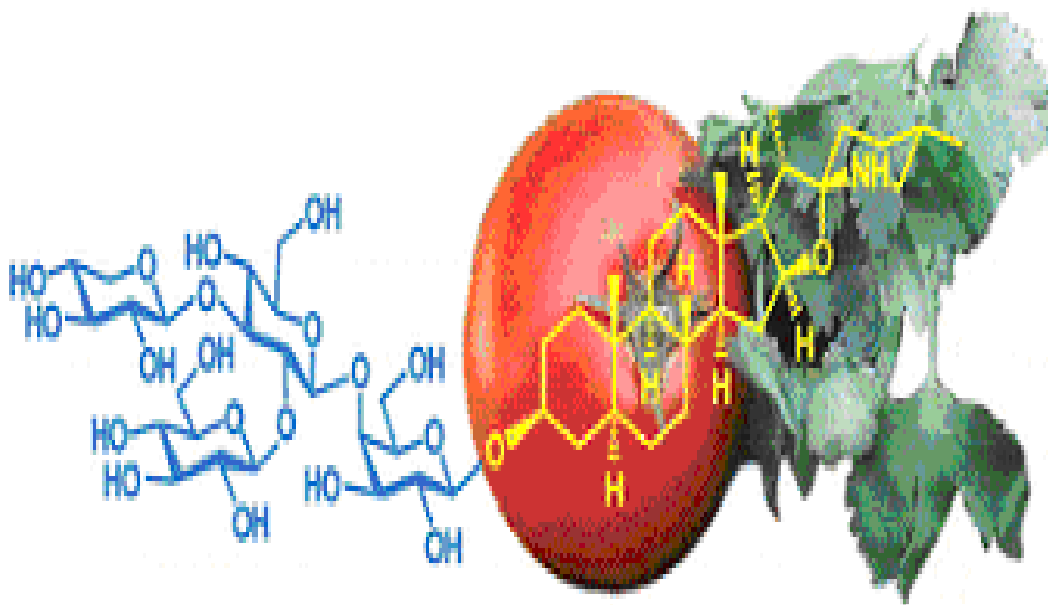


ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ
ΤΟΜΑΤΙΝΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ *Fusarium solani* ΣΤΕΛΕΧΟΣ
FsK.



ΣΤΑΜΑΤΟΥΛΑ ΑΡΓΥΡΗ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. Εισαγωγή	σελ.4
A.1. Μύκητες.....	σελ.4
A.1.1. Φυτοπαθογόνοι μύκητες.....	σελ.6
A.1.2.Είσοδος στον ξενιστή.....	σελ.7
A.1.3.Μικροοργανισμοί για τον έλεγχο των φυτών.....	σελ.8
A.1.4 Μη παθογόνοι μύκητες.....	σελ.9
A,1.4.1 Επαγόμενη ανθεκτικότητα που προκαλείται από φυτοπροστατευτικούς οργανισμούς.....	σελ.10
A.2. Μηχανισμοί άμυνας φυτικών οργανισμών.....	σελ.10
A.2.1. Θεμελιώδης άμυνα.....	σελ.11
A.2.2. Επαγόμενη άμυνα.....	σελ.12
A.3. Επαγόμενη προστασία μέσω του <i>Fusarium solani</i> (Fsk).....	σελ.12
A.4.Σαπωνίνες-τοματίνη.....	σελ.14
A.5.1. Γλυκοσιδάσες.....	σελ.15
A.5.2. Τοματινάση.....	σελ.19
A.6. Αρχές ενζυμικής κινητικής.....	σελ.21
B. Σκοπός της εργασίας.....	σελ.23
Γ. Υλικά και Μέθοδοι.....	σελ.24
Γ.1. Απομόνωση τοματινάσης από το μύκητα Fsk.....	σελ.24
Γ.1.2.Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών-Μέθοδος Bradford..	σελ.25
Γ.2. Καθαρισμός ενζύμου μέσω διαπίδυσης.....	σελ.26
Γ.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	σελ.28
Γ.4. TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας).....	σελ.30
Γ.5. Tomatinase Assay με συνθετικό υπόστρωμα PNG.....	σελ.32
Γ.5.1. Εύρεση βέλτιστων συνθηκών της ενζυμικής αντίδρασης.....	σελ.32
Γ.5.2. Υπολογισμός των τιμών Km και V_{max} για το ανάλογο υποστρώματος PNG.....	σελ.32

Γ.6. Tomatinase assay activity με DNS.....σελ.33	σελ.33
Γ.7. Tomatinase assay activity με αντιδραστήριο Somogyi-Nelson.....σελ.34	σελ.34
Δ.Αποτελέσματα.....σελ.37	σελ.37
Δ.1. Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών-Μέθοδος Bradford...σελ.37	σελ.37
Δ.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....σελ.38	σελ.38
Δ.3.TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας).....σελ.39	σελ.39
Δ.4. Εύρεση βέλτιστου pH της ενζυμικής αντίδρασης.....σελ.40	σελ.40
Δ.5. Επεξεργασία κινητικών δεδομένων Τοματινάσης.....σελ.40	σελ.40
Ε. Συζήτηση.....σελ.46	σελ.46
ΣΤ. Βιβλιογραφία.....σελ.48	σελ.48

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνος καθηγητής :

Κοντού Μαρία, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Τριμελής επιτροπή :

Κοντού Μαρία, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Νόλης Ηλίας, Διδάσκων σύμφωνα με το Π.Δ. 407/80.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή για την υπόδειξη και την παρακολούθηση του θέματος, για την καθοδήγηση, για τις χρήσιμες συμβουλές και για τη στήριξή τους στην πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Καρούλια Ζωή και Κατσαρού Δήμητρα και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Καντσάδη Αναστασία για την βοήθειά τους, τις παρατηρήσεις τους και τα εύστοχα σχόλιά τους καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Λειτουργικής Βιοχημείας για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Μύκητες

Οι μύκητες αποτελούν ένα ξεχωριστό βασίλειο από τα πέντε των έμβιων όντων, που περιλαμβάνει μονοκύτταρους και πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι οποίοι στερούνται χλωροφύλλη. Οι μύκητες εμφανίζουν τεράστια ποικιλία και υπάρχουν παντού. Οι περισσότεροι βρίσκονται στο έδαφος, στα φυτά και τρέφονται από ανόργανα συστατικά των ζώντων ή νεκρών οργανισμών. Για το λόγο αυτό θεωρούνται το « βασικό εργαστήριο αποικοδόμησης των οργανικών ουσιών».

Είναι οργανισμοί με εύκαμπτα κυτταρικά τοιχώματα, με δομική μονάδα στους πολυκύτταρους μύκητες, την μυκηλιακή υφή. Οι μυκηλιακές υφές αποτελούν το σώμα ή θαλλό (thallus) του μύκητα. Τα είδη, αλλά και ο πληθυσμός που συναντώνται στο έδαφος, καθορίζονται κυρίως από τον αερισμό, την υγρασία, το pH, τη θερμοκρασία αλλά και την οργανική ουσία που παρέχεται για την ανάπτυξή τους. Σε όλα τα εδάφη υπάρχουν όλες σχεδόν οι τάξεις των μυκήτων. Συνήθως είναι αερόβιοι οργανισμοί, εκτός από μερικές ζύμες που είναι προαιρετικά αναερόβιες, και μπορούν να παράγουν ενέργεια μέσω των ζυμώσεων.

Σύμφωνα με μελέτη του Prescott et al (1999), υπάρχουν περίπου 1,5 εκατομμύρια είδη μυκήτων ενώ έχουν καταγραφεί και μελετηθεί πάνω από 90.000 είδη. Μεγάλη είναι η συμβολή των μυκητών στην αποικοδόμηση των οργανικών ουσιών και στην ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων στο περιβάλλον.

Ανάλυση της αλληλουχίας του 18S rRNA και άλλων 25 πρωτεϊνών έδειξε ότι οι μύκητες είναι περισσότερο συγγενικοί με τα ζώα παρά με φυτά, γεγονός που υποστηρίζεται από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους (Baldauf et al 1993). Οι μύκητες και τα ζώα χρησιμοποιούν χιτίνη, γλυκογόνο και τρεχαλόζη ουσίες που απουσιάζουν από τα φυτά τα οποία χρησιμοποιούν αντίστοιχα κυτταρίνη, άμυλο και σακχαρόζη (Wessels et al 1999).

Πάνω από το 25% των γνωστών ασκομυκήτων συμμετέχουν σε ένα γνωστό συμβιωτικό φαινόμενο με τα κυανοπράσινα φύκη, που οδηγεί στο σχηματισμό των

λειχηνών. Στην φύση το 95% των φυτών συμβιώνει με μύκητες στο ριζικό τους σύστημα, σχηματίζοντας μια δομή που είναι γνωστή ως μυκόρριζα. Πέρα από την συγγένεια και τις συμβιωτικές σχέσεις, όσο αναφορά τα ζώα, τα φυτά και άλλους μικροοργανισμούς, οι μύκητες λειτουργούν ή δρουν ανταγωνιστικά, σαπροφυτικά, παρασιτικά και συχνά μολυσματικά.

Ένζυμα όπως γλυκοαμυλάσες, πηκτινάσες, πρωτεάσες, λιπάσες, οργανικές ενώσεις όπως το κιτρικό οξύ, το ασκορβικό οξύ, η αιθανόλη, η ακετόνη κτλ, αντιβιοτικά, εμβόλια και φάρμακα αποτελούν προϊόντα των μυκητών. Επίσης οι μύκητες συμμετέχουν στις διαδικασίες παράγωγης ψωμιού, μπύρας, κρασιού, γιαουρτιού και τυριών. Παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην αποσύνθεση φυτικών κυρίως οργανικών υπολειμμάτων και συμβάλουν στην διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους. Η βιοτεχνολογική τους αξιοποίηση οδήγησε στην παραγωγή αλκοόλης, στην παραγωγή πρωτεϊνών για ζωοτροφές, αλλά παράγωγά τους χρησιμοποιούνται και ως ανθρώπινη τροφή, ενώ έχουν απομονωθεί και πρωτεΐνες υψηλής ιατροφαρμακευτικής αξίας. Οι μύκητες είναι παθογόνοι για τα φυτά (πάνω από 5.000), για τα ζώα και για τον άνθρωπο. Προσβάλλουν την ξυλεία, τα ρούχα, τα έργα τέχνης, τα μέταλλα και τα τρόφιμα. Πολλοί μύκητες παράγουν τοξίνες (αφλατοξίνη, ωχρατοξίνη κτλ) που σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις, βλάβες στο ήπαρ και στους νεφρούς και οδηγούν τελικά θάνατο. Κάποιοι άλλοι μύκητες έχουν παραισθησιογόνα δράση.

Η ικανότητα των μυκήτων να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂, έχει ως αποτέλεσμα την κατακόρυφη διανομή τους στο έδαφος. Περιορισμένες είναι οι γνώσεις μας σχετικά την πληθυσμιακή τους δυναμική, με την κοινοτική τους δομή και την ποικιλότητα. Ο χρόνος ζωής των μυκήτων ποικίλει ανάλογα με τον ελεύθερο χώρο που διαθέτουν για να αναπτυχθούν και θρεπτικά συστατικά, αναπτύσσονται. Η πλειονότητα όμως της ενεργούς μυκητοχλωρίδας εντοπίζεται στους ατελείς μύκητες και συγκεκριμένα στα γένη *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Cladosporium* και *Fusarium* και στους φυκομύκητες *Mucor*, *Rhizopus* και *Mortierella*. Η σύνθεση των μυκήτων στο έδαφος, ελέγχεται από την ποσότητα και τη μορφή του άνθρακα. Έτσι, τα *Penicillia*, σε γενικές γραμμές, αποικοδομούν κυτταρίνη και ξυλάνες, ενώ η συχνότητα εμφάνισης των *Mucorales*, τα οποία αποικοδομούν πρωτεΐνες, αυξάνεται με την εντατικοποίηση της διαδικασίας της αποσύνθεσης και της ανοργανοποίησης στο έδαφος. Ο *Mucor hiemalis f. hiemalis*, εξαιτίας της ταχύτητας ανάπτυξης του, αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς μύκητες

του εδάφους, γι αυτό και αποτελεί τον αντιπροσωπευτικό μύκητα της οικογένειας *Mucorales* (*Zygomycotina*).

1.1. Φυτοπαθογόνοι μύκητες

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες, αν και αποτελούν τη μειοψηφία των μυκήτων, είναι σε θέση να προκαλέσουν ολικές καταστροφές στα φυτά. Η προσβολή του ξενιστή εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες: Τις συνθήκες του περιβάλλοντος και την ευπάθεια του ξενιστή, οι οποίοι καθορίζουν την έναρξη της προσβολής και της ασθένειας. Οι περισσότεροι φυτοπαθογόνοι μύκητες εισέρχονται στον ξενιστή είτε με ένα συνδυασμό μηχανικής πίεσης και ενζύμικης δράσης σχηματίζοντας ειδικές δομές τα απρεσσόρια, είτε από τα στόματα των φυτών (παράσιτα αδυναμίας). Υπολογίζονται περίπου 6.500 είδη μυκήτων που αποτελούν υποχρεωτικά παράσιτα των ανώτερων φυτών. Τα μη υποχρεωτικά παράσιτα είναι πολύ περισσότερα. Ένα μόνο γένος των Αδηλομυκήτων, το γένος *Cercosora*, διαθέτει 1200 παρασιτικά είδη. Σε κάποιους από τους κατώτερους μύκητες δε διακρίνεται κυτταρικό τοίχωμα σε όλη ή σε ένα μέρος της διάρκειας του βιολογικού τους κυκλού.

Η ευαισθησία, η ανεκτικότητα ή η ανθεκτικότητα των φυτών απέναντι στα παθογόνα στελέχη συνιστά εξελικτική διαδικασία με έντονη την επίδραση και αλληλεπίδραση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Η άμυνα των φυτών καθορίζεται από τα γονίδια και το περιβάλλον. Τα γονίδια συμβάλουν με την έκφραση αντιμυκητιακών και αντιβακτηριακών πρωτεϊνών στην ενδογενή άμυνα του φυτού, ενώ το περιβάλλον και ειδικά η θερμοκρασία και η υγρασία καθορίζουν αν οι συνθήκες θα είναι ευνοϊκές ή όχι για μια μόλυνση. Η παρουσία θρεπτικών και η απουσία τοξικών ουσιών, στο σημείο προσβολής, είναι ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας άμυνας των φυτών απέναντι στους μύκητες.



Εικόνα 1^η: Προσβεβλημένο φυτό από μύκητα.

