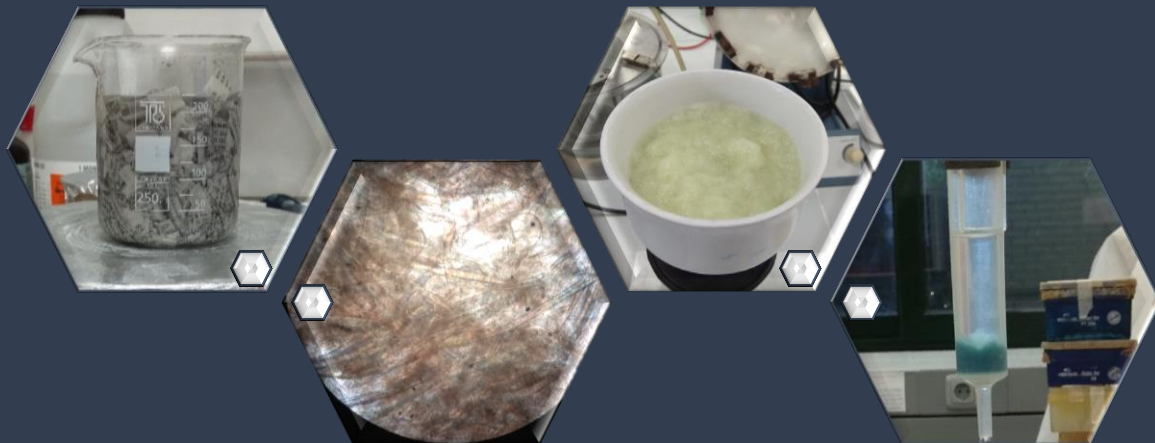




ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Βιο-επεξεργασία παραπροϊόντων ιχθύων
για την
παραγωγή ενζύμων υψηλής προστιθέμενης αξίας

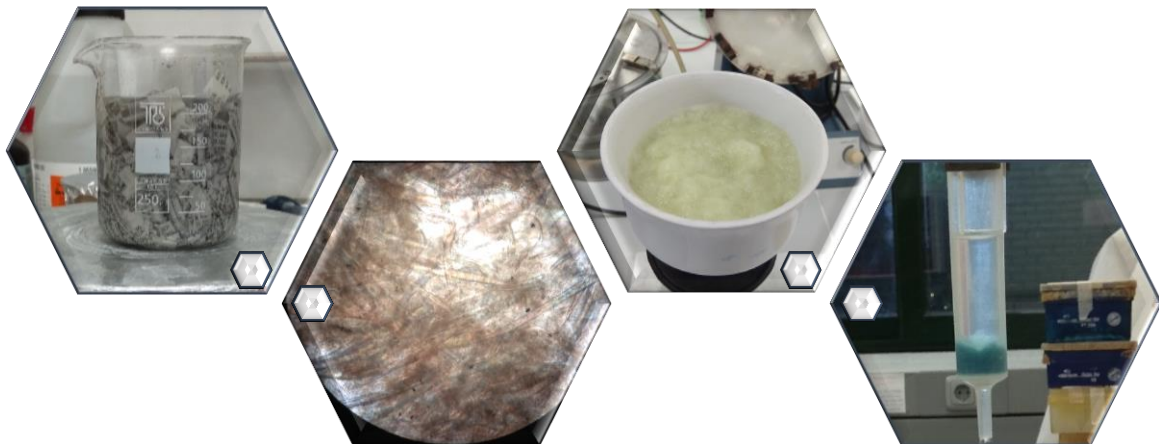


Γεώργιος Ε. Πρεμέτης
Μεταπτυχιακή Διατριβή
Επιβλέπων καθηγητής: Λάμπρου Νικόλαος
ΑΘΗΝΑ 2018



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Βιο-επεξεργασία παραπροϊόντων ιχθύων
για την
παραγωγή ενζύμων υψηλής προστιθέμενης αξίας



Γεώργιος Ε. Πρεμέτης
Μεταπτυχιακή Διατριβή
Επιβλέπων καθηγητής: Λάμπρου Νικόλαος
ΑΘΗΝΑ 2018

Βιο-επεξεργασία παραπροϊόντων ιχθύων για την παραγωγή ενζύμων υψηλής προστιθέμενης αξίας

Γεώργιος Ε. Πρεμέτης

Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΑΘΗΝΑ 2018

Επιβλέπων καθηγητής: Λάμπρου Νικόλαος

Τριμελής επιτροπή: 1. Λάμπρου Νικόλαος, Διευθυντής Εργαστηρίου Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

2. Ντούνη Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Εργαστήριο Γενετικής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

3. Βλαχάκης Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής, Εργαστήριο Γενετικής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Περίληψη

Η κυτταρίνη αποτελεί ένα από τα άφθονα υλικά στον πλανήτη. Το συγκεκριμένο υλικό συσσωρεύεται στο περιβάλλον μέσα από πολλές διεργασίες καθώς η βιομηχανία χαρτιού συμβάλλει σημαντικά στο ποσοστό των εκπεμπόμενων ρύπων στο περιβάλλον, όπως για παράδειγμα τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Πολλές μελέτες, έχουν πραγματοποιηθεί για να βρεθεί ένας οικονομικός και παράλληλα φιλικός προς το περιβάλλον τρόπος για την αξιοποίηση της κυτταρίνης.

Οι πρωτεάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς ανάμεσα σε αμινοξικά κατάλοιπα πολυπεπτιδικών αλυσίδων και είναι το σημαντικότερο βιοτεχνολογικό ένζυμο αποτελώντας το 75% της αγοράς των βιοτεχνολογικών ενζύμων. Χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, ζωοτροφών, κλωστοϋφαντουργία, απορρυπαντικών, φαρμάκων, μεταποιητικές βιομηχανίες επεξεργασίας χαρτιού και χαρτοπολτού, επεξεργασία δέρματος και στη γεωργία.

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η δημιουργία και αξιολόγηση χρωματογραφικών προσροφητών συγγένειας και στη συνέχεια ο καθαρισμός πρωτεασών από παραπροϊόντα ιχθυοκαλλιέργειας (πεπτικό σύστημα ψαριών). Στο πρώτο στάδιο, δημιουργήθηκαν προσροφητές συγγένειας χρησιμοποιώντας σαν χρωματογραφικό υλικό κυτταρίνη που απομονώθηκε από ανακυκλώσιμα υλικά/παραπροϊόντα (εφημερίδα). Σαν δεσμευτής χρησιμοποιήθηκε η μονοχλωροτριαζινο-χρωστική Cibacron Blue 3GA. Η αντίδραση σύνδεσης της χρωστικής στην κυτταρίνη πραγματοποιείται μέσω νουκλεόφιλης προσβολή του υδροξυλίου της κυτταρίνης στο ηλεκτρονιόφιλο χλώριο του τριαζινικού δακτυλίου της χρωστικής. Η αντίδραση ακινητοποίησης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 60°C εξαιτίας της μειωμένης δραστηριότητας του μονοχλωροτριαζινικού δακτυλίου. Αρχικά, μελετήθηκε η ποσότητα χρωστικής που ακινητοποιήθηκε με βάση την επεξεργασία ή όχι με υδροχλωρικό οξύ για την αύξηση του αριθμού των διαθέσιμων υδροξυλίων της κυτταρίνης και το χρόνο της αντίδρασης (4.5 και 7.5 ώρες).

Στη συνέχεια, για τον προσροφητή με την υψηλότερη συγγέντρωση ακινητοποιημένης χρωστικής μελετήθηκε με μετωπική ανάλυση η χωρητικότητα του χρησιμοποιώντας δύο πρότυπες πρωτεΐνες (αλβουμίνη και λυσοζύμη). Επίσης, μελετήθηκε η ισορροπία και η κινητική προσρόφησης των πρωτεϊνών στον προσροφητή. Τα αποτελέσματα για την ισορροπία προσρόφησης έδωσαν καλύτερη προσαρμογή στο πρότυπο του

Langmuir ($R^2=0,9578$ για την αλβουμίνη και $R^2=0,9964$ για τη λυσοζύμη) γεγονός το οποίο δείχνει ότι τα συστήματα BSA-CELL-CB3GA και Lys-CELL-CB3GA, ακολουθούν το μοντέλο επαρκώς. Η παράμετρος q_{max} , δηλαδή η μέγιστη χωρητικότητα της προσροφημένης πρωτεΐνης (mg/g προσροφητή) βρέθηκε ίση με 3.9 mg/g προσροφητή για την αλβουμίνη και 5.7 mg/γρ προσροφητή για τη λυσοζύμη.

Στο δεύτερο στάδιο, μελετήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά του προσροφητή και χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση πρωτεασών. Σαν βιολογικά υλικά χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα στομάχου και παγκρέατος από το είδος *Sparus aurata*. Για τη βελτίωση της χωρητικότητας και της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του προσροφητή μελετήθηκε η προσρόφηση των πρωτεασών σε διαφορετικές τιμές pH για τα διαλύματα εξισορρόπησης, πλύσης και έκλουσης. Χρησιμοποιώντας συγκεκριμένες τιμές επιτεύχθηκε απόδοση καθαρισμού των πρωτεασών 168% και 113% από το στομάχι και το πάγκρεας με καθαρισμό 47- και 34-φορές αντίστοιχα. Όσον αφορά τις σερινοπρωτεάσες θρυψίνη και χυμοθρυψίνη από το πάγκρεας παρατηρήθηκε απόδοση καθαρισμού 49.5% και 18.85% με καθαρισμό 15- και 5-φορές αντίστοιχα. Η καθαριστική ικανότητα του προσροφητή κρίθηκε σε μεγάλο βαθμό ικανοποιητική καθώς αρχικός στόχος ήταν η εύρεση ενός πρωτοκόλλου καθαρισμού των ενζύμων με όσον το δυνατόν λιγότερα στάδια και με πολύ χαμηλό κόστος.

Abstract

Cellulose is one of the most abundant materials on Earth. This particular material accumulates in the environment through several processes, as paper industries contribute in the percent of the emitted pollutants, such as lignocellulose materials, in a great manner. Numerous studies have been conducted to find an economical and environmentally friendly method to reuse cellulose.

Proteases are enzymes that hydrolyze peptide bonds between amino acids and constitute 75% of the biotechnological enzyme market. They find many different uses in food industry, animal feed, textiles, detergents, pharmaceuticals, industries for paper and paper pulp processing, leather processing and agriculture.

The purpose of the current study was the design, synthesis and evaluation of affinity chromatography adsorbents for protease purification from fish farming byproducts (fish digestive system). In the first step, affinity adsorbents were synthesized using cellulose as matrix. Cellulose was isolated from recycled products (waste newspaper). As affinity ligand, the monochlorotriazine dye Cibacron Blue 3GA was used. The immobilization of the triazine dye to cellulose is achieved through nucleophilic substitution reaction of the hydroxyl group of cellulose fibers on the electrophilic chloride center of the dye. The immobilization reaction takes place at high temperature (60°C) due to low reactivity of the monochlorotriazine ring. The immobilized dye concentration was measured in two different cellulose isolations (with or without acid treatment) using two different immobilization reaction times (4.5 and 7.5h).

The next step was the determination of the binding capacity of the affinity adsorbent employing two standard proteins (Bovine Serum Albumin and Lysozyme, BSA). This was achieved by frontal analysis and absorption equilibrium studies. The results showed that the binding of proteins to the affinity adsorbent obey the Langmuir model (R^2 value, $R^2=0,9578$ for BSA and $R^2=0,9964$ for Lysozyme). The maximum binding capacity (q_{max}), was calculated equal to 3.9 mg/gr and 5.7 mg/gr of adsorbent for BSA and Lysozyme respectively. The second objective of the study was to evaluate the affinity chromatography behavior of the affinity adsorbent towards proteases from fish waste. As a source of proteases the stomach and pancreas from *Sparus aurata* (Mediterranean bream) was used. Different pH values were studied for the equilibration, wash and elution values. Using suitable conditions a 168% and 113% of

recovery was achieved for the proteases from the stomach and pancreatic extract, respectively. In the case of the trypsin and chymotrypsin, from *Sparus aurata* pancreas, a 49.5% and 18.85% recovery was achieved, respectively. The results showed that the Cibacron Blue 3GA affinity adsorbent can be used for the partial purification of proteases from crude *Sparus aurata* extracts.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του καθηγητή του Τμήματος Βιοτεχνολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών Λάμπρου Νικόλαο.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Λάμπρου Νικόλαο που μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον, σημαντικό και επίκαιρο θέμα, όπως επίσης και για την αδιάκοπη συμπαράσταση, την άριστη καθοδήγηση τόσο κατά τη διάρκεια της φοίτησης μου όσο και σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας.

Θέλω επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην εξέταση μου και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, την κυρία Ευαγγελία Παπά, ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου, την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Χρονοπούλου Ευαγγελία και τους υποψήφιους διδάκτορες Νίκο και Ελισάβετ για τη βοήθεια τους τις συμβουλές τους και το φιλικό περιβάλλον συνεργασίας.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	2
1. Εισαγωγή.....	11
1.1 Κυτταρίνη.....	12
1.1.1 Χημεία της κυτταρίνης.....	12
1.1.2 Ημικυτταρίνες.....	12
1.1.3 Λιγνίνη.....	13
1.1.4 Απομόνωση της κυτταρίνης.....	13
1.1.5 Υδρόλυση της κυτταρίνης.....	14
1.1.6 Ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης.....	14
1.1.7 Όξινη υδρόλυση της κυτταρίνης.....	15
1.2 Πρωτεάσες.....	15
1.2.1 Γενικά για τις πρωτεάσες.....	15
1.2.2 Ταξινόμηση των πρωτεασών.....	16
1.2.3 Εφαρμογές των πρωτεασών.....	19
1.2.4 Πρωτεΐνες από απόβλητα.....	21
1.3 Βιολογική αναγνώριση.....	25
1.3.1 Χρωματογραφία συγγένειας.....	26
1.3.2 Εφαρμογές χρωματογραφίας συγγένειας.....	27
1.3.3 Χαρακτηριστικά φορέα για τη χρωματογραφία συγγένειας.....	28
1.3.4 Τρόποι έκλουσης προσροφημένων μακρομορίων στη χρωματογραφία συγγένειας.....	28
1.4 Τριαζινο-χρωστικές.....	29
1.4.1 Τριαζίνη.....	29
1.4.2 Χρωστικές.....	29
1.4.3 Αλληλεπίδραση χρωστικών με πρωτεΐνες.....	30
1.4.4 Κατηγορίες τριαζινο-χρωστικών.....	30
1.4.5 Σύνθεση χλωροτριαζινο-χρωστικών.....	31
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	33
2.1 Υλικά.....	34
2.1.1 Κατάλογος χημικών αντιδραστηρίων και υποστρωμάτων.....	34
2.1.2 Πλαστικά αναλώσιμα.....	34
2.1.3 Εξοπλισμός.....	35
2.1.4 Διαλύματα.....	35
2.2 Μέθοδοι.....	36

2.2.1 Απομόνωση νανοϊνών κυτταρίνης από απόβλητα χαρτιού (εφημερίδα) ..	36
2.2.2 Παρατήρηση κυτταρίνης σε οπτικό μικροσκόπιο.....	36
2.2.3 Ακίνητοποίηση χρωστικής Cibacron Blue 3GA σε νανοΐνες κυτταρίνης ...	36
2.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ακινητοποιημένων χρωστικών	37
2.2.5 Προσδιορισμός χωρητικότητας και ικανότητας συγκράτησης του προσροφητή.....	37
2.2.6 Μελέτη της ισορροπίας και της κινητικής κατά την προσρόφηση της αλβουμίνης και της λυσοζύμης στον προσροφητή κυτταρίνης-Cibacron Blue 3GA	38
2.2.7 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford (1976)	38
2.2.8 Καθαρισμός πρωτεασών μέσω βιολογικής λειτουργίας χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή CELL-CB3GA.....	40
2.2.9 Σύνθεση της αζωζελατίνης	40
2.2.10 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός πρωτεασών χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη.....	42
2.2.11 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της θρυψίνης	44
2.2.12 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της χυμοθρυψίνης	45
2.2.13 Λήψη στομάχου ή παγκρέατος από το είδος <i>Sparus aurata</i> και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος.....	46
2.2.14 Διαπίδυση	47
3. Αποτελέσματα	49
3.1 Απομόνωση νανοϊνών κυτταρίνης από απόβλητα χαρτιού (εφημερίδα).....	50
3.2 Ακίνητοποίηση των χρωστικών.....	51
3.3 Προσδιορισμός της χωρητικότητας με μετωπική ανάλυση.....	54
3.4 Μελέτη της ισορροπίας και της κινητικής κατά την προσρόφηση της αλβουμίνης και της λυσοζύμης στον προσροφητή CELL-CB3GA.....	55
3.5 Καθαρισμός πρωτεασών από εκχύλισμα στομάχου του ψαριού <i>Sparus aurata</i>	60
3.6 Καθαρισμός πρωτεασών από εκχύλισμα παγκρέατος του ψαριού <i>Sparus aurata</i>	61
4. Συζήτηση.....	65
5. Βιβλιογραφία	71

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. Εισαγωγή

1.1 Κυτταρίνη

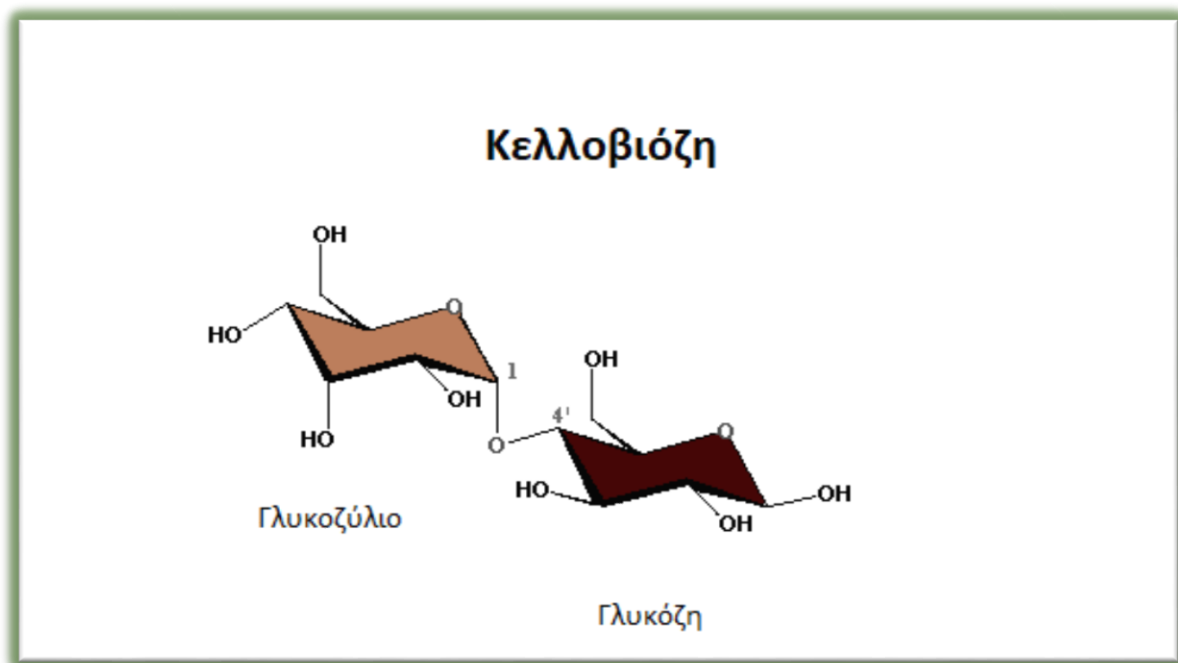
Η κυτταρίνη αποτελεί το πιο άφθονο υλικό στον πλανήτη, με φυσικές πηγές να αποτελούν οι κορμοί των δέντρων, οι ίνες από βαμβάκι και κάποια φύκη, βακτήρια και ζώα. Βέβαια η πιο καθαρή μορφή κυτταρίνης εντοπίζεται στις ίνες βαμβακιού με την καθαρότητα να φτάνει το 95% (Cseke et al., 2004). Οι φυσικές ίνες κυτταρίνης αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη, λιγνίνη και ήμι-κυτταρίνη. Οι αλυσίδες κυτταρίνης βιοσυνθέτονται από ένζυμα με συνεχή τρόπο και ρυθμό μέχρι τον σχηματισμό μικροϊνιδίων κυτταρίνης.

1.1.1 Χημεία της κυτταρίνης

Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από πολυάριθμες (1→4)-β-D-γλυκάνες, δηλαδή γραμμικές αλυσίδες καταλοίπων β-D-γλυκόζης συνδεδεμένων με (1→4) δεσμούς. Επειδή κάθε μόριο γλυκόζης έχει ικανότητα περιστροφής 180° ως προς τα γειτονικά του, η επαναλαμβανόμενη μονάδα της κυτταρίνης θεωρείται ότι είναι η κελλοβιόζη, ένας δισακχαρίτης μορίων β-D-γλυκόζης που είναι συνδεδεμένα με (1→4) δεσμούς. Στην κυτταρίνη, πολλές ξεχωριστές γλυκάνες διευθετούνται στενά μεταξύ τους για να σχηματίσουν το μικροϊνίδιο κυτταρίνης στο οποίο οι γλυκάνες έχουν παράλληλη διεύθυνση και συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals για να δημιουργήσουν μια ταινία υψηλού βαθμού οργάνωσης (κρυσταλλική, crystalline) πλάτους 2-20nm η οποία αποκλείει το νερό και είναι σχετικά απρόσιτη σε προσβολή από ένζυμα. Ως αποτέλεσμα τα μικροϊνίδια κυτταρίνης είναι αδιάλυτα, ισχυρά και σταθερά στην ενζυμική αποικοδόμηση και απαιτείται πολύ μεγάλη ενέργεια για την προσβολή του συγκεκριμένου γλυκοζιτικού δεσμού (Scorec et al., 2003). Τα μικροϊνίδια κυτταρίνης έχουν μήκος μερικά μικρόμετρα και ποικίλουν σημαντικά σε πλάτος και βαθμό οργάνωσης ανάλογα με τη βιολογική τους προέλευση (Kennedy et al., 2007, Sturcova et al., 2004). Αυτή η ποικιλία πλάτους των μικροϊνιδίων κυτταρίνης οφείλεται στο διαφορετικό αριθμό παράλληλων αλυσίδων γλυκάνης που τα αποτελούν. Τα μικροϊνίδια κυτταρίνης μπορούν επίσης να δημιουργούν δεσμίδες που διαμορφώνουν μεγαλύτερα μικροϊνίδια, όπως συμβαίνει σε εκείνα του ξύλου και κατ' επέκταση στο χαρτί.

1.1.2 Ημικυτταρίνες

Οι ημικυτταρίνες (hemicellulose), είναι μακροί γραμμικοί πολυσακχαρίτες που φέρουν συχνά βραχείες πλευρικές διακλαδώσεις, οι οποίες προσδένονται με χαρακτηριστικό τρόπο στα μικροϊνίδια κυτταρίνης. Αυτές μπορούν να σχηματίζουν ινίδια που



Εικόνα 1: Κελλοβιόζη που δείχνει τον (1→4)-β-D-γλυκοζιδικό δεσμό μεταξύ δύο καταλοίπων γλυκόζης με ανεστραμένο προσανατολισμό.

συνδέουν τα μικροϊνίδια κυτταρίνης μεταξύ τους σε ένα συνδετικό δίκτυο ή μπορεί να αποτελέσουν ένα στρώμα που να εμποδίζει τα μικροϊνίδια κυτταρίνης να συνδέονται μεταξύ τους.

1.1.3 Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα πολύπλοκο φαινολικό πολυμερές που δομείται από φαινυλοπροπανοειδείς υπομονάδες, οι οποίες προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη. Η λιγνίνη παίζει πρωτογενείς και δευτερογενείς ρόλους στα φυτά. Η ακριβής της δομή είναι δύσκολο να απομονωθεί από τα φυτά, καθώς σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με την κυτταρίνη και άλλους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος.

1.1.4 Απομόνωση της κυτταρίνης

Η απομόνωση κυτταρίνης με πολύ υψηλό βαθμό καθαρότητας αποτελεί αντικείμενο πολλών μελετών για πολλά χρόνια λόγω κυρίως της πολυπλοκότητάς της δομής των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών (Brendel et al., 2000). Απαραίτητη προϋπόθεση για την απομόνωση είναι η απομάκρυνση της λιγνίνης, των ημικυτταρίνων και άλλων μη κυτταρινούχων ουσιών (Sun et al., 1998). Στη βιομηχανία χαρτιού η ομογενοποίηση του υλικού και η διαδικασία λεύκανσης που ακολουθείται, πραγματοποιείται για την απομάκρυνση της λιγνίνης, των ημικυτταρίνων και των υπόλοιπων ουσιών με σκοπό την απομόνωση υψηλού βαθμού καθαρότητας

κυτταρίνης. Αυτή η διαδικασία είναι δύσκολη και απαιτεί αλκαλική επεξεργασία σε αρκετά υψηλή θερμοκρασία.

