

**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΙV ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Βιοτεχνολογική αξιοποίηση μικροβιακού και  
ενζυμικού συστήματος λιγνινολυτικών  
μυκήτων**

Διδακτορική Διατριβή

Αναστασία Ζέρβα

Βιολόγος, MSc

Επιβλέπων Καθηγητής: Ευάγγελος Τόπακας

Αθήνα, 2017



*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανωτάτη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202).*



Στους γονείς μου,  
Λιζέτα και Τάκη,  
για όλη τους την αγάπη



Humans have evolved to their relatively high state by retaining the immature characteristics of their ancestors. Humans are the most advanced of mammals – although a case could be made for the dolphins – because they seldom grow up. Behavioral traits such as curiosity about the world, flexibility of response, and playfulness are common to practically all young mammals but are usually rapidly lost with the onset of maturity in all but humans. Humanity has advanced, when it has advanced, not because it has been sober, responsible and cautious, but because it has been playful, rebellious, and immature.”

**Tom Robbins, *Still Life with Woodpecker*, 1980**





# Βιοτεχνολογική αξιοποίηση ενζυμικού και μικροβιακού συστήματος λιγνινολυτικών μυκήτων

## Διδακτορική Διατριβή

### Εξεταστική επιτροπή

#### **Ευάγγελος Τόπακας**

Επίκουρος Καθηγητής

Σχολής Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π.

#### **Πάυλος Χριστακόπουλος**

Σ. Καθηγητής

Σχολής Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π

#### **Φραγκίσκος Κολίσης**

Ομότιμος Καθηγητής,

#### **Δημήτριος Κέκος**

Καθηγητής

Σχολής Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π.

#### **Γεώργιος Ζερβάκης**

Αναπληρωτής Καθηγητής

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, ΓΠΑ

#### **Νικόλαος Τσουκιάς**

Αναπληρωτής Καθηγητής

Σχολής Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π.

#### **Δημήτριος Χατζηνικολάου**

Επίκουρος Καθηγητής

Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας,

ΕΚΠΑ

Επιβλέπων Καθηγητής

Μέλος συμβουλευτικής  
και εξεταστικής επιτροπής

Μέλος συμβουλευτικής  
και εξεταστικής επιτροπής

Μέλος εξεταστικής  
επιτροπής

Μέλος εξεταστικής  
επιτροπής

Μέλος εξεταστικής  
επιτροπής

Μέλος εξεταστικής  
επιτροπής



### Δημοσιεύσεις εργασιών σε επιστημονικά περιοδικά

1. Zerva A., Christakopoulos P. and Topakas E. (2015). Characterization and application of a novel class II thermophilic peroxidase from *Myceliophthora thermophila* in biosynthesis of polycatechol. *Enzyme and Microbial Technology* 75–76(0): 49-56.
2. Zerva A., Zervakis G. I., Christakopoulos P. and Topakas E. Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. *Journal of Environmental Management*. Available online 3 March 2016
3. Zerva, A., Manos, N., Vouyiouka, S., Christakopoulos, P., Topakas, E. Bioconversion of Biomass-Derived Phenols Catalyzed by *Myceliophthora thermophila* Laccase. *Molecules* **2016**, *21*, 550.
4. Zerva A., Papaspyridi L.-M., Christakopoulos P. and Topakas E. (2017). Valorization of Olive Mill Wastewater for the Production of  $\beta$ -glucans from Selected Basidiomycetes. *Waste and Biomass Valorization*: 1-11.
5. Zerva, A., Koutroufini, E., Detsi, A., Topakas, E. Heterologous expression and characterization of a novel thermophilic laccase-like multicopper oxidase (LMCO) from *Myceliophthora thermophila* and its application in biotransformation of flavonoids, in preparation.
6. Zouraris, D., Zerva, A., Topakas, E., Karantonis, A. Electrochemical study of the kinetics of MtPerII peroxidase, in preparation.

### Άλλες δημοσιεύσεις

Anastasia Zerva, Georgios I. Zervakis, Paul Christakopoulos and Evangelos Topakas, From toxic wastes to valuable products: valorization of olive oil mill wastewater using mushrooms, *Atlas of Science*, April 27, 2016.

## Συμμετοχές σε συνέδρια

### Προφορικές παρουσιάσεις

Anastasia Zerva, Paul Christakopoulos, Evangelos Topakas. Characterization of a novel thermophilic Class II peroxidase from *Myceliophthora thermophila*, ECOST Training School, COST Action CM1303, 28/05/2014 to 01/06/2014, Certosa di Pontignano, Siena, Italy

Zerva A., Gkatzarou E., Mioteli D., Mousavi G., Zervakis G., Christakopoulos P., Topakas E. Degradation of olive mill waste waters by two wood-rot fungi and their effect on the induction of extracellular ligninolytic enzymes. International Conference on Industrial Waste & Wastewater Treatment & Valorization, 21-23 May 2015, President Hotel, Athens

Anastasia Zerva, Nikolaos Manos, Stamatina Vouyiouka, Paul Christakopoulos, Evangelos Topakas. Polymerization of naturally occurring phenols by a *Myceliophthora thermophila* laccase. ECOST Training School, COST Action CM1303, 27/04/2016 to 01/05/2016, Certosa di Pontignano, Siena, Italy

A. Zerva, L.-M. Papaspyridi, G. Mousavi, P. Christakopoulos and E. Topakas. Isolation of β-glucans from selected Basidiomycetes strains grown in olive oil mill wastewater. 4th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, Limassol, Cyprus, 23–25 June 2016

### Παρουσιάσεις πόστερ

Zerva A., Gkatzarou E., Mioteli D., Mousavi M., Zervakis G., Christakopoulos P., Topakas E. Bio-valorization of olive oil mill waste, with the use of indigenous Greek Basidiomycetous species. 6th Conference of the Hellenic scientific society Mikrobiokosmos 'New Horizons in the Micro World', 3-5 April 2015, National Hellenic Research Foundation.

A. Zerva, N. Manos, E. Koutroufini and E. Topakas. A novel laccase-like enzyme from thermophile fungus *Myceliophthora thermophila*. 8th European Meeting on OxiZymes, 3–6 July 2016, Hof van Wageningen, Wageningen, Netherlands.

## Περίληψη

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση του βιοτεχνολογικού δυναμικού λιγνιολυτικών μυκήτων, τόσο σε επίπεδο ολόκληρων των οργανισμών και των καλλιεργειών τους, όσο και των επιμέρους ενζυμικών συστημάτων που είναι υπεύθυνα για την οξειδωτική διάσπαση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Προς αυτή την κατεύθυνση, στα πρώτα στάδια της διατριβής δοκιμάστηκαν δυο στελέχη βασιδιομυκήτων αναφορικά με την ικανότητά τους να αποικοδομούν απόβλητα υψηλού φαινολικού φορτίου. Το απόβλητο που επιλέχθηκε προς διερεύνηση ήταν το υγρό απόβλητο ελαιουργείου (ΥΑΕ), το οποίο αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στις χώρες παραγωγής ελαιολάδου, λόγω του υψηλού του οργανικού φορτίου και της υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων. Τα στελέχη βασιδιομυκήτων *Pleurotus citrinopileatus* LGAM 28684 και *Irpex lacteus* LGAM 238 δοκιμάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αποικοδομούν το ΥΑΕ, ενώ διερευνήθηκε και η επίδραση διαφόρων παραμέτρων στην ικανότητα αποικοδόμησης, όπως το pH του μέσου καλλιέργειας, η προσθήκη πηγών αζώτου και η συγκέντρωσή τους. Οι συνθήκες που κρίθηκαν βέλτιστες για κάθε στέλεχος ήταν οι pH 6, 30 g L<sup>-1</sup> εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού για το *P. citrinopileatus* και 20 g L<sup>-1</sup> για το *I. lacteus*. Τα δύο στελέχη έδειξαν πολύ ικανοποιητικά επίπεδα αποικοδόμησης του ΥΑΕ και παραγωγής εξωκυτταρικών λιγνιολυτικών ενζύμων, επιτυγχάνοντας πάνω από 90% μείωση των φαινολικών ενώσεων και αποχρωματισμού. Σε επόμενο στάδιο δοκιμάστηκε η ικανότητα παραγωγής ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών από ανάπτυξη τριών στελεχών βασιδιομυκήτων σε βυθισμένη καλλιέργεια, και επιχειρήθηκε η ταυτόχρονη αποικοδόμηση και αξιοποίηση του ΥΑΕ μέσω της παραγωγής μυκηλιακών πολυσακχαριτών. Τα στελέχη βασιδιομυκήτων που επιλέχθηκαν για αυτό το σκοπό ήταν τα *Ganoderma lucidum* LGAM 9720, *Pleurotus citrinopileatus* LGAM 28684 και *Pleurotus ostreatus* LGAM 1123, και αναπτύχθηκαν για συγκριτικούς σκοπούς σε δύο θρεπτικά υποστρώματα, ένα ημισυνθετικό μέσο με ξυλόζη ως πηγή άνθρακα και ένα μέσο με ΥΑΕ ως πηγή άνθρακα, ενώ δοκιμάστηκαν επίσης και δύο διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών της βιομάζας. Τα υψηλότερα επίπεδα αποικοδόμησης του ΥΑΕ παρατηρήθηκαν από το στέλεχος *G. lucidum*, ενώ οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από όλα τα στελέχη βρέθηκαν να είναι πιο πλούσιοι σε γλυκάνες στην περίπτωση της ανάπτυξης σε ημισυνθετικό υπόστρωμα σε σύγκριση με το θρεπτικό μέσο με ΥΑΕ. Σχετικά με τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, η βιομάζα του *P. ostreatus* βρέθηκε να είναι η πιο πλούσια σε γλυκάνες, με ολικό περιεχόμενο 8,68 % (w/w) κατά την ανάπτυξη σε ημισυνθετικό μέσο και 7,58% (w/w) κατά την ανάπτυξη σε ΥΑΕ. Μετά την εφαρμογή των μεθόδων απομόνωσης των πολυσακχαριτών της βιομάζας, το κλάσμα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκάνες προήλθε από το *G. lucidum* μετά από ανάπτυξη σε ημισυνθετικό μέσο, με 49,1 % (w/w) ολικές γλυκάνες. Τα φάσματα FTIR των απομονωμένων κλασμάτων αποκάλυψαν την ύπαρξη α- και β- γλυκοζιδικών δεσμών, αλλά και την ύπαρξη πρωτεϊνικών επιμολύνσεων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απομάκρυνση των α-γλυκανών και των υπολειπόμενων πρωτεϊνών δεν επιτεύχθηκε πλήρως με καμία από τις δύο μεθόδους. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής υποδεικνύουν ότι η ταυτόχρονη αποικοδόμηση και αξιοποίηση των ΥΑΕ για παραγωγή μικροβιακών πολυσακχαριτών θα μπορούσε να είναι μια βιώσιμη λύση για την επεξεργασία τέτοιου είδους αποβλήτων.

Ακολούθως, σχετικά με τη μελέτη και αξιοποίηση του ενζυμικού δυναμικού των λιγνιολυτικών μυκήτων, επιλέχθηκαν δύο γονίδια του θερμόφιλου ασκομύκητα *Myceliophthora thermophila* τα οποία μετά από βιοπληροφορική ανάλυση βρέθηκε ότι πιθανώς εμπλέκονται στην αποικοδόμηση

της λιγνινοκυτταρίνης και άρα κρίθηκαν κατάλληλα για περαιτέρω μελέτη. Τα γονίδια αυτά απομονώθηκαν από το γονιδίωμα του μικροοργανισμού, κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλους φορείς και εκφράστηκαν ετερόλογα στη ζύμη *Pichia pastoris*. Τα ένζυμα που προέκυψαν βρέθηκε ότι είχαν ενεργότητες υπεροξειδάσης και πολυφαινολικής οξειδάσης και ονομάστηκαν αντίστοιχα *MtPerII* και *MtLac2*. Μετά την απομόνωση των ενζύμων αυτών με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου, τα καθαρά πλέον ένζυμα χαρακτηρίστηκαν πλήρως ως προς τις φυσικοχημικές, βιοχημικές και καταλυτικές ιδιότητές τους. Οι *MtPerII* και *MtLac2* βρέθηκε ότι μπορούν να οξειδώσουν μεγάλο εύρος φαινολικών υποστρωμάτων, ενώ κρίθηκαν ιδιαίτερα θερμοσταθερά ένζυμα, αφού η μεν *MtPerII* φάνηκε ότι διατηρεί το 70% της ενεργότητάς της στους 50°C μετά από επώαση 8 ωρών, ενώ η *MtLac2* αντίστοιχα διατηρεί το 70% της ενεργότητάς της μετά από επώαση 24 ωρών στους 50 °C. Επιπλέον, η *MtPerII* φάνηκε ότι διαθέτει μια ασυνήθιστα υψηλή ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, αφού διατηρεί το 80% της αρχικής της ενεργότητας μετά από επώαση 24 ωρών σε μεγάλη περίσσεια H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Σε ότι αφορά τα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά, η μεν *MtPerII* δρα βέλτιστα σε συνθήκες pH 5 και 60 °C, ενώ η *MtLac2* σε pH 4 και 50 °C. Εξαιτίας του υψηλού βαθμού γλυκοζυλίωσής τους, τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν υψηλότερα μοριακά βάρη από τα θεωρητικά αναμενόμενα. Στη συνέχεια, καθένα από τα ένζυμα αυτά δοκιμάστηκε σε μια εφαρμογή που σχετίζεται με το πεδίο της βιοκατάλυσης, με ιδιαίτερη επιτυχία: Η *MtPerII* βρέθηκε ότι μπορεί να καταλύσει επιτυχώς τον πολυμερισμό της κατεχόλης, ενώ με τη χρήση της *MtLac2* επιτεύχθηκε η βιομετατροπή φλαβονοειδών ενώσεων, από τη φυσική χαλκόνη βουτεΐνη στη φυσική ωρόνη σουλφουρετίνη, ένα προϊόν με πολλές βιολογικές δράσεις.

Τέλος, η εμπορική λακκάση του *M. thermophila* χρησιμοποιήθηκε για τη βιομετατροπή φαινολικών ενώσεων, και συγκεκριμένα της κατεχόλης, της πυρογαλλόλης και του γαλλικού οξέος. Τα προϊόντα που προέκυψαν από την οξείδωση της κατεχόλης και του γαλλικού οξέος βρέθηκε ότι ήταν πολυμερή μόρια, τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως προς τις οπτικές και θερμικές ιδιότητές τους. Οι φασματοσκοπίες <sup>1</sup>H-NMR και FTIR αποκάλυψαν ότι οι δεσμοί που δημιουργήθηκαν μεταξύ των μονομερών ήταν αιθερικοί και δεσμοί άνθρακα-άνθρακα, ενώ το μοριακό βάρος της πολυκατεχόλης βρέθηκε μεγαλύτερο από αυτό του πολύ-γαλλικού οξέος. Ωστόσο, το προϊόν βιομετατροπής της πυρογαλλόλης βρέθηκε να είναι το διμερές της, η πουργουρογαλλίνη, ένα μόριο με πολύ υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Γενικά, η βιοκαταλυτική σύνθεση των φαινολικών πολύ- ή oligομερών όπως επιτεύχθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν μια εναλλακτική, πιο φιλική προς το περιβάλλον λύση σε παραδοσιακές εφαρμογές συνθετικής χημείας.

## Abstract

The main aim of the present doctoral thesis was the investigation of the biotechnological potential of the ligninolytic fungi, at the whole-cell level as well as at the level of the enzymatic systems responsible for the oxidative degradation of lignocellulosic biomass. Towards that goal, in the first steps of the thesis, two basidiomycetes strains were tested regarding their ability to degrade waste materials of high phenolic content. The waste material chosen for this purpose was the olive oil mill wastewater (OMWW) a product that poses serious problems for olive-oil producing countries due to its high organic load and its high concentration of phenol compounds. The basidiomycetes strains *Pleurotus citrinopileatus* LGAM 28684 and *Irpex lacteus* LGAM 238 were tested regarding their ability to degrade OMWW, while the effect of several parameters, such as the pH and the nature and concentration of the nitrogen supplementation, in the degradation capacity was also investigated. The optimum conditions for each strain were found to be pH 6, 30 g L<sup>-1</sup> corn steep liquor for *P. citrinopileatus* and 20 g L<sup>-1</sup> for *I. lacteus*. The two strains showed very satisfactory levels of OMWW degradation and extracellular ligninolytic enzymes production, achieving over 90% phenols reduction and decolourization. In the next step, the ability of intracellular and extracellular polysaccharides production from three basidiomycetes strains was tested in submerged culture, and the simultaneous degradation and valorization of the OMWW was attempted through the production of fungal polysaccharides. The basidiomycetes strains selected for this purpose were *Ganoderma lucidum* LGAM 9720, *Pleurotus citrinopileatus* LGAM 28684 and *Pleurotus ostreatus* LGAM 1123, and they were grown in two different media for comparison, a semi-synthetic medium with xylose as carbon source and an OMWW-based medium, while two different methods were tested for the isolation of the biomass polysaccharides. The highest levels of OMWW degradation were observed from *G. lucidum*, while the extracellular polysaccharides isolated from all strains were found to be richer in glucan content in the case of semi-synthetic medium growth compared to OMWW-growth. Regarding the intracellular polysaccharides, the *P. ostreatus* biomass was found to be richer in glucans, with total glucan content 8.68% (w/w) during growth in semi-synthetic medium and 7.58% (w/w) during growth in OMWW-based medium. After application of the two isolation methods in the mycelial biomass, the fraction with the highest glucan content was found to be the one from *G. lucidum* after growth in semi-synthetic medium, containing 49.1% (w/w) total glucans. The FTIR spectra of the isolated fractions revealed the existence of  $\alpha$ - and  $\beta$ - glucosidic bonds, but also the existence of protein contamination, indicating that the removal of  $\alpha$ -glucans and proteins was not entirely successful with neither of the two tested methods. However, the results of the present thesis indicate that the simultaneous degradation and valorization of OMWW for the production of microbial polysaccharides could be a viable alternative for the treatment of such wastes.

Following the above results, regarding the study and valorization of the enzymatic potential of ligninolytic fungi, two genes were selected from the thermophile ascomycete *Myceliophthora thermophila*, on the basis of bioinformatics analysis indicating their implication in lignocellulose degradation, and thus were considered appropriate for further study. These genes were isolated from the genome of *M. thermophila*, cloned in suitable vectors and expressed heterologously in *Pichia pastoris*. The resulting enzymes were found to exhibit peroxidase and polyphenol-oxidase activities and were named *MtPerII* and *MtLac2* respectively. Following their separation and purification with metal affinity chromatography, the purified enzymes were fully characterized in regard to their physicochemical, biochemical and catalytic properties. The *MtPerII* and *MtLac2* were found to be able

to oxidize a wide variety of phenolic compounds, while they were found to be very thermostable, since *MtPerII* was found to retain 70% of its activity in 50 °C after 8-hour incubation, while *MtLac2* retains 70% of its activity in 50 °C after 24-hour incubation. Moreover, *MtPerII* appears to be extremely tolerant in excessive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantities, since it retains 80% of its original activity after 24-hour incubation in great H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> excess. Regarding their biochemical characteristics, *MtPerII* displays the optimum activity at pH 5 and 60 °C, while *MtLac2* in pH 4 and 50 °C. Due to their high degree of glycosylation, both enzymes appear to be of a higher molecular weight than the theoretically calculated. The performance of each enzyme was tested in an application relative to biocatalysis field, with great success: *MtPerII* was found to be able to successfully catalyze catechol polymerization, while with the use of *MtLac2* the bioconversion of flavonoid compounds was achieved, from the natural chalcone butein to natural aurone sulfuretin, a product with multiple biological activities.

Finally, the commercial laccase from *M. thermophila* was used for the bioconversion of phenolic compounds, specifically catechol, pyrogallol and gallic acid. The products obtained from the oxidation of catechol and gallic acid were found to be polymers, which were further characterized regarding their optical and thermal properties. <sup>1</sup>H-NMR and FTIR spectrometry revealed the bonds among the monomer units were ether and carbon-carbon bonds, while the molecular weight of polycatechol was found higher than the respective molecular weight of poly-gallic acid. However, the bioconversion product of pyrogallol was found to be its dimer, purpurogallin, a molecule with very high antioxidant activity. Overall, the biocatalytic synthesis of phenol poly- or oligomers, as demonstrated in the present work, could be used as an alternative, environmentally friendly solution in traditional synthetic chemistry applications.



## Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Ευάγγελου Τόπακα. Με την ευκαιρία αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου για τη συνεχή καθοδήγηση που μου προσέφερε, την καθημερινή ενθάρρυνση, και τη βοήθεια σε πάσης φύσεως δυσκολίες. Χωρίς αυτόν η διδακτορική διατριβή δεν θα είχε την παρούσα μορφή, και γι' αυτό τον ευχαριστώ από καρδιάς.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σ. Καθηγητή Παύλο Χριστακόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και για το θερμό του καλοσώρισμα στα πλαίσια της ομάδας, αλλά και για τη συμβολή και την καθοδήγησή του ως μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής. Η Επιτροπή συμπληρώνεται με τον Ομότιμο Καθηγητή Φραγκίσκο Κολίση, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την υποστήριξή του σε εργαστηριακά θέματα και για τις πολύτιμες συμβουλές του επί του κειμένου.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω μια σειρά επιστημόνων με τους οποίους είχα την τύχη να συνεργαστώ στα πλαίσια της διδακτορικής μου διατριβής, για την πολύτιμη βοήθειά τους:

Τον Καθηγητή Δημήτριο Κέκο για την πάσης φύσεως βοήθεια καθ'όλη τη διάρκεια της διατριβής μου, όπως επίσης και τη Δρα Διομή Μαμμά για τις συμβουλές της και την άμεση ανταπόκριση σε κάθε είδους πρόβλημα.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή ΓΠΑ Γεώργιο Ζερβάκη για τα στελέχη των μακρομοικτών της μυκητοθήκης LGAM που μας διέθεσε, αλλά κυρίως για την επιστημονική καθοδήγηση και τις ανεξάντλητες γνώσεις του σχετικά με τη βιολογία των μακρομοικτών. Η συνεργασία μου μαζί του ήταν άψογη, και τον ευχαριστώ ιδιαίτερα γι' αυτό.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νικόλαο Τσουκιά και τον Επίκουρο Καθηγητή ΕΚΠΑ Δημήτρη Χατζηνικολάου, οι οποίοι, ως μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής αφιέρωσαν πολύτιμο χρόνο και μου παρείχαν σημαντικές υποδείξεις επί του κειμένου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ε. Καθηγητή Δ. Χατζηνικολάου για την πολυετή συνεργασία πριν την έναρξη της διατριβής μου, καθώς η καθοδήγησή του μου ενέπνευσε την αγάπη για την εφαρμοσμένη επιστήμη, και οδήγησε στην απόφαση για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Σταματίνα Βουγιούκα για την πολύτιμη βοήθειά της και τις ανεξάντλητες γνώσεις της σχετικά με τη χημεία των πολυμερών. Η συνεργασία μας ήταν άψογη, και την ευχαριστώ ιδιαίτερα γι' αυτό. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρα Δημήτρη Κορρέ για τη φιλοξενία στο εργαστήριο Τεχνολογίας και Χημείας Πολυμερών, και κυρίως για τη βοήθειά του στα πειράματα θερμικής αντοχής των πολυμερών.

Ευχαριστώ επίσης την Επίκουρη Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση για τη συνεργασία στα πλαίσια των πειραμάτων βιομετατροπής των φλαβονοειδών, αλλά και για τη βοήθειά της στην ερμηνεία των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$ . Η εμπειρία της στο πεδίο της οργανικής σύνθεσης συνεισέφερε σημαντικά στις σχετικές εφαρμογές που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή, και την ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη συμβολή της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Claudia Crestini και Heiko Lange από το University of Rome Tor Vergata, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, όπως επίσης και τη Δρα Ανθή Καρναούρη για τη διεξαγωγή των αναλύσεων GPC των πολυμερών.

Ευχαριστώ επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή Αντώνη Καραντώνη για την εξαιρετική συνεργασία και την επιμονή του σχετικά με την περαιτέρω αξιοποίηση μέρους των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παρόντα και παρελθόντα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τη συνεργασία και τη φιλόξενη ατμόσφαιρα στο εργαστήριο και συγκεκριμένα τους διδάκτορες Μαρία Δημαρόγκωνα, Θωμά Πάσχο, Μαριάννα Χαραυγή, Ανθή Καρναούρη, Λέρια Παπασπυρίδη, και τους υποψήφιους διδάκτορες Δανάη Αλαμάνου, Μαρία Σαββίδου, Στράτο Νικολάιβιτς, Μαρία Κανελλή, Κώστα Κατσιμπουρα, Παναγιώτη Αγιουτάντη και Αγγελίνα Χαλιμά, καθώς και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Νίκο Μάνο. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους απόφοιτους της σχολής με τους οποίους συνεργάστηκα κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής, την Εμμανουέλα Γκατζάρου, Δανάη Μιοτέλη, Μελίσα Μουσανί, Ειρήνη Βαρδάκα, Ευθυμία Κουτρουφίνη και τον Δημήτρη Ζουράρη.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου, καθώς χωρίς την αδιάλειπτη αγάπη και υποστήριξή της, η πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήταν ανέφικτη. Ευχαριστώ επίσης από καρδιάς τους φίλους μου που στάθηκαν στο πλευρό μου καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Η παρούσα έρευνα συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και δια βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: ΘΑΛΗΣ – ΕΚΠΑ- MIS 377062.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Αναστασία Ζέρβα,

Αθήνα 2017

## Συντμήσεις

YAE	Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείου	YAE
PA	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
2,6 DMP	2,6 διμεθοξυφαινόλη	2,6 dimethoxyphenol
AAO	Οξειδάσες των αρυλ-αλκοολών	Aryl- alcohol oxidases
ABTS	2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
APS	Υπερθειϊκό αμμώνιο	Ammonium persulphate
AS	Συνθετάση της ωραιοσιδίνης	Aureusidin synthase
BMGY	Σύνθετο θρεπτικό μέσο ρυθμιστικού διαλύματος – γλυκερόλης	Buffered Glycerol-complex medium
BMMY	Σύνθετο θρεπτικό μέσο ρυθμιστικού διαλύματος – μεθανόλης	Buffered Methanol-complex medium
BOD	Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο	Biological oxygen demand
CAZy	Ένζυμα ενεργά έναντι πολυσακχαριτών	Carbohydrate-Active enzymes
COD	Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο	Chemical oxygen demand
CSL	Εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού	Corn steep liquor
DMAB	4-(διμεθυλάμινο)βενζαλδεΐδη	4-(Dimethylamino)benzaldehyde
DMSO	Διμεθυλο-σουλφοξειδίο	Dimethylsulfoxide
DNS	Δινιτροσαλικυλικό οξύ	Dinitrosalicylic acid
DSC	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης	Differential Scanning Calorimetry
DyP	Υπεροξειδάση αποικοδόμησης βαφών	Dye-decolorizing Peroxidase
EDCs	Ενδοκρινικοί διαταράκτες	Endocrine Disruptive Chemicals
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ	Ethylenediaminetetraacetic acid
EndoH	Ενδογλυκοζιδάση H	Endoglucosidase H
EPS	Εξωκυτταρικοί πουσακχαρίτες	Extracellular polysaccharides
ESI-MS	Φασματομετρία μάζας	Mass spectrometry
FOLymes	Λιγνινοκυτικά οξειδωτικά ένζυμα από μύκητες	fungal oxidative lignin enzymes
FTIR	Φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier	Fourier-transformed Infrared Spectrometry
GLX	Οξειδάση του γλυοξυλικού	Glyoxal oxidase
GP	Γενικές υπεροξειδάσες	generic peroxidases
GPC	Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης	Gel Permeation Chromatography
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Ακρίβειας	High performance liquid chromatography
HRP		Horseradish peroxidase
IEF-PAGE	Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης	Isoelectric focusing - Polyacrylamide gel electrophoresis
IMAC	Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPS	Ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες	Intracellular polysaccharides
LB		Luria- Bertani medium
LDA	Βοηθητικά ένζυμα αποικοδόμησης της λιγνίνης	Lignin degrading auxiliary enzymes
L-DOPA	L-3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
LiP	Υπεροξειδάση της λιγνίνης	Lignin peroxidase
LMCO	Πολυφαινολική οξειδάση	laccase-like multicopper oxidase
LME	Ένζυμα τροποποίησης της λιγνίνης	Lignin – modifying enzymes
LO	Οξειδάσες της λιγνίνης	lignin oxidases

LRET	Μηχανισμός απομακρυσμένης μεταφοράς ηλεκτρονίων	Long Range Electron Transfer
LS-LB	Χαμηλής αλατότητας LB	Low salt LB
MBTH	3- μεθυλ- 2- βενζοθειαζολινόνη υδραζίνη	3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazine
MCO's	Πολυφαινολικές οξειδάσες	multicopper oxidases
MiP	Υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου	Manganese-independent peroxidase
MM	Θρεπτικό μέσο μεθανόλης	Methanol medium
MnP	Υπεροξειδάση του μαγγανίου	Manganese peroxidase
NMR	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	Nuclear magnetic resonance
OE-PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μέσω επικαλυπτόμενων εκκινητών	Overlap extension polymerase chain reaction
PAHs	Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	Polymerase chain reaction
PDA	Άγαρ πατάτας-δεξτρόζης	Potato dextrose agar
PDI	συντελεστής κατανομής μοριακών βαρών	polydispersity index
PHA	Πολύ-υδροξυ-αλκανοειδή	Polyhydroxyalkanoates
pI	Ισοηλεκτρικό σημείο	Isoelectric point
RT	Χρόνος παραμονής	Retention time
SDS	Θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου- θειϊκού δωδεκυλικού νατρίου	Sodium dodecyl sulphate - Polyacrylamide gel electrophoresis
TBE	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Βορικού οξέος- EDTA	Tris-Borate-EDTA buffer
TE	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris – EDTA	Tris-EDTA buffer
TEMED	N,N,N',N'- τετραμέθυλο-αιθυλενο- διαμίνη	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TEMPO		2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl radical
TGA	Θερμοσταθμική ανάλυση	Thermogravimetric analysis
Tris	Τρις(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο	tris(hydroxymethyl)aminomethane
VP	Ευέλικτη υπεροξειδάση	Versatile peroxidase
YNB	Θρεπτικό μέσο με βάση το εκχύλισμα ζύμης και με προσθήκη πηγής αζώτου	Yeast nitrogen base
YPD	Θρεπτικό μέσο εκχυλίσματος ζύμης, πεπτόνης, δεξτρόζης	Yeast peptone dextrose medium
YPDS	Θρεπτικό μέσο εκχυλίσματος ζύμης, πεπτόνης, δεξτρόζης και σορβιτόλης	Yeast peptone dextrose sorbitol medium

## Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Βιβλιογραφική ανασκόπηση .....	1
1.1 Λιγνινολυτικοί μύκητες .....	1
1.1.1 Μακρομύκητες .....	1
1.1.1.1 Το γένος <i>Pleurotus</i> .....	1
1.1.1.2 Το γένος <i>Ganoderma</i> .....	5
1.1.1.3 Το γένος <i>Irpex</i> .....	11
1.1.2 Γλυκάνες .....	14
1.1.2.1 Βιολογική δραστικότητα των γλυκανών .....	17
1.1.2.2 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των γλυκανών .....	18
1.1.2.3 Ασκομύκητες .....	19
<i>Myceliophthora thermophila</i> .....	19
1.2 Λιγνινολυτικά ένζυμα .....	20
1.2.1 Λιγνινοκυτταρινούχα υλικά .....	20
1.2.2 Μύκητες που παράγουν λιγνινολυτικά ένζυμα .....	20
1.2.3 Λακκάσες .....	23
1.2.3.1 Δομικά χαρακτηριστικά .....	24
1.2.3.2 Καταλυτικά χαρακτηριστικά .....	26
1.2.3.3 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των λακκασών στην περιβαλλοντική βιοτεχνολογία .....	27
1.2.4 Υπεροξειδάσες .....	29
1.2.4.1 Υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiPs) .....	30
1.2.4.2 Υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnPs) .....	32
1.2.4.3 Ευέλικτες υπεροξειδάσες (VPs) .....	34
1.2.4.4 Υπεροξειδάσες αποικοδόμησης βαφών (DyPs) .....	35
1.2.4.5 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές υπεροξειδασών .....	36
1.2.5 Άλλα βοηθητικά ένζυμα αποικοδόμησης της λιγνίνης .....	40
1.2.5.1 Οξειδάση των αρυλ-αλκοολών (AAO) .....	40
1.2.5.2 Οξειδάση του γλυοξυλικού (GLX) .....	41
1.3 Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείου .....	42
1.3.1 Μέθοδοι εξαγωγής ελαιολάδου .....	43
1.3.2 Σύνθεση ΥΑΕ – Πολυφαινόλες .....	44
1.3.3 Μέθοδοι επεξεργασίας ΥΑΕ .....	47
1.3.3.1 Μέθοδοι αποτοξικοποίησης .....	48
1.3.3.2 Διεργασίες που στοχεύουν στην παραγωγή χρήσιμων προϊόντων .....	51
Κεφάλαιο 2: Υλικά και μέθοδοι .....	54
2.1 Υλικά .....	54
2.1.1 Μικροοργανισμοί .....	54
2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια – Αναλώσιμα υλικά – Στήλες χρωματογραφίας .....	55
2.1.3 Εμπορικά ένζυμα – Τυποποιημένα εμπορικά σκευάσματα (kit) αντιδραστηρίων .....	55
2.1.4 Ρυθμιστικά διαλύματα .....	55
2.1.5 Θρεπτικά υποστρώματα .....	56
2.1.6 Συσκευές – Όργανα .....	58
2.1.7 Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης .....	59
2.1.7.1 pCR® Blunt .....	59
2.1.7.2 pPICZαC/ pPICZαA .....	59
2.1.8 Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια – εκκινητές (primers) .....	60
2.2 Καλλιέργειες μικροοργανισμών .....	61
2.2.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες Βασιδιομυκήτων .....	61
2.2.1.1 Στερεές καλλιέργειες .....	61
2.2.1.2 Υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας .....	61

2.2.1.3 Ανάπτυξη Βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα .....	62
2.2.1.4 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων .....	62
2.2.1.5 Προσδιορισμός φαινολικού φορτίου .....	62
2.2.1.6 Αποχρωματισμός ΥΑΕ .....	63
2.2.2 Υγρές και στερεές καλλιέργειες του μύκητα <i>Myceliophthora thermophila</i> .....	63
2.2.3 Υγρές και στερεές καλλιέργειες Βακτηρίων .....	63
2.2.4 Υγρές και στερεές καλλιέργειες Ζυμομυκήτων .....	64
2.2.4.1 Στερεές καλλιέργειες του ζυμομύκητα <i>P. pastoris</i> για επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων .....	64
2.3 Απομόνωση ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών από υγρές καλλιέργειες βασιδιομυκήτων .....	64
2.3.1 Απομόνωση εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών .....	64
2.3.2 Απομόνωση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών .....	65
2.3.2.1 Πρωτόκολλο Syngytysa et al., 2009 .....	65
2.3.2.2 Πρωτόκολλο Wei et al., 2008 .....	66
2.3.3 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας γλυκανών σε στερεά δείγματα .....	66
2.4 Μοριακές τεχνικές .....	69
2.4.1 Απομόνωση γενετικού υλικού – Ανάλυση γενωμικού DNA .....	69
2.4.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA .....	69
2.4.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης .....	69
2.4.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης .....	70
2.4.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Επικαλυπτόμενη PCR .....	70
2.4.6 Απομόνωση εσώνίων από αλληλουχία DNA .....	71
2.4.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκτομή τμημάτων DNA μέσω επικαλυπτόμενων εκκινητών (Splicing by Overlapping Extension PCR, OE-PCR) .....	71
2.4.7 Συνένωση μορίων DNA (ligation) .....	72
2.4.8 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες .....	73
2.4.9 Προετοιμασία και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων βακτηρίων και μυκήτων .....	74
2.4.9.1 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> Top10 .....	74
2.4.9.2 Μετασχηματισμός μέσω θερμικού σοκ (Heat shock) .....	75
2.4.9.3 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i> .....	75
2.4.9.4 Μετασχηματισμός κυττάρων <i>P. pastoris</i> με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) .....	76
2.5 Μέθοδοι ανάλυσης και χαρακτηρισμού πρωτεϊνών .....	76
2.5.1 Παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>P. pastoris</i> .....	76
2.5.1.1 Υγρές καλλιέργειες μικρής και μεγάλης κλίμακας για απομόνωση των ετερόλογων πρωτεϊνών .....	77
2.5.1.2 Διήθηση, συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκειμένου υγρού της καλλιέργειας .....	77
2.5.1.3 Καθαρισμός των ετερόλογων πρωτεϊνών .....	78
2.5.2 Ηλεκτροφορητικές τεχνικές (SDS-PAGE, IEF-PAGE, native PAGE), εμφάνιση πρωτεϊνών και ζυμογραφήματα .....	79
2.5.2.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) .....	79
2.5.2.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native PAGE) .....	81
2.5.2.3 Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Isoelectric focusing PAGE, IEF-PAGE) .....	81
2.5.2.4 Εμφάνιση των πρωτεϊνών στα πηκτώματα .....	81
2.5.2.5 Ζυμογραφήματα .....	82
2.5.3 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών μορίων .....	83
2.5.4 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας .....	83
2.5.5 Υπολογισμός κινητικών σταθερών .....	85
2.5.6 Υπολογισμός βέλτιστης θερμοκρασίας και σταθερότητας ενζύμων .....	85
2.5.7 Υπολογισμός βέλτιστου pH ενζυμικής ενεργότητας και σταθερότητας σε διαφορετικά pH .....	85
2.5.8 Υπολογισμός ενζυμικής σταθερότητας σε υπεροξειδίου του υδρογόνου .....	85
2.6 Ενζυμικές αντιδράσεις βιομετατροπής φαινολικών ενώσεων .....	87
2.7 Ανάλυση προϊόντων πολυμερισμού και βιομετατροπής .....	87
2.7.1 Προσδιορισμός θερμικής αντοχής προϊόντων πολυμερισμού .....	87
2.7.1.1 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC) .....	87
2.7.1.2 Θερμοσταθμική ανάλυση (Thermogravimetric analysis, TGA) .....	87

2.7.2 Φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-transformed Infrared Spectrometry, FT-IR) .....	88
2.7.3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( <sup>1</sup> H-NMR) .....	89
2.7.4 Φασματομετρία μάζας (MS) .....	90
2.7.5 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High performance liquid chromatography, HPLC) .....	90
2.7.6 Ιξωδομετρία .....	90
2.8 Βιοπληροφορικά εργαλεία, αλγόριθμοι και βάσεις δεδομένων .....	91
2.8.1 Αλγόριθμοι .....	91
2.8.2 Βάσεις δεδομένων .....	92
2.8.3 Υπολογιστικά πακέτα λογισμικού .....	92
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα .....	93
3.1 Μικροβιακή αποικοδόμηση κασίγαρου με χρήση επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων .....	93
3.1.1 Προκαταρκτικά πειράματα – Στερεές καλλιέργειες .....	93
3.1.2 Επίδραση αρχικού pH καλλιέργειας στα μελετώμενα στελέχη βασιδιομυκήτων .....	94
3.1.3 Επίδραση διαφορετικών πηγών αζώτου στην ανάπτυξη των μελετούμενων στελεχών βασιδιομυκήτων .....	97
3.1.4 Επίδραση συγκέντρωσης πηγής αζώτου στην ανάπτυξη των μελετούμενων στελεχών βασιδιομυκήτων .....	102
3.1.4.1 Μέτρηση φαινολικού φορτίου μυκηλιακής βιομάζας.....	107
3.1.4.2 Ζυμογραφήματα .....	107
3.2 Μικροβιακή παραγωγή γλυκανών από επιλεγμένα στελέχη βασιδιομυκήτων σε ημισυνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα και σε υπόστρωμα ΥΑΕ .....	109
3.2.1 Ανάπτυξη βιομάζας βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου.....	109
3.2.2 Απομόνωση εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών .....	111
3.2.3 Απομόνωση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών .....	114
3.2.4 Ανάλυση φασμάτων FT-IR των απομονωμένων πολυσακχαριτικών κλασμάτων .....	123
3.3 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός επιλεγμένων λιγνινολυτικών ενζύμων από μύκητες – Βιοτεχνολογικές εφαρμογές .....	126
3.3.1 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός της υπεροξειδάσης <i>MtPerII</i> του <i>M. thermophila</i> . Εφαρμογή του ενζύμου στη βιομετατροπή της κατεχόλης. ....	126
3.3.1.1 Βιοπληροφορική ανάλυση .....	126
3.3.1.2 Απομόνωση γονιδίου <i>MtPerII</i> από το γονιδίωμα του <i>M. thermophila</i> .....	128
3.3.1.3. Κλωνοποίηση σε pCR®Blunt και αφαίρεση εσωνίων .....	129
3.3.1.4 Κλωνοποίηση σε pRiCzA και γραμμικοποίηση του ανασυνδυασμένου φορέα .....	131
3.3.1.5 Ανάλυση μετασχηματισμένων κλώνων <i>P. pastoris</i> και μελέτη έκφρασης της ετερόλογης <i>MtPerII</i> .....	132
3.3.1.6 Παραγωγή και απομόνωση της ετερόλογης <i>MtPerII</i> .....	136
3.3.1.7 Χαρακτηρισμός της ετερόλογης υπεροξειδάσης <i>MtPerII</i> .....	138
3.3.1.8 Οξειδωτικός πολυμερισμός της κατεχόλης με χρήση της <i>MtPerII</i> .....	142
3.3.2 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός της λακκάσης <i>MtLac2</i> . Εφαρμογή του ενζύμου στη βιομετατροπή φλαβονοειδών. ....	145
3.3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση .....	145
3.3.2.2 Απομόνωση γονιδίου <i>MtLac2</i> από το γονιδίωμα του <i>M. thermophila</i> .....	147
3.3.2.3 Απομόνωση των εξωνίων του γονιδίου <i>MtLac2</i> .....	148
3.3.2.4 Κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pRiCzA και γραμμικοποίηση του ανασυνδυασμένου φορέα .....	151
3.3.2.5 Ανάλυση μετασχηματισμένων κλώνων <i>P. pastoris</i> και μελέτη έκφρασης της ετερόλογης <i>MtLac2</i> .....	151
3.3.2.6 Παραγωγή και απομόνωση της ετερόλογης <i>MtLac2</i> .....	155
3.3.2.7 Χαρακτηρισμός της ετερόλογης λακκάσης <i>MtLac2</i> .....	158
3.3.2.8 Ανθεκτικότητα της <i>MtLac2</i> έναντι παρεμποδιστών .....	159
3.3.2.9 Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της <i>MtLac2</i> .....	160
3.3.2.10 Καταλυτικά χαρακτηριστικά της <i>MtLac2</i> .....	161
3.3.2.11 Βιομετατροπή φυσικών φλαβονοειδών .....	166
3.3.3 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση της εμπορικής λακκάσης <i>Novozym 51003</i> από τον <i>M. thermophila</i> στον ολιγομερισμό φαινολικών ενώσεων .....	171
3.3.3.1 Επίδραση του pH και της θερμοκρασίας στη βιομετατροπή φαινολικών ενώσεων .....	171
3.3.3.2 Βιομετατροπή φαινολικών ενώσεων και χαρακτηρισμός των προϊόντων .....	172
3.3.3.3 Φασματομετρική ανάλυση των προϊόντων .....	174
3.3.3.4 Εκτίμηση μοριακού βάρους των προϊόντων .....	179

3.3.3.5 Θερμικά χαρακτηριστικά των προϊόντων του πολυμερισμού .....	180
Κεφάλαιο 4: Γενικά Συμπεράσματα – Μελλοντικές προκλήσεις .....	184
4.1 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση μικροβιακού δυναμικού λιγνινολυτικών μυκήτων .....	184
4.1.1 Μικροβιακή αποικοδόμηση ΥΑΕ με χρήση επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων .....	184
4.1.2 Παραγωγή γλυκανών από λιγνινολυτικούς μύκητες .....	186
4.2 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση ενζυμικού δυναμικού λιγνινολυτικών μυκήτων .....	188
4.2.1 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός λιγνινολυτικών ενζύμων του μύκητα <i>M. thermophila</i> .....	189
4.2.2 Εφαρμογές λιγνινολυτικών ενζύμων .....	190
4.3 Μελλοντικές προκλήσεις .....	192
Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία .....	194
Παράρτημα Α .....	220



# Κεφάλαιο 1:

## Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

---

### 1.1 Λιγνινολυτικοί μύκητες

---

#### 1.1.1 Μακρομύκητες

---

##### 1.1.1.1 Το γένος *Pleurotus*

---

Το γένος *Pleurotus* περιλαμβάνει μερικά από τα πιο γνωστά και ευρέως διαδεδομένα καλλιεργούμενα εδώδιμα μανιτάρια στον κόσμο, όπως το *P. ostreatus*, τα οποία συνήθως αναφέρονται ως «οστρακοειδή» μανιτάρια (oyster mushrooms), λόγω του σχήματος του πύλου, και ανήκουν στο Βασίλειο των Μυκήτων, φύλο Βασιδιομυκήτων, κλάση Agaricomycetes, τάξη Agaricales, οικογένεια Pleurotaceae, γένος *Pleurotus*. Η εξάπλωσή τους είναι κοσμοπολιτική, καθώς οι μύκητες αυτοί είναι ικανοί να αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, από 15-31°C, ενώ μπορούν να αποικίσουν και ένα μεγάλο εύρος φυσικών λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων, όπως άχυρα δημητριακών, πριονίδι, χαρτί, υπολείμματα μπανάνας, σπάδικα αραβοσίτου, απόβλητα βαμβακιού, δασικά υπολείμματα, και άλλα. Οι βασιδιομύκητες του γένους *Pleurotus* ανήκουν στους μύκητες λευκής σήψης, που έχουν τη δυνατότητα να αποικοδομούν πλήρως τα συστατικά του ξύλου, και πιο συγκεκριμένα τα δομικά του μακρομόρια, την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη. Ως εκ τούτου, οι μύκητες αυτοί μπορούν να αναπτύσσονται σε κορμούς δέντρων και λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα ενώ είναι κυρίως σαπρότροφοι οργανισμοί. Μερικά από τα πιο γνωστά είδη είναι τα *P. ostreatus* (το οστρακοειδές μανιτάρι, oyster mushroom), *P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. flabellatus*, *P. cystidiosus* (abalone mushroom), *P. sapidus*, *P. eryngii* (το βασιλικό οστρακοειδές μανιτάρι, king oyster mushroom), *P. tuber-regium* (king tuber mushroom), *P. pulmonarius* (phoenix oyster mushroom), *P. citrinopileatus* (το χρυσό οστρακοειδές μανιτάρι, golden oyster mushroom) και άλλα.