1.2.Είσοδος στον ξενιστή

Οι πρωτογενείς μολύνσεις στα καλλιεργούμενα φυτά δημιουργούνται από υπάρχοντα σκληρώτια στο έδαφος. Τα σκληρώτια είναι μαύρα ακανόνιστα αναπαραγωγικά σώματα, μέσω των οποίων επιβιώνει ο μύκητας στο έδαφος για πολλά χρόνια. Τα σκληρώτια είναι βλαστικές δομές που έχουν σχηματιστεί από μια πυκνή μάζα μυκηλίου, η οποία καλύπτεται και προστατεύεται από ένα στρώμα διαφοροποιημένων κυττάρων που αποτελούν το φλοιό. Έχει υπολογιστεί ότι το 90% του κύκλου ζωής του μύκητα είναι υπό μορφή σκληρωτίου στο έδαφος (Adams et al 1979).



Εικόνα 2^η: Σκληρώτια του μύκητα.

Τα σκληρώτια βλαστάνουν είτε μυκηλιογενώς και μολύνουν τις ρίζες, τους βλαστούς ή τα φύλλα που βρίσκονται σε επαφή με το έδαφος, είτε καρπογένως παράγοντας αποθήκια και ελευθερώνοντας ασκοσπόρια, τα οποία μολύνουν το βλαστό, τα άνθη και τα φύλλα. Πολλές φορές η βλάστηση των σκηρομάτων μπορεί να γίνει και με τους δυο τρόπους. Στην εδαφογραμμή οι μολύνσεις γίνονται είτε με τα ασκοσπόρια είτε με το μυκήλιο (Adams et al 1979).

Μηχανικά τραύματα και τραυματισμοί από έντομα σε λαχανικά παρέχουν θέσεις εισόδου για το μύκητα. Η προσβεβλημένη περιοχή αποκτά πράσινο βαθύ χρώμα ή υδατώδη εμφάνιση και λίγο αργότερα κιτρινίζει. Ακολούθως εμφανίζει λευκό βαμβακώδες μυκήλιο που εξαπλώνεται στα υγιή σημεία του φύτου (Dillard et al 1995).

1.3.Μικροοργανισμοί για τον έλεγχο των ασθενειών των φυτών

Δεκάδες ωφέλιμοι μικροοργανισμοί που ονομάζονται ανταγωνιστές, (μεταξύ των οποίων είναι και τα μυκοπαράσιτα) έχουν δοκιμαστεί για τον έλεγχο ασθενειών στο ριζικό σύστημα και κυρίως των ασθενειών που προσβάλλουν το υπέργειο τμήμα και τους καρπούς των καλλιεργούμενων φυτών. Μερικοί από τους πιο διαδεδομένους παθογόνους μικροοργανισμούς είναι: *Trichoderma spp*, *subtilis*, *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas cepacia*, *Streptomyces griseoviridis*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, , *Coniothyrium minitans*, *Verticillium lecanii*, *Myrothecium verrucaria*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium rabacterium*, *Pseudomonas cepacia*, *Streptomyces griseoviridis*. Μη παθογόνα

στελέχη είναι τα *Fusarium* και *Phlebia gigantean*. Ο τελικός έλεγχος που δίνουν σε κάποιες περιπτώσεις αγγίζει το 80%.

Οι μηχανισμοί μέσα από τους οποίους οι ανταγωνιστές επιτυγχάνουν τον έλεγχο ενάντια σε παθογόνα είναι : ο ανταγωνισμός για θρεπτικά μέσα , για χώρο και πιθανόν για νερό και οξυγόνο, η παραγωγή αντιβιοτικών, τοξινών, υδρολυτικών ενζύμων και σχηματισμός biofilm (El-Tarabily et al 2000).

1.4.Μη παθογόνοι μύκητες

Η παρουσία ωφέλιμων μη παθογόνων μικροοργανισμών στο ριζικό σύστημα των φυτών έχει πολλές φορές θετικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των φυτών. Οι μυκόρριζες παρέχουν νερό και θρεπτικά στοιχεία στον ξενιστή. Τα υπεύθυνα για την προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών ριζοβακτηρίδια, παράγουν και παρέχουν στα φυτά φυτοορμόνες. Επίσης τα μυκοπαράσιτα/ανταγωνιστές παρέχουν προστασία στο ριζικό σύστημα από φυτοπαθογόνα μικρόβια. Τέλος, η παρουσία τους συχνά υποκινεί αντιδράσεις άμυνας μέσα από μια διαδικασία γνωστή ως επαγόμενη συστηματική ανθεκτικότητα, η οποία είναι ένας νέος σχετικά και σημαντικός μηχανισμός άμυνας των φυτών. Αν και δεν είναι απολύτως ξεκάθαρο, το πιθανότερο είναι να παράγονται αντιμικροβακοί παράγοντες όπως είναι οι φυτοαλεξίνες, ενώ φαίνεται να έχουν άμεση σχέση με το σαλικυλικό οξύ, με την αυξημένη δράση της χιτινάσης τις περοξειδάσης καθώς και με την εναπόθεση της λιγνίνης.

Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί, που προστατεύουν το ριζικό σύστημα των φυτών διαθέτουν μια σειρά από μηχανισμούς, μέσω των οποίων αναστέλλουν την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών ή προκαλούν ακόμα και την καταστροφή τους. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς είναι τα αντιβιοτικά, οι τοξίνες, ο παρασιτισμός, ο ανταγωνισμός για τα θρεπτικά και το χώρο και η επαγόμενη συστηματική ανθεκτικότητα (Koiike et al 2001).

1.4.1.Επαγόμενη Ανθεκτικότητα που προκαλείται από φυτο-προστατευτικούς οργανισμούς

Επαγόμενη ανθεκτικότητα μπορεί να προκληθεί και από μη παθογόνους μικροοργανισμούς. Έτσι, σε φυτά τομάτας που εφαρμόστηκε ο *Bacillus subtilis* στο ριζικό τους σύστημα είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση έως και 50% του παρασιτισμού από τον *Phytophthora infestans*. Παράλληλα σε φυτά φασολιού χρησιμοποιήθηκε ο *Pseudomonas aeruginosa* οποίος παράγει σαλικυλικό οξύ, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα κατά του *Botrytis cinerea* στα φυτά του φασολιού. Ακόμη, ένα μείγμα από ριζοβακτήρια που επάγουν την αύξηση του φυτού (plant-promoting rhizobacteria [PGPR]) (*Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Curtobacterium flaccumfaciens*) μελετήθηκε για την αποτελεσματικότητά τους ενάντια παθογόνων μικροοργανισμών που προσβάλουν το φύλλωμα στο αγγούρι. Μέσω της επαγόμενης συστηματικής ανθεκτικότητας (induced systemic resistance) παρατηρήθηκε καταστολή της γωνιώδους κηλίδωσης (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) και της ανθράκωσης (*Colletotrichum orbiculare*). Ομοίως θετικά αποτελέσματα κατά της ανθράκωσης, της γωνιώδους κηλίδωσης και της μάρανσης από *Fusarium* στο αγγούρι παρατηρήθηκε ύστερα από εφαρμογή μυκήτων που επάγουν την αύξηση του φυτού (plant growth promoting fungi-PGPF). Οι PGPF οδήγησαν άμεσα ή έμμεσα στην επαγόμενη συστηματική ανθεκτικότητα των φυτών τομάτας κατά του *Erwinia tracheiphila* καθώς επίσης και κατά των cucumber mosaic virus (CMV) και tomato mottle virus (ToMoV)3.

2.Μηχανισμοί άμυνας φυτικών οργανισμών

Στα φυσικά οικοσυστήματα τα φυτά βρίσκονται συνεχώς σε επαφή με ένα εχθρικό βιοτικό περιβάλλον. Βακτήρια, ιοί, μύκητες, νηματώδεις, ακάρεα, έντομα, φυτοφάγα ζώα, συγκροτούν ένα μακρύ κατάλογο απειλητικών για την επιβίωση εχθρών. Δεδομένου ότι τα φυτά αδυνατούν να αντεπεξέλθουν στις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος με τη φυγή, αναγκάστηκαν μέσω της εξέλιξης να εφοδιαστούν με μηχανισμούς για την επιβίωση τους. Οι φυτικοί οργανισμοί επιτυγχάνουν να επιβιώσουν από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις μέσω φυσικών

παρεμβαλλόμενων αμυντικών φραγμάτων, όπως η επιδερμίδα και η εφυμενίδα, αλλά και μέσω της βιοχημικής σύνθεσης ενώσεων που μπορεί να είναι τοξικές ή/και αποτρεπτικές για τα παθογόνα. Η άμυνα των φυτών είναι δυο ειδών:

- 1^ο) Θεμελιώδη προϋπάρχουσα άμυνα
- 2^ο) Επαγόμενη άμυνα

2.1.Θεμελιώδης άμυνα

Οι φυτικοί οργανισμοί αναπτύσσουν μόνιμους μηχανισμούς προστασίας μέσω της δομής τους. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι μορφολογικοί χαρακτήρες, όπως η επιδερμίδα και τα εξαρτήματά της (άκανθές, τρίχες κ.α.). Η κουτίνη και οι κηροί της εφυμενίδας των υπέργειων οργάνων, καθώς και η σουβερίνη, που καλύπτει κυρίως τα υπόγεια όργανα, αποτελούν βασικό τμήμα της θεμελιώδους άμυνας. Με αυτόν τον τρόπο οι δευτερογενείς μεταβολίτες συσσωρεύονται σε περιοχές πάνω ή κοντά στην επιφάνεια των φυτών.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οργανικά μόρια, η σύνθεση των οποίων δεν φαίνεται να σχετίζεται ευθέως με τις ανάγκες της αύξησης και της ανάπτυξης των φυτών. Αρχικά, θεωρήθηκε πως τα οργανικά αυτά μόρια αποτελούν προϊόντα μεταβολικής δραστηριότητας που δε σχετίζονται με φυσιολογικές λειτουργίες ζωτικής σημασίας και χαρακτηρίστηκε ως μια δευτερεύουσα σημασίας δραστηριότητα (Kumiko et al 2006).

Η θεμελιώδη άμυνα μπορεί να προσαρμόζεται, όχι μόνο σε καταπονήσεις, αλλά και στις διάφορες συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον. Μεγάλη επίδραση στη διαμόρφωση της θεμελιώδους άμυνας έχει η εποχή, το στάδιο της ανάπτυξης και το είδος του οργάνου (Lincoln Taiz et al 2002) . Μια σημαντική συνεισφορά στην άμυνα ενός φυτικού οργανισμού έχουν και οι απονεκρωμένοι ιστοί, στους οποίους, όμως, σε κάποια στάδια της ανάπτυξης συσσωρεύονται δευτερογενείς μεταβολίτες, συνήθως φαινολικές ουσίες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το εγκάρδιο ξύλο του κορμού ορισμένων δένδρων, καθώς και ορισμένα επιδερμικά εξαρτήματα. Τέλος, έχει διαπιστωθεί ότι τα νεαρά φύλλα θωρακίζονται με υψηλότερη συγκέντρωση δευτερογενών μεταβολιτών, ενώ οι καρποί εμφανίζουν μειωμένη

αμυντική προστασία, καθώς η κατανάλωση τους αποτελεί συνήθως μέρος της διαδικασίας εξάπλωσης του είδους.

2.2. Επαγόμενη άμυνα

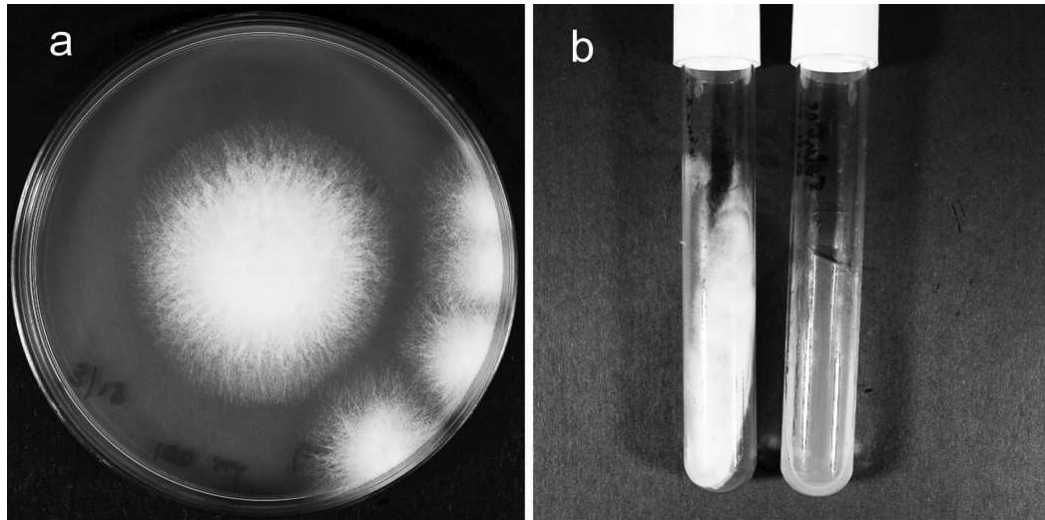
Μετά την προσβολή από παθογόνους εισβολείς, στο φυτικό κύτταρο αρχίζει μια σειρά από χημικές αντιδράσεις για την προστασία του. Οι επαγόμενοι αμυντικοί μηχανισμοί αποτελούνται από τις παρακάτω διεργασίες:

1. Σύνθεση φυτοαλεξινών από τα προσβεβλημένα κύτταρα του φυτού. Είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι τοξικές για τους παθογόνους εισβολείς.
2. Αντίδραση υπερευαισθησίας δηλαδή νέκρωση των προσβεβλημένων κυττάρων με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ώστε να μην εξαπλωθεί η μόλυνση σε όλο το φυτό.
3. Παραγωγή μορίων-σημάτων συναγερμού όπως οξείδιο του αζώτου, σαλικυλικό, γιασμονικό, βενζοϊκό οξύ και αιθυλένιο.
4. Ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων.
5. Σύνθεση νέων πρωτεϊνών όπως οι λεκτίνες και οι χιτινάσες, που στοχεύουν στην εξουδετέρωση του παθογόνου.

3.Επαγόμενη προστασία μέσω του *Fusarium solani* (FsK)

Ο *Fusarium solani* είναι ένας μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας που εντοπίζεται στο έδαφος και σε φυτικούς οργανισμούς. Απομονώθηκε από ένα επισχετικό compost από υπολείμματα στεμφύλων και παραπροϊόντων ελαιουργίας. Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφανίζει την ικανότητα να επιφέρει στα φυτά της τομάτας ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα του φυλλώματος *Septoria lycopersici* (Olivain et al 1998) . Ο μύκητας προστατεύει επίσης τοπικά το φυτό έναντι της προσβολής από το ριζομύκητα σήψης *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici* (Kavroulakis et al 2007) μέσω του μηχανισμού άμυνας που εμπλέκεται το αιθυλένιο. Ο *Fusarium solani*, όπως και άλλοι μύκητες παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα. Κάποια από αυτά παρουσιάζουν μεγάλο ερευνητικό

ενδιαφέρον και είναι γνωστά ως τοματινάσες. Οι τοματινάσες του *Fusarium solani* και του *Fusarium oxysporum* διασπούν την β1-συνδεδεμένη γαλακτόζη και απελευθερώνουν την β-lycotetraose και την τοματιδίνη (Roldan-Arjona et al 1999) .