1.1.5 Υδρόλυση της κυτταρίνης

Λόγω της σταθερότητας της δομής της κυτταρίνης, η υδρόλυσή της, παρουσιάζει επίσης ερευνητικό ενδιαφέρον. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στοχεύουν στην υδρόλυση μέσω όξινης επεξεργασίας (Wald et al., 1984) ή χρήσης υδρολυτικών ενζύμων (Yu et al., 2010). Η υδρόλυση της κυτταρίνης αποτελεί σημαντική βιοτεχνολογική μέθοδο για την αποτελεσματική χρήση της λιγνινοκυτταρίνης καθώς η γλυκόζη χρησιμοποιείται στην παραγωγή χημικών ουσιών, σε βιοκαύσιμα, σε τρόφιμα και πολλά φάρμακα (Brown et al., 1979). Η υδρόλυση της κυτταρίνης περιλαμβάνει τα στάδια εκείνα που οδηγούν στον σχηματισμό μονοσακχαριτών. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ποικίλουν ανάλογα με τον χρόνο και τη θερμοκρασία υδρόλυσης καθώς και με τον καταλύτη που επιλέγεται. Οι παράγοντες που έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν τη διαδικασία υδρόλυσης είναι η πυκνότητα των ινών, το ποσοστό κρυστάλλωσης και η περιεκτικότητα σε λιγνίνη και ημικυτταρίνες (Knauf et al., 2004). Σαν αποτέλεσμα, η μέθοδος υδρόλυσης της κυτταρίνης θα πρέπει να στοχεύει στην αύξηση του ποσοστού σακχάρων, στην αποφυγή αποδόμησης ή απώλειας σακχάρων, στην αποφυγή σχηματισμού επιβλαβών παραπροϊόντων και να μην έχει μεγάλο κόστος (Shoa et al., 2007).

1.1.6 Ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης

Η υδρόλυση κυτταρινούχων υλικών πραγματοποιείται από μία κλάση ενζύμων που ονομάζεται κυτταρινάσες. Τα συγκεκριμένα ένζυμα απαντούν κυρίως σε μύκητες, βακτήρια και πρωτόζωα. Τα τρία σημαντικότερα ένζυμα που αποπολυμερίζουν την κυτταρίνη είναι η έξογλουκανάση, η β-γλουκοσιδάση και η ενδογλουκανάση. Οι καταλυτικές ιδιότητες των κυτταρινασών τις κατατάσσουν σε διαφορετικές οικογένειες με βάση την αμινοξική ακολουθία τους. Οι κυτταρινάσες, όλο και περισσότερο χρησιμοποιούνται για πολλές βιομηχανικές διεργασίες, όπως για παράδειγμα στη βιομηχανία χαρτιού, τροφίμων και ως πρόσθετο στις ζωοτροφές. Οι αυξανόμενες περιβαλλοντικές ανησυχίες οδήγησαν στη χρήση των κυτταρινασών για παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά μέσω ενζυμικής υδρόλυσης (Bayer et al., 2007, Himmel et al., 1999, Zaldivar et al., 2001). Η ενδο-γλουκανάση διασπά τυχαία (1→4) δεσμούς δημιουργώντας νέα άκρα. Το ενεργό τους κέντρο μοιάζει με κανάλι μεταβλητού μεγέθους στο οποίο δεσμεύεται η κυτταρίνη. Η εξογλουκανάση

δρα στο άκρο της αλυσίδας της κυτταρίνης ελευθερώνοντας κελλοβιόζη ή γλυκόζη σαν κύρια προϊόντα από την διάσπαση της αλυσίδας. Τέλος η β-γλουκοσιδάση, συνήθως διασπά την κελλοβιόζη σε γλυκόζη (Zhang et al., 2013).

1.1.7 Όξινη υδρόλυση της κυτταρίνης

Η όξινη υδρόλυση της κυτταρίνης έχει περιγραφεί από τον 19ο αιώνα και με τεχνολογικές εφαρμογές από τις αρχές του 20ου αιώνα. Η όξινη υδρόλυση μπορεί να διαχωριστεί σε δύο προσεγγίσεις ανάλογα με την πυκνότητα του οξέος που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία που επιλέγεται. Στην πρώτη μεθοδολογία χρησιμοποιείται πυκνό οξύ, με πιο σύνηθες το θειικό οξύ, σε χαμηλή θερμοκρασία οδηγώντας στον σχηματισμό μικρού αριθμού αποδιαταγμένων προϊόντων. Βέβαια, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες και έχει μεγάλο κόστος. Η χρήση αραιωμένου θειικού οξέος εμφανίζει τη μεγαλύτερη βιομηχανική εφαρμογή, καθώς επιτυγχάνει ικανοποιητικά ποσοστά καταλοίπων γλυκόζης. Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιούνται επίσης υδροχλωρικό οξύ, νιτρικό οξύ και φωσφορικό οξύ. Η τεχνική αυτή εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με την προηγούμενη όσον αφορά τα προϊόντα της υδρόλυσης και το βαθμό αποδιάταξης.

1.2 Πρωτεάσες

1.2.1 Γενικά για τις πρωτεάσες

Οι πρωτεάσες (γνωστές και ως πρωτεϊνάσες ή πεπτιδάσες), είναι ένζυμα που υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς ανάμεσα σε αμινοξικά κατάλοιπα πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Θεωρούνται ως τα πιο σημαντικά ένζυμα της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας. Το 75% των βιομηχανικών ενζύμων είναι υδρολυτικά ένζυμα και αποτελούν το 60% της συνολικής αγοράς των ενζύμων. Οι πρωτεάσες μπορεί να έχουν εξειδικευμένη δράση, έχοντας ως στόχο ένα συγκεκριμένο αμινοξύ μιας πρωτεΐνης ή όχι διασπώντας πρωτεΐνες σε διαφορετικά αμινοξέα. Η ικανότητα των πρωτεασών να καταλύουν την αντίδραση διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού σε ένα μόνο αμινοξύ αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα και βρίσκει εφαρμογή σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές όπως για παράδειγμα στη βιομηχανία τροφίμων, ζωοτροφών, κλωστοϋφαντουργία, απορρυπαντικών, φαρμάκων, μεταποιητικές βιομηχανίες επεξεργασίας χαρτιού και χαρτοπολτού, επεξεργασία δέρματος στη γεωργία και στις χρωματογραφικές τεχνικές (π.χ. φασματοσκοπία μάζας, αέρια χρωματογραφία). Οι πρωτεάσες απαντούν σε όλους τους οργανισμούς και συμμετέχουν σε όλες τις αντιδράσεις του μεταβολισμού. Κατά τη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου, οι πρωτεάσες διασπούν κυτταρικά

συστατικά με σκοπό να ξαναχρησιμοποιηθούν. Επίσης, τα φυτά αξιοποιούν τα συγκεκριμένα ένζυμα ως άμυνα εναντίον παθογόνων μυκήτων και βακτηρίων. Στις επιστήμες της βιοτεχνολογίας οι πρωτεάσες βρίσκουν μεγάλη ποικιλία εφαρμογών, όπως για παράδειγμα ως πρόσθετα στα απορρυπαντικά.

1.2.2 Ταξινόμηση των πρωτεασών

Οι πρωτεάσες ταξινομούνται με βάση τρία κριτήρια: την αντίδραση που καταλύουν, τη φύση του καταλοίπου ή των καταλοίπων που δρουν και τις εξελικτικές σχέσεις που εμφανίζουν. Οι ενδοπεπτιδάσες διασπούν μία πρωτεΐνη υδρολύοντας πεπτιδικούς δεσμούς στο εσωτερικό της. Οι εξωπεπτιδάσες αφαιρούν αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο ή το καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Διακρίνονται στις καρβοξυπεπτιδάσες και τις αμινοπεπτιδάσες ανάλογα με τον αν δρουν στο καρβοξυτελικό άκρο ή στο αμινο-τελικό άκρο αντίστοιχα. Οι πρωτεάσες επίσης διακρίνονται με βάση τα αμινοξέα που εντοπίζονται στο ενεργό τους κέντρο δηλαδή πρωτεάσες με καταλυτικό κατάλοιπο σερίνη (σερινοπρωτεάσες), κυστεΐνη (θειολοπρωτεάσες) και ασπαρτικό ή γλουταμινικό οξύ.

Σερινοπρωτεάσες

Οι σερινοπρωτεάσες σχηματίζουν στο ενεργό τους κέντρο ένα καταλυτικό τρίγωνο που αποτελείται από τρία αμινοξέα, ιστιδίνη (His 57), σερίνη (Ser 221) και ασπαρτικό οξύ (Asp 102) και σε αυτά οφείλεται η δράση των πρωτεϊνών αυτών. Παρόλο που αυτά τα αμινοξέα φαίνεται ότι βρίσκονται πολύ μακριά μεταξύ τους λόγω των θέσεων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, στην πραγματικότητα είναι πολύ κοντά μεταξύ τους λόγω αναδίπλωσης της πρωτεΐνης. Χωρίζονται σε δύο οικογένειες, τις σαμππιλυσίνες και τις θρυψίνες, οι οποίες ακολούθησαν πορεία ανεξάρτητης συγκλίνουσας εξέλιξης (Κλώνης 2007). Η σαμππιλυσίνη είναι αποκλειστικά βακτηριακής προέλευσης ενώ η θρυψίνη και η χυμοθρυψίνη είναι ζωικής προέλευσης. Παρουσιάζουν εντυπωσιακή διαφορά στην τριτοταγή τους δομή και χαμηλή ομολογία στην πρωτοταγή. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω έχουν κοινό καταλυτικό μηχανισμό. Το κατάλοιπο της ιστιδίνης αποτελεί τη βάση που απάγει το πρωτόνιο από το κατάλοιπο σερίνης και διευκολύνει το σχηματισμό ομοιοπολικής τετραεδρικής μεταβατικής κατάστασης του καρβονυλικού άνθρακα προς τη λύση του πεπτιδικού δεσμού (Κλώνης, 2007). Η ισχυρή πρόσδεση της κατάστασης αυτής εξασφαλίζεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ του καταλοίπου του ασπαρτικού οξέος και μίας ειδικής θέσεως επάνω στο

ένζυμο που ονομάζεται οπή οξυανιόντος. Σημαντικό χαρακτηριστικό αποτελεί η μέτρια εκλεκτικότητα με την οποία πραγματοποιείται η δέσμευση των πεπτιδικών υποστρωμάτων. Οι σερινοπρωτεάσες δεν εμφανίζουν απόλυτη εξειδίκευση και υδρολύουν με διαφορετική ταχύτητα πεπτιδικούς δεσμούς που φέρουν διαφορετικές πλευρικές ομάδες αμινοξέων. Στις σερινοπρωτεάσες η καταλυτικά απαραίτητη δραστική σερίνη του ενεργού τους κέντρου προσβάλλει πυρηνόφιλα τον πεπτιδικό καρβονυλικό άνθρακα. Αν η σερίνη δεν βρισκόταν στο συγκεκριμένο περιβάλλον του ενεργού κέντρου του ενζύμου το πιθανότερο είναι να μην λειτουργεί ως πυρηνόφιλο, αφού θα διατηρούσε πρωτονιωμένο το υδροξύλιο της. Ωστόσο, η παρουσία της ιστιδίνης, η οποία δρα ως βάση, έχει ως αποτέλεσμα την απαγωγή του πρωτονίου της σερίνης και το σχηματισμό ιμιδαζολικού κατιόντος, το οποίο σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από το καρβοξύλιο του ασπαραγινικού οξέος.

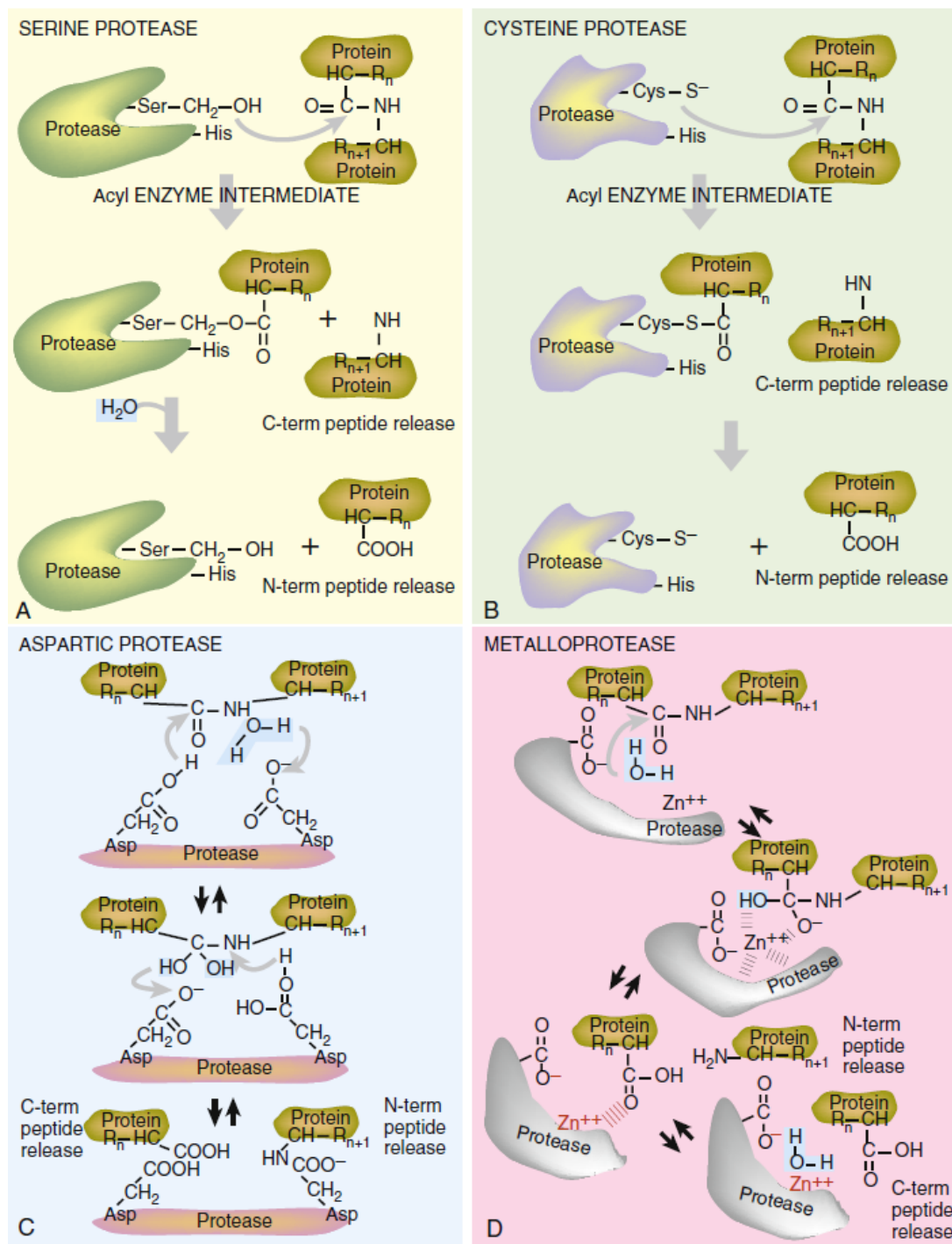
Θειολοπρωτεάσες

Οι θειολοπρωτεάσες ανήκουν στην κατηγορία των υδρολασών και στο ενεργό τους κέντρο φέρουν ένα καταλυτικά απαραίτητο κατάλοιπο κυστεΐνης. Η σουλφυδρυλομάδα της κυστεΐνης δρα ως πυρηνόφιλη ομάδα προσβολής του πεπτιδικού καρβονυλικού άνθρακα του υποστρώματος, όπως η σερίνη στις σερινοπρωτεάσες. Η σουλφυδρυλομάδα είναι ευπαθής σε οξειδωτικές συνθήκες οι οποίες και αδρανοποιούν το ένζυμο, ο χειρισμός του οποίου *in vitro* πρέπει να πραγματοποιείται παρουσία αναγωγικών παραγόντων (Κλώνης 2007). Στις θειολοπρωτεάσες ανήκουν τα ένζυμα παπαΐνη από το είδος *Carica papaya*, βρομελαΐνη από το είδος *Ananas comosus*, ακτινιδίνη, τα οποία είναι όλα φυτικής προέλευσης.

Υδρολάσες με καταλυτικό κατάλοιπο ασπαρτικού ή γλουταμινικού οξέος

Σε αυτή την κατηγορία ενζύμων ανήκουν οι απαλογονάσες, οι οποίες διασπούν το δεσμό αλογόνου-άνθρακα και αλογονανθράκων ελευθερώνοντας αλογονανιόν. Υποστρώματα των απαλογονασών είναι διάφορες μονο- και πολύ-αλογονο-υποκατεστημένες οργανικές ενώσεις, όπως για παράδειγμα πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αλογονάνθρακες, αλογονομένα κυκλοαλκάνια. Τέτοιες ενώσεις συχνά βαραίνουν το περιβάλλον, λόγω της χρησιμοποίησής τους ως ξενοβιοτικά, διαλύτες, συνθετικά υποπροϊόντα και αντιδραστήρια της χημικής βιομηχανίας. Ατυχώς, οι αλογονάνθρακες είναι λιγότερο βιοδιασπάσιμοι στο περιβάλλον, συγκριτικά με τις αντίστοιχες μη αλογονομένες ενώσεις. Συνεπώς, ιδιαίτερη σημασία αποκτούν ένζυμα

τα οποία επιτρέπουν σε μικροοργανισμούς που τα διαθέτουν να χρησιμοποιούν τους αλογονάνθρακες ως πηγή άνθρακα και να τους μεταβολίζουν. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τις πρωτεάσες πεψίνη και χυμοσίνη.



Εικόνα 2: (A): Οι σερινοπρωτεάσες διασπών τους δεσμούς της κυτταρίνης σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο. (B): Οι θειολοπρωτεάσες έχουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης αλλά στο ενεργό τους κέντρο υπάρχει το καταλυτικό αμινοξύ κυστεΐνη. (C): Υδρολάσες με καταλυτικό κατάλοιπο ασπαραγινικού οξέος έχουν δύο κατάλοιπα ασπαραγινικού οξέος τα οποία δρουν ταυτόχρονα. (D): Οι μεταλλοπρωτεάσες χρησιμοποιούν ιόντα μετάλλων ως συμπαραγόντες για την πέψη των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα Zn²⁺.

Η τέταρτη οικογένεια πρωτεασών, οι μεταλλοπρωτεάσες, χρησιμοποιούν ιόντα μετάλλων ως συμπαράγοντες για την πέψη των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα η θερμολυσίνη. Τέλος, την πέμπτη οικογένεια αποτελούν εκείνες οι πρωτεάσες που έχουν στο ενεργό τους κέντρο θρεονίνη.

1.2.3 Εφαρμογές των πρωτεασών

Οι καταλυτικές ιδιότητες των πρωτεασών χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανικές διαδικασίες, όπως στην βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Πρόσφατες βιοτεχνολογικές μελέτες στον τομέα της υδρόλυσης πρωτεϊνών έχουν προσφέρει σημαντικές πληροφορίες στη χρήση πεπτιδίων, μετά από δράση πρωτεασών. Πρωτεάσες που προέρχονται από βακτήρια έχουν σημαντικά χαρακτηριστικά όπως η μικρού κόστους έκφρασή τους και η μεγάλη σταθερότητα. Ο πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενος τρόπος παραγωγής βιοενεργών πεπτιδίων είναι μέσω της υδρόλυσης πρωτεϊνών.

Βιομηχανία απορρυπαντικών

Τα τελευταία χρόνια οι πρωτεάσες έχουν σταματήσει να είναι πρόσθετα και έχουν γίνει ένα απαραίτητο συστατικό των απορρυπαντικών. Πλέον, με την μεγάλη χρήση των μικροοργανισμών για παραγωγή πρωτεϊνών, πολλές έρευνες έχουν γίνει με θέμα τις πρωτεάσες, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως σκόνη για τη συγκεκριμένη χρήση. Βασικά χαρακτηριστικά των πρωτεασών για την εφαρμογή τους σε απορρυπαντικά είναι η υψηλή δραστηριότητα και η σταθερότητα σε υψηλές τιμές pH και θερμοκρασίας, καθώς και η μεγάλη αντοχή που εμφανίζουν έναντι πολλών οξειδωτικών παραγόντων που υπάρχουν στο σκεύασμα. Οι πιο κατάλληλες πρωτεάσες για τη χρήση σε απορρυπαντικά είναι εκείνες που έχουν τιμή ισοηλεκτρικού σημείου (pI), ίση ή πολύ κοντά με την τιμή pH του απορρυπαντικού (Rao et al., 1998).

Βιομηχανία τροφίμων

Αρτοποιία

Ο άρτος αποτελεί τη βάση της διατροφής πολλών λαών συμπεριλαμβανομένου και των Ελλήνων. Όμως, η πρώτη ύλη της παραγωγής του το αλεύρι των δημητριακών και κυρίως του σίτου, δεν περιέχει τις αναγκαίες ποσότητες των απαραίτητων ενζύμων όπως είναι οι πρωτεάσες και οι α-αμυλάσες ή β-αμυλάσες. Έτσι τα ένζυμα αυτά προστίθενται από τον αρτοποιό, κυρίως με τη μορφή της ζύμης αρτοποιίας ή με τη

μορφή καθαρών παρασκευασμάτων, κατά τη διάρκεια της αρτοποιήσης. Οι πρωτεάσες υδρολύουν τόσο εσωτερικούς (ενδοπεπτιδάσες) όσο και εξωτερικούς (εξωπεπτιδάσες) πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών του αλεύρου και του ζυμαριού γνωστών με το κοινό όνομα γλουτένη. Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται τόσο η τροποποίηση των μηχανικών ιδιοτήτων του ζυμαριού όσο και η απελευθέρωση αμινοξέων και μικρών πεπτιδίων. Τα τελευταία αποτελούν, κυρίως, θρεπτικό υλικό των μικροοργανισμών της ζύμης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας κατά το ψήσιμο επιταχύνεται και η δράση των αμυλασών, που είχε αρχίσει αμέσως μετά την προσθήκη της ζύμης. Πρωτεόλυση και γλυκόλυση, λοιπόν, συντείνουν στην παραγωγή CO₂ λόγω της αυξημένης δραστηριότητας των μικροοργανισμών της ζύμης και επιπλέον, έχουν ως συνέπεια την διόγκωση του ζυμαριού, που αποτελεί σημαντικό στοιχείο της ποιότητας του άρτου.

Οινοπνευματοποιία (οίνος, ζύθος)

Όπως και στην περίπτωση της αρτοποιίας έτσι και στην περίπτωση της οινοπνευματοποιίας παρατηρούνται δράσεις πρωτεασών και αμυλασών. Οι πρώτες ύλες, δηλαδή ο χυμός σταφυλιών (γλεύκος) και ο ζυθογλεύκος δεν είναι ιδιαίτερα πλούσιες στα απαραίτητα ένζυμα, γι' αυτό και προστίθενται με τη μορφή ειδικών ζυμών είτε και καθαρών παρασκευασμάτων. Στην περίπτωση της οινοπνευματοποιίας είναι απαραίτητη η παρουσία και δράση της β-1,4 γλυκανάσης κυτταρινάσης. Η περιεκτικότητα των γλευκών σε πρωτεΐνες είναι περιορισμένη. Αντίθετα, είναι σχετικά αυξημένη η περιεκτικότητα σε πόλυ- ή ολιγοσακχαρίτες. Η δράση των πρωτεασών και της κυτταρινάσης προηγείται των κύριων δράσεων των αμυλασών αφού πρέπει να υδρολυθούν τα κυτταρικά τοιχώματα. Έτσι, τα γλεύκη εμπλουτίζονται συνέχεια σε θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών των ζυμών, όπως μονοσακχαρίτες (κυρίως γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη) αλλά και σε υλικά που θα εμπλουτίσουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες των έτοιμων προϊόντων.

Παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων

Η παρασκευή των τυριών, κυρίως, αλλά και των άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων είναι μια διαδικασία γνωστή εδώ και πολλά χρόνια. Πέρα από τις επιμέρους διεργασίες, που οδηγούν στην παρασκευή εξειδικευμένων προϊόντων σε γεύση και ποιότητα, η παρασκευή των τυριών συντελείται στη βάση της δράσης των ενζύμων ρεννίνη, πεψίνη και λιπάση. Η ρεννίνη, κατά το πρώτο στάδιο της πήξης του γάλακτος,

υδρολύει την κ- καζεΐνη μεταξύ των καταλοίπων φαινυλαλανίνη (Phe 105) και μεθειονίνη (Met 106), ενώ η πεψίνη υδρολύει περαιτέρω την καζεΐνη και αλλοιώνει τη γεύση του τυριού με την απελευθέρωση μικρών πεπτιδίων. Η λιπάση δρα κατά το δεύτερο στάδιο της πήξης του τυριού όπου στο πρωτεϊνικό πήγμα έχουν εγκλωβιστεί τα λιπαρά συστατικά του γάλακτος. Εκεί υδρολύει τα τριγλυκερίδια και τα λιπαρά οξέα, τα οποία κατά την ωρίμανση του τυριού του προσδίδουν την επιθυμητή γεύση και άρωμα.