**Εικόνα 1.1.1:** *Pleurotus ostreatus* (Μυκητοθήκη LGAM, φωτογραφία: Δρ. Γεώργιος Ζερβάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας, ΓΠΑ)

Μορφολογικά, τα καρποσώματα των ειδών *Pleurotus* χαρακτηρίζονται από έναν έκκεντρο στύπο, και καρποσώματα σε σχήμα στρειδιού, τα οποία μπορεί να εμφανίζονται σε ομάδες ή μεμονωμένα. Το μέγεθός τους μπορεί να ποικίλλει πολύ, από 2-3 cm έως και 15-20 cm. Ανάλογα με το είδος, τα περιθώρια του

στύπου μπορεί να είναι ομαλά, οδοντωτά ή φυλλωτά. Ωστόσο, το χαρακτηριστικό με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία ανάμεσα στα είδη του γένους *Pleurotus* είναι το χρώμα, το οποίο συνήθως εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης του καρποσώματος, και μπορεί να είναι λευκό, υπόλευκο, καφέ, γκρί ή μπλε. Στη φύση, ο κύκλος ζωής των μυκήτων *Pleurotus* ακολουθεί σε γενικές γραμμές τον κύκλο ζωής όλων των μακρομυκήτων, ο οποίος περιλαμβάνει το σχηματισμό μονοπυρηνικών σπορίων από τα καρποσώματα, τη βλάστηση των σπορίων και τη σύζευξή τους, προκειμένου να προκύψει το δικαρυωτικό μυκήλιο. Το μυκήλιο εξαπλώνεται στη σηπόμενη φυτική ύλη, παράγοντας τις καταβολές των βασιδιομάτων, οι οποίες σε ιδανικές κλιματικές συνθήκες αναπτύσσονται περαιτέρω και διαφοροποιούνται σε μεγαλύτερα καρποσώματα, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν και απελευθερώνουν τα επόμενα βασιδιοσπόρια.

Η εμπορική καλλιέργεια τωνμανιταριών *Pleurotus* γίνεται σε σάκους πολυαιθυλενίου, οι οποίοι γεμίζουν με το υπόστρωμα, το οποίο συνήθως είναι κάποιο λιγνινοκυτταρινούχο προϊόν με υψηλό βαθμό υγρασίας.

#### A) Διατροφικά χαρακτηριστικά τωνμανιταριών *Pleurotus*

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ταμανιτάρια *Pleurotus* ανήκουν στα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα γένη ως ανθρώπινη τροφή. Η συνεχόμενη μείωση των φυσικών πόρων, και ειδικά των διατροφικών αποθεμάτων, έχει συγκεντρώσει το ερευνητικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον σταμανιτάρια, και ειδικά σε αυτά του γένους *Pleurotus*, ως μια πολύτιμη πηγή τροφής, η κατανάλωση της οποίας φαίνεται να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία.

Σε γενικές γραμμές, τα καρποσώματα των βασιδιομυκήτων *Pleurotus*, αποτελούνται από υγρασία σε ποσοστό 85-90%. Το βασικό χαρακτηριστικό που τους προσδίδει υψηλότερη διατροφική αξία σε σχέση με τα περισσότερα λαχανικά και δημητριακά είναι η υψηλή τους περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, καθώς τα περισσότερα είδη αποτελούνται από πρωτεΐνη σε ποσοστό 11-42 % επί ξηρού. Πιο σημαντικό ακόμη είναι το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες αυτές είναι μια πολύτιμη πηγή απαραίτητων αμινοξέων, τα οποία δεν μπορούν να συντεθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό (Ouyetayo et al., 2007). Ταμανιτάρια *Pleurotus* είναι επίσης πλούσια σε απαραίτητα λιπαρά οξέα (0,2-8% επί ξηρού), τόσο μονοακόρεστα, όπως το ολεϊκό οξύ, όσο και πολυακόρεστα, όπως το λινολεϊκό οξύ (Synytsya et al., 2008). Ταμανιτάρια *Pleurotus* είναι επίσης πλούσια σε υδατάνθρακες, σε μορφή πολυσακχαριτών

ή γλυκοπρωτεϊνών, και διαιτητικές ίνες. Οι κύριοι πολυσακχαρίτες που απαντώνται στα καρποσώματα είναι η χιτίνη, οι α- και β- γλυκάνες, και ημικυτταρίνες όπως οι μαννάνες, ξυλάνες και γαλακτάνες. Οι γλυκάνες βρίσκονται σε πολλές διαφορετικές μορφές στα είδη του γένους *Pleurotus*, και έχουν ιδιαίτερη βιολογική σημασία, λόγω των ευεργετικών τους επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία, όπως περιγράφεται παρακάτω. Ενδεικτικά, από το *Pleurotus* sp. έχει απομονωθεί μια συγκεκριμένης δομής β-γλυκάνη, η πλευράνη, η οποία έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει αντικαρκινική δράση, από πληθώρα ερευνητικών μελετών. Το ποσοστό των πολυσακχαριτών διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ειδών, κυμαίνεται πάντως μεταξύ 36-60% επί ξηρού, ενώ η περιεκτικότητα των μανιταριών αυτών σε διαιτητικές ίνες κυμαίνεται μεταξύ 10-31% επί ξηρού (Oyetao et al., 2007).

Τα κύρια μακροθρεπτικά στοιχεία που απαντώνται στα μανιτάρια αυτά είναι ο φώσφορος, το νάτριο και το κάλιο, ενώ τα κυριότερα ιχνοστοιχεία είναι ο σίδηρος και ο ψευδάργυρος, αλλά υπάρχουν ακόμη και μια πληθώρα άλλων στοιχείων σε μικρότερες ποσότητες, όπως το ασβέστιο, το μαγνήσιο, το μαγγάνιο και ο χαλκός (Patrabansh et al., 1999).

#### Β) Φαρμακευτικές ιδιότητες των μανιταριών *Pleurotus*

Οι κυριότερες βιολογικές δράσεις που έχουν αναφερθεί για τα μανιτάρια *Pleurotus* είναι η αντικαρκινική δράση (Xue et al., 2015), η αντι-υπερχοληστεριναιμική (Miyazawa et al., 2008), η αντιδιαβητική (Ng et al., 2015), η ηπατοπροστατευτική (Bobek et al., 1994), η αντιγηραντική, αντιοξειδωτική (González-Palma et al., 2016) αλλά και η αντιμικροβιακή (Younis et al., 2015), συμπεριλαμβανομένων της αντιβακτηριακής, αντι-ιικής και αντιμυκητιακής δράσης.

Οι δράσεις αυτές έχουν διαπιστωθεί σε ποικίλα παρασκευάσματα των μυκήτων *Pleurotus*, όπως για παράδειγμα ολόκληρα καρποσώματα ή μυκήλιο, αποξηραμένα και κονιορτοποιημένα καρποσώματα, εκχυλίσματα των βασιδιοκαρπίων μετά από κατεργασία με ζεστό νερό, αλκαλικά διαλύματα, ή και οργανικούς διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας). Ο ακριβής μηχανισμός της βιολογικής δράσης παραμένει ως επί το πλείστον άγνωστος, ωστόσο, μια σειρά μορίων έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί ως υπεύθυνα για κάποιες από τις προαναφερθείσες βιολογικές δράσεις. Οι κυριότερες από αυτές περιγράφονται παρακάτω:

- Η πλευράνη είναι ένα πολυσακχαριτικό μόριο με δομή β-(1,3)(1,6)- γλυκάνης που εμφανίζει προστατευτική δράση έναντι της ανάπτυξης όγκων (Kogan, 2000), αλλά και ανοσοκατασταλτική (Rovensky et al., 2009) και αντιοξειδωτική δράση (Bobek and Galbavy, 2001)
- Η λοβαστατίνη, μια ουσία που ανήκει χημικά στα πολυκετίδια, και λειτουργεί ως αναστολέας της αναγωγής του 3-υδροξυ-μέθυλο-γλουταρυλικού συνενζύμου (HMG-CoA αναγωγής), ένα ένζυμο απαραίτητο για τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης. Η ουσία αυτή χρησιμοποιείται φαρμακευτικά για τη θεραπεία της υπερχοληστεριναιμίας (Gunde-Cimerman and Cimerman, 1995, Gunde-Cimerman et al., 1993) και της αθηροσκλήρωσης (Alarcon and Aguila, 2006).
- Η πλευροστρίνη, ένα πεπτίδιο 7 kDa με αντιμυκητιακή δράση έναντι του *Fusarium oxysporum* και άλλων μυκήτων (Chu et al., 2005), και η ερυνγκίνη, ένα πεπτίδιο 10 kDa, επίσης με αντιμυκητιακή δράση (Wang et al., 2004).

#### Γ) Λιγνινολυτικά ένζυμα και βιοαποικοδόμηση

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα είδη του γένους *Pleurotus* ανήκουν στους μύκητες λευκής σήψης, και άρα διαθέτουν όλα τα απαραίτητα ένζυμα για την αποικοδόμηση της λιγνίνης, αλλά και της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης. Καθώς το είδος *P. ostreatus* είναι το πιο καλά μελετημένο ανάμεσα

στα είδη του γένους, σημαντική ερευνητική προσπάθεια έχει αφιερωθεί και στη μελέτη του λιγνινολυτικού ενζυμικού του συστήματος, αλλά κυρίως στην εφαρμογή του σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών βιοαποικοδόμησης ρυπαντών. Ενδεικτικά, κάποιες από τις εφαρμογές βιοεξυγίανσης στις οποίες έχουν δοκιμαστεί είδη του γένους *Pleurotus*, είναι η αποικοδόμηση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων του εδάφους (Byss et al., 2008, Rozdnyakova et al., 2016), η αποικοδόμηση φαρμακευτικών αποβλήτων (Cajthaml et al., 2009), η αποικοδόμηση βαφών (Novotny et al., 2001, Heinfling et al., 1998), και φυσικά των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων (Baldrian et al., 2005), αλλά ακόμη και η αποικοδόμηση πλαστικού (daLuz et al., 2013), και πολυαιθυλενίου (daLuz et al., 2015). Ωστόσο, η πιο καλά μελετημένη εφαρμογή βιοεξυγίανσης για τα είδη του γένους *Pleurotus* είναι η αποικοδόμηση των αποβλήτων επεξεργασίας της ελιάς και παραγωγής του ελαιόλαδου, καθώς το συγκεκριμένο πεδίο συγκεντρώνει την προσοχή των ερευνητών για περισσότερα από 20 χρόνια (Aggelis et al., 2002, 2003, Fountoulakis et al., 2002, Martirani et al., 1996, Ntougias et al., 2012, Olivieri et al., 2012, Saavedra et al., 2006, Tsioulpas et al., 2002). Τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις η μείωση του φαινολικού φορτίου των αποβλήτων ξεπερνά το 70% (Tsioulpas et al., 2002, Koutrotsios and Zervakis, 2014) ή ακόμη και το 95% (Ntougias et al., 2015). Ωστόσο, η πραγματοποίηση της βιολογικής επεξεργασίας σε βιομηχανικό επίπεδο ακόμη δεν είναι εφικτή, καθώς ο χρόνος που χρειάζεται για την ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων, ακόμη και σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες, είναι ιδιαίτερα μεγάλος, συνήθως 12 ημέρες ή και περισσότερο (Tsioulpas et al., 2002, Koutrotsios et al., 2014), γεγονός που καθιστά τη διαδικασία αυτή οικονομικά ασύμφορη. Εξαιτίας αυτού, οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται επίσης στη μελέτη των βιοκαταλυτών που είναι υπεύθυνοι για την αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων, με στόχο τη μείωση του απαραίτητου χρόνου προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Πράγματι, φαίνεται ότι η χρήση μόνο του εξωκυτταρικού ενζυμικού παρασκευάσματος των μυκήτων *Pleurotus* μπορεί να μειώσει το χρόνο επεξεργασίας των αποβλήτων τουλάχιστον στο μισό (Ntougias et al., 2015). Με δεδομένη την εξαιρετική επιτυχία των μυκήτων *Pleurotus* στην αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων, οι μελέτες που επικεντρώνονται στο ενζυμικό σύστημα που είναι υπεύθυνο για τη δράση αυτή είναι προφανώς πολυάριθμες (Rodriguez et al., 2004, Marzullo et al., 1995, Mansur et al., 2003, Bao et al., 2012, Camarero et al., 1999, Martinez et al., 1996, Munoz et al., 1997, Ruiz-Duenas et al., 2001, Soden et al., 2002 και πολλά άλλα), αλλά τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει επεκταθεί και σε μελέτες γονιδιώματος (Fernandez-Fueyo et al., 2014a), και πρωτεώματος (Fernandez-Fueyo et al., 2016, 2014b, Salvachua et al., 2016, Zorn et al., 2005). Στο γονιδίωμα του *P. ostreatus* έχουν βρεθεί εννέα γονίδια λιγνινολυτικών υπεροξειδασών (Ruiz-Duenas et al., 2011) εκ των οποίων τα πέντε αντιστοιχούν σε υπεροξειδάσες εξαρτώμενες από το μαγγάνιο (Manganese peroxidases, MnP's) και τα υπόλοιπα τέσσερα σε «ευέλικτες» υπεροξειδάσες (Versatile Peroxidases, VP's), ενώ είναι χαρακτηριστική η απουσία γονιδίων που κωδικοποιούν για υπεροξειδάσες της λιγνίνης (Lignin peroxidases, LiP's) και για γενικές υπεροξειδάσες (Generic peroxidases, GP's). Η ανάλυση του εξωκυτταρικού πρωτεώματος του *P. ostreatus* τεκμηρίωσε τη διαφορική έκφραση των γονιδίων αυτών ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως είναι η θερμοκρασία και το pH, και κατέταξε τα γονίδια αυτά ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασής τους κατά την ανάπτυξη του μύκητα σε λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα, σε τρεις κατηγορίες: υψηλής έκφρασης, στην οποία ανήκουν τα γονίδια *mnp3* και *vp1*, μέτριας έκφρασης, στην οποία ανήκουν τα γονίδια *mnp2*, *vp2*, *mnp6*, *vp3* και *mnp1*, και χαμηλής έκφρασης, στην οποία ανήκουν τα γονίδια *mnp4* και *mnp5* (Fernández-Fueyo et al., 2014b). Ωστόσο, η λιγνινολυτική δραστηριότητα του *P. ostreatus* φαίνεται να οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παραγωγή λακκασών, όπως είναι γνωστό εδώ και χρόνια (Palmieri et al., 2000, Mansur et al., 2003,

Tsioulpas et al., 2002), αλλά τεκμηριώθηκε και πρόσφατα με τη μελέτη του εξωκυτταρικού πρωτεώματος κατά την ανάπτυξη σε διαφορετικά υποστρώματα (Fernández-Fueyo et al., 2016). Σύμφωνα με τους Fernandez-Feyo et al., τα ένζυμα με ενεργότητα λακκάσης φαίνεται να αποτελούν έως και 21% των ολικών εξωκυτταρικών πρωτεϊνών κατά την ανάπτυξη σε ξυλώδες υλικό, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τις εξωκυτταρικές υπεροξειδάσες είναι μόλις 2%. Η αλληλουχία του γονιδιώματος του μύκητα αποκάλυψε την ύπαρξη 12 γονιδίων που κωδικοποιούν για λακκάσες (Castanera et al., 2012), αλλά μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί μόνο έξι από αυτές, οι ΡΟΧΑ1b (Lacc6), ΡΟΧΑ1w, ΡΟΧΑ2, ΡΟΧΑ3a (Lacc2), ΡΟΧΑ3b, και ΡΟΧC (Lacc10) (Giardina et al., 1996, 1999, Palmieri et al., 2003), ενώ οι Lacc2, Lacc6 και Lacc10 έχουν επίσης εκφραστεί και ετερόλογα στη ζύμη (Faraco et al., 2008, Piscitelli et al., 2005). Οι λακκάσες αυτές είναι μονομερείς γλυκοπρωτεΐνες, εκτός των ΡΟΧΑ3a (Lacc2) και ΡΟΧΑ3b, των οποίων τα μοριακά βάρη βρίσκονται μεταξύ 56 και 67 kDa, και όλες διαθέτουν όξινα ισοηλεκτρικά σημεία (2,9 έως 4,3) με εξαίρεση τις ΡΟΧΑ1W και ΡΟΧΑ1B με τιμές pI 6,7 και 6,9 αντίστοιχα. Όλες οι λακκάσες οξειδώνουν το ABTS και τη συρινγαλαζίνη, όμως η γουαϊακόλη, η οποία θεωρείται ένα από τα παραδοσιακά υποστρώματα των λακκασών, οξειδώνεται μόνο από την ΡΟΧΑ2. Ενώ πρόκειται για κλασσικές μπλε λακκάσες, με χαρακτηριστικές κορυφές στα 605 nm, η ΡΟΧΑ1w είναι μια «λευκή» λακκάση, με μόνο μια ευρεία κορυφή στα 400 nm (Palmieri et al., 1997).

Από τον *P. eryngii* έχει επίσης απομονωθεί και χαρακτηριστεί και μια ευέλικτη υπεροξειδάση (VP) (Ruiz-Duenas et al., 2001), η οποία έχει επίσης εκφραστεί ετερόλογα και σε *E. coli* (Perez-Boada et al., 2002). Το ένζυμο έχει μοριακό βάρος 43 kDa και είναι γλυκοζυλιωμένο (Martinez et al., 1996) ενώ η οξείδωση του υποστρώματος λαμβάνει χώρα και στην επιφάνεια του ενζύμου, εκτός από το ενεργό κέντρο, με έναν μηχανισμό γνωστό ως LRET (Long Range Electron Transfer) (Ruiz-Dueñas et al., 2001). Τέλος, στα υπερκείμενα των καλλιεργειών *P. ostreatus* έχουν βρεθεί και ένζυμα με επικουρικό ρόλο στην αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης, όπως μια οξειδάση αρυλ-αλκοολών και δύο DyPs (Dye decolorizing peroxidases) (Fernandez-Feyo et al., 2016).

#### 1.1.1.2 Το γένος *Ganoderma*

---

Το γένος *Ganoderma* αποτελείται από περίπου 80 είδη μανιταριών με κοσμοπολιτική εξάπλωση, τα οποία αναπτύσσονται σε λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα, όπως οι κορμοί των δέντρων, και, όπως και τα είδη του γένους *Pleurotus*, ανήκουν στους μύκητες λευκής σήψης που μπορούν να αποικοδομήσουν πλήρως όλα τα συστατικά της λιγνινοκυτταρίνης. Τα καρποσώματα των μυκήτων του γένους *Ganoderma* έχουν σκληρή, ξυλώδη ή δερματώδη υφή, και γι' αυτό το λόγο δεν είναι εδώδιμα, ωστόσο παράγουν εκατοντάδες βιοδραστικές ενώσεις, πολλές από τις οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως ως φάρμακα, κυρίως στην Άπω Ανατολή, όπου η χρήση των μανιταριών αυτών είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη. Το *Ganoderma lucidum* ειδικά, ως ο καλύτερα μελετημένος εκπρόσωπος του γένους, αποτελεί το κύριο συστατικό σε μια σειρά συμπληρωμάτων διατροφής που κυκλοφορούν και στην Ελλάδα (Organo™ Organic *Ganoderma lucidum*) λόγω των ιδιοτήτων του ως ανοσορρυθμιστικού παράγοντα. Τα μανιτάρια αυτά είναι γνωστά ως lingzhi στην Κίνα και reishi στην Ιαπωνία, όπου οι φαρμακευτικές τους ιδιότητες είναι γνωστές εδώ και 2000 χρόνια. Οι ιδιότητες αυτές περιλαμβάνουν τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού, την ηπατοπροστατευτική δράση, τη βακτηριοστατική δράση, και πολλά άλλα. Η οικονομική τους σημασία είναι τεράστια λόγω της εκτενούς χρήσης τους στην ανατολική ιατρική, αλλά και λόγω του

δυναμικού τους ως παράγοντες βιοεξυγίανσης. Η κατάταξη των μανιταριών αυτών έχει ως εξής: Βασίλειο Μύκητες, διαίρεση Βασιδιομύκητες, κλάση Agaricomycetes, τάξη Polyporales, οικογένεια Ganodermataceae, γένος *Ganoderma*. Η οικογένεια Ganodermataceae περιλαμβάνει Βασιδιομύκητες με βασιδιοσπόρια με διπλά τοιχώματα, και αποτελείται από 219 είδη, όλα στο γένος *Ganoderma* (Moncalvo, 2000). Τα βασιδιοκάρπια του γένους αυτού έχουν γυαλιστερή σκληρή επιφάνεια, η οποία αποδίδεται σε πιλοκουστίδια με πολύ σκληρά τοιχώματα, εμβαπτισμένα στο εξωτερικό στρώμα της μελανίνης (Moncalvo, 2000). Τα είδη του γένους *Ganoderma* χαρακτηρίζονται επίσης από μεγάλη φαινοτυπική πλαστικότητα, αφού η γεωγραφική τοποθεσία και οι συνθήκες της ανάπτυξης παίζουν μεγάλο ρόλο στη μορφολογία του μανιταριού, η οποία ποικίλλει σημαντικά. Το γεγονός αυτό δημιουργεί προφανή προβλήματα με τη μορφολογική ταξινόμηση των μανιταριών αυτών (Zhao and Zhang 1994).



**Εικόνα 1.1.2:** *G. lucidum*

Η αυξημένη ζήτηση για το *G. lucidum*, λόγω της φαρμακευτικής του αξίας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δημιούργησε την ανάγκη καλλιέργειάς του. Η τεχνητή καλλιέργεια του *G. lucidum* πραγματοποιούνταν παραδοσιακά σε στερεά υποστρώματα όπως σπόρους δημητριακών, πριονίδι, ή κομμένους κορμούς δέντρων (Chang and Buswell 1999, Wasser et al., 2005, Boh et al. 2007).

Ωστόσο, η καλλιέργειά του σε στερεά υποστρώματα διαρκεί αρκετούς μήνες και υπόκειται σε εποχιακές διακυμάνσεις. Προκειμένου να ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά, πιο πρόσφατα άρχισε να χρησιμοποιείται η υγρή βυθισμένη καλλιέργεια για την ανάπτυξη μυκηλίου, η οποία πλεονεκτεί στη ρύθμιση των παραμέτρων και στον ενιαίο βαθμό ποιότητας του τελικού προϊόντος, ενώ είναι και πιο γρήγορη, αλλά και ανεξάρτητη των εποχιακών διακυμάνσεων (Sanodiya et al., 2009). Με την υγρή βυθισμένη καλλιέργεια οι παράμετροι της διεργασίας μπορούν να ελεγχθούν με ακρίβεια, αφού η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε πλήρως ελεγχόμενες συνθήκες, ενώ η απομόνωση και ο καθαρισμός των βιοενεργών ενώσεων (π.χ. των πολυσακχαριτών) μπορεί να πραγματοποιηθεί με αρκετά απλές μεθόδους, δεδομένου ότι πολλές από αυτές τις ενώσεις εκκρίνονται και στο περιβάλλον υγρό καλλιέργειας. Η υγρή βυθισμένη καλλιέργεια επιτρέπει επίσης την εύκολη και γρήγορη αριστοποίηση παραμέτρων της καλλιέργειας, όπως το pH, ο φωτισμός, η μορφολογία του μυκηλίου, η θερμοκρασία, αλλά και η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος, για την παραγωγή των επιθυμητών προϊόντων.

Σύμφωνα με την εκτίμηση του Lin (2000) περισσότερα από 90 σκευάσματα προερχόμενα από το *G. lucidum* κυκλοφορούν στην αγορά παγκοσμίως, ενώ σήμερα η παγκόσμια κατανάλωση υπολογίζεται σε αρκετές χιλιάδες τόνους, με συνεχείς τάσεις αύξησης. Τα σκευάσματα που παράγονται από προϊόντα του *G. lucidum* μπορεί να προέρχονται από διάφορα μέρη του μυκηλίου (Chang and Buswell 2008): η πιο απλή μορφή είναι ολόκληρα τα καρποσώματα αποξηραμένα και κονιορτοποιημένα σε μορφή κάψουλας ή ταμπλέτας. Άλλες μορφές είναι αποξηραμένο και κονιορτοποιημένο μυκήλιο από βυθισμένη καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρες, ή από ημιστερεές καλλιέργειες, είτε σπόρια, ολόκληρα, ή χωρίς κυτταρικά τοιχώματα. Κάποια σκευάσματα παράγονται και από εκχυλίσματα των

καρποσωμάτων ή του υγρού καλλιέργειας, με επεξεργασία με ζεστό νερό ή με αιθανόλη, τα οποία είναι εμπλουτισμένα σε τριτερπένια ή πολυσακχαρίτες. Τέλος, κάποια σκευάσματα παράγονται και από μίγματα κονιορτοποιημένων καρποσωμάτων ή εκχυλισμάτων *Ganoderma* με καρποσώματα ή εκχυλίσματα από άλλους Βασιδιομύκητες (π.χ. *Lentinula edodes*, *Agaricus brasiliensis*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus* spp., και *Flammulina velutipes*) ή ακόμη και με φύκη, όπως παρασκευάσματα σπιρουλίνα.

#### A) Βιοδραστικές ενώσεις

Το *G. lucidum* βρέθηκε ότι αποτελείται από 1,8% τέφρα, 26-28% πολυσακχαρίτες, 3-5% λίπη, 59% ίνες και 7-8% πρωτεΐνη (Mau et al., 2001). Επιπλέον, ταμανιτάρια αυτά περιλαμβάνουν και μια ποικιλία βιοδραστικών ενώσεων, όπως τερπενοειδή, στεροειδή, φαινολικές ενώσεις, νουκλεοτίδια και τα παράγωγά τους, γλυκοπρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, ενώ οι πρωτεΐνες τωνμανιταριών περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα που ο άνθρωπος δεν μπορεί να συνθέσει. Η διατροφική αξία τους όμως οφείλεται σε μεγάλο βαθμό και στην υψηλή αναλογία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε σχέση με τα ολικά λιπαρά οξέα (Chang and Buswell 1996, Sanodiya et al. 2009). Ωστόσο, οι πιο σημαντικές βιοδραστικές ενώσεις που παράγονται από το *G. lucidum* είναι οι πολυσακχαρίτες, οι πεπτιδογλυκάνες και τα τριτερπένια (Boh et al. 2007, Zhou et al. 2007).

#### B) Πολυσακχαρίτες και πεπτιδογλυκάνες

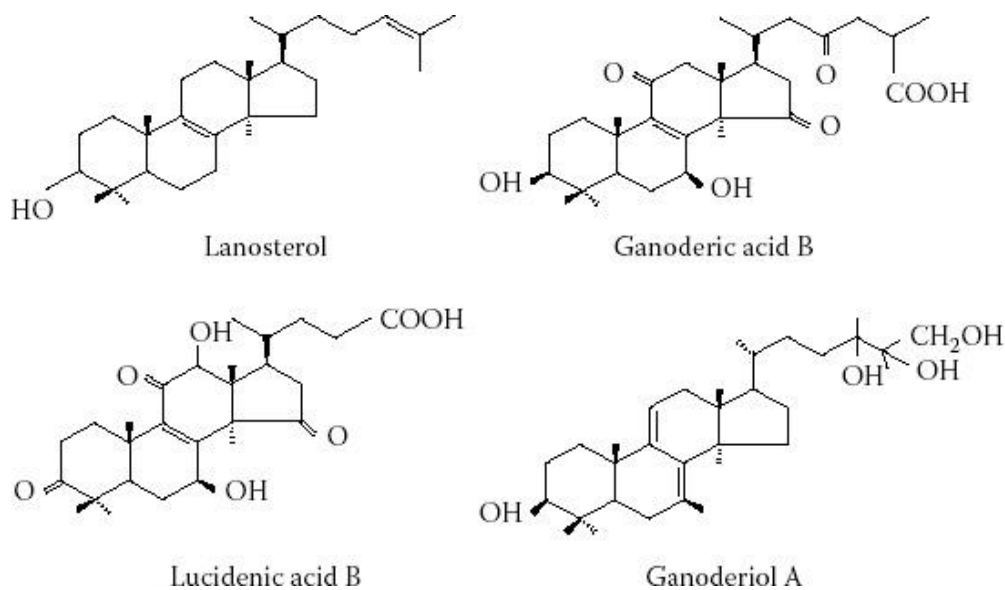
Από το *G. lucidum* έχει απομονωθεί μεγάλη ποικιλία μορίων γλυκανών, όπως για παράδειγμα οι γανοδεράνες A, B και C, με ευρύ πεδίο βιολογικών δράσεων, όπως, αντιφλεγμονώδης δράση, υπογλυκαιμική, αντικαρκινική και ανοσορρυθμιστική (Bao et al. 2001, Wachtel-Galor et al., 2004). Οι πολυσακχαρίτες απομονώνονται συνήθως από ταμανιτάρια με κατεργασία με ζεστό νερό, η οποία ακολουθείται από καταβύθιση με αιθανόλη ή μεθανόλη, ή με κατεργασία με νερό και άλαλη. Η ποικιλία των μοριακών δομών και των μεγεθών των πολυσακχαριτών αυτών μπορεί να είναι πολύ μεγάλη. Τα πολυσακχαριτικά σκευάσματα που παράγονται από το *G. lucidum* πωλούνται ως συμπληρώματα διατροφής ή και ως φυσικά φάρμακα για ασθένειες του ήπατος ή καρκίνο (Gao et al., 2005). Ακόμη, μια ποικιλία πεπτιδογλυκανών έχει απομονωθεί από τον *G. lucidum*, όπως η πρωτεογλυκάνη GLPG με αντι-ικική δράση (Li et al., 2005), η ανοσορρυθμιστική ουσία GLIS (Ji et al., 2007), ένα υδατοδιαλυτό γλυκοπεπτίδιο PGY (Wu and Wang 2009), το πεπτίδιο GL-PS (Ho et al., 2007) και η F3, ένα γλυκοπρωτεϊνικό μόριο με φουκόζη (Chien et al., 2004).

#### Γ) Τριτερπένια

Τα τερπένια είναι μια τάξη φυσικών ενώσεων των οποίων οι ανθρακικοί σκελετοί αποτελούνται από μία ή περισσότερες μονάδες ισοπρενίου με 5 άνθρακες. Παραδείγματα τερπενίων είναι η μενθόλη (μονοτερπένιο) και το β-καροτένιο (τετρατερπένιο). Πολλά είναι αλκένια, αν και κάποια περιλαμβάνουν και άλλες λειτουργικές ομάδες, ενώ κάποια είναι κυκλικά. Οι ενώσεις αυτές είναι παρούσες στα φυτά κυρίως. Τα τερπένια έχουν σημαντική αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και υπολιπιδαιμική δράση (Haralampidis et al., 2002). Τα τριτερπένια είναι μια υποκατηγορία των τερπενίων, με σκελετό 30 ατόμων άνθρακα, μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 400-600 kDa και εξαιρετικά πολύπλοκη χημική δομή (Zhou et al., 2007). Σε γενικές γραμμές, πολύ λίγα είναι γνωστά για τα ένζυμα και τα βιοχημικά μονοπάτια που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεσή τους.

Στο *G. lucidum*, η χημική δομή των τριτερπενίων βασίζεται στη λανοστάνη, ένα μεταβολίτη της λανοστερόλης, η βιοσύνθεση του οποίου βασίζεται στην κυκλοποίηση του σκουαλενίου

(Haralampidis et al., 2002). Η απομόνωση των τριτερπενίων πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση μεθανόλης, αιθανόλης, ακετόνης, χλωροφορμίου, αιθέρα, ή μίγματος αυτών. Τα εκχυλίσματα συνήθως καθαρίζονται περαιτέρω με διάφορες τεχνικές, όπως HPLC (Chen et al. 1999, Su et al. 2001). Τα πρώτα τριτερπένια που απομονώθηκαν από τον *G. lucidum* ήταν τα γανοδερικά οξέα A και B (Kubota et al., 1982). Έκτοτε, πάνω από 100 τριτερπένια έχουν απομονωθεί από αυτό το μακρομύκητα, 50 εκ των οποίων θεωρείται ότι είναι μοναδικά σε αυτό τον οργανισμό. Η πλειοψηφία τους είναι γανοδερικά και λουσιντενικά οξέα, αλλά έχουν ταυτοποιηθεί επίσης και άλλα τριτερπένια, όπως γανοδεράλες, γανοδεριόλες και γανοδερμικά οξέα (Nishitoba et al. 1984, Sato et al. 1986, Gonzalez et al. 1999, Ma et al. 2002, Akihisa et al. 2007, Zhou et al. 2007, Jiang et al. 2008, Chen et al. 2010). Παραδείγματα της δομής των τριτερπενίων φαίνονται στην παρακάτω Εικόνα:



**Εικόνα 1.1.3:** Χημική δομή της λανοστερόλης και τριών ακόμη τριτερπενίων του *G. lucidum*. (Wachtel-Galor et al., 2011).

Το *G. lucidum* είναι σαφώς πλούσιο σε τριτερπένια, ενώ σε αυτή την κατηγορία των μεταβολιτών φαίνεται να οφείλονται, σε μεγάλο βαθμό, οι βιολογικές δράσεις του. Ωστόσο, το ποσοστό και το είδος των τριτερπενίων είναι διαφορετικό στα διαφορετικά μέρη του μανιταριού αλλά και στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Για το λόγο αυτό, το προφίλ των τριτερπενίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης της ποιότητας διαφορετικών δειγμάτων και σκευασμάτων (Chen et al. 1999, Su et al. 2001).

#### Δ) Άλλα συστατικά

Τα μανιτάρια *G. lucidum* είναι επίσης πλούσια σε ιχνοστοιχεία, όπως φωσφόρος, θείο, κάλιο, ασβέστιο και μαγνήσιο, αλλά και σίδηρο, νάτριο, ψευδάργυρο, χαλκό, μαγγάνιο και στρόντιο σε μικρότερες ποσότητες (Chen et al., 1998). Ακόμη, περιέχουν και ουσίες όπως πρωτεΐνες και λεκτίνες, οι οποίες θεωρείται ότι συνεισφέρουν στη συνολική θεραπευτική δράση του μακρομύκητα. Οι βιοενεργές πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη LZ-8, με ανοσοκατασταλτική δράση (Van der Hem et al., 1995), και μια πρωτεΐνη μεγέθους 15 kDa, τη γανοδερμίνη, με αντιμυκητιακή δράση (Wang and Ng, 2006). Οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες που προσδέονται υδατάνθρακες και συμμετέχουν στη λειτουργία του



ανοσοποιητικού συστήματος των θηλαστικών (Wang et al., 1998). Από τον *G. lucidum* έχει απομονωθεί μια εξαμερής λεκτίνη, μεγέθους 114 kDa (Thakur et al., 2007). Τέλος, στον *G. lucidum* έχουν βρεθεί και ενώσεις όπως η εργοστερόλη, νουκλεοσίδια, νουκλεοτίδια (Wasser et al., 2005, Paterson 2006) και λιπαρά οξέα μεγάλης αλυσίδας τα οποία θεωρείται ότι συνεισφέρουν στην αντικαρκινική δράση του μανιταριού (Fukuzawa et al., 2008).

