



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΕΙΡΑΙΩΣ
ΤΜΗΜΑ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΟΙΚΟΝΟΜΙΑ, ΚΥΚΛΙΚΗ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***Μελέτη καινοτόμων ενζύμων για την αποδοτική
αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας***

ΛΥΡΙΣΤΗ ΣΤΑΜΑΤΙΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Τόπακας Ευάγγελος

Πειραιάς, Ιούλιος 2022



UNIVERSITY OF PIRAEUS
DEPARTMENT OF ECONOMICS



NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF
ATHENS
SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING

MASTER PROGRAM

«BIOECONOMY, CIRCULAR ECONOMY AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT»

MASTER THESIS

***Study of novel enzymes for the efficient degradation of
lignocellulosic biomass***

LYRISTI STAMATIA

Thesis supervisor: Topakas Evangelos

Piraeus, July 2022

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Ευάγγελου Τόπακα, στο πλαίσιο της ολοκλήρωσης του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Βιοοικονομία, Κυκλική οικονομία και Βιώσιμη ανάπτυξη» του Πανεπιστημίου Πειραιώς.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ευάγγελο Τόπακα για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, καθώς και για την επιστημονική καθοδήγηση κατά τη διεξαγωγή της μελέτης αυτής. Η ευκαιρία που μου δόθηκε να δουλέψω σε ένα τόσο ενεργό εργαστήριο ήταν πολύ σημαντική για εμένα.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του Ε.Μ.Π. Χριστίνα Πεντάρη για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής, το χρόνο που αφιέρωσε και την προθυμία της να βοηθήσει στην επίλυση κάθε απορίας που προέκυψε. Η στήριξη της ήταν αδιαμφισβήτητα πολύτιμη και η εργασία αυτή δε θα είχε την παρούσα μορφή χωρίς τη συνδρομή της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους υποψήφιους διδάκτορες και τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για το ευχάριστο και φιλόξενο κλίμα που μου προσέφεραν, καθώς και για το περιβάλλον ομαλής συνεργασίας που δημιουργήθηκε.

Τέλος, σε όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού, η υποστήριξη και η συμπαράσταση της οικογένειάς μου υπήρξε ανεκτίμητη.

Σταματία Λυριστή,

Πειραιάς, 2022

Περίληψη

Η αποδόμηση της μη βρώσιμης λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας έχει αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια ως μια σημαντική ευκαιρία για παραγωγή βιοενέργειας και βιοχημικών προϊόντων μέσω των βιοδιωλιστηρίων. Η ιδέα του βιοδιωλιστηρίου αποτελεί την πλέον φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο παραγωγής βιοκαυσίμων με στόχο την προώθηση της χρήσης ανανεώσιμων πρώτων υλών για τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκαλούνται από την αλόγιστη χρήση των υδρογονανθράκων. Για την ευρεία εκμετάλλευση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι αναπόδραστη ανάγκη η κατάλληλη αξιοποίηση διάφορων μικροοργανισμών και βιοκαταλυτών. Το βιοδιωλιστήριο λιγνινοκυτταρίνης ενσωματώνει τις έννοιες της αειφορίας, της οικολογικής συνείδησης και της αξιοποίησης πράσινων τεχνολογιών για τη μείωση, επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση της βιομάζας. Επομένως, ευθυγραμμίζεται πλήρως με τις αρχές της κυκλικής βιοοικονομίας, ενός νέου μοντέλου οικονομίας που συνδυάζει τη βιοοικονομία με μια κυκλική οικονομία που βασίζεται σε ανανεώσιμες πηγές, αποσκοπώντας στην προστασία του περιβάλλοντος και την εξασφάλιση της οικονομικής βιωσιμότητας.

Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην ενζυμική αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δύο καινοτόμα ένζυμα και συγκεκριμένα μια αραβινοφουρανοζιδάση της οικογένειας των γλυκοζιδικών υδρολασών GH43 (*TtAbf43*) και μια εστεράση, η οποία ανήκει στην οικογένεια των εστερασών CE16 του οξικού οξέος (*TtCE16*) από το μύκητα *Thermothelomyces thermophilus*, τα οποία εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Αρχικά, έγινε βιοχημικός χαρακτηρισμός των δύο ενζύμων και σε δεύτερη φάση μελετήθηκε η συνεργιστική δράση των δύο αυτών ενζύμων με άλλα ημικυτταρινολυτικά ένζυμα (ξυλανάσες, αραβινοφουρανοζιδάσες, εστεράσες) με στόχο την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους.

Ειδικότερα, όσον αφορά την αραβινοφουρανοζιδάση *TtAbf43*, προσδιορίστηκε η ενζυμική της ενεργότητα σε υπόστρωμα αραβινάνης, όπου βρέθηκε 21 ± 2 U/mg, καθώς και οι κινητικές σταθερές Michaelis-Menten (V_{max} , K_M) σε υπόστρωμα αραβινάνης σκοπό να διερευνηθεί η συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος. Στην αραβινάνη σημειώθηκαν $V_{max}=0.18 \pm 0.01$ mg/ml/min και $K_M=109 \pm 13$ mg/ml, τιμές που υποδηλώνουν χαμηλή συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος. Επιπλέον, εξετάστηκε η συνδυαστική της δράση με τις εμπορικές αραβινοφουρανοζιδάσες E-AFASE και E-AFAM2 σε αραβινοξυλάνη σιταριού (WA) και αραβινοξυλάνη σίκαλης (RA). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και στα δύο υποστρώματα η *TtAb43* παρουσίασε παρόμοιο τρόπο δράσης με την E-AFAM2 και συμπληρωματικό τρόπο δράσης με την E-AFASE, άρα θεωρείται πως το ένζυμο κόβει τη μία αραβινόζη από διπλά υποκατεστημένα μόρια ξυλόζης. Οι βαθμοί συνεργιτισμού που σημειώθηκαν κατά τη συνδυαστική δράση της *TtAbf43* με την εμπορική αραβινοφουρανοζιδάση E-AFASE (1.57 ± 0.09 με υπόστρωμα το WA και 1.18 ± 0.17 με υπόστρωμα το RA) υποδεικνύουν συνεργιτισμό, αναδεικνύοντας την αναγκαιότητα της συνδυασμένης αξιοποίησής τους για την αποδοτική υδρόλυση βιομάζας.

Κατόπιν, διεξήχθη ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της εστεράσης του οξικού οξέος *TtCE16*. Το ένζυμο παρουσίασε ειδική ενεργότητα 587 ± 35 U/mg σε υπόστρωμα p-NP

Acetate, 107 ± 7 U/mg σε o-NP Acetate, 2.6 ± 0.6 U/mg σε p-NP Butyrate και 11.0 ± 2.3 U/mg σε p-NP Palmitate και με την πραγματοποίηση κινητικής Michaelis-Menten προσδιορίστηκε η σταθερά K_M , που προέκυψε 0.09 ± 0.01 mM σε p-NP Acetate και υποδηλώνει υψηλή συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι οι 60 °C, ενώ διατηρεί υψηλή ενεργότητα σε ένα εύρος θερμοκρασιών $45-70$ °C. Η εστεράση διατηρεί την ενεργότητά της κατόπιν εικοσιτετράωρης επώασης σε ήπιες θερμοκρασίες, ενώ αδρανοποιείται πάνω από τους 50 °C και είναι ιδιαίτερος σταθερή σε ένα εύρος pH $3-9$. Ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου προσεγγίστηκε κατόπιν συγκριτικής μελέτης με εστεράσες του οξικού οξέος γνωστής εξειδίκευσης που ανήκουν στις οικογένειες CE2 και CE6 ως προς το υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης, που είχε επεξεργαστεί με ξυλανάσες των οικογενειών GH10 (E-XYLATM) και GH11 (E-XYAN4). Η ποσοστιαία απελευθέρωση οξικού οξέος ($116 \pm 7\%$ και $95 \pm 7\%$ με τις E-XYLATM και E-XYAN4 αντίστοιχα) στα δείγματα που περιείχαν το συνδυασμό *Ti*CE16-*O*CE6, οδηγεί στην υπόθεση περί συμπληρωματικής δράσης των δύο ενζύμων, ενώ η παρόμοια δράση που εμφάνισε με την εστεράση *Ci*CE2, οδηγεί στην υπόθεση ότι το μελετώμενο ένζυμο κόβει ακετυλώσεις από τις θέσεις 2-3-4 και διπλές υποκαταστάσεις από ξυλο-ολιγοσακχαρίτες. Κατόπιν, μελετήθηκε η συνεργιστική δράση της E-XYLATM με τις εστεράσες *Ti*CE16 και *O*CE6 σε υπόστρωμα προκατεργασμένου ξύλου οξιάς (ΠΞΟ), με τη μεγαλύτερη απελευθέρωση οξικού οξέος να παρατηρείται κατά το συνδυασμό *Ti*CE16-*O*CE6-E-XYLATM, ενώ κατά το συνδυασμό αυτό και η συγκέντρωση του ουρονικού UXOS παρουσίασε μια αυξητική τάση ($186 \pm 11\%$). Έπειτα, διερευνήθηκε η συνεργιστική δράσης της ξυλανάσης *Ti*Xyn30A με τις εστεράσες *Ti*CE16, *Ci*CE2 και *O*CE6 σε ακετυλιωμένη ξυλάνη και σε ΠΞΟ. Όσον αφορά το υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης, ο συνδυασμός *Ti*CE16- *Ti*Xyn30A οδήγησε σε αύξηση ξυλοβιόζης κατά $21 \pm 2\%$, που όμως υστερούσε σημαντικά της αύξησης που παρατηρήθηκε με το του συνδυασμό *Ti*Xyn30A-*O*CE6, γεγονός αναμενόμενο αφού η *Ti*CE16 επί της ουσίας δρα στα προϊόντα της GH30. Όσον αφορά το υπόστρωμα ΠΞΟ, δε σημειώθηκε αύξηση των σακχάρων X1 και X2, ενώ μηδενική αύξηση παρατηρήθηκε και στην απελευθέρωση του ουρονικού ολιγοσακχαρίτη *O*-XUX με την συνεργιστική δράση των ενζύμων *Ti*Xyn30A-*Ti*CE16 με αποτέλεσμα ο συνδυασμός της μελετώμενης εστεράσης με την ξυλανάση *Ti*Xyn30A να θεωρείται αναποτελεσματικός για την υδρόλυση του ΠΞΟ.

Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση της α-γλυκουρονιδάσης E-AGUBS στα προϊόντα υδρόλυσης της *Ti*Xyn30A σε υπόστρωμα ΠΞΟ και πιο συγκεκριμένα στο *O*-UX (2^2 - (4-O-Methyl- α -D-Glucuronyl)-xylobiose). Βρέθηκε ότι η γλυκουρονισάση παρεμποδίζεται κατά τη διάσπαση του *O*-UX, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται σε ακετυλίωση στη θέση 3 της ξυλόζης που φέρει το ουρονικό, με το αποτέλεσμα αυτό να χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία αναδείχθηκε η σημασία των βοηθητικών ενζύμων, τόσο ως προς τον συνεργιστικό με τις ξυλανάσες όσο και ως προς τη συμπληρωματική δράση με ένζυμα της ίδιας ενεργότητας αλλά διαφορετικής εξειδίκευσης. Κατά συνέπεια, συμβάλλει στο να ανοίξουν νέοι ορίζοντες στην έρευνα για την αποδοτική αποικοδόμηση της βιομάζας.

Abstract

The degradation of non-edible lignocellulosic biomass has emerged in recent years as a significant opportunity for the production of bioenergy and biochemical products through biorefineries. The biorefinery concept is the most environmentally friendly method of biofuel production, aimed at the promotion of the use of renewable raw materials in order to reduce the environmental impact caused by the reckless use of hydrocarbons. For the widespread utilisation of lignocellulosic biomass to be achieved, there is a pressing need to make appropriate use of various microorganisms and biocatalysts. The biorefinery incorporates the concepts of sustainability, ecological awareness and the use of green technologies for the reduction, reuse and recycling of biomass. It is hence fully in line with the principles of the circular bioeconomy, a new economic model that combines bioeconomy with a circular economy which is based on renewable sources, aiming to protect the environment and ensure economic sustainability.

In this context, the present study has focused on the enzymatic degradation of hemicellulose from lignocellulosic biomass. More specifically, two novel enzymes were studied, namely an arabinofuranosidase of GH43 family (*TtAbf43*) and an acetyl esterase of CE16 family (*TtCE16*) from the fungus *Thermothelomyces thermophilus*, which are involved in the degradation of lignocellulosic biomass. At first, the two enzymes were biochemically characterised and then the synergistic effect of these two enzymes with other enzymes (xylanases, arabinofuranosidases, esterases) was studied, with the aim of gaining a better understanding of their mode of action.

To be more specific, with regard to arabinofuranosidase *TtAbf43*, its activity was determined, where 21 ± 2 U/mg was found, as well as the Michaelis-Menten (V_{\max} , K_M) kinetic parameters in arabinan, in order to investigate the enzyme-substrate affinity. $V_{\max} = 0.18 \pm 0.01$ mg/ml/min and $K_M = 109 \pm 13$ mg/ml were noted in the arabinan. These values indicate a low enzyme-substrate affinity. In addition, its combined action with the commercial arabinofuranosidases E-AFASE and E-AFAM2 on wheat arabinoxylan (WA) and on rye arabinoxylan (RA) were examined. The results showed that on both substrates *TtAbf43* exhibited a similar mode of action to E-AFAM2 and a complementary mode of action with E-AFASE, so it is considered that the enzyme cleaves one arabinose from double substituted xylose residues. The degree of synergy that occurred during the combined action of *TtAbf43* with the commercial arabinofuranosidase E-AFASE (1.57 ± 0.09 with WA as the substrate and 1.18 ± 0.17 with RA as the substrate) indicate synergism, highlighting the need for their combined utilisation for the efficient hydrolysis of biomass.

Following the above, the biochemical characterization of acetyl esterase *TtCE16* was performed. The enzyme exhibited activity 587 ± 35 U/mg on p-NP Acetate, 107 ± 7 U/mg on o-NP Acetate, 2.6 ± 0.6 U/mg on p-NP Butyrate and 11.0 ± 2.3 U/mg on p-NP Palmitate. Through the conduction of Michaelis-Menten kinetics, the K_M constant was determined, resulting in 0.09 ± 0.01 mM in p-NP Acetate and indicating a high enzyme-

substrate affinity. The optimum temperature of action of the enzyme is 60 °C, maintaining high activity in a temperature range of 45-70 °C. The esterase maintains its activity after a 24-hour incubation at mild temperatures, while it becomes inactive in temperatures above 50 °C and is particularly stable in a pH range of 3-9. The mode of action of the enzyme was approximated following a comparative study with esterases of the acetic acid of a known specificity, belonging to the CE2 and CE6 families with regard to the acetylated xylan, which has been processed with xylanases of the GH10 (E-XYLATM) and GH11 (E-XYAN4) families. The percentage release of acetic acid ($116\pm 7\%$ and $95\pm 7\%$ with E-XYLATM and E-XYAN4 respectively) in the samples containing the *Tt*CE16-OCE6 combination leads to the hypothesis that the two enzymes have complementary action, while the similar action with the *Ct*CE2 esterase it presented leads to the hypothesis that the studied enzyme shows strong preference for the deacetylation of positions 2-3-4 and double substituted residues from xylooligosaccharides. Subsequently, the synergistic action of E-XYLATM with the *Tt*CE16 and OCE6 esterases on a substrate of pretreated beechwood xylan (PBX) was studied, with the largest release of acetic acid being observed during the *Tt*CE16-OCE6-E-XYLATM combination. During this combination, the concentration of the uronic oligosaccharide UXOS showed an increasing trend ($186\pm 11\%$). The synergistic action of xylanase *Tt*Xyn30A with esterases *Tt*CE16, *Ct*CE2 and OCE6 on acetylated xylan and on PBX as substrates was then examined. As far as the acetated xylan substrate is concerned, the *Tt*CE16- *Tt*Xyn30A combination led to an increase in xylobiose by $21\pm 2\%$, which was, however, significantly lower than the increase observed as a result of the *Tt*Xyn30A-OCE6 combination. This is to be expected, since *Tt*CE16 essentially acts on the products of GH30. When it comes to the substrate PBX, there was no increase in X1 and X2 sugars, while a zero increase was also observed in the release of uronic oligosaccharide O-XUX with the synergistic action of the enzymes *Tt*Xyn30A-*Tt*CE16. As a result, the combination of the studied esterase with the xylanase *Tt*Xyn30A was considered ineffective for the degradation of PBX.

Finally, the effect of α -Glucuronidase E-AGUBS on the hydrolysis products of *Tt*Xyn30A on PBX and, more specifically, on O-UX (2^2 -(4-O-Methyl- α -D-Glucuronyl)-xylobiose) was examined. It was discovered that glucuronidase is inhibited during the breakdown of O-UX, which is most likely due to the acetylation in position 3 that the uronic oligosaccharide carries, with this result requiring further investigation.

In conclusion, the present study highlighted the significance of auxiliary enzymes, in terms of both synergism with xylanases and complementary action with enzymes of the same activity but different specificity. As a result, it contributes to the opening of new horizons in research into the efficient degradation of lignocellulosic biomass.

Πίνακας περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΛΙΓΝΙΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΟΣ ΒΙΟΜΑΖΑ	1
1.1. Δομή λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας	1
1.2. Είδη λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.....	2
1.2.1. Γεωργικά υπολείμματα.....	2
1.2.2. Δασικά υπολείμματα	3
1.3. Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχων υπολειμμάτων.....	4
1.3.1. Κυτταρίνη.....	5
1.3.2. Ημικυτταρίνη.....	6
1.3.3. Λιγνίνη.....	8
1.4. Ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.....	9
1.4.1. Ξυλανάσες	10
1.4.2. Ξυλανάσες των οικογενειών 10 και 11 (GH10 και GH11)	10
1.5. Συνεργιστική δράση ενζύμων και βαθμός συνεργιτισμού	16
1.5.1. Βαθμός και είδη συνεργιτισμού για την αποικοδόμηση των ημικυτταρινών.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΡΗΣΗ ΞΥΛΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ, ΟΦΕΛΗ ΚΑΙ ΚΥΚΛΙΚΗ ΒΙΟΟΙΚΟΝΟΜΙΑ.....	18
2.1. Βιοδιυλιστήρια	18
2.1.1. Η έννοια του βιοδιυλιστηρίου	18
2.1.2. Κατηγορίες βιοδιυλιστηρίων.....	19
2.2. Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για παραγωγή ξυλοολιγοσακχαριτών	22
2.2.1. Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας.....	23
2.2.2. Φυσικοχημικές μέθοδοι προκατεργασίας.....	24
2.2.3. Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας.....	25
2.2.4. Βιολογική Προκατεργασία	27
2.3. Ξυλοολιγοσακχαρίτες και οφέλη.....	27
2.3.1. Οι ξυλοολιγοσακχαρίτες ως πρεβιοτικά.....	27
2.3.2. Διαταραχές στην εντερική μικροχλωρίδα	28
2.3.3. Η σημασία των ξυλοολιγοσακχαριτών.....	29
2.3.4. Οφέλη των ξυλοολιγοσακχαριτών στην ανθρώπινη υγεία.....	29
2.3.5. Οφέλη των ξυλοολιγοσακχαριτών ως συστατικά σε ζωοτροφές	30
2.4. Ξυλοολιγοσακχαρίτες και κυκλική βιοοικονομία	32
2.4.1. Σημασία των βιοδιυλιστηρίων δεύτερης γενιάς στην καταπολέμηση των παγκόσμιων περιβαλλοντικών ζητημάτων.....	32

2.4.2. Η έννοια της κυκλικής βιοοικονομίας.....	34
2.4.3. Βιοοικονομία, κυκλική οικονομία και ξυλοολιγοσακχαρίτες	36
2.4.4. Τάσεις της αγοράς στον τομέα των ξυλοολιγοσακχαριτών.....	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
3.1. Υλικά.....	39
3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια -Αναλώσιμα Υλικά	39
3.1.2. Ρυθμιστικά Διαλύματα (buffers)	39
3.1.3. Ένζυμα.....	39
3.1.4. Όργανα και συσκευές	40
3.2. Μέθοδοι.....	42
3.2.1. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin-Layer Chromatography, TLC).....	42
3.2.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	43
3.2.3. Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης (High Performance Anion-Exchange Chromatography, HPAEC).....	45
3.2.4. Μέτρηση ολικών αναγωγικών σακχάρων με τη χρήση διαλύματος 5-δινιτροσαλυκυλικού οξέος (DNS).....	46
3.2.5. Μέτρηση ενεργότητας ξυλανασών.....	47
3.2.6. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών	47
3.2.7. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TtAbf43</i> και συνεργιτισμοί.....	49
3.2.8. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της εστεράσης του οξικού οξέος, <i>TtCE16</i> και συνεργιτισμοί.....	52
3.2.9. Επίδραση της δράσης της α -γλυκουρονιδάσης E-AGUBS στα προϊόντα υδρόλυσης της <i>TtXyn30A</i> σε υπόστρωμα ΠΞΟ	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
4.1. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TtAbf43</i> και συνεργιτισμοί59	
4.1.1. Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας σε υπόστρωμα αραβινάνης	59
4.1.2. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων σε υπόστρωμα αραβινάνης και π-νιτροφαίνυλ-αραβινοφουρανόζης (pNP-Araf)	59
4.1.3. Τρόπος δράσης της αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TtAbf43</i> και συνεργιτισμοί με τις εμπορικές αραβινοφουρανοζιδάσες E-AFASE και E-AFAM2.....	61
4.2. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της εστεράσης του οξικού οξέος <i>TtCE16</i> και συνεργιτισμοί	62
4.2.1. Μελέτη της εξειδίκευσης της <i>TtCE16</i> ως προς διαφορετικά υποστρώματα	62
4.2.2. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten σε υπόστρωμα p-NP Acetate.....	63
4.2.3. Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης.....	64
4.2.4. Μελέτη σταθερότητας σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και pH.....	65

4.2.5. Μηχανισμός δράσης της εστεράσης του οξικού οξέος <i>TtCE16</i> και συνεργισμοί με τις εστεράσες <i>CtCE2</i> και <i>OCE6</i> και τις <i>GH10</i> και <i>GH11</i> ξυλανάσες σε ακετυλιωμένη ξυλάνη	66
4.2.6. Τρόπος δράσης και συνεργισμοί με τις εστεράσες <i>CtCE2</i> και <i>OCE6</i> και τις <i>GH10</i> και <i>GH11</i> ξυλανάσες σε ακετυλιωμένη ξυλάνη με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC)	67
4.2.7. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της <i>GH10</i> ξυλανάσης με τις εστεράσες <i>TtCE16</i> και <i>OCE6</i> σε υπόστρωμα ΠΞΟ	69
4.2.8. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της <i>TtXyn30A</i> ξυλανάσης με εστεράσες του οξικού οξέος σε ακετυλιωμένη ξυλάνη.....	73
4.2.9. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της <i>TtXyn30A</i> ξυλανάσης με εστεράσες του οξικού οξέος σε υπόστρωμα ΠΞΟ	74
4.3. Επίδραση της δράσης της α -γλυκουρονιδάσης E-AGUBS στα προϊόντα υδρόλυσης της <i>TtXyn30A</i> σε υπόστρωμα ΠΞΟ	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	77
5.1. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TtAbf43</i> και συνεργισμοί.....	77
5.1.1. Εξειδίκευση υποστρώματος	77
5.1.2. Κινητική σε αραβινάνη και pNPArabinofuranoside και προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων Michaelis-Menten.....	77
5.1.3. Συνεργισμοί με τις εμπορικές αραβινοφουρανοζιδάσες E-AFAM2 και E-AFASE	79
5.2. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της εστεράσης του οξικού οξέος <i>TtCE16</i> και συνεργισμοί	79
5.2.1. Μελέτη της εξειδίκευσης ως προς διαφορετικά υποστρώματα.....	79
5.2.2. Μελέτη της κινητικής σε υπόστρωμα p-NP Acetate και προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων Michaelis-Menten.....	80
5.2.3. Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης.....	80
5.2.4. Σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες και σε διαφορετικές τιμές pH	80
5.2.5. Τρόπος δράσης και συνεργισμοί με τις εστεράσες <i>CtCE2</i> και <i>OCE6</i> και τις <i>GH10</i> και <i>GH11</i> ξυλανάσες σε ακετυλιωμένη ξυλάνη.....	81
5.2.6. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της <i>GH10</i> ξυλανάσης με τις εστεράσες <i>TtCE16</i> και <i>OCE6</i> σε υπόστρωμα ΠΞΟ με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).....	82
5.2.7. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της <i>GH10</i> ξυλανάσης με τις εστεράσες <i>TtCE16</i> και <i>OCE6</i> σε υπόστρωμα ΠΞΟ με τη μέθοδο χρωματογραφίας ιοανταλλαγής υψηλής απόδοσης (HPEAC)	83
5.2.8. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της <i>TtXyn30A</i> ξυλανάσης με εστεράσες του οξικού οξέος σε ακετυλιωμένη ξυλάνη.....	83
5.2.9. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της <i>TtXyn30A</i> ξυλανάσης με εστεράσες του οξικού οξέος σε υπόστρωμα ΠΞΟ	84

5.3. Επίδραση της δράσης της α-γλυκουρονιδάσης E-AGUBS στα προϊόντα υδρόλυσης της <i>TiXyn30A</i> σε υπόστρωμα ΠΞΟ.....	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ.....	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ	87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	88
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	99

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Βιοπολυμερή που αποτελούν την λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα	1
Εικόνα 2: Τύποι λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και η χημική τους σύσταση	2
Εικόνα 3: Δυναμικό των γεωργικών υπολειμμάτων παγκοσμίως το 2019.....	3
Εικόνα 4: Κατανομή της παγκόσμιας ξυλώδους βιομάζας ανά τις ηπείρους το 2020. .	4
Εικόνα 5: Η δομή του κυτταρικού τοιχώματος	5
Εικόνα 6: Δομική μονάδα κυτταρίνης. Εντός των αγκυλών απεικονίζεται η κελλοβιόζη	6
Εικόνα 7: Μονομερή σάκχαρα που εντοπίζονται στις ημικυτταρίνες.	8
Εικόνα 8: Δομή ξυλάνης.....	8
Εικόνα 9: Δομή της λιγνίνης.....	9
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της ενζυμικής αποικοδόμησης της ημικυτταρίνης	9
Εικόνα 11: Χωρική διάταξη τυπικής ενεργής θέσης των ξυλανασών GH10	11
Εικόνα 12: Χωρική διάταξη τυπικής ενεργής θέσης των ξυλανασών GH11	11
Εικόνα 13: Χωρική διάταξη τυπικής ενεργής θέσης των ξυλανασών GH30	13
Εικόνα 14: Η δράση των α-L-αραβινοφουρανοζιδασών σε πολυμερές αραβινάνης, από το οποίο απελευθερώνουν μονομερή αραβινόζης διασπώντας υπολείμματα α-1,2, α-1,3 ή α-1,5 συνδεδεμένων μορίων αραβινόζης από το μη αναγωγικό άκρο	14
Εικόνα 15: Μηχανισμός δράσης της πλειονότητας των ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια GH43.....	15
Εικόνα 16: Οι διάφορες γενιές βιοδιύλιστηρίων	19
Εικόνα 17: Η έννοια και η ιεραρχία των βιοδιύλιστηρίων	22
Εικόνα 18: Μέθοδοι προκατεργασίας της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας	23
Εικόνα 19: Τα οφέλη των ξυλοολιγοσακχαριτών στους ανθρώπους και τα ζώα.....	32
Εικόνα 20: Η ενσωμάτωση των βιοδιύλιστηρίων λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας στην προσέγγιση της κυκλικής οικονομίας.	34
Εικόνα 21: Σύγκριση γραμμικής και κυκλικής οικονομίας.....	36
Εικόνα 22: Σύγκριση των ΧOs με άλλα πρεβιοτικά όσον αφορά τον όγκο της αγοράς και την τιμή πώλησης.	37
Εικόνα 23: Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer ...	41
Εικόνα 24: Συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, Spectra Max 250 -Molecular Devices.....	41
Εικόνα 25: Διάταξη της HPLC	44
Εικόνα 26: Συσκευή για την HPLC.	45
Εικόνα 27: Συσκευή για την HPAEC	46
Εικόνα 28: Υπόστρωμα αραβινάνης.....	50
Εικόνα 29: TLC δύο διαστάσεων τυφλού δείγματος και των εξεταζόμενων εστερασών (CiCE2, OCE6, TiCE16) σε ακετυλιωμένη ξυλάνη που έχει κατεργαστεί με την ξυλανάση GH10.....	68
Εικόνα 30: TLC συνεργιστικής δράσης των εστερασών OCE6 και TiCE16 για την αποακετυλίωση της ξυλοβιόζης.....	69

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων.....	39
Πίνακας 2: Χημικοί τύποι των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη εξειδίκευσης ενζύμου.....	53
Πίνακας 3: Ποσοστά υδρόλυσης της αραβινάνης και μετρήσεις ενεργότητας σε διάφορα υποστρώματα.....	59
Πίνακας 4: Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Michaelis-Menten για το ένζυμο <i>TtGH43</i> σε υπόστρωμα αραβινάνης.....	60
Πίνακας 5: Ποσοστά υδρόλυσης και βαθμοί συνεργιτισμού της <i>TtAbf43</i> και των εμπορικών ενζύμων E-AFAM2 και E-AFASE σε υπόστρωμα RA.....	61
Πίνακας 6: Ποσοστά υδρόλυσης και βαθμοί συνεργιτισμού της <i>TtAbf43</i> και των εμπορικών ενζύμων E-AFAM2 και E-AFASE σε υπόστρωμα WA.....	61
Πίνακας 7: Τιμές ενεργότητας της εστεράσης <i>TtCE16</i> στα διαφορετικά υποστρώματα που εξετάστηκαν.....	62
Πίνακας 8: Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Michaelis-Menten όπως προκύπτουν από τη μελέτη της δράσης της εστεράσης <i>TtCE16</i> στο υπόστρωμα pNP Acetate.....	63
Πίνακας 9: Επί τοις εκατό απελευθέρωση οξικού οξέος κατά την δράση των εστερασών σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης, η οποία είχε υποστεί προκατεργασία με ξυλανάσες της οικογένειας GH10 (A) και GH11 (B).....	66
Πίνακας 10: Απελευθέρωση οξικού οξέος και βαθμός συνεργιτισμού ως προς το οξικό των εστερασών <i>TtCE16</i> και <i>TtCE6</i> και της ξυλανάσης της οικογένειας GH10 σε υπόστρωμα ΠΞΟ.....	69
Πίνακας 11: Απελευθέρωση ξυλόζης και βαθμοί συνεργιτισμού ως προς την ξυλόζη κατά τη συνεργιστική υδρόλυση του υποστρώματος από την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και <i>TtCE16</i>	71
Πίνακας 12: Απελευθέρωση ξυλοβιόζης και βαθμοί συνεργιτισμού ως προς την ξυλοβιόζη στα δείγματα με την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και <i>TtCE16</i>	71
Πίνακας 13: Μείωση ξυλοτριόζης στα δείγματα με την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και <i>TtCE16</i>	71
Πίνακας 14: Μείωση ξυλοτετραόζης στα δείγματα με την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και <i>TtCE16</i>	72
Πίνακας 15: Μείωση ξυλοπενταόζης στα δείγματα με την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και <i>TtCE16</i>	72
Πίνακας 16: Μείωση ξυλοεξαόζης στα δείγματα με την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και <i>TtCE16</i>	72
Πίνακας 17: Αύξηση του UX στα δείγματα με την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και <i>TtCE16</i>	73
Πίνακας 18: Ποσοστό αύξησης στην απελευθέρωση ξυλοβιόζης και βαθμοί συνεργιτισμού της ξυλανάσης <i>TtXyn30A</i> και των εστερασών <i>TtCE16</i> , <i>CtCE2</i> , OCE6 σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης.....	73
Πίνακας 19: Ποσοστιαία αύξηση στην απελευθέρωση ξυλόζης και βαθμοί συνεργιτισμού κατά τη συνδυασμένη δράση της ξυλανάσης <i>TtXyn30A</i> και των εστερασών <i>TtCE16</i> , <i>CtCE2</i> , OCE6 σε υπόστρωμα ΠΞΟ.....	74

Πίνακας 20: Ποσοστιαία αύξηση στην απελευθέρωση ξυλοβιόζης και βαθμοί συνεργιτισμού κατά τη συνδυασμένη δράση της ξυλανάσης <i>TiXyn30A</i> και των εστερασών <i>TiCE16</i> , <i>CiCE2</i> , <i>OCE6</i> σε υπόστρωμα ΠΞΟ.....	74
Πίνακας 21: Ποσοστιαία αύξηση στην απελευθέρωση του ουρονικού ολιγοσακχαρίτη O-XUX και βαθμοί συνεργιτισμού κατά τη συνδυασμένη δράση της ξυλανάσης <i>TiXyn30A</i> και των εστερασών <i>TiCE16</i> , <i>CiCE2</i> , <i>OCE6</i> σε υπόστρωμα ΠΞΟ.	74
Πίνακας 22: Ποσοστιαία αύξηση στην απελευθέρωση του ουρονικού ολιγοσακχαρίτη O-UX και βαθμοί συνεργιτισμού κατά τη συνδυασμένη δράση της της ξυλανάσης <i>TiXyn30A</i> και των εστερασών <i>TiCE16</i> , <i>CiCE2</i> , <i>OCE6</i> σε υπόστρωμα ΠΞΟ.	75
Πίνακας 23: Επίδραση της γλυκουρονιδάσης E-AGUBS στον ουρονικό ολιγοσακχαρίτη O-UX που απελευθερώνεται από τη δράση της ξυλανάσης <i>TiXyn30A</i> σε υπόστρωμα ΠΞΟ.....	76

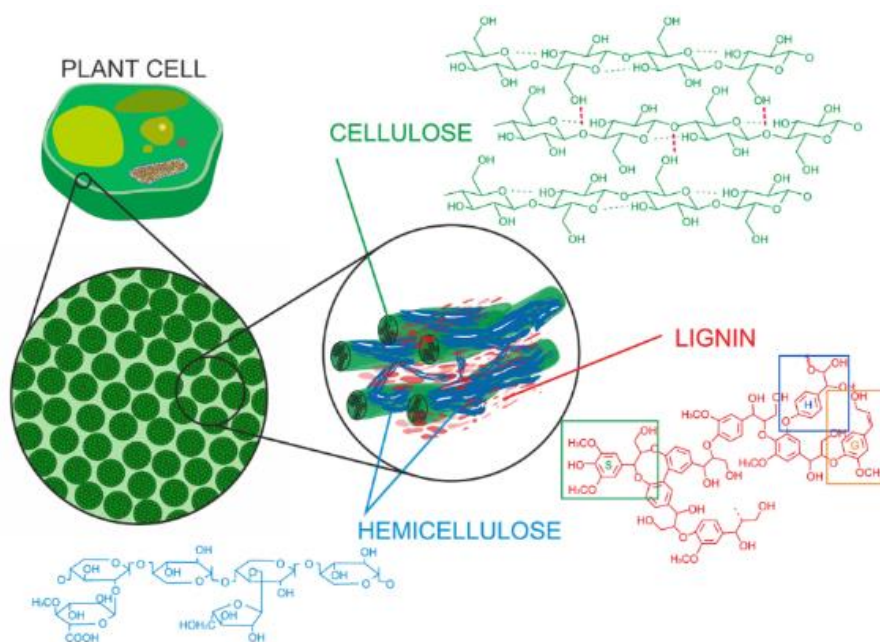
Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Κινητική μελέτη της αραβινοφουρανοζιδάσης <i>TiAbf43</i> σε υπόστρωμα αραβινάνης με βάση το μοντέλο Michaelis-Menten.....	60
Διάγραμμα 2: Προσαρμογή των αποτελεσμάτων της μελέτης της κινητικής της <i>TiCE16</i> σε pNPAcetate στην εξίσωση Michaelis-Menten.....	63
Διάγραμμα 3: Μεταβολή της ενεργότητας της εστεράσης <i>TiCE16</i> βάσει των διαφορετικών θερμοκρασιών που εξετάστηκαν. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι ποσοστιαίες τιμές ενεργότητας του ενζύμου που προσδιορίστηκαν, θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα της εστεράσης στη θερμοκρασία με τη μέγιστη ενεργότητα...	64
Διάγραμμα 4: Επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική ενεργότητα της <i>TiCE16</i> . Η μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκε κατόπιν επώασης του ενζύμου μετά από επώαση 24 ωρών στην εκάστη θερμοκρασία.....	65
Διάγραμμα 5: Επίδραση του pH στη σχετική ενεργότητα της <i>TiCE16</i> μετά από επώαση 24 ωρών	66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΛΙΓΝΙΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΟΣ ΒΙΟΜΑΖΑ

1.1. Δομή λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα, που είναι επίσης γνωστή και ως λιγνινοκυτταρίνη, είναι το πιο άφθονο βιοανανεώσιμο υλικό στη γη, που παράγεται μέσω της διαδικασίας φωτοσύνθεσης από ατμοσφαιρικό CO₂ και νερό χρησιμοποιώντας την ενέργεια του ηλιακού φωτός. Είναι μια πολύπλοκη δομή, που συνίσταται κυρίως από πολυσακχαρίτες, φαινολικά πολυμερή και πρωτεΐνες που αποτελούν το ουσιαστικό μέρος των ξυλωδών κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών (Yousuf et al., 2020). Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελεί μείζονος σημασίας δομικό στοιχείο των φυτών, αλλά και πηγή ανανεώσιμης οργανικής ύλης, ενώ τις τελευταίες δεκαετίες χρησιμοποιείται ευρέως και ως εναλλακτική πηγή ενέργειας. Αποτελείται από τρία είδη πολυμερών, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη που συνδέονται μεταξύ τους με ισχυρούς διασταυρωμένους χημικούς μη ομοιοπολικούς δεσμούς και ομοιοπολικά διασταυρωμένα πλέγματα (εικόνα 1). Η λιγνινοκυτταρίνη είναι εξαιρετικά ανθεκτική στη μικροβιακή αποικοδόμηση. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με την παρουσία λιγνίνης, το βαθμό κρυσταλλικότητας, το βαθμό πολυμερισμού των πολυσακχαριτών, τη διαθέσιμη επιφάνεια και την περιεκτικότητα σε υγρασία (Van Dyk et al., 2012).



Εικόνα 1: Βιοπολυμερή που αποτελούν την λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα (Hasanov et al., 2020)

Μόνο ένα μικρό ποσοστό της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης που παράγεται ως παραπροϊόντα των αγροτικών και δασικών καλλιεργειών αξιοποιείται, ενώ το υπόλοιπο μέρος θεωρείται απόβλητο (Sánchez et al., 2009). Τα πολυμερή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας αποτελούν πάνω από το 60% της φυτικής βιομάζας και αντιπροσωπεύουν μια τεράστια πιθανή πρώτη ύλη για τα τρόφιμα, τις ζωοτροφές,

τα βιοκαύσιμα, τα βιολιπάσματα και άλλες βιομηχανικές διεργασίες (Tengerdy et al., 2003). Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά αποτελούν το 50% της παγκόσμιας βιομάζας και διακρίνονται στα δασικά απόβλητα και τα γεωργικά υπολείμματα.

Lignocellulosic biomass		Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)
Hardwood	Poplar	50.8–53.3	26.2–28.7	15.5–16.3
	Oak	40.4	35.9	24.1
	Eucalyptus	54.1	18.4	21.5
Softwood	Pine	42.0–50.0	24.0–27.0	20.0
	Douglas fir	44.0	11.0	27.0
	Spruce	45.5	22.9	27.9
Agricultural waste	Wheat Straw	35.0–39.0	23.0–30.0	12.0–16.0
	Barley Hull	34.0	36.0	13.8–19.0
	Barley Straw	36.0–43.0	24.0–33.0	6.3–9.8
	Rice Straw	29.2–34.7	23.0–25.9	17.0–19.0
	Rice Husks	28.7–35.6	12.0–29.3	15.4–20.0
	Oat Straw	31.0–35.0	20.0–26.0	10.0–15.0
	Ray Straw	36.2–47.0	19.0–24.5	9.9–24.0
	Corn Cobs	33.7–41.2	31.9–36.0	6.1–15.9
	Corn Stalks	35.0–39.6	16.8–35.0	7.0–18.4
	Sugarcane Bagasse	25.0–45.0	28.0–32.0	15.0–25.0
	Sorghum Straw	32.0–35.0	24.0–27.0	15.0–21.0
Grasses	Grasses	25.0–40.0	25.0–50.0	10.0–30.0
	Switchgrass	35.0–40.0	25.0–30.0	15.0–20.0

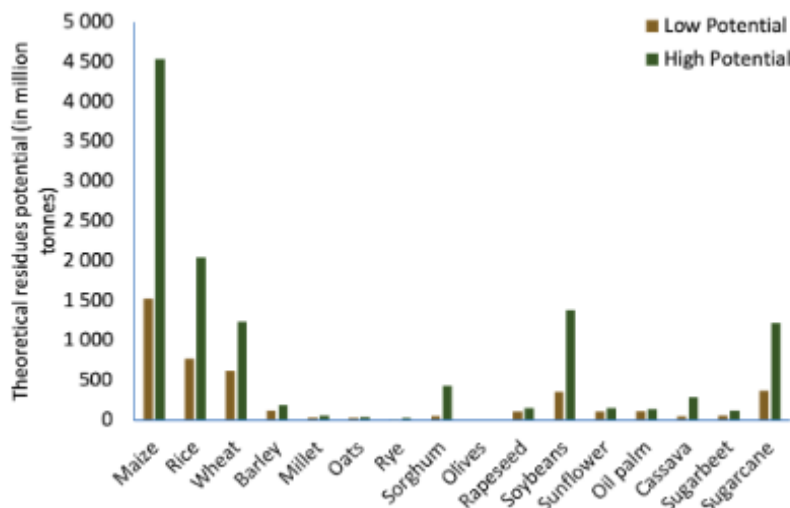
Εικόνα 2: Τύποι λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και η χημική τους σύσταση (Isikgor et al., 2015).

1.2. Είδη λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

1.2.1. Γεωργικά υπολείμματα

Τα απόβλητα αγροτοβιομηχανιών παράγονται κατά τη βιομηχανική μετατροπή των γεωργικών προϊόντων. Στα υπολείμματα αυτά συμπεριλαμβάνονται υλικά όπως άχυρο, μίσχοι, φύλλα, φλοιοί, κελύφη σπόροι, πολλοί από φρούτα, πυρήνες, βγάσση (bagasse), όσπρια ή δημητριακά. Μεγάλες ποσότητες υπολειμμάτων γεωργικών φυτών παράγονται ετησίως παγκοσμίως και χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό. Ο αραβόσιτος, το σιτάρι, το ρύζι και το ζαχαροκάλαμο είναι οι τέσσερις γεωργικές καλλιέργειες με τη μέγιστη παραγωγή καθώς και έκταση (εικόνα 3). Αυτές οι τέσσερις καλλιέργειες είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία της πλειονότητας της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας στον τομέα της γεωργίας και οι υπόλοιπες καλλιέργειες αποτελούν μόνο ένα μικρό ποσοστό της συνολικής παραγωγής γεωργικών αποβλήτων στον κόσμο. Το άχυρο καλαμποκιού είναι το υπόλειμμα που απομένει μετά τη συγκομιδή του πυρήνα καλαμποκιού και περιλαμβάνει μίσχους, φύλλα, στάχυα και φλοιούς. Η ετήσια παραγωγή του είναι 4 τόννοι/στρέμμα. Το άχυρο παράγεται κατά τη συγκομιδή σιταριού με ρυθμό 1-3 τόνους/στρέμμα ετησίως υπό αυστηρές συνθήκες καλλιέργειας. Το άχυρο ρυζιού είναι το υπόλειμμα από την παραγωγή ρυζιού και είναι ένα από τα πιο άφθονα λιγνινοκυτταρινικά απόβλητα στον

κόσμο. Η βαγάσση παράγεται σε τεράστιες ποσότητες κατά την επεξεργασία του ζαχαροκάλαμου και είναι ένας από τους πιο οικονομικούς ανανεώσιμους γεωργικούς πόρους. Ένας τόνος ζαχαροκάλαμου παράγει 135 κιλά ζάχαρης και 130 κιλά ξηρής βαγάσσης. Τα περισσότερα από τα γεωργικά υπολείμματα έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη, αλλά εντοπίζονται και κάποιες μικρές διαφοροποιήσεις, όπως π.χ. το άχυρο σίτου που περιέχει σημαντική ποσότητα πηκτίνης και πρωτεϊνών, σε σχέση με τα υπόλοιπα άχυρα (Saini et al., 2015).



Εικόνα 3: Δυναμικό των γεωργικών υπολειμμάτων παγκοσμίως το 2019. ^[1]

1.2.2. Δασικά υπολείμματα

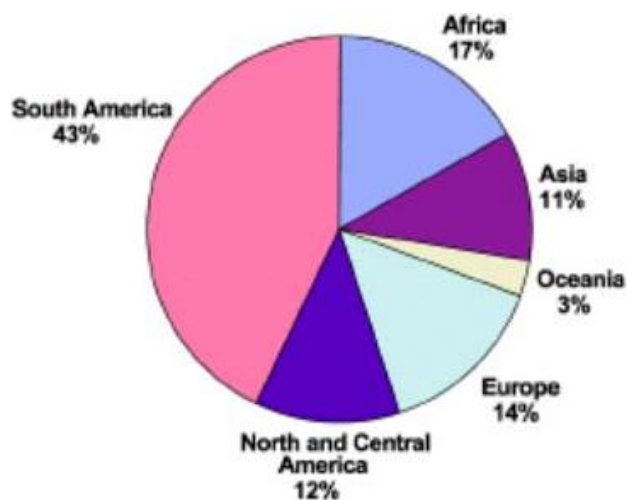
Περιλαμβάνουν τμήματα ξύλου, ρίζες, κλαδιά, και φυλλώματα, τη δασική δηλαδή βιομάζα που συσσωρεύεται φυσιολογικά στο έδαφος, αλλά και κλαδέματα και υπολείμματα υλοτομίας όπως πριονίδια και φλοιούς. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες βιομάζας που προέρχονται από τη δασοκομία (Titus et al., 2021):

- πρωτογενείς πρώτες ύλες που απομακρύνονται από τα δάση
- δευτερεύουσες πρώτες ύλες ως παραπροϊόντα της δασικής παραγωγής

Κατά τη συγκομιδή, μόνο ένα κομμάτι της βιομάζας από τα δέντρα συλλέγεται, ενώ τα υπολείμματα συνήθως παραμένουν στο έδαφος συμβάλλοντας στη γονιμότητα του κατά την αποδόμηση (Correa Molinari et al., 2010). Η αραίωση των δένδρων (thinning) είναι ένα βασικό εργαλείο για τη δασοκομία και κατά τη διαδικασία αυτή αφαιρούνται δένδρα τα οποία αναπτύσσονται πολύ κοντά μεταξύ τους.