1.2.4 Πρωτεΐνες από απόβλητα

Οι πρωτεΐνες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε όλους τους οργανισμούς, έχοντας διαφορετικές λειτουργίες όπως η κατάλυση μεταβολικών διεργασιών, η αναγνώριση της γενετικής πληροφορίας, η μεταφορά μορίων, ακόμα και η αποθήκευση ενέργειας. Πολλές φορές, πρωτεΐνες από διάφορες πηγές αποβάλλονται στο περιβάλλον, θέτοντας έτσι την πρόκληση για αξιοποίηση των αποβλήτων αυτών για παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τέτοια προϊόντα αποτελούν οι ανθρώπινες και ζωικές τροφές ή βιοδραστικά πεπτιδία με πολλές εφαρμογές στην υγεία και άλλους τομείς της βιομηχανίας. Σύμφωνα με πολλούς οργανισμούς τροφίμων και γεωπονίας, υπάρχει μεγάλη ανάγκη για παραγωγή πρωτεϊνούχων τροφίμων για την επόμενη δεκαετία. Σύμφωνα με έρευνες, αναμένεται να υπάρξει επάρκεια πρωτεϊνούχων γευμάτων για τα επόμενα δέκα χρόνια αλλά με βάση την τωρινή ζήτηση. Συνεπώς, μεγάλη προσοχή δίνεται πλέον στην ανάκτηση πρωτεϊνών από τέτοιες πηγές, καθώς αποτελεί ελπιδοφόρα εναλλακτική, ειδικότερα σε χώρες όπου η ζήτηση είναι μεγαλύτερη από την παραγωγή. Το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεϊνών που καταναλώνει ο άνθρωπος προέρχεται από τα δημητριακά και έπειτα από ζωικά προϊόντα όπως το γάλα το κρέας και τα ψάρια. Κατά τις διαδικασίες παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων προϊόντων από βιομηχανίες τροφίμων, μεγάλο μέρος των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται καταλήγουν στο νερό που αποβάλλεται. Η ανάκτηση των πρωτεϊνών από τις απορροές νερού μπορεί να αποτελέσει οικονομική ανακούφιση σε εταιρείες, καθώς μπορεί να πωληθεί ως ένα επιπλέον προϊόν και ταυτόχρονα να μειώσει τη ρύπανση του περιβάλλοντος. Οι πρωτεΐνες μπορούν να καταλήξουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες αποβλήτων, τα υδατικά και τα στερεά.

Βιομηχανία ψαριών

Το θαλάσσιο περιβάλλον αποτελεί μία μεγάλη πηγή διαφοροποιημένων οργανισμών προσαρμοσμένων να επιβιώνουν σε διαφορετικά και πολλές φορές ακραία περιβάλλοντα. Αυτή η γενετική ποικιλομορφία, ακόμη και μέσα στο ίδιο είδος, συνεπάγεται και διαφορετικές ενζυμικές ιδιότητες. Συνεπώς, το περιβάλλον αυτό προσφέρει δυνατότητα εύρεσης πρωτεϊνών με μοναδικές φυσικές, χημικές και καταλυτικές ιδιότητες. Μέχρι πρόσφατα, πρωτεάσες από πολλά θαλάσσια είδη έχουν απομονωθεί και σε πολλά εμπορικά είδη, όπως για παράδειγμα ο μπακαλιάρος και η τσιπούρα (*Atlantic cod*, *Sea bream*) (Gildberg et al., 2004, Zhou et al., 2007). Ανάμεσα στα είδη αλλά ακόμα και μέσα στο ίδιο είδος υπάρχουν διαφορές στην ποσότητα και τα ισοένζυμα των πρωτεασών (Bougatef et al., 2008). Οι πρωτεάσες και συγκεκριμένα οι πεψίνες έχουν μελετηθεί και αλληλουχηθεί εκτενώς (Polgár et al., 1987, Gildberg et al., 1990, Brier et al., 2007, Squires et al., 1986, Haard et al., 1986, Amiza et al., 2002). Για παράδειγμα, έρευνες έχουν δείξει ότι οι πεψίνες του είδους *Atlantic cod* παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες από εκείνες άλλων ειδών που ζουν σε πιο θερμά περιβάλλοντα. Επίσης, φαίνεται ότι πολλές πεψίνες παρουσιάζουν ομολογία με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του ανθρώπου με τη διαφορά όμως ότι μειώνεται σε μεγάλο βαθμό η δραστικότητά τους σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες σε σχέση με εκείνες του ανθρώπου που επιβιώνει σε θερμότερο περιβάλλον (Bjelland et al., 1988). Η βιομηχανική επεξεργασία των ψαριών αποτελεί ένα αυξανόμενο πρόβλημα για το περιβάλλον, ειδικότερα στις χώρες όπου τέτοιες διεργασίες έχουν ιδιαίτερη σημασία για την οικονομία τους. Ένα μεγάλο μέρος των επεξεργασμένων θαλάσσιων οργανισμών (κεφάλι, οστά, πτερύγια, δέρμα, ουρά και σπλάχνα) δεν αξιοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς δεν αποτελούν μέρος της διατροφής του ανθρώπου, λόγω της ανεπιθύμητης υφής και των έντονων γεύσεων και συνεπώς αποτελούν απόβλητα και απορρίπτονται σε χωματερές ή ακόμα και στη θάλασσα οδηγώντας σε περιβαλλοντικό πρόβλημα. Από αυτά, ένα σημαντικό ποσοστό περιέχει πολύτιμα συστατικά, όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες, χιτίνη και σημαντικές χρωστικές (De Holanda and Netto, 2006). Ένας τρόπος για αποφυγή μόλυνσης του περιβάλλοντος αποτελεί η αποτελεσματικότερη επεξεργασία των οργανισμών αυτών, πριν την απόρριψη των αποβλήτων. Ταυτόχρονα, σημαντικές για πολλές διαδικασίες πρωτεΐνες μπορούν να απομονωθούν ως παραπροϊόν με κατάλληλη επεξεργασία, διαδικασία που είναι και οικονομικά ωφέλιμη για τις εταιρείες (Guerrero et al., 1998).

Επεξεργασία κρέατος από αγροτικά ζώα

Κατά τη εκτροφή αγροτικών ζώων, το αίμα είναι το κύριο οργανικό απόβλητο που απομακρύνεται. Για παράδειγμα, στο Μεξικό, περίπου 91 εκατομμύρια λίτρα αίματος παράγονται κάθε χρόνο από την εκτροφή αγροτικών ζώων (Gómez- Juárez et al., 1999). Το 15% αυτή της ποσότητας επαναχρησιμοποιείται για την διατροφή αυτών των ζώων και το υπόλοιπο απομακρύνεται σε αποχετεύσεις και χωματερές, το οποίο αποτελεί σημαντική πηγή πρωτεϊνών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Γι' αυτό το λόγο μέθοδοι για τη συλλογή και την επεξεργασία του αίματος έχουν ξεκινήσει και απολαμβάνουν οικονομικής επιτυχίας (Gómez- Juárez et al., 1999; Selmane et al., 2008). Ένας τρόπος για αξιοποίηση αυτής της πηγής είναι είτε με υπερδιήθηση είτε με ξήρανση με ψεκασμό (Dailloux et al., 2002). Καθώς η αγορά κρέατος από αγροτικά ζώα επεκτείνεται, η υψηλή ποιότητα στις ζωοτροφές αποτελεί σημαντική παράμετρο. Οι πρωτεΐνες που συλλέγονται από διάφορες πηγές είναι απαραίτητο πρόσθετο στις τροφές αυτές, όχι μόνο ως θρεπτικά συστατικά αλλά και ως ενισχυτικό γεύσης (De Holanda and Netto, 2006).

Επεξεργασία γαλακτοκομικών προϊόντων

Εκτεταμένες έρευνες πραγματοποιούνται για μεθόδους ανάκτησης πρωτεϊνών από γαλακτοκομικά απόβλητα. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι πολύτιμα προϊόντα με εξαιρετικές θρεπτικές και λειτουργικές ιδιότητες. Περίπου 2-10 λίτρα αποβλήτων παράγονται από κάθε ένα λίτρο επεξεργασμένου γάλακτος. Ο ορός του γάλακτος είναι ένα από τα κύρια παραπροϊόντα που παράγονται μετά την πήξη του γάλακτος και την απομάκρυνση της καζεΐνης. Η σύστασή του αποτελείται κυρίως από λακτόζη (4.5-5% w/v), πρωτεΐνες (0.6-0.8% w/v) και λιπίδια (0.4-0.5% w/v). Από βιομηχανικής και περιβαλλοντικής σκοπιάς η επαναχρησιμοποίηση των πρωτεϊνών από τα απόβλητα έχει μεγάλη οικονομική σημασία (Cassini et al., 2010). Συνεπώς, οι εφαρμογές τους ως υψηλής προστιθέμενης αξίας πρόσθετα στους τομείς της διατροφολογίας και της φαρμακευτικής, έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό (Chollangi and Hossain, 2007). Η κύρια πρωτεΐνη του γάλακτος είναι η καζεΐνη, αποτελώντας περίπου το 80% του πρωτεώματος στο γάλα. Για την απομόνωση αυτών των πρωτεϊνών συχνά χρησιμοποιούνται τεχνολογία μεμβρανών (υπερδιήθηση) ή χρωματογραφικές τεχνικές.

Αγροβιομηχανικά απόβλητα

Τα αγροβιομηχανικά απόβλητα περιλαμβάνουν τα απόβλητα που παράγονται κατά τη διάρκεια γεωπονικών διεργασιών. Συγκεκριμένα, απόβλητα υψηλής αξίας ελευθερώνονται κατά το σχηματισμό του βλαστού, των φύλλων και των υπόλοιπων τμημάτων σε φυτά όπως το άχυρο, τα όσπρια και τα δημητριακά (ρύζι, σιτάρι, καλαμπόκι και σόργο). Η σύσταση τους είναι κυρίως σάκχαρα, πρωτεΐνες και μέταλλα (Panesar et al., 2016). Φθηνές αγροβιομηχανικές πηγές, όπως για παράδειγμα το πίτουρο σιταριού, το αλεύρι σόγιας και το ζαχαροκάλαμο έχουν αξιοποιηθεί για την ανάκτηση υδατανθράκων και αζώτου αντί για την εργαστηριακή σύνθεση τους (Fatima et al., 2014). Ένα σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα αποτελεί η συσσώρευση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (κυτταρίνη) από τα μέρη των φυτών που δεν χρησιμοποιούνται ή αποτελούν παραπροϊόντα των βιομηχανικών διεργασιών. Επίσης, αξιοποιήσιμα είναι και τα απόβλητα από βιομηχανίες φρούτων και λαχανικών. Καθώς τα τελευταία χρόνια αυξάνεται η ζήτηση για έτοιμα συσκευασμένα και προεπεξεργασμένα προϊόντα, έχουν αυξηθεί και τα απόβλητα από τις συγκεκριμένες διεργασίες κυρίως από φύλλα και σπόρους (Joshi et al., 2008). Στις περισσότερες περιπτώσεις τα υλικά αυτά χρησιμοποιούνται κυρίως σε θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη μικροβίων, καθώς είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά, βιταμίνες (Schieber et al., 2001). Ένας ακόμη τομέας αξιοποίησης αποβλήτων είναι η ζυθοποιία. Το κοκκώδες σιτάρι είναι το κύριο παραπροϊόν της βιομηχανίας ζύθου έχοντας μεγάλη συγκέντρωση σε λιγνίνη, πρωτεΐνες και άλλα θρεπτικά συστατικά (White et al., 2008, Mussatto et al., 2008). Η μετατροπή αυτών των αγροβιομηχανικών αποβλήτων σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, εξελίχθηκε πρόσφατα σ' έναν αναπτυσσόμενο τομέα έρευνας, με αποτέλεσμα μέσω βιοτεχνολογικών μεθοδολογιών να μετατρέπονται σε πολλά χρήσιμα προϊόντα συμπεριλαμβανομένων και ενζύμων.

Διαδικασία παραγωγής αντιβιοτικών

Πέρα από τη βιομηχανία τροφίμων, μεγάλες ποσότητες οργανικών αποβλήτων παράγονται συνήθως από τη βιοσύνθεση αντιβιοτικών. Εξαιτίας των τοξικών καταλοίπων, η διαχείριση αυτών των αποβλήτων είναι ταυτόχρονα δύσκολη και ακριβή. Συνεπώς, η ανάκτηση πρωτεϊνών αποτελεί τομέα μεγάλου ενδιαφέροντος (Li et al., 2004).

Απόβλητα από μικροφύκη

Τα μικροφύκη είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε απόβλητα νερού και να καταναλώνουν νιτρικά, φωσφορικά και ανθρακικά άλατα. Καθώς καθαρίζεται το νερό, τα φύκη συλλέγονται, έχοντας μορφή λάσπης και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων και ως ζωοτροφή. Οι οργανισμοί αυτοί θεωρούνται πηγή πληθώρας πολύτιμων συστατικών που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε τροφές, σε φυσικές χρωστικές, σε προϊόντα προστασίας του δέρματος καθώς είναι πλούσια σε πρωτεΐνες και έχουν μελετηθεί εκτενώς για να βρεθεί λύση στην έλλειψη τροφών. Από φύκη που αναπτύσσονται σε απόβλητα μπορούν να απομονωθούν πεπτιδία με αντιοξειδωτική ή αντικαρκινική δράση που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία φαρμάκων. Ένα πολύ μεγάλο ποσοστό της ξηρής μάζας των μικροφυκών αποτελείται από υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες (Sheih et al., 2009).

1.3 Βιολογική αναγνώριση

Όλοι οι οργανισμοί, από τους πιο απλούς μέχρι τους πιο πολύπλοκους, όπως ο άνθρωπος, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς επικοινωνίας μέσω μορίων τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με μη-ομοιοπολικές αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές επιτρέπουν τον σχηματισμό μοριακών συμπλόκων. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις για παράδειγμα είναι η αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος, ορμόνης-υποδοχέα, αντιγόνου-αντισώματος. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα βιολογικά μακρομόρια δεσμεύουν ή δεσμεύονται εκλεκτικά και αντιστρεπτά από άλλα μόρια ονομάζεται βιολογική αναγνώριση (biological recognition) (Chaiken, 1983). Ο μηχανισμός της βιολογικής αναγνώρισης είναι το αποτέλεσμα διαφόρων διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, όπως των ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, των δυνάμεων van der Waals και των δεσμών υδρογόνου (Chaiken, 1983). Οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις ή δυνάμεις Coulomb αναπτύσσονται μεταξύ αντίθετα φορτισμένων ιόντων. Η συμμετοχή των δυνάμεων αυτών στη βιολογική αναγνώριση είναι ιδιαίτερα σημαντική και καθοριστική. Στα περισσότερα βιολογικά σύμπλοκα έχουν αναγνωριστεί τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις, όπως για παράδειγμα στην αλληλεπίδραση θρυψίνης με τον αναστολέα της (Weiner et al., 1982). Σε όλες τις περιπτώσεις πιστεύεται ότι η παρουσία φορτίων και η ανάπτυξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων βοηθάει στον κατάλληλο προσανατολισμό και τη διευθέτηση των διάφορων υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο των ενζύμων (Hol, 1985, Fersht, 1985), ως και τη σωστή αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Hol, 1985, Iwata & Ohta,

1993). Οι δεσμοί υδρογόνου αναπτύσσονται μεταξύ ενός ηλεκτραρνητικού ατόμου και ενός ατόμου με ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων ή με ελεύθερα π ηλεκτρόνια. Παρόλο που ο δεσμός υδρογόνου είναι ασθενής σε ένταση, η συνεισφορά του στη σταθεροποίηση της δομής των μοριακών συμπλόκων είναι μεγάλης σημασίας γιατί συνήθως εμφανίζεται κατά δεκάδες ή και εκατοντάδες και δρα προσθετικά προκαλώντας σημαντικό αποτέλεσμα στη σταθερότητα των συμπλόκων και κατ' επέκταση στο σχηματισμό πιο περίπλοκων δομών. Το μήκος του δεσμού υδρογόνου βρίσκεται μεταξύ εκείνου των δεσμών van der Waals και των ομοιοπολικών δεσμών. Σημαντικό χαρακτηριστικό του δεσμού υδρογόνου είναι η εξάρτηση του από τον προσανατολισμό των ομάδων που συμμετέχουν. Οι δεσμοί van der Waals είναι αποτέλεσμα ασθενών έλξεων μεταξύ μη φορτισμένων ατόμων που βρίσκονται σε απόσταση μεταξύ τους περίπου 3-4 Å. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι γενικά ασθενείς (1 Kcal/mol) αλλά, όπως και οι δεσμοί υδρογόνου, δρώντας προσθετικά συνεισφέρουν σημαντικά στη σταθεροποίηση της βιολογικής δομής και στη μοριακή αναγνώριση (Fersht, 1985, Iwata&Ohta, 1993). Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις στην πραγματικότητα δεν είναι ελκτικές δυνάμεις, αλλά δημιουργούνται από την αύξηση της εντροπίας η οποία λαμβάνει χώρα όταν δύο μη πολικές ομάδες έρχονται σε επαφή, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος. Η συμμετοχή των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στο σχηματισμό βιολογικών συμπλοκών είναι αρκετά συνηθισμένη, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ χρωστικών και ενζύμων (Glazer, 1970).

1.3.1 Χρωματογραφία συγγένειας

Πλέον, ο σημαντικότερος παράγοντας της επιτυχούς εμπορικής εκμετάλλευσης βιοτεχνολογικών προϊόντων αποτελεί η τεχνολογία απομόνωσης και καθαρισμού βιολογικών μακρομορίων, γνωστή ως κατιούσα επεξεργασία, (downstream processing), (Hodgson, 1990, Arnold, 1991, Champluvier & Kula, 1992b, Hodgson, 1992, Labrou & Clonis, 1994, Narayanan, 1994, Shadana & Beelaram, 1994, Jones et al., 1995, Wu et al., 1996). Το κρισιμότερο στάδιο στην κατιούσα επεξεργασία είναι οι διαδικασίες "υψηλού καθαρισμού", από τις οποίες σημαντικότερες τεχνικές είναι οι χρωματογραφικές. Στις περιπτώσεις που η καθαρότητα του προϊόντος κρίνεται αναγκαία σε υψηλό βαθμό, όπως στις περιπτώσεις μακρομορίων με φαρμακευτικές, διαγνωστικές και αναλυτικές εφαρμογές, τότε η χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography), αποτελεί την ιδανικότερη λύση (Clonis, 1990, Hodgson, 1990,

Arnold, 1991, Clonis, 1991, Hodgson, 1992, Narayanan, 1994, Shadana & Beelaram, 1994, Jones et al., 1995). Η χρωματογραφία συγγενείας αποτελεί την πλέον εκλεπτυσμένη και εξειδικευμένη τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού βιολογικών μακρομορίων (Cuatrecasas, 1970, Clonis, 1982, 1990, 1991). Η τεχνική μπορεί να περιγραφεί ως βιοεκλεκτική χρωματογραφία προσρόφησης, επειδή ο διαχωρισμός και καθαρισμός του βιολογικού μακρομορίου βασίζεται στη δυνατότητα εκλεκτικής προσρόφησης του σε ένα μόριο, τον δεσμευτή, (ligand), που είναι ακινητοποιημένο σε κάποιο αδιάλυτο υδρόφιλο πολυμερές υλικό, το φορέα (σεφαρόζη, κυτταρίνη κ.α.). Στο Σχήμα 1 φαίνεται η αρχή της τεχνικής. Ο δεσμευτής πρέπει να παρουσιάζει εκλεκτική συγγένεια με το μακρομόριο που πρόκειται να καθαριστεί όπως για παράδειγμα μπορεί να είναι κάποιο ανάλογο του υποστρώματος του μακρομορίου ή κάποιος αναστολέας ή ενεργοποιητής ή συνένζυμο. Το σύστημα του στερεού φορέα με το ακινητοποιημένο μόριο του δεσμευτή αποτελεί τον λεγόμενο προσροφητή συγγενείας (affinity absorbent). Όταν ένα βιολογικό δείγμα που περιέχει μίγμα μακρομορίων περάσει από τη χρωματογραφική στήλη που φέρει πακτωμένο τον προσροφητή τότε, θεωρητικά, μόνο το μακρομόριο που παρουσιάζει συγγένεια με τον δεσμευτή θα συγκρατηθεί (προσροφηθεί) στη στήλη, ενώ όλα τα άλλα μόρια θα απομακρυνθούν κατά το στάδιο των πλύσεων. Ο τρόπος με τον οποίο ακινητοποιείται ο δεσμευτής στο φορέα έχει μεγάλη σημασία, αφού θα πρέπει και μετά την ακινητοποίηση του να μη μεταβάλλεται η στερεοχημική του διαμόρφωση και να διατηρεί την ικανότητα εκλεκτικής αλληλεπίδρασης με το μακρομόριο. Ακολούθως, το προσροφημένο μακρομόριο εκλύεται κάτω από συνθήκες που εξασθενούν τις δυνάμεις μοριακής αναγνώρισης με το δεσμευτή, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του συμπλόκου.

Τέσσερις κύριες κατηγορίες φορέων έχουν χρησιμοποιηθεί στη χρωματογραφία συγγενείας: τα φυσικά πολυμερή, τα συνθετικά πολυμερή, τα ημισυνθετικά πολυμερή και τα ανόργανα υλικά (Clonis & Lowe, 1988, Boschetti, 1994). Αρκετά φυσικά πολυμερή όπως η αγαρόζη, η κυτταρίνη, η δεξτράνη, τα παράγωγα του αλγινικού οξέος είναι αποδεκτά για τη χρωματογραφία συγγενείας.

1.3.2 Εφαρμογές χρωματογραφίας συγγενείας.

Η χρωματογραφία συγγενείας εφαρμόζεται σε διαδικασίες καθαρισμού ενζύμων και πρωτεϊνών, αντισωμάτων, υποδοχέων ορμονών, κυττάρων και ιών, καθώς και νουκλεϊκών οξέων και νουκλεοτιδίων. Επίσης, εφαρμόζεται σε διαδικασίες διαχωρισμού ισοενζύμων, μετουσιωμένων ή χημικά τροποποιημένων πρωτεϊνών από

φυσικές πρωτεΐνες και μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Άλλες εφαρμογές αφορούν τη συμπύκνωση αραιωμένων πρωτεϊνικών διαλυμάτων, τη μελέτη του μηχανισμού και της αλληλουχίας ενζυμικών αντιδράσεων, και υπολογισμός σταθερών διάστασης και ισορροπίας ενζυμικών αντιδράσεων.

1.3.3 Χαρακτηριστικά φορέα για τη χρωματογραφία συγγένειας

Ο ιδανικός φορέας για τη χρωματογραφία συγγενείας θα πρέπει να συνδυάζει ορισμένες βασικές απαιτήσεις και χαρακτηριστικά (Clonis & Lowe, 1988) όπως: (α) θα πρέπει να είναι υδρόφιλος και να μην αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια, εμφανίζοντας ελάχιστη μη- εκλεκτική προσρόφηση, (β) θα πρέπει να εμφανίζει σφαιρική μορφή με καλή ροή τόσο σε υψηλές όσο και σε χαμηλές πιέσεις, (γ) να περιέχει πολλές χημικές ομάδες (υδροξύλια) οι οποίες εύκολα να μπορούν να ενεργοποιηθούν ή να τροποποιηθούν ώστε να ακινητοποιηθεί ο δεσμευτής, (δ) να είναι χημικά και μηχανικά ανθεκτικός σε διάφορες συνθήκες pH, θερμοκρασίας, ιοντικής ισχύς και πίεσης και (ε) να σχηματίζει μεγαλοπορώδη δομή, επιτρέποντας ομοιόμορφη και ανεμπόδιση είσοδο και έξοδο των μακρομορίων στο εσωτερικό των σφαιριδίων του φορέα. Στην πραγματικότητα, όμως, κανένας από τους μέχρι σήμερα διαθέσιμους φορείς στην βιομηχανία της χρωματογραφίας συγγένειας, δεν συνδυάζει όλες τις παραπάνω ιδιότητες, όμως υπάρχουν μερικοί φορείς που συνδυάζουν αρκετές από αυτές και χρησιμοποιούνται ευρέως.

1.3.4 Τρόποι έκλουσης προσροφημένων μακρομορίων στη χρωματογραφία συγγένειας

Η τεχνική που εφαρμόζεται για την έκλουση προσροφημένων μακρομορίων, κατά τη χρωματογραφία συγγενείας, εξαρτάται κυρίως από τη φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ δεσμευτή και μακρομορίου, ως και το βαθμό εκλεκτικότητας. Έτσι λοιπόν η μεταβολή της ιοντικής ισχύς ή του pH του διαλύματος επηρεάζει την προσρόφηση εκείνων των μακρομορίων που η δέσμευση τους βασίζεται κυρίως σε ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Η μεταβολή της πολικότητας του διαλύτη επηρεάζει τα μακρομόρια που δεσμεύονται κυρίως με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ή δυνάμεις van der Waals. Τέτοιου είδους έκλουση θεωρείται ως μη-εκλεκτική, είναι γενικά οικονομική και εφαρμόζεται κυρίως σε συστήματα υψηλής εκλεκτικότητας. Συχνά η έκλουση του δεσμευμένου μακρομορίου είναι δυνατόν να επιτευχθεί με την εισαγωγή στην υγρή φάση ενός μορίου, το οποίο θα πρέπει ή να συναγωνίζεται με το δεσμευτή για την ίδια θέση δέσμευσης στο μακρομόριο ή να δημιουργεί με το προσροφημένο ένζυμο τέτοιο

σύμπλοκο που να εξασθενεί την αλληλεπίδραση δεσμευτή- μακρομορίου. Η τεχνική αυτή θεωρείται ως εκλεκτική έκλουση και επιτρέπει την παραλαβή εκείνου ή εκείνων των μακρομορίων που εμφανίζουν συγγένεια με το συγκεκριμένο συναγωνιστικό μόριο (Hodgson, 1990, Arnold, 1991, Champluvier & Kula, 1992a,b, Hodgson, 1992, Labrou & Clonis, 1994, Narayanan, 1994, Sekine et al., 1994, Shadana & Beelaram, 1994, Galaev, et al., 1995, Hubatsch et al., 1995). Η τεχνική αυτή, αν και τις περισσότερες φορές είναι σχετικά δαπανηρή, προτιμάται γιατί δίνει υψηλό βαθμό καθαρισμού και επιλέγεται σε συστήματα εκλεκτικότητας έναντι ομάδας μορίων (Clonis, 1982). Η χρωματογραφία συγγενείας συνδυάζει σημαντικά πλεονεκτήματα συγκρινόμενη με τις συνηθισμένες χρωματογραφικές τεχνικές καθαρισμού πρωτεϊνών όπως της ιοντοανταλλαγής και της μοριακής διήθησης (Clonis, 1982, Clonis & Lowe, 1988, Labrou & Clonis, 1994). Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε και κατεργαζόμαστε μεγάλους όγκους εκχυλίσματος, μεγαλύτερους ακόμα και από τον όγκο της χρωματογραφικής στήλης, κάτι που είναι απαγορευτικό τουλάχιστον για τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Αυτό το μειονέκτημα κρίνεται σημαντικό σε περιπτώσεις που το βιολογικό εκχύλισμα είναι πολύ αραιό ή όταν η πρωτεΐνη στόχος βρίσκεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση στο εκχύλισμα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα της χρωματογραφίας συγγενείας είναι η αποτελεσματικότητα στον καθαρισμό βιομορίων.