#### Ε) Λιγνινολυτικά ένζυμα και βιοαποικοδόμηση

Με δεδομένη την τεράστια βιοτεχνολογική αξία του *G. lucidum*, πολλές μελέτες έχουν αφιερωθεί στη διερεύνηση του γονιδιώματος, του μεταγραφώματος και του πρωτεώματός του με σκοπό τη διαλεύκανση των βιοσυνθετικών μονοπατιών για τη σύνθεση βιοδραστικών ενώσεων, αλλά και για την εκτίμηση του λιγνινολυτικού δυναμικού του μικροοργανισμού. Το γονιδίωμα του μακρομύκητα (Chen et al., 2012), μεγέθους 43,3 Mb περιλαμβάνει 16.113 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, εκ των οποίων 417 κατατάσσονται σε ένζυμα που δρουν σε υδατάνθρακες (carbohydrate-active enzymes, CAZymes), όπως αυτά περιγράφονται από τη βάση δεδομένων CAZy. Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση των κύριων πολυσακχαριτών του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της πηκτίνης. Οι αλληλουχίες λιγνινολυτικών οξειδοαναγωγασών που ανιχνεύθηκαν στο γονιδίωμα ήταν 36, ενώ μια δεύτερη γονιδιωματική ανάλυση (Liu et al., 2012) η οποία δημοσιεύτηκε την ίδια περίοδο, αναφέρει 48 αλληλουχίες που ανήκουν σε οξειδωτικά ένζυμα αποπολυμερισμού της λιγνίνης (FOLymes, fungal oxidative lignin enzymes), 24 εκ των οποίων κατατάσσονται στην οικογένεια των οξειδασών της λιγνίνης (LO) και 24 σε βοηθητικά ένζυμα (LDA). Οι οξειδάσες της λιγνίνης διαιρούνται περαιτέρω σε λακκάσες, υπεροξειδάσες της λιγνίνης και υπεροξειδάσες του μαγγανίου, ευέλικτες υπεροξειδάσες και αφυδρογονάσες της κελλοβιόζης. Από αυτές τις κατηγορίες, ο *G. lucidum* διαθέτει 16 γονίδια λακκασών, 7 γονίδια υπεροξειδασών και 1 γονίδιο αφυδρογονάσης της κελλοβιόζης. Σε ότι αφορά τα βοηθητικά ένζυμα, στο γονιδίωμα βρέθηκαν 10 αλληλουχίες οξειδασών των άρυλ-αλκοολών, 9 οξειδασών χαλκού, 3 οξειδασών της γλυκόζης και 2 αναγωγασών βενζοκινόνης. Η ανάλυση του μεταγραφώματος που ακολούθησε αποκάλυψε την ύπαρξη μόνο 10 γονιδίων λακκασών, μιας υπεροξειδάσης και δύο αφυδρογονασών της κελλοβιόζης (Yu et al., 2012), συνολικά δηλαδή 13 γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια των κύριων οξειδασών της λιγνίνης και επιπλέον 9 γονίδια που ανήκουν στην κατηγορία των βοηθητικών ενζύμων, δηλαδή μια οξειδάση άρυλ-αλκοολών, 5 οξειδάσες του γλυοξυλικού, μια αναγωγή της βενζοκινόνης και δύο αλκοολικές οξειδάσες. Τελικά, το πρωτέωμα του *G. lucidum* που δημοσιεύτηκε το 2015 (Yu et al., 2015) αποκάλυψε την ύπαρξη 803 πρωτεϊνών συνολικά, με 61 από αυτές να αφορούν στην αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης, μεταξύ αυτών δύο λακκάσες, μια αφυδρογονάση της κελλοβιόζης, και 3 οξειδάσες χαλκού.

Με τη δημοσίευση των παραπάνω δεδομένων, μια λακκάση Glac15 απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από καλλιέργειες του *G. lucidum*, από τους Fang et al., (2015). Το ένζυμο αυτό βρέθηκε ότι έχει βέλτιστη ενεργότητα σε pH 4,5 και θερμοκρασία 45 °C, ενώ είναι ενεργό έναντι των παραδοσιακών υποστρωμάτων των λακκασών, όπως το ABTS, η 2,6 διμεθοξυφαινόλη, η συρινγκαλδαζίνη και η γουαιακόλη. Στη μελέτη αυτή, η λακκάση χρησιμοποιήθηκε για την αποτοξικοποίηση υποστρώματος φύλλων και κλαδιών καλαμποκιού (corn stover) προκατεργασμένο με ατμό και οξύ. Η λακκάση απομάκρυνε έως και 84% των φαινολικών ουσιών του προκατεργασμένου υποστρώματος σε pH 5 μετά από επώαση 24 ωρών, με ακόλουθη αύξηση της παραγωγής αιθανόλης κατά 10% (Fang et al., 2015).

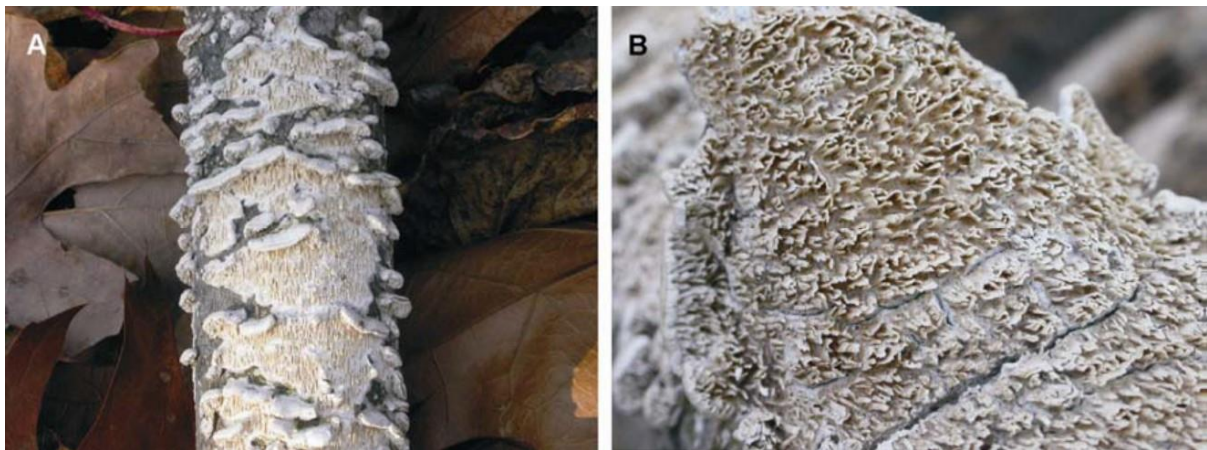
Παρότι οι μύκητες του γένους *Ganoderma* ανήκουν στους Βασιδιομύκητες λευκής σήψης και διαθέτουν όλα τα απαραίτητα ένζυμα για τη διάσπαση της λιγνινοκυτταρίνης, όπως αποκαλύφθηκε και από τις εκτενείς μελέτες του γονιδιώματος, του μεταγραφώματος και του πρωτεώματός του *G. lucidum*, οι βιβλιογραφικές αναφορές για την εφαρμογή των μυκήτων αυτών σε διεργασίες βιοαποικοδόμησης είναι ελάχιστες. Η πρώτη σχετική μελέτη δημοσιεύθηκε το 2007 από τους Matos et al., και αφορά στη δοκιμή του στελέχους *G. applanatum* στην αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργείου (ΥΑΕ). Τα ΥΑΕ περιέχουν φαινολικές ενώσεις σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις, και γι' αυτό το λόγο εμφανίζουν υψηλή φυτοτοξικότητα. Η βιολογική επεξεργασία των λυμάτων αυτών με Βασιδιομύκητες λευκής σήψης αποτελεί αντικείμενο μελέτης εδώ και πάνω από 20 χρόνια. Τα αποτελέσματα των Matos et al., (2007) για το στέλεχος *G. applanatum* αναφέρουν σημαντική μείωση του χρώματος του αποβλήτου και του φαινολικού φορτίου. Ωστόσο, σε ότι αφορά τις λιγνινολυτικές ενζυμικές ενεργότητες, δεν ανιχνεύθηκαν ενεργότητες λιγνινολυτικών υπεροξειδασών, παρά μόνο λακκάσης, η παραγωγή της οποίας φαίνεται να επάγεται από την προσθήκη ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο. Στη μελέτη των Ntougias et al., (2012) από 39 στελέχη που δοκιμάστηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην αποικοδόμηση των ΥΑΕ, 2 στελέχη *Ganoderma* (*G. australe* και *G. carnosum*) φάνηκε να βρίσκονται ανάμεσα στα πιο αποτελεσματικά, με υψηλές αποδόσεις σε βιομάζα και σημαντική μείωση του φαινολικού φορτίου (έως και 65%) και του COD (έως και 28.5%). Η παραγωγή λακκάσης ξεκίνησε ήδη από τις πρώτες ημέρες της καλλιέργειας, αλλά στη συνέχεια ανιχνεύθηκαν επίσης και ενζυμικές ενεργότητες υπεροξειδασών εξαρτημένων και ανεξάρτητων του μαγγανίου, σε χαμηλά επίπεδα. Τα εξεταζόμενα στελέχη *Ganoderma* πάντως, αν και έδειξαν ικανοποιητικό προφίλ αποικοδόμησης, δεν πέτυχαν την αποτοξικοποίηση του αποβλήτου, αφού οι τιμές φυτοτοξικότητας που υπολογίστηκαν για το απόβλητο κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα πριν και μετά την επώαση με τους μύκητες. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία και με αυτά των Koutrotsios και Zervakis (2014), όπου, από περισσότερα από 60 στελέχη που εξετάστηκαν, εκείνα που ανήκαν στο γένος *Ganoderma* (*G. carnosum*, *G. resinaceum* και *G. adspersum*) ξεχώρισαν, καθώς ήταν ικανά να αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα με 100% ΥΑΕ, εμφάνισαν υψηλές ενεργότητες υπεροξειδασών του μαγγανίου, και πέτυχαν υψηλά ποσοστά αποικοδόμησης σε λιγότερο χρόνο (49% μείωση του φαινολικού φορτίου σε 12 ημέρες) συγκριτικά με τα άλλα εξεταζόμενα στελέχη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα για τον αποχρωματισμό του αποβλήτου ήταν λιγότερο ικανοποιητικά, καθώς ο υψηλότερος αποχρωματισμός που επιτεύχθηκε για στελέχη του γένους *Ganoderma* ήταν 14%.

Τέλος ένα στέλεχος *Ganoderma* spp. έχει χρησιμοποιηθεί και για την κατεργασία του αχύρου, με σκοπό την αύξηση της θρεπτικής του αξίας προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή (Shrivastava et al., 2012). Οι Βασιδιομύκητες λευκής σήψης μπορούν να χρησιμοποιηθούν εν δυνάμει γι' αυτό το σκοπό, καθώς είναι ικανοί να αποικοδομούν την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη, αυξάνοντας την προσβασιμότητα της κυτταρίνης από τα ένζυμα και τους μικροοργανισμούς του πεπτικού συστήματος των μηρυκαστικών. Επιπλέον, η παρουσία του μυκηλίου στο κατεργασμένο υπόστρωμα αυξάνει σημαντικά το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της τροφής, αυξάνοντας αναλόγως και τη θρεπτική της αξία. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικά, καθώς η περιεχόμενη λιγνίνη και ημικυτταρίνη μειώθηκαν σε ποσοστό 34,95% και 42,51% αντίστοιχα, ενώ η θρεπτική αξία του υποστρώματος αυξήθηκε σημαντικά.

### 1.1.1.3 Το γένος *Irpex*

Τα είδη του γένους *Irpex* ξεχωρίζουν από τα καρποσώματά τους που αναπτύσσονται σαν κρούστα πάνω σε κορμούς δέντρων, τους οποίους και αποικοδομούν, προκαλώντας λευκή σήψη (Εικόνα 1.1.4). Οι μύκητες αυτοί μπορούν επίσης να αναπτυχθούν σε νεκρή φυτική ύλη, συνήθως ξυλώδη, όπως νεκρά κλαδιά δέντρων, θάμνων ή και κωνοφόρων, καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Τα βασιδιοκάρπιά τους είναι υπόλευκα με βελούδινη τριχωτή υφή, 10-40 mm, τα οποία υπερυψώνονται της επιφάνειας το μυκηλίου σε επίπεδα «δόντια» μήκους έως και 6 mm. Ο μύκητας απαντάται συνήθως στην εύκρατη ζώνη, στην Ευρώπη και τη Βόρειο Αμερική (Lincoff 1981).

Τα μανιτάρια αυτά ανήκουν στους μύκητες λευκής σήψης, και κατατάσσονται στο Βασίλειο των Μυκήτων, διαίρεση Βασιδιομυκήτων, κλάση Agaricomycetes, τάξη Polyporales, οικογένεια Meruliaceae, γένος *Irpex*.



**Εικόνα 1.1.4:** Φωτογραφίες του *Irpex lacteus*. Α) Ανάπτυξη του μύκητα σε κλαδί δέντρου, Β) λεπτομερής όψη της υφής του αναπτυσσόμενου μυκηλίου (Novotny et al., 2009).

Η βιοτεχνολογική σημασία των μανιταριών *Irpex*, και κυρίως του πιο μελετημένου εκπροσώπου τους, *Irpex lacteus*, είναι πολύ μεγάλη, καθώς τα μανιτάρια είναι πολύ αποτελεσματικά στην αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης και διαθέτουν πολύ αποτελεσματικά οξειδωτικά ένζυμα. Ο *I. lacteus* έχει βρεθεί ότι παράγει και μεταβολίτες με τοξική δράση έναντι των νηματωδών σκωλήκων (Hayashi et al., 1981). Σε ότι αφορά το ενζυμικό οπλοστάσιο του *I. lacteus*, από το στέλεχος αυτό έχουν απομονωθεί ένζυμα με δράση ένδο- και έξω-κυτταρινάσης (Novotny et al., 2009), ενδο-β-ξυλοζιδάσης, δύο ενδο-1,4-β-ξυλανάσες, α-γλυκουρονοζιδάση, μια πρωτεΐνάση παρόμοια με πεψίνη και άλλα (Novotny et al., 2009). Ωστόσο, ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα οξειδωτικά ένζυμα του μύκητα αυτού, τα οποία είναι και υπεύθυνα για τη λιγνινολυτική δράση. Όπως όλοι οι μύκητες λευκής σήψης, ο *I. lacteus* παράγει λακκάσες και υπεροξειδάσες εξαρτημένες και ανεξάρτητες από το μαγγάνιο για την αποικοδόμηση της λιγνίνης. Η ενεργότητα υπεροξειδάσης της λιγνίνης του μύκητα αυτού φαίνεται να οφείλεται σε τρία ένζυμα, τα οποία ονομάστηκαν LiP1, LiP2, και LiP3 (Rothschild et al., 2002), με μοριακά βάρη 41, 41 και 44 kDa, και pI 5,0, 4,9 και 4,6 αντίστοιχα. Τα ένζυμα αυτά δείχνουν μικρή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, γεγονός που τα καθιστά ικανά να οξειδώνουν ευρύ φάσμα υποκατεστημένων φαινολών. Σε αντίθεση με την ενεργότητα LiP, η ενεργότητα υπεροξειδάσης εξαρτημένης από το μαγγάνιο φαίνεται να οφείλεται σε ένα μόνο ένζυμο, MnP, με μοριακό βάρος 38.3 kDa και pI 3,7 (Shin et al., 2005), και ως εκ τούτου κατατάσσεται στις

μικρού μοριακού βάρους όξινες MnP's. Η ενεργότητα λακκάσης του μύκητα αυτού ωστόσο, εμφανίζει μια πιο ασυνήθιστη συμπεριφορά: αν και έχει ανιχνευθεί εξωκυτταρική ενεργότητα λακκάσης στις καλλιέργειες του *I. lacteus* (Novotny et al., 2000), η ενεργότητά της στο υπερκείμενο των καλλιεργειών είναι ασυνήθιστα χαμηλή (Svobodova et al., 2006). Αυτό φαίνεται να συμβαίνει επειδή η λακκάση αυτή μάλλον είναι συνδεδεμένη με το κυτταρικό τοίχωμα, και η προσπάθεια απομόνωσής της οδηγεί σε απώλεια της ενεργότητάς της (Svobodova et al., 2008). Εκτός από τα παραπάνω ένζυμα, έχουν βρεθεί επίσης και άλλες ενεργότητες οοξειδωτικών ενζύμων, όπως μια μη ειδική υπεροξειδάση (Shin 2004) και πιο πρόσφατα, μια υπεροξειδάση αποικοδόμησης βαφών (DyP) (Salvachua et al., 2014).

Εξαιτίας του ισχυρού λιγνινολυτικού συστήματος του *I. lacteus*, ο μύκητας αυτός έχει δοκιμαστεί σε πληθώρα εφαρμογών βιοεξυγίανσης και αποικοδόμησης ρυπαντών, όπως PAHs, συνθετικών βαφών και ορμονών, αλλά και για αποχρωματισμό βιομηχανικών αποβλήτων. (Song 1997, Sasek et al., 1998, Novotny et al., 2001, Aggelis et al., 2002, Ricci et al., 2005, Rigas and Dritsa 2006, Matos et al., 2007, Hwang et al., 2008). Η αποικοδόμηση των PAHs φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής MnP, με διάνοιξη των δακτυλίων (Cajthaml et al. 2002, 2006). Ο μύκητας εξετάστηκε ως προς την αποικοδόμηση των PAHs σε τεχνητά μολυσμένο χώμα, το οποίο περιείχε 50 mg kg<sup>-1</sup> φαινανθρένιο, ανθρακένιο, φλουορανθρένιο και πυρένιο, και βρέθηκε ότι είναι ικανός να εποικίζει το μολυσμένο χώμα ιδιαίτερα ικανοποιητικά (Novotny et al., 2000), ενώ σε άλλη μελέτη η αποικοδόμηση των PAHs έφτασε το 67% (Bhatt et al., 2002), με ταυτόχρονη αποτοξικοποίηση του χώματος. Επίσης ο *I. lacteus* έδειξε εξαιρετικά αποτελεσματική αποικοδόμηση της δισφαινόλης A (bisphenol A) (Shin et al., 2007), μιας ουσίας ευρέως χρησιμοποιούμενης σε πλαστικά υλικά, η οποία με την είσοδό της στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να διαταράξει το ενδοκρινικό σύστημα, μιμούμενη τη δράση των φυσικών ορμονών.

Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στην αποικοδόμηση συνθετικών βαφών από τον *I. lacteus*. Στη μελέτη των Novotny et al., (2001) ο μύκητας βρέθηκε ικανός να αποικοδομεί με αποτελεσματικότητα 56-100% όλες τις δοκιμαζόμενες βαφές σε διάστημα 14 ημερών. Μελέτες παρεμπόδισης της δράσης των ενζύμων MnP και λακκάσης έδειξαν ότι η αποικοδόμηση των βαφών οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό σε αυτές (Kasinath et al. 2003; Novotný et al. 2004b). Η MnP του *I. lacteus* έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και σε *in vitro* πειράματα για την αποικοδόμηση βαφών (Shin et al. 2005; Svobodová et al. 2006), όπως επίσης και η λακκάση (Svobodová et al. 2008).

Ο *I. lacteus* έχει δοκιμαστεί επίσης και στην αποικοδόμηση αποβλήτων της επεξεργασίας της ελιάς. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Aggelis et al., (2002), η δράση του μύκητα εξετάστηκε σε απόβλητα της διεργασίας ξεπικρίσματος της ελιάς. Στη μελέτη αυτή, όπως αναφέρθηκε ήδη, φάνηκε ότι η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων από το μύκητα αυτό οφείλεται περισσότερο στη δράση υπεροξειδασών, και σε πολύ μικρότερο βαθμό, λακκάσης. Ακόμη, σε μια μελέτη αξιολόγησης περισσότερων από 60 μακρομυκήτων σχετικά με την αποικοδόμηση των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου (ΥΑΕ) από τους Koutrotsios και Zervakis (2014), ο *I. lacteus* αναδείχθηκε ως ένας από τους πιο αποτελεσματικούς αποικοδομητές των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου επιτυγχάνοντας αποχρωματισμό έως και 56% με ταυτόχρονη μείωση φαινολικών 58,9%. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν υψηλή συσχέτιση με την παραγωγή ενζύμων με ενεργότητα MiP και MnP.

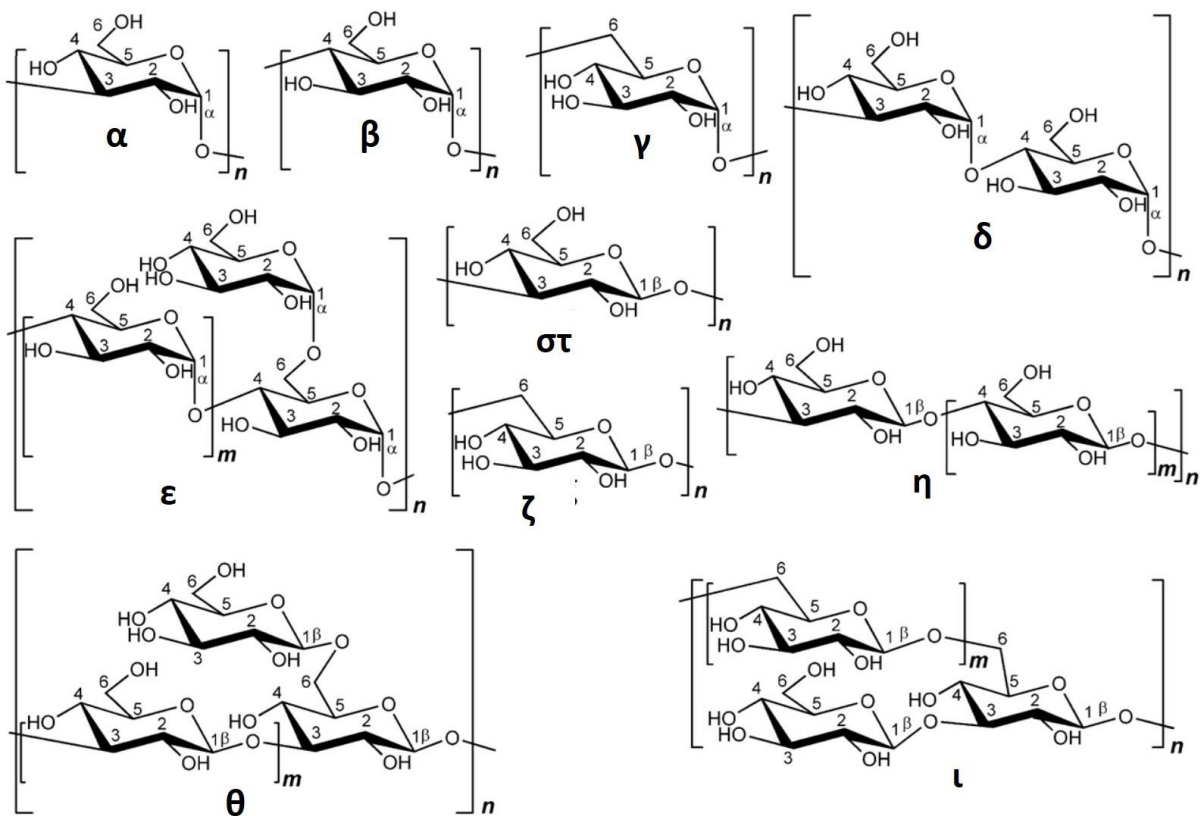
Τέλος, στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετές προσπάθειες προκατεργασίας λιγνινοκυτταρινούχων αποβλήτων με χρήση του *I. lacteus*, για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Η

προκατεργασία είναι το στάδιο όπου η πολύπλοκη δομή της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος αποικοδομούνται εν μέρει, έτσι ώστε στο ακόλουθο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης, τα ένζυμα να μπορούν να έρθουν σε επαφή με τις ίνες της κυτταρίνης, προκειμένου να τις διασπάσουν προς παραγωγή ζυμώσιμης γλυκόζης. Η απομάκρυνση και τροποποίηση της λιγνίνης τροποποιεί σημαντικά τη δομή των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων, αφού το πολυμερές αυτό αποτελεί το φράγμα προστασίας της κυτταρίνης από ενζυμική αποικοδόμηση.

Οι Xu et al., 2010 εξέτασαν την επίδραση της προκατεργασίας φύλλων και στελεχών καλαμποκιού με τον μύκητα στην απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων μετά το στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης. Τα αποτελέσματά τους δείχνουν ότι η αποίκηση του υποστρώματος με τον *I. lacteus* επέφερε σημαντικές αλλαγές στη δομή του, αυξάνοντας το πλήθος και το μέγεθος των πόρων στα κυτταρικά τοιχώματα του καλαμποκιού, μαλακώνοντας εν μέρει την υφή του φυτού, και τελικά, επιτυγχάνοντας ένα υψηλότερο ποσοστό σακχαροποίησης. Ο *I. lacteus* κατά τη διάρκεια της επώασης στο υπόστρωμα καλαμποκιού, έδειξε να αποικοδομεί επιλεκτικά πρώτα την ημικυτταρίνη, και στη συνέχεια τη λιγνίνη, αφήνοντας άθικτες τις ίνες της κυτταρίνης, τουλάχιστον τις πρώτες 90 ημέρες της επώασης. Ο Song και οι συνεργάτες του (2013) πέτυχαν ακόμη πιο αποτελεσματική προκατεργασία με την προσθήκη μαγγανίου: η απόδοση της γλυκόζης μετά την ενζυμική υδρόλυση αυξήθηκε κατά 61,39%, με μέγιστη απόδοση υδρόλυσης των πολυσακχαριτών της τάξης του 91,41%, ενώ η προσθήκη μαγγανίου οδήγησε στην αύξηση της απόδοσης της παραγόμενης αιθανόλης κατά 59,23%. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται να οφείλονται στην επιλεκτική απομάκρυνση της λιγνίνης, αφού αυτή αυξήθηκε κατά 135% μετά την προσθήκη μαγγανίου σε κατάλληλη συγκέντρωση. Τα αποτελέσματα συμφωνούν και με αυτά των Du et al., (2011) οι οποίοι επιβεβαίωσαν την αύξηση των ζυμώσιμων σακχάρων μετά την προκατεργασία με *I. lacteus* και την απομάκρυνση της λιγνίνης. Επιπλέον έδειξαν ότι τα ένζυμα και οι μεταβολίτες που παράγονται κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας από τον *I. lacteus* δρουν βοηθητικά στα εμπορικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται στο επόμενο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης, αυξάνοντας περαιτέρω την απελευθέρωση των σακχάρων, ακόμη και απουσία του μικροοργανισμού. Η πρωτεωμική μελέτη των Salvachua et al., (2013α) αποκάλυψε επίσης και τον σημαντικό ρόλο που παίζουν οι πρωτεάσες στην αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης, καθώς φαίνεται πως είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση του αζώτου που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Στην εργασία αυτή βρέθηκαν επίσης και ένζυμα με ενεργότητες οξειδάσης του γλυοξυλικού οξέος και αφυδρογονάσης της κελλοβιόζης, τα οποία παρέχουν το απαραίτητο  $H_2O_2$  για τη λειτουργία των λιγνινολυτικών υπεροξειδασών. Οι υπεροξειδάσες στο πρωτέωμα του *I. lacteus* κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης σε άχυρο φαίνεται να αντιπροσωπεύονται κυρίως από δύο ένζυμα, ένα με ενεργότητα υπεροξειδάσης εξαρτώμενης από το μαγγάνιο και ένα με ενεργότητα DyP. Η DyP του *I. lacteus* απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε σε επόμενη μελέτη των Salvachua et al., (2013b), και έδειξε να είναι μια υπεροξειδάση υψηλού ενζυμικού δυναμικού με δυνατότητα αποικοδόμησης ευρέος φάσματος βαφών. Από όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι ο *I. lacteus* διαθέτει ένα πλήρες ενζυμικό οπλοστάσιο για την αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης, γεγονός που τον καθιστά εξαιρετικά πολύτιμο εργαλείο σε πληθώρα βιοτεχνολογικών εφαρμογών.

### 1.1.2 Γλυκάνες

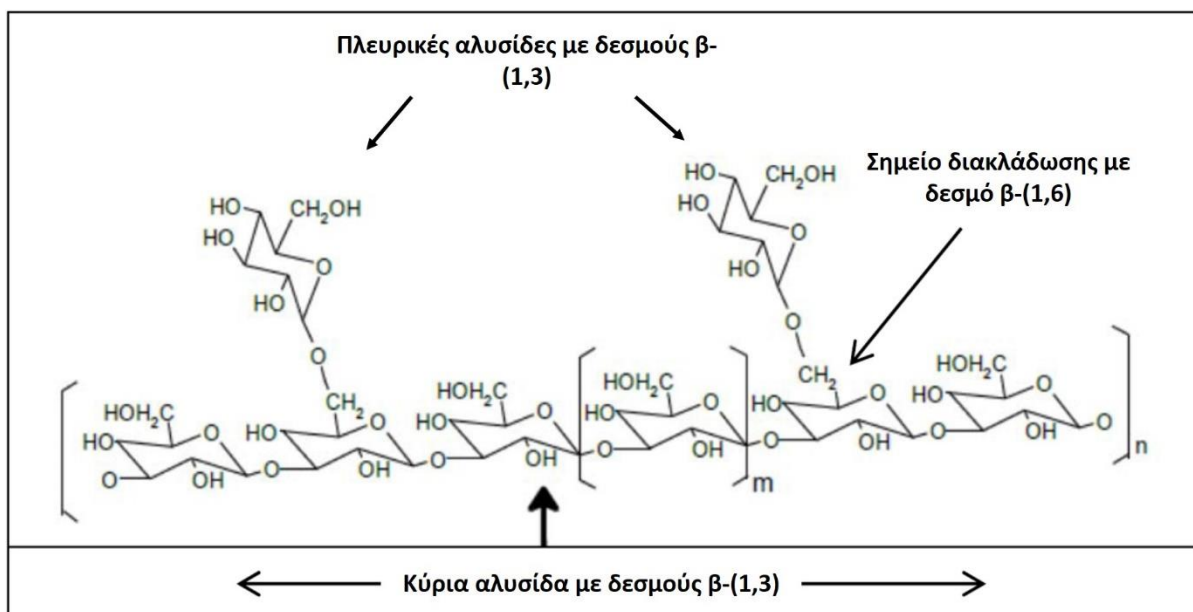
Οι γλυκάνες είναι πολυμερή μόρια που αποτελούνται από ένα μόνο μονομερές, τη γλυκόζη. Αν και η σύστασή τους είναι γενικά απλή, οι γλυκάνες παρουσιάζουν μια εξαιρετικά υψηλή δομική πολυπλοκότητα, η οποία οφείλεται στα διαφορετικά είδη των γλυκοζιδικών δεσμών που είναι δυνατό να σχηματιστούν, στην ανωμερική διάταξη των υδροξυλίων, αλλά και ενδεχομένως στην ύπαρξη πλευρικών αλυσίδων, καθώς επίσης και στο μέγεθος αυτών. Οι γλυκάνες αποτελούν τους πιο διαδεδομένους πολυσακχαρίτες στη φύση, δεδομένου ότι σε αυτή τη χημική κατηγορία ανήκουν το άμυλο και η κυτταρίνη, συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Ωστόσο, γλυκάνες απαντώνται επίσης και στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων σαν δομικά τους στοιχεία, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σαν πηγή ενέργειας (Synytsya and Novak, 2014). Οι δομές που μπορεί να λάβουν οι πολυσακχαρίτες αυτοί είναι τρεις: α-γλυκάνες, β-γλυκάνες ή μικτές α,β-γλυκάνες που είναι πιο σπάνιες. Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας που εμφανίζουν, για τον πλήρη χαρακτηρισμό τους παίζει επίσης ρόλο το μοριακό τους βάρος και η ύπαρξη διακλαδώσεων, καθώς επίσης και το μέγεθος αυτών. Με βάση τα χαρακτηριστικά αυτά οι γλυκάνες μπορεί να εμφανίζονται σε (1,3)-α-D μορφή, (1,4)-α-D μορφή, (1,3)-β-D μορφή, (1,6)(1,3)-β-D μορφή ή πολλές άλλες (Synytsya and Novak 2013). Στην παρακάτω Εικόνα φαίνονται οι κυριότερες δομές γλυκανών που απαντώνται στη φύση.



**Εικόνα 1.1.5:** Δομές γλυκανών από μύκητες. Α) (1,3)-α-D-γλυκάνη, β) (1,4)-α-D-γλυκάνη, γ) (1,6)-α-D-γλυκάνη, δ) μικτοί δεσμοί (1,3), (1,4)-α-D-γλυκάνης, ε) διακλαδισμένη (1,4), (1,6)-α-D-γλυκάνη, στ) (1,3)-β-D-γλυκάνη, ζ) (1,6)-β-D-γλυκάνη, η) μικτοί δεσμοί (1,3), (1,4)-β-D-γλυκάνης, θ) διακλαδισμένη (1,3),(1,6)-β-D-γλυκάνη, ι) διακλαδισμένη (1,6),(1,3)-β-D-γλυκάνη (Synytsya and Novak, 2013).

Οι γραμμικές (1,4)- $\alpha$ -D-γλυκάνες και οι διακλαδισμένες (1,4)(1,6)- $\alpha$ -D-γλυκάνες είναι πολύ διαδεδομένες στη φύση και συνήθως παίζουν το ρόλο της πηγής ενέργειας. Στην κατηγορία αυτή εμπίπτει το άμυλο, γνωστός αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης των φυτών (Thitipraphunkul et al., 2003). (1,4)(1,6)- $\alpha$ -D-γλυκάνη είναι επίσης και το γλυκογόνο που λειτουργεί ως αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης στα ζώα (McIntyre et al., 1993), ενώ η κυτταρίνη των φυτών χημικά ανήκει στις (1,4)- $\beta$ -D-γλυκάνες. Ωστόσο, η μεγαλύτερη πολυπλοκότητα σε διαφορετικά είδη γλυκανών απαντάται στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων, τα οποία αποτελούνται κυρίως από δομικούς πολυσακχαρίτες και γλυκοπρωτεΐνες. Το κύριο δομικό είδος γλυκάνης που βρίσκεται στα μυκηλιακά κυτταρικά τοιχώματα είναι οι (1,3)- $\beta$ -D-γλυκάνη, με ή χωρίς  $\beta$ -(1,6) διακλαδώσεις, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να είναι παρούσες και  $\beta$ -(1,4) διακλαδώσεις, αλλά ακόμη και (1,3)- $\alpha$ -D-γλυκάνες (Synytsya et al., 2009), και γραμμικές ή διακλαδισμένες  $\alpha$ ,  $\beta$  γλυκάνες (Mandal et al., 2010). Λόγω της πολυπλοκότητάς τους, οι πολυσακχαρίτες αυτοί συνήθως ονομάζονται σύμφωνα με το γένος του μύκητα από το οποίο προήλθαν, όπως για παράδειγμα πλευράνη για τη γλυκάνη των ειδών *Pleurotus*, λεντινάνη για τη γλυκάνη των ειδών *Lentinula*, γκριφολάνη για τη γλυκάνη των ειδών *Grifola* κλπ. Οι μυκητιακές γλυκάνες συνήθως βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα σε πολύπλοκα συμπλέγματα με άλλους πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες ή φαινολικές ουσίες. Εκτός από τα κυτταρικά τοιχώματα (ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες, intracellular polysaccharides, IPS), γλυκάνες μπορεί να βρίσκονται επίσης και σε άλλα μέρη των μυκήτων, όπως τα καρποσώματα των μακρομυκήτων, ή ακόμη και να εκκρίνονται στο περιβάλλον μέσω (εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες, extracellular polysaccharides, EPS).

Σε ότι αφορά τις  $\alpha$ -D-γλυκάνες, οι πιο διαδεδομένες στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων είναι οι γραμμικές (1,3)- $\alpha$ -D-γλυκάνες. Πολυσακχαρίτες με αυτή τη διαμόρφωση έχουν απομονωθεί από τα μυκήλια των ειδών *Aspergillus niger* (Horisberger et al., 1972), *Penicillium chrysogenum* (Wang et al., 2007) και *Agrocybe cylindracea* (Kiho et al., 1989), αλλά και από τα καρποσώματα των *Ganoderma lucidum* (Chen et al., 1998), *Pleurotus ostreatus* (Synytsya et al., 2009), *Pleurotus eryngii* (Synytsya et al., 2009), *Lentinula edodes* (Wiater et al., 2011) και πολλών άλλων. Σε αρκετούς μύκητες έχουν βρεθεί επίσης και γραμμικές  $\beta$ -D-γλυκάνες, κυρίως (1,3) ή (1,6)- $\beta$ -D-γλυκάνες, ενώ οι πολυσακχαρίτες με δομή όμοια με της κυτταρίνης ((1,4)- $\beta$ -D-γλυκάνη) απουσιάζουν εδώ. Γραμμικές (1,3)- $\beta$ -D-γλυκάνες έχουν απομονωθεί από τον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (Medeiros et al., 2012) αλλά και από το *Ganoderma lucidum* (Wang and Zhang, 2009). Στον *S. cerevisiae* έχουν βρεθεί επίσης και γραμμικές (1,6)- $\beta$ -D-γλυκάνες (Fleet and Manners, 1976), καθώς και στα καρποσώματα του *Agaricus blazei* (Kawagishi et al., 1990). Ωστόσο, η πλειοψηφία των  $\beta$ -D-γλυκανών που απαντώνται στους μύκητες είναι διακλαδισμένες  $\beta$ -D-γλυκάνες, οι οποίες περιλαμβάνουν (1,3) και (1,6) γλυκοζιδικούς δεσμούς. Οι περισσότερες αποτελούνται από μια κύρια αλυσίδα μονομερών γλυκόζης συνδεδεμένων με (1,3)- $\beta$ - γλυκοζιδικούς δεσμούς και πλευρικές αλυσίδες με (1,6)- $\beta$ - συνδεδεμένα μόρια D-γλυκόζης (Chen and Seviour, 2007), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1.6, αλλά έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις όπου ο σχηματισμός είναι ανάποδος, δηλαδή η κύρια αλυσίδα αποτελείται από μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα με (1,6)- $\beta$ - δεσμούς και οι πλευρικές αλυσίδες ενώνονται με την κύρια με (1,3)- $\beta$ -δεσμούς (Sun et al., 2012).



**Εικόνα 1.1.6:** Δομή διακλαδισμένης (1,3)(1,6)-β-D-γλυκάνης όπως απαντάται στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων.

Οι β-D-γλυκάνες από φυσικές πηγές φαίνεται να λαμβάνουν μια στερεοδιάταξη τριπλής έλικας, η οποία σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου και από τις πλευρικές αλυσίδες, αλλά αυτό φαίνεται να ισχύει μόνο για μόρια υψηλού μοριακού βάρους (Sletmoen and Stokke, 2008), ενώ τα μικρότερα μόρια λαμβάνουν στερεοδιάταξη απλής έλικας.

Οι (1,3)-β-D-γλυκάνες με (1,6)-β-διακλαδώσεις των μυκήτων εμφανίζουν τεράστια ποικιλομορφία σε ότι αφορά το μέγεθος και τη συχνότητα των διακλαδώσεων, όπως επίσης και το σχηματισμό συμπλεγμάτων με άλλους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, κυρίως με τη χιτίνη. Για παράδειγμα, ο Snyhysya και οι συνεργάτες του (2009) απομόνωσαν διακλαδισμένες (1,3)(1,6)-β-D-γλυκάνες από τα καρποσώματα των μυκήτων *Pleurotus ostreatus* και *Pleurotus eryngii* σε σύμπλοκο με πρωτεΐνες, ενώ το στερεό κλάσμα που προέκυψε βρέθηκε ότι αποτελούνταν σε μεγάλο βαθμό από σύμπλοκο γλυκανών με χιτίνη.

Κάποιοι από τους πιο γνωστούς πολυσακχαρίτες αυτής της κατηγορίας είναι η λεντινάνη, η οποία έχει απομονωθεί από το μύκητα *Lentinula edodes* (Zhang et al., 2011), η γκριφολάνη, από το μύκητα *Grifola frondosa* (Tada et al., 2009), και οι εξωπολυσακχαρίτες σχιζοφυλλάνη και σκληρογλυκάνη, από τους μύκητες *Schizophyllum commune* (Tabata et al., 1981) και *Sclerotium* sp. (Coviello et al., 2005) αντίστοιχα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει επίσης και μια πλειάδα διαφορετικών πολυσακχαριτών που έχουν απομονωθεί από καρποσώματα (Hung et al., 2008) ή μυκήλια βυθισμένης καλλιέργειας (Sone et al., 1985) ειδών του γένους *Ganoderma*. Για παράδειγμα, η αδιάλυτη στο νερό γλυκάνη του *G. jaronicum* βρέθηκε ότι διαθέτει χαμηλό βαθμό διακλάδωσης (Ukai et al., 1982), ενώ η β-D-γλυκάνη από τα καρποσώματα του *G. lucidum* βρέθηκε να είναι ένας πολυσακχαρίτης υψηλού βαθμού διακλάδωσης (Chang and Lu, 2004). Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για τη β-D-γλυκάνη των καρποσωμάτων του *G. resinaceum* (Amaral et al., 2008).

Μόρια β-D-γλυκανών με (1,6) δεσμούς στην κύρια αλυσίδα και (1,3) δεσμούς στις διακλαδώσεις έχουν απομονωθεί από τους μακρομύκητες *Agaricus blazei* (Mizuno et al., 1990), *Pleurotus citrinopileatus* (Sun et al., 2012) και *Phellinus baumii* (Ge et al., 2009), ενώ έχουν βρεθεί επίσης και



μόρια (1,3)-β-D-γλυκανών τα οποία περιλαμβάνουν και τα δύο είδη δεσμών στις διακλαδώσεις. Το πιο κλασσικό παράδειγμα αυτού του είδους των πολυσακχαριτών είναι η πλευράνη, η οποία βρίσκεται στα βασιδιοκάρπια του *Pleurotus ostreatus* (Karacsonyi and Kuniak, 1994).

