



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ,

ΟΜΑΔΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ,

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Υπερέκφραση, καθαρισμός και χαρακτηρισμός μίας
θερμόφιλης β-φωσφογλυκοζιδάσης από το
Geobacillus sp. και παραγωγή καθαρών
φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων**

Μαλάμος Αθανάσιος

ΑΜ 111320100042

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: Δημήτρης Χατζηνικολάου

Αθήνα 2016

Ευχαριστιες

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας, του Τομέα Βοτανικής στο πλαίσιο των προπτυχιακών σπουδών στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για την επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον κο Δημήτρη Χατζηνικολάου, Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιολογίας, του ΕΚΠΑ, για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του. Η συνεισφορά αυτή ήταν καθοριστική για την εκπλήρωση αυτής της εργασίας.

Την Αναστασία Γαλανπούλου, για την καθημερινή της βοήθεια και το χρόνο που αφιέρωσε.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους και την οικογένειά μου που βρίσκονταν πάντα δίπλα μου και στήριζαν τις επιλογές μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ένζυμο β-P-γλυκοζιδάση (EC 3.2.1.86) είναι ένα σημαντικό μέλος της οικογένειας των γλυκοζιδικών υδρολασών GH1, με λειτουργία την υδρόλυση των β-(1,4)-γλυκοζιδικών δεσμών σε φωσφορυλιωμένα υποστρώματα. Η δράση του εξαρτάται από το βακτηριακό σύστημα μεταφοράς υδατανθράκων PEP:PTS (PhosphoenolPyruvate: PhosphoTransferase System), το οποίο ευθύνεται για την πρόσληψη και ταυτόχρονη φωσφορυλίωση πλήθους εξωκυτταρικών ολιγοσακχαριτών. Για τη διεξαγωγή του βιοχημικού χαρακτηρισμού του ενζύμου, πραγματοποιήθηκε βιοσύνθεση και καθαρισμός φωσφορυλιωμένων δισακχαριτών, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα της β-P-γλυκοζιδάσης. Κατόπιν έγινε υπερέκφραση του γονιδίου μίας GH1 β-P-γλυκοζιδάσης, η οποία είχε προηγουμένως απομονωθεί από θερμοφίλο στέλεχος του *Geobacillus sp.* και το τελικό προϊόν υπέστη διαδικασία καθαρισμού. Μέσω μετρήσεων της ενζυμικής ενεργότητας σε ένα εύρος θερμοκρασιών και pH, προσδιορίστηκε ως βέλτιστη θερμοκρασία δράσης αυτή των 65°C και η τιμή pH 6. Οι μελέτες θερμοκρασιακής σταθερότητας έδειξαν ότι το ένζυμο δεν διατηρεί την αρχική του ενεργότητα μετά από επώαση σε θερμοκρασία 65 °C για διάστημα μίας ώρας. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη πιθανών αναστολέων στο ενζυμικό διάλυμα δεν επέφερε σημαντική μείωση της ενζυμικής ενεργότητας.

ABSTRACT

The enzyme 6-phospho- β -glucosidase (EC 3.2.1.86) from glycoside hydrolase family 1 (GH1), catalyzes the hydrolysis of β -(1,4)-linked phosphorylated compounds. The enzymatic function is closely dependent on the bacterial PEP:PTS system (PhosphoEnolPyruvate: PhosphoTransferase System), which is responsible for the uptake and simultaneous phosphorylation of numerous extracellular oligosaccharides. Production and purification of phosphorylated disaccharides to be used as substrates, was the first step towards the characterization of a novel β -P-glucosidase isolated from a thermophilic strain of *Geobacillus sp.* Moreover, sufficient quantities of protein were obtained as a result of overexpression in recombinant *E. coli* strains and purification. The optimal conditions of the enzymatic reaction were determined by measurement of enzymatic activity in different temperatures and pH values. Thus, optimal enzyme activity was exhibited at 65 °C and pH 6. Thermal stability was also ascertained. Incubation of the enzymatic solution across a range of temperatures resulted in a substantial decrease in activity. However, no significant decrease was observed following the addition of inhibitors.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	6
1.1.1 Θερμόφιλοι μικροοργανισμοί.....	6
1.1.2 Το γένος Geobacillus	9
1.2 ΕΝΖΥΜΑ.....	13
1.2.1 Κινάσες	13
1.2.2 Γλυκοζιδικές υδρολάσες (Glycoside Hydrolases, GHs)	14
1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	20
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	21
2.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ.....	21
2.1.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες καλλιέργειας.....	21
2.1.2 Πλασμίδια.....	21
2.2 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ β-ΦΩΣΦΟ-ΓΛΥΚΟΖΙΔΑΣΗΣ.....	22
2.2.1 Υπερέκφραση β-φωσφο-γλυκοζιδάσης	22
2.2.2 Καθαρισμός β-φωσφο-γλυκοζιδάσης.....	22
2.2.3 Συνθήκες αποθήκευσης β-φωσφο-γλυκοζιδάσης	24
2.2.4 Αποκοπή επιτόπου ιστιδίνης.....	24
2.2.5 Υπερέκφραση και καθαρισμός υπόλοιπων ενζύμων.....	24
2.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ β-ΦΩΣΦΟΓΛΥΚΟΖΙΔΑΣΗΣ	24
2.3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (SDS-PAGE) 24	
2.3.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών απουσία αποδιατακτικού παράγοντα (Native PAGE)	26
2.3.3 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας	27
2.3.4 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	29
2.3.5 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική ενεργότητα	30
2.3.6 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική σταθερότητα	30
2.3.7 Επίδραση του pH στην ενζυμική ενεργότητα	30

2.3.8 Μελέτη της αναστολής στην ενζυμική ενεργότητα από ολιγο- και μονοσακχαρίτες	30
2.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ.....	32
2.4.1 Βιοσύνθεση και καθαρισμός φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων	32
2.4.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης υποστρωμάτων	33
2.4.5 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).....	34
2.4.6 Συνθήκες συντήρησης	34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
3.1 ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ.....	35
3.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ.....	36
3.2.1 Αρχικός καθαρισμός με βάριο	36
3.2.2 Καθαρισμός υποστρωμάτων σε στήλη ανιοντοανταλλαγής	37
3.3 ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ.....	38
3.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική ενεργότητα	38
3.3.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική σταθερότητα	39
3.3.3 Επίδραση του pH στην ενζυμική ενεργότητα	39
Εικόνα 3.7: Επίδραση pH στην ενεργότητα της β-φωσφογλυκοζιδάσης. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων.	40
3.3.4 Επίδραση αναστολέων στην ενεργότητα της β-φωσφογλυκοζιδάσης.....	40
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

1.1.1 Θερμόφιλοι μικροοργανισμοί

1.1.1.1 Ορισμός

Ως θερμόφιλοι χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί οι οποίοι εμφανίζουν βέλτιστη ανάπτυξη σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 40 °C (Antranikian et al. 2008). Σε αυτήν την κατηγορία των ακραιόφιλων μικροοργανισμών ανήκουν κυρίως προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, βακτήρια και αρχαία, και λιγότερο ευκαρυωτικοί. Όπως έχει παρατηρηθεί, ο αριθμός των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας με αποτέλεσμα, σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 75 °C, η συντριπτική πλειονότητα των εκπροσώπων - υπερθερμόφιλοι μικροοργανισμοί - να ανήκουν στους προκαρυωτικούς (Stetter 2006).

Τα ανώτατα όρια που περιορίζουν την ύπαρξη ζωής στη Γη δεν είναι γνωστά με σαφήνεια. Με αφετηρία την ανακάλυψη του βακτηρίου *Thermus aquaticus* στις θερμές πηγές του Yellowstone National Park (Brock TD, 1967), συνεχώς διευρύνονται και προσδιορίζονται καινούρια είδη τα οποία αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες οι οποίες θεωρούνταν προηγουμένως απαγορευτικές. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το υπερθερμόφιλο αρχαίο *Geogemma barossii* το οποίο αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 121 °C, ενώ διατηρεί τις βιολογικές του λειτουργίες έως και τους 130 °C (Kashefy and Lovley, 2003).

Τα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών τα οποία ευθύνονται για την ικανότητά τους να διαβιούν στις ακραίες αυτές θερμοκρασίες είναι αντικείμενο μελέτης συνεχώς αυξανόμενου ενδιαφέροντος για λόγους που θα αναφερθούν στη συνέχεια.

1.1.1.2 Ενδιαιτήματα

Τα φυσικά ενδιαιτήματα όπου εντοπίζονται κατά κύριο λόγο οι θερμόφιλοι μικροοργανισμοί είναι θερμαινόμενα μέσω γεωθερμικής ενέργειας. Τέτοια ενδιαιτήματα αποτελούν:

- Ηφαιστειακά εδάφη (Zhang et al. 2010)
- Υδροθερμικές εκκενώσεις
 - Επιφανειακές θερμές πηγές (Alkhalili et al. 2016)
 - Υποθαλάσσιες καμινάδες (Zhang and He 2016)

Θερμόφιλοι μικροοργανισμοί εντοπίζονται και σε τεχνητά ενδιαιτήματα, όπως:

- Οικιακούς θερμοσίφωνες (Brock and Boylen 1973)
- Τμήματα της βιομηχανίας τροφίμων (Huck et al. 2008)

Η μελέτη των θερμόφιλων, όπως και άλλων ακραιόφιλων, οργανισμών που απομονώνονται από τα φυσικά τους ενδιαιτήματα, παρουσιάζει εκτός από μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, μία μοναδική ευκαιρία να εξακριβωθούν οι εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στους υπάρχοντες μικροοργανισμούς.

Αντίθετα, αν και οι θερμόφιλοι μικροοργανισμοί κατά κύριο λόγο δεν παρουσιάζουν παθογένεια, η ύπαρξή τους σε οικιακά απόβλητα τα οποία καταλήγουν στο δημόσιο δίκτυο είναι ανεπιθύμητη αφού προκαλεί, λόγω συσσώρευσης, μείωση της ροής και διαταράσσει τις φυσικές βιοκοινότητες στα σημεία εκροής.

Στις βιομηχανίες τροφίμων και ειδικά στις γαλακτοβιομηχανίες, η ανάπτυξη θερμοάντοχων στελεχών περιορίζεται αυστηρά για την αποφυγή της αλλοίωσης της ποιότητας του προϊόντος αλλά και την εξάλειψη πιθανών παθογόνων μικροοργανισμών.

1.1.1.3 Βιοτεχνολογική σημασία

Απόπειρες για χρήση θερμοφίλων μικροοργανισμών σε βιομηχανικές διαδικασίες έχουν γίνει περιορισμένα στο παρελθόν. Η περιορισμένη γνώση πάνω στη φυσιολογία αυτών των οργανισμών και ο ανεπαρκής τεχνολογικός εξοπλισμός καθιστούσαν αυτές τις απόπειρες οικονομικά ασύμφορες μέχρι πρόσφατα (Schiraldi and De Rosa 2002).

Η εκτεταμένη έρευνα που έχει λάβει χώρα τα τελευταία χρόνια έχει συμβάλλει στην ανάπτυξη μεθόδων και διαδικασιών οι οποίες βασίζονται στη χρήση θερμοφίλων μικροοργανισμών ως:

- Πηγές θερμοανθεκτικών πρωτεϊνών και ενζύμων βιομηχανικού ενδιαφέροντος
- Βιοκαταλύτες για τη μετατροπή βιομάζας σε ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καύσιμα ή συμπληρώματα ζωικής τροφής
- Βιοκαταλύτες στη διαχείριση αποβλήτων

Η χρήση ενζύμων που προέρχονται από θερμοφίλους μικροοργανισμούς παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα στις διαδικασίες της βιομηχανίας λόγω της δομικής και λειτουργικής σταθερότητάς τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Έτσι αποφεύγονται πιθανές επιμολύνσεις από άλλους μεσόφιλους μικροοργανισμούς ενώ παράλληλα διατηρείται υψηλή διαλυτότητα των οργανικών ενώσεων (Becker 1997).

Η μείωση του ιξώδους στις υψηλές θερμοκρασίες και η αύξηση της διαλυτότητας έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας των αντιδράσεων (Mozhaev, 1993; Krahe et al., 1996; Kumar and Swati, 2001) και κατά συνέπεια την αύξηση της παραγωγής, αποφέροντας εξαιρετικά οικονομικά οφέλη.