1.4 Τριαζινο-χρωστικές

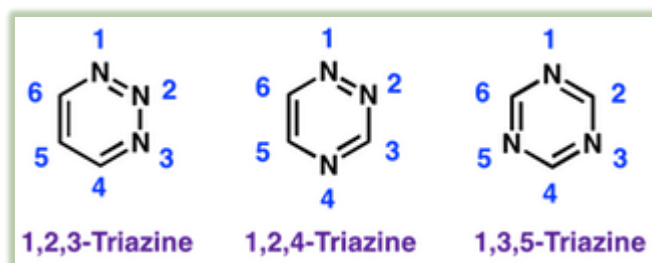
1.4.1 Τριαζίνη

Η τριαζίνη είναι μία ετεροκυκλική δομή που περιέχει τρία άτομα αζώτου και τρία άτομα άνθρακα. Υπάρχουν τρία διαφορετικά ισομερή της τριαζίνης, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους στον τρόπο με τον οποίο συνδέονται τα άτομα αζώτου και άνθρακα στην δομή αυτή (Εικόνα 3).

1.4.2 Χρωστικές

Οι χρωστικές είναι πολυαρωματικές ενώσεις με φορτισμένες ομάδες που απορροφούν ακτινοβολία στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και οι ομάδες αυτές μπορούν να συμμετάσχουν σε αντιδράσεις προσθήκης, αντικατάστασης με αμινομάδες ή υδροξυλομάδες. Οι χρωμοφόρες ομάδες των χρωστικών προέρχονται από τη χημική συμπύκνωση πολυαρωματικών συστημάτων τα οποία, με τη βοήθεια κατάλληλων υποκατάστατων (π.χ. αυξόχρωμων ομάδων), ρυθμίζονται ώστε να απορροφούν ορατό φως κατάλληλης συχνότητας (Schundehutte, 1972). Τα

πολυαρωματικά αυτά χρωμοφόρα συστήματα γίνονται υδατοδιαλυτά με την προσθήκη όξινων ή βασικών ομάδων σε βοηθητικούς βενζολικούς δακτυλίους (Schundehutte, 1972). Οι χρωστικές χρησιμοποιήθηκαν, αρχικά, στη βαφή φυσικών υλικών όπως το μαλλί, το μετάξι και το δέρμα.



Εικόνα 3: Ισομερή τριαζίνης.

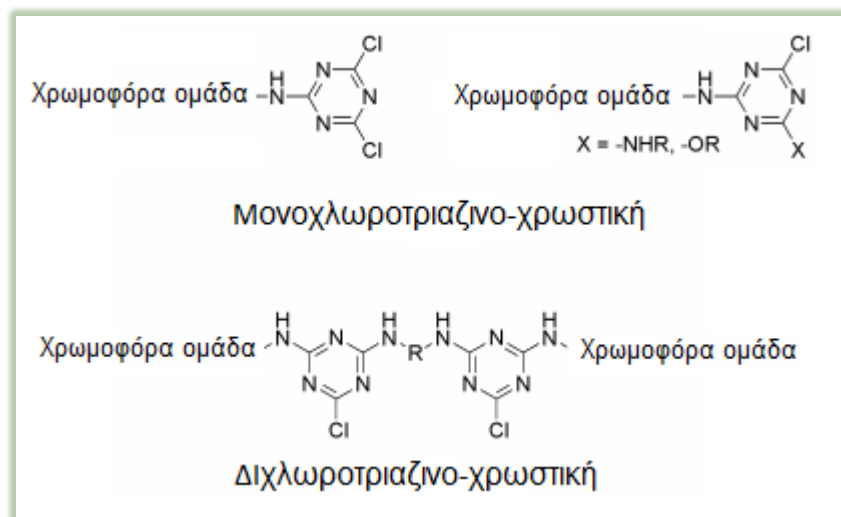
1.4.3 Αλληλεπίδραση χρωστικών με πρωτεΐνες

Η στερέωση των χρωστικών σε υλικά ινώδους πρωτεϊνικής σύστασης (π.χ. κεράτινη, φεριτίνη, κολλαγόνο) οφείλεται στην ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων με τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων, μέσω ιοντικών, van der Waals και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Lowe, 1987). Στις σφαιρικές πρωτεΐνες η δέσμευση και αλληλεπίδραση των συνθετικών χρωστικών γίνεται κατά προτίμηση στην ευρύτερη περιοχή του μακρομορίου όπου αλληλεπιδρούν και τα φυσικά του υποστρώματα όπως για παράδειγμα συνένζυμα ή προσθετικές ομάδες (Glazer, 1970). Πιστεύεται ότι η ειδική στερεοδιάταξη ενεργούς περιοχής των σφαιρικών πρωτεϊνών σε συνδυασμό με τον υδρόφοβο και ιοντικό χαρακτήρα της, αλλά και τη μεγάλη ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, συνεισφέρει στην αλληλεπίδραση μεταξύ χρωστικών και πρωτεϊνών (Glazer, 1970, Subramanian & Kaufman, 1980, Kopperschlager & Johansson, 1982, Lowe, 1987, Presterà et al., 1992). Τα αμινοξέα που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση είναι, τις περισσότερες φορές, διαφορετικά από αυτά που συμμετέχουν στη δέσμευση των φυσιολογικών υποστρωμάτων (Biellman et al., 1979).

1.4.4 Κατηγορίες τριαζινο-χρωστικών

Οι χημικά ενεργές τριαζινο-χρωστικές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις μονοχλωροτριαζινο-χρωστικές και διχλωροτριαζινο-χρωστικές. Οι χρωστικές Procion MX, Procion H, Procion P, και Cibacron αποτελούν παράδειγμα μονοχλωροτριαζινο-χρωστικών. Οι διχλωροτριαζινο-χρωστικές είναι πιο δραστικές και μπορούν να αντιδράσουν χωρίς την παροχή θερμότητας για την πραγματοποίηση της αντίδρασης,

όπως συμβαίνει με τις μονοχλωροτριαζινο-χρωστικές. Βέβαια, οι χρωστικές αυτές είναι λιγότερο σταθερές σε σχέση με τις μονοχλωροτριαζινο-χρωστικές και ως αποτέλεσμα αναγκαία είναι η παρουσία κάποιου ρυθμιστικού διαλύματος για την αύξηση της σταθερότητας τους. Οι χημικά δραστικές χρωστικές είναι συνθετικές πολυαρωματικές χρωστικές που κύρια δομικά τους τμήματα είναι το χρωμοφόρο και



Εικόνα 4: Δομή μονο- και διχλωροτριαζινο-χρωστικών.

η δραστική ομάδα η οποία εισάγεται ώστε να είναι δυνατή η ομοιοπολική σύνδεση της χρωστικής σε διάφορους φορείς. Η τεχνολογία των δραστικών χρωστικών αναπτύχθηκε με σκοπό τη δημιουργία ανεξίτηλης βαφής κυρίως στα βαμβακερά υφάσματα. Οι τριαζινο-χρωστικές αναπτύχθηκαν από τους Rattee και Stephen το 1956, δημιουργώντας έτσι την κατηγορία των γνωστών χλωροδραστικών χρωστικών με το εμπορικό όνομα Procion και Cibacron (Lowe, 1987).

1.4.5 Σύνθεση χλωροτριαζινο-χρωστικών

Κατά τη σύνθεση, η δραστική ομάδα συνδέεται με το υπόλοιπο μόριο της χρωστικής μέσω -NH- ομάδας κατόπιν νουκλεόφιλης αντικατάστασης του ενός χλωρίου του τριαζινικού δακτυλίου από μία αμινομάδα του προδρόμου μορίου της χρωστικής. Οι χρωστικές που προκύπτουν με τον τρόπο αυτό χαρακτηρίζονται ως διχλωροτριαζινο-χρωστικές και είναι πολύ δραστικές εξαιτίας του έντονα ηλεκτρονιόφιλου χαρακτήρα του διχλωροτριαζινικού δακτυλίου. Το μειονέκτημα των χρωστικών αυτών είναι η εύκολη υδρόλυση τους από το διαλύτη κατά τις διαδικασίες της βαφής. Το πρόβλημα αυτό περιορίστηκε με την αντικατάσταση ενός επιπλέον ατόμου χλωρίου του διχλωροτριαζινικού δακτυλίου, από αρωματικούς συνήθως υποκατάστατες. Με τον

τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν οι μονοχλωροτριαζινο-χρωστικές οι οποίες αν και πολύ λιγότερο δραστικές είναι περισσότερο σταθερές (Lowe et al., 1981, Lowe, 1987).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Κατάλογος χημικών αντιδραστηρίων και υποστρωμάτων

Οι Πίνακες 1 και 2 παρουσιάζουν τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραματικών προσδιορισμών.

Πίνακας 1: Κατάλογος των αντιδραστηρίων

#	Αντιδραστήριο	Εταιρεία
1	Αλβουμίνη ορού μόσχου (BSA)	Serva
2	Γλυκερόλη 99.5%	Panreac
3	Διμέθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)	Reidel- de Haen
4	Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH ₂ PO ₄)	Sigma
5	Θειικό νάτριο (NaSO ₄)	Mallinckrodt
6	Θειοκυανιούχο κάλιο (KSCN)	Carlo Erba.
7	Μεθανόλη (CH ₃ OH)	Scharlau
8	Οξικό νάτριο (CH ₃ COONa)	Merck
9	Οξικό οξύ (CH ₃ COOH)	Panreac
10	Τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο (Tris)	Sigma
11	Υδροχλωρικό οξύ (HCl)	Scharlau
12	Υδροξειδίο του καλίου (KOH)	Sigma-Aldrich
13	Υδροξειδίο του νατρίου (NaOH)	Merck
14	Χλωριούχο κάλιο (KCl)	Riedel-de Haen
15	Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	Sigma-Aldrich
16	Cibacron Blue 3GA	Sigma

Πίνακας 2: Κατάλογος των χρησιμοποιηθέντων υποστρωμάτων

#	Υπόστρωμα	Εταιρεία
1	Αιθυλεστέρας της βενζοϋλο-L-αργινίνης (BAEE)	Sigma
2	Αιθυλεστέρας της βενζοϋλο-L-τυροσίνης (BTEE)	Sigma

2.1.2 Πλαστικά αναλώσιμα

Ο Πίνακας 3 περιλαμβάνει τα πλαστικά αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 3: Πλαστικά αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν

#	Είδος	Εταιρεία
1	Πλαστικά ακρορύγχια (tips)	Greiner Bio-one
2	Πλαστικοί σωλήνες 15mL και 50mL (falcon)	NerbePlus
3	Πλαστικά σωληνάρια (1.5 και 2mL)	Greiner Bio-one
4	Πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης (semi-macro0)	Sarstedt

2.1.3 Εξοπλισμός

Εργαστηριακός εξοπλισμός (όργανα)

- Η ζύγιση των αντιδραστηρίων και υποστρωμάτων έγινε με τη χρήση του αναλυτικού ζυγού METTLERAT 261 και του φαρμακευτικού ζυγού METTLER PM2500.
- Για τους προσδιορισμούς της ενζυμικής δραστηριότητας, χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης-ορατού-υπεριώδους-του οίκου Hitachi (μοντέλο U-2900, μήκος οπτικής διαδρομής 10 mm), που φέρει θερμοστατούμενη υποδοχή κυψελίδας.
- Η αντίδραση ακινητοποίησης της χρωστικής στην κυτταρίνη έγινε σε θερμοστατούμενο επωαστήρα με περιστροφική ανακίνηση της εταιρείας LabTech.
- Οι μετρήσεις pH των διαλυμάτων, πραγματοποιήθηκαν με το pHμετρο ORION μοντέλο 410A.
- Για τη συλλογή των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν οι φυγόκεντροι Herme Z160M και Eppendorf Centrifuge 5804R.
- Ως υδατόλουτρο χρησιμοποιήθηκε συσκευή της εταιρείας Stuart.
- Για τις μικροποσότητες δειγμάτων και αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκαν μηχανικές πιπέτες (Gilson), με μέγιστο ποσό λήψης τα 10μL, τα 100μL και τα 1000μL.

Εργαστηριακός εξοπλισμός (Λογισμικό)

- GraphPad Prism 6, για τον προσδιορισμό των παραμέτρων στην Κινητική προσρόφησης και Ισορροπία προσρόφησης.

2.1.4 Διαλύματα

Έτοιμο διάλυμα αλβουμίνης από ορό μόσχου (BSA)

- Ζυγίζονται 2mg BSA σε πλαστικό σωληνάριο Eppendorf, και διαλύονται σε 10mL ddH₂O. Η ποσότητα μοιράζεται σε ξεχωριστά δοχεία και φυλάσσεται στην κατάψυξη.

Διαλύματα για τον καθαρισμό των ενζύμων σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας.

Διαλύματα εξισορρόπησης που χρησιμοποιήθηκαν

- Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH₂PO₄) 10mM και ρύθμιση του pH στο 7.0 με προσθήκη διαλύματος KOH.
- Διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa)

- 10mM και ρύθμιση του pH με προσθήκη διαλύματος CH_3COOH .
- Διάλυμα αναγέννησης των προσροφητών, 3M KSCN

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Απομόνωση νανοϊνών κυτταρίνης από απόβλητα χαρτιού (εφημερίδα)

Η απομόνωση νανοϊνών κυτταρίνης από απόβλητα χαρτιού περιλαμβάνει τρία στάδια. Την αλκαλική επεξεργασία, την διαδικασία λεύκανσης και την όξινη υδρόλυση. Αρχικά τα απόβλητα χαρτιού (περίπου 25g), κόβονται σε μικρά κομμάτια και τοποθετούνται σε ζεστό νερό μέχρι να ομογενοποιηθούν και να γίνουν σαν πολτός. Κατά την αλκαλική επεξεργασία το χαρτί τοποθετείται σε 10% υδατικό διάλυμα υπεροξειδίου του νατρίου, για τρεις ώρες στους 70°C . Η επεξεργασία αυτή είναι απαραίτητη για την απομάκρυνση των ινών των ημικυτταρίνων από το χαρτί. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται πολυάριθμες πλύσεις του υλικού σε ηθμό μέχρι το pH να γίνει ουδέτερο. Οι ίνες κυτταρίνης είναι ενσωματωμένες σε ίνες των ημικυτταρίνων και με την αλκαλική επεξεργασία, προκαλείται διεύρυνση των ινών των ημικυτταρίνων με αποτέλεσμα την εξασθένιση των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου. Η επεξεργασία λεύκανσης περιλαμβάνει τοποθέτηση του υλικού σε 2% υδατικό διάλυμα εμπορικού σκευάσματος υποχλωριώδους νατρίου επί 12-14 ώρες μέχρι να αφαιρεθούν οι έγχρωμες ουσίες που υπάρχουν στο χαρτί. Το υπολειπόμενο γκρι χρώμα του υλικού απομακρύνεται τελικά με πολυάριθμες πλύσεις σε ηθμό μέχρι το pH να γίνει ουδέτερο. Ο δεύτερος σκοπός της επεξεργασίας λεύκανσης είναι η απομάκρυνση της εναπομένουσας λιγνίνης στο υλικό. Τέλος το υλικό υποβάλλεται σε όξινη υδρόλυση με 30% υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου, για μία ώρα στους 35°C και ακολουθείται από πολλές πλύσεις μέχρι το pH να γίνει ουδέτερο. Ο σκοπός της όξινης υδρόλυσης είναι η διάσπαση των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου των ινών κυτταρίνης. Μετά το πέρας της επεξεργασίας αυτής το υλικό αποθηκεύεται ενυδατωμένο στους 4°C , έτσι ώστε να μην σχηματιστούν ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου.

2.2.2 Παρατήρηση κυτταρίνης σε οπτικό μικροσκόπιο

Το οπτικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν μοντέλο OLYMPUS U-CMAD3. Το μικροσκόπιο φέρει φωτογραφικό φακό τύπου OLYMPUS Dx50. Για την ανάλυση των εικόνων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CellA.

2.2.3 Ακίνητοποίηση χρωστικής Cibacron Blue 3GA σε νανοϊνες κυτταρίνης

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των προσροφητών συγγενείας βασίστηκε στο γενικό πρωτόκολλο των Lowe et al., (1980). Αναλυτικά η διαδικασία

έχει ως εξής: 1 g καθαρής κυτταρίνης, εξαντλητικά πλυμένου με νερό (περίπου 500 mL), εισάγεται σε υδατικό διάλυμα χρωστικής Cibacron Blue 3GA (1 mL) και κατόπιν προστίθεται διάλυμα χλωριούχου νατρίου (0.2 mL, 22% w/v). Το αιώρημα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου επί 30 min. Ακολούθως προστίθεται στερεό ανθρακικό νάτριο (τελική συγκέντρωση 1% w/v) και το εναιώρημα αφήνεται υπό ανάδευση στους 60°C για διάστημα 4.5 και 7.5 ωρών για τους δύο προσροφητές που κατασκευάστηκαν. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης οι μπλε προσροφητές πλένονται με τα ακόλουθα διαλύματα: νερό (100 mL), 1.0 M NaCl (50 mL), 50% v/v διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)/νερό (10 mL), 1.0 M NaCl (50 mL) και τέλος με νερό (100 mL). Οι προσροφητές διατηρούνται σε υδατικό διάλυμα μεθανόλης (20%) και φυλάσσονται στους 4°C.

2.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ακινητοποιημένων χρωστικών

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ακινητοποιημένων χρωστικών πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου της όξινης υδρόλυσης των Lowe et al., (1980). Αρχικά 30 mg νωπού προσροφητή προστίθενται σε διάλυμα HCl (5M, 0.6 mL) και το αιώρημα επωάζεται στους 70-80°C επί 3-5 min. Το υδρόλυμα εξουδετερώνεται με προσθήκη NaOH (10 M, 0.3 mL) και ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 1M, pH 7.6, 2.1 mL). Η απορρόφηση του διαλύματος μετράται στα 620 nm, έχοντας ως αναφορά υδρολυμένο μη υποκατεστημένο προσροφητή καθαρής κυτταρίνης. Η συγκέντρωση της ακινητοποιημένης χρωστικής υπολογίζεται ως μmol χρωστικής/g νωπού προσροφητή. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ακινητοποιημένης χρωστικής χρησιμοποιείται συντελεστής μοριακής απόσβεσης υπολογισμένος σε διάλυμα όμοιο με αυτό του υδρολυμένου προσροφητή από διαλύματα χρωστικών 20 μM .

2.2.5 Προσδιορισμός χωρητικότητας και ικανότητας συγκράτησης του προσροφητή

Η χωρητικότητα και η χρωματογραφική συμπεριφορά προσδιορίζεται με δύο πρότυπες πρωτεΐνες διαφορετικού μοριακού βάρους. Η διαδικασία έχει ως εξής: προσροφητής κυτταρίνης με ακινητοποιημένη χρωστική Cibacron Blue 3GA (CELLULOSE-Cibacron Blue 3GA, CELL-CB3GA) εγκιβωτίζεται σε χρωματογραφική στήλη (1 mL) και εξισορροπείται με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης 20 mM KH_2PO_4 pH=7.0 (10 mL) στους 4°C. Στη συνέχεια φορτώνεται με πρωτεΐνη, διαλυμένη σε διάλυμα εξισορρόπησης και συλλέγεται σε διαφορετικές κλασματώσεις. Έπειτα προσδιορίζεται

η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές κλασματώσεις (mg/mL). Η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που προσδένεται στη χρωστική υπολογίζεται από τη διαφορά της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης που φορτώθηκε στη στήλη με τη συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που μετρήθηκε στις διαφορετικές κλασματώσεις. Τέλος κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη χωρητικότητας χρησιμοποιώντας την ποσότητα πρωτεΐνης (mg/mL) από τις διαφορετικές κλασματώσεις. Τέλος το χρωματογραφικό υλικό αναγεννάται με υδατικό διάλυμα θειοκυανιούχου καλίου 3M.

2.2.6 Μελέτη της ισορροπίας και της κινητικής κατά την προσρόφηση της αλβουμίνης και της λυσοζύμης στον προσροφητή κυτταρίνης-Cibacron Blue 3GA

Ισορροπία προσρόφησης: Διαφορετικές ποσότητες πρωτεΐνης (20μM – 100μM) αναμειγνύονται με 20 mg προσροφητή και συγκεκριμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης, έως τελικού όγκου 1 mL. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύονται σε θερμοκρασία 4°C επί 75 min ώστε το σύστημα να έρθει σε ισορροπία. Μετά την πάροδο του χρόνου αυτού η υγρή φάση διαχωρίζεται από τον προσροφητή με φυγοκέντρηση (6000xg, 2 min) και στο υπερκείμενο γίνεται προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford. Η ποσότητα του ενζύμου (α*) που δεσμεύεται στον προσροφητή στην ισορροπία υπολογίζεται από τη διαφορά της ολικής ποσότητας του ενζύμου πριν την προσρόφηση και την ποσότητα που παραμένει στο υπερκείμενο μετά την προσρόφηση.

Κινητική της προσρόφησης: Η κινητική μελέτη γίνεται σε μίγμα επώασης (ολικός όγκος 4 mL) που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα (KH₂PO₄, 20mM, pH=7.0), γνωστή συγκέντρωση πρωτεΐνης και 100 mg προσροφητή. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C. Η ταχύτητα της προσρόφησης παρακολουθείται περιοδικά με αφαίρεση δείγματος από το αιώρημα (0.5 mL), φυγοκέντρηση (10000 xg, 30 sec) για το διαχωρισμό του προσροφητή από το εκχύλισμα και προσδιορισμό της πρωτεΐνης με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford.

2.2.7 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford (1976)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, να αλλάζει χρώμα όταν αυτή αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη κατιοντική χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική (ανιοντική) είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595 nm

(Kruger, 1994). Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για πρωτεϊνικά δείγματα, των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0.04 mg/mL έως 0.20 mg/mL. Χρησιμοποιείται ευρέως γιατί είναι ευαίσθητη, γρήγορη και σχετικά ακριβής.

Η χρωστική (100 mg) διαλύεται σε 100 mL υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50% (v/v) και στη συνέχεια προστίθενται 100 mL πυκνού φωσφορικού οξέος (85% w/v). Το μίγμα μεταφέρεται σε σκοτεινό δοχείο και ακολουθεί απαέρωση για 20 λεπτά σε υπέρηχους. Το διάλυμα αυτό αποτελεί το πυκνό αντιδραστήριο Bradford, το οποίο φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος. Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το αντιδραστήριο Bradford αραιώνεται με νερό σε αναλογία $\frac{1}{4}$ και το διάλυμα που προκύπτει μπορεί να διατηρηθεί σε σκοτεινό δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C για 24 ώρες.

Κάθε φορά που θέλουμε να προσδιοριστεί η πρωτεΐνη σε ένα άγνωστο δείγμα, με το ίδιο διάλυμα του αντιδραστήριου Bradford που θα γίνει ο προσδιορισμός κάνουμε και μια πρότυπη καμπύλη με αλβουμίνη από ορό μόσχου (BSA) γνωστής συγκέντρωσης. Το στοκ της BSA που χρησιμοποιούμε είναι τα 0.2 mg/mL και θεωρούμε τελικό όγκο αντίδρασης τα 50 mL. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι συγκεντρώσεις της BSA και οι όγκοι των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 4: Όγκοι και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο Bradford.

