδοκυτταρικό εκχύλισμα σε θερμοκρασία 70 °C και pH 8. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στις Εικόνες 3-34 και 3-35.



**Εικόνα 3-34** Κινητική ετερόλογης έκφρασης θερμοσταθερής λιπάσης σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3)pLysS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα (IPTG) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης. Με καφέ μπάρες απεικονίζεται η λιπολυτική ενεργότητα (U/mL) στους 25 °C ενώ με μπλε στους 37 °C. Με καφέ γραμμή η οπτική απορρόφηση στα 600 nm στην καλλιέργεια των 25 °C ενώ με μπλε στους 37 °C.



**Εικόνα 3-35** SDS PAGE ενδοκυτταρικών κλασμάτων από καλλιέργεια μετασηματισμένων BL21(DE3)pLysS στους 37 °C κατά την προσθήκη IPTG 0,5mM (0 ώρες) και έπειτα από 6 ώρες.

Τα BL21(DE3)pLysS διαθέτουν ένα πιο αυστηρό σύστημα ελέγχου της μεταγραφής παράγοντας την T7 λυσοζύμη, φυσικό αναστολέα της T7 RNA πολυμεράσης. Η έκφραση του γονιδίου στόχου είναι συνεχής, αλλά καταλήγει σε χαμηλότερα επίπεδα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και στα παραπάνω αποτελέσματα, όπου η μεταγραφική ικανότητα του ετερόλογου γονιδίου παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα (Εικόνα 3-35), όπως και η ενζυμική ενεργότητα (Εικόνα 3-34).

Όσον αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας επώασης, παρατηρήθηκε πως τα μετασχηματισμένα BL21pLysS εμφανίσαν υψηλότερο ρυθμό αύξησης που συνοδεύτηκε από μεγαλύτερες τιμές ενζυμικής ενεργότητας σε χαμηλή θερμοκρασία (25 °C). Μόνο σε συνθήκες έντονης επαγωγής (1 mM IPTG – παρέλευση > 3 ώρες επαγωγής) αντιστράφηκε το σκηνικό και οι 37 °C αποτέλεσαν καλύτερη συνθήκη. Συγκρίνοντας τη συμπεριφορά των 3 διαφορετικών σειρών δεκτικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία τα BL21(DE3)pLysS υπερτερούν στην παραγωγή ενεργής διαλυτής πρωτεΐνης.

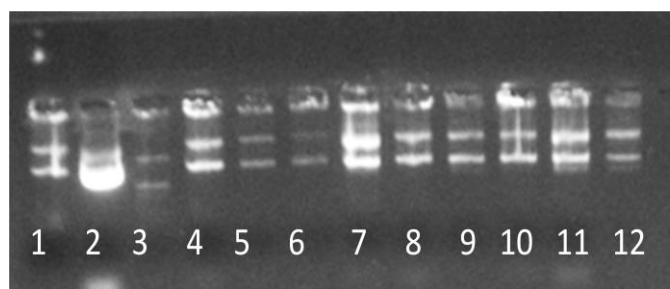
---

### 3.3.8 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

---

Η υπερέκφραση της θερμοσταθερής λιπάσης σε κύτταρα εντόμου Sf9 έγινε χρησιμοποιώντας το σύστημα *flashBAC*<sup>TM</sup>. Το γονίδιο – στόχος ενισχύθηκε με τα εκκινητικά μόρια LipF-*Bam*HI και LipR-*Xba*I και ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε για τη συνεπιμόλυνση με το ιικό DNA των Sf9 κυττάρων ήταν το πλασμίδιο pOET1 (§2.13.1 και §2.13.2).

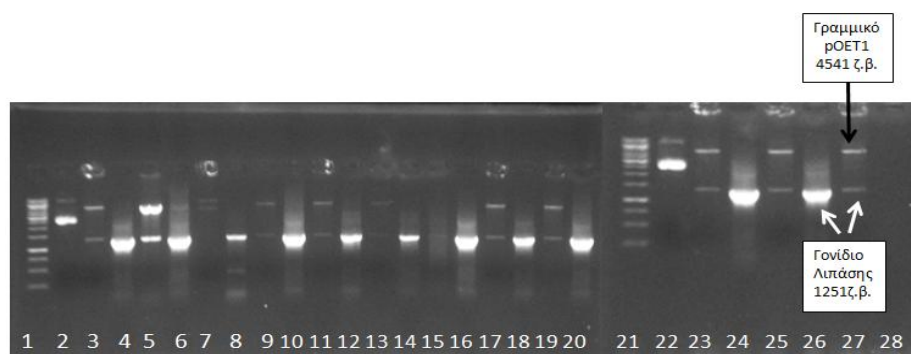
Αρχικά, το ενισχυμένο γονίδιο της λιπάσης καθώς και ο φορέας κλωνοποίησης pOET1 περιορίστηκαν με τα ένζυμα *Xba*I και *Bam*HI. Ακολούθησε η αντίδραση δεσμάσης και τα προϊόντα της μετασχημάτισαν κύτταρα *E.coli* DH5a. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα ξενιστές αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα με αμπικιλίνη και από αυτά επιλέχθηκαν 12 καθαρές αποικίες οι οποίες επανακαλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (Εικόνα 3-36).



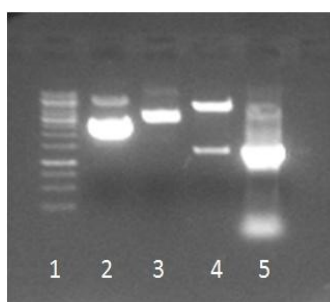
**Εικόνα 3-36** Ηλεκτροφόρηση των πλασμιδίων που απομονώθηκαν από τα ανθεκτικά στην αμπικιλίνη στελέχη (12 κλώνοι) του *E. coli* που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό τους με τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης (ligation) του πλασμιδίου pOET1 με το γονίδιο της λιπάσης.

Ο έλεγχος της επιτυχίας της κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε τόσο με πέψη του πλασμιδιακού DNA με τις ενδονουκλεάσες *Xba*I και *Bam*HI καθώς και με αντίδραση PCR για το γονίδιο της λιπάσης (Εικόνα 3-37). Σε όλες τις περιπτώσεις θεωρήθηκε επιτυχής η κλωνοποίηση.

Η συνεπιμόλυνση των Sf9 κυττάρων έγινε επιλέγοντας τον κλώνο 1 (Εικόνα 3-38), από την καλλιέργεια του οποίου απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA κάτω από στείρες συνθήκες και εκτιμήθηκε η συγκέντρωσή του.



**Εικόνα 3-37** Θέσεις 1 και 21: Πρότυποι Δείκτες DNA, Θέσεις 2 και 22: μη ανασυνδυασμένο pOET1, Θέση 3,5,7,9,11,13,15,17,19,23,25,27: πέψη των κλώνων 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 αντίστοιχα με *XbaI* και *BamHI*, Θέση 4,6,8,10,12,14,16,18,20,24,26,28: PCR για το γονίδιο της λιπάσης στους κλώνους 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 αντίστοιχα.



**Εικόνα 3-38** Θέση 1: Δείκτης Πρότυπων Μοριακών Βαρών DNA, Θέση 2: pOET1 (4541 ζ.β.), Θέση 3: ανασυνδυασμένο με θερμοσταθερή λιπάση pOET1 (5792 ζ.β.) από καλλιέργεια κλώνου 1, Θέση 4: Πέψη ανασυνδυασμένου pOET1 με *XbaI* και *BamHI*, Θέση 5: PCR αντίδραση για λιπάση (1251 ζ.β.) σε ανασυνδυασμένο pOET1.

Η ενσωμάτωση του γονιδίου της λιπάσης στο ιικό DNA μέσω του φορέα pOET1 και η ακόλουθη επιμόλυνση των κυττάρων με τον ανασυνδυασμένο ιό πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε εκτενώς στα Υλικά και Μέθοδοι. Η επιτυχία της διαδικασίας ελέγχθηκε τόσο με αντίδραση PCR για το γονίδιο - στόχο όσο και με εκτίμηση της ενεργότητας της λιπάσης στο ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό διάλυμα. Η πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε σε ίδιες τιμές ειδικής ενζυμικής ενεργότητας τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά. Για την αποφυγή της παρουσίας των λοιπών ενδοκυτταρικών πρωτεασών, επιλέχθηκε το εξωκυτταρικό κλάσμα για την πορεία του ενζυμικού καθαρισμού.

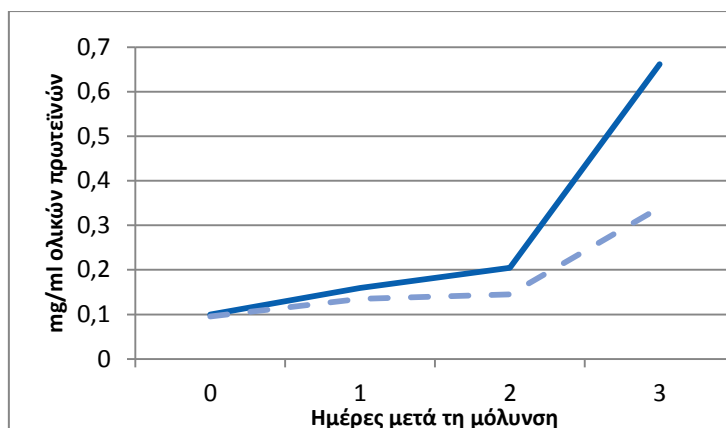


Ακολούθησαν καλλιέργειες εμπλουτισμού του ανασυνδυασμένου βακυλοϊού και τιτλοποίηση αυτών. Η τελευταία ανέδειξε εξαιρετικά υψηλό τίτλο ιού ( $3 \cdot 10^9$  pfu/ml). Συνήθως, οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ  $5 \cdot 10^7$  και  $2 \cdot 10^8$  pfu/ml. Γενικά, ισχύουν 2 στρατηγικές επιμόλυνσης ιστοκαλλιιεργειών με ανασυνδυασμένο ιό. Κατά την πρώτη, η μόλυνση πραγματοποιείται σε χαμηλή τιμή pfu ιού / κύτταρο (multiplicity of infection – MOI), συνεπώς τα κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται έπειτα από τη μόλυνση και η μέγιστη παραγωγή της πρωτεΐνης παρατηρείται μετά από την παρέλευση 5 τουλάχιστον ημερών. Στην περίπτωση αυτή, πραγματοποιείται οικονομία στην ποσότητα του ανασυνδυασμένου ιού. Στη δεύτερη στρατηγική, η μόλυνση πραγματοποιείται σε υψηλές τιμές pfu ιού / κύτταρο, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να μολύνονται ταυτόχρονα από τον ιό και η μέγιστη παραγωγή της πρωτεΐνης να εμφανίζεται χρονικά νωρίτερα. Στην περίπτωση αυτή, η επιτυχία του αποτελέσματος εμφανίζεται στον χρόνο επώασης. Στην παρούσα εργασία, με δεδομένο τον εξαιρετικά υψηλό τίτλο ιού ακολουθήθηκε η δεύτερη περίπτωση, δηλαδή η επιμόλυνση κυττάρων με υψηλό MOI ανασυνδυασμένου βακυλοϊού.

Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση κυττάρων Sf9 σε καλλιέργειες (διπλές) υπό ανάδευση με 15 MOI ανασυνδυασμένου ιού και ακολούθησε εκτίμηση της ειδικής λιπολυτικής ενεργότητας του εξωκυτταρικού διαλύματος στην πορεία του χρόνου (Πίνακας 3-14). Η μέγιστη ειδική ενζυμική ενεργότητα εμφανίστηκε στις 48 ώρες μετά τη μόλυνση. Η εμφάνιση ενζυμικής ενεργότητας έπειτα από τη μόλυνση (0 ημέρες) εξηγείται από την ύπαρξη πρωτεΐνης στο εμβόλιο του ιού (θόρυβος). Σε κύτταρα που δεν είχαν μολυνθεί με ιό παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές ολικών πρωτεϊνών στο εξωκυτταρικό κλάσμα, γεγονός που υποδεικνύει την καλύτερη ανάπτυξη τους (Εικόνα 3-39). Τα μολυσμένα κύτταρα είχαν αναστείλει τον διπλασιασμό τους καθώς και τη συνολική μεταγραφική και μεταφραστική ικανότητα των δικών τους γονιδίων. Οι συνθήκες, 15 MOI και 48 ώρες επώασης των κυττάρων στους 28 °C, χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις πειραματικές προσπάθειες καθαρισμού της λιπάσης που ακολουθούν.

**Πίνακας 3-14** Αριστοποίηση χρονικής παραγωγής λιπάσης από διπλές καλλιέργειες (A και B) μολυσμένων Sf9 κυττάρων με 15 MOI ανασυνδυασμένου ιού.

Μέρες μετά τη μόλυνση (15 MOI)	Ενζυμική Ενεργότητα (U/mL)		Συγκέντρωση Ολικών Πρωτεϊνών (mg/mL)		Ειδική Ενζυμική Ενεργότητα Μέσος Όρος (U/mg)
	A	B	A	B	
<b>0</b>	0,49	0,48	0,08	0,11	5,24
<b>1</b>	0,63	0,64	0,13	0,14	4,75
<b>2</b>	8,14	7,44	0,13	0,16	<b>54,5</b>
<b>3</b>	6,9	8,4	0,35	0,33	22,5



**Εικόνα 3-39** Εκτίμηση ολικών πρωτεϊνών σε εξωκυτταρικό διάλυμα καλλιέργειας Sf9 κυττάρων μολυσμένων (διακεκομμένη γραμμή) και μη (συνεχής γραμμή) στην πορεία του χρόνου. Στο χρόνο 0 αρχίζει ο χρόνος μετά τη μόλυνση.

### 3.3.8.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ

Τα εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα λιπολυτικής ενεργότητας στο στέλεχος φυσικού τύπου και η δημιουργία αδιάλυτων συσσωματωμάτων κατά την υπερέκφραση του γονιδίου της λιπάσης σε προκαρυωτικό σύστημα, τα καθιστούν ακατάλληλα για χρήση στην παραγωγή και στον καθαρισμό του ενζύμου. Η ετερόλογη έκφραση της λιπάσης σε ευκαρυωτικό σύστημα οδήγησε σε υψηλή και ταχεία παραγωγή ενεργής και διαλυτής πρωτεΐνης, χαρακτηριστικά που αναδεικνύουν το εξωκυτταρικό δείγμα της καλλιέργειας των μολυσμένων με ιό Sf9 κυττάρων ως ιδανική πρώτη ύλη. Συνεπώς, σε όλες τις προσπάθειες καθαρισμού της θερμοσταθερής υπερεκφρασμένης λιπάσης χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο διάλυμα ως αρχικό υλικό (15 MOI βακυλοϊού και 48ωρη επώαση).

Ο διαχωρισμός της λιπάσης από τα λοιπά βιομόρια του ακατέργαστου δείγματος με τη χρήση διαφορετικής φύσης χρωματογραφικών βημάτων εμφάνισε πολλά προβλήματα. Η λιπάση παρουσίασε έναν εξαιρετικά υδρόφοβο χαρακτήρα, γεγονός που οδήγησε στη μη εξειδικευμένη προσκόλληση της στα σωματίδια διαφόρων ρητινών. Χρησιμοποιήθηκαν ανιοντοανταλλακτικές, υδρόφοβες καθώς και ρητίνες μοριακής διήθησης και σε όλες τις περιπτώσεις, το 40-90 % της αρχικής ενζυμικής ποσότητας παρέμενε προσκολλημένο στη στήλη (Πίνακας 3-15). Μάλιστα η λιπάση εμφάνιζε ικανότητα ενζυμικής δράσης κατά την ακινητοποίησή της στην εκάστοτε ρητίνη.

**Πίνακας 3-15** Μη εξειδικευμένη προσκόλληση της λιπάσης σε διαφορετικές ρητίνες.

<b>Ρητίνη</b>	<b>Είδος Χρωματογραφίας</b>	<b>Ποσοστό (%) ενζυμικής ενεργότητας που παραμένει προσκολλημένο στη ρητίνη</b>
<b>Q-Sepharose Fast Flow</b>	Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία	Έπειτα από την έκπλυση της στήλης με διάλυμα NaCl 2M – παραμονή στη ρητίνη του 90 % της συνολικής ενεργότητας
<b>4B-200 Sepharose</b>	Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	60 %
<b>G-150 Sephadex</b>	Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	45 %
<b>S-200 HR Sephacryl</b>	Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	50 %
<b>Phenyl Sepharose</b>	Υδρόφοβη χρωματογραφία	Έπειτα από την έκπλυση της στήλης με νερό – παραμονή στη ρητίνη του 100 % των συνολικών Units
<b>Tert – Butyl Sepharose</b>	Υδρόφοβη χρωματογραφία	Έπειτα από την έκπλυση της στήλης με νερό – παραμονή στη ρητίνη του 85 % των συνολικών Units

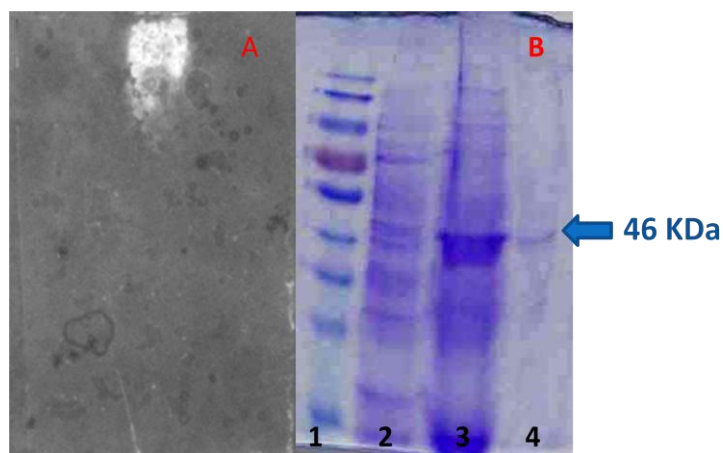
Για την αποκόλληση της λιπάσης από τη ρητίνη χρησιμοποιήθηκε ποικιλία διαφορετικών διαλυμάτων όπως: γραμμική διαβάθμιση διαλυμάτων αιθανόλης, μεθανόλης, ισοπροπανόλης, ακετονιτριλίου ή προπυλενογλυκόλης, διαφορετικές συγκεντρώσεις Triton X-100, 1% (w/v) δεοξυχολικό νάτριο καθώς και συνδυασμοί αυτών με προσθήκη αλατιού (NaCl). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε γραμμική διαβάθμιση διαλυμάτων διαφορετικού pH. Σε όλες τις περιπτώσεις είτε η ανάκτηση δεν θεωρήθηκε ικανοποιητική είτε προέκυπτε δείγμα με ηλεκτροφορητικά ίδιο πρότυπο με το ακατέργαστο.

Ακολουθώντας την ιδιόμορφη φύση των λιπασών, σε μία λογική εκμετάλλευσης των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους και μετατροπής αυτών σε πλεονεκτήματα, ακολούθησε η έκλυση της πρωτεΐνης από τη ρητίνη Q Sepharose Fast Flow (εξισορρόπηση σε pH 8) με τη χρήση γαλακτώματος (Tris-HCl, 50 mM, pH 8, Triton X-100 0,5% (w/v), αραβικό κόμμι 0,1 % (w/v)). Το γαλάκτωμα αυτό χρησιμοποιείται και για την εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας με το ψευδοϋπόστρωμα πάρα-νίτρο-φαίνυλο παλμιτικό οξύ. Οι λιπάσες θεωρούνται επιφανειοενεργά ένζυμα και η ιδιαιτερότητα του μικροπεριβάλλοντος τους μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη διαμόρφωση, οι οποίες συνήθως επιδρούν και στη δραστηρότητα τους. Στο κλάσμα του γαλακτώματος εν τέλει παρελήφθη η λιπάση σε καθαρή ηλεκτροφορητικά μορφή (Εικόνα 3-40).

### 3.3.8.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ

Η ανάκτηση της λιπάσης σε ηλεκτροφορητικά καθαρή μορφή, με ένα μόνο χρωματογραφικό βήμα, επέτρεψε τον ενζυμικό χαρακτηρισμό όσον αφορά στα φυσικοχημικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά καθώς και τη μελέτη της βασικής κινητικής του ενζύμου. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν τόσο στο καθαρό όσο και στο ακατέργαστο δείγμα.

Η λιπάση, κατά την ηλεκτροφόρηση παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (Εικόνα 3-40), εμφάνισε μοριακό βάρος κοντά στα 46 kDa, αναμενόμενη τιμή με βάση την πρωτοταγή δομή του γονιδίου της (1251 ζ.β.). Ωστόσο, στο ζυμογράφημα (πήκτωμα απουσία αποδιακτικού παράγοντα) η λιπάση εμφάνισε υψηλό μοριακό βάρος (<170 kDa) εξαιτίας σχηματισμού πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, χαρακτηριστικό των υδρόφοβων μορίων των λιπασών.

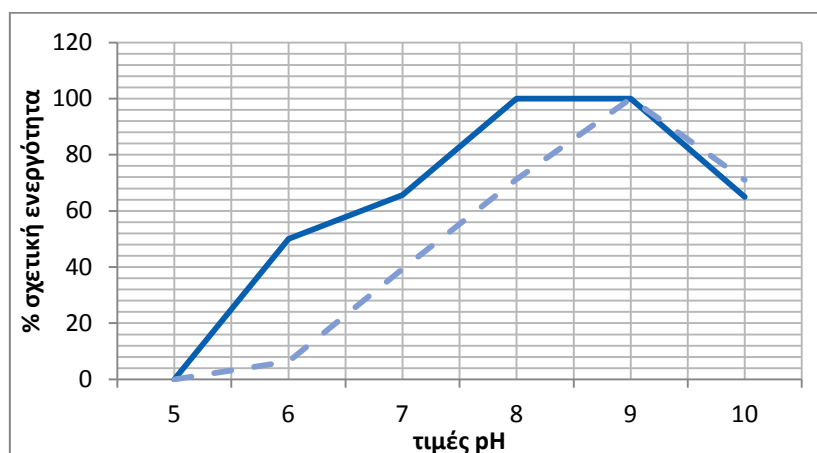


**Εικόνα 3-40** Α. Ζυμογράφημα λιπάσης (παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία) Β. 1. Πρότυποι πρωτεϊνικοί δείκτες 2. Εξωκυτταρικό καλλιέργειας μη μολυσμένων Sf9 κυττάρων 3. Ακατέργαστο ενζυμικό δείγμα 4. Καθαρισμένη λιπάση.

Το επόμενο βήμα περιελάμβανε τον προσδιορισμό του άριστου ζεύγους pH και θερμοκρασίας της ενζυμικής ενεργότητας.

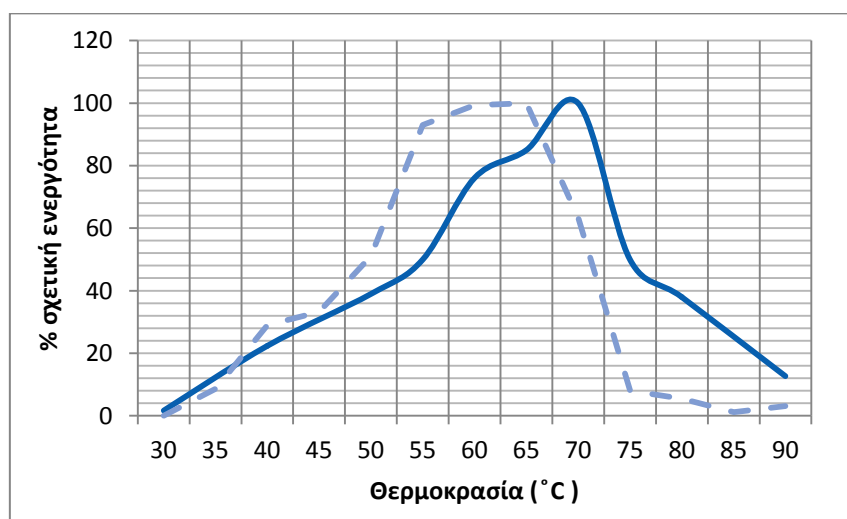
Κατά τη διάρκεια της ενζυμικής κατάλυσης, κυρίαρχο στάδιο αποτελεί η δημιουργία του ενδιάμεσου συμπλέγματος ενζύμου – υποστρώματος. Η δημιουργία όμως του συμπλέγματος εξαρτάται από το pH στο οποίο βρίσκονται εν διαλύσει ένζυμο και υπόστρωμα. Η εξάρτηση της ενζυμικής ενεργότητας από το pH διαμορφώνεται ανάλογα με τον ιονισμό των διάφορων λειτουργικών ομάδων στο ενζυμικό μόριο και στο υπόστρωμα.

Η εύρεση της καμπύλης εξάρτησης της ενεργότητας από το pH πραγματοποιήθηκε με εκτίμηση της τελευταίας σε διαφορετικές τιμές pH, σε συνθήκες κορεσμού υποστρώματος.



**Εικόνα 3-41** Καμπύλη εξάρτησης ενεργότητας θερμοσταθερής λιπάσης από το pH. Με συνεχή γραμμή απεικονίζεται το ακατέργαστο ένζυμο και με διακεκομμένη το καθαρισμένο.

Η λιπάση εμφάνισε άριστο pH ενζυμικής δράσης το 9, ενώ παρατηρήθηκε ότι σε pH μικρότερο του 6 δεν εμφάνιζε ενεργότητα (Εικόνα 3-41). Συνεπώς το ένζυμο μπορεί να χαρακτηριστεί ως αλκαλόφιλο. Η καμπύλη εξάρτησης της ενζυμικής ενεργότητας από τη θερμοκρασία προσδιορίστηκε με τη διεξαγωγή της αντίδρασης σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης. Το θερμοκρασιακό άριστο δράσης εμφανίστηκε στο ακατέργαστο ενζυμικό δείγμα στους 70 °C ενώ στο καθαρισμένο στους 65 °C (Εικόνα 3-42). Παράλληλα, μελετήθηκε η σταθερότητα της λιπάσης σε ένα εύρος τιμών θερμοκρασίας από 60 έως 100 °C. Σε όλες τις περιπτώσεις το pH διατηρήθηκε σταθερό στο 8.



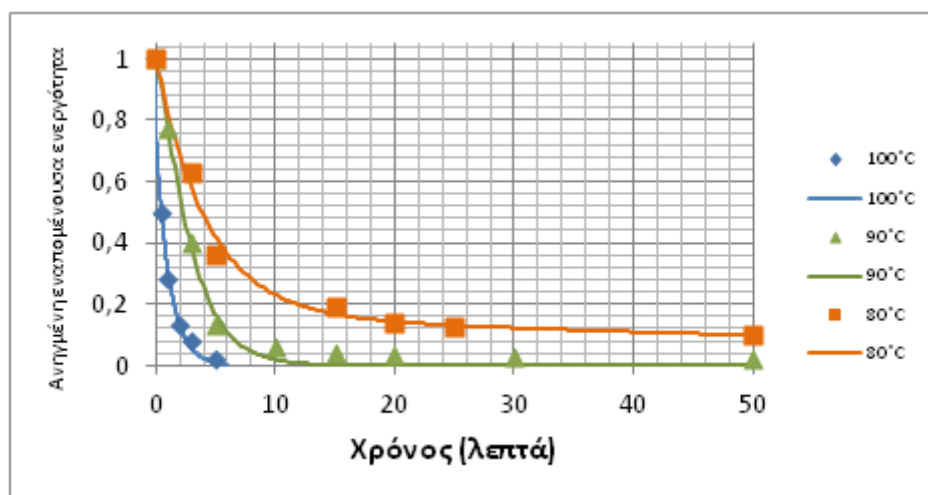
**Εικόνα 3-42** Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική ενεργότητα θερμοσταθερής λιπάσης. Με συνεχή γραμμή απεικονίζεται το ακατέργαστο ένζυμο και με διακεκομμένη το καθαρισμένο.

Μαθηματική προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων σε διάφορα πρότυπα απενεργοποίησης έδειξε πως ο κινητικός μηχανισμός απενεργοποίησης της λιπάσης σε υψηλές θερμοκρασίες είναι 2<sup>ης</sup> τάξης (§3.3.4).

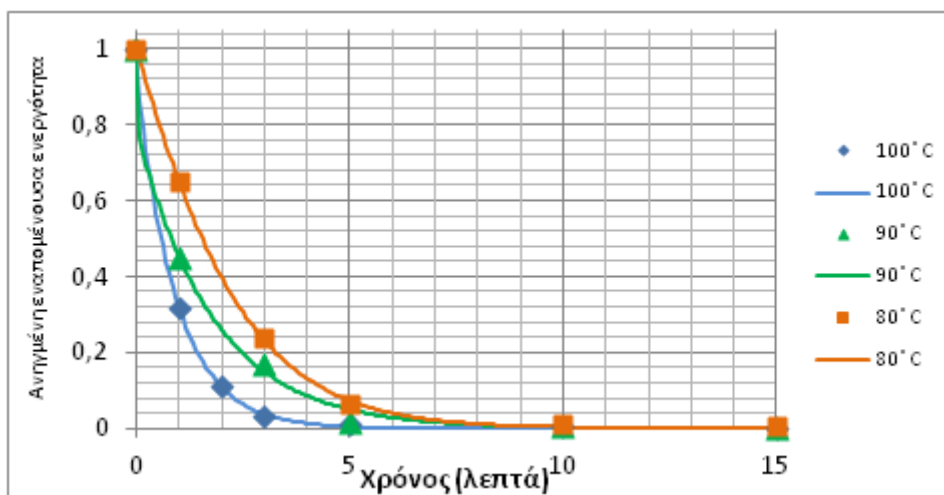
Τα αποτελέσματα απενεργοποίησης της θερμοσταθερής λιπάσης σε υψηλές θερμοκρασίες προσαρμόστηκαν με τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης (Λογισμικό Πακέτο, SigmaStat/SigmaPlot – SPSS Science Inc.) στο πρότυπο που ήδη έχει περιγραφεί στην Ενότητα 3.3.4 με αποτέλεσμα τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων  $\alpha_1$ ,  $k_1$  και  $k_2$  (Πίνακας 3-16).

**Πίνακας 3-16** Τιμές κινητικών παραμέτρων θερμικής απενεργοποίησης καθαρής λιπάσης σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

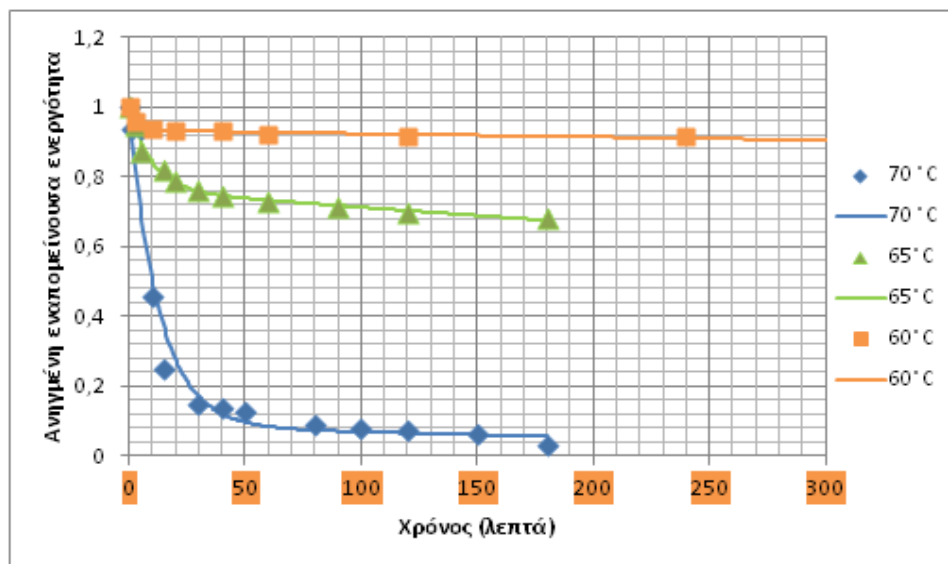
Θερμοκρασία	$\alpha_1$ (E <sub>1</sub> /E)	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2$ (min <sup>-1</sup> )
60	0,933 ±0,0026	0,2829 ± 0,0532	0,0001 ±0
65	0,7578 ±0,0121	0,1007 ±0,0142	0,0007 ±0,0002
70	0,0849 ±0,01006	0,0771 ±0,0199	0,0025 ±0,00118
80	0,4775 ±0,221	0,7261 ±0,09467	0,7229 ±0,1755
90	0,7905 ±0,0738	9987934 ± 1109153	0,5558 ±0,0655
100	0,937 ±0,036	11536607 ±189565,3	1,0742 ±0,0302



**Εικόνα 3-43** Ρυθμός απενεργοποίησης θερμοσταθερής λιπάσης (ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ). Η τιμή 1 αντιστοιχεί στην ενζυμική ενεργότητα του δείγματος πριν την επώαση στην αντίστοιχη θερμοκρασία.



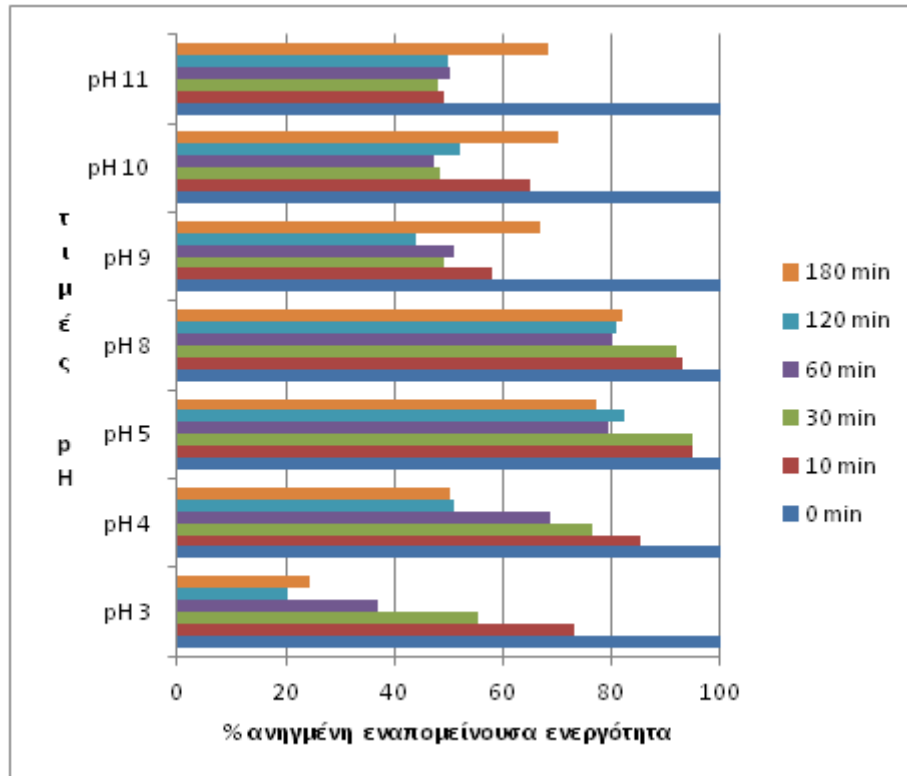
**Εικόνα 3-44** Ρυθμός απενεργοποίησης θερμοσταθερής λιπάσης (ΚΑΘΑΡΙΣΜΕΝΟ ΔΕΙΓΜΑ). Η τιμή 1 αντιστοιχεί στην ενζυμική ενεργότητα του δείγματος πριν την επώαση στην αντίστοιχη θερμοκρασία.



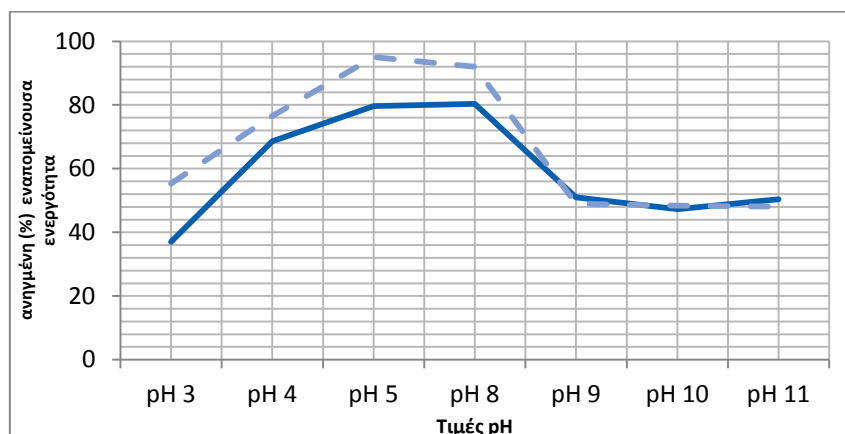
**Εικόνα 3-45** Ρυθμός απενεργοποίησης θερμοσταθερής λιπάσης σε θερμοκρασία 60-70 °C (ΚΑΘΑΡΙΣΜΕΝΟ ΔΕΙΓΜΑ). Η τιμή 1 αντιστοιχεί στην ενζυμική ενεργότητα του δείγματος πριν την επώαση στην αντίστοιχη θερμοκρασία.

Στα αποτελέσματα των Εικόνων 3-43, 3-44 και 3-45 παρατηρήθηκε εξαιρετική ενζυμική σταθερότητα έως τους 65 °C. Η αύξηση της θερμοκρασίας πέρα των 70 °C επέδρασε καθοριστικά στην πρωτεϊνική διαμόρφωση και κατά συνέπεια στην ενζυμική δράση. Μάλιστα, στους 90 και 100 °C φάνηκε πως η λιπάση περνά άμεσα στην ενδιάμεση κατάσταση ( $E_1$ ) και ακολουθεί το δρόμο της απενεργοποίησης. Ο ρυθμός απενεργοποίησης του ακατέργαστου δείγματος εμφανίστηκε πιο αργός συγκριτικά με το καθαρισμένο. Αυτό σχετίζεται με το γεγονός ότι το διάλυμα του δείγματος περιείχε το μη ιονικό απορρυπαντικό Triton X-100. Η παρουσία του παρεμπόδισε τον σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, γεγονός που οδήγησε στη μείωση της σταθερότητας του ενζύμου.

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο ρυθμός απενεργοποίησης της θερμοσταθερής λιπάσης σε εύρος τιμών pH από 3 έως 5 και από 8 έως 11 (Εικόνα 3-46 και 3-47). Σε όλες τις περιπτώσεις η θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή (25 °C).