Εικόνα 3^η: *Fusarium solani*.

Βασίλειο	Μύκητας
Φύλο	Ασκομύκητας
Τάξη	Hypocreales
Οικογένεια	Hypocreaceae
Γένος	Fusarium

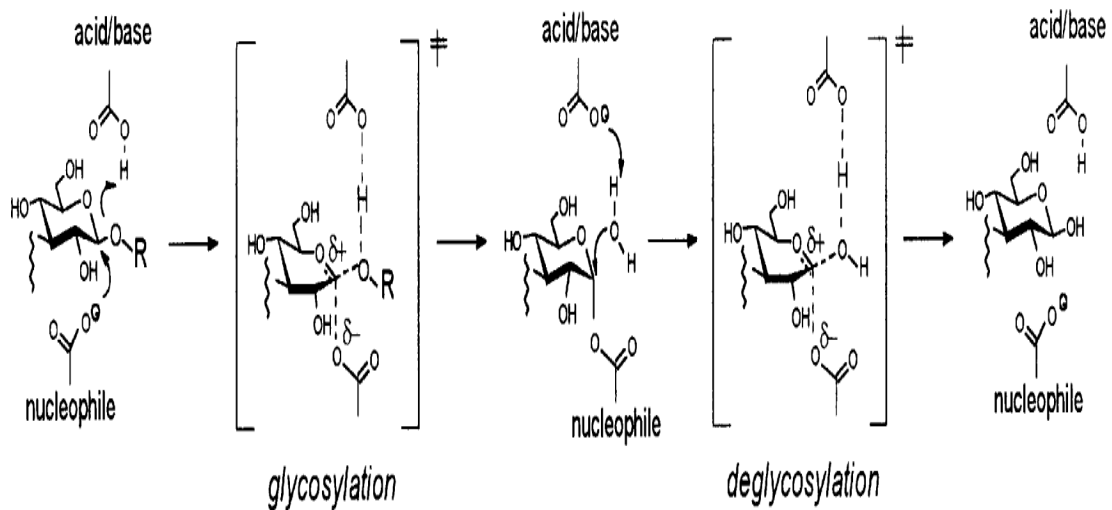
Πίνακας 1^{ος}: Χαρακτηριστικά *Fusarium solani*.

4.Σαπωνίνες-τοματίνη

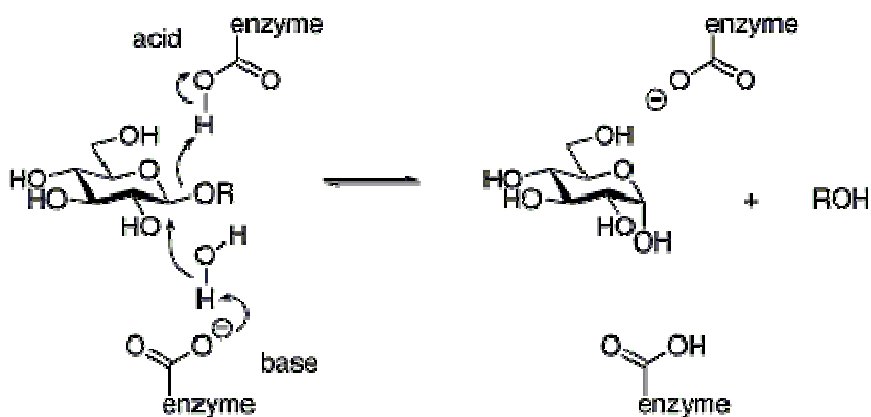
Οι σαπωνίνες αποτελούνται από ένα άγλυκο (aglucone) τμήμα που έχει δομή είτε στερεοειδούς, είτε τριτερπενοειδούς και συνδέεται με ένα ή περισσότερα σάκχαρα. Σχηματίζουν συμπλέγματα με τις στερόλες των μεμβρανών, οι οποίες φέρουν ελεύθερες 3β-υδροξυστερόλες. Το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η απώλεια της σταθερότητας των μεμβρανών, η αύξηση της διαπερατότητας τους και η επακόλουθη διαρροή των ηλεκτρολυτών (Sandrock et al 1995). Η α-τοματίνη είναι μια σαπωνίνη που εμποδίζει την ανάπτυξη των μυκήτων, αφού είναι τοξική γι' αυτούς. Παράγεται στο φυτό της τομάτας και είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης. Η συγκέντρωση της α-τοματίνης είναι ικανή να προστατεύσει τις υγιείς τομάτες από το μύκητα. Βρίσκεται στα φύλλα, τις ρίζες και τον κορμό του φυτού, ενώ υπάρχει και στα ανώριμα φρούτα. Παρουσιάζει υδρόφοβο χαρακτήρα και έχει αιμολυτικές και χολιστερολικές ιδιότητες για το μύκητα. Τέτοιου είδους σαπωνίνες μπορεί να συναντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε υγιείς φυτικούς οργανισμούς. Πρόσφατα ο όρος φυτοαντισιπίνες (phytoanticipin) έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει τις σαπωνίνες και άλλα χαμηλού μοριακού βάρους αντιμικροβιακά μόρια, τα οποία παράγονται σαν μέρος της φυσιολογικής ανάπτυξης των φυτών και μπορεί να παίζουν ρόλο στην προστασία τους από παθογόνους παράγοντες (Banetten et al 1994). Αυτός ο όρος έχει χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό τους από τα παθητικά παραγόμενα αντιμικροβιακά μόρια που συνθέτονται de novo ως απόκριση στην μικροβιακή μόλυνση.

σακχάρου. Αυτή η βάση βρίσκεται πιο μακριά στην περίπτωση αναστροφής, όπου ένα μόριο νερού θα πρέπει να βρίσκεται μεταξύ της βάσης και του σακχάρου.

Αυτή η διαφορά οδηγεί σε μια μέση απόσταση μεταξύ των δύο καταλυτικών καταλοίπων της τάξης των 5.5 Å στα ένζυμα που χρησιμοποιούν το μηχανισμό της διατήρησης, ενώ στα ένζυμα που χρησιμοποιούν τον μηχανισμό της αναστροφής φτάνουν σε μια απόσταση των 10 Å (Gideon Davies et al 1995).



Εικόνα 5^η : Μηχανισμός διατήρησης..



Εικόνα 6^η : Μηχανισμός αναστροφής..

Έχει προταθεί μια κατάταξη των γλυκοσιδάσων σε οικογένειες με βάση την ομοιότητα τους στην αμινοξιδελική τους αλληλουχία, ώστε να διευκολυνθεί η συλλογή χρήσιμων πληροφοριών για τη δομή και την λειτουργία των ενζύμων αυτών. Με βάση αυτή την κατάταξη, ένζυμα με διαφορετική ειδικότητα για υποστρώματα βρίσκονται μερικές φορές στην ίδια οικογένεια, υποδεικνύοντας μια εξελικτική απόκλιση για την δημιουργία νέων ιδιοτήτων. Από την άλλη, ένζυμα τα οποία υδρολύουν το ίδιο υπόστρωμα μπορεί μερικές φορές να βρεθούν σε διαφορετικές οικογένειες. Επειδή η τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών αυτών είναι περισσότερο συντηρημένη από ότι οι αλληλουχίες τους, διαφορετικές οικογένειες βασιζόμενες στην αλληλουχία μπορεί να έχουν συναφείς αναδιπλώσεις.

Μελέτες έχουν δείξει (Orego et al 1994) ότι συγκεκριμένες αναδιπλώσεις πρωτεϊνών εμφανίζονται πολύ συχνότερα από τις άλλες. Συγκεκριμένα μόνο εννέα από αυτές είναι επαρκείς για να περιγράψουν την αναδίπλωση στο 30% του συνόλου των πρωτεϊνών. Μέχρι στιγμής από της είκοσι δύο οικογένειες των γλυκοσιδάσων των οποίων η 3D δομή έχει βρεθεί οι έννια από αυτές ανήκουν στον τύπο TIM barrel. Συγκρίνοντας τις αλληλουχίες διαφορετικών οικογενειών γλυκοσιδάσων παρατηρούμε ότι μοιράζονται την ίδια αναδίπλωση, προτείνοντας έτσι ότι για τις γλυκοσιδάσες η προτίμηση προς κάποια αναδίπλωση είναι εξίσου σημαντική.

Οι γλυκοσιδάσες ταξινομούνται σύμφωνα με την τοπολογία της ενεργούς τους θέσης. Η συνολική τοπολογία των ενεργών θέσεων μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις γενικές τάξεις ανάλογα με το εάν το ένζυμο χρησιμοποιεί το μηχανισμό διατήρησης ή της αναστροφής. Αυτές οι τρεις τοπολογίες μπορούν κατά κανόνα να δημιουργηθούν στην ίδια αναδίπλωση με το ίδιο καταλυτικό κατάλοιπο.

•**Τοπολογία Pocket or crater :**

Αυτή η τοπολογία είναι βέλτιστη για την αναγνώριση των μη αναγωγικών άκρων σακχάρων και εντοπίζεται σε μονοσακχαρίτες, όπως είναι η β-γαλακτοσιδάση, η β-γλυκοσιδάση και η νευραμινιδάση, αλλά και σε εξωπολυσακχαρίτες, όπως είναι η γλυκοαμυλάση και η β-αμυλάση. Αυτοί οι εξωπολυσακχαρίτες είναι προσαρμοσμένοι σε υποστρώματα που διαθέτουν ένα μεγάλο αριθμό διαθέσιμων άκρων αλυσίδας, όπως είναι οι αμυλόκοκκοι των οποίων η ακτινωτή δομή εκθέτει όλα τα μη αναγωγικά άκρα αλυσίδων στην επιφάνεια. Από

την άλλη αυτά τα ένζυμα δεν είναι πολύ αποτελεσματικά σε ινώδη υποστρώματα, όπως είναι η κυτταρίνη που δεν έχει σχεδόν κανένα ελεύθερο άκρο αλυσίδας.

•Τοπολογία Cleft or groove

Αυτή η “ ανοιχτή ” δομή επιτρέπει ένα τυχαίο ζευγάριωμα αρκετών μονάδων σακχάρων στα πολυμερικά υποστρώματα που βρίσκονται συνήθως σε πολυσακχαρίτες με εσωτερική δράση όπως η λυσοζύμη, οι α-αμυλάσες, οι ξυλανάσες και οι χιτινάσες.

•Τοπολογία Τούνελ (Tunnel)

Αυτή η τοπολογία προκύπτει από την προηγούμενη όταν η πρωτεΐνη περιέχει μακριές θηλιές (loops) οι οποίες καλύπτουν ένα μέρος από την σχισμή, όμως μέχρι στιγμής έχει βρεθεί μόνο στην υδρολάση της κελλοβιόζης . Η προκύπτουσα δομή επιτρέπει στον πολυσακχαριδική αλυσίδα να αναχθεί. Η τοπολογία αυτή επιτρέπει στα ένζυμα να απελευθερώνουν το προϊόν, ενώ παραμένουν σταθερά συνδεδεμένα με την πολυσακχαριδική αλυσίδα. Παραμένει όμως ασαφές προς το παρόν αν το υπόστρωμα αρχικά διεισδύει στην αρχική θέση μέσω των δύο εισόδων του τούνελ ή αν οι θηλιές οι οποίες κλείνουν την ενεργή θέση, μπορούν να ανοίξουν περιστασιακά για να επιτρέψουν ένα τυχαίο ζευγάριωμα του υποστρώματος με την ενεργή θέση και να ακολουθήσει διαδικασία επεξεργασίας (Davies et al 1995).

Table 1. Structures and mechanisms in various families of glycosyl hydrolases.

Family	Enzyme	Organism	EC number	PDB* code	Mechanism	Reference
1	β -glucosidase	<i>Trifolium repens</i>	3.2.1.21	–	retaining	[31]
2	β -galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	3.2.1.23	1BGL	retaining	[32]
5	endoglucanase A	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	3.2.1.4	–	retaining	[33]
6	cellobiohydrolase II	<i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.91	3CBH	inverting	[28]
	endoglucanase	<i>Thermononospora fusca</i>	3.2.1.4	1TML	inverting	[34]
7	cellobiohydrolase I	<i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.91	1CEL	retaining	[35]
	endoglucanase I	<i>Humicola insolens</i>	3.2.1.4	–	retaining	[Davies, unpublished]
9	endoglucanase D	<i>Clostridium thermocellum</i>	3.2.1.4	–	inverting	[36]
10	xylanase A	<i>Streptomyces lividans</i>	3.2.1.8	1XAS	retaining	[37]
11	xylanase	<i>Bacillus circulans</i>	3.2.1.8	1BCX	retaining	[38]
13	α -amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>	3.2.1.1	6TAA	retaining	[39]
14	β -amylase	<i>Glycine max</i>	3.2.1.2	1BTC	inverting	[40]
15	glucoamylase	<i>Aspergillus awamori</i>	3.2.1.3	3GLY	inverting	[41]
16	β -1,3-1,4-glucanase	<i>Bacillus sp.</i>	3.2.1.73	1BYH	retaining	[42]
17	β -1,3-1,4-glucanase	<i>Hordeum vulgare</i>	3.2.1.73	1GHR	unknown [†]	[43]
18	chitinase	<i>Serratia marcescens</i>	3.2.1.14	1CTN	retaining	[44]
19	chitinase	<i>Hordeum vulgare</i>	3.2.1.14	1BAA	inverting	[45]
20	chitinase	<i>Serratia marcescens</i>	3.2.1.52	–	retaining	†
22	lysozyme	Hen egg white	3.2.1.17	1HEL	retaining	[7]
23	lysozyme	Goose	3.2.1.17	153L	unknown	[15]
24	lysozyme	Bacteriophage T4	3.2.1.17	1LYD	unknown	[46]
33	sialidase	<i>Salmonella typhimurium</i>	3.2.1.18	2SIL	retaining	[10]
34	neuraminidase	Influenza virus B	3.2.1.18	1NSB	retaining	[47]
45	endoglucanase V	<i>Humicola insolens</i>	3.2.1.4	1ENG	inverting	[48]

*Protein Data Bank. †This family is predicted to have a retaining mechanism [24,25]. †I Tews, Z Dauter, KS Wilson & CE Vorgias, [abstract 038], 4th European Workshop on Crystallography of Biological Macromolecules, Como, Italy, May 1995.

Εικόνα 7^η : Δομές και μηχανισμοί διαφορετικών οικογενειών γλυκοσιδασών (Davies G. et al 1995).