1.1.2 Το γένος *Geobacillus*

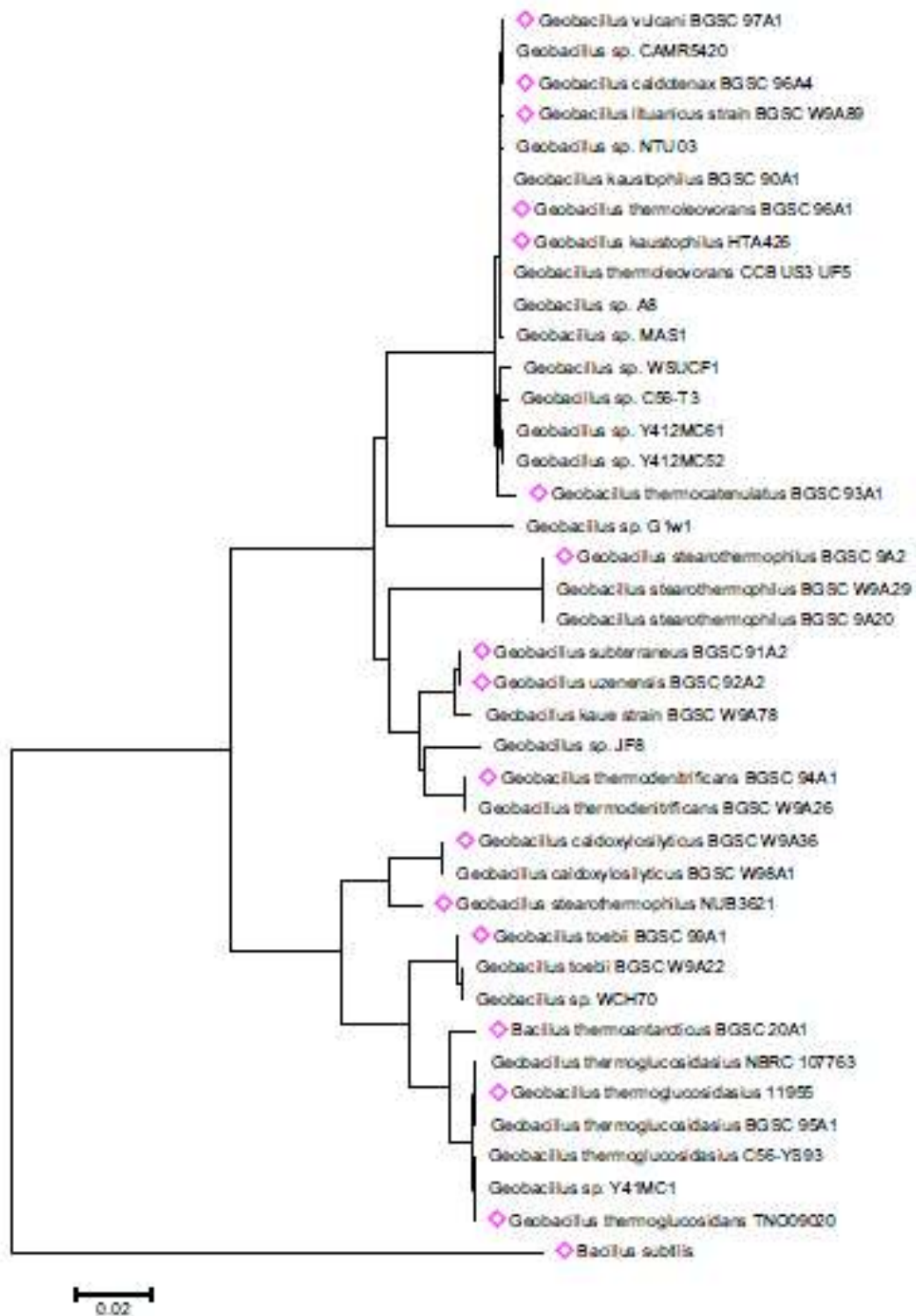
1.1.2.1 Συστηματική κατάταξη

Το γένος *Geobacillus* πρόκειται για μία ομάδα θετικών κατά Gram, υποχρεωτικά ή δυνητικά αερόβιων, θεرمόφιλων σποριογόνων βακίλων. Τα είδη του γένους αυτού θεωρούταν μέχρι πρόσφατα ότι ανήκαν στο γένος *Bacillus* και αποτελούσαν την πέμπτη ομάδα του γένους αυτού, η οποία περιελάμβανε μόνο θεرمόφιλα στελέχη,

Το 2001 βάσει ανάλυσης του 16SrRNA αλλά και μορφολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών, έγινε επαναταξινόμησή τους ως ξεχωριστό γένος, με αντιπροσωπευτικό είδος το *Geobacillus stearothermophilus* (Nazina et al. 2001).

Βασίλειο:	Bacteria
Φύλο:	Firmicutes
Ομοταξία:	Bacilli
Τάξη:	Bacillales
Οικογένεια:	Bacillaceae
Γένος:	<i>Geobacillus</i>

Εικόνα 1.1: Συστηματική κατάταξη του γένους *Geobacillus*.



Εικόνα 1.2: Εξελικτικές σχέσεις του γένους *Geobacillus* (Hussein et al. 2015).

1.1.2.2 Ενδιαιτήματα

Η πλειονότητα των στελεχών του γένους *Geobacillus* αναπτύσσονται βέλτιστα στο θερμοκρασιακό εύρος 45-70 °C. Τα σπόρια του γένους αυτού χαρακτηρίζονται από μεγάλη ανθεκτικότητα στην υπεριώδη ακτινοβολία, στη θερμική απενεργοποίηση και στην αποξήρανση (Setlow 2006).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στελέχη εντοπίζονται και σε περιβάλλοντα όπου οι θερμοκρασίες δεν ξεπερνάει τους 30 °C. Η ευρεία εξάπλωση του γένους αποδίδεται στο μικρό μέγεθος των σπορίων του, περίπου 1 μm, το οποίο επιτρέπει μακρές περιόδους αιώρησης στην ατμόσφαιρα (Zeigler 2014).

Λόγω της ποικιλίας καταβολικών οδών του γένους αυτού, στελέχη έχουν απομονωθεί από λίπασμα, θερμές πηγές και βαθιά γεωθερμικά πεδία, όπως πετρελαιοπηγές και ιζήματα.

1.1.2.3 Ένζυμα και εφαρμογές

Η έρευνα επάνω στις βιοτεχνολογικές εφαρμογές του γένους *Geobacillus* επικεντρώνεται στην παραγωγή βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς μέσω διαδικασιών ζύμωσης.

Συγκεκριμένα, η βιοαιθανόλη είναι ένα πλέον εμπορικά διαθέσιμο βιοκαύσιμο το οποίο, εκτός από υψηλό αριθμό οκτανίου, είναι βιοδιασπώμενο και ελάχιστα τοξικό. Η χρήση του έχει ως αποτέλεσμα ελάχιστες επιπτώσεις στο περιβάλλον σε αντιδιαστολή με τα ευρέως χρησιμοποιούμενα καύσιμα (Hansen et al. 2005).

Η ικανότητα ανάπτυξης των στελεχών σε υψηλές θερμοκρασίες επιτρέπει τη συνεχή απομάκρυνση πτητικών προϊόντων της ζύμωσης χωρίς να προκαλείται φθορά του εξοπλισμού ενώ παράλληλα αποφεύγονται μολύνσεις από μεσόφιλους μικροοργανισμούς (Cripps et al. 2009).

Το βασικότερο όμως πλεονέκτημα του γένους *Geobacillus* για την παραγωγή βιοκαυσίμων έγκειται στην ικανότητα διάσπασης ενός μεγάλου εύρους ολιγοσακχαριτών, γεγονός το οποίο εξηγεί το αυξανόμενο ενδιαφέρον στη μελέτη του τα τελευταία χρόνια (Cripps et al. 2009).

Πρόσφατα, τα στελέχη του γένους παρουσιάζουν όλο και μεγαλύτερη εκμετάλλευση στις βιομηχανίες χάρτου και υφασμάτων για λέπτυνση των προϊόντων (Valladares et al. 2011) αλλά και στην βιοεξυγείανση και αποκατάσταση υποβαθμισμένων ενδιαιτημάτων λόγω οργανικών ρυπαντών (Megharaj et al. 2011).

Τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιούνται ως βιοκαταλύτες είναι κυρίως:

- Πρωτεάσες (Haki and Rakshit 2003):
 - επεξεργασία δερμάτων
 - πρόσθετα απορρυπαντικών
 - βιομηχανία τροφίμων
 - κλινικές εφαρμογές

- Λιπάσες:
 - βιομηχανία καλλυντικών (Ansorge-Schumacher and Thum 2013)
 - βιομηχανία τροφίμων, τυροβιομηχανία (Khanniri et al. 2015)
 - συνθετική χημεία (Pandey et al. 1999)

- Καρβοξυλικές εστεράσες:
 - βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς (Zhang et al. 2011)

- Ισομεράση της L-αραβινόζης:
 - βιομηχανία τροφίμων, παραγωγή D-ταγκατόζης (Seo 2013)
 - φαρμακοβιομηχανία (Oh 2007)

- Φωσφορυλάσες πυριμιδινών:
 - θεραπεία καρκίνου (Vander Heiden 2011)
 - καταπολέμηση ιικών μολύνσεων (De Clercq 2011)

1.2 ENZYMA

1.2.1 Κινάσες

Κινάσες ονομάζονται τα ένζυμα τα οποία καταλύουν τη μεταφορά μίας φωσφορικής ομάδας από ένα μόριο δότη, συνήθως το ATP, σε συγκεκριμένα υποστρώματα. Ανήκουν στην υπεροικογένεια των φωσφοτρανσφερασών και κατατάσσονται ανάλογα με το υπόστρωμα-στόχο τους σε:

- πρωτεϊνικές κινάσες:
Οι πρωτεϊνικές κινάσες έχουν ως υπόστρωμα πρωτεΐνες και δρουν πάνω σε αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης, τυροσίνης ή ιστιδίνης. Με τον τρόπο αυτό μεταβάλλεται η ενεργότητα και η σταθερότητα πολλών πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο (Manning et al. 2002).
- λιπιδικές κινάσες:
Οι λιπιδικές κινάσες καταλύουν τη φωσφορυλίωση λιπιδίων τόσο της πλασματικής μεμβράνης όσο και της μεμβράνης των κυτταροπλασματικών οργανιδίων. Η φωσφορυλίωση των λιπιδίων της πλασματικής μεμβράνης διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, όπως για παράδειγμα στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης (Holzer and Duntze 1971).
- κινάσες υδατανθράκων:
Οι κινάσες υδατανθράκων συμμετέχουν στον καταβολισμό των σακχάρων, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αυτό της εξωκινάσης η οποία φωσφορυλιώνει τη γλυκόζη “παγιδεύοντάς” την στο εσωτερικό του κυττάρου κατά τα πρώτα στάδια της γλυκόλυσης (Holzer and Duntze 1976).

1.2.1.1 Κινάσες β-γλυκοζιδίων

Οι β-γλυκοζιδικές κινάσες (EC 2.7.1.85) φωσφορυλιώνουν ένα μεγάλο αριθμό β-D-γλυκοζιδίων, χρησιμοποιώντας ως δότη της φωσφορικής ομάδας κυρίως το ATP αλλά και τα GTP, CTP, ITP και UTP σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



1.2.2 Γλυκοζιδικές υδρολάσες (Glycoside Hydrolases, GHs)

1.2.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η υψηλή στερεοχημική ποικιλομορφία των υδατανθράκων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μεγάλου αριθμού διαφορετικών ισομερών ολιγοσακχαριτών. Το γεγονός αυτό εκμεταλλεύονται οι μικροοργανισμοί για την αποικοδόμηση μεγάλου εύρους υποστρωμάτων με τη χρήση ενός πλήθους ενζύμων.

Οι γλυκοσιδικές υδρολάσες (Glycoside Hydrolases, GH, EC 3.2.1.x) επιτελούν αυτό το σκοπό, διασπώντας τους γλυκοσιδικούς δεσμούς των υδατανθράκων. Ταξινομούνται σε 135 διαφορετικές οικογένειες βάσει ομοιότητας στην αλληλουχία και τη δομή, σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα στοιχεία της βάσης δεδομένων Carbohydrate Active enZymes ή CaZy (cazy.org).

Γλυκοσιδικές υδρολάσες όπως κυτταρινάσες, ξυλανάσες και άλλες γλυκοσιδάσες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή σακχάρων από προκατεργασμένη βιομάζα, τα οποία στη συνέχεια υπόκεινται σε διαδικασίες ζύμωσης με τελικό προϊόν την αιθανόλη ή βουτανόλη (Wilson 2009).

Άλλες γλυκοσιδάσες συμμετέχουν σε ένα μεγάλο εύρος βιολογικών διαδικασιών, όπως η μολυσματικότητα του πνευμονιόκκοκου ο οποίος ευθύνεται για υψηλό αριθμό θανάτων ετησίως (Abott et al. 2009). Οι αναστολείς των γλυκοσιδασών παίζουν σημαντικό ρόλο στην θεραπείων νόσων, όπως της νόσου του Alzheimer (Yuzwa et al.2008).