Τέλος, από τα καρποσώματα του *Trametes versicolor* έχει απομονωθεί και ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον σύμπλοκο πεπτιδογλυκάνης, η κρεστίνη (Tsukagoshi et al., 1984), το οποίο εμφανίζει έντονη βιολογική δραστηριότητα. Το πολυσακχαριτικό μέρος του συμπλέγματος αυτού αποτελείται από μια κύρια αλυσίδα (1,4)-β-D-γλυκάνης με (1,3) και (1,6) διακλαδώσεις, η οποία είναι επίσης ομοιοπολικά προσδεμένη σε μονάδες πεπτιδίων (Ooi and Liu, 2000).

#### 1.1.2.1 Βιολογική δραστηριότητα των γλυκανών

---

Οι ευεργετικές επιδράσεις της κατανάλωσης μανιταριών στην ανθρώπινη υγεία είναι γνωστές εδώ και πολλές δεκαετίες, αλλά η ταυτοποίηση των γλυκανών ως το δραστικό συστατικό τους έχει πραγματοποιηθεί σχετικά πρόσφατα. β-D-γλυκάνες δεν παράγονται από τα θηλαστικά, και ως εκ τούτου το ανοσοποιητικό τους σύστημα τις αντιλαμβάνεται ως «εισβολείς», ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς της έμφυτης και της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης (Brown and Gordon 2005). Η ενεργοποίηση αυτή είναι και η βάση της βιολογικής δραστηριότητας των γλυκανών, καθώς η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος οδηγεί σε πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση μολύνσεων από βακτήρια και ιούς, αλλά και στον περιορισμό της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Σε ότι αφορά την έμφυτη ανοσία, οι γλυκάνες ενεργοποιούν τα φαγοκύτταρα, με αποτέλεσμα την φαγοκυττάρωση των παθογόνων (Brown et al. 2002). Επίσης οι γλυκάνες ενεργοποιούν τη σύνθεση των κυτταροκινών, όπως η ιντερλευκίνες, αλλά και του TNF-α (Tumor necrosis factor α) και ιντερφερονών, οι οποίες στη συνέχεια ενεργοποιούν τους μηχανισμούς της επίκτητης ανοσίας, δηλαδή τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων σε βοηθητικά T-κύτταρα (Chen et al., 2007). Έτσι, οι γλυκάνες φαίνεται να ενεργοποιούν ολόκληρο το ανοσοποιητικό σύστημα με στόχο την αντιμετώπιση πιθανών απειλών. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η στοματική ή ενδοφλέβια χορήγηση β-γλυκανών έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους των καρκινικών όγκων, μέσω ενεργοποίησης των μακροφάγων, σε πειράματα σε ποντίκια (Allendorf et al. 2005, Yan et al. 2005), αλλά και σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ωθήκης φαίνεται ότι επάγει την απόπτωση ή τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Kobayashi et al. 2005). Η χορήγηση β-γλυκανών φαίνεται επίσης να ανακουφίζει και από τις παρενέργειες της χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας (Gu et al. 2005), μειώνοντας την πιθανότητα ευκαιριακής μόλυνσης. Η ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων έχει ευεργετική επίδραση επίσης και σε περιπτώσεις ιικών αλλά και βακτηριακών μολύνσεων. Η χορήγηση β-γλυκανών φαίνεται να μπορεί να θεραπεύσει ποντίκια μολυσμένα με *Bacillus anthrax*, κάτι που φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης των κυτταροκινών IL-2 και IL-10 (Kournikakis et al., 2003). β- γλυκάνη του *S. cerevisiae* φαίνεται επίσης να βοηθά στη θεραπεία λοιμώξεων *Staphylococcus aureus*, ακόμα και αν τα στελέχη αυτά ήταν ανθεκτικά σε αντιβιοτικά της οικογένειας των β-λακταμών (Liang et al., 1998). Επιπλέον, καθώς οι β-γλυκάνες είναι συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, μπορούν να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα και ενάντια σε ευκαιριακές μυκητιακές λοιμώξεις, οι οποίες συνήθως είναι κρίσιμες σε περιπτώσεις ανοσοκατεσταλμένων ασθενών.

Εκτός από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, οι β-γλυκάνες έχει βρεθεί ότι επιδεικνύουν και μια πληθώρα ευεργετικών επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία, αν και ο μηχανισμός

της δράσης τους είναι ακόμη άγνωστος. Ανάμεσα σε αυτές τις επιδράσεις περιλαμβάνονται η μείωση της χοληστερόλης του αίματος (Nicolosi et al., 1999), η μείωση της γλυκόζης του αίματος (Lo et al., 2006), ο έλεγχος της πίεσης του αίματος (Tam et al., 1986) και η επιτάχυνση της επούλωσης τραυμάτων μέσω ενεργοποίησης των μακροφάγων (Mayhew 2001), αλλά και ενεργοποίησης της βιοσύνθεσης του κολλαγόνου (Wei et al., 2002b). Όλα αυτά τα αποτελέσματα, αν και εξαιρετικά ενθαρρυντικά, θα πρέπει να αντιμετωπίζονται προς το παρόν με κάποια επιφύλαξη, καθώς όλα τα πολυσακχαρικά παρασκευάσματα που έχουν χρησιμοποιηθεί για τέτοιου είδους μελέτες έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές, και άρα περιέχουν μικρό, αλλά σημαντικό ποσοστό προσμίξεων, οι οποίες μπορεί, έως ένα βαθμό τουλάχιστον, να επηρεάζουν τα τελικά αποτελέσματα.

Ο βαθμός της βιολογικής δραστηριότητας των μυκητιακών γλυκανών συνήθως σχετίζεται με μια σειρά χαρακτηριστικών του μορίου, όπως το μοριακό βάρος και η δομή του εξεταζόμενου πολυσακχαρίτη. Όμως, τα δεδομένα της επίδρασης συγκεκριμένων παραγόντων όπως το μοριακό βάρος, η συχνότητα και το μέγεθος των διακλαδώσεων, η τρισδιάστατη διάταξη και οι διαμοριακοί δεσμοί είναι συχνά αντικρουόμενα (Chen and Seviour, 2007, Novak and Vetvicka, 2008, Wasser, 2002). Οι γλυκάνες λεντινάνη, σχιζοφυλλάνη ή η β-D-γλυκάνη της ζύμης αρτοποιίας φαίνεται να εμφανίζουν τη μέγιστη αντικαρκινική δράση, αλλά μόρια γλυκανών με μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό διακλαδώσεων φαίνεται να είναι λιγότερο δραστικές (Misaki et al., 1981, 1984). Η ύπαρξη διακλαδώσεων ωστόσο φαίνεται να είναι σημαντική, όπως δείχθηκε με το πείραμα των Kihō et al., (1998), όπου η χημική προσθήκη β-(1,6) διακλαδώσεων σε γραμμική βακτηριακή β-γλυκάνη αύξησε τη δραστηριότητά της έναντι κυττάρων σαρκώματος 180 από ποντίκια. Σε γενικές γραμμές, φαίνεται ότι οι γλυκάνες με κύρια αλυσίδα β-(1,3) διαθέτουν αντικαρκινική δράση (Seviour et al., 1992), η οποία δείχνει αυξημένη στις αλυσίδες με β-(1,6) δεσμούς (Misaki et al., 1981), ενώ οι (1,3)-α-γλυκάνες δεν φαίνεται να εμφανίζουν καμία βιολογική δραστηριότητα. Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης η στερεοδομή των μορίων, καθώς οι γλυκάνες μεγάλου μοριακού βάρους που λαμβάνουν στερεοδιάταξη τριπλής έλικας φαίνεται να είναι πιο ισχυροί ανοσορυθμιστές (Falch et al., 2000), αν και πιθανότατα οι πολυσακχαρίτες μεγάλου μοριακού βάρους, με την είσοδό τους στο πεπτικό σύστημα του ξενιστή, αποικοδομούνται σε μικρότερα μόρια ολιγοσακχαριτών, τα οποία προσδένονται στους κυτταρικούς υποδοχείς και επιφέρουν την παρατηρούμενη βιολογική απόκριση. Τέλος, είναι μάλλον αναμενόμενο το γεγονός ότι οι γλυκάνες με υψηλή διαλυτότητα στο νερό να εμφανίζουν και υψηλή βιολογική δραστηριότητα (Ishibashi et al., 2000).

#### *1.1.2.2 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των γλυκανών*

---

Οι πολλαπλές βιολογικές δράσεις των β-γλυκανών τις καθιστούν προφανείς στόχους για τη βιομηχανία φαρμάκων και συμπληρωμάτων διατροφής για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού. Ωστόσο, οι β-γλυκάνες εμφανίζουν και πολλά άλλα χαρακτηριστικά, τα οποία βρίσκουν εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και καλλυντικών. Για παράδειγμα, η επουλωτική δράση που εμφανίζουν έναντι τραυμάτων έχει δοκιμαστεί στην παρασκευή καλλυντικών, με εξαιρετικά αποτελέσματα. Οι β-γλυκάνες εμφανίζουν ενυδατική δράση και απαλύνουν τα σημάδια γήρανσης, καθώς απορροφώνται από την επιδερμίδα του προσώπου, αλλά και από το υποκείμενο στρώμα της δερμίδας (Zhu et al., 2016).

Πιο σημαντική όμως είναι η αξιοποίηση τους στη βιομηχανία τροφίμων. Το υψηλό ιξώδες που εμφανίζουν οι β-γλυκάνες τις καθιστά πολύτιμα εργαλεία για πληθώρα εφαρμογών, όπως η παραγωγή προϊόντων με βελτιωμένα ρεολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Lyly et al., 2003), η αντικατάσταση του λίπους σε προϊόντα χαμηλής θερμιδικής αξίας (Kontogiorgos et al., 2004), όπως προϊόντα κρέατος και γαλακτοκομικών, και η βελτίωση της ποιότητας αλεύρων και ψωμιού (Delcour et al., 1991). Σημαντική επίσης είναι και η παραγωγή προϊόντων για ασθενείς με διαβήτη, καθώς το υψηλό ιξώδες που εμφανίζουν οι β-γλυκάνες επιβραδύνει την πέψη των τροφών στο στομάχι, επιτρέποντας μια πιο ομαλή αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στον οργανισμό μετά τη λήψη τροφής (Wood, 2002). Ακόμη, φιλμ β-γλυκανών έχουν εξεταστεί σαν υποψήφια εδώδιμα και βιοδιασπώμενα υλικά για συσκευασίες τροφίμων (Skendi et al., 2003).

### 1.1.2 Ασκομύκητες

---

#### *Myceliophthora thermophila*

Ο *M. thermophila* είναι ένας νηματοειδής θερμοφίλος ασκομύκητας. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του βρίσκεται μεταξύ 45-50 °C, και είναι ένας οργανισμός με ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να διασπάσει πλήρως την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη της φυτικής βιομάζας, και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πλήθος εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής βιοκαυσίμων. Ο *M. thermophila* ανήκει στο Βασίλειο των Μυκήτων, φύλο Ασκομυκήτων, κλάση Sordariomycetes, τάξη Sordariales, οικογένεια Chaetomiaceae, γένος *Myceliophthora*, είδος *M. thermophila*. Οι αποικίες του στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης φαίνονται ελαφρώς ερυθρές, αλλά στη συνέχεια παίρνουν καφέ χρώμα και κοκκώδη υφή.

Το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον για το μύκητα αυτόν πηγάζει κυρίως από την ικανότητά του να διασπά τους πολυσακχαρίτες της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, αλλά και από τη θερμοφιλή φύση του, η οποία τον καθιστά πολύτιμη πηγή θερμοφίλων ενζύμων, τα οποία σε γενικές γραμμές εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα από τα αντίστοιχα μεσόφιλα ένζυμα και εξαιτίας αυτού είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε βιομηχανικές εφαρμογές. Για τους παραπάνω λόγους, το ενζυμικό σύστημα αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρίνης του συγκεκριμένου μικροοργανισμού έχει μελετηθεί εκτενώς, και ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί. Η κυτταρινολυτική ενεργότητα του *M. thermophila* φαίνεται να είναι αρκετές φορές μεγαλύτερη από των αντίστοιχων ενζύμων μεσόφιλων μυκήτων (Berka et al., 2011, Bhat and Maheshwari, 1987). Ακόμη, ο μύκητας αυτός έχει χρησιμοποιηθεί για την εύρεση καινοτόμων ενζυμικών ενεργοτήτων, που απομονώθηκαν από αυτόν για πρώτη φορά, όπως μια εξωκυτταρική αλδονολακτονάση και εστεράση του γλυκουρονικού (Beeson et al., 2011, Torakas et al., 2010). Ακόμη, μια λακκάση του οργανισμού αυτού έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την απομάκρυνση της λιγνίνης από φυτική βιομάζα (Rico et al., 2014). Η αποκωδικοποίηση του γονιδιώματός του, το 2011, αποκάλυψε την ύπαρξη μιας μεγάλης ποικιλίας λιγνοκυτταρινολυτικών γονιδίων (Berka et al., 2011).

---

## 1.2 Λιγνινολυτικά ένζυμα

---

### 1.2.1 Λιγνινοκυτταρινούχα υλικά

---

Η λιγνινοκυτταρίνη είναι ένα ανανεώσιμο οργανικό υλικό και το βασικό δομικό στοιχείο όλων των φυτών. Τα λιγνινοκυτταρινούχα απόβλητα παράγονται σε μεγάλες ποσότητες από πολλούς βιομηχανικούς τομείς, όπως η δασική βιομηχανία, η βιομηχανία χαρτιού, η γεωργική βιομηχανία και η βιομηχανία τροφίμων, αλλά είναι επίσης παρόντα και στα αστικά στερεά απόβλητα ή σε απόβλητα κτηνοτροφικών μονάδων (Dashtban et al., 2010).

Η λιγνινοκυτταρίνη αποτελείται από τρία δομικά στοιχεία: την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη. Περιέχει επίσης και μικρές ποσότητες άλλων υλικών, όπως τέφρα, πρωτεΐνες και πηκτίνη, ανάλογα με την προέλευση (Dashtban et al., 2010). Η κυτταρίνη, το βασικό δομικό συστατικό όλων των φυτών και το πιο άφθονο οργανικό πολυμερές στη γη, είναι ένα γραμμικό βιοπολυμερές μονάδων γλυκόζης συνδεδεμένων με β-1,4- γλυκοζιδικούς δεσμούς. Οι ημικυτταρίνες είναι ετερογενή πολυμερή πεντοζών (όπως η ξυλόζη και η αραβινόζη), εξοζών (όπως η γλυκόζη, η μαννόζη και η γαλακτόζη) και οξέων, και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία που εξαρτάται από την πηγή τους. Η λιγνίνη, το δεύτερο πιο άφθονο βιοπολυμερές στη γη, είναι ένα ετερογενές αρωματικό μακρομόριο, από τριών ειδών αρωματικές αλκοόλες, την κωνιφερυλική αλκοόλη, τη σιναπική αλκοόλη και την π-κουμαρική αλκοόλη. Οι αλκοόλες αυτές σχηματίζουν τις τρεις υπομονάδες από τις οποίες αποτελείται η λιγνίνη, την γουαϊακυλ-, συρινγκυλ- και π-υδροξυφαινυλ- υπομονάδα (Martinez et al., 2005). Οι υπομονάδες αυτές συνδέονται μεταξύ τους με οξειδωτικές αντιδράσεις σύζευξης και σχηματίζουν την εξαιρετικά πολύπλοκη δομή της λιγνίνης, η οποία ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό στα διάφορα φυτά και είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στην αποικοδόμηση (Wong, 2009). Η σύνδεση της λιγνίνης με τα μακρομόρια της κυτταρίνης και των ημικυτταρινών στο φυτικό τοίχωμα παρέχει στα φυτά ένα αδιαπέραστο φράγμα. Ωστόσο, αν και η λιγνίνη είναι ανθεκτική στη μικροβιακή αποικοδόμηση, κάποιοι μικροοργανισμοί παράγουν τα κατάλληλα ένζυμα για να την αποικοδομήσουν. Οι βασιδιομύκητες λευκής σήψης είναι οι πιο ισχυροί αποικοδομητές της λιγνίνης, και η πιο καλά μελετημένη μικροβιακή ομάδα σε ότι αφορά τη μικροβιακή αποικοδόμηση των φυτικών προϊόντων.

### 1.2.2 Μύκητες που παράγουν λιγνινολυτικά ένζυμα

---

Οι μύκητες που μπορούν να παράγουν τα απαραίτητα ένζυμα για την αποικοδόμηση της λιγνίνης είναι πολλοί, και περιλαμβάνουν τόσο ασκομύκητες (όπως ο *Trichoderma reesei*) όσο και βασιδιομύκητες, τόσο λευκής σήψης (όπως ο *Phanerochaete chrysosporium*) όσο και καφέ σήψης (όπως ο *Fomitopsis palustris*). Η αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας από τους μύκητες αυτούς πραγματοποιείται από πολύπλοκα μίγματα κυτταρινασών, ημικυτταρινασών και λιγνινολυτικών ενζύμων. Οι λιγνινολυτικοί μύκητες ακολουθούν δύο εναλλακτικές στρατηγικές για την αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας: είτε διασπούν ταυτοχρόνως όλα τα συστατικά της, όπως οι μύκητες *Trametes versicolor*, *P. chrysosporium* και *Irpex lacteus*, είτε αποικοδομούν επιλεκτικά τη

λιγνίνη, όπως οι *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phlebia* spp και *Dichomitus squalens*. Οι επιλεκτικοί αποικοδομητές της λιγνίνης είναι προτιμητέοι σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές που απαιτούν την απομόνωση άθικτων ινών κυτταρίνης, όπως είναι η βιομηχανία βιοκαυσίμων και η βιομηχανία χαρτιού (Mai et al., 2004). Οι ασκομύκητες διασπούν κυρίως την ημικυτταρίνη και την κυτταρίνη, αφού η ικανότητά τους να διασπούν τη λιγνίνη είναι περιορισμένη (Martinez et al., 2005). Ωστόσο κάποια στελέχη, μεταξύ αυτών και ο φυτοπαθογόνος μύκητας *Fusarium oxysporum* ή ο *F. solani* παράγουν τα κατάλληλα ένζυμα για την αποικοδόμηση της λιγνίνης.

Τα ένζυμα αποικοδόμησης της λιγνίνης κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις φαινολοξειδάσες, όπως είναι η λακκάση (EC 1.10. 3.2), και τις υπεροξειδάσες της αίμης, όπως η υπεροξειδάση που εξαρτάται από το μαγγάνιο (MnP, EC 1.11.1.13), η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP, EC 1.11.1.14) και η ευέλικτη υπεροξειδάση (VP, EC 1.11.1.16) (Martinez et al., 2005), αλλά και μια κατηγορία υπεροξειδασών που έχουν ονομαστεί υπεροξειδάσες αποικοδόμησης βαφών (Dye-decolorizing peroxidases, DyP's, EC 1.11.1.19). Το ενζυμικό σύστημα αποικοδόμησης της λιγνίνης ολοκληρώνεται με μια σειρά επιπλέον βοηθητικών ενζύμων, όπως οι οξειδάσες των αρυλ- αλκοολών (EC 1.1.3.7), οι οξειδάσες του γλυοξυλικού (EC 1.2.3.5) και η οξειδάση της 1-γλυκόζης (EC 1.1.3.4), τα οποία παράγουν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που είναι απαραίτητο για τη δράση των υπεροξειδασών (Ander and Marzullo, 1997). Σε γενικές γραμμές, οι λακκάσες χρησιμοποιούν ως δέκτη ηλεκτρονίων το μοριακό οξυγόνο, ενώ οι υπεροξειδάσες το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι μύκητες που αποικοδομούν τη λιγνίνη εκκρίνουν ένα ή περισσότερα από τα ένζυμα αυτά, σε συνδυασμό με άλλες ενώσεις που είναι απαραίτητες. Για παράδειγμα, ο *P. chrysosporium* παράγει αρκετά ένζυμα με ενεργότητα υπεροξειδάσης, αλλά όχι λακκάσες, σε συνδυασμό με μια οξειδάση του γλυοξυλικού οξέος, η δράση της οποίας παρέχει το απαραίτητο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για τη δράση των υπεροξειδασών (Singh and Chen, 2008, Kersten, 1990). Η υπεροξειδάση της λιγνίνης, αν και διαθέτει ικανότητα οξειδωσης του μη φαινολικού κομματιού της λιγνίνης, που αποτελεί το 80-90% αυτής, απουσιάζει από πολλούς λιγνινολυτικούς μικροοργανισμούς. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η αποικοδόμηση της λιγνίνης μπορεί να επιτευχθεί με πολλές εναλλακτικές ενζυμικές στρατηγικές. Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των αρχικών σταδίων της μυκητιακής αποικοδόμησης του ξύλου έχουν δείξει ότι τα λιγνινολυτικά ένζυμα είναι πολύ ογκώδη για να εισχωρήσουν στους πόρους του ξύλου (Srebotnik et al., 1988). Έτσι έχει προταθεί η υπόθεση ότι η αποικοδόμηση ξεκινά με οξειδωτικά μόρια μικρού μοριακού βάρους, τα οποία διαχέονται και είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία οπών στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα, μέσω των οποίων τα οξειδωτικά ένζυμα θα μπορέσουν να προσεγγίσουν τα μακρομόρια-στόχους (Srebotnik et al., 1988). Στον Πίνακα 1.2.1 φαίνονται τα βασικά χαρακτηριστικά των κυριότερων λιγνινολυτικών ενζύμων.

**Πίνακας 1.2.1:** Τα βασικά χαρακτηριστικά των κυριότερων λιγνινολυτικών ενζύμων (Dashtban et al., 2010)

Ένζυμο	Φαινολοξειδάσες Λακκάσες	Υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP)	Υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP)	Ευέλικτη υπεροξειδάση (VP)
<b>Αντίδραση</b>	4 βενζενεδιόλη + O <sub>2</sub> = 4 βενζο-σεμικινόνη + 2 H <sub>2</sub> O	1,2-δισ(3,4-Διμεθοξυφαινυλ)π ροπαν-1,3-διόλη	2Mn(II) + 2H <sub>2</sub> O = 2Mn(III) + 2H <sub>2</sub> O	δότης + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = οξειδωμένος δότης + 2H <sub>2</sub> O

+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 3,4-  
διμεθοξυβενζαλδεΐ  
δη+ 1-  
(3,4-  
διεθοξυφαινυλ)αιθ  
αν-1,2-διόλη  
+ H<sub>2</sub>O

(π.χ. reactive  
black 5 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
= οξειδωμένο  
reactive black 5  
+  
2H<sub>2</sub>O)

<b>Προσθετική ομάδα</b>	-	Αίμη	Αίμη	Αίμη
<b>Μέταλλα Ιόντα</b>	ή Ca <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Ιμιδαζόλιο K <sup>+</sup> K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Mn <sup>2+</sup> Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Σίδηρος	Ca <sup>2+</sup> Cd <sup>2+</sup> Mn <sup>2+</sup> Sm <sup>3+</sup>	Mn <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup> Σίδηρος
<b>Μεσολαβητές</b>	Φαινόλες, ανιλίνη, ABTS, HBT και άλλα	Βερατρυλική αλκοόλη	Οργανικά οξέα, θειόλες, ακόρεστα λιπαρά οξέα	Βερατρυλική αλκοόλη
<b>Υπομονάδες και μοριακό βάρος</b>	Μονομερείς (43-100), διμερείς, τριμερείς και ολιγομερείς	Μονομερείς (37-50)	Μονομερείς (32-62,5)	Μονομερείς
<b>Θερμοκρασία δράσης</b>	20-80	35-55	30-60	Άγνωστο
<b>pH δράσης</b>	2-10	1-5	2,5-6,8	3-5
<b>Τοποθεσία</b>	Κυρίως εξωκυτταρική	Εξωκυτταρική	Εξωκυτταρική	Εξωκυτταρική
<b>Γλυκοζυλίωση</b>	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
<b>Αναφορές</b>	Wesenberg et al., 2003, Chang et al., 2009, Asgher et al., 2008, Hilden et al., 2009	Wesenberg et al., 2003, Chang et al., 2009, Asgher et al., 2008, Hammel and Cullen, 2008	Wesenberg et al., 2003, Chang et al., 2009, Asgher et al., 2008, Baborova et al., 2006	Chang et al., 2009, Davila-Vazquez et al., 2005

Τα λιγνινολυτικά ένζυμα (LME's) διαθέτουν επίσης την ικανότητα αποικοδόμησης διαφόρων ξενοβιοτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των βαφών, χλωροφαινολών, πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAH's), οργανοφωσφορικών ενώσεων και φαινολών (Wesenberg et al., 2003). Το υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό των λιγνινολυτικών ενζύμων και η ικανότητά τους να αποικοδομούν ανθεκτικούς ρυπαντές, τις καθιστά πολύτιμα εργαλεία σε μια ποικιλία εφαρμογών, όπως η λεύκανση του χαρτοπολτού (Call and Call, 2005), η βιοεξυγίανση μέσω της αποικοδόμησης

βιομηχανικών βαφών (Mehta 2012), η επεξεργασία υγρών αποβλήτων και η αποικοδόμηση των ζιζανιοκτόνων (Pizzul et al., 2009). Έτσι, το ερευνητικό ενδιαφέρον για τη μελέτη των ιδιοτήτων τους και για τη δοκιμή τους σε διάφορες εφαρμογές αυξάνεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια.

### 1.2.3 Λακκάσες

---

Οι λακκάσες απομονώθηκαν για πρώτη φορά από το δέντρο *Rhus vernicifera*, το ιαπωνικό δέντρο από το οποίο παράγεται η λάκα (Yoshida, 1883), ενώ λίγα χρόνια μετά διαπιστώθηκε και η ύπαρξή της στους μύκητες (Bertrand, 1896). Οι λακκάσες (benzenediol:oxygen oxidoreductases, EC 1.10.3.2) ανήκουν τις πολυφαινολοξειδάσες που περιέχουν άτομα χαλκού στο ενεργό τους κέντρο και αναφέρονται συχνά ως multicopper oxidases (MCO's). Οι χαλκοί συνήθως κατατάσσονται σε τρεις τύπους, ένας από τους οποίους δίνει το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα των λακκασών. Παρόμοια ένζυμα στα οποία λείπει ο χαλκός που δίνει το μπλε χρώμα αναφέρονται συχνά ως «κίτρινες» ή «λευκές» λακκάσες. Οι λακκάσες καταλύουν την αναγωγή του οξειδίου σε νερό, συνοδευόμενη από την οξείδωση του υποστρώματος, συνήθως μιας π-διυδροξυφαινόλης ή κάποιου άλλου φαινολικού μορίου. Η ταυτοποίηση των λακκασών με βάση τα υποστρώματα που οξειδώνουν είναι εξαιρετικά δύσκολη, εξαιτίας του πολύ μεγάλου εύρους υποστρωμάτων τα οποία μπορούν να οξειδώσουν, τα οποία διαφέρουν σημαντικά από ένζυμο σε ένζυμο, και επιπλέον επικαλύπτονται με τα υποστρώματα άλλων ενζύμων, όπως των μονοφαινολοξειδασών και της τυροσινάσης. Η συρινγκαλδαζίνη (N,N'-δισ-(3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζυλιδεν-υδραζίνη) θεωρείται αποκλειστικό υπόστρωμα των λακκασών (Harkin et al., 1974), υπό την προϋπόθεση ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου απουσιάζει από την αντίδραση, καθώς το υπόστρωμα αυτό οξειδώνεται επίσης και από τις υπεροξειδάσες. Συνοπτικά, η λακκάση καταλύει την οξείδωση πολυφαινολών, μεθοξυ-υποκατεστημένων φαινολών, αρωματικών διαμινών και πολλών άλλων μορίων, αλλά όχι της τυροσίνης, η οποία θεωρείται αποκλειστικό υπόστρωμα των τυροσινασών.

Οι λακκάσες τυπικά βρίσκονται σε φυτά και μύκητες. Οι φυτικές λακκάσες συμμετέχουν στη δημιουργία ελεύθερων ριζών που πολυμερίζονται για να σχηματίσουν τη λιγνίνη του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος (Liu et al., 1994, Boudet, 2000), ενώ στους μύκητες πιθανώς εμπλέκονται σε φυσιολογικές λειτουργίες όπως η μορφογένεση, οι αλληλεπιδράσεις παθογόνων μυκήτων με τα φυτά-ξενιστές τους, στην άμυνα έναντι περιβαλλοντικού στρες και στην αποικοδόμηση της λιγνίνης (Thurston, 1994). Τα βακτηριακά ένζυμα που έχουν χαρακτηριστεί ως λακκάσες εντοπίζονται συνήθως ενδοκυτταρικά ή στον περιπλασματικό χώρο (Claus, 2003). Σε ότι αφορά τις μυκητιακές λακκάσες, υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με την παραγωγή τους από ασκομύκητες, συνήθως από φυτοπαθογόνα είδη όπως το *Gaeumannomyces graminis* (Edens et al., 1999), *Magnaporthe grisea* (Iyer and Chato, 2003), *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen et al., 2002), *Neurospora crassa* (Froehner and Eriksson, 1974) και *Podospira anserina* (Molitoris and Esser, 1970), αλλά και εδαφικά είδη, όπως τα *Aspergillus*, *Curvularia* και *Penicillium* (Banerjee and Vohra, 1991, Rodriguez et al., 1996). Σε ασκομύκητες που ανήκουν στα γένη *Trichoderma* και *Botryosphaeria* έχουν εντοπιστεί επίσης ένζυμα με ενεργότητα λακκάσης, τα οποία όμως φαίνεται να συμμετέχουν στη μορφογένεση των μυκήτων αυτών, και ειδικά των σπορίων τους. Σχετικά με την εξάπλωσή τους σε είδη βασιδιομυκήτων, οι λακκάσες έχουν εντοπιστεί σε βασιδιομύκητες λευκής σήψης και σαπρότροφους οργανισμούς. Σχεδόν όλα τα είδη βασιδιομυκήτων λευκής σήψης έχει αναφερθεί ότι παράγουν λακκάσες, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό (Hatakka, 2001). Για παράδειγμα, η λακκάση του

*Rychnororus cinnabarinus* είναι το μόνο λιγνινολυτικό ένζυμο του οργανισμού αυτού (Eggert et al., 1996).

Λόγω της φύσης του υποστρώματός τους, οι λακκάσες θα πρέπει να είναι αποκλειστικά εξωκυτταρικές, και όντως αυτό φαίνεται να ισχύει για την πλειοψηφία των ενζύμων που έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα. Ωστόσο, υπάρχουν και κάποιες εξαιρέσεις, όπως για παράδειγμα οι λακκάσες του βασιδιομύκητα *Irpex lacteus*, οι οποίες είναι αποκλειστικά συνδεδεμένες με το κυτταρικό τοίχωμα, ή του *Trichoderma* spp., οι οποίες εντοπίζονται στα σπόρια (Holker et al., 2002). Οι λακκάσες αυτές θεωρείται ότι συμμετέχουν στο σχηματισμό της μελανίνης και άλλων προστατευτικών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος (Eggert et al., 1995).

Αν και η αποικοδόμηση της λιγνίνης και ο μεταβολισμός των χουμικών οξέων είναι ο βασικότερος βιολογικός ρόλος των λακκασών στο οικοσύστημα, υπάρχουν και άλλες βιολογικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται. Μια από αυτές είναι η αλληλεπίδραση των μυκήτων με άλλους μικροοργανισμούς, μεταξύ άλλων με τους εδαφικούς μύκητες, όπως ο *Trichoderma* sp., αλλά και βακτήρια. Η διαδικασία αυτές συνήθως συνοδεύονται από μια έντονη επαγωγή της έκφρασης λακκασών, η οποία άλλον είναι γενικευμένη στους βασιδιομύκητες (Baldrian, 2004) αλλά έχει παρατηρηθεί επίσης και στο μύκητα *R. solani* όταν έρθει σε επαφή με βακτήρια του γένους *Pseudomonas* τα οποία παράγουν αντιμυκητιακές ουσίες (Crowe and Olsson, 2001). Η αλληλεπίδραση αυτή πιθανώς περιλαμβάνει τη βιοσύνθεση ουσιών όπως οι μελανίνες ή άλλες ουσίες, που συμμετέχουν στην παθητική άμυνα ενάντια σε εδαφικά βακτήρια και μύκητες (Eggert et al., 1995, Baldrian et al., 2004). Οι λακκάσες επίσης μπορούν να είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση φαινολικών αντιβιοτικών που παρεμποδίζουν την μυκητιακή ανάπτυξη.

#### 1.2.3.1 Δομικά χαρακτηριστικά

---

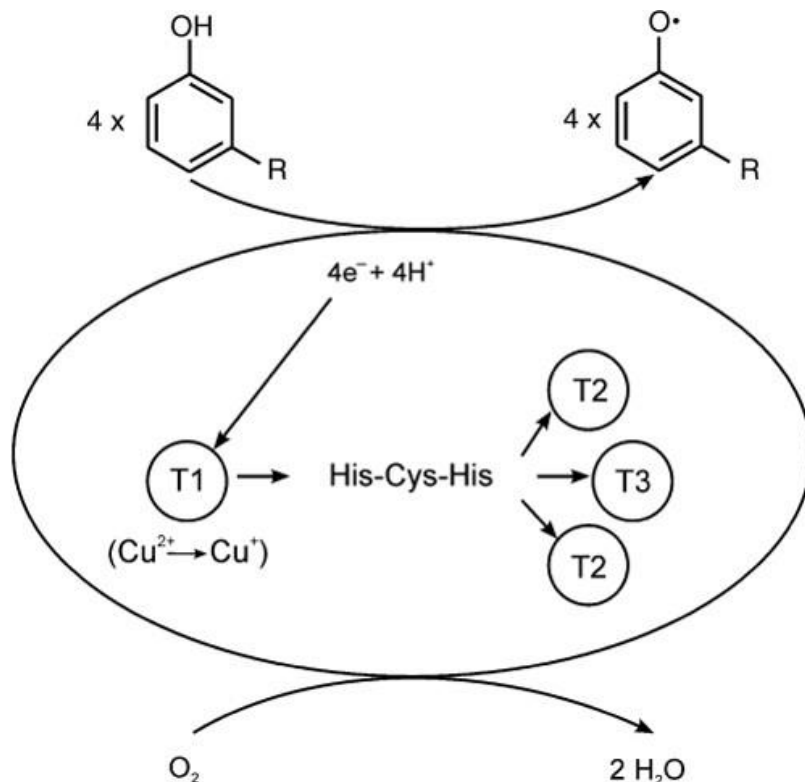
Οι συνήθεις μυκητιακές λακκάσες είναι πρωτεΐνες μεγέθους 60-70 kDa με όξινα ισοηλεκτρικά σημεία κοντά στο pH 4. Ωστόσο, στις λακκάσες των ασκομυκήτων φαίνεται να υπάρχει ιδιαίτερη ετερογένεια, ειδικά σε ότι αφορά το μοριακό βάρος τους. Αρκετά είδη μυκήτων παράγουν μια μεγάλη ποικιλία ισοενζύμων. Για παράδειγμα, ο *P. ostreatus* παράγει τουλάχιστον 8 ισοένζυμα με δράση λακκάσης, έξι από τα οποία έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί (Giardina et al., 1996, 1999, Palmieri et al., 2003). Το κυριότερο ένζυμο είναι η ΡΟΧC με μοριακό βάρος 59 kDa και pI 2,9. Τα ισοένζυμα ΡΟΧA2, ΡΟΧB και ΡΟΧB2 εμφανίζουν παρόμοια μοριακά βάρη στα 67 kDa, ενώ οι ΡΟΧA1b και ΡΟΧA1w είναι μικρότερες (61 kDa). Τα ένζυμα ΡΟΧA3a και ΡΟΧA3b είναι ετεροδιμερή και αποτελούνται από μια μεγάλη υπομονάδα των 61 kDa και μια μικρή υπομονάδα των 16 ή 18 kDa. Η μοριακή βάση της ύπαρξης διαφορετικών ισοενζύμων λακκασών στους μύκητες βρίσκεται στο γονιδίωμά τους, όπου συνήθως απαντώνται πολλαπλά γονίδια λακκασών (Castanera et al., 2012).

Η συντριπτική πλειοψηφία των λακκασών είναι μονομερείς πρωτεΐνες. Κάποιες λακκάσες έχουν δομή ομοδιμερούς, το οποίο αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες, όπως στην περίπτωση των λακκασών του *Phellinus ribis* (Min et al., 2001), *Pleurotus pulmonarius* (Souza and Peralta, 2003), *Trametes villosa* (Yaver et al., 1996), και του ασκομύκητα *Rhizoctonia solani* (Wahleithner et al., 1996). Ειδικά για την περίπτωση του *P. ostreatus*, όλες οι λακκάσες του που έχουν χαρακτηριστεί είναι μονομερείς πρωτεΐνες, εκτός από τις ΡΟΧ3a και ΡΟΧ3b, οι οποίες, όπως αναφέρθηκε, αποτελούνται από δύο υπομονάδες.



Όπως τα περισσότερα εξωκυτταρικά ένζυμα των μυκήτων, οι λακκάσες είναι γλυκοπρωτεΐνες. Ο βαθμός γλυκοζυλίωσής τους συνήθως ποικίλλει μεταξύ του 10% και του 25%, αν και έχουν βρεθεί και ένζυμα που παρεκκλίνουν από αυτό το εύρος, όπως η λακκάση του *Coriolopsis fulvocinnerea*, με ποσοστό 32% (Shleev et al., 2004) και του *P. pulmonarius* με ποσοστό 44% (Souza and Peralta, 2003). Η γλυκοζυλίωση των μυκητιακών λακκασών είναι ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που δημιουργούνται κατά την ετερόλογη έκφραση των ενζύμων αυτών, και είναι εξαιρετικά δύσκολο να ξεπεραστεί. Η γλυκοζυλίωση, εκτός από την προστασία που προσφέρει στα εξωκυτταρικά ένζυμα έναντι των πρωτεασών, σταθεροποιεί επιπλέον και τη δομή των ενζύμων (Yoshitake et al., 1993).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι λακκάσες καταλύουν την οξειδωση ενός ηλεκτρονίου του υποστρώματος ταυτόχρονα με την αναγωγή τεσσάρων ηλεκτρονίων από το μοριακό οξυγόνο στο νερό (Messerschmidt, 1997). Οι μπλε λακκάσες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη τουλάχιστον ενός χαλκού Τύπου I, μαζί με τουλάχιστον δύο χαλκούς Τύπου III και έναν χαλκό Τύπου II, οι οποίοι είναι οργανωμένοι σε ένα τρι-πυρηνικό κέντρο. Τα διαφορετικά κέντρα του χαλκού μπορούν να ταυτοποιηθούν από τις οπτικές τους ιδιότητες. Ο χαλκός T1 χαρακτηρίζεται από μια έντονη ζώνη απορρόφησης στα 600 nm, ενώ ο χαλκός T2 εμφανίζει ασθενή μόνο απορρόφηση στο ορατό φάσμα. Τα υποστρώματα οξειδώνονται από τον χαλκό T1 και τα ηλεκτρόνιά τους μεταφέρονται, πιθανώς μέσω ενός συντηρημένου τριπεπτιδίου His-Cys-His στους χαλκούς T2/T3, όπου το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σε νερό (Messerschmidt, 1997). Κάποια ένζυμα δεν διαθέτουν T1 χαλκό, και έτσι χαρακτηρίζονται «κίτρινες» λακκάσες, εξαιτίας της έλλειψης της χαρακτηριστικής ζώνης απορρόφησης στα 600 nm (Leontievsky et al., 1997).



**Εικόνα 1.2.1:** Ο καταλυτικός κύκλος της λακκάσης (Baldrian, 2006).

Αν και υπάρχουν διαθέσιμες δομές για αρκετές λακκάσες, όπως του *Coprinus cinereus* (Ducros et al., 1998), *T. versicolor* (Piontek et al., 2002), *P. cinnabarinus* (Antorini et al., 2002), *M. albomyces* (Hakulinen et al., 2002) και *R. lignosus* (Garavaglia et al., 2004), ο μηχανισμός της μεταφοράς

ηλεκτρονίων και της αναγωγής του οξυγόνου δεν είναι γνωστοί. Μια λεπτομερής δομική μελέτη μεταξύ της λακκάσης χαμηλού δυναμικού ( $E_0$ ) του *C. cinereus* και της λακκάσης υψηλού δυναμικού του *T. versicolor* αποκάλυψε δομικές διαφορές που εντοπίζονται στη διαμόρφωση του χαλκού T1, και πιθανώς είναι υπεύθυνες για τη διαφορά δυναμικού (Piontek et al., 2002). Ακόμη, η «λευκή» λακκάση του *P. ostreatus* έχει ένα μόνο άτομο χαλκού, μαζί με δύο άτομα ψευδαργύρου και ένα άτομο σιδήρου (Palmieri et al., 1997). Μελλοντικές δομικές μελέτες πιθανώς θα δείξουν ότι οι λακκάσες χαρακτηρίζονται από πολύ μεγαλύτερη ετερογένεια από ότι πιστεύεται μέχρι σήμερα.