Εικόνα 3-46 Εκτίμηση σταθερότητας λιπάσης σε διαφορετικές τιμές pH.

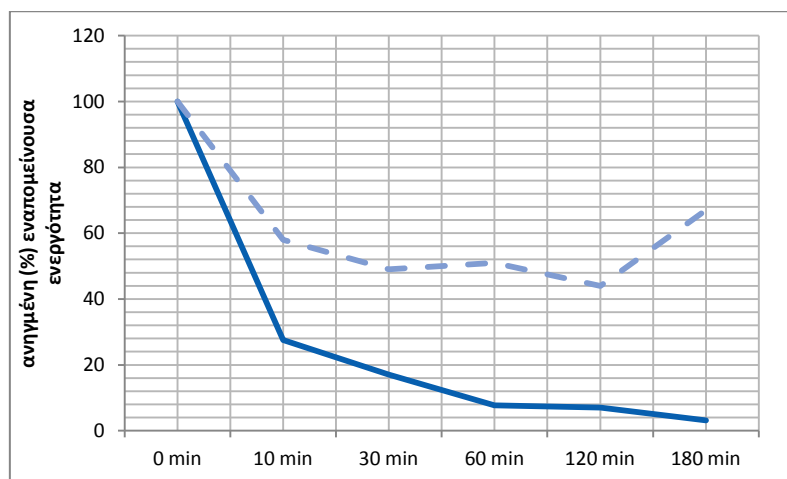


Εικόνα 3-47 Ρυθμός απενεργοποίησης λιπάσης σε διαφορετικές τιμές pH έπειτα από την παρέλευση 30 (διακεκομμένη γραμμή) και 60 λεπτών (συνεχής γραμμή).



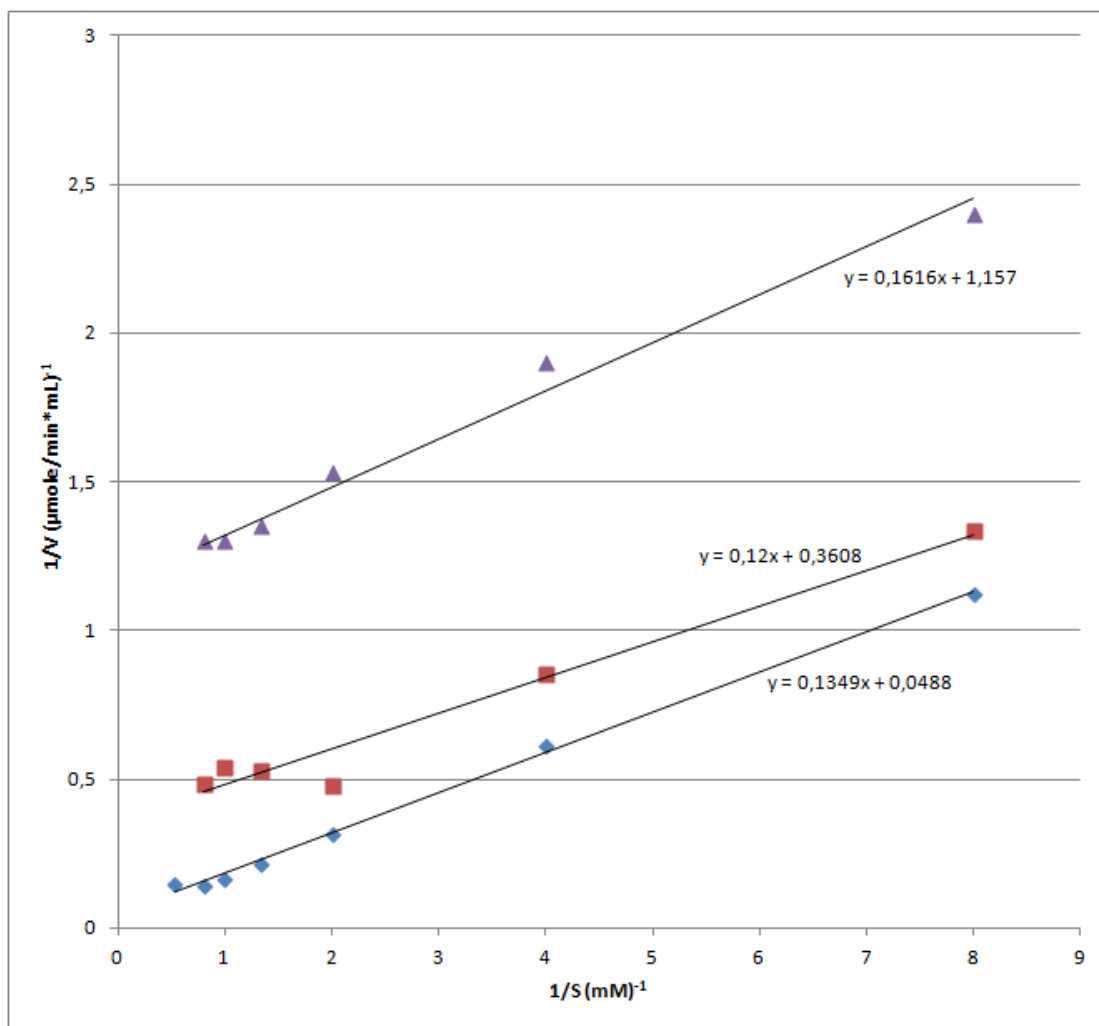
Το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο της λιπάσης υπολογίστηκε κοντά στο 6 και το άριστο ενζυμική δράσης κοντά στο 9. Το ένζυμο εμφάνισε μειωμένη σταθερότητα στο pH 3 όπου μετά την παρέλευση 180 λεπτών απέμεινε μόλις το 24 % της αρχικής ενεργότητας.

Σε τιμές pH 5 έως 8 η σταθερότητα της λιπάσης ήταν αυξημένη ενώ στις τιμές άνω του 8 εμφανίστηκε ικανοποιητική. Ακολούθησε μελέτη του ρυθμού απενεργοποίησης της λιπάσης σε συνδυασμό ακραίων τιμών θερμοκρασίας και pH (65 °C, pH 9). Παρατηρήθηκε ραγδαία πτώση στην ενεργότητα του ενζύμου συγκριτικά με την απενεργοποίηση από το pH ή τη θερμοκρασία μεμονωμένα (Εικόνα 3-48). Η έκθεση της πρωτεΐνης στον συνδυασμό των παραγόντων αυτών ενδεχομένως οδήγησε σε αλκαλική λύση των πεπτιδικών δεσμών και στην καταστροφή της δομής του μορίου.



**Εικόνα 3-48** Ρυθμός απενεργοποίησης λιπάσης σε συνδυασμό αυξημένης θερμοκρασίας και αλκαλικού pH (συνεχής γραμμή). Με τη διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται ο ρυθμός απενεργοποίησης της λιπάσης σε διάλυμα με pH 9 αλλά θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Τα ψευδοϋποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητική μελέτη της καθαρισμένης λιπάσης ήταν εστέρες της π – νιτροφαινόλης με καπρυλικό (pNPC, 8 άτομα άνθρακα), λαυρικό (pNPL, 12 άτομα άνθρακα) και παλμιτικό οξύ (pNPP, 16 άτομα άνθρακα). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο άριστο ζεύγος pH και θερμοκρασίας και υπολογίστηκαν οι θεωρητικές τιμές  $K_m$  και  $V_{max}$  για όλα τα ψευδοϋποστρώματα (Πίνακας 3-17).



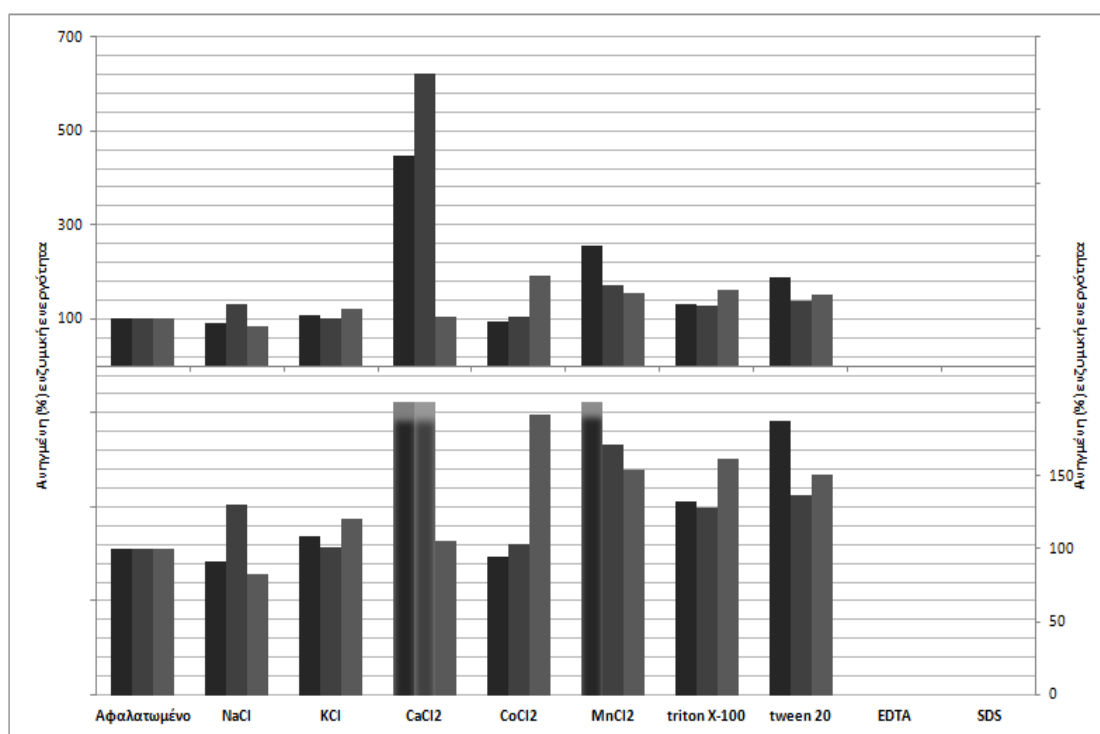
**Εικόνα 3-49** Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου της ενζυμικής ενεργότητας της καθαρισμένης λιπάσης ως προς τη συγκέντρωση διαφορετικών ψευδοϋποστρωμάτων [▲ pNPC, ■ pNPL, ◆ pNPP] για τον προσδιορισμό των θεωρητικών τιμών  $K_m$  και  $V_{max}$ .

Η υπερεκφρασμένη λιπάση εμφάνισε μεγαλύτερη συγγένεια με το καπρυλικό οξύ (8 άτομα άνθρακα) ενώ μεγαλύτερη ταχύτητα αντίδρασης στο παλμιτικό οξύ (16 άτομα άνθρακα). Ωστόσο, η λιπάση εμφανίστηκε καταλληλότερη στην διάσπαση εστερικών δεσμών με λιπαρά οξέα μεσαίου μήκους (λαυρικό οξύ, 12 άτομα άνθρακα).

**Πίνακας 3-17** Θεωρητικές τιμές  $K_m$  και  $V_{max}$  λιπάσης για διαφορετικά υποστρώματα.

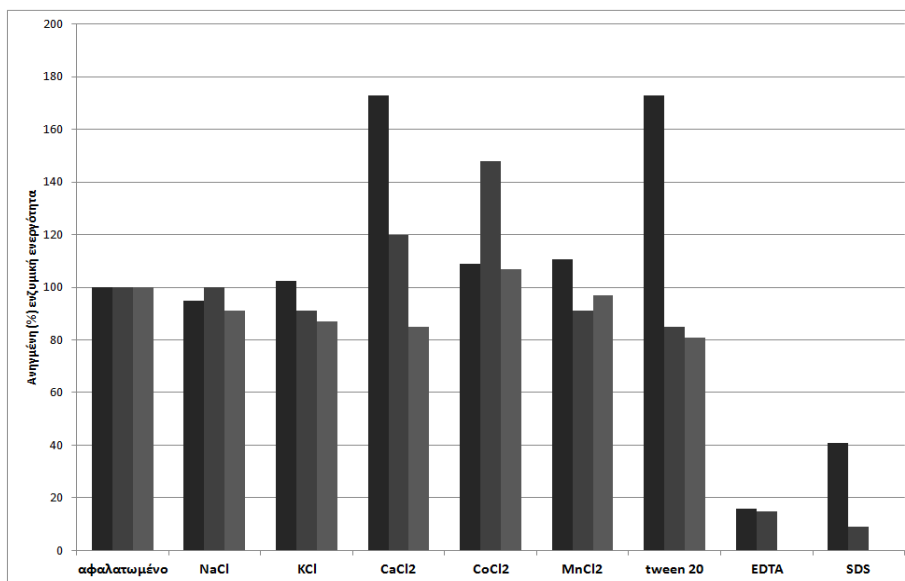
Ψευδοϋπόστρωμα	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mole/ml} \cdot \text{min}$ )	Φυσιολογική αποδοτικότητα ( $V_{max}/K_m$ ) ( $\mu\text{mole} \cdot \text{mM/ml} \cdot \text{min}$ )
pNPC (C8)	0,140	0,864	6,17
pNPL (C12)	0,333	2,778	8,34
pNPP (C16)	2,764	20,49	7,41

Η επίδραση των μεταλλικών ιόντων, επιφανειοδραστικών και χηλικών παραγόντων καθώς και των οργανικών διαλυτών μελετήθηκε τόσο στο ακατέργαστο ενζυμικό δείγμα όσο και στην καθαρισμένη πρωτεΐνη.

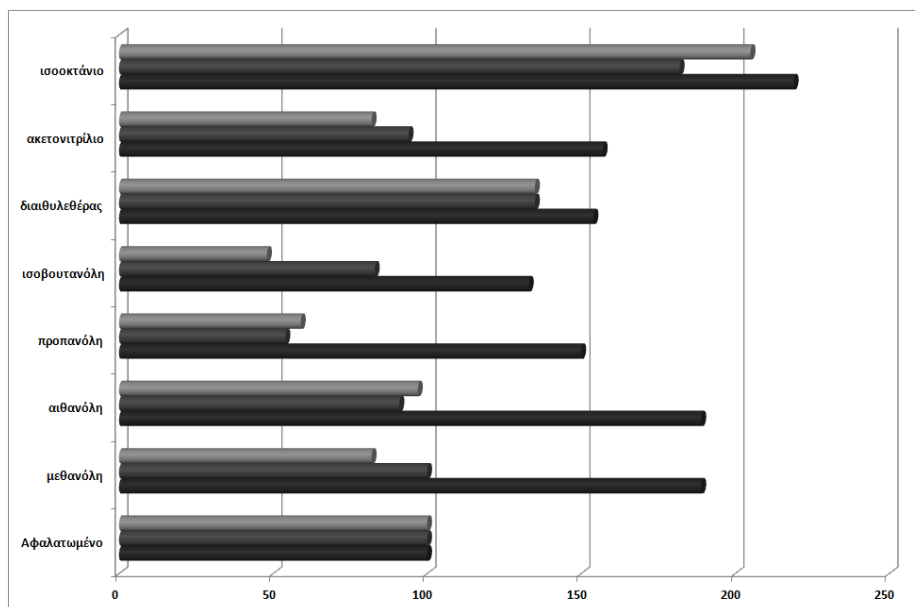


**Εικόνα 3-50** Επίδραση μεταλλικών ιόντων, επιφανειοδραστικών ουσιών και χηλικών παραγόντων στην ενεργότητα της λιπάσης στο ακατέργαστο δείγμα σε διαφορετικούς χρόνους επώασης (■ 0 ώρες, ■ 1 ώρα, ■ 2 ώρες). Η ενεργότητα του αφαλατωμένου δείγματος θεωρήθηκε τιμή μάρτυρας (100%) για κάθε χρόνο.

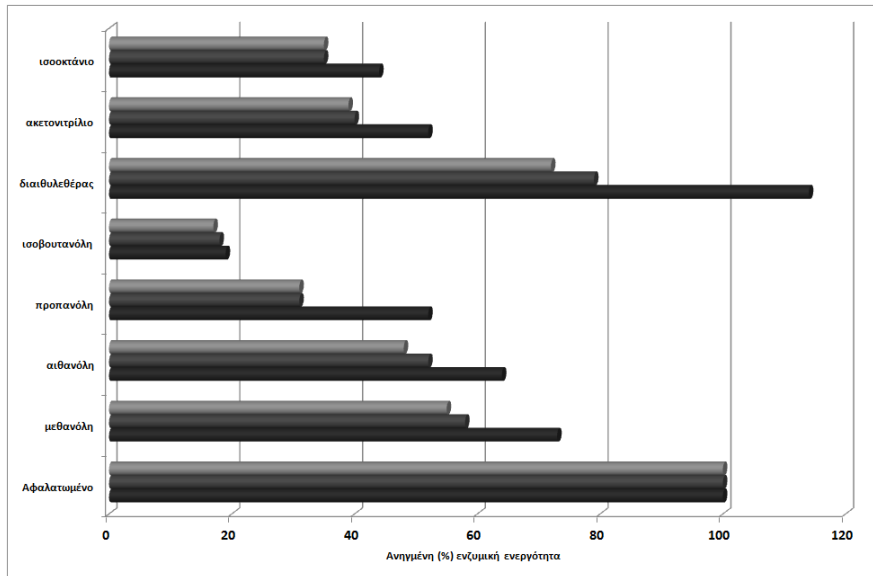
Η λιπάση στο ακατέργαστο δείγμα εμφανίστηκε αρκετά σταθερή στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες ακόμα και έπειτα από την παραμονή 2 ωρών σε αυτούς. Μάλιστα στην πλειοψηφία τους, εμφανίστηκε αυξημένη ενζυμική δράση ακριβώς έπειτα από την προσθήκη τους στο δείγμα. Η σταθερότητα μειώθηκε στο καθαρισμένο ένζυμο, φαινόμενο που εμφανίστηκε και στη μελέτη του ρυθμού ενζυμικής απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία.



**Εικόνα 3-51** Επίδραση μεταλλικών ιόντων, επιφανειδραστικών ουσιών και χηλικών παραγόντων στην ενεργότητα της λιπάσης στο καθαρισμένο δείγμα σε διαφορετικούς χρόνους επώασης (■ 0 ώρες, ■ 1 ώρα, ■ 2 ώρες). Η ενεργότητα του αφαλατωμένου δείγματος θεωρήθηκε τιμή μάρτυρας (100%) για κάθε χρόνο.

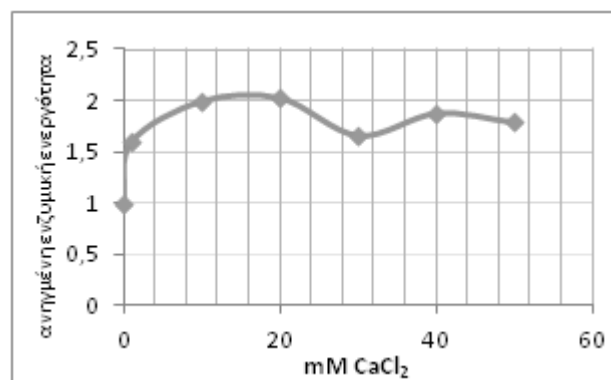


**Εικόνα 3-52** Επίδραση οργανικών διαλυτών (40 % v/v) στην ενζυμική ενεργότητα λιπάσης στο ακατέργαστο δείγμα σε διαφορετικούς χρόνους επώασης (■ 0 ώρες, ■ 1 ώρα, ■ 2 ώρες). Η ενεργότητα του αφαλατωμένου δείγματος θεωρήθηκε τιμή μάρτυρας (100%) για κάθε χρόνο.



**Εικόνα 3-53** Επίδραση οργανικών διαλυτών (40 % v/v) στην ενζυμική ενεργότητα λιπάσης στο καθαρισμένο δείγμα σε διαφορετικούς χρόνους επώασης (■ 0 ώρες, ■ 1 ώρα, ■ 2 ώρες). Η ενεργότητα του αφαλατωμένου δείγματος θεωρήθηκε τιμή μάρτυρας (100%) για κάθε χρόνο.

Το ένζυμο εμφάνισε 100% αναστολή της δράσης του παρουσία SDS και EDTA. Η ανασταλτική δράση του EDTA χαρακτηρίζει τη λιπάση ως μεταλλοένζυμο. Όσον αφορά στην επίδραση των μεταλλικών ιόντων, δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη επίδραση στην ενζυμική δράση από το νάτριο, κάλιο, κοβάλτιο και μαγγάνιο. Το ασβέστιο εμφάνισε ενισχυτική ενζυμική δράση η οποία μελετήθηκε αναλυτικά (Εικόνα 3-54). Παρουσία χλωριούχου ασβεστίου συγκέντρωσης 10 mM στο ρυθμιστικό διάλυμα εκτίμησης ενεργότητας αυξήθηκε η δράση της καθαρισμένης λιπάσης κατά 2 τουλάχιστον φορές.



**Εικόνα 3-54** Επίδραση ασβεστίου στη λιπολυτική ενεργότητα καθαρισμένου δείγματος

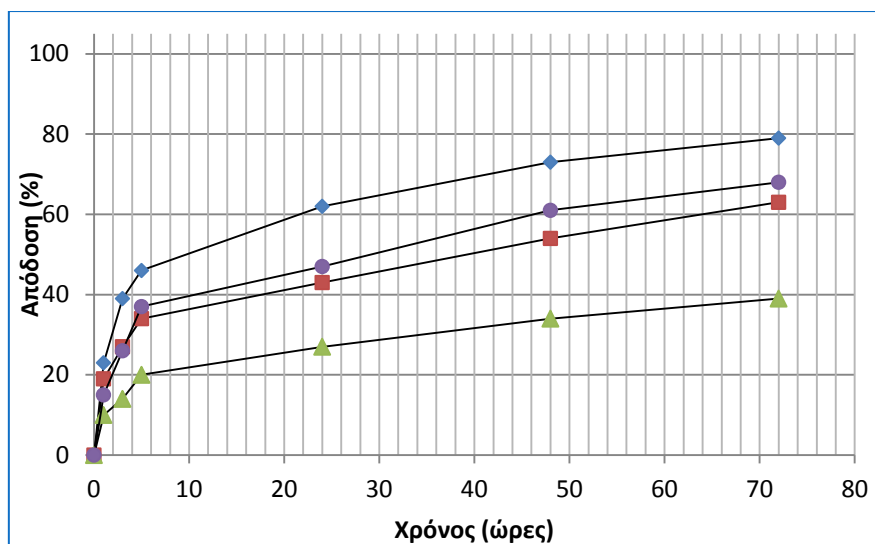
### 3.3.8.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΟΛΗΣ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΜΕΝΗ ΛΙΠΑΣΗ ΣΕ ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ

Οι αντιδράσεις εστεροποίησης της τυροσόλης (φυσικό αντιοξειδωτικό) με το βινυλεστέρα του βουτυρικού οξέος πραγματοποιήθηκαν παρουσία είτε λυοφιλιωμένης λιπάσης (ακατέργαστο ενζυμικό δείγμα) είτε ακινητοποιημένης σε Celite. Οι βιοκαταλυτικές διεργασίες έλαβαν χώρα σε δύο άνυδρα ιοντικά υγρά που χρησιμοποιούνται ευρύτατα, το 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([bmim]BF<sub>4</sub>) και το 1-n-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([bmim]PF<sub>6</sub>) και σε θερμοκρασία 50 °C .

**Πίνακας 3-18** Δυνατότητα εστεροποίησης της τυροσόλης (20mM) με τον βινυλεστέρα του βουτυρικού οξέος (100mM) από την ακινητοποιημένη και λυοφιλιωμένη λιπάση στα ιοντικά υγρά [bmim]PF<sub>6</sub> και [bmim]BF<sub>4</sub> στους 50 °C.

Χρόνος (ώρες)	[bmim]PF <sub>6</sub>		[bmim]BF <sub>4</sub>	
	Ακινητοποιημένη λιπάση σε Celite Απόδοση (%)	Λυοφιλιωμένη λιπάση Απόδοση (%)	Λυοφιλιωμένη λιπάση Απόδοση (%)	Ακινητοποιημένη λιπάση σε Celite Απόδοση (%)
0	0	0	0	0
1	23	19	10	15
3	39	27	14	26
5	46	34	20	37
24	62	43	27	47
48	73	54	34	61
72	79	63	39	68

Η λιπάση τόσο στην ακινητοποιημένη της κατάσταση, όσο και ως λυοφιλιωμένη διατήρησε τις καταλυτικές τις ικανότητες και στα δύο ιοντικά υγρά. Βέβαια, η φύση του ιοντικού υγρού (ιδιαίτερα το ανόργανο ιόν) φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα απόδοσης στη διεργασία ακυλίωσης. Η απόδοση της αντίδρασης μετά από 72 ώρες επώασης στους 50 °C πλησιάζει το 80 % στην περίπτωση όπου χρησιμοποιείται ακινητοποιημένο ένζυμο σε [bmim]PF<sub>6</sub> (Πίνακας 3-18 και Εικόνα 3-55).



**Εικόνα 3-55** Βιοκαταλυτική διεργασία εστεροποίησης της τυροσόλης σε ιοντικά υγρά.

◆ : Ακίνητοποιημένη λιπάση σε Celite - [bmim]PF<sub>6</sub>, ■ : Λυοφιλιωμένη λιπάση - [bmim]PF<sub>6</sub>,

● : Ακίνητοποιημένη λιπάση σε Celite - [bmim]BF<sub>4</sub>, ▲ : Λυοφιλιωμένη λιπάση - [bmim]BF<sub>4</sub>





## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Η μελέτη και η διατήρηση της μικροβιακής ποικιλότητας κρίνεται επιτακτική στη σύγχρονη κοινωνία, όχι μόνο αντικατοπτρίζοντας την έμφυτη ανθρώπινη περιέργεια για την κατανόηση της ζωής, αλλά κυρίως για την προστασία της ισορροπίας της βιόσφαιρας και των οικοσυστημάτων της. Η τεράστια ποικιλία στους αβιοτικούς παράγοντες που χαρακτηρίζει τα διαφορετικά οικοσυστήματα καθορίζει την ποσοτική και ποιοτική σύσταση των βιοτικών παραγόντων. Οι μικροοργανισμοί εμφανίζουν δομικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά που τους εξασφαλίζουν στρατηγικές επιβίωσης ακόμα και στις πιο ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Το παραπάνω αναδεικνύει ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών της πλούσιας μικροβιακής ποικιλότητας με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας της ανθρώπινης, ζωικής και φυτικής ζωής (Bull, 2004).

Η συστηματική μικροβιολογική έρευνα σε ακραία περιβάλλοντα οδηγεί στην ανακάλυψη βιολογικών πηγών όπου διαμέσου της βιοτεχνολογίας ενδέχεται να δώσουν λύσεις σε περιβαλλοντικά και βιομηχανικά προβλήματα ή να αναδείξουν το φυσικό πλούτο μίας τοπικής κοινωνίας ή ενός κράτους. Οι βιότοποι με υψηλές θερμοκρασίες (θερμοπηγές, ηφαιστειακά περιβάλλοντα κ.α.) φιλοξενούν μικροβιακή ποικιλότητα με υψηλό βιοτεχνολογικό δυναμικό (Gomes and Steiner, 2004). Αν και οι θεμόφιλοι μικροοργανισμοί εμφάνισαν αρχικά δυσκολίες στην απομόνωση και καλλιέργεια τους στο εργαστήριο, η ικανότητά τους να παράγουν ενεργά και σταθερά ένζυμα καθώς και άλλα βιοενεργά μακρομόρια άσκησε πίεση για την εξερεύνηση των αντίστοιχων ενδαιτημάτων (Niehaus et al., 1999, de Miguel Bouzas et al., 2006). Κατά την πρακτική εφαρμογή των ενζύμων, ο ιδανικός βιοκαταλύτης θα πρέπει να προσαρμόζεται ο ίδιος στις εκάστοτε συνθήκες της διεργασίας ώστε να μην απαιτεί την αλλαγή των παραμέτρων για τη δράση του. Συνεπώς, η ανάγκη για ανακάλυψη ενζύμων με νέες ιδιότητες στρέφει το επιστημονικό βλέμμα στο μικροβιακό πλούτο του φυσικού περιβάλλοντος (Ratnaparkhe and Tiwari, 2011, Liszka et al., 2012).

Κατά τη Διδακτορική Διατριβή του Χ. Μεϊντάνη (2005) στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, του Τομέα Βοτανικής, του Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών απομονώθηκαν μικροβιακά στελέχη στη διάρκεια της συστηματικής καταγραφής της ποικιλότητας σε επιλεγμένες οικοθέσεις του ηφαιστειακού συμπλέγματος της Σαντορίνης. Πρόκειται για θεμόφιλα, στην πλειοψηφία τους, στελέχη τα οποία ταξινομήθηκαν κοντά στο γένος *Geobacillus*. Στελέχη του παραπάνω γένους έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από πληθώρα ενδαιτημάτων υψηλών θερμοκρασιών σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Nazina et al., 2004, Nazina et al., 2005, Romano et al., 2005, Rahman et al., 2007, Logan and Allan, 2008, Dhaker et al., 2011). Το ενδιαφέρον για τα βακτήρια του γένους *Geobacillus* ενισχύθηκε τα τελευταία 20 έτη εξαιτίας της επιτυχημένης συμμετοχής τους σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές ως πηγές θερμοσταθερών ενζύμων (πρωτεάσες, αμυλάσες, λιπάσες, ξυλανάσες, κυτταρινάσες, DNA πολυμεράσες και περιοριστικές ενδονουκλεάσες) αλλά και άλλων προϊόντων βιομηχανίας (Obeidat et al., 2012). Επίσης, έχει αναφερθεί πρόσφατα η αντιοξειδωτική τους δράση (Dhaker et al., 2011) και η ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων (Marchant and Banat, 2010). Στην παρούσα ερευνητική προσπάθεια εκτιμήθηκε η υδρολυτική ικανότητα των

απομονωθέντων στελεχών σε υποστρώματα όπως είναι τα τριγλυκερίδια, η κυτταρίνη και η ξυλάνη ή άλλες σύνθετες πηγές άνθρακα.

Η αρχική προσπάθεια ομαδοποίησης των 101 απομονωθέντων θερμοφίλων στελεχών πραγματοποιήθηκε μέσω της τυχαίας ενίσχυσης μικρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο γονιδίωμα τους και την ακόλουθη ανάλυση του ραβδωτού κώδικα. Γενικά, τα βακτήρια των γενών *Bacillus* και *Geobacillus* κατά την ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου τους εμφανίζουν ποσοστό ταυτότητας μεγαλύτερο του 98,5 % και η διάκριση τους σε επίπεδο στελέχους γίνεται συνήθως επιτυχώς με μεθόδους γενετικού αποτυπώματος όπως είναι η BOX- ή η REP PCR (Meintanis et al., 2008, Adiqzel et al., 2011). Η ανάλυση του BOX PCR αποτυπώματος των θερμοφίλων στελεχών εμφάνισε 37 διαφορετικές ζώνες με διακριτό μοριακό βάρος. Στο δένδρογραμμα που προέκυψε από τη σύγκριση των ραβδωτών προτύπων δεν παρατηρήθηκε μεγάλη συγγένεια μεταξύ των στελεχών στις περισσότερες περιπτώσεις, γεγονός που επεσήμανε τη μεγάλη ποικιλότητα εντός του γένους σε ένα φυσικό περιβάλλον ακραίων συνθηκών όπως το ηφαιστειακό σύμπλεγμα της Σαντορίνης. Μόνο σε 4 περιπτώσεις εμφανίστηκε σαφής γενετική συγγένεια και αυτές ήταν τα στελέχη SP44, SP45, SP46, SP56, SP58, SP63, SP64, SP66, SP67, SP68, SP90 και SP91, τα στελέχη SP81, SP85, SP88, SP98 και SP99, τα στελέχη SP72, SP73, SP77, SP84 και SP94 καθώς και τα στελέχη SP28, SP30, SP31, SP32, SP33, SP38, SP39 και SP41. Σε μία ταξινόμηση με χαλαρά κριτήρια ομοιότητας τα 101 στελέχη ταξινομήθηκαν σε 3 μεγάλες ομάδες όπου οι δύο πρώτες είχαν από 40 μέλη και η τρίτη αποτελούταν από 21.

Στη συνέχεια, τα 101 θερμοφιλά στελέχη χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογική πηγή για την ανίχνευση υδρολυτικών ενζυμικών ενεργοτήτων με βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμες ιδιότητες όπως η θερμική αντοχή. Αρχικά, εκτιμήθηκε η ικανότητα των βακτηρίων να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται χρησιμοποιώντας υποστρώματα όπως η κυτταρίνη, η ξυλάνη ή το ελαιόλαδο. Η επιβίωση τους, υποδηλώνει την προμήθεια της απαιτούμενης ενέργειας από τη διάσπαση των προαναφερθέντων πηγών άνθρακα, η οποία εκτελείται μέσω της παραγωγής και έκκρισης των αντίστοιχων ενζύμων.

## ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ

---

Το πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας περιελάμβανε την εκτίμηση του κυτταρινολυτικού και ξυλανολυτικού δυναμικού των απομονωθέντων μικροοργανισμών. Αρχικά, τα βακτηριακά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα με μοναδική πηγή άνθρακα την καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη (CMC) ή την ξυλάνη σημύδας. Η ανίχνευση ενζυμικής ενεργότητας ένδο-κυτταρινάσης ή ξυλανάσης πραγματοποιήθηκε ως ζώνη αποχρωματισμού έπειτα από χρώση με Ερυθρό του Κονγκό, ουσία που προσδένεται στους β-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς των πολυμερών (κυτταρίνη ή ξυλάνη). Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση μικροοργανισμών με ικανότητα διάσπασης κυτταρίνης (Teather and Wood, 1982, Zhang et al., 2006, Gautam et al., 2012, Gupta et al., 2012) ή ξυλάνης (Cordeiro et al., 2002, Avcioğlu et al., 2005, Ninawe et al., 2006) από ποικίλα περιβάλλοντα. Ξυλανολυτική ενεργότητα ανιχνεύθηκε στην πλειοψηφία των στελεχών (80%) και μεταξύ αυτών μόλις 8 στελέχη παρουσίασαν ταυτόχρονη

κυτταρινολυτική δράση ενώ το 20% δεν εμφάνισε καμία από τις δύο υδρολυτικές ικανότητες. Η ευρεία εξάπλωση της ξυλανολυτικής ενεργότητας στα θερμοφιλά στελέχη μπορεί να εξηγηθεί από τη διαφορετική διαλυτότητα, ευκολία στην αποικοδόμηση και διαθεσιμότητα της ξυλάνης σε σχέση με την κυτταρίνη. Η ξυλάνη είναι περισσότερο διαλυτή και διασπάται πολύ ταχύτερα αποτελώντας μία εύκολα προσβάσιμη πηγή άνθρακα για τους μικροοργανισμούς συγκριτικά με την κυτταρίνη (Mathrani et al., 1993). Επίσης, η επικράτηση των ξυλανολυτικών μικροοργανισμών μπορεί να συσχετιστεί με τις επιμέρους φυσικοχημικές συνθήκες των ενδιαιτημάτων απομόνωσης χωρίς όμως πλήρη συσχέτιση του υδρολυτικού προφίλ με τις διαφορετικές οικοθέσεις καθώς σε αρκετές περιπτώσεις για την απομόνωση κυτταρινολυτικών μικροοργανισμών πρέπει να προηγείται κατάλληλος εμπλουτισμός των περιβαλλοντικών δειγμάτων, διαδικασία που δεν πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (Salah et al., 2007). Άλλωστε, η παρατηρούμενη μεταβολική ποικιλότητα αφορά μόνο τους καλλιεργήσιμους μικροοργανισμούς, οι οποίοι συνιστούν μικρό ποσοστό του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού (Kamagata and Tamaki, 2005, Sekiguchi, 2006, Kaul and Asano, 2012). Η ανίχνευση κυτταρινολυτικών και ξυλανολυτικών μικροοργανισμών σε ακραία περιβάλλοντα συχνά αναδεικνύει το ερώτημα εάν τα υδρολυτικά ένζυμα προέρχονται από νέα σε εμφάνιση γονίδια ή απλά αντικατοπτρίζεται η μεταφορά γονιδίων από αντίστοιχους μεσόφιλους μικροοργανισμούς. Ανεξάρτητα από την προέλευση των κυτταρινασών και ξυλανάσων, η παρουσία τους σε θερμοφιλά βακτήρια, απομονωθέντα από το φυσικό περιβάλλον, συνήθως μαρτυρά την τυχαία συσσώρευση φυτικής ύλης στον βίοτοπο.

Η περαιτέρω μελέτη, έγινε με επιλογή των 8 στελεχών που εμφάνισαν ταυτόχρονη κυτταρινολυτική και ξυλανολυτική δράση (SP17, SP24, SP37, SP38, SP45, SP46, SP47, SP50) καθώς και επιπλέον 7 με τις υψηλότερες σχετικές ενεργότητες ξυλανάσης (SP8, SP11, SP59, SP68, SP69, SP74, SP87). Ακολούθησαν βιοχημικές δοκιμές για τα 15 επιλεγμένα στελέχη και ανάλυση της αλληλουχίας τμήματος του 16S rRNA γονιδίου. Όλοι οι βάκιλοι εμφάνισαν θετική χρώση κατά Gram καθώς και παρουσία καταλάσης και οξειδάσης. Τα χαρακτηριστικά αυτά συμφωνούν με την περιγραφή του γένους *Geobacillus* από τον Nazina και συνεργάτες μόλις το 2001 (Nazina et al., 2001). Η φυλογενετική ομοιότητα επιβεβαιώθηκε και από την ανάλυση και σύγκριση της αλληλουχίας του 16S rDNA όπου τα ποσοστά ομοιότητας ήταν υψηλά (>95 %) για την πλειοψηφία των στελεχών. Μόνο τα SP59 και SP87 εμφάνισαν χαμηλή φυλογενετική συγγένεια με τα υπόλοιπα 13 και ομαδοποιήθηκαν στον ίδιο κλάδο του φυλογενετικού δέντρου. Αξιοσημείωτο ήταν, πως τα στελέχη αυτά εμφάνισαν παρόμοια υδρολυτική συμπεριφορά στις στερεές καλλιέργειες με υψηλή ξυλανολυτική ενεργότητα και απουσία ανιχνεύσιμης κυτταρινολυτικής δράσης.

