



## Σύμπραξη συμμετεχόντων φορέων

- Ανώνυμη Εταιρεία Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης της Βιομηχανίας Τροφίμων (ΕΤΑΤ Α.Ε.)
- Ινστιτούτο Ελαιάς & Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.)
- Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.)
- Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Τεχνολογίας Περιβάλλοντος
- Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας Εδαφολογίας και Γεωργικής Χημείας, Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας και Εδαφολογίας
- Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας
- Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας
- «Ελευθέριος Λαχουβάρης» Παραγωγή Υποστρωμάτων Καλλιέργειας Μανιταριών
- Γεωπονική Χαραντώνης Δημήτριος
- Αγροτικός Συνεταιρισμός Νιοχωρίου - Λεύκτρου
- Βιοκαλλιεργητές Σητείας Α.Ε.

# Βιολογική επεξεργασία και αξιοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας

Τεύχος 3, Ιούνιος 2007

## Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για λακκάση και Μn-υπεροξειδάση στο στέλεχος *Pleurotus ostreatus* IK-1123

Δρ. Σπύρος Ντούγιας, Δρ Ν. Καβρουλάκης, Δρ. Γ. Ζερβάκης  
Ινστιτούτο Ελαιάς & Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.) και  
Δρ Κ. Παπαδοπούλου (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)

Οι φαινολικές ουσίες των ΥΑΕ που είναι υπεύθυνες για την υψηλή τοξικότητα και το μαύρο χρώμα του αποβλήτου, έχουν συγγενή δομή με τη λιγνίνη, την κυτταρίνη ή με ενώσεις που προκύπτουν από την αποδόμησή τους. Για το λόγο αυτό, λιγνοκυτταρινολυτικοί βασιδιομύκητες και κυρίως μύκητες λευκής σήψης ("white-rot fungi") μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές σχετικές με την αποδόμηση των υγρών αποβλήτων ελαιουργίας (ΥΑΕ). Τα συνήθη ένζυμα που εμπλέκονται στη αποδόμηση των ΥΑΕ είναι η λιγνίνη-υπεροξειδάση, η υπεροξειδάση του μαγγανίου και η λακάση (φαινολοξειδάση).

Στα πλαίσια του εν λόγω ερευνητικού έργου, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για λακκάση και Μn-υπεροξειδάση στο στέλεχος *Pleurotus ostreatus* IK-1123 που αναπτύσσεται σε απόβλητα ελαιουργείων.

Στόχοι των πειραματικών προσεγγίσεων είναι:

α) η αναγνώριση ορθόλογων γονιδίων που εκφράζονται κατά τη διάρκεια της αποδόμησης των ΥΑΕ από το επιλεγμένο στέλεχος μύκητα,

β) η διευκρίνιση του προτύπου της έκφρασης των γονιδίων αυτών και του ρόλου τους κατά τη διάρκεια της αποδόμησης,

γ) η μελέτη του ενζυμικού μηχανισμού αποδόμησης των ΥΑΕ από το επιλεγμένο αυτό στέλεχος.

Τρεις συγκεντρώσεις ΥΑΕ (12.5%, 25% και 50% v/v) μελετήθηκαν, ενώ πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις 5, 10, 20 και 30 ημέρες (t5, t10, t20 και t30 αντίστοιχα) μετά τον εμβολιασμό του υποστρώματος. Σε όλους τους χειρισμούς προσδιορίστηκε το ξηρό βάρος του μυκηλίου, ο βαθμός αποχρωματισμού, το ολικό φαινολικό φορτίο, ο δείκτης βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου καθώς και η ενεργότητα των ενζύμων λακκάση και υπεροξειδάση (εξαρτώμενη και μη του Μn). Επίσης, σε κάθε χειρισμό, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA, καθαρισμός αυτού και υλοποίηση της αντίδρασης RT-PCR, χρησιμοποιώντας κατάλληλα επιλεγμένους εκκινήτες. Για την ταυτοποίηση των ενισχυμένων τμημάτων πραγματοποιήθηκε ένθεση προϊόντος RT-PCR σε πλασμιδιακό φορέα, εύρεση της αλληλουχίας βάσεων και σύγκριση ακολουθιών.