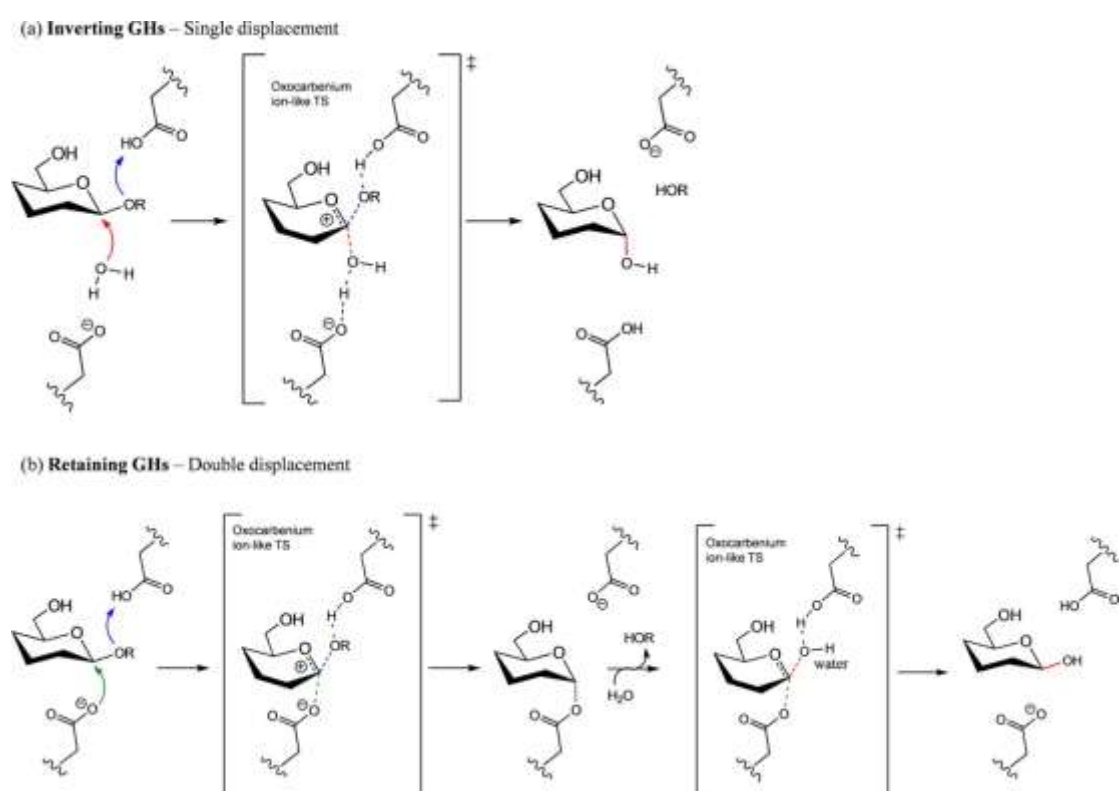
1.2.2.2 Μηχανισμοί ενζυμικής κατάλυσης

Η ενζυμική κατάλυση του υποστρώματος από τις γλυκοζιδικές υδρολάσες, γίνεται σύμφωνα με το μηχανισμό αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης S_N2 . Πραγματοποιείται οξεοβασική κατάλυση του υποστρώματος με διατήρηση ή αναστροφή της στερεοδιαμόρφωσης του ανωμερούς κέντρου, με εξαίρεση τα μέλη της οικογένειας GH4.

Η οξεοβασική αντίδραση υποβοηθάται από δύο σημαντικά κατάλοιπα: ένα δότη πρωτονίου και ένα νουκλεόφιλο κατάλοιπο, τα οποία είναι συνήθως το ασπαρτικό ή γλουταμινικό οξύ και οι συζυγείς τους βάσεις.

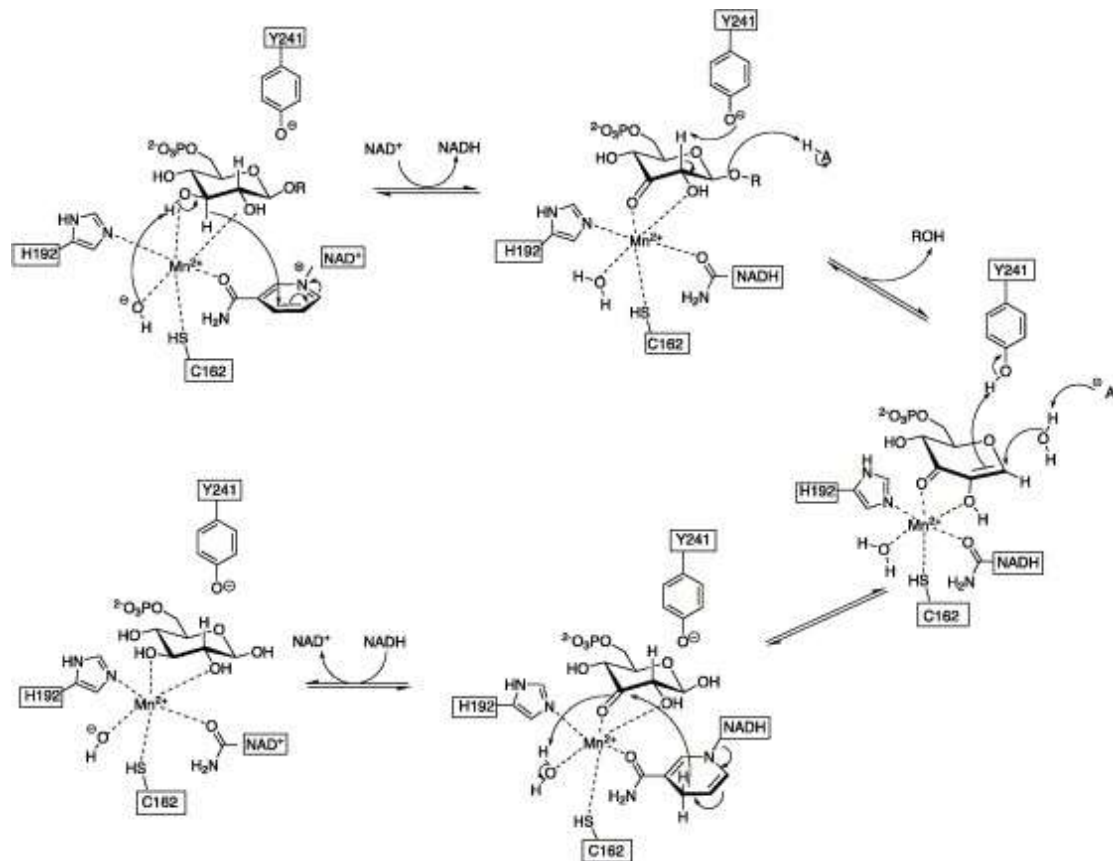
Οι γλυκοζιδικές υδρολάσες που δρουν με μηχανισμό αναστροφής (εικόνα 1.α), πραγματοποιούν μοναδική νουκλεόφιλη υποκατάσταση, ενώ σε αυτές όπου διατηρείται η ανωμερής διαμόρφωση (εικόνα 1.β) γίνεται διπλή εκτόπιση μέσω σχηματισμού και υδρόλυσης ενός ομοιοπολικού ενδιάμεσου.

Ανεξάρτητα του μηχανισμού που χρησιμοποιείται, η αντίδραση περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου καρβοκατιόντος, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε υπόστρωμα και κοινό σε κάθε GH οικογένεια (Zechel and Withers 2000).



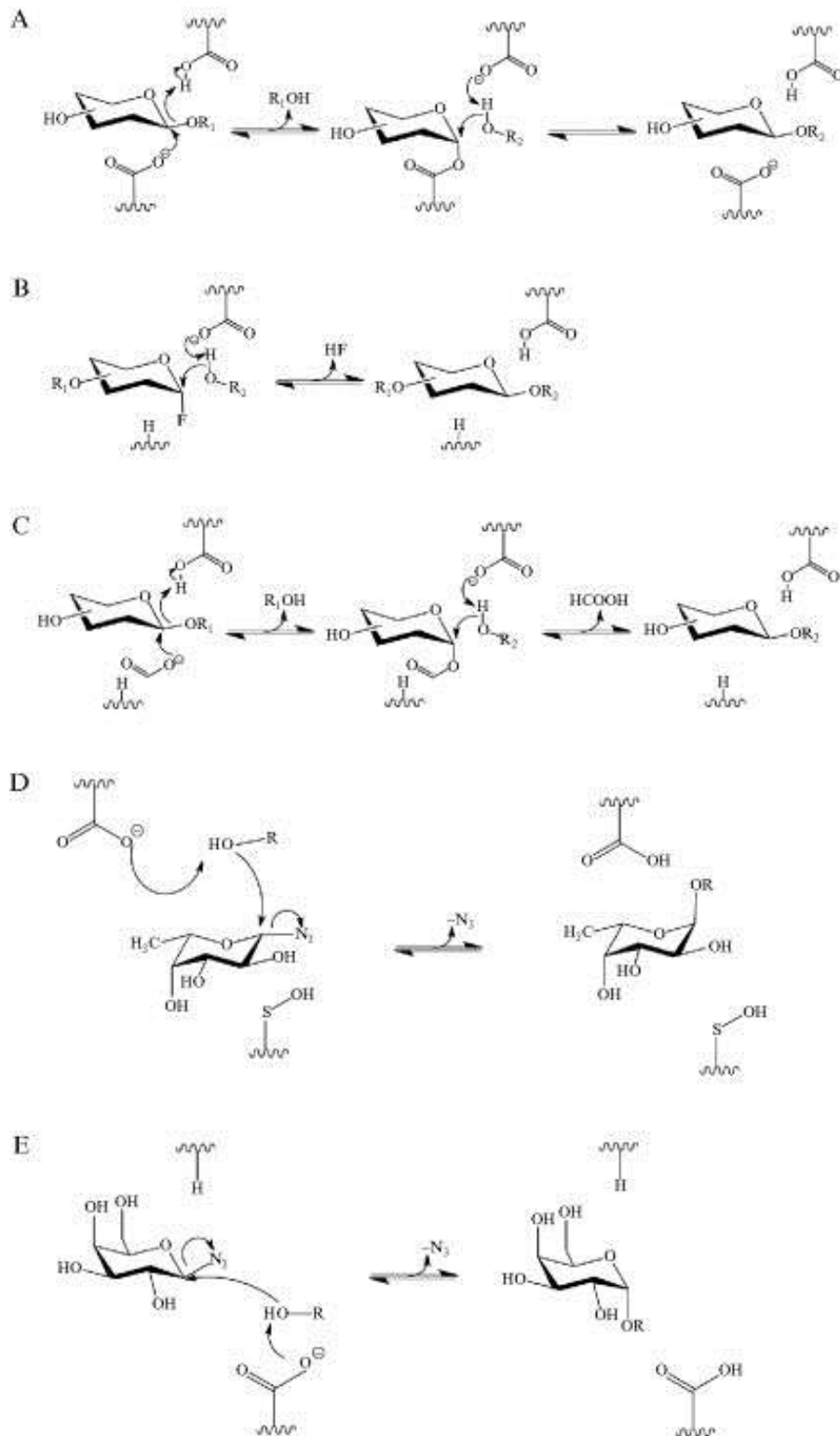
Εικόνα 1.3: Γενικοί μηχανισμοί ενζυμικής κατάλυσης από γλυκοζιδικές υδρολάσες: (α) μηχανισμός αναστροφής (β) μηχανισμός διατήρησης (Ardèvol and Rovira 2015).

Παρέκκλιση από τους παραπάνω μηχανισμούς ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος αποτελούν τα ένζυμα GH4, τα οποία χρησιμοποιούν μηχανισμό απόσπασης με υποχρεωτική ύπαρξη του NAD^+ και ιόντος μετάλλου Mn^{2+} (Varrot et al. 2005).



Εικόνα 1.4: μηχανισμός κατάλυσης του γλυκοσιδικού δεσμού μέσω σταδίων απόσπασης από μία NAD⁺ εξαρτώμενη 6-P-β-γλυκοζιδάση (Varrot et al. 2005).

Σημαντική έρευνα πάνω στους μηχανισμούς ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζιδικών δεσμών έχει στοχεύσει στην επαναφορά της τρανσγλυκολυτικής ενεργότητας των εξω-γλυκοζιδασών για τη δημιουργία γλυκοσυνθασών. Οι πρώτες προσπάθειες έγιναν το 1998 από τον Withers και τους συνεργάτες του οι οποίοι με μεταλλαγή της πυρηνόφιλης ομάδας μίας β-γλυκοζιδάσης και χρησιμοποιώντας ως δότη γλυκοζιδίου ένα υπόστρωμα αντίθετης ανωμερικής διαμόρφωσης και ισχυρώς αποχωρούσας ομάδας φθορίου (α-φθορο-γλυκοζίδιο), κατάφεραν να αντιστρέψουν την υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου με αποτέλεσμα τη συσσώρευση β-ολιγοσακχαριτών.