Οι θέσεις των 15 επιλεγμένων στελεχών στο δενδρόγραμμα από το BOX PCR αποτύπωμα, ήταν διάσπαρτες, με αντιπροσώπους και στις 3 ομάδες. Επιβεβαιώθηκε συνεπώς, ότι η υψηλή φυλογενετική συγγένεια που επέδειξε η ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rDNA στα 15 θερμοφιλά βακτήρια δεν αρκεί για την ταξινόμηση σε επίπεδο στελέχους, χαρακτηριστικό του γένους *Geobacillus*. Μάλιστα, έχουν προταθεί διάφορες μοριακές τεχνικές για την αύξηση της ακρίβειας στην διάκριση των αντιπροσώπων του γένους αυτού (Kuisiene et al., 2002, Zeigler, 2005,

Kuisiene et al., 2007, Meintanis et al., 2008, Kuisiene et al., 2009, Weng et al., 2009, Cihan et al., 2011).

Στη συνέχεια, τα 15 επιλεγμένα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό παρουσία διαφορετικών πηγών άνθρακα (ξυλόζη, ξυλάνη, κελλοβιόζη, καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη, πίτυρο σίτου και θρυμματισμένο σπάδικα καλαμποκιού) και προσδιορίστηκαν οι εξωκυτταρικές ενεργότητες ένδο-ξυλανάσης, κυτταρινάσης, β-γλυκοζιδάσης και β-ξυλοζιδάσης. Ο χρόνος διπλασιασμού των επιλεγμένων στελεχών εμφανίστηκε αρκετά υψηλός και η βιομάζα που ανέπτυξαν κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα, χαρακτηριστικό των θερμοφίλων μικροοργανισμών (Turner et al., 2007). Η χαμηλή συγκέντρωση κυττάρων αποτελεί πρόβλημα για τη μικρού ή μεγάλου επιπέδου ενζυμική παραγωγή και η καλλιέργεια θερμοφίλων στελεχών φυσικού τύπου για εμπορική αξιοποίηση των προϊόντων τους αποτελεί οικονομική πρόκληση. Βέβαια, έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες για επίτευξη γρηγορότερου ρυθμού αύξησης των θερμοφίλων που αφορούν στην αριστοποίηση του θρεπτικού υποστρώματος, τη χρήση ειδικού εξοπλισμού κατά τη ζύμωση, την αύξηση της διαλυτότητας του οξυγόνου και την αποφυγή της ανασταλτικής δράσης ενδογενών προϊόντων της διεργασίας (Krahe et al., 1996, Schiraldi et al., 2001, Schiraldi and De Rosa, 2002).

Ο προσδιορισμός των υδρολυτικών ενεργοτήτων των 15 επιλεγμένων στελεχών κατά την ανάπτυξη σε διαφορετικές πηγές άνθρακα δεν έδειξε συνεχή ενζυμική έκκριση. Η μικροβιακή παραγωγή κυτταρινολυτικών και ξυλανολυτικών ενζύμων είναι μία επαγωγική διαδικασία και η επιλογή της πηγής άνθρακα κατά την καλλιέργεια είναι κρίσιμη καθώς μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά επίπεδα ενεργοτήτων και παραγωγικότητας. Άλλωστε, εκτός από την παροχή της απαιτούμενης ενέργειας για την αύξηση του μικροοργανισμού, αποτελεί συχνά πηγή των επαγωγικών μορίων κατά τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Haltrich et al., 1996, Kulkarni et al., 1999, Rastogi et al., 2010).

Όσον αφορά στην ένδο-ξυλανάση, σε όλα τα στελέχη ανιχνεύθηκε εξωκυτταρική ενεργότητα, γεγονός που συμφώνησε με τα αποτελέσματα των αρχικών στερεών καλλιεργειών. Ωστόσο, σε καμία περίπτωση δεν υπήρξε σαφής αντιστοίχιση των υδρολυτικών επιπέδων έκκρισης μεταξύ των δύο διαφορετικών τρόπων καλλιέργειας. Αυτό ενδεχομένως σχετίζεται με τις διαφορετικές συνθήκες αύξησης του μικροοργανισμού, διάχυσης και διαθεσιμότητας του υποστρώματος και του νερού (Dhiman et al., 2008α) καθώς και στις διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης των ενεργοτήτων. Αν και οι στερεές καλλιέργειες συχνά θεωρούνται πρωταρχικό βήμα για την επιλογή του κατάλληλου μικροοργανισμού-παραγωγού (Perttula et al., 1993, Cordeiro et al., 2002) καθώς προσομοιάζουν περισσότερο στο φυσικό περιβάλλον, ίσως δεν αποτελούν αξιόπιστο εργαλείο για τη μελέτη της ενζυμικής παραγωγικότητας, η οποία προτίνεται να πραγματοποιείται σε υγρές βιοδιεργασίες. Ιδιαίτερα για τα βακτήρια, ελάχιστες είναι οι αναφορές σχετικά με υψηλά επίπεδα ξυλανολυτικής ενεργότητας σε στερεές καλλιέργειες (Battan et al., 2006, Sanghi et al., 2008). Γενικά, το υψηλότερο επίπεδο έκκρισης εντοπίστηκε παρουσία ξυλόζης (στέλεχος SP24) ενώ καλύτερος επαγωγέας εμφανίζεται να είναι η ξυλάνη, η οποία προτείνεται ως πηγή άνθρακα για την πρωταρχική επιλογή ξυλανολυτικού μικροοργανισμού. Επίσης, το αδιάλυτο πίτυρο σίτου, πλούσιο σε ημικυτταρίνη, φάνηκε να επιδρά θετικά στην παραγωγή ξυλανάσης καθώς στα 12 από τα 15 στελέχη ανιχνεύθηκε ενεργότητα η οποία όμως περιορίστηκε σε χαμηλά επίπεδα.

Συχνά, αγροβιομηχανικά παραπροϊόντα αποτελούν φθηνούς επαγωγείς ξυλανασών (Kulkarni et al., 1999) όπως στην περίπτωση του *Geobacillus thermoleovorans* όπου το πίτυρο σίτου οδήγησε στα υψηλότερα ξυλανολυτικά επίπεδα σε σύγκριση με άλλες πηγές άνθρακα (Sharma et al., 2007). Επιπροσθέτως, ενδιαφέρον εμφάνισε η ανίχνευση ξυλανολυτικής δράσης από 8 στελέχη σε καλλιέργειες με μοναδική πηγή άνθρακα την κελλοβιόζη. Το παραπάνω φαινόμενο έχει αναφερθεί κατά το παρελθόν στη βιβλιογραφία αλλά αφορούσε στην πλειοψηφία τους αναερόβια βακτήρια και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν εξηγήθηκε πως σχετίζεται με τη βιοσύνθεση κυτταρινασών και ξυλανασών (Paul and Varma, 1990, Blois and Wiegel, 1995, Kosugi et al., 2001, Bocchini et al., 2008).

Οι πληροφορίες σχετικά με την παραγωγή κυτταρινασών από βακτήρια του γένους *Geobacillus* είναι περιορισμένες και σε καμία περίπτωση δεν έχει αναφερθεί στέλεχος με ικανότητα έκκρισης υψηλών κυτταρινολυτικών επιπέδων ακόμα και σε αριστοποιημένες συνθήκες αύξησης (Rastogi et al., 2010). Συγκεκριμένα, τα βιβλιογραφικά επίπεδα έκκρισης κυμάνθηκαν από 0,011 U/mL έως 0,8 U/mL (Tai et al., 2004, Abdel-Fattah et al., 2007, Rastogi et al., 2009), τιμές παραπλήσιες με αυτές που ανιχνεύθηκαν και στην παρούσα εργασία. Ανεξάρτητα από τα επίπεδα των ενζυμικών ενεργοτήτων, εντοπίστηκε κυτταρινολυτική δράση σε όλα τα στελέχη και σε τουλάχιστον μία πηγή άνθρακα, ακόμα και στα 7 θερμοφιλά βακτήρια που δεν είχαν εμφανίσει ανάλογη δράση κατά την πρωταρχική επιλογή (στερεές καλλιέργειες σε καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη). Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στους διαφορετικούς τρόπους καλλιέργειας και όρια ενζυμικής ανίχνευσης των μεθόδων καθώς και στη χαμηλή επαγωγική δράση της καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνης (CMC) η οποία και στους δύο τύπους καλλιέργειας κρίνεται ανεπαρκής. Η μη επαγωγική δράση της CMC στη βιοσύνθεση κυτταρινάσης από τα επιλεγμένα στελέχη πιστοποιήθηκε και κατά τη μοριακή ανίχνευση κυτταρινολυτικών γονιδίων στο γονιδίωμα 4 βακτηρίων που δεν είχαν υδρολυτική δράση στο CMC στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της εργασίας συμφωνούν στο ότι παρόλο που η πρωταρχική επιλογή κυτταρινολυτικών μικροοργανισμών γίνεται συχνά σε στερεές καλλιέργειες με υπόστρωμα την CMC, εξαιτίας της ευκολίας και του χαμηλού κόστους, η μέθοδος αυτή αδυνατεί να ανιχνεύσει ολόκληρο το μεταβολικό δυναμικό διάσπασης της κυτταρίνης των υπό μελέτη μικροοργανισμών. Στη σύγχρονη αναζήτηση μικροοργανισμών-ενζυμικών παραγωγών οι υγρές καλλιέργειες σε διαφορετικές πηγές άνθρακα θεωρούνται πιο αξιόπιστες και συναγωνίζοντας τη δημιουργία μεταγενωμικών βιβλιοθηκών σε συνδυασμό με ενζυμικό έλεγχο υψηλής απόδοσης (high throughput enzymatic screening) οδηγεί στην εύρεση νέων γονιδίων παρακάμπτοντας τη διαδικασία της καλλιέργειας (Maki et al., 2009, Navarro et al., 2010, Hess et al., 2011, Mewis et al., 2011).

Οι υψηλότερες ενεργότητες ένδο-κυτταρινάσης ανιχνεύτηκαν παρουσία ξυλόζης (στέλεχος SP24) και πίτυρου σίτου (στέλεχος SP74). Η ξυλόζη, λειτούργησε επαγωγικά για την έκκριση κυτταρινάσης καθώς σε 10 από τα 15 επιλεγμένα στελέχη προσδιορίστηκε η αντίστοιχη εξωκυτταρική ενεργότητα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η παραγωγή ξυλανασών παρουσία κελλοβιόζης (προϊόν υδρόλυσης κυτταρίνης) και η παραγωγή κυτταρινασών παρουσία ξυλόζης (μονομερές ξυλάνης). Το παραπάνω εξηγείται ενδεχομένως από την ταυτόχρονη παρουσία κυτταρινών και ημικυτταρινών στο φυσικό περιβάλλον, όπου με σκοπό τη μικροβιακή αύξηση οδηγεί στη βιοσύνθεση ενζύμων με διαφορετικές υδρολυτικές ικανότητες. Τέλος, το πίτυρο

σίτου εμφανίστηκε ως εξαιρετική πηγή άνθρακα για την επαγωγή των κυτταρινασών καθώς κατά τη χρήση του ανιχνεύθηκε εξωκυτταρική ενεργότητα και στα 15 στελέχη.

Όσον αφορά στη β-ξυλοζιδάση και β-γλυκοζιδάση, η ανίχνευση εξωκυτταρικών ενεργοτήτων ήταν περιορισμένη και χωρίς συγκεκριμένο πρότυπο, καθότι τα ένζυμα αυτά βρίσκονται ενδεχομένως ενδοκυτταρικά ή χαλαρά προσδεμένα στις μεμβράνες.

Το πίτυρο σίτου αποτέλεσε την καλύτερη επαγωγικά πηγή άνθρακα για τη βιοσύνθεση κυτταρινολυτικών και ξυλανολυτικών ενζύμων. Αυτό το χαμηλού κόστους αγροβιομηχανικό προϊόν συνίσταται από το εξωτερικό τμήμα του σιταριού και αποτελείται από μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες (αραβινοξυλάνες, κυτταρίνη και β-(1,3)(1,4) γλυκάνες), άμυλο και πρωτεΐνες (Carré and Brillouet, 1986, Ralet et al., 1990, Maes and Delcour, 2002). Έχει χρησιμοποιηθεί σε μικροβιακές καλλιέργειες μυκήτων και βακτηρίων καταλήγοντας σε πλούσια γονιδιακή έκφραση υδρολυτικών ενζύμων (Maeda et al., 2004, Asha Poorna and Prema, 2007, Sharma et al., 2007, Sun et al., 2008, Bansal et al., 2012), χωρίς όμως να έχει διαλευκανθεί πλήρως η ρύθμιση της πρωτεϊνικής βιοσύνθεσης. Η πιο πιθανή εκδοχή για την επίδραση του σύνθετου αυτού υποστρώματος στην ενζυμική βιοσύνθεση είναι η ποικιλία των ολιγοσακχαριτών που απελευθερώνονται κατά τη διάλυσή του και μπορούν να μετατραπούν σε επαγωγείς μέσω τρανς - γλυκοζυλίωσης (Suto and Tomita, 2001a, Schmoll and Kubicek, 2003). Με βάση τα παραπάνω, το πίτυρο σίτου επιλέχθηκε ως η καλύτερη πηγή άνθρακα για την παραγωγή κυτταρινολυτικών και ξυλανολυτικών ενζύμων από τα επιλεγμένα στελέχη, προσφέροντας ένα επιπλέον οικονομικό πλεονέκτημα.

Το στέλεχος SP24 εμφάνισε ταυτόχρονη έκκριση ένδο- ξυλανάσης και κυτταρινάσης καθώς και β-ξυλοζιδάσης και β-γλυκοζιδάσης σε ικανοποιητικά επίπεδα σε όλα τα στάδια της καλλιέργειας σε πίτυρο σίτου. Συνεπώς, επιλέχθηκε με στόχο την πλήρη μελέτη της φυσιολογίας και βιοσύνθεσης των υδρολασών βιομάζας.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση μικρής ποσότητας συμπληρωματικών πηγών άνθρακα και αζώτου στην ενζυμική επαγωγή σε υγρές καλλιέργειες του επιλεγμένου στελέχους (SP24). Η προσθήκη ξυλάνης (0,125% w/v) μαζί με το πίτυρο σίτου στο θρεπτικό υπόστρωμα οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας στα 3 υπό μελέτη ένζυμα, με εξαίρεση τη β-γλυκοζιδάση. Μάλιστα, τα επίπεδα κυτταρινάσης ενισχύθηκαν κατά 3,5 φορές ενώ της ξυλανάσης και της β-ξυλοζιδάσης κατά 2 και 2,5 φορές αντίστοιχα. Οι ολιγοσακχαρίτες που προκύπτουν από την υδρόλυση του οργανικού πολυμερούς είναι γνωστό ότι ενισχύουν την παραγωγή ξυλανολυτικών ενζύμων (Bastawde, 1992) και υπάρχουν πληθώρα αναφορών σχετικά με αυτή τη δράση (Levin and Forchiassin, 1998, Beg et al., 2000, Kamra and Satyanarayana, 2004, Sharma et al., 2007). Λιγότερο διαδεδομένη είναι η επαγωγική δράση της ξυλάνης στη βιοσύνθεση κυτταρινασών και εξηγείται από τη δομική της ομοιότητα με την κυτταρίνη, από την ταυτόχρονη παρουσία των δύο υποστρωμάτων στο φυσικό περιβάλλον και την ενδεχόμενη κοινή γονιδιακή ρύθμιση κυτταρινολυτικών και ξυλανολυτικών γονιδίων (Hřimová et al., 1989, Han et al., 2003β, Sibtain et al., 2003).

Η παραγωγή κυτταρινασών ενισχύθηκε επίσης με την προσθήκη αμύλου. Η υδρόλυση του πολυμερούς αυτού οδηγεί στην απελευθέρωση καταλοίπων γλυκόζης, τα οποία γενικά έχουν ανασταλτική δράση στην παραγωγή υδρολασών βιομάζας.

Ωστόσο, η παρατήρηση υψηλής ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης κατά τα αρχικά στάδια της καλλιέργειας (8 ώρες), ενίσχυσε την υπόθεση ενζυμικής τρανς-γλυκοζυλίωσης της γλυκόζης σε σοφορόζη (δισακχαρίτης) η οποία θεωρείται από τους πιο ισχυρούς επαγωγείς στην έκκριση κυτταρινολυτικών ενζύμων. Συνεπώς, ο πιθανότερος μηχανισμός ρύθμισης που προτίνεται για τη βιοσύνθεση των κυτταρινασών του επιλεγμένου στελέχους περιελάμβανε την επαγωγή της σύνθεσης και έκκρισης β-γλυκοζιδάσης από το άμυλο, την παραγωγή σοφορόζης ως προϊόν της δράσης της β-γλυκοζιδάσης στα κατάλοιπα γλυκόζης και τη μεταφορά του δισακχαρίτη στο εσωτερικό του κυττάρου για σύνθεση ένδο-κυτταρινάσης και αναστολή της έκκρισης β-γλυκοζιδάσης. Η σοφορόζη μεταφέρεται ενδοκυτταρικά μέσω μιας περμεάσης κελλοβιόζης, δισακχαρίτης που επίσης εμφάνισε επαγωγική δράση στα κυτταρινολυτικά ένζυμα. Ο παραπάνω μηχανισμός έχει παρατηρηθεί και μελετηθεί μόνο σε νηματοειδείς μύκητες (Sternberg and Mandels, 1979, Sternberg and Mandels, 1980, Taj-Aldeen, 1993, Tomme et al., 1995, Suto and Tomita, 2001α, Semenovaa et al., 2009).

Η προσθήκη συμπληρωματικών πηγών αζώτου (καζεΐνη, τρυπτόνη και φωσφορικό αμμώνιο) στο βασικό μέσο καλλιέργειας του επιλεγμένου στελέχους δεν ενίσχυσε την ενζυμική παραγωγή, υποδεικνύοντας την επάρκεια αζώτου από τα νιτρικά ιόντα και το εκχύλισμα ζύμης. Χαρακτηριστική ήταν η ανασταλτική επίδραση του φωσφορικού αμμωνίου για τη σύνθεση των 3 από τα 4 υπό μελέτη ένζυμα. Οι ανόργανες φωσφορικές πηγές θεωρούνται βασικά συστατικά βιομορίων όπως το cAMP, νουκλεϊκών οξέων και συνενζύμων, που παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη σύνθεση ποικιλίας πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών (Dean, 1972, Herrera-Herrera et al., 2009). Μάλιστα, σε υψηλές συγκεντρώσεις (>0,1 %) τα φωσφορικά ιόντα μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, τα οποία παρεμποδίζουν την έκκριση στο εξωκυτταρικό υγρό (Shaku et al., 1980).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, επιλέχθηκε ως βέλτιστη, για την ενζυμική παραγωγή, συμπληρωματική πηγή του πιτύρου η ξυλάνη σημύδας. Με το αριστοποιημένο υπόστρωμα αύξησης (2 % w/v πίτυρο και 0,125 % w/v ξυλάνη) επιτεύχθηκε για το επιλεγμένο στέλεχος SP24 η αύξηση των σχετικών ενζυμικών ενεργοτήτων έως και 3,5 φορές.

Εκτός από τη σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος βασικοί παράμετροι για την ενζυμική παραγωγή θεωρούνται η μηχανική ανάδευση των υγρών καλλιέργειών σε συνδυασμό με την παροχή οξυγόνου (αερισμός). Αυτό σχετίζεται με τη σωστή κατανομή των θρεπτικών συστατικών στο μέσο αύξησης καθώς και την παροχή του απαιτούμενου οξυγόνου για τη γρηγορότερη αύξηση του μικροοργανισμού, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις υψηλών θερμοκρασιών όπου μειώνεται η διαλυτότητα του. Η επίδραση της παροχής οξυγόνου στη βιοσύνθεση κυτταρινολυτικών και ξυλανολυτικών ενζύμων έχει μελετηθεί εκτενώς ιδιαίτερα σε νηματοειδείς μύκητες (Wase et al., 1985, Palma et al., 1996, Ilias and Hoq, 1998, Chipeta et al., 2008, Ahamed and Vermette, 2010, Bakri et al., 2011). Ωστόσο, λίγες είναι οι αναφορές για το γένος *Bacillus* (Pham et al., 1997, Huang et al., 2001, Sepahy et al., 2011) και δεν υπάρχει αντίστοιχη μελέτη για το γένος *Geobacillus*.

Το επιλεγμένο στέλεχος SP24 καλλιεργήθηκε στο βελτιστοποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα με μοναδική μεταβαλλόμενη συνθήκη την παροχή οξυγόνου (0, 0,15, 0,37 και 0,6 vvm). Η παρατήρηση των καμπυλών αύξησης στις καλλιέργειες των 4

διαφορετικών βιοαντιδραστήρων έδειξε άμεση εξάρτηση της βιωσιμότητας του μικροοργανισμού με τον αερισμό. Σε ανοξικές συνθήκες το στέλεχος ανέπτυξε πληθυσμό κατά 2 τάξεις ελαττωμένο αν και γενικά οι γεωβάκιλοι θεωρούνται δυνητικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί (Nazina et al., 2001). Τα χαμηλά επίπεδα αύξησης συσχετίστηκαν με την αδυναμία του βακτηρίου να παράγει και να εκκρίνει τα απαραίτητα ένζυμα για τη διάσπαση των υποστρωμάτων (ξυλάνη και πίτυρο) και την προμήθεια της απαιτούμενης ενέργειας. Αντίθετα, ο ταχύτερος ρυθμός αύξησης του επιλεγμένου στελέχους παρατηρήθηκε κατά τη μέγιστη παροχή οξυγόνου όπου μόλις 6 ώρες μετά τον εμβολιασμό εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας. Η συσχέτιση του ρυθμού μικροβιακής αύξησης με τον αερισμό της καλλιέργειας αποτελεί ενδεχομένως βασική παράμετρο στην αύξηση της παραγωγικότητας σε βιομάζα ή προϊόντα κατά τις θερμοφιλες βιοδιεργασίες (Demirtas et al., 2003, Ugwuanyi, 2008). Συνεπώς, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα υψηλής παροχής οξυγόνου κατά την καλλιέργεια γεωβακίλων.

Η συσχέτιση των επιπέδων αερισμού με την ενζυμική παραγωγή δεν οδήγησε σε σαφή συμπεράσματα. Αναλυτικότερα, η βιοσύνθεση των ξυλανολυτικών ενζύμων δεν εμφάνισε ιδιαίτερη εξάρτηση από την παροχή οξυγόνου καθότι οι ενζυμικές τιμές δεν απέκλιναν περισσότερο του 30 % μεταξύ τους για τα διάφορα επίπεδα αερισμού. Η ανίχνευση ξυλανάσης και β-ξυλοζιδάσης κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα κατά την εκθετική φάση αύξησης του μικροοργανισμού ενώ οι μέγιστες τιμές εντοπίστηκαν στην αρχή της φάσης στασιμότητας. Το χρονικό αυτό πρότυπο έκκρισης χαρακτηρίζει τα περισσότερα εξοένζυμα των βακίλων (Priest, 1977).

Τα επίπεδα ένδο-κυτταρινάσης εμφάνισαν σαφή συσχέτιση με την παροχή οξυγόνου. Συγκεκριμένα, αυξήθηκαν κατά 3 φορές σε αερισμό 0,37 vvm χωρίς να παρατηρηθεί ίδια συμπεριφορά σε περαιτέρω αύξηση. Παρόμοια συσχέτιση έχει παρατηρηθεί από τον Rastogi και συνεργάτες όπου τα επίπεδα παραγωγής κυτταρινάσης σε μικροαερόφιλες και αερόφιλες συνθήκες από στελέχη του γένους *Geobacillus* δεν διέφεραν κατά πολύ (Rastogi et al., 2010). Ίδιο πρότυπο έκκρισης με τις ξυλανάσες εμφάνισαν και οι κυτταρινάσες με ανίχνευση αυτών στη φάση στασιμότητας κατά την κλειστή καλλιέργεια του επιλεγμένου στελέχους. Το παραπάνω έχει ευρέως παρατηρηθεί και βιβλιογραφικά (Robson and Chambliss, 1984, Dhillon et al., 1985).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκέντρωσε η μελέτη της βιοσύνθεσης της β-γλυκοζιδάσης. Το ένζυμο αυτό δεν έχει ουδέποτε ανιχνευθεί και μελετηθεί σε στελέχη του γένους *Geobacillus* αν και είναι αρκετά διαδεδομένο στους μεσόφιλους βακίλους (Pajni et al., 1989, Sanz-Aparicio et al., 1998, Zahoor et al., 2011, Kim et al., 2012). Η β-γλυκοζιδάση, όπως ήδη έχει αναφερθεί, εντοπίστηκε εξωκυτταρικά έπειτα από επαγωγή της από το άμυλο και προτάθηκε η δράση της στον σχηματισμό σοφορόζης. Όσον αφορά στον αερισμό, παρατηρήθηκε ισχυρή ανασταλτική δράση στη βιοσύνθεση του ενζύμου κατά την αύξηση της παροχής οξυγόνου. Η επαγωγική δράση των αναερόβιων συνθηκών στην παραγωγή β-γλυκοζιδάσης δεν έχει παρατηρηθεί ποτέ σε βακτήρια ενώ υπάρχουν δύο σχετικές αναφορές για μύκητες. Η βιοσύνθεση β-γλυκοζιδάσης από τον μύκητα *Candida wickerhamii* σε αερόβιες συνθήκες επάγεται από την κελλοβιόζη και καταστέλλεται από την γλυκόζη. Ωστόσο η ανάπτυξη του μύκητα αναερόβιως οδηγεί σε υψηλά ενζυμικά επίπεδα (εμπλουτισμός ειδικής ενεργότητας κατά 30 φορές) ακόμα και παρουσία γλυκόζης (Freer and Detroy, 1985). Ηπιότερη επίδραση του φαινομένου εμφανίστηκε στην καλλιέργεια του μύκητα *Aspergillus niger* C6 όπου τα μέγιστα επίπεδα β-



γλυκοζιδάσης εμφανίστηκαν σε παροχή οξυγόνου 0,2 vvm (García-Kirchner et al., 2005). Συνεπώς, η ρύθμιση της βιοσύνθεσης του ενζύμου, αν και βακτηριακής προέλευσης, φαίνεται να εμφανίζει κοινά χαρακτηριστικά με αυτή των μυκήτων.

Ακολούθησε η μελέτη της τοπολογίας των υδρολασών βιομάζας του στελέχους SP24, κατά την οποία πιστοποιήθηκε αρχικά ο εξωκυτταρικός χαρακτήρας της ένδο-κυτταρινάσης και της ένδο-ξυλανάσης. Ο ρυθμός έκκρισης των παραπάνω ενζύμων συσχετίστηκε με την παροχή οξυγόνου στην καλλιέργεια και σε συνθήκες υψηλού αερισμού εντοπίστηκε η συνολική ενεργότητα εξωκυτταρικά, απόρροια του ταχύτερου ρυθμού αύξησης του μικροοργανισμού. Τα ένζυμα αυτά στην πλειοψηφία τους ανιχνεύονται εκτός του κυττάρου εξαιτίας της ανικανότητας εισόδου των μεγαλομοριακών υποστρωμάτων τους εντός του κυττάρου (Collins et al., 2005). Γεγονός που έχει αναφερθεί για τις ένδο-κυτταρινάσες (Ng et al., 2009, Rastogi et al., 2009, Vimla et al., 2009) και τις ένδο-ξυλανάσες (Baba et al., 1994, Sharma et al., 2007, Canakci et al., 2012) του γένους *Geobacillus*.

Αντίθετα, η β-γλυκοζιδάση και η β-ξυλοζιδάση εντοπίστηκαν στο κυτταρόπλασμα κατά την εκθετική φάση της μικροβιακής αύξησης και μόνο στα τελικά στάδια της ζύμωσης η ενεργότητα τους ανιχνεύθηκε εξωκυτταρικά, γεγονός που ενδεχομένως συνδέεται με τη μερική αυτόλυση των κυττάρων στη φάση θανάτου (ιδιαίτερα για τη β-ξυλοζιδάση). Γενικά, έχουν αναφερθεί β-ξυλοζιδάσες του γένους *Geobacillus* με εξωκυτταρική ενεργότητα (Baba et al., 1994, Lama et al., 2004, Quintero et al., 2007) αν και ο συνεργιστικός μηχανισμός διάσπασης κυτταρίνης ή ξυλάνης από αερόβια βακτήρια συστέινει την ενδοκυτταρική παρουσία τους (Gilbert and Hazlewood, 1993, Paavilainen et al., 1993, Brūx et al., 2006).

Συμπερασματικά, η αναζήτηση ενός στελέχους με ταυτόχρονη ξυλανολυτική και κυτταρινολυτική δράση στο σύνολο των θερμοφίλων, απομονωθέντων από ηφαιστειακό ενδιαίτημα, μικροοργανισμών κατέληξε στο στέλεχος SP24 (κωδικός NCBI-JN692241). Η βελτιστοποίηση του θρεπτικού υποστρώματος αύξησης ως προς την ενζυμική παραγωγή με παράλληλη μείωση του κόστους της βιοδιεργασίας, η αριστοποίηση της παροχής οξυγόνου ως προς τη μικροβιακή αύξηση και η κατανόηση της βιοσυνθετικής ρύθμισης και τοπολογίας των γλυκοζιδικών υδρολασών επιτρέπει τη μελλοντική αξιοποίηση του υδρολυτικού δυναμικού του μικροοργανισμού σε ευρύτερης κλίμακας ζυμώσεις. Παράλληλα, ο μοριακός εντοπισμός γονιδίων κυτταρινάσης και ξυλανάσης στο γονιδίωμα του επιλεγμένου μικροοργανισμού, επιτρέπει επίσης την υπερέκφραση αυτών σε μεσόφιλα συστήματα.

## ΛΙΠΑΣΕΣ

---

Το δεύτερο μέρος της παρούσας εργασίας αφορούσε στην εκτίμηση του λιπολυτικού δυναμικού των 101 θερμοφίλων βακτηριακών στελεχών και στην επιλογή ενζύμων (και όχι μικροοργανισμών αυτή τη φορά) με βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμες ιδιότητες για την υπερέκφραση αυτών σε μεσόφιλους δέκτες. Ο προσδιορισμός της λιπολυτικής ικανότητας των θερμοφίλων βακτηρίων πραγματοποιήθηκε τόσο ποιοτικά (στερεές καλλιέργειες) όσο και ποσοτικά (υγρές καλλιέργειες). Το ελαιόλαδο χρησιμοποιήθηκε ως μοναδική πηγή άνθρακα και στις δύο μεθόδους καλλιέργειας. Η συγκεκριμένη πηγή άνθρακα αποτελεί συχνή επιλογή επαγωγέα λιπασών εξαιτίας της

περιέχουσας ποικιλίας τριγλυκεριδίων που διαθέτει και τα οποία αποτελούν υπόστρωμα υδρολυτικών ενζύμων με προτίμηση σε εστερικούς δεσμούς μεσαίου ή μεγάλου μήκους λιπαρών οξέων και γλυκερόλης (ανίχνευση λιπάσης και όχι εστεράσης)(Gupta et al., 2003).

Αρκετές αναφορές σχετικές με μικροβιακής προέλευσης θερμοσταθερές λιπάσες είναι διαθέσιμες και στις περισσότερες από αυτές το πρώτο βήμα είναι η απομόνωση μικροοργανισμών, η εκτίμηση του λιπολυτικού δυναμικού τους και η αριστοποίηση των συνθηκών ενζυμικής παραγωγής (Jaeger et al., 1994, Abdel-Fattah, 2002, Castro-Ochoa et al., 2005). Συνήθως, ακολουθεί επιπλέον επιλογή των λιπασών με τις επιθυμητές ιδιότητες (Dahiya and Purkayastha, 2011). Στην παρούσα εργασία ο ποιοτικός προσδιορισμός λιπάσης πραγματοποιήθηκε σε στερεές καλλιέργειες με τη φθορίζουσα χρωστική Ροδαμίνη Β. Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη μέθοδο ανίχνευσης λιπολυτικών μικροοργανισμών εξαιτίας της απλότητάς της, της δυνατότητας χρήσης διαφορετικών υποστρωμάτων, τον ταυτόχρονο έλεγχο πολλών μικροοργανισμών καθώς και της ικανότητας της για ποσοτικοποίηση ενζυμικών ενεργοτήτων μεταξύ 1 και 30 nkat (Kouker and Jaeger, 1987, Sharma et al., 2001, Hasan et al., 2006). Ωστόσο, η μέθοδος δεν εξασφαλίζει ομοιόμορφη κατανομή του υποστρώματος (Vargas et al., 2004, Sorokin and Jones, 2009) και συχνά απαιτεί παράταση χρόνου κατά την επώαση (Singh et al., 2006). Το τελευταίο παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία καθώς έπειτα από παρέλευση 24 ωρών το 9 % του συνόλου των στελεχών εμφάνισε λιπολυτική δράση, το οποίο όμως αυξήθηκε στο 17 % μετά από 48 ώρες.

Ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός της εξωκυτταρικής ενεργότητας λιπασών σε υγρές καλλιέργειες ελαιολάδου. Στις πρώτες 24 ώρες το 72,3 % των θερμοφίλων στελεχών εμφάνισε ανιχνεύσιμη λιπολυτική δράση ενώ στις 72 ώρες το ποσοστό μειώθηκε στο 69,3 %. Η μείωση του ποσοστού στην πορεία του χρόνου αντανακλούσε την πιθανή ύπαρξη πρωτεασών στο εξωκυτταρικό μέσο ή το σχηματισμό αδιάλυτων αλάτων ασβεστίου στα οποία προσροφάται η λιπάση και απομακρύνεται κατά τη φυγοκέντρωση (Schmidt-Dannert et al., 1994, Vargas et al., 2004).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης λιπολυτικού φαινοτύπου δεν εμφανίζουν ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ τους. Μόνο 4 από τα 101 στελέχη επέδειξαν πανομοιότυπο πρότυπο υδρόλυσης του ελαιολάδου και σε στερεές και σε υγρές καλλιέργειες (SP73, SP75, SP83 και SP93). Χαρακτηριστικό ήταν πως αρκετά στελέχη ενώ δεν εμφάνισαν φθορίζουσα ζώνη στο υπόστρωμα με Ροδαμίνη Β ανέπτυξαν υψηλές τιμές εξωκυτταρικής ενεργότητας στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Ωστόσο, σε καμία περίπτωση δεν εντοπίστηκε στέλεχος με θετικό αποτέλεσμα στις στερεές και μη ανιχνεύσιμη λιπολυτική ενεργότητα στις υγρές καλλιέργειες. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και με δεδομένη την χρήση κοινής επαγωγικής πηγής άνθρακα (ελαιολάδο) συμπεραίνεται πως η διακριτική ευαισθησία των στερεών καλλιεργειών με Ροδαμίνη Β είναι χαμηλή και για την αξιόπιστη ανίχνευση μικροοργανισμού με λιπολυτικό δυναμικό οι υγρές καλλιέργειες αποτελούν αναγκαίο βήμα. Αυτό μπορεί να σχετίζεται είτε με τα ενδογενή προβλήματα των στερεών καλλιεργειών που έχουν ήδη αναφερθεί (ανομοιογένεια υποστρώματος, περιορισμένη διαθεσιμότητα νερού κ.α.) είτε με τη μέθοδο ανίχνευσης της υδρόλυσης. Η Ροδαμίνη Β προσδένεται μόνο σε μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα επομένως δεν μπορεί να ανιχνεύσει το σύνολο των προϊόντων

υδρόλυσης του ελαιολάδου και απαιτεί υψηλή ενζυμική ενεργότητα για την παρατήρηση έντονης φθορίζουσας ζώνης. Αδυναμία συσχέτισης ενζυμικής παραγωγής ή ανίχνευσης μεταξύ υγρών και στερεών καλλιιεργειών αναφέρεται γενικά στη βιβλιογραφία (Vargas et al., 2004) και διαπιστώθηκε επίσης στη τρέχουσα εργασία και στην περίπτωση ανίχνευσης κυτταρινολυτικής και ξυλανολυτικής δράσης στους ίδιους μικροοργανισμούς. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λιπασών ανέδειξε ένα σύνολο στελεχών με εμφάνιση έντονης φθορίζουσας ζώνης και άλλα με ικανότητα έκκρισης υψηλών ενζυμικών επιπέδων ( $>0,75$  nkat/mL-μέσος όρος). Τα 9 θερμοφιλά στελέχη (SP14, SP22, SP29, SP73, SP75, SP76, SP79, SP83 και SP93) που πληρούσαν είτε το ένα είτε και τα δύο κριτήρια επιλέχθηκαν με στόχο την περαιτέρω μελέτη και χαρακτηρισμό των λιπασών τους.

Η μεγάλη ποικιλία καταβολικών μονοπατιών στους μικροοργανισμούς αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό του μικροβιακού κόσμου. Το εύρος ποικιλότητας διαφέρει ανάμεσα στα διαφορετικά είδη και περιλαμβάνει στελέχη που μπορούν να καταβολίσουν περιορισμένο αριθμό υποστρωμάτων έως στελέχη με ικανότητα χρήσης περισσότερων από 100 διαφορετικών πηγών άνθρακα και ενέργειας. Σε γενικές γραμμές οι μικροοργανισμοί με ικανότητα διάσπασης υδατανθράκων αδυνατούν να χρησιμοποιήσουν πρωτεΐνες ή λίπη ως ενεργειακή πηγή για την αύξηση και τη διαίρεσή τους (Lynd et al., 2002). Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας συμφωνούν με τα προαναφερθέντα καθότι κανένα επιλεγμένο στέλεχος για την αυξημένη λιπολυτική του δράση δεν εμφάνισε αντίστοιχη κυτταρινολυτική ή ξυλανολυτική ικανότητα.

Ο φαινοτυπικός και γενετικός χαρακτηρισμός των 9 επιλεγμένων λιπολυτικών στελεχών ανέδειξε υψηλή φυλογενετική ομοιότητα με το γένος *Geobacillus* ή άλλα στενά συγγενικά είδη (*Aneurinibacillus*). Η πλειοψηφία των επιλεγμένων θερμοφίλων βακτηρίων (6 στα 9) εντοπίστηκε στην πρώτη ομάδα στελεχών ενώ 3 από τα 9 άνηκαν στη δεύτερη ομάδα του δένδρογράμματος του BOX PCR αποτυπώματος. Σημαντικός αριθμός εξωκυτταρικών λιπασών του γένους *Geobacillus* έχουν αναφερθεί και μελετηθεί ως προς την παραγωγή τους (Berekaa et al., 2009, Sifour et al., 2010, Sánchez-Otero et al., 2011) είτε έχουν υπερεκφραστεί σε μεσόφιλα συστήματα (Quintana-Castro et al., 2009, Jiang et al., 2010, Ebrahimpour et al., 2011, Tayyab et al., 2011).