5.2. Τοματινάση

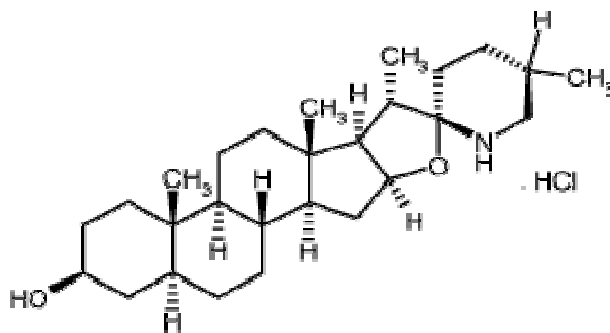
Η τοματινάση χρησιμοποιείται σαν όπλο από τον *Fusarium solani* προκειμένου να παρακάμψει την άμυνα του φυτού. Υδρολύοντας την τοματίνη προκύπτουν δυο παράγωγά της. Αυτά που είναι λιγότερο τοξικά, είναι η τοματιδίνη και η γλυκοτετραόζη. Τα παθογόνα της τομάτας έχουν την ικανότητα να αντιστέκονται στην α -τοματίνη λόγω της μεμβρανικής τους σύστασης, καθώς και εξαιτίας άλλων παραγόντων, όπως για παράδειγμα είναι τα εξωκυττάρια ένζυμα, όπως είναι η τοματινάση.

Υπάρχουν δυο μηχανισμοί ανθεκτικότητας του μύκητα στην α -τοματίνη. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά την σύσταση των μεμβρανών του. Έχουν απομονωθεί μεταλλαγμένα στελέχη του FsK για την βιοσύνθεση στερολών, τα οποία έδειξαν αυξημένη αντοχή στην α -τοματίνη, ενώ είναι ικανά να μολύνουν το φυτό της τομάτας (Defago et al 1983). Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει ενζυμική αποτοξίνωση. Πολύ παθογόνοι μύκητες της τομάτας παράγουν γλυκοσιλικές υδρολάσες που απομακρύνουν το σάκχαρο από το μόριο των σαπωνινών. Αυτά τα

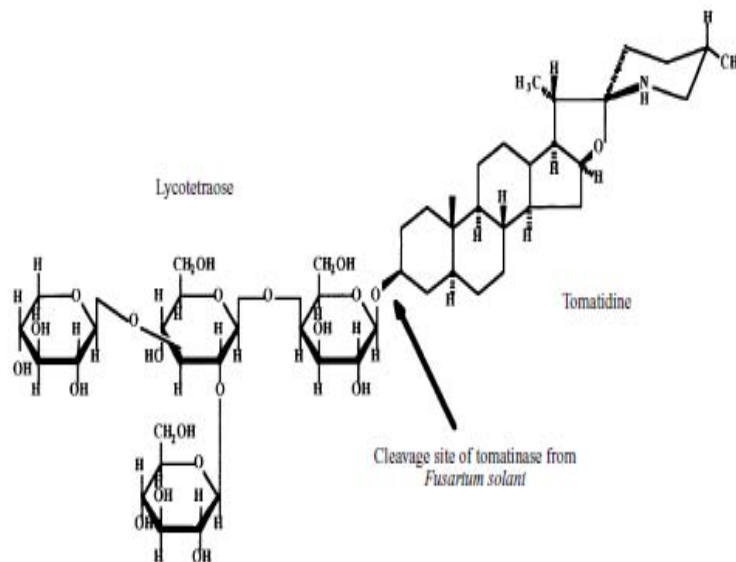
ένζυμα ονομάζονται τοματινάσες και έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης μεταξύ τους.

Πολυκλωνικό αντίσωμα αντί-τοματινάσης του *Fusarium oxysporum* δεν αναγνωρίζει την τοματινάση του *Fusarium solani* προτείνοντας έτσι ότι η τοματινάση αυτή μπορεί να είναι ένα μοναδικό μόριο. Η τοματινάση από τον *Fusarium oxysporum* και του *Botrytis cinerea* κόβουν την β1-γαλακτόζη, που είναι συνδεδεμένη και απελευθερώνουν τον τετρασακχαρίτη β-λυκοτετραόζη και την τοματιδίνη. Η τοματινάση από τον *Alternaria solani* επίσης αποικοδομεί τη α-τοματίνη σε τοματιδίνη, αλλά απελευθερώνει έναν μονοσακχαρίτη, αντί του τετρασακχαρίτη. Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί απομακρύνουν σάκχαρα και καταστρέφουν την ικανότητα της α-τοματίνης να σχηματίζει συμπλέγματα με τις στερόλες των μεμβράνων.

Η τοματινάση είναι μια γλυκοσιδάση που ανήκει στην οικογένεια των β-γλυκοσιδάσων. Η αποτοξικοποίηση της α-τοματίνης επιτυγχάνεται καθώς η τοματινάση απομακρύνει είτε ένα, είτε και τα τέσσερα σάκχαρα από την τοματίνη.



Εικόνα 8^η : Δομή τοματιδίνης.



Εικόνα 9^η : Υδρόλυση της α-τοματίνης από το ένζυμο τοματινάση.

6. Αρχές ενζυμικής κινητικής

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, όπως διατυπώθηκε κυρίως από τους Michaelis-Menten, ασχολείται με την μέτρηση χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου, V_{max} και K_M , και με την μέτρηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Οι κυριότεροι παράγοντες είναι: η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο (προϊόντα αντιδράσεων, συνένζυμα, ενεργοποιητές, αναστολείς), το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.

Η ενεργότητα ενός ενζύμου, E , εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Για την απλούστερη περίπτωση, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, η ταχύτητα, V , ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος, S , που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων, P , που δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου και υπολογίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{MAX} * ([S] / K_M + [S])$$

Όπου V_0 η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, $[S]$ η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, V_{MAX} Η μέγιστη ταχύτητα για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε :

$$K_M (\text{σταθερά Michaelis}) = k_1 + k_3/k_2$$

Από την εξίσωση Michaelis-Menten προκύπτει ότι η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας, V_0 , με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$, είναι μια ορθογώνια υπερβολή. Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική πρώτης τάξεως, $V_0 = k[S]$), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική μηδενικής τάξεως, $V_0 = k$) και πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας, V_{MAX} . Η σταθερά Michaelis είναι η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία έχουμε το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Έτσι έχουμε μια εκτίμηση της συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Οι καταλυτικές σταθερές K_M και V_{MAX} είναι χαρακτηριστικές μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή K_M είναι σταθερά για ένα ένζυμο με ένα ορισμένο υπόστρωμα κάτω από καθορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος, εκφράζεται ως συγκέντρωση και συνήθως κυμαίνεται σε 10^{-1} με 10^{-7} M. Αντίθετα η V_{MAX} εξαρτάται από το ποσό του ενζύμου που χρησιμοποιείται και γι αυτό εκφράζεται ως ταχύτητα σχηματισμού P ανά μονάδες ενζύμου (π.χ. $\mu\text{moles/min/mg}$ πρωτεΐνης)

Μια πολύ χρήσιμη σταθερά είναι ο αριθμός ανακύκλωσης δηλαδή η k_{CAT} , που ορίζεται ως $k_{cat} = V_{MAX}/[E_T]$. Η k_{cat} αντιστοιχεί στον μέγιστο αριθμό moles υποστρώματος που μπορούν να μετατραπούν σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου σε συνθήκες ενζυμικού κορεσμού, αντιπροσωπεύει δηλαδή τη μοριακή ενεργότητα του ενζύμου και εκφράζεται σε sec^{-1} . Η $k_{cat} = k_3$ όταν $[S] \gg K_M$ και έχει τιμές που κυμαίνονται ανάμεσα στο $1-10^7$. Τέλος η σταθερά εξειδίκευσης, k_{cat}/K_M ο λόγος δυο σταθερών, εκφράζεται σε $M^{-1} \text{sec}^{-1}$ και είναι ενδεικτική της αποδοτικότητας του ενζύμου. Αντιστοιχεί στην σταθερά της ταχύτητας k_1 ανάμεσα στο υπόστρωμα και στο ελεύθερο ένζυμο, όταν $[S] \ll K_M$ και $[E_T] = [E_{\text{ελεύθερο}}]$

B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΓΓΡΑΣΙΑΣ

Η τοματινάση είναι μια γλυκοσιδάση που ανήκει στην οικογένεια των β-γλυκοσιδασών. Η αμινοξική της ακολουθία υποδεικνύει ότι ανήκει στην οικογένεια 3 των γλυκοσιδασών. Η οικογένεια αυτή έχει πάνω από 100 μέλη, περιλαμβάνοντας ένζυμα που προέρχονται από μύκητες και βακτήρια. Δεν υπάρχουν πληροφορίες ούτε για το μηχανισμό ενζυμικής της δράσης, ούτε για την δομή της. Άρα παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, αφού ανήκει σε μια μη χαρακτηρισμένη οικογένεια ενζύμων. Ακόμα ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν μπορεί να γίνει σχεδιασμός δομής με βάση την ομολογία της, γιατί οι εν λόγω πρωτεΐνες είναι εξαιρετικά αποκλίνουσες (Vicki A. 2004). Δεν υπάρχει κάποιο μοντέλο ομολογίας για την ακριβή περιγραφή της δομής της τοματινάσης. Άρα θα πρέπει να γίνει εξαρχής σχεδιασμός του ενζύμου. Για αυτούς τους λόγους σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν αρχικά η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών έτσι ώστε, στη συνέχεια να γίνει μελέτη της ενζυμικής δράσης της τοματινάσης του μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος Fsk.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Φωτόμετρο	Spectronic 20 genesys
Speed Vac	RC110B
Φυγόκεντρος	Eppendorf Centrifuge 5810R

Πίνακας 2^{ος}: Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.

Tomatine	Extrasynthese
Tomatidine	Sigma
DNS	Sigma
PNG	Alfa Aesar
Bradford	BIOQUANT της Merck
Ammonium Sulfate	Serva
Sodium Acetate	Merck

Πίνακας 3^{ος}: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

Γ.1. Απομόνωση τοματινάσης του μύκητα *fusarium solani*

Παρασκευή υγρού θρεπτικού μέσου LB

Για την παρασκευή ενός λίτρου υγρού θρεπτικού μέσου προστίθενται 10 g Casein, 5 g NaCl, 5g yeast extract και 5ml θεικό αμμώνιο 10 mM σε νερό .Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε και εμβολιάστηκε με στερεή καλλιέργεια του μύκητα FsK. Στην καλλιέργεια προστέθηκε α-τοματίνη 200μM και αναπτύχθηκε για 5 μέρες σε θερμοκρασία 29°C σε συνεχής ανάδευση. Η α-τοματίνη επάγει την παράγωγη της τοματινάσης του μύκητα.

Αφού έχει αναπτυχθεί η καλλιέργεια διηθούμε με γάζα έτσι ώστε να απομακρύνουμε το μικκύλιο .

Στην συνέχεια κατακρημνίζουμε τις πρωτεΐνες με σταδιακή προσθήκη κορεσμένου διαλύματος 80% θειικού αμμωνίου, στους 0° C. Το αφήνουμε όλο το βράδυ σε συνεχή ανάδευση στους 4°C.

Μετά την κατακρήμνιση φυγοκεντρούμε στις 10.000 rpm στους 4° C για μια ώρα. Το ίζημα που παρουσιάζεται επαναδιαλύεται με 1ml οξικό νάτριο 20mM pH =5.

Γ.1.2. Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών-Μέθοδος Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός δείγματος σε πρωτεΐνες πραγματοποιείται με την μέθοδο Bradford. Οι πρωτεΐνες αντιδρούν με το αντιδραστήριο που βρίσκεται σε περίσσεια και σχηματίζεται μια έγχρωμη ένωση. Σε ορισμένο εύρος συγκεντρώσεων η ποσότητα της σχηματιζόμενης έγχρωμης ένωσης είναι ανάλογη της ποσότητας της αρχικής ουσίας. Για την ποσοτικοποίηση του δείγματος, είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας με την πρωτεϊνική συγκέντρωση, με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Αρχικά, λοιπόν μετράται η απορρόφηση μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων BSA (Bovine Serum Albumin). Η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων γίνεται ως εξής :

Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων	Ποσότητα BSA (10μg/ml)	Ποσότητα H ₂ O
0	0	1ml
0,1	10μl	990 μl
0,2	20 μl	980 μl

0,4	40 μl	960 μl
0,6	60 μl	940 μl
0,8	80 μl	920 μl
1	100 μl	900 μl

Πίνακας 4^{ος}: Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων στη μέθοδο Bradford.

Για τη κατασκευή της πρότυπης καμπύλης κάθε φορά παίρνουμε 20μl από το κάθε πρότυπο διάλυμα και προσθέτουμε 980 μl διαλύματος Bradford. Ακολουθεί καλή ανάδευση, επώαση για 5min και μέτρηση απορρόφησης στα 595 nm. Από τις τιμές απορρόφησης των πρότυπων δειγμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη, από την οποία βρίσκουμε την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης. Με βάση την πρότυπη καμπύλη που δημιουργήσαμε αντιστοιχίζουμε την τιμή της απορρόφησης του δείγματος μας και γίνεται ο προσδιορισμός της άγνωστης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του δείγματος.

Γ.2. Καθαρισμός ενζύμου μέσω διαπίδυση

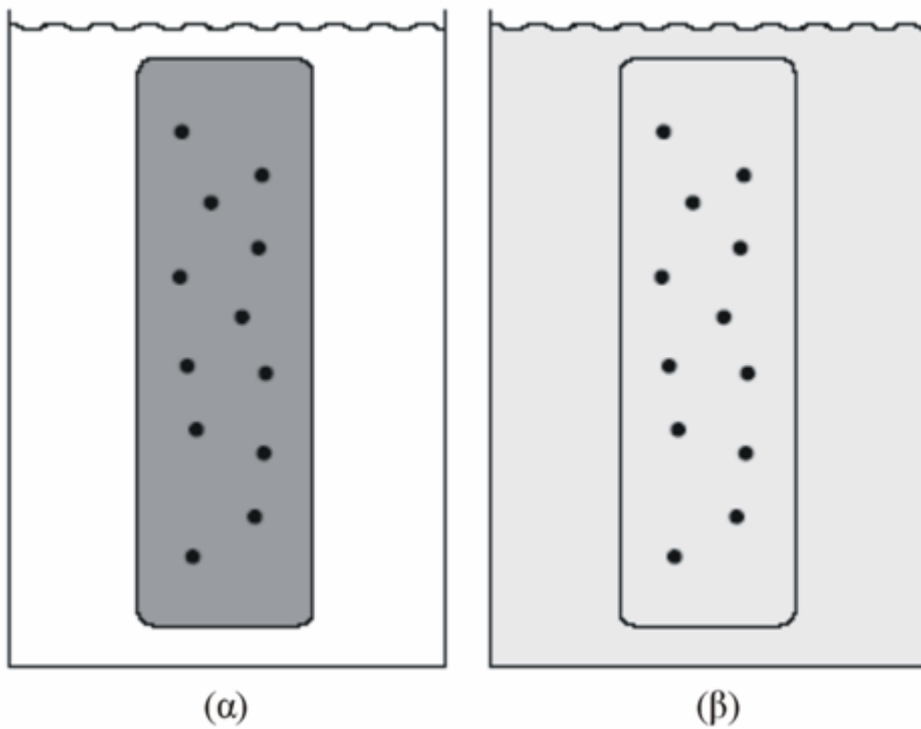
Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε διαπίδυση. Είναι μια μέθοδος διαχωρισμού με βάση το μέγεθος κατά την οποία χρησιμοποιείται ημιπερατή μεμβράνη για να διαχωρίσει τον αναλυτή από τις παρεμποδίσσεις. Εμβαπτίζεται σε διάλυμα του οποίου η σύσταση διαφέρει από αυτή του δείγματος. Στο πείραμα μας είναι το οξικό νάτριο 20mM pH=5.