Εικόνα 1.5: Μηχανισμός αντίδρασης γλυκοζιδικών υδρολασών και γλυκοσυνθασών: (A) μηχανισμός αντίδρασης διατήρησης εξω-β-γλυκοζιδικών υδρολασών, (B) μηχανισμός αντίδρασης μεσόφιλων β-γλυκοσυνθασών, (C) μηχανισμός αντίδρασης θερμόφιλων β-γλυκοσυνθασών, (D) θερμόφιλη α-φουκοσυνθάση, (E) θερμόφιλη α-γαλακτοσυνθάση (Cobucci-Ponzano et al. 2012)

Καινούριες γλυκοσυνθάσες έχουν σχεδιαστεί έκτοτε με επιτυχία από διάφορες οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών ακολουθώντας τη γενική αυτή στρατηγική (Bojarova and Kren 2009; Cobucci-Ponzano et al. 2011; Hancock et al. 2006; Jakeman and Withers 2002; Perugino et al. 2004)

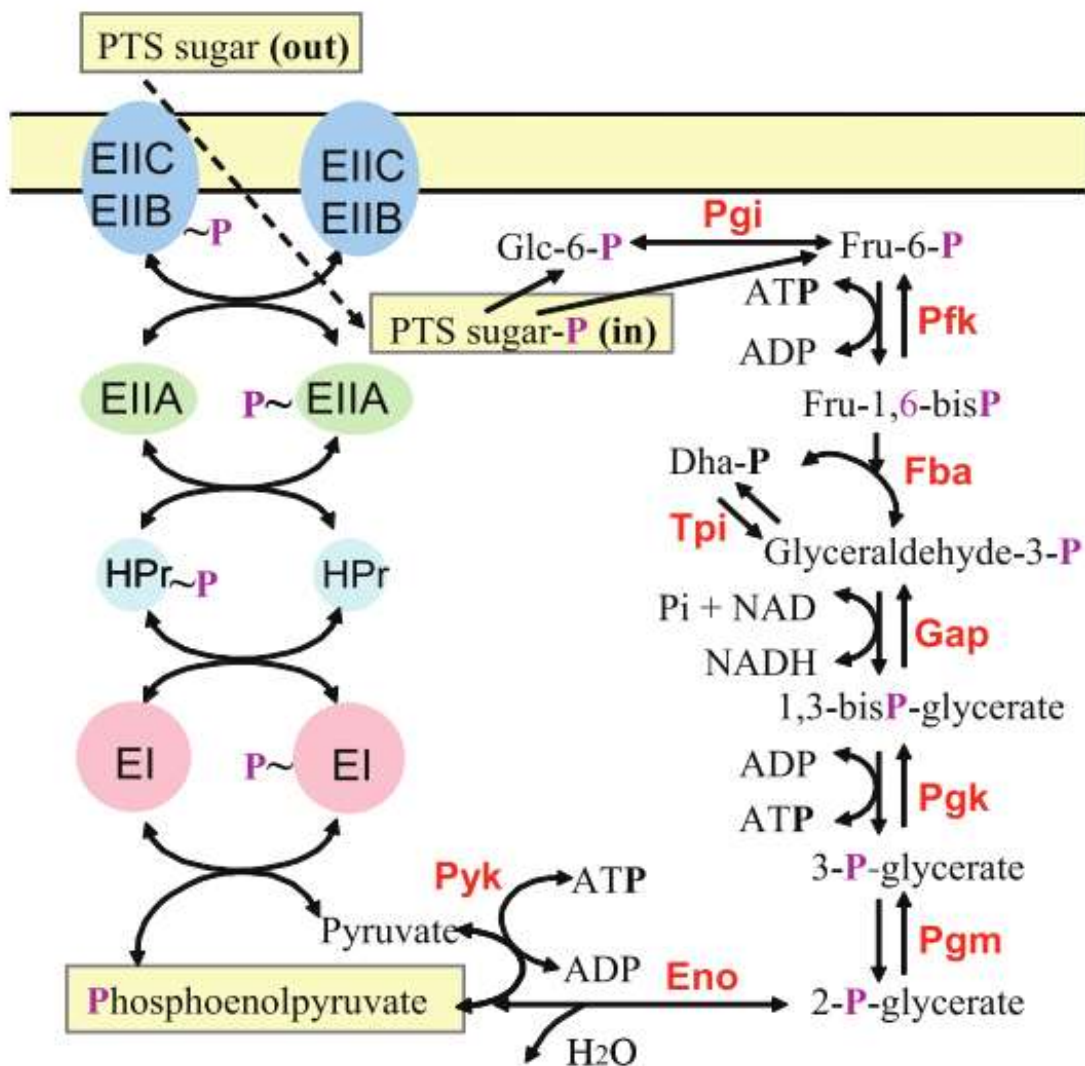
1.2.2.3 PTS σύστημα και φωσφογλυκοζιδάσες

Ανάλογα με τη σύσταση του εξωκυττάριου περιβάλλοντος, τα βακτήρια επάγουν την έκφραση γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα αναγκαία για την αποικοδόμηση του υποστρώματος, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλουν γονίδια ενζύμων που δεν συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί το οπερόνιο της λακτόζης του βακτηρίου *Escherichia coli*, το οποίο μελετήθηκε για πρώτη φορά από τους Jacob και Monod το 1961.

Το βακτηριακό σύστημα φωσφορυλίωσης και μεταφοράς μονοσακχαριτών και ολιγοσακχαριτών μέσω της κυτταρικής μεμβράνης (PhosphoEnolPyruvate: PhosphoTransferase System, PEP:PTS) παίζει σημαντικό ρόλο στην καταβολική καταστολή του άνθρακα. Χρησιμοποιείται ευρύτατα από μεγάλο αριθμό τόσο θετικών όσο και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.

Χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά από τους Kundig, Ghosh, και Roseman, ως ένα σύστημα το οποίο καταλύει την είσοδο πολυάριθμων υδατανθράκων με ταυτόχρονη μετατροπή τους στους αντίστοιχους φωσφοεστέρες κατά τη μεταφορά τους μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, χρησιμοποιώντας το φωσφοενολοπυροσταφυλικό ως πηγή ενέργειας και δότη της φωσφορικής ομάδας.

Αν και το PTS διαφοροποιείται αρκετά στα επιμέρους στοιχεία του ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού, ο βασικός μηχανισμός παραμένει ίδιος και απεικονίζεται στην εικόνα 1.5.



Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση των στοιχείων του βακτηριακού συστήματος μεταφοράς υδαταθράκων (Deutscher et al. 2006).

Όπως είναι εμφανές και από την παραπάνω εικόνα, οι ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι έχουν μεταφερθεί στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω του PTS έχουν υποστεί φωσφορυλίωση στο έκτο άτομο άνθρακα. Για την πλήρη αποικοδόμηση τους προς φωσφορυλιωμένους μονοσακχαρίτες ικανούς να εισέλθουν στις κύριες καταβολικές οδούς παραγωγής ενέργειας, είναι αναγκαία περαιτέρω υδρόλυση. Αυτή επιτυγχάνεται από εξειδικευμένα ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένους φωσφορυλιωμένους δισακχαρίτες, ως επι το πλείστον φωσφο-β-γαλακτοζιδάσες (EC 3.2.1.85) και φωσφο-β-γλυκοζιδάσες (EC 3.2.1.86), τα οποία ταξινομούνται βάσει ομοιότητας στην αλληλουχία στις οικογένειες 1 και 4 (GH1 και GH4) των γλυκοζιδικών υδrolασών.

Όπως έχει διαπιστωθεί, τα γονίδια πολλών φωσφογλυκοζιδασών εντοπίζονται στο γονιδίωμα σε μεγάλη εγγύτητα των γονιδίων των στοιχείων του βακτηριακού PTS (Hengstenberg et al. 1993), γεγονός το οποίο καταδεικνύει τη στενή λειτουργική και ρυθμιστική σχέση ανάμεσα στις δύο διαδικασίες.

1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία ανήκει σε μία ευρύτερη προσπάθεια μελέτης των θερμοφίλων βακτηριακών στελεχών του γένους *Geobacillus* τα οποία απομονώθηκαν από το ηφαιστειακό σύμπλεγμα της Σαντορίνης (Meintanis, Chalkou et al. 2006; Meintanis, Chalkou et al. 2008) και φυλάσσονται στην τράπεζα στελεχών του εργαστηρίου Μικροβιολογίας (τομέας Βοτανικής, τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ).

Το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus sp. SP24*, παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε προηγούμενες εργασίες λόγω του θερμοφίλου χαρακτήρα του αλλά και της υψηλής κυτταρινολυτικής του ικανότητας (Stathoroulou, Galanoroulou et al. 2012).

Στα πλαίσια αυτά έγινε ο χαρακτηρισμός μίας νέας GH1 β-φωσφο-γλυκοζιδάσης η οποία είχε προηγουμένως απομονωθεί και κλωνοποιηθεί από το παραπάνω στέλεχος (Θεοφανούδης 2015). Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η ενζυμική ενεργότητα σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και pH αλλά και η σταθερότητα του ενζύμου μετά από επώαση σε εύρος θερμοκρασιών.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε παραγωγή φωσφορυλιωμένων δισακχαριτών μεγάλης καθαρότητας τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για τη διαλεύκανση της λειτουργικής δομής του ενζύμου κατά τη δέσμευσή του σε αυτά τα υποστρώματα.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

2.1.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες καλλιέργειας

Τα γονίδια των ενζύμων β-φωσφογλυκοζιδάσης του *Geobacillus sp. SP24* και της ATP-εξαρτώμενης κινάσης β-γλυκοκοζιδίων (BgIK) της *Klebsiella pneumoniae*, βρίσκονταν εντός μετασηματισμένων στελεχών E. coli BL21, ως αποτέλεσμα προηγούμενων ερευνητικών εργασιών.

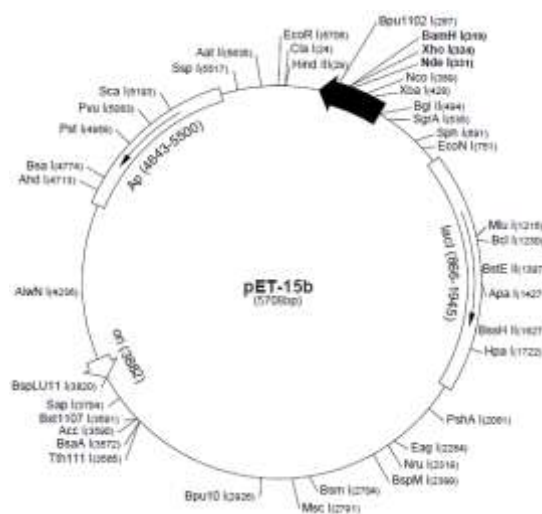
Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε στερεές και υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο LB (Luria Bertani medium), σε θερμοκρασία 37 °C.

Πίνακας 2.1: Σύσταση θρεπτικού LB.

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Tryptone	10
Yeast extract	5
NaCl	10

2.1.2 Πλασμίδια

Τα γονίδια που αναφέρθηκαν βρίσκονταν κλωνοποιημένα σε πλασμιδιακό φορέα pET-15b (Novagen) εντός των στελεχών BL21 E. coli.



Εικόνα 2.2: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα *ret15b*.

Το γονίδιο της β-φωσφογλυκοζιδάσης το οποίο περιείχε σημειακή μεταλλαγή (Site Directed Mutagenesis – SDM) στο ενεργό κέντρο (θέση 387, γλουταμινικό οξύ → γλυκίνη) βρισκόταν κλωνοποιημένο σε πλασμιδιακούς φορείς εντός στελεχών *E. coli* DH5a. Τα πλασμίδια απομονώθηκαν και με αυτά μετασχηματίστηκαν στελέχη *E. coli* BL21.

2.2 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ Β-ΦΩΣΦΟ-ΓΛΥΚΟΖΙΔΑΣΗΣ

2.2.1 Υπερέκφραση β-φωσφο-γλυκοζιδάσης

Η υπερέκφραση του ενζύμου έγινε σε μετασχηματισμένα στελέχη *E. coli* BL21, τα οποία περιείχαν το γονίδιο της β-φωσφο-γλυκοζιδάσης σε πλασμιδιακούς φορείς pET15b.