Γενικά, η παραγωγή λιπασών πραγματοποιείται σε στερεές (Alkan et al., 2007) ή υγρές καλλιέργειες (Chakraborty et al., 2010) και επηρεάζεται από τη σύσταση του υποστρώματος αύξησης αλλά και από φυσικοχημικούς παράγοντες όπως είναι το pH, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (Treichel et al., 2010). Ωστόσο, ο σημαντικότερος παράγοντας για την έκφραση της λιπολυτικής δράσης θεωρείται η πηγή άνθρακα (Lotti et al., 1998). Στις περισσότερες αναφορές σχετικά με την παραγωγή λιπασών δε χρησιμοποιούνται απλά σάκχαρα αλλά λιπιδικά υποστρώματα όπως έλαια (Kumar et al., 2005, Takaç and Marul, 2008), τριγλυκερίδια (Janssen et al., 1994), λιπαρά οξέα (Obradors et al., 1993), εστέρες λιπαρών οξέων - Tweens (Abdel-Fattah, 2002, Li et al., 2004), χολικά άλατα (Sugiura et al., 1975) και γλυκερόλη (Lin et al., 2006a, Berekaa et al., 2009). Τα 9 επιλεγμένα για τη λιπολυτική τους ικανότητα θερμοφιλά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε υγρές και στερεές καλλιέργειες διαφορετικών πηγών άνθρακα (ελαιόλαδο, γλυκερόλη, Tween 20 και τριβουτυρίνη).

Η πρωταρχική ποιοτική ανίχνευση λιπολυτικών ενεργιοτήτων σε στερεές καλλιέργειες στο σύνολο των θερμοφίλων στελεχών ανέδειξε τη μειωμένη ευαισθησία της φθορίζουσας ουσίας Ροδαμίνης Β και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε αυτή τη φορά η χρωστική Ερυθρό του Μεθυλίου η οποία ανιχνεύει την πτώση στο pH εξαιτίας της απελευθέρωσης των λιπαρών οξέων (προϊόντα λιπόλυσης). Αναφορικά με τις διαφορετικές πηγές άνθρακα, σε καλλιέργειες τριβουτυρίνης παρατηρήθηκε ζώνη αποχρωματισμού στα 8 από τα 9 στελέχη, υποδεικνύοντας την υδρόλυση του υποστρώματος. Ωστόσο το αποτέλεσμα αυτό δεν προσδιορίζει καθαρή λιπολυτική δράση, καθότι η διάσπαση της τριβουτυρίνης πραγματοποιείται και από εστεράσες, οι οποίες μπορεί να συνυπάρχουν. Το μοναδικό στέλεχος που δεν εμφάνισε ικανότητα υδρόλυσης της τριβουτυρίνης αλλά μόνο του ελαιολάδου και του Tween 20 ήταν το SP22, αποκαλύπτοντας τη σαφή λιπολυτική φύση του ενζύμου που εκκρίνει.

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας των λιπασών στο εξωκυτταρικό υγρό των καλλιεργειών διαφορετικών πηγών άνθρακα έγινε με τη χρήση του ψευδοϋποστρώματος pNPP με το οποίο αντιμετωπίστηκε το πρόβλημα διάκρισης μεταξύ λιπασών και εστερασών που παρουσιάστηκε στις στερεές καλλιέργειες τριβουτυρίνης, καθότι ανιχνεύει μόνο λιπολυτική δράση. Όλα τα επιλεγμένα στελέχη εμφάνισαν ανιχνεύσιμες ενεργότητες λιπάσης και στις 4 πηγές άνθρακα, οι οποίες όμως κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα, χαρακτηριστικό των θερμοφίλων βακτηρίων (Lee et al., 2001, Turner et al., 2007). Η ενζυμική έκκριση παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις στο τέλος της εκθετικής φάσης – αρχή φάσης στασιμότητας, κατ'αναλογία με αρκετές σχετικές αναφορές (Lee et al., 1999, Tamerler and Keshavarz, 2000, Castro-Ochoa et al., 2005).

Τα 4 από τα 9 στελέχη (SP22, SP76, SP79 και SP83) εμφάνισαν μέγιστη ενζυμική ενεργότητα εξωκυτταρικής λιπάσης παρουσία του Tween 20 (εστέρας λαυρικού οξέος). Η υδρόλυση του εστερικού δεσμού στο υπόστρωμα αυτό οδηγεί στην απελευθέρωση λαυρικού οξέος, λιπαρό οξύ με 12 άτομα άνθρακα, το οποίο ενδεχομένως μπορεί να εισέλθει ταχύτερα στο κύτταρο και μέσω της β-οξειδωσης του να παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια. Αντίθετα τα λιπαρά οξέα από την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων του ελαιολάδου είναι μακράς αλυσίδας (16 και 18 άτομα άνθρακα) και η είσοδος τους στο κύτταρο πραγματοποιείται όχι μόνο με διάχυση, όπως στα μεσαίου και μικρού μήκους, αλλά και με ενεργή μεταφορά (Banchio and Gramajo, 1997), οδηγώντας σε χαμηλότερους ρυθμούς αύξησης. Επιπλέον, το Tween 20 μειώνει την επιφανειακή τάση μεταξύ οργανικής και υδατικής φάσης στην καλλιέργεια δημιουργώντας συνθήκες γαλακτώματος στις οποίες οι λιπάσες ως επιφανειοενεργά ένζυμα δρουν άριστα και βοηθά στην ταχύτερη είσοδο των υποστρωμάτων στο κύτταρο. Μάλιστα, σε αρκετές περιπτώσεις η προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων, όπως είναι το Tween ή το Triton, στο μέσο αύξησης θεωρείται προαπαιτούμενο για την παραγωγή λιπασών (Espinosa et al., 1990, Henriette et al., 1993, Boekema et al., 2007, Pogaku et al., 2010, Sangeetha et al., 2011).

Η τριβουτυρίνη (τριγλυκερίδιο βουτυρικού οξέος – 4 άτομα άνθρακα), θεωρήθηκε καλή επαγωγική πηγή λιπασών σε 3 από τα 9 επιλεγμένα στελέχη (SP14, SP29 και SP93), τα οποία εμφάνισαν (παρουσία της) τις υψηλότερες εξωκυτταρικές ενεργότητες. Επίσης, τα στελέχη αυτά, επέδειξαν υδρολυτική ικανότητα διάσπασης της τριβουτυρίνης και στις στερεές καλλιέργειες, εμφανίζοντας προτίμηση στη διάσπαση εστερικών δεσμών λιπαρών οξέων μικρού μήκους, όπως είναι το βουτυρικό

οξύ. Εκτός, από την εξειδίκευση των λιπασών όσον αφορά στο μήκος των λιπαρών οξέων, η προτίμηση τους στη θέση του εστερικού δεσμού στο σκελετό της γλυκερόλης είναι επίσης σημαντικός παράγοντας και λιπάσες που υδρολύουν το μεσαίο δεσμό (sn-2 εξειδίκευση) προτιμούν συνήθως τη τριβουτυρίνη ως υπόστρωμα (Ota et al., 2000).

Συσχετίζοντας, την άριστη πηγή άνθρακα με τη φύση του υποστρώματος (υγρό ή στερεό), παρατηρήθηκε ότι τα μισά περίπου στελέχη επέδειξαν ίδια συμπεριφορά και στους δύο τρόπους καλλιέργειας. Χειρότερη επαγωγική πηγή θεωρήθηκε η γλυκερόλη, αν και έχει αναφερθεί ενισχυτική δράση της στην παραγωγή λιπασών από βακτήρια (Gupta et al., 2004a, Berekaa et al., 2009). Τα αποτελέσματα από τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της λιπολυτικής ικανότητας των θερμοφίλων στελεχών καθώς και από τη μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών πηγών άνθρακα στην παραγωγή λιπασών οδηγούν στην πρόταση για τη χρήση της τριβουτυρίνης ως πηγή άνθρακα σε στερεές καλλιέργειες κατά τον πρωταρχικό έλεγχο για την επιλογή λιπολυτικών μικροοργανισμών. Η επιλογή των μικροοργανισμών-παραγωγών είναι αναγκαίο να ακολουθείται από υγρές καλλιέργειες ελαιολάδου για την πιστοποίηση της παραγωγής λιπασών και όχι εστερασών. Η πρόταση του ελαιολάδου, ως υπόστρωμα στις υγρές καλλιέργειες, βασίζεται στην ποικιλία λιπαρών οξέων, που περιέχουν τα τριγλυκερίδια του, τα οποία διαφέρουν τόσο στο μήκος όσο και στο βαθμό ακορεστότητας.

Αναγκαία προαπαιτούμενα χαρακτηριστικά για την εφαρμογή των λιπασών στις διάφορες βιομηχανικές διεργασίες αποτελούν η θερμική σταθερότητα και η δράση τους σε αλκαλικό pH. Η διερεύνηση των παραπάνω χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκε σε εξωκυτταρικό δείγμα από υγρές καλλιέργειες ελαιολάδου των 9 επιλεγμένων λιπολυτικών στελεχών.

Οι λιπάσες των 9 επιλεγμένων θερμοφίλων στελεχών επέδειξαν δραστικότητα σε εύρος pH μεταξύ 6 και 9,5. Το άριστο pH δράσης προσδιορίστηκε στο 8 για την πλειοψηφία των ενζύμων ενώ εντοπίστηκαν 2 λιπάσες με άριστο το 8,5 (SP29 και SP73) και άλλες δύο με το 9 (SP22 και SP83). Η λιπολυτική ικανότητα μειώθηκε δραστικά σε όλες τις περιπτώσεις στο pH 10 όπου μόνο τα 4 ένζυμα με τα υψηλότερα άριστα δράσης διατήρησαν από 20-40 % της μέγιστης σχετικής ενεργότητά τους. Η αλκαλοφιλία είναι ευρέως διαδεδομένη στις θερμοφιλες λιπάσες των γενών *Bacillus* και *Geobacillus* (Sinhaikul et al., 2001, Sharma et al., 2002a, Leow et al., 2004, Li and Zhang, 2005, Abdel-Fattah and Gaballa, 2008, Jiang et al., 2010, Shariff et al., 2011) γεγονός που τις καθιστά ως υποψήφιους βιοκαταλύτες για ποικιλία διεργασιών.

Αναφορικά με την άριστη θερμοκρασία δράσης, όλες οι υπό μελέτη λιπάσες εμφάνισαν ενεργότητα από τους 40 έως τους 100 °C. Η άριστη θερμοκρασία δράσης για την πλειοψηφία των λιπασών ήταν οι 90 °C ενώ τα ένζυμα από δύο στελέχη επέδειξαν άριστη ενεργότητα στους 85 °C (SP75 και SP83) και 80 °C (SP76 και SP96) αντίστοιχα.

Η θερμική απενεργοποίηση των λιπασών μελετήθηκε εκτενώς και η προσαρμογή των αποτελεσμάτων σε διάφορα πρότυπα απενεργοποίησης έδειξε πως ο κινητικός μηχανισμός είναι 2<sup>ης</sup> τάξης. Ανάλογη προσαρμογή θερμικής απενεργοποίησης λιπασών του γένους *Geobacillus* δεν έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Όλες οι λιπάσες χαρακτηρίζονται ως θερμοσταθερές αλλά αυτές των στελεχών SP14,

SP22, SP29 και SP73 επέδειξαν υψηλή θερμική αντοχή ακόμα και στους 100 °C. Λιγότερο σταθερή, συγκριτικά με τις υπόλοιπες 8, ήταν η λιπάση του στελέχους SP93. Οι αναφορές σχετικά με τον χαρακτηρισμό λιπασών από *Geobacillus* τονίζουν τη θερμοσταθερότητα των ενζύμων, οι οποίες στις περισσότερες περιπτώσεις κυμάνθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (Schmidt-Dannert et al., 1994, Leow et al., 2004, Li and Zhang, 2005, Abdel-Fattah and Gaballa, 2008, Sifour et al., 2010).

Με δεδομένο ότι τα χαμηλά επίπεδα ενζυμικής παραγωγής δεν επιτρέπουν τον πρωτεϊνικό καθαρισμό από καλλιέργεια των στελεχών φυσικού τύπου, η υπερέκφραση των επιθυμητών γονιδίων σε μεσόφιλα συστήματα ήταν ο επόμενος στόχος. Σε αυτή τη λογική, σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση ολόκληρου του πλαισίου ανάγνωσης των λιπασών. Στα 6 από τα 9 στελέχη παρελήφθη προϊόν ενίσχυσης αναμενόμενου μοριακού βάρους, ενώ στα υπόλοιπα 3 στελέχη (SP14, SP29 και SP93) η αντίδραση PCR ήταν αρνητική αν και δοκιμάστηκε ποικιλία διαφορετικών συνθηκών. Το γονίδιο λιπάσης που επιλέχθηκε για κλωνοποίηση και υπερέκφραση ήταν το προϊόν ενίσχυσης από το γονιδίωμα του στελέχους SP22. Η επιλογή βασίστηκε στην αυξημένη σταθερότητα και θερμική αντοχή καθώς και στην αλκαλοφιλία που επέδειξε η αντίστοιχη λιπάση κατά την μελέτη των χαρακτηριστικών της.

Η απομόνωση και ανάλυση της πλήρους αλληλουχίας του γονιδίου εμφάνισε ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1251 ζ.β., μέγεθος αρκετά διαδεδομένο για τις λιπάσες του γένους *Geobacillus* (Sabri et al., 2009, Jiang et al., 2010, Ebrahimpour et al., 2011, Tayyab et al., 2011). Παράλληλα, η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης ανέδειξε το χαρακτηριστικό πενταπεπτίδιο Ala-X-Ser-X-Gly (καταλυτική περιοχή σερίνης) καθώς και τη σημαντική για το ενεργό κέντρο, τριάδα His - 42, Ser -141 και Asp-345. Τα παραπάνω αποτελούν ιδιαιτερότητες των θερμόφιλων λιπασών (υποοικογένεια I.5) του γένους *Bacillus* (Cho et al., 2000, Abdel-Fattah and Gaballa, 2008, Quintana-Castro et al., 2009, Ebrahimpour et al., 2011). Μάλιστα, οι λιπάσες και οι πρωτεάσες (υδρολάσες σερίνης) του γένους *Bacillus* εμφανίζουν τη σερίνη στο πενταπεπτίδιο Gly-X-Ser-X-Gly. Η αντικατάσταση της γλυκίνης-139 από την αλανίνη, χαρακτηριστικό των θερμόφιλων λιπασών, σταθεροποιεί την καταλυτική θηλιά και οδηγεί σε αυξημένης σταθερότητας μόρια (Jeong et al., 2002). Επίσης, τα τελευταία έτη έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές εξελικτικές προσπάθειες *in vitro* σε μόρια μεσόφιλων λιπασών με στόχο την αύξηση της θερμοκρασίας τήξης και τη μείωση του ρυθμού θερμικής απενεργοποίησης τους (Ahmad et al., 2008, Kamal et al., 2011). Η μετατροπή των μορίων σε σταθερότερη λειτουργική κατάσταση είναι συχνά θέμα μερικών μεταλλαγών που οδηγούν στη διαμόρφωση ασθενών ενδομοριακών δυνάμεων, όπως οι δεσμοί υδρογόνου.

Αρχικά, η υπερέκφραση του γονιδίου της λιπάσης πραγματοποιήθηκε σε βακτηριακό σύστημα (δεκτικά κύτταρα *E.coli*) υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή T7 (φορέας κλωνοποίησης - pET15b). Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 3 σειρές κυττάρων-ξενιστών (DH5a, BL21(DE3) και BL21(DE3)pLysS) στις οποίες μελετήθηκε η κινητική έκφρασης της θερμοσταθερής λιπάσης. Στα κύτταρα DH5a η μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου - στόχου παρέμεινε σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα, γεγονός αναμενόμενο, καθότι εκλείπει από το γονιδίωμα τους η T7 RNA πολυμεράση (εξειδικευμένη για τον T7 υποκινητή). Μάλιστα, απουσία επαγωγικών συνθηκών

(IPTG) δεν ανιχνεύθηκε ενζυμική ενεργότητα. Η πρωτεΐνη εντοπίστηκε ενδοκυτταρικά, δεν εμφάνισε τοξικότητα και οι άριστες συνθήκες έκφρασής της αντιστοιχούν σε συγκέντρωση του επαγωγέα (IPTG) στα 0,5 mM και 20 ώρες επώασης τους 25 °C. Τα παραπάνω κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την αποθήκευση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου εξαιτίας της σταθερότητας του μέσα σε αυτά. Ο μετασχηματισμός των BL21(DE3) κυττάρων εμφάνισε υψηλή μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου στόχου παρουσία επαγωγικών συνθηκών. Η παρουσία της T7 RNA πολυμεράσης στο γονιδίωμα των κυττάρων αυτών οδήγησε σε χαμηλή μεταγραφή του ανασυνδυασμένου γονιδίου ακόμα και απουσία οποιασδήποτε μορφής επαγωγέα. Ωστόσο, η ενζυμική ενεργότητα που ανιχνεύτηκε δε συμβάδισε με τα επίπεδα μεταγραφής. Η υψηλή παραγωγή της πρωτεΐνης και η υδρόφοβη φύση της οδήγησε στο σχηματισμό αδιάλυτων μη ενεργών συσσωματωμάτων. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται συχνά στις υπερέκφρασεις λιπασών από βακτήρια (Chung et al., 1991, Ogino et al., 2007, Akbari et al., 2010) και πιστοποιήθηκε με την ανίχνευση της πρωτεΐνης και στο αδιάλυτο ενδοκυτταρικό κλάσμα. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος, ακολούθησαν καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων σε διαφορετικές συνθήκες επαγωγής και χαμηλότερη θερμοκρασία (Makrides, 1996, Sorensen and Mortensen, 2005, Burgess, 2009). Η μείωση στη θερμοκρασία επώασης οδήγησε σε χαμηλότερο ρυθμό αύξησης των μικροοργανισμών, αφήνοντας χρονικό περιθώριο στα πρωτεϊνικά μόρια να συντεθούν και να αναδιπλωθούν σωστά. Σε αρκετές περιπτώσεις αποτέλεσε την πιο εύκολη λύση για την αποφυγή σχηματισμού ανενεργών συσσωματωμάτων. Στην παρούσα εργασία σε καμία περίπτωση δεν απεφεύχθη η παραλαβή της λιπάσης στο αδιάλυτο κλάσμα. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες αναδιάλυσης των συσσωματωμάτων (Singh and Panda, 2005) σε χαοτροπικούς παράγοντες (ουρία) χωρίς όμως επιτυχές αποτέλεσμα καθώς η λιπάση έχανε εντελώς την ενεργότητά της. Ακολούθησε ο μετασχηματισμός των BL21(DE3)pLysS, τα οποία διαθέτουν ένα πιο ισχυρό σύστημα ελέγχου της μεταγραφής παράγοντας την T7 λυσοζύμη, φυσικό αναστολέα της T7 RNA πολυμεράσης. Η μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου στόχου ήταν συνεχής αλλά σε χαμηλά επίπεδα συγκριτικά με τα BL21(DE3). Η μείωση στη θερμοκρασία επώασης αύξησε τα επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας χωρίς όμως αυτά να κρίνονται ικανοποιητικά (περίπου 2πλάσια από το στέλεχος φυσικού τύπου). Ανάλογα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και στη διεθνή βιβλιογραφία (Schmidt-Dannert et al., 1994, Luisa Rúa et al., 1997, Cho et al., 2000, Luque et al., 2004). Συμπερασματικά, η υπερέκφραση της θερμοσταθερής λιπάσης του στελέχους SP22 (*Geobacillus* sp.) σε προκαρυωτικό σύστημα εμφάνισε προβλήματα, καθώς σε συνθήκες υψηλής παραγωγής οδήγησε στον σχηματισμό αδιάλυτων συσσωματωμάτων για τα οποία ενδεχομένως ευθύνονται τα βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μορίου όπως η υδροφοβικότητα, το υψηλό ισοηλεκτρικό του σημείο (Zhang et al., 2009γ) ή κάποια απαιτούμενη μεταμεταφραστική τροποποίηση η οποία δεν πραγματοποιείται στα ξενιστικά κύτταρα.

Η ανάγκη εύρεσης ενός πιο αποδοτικού συστήματος υπερέκφρασης της θερμοσταθερής λιπάσης οδήγησε στην επιλογή της αξιολόγησης του συστήματος *flashBAC*<sup>TM</sup>. Αξίζει να αναφερθεί ότι το σύστημα αυτό ουδέποτε έχει χρησιμοποιηθεί για την υπερέκφραση βακτηριακής λιπάσης παρά μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις ευκαρυωτικών γονιδίων λιπάσης (Holm et al., 1994, Holm and Contreras, 1998, Joliff et al., 1998, Karlsson et al., 2000). Επίσης, οι αναφορές

έκφρασης θερμοσταθερών πρωτεϊνών μέσω των βακυλοϊών στη διεθνή βιβλιογραφία είναι ελάχιστες και μάλιστα όχι από βακτήρια (Mroczkowski et al., 1994, Lin et al., 2006β).

Η υπερέκφραση της λιπάσης με το σύστημα *flashBAC*<sup>TM</sup> οδήγησε σε εξαιρετικά υψηλές τιμές ειδικής ενζυμικής ενεργότητας καθώς επίσης και στην ολοκληρωτική εμφάνιση της πρωτεΐνης σε διαλυτή μορφή. Αναλυτικότερα, τα επίπεδα ειδικής ενζυμικής ενεργότητας εμφανίστηκαν έως και 10000 φορές υψηλότερα από το στέλεχος φυσικού τύπου και ενισχυμένα κατά 5000 φορές συγκριτικά με το ετερόλογο προκαρυωτικό σύστημα έκφρασης. Τα επίπεδα αυτά θεωρούνται εξαιρετικά υψηλά για υπερέκφραση λιπασών καθότι αυτά κυμαίνονται βιβλιογραφικά συνήθως από 1,4 έως 178 φορές υψηλότερα από το στέλεχος φυσικού τύπου (Cho et al., 2000, Leow et al., 2004, Ma et al., 2006, Yan et al., 2007, Abdel-Fattah and Gaballa, 2008, Hamid et al., 2009, Shariff et al., 2011). Οι παραπάνω εντυπωσιακές τιμές ενδεχομένως σχετίζονται και με τον ασυνήθιστα υψηλό τίτλο του ιού ( $3 \cdot 10^9$  pfu/ml) δηλαδή την ευκολία αντιγραφής του ανασυνδυασμένου ιού στα κύτταρα Sf9. Συνεπώς, το σύστημα *flashBAC*<sup>TM</sup> εμφανίστηκε ιδιαίτερα αποδοτικό στην παραγωγή ετερόλογης διαλυτής θερμοσταθερής λιπάσης σε μικρό χρονικό διάστημα (48 ώρες) απουσία οποιουδήποτε επαγωγέα.

Την αριστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας μολυσμένων Sf9 κυττάρων και παραγωγής του ενζύμου, ακολούθησε ο καθαρισμός της υπερεκφρασμένης λιπάσης από το εξοκυττάριο υγρό με ένα μόνο χρωματογραφικό βήμα. Η ιδιαιτερότητα του μορίου να προσκολλάται μη εξειδικευμένα σε σωματίδια ρητίνης λειτούργησε ευεργετικά και οδήγησε σε ηλεκτροφορητικά καθαρή μορφή πρωτεΐνης έπειτα από την έκλουσή της από ανιοντοανταλλακτική ρητίνη (Q Sepharose Fast Flow) σε διάλυμα γαλακτώματος. Η λιπάση κατά την ηλεκτροφόρηση της παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα εμφάνισε μοριακό βάρος 46 kDa ενώ κατά το ζυμογράφημα (απουσία αποδιατακτικού παράγοντα) εμφανίστηκε σε υψηλά μοριακά βάρη (>170 kDa). Το τελευταίο δικαιολογείται από τον σχηματισμό πολυμερών εξαιτίας της υδροφοβικότητας του ενζύμου. Ο συνδυασμός της γρήγορης και μεγάλης παραγωγής λιπάσης με το σύστημα *flashBAC*<sup>TM</sup> και ο καθαρισμός του μορίου σε ένα μόνο βήμα καθιστά τη συνολική διαδικασία πλεονεκτική σε χρόνο, κόστος και επίπεδα παραγωγής.

Μελετώντας τα χαρακτηριστικά του καθαρισμένου μορίου, εμφάνισε αυξημένη θερμοσταθερότητα έως τους 65 °C, σχεδόν χωρίς καμία απώλεια ενεργότητας. Η κινητική απενεργοποίησης του ενζύμου ήταν 2 τάξεων και παρατηρήθηκε ότι στις θερμοκρασίες 90 και 100 °C η λιπάση μετέπεσε ταχύτατα στην ενδιάμεση κατάσταση η οποία οδήγησε στην ανενεργό μορφή της. Χαρακτηριστικό είναι, ότι το ένζυμο εμφάνισε μεγαλύτερη θερμοσταθερότητα στο ακατέργαστο ενζυμικό δείγμα καθώς επίσης και έπειτα από την παραγωγή του από το στέλεχος φυσικού τύπου. Αυτό σχετίστηκε με το γαλάκτωμα στο οποίο βρίσκεται εν διαλύσει το καθαρό ένζυμο το οποίο το διατήρησε στη μονομερή του κατάσταση (Salameh and Wiegel, 2010) που θεωρείται πιο ευάλωτη στην απενεργοποίηση. Η άριστη θερμοκρασία δράσης της καθαρής λιπάσης ήταν οι 65 °C ενώ του ακατέργαστου ενζυμικού δείγματος οι 70 °C. Η διαφορά αυτή αιτιολογείται από τα πρότυπα θερμοσταθερότητας των δύο δειγμάτων.



Όσον αφορά στο pH, η λιπάση εμφανίστηκε αρκετά σταθερή σε ένα ευρύ φάσμα τιμών και ως άριστη τιμή δράσης ήταν το 9, όπως και στο στέλεχος φυσικού τύπου. Αρκετές θερμοσταθερές λιπάσες των γενών *Bacillus* και *Geobacillus* εμφανίζουν αλκαλοφιλία (Leow et al., 2004, Quintana-Castro et al., 2009, Jiang et al., 2010, Shariff et al., 2011) γεγονός που δικαιολογείται από την αντικατάσταση της γλυκίνης με αργινίνη (θετικά φορτισμένο αμινοξύ) στο χαρακτηριστικό καταλυτικό τους πενταπεπτίδιο (Jaeger et al., 1994). Η ταυτόχρονη επώαση του ενζυμικού δείγματος σε υψηλή θερμοκρασία και σε αλκαλικό pH οδήγησε στην γρήγορη απενεργοποίηση του εξαιτίας της αλκαλικής λύσης των πεπτιδικών δεσμών και της αποδόμησης του μορίου.

Η θερμοφιλή λιπάση του στελέχους SP22 (*Geobacillus* sp.) εμφανίστηκε αρκετά σταθερή παρουσία διαφορετικών οργανικών διαλυτών. Η μοναδική περίπτωση σημαντικής απώλειας ενζυμικής δράσης εμφανίστηκε στην ισοβουτανόλη. Ωστόσο σε όλες τις περιπτώσεις η μείωση στη λιπολυτική ενεργότητα ήταν αντιστρεπτή κατά την αφαίρεση του διαλύτη από το πρωτεϊνικό περιβάλλον. Η σύγκριση της σταθερότητας του μορίου στην καθαρή και ακατέργαστη μορφή εμφάνισε το ίδιο πρότυπο με την απενεργοποίηση του μορίου από θερμοκρασία. Δηλαδή, η επίδραση των διαλυτών στο ακατέργαστο ενζυμικό δείγμα όχι μόνο δεν ήταν ανασταλτική αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις ενισχύθηκε η δράση του. Το παραπάνω πιστοποίησε την υπόθεση σχηματισμού ενζυμικών πολυμερών που προστατεύουν την απενεργοποίηση του ενζύμου όταν αυτό βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα όπως στο ακατέργαστο δείγμα. Η παρουσία οργανικών διαλυτών σε συστήματα αντιδράσεων που συμμετέχουν λιπολυτικά ένζυμα εμφανίζει πλεονέκτημα συγκριτικά με τη χρήση ανόργανων συστατικών ή νερού εξαιτίας της αυξημένης διαλυτότητας των υποστρωμάτων, της εύκολης ανάκτησης των προϊόντων καθώς και της δυνατότητας σύνθεσης εστερικών δεσμών (Zhang et al., 2009α, Zhang et al., 2009β). Έχει παρατηρηθεί ότι οι λιπάσες που εμφανίζουν σταθερότητα στους οργανικούς διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη σύνθεση βιοπολυμερών, σε αντιδράσεις τρανς-εστεροποίησης και στην παραγωγή βιοντήζελ (Singh and Singh, 2010).

Η παρουσία συμπαραγόντων για τη δράση των λιπασών συνήθως δεν είναι αναγκαία, όμως σε αρκετές περιπτώσεις τα δισθενή κατιόντα όπως το ασβέστιο φαίνεται να ενισχύουν τη δράση ή τη σταθερότά τους. Η ενίσχυση αυτή συμβαίνει είτε εξαιτίας του σχηματισμού αλάτων μεταξύ του ασβεστίου και των μακράς αλυσίδας λιπαρών οξέων είτε εξαιτίας των δομικών αλλαγών που υπόκειται το μόριο έπειτα από την πρόσδεση του κατιόντος (Macrae and Hammond, 1985, Gupta et al., 2004β, Sangeetha et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη, η υπερεκφρασμένη λιπάση εμφάνισε αύξηση ενεργότητας παρουσία ασβεστίου ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση από το νάτριο, το κάλιο, το κοβάλτιο και το μαγγάνιο. Η προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου τελικής συγκέντρωσης 10 mM στο ρυθμιστικό διάλυμα εκτίμησης της ενζυμικής δράσης οδήγησε σε διπλάσιες τιμές ενεργότητας. Η εξάρτηση του ενζύμου από το ασβέστιο πιστοποιείται επίσης και από την ολοκληρωτική απώλεια δράσης του παρουσία του χηλικού παράγοντα EDTA (μεταλλοένζυμο). Επίσης, ανασταλτική δράση εμφανίστηκε παρουσία της επιφανειοδραστικής ένωσης SDS, αρκετά σύνηθες σε τέτοιου είδους μόρια (Kim et al., 1998, Ebrahimpour et al., 2011, Tayyab et al., 2011). Τέλος, οι γαλακτωματοποιητές Triton X-100 και Tween 20 ενίσχυσαν ελαφρώς την ενζυμική δράση.

Ολοκληρώνοντας το χαρακτηρισμό της λιπάσης, μελετήθηκε η δράση της έναντι ψευδοϋποστρώματων με λιπαρά οξέα διαφορετικών αλυσίδων. Η λιπάση εμφάνισε μεγαλύτερη συγγένεια με το καπρυλικό οξύ (8 άτομα άνθρακα) και μεγαλύτερη ταχύτητα αντίδρασης στη διάσπαση εστέρων με παλμιτικό οξύ (16 άτομα άνθρακα). Ωστόσο, η μέγιστη αποδοτικότητα του μορίου εντοπίστηκε κατά την υδρόλυση του ψευδοϋποστρώματος με λαυρικό οξύ (12 άτομα άνθρακα). Η μεγάλη υδρολυτική απόδοση του ενζύμου σε εστέρες λαυρικού οξέος συμφωνεί και με τη μελέτη της βιοσύνθεσης του από το στέλεχος φυσικού τύπου, καθώς κατά την ανάπτυξη παρουσία Tween 20 (εστέρας λαυρικού οξέος) εμφάνιστηκαν οι υψηλότερες εξωκυτταρικές ενεργότητες λιπάσης. Γενικά, οι λιπάσες του γένους *Geobacillus* εμφανίζουν συγγένεια με υποστρώματα αλυσίδας 8-16 ατόμων άνθρακα (Schmidt-Dannert et al., 1994, Cho et al., 2000, Lee et al., 2001).

Συνοψίζοντας, το σύστημα *flashBAC*<sup>TM</sup>, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία για υπερέκφραση θερμοφιλης βακτηριακής λιπάσης, εμφάνισε εξαιρετικά αποτελέσματα τόσο σε επίπεδα ειδικής ενζυμικής ενεργότητας όσο και σε πρωτεϊνική διαλυτότητα. Μάλιστα, ο εμπλουτισμός της ειδικής ενζυμικής ενεργότητας σε σύγκριση με το στέλεχος φυσικού τύπου και το ετερόλογο βακτηριακό σύστημα εμφανίστηκε να είναι ο υψηλότερος που έχει αναφερθεί διεθνώς. Ο ακόλουθος χαρακτηρισμός της υπερεκφρασμένης λιπάσης ανέδειξε έναν εξαιρετικό συνδυασμό βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμων ιδιοτήτων (θερμοσταθερότητα, αλκαλοφιλία, σταθερότητα στους οργανικούς διαλύτες) ανοίγοντας ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών.

Στην παρούσα εργασία, διαπιστώθηκε τέλος και η ικανότητα της θερμοσταθερής λιπάσης να καταλύει την αντίδραση εστεροποίησης της τυροσόλης παρουσία ιοντικών υγρών. Η τυροσόλη είναι ένα μονοφαινολικό αντιοξειδωτικό που εντοπίζεται σε μεγάλες ποσότητες στο ελαιόλαδο και δύναται να εξαχθεί από τα ελαιουργικά απόβλητα (Fki et al., 2005). Η αποτελεσματικότητα της έχει πιστοποιηθεί πειραματικά στην αναστολή της οξείδωσης της LDL χοληστερόλης (Marrugat et al., 2004) και στη μείωση των δυσάρεστων συνεπειών αυτής (Giovannini et al., 1999), στην αποφυγή συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Plotnikov et al., 2007), στην πρόληψη αρρυθμιών και ισχαιμιών και στη γρηγορότερη καρδιακή επαναιμάτωση (Chernyshova et al., 2007). Τα λιπόφιλα παράγωγα της τυροσόλης και, ιδιαίτερα, οι εστέρες άκυλο-αλυσίδων εμφανίζουν καλύτερη συγγένεια με τα επίσης λιπόφιλα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Για τον λόγο αυτό, τα εστεροποιημένα παράγωγα της τυροσόλης εμφανίζουν πλήθος εφαρμογών στο πεδίο των φαρμάκων και των προϊόντων αντιγήρανσης (Fragoroulou et al., 2007). Οι λιπάσες εμφανίζουν την ικανότητα σύνθεσης λιπόφιλων εστέρων τυροσόλης μέσω τρανς-εστεροποίησης και οδηγούν σε παράγωγα διαφορετικού μήκους αλυσίδας (Aissa et al., 2007, Mateos et al., 2008) για τα οποία αναφέρθηκε πρόσφατα και η αντιμικροβιακή τους δράση (Aissa et al., 2012).

Η υπερεκφρασμένη, με το σύστημα *flashBAC*<sup>TM</sup>, θερμοσταθερή λιπάση του στελέχους *Geobacillus* SP22 εμφάνισε ικανότητα σύνθεσης λιπόφιλων εστέρων της τυροσόλης με το βουτυρικό οξύ σε ιοντικά υγρά. Τα ιοντικά υγρά θεωρούνται εναλλακτικοί «πράσινοι» διαλύτες σε διεργασίες μη υδατικής βιοκατάλυσης και συγκεντρώνουν πλεονεκτήματα έναντι των οργανικών διαλυτών καθότι δεν είναι πτητικοί ή εύφλεκτοι και εμφανίζουν χημική και θερμική σταθερότητα. Επίσης, σπουδαίο πλεονέκτημα έναντι των συμβατικών οργανικών διαλυτών θεωρείται η

δυνατότητα πολυάριθμων συνδυασμών στην επιλογή των υποκαταστατών (κατιόντα ή ανιόντα, οργανικοί ή ανόργανοι) η οποία επιφέρει διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά στα προκύπτοντα ιοντικά υγρά όπως πολικότητα, υδροφοβικότητα, ιξώδες και δυνατότητα ανάμιξης με οργανικούς διαλύτες (Yang and Pan, 2005). Επιπλέον, τα ένζυμα παρουσία ιοντικών υγρών εμφανίζουν αυξημένη ενεργότητα, σταθερότητα και εξειδίκευση έναντι του υποστρώματος το οποίο επιδεικνύει καλύτερη διαλυτότητα (Moon et al., 2006).

Η απόδοση της αντίδρασης εστεροποίησης από την υπερεκφρασμένη λιπάση εμφάνισε εξάρτηση τόσο από τη φύση του ιοντικού υγρού όσο και από την κατάσταση του ενζυμικού δείγματος (λυοφιλιωμένο ή ακινητοποιημένη λιπάση σε Celite). Η ακινητοποίηση του ενζύμου σε αδρανή φορέα αυξάνει κατά 30 % την απόδοση της βιοκατάλυσης συγκριτικά με το λυοφιλιωμένο ένζυμο. Αυτό ενδεχομένως σχετίζεται από την αύξηση της σταθερότητας του ενζυμικού μορίου εξαιτίας της ακινητοποίησης του, που αποτρέπει την απενεργοποίηση και ενισχύει τη δραστηριότητά του (Moon et al., 2006). Η απόδοση της αντίδρασης μετά από 72 ώρες επώασης στους 50 °C πλησιάζει το 80% στην περίπτωση όπου χρησιμοποιείται ακινητοποιημένο ένζυμο σε [bmim]PF<sub>6</sub>. Γενικά, οι λιπάσες επιδεικνύουν αυξημένη ενεργότητα και σταθερότητα στο υδρόφοβο ιοντικό υγρό [bmim]PF<sub>6</sub> έναντι του υδρόφιλου -BF<sub>4</sub> (Nara et al., 2002, Kaar et al., 2003, Sunitha et al., 2007, Xue et al., 2012). Συνεπώς, η ικανότητα της θερμοσταθερής λιπάσης να καταλύει αντιδράσεις ακυλίωσης σε ιοντικά υγρά είναι παρόμοια με αυτή που έχει παρατηρηθεί πρόσφατα με διάφορα εμπορικά σκευάσματα.

## ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία συνοψίζονται στα εξής:

1. Τα 101 θερμοφιλά βακτηριακά στελέχη, απομονωθέντα από το ηφαιστειακό σύμπλεγμα της Σαντορίνης, ομαδοποιήθηκαν με βάση το BOX PCR αποτύπωμά τους. Η σύγκριση των ραβδωτών κωδικών τους κατέληξε στον σχηματισμό δενδρογράμματος αναδεικνύοντας τη μεγάλη ποικιλότητα εντός γένους και είδους στο φυσικό αυτό ενδιαίτημα ακραίων συνθηκών.
2. Η εκτίμηση του κυτταρινολυτικού, ξυλανολυτικού και λιπολυτικού δυναμικού του συνόλου των βακτηριακών στελεχών εμφάνισε ποικιλία καταβολικών μονοπατιών και ανέδειξε μικροοργανισμούς και ένζυμα με υψηλή υδρολυτική αποδοτικότητα.
3. Ο ποιοτικός προσδιορισμός του ξυλανολυτικού και κυτταρινολυτικού δυναμικού των απομονωθέντων βακτηρίων ανέδειξε 15 στελέχη με υψηλή υδρολυτική ικανότητα. Από αυτά, το στέλεχος SP24 (#NCBI-JN692241) εμφάνισε ταυτόχρονη έκκριση ένδο- ξυλανάσης και κυτταρινάσης καθώς και β-ξυλοζιδάσης και β-γλυκοζιδάσης και επιλέχθηκε για τη μελέτη της βιοσύνθεσης των υδρολασών βιομάζας. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών ενζυμικής παραγωγής του επιλεγμένου στελέχους κατέληξε στο πίτυρο σίτου, ως βασική πηγή άνθρακα, και στην ξυλάνη σημύδας, ως συμπληρωματική επαγωγική πηγή, μειώνοντας το συνολικό κόστος της βιοδιεργασίας. Επίσης, η παροχή οξυγόνου (αερισμός) κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας επηρέασε τόσο το ρυθμό μικροβιακής αύξησης όσο και την ενζυμική βιοσύνθεση. Συγκεκριμένα,

στα 3 υπό μελέτη υδρολυτικά ένζυμα (εκτός της β-γλυκοζιδάσης) αυξήθηκαν τα επίπεδα παραγωγής τους αναλογικά με την παροχή οξυγόνου.

4. Η ανίχνευση ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης από στέλεχος *Geobacillus* πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά βιβλιογραφικά στην παρούσα εργασία και εμφάνισαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον οι συνθήκες επαγωγής της (άμυλο και αναερόβιες συνθήκες).
5. Η μελέτη της τοπολογίας των υδρολασών βιομάζας του στελέχους SP24 (#NCBI-JN692241) πιστοποίησε την εξωκυτταρική παρουσία της ένδοκυτταρινάσης και ένδο-ξυλανάσης ενώ η β-γλυκοζιδάση καθώς και η β-ξυλοζιδάση εντοπίστηκαν στο κυτταρόπλασμα κατά την εκθετική φάση της μικροβιακής αύξησης.
6. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της λιπολυτικής δράσης των απομονωθέντων βακτηρίων οδήγησε στην επιλογή 9 στελεχών με υψηλό υδρολυτικό δυναμικό. Η μελέτη της βιοσύνθεσης των λιπολυτικών ενζύμων σε διαφορετικές πηγές άνθρακα ανέδειξε το Tween 20 και την τριβουτυρίνη ως τους καλύτερους επαγωγείς. Ακολούθησε η μερική απομόνωση των λιπασών και η διερεύνηση των βιοχημικών χαρακτηριστικών τους. Όλες οι λιπάσες εμφάνισαν υψηλές θερμοκρασίες δράσης (>80 °C), αλκαλοφιλία και εξαιρετική θερμική αντοχή. Μάλιστα, για πρώτη φορά μελετήθηκε εκτενώς ο μηχανισμός θερμικής απενεργοποίησης των θερμοφίλων λιπασών ο οποίος ακολούθησε κινητική 2 τάξεων.
7. Η λιπάση του στελέχους SP22 (#NCBI-JQ808133) εμφάνισε αυξημένη σταθερότητα και αλκαλοφιλία και επιλέχθηκε για υπερέκφραση του γονιδίου της σε μεσόφιλα συστήματα. Η απομόνωση και ανάλυση της αλληλουχίας του υπεύθυνου γονιδίου εμφάνισε ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1251 ζ.β. και η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης ανέδειξε τη χαρακτηριστική, για την υποοικογένεια των λιπασών I.5, καταλυτική περιοχή της σερίνης. Ακολούθησε η υπερέκφραση του γονιδίου της λιπάσης σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές *E.coli* και η αριστοποίηση των συνθηκών επαγωγής. Σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίστηκαν προβλήματα πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης σε συνθήκες υψηλής μεταγραφικής ικανότητας και σχετίστηκε με τα βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μορίου όπως η υδροφοβικότητά του.
8. Η ανάγκη εύρεσης ενός πιο αποδοτικού συστήματος υπερέκφρασης οδήγησε στην επιλογή του συστήματος *flashBAC*<sup>TM</sup>. Το εν λόγω σύστημα ουδέποτε έχει χρησιμοποιηθεί για την υπερέκφραση βακτηριακής λιπάσης και οι αναφορές για θερμοσταθερές πρωτεΐνες είναι ελάχιστες. Τα αποτελέσματα ήταν εξαιρετικά καθότι τα επίπεδα ειδικής ενζυμικής ενεργότητας ήταν έως και 10000 φορές υψηλότερα από το στέλεχος φυσικού τύπου και ενισχυμένα κατά 5000 φορές από το ετερόλογο προκαρυωτικό σύστημα έκφρασης.
9. Η αριστοποίηση των συνθηκών παραγωγής της υπερεκφρασμένης λιπάσης από τα μολυσμένα Sf9 κύτταρα οδήγησε στην παραλαβή μεγάλης ποσότητας διαλυτής λιπάσης σε χρονικό διάστημα 48 ωρών απουσία οποιουδήποτε επαγωγέα. Ακολούθησε ο καθαρισμός της υπερεκφρασμένης λιπάσης σε ένα μόνο χρωματογραφικό βήμα. Η λιπάση παρελήφθη σε ηλεκτροφορητικά καθαρή μορφή έπειτα από τη μη εξειδικευμένη πρόσδεση της σε ρητίνη και την ακόλουθη έκλυση αυτής σε διάλυμα με Triton και κόμμι.

10. Η υπερεκφρασμένη λιπάση χαρακτηρίστηκε πλήρως και εμφάνισε αξιόλογες βιοτεχνολογικές ιδιότητες όπως: θερμοσταθερότητα, υψηλή θερμοκρασία δράσης, αλκαλοφιλία και σταθερότητα έναντι οργανικών διαλυτών. Επίσης εμφάνισε συγγένεια με υποστρώματα λιπαρών οξέων με 8-16 άτομα άνθρακα και ενίσχυση της δράσης της παρουσία ασβεστίου.
11. Στην παρούσα εργασία, διαπιστώθηκε επιπλέον η ικανότητα της υπερεκφρασμένης λιπάσης να καταλύει την αντίδραση εστεροποίησης του μονοφαινολικού αντιοξειδωτικού τυροσόλη, σε περιβάλλον ιοντικών υγρών. Η απόδοση της συνθετικής αντίδρασης εμφάνισε εξάρτηση τόσο από τη φύση του ιοντικού υγρού όσο και από την κατάσταση του ενζυμικού δείγματος (ακίνητοποιημένη ή λυοφιλιωμένη λιπάση) και συγκρίνεται με διάφορα εμπορικά σκευάσματα.



## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1-1</b> Φυλογενετικό δέντρο των γεωβακίλλων βασισμένο στις 16S rRNA γονιδιακές ευθυγραμμίσεις	29
<b>Εικόνα 1-2</b> Πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικής ποικιλότητας, ενζυμικής δραστηριότητας, ταξινομικής και λειτουργικής ποικιλότητας (Kandeler et al., 1996)	34
<b>Εικόνα 1-3</b> Η καταλυτική δράση των λιπασών.	35
<b>Εικόνα 1-4</b> (Α) Εμφάνιση ανενεργούς λιπάσης με κάλυψη του ενεργού κέντρου από το αμφίφιλο πεπτίδιο (Β) Εμφάνιση λιπάσης στην ενεργό μορφή (Γ) Διεπιφανειακή ενεργοποίηση λιπάσης.	36
<b>Εικόνα 1-5</b> (Α) Υδρόλυση των τριών εστερικών δεσμών του τριγλυκεριδίου με τον ίδιο ρυθμό από μη εξειδικευμένη λιπάση (Β) Υδρόλυση των ακραίων εστερικών δεσμών στο σκελετό του τριγλυκεριδίου από λιπάση με εξειδίκευση sn-1,3.	41
<b>Εικόνα 1-6</b> Ενζυμική τρανσεστεροποίηση προς παραγωγή βιοντήζελ	48
<b>Εικόνα 1-7</b> Χημική και τρισδιάστατη δομή της κυτταρίνης, βασική μονάδα της οποίας είναι ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη	49
<b>Εικόνα 1-8</b> Μοριακή δομή κυτταρίνης και καρβό-ξυμέθυλ-κυτταρίνης	50
<b>Εικόνα 1-9</b> Κυτταρινολυτικός μηχανισμός του <i>T. reesei</i> . Η κυτταρινάση αποτελείται από την υπομονάδα πρόσδεσης στην κυτταρίνη (CBM), από τον πολυσύνδεσμο και από την καταλυτική περιοχή (CD). Το προϊόν της διάσπασης είναι η κελλοβιόζη.	51
<b>Εικόνα 1-10</b> Σχηματική απεικόνιση συνεργιστικής υδρόλυσης άμορφης και κρυσταλλικής κυτταρίνης από απλά (Α) και σύνθετα (Β) κυτταρινολυτικά συστήματα	52
<b>Εικόνα 1-11</b> Βασική δομή του σκελετού της ξυλάνης	59
<b>Εικόνα 1-12</b> Ξυλανολυτικό ενζυμικό σύστημα.	61
<b>Εικόνα 1-13</b> Συνεργιστική ενζυμική υδρόλυση αραβινοξυλάνης.	63
<b>Εικόνα 1-14</b> Υποθετικός μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης του μικροβιακού ξυλανολυτικού συστήματος.	64
<b>Εικόνα 1-15</b> Το σύστημα γονιδιακής υπερέκφρασης T7.	71
<b>Εικόνα 1-16</b> Εμφάνιση ιών του γένους <i>Granulovirus</i> (GVs)	73
<b>Εικόνα 1-17</b> Εμφάνιση ιών του γένους <i>Nucleopolyhedrovirus</i> με πολλαπλά νουκλεοκαψίδια	73
<b>Εικόνα 1-18</b> Εμφάνιση της εξωκυττάριας (Budded virus) καθώς και της περιβαλλοντικής μορφής του ιού (Derived virus).	74
<b>Εικόνα 1-19</b> Διφασικός τύπος αντιγραφής των βακυλοϊών	75
<b>Εικόνα 1-20</b> Πορεία δημιουργίας ανασυνδυασμένου ιού	80
<b>Εικόνα 1-21</b> Δημιουργία ανασυνδυασμένων ιών με το σύστημα flashBAC	80
<b>Εικόνα 2-1</b> Ποιοτικός προσδιορισμός ξυλανάσης έπειτα από χρώση με ερυθρό του Κονγκό Α: απουσία ζώνης αποχρωματισμού Β: Εμφάνιση ζώνης αποχρωματισμού - ένδειξη ενζυμικής υδρόλυσης ξυλάνης	90
<b>Εικόνα 2-2</b> Ποιοτικός προσδιορισμός λιπάσης. Εμφάνιση φθορισμού κατά την παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ένδειξη λιπολυτικής ενεργότητας του αντίστοιχου στελέχους.	90
<b>Εικόνα 2-3</b> Υδρόλυση pNPX από τη β-ξυλοζιδάση	93
<b>Εικόνα 2-4</b> Υδρόλυση pNPP παρουσία λιπάσης.	93
<b>Εικόνα 2-5</b> Ζώνη χρωματικής αλλαγής του ερυθρού του μεθυλίου εξαιτίας πτώσης του pH, που αποτελεί ένδειξη λιπολυτικής δράσης του μικροοργανισμού	97
<b>Εικόνα 2-7</b> Χάρτης του πλασμιδίου pET15b.	104
<b>Εικόνα 2-6</b> Χάρτης του πλασμιδίου pBluescript II SK	104

<b>Εικόνα 2-8</b> Πλασμιδιακός χάρτης του <i>pOET1</i>	117
<b>Εικόνα 2-9</b> Παρατήρηση σχηματισμού πλακών από ανασυνδυασμένο βακυλοϊό	123
<b>Εικόνα 2-10</b> Χημική δομή τυροσόλης.	128
<b>Εικόνα 3-1</b> Δενδρόγραμμα με το σύνολο των 101 θερμοφίλων βακτηριακών στελεχών, με βάση το BOX PCR αποτύπωμα τους (TREECON software, neighbor-joining method) και ομαδοποίηση σε 3 ομάδες Α, Β και Γ. Στο δέντρο τοποθετήθηκε ως ρίζα το SP1. Οι τιμές bootstrap εκφράζονται ως ποσοστό στις 100 επαναλήψεις.	130
<b>Εικόνα 3-2</b> Ποσοστιαία ποιοτική εκτίμηση ζυλανολυτικής και κυτταρινολυτικής ικανότητας θερμοφίλων βακτηρίων.	131
<b>Εικόνα 3-3</b> Φυλογενετικό δέντρο των 15 επιλεγμένων στελεχών για την κυτταρινολυτική και ζυλανολυτική τους δράση. (MEGA5 software, neighbor-joining method). Οι τιμές bootstrap εκφράζονται ως ποσοστό στις 100 επαναλήψεις.	135
<b>Εικόνα 3-4</b> Ποσοτική εκτίμηση ενζυμικής ενεργότητας στο εξωκυτταρικό υγρό έπειτα από υγρή καλλιέργεια με μοναδική πηγή άνθρακα το πίτυρο στα 15 επιλεγμένα στελέχη (2 και 7 ημέρες). Επιλογή στελέχους SP24 εξαιτίας της ικανότητας ταυτόχρονης έκκρισης και των 4 υδρολυτικών ενζύμων σε ικανοποιητικά επίπεδα (ανάλογη συμπεριφορά και στις στερεές καλλιέργειες).	139
<b>Εικόνα 3-5</b> Επίδραση πρόσθετων πηγών άνθρακα και αζώτου στο βασικό υπόστρωμα με πίτυρο (μάρτυρας) στην ενζυμική παραγωγή κυτταρινάσης, ζυλανάσης, β-ζυλοζιδάσης και β-γλυκοζιδάσης σε κλειστές καλλιέργειες του στελέχους SP24 (δείγματα 8, 24, 48 και 72 ωρών). Οι ενζυμικές ενεργότητες προκύπτουν από το μέσο όρο τριπλών καλλιεργειών για την κάθε συνθήκη.	140
<b>Εικόνα 3-6</b> Μέγιστη σχετική ενζυμική ενεργότητα έπειτα από επιπλέον προσθήκη διαφορετικών πηγών άνθρακα και αζώτου (0,125 % w/v) στο βασικό υπόστρωμα BMI (πίτυρο 2 % w/v). Το 100% αντιστοιχεί στην καλλιέργεια μάρτυρα, με πίτυρο ως μοναδική πηγή. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριπλών καλλιεργειών και στην εικόνα εμφανίζονται οι γραμμές σφάλματος ( $\pm$ SD).	141
<b>Εικόνα 3-7</b> Καμπύλες αύξησης των κλειστών καλλιεργειών (βιοαντιδραστήρας) του στελέχους SP24 σε διαφορετικές συνθήκες αερισμού (0, 0,15, 0,37 και 0,6 vvm). Η συγκέντρωση βιομάζας εκφράζεται σε cfu/mL και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση ( $\pm$ SD) από τουλάχιστον 3 τρυβλία (όχι απαραίτητα ίδιας αραίωσης).	142
<b>Εικόνα 3-8</b> Συνολική ενζυμική παραγωγή στην πορεία του χρόνου σε βιοαντιδραστήρες διαφορετικών συνθηκών παροχής οξυγόνου. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριπλών εκτιμήσεων, εμφανίζοντας μικρό σφάλμα (τυπική απόκλιση <5 %). Α. Κυτταρινάση, Β. Ξυλανάση, Γ. β-γλυκοζιδάση, Δ. β-ζυλοζιδάση.	143
<b>Εικόνα 3-9</b> Τοπολογία υδρολυτικών ενζύμων σε καλλιέργειες διαφορετικού αερισμού (0,15, 0,37 και 0,6 vvm), εκφρασμένη σε ποσοστό % της συνολικής ενζυμικής ενεργότητας. Τα χρονικά σημεία αντιστοιχούν στην εκθετική φάση αύξησης (24 ώρες) και στο τέλος της φάσης στασιμότητας (50 ώρες). Με μαύρο απεικονίζεται το εξωκυτταρικό κλάσμα, με σκούρο γκρι το ενδοκυτταρικό, με ανοιχτό γκρι το χαλαρά προσδεμένο στις μεμβράνες και με λευκό το ισχυρά προσδεμένο στις μεμβράνες κλάσμα.	145
<b>Εικόνα 3-10</b> Εντοπισμός ενζυμικών ενεργοτήτων σε καλλιέργεια βιοαντιδραστήρα με παροχή οξυγόνου 0,6 vvm κατά την πορεία της μικροβιακής αύξησης.	146
<b>Εικόνα 3-11</b> Ενίσχυση με PCR του γονιδίου ένδο-κυτταρινάσης στα 15 θερμοφιλά στελέχη.	148
<b>Εικόνα 3-12</b> Θετική ενίσχυση με PCR του γονιδίου ένδο-ζυλανάσης.	148



- Εικόνα 3-13** Ποσοστιαίος ποιοτικός προσδιορισμός λιπάσης στο σύνολο των θερμόφιλων βακτηριακών στελεχών σε στερεές καλλιέργειες 24 και 48 ωρών. \_\_\_\_\_ 149
- Εικόνα 3-14** Ποσοστιαίος ποσοτικός προσδιορισμός λιπάσης στο σύνολο των θερμόφιλων βακτηριακών στελεχών σε υγρές καλλιέργειες 24 και 72 ωρών. \_\_\_\_\_ 149
- Εικόνα 3-15** Φυλογενετικό δέντρο με βάση τα ενισχυμένα τμήματα 16S rDNA από τα επιλεγμένα λιπολυτικά στελέχη και τα αντίστοιχα γονιδια των φυλογενετικά πλησιέστερων μικροοργανισμών. (MEGA5 software, neighbor-joining method). Οι τιμές bootstrap εκφράζονται ως ποσοστό στις 100 επαναλήψεις. \_\_\_\_\_ 153
- Εικόνα 3-16** Εκτίμηση εξωκυτταρικής λιπολυτικής ενεργότητας σε υγρές καλλιέργειες των επιλεγμένων στελεχών παρουσία διαφορετικής πηγής άνθρακα. \_\_\_\_\_ 154
- Εικόνα 3-17** Καμπύλη αύξησης και έκκρισης εξωκυτταρικής λιπάσης κλειστής καλλιέργειας του στελέχους SP29 παρουσία ελαιολάδου ως πηγή άνθρακα. Με μαύρη γραμμή απεικονίζεται η οπτική απορρόφηση στα 600 nm και με γκρι η ενζυμική ενεργότητα σε U/mL. \_\_\_\_\_ 156
- Εικόνα 3-18** Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δράση των μερικώς καθαρισμένων λιπασών στα 9 επιλεγμένα θερμόφιλα στελέχη. \_\_\_\_\_ 157
- Εικόνα 3-19** Επίδραση του pH στην ενεργότητα των μερικώς καθαρισμένων λιπασών από τα 9 επιλεγμένα στελέχη (A): ▲, SP14; ●, SP22; □, SP29. (B): ▲, SP73; ●, SP75; □, SP76. (C): ▲, SP79; ●, SP83; □, SP93. \_\_\_\_\_ 158
- Εικόνα 3-20** Θερμοσταθερότητα των 9 μερικώς καθαρισμένων λιπασών στους 70 °C (△), 80 °C (▲), 90 °C (□) και 100 °C (■). \_\_\_\_\_ 162
- Εικόνα 3-21** Ενίσχυση εσωτερικού τμήματος γονιδίου θερμοσταθερής λιπάσης στα οχτώ από τα εννέα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη (PCR με ολιγονουκλεοτίδια '5 Lip+300 και '3 Lip+1270). \_\_\_\_\_ 164
- Εικόνα 3-22** Ενίσχυση ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης γονιδίου λιπάσης στα έξι από τα εννέα επιλεγμένα θερμόφιλα στελέχη (PCR με ολιγονουκλεοτίδια GeoLipF2-GeoLipR2). \_\_\_\_\_ 165
- Εικόνα 3-23** Έλεγχος επιτυχούς κλωνοποίησης του γονιδίου της λιπάσης (SP22) με το φορέα pBluescript σε *E. coli* DH5a. Στις πρώτες 9 θέσεις παρατηρούνται οι πέψεις ανασυνδυασμένων pBluescript με XbaI και ClaI όπου καταλήγουν στο γραμμικό πλασμίδιο και στο γονίδιο της λιπάσης και στις επόμενες 9 οι θετικές αντιδράσεις PCR για το γονίδιο της λιπάσης (1251 ζ.β.). Οι αντιδράσεις αφορούν πλασμίδια από ανθεκτικές στην αμπικιλίνη αποικίες. \_\_\_\_\_ 166
- Εικόνα 3-24** Ανάλυση αλληλουχίας κωδικής αλυσίδας γονιδίου θερμοσταθερής λιπάσης (στέλεχος SP22). Με πράσινο εμφανίζεται το κωδικόνιο έναρξης και με κόκκινο το κωδικόνιο λήξης. \_\_\_\_\_ 166
- Εικόνα 3-25** Πρωτοταγής δομή της θερμοσταθερής λιπάσης. Με μωβ χρώμα εμφανίζεται το χαρακτηριστικό πενταπεπτίδιο Ala-X-Ser-X-Gly και με μπλε τα αμινοξέα που συμμετέχουν στην καταλυτική τριάδα μαζί με τη σερίνη-141. \_\_\_\_\_ 167
- Εικόνα 3-26** Ηλεκτροφόρηση των πλασμιδίων που απομονώθηκαν από τα ανθεκτικά στην αμπικιλίνη στελέχη του *E. coli* που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό τους με τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης (ligation) του πλασμιδίου pET15b με το γονίδιο της λιπάσης \_\_\_\_\_ 168
- Εικόνα 3-27** Α. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης πλασμιδιακού DNA κλώνου 1 με NdeI και BamHI. Στη θέση 1 παρατηρείται ο κυκλικός ανασυνδυασμένος φορέας και στη θέση 2 ο γραμμικός φορέας και το γονίδιο της λιπάσης. Β. Αντίδραση PCR για το γονίδιο της λιπάσης στο πλασμιδιακό DNA του κλώνου 1. \_\_\_\_\_ 168

**Εικόνα 3-28** Μετασηματισμός σε *E. coli* και ακόλουθος ποιοτικός εντοπισμός ενζυμικής ενεργότητας σε στερεές καλλιέργειες LB-Ροδαμίνης με πηγή άνθρακα ελαιόλαδο και επιπλέον αμικιλίνη. \_\_\_\_\_169

**Εικόνα 3-29** Κινητική ετερόλογης έκφρασης θερμοσταθερής λιπάσης σε κύτταρα *E. coli* DH5a σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα (IPTG). Με καφέ μπάρες απεικονίζεται η λιπολυτική ενεργότητα στο εξωκυτταρικό και με γαλάζιο στο ενδοκυτταρικό κλάσμα. Η οπτική απορρόφηση (600nm) της καλλιέργειας απεικονίζεται για τα μη μετασηματισμένα βακτήρια με διακεκομμένη γραμμή και για τα μετασηματισμένα με γαλάζια συμπαγή γραμμή. \_\_\_\_\_170

**Εικόνα 3-30** SDS PAGE ενδοκυτταρικών κλασμάτων από καλλιέργεια μετασηματισμένων DH5a, 20 ωρών έπειτα από επαγωγή με διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG στους 37 °C. \_\_\_\_\_170

**Εικόνα 3-31** Κινητική ετερόλογης έκφρασης θερμοσταθερής λιπάσης σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα (IPTG) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης. Με καφέ μπάρες απεικονίζεται η λιπολυτική ενεργότητα (U/mL) στους 25 °C ενώ με μπλε στους 37 °C. Με καφέ γραμμή η οπτική απορρόφηση στα 600 nm στην καλλιέργεια των 25 °C ενώ με μπλε στους 37 °C. \_\_\_\_\_172

**Εικόνα 3-32** SDS PAGE ενδοκυτταρικών κλασμάτων από καλλιέργεια μετασηματισμένων BL21(DE3) στους 37 °C κατά την προσθήκη IPTG (0,5mM) και έπειτα από 6 ώρες από αυτήν. \_\_\_\_\_172

**Εικόνα 3-33** Δοκιμή διαλυτότητας λιπάσης. Α. Κατανομή της ενζυμικής ενεργότητας στο διαλυτό και στο αδιάλυτο κλάσμα σε συνθήκες επαγωγής 3 ωρών στους 25 °C από τα BL21(DE3) Β. Κατανομή της ενζυμικής ενεργότητας στο διαλυτό και στο αδιάλυτο κλάσμα σε συνθήκες επαγωγής 6 ωρών στους 25 °C από τα BL21(DE3) Γ. Κατανομή της ενζυμικής ενεργότητας στο διαλυτό και στο αδιάλυτο κλάσμα σε συνθήκες επαγωγής 3 ωρών στους 37 °C από τα BL21(DE3) Δ. Κατανομή της ενζυμικής ενεργότητας στο διαλυτό και στο αδιάλυτο κλάσμα σε συνθήκες επαγωγής 6 ωρών στους 37 °C από τα BL21(DE3). \_\_\_\_\_173

**Εικόνα 3-34** Κινητική ετερόλογης έκφρασης θερμοσταθερής λιπάσης σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3)pLysS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα (IPTG) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης. Με καφέ μπάρες απεικονίζεται η λιπολυτική ενεργότητα (U/mL) στους 25 °C ενώ με μπλε στους 37 °C. Με καφέ γραμμή η οπτική απορρόφηση στα 600 nm στην καλλιέργεια των 25 °C ενώ με μπλε στους 37 °C. \_\_\_\_\_174

**Εικόνα 3-35** SDS PAGE ενδοκυτταρικών κλασμάτων από καλλιέργεια μετασηματισμένων BL21(DE3)pLysS στους 37 °C κατά την προσθήκη IPTG 0,5mM (0 ώρες) και έπειτα από 6 ώρες. \_\_\_\_\_174

**Εικόνα 3-36** Ηλεκτροφόρηση των πλασμιδίων που απομονώθηκαν από τα ανθεκτικά στην αμικιλίνη στελέχη (12 κλώνοι) του *E. coli* που προέκυψαν από τον μετασηματισμό τους με τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης (ligation) του πλασμιδίου pOET1 με το γονίδιο της λιπάσης. \_\_\_\_\_175

**Εικόνα 3-37** Θέσεις 1 και 21: Πρότυποι Δείκτες DNA, Θέσεις 2 και 22: μη ανασυνδυνασμένο pOET1, Θέση 3,5,7,9,11,13,15,17,19,23,25,27: πέψη των κλώνων 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 αντίστοιχα με XbaI και BamHI, Θέση 4,6,8,10,12,14,16,18,20,24,26,28: PCR για το γονίδιο της λιπάσης στους κλώνους 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 αντίστοιχα. \_\_\_\_\_176

**Εικόνα 3-38** Θέση 1: Δείκτης Πρότυπων Μοριακών Βαρών DNA, Θέση 2: pOET1 (4541 ζ.β.), Θέση 3: ανασυνδυνασμένο με θερμοσταθερή λιπάση pOET1 (5792 ζ.β.) από καλλιέργεια κλώνου 1, Θέση 4: Πέψη ανασυνδυνασμένου pOET1 με XbaI και

BamHI, Θέση 5: PCR αντίδραση για λιπάση (1251 ζ.β.) σε ανασυνδυασμένο pOET1. \_\_\_\_\_176

**Εικόνα 3-39** Εκτίμηση ολικών πρωτεϊνών σε εξωκυτταρικό διάλυμα καλλιέργειας Sf9 κυττάρων μολυσμένων (διακεκομμένη γραμμή) και μη (συνεχής γραμμή) στην πορεία του χρόνου. Στο χρόνο 0 αρχίζει ο χρόνος μετά τη μόλυνση. \_\_\_\_\_178

**Εικόνα 3-40** Α. Ζυμογράφημα λιπάσης (παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία) Β. 1. Πρότυποι πρωτεϊνικοί δείκτες 2. Εξωκυτταρικό καλλιέργειας μη μολυσμένων Sf9 κυττάρων 3. Ακατέργαστο ενζυμικό δείγμα 4. Καθαρισμένη λιπάση. \_\_\_\_\_180

**Εικόνα 3-41** Καμπύλη εξάρτησης ενεργότητας θερμοσταθερής λιπάσης από το pH. Με συνεχή γραμμή απεικονίζεται το ακατέργαστο ένζυμο και με διακεκομμένη το καθαρισμένο. \_\_\_\_\_181

**Εικόνα 3-42** Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική ενεργότητα θερμοσταθερής λιπάσης. Με συνεχή γραμμή απεικονίζεται το ακατέργαστο ένζυμο και με διακεκομμένη το καθαρισμένο. \_\_\_\_\_181

**Εικόνα 3-43** Ρυθμός απενεργοποίησης θερμοσταθερής λιπάσης (ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ). Η τιμή 1 αντιστοιχεί στην ενζυμική ενεργότητα του δείγματος πριν την επώαση στην αντίστοιχη θερμοκρασία. \_\_\_\_\_182

**Εικόνα 3-44** Ρυθμός απενεργοποίησης θερμοσταθερής λιπάσης (ΚΑΘΑΡΙΣΜΕΝΟ ΔΕΙΓΜΑ). Η τιμή 1 αντιστοιχεί στην ενζυμική ενεργότητα του δείγματος πριν την επώαση στην αντίστοιχη θερμοκρασία. \_\_\_\_\_183

**Εικόνα 3-45** Ρυθμός απενεργοποίησης θερμοσταθερής λιπάσης σε θερμοκρασία 60-70 °C (ΚΑΘΑΡΙΣΜΕΝΟ ΔΕΙΓΜΑ). Η τιμή 1 αντιστοιχεί στην ενζυμική ενεργότητα του δείγματος πριν την επώαση στην αντίστοιχη θερμοκρασία. \_\_\_\_\_183

**Εικόνα 3-46** Εκτίμηση σταθερότητας λιπάσης σε διαφορετικές τιμές pH. \_\_\_\_\_184

**Εικόνα 3-47** Ρυθμός απενεργοποίησης λιπάσης σε διαφορετικές τιμές pH έπειτα από την παρέλευση 30 (διακεκομμένη γραμμή) και 60 λεπτών (συνεχής γραμμή). \_\_\_\_\_184

**Εικόνα 3-48** Ρυθμός απενεργοποίησης λιπάσης σε συνδυασμό αυξημένης θερμοκρασίας και αλκαλικού pH (συνεχής γραμμή). Με τη διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται ο ρυθμός απενεργοποίησης της λιπάσης σε διάλυμα με pH 9 αλλά θερμοκρασία περιβάλλοντος. \_\_\_\_\_185

**Εικόνα 3-49** Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου της ενζυμικής ενεργότητας της καθαρισμένης λιπάσης ως προς τη συγκέντρωση διαφορετικών ψεύδοϋποστρωμάτων [ $\blacktriangle$  rNPC,  $\blacksquare$  rNPL,  $\blacklozenge$  rNPP] για τον προσδιορισμό των θεωρητικών τιμών  $K_m$  και  $V_{max}$ . \_\_\_\_\_186

**Εικόνα 3-50** Επίδραση μεταλλικών ιόντων, επιφανειδραστικών ουσιών και χηλικών παραγόντων στην ενεργότητα της λιπάσης στο ακατέργαστο δείγμα σε διαφορετικούς χρόνους επώασης \_\_\_\_\_187

**Εικόνα 3-51** Επίδραση μεταλλικών ιόντων, επιφανειδραστικών ουσιών και χηλικών παραγόντων στην ενεργότητα της λιπάσης στο καθαρισμένο δείγμα σε διαφορετικούς χρόνους επώασης ( $\blacksquare$  0 ώρες,  $\blacksquare$  1 ώρα,  $\blacksquare$  2 ώρες). Η ενεργότητα του αφαλατωμένου δείγματος θεωρήθηκε τιμή μάρτυρας (100%) για κάθε χρόνο. \_\_\_\_\_188

**Εικόνα 3-52** Επίδραση οργανικών διαλυτών (40 % v/v) στην ενζυμική ενεργότητα λιπάσης στο ακατέργαστο δείγμα σε διαφορετικούς χρόνους επώασης ( $\blacksquare$  0 ώρες,  $\blacksquare$  1 ώρα,  $\blacksquare$  2 ώρες). Η ενεργότητα του αφαλατωμένου δείγματος θεωρήθηκε τιμή μάρτυρας (100%) για κάθε χρόνο. \_\_\_\_\_188

**Εικόνα 3-53** Επίδραση οργανικών διαλυτών (40 % v/v) στην ενζυμική ενεργότητα λιπάσης στο καθαρισμένο δείγμα σε διαφορετικούς χρόνους επώασης ( $\blacksquare$  0 ώρες,  $\blacksquare$  1

ώρα, ■ 2ώρες). Η ενεργότητα του αφαλατωμένου δείγματος θεωρήθηκε τιμή μάρτυρας (100%) για κάθε χρόνο. \_\_\_\_\_189

**Εικόνα 3-54** Επίδραση ασβεστίου στη λιπολυτική ενεργότητα καθαρισμένου δείγματος \_\_\_\_\_189

**Εικόνα 3-55** Βιοκαταλυτική διεργασία εστεροποίησης της τυροσόλης σε ιοντικά υγρά. \_\_\_\_\_191

## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Abada, E. A. (2008). "Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1." Pak J Biol Sci **11**(8): 1100-1106.
- Abdel-Fattah, Y. (2002). "Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. using Box-Behnken experimental design." Biotechnology Letters **24**: 1217-1222.
- Abdel-Fattah, Y. R., E. R. El-Helow, K. M. Ghanem and W. A. Lotfy (2007). "Application of factorial designs for optimization of avicelase production by a thermophilic *Geobacillus* isolate." Research Journal of Microbiology **2**(1): 13-23.
- Abdel-Fattah, Y. R. and A. A. Gaballa (2008). "Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli*." Microbiological Research **163**(1): 13-20.
- Abdulla, H. M. and S. A. El-Shatoury (2007). "Actinomycetes in rice straw decomposition." Waste Management **27**(6): 850-853.
- Abou-Hachem, M., F. Olsson and E. Nordberg Karlsson (2003). "Probing the stability of the modular family 10 xylanase from *Rhodothermus marinus*." Extremophiles **7**(6): 483-491.
- Adiquzel, A., K. İnan, F. Şahin, T. Arasoglu, M. Gulluce, A. O. Belduz and Ö. Baris (2011). "Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey)." Turkish Journal of Biology **35**: 267-274.
- Aguilar, C., E. Favela-Torres, G. Vinegra-González and C. Augur (2002). "Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus niger* Aa-20." Applied Biochemistry and Biotechnology **102-103**(1): 407-414.
- Ahamed, A. and P. Vermette (2010). "Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor." Biochemical Engineering Journal **49**(3): 379-387.
- Ahmad, S., M. Z. Kamal, R. Sankaranarayanan and N. M. Rao (2008). "Thermostable *Bacillus subtilis* Lipases: In Vitro Evolution and Structural Insight." Journal of Molecular Biology **381**(2): 324-340.
- Ahmed, E., T. Raghavendra and D. Madamwar (2010). "A Thermostable Alkaline Lipase from a Local Isolate *Bacillus subtilis* EH 37: Characterization, Partial Purification, and Application in Organic Synthesis." Applied Biochemistry and Biotechnology **160**(7): 2102-2113.
- Aiello, C., A. Ferrer and A. Ledesma (1996). "Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414." Bioresource Technology **57**(1): 13-18.
- Aissa, I., M. Bouaziz, H. Ghamgui, A. Kamoun, N. Miled, S. Sayadi and Y. Gargouri (2007). "Optimization of Lipase-Catalyzed Synthesis of Acetylated Tyrosol by Response Surface Methodology." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(25): 10298-10305.
- Aissa, I., R. Sghair, M. Bouaziz, D. Laouini, S. Sayadi and Y. Gargouri (2012). "Synthesis of lipophilic tyrosyl esters derivatives and assessment of their antimicrobial and antileishmania activities." Lipids in Health and Disease **11**(1): 13.

- Akbari, N., K. Khajeh, N. Ghaemi and Z. Salemi (2010). "Efficient refolding of recombinant lipase from *Escherichia coli* inclusion bodies by response surface methodology." Protein Expression and Purification **70**(2): 254-259.
- Al-Qodah, Z. (2006). "Production and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*." Biotechnology Journal **1**(7-8): 850-857.
- Alam, M. Z., N. Muhammad and M. E. Mahmat (2005). "Production of Cellulase from Oil Palm Biomass as Substrate by Solid State Bioconversion." American Journal of Applied Sciences **2**(2): 569-572.
- Alkan, H., Z. Baysal, F. Uyar and M. Dogru (2007). "Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes." Applied Biochemistry and Biotechnology **136**(2): 183-192.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." Journal of Molecular Biology **215**(3): 403-410.
- Andersson, R. E., C. B. Hedlund and U. Jonsson (1979). "Thermal Inactivation of a Heat-Resistant Lipase Produced by the Psychrotrophic Bacterium *Pseudomonas fluorescens*." Journal of dairy science **62**(3): 361-367.
- Ando, S., H. Ishida, Y. Kosugi and K. Ishikawa (2002). "Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*." Applied and Environmental Microbiology **68**(1): 430-433.
- Angenent, L. T., K. Karim, M. H. Al-Dahhan, B. A. Wrenn and R. Domínguez-Espinosa (2004). "Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater." Trends in Biotechnology **22**(9): 477-485.
- Angkawidjaja, C. and S. Kanaya (2006). "Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system." Cellular and Molecular Life Sciences **63**(23): 2804-2817.
- Anuradha, P., K. Vijayalakshmi, N. Prasanna and D. Sridevi (2007). Production and properties of alkaline xylanases from *Bacillus* sp. isolated from sugarcane fields. Bangalore, INDE, Current Science Association.
- Arpigny, J. L. and K. E. Jaeger (1999). "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties." Biochem. J. **343**(1): 177-183.
- Arroyo, M., J. M. a. Sánchez-Montero and J. V. Sinisterra (1999). "Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media." Enzyme and Microbial Technology **24**(1-2): 3-12.
- Ash, C., J. A. E. Farrow, S. Wallbanks and M. D. Collins (1991). "Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences." Letters in Applied Microbiology **13**(4): 202-206.
- Asha Poorna, C. and P. Prema (2007). "Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling." Bioresource Technology **98**(3): 485-490.
- Atlas, R. M. (1993). Handbook of Microbiology Media. Florida, CRC Press.
- Avcioglu, B., B. Eyupoglu and U. Bakir (2005). "Production and characterization of xylanases of a *Bacillus* strain isolated from soil." World Journal of Microbiology and Biotechnology **21**(1): 65-68.
- Ayres, M. D., S. C. Howard, J. Kuzio, M. Lopez-Ferber and R. D. Possee (1994). "The Complete DNA Sequence of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus." Virology **202**(2): 586-605.