Μετρήσεις	Αντιδραστήριο Bradford (μL)	BSA (mg/mL)	H ₂ O (μL)
1	950	0	50
2	950	0.04 (10 μL)	40
3	950	0.08 (20 μL)	30
4	950	0.12 (30 μL)	20
5	950	0.16 (40 μL)	10
6	950	0.20 (50 μL)	0
7	950	x	50-x

Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου 25°C επί 20 λεπτά και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595 nm, μηδενίζοντας με το μάρτυρα. Η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης σύμφωνα με το νόμο του Beer-Lambert και τον τύπο:

$$A=c \cdot \epsilon \cdot d$$

όπου A: απορρόφηση

c: συγκέντρωση (mg/mL)

ε: συντελεστής μοριακής απόσβεσης (υπολογίζεται από τη πρότυπη καμπύλη αναφοράς και είναι η κλίση της ευθείας)

d:μήκος κυψελίδας 1 cm

2.2.8 Καθαρισμός πρωτεασών μέσω βιολογικής λειτουργίας χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή CELL-CB3GA

Για τον καθαρισμό πρωτεασών χρησιμοποιήθηκε η στήλη χρωματογραφίας συγγένειας, με προσροφητή συγγένειας τον CELL-CB3GA. Η διαδικασία απεικονίζεται στο Σχήμα 1. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για όλους τους καθαρισμούς με χρωματογραφία συγγένειας είναι η παρακάτω:

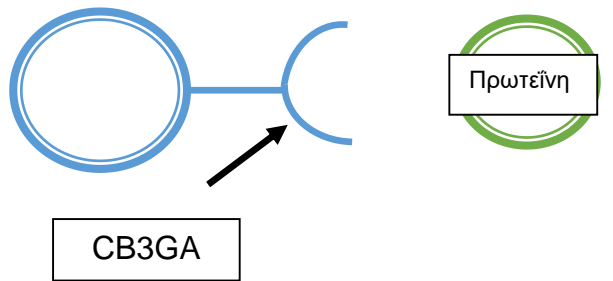
Ο προσροφητής συγγένειας εγκιβωτίζεται σε χρωματογραφική στήλη (1 mL) και εξισορροπείται με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης 10 mM KH_2PO_4 pH=7.0 (10 mL) στους 4°C . Στη συνέχεια η στήλη φορτώνεται με το βιολογικό υλικό (το οποίο δεν είναι άλλο από την πάστα κυττάρων διαλυμένη σε διάλυμα εξισορρόπησης, (§2.2.13) που περιέχει και το ένζυμο-στόχο, για το οποίο θα πρέπει να είναι γνωστή η ειδική δραστηριότητα του. Λόγω της συγγένειας του δεσμευτή και του ένζυμο-στόχου, το αντίστοιχο σύμπλοκο σχηματίζεται επί της στήλης. Η στήλη πλένεται με το διάλυμα εξισορρόπησης (5 mL), ώστε να απομακρυνθούν τα αδέσμευτα μόρια. Ακολουθώντας το προσροφημένο ένζυμο, αποδεσμεύεται (εκλούεται) με το ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης, το οποίο αποτελείται από NaCl 3M διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης, (3mL) και συναγωνίζεται το σύμπλοκο ένζυμο-δεσμευτή. Τέλος το χρωματογραφικό υλικό αναγεννάται με διάλυμα θειοκυανιούχου καλίου 3M. Για τους καθαρισμούς των πρωτεασών με τον συγκεκριμένο προσροφητή πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικά pH στα διαλύματα εξισορρόπησης, πλύσης και έκλυσης με στόχο να βελτιωθούν τα αποτελέσματα των καθαρισμών.

2.2.9 Σύνθεση της αζωζελατίνης

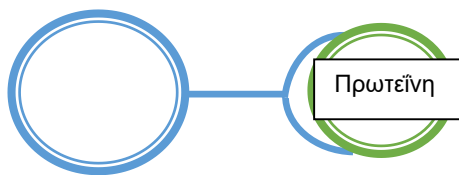
Η αζωζελατίνη είναι ένα παράγωγο της ζελατίνης, το οποίο κατακρημνίζεται εύκολα παρουσία τριχλωροξικού οξέος και ως αποτέλεσμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή πολλών υποστρωμάτων. Η αμινοξική της αλληλουχία την καθιστά επιδεκτική στην υδρόλυση από πολλές ενδοπρωτεϊνάσες και κατάλληλη για πολλές εφαρμογές. Τα παράγωγα υδρόλυσης της αζωζελατίνης μετρώνται στα 440nm, έτσι

ώστε τα παραγόμενα πεπτίδια να μην επηρεάζουν τις μετρήσεις. Επιπλέον, υδρολύεται γρήγορα από πολλά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένου και των τριών από τις

Χρωματογραφικό υλικό (κυτταρίνη)



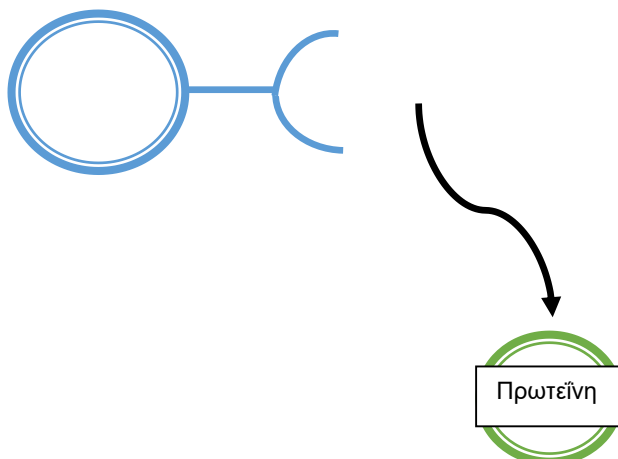
Στάδιο προσροφήσεως



**Στάδιο απομακρύνσεως
αδέσμευτων ουσιών**



Έκπλυση με
ρυθμιστικό
διάλυμα 20
mM KH_2PO_4



**Στάδιο εκλούσεως
καθαρού ενζύμου**

Έκλουση του
ενζύμου με
διάλυμα 3M
NaCl

Σχήμα 1: Αρχή της χρωματογραφίας συγγένειας.

τέσσερις κλάσεις πρωτεασών και υδρολύεται αργά από την τέταρτη κλάση. Η αζωζελατίνη, εμφανίζει διαλυτότητα σε όλο το εύρος pH και χρησιμοποιείται για μελέτη ενδοπρωτεασών (pH 3-9) και αυτό την καθιστά κατάλληλο υπόστρωμα για πολλά συστήματα.

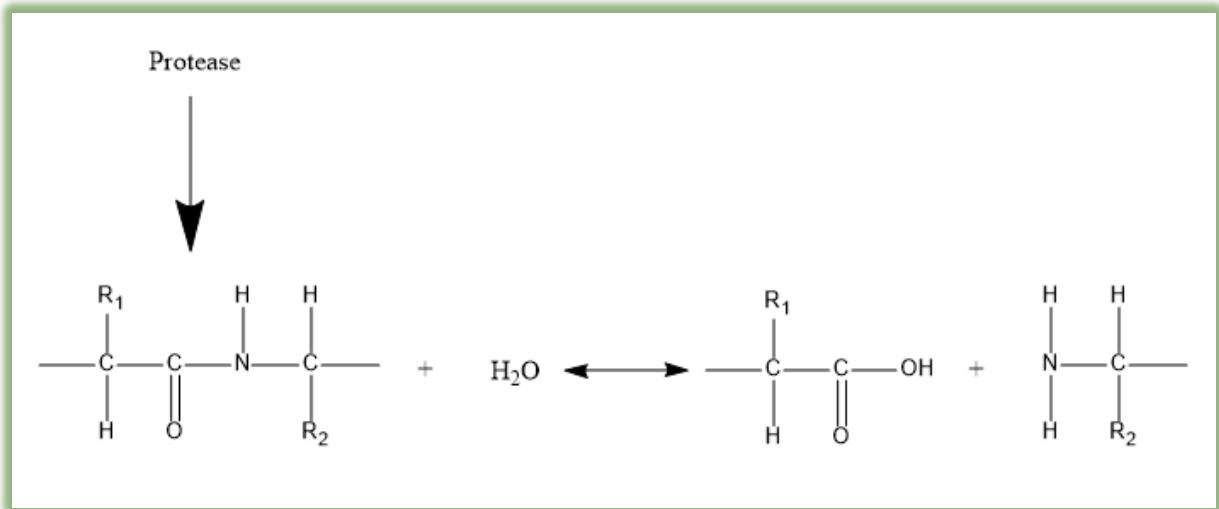
Για τη σύνθεση της αζωζελατίνης, αρχικά παρασκευάζονται δύο διαλύματα:

A: 25 g ζελατίνης διαλύονται σε 275 mL νερού που περιέχει 4 g ανθρακικού νατρίου σε θερμοκρασία 54° C.

B: 0.01 mol σουλφανιλικού οξέος διαλύονται σε 30 mL νερού που περιέχει 0.01 mol υπεροξειδίου του νατρίου. Σε αυτό το διάλυμα προστίθενται 0.01 mol νιτρικού νατρίου και 0.02 mol υδροχλωρικού οξέος και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 2 λεπτά μέχρι να γίνει θολό. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.02 mol υδροξειδίου του νατρίου και αναδεύεται για 5 δευτερόλεπτα. Έπειτα αναμειγνύεται με το διάλυμα A και αναδεύεται γρήγορα. Το τελικό πορτοκαλί-κόκκινο διάλυμα αναδεύεται για 5 λεπτά και στη συνέχεια πραγματοποιείται διαπίδυση 3 φορές με 4 λίτρα διαλύματος αζιδίου του νατρίου 0.01% σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την διαπίδυση η αζωζελατίνη λειωφιλιώνεται και αποθηκεύεται στους 4° C.

2.2.10 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός πρωτεασών χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη

Η ανάπτυξη μίας σταθερής και αξιόπιστης μεθόδου και ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελεί κρίσιμο στάδιο. Η αζωκαζεΐνη είναι μια καζεΐνη συζευγμένη με ένα μόριο αζωχρωστικής. Αποτελεί ένα μη εξειδικευμένο υπόστρωμα πρωτεασών και ως αποτέλεσμα χρησιμοποιείται για όλες τις τάξεις πρωτεασών. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση ανάμεσα στο υπόστρωμα και στα μόρια πρωτεασών. Η υδρόλυση της αζωκαζεΐνης από την πρωτεάση απελευθερώνει στο διάλυμα την αζωχρωστική, η οποία είναι διαλυτή σε τριχλωροοξικό οξύ δίνοντας πορτοκαλί χρώμα στο διάλυμα και προσδιορίζεται στα 440 nm. Στην Εικόνα 5 φαίνεται η αντίδραση της πρωτεάσης με υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη.



Εικόνα 5: Αντίδραση πρωτεάσης με υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη.

Για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό πρωτεασών με υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη αρχικά παρασκευάζονται τα εξής διαλύματα:

A: Διάλυμα ανθρακικού νατρίου 0.1 M, pH=8.5. Το pH ρυθμίζεται χρησιμοποιώντας υδροχλωρικό οξύ.

B: Διάλυμα αζωζελατίνης 10 mg/mL σε διάλυμα δισόξεινου φωσφορικού καλίου (A). Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για δέκα λεπτά μέχρι να διαλυθεί η αζωζελατίνη σε θερμοκρασία 80-85° C. Η θερμοκρασία θα πρέπει να αυξάνεται ήπια. Είναι σημαντικό να μην ανέβει υπερβολικά η θερμοκρασία του διαλύματος. Στη συνέχεια το pH προσαρμόζεται στην τιμή 8.5 ένα αυτό είναι απαραίτητο χρησιμοποιώντας υπεροξειδίο του νατρίου ή υδροχλωρικό οξύ.

Γ: Διάλυμα τριχλωροξικού οξέος 10% w/v.

Δ: Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 2M.

Για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηρότητας ακολουθείται η εξής διαδικασία: σε δοχείο erpendorf προστίθενται 250 μL διαλύματος αζωζελατίνης (B) και 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος (A). Στη συνέχεια πραγματοποιείται ήπια ανάδευση και επώαση τους 37° C για πέντε λεπτά. Κατόπιν, προστίθεται 300μL δείγμα μόνο στο δοχείο μάρτυρα (Test) και τα δοχεία επωάζονται στους 37° C για 30 λεπτά. Μετά την επώαση προστίθενται 600 μL διαλύματος τριχλωροξικού οξέος και 300 μL δείγματος μόνο στο τυφλό (Blank). Τα δοχεία αφήνονται στον πάγο για 5-10 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στις 13000 στροφές για 10 λεπτά. Τέλος 500 μL από το

υπερκείμενο προστίθενται σε 500 μL διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 2M και μετράται η απορρόφηση στα 440 nm.

Υπολογισμός ενζυμικής δραστηριότητας (Units/mL)

Μία μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας αντιστοιχεί σε εκείνη την ποσότητα ενζύμου που προκαλεί 0.01 αύξηση της απορρόφησης στα 440 nm.

$$\frac{\text{Units}}{\text{ml}} \text{ ενζύμου} = \frac{(\mu\text{mol πρωτεΐνης ισοδύναμη της Abs}) \times (V_{\text{τελ}}) \times df}{(30) \times (V1) \times (V2)}$$

Όπου:

$V_{\text{τελ}}$: ο τελικός όγκος του προσδιορισμού σε mL

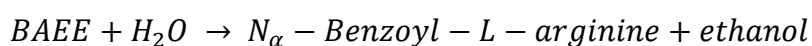
df: αραίωση

V_1 : όγκος (mL) που χρησιμοποιήθηκαν στην φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό

V_2 : όγκος ενζύμου (mL)

2.2.11 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της θρυψίνης

Η διαδικασία για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της θρυψίνης, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το αντιδραστήριο BAEE, είναι συνεχής και βασίζεται στην αντίδραση:



Thrypsin

Αρχικά παρασκευάζονται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

A: Διάλυμα φωσφορικού νατρίου, 67 mM, pH=7.6 στους 25° C.

B: Διάλυμα BAEE, 0.25 mM διαλυμένο στο διάλυμα A.

Γ: Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, 1 mM.

Η διαδικασία έχει ως εξής: σε UV κυψελίδες του 1 mL προστίθενται οι ακόλουθες ποσότητες αντιδραστηρίων σύμφωνα με τον Πίνακα 5.

Αμέσως μετά την εισαγωγή του ενζυμικού διαλύματος, οι κυψελίδες αναδεύονται γρήγορα και μετράται η αύξηση της απορρόφησης στα 253 nm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια καταγράφεται ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης ανά λεπτό

Πίνακας 5: Πίνακας αντιδραστηρίων για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της θρυψίνης.

Αντιδραστήριο	Blank (μL)	Test (μL)
Υπόστρωμα (BAEE)	937	937
HCl	63	40
Ενζυμικό διάλυμα	-	23

($\Delta A_{253}/\text{minute}$) και του τυφλού (Blank) και του μάρτυρα (Test). Ο υπολογισμός της ενζυμικής δραστηρότητας (Units/mL) βασίζεται στον τύπο:

BAEE units/mL enzyme =

$$((\Delta A_{253}/\text{minute Test} - \Delta A_{253}/\text{minute Blank}) \times df) / (0.001 \times 0.023)$$

Όπου:

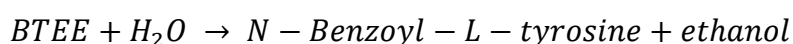
df: αραίωση

0.023: ο όγκος ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε.

Μία μονάδα ενζυμικής δραστηρότητας θρυψίνης αντιστοιχεί σε 0.001 ρυθμό αύξησης της απορρόφησης (ΔA_{253}).

2.2.12 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της χυμοθρυψίνης

Η διαδικασία για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηρότητας της χυμοθρυψίνης, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το αντιδραστήριο BTEE, είναι συνεχής και βασίζεται στην αντίδραση:



Chymotrypsin

Αρχικά παρασκευάζονται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

A: Διάλυμα Tris υδροχλωρικού οξέος, 80 mM, pH=7.8 στους 25° C (Buffer).

B: Διάλυμα BTEE (37% BTEE, 64.4% μεθανόλη). Συμπληρώνουμε μέχρι τα 100 mL με νερό.

Γ: Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, 1 mM.

Δ: Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου, 2M.

Πίνακας 6: Πίνακας αντιδραστηρίων για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της θρυψίνης.

Αντιδραστήριο	Blank (μL)	Test (μL)
Buffer	473	473
Υπόστρωμα (BTEE)	467	467
CaCl ₂	26	26
HCl	34	-
Ενζυμικό διάλυμα	-	34

Η διαδικασία έχει ως εξής: σε UV κυψελίδες του 1 mL προστίθενται οι ακόλουθες ποσότητες αντιδραστηρίων σύμφωνα με τον παραπάνω Πίνακα 6. Αμέσως μετά την εισαγωγή του ενζυμικού διαλύματος, οι κυψελίδες αναδεύονται γρήγορα και μετράται η αύξηση της απορρόφησης στα 256 nm για 3-5 λεπτά. Στη συνέχεια καταγράφεται ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης ανά λεπτό ($\Delta A_{256}/\text{minute}$) και του τυφλού (Blank) και του μάρτυρα (Test). Ο υπολογισμός της ενζυμικής δραστηρότητας (Units/mL) βασίζεται στον τύπο:

Units/mL enzyme =

$$((\Delta A_{256}/\text{minute Test} - \Delta A_{256}/\text{minute Blank}) \times (V_{\text{TEΛ}} \times df)) / (0.964) \times V_{\text{ΕΝΖ}}$$

Όπου:

df: αραίωση

0.964: ο συντελεστής διάσπασης του BTEE στα 256 nm.

$V_{\text{TEΛ}}$: ο τελικός όγκος στην κυψελίδα σε mL.

$V_{\text{ΕΝΖ}}$: ο όγκος ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε σε mL

Μία μονάδα ενζυμικής δραστηρότητας χυμοθρυψίνης υδρολύει 1 μmol BTEE ανά λεπτό.

2.2.13 Λήψη στομάχου ή παγκρέατος από το είδος *Sparus aurata* και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος

Στη συγκεκριμένη μελέτη συλλέχθηκε στομάχι και πάγκρεας από το είδος *Sparus aurata* (Σπάρος ο χρυσόχρους, κν. τσιπούρα). Το συγκεκριμένο ψάρι προέρχεται από ιχθυοκαλλιέργεια του Ιονίου πελάγους και το υλικό (στομάχι ή πάγκρεας), χρησιμοποιούταν δύο μέρες μετά την συλλογή του από την ιχθυοκαλλιέργεια. Το υλικό (έστω 1 g) επαναιωρείται σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος. Στη

συγκεκριμένη περίπτωση, ανάλογα με το pH εξισορρόπησης που χρησιμοποιήθηκε στη χρωματογραφία, επιλέχθηκε για τιμές pH < 6 ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου και για τιμές pH > 6 ρυθμιστικό διάλυμα τριχλωροοξικού οξέος. Ακολουθεί πολτοποίηση του υλικό στο ρυθμιστικό διάλυμα. Το υλικό φυγοκεντρείται στις 8.000 rpm για 10 λεπτά και συλλέγεται το υπερκείμενο, για περαιτέρω επεξεργασία.

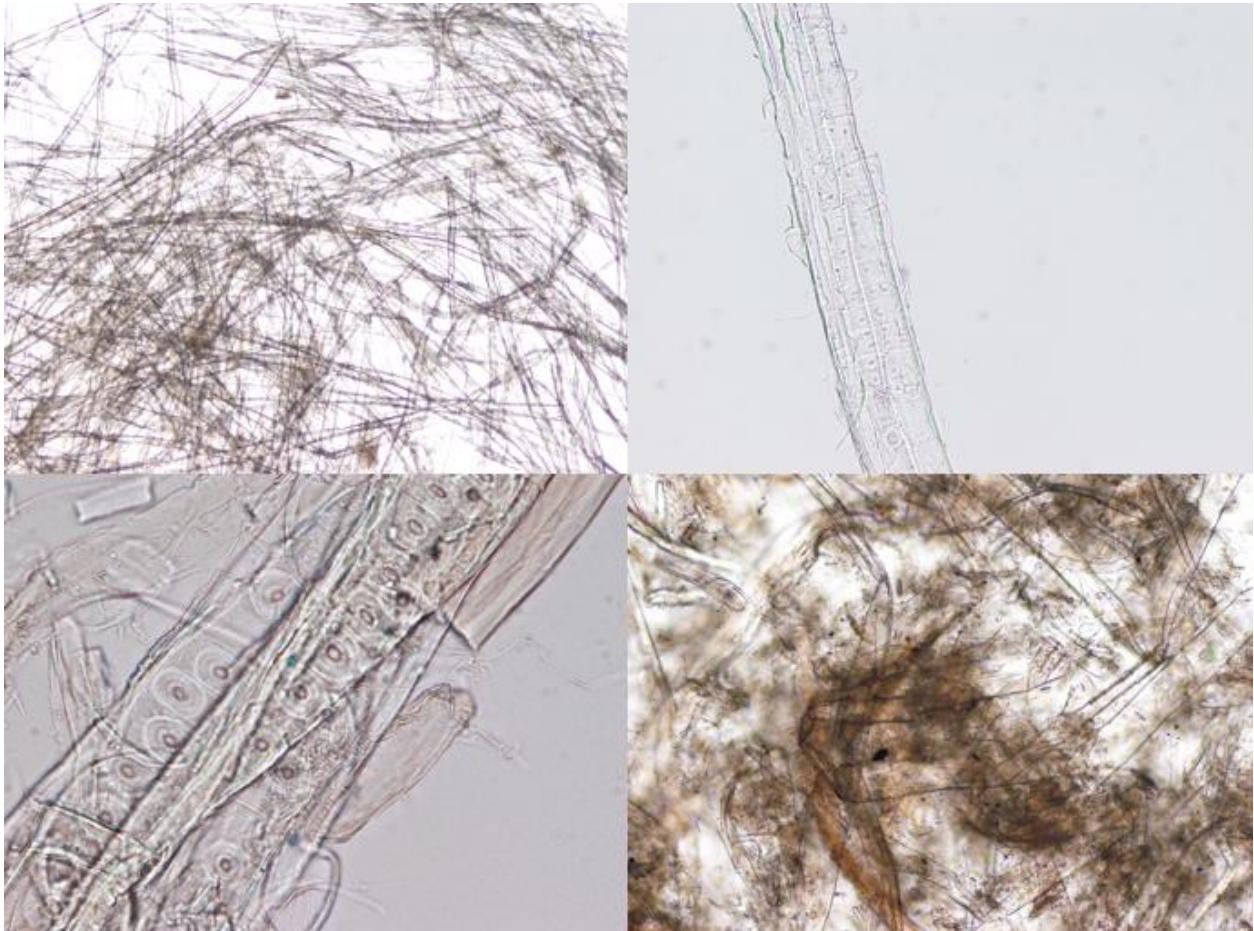
2.2.14 Διαπίδυση

Τα εκχυλίσματα υποβάλλονται σε διαπίδυση, ως μορφή χαμηλού καθαρισμού σε ρυθμιστικό διάλυμα ($\approx 3-4$ L) κατάλληλης συγκέντρωσης και pH, προκειμένου να αποκτήσουν την ίδια σύσταση με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης της χρωματογραφίας. Για τη διαπίδυση χρησιμοποιείται ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης, με όριο αποκλεισμού 12 kDa της εταιρείας Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.). Η διαδικασία διαρκεί 18-24 ώρες και πραγματοποιείται στους 4°C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση νανοϊνών κυτταρίνης από απόβλητα χαρτιού (εφημερίδα)

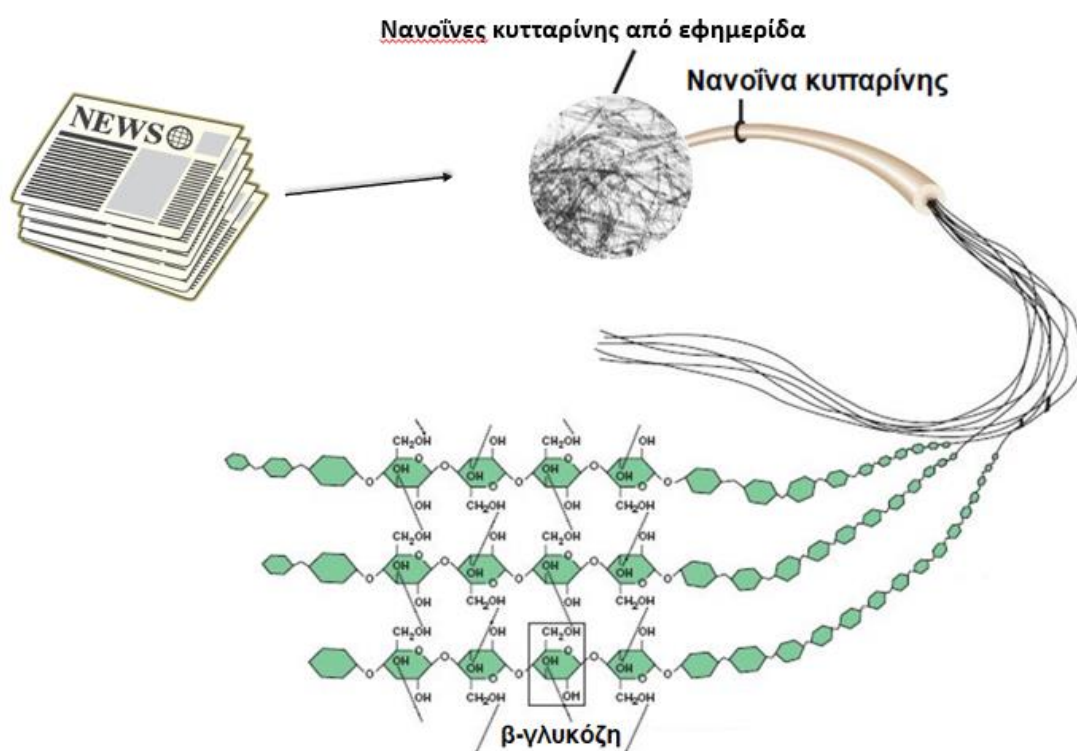


Εικόνα 6: Παρατήρηση νανοϊνιδίων κυτταρίνης σε οπτικό μικροσκόπιο OLYMPUS U-CMAD3.