Επώαση O/N με συνεχή ανάδευση στους 0° C πραγματοποιώντας δυο αλλαγές του ρυθμιστικού διαλύματος ανά οκτώ ώρες .

Στην διαπίδυση χρησιμοποιούμε μεμβράνες που κατασκευάζονται από κυτταρίνη με διάμετρο πόρων 1-5nm. Παρασκευάζονται ως εξής : φτιάχνουμε ένα

διάλυμα 8g διτανθρακικού νατρίου σε 500ml H₂O και το αφήνουμε να βράσει για 30 min. Οι μεμβράνες με αυτή τη διαδικασία καθίστανται ημιδιαπερατές.

Εάν η συγκέντρωση ενός συστατικού είναι διαφορετική εκατέρωθεν της μεμβράνης η δημιουργούμενη βαθμίδα συγκέντρωσης παρέχει την κινητήρια δύναμη για τη διάχυσή της κατά μήκος της μεμβράνης. Έτσι, ενώ τα μικρά μπορούν να διέρθουν ελεύθερα μέσω της μεμβράνης, τα μεγάλα κατακρατούνται. Η διαπίδυση ως μέθοδος διαχωρισμού χρησιμοποιείται συχνά στον καθορισμό πρωτεϊνών, ορμονών και ενζύμων (Μπακέα 2008).



Εικόνα 10^η : Μέθοδος διαχωρισμού με διαπίδυση. Πορώδης μεμβράνη με διάλυμα της προς απομάκρυνση ουσίας βυθίζεται σε καθαρό διαλύτη: (α) πριν και (β) μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας.

Γ.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες και αλλά μακρομόρια (DNA, RNA) διαχωρίζονται καθώς κινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, μέσα από τους πόρους ενός πηκτώματος. Η ταχύτητα μετακίνησης των (U) εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο του μορίου (Z) και από τον συντελεστή τριβής (f) σύμφωνα με τον τύπο $U=E*Z/f$. Η ηλεκτροστατική δύναμη Ez που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετο φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής $f v$ που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου. Η σταθερά τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται καθώς επίσης και από την πυκνότητα και το ιξώδες του πηκτώματος.

Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτή παρά σε υγρό, διότι η πηκτή καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας (απαραίτητη για τον σωστό διαχωρισμό) και λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Τα μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Το πήκτωμα μπορεί να είναι άμυλο ή αγαρόζη κυρίως όμως χρησιμοποιείται πολυακρυλαμίδιο για τις πρωτεΐνες, γιατί παρέχει μεγάλη επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων, είναι χημικά αδρανές, διαφανές, σταθερό σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασίας και ιοντική ισχύος και επιπλέον το μέγεθος των πόρων του μπορεί να ποικίλει σημαντικά.

Το σύστημα ηλεκτροφόρησης μπορεί να είναι συνεχές ή ασυνεχές. Στο συνεχές σύστημα χρησιμοποιείται το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα στην πηκτή και στα δοχεία ηλεκτροδίων και έχει ένα μόνο ενιαίο πήκτωμα διαχωρισμού . Στο ασυνεχές σύστημα, ένα μη περιοριστικό πήκτωμα με μεγάλους πόρους αποκαλούμενο πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) είναι τοποθετημένο σε στρώσεις πάνω από ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Κάθε πήκτωμα γίνεται με ένα διαφορετικό ρυθμιστικό διάλυμα και τα ρυθμιστικά των δεξαμενών είναι διαφορετικά από τα ρυθμιστικά των πηκτωμάτων. Η σύσταση, το pH και το μέγεθος των πόρων των δυο πηκτών είναι τέτοια, ώστε στην πηκτή συσσώρευσης τα δείγματα να συμπυκνώνονται και στο

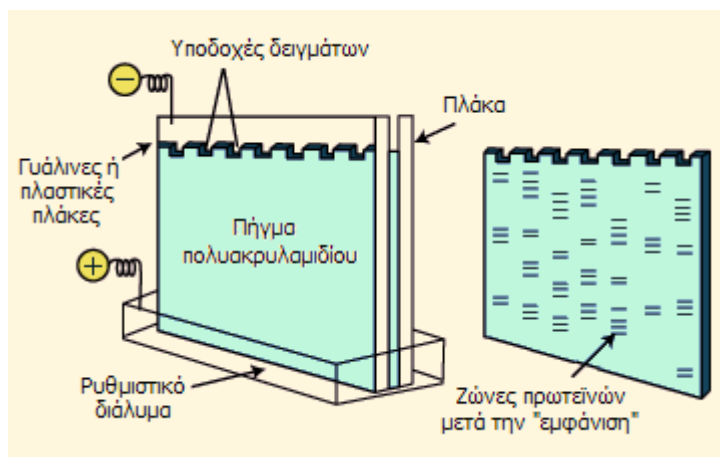
τέλος οι πρωτεΐνες να συσσωρεύονται σε στενές ζώνες μεγάλης συγκέντρωσης. Στην πηκτή διαχωρισμού επιτελείται ο διαχωρισμός τους, λόγω διαφορετικής κινητικότητας κάθε πρωτεΐνης. Έτσι επιτυγχάνεται πολύ καλύτερα ο διαχωρισμός τους από ότι στο συνεχές σύστημα και η καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Τέλος η ηλεκτροφόρηση δύναται να γίνει παρουσία ή απουσία αποδιατακτικών μέσων, όπως του απορρυπαντικού SDS (θειικό δωδεκανικό νάτριο) ή της ουρίας. Στην πρώτη περίπτωση (κάτω από μη-μετουσιωτικές συνθήκες), τα πρωτεϊνικά μόρια διατηρούν άθικτες τις ανώτερες διαμορφώσεις τους και παραμένουν κατά κανόνα δραστικά. Στη δεύτερη περίπτωση (ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες) αναδιατάσσονται οι τυχόν υπομονάδες των πρωτεϊνών λαμβάνοντας τυχαίες διαμορφώσεις και διαχωρίζονται.

Το θειικό άλας νατρίου (Sodium dodecyl sulphate, SDS) είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο δεσμεύεται πάνω στην ραχοκοκαλιά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με υδρόφοβους δεσμούς. Το SDS δεσμεύεται αρκετά εξειδικευμένα με σταθερό ποσό SDS ανά μονάδα βάρους πρωτεΐνης (1,4 gr SDS : 1 gr πρωτεΐνης) και έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση όλων των μη ομοιοπολικών δεσμών στο μόριο της πρωτεΐνης, την αποδιάταξή της και τη δημιουργία ενός επιμήκους συμπλόκου SDS-πολυπεπτιδικής αλυσίδας με καθαρό αρνητικό φορτίο και περίπου σταθερό λόγο φορτίου ανά μονάδα μάζας πολυπεπτιδίου. Συνεπώς το ολικό φορτίο του συμπλόκου εξαρτάται μόνο από το μέγεθος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του στο πήκτωμα αποκλειστικά από το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου.

Έτσι, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών ή των υπομονάδων αυτών, με τον παραλληλισμό των αποτελεσμάτων της SDS-PAGE πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (μάρτυρες) σε σχέση με αυτά των υπό χαρακτηρισμό πρωτεϊνών. Γραμμική σχέση υπάρχει μεταξύ του λογαρίθμου του μοριακού βάρους ενός SDS-μετουσιωμένου πολυπεπτιδίου ή ενός νουκλειικού οξέος και του Rf του. Το Rf ορίζεται ως η αναλογία της απόστασης μετανάστευσης ενός μορίου προς αυτή που μετανάστευσε ένας χρωματισμένος μάρτυρας. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ταυτοποίηση, διαχωρισμό και χαρακτηρισμό πρωτεϊνών, καθώς επίσης για τον έλεγχο της ομοιογένειας ενός πρωτεϊνικού κλάσματος. Παρουσιάζει όμως ορισμένους περιορισμούς. Έτσι, πολύ βασικές

πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες με μεγάλο βαθμό γλυκοσυλίωσης (επειδή δεσμεύουν απορρυπαντικό μόνο στο πρωτεϊνικό τμήμα τους) κινούνται πιο αργά στην πηκτή με αποτέλεσμα να ταυτοποιούνται λανθασμένα. Επίσης λανθασμένο μοριακό βάρος μπορεί να προκύψει και για ορισμένες περιπτώσεις πρωτεϊνών που δεν αναδιατάσσονται πλήρως με το SDS.



Εικόνα 11^η: Μέθοδος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Γ.4. TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας)

Με αυτήν την χρωματογραφική τεχνική έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των προϊόντων υδρόλυσης της α-τοματίνης. Χρησιμοποιούνται γυάλινες ή αλουμινένιες πλάκες επιστρωμένες με μια στοιβάδα στατικής φάσης. Η στατική φάση συνήθως είναι γέλη πυριτίου ή λιγότερο συχνά οξείδιο αργιλίου, κυτταρίνης κτλ. Η κινητή φάση αποτελείται από χλωροφόρμιο, μεθάνολη και νερό σε αναλογία 6:4:1.

Πραγματοποιούμε την δημιουργία αντίδρασης με:

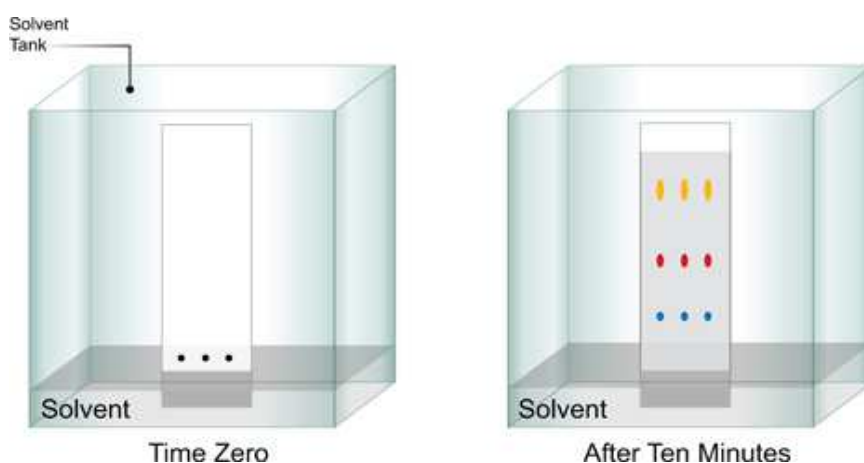
- 13μl από το διάλυμα της τοματινάσης
- 1μl α-τοματίνης 10mM
- 36μl οξικό νάτριο 20mM pH =5

Σε τελικό όγκο 50μl και την αφήσαμε O/N σε θερμοκρασία δωματίου.

Το δείγμα την επόμενη μέρα λυοφιλιοποιείται και το επαναδιαλύουμε σε 30μl μεθανόλης. Ως control χρησιμοποιήσαμε α-τοματίνη 10mM διαλυμένη σε 50μl μεθανόλης και τοματιδίνη διαλυμένη σε 200μl μεθανόλης.

Η πλάκα του TLC είναι τοποθετημένη πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα στους 50 °C έτσι ώστε να εξατμίζεται αμέσως η μεθανόλη. Φορτώνουμε 10μl τοματιδίνης στην συνέχεια 10μl τοματίνη δεξιά και αριστερά από 10μl του δείγματος της αντίδρασης σε απόσταση μεταξύ τους 2cm. Στην συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια μέσα σε αεροστεγή θάλαμο, στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί η κινητή φάση σε ύψος κάτω από αυτό των κηλίδων. Οι διαλύτες πρέπει να έχουν εισαχθεί στο θάλαμο τουλάχιστον 10min πριν την τοποθέτηση της πλάκας, ώστε να έχει κορεσθεί ο υπερκείμενος χώρος από τους ατμούς.

Ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με την βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Στην συνέχεια αποσύρεται και ψεκάζεται με 30% θειικό οξύ σε όλη την επιφάνεια της πλάκας. Τέλος στεγνώνεται με ζεστό αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Από το χρώμα των κηλίδων μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την κατηγορία των ουσιών που παρατηρούνται .



Εικόνα12¹ : Τεχνική TLC.

Γ.5. Tomatinase Assay με συνθετικό υπόστρωμα PNG

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήσαμε το PNG το οποίο είναι ένα συνθετικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την ενζυμική κινητική γλυκοσιδασών. Ετοιμάστηκε διάλυμα pB (phosphate buffer) pH =6 50mM που περιείχε Na₂HPO₄ και NaH₂PO₄. Στο διάλυμα προσθέτουμε το υπόστρωμα που είναι το 4-Nitrophenyl-B-D-glucopyranoside με τελική συγκέντρωση 10mM (PNG).

Γ.5.1. Εύρεση βέλτιστων συνθηκών της ενζυμικής αντίδρασης .

Σε 8ml PNG 10mM προσθέτουμε 300μl από το διάλυμα τοματινάσης που έχουμε. Η αντίδραση επωάζεται στους 37° C στο υδατόλουτρο. Για κάθε μέτρηση αποσπούμε από την αντίδραση 900μl και προσθέτουμε 100μl καυστικού νατρίου 2M έτσι ώστε να σταματήσει η δράση του ενζύμου. Μηδενίζουμε με PNG και μετράμε την απορρόφηση στα 410nm. Πραγματοποιήσαμε μετρήσεις για: .

1. pH 4
2. pH 5
3. pH 6
4. pH 7

Γ.5.2. Υπολογισμός των τιμών Km και Vmax για το ανάλογο υποστρώματος PNG.

Ακλουθώντας την ίδια διαδικασία για την εύρεση βέλτιστων συνθηκών χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος PNG:

1. 10 mM
2. 20 mM
3. 50 mM
4. 100 mM

G.6. Tomatinase assay activity με DNS.