Βάσει των αποτελεσμάτων,

δεν παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων του ενζύμου λακκάση την περίοδο t(10) παρουσία ΥΑΕ συγκεντρώσεως 12.5% v/v, προφανώς λόγω εξάντλησης διαφόρων φαινολικών συστατικών από τα πρώτα στάδια επώασης (ήδη η δράση του ενζύμου και η αποδόμηση φαινολικών συστατικών είναι σημαντική από τη χρονική περίοδο t5). Αντιθέτως, παρατηρήθηκε επαγωγή γονιδίων του ενζύμου λακκάση την περίοδο t(10) παρουσία ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25 και 50% v/v, ενώ δεν επάγονταν στους μετέπειτα χειρισμούς, προφανώς λόγω εξάντλησης διαφόρων φαινολικών συστατικών. Στο χειρισμό t(10) σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25% v/v ενισχύθηκαν δύο διαφορετικά cDNA που αντιστοιχούν σε φαινολοξειδάσες διαφορετικού μοριακού βάρους.

Στην περίπτωση του ενζύμου Μn-υπεροξειδάση (MnP), η επαγωγή της έκφρασης γονιδίων MnP παρουσία ΥΑΕ συγκεντρώσεως 12.5% είναι σταθερή για τους χειρισμούς t(10) και t(20), ενώ παρατηρείται σχετική μείωση της έκφρασης στο χειρισμό t(30). Σε ΥΑΕ συγκεντρώσεως 25%, δεν παρατηρήθηκε έκφραση των

γονιδίων MnP στο χειρισμό t(10), ενώ στα μετέπειτα στάδια επώασης παρατηρήθηκε έκφραση με ενίσχυση δύο διαφορετικών cDNAs που φθίνει στο t(30). Τέλος, δεν παρατηρήθηκε έκφραση των γονιδίων MnP παρουσία YAE συγκεντρώσεως 50% στους χειρισμούς t(10) & t(20), εν αντιθέσει με το χειρισμό t(30).

Συμπερασματικά προκύπτει ότι η

επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων του ενζύμου λακκάση προηγείται αυτής του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση. Επιπλέον, σε αραιωμένα YAE (έως 25% v/v) η αποδόμηση ολοκληρώνεται στα πρώτα στάδια επώασης.

Στην παρούσα φάση κατασκευάζεται μια αφαιρετική βιβλιοθήκη, χρησιμοποιώντας cDNA από το μύκητα που

είχε αναπτυχθεί στην παρουσία YAE και σε «ελαχιστοποιημένο» θρεπτικό υλικό. Οι κοινές εκφραζόμενες αλληλουχίες απομακρύνεται με κατάλληλους υβριδισμούς και η βιβλιοθήκη σαρώνεται διαφορικά. Η διαφορική έκφραση των εντοπισμένων με αυτόν τον τρόπο κλώνων επιβεβαιώνεται με ανάλυση κατά Northern και αλληλούχιση τους.

## Μελέτη και προσδιορισμός γονιδίων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιουργείου

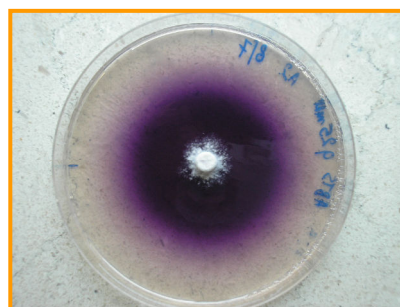
### Καθηγήτρια Μιλτιάδης Τύπας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας

Σκοπός είναι η βελτίωση της διαδικασίας αποδόμησης των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου (YAE) με τη χρήση μυκήτων λευκής σήψης και των λιγνινολυτικών τους ενζύμων. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας κρίθηκε απαραίτητη η απομόνωση, ο χαρακτηρισμός και η αξιοποίηση γονιδίων του συστήματος αποτοξικοποίησης των YAE που χρησιμοποιείται από μύκητες λευκής σήψης (βασιδιομύκητες). Οι βασιδιομύκητες αναπτύσσονται φυσιολογικά σε ξύλο και αποικοδομούν την λιγνίνη (σύνθετο πολυμερές από φαινολοπροπανικές μονάδες), ένα από τα συστατικά του ξύλου μαζί με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη. Στα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης ανήκουν δύο γλυκοζυλιωμένες υπεροξειδάσες, η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP), καθώς και μια φαινολοξειδάση, η λακκάση (Pox/Lac), και εμφανίζουν απουσία εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη μυκήτων, που ανήκουν στα είδη *Pleurotus ostreatus* και *Phanerochaete chrysosporium*. Το πρώτο επιλέχθηκε μετά την αξιολόγηση ενός μεγάλου αριθμού βασιδιομυκήτων, όσον αφορά την ικανότητα τους στην βιοαποδόμηση των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου. Ο μύκητας *Phanerochaete chrysosporium* έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες διεθνώς για την αποικοδόμηση του YAE, λόγω της αυξημένης ικανότητας να αποικοδομεί πολυφαινολικές ενώσεις, όπως αυτές που περιέχουν τα YAE, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και στα δικά μας πειράματα.

Σε πρώτο στάδιο έγιναν μελέτες της ανάπτυξης των στελεχών κάτω από διαφορετικές συνθήκες και συγκεντρώσεις YAE, αλλά και ο καθορισμός συγκεκριμένων θρεπτικών μέσων (χημικά προσδιορισίμα), ώστε να υπάρχει συγκριτικό σημείο αναφοράς στις μελέτες του τρόπου/ελέγχου λειτουργίας των γονιδίων (ενzymικές δραστηριότητες, επαγωγή, καταστολή κ.λπ.). Παράλληλα, εφαρμόστηκαν πολλά και διαφορετικά πρωτόκολλα ενzymικών προσδιορισμών βασισμένα στη διεθνή βιβλιογραφία προκειμένου να γίνουν οι κατάλληλες βελτιώσεις/τροποποιήσεις.

Σε δεύτερο στάδιο, για την ανάκτηση των γονιδίων ενδιαφέροντος σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητικών μορίων (primers) και έγινε εμπλουτισμός (PCR) πέντε τμημάτων και έντεκα

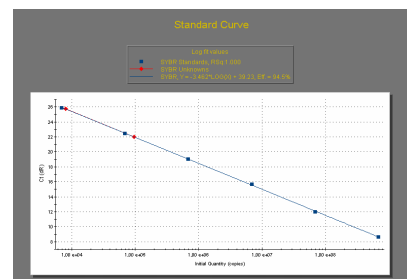


**Ποιοτικός προσδιορισμός παραγωγής λακκάσης σε τρυβλίο**

ολόκληρων γονιδίων για λακκάσες, υπεροξειδάσες λιγνίνης και Mn-υπεροξειδάσες. Όλα τα προϊόντα εμπλουτισμού κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλους φορείς και αναλύθηκε η πρωτοταγής δομή τους (sequencing). Η ταυτότητά τους πιστοποιήθηκε σε σύγκριση με αλλη-

λουχίες που έχουν κατατεθεί στις γενετικές τράπεζες.

Παράλληλα, για την ανάκτηση των γονιδίων χωρίς έσωνια, κατασκευάστηκαν cDNA βιβλιοθήκες των δύο στελεχών, με mRNA απομονωμένο από μυκήλιο που έχει αναπτυχθεί σε συνθήκες επαγωγής των λιγνινολυτικών ενζύμων. Τα ήδη κλωνοποιημένα γονίδια χρησιμοποιούνται ως ι-χνηθέτες για την ανάκτηση των χωρίς έσωνια γονιδίων από τις βιβλιοθήκες.