Η εκτίμηση του FAO (Food and Agriculture Organization) για την παγκόσμια ξυλώδη βιομάζα το 2020 ήταν 422 δισεκατομμύρια τόνοι (εικόνα 4). Η περιοχή με τη μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας ήταν η Νότια Αμερική με 43% του παγκόσμιου συνόλου ή 180 δισεκατομμύρια τόνους (εικόνα 4). Μόνο η Βραζιλία αντιπροσώπευε το 27% της υπέρχειας ξυλώδους βιομάζας στον κόσμο. Η Αφρική είχε τη δεύτερη μεγαλύτερη ποσότητα με το 17% του παγκόσμιου συνόλου, δηλαδή 71

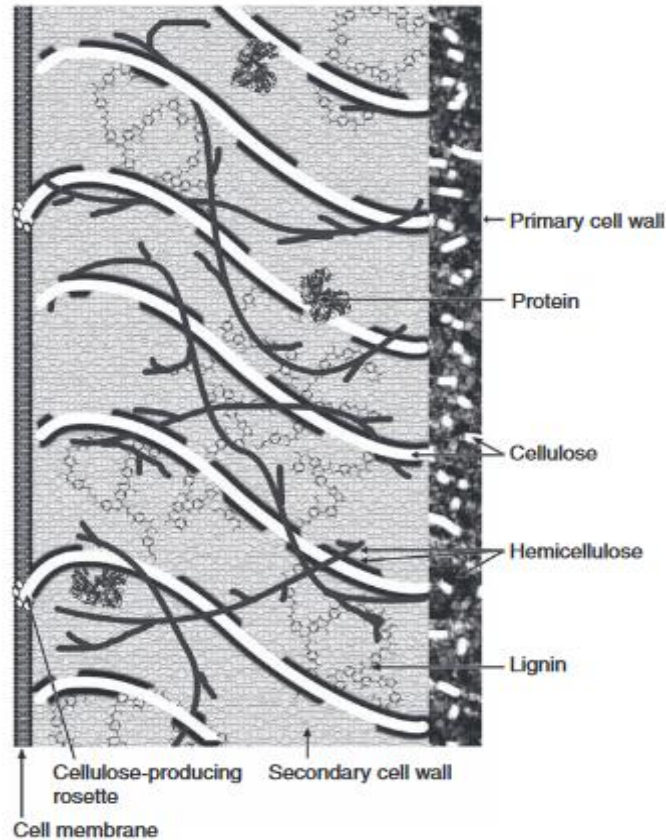
δισεκατομμύρια τόνους. Οι άλλες περιοχές μαζί αντιπροσώπευαν το 40 τοις εκατό της παγκόσμιας ξυλώδους βιομάζας. ^[2]



Εικόνα 4: Κατανομή της παγκόσμιας ξυλώδους βιομάζας ανά τις ηπείρους το 2020. ^[2]

1.3. Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχων υπολειμμάτων

Το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών είναι ο πιο αποτελεσματικός μηχανισμός προστασίας τους από το εξωτερικό περιβάλλον. Ο βασικότερος ρόλος που διαδραματίζει είναι αυτός της δομικής σταθερότητας, αφού παρέχει ακαμψία, αντοχή και σχήμα στο κύτταρο. Επιπλέον, είναι ζωτικής σημασίας και όσον αφορά την άμυνα απέναντι στους διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς (Brett et al., 1996). Η λιγνινοκυτταρίνη είναι ένα σύνθετο δομικό υλικό που εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα φυτών και αποτελείται από κυτταρίνη (40–50%), ημικυτταρίνη (20–40%) και λιγνίνη (20–30%) (Barhoum et al., 2020). Η σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και ποικίλλει, τόσο μεταξύ των φυτικών ειδών, όσο και μεταξύ των ιστών το ίδιου φυτού (εικόνα 5). Επιπλέον, διαφοροποιήσεις παρατηρούνται ακόμη κι ανάμεσα σε κυτταρικά τοιχώματα διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης. Πρωτεΐνες, ρητίνες, έλαια και τέφρα συγκροτούν το υπόλοιπο κλάσμα αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις (Tumuluru et al., 2011).

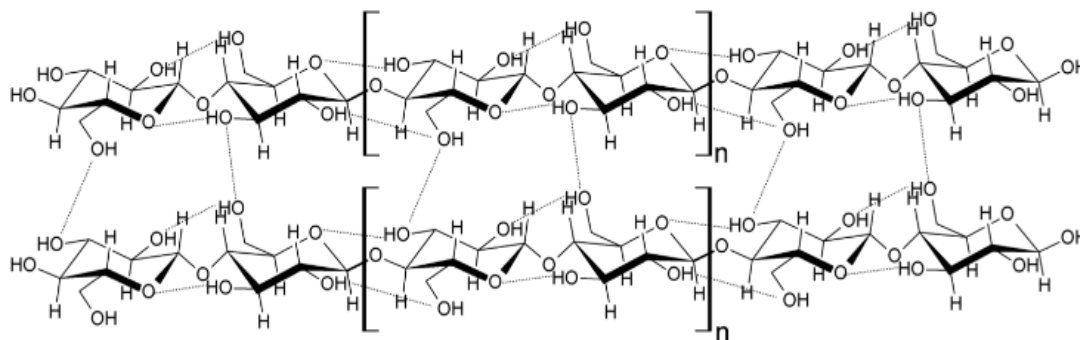


Εικόνα 5: Η δομή του κυτταρικού τοιχώματος (Byrt et al., 2013).

1.3.1. Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί το πιο άφθονο φυσικό πολυμερές στον πλανήτη και το βασικότερο συστατικό των φυτών. Η κυτταρίνη αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, μήκους 8000-15000 μορίων, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό με μέσο μοριακό βάρος περίπου 100.000 (εικόνα 6). Η φυτική βιομάζα περιέχει 40-50% μορίων κυτταρίνης που συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου. Η ισχυρή τους τάση να σχηματίζουν ενδομοριακούς και διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου αυξάνει την ακαμψία της κυτταρίνης και την καθιστά εξαιρετικά ανθεκτική στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες (Anwar et al., 2014). Η σύζευξη των γειτονικών μορίων κυτταρίνης με δεσμούς υδρογόνου καθώς και η επίδραση των δυνάμεων van der Waals, έχουν ως αποτέλεσμα και το σχηματισμό κρυσταλλικής δομής (Zhang et al., 2004). Το μεγαλύτερο μέρος της κυτταρίνης είναι κρυσταλλικό, αλλά μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών παρεμβάλλονται μικρότερες, άμορφες περιοχές. Οι περιοχές αυτές είναι πιο επιρρεπείς στην ενζυμική αποικοδόμηση. Η περιεκτικότητα σε κρυσταλλική και μη κρυσταλλική κυτταρίνη ποικίλλει ανάλογα με το είδος του φυτού. Διαφορετικοί τρόποι σύνδεσης των αλυσίδων γλυκάνης οδηγούν σε διαφορετικές κρυσταλλικές δομές κυτταρίνης που μπορούν να παρατηρηθούν ακόμα και μέσα στο ίδιο μικροϊνίδιο (Brown et al., 2007). Η λιγνίνη και η ημικυτταρίνη

βρίσκονται στα διαστήματα μεταξύ των μικροϊνιδίων κυτταρίνης στο πρωτογενές και δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα, καθώς και στις ενδιάμεσες πτυχώσεις.



Εικόνα 6: Δομική μονάδα κυτταρίνης. Εντός των αγκυλών απεικονίζεται η κελλοβιόζη (Xiros et al., 2013).

1.3.2. Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη αντιπροσωπεύει το ένα τρίτο της συνολικής λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας και παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της πιθανής χρήσης τους σε προϊόντα βιολογικής προελεύσεως όπως μεμβράνες και πρόσθετα τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων (Berglund et al., 2020). Εν αντιθέσει με την κυτταρίνη, υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι ημικυτταρινών. Η ημικυτταρίνη περιλαμβάνει πολυμερή ξυλάνης, μαννάνης, γαλακτάνης, γλυκάνης και αραβινάνης (Van Dyk et al., 2012). 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 (εικόνα 7). Οι ημικυτταρίνες είναι άμορφα πολυμερή, που αποτελούνται από διακλαδωμένες πολυσακχαρικές αλυσίδες μικρού μήκους. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν εντοπιστεί και κρυσταλλικές περιοχές ξυλάνης, όταν αυτή έρχεται σε επαφή με κρυσταλλικές περιοχές κυτταρίνης, όπου και δημιουργούνται ινίδια «ξυλοκυτταρίνης» (Grantham et al., 2017). Η σύσταση της ημικυτταρίνης και η περιεκτικότητα της βιομάζας σε ημικυτταρίνη της ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ διαφορετικών ειδών και τύπων φυτικών κυττάρων. Ο πιο σημαντικός βιολογικός ρόλος των ημικυτταρινών είναι η συμβολή τους στην ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος μέσω αλληλεπίδρασης με την κυτταρίνη και, σε ορισμένα τοιχώματα, με τη λιγνίνη (Scheller et al., 2010). Αν και οι ημικυτταρίνες είναι δομικά πιο πολύπλοκες από την κυτταρίνη και απαιτούν επί της ουσίας περισσότερα ένζυμα για την πλήρη υδρόλυσή τους, στο μεγαλύτερο ποσοστό τους αποτελούνται από άμορφες περιοχές και κατά συνέπεια είναι πιο ευαίσθητες στην ενζυμική υδρόλυση (Saha et al., 2003). Οι ημικυτταρίνες σκληρού ξύλου περιέχουν κυρίως ξυλάνες, ενώ οι ημικυτταρίνες μαλακού ξύλου περιέχουν κυρίως γλυκομαννάνες.

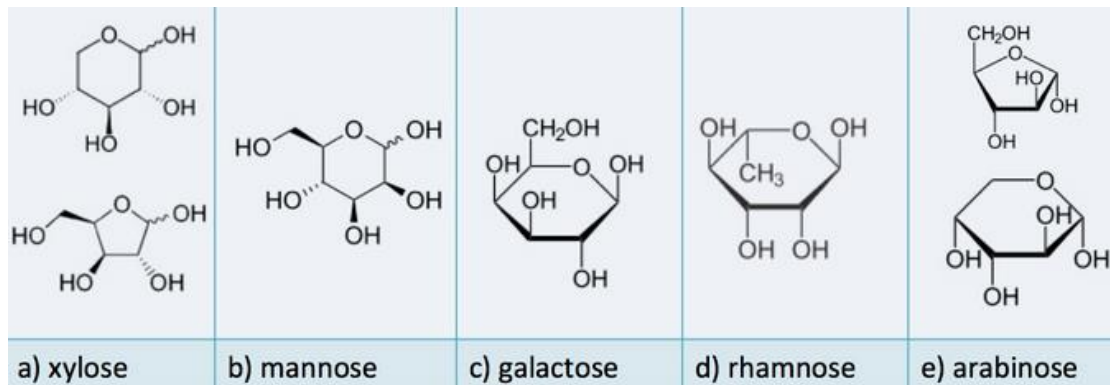
Η ξυλάνη είναι το κυριότερο συστατικό της ημικυτταρίνης και αποτελεί το δεύτερο αφθονότερο φυσικό πολυσακχαρίτη στη γη μετά την κυτταρίνη. Οι ξυλάνες εντοπίζονται στα δευτεροταγή κυτταρικά τοιχώματα, λειτουργώντας ουσιαστικά ως συνδετικός ιστός ανάμεσα στην κυτταρίνη και τη λιγνίνη ώστε να εξασφαλιστεί η

συνεκτικότητα και η ακεραιότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων, αλλά και στα πρωτογενή τοιχώματα. Η ξυλάνη αλληλεπιδρά με τις δομικές μονάδες του κυτταρικού τοιχώματος μέσω ομοιοπολικών δεσμών και δεσμών υδρογόνου. Όσον αφορά τα δομικά της χαρακτηριστικά, η ξυλάνη παρουσιάζει ποικιλομορφία, η οποία διαμορφώνεται βάσει της πηγής προέλευσής της (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013). Ο βασικός σκελετός της ξυλάνης περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες μονάδες β-D ξυλοπυρανόζης ενωμένες με β-1,4 γλυκοζιδικό δεσμό. Η αλυσίδα αυτή μπορεί να περιέχει πλευρικές υποκαταστάσεις με μονάδες D-γαλακτόζης, L-αραβινόζης, γλυκουρονικού οξέος, φερουλικό οξέος, π-κουμαρικού οξέος και οξικού οξέος (De Souza, 2013). 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).

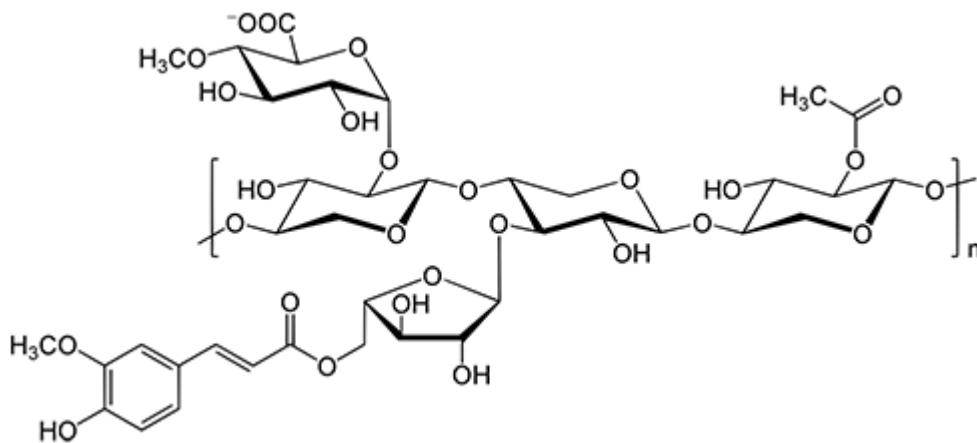
Η ημικυτταρίνη μπορεί να υδρολυθεί με οξέα στα μονομερή συστατικά της: ξυλόζη, μαννόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη και μικρές ποσότητες ραμνόζης, γλυκουρονικού οξέος, μεθυλ-γλυκουρονικού οξέος και γαλακτουρονικού οξέος (Khandeparker et al., 2008). Ωστόσο, πολλές φορές η υδρόλυση με οξέα οδηγεί στην παραγωγή ανασταλτικών παραγόντων, όπως οι φουρφουράλες (Lee et al., 1986). Η αποικοδόμηση και ο αποπολυμερισμός αυτού του πολυσακχαρίτη σε ξυλοολιγοσακχαρίτες και ξυλόζη μπορεί να επιτευχθεί επίσης και ενζυμικά, μέσω της συνεργιστικής δράσης βιοκαταλυτών (Bastawde, 1992).

Ειδικότερα, τα ένζυμα που παίρνουν μέρος στην υδρόλυση της ξυλάνης μπορούν να ομαδοποιηθούν ως εξής (Σταθοπούλου, 2012, Subramanian et al., 2012):

- β-1,4- Ενδοξυλανάσες (EC 3.2.1.8): ένζυμα που υδρολύουν τυχαίους εσωτερικούς γλυκοζιδικούς δεσμούς στο βασικό σκελετό της ξυλάνης.
- β-1,4- Εξωξυλανάσες (EC 3.2.1.37): ένζυμα που απομακρύνουν κατάλοιπα D-ξυλόζης από μη αναγωγικά άκρα ξυλάνης.
- β-Ξυλοζιδάσες (EC 3.2.1.37): ένζυμα που απελευθερώνουν κατάλοιπα ξυλόζης από ξυλο-ολιγοσακχαρίτες.
- α-Αραβινοφουρανοζιδάσες (EC 3.2.1.55): ένζυμα που απομακρύνουν υποκαταστάτες αραβινόζης από τις θέσεις O-2 ή O-3 στα 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.
- 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.
- Εστεράσες: ένζυμα που καταλύουν το σπάσιμο εστερικών δεσμών μεταξύ των ξυλοζών του κυρίως σκελετού και υποκαταστάσεων όπως για παράδειγμα το οξικό οξύ (EC 3.1.1.6). Υπάρχουν πολλές κατηγορίες εστερασών ανάλογα με τον υποκαταστάτη που απομακρύνουν (οξικό, φερουλικό ή π-κουμαρικό οξύ).



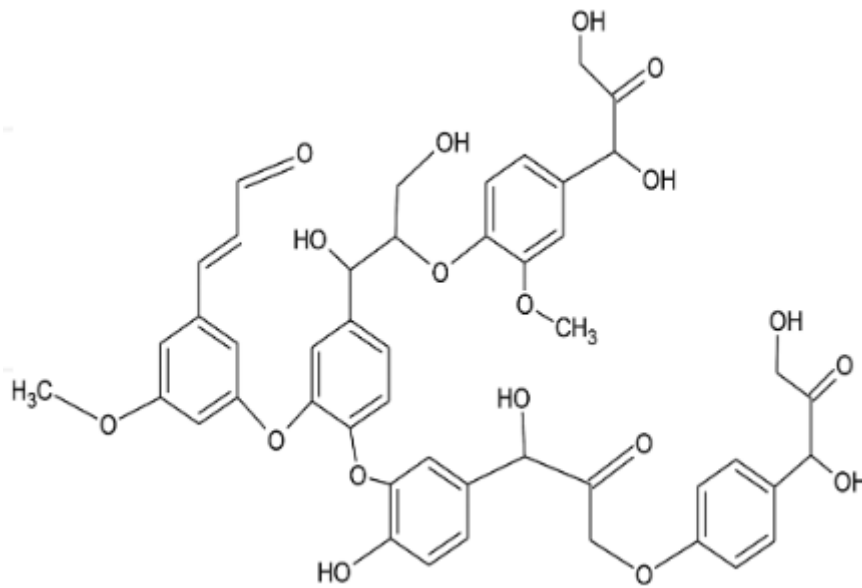
Εικόνα 7: Μονομερή σάκχαρα που εντοπίζονται στις ημικυτταρίνες. ^[3]



Εικόνα 8: Δομή ξυλάνης. ^[3]

1.3.3. Λιγνίνη

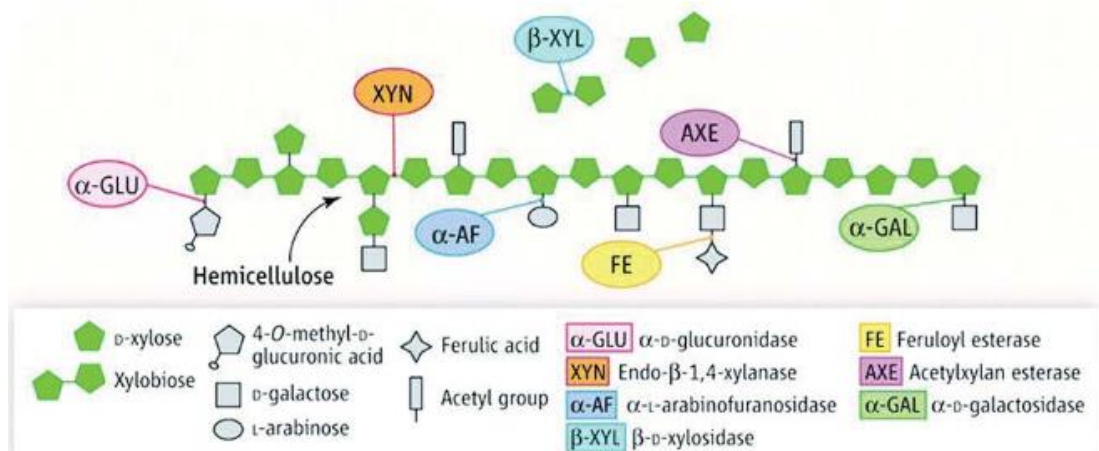
Η λιγνίνη είναι το δεύτερο πιο άφθονο πολυμερές της λιγνινοκυτταρίνης στη γη μετά την κυτταρίνη, που αντιστοιχεί στο 15-40% του ξηρού βάρους. Είναι ένα πολύ σύνθετο άμορφο ετεροπολυμερές μακρομόριο φαινυλοπροπανοειδών δομικών μονάδων που ευθύνεται για την υδροφοβικότητα και τη δομική ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος. Συνδέεται με χημικούς δεσμούς με την ημικυτταρίνη και την κυτταρίνη, σχηματίζοντας ένα φυσικό προστατευτικό στρώμα στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, που τους παρέχει στήριξη, υψηλή αντοχή, μη διαπερατότητα, προστασία από εξωτερικούς μικροβιακούς παράγοντες και οξειδωτικές δράσεις (Sánchez et al., 2019, Zoghلامي et al., 2019). Οι δεσμοί στο πολυμερές της λιγνίνης είναι δεσμοί άνθρακα- άνθρακα και αιθερικοί δεσμοί (εικόνα 9). Η δομή της παρεμποδίζει την διείσδυση ενζύμων, που υδρολύουν πολυσακχαρίτες. Η λιγνίνη παρουσιάζει χαμηλή διόγκωση ενώ υδρολύεται δύσκολα κυρίως με αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες (150-180°C). Επίσης, προσδίδει υψηλή αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2011). Γενικά, οι λιγνίνες κατηγοριοποιούνται σε τρεις μεγάλες ομάδες ανάλογα με την προέλευσή τους σε λιγνίνη μαλακού ξύλου, σκληρού ξύλου και λιγνίνη χόρτου.



Εικόνα 9: Δομή της λιγνίνης (Mahmood .et al, 2018)

1.4. Ενζυμική υδρόλυση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Η ημικυτταρίνη παρουσιάζει πολύπλοκη σύνθεση και συνεπώς απαιτεί τη συνεργιστική δράση πολλών ξυλανολυτικών ενζύμων για την υδρόλυσή της. Τα ένζυμα που αποικοδομούν την ημικυτταρίνη μπορούν να χωριστούν σε αποπολυμεριστικά ένζυμα που διασπούν τον κύριο σκελετό του πολυμερούς και σε ένζυμα που απομακρύνουν πλευρικούς υποκαταστάτες, οι οποίοι ενδέχεται να δημιουργήσουν στερεοχημικά εμπόδια στα αποπολυμεριστικά ένζυμα. Όπως προαναφέρθηκε, τα βασικά ένζυμα για την αποικοδόμηση της ξυλάνης σε μονομερή είναι οι ξυλανάσες και οι β-ξυλοσιδάσες, ενώ βοηθητικά ένζυμα που εμπλέκονται στη διάσπαση της ημικυτταρίνης αποτελούν οι α-L-αραβινοφουρανοσιδάσες, οι α-γλυκουρονιδάσες, οι εστεράσες του φερουλικού οξέος, η α-D-γαλακτοσιδάση και οι εστεράσες του οξικού οξέος (Van Dyk & Pletschke, 2012) (εικόνα 10).



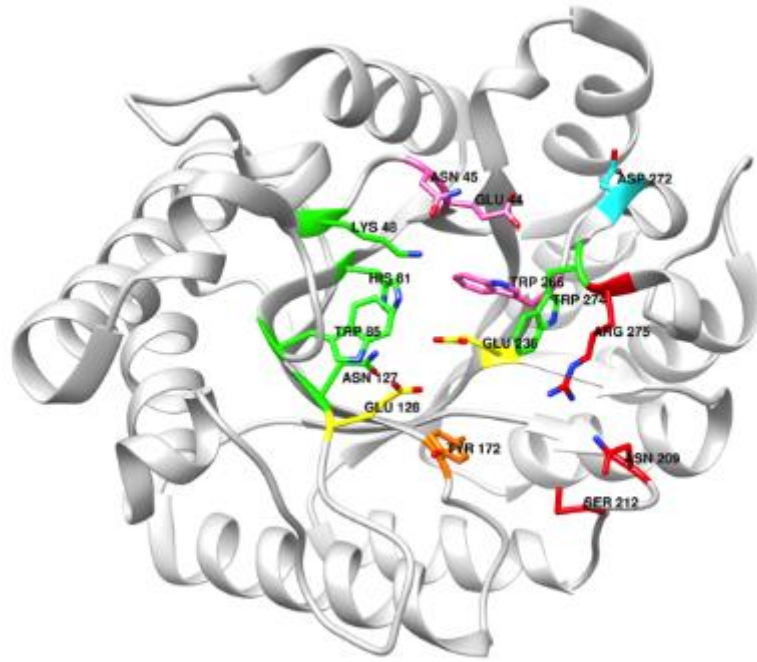
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της ενζυμικής αποικοδόμησης της ημικυτταρίνης (Madadi et al., 2017).

1.4.1. Ξυλανάσες

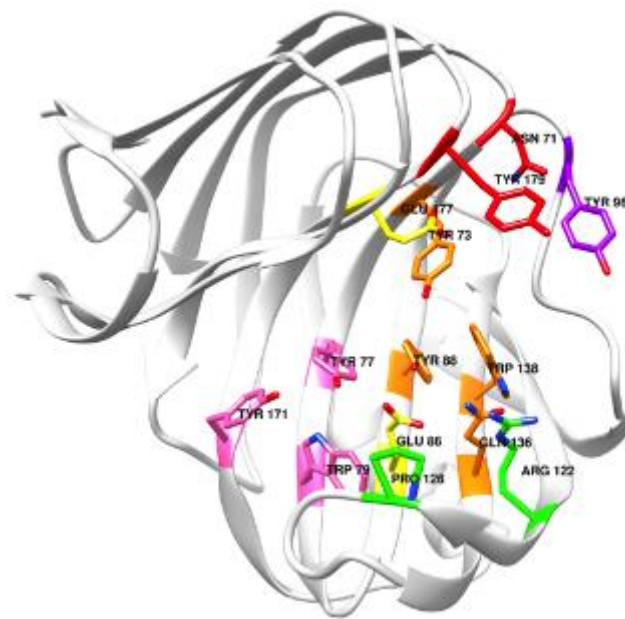
Οι ξυλανάσες, ως ημικυτταρινολυτικά ένζυμα, αποτελούν μια κατηγορία ενζύμων που διασπούν τον γραμμικό πολυσακχαρίτη της ξυλάνης σε ξυλο-ολιγομερή, διασπώντας τους εσωτερικούς β-(1→4) γλυκοζιδικούς δεσμούς μεταξύ των μονάδων ξυλόζης (Yang et al., 2014). Τα προϊόντα αυτής της διάσπασης περιλαμβάνουν ξυλόζη ως μονομερές αλλά και ολιγοσακχαρίτες όπως ξυλοβιόζη. Οι ξυλανάσες έχουν μελετηθεί εκτενώς και παρουσιάζουν δυναμικό αξιοποίησης για την παραγωγή υδρολύματος από αγροτοβιομηχανικά απόβλητα, τη βελτίωση ζωοτροφών που προέρχονται από λιγνινοκυτταρίνη και μετατροπή τους σε πιο εύπεπτες, την επεξεργασία τροφίμων, καθώς και τη βιολεύκανση χαρτοπολτού. Μια ποικιλία μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των νηματοειδών μυκήτων και ζυμομυκήτων, έχει αναφερθεί ότι παράγουν ξυλανάσες, με κυριότερους παραγωγούς να είναι οι μύκητες, όπως π.χ τα γένη των *Aspergillus* και *Trichoderma* (Fengxia et al., 2008).

1.4.2. Ξυλανάσες των οικογενειών 10 και 11 (GH10 και GH11)

Η βάση δεδομένων της CAZy (Carbohydrate-Active enZymes Database, <http://www.cazy.org/>) αφορά σε ένζυμα και πρωτεϊνικές δομές που έχουν δράση σε γλυκοζιδικούς δεσμούς ή προσδένονται σε υδατανθρακικές αλυσίδες, ενώ παράλληλα κατατάσσει τις πρωτεΐνες αυτές σε οικογένειες με βάση τα δομικά τους χαρακτηριστικά. Οι ξυλανάσες εν προκειμένω εντοπίζονται κυρίως στις οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών (GH), GH10 και GH11 (εικόνα 11, εικόνα 12). Οι ξυλανάσες των οικογενειών GH10 και GH11 έχουν μελετηθεί ευρέως στη βιβλιογραφία με τις GH10 ξυλανάσες να παρουσιάζουν λιγότερη εξειδίκευση υποστρώματος από τις GH11 ξυλανάσες. Ως εκ τούτου, οι GH10 ξυλανάσες δρουν με στόχο δεσμούς πιο κοντά σε υποκατεστημένες περιοχές, απαιτώντας για τη δράση τους δύο μη υποκατεστημένα διαδοχικά μόρια ξυλόζης στην κυρίως αλυσίδα (Bonnin et al., 2006). Αντίθετα, οι ξυλανάσες της GH11 οικογένειας χρειάζονται τρία διαδοχικά μη υποκατεστημένα υπολείμματα ξυλόζης (Katsimpouras et al., 2019). Οι ξυλανάσες της οικογένειας 10 έχουν γενικά υψηλότερο μοριακό βάρος και χαμηλότερο ισοηλεκτρικό σημείο συγκριτικά με την οικογένεια 11, ενώ διαφέρουν και ως προς την τρισδιάστατη δομή τους. Επιπλέον, η οικογένεια 10 έχει μικρότερη εξειδίκευση σε συνθετικά υποστρώματα σε σχέση με τις ξυλανάσες της οικογένειας 11. Ενώ οι GH11 ξυλανάσες παρουσιάζουν πιο έντονα ένδο-δράση, στοχεύοντας δεσμούς στο μέσο του κορμού της ξυλάνης, οι GH10 ξυλανάσες εμφανίζουν επίσης έξω-δράση, αποικοδομώντας την ξυλάνη και από τα άκρα της, με μια προτίμηση δράσης από το μη αναγωγικό άκρο. (Morgan et al., 2017). Επομένως, τα προϊόντα που παράγονται μέσω της δράσης των ξυλανασών της οικογένειας 10 στα διάφορα είδη ξυλάνης έχουν μικρότερο μοριακό βάρος από τα αντίστοιχα των ξυλανασών της οικογένειας 11.



Εικόνα 11: Χωρική διάταξη τυπικής ενεργής θέσης των ξυλανασών GH10 (Linares-Pastén et al., 2016).



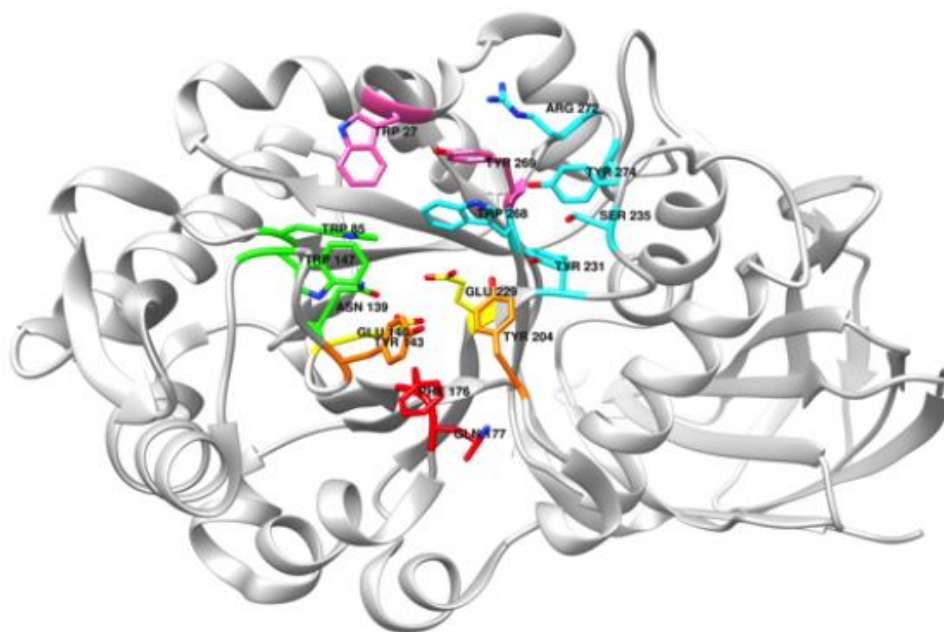
Εικόνα 12: Χωρική διάταξη τυπικής ενεργής θέσης των ξυλανασών GH11 (Linares-Pastén et al., 2016).

1.4.3. Ξυλανάση της οικογένειας 30 (GH30)

Η οικογένεια GH30 των γλυκοζιτικών υδρολασών παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία. Τα ένζυμα που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια περιλαμβάνουν β-γλυκοζιδάσες, β-γλυκουρονοζιδάσες, β-ξυλοζιδάσες, β-φουκοζιδάσες, γλυκοζυλκεραμιδάσες, β-1,6-γλυκανάσες, β-1,4-ξυλανάσες και ενδο-β-1,6-γαλακτανάσες. Οι GH30 ξυλανάσες διαφέρουν αρκετά ως προς την ενεργότητά τους. Μπορούν να είναι ενδοξυλανάσες

χωρίς εξειδίκευση ή να είναι εξειδικευμένες υδρολάσες για τη διάσπαση ξυλανών που περιέχουν 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικό οξύ (MeGlcA) ή πλευρικά υπολείμματα D-γλυκουρονικού οξέος (GlcA) (εικόνα 13). Επιπρόσθετα, κάποιες ξυλοβιοϋδρολάσες απελευθερώνουν ξυλοβιόζη από το μη αναγωγικό άκρο, ενώ κάποιες άλλες πρόσφατα χαρακτηρισμένες GH30 ξυλανάσες είναι σε θέση να απελευθερώνουν ξυλόζη από το αναγωγικό άκρο (Puchart et al., 2021). Η ενεργότητα των ενδοξυλανασών GH30 τις καθιστά βασικό εργαλείο για την παραγωγή ουρονικών ξυλοολιγοσακχαριτών (UXOS). Οι ενδο-ξυλανάσες, γενικά, αποτελούν σημαντικά εργαλεία για την παραγωγή καθορισμένης δομής, πρεβιοτικών ολιγοσακχαριτών (Katsimpouras et al., 2019). Ορισμένες από τις πρόσφατα χαρακτηρισμένες GH30 ξυλανάσες απελευθερώνουν ξυλοβιόζη από το μη αναγωγικό άκρο. Η οικογένεια των γλυκοσιδικών υδρολασών GH30 της βάσης δεδομένων CAZy (GH30) απαρτίζεται από 9 υποοικογένειες, οι οποίες περιλαμβάνουν διαφορετικές ενεργότητες που σχετίζονται με την αποδόμηση της ξυλάνης. Οι υποοικογένειες 7 και 8 (GH30_7 και GH30_8), αποτελούνται από μυκητιακές και βακτηριακές ξυλανάσες, αντίστοιχα. Οι βακτηριακές ενδοξυλανάσες GH30 έχουν γλυκουρονοξυλανολυτική δράση, ενώ οι μυκητιακές ενδοξυλανάσες εμφανίζουν ποικιλία λειτουργικών ιδιοτήτων που σχετίζονται με β-1,4-ξυλανάση (Nikolaitis et al., 2021). Εκτός από την ειδικότητα του υποστρώματος, η λειτουργική ποικιλία των ξυλανασών GH30_7 αντανακλώνεται επίσης στον τρόπο δράσης τους, που περιλαμβάνει τόσο τα έξω- όσο και τα ένδο-ενεργά ένζυμα. Η υποοικογένεια GH30-8 αποτελείται κυρίως από βακτηριακές ενδο-β-1,4-ξυλανάσες εξειδικευμένες για την αποικοδόμηση των ξυλανών που περιέχουν 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικό οξύ (MeGlcA) ή D-γλυκουρονικό οξύ (GlcA) υπολείμματα. Αυτές οι λεγόμενες γλυκουρονοξυλανάσες διασπούν το δεύτερο γλυκοσιδικό δεσμό από το υποκατεστημένο με ουρονικό οξύ υπόλειμμα Xylp προς το αναγωγικό άκρο, δημιουργώντας αλδουρονικά οξέα του γενικού τύπου MeGlcA₂Xyln (Šuchová et al., 2019).

Η ξυλανάση GH30 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η *TtXyn30A* που απομονώθηκε από το μύκητα *T. Thermophila*. Το συγκεκριμένο ένζυμο παρουσιάζει τόσο ενδο-δράση που εξαρτάται από τον πλευρικό υποκαταστάτη MeGlcA, όσο και έξω-δράση σε γραμμικούς ξυλοολιγοσακχαρίτες, απελευθερώνοντας μονάδες ξυλοβιόζης από το μη αναγωγικό άκρο. Κατά συνέπεια, η ξυλανάση *TtXyn30A* παρουσιάζει και βοηθητική δράση ξυλοβιοϋδρολάσης (Katsimpouras et al., 2019).



Εικόνα 13: Χωρική διάταξη τυπικής ενεργής θέσης των ξυλανάσων GH30 (Linares-Pastén et al., 2016).

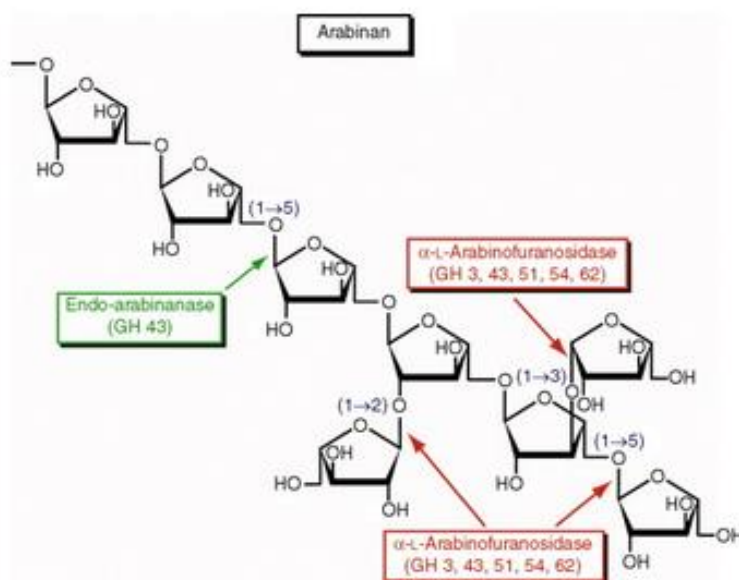
1.4.4. β-ξυλοζιδάσες

Οι β-ξυλοζιδάσες είναι ένζυμα που συνήθως δρουν σε συνέργεια με τις ενδο-1, 4-ξυλανάσες και διασπούν ξυλο-ολιγοσακχαρίτες σε ξυλόζη από το μη αναγωγικό άκρο, αναιρώντας έτσι την παρεμπόδιση της δράσης των ξυλανάσων από τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης (Zhuo et al., 2018). Οι β-ξυλοζιδάσες είναι μια ομάδα διαφορετικών δομικά ενζύμων με ποικίλες ειδικότητες και ετερογένεια υποστρωμάτων. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZy αυτά τα ένζυμα βρίσκονται επί του παρόντος σε 11 διαφορετικές οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών. Οι β-ξυλοζιδάσες οι οποίες καταλύουν φυσικά υποστρώματα κατατάσσονται σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZy στις οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών 3, 5, 30, 39, 43, 51, 52 και 120. Οικογένειες όπως η GH1 και η GH54 υδρολύουν τεχνητά υποστρώματα όπως το υπόστρωμα νιτροφαίνυλ-β-D-ξυλοπυρνώζη (nitrophenylβ-D-xylopyranoside) χωρίς όμως να είναι βέβαιο ότι είναι εξίσου αποτελεσματικές στην απελευθέρωση ξυλόζης από τα φυσικά υποστρώματα (Rohman et al., 2019).

1.4.5. Αραβινοφουρανοζιδάσες

Οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες είναι τα ένζυμα που σχετίζονται με την απομάκρυνση υποκαταστάσεων L-αραβινόζης από μόρια ξυλόζης και στη φύση έχουν απομονωθεί από βακτήρια, μύκητες και φυτά. Αυτά τα ένζυμα λειτουργούν συνεργιστικά με άλλα ημικυτταρολυτικά ένζυμα αφαιρώντας τις πλευρικές αλυσίδες L-αραβινόζης που διαφορετικά θα παρεμπόδιζαν τη δραστηριότητα των ενζύμων αποικοδόμησης του κύριου σκελετού. Οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες καταλύουν ειδικά την υδρόλυση των τερματικών μη αναγωγικού άκρου α-L-1,2-, α-L-1,3- και α-L-1,5-αραβινοφουρανοσυλίων (arabinofuranosyl residues) από διαφορετικούς

ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες (εικόνα 14) (Numan et al., 2006), (Yeoman et al., 2010). Οι α -L-αραβινοφουρανοσιδάσες υπάρχουν στις οικογένειες 2, 3, 43, 51, 54 και 62 των γλυκοζιδικών υδρολασών (Thakur et al., 2020). Οι δομές, καθώς και οι καταλυτικοί μηχανισμοί για καθμία από αυτές τις οικογένειες ενζύμων έχουν μελετηθεί ευρέως. Ειδικότερα, οι αραβινοφουρανοσιδάσες με δράση στην αραβινοξυλάνη διακρίνονται σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από ένζυμα που δρουν σε ξυλόζες της κύριας αλυσίδας που διαθέτουν μονή υποκατάσταση αραβινόζης στη θέση 2 ή 3. Αποκαλούνται ως m2,3 α -L-αραβινοφουρανοσιδάσες και εντοπίζονται σε όλες τις αναφερόμενες οικογένειες. Η δεύτερη ομάδα (d-3- α -L-αραβινοφουρανοσιδάσες) περιλαμβάνει ένζυμα που δρουν σε διπλά υποκατεστημένες ξυλόζες απελευθερώνοντας τον α -(1→3) δεσμό αραβινόζης, ενώ αφήνουν τον α -(1→2) δεσμό στην κύρια αλυσίδα της ξυλάνης. Αυτή η ομάδα ενζύμων απαντάται στις οικογένειες GH43 και GH51 (Biely et al., 2016). Οι α -L-αραβινοφουρανοσιδάσες έχουν πιθανές εφαρμογές στη μετατροπή των λιγνινοκυτταρινικών υπολειμμάτων της γεωργίας σε βιοαιθανόλη, ενώ έχουν αναφερθεί επίσης χρήσεις τους σε χαρτοπολλτό, ζωοτροφές, ποτά και φαρμακευτικές βιομηχανίες (Thakur et al., 2020).

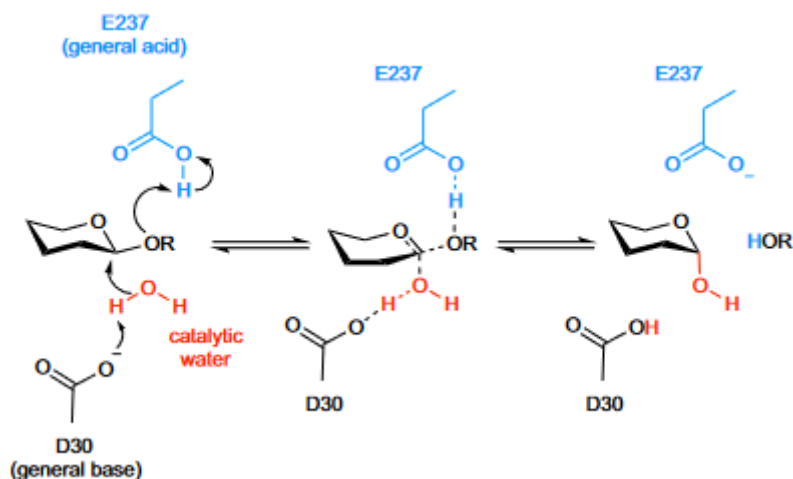


Εικόνα 14: Η δράση των α -L-αραβινοφουρανοσιδασών σε πολυμερές αραβινάνης, από το οποίο απελευθερώνουν μονομερή αραβινόζης διασπώντας υπολείμματα α -1,2, α -1,3 ή α -1,5 συνδεδεμένων μορίων αραβινόζης από το μη αναγωγικό άκρο (Yeoman et al., 2010).

1.4.6. Γλυκοζιδικές υδρολάσες της οικογένειας 43 (GH43)

Η οικογένεια των ενζύμων GH43 αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών που δρουν πάνω στην ημικυτταρίνη. Η οικογένεια GH43 περιέχει ένζυμα που έχουν διαφορετικές ενεργότητες όπως τη β -1,4-ξυλοσιδάση, τη β -1,3-ξυλοσιδάση, τη β -1,4-ενδοξυλανάση, τη 1,3- β -γαλακτοσιδάση γαλακτάνης, την α -L-αραβινοφουρανοσιδάση και την αραβινανάση. Η οικογένεια χωρίζεται σε 37 υποοικογένειες που παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία τόσο ως προς τη δομή όσο και ως προς τη λειτουργία. Τα μέλη της ίδιας υποοικογένειας μπορεί να εμφανίζουν διαφορετικούς τρόπους δράσης, αναγνώρισης του υποστρώματος καθώς και

διαφορετική τεταρτοταγή δομή. Τα περισσότερα ένζυμα της οικογένειας GH43 που έχουν χαρακτηριστεί έως σήμερα έχουν διττή λειτουργία, συνήθως συνδυάζοντας δράση β-ξυλοζιδάσης και α-L-αραβινοφουρανοζιδάσης (Thakur et al., 2020). Τα ένζυμα GH43 διασπούν τους γλυκοσιδικούς δεσμούς μέσω αναστροφής της διαμόρφωσης του ανωμερικού άνθρακα. Η αντίδραση καταλύεται από ένα οξύ και μία βάση. Ειδικότερα, το οξύ πρωτονώνει το γλυκοσιδικό άτομο οξυγόνου, ενώ η βάση αποπρωτονώνει το πυρηνόφιλο μόριο νερού (Morais et al., 2021), (εικόνα 15).



Εικόνα 15: Μηχανισμός δράσης της πλειονότητας των ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια GH43 (Morais et al., 2021).

1.4.7. Εστεράσες του οξικού οξέος

Οι εστεράσες του οξικού οξέος διασπούν τις ακετυλομάδες που είναι υποκατεστημένες στις θέσεις 2, 3 ή/και 4 των ξυλοπυρανοζών τις ξυλάνης, μετατρέποντας έτσι την κύρια αλυσίδα προσβάσιμη σε ξυλανάσες και β-ξυλοζιδάσες (Latha et al., 2007, Biely et al., 2016). Τα συγκεκριμένα ένζυμα ταξινομούνται σε οκτώ οικογένειες σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZy (CE2, CE3, CE4, CE5, CE6, CE7 και CE16) (Nakamura et al., 2017). Οι εστεράσες του οξικού οξέος απελευθερώνουν οξικό οξύ στις θέσεις 2, 3 και 4 σε μόνο-και δι-ακετυλιωμένα μόρια ξυλόζης, μετατρέποντας έτσι την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης προσβάσιμη σε ξυλανάσες και β-ξυλοζιδάσες ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδόμησή της στα μονομερή. Η θέση και η ποσότητα των συγκεκριμένων υποκαταστατών οξικού οξέος ποικίλει ανάλογα με το είδος του φυτού αλλά και τις συνθήκες ανάπτυξης (Biely et. 2014, Biely, 2012).

Όσον αφορά τους συνεργισμούς των συγκεκριμένων ενζύμων, οι Selig et al. (2009) έδειξαν ότι η συνδυαστική δράση των ενδοξυλανασιών και των ακετυλ-εστερασιών έχει βελτιώσει σημαντικά την υδρόλυση του πολυμερούς ξυλάνης. Κατά την υδρόλυση της ξυλάνης από προεπεξεργασμένο άχυρο σίτου με χρήση ξυλανολυτικών ενζύμων και εστερασιών του οξικού οξέος, η απομάκρυνση των πλευρικών υποκαταστάσεων του οξικού ενίσχυσε την προσβασιμότητα της ξυλάνης από τα ξυλανολυτικά ένζυμα, καθώς επίσης η αποικοδόμηση της ξυλάνης αύξησε προοδευτικά τη διαθεσιμότητα της κυτταρίνης στις κυτταρινάσες, με αποτέλεσμα την υδρόλυσή της (Zhang et al. 2011).

Παράλληλα, τα κυτταρολυτικά και ξυλανολυτικά ένζυμα λειτουργούν με συνεργιστικό τρόπο και η συνδυαστική χρήση κυτταρινασών, ξυλανασών και εστερασών του οξικού οξέος έχει οδηγήσει σε υψηλότερη υδρόλυση της κυτταρίνης (Kameshwar et al., 2018).

1.5. Συνεργιστική δράση ενζύμων και βαθμός συνεργιστισμού

1.5.1. Βαθμός και είδη συνεργιστισμού για την αποικοδόμηση των ημικυτταρινών

Η λιγνινοκυτταρίνη είναι εξαιρετικά ανθεκτική στη μικροβιακή αποικοδόμηση και απαιτεί μεγάλη ποικιλία ενζύμων με διαφορετικές ιδιότητες για την αποδόμηση όλων των συστατικών της. Η ενζυμική υδρόλυση αποτελεί την πλέον κατάλληλη τεχνολογία για την μετατροπή της λιγνινοκυτταρίνης στα μονομερή της σάκχαρα. Τα μείγματα των ενζύμων που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι είτε εμπορικά είτε ακατέργαστα (Van Dyk et al., 2012). Η συνεργιστική δράση ενζύμων για την αποτελεσματική βιοαποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, τόσο τεχνικά (υψηλή ειδικότητα, ήπιες συνθήκες αντίδρασης) όσο και οικονομικά (κόστος βιομηχανικών διεργασιών) (Spagnuolo et al., 1997).