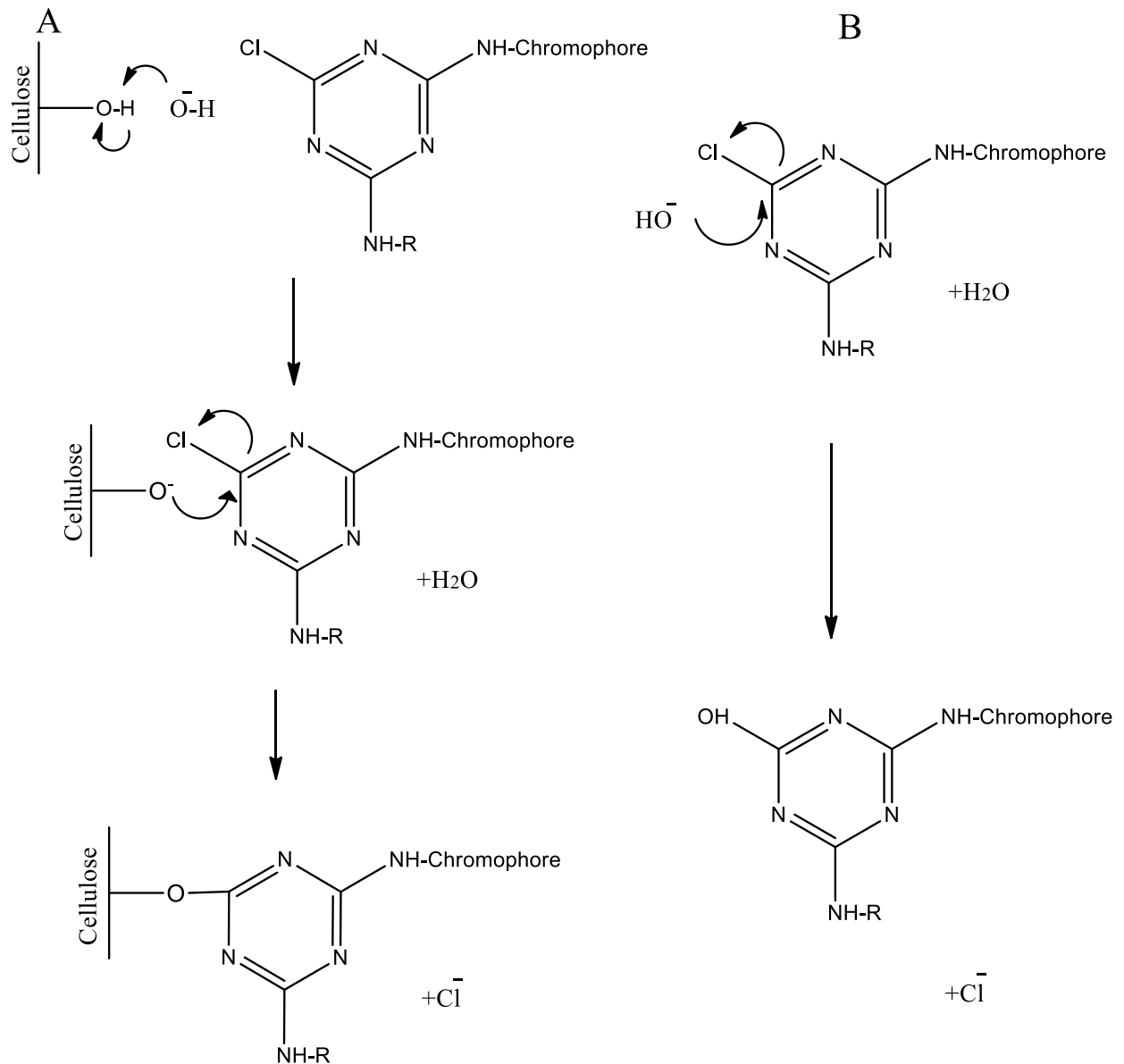
25 γραμμάρια εφημερίδας κομμένη σε μικρά κομμάτια χρησιμοποιήθηκαν και μετά το τέλος της διαδικασίας απομονώθηκαν 20 γραμμάρια καθαρής κυτταρίνης (απόδοση 80%). Η διαμόρφωση των νανοϊνών κυτταρίνης, μετά από παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο, δείχνει δομή ράβδων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6. Οι νανοΐνες που απομονώθηκαν από απόβλητα χαρτιού (εφημερίδα), φαίνεται να έχουν μικρή ομοιομορφία και αυτό μπορεί να οφείλεται στην επεξεργασία που έγινε κατά την προετοιμασία για την παρατήρησή τους. Συγκεκριμένα, η διάσπαση των ινών μπορεί να είναι αποτέλεσμα της επίδρασης υπερήχων ή της όξινης επεξεργασίας. Επίσης, από την παρατήρηση των ινών φαίνεται ότι δεν υπάρχουν πολλές διακλαδώσεις στις αλυσίδες της κυτταρίνης. Κάτι τέτοιο είναι αποτέλεσμα της όξινης επεξεργασίας με υδροχλωρικό οξύ, όπου γίνεται η διάσπαση των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου των ινών κυτταρίνης (Tagaki et al., 2013).

3.2 Ακίνητοποίηση των χρωστικών

Οι προσροφητές χρωματογραφίας με ακίνητοποιημένη την χρωστική Cibacron Blue 3GA (CELL-CB3GA), παρασκευάστηκαν με άμεση ομοιοπολική πρόσδεση των μορίων των χρωστικών στο πολυμερές κυτταρίνη κάτω από αλκαλικές συνθήκες. Το πολυμερές αυτό αποτελείται από διαμοριακά συνδεδεμένη κυτταρίνη, η δομή της οποίας φαίνεται στην Εικόνα 7. Η διαμοριακά συνδεδεμένη κυτταρίνη εμφανίζει ικανοποιητική χημική και βιολογική σταθερότητα, μηχανική συμπεριφορά, ανθεκτικότητα σε υψηλή θερμοκρασία και σε συνδιασμό με τις μεγάλες ποσότητες που απαντούν στη φύση και την εύκολη εύρεση της αποτελεί έναν χαμηλού κόστους και κατάλληλο χρωματογραφικό φορέα για τη δημιουργία προσροφητών χρωματογραφίας συγγενείας. Στο Σχήμα 2 φαίνεται η πορεία της αντίδρασης ακίνητοποίησης χρωστικής, κατά την οποία λαμβάνει χώρα νουκλεόφιλη προσβολή του υδροξυλίου της κυτταρίνης στο ηλεκτρονιόφιλο χλώριο του τριαζινικού δακτυλίου της χρωστικής. Η αντίδραση ακίνητοποίησης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 60°C εξαιτίας της μειωμένης δραστηριότητας του μονοχλωροτριαζινικού δακτυλίου.



Εικόνα 7: Χημική δομή της επαναλαμβανόμενης μονάδας του μονοσακχαρίτη β-γλυκόζη της κυτταρίνης.



Σχήμα 2: (A) Χημική αντίδραση της ακινητοποίησης χλωροτριαζινο-χρωστικής σε κυτταρίνη κάτω από αλκαλικές συνθήκες και (B) η κύρια παράπλευρη αντίδραση υδρόλυσης της χρωστικής.

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται πολλές μέθοδοι άμεσης ακινητοποίησης χρωστικών, οι περισσότερες των οποίων βασίζονται στην ίδια γενική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3. Κάποιες μικρές διαφοροποιήσεις αφορούν τις συνθήκες του pH, της θερμοκρασίας (25-80°C) (Clonis & Lowe, 1981, Clonis et al., 1987, Tsamadis et al. 1992, Makriyannis & Clonis, 1993) και του χρόνου αντίδρασης (από 0,5 h έως 5 ημέρες) (Clonis & Lowe, 1981, Clonis et al., 1987, Tsamadis et al. 1992, Makriyannis & Clonis, 1993). Η προσθήκη του χλωριούχου νατρίου στο μίγμα αντίδρασης (περίπου 1 % w/v τελική συγκέντρωση) προκαλεί "εξαλάτωση" και προσρόφηση των μορίων της χρωστικής πάνω στην κυτταρίνη (Stead, 1987), επιταχύνοντας στη συνέχεια την

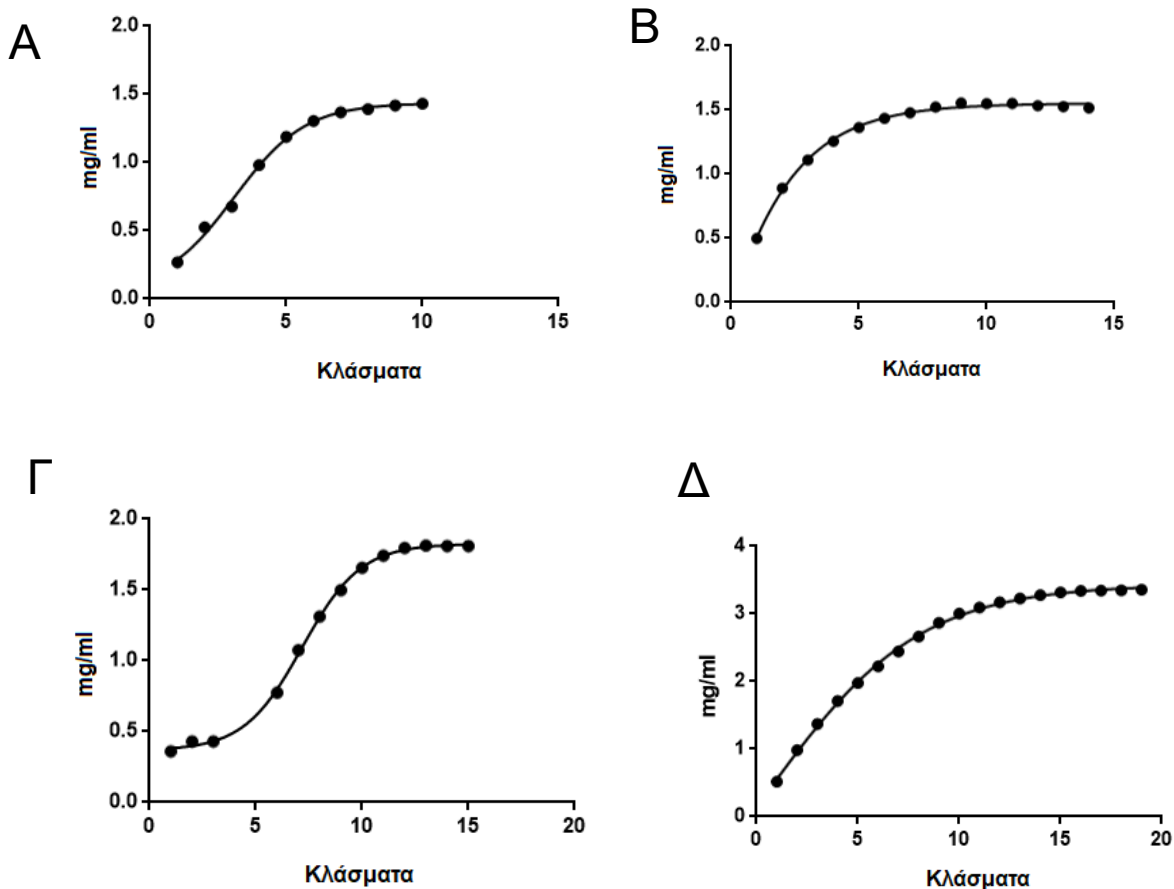
αντίδραση ακινητοποίησης και περιορίζοντας το βαθμό υδρόλυσης της χρωστικής από το διαλύτη (Stead, 1987). Η προσρόφηση αυτή ευνοείται από την ύπαρξη στα μόρια των χρωστικών, πλούσιων ηλεκτρονιακά ατόμων (οξυγόνου, αζώτου και θείου) ικανών να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τον φορέα (κυτταρίνη). Η ηλεκτρονιοφιλικότητα του ατόμου του χλωρίου του τριαζινικού δακτυλίου και συνεπώς η ταχύτητα της αντίδρασης ακινητοποίησης, επηρεάζεται ισχυρά από τη χημική δομή της χρωστικής. Πολλές μέθοδοι προσδιορισμού της υποκατάστασης του φορέα από χρωστική έχουν αναπτυχθεί με σημαντικότερη και πιο συνηθισμένη τη φωτομετρική μέθοδο του όξινου υδρολύματος του προσροφητή (Lindner et al., 1989, Burton et al., 1990, Alderton et al., 1994). Με τη μέθοδο αυτή λαμβάνονται εξαιρετικά επαναλήψιμα και ακριβή αποτελέσματα. Στον Πίνακα 7 φαίνονται τα αποτελέσματα του βαθμού υποκατάστασης, δηλαδή τα μολ ακινητοποιημένης χρωστικής ανά γραμμάριο νωπού προσροφητή χρησιμοποιώντας το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της χρωστικής Cibacron Blue 3G-A (Λάμπρου, 1997). Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της χρωστικής Cibacron Blue 3GA (ϵ_{620}) υπολογίστηκε στα 620 nm σε απιονισμένο νερό από πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις της χρωστικής. Από τον Πίνακα 7 παρατηρούμε ότι μεγαλύτερη ποσότητα χρωστικής έχει ακινητοποιηθεί στην κυτταρίνη μετά από επεξεργασία της με υδροχλωρικό οξύ και μετά από 7,5 ώρες επώαση για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ακινητοποίησης. Αυτό συμβαίνει καθώς το υδροχλωρικό οξύ διασπά τους ενδομοριακούς δεσμούς της κυτταρίνης, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τον αριθμό των διαθέσιμων υδροξυλίων (OH) για την ακινητοποίηση της χρωστικής.

Πίνακας 7: Συνθήκες ακινητοποίησης των χρωστικών σε κυτταρίνη. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 60°C.

Χρόνος επώασης (h)	Επεξεργασία με HCl	mg χρωστικής /g νωπού προσροφητή	μmol ακινητοποιημένης χρωστικής /g νωπού προσροφητή	ϵ_{620} (lit/mmol*c m)
4,5	OXI	0.05	0.07	5.4
	NAI	0.10	0.12	
7,5	OXI	2.75	3.55	
7,5	NAI	3.09	3.99	

3.3 Προσδιορισμός της χωρητικότητας με μετωπική ανάλυση

Η μέγιστη ικανότητα συγκράτησης για τις δύο κολώνες, προσδιορίστηκε με δύο πρότυπες πρωτεΐνες διαφορετικού μοριακού βάρους, την λυσοζύμη (14 kDa) και την αλβουμίνη (66 kDa). Ποσότητα πρωτεϊνών φορτώθηκε στις δύο κολώνες (επώαση για 7.5 ώρες πριν και μετά την επεξεργασία με το HCl και συλλέχθηκαν κλάσματα μέχρι η ικανότητα συγκράτησης της κάθε κολώνας να φτάσει στο μέγιστο. Οι κολώνες εξισορροπήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 20mM, pH=7. Η έκλουση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με διάλυμα χλωριούχου νατρίου, 1M σε



Σχήμα 3: Μέγιστη ικανότητα συγκράτησης των προσροφητών μετά από 7,5 ώρες επώαση για ακινητοποίηση της χρωστικής, πριν και μετά την επεξεργασία της κυτταρίνης με HCl για τις πρωτεΐνες αλβουμίνη και λυσοζύμη. A: Ικανότητα συγκράτησης της αλβουμίνης για τον προσροφητή πριν την επεξεργασία με HCl. B: Ικανότητα συγκράτησης της λυσοζύμης για τον προσροφητή πριν την επεξεργασία με HCl. Γ: Ικανότητα συγκράτησης της αλβουμίνης για τον προσροφητή μετά την επεξεργασία με HCl. Δ: Ικανότητα συγκράτησης της λυσοζύμης για τον προσροφητή μετά την επεξεργασία με HCl.

διάλυμα εξισορρόπησης. Από το Σχήμα 3 παρατηρούμε ότι η μέγιστη ικανότητα συγκράτησης και για τις δύο πρωτεΐνες είναι μεγαλύτερη στην κολώνα που

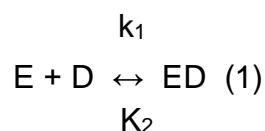
ακίνητοποιήθηκε περισσότερη χρωστική μετά από επεξεργασία με HCl. Συγκεκριμένα, για τον προσροφητή χωρίς επεξεργασία της κυτταρίνης με HCl πριν την ακίνητοποίηση της χρωστικής συγκρατήθηκαν 1,4 mg και 1,5 mg αλβουμίνης και λυσοζύμης αντίστοιχα. Όσον αφορά τον προσροφητή μετά την επεξεργασία της κυτταρίνης με HCl, συγκρατήθηκαν 1,8 mg και 3,3 mg αλβουμίνης και λυσοζύμης, αντίστοιχα. Αυτό συμβαίνει καθώς οι πρωτεΐνες έχουν την δυνατότητα να δεσμευτούν σε μεγαλύτερο αριθμό ακίνητοποιημένων μορίων χρωστικής.

3.4 Μελέτη της ισορροπίας και της κινητικής κατά την προσρόφηση της αλβουμίνης και της λυσοζύμης στον προσροφητή CELL-CB3GA

Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με ακίνητοποιημένες χρωστικές είναι αρκετά πολύπλοκη και δύσκολα κατανοητή διαδικασία (Chase, 1984, Liapis, 1989, Livingston & Chase, 1989, Boyer & Hsu, 1992). Οι χρωστικές είναι πολυλειτουργικά μόρια που περιέχουν συνδυασμό από υδρόφοβες και φορτισμένες περιοχές με αποτέλεσμα η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες να είναι πολύπλοκη και ετερογενής στη φύση (Chase, 1984, Liapis, 1989, Livingston & Chase, 1989, Boyer & Hsu, 1992). Τέτοια συστήματα είναι ιδιαίτερα δύσκολο να μελετηθούν μέσω ενός γενικού προτύπου.

Ένα απλοποιημένο πρότυπο με το οποίο τις περισσότερες φορές περιγράφονται τα συστήματα αυτά είναι οι ισόθερμοι προσρόφησης των Langmuir και Freundlich (Chase, 1984, Liapis, 1989, Livingston & Chase, 1989, Boyer & Hsu, 1992).

Οι ισόθερμοι προσρόφησης συχνά χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν και να χαρακτηρίσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ ενός ακίνητοποιημένου συστήματος (προσροφητή) και ενός ελεύθερου μορίου (πρωτεΐνης). Επιπλέον επιτρέπουν την έκφραση ποσοτικής σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα και στο στερεό προσροφητή όταν οι δύο φάσεις βρίσκονται σε ισορροπία. Η ισορροπία της αλληλεπίδρασης περιγράφεται με τη σχέση:



όπου E είναι το ένζυμο στην κινητή φάση, D η ακίνητοποιημένη χρωστική, ED το αντιστρεπτό σύμπλοκο ενζύμου και χρωστικής, και k_1 , k_2 οι σταθερές ταχύτητας των δύο αντιδράσεων. Ο λόγος k_1/k_2 είναι ίσος με τη σταθερά διάστασης KD του

συμπλόκου. Οι σταθερές ταχύτητας k_1 και k_2 δεν αντιπροσωπεύουν απλά τις ταχύτητες προσρόφησης και εκρόφησης της πρωτεΐνης στην ακινητοποιημένη χρωστική αλλά και τη συνεισφορά του περιορισμού μεταφοράς μάζας από το διάλυμα στο στερεό προσροφητή (Chase, 1984, Shiosaki et al, 1994, Somers et al, 1994).

Το πρότυπο του Langmuir στηρίζεται στην παραδοχή ότι τα μόρια της υγρής φάσης (πρωτεΐνες) προσροφούνται σε συγκεκριμένες και καθορισμένες θέσεις, κάθε μία από τις οποίες αλληλεπιδρά και συγκρατεί ένα μόνο μόριο. Οι θέσεις αυτές θεωρούνται ενεργειακά ισοδύναμες και είναι αρκετά απομακρυσμένες μεταξύ τους οπότε και δεν υπάρχουν δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γειτονικών μορίων. Από την ισορροπία που περιγράφεται στη σχέση (1) λαμβάνεται η παρακάτω σχέση του Langmuir (Chase, 1984, Liapis, 1989, Livingston & Chase, 1989, Boyer & Hsu, 1992, Shiosaki et al, 1994).

$$q^* = \frac{c^* q_{max}}{K_D + c^*} \quad (2)$$

όπου q^* είναι η συγκέντρωση της προσροφημένης πρωτεΐνης στη στερεή φάση σε κατάσταση ισορροπίας (mg/g προσροφητή), c^* η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στην υγρή φάση σε κατάσταση ισορροπίας (mg/mL διαλύματος), q_{max} η μέγιστη χωρητικότητα της προσροφημένης πρωτεΐνης (mg/g προσροφητή), και K_D είναι η σταθερά της ισορροπίας (mg/mL).

Η ισόθερμος του Freundlich είναι μια εμπειρική ισόθερμος για την εξαγωγή της οποίας γίνεται η παραδοχή ότι η ενθαλπία κατά την προσρόφηση των μορίων μεταβάλλεται εκθετικά σε σχέση με τις διαθέσιμες θέσεις δέσμευσης (Livingston & Chase, 1989) υγρή φάση (mg/mL διαλύματος), k η σταθερά ταχύτητας της ισόθερμου του Freundlich ($\text{mg}^{n-1} \text{ mL}^n/\text{g}$), και n ο σταθερός εκθέτης της ισόθερμου (αδιάστατος). Ο εκθέτης αυτός σχετίζεται με το είδος των αλληλεπιδράσεων (έλξη ή άπωση) ανάμεσα στα προσροφημένα χημικά είδη (Livingston & Chase, 1989).

$$q^* = k(c^*)^n \quad (3)$$

Για τη μελέτη και ανάλυση του συστήματος αλληλεπίδρασης του προσροφητή της κυτταρίνης με τις δύο πρωτεΐνες ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6 και βασίζεται στη μέθοδο των Livingston & Chase, (1989). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, γνωστή μάζα προσροφητή και γνωστή ποσότητα ενζύμου, σε

κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, αφήνονται κάτω από συνθήκες συνεχούς ανάδευσης (4°C, για 75 min) ώστε να επέλθει ισορροπία. Από τη μεταβολή της συγκέντρωσης του ενζύμου στην υγρή φάση, εξαιτίας της προσρόφησης, υπολογίζεται η ποσότητα c^* (συγκέντρωση του ενζύμου που μένει στην υγρή φάση μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας) και την ποσότητα q^* (συγκέντρωση του προσροφημένου ενζύμου στη στερεή φάση μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας). Διάφορες τιμές c^* και q^* λαμβάνονται χρησιμοποιώντας διαφορετικές ποσότητες ενζύμου, από τις οποίες καθορίζεται γραφικά ποια θεωρητική ισόθερμος (Langmuir ή Freundlich) ικανοποιεί περισσότερο τα πειραματικά δεδομένα. Μετασχηματισμός της ισόθερμου του Langmuir σε μορφή διπλού αντιστρόφου, δίνει την παρακάτω σχέση:

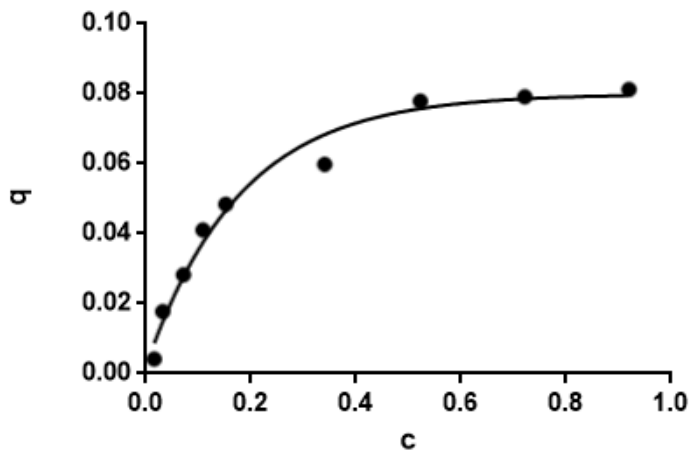
$$\frac{c^*}{q^*} = \frac{K_D}{q_{max}} + \frac{c^*}{q_{max}} \quad (4)$$

Από την ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της προσρόφησης ισορροπίας με τη μέθοδο των "ελαχίστων τετραγώνων", και τον προσδιορισμό του συντελεστή προσαρμογής (R) των αποτελεσμάτων σε ευθεία γραμμή, καθορίζεται η θεωρητική ισόθερμος που επαληθεύει καλύτερα τα πειραματικά αποτελέσματα (Livingston & Chase, 1989).

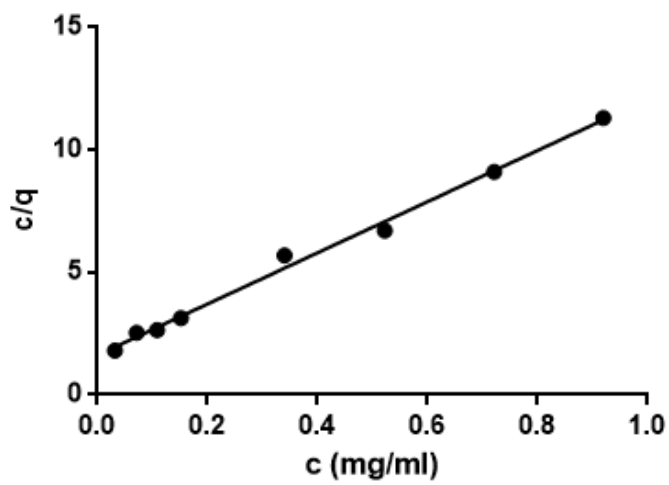
Στο Σχήμα 4 και 5 φαίνεται προσρόφηση της αλβουμίνης (BSA) και της λυσοζύμης, σύμφωνα με τις εξισώσεις (2) Σχήμα 4 και 5(A) και (4) Σχήμα 4 και 5 (B), του Langmuir. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδωσαν καλύτερη προσαρμογή στο πρότυπο του Langmuir (προσαρμογή σε ευθεία $R^2=0,9578$ για την αλβουμίνη και $R^2=0,9964$ για τη λυσοζύμη) γεγονός το οποίο δείχνει ότι τα συστήματα BSA-CELL-CB3GA και Lys-CELL-CB3GA, ακολουθούν το μοντέλο επαρκώς. Η παράμετρος q_{max} βρέθηκε ίση με 0.095 mg/g προσροφητή για την αλβουμίνη και 0.088 mg/g προσροφητή για τη λυσοζύμη. Ο παραπάνω υπολογισμός δείχνει ότι ένα μεγάλο ποσοστό των ακινητοποιημένων θέσεων καταλαμβάνονται από τις πρωτεΐνες.