**Πρωταρχικά αποτελέσματα qPCR για το γονίδιο υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) του μύκητα *P. chrysosporium*.**

Τα γονίδια των λακκασών που απομονώθηκαν χρησιμοποιούνται για το μετασχηματισμό του *Phanerochaete chrysosporium*, ενώ τα γονίδια των υπεροξειδάσων της λιγνίνης για το μετασχηματισμό του *Pleurotus ostreatus*. Μετασχηματίζοντας τους μύκητες με γονίδια των ενζύμων που δε παράγουν επιδιώκεται η βελτιστοποίηση της αποδόμησης των YAE.

Για την μελέτη και ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων λιγνινολυτικών ενζύμων των φυσικών στελεχών αλλά και των μετασχηματισμένων, όταν αναπτύσσονται σε YAE

και προσδιορίσιμα θρεπτικά μέσα χρησιμοποιείται μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος προσδιορισμού της έκφρασης των γονιδίων, το real time- PCR (qPCR). Οι αντιδράσεις γίνονται στο μηχάνημα Mx3000P της

Stratagene. Γνωρίζοντας την ακριβή αλληλουχία των γονιδίων σχεδιάστηκαν ειδικά εκκνητικά μόρια (primers). Τα γονίδια των πρωτεϊνών που εκφράζονται περισσότερο όταν οι μύκητες αναπτύσσονται σε YAE

θα κλωνοποιηθούν σε κατάλληλους φορείς έκφρασης ώστε να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες από επιλεγμένα στελέχη βακτηρίων και ζυμών.

## Μελέτη της ικανότητας βιοαποδόμησης φαινολικών συστατικών, μοριακής φυλογένειας και βιομετατροπών οικονομικού ενδιαφέροντος από βακτήρια που ενδιαιτούν στα YAE.

Εργ. Ν. Πανόπουλου, IMBB-ITE και Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Κρήτης, Ηράκλειο

Στα πλαίσια του έργου μελετήθηκαν επιλεγμένα στελέχη βακτηρίων, αλλά και ο συνολικός βακτηριακός πληθυσμός σε δείγματα YAE. Οι μελέτες αυτές συμπεριελάμβαναν ταξινόμηση, μοριακά προφίλ, φυλογενετικές σχέσεις, ικανότητα μεταβολισμού φαινολικών συστατικών και ικανότητα βιομετατροπών τους σε προϊόντα εμπορικού ενδιαφέροντος. Συγκεκριμένα, αρχικά απομονώθηκαν από YAE 3 φάσεων βακτηριακά στελέχη ικανά να αναπτύσσονται σε τουλάχιστον ένα από πέντε επιλεγμένα φαινολικά υποστρώματα (κουμαρικό, καφεϊκό, συριγικό, βανιλικό, και πρωτοκατεχουϊκό οξύ) που βρίσκονται σε YAE. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι φυσιολογικές, βιοχημικές και μεταβολικές τους ικανότητες, η ικανότητα τους για αποδόμηση και βιομετατροπές φαινολικών συστατικών των YAE σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας και η ταξινόμική τους θέση και φυλογενετικές τους σχέσεις με βάση τις πλήρους μήκους αλληλουχίες ριβοσωμικού RNA. Επίσης, εφαρμόστηκαν δυο μεταγονιδιωματικές προσεγγίσεις στη μικροβιολογία των YAE: α) μελέτη του φυλογενετικού προφίλ κλωνοποιημένων αλληλουχιών rRNA από συνολικό DNA των YAE (χωρίς προηγουμένως να καλλιεργηθούν οι μικροοργανισμοί σε θρεπτικά μέσα) και β) μελέτη του φυλογενετικού προφίλ του συνολικού βακτηριακού πληθυσμού σε επτά δείγματα YAE που αντιπροσώπευαν ελαιοτριβεία 2 και 3 φάσεων από διάφορες ελαιοκομικές περιοχές της χώρας.