1. Αρχικά, έγινε επίστρωση τρυβλίων LB παρουσία αμπικιλίνης με το μετασχηματισμένο στέλεχος BL21 και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για διάστημα 14 ωρών. Επιλέχθηκε μονήρης αποικία η οποία εμβολιάστηκε σε υγρή προκαλλιέργεια 5 ml LB με αμπικιλίνη και επώαστηκε στους 37 °C υπό ανάδευση overnight .

2. Έπειτα, η προκαλλιέργεια προστέθηκε σε κλειστή, υγρή βακτηριακή καλλιέργεια LB 1L, με δείκτη αμπικιλίνης 0.1 mg/ml.

3. Η επαγωγή της υπερέκφρασης πραγματοποιήθηκε κατά την εκθετική φάση της καλλιέργειας. Τη χρονική στιγμή όπου η απορρόφηση δείγματος καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600nm ήταν 0.8, προστέθηκε IPTG 1mM.

Η βέλτιστη συγκέντρωση πρωτεΐνης παραλαμβάνεται έπειτα από τρεις ώρες.

2.2.2 Καθαρισμός β-φωσφο-γλυκοζιδάσης

Τα βακτηριακά κύτταρα της καλλιέργειας απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 5000 G. Αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό, το ίζημα αναδιαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα NPI-10. Ακολούθησε ρήξη των κυτταρικών τοιχωμάτων με χρήση μηχανήματος υπερήχων σε πρόγραμμα 3 sec λύση

/ 9 sec ανάπαυση για 8 λεπτά και περαιτέρω φυγοκέντρηση στις 140000 στροφές για 35 λεπτά για την παραλαβή του ενδοκυτταρικού υγρού.

Για τον καθαρισμό της β-φωσφο-γλυκοζιδάσης έγινε χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη Ni-NTA agarose, ειδική για πρωτεΐνες με σινιάλο ιστιδίνης (Sambrook et al. 1989). Συνοπτικά, τα βήματα που έγιναν ήταν:

1. Εξισορρόπηση της στήλης με buffer NPI-10.
2. Προσθήκη του δείγματος στη ρητίνη και ανάδευση για 1 ώρα στους 4 °C.
3. Έκλουση του δείγματος.
4. Προσθήκη στη ρητίνη 20 ml buffer NPI-20 και ανάδευση για 20 λεπτά στους 4 °C.
5. Έκλουση του δείγματος.
6. Επανάληψη των βημάτων 4 και 5.
7. Κλασματική έκλουση του δείγματος με προσθήκη buffer NPI-250.

Πίνακας 2.3: Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων NPI-10, NPI-20, NPI-250.

	NPI-10	NPI-20	NPI-250
NaH₂PO₄	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM
imidazole	10 mM	20 mM	250 mM

Στα κλάσματα στα οποία διαπιστώθηκε η παρουσία πρωτεΐνης, μέσω ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, έγινε επακόλουθος καθαρισμός με διαπύδηση. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε ειδική μεμβράνη η οποία αφέθηκε μέσα ποτήρι ζέσεως που

περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα TBS overnight. Με αυτόν τον τρόπο διαχωρίστηκε η πρωτεΐνη από μόρια με μοριακό βάρος μικρότερο των 12000 kDa.

2.2.3 Συνθήκες αποθήκευσης β-φωσφο-γλυκοζιδάσης

Το καθαρό ένζυμο αποθηκεύτηκε αρχικά σε διάλυμα MES 100 mM pH 6 και γλυκερόλης 50%, στους -20 °C. Μετα από διαπίστωση ελάττωσης της ενεργότητας σε βάθος χρόνου, η αποθήκευση έγινε σε διάλυμα MES 100 mM pH 6 σε καθαρή μορφή στους 5 °C.

2.2.4 Αποκοπή επιτόπου ιστιδίνης

Ο επίτοπος ιστιδίνης αφαιρέθηκε με επώαση του ενζύμου σε θρομβίνη σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα 10 ωρών (Hakes and Dixon 1992).

2.2.5 Υπερέκφραση και καθαρισμός υπόλοιπων ενζύμων

Με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στις παραπάνω ενότητες (2.2.1 έως 2.2.4) έγινε και η υπερέκφραση και ο καθαρισμός του μεταλλαγμένου ενζύμου της β-φωσφογλυκοζιδάσης αλλά και της ATP-εξαρτώμενης κινάσης των β-γλυκοζιδίων η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη βιοσύνθεση των υποστρωμάτων της β-φωσφογλυκοζιδάσης.

2.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ Β-ΦΩΣΦΟΓΛΥΚΟΖΙΔΑΣΗΣ

2.3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (SDS-PAGE)

Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους αλλά και τον εντοπισμό των υπομονάδων που συνιστούν την ενεργή β-φωσφογλυκοζιδάση, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate). Το SDS αποδιατάσσει τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες και προσδέεται σε αυτές, προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο ανάλογο του μήκους τους.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης δεν έχει ενιαία σύσταση. Αποτελείται από το πήκτωμα συμπύκνωσης όπου τα δείγματα αποκτούν ενιαίο μέτωπο και το πήκτωμα διαχωρισμού στο οποίο, κάτω από επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, γίνεται διαχωρισμός βάσει του μοριακού βάρους. Η σύσταση του κάθε πηκτώματος αναφέρεται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 2.4: Πηκτώματα συμπύκνωσης και διαχωρισμού (12% πολυακρυλαμίδη) SDS-PAGE

	Σύσταση πηκτώματος συμπύκνωσης (ml)	Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού 12% (ml)
Ακρυλαμίδη- Μπισ ακρυλαμίδη (30:0,8%)	3.45	8
1 M Tris/HCl pH 6.8/8.8	0.63	5
10% APS	0.05	0.2
TEMED	0.005	0.008
dH ₂ O	3.45	6.8

Τα δείγματα πρωτεϊνών προετοιμάζονται σε κατάλληλο διάλυμα φόρτωσης πριν την προσθήκη τους στο πήκτωμα. Ακολούθως, το πήκτωμα τοποθετείται στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης και στα άκρα του εφαρμόζεται τάση 200 V για διάστημα 40 λεπτών.

Πίνακας 2.5: Διάλυμα φόρτωσης 3X SDS-PAGE.

	Σύσταση
Γλυκερόλη	2 g/1.5 ml
Tris-HCl pH 6.8 0,5 M	1 ml
Μπλε της Βρωμοφαινόλης 0,04%	
SDS 15%	
Μερκαπτοαιθανόλη	1.5 %

Πίνακας 2.6: Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (5X) SDS-PAGE.

	Συγκέντρωση (g/L)
Tris	15
Γλυκίνη	72
SDS	5

Η χρώση των πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης έγινε με διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue και ακολούθησε επώαση σε διάλυμα αποχρωματισμού.

Πίνακας 2.7: Διάλυμα χρώσης πηκτώματος SDS-PAGE.

	Σύσταση
Coomassie R-250	1.25 g
Μεθανόλη	225 ml
Οξικό οξύ	50 ml
dH ₂ O	225 ml

Πίνακας 2.8: Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτώματος SDS-PAGE.

	Σύσταση (ml)
Μεθανόλη (30%)	300
Οξικό οξύ (10%)	100
dH ₂ O	600

2.3.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών απουσία αποδιατακτικού παράγοντα (Native PAGE)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αντίστοιχη της παραγράφου 2.4.1. Η σύσταση των πηκτωμάτων και των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται παρακάτω.

Πίνακας 2.9: Πηκτώματα συμπύκνωσης και διαχωρισμού (12% πολυακρυλαμίδη) Native-PAGE

	Σύσταση πηκτώματος συμπύκνωσης (ml)	Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού 12% (ml)
Ακρυλαμίδη- Μπισ ακρυλαμίδη (30:0,8%)	1	8
0.5/1.5 M Tris/HCl pH 6.8/8.8	1	5
10% APS	0.04	0.07
TEMED	0.008	0.014
dH ₂ O	5	7

Πίνακας 2.10: Διάλυμα φόρτωσης (1X) Native-PAGE.

	Σύσταση
Γλυκερόλη	1 g/0.75 ml
0.1 M Tris-HCl pH 8.6	10 ml
Μπλε της Βρωμοφαινόλης	0,0025% (w/v)

Πίνακας 2.11: Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (5X) Native-PAGE.

	Συγκέντρωση (g/L)
Tris	15.2
Γλυκίνη	72

2.3.3 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας

Ο έμμεσος προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης πραγματοποιήθηκε μέσω της μέτρησης της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος κατά την ενζυμική αντίδραση, η οποία υπολογίστηκε φωτομετρικά. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά υποστρώματα, τα οποία είχαν προηγουμένως υποστεί φωσφορυλίωση, το ψευδοϋπόστρωμα παρανίτροφαινυλ-β-D-

φωσφογλυκοκυρανόζη (pNPG6P) και το φυσικό υπόστρωμα φωσφο-κελλοβιόζη. Ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι, οι οποίες αναπτύσσονται αναλυτικά παρακάτω και παράλληλα εξετάστηκαν οι αντίστοιχοι μάρτυρες.

2.3.3.1 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας σε παρανίτρο-φαινυλ-β-D-6-φωσφογλυκοκυρανόζη (pNPG6P)

Η αρχή της μεθόδου για την εκτίμηση της β-γλυκοζιδικής ενεργότητας στηρίχθηκε στη διάσπαση του β-1,4-γλυκοσιδικού δεσμού του φωσφορυλιωμένου ψευδοϋποστρώματος παρανίτρο-φαινυλ-β-D-6-φωσφογλυκοκυρανόζη, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση φωσφογλυκόζης και p-νιτροφαινόλης. Η p-νιτροφαινόλη, η οποία παράγεται κατά την αντίδραση, απορροφά σε μήκος κύματος 410 nm επιτρέποντας τη φωτομετρική της ανίχνευση.

Η αναλυτική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Σε 125 μl ρυθμιστικού διαλύματος 2-(N-μορφονυλο)αιθανοσουλφονικού οξέος (MES) pH 6.5, προστίθενται 15 μl παρανίτρο-φαινυλ-β-D-6-φωσφογλυκοκυρανόζης τελικής συγκέντρωσης 0.65 mM και 10 μl ενζυμικού δείγματος στην κατάλληλη αραίωση ώστε .
2. Γίνεται επώαση των δειγμάτων για χρονικά διαστήματα των 5, 10 και 15 λεπτών στους 60 °C.
3. Η αντίδραση τερματίζεται με άμεση μεταφορά σε πάγο και προσθήκη 150 μl Na_2CO_3 1M.
4. Ακολουθεί φωτομέτρηση 200 μl του κάθε δείγματος στα 410 nm.

2.3.3.2 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας σε φωσφο-κελλοβιόζη (P-cellobiose)

Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-φωσφο-γλυκοζιδάσης στο φυσικό υπόστρωμα, ακολουθήθηκε η μέθοδος GOD/PAP.



Εικόνα 2.3: Αρχή μεθόδου GOD-PAP.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ποσοτικοποίηση της γλυκόζης που απελευθερώνεται σύμφωνα με την αντίδραση της παραπάνω εικόνας(Εικόνα 2.). Παρουσία του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης, η γλυκόζη οξειδώνεται και παράγει H_2O_2 . Η αντίδραση του H_2O_2 με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα. Συγκεκριμένα:

1. Σε 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10mM 2-(N-μορφονιλο)αιθανοσουλφονικού οξέος (MES) pH 6.5, προστέθηκαν 10 μl φωσφο-κελλοβιόζης 10 mM και 10 μl εζυμικού δείγματος β -P-γλυκοζιδάσης.
2. Το διάλυμα επώαστηκε για 10 λεπτά στους 60 °C.
3. Προσθήκη του διαλύματος σε 1 ml αντιδραστηρίου GOD/PAP (biosis) και επώαση στους 37 °C για 15 λεπτά.
4. Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 510 nm.

2.3.4 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Για το φωτομετρικό υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bradford. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας δείγματος σε 1 ml αντιδραστηρίου Bradford.
2. Ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
3. Φωτομέτρηση του διαλύματος σε μήκος κύματος 595 nm.

Ο υπολογισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης έγινε με βάση πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης.

2.3.5 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική ενεργότητα

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική ενεργότητα προσδιορίστηκε με μέτρηση της ενεργότητας της β-φωσφο-γλυκοζιδάσης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.3.1, για διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανά 5 °C σε τιμές από 40 °C έως 75 °C.

2.3.6 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική σταθερότητα

Η εκτίμηση της σταθερότητας του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας έγινε με επώαση ενζυμικού διαλύματος σε τιμές θερμοκρασίας από 55 °C έως 75 °C, με βήμα τους 5 °C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν μέτρηση της εναπομείνουσας ενζυμικής ενεργότητας (παράγραφος 2.3.3.1).