### 1.2.3.2 Καταλυτικά χαρακτηριστικά

---

Οι λακκάσες καταλύουν την αναγωγή του  $O_2$  σε  $H_2O$  οξειδώνοντας ταυτόχρονα ένα μεγάλο εύρος φαινολικών υποστρωμάτων, εκτός της τυροσίνης, χρησιμοποιώντας τα σαν δότες ηλεκτρονίων (Thurston 1994). Ωστόσο, οι λακκάσες μοιράζονται κοινούς δότες ηλεκτρονίων με τις τυροσινάσες, καθιστώντας τη διάκριση μεταξύ των δύο ενζύμων πολύ δύσκολη. Επιπλέον, η αλληλεπικάλυψη της δραστηριότητας των λακκασών με τις μονοφαινολ-μονοξυγενάσες και την οξειδάση της κατεχόλης (1,2-benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.1), περιπλέκει ακόμη περισσότερο τον σαφή διαχωρισμό των ενζύμων αυτών. Σε γενικές γραμμές, έχουν επικρατήσει στη βιβλιογραφία δύο κριτήρια για να χαρακτηριστεί ένα ένζυμο ως πραγματική λακκάση: να οξειδώνει την συρινγκαλδαζίνη, αλλά όχι την τυροσίνη (Thurston, 1994).

Οι λακκάσες χαρακτηρίζονται από υψηλά οξειδωτικά δυναμικά ( $E_0$ ) με τιμές που ξεκινούν από 450-480 mV για τη λακκάση του *M. thermophila* έως 760-790 mV για τη λακκάση του *Polyporus pinsitus* (Solomon et al., 1996, Xu, 1996, Xu et al., 2000). Οι τιμές των καταλυτικών τους σταθερών κυμαίνονται για το  $K_m$  από μερικά  $\mu M$  για την συρινγκαλδαζίνη και το ABTS έως μερικές εκατοντάδες  $\mu M$  για την 2,6 DMP και τη γουαϊακόλη. Η καταλυτική τους απόδοση που εκφράζεται ως  $k_{cat}$  μπορεί να κυμαίνεται σε αρκετές τάξεις μεγέθους για διαφορετικά υποστρώματα και συνήθως είναι χαρακτηριστική για κάθε πρωτεΐνη. Οι λακκάσες γενικά συνδυάζουν υψηλή συγγένεια για το ABTS και τη συρινγκαλδαζίνη με υψηλές τιμές  $k_{cat}$ , ενώ η οξειδωση της 2,6 DMP και της γουαϊακόλης είναι αρκετά πιο αργή και συνοδεύεται από υψηλότερες τιμές  $K_m$ . Οι χαμηλές τιμές  $K_m$  είναι επίσης χαρακτηριστικές για το σιναπικό οξύ, την υδροκινόνη και το συρινγικό οξύ, ενώ σχετικά υψηλές τιμές παρατηρούνται για τις παρα-υποκατεστημένες φαινόλες, το βανιλικό οξύ ή την αντίστοιχη αλδεΐδη. Οι λακκάσες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την προτίμησή τους σε όρθο-μέτα- ή πάρα- υποκατεστημένες φαινόλες. Οι όρθο-υποκατεστημένες φαινόλες, όπως η γουαϊακόλη, η ο-φαιτυλενεδιαμίνη, το καφεϊκό οξύ, η διυδροξυφαιτυλαμίνη, το πρωτοκατεχουϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ και η πυρογαλλόλη φάνηκαν να είναι καλύτερα υποστρώματα σε σχέση με τα παρα-υποκατεστημένα (π-φαιτυλενεδιαμίνη, ρεζορκινόλη και άλλα) για τα παρασκευάσματα λακκάσης από τους μύκητες *L. litschaueri* και *P. brumalis* (Blaich and Esser, 1975). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί και με τις λακκάσες του *T. versicolor*, και των ασκομυκήτων *P. anserina* και *Pyricularia oryzae*, ενώ η λακκάση από τον *Ganoderma lucidum* καταλύει την οξειδωση μόνο των όρθο- και πάρα- διυδροξυφαιτυλ- ενώσεων, όπως η π-φαιτυλενεδιαμίνη και κάποιες πολυφαινόλες, όχι όμως τα μετα-υδροξυμέθυλ- παράγωγα ή το ασκορβικό οξύ (Fahraeus, 1961, Fahraeus & Ljunggren, 1961). Παρουσία μορίων μεσολαβητών, οι λακκάσες μπορούν επίσης να οξειδώσουν το  $Mn^{2+}$ .

Οι μυκητιακές λακκάσες συνήθως έχουν βέλτιστες τιμές pH δράσης σε όξινα pH. Ενώ τα βέλτιστα pH για την οξειδωση του ABTS είναι σε γενικές γραμμές κάτω του 4, για άλλες ενώσεις όπως η 2,6 DMP, η γουαϊακόλη και η συρινγκαλδαζίνη, οι τιμές αυτές είναι από 4 έως 7. Οι θερμοκρασίες δράσης των λακκασών συνήθως δεν αποκλίνουν πολύ από άλλα εξωκυτταρικά λιγνιολυτικά ένζυμα με βέλτιστες τιμές από 50-70 °C, αν και έχουν περιγραφεί και ένζυμα με βέλτιστες τιμές εκτός του εύρους αυτού, όπως η λακκάση του *G. lucidum* με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 25 °C (Ko et al., 2001). Η σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες ωστόσο ποικίλλει πολύ. Ο χρόνος ημιζωής στους 50 °C μπορεί να κυμαίνεται από μερικά λεπτά, όπως ισχύει για τη λακκάση του *B. cinnerea* (Slomczynski et al., 1995), πάνω από 2-3 ώρες για τις λακκάσες των *L. edodes* και *A. bisporus* (Wood, 1980, D'Annibale et al., 1996), έως και 50-70 ώρες για τη λακκάση του *Trametes* sp. (Smirnov et al., 2001).

Κάποια μόρια μικρού μοριακού βάρους, τα οποία οξειδώνονται από τη λακκάση σε ρίζες, μπορούν να λειτουργήσουν σαν μεσολαβητές, οξειδώνοντας με τη σειρά τους άλλες ενώσεις, οι οποίες κανονικά δεν μπορούν να οξειδωθούν από το ένζυμο. Ένα παράδειγμα τέτοιων ενώσεων είναι αυτές που ανήκουν στο μη φαινολικό κλάσμα της λιγνίνης, το οποίο κανονικά δεν οξειδώνεται από τις λακκάσες, αλλά τα μόρια μεσολαβητές μπορούν να διαχυθούν σε σημεία που δεν είναι προσβάσιμα από το ένζυμο και να επιφέρουν οξειδωτικές αλλαγές στο πολυμερές. Στη φύση, οι ενώσεις που παίζουν το ρόλο των μεσολαβητών μπορεί να είναι μικρομοριακές ενώσεις που προκύπτουν από την αποικοδόμηση της ίδιας της λιγνίνης από τα οξειδωτικά ένζυμα (Camarero et al., 2005). Μόρια-μεσολαβητές που απαντώνται στη φύση μπορεί να είναι το 3-υδροξυανθρανιλικό οξύ, η φαινόλη, η ανιλίνη, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και η 4-υδροξυβενζυλ-αλκοόλη (Johannes and Majcherczyk, 2000). Άλλοι φυσικοί μεσολαβητές περιλαμβάνουν μόρια-παράγωγα των μονομερών της λιγνίνης, όπως η συρινγκαλδεΐδη, η ακετοσυρινγκόνη, η βανιλίνη, η ακετοβανιλλόνη, και το π-κουμαρικό οξύ (Camarero et al., 2005). Ακόμη, έχει μελετηθεί και η χρήση συνθετικών μορίων που μπορούν να δράσουν ως μεσολαβητές, όπως το ABTS, TEMPO, 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο, το βιολογικό οξύ και άλλα (Bourbonnais et al., 1997).

#### 1.2.3.3 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των λακκασών στην περιβαλλοντική βιοτεχνολογία

---

Οι λακκάσες εμφανίζουν μια σειρά πλεονεκτημάτων που τις καθιστούν πολύτιμα εργαλεία σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Αρχικά, εμφανίζουν χαμηλή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, γεγονός που τους επιτρέπει να οξειδώνουν μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων ξενοβιοτικών ουσιών, όπως τα χλωριωμένα φαινολικά παράγωγα (Bollag et al., 2003), συνθετικές βαφές (Rodriguez et al., 1999), ζιζανιοκτόνα (Torres et al., 2003), και πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Johannes et al., 1996). Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη λεύκανση του χαρτοπολτού (Bourbonnais and Paice, 1996), ή στην αποτιξοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων όπως τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου (Tsioupras et al., 2002).

Ωστόσο, το χαμηλό οξειδωτικό δυναμικό των λακκασών (450-800 mV) σε σχέση με τις αντίστοιχες λιγνιολυτικές υπεροξειδάσες (>1V) επιτρέπει μόνο την άμεση αποικοδόμηση ενώσεων χαμηλού οξειδωτικού δυναμικού, και όχι των πιο ανθεκτικών αρωματικών ενώσεων, στις οποίες περιλαμβάνονται κάποιες συνθετικές βαφές και οι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) (Xu et al., 1996). Το πρόβλημα αυτό θα μπορούσε εν μέρει να αντιμετωπιστεί με τη χρήση

μορίων μεσολαβητών. Ωστόσο, η χρήση τους σε βιομηχανική κλίμακα δεν έχει επιτευχθεί ακόμη, κυρίως λόγω του υψηλού κόστους της παραγωγής των μορίων αυτών. Το πρόβλημα αυτό θα μπορούσε να λυθεί με τη χρήση φυσικών μεσολαβητών οι οποίοι μπορούν να απομονωθούν από φυσικά υποστρώματα, όπως αγροτοβιομηχανικά απόβλητα.

Τέλος, οι λακκάσες μπορούν να ακινητοποιήσουν εδαφικούς ρυπαντές σε χουμικές ενώσεις, μια διαδικασία παρόμοια με τη σύνθεση των χουμικών οξέων στη φύση. Τα ξενοβιοτικά που μπορούν να ακινητοποιηθούν με τον τρόπο αυτό περιλαμβάνουν φαινολικές ενώσεις και ανιλίνες, όπως η 3,4-διχλωροανιλίνη, το 2,4,6-τρινιτριτολουένιο ή χλωριωμένες φαινόλες (Baldrian, 2006). Η ακινητοποίηση μειώνει τη βιολογική διαθεσιμότητα των ξενοβιοτικών και άρα την τοξικότητά τους.

#### A) Εφαρμογές των λακκασών στην οργανική σύνθεση

Η οργανική σύνθεση των περισσότερων χημικών ενώσεων έχει αρκετά μειονεκτήματα, τα οποία περιλαμβάνουν το υψηλό κόστος των πρόδρομων ενώσεων, πολύπλοκες αντιδράσεις πολλών σταδίων και την τοξικότητα των αντιδραστηρίων, η οποία οδηγεί σε επιβλαβείς περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Γι' αυτό το λόγο γίνεται μια προσπάθεια τις τελευταίες δεκαετίες να αντικατασταθούν, όπου είναι δυνατό, οι χημικές μέθοδοι σύνθεσης με ενζυμικές αντιδράσεις, οι οποίες συνήθως πραγματοποιούνται σε πιο ήπιες συνθήκες και είναι πιο φιλικές προς το περιβάλλον. Η λακκάσες, για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, έχουν δοκιμαστεί ευρέως σε εφαρμογές οργανικής σύνθεσης, σε πολλές περιπτώσεις με εξαιρετικά αποτελέσματα.

#### B) Χρήση των λακκασών για παραγωγή πολυμερών και τροποποίησή τους

Ο ενζυμικός πολυμερισμός με χρήση λακκασών συγκεντρώνει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, επειδή οι λακκάσες, ή το σύστημα λακκάσης-μεσολαβητή (Laccase-Mediator System, LMS), μπορούν να συνθέσουν πολυμερή μόρια τα οποία είναι δύσκολο ή και αδύνατο να συντεθούν μέσω χημικής σύνθεσης, σε ένα μόνο στάδιο. Για παράδειγμα, η ικανότητα πολυμερισμού των λακκασών έχει εφαρμοστεί σε μονομερή κατεχόλης και γαλλικού οξέος για την παραγωγή πολυμερών (Aktas and Tanyolac, 2003, Lopez et al., 2013). Τα πολυμερή αυτά είναι πολύτιμα λόγω των ηλεκτροχημικών τους ιδιοτήτων, ενώ οι εφαρμογές τους, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνουν την κατασκευή χρωματογραφικών στηλών και λεπτών φιλμ για βιοαισθητήρες. Η σύνθεση των πολυμερών αυτών μπορεί να πραγματοποιηθεί επίσης και με υπεροξειδάσες, ωστόσο, τα ένζυμα αυτά χαρακτηρίζονται από χαμηλή σταθερότητα κατά τη χρήση, λόγω της αναγκαίας προσθήκης υπεροξειδίου, το οποίο είναι τοξικό και τελικά τις καταστρέφει (Aktas and Tanyolac, 2003). Η σύνθεση πολυμερών όπως η πολύ(1-ναφθόλη) έχει επίσης επιτευχθεί με τη χρήση λακκασών (Aktas et al., 2001). Το πολυμερές αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε παράγωγα ξύλου, υλικά επιστρώσεων και συγκολλητικές ουσίες (Aktas et al., 2001). Ο ενζυμικός πολυμερισμός πολυφαινολών από τις λακκάσες έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια σαν μια βιώσιμη, μη τοξική εναλλακτική λύση στη χημική τους σύνθεση που απαιτεί τη χρήση φορμαλδεΐδης (Wariishi et al., 2006, Takahara, 2004). Το πολύ(2,6-διμεθυλ-1,4-οξυφαινυλο)-πολύ(φαινυλενοξειδίο) (PPO) χρησιμοποιείται ευρέως ως ένα υψηλής απόδοσης πλαστικό, λόγω των εξαιρετικών χημικών και μηχανικών ιδιοτήτων του. Το PPO κατασκευάζεται από ένα μονομερές 2,3-διμεθυλοφαινόλης, με ένα σύστημα καταλυτών χαλκού/αμίνης. Η 2,6-διμεθυλοφαινόλη μπορεί επίσης να πολυμεριστεί από οξειδωτικά ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση και οι λακκάσες, και να δώσει ένα πολυμερές που να αποτελείται αποκλειστικά από μονάδες 1,4-οξοφαινυλενίου (Ikeda et al., 1996, 1998). Παράγωγα του PPO έχουν παραχθεί επίσης και με τον πολυμερισμό μονάδων 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος, συριγγικού οξέος, και 3,5-

διμεθυλ-4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (Ikeda et al., 1996). Ακόμη, ο πολυμερισμός φλαβονοειδών έχει επιτευχθεί με τη χρήση πολυφαινολοξειδασών και λακκάσων, με αποτέλεσμα προϊόντα με αυξημένη αντιοξειδωτική δράση. Οι λακκάσες επίσης μπορούν να πολυμερίσουν οξειδωτικά το ακρυλαμίδιο, με ή χωρίς μεσολαβητές (Ikeda et al., 1998). Τέλος, η λακκάση έχει χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση συμπολυμερών λιγνίνης (Gubitz and Paulo, 2003). Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι οι λακκάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόσδεση μονάδων φαινολικών οξέων σε ίνες χαρτοπολτού (Lund and Ragauskas, 2001). Η ικανότητα αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για την τροποποίηση ινών με ποικιλία χημικών ενώσεων, με σκοπό την τροποποίηση των ιδιοτήτων τους, και τελικά την κατασκευή υλικών με καινοτόμες ιδιότητες.

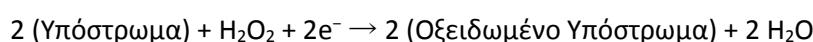
#### Γ) Οξειδωτική τροποποίηση οργανικών ενώσεων

Οι λακκάσες έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης και για τη σύνθεση ενώσεων φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Αρχικά, η σύνθεση της ακτινοσίνης έχει πραγματοποιηθεί με χρήση λακκάσης, από 4-μεθυλ-3-υδροξυανθρανιλικό οξύ. Το μόριο αυτό παρεμποδίζει τη μεταγραφή του DNA των καρκινικών κυττάρων και άρα έχει αντικαρκινική δράση (Burton, 2003). Άλλο παράδειγμα σύνθεσης είναι η οξειδωτική σύζευξη των μορίων καταραντίνη και βιντολίνη για το σχηματισμό βινβλαστίνης, ενός πολύ σημαντικού αντικαρκινικού φαρμάκου, που χρησιμοποιείται ευρέως στην αντιμετώπιση των λευχαιμιών. Πρόκειται για ένα φυσικό προϊόν, που παράγεται από το φυτό *Catharanthus roseus*, αλλά σε μικρές μόνο ποσότητες. Οι πρόδρομες ενώσεις του όμως παράγονται σε μεγαλύτερες ποσότητες και άρα μπορούν να απομονωθούν και να καθαριστούν με σχετικά χαμηλό κόστος. Οι ερευνητές που πέτυχαν τη σύνθεση της βινβλαστίνης με χρήση λακκάσης αναφέρουν αποδόσεις έως και 40% (Yarolon et al., 1994). Ακόμη, οι λακκάσες έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση παραγώγων του αντιβιοτικού κυκλοσπορίνη (Molino et al., 2004), αλλά και για την οξειδωτική μετατροπή κατεχινών. Τα μόρια αυτά είναι οι δομικές μονάδες των ταννινών, οι οποίες θεωρούνται πολύ σημαντικές αντιοξειδωτικές ενώσεις σε διάφορα φυτά, λαχανικά και στο τσάι. Η ικανότητα των κατεχινών να απορροφούν τις ελεύθερες ρίζες τις καθιστά σημαντικές στην πρόληψη του καρκίνου, της φλεγμονής και καρδιαγγειακών ασθενειών. Η οξείδωση της κατεχίνης από τη λακκάση είχε ως αποτέλεσμα μόρια με ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση (Kurisawa et al., 2003). Τέλος, οι λακκάσες έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση παραγώγων διάφορων ορμονών, κυρίως διμερών ή ολιγομερών. Με τη χρήση της λακκάσης έχουν παραχθεί διμερή της φυτοαλεξίνης ρεσβερατρόλης (Nikotra et al., 2004), αλλά και της ισοευγενόλης και της κωνιφερυλικής αλκοόλης (Shiba et al., 2000).

### 1.2.4 Υπεροξειδάσες

---

Οι υπεροξειδάσες καταλύουν την οξείδωση διαφόρων οργανικών και ανόργανων υποστρωμάτων παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο λειτουργεί ως δέκτης ηλεκτρονίων, σύμφωνα με την αντίδραση:



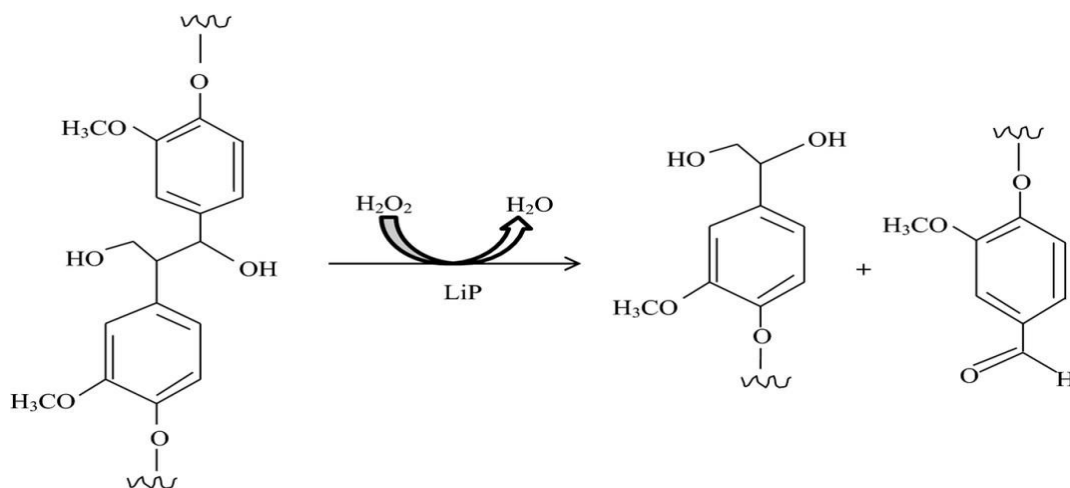
Οι υπεροξειδάσες είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση, μεταξύ άλλων σε φυτά, ζώα, και μικροοργανισμούς (Falade et al., 2016), και διαχωρίζονται ανάλογα με την ύπαρξη ή την απουσία αίμης (πρωτοπορφυρίνης IX) στο ενεργό τους κέντρο. Οι υπεροξειδάσες της αίμης διαχωρίζονται

περαιτέρω σε τρεις κατηγορίες (Welinder, 1992). Η Τάξη I περιλαμβάνει τις ενδοκυτταρικές υπεροξειδάσες, όπως είναι η υπεροξειδάση του κυτοχρώματος C της ζύμης. Η Τάξη II περιλαμβάνει τις εξωκυτταρικές μυκητιακές λακκάσες, όπως είναι η υπεροξειδάση της λιγνίνης, η υπεροξειδάση του μαγγανίου και η ευέλικτη υπεροξειδάση, οι οποίες εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης, ενώ η Τάξη III περιλαμβάνει υπεροξειδάσες φυτικής προέλευσης όπως η υπεροξειδάση HRP, οι οποίες εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

Οι υπεροξειδάσες της αίμης της Τάξης II αναφέρονται ως μυκητιακές ή βακτηριακές. Πρόκειται για εξωκυτταρικά ένζυμα σχετιζόμενα με την αποικοδόμηση της λιγνίνης. Οι υπεροξειδάσες αυτές, κυρίως οι MnP, LiP και VP οξειδώνουν συγκεκριμένα στοιχεία της δομής της λιγνίνης και μπορούν να δράσουν συνεργιστικά εφόσον παράγονται από τον ίδιο μικροοργανισμό. Η MnP οξειδώνει τις φαινολικές ενώσεις της λιγνίνης, η LiP στοχεύει στο μη-φαινολικό κομμάτι της λιγνίνης, ενώ η VP έχει την ικανότητα να οξειδώνει τόσο τις φαινολικές, όσο και τις μη φαινολικές ενώσεις.

#### 1.2.4.1 Υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiPs)

Οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiPs) διαθέτουν υψηλό οξειδωτικό δυναμικό, και ως εκ τούτου μπορούν να οξειδώνουν τις μη φαινολικές δομές της λιγνίνης, οι οποίες αποτελούν έως και το 90% του μακρομορίου (Martinez et al., 2005). Επίσης, χαρακτηρίζονται και από την ικανότητά τους να οξειδώνουν ένα ευρύ φάσμα αρωματικών ενώσεων, και έτσι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της λιγνίνης. Ακόμη, μπορούν να οξειδώσουν και μεγάλη ποικιλία φαινολικών ουσιών (Bariocchi et al., 2001). Η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP, EC 1.11.1.14, diaryl-propane oxygenase), είναι μια αιμοπρωτεΐνη που καταλύει την οξειδωτική αποικοδόμηση της λιγνίνης, εξαρτώμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2.2.



**Εικόνα 1.2.2:** Οξειδωτική διάσπαση των δεσμών της λιγνίνης από την υπεροξειδάση της λιγνίνης (Falade et al., 2016)

Υπεροξειδάση με ενεργότητα LiP απομονώθηκε για πρώτη φορά από το εξωκυτταρικό υγρό των καλλιεργειών *P. chrysosporium* (Tien and Kirk, 1983). Έκτοτε, έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί επίσης και άλλα ένζυμα LiP από τους οργανισμούς *P. chrysosporium*, *Trametes versicolor* (Johansson et al., 1993), *Phlebia radiata* (Moilanen et al., 1996) και *Phanerochaete sordida* (Sugiura et al., 2009). Συγκεκριμένα, από το εξωκυτταρικό υγρό του *P. chrysosporium* έχουν απομονωθεί έξι ισοένζυμα LiP, τα οποία ονομάστηκαν H1, H2, H6, H7, H8 και H10 (Farrell et al., 1989). Ο χαρακτηρισμός τους αποκάλυψε ότι τα ισοένζυμα αυτά διαφέρουν ως προς το ισοηλεκτρικό σημείο, το υδατανθρακικό περιεχόμενο, την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και τη σταθερότητα. Οι αμινοτελικές ακολουθίες τους αποκάλυψαν επίσης σημαντικές αποκλίσεις, ένδειξη ότι τα ένζυμα αυτά κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος του *P. chrysosporium* αποκάλυψε την ύπαρξη 10 γονιδίων που κωδικοποιούν για LiPs, και έτσι επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των ισοενζύμων (Martinez et al., 2004).

#### A) Δομικά χαρακτηριστικά

Δομικά, η LiP είναι μια μονομερής αιμοπρωτεΐνη σφαιρικού σχήματος με μέγεθος περίπου 50\*40\*40 Å (Piontek et al., 1993). Η δομή της μπορεί να διαχωριστεί σε δύο περιοχές, την περιοχή κοντά στην αίμη, και την περιοχή μακριά από αυτήν. Η αίμη είναι σταθερά προσδεσμένη στο εσωτερικό του μορίου, και επικοινωνεί με το εξωτερικό περιβάλλον μέσω δύο μικρών καναλιών. Το πρότυπο αναδίπλωσης της LiP περιλαμβάνει οχτώ μεγάλες α-έλικες, οκτώ μικρές α-έλικες και τρία μικρά αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα (Choinowski, et al., 1999).

Τα μοριακά βάρη των LiPs κυμαίνονται από 38-43 kDa, τα ισοηλεκτρικά τους σημεία από 3,3 έως 4,7 (Glumoff et al., 1990, Kirk et al., 1986a) και οι βέλτιστες τιμές pH δράσης τους βρίσκονται σε χαμηλές τιμές, γύρω στο 3, με βερατρυλική αλκοόλη ως υπόστρωμα (Furukawa et al., 2014, Tien and Kirk, 1988). Το χαμηλό pH δράσης τους είναι αυτό που τις διακρίνει από άλλες υπεροξειδάσες.

#### B) Καταλυτικά χαρακτηριστικά

Οι LiPs οξειδώνουν διαφορετικές ενώσεις-μοντέλα, αντιπροσωπευτικά της δομής της λιγνίνης, συμπεριλαμβανομένων των αρυλ-γλυκερολ-αρυλ-αιθέρων με β-O-4 δεσμούς. Η οξείδωση του υποστρώματος από τη LiP οδηγεί στη δημιουργία κατιοντικής ρίζας, με αποτέλεσμα τη διάσπαση πλευρικών αλυσίδων, την απομεθυλίωση, την ενδομοριακή προσθήκη και άλλα (Kirk et al., 1986b). Η οξείδωση από LiP μπορεί επίσης να οδηγήσει σε υδροξυλίωση βενζυλικών μεθυλομάδων, οξείδωση των βενζυλ-αλκοολών στις αντίστοιχες κετόνες, και οξείδωση φαινολών (Furukawa et al., 2012, Paliwal et al., 2012).

Εκτός από την οξείδωση των μη φαινολικών υποστρωμάτων, η LiP μπορεί να οξειδώσει και μια ποικιλία φαινολικών υποστρωμάτων, όπως N-υποκατεστημένες ανιλίνες (Bariocchi et al., 2001). Τα φαινολικά υποστρώματα που μπορεί να οξειδώσει η LiP περιλαμβάνουν τη γουαϊακόλη, την ακετοσυρινγκόνη, την κατεχόλη, τη βανιλυλ-αλκοόλη και το συρινγκικό οξύ (Wong, 2009). Ωστόσο, το κλασικό της υπόστρωμα είναι η βερατρυλική αλκοόλη, ένα υψηλού οξειδωτικού δυναμικού, μη φαινολικό μόριο, το οποίο έχει προταθεί ότι παίζει το ρόλο του μεσολαβητή κατά την αποικοδόμηση της λιγνίνης, με στόχο την ενίσχυση της οξειδωτικής ικανότητας των LiPs (Lundell et al., 1993, Schoemaker et al., 1994). Η ικανότητα της LiP να οξειδώνει τη λιγνίνη και άλλα υποστρώματα υψηλού οξειδωτικού δυναμικού αποδίδεται σε ένα εκτεθειμένο αμινοξύ τρυπτοφάνης (Trp<sub>171</sub>), το οποίο δημιουργεί μια ρίζα στην επιφάνεια του ενζύμου, και επιτρέπει τη μεταφορά ηλεκτρονίων έως την αίμη με ένα μηχανισμό που είναι γνωστός ως LRET (Long Range Electron Transfer). Πιθανές

τροποποιήσεις στο περιβάλλον της τρυπτοφάνης αυτής έχει δειχθεί ότι μπορούν να επιφέρουν αλλαγές στην ενεργότητα του ενζύμου, στη σταθερότητά του, και στην εξειδίκευσή του σε διάφορα υποστρώματα (Ivancich et al., 2001).

Ο καταλυτικός κύκλος της LiP περιλαμβάνει τρία στάδια: Το πρώτο στάδιο είναι η οξείδωση του σιδήρου III της αίμης του ενζύμου από το υπεροξειδίο του υδρογόνου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός οξο-φερυλ ενδιάμεσου (Ένωση I). Στο δεύτερο στάδιο, το ενδιάμεσο ανάγεται από ένα μόριο υποστρώματος, το οποίο δίνει ένα ηλεκτρόνιο στην Ένωση I, προς το σχηματισμό του δεύτερου ενδιάμεσου, της Ένωσης II. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει την πρόσληψη ενός ακόμη ηλεκτρονίου από το ανηγμένο υπόστρωμα, προκειμένου να επανέλθει το ένζυμο στην αρχική του κατάσταση, και να ολοκληρωθεί ο οξειδωτικός κύκλος (Abdel-Hamid et al., 2013).

#### 1.2.4.2 Υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnPs)

---

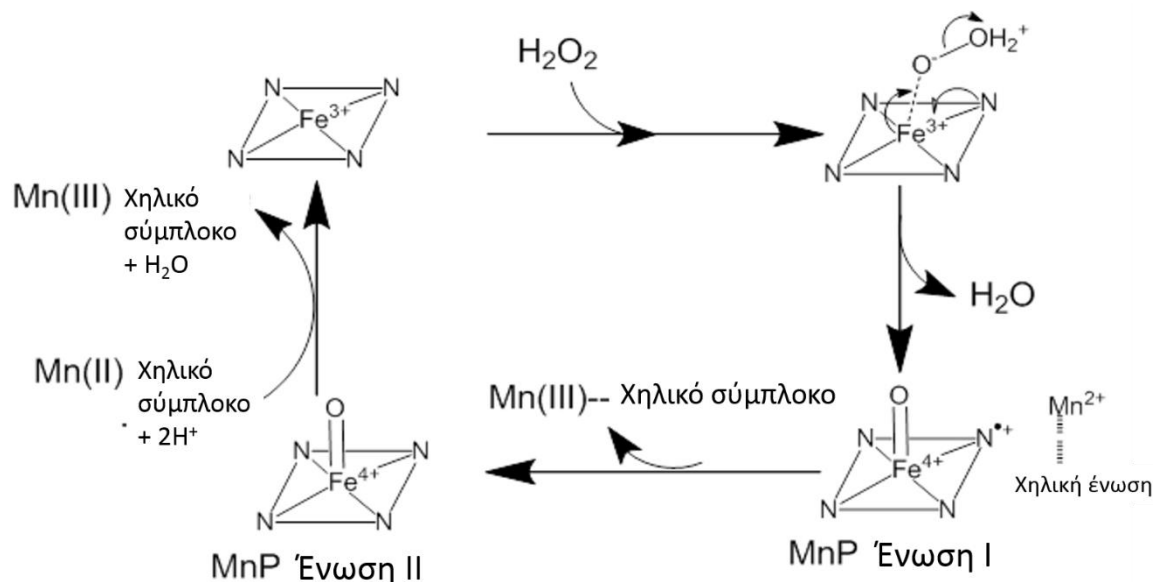
Η παραγωγή υπεροξειδασών του μαγγανίου μέχρι στιγμής έχει παρατηρηθεί μόνο για βασιδιομύκητες λευκής σήψης, και για καμία άλλη ομάδα μικροοργανισμών. Οι μύκητες αυτοί συνήθως παράγουν πολλαπλά ισοένζυμα με ενεργότητα MnP (Hattaka, 1994, 2001), ενώ στο μύκητα *Ceriporiopsis subvermispora* έχουν βρεθεί 11 ισοένζυμα (Lobos et al., 1994). Οι ισομορφές αυτές διαφέρουν κυρίως στα ισοηλεκτρικά σημεία τους, τα οποία συνήθως είναι όξινα και κυμαίνονται γύρω στο 3-4, αν και έχουν βρεθεί και ένζυμα με λιγότερο όξινα, έως και ουδέτερα ισοηλεκτρικά σημεία (Hattaka 1994, 2001, Lobos et al., 1994). Τα μοριακά βάρη των MnPs συνήθως κυμαίνονται από 38-62,5 kDa, αλλά τα περισσότερα χαρακτηρισμένα ένζυμα έχουν μοριακό βάρος γύρω στα 45 kDa (Hattaka, 1994, 2001).

##### A) Καταλυτικά χαρακτηριστικά

Ο καταλυτικός κύκλος των MnPs μοιάζει με αυτόν των άλλων υπεροξειδασών αίμης, αλλά σε αντίθεση με αυτές περιλαμβάνει  $Mn^{2+}$ , το οποίο παίζει το ρόλο του υποστρώματος. Ο κύκλος ξεκινά με την πρόσδεση του  $H_2O_2$  ή ενός οργανικού υπεροξειδίου στο ένζυμο και τη δημιουργία ενός συμπλόκου σιδήρου-υπεροξειδίου. Η διάσπαση του δεσμού οξυγόνου-οξυγόνου του υπεροξειδίου απαιτεί μια μεταφορά δύο ηλεκτρονίων από την αίμη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία της Ένωσης I της MnP, δηλαδή ενός συμπλόκου  $Fe^{4+}$ -οξο-πορφυρινικής ρίζας. Κατόπιν, ο δεσμός οξυγόνου-οξυγόνου διασπάται και απελευθερώνεται ένα μόριο νερού. Η αναγωγή πραγματοποιείται μέσω της Ένωσης II της MnP (σύμπλοκο  $Fe^{4+}$ -οξο-πορφυρίνης). Ένα ιόν  $Mn^{2+}$ , το οποίο οξειδώνεται σε  $Mn^{3+}$ , λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων για αυτό το πορφυρινικό ενδιάμεσο. Η αναγέννηση του ενζύμου επιτυγχάνεται με την οξείδωση ενός ακόμη μορίου  $Mn^{2+}$  σε  $Mn^{3+}$ , και την απελευθέρωση ενός ακόμη μορίου νερού. Ενώ η Ένωση I της MnP μοιάζει με αυτήν της LiP και άλλων υπεροξειδασών, και μπορεί να αναχθεί, εκτός από το  $Mn^{2+}$ , και από άλλες φαινολικές ενώσεις, η Ένωση II ανάγεται πολύ αργά με τα άλλα υποστρώματα εκτός του  $Mn^{2+}$ , ενώ η παρουσία του είναι απαραίτητη για να ολοκληρωθεί ο καταλυτικός κύκλος (Wariishi et al., 1988). Το  $Mn^{3+}$  που σχηματίζεται σταθεροποιείται από οργανικά οξέα όπως είναι το οξικό οξύ, και με τη σειρά του λειτουργεί σαν ένας μικρομοριακός, διαχεόμενος μεσολαβητής, ο οποίος μπορεί να οξειδώσει οργανικές ενώσεις μη-ειδικά, μέσω απόσπασης υδρογόνου και ενός ηλεκτρονίου (Hattaka, 2001, Wariishi et al., 1988). Οι ενώσεις του  $Mn^{3+}$  με καρβοξυλικά οξέα όπως το οξικό, το μαλονικό, το μηλικό, το τρυγικό και το γαλακτικό, μπορούν να προκαλέσουν την οξείδωση διαφόρων υποστρωμάτων (Hattaka, 2001). Οι φαινολικές και αμινο-



αρωματικές ενώσεις οξειδώνονται με αφαίρεση ενός υδρογόνου προς τις αντίστοιχες ρίζες (Wariishi et al., 1988, 1989, 1992). Κάποιες μη φαινολικές αρωματικές ενώσεις με χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό μπορούν επίσης να οξειδωθούν, όπως το τετραμεθοξυβενζένιο ή το ανθρακένιο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των αντίστοιχων κατιοντικών άρυλ-ριζών (Sack et al., 1997). Όμως, η MnP είναι εξαιρετικά ευαίσθητη σε υψηλές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$ , οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν αντιστρεπτή απενεργοποίηση του ενζύμου, μέσω του σχηματισμού της Ένωσης III, μια οξειδωτική κατάσταση που είναι καταλυτικά ανενεργή (Wariishi et al., 1988).



**Εικόνα 1.2.3:** Ο καταλυτικός κύκλος της MnP.

Οι MnPs θεωρούνται κυρίως λιγνινολυτικά ένζυμα επειδή το  $Mn^{3+}$  που παράγεται ως προϊόν της δράσης τους μπορεί να οξειδώσει διάφορες μονομερείς και διμερείς φαινόλες, συμπεριλαμβανομένων μορίων-μοντέλων της δομής της λιγνίνης. Η αντίδραση της MnP του *P. chrysosporium* με το  $Mn^{2+}$ , το  $H_2O_2$  και μαλονικό νάτριο βρέθηκε ότι μπορεί να οδηγήσει σε διασπάσεις δεσμών  $C_{\alpha}-C_{\beta}$ , οξείδωση  $C_{\alpha}$  και διάσπαση των δεσμών των φαινολικών συριγγκυλομάδων της λιγνίνης (Wariishi et al., 1989). Επίσης, έχει επιτευχθεί η διάσπαση τεσσάρων διαφορετικών συνθετικών μορίων λιγνίνης με τη χρήση του ίδιου ενζύμου, και με προσθήκη μαλονικού οξέος ως μεσολαβητή (Hofrichter, 2002).

## B) Δομικά χαρακτηριστικά

Μέχρι στιγμής, έχουν προσδιοριστεί οι κρυσταλλικές δομές και έχουν κατασκευαστεί μοριακά μοντέλα με βάση τις γονιδιακές ακολουθίες για τις MnPs των *P. chrysosporium*, *C. subvermisporea* και *P. eryngii* (Sundaramoorthy et al., 1994, Canales et al., 1998, Camarero et al., 2000, Tello et al., 2000). Η MnP διαθέτει 5 δισουλφιδικούς δεσμούς και δύο ιόντα  $Ca^{2+}$ , τα οποία συγκρατούν τη δομή του ενεργού κέντρου (Sutherland et al., 1997). Το ίδιο το ενεργό κέντρο αποτελείται από μια ιστιδίνη, η οποία συνδέεται με δεσμό υδρογόνου με ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος, και από μια κοιλότητα που περιέχει μια ακόμη ιστιδίνη, η οποία θεωρείται ότι παίζει κεντρικό ρόλο στην κατάλυση, και ένα κατάλοιπο αργινίνης. Ωστόσο, το ένζυμο φαίνεται να διαθέτει μόνο μια θέση πρόσδεσης του  $Mn^{2+}$ , η οποία σχηματίζεται από την αίμη, τρία όξινα αμινοξέα και δύο μόρια νερού (Sundaramoorthy et al., 1997).

Ο γενικός καταλυτικός κύκλος που περιγράφηκε στο προηγούμενο υποκεφάλαιο ισχύει για τις περισσότερες MnP's αλλά έχουν βρεθεί και ένζυμα τα οποία μπορούν να οξειδώσουν επίσης φαινολικές και μη φαινολικές αρωματικές ενώσεις, όπως το κόκκινο της φαινόλης και τη βερατρυλική αλκοόλη, και άρα μπορούν να χαρακτηριστούν ως «υβριδικές» μορφές μεταξύ της MnP και της LiP. Με τη συσσώρευση βιβλιογραφικών δεδομένων, τα ένζυμα αυτά τελικά κατατάχθηκαν σε μια ξεχωριστή κατηγορία, τις ευέλικτες υπεροξειδάσες, οι οποίες θα εξεταστούν σε άλλο υποκεφάλαιο. Ωστόσο, η ύπαρξη των ευέλικτων υπεροξειδασών υποδεικνύει ότι οι MnPs και οι LiPs χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλή συγγένεια. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από δεδομένα πρωτεϊνικής μηχανικής, όπου η μετάλλαξη ενός και μόνο αμινοξέος S168W της MnP του *P. chrysosporium* επέτρεψε στο ένζυμο να μπορεί να οξειδώσει και το  $Mn^{2+}$ , αλλά και τυπικά υποστρώματα των LiPs όπως τη βερατρυλική αλκοόλη (Timofeevski et al., 2000).

#### 1.2.4.3 Ευέλικτες υπεροξειδάσες (VPs)

---

Η ενεργότητα ευέλικτης υπεροξειδάσης (VP) μέχρι στιγμής έχει βρεθεί σε μύκητες των γενών *Pleurotus* (*P. ostreatus* και *P. eryngii*) και *Bjerkandera* (*B. adusta*) (Hofrichter et al., 2010). Η VP (EC 1.11.1.16, Reactive Black 5:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> οξειδοαναγωγή) χαρακτηρίζεται από χαμηλή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και άρα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, αλλά και από την ομοιοτήτά της με τυπικά χαρακτηριστικά των υπεροξειδασών MnPs και LiPs. Για παράδειγμα, οι VP και LiP μπορούν να οξειδώσουν τη βερατρυλική αλκοόλη, αν και η LiP εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια, αλλά μόνο η VP μπορεί να οξειδώσει βαφές όπως το Reactive Black 5, δηλαδή ενώσεις υψηλού οξειδωτικού δυναμικού.