- Azzaz, H. H., H. A. Murad, A. M. Kholif, M. A. Hanfy and M. H. Abdel Gawad (2012). "Optimization of Culture Conditions Affecting Fungal Cellulase Production." Research Journal of Microbiology **7**: 23-31.
- Baba, T., R. Shinke and T. Nanmori (1994). "Identification and characterization of clustered genes for thermostable xylan-degrading enzymes,  $\beta$ -xylosidase and xylanase, of *Bacillus stearothermophilus* 21." Applied and Environmental Microbiology **60**(7): 2252-2258.
- Babu, I. S. and G. H. Rao (2007). "Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in Solid State Fermentation Using Mixed Substrate." Research Journal of Microbiology **2**: 469-474.
- Bajaj, B. K., Y. P. Khajuria and V. P. Singh (2012). "Agricultural residues as potential substrates for production of xylanase from alkali-thermotolerant bacterial isolate." Biocatalysis and Agricultural Biotechnology(0).
- Bakri, Y., A. Mekaeel and A. Koreih (2011). "Influence of agitation speeds and aeration rates on the Xylanase activity of *Aspergillus niger* SS7." Brazilian Archives of Biology and Technology **54**: 659-664.
- Ball, A. S. and A. J. McCarthy (1989). "Production and properties of xylanases from actinomycetes." Journal of Applied Microbiology **66**(5): 439-444.
- Bamforth, C. W. (2009). "Current perspectives on the role of enzymes in brewing." Journal of Cereal Science **50**(3): 353-357.
- Banat, I. M., R. Marchant and T. J. Rahman (2004). "*Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **54**(6): 2197-2201.
- Banchio, C. and H. C. Gramajo (1997). "Medium- and long-chain fatty acid uptake and utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2): first characterization of a Gram-positive bacterial system." Microbiology **143**(7): 2439-2447.
- Bansal, N., R. Tewari, R. Soni and S. K. Soni (2012). "Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues." Waste Management(0).
- Bao, Q., Y. Tian, W. Li, Z. Xu, Z. Xuan, S. Hu, W. Dong, J. Yang, Y. Chen, Y. Xue, Y. Xu, X. Lai, L. Huang, X. Dong, Y. Ma, L. Ling, H. Tan, R. Chen, J. Wang, J. Yu and H. Yang (2002). "A Complete Sequence of the *T. tengcongensis* Genome." Genome Research **12**(5): 689-700.
- Başbülbul Özdemir, G. and H. Biyik (2011). "Isolation and Characterization of a Bacteriocin-Like Substance Produced by *Geobacillus toebii* Strain HBB-247." Indian Journal of Microbiology: 1-5.
- Bastawde, K. B. (1992). "Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action." World Journal of Microbiology and Biotechnology **8**(4): 353-368.
- Battan, B., J. Sharma and R. C. Kuhad (2006). "High-level xylanase production by alkaliphilic *Bacillus pumilus* ASH under solid-state fermentation." World Journal of Microbiology and Biotechnology **22**(12): 1281-1287.
- Bayer, E. A., J.-P. Belaich, Y. Shoham and R. Lamed (2004). "THE CELLULOSOMES: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides." Annual Review of Microbiology **58**(1): 521-554.
- Bayer, E. A., H. Chanzy, R. Lamed and Y. Shoham (1998). "Cellulose, cellulases and cellulosomes." Current Opinion in Structural Biology **8**: 548 - 557.
- Bayer, E. A., E. Morag and R. Lamed (1994). "The cellulosome — A treasure-trove for biotechnology." Trends in Biotechnology **12**(9): 379-386.

- Bayer, E. A., E. Setter and R. Lamed (1985). "Organization and distribution of the cellulosome in *Clostridium thermocellum*." Journal of Bacteriology **163**(2): 552-559.
- Becker, P., I. Abu-Reesh, S. Markossian, G. Antranikian and H. Märkl (1997). "Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil." Applied Microbiology and Biotechnology **48**(2): 184-190.
- Beg, Q. K., B. Bhushan, M. Kapoor and G. S. Hoondal (2000). "Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **24**(6): 396-402.
- Beg, Q. K., M. Kapoor, L. Mahajan and G. S. Hoondal (2001). "Microbial xylanases and their industrial applications: a review." Applied Microbiology and Biotechnology **56**(3): 326-338.
- Béguin, P. and J.-P. Aubert (1994). "The biological degradation of cellulose." FEMS Microbiology Reviews **13**(1): 25-58.
- Beisson, F., A. Tiss, C. Riviere and R. Verger (2000). "Methods for lipase detection and assay: a critical review." European Journal of Lipid Science and Technology **102**(2): 133-153.
- Bell, P. J. L., H. Nevalainen, H. W. Morgan and P. L. Bergquist (1999). "Rapid cloning of thermoalkalophilic lipases from *Bacillus* spp. using PCR." Biotechnology Letters **21**(11): 1003-1006.
- Berekaa, M., T. Zaghloul, Y. Abdel-Fattah, H. Saeed and M. Sifour (2009). "Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5." World Journal of Microbiology and Biotechnology **25**(2): 287-294.
- Bergquist, P. L., M. D. Gibbs, D. D. Morris, V. S. J. Te'o, D. J. Saul and H. W. Morgan (1999). "Molecular diversity of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic bacteria." FEMS Microbiology Ecology **28**(2): 99-110.
- Berner, R. A. (2003). "The long-term carbon cycle, fossil fuels and atmospheric composition." Nature **426**(6964): 323-326.
- Bertoldo, C. and G. Antranikian (2002). "Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria." Current Opinion in Chemical Biology **6**(2): 151-160.
- Bhat, M. K. (2000). "Cellulases and related enzymes in biotechnology." Biotechnology Advances **18**: 355 - 383.
- Bhat, M. K. and S. Bhat (1997). "Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications." Biotechnology Advances **15**(3-4): 583-620.
- Biely, P., M. Vršanská, M. Tenkanen and D. Kluepfel (1997). "Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties." Journal of Biotechnology **57**(1-3): 151-166.
- Bisaria, V. S. and T. K. Ghose (1981). "Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products." Enzyme and Microbial Technology **3**(2): 90-104.
- Bisaria, V. S. and M. Saroj (1989). Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. London, ROYAUME-UNI, Informa Healthcare.
- Blankenship, J. W., E. Varfolomeev, T. Goncharov, A. V. Fedorova, D. S. Kirkpatrick, A. Izrael-tomasevic, L. Phu, D. Arnott, M. Aghajan, K. Zobel, J. F. Bazan, W. J. Fairbrother, K. Deshayes and D. Vucic (2009). "Ubiquitin



- binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP21." Biochem J **417**(1): 149-160.
- Blissard, G. W. and G. F. Rohrmann (1991). "Baculovirus gp64 gene expression: analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE1." Journal of Virology **65**(11): 5820-5827.
- Blois, S. and J. Wiegel (1995). "Cellulolytic vestiges of the xylanase activity in a new strictly xylanolytic, thermophilic *Clostridium* sp." Biotechnology Letters **17**(1): 89-94.
- Bocchini, D. A., E. Gomes and R. Silva (2008). Xylanase Production by *Bacillus circulans* D1 Using Maltose as Carbon Source. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. W. S. Adney, J. D. McMillan, J. Mielenz and K. T. Klasson, Humana Press: 149-157.
- Boekema, B. K. H. L., A. Beselin, M. Breuer, B. Hauer, M. Koster, F. Rosenau, K.-E. Jaeger and J. Tommassen (2007). "Hexadecane and Tween 80 Stimulate Lipase Production in *Burkholderia glumae* by Different Mechanisms." Applied and Environmental Microbiology **73**(12): 3838-3844.
- Bok, J.-D., D. A. Yernool and D. E. Eveleigh (1998). "Purification, Characterization, and Molecular Analysis of Thermostable Cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*." Applied and Environmental Microbiology **64**(12): 4774-4781.
- Brüx, C., A. Ben-David, D. Shallom-Shezifi, M. Leon, K. Niefind, G. Shoham, Y. Shoham and D. Schomburg (2006). "The Structure of an Inverting GH43  $\beta$ -Xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its Substrate Reveals the Role of the Three Catalytic Residues." Journal of Molecular Biology **359**(1): 97-109.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**: 1-2.
- Bradoo, S., R. K. Saxena and R. Gupta (1999). "Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp." World Journal of Microbiology and Biotechnology **15**(1): 87-91.
- Brady, L., A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huge-Jensen, L. Norskov, L. Thim and U. Menge (1990). "A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase." Nature **343**(6260): 767-770.
- Braunagel, S. C. and M. D. Summers (2007). Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope.
- Brock, T. D. (1967). "Life at High Temperatures." Science **158**(3804): 1012-1019.
- Brock, T. D. and H. Freeze (1969). "*Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile." Journal of Bacteriology **98**(1): 289-297.
- Bronnenmeier, K., A. Kern, W. Liebl and W. L. Staudenbauer (1995). "Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials." Applied and Environmental Microbiology **61**(4): 1399-1407.
- Brown Jr, R. M. and I. M. Saxena (2000). "Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers." Plant Physiology and Biochemistry **38**(1-2): 57-67.
- Bruins, M., A. Janssen and R. Boom (2001). "Thermostables and their applications." Applied Biochemistry and Biotechnology **90**(2): 155-186.

- Bruseti, L., I. Malkhazova, M. Gtari, I. Tamagnini, S. Borin, M. Merabishvili, N. Chanishvili, D. Mora, F. Cappitelli and D. Daffonchio (2008). "Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography." BMC Microbiology **8**(1): 220.
- Brzozowski, A. M., U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Hüge-Jensen, S. A. Patkar and L. Thim (1991). "A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex." Nature **351**(6326): 491-494.
- Buist, G., A. N. J. A. Ridder, J. Kok and O. P. Kuipers (2006). "Different subcellular locations of secretome components of Gram-positive bacteria." Microbiology **152**(10): 2867-2874.
- Bull, A. T. (2004). Microbial Diversity and Bioprospecting, ASM Press.
- Burgess, R. (2009). Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. Methods in Enzymology. R. B. Richard and P. D. Murray, Academic Press. **Volume 463**: 259-282.
- Cadirci, B. H. and I. Yasa (2010). "An organic solvents tolerant and thermotolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* P21." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **64**(3-4): 155-161.
- Çağlayan, M. and N. Bilgin (2011). "Cloning and Sequence Analysis of Novel DNA Polymerases from Thermophilic *Geobacillus* Species Isolated from Hot Springs in Turkey: Characterization of a DNA Polymerase I from *Geobacillus kaue* Strain NB." Applied Biochemistry and Biotechnology **165**(5): 1188-1200.
- Canakci, S., Z. Cevher, K. Inan, M. Tokgoz, F. Bahar, M. Kacagan, F. A. Sal and A. O. Belduz (2012). "Cloning, purification and characterization of an alkali-stable endoxylanase from thermophilic *Geobacillus* sp. 71." World Journal of Microbiology and Biotechnology **28**(5): 1981-1988.
- Cannio, R., N. Prizito, M. Rossi and A. Morana (2004). "A xylan-degrading strain of *Sulfolobus solfataricus* isolation and characterization of the xylanase activity." Extremophiles **8**(2): 117-124.
- Cantarel, B. L., P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard and B. Henrissat (2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics." Nucleic Acids Research **37**(suppl 1): D233-D238.
- Carpentier, D. C. J., C. M. Griffiths and L. A. King (2008). "The baculovirus P10 protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection." Virology **371**(2): 278-291.
- Carré, B. and J.-M. Brillouet (1986). "Yield and composition of cell wall residues isolated from various feedstuffs used for non-ruminant farm animals." Journal of the Science of Food and Agriculture **37**(4): 341-351.
- Castro-Ochoa, L. D., C. Rodríguez-Gómez, G. Valerio-Alfaro and R. Oliart Ros (2005). "Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11." Enzyme and Microbial Technology **37**(6): 648-654.
- Cavka, A., B. Aliksson, S. Rose, W. van Zyl and L. Jönsson (2011). "Biorefining of wood: combined production of ethanol and xylanase from waste fiber sludge." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **38**(8): 891-899.

- Chakraborty, K., P. Vijayagopal, R. D. Chakraborty and K. K. Vijayan (2010). "Preparation of eicosapentaenoic acid concentrates from sardine oil by *Bacillus circulans* lipase." Food Chemistry **120**(2): 433-442.
- Chanda, S. K., E. L. Hirst, J. K. N. Jones and E. G. V. Percival (1950). "262. The constitution of xylan from esparto grass (*stipa tenacissima*, L.)." Journal of the Chemical Society (Resumed).
- Cheirsilp, B., P. Jeamjounkhaw and A. H-Kittikun (2009). "Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **59**(1-3): 206-211.
- Chen, X.-G., O. Stabnikova, J.-H. Tay, J.-Y. Wang and S. T.-L. Tay (2004). "Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus* sp. nov., from sewage sludge." Extremophiles **8**(6): 489-498.
- Chen, Y., B. Xiao, J. Chang, Y. Fu, P. Lv and X. Wang (2009). "Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor." Energy Conversion and Management **50**(3): 668-673.
- Chernyshova, G., M. Plotnikov, V. Smol'yakova, I. Golubeva, O. Aliev, T. Tolstikova, A. Krysin and I. Sorokina (2007). "Antiarrhythmic activity of n-tyrosol during acute myocardial ischemia and reperfusion." Bulletin of Experimental Biology and Medicine **143**(6): 689-691.
- Chipeta, Z., J. du Preez and L. Christopher (2008). "Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **35**(6): 587-594.
- Cho, A. R., S.-K. Yoo and E.-J. Kim (2000). "Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1." FEMS Microbiology Letters **186**(2): 235-238.
- Choi, W. C., H. K. Myung, H. S. Ro, R. R. Sang, T. K. Oh and J. K. Lee (2005). "Zinc in lipase L1 from *Geobacillus stearothermophilus* L1 and structural implications on thermal stability." FEBS Letters **579**(16): 3461-3466.
- Choo, W.-S. and E. Birch (2009). "Radical Scavenging Activity of Lipophilized Products from Lipase-Catalyzed Transesterification of Triolein with Cinnamic and Ferulic Acids." Lipids **44**(2): 145-152.
- Christakopoulos, P., P. Katapodis, E. Kalogeris, D. Kekos, B. J. Macris, H. Stamatis and H. Skaltsa (2003). "Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases." International Journal of Biological Macromolecules **31**(4-5): 171-175.
- Chung, G. H., Y. P. Lee, O. J. Yoo and J. S. Rhee (1991). "Overexpression of a thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* in *Escherichia coli*" Applied Microbiology and Biotechnology **35**(2): 237-241.
- Cihan, A., B. Ozcan, N. Tekin and C. Cokmus (2011). "Phylogenetic diversity of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolated from different geothermal regions of Turkey." World Journal of Microbiology and Biotechnology **27**(11): 2683-2696.
- Collins, T., C. Gerday and G. Feller (2005). "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases." FEMS Microbiology Reviews **29**(1): 3-23.
- Commenil, P., L. Belingheri, M. Sancholle and B. Dehorter (1995). "Purification and Properties of an Extracellular Lipase from the Fungus *Botrytis cinerea*." Lipids **30**(4): 351-356.
- Coorevits, A., A. E. Dinsdale, G. Halket, L. Lebbe, P. de Vos, A. Van Landschoot and N. A. Logan (2011). "Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*:

- emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus*; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.
- Cordeiro, C. A. M., M. L. L. Martins, A. B. Luciano and R. F. d. Silva (2002). "Production and properties of Xylanase from thermophilic *Bacillus* sp." Brazilian Archives of Biology and Technology **45**: 413-418.
- Cortez, J. M., J. Ellis and D. P. Bishop (2002). "Using Cellulases to Improve the Dimensional Stability of Cellulosic Fabrics." Textile Research Journal **72**(8): 673-680.
- Csiszár, E., A. Losonczi, B. Koczka, G. Szakács and A. Pómlényi (2006). "Degradation of Lignin-Containing Materials by Xylanase in Biopreparation of Cotton." Biotechnology Letters **28**(10): 749-753.
- Dahiya, P. and S. Purkayastha (2011). "Isolation, Screening and Production of Extracellular Alkaline Lipase from a Newly Isolated *Bacillus* sp. PD-12." Journal of Biological Sciences **11**: 381-387.
- Darnell, J. E., H. Lodish and D. Baltimore (1986). Molecular Cell Biology. New York, Scientific American Press.
- Davies, G. and B. Henrissat (1995). "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases." Structure **3**(9): 853-859.
- Davis, B. J. (1964). "DISC ELECTROPHORESIS – II METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS\*." Annals of the New York Academy of Sciences **121**(2): 404-427.
- De Faveri, D., B. Aliakbarian, M. Avogadro, P. Perego and A. Converti (2008). "Improvement of olive oil phenolics content by means of enzyme formulations: Effect of different enzyme activities and levels." Biochemical Engineering Journal **41**(2): 149-156.
- De Macario, E. C. and A. Macario (2000). "Stressors, stress and survival: overview." Frontiers in Bioscience **5**: 780-786.
- de Miguel Bouzas, T., J. Barros-Velázquez and T. G. Villa (2006). "Industrial Applications of Hyperthermophilic Enzymes: A Review." Protein & Peptide Letters **13**(7): 645-651.
- de Pascale, D., A. Cusano, F. Autore, E. Parrilli, G. di Prisco, G. Marino and M. Tutino (2008). "The cold-active Lip1 lipase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family." Extremophiles **12**(3): 311-323.
- de Vries, R. P., H. C. M. Kester, C. H. Poulsen, J. A. E. Benen and J. Visser (2000). "Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides." Carbohydrate Research **327**(4): 401-410.
- Dean, A. C. R. (1972). "Influence of environment on the control of enzyme synthesis." Journal of Applied Chemistry and Biotechnology **22**(2): 245-259.
- Demain, A. L., M. Newcomb and J. H. D. Wu (2005). "Cellulase, Clostridia, and Ethanol." Microbiology and Molecular Biology Reviews **69**(1): 124-154.
- Demirtas, M. U., A. Kolhatkar and J. J. Kilbane II (2003). "Effect of aeration and agitation on growth rate of *Thermus thermophilus* in batch mode." Journal of Bioscience and Bioengineering **95**(2): 113-117.

- Dey, D., J. Hinge, A. Shendye and M. Rao (1992). "Purification and properties of extracellular endoxylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp." Canadian Journal of Microbiology **38**(5): 436-442.
- Dhaker, A., R. Marwah, R. Damodar, D. Gupta, H. Gautam, S. Sultana and R. Arora (2011). "In vitro evaluation of antioxidant and radioprotective properties of a novel extremophile from mud volcano: implications for management of radiation emergencies." Molecular and Cellular Biochemistry **353**(1): 243-250.
- Dharmsthiti, S. and S. Luchai (1999). "Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027." FEMS Microbiology Letters **179**(2): 241-246.
- Dheeran, P., S. Kumar, Y. Jaiswal and D. Adhikari (2010). "Characterization of hyperthermostable  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus* sp. IPTN." Applied Microbiology and Biotechnology **86**(6): 1857-1866.
- Dhillon, N., S. Chhibber and M. Saxena (1985). "A constitutive endoglucanase (CMCase) from *Bacillus licheniformis*-1." Biotechnology Letters **7**(9): 695-697.
- Dhiman, S. S., J. Sharma and B. Battan (2008 $\alpha$ ). "Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: A review." BioResources **3**(4): 1377-1402.
- Dhiman, S. S., J. Sharma and B. Battan (2008 $\beta$ ). "Pretreatment processing of fabrics by alkalothermophilic xylanase from *Bacillus stearothermophilus* SDX." Enzyme and Microbial Technology **43**(3): 262-269.
- Dhiman, T. R., M. S. Zaman, R. R. Gimenez, J. L. Walters and R. Treacher (2002). "Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding." Animal Feed Science and Technology **101**(1-4): 115-125.
- Dienes, D., A. Egyházi and K. Réczey (2004). "Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases." Industrial Crops and Products **20**(1): 11-21.
- Dizge, N., C. Aydiner, D. Y. Imer, M. Bayramoglu, A. Tanriseven and B. Keskinler (2009). "Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer." Bioresource Technology **100**(6): 1983-1991.
- Doi, R. H., A. Kosugi, K. Murashima, Y. Tamaru and S. O. Han (2003). "Cellulosomes from Mesophilic Bacteria." Journal of Bacteriology **185**(20): 5907-5914.
- Domingues, F. C., J. A. Queiroz, J. M. S. Cabral and L. P. Fonseca (2000). "The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30." Enzyme and Microbial Technology **26**(5-6): 394-401.
- Dong, H., S. Gao, S.-p. Han and S.-g. Cao (1999). "Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in non-aqueous media." Biotechnology and Applied Biochemistry **30**(3): 251-256.
- Doppelbauer, R., H. Esterbauer, W. Steiner, R. M. Lafferty and H. Steinmüller (1987). "The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*." Applied Microbiology and Biotechnology **26**(5): 485-494.
- Dutta, S. and L. Ray (2009). "Production and Characterization of an Alkaline Thermostable Crude Lipase from an Isolated Strain of *Bacillus cereus*." Applied Biochemistry and Biotechnology **159**(1): 142-154.
- Ebrahimpour, A., R. N. Z. R. A. Rahman, M. Basri and A. B. Salleh (2011). "High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent

- tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM." Bioresource Technology **102**(13): 6972-6981.
- Eda, S. (1976). Xylan isolated from the stalk of *Nicotiana tabacum*, Agric. Biol. Chem. .
- Edwards, K. J., C. G. Wheat and J. B. Sylvan (2011). "Under the sea: microbial life in volcanic oceanic crust." Nat Rev Micro **9**(10): 703-712.
- Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde and E. C. Bottger (1989). "Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA." Nucl. Acids Res. **17**(19): 7843-7853.
- Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, L. H. Carreira, L. G. Ljungdahl, K. C. Kuo and C. W. Gehrke (1985). "DNA methylation in thermophilic bacteria: N4-methylcytosine, 5-methylcytosine, and N5methyladenine." Nucleic Acids Research **13**(4): 1399-1412.
- Enari, T.-M. and M.-L. Niku-Paavola (1987). "Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: is the Current Theory of the Mechanisms of Hydrolysis Valid?" Critical Reviews in Biotechnology **5**(1): 67-87.
- Enari, T. M. and P. Markkanen (1977). Production of cellulolytic enzymes by fungi Advances in Biochemical Engineering, Volume 5, Springer Berlin / Heidelberg. **5**: 1-24.
- Espinosa, E., S. Sánchez and A. Farrés (1990). "Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313." Biotechnology Letters **12**(3): 209-214.
- Felix, C. R. and L. G. Ljungdahl (1993). "The Cellulosome: The Exocellular Organelle of *Clostridium*." Annual Review of Microbiology **47**(1): 791-819.
- Feng, L., W. Wang, J. Cheng, Y. Ren, G. Zhao, C. Gao, Y. Tang, X. Liu, W. Han, X. Peng, R. Liu and L. Wang (2007). "Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(13): 5602-5607.
- Ferrato, F., F. Carriere, L. Sarda and R. Verger (1997). [16] A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. Methods in Enzymology. E. A. D. Byron Rubin, Academic Press. **Volume 286**: 327-347.
- Fki, I., N. Allouche and S. Sayadi (2005). "The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants." Food Chemistry **93**(2): 197-204.
- Fontes, C. M. G. A. and H. J. Gilbert (2010). "Cellulosomes: Highly Efficient Nanomachines Designed to Deconstruct Plant Cell Wall Complex Carbohydrates." Annual Review of Biochemistry **79**(1): 655-681.
- Fowler, T. and C. Mitchinson (2001). Mutant EGIII cellulase, DNA encoding such EGIII compositions and methods for obtaining same. US, Genencor International, Inc. (Rochester, NY). **6187732**.
- Fragopoulou, E., T. Nomikos, H. C. Karantonis, C. Apostolakis, E. Pliakis, M. Samiotaki, G. Panayotou and S. Antonopoulou (2007). "Biological Activity of Acetylated Phenolic Compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(1): 80-89.
- Freer, S. N. and R. W. Detroy (1985). "Regulation of  $\beta$ -1, 4-Glucosidase Expression by *Candida wickerhamii*." Applied and Environmental Microbiology **50**(1): 152-159.

- Fuxa, J. R. (2004). "Ecology of insect nucleopolyhedroviruses." Agriculture, Ecosystems & Environment **103**(1): 27-43.
- Gambacorta, A., A. Gliozzi and M. Rosa (1995). "Archaeal lipids and their biotechnological applications." World Journal of Microbiology and Biotechnology **11**(1): 115-131.
- García-Kirchner, O., M. Segura-Granados and P. Rodríguez-Pascual (2005). "Effect of media composition and growth conditions on production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus niger* C-6." Applied Biochemistry and Biotechnology **121**(1): 347-359.
- Gautam, S. P., P. S. Bundela, A. K. Pandey, Jamaluddin, M. K. Awasthi and S. Sarsaiya (2012). "Diversity of Cellulolytic Microbes and the Biodegradation of Municipal Solid Waste by a Potential Strain." International Journal of Microbiology **2012**.
- Gerhardt, P. (1981). Manual of methods for general bacteriology American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Ghazali, H., S. Hamidah and Y. Che Man (1995). "Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases." Journal of the American Oil Chemists' Society **72**(6): 633-639.
- Gilbert, H. J. and G. P. Hazlewood (1993). "Bacterial cellulases and xylanases." Journal of General Microbiology **139**(2): 187-194.
- Gilkes, N. R., B. Henrissat, D. G. Kilburn, R. C. Miller and R. A. Warren (1991). "Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families." Microbiological Reviews **55**(2): 303-315.
- Giovannini, C., E. Straface, D. Modesti, E. Coni, A. Cantafora, M. De Vincenzi, W. Malorni and R. Masella (1999). "Tyrosol, the Major Olive Oil Biophenol, Protects Against Oxidized-LDL-Induced Injury in Caco-2 Cells." The Journal of Nutrition **129**(7): 1269-1277.
- Gomes, J. and W. Steiner (2004). "The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes." Food Technology and Biotechnology **42**: 223 - 235.
- Gottschal, J. C. and R. A. Prins (1991). "Thermophiles: A life at elevated temperatures." Trends in ecology & evolution (Personal edition) **6**(5): 157-162.
- Granados, R. R. and K. A. Lawler (1981). In vivo pathway of Autographa californica baculovirus invasion and infection.
- Gruber, K., G. Klintschar, M. Hayn, A. Schlacher, W. Steiner and C. Kratky (1998). "Thermophilic Xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: High-Resolution X-ray Structure and Modeling Studies†,‡." Biochemistry **37**(39): 13475-13485.
- Guarino, L. A., B. Xu, J. Jin and W. Dong (1998). "A Virus-Encoded RNA Polymerase Purified from Baculovirus-Infected Cells." Journal of Virology **72**(10): 7985-7991.
- Guérin, L., D.-H. Sutter, A. Demois, M. Chereau and G. Trandafir (2009). "Determination of Activity Profiles of the Main Commercial Enzyme Preparations Used in Winemaking." American Journal of Enology and Viticulture **60**(3): 322-331.
- Gunasekaran, V., S. M. Kotay and D. Das (2006). "Alkaline lipase production by *Citrobacter freundii* IIT-BT L139. ." Indian Journal of Experimental Biology **44**(6): 485-491.

- Guncheva, M. and D. Zhiryakova (2011). "Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **68**(1): 1-21.
- Guo, Z. and X. Xu (2005). "New opportunity for enzymatic modification of fats and oils with industrial potentials." Organic & Biomolecular Chemistry **3**(14).
- Gupta, N., G. Mehra and R. Gupta (2004 $\alpha$ ). "A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett–Burman design and by response surface methodology." Canadian Journal of Microbiology **50**(5): 361-368.
- Gupta, P., K. Samant and A. Sahu (2012). "Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential." International Journal of Microbiology **2012**.
- Gupta, R., N. Gupta and P. Rathi (2004 $\beta$ ). "Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties." Appl Microbiol Biotechnol **64**(6): 763-781.
- Gupta, R., P. Rathi, N. Gupta and S. Bradoo (2003). "Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview." Biotechnol Appl Biochem **37**(Pt 1): 63-71.
- Haba, E., O. Bresco, C. Ferrer, A. Marques, M. Busquets and A. Manresa (2000). "Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate - science tackles a potential health hazard." Enzyme and Microbial Technology **26**: 40-44.
- Haki, G. D. and S. K. Rakshit (2003). "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review." Bioresource Technology **89**(1): 17-34.
- Hakulinen, N., O. Turunen, J. Jänis, M. Leisola and J. Rouvinen (2003). "Three-dimensional structures of thermophilic  $\beta$ -1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*." European Journal of Biochemistry **270**(7): 1399-1412.
- Haltrich, D., B. Nidetzky, K. D. Kulbe, W. Steiner and S. Župančič (1996). "Production of fungal xylanases." Bioresource Technology **58**(2): 137-161.
- Hamid, T., M. Eltaweel, R. Rahman, M. Basri and A. Salleh (2009). "Characterization and solvent stable features of Strep-tagged purified recombinant lipase from thermostable and solvent tolerant *Bacillus* sp. strain 42." Annals of Microbiology **59**(1): 111-118.
- Han, S.-J., J. H. Back, M. Y. Yoon, P. K. Shin, C. S. Cheong, M.-H. Sung, S.-P. Hong, I. Y. Chung and Y. S. Han (2003 $\alpha$ ). "Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* species SY-01." Biochimie **85**(5): 501-510.
- Han, S. O., H. Yukawa, M. Inui and R. H. Doi (2003 $\beta$ ). "Regulation of Expression of Cellulosomal Cellulase and Hemicellulase Genes in *Clostridium cellulovorans*." J. Bacteriol. **185**(20): 6067-6075.
- Han, W. and M. He (2010). "The application of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw decomposition." Bioresource Technology **101**(10): 3724-3731.
- Hang, X. and L. A. Guarino (1999). "Purification of Autographa californica nucleopolyhedrovirus DNA polymerase from infected insect cells." Journal of General Virology **80**(9): 2519-2526.
- Haros, M., C. Rosell and C. Benedito (2002). "Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling." European Food Research and Technology **215**(5): 425-430.



- Harris, G. W., R. W. Pickersgill, I. Connerton, P. Debeire, J.-P. Touzel, C. Breton and S. Pérez (1997). "Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **29**(1): 77-86.
- Harwood, J. (1989). "The Versatility of Lipases for Industrial Uses." Trends in Biochemical Sciences **14**(4): 125-126.
- Hasan, F., A. A. Shah and A. Hameed (2006). "Industrial applications of microbial lipases." Enzyme and Microbial Technology **39**(2): 235-251.
- Haught, C., D. L. Wilkinson, K. Zgafas and R. G. Harrison (1994). "A method to insert a DNA fragment into a double-stranded plasmid." Biotechniques **16**(1): 46-48.
- Hawtin, R. E., T. Zarkowska, K. Arnold, C. J. Thomas, G. W. Gooday, L. A. King, J. A. Kuzio and R. D. Possee (1997). "Liquefaction of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus-Infected Insects Is Dependent on the Integrity of Virus-Encoded Chitinase and Cathepsin Genes." Virology **238**(2): 243-253.
- Hawumba, J. F., J. Theron and V. S. Brözel (2002). "Thermophilic Protease-Producing *Geobacillus* from Buranga Hot Springs in Western Uganda." Current Microbiology **45**(2): 144-150.
- Hebeish, A. and N. A. Ibrahim (2007). The impact of frontier sciences on textile industry. Bombay, INDE, Colour Publications.
- Hefferon, K. L., A. G. P. Oomens, S. A. Monsma, C. M. Finnerty and G. W. Blissard (1999). "Host Cell Receptor Binding by Baculovirus GP64 and Kinetics of Virion Entry." Virology **258**(2): 455-468.
- Helistö, P. and T. Korpela (1998). "Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method." Enzyme and Microbial Technology **23**(1-2): 113-117.
- Henriette, C., S. Zinebi, M. F. Aumaitre, E. Petitdemange and H. Petitdemange (1993). "Protease and lipase production by a strain of *Serratia marcescens* (532 S)." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **12**(2): 129-135.
- Henrissat, B. (1991). "A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities." Biochem. J. **280**: 239-316.
- Henrissat, B. (1994). "Cellulases and their interaction with cellulose." Cellulose **1**(3): 169-196.
- Henrissat, B. and A. Bairoch (1993). "New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." The Biochemical journal, PORTLAND PRESS-LONDON. **280**: 781-788.
- Henrissat, B. and A. Bairoch (1996). "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases." Biochem J. **316**: 695-696.
- Herbert, R. A. and R. J. Sharp (1992). Molecular biology and biotechnology of extremophiles, Blackie.
- Herniou, E. A., T. Luque, X. Chen, J. M. Vlak, D. Winstanley, J. S. Cory and D. R. O'Reilly (2001). "Use of Whole Genome Sequence Data To Infer Baculovirus Phylogeny." Journal of Virology **75**(17): 8117-8126.
- Herniou, E. A., J. A. Olszewski, J. S. Cory and D. R. O'Reilly (2003). "THE GENOME SEQUENCE AND EVOLUTION OF BACULOVIRUSES." Annual Review of Entomology **48**(1): 211-234.
- Herniou, E. A., J. A. Olszewski, D. R. O'Reilly and J. S. Cory (2004). "Ancient Coevolution of Baculoviruses and Their Insect Hosts." Journal of Virology **78**(7): 3244-3251.

- Herrera-Herrera, J., O. Pérez-Avalos, L. Salgado and T. Ponce-Noyola (2009). "Cyclic AMP regulates the biosynthesis of cellobiohydrolase in *Cellulomonas flavigena* growing in sugar cane bagasse." Archives of Microbiology **191**(10): 745-750.
- Herrera, A. and C. S. Cockell (2007). "Exploring microbial diversity in volcanic environments: A review of methods in DNA extraction." Journal of Microbiological Methods **70**(1): 1-12.
- Hess, M., A. Sczyrba, R. Egan, T.-W. Kim, H. Chokhawala, G. Schroth, S. Luo, D. S. Clark, F. Chen, T. Zhang, R. I. Mackie, L. A. Pennacchio, S. G. Tringe, A. Visel, T. Woyke, Z. Wang and E. M. Rubin (2011). "Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading Genes and Genomes from Cow Rumen." Science **331**(6016): 463-467.
- Hjorth, A., F. Carriere, C. Cudrey, H. Woldike, E. Boel, D. M. Lawson, F. Ferrato, C. Cambillau and G. G. Dodson (1993). "A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase." Biochemistry **32**(18): 4702-4707.
- Holm, C., P. Belfrage, T. Østerlund, R. C. Davis, M. C. Schotz and D. Langin (1994). "Hormone-sensitive lipase: structure, function, evolution and overproduction in insect cells using the baculovirus expression system." Protein Engineering **7**(4): 537-541.
- Holm, C. and J. A. Contreras (1998). High-Level Baculoviral Expression of Hormone-Sensitive Lipase. **109**: 165-175.
- Holst, O., Å. Manelius, M. Krahe, H. Märkl, N. Raven and R. Sharp (1997). "Thermophiles and fermentation technology." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **118**(3): 415-422.
- Houde, A., A. Kademi and D. Leblanc (2004). "Lipases and their industrial applications." Applied Biochemistry and Biotechnology **118**(1): 155-170.
- Howell, J. A. and M. Mangat (1978). "Enzyme deactivation during cellulose hydrolysis." Biotechnology and Bioengineering **20**(6): 847-863.
- Hreggvidsson, G. O., E. Kaiste, O. Holst, G. Eggertsson, A. Palsdottir and J. K. Kristjansson (1996). "An extremely thermostable cellulase from the thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*." Applied and Environmental Microbiology **62**(8): 3047-3049.
- Hrmová, M., P. Biely and M. Vršanská (1989). "Cellulose- and xylan-degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*." Enzyme and Microbial Technology **11**(9): 610-616.
- Hrmová, M., E. Petráková and P. Biely (1991). "Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose." Journal of General Microbiology **137**(3): 541-547.
- Huang, T.-K., P.-M. Wang and W.-T. Wu (2001). "Cultivation of *Bacillus thuringiensis* in an airlift reactor with wire mesh draft tubes." Biochemical Engineering Journal **7**(1): 35-39.
- Huber, R., C. R. Woese, T. A. Langworthy, J. K. Kristjansson and K. O. Stetter (1990). "*Fervidobacterium islandicum* sp. nov., a new extremely thermophilic eubacterium belonging to the Thermotogales." Archives of Microbiology **154**(2): 105-111.
- Hun, C. J., R. N. Z. A. Rahman, A. B. Salleh and M. Basri (2003). "A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase." Biochemical Engineering Journal **15**(2): 147-151.