Το 3,5-Dinitrosalicylic οξύ ή DNS είναι μια αρωματική ένωση που χρησιμοποιείται κυρίως σε πειράματα ενζυμικής κινητικής. Σε αυτό το πείραμα στόχος μας είναι να βρούμε την ενζυμική ενεργότητα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο προσδιορισμού των αναγωγικών σακχάρων της χρωστική DNS, η οποία δεσμεύεται στην β-lycotetraose που είναι αναγωγικό σάκχαρο και παράγεται από την διάσπαση της β1-συνδεδεμένης γαλακτόζης από την α-τοματίνη.

Είναι μια άμεση διαδικασία. Το σάκχαρο μειώνει το διαθέσιμο DNS και οδηγεί σε αλλαγή στο φάσμα απορρόφησης, η οποία παρατηρείται με αλλαγή του χρώματος από κίτρινο σε κόκκινο- καφέ. Το ποσοστό της απορρόφησης σχετίζεται άμεσα με την αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος της αντίδρασης που καταλύει η τοματινάση.

Παρασκευή dinitrosalicylic acid reagent solution 1% (DNS) 100ml:

- 1g Dinitrosalicylic acid
- 0,2g Phenol (C₆H₅OH)
- 0,05g Sodium sulfite (NaSO₃)
- 1g Sodium hydroxide (NaOH)
- 100ml H₂O

Παρασκευάζουμε αντίδραση η οποία περιέχει:

1. 260μl α-tomatine 10mM
2. 800μl διάλυμα tomatinase
3. 1540μl Sodium -acetate (CH₃COONa) 20mM pH=5

Ως τυφλό για το μηδενισμό στο φωτόμετρο χρησιμοποιούμε:

1. 154μl διάλυμα tomatinase
2. 346μl Sodium-acetate (CH₃COONa) 20mM pH=5

Η αντίδραση επωάζεται στους 37 °C. Για κάθε χρόνο παίρνουμε 500μl στα οποία προσθέτουμε 200μl DNS και θερμαίνουμε στους 90° C για 15min. Στην

συνέχεια αποσύρουμε τα δείγματα από το heat block και προσθέτουμε 166ml τριγικό κάλιο νάτριο (Rochelle $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_5 \times 4\text{H}_2\text{O}$) το οποίο σταθεροποιεί το χρώμα που απέκτησε το δείγμα κατά την θέρμανση. Φωτομετρούμε στα 575nm.

Γ.7. Tomatinase assay activity με αντιδραστήριο Somogyi-Nelson:

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε δυο βήματα:

- Προσθήκη αντιδραστηρίου A Nelson
- Προσθήκη αντιδραστηρίου B αρσενομολυβδενικού.

Κατά τον προσδιορισμό δράσης του ενζύμου με το αντιδραστήριο Nelson ο Cu^{+2} ανάγεται σε Cu^{+1} λόγω της αύξησης της β-γλυκοτετραόζης.

Αρχικά παρασκευάζουμε τα αντιδραστήρια για την μέθοδο Somogyi-Nelson με την όποια μπορούμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση σακχάρων και συγκεκριμένα για αυτό το πείραμα τη συγκέντρωση της β-lycotetraose.

Κατά το δεύτερο βήμα με την προσθήκη του αρσενομολυβδενικού (άχρωμο) το Cu^{+1} οξειδώνεται σε Cu^{+2} , δίνοντας ένα έντονο μπλε χρώμα, το οποίο αντανακλά τη συγκέντρωση του προϊόντος και συνεπώς την ενεργότητα του ενζύμου.

• Αντιδραστήριο A (Nelson) 200ml :

1. 5,6g NaHPO_4 και 8g τριγικό κάλιο νάτριο (Rochelle $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_5 \times 4\text{H}_2\text{O}$) σε 140ml νερό
2. Το διάλυμα θερμαίνεται με συνεχή ανάδευση
3. Επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου
4. Προσθέσαμε 20ml NaOH 1N
5. Υπό συνεχή ανάδευση προσθέσαμε 1,6ml 10% w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

6. Προσθήκη 36g Na₂SO₄
7. Τέλος προσθέτουμε νερό έως τον τελικό όγκο 200ml

Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για δυο μέρες σε θερμοκρασία δωματίου. Φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο δοχείο και το χρώμα του πρέπει να είναι έντονο μπλε. Πριν τη χρήση πραγματοποιείται διήθηση με απλό διηθητικό χαρτί.

•Αντιδραστήριο Β (αρσενομολυβδενικό) 200ml :

1. Σε 180ml H₂O προσθέτουμε 1g (NH₄)₆Mo₇O₂₄
2. Προσθέτουμε 8,5g θειικό οξύ 12M
3. Σε 5ml H₂O προσθέτω 1.2g Na₂HasO₄ 7H₂O και με αυτό συμπληρώνουμε το προηγούμενο διάλυμα.

Το αντιδραστήριο Β επωάζεται για δυο μέρες στους 37 ° C και αποθηκεύεται σε σκουρόχρωμο δοχείο.

Παρασκευάσαμε αντίδραση για τη μέθοδο Somogyi- Nelson με τα εξής:

- 150μl Sodium-acetate (CH₃COONa) 20mM pH=5
- 250μl α-tomatine 10mM
- 250μl από το διάλυμα tomatinase

Πειραματική διαδικασία:

1. Μετά από πέρας κάθε χρόνου παίρνουμε από την αντίδραση, η οποία επωάζεται στους 30° C, 130μl και προσθέτουμε 20μl NaOH 1M για την διακοπή της διάσπασης
2. Προσθέτουμε στην συνέχεια 200μl από το αντιδραστήριο Nelson και θερμαίνουμε στους 100° C για 15min
3. Επαναφέρουμε στην θερμοκρασία δωματίου
4. Προσθέτουμε 200μl από το αντιδραστήριο Β και κάνουμε vortex σε κάθε δείγμα
5. Αναδεύοντας αραιώνουμε με 1260μl H₂O κάθε δείγμα
6. Κάνουμε vortex για 5min
7. Φυγοκετρούμε στις 8.000 rpm για 5min
8. Το υπερκείμενο φωτομετρήθηκε στα 650nm

9. Σαν τυφλό χρησιμοποιούμε διάλυμα που περιέχει:

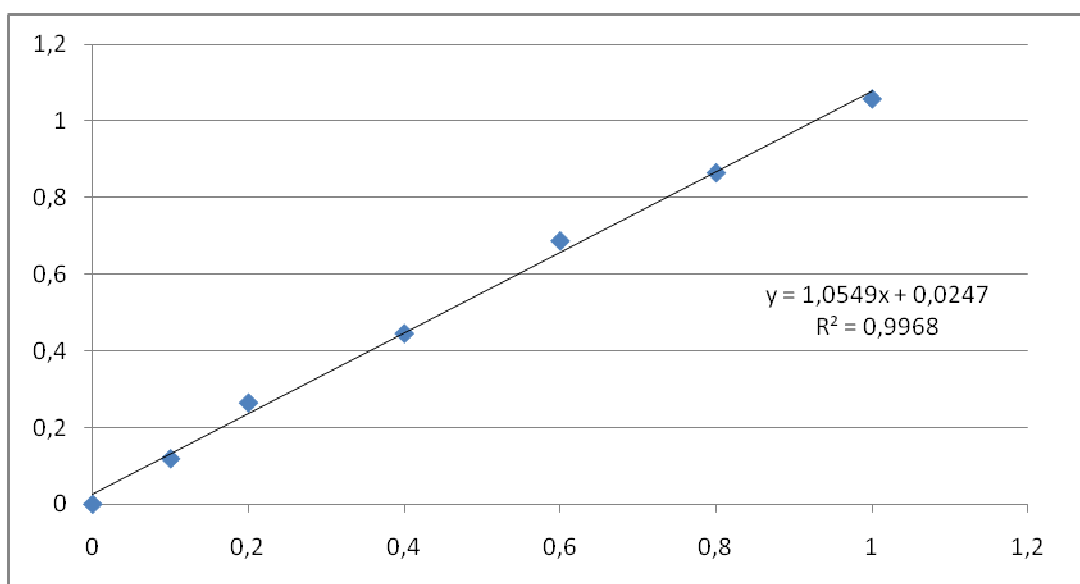
- 130μl Na-acetate 20mM pH=5
- 20μl NaOH

Ακολουθούμε την ίδια διαδικασία όλα σε τα δείγματα μας.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ.1 Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός-Μέθοδος Bradford

Από τις τιμές απορρόφησης γνωστής συγκέντρωσης των πρότυπων δειγμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη, από την οποία βρίσκουμε την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης.



Γράφημα 1^ο: Πρότυπη καμπύλη BSA.

Στη συνέχεια από την τιμή της απορρόφησης που βρέθηκε στο δείγμα γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεΐνης, σύμφωνα με την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης. Η συγκέντρωση της τοματινάσης βρέθηκε ότι είναι 0,395 mg/ml.

Δ.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

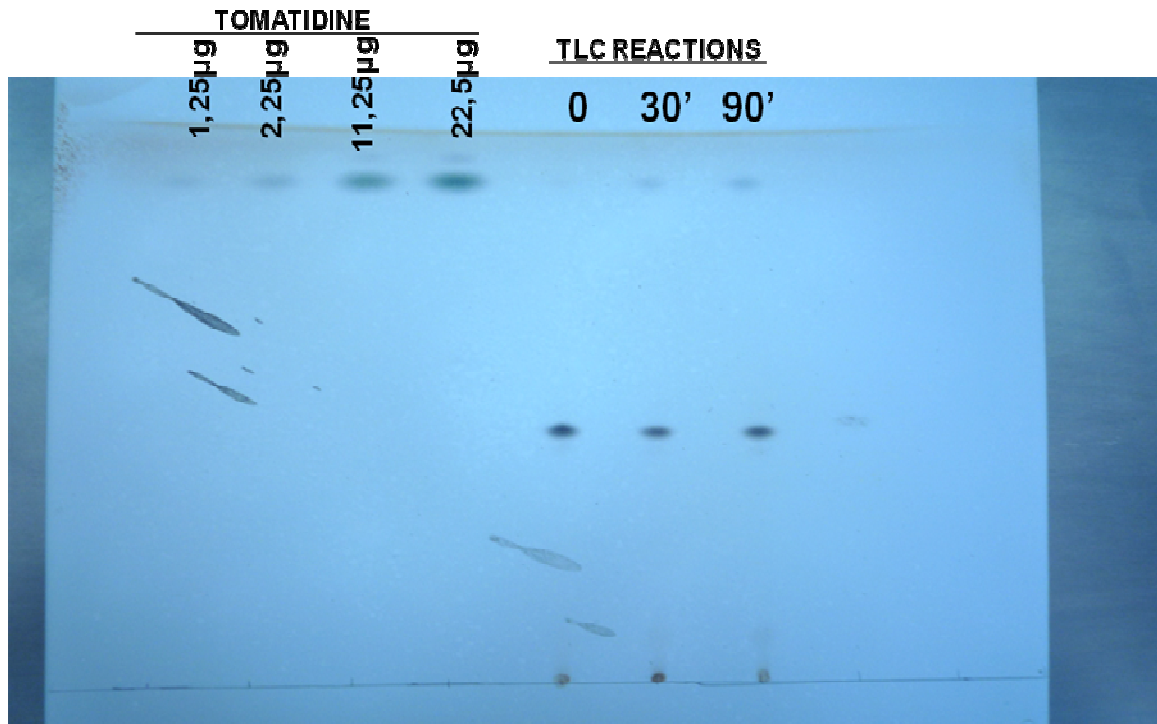
Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του δείματός μας, που περιέχει την τοματινάση. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του δείματος έγινε ανάλογα με το μοριακό τους βάρος για την ανίχνευση της τοματινάσης.



Εικόνα 13^η: Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου για την ανίχνευση της τοματινάσης.

4.3. TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας)

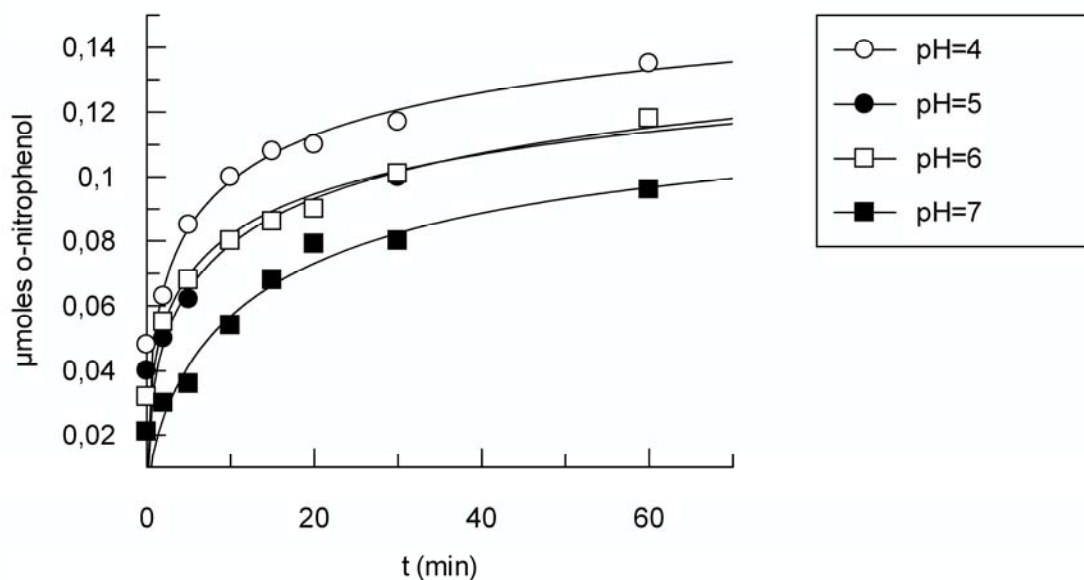
Η τοματιδίνη απεικονίζεται στην πλάκα TLC σε συγκεκριμένο χαρακτηριστικό ύψος. Με αυτό τον τρόπο, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη τοματινίνης στα δείγματα μας, καθώς επίσης και ότι είναι ενεργή, αφού διασπά το υπόστρωμά της, δηλαδή την τοματίνη, παράγοντας τοματιδίνη.



Εικόνα 14^η: Αποτελέσματα TLC.

1. Δείγμα με τοματιδίνη συγκέντρωσης 1,25 μg.
2. Δείγμα με τοματιδίνη συγκέντρωσης 2,25 μg.
3. Δείγμα με τοματιδίνη συγκέντρωσης 11,25 μg.
4. Δείγμα με τοματιδίνη συγκέντρωσης 22,5 μg.
5. Δείγμα αντίδρασης τοματινίνης σε τοματίνη για χρόνο 0min.
6. Δείγμα αντίδρασης τοματινίνης σε τοματίνη για χρόνο 30min.
7. Δείγμα αντίδρασης τοματινίνης σε τοματίνη για χρόνο 90min.
8. Δείγμα με τοματίνης συγκέντρωσης 0.2 mM

Δ.4. Εύρεση βέλτιστου pH της ενζυμικής αντίδρασης .