Ως βαθμός συνεργιστισμού (Degree of synergy, DS) ορίζεται ο λόγος της ενεργότητας του συνδυασμού των ενζύμων προς το άθροισμα των ενεργοτήτων των επιμέρους ενζύμων εάν αυτά δρούσαν μόνα τους στο ίδιο υπόστρωμα. Ουσιαστικά, αποτελεί ένα μέτρο για να καθοριστεί εάν ένα ένζυμο συμβάλλει στην ικανότητα ενός άλλου ενζύμου να δρα στο υπόστρωμά του. Ενίοτε αναφέρεται και ως ποσοστό αύξησης της ενεργότητας (Van Dyk et al., 2012). Ο βαθμός συνεργιστισμού μπορεί να υπολογιστεί με βάση το σχηματισμό προϊόντος, τη μετατροπή του υποστρώματος ή τους ρυθμούς αντίδρασης (Andersen et al., 2008) και μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή ενός υποστρώματος, για το μηχανισμό δράσης ενός ενζύμου, καθώς και για τις βέλτιστες αναλογίες ενζύμων που απαιτούνται. Όταν ο βαθμός συνεργιστισμού παίρνει τιμή χαμηλότερη ή ίση του 1, σημαίνει πως δεν υπάρχει συνεργιστική δράση μεταξύ των ενζύμων ή ότι τα ένζυμα ανταγωνίζονται για να καταλάβουν τις ίδιες θέσεις και τελικά οδηγούνται σε παρεμπόδιση. Πολύ υψηλά επίπεδα συνέργειας, με τιμή μεγαλύτερη της μονάδας, υποδηλώνουν ότι τα ένζυμα συνεργάζονται στενά μεταξύ τους παρουσιάζοντας συμπληρωματική δράση. Εάν δεν βρεθεί συνεργιστισμός (DS=1), τότε δεν σημαίνει αυτόματα ότι ένα ένζυμο δεν απαιτείται για την υδρόλυση ενός υποστρώματος, αλλά πιθανώς υποδεικνύει πως τα ένζυμα δεν χρειάζεται να συνεργαστούν και λειτουργούν ανεξάρτητα. Ο βαθμός συνεργιστισμού εξαρτάται από τις ιδιότητες του υποστρώματος, τα συγκεκριμένα ένζυμα που χρησιμοποιούνται, τις μοριακές αναλογίες των ενζύμων, καθώς και τη συνολική συγκέντρωση ενζύμων. Ειδικότερα, ο βαθμός συνέργειας είναι χαμηλός σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά επίσης μειώνεται και όταν οι ποσότητες του ενζύμου είναι πολύ υψηλές. Ακόμα, παρατηρείται διαφορά στο μέγεθος του βαθμού συνεργιστισμού μεταξύ δύο ενζύμων όταν αυτά χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα ή διαδοχικά κατά την υδρόλυση του υποστρώματος (Van Dyk et al., 2012). Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο οι πραγματικές βιοχημικές δοκιμασίες με συνδυασμούς ενζύμων μπορούν να καθορίσουν τους βέλτιστους συνδυασμούς αυτών σε πολύπλοκα υποστρώματα.

Όσον αφορά τους τύπους συνεργιτισμού, για τις ημικυτταρίνες έχουν προσδιορισθεί τρεις τύποι συνεργιών, η ομοιοσυνέργεια, η ετεροσυνέργεια και η αντι-συνέργεια. Ο ομοσυνεργιτισμός απαντάται μεταξύ ενζύμων διάσπασης της κύριας αλυσίδας των πολυσακχαριτών ή μεταξύ δύο ενζύμων που απομακρύνουν τους υποκαταστάτες. Ο ετεροσυνεργιτισμός σημειώνεται μεταξύ ενζύμων υπεύθυνων για τη διάσπαση της κύριας αλυσίδας των πολυσακχαριτών και ενζύμων υπεύθυνων για την απομάκρυνση των υποκαταστατών. Ο αντισυνεργιτισμός απαντάται όταν ένα ένζυμο αναστέλλει τη δράση ενός άλλου ενζύμου, όπως όταν ένα ένζυμο διάσπασης της κύριας αλυσίδας απαιτεί έναν υποκατάστατη για να δράσει, ενώ αυτός έχει αφαιρεθεί από κάποιο άλλο ένζυμο (Van Dyk & Pletschke, 2012, Malgas et al., 2019).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΡΗΣΗ ΕΥΛΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ, ΟΦΕΛΗ ΚΑΙ ΚΥΚΛΙΚΗ ΒΙΟΟΙΚΟΝΟΜΙΑ

2.1. Βιοδιυλιστήρια

2.1.1. Η έννοια του βιοδιυλιστηρίου

Λόγω της παγκόσμιας ανάγκης σήμερα για μετριασμό των περιβαλλοντικών ανησυχιών, παρατηρείται μια διαρκώς αυξανόμενη αναζήτηση για νέες πιο βιώσιμες τεχνολογίες από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα. Έτσι, έχει αναπτυχθεί εκτεταμένη έρευνα για παραγωγή ενέργειας που προέρχεται από βιομάζα ή ανανεώσιμες πηγές, τα λεγόμενα βιοκαύσιμα, όπως είναι η βιοαιθανόλη, το βιοντίζελ, το βιο-υδρογόνο, το βιοαέριο, τα φυτικά έλαια, το βιοέλαιο, το βιοσυνθετικό αέριο και η βιοαπανθρακοποίηση (Pinales-Marquez et al., 2021).

Η παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοχημικών από τη μη βρώσιμη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα (π.χ. άχυρο, βαγάσα κ.λπ.) έχει αναδειχθεί ως μία σημαντική ευκαιρία για την ανάπτυξη μιας νέας οικονομίας, ανεξάρτητης από τα ορυκτά καύσιμα που συνεπάγονται την εκπομπή αερίων θερμοκηπίου. Παρά τα πολλά είδη φυτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα από πειράματα που έχουν διεξαχθεί σε εργαστηριακή κλίμακα, απαιτείται η βελτίωση της αποδοτικότητας της διαδικασίας προκειμένου να αυξηθεί η ανταγωνιστικότητά της ως προς το κόστος. Παράλληλα, κρίσιμης σημασίας είναι και ο τερματισμός της εξάρτησής της από κυβερνητικές επιδοτήσεις και νόμους (π.χ. χαμηλότεροι φορολογικοί συντελεστές από τα ορυκτά καύσιμα και εντολή ενθάρρυνσης κατανάλωσης βιοκαυσίμων). Η εστίαση βρίσκεται στην ανάπτυξη προηγμένων τεχνικών προκατεργασίας που είναι φιλικές προς το περιβάλλον, οικονομικά αποδοτικές και επιτυγχάνουν ευρεία παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοχημικών (Vu et al., 2020).

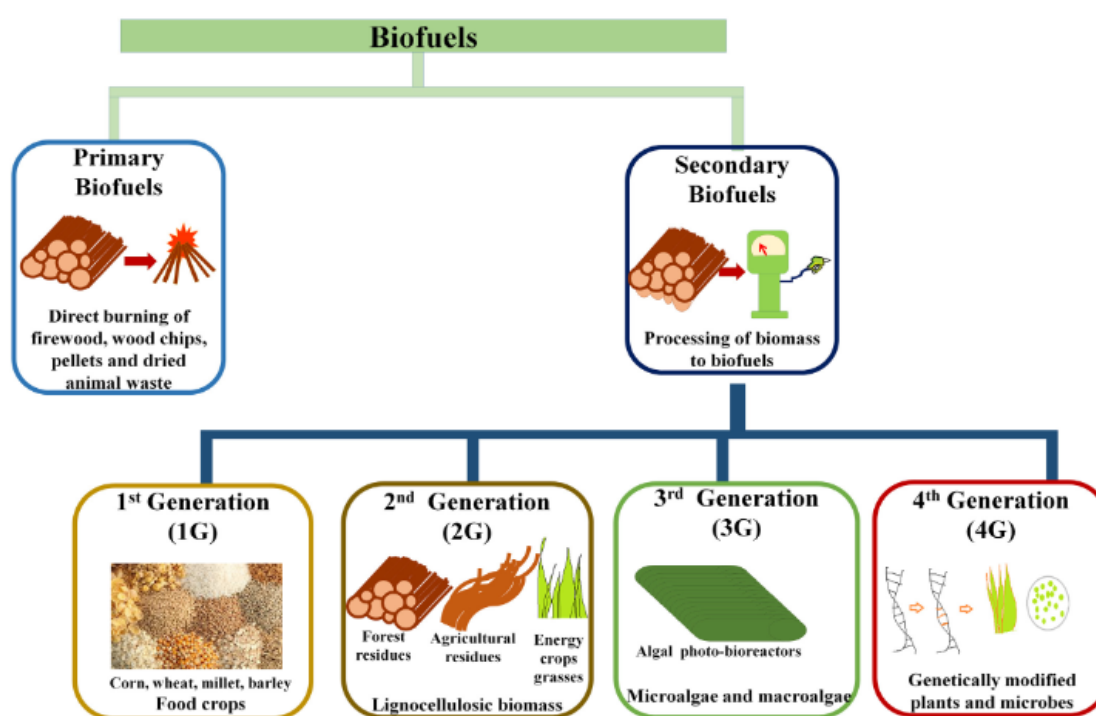
Η ιδέα του βιοδιυλιστηρίου αποτελεί μια διαφοροποίηση του συμβατικού μοντέλου του διυλιστηρίου, καθώς σε αυτό γίνεται χρήση διαφορετικών τύπων βιομάζας μέσω διαφόρων διεργασιών. Η διαδικασία αυτή αποτελεί την πλέον φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο παραγωγής βιοκαυσίμων με στόχο την προώθηση της χρήσης ανανεώσιμων πρώτων υλών για τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκαλούνται από την αλόγιστη χρήση των υδρογονανθράκων. Υπάρχουν διάφοροι ορισμοί για τα βιοδιυλιστήρια, ωστόσο ένας από τους πιο αντιπροσωπευτικούς δόθηκε από τον Διεθνή Οργανισμό Ενέργειας (IEA). Σύμφωνα με τον IEA, το βιοδιυλιστήριο ορίζεται ως «η βιώσιμη επεξεργασία της βιομάζας σε ένα φάσμα εμπορεύσιμων προϊόντων και ενέργειας». Η ιδέα του βιοδιυλιστηρίου περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα τεχνολογιών επεξεργασίας και διαχωρισμού ικανών να τροποποιήσουν τους πόρους βιομάζας (ξύλο, καλαμπόκι, παντζάρι, ζαχαροκάλαμο, κ.λπ.) σε κλάσματα (υδατάνθρακες C5 ή C6, λιπίδια, πρωτεΐνες, τριγλυκερίδια κ.λπ.) που μπορούν να μετατραπούν περαιτέρω σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας, όπως βιοκαύσιμα, βιοϋλικά, λιπάσματα και χημικά. Η ιδέα του βιοδιυλιστηρίου είναι ανάλογη με τα σύγχρονα διυλιστήρια πετρελαίου, τα οποία παράγουν μεγάλη ποικιλία καυσίμων και

προϊόντων από αργό πετρέλαιο. Ωστόσο, στα βιοδιυλιστήρια, η βιομάζα αντικαθιστά το αργό πετρέλαιο ως πρώτη ύλη (Chaturvedi et al., 2020).

Λαμβάνοντας υπόψη τη διαθέσιμη ποσότητα βιομάζας, είναι εύκολο να αντιληφθεί κανείς τη μεγάλη ευκαιρία να επωφεληθεί του χαμηλού κόστους της πρώτης ύλης για την παραγωγή χημικών εμπορικών προϊόντων ή ενώσεων αναγκαίων για τον άνθρωπο. Μέσω αυτών των βιώσιμων διαδικασιών, ο απώτερος σκοπός είναι η αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων και η διαμόρφωση μιας βιοοικονομίας που βασίζεται στη χρήση ανανεώσιμων πηγών, για τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και τον εμπλουτισμό της παραγωγής τροφίμων και υλικών. Στη βιοοικονομία του μέλλοντος, τα βιοκαύσιμα θα διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο. Ωστόσο, η βιωσιμότητα αυτών των συστημάτων εξαρτάται από τη σωστή επιλογή μεθόδων, τις κατάλληλες πρώτες ύλες και την παραγωγή των σχετικών παραπροϊόντων (Pinales-Marquez et al., 2021).

2.1.2. Κατηγορίες βιοδιυλιστηρίων

Η χρήση διαφορετικών τύπων βιομάζας, που συνεπάγεται την εξειδικευμένη ανάπτυξη διαδικασιών για κάθε πρώτη ύλη, σε συνδυασμό με το ενδιαφέρον για την παραγωγή συγκεκριμένων ενώσεων, έχει προκαλέσει έναν διαχωρισμό στα μοντέλα επεξεργασίας, καθώς και στους στόχους και τις οικονομικές προσεγγίσεις, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφορετικών τύπων ή γενιών βιοδιυλιστηρίων (Pinales-Marquez et al., 2021) (εικόνα 16).



Εικόνα 16: Οι διάφορες γενιές βιοδιυλιστηρίων (Kumar et al., 2020).

2.1.2.1. Βιοδιυλιστήρια 1^{ης} γενιάς

Τα βιοκαύσιμα που προέρχονται από βρώσιμα μέρη καλλιεργειών τροφίμων όπως π.χ. αμυλούχα, ζαχαρούχα προϊόντα και φυτικά έλαια κ.λπ. ονομάζονται βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς. Τα βρώσιμα μέρη μετατρέπονται σε βιοαιθανόλη, βιοντίζελ, βιοαέριο και αέριο σύνθεσης (Kumar et al., 2020). Η χρήση των βρώσιμων πρώτων υλών δημιουργούν σημαντικό πρόβλημα, γιατί προκαλείται ανταγωνισμός γης μεταξύ εδαφών παραγωγής ενέργειας και τροφίμων. Επίσης, η αυξανόμενη ζήτηση για ενέργεια θα συμβάλει στην υπερβολική επέκταση των καλλιεργειών και την υπερεντατικοποίηση της γεωργίας, προκαλώντας υποβάθμιση και διάβρωση του εδάφους, απώλεια συστημάτων βιοποικιλότητας και αύξηση της κατανάλωσης νερού (Pinales-Marquez et al., 2021).

2.1.2.2. Βιοδιυλιστήρια 2^{ης} γενιάς

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς είναι οι μη εδώδιμες καλλιέργειες, ήτοι τα δασικά και γεωργικά υπολείμματα. Αυτή η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελεί μια μεγάλη ευκαιρία, λόγω της ευρείας γκάμας προϊόντων που μπορούν να παραχθούν, όπως είναι τα βιοχημικά προϊόντα, τα βιοϋλικά και τα βιοκαύσιμα. Η κυτταρίνη απαρτίζεται από μονομερή γλυκόζης, συνεπώς μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης και ζύμωσης, είναι δυνατός ο σχηματισμός υγρών βιοκαυσίμων, όπως π.χ. η βιοαιθανόλη. Η λιγνίνη είναι ένα βιοπολυμερές που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αρωματικών ενώσεων, όπως προϊόντα βιοαερίου, καθώς επίσης και για το σχηματισμό αντιμικροβιακών παραγόντων. Τέλος, η ημικυτταρίνη, θεωρείται μια εξαιρετική πηγή για την παραγωγή ενώσεων με υψηλή προστιθέμενη αξία, όπως τα XOs, τα οποία είναι ενώσεις με δυνατότητα εφαρμογής στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία παραπροϊόντων που μπορούν να εξαχθούν μέσω διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας που εφαρμόζονται σε λιγνινοκυτταρινικά υλικά. Η δεύτερη γενιά βιοκαυσίμων στοχεύει στην εξάλειψη του ανταγωνισμού για τις καλλιέργειες τροφίμων, αφού αντί να διατεθούν καλλιέργειες για τη δημιουργία βιοκαυσίμων και βιοπροϊόντων, αξιοποιούνται τα υπολείμματα της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας που δημιουργείται από τη γεωργία, τη δασοκομία και τη βιομηχανία τροφίμων (Pinales-Marquez et al., 2021). Ωστόσο, η συνολική διαθέσιμη αρόσιμη γη είναι πεπερασμένη, γεγονός που περιορίζει τις καλλιέργειες μη εδώδιμων καλλιεργειών. Έτσι, τον τελευταίο καιρό οι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στην παραγωγή τροφικών καλλιεργειών με υψηλότερη περιεκτικότητα σε κυτταρίνη στα μη βρώσιμα μέρη των καλλιεργειών (Kumar et al., 2020).

2.1.2.3. Βιοδιυλιστήρια 3^{ης} γενιάς

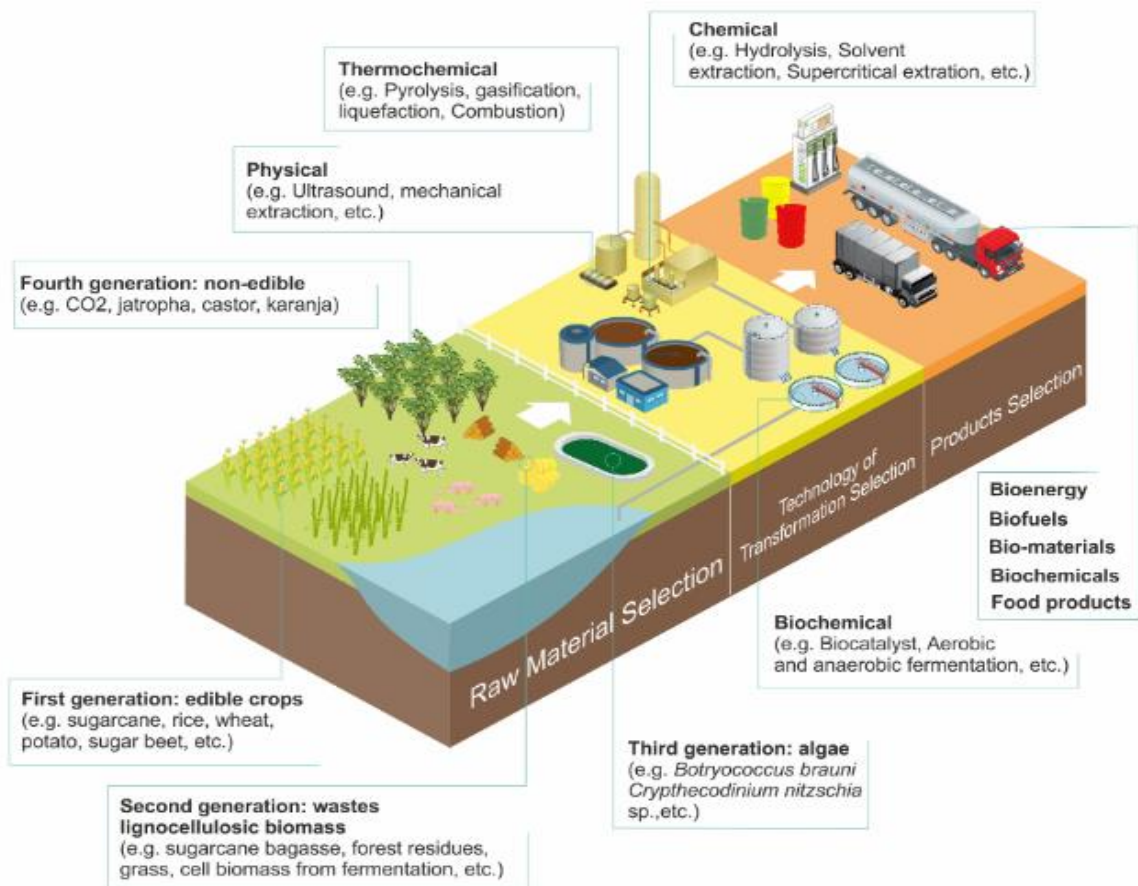
Τα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς προέρχονται από φύκια και θεωρούνται ως αποτελούν εναλλακτική λύση ως καύσιμα χαμηλού κόστους. Η αξιοποίηση των φυκών θα μπορούσε να επιφέρει πολλαπλά οφέλη, αφού η βιομάζα αυτή θα μπορούσε να καλύψει τις ανάγκες της ζήτησης ενέργειας χωρίς να δημιουργείται ανταγωνισμός για τα γεωργικά εδάφη, όπως συμβαίνει με την περίπτωση των βιοδιυλιστηρίων πρώτης γενιάς. Τα φύκια μπορούν να ταξινομηθούν σε μικροφύκη (φύκι με μέγεθος μεταξύ 2-

200 μm) ή μακροφύκη. Ανάλογα τη μορφολογία τους και του τρόπου καλλιέργειας σε υδάτινο περιβάλλον, τα συστατικά της βιομάζας είναι τα λιπίδια, οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες, που μπορούν να δημιουργήσουν διάφορους τύπους βιοκαυσίμων και μια ποικιλία ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Pinales-Marquez et al., 2021). Για την παραγωγή μικροφυκών μπορούν να χρησιμοποιηθούν υγρά απόβλητα ή αλμυρό νερό και συνεπώς ελαχιστοποιείται η χρήση γλυκού νερού, πράγμα που δε συμβαίνει με τα βιοκαύσιμα πρώτης και δεύτερης γενιάς. Ωστόσο, τα μειονεκτήματα των βιοκαυσίμων τρίτης γενιάς είναι το υψηλό λειτουργικό κόστος και το υψηλό επίπεδο καινοτομίας που απαιτείται για την αποτελεσματική αξιοποίησή τους (Kumar et al., 2020).

Σήμερα, η τεχνολογική πρόοδος και η έρευνα έχουν οδηγήσει σε μια καλή προσέγγιση των βιοδιυλιστηρίων τρίτης γενιάς, των οποίων η βιωσιμότητά θα εξαρτηθεί από την ενσωμάτωση ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας στη διαδικασία τους. Η μετατροπή της πρώτης ύλης σε διάφορα προϊόντα θα καταστήσει αυτόν τον τύπο βιοδιυλιστηρίου ανάλογο του συμβατικού βιοδιυλιστηρίου (Pinales-Marquez et al., 2021).

2.1.2.4. Βιοδιυλιστήρια 4^{ης} γενιάς

Τα βιοδιυλιστήρια τέταρτης γενιάς βασίζονται στην αναζήτηση της ιδανικής βιομάζας, η οποία θα επιτύχει υψηλότερες αποδόσεις και υψηλότερα ποσοστά βιομετατροπής, ενώ παράλληλα θα χρειάζεται λιγότερη ενέργεια για την παραγωγή της. Ως βιομάζα τέταρτης γενιάς θεωρούνται τα φυτά ή οι μικροοργανισμοί με υψηλή ικανότητα δέσμευσης άνθρακα από την ατμόσφαιρα ή το έδαφος, συμπεριλαμβανομένων και των γενετικά τροποποιημένων ζωντανών φυτών με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, καθώς και των οργανικών αποβλήτων. Οι μετασχηματισμοί βιομάζας τέταρτης γενιάς περιλαμβάνουν διεργασίες και τεχνικές υψηλής τεχνολογίας. Οι διεργασίες αυτές λαμβάνουν υπόψη παραμέτρους όπως ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών και η παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοϋλικών με αρνητική παραγωγή άνθρακα, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης ανανεώσιμης ενέργειας, όπως η ηλιακή ενέργεια κατά τη διαδικασία. Ωστόσο, το μοντέλο αυτό βρίσκεται ακόμα σε ερευνητικό επίπεδο, καθώς απαιτεί εναλλακτικές και πιο αποδοτικές διαδικασίες (Pinales-Marquez et al., 2021).



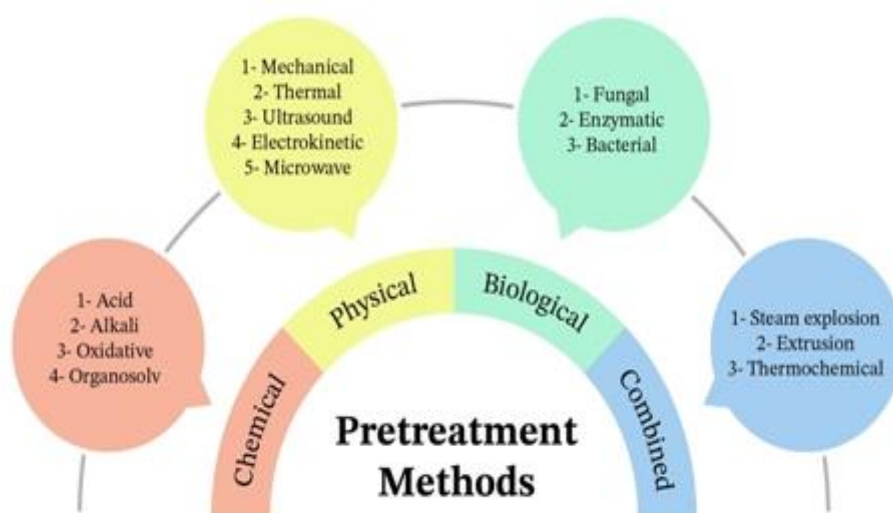
Εικόνα 17: Η έννοια και η ιεραρχία των βιοδιυλιστηρίων (Gutiérrez et al., 2017).

2.2. Προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για παραγωγή ξυλοολιγοσακχαριτών

Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα είναι πολύ ανθεκτική στη αποδόμηση. Αρκετοί παράγοντες ευθύνονται για την ανθεκτικότητα της βιομάζας, όπως η κρυσταλλική της δομή, η περιεκτικότητα λιγνίνης και η δομική ετερογένεια και πολυπλοκότητα των συστατικών της. Η πολυπλοκότητα της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας καθιστά αδήριτη ανάγκη την προκατεργασία (Baruah et al., 2018). Η προκατεργασία εξασφαλίζει τη μεγιστοποίηση της καθαρότητας της διαθέσιμης βιομάζας για τις διεργασίες που θα ακολουθήσουν. Σε αυτή τη διαδικασία, η φυσική και χημική δομή της βιομάζας μεταβάλλεται και η κυτταρίνη υφίσταται υδρόλυση. Η προεπεξεργασία επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την οικονομική βιωσιμότητα των βιοδιυλιστηρίων, καθώς αγγίζει έως και το 40 % του συνολικού κόστους επεξεργασίας (Pinales-Marquez et al., 2021). Με την προκατεργασία προκαλούνται ρωγμές και θραύση του υλικού και υπόκειται σε δομικές αλλαγές. Ειδικότερα, υδρολύεται η ημικυτταρίνη και απομακρύνεται η λιγνίνη με αποτέλεσμα τη μείωση της κρυσταλλικότητας και του βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης, καθώς και την αύξηση της ενεργής επιφάνειας του υλικού.

Οι μέθοδοι προκατεργασίας της βιομάζας κατηγοριοποιούνται σε φυσικές, χημικές, φυσικοχημικές και βιολογικές διεργασίες (εικόνα 18). Η επιλογή και ο συνδυασμός

των μεθόδων ποικίλει ανάλογα με το είδος της βιομάζας, της δαπάνης και τις απαιτήσεις (Lin et al., 2010). Οι φυσικές μέθοδοι αφορούν τη μηχανική αποσύνθεση με άλεση, λείανση και αποκοπή. Η χημική επεξεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας περιλαμβάνει τη χρήση χημικών ουσιών όπως βάσεις, οξέα και οργανικούς διαλύτες. Οι φυσικοχημικές διεργασίες χρησιμοποιούν συνδυασμό τόσο φυσικών όσο και χημικών μεθόδων ώστε να επιτευχθεί η προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Συνήθως, περιλαμβάνουν την έκρηξη ατμού, την έκρηξη αμμωνίας και την έκρηξη διοξειδίου του άνθρακα. Η βιολογική επεξεργασία περιλαμβάνει τη χρήση μικροοργανισμών ή βιοκαταλυτών για την διάσπαση της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης. Παρακάτω, περιγράφεται συνοπτικά η κάθε μέθοδος και οι κυριότερες διαδικασίες που περιλαμβάνει.



Εικόνα 18: Μέθοδοι προκατεργασίας της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (Kamusoko et al., 2019).

2.2.1. Φυσικές μέθοδοι προκατεργασίας

2.2.1.1. Θέρμανση με μικροκύματα

Η διαδικασία θέρμανσης με μικροκύματα αποτελεί εναλλακτική της συμβατικής θέρμανσης, γιατί μειώνει τη χρήση διαλυτών ή βοηθητικών χημικών που χρησιμοποιούνται και ευνοεί τον διαχωρισμό των προϊόντων. Η επεξεργασία με ακτινοβολία μικροκυμάτων πραγματοποιείται με έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα με μήκη κύματος από 1 mm έως 1 m και με συχνότητα μεταξύ 300 και 300.000 MHz. Επί του παρόντος, η επεξεργασία με μικροκύματα χρησιμοποιείται στη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα με δύο τρόπους. Ο πρώτος είναι με θερμοκρασίες χαμηλότερες των 200°C και έχει στόχο τον αποπολυμερισμό της δομής της βιομάζας και την παραγωγή ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας, ενώ ο δεύτερος αφορά την υποβοηθούμενη από μικροκύματα πυρόλυση λιγνίνης απουσία οξυγόνου σε

θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 400°C που μετατρέπει τη βιομάζα σε βιοαέριο ή βιοέλαιο (Pinales-Marquez et al., 2021).

2.2.1.2. Επεξεργασία με υπερήχους

Η επεξεργασία διαλυμάτων με υπερήχους είναι μια νέα αναδυόμενη τεχνολογία που έχει δυνατότητες ως εναλλακτική μέθοδο προκατεργασίας. Η χρήση υπερήχων σε συνδυασμό με χημικές μεθόδους επεξεργασίας συμβάλλει στη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης, στην αύξηση του πορώδους και επιτυγχάνει μεγαλύτερη μεταφορά μάζας, οδηγώντας σε σημαντικές βελτιώσεις στη διαδικασία μετατροπής της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε ΧOs (Bussemaker et al., 2013). Ωστόσο, κατά την εφαρμογή της μεθόδου προκατεργασίας με υπερήχους ελλοχεύει ο κίνδυνος διάσπασης των γλυκοσιδικών δεσμών, για αυτό και απαιτείται πολύ προσεκτική και ορθή επιλογή των παραμέτρων της διαδικασίας για τη διατήρηση των μοριακών και δομικών ιδιοτήτων των μορίων (Pinales-Marquez et al., 2021). Ακόμα, η μέθοδος αυτή έχει και υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις (Bussemaker et al., 2013).

2.2.1.3. Μηχανική προκατεργασία

Η μηχανική προκατεργασία της βιομάζας επιδιώκει την αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας, τη μείωση του βαθμού πολυμερισμού, καθώς και της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Η κοπή και η άλεση είναι οι βασικές μηχανικές μέθοδοι προκατεργασίας. Ειδικότερα, η μηχανική κονιορτοποίηση περιλαμβάνει θρυμματισμό, λείανση ή/και άλεση, η οποία όταν εφαρμόζεται στη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα μειώνει την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης. Η απαιτούμενη ενέργεια στη διαδικασία εξαρτάται από το μέγεθος του τελικού προϊόντος και τα χαρακτηριστικά της βιομάζας. Κατά την κοπή, η βιομάζα κόβεται σε μικρά θραύσματα μεγέθους 10-30 mm. Κατά την άλεση, η βιομάζα μειώνεται σε μέγεθος σωματιδίων από 0,2 mm έως 2 mm (Sun et al., 2002). Αυτή η μέθοδος είναι ιδιαίτερα δαπανηρή, αν και χρησιμοποιείται ευρέως και σε πλήρη κλίμακα (Prakesh et al., 2020).

2.2.2. Φυσικοχημικές μέθοδοι προκατεργασίας

2.2.2.1. Έκρηξη ατμού

Η μέθοδος της έκρηξης ατμού είναι μια από τις πιο ευρέως διαδεδομένες φυσικοχημικές επεξεργασίες της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Κατά τη μέθοδο αυτή, η βιομάζα υπόκειται προκατεργασία σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες χρησιμοποιώντας ατμό για κάποιο χρονικό διάστημα. Ο ατμός υψηλής πίεσης συνήθως κυμαίνεται από 0,69 έως 4,83 MPa. Η τεμαχισμένη βιομάζα εκτίθεται για λίγα λεπτά σε αυτόν κατόπιν η πίεση του ατμού μειώνεται αργά έως ότου φτάσει την ατμοσφαιρική πίεση. Καθώς μειώνεται η πίεση, η βιομάζα υφίσταται αποσυμπίεση και τα συστατικά της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης αποδομούνται λόγω των υψηλών θερμοκρασιών (Sun et al., 2002). Ωστόσο, κατά τη διεργασία αυτή μπορεί να προκύψουν σοβαρά προβλήματα, όπως σχηματισμός HMF και φουρφουράλης ή αδυναμία πλήρους διάσπασης της λιγνίνης (Pinales-Marquez et al., 2021).

2.2.2.2. Προκατεργασία με θερμό νερό

Το ζεστό νερό (Liquid Hot Water, LHW) είναι μια υδροθερμική προεπεξεργασία (γνωστή και ως αυτοϋδρόλυση), η οποία πραγματοποιείται με απόρριψη ζεστού νερού σε λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα σε θερμοκρασία 150-230°C και πίεση 4.9-20 bar και χρόνους παραμονής 10-50 λεπτά, που επιδιώκει να διαλυτοποιήσει την ημικυτταρίνη και να συμπυκνώσει την κυτταρίνη και τη λιγνίνη στο στερεό κλάσμα (Pinales-Marquez et al., 2021). Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε αντιδραστήρα υψηλής πίεσης. Αυτή η μέθοδος δεν απαιτεί αντιδραστήρα ανθεκτικό στην διάβρωση, καθώς και χημικά, ενώ δεν υπάρχει σχηματισμός τοξικών ενώσεων (Ravindran et al., 2016).

2.2.2.3. Έκρηξη αμμωνίας

Η προκατεργασία με έκρηξη αμμωνίας μπορεί να θεωρηθεί ως συνδυασμός έκρηξης ατμού και αλκαλικής προεπεξεργασίας. Στη μέθοδο αυτή, η βιομάζα επεξεργάζεται με υγρή άνυδρη αμμωνία (1-2 kg αμμωνία/kg βιομάζας) σε μέτριες θερμοκρασίες (40-140°C) και υψηλές πιέσεις (250-300 psi) για λίγα λεπτά, μετά τα οποία η πίεση απελευθερώνεται άμεσα. Αποτέλεσμα είναι να προκαλείται διάσπαση του συμπλόκου λιγνίνης-υδατάνθρακα, υδρόλυση της ημικυτταρίνης και αποκρυστάλλωση της κυτταρίνης, που οδηγούν σε περαιτέρω αυξημένη επιφάνεια. Η κατεργασία αυτή διευκολύνει τη μετέπειτα ενζυμική μετατροπή της κυτταρίνης και των ημικυτταρινών σε ζυμώσιμα σάκχαρα με χαμηλά έως μέτρια ενζυμικά φορτία (Carvalho et al., 2008). Ένα βασικό πλεονέκτημα της διεργασίας είναι ότι η αμμωνία που χρησιμοποιείται μπορεί να ανακτηθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί (Ravindran et al., 2016). Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγεται το υψηλό της κόστος που σχετίζεται με την αμμωνία και την ανάκτησή της, καθώς και με θέματα ασφάλειας σχετικά με την πρακτική χρήση της αμμωνίας (Carvalho et al., 2008).

2.2.3. Χημικές μέθοδοι προκατεργασίας

2.2.3.1. Προκατεργασία με οξύ

Η προεπεξεργασία με οξέα οδηγεί σε βελτίωση της ενζυμικής υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας προς απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων. Τα οξέα που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη διαδικασία είναι τα HCl και H₂SO₄ κατά κύριο λόγο. Η όξινη προεπεξεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας βασίζεται στην ευαισθησία των δεσμών μεταξύ ημικυτταρίνης και κυτταρίνης στα οξέα. Πιο συγκεκριμένα, η προεπεξεργασία με οξέα έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των δυνάμεων van der Waals, των δεσμών υδρογόνου και των ομοιοπολικών δεσμών που συγκρατούν τα συστατικά της βιομάζας, γεγονός που κατά συνέπεια προκαλεί τη διαλυτοποίηση της ημικυτταρίνης και τη μείωση της κυτταρίνης. Η κύρια αντίδραση που συμβαίνει κατά την προεπεξεργασία με οξύ είναι η υδρόλυση της ημικυτταρίνης, ιδιαίτερα της ξυλάνης (Amin et al., 2017). Η προεπεξεργασία υδρόλυσης αραιού οξέος μπορεί να επιτύχει υψηλούς ρυθμούς αντίδρασης και να βελτιώσει σημαντικά την υδρόλυση της κυτταρίνης (Amin et al., 2017). Ωστόσο, τα οξέα αυτά είναι διαβρωτικά και τοξικά και συνεπώς απαιτούν αντιδραστήρες που είναι ανθεκτικοί στη διάβρωση, γεγονός που καθιστά τη διαδικασία προεπεξεργασίας ιδιαίτερα δαπανηρή. Επιπλέον, κάτω από αυτές τις συνθήκες, μπορεί να προκύψει παραγωγή φουρφουράλης και HMF. Αναπόδραστη ανάγκη αποτελεί η ανάκτηση του οξέος μετά το πέρας της

προκατεργασίας προκειμένου να μετριαστεί το κόστος της εν λόγω μεθόδου (Kumar et al., 2009).

2.2.3.2. Αλκαλική προκατεργασία

Η αλκαλική προκατεργασία περιλαμβάνει την προσθήκη βάσεων στη βιομάζα, που οδηγεί σε αύξηση της εσωτερικής επιφάνειας λόγω διόγκωσης, μείωση του βαθμού πολυμερισμού και της κρυσταλλικότητας, καταστροφή των δεσμών μεταξύ της λιγνίνης και άλλων πολυμερών και διάσπαση της λιγνίνης. Η συγκεκριμένη προεπεξεργασία λειτουργεί καλύτερα για βιομάζα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιγνίνη, ενώ βιομάζα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη καθιστά αυτή τη μέθοδο λιγότερο αποτελεσματική (Aftab et al., 2019). Τα NaOH, KOH και Ca(OH)₂ είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες βάσεις στην αλκαλική προεπεξεργασία, στην οποία οι συνθήκες διεργασίας είναι σχετικά ήπιες, αφού μπορούν να πραγματοποιηθούν σε συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά οι χρόνοι προεπεξεργασίας είναι της τάξης των ωρών ή των ημερών και όχι των λεπτών ή των δευτερολέπτων (Aftab et al., 2019), (Kumar et al., 2009). Σε σύγκριση με τις όξινες διεργασίες, οι αλκαλικές διεργασίες προκαλούν λιγότερη αποικοδόμηση του σακχάρου και πολλά από τα καυστικά άλατα μπορούν να ανακτηθούν και/ή να αναγεννηθούν (Kumar et al., 2009).

2.2.3.3. Προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες

Σε αυτή τη διαδικασία, ένα μίγμα υδατικού οργανικού διαλύτη χρησιμοποιείται με καταλύτες ανόργανων οξέων. Αυτό το μείγμα καταλυτών βοηθά στη θραύση των εσωτερικών δεσμών λιγνίνης και ημικυτταρίνης. Ειδικότερα, η κυτταρίνη ανακτάται ως στερεή, ενώ η περισσότερη λιγνίνη και η ημικυτταρίνη διαλύονται μέσα στον οργανικό διαλύτη. Πολλά οξέα όπως το οξαλικό, το σαλικυλικό, το υδροχλωρικό και το θειικό οξύ δρουν ως καταλύτες σε αυτή τη διαδικασία (αντιδραστήρα (Prakesh et al., 2020), (Kumar et al., 2009). Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η αιθανόλη, η ακετόνη, η μεθανόλη, η αιθυλενογλυκόλη και η τριαιθυλενογλυκόλη. Η διαδικασία οργανοδιαλυτοποίησης περιλαμβάνει ταυτόχρονα προϋδρόλυση και απομάκρυνση της λιγνίνης από τη βιομάζα. Γενικά, οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην προκατεργασία αυτή πρέπει να αποστραγγιστούν από τον αντιδραστήρα, να συμπυκνωθούν, να εξατμιστούν και να ανακυκλωθούν για να μειωθεί το κόστος παραγωγής. Η απομάκρυνση των διαλυτών από το σύστημα είναι απαραίτητη επειδή οι διαλύτες μπορεί να έχουν ανασταλτική δράση όσον αφορά την ανάπτυξη μικροοργανισμών, καθώς και την ενζυμική υδρόλυση και ζύμωση, εάν υπάρχουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο εσωτερικό του αντιδραστήρα (Prakesh et al., 2020).

2.2.3.4. Οξονόλυση

Η προκατεργασία με όζον είναι ένας από τους πολύ αποτελεσματικούς τρόπους μείωσης της λιγνίνης στη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα. Το αέριο όζον διέρχεται μέσω ενός δοχείου αντίδρασης που περιέχει το υπόστρωμα και αποδομεί τη λιγνίνη, ενώ η κυτταρίνη δεν επηρεάζεται. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την αποικοδόμηση πολλών λιγνινοκυτταρινούχων προϊόντων όπως το σιτάρι, η βαγάσα, τα άχυρα

βαμβακιού, φιστικιού κ.λπ. Η μέθοδος πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες δωματίου και πίεση περιβάλλοντος και το όζον δεν παράγει ανεπιθύμητα παράγωγα λιγνίνης ή τοξικά υπολείμματα. Επιπλέον, το όζον μπορεί εύκολα να αποσυντεθεί με τη βοήθεια καταλυτικής κλίνης ή με την αύξηση της θερμοκρασίας. Ωστόσο, η διαδικασία της οζονόλυσης απαιτεί μεγάλες ποσότητες όζοντος για να λάβει χώρα, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα δαπανηρή (Prakesh et al., 2020).

2.2.4. Βιολογική Προκατεργασία

Η αποδόμηση των δομών της λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα χρησιμοποιώντας μικρόβια και/ή ένζυμα ως καταλύτες αναφέρεται ως βιολογική προεπεξεργασία (Amin et al., 2017). Εν αντιθέσει με τις συμβατικές μεθόδους προκατεργασίας (χημικές, φυσικές, φυσικοχημικές) που απαιτούν ακριβά αντιδραστήρια, υψηλές θερμοκρασίες ή/και πιέσεις, εξοπλισμό και υψηλή κατανάλωση ενέργειας, η βιολογική μέθοδος απαιτεί ζωντανούς μικροοργανισμούς για την προεπεξεργασία του λιγνινοκυτταρινικού υλικού, είναι χαμηλότερου κόστους και πιο φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος και απαιτεί λιγότερη ενέργεια προκειμένου να λάβει χώρα και δεν συνεπάγεται το σχηματισμό αναστολέων (Aftab et al., 2019), (Baruah et al., 2018). Μέσω αυτής της προκατεργασίας αυτής, βακτήρια ή μύκητες αποικοδομούν τη λιγνίνη, ως ολόκληρα κύτταρα ή ένζυμα. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης είναι οι λακάσες, η υπεροξειδάση της λιγνίνης, η υπεροξειδάση του μαγγανίου κ.λπ. (Baruah et al., 2018).

Οι μύκητες είναι οι πλέον κατάλληλοι για τέτοιες εφαρμογές καθώς είναι ικανοί να αποικοδομούν την κυτταρίνη, τις ημικυτταρίνες και τη λιγνίνη. Οι μύκητες καφέ και λευκής σήψης, όπως και οι μύκητες μαλακής σήψης χρησιμοποιούνται για την αποικοδόμηση των λιγνινοκυτταρινούχων αποβλήτων. Οι καφέ μύκητες σήψης προσβάλλουν κυρίως την κυτταρίνη, ενώ οι λευκοί προσβάλλουν τόσο την κυτταρίνη όσο και την λιγνίνη. Συνήθως, οι μύκητες της λευκής σήψης είναι οι πιο αποτελεσματικοί κατά τη βιολογική προεπεξεργασία λόγω της υψηλής απόδοσης σακχάρων (Sun et al., 2002), (Baruah et al., 2018). Μείγματα ενζύμων μπορούν να λειτουργήσουν συνεργιστικά για την επέκταση των μικρών πόρων και την αύξηση της πρόσβασης ανοίγοντας τη μήτρα του κυτταρικού τοιχώματος (Amin et al., 2017). Η βιολογική προεπεξεργασία δεν χρησιμοποιείται μόνο για την αφαίρεση λιγνίνης, αλλά και για την αφαίρεση συγκεκριμένων συστατικών όπως οι αντιμικροβιακές ουσίες (Baruah et al., 2018). Παρά την πληθώρα πλεονεκτημάτων της, αυτή η μέθοδος συχνά δεν προτιμάται για την προκατεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, καθώς παρουσιάζονται προσκόμματα που αφορούν το χαμηλό ποσοστό υδρόλυσης (Sun et al., 2002).

2.3. Ξυλοολιγοσακχαρίτες και οφέλη

2.3.1. Οι ξυλοολιγοσακχαρίτες ως πρεβιοτικά

Ο αυξανόμενος προβληματισμός γύρω από θέματα διατροφής και υγείας έχουν ωθήσει τους καταναλωτές σήμερα να στραφούν προς πιο υγιεινές και βιώσιμες επιλογές όσον αφορά τις διατροφικές τους συνήθειες, προτιμώντας τη χρήση φυσικών προϊόντων,

συμπεριλαμβανομένων των λειτουργικών τροφίμων, δηλαδή προϊόντων που έχουν οφέλη και για την υγεία εκτός από τη διατροφή. Οι τάσεις που παρατηρούνται εξηγούν τη μείωση των εσόδων των καταστημάτων γρήγορου φαγητού και την ολοένα και μεγαλύτερη ζήτηση λειτουργικών συστατικών, όπως τα πρεβιοτικά, που σήμερα διατίθενται στην αγορά πλην της συμβατικής τους χρήσης (δηλ. για τη βελτίωση του πεπτικού συστήματος). Συγκεκριμένα, πλέον χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα ζάχαρης, για τη διαχείριση του βάρους, για την καλύτερη απορρόφηση των μετάλλων και για τη βελτίωση της υγείας των μυών. Σήμερα, οι καταναλωτές φαίνεται να είναι διατεθειμένοι να πληρώσουν περισσότερο για τροφές που περιέχουν πρεβιοτικά (Amorim et al., 2019).

Τα πρεβιοτικά ορίζονται σύμφωνα με τον ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) ως «ένα υπόστρωμα που χρησιμοποιείται επιλεκτικά από μικροοργανισμούς-ξενιστές αποδίδοντας οφέλη για την υγεία», όπου ο ξενιστής μπορεί να είναι άνθρωπος ή ζώο. Η παγκόσμια αγορά πρεβιοτικών συστατικών κυμάνθηκε σε 4.07 δισεκατομμυρίων δολαρίων το 2017 και αναμένεται να φτάσει σε αξία 7.37 δισεκατομμυρίων δολαρίων ΗΠΑ έως το 2023, καταγράφοντας έναν ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης (CAGR) της τάξης του 10.4%. Ειδικότερα, οι πρεβιοτικοί ξυλοολιγοσακχαρίτες (XOs) παρουσιάζονται ως πολλά υποσχόμενα συστατικά τροφίμων λόγω της ανταγωνιστικής τιμής τους σε σύγκριση με άλλα πρεβιοτικά, της θερμοκρασιακής τους σταθερότητας και της σταθερότητας τους σε διαφορετικά pH, καθώς και των πολυδιάστατων θετικών επιδράσεων στην υγεία ανθρώπων και ζώων (Amorim et al., 2019). Η βιομηχανία επικεντρώνεται επί του παρόντος στην ανάπτυξη διαφορετικών διαδικασιών για την παραγωγή των XOs που να έχουν αυξημένη απόδοση και υψηλό δυναμικό για την κάλυψη των αναγκών της αγοράς, αλλά και χαμηλότερο κόστος, εφαρμόζοντας στρατηγικές που μπορούν να συμπεριληφθούν στις διεργασίες ενός βιοδιύλιστηρίου (Amorim et al., 2019).

2.3.2. Διαταραχές στην εντερική μικροχλωρίδα

Λόγω της σημαντικής επίδρασης στη φυσιολογία του ξενιστή, η εντερική μικροχλωρίδα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα όργανο κατασκευασμένο από μικροοργανισμούς. Για αυτό το λόγο, οι αλλοιώσεις της σύνθεσης στη μικροχλωρίδα, καθώς και η μείωση ή ανισορροπία της μικροβιακής ζωής του εντέρου αποτελούν σημαντικές αιτίες για την ανάπτυξη διάφορων ασθενειών, όπως αλλεργίες, διαβήτης, παχυσαρκία, μεταβολικό σύνδρομο, σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου και καρκίνο του παχέος εντέρου.

Μερικοί από τους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την εντερική χλωρίδα είναι η υπερβολική ή λανθασμένη χρήση αντιβιοτικών, οι διατροφικές συνήθειες (ένα παράδειγμα είναι ότι οι αδύνατοι άνθρωποι με ισορροπημένες διατροφές χαμηλών θερμίδων, που ασκούνται έχουν υψηλότερα επίπεδα εντερικής χλωρίδας), οι τοκετοί με καισαρική τομή, η εμβρυϊκή ανάπτυξη και η διατροφή στα πρώτα χρόνια της ζωής, συναισθηματικοί παράγοντες όπως το άγχος, η φυσική δραστηριότητα και εξωτερικοί παράγοντες όπως υψόμετρο, θερμοκρασία, τοξικοί ρύποι κ.λπ. Λόγω της μεγάλης ποικιλίας των παραγόντων που μπορούν να οδηγήσουν στην επιδείνωση της εντερικής χλωρίδας και του ανθρώπινης υγείας γενικότερα, τα

πρεβιοτικά και τα προβιοτικά αποτελούν σημαντικά εργαλεία που μπορούν να ενισχύσουν την βακτηριακή ζωή του εντέρου (Pinales-Marquez et al., 2021).