- Ibrahim, N. A., K. El-Badry, B. M. Eid and T. M. Hassan (2011). "A new approach for biofinishing of cellulose-containing fabrics using acid cellulases." Carbohydrate Polymers **83**(1): 116-121.
- Ilias, M. and M. M. Hoq (1998). "Short Communication: Effect of agitation rate on the growth and production of xylanase free of cellulase by *Thermomyces lanuginosus* MH4 in bioreactor." World Journal of Microbiology and Biotechnology **14**(5): 765-767.
- Imanaka, T. (2011). "Molecular bases of thermophily in hyperthermophiles." Proceedings of the Japan Academy, Series B **87**(9): 587-602.
- Immanuel, G., R. Dhanusa, P. Prema and A. Palavesam (2006). "Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coirretting effluents of estuarine environment." Int. J. Environ. Sci. Technol. **3**: 25-34.
- Inceoglu, A. B., S. G. Kamita, A. C. Hinton, Q. Huang, T. F. Severson, K.-d. Kang and B. D. Hammock (2001). "Recombinant baculoviruses for insect control." Pest Management Science **57**(10): 981-987.
- Inci, Ç. (2005). "Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids." Process Biochemistry **40**(2): 945-949.
- Irfan, M., U. Irfan, Z. Razaq, Q. Syed and M. Nadeem (2011). "Utilization of agricultural wastes as a substrate for Carboxymethyl cellulase production from *Aspergillus niger* in submerged fermentation." IJAVMS **5**(5): 464-471.
- Jaeger, K.-E. and T. Eggert (2002). "Lipases for biotechnology." Current Opinion in Biotechnology **13**(4): 390-397.
- Jaeger, K.-E. and M. T. Reetz (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology." Trends in Biotechnology **16**(9): 396-403.
- Jaeger, K., S. Ransac, B. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel and O. Misset (1994). "Bacterial lipases." FEMS Microbiol Rev **15**(1): 29-63.
- Janssen, P. H., C. R. Monk and H. W. Morgan (1994). "A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its p-nitrophenyl-palmitate esterase activity." FEMS Microbiology Letters **120**(1-2): 195-200.
- Javier, P. F. I., G. Óscar, J. Sanz-Aparicio and P. Díaz (2007). Xylanases: Molecular Properties and Applications. Industrial Enzymes. J. Polaina and A. P. MacCabe, Springer Netherlands: 65-82.
- Jehle, J. A., G. W. Blissard, B. C. Bonning, J. S. Cory, E. A. Herniou, G. F. Rohrmann, D. A. Theilmann, S. M. Thiem and J. M. Vlak (2006). "On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision." Archives of Virology **151**(7): 1257-1266.
- Jeong, S.-T., H.-K. Kim, S.-J. Kim, S.-W. Chi, J.-G. Pan, T.-K. Oh and S.-E. Ryu (2002). "Novel Zinc-binding Center and a Temperature Switch in the *Bacillus stearothermophilus* L1 Lipase." J. Biol. Chem. **277**(19): 17041-17047.
- Ji, X., G. Sutton, G. Evans, D. Axford, R. Owen and D. I. Stuart (2010). "How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses." EMBO J **29**(2): 505-514.
- Jiang, Y., X. Zhou and Z. Chen (2010). "Cloning, expression, and biochemical characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus stearothermophilus* JC." World Journal of Microbiology and Biotechnology **26**(4): 747-751.
- Jiang, Z.-Q., W. Deng, L.-T. Li, C.-H. Ding, I. Kusakabe and S.-S. Tan (2004). "A novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) secreted by *Streptomyces olivaceoviridis*." Biotechnology Letters **26**(5): 431-436.

- Jiang, Z., W. Deng, Q. Yan, Q. Zhai, L. Li and I. Kusakabe (2006). "Subunit composition of a large xylanolytic complex (xylanosome) from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86." Journal of Biotechnology **126**(3): 304-312.
- Jiang, Z., X. Li, S. Yang, L. Li and S. Tan (2005). "Improvement of the breadmaking quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase B from *Thermotoga maritima*." Food Research International **38**(1): 37-43.
- Joliff, G., S. Vaganay, C. Legay and C. Bénicourt (1998). "Secretion of an active recombinant dog gastric lipase from baculovirus-infected insect cells." Biotechnology Letters **20**(7): 697-702.
- Ju, L. K. and O. A. Afolabi (1999). "Wastepaper hydrolysate as soluble inducing substrate for cellulase production in continuous culture of *Trichoderma reesei*." Biotechnology Progress **15**(1): 91-97.
- Juodeikiene, G., L. Basinskiene, D. Vidmantiene, T. Makaravicius, E. Bartkiene and H. Schols (2011). "The use of  $\beta$ -xylanase for increasing the efficiency of biocatalytic conversion of crop residues to bioethanol." Catalysis Today **167**(1): 113-121.
- Kaar, J. L., A. M. Jesionowski, J. A. Berberich, R. Moulton and A. J. Russell (2003). "Impact of Ionic Liquid Physical Properties on Lipase Activity and Stability." Journal of the American Chemical Society **125**(14): 4125-4131.
- Kahveci, D., Z. Guo, B. Özçelik and X. Xu (2009). "Lipase-catalyzed glycerolysis in ionic liquids directed towards diglyceride synthesis." Process Biochemistry **44**(12): 1358-1365.
- Kamagata, Y. and H. Tamaki (2005). "Cultivation of Uncultured Fastidious Microbes." Microbes and Environments **20**(2): 85-91.
- Kamal Kumar, B., H. Balakrishnan and M. V. Rele (2004). "Compatibility of alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* NCL (87-6-10) with commercial detergents and proteases." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **31**(2): 83-87.
- Kamal, M. Z., S. Ahmad, T. R. Molugu, A. Vijayalakshmi, M. V. Deshmukh, R. Sankaranarayanan and N. M. Rao (2011). "In Vitro Evolved Non-Aggregating and Thermostable Lipase: Structural and Thermodynamic Investigation." Journal of Molecular Biology **413**(3): 726-741.
- Kambiz Morabbi, H., E. Fereshteh, Y. Bagher and T. Fatemeh (2008). Isolation and Identification of a Lipase Producing *Bacillus* sp. from Soil, Asian Network for Scientific Information, Pakistan.
- Kamra, P. and T. Satyanarayana (2004). "Xylanase production by the thermophilic mold *Humicola lanuginosa* in solid-state fermentation." Applied Biochemistry and Biotechnology **119**(2): 145-157.
- Kandeler, F., C. Kampichler and O. Horak (1996). "Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities." Biology and Fertility of Soils **23**(3): 299-306.
- Kang, S. W., Y. S. Park, J. S. Lee, S. I. Hong and S. W. Kim (2004). "Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass." Bioresource Technology **91**(2): 153-156.
- Kanwar, L., B. K. Gogoi and P. Goswami (2002). "Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique." Bioresource Technology **84**(3): 207-211.
- Kar, S., A. Mandal, P. K. d. Mohapatra, K. C. Mondal and B. R. Pati (2006). "Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3." Brazilian Journal of Microbiology **37**: 462-464.

- Karkhane, A. A., B. Yakhchali, F. R. Jazii and B. Bambai (2009). "The effect of substitution of Phe181 and Phe182 with Ala on activity, substrate specificity and stabilization of substrate at the active site of *Bacillus thermocatenulatus* lipase." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **61**(3-4): 162-167.
- Karlsson, M., H. Tornqvist and C. Holm (2000). "Expression, Purification, and Characterization of Histidine-Tagged Mouse Monoglyceride Lipase from Baculovirus-Infected Insect Cells." Protein Expression and Purification **18**(3): 286-292.
- Karmakar, M. and R. R. Ray (2011). "Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases." Research Journal of Microbiology **6**: 41-53.
- Katapodis, P., M. Vardakou, E. Kalogeris, D. Kekos, B. J. Macris and P. Christakopoulos (2003). "Enzymic production of a feruloylated oligosaccharide with antioxidant activity from wheat flour arabinoxylan." European Journal of Nutrition **42**(1): 55-60.
- Katsoura, M. H., A. C. Polydera, L. Tsironis, A. D. Tselepis and H. Stamatis (2006). "Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency." Journal of Biotechnology **123**(4): 491-503.
- Katsoura, M. H., A. C. Polydera, L. D. Tsironis, M. P. Petraki, S. K. Rajačić, A. D. Tselepis and H. Stamatis (2009). "Efficient enzymatic preparation of hydroxycinnamates in ionic liquids enhances their antioxidant effect on lipoproteins oxidative modification." New Biotechnology **26**(1-2): 83-91.
- Kaul, P. and Y. Asano (2012). "Strategies for discovery and improvement of enzyme function: state of the art and opportunities." Microbial Biotechnology **5**(1): 18-33.
- Kawashima, T., N. Amano, H. Koike, S.-i. Makino, S. Higuchi, Y. Kawashima-Ohya, K. Watanabe, M. Yamazaki, K. Kanehori, T. Kawamoto, T. Nunoshiba, Y. Yamamoto, H. Aramaki, K. Makino and M. Suzuki (2000). "Archaeal adaptation to higher temperatures revealed by genomic sequence of *Thermoplasma volcanium*." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(26): 14257-14262.
- Kengen, S. W. M., E. J. Luesink, A. J. M. Stams and A. J. B. Zehnder (1993). "Purification and characterization of an extremely thermostable  $\beta$ -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." European Journal of Biochemistry **213**(1): 305-312.
- Khandeparker, R. and M. Numan (2008). "Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **35**(7): 635-644.
- Khemakhem, B., M. B. Ali, N. Aghajari, M. Juy, R. Haser and S. Bejar (2009). "Engineering of the  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus stearothermophilus* US100 for detergent incorporation." Biotechnology and Bioengineering **102**(2): 380-389.
- Khyami-Horani, H. (1996). "Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase." World Journal of Microbiology and Biotechnology **12**(4): 399-401.
- Kim, H.-K., S.-Y. Park, J.-K. Lee and T.-K. Oh (1998). "Gene Cloning and Characterization of Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **62**(1): 66-71.
- Kim, H. K., H. J. Choi, M. H. Kim, C. B. Sohn and T. K. Oh (2002). "Expression and characterization of Ca<sup>2+</sup>-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26."

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1583**(2): 205-212.
- Kim, S. S., E. K. Kim and J. S. Rhee (1996). "Effects of Growth Rate on the Production of *Pseudomonas fluorescens* Lipase during the Fed-Batch Cultivation of *Escherichia coli*." Biotechnology Progress **12**(5): 718-722.
- Kim, Y.-K., S.-C. Lee, Y.-Y. Cho, H.-J. Oh and Y. H. Ko (2012). "Isolation of Cellulolytic *Bacillus subtilis* Strains from Agricultural Environments." ISRN Microbiology **2012**.
- King, G. M. (2007). "Chemolithotrophic Bacteria: Distributions, Functions and Significance in Volcanic Environments." Microbes and Environments **22**(4): 309-319.
- Koeuth, T., J. Versalovic and J. R. Lupski (1995). "Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria." Genome Res. **5**(4): 408-418.
- Kolenová, K., M. Vršanská and P. Biely (2006). "Mode of action of endo- $\beta$ -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides." Journal of Biotechnology **121**(3): 338-345.
- Kosugi, A., K. Murashima and R. H. Doi (2001). "Characterization of Xylanolytic Enzymes in *Clostridium cellulovorans*: Expression of Xylanase Activity Dependent on Growth Substrates." Journal of Bacteriology **183**(24): 7037-7043.
- Kouker, G. and K. E. Jaeger (1987). "Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases." Appl. Environ. Microbiol. **53**(1): 211-213.
- Kragl, U., M. Eckstein and N. Kaftzik (2002). "Enzyme catalysis in ionic liquids." Current Opinion in Biotechnology **13**(6): 565-571.
- Krahe, M., G. Antranikian and H. Märkl (1996). "Fermentation of extremophilic microorganisms." FEMS Microbiology Reviews **18**(2-3): 271-285.
- Krishna, C. (1999). Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. Kidlington, ROYAUME-UNI, Elsevier.
- Kristensen, J. B., X. Xu and H. Mu (2005). "Process Optimization Using Response Surface Design and Pilot Plant Production of Dietary Diacylglycerols by Lipase-Catalyzed Glycerolysis." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(18): 7059-7066.
- Kristjansson, J. K. (1989). "Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes." Trends in Biotechnology **7**: 349 - 353.
- Kubicek, C. (1992). The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. Enzymes and Products from Bacteria Fungi and Plant Cells, Springer Berlin / Heidelberg. **45**: 1-27.
- Kuhad, R. C., R. Gupta and A. Singh (2011). "Microbial Cellulases and Their Industrial Applications." Enzyme Research.
- Kuisiene, N., R. Jomantiene, D. Valiunas and D. Chitavichius (2002). "Characterization of Thermophilic Proteolytic Spore-Forming Bacteria from a Geothermal Site in Lithuania Based on 16S rDNA RFLP and ITS-PCR Analyses1." Microbiology **71**(6): 712-716.
- Kuisiene, N., J. Raugalas and D. Chitavichius (2009). "Phylogenetic, Inter, and Intraspecific Sequence Analysis of spo0 Gene of the Genus *Geobacillus*." Current Microbiology **58**(6): 547-553.
- Kuisiene, N., J. Raugalas, M. Stuknyte and D. Chitavichius (2007). "Identification of the genus *Geobacillus* using genus-specific primers, based on the 16S–23S

- rRNA gene internal transcribed spacer." FEMS Microbiology Letters **277**(2): 165-172.
- Kulkarni, N. and R. V. Gadre (1999). "A novel alkaline, thermostable, protease-free lipase from *Pseudomonas*." Biotechnology Letters **21**(10): 897-899.
- Kulkarni, N., A. Shendye and M. Rao (1999). "Molecular and biotechnological aspects of xylanases." FEMS Microbiology Reviews **23**(4): 411-456.
- Kumar, S., K. Kikon, A. Upadhyay, S. S. Kanwar and R. Gupta (2005). "Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3." Protein Expression and Purification **41**(1): 38-44.
- Kumar, S. and R. Nussinov (2001). "How do thermophilic proteins deal with heat?" Cellular and Molecular Life Sciences **58**(9): 1216-1233.
- Labuschagne, R. B., A. van Tonder and D. Litthauer (1997). "*Flavobacterium odoratum* lipase: Isolation and characterization." Enzyme and Microbial Technology **21**(1): 52-58.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lama, L., V. Calandrelli, A. Gambacorta and B. Nicolaus (2004). "Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*." Research in Microbiology **155**(4): 283-289.
- Lampen, J. G., S. C. Kuo and F. R. Cano (1972). Control of synthesis and secretion of exoenzymes by yeast protoplast. Yeast, Mould and Plant Protoplasts. J. R. Villanueva, Acha, J.R., Gaskon, I.G., Uruburu, F. London, Academic Press: 143-156.
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. E. Stackebrandt and M. Goodfellow. New York, Wiley: 115-175.
- Lasa, I. and J. Berenguer (1993). "Thermophilic enzymes and their biotechnological potential." Microbiologia Madrid Spain **9**: 77-89.
- Le Ruyet, P., H. C. Dubourguier, G. Albagnac and G. Prensier (1985). "Characterization of *Clostridium thermolacticum* sp. nov., a hydrolytic thermophilic anaerobe producing high amounts of lactate." Systematic and Applied Microbiology **6**(2): 196-202.
- Lee, D., A. H. C. Yu and J. N. Saddler (1995). "Evaluation of cellulase recycling strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates." Biotechnology and Bioengineering **45**(4): 328-336.
- Lee, D. W., H. W. Kim, K. W. Lee, B. C. Kim, E. A. Choe, H. S. Lee, D. S. Kim and Y. R. Pyun (2001). "Purification and characterization of two distinct thermostable lipases, from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1." Enzyme and Microbial Technology **29**(6-7): 363-371.
- Lee, D. W., Y. S. Koh, K. J. Kim, B. C. Kim, H. J. Choi, D. S. Kim, M. T. Suhartono and Y. R. Pyun (1999). "Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1." FEMS Microbiology Letters **179**(2): 393-400.
- Lee, H., P. Biely, R. K. Latta, M. F. S. Barbosa and H. Schneider (1986). "Utilization of Xylan by Yeasts and Its Conversion to Ethanol by *Pichia stipitis* Strains." Applied and Environmental Microbiology **52**(2): 320-324.
- Lee, S. H., E. Minagawa, H. Taguchi, H. Matsuzawa, T. Ohta, S. Kaminogawa and K. Yamauchi (1992). "Purification and characterization of a thermostable

- carboxypeptidase (carboxypeptidase Taq) from *Thermus aquaticus* YT-1." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **56**(11): 1839-1844.
- Lee, S. H. and D. H. Park (2008). "Isolation and physiological characterization of *Bacillus clausii* SKAL-16 isolated from wastewater." Journal of Microbiology and Biotechnology **18**(12): 1908-1914.
- Lemos, M. A., J. A. Teixeira, M. R. M. Domingues, M. Mota and F. M. Gama (2003). "The enhancement of the cellulolytic activity of cellobiohydrolase I and endoglucanase by the addition of cellulose binding domains derived from *Trichoderma reesei*." Enzyme and Microbial Technology **32**(1): 35-40.
- Leow, T., R. Rahman, M. Basri and A. Salleh (2004). "High level expression of thermostable lipase from *Geobacillus* sp. strain T1." Biosci Biotechnol Biochem **68**(1): 96-103.
- Leschine, S. B. (1995). "Cellulose degradation in anaerobic environments." Annual Review of Microbiology **49**: 399-426.
- Lesuisse, E., K. Schanck and C. Colson (1993). "Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme." European Journal of Biochemistry **216**(1): 155-160.
- Levin, L. and F. Forchiassin (1998). "Influence of growth conditions on the production of xylanolytic enzymes by *Trametes trogii*." World Journal of Microbiology and Biotechnology **14**(3): 443-446.
- Li, C.-Y., C.-Y. Cheng and T.-L. Chen (2004). "Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source." Biochemical Engineering Journal **19**(1): 25-31.
- Li, D.-C., A.-N. Li and A. C. Papageorgiou (2011). "Cellulases from Thermophilic Fungi: Recent Insights and Biotechnological Potential." Enzyme Research **2011**.
- Li, H. and X. Zhang (2005). "Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1." Protein Expression and Purification **42**(1): 153-159.
- Lianghua, T. and X. Liming (2005). "Purification and partial characterization of a lipase from *Bacillus coagulans* ZJU318." Applied Biochemistry and Biotechnology **125**(2): 139-146.
- Lin, E.-S., C.-C. Wang and S.-C. Sung (2006 $\alpha$ ). "Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture." Enzyme and Microbial Technology **39**(1): 98-102.
- Lin, X. a., W. Zhang, Y. Chen, B. Yao and Z. F. Zhang (2006 $\beta$ ). Overexpression of celb gene coding for glucosidase from *Pyrococcus furiosus* using a baculovirus expression vector system in Silkworm, *Bombyx mori*. ALLEMAGNE, Verlag der Zeitschrift Naturforschung.
- Liszka, M. J., M. E. Clark, E. Schneider and D. S. Clark (2012). "Nature Versus Nurture: Developing Enzymes That Function Under Extreme Conditions." Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering **3**(1).
- Liu, W., W. Zhu, Y. Lu, J. Kong and G. Ma (1998). "Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409." Process Biochemistry **33**(3): 331-336.
- Logan, N. A. L. A. and R. N. A. N. Allan (2008). Aerobic, Endospore-Forming Bacteria from Antarctic Geothermal Soils. Microbiology of Extreme Soils. P. Dion and C. S. Nautiyal, Springer Berlin Heidelberg. **13**: 155-175.



- Long, Z.-D., J.-H. Xu, L.-L. Zhao, J. Pan, S. Yang and L. Hua (2007). "Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioregulation of racemic ketoprofen." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **47**(3-4): 105-110.
- Lopes, M., N. Gomes, C. Gonçalves, M. A. Z. Coelho, M. Mota and I. Belo (2008). "*Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure." Letters in Applied Microbiology **46**(2): 255-260.
- Lotti, M., S. Monticelli, J. Luis Montesinos, S. Brocca, F. Valero and J. Lafuente (1998). "Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase." Chemistry and Physics of Lipids **93**(1-2): 143-148.
- Luisa Rúa, M., C. Schmidt-Dannert, S. Wahl, A. Sprauer and R. D. Schmid (1997). "Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*: Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity." Journal of Biotechnology **56**(2): 89-102.
- Lund, H. (2001). Process for combined desizing and "stone-washing" of dyed denim. United States, Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, DE)
- Luque, R., M. Orejas, N. I. Perotti, D. Ramón and M. E. Lucca (2004). "pH Control of the production of recombinant glucose oxidase in *Aspergillus nidulans*." Journal of Applied Microbiology **97**(2): 332-337.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl and I. S. Pretorius (2002). "Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology." Microbiology and Molecular Biology Reviews **66**: 506 - 577.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, G. Wolfaardt and Y.-H. P. Zhang (2009). "ChemInform Abstract: Cellulose Hydrolysis by *Clostridium thermocellum*: A Microbial Perspective." ChemInform **40**(45): no-no.
- Lynd, L. R., C. E. Wyman and T. U. Gerngross (1999). "Biocommodity Engineering." Biotechnology Progress **15**(5): 777-793.
- Ma, J., Z. Zhang, B. Wang, X. Kong, Y. Wang, S. Cao and Y. Feng (2006). "Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*." Protein Expression and Purification **45**(1): 22-29.
- Macedo Rodrigues, J. C., M. L. De Souza, D. O'Reilly, L. M. Velloso, F. J. Rivera Pinedo, F. B. Razuck, B. Ribeiro and B. M. Ribeiro (2001). "Characterization of the Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase (egt) Gene of *Anticarsia gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus." Virus Genes **22**(1): 103-112.
- Mach-Aigner, A. R., M. E. Pucher and R. L. Mach (2010). "d-Xylose as a Repressor or Inducer of Xylanase Expression in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*)." Applied and Environmental Microbiology **76**(6): 1770-1776.
- Macrae, A. R. and R. C. Hammond (1985). "Present and Future Applications of Lipases." Biotechnology & Genetic Engineering Reviews **3**: 193-217.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko and T. D. Brock (2006). Brock biology of microorganisms, Pearson Prentice Hall.
- Maeda, H., M. Sano, Y. Maruyama, T. Tanno, T. Akao, Y. Totsuka, M. Endo, R. Sakurada, Y. Yamagata, M. Machida, O. Akita, F. Hasegawa, K. Abe, K. Gomi, T. Nakajima and Y. Iguchi (2004). "Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags." Applied Microbiology and Biotechnology **65**(1): 74-83.
- Maes, C. and J. A. Delcour (2002). "Structural Characterisation of Water-extractable and Water-unextractable Arabinoxylans in Wheat Bran." Journal of Cereal Science **35**(3): 315-326.

- Maheshwari, R., G. Bharadwaj and M. K. Bhat (2000). "Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes." Microbiology and Molecular Biology Reviews **64**: 461 - 488.
- Maiti, N. K., A. Mandal, S. Mohanty and M. Samanta (2008). "Comparative analysis of genome of *Edwardsiella tarda* by BOX-PCR and PCR-ribotyping." Aquaculture **280**(1-4): 60-63.
- Majeti, N. V. and R. Kumar (2000). "A review of chitin and chitosan applications." Reactive and Functional Polymers **46**(1): 1-27.
- Maki, M., K. T. Leung and W. Qin (2009). "The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass." International journal of biological sciences **5**(5): 500-516.
- Makrides, S. C. (1996). "Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*." Microbiological Reviews **60**(3): 512-538.
- Malcata, F. X., H. R. Reyes, H. S. Garcia, C. G. Hill and C. H. Amundson (1992). "Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalyzed by Immobilized Lipases." Enzyme and Microbial Technology **14**(6): 426-446.
- Marchant, R. and I. M. Banat (2010). The Genus *Geobacillus* and Hydrocarbon Utilization. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis, Springer Berlin Heidelberg: 1887-1896.
- Marchant, R., I. M. Banat, T. J. Rahman and M. Berzano (2002 $\alpha$ ). "The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments." Environmental Microbiology **4**(10): 595-602.
- Marchant, R., I. M. Banat, T. J. S. Rahman and M. Berzano (2002 $\beta$ ). "What are high-temperature bacteria doing in cold environments?" Trends in Microbiology **10**(3): 120-121.
- Marchant, R., A. Franzetti, S. Pavlostathis, D. Tas, I. Erdbrügger, A. Únyayar, M. Mazmanci and I. Banat (2008). "Thermophilic bacteria in cool temperate soils: are they metabolically active or continually added by global atmospheric transport?" Applied Microbiology and Biotechnology **78**(5): 841-852.
- Marrs, B., S. Delagrave and D. Murphy (1999). "Novel approaches for discovering industrial enzymes." Current Opinion in Microbiology **2**(3): 241-245.
- Marrugat, J., M.-I. Covas, M. Fitó, H. Schröder, E. Miró-Casas, E. Gimeno, M. C. López-Sabater, R. Torre, M. Farré and S. I. the members of the (2004). "Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation." European Journal of Nutrition **43**(3): 140-147.
- Martin, B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, R. Hakenbeck, D. A. Morrison, G. J. Boulnois and J.-P. Claverys (1992). "A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*." Nucl. Acids Res. **20**(13): 3479-3483.
- Masaki, M., N. Kotoyoshi and Y. Tsuneo (1985). "Immunological Properties and Constituent Amino Acids of Three Xylanases Produced Inductively from *Streptomyces* sp." Agricultural and Biological Chemistry **49**(12): 3409-3413.
- Mateos, R., M. Trujillo, G. Pereira-Caro, A. s. Madrona, A. Cert and J. L. Espartero (2008). "New Lipophilic Tyrosyl Esters. Comparative Antioxidant Evaluation with Hydroxytyrosyl Esters." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(22): 10960-10966.
- Mathlouthi, N., H. Juin and M. Larbier (2003 $\alpha$ ). "Effect of xylanase and  $\beta$ -glucanase supplementation of wheat- or wheat- and barley-based diets on the performance of male turkeys." British Poultry Science **44**(2): 291-298.

- Mathlouthi, N., J. P. Lallès, P. Lepercq, C. Juste and M. Larbier (2002). "Xylanase and  $\beta$ -glucanase supplementation improve conjugated bile acid fraction in intestinal contents and increase villus size of small intestine wall in broiler chickens fed a rye-based diet." Journal of Animal Science **80**(11): 2773-2779.
- Mathlouthi, N., M. A. Mohamed and M. Larbier (2003 $\beta$ ). "Effect of enzyme preparation containing xylanase and  $\beta$ -glucanase on performance of laying hens fed wheat/barley- or maize/soybean meal-based diets." British Poultry Science **44**(1): 60-66.
- Mathrani, I. M., P. Nielsen, J. Sonne-Hansen, J. K. Kristjansson and B. K. Ahring (1993). "Influence of pH and Temperature on Enumeration of Cellulose- and Hemicellulose-Degrading Thermophilic Anaerobes in Neutral and Alkaline Icelandic Hot Springs." Applied and Environmental Microbiology **59**(6): 1963-1965.
- Matsumura, S., K. Sakiyama and K. Toshima (1999). "Preparation of octyl  $\beta$ -D-xylobioside and xyloside by xylanase-catalyzed direct transglycosylation reaction of xylan and octanol." Biotechnology Letters **21**(1): 17-22.
- Maugeri, T. L., C. Gugliandolo, D. Caccamo and E. Stackebrandt (2002). "Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents." Systematic and Applied Microbiology **25**(3): 450-455.
- Mawadza, C., R. Hatti-Kaul, R. Zvauya and B. Mattiasson (2000). "Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains." Journal of Biotechnology **83**(3): 177-187.
- McDougal, V. V. and L. A. Guarino (1999). "Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus DNA Polymerase: Measurements of Processivity and Strand Displacement." Journal of Virology **73**(6): 4908-4918.
- Meintanis, C., K. Chalkou, K. Kormas and A. Karagouni (2006). "Biodegradation of Crude Oil by Thermophilic Bacteria Isolated from a Volcano Island." Biodegradation **17**(2): 3-9.
- Meintanis, C., K. I. Chalkou, K. A. Kormas, D. S. Lympelopoulou, E. A. Katsifas, D. G. Hatzinikolaou and A. D. Karagouni (2008). "Application of rpoB sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillus*." Letters in Applied Microbiology **46**(3): 395-401.
- Merivuori, H., J. Sands and B. Montenecourt (1985). "Effects of tunicamycin on secretion and enzymatic activities of cellulase from *Trichoderma reesei*." Applied Microbiology and Biotechnology **23**(1): 60-66.
- Merrington, C. L., P. A. Kitts, L. A. King and R. D. Possee (1996). "An Autographa californica Nucleopolyhedroviruslef-2 Mutant: Consequences for DNA Replication and Very Late Gene Expression." Virology **217**(1): 338-348.
- Mewis, K., M. Taupp and S. J. Hallam (2011). "A high throughput screen for biomining cellulase activity from metagenomic libraries." J Vis Exp(48).
- Mhetras, N. C., K. B. Bastawde and D. V. Gokhale (2009). "Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207." Bioresour Technol **100**(3): 1486-1490.
- Mikhailov, V. S., K. Okano and G. F. Rohrmann (2005). "The Redox State of the Baculovirus Single-stranded DNA-binding Protein LEF-3 Regulates Its DNA Binding, Unwinding, and Annealing Activities." Journal of Biological Chemistry **280**(33): 29444-29453.
- Mikhailov, V. S. and G. F. Rohrmann (2002). "Baculovirus Replication Factor LEF-1 Is a DNA Primase." Journal of Virology **76**(5): 2287-2297.

- Miller, G. L. (1959). "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." Analytical Chemistry **31**(3): 426-428.
- Miller, L. K. (1997). "Baculovirus interaction with host apoptotic pathways." Journal of Cellular Physiology **173**(2): 178-182.
- Mitra, K., S.-A. Kim, J.-H. Lee, S.-W. Choi and K.-T. Lee (2010). "Production and characterization of  $\alpha$ -linolenic acid enriched structured lipids from lipase-catalyzed interesterification." Food Science and Biotechnology **19**(1): 57-62.
- Miyazaki, K. and S. Fujikawa (2009). Methods of treating skin disease, scalp disease, sensitive skin or suppressing hair loss with microbubble washing compositions. US.
- Moayedallaie, S., M. Mirzaei and J. Paterson (2010). "Bread improvers: Comparison of a range of lipases with a traditional emulsifier." Food Chemistry **122**(3): 495-499.
- Monsma, S. A., A. G. Oomens and G. W. Blissard (1996). "The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection." Journal of Virology **70**(7): 4607-4616.
- Moon, Y., S. Lee, S. Ha and Y.-M. Koo (2006). "Enzyme-catalyzed reactions in ionic liquids." Korean Journal of Chemical Engineering **23**(2): 247-263.
- Morosoli, R., S. Durand and F. Boucher (1989). "Stimulation of xylanase synthesis in *Cryptococcus albidus* by cyclic AMP." FEMS Microbiology Letters **57**(1): 57-60.
- Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple and M. Ladisch (2005). "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass." Bioresource Technology **96**(6): 673-686.
- Mozhaev, V. V. (1993). "Mechanism-based strategies for protein thermostabilization." Trends in Biotechnology **11**(3): 88-95.
- Mroczkowski, B. S., A. Huvar, W. Lernhardt, K. Misono, K. Nielson and B. Scott (1994). "Secretion of thermostable DNA polymerase using a novel baculovirus vector." Journal of Biological Chemistry **269**(18): 13522-13528.
- Muhd Sakaff, M. K. L., A. Y. Abdul Rahman, J. A. Saito, S. Hou and M. Alam (2012). "Complete Genome Sequence of the Thermophilic Bacterium *Geobacillus thermoleovorans* CCB\_US3\_UF5." Journal of Bacteriology **194**(5): 1239.
- Murphy, C. I., H. Piwnica-Worms, S. Grünwald, W. G. Romanow, N. Francis and H.-Y. Fan (2001). Maintenance of Insect Cell Cultures and Generation of Recombinant Baculoviruses. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.
- Nara, S. J., J. R. Harjani and M. M. Salunkhe (2002). "Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: a comparative study." Tetrahedron Letters **43**(16): 2979-2982.
- Navarro, D., M. Couturier, G. Silva, J.-G. Berrin, X. Rouau, M. Asther and C. Bignon (2010). "Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass." Microbial Cell Factories **9**(1): 1-12.
- Nawani, N. and J. Kaur (2000). "Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33." Molecular and Cellular Biochemistry **206**(1): 91-96.
- Nazina, T., T. Tourova, A. Poltarau, E. Novikova, A. Grigoryan, A. Ivanova, A. Lysenko, V. Petrunyaka, G. Osipov, S. Belyaev and M. V. Ivanov (2001). "Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from

- petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*." Int J Syst Evol Microbiol **51**: 433-446.
- Nazina, T. N., E. V. Lebedeva, A. B. Poltarau, T. P. Tourova, A. A. Grigoryan, D. S. Sokolova, A. M. Lysenko and G. A. Osipov (2004). "*Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **54**(6): 2019-2024.
- Nazina, T. N., D. S. Sokolova, A. A. Grigoryan, N. M. Shestakova, E. M. Mikhailova, A. B. Poltarau, T. P. Tourova, A. M. Lysenko, G. A. Osipov and S. S. Belyaev (2005). "*Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species." Systematic and Applied Microbiology **28**(1): 43-53.
- Ng, I. S., C.-W. Li, Y.-F. Yeh, P. Chen, J.-L. Chir, C.-H. Ma, S.-M. Yu, T.-h. Ho and C.-G. Tong (2009). "A novel endo-glucanase from the thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. 70PC53 with high activity and stability over a broad range of temperatures." Extremophiles **13**(3): 425-435.
- Niehaus, F., C. Bertoldo, M. Kahler and G. Antranikian (1999). "Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application." Applied Microbiology and Biotechnology **51**: 711 - 729.
- Ninawe, S., R. Lal and R. Kuhad (2006). "Isolation of Three Xylanase-Producing Strains of Actinomycetes and Their Identification Using Molecular Methods." Current Microbiology **53**(3): 178-182.
- Nobiron, I., D. R. O'Reilly and J. A. Olszewski (2003). "Autographa californica nucleopolyhedrovirus infection of *Spodoptera frugiperda* cells: a global analysis of host gene regulation during infection, using a differential display approach." Journal of General Virology **84**(11): 3029-3039.
- Nthangeni, M. B., H. G. Patterson, A. Van Tonder, W. P. Vergeer and D. Litthauer (2001). "Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: A comparative report on *Bacillus* lipases." Enzyme and Microbial Technology **28**(7-8): 705-712.
- Nunn, J. R., H. Parolis and I. Russell (1973). "Polysaccharides of the red alga *Chaetangium erinaceum* : Part I. isolation and characterisation of the water-soluble xylan." Carbohydrate Research **26**(1): 169-180.
- Obeidat, M., H. Khyami-Horani, A. Al-Zoubi and I. Otri (2012). "Isolation, characterization, and hydrolytic activities of *Geobacillus* species from Jordanian hot springs." African Journal of Biotechnology **11**(25): 6763-6768.
- Obojska, A., N. G. Ternan, B. Lejczak, P. Kafarski and G. McMullan (2002). "Organophosphonate Utilization by the Thermophile *Geobacillus caldoxylosilyticus* T20." Applied and Environmental Microbiology **68**(4): 2081-2084.
- Obradors, N., J. L. Montesinos, F. Valero, F. J. Lafuente and C. Sola (1993). "Effects of different fatty-acids in lipase production by *Candida rugosa*." Biotechnology Letters **15**(4): 357-360.
- Ogino, H., Y. Katou, R. Akagi, T. Mimitsuka, S. Hiroshima, Y. Gemba, N. Doukyu, M. Yasuda, K. Ishimi and H. Ishikawa (2007). "Cloning and expression of

- gene, and activation of an organic solvent-stable lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LST-03." Extremophiles **11**(6): 809-817.
- Ohkawa, T., L. E. Volkman and M. D. Welch (2010). "Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface." The Journal of Cell Biology **190**(2): 187-195.
- Ojumu, T. V., B. O. Solomon, E. Betiku, S. K. Layokun and B. Amigun (2003). "Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in saw dust, bagasse and corncob." Afr. J. Biotechnol. **2**: 150-152.
- Olson, V. A., J. A. Wetter and P. D. Friesen (2002). "Baculovirus Transregulator IE1 Requires a Dimeric Nuclear Localization Element for Nuclear Import and Promoter Activation." Journal of Virology **76**(18): 9505-9515.
- Omojasola, P. F., O. P. Jilani and S. A. Ibiyemi (2008). "Cellulase production by some fungi cultured on pineapple waste." Nature Sci. **6**: 64-69.
- Oomens, A. G. P. and G. W. Blissard (1999). "Requirement for GP64 to Drive Efficient Budding of Autographa californica Multicapsid Nucleopolyhedrovirus." Virology **254**(2): 297-314.
- Ota, Y., T. Sawamoto and M. Hasuo (2000). "Tributylin Specifically Induces a Lipase with a Preference for the sn-2 Position of Triglyceride in *Geotrichum* sp. FO401B." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **64**(11): 2497-2499.
- Paavilainen, S., J. Hellman and T. Korpela (1993). "Purification, characterization, gene cloning, and sequencing of a new beta-glucosidase from *Bacillus circulans* subsp. alkalophilus." Applied and Environmental Microbiology **59**(3): 927-932.
- Packter, N. M. (1992). "Microbial degradation of natural products: Edited by G Winkelmann. pp 420. VCH, Weinheim, Germany. 1992. £93: ISBN 3-527-28354-4." Biochemical Education **20**(3): 191-192.
- Packter, N. M. (1994). "Lipases — their structure, biochemistry and application: Edited by P Woolley and S B Petersen. pp 363. Cambridge University Press. 1994. ." Biochemical Education **22**(4): 216-216.
- Paes, G. and M. J. O'Donohue (2006). "Engineering increased thermostability in the thermostable GH-11 xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus*." Journal of Biotechnology **125**: 338 - 350.
- Pajni, S., N. Dhillon, D. V. Vadehra and P. Sharma (1989). "Carboxymethyl cellulase, β-glucosidase and xylanase production by *Bacillus* isolates from soil." International Biodeterioration **25**(1-3): 1-5.
- Pala, H., M. Mota and F. M. Gama (2004). "Enzymatic versus chemical deinking of non-impact ink printed paper." Journal of Biotechnology **108**(1): 79-89.
- Palma, M. B., A. M. Ferreira Milagres, A. M. R. Prata and I. M. de Mancilha (1996). "Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*." Process Biochemistry **31**(2): 141-145.
- Pandey, A., S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger and V. T. Soccol (1999). "The realm of microbial lipases in biotechnology." Biotechnology and Applied Biochemistry **29**(2): 119-131.
- Park, S. and R. J. Kazlauskas (2003). "Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology." Current Opinion in Biotechnology **14**(4): 432-437.
- Patel, J. B. (2001). "16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory." Molecular Diagnosis **6**(4): 313-321.
- Patmanidi, A. L., R. D. Possee and L. A. King (2003). "Formation of P10 tubular structures during AcMNPV infection depends on the integrity of host-cell microtubules." Virology **317**(2): 308-320.