##### A) Δομικά χαρακτηριστικά

Η τρισδιάστατη δομή της VP του *P. eryngii* έχει προσδιοριστεί, μετά από ετερόλογη έκφραση σε *E. coli*, και έχει βρεθεί ότι περιλαμβάνει 11-12 έλικες, τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς, δύο θέσεις δέσμευσης  $Ca^{2+}$ , μια θέση δέσμευσης της αίμης, η οποία περιλαμβάνει τα κατάλοιπα ιστιδινών His<sub>47</sub> και His<sub>169</sub>, και μια θέση δέσμευσης  $Mn^{2+}$  (Ruiz-Duenas et al., 2007, Perez-Boada et al., 2005). Η θέση δέσμευσης του  $Mn^{2+}$  μοιάζει με αυτήν της MnP, και περιλαμβάνει τις καρβοξυλικές ομάδες των Glu<sub>36</sub>, Glu<sub>40</sub> και Asp<sub>175</sub>. Επίσης, το χαρακτηριστικό κατάλοιπο τρυπτοφάνης των LiPs (Trp<sub>164</sub>), εκτεθειμένο στην επιφάνεια του ενζύμου, είναι παρόν και στις VPs. Το κατάλοιπο αυτό επιτρέπει την οξείδωση υποστρωμάτων υψηλού και χαμηλού δυναμικού στην επιφάνεια του ενζύμου, συμπεριλαμβανομένων και κάποιων που δεν οξειδώνονται από τη LiP χωρίς τη χρήση μεσολαβητών (Morales et al., 2012, Perez-Boada et al., 2005). Η Trp<sub>164</sub> είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του μηχανισμού LRET, μέσω του οποίου, μετά την οξείδωση του υποστρώματος, τα ηλεκτρόνια της πρωτεϊνικής ρίζας καθοδηγούνται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, στο περιβάλλον δηλαδή της αίμης (Doyle et al., 1998, Blodig et al., 2001, Smith et al., 2009). Ο μηχανισμός θεωρείται υπεύθυνος για την οξείδωση μακρομορίων λιγνίνης από τη VP (Saez-Jimenez et al., 2015). Η χαμηλή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα της VP είναι αποτέλεσμα του υψηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού της ( $E_0 > +1,4V$ ) (Hofrichter et al., 2010).

##### B) Καταλυτικά χαρακτηριστικά

Ο καταλυτικός κύκλος της VP μοιάζει με αυτόν που έχει περιγραφεί για τη LiP. Το ένζυμο καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των Ενώσεων I και II. Ο

μηχανισμός της οξειδωσης του  $Mn^{2+}$  και των αρωματικών υποστρωμάτων με άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων στην αίμη, όπως επίσης και ο μηχανισμός LRET από την επιφάνεια του ενζύμου είναι παρόμοιοι με αυτούς που έχουν περιγραφεί για τη LiP του *P. chrysosporium* (Perez-Boada et al., 2005). Η καταλυτική ενεργότητα της VP του *P. eryngii* ως προς το μαγγάνιο είναι παρόμοια με αυτήν της MnP, αλλά η ενεργότητά της έναντι της βερατρυλικής αλκοόλης είναι περίπου 10 φορές χαμηλότερη σε σχέση με τη LiP (Perez-Boada et al., 2005), όμως μπορεί να οξειδώσει τόσο φαινολικά όσο και μη φαινολικά μόρια – μοντέλα της λιγνίνης. Ακόμη, είναι και η μοναδική λιγνινολυτική υπεροξειδάση με ικανότητα οξειδωσης της βαφής Reactive Black 5, αλλά και μονομερών φαινολικών ενώσεων και αμινών, χωρίς την προσθήκη μαγγανίου ή άλλων μεσολαβητών (Perez-Boada et al., 2005).

#### 1.2.4.4 Υπεροξειδάσες αποικοδόμησης βαφών (DyPs)

---

Οι υπεροξειδάσες αποικοδόμησης βαφών (Dye-Decolorizing Peroxidases, DyPs), ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά πριν από περίπου 15 χρόνια στους μύκητες, και ονομάστηκαν με βάση την ικανότητά τους να αποικοδομούν μια μεγάλη ποικιλία βαφών (Kim and Shoda, 1999). Έκτοτε, μεγάλη ποικιλία DyPs έχει ανακαλυφθεί επίσης και σε βακτηριακά πρωτεώματα (Sugano, 2009), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ένζυμα αυτά είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα ανάμεσα σε διάφορες ομάδες μικροοργανισμών. Η βάση δεδομένων Inter-pro κατατάσσει στην οικογένεια αυτή 5.019 ένζυμα από τα οποία 4.886 είναι βακτηριακά, 122 είναι ευκαρυωτικά και 11 ανήκουν σε αρχαιοβακτήρια. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων PeroxiBase, οι DyPs ταξινομούνται περαιτέρω σε 4 τάξεις, A-D, με τις μυκητιακές DyPs να ταξινομούνται όλες μαζί στην τάξη D. Τα ένζυμα αυτά είναι συνήθως 50-60 kDa, και όλα τους περιλαμβάνουν αίμη, προσδεσμένη μη ομοιοπολικά, σαν συμπαράγοντα (Sugano et al., 2007, Zubieta et al., 2007). Επίσης έχει αναφερθεί και η ύπαρξη κάποιων ενζύμων που παράγονται σαν ολιγομερή, από μονομερή έως εξαμερή (Kim and Shoda, 1999, Liu et al., 2011, Zubieta et al., 2007). Τέλος, όλες οι DyPs που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα, από τους μύκητες *A. auricula-judae*, *B. adusta*, *Exidia glandulosa*, *I. lacteus*, *M. scorodoni*, *Mycena epipterygia* και *T. albuminosus* (Liers et al., 2010, Salvachua et al., 2013c, Liers et al., 2013, Linde et al., 2014, 2015), είναι εξωκυτταρικά ένζυμα, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανώς παίζουν κάποιο ρόλο στη μετατροπή της φυτικής βιομάζας και του εδαφικού οργανικού φορτίου.

##### A) Δομικά χαρακτηριστικά

Οι DyPs εμφανίζουν έναν αριθμό χαρακτηριστικών γνωρισμάτων που τις διαφοροποιούν από όλες τις άλλες υπεροξειδάσες. Αρχικά, η πρωτοταγής αμινοξική τους ακολουθία δεν εμφανίζει καμία ομοιότητα με όλες τις άλλες υπεροξειδασές των φυτών και των ζώων. Επίσης, στα ένζυμα αυτά απουσιάζει το τυπικό μοτίβο πρόσδεσης της αίμης όλων των υπολοίπων υπεροξειδασών, το οποίο αποτελείται από δύο ιστιδίνες και μια αργινίνη (Sugano, 2009). Αντιθέτως, οι DyPs προσδέουν την αίμη μη ομοιοπολικά, ενώ στην πρόσδεση φαίνεται να παίζει ρόλο ένα μοτίβο συντηρημένο σε όλες τις DyPs, GXXDG. Στην ακολουθία αυτή, η αντικατάσταση του συντηρημένου ασπαρτικού με μια αλανίνη ή ασπαραγίνη φαίνεται ότι απενεργοποιεί το ένζυμο, αν και η πρόσδεση της αίμης δεν επηρεάζεται (Sugano et al., 2007).

Μέχρι σήμερα, ένας μικρός αριθμός μόνο ενζύμων DyP έχει χαρακτηριστεί, ενώ είναι διαθέσιμες και κάποιες κρυσταλλικές δομές (Liu et al., 2011, Roberts et al., 2011, Strittmatter et al., 2013, Sugano et

al., 2007, Zubietta et al., 2007). Ενώ οι DyPs χαρακτηρίζονται από μια εξαιρετικά χαμηλή ομοιότητα των πρωτοταγών αμινοξικών τους αλληλουχιών με όλες τις άλλες υπεροξειδάσες, η λειτουργική τους τοπολογία φαίνεται να είναι πολύ συντηρημένη. Δομικά οι DyPs αποτελούνται από δύο περιοχές (domains), οι οποίες περιέχουν α-έλικες και αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα (Colpa et al., 2014). Η αναδίπλωση και των δύο περιοχών μοιάζει με εκείνη των φερρεδοξινών, όπου το ενεργό κέντρο εντοπίζεται στο ενδιάμεσο αυτών των περιοχών, περικλείοντας την αίμη. Το μοτίβο πρόσδεσης της αίμης περιλαμβάνει μια πολύ συντηρημένη ιστιδίνη στο καρβοξυτελικό άκρο, η οποία φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση της αίμης (Liu et al., 2011, Zubietta et al., 2007). Αντίστοιχα, το ασπαρτικό που περιλαμβάνεται στο μοτίβο GXXDG κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου κινείται προκειμένου να βρεθεί σε κατάλληλη θέση για την αλληλεπίδραση με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, συμμετέχοντας με αυτό τον τρόπο στο σχηματισμό της Ένωσης I (Yoshida et al., 2011), και άρα φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην κατάλυση.

#### B) Καταλυτικά χαρακτηριστικά

Οι DyPs διαθέτουν την ικανότητα οξειδωσης υποστρωμάτων τα οποία είναι πολύ μεγάλα για να χωρέσουν στο ενεργό κέντρο. Για παράδειγμα, μια DyP έχει δείξει καταλυτική ενεργότητα έναντι μεγάλων μορίων kraft λιγνίνης (Roberts et al., 2011). Προκειμένου να εξηγηθεί το φαινόμενο αυτό, έχει προταθεί ένας μηχανισμός απομακρυσμένης μεταφοράς ηλεκτρονίων (Long Range Electron Transfer, LRET), ανάμεσα στην αίμη και στην επιφάνεια του ενζύμου. Πράγματι, ένας τέτοιος καταλυτικός μηχανισμός έχει προταθεί για την πρωτεΐνη AauDyPI του μύκητα *Auricularia auricula-judae* (Strittmatter et al., 2013). Μια πολύ συντηρημένη τυροσίνη Tyr<sub>337</sub>, και μια λευκίνη Leu<sub>357</sub> βρέθηκε ότι διευκολύνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την αίμη στην επιφάνεια του ενζύμου, σχηματίζοντας ένα κέντρο οξειδωσης εκτεθειμένο στην επιφάνεια του ενζύμου, το οποίο είναι ικανό να αντιδρά με ογκώδη υποστρώματα. Ένας αντίστοιχος μηχανισμός έχει περιγραφεί και για τις LIPs και VPs (Strittmatter et al., 2013).

Τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν βέλτιστα pH δράσης σε όξινες τιμές pH. Αν και τα καλύτερα υποστρώματα των DyPs είναι οι ανθρακινονικές βαφές, όπως το Reactive Blue 19, Reactive Blue 5 και άλλα (Kim et al., 1995), οι οποίες δύσκολα μπορούν να οξειδωθούν από άλλες υπεροξειδάσες, οξειδώνουν επίσης πολύ αποτελεσματικά και το ABTS (Salvachua et al., 2013c, Linde et al., 2014, 2015), αλλά και τη 2,6-διμεθοξυφαινόλη, τη γουαϊακόλη, υποκατεστημένες φαινόλες, αζο-βαφές, όπως το Reactive Black 5, το ασκορβικό οξύ, το β-καροτένιο, τη βερατρυλική αλκοόλη και μόρια-μοντέλα της δομής της λιγνίνης (Liers et al., 2010, 2013 Salvachua et al., 2013c, Linde et al., 2014, 2015).

#### 1.2.4.5 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές υπεροξειδασών

---

Οι λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες αποτελούν πολύτιμα βιοκαταλυτικά εργαλεία για ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών, λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων τους, κυρίως της ικανότητάς τους να οξειδώνουν μεγάλο εύρος οργανικών ενώσεων, αλλά και του υψηλού οξειδωτικού δυναμικού τους, που τους επιτρέπει να οξειδώσουν ενώσεις ιδιαίτερα ανθεκτικές στην αποικοδόμηση, όπως για παράδειγμα, τοξικούς ρυπαντές. Οι εφαρμογές στις οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν τα ένζυμα αυτά ποικίλλουν από εφαρμογές βιοαποικοδόμησης τοξικών ουσιών ή οργανικών αποβλήτων, έως επεξεργασία πρώτων

υλών για τις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και καλλυντικών, αλλά έχουν δοκιμαστεί και σε εφαρμογές οργανικής σύνθεσης.

#### A) Βιοαποικοδόμηση – Βιοεξυγίανση

Μια από τις κυριότερες εφαρμογές στις οποίες έχουν δοκιμαστεί οι λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες είναι η αποικοδόμηση βαφών. Προς το παρόν, υπάρχουν περισσότερες από 10.000 βαφές διαθέσιμες εμπορικά, και η παγκόσμια ετήσια παραγωγή βαφών και προϊόντων τους ανέρχεται στους  $7 \cdot 10^5$  τόνους (Zollinger 1991). Οι κυριότερες βιομηχανίες στις οποίες χρησιμοποιούνται βαφές είναι η βιομηχανία υφασμάτων, πλαστικών, δέρματος, χαρτιού και χαρτοπολλτού (Rai et al., 2005). Επιπλέον, οι βαφές χρησιμοποιούνται και σαν προσθετικά σε πετρελαϊκά προϊόντα, αλλά και στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών (Harazono and Nakamura 2005). Η ραγδαία αύξηση της βιομηχανίας υφασμάτων οδήγησε πρόσφατα σε μια αντίστοιχη αύξηση της ποσότητας και της πολυπλοκότητας των βιομηχανικών αποβλήτων που περιέχουν βαφές και τελικά καταλήγουν στο περιβάλλον. Τα απόβλητα αυτά είναι εξαιρετικά δύσκολο να επεξεργαστούν αποτελεσματικά, επειδή οι χημικές δομές των βαφών είναι συνήθως πολύπλοκες, γεγονός που τις καθιστά ιδιαίτερα σταθερές και ανθεκτικές στην αποικοδόμηση (Padmesh et al., 2005). Η χρήση λιγνινολυτικών ενζύμων είναι μια πιθανή βιώσιμη λύση για τη βιοεξυγίανση τέτοιων αποβλήτων επειδή τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, μεταξύ άλλων τοξικές ενώσεις, φαινόλες, χλωροφαινόλες, δισφαινόλες, μεθυλιωμένες φαινόλες, ανιλίνες, και άλλες ετεροκυκλικές αρωματικές ενώσεις σε λιγότερο τοξικά, αδιάλυτα παράγωγα, τα οποία μπορούν να απομακρυνθούν πιο εύκολα (Torres et al., 2003). Η MnP του *P. ostreatus* έχει δειχθεί ότι μπορεί να αποικοδομήσει μια ποικιλία βαφών σουλφοναφθαλεΐνης, όπως Phenol red, m-cresol purple, πράσινο της βρωμοκρεσόλης και άλλα (Shrivastava et al., 2005). Η MnP του *Schizophyllum* sp. βρέθηκε ότι μπορεί να αποικοδομήσει άζο-βαφές όπως congo red, orange G και άλλες (Cheng et al., 2007), ενώ η MnP του *Ischnoderma resinosum* ήταν ενεργή έναντι των βαφών reactive blue 5, reactive blue 19, reactive red 22 και reactive yellow 15 (Kokol et al., 2007). Η MnP του *B. adusta* βρέθηκε ότι είναι πιο αποδοτική στην αποικοδόμηση ανθρακινονικών βαφών, όπως το reactive blue 19, reactive black 5 και acid orange 7 (Mohorcic et al., 2006). Σε μεγαλύτερη κλίμακα, οι δοκιμές αποικοδόμησης βαφών με MnP ακινητοποιημένη σε μεμβρανικούς αντιδραστήρες, απέδωσαν 85% αποικοδόμηση της Acid Orange 7, με 18 ημέρες συνεχόμενης λειτουργίας (Lopez et al., 2004).

Η LiP του *P. chrysosporium* μπορεί επίσης να οξειδώσει μεγάλη ποικιλία βαφών, όπως το μπλε του μεθυλίου και Azure B (Ferreira-Leitao et al., 2007), ενώ έχει δοκιμαστεί και σε ένα σύστημα συζευγμένων αντιδράσεων με οξειδάση της γλυκόζης (Lan et al., 2006) η οποία παρείχε σταθερή τροφοδοσία  $H_2O_2$  στο σύστημα. Με τη μέθοδο αυτή επιτεύχθηκε η αποικοδόμηση των βαφών φουσκίνη, ροδαμίνη B και κυανό του ξυλενίου, ενώ η προσθήκη βερατρυλικής αλκοόλης, η οποία μπορεί να δράσει ως μεσολαβητής, αύξησε την αποικοδόμηση σε τελικό ποσοστό 89% (Yu et al., 2006). Η VP του *B. adusta* έχει επίσης δοκιμαστεί σε τέτοιες εφαρμογές, με ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αποικοδόμηση βιομηχανικών βαφών (Moreira et al., 2006, Tinoco et al., 2007). Η VP του *Thanatephorus cucumeris* σε συνδυασμό με την DyP του ίδιου οργανισμού, φάνηκε ότι μπορούν να αποικοδομήσουν αποτελεσματικά άζο-βαφές, και συγκεκριμένα τη βαφή Reactive blue 5. Οι Sugano et al., (2006) έδειξαν ότι η βαφή τροποποιείται πρώτα από την DyP σε κόκκινο προϊόν, το οποίο στη συνέχεια αποχρωματίζεται πλήρως από τη VP. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι DyPs είναι μια κατηγορία υπεροξειδασών με ιδιαίτερα ενδιαφέρον βιοτεχνολογικό δυναμικό λόγω της ικανότητάς τους να αποικοδομούν μια ευρεία ποικιλία συνθετικών βαφών, και ως εκ τούτου

μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πολλές εφαρμογές βιοεξυγίανσης υγρών αποβλήτων των αντίστοιχων βιομηχανιών. Οι Sugano et al., (2000) έδειξαν ότι η DyP του *Trametes cucumeris* μπορεί να αποικοδομήσει περισσότερες από 30 συνθετικές βαφές. Οι Shakeri and Shoda (2008) πέτυχαν επαναλαμβανόμενους κύκλους αποικοδόμησης της ανθρακινονικής βαφής Remazol Brilliant Blue R με ακινητοποιημένη DyP του *Aspergillus oryzae*.

Επιπλέον, κάποιες έρευνες δείχνουν ότι οι DyPs εμπλέκονται στην αποικοδόμηση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, όπως για παράδειγμα η DyP του *I. lacteus*, η οποία φάνηκε να αυξάνει την υδρολυτική αποικοδόμηση του αχύρου κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας (Salvachua et al., 2013c), με στόχο την παραγωγή αιθανόλης. Σε παρόμοιες εφαρμογές έχουν δοκιμαστεί επίσης και άλλα λιγνινολυτικά ένζυμα. Για παράδειγμα, η MnP έχει βρεθεί ότι αποικοδομεί τη λιγνίνη ξύλου κωνοφόρων, με προσθήκη μαγγανίου, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και ενός οργανικού οξέος που δρα σαν μεσολαβητής (Hatakka et al., 2003).

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες αποτελούνται από δύο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους και είναι προϊόντα της εκτεταμένης χρήσης ορυκτών πηγών καυσίμων. Λόγω της προκαρκινογόνου και μεταλλαξογόνου δράσης τους, θεωρούνται από τους πιο επικίνδυνους ρυπαντές, και σημαντική ερευνητική προσπάθεια έχει αφιερωθεί στην εύρεση περιβαλλοντικά φιλικών λύσεων για την απομάκρυνσή τους από περιβαλλοντικούς αποδέκτες. Οι PAHs μπορούν να οξειδωθούν από τις λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες, με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων τα οποία έχουν μειωμένη μεταλλαξογόνο δράση σε σχέση με τα αρχικά, ή είναι πιο εύκολα βιοδιασπώμενα (Torres et al., 2010). Η VP από τον *B. adusta* έχει χρησιμοποιηθεί και για την αποικοδόμηση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs). Ανεξάρτητα από την παρουσία μαγγανίου, η VP μπορούσε να οξειδώσει τις PAHs στις αντίστοιχες κινόνες, με αποτέλεσμα τη βιομετατροπή τους (Wang et al., 2002).

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες (Endocrine Disruptive Chemicals, EDCs) είναι μια κατηγορία ενώσεων, οι οποίες, λόγω της χημικής τους σύνθεσης, λειτουργούν σαν ανταγωνιστές των ορμονών. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να διαταράξουν τη σύνθεση, έκκριση, μεταφορά, πρόσδεση ή λειτουργία των ενδογενών ορμονών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ομοιόσταση, την αύξηση, ή την αναπαραγωγή των ζωντανών οργανισμών (Cabana and Agathos, 2007). Κάποιες από τις ενώσεις αυτές μπορούν να οξειδωθούν από τις υπεροξειδάσες. Για παράδειγμα, η MnP του *P. ostreatus* χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την απομάκρυνση 0,4 mM δισφαινόλης A σε μόλις 1 ώρα. Η οξείδωσή της οδήγησε στην απόσπαση ενός ηλεκτρονίου και στο σχηματισμό ρίζας, η οποία στη συνέχεια διασπάστηκε αυθόρμητα, οδηγώντας στη δημιουργία διαφόρων μικρότερων μορίων (Hirano et al., 2000). Αντίστοιχα, η οιστρόνη, μια ουσία που δρα σαν οιστρογόνο και βρίσκεται συχνά σε υψηλές συγκεντρώσεις σε μονάδες επεξεργασίας αστικών αποβλήτων, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για τη MnP του *Phanerochaete sordida*. Το ένζυμο αποικοδόμησε πλήρως 10 μM οιστρόνης σε λιγότερο από 2 ώρες (Tamagawa et al., 2006). Οι Tsutsumi et al., (2001) πρότειναν έναν υποθετικό μηχανισμό για την αποικοδόμηση των ουσιών αυτών, σύμφωνα με τον οποίο, η οξείδωση των EDCs από τις υπεροξειδάσες οδηγεί στον πολυμερισμό τους και άρα στο σχηματισμό μεγαλύτερων μορίων, τα οποία, λόγω μεγέθους, δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τους ορμονικούς υποδοχείς και άρα δεν εμφανίζουν βιολογική δράση.

Ένζυμα με δράση υπεροξειδάσης έχουν δοκιμαστεί επίσης και στη βιοαποικοδόμηση των ζιζανιοκτόνων. Η VP του *B. adusta* αποικοδόμησε ικανοποιητικά τα ζιζανιοκτόνα πενταχλωροφαινόλη, bromoxynil (3,5-διβρωμο-4-υδροξυβενζονιτρίλιο) και dichlorophen (4-χλωρο-

2- [(5-χλωρο-2-υδροξυφαινυλ)μεθυλ]φαινόλη) (Davila-Vazquez et al., 2005). Η υπεροξειδάση της λιγνίνης του *P. chrysosporium* έχει δοκιμαστεί επίσης και στην βιοαποικοδόμηση μορίων διοξινών, και έχει βρεθεί ότι μπορεί να διασπάσει την 2,7-δichλωρο-διβενζο-π-διοξίνη σε 4-χλωρο-1,2-βενζοκινόνη και 2-υδροξυ-1,4-βενζοκινόνη. Η απόδοση της αντίδρασης αυξήθηκε με την προσθήκη βερατρυλικής αλκοόλης στην αντίδραση (Valli et al., 1992).

#### Β) Συνθετικές εφαρμογές

Μια πρόσφατη μελέτη από τους Salvachua et al., (2013d) αποκάλυψε την εξαιρετική βιοτεχνολογική αξία της VP του *P. eryngii* σε συνθετικές εφαρμογές βιοκατάλυσης. Στη μελέτη αυτή επιτεύχθηκε η ομοιοπολική σύνδεση μορίων β-καζεΐνης και πεπτιδίων που περιέχουν τυροσίνη, μέσω οξειδωσης των φαινολικών πλευρικών ομάδων της. Επίσης, επιτεύχθηκε η ομοιοπολική σύνδεση ολιγομερών φερουλ-αραβινοξυλάνης με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός υλικού με τροποποιημένες ρεολογικές ιδιότητες και ικανότητα σχηματισμού πηκτώματος. Τέλος, στη μελέτη αυτή επιτεύχθηκε επίσης και η κατασκευή καινοτόμου υλικού, από την οξειδωτική πρόσδεση πεπτιδίων σε τεχνητά ολιγομερή λιγνίνης.

Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου επιτεύχθηκε με τη χρήση της MnP του *B. adusta* και 2,4-πεντανεδιόνης ως μεσολαβητή, με απόδοση 96%. Το πολυακρυλαμίδιο που παράχθηκε με τη χρήση της MnP βρέθηκε ότι έχει μοριακό βάρος 155000, το οποίο είναι ένα εξαιρετικά ενθαρρυντικό αποτέλεσμα σε σύγκριση με το μοριακό βάρος 13000 που επιτυγχάνεται με την παραδοσιακή μέθοδο χημικού πολυμερισμού με χρήση Fe-APS (Iwahara et al., 2000).

#### Γ) Βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών

Σχετικά με τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές των Lips, οι σημαντικότερες από αυτές αφορούν στη βιομηχανία καλλυντικών και δερματολογικών προϊόντων. Τα πιο γνωστά από αυτά βασίζονται στη LiP του *P. chrysosporium*, και κυκλοφορούν με τα εμπορικά ονόματα Melanozyme™, μια κρέμα για λεύκανση του δέρματος ([www.elureskin.com](http://www.elureskin.com)) και Luminase, επίσης για βελτίωση του τόνου του δέρματος, προϊόντα και τα δύο της εταιρείας Syneron Medical Ltd, Irvine, California, USA, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των πανάδων και των κηλίδων του δέρματος.

Από το στέλεχος *Ceriporiopsis* sp. απομονώθηκαν δύο υπεροξειδάσες που έχουν την ικανότητα αποικοδόμησης της μελανίνης των μαλλιών, τόσο συνθετικών όσο και ανθρώπινων (Nagasaki et al., 2008). Η χρήση ενζύμων σαν εναλλακτική των σύγχρονων μεθόδων αποχρωματισμού των μαλλιών, οι οποίες περιλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αλκαλικές συνθήκες, θα μπορούσε να δώσει λύση σε προβλήματα που σχετίζονται με τη δυσανεξία του δέρματος και των τριχών σε αυτού του είδους τη χημική επεξεργασία, αφού η λεύκανση των μαλλιών θα είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί σε πιο ήπιες χημικά συνθήκες.

Επίσης, δύο DyPs έχει δειχθεί ότι μπορούν να αποικοδομήσουν το β-καροτένιο (Scheibner et al., 2008). Η αποικοδόμηση του β-καροτενίου είναι ιδιαίτερης σημασίας στη βιομηχανία των τροφίμων, επειδή επιτρέπει την ενζυμική λεύκανση τροφών και ποτών που περιέχουν αλεύρι. Η εφαρμογή αυτή έχει επίσης πατενταριστεί πρόσφατα και η αντίστοιχη DyP διατίθεται εμπορικά υπό το όνομα MaxiBright από την εταιρεία DSM (Colpa et al., 2014).

Η διαύγαση των ποτών, και κυρίως των χυμών φρούτων έγκειται στη μείωση του περιεχομένου φαινολικού φορτίου τους (Alper and Acar, 2004), και στη σύγχρονη βιομηχανία επιτυγχάνεται με φυσικές μεθόδους, όπως η υπερδιήθηση. Με τη μέθοδο αυτή όμως δεν μπορούν να απομακρυνθούν

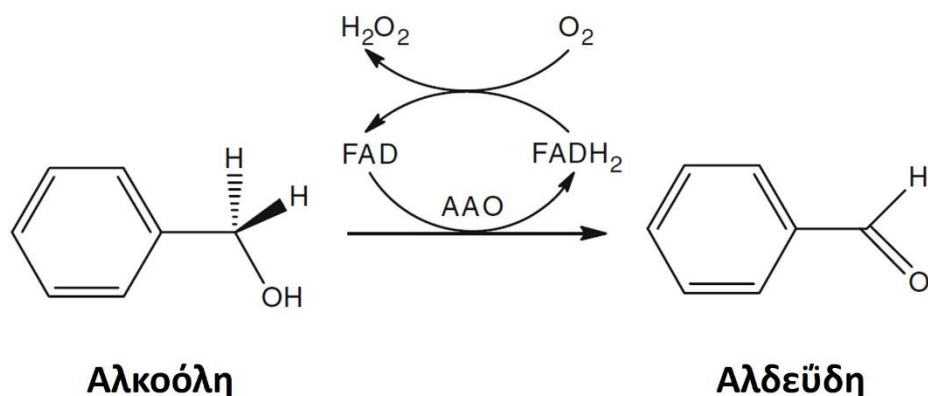
οι μικρομοριακές φαινολικές ενώσεις, οι οποίες συνήθως οδηγούν σε αυξημένη τελική θολότητα του προϊόντος. Μια εναλλακτική λύση θα μπορούσε να είναι η χρήση οξειδωτικών ενζύμων για το σκοπό αυτό. Οι Gassara-Chatti et al., (2013) πέτυχαν ικανοποιητική διαύγηση χυμού με τη χρήση ακινητοποιημένων λιγνινολυτικών ενζύμων (LiP, MnP και λακκάσης). Τα οξειδωτικά ένζυμα φαίνεται να πολυμερίζουν οξειδωτικά τις μικρομοριακές φαινολικές ενώσεις, οδηγώντας στο σχηματισμό μεγαλύτερων μορίων, τα οποία μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα με υπερδιήθηση ή φυγοκέντρηση.

### 1.2.5 Άλλα βοηθητικά ένζυμα αποικοδόμησης της λιγνίνης

Όπως είναι προφανές από όσα έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής, το  $H_2O_2$  παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της λιγνίνης από τους μύκητες λευκής σήψης, καθώς είναι απαραίτητο για τη δράση των λιγνινολυτικών υπεροξειδασών (Ruiz-Duenas and Martinez, 2009). Μια ποικιλία εξωκυτταρικών ενζύμων θεωρείται ότι εμπλέκεται στην εξωκυτταρική παραγωγή  $H_2O_2$  στους μύκητες λευκής σήψης. Στα ένζυμα αυτά, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνονται οι οξειδάσες του γλυοξυλικού (Kersten and Kirk, 1987) και οι οξειδάσες των αρυλ-αλκοολών (AAO) (Guillen et al., 1990).

#### 1.2.5.1 Οξειδάση των αρυλ-αλκοολών (AAO)

Η οξειδάση των αρυλ-αλκοολών (AAO) είναι μια εξωκυτταρική φλαβοπρωτεΐνη, η οποία παρέχει το  $H_2O_2$  που είναι απαραίτητο για τη δράση των υπεροξειδασών κατά τη διάρκεια της μυκητιακής αποικοδόμησης της λιγνίνης. Ένζυμα με ενεργότητα AAO έχουν βρεθεί στους μύκητες *Pleurotus* (Bourbonnais and Paice, 1988, Guillen et al., 1992), *Trametes versicolor* (Farmer et al., 1960), *Fusarium solani* (Iwahara et al., 1980), *Bjerkandera adusta* (Romero et al., 2009), και *Botrytis cinerea* (Goetghebeur et al., 1993). Η συμμετοχή της AAO στην αποικοδόμηση της λιγνίνης υποστηρίζεται από πειραματικά δεδομένα που υποδεικνύουν ταυτόχρονη έκφρασή της με ένζυμα LiP, στο μύκητα *B. adusta* (Muheim et al., 1990) και VP σε μύκητες *Pleurotus* (Camarero et al., 1996). Η αντίδραση που καταλύει η AAO είναι η οξείδωση των αρυλ-αλκοολών σε αλδεΐδες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2.4, και σε δεύτερο στάδιο σε οξέα (Ferreira et al., 2010, Guillen et al., 1992).



**Εικόνα 1.2.4:** Η αντίδραση που καταλύεται από τις οξειδάσες των αρυλ-αλκοολών (AAO) (Hernández-Ortega et al., 2012).



Τα υποστρώματα της AAO περιλαμβάνουν αλκοόλες που παράγονται από τη μικροβιακή αποικοδόμηση της λιγνίνης, αλλά και μεταβολίτες που παράγονται από τους ίδιους τους μύκητες. Η AAO από στελέχη *Pleurotus* δείχνει μεγαλύτερη συγγένεια για μη φαινολικές αρωματικές ουσίες (Ferreira et al., 2005, Guillen et al., 1992), όμως η AAO του *B. adusta* οξειδώνει επίσης αποτελεσματικά και φαινολικές βενζυλ-αλκοόλες (Romero et al., 2009). Η AAO του *P. eryngii* έχει δειχθεί ότι μπορεί να παρέχει μια συνεχή ροή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε συνεργασία με μυκητιακές αφυδρογονάσες κατά τη διάρκεια οξείδωσης μιας ποικιλίας υποστρωμάτων, όπως βενζυλικά, π-μεθοξυβενζυλικά, βερατρυλικά, και βανιλλυλικά υποστρώματα (Guillen et al., 1994), καθώς οι ενώσεις αυτές μπορούν στη συνέχεια να αναχθούν από τις αφυδρογονάσες, τροφοδοτώντας συνεχώς τη δράση των AAO.

Η AAO είναι μια εξωκυτταρική μονομερής πρωτεΐνη, και ανήκει στην υπεροικογένεια των οξειδοαναγωγασών γλυκόζης-μεθανόλης-χολίνης (GMC), οι οποίες περιέχουν FAD σαν συμπράγοντα. Για πολλά χρόνια, οι μόνες γονιδιακές αλληλουχίες που ήταν διαθέσιμες ήταν αυτές των *P. eryngii* και *P. pulmonarius* (Varela et al., 1999, 2000). Πρόσφατα, με τη ραγδαία αύξηση των γονιδιωματικών δεδομένων, οι αλληλουχίες που είναι καταχωρημένες ως AAO βασιδιομυκήτων στη βάση δεδομένων του DOE Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov>) έχουν φτάσει τις 50, ενώ τα πειραματικά δεδομένα συνεχίζουν να συσσωρεύονται, καθώς τα ένζυμα αυτά έχουν και βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, κυρίως σε εφαρμογές οργανικής σύνθεσης αρωματικών ενώσεων, όπως η βανιλίνη, η οποία προς το παρόν παράγεται μέσω χημικής σύνθεσης από πετροχημικά παράγωγα (Hernández-Ortega et al., 2012).

#### 1.2.5.2 Οξειδάση του γλυοξυλικού (GLX).

---

Η οξειδάση του γλυοξυλικού είναι ένα από τα ένζυμα που ανάγουν το μοριακό οξυγόνο σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, και με αυτό τον τρόπο είναι απαραίτητα για την τροφοδοσία των υπεροξειδασών κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης της λιγνίνης *in vivo*. Παράλληλα, οι οξειδάσες αυτές οξειδώνουν απλές αλδεΐδες όπως η γλυοξάλη και η μεθυλ-γλυοξάλη στα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα (Whittaker et al., 1996). Η GLX είναι ένα μεταλλοένζυμο που περιέχει χαλκό, και η δομή της μοιάζει με αυτήν της οξειδάσης της γαλακτόζης (Whittaker et al., 1996). Άλλωστε, τα δύο αυτά ένζυμα κατατάσσονται μαζί στην οικογένεια AA5 της βάσης δεδομένων CAZy, καθώς εμφανίζουν παρόμοια τεταρτοταγή δομή και δομή ενεργού κέντρου, παρότι διαφέρουν ως προς την καταλυτική τους εξειδίκευση και την πρωτοταγή τους δομή (Levasseur et al., 2013). Το ενεργό κέντρο στο οποίο εντοπίζεται ο χαλκός είναι εξαιρετικά συντηρημένο στα δύο αυτά ένζυμα, και αποτελείται από ένα πλευρικό δεσμό κυστεΐνης-τυροσίνης, μια πλευρική μονάδα τυροσίνης και δύο πλευρικές μονάδες ιστιδινών (Kersten and Cullen, 2014, Whittaker, 2003). Η GLX εμφανίζει εξαιρετικά ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Η πιο καλά μελετημένη GLX προέρχεται από τον *P. chrysosporium*, αλλά τα πειραματικά δεδομένα για ένζυμα από άλλες πηγές είναι ελάχιστα.

---

## 1.3 Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείου

---

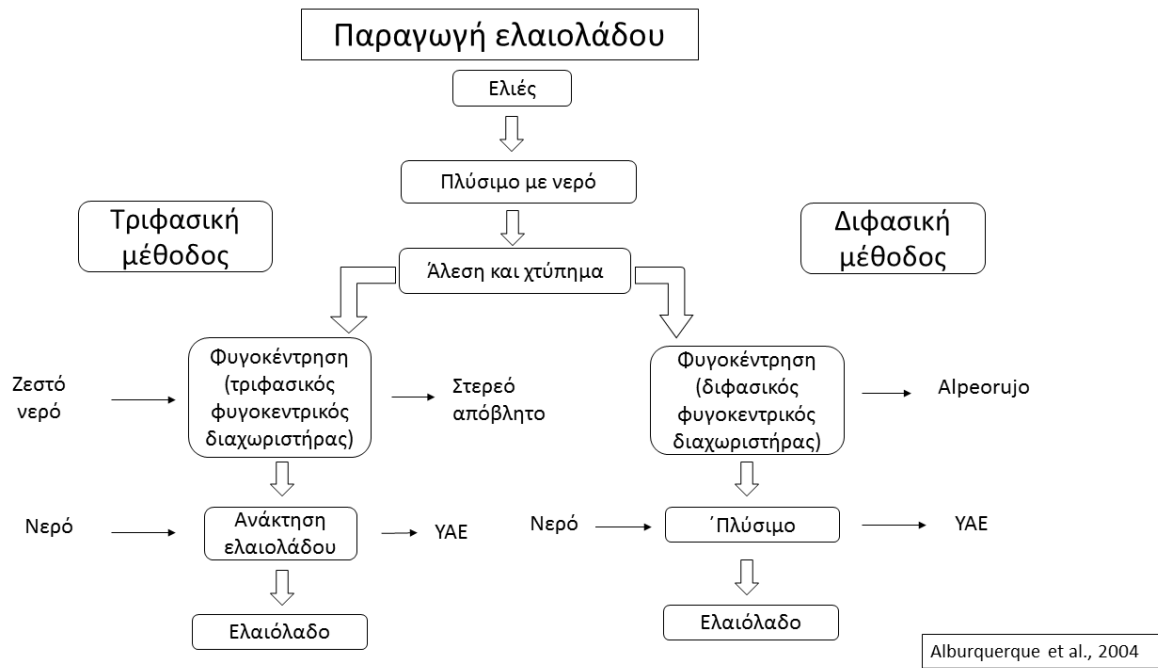
Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων, (FAO, <http://www.fao.org/faostat/>), το 2014 η ελληνική παραγωγή ελαιολάδου ανήλθε στους 208.900 τόνους, ενώ η αντίστοιχη παραγωγή της Ιταλίας ήταν 294.914 τόνους και της Ισπανίας 1.738.600 τόνους. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι η Ελλάδα βρίσκεται στην τρίτη θέση των ελαιοπαραγωγών χωρών παγκοσμίως. Η παραγωγή ελαιολάδου όμως συνοδεύεται και από αντίστοιχη παραγωγή αποβλήτων, η οποία εκτιμάται ότι ανέρχεται στα 7 έως 30 εκατομμύρια m<sup>3</sup> ετησίως, σε παγκόσμια κλίμακα (Tsagkaraki et al., 2007). Η παραδοσιακή μέθοδος και η τριφασική μέθοδος εξαγωγής του λαδιού, οι οποίες χρησιμοποιούνται πιο συχνά στον ελλαδικό χώρο, παράγουν τριών ειδών προϊόντα: το ελαιόλαδο (20%) και δύο ειδών απόβλητα: ένα στερεό απόβλητο (30%) και ένα υγρό απόβλητο, τον κατσίγαρο (50%). Το στερεό απόβλητο είναι ένα μίγμα της σάρκας της ελιάς και του ελαιοπυρήνα. Προς το παρόν, το απόβλητο αυτό επεξεργάζεται περαιτέρω σε ειδικές μονάδες για την εξαγωγή του πυρηνέλαιου. Μετά τη διαδικασία αυτή, το ξηρό κλάσμα που απομένει μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν καύσιμο, σαν πρόσθετο ζωοτροφών ή ακόμη και σαν λίπασμα για τα ίδια τα ελαιόδεντρα. Η κατάσταση όμως είναι πιο περίπλοκη με την κατεργασία του υγρού αποβλήτου (YAE). Επί του παρόντος δεν έχει βρεθεί κάποια γενικώς αποδεκτή μέθοδος επεξεργασίας του που να συνδυάζει την ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων με την οικονομική βιωσιμότητα. Το YAE είναι ένα μίγμα από νερό που έχει χρησιμοποιηθεί για το πλύσιμο των ελιών αλλά και σε διάφορα άλλα στάδια της διαδικασίας, και από μαλακούς ιστούς της ελιάς, πηκτίνες και σε μικρό ποσοστό, ελαιόλαδο. Τα βασικά του χαρακτηριστικά είναι οι υψηλές τιμές BOD και φαινολικών ενώσεων, αλλά και η εξαιρετικά υψηλή του ποικιλομορφία, αφού η σύστασή του εξαρτάται άμεσα από την ποικιλία και την ωριμότητα της ελιάς, τις κλιματικές και εδαφικές συνθήκες και τη μέθοδο παραγωγής του ελαιολάδου. Ακόμη, το pH του είναι συνήθως χαμηλό, το οργανικό του φορτίο υψηλό, όπως επίσης και η ηλεκτρική του αγωγιμότητα. Η υψηλή συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων του προσδίδει σκούρο χρώμα και έντονη μυρωδιά, ενώ επιπλέον περιέχει και γαλακτωματοποιημένα λίπη. Στο απόβλητο περιέχονται επίσης πρωτεΐνες και σάκχαρα, και σε μικρότερα ποσοστά, οργανικά οξέα, πολυαλκοόλες, λίπη, και άλλα. Η παρουσία του YAE σε υδατικούς αποδέκτες μειώνει τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου και αυξάνει το οργανικό φορτίο. Η υψηλή του συγκέντρωση σε φώσφορο μπορεί να προκαλέσει υπέρμετρη αύξηση των φυκών, οδηγώντας σε φαινόμενα ευτροφισμού. Κάποιοι υδατικοί οργανισμοί, όπως ψάρια και κάποια αρθρόποδα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις του αποβλήτου, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των πληθυσμών τους (Fiorentino et al., 2004). Επίσης, λόγω της υψηλής του συγκέντρωσης σε πολυφαινόλες, το YAE είναι εξαιρετικά τοξικό έναντι φυτών και μικροοργανισμών του εδάφους. Η επαφή του με φυτά παρεμποδίζει τη βλάστηση των σπόρων πολλών ειδών φυτών, αλλά και την ανάπτυξη των νεαρών φυτών (Rinaldi et al., 2003). Αυτές οι τοξικές ιδιότητες των φαινολών του YAE αποτελούν σημαντικό εμπόδιο των βιολογικών διεργασιών που συμβαίνουν στις συνηθισμένες μονάδες επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων, οπότε οι μονάδες αυτές δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επεξεργασία του. Ο σχεδιασμός κατάλληλων μονάδων επεξεργασίας των YAE πρέπει να επιλύσει έναν σημαντικό αριθμό προβλημάτων, που αποτελούν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των YAE, προκειμένου οι μονάδες αυτές να είναι αποδοτικές: Το απόβλητο χαρακτηρίζεται από εποχιακή παραγωγή, αφού παράγεται το πολύ 4 μήνες το χρόνο, ενώ η χημική του σύνθεση και η ποσότητά του μπορεί να ποικίλλουν πολύ από χρονιά σε χρονιά. Επίσης, στην

Ελλάδα κυρίως, η παραγωγή της πλειονότητας του ελαιόλαδου πραγματοποιείται από πολυάριθμες μικρές μονάδες διασκορπισμένες σε όλη την επικράτεια, καθιστώντας τη συλλογή και μεταφορά του αποβλήτου ιδιαίτερα δύσκολη και οικονομικά ασύμφορη. Έτσι, στις περισσότερες περιπτώσεις, τα απόβλητα διατίθενται στο περιβάλλον χωρίς προηγούμενη κατεργασία, είτε σε δεξαμενές εξάτμισης, είτε απευθείας στο έδαφος ή σε υδατικούς αποδέκτες, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις καίγονται για παραγωγή ενέργειας. Η Ελληνική νομοθεσία απαγορεύει μεν την απόρριψη ανεπεξέργαστων αποβλήτων στο έδαφος (νόμοι 1650/86 και 3010/2002), ωστόσο δεν υπάρχει ειδική νομοθεσία για την απόρριψη αποβλήτων ελαιουργείου, όπως σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες.