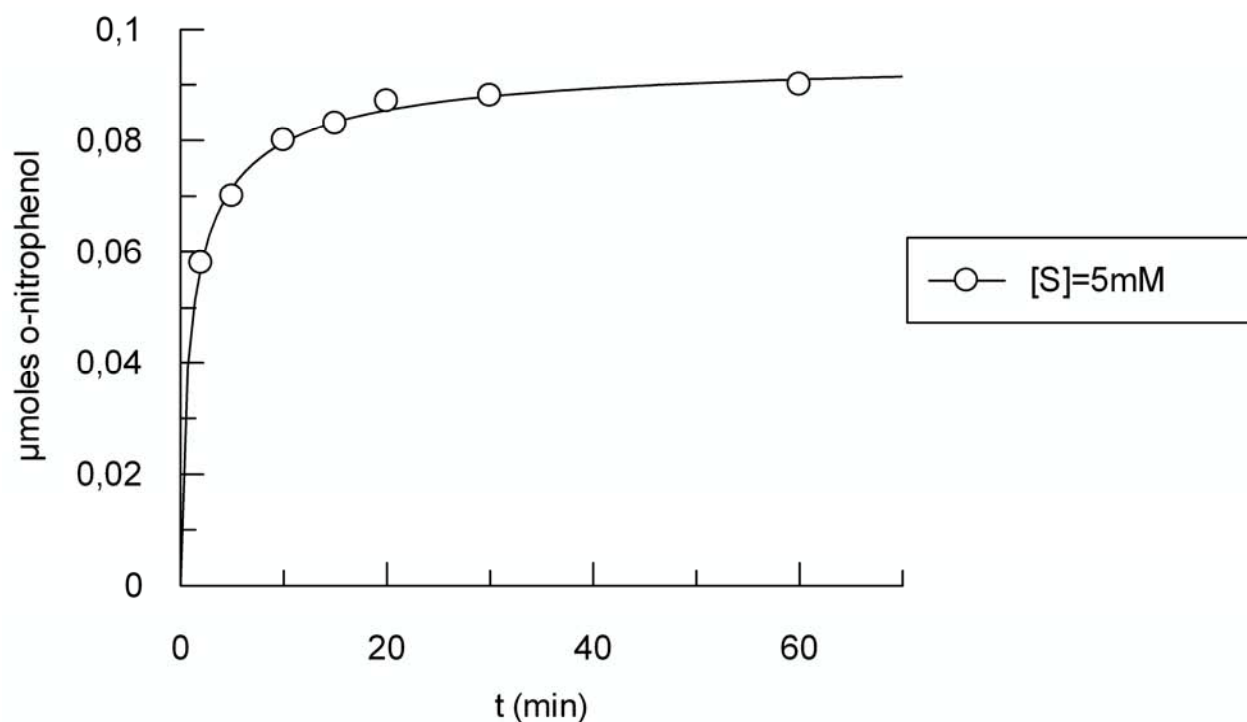


Εικόνα 15^η: Διάγραμμα pH που παρουσιάζει την συγκέντρωση του υποστρώματος (PNG) ως προς το χρόνο.

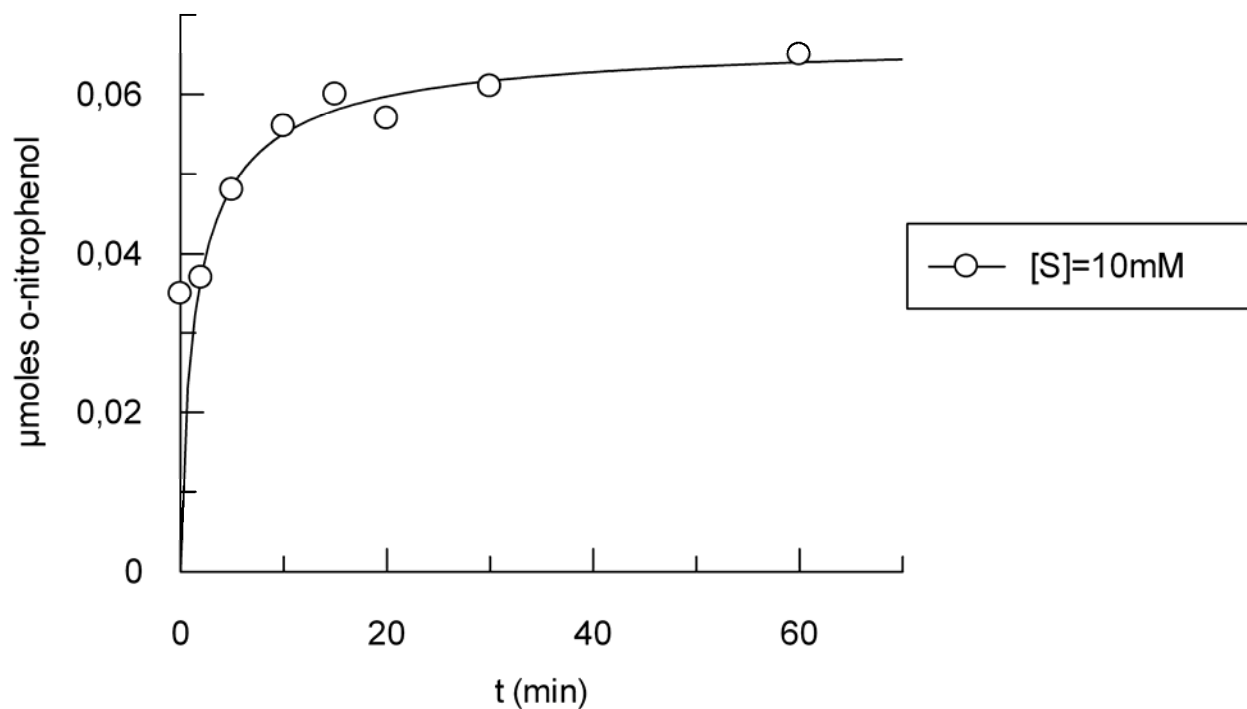
Με βάση τα αποτελέσματα και τις τιμές του διαγράμματος προκύπτει ότι το βέλτιστο pH για την τοματινάση είναι το 4.

Δ.5. Επεξεργασία κινητικών δεδομένων Τοματινάσης.

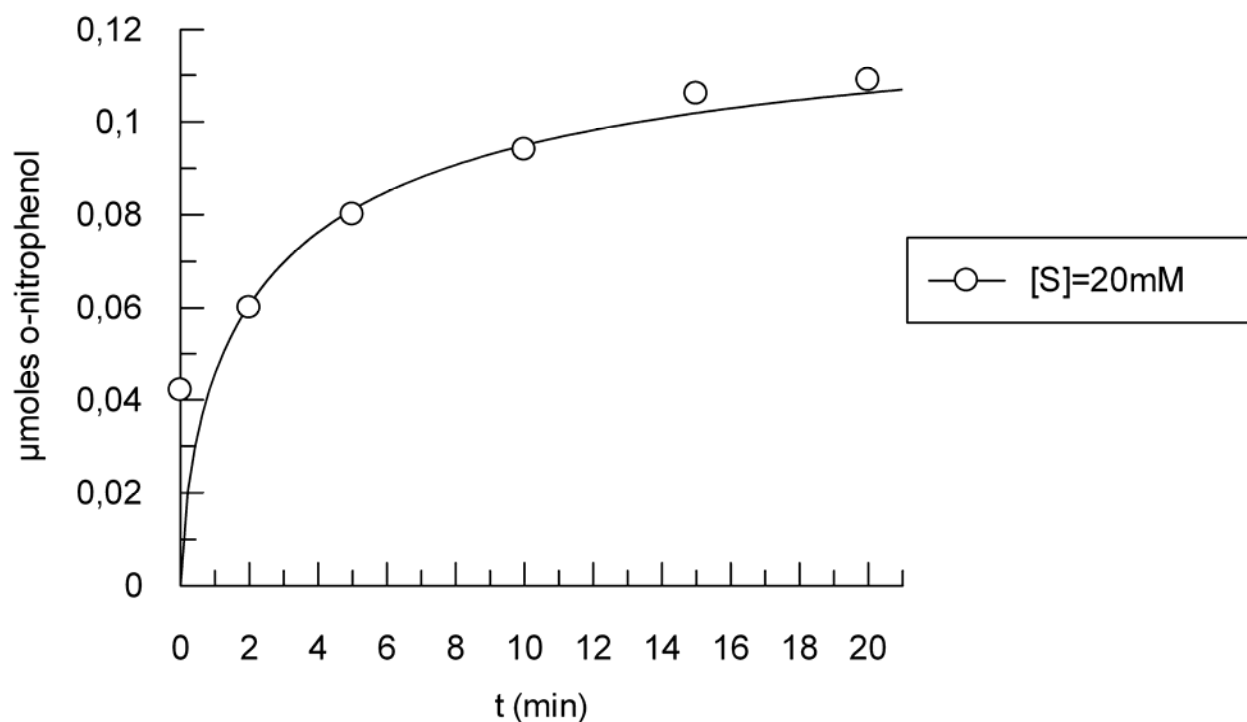
Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται, μετά από τον προσδιορισμό της διάσπασης του συνθετικού υποστρώματος PNG στα δείγματα του πειράματος, επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Grafit (Leatherbarrow, 1990). Από την απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 410 nm και την καταγραφή των τιμών, προκύπτουν τα ακόλουθα διαγράμματα, τα οποία αντιστοιχούν σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις της PNG.



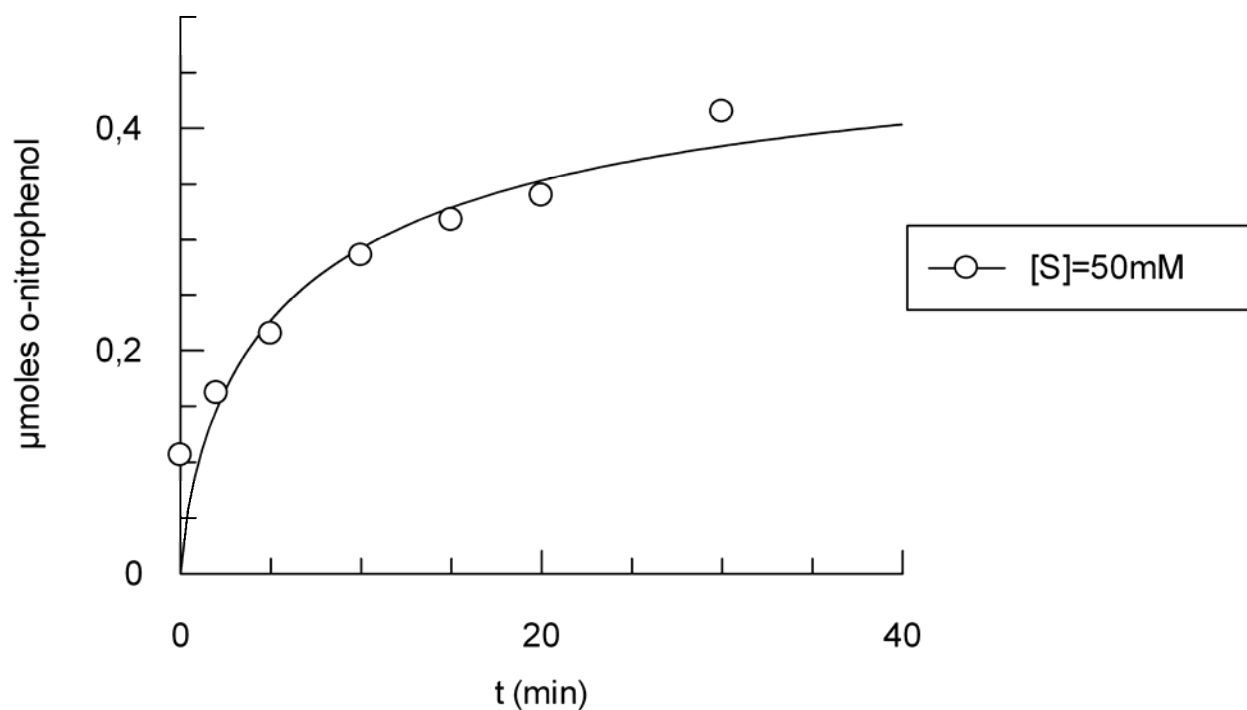
Εικόνα 16^η: Διάγραμμα το οποίο παρουσιάζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος (5 mM PNG) ως προς το χρόνο.



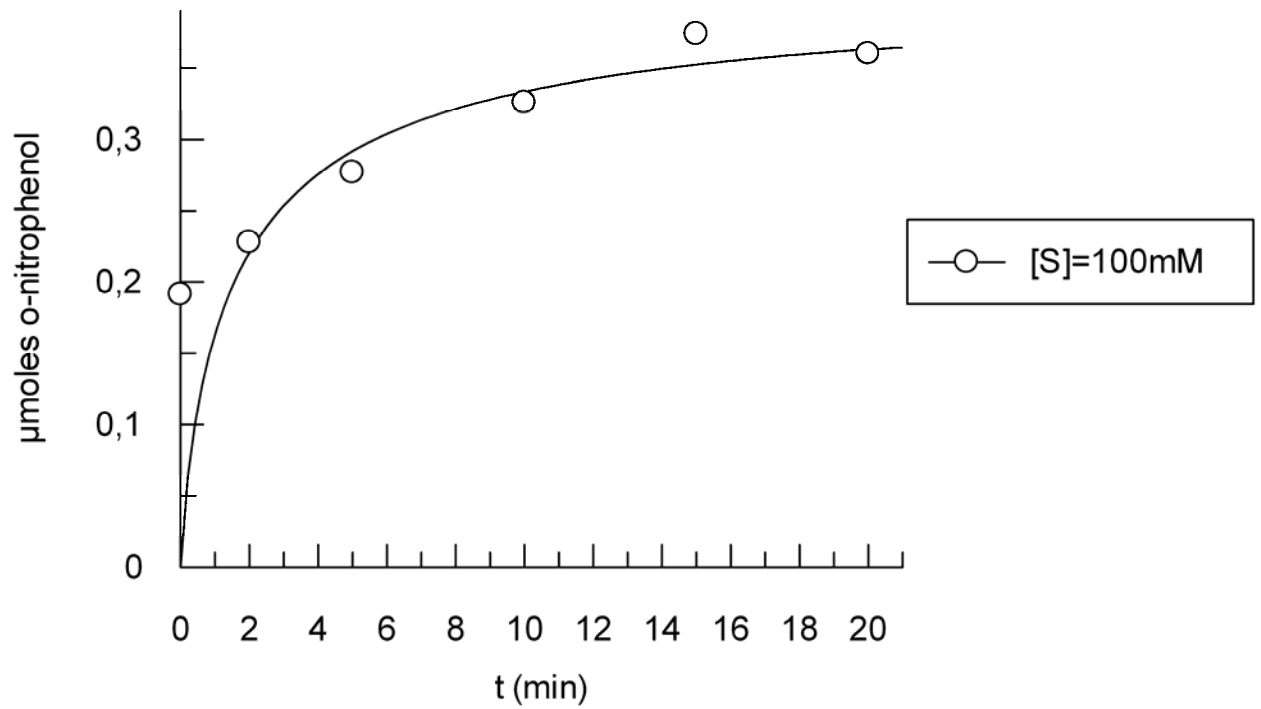
Εικόνα 17^η: Διάγραμμα το οποίο παρουσιάζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος (10 mM PNG) ως προς το χρόνο.