Με βάση τα μοριακά αποτυπώματα των στοιχείων ERIC και BOX τα περισσότερα στελέχη ομοδοποιήθηκαν σε δύο ομάδες ενώ τρία στελέχη είχαν διακριτά αποτυπώματα από όλα τα άλλα. Στο φυλογενετικό δένδρο των 16S rRNA αλληλουχιών, η πλειονότητα των στελεχών συμπεριλαμβανόμενων εκείνων της ομάδας

A, τοποθετούνται στα Εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae*) στον κλάδο των γ-πρωτεοβακτηρίων, τα στελέχη της ομάδας B στην ομάδα των *Burkholderiaceae*, *Pandora* species στον κλάδο των β-πρωτεοβακτηρίων ενώ δύο στελέχη στον κλάδο των *Firmicutes* με πλησιέστερους συγγενείς μέλη των *Staphylococcaceae* (*S. pasteurii* & *S. epidermitis*, αντίστοιχα). Από τη μελέτη του συνολικού βακτηριακού «μεταγενώματος» των YAE, προκύπτει ότι στους μικροοργανισμούς που εκπροσωπούνται στην μεταγενετική βιβλιοθήκη rRNA συμπεριλαμβανόταν συγγενείς της τάξης γ-proteobacteria, όπως και μη καλλιεργημένα εντεροβακτήρια, μέλη του γένους *Shigella* Ακτινοβακτήρια, *Firmicutes* (*Clostridium*), μη καλλιεργημένα στελέχη του γένους *Staphylococcus* και απρωτεοβακτήρια (*Gyrocarpus*) και πιθανώς και κυανοβακτήρια. Τα συμπεράσματα της φυλογενετικής ανάλυσης είναι ότι οι πλησιέστεροι φυλογενετικοί συγγενείς βακτηρίων που ενδιαιτούν σε YAE είναι οργανισμοί που δεν έχουν καλλιεργηθεί ("uncultured bacteria") που δεν έχουν μελετηθεί από φυσιολογική ή βιοχημική άποψη και παραμένουν άγνωστοι στην περιβαλλοντική μικροβιολογία.

Χρησιμοποιήθηκαν μικροσυστοιχίες ριβοσωμικού DNA που εκπροσωπούν 9.000 βακτήρια (PhyloChip, εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας του Lawrence Berkeley Laboratory, Berkeley, California, USA) για το χαρακτηρισμό του μικροβιακού μεταγενώματος σε 7 δείγματα YAE. Από την προκαταρκτική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα: α) η σύνθεση του προκαρυωτικού πληθυσμού είναι διαφορετική για κάθε δείγμα, β) η τεχνολογία εκχύλισης του ελαιόλαδου (2 ή 3 φάσεων) επηρεάζει τη βακτηριακή βιοποικιλότητα

των YAE σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι η γεωγραφική προέλευση ή ποικιλία των ελαιόδεντρων, γ) Εντεροβακτήρια υπάρχουν σε όλα τα δείγματα, γεγονός το οποίο ενδεχομένως έχει σημασία από υγειονομικής πλευράς.

Από τη μελέτη των μεταβολικών ικανοτήτων ενός αριθμού βακτηρίων προκύπτει ότι η πλειονότητα των στελεχών είναι ικανά να αποδομούν πλήρως φαινολικά συστατικά των YAE με εξαίρεση το συριγικό οξύ και ένα στέλεχος διαθέτει και την ικανότητα να παρεμποδίζει τον σχηματισμό μαύρου χρώματος σε συνθετικό μείγμα φαινολικών ουσιών, όχι όμως και σε YAE. Τέλος, εντοπίστηκαν ορισμένα στελέχη ικανά να παράγουν νέα προϊόντα μεταβολισμού όταν αναπτύσσονται σε YAE. Μεταξύ αυτών των ουσιών ιδιαίτερο ενδιαφέ παρουσιάζει η υδροξυτυροσόλη, ουσία με ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και υψηλή εμπορική αξία. Μελέτες που συνεχίζονται αποσκοπούν στην βελτιστοποίηση των συνθηκών παραγωγής αυτών των ουσιών με καλλιέργειες των επιλεγμένων μικροοργανισμών σε YAE όπως και στην απομόνωση και χαρακτηρισμό ενζύμων για βιομετατροπή συστατικών των YAE σε προϊόντα υψηλής εμπορικής αξίας. Η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων διευρύνει τις δυνατότητες οικονομικά βιώσιμης διαχείρισης των YAE.