### *1.3.1 Μέθοδοι εξαγωγής ελαιολάδου*

---

Οι μέθοδοι εξαγωγής ελαιολάδου είναι τρεις, η παραδοσιακή μέθοδος με χρήση πρέσας, η διφασική φυγοκεντρική μέθοδος και η τριφασική φυγοκεντρική μέθοδος (Tsagaraki et al., 2007). Στην παραδοσιακή πιεστική μέθοδο, η ποσότητα του προστιθέμενου νερού είναι μικρή, άρα και η ποσότητα των υγρών αποβλήτων είναι μικρή, αν και αυτά παράγονται πιο συμπυκνωμένα. Στην τριφασική φυγοκεντρική μέθοδο η προσθήκη ζεστού νερού είναι απαραίτητη στο στάδιο της φυγοκέντρωσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγαλύτερου όγκου υγρών αποβλήτων, τα οποία επιπλέον έχουν και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αιωρούμενα στερεά, σε σχέση με τα απόβλητα της πιεστικής μεθόδου. Η διφασική μέθοδος αναπτύχθηκε σχετικά πρόσφατα με σκοπό τη μείωση των παραγόμενων αποβλήτων. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα δημοφιλής στην Ισπανία, όπου έχει υιοθετηθεί από περίπου 90% των ελαιοτριβείων. Η διαφορά της με την τριφασική είναι ότι δεν απαιτείται επιπλέον νερό κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης και τα προϊόντα που παράγονται είναι δύο ειδών: το ελαιόλαδο, και ένα μόνο απόβλητο, για το οποίο έχει επικρατήσει η ονομασία *alpeorujo*, και είναι ένα μίγμα της σάρκας της ελιάς και των υγρών αποβλήτων, με υφή ημιστερεάς λάσπης. Σε γενικές γραμμές, η διφασική μέθοδος θεωρείται προτιμητέα, καθώς είναι λιγότερο πολύπλοκη, απαιτεί λιγότερη ενέργεια, παράγει ελαιόλαδο υψηλότερης ποιότητας σε σχέση με την τριφασική μέθοδο, αλλά έως και 80% μικρότερο όγκο αποβλήτων. Ωστόσο, το απόβλητο αυτό είναι αρκετά πιο δύσκολο στην επεξεργασία, επειδή διαθέτει πολύ μεγαλύτερο ποσοστό υγρασίας σε σχέση με το στερεό απόβλητο της τριφασικής μεθόδου, και άρα η ξήρανσή του προκειμένου να εξαχθεί από αυτό το πυρηνέλαιο είναι ένα επιπλέον κόστος για τις αντίστοιχες μονάδες. Ακόμη, διαθέτει υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες και πολυφαινόλες, γεγονός που δημιουργεί προβλήματα καραμελοποίησης και συσσωμάτωσης κατά την ξήρανση.



**Εικόνα 1.3.1:** Σχηματική απεικόνιση της τριφασικής και διφασικής μεθόδου παραγωγής ελαιολάδου (Alburquerque et al., 2004).

### 1.3.2 Σύνθεση ΥΑΕ – Πολυφαινόλες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η σύνθεση των ΥΑΕ μπορεί να εμφανίζει τεράστια ποικιλομορφία, η οποία εξαρτάται από τη διαδικασία εξαγωγής ελαιολάδου, αλλά και από τα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης. Στον παρακάτω Πίνακα φαίνονται ενδεικτικές συγκεντρώσεις των κυριότερων συστατικών των ΥΑΕ, με βάση επιλεγμένες βιβλιογραφικές αναφορές:

**Πίνακας 1.3.1:** Χημικά χαρακτηριστικά των αποβλήτων από διαφορετικές μεθόδους εξαγωγής ελαιολάδου (Dermeche et al., 2013).

Παράμετροι	Απόβλητα			Αναφορές
	ΥΑΕ	Στερεά απόβλητα		
		Στερεό απόβλητο τριφασικής μεθόδου	Αιρεοσυζο	
Ελαιοπυρήνα (%)		15–45	12–18	Dermeche et al., 2013
Ολικά στερεά (%)	6.33–7.19	87.1–94.4		Vlyssides et al., 1996, Paredes et al., 1999, Martin-Garcia et al. 2003.
Τέφρα (%)	1	1.7–4	1.42–4	Lafka et al., 2011, Vlyssides et al., 1998
pH	2.24–5.9		4.9–6.8	Galiatsatou et al., 2002, Baeta-Hall et al., 2005
Ηλεκτρική αγωγιμότητα (dS/m)	5.5–10		1.78–5.24	Paredes et al., 1999, Baeta-Hall et al., 2005
Ολικός άνθρακας (%)	2–3.3	29.03–42.9	25.37	Garcia-Castello et al., 2010, Vlyssides et al., 1998
Οργανικό φορτίο (%)	57.2–62.1	85	60.3–98.5	Vlyssides et al., 1996, Martin-Garcia et al. 2003, Vlyssides et al., 2004
Ολικός οργανικός άνθρακας (g/L)	20.19–39.8			Garcia-Castello et al., 2010, Vlyssides et al., 2004
Ολικά αιωρούμενα στερεά (g/L)	25–30			Khoufi et al., 2008
Ανόργανος άνθρακας (g/L)	0.2			Garcia-Castello et al., 2010
Ολικό άζωτο (%)	0.63	0.2–0.3	0.25–1.85	Paredes et al., 1999
P (%)	0.19	0.03–0.06	0.03–0.14	Paredes et al., 1999

<b>K (%)</b>	0.44–5.24	0.1–0.2	0.63–2.9	Yangui et al., 2009, Paredes et al., 1999, Vlyssides et al., 2004
<b>Na (%)</b>	0.15		0.02–0.1	Paredes et al., 1999, Madejon et al., 1998
<b>Ca (%)</b>	0.42–1.15		0.23–1.2	Yangui et al., 2009, Paredes et al., 1999,
<b>Mg (%)</b>	0.11–0.18		0.05–0.17	Yangui et al., 2009, Paredes et al., 1999, Madejon et al., 1998
<b>Fe (%)</b>	0.26 ± 0.03		0.0526– 0.26	Yangui et al., 2009
<b>Cu (%)</b>	0.0021		0.0013– 0.0138	Paredes et al., 1999, Madejon et al., 1998
<b>Mn (%)</b>	0.0015		0.0013– 0.0067	Paredes et al., 1999, Madejon et al., 1998
<b>Zn (%)</b>	0.0057		0.0010– 0.0027	Paredes et al., 1999
<b>Λίπη (%)</b>	0.03–4.25	3.5–8.72	3.76–18.0	Paredes et al., 1999, Vlyssides et al., 1998, Baeta-Hall et al., 2005
<b>Ολικά φαινολικά (%)</b>	0.63–5.45	0.2–1.146	0.4–2.43	Yangui et al., 2009, Vlyssides et al., 1998, Caputo et al., 2003
<b>Ολικά σάκχαρα (%)</b>	1.5–12.22	0.99–1.38	0.83–19.3	Paredes et al., 1999, Vlyssides et al., 1998, Vlyssides et al., 2004, Caputo et al., 2003
<b>Ολικές πρωτεΐνες (%)</b>		3.43–7.26	2.87–7.2	Vlyssides et al., 1998
<b>Chemical oxygen demand (g/L)</b>	30–320			Galiatsatou et al., 2002
<b>Biological oxygen demand (g/L)</b>	35–132			Sierra et al., 2001
<b>Κυτταρίνη (%)</b>		17.37–24.14	14.54	Vlyssides et al., 1998
<b>Ημικυτταρίνη (%)</b>		7.92–11.00	6.63	Vlyssides et al., 1998
<b>Λιγνίνη (%)</b>		0.21–14.18	8.54	Vlyssides et al., 1998

Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά των ΥΑΕ, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι το φαινολικό τους περιεχόμενο. Οι (πολύ)φαινόλες, λόγω της υδατοδιαλυτότητάς τους, κατά τη διάρκεια επεξεργασίας της ελιάς μεταφέρονται από τη σάρκα στο υδατικό κλάσμα και τελικά απομακρύνονται με τα ΥΑΕ. Το φαινολικό περιεχόμενο των ΥΑΕ μπορεί επίσης να ποικίλλει σημαντικά, τόσο σε ποσότητα όσο και σε ποιότητα, ανάλογα με τις διαφοροποιήσεις μιας σειράς παραμέτρων, όπως το είδος της ελιάς, το στάδιο ωριμότητάς της, και κυρίως το είδος της διεργασίας που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του λαδιού (Lesage-Meesen et al., 2001).

Στα ΥΑΕ έχουν βρεθεί πάνω από 30 διαφορετικές φαινολικές ουσίες, οι οποίες μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες με βάση το μοριακό τους βάρος: τα φαινολικά μονομερή, φλαβονοειδή και άλλα, με μοριακό βάρος μικρότερο των 10 kDa, και τα σκουρόχρωμα φαινολικά πολυμερή μεσαίου και μεγάλου μοριακού βάρους άνω των 10 kDa. Σε ότι αφορά τη χημική τους δομή, διακρίνονται σε τρεις κυρίως κατηγορίες: τα παράγωγα του κινναμικού οξέος, όπως το κινναμικό οξύ, το ο- και π- κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό και φερουλικό οξύ, τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, όπως το βενζοϊκό οξύ και το πρωτο-κατεχουϊκό οξύ, και τα παράγωγα της β-3,4-διϋδροξυφαινυλ-αιθανόλης, όπως η τυροσόλη και η υδροξυ-τυροσόλη. Άλλες φαινολικές ενώσεις που έχουν βρεθεί σε ΥΑΕ είναι η κατεχόλη, η 4-μέθυλ-κατεχόλη, η π-κρεσόλη, η ρεζορκινόλη, η ολευρωπεΐνη, η διμεθυλολευρωπεΐνη, το βερμπασκοσίδιο, και κάποια φαινολικά οξέα όπως το βανιλλικό οξύ, το πρωτοκατεχουϊκό οξύ, το βερατρικό οξύ, το συρινγικό οξύ και το κινναμικό οξύ. Επίσης, στα ΥΑΕ εντοπίζονται και φλαβονοειδή, όπως η απιγενίνη, η ανθοκυανίνη, η λουτεολίνη, η κερσετίνη και άλλα (Ramos-Cormenzana et al., 1996, Lesage-Meesen et al., 2001). Μεταξύ των διαφόρων φαινολικών ενώσεων που περιέχουν τα ΥΑΕ, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η υδροξυ-τυροσόλη, η οποία παράγεται από την υδρόλυση της ολευρωπεΐνης από μια γλυκοζιδάση σε ελενολικό οξύ και υδροξυτυροσόλη. Η υδροξυτυροσόλη εμφανίζει εξαιρετική αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση, ενώ διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι διαθέτει επιπλέον και αντικαρκινική δράση, αλλά δρα και προστατευτικά έναντι καρδιαγγειακών ασθενειών (Vilaplana-Pérez et al., 2014). Λόγω των πολλαπλών της βιολογικών δράσεων, η υδροξυτυροσόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό τροφίμων, ή ακόμη και στη βιομηχανία καλλυντικών (Miralles et al., 2015).

### 1.3.3 Μέθοδοι επεξεργασίας ΥΑΕ

---

Σύμφωνα με τα παραπάνω, γίνεται προφανές ότι το ΥΑΕ είναι ένας ισχυρός ρυπογόνος παράγοντας, ταυτόχρονα όμως είναι και μια πηγή πολύτιμων ενώσεων, όπως πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, ανόργανα συστατικά και άλλα, τα οποία θα μπορούσαν εν δυνάμει να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν εμπορικά. Έτσι, οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται στην ανάπτυξη ευέλικτων και αποδοτικών μεθόδων, οι οποίες θα επιτρέπουν την ανάκτηση χρήσιμων ουσιών, η εκμετάλλευση των οποίων θα μπορούσε να μειώσει έως ένα βαθμό το κόστος της επεξεργασίας. Με βάση αυτά τα δεδομένα, οι μέθοδοι επεξεργασίας που έχουν προταθεί μέχρι σήμερα μπορούν να διαχωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες:

- Μέθοδοι αποτοξικοποίησης

- Διεργασίες που στοχεύουν στην παραγωγή διαφόρων προϊόντων
- Διεργασίες που στοχεύουν στην παραγωγή ενέργειας
- Συνδυαστικές μέθοδοι.

### 1.3.3.1 Μέθοδοι αποτοξικοποίησης

---

Οι μέθοδοι αυτές στοχεύουν στη βιοεξυγίανση του αποβλήτου, προκειμένου να μπορεί να απορριφθεί με ασφάλεια σε εδαφικούς ή υδατικούς αποδέκτες, και χωρίζονται σε βιολογικές ή φυσικοχημικές μεθόδους.

#### A) Βιολογικές μέθοδοι

Οι βιολογικές μέθοδοι χωρίζονται σε αερόβιες και αναερόβιες μεθόδους. Με δεδομένο ότι οι αερόβιες μέθοδοι επιτρέπουν πολύ μικρή εισερχόμενη συγκέντρωση αποβλήτου, σε γενικές γραμμές οι αναερόβιες θεωρούνται πιο κατάλληλες για την επεξεργασία των ΥΑΕ. Επιπλέον, οι αναερόβιες μέθοδοι μπορούν να οδηγήσουν και στην παραγωγή μεθανίου, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο, και να καλύψει, τουλάχιστον εν μέρει, τις ενεργειακές απαιτήσεις της μονάδας.

#### Αναερόβιες διεργασίες

Οι αναερόβιες διεργασίες οφείλονται κατά κύριο λόγο σε βακτηριακή δράση, και μπορούν να διαχωριστούν σε τρία στάδια: στο πρώτο στάδιο, τα αναερόβια βακτήρια διασπούν τα πολύπλοκα οργανικά μακρομόρια, όπως πολυσακχαρίτες και πολυφαινόλες, στα μονομερή τους (απλά σάκχαρα και φαινόλες, αντίστοιχα). Τα μόρια αυτά στη συνέχεια μετατρέπονται σε οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, φορμικό οξύ και αλκοόλες από ακετογόνα βακτήρια, στο δεύτερο στάδιο της διαδικασίας. Στο τελευταίο στάδιο της διαδικασίας, τα μεθανογόνα βακτήρια μετατρέπουν τα οργανικά οξέα σε βιοαέριο, το οποίο είναι ένα μίγμα κυρίως μεθανίου (60-80%) και άλλων αερίων, κυρίως διοξειδίου του άνθρακα (Sabbah et al., 2004). Λόγω της μικροβιακής δραστηριότητας που είναι απαραίτητη για τη λειτουργία των διεργασιών αυτών, η αραίωση του αποβλήτου ως ένα βαθμό είναι απαραίτητη. Μια πιο οικονομική εναλλακτική λύση σε σχέση με το νερό είναι η ανάμιξη του ΥΑΕ με κάποιο άλλο οργανικό παραπροϊόν, το οποίο, σε συνδυασμό με τη μείωση της συγκέντρωσης των τοξικών πολυφαινολών, θα μπορούσε να προσφέρει επίσης τον εμπλουτισμό του αποβλήτου σε θρεπτικές ενώσεις πολύτιμες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όπως πηγές αζώτου. Για παράδειγμα, η ανάμιξη των ΥΑΕ με υγρά απόβλητα χοιροτροφείων από τους Rozzi και Malrei (1996) και Marques (2001), και η ακόλουθη αναερόβια ζύμωσή τους οδήγησε στη μείωση του COD κατά 70-80%, με αποτέλεσμα το υγρό απόβλητο να μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί ως υγρό άρδευσης.

#### Αερόβιες διεργασίες

Οι αερόβιες διεργασίες αποτοξικοποίησης των ΥΑΕ είναι πολύ καλά μελετημένες και επικεντρώνονται κυρίως στην επεξεργασία τους με Βασιδιομύκητες λευκής σήψης, όπως οι μύκητες του γένους *Pleurotus*. Οι μύκητες αυτοί, όπως έχει ήδη αναφερθεί, παράγουν λιγνινολυτικά ένζυμα και μπορούν να διασπάσουν τις φαινολικές ενώσεις των ΥΑΕ, οι οποίες μοιάζουν δομικά με τη



λιγνίνη. Τα ποσοστά μείωσης του φαινολικού φορτίου που έχουν επιτευχθεί με αυτή τη μέθοδο είναι εντυπωσιακά (Olivieri et al., 2012, Ntougias et al., 2012, Koutrotsios and Zervakis 2014), και φτάνουν το 95% (Olivieri et al., 2006, Ntougias et al., 2015), με ανάλογα αποτελέσματα και σε ότι αφορά τον αποχρωματισμό του αποβλήτου.

Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτές παρουσιάζουν κάποια σημαντικά μειονεκτήματα. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η ικανοποιητική ανάπτυξη των μικροοργανισμών, η προκατεργασία του αποβλήτου είναι απαραίτητη: η κατάλληλη αραίωση, η ρύθμιση του pH και η θερμική προκατεργασία (αποστείρωση ή παστερίωση) είναι κομβικής σημασίας στην επιτυχία της μεθόδου. Ακόμη, η ανάπτυξη των Βασιδιομυκήτων είναι ιδιαίτερα αργή, σε σύγκριση με μονοκύτταρους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα ο απαιτούμενος χρόνος για τη βιοαποικοδόμηση (τουλάχιστον 6-12 ημέρες) (Koutrotsios and Zervakis, 2014, Ntougias et al., 2015) να λειτουργεί παρεμποδιστικά στην εφαρμογή της διαδικασίας σε βιομηχανικό επίπεδο.

#### B) Φυσικοχημικές διεργασίες

##### Εξουδετέρωση, καθίζηση/συσσωμάτωση

Οι διεργασίες αυτές συνίστανται στην προσθήκη χημικών ουσιών με στόχο την καθίζηση των αιωρούμενων στερεών και των κolloειδών σωματιδίων των ΥΑΕ σε ένα αδιάλυτο στερεό, το οποίο μπορεί να απομακρυνθεί με ευκολία. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να μειωθούν τα αιωρούμενα λίπη, στερεά, καθώς και οι τιμές BOD και COD. Η καθίζηση των κolloειδών μπορεί να επιτευχθεί είτε με τροποποίηση της τιμής pH (εξουδετέρωση) είτε με προσθήκη μιας ουσίας-επαγωγέα της καθίζησης (καθίζηση/συσσωμάτωση). Για παράδειγμα, η προσθήκη CaO με στόχο την αύξηση του pH στο 11 έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε μείωση των λιπαρών και του COD, σε αποχρωματισμό και σε σημαντική μείωση της μυρωδιάς (Mitrakas et al., 1996). Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η παραγωγή λάσπης με υψηλό ρυπαντικό φορτίο, ενώ ακόμη και το υγρό που παραμένει, αν και με μειωμένες τιμές BOD και COD, δεν μπορεί να διατεθεί με ασφάλεια σε περιβαλλοντικούς αποδέκτες. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού, οι μέθοδοι αυτές είναι περισσότερο κατάλληλες σαν μέθοδοι προκατεργασίας.

##### Οξειδωτικές μέθοδοι

Διάφοροι οξειδωτικοί παράγοντες έχουν δοκιμαστεί στην κατεργασία των ΥΑΕ, όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου, όζον, χλώριο και χλωριωμένα παράγωγα, ή συνδυασμός αυτών. Ακόμη, έχουν αναπτυχθεί και μέθοδοι οξείδωσης που συνδυάζουν χημικούς παράγοντες με υπεριώδη ακτινοβολία. Ο συνδυασμός αυτός οδηγεί στο σχηματισμό ιδιαίτερα ισχυρών ριζών, οι οποίες έχουν την ικανότητα να ανοργανοποιήσουν πλήρως πολύπλοκα οργανικά μόρια. Ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα είναι το αντιδραστήριο Fenton, το οποίο συνδυάζει το υπεροξείδιο του υδρογόνου με ένα σιδηρούχο άλας (Gernjak et al., 2004, Rivas et al., 2001). Άλλες μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί συνδυάζουν το όζον με UV ακτινοβολία (Javier-Benitez et al., 1997), το υπεροξείδιο του υδρογόνου με UV ακτινοβολία (Gernjak et al., 2004). Το μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι συνήθως το υψηλό κόστος των οξειδωτικών παραγόντων, και γι' αυτό το λόγο, οι μέθοδοι αυτές εφαρμόζονται σαν εναλλακτική λύση των βιολογικών διεργασιών.

##### Θερμικές μέθοδοι

Οι μέθοδοι αυτής της κατηγορίας περιλαμβάνουν πολλές διαφορετικές διεργασίες, όπως την εξάτμιση, την απόσταξη, την πυρόλυση και άλλες. Τα μειονεκτήματα αυτών αφορούν κυρίως στα

υψηλά λειτουργικά κόστη, αφού απαιτούνται υψηλά ποσά ενέργειας και ειδικός εξοπλισμός, αλλά και την επιπλέον διαχείριση που απαιτείται για τα αέρια και στερεά προϊόντα. Τα προϊόντα των μεθόδων αυτών είναι συνήθως πιο συμπυκνωμένα από το αρχικό ΥΑΕ, και άρα απαιτούν επιπλέον στάδια για την ασφαλή διάθεσή τους, ή ακόμη και για την καύση τους και την παραγωγή αέριων ρύπων (Rozzi and Malrei, 1996). Η φυσική εξάτμιση των ΥΑΕ σε εξατμισοδεξαμενές ή φυσικές λίμνες απόθεσης, με τη βοήθεια της ηλιακής ενέργειας, είναι ασύγκριτα πιο οικονομική και απλή μέθοδος, και ήταν μια από τις πρώτες λύσεις που χρησιμοποιήθηκε ευρέως, ενώ είναι και η πιο διαδεδομένη μέθοδος διάθεσης των αποβλήτων αυτή τη στιγμή στην Ελλάδα. Το απόβλητο συνήθως παραμένει για 7-8 μήνες στις δεξαμενές, ενώ απαιτείται και μεγάλη επιφάνεια για την εναπόθεση, αν και η μείωση του COD που αναφέρεται είναι σημαντική (έως και 75-80%). Η μέθοδος αυτή ωστόσο συνοδεύεται από σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα, που αφορούν τόσο τις αέριες εκπομπές μεθανίου, όσο και τη μόλυνση των υπόγειων υδατικών αποθεμάτων (Azbar et al., 2004, Rozzi and Malrei 1996). Η καύση και η πυρόλυση είναι δύο καταστρεπτικές μέθοδοι, που δεν επιτρέπουν περαιτέρω χρήση του ΥΑΕ, ενώ χαρακτηρίζονται από υψηλά κόστη λειτουργίας, υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια, προκατεργασία του αποβλήτου και ακριβό εξοπλισμό, έτσι επιλέγονται κυρίως για πολύ συμπυκνωμένα ΥΑΕ ή για ημιστερεά απόβλητα ελαιουργείων.

#### Διήθηση

Οι διάφορες μέθοδοι διήθησης με χρήση μεμβρανών έχουν δοκιμαστεί ευρέως στην κατεργασία των ΥΑΕ, επειδή είναι αποτελεσματικές στο διαχωρισμό μιγμάτων ελαίου/νερού, χωρίς προσθήκη επιπλέον διαλυτών. Η υπερδιήθηση είναι η πιο δημοφιλής μέθοδος αυτής της κατηγορίας, ενώ έχουν δοκιμαστεί επίσης η μικρο-διήθηση και η αντίστροφη ώσμωση. Η εφαρμογή των μεθόδων αυτών καταλήγει στο διαχωρισμό του αποβλήτου σε δύο φάσεις, το διήθημα και το συμπυκνωμένο κλάσμα. Τα κολλοειδή σωματίδια, τα λίπη και τα μακρομόρια μεγάλου μοριακού βάρους που δεν διαπερνούν τις μεμβράνες, λαμβάνονται στο συμπυκνωμένο κλάσμα. Με την υπερδιήθηση παράγεται μικρή μόνο ποσότητα συμπυκνωμένου κλάσματος, καθώς το 90-95% του όγκου του αποβλήτου συγκεντρώνεται στο διήθημα, ενώ με την επιλογή του κατάλληλου μεγέθους των πόρων της μεμβράνης, μπορεί να ελεγχθεί η σύσταση του διηθήματος. Έτσι, μπορεί να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των λιπαρών ουσιών από τα άλατα, τα σάκχαρα και τις φαινόλες, ενώσεις οι οποίες στη συνέχεια θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν εμπορικά (Paraskeva et al., 2007, Di Lecce et al., 2014).

Ωστόσο, το κόστος των διεργασιών αυτών είναι εξαιρετικά υψηλό, και επιπλέον απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό για τη λειτουργία τους. Το βασικότερο πρόβλημα είναι η συχνή καταστροφή των μεμβρανών, η οποία προκαλείται από τις κολλώδεις ουσίες του αποβλήτου (Pulido, 2016). Ακόμη, οι τιμές COD τόσο του διηθήματος όσο και του συμπυκνωμένου κλάσματος δεν επιτρέπουν την απευθείας απόρριψη στο περιβάλλον, οπότε κάποιο επιπλέον στάδιο επεξεργασίας είναι συνήθως απαραίτητο. Οι μέθοδοι αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά μόνο στην περίπτωση όπου ο στόχος είναι η απομόνωση υψηλής αξίας ενώσεων, όπως πολυφαινολών και αρωματικών ενώσεων, προκειμένου να αξιοποιηθούν περαιτέρω. Οι ουσίες αυτές συμπυκνώνονται με τη χρήση των μεμβρανών, κάτι που διευκολύνει την επακόλουθη απομόνωση και τον καθαρισμό τους, ενώ, εφόσον πρόκειται για προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, είναι εφικτή και η κάλυψη του υψηλού κόστους των μεμβρανών. Ταυτοχρόνως, το συμπυκνωμένο κλάσμα στο οποίο περιέχονται υψηλές συγκεντρώσεις λαδιού και χαμηλές συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω ως λίπασμα ή ζωοτροφή.

#### A) Παραγωγή λιπασμάτων

Τα ΥΑΕ δεν μπορούν να διατεθούν απευθείας στο έδαφος, λόγω των φυτοτοξικών τους ιδιοτήτων. Ωστόσο, με την κατάλληλη κατεργασία, μπορούν να μετατραπούν σε ένα χρήσιμο λίπασμα, λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε νερό, οργανικό φορτίο και θρεπτικά συστατικά. Τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Azotobacter* μπορούν να χρησιμοποιήσουν τις φαινόλες, τα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα του ΥΑΕ σαν πηγή άνθρακα, με ταυτόχρονη αζωτοδέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου σε οργανικές νιτρο-ενώσεις. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί η πλήρης ανακύκλωση του αποβλήτου και η επαναδιάθεσή του στο έδαφος (Chatjivanlidis et al., 1996, Ramos-Cormenzana et al., 1995).

#### B) Κομποστοποίηση

Η κομποστοποίηση αφορά μια ελεγχόμενη βιολογική αποικοδόμηση οργανικών υποστρωμάτων (αποβλήτων, υπολειμμάτων, κ.α.). Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό χρησιμοποιούν το οργανικό υπόστρωμα για αύξηση και αναπαραγωγή σε δύο στάδια: ένα θερμόφιλο στάδιο το οποίο χαρακτηρίζεται από τη γρήγορη ανάπτυξη των βακτηριακών πληθυσμών και την επακόλουθη γρήγορη αποικοδόμηση του οργανικού φορτίου και ένα μεσόφιλο στάδιο όπου αναπτύσσονται οι μύκητες και ο ρυθμός της αποικοδόμησης είναι χαμηλότερος. Το τελικό προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα για την ανάπτυξη των φυτών.

Στην περίπτωση της κομποστοποίησης του ΥΑΕ, αυτό προστίθεται στο θερμόφιλο στάδιο, προκειμένου να αντικαταστήσει το νερό που εξατμίζεται. Έτσι, το θερμόφιλο στάδιο μπορεί να επιμηκυνθεί, το στερεό υπόστρωμα εμπλουτίζεται σε οργανική ύλη, απαραίτητη για τη μικροβιακή αύξηση, και το ΥΑΕ συμπυκνώνεται αλλά και αποικοδομείται. Κατάλληλοι φορείς για την κομποστοποίηση του ΥΑΕ θεωρούνται υποστρώματα που είναι πλούσια σε άζωτο, προκειμένου να αντισταθμιστεί η χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο του ΥΑΕ, όπως υπολείμματα βαμβακιού, άχυρο καλαμποκιού (Cegarra et al., 1996, Paredes et al., 1999), άχυρο κριθαριού ή υπολείμματα ρυζιού (Cegarra et al., 1996). Στερεά απόβλητα από τη βιομηχανία ελαιολάδου μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν, όπως ελαιοπυρήνα, ή φύλλα και κλαδιά ελιάς, όπως έχει ήδη εφαρμοστεί πιλοτικά σε μια μονάδα στην Κρήτη (Manios et al., 2004, Parlavantza et al., 1994). Ακόμη, κοπριά ζώων και αστικά απόβλητα έχουν δοκιμαστεί, λόγω της περιεκτικότητάς τους σε άζωτο (Paredes et al., 2001). Ωστόσο, αν και η χρήση του ΥΑΕ σαν λίπασμα φαίνεται να είναι βιώσιμη, δεν είναι αρκετή για να απορροφήσει τις τεράστιες ποσότητες ΥΑΕ που παράγονται ετησίως.

#### Γ) Ανάκτηση αντιοξειδωτικών ουσιών

Ο καρπός της ελιάς είναι πλούσιος σε υδατοδιαλυτές ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή, οι ανθοκυανίνες, οι ταννίνες, και κάποια οξέα. Οι πολυφαινόλες του ΥΑΕ έχει δείχθει ότι διαθέτουν επίσης αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση. Οι ουσίες αυτές, απομονωμένες ή σε συνδυασμό με άλλες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής ή καλλυντικά. Λόγω των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σαν αντιμικροβιακοί παράγοντες σε απορρυπαντικά. Η υδροξυτυροσόλη είναι μια από τις πιο σημαντικές ενώσεις του ΥΑΕ και παρουσιάζει ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον λόγω των εξαιρετικών φαρμακολογικών και

αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της, αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό τροφίμων, ή σε καλλυντικά με αντιγηραντική και αντιοξειδωτική δράση.

Η απομόνωση των ενώσεων αυτών από το ΥΑΕ μπορεί να πραγματοποιηθεί με εκχύλιση με διαλύτη (liquid-liquid extraction) ή με προσρόφηση σε κατάλληλες ρητίνες. Συνήθως χρησιμοποιούνται χρωματογραφικές μέθοδοι για τον διαχωρισμό και καθαρισμό των ουσιών αυτών (De Marco et al., 2007). Οι πολικοί διαλύτες είναι οι καταλληλότεροι για την απομόνωση των πολυφαινόλων του ΥΑΕ, όπως οξικός αιθυλεστέρας και διεθυλαιθέρας.

Ακόμη, οι πολυφαινόλες του ΥΑΕ μπορούν να διαχωριστούν και μέσω προσρόφησης σε ένα πορώδες υλικό όπως ο ενεργός άνθρακας (Galiatsatou et al., 2002), ο ενεργός πηλός, και κάποια πολυμερή.

#### Δ) Παραγωγή βιοπολυμερών

Η παραγωγή βιοπολυμερών από ΥΑΕ είναι μια πολύ ενδιαφέρουσα εναλλακτική η οποία μελετάται τα τελευταία χρόνια λόγω της υψηλής προστιθέμενης αξίας τους και των εξαιρετικών τους ιδιοτήτων. Οι έρευνες επικεντρώνονται κυρίως σε δύο είδη βιοπολυμερών: τους εξωπολυσακχαρίτες και τα πολυ-υδροξυ-αλκανοειδή.

Οι εξωπολυσακχαρίτες είναι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες που παράγονται από κάποιους μικροοργανισμούς. Τα μόρια αυτά διαθέτουν εξαιρετικές ρεολογικές ιδιότητες, όπως καλή διαλυτότητα στο νερό, αύξηση του ιξώδους ενός διαλύματος ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις, ψευδοπλαστικότητα και σταθερότητα σε διάλυμα. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς, από οικονομική σκοπιά, είναι η ξανθάνη και η πουλλουλάνη. Η πουλλουλάνη παράγεται από το μύκητα *Aureobasidium pullulans*. Το ΥΑΕ έχει δειχθεί ότι είναι ένα καλό υπόστρωμα για την παραγωγή της σε συγκεντρώσεις έως και  $8 \text{ g L}^{-1}$  (Ramos-Cormenzana et al., 1995). Η ξανθάνη παράγεται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris*. Η παραγωγή της από ΥΑΕ έχει επιτευχθεί σε συγκεντρώσεις έως και  $7.7 \text{ g L}^{-1}$  (Lopez et al., 2001, Lopez and Ramos-Cormenzana, 1996). Τα πολυ-υδροξυαλκανοειδή (polyhydroxyalkanoates, PHA), είναι πολυεστέρες που συγκεντρώνονται σε ενδοκυτταρικούς κόκκους υπό συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης. Τα πολυμερή αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών και για την κατασκευή μικρο-ή νανο-σωματιδίων για ελεγχόμενη απελευθέρωση βιολογικά ενεργών ουσιών ή φαρμάκων. Η παραγωγή των ουσιών αυτών είναι εξαιρετικά ακριβή, κυρίως λόγω των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η χρήση ΥΑΕ για αυτό το σκοπό είναι μια πολύ οικονομική εναλλακτική λύση, ενώ κάποια στελέχη *Azotobacter chroococcum* έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Gonzalez-Lopez et al., 1996).

#### Ε) Παραγωγή βιοαερίου

Το βιοαέριο περιέχει μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πηγή ενέργειας όπως το φυσικό αέριο. Παράγεται κατά την αναερόβια ζύμωση των υγρών αποβλήτων, και το ΥΑΕ φαίνεται να είναι κατάλληλο για αυτή τη διεργασία, λόγω του υψηλού οργανικού του φορτίου. Ωστόσο, η υψηλή συγκέντρωσή του σε πολυφαινόλες είναι τοξική για τα περισσότερα μεθανογόνα βακτήρια, οπότε κάποιου είδους προκατεργασία είναι απαραίτητη πριν την αναερόβια ζύμωση (Gelegenis et al., 2007, Oz et al., 2015).

#### ΣΤ) Παραγωγή ζωοτροφών

Τα στερεά απόβλητα της παραγωγής ελαιολάδου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφές, αφού είναι πλούσια σε έλαια, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Ωστόσο, η υψηλή συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων και αλάτων δημιουργούν προβλήματα, καθώς μπορεί να παρεμποδίσουν τη σωστή πέψη και απορρόφηση των ωφέλιμων συστατικών. Το πρόβλημα αυτό θα μπορούσε να λυθεί με κατάλληλη προκατεργασία των αποβλήτων στοχεύοντας στην αύξηση της θρεπτικής τους αξίας (Shabtay et al., 2009).

## Κεφάλαιο 2

### Υλικά και Μέθοδοι

#### 2.1 Υλικά

##### 2.1.1 Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μικροοργανισμοί:

###### Βασιδιομύκητες

Τα στελέχη των Βασιδιομυκήτων παραλήφθηκαν από τη Μυκητοθήκη του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπεύθυνος της οποίας είναι ο Αναπληρωτής καθηγητής του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής Γεώργιος Ζερβάκης, και ήταν τα εξής:

- *Pleurotus citrinopileatus* LGAM 28684
- *Pleurotus ostreatus* LGAM 1123
- *Irpex lacteus* LGAM 238
- *Ganoderma lucidum* LGAM 9720

Τα στελέχη παρελήφθησαν και διατηρούνταν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA στους 4 °C.

###### Ασκομύκητες

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο θερμοφίλος νηματοειδής μύκητας *M. thermophila* ATCC 42464, από την εταιρεία DSMZ (DSM, Γερμανία).

###### Ζυμομύκητες

Το φυσικό στέλεχος X33 αγρίου τύπου (Mut<sup>+</sup>) της ζύμης *Pichia pastoris* από την εταιρεία Invitrogen (Η.Π.Α.), χρησιμοποιήθηκε ως φορέας έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών. Ο συγκεκριμένος μονοκύτταρος ζυμομύκητας επιλέχθηκε ως σύστημα έκφρασης πρωτεϊνών από ευκαρυωτικούς οργανισμούς, με βάση το χαρακτηριστικό του να αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας ως μόνη πηγή άνθρακα τη μεθανόλη. Ο μεταβολισμός της μεθανόλης ξεκινά με το ένζυμο αλκοολική οξειδάση, η έκφραση του οποίου ελέγχεται στο συγκεκριμένο μικροοργανισμό από δύο γονίδια, τα *AOX1* και *AOX2*, τα οποία εμφανίζουν υψηλή ομολογία μεταξύ τους. Τα κύτταρα στα οποία εκφράζονται και τα δύο γονίδια έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης, με αποτέλεσμα τον φαινότυπο Mut<sup>+</sup>. Επιπλέον, ο συγκεκριμένος μύκητας προσφέρει μια πληθώρα άλλων πλεονεκτημάτων για την έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, καθώς μπορεί να αναπτύσσεται με υψηλό ρυθμό σε θρεπτικά υποστρώματα χαμηλού κόστους, έχει τη δυνατότητα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και γλυκοζυλίωσης, και

επίσης χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα έκκρισης ενδογενών πρωτεϊνών, οπότε διευκολύνεται η απομόνωση των υψηλά εκκρινόμενων ετερόλογων πρωτεϊνών.

### Βακτήρια

Το στέλεχος *Escherichia coli* TOP10, της εταιρείας Invitrogen (Η.Π.Α.) [γονότυπος: F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*araleu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*] χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση και τον πολλαπλασιασμό πλασμιδιακών φορέων.