2.3.7 Επίδραση του pH στην ενζυμική ενεργότητα

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας σε διαφορετικές τιμές pH, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.3.1. Η ενεργότητα της β-φωσφο-γλυκοζιδάσης μετρήθηκε σε pH από 3 έως 8, με βήμα 0.5. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε pH ήταν:

- Κιτρικό οξύ- Na_2HPO_4 , για τιμές pH από 3 έως 5
- NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , για τιμές pH από 5 έως 8

2.3.8 Μελέτη της αναστολής στην ενζυμική ενεργότητα από ολιγο- και μονοσακχαρίτες

Η επίδραση των αναστολέων στην ενζυμική ενεργότητα της β-φωσφογλυκοζιδάσης διαπιστώθηκε αρχικά μέσω της μέτρησης της ποσότητας του προϊόντος κατά την αντίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα παρανίτροφαινυλ-β-D-φωσφογλυκοκυρανόζη (pNPG6P), παρουσία και απουσία των παρακάτω ολιγο- και μονοσακχαριτών.

- Λακτόζη
- Γλυκόζη
- Κελλοβιόζη
- Φρουκτόζη

- Γαλακτόζη
- Φωσφο-φρουκτόζη
- Φωσφο-γλυκόζη

Πίνακας 2.12: όγκοι και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μέτρηση της ενζυμικής αναστολής στο ψευδοϋπόστρωμα pNPG6P.

	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση (mM)
β-φωσφογλυκοζιδάση	10	(κατάλληλη αραιώση)
pNPG6P	30	0.5
Αναστολέας	60	50
10 mM MES pH 6	200	

Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη 300 μl Na₂CO₃ 1 M και η μέτρηση του παραγόμενου προϊόντος με φωτομέτρηση στα 410 nm.

Στη συνέχεια μετρήθηκε η επίδραση των ίδιων αναστολέων στην ενζυμική υδρόλυση του φυσικού υποστρώματος φωσφο-κελλοβιόζη.

Πίνακας 2.13: όγκοι και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μέτρηση της ενζυμικής αναστολής στο υπόστρωμα φωσφο-κελλοβιόζη.

	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση (mM)
β-φωσφογλυκοζιδάση	10	(κατάλληλη αραιώση)
Φωσφο-κελλοβιόζη	10	2
Αναστολέας	20	50
10 mM MES pH 6	60	

Η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος μετρήθηκε με τη μέθοδο GOD/PAP για να εκτιμηθεί η αλλαγή στην ενερότητα του ενζύμου.

2.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

2.4.1 Βιοσύνθεση και καθαρισμός φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων

Η διαδικασία παραγωγής φωσφορυλιωμένων δισακχαριτών βασίστηκε στη χρησιμοποίηση μίας ATP-εξαρτώμενης κινάσης β-γλυκοκοζιδίων (BglK) από το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae* (Thompson, Frieder, Lichtenthaler, Peters and Pikis 2002). Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιήθηκε η παραγωγή των φωσφορυλιωμένων δισακχαριτών:

- παρανίτροφαινυλ-β-D-φωσφογλυκοκυρανόζη (pNPG6P)
- φωσφοκελλοβιόζη
- φωσφολακτόζη
- φωσφογεντιοβιόζη

Η κινάση υπερεκφράστηκε σε BL21 *E. coli* δεκτικά κύτταρα και καθαρίστηκε με τον τρόπο που αναφέρεται στην ενότητα 2.2.

Συνοπτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την παραγωγή φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων ήταν τα εξής:

1. Διαλυτοποίηση 2 mmol δισακχαρίτη σε 10 ml 25 mM ρυθμιστικού διαλύματος 4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινοθανοσουλφονικού οξέως (HEPES) pH 7.5, το οποίο περιέχει 2 mM MgSO₄.
2. Προσθήκη 1 mmol ATP διαλυτοποιημένου σε 10 ml dH₂O, όπου το pH έχει ρυθμιστεί στην τιμή 7.5 με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας NH₄OH 1 M.
3. Προσθήκη BglK (40 units)
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και διατήρηση του pH του διαλύματος στην τιμή 7.5 με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας NH₄OH 1 M.

2.4.1.1 Αρχικός καθαρισμός υποστρωμάτων με βάριο

Ο πρωτογενής καθαρισμός των φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων έγινε με την προσθήκη οξικού αλατος του βαρίου με αποτέλεσμα την καταβύθιση της περίσσειας ADP και ATP λόγω σχηματισμού αλάτων (Thompson, Frieder, Lichtenthaler, Peters and Pikis 2002).

Συγκεκριμένα, στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης της παραγράφου 2.3.1 προστέθηκαν, υπό συνεχή ανάδευση, 3 mmol οξικού αλατος του βαρίου, αφού είχε προηγουμένως ρυθμιστεί η τιμή pH 8.2. Το ίζημα απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση, ενώ στο υπερκείμενο, αφού αρχικά καθαρίστηκε με ειδικό φίλτρο μεγέθους πόρου 0.22 μM , προστέθηκε καθαρή αιθανόλη σε αναλογία όγκου 4 προς 1. Έγινε επώαση του διαλύματος στους 5 °C για 12 ώρες και ακολούθησε φυγοκέντρηση, απόρριψη του υπερκείμενου και αποξήρανση του ιζήματος στους 37 °C για 2 ώρες. Τελικά, η απαλλαγή από τα ιόντα βαρίου πραγματοποιήθηκε με στήλη ρητίνης όπου αντικαταστάθηκαν με ιόντα H^+ .

Η καθαρότητα των υποστρωμάτων διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).

2.4.1.2 Καθαρισμός σε στήλη ιοντοανταλλαγής

Τα φωσφορυλιωμένα υποστρώματα καθαρίστηκαν περαιτέρω σε στήλη ανιοντοανταλλαγής Q-sepharose. Με την τεχνική αυτή απομακρύνθηκε η πρόσμιξη από το μή φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα και επιτεύχθηκε ο εμπλουτισμός του φωσφορυλιωμένου δισακχαρίτη.

Ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM πιπεραζίνης pH 10 χρησιμοποιήθηκε για την εξισορρόπηση της στήλης και τη δέσμευση του φωσφορυλιωμένου υποστρώματος. Η αποδέσμευση από την ρητίνη έγινε με διάλυμα 100 mM NaCl.

Ταυτοποίηση της καθαρότητας έγινε όπως προηγουμένως με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.

2.4.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης υποστρωμάτων

Η συγκέντρωση των υποστρωμάτων τα οποία παράχθηκαν με τη μέθοδο που αναφέρεται στην παράγραφο 2.3.1, υπολογίστηκε βάσει της ποσότητας του

προϊόντος που απελευθερώνεται κατά την ολική διάσπασή τους στην ενζυμική αντίδραση με τη β-φωσφογλυκοζιδάση, παράγραφοι 2.4.4.1 και 2.4.4.2 για τα αντίστοιχα υποστρώματα. Χρησιμοποιήθηκε περίσσεια ενζύμου και μεγάλος χρόνος αντίδρασης (12 ώρες) για την πλήρη διάσπαση του υποστρώματος.

2.4.5 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)

Η ανίχνευση των φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων και ο προσδιορισμός της καθαρότητάς τους έγινε μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην παροδική ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου, αλληλεπιδράσεων Van der Waals και αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου ανάμεσα στα συστατικά του δείγματος και τη στατική φάση, στη συγκεκριμένη περίπτωση τις ελεύθερες ομάδες υδροξυλίου στην επιφάνεια του silica gel. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ν-βουτανόλης/οξικού οξέος/dH₂O σε αναλογία όγκου 2:1:1. Για την εμφάνιση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα εμφάνισης 0.2% w/v ορκινόλη-20% v/v θειικό οξύ και επώαση σε θερμοκρασία 95 °C για 15 λεπτά.

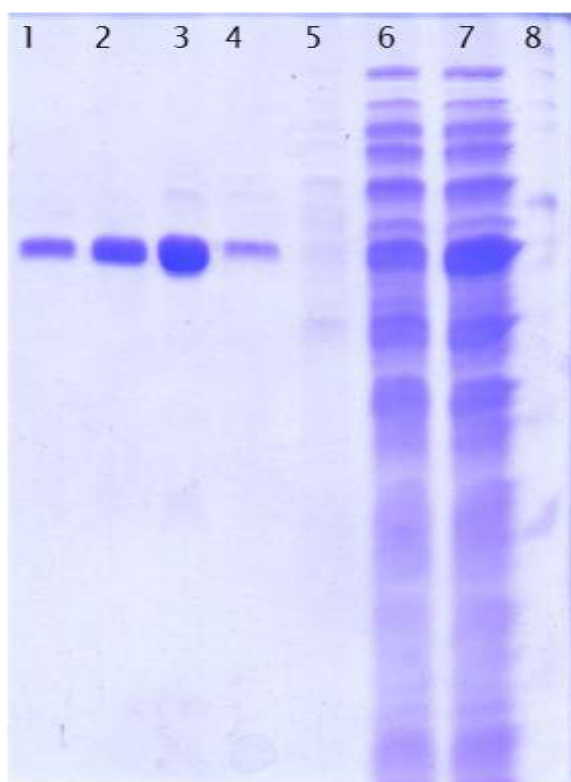
2.4.6 Συνθήκες συντήρησης

Όλα τα υποστρώματα διατηρήθηκαν στους -10 °C σε διαλύτη dH₂O χωρίς να παρατηρηθεί αλλοίωση σε διάστημα αρκετών μηνών.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ

Η καθαρότητα της πρωτεΐνης που απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη Ni-NTA agarose, διαπιστώθηκε με ηλεκτροφόρηση του ενζυμικού δείγματος σε πήκτωμα ακρυλαμίδης.



Εικόνα 3.1: SDS-PAGE. Διαδρομή 1,2,3,4: β-P-γλυκοζιδάση Διαδρομή 5: Wash 20mM Διαδρομή 6: Δ/μα έκλουσης πρωτεϊνών Διαδρομή 7: Αρχικό δείγμα Διαδρομή 8: Μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους.

3.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

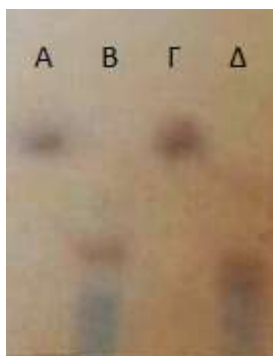
3.2.1 Αρχικός καθαρισμός με βάριο

Ο πρωτογενής καθαρισμός των υποστρωμάτων που παράχθηκαν, όπως φαίνεται στην απεικόνιση των TLC των υποστρώματος pNPG6P (εικόνα 3.2), φωσφο-λακτόζης και φωσφο-γεντιοβιόζης (εικόνα 3.3) δεν ήταν επαρκής για την πλήρη απομάκρυνση των προσμίξεων.

Αντιθέτως, ανιχνεύθηκαν μόνο ίχνη μη φωσφορυλιωμένου υποστρώματος, το οποίο αποτελεί τον κύριο παρεμποδιστή λόγω της στερεοδομικής ομοιότητας με τη φωσφορυλιωμένη μορφή. Η αναλογία φωσφορυλιωμένου προς μη φωσφορυλιωμένου υποστρώματος ήταν αρκετά ικανοποιητική ώστε να μην υπάρχει σημαντική επίδραση στην K_m του ενζύμου προς το τελευταίο.



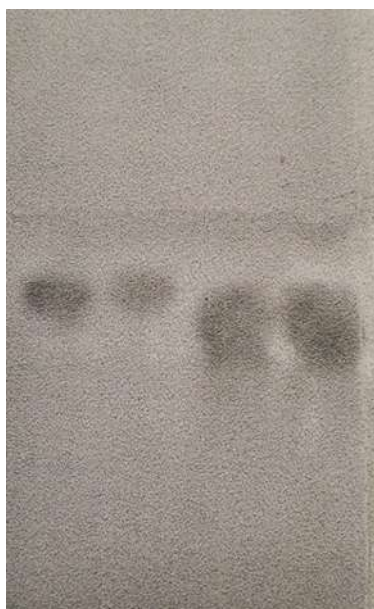
Εικόνα 3.2: Φωτογραφία χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας του υποστρώματος παρανίτροφαινυλ-β-D-φωσφογλυκοκυρανόζη (pNPG6P), μετά από τον πρωτογενή καθαρισμό με βάριο: A. pNPG B. pNPG6P.



Εικόνα 3.3: Φωτογραφία χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας των υποστρωμάτων φωσφο-λακτόζης και φωσφο-γεντιοβιόζης: Α. δείκτης λακτόζης, Β. φωσφολακτόζη, Γ. δείκτης κελλοβιόζης, Δ. φωσφο-γεντιοβιόζη.

3.2.2 Καθαρισμός υποστρωμάτων σε στήλη ανιοντοανταλλαγής

Έπειτα από τον καθαρισμό των φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων σε στήλη ανιοντοανταλλαγής, το ποσοστό μη φωσφορυλιωμένου υποστρώματος μειώθηκε σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Το γεγονός επιβεβαιώθηκε με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας. Έτσι, επιτεύχθηκε ο εμπλουτισμός των υποστρωμάτων και αποφυγή σφαλμάτων λόγω παρεμπόδισης της ενεργότητας της β-Ρ-γλυκοζιδάσης κατά τον βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου.

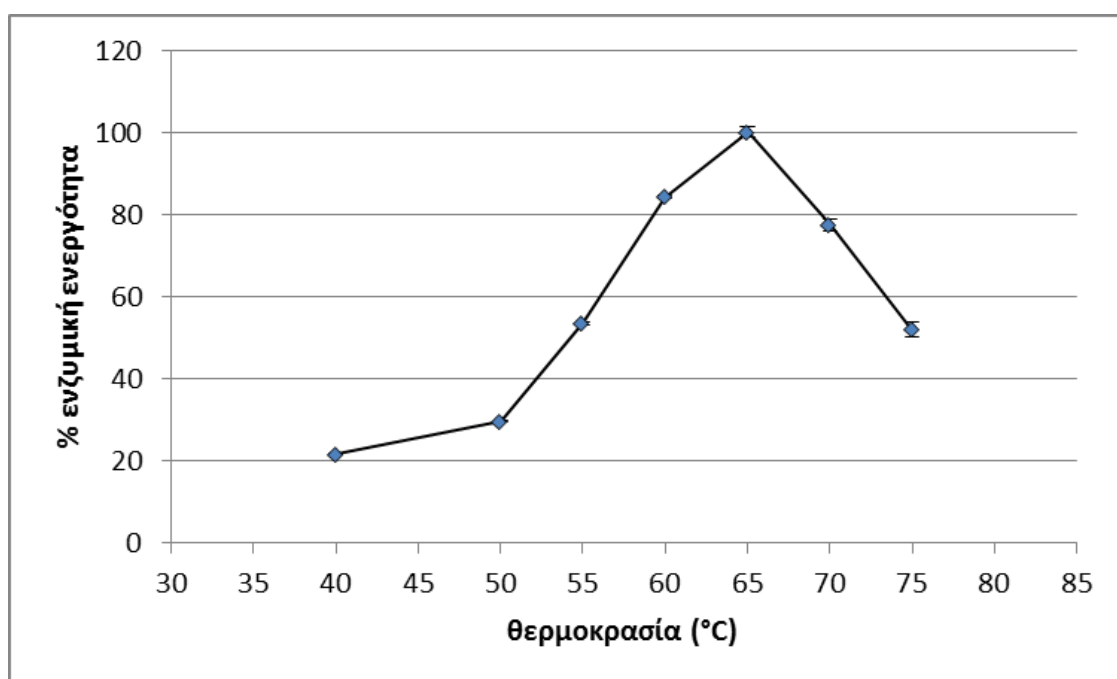


Εικόνα 3.4: Φωτογραφία χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας των υποστρωμάτων φωσφο-λακτόζης και φωσφο-γεντιοβιόζης: Α. δείκτης λακτόζης, Β. φωσφολακτόζη, Γ. δείκτης κελλοβιόζης, Δ. φωσφο-γεντιοβιόζη.

3.3 ENZYMΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

3.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική ενεργότητα

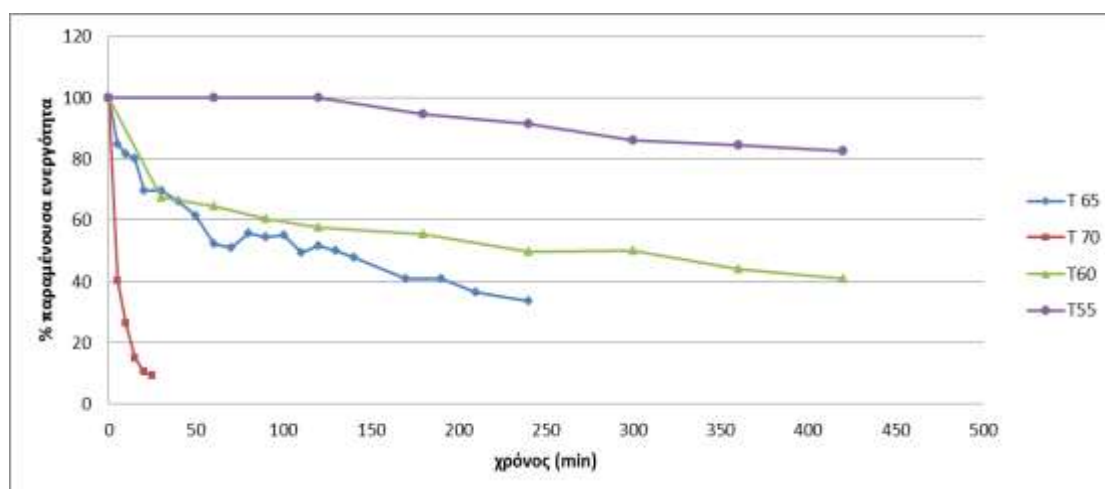
Η θερμοκρασία στην οποία η β-φωσφογλυκοζιδάση παρουσίασε τη μέγιστη ενεργότητα προσδιορίστηκε σε ένα εύρος τιμών, πραγματοποιώντας την ενζυμική αντίδραση υδρόλυσης του ψευδοϋποστρώματος pNPG6P από τη β-φωσφογλυκοζιδάση.



Εικόνα 3.5: Επίδραση θερμοκρασίας στην ενεργότητα της β-φωσφογλυκοζιδάσης. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Στην εικόνα 3.5 φαίνεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι οι 65 °C, ενώ σε απόκλιση ± 5 °C η ενεργότητα παραμένει αρκετά υψηλή. Στις υπόλοιπες θερμοκρασίες που εξετάστηκαν, η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται με αναμενόμενο τρόπο.

3.3.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική σταθερότητα



Εικόνα 3.6: Σταθερότητα της β-φωσφογλυκοζιδάσης στις διαφορετικές θερμοκρασιακές τιμές.

Η εικόνα 3.6 συνοψίζει την ποσοστιαία ενεργότητα του ενζύμου συναρτήσει του χρόνου για διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας.

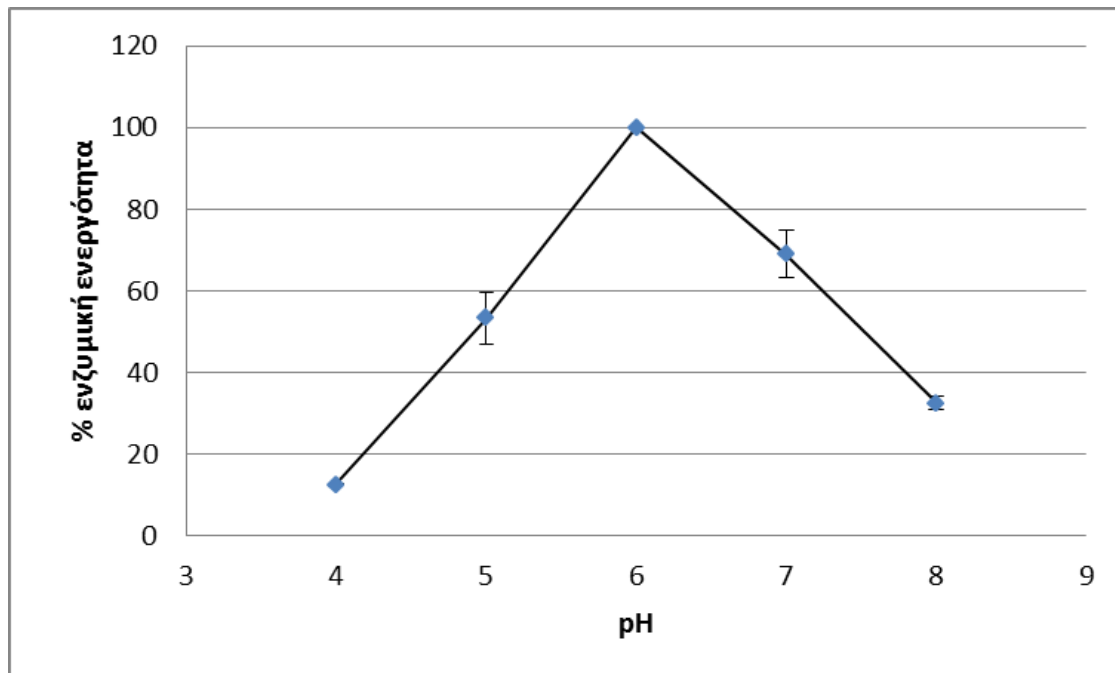
Βάσει αυτής φαίνεται ότι μετά από επώαση του ενζύμου για 2 ώρες στους 55 °C, η ενεργότητα παραμένει στο 100% της αρχικής, ενώ ακόμη και μετά από 6 ώρες η παραμένουσα ενεργότητα είναι άνω του 80%.

Σε αντίθεση, στις υπόλοιπες θερμοκρασίες που εξετάστηκαν, το ένζυμο δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτη σταθερότητα. Συγκεκριμένα, για τις θερμοκρασιακές τιμές των 60 και 65 °C, η ενεργότητα της β-φωσφογλυκοζιδάσης έχει μειωθεί στο 60% και 55% αντίστοιχα μέσα στις 2 πρώτες ώρες.

Τέλος, το ένζυμο δεν παρουσιάζει καμία σταθερότητα στους 70 °C, αφού μέσα στα πρώτα 30 λεπτά, η ενεργότητά του είναι σχεδόν μηδενική.

3.3.3 Επίδραση του pH στην ενζυμική ενεργότητα

Οι τιμές pH που ελέγχθηκαν στα διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα και η ενζυμική ενεργότητα που μετρήθηκε παρουσιάζονται στην εικόνα 3.7.



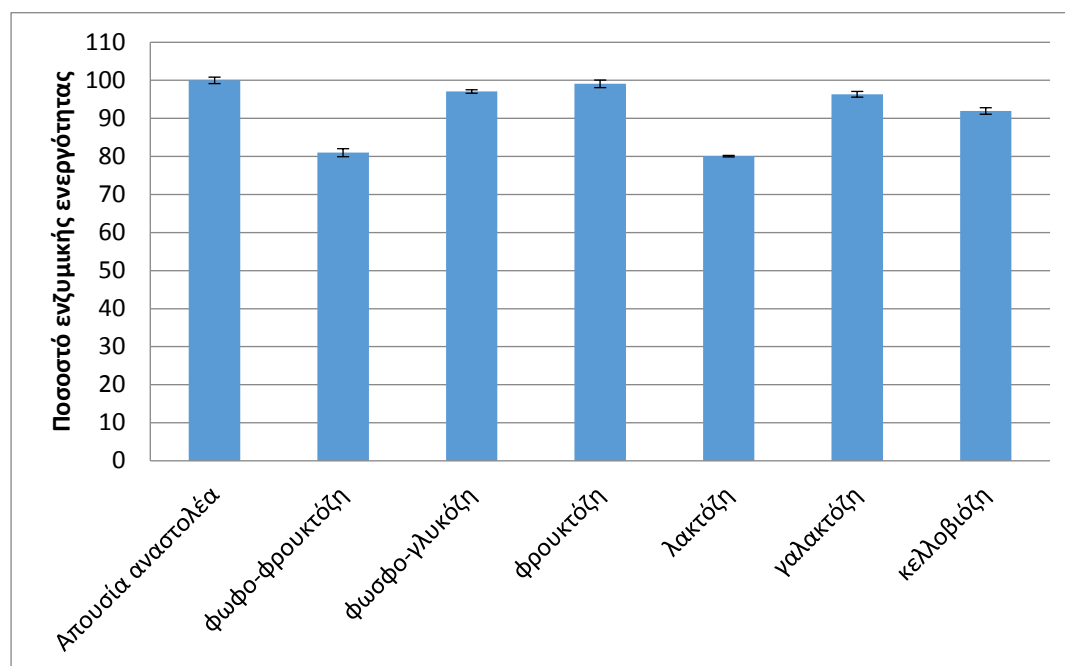
Εικόνα 3.7: Επίδραση pH στην ενεργότητα της β-φωσφογλυκοζιδάσης. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων.

Για το εύρος τιμών pH 4-8, η μέγιστη ενζυμική ενεργότητα παρατηρήθηκε στο pH 6. Ακόμη και μικρές αποκλίσεις από αυτήν την τιμή είχαν ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου.