\*Η μελέτη του μεταβολικού προφίλ και βιομετατροπών έγινε με συνεργασία του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Χημείας του Παν/μίου Κρήτης και η μελέτη του rRNA μεταγενώματος σε συνεργασία με τα εργαστήρια του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του ITE και του εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας του Lawrence Berkeley Laboratory, US Department of Energy, Berkeley, California, USA.

ΑΝΑΔΟΧΟΣ ΕΡΓΟΥ:  
ΕΤΑΤ Α.Ε.

Υπεύθυνος Αναδόχου:  
Δρ. Φραγκίσκος Γαίτης  
Τηλέφωνο: 210-9270040  
fax: 210-9270041  
e-mail: f.gaitis@etat.gr

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ  
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΕΡΓΟΥ:  
Δρ. Γεώργιος Ζερβάκης,  
Ινστιτούτο Ελαίας &  
Οπωροκρηπευτικών  
Καλαμάτας (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.)  
Τηλέφωνο: 27210-91784  
fax: 27210-27133  
e-mail:  
zervakis@kal.forthnet.gr

Γ' ΚΟΙΝΩΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΤΗΡΙΞΗΣ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ



«Το έργο

συγχρηματοδοτείται  
κατά 75% από την  
Ευρωπαϊκή Ένωση -  
Ευρωπαϊκό Ταμείο  
Περιφερειακής  
Ανάπτυξης και κατά  
25% από το Ελληνικό  
Δημόσιο στα πλαίσια  
του Επιχειρησιακού  
Προγράμματος  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
του Μέτρου 4.5, της  
Δράσης 4.5.1 του  
Συντονισμένου  
Προγράμματος ΦΥΣΙΚΟ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ  
ΒΙΩΣΙΜΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.  
(Κωδικός ΦΠ66)»

## Λίγα λόγια για του συμμετέχοντες φορείς

### Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Το εργαστήριο, έχει μακρόχρονη πείρα σε θέματα Μικροβιακής – Μοριακής Γενετικής και Βιοτεχνολογίας. Οι ερευνητικές του δραστηριότητες περιστρέφονται σε δύο κύριες κατευθύνσεις :

**α) Γενετική Μυκήτων:** Μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων με οικονομική σημασία, όπως φυτοπαθογόνοι και εντομοφάγοι μύκητες, με κλασικές μοριακές τεχνικές (RFLPs, RAPD, AFLP, PFGE, PCRing, DNA/DNA, DNA/RNA υβριδισμοί, ανοσοϋβριδισμοί κ.λπ.). Ανάλυση του πυρηνικού συμπλέγματος των rRNA επαναλαμβανόμενων γονιδίων, εσωνίων εντός αυτών (SSU, LSU) και εξειδικευμένων μοτίβων της μη μεταγραφόμενης περιοχής IGS. Ανάλυση δομής - λειτουργίας μιτοχονδριακών DNA (το εργαστήριο θεωρείται άκρως εξειδικευμένο στην ανάλυση μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων μιτοσπορικών μυκήτων δεδομένου ότι από τα 28 παγκοσμίως γνωστά γονιδιώματα έχει 10 δικά του). Φυλογενετικές και εξελικτικές διαφοροποιήσεις μικροοργανισμών, βιοποικιλότητα, βιοασφάλεια. Σε επίπεδο ρουτίνας κλασικές προσεγγίσεις δημιουργίας-απομόνωσης μεταλλαγών, μωτικού ανασυνδυασμού, πρωτοπλαστών, απομόνωσης και χαρακτηρισμού γονιδίων, γενετικού μετασχηματισμού με διάφορους φορείς έκφρασης και αδρανοποίησης και τέλος αντικατάστασης γονιδίων ή διακοπής λειτουργίας.