Η μελέτη της κινητικής προσρόφησης της αλβουμίνης και της λυσοζύμης φαίνεται στο Σχήμα 6. Από το σχήμα φαίνεται ότι η ισορροπία αποκαθίσταται μετά από περίπου 5 min για την λυσοζύμη και 10 min για την αλβουμίνη.

A Ισοροπία Προσρόφησης Αλβουμίνης

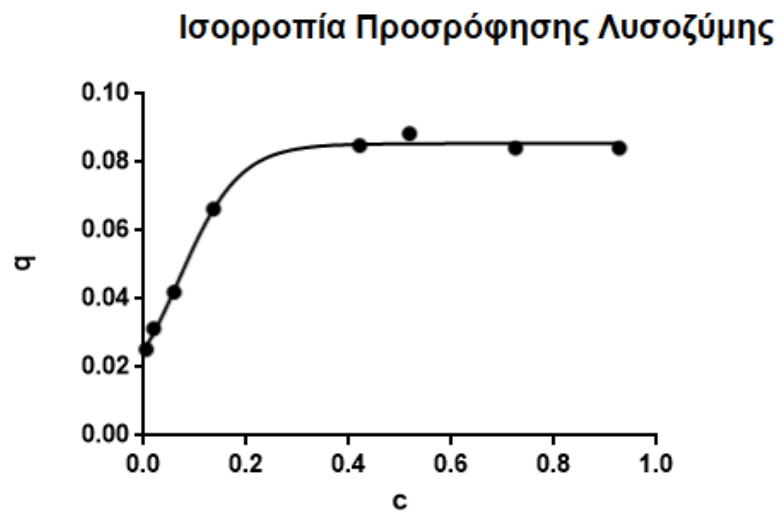


B

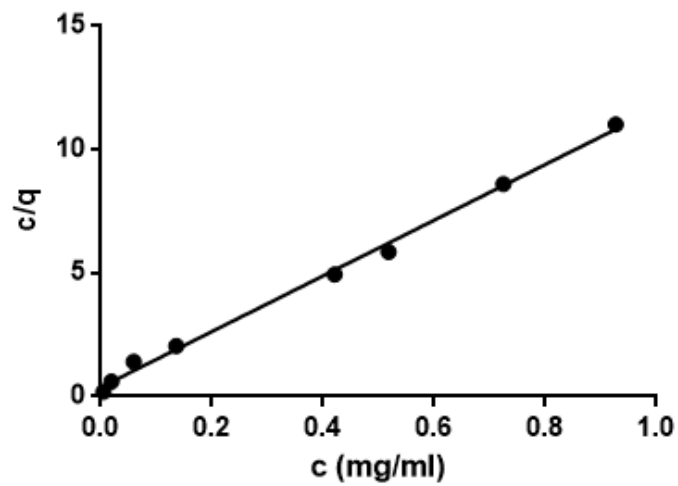


Σχήμα 4: Προσρόφηση της BSA στο προσροφητή CELL-CB3GA στους 4°C (B) Γραφική παράσταση της ισόθερμου του Langmuir για την προσρόφηση της BSA προσροφητή CELL-CB3GA στους 4°C.

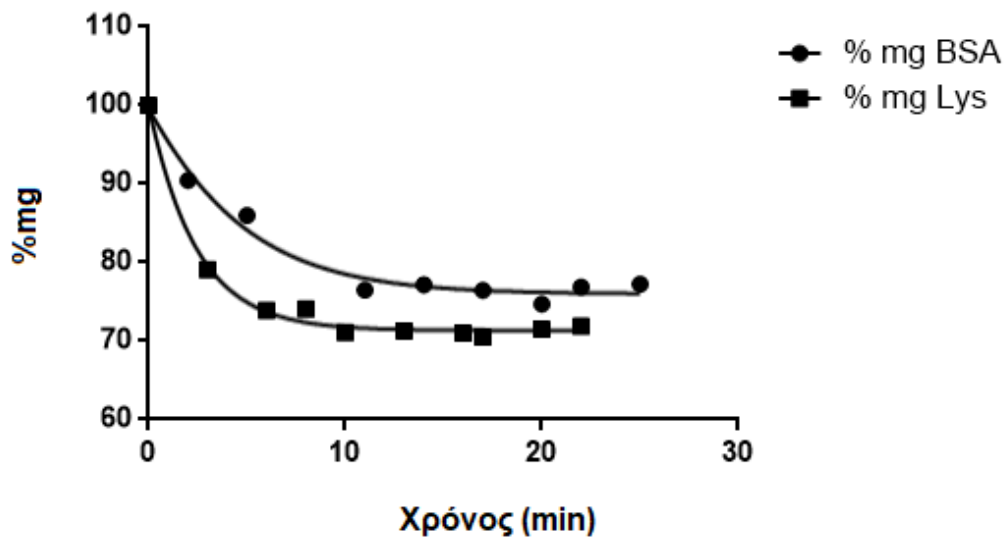
A



B



Σχήμα 5: Προσρόφηση της λυσοζύμης στο προσροφητή CELL-CB3GA στους 4°C (B) Γραφική παράσταση της ισόθερμου του Langmuir για την προσρόφηση της λυσοζύμης προσροφητή CELL-CB3GA στους 4°C.



Σχήμα 6: Κινητική Προσρόφησης του προσροφητή CELL-CB3GA, για τις πρωτεΐνες αλβουμίνη και λυσοζύμη.

3.5 Καθαρισμός πρωτεασών από εκχύλισμα στομάχου του ψαριού *Sparus aurata*

Εκχύλισμα στομάχου διαλύθηκε σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 , 10mM, pH = 7), φυγοκεντρήθηκε στις 8.000 στροφές για 10 min και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Οι πρωτεάσες καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας στον προσροφητή CEL-CB3GA. Ο προσροφητής εξισορροπήθηκε με διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 , 10mM, pH=5,5). Μόλις φορτώθηκε το βιολογικό υλικό (crude), ακολούθησε πλύση (5mL) διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 , 10mM, pH=6,5). Η έκλουση (3mL) πραγματοποιήθηκε με διάλυμα χλωριούχου νατρίου, 3M σε διάλυμα πλύσεων (pH= 6.5). Στο εκχύλισμα στομάχου έγινε έλεγχος για ενζυμική δραστικότητα θρυψίνης, χυμοθρυψίνης και πρωτεάσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη. Στο συγκεκριμένο εκχύλισμα δεν βρέθηκε ενζυμική δραστικότητα θρυψίνης και χυμοθρυψίνης. Στον Πίνακα 8 φαίνεται ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας πρωτεάσης με υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη από τον καθαρισμό στον προσροφητή CEL-CB3GA.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα καθαρισμού πρωτεασών από εκχύλισμα στομάχου του είδους *Sparus aurata*, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη.

Στάδιο καθαρισμού	Όγκος (mL)	Πρωτεΐνη (mg)	Ενζυμικές μονάδες (units)	Ειδική δραστηριότητα (units/mg)	Καθαρισμός (φορές)	Ανάκτηση (%)
Αρχικό εκχύλισμα	1	10.51	7.07	0.67	1	100
Έκλουση	3	0.37065	11.875	32.04	47	168

Η έκταση της προσρόφησης και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών επηρεάζεται δραματικά από το pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικά pH των συγκεκριμένων διαλυμάτων για να βελτιωθούν τα αποτελέσματα του καθαρισμού. Όσο χαμηλότερο είναι το pH του διαλύματος εξισορρόπησης, τόσο αυξάνεται η χωρητικότητα του προσροφητή. Επίσης, το pH των διαλυμάτων πλύσης και έκλουσης επηρεάζει την έκλουση των πρωτεϊνών. Ως βέλτιστες τιμές pH βρέθηκαν εκείνες που αναφέρονται παραπάνω, στις οποίες παρατηρήθηκε μεγαλύτερη χωρητικότητα, ανάκτηση και καθαρισμός. Με χρήση της παραπάνω μεθόδου παρατηρούμε από τον πίνακα των αποτελεσμάτων αύξηση της ειδικής δραστηριότητας (47.67 φορές καθαρισμού) των πρωτεϊνών με ποσοστό ανάκτησης 55.9%.

3.6 Καθαρισμός πρωτεασών από εκχύλισμα παγκρέατος του ψαριού *Sparus aurata*

Εκχύλισμα παγκρέατος διαλύθηκε σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 , 10mM, pH = 7), φυγοκεντρήθηκε στις 8.000 στροφές για 10 min και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Για την χρωματογραφία συγγένειας στον προσροφητή CELL-CB3GA χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια διαλύματα εξισορρόπησης, πλύσης και έκλουσης, όπως παραπάνω στον καθαρισμό πρωτεϊνών από εκχύλισμα στομάχου. Ο προσροφητής εξισορροπήθηκε με διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 , 10mM, pH=5,5). Μόλις φορτώθηκε το βιολογικό υλικό (crude), ακολούθησε πλύση (5mL) διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 , 10mM, pH=6,5). Η έκλουση (3mL) πραγματοποιήθηκε με διάλυμα χλωριούχου νατρίου, 3M σε διάλυμα πλύσεων (pH= 6.5). Τα αποτελέσματα του καθαρισμού φαίνονται στους Πίνακες9, 10, 11.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα καθαρισμού πρωτεασών από εκχύλισμα παγκρέατος του είδους *Sparus aurata*, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη.

Στάδιο καθαρισμού	Όγκος (mL)	Πρωτεΐνη (mg)	Ενζυμικές μονάδες (units)	Ειδική δραστηριότητα (units/mg)	Καθαρισμός (φορές)	Ανάκτηση (%)
Αρχικό εκχύλισμα	1.00	1.81	7.88	4.35	1.00	100.00
Έκλουση	3.00	0.06	8.92	150.71	34	113.23

Πίνακας 10: Αποτελέσματα καθαρισμού θρυψίνης από εκχύλισμα παγκρέατος του είδους *Sparus aurata*.

Στάδιο καθαρισμού	Όγκος (mL)	Πρωτεΐνη (mg)	Ενζυμικές μονάδες (units)	Ειδική δραστηριότητα (units/mg)	Καθαρισμός (φορές)	Ανάκτηση (%)
Αρχικό εκχύλισμα	1.00	1.81	960.32	529.97	1.00	100.00
Έκλουση	3.00	0.06	471.07	7961.91	15	49.05

Πίνακας 11: Αποτελέσματα καθαρισμού χυμοθρυψίνης από εκχύλισμα παγκρέατος του είδους *Sparus aurata*.

Στάδιο καθαρισμού	Όγκος (mL)	Πρωτεΐνη (mg)	Ενζυμικές μονάδες (units)	Ειδική δραστηριότητα (units/mg)	Καθαρισμός (φορές)	Ανάκτηση (%)
Αρχικό εκχύλισμα	1.00	1.81	4.56	2.51	1.00	100.00
Έκλουση	3.00	0.06	0.87	14.54	5	18.85

Από τους Πίνακες 9, 10, 11 των αποτελεσμάτων αρχικά παρατηρούμε ότι στο εκχύλισμα παγκρέατος παρατηρήθηκε όχι μόνο ενζυμική δραστηριότητα πρωτεάσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη αλλά και δραστηριότητα θρυψίνης και χυμοθρυψίνης. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα εκφράζονται στο πάγκρεας και από εκεί να μεταφέρονται σε άλλα όργανα. Όσον αφορά τον έλεγχο για πρωτεάσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη, η ανάκτηση των ενζύμων ήταν 37.74 % και τα ένζυμα καθαρίστηκαν 34.68 φορές. Για τον έλεγχο της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης, τα ένζυμα καθαρίστηκαν 15.02 και

5.77 φορές με απόδοση καθαρισμού 16.35% και 6.28 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ικανοποιητικά, αν σκεφτούμε το γεγονός ότι η μόνη επεξεργασία του υλικό ήταν η φυγοκέντρηση για 10 λεπτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

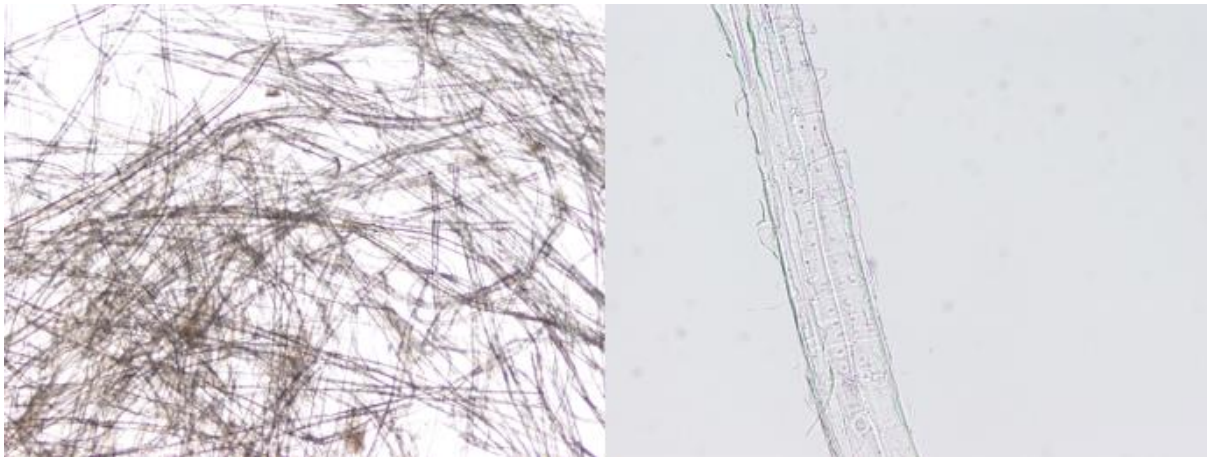
4. Συζήτηση

Η κυτταρίνη αποτελεί ένα από τα άφθονα υλικά στον πλανήτη. Το συγκεκριμένο υλικό συσσωρεύεται στο περιβάλλον μέσα από πολλές διεργασίες. Για παράδειγμα, κάθε βιομηχανική διεργασία που χρησιμοποιεί φυτά, είτε πρόκειται για φυτά που χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη για παραγωγή προϊόντων, είτε πρόκειται για συσκευασία τροφίμων για διατροφή του ανθρώπου και άλλων οργανισμών, παράγει απόβλητα πλούσια σε λιγνινοκυτταρινούχα συστατικά. Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από πολυάριθμες (1→4)-β-D-γλυκάνες, δηλαδή γραμμικές αλυσίδες καταλοίπων β-D-γλυκόζης συνδεδεμένων με (1→4) δεσμούς. Στην κυτταρίνη, πολλές ξεχωριστές γλυκάνες διευθετούνται στενά μεταξύ τους για να σχηματίσουν το μικροϊνίδιο κυτταρίνης στο οποίο οι γλυκάνες έχουν παράλληλη διευθέτηση και συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals για να δημιουργήσουν μια ταινία υψηλού βαθμού οργάνωσης. Ως αποτέλεσμα τα μικροϊνίδια κυτταρίνης είναι αδιάλυτα, ισχυρά και σταθερά στην ενζυμική αποικοδόμηση και απαιτείται πολύ μεγάλη ενέργεια για την προσβολή του συγκεκριμένου γλυκοζιτικού δεσμού. Πολλές μελέτες, έχουν πραγματοποιηθεί για να βρεθεί ένας οικονομικός και παράλληλα φιλικός προς το περιβάλλον τρόπος για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης.

Η βιομηχανία χαρτιού θεωρείται μία από τους μεγαλύτερους καταναλωτές φυσικών πόρων (ξύλου και νερού) και ενέργειας (ηλεκτρισμός και ορυκτά καύσιμα). Οι συγκεκριμένες βιομηχανίες συμβάλλουν σημαντικά στο ποσοστό των εκπεμπόμενων ρύπων στο περιβάλλον. Αυτοί οι ρύποι, όπως για παράδειγμα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά είναι αποτέλεσμα την χημικής επεξεργασίας του ξύλου και της παραγωγής χαρτιού. Σε αυτούς τους ρύπους έρχονται να προστεθούν και κάποια προϊόντα αυτών, όπως για παράδειγμα οι εφημερίδες ή τα περιοδικά, καθώς μετά από κάποιο χρονικό διάστημα αποτελούν απόβλητο.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, αρχικά απομονώθηκε κυτταρίνη από απόβλητα χαρτιού και συγκεκριμένα εφημερίδα. Το πρώτο στάδιο ήταν η αλκαλική επεξεργασία του υλικού με υδροξείδιο του νατρίου (NaOH), για την μείωση της ισχύς των ενδομοριακών δεσμών των ινών που σχηματίζουν το χαρτί. Συγκεκριμένα, οι ίνες αποτελούνται από ινίδια κυτταρίνης τα οποία περιβάλλονται από ημικυτταρίνες και λιγνίνες. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η διαδικασία λεύκανσης. Στη βιομηχανία χαρτιού η ομογενοποίηση του υλικού και η διαδικασία λεύκανσης που ακολουθείται, πραγματοποιείται για την απομάκρυνση της λιγνίνης, των ημικυτταρινών και των υπόλοιπων ουσιών με σκοπό

την απομόνωση υψηλού βαθμού καθαρότητας κυτταρίνης. Επίσης, με τη διαδικασία λεύκανσης απομακρύνονται και σχεδόν όλες οι χρωστικές που υπάρχουν στο χαρτί βελτιώνοντας τον βαθμό καθαρότητας της κυτταρίνης ακόμη περισσότερο. Τέλος με την όξινη επεξεργασία με υδροχλωρικό οξύ διασπώνται οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται ανάμεσα στα ινίδια κυτταρίνης, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τα διαθέσιμα υδροξύλια που υπάρχουν στο υλικό.



Εικόνα 8: Παρατήρηση κυτταρίνης σε οπτικό μικροσκόπιο OLYMPUS U-CMAD3.

Σε αντίθεση με όλες τις μεθόδους χημικής ακινητοποίησης που εφαρμόζονται για τη σύνθεση προσροφητών χρωματογραφίας συγγενείας, η άμεση ακινητοποίηση των χρωστικών, δια μέσου του τριαζινικού δακτυλίου, αποτελεί την απλούστερη και οικονομικότερη μέθοδο. Το χλώριο του ετεροκυκλικού τριαζινικού δακτυλίου απομακρύνεται εύκολα από τα ενεργοποιημένα υδροξύλια της κυτταρίνης σε αλκαλικό περιβάλλον (Clonis, 1987, 1990, 1991). Ο σημαντικότερος περιορισμός στην έκταση της υποκατάστασης αποτελεί η παράπλευρη αντίδραση υδρόλυσης της χρωστικής από το διαλύτη (Σχήμα 7 Β). Η συγκέντρωση της ακινητοποιημένης χρωστικής είναι σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει το βαθμό επιτυχίας της χρωματογραφίας συγγενείας. Η υψηλή συγκέντρωση συνήθως αυξάνει την ποσότητα πρωτεΐνης/ενζύμου που μπορεί να συγκρατήσει ο προσροφητής (χωρητικότητα του προσροφητή) (Dean & Watson, 1979), αφού δημιουργούνται περισσότερες διαθέσιμες θέσεις. Παράλληλα όμως αυξάνεται και η μη εκλεκτική προσρόφηση, ευνοώντας την παράπλευρη αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης από πολλές διαφορετικές θέσεις.

Για αυτόν τον λόγο και δεν πραγματοποιήθηκε και τρίτη αντίδραση ακινητοποίησης της χρωστικής Cibacron Blue 3GA σε κυτταρίνη, χρησιμοποιώντας περισσότερη χρωστική. Αυτό έχει ως συνέπεια την αύξηση της έντασης αλληλεπίδρασης (Boyer &

Hsu, 1992) με αποτέλεσμα η προσροφημένη πρωτεΐνη να εκλούεται πολύ δύσκολα και συχνά μη εκλεκτικά. Χαμηλή συγκέντρωση ακινητοποιημένης χρωστικής συνήθως οδηγεί σε χαλαρή ή και καθόλου δέσμευση, συνεπώς και σε μικρή χωρητικότητα του προσροφητή. Στην παρούσα μελέτη οι χρωστικές ακινητοποιήθηκαν σε συγκέντρωση $3,7 \pm 0,2$ $\mu\text{mol}/\text{g}$ νωπού προσροφητή. Αυτός ο βαθμός υποκατάστασης θεωρείται ικανοποιητικός αφού εμπίπτει στο συνήθως χρησιμοποιούμενο εύρος τιμών για την χρωματογραφία συγγενείας σε χρωστικές (Burton et al., 1988b, Burton et al., 1990, Alderton et al., 1994), επιτρέποντας εκλεκτική αλληλεπίδραση και ταυτόχρονα ισχυρή συγκράτηση και ικανοποιητική χωρητικότητα σε επιθυμητή πρωτεΐνη.

Οι πρωτεάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς ανάμεσα σε αμινοξικά κατάλοιπα πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Τα ένζυμα αυτά μπορεί να έχουν εξειδικευμένη δράση, έχοντας ως στόχο ένα συγκεκριμένο αμινοξύ μιας πρωτεΐνης ή όχι διασπώντας πρωτεΐνες σε περισσότερα αμινοξέα. Η ικανότητα των πρωτεασών να καταλύουν την αντίδραση διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού σε ένα μόνο αμινοξύ αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα και βρίσκει εφαρμογή σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές όπως για παράδειγμα στις χρωματογραφικές τεχνικές (π.χ. φασματοσκοπία μάζας, αέρια χρωματογραφία). Οι πρωτεάσες ταξινομούνται με βάση τρία κριτήρια: την αντίδραση που καταλύουν, τη φύση του καταλοίπου ή των καταλοίπων που δρουν και τις εξελικτικές σχέσεις που εμφανίζουν. Οι πρωτεάσες επίσης διακρίνονται με βάση τα αμινοξέα που εντοπίζονται στο ενεργό τους κέντρο δηλαδή πρωτεάσες με καταλυτικό κατάλοιπο σερίνη (σερινοπρωτεάσες), κυστεΐνη (θειολοπρωτεάσες) και ασπαρτικό ή γλουταμινικό οξύ. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι πρωτεάσες θρυψίνη και χυμοθρυψίνη που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη από εκχύλισμα παγκρέατος του είδους *Sparus aurata* (Σπάρος ο χρυσόχρους, κν. τσιπούρα).

Στο δεύτερο μέρος της συγκεκριμένης μελέτης, επιδιώχθηκε να γίνει απομόνωση πρωτεασών από διάφορα όργανα κάποιων οργανισμών, που δεν καταναλώνονται από τον άνθρωπο. Συνεπώς, αυτά τα υλικά αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών και παράλληλα μη αξιοποιήσιμο απόβλητο από καμία βιομηχανία. Το πεπτικό σύστημα των ψαριών αποτελεί ένα τέτοιο υλικό. Για το συγκεκριμένο σκοπό, συλλέχθηκε στομάχι και πάγκρεας από το είδος *Sparus aurata*. Το συγκεκριμένο ψάρι προέρχεται από ιχθυοκαλλιέργεια του Ιονίου πελάγους και συνεπώς αποτελεί κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής και της διατροφής των Ελλήνων. Το υλικό (έστω 1 g)

επαναιωρήθηκε σε τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος. Ανάλογα με το pH εξισορρόπησης που χρησιμοποιήθηκε στη χρωματογραφία, επιλέχθηκε για τιμές pH < 6 ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου και για τιμές pH > 6 ρυθμιστικό διάλυμα Tris. Ακολουθεί πολτοποίηση του υλικού στο ρυθμιστικό διάλυμα. Το υλικό φυγοκεντρείται στις 8.000 rpm για 10 λεπτά και συλλέγεται το υπερκείμενο, για περαιτέρω επεξεργασία. Για τον καθαρισμό των πρωτεασών χρησιμοποιήθηκε ο προσροφητής CELL-CB3GA, μετά από αντίδραση ακινητοποίησης 7.5 ωρών και επεξεργασία της κυτταρίνης με υδροχλωρικό οξύ.