3.3.4 Επίδραση αναστολέων στην ενεργότητα της β-φωσφογλυκοζιδάσης

Ο ρυθμός παραγωγής προϊόντος κατά την ενζυμική υδρόλυση του pNPG6P δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την ύπαρξη αναστολέων στο μίγμα αντίδρασης. Τόσο οι μη φωσφορυλιωμένοι όσο και οι φωσφορυλιωμένοι μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες που δοκιμάστηκαν (γαλακτόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, λακτόζη, κελλοβιόζη, φωσφοφρουκτόζη, φωσφο-γλυκόζη), δεν επέφεραν μείωση της ενεργότητας του ενζύμου παρά την υψηλή συγκέντρωσή τους στο μίγμα αντίδρασης.

Η ενεργότητα του ενζύμου κατά την υδρόλυση του φυσικού υποστρώματος φωσφοκελλοβιόζη δεν αναστέλλεται σε σημαντικό βαθμό από κανέναν από τους αναστολείς που δοκιμάστηκαν. Με εξαίρεση τη λακτόζη και τη φωσφογλυκόζη, η προσθήκη των οποίων στο μίγμα αντίδρασης επέφερε μείωση της ενεργότητας κατά 20 %, δεν παρατηρείται παρεμπόδιση στη δράση του ενζύμου σε καμία άλλη περίπτωση. Η ενεργότητα παραμένει σε ποσοστά μεγαλύτερα του 90 % αυτής που παρατηρείται απουσία αναστολέων.



Εικόνα 3.8: Επίδραση πιθανών αναστολέων στην ενζυμική ενεργότητα. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε η υπερέκφραση και ο καθαρισμός του ενζυμικού διαλύματος της β-P-γλυκοζιδάσης. Η ενζυμική επαγωγή πραγματοποιήθηκε στα μετασηματισμένα στελέχη E. coli BL21 σε υγρές καλλιέργειες, χρησιμοποιώντας ως επαγωγέα, στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των μικροοργανισμών, το IPTG. Ο ενζυμικός καθαρισμός αποσκοπούσε στην απομάκρυνση των υπολοίπων υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών και μεταβολιτών οι οποίες θα επενέβαιναν στις μετρήσεις κατά το βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου. Η μέθοδος βασίστηκε στον επίτοπο

ιστιδίνης, ο οποίος επέτρεψε τον εύκολο και γρήγορο διαχωρισμό της πρωτεΐνης μέσω της εκλεκτικής πρόσδεσής της σε στήλη νικελίου.

Η βιοσύνθεση των φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων παρανίτροφαινυλ-β-D-φωσφογλυκοκυρανόζη (pNPG6P), φωσφοκελλοβιόζη, φωσφολακτόζη και φωσφογεντιοβιόζη έγινε χρησιμοποιώντας μία κινάση των β-γλυκοζιδίων (bglK), η οποία προέρχεται από τον παθογόνο μικροοργανισμό *Klebsiella pneumoniae*. Πηγή φωσφορικής ομάδας ήταν το ATP, το οποίο προστέθηκε κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η περίσσεια ATP και ADP, καθώς και άλλες προσμίξεις από οργανικά κατάλοιπα οι οποίες ήταν ορατές σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, απομακρύνθηκαν αρχικά μέσω πρωτογενούς καθαρισμού με βάριο. Καθώς αυτό δεν ήταν επαρκές για την πλήρη απομάκρυνσή τους, έγινε δευτερεύων καθαρισμός μέσω στήλης ανιοντοανταλλαγής, μετά την οποία οι προσμίξεις από οργανικά κατάλοιπα καθώς και το εναπομείναν μη φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα δεν ήταν πλέον ορατά σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

Η παραλαβή καθαρού ενζυμικού διαλύματος καθώς και καθαρών φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων εκτός της διασφάλισης αποφυγής σφαλμάτων κατά το μετέπειτα βιοχημικό χαρακτηρισμό της β-φωσφογλυκοζιδάσης, αποσκοπούσαν επίσης στην κρυσταλλογραφική μελέτη του ενζύμου η οποία βρίσκεται αυτή τη στιγμή σε πρώιμα στάδια.

Σχετικά με το βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου, διαπιστώθηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της β-φωσφογλυκοζιδάσης είναι οι 65 °C και το βέλτιστο pH το 6. Η σταθερότητα του ενζύμου σε υψηλές θερμοκρασίες δεν ήταν ικανοποιητική, αφού επώαση σε θερμοκρασία 65 °C για διάστημα μίας ώρας επιφέρει μείωση της ενζυμικής ενεργότητας κατά 30%. Η ενεργότητα παραμένει ικανοποιητική, σε επίπεδα άνω του 80%, μετά από επώαση στους 55 °C για διάστημα 7 ωρών.

Όσον αφορά την αναστολή της ενεργότητας της β-φωσφογλυκοζιδάσης από μονο- και ολιγοσακχαρίτες, δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές παρουσία και απουσία των πιθανών αναστολέων. Από τους αναστολείς που δοκιμάστηκαν (φωσφοφρουκτόζη, φωσφο-γλυκόζη, φρουκτόζη, λακτόζη, γαλακτόζη και κελλοβιόζη), μόνο οι φωσφοφρουκτόζη και λακτόζη επέφεραν αναστολή της ενεργότητας της τάξεως

του 20%. Η αναστολή αυτή παρατηρήθηκε κατά την ενζυμική αντίδραση έναντι του φυσικού υποστρώματος φωσφο-κελλοβιόζη. Η αναλογία υποστρώματος προς τον παρεμποδιστή ήταν 1 προς 10, γεγονός που καταδεικνύει ότι δεν παρατηρούνται σημαντικά επίπεδα αναστολής.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abbott, D.W., et al., *Streptococcus pneumoniae endohexosaminidase D, structural and mechanistic insight into substrate-assisted catalysis in family 85 glycoside hydrolases*. J Biol Chem, 2009. 284(17): p. 11676-89.
2. Alkhalili, R.N., et al., *Antimicrobial Protein Candidates from the Thermophilic Geobacillus sp. Strain ZGt-1: Production, Proteomics, and Bioinformatics Analysis*. Int J Mol Sci, 2016. 17(8).
3. Antranikian, G., et al., *Diversity of bacteria and archaea from two shallow marine hydrothermal vents from Vulcano Island*. Extremophiles, 2017. 21(4): p. 733-742.
4. Ardèvol, A. and C. Rovira, *Reaction Mechanisms in Carbohydrate-Active Enzymes: Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Insights from ab Initio Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Dynamic Simulations*. Journal of the American Chemical Society, 2015. 137(24): p. 7528-7547.

5. Barabote, R.D. and M.H. Saier, *Comparative Genomic Analyses of the Bacterial Phosphotransferase System*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2005. 69(4): p. 608-634.
6. Brock, T.D., *Life at high temperatures. Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed*. Science, 1967. 158(3804): p. 1012-9.
7. Brock, T.D. and K.L. Boylen, *Presence of thermophilic bacteria in laundry and domestic hot-water heaters*. Appl Microbiol, 1973. 25(1): p. 72-6.
8. Davies, G. and B. Henrissat, *Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases*. Structure, 1995. 3(9): p. 853-859.
9. Deutscher, J., C. Francke, and P.W. Postma, *How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2006. 70(4): p. 939-1031.
10. Di Lauro, B., M. Rossi, and M. Moracci, *Characterization of a beta-glycosidase from the thermoacidophilic bacterium Alicyclobacillus acidocaldarius*. Extremophiles, 2006. 10(4): p. 301-10.
11. Gardossi, L., et al., *Guidelines for reporting of biocatalytic reactions*. Trends in Biotechnology. 28(4): p. 171-180.
12. He, T. and X. Zhang, *Characterization of Bacterial Communities in Deep-Sea Hydrothermal Vents from Three Oceanic Regions*. Mar Biotechnol (NY), 2016. 18(2): p. 232-41.
13. Huck, J.R., M. Sonnen, and K.J. Boor, *Tracking heat-resistant, cold-thriving fluid milk spoilage bacteria from farm to packaged product*. J Dairy Sci, 2008. 91(3): p. 1218-28.
14. Hussein, A.H., B.K. Lisowska, and D.J. Leak, *Chapter One - The Genus Geobacillus and Their Biotechnological Potential*, in *Advances in Applied Microbiology*, S. Sima and G. Geoffrey Michael, Editors. 2015, Academic Press. p. 1-48.
15. Ibrahim M. A. Al-Maghrabi, A.O.B.A.M.R.I.O.C., *Use of Thermophilic Bacteria for Bioremediation of Petroleum Contaminants*. Energy Sources, 1999. 21(1-2): p. 17-29.
16. Kashefi, K. and D.R. Lovley, *Extending the upper temperature limit for life*. Science, 2003. 301(5635): p. 934.
17. Khasin, A., I. Alchanati, and Y. Shoham, *Purification and characterization of a thermostable xylanase from Bacillus stearothermophilus T-6*. Applied and Environmental Microbiology, 1993. 59(6): p. 1725-1730.
18. Kirk, O., T.V. Borchert, and C.C. Fuglsang, *Industrial enzyme applications*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. 13(4): p. 345-351.
19. Kuo, L.C. and K.T. Lee, *Cloning, expression, and characterization of two beta-glucosidases from isoflavone glycoside-hydrolyzing Bacillus subtilis natto*. J Agric Food Chem, 2008. 56(1): p. 119-25.
20. Lansky, S., et al., *Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of Gan1D, a GH1 6-phospho-beta-galactosidase from Geobacillus stearothermophilus T1*. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2014. 70(Pt 2): p. 225-31.
21. Meintanis, C., et al., *Biodegradation of crude oil by thermophilic bacteria isolated from a volcano island*. Biodegradation, 2006. 17(2): p. 105-11.
22. Miot, S. and J.-L. Boulay, *Protein technologies and commercial enzymes*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. 13(4): p. 287-288.
23. Parry, N.J., et al., *Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from Thermoascus aurantiacus*. Biochemical Journal, 2001. 353(Pt 1): p. 117-127.

24. Perugino, G., et al., *Oligosaccharide synthesis by glycosynthases*. Trends in Biotechnology, 2004. 22(1): p. 31-37.
25. Rye, C.S. and S.G. Withers, *Glycosidase mechanisms*. Curr Opin Chem Biol, 2000. 4(5): p. 573-80.
26. Schiraldi, C. and M. De Rosa, *The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles*. Trends Biotechnol, 2002. 20(12): p. 515-21.
27. Schmid, A., et al., *The use of enzymes in the chemical industry in Europe*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. 13(4): p. 359-366.
28. Setlow, P., *Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals*. J Appl Microbiol, 2006. 101(3): p. 514-25.
29. Stathopoulou, P.M., et al., *Assessment of the biomass hydrolysis potential in bacterial isolates from a volcanic environment: biosynthesis of the corresponding activities*. World J Microbiol Biotechnol, 2012. 28(9): p. 2889-902.
30. Studholme, D.J., *Some (bacilli) like it hot: genomics of Geobacillus species*. Microbial Biotechnology, 2015. 8(1): p. 40-48.
31. Turner, P., G. Mamo, and E.N. Karlsson, *Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining*. Microbial Cell Factories, 2007. 6: p. 9-9.
32. van den Burg, B. and V.G.H. Eijsink, *Selection of mutations for increased protein stability*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. 13(4): p. 333-337.
33. Varrot, A., et al., *NAD⁺ and metal-ion dependent hydrolysis by family 4 glycosidases: structural insight into specificity for phospho-beta-D-glucosides*. J Mol Biol, 2005. 346(2): p. 423-35.
34. Vuong, T.V. and D.B. Wilson, *Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity*. Biotechnol Bioeng, 2010. 107(2): p. 195-205.
35. Wilson, D.B., *Cellulases and biofuels*. Curr Opin Biotechnol, 2009. 20(3): p. 295-9.
36. Wissuwa, J., et al., *Isolation and complete genome sequence of the thermophilic Geobacillus sp. 12AMOR1 from an Arctic deep-sea hydrothermal vent site*. Stand Genomic Sci, 2016. 11: p. 16.
37. Zarros, A. and S.D. Boomkamp, *Methodological accuracy and firm interpretation of enzymatic analysis: The usefulness of Bisswanger's "Practical Enzymology"*. Journal of Natural Science, Biology, and Medicine, 2014. 5(2): p. 499-501.
38. Zeigler, D.R., *The Geobacillus paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?* Microbiology, 2014. 160(Pt 1): p. 1-11.
39. Zeldes, B.M., et al., *Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals*. Front Microbiol, 2015. 6: p. 1209.
40. Zhang, J., et al., *The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed*. Biotechnology for Biofuels, 2011. 4(1): p. 60.
41. Zhang, J., et al., *Laceyella tengchongensis sp. nov., a thermophile isolated from soil of a volcano*. Int J Syst Evol Microbiol, 2010. 60(Pt 9): p. 2226-30.