**β) Βακτηριακή Γενετική:** Μελέτη διάφορων βακτηρίων που παράγουν ένζυμα, βιοκαταλύτες ή γενικότερα ουσίες βιομηχανικής σημασίας. Ιδιαίτερη έμφαση στα συστήματα γενετικής τροποποίησης – ανάλυσης γονιδιακών προϊόντων – γονιδιωματικής ανάλυσης και μελέτης συστημάτων επικοινωνίας βακτηρίων (Quorum sensing). Σε επίπεδο ρουτίνας κλασικές προσεγγίσεις δημιουργίας-απομόνωσης μεταλλαγών (ακτινοβολίες, χημικές ουσίες, μεταθετά στοιχεία), μοριακός – λειτουργικός χαρακτηρισμός πλασμιδίων, κατασκευή στελεχών και φορέων έκφρασης γονιδίων.

Ως οργανισμός πρότυπο στο εργαστήριο χρησιμοποιείται το αιθανολοπαραγωγό βακτήριο *Zyotomonas mobilis*, στο οποίο μελετώνται οι μοριακοί μηχανισμών επιδιόρθωσης, ομόλογου και μη ομόλογου γενετικού ανασυνδυασμού, καθώς και τα συστήματα συνύπαρξης πολλών φυσικών πλασμιδίων παρομοίων μοριακών μεγεθών.

Το Εργαστήριο είναι πλήρως εξοπλισμένο με όλα τα απαραίτητα όργανα για εκτέλεση πειραμάτων Μοριακής Γενετικής Μικροοργανισμών.

### Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

Στο IMBB η έρευνα που εκτελείται δίνει έμφαση στην διερεύνηση των βασικών μηχανισμών της ζωής, στα ολοκληρωμένα προγράμματα αποκωδικοποίησης της δομής και της λειτουργίας όλων των γονιδίων ενός οργανισμού και τέλος στην κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης και περιβαλλοντικής προσαρμογής των ζωντανών οργανισμών. Οι τεχνολογίες που αναπτύσσονται στο Ινστιτούτο βασίζονται στη γενετική μηχανική και έχουν τρεις γενικούς στόχους:

- την βελτίωση της ποιότητας αλλά και της ποσότητας της παραγόμενης τροφής με την ανάπτυξη μεθόδων ορθολογικής καταπολέμησης εχθρών της γεωργίας και την ορθολογική διαχείριση της κτηνοτροφίας
- την παραγωγή ενζύμων, πρωτεϊνών και ανοσοδιαγνωστικών με βιοτεχνολογικές και φαρμακευτικές εφαρμογές και
- την ανάπτυξη τεχνολογιών με εφαρμογές στη λειτουργική γονιδιωματική, δηλαδή για την ανακάλυψη της λειτουργίας όλων των πρωτεϊνών ενός οργανισμού.

Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας δημοσιεύονται σε υψηλού κύρους διεθνή επιστημονικά περιοδικά, κατοχυρώνονται με διεθνή διπλώματα ευρεσιτεχνίας και αποτελούν την βάση για συνεργασίες με διεθνείς εταιρείες αλλά και για την δημιουργία νέων εταιρειών.

Τα πιο σημαντικά επιτεύγματα του IMBB που του έχουν δώσει και την διεθνή αναγνώριση είναι:

- Πληθώρα μελετών που αφορούν την διερεύνηση των μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων και δημοσιευμένων σε διεθνή περιοδικά υψηλού επιστημονικού κύρους
- Προγράμματα γονιδιωματικής έρευνας. Συμμετοχή του IMBB στα ολοκληρωμένα πι γονιδιώματα της ζύμης, της Δροσόφιλας και του ανθρώπου.
- Ανάπτυξη τεχνολογίας μεταφοράς γονιδίων σε έντομα οικονομικής σημασίας και επέκτασή της σε ανθρώπινα κύτταρα και σε ποντίκια (μεταθετό στοιχείο Μίνως).
- Έρευνα και ανάπτυξη νέας γενιάς εντομοκτόνων με στόχο την πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την σύνθεση της χιτίνης των εντόμων (συνεργασία με Bayer).
- Τοπολογία πρωτεϊνών, μηχανισμοί έκκρισης πρωτεϊνών, παραγωγή βιοφαρμακευτικών πρωτεϊνών (συνεργασία με Pfizer).