Εικόνα 18^η: Διάγραμμα το οποίο παρουσιάζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος (20 mM PNG) ως προς το χρόνο.

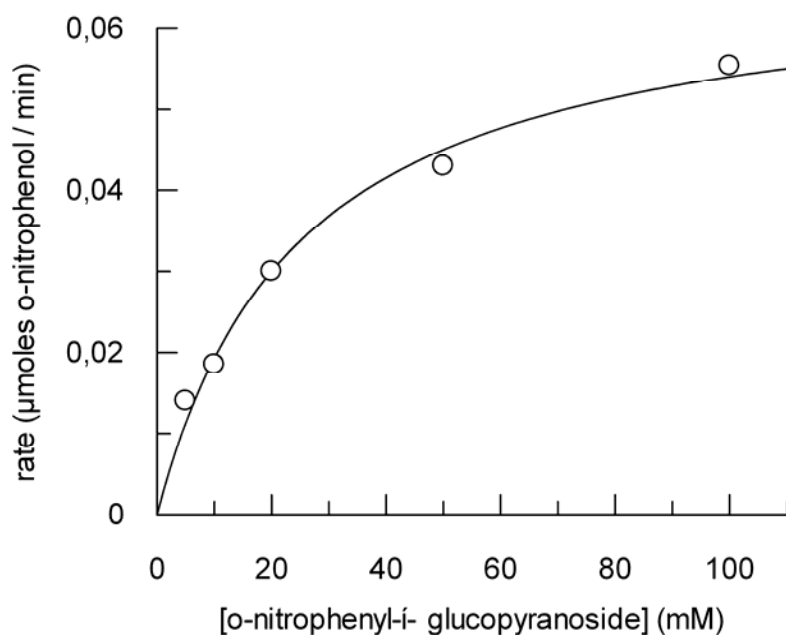


Εικόνα 19^η: Διάγραμμα το οποίο παρουσιάζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος (50 mM PNG) ως προς το χρόνο.



Εικόνα 20^η: Διάγραμμα το οποίο παρουσιάζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος (100 mM PNG) ως προς το χρόνο.

Από κάθε ένα από τα παραπάνω διαγράμματα προσδιορίστηκε η αρχική ταχύτητα, βάση των οποίων στη συνέχεια, προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα Michaelis- Menten από το οποίο και προσδιορίστηκε εν συνεχεία η K_m και η V_{max} .



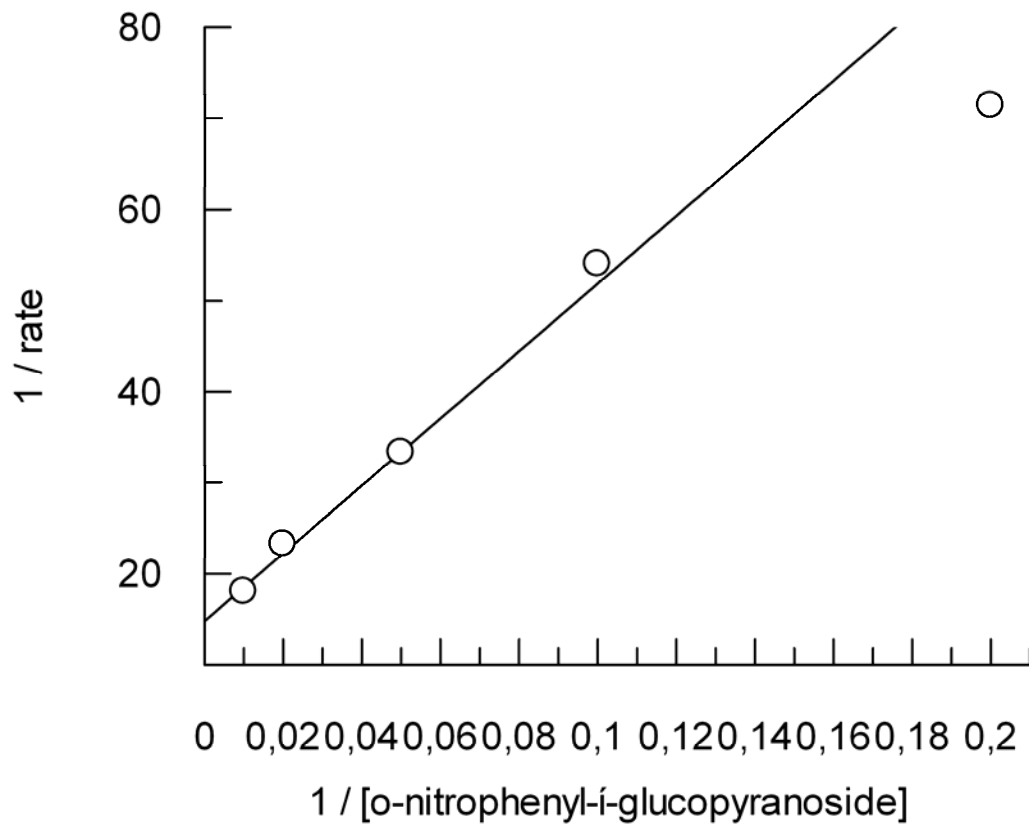
Parameter	Value	Std. Error
V _{max}	0,0676	0,0041
K _m	25,0520	4,0208

Εικόνα 21^η: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της τοματινάσης, σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος της PNG (5, 10, 20, 50, 100 mM). Το διάγραμμα (υπερβολή), παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

Από το παραπάνω διάγραμμα κινητικής μελέτης της τοματινάσης, προκύπτει ότι τα χαρακτηριστικά του ενζύμου είναι τα ακόλουθα :

$$K_m = 25,052 \pm 4,0208 \text{ mM και } V_{\max} = 0,0676 \pm 0,0041 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$$

Επειδή, δεν είναι πάντοτε δυνατό να καθοριστεί, τότε επιτυγχάνεται η V_{\max} , γιατί η καμπύλη σχήματος υπερβολής, έχει βαθμιαία ανοδική κλίση σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, αν παρασταθεί γραφικά η $1/v_0$ ως προς την $1/[S]$, τότε λαμβάνεται ευθεία γραμμή (**Lineweaver-Burke**). Το διάγραμμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της K_m και της V_{\max} .



Εικόνα 22^η: Διάγραμμα Lineweaver-Burke (ή διαφορετικά διάγραμμα διπλού αντιστρόφου).

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η τοματινάση είναι ένα ένζυμο που παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό και οικονομικό ενδιαφέρον. Είναι το ένζυμο εκείνο που βοηθά τους μύκητες να ξεπεράσουν την άμυνα των φυτών της τομάτας (*Lycopersicon esculentum*) απέναντι σε αυτούς τους παθογόνους μικροοργανισμούς, η οποία εκδηλώνεται μέσα από την δράση της τοματίνης που υπάρχει στα φύλλα και στις ρίζες του φυτού. Με τον τρόπο αυτό οι μύκητες προσβάλλουν την τομάτα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των καρπών των καλλιέργειών σε παγκόσμιο επίπεδο. Ανήκει σε μια οικογένεια γλυκοσιδασών (την οικογένεια 3) για την οποία υπάρχουν ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα. Δεν υπάρχουν πληροφορίες ούτε την ενζυμική δράση των μελών της οικογένειας αυτής ούτε και για την δομή τους.

Σε αυτή την εργασία απομονώσαμε την τοματινάση από υγρές καλλιέργειες του μη παθογόνου μύκητα *Fusarium solani*, στελέχους Fsk, αρχικά μέσω ενός καθαρισμού, χρησιμοποιώντας θειικό αμμώνιο 80% για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, και στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε διαπίδυση.

Η παρουσία της τοματινάσης, αλλά και η δραστηριότητά της, επιβεβαιώθηκαν με τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Αφήσαμε το ένζυμο να δράσει πάνω στο φυσικό του υπόστρωμα για διάφορες χρονικές στιγμές, ανιχνεύοντας με τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας την τοματιδίνη, που είναι το προϊόν της αντίδρασης της διάσπασης της τοματίνης από την τοματινάση. Με αυτόν τον τρόπο υπήρξε ένας ποιοτικός έλεγχος της δράσης του ενζύμου.

Για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε κινητικός χαρακτηρισμός του ενζύμου, χρησιμοποιώντας το συνθετικό υπόστρωμα (PNG). Επιτεύχθηκε τελικά η εύρεση των κινητικών σταθερών της τοματινάσης K_m και της V_{max} , αλλά και του βέλτιστου pH δράσης της, που βρέθηκε ότι είναι το 4.

Ακολούθησαν πειράματα προσδιορισμού της ενζυμικής δράσης της τοματινάσης με το φυσικό της υπόστρωμα, την τοματίνη. Αρχικά προσπαθήσαμε να μετρήσουμε την ταχύτητα με την μέθοδο Somogyi-Nelson, που ανιχνεύει την αύξηση της β-γλυκοτετραόζης μέσω της αναγωγής του χαλκού. Επίσης έγινε προσπάθεια ανίχνευσης της β-γλυκοτετραόζης και με την μέθοδο προσδιορισμού των αναγωγικών σακχάρων με τη βοήθεια της χρωστικής DNS, η οποία δεσμεύεται στη β-γλυκοτετραόζη. Τελικά, δεν καταφέραμε να καταλήξουμε σε ασφαλή

συμπεράσματα, καθώς η ποσότητα της β-γλυκοτετραόζης που παράγεται από την αντίδραση της διάσπασης της τοματίνης δεν είναι αρκετή, ώστε να φωτομετρηθεί.

Αυτά τα πειραματικά δεδομένα μας κάνουν να πιστεύουμε ότι το πρόβλημα που αντιμετωπίσαμε εντοπίζεται είτε στο ένζυμο είτε στο υπόστρωμα. Πιο συγκεκριμένα επειδή το ένζυμο βρίσκεται υπό τη μορφή ακατέργαστου εκχυλίσματος μπορεί είτε να είναι πολύ αραιό είτε μπορεί να περιέχει προσμίξεις, που παρεμποδίζουν την δράση του, οπότε ίσως να είναι απαραίτητη η απομόνωση καθαρότερου ενζύμου. Παράλληλα, ένα άλλο πρόβλημα που αντιμετωπίσαμε αφορά το υπόστρωμα. Η τοματίνη που χρησιμοποιήσαμε δεν μπορούσε να διαλυθεί σε συγκεντρώση μεγαλύτερη από 10 mM, οπότε για τα πειράματα της ενζυμικής κινητικής μπορέσαμε να χρησιμοποιήσουμε μέχρι και 7 mM υποστρώματος. Ενδεχομένως, εάν μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ίσως να είχαμε καλύτερα αποτελέσματα, όπως κάναμε, όταν χρησιμοποιήσαμε το τεχνητό υπόστρωμα PNG, από το οποία μπορέσαμε να χρησιμοποιήσουμε μέχρι και 100 mM.

Στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας έχει πραγματοποιηθεί η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδίου της τοματινάσης. Πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός, αλλά και η κλωνοποίηση της, ωστόσο αναμένεται ο ενζυμικός χαρακτηρισμός της ανασυνδυασμένης τοματινάσης.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ajit Varma, Savita Verma, Sudha, Nirmal Sahay, Britta Butehorn and Philipp Franken, 1998, *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte.
- Adams, P.B. and Ayres, W.A. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*.
- Diaz J., Silvar C., Varela M., Bernal A., Merino F., 2005 *Fusarium* confers protection against several mycelia pathogens of pepper plants.
- Dillard, H.R. and Cobb, A.C. 1995. Relationship between leaf injury and colonization.
- Gideon Davies and Bernard Henrissat, 1995, Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases
- G. Fuchs, Y. Moenne-Loccoz and G. Defago, 1998. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 to Protect Tomato against *Fusarium* Wilt
- Karvoulakis, N. Ntougias, S. Zervakis, Gl. Ehaliotis, C. Haralampidis, K. Papadopoulou, KK.2007. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY*.58(14):3853-3864.
- Kaup, O., Grafen, I., Zellerman, E.M., Eichenlaub, R., Gartemann, K.H., 2005, Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Glavibacter michiganensis* NGPPB382
- K Lairini, A Perez-Espinoza, M Pineda, and M Ruiz-Rubio, May 1996, Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*
- Kumiko Oka, Akiko Okubo, Motoichiro Kodama and Hiroshi Otani 2006, Detoxification of a-tomatina by tomato pathogens *Alternaria alternata* tomato pathotype and *Corynerpora casiicola* and its role in infection
- Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger, 2002, *Plant Physiology*
- Olivain C., Alabouvette C., 1998, Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain

- Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. 1999. Microbiology. 4th edition. McGraw-hill
- Redman Regina S., Dunigan David D., Rodriguez Rusty J.,2001,Fungal symbiosis from mutualism to parasitism : who controls the outcome, host or invader?
- Sandrock, R. W.,Della Penna, D., VanEtten, 1995, ppurification characterization of β 2-tomatinase ,an Enzyme involved in the Degredation of α -tomatinase and Isolation of the GeneEncoding β 2-tomatinase from *Septoria lycopersici*
- Simos G., Panagiotidis C. A., Skoumbas A., Choli D., Ouzounis C., Georgatos J. G.,1993, Barley β -glukosidase : expression during seed germination and maturation and partial amino acid sequences
- Simos G., Georgatos J. G. 1988, Lactose-hydrolysing β -glycosidases of barley meal
- Sprague SJ, Watt M,Kirkegaard JA, and Howlett GJ,2007, Pathways of infection of Brassica napus roots by *Leptosphaeria maculans*.
- Teresa Roldan-Arjona, Alonso Perez-Espinoza, and Manuel Ruiz-Rubio, 1999, Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp.lycopersici Defines a New Class of Saponinases
- T. Quidde, A. E. Osbourn and P. Tudzynski , 1998 , Detoxification of α -tomatinase by *Botrytis cinerea*
- Vicky A. Bamford,a Ola O.Kolade,a Anne E. Osbourn and Andrew M. Hemmings , 2004 , Purification Crystalization and preliminary X-ray diffraction analysis of a fungal saponin-detoxifying enzyme.
- VinaleFrancecko, Sivasithamparam Krishnapillai, Ghisalberti Emilio L., Marra Roberta, Woo Sheridan L., Lorito Matteo , 2007 , Trichoderma-plant – pathogen interactions
- Zehnder ,G.W., Murphy, J.F., Sikora,E.J., Kloepper, J.W., 2001 . Application to rhizobacteria for induced resistance.