- Paul, J. and A. K. Varma (1990). "Influence of sugars on endoglucanase and  $\beta$ -xylanase activities of a *Bacillus* strain." *Biotechnology Letters* 12(1): 61-64.
- Pavlostathis, S. G., R. Marchant, I. M. Banat, N. G. Ternan and G. McMullan (2006). "High growth rate and substrate exhaustion results in rapid cell death and lysis in the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoleovorans*." *Biotechnology and Bioengineering* 95(1): 84-95.
- Paz, A., D. Mester, I. Baca, E. Nevo and A. Korol (2004). "Adaptive role of increased frequency of polypurine tracts in mRNA sequences of thermophilic prokaryotes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9): 2951-2956.
- Percival, E. G. V. and S. K. Chanda (1950). "The Xylan of *Rhodymenia palmata*." *Nature* 166(4227): 787-788.
- Perera, O. P., S. M. Valles, T. B. Green, S. White, C. A. Strong and J. J. Becnel (2006). "Molecular analysis of an occlusion body protein from *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus (CuniNPV)." *Journal of Invertebrate Pathology* 91(1): 35-42.
- Persson, I., F. Tjerneld and B. Hahn-Hägerdal (1991). "Fungal cellulolytic enzyme production: A review." *Process Biochemistry* 26(2): 65-74.
- Perttula, M., M. Rättö, M. Kondradsdottir, J. K. Kristjansson and L. Viikari (1993). "Xylanases of thermophilic bacteria from Icelandic hot springs." *Applied Microbiology and Biotechnology* 38(5): 592-595.
- Petti, C. A. (2007). "Medical Microbiology: Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing." *Clinical Infectious Diseases* 44(8): 1108-1114.
- Pham, P. L., P. Strehaiano and P. Taillandier (1997). "Effect of aeration on xylanase production by *Bacillus* sp. I-1018." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 18(1): 41-43.
- Plotnikov, M., G. Chernysheva, V. Smol'yakova, M. Maslov, I. Cherkashina, A. Krysin, I. Sorokina and T. Tolstikova (2007). "Effect of n -tyrosol on blood viscosity and platelet aggregation." *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 143(1): 61-63.
- Pogaku, P., A. Suresh, P. Srinivas and S. Ram Reddy (2010). "Optimization of lipase production by *Staphylococcus* sp. Lp12." *African Journal of Biotechnology* 9(6): 882-886.
- Pokusaeva, K., N. Kuisiene, D. Jasinskyte, K. Rutiene, J. Saleikiene and D. Chitavichius (2009). "Novel bacteriocins produced by *Geobacillus stearothermophilus*." *Central European Journal of Biology* 4(2): 196-203.
- Polizeli, M. L. T. M., A. C. S. Rizzatti, R. Monti, H. F. Terenzi, J. A. Jorge and D. S. Amorim (2005). "Xylanases from fungi: properties and industrial applications." *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(5): 577-591.
- Prathumpai, W., S. J. Flitter, M. McIntyre and J. Nielsen (2004). "Lipase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* expressing a lipase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(6): 714-719.
- Prazeres, J. N. d., J. A. B. Cruz and G. M. Pastore (2006). "Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity." *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 505-509.
- Priest, F. G. (1977). "Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*." *Bacteriological Reviews* 41(3): 711-753.

- Prikhod'ko, E. A., A. Lu, J. A. Wilson and L. K. Miller (1999). "In Vivo and In Vitro Analysis of Baculovirus-2 Mutants." Journal of Virology **73**(3): 2460-2468.
- Prikhod'ko, E. A. and L. K. Miller (1999). "The Baculovirus PE38 Protein Augments Apoptosis Induced by Transactivator IE1." Journal of Virology **73**(8): 6691-6699.
- Quintana-Castro, R., P. Díaz, G. Valerio-Alfaro, H. García and R. Oliart-Ros (2009). "Gene Cloning, Expression, and Characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 Thermoalkaliphilic Lipase." Molecular Biotechnology **42**(1): 75-83.
- Quintero, D., Z. Velasco, E. Hurtado-Gómez, J. L. Neira and L. M. Contreras (2007). "Isolation and characterization of a thermostable  $\beta$ -xylosidase in the thermophilic bacterium *Geobacillus pallidus*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics **1774**(4): 510-518.
- Quyên, D. T., C. Schmidt-Dannert and R. D. Schmid (2003). "High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase." Protein Expression and Purification **28**(1): 102-110.
- Rahman, R., T. Leow, A. Salleh and M. Basri (2007). "*Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia." BMC Microbiology **7**(1): 77.
- Raita, M., V. Champreda and N. Laosiripojana (2010). "Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in tert-butanol system." Process Biochemistry **45**(6): 829-834.
- Rajmohan, S., C. E. R. Dodd and W. M. Waites (2002). "Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage." Journal of Applied Microbiology **93**(2): 205-213.
- Ralet, M. C., J. F. Thibault and G. Della Valle (1990). "Influence of extrusion-cooking on the physico-chemical properties of wheat bran." Journal of Cereal Science **11**(3): 249-259.
- Rastogi, G., A. Bhalla, A. Adhikari, K. M. Bischoff, S. R. Hughes, L. P. Christopher and R. K. Sani (2010). "Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains." Bioresource Technology **101**(22): 8798-8806.
- Rastogi, G., G. L. Muppidi, R. N. Gurrām, A. Adhikari, K. M. Bischoff, S. R. Hughes, W. A. Apel, S. S. Bang, D. J. Dixon and R. K. Sani (2009). "Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **36**(4): 585-598.
- Rathi, P., S. Bradoo, R. K. Saxena and R. Gupta (2000). "A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation." Biotechnology Letters **22**(6): 495-498.
- Rathi, P., R. K. Saxena and R. Gupta (2001). "A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation." Process Biochemistry **37**(2): 187-192.
- Ratnaparkhe, A. and A. Tiwari (2011). BIO-PROSPECTING APPROACH FOR BIOCATALYSTS FROM EXTREMOPHILES.
- Razvi, A. and J. M. Scholtz (2006). "Lessons in stability from thermophilic proteins." Protein Science **15**(7): 1569-1578.
- Reading, N. C. and V. Sperandio (2006). "Quorum sensing: the many languages of bacteria." FEMS Microbiology Letters **254**(1): 1-11.



- Reetz, M. T. (2001). "Combinatorial and Evolution-Based Methods in the Creation of Enantioselective Catalysts." Angewandte Chemie International Edition **40**(2): 284-310.
- Reilly, P. J. (1981). "Xylanases: structure and function." Basic life sciences **18**: 111-129.
- Rizzatti, A., F. Freitas, M. Bertolini, S. Peixoto-Nogueira, H. Terenzi, J. Jorge and M. d. Polizeli (2008). "Regulation of xylanase in *Aspergillus phoenicis* a physiological and molecular approach." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **35**(4): 237-244.
- Robertson, N. M., J. Zangrilli, T. Fernandes-Alnemri, P. D. Friesen, G. Litwack and E. S. Alnemri (1997). "Baculovirus P35 Inhibits the Glucocorticoid-mediated Pathway of Cell Death." Cancer Research **57**(1): 43-47.
- Robson, L. M. and G. H. Chambliss (1984). "Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate." Applied and Environmental Microbiology **47**(5): 1039-1046.
- Rohrmann, G. F. (2011). Baculovirus Molecular Biology. US, National Center for Biotechnology Information.
- Romano, I., A. Poli, L. Lama, A. Gambacorta and B. Nicolaus (2005). "*Geobacillus thermoleovorans* subsp. stromboliensis subsp. nov., isolated from the geothermal volcanic environment." The Journal of General and Applied Microbiology **51**(3): 183-189.
- Rosas-Acosta, G., S. C. Braunagel and M. D. Summers (2001). "Effects of Deletion and Overexpression of the Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus FP25K Gene on Synthesis of Two Occlusion-Derived Virus Envelope Proteins and Their Transport into Virus-Induced Intranuclear Membranes." Journal of Virology **75**(22): 10829-10842.
- Rosenberg, A. H., B. N. Lade, C. Dao-shan, S.-W. Lin, J. J. Dunn and F. W. Studier (1987). "Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase." Gene **56**(1): 125-135.
- Rua, M. L., T. Diazmaurino, V. M. Fernandez, C. Otero and A. Ballesteros (1993). "Purification and characterization of 2 distinct lipases from *Candida cylindracea*." Biochimica Et Biophysica Acta **1156**(2): 181-189.
- Sabri, S., R. N. Z. R. A. Rahman, T. C. Leow, M. Basri and A. B. Salleh (2009). "Secretory expression and characterization of a highly Ca<sup>2+</sup>-activated thermostable L2 lipase." Protein Expression and Purification **68**(2): 161-166.
- Saffary, R., R. Nandakumar, D. Spencer, F. T. Robb, J. M. Davila, M. Swartz, L. Ofman, R. J. Thomas and J. DiRuggiero (2002). "Microbial survival of space vacuum and extreme ultraviolet irradiation: strain isolation and analysis during a rocket flight." FEMS Microbiology Letters **215**(1): 163-168.
- Sahdev, S., K. S. Saini and S. E. Hasnain (2010). "Baculovirus P35 protein: An overview of its applications across multiple therapeutic and biotechnological arenas." Biotechnology Progress **26**(2): 301-312.
- Salah, A., S. Ibrahim and A. I. El-diwany (2007). "Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme." Australian Journal of Basic and Applied Sciences **1**(4): 473-478. .
- Salameh, M. A. and J. Wiegel (2010). "Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two Alkalithermophilic Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*." The open biochemistry journal **4**: 22-28.

- Salameh, M. d. and J. Wiegel (2007 $\alpha$ ). Lipases from Extremophiles and Potential for Industrial Applications. Advances in Applied Microbiology. S. S. Allen I. Laskin and M. G. Geoffrey, Academic Press. **Volume 61**: 253-283.
- Salameh, M. d. A. and J. Wiegel (2007 $\beta$ ). "Purification and Characterization of Two Highly Thermophilic Alkaline Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*." Applied and Environmental Microbiology **73**(23): 7725-7731.
- Salkinoja-Salonen, M. (1990). Method for manufacturing paper or cardboard and product containing cellulase. US, Enso-Gutzeit Oy, Finland. **4,980,023**.
- Salovuori, I. (1987). Biosynthesis of an inducible glycosylated secretory enzyme (CBH I) of *Trichoderma reesei*. Espoo; Helsinki, Technical Research Centre of Finland ; Govt. Print. Centre [distributor].
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. NY, Cold Spring Harbor.
- Sánchez-Otero, M. G., I. I. Ruiz-López, D. E. Ávila-Nieto and R. M. Oliart-Ros (2011). "Significant improvement of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkalophilic lipase production using Response Surface Methodology." New Biotechnology **28**(6): 761-766.
- Sánchez, M., N. Prim, F. Ráñez-Gil, F. I. J. Pastor and P. Diaz (2002). "Engineering of baker's yeasts, *E. coli* and *Bacillus* hosts for the production of *Bacillus subtilis* Lipase A." Biotechnology and Bioengineering **78**(3): 339-345.
- Sandalli, C., K. Singh, M. Modak, A. Ketkar, S. Canakci, İ. Demir and A. Belduz (2009). "A new DNA polymerase I from *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4: cloning, characterization, and mutational analysis of two aromatic residues." Applied Microbiology and Biotechnology **84**(1): 105-117.
- Sangeetha, R., I. Arulpandi and A. Geetha (2011). "Bacterial Lipases as Potential Industrial Biocatalysts: An Overview." Research Journal of Microbiology **6**: 1-24.
- Sangeetha, R., A. Geetha and I. Arulpandi (2010). "Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization." Brazilian Journal of Microbiology **41**: 179-185.
- Sanghi, A., N. Garg, J. Sharma, K. Kuhar, R. Kuhad and V. Gupta (2008). "Optimization of xylanase production using inexpensive agro-residues by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH in solid-state fermentation." World Journal of Microbiology and Biotechnology **24**(5): 633-640.
- Sani, D. G. (2006) " Step up: Bacterial lipase to substitute pancreatic lipase for enzyme therapy."
- Sanz-Aparicio, J., J. A. Hermoso, M. Martínez-Ripoll, J. L. Lequerica and J. Polaina (1998). "Crystal structure of  $\beta$ -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases." Journal of Molecular Biology **275**(3): 491-502.
- Saville, G. P., A. L. Patmanidi, R. D. Possee and L. A. King (2004). "Deletion of the Autographa californica nucleopolyhedrovirus chitinase KDEL motif and in vitro and in vivo analysis of the modified virus." Journal of General Virology **85**(4): 821-831.
- Saxena, I. M. and R. M. Brown (2005). "Cellulose Biosynthesis: Current Views and Evolving Concepts." Annals of Botany **96**(1): 9-21.
- Schiano Moriello, V., L. Lama, A. Poli, C. Gugliandolo, T. L. Maugeri, A. Gambacorta and B. Nicolaus (2003). "Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **30**(2): 95-101.

- Schiraldi, C., M. Acone, M. Giuliano, M. Carteni, M. De Rosa, I. Di Lernia and C. Maresca (2001). "Innovative fermentation strategies for the production of extremophilic enzymes." Extremophiles **5**(3): 193-198.
- Schiraldi, C. and M. De Rosa (2002). "The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles." Trends in Biotechnology **20**(12): 515-521.
- Schloss, P. D., A. G. Hay, D. B. Wilson, J. M. Gossett and L. P. Walker (2005). "Quantifying bacterial population dynamics in compost using 16S rRNA gene probes." Applied Microbiology and Biotechnology **66**(4): 457-463.
- Schmid, R. D. and R. Verger (1998). "Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications." Angewandte Chemie International Edition **37**(12): 1608-1633.
- Schmidt-Dannert, C., H. Sztajer, W. Stöcklein, U. Menge and R. D. Schmid (1994). "Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism **1214**(1): 43-53.
- Schmoll, M. and C. P. Kubicek (2003). "Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus." Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica **50**(2): 125-145.
- Schultz, K. L. W., J. A. Wetter, D. C. Fiore and P. D. Friesen (2009). "Transactivator IE1 Is Required for Baculovirus Early Replication Events That Trigger Apoptosis in Permissive and Nonpermissive Cells." Journal of Virology **83**(1): 262-272.
- Schulze, E. (1891). "In formation regarding chemical composition of plant cell membrane." Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft **24**: 2277-2287.
- Schwarz, W. H. (2001). "The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria." Applied Microbiology and Biotechnology **56**(5): 634-649.
- Sekiguchi, Y. (2006). "Yet-to-be Cultured Microorganisms Relevant to Methane Fermentation Processes." Microbes and Environments **21**(1): 1-15.
- Semenovaa, M., O. Okunevb, A. Gusakov and V. A. Sinityn (2009). "Disaccharide Synthesis by Enzymatic Condensation of Glucose: Glycoside Linkage Patterns for Different Fungal Species." Open Glycoscience **2**: 20-24.
- Sepahy, A. A., S. Ghazi and M. A. Sepahy (2011). "Cost-Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase by Indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 Fermented on Agricultural Waste." Enzyme Research **2011**.
- Shaku, M., S. Koike and S. Udaka (1980). "Cultural conditions for protein production by *Bacillus brevis* No. 47. ." Agric Biol Chem **44**: 99-103.
- Shariff, F. M., R. N. Z. R. A. Rahman, M. Basri and A. B. Salleh (2011). "A Newly Isolated Thermostable Lipase from *Bacillus* sp." International Journal of Molecular Sciences **12**(5): 2917-2934.
- Sharma, A., S. Adhikari and T. Satyanarayana (2007). "Alkali-thermostable and cellulase-free xylanase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*." World Journal of Microbiology and Biotechnology **23**(4): 483-490.
- Sharma, D., B. Sharma and A. K. Shukla (2011). "Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review. ." Biotechnology **10**: 23-40.
- Sharma, P., S. Pajni, N. Dhillon, D. V. Vadehra and D. K. Dube (1986). "Limitations of the Congo-Red staining techniques for the detection of cellulolytic activities." Biotechnology Letters **8**(8): 579-580.
- Sharma, R., Y. Chisti and U. C. Banerjee (2001). "Production, purification, characterization, and applications of lipases." Biotechnology Advances **19**(8): 627-662.

- Sharma, R., S. K. Soni, R. M. Vohra, L. K. Gupta and J. K. Gupta (2002 $\alpha$ ). "Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1." Process Biochemistry **37**(10): 1075-1084.
- Sharma, R., S. K. Soni, R. M. Vohra, R. S. Jolly and L. K. Gupta (2002 $\beta$ ). Production of extracellular alkaline lipase from a *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. Hisar, INDE, Association of Microbiologists of India.
- Shrivastava, B., S. Thakur, Y. Khasa, A. Gupte, A. Puniya and R. Kuhad (2011). "White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed." Biodegradation **22**(4): 823-831.
- Si, Y.-H., M.-G. Fang, Y. Huang, F.-L. Zheng, T. Li, Z.-H. Hu and H.-Z. Wang (2007). "Construction and Characterization of a *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus Bacterial Artificial Chromosome with Deletion of Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase Gene." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **71**(10): 2435-2441.
- Sibtain, A., Qurrat-ul-Ain, A. Nighat, N. Saima, Sajjad-ur-Rahman and J. Amer (2003). "Induction of Xylanase and Cellulase Genes from *Trichoderma harzianum* with Different Carbon Sources." Pakistan Journal of Biological Sciences **6**: 1912-1916.
- Sifour, M., T. I. Zaghoul, H. M. Saeed, M. M. Berekaa and Y. R. Abdel-fattah (2010). "Enhanced production of lipase by the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental designs." New Biotechnology **27**(4): 330-336.
- Simpson, H., U. Haufler and R. Daniel (1991). "An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*." Biochem J. **277**: 413-417.
- Sinchaikul, S., B. Sookkheo, S. Phutrakul, F.-M. Pan and S.-T. Chen (2001). "Optimization of a Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, Purification, and Characterization." Protein Expression and Purification **22**(3): 388-398.
- Sindhu, I., S. Chhibber, N. Capalash and P. Sharma (2006). "Production of Cellulase-Free Xylanase from *Bacillus megaterium* by Solid State Fermentation for Biobleaching of Pulp." Current Microbiology **53**(2): 167-172.
- Singer, G. A. C. and D. A. Hickey (2003). "Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content." Gene **317**(0): 39-47.
- Singh, A. and K. Hayashi (1995). *Microbial Cellulases: Protein Architecture, Molecular Properties, and Biosynthesis*. Advances in Applied Microbiology. N. Saul and I. L. Allen, Academic Press. **Volume 40**: 1-44.
- Singh, R., N. Gupta, V. Goswami and R. Gupta (2006). "A simple activity staining protocol for lipases and esterases." Applied Microbiology and Biotechnology **70**(6): 679-682.
- Singh, S., A. M. Madlala and B. A. Prior (2003). "*Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases." FEMS Microbiology Reviews **27**(1): 3-16.
- Singh, S. M. and A. K. Panda (2005). "Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins." Journal of Bioscience and Bioengineering **99**(4): 303-310.
- Singh, S. P. and D. Singh (2010). "Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review." Renewable and Sustainable Energy Reviews **14**(1): 200-216.

- Smith, G. E., M. D. Summers and M. J. Fraser (1983). "Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector." Molecular and Cellular Biology **3**(12): 2156-2165.
- Sorensen, H. and K. Mortensen (2005). "Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*." Microbial Cell Factories **4**(1): 1.
- Sorokin, D. and B. Jones (2009). "Improved method for direct screening of true lipase-producing microorganisms with particular emphasis on alkaline conditions." Microbiology **78**(1): 125-130.
- Srivastava, R. and A. K. Srivastava (1993). "Characterization of a bacterial xylanase resistant to repression by glucose and xylose." Biotechnology Letters **15**(8): 847-852.
- Steiner, W., R. M. Lafferty, I. Gomes and H. Esterbauer (1987). "Studies on a wild strain of *Schizophyllum commune*: Cellulase and xylanase production and formation of the extracellular polysaccharide Schizophyllan." Biotechnology and Bioengineering **30**(2): 169-178.
- Sternberg, D. and G. R. Mandels (1979). "Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose." Journal of Bacteriology **139**(3): 761-769.
- Sternberg, D. and G. R. Mandels (1980). "Regulation of the cellulolytic system in *Trichoderma reesei* by sophorose: induction of cellulase and repression of beta-glucosidase." Journal of Bacteriology **144**(3): 1197-1199.
- Stetter, K. O. (1999). "Extremophiles and their adaptation to hot environments." FEBS Letters **452**(1-2): 22-25.
- Stránský, K., M. Zarevúcka, Z. Kejík, Z. Wimmer, M. Macková and K. Demnerová (2007). "Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum* sp." Biochemical Engineering Journal **34**(3): 209-216.
- Strober, W. (2001). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." Journal of Molecular Biology **189**(1): 113-130.
- Subramaniyan, S. and P. Prema (2002). "Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application." Critical Reviews in Biotechnology **22**(1): 33-64.
- Sugihara, A., T. Tani and Y. Tominaga (1991). "Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Bacillus* Sp." Journal of Biochemistry **109**(2): 211-216.
- Sugiura, T., Y. Ota and Y. Minoda (1975). "Effects of fatty acids, lipase activator, phospholipids and related substances on the lipase production by *Candida parapolytica*." Agricultural and Biological Chemistry **39**(9): 1689-1694.
- Sukumaran, R. K., R. R. Singhanian and A. Pandey (2005). Microbial cellulases - Production, applications and challenges, CSIR.
- Sun, X., Z. Liu, Y. Qu and X. Li (2008). "The Effects of Wheat Bran Composition on the Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes by *Penicillium decumbens* " Applied Biochemistry and Biotechnology **146**(1): 119-128.
- Sunitha, S., S. Kanjilal, P. S. Reddy and R. B. N. Prasad (2007). "Ionic liquids as a reaction medium for lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil." Biotechnology Letters **29**(12): 1881-1885.
- Sunna, A. and G. Antranikian (1997). "Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria." Critical Reviews in Biotechnology **17**(1): 39-67.

- Sunna, A. and P. Bergquist (2003). "A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4- $\beta$ -xylanase isolated directly from an environmental DNA sample." Extremophiles **7**(1): 63-70.
- Sunna, A., J. Puls and G. Antranikian (1997). "Characterization of the xylanolytic enzyme system of the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermotoga maritima*, *T. neapolitana*, and *T. thermarum*." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **118**(3): 453-461.
- Suto, M. and F. Tomita (2001 $\alpha$ ). "Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi." Journal of Bioscience and Bioengineering **92**(4): 305-311.
- Suto, M. and F. Tomita (2001 $\beta$ ). "Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi." The Society for Biotechnology, Japan **92**(4): 305-311.
- Szewczyk, B., L. Hoyos-Carvajal, M. Paluszek, I. Skrzecz and M. Lobo de Souza (2006). "Baculoviruses — re-emerging biopesticides." Biotechnology Advances **24**(2): 143-160.
- Tabka, M. G., I. Herpoël-Gimbert, F. Monod, M. Asther and J. C. Sigoillot (2006). "Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment." Enzyme and Microbial Technology **39**(4): 897-902.
- Tai, S. K., H. P. P. Lin, J. Kuo and J. K. Liu (2004). "Isolation and characterization of a cellulolytic *Geobacillus thermoleovorans* T4 strain from sugar refinery wastewater." Extremophiles **8**(5): 345-349.
- Taj-Aldeen, S. J. (1993). "Effect of starch on the induction of  $\beta$ -glucosidase in *Trichoderma reesei*." Mycological Research **97**(3): 318-320.
- Takaç, S. and B. Marul (2008). "Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **35**(9): 1019-1025.
- Takami, H., S. Nishi, J. Lu, S. Shimamura and Y. Takaki (2004). "Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench." Extremophiles **8**(5): 351-356.
- Tamerler, C. and T. Keshavarz (2000). Lipolytic enzyme production in batch and fed-batch cultures of *Ophiostoma piceae* and *Fusarium oxysporum*. Chichester, ROYAUME-UNI, Wiley.
- Taylor, T. and I. Vaisman (2010). "Discrimination of thermophilic and mesophilic proteins." BMC Structural Biology **10**(Suppl 1): S5.
- Tayyab, M., N. Rashid and M. Akhtar (2011). "Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: Cloning and characterization of the lipase." Journal of Bioscience and Bioengineering **111**(3): 272-278.
- Teather, R. M. and P. J. Wood (1982). "Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen." Applied and Environmental Microbiology **43**(4): 777-780.
- Thomas, C. J., H. L. Brown, C. R. Hawes, B. Y. Lee, M.-K. Min, L. A. King and R. D. Possee (1998). "Localization of a Baculovirus-Induced Chitinase in the Insect Cell Endoplasmic Reticulum." Journal of Virology **72**(12): 10207-10212.
- Tomme, P., R. A. J. Warren and N. R. Gilkes (1995). Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. Advances in Microbial Physiology. R. K. Poole, Academic Press. **Volume 37**: 1-81.
- Treichel, H., D. de Oliveira, M. A. Mazutti, M. Di Luccio and J. V. Oliveira (2010). "A review on microbial lipases production." Food and Bioprocess Technology **3**(2): 182-196.

- Trivedi, S., S. R. Rao and H. S. Gehlot (2005). "Nucleic acid stability in thermophilic prokaryotes : a review." Journal of Cell and Molecular Biology **4**: 61-69.
- Trudeau, D., J. O. Washburn and L. E. Volkman (2001). "Central Role of Hemocytes in *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*." Journal of Virology **75**(2): 996-1003.
- Tumilasci, V. F., È. Leal, P. M. A. Zanotto, T. Luque and J. L. C. Wolff (2003). "Sequence Analysis of a 5.1 kbp Region of the Spodoptera frugiperda Multicapsid Nucleopolyhedrovirus Genome that Comprises a Functional Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase (egt) Gene." Virus Genes **27**(2): 137-144.
- Turner, P., G. Mamo and E. Karlsson (2007). "Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining." Microbial Cell Factories **6**(1): 9.
- Turunen, O., K. Etuaho, F. Fenel, J. Vehmaanperä, X. Wu, J. Rouvinen and M. Leisola (2001). "A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the  $\alpha$ -helix region of *Trichoderma reesei* endo-1,4- $\beta$ -xylanase II increases the thermal stability through synergism." Journal of Biotechnology **88**(1): 37-46.
- Turunen, O., M. Vuorio, F. Fenel and M. Leisola (2002). "Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4- $\beta$ -xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH." Protein Engineering **15**(2): 141-145.
- Uffen, R. L. (1997). "Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **19**(1): 1-6.
- Ugwuanyi, J. O. (2008). "Yield and protein quality of thermophilic *Bacillus* spp. biomass related to thermophilic aerobic digestion of agricultural wastes for animal feed supplementation." Bioresource Technology **99**(8): 3279-3290.
- Uhl, A. M. and R. M. Daniel (1999). "The first description of an archaeal hemicellulase: the xylanase from *Thermococcus zilligii* strain AN1." Extremophiles **3**(4): 263-267.
- Urbietá, M., E. González Toril, A. Aguilera, M. Giaveno and E. Donati (2012). "First Prokaryotic Biodiversity Assessment Using Molecular Techniques of an Acidic River in Neuquén, Argentina." Microbial Ecology: 1-14.
- Van de Peer, Y. and R. De Wachter (1994). "TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment." Computer applications in the biosciences : CABIOS **10**(5): 569-570.
- van Oers, M. (2011). "Opportunities and challenges for the baculovirus expression system." Journal of Invertebrate Pathology **107, Supplement(0)**: S3-S15.
- van Oers, M. M., J. T. M. Flipsen, C. B. E. M. Reusken and J. M. Vlak (1994). "Specificity of Baculovirus p10 Functions." Virology **200**(2): 513-523.
- van Peij, N. N. M. E., J. Brinkmann, M. Vršanská, J. Visser and L. H. de Graaff (1997). " $\beta$ -Xylosidase Activity, Encoded by xlnD, is Essential for Complete Hydrolysis of Xylan by *Aspergillus niger* but not for Induction of the Xylanolytic Enzyme Spectrum." European Journal of Biochemistry **245**(1): 164-173.
- van Rantwijk, F., R. Madeira Lau and R. A. Sheldon (2003). "Biocatalytic transformations in ionic liquids." Trends in Biotechnology **21**(3): 131-138.
- van Rantwijk, F. and R. A. Sheldon (2007). "Biocatalysis in Ionic Liquids." Chemical Reviews **107**(6): 2757-2785.

- Vanarsdall, A. L., K. Okano and G. F. Rohrmann (2006). "Characterization of the Role of Very Late Expression Factor 1 in Baculovirus Capsid Structure and DNA Processing." Journal of Virology **80**(4): 1724-1733.
- Vargas, V. A., O. D. Delgado, R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson (2004). "Lipase-producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake." Biotechnology Letters **26**(2): 81-86.
- Verger, R. (1997). "'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts." Trends in Biotechnology **15**(1): 32-38.
- Versalovic, J., M. Schneider, F. De Bruijn and J. Lupski (1994). "Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction." Methods Mol Cell Biol **5**: 25 - 40.
- Vieille, C. and G. J. Zeikus (2001). "Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability." Microbiology and Molecular Biology Reviews **65**: 1 - 43.
- Viikari, L., A. Kantelinen, J. Sundquist and M. Linko (1994). "Xylanases in bleaching: From an idea to the industry." FEMS Microbiology Reviews **13**(2-3): 335-350.
- Vimla, A., C. C. Rath and A. Sree (2009). "Characterisation of extracellular cellulase (Endoglucanase) activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus* isolated from marine sponges of Gopalpur coast, Orissa (Bay of Bengal)." Journal of Pure and Applied Microbiology **3**(1): 67-74.
- Volkman, L. E. and M. D. Summers (1977). "*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: Comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded forms." Journal of Invertebrate Pathology **30**(1): 102-103.
- Walker, J. M., A. Belkum and P. W. M. Hermans (2001). BOX PCR Fingerprinting for Molecular Typing of *Streptococcus pneumoniae*. Antibiotic Resistance. S. H. Gillespie, Humana Press. **48**: 159-168.
- Wang, J., Y. Bai, P. Shi, H. Luo, H. Huang, J. Yin and B. Yao (2011). "A novel xylanase, XynA4-2, from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with potential applications in the brewing industry." World Journal of Microbiology and Biotechnology **27**(2): 207-213.
- Wang, M., E. Tuladhar, S. Shen, H. Wang, M. M. van Oers, J. M. Vlak and M. Westenberg (2010). "Specificity of Baculovirus P6.9 Basic DNA-Binding Proteins and Critical Role of the C Terminus in Virion Formation." Journal of Virology **84**(17): 8821-8828.
- Wang, S. L., Y. T. Lin, T. W. Liang, S. H. Chio, L. J. Ming and P. C. Wu (2009). "Purification and characterization of extracellular lipases from *Pseudomonas monteilii* TKU009 by the use of soybeans as the substrate." J Ind Microbiol Biotechnol **36**(1): 65-73.
- Wang, Y., K. C. Srivastava, G.-J. Shen and H. Y. Wang (1995). "Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841)." Journal of Fermentation and Bioengineering **79**(5): 433-438.
- Wase, D. A. J., W. J. McManamey, S. Raymahasay and A. K. Vaid (1985). "Comparisons between cellulase production by *Aspergillus fumigatus* in agitated vessels and in an air-lift fermentor." Biotechnology and Bioengineering **27**(8): 1166-1172.
- Weng, F. Y., C. S. Chiou, P. H. P. Lin and S. S. Yang (2009). "Application of recA and rpoB sequence analysis on phylogeny and molecular identification of *Geobacillus* species." Journal of Applied Microbiology **107**(2): 452-464.



- Wilkes, J. S. (2004). "Properties of ionic liquid solvents for catalysis." Journal of Molecular Catalysis A: Chemical **214**(1): 11-17.
- Winkler, F. K., A. D'Arcy and W. Hunziker (1990). "Structure of human pancreatic lipase." Nature **343**(6260): 771-774.
- Winterhalter, C., P. Heinrich, A. Candussio, G. Wich and W. Liebl (1995). "Identification of a novel cellulose-binding domain the multidomain 120 kDa xylanase XynA of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*." Molecular Microbiology **15**(3): 431-444.
- Wolfenden, R. and M. J. Snider (2001). "The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts." Accounts of Chemical Research **34**(12): 938-945.
- Wong, K. K., L. U. Tan and J. N. Saddler (1988). "Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications." Microbiological Reviews **52**(3): 305-317.
- Woo, P. C. Y., S. K. P. Lau, J. L. L. Teng, H. Tse and K. Y. Yuen (2008). "Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories." Clinical Microbiology and Infection **14**(10): 908-934.
- Wu, C. and S. Wang (2012). "A pH-Sensitive Heparin-Binding Sequence from Baculovirus gp64 Protein Is Important for Binding to Mammalian Cells but Not to Sf9 Insect Cells." Journal of Virology **86**(1): 484-491.
- Wu, S., B. Liu and X. Zhang (2006). "Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific." Applied Microbiology and Biotechnology **72**(6): 1210-1216.
- Xu, Y., H. Liu, W. Du, Y. Sun, X. Ou and D. Liu (2009). "Integrated production for biodiesel and 1,3-propanediol with lipase-catalyzed transesterification and fermentation." Biotechnology Letters **31**(9): 1335-1341.
- Xue, L., Y. Li, F. Zou, L. Lu, Y. Zhao, X. Huang and Y. Qu (2012). "The catalytic efficiency of lipase in a novel water-in-[Bmim][PF6] microemulsion stabilized by both AOT and Triton X-100." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **92**(0): 360-366.
- Yan, J., J. Yang, L. Xu and Y. Yan (2007). "Gene cloning, overexpression and characterization of a novel organic solvent tolerant and thermostable lipase from *Galactomyces geotrichum* Y05." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **49**(1-4): 28-35.
- Yang, S. and L. K. Miller (1999). "Activation of Baculovirus Very Late Promoters by Interaction with Very Late Factor 1." Journal of Virology **73**(4): 3404-3409.
- Yang, Z. and W. Pan (2005). "Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis." Enzyme and Microbial Technology **37**(1): 19-28.
- Yu, M. and E. B. Carstens (2010). "Identification of a Domain of the Baculovirus *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Single-Strand DNA-Binding Protein LEF-3 Essential for Viral DNA Replication." Journal of Virology **84**(12): 6153-6162.
- Yu, Q. (2010). "Identification and functional analysis of the putative anti-apoptotic gene iap of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus." Virus Genes **41**(2): 298-304.
- Zahoor, S., M. Javed, M. Aftab and I.-u.-H. Ikram-ul-Haq (2011). "Cloning and expression of  $\beta$ -glucosidase gene from *Bacillus licheniformis* into *E. coli* BL 21 (DE3)." Biologia **66**(2): 213-220.
- Zarringhalami, S., M. A. Sahari, M. Barzegar and Z. Hamidi-Esfehani (2010). "Enzymatically modified tea seed oil as cocoa butter replacer in dark

- chocolate." International Journal of Food Science & Technology **45**(3): 540-545.
- Zeigler, D. R. (2005). "Application of a recN sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55**(3): 1171-1179.
- Zeilinger, S., R. L. Mach, M. Schindler, P. Herzog and C. P. Kubicek (1996). "Different Inducibility of Expression of the Two Xylanase Genes xyn1 and xyn2 in *Trichoderma reesei*." Journal of Biological Chemistry **271**(41): 25624-25629.
- Zhang, A., R. Gao, N. Diao, G. Xie, G. Gao and S. Cao (2009 $\alpha$ ). "Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **56**(2-3): 78-84.
- Zhang, H., F. Zhang and Z. Li (2009 $\beta$ ). "Gene analysis, optimized production and property of marine lipase from *Bacillus pumilus* B106 associated with South China Sea sponge *Halichondria rugosa*." World Journal of Microbiology and Biotechnology **25**(7): 1267-1274.
- Zhang, J., S.-K. Tang, Y.-Q. Zhang, L.-Y. Yu, H.-P. Klenk and W.-J. Li (2010). "*Laceyella tengchongensis* sp. nov., a thermophile isolated from soil of a volcano." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **60**(9): 2226-2230.
- Zhang, P. Y. H., M. E. Himmel and J. R. Mielenz (2006). "Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies." Biotechnology Advances **24**(5): 452-481.
- Zhang, T., X. Xu, L. Shen, Y. Feng, Z. Yang, Y. Shen, J. Wang, W. Jin and X. Wang (2009 $\gamma$ ). "Modeling of protein refolding from inclusion bodies." Acta Biochimica et Biophysica Sinica **41**(12): 1044-1052.
- Zhang, Y.-H. P. and L. R. Lynd (2004). "Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems." Biotechnology and Bioengineering **88**(7): 797-824.
- Zhang, Y., K. Meng, Y. Wang, H. Luo, P. Yang, P. Shi, N. Wu, Y. Fan, J. Li and B. Yao (2008). "A novel proteolysis-resistant lipase from keratinolytic *Streptomyces fradiae* var. k11." Enzyme and Microbial Technology **42**(4): 346-352.
- Zhao, L.-L., J.-H. Xu, J. Zhao, J. Pan and Z.-L. Wang (2008). "Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010." Process Biochemistry **43**(6): 626-633.
- Zheng, H., B. Guo, X.-L. Chen, S.-J. Fan and Y.-Z. Zhang (2011). "Improvement of the quality of wheat bread by addition of glycoside hydrolase family 10 xylanases." Applied Microbiology and Biotechnology **90**(2): 509-515.
- Zhou, J. and G. W. Blissard (2008). "Identification of a GP64 Subdomain Involved in Receptor Binding by Budded Virions of the Baculovirus Autographica californica Multicapsid Nucleopolyhedrovirus." Journal of Virology **82**(9): 4449-4460.
- Zhu, K., A. Jutila, E. K. J. Tuominen, S. A. Patkar, A. Svendsen and P. K. J. Kinnunen (2001). "Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology **1547**(2): 329-338.

- Zhu, W., D. Cha, G. Cheng, Q. Peng and P. Shen (2007). "Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049." Enzyme and Microbial Technology **40**(6): 1592-1597.
- Zverlov, V., S. Mahr, K. Riedel and K. Bronnenmeier (1998). "Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from the extreme thermophile '*Anaerocellum thermophilum*' with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains." Microbiology **144**(2): 457-465.

- Καραγκούνη Α.Δ. (2001) Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενικής Μικροβιολογίας. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα
- Μεϊντάνης Χ.Κ. (2005) Μελέτη ποικιλότητας προκαρυωτικών οργανισμών (Αρχαίων και Βακτηριακών προκαρυωτικών οργανισμών) στη Σαντορίνη. Διακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών.