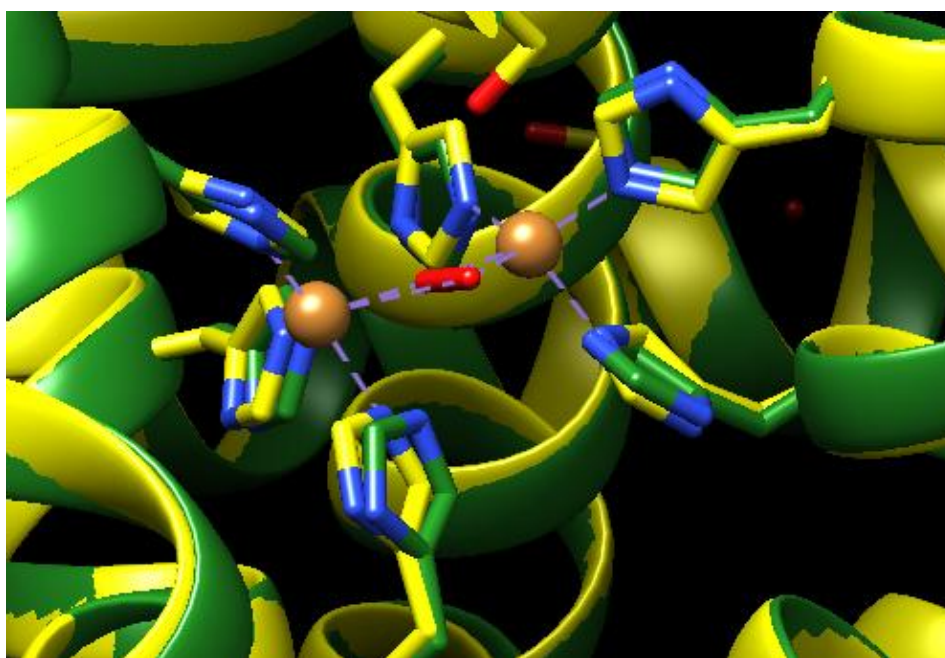


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ VI: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ενίσχυση της δράσης μονοφαινολάσης
μίας πολυφαινολοξειδάσης του μύκητα
Myceliophthora thermophila με
μεθόδους πρωτεϊνικής μηχανικής



μ -

: , . .

2016

μ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

μ μ μ μ *Myceliophthora thermophila* μ
 μ μ .
 μ μ μ *pPICZ A* μ
 μ DNA μ μ *MtOx60685*. To
L306A (MutOx2) Y296V (MutOx3) μ G292N (MutOx1),
 μ μ . μ μ μ PCR, μ
33 μ *Pichia pastoris* μ μ μ -
. μ μ μ μ , μ
 μ , μ μ μ μ μ
 μ G292N μ μ
 μ / 1,89, μ μ μ μ
 μ μ L- .
 μ μ L306A Y296V
 μ μ . μ μ μ μ
 μ pH μ μ μ
, μ . μ μ
 μ μ G292N. μ μ
 μ μ μ T=60°C
pH μ μ 6-8.
 μ μ μ
Michaelis-Menten μ μ μ μ 4-

μ . μ μ
μ μ MtOx ($k_{cat}/K_m=3006,2\pm 197,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), μ
μ μ μ MtOx2 ($k_{cat} / K_m=61,7\pm 9,3\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). μ
, μ ,
μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ 187
S199. μ μ
μ μ PCR
μ μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ pCR[®] Blunt. μ
μ μ μ μ μ *P. pastoris*, μ μ
μ .

ABSTRACT

The purpose of this specific diploma thesis was the protein engineering of a polyphenol oxidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* towards enhancement of its monophenolase activity.

The recombinated plasmid *pPICZ A* which included the coding sequence of polyphenol oxidase gene *MtOx6068* was used as a template. The different mutations G292N (MutOx1), L306A (MutOx2) and Y296V (MutOx3) were introduced into the plasmid DNA through site-directed mutagenesis, using PCR. The mutated genes were inserted in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* through transformation and accordingly, the mutated proteins were heterologously expressed.

The substrate specificity of the enzyme MtOx, as well as that of the mutated proteins, was examined on a wide range of phenolic substrates. The activities of the examined enzymes in each substrate were determined spectroscopically and found to differ between them, without presenting any special pattern. The ratio of monophenolase/diphenolase activity of enzyme MutOx1 was substantially increased to the value of 1,89, whereas the wild type showed no tyrosinase activity on L-tyrosine. The enzymes which carried the mutations L306A and Y296V respectively presented an enhanced activity towards polyphenolic substrates.

The mutated enzymes were also characterized in terms of pH- and T-optimum, as well as in terms of thermostability. The enzyme MutOx1 proved to be the most thermostable between the four examined proteins. The T-optimum of all the mutated enzymes was 60°C and the pH-optimum was between the values 6-8.

Furthermore the Michaelis-Menten constants of the oxidation of 4-chlorocatechol and catechol catalyzed by the four enzymes were calculated. The highest catalytic efficiency in the substrate 4-chlorocatechol was exhibited by MtOx ($k_{\text{cat}}/K_m=3006,2\pm 197,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), whereas in catechol by MutOx2 ($k_{\text{cat}}/K_m=61,7\pm 9,3\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Following the purpose of enhancing the monophenolase activity of the enzyme MtOx, one more mutation was introduced in the wild type gene, in order to cut out a sequence of 11 amino acids between 187 and S199. The rest gene sequences located

on the right and left side of the corresponding 33 nucleotide- part were amplified and isolated with PCR. They were afterwards combined in one final mutated gene which was used for the recombination of the plasmid *pCR*[®] Blunt. The transformation of the yeast *P. pastoris*, the heterologous expression of the mutated protein (MutOx4) and its characterization are yet to be carried out.

Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.	ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΕΞΕΛΙΞΗ	5
1.1.	Ορισμός και γενικές αρχές	5
1.2.	Κατευθυνόμενη εξέλιξη στο πρωτεϊνικό επίπεδο	6
2.	ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	7
2.1.	Εισαγωγή	7
2.2.	Είδη μεταλλάξεων	7
2.3.	Εμφάνιση μεταλλάξεων-Μηχανισμοί	8
3.	ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΟΞΕΙΔΑΣΕΣ	12
3.1.	Πολυφαινολοξειδάσες (PPOs)	12
3.2.	Τυροσινάση	13
3.3.	Κατεχολοξειδάση	22
3.4.	Εξειδικευμένη δράση μονοφαινολάσης/ διφαινολάσης- Ερμηνεία	26
3.5.	Κατευθυνόμενη εξέλιξη σε PPOs	30
3.6.	Υποστρώματα- Ονοματολογία	32

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.	ΟΡΓΑΝΑ- ΣΥΣΚΕΥΕΣ	37
2.	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	38
3.	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	39
3.1.	Εμπορικά Ένζυμα και αντιδραστήρια	39
3.2.	Αντιβιοτικά	39
3.3.	Θρεπτικά υλικά	40
3.4.	Ρυθμιστικά διαλύματα (buffer)	42
3.5.	Εκκινητές	42
3.6.	Πλασμιδιακοί φορείς	43
4.	ΓΟΝΙΔΙΑΚΟ DNA	45
5.	ΜΕΘΟΔΟΙ	46
5.1.	Παρασκευή θρεπτικών υλικών	46
5.2.	Μοριακές τεχνικές	47
5.3.	Τεχνικές παραγωγής και παραλαβής πρωτεΐνης	56

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	77
1.1.	Μεταλλάξεις G292N, L306A και Y296V:.....	77
1.2.	Μετάλλαξη MutOx I178-S199:	78
2.	ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ <i>P. pastoris</i> ..	79
2.1.	Επιλογή του κατάλληλου κλώνου μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης <i>P. pastoris</i> για την παραγωγή της πρωτεΐνης.....	79
2.2.	Υπολογισμός της παραγωγής πρωτεΐνης ανά μονάδα όγκου της υγρής καλλιέργειας.....	83
3.	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	83
3.1.	Προσδιορισμός του μεγέθους της ανασυνδυασμένης μεταλλαγμένης πρωτεΐνης	83
3.2.	Προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής της αρχικής PPO και των μεταλλάξεων αυτής	85
3.3.	Δράση σε διαφορετικά υποστρώματα	88
3.4.	Θερμικά χαρακτηριστικά.....	92
3.5.	Βέλτιστη τιμή pH δράσης	95
3.6.	Κινητικές σταθερές.....	95

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σε πηκτική ακρυλαμίδου SDS- PAGE:.....	103
2.	Κατηγοριοποίηση του ενζύμου:.....	104
3.	Συμπεράσματα σχετικά με την εξελικτική σχέση μικροοργανισμών που παράγουν PPOs:.....	105
4.	Κινητικές παράμετροι:	106
5.	Εξειδικευμένη δράση σε διάφορα υποστρώματα:	107
6.	Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης:.....	109
7.	Θερμοσταθερότητα:.....	109
8.	Βέλτιστο pH δράσης:	111
9.	Σύγκριση με την πρωτεΐνη AoCO:	112
10.	Προτάσεις για το μέλλον:.....	113
10.1.	Όσον αφορά το μη μεταλλαγμένο ένζυμο MtOx:	113
10.2.	Όσον αφορά όλα τα εξεταζόμενα ένζυμα MtOx και MutOx1,2 και 3:.....	113

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΕΞΕΛΙΞΗ

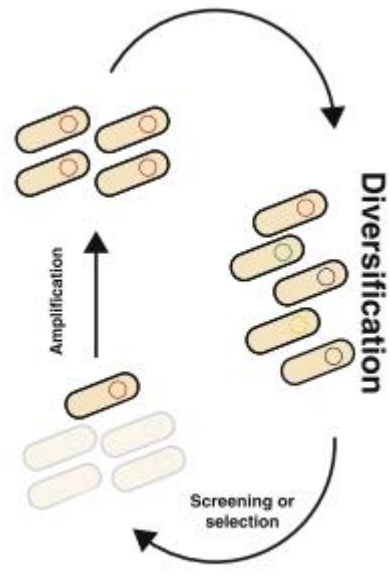
1.1. Ορισμός και γενικές αρχές

Η κατευθυνόμενη εξέλιξη είναι η διαδικασία στην οποία η φυσική επιλογή επηρεάζει την πορεία της εξέλιξης, οδηγώντας σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της επιλογής των ατόμων που έχουν τα πιο ευνοϊκά χαρακτηριστικά για το περιβάλλον, ή μέσω της εισαγωγής νέων χαρακτηριστικών στο πληθυσμό. Η κατευθυνόμενη εξέλιξη μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση νέων ειδών, ή στην αλλαγή της μορφής και της λειτουργίας ενός είδους.

(Bassalo, Liu, & Gill, 2016a).

Η κατευθυνόμενη εξέλιξη μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της επιλογής των ατόμων που έχουν τα πιο ευνοϊκά χαρακτηριστικά για το περιβάλλον, ή μέσω της εισαγωγής νέων χαρακτηριστικών στο πληθυσμό. Η κατευθυνόμενη εξέλιξη μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση νέων ειδών, ή στην αλλαγή της μορφής και της λειτουργίας ενός είδους.

(Cobb, Sun, & Zhao, 2013).



Εικόνα 1. Συνήθης διαδικασία κατευθυνόμενης εξέλιξης (Bassalo et al., 2016)

1.2. Κατευθυνόμενη εξέλιξη στο πρωτεϊνικό επίπεδο

μ μ μ

.

μ μ μ , μ μ

μ μ . , μ μ

μ ,

μ . (Uria & Zilda, 2016).

μ μ μ μ μ

.

μ μ

μ , μ

μ . μ

μ μ μ

μ , μ μ μ μ

(Jäckel, Kast, & Hilvert, 2008).

μ μ , μ

μ μ

μ , μ

μ μ μ

(xylose reductase XR) μ D-

, μ μ , L-

Nair Zhao (Nair N.U, Zhao H, 2008). 2016 Nimpiboon et al.

μ μ μ

Corynebacterium glutamicum (CgAM) μ

μ μ (Nimpiboon et al., 2016).

μ μ μ μ

μ μ μ .

2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

2.1. Εισαγωγή

Η μετάλλαξη είναι η αλλαγή στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο DNA. Η μετάλλαξη μπορεί να συμβεί λόγω της αβούλειας των ενζύμων ή λόγω της έκθεσης σε φυσικούς ή χημικούς παράγοντες. Η μετάλλαξη μπορεί να είναι βλαβερή ή ωφέλιμη. Η μετάλλαξη είναι η πηγή της γενετικής ποικιλίας. (Michael L. Shuler, Fikret Kargi, 2005).

DNA

2.2. Είδη μεταλλάξεων

Η μετάλλαξη μπορεί να είναι σημειακή ή δομική. Η σημειακή μετάλλαξη αφορά την αλλαγή ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων στο DNA. Η δομική μετάλλαξη αφορά την αλλαγή στην δομή του DNA.

2.2.1. Μετάλλαξη σημείου

Η μετάλλαξη σημείου είναι η αλλαγή ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων στο DNA. Η μετάλλαξη σημείου μπορεί να είναι αντικατάσταση, διαγραφή ή εισαγωγή. Η αντικατάσταση είναι η αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου σε άλλο. Η διαγραφή είναι η απώλεια ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων. Η εισαγωγή είναι η προσθήκη ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων. Η μετάλλαξη σημείου μπορεί να είναι σιωπηλή, συντηρητική ή μη συντηρητική. Η σιωπηλή μετάλλαξη δεν αλλάζει το πρωτεϊνικό προϊόν. Η συντηρητική μετάλλαξη αλλάζει το πρωτεϊνικό προϊόν, αλλά η αλλαγή είναι μικρή. Η μη συντηρητική μετάλλαξη αλλάζει το πρωτεϊνικό προϊόν, αλλά η αλλαγή είναι μεγάλη. (Michael L. Shuler, Fikret Kargi, 2005).

« ».

2.2.2. Μετάλλαξη εξάλειψης

Η μετάλλαξη εξάλειψης είναι η απώλεια ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων στο DNA. Η μετάλλαξη εξάλειψης μπορεί να είναι μικρή ή μεγάλη. Η μικρή μετάλλαξη εξάλειψης αφορά την απώλεια ενός ή δύο νουκλεοτιδίων. Η μεγάλη μετάλλαξη εξάλειψης αφορά την απώλεια ενός ή περισσότερων γονιδίων.

(Flibotte et al., 2010)

(Michael L. Shuler, Fikret Kargi, 2005).

2.2.3. Μετάλλαξη προσθήκης

μ μ , μ

DNA.

μ .

2.2.4. Κυκλική μετάθεση (Circular permutation)

μ μ

μ μ

μ

μ

μ

μ

μ

μ

μ

N-

C-

μ

μ

μ

μ

μ

μ

.

μ μ

μ

μ

μ

μ

μ

μ μ

μ

μ

μ

μ

μ

(Pierre, Shah, Xiao,

& Kim, 2015).

2.3. Εμφάνιση μεταλλάξεων-Μηχανισμοί

μ

μ μ DNA

,

μ

,μ

:

2.3.1. Τυχαία μεταλλαξιγένεση με error-prone PCR

μ

μ

μ

μ

μ

,

μ

.

μ

μ

DNA

μ

μ

μ

μ

μ

DNA(error- prone

PCR).

μ

μ

μ

Mn²⁺

dNTPs

μ

μ

PCR,

μ

μ

μ

μ

(. . Taq polymerase)

(Nimpiboon et al., 2016).

μ

DNA

PCR

μ

μ DNA μ μ μ .

2.3.2. Τυχαία μεταλλαξιγένεση με χρήση χημικών μεταλλαξογόνων παραγόντων

μ μ μ .

μ DNA

μ (. . μ ,

μ), (. . , UV

), μ (. . μ), μ (μ) ,

(UV) (μ μ μ) .

μ μ DNA μ

μ

. DNA μ

μ μ DNA

μ , μ μ μ (Liu et al., 2016).

μ μ μ

, μ

.

2.3.3. Αναδιάταξη του DNA (DNA shuffling)

μ μ μ μ μ

μ μ DNA μ .

μ μ μ μ μ ,

, μ μ μ

μ μ . μμ DNA μ

μ « μ » μ DNA μ

, μ μ . μ μμ

, μ μ μ

μ μ μ μ μ

μ μ DNA. DNA

μ μ μ μ , μ

μ μ μ μ

« μ » μ (F. H. Arnold, G. Georgiou, 2003).
 DNA μ μ
 μ (Bassalo, Liu, & Gill, 2016b).

2.3.4. Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (site-directed mutagenesis)

μ , μ μ
 μ μ , μ μ .
 DNA μ μ μ
 μ μ μ . μ μ
 μ μ μ
 μ μ μ μ
 (primers).

μ μ μ μ μ
 μ μ . , μ μ
 DNA, μ μ μ
 μ μ μ
 (H. Robert Horton, Laurence A. Moran et al., 2008).

. DNA
 μ μ , , μ μ
 μμ DNA μ μ
 μ μ μ μ
 (Bruce Alberts, Dennis Bray et al., 2011). DNA

μ μ
 μ μ DNA.
 μ μ μ
 μ μ , μ
 μ μ (CP) μ .
 μ μ μ μ
 , μ μ
 μ μμ DNA.

3. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΟΞΕΙΔΑΣΕΣ

3.1. Πολυφαινολοξειδάσες (PPOs)

3.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Οι πολυφαινολοξειδάσες (PPOs) είναι ένζυμα που κατατάσσονται στην οικογένεια των οξειδάσων (EC 1.10.3.1, 1.10.3.2, 1.10.3.3, 1.10.3.4, 1.10.3.5, 1.10.3.6, 1.10.3.7, 1.10.3.8, 1.10.3.9, 1.10.3.10, 1.10.3.11, 1.10.3.12, 1.10.3.13, 1.10.3.14, 1.10.3.15, 1.10.3.16, 1.10.3.17, 1.10.3.18, 1.10.3.19, 1.10.3.20, 1.10.3.21, 1.10.3.22, 1.10.3.23, 1.10.3.24, 1.10.3.25, 1.10.3.26, 1.10.3.27, 1.10.3.28, 1.10.3.29, 1.10.3.30, 1.10.3.31, 1.10.3.32, 1.10.3.33, 1.10.3.34, 1.10.3.35, 1.10.3.36, 1.10.3.37, 1.10.3.38, 1.10.3.39, 1.10.3.40, 1.10.3.41, 1.10.3.42, 1.10.3.43, 1.10.3.44, 1.10.3.45, 1.10.3.46, 1.10.3.47, 1.10.3.48, 1.10.3.49, 1.10.3.50, 1.10.3.51, 1.10.3.52, 1.10.3.53, 1.10.3.54, 1.10.3.55, 1.10.3.56, 1.10.3.57, 1.10.3.58, 1.10.3.59, 1.10.3.60, 1.10.3.61, 1.10.3.62, 1.10.3.63, 1.10.3.64, 1.10.3.65, 1.10.3.66, 1.10.3.67, 1.10.3.68, 1.10.3.69, 1.10.3.70, 1.10.3.71, 1.10.3.72, 1.10.3.73, 1.10.3.74, 1.10.3.75, 1.10.3.76, 1.10.3.77, 1.10.3.78, 1.10.3.79, 1.10.3.80, 1.10.3.81, 1.10.3.82, 1.10.3.83, 1.10.3.84, 1.10.3.85, 1.10.3.86, 1.10.3.87, 1.10.3.88, 1.10.3.89, 1.10.3.90, 1.10.3.91, 1.10.3.92, 1.10.3.93, 1.10.3.94, 1.10.3.95, 1.10.3.96, 1.10.3.97, 1.10.3.98, 1.10.3.99, 1.10.3.100).

Οι PPOs είναι ένζυμα που κατατάσσονται στην οικογένεια των οξειδάσων (EC 1.10.3.1, 1.10.3.2, 1.10.3.3, 1.10.3.4, 1.10.3.5, 1.10.3.6, 1.10.3.7, 1.10.3.8, 1.10.3.9, 1.10.3.10, 1.10.3.11, 1.10.3.12, 1.10.3.13, 1.10.3.14, 1.10.3.15, 1.10.3.16, 1.10.3.17, 1.10.3.18, 1.10.3.19, 1.10.3.20, 1.10.3.21, 1.10.3.22, 1.10.3.23, 1.10.3.24, 1.10.3.25, 1.10.3.26, 1.10.3.27, 1.10.3.28, 1.10.3.29, 1.10.3.30, 1.10.3.31, 1.10.3.32, 1.10.3.33, 1.10.3.34, 1.10.3.35, 1.10.3.36, 1.10.3.37, 1.10.3.38, 1.10.3.39, 1.10.3.40, 1.10.3.41, 1.10.3.42, 1.10.3.43, 1.10.3.44, 1.10.3.45, 1.10.3.46, 1.10.3.47, 1.10.3.48, 1.10.3.49, 1.10.3.50, 1.10.3.51, 1.10.3.52, 1.10.3.53, 1.10.3.54, 1.10.3.55, 1.10.3.56, 1.10.3.57, 1.10.3.58, 1.10.3.59, 1.10.3.60, 1.10.3.61, 1.10.3.62, 1.10.3.63, 1.10.3.64, 1.10.3.65, 1.10.3.66, 1.10.3.67, 1.10.3.68, 1.10.3.69, 1.10.3.70, 1.10.3.71, 1.10.3.72, 1.10.3.73, 1.10.3.74, 1.10.3.75, 1.10.3.76, 1.10.3.77, 1.10.3.78, 1.10.3.79, 1.10.3.80, 1.10.3.81, 1.10.3.82, 1.10.3.83, 1.10.3.84, 1.10.3.85, 1.10.3.86, 1.10.3.87, 1.10.3.88, 1.10.3.89, 1.10.3.90, 1.10.3.91, 1.10.3.92, 1.10.3.93, 1.10.3.94, 1.10.3.95, 1.10.3.96, 1.10.3.97, 1.10.3.98, 1.10.3.99, 1.10.3.100).

3.1.2. Δομικά χαρακτηριστικά

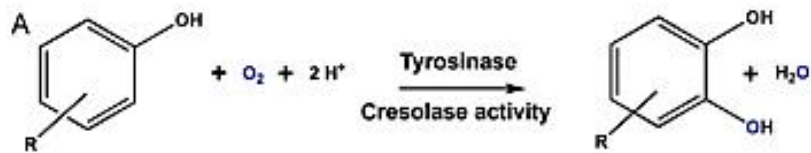
Οι PPOs είναι ένζυμα που κατατάσσονται στην οικογένεια των οξειδάσων (EC 1.10.3.1, 1.10.3.2, 1.10.3.3, 1.10.3.4, 1.10.3.5, 1.10.3.6, 1.10.3.7, 1.10.3.8, 1.10.3.9, 1.10.3.10, 1.10.3.11, 1.10.3.12, 1.10.3.13, 1.10.3.14, 1.10.3.15, 1.10.3.16, 1.10.3.17, 1.10.3.18, 1.10.3.19, 1.10.3.20, 1.10.3.21, 1.10.3.22, 1.10.3.23, 1.10.3.24, 1.10.3.25, 1.10.3.26, 1.10.3.27, 1.10.3.28, 1.10.3.29, 1.10.3.30, 1.10.3.31, 1.10.3.32, 1.10.3.33, 1.10.3.34, 1.10.3.35, 1.10.3.36, 1.10.3.37, 1.10.3.38, 1.10.3.39, 1.10.3.40, 1.10.3.41, 1.10.3.42, 1.10.3.43, 1.10.3.44, 1.10.3.45, 1.10.3.46, 1.10.3.47, 1.10.3.48, 1.10.3.49, 1.10.3.50, 1.10.3.51, 1.10.3.52, 1.10.3.53, 1.10.3.54, 1.10.3.55, 1.10.3.56, 1.10.3.57, 1.10.3.58, 1.10.3.59, 1.10.3.60, 1.10.3.61, 1.10.3.62, 1.10.3.63, 1.10.3.64, 1.10.3.65, 1.10.3.66, 1.10.3.67, 1.10.3.68, 1.10.3.69, 1.10.3.70, 1.10.3.71, 1.10.3.72, 1.10.3.73, 1.10.3.74, 1.10.3.75, 1.10.3.76, 1.10.3.77, 1.10.3.78, 1.10.3.79, 1.10.3.80, 1.10.3.81, 1.10.3.82, 1.10.3.83, 1.10.3.84, 1.10.3.85, 1.10.3.86, 1.10.3.87, 1.10.3.88, 1.10.3.89, 1.10.3.90, 1.10.3.91, 1.10.3.92, 1.10.3.93, 1.10.3.94, 1.10.3.95, 1.10.3.96, 1.10.3.97, 1.10.3.98, 1.10.3.99, 1.10.3.100).

μ (Kaintz et al., 2014). μ
 μ
 C- μ μ . μ μ « » PPOs
 (Hakulinen, Gasparetti, Kaljunen, Kruus, & Rouvinen, 2013).

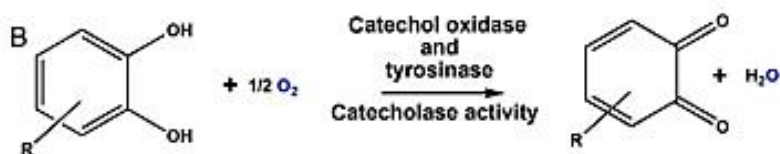
3.2. Τυροσινάση

3.2.1. Δράση ενζύμου

« » μ μ μ
 . μ
 μ μ .
 - μ μ (2.)
 (3.).
 μ (1)
 (2) (Bijelic, Pretzler, Molitor, Zekiri, & Rompel, 2015).
 μ , μ μ ,
 μ μ ,
 , μ μ , μ ,
 μ μ . μ μ
 μ μ (Faccio, Kruus, Saloheimo, & Thöny-Meyer, 2012).
 , μ (Kaintz et al.,
 2014), μ μ ,
Bacillus megaterium (Goldfeder, Kanteev, Adir, & Fishman, 2013).



Εικόνα 2 . Δράση μονοφαινολάσης (Kainz et al., 2014)



Εικόνα 3. Δράση διφαινολάσης (Kainz et al., 2014)

3.2.2. Καταλυτικός μηχανισμός

μ μ μ μ μ μ μ N 6
 μ His μ μ 4 -
 (Sendovski, Kanteev, Ben-Yosef, Adir, & Fishman, 2011).

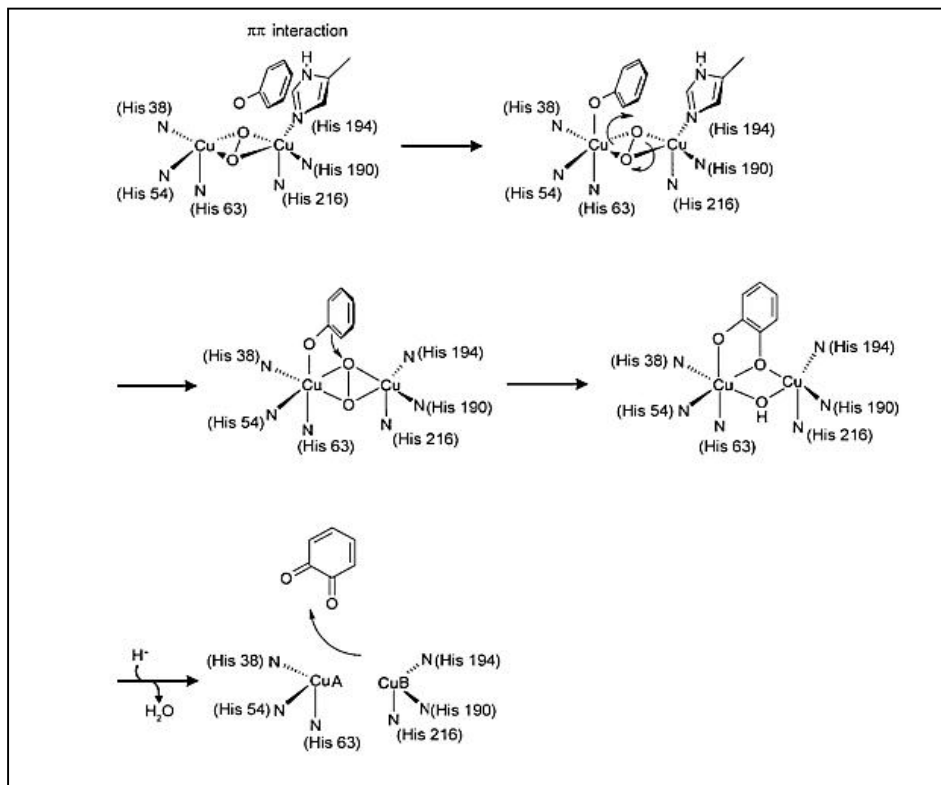
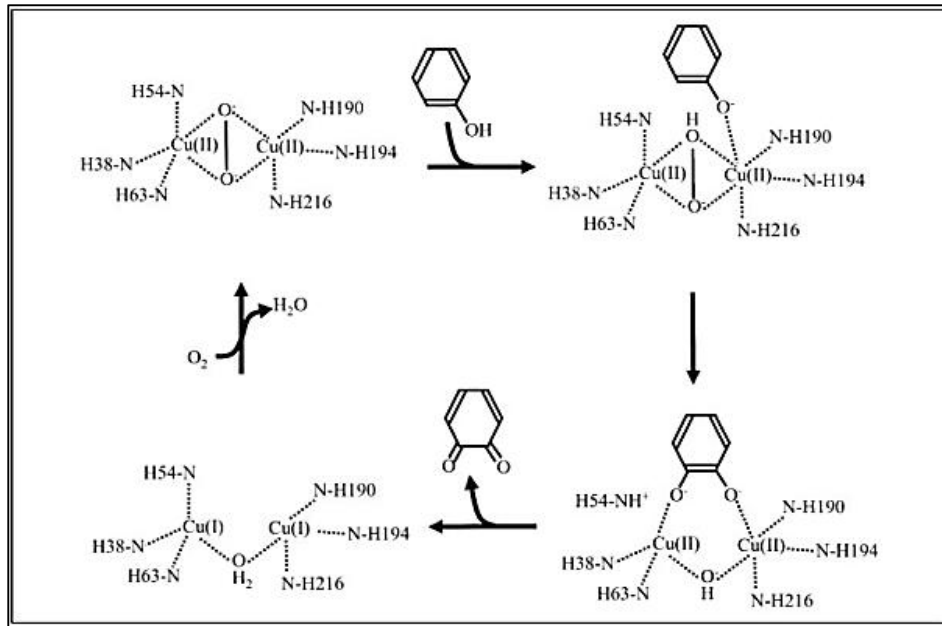
His μ μ Cu(A) Cu(B)
 μ ,
 μ (Olivares & Solano, 2009).

Κ μ
 μ . μ μ
 «deoxy» μ μ μ μ μ
 μ . μ μ μ μ
 . μ μ μ μ
 , μ «oxy»
 μ μ [Cu(II)-O2-Cu(II)] (Rolff, M; Schottenheim, J; Decker, H; Tuczek, 2011).

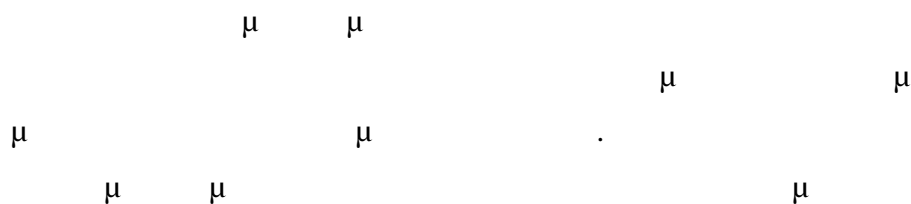
μ μ μ μ μ μ
 μ - . μ μ
 μ . μ «met» μ μ
 μ μ Cu(II) μ μ
 μ . oxy μ μ
 μ μ μ , μ μ
 μ μ μ - ,
 μ μ - . μ μ
 . μ μ
 , μ μ μ .
 μ met- μ μ , μ
 deoxy- (Lee, Baek,
 Lee, & Kim, 2016).

μ μ μ μ μ μ
 , μ μ μ μ μ μ
 .

μ ,
μ μ Matoba et al. (2006) Decker et al. (2006).
μ μ μ , μ μ
, :
μ μ Cu(II) oxy μ
μ μ
μ .
μ μ μ Cu
μ μ μ « »
μ -
μ μ μ μ
μ μ μ μ
μ μ μ
, μ
,
μ deoxy (4.) (Matoba, Kumagai, Yamamoto,
Yoshitsu, & Sugiyama, 2006) (Decker, Schweikardt, & Tuczec, 2006).
μ μ μ μ
μ μ Cu(A) ,
μ μ Matoba et al.
μ μ μ Cu(B) μ
Decker et al. Cu(A)
μ .



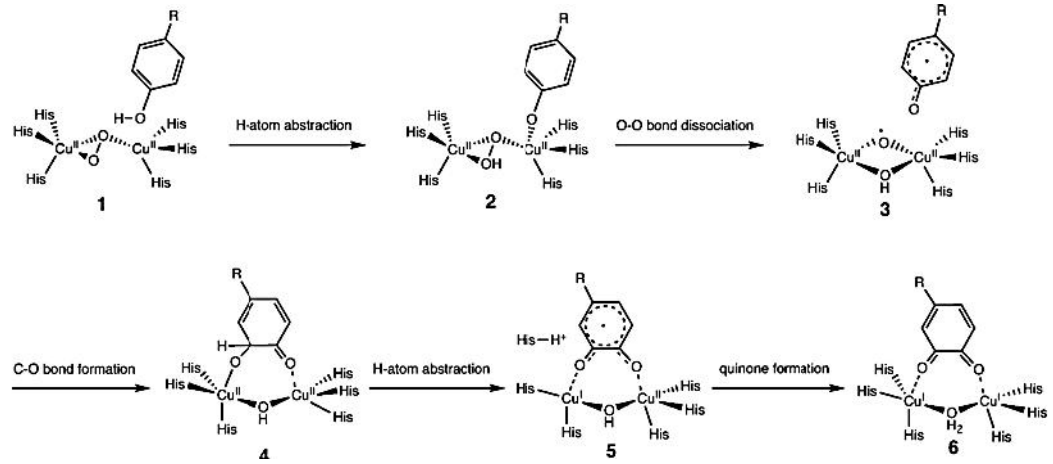
Εικόνα 4. Εικονική αναπαράσταση των σταδίων του καταλυτικού μηχανισμού της SctYR σύμφωνα με τους Matoba et al. (2006) (πάνω) και τους Decker et al. (2006) (κάτω). Το υπόστρωμα δεσμεύεται στην οξυ μορφή και απελευθερώνεται οδηγώντας έτσι στη deoxy μορφή



(Inoue, Shiota, & Yoshizawa, 2008).

μ μ μ :

Εικόνα 5. Εναλλακτικός μηχανισμός δράσης του ενζύμου τυροσινάση, με βάση το μηχανισμό ριζών (Inoue et al., 2008).



3.2.3. Χρησιμότητα ενζύμου

μ , μ

- μ

μ . μ μ

μ μ μ , .

μ μ μ Parkinson.(Matoba et al., 2006)

μ , μ

μ μ , μ μ

μ .

(-) μ μ

μ , μ , μ

μ μ

μ μ μ μ μ

μ μ

- μ - (μ)

(Goldfeder et al., 2013).

μ μ

μ μ

μ μ ,
 μ .
 μ μ
 μ *Rhizobium etli* μ
 μ μ μ ,
E. coli W3110 (Lagunas-Muñoz,
 Cabrera-Valladares, Bolívar, Gosset, & Martínez, 2006).

μ μ μ
 μ μ , μ
 μ μ μ , μ
 μ μ μ μ , μ
 μ μ μ .
 μ , μ μ μ
 μ μ μ μ μ (Faccio et al.,
 2012). μ A.
bisporus *T. reesei*
 μ μ (Ercili-Cura, 2012).
 μ μ μ ,
 μ μ μ μ , μ
 μ .
 μ μ μ μ μ
 (Faccio et al., 2012)(Fairhead & Thony-Meyer,
 2012). μ
 μ .

3.2.5. Κρυσταλλική δομή ενζύμου

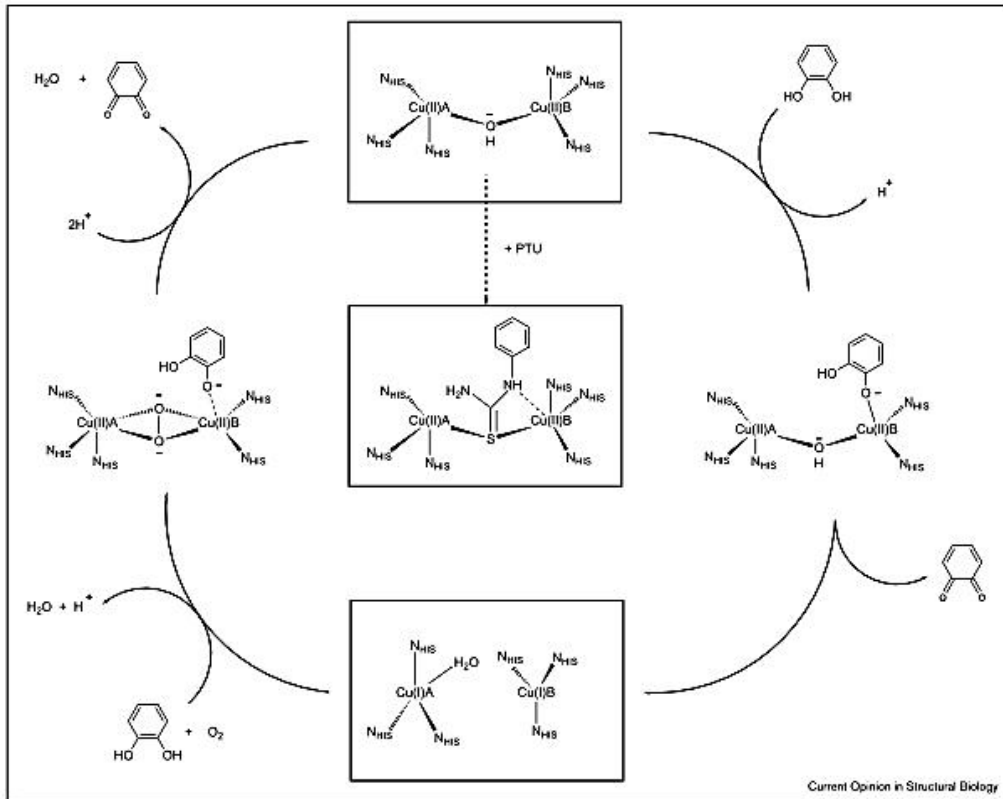
μ μ
S. Castaneoglobisporus Matoba et al. (2006).
 μ μ ScTYR- μ μ μ
 μ , - μ μ μ μ
 ORF378 . μ μ μ
 Cu(II) . 2011

μ μ BmTYR
Sendovski et al. (2011). μ μ
μ , μ μ .
μ μ μ μ
μ μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ μ μ μ Cu(A)
μ His. BmTYR
μ μ μ Val,
μ (Kaintz et al., 2014). μ μ
« » μ μ ,
μ μ μ
μ .
μ μ μ , μ μ μ
BmTYR, Cu(A) μ μ
μ , μ μ Cu(B)
μ μ μ μ
Cu(A) μ , μ
(Sendovski et al., 2011) Decker et al. (2006)
Olivares et al. (2009).
2015 μ μ
 , *Juglans regia*, () Bijelic et al.
μ μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ μ
Cu(A) μ μ μ μ
μ S μ Cys, μ μ μ μ Cu(A)
μ Phe μ μ
 , μ μ
 . μ

μ μ μ -
 « » μ μ -
 μ μ , μ
 (Molitor, Mauracher, & Rompel, 2016).

3.3.2. Καταλυτικός μηχανισμός

μ μ μ CO
 Klabunde et al. (1998) Wright et al. (2009).
 μ met .
 μ μ μ μ
 μ oxy . μ μ μ
 Cu(B) (Klabunde, Eicken,
 Sacchettini, & Krebs, 1998). μ
 μ μ μ μ
 μ - μ μ H₂O μ
 μ - . μ OH⁻
 μ μ μ
 met μ (Wright &
 Dyson, 2009).
 μ μ COs
 μ H⁺ μ μ Cu
 (Siegbahn, 2004).



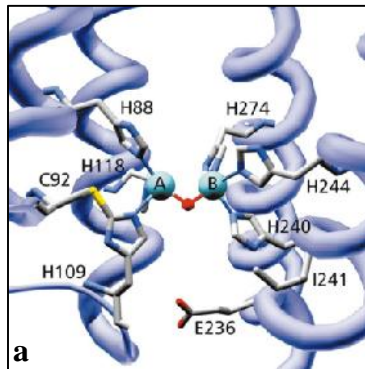
Εικόνα 8. Προτεινόμενος καταλυτικός μηχανισμός του ενζύμου κατεχολοξειδάση (Eicken, Krebs, & Sacchettini, 1999)

3.3.3. Κρυσταλλική δομή ενζύμου

μ IbCO (CO)
 , Klabunde et al. (1998).
 μ μ μ ,
 μ μ μ (PTU) μ
 μ . μ
 μ *Vitis vinifera*
 Virador et al. (2010). μ μ
 μ μ ,
 μ μ .
 μ μ 4 -
 , μ His μ 2 Cu (Kaintz
 et al., 2014). C s
 μ μ μ Cys
 μ His μ μ

Cu(A) (Virador et al., 2010).).

μ Phe
 μ
 μ μ
 μ , *Aspergillus oryzae*
 Hakulinen et al. (2013). μ μ
 AoCO μ
 μ . μ AoCO μ
 μ μ μ
 μ μ COs
 Cu μ μ 4 - .
 μ μ μ His
 4 - .
 μ μ AoCO
 μ 2 - μ μ
 , μ μ 3 μ
 (Leu 180- Leu182) μ μ
 μ Phe
 μ μ Cys- His (Hakulinen et al., 2013).



μ μ μ
 μ COs μ , μ
 .
 μ COs IbCO VvCO μ
 μ Phe μ
 μ .
 μ , , μ μ
 μ . μ μ
 μ μ Phe Leu
 μ μ .
 μ Phe
 , μ
 Cu(A) μ
 μ (. . Decker et al., 2006). Cu(B)
 μ μ μ ,
 μ .
 μ μ Phe
 μ ScTYR BmTYR.
 ScTYR μ , BmTYR
 μ Val μ
 Phe (Sendovski et al., 2011). μ μ
 AoCO μ
 μ Phe. μ 2 - 3 μ Leu
 μ μ Cu(A)
 (Hakulinen et al., 2013). μ μ
 μ μ μ μ
 μ .
 μ μ μ μ
 met . ,
 μ « μ », μ
 μ μ oxy μ μ .

μ , μ μ μ

μ μ μ μ

3.5.2. Γνωστές προσπάθειες εισαγωγής ή ενίσχυσης της δράσης μονοφαινολάσης ορισμένων PPOs μέχρι σήμερα

μ COs μ

μ μ μ 2010,

Shuster Ben-Yosef et al., μ μ

Bacillus megaterium.

μ R209H BmTYR 1,7

μ μ μ μ 1,5

μ μ μ

μ His Cu(B),

μ μ (Shuster Ben-Yosef, Sendovski, & Fishman, 2010).

Goldfeder et al. (2013)

μ BmTYR, μ

μ

μ V218-

μ μ Phe Gly (Goldfeder et al., 2013).

Solem et al.

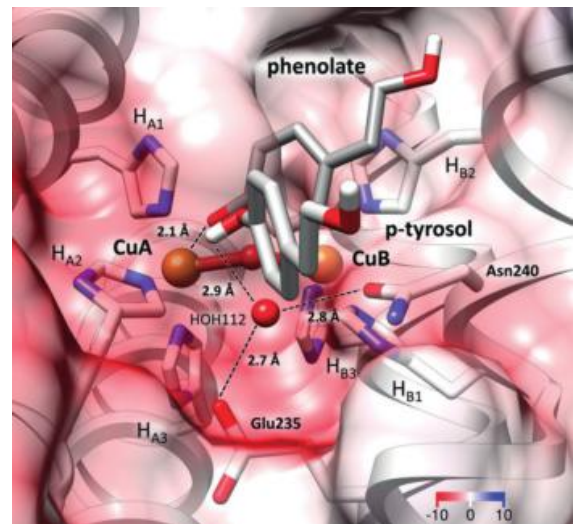
2016 μ

μ VvCO μ μ

μ μ μ

μ μ μ μ Asn

(μ G241 μ μ Asn (μ G241N)



Εικόνα 12. Το ενεργό κέντρο της μεταλλαγμένης VvCO, παρουσία του υποστρώματος p- tyrosol. Διακρίνονται τα αμινοξέα Glu και Asp, το μόριο νερού και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις (Solem et al., 2016)

241
 His Cu(B)
 μ μ /
 Asn μ μ μ Glu
 μ (Solem et al.,
 2016). μ μ μ μ

3.6. Υποστρώματα- Ονοματολογία

μ , μ - μ
 μ μ , ,
 , μ .

3.6.1. Μονοφαινόλες

μ
 μ
 , μ μ
 μ μ (Weng
 & Yen, 2012). μ «μ » μ
 μ , μ
 μ -OH μ
 PPOs μ μ
 μ -OH
 μ «μ -»
 (Quideau, Deffieux,
 Douat-Casassus, & Pouységu, 2011). μ μ
 μ μ ,
 «μ » μ μ
 μ μ μ μ μ
 μ .

3.6.2. Όρθο- διφαινόλες

μ μ ,
μ « » μ
.
μ μ
μ , μ μ « » μ
μ -OH . -
μ
« ». - μ μ
μ COs. μ
μ μ μ , ,
μ μ (Nolan & O'Connor, 2007).
μ μ ,
(Allouche, Damak, Ellouz, & Sayadi, 2004).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΟΡΓΑΝΑ- ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- : μ μ
- Labo Autoclave, SANYO (. . .)
- pH-μ 537, WTW (μ)
- Orbit LS, Labnet (. . .)
- μ μ μ Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (μ)
- μ μ
- μ ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd ()
- μ UV2000, Hitachi (. . .)
- μ Direct-Q, Millipore (. . .)
- μ TC-512, TECHNE (. . .)
- Easygel H1-set, Scie-plas (. . .)
- Micropulser™, Biorad (. . .)
- μ Mini-PROTEAN 3, Biorad (. . .)
- E863, CONSORT ()
- μ InGenius BioImaging, Syngene (. . .), μ μ GeneSnap v6.05 GeneTools v3.06
-
- Amicon Stirred Cell 8400 μ μ μ PM-10, Millipore (. . .)
- J2-21 TJ-6 Beckman Coulter (. . .), Sorval® RC28S, DuPont (. . .) μ Eppendorf 3200 (μ)
- (Biorad, . . .) μ Talon® μ (Clontech, . . .)
- μ μ μ μ
- Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) Abs 120-4 (KERN & Sohn GmbH)

- μ microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices)
- SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG Labtech)

μ
: , μ , , ,
, , eppendorf tubes, paster, μ .

2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

μ μ μ μ
:

Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene,): μ

DNA μ μ
 μ pPICZ (Invitrogen).
 μ .

endA,

μ DNA μ . :
endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10
proAB⁺ lacI^q (lacZ)M15 Amy Cm^R] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)

Escherichia coli TOP 10 (Invitrogen,): μ

DNA μ μ
 μ pCR[®] Blunt (Invitrogen).
 μ .

μ . :

F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 nupG recA1 araD139
(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 -

Pichia pastoris -33 (Invitrogen): μ μ *Pichia*

pastoris (μ Mut⁺) μ

μ μ pPICZ A.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

3.1. Εμπορικά Ένζυμα και αντιδραστήρια

- μ Pfu Turbo HotStart Polymerase (2,5 U/ μ L) (Agilent Technologies)
 - μ KOD Hot Start Polymerase (1,0 U/ μ L) (Novagen)
 - μ *EcoRI* (15 U/ μ L) (Takara Bio Inc.)
 - μ *XbaI* (15 U/ μ L) (Takara Bio Inc.)
 - μ *DpnI* (10 U/ μ L) (Takara Bio Inc.)
 - μ *EndoH* (500 U/ μ L) (BioLabs Inc.)
 - μ ExpressLink™ T4 DNA Ligase† (5 U/ μ L) (Invitrogen)
- μ DNA
 μ *E. coli* μ GenElute™ Plasmid Miniprep
 Kit (Sigma- Aldrich). μ DNA μ
 μ μ NucleoSpin® Gel and
 PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

3.2. Αντιβιοτικά

- DNA μ , μ :

Πίνακας 1. Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν και συγκέντρωση αυτών

μ		(μ g/mL)
<i>E. coli</i> TOP 10	μ	50
<i>E. coli</i> XL1- Blue		25
<i>P.pastoris</i>		100

3.3. Θρεπτικά υλικά

μ (. 1.) μ XL1-Blue
 LS-LB (Low Salt-LB) μ
 , μ
 « » .
 :

Πίνακας 2. Σύσταση θρεπτικού υλικού LB

	% w/v	μ	H ₂ O
	1		
NaCl* ¹	1		
μ μ (Yeast extract)	0,5		
* ²	1,5		

*¹ LS-LB 0,5%
 w/v NaCl, μ .

*²

LB *E. coli* TOP10 μ (. 1.)
 μ

μ *P. pastoris* μ
 : YPD, BMGY, BMMY .
 (. 1.) .
 , μ μ
 :

Πίνακας 3.. Σύσταση θρεπτικού YPD για ανάπτυξη της ζύμης *P. pastoris*

YPD	
	% w/v
	μ H ₂ O
	2
	2
μ μ	1
*	2

*

Πίνακας 4. Σύσταση διαλύματος YNB, απαραίτητου συστατικού των BMGY, BMMY

	% w/v μ H ₂ O
Ammonium Sulfate	10
Yeast Nitrogen Base	3,4

Πίνακας 5. Σύσταση θρεπτικών υλικών BMGY, BMMY, MM για ανάπτυξη της ζύμης *P. pastoris* (b)

	% w/v μ H ₂ O
	1,5
	% v/v
	10
μ	0,5
	0,4 mg/L
BMGY	
	% w/v μ H ₂ O
	2
μ μ	1
	% v/v
	10
μ μ 1M Potasium Phosphate pH=6	10
X10 μ *	10
	0,4 mg/L
CuSO ₄	25 μ

* BMMY 0,5% v/v μ , μ BMGY, μ μ μ

3.4. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffer)

μ μ μ :

Πίνακας 6. Σύσταση και pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

μ μ	pH		()
Sodium Phosphate	6-8	Na ₂ HPO ₄	0,1
		NaH ₂ PO ₄	0,1
Potassium Phosphate	6	K ₂ HPO ₄	1
		KH ₂ PO ₄	1
Na ₂ HPO ₄ / Citric acid	3-6	Na ₂ HPO ₄	0,2
		Citric acid	0,1
Tris/ HCl	8-9	Tris base	0,1
		HCl	
Talon	8	Tris base	0,5
		NaCl	3
Tris/ 0.2% w/v SDS	8,8	Tris base	0,75
		SDS 0,2% w/v	
Tris/ 0.2% w/v SDS	6,8	Tris base	0,25
		SDS 0,2% w/v	

3.5. Εκκινητές

μ μ μ μ , MtOx60685
 μ μ μ μ
 μ μ DNA μ
 (primers) μ μ μ
 MtOx ,
 Eurofins MWG Operon.

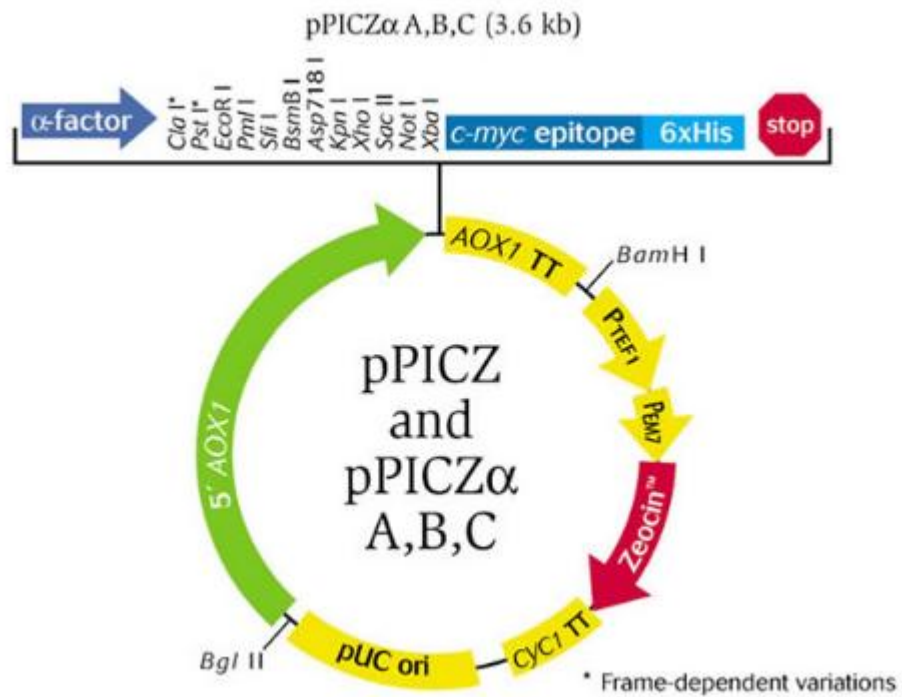
factor

C-

6

μ His

μ



Εικόνα 13. Πλασμιδιακός φορέας pPICZαA (ThermoFisher cite)

3.6.2. pCR® Blunt

I178-S199 μ μ pCR® Blunt μ MutOx
 Invitrogen. μ μ DNA μ
 . μ ccdB E.
 coli. μ μ DNA
 ccdB. μ μ μ E.coli
 μ pCR® Blunt μ ,
 . μ .

7-8

(signal peptide) :

EFRCSSDAPPPAPVGDDLTEPKELTDLFEKAKKAVIDRLHEDEKALRARGEAP
 RCTADKLIFRREYGSLSKDERLAYVNAVKCLQSKPPRTPASVAPGARSRFDDF
 VVVHIQQTLDIHYSGIFQAWHRWFVYQYEKALRDECGYTGYPYWDWPKY
 ASAPQDSPLFNGDPYSLGGNGEYVPHDGPVIVPPEGVSGGNISLPAGVGGGFV
 RTGPFANMTVNLPVGGGLADTAPGPQGGLGYNPRGLKRDLGGAMNTRYAN
 YTTVLRLLTQPDVDAFRTVSEGVPYTVVEIGPHGGIHYTIGGDPGGDLFTSPGD
 PAFWVHHAQMDRVWATWQALGLLPPADGGDPDPARRYTDLGKGDYAHRT
 WQNSPPSPFAELSDVIDMGYAAPSTTIGAVMSTTEGELCYFYL

5. ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Παρασκευή θρεπτικών υλικών

μ
 μ μ μ T= 121°C
 μ 20 min. ,
 μ 40 C .

LB LS-LB μ pH μ
 μ 7,0- 7,4 μ μ NaOH 1M.
 , μ

μ
 BMGY BMMY μ μ
 , μ μ
 T= 4°C, μ μ
 , μ T=40°C
 μ μ μ μ
 μ μ μ μ
 μ μ μ μ 20-26 h.

Πίνακας 8. Συνθήκες εφαρμοσμένης μεθόδου PCR για την παραγωγή των αντιγράφων μεταλλαγμένου πλασμιδίου pPICZaA

	(°C)	t(s)
	95	120
	95	30
	9	30
μ	72	9
μ μ	72	600
μ μ μ	4	-
μ PCR		
μ	18	

Πίνακας 9. Μεταβαλλόμενες συνθήκες της PCR μεταλλαξιγένεσης

/		μ (°C)	μ (s)
1	G292N	53	300
2	L306A	53	360
3	Y296V	55	360
4	1- 187	52	50
	S199-L424	60	50
	MutOx I187-S199	61	80

μ μ μ (/ :1,2 3)
μ μ PCR :

Πίνακας 10. Σύσταση μίγματος που εισήχθη στη συσκευή PCR για μεταλλαξιγένεση (Μεταλλάξεις με A/A: 1, 2 και 3)

	(μL)
H ₂ O	32
μ μ μ (μ MgSO ₄)	5
dNTPs (2 mM)	5
μ DNA x10 μ (pPICZaA)*	5
μ «forward» (50 μ)	1
μ «reverse» (50 μM)	1
μ μ Pfu Turbo HotStart	1

* MtOx

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

MutOx I187-S199
 33 μ, 188 μ, 198.
 DNA
 PCR,
 DNA
 PCR.
 33
 PCR
 DNA
 MutOx I187-S199 :

Πίνακας 11. Σύσταση μίγματος που εισήχθη στη συσκευή PCR για πολλαπλασιασμό των δύο αλληλουχιών M1-L165 και G176-L424

	(μL)
H ₂ O	29
μ μ μ 10	5
dNTPs (2 mM)	5
MgSO ₄	3
μ DNA x10 μ (pPICZaA)*	5
μ «forward» (50 μ)	1
μ «reverse» (50 μM)	1
μ μ OD Hot Start	1

μ μ PCR
 μμ :

Πίνακας 12. Σύσταση δείγματος που εισήχθη στην PCR για την συνένωση των κομματιών M1-L165 & G176-L424

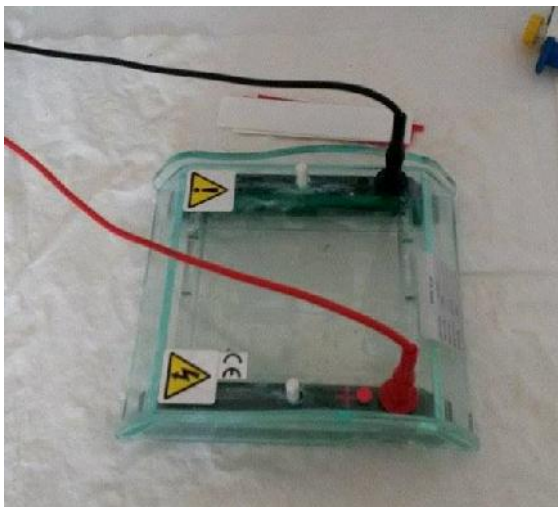
				(μL)
H ₂ O				32
μ	μ	μ	10	5
dNTPs (2 mM)				5
MgSO ₄				3
μ	DNA 1-L185			1
μ	DNA G196-L424			1
μ	«forward» (50 μ)			1
μ	«reverse» (50 μM)			1
μ	μ	OD Hot Start		1

5.2.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

PCR μ μ μ DNA μ μ μ μ
 DNA μ 1% w/v.
 μ μ μ DNA
 μ μ μ μ μ
 NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

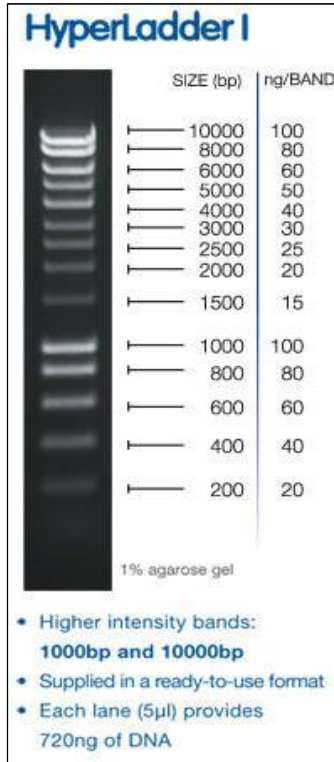
μ μ 0,5 g Agarose low EEO
 (AppliChem, μ) 50 mL μ TBE μ .
 μ 50 C 5 μL μ . μ
 μ μ 60 mL TBE,

μ μ DNA
 μ « »
 μ ,
 μ μ DNA
 μ (HyperLadder™ I: 200-
 10,000 bp). μ
 μ μ 60V
 45 min,
 μ
 μ .



Εικόνα 15. Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA

μ UV μ e
 , μ
 μ InGenius BioImaging, Syngene.



Εικόνα 16.. Απεικόνιση του αποτελέσματος ηλεκτροφόρησης του πρότυπου Hyperladder I (Centaur cite)

Πίνακας 13. Συνήθης σύσταση δείγματος προς ηλεκτροφόρηση*

	(μL)
μ PCR	5
Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue (Bioline)	2
ddH ₂ O	3

Πίνακας 14.Σύσταση διαλύματος TBE(10x)

Tris Base	108 g/L
	55 g/L
EDTA 0,5 M pH=8	40 mL/L

* μ DNA
 μ , μ
 μ μ 5 μL Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue (Bioline).

5.2.3. Καταστροφή του «γονικού» (parental) DNA

DNA μ
 PCR μ μ μ DpnI
 (Agilent Technologies). μ μ
 μ μ DNA. μ DNA
 μ μ *in vivo* μ μ μ
 μ μ DNA *in vitro* μ μ
 PCR μ μ DpnI. 1

μL μ μ μ PCR.
 μ 1 h μ T= 37 C.

5.2.4. Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *E. coli* με θερμικό σοκ

μ μ μ μ μ μ
 μ DNA μ μ *E. coli*
 μ DNA.
 μ T= -80°C μ
 100 μL μ 51% v/v μ CaCl 0,1 M 49% v/v
 μ 50% v/v, eppendorf.
 μ μ μ μ μ *E. coli* μ μ T=4 C
 μ . μ μ 5 μL μ PCR
 μ DNA,
 μ *DpnI*. μ μ DNA μ
 T= 4°C 30 min. T=
 42°C 70 s (Heat Shock). μ μ μ
 LB 200 μL 1 h = 37 C.
 μ
 (LS-LB Zeocin XL1-Blue
 LB Kanamycin TOP10). T=37°C 20 h.

5.2.5. Κλωνοποίηση και παραλαβή του πλασμιδιακού DNA

μ μ μ
 , μ μ
 μ 5 mL.
 (190 rpm) μ T=37°C 16-20 h (overnight).
 μ μ DNA
 μ μ GenElute™
 Plasmid Miniprep Kit (Sigma- Aldrich).

5.2.6. Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

μ DNA μ μ μ
 . μ 13 14

μ . μ μ μ
 μ *EcoRI* *XbaI*, μ 1 h
 μ T=37°C. μ μ μ
 μ DNA :

Πίνακας 15. Σύσταση μίγματος πέψης πλασμιδιακού DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *XbaI* & *EcoRI*

	(μL)
μ DNA	5
μ μ <i>XbaI</i> 10X (10 mM Tris-HCl, pH=7,5, 7mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 7 mM 2-mercaptoethanol, 0,01% BSA)	2
<i>EcoRI</i>	1
<i>XbaI</i>	1
H ₂ O	11

μ , μ μ μ DNA μ μ
 μ μ μ μ μ , μ
 μ (5.2.2). μ
 μ μ μ μ μ 5 μL
 Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue (Bioline).

5.2.7. Αλληλούχιση DNA (DNA Sequencing)

μ μ μ μ
 DNA μ μ μ PCR,
 μμ μ μ .
 μ μ DNA .
 μ μ μ DNA 10
 μL (300-500 ng), VBC-Biotech Services GmbH ().

5.2.8. Ανασυνδυασμός του πλασμιδιακού φορέα pCR® Blunt με γραμμικό DNA

μ μ μ μ DNA μ μ μ

ExpressLink™ T4 DNA Ligase† (Invitrogen).

μ Eppendorf μ 2 h
 μ T=16°C. μ μ :

Πίνακας 16. Σύσταση μίγματος για ανασυνδυασμό του πλασμιδιακού φορέα pCR^R Blunt με το επιθυμητό γραμμικό τμήμα DNA

	(μL)
μ μ μ pCR [®] Blunt	1
μμ μ μ DNA μ	5
μ μ 5X T4 DNA	2
H ₂ O	1
μ ExpressLink™ T4 DNA Ligase†	1

5.2.9. Προετοιμασία και μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων ζύμης *P. pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση

μ μ , μ DNA
P. pastoris μ .
 μ μ μ DNA, μ μ μ
E. coli μ μ 5.2.4, 5.2.5.
 μ μ
 μ μ μ μ , μ μ
 :

5.2.9.1. Προετοιμασία επιδεικτικών σε μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης *P. pastoris*

P. pastoris -33 μ
 50 mL YPD
 μ T=30°C (180 rpm) 1 d.
 5 mL μ
 YPD 100 mL,
 O.D₆₀₀= 0,56. 100 mL

μ
 $O.D_{600} = 1,3 - 1,6$ (μ 4 h).
 μ
 TJ-6 Beckman Coulter $T=4^{\circ}C$
 8000 rpm 6 , μ :
 I. 10 min μ
 II. (10 min μ H_2O) 3
 III. (8 min μ μ 1) 2
 μ μ
 μ μ . μ
 μ μ
 $T=4^{\circ}C$. μ
 600 μL μ 1M
 $T=4^{\circ}C$.

5.2.9.2. Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *P. pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση

80 μL μ
 5.2.9.1. 30 μL
 $\mu\mu$ μ μ DNA (μ
 5.2.6.). 110 μL μ
 μ μ
 ($T=4^{\circ}C$) 5 min.
 μ $\mu\mu$ Pic (μ
 2 kV 4 ms). μ
 μ μ μ $\mu\mu$
 μ μ μ μ DNA. μ
 μ μ μ $\mu\mu$ 1
 mL μ μ 1M. μ
 μ μ falcon tube 15 mL μ
 μ 2 h μ $T=30^{\circ}C$. μ

μ μ

5.3.2.2. Προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου της καλλιέργειας με φωτομέτρηση

μ μ , μ , μ μ μ
 , μ μ
 200 μL. μ 20 50 μ μ
 1 mL, O.D₆₀₀ μ μ
 μ . μ O.D₆₀₀ μ μ μ
 UV2000, Hitachi μ μ μ μ μ ,
 μ μ . μ
 O.D₆₀₀ μ μ
 μ , μ μ μ
 (calibration). μ μ μ μ μ
 μ

5.3.2.3. Παραλαβή του εξωκυτταρικού υγρού μίγματος καλλιέργειας (crude)

10

min μ 10000 rpm. μ ,
 , μ
 μ . μ μ μ ,
 μ μ μ μ 0,8 μm,
 μ μ μ 0,2 μm.
 ,
 T=4°C μ μ .

5.3.2.4. Συμπύκνωση του crude με υπερδιήθηση

« »
 μ Amicon Stirred Cell 8400 μ
 μ μ PM-10, Millipore (. . .) μ μ

Affinity Resin (Clontech, . . .) T=4°C μ
 20% v/v ethanol. μ :

I. μ μ
 II. μ 20 mL μ H₂O
 III. μ μ 60 mL
 μ μ Talon (3 μ 20 mL μ
 μ)
 IV. μ μ crude μ
 V. μ 10 mL μ μ Talon
 VI. μ 5 mL μ μ 5 mM
 VII. μ 7 mL μ μ 100 mM
 μ
 VIII. μ 7 mL μ μ 100 mM
 μ μ
 IX. μ 80 mL μ H₂O μ
 (4 μ 20 mL)
 X. T=4°C, 4
 mL μ 20% v/v ethanol .
 μ μ IV, V, VI, VII VIII
 falcon tubes ,
 T=4°C. μ μ ,
 5.3.3.4.
 μ μ ,
 μ μ μ . μ μ
 μ μ μ 100 mM.

5.3.2.7. Εξισορρόπηση του διαλύματος της ανασυνδυασμένης μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με ρυθμιστικό διάλυμα Sodium Phosphate pH=7 0,1M

μ μ μ ,
 , μ μ Sodium Phosphate pH=7 0,1
 μ (

μ pH-optimum). μ μ
 5.3.2.5.2.
 μ μ μ T=4°C.

5.3.3. Μέθοδοι ανάλυσης της ανασυνδυασμένης μεταλλαγμένης πρωτεΐνης

5.3.3.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο λαμβανόμενο πρωτεϊνικό διάλυμα

μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ 280 nm, μ μ 10 μg/mL.
 μ μ μ
 , μ μ 280 nm,
 μ μ .

H $O.D_{280}$ μ μ UV2000, Hitachi
 μ μ μ (Stoscheck, 1990):

$$C(\text{mg/mL}) = (O.D_{280}) / C(\text{mg/mL}) = C(\text{mg/mL}) / MW (\text{g/mol})$$

:

$C(\text{mg/mL})$, Molarity
 $C(\text{mg/mL})$, mg/mL
 $O.D_{280}$, μ μ 280 nm
 MW , μ

, μ μ
 μμ ProtParam μ ExPASy.

5.3.3.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ

μ
 μμ
 (SDS)
 -μ
 μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ

5.3.3.2.1. Προετοιμασία της πηκτής SDS-PAGE

μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ
 μ 17. μ μ μ
 SDS-PAGE Mini-Protean 3
 (Biorad),
 μ μ μ μ,
 μ « » μ μ μ
 μ
 μ μ μ
 500 mL μ
 μ 30,3 g/L Tris, 144 g/L , 1% w/v SDS, pH 8,3.

Πίνακας 17. Σύσταση των δύο φιλμ της πηκτής πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE

μ		μ	
	(μL)		(μL)
ddH ₂ O	3500	ddH ₂ O	3000
μ μ 0,75 Tris, 0.2% w/v SDS, pH 8,8	9400	μ μ 0,25 Tris, 0.2% w/v SDS, pH 6,8	3750
40% bis-acrylamide	5800	40% bis-acrylamide	750
TEMED	30	TEMED	20
10% w/v APS	90	10% w/v APS	60

μ ,
 , μ μ μ .
5.3.3.3. Προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής της αρχικής πρωτεΐνης και των μεταλλάξεων αυτής
 MtOx μ ,
 μ .
 Hhpred μ
 , μ μ μ μ μ μ . ,
 μ μμ Coot μ μ
 μ MtOx.
 μ μ μ
 μ (μ .pdb) μ μ .
 μ μμ Chimera
 1.11 μ .

5.3.3.4. Προσδιορισμός του φάσματος απορρόφησης του ενζύμου

μ μ μ
 220nm-700nm μ SPECTROstar
 Nano Microplate Reader (BMG Labtech). μ ,
 μ ,
 , μ μ μ μ
 μ μ 2 nm. μ μ μ
 μ μ μ μ μμ SigmaPlot 12.

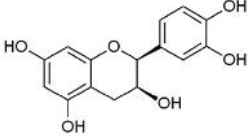
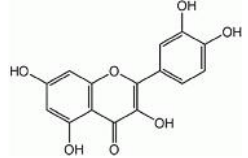
5.3.3.5. Εξέταση της εξειδικευμένης δράσης του μεταλλαγμένου ενζύμου σε διάφορα υποστρώματα (substrate specificity)

μ μ μ μ
 μ μ μ
 μ . μ , 2mM,
 μ
 μ Sodium Phosphate. μ
 μ T=40°C, (900rpm), μ 21 h

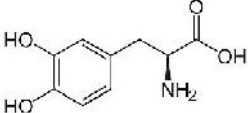
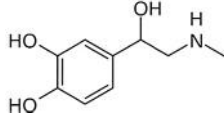
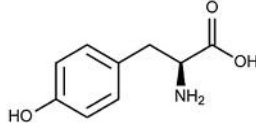
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

	7	
-	7	
-	7	
	7	

Πίνακας 20. Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων ενζύμων (πολυφαινολικά)

μ	pH	μ
	7	
	7	
	7	

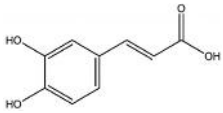
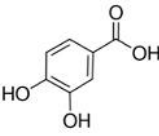
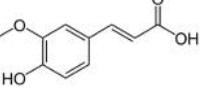
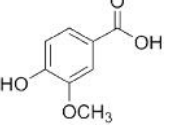
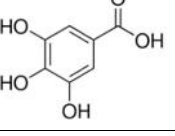
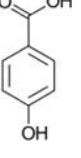
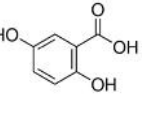
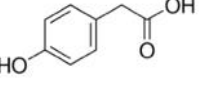
Πίνακας 21. Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων ενζύμων (αζωτούχα)

μ	pH	μ
L-DOPA	7	
	7	
L-	7	

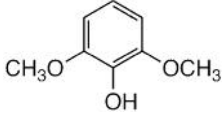
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

D-	7	
----	---	---

Πίνακας 22. Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων ενζύμων (οργανικά οξέα)

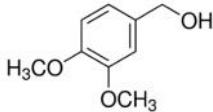
μ	pH	μ
	7	
	7	
	7	
	7	
	6	
-	7	
2,5-	7	
-		

Πίνακας 23. Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων ενζύμων (μονοφαινολικά διυποκατεστημένα)

μ	pH	μ
2,6- μ (DMP)	7	

	7	
--	---	---

Πίνακας 24. Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων ενζύμων (μη φαινολικά)

μ	pH	μ
	7	

1,84 μM) + 25 μL DOPA 10mM.

5.3.3.6. Μέτρηση της ενεργότητας του μεταλλαγμένου ενζύμου

Unit (U). 1
 Unit μ μ μ μ
 μ μ 440 nm μ μ μ 4-
 4,6 mM 1 min
 μ =43 C. μ μ
 1 min μ μ μ 230 μL μ 20 μL
 μ μ μ μ microplate Spectra Max 250
 (Molecular Devices) μ μ 440 nm,
 μ 50s 20 min.
 pH μ μ
 μ μ μ
 μ pH,

5.3.3.7. Προσδιορισμός των κινητικών σταθερών Michaelis- Menten του ενζύμου

Michaelis-
 Menten, ζεταλω μαθηματικό τι :

$$u = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_n + [S]} \quad (B)$$

μ : μ ,
 μ k_{cat} μ
 μ ,
 μ .
 k_{cat}/K_m μ .

μ μ μ
 pH=7 (μ Sodium Phosphate).
 μ Sodium Phosphate pH=7 μ ,

5.3.3.4. μ
 μ μ μ
 μ 420 nm. μ
 μ μ μ

Michaelis-Menten K_m V_{max}
 μ μ μ , μ μμ GraphPad Prism 5.
 μ μ μ μ μ μ

Michaelis-Menten. μ μ
 μ :

Πίνακας 25. Συγκεντρώσεις υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών Michaelis-Menten του μεταλλαγμένου ενζύμου

μ	(mM)
4-	0,2-0,4-0,6-0,8-1-1,4-2-3-4-5-10-15-20
	0,5-1,5-3-4-5-7-10-15-20-30-40-50-60

5.3.3.8. Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου (*T-optimum*)

μ μ μ
 μ - eppendorf tubes-
 μ 4- 4,6 mM,
 μ μ μ , 1 mL μ
 μ : 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 C 10 min.

2 min, 250 μ L (tube) μ T=4°C, μ . μ
 μ μ 440 nm. μ
 (blank) μ .

5.3.3.9. Προσδιορισμός της βέλτιστης τιμής pH δράσης του ενζύμου (pH- optimum)

μ μ pH μ
 μ 5 mM μ ,
 , μ pH 3-9. μ μ
 μ : Sodium Phosphate,
 Tris/HCl Na₂HPO₄/ Citric acid (6).
 μ μ μ μ
 μ , μ , μ μ ,
 5.3.3.4. μ μ μ μ
 420 nm.

5.3.3.10. Προσδιορισμός της θερμοσταθερότητας του ενζύμου (T- stability)

μ μ μ μ μ Eppendorf
 tubes μ μ , μ μ
 Eppendorf Thermomixer Comfort. μ
 Eppendorf μ
 T=4°C μ . , μ μ
 μ μ 5.3.3.4.
 μ 40,50,60,70 C.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

1.1. Μεταλλάξεις G292N, L306A και Y296V:

μ *Myceliophthora thermophilla*

μ MtOx μ 1,275 kb μ μ μ

pPICZ A, μ 3,6 kb. μ μ

DNA μ 4,875 kb. μ G292N, L306A

Y296V μ μ , μ

μ μ DNA μ . μ μ ,

μ μ μ , μ μ DNA

μ PCR μ 4,875 kb.

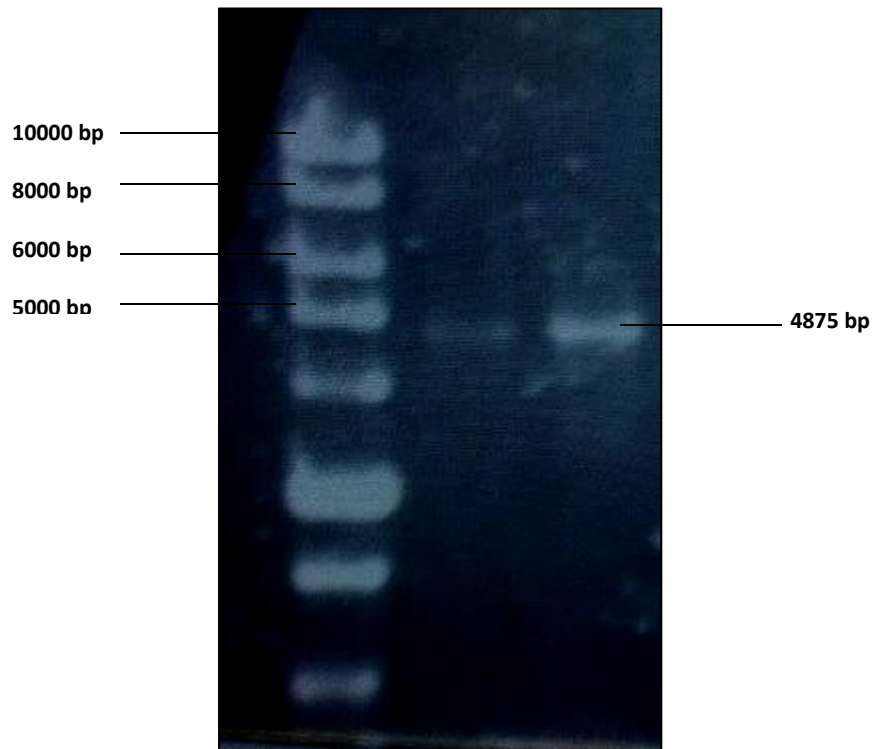
PCR, μ μ , μ

μ DNA μ μ .

30 min 20

μ μ :

Εικόνα 20. Πήκτωμα αγαρόζης ύστερα από ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR μήκους 4875 bp



μ μ DNA,

μ PCR. μ μ

μ DNA μ

μ μ DNA. μ DNA
E. coli TOP10
μ μ μ μ μ μ
μ μ μ DNA μ
μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ

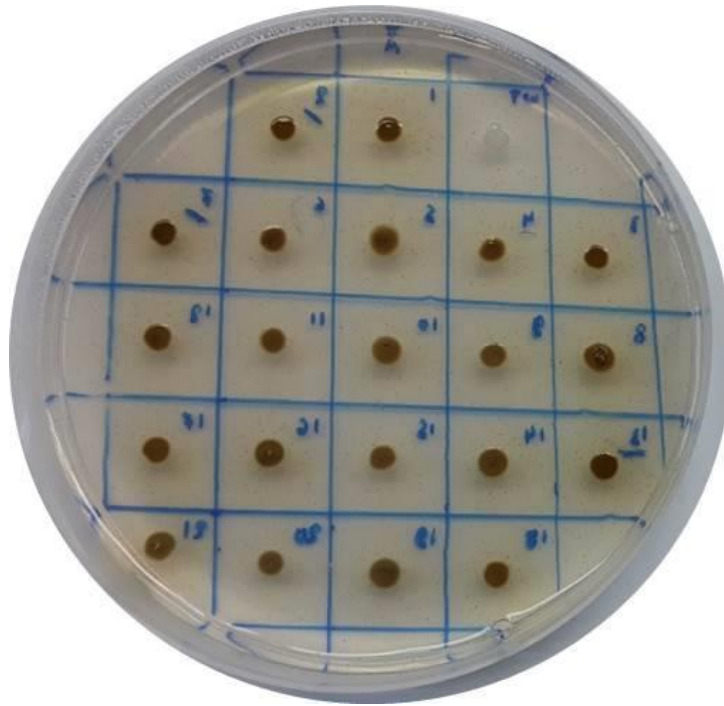
2. ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ *P. pastoris*

2.1. Επιλογή του κατάλληλου κλώνου μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης *P. pastoris* για την παραγωγή της πρωτεΐνης

μ μ μ μ μ μ
5.2.9.
μ μ μ
μ «plate assay» (.
5.3.1.).
μ μ
22:

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

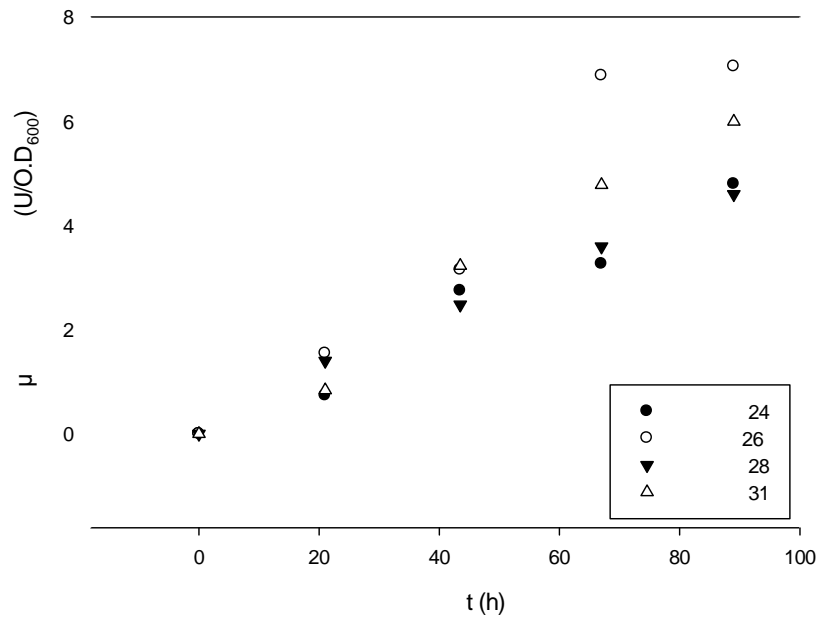
Εικόνα 22. Εφαρμογή plate- assay για την εύρεση του μετασηματισμένου κλώνου που παρουσιάζει μέγιστη παραγωγικότητα πρωτεΐνης. Η εγγενής περιοχή των κλώνων παρουσιάζει χρωματισμό διαφορετικής έντασης, ανάλογα με την ποσότητα ενζύμου που παράχθηκε από αυτούς. Ο μη μετασηματισμένος κλώνος έχει άσπρο χρώμα, καθώς δεν παρήγαγε ένζυμο.



μ G292N

, , μ , μ , μ plate assay , 5.3.2 μ μ μ 50 mL (). 4 d T=30°C, 180 rpm. μ , μ , μ , μ 5.3.3.4 , μ μ μ μ μ -33. μ μ μ μ -33 μ -

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

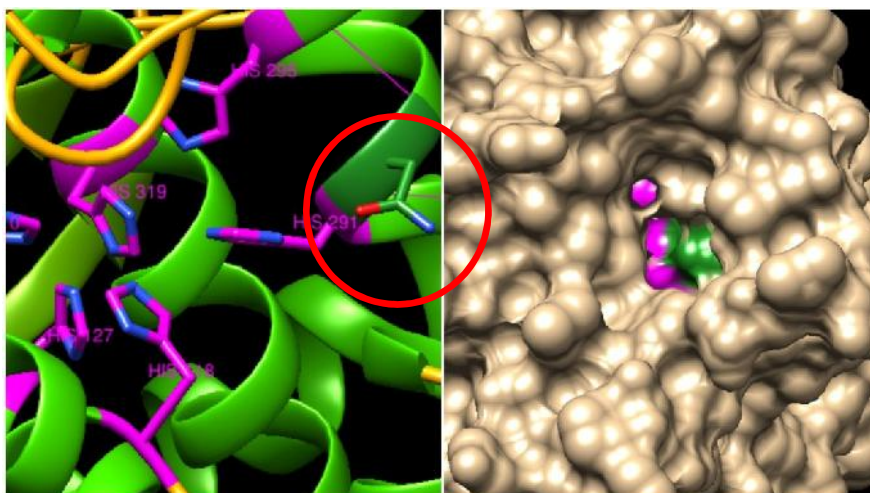


Διάγραμμα 2. Διάγραμμα ανηγμένης ενεργότητας του υπερκείμενου υγρού καλλιέργειας κάθε μετασηματισμένου κλώνου που επιλέχθηκε, προς το κυτταρικό φορτίο καλλιέργειας, συναρτήσει του χρόνου

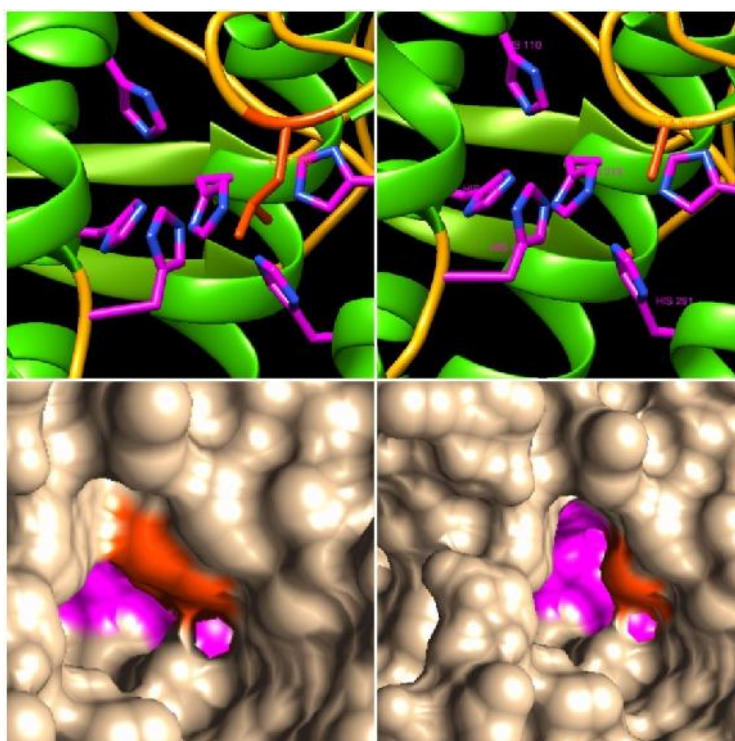
μμ 1 μ
 26 μ
 μ ,
 μ μ . ,
 μ , μ , μ
 μ μ . , μ
 , μ
 μ ,
 . 26
 μ μ MutOx1.
 μ μ
 μ μ
 «plate assay». μ
 . 5 μ μ
 MutOx2 . 6
 μ μ MutOx3.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εικόνα 25. Τριτοταγής δομή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης MutOx1. Αριστερά απεικονίζεται το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, στο οποίο διακρίνονται οι διαφορετικές δευτεροταγείς δομές και τα αμινοξέα His που συντονίζουν τα 2 ιόντα Cu (μπλε), καθώς και το αμινοξύ της Asn που έχει αντικαταστήσει τη Gly. Το αμινοξύ που υπέστη μετάλλαξη βρίσκεται πάνω από την είσοδο του ενεργού κέντρου, όπως φαίνεται στη δεξιά εικόνα και σύμφωνα με προηγούμενες θεωρίες σταθεροποιεί μέσω αλληλεπιδράσεων το μόριο οξυγόνου εντός του ενεργού κέντρου. Στην εικόνα αριστερά διακρίνεται επιπλέον το άτομο του οξυγόνου (κόκκινο) και αυτό του αζώτου (μπλε), που ανήκουν στο αμινοξύ Asn και ευθύνονται για τις αναπτυσσόμενες αλληλεπιδράσεις.

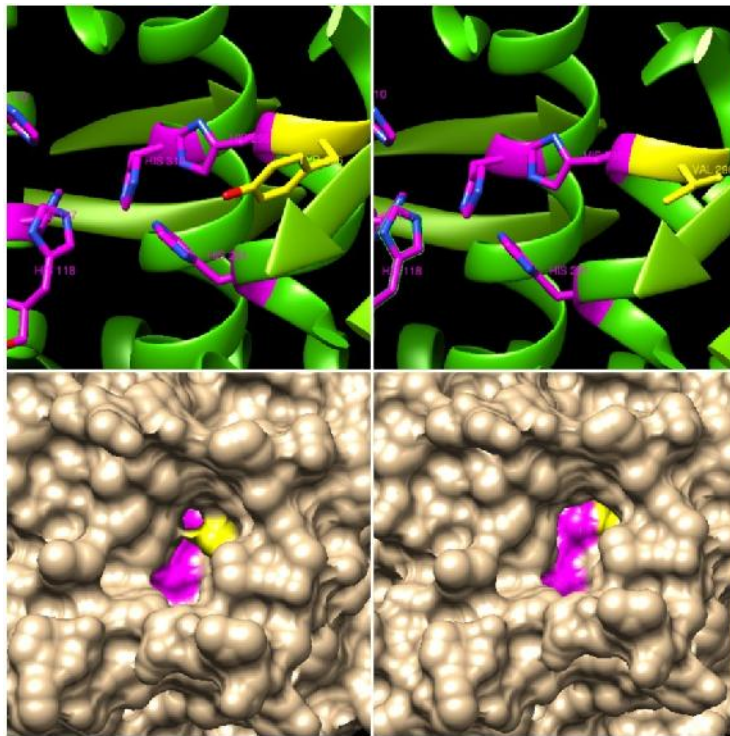


Εικόνα 26. Πάνω αριστερά απεικονίζεται το ενεργό κέντρο του MtOx, ενώ πάνω δεξιά το ενεργό κέντρο του MutOx2. Με σκούρο πορτοκαλί χρώμα διακρίνεται το αμινοξύ Leu306 που έχει αντικατασταθεί στη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη από το Ala306. Από τις κάτω εικόνες είναι φανερό πως η αντικατάσταση της Leu με τη μικρότερη σε μέγεθος Ala «απελευθερώνει» μερικώς την είσοδο στο ενεργό κέντρο.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εικόνα 27. Πάνω αριστερά απεικονίζεται το ενεργό κέντρο του MtOx και το αρχικό ογκώδες αμινοξύ της Tyr296, ενώ πάνω δεξιά το ενεργό κέντρο του MutOx3 με το αμινοξύ Val296 (κίτρινο). Από τις εικόνες της κοιλότητας που οδηγεί στο ενεργό κέντρο κάθε ενζύμου (κάτω) διακρίνεται η μειωμένη παρεμπόδιση που προκαλεί το μεταλλαγμένο αμινοξύ Val296, συγκριτικά με την Tyr.



Εικόνα 28. Σύγκριση των δομών του αρχικού ενζύμου MtOx και του μεταλλαγμένου ενζύμου MutOx4. Εντός του κύκλου φαίνεται ο βρόγχος των 11 αμινοξέων που λείπει από το μεταλλαγμένο ένζυμο

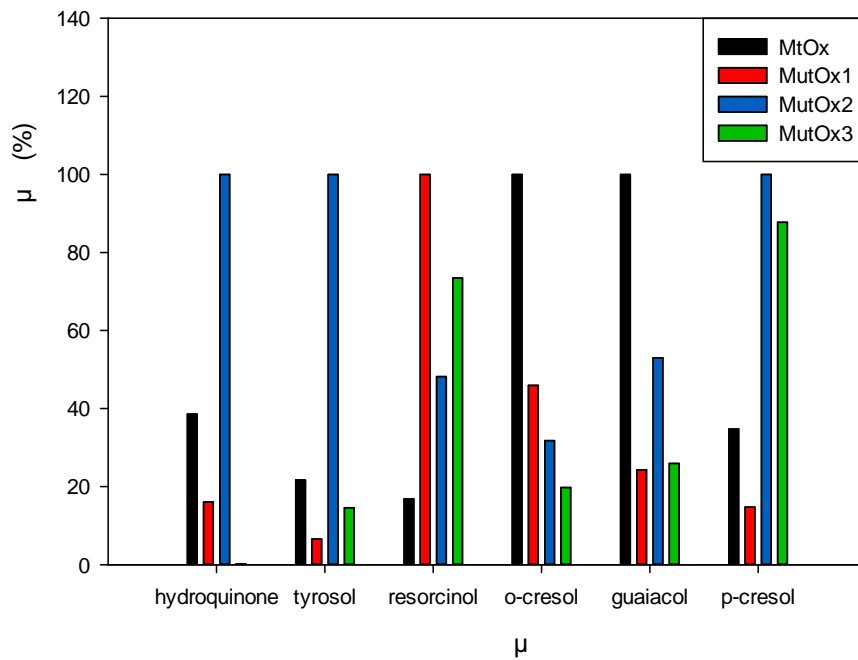


μ μ μ μ
 L306 296V μ μ ,
 μ G292N μ μ μ

3.3. Δράση σε διαφορετικά υποστρώματα

5.3.3.3 « ».

μμ 4-8:

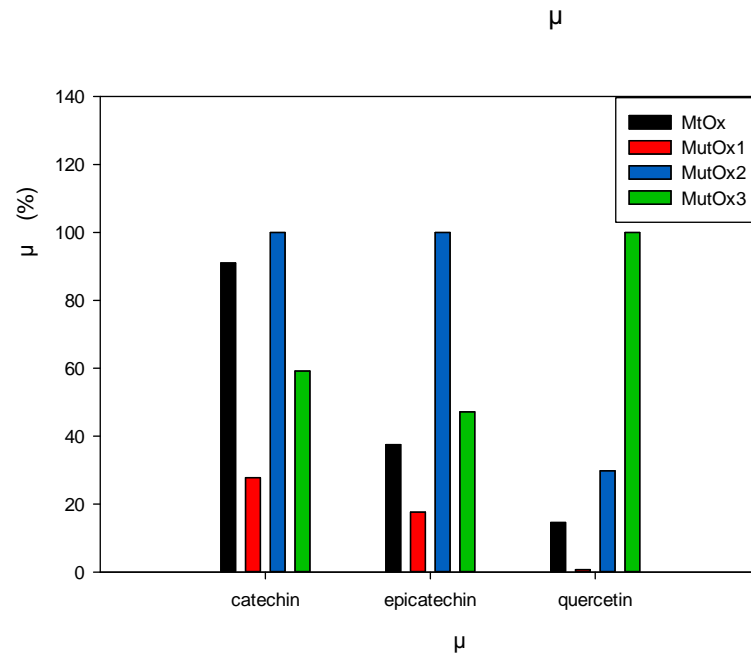


Διάγραμμα 3. Ραβδόγραμμα σχετικής ενεργότητας των εξεταζόμενων ενζύμων σε διάφορα μονοφαινολικά, μονοϋποκατεστημένα υποστρώματα

MutOx2

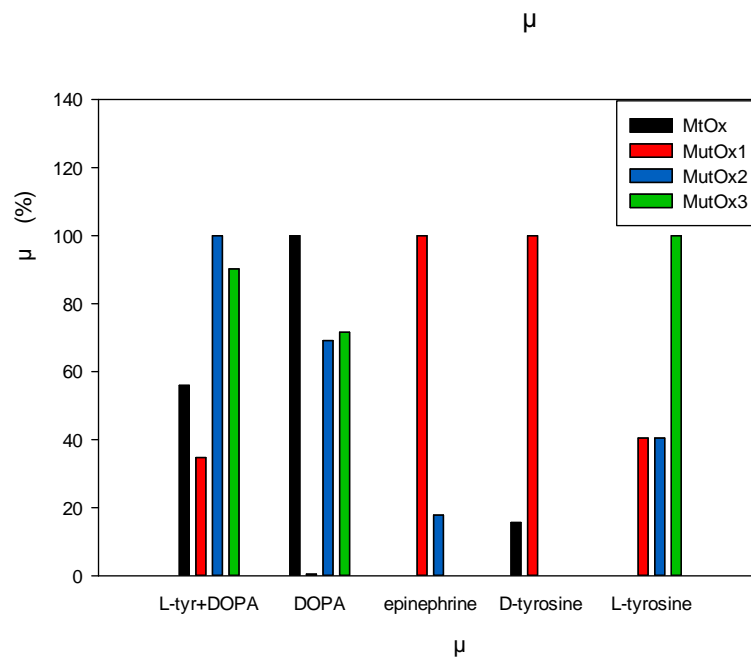
MutOx1

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Διάγραμμα 4.Ραβδόγραμμα σχετικής ενεργότητας των εξεταζόμενων ενζύμων σε διάφορα πολυφαινολικά υποστρώματα

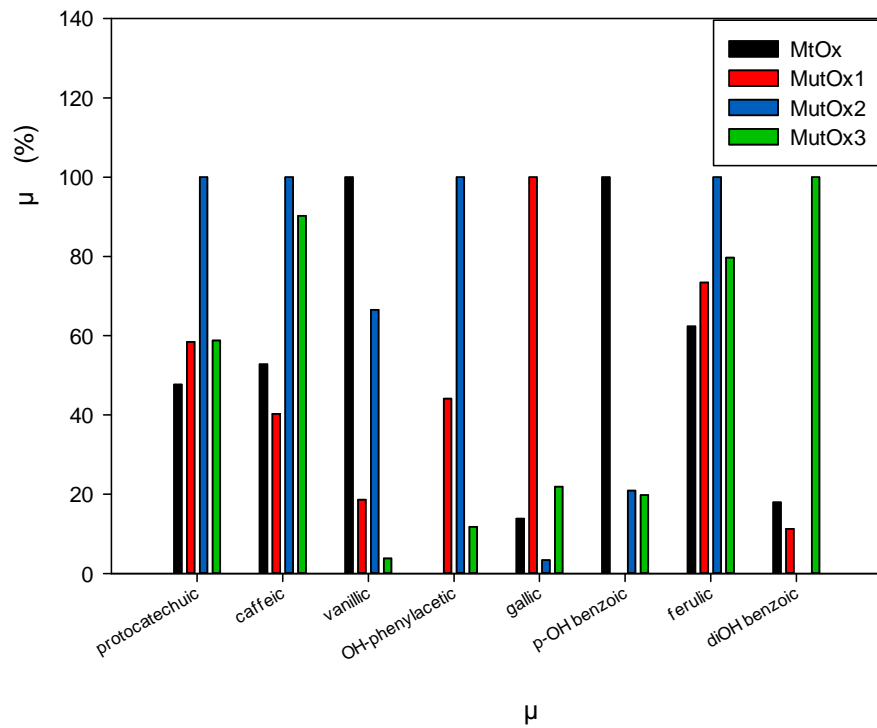
MutOx3 MutOx2 μ μ , μ . μ 600%
 μ μ . μ MutOx3
 μ MutOx2.



Διάγραμμα 5.Ραβδόγραμμα σχετικής ενεργότητας των εξεταζόμενων ενζύμων σε αζωτούχα υποστρώματα

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

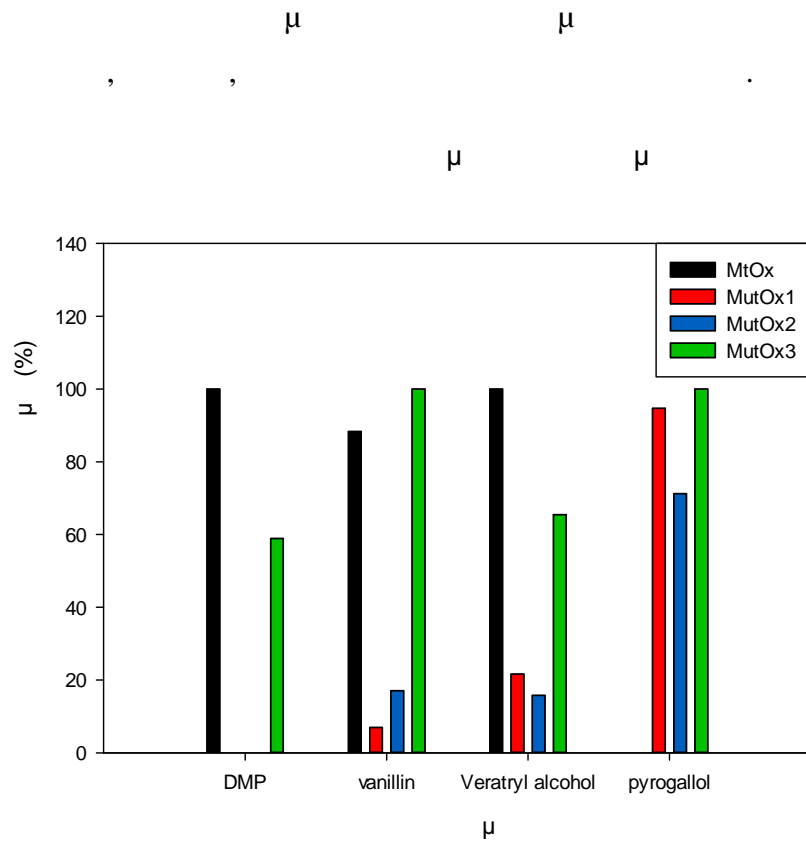
μ MutOx2 μ
 L- , μ L-DOPA,
 L-
 μ . L-DOPA L- , μ
 , μ μ MtOx
 MutOx3 , D- MutOx1.
 μ μ μ
 MutOx1 MutOx2. μ
 μ μ MtOx.



Διάγραμμα 6. Ραβδόγραμμα σχετικής ενεργότητας των εξεταζόμενων ενζύμων σε διάφορα οργανικά οξέα ως υποστρώματα

μ MtOx μ
 μ - ,
 μ μ
 μ MutOx1 μ
 (μ 600% μ MtOx)
 MutOx3 (450%). μ μ
 μ MutOx2 μ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Διάγραμμα 7. Ραβδόγραμμα σχετικής ενεργότητας των εξεταζόμενων ενζύμων στα υποστρώματα πυρογαλλόλη, βερατρλική αλκοόλη, βανιλίνη και 2,6-διμεθοξυφαινόλη

	MtOx	MutOx1	MutOx2	MutOx3
DMP	100	0	0	60
vanillin	90	10	20	100
Veratryl alcohol	100	20	15	65
pyrogallol	0	95	70	100

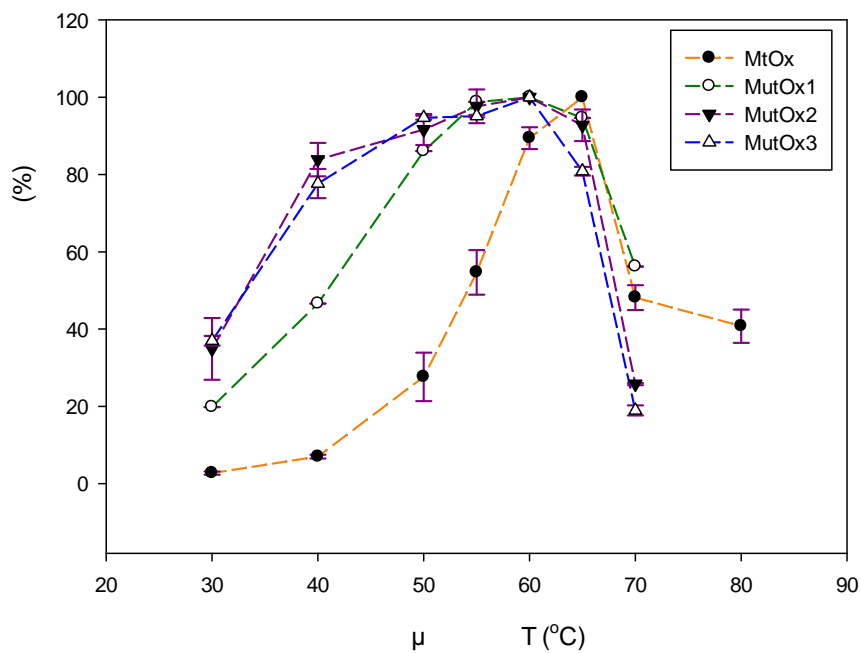
Πίνακας 27. Προσδιορισμός του λόγου δράσης μονοφαινολάσης/διφαινολάσης των εξεταζόμενων ενζύμων

	MtOx	MutOx1	MutOx2	MutOx3
Ratio	0,00	1,89	0,01	0,03

3.4. Θερμικά χαρακτηριστικά

3.4.1. Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του μεταλλαγμένου ενζύμου

5.3.3.6. . μ
 μ μ μ μ μ μ μ μ
 μ μ
 μμ 9:



Διάγραμμα 8. Συνδυαστικό διάγραμμα σχετικής ενεργότητας κάθε ενζύμου συναρτήσει της θερμοκρασίας αντίδρασης

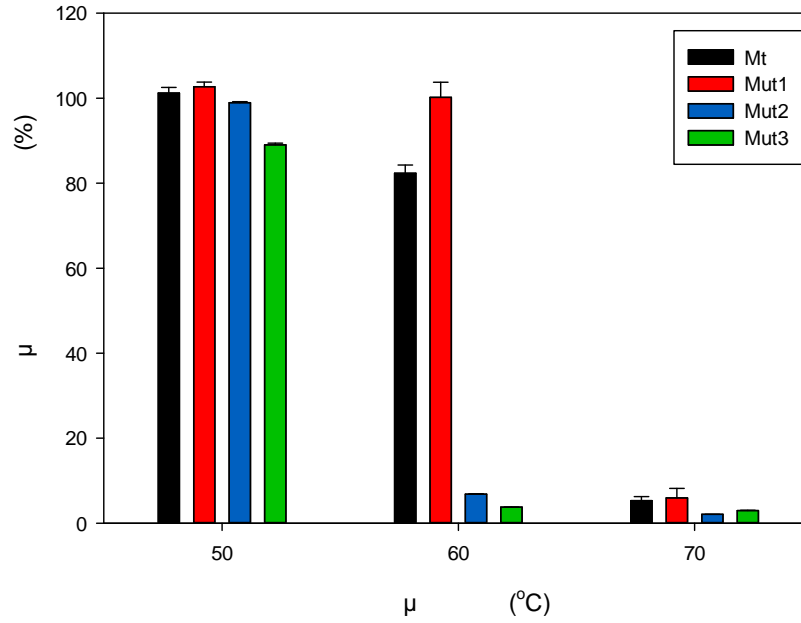
μ μ 12 μ μ μ
 μ μ μ μ 60 C-65°C. μ μ
 μ μ μ μ μ μ
 μ 60°C, , μ μ μ μ μ
 μ 65 C.

3.4.2. Θερμοσταθερότητα των ενζύμων

μ μ μ μ μ μ
 μ 5.3.3.8 μ
 . μ μ μ μ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

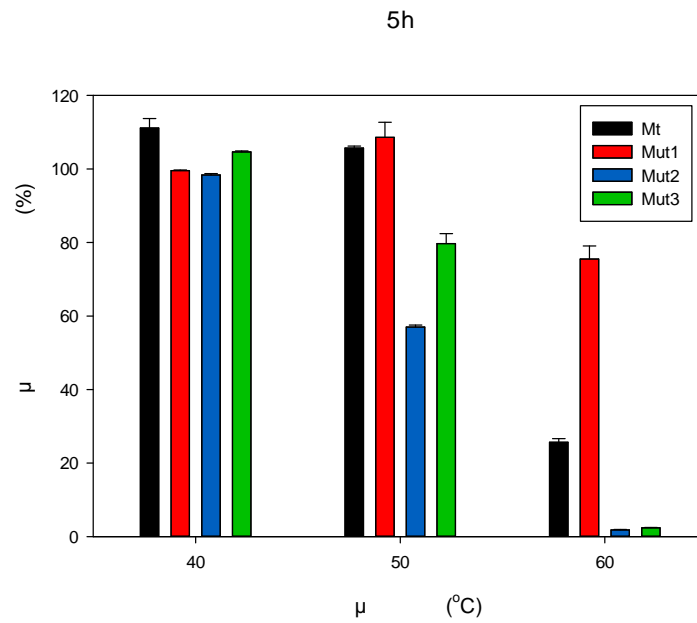
μ μ μ μ 10-12.
 μ μ μ ,
 μ μ μ (T=4°C) μ 100%.
 2h



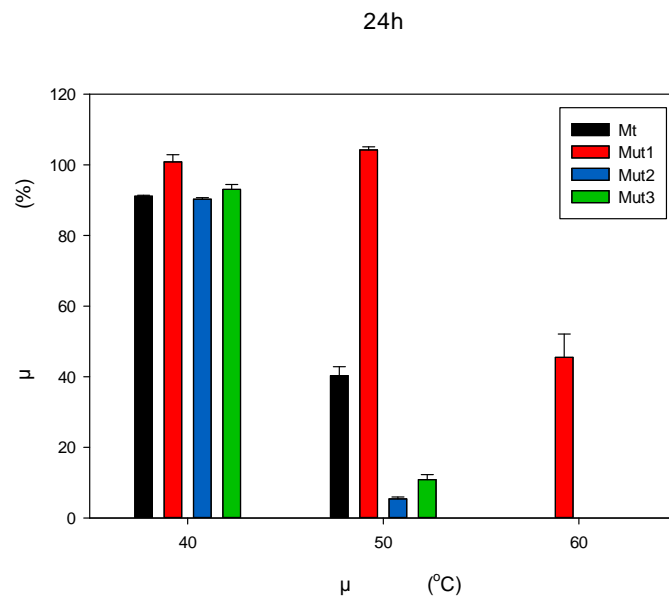
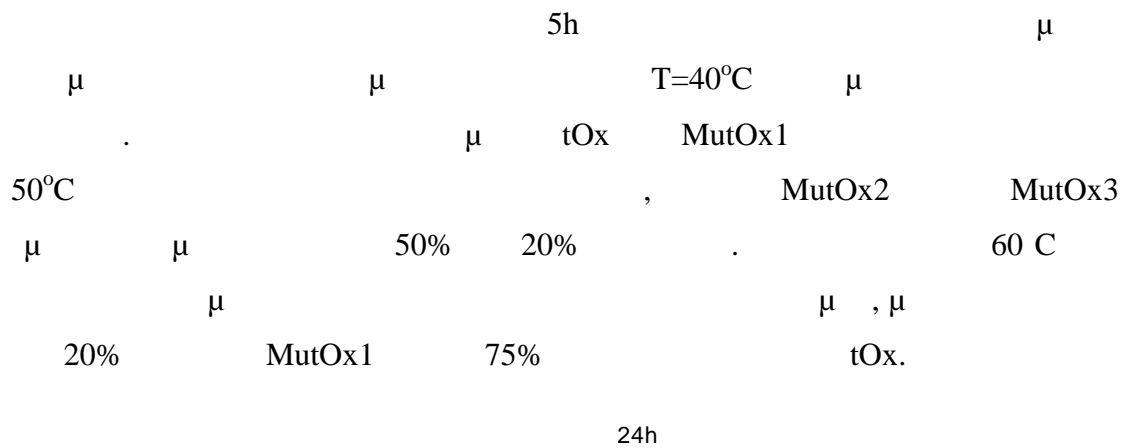
Διάγραμμα 9. Ραβδόγραμμα απεικόνισης της μεταβολής ενεργότητας κάθε ενζύμου σε σταθερή θερμοκρασία επώασης T=50,60 & 70°C για 2h

μ μ μ ,
 2h 50°C, 60 C
 μ MtOx MutOx2 MutOx3, 20%
 μ MtOx μ MutOx1.
 μ 70 C
 , μ μ 2h. μ μ
 40°C , μ μ
 μ μ μ .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Διάγραμμα 10. Ραβδόγραμμα απεικόνισης της μεταβολής ενεργότητας κάθε ενζύμου σε σταθερή θερμοκρασία επώασης T=40,50 & 60°C για 5h



Διάγραμμα 11. Ραβδόγραμμα απεικόνισης της μεταβολής ενεργότητας κάθε ενζύμου σε σταθερή θερμοκρασία επώασης T=40,50 & 60oC για 24h

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

24h μ T=40°C μ MtOx,
 MutOx2 MutOx3 μ μ
 (10%), μ μ μ MutOx1 .
 μ μ 50°C,
 μ 60%. μ
 90-95%. μ (24 h) 60°C, μ μ
 MutOx1, , 50% .

3.5. Βέλτιστη τιμή pH δράσης

μ μ pH μ
 μ 5.3.3.7.
 . μ pH
 μ μ .
 μ , μ :

Πίνακας 28. Βέλτιστη τιμή pH δράσης κάθε ενζύμου (διευκρινίζεται και το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε)

μ	μ pH	μ μ
MtOx	8	Sodium Phosphate
MutOx1	6	Na ₂ HPO ₄ /
MutOx2	6	Sodium Phosphate
MutOx3	8	Sodium Phosphate

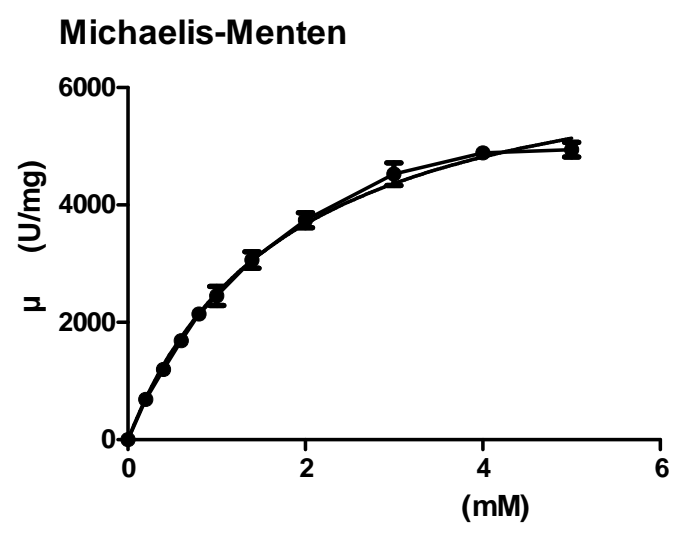
3.6. Κινητικές σταθερές

μ μ μ
 MutOx1, MutOx2 MutOx3, MtOx
 5.3.3.5 , μ
 4- μ ,
 μ μ μ
 .
 μ μ μ
 μ μ μ
 μ μ μ μ μ Michaelis-

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

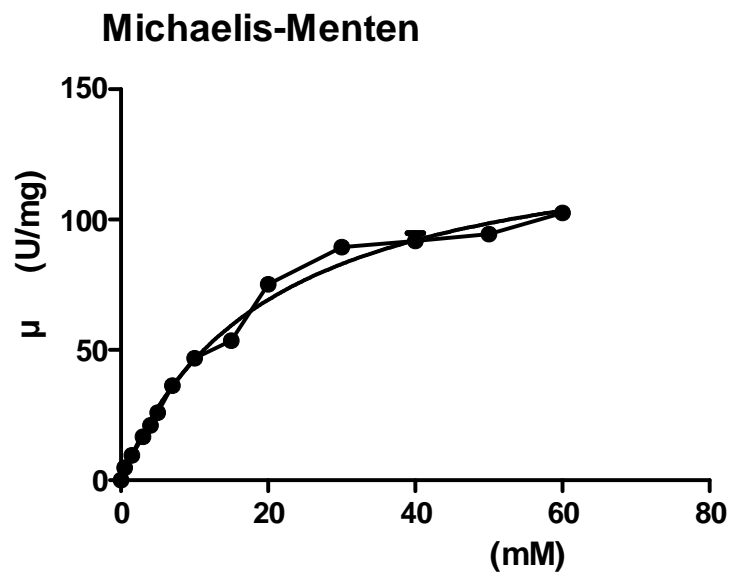
Menten μ μ Graphpad Prism 5. μ

μ μ MtOx:
 μ :



Διάγραμμα 12. Διάγραμμα Michaelis-Menten του MtOx σε χλωροκατεχόλη

μ :

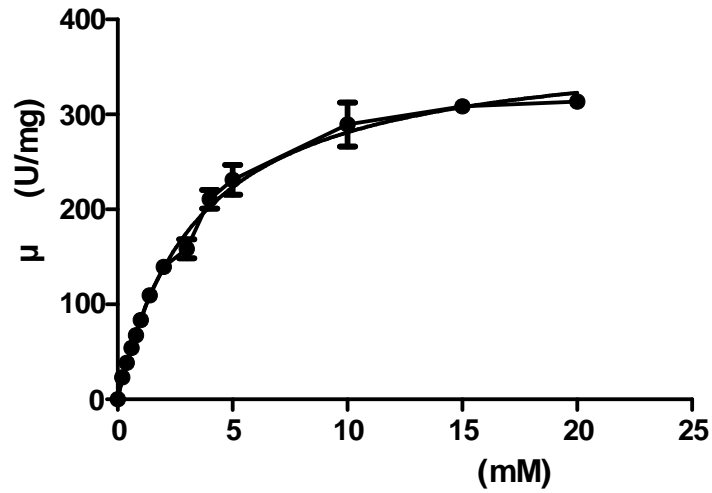


Διάγραμμα 13. Διάγραμμα Michaelis-Menten του MtOx σε κατεχόλη

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

_____ μ MutOx1:
_____ μ _____ :

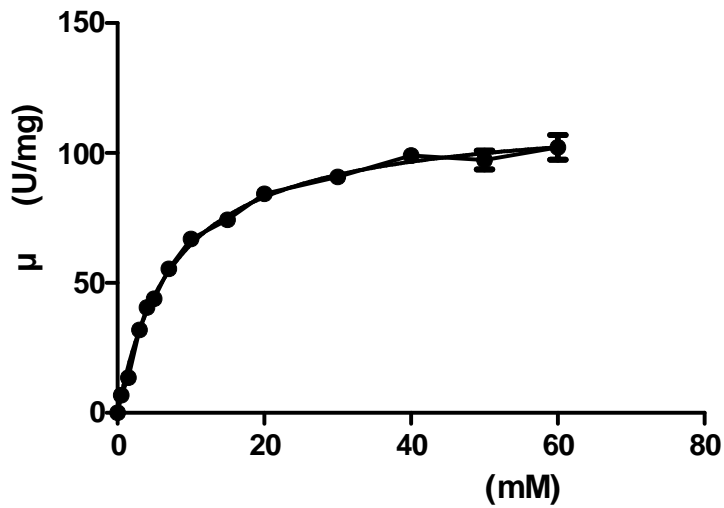
Michaelis-Menten



Διάγραμμα 14. Διάγραμμα Michaelis-Menten του MutOx1 σε χλωροκατεχόλη

_____ μ _____ :

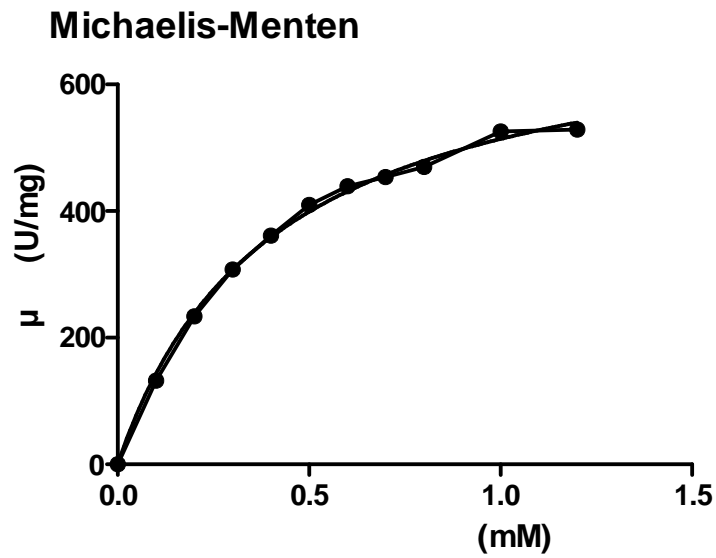
Michaelis-Menten



Διάγραμμα 15. Διάγραμμα Michaelis-Menten του MutOx1 σε κατεχόλη

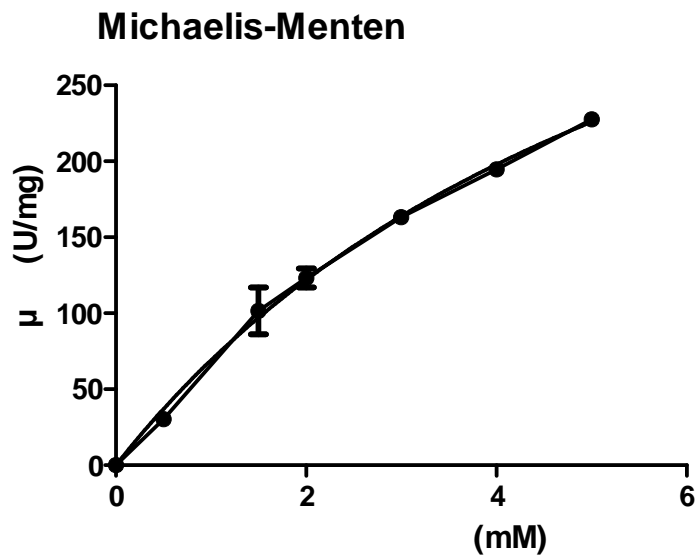
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μ MutOx2:
μ :



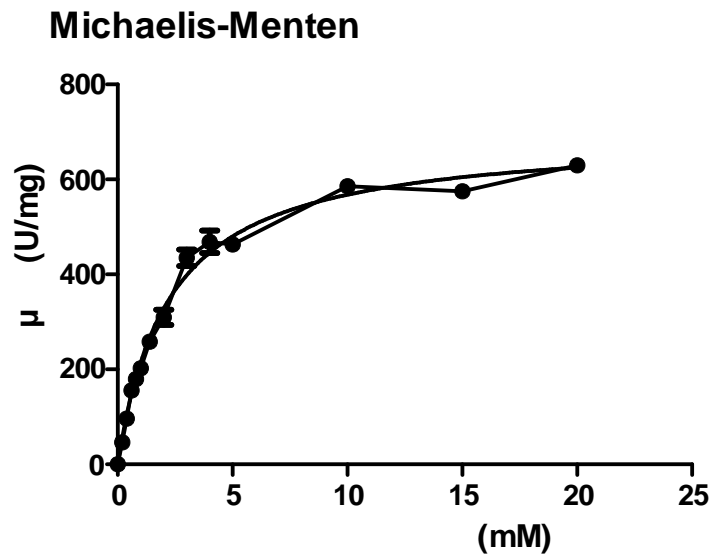
Διάγραμμα 16. Διάγραμμα Michaelis-Menten του MutOx2 σε χλωροκατεχόλη

μ :



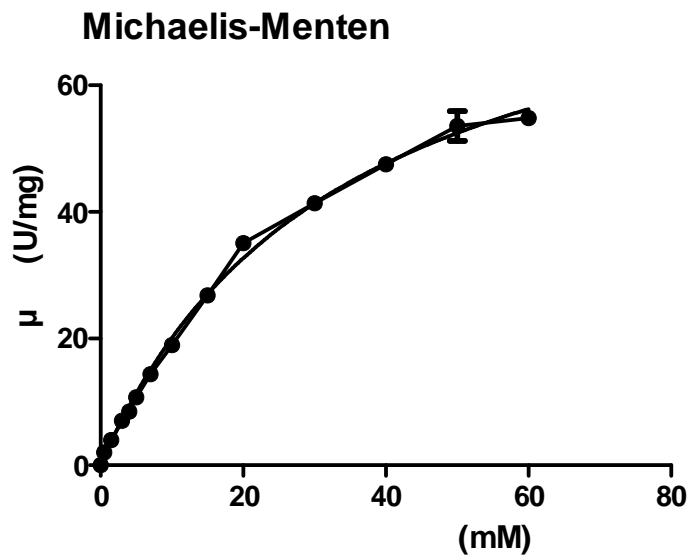
Διάγραμμα 17. Διάγραμμα Michaelis-Menten του MutOx2 σε κατεχόλη

μ MutOx3:
μ :



Διάγραμμα 18. Διάγραμμα Michaelis-Menten του MutOx3 σε χλωροκατεχόλη

μ :



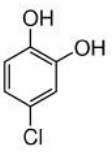
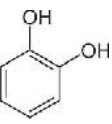
Διάγραμμα 19. Διάγραμμα Michaelis-Menten του MutOx3 σε κατεχόλη

Michaelis- Menten μ μ μ ,
μ . V_{max} K_m

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μ (), K_{cat} , μ
 μ ().

Πίνακας 29. Κινητικές σταθερές Michaelis- Menten των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών MutOx1, MutOx2 και MutOx3 για τα υποστρώματα χλωροκατεχόλη και κατεχόλη

μ	μ	V_{max} (U/mg)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)
	MtOx	6986,0±182,7	1,8±0,1	5414,2±141,6	3006,2±197,7
	MutOx1	379,0±8,0	3,5±0,2	293,7±6,2	84,3±5,1
	MutOx2	722,3±17,0	0,4±0,0	599,8±13,2	1380,5±87,9
	MutOx3	930,2±65,1	9,1±1,3	720,9±50,4	79,3±12,7
	MtOx	137,4±5,8	19,7±2,0	106,5±4,5	5,4±0,6
	MutOx1	115,6±1,8	7,9±0,4	89,6±1,4	11,4±0,6
	MutOx2	522,5±42,9	6,6±0,8	404,9±33,2	61,7±9,3
	MutOx3	87,9±3,0	33,8±2,3	68,1±2,3	2,0±0,2

μ 29 μ
 $K_m=0,4mM$, μ μ μ MutOx2, μ
 μ MtOx. μ μ MutOx2
 μ - μ ,
 (k_{cat}/K_m) μ μ μ μ ,
 MutOx2. μ μ μ
 μ μ 4- ,
 μ k_{cat}/K_m μ .

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σε πηκτή ακρυλαμιδίου SDS- PAGE:

MtOx, MutOx1, MutOx2 MutOx3 46,5

kDa. μ μ μ

« » . μ μ

C- . PPO A.

oryzae μ μ 44 kDa (Kaintz et al., 2014).

I. batatas μ 40 kDa μ

(Eicken, Zippel, Büldt-Karentzopoulos, & Krebs,

1998). μ μ μ

μ μ μ μ 60-69 kDa, μ

μ 38-46 kDa (Kaintz et al., 2014).

μ μ μ 23 μ μ

μ μ μ μ μ μ μ ,

μ μ μ μ μ μ μ ,

μ μ μ μ μ μ μ 40 kDa.

μ μ μ μ μ μ μ

Pichia pastoris

μ , μ

μ μ μ μ μ μ μ

μ μ μ μ μ μ μ μ μ μ

EndoH. μ *EndoH* μ μ μ μ μ μ μ

μ μ μ μ μ μ μ μ μ μ μ μ μ

μ *P. pastoris*..

μ μ μ μ μ μ μ μ μ μ μ μ μ

(. 23). μ μ

μ

μ *EndoH* ,
 . μ
 μ μ μ μ μ
 μ μ - , *EndoH*
 μ .
 μ μ μ . , μ μ
 μ MtOx μ μ
 μ (μ μ μ) μ ,
 -
 μ .

2. Κατηγοριοποίηση του ενζύμου:

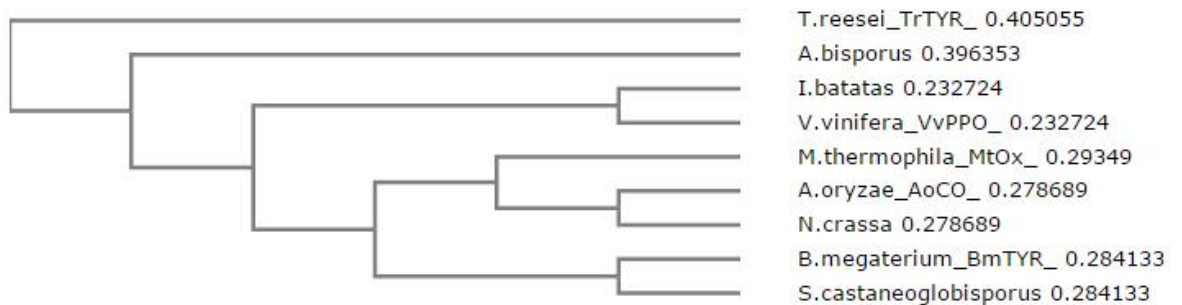
μ MtOx, μ
 « » ()
 .
 PPOs μ μ C-
 μ μ
 μ μ MtOx μ μ - (7)- - (8)- (.
 MtOx « »)
 Cu(A) μ Cys μ His
 Cu(A). « »
 μ 6 μ Cys
 (Gasparetti et al., 2010). MtOx μ μ
 5 μ . μ
 μ *A. oryzae* μ μ μ μ
 μ . (Hakulinen et al., 2013).
 μμ MtOx μ
 PPOs, AoCO μ μ μ μ
 MtOx *M. thermophila* (45% μ) .
 PPOs,
 μ *Myceliophthora thermophila*,
 μ μ , μ μ
 μ μ *Streptomyces*.
 μ μ μ , 30 kDa, μ

C-
 (Claus & Decker, 2006).
 A.
bisporus *P. nameko*
 C- (Selinheimo et al., 2009).
Neurospora crassa *Trichoderma reesei* (Faccio, Arvas, Thöny-Meyer, & Saloheimo, 2013).

3. Συμπεράσματα σχετικά με την εξελικτική σχέση μικροοργανισμών που παράγουν PPOs:

Clustal Omega
 UPGMA
 PPOs

Εικόνα 29. Φυλογενετικό δέντρο ορισμένων μυκήτων, βακτηρίων και φυτών (εξάγεται με βάση την πεπτιδική αλληλουχία των PPOs που παράγουν)



B. megaterium
S. castaneoglobisporus
M. thermophila (
), *A. oryzae* *N. crassa.* *I. batatas* *V. vinifera*
M. thermophila *A. bisporus*
T. reesei.
 .

μ ,

.

5. Εξειδικευμένη δράση σε διάφορα υποστρώματα:

μ

μ μ μ μ

μ .

μ ,

μ , μ L-

μ μ μ

μ , μ μ . μ ,

μ , μ μ

μ ,

μ μ μ μ

μ , μ μ ,

μ μ ,

μ L306A Y296V μ

, μ

, μ μ μ μ

μ . MutOx2 MutOx3, μ

MutOx1, μ μ ,

μ μ .

μ μ

MutOx2 μ μ μ

μ . μ μ μ

μ -

μ (, , -).

μ

μ μ μ μ μ μ μ

μ . -

μ μ μ μ

μ , . μ -

- μ μ μ

, μ μ μ μ ,

μ μ μ μ . μ μ

μ μ μ μ μ

μ

,

, μ μ .

μ μ μ MutOx1 μ μ

μ μ μ μ ,

μ , μ .

μ , μ μ

μ μ μ .

MutOx1 μ μ

μ Asn. Asn μ μ

μ μ μ μ μ .

μ μ μ μ ,

.

μ μ μ μ μ ,

μ μ μ μ MutOx2

μ μ . μ

μ .

μ / μ μ μ μ

μ , μ .

(29) μ μ

μ μ μ MutOx1. μ μ

μ μ

μ L-DOPA, L- ,

μ .

μ μ μ μ .

μ μ μ μ μ

μ μ

PPOs μ μ μ (. . L-

DOPA). PPOs μ
 μ , μ «oxy»
 μ μ μ (10-15%)
 μ μ , μ
 «met» μ , μ «oxy» ,
 (Halaouli, Asther, Sigoillot, Hamdi, & Lomascolo, 2006) (Dalfard et al., 2006).
 μ 4 μ L-
 5 μ μ L-DOPA.

6. Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης:

μ μ MtOx
 , μ μ μμ 9, μ 65 C.
 μ μ μ μ 60 C
 μ μ μ μ μ μ ,
 μ μ μ μ μ μ
 μ PPOs, μ μ
 μ μ μ
Molus Alba L. μ
 μ T=65°C, μ μ
 T= 35°C T=25 C (Arslan et al.,
 2004; Aydemir, 2004; Gawlik-Dziki et al., 2008). μ
 μ
 μ μ ,
 μ μ (Guo et al., 2015).

7. Θερμοσταθερότητα:

μ μ μ μ
 MutOx1, μ μ G292N MtOx.
 μ MutOx2. μ T=40°C
 μ μ 24 h. μ
 T= 60°C μ μ MutOx1 50%
 24h. μ μ μ G292N μ
 μ μ μ .
 μ μ μ Asn μ .

μ , μ
 292 μ
 μ .
 μ MutOx1
 μ . μ
 μ μ μ
 G292N.
 μ
 μ μ μ μ
 . μ
 80% 5 min,
 μ T=50°C, μ ,
 μ , 40 min (Mazzafera & Robinson, 2000) (Gawlik-
 Dziki et al., 2008). μ μ
 μ μ μ μ Cys
 . μ μ μ
 μ μ μ
 μ (Faccio et al., 2012). μ
 5 μ Cys, μ μ
 μ
 Cys.
 μ μ μ , μ μ
 μ μ μ μ μ
 μ μ μ
 μ μ μ 40 C, μ
 μ μ μ .
 μ μ μ μ ,
 μ
 21 h.

μ μ μ μ
μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ

8. Βέλτιστο pH δράσης:

μ MtOx MutOx3 pH = 8.
μ MutOx1 MutOx2 pH = 6.
μ μ pH = 8
μ Sodium Phosphate,
μ Tris Base/HCl μ μ pH. μ
P. Mazzafera, S. Robinson 2000 μ
μ μ μ μ μ
μ μ PH₄³⁻ μ , μ
μ μ μ μ μ
μ (Mazzafera & Robinson, 2000).
μ μ μ μ μ
pH PPOs
pH. μ PPO
μ pH=5-7 (Aydemir, 2004)
pH= 6-7 (Mazzafera
& Robinson, 2000). μ
Streptomyces polyantibioticus Streptomyces pharetrae pH
μ μ 7 (Le Roes-Hill, Palmer, Rohland,
Kirby, & Burton, 2015).
μ , μ
pH=8. MtOx MutOx3
μ μ pH μ
PPOs.

9. Σύγκριση με την πρωτεΐνη AoCO:

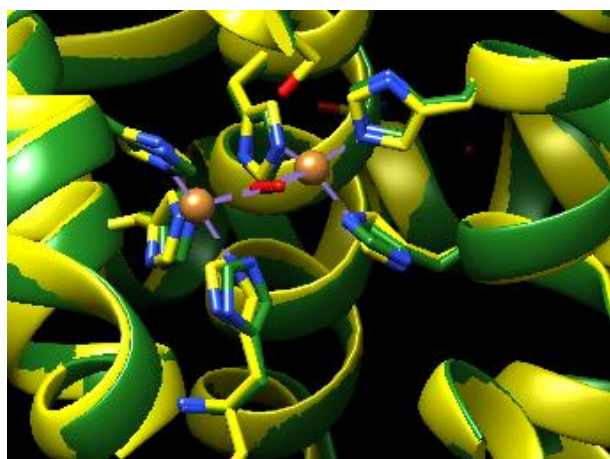
μ μ PPO *Myceliophthora*
thermophila MtOx μ *Aspergillus oryzae* AoCO
 μ μ MutOx1, MutOx2 MutOx3. μ ,
 μ μ MutOx1, MutOx2 MutOx3. « »
 μ , μ C-
 μ .

Πίνακας 30. Συγκριτικές ιδιότητες των εξεταζόμενων ενζύμων της *M. thermophila* και της κατεχολοξειδάσης του *A. oryzae* AoCO (Gasparetti et al., 2010)

	MtOx	MutOx1	MutOx2	MutOx3	AoCO4
m (mM)	19,7±2,0	7,9±0,4	6,6±0,8	33,8±2,3	3,3
pH	8	6	6	8	5,6*
μ $t_{1/2}$ (h) T=50°C	24	>24	5	8	20

* μ μ -
 AoCO4 μ μ
 μ μ *M.*
thermophila- μ μ μ . μ μ
 μ μ . μ μ μ
 AoCO4 MtOx, μ μ MtOx
 μ AoCO4.
 μ μ μ .

Εικόνα 30. Σύγκριση των ενεργών κέντρων των MtOx (με πράσινο) και AoCO4 (με κίτρινο). Οι ιστιδίνες με τις οποίες συντονίζονται τα ιόντα χαλκού βρίσκονται σχεδόν σε όμοια θέση.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

μ
μ μ μ μ μ μ μ
μ μ μ 33 (.).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2011). . Nicosia: Broken Hill Publishers LTD
- Allouche, N., Damak, M., Ellouz, R., & Sayadi, S. (2004). Use of Whole Cells of, 70(4), 2105–2109. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2105>
- Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S., & Ozensoy, O. (2004). Purification of mulberry (Morus alba L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry*, 88(3), 479–484. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.005>
- Aydemir, T. (2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (Cynara scolymus L.) heads. *Food Chemistry*, 87(1), 59–67. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.017>
- Bassalo, M. C., Liu, R., & Gill, R. T. (2016a). Directed evolution and synthetic biology applications to microbial systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 39, 126–133. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.03.016>
- Bassalo, M. C., Liu, R., & Gill, R. T. (2016b). Directed evolution and synthetic biology applications to microbial systems. *Current Opinion in Biotechnology*. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.03.016>
- Bijelic, A., Pretzler, M., Molitor, C., Zekiri, F., & Rompel, A. (2015). The structure of a plant tyrosinase from Walnut leaves reveals the importance of “substrate-guiding residues” for enzymatic specificity. *Angewandte Chemie - International Edition*. <http://doi.org/10.1002/anie.201506994>
- Bozzini, T., Botta, G., Delfino, M., Onofri, S., Saladino, R., Amatore, D., ... Palamara, A. T. (2013). Tyrosinase and Layer-by-Layer supported tyrosinases in the synthesis of lipophilic catechols with antiinfluenza activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(24), 7699–7708. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.10.026>
- Claus, H., & Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(1), 3–14. <http://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.012>

- Cobb, R. E., Sun, N., & Zhao, H. (2013). Directed evolution as a powerful synthetic biology tool. *Methods*, *60*(1), 81–90. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.03.009>
- Dalfard, A. B., Khajeh, K., Souidi, M. R., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B., & Sajedi, R. H. (2006). Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(7), 1409–1416. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.029>
- Decker, H., Schweikardt, T., & Tucek, F. (2006). The first crystal structure of tyrosinase: All questions answered? *Angewandte Chemie - International Edition*, *45*(28), 4546–4550. <http://doi.org/10.1002/anie.200601255>
- Eicken, C., Krebs, B., & Sacchettini, J. C. (1999). Catechol oxidase — structure and activity. *Current Opinion in Structural Biology*, *9*(6), 677–683. [http://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00029-9](http://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00029-9)
- Eicken, C., Zippel, F., Büldt-Karentzopoulos, K., & Krebs, B. (1998). Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center. *FEBS Letters*, *436*(2), 293–299. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01113-2](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01113-2)
- Ercili-Cura, D. (2012). Structure modification of milk protein gels by enzymatic cross-linking, 82.
- Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomas-Barberan, F. A., & Wichers, H. J. (2001). Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(3), 1187–1193. <http://doi.org/10.1021/jf001258b>
- Faccio, G., Arvas, M., Thöny-Meyer, L., & Saloheimo, M. (2013). Experimental and bioinformatic investigation of the proteolytic degradation of the C-terminal domain of a fungal tyrosinase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *121*, 37–45. <http://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.12.006>
- Faccio, G., Kruus, K., Saloheimo, M., & Thöny-Meyer, L. (2012). Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochemistry*, *47*(12), 1749–1760. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.08.018>

- Fairhead, M., & Thöny-Meyer, L. (2012). Bacterial tyrosinases: Old enzymes with new relevance to biotechnology. *New Biotechnology*, 29(2), 183–191. <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.05.007>
- Flibotte, S., Edgley, M. L., Chaudhry, I., Taylor, J., Neil, S. E., Rogula, A., ... Moerman, D. G. (2010). Whole-genome profiling of mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. <http://doi.org/10.1534/genetics.110.116616>
- Fronk, P., Hartmann, H., Bauer, M., Solem, E., Jaenicke, E., Tenzer, S., & Decker, H. (2015). Polyphenoloxidase from Riesling and Dornfelder wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase. *Food Chemistry*. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.016>
- Gasparetti, C., Faccio, G., Arvas, M., Buchert, J., Saloheimo, M., & Kruus, K. (2010). Discovery of a new tyrosinase-like enzyme family lacking a C-terminally processed domain: Production and characterization of an *Aspergillus oryzae* catechol oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(1), 213–226. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2258-3>
- Gawlik-Dziki, U., Złotek, U., & Wiecek, M. (2008). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.). *Food Chemistry*, 107(1), 129–135. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.068>
- Goldfeder, M., Kanteev, M., Adir, N., & Fishman, A. (2013). Influencing the monophenolase/diphenolase activity ratio in tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.12.021>
- Guo, J., Rao, Z., Yang, T., Man, Z., Xu, M., Zhang, X., & Yang, S.-T. (2015). Enhancement of the thermostability of *Streptomyces kathirae* SC-1 tyrosinase by rational design and empirical mutation. *Enzyme and Microbial Technology*, 77, 54–60. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.002>
- Hakulinen, N., Gasparetti, C., Kaljunen, H., Kruus, K., & Rouvinen, J. (2013). The crystal structure of an extracellular catechol oxidase from the ascomycete fungus *Aspergillus oryzae*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18(8), 917–929. <http://doi.org/10.1007/s00775-013-1038-9>

- Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J. C., Hamdi, M., & Lomascolo, A. (2006). Fungal tyrosinases: New prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, *100*(2), 219–232. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02866.x>
- Inoue, T., Shiota, Y., & Yoshizawa, K. (2008). Quantum Chemical Approach to the Mechanism for the Biological Conversion of Tyrosine to Dopaquinone Quantum Chemical Approach to the Mechanism for the Biological Conversion of Tyrosine to Dopaquinone, (11), 16890–16897. <http://doi.org/10.1021/ja802618s>
- Jäckel, C., Kast, P., & Hilvert, D. (2008). Protein Design by Directed Evolution. *Annual Review of Biophysics*, *37*(1), 153–173. <http://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125832>
- Kaintz, C., Mauracher, S. G., & Rompel, A. (2014). Type-3 copper proteins: Recent advances on polyphenol oxidases. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. <http://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.07.001>
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., & Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*, *5*(12), 1084–1090. <http://doi.org/10.1038/4193>
- Lagunas-Muñoz, V. H., Cabrera-Valladares, N., Bolívar, F., Gosset, G., & Martínez, A. (2006). Optimum melanin production using recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(5), 1002–1008. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03013.x>
- Le Roes-Hill, M., Palmer, Z., Rohland, J., Kirby, B. M., & Burton, S. G. (2015). Partial purification and characterisation of two actinomycete tyrosinases and their application in cross-linking reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *122*, 353–364. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.10.012>
- Lee, S. H., Baek, K., Lee, J. E., & Kim, B. G. (2016). Using tyrosinase as a monophenol monooxygenase: A combined strategy for effective inhibition of melanin formation. *Biotechnology and Bioengineering*, *113*(4), 735–743. <http://doi.org/10.1002/bit.25855>
- Li, R., Li, N., Wang, Z., Wang, X., & Liu, W. (2015). Characterization of Polyphenol

- Oxidase from Jipicao Yam. *Journal of Food Biochemistry*.
<http://doi.org/10.1111/jfbc.12117>
- Liu, B., Xue, Q., Tang, Y., Cao, J., Guengerich, F. P., & Zhang, H. (2016).
 Mechanisms of mutagenesis: DNA replication in the presence of DNA damage.
<http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.03.006>
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., & Sugiyama, M. (2006).
 Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is
 flexible during catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8981–8990.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M509785200>
- Mazzafera, P., & Robinson, S. P. (2000). Characterization of polyphenol oxidase in
 coffee. *Phytochemistry*, 55(4), 285–296. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00332-0](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00332-0)
- Molitor, C., Mauracher, S. G., & Rompel, A. (2016). Aurone synthase is a catechol
 oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of
 plant polyphenol oxidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,
 E1806–E1815. <http://doi.org/10.1073/pnas.1523575113>
- Nimpiboon, P., Kaulpiboon, J., Krusong, K., Nakamura, S., Kidokoro, S. ichi, &
 Pongsawasdi, P. (2016). Mutagenesis for improvement of activity and
 thermostability of amylomaltase from *Corynebacterium glutamicum*.
International Journal of Biological Macromolecules.
<http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.022>
- Nolan, L. C., & O'Connor, K. E. (2007). Use of *Pseudomonas mendocina*, or
 recombinant *Escherichia coli* cells expressing toluene-4-monooxygenase, and a
 cell-free tyrosinase for the synthesis of 4-fluorocatechol from fluorobenzene.
Biotechnology Letters, 29(7), 1045–1050. <http://doi.org/10.1007/s10529-007-9365-y>
- Olivares, C., & Solano, F. (2009). New insights into the active site structure and
 catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell &
 Melanoma Research*, 22(6), 750–760. <http://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00636.x>

- Pierre, B., Shah, V., Xiao, J., & Kim, J. R. (2015). Construction of a random circular permutation library using an engineered transposon. *Analytical Biochemistry*, 474, 16–24. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.011>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(3), 586–621. <http://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Rolff, M.; Schottenheim, J; Decker, H; Tucek, F. (2011). Copper-O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 4077–4098. <http://doi.org/10.1039/c0cs00202j>
- Selinheimo, E., Gasparetti, C., Mattinen, M.-L., Steffensen, C. L., Buchert, J., & Kruus, K. (2009). Comparison of substrate specificity of tyrosinases from *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(1), 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.09.013>
- Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V. S., Adir, N., & Fishman, A. (2011). First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *Journal of Molecular Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.10.048>
- Shuster Ben-Yosef, V., Sendovski, M., & Fishman, A. (2010). Directed evolution of tyrosinase for enhanced monophenolase/diphenolase activity ratio. *Enzyme and Microbial Technology*. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.08.008>
- Siegbahn, P. E. M. (2004). The catalytic cycle of catechol oxidase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 9(5), 577–590. <http://doi.org/10.1007/s00775-004-0551-2>
- Solem, E., Tucek, F., & Decker, H. (2016). Tyrosinase versus Catechol Oxidase: One Asparagine Makes the Difference. *Angewandte Chemie - International Edition*. <http://doi.org/10.1002/anie.201508534>
- Stoscheck, C. M. (1990). [6] Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182, 50–68. [http://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-P](http://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P)

- Uria, A. R., & Zilda, D. S. (2016). Chapter One – Metagenomics-Guided Mining of Commercially Useful Biocatalysts from Marine Microorganisms. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 78, pp. 1–26).
<http://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.05.001>
- Virador, V. M., Reyes Grajeda, J. P., Blanco-Labra, A., Mendiola-Olaya, E., Smith, G. M., Moreno, A., & Whitaker, J. R. (2010). Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of grenache (VITIS vinifera) polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1189–1201.
<http://doi.org/10.1021/jf902939q>
- Weng, C.-J., & Yen, G.-C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, 38(1), 76–87. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.03.001>
- Wright, P. E., & Dyson, H. J. (2009). Linking folding and binding. *Current Opinion in Structural Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.12.003>
- Yasuda, D., Takahashi, K., Ohe, T., Nakamura, S., & Mashino, T. (2013). Antioxidant activities of 5-hydroxyoxindole and its 3-hydroxy-3-phenacyl derivatives: The suppression of lipid peroxidation and intracellular oxidative stress. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(24), 7709–7714.
<http://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.10.021>