2.3.3. Η σημασία των ξυλοολιγοσακχαριτών

Οι ξυλοολιγοσακχαρίτες XOs είναι ικανοί να βελτιώσουν σημαντικά την ποιότητα πολλών τροφίμων με την τροποποίηση της γεύσης τους και τη βελτίωση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους. Τα XOs είναι σταθερά σε ένα ευρύ φάσμα pH και θερμοκρασίας, και ως εκ τούτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα σε διάφορα είδη διατροφής (Jain et al., 2015). Ξυλοολιγοσακχαρίτες με χαμηλό βαθμό πολυμερισμού (2-20 μονομερή) θεωρούνται ως μη εύπεπτα σάκχαρα (NDOs) γνωστά για τα οφέλη τους ως διαιτητικές ίνες. Πρόσφατα, έγινε αντιληπτή η σημασία των NDOs κυρίως λόγω των ιδιοτήτων τους όπως η γλυκαντική τους ικανότητα, η ικανότητα δέσμευσης νερού, η ικανότητα αντικατάστασης λίπους και κυρίως η αντίστασή τους στην πέψη στην ανώτερη οδό του γαστρεντερικού σωλήνα και της ζύμωσης στο παχύ έντερο. Οι μη εύπεπτοι ολιγοσακχαρίτες μπορούν να ενσωματώνονται σε επεξεργασμένα τρόφιμα και θα μπορούσαν να είναι πολλά υποσχόμενα λειτουργικά συστατικά σε άλλα προϊόντα. Η χρήση τους αποφέρει και οικονομικά οφέλη, καθώς παρέχουν μια ευκαιρία για τις βιομηχανίες της αγροδιατροφής να παράγουν προϊόντα προστιθέμενης αξίας από απόβλητα και ως εκ τούτου να συνεισφέρουν στη μείωση της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης και της διαχείρισης των αποβλήτων. Τα απόβλητα που παράγονται από τις βιομηχανίες της γεωργίας αποτελούνται κυρίως από φυτική βιομάζα που μπορεί να μετατρέπεται σε NDO χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα μικροβιακά ένζυμα (Jain et al., 2015).

2.3.4. Οφέλη των ξυλοολιγοσακχαριτών στην ανθρώπινη υγεία

Μέσα στο γαστρεντερικό σύστημα των ανθρώπων και των διαφόρων θηλαστικών, υπάρχουν περισσότερα από 1000 είδη μικροοργανισμών, τα οποία αντιπροσωπεύουν ένα συνολικό μέσο πληθυσμό 10^{14} μικροοργανισμών, που υπερβαίνει το δεκαπλάσιο του αριθμού των σωματικών κυττάρων. Η εντερική αυτή μικροχλωρίδα προστατεύει από την εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών στο ανθρώπινο σώμα και παίζει έναν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της εύρυθμης λειτουργίας του εντερικού φραγμού. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η εντερική μικροχλωρίδα επηρεάζει και τις εγκεφαλικές λειτουργίες, όπως τη σύνθεση της μυελίνης, τις νευροφλεγμονώδεις αποκρίσεις και τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Pinales-Marquez et al., 2021).

Τα XOs έχουν αξιοσημείωτες δυνατότητες ως πρεβιοτικά. Τα οφέλη τους περιλαμβάνουν τη βελτίωση της λειτουργίας του εντέρου, την ενίσχυση της βιολογικής διαθεσιμότητας του ασβεστίου βελτιώνοντας την απορρόφησή του, τις θετικές επιδράσεις στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, το ρόλο τους ως αντιοξειδωτικά, την προστατευτική δράση κατά των καρδιαγγειακών παθήσεων και μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου λόγω του σχηματισμού λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (Jain et al., 2015, Carvalho et al., 2013). Επιπλέον, τα XOs επιφέρουν ευεργετικές επιδράσεις σε: δέρμα, αίμα, και ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ παράλληλα έχουν και αντιοξειδωτικές, αντι-φλεγμονώδεις και αντιαλλεργικές δράσεις (Carvalho et al., 2013).

Ειδικότερα, η κατανάλωση των XOs αυξάνει επιλεκτικά την εντερική ανάπτυξη των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium*, εμποδίζοντας την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων, και για αυτόν τον λόγο, τα σάκχαρα αυτά προλαμβάνουν τη δυσκοιλιότητα, τη διάρροια, καθώς και τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Pinales-Marquez et al., 2021). Ακόμα, οδηγούν σε μείωση της περιεκτικότητας σε τριγλυκερίδια στο αίμα και στο συκώτι και σε παραγωγή βιταμινών του συμπλέγματος Β. Άλλες πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι εξαιτίας της αντιοξειδωτικής τους δράσης, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για τη μείωση του στρες (Samanta et al., 2015).

Ένα άλλο πλεονέκτημα της κατανάλωσης ξυλοολιγοσακχαριτών είναι η βελτίωση της πέψης και της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών, ιδιαίτερα σε βρέφη με αδύναμο πεπτικό σύστημα. Ακόμα, αναφέρεται ότι η πρόσληψη σιροπιού με 4,2g XOs μπορεί να ανακουφίσει από τα συμπτώματα της δυσκοιλιότητας σε έγκυες γυναίκες χωρίς καμία παρενέργεια. Γενικά, τα XOs που έχουν βαθμό πολυμερισμού 2-9 διεγείρουν την ανάπτυξη βακτηρίων του εντέρου, αλλά για εφαρμογές τροφίμων, επιλέγονται XOs με DP 2-4, λόγω των ιδιοτήτων τους και της ταχείας αφομοίωσής τους από το πεπτικό σύστημα (Pinales-Marquez et al., 2021).

2.3.5. Οφέλη των ξυλοολιγοσακχαριτών ως συστατικά σε ζωοτροφές

Η χρήση αντιβιοτικών αυξητικών παραγόντων (AGPs) στη ζωική παραγωγή άρχισε πριν από μισό αιώνα όταν τα υπολείμματα της χλωροτετρακυκλίνης προστέθηκαν στις τροφές των κοτόπουλων. Αυτά τα υπολείμματα προστέθηκαν για να χρησιμεύσουν ως πηγή βιταμίνης B12, αλλά οδήγησαν σε ενισχυμένη ανάπτυξη που ήταν πολύ μεγάλη για να εξηγηθεί μόνο ως μια απλή επίδραση της χρήσης βιταμινών. Αυτή η παρατήρηση επεκτάθηκε γρήγορα σε άλλα αντιβιοτικά και άλλα ζωικά είδη οδηγώντας σε ευρεία υιοθέτηση της συμπερίληψης των AGPs (Antimicrobial Growth Performance Promoters) στις ζωοτροφές. Κατά τις πρόσφατες δεκαετίες, σημαντικές ποσότητες αντιβιοτικών έχουν χρησιμοποιηθεί στα ζώα, τόσο ως θεραπευτικοί όσο και ως παράγοντες που προάγουν την ανάπτυξη (Carvalho et al., 2013).

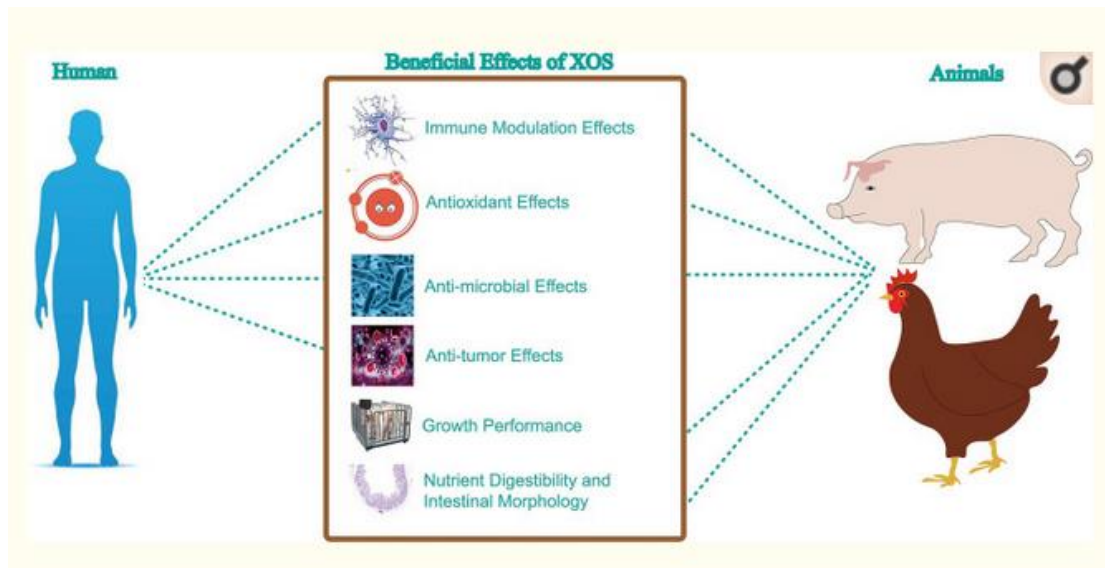
Τα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη ζωική παραγωγή, όχι μόνο για τη θεραπεία ή την πρόληψη της μόλυνσης σε ζώα εκτροφής αλλά και για τη μακροχρόνια χορήγηση τους ως συστατικά σε ζωοτροφές, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τα ζώα να κερδίζουν βάρος πιο γρήγορα και να αυξάνεται η παραγωγικότητα και η απόδοση της ζωικής παραγωγής. Ωστόσο, η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών οδηγεί σε αντίσταση και στην παραγωγή πιο λοιμωδών στελεχών παθογόνων μικροοργανισμών. Κατά συνέπεια, το 2006, η Ευρωπαϊκή Ένωση απαγόρευσε τη χρήση των αντιβιοτικών που προάγουν την ανάπτυξη (GPAs) στον αγροδιατροφικό τομέα (Carvalho et al., 2013).

Τα πρεβιοτικά έχουν ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες και τη δυνατότητα να μειώνουν τη φλεγμονή όταν χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στη διατροφή των χοίρων. Κατά τον απογαλακτισμό, οι χοίροι αντιμετωπίζουν διάφορους στρεσογόνους παράγοντες, όπως αλλαγή περιβάλλοντος και αλλαγή από υγρή σε ξηρή τροφή. Η χαμηλότερη πρόσληψη τροφής και η αυξημένη συχνότητα διάρροιας μειώνουν την αύξηση του σωματικού βάρους στο πρώιμο στάδιο, μετά τον απογαλακτισμό των χοίρων. Εφόσον τα βακτήρια που παράγουν εντερικό γαλακτικό οξύ μειώνονται αμέσως στην περίοδο μετά τον

απογαλακτισμό, αυτό μπορεί να διευκολύνει τον αποικισμό παθογόνων όπως *Clostridium* spp, *E. coli* και *Salmonella*. Λύση στο πρόβλημα αυτό μπορούν να δώσουν τα πρεβιοτικά, που είναι μη εύπεπτα συστατικά ζωοτροφών τα οποία ζυμώνονται στο κάτω μέρος του εντέρου. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, υπάρχει παραγωγή Πτητικών Λιπαρών Οξέων (VFAs) κυρίως οξικού, προπιονικού και βουτυρικού οξέος που μειώνουν το εντερικό pH. Έχει αποδειχθεί ότι τα παθογόνα βακτήρια όπως η *Salmonella*, το *E. coli* και το *Clostridium* δεν αναπαράγονται καλά σε όξινα περιβάλλοντα. Επιπλέον, το βουτυρικό οξύ διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων, αυξάνοντας έτσι την επιφάνεια για την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών. Τα VFAs χρησιμεύουν επίσης ως πηγές ενέργειας για τα ζώα [4].

Τα XOs έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διατροφή και τη βελτίωση της υγείας των ζώων λόγω των βιολογικών λειτουργιών τους, δηλαδή των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονώδων και αντιμικροβιακών τους δράσεων (εικόνα 19). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναδείξει τα οφέλη των ξυλοολιγοσακχαριτών στην ανάπτυξη και την απόδοση των ζώων. Οι Liu et al. ανέφερε ότι η θεραπεία με XOs σε δόση 200 mg/kg αύξησε το μέσο ημερήσιο κέρδος (ADG) κατά 17% και το κέρδος στη διατροφή (G/F) κατά 14%, ενώ βελτίωσε και την συνολική πέψη (ATTD). Οι μελετητές διαπίστωσαν ότι τα αποτελέσματα της προσθήκης 500 mg/kg XOs στην απόδοση ανάπτυξης ήταν πολύ παρόμοια με αυτά του αντιβιοτικού χλωροτετρακυκλίνης στους χοίρους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συμπλήρωμα XOS σε δόση 500 mg/kg XOS θα μπορούσε να αυξήσει σημαντικά το σωματικό βάρος (BW), το μέσο ημερήσιο κέρδος (ADG), τη μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής (ADFI) και το λόγο της τροφής προς την ανάπτυξη (F:G) των χοίρων. Παρόμοια αποτελέσματα σημειώθηκαν και στα κοτόπουλα. Ωστόσο, καθοριστικής σημασίας αποτελεί η ποσότητα των ξυλοολιγοσακχαριτών που προστίθεται, καθώς με πολύ χαμηλές ποσότητες XOs (π.χ. 0,01%) παρατηρείται αμελητέα βελτίωση. Συνεπώς, αναλόγως τη δόση των ξυλοολιγοσακχαριτών, είναι δυνατό να υπάρξει σημαντική βελτίωση στην ανάπτυξη και την απόδοση των ζώων, στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, καθώς επίσης οι ξυλοολιγοσακχαρίτες δύναται να αποτελέσουν νέες εναλλακτικές λύσεις ως αυξητικοί παράγοντες στα αντιβιοτικά (Chen et al., 2021).

Ωστόσο, σύμφωνα με τους Falcão et al., υπάρχει έλλειψη συνέπειας στα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τα πρεβιοτικά. Αυτή η ασυνέπεια μπορεί να εξηγηθεί από διαφορές στα πειραματικά πρωτόκολλα, π.χ. τον αριθμό των ζώων, τις συνθήκες υγιεινής και τη φύση και την ποσότητα του πρεβιοτικού που προστίθεται στη ζωοτροφή. Επιπλέον, εκτιμάται ότι τα πρεβιοτικά παρουσιάζουν οφέλη στα μακρόβια όντα, αλλά όχι στα βραχύβια, όπως π.χ. τα κουνέλια. Επιπλέον, ότι το ποσό των ξυλοολιγοσακχαριτών που απαιτούνται για την πιο αποδοτική ζωική παραγωγή περιορίζεται λόγω του υψηλού τους κόστους (Carvalho et al., 2013).



Εικόνα 19: Τα οφέλη των ξυλοολιγοσακχαριτών στους ανθρώπους και τα ζώα (Chen et al., 2021).

2.4. Ξυλοολιγοσακχαρίτες και κυκλική βιοοικονομία

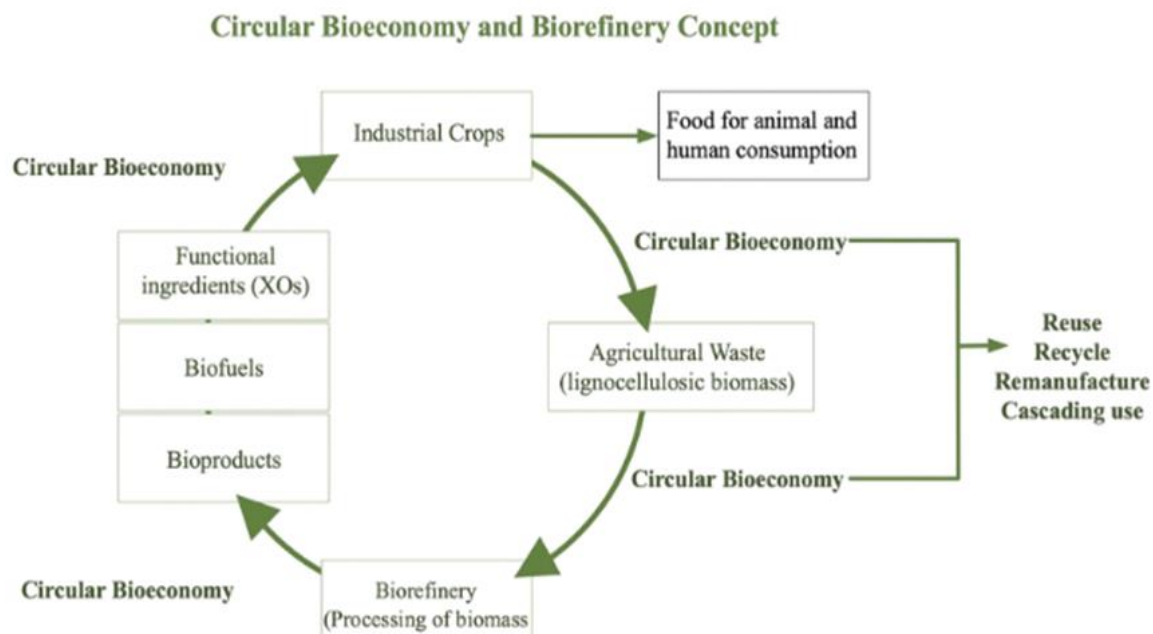
2.4.1. Σημασία των βιοδυλιστηρίων δεύτερης γενιάς στην καταπολέμηση των παγκόσμιων περιβαλλοντικών ζητημάτων

Η Συμφωνία των Ηνωμένων Εθνών που έλαβε χώρα στο Παρίσι και υπογράφηκε το 2016, η οποία αποτελεί την πρώτη οικουμενική, νομικά δεσμευτική παγκόσμια συμφωνία για το κλίμα έθεσε ως βασικό στόχο της τον περιορισμό της αύξησης της παγκόσμιας θερμοκρασίας του πλανήτη από 2.0°C σε 1.5°C. Η υπερθέρμανση της γης είναι ένα ζήτημα που προβληματίζει ολοένα και περισσότερο την επιστημονική κοινότητα για τις επιπτώσεις που μπορεί να επιφέρει. Η αύξηση της θερμοκρασίας της γης προκαλείται σε μεγάλο βαθμό από τις εκπομπές που απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα από την υπερβολική χρήση ορυκτών καυσίμων. Κατά την καύση τους παράγονται μεγάλες ποσότητες CO₂, CO, NO_(x), CH₄, γεγονός που οδηγεί στο φαινόμενο του θερμοκηπίου και προκαλεί σημαντική άνοδο της θερμοκρασίας της γης, καθώς και αλλαγές στην επιφάνειά της. Εξαιτίας της κλιματικής αλλαγής και του αντίκτυπού της έγινε η επικύρωση του Πρωτοκόλλου του Κιότο, ως μια παγκόσμια προσπάθεια μείωσης της εκπομπής αερίων που προκαλούν το φαινόμενο του θερμοκηπίου μέσω της ανάπτυξης νέων τεχνολογιών και μεθοδολογιών. Ωστόσο, η αύξηση στην κατανάλωση και καύση ορυκτών καυσίμων δεν έχει δημιουργήσει μόνο περιβαλλοντικά προβλήματα αλλά έχει επιφέρει και σημαντικά προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία. Ειδικότερα, έχουν σημειωθεί 2.9 εκατομμύρια πρόωροι θάνατοι από ασθένειες του πνεύμονα, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, η ισχαιμική καρδιοπάθεια, οι λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, καθώς και διάφορα αναπνευστικά προβλήματα λόγω εισπνοής ρυπογόνων σωματιδίων (ιδίως αυτών με μέγεθος μεγαλύτερο ή ίσο του 2.5 μm (PM 2.5)). Δεδομένων των αυξανόμενων περιβαλλοντικών και κοινωνικών προβλημάτων, η έννοια του βιοδυλιστηρίου αποτελεί μια μερική ή ολική λύση που επιτρέπει τη μείωση των αρνητικών επιπτώσεων στο περιβάλλον και τη δημόσια υγεία προωθώντας την υπεύθυνη χρήση των ανανεώσιμων πηγών, όπως η βιομάζα. Ωστόσο, είναι απαραίτητο

να τονιστεί ότι η ανάπτυξη ενός βιοδιυλιστηρίου απαιτεί τη συμμετοχή των τεχνολογικών ιδρυμάτων, των κυβερνήσεων, καθώς και της βιομηχανίας προκειμένου να υπάρξουν οικονομικά και κοινωνικά οφέλη (Pinales-Marquez et al., 2021).

Η υπερβολική χρήση πετροχημικών και τα σχετικά περιβαλλοντικά ζητήματα που συνεπάγεται, έχουν οδηγήσει σε αναζήτηση εναλλακτικών ανανεώσιμων πηγών, που έχουν τη δυνατότητα όχι μόνο να εκπληρώσουν τις απαιτήσεις του συνεχώς αυξανόμενου πληθυσμού αλλά και να συμβάλλουν στον μετριασμό των εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου (GHG, Greenhouse Gas). Η παραγωγή ενέργειας και καυσίμων από μη εδώδιμη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα, όπως γεωργικά υπολείμματα, ενεργειακές καλλιέργειες, απόβλητα δασοκομίας, και βιομηχανικά απόβλητα προσφέρει μια ξεκάθαρη πρόταση αξίας. Εκτός από την απανθρακοποίηση του περιβάλλοντος, οι ανανεώσιμες πηγές καυσίμων και χημικών έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην ύπαιθρο και την παγκόσμια οικονομία. Επιπλέον, οι πρόσφατες ανακαλύψεις στη συνθετική βιολογία για ανάπτυξη ενζύμων και μικροοργανισμών και η ανάπτυξη της μηχανικής διεργασιών έχουν αυξήσει τη δυνατότητα παραγωγής οικονομικών βιοκαυσίμων/βιοχημικών, που ανταγωνίζονται την τιμή των καυσίμων και των χημικών που από πετρέλαιο. Η λιγνινοκυτταρινούχος πρώτη ύλη δεν ανταγωνίζεται με τις εδώδιμες καλλιέργειες, αποφεύγοντας έτσι τον κίνδυνο έλλειψης τροφίμων. Αν και το διυλιστήριο βιομάζας δεν είναι μια νέα ιδέα, διερευνάται εκ νέου για την ανάπτυξη βιώσιμων καυσίμων, χρησιμοποιώντας απόβλητα για την καταπολέμηση της αυξανόμενης περιβαλλοντικής επιβάρυνσης. Για να γίνει ο μετασχηματισμός της λιγνινοκυτταρίνης μια εμπορικά βιώσιμη διαδικασία, η μετάβαση από μια γραμμική οικονομία (διάθεση πόρων / πρώτης ύλης) σε μια κυκλική οικονομία (ανακύκλωση πόρων/πρώτων υλών) είναι αναπόφευκτη. Εκτός από τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων, η ανάπτυξη βιοδιυλιστηρίων λιγνινοκυτταρίνης θα μπορούσε να δημιουργήσει νέες ευκαιρίες απασχόλησης στον τομέα των χημικών, των γεωργικών βιομηχανιών και της βιομηχανιών τροφίμων. Περίπου 170 δισεκατομμύρια κυβικοί τόνοι βιομάζας παράγονται σε ένα χρόνο, εκ των οποίων το 60–75% αποτελείται κυρίως από υδατάνθρακες με την αξιοποίησή τους στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές να περιορίζεται μόνο στο 3–4%. Το βιοδιυλιστήριο λιγνινοκυτταρίνης ενσωματώνει τις έννοιες της αειφορίας, της οικολογικής συνείδησης και της αξιοποίηση φιλικών προς το περιβάλλον τεχνολογιών για τη μείωση, επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση βιομάζας (εικόνα 20). Με άλλα λόγια, ακολουθεί τις αρχές της κυκλικής οικονομίας, όπου δεν είναι μόνο η αποτίμηση και αξιοποίηση των αποβλήτων αλλά και η μετατροπή των δευτερογενών/υπολειμματικών ρευμάτων σε χρήσιμα προϊόντα. Είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογική πλατφόρμα που έχει τη δυνατότητα να ανταποκρίνεται σε πολλές κοινωνικές απαιτήσεις, αλλά η έλλειψη οικονομικής αποδοτικότητας και των βιώσιμων διεργασιών εμποδίζουν την περαιτέρω ανάπτυξή του. Η ανάπτυξη ολοκληρωμένων διαδικασιών για βιοκαύσιμα και βιοχημική παραγωγή, η αποτελεσματική αξιοποίηση των υδατανθράκων, ιδιαίτερα των πεντοζών, η αξιοποίηση των απορριμμάτων είναι μερικές από τις βιώσιμες προσεγγίσεις που πρέπει να μελετηθούν (Chandel et al., 2020). Η χρήση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για ένα μοντέλο βιοδιυλιστηρίου δεύτερης γενιάς αποτελεί μια τεχνολογική πρόκληση, αφού τα υλικά περιέχουν εξαιρετικά μεταβλητά ποσοστά δομικών πολυσακχαριτών, οι οποίοι είναι επίσης σύνθετοι, καθιστώντας αυτά τα χαρακτηριστικά της εμπόδιο για την αποτελεσματική ζύμωση σακχάρων και

ενώσεων με υψηλή προστιθέμενη αξία και αποτελεί το κύριο εμπόδιο για τον μετασχηματισμό τους και την πλήρη χρήση τους. Για το λόγο αυτό, η χρήση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας περιστρέφεται γύρω από την κλασμάτωση της μέσω διεργασιών που είναι πιο βιώσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον και επίσης έχουν μειωμένο κόστος για την εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα (Pinales-Marquez et al., 2021).



Εικόνα 20: Η ενσωμάτωση των βιοδιυλιστηρίων λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας στην προσέγγιση της κυκλικής οικονομίας (Pinales-Marquez et al., 2021).

2.4.2. Η έννοια της κυκλικής βιοοικονομίας

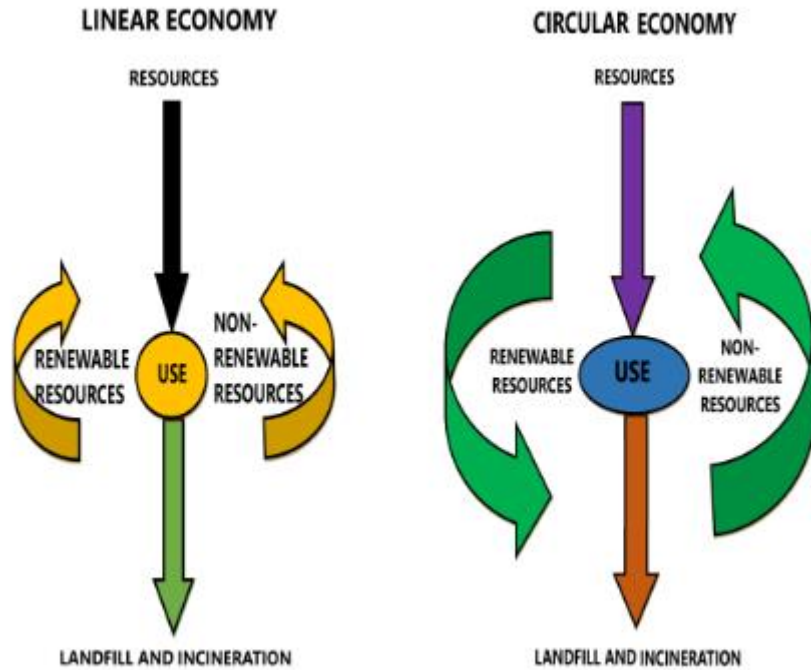
Η βιοοικονομία περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο τους οικονομικούς τομείς που ασχολούνται με το μετασχηματισμό της ανανεώσιμης βιομάζας σε τρόφιμα, ζωοτροφές, υλικά και βιοενέργεια. Διάφορες χώρες όπως οι ΗΠΑ, ο Καναδάς, η Βραζιλία, όπως επίσης και η ΕΕ, έχουν εφαρμόσει αρκετές πρωτοβουλίες με κυβερνητική εντολή σε περιφερειακό, εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο για την ενίσχυση των βιοανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Ένα τέτοιο μέτρο είναι ο επιτυχής μετασχηματισμός του ενεργειακού μίγματος, με την ενίσχυση των διάφορων βιοκαυσίμων. Η ευρωπαϊκή βιοοικονομία εμφανίζει μια παραγωγή εσόδων περίπου 2 τρισεκατομμύρια ευρώ μαζί με την απασχόληση 22 εκατομμυρίων ανθρώπων (Chandel et al., 2020).

Εκτιμάται ότι από κάθε ευρώ που επενδύει η Ε.Ε σε προϊόντα βιοοικονομίας και καινοτομίας μπορούν να προκύπτουν 10 ευρώ προστιθέμενης αξίας στη βιοοικονομία έως το 2025. Συνολικά, η βιοοικονομία αναμένεται να ενισχύσει τη βιωσιμότητα της οικονομικών διαδικασιών και των προϊόντων και συνδέεται με διάφορους στόχους όπως το μετριασμό της κλιματικής αλλαγής, την οικολογική θωράκιση, την παροχή μιας μεγάλης ποικιλίας ενεργειακών προϊόντων και την ενεργειακή ασφάλεια. Η γεωργία, ο δασικός τομέας, η βιομηχανία χαρτιού κ.λπ. διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ενίσχυση της βιοοικονομίας. Υπάρχουν ακόμη πολλές προκλήσεις στη

διαχείριση των αποβλήτων, ιδίως όσον αφορά την αξιοποίησή τους για την παραγωγή ενέργειας. Ωστόσο, η αντικατάσταση των ορυκτών πόρων με πηγές βιολογικής βάσης από μόνη της δεν εξασφαλίζει τη βιώσιμη ανάπτυξη. Οι συζητήσεις για την εκμετάλλευση των βιολογικών πηγών προς παραγωγή ενέργειας καταδεικνύουν ότι η αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων με βιομάζα δεν είναι οικονομικά αποτελεσματική ή πολλές φορές και περιβαλλοντικά βιώσιμη. Είναι κρίσιμης σημασίας η ανάγκη προστασίας του περιβάλλοντος, καθώς και στρατηγικών για την εξασφάλιση της οικονομικής βιωσιμότητας. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, προτείνεται πλέον ένα μοντέλο που θα συνδυάζει τη βιοοικονομία με μια κυκλική οικονομία που βασίζεται σε ανανεώσιμες πηγές, δηλαδή η κυκλική βιοοικονομία (Chandel et al., 2020).

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή όρισε το 2015 την κυκλική οικονομία ως ένα μοντέλο παραγωγής και κατανάλωσης, το οποίο περιλαμβάνει την ανταλλαγή, επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση με σκοπό τη την παράταση του κύκλου ζωής των υλικών, των πόρων και των προϊόντων (Stegmann et al., 2020). Η κυκλική βιοοικονομία διαφέρει από τη γραμμική οικονομία, στην οποία οι πόροι μετατρέπονται σε προϊόντα με «τέλος ζωής». Σε αντίθεση με τη γραμμική οικονομία, η κυκλική βιοοικονομία διερευνά τη χρήση φθινών πρώτων υλών, όπως υπολείμματα και απόβλητα, που απαιτούν χαμηλότερες εισροές για την ολοκλήρωση των διαδικασιών, ώστε να διασφαλιστεί και η οικονομική βιωσιμότητα (εικόνα 21). Στην κυκλική βιοοικονομία, ο βασικός στόχος είναι η ελαχιστοποίηση της παραγωγής των απορριμμάτων σε συνδυασμό με την αξιοποίηση πρώτων υλών χαμηλού κόστους για τη δημιουργία χρήσιμων προϊόντων με προστιτό κόστος παραγωγής. Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει πολλά βήματα όπως ο σχεδιασμός, η παραγωγή, η χρήση του προϊόντος και η επαναχρησιμοποίηση των παραπροϊόντων που σχηματίζονται στη διαδικασία. Συνολικά, η κυκλική βιοοικονομία συνοψίζεται στη μείωση, την επαναχρησιμοποίηση και την ανακύκλωση των υλικών.

Τα ζητήματα στο υπάρχον οικονομικό σύστημα είναι πολύ περίπλοκα. Όλοι οι συμμετέχοντες, όπως επιχειρήσεις, ιδιώτες και οργανισμοί, είναι αλληλένδετοι κρίκοι του δικτύου, όπου οι ενέργειες του ενός συμμετέχοντος επηρεάζουν τους άλλους. Επομένως, η συνεργασία αποτελεί αδήριτη ανάγκη. Οι επιχειρήσεις οφείλουν να μην επικεντρώνονται στο αποκλειστικά στο οικονομικό τους κέρδος αλλά στη βελτιστοποίηση του συνολικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένης ολόκληρης της αλυσίδας αξίας, γεγονός που είναι εφικτό μόνο μέσω των συνεργιών. Η διάκριση των συνολικών λειτουργιών, των κινδύνων και των δυνατών σημείων για την ολοκληρωμένη ανάπτυξη της διαδικασίας είναι ουσιαστικής σημασίας κατά τη λήψη των αποφάσεων. Με τη συνεργασία, η επιχείρηση μπορεί να αυξήσει τα οφέλη τόσο για τους μετόχους, όσο και για την κοινωνία και το περιβάλλον (Chandel et al., 2020).



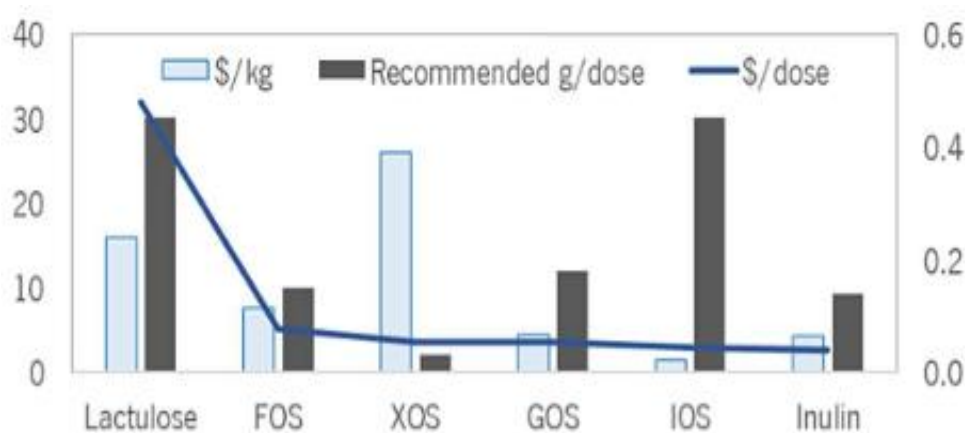
Εικόνα 21: Σύγκριση γραμμικής και κυκλικής οικονομίας (Chandel et al., 2020).

2.4.3. Βιοοικονομία, κυκλική οικονομία και ξυλοολιγοσακχαρίτες

Σήμερα, παρατηρείται μια αδιάκοπη αναζήτηση ενέργειας και πόρων για την παραγωγή τροφίμων και καυσίμων, που είναι αποτέλεσμα της ραγδαίας αύξησης του πληθυσμού. Η κατάσταση αυτή προκαλεί την ανάγκη ανάπτυξης τεχνολογιών και πολιτικών για την αποτελεσματικότερη και πιο βιώσιμη χρήση των εδαφών, την αποφυγή ανταγωνισμού μεταξύ τροφίμων και ενεργειακών πόρων, τις μεγάλες ποσότητες απορριμμάτων και της εύρεσης μη βρώσιμων πρώτων υλών. Μη βρώσιμες πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοκαυσίμων και προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας είναι κατά κύριο λόγο διάφορα άχυρα δημητριακών, βαγάσα από ζαχαροκάλαμο, άχυρα καλαμποκιού, απόβλητα γεωργικής και δασικής βιομάζας και βιομηχανικά οργανικά απόβλητα. Ετησίως παράγονται περίπου 1.3 δισεκατομμύρια τόνοι λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας παγκοσμίως. Από όλη αυτή τη βιομάζα, μόνο το 3% χρησιμοποιείται επί του παρόντος για την παραγωγή βιοπροϊόντων. Η χρήση αγροτικών υπολειμμάτων, τα οποία δεν προορίζονται για τρόφιμα είναι οικονομικά συμφέρουσα στρατηγική για την παραγωγή ενώσεων προστιθέμενης αξίας. Συγκεκριμένα, μπορούν να μειώσουν το κόστος της διαδικασίας μικροβιακής ζύμωσης, με μείωση του μέσου κόστους παραγωγής, το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 60% του κόστους της διαδικασίας ζύμωσης. Ωστόσο, η χρήση αγρο-υπολειμμάτων παρουσιάζει επίσης προκλήσεις, όπως μεταβλητή σύνθεση, εποχικότητα και κίνδυνο αλλοίωσης κατά την αποθήκευση. Επιπλέον, ανάλογα με τη χημική σύνθεση, τα υπολείμματα μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο κατάλληλα για παραγωγή ΧΟΣ. Υπολείμματα με υψηλότερες ποσότητες ξυλάνης και χαμηλές ποσότητες λιγνίνης είναι οι καλύτερες επιλογές. Καλαμπόκι, άχυρο σίτου και βαγάσα ζαχαροκάλαμου είναι παραδείγματα υπολειμμάτων με ενδιαφέρουσες αναλογίες ξυλάνης/λιγνίνης (Amorim et al., 2019).

2.4.4. Τάσεις της αγοράς στον τομέα των ξυλοολιγοσακχαριτών

Η αξιοποίηση των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων αποτελεί μια συμφέρουσα ευκαιρία για την παραγωγή ενώσεων με υψηλή προστιθέμενη αξία και βιοκαυσίμων, λόγω της διαθέσιμης ποσότητας και των περιβαλλοντικών οφελών που συνεπάγεται, καθώς με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται και ένα σχέδιο διαχείρισης των εκατομμυρίων τόνων απορριμμάτων που παράγονται ετησίως. Αν και τα ΧOs έχουν χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν, κατηγοριοποιούνται ως «αναδυόμενα πρεβιοτικά», σε περιοχές όπως η Βόρεια Αμερική και η Ευρώπη, με βάση τους ισχυρισμούς υγείας και σε σύγκριση με άλλα καθιερωμένα πρεβιοτικά, όπως η ινουλίνη. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα ΧOs σε σύγκριση με άλλα πρεβιοτικά όσον αφορά τον όγκο της αγοράς και την τιμή πώλησης (εικόνα 22).



Εικόνα 22: Σύγκριση των ΧOs με άλλα πρεβιοτικά όσον αφορά τον όγκο της αγοράς και την τιμή πώλησης (Amorim et al., 2019).

Βάσει της τωρινής αγοράς των ξυλοολιγοσακχαριτών, η περιφερειακή ρυθμιστική έγκριση αναμένεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξή της, η οποία με τη σειρά της θα εξαρτηθεί σε μεγάλο βαθμό από τις επενδύσεις σε έρευνα και ανάπτυξη (E&A). Δεδομένου ότι τα πειραματικά δεδομένα για τα ΧOs είναι ελάχιστα, θεωρείται ότι η επίδειξη ουσιαστικών ενδείξεων για την αποτελεσματικότητα των ΧOs ως πρεβιοτικών θα είναι το κλειδί για την απόκτηση εγκρίσεων ισχυρισμών υγείας και κατά συνέπεια για την αύξηση της εμπορικής αξίας των ΧOs (Amorim et al., 2019).

Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη του Global Info Research (GIR), η παγκόσμια αγορά για τους ξυλοολιγοσακχαρίτες αναμένεται να αυξηθεί από 93 εκατομμύρια δολάρια το 2017 σε 130 εκατομμύρια δολάρια το 2023, με ετήσιος ρυθμός ανάπτυξης (CAGR) περίπου 5.3%, που προβλέπεται να φτάσει το 12.2%, μέχρι το 2024 (Amorim et al., 2019), (Pinales-Marquez et al., 2021). Οι Longlive, Kangwei, Hfsugar είναι τρεις από τους κορυφαίους κατασκευαστές ΧOs. Λόγω του διηλεκτός και μεγαλύτερου ανταγωνισμού αναμένεται να αυξηθούν σημαντικά οι επενδύσεις σε έρευνα και ανάπτυξη, καθώς και σε καινοτομία και θα είναι καθοριστικής σημασίας για την ενίσχυση της ζήτησης των ΧOs, ειδικά για την απόκτηση έγκρισης ισχυρισμών υγείας που ευνοούν φυσικά και την ευρύτερη αποδοχή από τους καταναλωτές. Τα ΧOs

θεωρούνται από τα πιο ανταγωνιστικά πρεβιοτικά συστατικά όσον αφορά την τιμή ανά συνιστώμενη δόση δεδομένης της χαμηλότερης τους απαίτησης για την επίτευξη του πρεβιοτικού αποτελέσματος, που κυμαίνεται σε 1,4–2,8 g/ημέρα. Οι ξυλοολιγοσακχαρίτες αναμένεται να διεκδικήσουν τα επόμενα χρόνια μεγαλύτερο μερίδιο αγοράς, καθώς τα πιθανά και πολυδιάστατα οφέλη τους γίνονται γνωστά ευρύτερα και τεκμηριωμένα (Amorim et al., 2019).

Όσον αφορά την αξιοποίηση των ξυλοολιγοσακχαριτών για την παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοχημικών παρατηρείται ξεκάθαρα μια παγκόσμια στροφή προς αυτά τα προϊόντα που προέρχονται από βιολογική πρώτη ύλη και τα καθιστούν σημαντικό στόχο των βιοδιυλιστηρίων. Οι προβλέψεις της αγοράς για βιολογικά προϊόντα, χημικές ουσίες όπως αιθανόλη, βουτανόλη, ηλεκτρικό οξύ, γαλακτικό οξύ, χρωστικές με βιολογική βάση, ακρυλικό οξύ, γλυκερίνη κ.λπ., έδειξαν έναν ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης (CAGR) 16.16% με αγορά που αποτιμάται στα 6474 εκατομμύρια δολάρια το 2017 και η οποία αναμένεται να προσεγγίσει τα 23976 εκατομμύρια δολάρια έως το 2025. Τα βιοκαύσιμα κατέγραψαν τα υψηλότερα έσοδα (3690 εκατομμύρια δολάρια το 2016) και ο αριθμός αυτός αναμένεται να αυξηθεί με CAGR 16.43% έως το 2025. Μεταξύ των διαφορετικών προϊόντων που βασίζονται στα βιοδιυλιστήρια, τα βιοαποδομήσιμα πλαστικά παρουσιάζουν ταχεία ανάπτυξη με εκτιμώμενο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης (CAGR) 16.62% έως το 2025. Η περιοχή Ασίας-Ειρηνικού έχει τη μεγαλύτερη αγορά βιο-βασισμένων χημικών και ακολουθεί η Ευρώπη, η δεύτερη μεγαλύτερη αγορά χημικών βιολογικών προϊόντων. Στην Ευρώπη, η Γερμανία κυριαρχεί στην αγορά χημικών ουσιών με βιολογική βάση και ακολουθούν η Γαλλία, το Ηνωμένο Βασίλειο και η Ιταλία. Οι σημαντικότεροι παίκτες στην αγορά βιο-βασισμένων χημικών ουσιών είναι η BioAmber Inc. στις Η.Π.Α., η BASF AG στη Γερμανία., η Cargill στις ΗΠΑ, η Braskem στη Βραζιλία., η CORBION Purac στην Ολλανδία, η Meredian Inc. στις ΗΠΑ, η Metabolix Inc. στις Η.Π.Α., η Methanex Corporation στον Καναδά, η Mitsubishi Chemicals στην Ιαπωνία, η Myriant Technologies LLC στις Η.Π.Α., η Natureworks στις Η.Π.Α., η Novozymes ASS στη Δανία, η PTT Global στην Ταϊλάνδη, η Royal DSM στην Ολλανδία, η Synbra στην Ολλανδία και η Teijin και Zhejiang Hisun Biomaterials Co. Ltd στην Κίνα. Η Mitsubishi Chemicals κρατάει το σημαντικότερο παγκόσμιο μερίδιο στην αγορά βιο-βασισμένων ουσιών και ακολουθούν οι BASF, PTT Global και Mitsui & Co. αντίστοιχα (Chandel et al., 2020)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια -Αναλώσιμα Υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και AppliChem (Γερμανία), ενώ η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατασκευάστηκαν από τις εταιρείες Greiner-Bio One (Γερμανία), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SCHOTT AG (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.) και ROTH (Η.Π.Α.).

Υπόστρωμα προκατεργασμένης βιομάζας από ξύλο οξιάς (ΠΞΟ)

Για τα πειράματα που διενεργήθηκαν στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα προκατεργασμένης βιομάζας από ξύλο οξιάς (ΠΞΟ), η προμήθεια του οποίου έγινε από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας. Η προκατεργασία του πραγματοποιήθηκε υδροθερμικά με διαλύτη οξικού οξέος, με παροχή οξυγόνου 40%, για 3h σε θερμοκρασία 80 °C. Το υπόστρωμα αυτό είχε σύσταση 51.8% κυτταρίνη και 28.1% ημικυτταρίνη και 7.6% λιγνίνη.

3.1.2. Ρυθμιστικά Διαλύματα (buffers)

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα	pH	Συστατικά	Συγκέντρωση
Κιτρικού – φωσφορικού	5, 6	Na ₂ HPO ₄ C ₂ H ₃ NaO ₂	200 mM 200 mM
Φωσφορικών	6, 7	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄	200 mM
Οξικού οξέος	5	CH ₃ COONa CH ₃ COOH	200 mM
Tris/HCl	8	Tris base HCl (πυκνό)	200 mM

3.1.3. Ένζυμα

Τα εμπορικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στην εταιρεία Megazyme και ήταν τα εξής:

- Αραβινοφουρανοσιδάση E-AFASE, η οποία απομακρύνει μονές υποκαταστάσεις αραβινόζης από αραβινοξυλάνες και διακλαδισμένες αραβινάνες.^[5]
- Αραβινοφουρανοσιδάση E-AFAM2, η οποία εντοπίζει και υδρολύει την α-1,3-L-αραβινοφουρανόζη (α-1,3-linked L-arabinofuranose residues) από διπλά

υποκατεστημένα υπολείμματα D-ξυλοσυλίου (D-xylosyl) ή L-αραβινοσυλίου (L-arabinosyl) αραβινοξυλάνων και διακλαδισμένων αραβινανών, αντίστοιχα.^[6]

- Ξυλανάση της οικογένειας GH10, E-XYLATM, η οποία διασπά την ξυλάνη.^[7]
- Ξυλανάση της οικογένειας GH11, E-XYAN4, η οποία διασπά την ξυλάνη.^[8]
- Ακετυλεστεράση της οικογένειας CE6, E-AXEAO-3KU (OCE6), η οποία καταλύει την υδρόλυση ακετυλομάδων από πολυμερή ξυλάνης, ακετυλιωμένης ξυλόζης, ακετυλιωμένης γλυκόζης, οξικό α-ναφθυλεστέρα και οξικό 4-νιτροφαινυλεστέρα.^[9]
- α-γλυκουρονιδάση της οικογένειας GH67, E-AGUBS, η οποία υδρολύει τον α-1,2-γλυκοζιδικό δεσμό μεταξύ του D-γλυκουρονικού οξέος ή του 4-O-μέθυλ-D-γλυκουρονικού οξέος από τα τερματικά μη αναγωγικά άκρα D-ξυλόζης των ξυλο-ολιγοσακχαριτών και της ξυλάνης.^[10]

Εκτός από τα εμπορικά ένζυμα, χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον και ένζυμα που παρήχθησαν στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκε μία ξυλανάση της οικογένειας GH30 (*TiXyn30A*), μια εστεράση του οξικού οξέος της οικογένειας CE16 (*TiCE16*) και μια αραβινοφουρανοζιδάση της οικογένειας GH43 (*TiGH43*), τα οποία τρία ένζυμα προέρχονται από το μύκητα *Thermothelomyces thermophila* και μια εστεράση του οξικού οξέος της οικογένειας CE2 (*CtCE2*) που προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Clostridium thermocellum*.

3.1.4. Όργανα και συσκευές

- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία).
- Μετρητής pH 537, WTW (Γερμανία).
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer (Γερμανία).
- Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο.
- Σύστημα παραγωγής απιονισμένου νερού.
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.).
- Φυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία).
- Συσκευή διήθησης υπό κενό.
- Αναδευτήρας Vortex-2-Genie.
- Ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) και αναλυτικός ζυγός ABS 120-4 (KERN & Sohn GmbH).
- Συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, Spectra Max 250 -Molecular Devices (BMG Labtech).
- Φούρνος Muffle Furnace, Size 1, Gallenkamp (Γερμανία).
- Χρωματογράφος Υψηλής απόδοσης (HPLC) Shimadzu apparatus, Kyoto, Japan.
- Χρωματογράφος υψηλής απόδοσης ανιονεναλλαγής (HPAEC, DIONEX) Sunnyvale, CA, USA.

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε τυπικός εργαστηριακός εξοπλισμός, όπως ποτήρια ζέσεως, ογκομετρικοί κύλινδροι, κωνικές φιάλες, δοκιμαστικοί σωλήνες, σπάτουλες, πιπέτες διαφορετικών όγκων και tips πιπετών, vials, δοχεία Eppendorf και δοχεία falcon.



Εικόνα 23: Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer.



Εικόνα 24: Συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, Spectra Max 250 -Molecular Devices.