Κατά την επεξεργασία του υλικού παρατηρήθηκε ότι σε τιμές pH < 5,5 η δραστηριότητα των πρωτεασών χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη ήταν πολύ χαμηλή. Επίσης σε τιμές pH εξισορρόπησης > 5.5 ο προσροφητής δεν συγκρατούσε αρκετή ποσότητα πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε τιμή pH εξισορρόπησης 5.5. Όσο μικρότερο είναι το pH εξισορρόπησης τόσο αυξάνεται η ποσότητα πρωτεΐνης/ενζύμου που μπορεί να συγκρατήσει ο προσροφητής και συνεπώς αυξάνεται και η μη εκλεκτική προσρόφηση των πρωτεϊνών. Για να βελτιωθούν ακόμα περισσότερο τα αποτελέσματα του καθαρισμού τροποποιήθηκαν και οι τιμές pH των διαλυμάτων πλύσης και έκλουσης. Συγκεκριμένα μετά από δοκιμές επιλέχθηκε τιμή pH πλύσης και έκλουσης 6.5. Χρησιμοποιώντας αυτές τις τιμές επιτεύχθηκε απόδοση καθαρισμού των πρωτεασών χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη 55.9% και 37.7% από το στομάχι και το πάγκρεας με καθαρισμό 47.67 και 34.68 φορές αντίστοιχα. Όσον αφορά τις σερινοπρωτεάσες θρυψίνη και χυμοθρυψίνη από το πάγκρεας παρατηρήθηκε απόδοση καθαρισμού 16.35% και 6.28% με καθαρισμό 15.02 και 5.77 φορές αντίστοιχα. Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι σε όλους τους καθαρισμούς επιτεύχθηκε μεγάλη αύξηση της ειδικής δραστηριότητας (π.χ. 47,67 φορές για τις πρωτεάσες με υπόστρωμα την αζωκαζεΐνη από το στομάχι του συγκεκριμένου ψαριού). Επίσης, η απόδοση καθαρισμού ήταν σε αρκετά ικανοποιητικά επίπεδα, αν σκεφτούμε τα βήματα που ακολουθήσαμε για τους καθαρισμούς.

Από την αρχή της συγκεκριμένης μελέτης ήταν επιθυμητή η εύρεση ενός πρωτοκόλλου με όσον το δυνατόν λιγότερα βήματα και χωρίς μεγάλο ή και με καθόλου κόστος. Σε μεγάλης κλίμακας εφαρμογές πρωτοκόλλων η προσθήκη ακόμη και ενός επιπλέον βήματος απαιτεί περισσότερο χρόνο αλλά και περισσότερα χρήματα. Εναλλακτικά για να βελτιωθούν τα αποτελέσματα των καθαρισμών θα μπορούσαμε

να προσθέσουμε ένα βήμα διαπίδυσης αμέσως μετά την φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος από το στομάχι ή το πάγκρεας πριν το φορτώσουμε στον προσροφητή. Το στάδιο της διαπίδυσης είναι μια μορφή χαμηλού καθαρισμού σε ρυθμιστικό διάλυμα (~3-4 λίτρα) κατάλληλης συγκέντρωσης και pH, προκειμένου το πρωτεϊνικό εκχύλισμα να αποκτήσει την ίδια σύσταση με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης της χρωματογραφίας. Επίσης, για να βελτιωθεί η καθαρότητα του τελικού διαλύματος υπάρχει δυνατότητα τροποποίησης του βήματος της έκλουσης. Για παράδειγμα, η χρήση κάποιου υποστρώματος των ενζύμων για την εκλεκτική έκλουση τους θα βελτίωνε την καθαρότητα του τελικού προϊόντος. Όμως, από τέτοιου είδους καθαρισμούς με χρήση εκχυλισμάτων χωρίς μεγάλη επεξεργασία είναι δύσκολο αλλά δεν είναι και απαραίτητο να υπάρχει 100% καθαρότητα, όπως για παράδειγμα θα ήταν απαραίτητο σε εφαρμογές που προορίζονται για φαρμακευτική καλλιντική χρήση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

5. Βιβλιογραφία

- Alderton, W , Lowe, C and Thatcher, D (1994) *J Chromatog* , 677, 289-299
- Amiza MA, Owusu Apenten RK (2002) A single step purification of gastricsin– like proteinase from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *OnLine J Biol Sci* 2: 591-595
- Arnold, F (1991) *Bio/technol*, 9, 151-156
- Bayer EA , Lamed R , Himmel ME (2007). The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management . *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 : 237 – 245
- Beadle, G. W., Brauns, F. E., Deulofeu, V., Doudoroff, M., Fox, D. L., Geiger, E., ... Rasmussen, R. S. (1948). *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / Progrès Dans La Chimie Des Substances Organiques Naturelles*. Springer Vienna
- Biellman, J , Samama, J , Branden, C and Ekluud, H (1979) *Eur J Biochem* , 102, 107-113
- Biji, G. D., Arun, A., Muthulakshmi, E., Vijayaraghavan, P., Arasu, M. V., & Al-Dhabi, N. A. (2016). Bio-prospecting of cuttle fish waste and cow dung for the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus cereus* IND5 in solid state fermentation. *3 Biotech*, 6(2)
- Bjelland S, Gildberg A, Volden G (1988) Degradation of human epidermal keratin by fish pepsin. *Arch Dermatol Res* 280: 119-123
- Boschetti, E (1994) *J Chromatog* , 658, 204-236
- Bougatef A, Balti R, Zaied SB, Souissi N, Nasri M (2008) Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences. *Food Chem* 107: 777- 784
- Boyer, P and Hsu, J (1992) *Chem Eng Sci*, 47, 241-251
- Brendel, O., Iannetta, P.P.M., Stewart, D., (2000). A rapid and simple method to isolate pure alpha-cellulose, *Phytochem. Anal.*, 11, 7–10
- Brier S, Maria G, Carginale V, Capasso A, Wu Y, et al. (2007) Purification and characterization of pepsins A1 and A2 from the Antarctic rock cod *Trematomus bernacchii*. *FEBS J* 274: 6152-6166

- Brown, R. D., Jurasek, L., Eds. (1979). Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis; American Chem. Soc., 181-210
- Burton, N. P., & Lowe, C. R. (1992). Design of novel affinity adsorbents for the purification of trypsin-like proteases. *Journal of Molecular Recognition*, 5(2), 55–68
- Burton, S , Stead, V and Lowe, C (1988b) *J Chromatog* , 455,201-216
- Burton, S , Stead, V and Lowe, C (1990) *J Chromatog* , 508, 109-125
- Cai, J., & Zhang, L. (2005). Rapid Dissolution of Cellulose in LiOH/Urea and NaOH/Urea Aqueous Solutions. *Macromolecular Bioscience*, 5(6), 539–548
- Cassini, A.S., Tessar, I.C., Marczak, L.D.F., Pertile, C., 2010. Ultrafiltration of wastewater from isolated soy protein production: a comparison of three UF membranes. *J. Cleaner Prod.* 18 (3), 260–265
- Chaiken, I M (1983) In Chaiken, IM, Wilchek, M and Parikh, I (eds) *Affinity chromatography and biological recognition*, Academic Press, London, pp 3-6
- Champluvier, B and Kula, M -R, (1992a), *Bioseparation*, 2,179-202
- Champluvier, B and Kula, M -R, (1992b), *Biotech Bioeng* , 40, 33-40
- Chandrasekaran, M., Chandrasekar, R., Chun, S.-C., & Sathiyabama, M. (2016). Isolation, characterization and molecular three-dimensional structural predictions of metalloprotease from a phytopathogenic fungus, *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(2), 131–139
- Chase, H A (1984) *Chem Eng Sci*, 39, 1099-1110
- Chen, K.-H., Lee, S.-Y., Show, P.-L., Hong, S.-C., & Chang, Y.-K. (2018). Direct recovery of malate dehydrogenase from highly turbid yeast cell homogenate using dye-ligand affinity chromatography in stirred fluidized bed. *Journal of Chromatography B*, 1100–1101, 65–75
- Chollangi, A., Hossain, M.M., 2007. Separation of proteins and lactose from dairy wastewater. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 46 (5), 398–404
- Clonis, Y , Stead, V and Lowe, C (1987) *Biotechnol Bioeng* , 30, 621-627
- Clonis, Y and Lowe, CR (1981) *Biochim Biophys Acta*, 569, 86-98

Clonis, Y D (1982) *Chim Chron* , New Series, 11, 87-110

Cseke LJ, Wu W, Tsai CJ.2004. "Chapter 1: Isolation and purification of DNA." Cseke LJ, Kaufman PB, Podila GK, Tsai CJ, editors.*Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*.2nd edition. Florida: CRC Press LLC,1 - 19

Cuatrecasas, P (1970) *J Biol Chem*, 245, 3059-3066

Dailloux, S., Djelveh, G., Peyron, A., Oulion, C., 2002. Rheological behaviour of blood plasmas concentrated by ultrafiltration and by evaporation in relation to liquid–gel transition temperature. *J. Food Eng.* 55 (1), 35–39

Danial, W. H., Abdul Majid, Z., Mohd Muhid, M. N., Triwahyono, S., Bakar, M. B., & RamLi, Z. (2015). The reuse of wastepaper for the extraction of cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 118, 165–169

De Holanda, H.D., Netto, F.M., 2006. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *J. Food Sci.* 71 (5), C298– C303

Dean, P and Watson, D (1979) *J Chromatog* , 165, 301-319

Dey, S. S., & Dora, K. C. (2011). Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 16–24

dos Santos Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253–262

Fatima B, Hussain Z, Khan MA. Utilization of agro-industrial waste residues for the production of amylase from *Aspergillus oryzae* IIB-62014. *Br. Biotechnol J.* 2014; 4(4): 350-365

Fersht, K (1985) In *Enzyme structure and Mechanism*, Freeman, W and Company (eds), USA, pp 293-310

Foston, M. B., Hubbell, C. A., & Ragauskas, A. J. (2011). Cellulose Isolation Methodology for NMR Analysis of Cellulose Ultrastructure. *Materials*, 4(11), 1985–2002

Galaev, Y , Arvidson, P and Mattiasson, B (1995) *J Chromatog* , 710, 259-266

Gee, A. P., Borsos, T., & Boyle, M. D. P. (1979). Interaction between components of the human classical complement pathway and immobilized cibacron blue F3GA. *Journal of Immunological Methods*, 30(2), 119–126

Ghodake, G. S., Yang, J., Shinde, S. S., Mistry, B. M., Kim, D.-Y., Sung, J.-S., & Kadam, A. A. (2018). Paper waste extracted α -cellulose fibers super-magnetized and chitosan-functionalized for covalent laccase immobilization. *Bioresource Technology*, 261, 420–427

Gildberg A (2004) Digestive enzyme activities in starved pre-slaughter farmed and wild-captured, Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 238: 343-353

Gildberg A, Olsen RL, Bjarnason JB (1990) Catalytic properties and chemical composition of pepsins from Atlantic cod (*Gadusmorhua*). *Comp Biochem Physiol B* 96: 323-330

Glazer,A (1970) *Proc Natl Acad Sci USA*, 65,1057-1061

Godlewski, M., & Adamczyk, B. (2007). The ability of plants to secrete proteases by roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(9), 657–664

Gómez-Juárez, C., Castellanos, R., Ponce-Noyola, T., Calderón, V., Figueroa, J., 1999. Protein recovery from slaughterhouse wastes. *Bioresour. Technol.* 70 (2), 129–133

Gong, M., Aguirre, A.-M., & Bassi, A. (2016). Technical Issues Related to Characterization, Extraction, Recovery, and Purification of Proteins from Different Waste Sources. In *Protein Byproducts* (pp. 89–106). Elsevier

González-Rábade, N., Badillo-Corona, J. A., Aranda-Barradas, J. S., & Oliver-Salvador, M. del C. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review. *Biotechnology Advances*, 29(6), 983–996

Graça, V. C., Sousa, F., Santos, P. F., & Almeida, P. S. (2015). Protein Purification by Aminosquarylium Cyanine Dye-Affinity Chromatography. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 23–33). Springer New York

Guerrero, L., Omil, F., Méndez, R., Lema, J.M., 1998. Protein recovery during the overall treatment of wastewaters from fish-meal factories. *Bioresour. Technol.* 63, 221–229

Gunzer, G., & Hennrich, N. (1984). Purification of α 1-proteinase inhibitor by triazine dye affinity chromatography, ion-exchange chromatography and gel filtration on fractogel TSK. *Journal of Chromatography A*, 296, 221–229

Haard NF (1986) Atlantic Cod Gastric Protease. Characterization with casein and milk substrate and influence of sepharose immobilization on salt activation, temperature characteristics and milk clotting reaction. *J Food Sci* 51: 313-316

Haard, N. F. (1992). A Review of Proteolytic Enzymes from Marine Organisms and Their Application in the Food Industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1(1), 17–35

Himmel ME, Ruth MF , Wyman CE (1999). Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 358 – 364

Hodgson, J (1990) *Bio/technol*, 8, 600-602

Hodgson, J (1992) *Bio/technol*, 10, 997-1000

Hoi, M (1985) *Prog. Biophys Mol Biol* ,45, 149-195

Homaei, A., Lavajoo, F., & Sariri, R. (2016). Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 542–552

Hubatsch, I , Maurer, P , Engel, D and Aldolph, W (1995), *J Chromatog*, 711, 105-112

in, D.-Q., & Yao, S.-J. (2007). Optimizing Dye-Ligand Density with Molecular Analysis for Affinity Chromatography of Rabbit Muscle L-Lactate Dehydrogenase. *Biotechnology Progress*, 23(4), 904–910

Iwata, S and Ohta, T (1993) *J Mol Biol*, 230, 21-27

- Jiang, F., & Hsieh, Y.-L. (2015). Cellulose nanocrystal isolation from tomato peels and assembled nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, 122, 60–68
- Jones, B.L., Fontanini D., Jarvinen, M., Pekkarinen, A. Simplified Endoproteinase Assays Using Gelatin or Azogelatin (1998). *Anal. Biochem.* 263, 214–220
- Jones, C , Patel, A , Griffin, S , Martin, J , Young, P , O'Donnell, K , Silverman, C , Porter, T , Chaiken, I (1995) *J Chromatogr* , 707, 3-22
- Joshi VK, Devrajan A. Ethanol recovery from solid state fermented apple pomace and evaluation of physico-chemical characteristics of residue. *Nat Prod Radiance*. 2008; 7:127-132
- Kamińska, J., Dzięciol, J., & Kościelak, J. (1999). *Glycoconjugate Journal*, 16(11), 719–723
- Kennedy, C. J., Cameron, G. J., Šturcová, A., Apperley, D. C., Altaner, C., Wess, T. J., & Jarvis, M. C. (2007). Microfibril diameter in celery collenchyma cellulose: X-ray scattering and NMR evidence. *Cellulose*, 14(3), 235–246
- Kim, S.-K., & Dewapriya, P. (2013). Enzymes from Fish Processing Waste Materials and Their Commercial Applications. In *Seafood Processing By-Products* (pp. 183–196)
- Knauf, M., Moniruzzaman, M., (2004). Lignocellulosic Biomass Process: A Perspective, *Int. Sugar J.*, 106, 147-150
- Kobayashi, T., Hakamada, Y., Adachi, S. et al. *Appl Microbiol Biotechnol* (1995) 43: 473
- Kolakovic, R., Peltonen, L., Laukkanen, A., Hellman, M., Laaksonen, P., Linder, M. B., Laaksonen, T. (2013). Evaluation of drug interactions with nanofibrillar cellulose. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3), 1238–1244
- Kopperschlager, G and Johansson, G (1982) *Anal Biochem* , 124, 117-124
- Kumar, B., & Rani, S. (2017). Technical note on the isolation and characterization of collagen from fish waste material. *Journal of Food Science and Technology*, 54(1), 276–278

Kumar, S., & Punekar, N. S. (2014). High-Throughput Screening of Dye-Ligands for Chromatography. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 53–65). Humana Press

Labrou, N and Clonis, Y (1994) *J Biotechnol*, 36, 95-119

Lee HS, Kwon KK, Kang SG, Cha S-S, Kim S-J, Lee J-H (2010) Approaches for novel enzyme discovery from marine environments. *Curr Opin Biotechnol* 21(3):353–357

Lee, H. S., Kwon, K. K., Kang, S. G., Cha, S.-S., Kim, S.-J., & Lee, J.-H. (2010). Approaches for novel enzyme discovery from marine environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 353–357

Li, S., Li, X., Wang, D., 2004. Membrane (RO-UF) filtration for antibiotic wastewater treatment and recovery of antibiotics. *Sep. Purif. Technol.* 34 (1–3), 109–114

Li, Z., Rodriguez, E., Azaria, S., Pekarek, A., & Hage, D. S. (2017). Affinity monolith chromatography: A review of general principles and applications. *ELECTROPHORESIS*, 38(22–23), 2837–2850

Li, Z., Shao, L., Ruan, Z., Hu, W., Lu, L., & Chen, Y. (2018). Converting untreated waste office paper and chitosan into aerogel adsorbent for the removal of heavy metal ions. *Carbohydrate Polymers*, 193, 221–227

Liapis, AI (1989) *J Biotechnol*, 11, 143-160

Lindner, N , Jeffcoat, R and Lowe, C (1989) *J Chromatog* , 473, 227-240.

Livingston, A and Chase, H (1989) *J Chromatog*, 481, 159-174

López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433–30437

Lowe, C (1987) In *Reactive Dyes in Protein and Enzyme Technology* (Clonis, YD, Atkinson, T, Bruton, S and Lowe, C , eds), Macmillan Press, Basingstoke, pp 1-11

Lowe, C, Small, D and Atkinson, A (1981) *Int J Biochem*, 13,3-40

Luo, X., & Zhang, L. (2010). Creation of regenerated cellulose microspheres with diameter ranging from micron to millimeter for chromatography applications. *Journal of Chromatography A*, 1217(38), 5922–5929

- Mahboob, S. (2014). Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 4296–4305
- Makriyannis, T., & Clonis, Y. D. (1997). Design and study of peptide-ligand affinity chromatography adsorbents: Application to the case of trypsin purification from bovine pancreas. *Biotechnology and Bioengineering*, 53(1), 49–57
- Makriyannis, T and Clonis, Y (1993) *Process Biochem* , 28, 179-185
- Mayes, A. G., Hubble, J., & Eisenthal, R. (1991). Investigation of liquid phase cooperative binding interactions on the capacity of insoluble affinity adsorbents. *Journal of Chromatography A*, 539(2), 245–254
- Mislovičová, D., Chudinová, M., Gemeiner, P., & Dočolomanský, P. (1995). Affinity chromatography of invertase on Concanavalin A-bead cellulose matrix: the case of an extraordinary strong binding glycoenzyme. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 664(1), 145–153
- Mussatto SI, Rocha GJM, Roberto IC. Hydrogen peroxide bleaching of cellulose pulp obtained from brewers spent grain. *Cellulose*. 2008; 15:641-649
- Narayanan, S, (1994) *J Chromatog* , 658, 237-258
- Parmjit S Panesar, Rupinder Kaur, Gisha Singla, & Rajender S Sangwan. (2016). Bio-processing of Agro-industrial Wastes for Production of Food-grade Enzymes: Progress and Prospects. *Applied Food Biotechnology*, 3(4)
- Polgár L (1987). The mechanism of action of aspartic proteases involves “pushpull” catalysis. *FEBS Lett* 219: 1-4
- Presterà, T, Prochaska, H and Talalay, P (1992) *Biochemistry*, 31, 824-833
- R., S., J., J., & A., T. S. (2018). Purification, characterization, molecular modeling and docking study of fish waste protease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 569–583
- Rache, D., Hussin, M. H., Hui Chuin, C. T., Sabar, S., Fazita, M. R. N., Taiwo, O. F. A., Haafiz, M. K. M. (2016). Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization

and bio-composites application—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 789–804

Rao, M. B., Tanksale, A. M., & Ghatge, M. S. & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597–635

Schieber A, Stintzing FC, Carle R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds-Recent developments. *Trends Food Sci Technol*. 2001; 12:401-413

Schundehutte, K in K, Venkataraman (ed), In *The chemistry of synthetic dyes*, vol 6, Academic Press, New York, 1972, pp 211-325

Sekine, M, Hashimoto, Y, Suzuki, M , Inagaki, F , Takio, K and Suzuki, A (1994) 269, 31143-31148

Selmane, D., Christophe, V., Gholamreza, D., 2008. Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: io of operating conditions on functional properties. *Meat Sci*. 79 (4), 640–647

Şenel, S., Say, R., Arica, Y., & Denizli, A. (2001). Zinc ion-promoted adsorption of lysozyme to Cibacron Blue F3GA-attached microporous polyamide hollow-fiber membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 182(1–3), 161–173

Shadana, A and Beelaram, A (1994) *Bioseparation*, 4, 221-235

Sheih, I.-C., Wu, T.-K., Fang, T.J., 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresour. Technol*. 100 (13), 3419–3425

Shiosaki, A , Matonobu, G andTsutamu, H (1994) *J Chromatog* 679,1-9

Shoa, X., (2007). *Cellulosic Biomass to Ethanol: kinetic Modeling, Scale Up and Reactor Design*. Ph D. Thesis, Dartmouth College,China

Sicherer SH, Sampson HA. 2014. Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 133:291–307

Skopec, C. E., Himmel, M. E., Matthews, J. F., & Brady, J. W. (2003). Energetics for displacing a single chain from the surface of microcrystalline cellulose into the active site of *Acidothermus cellulolyticus* Cel5A. *Protein Engineering Design and Selection*, 16(12), 1005–1015

Somers, W, Smolders, A , Beverloo, W , Rozie, H , Visser, J , Rombouts, F and Riet, K (1994) *Bioseparation*, 4,285-298

Souza, A. G. de, Kano, F. S., Bonvent, J. J., & Rosa, D. dos S. (2017). Cellulose Nanostructures Obtained from Waste Paper Industry: A Comparison of Acid and Mechanical Isolation Methods. *Materials Research*, 20(suppl 2), 209–214

Souza, Alana Gabrieli de, Kano, Fabiany Sayuri, Bonvent, Jean Jacques, & Rosa, Derval dos Santos. (2017). Cellulose Nanostructures Obtained from Waste Paper Industry: A Comparison of Acid and Mechanical Isolation Methods. *Materials Research*, 20(Suppl. 2), 209-214. Epub June 29, 2017

Souza, P. M., Werneck, G., Aliakbarian, B., Siqueira, F., Ferreira Filho, E. X., Perego, P., Junior, A. P. (2017). Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 1103–1110

Squires EJ, Haard NF, Feltham LA (1986) Gastric proteases of the Greenland cod *Gadus ogac*. I. Isolation and kinetic properties. *Biochem Cell Biol* 64: 205- 214

Stead, CV (1987) In *Reactive Dyes in Protein and Enzyme Technology* (Clonis, YD, Atkinson, T , Bruton, S and Lowe, C , eds), Macmillan Press, Basingstoke, pp 13 32

Stewart, D. J., Hughes, P., & Lowe, C. R. (1989). Affinity chromatography on triazine dyes immobilized on novel perfluorocarbon supports. *Journal of Biotechnology*, 11(2–3), 253–265

Šturcová, A., His, I., Apperley, D. C., Sugiyama, J., & Jarvis, M. C. (2004). Structural Details of Crystalline Cellulose from Higher Plants. *Biomacromolecules*, 5(4), 1333–1339

Subramanian, S and Kaufman, B (1980) *J Biol Chem*, 255,10587-10570

- Sun, R.C., Hughes, S., (1998). Fractional extraction and physico-chemical characterization of hemicelluloses and cellulose from sugar beet pulp, *Carbohydr. Polym.*, 36, 293–299
- Sutkeviciute, I., Sereikaite, J., & Bumelis, V.-A. (2008). Analysis of Cibacron blue F3G-A interaction with therapeutic proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 22(9), 1001–1007
- Takagi, H., Nakagaito, A. N., & Bistamam, M. S. A. (2013). Extraction of cellulose nanofiber from waste papers and application to reinforcement in biodegradable composites. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 32(20), 1542–1546
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1–11
- Tavano, O. L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 412–436
- ThümmLer, K., Fischer, S., Feldner, A., Weber, V., Ettenauer, M., Loth, F., & Falkenhagen, D. (2010). Preparation and characterization of cellulose microspheres. *Cellulose*, 18(1), 135–142
- Thys, R.C.S., Brandelli, A. (2006). Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. *J.Appl. Microbiol.* 101, 1259–1268
- Tsamadis, G , Papageorgakopoulou, N and Clonis, Y (1992) *Bioproc Eng* , 7,213-218
- Vadivel, V., Moncalvo, A., Dordoni, R., & Spigno, G. (2017). Effects of an acid/alkaline treatment on the release of antioxidants and cellulose from different agro-food wastes. *Waste Management*, 64, 305–314
- Wald, S., Wilke, C. R., Blanch, H. W., (1984). Kinetics of the Enzymatic- Hydrolysis of Cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 221-230
- Weiner, P , Langridge, R , Blaney, J Schaefer, R and Kollman, P (1982) *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 79, 3754-3758

White JS, Yohannan BK, Walker GM. Bioconversion of brewers spent grain to bioethanol. *FEMS Yeast Res.* 2008; 8(7):1175-1184

Wu, X , Li, X , Chu, A and Liu, G (1996) *Int Symp Bioanal Chem Proc* pp 102-103

Yu, B., Chen, H. Z., (2010). Effect of the ash on enzymatic hydrolysis of steam exploded rice straw, *Bio. Tech.*, 101, 9114-9119

Zaldivar J , Nielsen J , Olsson L (2001). Fuel ethanol production

Zhang, X.-Z., & Zhang, Y.-H. P. (2013). Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. In *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers* (pp. 131–146). John Wiley & Sons, Inc

Zhao L, Budge SM, Ghaly AE, Brooks MS, Dave D (2011) Extraction, Purification and Characterization of Fish Pepsin: A Critical Review. *J Food Process Technol* 2:126

Zhou Q, Fu X, Zhang L, Su W, Cao M Purification and characterization of sea bream (*Sparus latus* Houttuyn) pepsinogens and pepsins. *Food Chem* 103: 795-801