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin-Layer Chromatography, TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography, TLC) είναι μια χρωματογραφική τεχνική που εφαρμόζεται για το διαχωρισμό μη πτητικών συστατικών σε διαλύματα. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στον διαφορετικό βαθμό συγγένειας των ενώσεων του δείγματος με τις κινητές και στατικές φάσεις, οποίος επηρεάζει την ταχύτητα με την οποία η κάθε ένωση μεταναστεύει. Ο στόχος της TLC είναι να επιτευχθούν καλώς καθορισμένα και διαχωρισμένα σημεία (Bele et al., 2011).

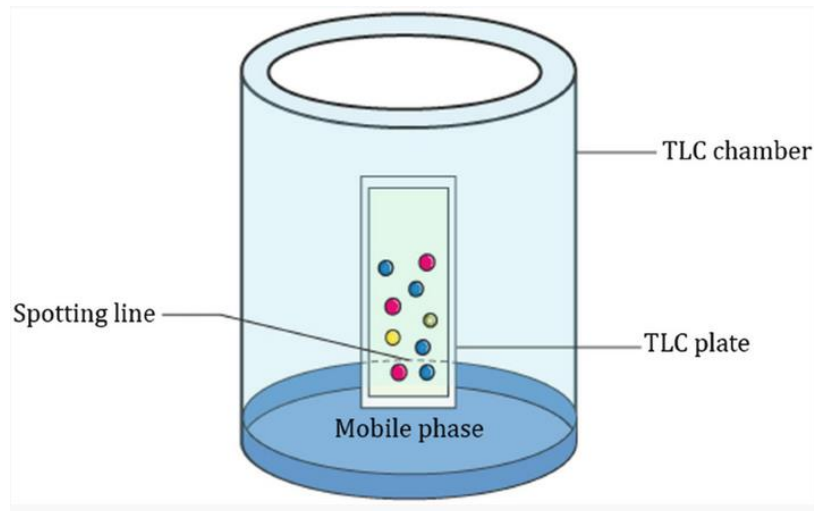
Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος TLC χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός ολιγοσακχαριτών με διαφορετικό βαθμό πολυμερισμού, (π.χ. ξυλόζη, ξυλοβιόζη, ξυλοτριόζη κ.ο.κ.), καθώς και για το διαχωρισμό ακετυλιωμένων σακχάρων από αντίστοιχα που δεν διαθέτουν ακετυλιώσεις (π.χ. διαχωρισμός ακετυλιωμένης ξυλοβιόζης από μη ακετυλιωμένη ξυλοβιόζη).

Η διαδικασία εφαρμογής της μεθόδου TLC συνοψίζεται ως εξής (Κατσιμπούρας, 2013):

- Αρχικά, κόβονται τα φύλλα TLC Silica Gel 60 F254 Merck στις επιθυμητές διαστάσεις ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να φορτωθούν.
- Με ένα μολύβι χαράσσεται η γραμμή βάσης σε απόσταση 1 cm από την κάτω πλευρά της πλάκας TLC και σημειώνονται οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων οι οποίες πρέπει να απέχουν περίπου 1cm τόσο μεταξύ τους όσο και από τα άκρα.
- Σε ειδικό βάζο ανάπτυξης TLC προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύτη έτσι ώστε όταν τοποθετηθεί η πλάκα TLC σε αυτό, η στάθμη του διαλύτη να είναι αρκετά πιο κάτω από την γραμμή βάσης. Το βάζο κλείνεται με καπάκι και αφήνεται μέχρι ο χώρος μέσα σε αυτό να κορεστεί σε ατμούς του διαλύτη.
- Τα δείγματα (πρότυπο και ενζυμικά διαλύματα) φορτώνονται στις προσημειωμένες θέσεις. Το φύλλο TLC βυθίζεται ομοιόμορφα στον διαλύτη του βάζου και αφήνεται να το διαβρέξει ο διαλύτης εξαιτίας των τριχοειδών δυνάμεων.
- Όταν ο διαλύτης έχει φτάσει σε ύψος περίπου 1 cm από το τέλος του φύλλου, αυτό αφαιρείται και σημειώνεται με μια γραμμή το ύψος που έφτασε ο διαλύτης. Αφού εξατμιστεί ο διαλύτης από το φύλλο TLC τοποθετείται σε στεγασμένο δοχείο που περιέχει ατμούς αμμωνίας ώστε να επιτευχθεί η αποακετυλίωση.
- Αφού εξατμιστεί η αμμωνία περιστρέφεται το φύλλο TLC κατά 90° έτσι ώστε η νέα βάση του TLC να είναι η ακμή που είχε τρέξει προηγουμένως το δείγμα. Φορτώνεται εκ νέου πρότυπο διάλυμα στην άκρη του TLC και βυθίζεται και πάλι το φύλλο σε διαλύτη κατά τον ίδιο τρόπο που περιεγράφηκε προηγουμένως.
- Προκειμένου να ανιχνευτούν οι κουκκίδες με τα σάκχαρα, το φύλλο στεγνώνεται και τοποθετείται σε αυτό βαφή. Η βαφή που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από 5% ορκινόλη (orcinol) w/v σε αιθανόλη, ενώ το διάλυμα περιέχει επίσης και 5% v/v θευκό οξύ.

- Έπειτα, το φύλλο μπαίνει σε ειδικό φούρνο στους 100 °C για 5 λεπτά.
- Τελευταίο βήμα είναι η ανίχνευση των σακχάρων.

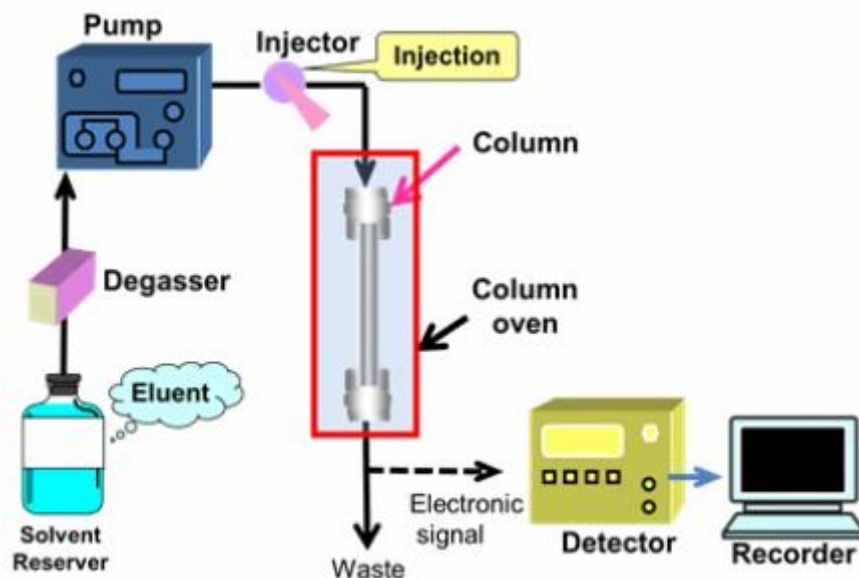
Στη νοητή διαγώνιο του φύλλου TLC θεωρείται ότι βρίσκονται τα μη ακετυλιωμένα σάκχαρα. Τα ακετυλιωμένα σάκχαρα βρίσκονται ακριβώς από κάτω από αυτή τη διαγώνιο.



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση διάταξης της TLC (Akash et al. 2020).

3.2.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) αποτελεί επέκταση της κλασικής χρωματογραφίας ανοιχτής στήλης και η ανάπτυξή της οφείλεται αφενός στη βελτίωση της τεχνολογίας (χρήση Η/Υ, κατασκευή ανθεκτικών στηλών, χρήση νέων ανιχνευτών) και αφετέρου στις βελτιωμένες δυνατότητες που παρέχει έναντι των άλλων αναλυτικών μεθόδων.



Εικόνα 25: Διάταξη της HPLC.^[11]

Η διάταξη της HPLC (Shimadzu, Κιότο, Ιαπωνία) αποτελείται από ένα σύστημα διαλυτών (Shimadzu LC-20AD), ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A), αυτόματο τροφοδότη δειγμάτων (Shimadzu SIL-20A) και λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων (LC solution v.1.24 SP1, Shimadzu) (εικόνα 26). Η στήλη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων ήταν η Aminex HP-87h (300x7.8 mm, μέγεθος σωματιδίων 9 μm, Bio-rad, Hercules, CA, Η.Π.Α.). Η κινητή φάση αποτελείται από 3 mM θεικού οξέος (H₂SO₄) σε απαερωμένο υπερκάρθαρο νερό με σταθερό ρυθμό ροής 0.6 mL/min, ενώ η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 50°C με τη χρήση στηλών (Merck Millipore, Darmstadt, Γερμανία). Ο χρόνος ανάλυσης ορίστηκε να είναι 30 min. Τα δείγματα πριν την ανάλυσή τους διηθήθηκαν με τη χρήση φίλτρων σύριγγας πορώδους 0.2 μm με σκοπό να απομακρυνθούν τα εναπομείναντα στερεά.

Το σύστημα παροχής κινητής φάσεως αποτελείται από μία αντλία υψηλής πίεσης. Το σύστημα περιέχει διάταξη αυτόματου δειγματολήπτη. Η ένεση του δείγματος για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν 5 μL. Για την πραγματοποίηση της μεθόδου, οι διαλύτες πρέπει να είναι καθαροί και να απαερώνονται (διηθούνται από ειδικά φίλτρα υπό κενό) για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων στην κυψελίδα και ασταθούς πίεσης στο κύκλωμα ροής. Όταν η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση επικρατεί ισοκρατική ροή (isocratic elution), ενώ όταν μεταβάλλεται βαθμιαία επικρατεί βαθμωτή ροή (gradient elution). Για τις ανάγκες του διαχωρισμού των αναγωγικών σακχάρων του στα πειράματα που διεξήχθησαν στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική ροή. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος HPLC για τη μέτρηση του οξικού οξέος (για τα πειράματα με την εστεράση *Tt*CE16) και η μέτρηση της αραβινόζης (για τα πειράματα με την αραβινοφουρανοζιδάση *Tt*Abf43).



Εικόνα 26: Συσκευή για την HPLC.

3.2.3. Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης (High Performance Anion-Exchange Chromatography, HPAEC)

Η χρωματογραφία ανιονεναλλαγής υψηλής απόδοσης (HPAEC) είναι ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο λόγω της ικανότητάς της να διαχωρίζει όλες τις κατηγορίες υδατανθράκων, (αλδιτόλων, αμινοσακχάρων, μόνο-, όλιγο- και πολυσακχαριτών) με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά όπως μέγεθος, σύνθεση, και ισομέρεια σύνδεσης. Ειδικότερα, η HPAEC εφαρμόζεται επί του παρόντος κυρίως στην έρευνα και την ανάλυση των ολιγοσακχαριτών και των πολυσακχαριτών και επιτυγχάνει έναν εξαιρετικά επιλεκτικό διαχωρισμό σε υψηλό pH, χρησιμοποιώντας ισχυρή ανταλλαγή ανιόντων στη στατική φάση. Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος HPAEC χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση γραμμικών ολιγοσακχαριτών, καθώς επίσης και ουρονικών ολιγοσακχαριτών. Το χρωματογραφικό σύστημα ήταν εξοπλισμένο με έναν παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή ED40 (PAD) (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) συνδεδεμένο με ένα ηλεκτρόδιο και μια στήλη CarboPac PA-1 (4 x 250 mm) με μια IC CarboPac PA1 (4 x 50 mm) προστατευτική στήλη. Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση κάθε σακχάρου επιτεύχθηκε με την κατασκευή καμπύλης αναφοράς από δείγματα γνωστής συγκέντρωσης των σακχάρων που μελετήθηκαν. Η ανίχνευση όξινων ολιγοσακχαριτών, όπως των 2²-(4-O-Μεθυλ-α-D-Γλυκουρονυλ)-ξυλοβιόζη (O-UX) ή 2²-(4-O-Μεθυλ-α-D-Γλυκουρονυλ)-ξυλοτριόζη (O-XUX), απαιτούσε σύστημα 4 διαλυτών: 10 mM NaOH (A), 100 mM NaOH (B), 200 mM οξικού νατρίου σε 100 mM

NaOH (C) και 1 M οξικού νατρίου σε 100 mM NaOH (D), ενώ οι συνθήκες έκλυσης ήταν:

- 0-3 λεπτά και ισοκρατικό βήμα 100% διαλύτης A.
- 3-10 λεπτά, γραμμική κλίση 100%, διαλύτης B.
- 10-15 λεπτά, γραμμική κλίση 70% διαλύτης B, 30% διαλύτης C.
- 15-35 λεπτά, γραμμική κλίση 61% διαλύτης B, 39% διαλύτης C.
- 35-37 λεπτά, εκθετική κλίση 0% διαλύτης B, 100% διαλύτης C.
- 37-39 λεπτά, εκθετική κλίση 0% διαλύτης C και 100% διαλύτης D.
- 39-44 λεπτά και ισοκρατικό βήμα 100% διαλύτης D.
- 44-45 λεπτά, εκθετική κλίση, 100% διαλύτης B, 0% διαλύτης D.
- 45-49 λεπτά και ισοκρατικό βήμα 100% διαλύτης B.
- 49-50 λεπτά, εκθετική κλίση 100% διαλύτης A, 0% διαλύτης B.
- 50-55 λεπτά, ισοκρατικό βήμα 100% διαλύτης A.



Εικόνα 27: Συσκευή για την HPLC.

3.2.4. Μέτρηση ολικών αναγωγικών σακχάρων με τη χρήση διαλύματος 5-δινιτροσαλκυλικού οξέος (DNS)

Για την εφαρμογή της μεθόδου DNS κάθε δείγμα ενζυμικής αντίδρασης αραιώνεται κατάλληλα προκειμένου τα αποτελέσματα της μέτρησης να βρίσκονται εντός των ορίων βαθμονόμησης του οργάνου. Αρχικά, ελήφθησαν 60 μ L από το δείγμα για καθένα από τα δείγματα τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Στον όγκο αυτό προστέθηκαν 60 μ L αντιδραστήριου DNS για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Παρασκευάστηκε, επίσης, ένα τυφλό (blank) δείγμα όπου χρησιμοποιήθηκε

απιονισμένο νερό και αντιδραστήριο DNS στην ίδια αναλογία. Όλα τα δείγματα έγιναν εις διπλούν για να διασφαλιστεί μεγαλύτερη ακρίβεια. Μετά από ανάδευση στη συσκευή vortex για 10 δευτερόλεπτα, ακολούθησε βρασμός για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 480 μL απιονισμένου νερού ώστε ο συνολικός όγκος σε κάθε δείγμα να είναι 600 μL και αναμείχθηκαν εκ νέου στη συσκευή vortex για 10 δευτερόλεπτα για να ομογενοποιηθούν. Τέλος, τοποθετήθηκαν 250 μL από κάθε δείγμα σε πλάκα ανάγνωσης για τη συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices), Spectra Max 250 και πραγματοποιήθηκε μέτρηση στα 540 nm. Με χρήση κατάλληλης καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε από ένα σύνολο διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων ξυλόζης, η απορρόφηση των δειγμάτων μετατράπηκε σε ανάλογο συγκέντρωσης ξυλόζης στα δείγματα και στη συνέχεια λαμβάνοντας υπόψη τις συνθήκες της αντίδρασης και υπολογίστηκε η ενζυμική ενεργότητά τους. Η ενζυμική ενεργότητα μετράται σε units (U), όπου 1U ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol αναγωγικών σακχάρων (ξυλόζης στην παρούσα εργασία) ανά λεπτό κάτω από ορισμένες πρότυπες συνθήκες προσδιορισμού (Katsimpouras et al., 2019).

3.2.5. Μέτρηση ενεργότητας ξυλανασών

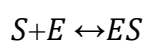
Σε πρώτο στάδιο, μετρήθηκε η ενεργότητα των ξυλανασών GH10 και GH11 σε beechwood ξυλάνη. Στις αντιδράσεις αυτές, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού φωσφορικού pH 5 50 mM, υπόστρωμα beechwood ξυλάνης με τελική συγκέντρωση 0.5% w/v, ξυλανάση GH10 συγκέντρωσης 0.078 mg/mL ή ξυλανάση GH11 συγκέντρωσης 0.0253 mg/mL. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ρυθμίστηκε στα 500 μL . Ακολούθως, τα δείγματα εισήχθησαν σε θερμαινόμενο επωαστήρα Eppendorf Thermomixer Comfort σε θερμοκρασία 45°C και υπό ανάδευση 950 rpm για 30 λεπτά. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων και μετρήθηκε η ενεργότητα τους με τη μέθοδο DNS, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.4.

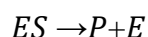
3.2.6. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών

Το βασικό μαθηματικό μοντέλο για την κινητική μιας καταλυόμενης αντίδρασης υποστρώματος-ενζύμου αναπτύχθηκε από τον V. C. R. Henry το 1902 και από τους Michaelis και Menten το 1913. Η κινητική μιας απλής ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης συχνά αναφέρεται ως κινητική Michaelis – Menten ή κινητική κορεσμού (saturation kinetics). Τα μοντέλα αυτά βασίζονται σε στοιχεία από αντιδραστήρες διαλείποντος έργου με σταθερό όγκο υγρού, στο οποίο οι αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και ενζύμου είναι γνωστές. Στα βιολογικά συστήματα πραγματοποιούνται περισσότερο πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις ενζύμου-υποστρώματος, όπως πολύ-υποστρωματικές πολυενζυμικές αντιδράσεις.

Κινητική Michaelis-Menten

Το μοντέλο Michaelis – Menten όσο αφορά την κινητική απλής αναντίστρεπτης δράσης με ένα υπόστρωμα περιγράφεται από τις παρακάτω δύο αντιδράσεις (Ainsworth, 1977):





όπου:

S: το υποστρώμα του ενζύμου

E: το ένζυμο

P: το προϊόν ενζυμικής δράσης

Οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν αυτή την εξίσωση και οι οποίες πρέπει να εκτιμηθούν από τα πειραματικά δεδομένα, είναι V_{max} , που είναι η μέγιστη ταχύτητα που επιτυγχάνεται θεωρητικά όταν το ένζυμο έχει κορεσθεί από μια άπειρη συγκέντρωση του υποστρώματος και K_M , δηλαδή η σταθερά Michaelis που είναι αριθμητικά ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος με την οποία επιτυγχάνεται το μισό της μέγιστης ταχύτητας (Dowd et al., 1965). Η συγκέντρωση του υποστρώματος, είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επιδρούν στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων. Εάν μια ενζυμική αντίδραση ακολουθεί την κινητική Michaelis-Menten, η γραφική παράσταση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης, v , έναντι της συγκέντρωσης του υποστρώματος, C_s , θα δώσει μια ορθογώνια υπερβολή της μορφής:

$$V = V_{max} * C_s / (K_M + C_s)$$

όπου:

V: η ταχύτητα της αντίδρασης.

V_{max} : η μέγιστη τιμή που μπορεί να πάρει η ταχύτητα V όταν όλο το ένζυμο έχει κορεσθεί από μια άπειρη συγκέντρωση του υποστρώματος.

K_M : η σταθερά Michaelis – Menten.

C_s : η συγκέντρωση του υποστρώματος.

Η σταθερά Michaelis – Menten, K_M , αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά ενός ενζύμου για δεδομένο υπόστρωμα και αντιπροσωπεύει εκείνη την τιμή του υποστρώματος στην οποία η τιμή της ταχύτητας της αντίδρασης ισούται με το μισό της μέγιστης ταχύτητας. Η K_M ορίζεται από την εξίσωση:

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

όπου:

k_1 : η σταθερά ταχύτητας σχηματισμού του συμπλόκου ES.

k_{-1} : η σταθερά ταχύτητας διάσπασης του συμπλόκου ES προς E και S.

k_2 : η σταθερά ταχύτητας διάσπασης του συμπλόκου ES προς E και P.

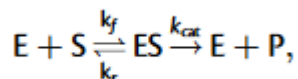
Η μέγιστη ταχύτητα V_{max} ορίζεται από τη σχέση (Labourel et al., 2021):

$$V_{max} = K_{cat} \cdot [E_T]$$

όπου:

K_{cat} : η σταθερά ταχύτητας διάσπασης του συμπλόκου ES προς E και P.

$[E_T]$: η αρχική ολική συγκέντρωση του ενζύμου.



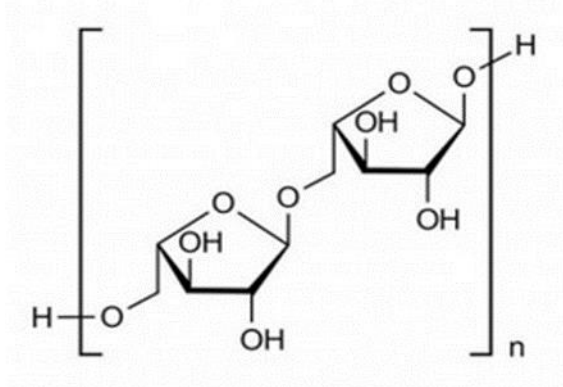
Η K_{cat} αφορά την ταχύτητα διάσπασης του ES σε P και E και ονομάζεται καταλυτική σταθερά. Η K_{cat} δηλώνει τον αριθμό μορίων υποστρώματος που καταλύει ένα μόριο ενζύμου ανά μονάδα χρόνου όταν είναι κορεσμένο με υπόστρωμα.

3.2.7. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* και συνεργισμοί

3.2.7.1. Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας σε υπόστρωμα αραβινάνης

Για την εξέταση της ενζυμικής ενεργότητας της *TtAbf43* εφαρμόστηκε η μέθοδος φωτομέτρησης με DNS που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.4. στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Για τις δοκιμές ενεργότητας πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις που περιλάμβαναν ως υπόστρωμα αραβινάνη με τελική συγκέντρωση 0.6% w/v, ένζυμο αραιωμένο σε Tris-HCl 20 mM με τελική συγκέντρωση 1.75, 0.875 και 0.583 mg/mL αντίστοιχα, ρυθμιστικό διάλυμα οξικού pH 5 σε συγκέντρωση 50 mM και απιονισμένο νερό. Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν τα 500 μ L. Για το πείραμα υλοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις ούτως ώστε να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη ακρίβεια. Τα δείγματα εισήχθησαν στο θερμομίξερ Eppendorf Thermomixer Comfort σε θερμοκρασία 60°C και υπό ανάδευση 950 rpm για 24 ώρες. Η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε με τη μέθοδο DNS, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), που αντί για ένζυμο χρησιμοποιήθηκε ίση ποσότητα από Tris-HCl 20 mM.

Για την ποσοτικοποίηση της αραβινόζης που απελευθερώθηκε από τη δράση του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε και η μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.



Εικόνα 28: Υπόστρωμα αραβινάνης. ^[12]

3.2.7.2. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων σε υπόστρωμα αραβινάνης

Για να εξεταστεί αν το σύστημα ενζύμου-υποστρώματος πιάνει μια σταθερή συμπεριφορά πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής για δεκαπέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος στο εύρος 0.5 έως 140 mg/mL. Ως αρχικό στοκ υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε 2.5% w/v αραβινάνη. Ο τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 250 μ L.

Κάθε αντίδραση περιλάμβανε buffer οξικού οξέος pH 5 50 mM, το ένζυμο *TtAbf43* σε τελική συγκέντρωση 1.75 mg/mL και το υπόστρωμα σε κατάλληλη αραιώση. Για κάθε συγκέντρωση παρασκευάστηκαν ένα τυφλό δείγμα και διπλές αντιδράσεις, ώστε να επιβεβαιωθεί η συμπεριφορά του συστήματος.

Τα δείγματα εισήλθαν στο thermomixer προς επώαση για 30 λεπτά στους 60°C και τα 950 rpm. Ακολούθως, με τη μέθοδο DNS, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.4, μετρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας στα 540 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank).

3.2.7.3. Κινητική για την π-νιτροφαίνυλ-αραβινοφουρανόζη (*p*-nitrophenyl-Arabinofuranoside, *pNP-Araf*)

Για να εξεταστεί εάν το σύστημα πιάνει μια σταθερή συμπεριφορά με υπόστρωμα το *p*-nitrophenyl-Arabinofuranoside (*pNP-Araf*) πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής για 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος από 5 έως 9 mM. Ως αρχικό στοκ υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε *pNP-Araf* 36.9 mM, διαλυμένη σε DMSO.

Τα συστατικά κάθε αντίδρασης ήταν το buffer οξικού οξέος pH 5 50 mM, ένζυμο *TtAbf43* σε τελική συγκέντρωση 0.7 mg/mL και υπόστρωμα σε κατάλληλη συγκέντρωση. Για κάθε συγκέντρωση παρασκευάστηκαν ένα τυφλό δείγμα και διπλές αντιδράσεις, για καλύτερη αξιοπιστία. Ο τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 500 μ L.

Τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά της 60°C και τα 950 rpm. Μετά το της της επώασης, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 100 μL Na_2CO_3 1 M. Ο λόγος της προσθήκης Na_2CO_3 ήταν αφενός γιατί ανεβάζει το pH και κιτρινίζει το διάλυμα, γεγονός που βοηθάει στη φωτομέτρηση που ακολουθεί και αφετέρου γιατί σε τόσο υψηλό pH επέρχεται οριστικός τερματισμός της αντίδρασης. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας στα 410 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκε με χρήση καμπύλης αναφοράς της π-νιτροφαινόλης που κατασκευάστηκε από πρότυπα διαλύματα της ουσίας στο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank).

3.2.7.4. Μηχανισμός δράσης της αραβινοφουρανοσιδάσης και συνεργισμοί με τις εμπορικές αραβινοφουρανοζιδάσες E-AFASE και E-AFAM2.

Για τον προσδιορισμό του μηχανισμού με τον οποίο δρα η *TtAbf43* πραγματοποιήθηκε σύγκριση της δράσης του ενζύμου με τη δράση δύο εμπορικών αραβινοφουρανοζιδασών, την E-AFASE και την E-AFAM2. Η E-AFASE απελευθερώνει μονές υποκαταστάσεις αραβινόζης από τη θέση O-2 ή O-3 στο σκελετό των ξυλανών ενώ η E-AFAM2 απελευθερώνει την O-3 υποκατάσταση από διπλά υποκατεστημένες ξυλόζες. Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν να φανεί επίσης και ο ενδεχόμενος συνεργισμός που επιτυγχάνεται μεταξύ του υπό μελέτη ενζύμου και των εμπορικών αραβινοφουρανοζιδασών. Η δράση των ενζύμων αυτών εξετάστηκε ως προς δύο υποστρώματα, σε αραβινοξυλάνη σιταριού (wheat arabinoxylan, WA) και αραβινοξυλάνη σίκαλης (rye arabinoxylan, RA). Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν περιλάμβαναν τους ακόλουθους συνδυασμούς:

- Τη δράση καθενός από τα ένζυμα *TtAbf43*, E-AFASE και E-AFAM2 ξεχωριστά στα υποστρώματα για 24 ώρες.
- Την ταυτόχρονη δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* και της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης E-AFAM2.
- Την ταυτόχρονη δράση της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* και της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης E-AFASE.
- Την ταυτόχρονη δράση της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης E-AFASE και της εμπορικής αραβινοφουρανοζιδάσης E-AFAM2.

Οι άνωθεν αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 500 μL και πραγματοποιήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστήρα στους 40 °C, υπό ανάδευση στα 950 rpm και η επώαση τους διήρκησε 24 ώρες. Στις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος με pH 5 50 mM στην αντίδραση, τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονταν όλα σε τελική συγκέντρωση 0,01 mg/ml, ενώ το εκάστοτε υπόστρωμα είχε τελική συγκέντρωση 0.5% w/v. Για κάθε δείγμα έλαβε χώρα διπλή αντίδραση για μεγαλύτερη ακρίβεια.

Μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε η μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS, όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.4. και της απελευθερούμενης αραβινόζης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC), όπως περιγράφεται

στην παράγραφο 3.2.2. Η ποσοτικοποίηση των σακχάρων προέκυψε από πρότυπες καμπύλες αναφοράς των σακχάρων στις ίδιες συνθήκες ανάλυσης.

3.2.8. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της εστεράσης του οξικού οξέος, *TiCE16* και συνεργισμοί

3.2.8.1. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας

Για τη μελέτη της εστεράσης του οξικού οξέος, *TiCE16*, αρχικά πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της ενεργότητας τόσο αυτής, όσο και των εστερασών *CiCE2* (*CE2*) και *OCE6* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική. Η ενεργότητα μετρήθηκε σε $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ενζύμου, δηλαδή την ποσότητα του ενζύμου που πρέπει να προστεθεί για την απελευθέρωση $1 \mu\text{mol}$ pNP, υπό καθορισμένες συνθήκες.

Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των εστερασών χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το p-NPA (4-nitrophenyl acetate, οξικός π-νιτροφαινυλεστέρας). Κατά την υδρόλυση του τεχνητού αυτού υποστρώματος απελευθερώνεται η ομάδα της 4-νιτροφαινόλης. Η μέτρηση ενεργότητας πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος $5.5 - 50 \text{ mM}$, υπόστρωμα διαλυμένο σε DMSO, σε συγκέντρωση 0.5 mM στον αντιδρών όγκο, με κατάλληλη αραίωση ενζυμικού διαλύματος. Τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν τα $600 \mu\text{L}$. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία $40 \text{ }^\circ\text{C}$ και η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 410 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate. Η συνολική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 10 λεπτά . Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank). Για κάθε δείγμα υλοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις για να διασφαλιστεί μεγαλύτερη ακρίβεια.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του προϊόντος, χρησιμοποιείται ο νόμος των Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

όπου:

A: η απορρόφηση του δείγματος

ε: ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας εκφρασμένος σε $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

b: η απόσταση της διαδρομής της ακτινοβολίας μέσα στο δείγμα εκφρασμένη σε cm .

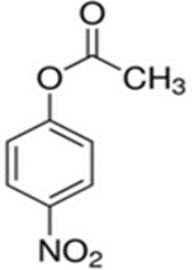
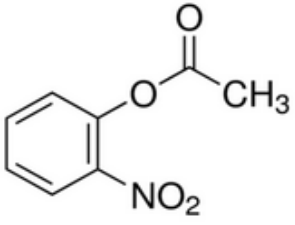
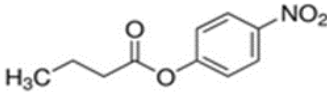
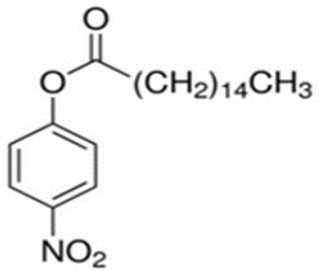
c: η συγκέντρωση της ουσίας εκφρασμένη σε M .

μέσω του οποίου είναι δυνατός ο συσχετισμός των απορροφήσεων των αντιδράσεων με τη συγκέντρωση του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης.

3.2.8.2. Μελέτη της εξειδίκευσης της TtCE16 ως προς διαφορετικά υποστρώματα

Για την εξέταση της εξειδικευμένης δράσης της εστεράσης TtCE16 πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σε διαφορετικά υποστρώματα και προσδιορίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου όταν δρα στο εκάστοτε υπόστρωμα.

Πίνακας 2: Χημικοί τύποι των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη εξειδίκευσης ενζύμου.

Υπόστρωμα	Χημικός τύπος
p-NP Acetate (4-Nitrophenyl acetate) ^[13] (οξικός 4-νιτροφαίνυλ-εστέρας)	
o-NP Acetate (2-Nitrophenyl acetate) ^[14] (οξικός 2-νιτροφαίνυλ-εστέρας)	
p-NP Butyrate (4-Nitrophenyl butyrate) ^[15] (βουτυρικός-4-νιτροφαίνυλ-εστέρας)	
p-NP Palmitate (4-Nitrophenyl palmitate) ^[16] (παλμιτικός-4-νιτροφαίνυλ-εστέρας)	

Όλα τα υποστρώματα παρασκευάστηκαν ύστερα από διάλυση της αντίστοιχης ουσίας σε DMSO. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού φωσφορικού pH-6, 50 mM, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 500 μ L και τελική συγκέντρωση υποστρώματος 0.5 mM για τα p-NP Acetate και o-NP Acetate ενώ 1.25 mM για τα p-NP Butyrate και p-NP Palmitate. Για κάθε υπόστρωμα παρασκευάστηκαν ένα τυφλό δείγμα και διπλές αντιδράσεις. Στα τυφλά δείγματα αντί του ενζύμου προστέθηκε Tris/HCl 20 mM.

Τα δείγματα εισήχθησαν σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 45°C και υπό ανάδευση στα 950 rpm για 10 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της κάθε αντίδρασης προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 100 μL Na_2CO_3 συγκέντρωσης 1M. Η μέτρηση ενεργότητας του ενζύμου έγινε στα 410 nm θεωρώντας ως μηδενική απορρόφηση την απορρόφηση του εκάστοτε τυφλού διαλύματος (blank).

3.2.8.3. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten σε υπόστρωμα p-NP Acetate

Η μελέτη της κινητικής της εστεράσης *TiCE16* σε υπόστρωμα p-NP Acetate πραγματοποιήθηκε σε ένα εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος 0.005 - 0.4 mM. Το υπόστρωμα p-NPA είχε αρχική συγκέντρωση 20 mM και ήταν διαλυμένο σε DMSO. Οι αντιδράσεις για το πείραμα αυτό περιλάμβαναν ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού pH 6 50 mM, ένζυμο σε τελική συγκέντρωση $4 \cdot 10^{-5}$ mg/mL και υπόστρωμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.025, 0.03, 0.04, 0.05, 0.07, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3 και 0.4 mM). Για κάθε συγκέντρωση παρασκευάστηκαν ένα τυφλό δείγμα και διπλές αντιδράσεις. Στα τυφλά δείγματα αντί του ενζύμου προστέθηκε Tris/HCl pH 8 20 mM. Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 600 μL . Τα δείγματα εισήχθησαν σε θερμομίξερ για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 60°C και υπό ανάδευση στα 950 rpm. Η μέτρηση των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) στα 410 nm όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.8.1.

Μετά από την επεξεργασία των τιμών απορρόφησης που ελήφθησαν από το φασματοφωτόμετρο προκύπτουν οι τιμές ενεργότητας οι οποίες προσαρμόζονται στο μοντέλο Michaelis-Menten με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων και σε περιβάλλον GraphPad Prism 8. Από την προσαρμογή των δεδομένων στο πρόγραμμα αυτό προσδιορίζονται οι τιμές των ζητούμενων κινητικών παραμέτρων, K_M και V_{max} .

3.2.8.4. Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης

Για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της εστεράσης *TiCE16* υπολογίστηκε η ενεργότητά της στο θερμοκρασιακό εύρος 25-80 °C. Κατά την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7 50 mM, ένζυμο συγκέντρωσης 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, καθώς επίσης και υπόστρωμα p-NP Acetate με τελική συγκέντρωση 0.03 mg/mL. Η κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 600 μL . Τα δείγματα εισήχθησαν σε θερμαινόμενους επωαστήρες υπό ανάδευση 950 rpm στις εκάστοτε θερμοκρασίες για 10 λεπτά. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις προς μεγαλύτερη ακρίβεια.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων σε συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) στα 410 nm. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank).

3.2.8.5. Μελέτη σταθερότητας σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και pH

Για τη μελέτη της σταθερότητας της εστεράσης του οξικού οξέος *TiCE16* σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και pH, το ένζυμο επώαστηκε σε καθορισμένες θερμοκρασιακές συνθήκες για 24 ώρες και σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (0, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h & 24 h), πραγματοποιούταν μέτρηση της ενεργότητάς του. Οι μετρήσεις ενεργότητας των δειγμάτων υλοποιήθηκαν όπως περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.8.1.

Η θερμοκρασιακή σταθερότητα της εστεράσης *TiCE16* εξετάστηκε στις ακόλουθες θερμοκρασίες: 4, 20, 30, 40, 50, 60 και 70°C. Η επώαση του ενζυμικού διαλύματος συγκέντρωσης 0.03 mg/mL έλαβε χώρα εντός θερμαινόμενων επωαστήρων. Για την εκάστοτε θερμοκρασία το ένζυμο αραιώθηκε με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7. Ακολούθησε η λήψη του δείγματος και η κατάλληλη αραιώση. Έτσι, κάθε νέο δείγμα περιλάμβανε ενζυμικό διάλυμα με τελική συγκέντρωση 0.03 mg/ml, υπόστρωμα pNPA με τελική συγκέντρωση 0.25 mM, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7 50 mM και απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, τα δείγματα εισήχθησαν σε θερμαινόμενο επωαστήρα Eppendorf Thermomixer Comfort σε θερμοκρασία 60°C και υπό ανάδευση 950 rpm για 10 λεπτά.

Η μέτρηση της ενεργότητας για κάθε δείγμα στον εκάστοτε χρόνο επώασης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.8.1. Για κάθε δείγμα υλοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις ούτως ώστε να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη ακρίβεια.

Για τη μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH πραγματοποιήθηκε επώαση του ενζύμου σε τιμές pH 3,4,5,6,7,8,9 χρησιμοποιώντας διάλυμα φωσφορικών 50 mM. Η επώαση του ενζύμου με συγκέντρωση $3 \cdot 10^{-5}$ mg/mL στα διαφορετικά pH έλαβε χώρα σε θερμοκρασία 4°C. Κάθε δείγμα περιλάμβανε ενζυμικό διάλυμα με τελική συγκέντρωση 0.03 mg/ml, υπόστρωμα pNPA με τελική συγκέντρωση 0.25 mM, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6 50 mM και απιονισμένο νερό μέχρι να επιτευχθεί ο επιθυμητός όγκος, δηλαδή τα 600 μ L. Στη συνέχεια, τα δείγματα εισήχθησαν στο θερμομίξερ σε θερμοκρασία 60°C και υπό ανάδευση 950 rpm για 10 λεπτά.

Πριν την επώαση πραγματοποιήθηκε για κάθε δείγμα δοκιμή ενεργότητας με χρήση της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) στα 410 nm και η τιμή ενεργότητας ορίστηκε ως τιμή για το χρόνο μηδέν. Στον εκάστοτε χρόνο επώασης, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 h, ελήφθη δείγμα από κάθε τιμή pH και μετρήθηκε άμεσα η ενεργότητα του ενζύμου με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.8.1. Για κάθε δείγμα υλοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις ούτως ώστε να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη ακρίβεια.

*3.2.8.6. Μηχανισμός δράσης της εστεράσης του οξικού οξέος, *TiCE16**

Ο προσδιορισμός του μηχανισμού δράσης της εστεράσης του οξικού οξέος, *TiCE16*, πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης το οποίο είχε προηγουμένως κατεργασθεί είτε από την ξυλανάση E-XYLATM (GH10) ή από την E-XYAN4 (GH11). Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τις εστεράσες *CiCE2* και

OCE6 (AXEAO-3KU). Εν συνεχεία, δοκιμάστηκε η ταυτόχρονη αλλά και η διαδοχική προσθήκη ζευγών των παραπάνω εστερασών.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η κατεργασία της ακετυλιωμένης ξυλάνης με την κάθε ξυλανάση ξεχωριστά. Η τελική συγκέντρωση ακετυλιωμένης ξυλάνης ήταν 0.6% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού pH 5 50 mM, ενώ οι συγκεντρώσεις των δύο ξυλανασών GH10 και GH11 ορίστηκαν σε 0.04 mg/mL έκαστη. Τα δείγματα εισήχθησαν σε θερμαινόμενου επωαστήρα στους 45°C και ανάδευση στα 950 rpm για 24 ώρες. Ύστερα, ακολούθησε βρασμός προς απενεργοποίηση των ξυλανασών .

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η κατεργασία του υδρολύματος των ξυλανασών με τις εστεράσες. Οι αντιδράσεις που έλαβαν χώρα περιλάμβαναν:

- Τα τυφλά δείγματα που περιείχαν μόνο τα υδρολύματα των ξυλανασών GH10 και GH11 αντίστοιχα.
- Καθεμιά από τις εστεράσες *TiCE16*, *CiCE2* και *OCE6* ξεχωριστά.
- Την ταυτόχρονη προσθήκη των εστερασών *TiCE16* και *CiCE2*.
- Τη διαδοχική προσθήκη πρώτα της εστεράσης *TiCE16* και στη συνέχεια της *CiCE2*.
- Τη διαδοχική προσθήκη πρώτα της εστεράσης *CiCE2* και στη συνέχεια της *TiCE16*.
- Την ταυτόχρονη προσθήκη των εστερασών *TiCE16* και AXEAO-3KU.
- Τη διαδοχική προσθήκη πρώτα της εστεράσης *TiCE16* και στη συνέχεια της εμπορικής εστεράσης AXEAO-3KU.
- Τη διαδοχική προσθήκη πρώτα της εμπορικής εστεράσης και στη συνέχεια της εστεράσης *TiCE16*.

Όλες οι παραπάνω αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 500 μ L και πραγματοποιήθηκαν σε Thermomixer Comfort στους 40°C, υπό ανάδευση 950 rpm για 24 ώρες. Στα δείγματα με την διαδοχική προσθήκη ενζύμων αφού ολοκληρώθηκε η δράση του πρώτου για 24 ώρες ακολούθησε 5 λεπτά βρασμός για την απενεργοποίηση αυτού, προσθήκη του δεύτερου και εκ νέου επώαση για 24ώρες. Η τελική συγκέντρωση κάθε εστεράσης που προστέθηκε ήταν 0.1 mg/mL. Πριν την ανάλυση όλες οι αντιδράσεις τερματίστηκαν με βρασμό. Για κάθε δείγμα υλοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις. Η απελευθέρωση του οξικού μετρήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.

Για τον έλεγχο του συνεργισμού μεταξύ των εστερασών σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης με ταυτόχρονη προσθήκη της ξυλανάσης GH10 τα δείγματα αναλύθηκαν και με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.1. στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

3.2.8.7. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της GH10 ξυλανάσης με τις εστεράσες TiCE16 και OCE6 σε υπόστρωμα ΠΞΟ

Για την υδρόλυση του υποστρώματος ΠΞΟ διεξήχθη μελέτη της συνεργιστικής δράσης της ξυλανάσης της οικογένειας GH10, E-XYLATM, με τις εστεράσες *TiCE16* και *OCE6*. Για το σκοπό αυτό, δοκιμάστηκαν οι εξής συνδυασμοί ενζύμων: *OCE6*-

TiCE16, *GH10-OCE6*, *GH10-TiCE16*, *GH10-OCE6-TiCE16*. Οι συγκεντρώσεις των ενζύμων στην αντίδραση ήταν για την ξυλανάση *GH10* 0.025 mg/mL, ενώ για την κάθε εστεράση 0.05 mg/mL. Κάθε αντίδραση περιλάμβανε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού pH 5.5 50 mM και υπόστρωμα σε συγκέντρωση 50 mg/mL σε τελικό όγκο αντίδρασης τα 700 μ L. Τα δείγματα εισήχθησαν σε θερμαινόμενο επωαστήριο για 24 ώρες σε θερμοκρασία 45°C και υπό ανάδευση στα 950 rpm. Έπειτα, ακολούθησε βρασμός προς απενεργοποίηση των ενζύμων και φυγοκέντρηση προς συλλογή του υπερκείμενου υγρού. Για κάθε δείγμα υλοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις. Η απελευθέρωση οξικού οξέος μετρήθηκε με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2. ενώ η ποσοτικοποίηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ανιονεναλλαγής HPAEC, όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3.

*3.2.8.8. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της *TiXyn30A* ξυλανάσης με εστεράσες του οξικού οξέος σε ακετυλιωμένη ξυλάνη*

Η συνεργιστική δράση της εστεράσης του οξικού οξέος *TiCE16* με την ξυλανάση της οικογένειας *GH30*, *TiXyn30A*, μελετήθηκε σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης και πραγματοποιήθηκε σύγκριση με τον συνεργιστικό που παρουσιάζει η ξυλανάση με τις εστεράσες *CiCE2* και *OCE6*. Οι αντιδράσεις περιλάμβαναν ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος pH 5 50 mM, υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης με συγκέντρωση 0.5% w/v, ενώ οι τελικές συγκεντρώσεις των ενζύμων ήταν 0.02 mg/mL για την ξυλανάση και 0.04 mg/mL για κάθε εστεράση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ρυθμίστηκε στα 500 μ L. Για κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις, καθώς επίσης παρασκευάστηκαν και τυφλά δείγματα στα οποία δεν υπήρξε η προσθήκη εστεράσης. Τα δείγματα εισήχθησαν εντός θερμαινόμενου επωαστήρα στους 45°C, και υπό ανάδευση 950 rpm για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων, ακολούθησε βρασμός για 5 λεπτά προς απενεργοποίηση των ενζύμων και φυγοκέντρηση για διαχωρισμό από τυχόν καθιζήσεις. Η μέτρηση της απελευθέρωσης των σακχάρων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ανιονεναλλαγής υψηλής απόδοσης HPAEC όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3.

*3.2.8.9. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της *TiXyn30A* ξυλανάσης με εστεράσες του οξικού οξέος σε υπόστρωμα ΠΞΟ*

Η συνεργιστική δράση της εστεράσης του οξικού οξέος *TiCE16* με την ξυλανάση *TiXyn30A* μελετήθηκε κατά την υδρόλυση φυσικού υποστρώματος ΠΞΟ. Για λόγους σύγκρισης μελετήθηκε και η συνεργιστική δράση της ξυλανάσης και με τις εστεράσες *CiCE2* και *OCE6*. Οι αντιδράσεις περιλάμβαναν ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος pH 5 50 mM, υπόστρωμα ΠΞΟ συγκέντρωσης 35 mg/mL, ενώ οι τελικές συγκεντρώσεις των ενζύμων ήταν 0.035 mg/mL για την ξυλανάση και 0.07 mg/mL για κάθε εστεράση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ορίστηκε στα 700 μ L. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις. Παρασκευάστηκαν, επίσης και τυφλές αντιδράσεις, χωρίς την προσθήκη εστεράσης. Τα δείγματα εισήχθησαν εντός θερμαινόμενου επωαστήρα Eppendorf Thermomixer Comfort στους 45°C, και υπό ανάδευση 950 rpm για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων, ακολούθησε

βρασμός για 5 λεπτά προς απενεργοποίηση των ενζύμων, καθώς και φυγοκέντρωση για τη συλλογή του υπερκείμενου υγρού. Η μέτρηση της απελευθέρωσης των σακχάρων και του οξικού οξέος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ανιοεναλλαγής υψηλής απόδοσης ΗΡΑΕC, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3.

3.2.9. Επίδραση της δράσης της α-γλυκουρονιδάσης E-AGUBS στα προϊόντα υδρόλυσης της *TtXyn30A* σε υπόστρωμα ΠΞΟ

Η ξυλανάση *TtXyn30A* είναι γνωστό ότι απελευθερώνει ουρονικούς ολιγοσακχαρίτες μέσω της ένδο-δράσης της, καταλήγοντας σε τελικά προϊόντα *O-UX* και *O-XUX* (Katsimpouras et al., 2019). Ωστόσο δεν έχει διερευνηθεί εάν οι ολιγοσακχαρίτες αυτοί φέρουν επίσης ακετυλίωση στη θέση 3 της ξυλόζης που έχει δεσμό με το ουρονικό οξύ. Η συγκεκριμένη δομή παρεμποδίζει τη δράση της α-γλυκουρονιδάσης. Σκοπός του πειράματος είναι να εξεταστεί αν η προσθήκη της γλυκουρονιδάσης υδρολύει τα όξινα προϊόντα της *TtXyn30A*. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η υδρόλυση του υποστρώματος από την ξυλανάση. Η διεξαγωγή των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος pH 5 30mM με υπόστρωμα ΠΞΟ 50 mg/mL και την ξυλανάση *TtXyn30A* σε συγκέντρωση 0.07 mg/mL, σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL. Για κάθε δείγμα υλοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις για μεγαλύτερη ακρίβεια. Τα δείγματα εισήχθησαν εντός θερμαινόμενου επωαστήρα στους 45°C, και υπό ανάδευση 950 rpm για 24 ώρες. Έπειτα ακολούθησε βρασμός 5 λεπτών για τη απενεργοποίηση της ξυλανάσης και φυγοκέντρωση. Στη συνέχεια, ελήφθη από κάθε δείγμα το υπερκείμενο υγρό και σε αυτό προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα α-γλυκορονιδάσης με τελική συγκέντρωση 0.2 mg/mL και ρυθμίστηκε το pH σε τιμή 6 με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού/φωσφορικού 75 mM. Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 600 μL. Τα νέα δείγματα εισήχθησαν εντός θερμαινόμενου επωαστήρα στους 40°C, και υπό ανάδευση 950 rpm για 24 ώρες, ενώ ακολούθησε εκ νέου βρασμός προς απενεργοποίηση της α-γλυκουρονιδάσης. Για κάθε δείγμα υλοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις. Η ποσοτικοποίηση της απελευθέρωσης των ολιγοσακχαριτών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο χρωματογραφίας ΗΡΑΕC, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* και συνεργιτισμοί

4.1.1. Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας σε υπόστρωμα αραβινάνης
Η μέτρηση ειδικής ενεργότητας της *TtAbf43* πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα αραβινάνης. Το ποσοστό υδρόλυσης της αραβινάνης, καθώς και η τιμή των μετρήσεων ενεργότητας που είχε το ένζυμο στο υπό μελέτη υπόστρωμα παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Για λόγους σύγκρισης παρατίθενται επίσης τα ποσοστά υδρόλυσης και οι τιμές ενεργότητας του ενζύμου και σε άλλα υποστρώματα αραβινοξυλάνης (αραβινοξυλάνη σιταριού και αραβινοξυλάνη σίκαλης) όπως προέκυψαν από την Παγούρτζη, 2021.

Πίνακας 3: Ποσοστά υδρόλυσης της αραβινάνης και μετρήσεις ενεργότητας σε διάφορα υποστρώματα.

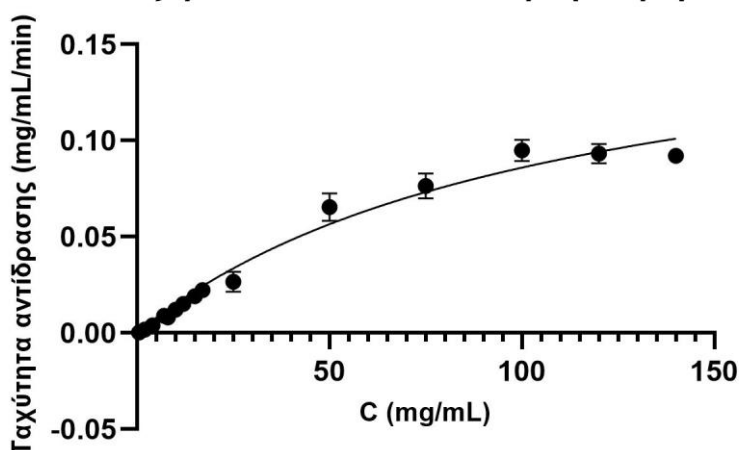
Υπόστρωμα	Ποσοστό υδρόλυσης της αραβινάνης	Units/mg ενζύμου
Αραβινάνη	12%	21 ± 2
Αραβινοξυλάνη σιταριού (WA)	55%	94 ± 2
Αραβινοξυλάνη σίκαλης (RA)	26%	87 ± 5
Αδιάλυτη αραβινοξυλάνη σιταριού	17%	34 ± 1

Όπως παρατηρείται από τον παραπάνω πίνακα, το ποσοστό υδρόλυσης της αραβινάνης προς αραβινόζη είναι μετρήσιμο αλλά χαμηλό (12%). Σύμφωνα με την Παγούρτζη, 2021, η αραβινοφουρανοζιδάση *TtGH43* παρουσιάζει υψηλότερα ποσοστά υδρόλυσης σε υποστρώματα αραβινοξυλάνης σιταριού, αραβινοξυλάνης σίκαλης και σε υπόστρωμα αδιάλυτης αραβινοξυλάνης σιταριού, της τάξεως του 55%, 26% και 17% αντίστοιχα. Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και όσον αφορά τις μετρήσεις ενεργότητας σε units/ mg ενζύμου, όπου αν και το ένζυμο εμφανίζει ενεργότητα στην αραβινάνη (21±2 Units/ mg), εντούτοις αυτή είναι χαμηλότερη σε σχέση με τους υπόλοιπους πολυσακχαρίτες.

4.1.2. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων σε υπόστρωμα αραβινάνης και π-νιτροφαίνυλ-αραβινοφουρανόζης (pNP-Araf)

Ακολούθησε η κινητική μελέτη της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* σε πολυμερικό υπόστρωμα αραβινάνης και στο τεχνητό υπόστρωμα p-nitrophenyl-alpha-l-arabinofuranoside (pNP-Araf) και προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι Michaelis-Menten. Η προσαρμογή στο μοντέλο Michaelis-Menten πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος GraphPad Prism 8 (διάγραμμα 1, πίνακας 4).

Προσαρμογή Κινητικής Michaelis-Menten για τη δράση του ενζύμου *TtAbf43* σε υπόστρωμα αραβινάνης



Διάγραμμα 1: Κινητική μελέτη της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* σε υπόστρωμα αραβινάνης με βάση το μοντέλο Michaelis-Menten.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 1, παρατηρείται ότι το σύστημα πιάνει πλατό, αποκτά δηλαδή μια σταθερή ταχύτητα αυξανόμενης της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι σε χαμηλές τιμές συγκέντρωσης υποστρώματος, η ταχύτητα της αντίδρασης είναι πρώτης τάξης, δηλαδή ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Αντίθετα, σε υψηλές τιμές συγκέντρωσης υποστρώματος, το ένζυμο έχει κορεσθεί από το υπόστρωμα και η ταχύτητα έχει αποκτήσει τη μέγιστη τιμή της V_{max} . Κατά συνέπεια, η ταχύτητα της αντίδρασης είναι μηδενικής τάξης.

Πίνακας 4: Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Michaelis-Menten για το ένζυμο *TtGH43* σε υπόστρωμα αραβινάνης.

Μέγεθος	Βέλτιστη τιμή
V_{max}	0.18 ± 0.01 mg/ml/min
K_M	109 ± 13 mg/ml
Βαθμοί ελευθερίας	58
R^2	0.974

Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Michaelis-Menten, δηλαδή η σταθερά Michaelis-Menten, K_M και η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης, V_{max} , βρέθηκαν για την αραβινάνη 109 ± 13 mg/mL και 0.18 ± 0.01 mg/mL/min αντίστοιχα. Εφόσον η τιμή της K_M είναι ένα μέτρο συνάφειας του υποστρώματος με το ένζυμο σημειώνεται πως η K_M για την *TtAbf43* θεωρείται υψηλή, αποκαλύπτοντας χαμηλή συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος. Όσο μικρότερη είναι η τιμή της K_M τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος και τόσο μικρότερη συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται ούτως ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης να φτάσει τη μέγιστη ταχύτητα. Κριτήριο εγκυρότητας και αξιοπιστίας του μοντέλου αποτελεί ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 , ο οποίος βρέθηκε 0.974 και κατά συνέπεια, το μοντέλο θεωρείται αξιόπιστο.

Όσον αφορά το υπόστρωμα pNPAraf, δεν επετεύχθη ο σχηματισμός πλατό στο γράφημα της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος με αποτέλεσμα το μοντέλο που προέκυψε να μην προσομοιάζει αυτό των Michaelis-Menten. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του το υπόστρωμα αυτοϋδρολύεται και έτσι δεν ήταν εφικτό να εξεταστούν υψηλότερες συγκεντρώσεις.

4.1.3. Τρόπος δράσης της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* και συνεργιτισμοί με τις εμπορικές αραβινοφουρανοζιδάσες E-AFASE και E-AFAM2

Ο προσδιορισμός του μηχανισμού δράσης του ενζύμου *TtAbf43* πραγματοποιήθηκε σε υποστρώματα αραβιλοξυλάνης WA και RA. Για λόγους σύγκρισης, η υδρόλυση των υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε παράλληλα από εμπορικές αραβινοφουρανοζιδάσες γνωστής ενεργότητας ((E-AFAM2 και E-AFASE) ενώ εξετάστηκε και το ενδεχόμενο συνδυασμένης δράσης της *TtAbf43* με εκάστη εμπορική αραβινοφουρανοζιδάση (πίνακες 5 και 6).

Πίνακας 5: Ποσοστά υδρόλυσης και βαθμοί συνεργιτισμού της *TtAbf43* και των εμπορικών ενζύμων E-AFAM2 και E-AFASE σε υπόστρωμα RA.

Αραβινοξυλάνη σίκαλης (RA)		
Δείγμα	% υδρόλυση αραβινοξυλάνης	Βαθμός συνεργιτισμού (DS)
Τυφλό	0	
<i>TtAbf43</i>	16.4 ± 0.2	
EAFAM2	11.9 ± 0.2	
EAFASE	33.2 ± 1.6	
<i>TtAbf43</i> -EAFAM2	15.9 ± 1.7	
<i>TtAbf43</i> -EAFASE	64.7 ± 0.6	1.30 ± 0.04
EAFASE-EAFAM2	53.3 ± 7.6	1.18 ± 0.17

Πίνακας 6: Ποσοστά υδρόλυσης και βαθμοί συνεργιτισμού της *TtAbf43* και των εμπορικών ενζύμων E-AFAM2 και E-AFASE σε υπόστρωμα WA.

Αραβινοξυλάνη σιταριού (WA)		
Δείγμα	% υδρόλυση αραβινοξυλάνης	Βαθμός συνεργιτισμού (DS)
Τυφλό	0	
<i>TtAbf43</i>	26.7 ± 0.3	
EAFAM2	21.1 ± 1.0	
EAFASE	19.6 ± 1.2	
<i>TtAbf43</i> -EAFAM2	26.7 ± 1.1	
<i>TtAbf43</i> -EAFASE	65.9 ± 0.9	1.42 ± 0.04
EAFASE-EAFAM2	64.2 ± 2.6	1.57 ± 0.09

Από τα πειραματικά αποτελέσματα προκύπτει ότι ο συνδυασμός της *TtAbf43* με την εμπορική αραβινοφουρανοζιδάση E-AFAM2 έχει ως αποτέλεσμα χαμηλά ποσοστά υδρόλυσης (26.7 ± 1.1 για την WA και 15.9 ± 1.7 για την RA) που δεν διαφέρουν ουσιαστικά από τα δείγματα στα οποία έδρασε μόνη της η *TtAbf43* (26.7 ± 0.3 για την WA και 16.4 ± 0.2 για την RA). Ως εκ τούτου τα δύο ένζυμα, GH43 και E-AFAM2, φαίνεται να δρουν με τον ίδιο τρόπο. Είναι γνωστό ότι η E-AFAM2 υδρολύει την α-1,3- αραβινοφουρανόζη από διπλά υποκατεστημένες ξυλόζες του πολυμερούς.^[1] Συνεπώς, η εξειδίκευση της *TtGH43* αναμένεται να είναι η ίδια. Την θέση αυτή ενισχύουν οι παρατηρήσεις από τον συνδυασμό της *TtGH43* με την εμπορική αραβινοφουρανοζιδάση E-AFASE. Συγκεκριμένα η συνδυασμένη δράση των ενζύμων αυξάνει σημαντικά το ποσοστό υδρόλυσης του πολυμερούς και στα δύο υποστρώματα (65.9 ± 0.9 για την WA και 64.7 ± 0.6 για την RA) σε σύγκριση από τα δείγματα στα οποία έδρασε μόνη η *TtAbf43* (26.7 ± 0.3 για την WA και 16.4 ± 0.2 για την RA). Μάλιστα ο βαθμός συνεργιτισμού (DS) που επιτυγχάνεται με το συνδυασμό των δύο αραβινοφουρανοζιδασών κυμαίνεται σε 1.42 ± 0.04 για την WA και 1.30 ± 0.04 για την RA. Η εμπορική αραβινοφουρανοζιδάση E-AFASE, όπως είναι γνωστό, υδρολύει τις μονές α-1,2- και α-1,3- υποκαταστάσεις αραβινοφουρανόζης από αραβινοξυλάνες κι από αραβινάνες^[11]. Επομένως, η υπό μελέτη αραβινοφουρανοζιδάση *TtAbf43* φαίνεται να έχει συμπληρωματική δράση σε αυτή της E-AFASE. Τέλος, αναφορικά με τις αντιδράσεις όπου πραγματοποιείται ταυτόχρονη δράση των δύο εμπορικών ενζύμων, σημειώνεται παραπλήσιο ποσοστό υδρόλυσης των υποστρωμάτων (64.2 ± 2.6 για την WA και 53.3 ± 7.62 για την RA) με τον συνδυασμό *TtGH43*-EAFASE, το οποίο συνάδει με την υπόθεσή μας για τον τρόπο δράσης της *TtAbf43*. Οι βαθμοί συνεργιτισμού σε αυτές τις περιπτώσεις κυμαίνονται σε 1.57 ± 0.09 για WA και 1.18 ± 0.17 για RA.

4.2. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της εστεράσης του οξικού οξέος *TtCE16* και συνεργιτισμοί

4.2.1. Μελέτη της εξειδίκευσης της *TtCE16* ως προς διαφορετικά υποστρώματα

Από τις αντιδράσεις της εστεράσης *TtCE16* με τα διαφορετικά τεχνητά υποστρώματα που εξετάστηκαν (p-NP Acetate, o-NP Acetate, p-NP Butyrate και p-NP Palmitate) προσδιορίστηκε η ενεργότητά της σε αυτά.

Πίνακας 7: Τιμές ενεργότητας της εστεράσης *TtCE16* στα διαφορετικά υποστρώματα που εξετάστηκαν.

Υπόστρωμα	Ενεργότητα ενζύμου (Units/mg enz)
p-NP Acetate	587 ± 35
o-NP Acetate	107 ± 7
p-NP Butyrate	2.6 ± 0.6
p-NP Palmitate	11.0 ± 2.3

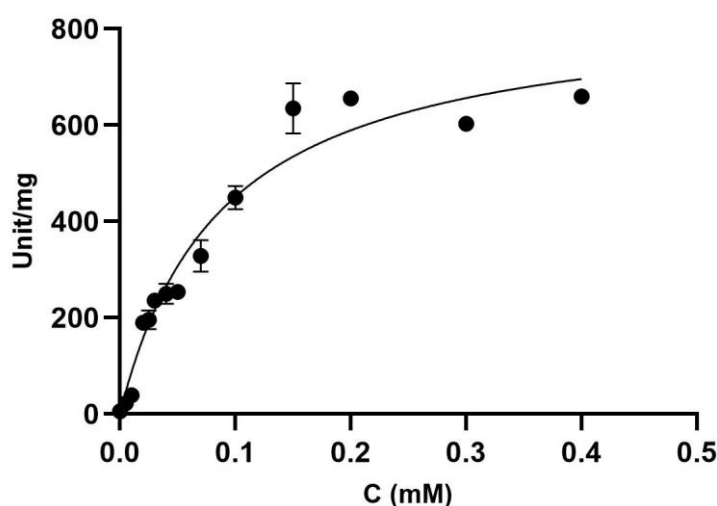
Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 7, υποδεικνύουν ενεργότητα του ενζύμου σε όλα τα εξεταζόμενα υποστρώματα. Η χαμηλότερη ενεργότητα εντοπίστηκε στο p-NP Butyrate (2.6 ± 0.6 U/mg). Εξαιρετικά υψηλή βρέθηκε η ενεργότητα του

ενζύμου στο υπόστρωμα υπόστρωμα p-NP Acetate (587 ± 35 U/mg), το οποίο χρησιμοποιήθηκε και ως υπόστρωμα για το βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου και αποτελεί χαρακτηριστικό υπόστρωμα για τις εστεράσες. Ιδιαίτερα υψηλή παρουσιάζεται και η τιμή της ενεργότητας του ενζύμου σε υπόστρωμα o-NP Acetate (107 ± 7 U/mg), ενώ αρκετά χαμηλότερη, αλλά αξιοσημείωτη, φαίνεται να είναι η ενεργότητα του ενζύμου στο υπόστρωμα p-NP Palmitate (11.0 ± 2.3 U/mg), το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό υπόστρωμα για τις λιπάσες.

4.2.2. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten σε υπόστρωμα p-NP Acetate

Η προσαρμογή των δεδομένων των αντιδράσεων στην εξίσωση Michaelis-Menten και ο υπολογισμός των κινητικών σταθερών έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 της GraphPad Software (διάγραμμα 2, πίνακας 8).

Προσαρμογή κινητικής Michaelis-Menten για τη δράση του ενζύμου TtCE16 στο υπόστρωμα pNP-Acetate



Διάγραμμα 2: Προσαρμογή των αποτελεσμάτων της μελέτης της κινητικής της TtCE16 σε pNP Acetate στην εξίσωση Michaelis-Menten. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συγκέντρωση υποστρώματος συναρτήσει της ενεργότητας του ενζύμου έτσι όπως προέκυψε από την προσαρμογή τους στο μοντέλο.

Πίνακας 8: Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Michaelis-Menten όπως προκύπτουν από τη μελέτη της δράσης της εστεράσης TtCE16 στο υπόστρωμα pNP Acetate.

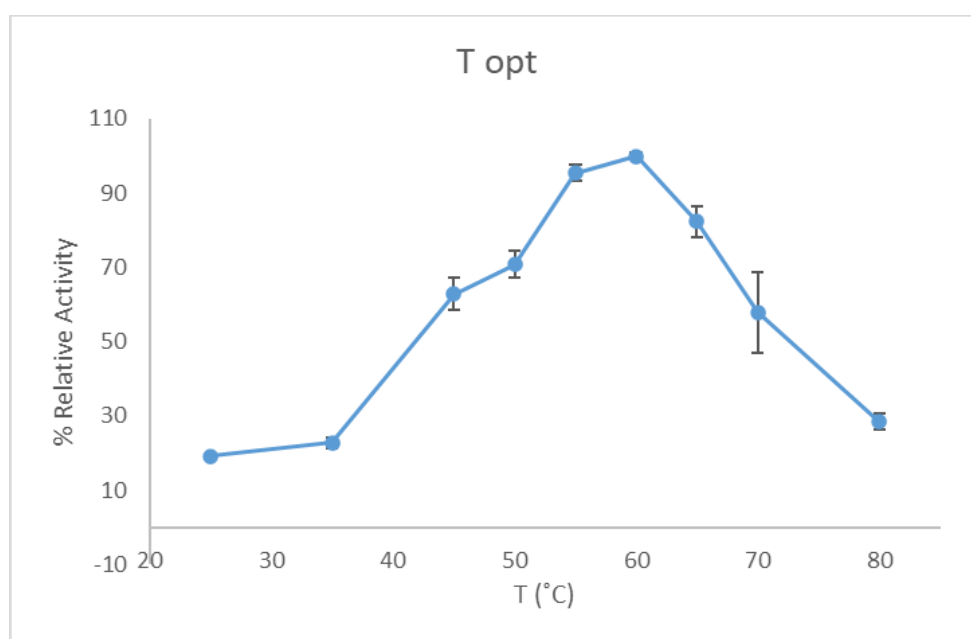
Μέγεθος	Βέλτιστη τιμή
V_{max}	849 ± 31 Unit/mg
K_M	0.09 ± 0.01 mM
Βαθμοί ελευθερίας	54
R^2	0.956

Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Michaelis-Menten, δηλαδή η σταθερά K_M και η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης, V_{max} , βρέθηκαν για το p-NP Acetate 0.09 ± 0.01

mM και 849.7 ± 31.95 Unit/mg αντίστοιχα. Η τιμή της σταθεράς Michaelis-Menten K_m της TtCE16 θεωρείται πολύ χαμηλή, γεγονός που υποδηλώνει πολύ υψηλή συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος. Κριτήριο εγκυρότητας και αξιοπιστίας του μοντέλου αποτελεί ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 , ο οποίος βρέθηκε 95.6% και κατά συνέπεια, το μοντέλο θεωρείται αξιόπιστο.

4.2.3. Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της TtCE16, προσδιορίστηκε η ενεργότητα της εστεράσης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.5. του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι (διάγραμμα 3).

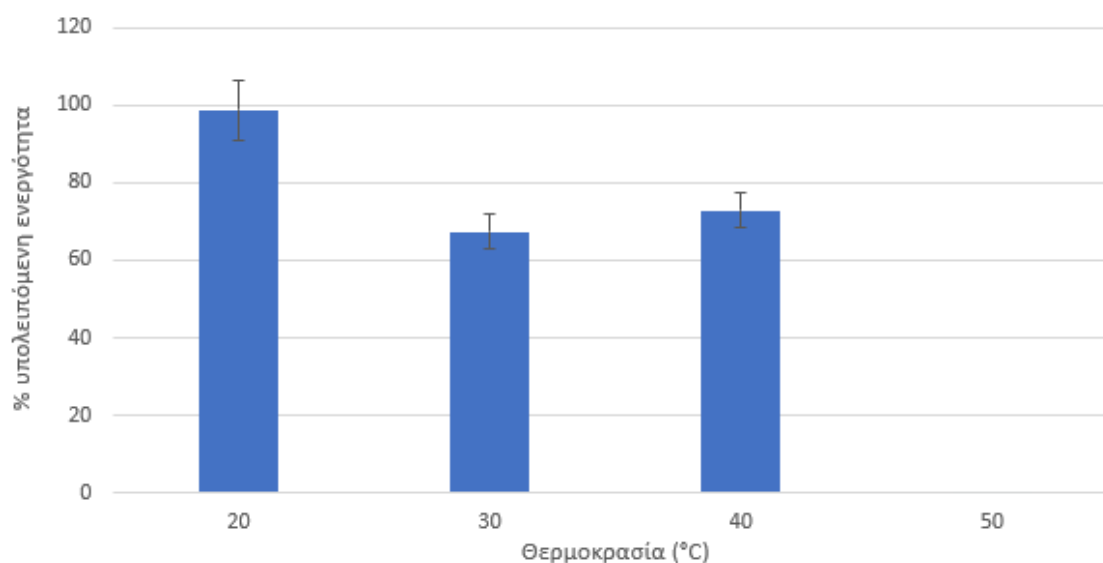


Διάγραμμα 3: Μεταβολή της ενεργότητας της εστεράσης TtCE16 βάσει των διαφορετικών θερμοκρασιών που εξετάστηκαν. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι ποσοστιαίες τιμές ενεργότητας του ενζύμου που προσδιορίστηκαν, θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα της εστεράσης στη θερμοκρασία με τη μέγιστη ενεργότητα.

Το ένζυμο παρουσιάζει τη μέγιστη ενεργότητα στους 60°C (διάγραμμα 3). Στις θερμοκρασίες 25°C, 35°C και 80°C φαίνεται να χάνει περισσότερο από το 50% της ενεργότητάς του. Αντίθετα στο εύρος 45-65 °C η εστεράση διατηρεί πάνω από το 50% της ενεργότητάς της. Ύστερα από το σημείο αυτό, η ενεργότητα φαίνεται να πέφτει κατακόρυφα, αφού στους 70°C το ένζυμο διατηρεί μόνο το 57% αυτής. Κατά συνέπεια, είναι φανερό ότι το ένζυμο λειτουργεί καλά σε ένα εύρος θερμοκρασιών 45-70 °C εκτός του οποίου, φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά η ενεργότητά του.

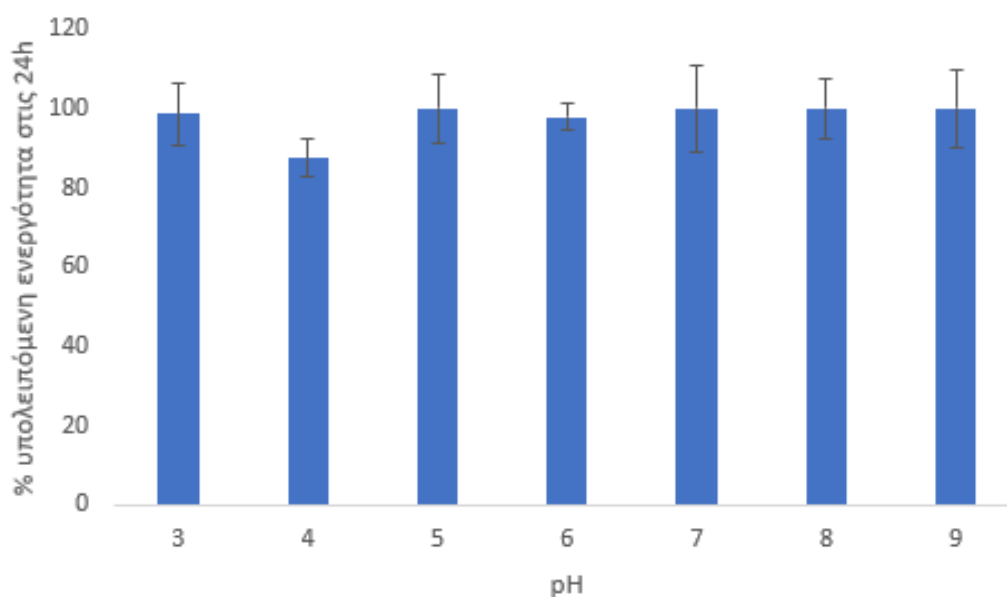
4.2.4. Μελέτη σταθερότητας σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και pH

Η μελέτη θερμοκρασιακής σταθερότητας της εστεράσης TtCE16 παρουσιάζει μεγαλύτερη αντοχή σε ήπιες θερμοκρασίες ενώ χάνει ενεργότητα σε υψηλότερες. Πιο συγκεκριμένα, η επώαση 24 ωρών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C) δεν έχει ιδιαίτερη επίδραση στη σταθερότητα του ενζύμου (διάγραμμα 4). Με επώαση σε υψηλότερες θερμοκρασίες το ένζυμο εμφανίζει χαμηλότερη λειτουργική σταθερότητα, καθώς σε θερμοκρασίες 30 και 40°C, παρατηρείται υπολειπόμενη ενεργότητα της τάξεως του 65%. Αντίθετα, σε υψηλότερες θερμοκρασίες, όπως 50, 60 και 70°C, φαίνεται ότι το ένζυμο έχει αδρανοποιηθεί πλήρως και η ενεργότητά του είναι μηδενική. Αξίζει να αναφερθεί, ότι τις πρώτες 4 ώρες επώασης, η εστεράση στους 20 και 30 °C διατηρεί το 100% της ενεργότητάς της, ενώ στους 40 °C το αντίστοιχο ποσοστό υποχωρεί στους 67 %.



Διάγραμμα 4: Επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική ενεργότητα της TtCE16. Η μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκε κατόπιν επώασης του ενζύμου μετά από επώαση 24 ωρών στην εκάστη θερμοκρασία.

Κατά τη μελέτη της λειτουργικής σταθερότητας την εστεράσης TtCE16 σε περιβάλλοντα με διαφορετικές συνθήκες pH, γίνεται εμφανές πως το ένζυμο διατηρεί την ενεργότητά του σε ένα μεγάλο εύρος pH. Πιο συγκεκριμένα, τόσο σε όξινα όσο και σε ουδέτερα και αλκαλικά περιβάλλοντα, σε ένα εύρος pH 3-9 η εστεράση φαίνεται να διατηρεί στο ακέραιο την ενεργότητά της μετά από 24 h επώαση, επιδεικνύοντας σημαντική λειτουργική σταθερότητα (διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5: Επίδραση του pH στη σχετική ενεργότητα της TtCE16 μετά από επώαση 24 ωρών.

4.2.5. Μηχανισμός δράσης της εστεράσης του οξικού οξέος TtCE16 και συνεργισμοί με τις εστεράσες CtCE2 και OCE6 και τις GH10 και GH11 ξυλανάσες σε ακετυλιωμένη ξυλάνη

Η μελέτη του μηχανισμού δράσης της TtCE16 πραγματοποιήθηκε σε ακετυλιωμένη ξυλάνη, προκατεργασμένη με χρήση ξυλανάσων των οικογενειών GH10 και GH11. Για λόγους σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν οι εστεράσες CtCE2 και OCE6.

Πίνακας 9: Επί τοις εκατό απελευθέρωση οξικού οξέος κατά την δράση των εστερασών σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης, η οποία είχε υποστεί προκατεργασία με ξυλανάσες της οικογένειας GH10 (A) και GH11 (B).

	A	B
Δείγμα	% απελευθέρωση οξικού οξέος	% απελευθέρωση οξικού οξέος
Τυφλό Δείγμα	0	19 ± 1
TtCE16	68 ± 2	39 ± 2
CtCE2	44 ± 3	32 ± 1
TtCE16-CtCE2	72 ± 2	46 ± 6
TtCE16 (1 ^η)-CtCE2(2 ^η)	83 ± 5	54 ± 3
CtCE2(1 ^η)-TtCE16(2 ^η)	76 ± 7	55 ± 1
OCE6	80 ± 4	73 ± 5
TtCE16-OCE6	107 ± 4	83 ± 6
TtCE16(1 ^η)-OCE6(2 ^η)	119 ± 5	89 ± 2
OCE6(1 ^η)-TtCE16(2 ^η)	116 ± 7	95 ± 7

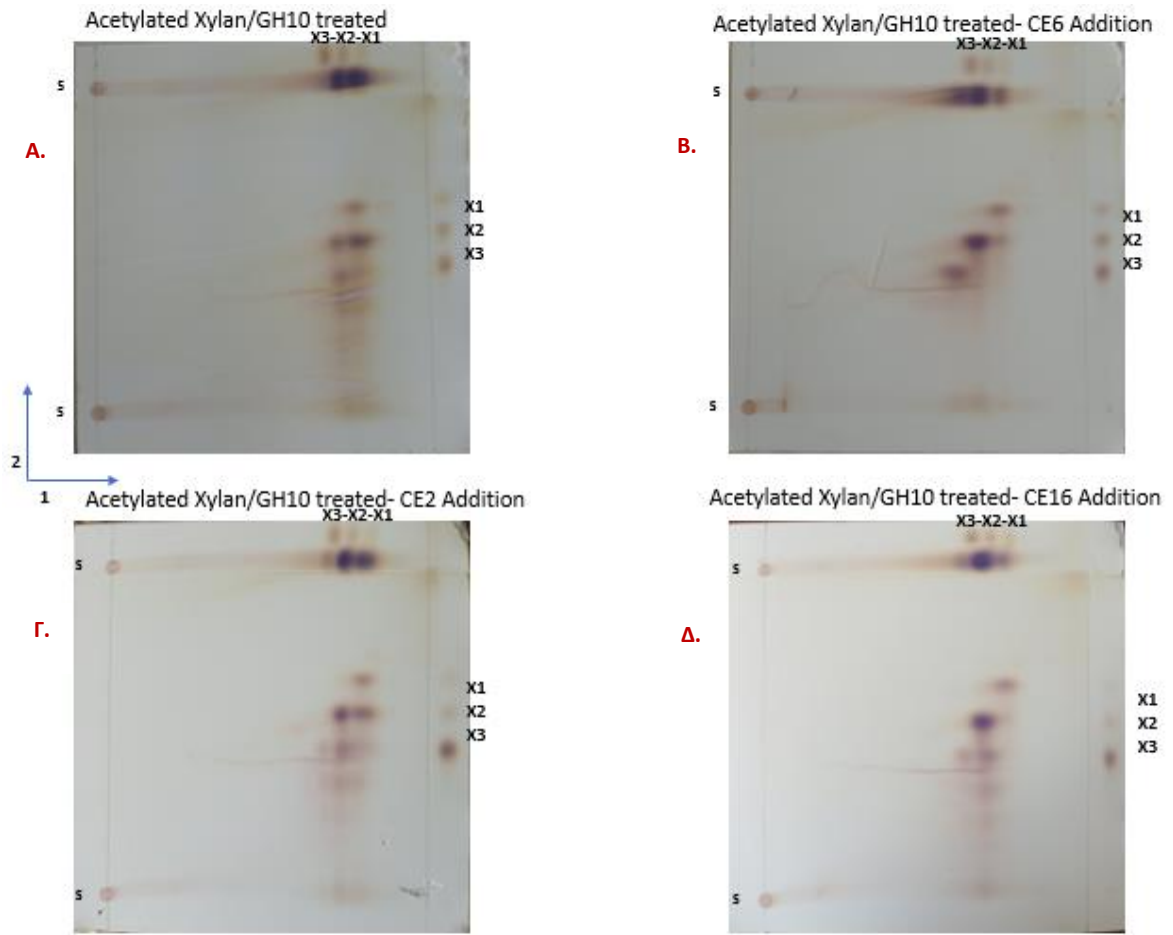
Η μεγαλύτερη απελευθέρωση οξικού επιτυγχάνεται στα δείγματα με την εστεράση OCE6 (πίνακας 9). Πιο συγκεκριμένα, σημειώνεται σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό απελευθέρωσης (80±4% και 73±5% σε υπόστρωμα κατεργασμένο από την ξυλάνη GH10 και GH11 αντίστοιχα) σε σχέση με τα δείγματα με την εστεράση TtCE16

($68\pm 2\%$ και $39\pm 2\%$ σε GH10 και GH11 αντίστοιχα) και ιδίως με την εστεράση *CtCE2* ($44\pm 3\%$ και $32\pm 1\%$ αντίστοιχα). Μια υπόθεση που εξηγεί το εύρημα αυτό είναι ότι πιθανώς ευθύνεται η αδυναμία της εστεράσης *CtCE2* να δρα σε διπλές υποκαταστάσεις οξικού και η αδυναμία της μελετώμενης εστεράσης *TtCE16* να λειτουργεί σε πολυμερικά υποστρώματα. Αντίθετα, η *OCE6* δρα τόσο σε μονές όσο και σε διπλές υποκαταστάσεις σε ολιγομερή και σε μακρομόρια (Neumüller et al., 2015). Ενδεχομένως γι' αυτό δεν μπορούν να προσεγγίσουν ποσοστό 100%. Ακόμα, τα υψηλότερα ποσοστά απελευθέρωσης οξικού όσον αφορά τα ένζυμα *CtCE2* και *TtCE16* που εντοπίζονται στα δείγματα της στήλης (A), συγκριτικά με αυτά της στήλης (B) (πίνακας 9) ενδεχομένως να αιτιολογούνται από το γεγονός ότι η GH10 είναι ικανή να δημιουργήσει άκρα με ακετυλίωση στη θέση 4 της ξυλοπυρανόζης του μη αναγωγικού άκρου, εν αντιθέσει με τη GH11. Ως γνωστόν, η *CtCE2* έχει δράση στη συγκεκριμένη θέση ακετυλίωσης και για τον λόγο αυτό εικάζεται και για την *TtCE16* ότι διατηρεί την ίδια εξειδίκευση. Ωστόσο, τα μεγαλύτερα ποσοστά αποακετυλίωσης συγκριτικά με την *CtCE2* υποδεικνύουν ότι η *TtCE16* στοχεύει και σε άλλες θέσεις ακετυλίωσης. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα αποτελέσματα της συνδυασμένης δράσης της εστεράσης *TtCE16* και της *CtCE2*, όπου σημειώνεται ελαφρώς μεγαλύτερη απελευθέρωση οξικού οξέος τόσο με την ταυτόχρονη προσθήκη των δύο ενζύμων ($72\pm 2\%$ και $46\pm 6\%$ στα A και B αντίστοιχα) όσο και με τη διαδοχική (83 ± 5 και 54 ± 3 στα A και B αντίστοιχα). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει βρεθεί ότι ο τρόπος δράσης των CE2 και CE16 σε υπολείμματα ξυλοπυρανοσουλίου είναι συμπληρωματικός των ακετυλ-εστερασών για την πλήρη απομάκρυνση των ακετυλομάδων κατά τη διάρκεια της βιοαποικοδόμησης της ημικυτταρίνης (Torakas et al., 2010). Επίσης, από το ίδιο άρθρο, είναι γνωστό ότι η CE-2 προτιμάει την αποακετυλίωση στις θέσεις 4 και 3 σε σχέση με τη θέση 2 και ότι δεν έχει δράση σε διπλές υποκαταστάσεις, κάτι που φαίνεται να ισχύει και με την *TtCE16*.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα για τη συνδυασμένη δράση των ενζύμων *OCE6* και *TtCE16*, παρατηρείται ότι, συμπεριλαμβανομένου και του τυφλού δείγματος, τόσο στην περίπτωση της διαδοχικής προσθήκης όσο και της ταυτόχρονης επιτυγχάνεται πλήρης αποακετυλίωση και για τις δύο προκατεργασίες υποστρωμάτων (πίνακας 9, υποδεικνύοντας συμπληρωματική δράση μεταξύ των ενζύμων. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι οι εστεράσες CE-6 και CE-16 έχουν συμπληρωματική δράση, με τη CE-6 να δρα κατά προτίμηση σε διπλή ακετυλίωση στις θέσεις 2 και 3 (Uhlirikoná et al., 2013).

4.2.6. Τρόπος δράσης και συνεργισμοί με τις εστεράσες *CtCE2* και *OCE6* και τις GH10 και GH11 ξυλανάσες σε ακετυλιωμένη ξυλάνη με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC)

Η μελέτη του προφίλ των προϊόντων της κάθε εστεράσης σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης που έχει κατεργαστεί από την ξυλανάση E-XYLATM πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας δύο διαστάσεων (2-D TLC).

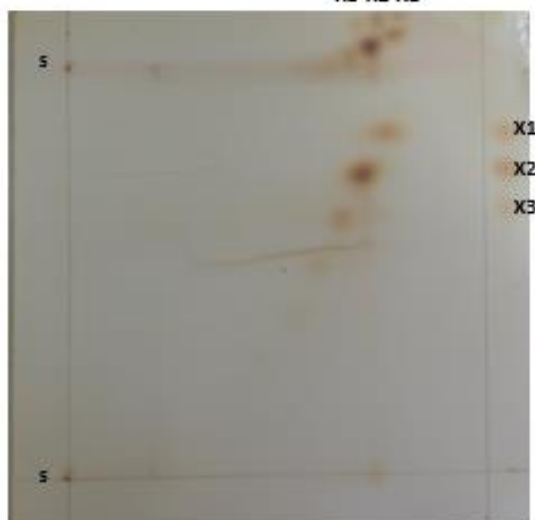


Εικόνα 29: TLC δύο διαστάσεων τυφλού δείγματος και των εξεταζόμενων εστερασών (CtCE2, OCE6, TtCE16) σε ακετυλιωμένη ξυλάνη που έχει κατεργαστεί με την ξυλανάση GH10. Στην εικόνα 29 Α. παρουσιάζεται η κατεργασμένη με την E-XYLATM ακετυλιωμένη ξυλάνη, στην εικόνα 29 Β. παρουσιάζεται η κατεργασμένη με την E-XYLATM ακετυλιωμένη ξυλάνη παρουσία της εστεράσης OCE6, στην εικόνα 29 Γ. παρουσιάζεται η κατεργασμένη με την E-XYLATM ακετυλιωμένη ξυλάνη παρουσία της εστεράσης CtCE2 και στην εικόνα 29 Δ. παρουσιάζεται η κατεργασμένη με την E-XYLATM ακετυλιωμένη ξυλάνη παρουσία της εστεράσης TtCE16.

Οι ολιγοσακχαρίτες που εμφανίζονται στο προκατεργασμένο υπόστρωμα περιλαμβάνουν ως επί το πλείστον ξυλόζη, ξυλοβιόζη, ακετυλιωμένη ξυλοβιόζη, ακετυλιωμένη ξυλοτριόζη και ακετυλιωμένους ολιγοσακχαρίτες μεγαλύτερου βαθμού πολυμερισμού (εικόνα 29 Α). Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τη βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία οι ξυλανάσες των οικογενειών GH10 χρειάζονται δύο διαδοχικές μη υποκατεστημένες ξυλοπυρανόζες ενώ δύναται να δημιουργήσουν μη αναγωγικά άκρα με ακετυλίωση. Κατόπιν επώασης με την εστεράση OCE6 το σύνολο των προϊόντων που παραμένουν στο υδρόλυμα φαίνεται να είναι μη υποκατεστημένες ξυλόζη, ξυλοβιόζη και ξυλοτριόζη, με εξαίρεση μόνο μια επιμένουσα ποσότητα ακετυλιωμένη ξυλοβιόζη (εικόνα 29 Β). Ενδεχομένως η ποσότητα αυτή να αντιστοιχεί σε ξυλοβιόζη με O-4 ακετυλίωση στο μη αναγωγικό άκρο. Μετά τη δράση της CtCE2 παραμένουν στο υδρόλυμα πολλά ακετυλιωμένα σάκχαρα (εικόνα 29 Γ). Αντίθετα μετά τη δράση της TtCE16, η ακετυλιωμένη ξυλοβιόζη εξαφανίζεται ενώ τμήμα της

ακυτυλιωμένης ξυλοτριόζης μετατρέπεται στον αντίστοιχο μη υποκατεστημένο ολιγοσακχαρίτη.

Acetylated Xylan/GH10 treated/ CE6 and CE16 addition
X3-X2-X1



Εικόνα 3030: TLC συνεργιστικής δράσης των εστερασών OCE6 και TtCE16 για την αποακετυλίωση της ξυλοβιόζης.

Η διαδοχική προσθήκη των εστερασών, αρχικά της OCE6 και έπειτα της TtCE16, στο υπόστρωμα της ακετυλιωμένης ξυλάνης που έχει επεξεργαστεί με την ξυλανάση GH10, οδηγεί σε πλήρη αποακετυλίωση της ξυλοβιόζης (εικόνα 30). Επομένως, επιβεβαιώνεται η συμπληρωματική δράση των εστερασών CE-6 και CE-16 στο εν λόγω υπόστρωμα.

4.2.7. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της GH10 ξυλανάσης με τις εστεράσες TtCE16 και OCE6 σε υπόστρωμα ΠΞΟ

Η μελέτη της συνεργιστικής δράσης μεταξύ της GH10 ξυλανάσης και των εστερασών OCE6 και TtCE16 σε υπόστρωμα ΠΞΟ, οδήγησε σε ορισμένες ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις.

Πίνακας 10: Απελευθέρωση οξικού οξέος και βαθμός συνεργισμού ως προς το οξικό των εστερασών TtCE16 και TtCE6 και της ξυλανάσης της οικογένειας GH10 σε υπόστρωμα ΠΞΟ.

Απελευθέρωση οξικού οξέος		
Δείγμα	Οξικό οξύ (mM)	Βαθμός συνεργισμού (DS)
OCE6	2.8 ± 0.1	
TtCE16	0.9 ± 0.1	
OCE6-TtCE16	3.1 ± 0.1	0.83 ± 0.04
GH10	0.5 ± 0.2	
GH10 - OCE6	3.6 ± 0.3	1.09 ± 0.00
GH10 - TtCE16	2.7 ± 0.1	2.00 ± 0.00
GH10 - OCE6 - TtCE16	4.9 ± 0.1	1.18 ± 0.07

Από τον παραπάνω πίνακα γίνεται εμφανές στα δείγματα με την παρουσία ενός μόνο ενζύμου, ότι αυτά που περιείχαν την ξυλανάση GH10 απελευθερώνουν σημαντικά λιγότερο οξικό σε σχέση με τα δείγματα που περιείχαν τις εστεράσες, γεγονός που ήταν απόλυτα αναμενόμενο αφού η απελευθέρωση οξικού είναι η κύρια δράση των εστερασών, σε αντίθεση με την GH10 που είναι μια ενδοξυλανάση με τελικά προϊόντα την ξυλόζη και την ξυλοβιόζη. Κατά την μεμονωμένη χρήση των εστερασών, στα δείγματα με την OCE6 σημειώθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση οξικού οξέος (2.8 ± 0.1 mM) συγκριτικά με τα αποτελέσματα που προέκυψαν στα δείγματα με την εστεράση TiCE16 (0.9 ± 0.1 mM), (πίνακας 10). Το αποτέλεσμα αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η CE6 έχει δράση σε πολυμερικά υποστρώματα, όπως είναι το συγκεκριμένο, σε αντίθεση με τη CE16, συνεπώς δύναται να απελευθερώσει μεγαλύτερη ποσότητα οξικού.

Αναφορικά με τα δείγματα στα οποία υπήρχε συνδυασμών ενζύμων, στις αντιδράσεις που περιείχαν το συνδυασμό των εστερασών OCE6-TiCE16 σημειώθηκε ελαφρώς υψηλότερη απελευθέρωση οξικού οξέος (3.1 ± 0.1 mM) συγκριτικά με τις αντιδράσεις που είχαν μόνο την OCE6 (2.8 ± 0.1 mM) και τις αντιδράσεις που είχαν μόνο την TiCE16 (0.9 ± 0.1 mM), εξαιτίας του γεγονότος ότι οι δύο αυτές εστεράσες παρουσιάζουν συμπληρωματική δράση όπως έχει βρεθεί και από τα προηγούμενα πειράματα. Ωστόσο, δεν εμφάνισαν συνεργιστικό (0.83 ± 0.04) πιθανότατα λόγω αλληλοεπικαλυπτόμενης δράσης των δύο ενζύμων, όπως για παράδειγμα τη δράση σε μονές ή και διπλές υποκαταστάσεις οξικού οξέος στο μη αναγωγικό άκρο.

Όσον αφορά τη συνεργιστική δράση της ξυλανάσης και των εστερασών, παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά οξικού οξέος και στα δείγματα με το GH10-OCE6 και με το συνδυασμό GH10-TiCE16. Αυτό συμβαίνει, γιατί πρώτα λειτουργεί η ξυλανάση GH10, απελευθερώνει υδατοδιαλυτούς ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες μεγαλύτερου μοριακού βάρους, κατόπιν δρα η εκάστοτε εστεράση, κόβει τα οξικά και απελευθερώνει θέσεις ώστε να μπορέσει να δράσει εκ νέου η ξυλανάση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι την τελική υδρόλυση των ολιγοσακχαριτών. Η εστεράση TiCE16 είναι πιο επιλεκτική στη δράση της εν συγκρίσει με την OCE6 και χρειάζεται ολιγοσακχαρίτες για να δράσει. Πιθανότατα για το λόγο αυτό παρατηρείται ο υψηλότερος βαθμός συνεργιστισμού ως προς το οξικό οξύ (2.00 ± 0.00), εντούτοις εξακολουθεί να απελευθερώνει λιγότερο υπόστρωμα από τη CE6, η οποία έχει δράσει και πάνω στην ξυλάνη. Ακόμα, στα δείγματα με το συνδυασμό GH10-OCE6 σημειώνεται συνεργιστισμός (1.09 ± 0.00), γιατί η ξυλανάση μπορεί και ξεμπλοκάρει θέσεις που δρουν ως υπόστρωμα για την εστεράση OCE6. Τέλος, στα δείγματα που περιλάμβαναν όλα τα ένζυμα παρατηρήθηκε συνεργιστισμός (1.18 ± 0.07) και επετεύχθη η υψηλότερη απελευθέρωση οξικού οξέος (4.92 ± 0.12 mM). Αυτό συμβαίνει αφενός λόγω του γεγονότος ότι η ξυλανάση συμβάλει στη δράση των εστερασών με το μηχανισμό που αναφέρθηκε προηγουμένως και αφετέρου λόγω του ότι οι OCE6 και TiCE16 δρουν συμπληρωματικά.

Η μελέτη της συνεργιστικής δράσης της GH10 ξυλανάσης με τις εστεράσες του οξικού OCE6 και TiCE16 με έμφαση στα προϊόντα υδρόλυσης της ξυλανάσης, μέσω της ποσοτικοποίησης των σακχάρων με τη μέθοδο χρωματογραφίας ανιόνεναλλαγής ΗΡΑΕC, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3., οδήγησε σε ορισμένες ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις.

Πίνακας 11: Απελευθέρωση ξυλόζης και βαθμοί συνεργιτισμού ως προς την ξυλόζη κατά τη συνεργιστική υδρόλυση του υποστρώματος από την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και TtCE16.

Ξυλόζη (X1)		
Δείγμα	Συγκέντρωση X1 (μM)	Βαθμός συνεργιτισμού (DS)
GH10	446 ± 8	
GH10 - OCE6	973 ± 12	2.2 ± 0.5
GH10 - TtCE16	468 ± 154	1.1 ± 0.4
GH10 - OCE6 - TtCE16	956 ± 31	2.1 ± 0.1

Πίνακας 12: Απελευθέρωση ξυλοβιόζης και βαθμοί συνεργιτισμού ως προς την ξυλοβιόζη στα δείγματα με την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και TtCE16.

Ξυλοβιόζη (X2)		
Δείγμα	Συγκέντρωση X2 (μM)	Βαθμός συνεργιτισμού (DS)
GH10	1512 ± 12	
GH10 - OCE6	2848 ± 13	1.9 ± 0.0
GH10 - TtCE16	1811 ± 52	1.2 ± 0.0
GH10 - OCE6 - TtCE16	2961 ± 137	2.0 ± 0.1

Η συνεργιστική δράση της εστεράσης TtCE16 και της GH10 ξυλανάσης οδηγεί σε χαμηλότερη απελευθέρωση ξυλόζης (468±154 μM) και ξυλοβιόζης (1811±52 μM) σε σχέση με τα δείγματα συνδυασμένης δράσης OCE6-GH10 όπου καταγράφηκε απελευθέρωση 973±12 μM και 1811±52 μM X1 και X2 αντίστοιχα (πίνακες 11 και 12). Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η εστεράση OCE6 δρα σε ολιγοσακχαρίτες που ενδεχομένως δεν επηρεάζουν ιδιαίτερος την ένδο-δράση της GH10 ξυλανάσης. Στα δείγματα με το συνδυασμό ενζύμων GH10-OCE6 καταγράφονται παραπλήσιοι βαθμοί συνεργιτισμού (2.2±0.5 για την X1 και 1.9±0.0 για την X2) με τα δείγματα όπου υπήρχαν και τα 3 ένζυμα (2.1±0.1 για την X1 και 2.0±0.1 για την X2), γεγονός που ενισχύει την πεποίθηση ότι η παρουσία της εστεράσης TtCE16 δε συνεισφέρει ιδιαίτερος στη ένδο-δράση της ξυλανάσης. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι στην ξυλοβιόζη αν και μικρός παρατηρείται συνεργιτισμός μεταξύ της μελετώμενης εστεράσης και της ξυλανάσης (1.2±0.0).

Πίνακας 13: Μείωση ξυλοτριόζης στα δείγματα με την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και TtCE16.

Ξυλοτριόζη (X3)		
Δείγμα	Συγκέντρωση X3 (μM)	% μείωση X3
OCE6- TtCE16	115 ± 52	
GH10	660 ± 12	
GH10 - OCE6	405 ± 3	39 ± 2
GH10 - TtCE16	596 ± 17	10 ± 3
GH10 - OCE6- TtCE16	378 ± 19	43 ± 3

Πίνακας 14: Μείωση ξυλοτετραόζης στα δείγματα με την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και TtCE16.

Ξυλοτετραόζη (X4)		
Δείγμα	Συγκέντρωση X4 (μM)	% μείωση X4
OCE6- TtCE16	35 ± 3	
GH10	301 ± 2	
GH10 - OCE6	147 ± 1	51 ± 1
GH10 - TtCE16	234 ± 1	22 ± 1
GH10 - OCE6 - TtCE16	128 ± 0	57 ± 1

Πίνακας 15: Μείωση ξυλοπενταόζης στα δείγματα με την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και TtCE16.

Ξυλοπενταόζη (X5)		
Δείγμα	Συγκέντρωση X5 (μM)	% μείωση X5
OCE6- TtCE16	28 ± 21	
GH10	180 ± 8	
GH10 - OCE6	100 ± 1	44 ± 5
GH10 - TtCE16	157 ± 5	13 ± 5
GH10 - OCE6 - TtCE16	82 ± 21	55 ± 13

Πίνακας 16: Μείωση ξυλοεξαόζης στα δείγματα με την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και TtCE16.

Ξυλοεξαόζη (X6)		
Δείγμα	Συγκέντρωση X6 (μM)	% μείωση X6
OCE6 - TtCE16	5 ± 4	
GH10	35 ± 2	
GH10 - OCE6	21 ± 1	38 ± 6
GH10 - TtCE16	30 ± 1	15 ± 5
GH10 - OCE6 - TtCE16	15 ± 4	57 ± 12

Αξίζει να σημειωθεί ότι για τα X3,X4,X5 και X6 δεν υπολογίστηκαν βαθμοί συνεργιτισμού, καθώς αυτά αποτελούν υπόστρωμα της ξυλανάσης GH10, άρα καταναλώνονται. Η παρουσία των εστερασών OCE6 και TtCE16 έχει επίδραση πάνω στα εν λόγω ολιγομερή, αφού τα αποακετυλιώνουν και έτσι επιτρέπουν στην ενδοξυλανάση GH10 να δράσει εκ νέου σε αυτά.

Στα δείγματα με τα ένζυμα GH10-OCE6 παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις των X3,X4,X5 και X6 (39±2 %, 51±1 %, 44±5 % και 38±6 % αντίστοιχα). Αντίθετα, στα δείγματα με τα ένζυμα GH10-TtCE16 παρατηρήθηκε χαμηλότερη μείωση της συγκέντρωσης των X3 (10±3%), X4 (22±1%), X5(13±5%), X6 (15±5%).

Αναφορικά με την ξυλοτριόζη και την ξυλοτετραόζη, στα δείγματα που περιείχαν και τα 3 ένζυμα, GH10-OCE6-TtCE16, επιτυγχάνεται μεν μεγαλύτερη μείωση των συγκεντρώσεων (43±3 % και 57±1 %) όχι όμως αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με τα δείγματα με το συνδυασμό GH10-OCE6. Όσον αφορά την ξυλοπενταόζη και ξυλοεξαόζη, σημειώνεται μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης παρουσία και των τριών ενζύμων (55±13 % για το X5 και 57±12 % για το X6).

Πίνακας 17: Αύξηση του UX στα δείγματα με την ξυλανάση GH10 και τις εστεράσες OCE6 και TtCE16.

UX	
Δείγμα	% αύξηση
GH10 - OCE6	159 ± 10
GH10 - TtCE16	17 ± 8
GH10 - OCE6 - TtCE16	186 ± 11

Στα δείγματα με το συνδυασμό ενζύμων GH10-OCE6 παρατηρείται πολύ μεγάλη αύξηση όσον αφορά τη συγκέντρωση του ουρονικού ολιγοσακχαρίτη UX, με ποσοστό 159±10%, ενώ στα δείγματα με το συνδυασμό ενζύμων GH10-TtCE16 παρατηρείται πολύ μικρότερη αύξηση (17±8 %). Το σημαντικότερο εύρημα όμως εδώ είναι ότι παρουσία και των τριών ενζύμων, GH10-OCE6-TtCE16 η συγκέντρωση του ουρονικού UX παρουσιάζει μια αυξητική τάση (186±11%).

4.2.8. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της TtXyn30A ξυλανάσης με εστεράσες του οξικού οξέος σε ακετυλιωμένη ξυλάνη

Ακολούθως, εξετάστηκε το ενδεχόμενο συνεργιστικής δράσης μεταξύ της ξυλανάσης TtXyn30A και της μελετώμενης εστεράσης TtCE16 σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης, καθώς και η σύγκριση της με τη συνεργιστική δράση της ξυλανάσης και των εστερασών CtCE2 και OCE6.

Πίνακας 18: Ποσοστό αύξησης στην απελευθέρωση ξυλοβιόζης και βαθμοί συνεργειτισμού της ξυλανάσης TtXyn30A και των εστερασών TtCE16, CtCE2, OCE6 σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης.

Ξυλοβιόζη (X2)		
Δείγμα	% αύξηση στην απελευθέρωση ξυλοβιόζης	Βαθμός συνεργειτισμού (DS)
TtXyn30A - TtCE16	21 ± 2	1.16 ± 0.03
TtXyn30A - OCE6	83 ± 2	1.75 ± 0.08
TtXyn30A - CtCE2	42 ± 1	1.26 ± 0.08

Αναφορικά με την απελευθέρωση της ξυλοβιόζης, του κυρίως προϊόντος της έξω δράσης της TtXyn30A, η ξυλανάση παρουσιάζει συνεργιστική δράση και με τις τρεις εστεράσες του οξικού (πίνακας 18). Ο πιο υψηλός συνεργειτισμός εντοπίστηκε στο συνδυασμό TtXyn30A - OCE6, όπου επιτεύχθηκε 83±2% αύξηση στην απελευθέρωση ξυλοβιόζης, ενώ στην περίπτωση της συνεργιστικής δράσης της TtCE16 με τη TtXyn30A, σημειώθηκε αύξηση (21±2%). Ο χαμηλότερος αυτός συνεργειτισμός οφείλεται στην αδυναμία δράσης της μελετώμενης εστεράσης TtCE16 στην κύρια αλυσίδα του πολυμερούς, σε αντίθεση με τη OCE6. Οι βαθμοί συνεργειτισμού βρέθηκαν 1.16±0.03 για το συνδυασμό TtXyn30A - TtCE16 και 1.75±0.08 για το συνδυασμό TtXyn30A-OCE6. Όσον αφορά την αύξηση στην απελευθέρωση X2 κατά τη συνεργιστική δράση της εστεράσης CtCE2 με την TtXyn30A, σημειώθηκε ποσοστό

42±1%, ενώ ο αντίστοιχος βαθμός συνεργειτισμού βρέθηκε 1.26±0.08. Παρά το γεγονός ότι η CtCE2 δεν έχει δράση σε διπλές υποκαταστάσεις, εντούτοις αποακετυλιώνει ολιγομερή μεγαλύτερου βαθμού πολυμερισμού συγκριτικά με τη TtCE16, απελευθερώνοντας θέσεις του πολυμερούς από ακετυλ-ομάδες που ενδεχομένως να μην οδηγούσαν σε αποτελεσματική πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Nikolainits et al., 2021).

4.2.9. Μελέτη συνεργειτικής δράσης της TtXyn30A ξυλανάσης με εστεράσες του οξικού οξέος σε υπόστρωμα ΠΞΟ

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε και η συνεργιστική δράση της εστεράσης του οξικού οξέος TtCE16 με την ξυλανάση της οικογένειας GH30 (TtXyn30A) σε μια προσπάθεια να συγκριθεί αυτός ο πιθανός συνεργισμός με τους αντίστοιχους που προκύπτουν με την ίδια ξυλανάση και τις εστεράσες CtCE2 (CE-2) και OCE6 (CE-6) αντίστοιχα.

Πίνακας 19: Ποσοστιαία αύξηση στην απελευθέρωση ξυλόζης και βαθμοί συνεργειτισμού κατά τη συνδυασμένη δράση της ξυλανάσης TtXyn30A και των εστερασών TtCE16, CtCE2, OCE6 σε υπόστρωμα ΠΞΟ.

Ξυλόζη (X1)		
Δείγμα	% αύξηση X1	Βαθμός συνεργειτισμού (DS)
TtXyn30A - TtCE16	16 ± 9	1.16 ± 0.09
TtXyn30A - OCE6	53 ± 8	1.53 ± 0.09
TtXyn30A - CtCE2	41 ± 6	1.41 ± 0.07

Πίνακας 20: Ποσοστιαία αύξηση στην απελευθέρωση ξυλοβιόζης και βαθμοί συνεργειτισμού κατά τη συνδυασμένη δράση της ξυλανάσης TtXyn30A και των εστερασών TtCE16, CtCE2, OCE6 σε υπόστρωμα ΠΞΟ.

Ξυλοβιόζη (X2)		
Δείγμα	% αύξηση X2	Βαθμός συνεργειτισμού (DS)
TtXyn30A - TtCE16	14 ± 4	1.14 ± 0.03
TtXyn30A - OCE6	51 ± 5	1.51 ± 0.05
TtXyn30A - CtCE2	58 ± 3	1.58 ± 0.04

Πίνακας 21: Ποσοστιαία αύξηση στην απελευθέρωση του ουρονικού ολιγοσακχαρίτη O-XUX και βαθμοί συνεργειτισμού κατά τη συνδυασμένη δράση της ξυλανάσης TtXyn30A και των εστερασών TtCE16, CtCE2, OCE6 σε υπόστρωμα ΠΞΟ.

O-XUX		
Δείγμα	% αύξηση O-XUX	Βαθμός συνεργειτισμού (DS)
TtXyn30A - TtCE16	-	1.00 ± 0.08
TtXyn30A - OCE6	142 ± 11	2.42 ± 0.10
TtXyn30A - CtCE2	112 ± 2	2.12 ± 0.03

Πίνακας 22: Ποσοστιαία αύξηση στην απελευθέρωση του ουρονικού ολιγοσακχαρίτη O-UX και βαθμοί συνεργισιμού κατά τη συνδυασμένη δράση της της ξυλανάσης TtXyn30A και των εστερασών TtCE16, CtCE2, OCE6 σε υπόστρωμα ΠΞΟ.

O-UX		
Δείγμα	% αύξηση O-UX	Βαθμός συνεργισιμού (DS)
TtXyn30A - TtCE16	6 ± 1	1.06 ± 0.01
TtXyn30A - OCE6	6 ± 5	1.06 ± 0.06
TtXyn30A - CtCE2	13 ± 4	1.13 ± 0.04

Η εστεράση TtCE16 ενισχύει τη δράση της ξυλανάσης GH30 όσον αφορά τόσο την ξυλόζη (X1) όσο και την ξυλοβιόζη (X2), προκαλώντας αύξηση στην απελευθέρωση των αντίστοιχων σακχάρων της τάξεως του 15% περίπου (πίνακες 19 και 20). Οι αντίστοιχοι βαθμοί συνεργισιμού βρέθηκαν 1.16 ± 0.09 για την ξυλόζη και 1.14 ± 0.03 για την ξυλοβιόζη. Ωστόσο, αυτή η αύξηση δεν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική συγκριτικά με τους συνδυασμούς ενζύμων TtXyn30A-OCE6 και TtXyn30A-CtCE2. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της προσθήκης της εστεράσης OCE6 και ξυλανάσης TtXyn30A σημειώθηκε αύξηση 53 ± 8 % για την ξυλόζη και 51 ± 5 % για την ξυλοβιόζη. Η διαφορά αυτή αντικατοπτρίζεται και στους αντίστοιχους βαθμούς συνεργισιμού, που στην περίπτωση της CtCE2 είναι 1.41 ± 0.07 για την ξυλόζη και 1.58 ± 0.04 για την ξυλοβιόζη ενώ για τη OCE6 είναι 1.53 ± 0.09 για την ξυλόζη και 1.51 ± 0.05 για την ξυλοβιόζη. Τα αποτελέσματα αυτά για το υπό μελέτη ένζυμο ήταν και τα αναμενόμενα, καθώς η εστεράση TtCE16 επιδρά στους ολιγοσακχαριτές X1-X3. Επομένως, είναι λογικό να μην ενισχύει σημαντικά τη δράση της ξυλανάσης GH30, αφού ουσιαστικά αποακετυλιώνει τα προϊόντα της και όχι το υπόστρωμά της.

Όσον αφορά τον ουρονικό ολιγοσακχαρίτη O-XUX παρατηρεί μηδενική αύξηση στην απελευθέρωση του με την συνεργιστική δράση των ενζύμων TtXyn30A-TtCE16. Αντίθετα, στις αντιδράσεις όπου υπήρχε είτε ο συνδυασμός ενζύμων TtXyn30A-CtCE2 είτε ο συνδυασμός TtXyn30A-OCE6 σημειώθηκε πολύ μεγάλη αύξηση στην απελευθέρωση του O-XUX, με τα ποσοστά να κυμαίνονται σε 112 ± 2 και 142 ± 11 αντίστοιχα. Οι βαθμοί συνεργισιμού (2.12 ± 0.03) για τα ένζυμα TtXyn30A-CtCE2 και (2.42 ± 0.10) για τα ένζυμα TtXyn30A-OCE6 είναι ενδεικτικοί της συμβολής αυτών των εστερασών. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς η απελευθέρωση ουρονικών ολιγοσακχαριτών αφορά την ενδοδράση της ξυλανάσης GH30. Εφόσον η εστεράση TtCE16 δεν παρουσιάζει δράση στην αλυσίδα του πολυμερούς είναι επόμενο να μη συμβάλλει και στην απελευθέρωση ουρονικών. Στον αντίποδα, οι εστεράσες CtCE2 και OCE6 φαίνεται να επιδεικνύουν τέτοια δράση. Όσον αφορά τον ουρονικό ολιγοσακχαρίτη O-UX, παρατηρείται ότι η συνεργιστική δράση των ενζύμων TtXyn30A-TtCE16 προκαλεί ποσοστιαία αύξηση 6.11 ± 1.31 %, ενώ ο συνδυασμός των ενζύμων TtXyn30A-CtCE2 προκαλεί διπλάσια αύξηση του ουρονικού O-UX (13 ± 4 %) και έχει μεγαλύτερο βαθμό συνεργισιμού 1.13 ± 0.04 , έναντι του συνδυασμού GH30-CE16 που σημειώνει DS ίσο με 1.06 ± 0.01 . Ο συνδυασμός TtXyn30A-OCE6 έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με τη συνδυαστική δράση των TtXyn30A-TtCE16, αφού η αύξηση του ουρονικού O-UX προέκυψε 6 ± 5 % και ο βαθμός συνεργισιμού 1.06 ± 0.06 .

4.3. Επίδραση της δράσης της α-γλυκουρονιδάσης E-AGUBS στα προϊόντα υδρόλυσης της *TtXyn30A* σε υπόστρωμα ΠΞΟ

Για τα προϊόντα υδρόλυσης του υποστρώματος ΠΞΟ από την ξυλανάση *TtXyn30A* μελετήθηκε η επίδραση της α-γλυκουρονιδάσης E-AGUBS. Από τα πειράματα που διεξήχθησαν βρέθηκε ότι η επιπλέον προσθήκη της α-γλυκουρονιδάσης στο υδρόλυμα της ξυλανάσης έχει επίδραση μόνο στην κορυφή του ουρονικού ολιγοσακχαρίτη O-UX.

Πίνακας 23: Επίδραση της γλυκουρονιδάσης E-AGUBS στον ουρονικό ολιγοσακχαρίτη O-UX που απελευθερώνεται από τη δράση της ξυλανάσης *TtXyn30A* σε υπόστρωμα ΠΞΟ.

O-UX		
Δείγμα	O-UX (μM)	% υδρόλυση O-UX
<i>TtXyn30A</i>	97 ± 67	
<i>TtXyn30A</i> - E-AGUBS	54 ± 4	44 ± 9

Η προσθήκη της α-γλυκουρονιδάσης E-AGUBS στα δείγματα που περιείχαν την ξυλανάση *TtXyn30A* οδήγησε σε μείωση της κορυφής του ουρονικού ολιγοσακχαρίτη O-UX σε ποσοστό περίπου 45%. Συνεπώς, παραμένει ένα 55% αυτής της κορυφής που δεν υδρολύεται. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται σε κάποια ακετυλίωση, που παρεμποδίζει τη δράση της γλυκουρονιδάσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* και συνεργισμοί

5.1.1. Εξειδίκευση υποστρώματος

Για την εύρεση του κατάλληλου υποστρώματος για την αραβινοφουρανοζιδάση της οικογένειας 43, *TtAbf43*, χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα αραβινάνης. Παρόλο που το ένζυμο εμφάνισε αξιοσημείωτη ενεργότητα στο συγκεκριμένο υπόστρωμα, εντούτοις αυτή ήταν αρκετά χαμηλή, συγκριτικά με υποστρώματα που έχουν εξεταστεί από άλλες μελέτες όπως αραβινοξυλάνη σιταριού (WA) και αραβινοξυλάνη σίκαλης (RA) (Παγούρτζη, 2021). Αξίζει να σημειωθεί ότι από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, έχουν βρεθεί ένζυμα της οικογένειας GH43, όπως η *CjAbf43A* από το βακτήριο *Cellvibrio japonicus* που εμφανίζουν τη βέλτιστη ενεργότητα με υπόστρωμα την αραβινάνη (Cartmell et al., 2011). Στον αντίποδα, στη μελέτη των Liu et al., 2021 η βακτηριακής προελεύσεως αραβινοφουρανοζιδάση *AmAraf43* που προέρχεται από τον *Acetivibrio mesophilus* δεν εμφάνισε ενεργότητα με υπόστρωμα τόσο τη γραμμική αραβινάνη όσο και τη διακλαδισμένη, ενώ εμφάνισε μεγαλύτερη ενεργότητα στην αραβινοξυλάνη σιταριού WAX-RS (0.56 ± 0.04 U/mg) και το pNPArif (0.41 ± 0.03 U/mg) (Liu et al., 2021). Παρόμοιο αποτέλεσμα προέκυψε και στην έρευνα των Lagaert et al., 2010 με τη βακτηριακή αραβινοφουρανοζιδάση από το *Bifidobacterium adolescentis* να μην επιδεικνύει ενεργότητα σε αραβινάνη, αλλά να επιδεικνύει στο υπόστρωμα pNP-Araf (249 mU/mg) (Lagaert et al., 2010). Η αραβινοφουρανοζιδάση από το βακτήριο *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, CAX43, παρουσίασε ενεργότητα στα συνθετικά υποστρώματα pNPArif ($271,061 \pm 4,83$ U/mg), pNPX ($111,82 \pm 3,23$ U/mg), αλλά και στα φυσικά WA ($0,693 \pm 0,08$ U/mg) και sugar beet αραβινάνη ($2,672 \pm 0,83$ U/mg) (Saleh et al., 2022). Στη μελέτη των Kühnel et al., 2011, η Abf43 αραβινοφουρανοζιδάση από το μύκητα *Chrysosporium lucknowense* παρουσίασε ενεργότητα 9.5 U/mg σε υπόστρωμα p-NPArif (Kühnel et al., 2011). Όσον αφορά τα ευρήματα της βιβλιογραφίας για άλλες μυκητιακές αραβινοφουρανοζιδάσες, η μελέτη των Motta et al., 2021 κατέδειξε το συνθετικό υπόστρωμα pNPG (β -D-galactopyranoside) ως το καταλληλότερο για τη μυκητιακής προελεύσεως αραβινοφουρανοζιδάση *ThAbf54* που προέρχεται από τον *Trichoderma harzianum* (Motta et al., 2021). Η αραβινοφουρανοζιδάση *PpAbf4*, από το μύκητα *Pichia pastoris* επέδειξε χαμηλή ενεργότητα τόσο με το υπόστρωμα pNPArif (1.24 ± 0.09 U/mg) όσο και με το pNP-b-Gal (0.276 ± 0.01 U/mg) (Ravanel et al., 2015). Χαμηλή ενεργότητα σε υποστρώμα p-NPArif και πολυσακχαρίτες που περιέχουν αραβινόζη επέδειξαν και αραβινοφουρανοζιδάσες της οικογένειας 43 από το γένος *Caldicellulosiruptor* (Abu Saleh et al., 2017).

5.1.2. Κινητική σε αραβινάνη και pNPArabinofuranoside και προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων Michaelis-Menten

Στα πειράματα κινητικής του ενζύμου *TtAbf43* που ακολούθησαν επιχειρήθηκε να διαπιστωθεί αν αποκτά το σύστημα μια σταθερή συμπεριφορά ως προς αυτά τα δύο

υποστρώματα. Όσον αφορά την αραβινάνη, η τιμή της K_M που προέκυψε βρέθηκε ιδιαίτερα υψηλά, γεγονός που υποδεικνύει χαμηλή συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος. Όσον αφορά τα πειράματα κινητικής που πραγματοποιήθηκαν με υπόστρωμα το pNPArabinoofuranoside το σύστημα δεν έπιασε σταθερή συμπεριφορά, αφού το υπόστρωμα αυτοϋδρολύεται. Συνεπώς, μένει να διερευνηθεί η μελέτη της κινητικής της συγκεκριμένης αραβινοφουρανοζιδάσης και σε διαφορετικά υποστρώματα προκειμένου να βρεθεί υπόστρωμα που να έχει με μεγαλύτερη συνάφεια με το ένζυμο.

Στη βιβλιογραφία εντοπίζονται υποστρώματα που έχουν πολύ μεγαλύτερη συγγένεια με το υπό μελέτη ένζυμο. Ειδικότερα, η Παγουρτζή, 2021, μελέτησε την κινητική της *TtAbf43* σε υποστρώματα αραβινοξυλάνης σιταριού (wheat arabinoxylan, WA) και αραβινοξυλάνης σίκαλης (rye arabinoxylan, RA). Οι τιμές της K_M που είχαν καταγραφεί ήταν 5.8 ± 0.6 για το WA και 3.6 ± 0.7 για το RA και το γεγονός ότι ήταν σημαντικά μικρότερες, υποδηλώνει τη μεγαλύτερη συγγένεια του υποστρωμάτων WA και RA με το ένζυμο σε σχέση με την αραβινάνη. Ανάλογες παρατηρήσεις προκύπτουν και για την αραβινοφουρανοζιδάση *Ct43Araf* από το βακτήριο *Clostridium thermocellum*, για την οποία προδιορίστηκαν οι σταθερές $K_M = 0.082 \pm 0.005$ mg/mL με υπόστρωμα το RA και $K_M = 0.072 \pm 0.003$ mg/mL με υπόστρωμα το WA (Ahmed et al., 2013). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Zhou et al., 2012, η διλειτουργική β-D ξυλοσιδάση/α-L-αραβινοφουρανοσιδάση *RuXyn1* (της οικογένειας GH43) παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη συγγένεια στο υπόστρωμα pNPX (4-Nitrophenyl β-D-xylopyranoside) βάσει της κινητικής σταθεράς K_M που προέκυψε (3.43 mg/mL) (Zhou et al., 2012). Στο ίδιο υπόστρωμα έχουν πραγματοποιηθεί κινητικές και για τις β-ξυλοζιδάση της οικογένειας GH43, *RrXyl43A*, η οποία προέρχεται από το μύκητα *Rhizophlyctis rosea* (Huang et al., 2019), όπου οι κινητικές παράμετροι K_M και u_{max} βρέθηκαν ίσες με 1.34 ± 0.17 mM και 34.61 U/mg αντίστοιχα, εκδηλώνοντας καλή αλληλεπίδραση με το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Όσον αφορά τη μυκητιακή διλειτουργική β-ξυλοζιδάση/αραβινοφουρανοζιδάση *Xyl3A* από τον *Humicola insolens*, οι τιμές K_M και u_{max} προέκυψαν 2.51 mM και 37.33 μmol/min/mg, αντίστοιχα, με υπόστρωμα το pNPX που βρέθηκε να είναι το βέλτιστο για το εν λόγω ένζυμο (Xia et al., 2015). Για το ίδιο ένζυμο οι Yang et al. βρήκαν κινητικές σταθερές K_M και u_{max} 12.2 mM και 203.8 μmol/min/mg αντίστοιχα, που υποδηλώνουν σαφώς μικρότερη συνάφεια (Yang et al., 2014).

Η GH43 αραβινοφουρανοζιδάση από το βακτήριο *Lactobacillus brevis* εμφάνισε $K_M = 12 \pm 2$ (mM) και $u_{max} = 4.0 \pm 0.3$ U/mg στο υπόστρωμα pNPAraf και κατά συνέπεια το εν λόγω ένζυμο δεν παρουσίασε μια καλή σχέση ενζύμου-υποστρώματος (Michlmayr et al., 2013). Αντίστοιχα, αξίζει να σημειωθεί ότι οι Saleh et al. 2022, διεξήγαγαν κινητική για τη βακτηριακή αραβινοφουρανοζιδάση CAX43 σε υπόστρωμα pNPAraf και η σταθερά Michaelis–Menten K_M προέκυψε 1.071 mmol/L, γεγονός που υποδεικνύει μια καλή συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος (Saleh et al., 2022).

5.1.3. Συνεργιτισμοί με τις εμπορικές αραβινοφουρανοζιδάσες E-AFAM2 και E-AFASE

Σύμφωνα με τα πειράματα που διεξήχθησαν για την εύρεση του τρόπου δράσης της μελετώμενης αραβινοφουρανοσιδάσης, καθώς και των πιθανών συνεργιτισμών της με εμπορικές αραβινοφουρανοσιδάσες, παρατηρήθηκε ότι η *TtGH43* φαίνεται να δρα κατά τον ίδιο τρόπο με την εμπορική E-AFAM2 που υδρολύει την α-1,3-αραβινοφουρανόζη από διπλά ακετυλιωμένες ξυλόζες. Παράλληλα, τα υψηλά ποσοστά υδρόλυσης αραβινόζης που σημειώθηκαν στα δείγματα που περιείχαν την *TtGH43* και την εμπορική E-AFASE υποδεικνύουν ότι η υπό μελέτη αραβινοφουρανοσιδάση *TtAbf43* φαίνεται να δρα κατά συμπληρωματικό τρόπο με την E-AFASE, η οποία υδρολύει τις α-1,2- και α-1,3- αραβινοφουρανόζες από αραβινοξυλάνες κι από διακλαδιζόμενες αραβινάνες. Συνεργιτισμός μεταξύ δύο αραβινοφουρανοζιδασών των οικογενειών 43 και 51 με διαφορετική εξειδίκευση που απομονώθηκαν από το βακτήριο *Streptomyces chartreusis* σημειώθηκε και κατά την υδρόλυση της αραβινάνης και της διακλασισμένης αραβινάνης σε αραβινόζη, σύμφωνα με τη μελέτη των Matsuo et al., 2000. Πιο συγκεκριμένα, όταν και τα δύο ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν μαζί για την υδρόλυση της αραβινάνης και της διακλαδισμένης αραβινάνης, ο βαθμός υδρόλυσης ήταν σημαντικά υψηλότερος από αυτόν που ελήφθη στις περιπτώσεις με τα μεμονωμένα ένζυμα. (Matsuo et al., 2000).

5.2. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της εστεράσης του οξικού οξέος *TtCE16* και συνεργιτισμοί

5.2.1. Μελέτη της εξειδίκευσης ως προς διαφορετικά υποστρώματα

Για την εύρεση του κατάλληλου υποστρώματος για την εστεράση του οξικού οξέος *TtCE16* εξετάστηκαν 4 διαφορετικά υποστρώματα, τα p-NP Acetate, o-NP Acetate, p-NP Butyrate και p-NP Palmitate. Από τα πειράματα που διεξήχθησαν προέκυψε ως συμπέρασμα το υπό μελέτη ένζυμο παρουσιάζει ενεργότητα σε όλα τα εξεταζόμενα υποστρώματα. Υψηλότερη εξειδίκευση βρέθηκε με υπόστρωμα το p-NP Acetate το οποίο εν γένει αποτελεί χαρακτηριστικό υπόστρωμα για τις εστεράσες. Αξιοσημείωτη όμως ήταν και η τιμή ενεργότητας που προέκυψε με υπόστρωμα το o-NP Acetate. Αντιθέτως, το ένζυμο παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερες τιμές ενεργότητας στα p-NP Palmitate και p-NP Butyrate.

Σύμφωνα με τους Puchart et al., οι εστεράσες του οξικού οξέος της οικογένειας 16, *AnCE16A* και *PaCE16A*, εμφανίζουν πολύ υψηλή ενεργότητα στο υπόστρωμα 4-nitrophenyl acetate (o-pNPA) και συγκεκριμένα 77.72 U/mg και 104.85 U/mg όπως συμβαίνει και με την εστεράση *TtCE16* που η ενεργότητα της στο συγκεκριμένο υπόστρωμα βρέθηκε ιδιαίτερα υψηλή (107±7 U/mg). Ωστόσο, τα συγκεκριμένα ένζυμα πρακτικά δεν εμφανίζουν ενεργότητα ως προς το υπόστρωμα p-nitrophenyl butyrate, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τη μελετώμενη εστεράση *TtCE16* (Puchart et al., 2016). Υψηλή βρέθηκε και η ενεργότητα των CE16 εστερασών από το μύκητα *Aspergillus niger* που κυμάνθηκε σε ένα εύρος 40-170 U/mg (Vegenas et al., 2022). Η εστεράση *EstEP16*, επέδειξε την υψηλότερη ενεργότητα στο υπόστρωμα p-nitrophenyl Acetate (pNPA) σημειώνοντας ενεργότητα 19.1 U/mg μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων στα οποία διερευνήθηκε η ενεργότητα της, όπως συνέβη

και με την εστεράση *TiCE16* (στην οποία βρέθηκε ακόμα υψηλότερη ενεργότητα στο pNPA, ήτοι 587 ± 35 U/mg). Μάλιστα, στην ίδια μελέτη, η ενεργότητα της *EstEP16* στο υποστρώματα p-nitrophenyl Butyrate (pNPB) καταγράφηκε ως αρκετά υψηλή, σε αντίθεση με τα ευρήματα για την *TiCE16*, ενώ στο p-nitrophenyl Palmitate (pNPP) η ενεργότητα της ήταν αμελητέα, ενώ η *TiCE16* παρουσίασε ενεργότητα στο συγκεκριμένο υπόστρωμα 11.0 ± 2.3 U/mg) (Zhu et al., 2013).

5.2.2. Μελέτη της κινητικής σε υπόστρωμα p-NP Acetate και προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων Michaelis-Menten

Ακολούθησαν πειράματα κινητικής της εστεράσης *TiCE16* σε υπόστρωμα p-NP Acetate για να εξεταστεί η συνάφεια ενζύμου και υποστρώματος. Από τα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι η χαμηλή τιμή της K_M που προέκυψε υποδηλώνει μεγάλη συγγένεια μεταξύ της εστεράσης και του υποστρώματος.

5.2.3. Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης

Ως βέλτιστη θερμοκρασία για την εστεράση του οξικού *TiCE16* βρέθηκαν οι 60 °C, ύστερα από τα σχετικά πειράματα που διεξήχθησαν. Αξίζει να αναφερθεί ότι ως βέλτιστη θερμοκρασία για άλλες ακετυλεστεράσες όπως αυτή από το μύκητα *Trichoderma reesei* ή αυτή από το μύκητα *Aspergillus oryzae* είχαν βρεθεί οι 50 °C, δηλαδή παραπλήσια τιμή θερμοκρασίας (Routanen et al., 1988), (Kato et al., 2021). Ίδια τιμή βέλτιστης θερμοκρασίας παρατηρήθηκε και για την εστεράση από το μύκητα *Aspergillus niger* (Kormelink et al., 1993). Εστεράσες από το μύκητα του γένους *Pseudozyma* και από το μύκητα *Aureobasidium pullulans* έχουν βρεθεί να έχουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 60 °C (Alex et al., 2014), (Lemes et al., 2019). Οι προαναφερθείσες τιμές βρίσκονται σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Ακόμα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία, η ενεργότητα του ενζύμου βρίσκεται κάτω από το 50% της βέλτιστης τιμής σε θερμοκρασίες 25 °C και 35 °C, ενώ η ενεργότητα πέφτει σημαντικά και μετά τους 70 °C.

5.2.4. Σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες και σε διαφορετικές τιμές pH

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα η *TiCE16* επιδεικνύει μια καλή σταθερότητα όσον αφορά τα διάφορα θερμοκρασιακά περιβάλλοντα και τις συνθήκες pH. Ειδικότερα, αναφορικά με τη θερμοκρασία η εστεράση στους 20 °C διατηρεί σχεδόν στο ακέραιο την ενεργότητά της, της οποίας η τιμή προσεγγίζει το 100%. Η ενεργότητα μειώνεται αλλά παραμένει υψηλή μετά τους 30 °C, ενώ το ένζυμο αδρανοποιείται τελείως σε θερμοκρασίες πάνω από 50 °C μετά το πέρας των 24 ωρών. Η μελετώμενη εστεράση φαίνεται πιο ανθεκτική στη διατήρηση της ενεργότητάς της σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε σύγκριση με άλλες ακετυλεστεράσες, όπως π.χ. η AοAXEC που μελετήθηκε κατόπιν επώασης σε θερμοκρασίες 50 °C και 60 °C για διάστημα τεσσάρων ωρών και παρατηρήθηκε ότι μετά το πέρας 4 ωρών η ενεργότητα ελαττώνεται σημαντικά, φτάνοντας το 40% (Kato et al., 2021).

Αναφορικά με το pH, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν, η εστεράση *TtCE16* διατηρεί στο ακέραιο την ενεργότητά της για pH= 5, 6, 7, 8 μετά από 24 ώρες. Επιπλέον, προέκυψε ως συμπέρασμα ότι το εν λόγω ένζυμο παρουσιάζει ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στις διαφορετικές τιμές pH, καθώς κατάφερε ακόμα και σε ακραίες τιμές, όπως pH= 3, 4 και 9, να έχει εναπομένουσα ενεργότητα που υπερβαίνει το 85%. Από τη βιβλιογραφία, έχουν γίνει γνωστές κι άλλες εστεράσες που διατηρούν την ενεργότητα τους μετά από επώαση 24 ωρών, όπως αυτή της οικογένειας CE16 από τον μύκητα *Myceliophthora thermophila*, όπως περιγράφεται από τους Mai-Gisoni et al. 2017, όπου διατηρεί το 97% της ενεργότητάς της μετά από 24 ώρες επώασης σε pH 6 (Mai-Gisoni et al., 2017).

Μελετώντας άλλες έρευνες που αφορούν τη σταθερότητα των ενζύμων που προέρχονται από τον ίδιο μικροοργανισμό ο οποίος χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη για την απομόνωση της εστεράσης του οξικού οξέος, παρατηρούνται παρόμοιες ιδιότητες με αυτές που προσδιορίστηκαν παραπάνω. Ειδικότερα, στη μελέτη των Karnaouri et al., 2017, η υδρολάση της οικογένειας 5 που έχει απομονωθεί από το μύκητα *Myceliophthora thermophila*, επέδειξε υψηλή θερμοκρασιακή σταθερότητα έπειτα από επώαση στους 50 °C και 55 °C για 24h (>80%), ενώ χάνει την ενεργότητα του πάνω από 60 °C. Επιπλέον, το ένζυμο ήταν σταθερό στην περιοχή pH 3–11 μετά από 24 ώρες διατηρώντας το 100% της αρχικής του ενεργότητας. Και στη μελέτη των Katsimpouras et al., 2016, η GH62 ενδο-μανάση επέδειξε επίσης υψηλή θερμική σταθερότητα με χρόνο ημι-ζωής 14.4 ώρες στους 60 °C. Στην έρευνα των Bonzom et al. οι υπολειμματικές δραστηριότητες έδειξαν ότι η φερουλική εστεράση MtFae1a από τον ίδιο μύκητα ήταν σχετικά σταθερή σε όλα τα pH και παρουσίασε υπολειμματική ενεργότητα πάνω από 80% μετά από 8 ώρες επώασης (Bonzom et al., 2019).

5.2.5. Τρόπος δράσης και συνεργισμοί με τις εστεράσες *CtCE2* και *OCE6* και τις GH10 και GH11 ξυλανάσες σε ακετυλιωμένη ξυλάνη

Από τα πειράματα που διεξήχθησαν για την διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της *TtCE16* εστεράσης, προέκυψε η παρατήρηση ότι η υπό μελέτη εστεράση επιφέρει παραπλήσια ποσοστά αποακετυλίωσης με την *CtCE2* ενώ η *OCE6* οδηγεί σε υψηλότερα αποτελέσματα σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανότατα οφείλεται στη δυνατότητα της εστεράσης CE6 να δρα σε διπλές ακετυλίωσεις αλλά και πολυμερή ξυλάνης. Όσον αφορά τα δείγματα που περιείχαν συνδυαστική δράση ενζύμων, παρατηρήθηκε σε όλα μεγαλύτερη απελευθέρωση οξικού οξέος τόσο με την ταυτόχρονη προσθήκη όσο και με τη διαδοχική προσθήκη των εστερασών. Ειδικότερα, στα δείγματα με τη συνεργιστική δράση των ενζύμων CE2-CE16 παρατηρήθηκε μια ελαφρώς μεγαλύτερη απελευθέρωση οξικού οξέος σε σχέση με τα δείγματα που είχαν μεμονωμένα τα ένζυμα. Το σημαντικότερο συμπέρασμα αυτής της σειράς των πειραμάτων, όμως, είναι η πλήρης αποακετυλίωση που επιτυγχάνεται στα δείγματα που είχαν το συνδυασμό ενζύμων CE6-CE16, τόσο στην κατεργασμένη ξυλάνη με την ξυλανάση GH10 όσο και με την ξυλανάση GH11. Η συμπληρωματική δράση των δύο αυτών εστερασών επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο TLC. Η συνεργιστική τους δράση οδήγησε σε αποακετυλίωση όλων των ακετυλιωμένων προϊόντων.

Ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία, παρατηρείται ότι έχει βρεθεί παρόμοιος τρόπος δράσης της εστεράσης της οικογένειας 16 από το μύκητα *Myceliophthora thermophila* και της αντίστοιχης από το μύκητα *Trichoderma reesei* όσον αφορά τη δράση τους στους ολιγοσακχαρίτες ξυλάνης. Και τα δύο ένζυμα χαρακτηρίζονται ως εξω-ακετυλ-εστεράσες λόγω της προτίμησής τους στο μη αναγωγικό άκρο των ξυλοολιγοσακχαριτών. Και τα δύο ένζυμα παρουσίασαν παρόμοια συνεργιστική δράση όταν υπήρχε επίσης ξυλανάση (Vegenas et al., 2022). Παρόμοιος φαίνεται να είναι κι ο τρόπος δράσης της CE16 εστεράσης από το μύκητα *Aspergillus niger*. Το συγκεκριμένο ένζυμο φαίνεται να επιτίθεται μόνο στα μη αναγωγικά άκρα και να αποακετυλιώνει στις θέσεις 3-Ac σε 3-Ac, 2,3-Ac και 2-O-GlcA,3-Ac υποκατεστημένων υπολειμμάτων, αλλά επίσης αποακετυλιώνει και τις θέσεις σε 2-Ac και 2,3-Ac των μη αναγωγικών άκρων (Vegenas et al., 2022).

5.2.6. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της GH10 ξυλανάσης με τις εστεράσες TtCE16 και OCE6 σε υπόστρωμα ΠΞΟ με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Τα πειράματα που έλαβαν χώρα σε υπόστρωμα ΠΞΟ με τη μέθοδο HPLC κατέδειξαν την υπεροχή της εστεράσης CE6 όσον αφορά την απελευθέρωση οξικού συγκριτικά με τη μελετώμενη εστεράση στα δείγματα με την παρουσία ενός μόνο ενζύμου. Το γεγονός αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει την υπόθεση περί αδυναμίας της εστεράσης CE16 να δράσει σε μεγαλύτερου M.B σακχαρίτες.

Αναφορικά με τα πειράματα που διεξήχθησαν για τον εντοπισμό των συνεργισμών που ενδεχομένως αναπτύσσονται μεταξύ της εστεράσης του οξικού οξέος TtCE16 και της ξυλανάσης GH10 (E-XYLATM) σημειώθηκε σαφής συνεργισμός, όπως και στα δείγματα με τα συνδυασμό CE6-GH10, καθώς οι εν λόγω εστεράσες είναι σε θέση να κόβουν οξικά και να απελευθερώνουν νέες θέσεις για να δράσει και πάλι η ξυλανάση. Ακόμα, στα δείγματα που περιλάμβαναν και τα 3 ένζυμα (CE6-CE16-GH10) το καλύτερο αποτέλεσμα όσον αφορά την απελευθέρωση οξικού, γεγονός που επιβεβαιώνει την ένδειξη για συμπληρωματική δράση των δύο εστερασών που προέκυψε από τα προηγούμενα πειράματα. Έτσι, βέλτιστος συνδυασμός για την αποικοδόμηση του υποστρώματος ΠΞΟ κρίνεται ο συνδυασμός των τριών αυτών ενζύμων.

Στη βιβλιογραφία έχει μελετηθεί η συνεργιστική δράση που αναπτύσσουν οι εστεράσες του οξικού οξέος και οι ξυλανάσες για την αποτελεσματική αποδόμηση της beechwood ξυλάνης. Η σημαντική επίδραση της δράσης της εστεράσης στην υδρόλυση των γλυκοσιδικών δεσμών υποδηλώνει ότι ο ρόλος της είναι καίριος σε διαδικασίες όπου χρησιμοποιείται ακετυλιωμένη ξυλάνη ως υπόστρωμα (Biely et al., 1986). Και οι Hettiarachchi et al. μελέτησαν τη συνεργιστική δράση μιας εστεράσης του οξικού με μια εμπορική ξυλανάση σε υπόστρωμα beechwood ξυλάνης και βρήκαν σημαντικά υψηλότερη δράση (29,47%) σε σχέση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο την ξυλανάση (Hettiarachchi et al., 2019).

5.2.7. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της GH10 ξυλανάσης με τις εστεράσες *TiCE16* και *OCE6* σε υπόστρωμα ΠΞΟ με τη μέθοδο χρωματογραφίας ιοανταλλαγής υψηλής απόδοσης (HPAEC)

Η παρουσία της εστεράσης *TiCE16* δε συνεισφέρει ιδιαίτερος στη δράση της ξυλανάσης E-XYLATM, όσον αφορά την απελευθέρωση ξυλόζης και ξυλοβιόζης. Αιτία για το αποτέλεσμα αυτό είναι ότι η εστεράση του οξικού, *CE16*, δρα σε ολιγοσακχαρίτες που ενδεχομένως δεν επηρεάζουν σημαντικά τη δράση της ξυλανάσης, η οποία δρα κατά προτεραιότητα σε μεγαλύτερου M.W σακχαρίτες και έπειτα σε ολιγοσακχαρίτες. Αναφορικά με την ξυλοτριόζη, ξυλοτετραόζη, ξυλοπενταόζη και ξυλοεξαόζη αν και παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των X3, X4, X5, X6, εντούτοις δεν ήταν η προσδοκώμενη και ήταν σαφώς μικρότερη από αυτήν που επετεύχθη με το συνδυασμό *CE6-GH10*. Κατά συνέπεια, συμπεραίνεται ότι η εστεράση *CE16* έχει πολύ μικρή επίδραση στην ενεργότητα της ξυλανάσης *GH10*, όσον αφορά αυτούς τους σακχαρίτες. Με άλλα λόγια, η εν λόγω εστεράση φαίνεται να έχει δράση στα X1, X2, X3 ενώ η ξυλανάση απελευθερώνει τα συστατικά αυτά ως προϊόντα, συνεπώς δεν μπορεί να δράσει πάνω τους. Εν αντιθέσει, στα δείγματα με τα ένζυμα *GH10-CE6* παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις των X3, X4, X5 και X6 και επομένως, η εστεράση *CE6* κρίνεται ως καταλληλότερη για συνεργιστικό με τη *GH10* ξυλανάση για την αποδόμηση υποστρώματος ΠΞΟ. Όσον αφορά την απελευθέρωση του ουρονικού ολιγοσακχαρίτη UX, παρόλο που με το συνδυασμό ενζύμων *CE16-GH10* δεν παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση, εντούτοις παρουσία και των τριών ενζύμων (*CE6-CE16-GH10*) επιτυγχάνεται αυξητική τάση.

Με τα συγκεκριμένα πειράματα επιβεβαιώνεται ότι όσο αυξάνει ο βαθμός πολυμερισμού του υποστρώματος τόσο μικρότερη είναι η επίδραση της εστεράσης *TiCE16* στην αποακετυλίωση για τη δράση της ξυλανάσης. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια επιπλέον ένδειξη ότι το μελετώμενο ένζυμο δρα σε ολιγοσακχαρίτες.

Στη βιβλιογραφία, έχουν αναφερθεί συνεργιστικοί εστερασών-ξυλανασών όσον αφορά την απελευθέρωση αλδουρονικών οξέων, όπως στη μελέτη των Razeq et al., που συγκρίθηκε μια υδατανθρακική εστεράση με μια ξυλανάση της οικογένειας 115 και βρέθηκε πολύ μεγαλύτερη απελευθέρωση σε σχέση με το συνδυασμό της εμπορικής εστεράσης *OCE6* με την ίδια ξυλανάση, πιθανώς λόγω της ικανότητας της εστεράσης που μελέτησαν να δρα και σε εσωτερικές και σε ακριανές (2-O-MeGlcP_A)₃-O-acetyl-Xylp δομές (Razeq et al., 2018),.

5.2.8. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της *TiXyn30A* ξυλανάσης με εστεράσες του οξικού οξέος σε ακετυλιωμένη ξυλάνη

Κατά τη μελέτη της συνδυαστικής δράσης της εστεράσης *TiCE16* και των υπόλοιπων εστερασών (*CE2* και *CE6*) με την ξυλανάση *TiXyn30A* σε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης σημειώθηκε σαφής συνεργιστική δράση των εστερασών και της ξυλανάσης, κατά την απελευθέρωση ξυλοβιόζης (X2). Ωστόσο, η μεγαλύτερη με διαφορά συνεργιστική δράση καταγράφηκε με το συνδυασμό *CE6-GH30*, γεγονός που πιστοποιεί την έλλειψη ενδο-δράσης της μελετώμενης εστεράσης, σε αντίθεση με τη *CE6*. Επί της ουσίας, η έξω-δράση της ξυλανάσης *TiXyn30A* απαιτεί τις τρεις ακριανές ξυλόζες από το μη αναγωγικό άκρο από τις οποίες κόβει τις δύο. Συγκρίνοντας τις

εστεράσες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, η CE6 επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα σε συνδυασμό με την GH30 που υποδηλώνει ότι η CE6 καθαρίζει το πολυμερές πιο αποτελεσματικά για να το αξιοποιήσει η GH30 μετέπειτα.

Παρόλο που στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί συνεργισμοί μεταξύ εστερασών του οξικού και ξυλανασών σε ακετυλιωμένη ξυλάνη, όπως π.χ. οι Kosugi et al. που βρήκαν συνεργιστική δράση μεταξύ μιας ξυλανάσης (ενδο-ξυλανάσης) της οικογένειας 11 και μιας εστεράσης του οξικού σε ακετυλιωμένη ξυλάνη (Kosugi et al., 2002), ή όπως οι Puchart et al. που χρησιμοποίησαν την εστεράση CE6 από μύκητα του γένους *Orpinomyces* για την παρασκευή ακετυλιωμένης γλυκουρονοξυλάνης με υποκαταστάσεις ουρονικών οξέων (3-*O*-ακετυλίωση), ώστε μετά να δράσει η ενδο-ξυλανάση της οικογένειας 30 (Puchart et al., 2019), εντούτοις ως τώρα δεν έχει σημειωθεί σαφής συνεργισμός μεταξύ GH30 ξυλανάσης με έξω-δράση με κάποια εστεράση του οξικού. Το εύρημα της παρούσας μελέτης, κατά συνέπεια, δύναται να αποτελέσει το έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη των συνεργισμών που μπορεί να αναπτυχθούν μεταξύ εστερασών του οξικού οξέος και GH30 ξυλανασών που παρουσιάζουν μόνο έξω-δράση στα εκάστοτε υποστρώματα.

5.2.9. Μελέτη συνεργιστικής δράσης της *TiXyn30A* ξυλανάσης με εστεράσες του οξικού οξέος σε υπόστρωμα ΠΕΟ

Ακολούθησε η μελέτη για την πιθανή συνεργιστική δράση της εστεράσης του οξικού οξέος *TiCE16* με την ξυλανάση της οικογένειας GH30 (*TiXyn30A*) σε υπόστρωμα ΠΕΟ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει συνεργισμός μεταξύ *TiCE16-TiXyn30A* όσον αφορά την απελευθέρωση ξυλόζης και ξυλοβιόζης, αλλά αυτός υστερεί αρκετά σε σχέση με τους συνεργισμούς που αναπτύχθηκαν στα δείγματα με το συνδυασμό *OCE6-TiXyn30A* και *CiCE2- TiXyn30A*. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού η CE16 επί της ουσίας δρα στα προϊόντα της GH30 και όχι το υπόστρωμά της. Μηδενική αύξηση με το συνδυασμό των ενζύμων *TiCE16-TiXyn30A* παρατηρήθηκε και όσον αφορά την απελευθέρωση του ουρονικού ολιγοσακχαρίτη *O-XUX*, σε αντίθεση με τους συνδυασμούς *CiCE2- TiXyn30A* και *OCE6-TiXyn30A* σημειώθηκε πολύ μεγάλη αύξηση στην απελευθέρωση του *O-XUX*, χάρη στην ικανότητα των εστερασών αυτών να δρουν και στο εσωτερικό του πολυμερούς. Τέλος, σχετικά με τον ουρονικό ολιγοσακχαρίτη *O-UX*, παρατηρείται συνεργισμός μεταξύ των ενζύμων *TiCE16-TiXyn30A*, αλλά υπολείπεται κατά πολύ σε σύγκριση με το συνδυασμό των ενζύμων *CiCE2- TiXyn30A*, που προκαλεί διπλάσια αύξηση του *O-UX*. Από όλα τα παραπάνω, προκύπτει ότι η συνδυαστική δράση των *TiCE16-TiXyn30A* δεν είναι αποτελεσματική για την αποδόμηση του υποστρώματος ΠΕΟ.

Σύμφωνα με τους Katsimpoura et al. που μελέτησαν κι αυτοί την *TiXyn30A* σε ξύλο οξιάς, το εν λόγω ένζυμο παρουσίασε μια ενδο-δράση παρόμοια με εκείνη των βακτηριακών ξυλανασών GH30 που απαιτούν MeGlcA, σε αντίθεση με τις πιο συχνές χαρακτηρισμένες μυκητιακές ξυλανάσες της οικογένειας 30. Ωστόσο, η *TiXyn30A* παρουσίασε επίσης μια συμπεριφορά έξω-δράσης απελευθερώνοντας το δισακχαρίτη ξυλοβιόζη από το μη αναγωγικό άκρο του XO. Τα κύρια ουρονικά XO (UXOS) ήταν τα αλδοτριουρονικά και το αλδοτετραουρονικό οξύ μετά από μεγαλύτερη επώαση

υποδεικνύοντας την ικανότητα της *TtXyn30A* να διασπά γραμμικά μέρη ξυλάνης και UXOS (Katsimpouras et al., 2019).

Κι άλλες ξυλανάσες της οικογένειας 30, όπως η *BsXyn30* από το βακτήριο *Bacillus subtilis* έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της ξυλάνης με υποκαταστάσεις γλυκουρονικών οξέων (Guo et al., 2018). Η *Xyn30D* από το βακτήριο *Raenibacillus barcinonensis* υδρολύει αποτελεσματικά τις γλυκουρονοξυλάνες και τους διακλαδισμένους ξυλοολιγοσακχαρίτες του μεθυλο-γλυκουρονικού οξέος, αλλά δεν εμφάνισε καταλυτική δράση στις υποκατεστημένες με αραβινόζη ξυλάνες (Valenzuela et al., 2012).

5.3. Επίδραση της δράσης της α-γλυκουρονιδάσης E-AGUBS στα προϊόντα υδρόλυσης της *TtXyn30A* σε υπόστρωμα ΠΞΟ

Τέλος, από τα πειράματα που διεξήχθησαν για να διερευνηθεί αν η προσθήκη της α-γλυκουρονιδάσης (E-AGUBS) σε δείγματα που περιέχουν την ξυλανάση GH30 (*TtXyn30A*) υποβοηθά την κατανάλωση ουρονικών ολιγοσακχαριτών σε υπόστρωμα ΠΞΟ παρατηρήθηκε μείωσή του ουρονικού O-UX σε ποσοστό 45%. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι το προϊόν της GH30 που δεν υδρολύεται είναι ακετυλιωμένο, αλλά το αποτέλεσμα αυτό χρήζει περαιτέρω μελέτης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Συνοψίζοντας, η παγκόσμια ανάγκη σήμερα για μείωση των εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου, η αλόγιστη χρήση των φυσικών πόρων και η διαρκώς αυξανόμενη αναζήτηση για νέες, πιο εξελιγμένες και βιώσιμες τεχνολογίες έχει οδηγήσει σε εκτεταμένη έρευνα όσον αφορά την παραγωγή ενέργειας, υλικών, ζωοτροφών και προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από ανανεώσιμες, μη εδώδιμες καλλιέργειες. Η παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοχημικών από τη μη βρώσιμη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα έχει αναδειχθεί ως μία σημαντική ευκαιρία για την ανάπτυξη της κυκλικής βιοοικονομίας, ενός μοντέλου δηλαδή που θα συνδυάζει τη βιοοικονομία με την κυκλική οικονομία που βασίζεται σε ανανεώσιμες πηγές. Η κυκλική βιοοικονομία αναμένεται να ενισχύσει τη βιωσιμότητα της οικονομικών διαδικασιών και των προϊόντων, να βοηθήσει στο μετριασμό της κλιματικής αλλαγής, καθώς επίσης και στη διασφάλιση της ενεργειακής επάρκειας, αλλά και να οδηγήσει στο άνοιγμα πολλών νέων θέσεων απασχόλησης.

Οι ξυλοολιγοσακχαρίτες (XOs) είναι συστατικά που προέρχονται από την λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα και αναμένεται να παίξουν σημαντικό ρόλο στη στροφή την κυκλική βιοοικονομία, λόγω της άφθονης διαθέσιμης ποσότητάς τους και των περιβαλλοντικών οφελών που συνεπάγεται, καθώς με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται και ένα σχέδιο διαχείρισης των απορριμμάτων. Οι ξυλοολιγοσακχαρίτες παρουσιάζονται ως αναδυόμενα πρεβιοτικά και επιφέρουν πολλά οφέλη τόσο για την υγεία του ανθρώπου, όσο και στην κτηνοτροφία ως συστατικά σε ζωοτροφές.

Η παρούσα εργασία εστιάζει στη μελέτη καινοτόμων ενζύμων (όπως είναι η αραβινοφουρανοζιδάση *TtAbf43* και η εστεράση του οξικού οξέος *TtCE16*) για την αποδοτικότερη αποικοδόμηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Πιο συγκεκριμένα, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην ενζυμική υδρόλυση της ξυλάνης, η οποία αποτελεί δομικό συστατικό της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Επιπλέον, μελετήθηκε η συνεργιστική δράση των προαναφερθέντων ενζύμων με διαφορετικά ένζυμα (ξυλανάσες, εστεράσες του οξικού οξέος και γλυκουρονιδάση) με σκοπό την μελέτη του μηχανισμού δράσης τους. Η κατανόηση του τρόπου δράσης αυτών των ενζύμων, των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας τους, καθώς και των συνεργιστισμών που αναπτύσσονται με άλλα ένζυμα αναμένεται να αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο στην εύρεση αποτελεσματικότερων κοκτέιλ ενζύμων που θα κάνουν την όλη διαδικασία της αποικοδόμησης ταχύτερη, οικονομικά βιώσιμη και αποδοτικότερη όσον αφορά τα χρήσιμα προϊόντα που προκύπτουν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκαν η αραβινοφουρανοζιδάση *TtAbf43* και η εστεράση του οξικού οξέος, *TtCE16*, προκειμένου να γίνουν πιο αντιληπτοί οι μηχανισμοί δράσης τους, οι συνθήκες στις οποίες λειτουργούν με βέλτιστο τρόπο και οι συνεργισμοί που αναπτύσσουν με άλλα ένζυμα, τόσο για τη διάσπαση πολυμερικών όσο και ξυλώδων υλικών. Από τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν και τα συμπεράσματα που συζητήθηκαν παραπάνω προκύπτουν ορισμένες προτάσεις για μελλοντική εργασία για την περαιτέρω ανάλυση των δύο αυτών ενζύμων. Προτείνονται λοιπόν:

- Η μελέτη της δράσης της αραβινοφουρανοζιδάσης *TtAbf43* σε λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα και η διερεύνηση της συνεργιστικής ικανότητας με άλλα ένζυμα.
- Η περαιτέρω μελέτη της συνεργιστικής δράσης της εστεράσης *TtCE16* με την εστεράση *OCE6* και σε άλλα υποστρώματα, καθώς και με άλλες ξυλανάσες, αφού λόγω της συμπληρωματικής του δράσης είναι πολλά υποσχόμενος ο συνεργισμός τους σε εφαρμογές βιοκατάλυσης.
- Η διερεύνηση της δράσης της εστεράσης *TtCE16* σε συνδυασμό και με άλλες ξυλανάσες που έχουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης από τις GH10 και GH11, καθώς ενδέχεται να φανεί εκεί πιο σημαντική η συμμετοχή της στην αποτελεσματική αποικοδόμηση των υποστρωμάτων.
- Ο έλεγχος της ακετυλίωσης που εικάζεται ότι υπάρχει κατά το συνεργιστικό μεταξύ της ξυλανάσης *TtXyn30A* και της α-γλυκουρονιδάσης E-AGUBS σε υπόστρωμα προκατεργασμένης βιομάζας από ξύλο οξιάς, καθώς και η μελέτη της δράσης της *TtCE16* σε αυτήν την ακετυλίωση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abu Saleh M., Han W. J., Lu M, Wang B., Li H., Kelly R. M. and Li F. L. (2017). Two Distinct α -L-Arabinofuranosidases in Caldicellulosiruptor Species Drive Degradation of Arabinose-Based Polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* 83(13).
- Aftab M. N., Iqbal I., Riaz F., Karadag A. and Tabatabaei M. (2019). Different Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass for Use in Biofuel Production. Biomass for Bioenergy- Recent Trends and Future Challenges. London, United Kingdom: IntechOpen.
- Ahmed S., Luis A. S., Bras J. L. A., Ghosh A., Gautam S., Gupta M. N., Fontes C. M. G. and Goyal A. (2013). A Novel α -L-Arabinofuranosidase of Family 43 Glycoside Hydrolase (Ct43Araf) from Clostridium thermocellum. *PLoS One* 8 (9).
- Ainsworth S. (1977). Michaelis-Menten Kinetics. *Steady-State Enzyme Kinetics*, 43-73.
- Akash M. S. H. and Rehman K. (2020) Thin Layer Chromatography. *Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Springer, Singapore.
- Alex D., Shainu A., Pandey A. and Sukumaran R. K. (2014). Esterase Active in Polar Organic Solvents from the Yeast Pseudozyma sp. NII 08165. *Enzyme Research* 2.
- Amin F. R., Khalid H., Zhang H., Rahman S., Zhang R., Guangqing L. and. Chen C. (2017). Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express* 7, 72.
- Amorim C., Silvério S. C., Prather K. L. J. and Rodrigues L. R. (2019). From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. *Biotechnology Advances* 37.
- Andersen N., Johansen K. S., Michelsen M., Stenby E. H., Krogh K. B., Olsson L. (2008). Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on Avicel. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 362–70.
- Anwar Z., Gulfranz M. and Irshad M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* Vol. 7, 163-173.
- Barhoum A., Jeevanandam J., Rastogi A., Samyn P., Boluk Y., Dufresne A., Danquah M. K. and Bechelany M. (2020). Plant Celluloses, Hemicelluloses, Lignins, and Volatile Oils for the Synthesis of Nanoparticles and Nanostructured Materials. *Nanoscale*, Issue 4, 22845-22890.
- Baruah J., Nath B. K., Sharma R., Kumar S., Deka R. C., Baruah D. C. and Kalita E. (2018). Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. *Frontiers in Energy Search*, 6.

- Bastawde K. B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, 353-368.
- Bele A. A. and Khale A. (2011). An overview of thin layer chromatography. *International journal of pharmaceutical sciences and research* 2, 256-267.
- Berglund J., Mikkelsen D., Flanagan B. M., Dhital S., Gaunitz S., Henriksson G., Lindström M. E., Yakubov G. E., Gidley M. J. and Vilaplana F. (2020). Wood hemicelluloses exert distinct biomechanical contributions to cellulose fibrillar networks. *Nature Communications* Vol 11, Issue 1.
- Biely P. (2012). Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 30, 1575–1588.
- Biely P., MacKenzie C., Puls J. and Schneider H. (1986). Cooperativity of Esterases and Xylanases in the Enzymatic Degradation of Acetyl Xylan. *Nature Biotechnology* 4, 731–733.
- Biely P., Singh S., and Puchart V. (2016). Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnology Advances*, 34, 1260–1274.
- Biely P., Westereng B., Puchart V., De Maayer P. and Cowan, D. A. (2014). Recent Progress in Understanding the Mode of Action of Acetylxytan Esterases. *Journal of Applied Glycoscience*, 61, 35–44.
- Bonnin E., Daviet S., Sorensen J. F., Sibbesen O., Goldson A., Juge N. and Saulnier L. (2006). Behaviour of family 10 and 11 xylanases towards arabinoxylans with varying structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 1618–1622.
- Bonzom C., Hüttner S., Mirgorodskaya E., Chong S., Uthoff S., Steinbüchel A., Verhaert R. M. D. and Olsson L. (2019). Glycosylation influences activity, stability and immobilization of the feruloyl esterase 1a from *Myceliophthora thermophila*. *AMB Expr* 9, 126.
- Brett C., Waldon K. (1996). *Physiology and biochemistry of plant cell walls. Second Edition. London: Chapman Hall.*
- Brown R.M. Saxena Jr., Saxena Inder M. (2007). Cellulose: Molecular and structural Biology. *The Netherlands: Springer.*
- Bussemaker M. J. and Zhang D. (2013). Effect of Ultrasound on Lignocellulosic Biomass as a Pretreatment for Biorefinery and Biofuel Applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 52, 3563-3580.
- Byrt C. S., Betts N., Farrokhi N. and Burton R. (2013). Deconstructing Plant Biomass: Cell Wall Structure and Novel Manipulation Strategies. *Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics* 135-150.
- Cartmell A., McKee L. S., Peña M. J., Larsbrink J., Brumer H., Kaneko S., Ichinose H., Lewis R. J., Viksø-Nielsen A., Gilbert H. J. and Marles-Wright J. (2011). The structure and function of an arabinan-specific α -1,2-Arabinofuranosidase identified

from screening the activities of bacterial GH43 glycoside hydrolases. *Journal of Biological Chemistry* 286, 15483–15495.

Carvalho F., Duarte L. C. and Gírio F. M. (2008). Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research* 67, 849-864.

Carvalho A. F. A., Neto P. O., Da Silva D. F. and Pastore G. M. (2013). Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International* 51, 75-85.

Chandel A. K., Garlapati V. K., Kumar S. P. J., Hans M., Singh A. K. and Kumar S. (2020). The role of renewable chemicals and biofuels in building a bioeconomy. *Biofuels Bioproducts and Biorefining* 14, 830-844.

Chaturvedi T., Torres A., Stephanopoulos G, Thomsen M. H. and Schmidt J. E. (2020). Developing Process Designs for Biorefineries—Definitions, Categories, and Unit Operations. *Energies* 13 (6).

Chen Y., Xie Y., Ajuwon K. M., Zhong R., Li T., Chen L., Zhang H., Beckers Y. and Everaert N. (2021). Xylo-Oligosaccharides, Preparation and Application to Human and Animal Health: A Review. *Frontiers in nutrition* 8, 731930.

Corradini C., Cavazza A. and Bignardi C. (2012). High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 2012, 1-13.

De Souza W. R. (2013). Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, edited by Anuj Chandel, Silvio Silva, IntechOpen.

Dowd J. E. and Riggs D. E. (1965). A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations. *Journal of Biological Chemistry* 240, 863-869.

Fengxia L., Mei L., Zhaoxin L., Xiaomei B., Haizhen Z. and Yi W. (2008). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology* 99, 5938–5941.

Ferreira-Leitao V., Leda Maria Fortes Gottschalk L. M., Ferrara M. A., Lima Nepomuceno A., Correa Molinari H. B. and Bon E. P. (2010). Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. *Waste Biomass Valor* 1, 65-67.

Geiss F. (1987). Fundamentals of thin layer chromatography planar chromatography. Heidelberg, Dr. A. Hiithig, ISBN 3-7786-0854-7.

Grantham N. J., Wurman-Rodrich J., Terrett O. M. Lyczakowski J. J., Stott K., Iuga D., Simmons T. J., Durand-Tardif M., Brown S. P., Dupree R., Busse-Wicher M. and Dupree P. (2017). An even pattern of xylan substitution is critical for interaction with cellulose in plant cell walls. *Nature Plants* 3, 859–865.

- Guo Y., Gao Z., Xu J., Chang S., Wu B. and He B. (2018). A family 30 glucuronoxylanase from *Bacillus subtilis* LC9: Expression, characterization and its application in Chinese bread making. *International Journal of Biological Macromolecules* 117, 377-384.
- Gutiérrez C. D. B., Sern D. L. R. and Alzate C. A. C. (2017). A comprehensive review on the implementation of the biorefinery concept in biodiesel production plants. *Biofuel Research Journal* 15, 691-703.
- Hasanov I., Raud M. and Kikas T. (2020). The Role of Ionic Liquids in the Lignin Separation from Lignocellulosic Biomass. *Energies* 13, 1-24.
- Hettiarachchi S. A., Kwon YK., Lee Y., Jo E., Eom T. Y, Kang Y. H., Kang DH., De Zoysa M., Marasinghe S. D. and Ohet C. (2019). Characterization of an acetyl xylan esterase from the marine bacterium *Ochrovirga pacifica* and its synergism with xylanase on beechwood xylan. *Microbial Cell Factories* 18, 122.
- Huang Y., Zheng X., Pilgaard B., Holck J., Muschiol J., Li S., and Lange L. (2019). Identification and characterization of GH11 xylanase and GH43 xylosidase from the chytridiomycetous fungus, *Rhizophlyctis rosea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 777–791.
- Isikgor F. H. and Remzi Becer C. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry* Vol. 6, 4497-4559.
- Jain I., Kumar V. and Satyanarayana T. (2015). Xylooligosaccharides: An economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. *Indian Journal of Experimental Biology* 53, 131-142.
- Kameshwar A. K. S. and Qin W. (2018). Understanding the structural and functional properties of carbohydrate esterases with a special focus on hemicellulose deacetylating acetyl xylan esterases. *Mycology* 9, 273-295.
- Kamusoko R., Jingura R. M., Parawira W. and Sanyika W. T. (2019). Comparison of pretreatment methods that enhance biomethane production from crop residues-a systematic review. *Biofuel Research Journal* 6 (4), 1080-1089.
- Karnaouri A., Muraleedharan M. N., Dimarogona M., Topakas E., Rova U., Sandgren M. and Christakopoulou P. (2017). Recombinant expression of thermostable processive MtEG5 endoglucanase and its synergism with MtLPMO from *Myceliophthora thermophila* during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels* 10, 126.
- Kato T., Shiono Y. and Koseki T. (2021). Identification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 132, 337-342.
- Katsimpouras C., Dedes G., Thomaidis N. S and Topakas E. (2019). A novel fungal GH30 xylanase with xylobiohydrolase auxiliary activity. *Biotechnology for Biofuels* Vol. 12.

- Katsimpouras C., Dimarogona M., Petropoulos P., Christakopoulos P. and Topakas E. (2016). A thermostable GH26 endo- β -mannanase from *Myceliophthora thermophila* capable of enhancing lignocellulose degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 8385–8397.
- Khandeparker R. and Numan M. (2008). "Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35, 635-644.
- Kormelink F. J. M., Lefebvre B., Strozyk F. and Voragen A. G. J. (1993). Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology* 27, 267-282.
- Kosugi A., Murashima K. and Doi R.H. (2002). Xylanase and acetyl xylan esterase activities of XynA, a key subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome for xylan degradation. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6399-6402.
- Kühnel S., Westphal Y., Hinz S. W., Schols H. A. and Gruppen H. (2011). Mode of action of *Chrysosporium lucknowense* C1 α -l-arabinohydrolases. *Bioresource Technology* 102, 1636-1643.
- Kumar B., Bhardwaj N., Agrawal K., Chaturvedi V. and Verma P. (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology* 199.
- Kumar P., Barrett D. M., Delwiche M. J. and Stroeve P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 48, 3713-3729.
- Labourel F. and Rajon E. (2021). Resource Uptake and the Evolution of Moderately Efficient Enzymes. *Molecular Biology and Evolution* 38, 3938–3952.
- Lagaert S., Pollet A., Delcour J. A., Lavigne R., Courtin C. M. and Volckaert G. (2010). Substrate specificity of three recombinant α -L-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium adolescentis* and their divergent action on arabinoxylan and arabinoxylan oligosaccharides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 402, 644-650.
- Latha G. M. and Muralikrishna G. (2007). Purification and partial characterization of acetic acid esterase from malted finger millet (*Eleusine coracana*, Indaf-15). *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 895-902.
- Lee H., Biely P., Latta R. K., Barbosa M. F. S. and Schneider H. (1986). "Utilization of Xylan by Yeasts and Its Conversion to Ethanol by *Pichia stipitis* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 320-324.
- Lemesa A. C., Silvério S. C., Rodrigues S. and Rodrigues L. R. (2019). Integrated strategy for purification of esterase from *Aureobasidium pullulans*. *Separation and Purification Technology* 209, 409-418.

- Lin Z., Huang H., Zhang H., Zhang L., Yan L. and Chen J. (2010) Ball milling pretreatment of corn stover for enhancing the efficiency of enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162, 1872–1880.
- Linares-Pastén J. A., Aronsson A. and Nordberg Karlsson E. (2016). Structural Considerations on the Use of Endo-Xylanases for the Production of prebiotic Xylooligosaccharides from Biomass. *Current Protein and Peptide Science* 18, 1-20.
- Liu Y., Vanderhaeghen S., Feiler W., Angelov A., Baudrexl M., Zverlov V. and Liebl W. (2021). Characterization of two α -L-Arabinofuranosidases from *Acetivibrio mesophilus* and their Synergistic Effect in Degradation of Arabinose-Containing Substrates. *Microorganisms* 9(7), 1467.
- Madadi M., Tu Y. and Abbas A. (2017). Recent Status on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *Electronic Journal of Biology* 13, 135-143.
- Mahmood Z., Yameen M., Jahangeer M., Riaz M., Ghaffar A. and Javid I. (2018). Lignin as Natural Antioxidant Capacity. *Lignin - Trends and Applications* 8, 181-205.
- Mai-Gisondi G., Maaheimo H., Chong S., Hinz S., Tenkanen M. and Master E. (2017). Functional comparison of versatile carbohydrate esterases from families CE1, CE6 and CE16 on acetyl-4-O-methylglucuronoxylan and acetyl-galactoglucomann. *BBA-General Subjects* 1861, 2398-2405.
- Malgas S., Mafa M. S., Mkabayi L. and Pletschke B. I. (2019). A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35, 1–13.
- Matsuo N., Kaneko S., Kuno A., Kobayashi H., and Kusakabe I. (2000). Purification, characterization and gene cloning of two alpha-L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* GS901. *The Biochemical journal* 346, 9–15.
- Michlmayr H., Hell J., Lorenz C., Böhmendorfer S., Rosenau T. and Kneifel W. (2013). Arabinoxylan oligosaccharide hydrolysis by family 43 and 51 glycosidases from *Lactobacillus brevis* DSM 20054. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 6747-6754.
- Morais M. A. B., Coines J., Domingues M. N., Pirolla R. A. S., Tonoli C. C. C., Santos C. R., Correa J. B. L., Gozzo F. C., Rovira C. and Murakami M. T. (2021). Two distinct catalytic pathways for GH43 xylanolytic enzymes unveiled by X-ray and QM/MM simulations. *Nature Communications* 12.
- Morgan N. K., Wallace A., Bedford M. R and Chocta M. (2017). Efficiency of xylanases from families 10 and 11 in production of xylo-oligosaccharides from wheat arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers* 167, 290–296.
- Motta M. L. L., Filho J. A. F., de Melo R.R., Zanphorlin L. M., dos Santos C. A. and de Souza A. P. (2021). Novel fungal metal-dependent α -L-arabinofuranosidase of family 54 glycoside hydrolase shows expanded substrate specificity. *Scientific Reports* 11, 10961.

- Nakamura A. M., Nascimento A. S. and Polikarpov I. (2017). Structural diversity of carbohydrate esterases. *Biotechnology Research and Innovation* 1, 35-51.
- Neumüller K. G., de Souza A. C., Van Rijn J. H., Streekstra H., Gruppen H. and Schols H. A. (2015). Positional preferences of acetyl esterases from different CE families towards acetylated 4-O-methyl glucuronic acid-substituted xylo-oligosaccharides. *Biotechnology for Biofuels* 8 (1),7.
- Nikolaivits E., Pentari C., Kosinas C., Feiler C. G., Spiliopoulou M., Weiss M. S., Dimarogona M. and Topakas E. (2021). Unique features of the bifunctional GH30 from *Thermothelomyces thermophila* revealed by structural and mutational studies. *Carbohydrate Polymers* 273.
- Numan M. T. and Bhosle N. B. (2006). α -L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 3, 247–260.
- Pinales-Marquez C. D., Rodríguez-Jasso R. M., Araújo R. G., Loredó-Trevi A., Nabarlatz D., Gullon B. and Ruiz H. A. (2021). Circular bioeconomy and integrated biorefinery in the production of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A review. *Industrial Crops & Products* 162.
- Poutanen K. and Sundberg M. (1988). An acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role in the hydrolysis of acetyl xylans. *Applied Microbiology and Biotechnology* 28, 419-424.
- Prakesh A., Dave V., Sur S. and Sharma P. (2020). Vivid techniques of pretreatment showing promising results in biofuel production and food processing. *Journal of Food Process Engineering* 44 (121).
- Puchart V., Agger J. W., Berrin J. G., Várnai A., Westereng B. and Biely P. (2016). Comparison of fungal carbohydrate esterases of family CE16 on artificial and natural substrates. *Journal of Biotechnology* 233, 228–236.
- Puchart V., Suchova K. and Biely P. (2021). Xylanases of glycoside hydrolase family 30 – An overview. *Biotechnology Advances* 47, 107704.
- Ravanal M. C. and Eyzaguirre J. (2015). Heterologous expression and characterization of α -L-arabinofuranosidase 4 from *Penicillium purpurogenum* and comparison with the other isoenzymes produced by the fungus. *Fungal Biology* 119, 7.
- Ravindran R. and Jaiswal A. K. (2016). A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 199, 92–102.
- Razeq F. M., Jurak E., Stogios P. J., Yan R., Tenkanen M., Kabel M. A., Wang W. and Master E. R. (2018). A novel acetyl xylan esterase enabling complete deacetylation of substituted xylans. *Biotechnology for Biofuels* 11, 74.
- Rohman A., Dijkstra B. W. and Tri Puspaningsih N. N. (2019). β -Xylosidases: Structural Diversity, Catalytic Mechanism, and Inhibition by Monosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 22.

- Saha B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* Vol. 30, 279-291.
- Saini J. K., Saini R. and Tewari L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech* Vol. 5, 337–353.
- Saleh M. A., Mahmud S., Albogami S., El-Shehawi A. M. , Paul G. K., Islam S., Dutta A. K., Uddin M. S. and Zaman S. (2022). Biochemical and Molecular Dynamics Study of a Novel GH 43 α -L-Arabinofuranosidase/ β -Xylosidase From *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM8903. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10, 810542.
- Samanta A. K., Jayapal N., Chikkerur J., Roy S., Kolte A., Senani S. and Sridhar M. (2015). Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 6, 62-71.
- Sánchez C. (2009). Lignocellulosic Residues: Biodegradation and Bioconversion by Fungi. *Biotechnology Advances* 27, 185–94.
- Scheller H. V. and Ulvskov P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61, 263-289.
- Selig M. J., Adney W. S., Himmel M. E. and Decker S. R. (2009). The impact of cell wall acetylation on corn stover hydrolysis by cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Cellulose* 16, 711–722.
- Singh S., Madlala A. M. and Prior B. A. (2003). *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 3-16.
- Spagnuolo M., Crecchio C., Pizzigallo M.D.R. and Ruggiero P. (1997). Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp. *Bioresource Technology* 60, 215-222.
- Stegmann P., Londo M. and Junginger M. (2020). The circular bioeconomy: Its elements and role in European bioeconomy clusters. *Resources, Conservation & Recycling: X* 6, 100029.
- Subramaniyan S. and Prema P. (2002). Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. *Critical Reviews in Biotechnology* 22, 33-64.
- Šuchová K., Puchart V., Spodsberg N., K. B. R. Mørkeberg Krogh K. B. R. and Biely P. (2021). Catalytic Diversity of GH30 Xylanases. *Molecules* 26 (15).
- Sun Y. and Cheng J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology* 83, 1–11.
- Tengerdy R. P. and Szakacs G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 169–179.
- Thakur A., Sharma K., Jamaldheen S. B. and Goyal A. (2020). Molecular characterization, regioselective and synergistic action of first recombinant type III α -L-

arabinofuranosidase of Family 43 Glycoside Hydrolase (PsGH43_12) from *Pseudopedobacter saltans*. *Molecular Biotechnology* 62, 443–455.

Titus B. D., Brown K., Helmisaari H. S., Vanguelova E., Stupak I., Evans A., Clarke N., Guidi C., Bruckman V. J., Varnagiryte-Kabasinskiene I., Armolaitis K., De Vries W., Hirai K., Kaarakka L., Hogg K., Reece P. (2021). Sustainable forest biomass: A review of current residue harvesting guidelines. *Energy, Sustainability and Society* Vol. 11 (10).

Topakas E., Kyriakopoulos S., Biely P., Hirsch J., Vafiadi C. and Christakopoulos P. (2010). Carbohydrate esterases of family 2 are 6-O-deacetylases. *FEBS Letters* 584, 543-548.

Tumuluru J. S., Wright T. C, Boardman R., Yancey N. A. and Sokhansanj S. (2011). A Review on Biomass Classification and Composition, Co-Firing Issues and Pretreatment Methods Vol. 3.

Uhliaríková I., Vršanská M., Barry V., Biely P. (2013). Positional specificity of acetylxy lan esterases on natural polysaccharide: An NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 6, 3365-3372.

Van Dyk J.S. and Pletschke B.I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology advances* 30, 1458-1480.

Valenzuela S. V., Diaz P., and Pastor F. I. (2012). Modular glucuronoxylan-specific xylanase with a family CBM35 carbohydrate-binding module. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 3923-3931.

Venegas F. A., Koutaniemi S., Langeveld S. M. J., Bellemare A., Chong S. L., Dilokpimol A., Lowden M. J., Hilden K. S., Leyva-Illades J. F., Mäkelä M. R., My Pham T. T., Peng M., Hancock M. A., Zheng Y., Tsang A., Tenkanen M., Powlowski J. and de Vries R.P. (2022). Carbohydrate esterase family 16 contains fungal hemicellulose acetyl esterases (HAEs) with varying specificity. *New Biotechnology* 9, 28-38.

Vu H. P., Nguyen L. N., Vu M. T, Johir A. H., McLaughlan R. and Nghiem L. D. (2020). A comprehensive review on the framework to valorise lignocellulosic biomass as biorefinery feedstocks. *Science of The Total Environment* 743, 140630.

Xia W., Shi P., Xu X., Qian L., Cui Y., Xia M. and Yao B. (2015). High Level Expression of a Novel Family 3 Neutral β -Xylosidase from *Humicola insolens* Y1 with High Tolerance to D-Xylose. *PLoS ONE* 10 (2).

Xiros C., Topakas E. and Christakopoulos P. (2013). Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Wires energy and environment* 2, 633–654.

Yang X., Shi P., Huang H., Luo H., Wang Y., Zhang W., and Yao B. (2014). Two xylose-tolerant GH43 bifunctional β -xylosidase/ α - arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan. *Food Chemistry* 148, 381–387.

Yeoman C. J., Han Y., Dodd D., Schroeder C. M., Mackie R. I. and Cann I. (2010). Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Advances in Applied Microbiology* 70, 1-55.

Yousuf A., Pirozzi D. and Sannino F. (2020). Fundamentals of lignocellulosic biomass. *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels* Chapter 1, 1-15.

Zhang J., Siika-Aho M., Tenkanen M. and Viikari L. (2011). The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed. *Biotechnology for Biofuels* 4(1).

Zhang Y.H.P. and Lynd L.R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng* 88, 797–824.

Zhou J. Bao L., Chang L., Zhou Y. and Lu H. (2012). Biochemical and kinetic characterization of GH43 b-D-xylosidase/a-L-arabinofuranosidase and GH30 a-L-arabinofuranosidase/b-D-xylosidase from rumen metagenome. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39, 143-152.

Zhu Y., Li J., Cai H., Ni H., Xiao A. and Hou L. (2013). Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library. *Microbiological Research* 168, 589-97.

Zhuo R., Yu H., Qin X., Ni H., Jiang Z., Ma F. and Zhang X. (2018). Heterologous expression and characterization of a xylanase and xylosidase from white rot fungi and their application in synergistic hydrolysis of lignocellulose. *Chemosphere* 212, 24–33.

Zoghalmi A. and Paës G. (2019). Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in Chemistry* Vol. 7

Ελληνική βιβλιογραφία

Κατσιμπούρας Κ. (2013). Σύνθεση καινοτόμων υποστρωμάτων για το χαρακτηρισμό εστερασών του γλυκουρονικού οξέος της ημικυτταρίνης. (Διπλωματική εργασία). Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.

Παγούρτζη Χ. (2021). Χαρακτηρισμός καινοτόμων βιοκαταλυτών και μελέτη της συνεργιστικής τους δράσης σε υποστρώματα ξυλάνης. (Διπλωματική εργασία). Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.

Σταθοπούλου Π. Μ. (2012). Βιοσύνθεση υδρολυτικών ενζύμων από θερμοφίλους μικροοργανισμούς. Εθνικό και Καποδιστριακό πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

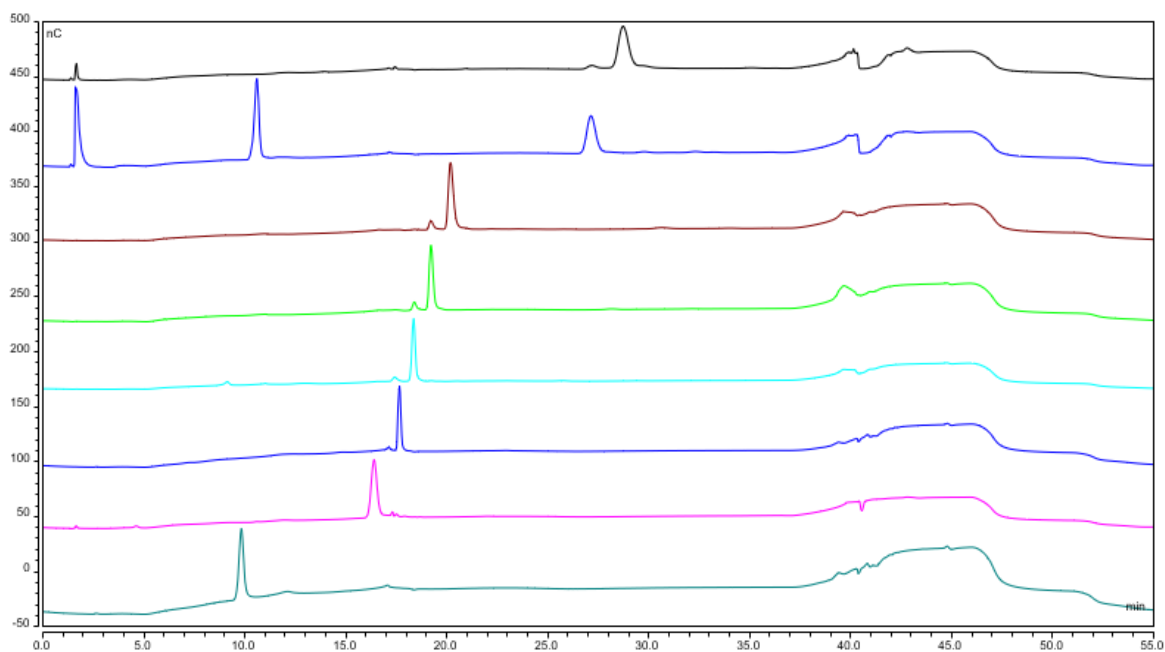
Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε. (2011). Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων. Αθήνα: Εκδόσεις Ε.Μ.Π. Σελ. 30-43.

Ιστοσελίδες

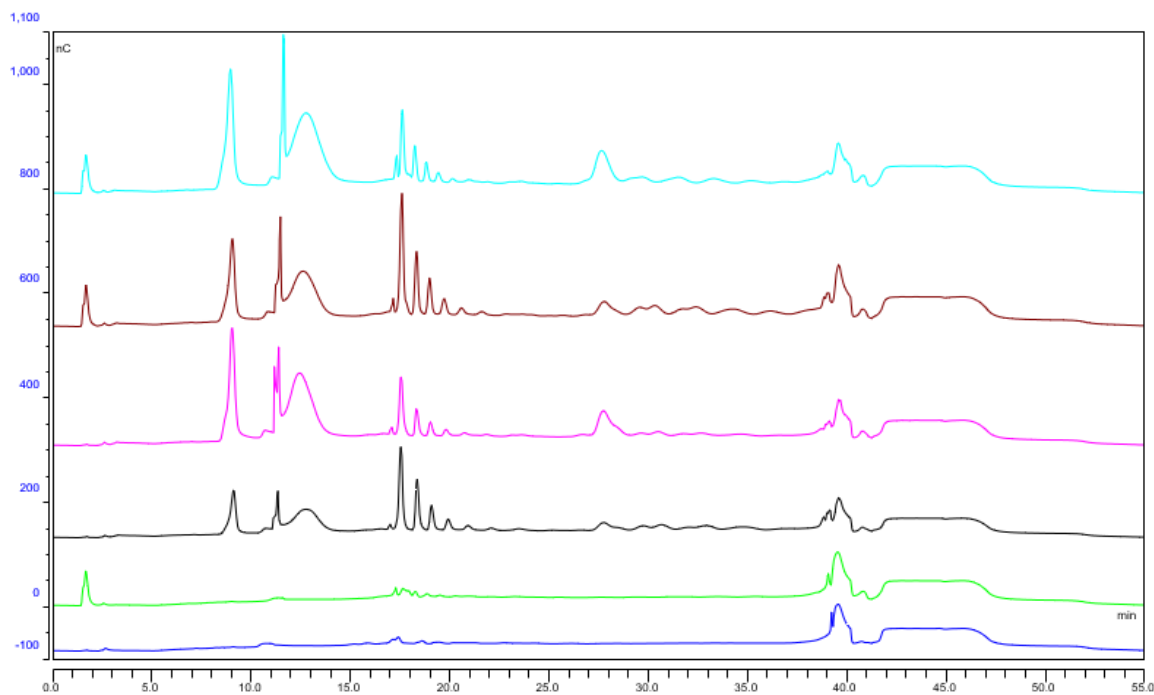
1. <http://www.worldbioenergy.org/global-bioenergy-statistics/>
2. <https://www.fao.org/3/y1997e/y1997e07.htm>
3. <https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/664>
4. <https://www.thepigsite.com/articles/prebiotics-and-probiotics-boost-pig-growth-and-health>
5. <https://www.megazyme.com/alpha-1-arabinofuranosidase-aspergillus-niger?sSearch=E-afase>
6. <https://www.megazyme.com/alpha-1-arabinofuranosidase-bifidobacterium-adolescentis?sSearch=E-afam>
7. <https://www.megazyme.com/endo-1-4-beta-xylanase-thermotoga-maritima>
8. <https://www.megazyme.com/endo-1-4-beta-xylanase-m4-aspergillus-niger>
9. <https://www.megazyme.com/acetylxylan-esterase-orpinomyces-sp>
10. <https://www.megazyme.com/alpha-glucuronidase-geobacillus-stearothermophilus>
11. <https://galaklc.com/hplc-system-components>
12. <https://www.elicity1-oligotech.com/arabinan/99-arabinan-polysaccharides-from-sugar-beet.html>
13. <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/sigma/n8130>
14. <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/aldrich/258032>
15. <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/sigma/n9876>
16. <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/sigma/n2752>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

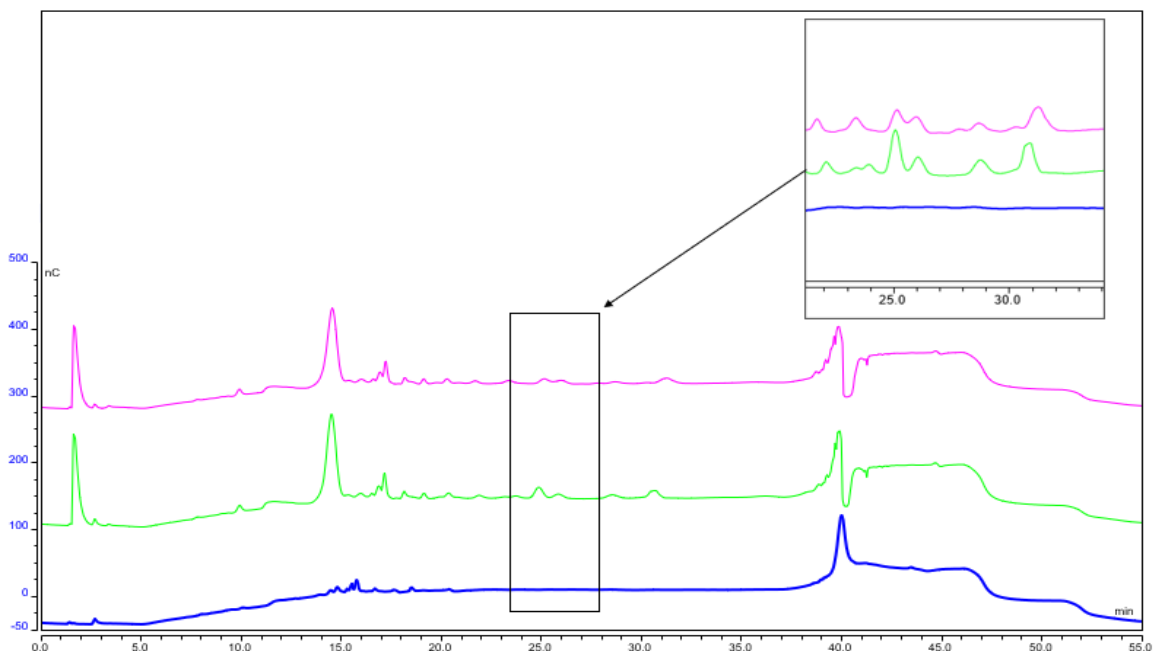
Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα που προέκυψαν ύστερα από την ανάλυση σε Dionex.



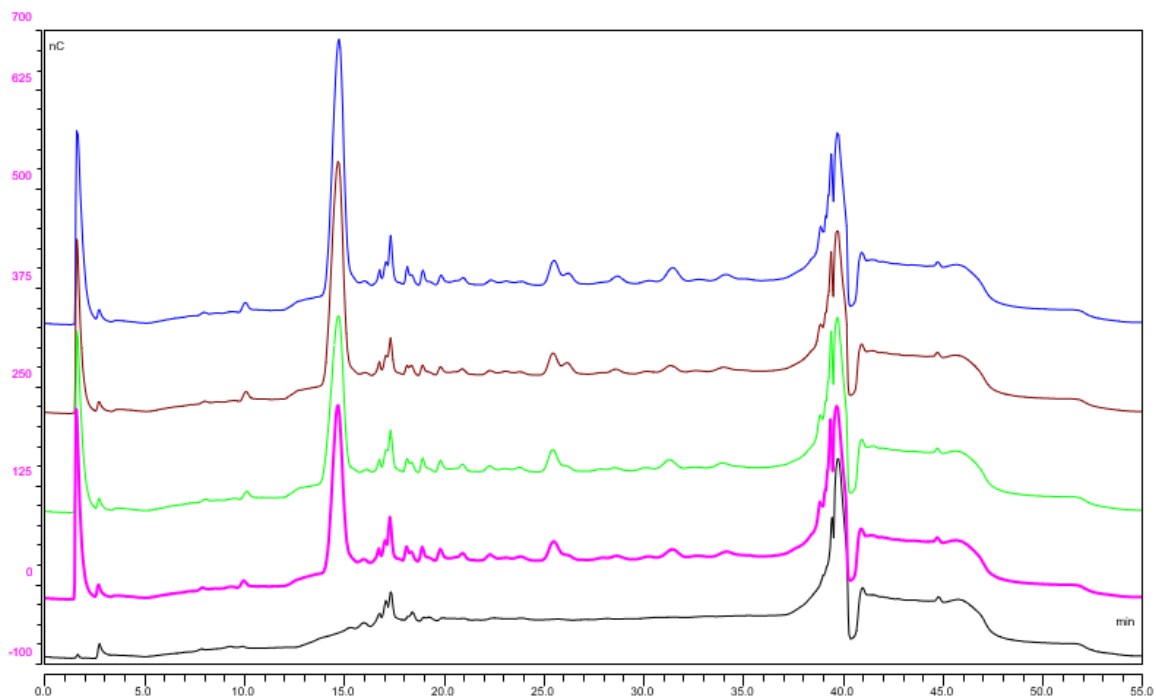
Διάγραμμα 1: Χρωματογραφήματα προτύπων σακχάρων με τη μέθοδο της χρωματογραφίας ανιοεναλλαγής υψηλής απόδοσης ΗΡΑΕC. Με σειρά από κάτω προς τα πάνω απεικονίζονται τα πρότυπα ως εξής: x1 (60 μ M)- (τιρκουάζ), x2 (80 μ M)- (μωβ), ΟΥΧΧ-GH30 (100 μ M)- (μπλε), x4 (60 μ M)- (γαλάζιο), x5 (40 μ M)- (πράσινο), x6 (20 μ M)- (μπορντό), x3 (46 μ M)- (μπλε ανοιχτό), ΟΥΧΧ (100 μ M)- (μάυρο).



Διάγραμμα 2: Χρωματογραφήματα του συνεργητισμού της GH10 ξυλανάσης με τις εστεράσες TtCE16 και OCE6. Με σειρά από κάτω προς τα πάνω απεικονίζονται το τυφλό δείγμα (μπλε), το δείγμα με το συνδυασμό TtCE16-EXYLATM (πράσινο), το δείγμα με την ξυλανάση E-XYLATM (μαύρο), το δείγμα με το συνδυασμό OCE6-EXYLATM (μωβ), το δείγμα με το συνδυασμό TtCE16-OCE6 (μπορντό) και τέλος το δείγμα και με τα τρία αυτά ένζυμα, TtCE16-OCE6-EXYLATM (γαλάζιο).



Διάγραμμα 3: Χρωματογραφήματα για την απεικόνιση της μείωσης του UX στα δείγματα με το συνδυασμό TtXyn30A- E-AGUBS. Με σειρά από κάτω προς τα πάνω απεικονίζονται το τυφλό δείγμα (μπλε), το δείγμα με τη ξυλανάση TtXyn30A (πράσινο) και το δείγμα με το συνδυασμό της ξυλανάσης TtXyn30A και της γλυκουρονιδάσης E-AGUBS (μωβ).



Διάγραμμα 4: Χρωματογραφήματα με τους συνεργιτισμούς της TtXyn30A με τις εστεράσες TtCE16, OCE6 και CtCE2. Με σειρά από κάτω προς τα πάνω απεικονίζονται το τυφλό δείγμα (μαύρο), το δείγμα με την ξυλανάση TtXyn30A (μωβ), το δείγμα με το συνδυασμό TtXyn30A- TtCE16 (πράσινο), το δείγμα με το συνδυασμό TtXyn30A-OCE6 (μπορντό) και το δείγμα με το συνδυασμό TtXyn30A-CtCE2 (μπλε).