### *2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια – Αναλώσιμα υλικά – Στήλες χρωματογραφίας*

---

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), AppliChem (Γερμανία) και Merck- Millipore (Γερμανία) και ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), Erpendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο) και Merck - Millipore (Γερμανία). Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με στήλες χρωματογραφίας υλικού Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.). Ο διαχωρισμός των προϊόντων από τις αντιδράσεις βιομετατροπής των φλαβονοειδών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας C18 CC 250/4.6 Nucleosil 100-5 column (Macherey-Nagel, Γερμανία).

### *2.1.3 Εμπορικά ένζυμα – Τυποποιημένα εμπορικά σκευάσματα (kit) αντιδραστηρίων*

---

Τα εμπορικά ένζυμα και τα τυποποιημένα εμπορικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες: Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), Macherey-Nagel (Γερμανία), Fermentas (Η.Π.Α.), New England Biolabs® Inc., (Η.Π.Α.), Takara BIO Inc., (Ιαπωνία), Invitrogen (Η.Π.Α.), Invivogen (Γαλλία), Novagen (Η.Π.Α.), Clontech (Η.Π.Α.), Finnzymes (Φινλανδία), Stratagene (Η.Π.Α.), BIORAD Laboratories (Η.Π.Α.), Megazyme (Ιρλανδία) και Novozymes (Ελβετία).

### *2.1.4 Ρυθμιστικά διαλύματα*

---

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, παρασκευάστηκαν όλα με απιονισμένο νερό, όπως παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα:

<b>Ρυθμιστικά Διαλύματα</b>	
<b>P-Δ Talon</b>	20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0
<b>TE</b>	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
<b>TBE 10X</b>	108 g L <sup>-1</sup> Tris base, 55 g L <sup>-1</sup> βορικό οξύ, 40 mL L <sup>-1</sup> EDTA 0,5 M, pH 8,0

ΡΔ δείγματος ηλεκτροφόρησης αγαρόζης	900 μL γλυκερόλη 50% (v/v), 100 μL Μπλε Βρωμοφαινόλης 10×
ΡΔ φωσφορικών για θρεπτικό μέσο BMGY-BMMY	132 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M, 868 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M, pH 6,0
ΡΔ δείγματος ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE	3,55 mL 0,25M Tris Base pH 6,8, 1,8 mL Γλυκερόλη 50% (v/v), 1,8 mL β-Μερκαπτοαιθανόλη, 0,71 gr SDS, 2,85 mL μπλε βρωμοφαινόλης 0,1 % (w/v)
ΡΔ ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE	3,03 g L <sup>-1</sup> Tris-base, 14,4 g L <sup>-1</sup> γλυκίνη, 1 g L <sup>-1</sup> SDS, pH 8,3
Χρωματισμός πηκτώματος SDS-PAGE	0,4% (w/v) Coomassie G-250, 400 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 500 mL ddH <sub>2</sub> O
Αποχρωματισμός πηκτώματος SDS-PAGE	200 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 700 mL ddH <sub>2</sub> O

### 2.1.5 Θρεπτικά υποστρώματα

Τα θρεπτικά υποστρώματα παρασκευάστηκαν με απιονισμένο νερό και, εφόσον ήταν απαραίτητο, αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121 °C για 20 min, υπό πίεση 0,1 mPa. Τα θερμοευαίσθητα υλικά αποστειρώθηκαν με διήθηση από φίλτρα σύριγγας διαμέτρου πόρων 0,2 μm και προστέθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα μετά την ψύξη τους, σε θερμοκρασία κάτω των 50 °C.

Θρεπτικά Υποστρώματα		
Buffered Complex (BMGY)	Glycerol Medium	1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 100 mM ΡΔ φωσφορικών (132 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M, 868 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M, pH 6.0), 1.34% (w/v) YNB (34 g L <sup>-1</sup> YNB χωρίςθειικό αμμώνιο και αμινοξέα, 100 g L <sup>-1</sup> θειικό αμμώνιο), 4x10 <sup>-5</sup> % (w/v) βιοτίνη, 1% (v/v) γλυκερόλη
Buffered Complex (BMMY)	Methanol Medium	1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 4x10 <sup>-5</sup> % (w/v) βιοτίνη, 0.5% (v/v) μεθανόλη, 100 mM ΡΔ φωσφορικών, pH 6.0, 1.34% (w/v) YNB
MM- άγαρ (Minimal Methanol medium)		yeast nitrogen base 0.34% (w/v), 1% (w/v)θειικό αμμώνιο, 0.5% (v/v) μεθανόλη, 0,00004% (w/v) βιοτίνη, 1,5% (w/v) άγαρ
Υγρό θρεπτικό μέσο YPD ± ζεοσίνη		1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 2% (w/v) δεξτρόζη ± 100 μg mL <sup>-1</sup> ζεοσίνη



<b>Στερεό θρεπτικό μέσο YPD ± ζεοσίνη</b>	YPD με 2% (w/v) άγαρ ± 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ζεοσίνη
<b>Στερεό θρεπτικό μέσο YPDS ± ζεοσίνη</b>	YPD με 1,5% (w/v) άγαρ, 1 M σορβιτόλη ± 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ζεοσίνη
<b>Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα βακτηρίων LB (Luria Bertani) ± καναμυκίνη</b>	1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) τρυπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, pH 7,4 ± 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ καναμυκίνη
<b>Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα βακτηρίων LB ± καναμυκίνη</b>	LB με 1,5% (w/v) άγαρ ± 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ καναμυκίνη
<b>Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα βακτηρίων LS-LB (χαμηλής αλατότητας LB) ± ζεοσίνη (zeocin)</b>	0,5% (w/v) NaCl, 1% (w/v) τρυπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, pH 7,4 ± 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ζεοσίνη
<b>Στερεό υπόστρωμα βακτηρίων LS-LB ± ζεοσίνη</b>	LB με 1,5% (w/v) άγαρ ± 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ζεοσίνη
<b>Υγρό θρεπτικό μέσο <i>M. thermophila</i></b>	1 g L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 g L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,1 g L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 10 g L <sup>-1</sup> εκχύλισμα ζύμης, 1% (w/v) γλυκόζη, pH 5,0
<b>Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα μυκήτων PDA</b>	3,9% (w/v) άγαρ από ζωμό πατάτας και δεξτρόζη
<b>Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα μυκήτων YAE</b>	P-Δ φωσφορικών, 50 mM, pH 6, 50% (v/v), κατσίγαρος 50% (v/v), 1,5% (w/v) άγαρ
<b>Υγρό θρεπτικό Υπόστρωμα Ξυλόζης Βασιδιομυκήτων</b>	Ξυλόζη 57 g L <sup>-1</sup> , Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract) 30 g L <sup>-1</sup> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g L <sup>-1</sup> , MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,2 g L <sup>-1</sup>
<b>Υγρό θρεπτικό Υπόστρωμα YAE Βασιδιομυκήτων</b>	P-Δ φωσφορικών, 50 mM, pH 6, 50% (v/v), κατσίγαρος 50% (v/v), Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract) 30 g L <sup>-1</sup>

Το υγρό απόβλητο ελαιουργείου (YAE) τριφασικού διαχωριστήρα προμηθεύτηκε από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και ήταν προσφορά του Αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής Γεωργίου Ζερβάκη. Η σύστασή του και οι φυσικοχημικές του ιδιότητες περιγράφονται στη μελέτη των Ntougias et al., 2013. Πριν τη χρήση, το pH ρυθμίστηκε στο 6 με 3 N NaOH και το απόβλητο φυγοκεντρήθηκε στις 8000 rpm, 4 °C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια το απόβλητο διηθήθηκε με χαρτί χρωματογραφίας Whatman no.1, για την αφαίρεση τυχόν αιωρούμενων στερεών, και αποθηκεύθηκε στους -20 °C μέχρι τη χρήση.

### 2.1.6 Συσκευές – Όργανα

---

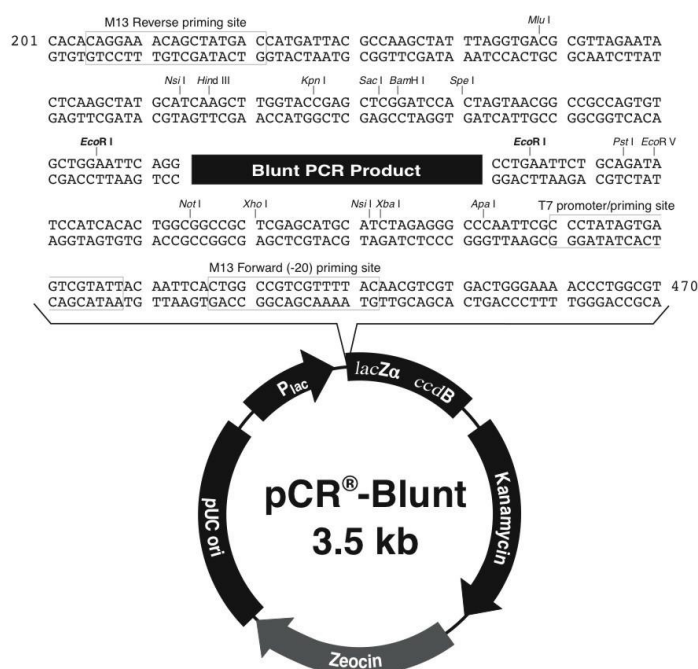
Οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οι εξής:

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave SANYO (Η.Π.Α.)
- Αναδευόμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία).
- Βιοαντιδραστήρες υγρής καλλιέργειας BIOFLO® & CELLIGEN® 310 (New Brunswick Scientific, Eppendorf Inc., CT, Η.Π.Α.) όγκου 2 L
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες.
- Μονάδα διαχωρισμού, ελέγχου και ανάπτυξης ηλεκτροφορήσεων (PhastSystem, Pharmacia, Σουηδία).
- Μονάδα ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό πρωτεϊνών Mini-PROTEAN 3 (BIORAD, Η.Π.Α.).
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα).
- Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού RE111 (Büchi, Σουηδία).
- Πολυφωτόμετρο microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG Labtech)
- Συλλέκτης κλασμάτων (Waters, Millipore, Η.Π.Α.).
- Συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης TC-512 TECHNE (Η.Π.Α.).
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία).
- Συσκευή διήθησης υπό κενό.
- Συσκευή λυοφιλίωσης (freeze drying), Christ ALPHA 1-4, B.Braun Biotec. International, Melsungen, (Γερμανία).
- Συσκευή ηλεκτρικής τροφοδοσίας E863 CONSORT (Βέλγιο).
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ BIORAD (Η.Π.Α.).
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης αгарόζης Easigel H1-set Scie-plas (Μεγάλη Βρετανία).
- Συσκευή μέτρησης pH, WTW 537 (WTW, Γερμανία).
- Συσκευή υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400, 400 mL και 50 mL και μεμβράνες PM-10 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.).
- Συσκευή φωτογράφισης σε θάλαμο InGenius Biolmaging Syngene (Μεγάλη Βρετανία) και λογισμικό GeneSnap v6.05 και GeneTools v3.06.
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q (Millipore, Η.Π.Α.).
- Σύστημα χρωματογραφίας διαχωρισμού πρωτεϊνών (ECONO gradient pump, BIORAD, Η.Π.Α. και Waters 600E, Millipore, Η.Π.Α.).
- Φυγόκεντροι Model J2-21 και TJ-6 Beckman Coulter (Η.Π.Α.), ALC 4239R (Μεγάλη Βρετανία) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία).
- Φωτόμετρο Hitachi UV 2000 (Η.Π.Α.).
- Αντλία HPLC LC-20AD (Shimadzu), συνδεδεμένη με ανιχνευτή UV-Vis ProStar 335 Diode Array detector (Agilent Technologies).

## 2.1.7 Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης

### 2.1.7.1 pCR® Blunt

Ο πλασμιδιακός φορέας pCR® Blunt της εταιρείας Invitrogen χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA με ισοτελή άκρα. Το πλασμίδιο φέρει γονίδιο θανάτου, το *ccdB*, έτσι ώστε οι φορείς που δεν διαθέτουν το υπό μελέτη ένθεμα να οδηγούν στο θάνατο των κυττάρων. Αντιθέτως, το γονίδιο διακόπτεται όταν το ένθεμα έχει ανασυνδυαστεί επιτυχώς, οπότε οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι που προκύπτουν αναπτύσσονται κανονικά στο θρεπτικό μέσο με το αντιβιοτικό επιλογής.

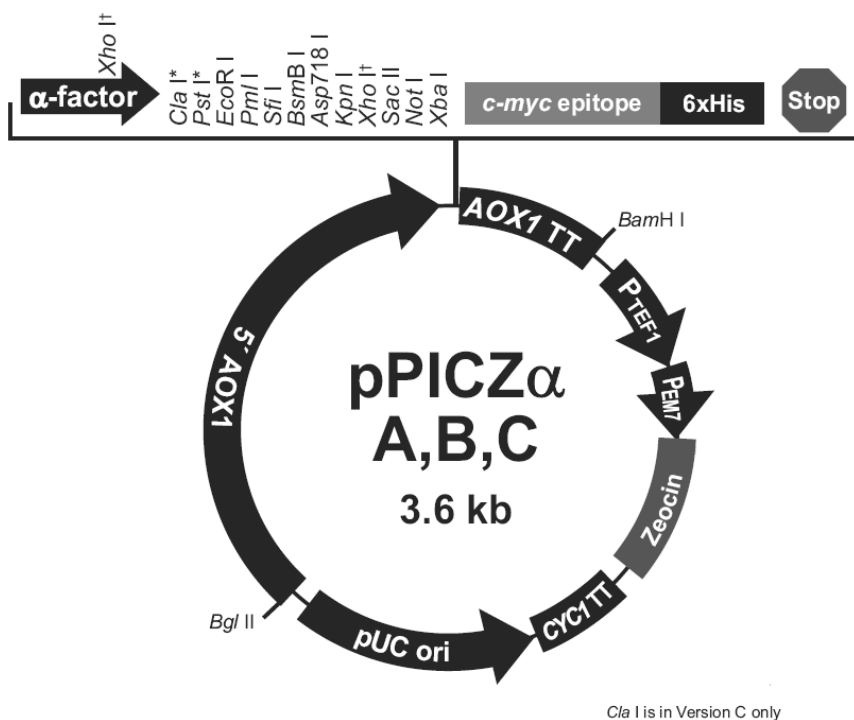


Εικόνα 2.1: Χάρτης περιορισμού του πλασμιδιακού φορέα pCR® Blunt (Invitrogen, Η.Π.Α.).

### 2.1.7.2 pPICZαC/ pPICZαA

Οι πλασμιδιακοί φορείς pPICZαC/ pPICZαA της εταιρείας Invitrogen χρησιμοποιήθηκαν για το μετασηματισμό επιδεικτικών κυττάρων *P. pastoris* με στόχο την έκφραση των επιθυμητών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και την έκκρισή τους στο περιβάλλον μέσο. Τα χαρακτηριστικά των φορέων, που επιτρέπουν τη χρήση τους για αυτό το σκοπό, είναι τα εξής:

- Σηματοδοτική αλληλουχία a-factor του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* που επιτρέπει την έκκριση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο περιβάλλον μέσο
- Γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη (zeocin, Invitrogen, Η.Π.Α.)
- Αλληλουχία – υποκινητής του γονιδίου της αλκοολικής οξειδάσης AOX1 και περιοχή ομολογίας που επιτρέπει την ενσωμάτωση στο γενωμικό DNA του *P. pastoris*.
- Επίτοπο του c-myc καθώς και έξι κωδικόνια His που επιτρέπουν τον καθαρισμό των ετερόλογων πρωτεϊνών με στήλες χρωματογραφίας ιόντων μετάλλου.



**Εικόνα 2.2:** Χάρτης περιορισμού των πλασμιδιακών φορέων pPICZ $\alpha$  (Invitrogen, Η.Π.Α.).

### 2.1.8 Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια – εκκινητές (primers)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για αντιδράσεις PCR στην παρούσα διατριβή προήλθαν από τις εταιρείες Sigma (Η.Π.Α.) και Eurofins MWG Operon (Γερμανία), όπως παρουσιάζονται παρακάτω:

<b>MtPerII</b>	
MtPerII-F	5'-GCATCGATGCGGACTCTCCTGGGTATGAAC-3' <b>Clal</b>
MtPerII-R	5'-CGTCTAGACCCGACAATGGCAGCACACC-3' <b>Xbal</b>
MtPerII-e1R	5'-CGCAGCGGCAAAGTCATCATTCCACACAGCCTGCGC-3'
MtPerII-e2F	5'-GACTTTGCCGCTGCGTACGT-3'

<b>MtLac</b>	
MtLac-F	5'- GCGAATTCGGAACCTCTGTCCATGATGAACAG -3' <i>EcoRI</i>
MtLac-R	5'- GCTCTAGATGACCGGAATCCTCACTATCC -3' <i>XbaI</i>
MtLac-e1R	5'- AAGGCCGTGCCAATGCATGCTAAGGTTCCG GTCATTC -3'
MtLac-e2F	5'- CATTGGCACGGCCTTTCTCAG -3'
MtLac-e2R	5'- CAGATC GTTTCATGCCCATGATCATGTGTGCCAGAATGTG -3'
MtLac-e3F	5'- GCATGGAAA CGATCTGGGTGG -3'

Στον παραπάνω πίνακα σημειώνονται επίσης οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών, καθώς επίσης και οι περιοχές αλληλεπικάλυψης στην περίπτωση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για αντιδράσης επικαλυπτόμενης PCR.

---

## 2.2 Καλλιέργειες μικροοργανισμών

---

### 2.2.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βασιδιομυκήτων

#### 2.2.1.1 Στερεές καλλιέργειες

---

Οι στερεές καλλιέργειες βασιδιομυκήτων πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA ή YAE. Για τον εμβολιασμό, στο κέντρο των τρυβλίων τοποθετήθηκαν τετράγωνα τεμάχια άγαρ, πλευράς 6mm, τα οποία είχαν αποκοπεί από τα άκρα αναπτυσσόμενης στερεής καλλιέργειας, υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 27 °C για 10 ημέρες σε σκοτάδι, και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους 4 °C ή χρησιμοποιήθηκαν απευθείας για τον εμβολιασμό υγρών καλλιεργείων.

#### 2.2.1.2 Υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας

---

Οι υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης ή YAE. Για τον εμβολιασμό τους, χρησιμοποιήθηκαν τετράγωνα τεμάχια άγαρ πλευράς 6mm, τα οποία είχαν αποκοπεί από τα άκρα αναπτυσσόμενης στερεής καλλιέργειας, υπό ασηπτικές συνθήκες, (1 τεμάχιο ανά 30 mL καλλιέργειας). Στην περίπτωση των υγρών καλλιεργείων με θρεπτικό υπόστρωμα YAE, χρησιμοποιούνταν επίσης ως μάρτυρας και μια κωνική φιάλη η οποία δεν είχε εμβολιαστεί με το μικροοργανισμό. Οι υγρές καλλιέργειες YAE όγκου 30 mL πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 mL, ενώ οι καλλιέργειες όγκου 100 mL πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Μετά τον εμβολιασμό, οι κωνικές φιάλες επώαστηκαν στους 27 °C, σε συνθήκες σκότους και με ήπια ανάδευση 80 rpm, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά, για 22 ημέρες, στην περίπτωση των καλλιεργείων με θρεπτικό υπόστρωμα YAE, ή για 12 ημέρες, στην περίπτωση των καλλιεργείων με

θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης. Η ανάπτυξη των καλλιιεργειών παρακολουθούνταν με λήψη δειγμάτων ανά τακτά χρονικά διαστήματα, και πραγματοποίηση των κατάλληλων αναλύσεων.

#### *2.2.1.3 Ανάπτυξη βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα*

---

Για την ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα, πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες προκαλλιέργειες όγκου 100 mL σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Μετά από επώαση 12 ημερών περίπου, οπότε και είχε αναπτυχθεί ικανή ποσότητα βιομάζας, οι προκαλλιέργειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των βιοαντιδραστήρων όγκου 2 L. Ο όγκος της καλλιέργειας σε κάθε περίπτωση ήταν 1700 mL, ενώ για κάθε στέλεχος πραγματοποιούνταν παράλληλα δύο καλλιέργειες, μια σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης, και μια σε θρεπτικό υπόστρωμα ΥΑΕ. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας διατηρούνταν σταθερά στους 28 °C, ενώ το pH διατηρούνταν σταθερό στο 6 με προσθήκη μικρής ποσότητας διαλυμάτων HCl ή NaOH 1M κατά περίπτωση. Η ανάδευση ρυθμίστηκε στα 80 rpm, και ο αερισμός στο 1 vvm, ώστε το διαλυμένο οξυγόνο να διατηρείται πάνω από το 10% της τιμής κορεσμού. Η ανάπτυξη των καλλιιεργειών στο βιοαντιδραστήρα παρακολουθούνταν με λήψη καθημερινών δειγμάτων, στα οποία πραγματοποιούνταν οι κατάλληλες αναλύσεις. Με το πέρας των καλλιιεργειών, το εξωκυτταρικό υγρό διαχωρίστηκε από τη βιομάζα με διήθηση, και διατηρήθηκε στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Η βιομάζα μετά από διαδοχικές πλύσεις, λυοφιλιώθηκε μέχρι σταθερού βάρους και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη μέχρι να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω.

#### *2.2.1.4 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων*

---

Η συγκέντρωση των ολικών αναγωγικών σακχάρων στα υπό μελέτη δείγματα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS, Miller 1959). Η μέθοδος βασίζεται στη δημιουργία έγχρωμου συμπλόκου μεταξύ του αντιδραστήριου DNS και του ελεύθερου ημιακεταλικού υδροξυλίου των αναγωγικών σακχάρων. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να προσδιοριστεί χρωματομετρικά η συγκέντρωσή τους. Συνοπτικά, σε κάθε δείγμα προστέθηκε ίσος όγκος αντιδραστήριου DNS, με την εξής σύσταση: 16 g L<sup>-1</sup> NaOH, 10 g L<sup>-1</sup> δινιτροσαλικυλικού οξέος, 402.7 g L<sup>-1</sup> K, Na-tartrate (Rochelle salts). Μετά από ανάμιξη, τα δείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο 100 °C, και στη συνέχεια προστέθηκαν 8 όγκοι νερού. Μετά από εκ νέου ανάμιξη, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 540 nm έναντι τυφλού διαλύματος, στο οποίο αντί για δείγμα είχε προστεθεί απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων προσδιορίστηκε με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς του επιθυμητού σακχάρου.

#### *2.2.1.5 Προσδιορισμός φαινολικού φορτίου*

---

Η μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu είναι ένα μίγμα φωσφο-μολυβδικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος και χρησιμοποιείται για το χρωματομετρικό προσδιορισμό των φαινολικών και πολυφαινολικών ενώσεων (Waterhouse, 2001). Συνοπτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 100 μL δείγμα κατάλληλα

αραιωμένο (ή πρότυπο), 7,9 ml απιονισμένο νερό και 500 μl αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu. Το μίγμα αναδεύτηκε σε vortex και αφέθηκε σε ηρεμία 30 s - 8 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 1500 μl κορεσμένου διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Μετά την εκ νέου ανάδευση σε vortex, το δείγμα αφέθηκε σε ηρεμία είτε για 2 h στους 20°C, είτε για 30 min σε υδατόλουτρο στους 40°C. Τέλος, το δείγμα φωτομετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης στα 765 nm με τυφλό, αντιστοίχως παρασκευασμένο δείγμα όπου στη θέση των 100 μl δείγματος, προστέθηκε 100 μl απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο δείγμα προσδιορίστηκε με τη βοήθεια κατάλληλης πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος, οπότε η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων εκφράστηκε σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

#### 2.2.1.6 Αποχρωματισμός ΥΑΕ

---

Ο αποχρωματισμός του ΥΑΕ υπολογίστηκε μετρώντας τη μείωση της οπτικής απορρόφησης του αποβλήτου στα 525 nm, όπως περιγράφεται στην εργασία των Aggelis et al., 2002. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό % της μείωσης του χρώματος του αρχικού αποβλήτου.

#### 2.2.2 Υγρές και στερεές καλλιέργειες του μύκητα *Myceliophthora thermophila*

---

Η ανάπτυξη του μύκητα *Myceliophthora thermophila* πραγματοποιήθηκε αρχικά σε στερεές καλλιέργειες, σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA όπως αναφέρεται σε προηγούμενο υποκεφάλαιο, στην αρχή με επώαση 4 ημερών στους 47 °C, και στη συνέχεια για 2 ακόμη ημέρες στους 60 °C με σκοπό την παραγωγή σπορίων. Οι καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό υγρών καλλιεργειών όγκου 100 mL σε κωνικές φιάλες των 250 mL, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενο υποκεφάλαιο. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 47 °C, 200 rpm για 4 ημέρες με σκοπό την παραγωγή βιομάζας.

#### 2.2.3 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηρίων

---

Τα στελέχη *E. coli* TOP10 αναπτύχθηκαν σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο LB ή LS-LB σε θερμοκρασία 37 °C με ή χωρίς προσθήκη κατάλληλου αντιβιοτικού. Οι υγρές καλλιέργειες όγκου 5 mL πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες 25 mL, για 16 h υπό ανάδευση 200 rpm. Οι στερεές καλλιέργειες επώαστηκαν επίσης σε κατάλληλους κλιβάνους στους 37 °C για 16 h επίσης. Τα τρυβλία στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους 4 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους και για διάστημα μικρότερο των δύο εβδομάδων.

## 2.2.4 Υγρές και στερεές καλλιέργειες Ζυμομυκήτων

---

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος αγρίου τύπου X33 του ζυμομύκητα *P. pastoris*. Ο ζυμομύκητας αναπτύχθηκε σε υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό YPD, στους 30 °C και υπό ανάδευση 200 rpm. Οι αντίστοιχες στερεές καλλιέργειες του ζυμομύκητα επώαστηκαν για 48 ώρες στους 30 °C, και τα τρυβλία αποθηκεύτηκαν στους 4 °C για διάστημα έως και 4 εβδομάδων.

Για τη φύλαξη των επιθυμητών στελεχών *P. pastoris* για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, ο μύκητας αναπτύχθηκε σε υγρές καλλιέργειες YPD για 16 ώρες σε 200 rpm στους 30 °C. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο YPD με προσθήκη 15% (v/v) γλυκερόλης, έτσι ώστε η τελική OD<sub>600</sub> να είναι 50-100 (περίπου  $2,5-5 \cdot 10^9$  κύτταρα mL<sup>-1</sup>).

### 2.2.4.1 Στερεές καλλιέργειες του ζυμομύκητα *P. pastoris* για επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων

---

Τα μετασχηματισμένα στελέχη *P. pastoris* που ήταν ανθεκτικά στο αντιβιοτικό ζεοσίνη και προέκυψαν από το μετασχηματισμό με τους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, ελέγχθηκαν ως προς την ενεργότητα υπεροξειδάσης ή λακκάσης σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν ABTS και μεθανόλη για επαγόμενη έκφραση του ενζύμου. Από τους ανθεκτικούς κλώνους που προέκυψαν, 30 αποικίες εμβολιάστηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε 1,34% yeast nitrogen base,  $4 \cdot 10^{-5}$  % (w/v) βιοτίνη, 0.5% (v/v) μεθανόλη, και 2 mM ABTS. Οι στερεές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30 °C για 4 ημέρες. Η ενεργότητα λακκάσης εντοπίστηκε από την εμφάνιση πράσινου χρώματος γύρω από την αναπτυσσόμενη αποικία. Για την περίπτωση όπου η ανίχνευση ενεργότητας υπεροξειδάσης ήταν επιθυμητή, μετά το σχηματισμό αποικιών, προστέθηκε επάνω από κάθε αποικία μια σταγόνα διαλύματος 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, και τα τρυβλία επώαστηκαν επιπλέον 10 λεπτά προκειμένου να αναπτυχθεί το πράσινο χρώμα.

---

## 2.3 Απομόνωση ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών από υγρές καλλιέργειες Βασιδιομυκήτων

---

### 2.3.1 Απομόνωση εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών

---

Σε ότι αφορά τους εξωπολυσακχαρίτες, το υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας από το βιοαντιδραστήρα συμπυκνώθηκε 10 φορές με εξάτμιση υπό κενό και στη συνέχεια οι πολυσακχαρίτες καταβυθίστηκαν με προσθήκη 4 όγκων καθαρής αιθανόλης και επώαση για 16 ώρες



στους 4 °C. Μετά από φυγοκέντρηση και λυοφιλίωση, το ξηρό βάρος των απομονωμένων κλασμάτων προσδιορίστηκε και τα κλάσματα αναλύθηκαν ως προς τη σύστασή τους σε γλυκάνες.

### 2.3.2 Απομόνωση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών

---

Η απομόνωση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών από τη μυκηλιακή βιομάζα πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους. Οι μέθοδοι αυτές αναπτύχθηκαν από τους Synytsya et al., 2009 και Wei et al., 2008, με κάποιες τροποποιήσεις, όπως περιγράφεται παρακάτω:

#### 2.3.2.1 Πρωτόκολλο Synytsya et al., 2009:

---

1. Η μυκηλιακή βιομάζα αφού παραληφθεί, λυοφιλιώνεται 16 ώρες. Ακολουθεί κονιορτοποίηση σε γουδί.
2. Προσθήκη διαλύματος 80% (v/v) αιθανόλης και καλή ανάμιξη
3. Φυγοκέντρηση 10 min 3000 rpm και απόρριψη υπερκείμενου
4. Ανάμιξη ιζήματος με απιονισμένο νερό, καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση ως άνω. Απόρριψη υπερκείμενου.
5. Βρασμός ιζήματος σε υπερκάθαρο νερό για 6 ώρες. Φύλαξη μίγματος για 16 ώρες στους 4 °C
6. Φυγοκέντρηση 15 min 300 rpm. Φύλαξη υπερκείμενου (Υδατοδιαλυτό κλάσμα)
7. Στο ίζημα, προσθήκη διαλύματος 1M NaOH, 0,05% (w/w) NaBH<sub>4</sub>. Επώαση στους 4 °C για 4 ώρες
8. Φυγοκέντρηση και φύλαξη υπερκείμενου (Αλκαλι-διαλυτό κλάσμα) και ιζήματος (Στερεό κλάσμα).
9. Ρύθμιση pH στο 7 με 1M HCl σε όλα τα κλάσματα
10. Στα δύο υπερκείμενα, προσθήκη αδιάλυτης καθαρής α-αμυλάσης από *Bacillus subtilis*. Επώαση υπό ανάδευση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Προσθήκη 1/5 του όγκου αντιδραστήριο Sevag (4 όγκοι χλωροφόρμιο: 1 όγκο βουτανόλη) και έντονη ανάδευση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Φυγοκέντρηση 20 λεπτά, 3000 rpm
13. Επανάληψη του βήματος 11 στο υπερκείμενο της φυγοκέντρησης για 7 φορές. Στο βήμα αυτό μετουσιώνονται οι πρωτεΐνες του μίγματος και απομακρύνονται στο ίζημα.
14. Αφού παραληφθεί το υπερκείμενο, προσθήκη 4 όγκων καθαρής αιθανόλης για την καταβύθιση των πολυσακχαριτών. Επώαση στους 4 °C για 16 ώρες σε ηρεμία.
15. Φυγοκέντρηση για παραλαβή του ιζήματος.
16. Ανάμιξη του ιζήματος με αιθανόλη 70% (v/v) και επώαση στους 4 °C για 16 ώρες σε ηρεμία.
17. Φυγοκέντρηση και παραλαβή ιζήματος. Ξήρανση ιζήματος στους 60 °C για 1 ώρα, προκειμένου να εξατμιστεί η αιθανόλη και στη συνέχεια λυοφιλίωση.

18. Στο Στερεό κλάσμα, προσθήκη καθαρής αιθανόλης και ανάδευση για 10 λεπτά.
19. Φυγοκέντρηση 15 λεπτά 3000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου
20. Το ίζημα τοποθετείται στους 60 °C για 1 ώρα, προκειμένου να εξατμιστεί η αιθανόλη και στη συνέχεια ακολουθεί λυοφιλίωση.

#### 2.3.2.2 Πρωτόκολλο Wei et al., 2008

---

Η ξηρή βιομάζα αρχικά ομογενοποιήθηκε σε 2 όγκους απιονισμένου νερού. Ακολούθησε επώαση στους 90-100 °C για 4-5 ημέρες. Το στερεά απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση 10000 g για 15 λεπτά. Το υγρό κλάσμα αναμίχθηκε με 2 όγκους καθαρής αιθανόλης και το μίγμα επώαστηκε στους 4 °C για 16 ώρες. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε και το ίζημα ξεπλύθηκε με αιθανόλη 70%. Με μια ακόμη φυγοκέντρηση παραλήφθηκε το στερεό πολυσακχαριτικό κλάσμα της βιομάζας, το οποίο μετά τη ζύγισή του, χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω αναλύσεις.

#### 2.3.3 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας γλυκανών σε στερεά δείγματα

---

Οι πολυσακχαρίτες που περιέχονται στη βιομάζα ποσοτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια εμπορικού σκευάσματος K-YBGL 04/2008 (Mushroom and yeast beta-glucan, Megazyme).

Συνοπτικά, η διαδικασία έχει ως εξής:

*Προσδιορισμός των ολικών γλυκανών (α- και β-γλυκάνες) και της D- γλυκόζης στους ολιγοσακχαρίτες, στη σουκρόζη και της ελεύθερης D- γλυκόζης*

Σύμφωνα με τη μέθοδο, αρχικά γίνεται η διαλυτοποίηση και των 1,3:1,6-β-D-γλυκανών, 1,3-β-D-γλυκανών και α-γλυκανών, της D-γλυκόζης που περιέχεται στους ολιγοσακχαρίτες, της σακχαρόζης, και της ελεύθερης D- γλυκόζης και ύστερα η μερική υδρόλυσή τους σε D- γλυκόζη. Τα παρακάτω βήματα αποτελούν τη χημική κατεργασία του δείγματος:

- Λαμβάνεται δείγμα ~10 mg και λειοτριβείται, έως ότου αποκτήσει κατάλληλα μικρή κοκκομετρία
- Το δείγμα αναμιγνύεται σε σωληνάκι Eppendorf των 2 mL με 150 μL πυκνού υδροχλωρικού οξέος (HCl), 37% v/v, και το διάλυμα αναδεύεται έντονα.
- Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο 30 °C για 45 min με ανάδευση κάθε 15 min. Σε αυτό το σημείο, διαλυτοποιούνται οι 1,3:1,6-β-D-γλυκάνες, 1,3-β-D-γλυκάνες και οι α-γλυκάνες.
- Ακολουθεί προσθήκη 1 mL απιονισμένου νερού και καλή ανάδευση
- Στη συνέχεια, το σωληνάκι τοποθετείται σε βραστό νερό (100 °C). Στο στάδιο αυτό υδρολύονται μερικώς οι 1,3:1,6-β-D-γλυκάνες, 1,3-β-D-γλυκάνες και οι α-γλυκάνες. Η μερική

όξινη υδρόλυση αποσκοπεί στη διάσπαση των ομοιοπολικών δεσμών με άλλους πολυσακχαρίτες (π.χ. χιτίνη) ή πρωτεΐνες.

- Στο τέλος των 2 ωρών, το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει στους 25 °C και μεταφέρεται σε σωληνάρια 15 mL, με ταυτόχρονη προσθήκη 1 mL KOH 2M για εξουδετέρωση του πυκνού HCl.
- Ακολουθεί ποσοτική μεταφορά σε 10 mL ογκομετρική φιάλη, η οποία πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 200 mM pH 5 μέχρι τη χαραγή.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 min στα 3000 rpm

Η υδρόλυση των α- και β- γλυκανών σε D- γλυκόζη ολοκληρώνεται με την επώαση του δείγματος με μείγμα έξω-1,3-β-γλουκανάσης και β-γλυκοζιδάσης. Η μέτρηση των ολικών γλυκανών, της D- γλυκόζης που περιέχεται στην σακχαρόζη και της ελεύθερης D- γλυκόζης γίνεται μέσω ενζυμικής αντίδρασης, της οξειδάσης της γλυκόζης, της υπεροξειδάσης και της 4- αμινοαντιπυρίνης. Τα παρακάτω βήματα, επομένως, αφορούν την ενζυμική κατεργασία του δείγματος.

- Από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης, μεταφέρονται κλάσματα όγκου 100 μL σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, εις διπλούν για κάθε δείγμα.
- Προστίθενται 100 μL διαλύματος έξω-1,3-γλουκανάσης ( $100 \text{ U mL}^{-1}$ ) και β-γλυκοζιδάσης ( $20 \text{ U mL}^{-1}$ ) και ανάδευση
- Τα διαλύματα επωάζονται στους 40 °C για 1h
- Στο τέλος της μιας ώρας, προστίθενται 3 mL διαλύματος οξειδάσης της γλυκόζης, υπεροξειδάσης και 4- αμινοαντιπυρίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,4 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα
- Τα διαλύματα επωάζονται στους 40 °C για 20 min
- Μετράται η απορρόφηση των διαλυμάτων στα 510 nm έναντι διαλύματος τυφλού. Ως τυφλό (blank) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου με pH 5 και 3 mL διαλύματος οξειδάσης της γλυκόζης, υπεροξειδάσης και 4- αμινοαντιπυρίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,4, το οποίο επωάζεται μαζί με τα δείγματα κατά το παραπάνω βήμα (στους 40 °C για 20 min)
- Παράλληλα, στην τελευταία επώαση μαζί με το τυφλό, εισάγεται και δείγμα (control) με πρότυπο διάλυμα D- γλυκόζης  $1.00 \text{ mg mL}^{-1}$ .

*Προσδιορισμός των α- γλυκανών (φυτογλυκογόνο και άμυλο), της D- γλυκόζης στη σουκρόζη και της ελεύθερης D- γλυκόζης*

Τα βήματα για τον προσδιορισμό των α- γλυκανών μπορούν να χωριστούν, και εδώ, σε χημική και ενζυμική κατεργασία. Στη χημική κατεργασία πραγματοποιείται η διαλυτοποίηση των α- γλυκανών,

ενώ σε αυτή την περίπτωση δεν είναι απαραίτητη η όξινη υδρόλυση, όπως στην περίπτωση των ολικών γλυκανών. Αυτό συμβαίνει διότι, ενώ μερικές β-γλυκάνες διαλύονται εύκολα σε ζεστό νερό ή ζεστό ΚΟΗ, αυτοί οι διαλύτες δεν είναι αποτελεσματικοί για τη διαλυτοποίηση των β-γλυκανών που προέρχονται από ζύμες ή μανιτάρια. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Δείγμα 10 mg λειοτριβείται και τοποθετείται σε σωληνάκι Eppendorf των 2 mL
- Προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  ΚΟΗ 2M
- Τα διαλύματα τοποθετούνται σε λουτρό πάγου για 20 min υπό ανάδευση για τη διαλυτοποίηση των α-γλυκανών

Η ενζυμική κατεργασία που ακολουθεί στοχεύει στην υδρόλυση των α-γλυκανών με διαλύματα ενζύμων αμυλογλυκοσιδάσης και ιμπερτάσης και στη μέτρηση των α-γλυκανών (φυτογλυκογόνο και άμυλο), της D-γλυκόζης στη σουκρόζη και της ελεύθερης D-γλυκόζης με ένζυμα προσδιορισμού της γλυκόζης, όπως και προηγουμένως:

- Μετά την επώαση στο λουτρό πάγου, προστίθενται 800  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου pH 3.8 και ακολουθεί ανάδευση
- Αμέσως μετά την ανάδευση, προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος αμυλογλυκοσιδάσης (1630 U  $\text{mL}^{-1}$ ) και ιμπερτάσης (500 U  $\text{mL}^{-1}$ ) και το διάλυμα αναδεύεται ξανά
- Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 40 °C για 30 min με ανάδευση ανά 5 min. Σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιείται υδρόλυση των α-γλυκανών.
- Μετά την επώαση, τα διαλύματα φυγοκεντρούνται για 1-2 min
- Από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης, μεταφέρονται κλάσματα όγκου 100  $\mu\text{L}$  σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, εις διπλούν για κάθε δείγμα.
- Στους δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου με pH 5 και 3 mL διαλύματος οξειδάσης της γλυκόζης, υπεροξειδάσης και 4-αμινοαντιπυρίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,4. Στη συνέχεια, τα διαλύματα επωάζονται στους 40 °C για 20 min
- Μετράται η απορρόφησή τους στα 510nm έναντι τυφλού δείγματος. Ως τυφλό (blank) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε 200  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου με pH 5 και 3 mL διαλύματος οξειδάσης της γλυκόζης, υπεροξειδάσης και 4-αμινοαντιπυρίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,4. Το διάλυμα αυτό επωάζεται μαζί με τα δείγματα, σύμφωνα με το παραπάνω βήμα (στους 40 °C για 20 min).

Η περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες προκύπτει μετά από αφαίρεση της περιεκτικότητας σε α-γλυκάνες από την ολική περιεκτικότητα του δείγματος σε γλυκάνες.

---

## 2.4 Μοριακές τεχνικές

---

### 2.4.1 Απομόνωση γενετικού υλικού – Ανάλυση γενωμικού DNA

---

Για την απομόνωση γενετικού υλικού από νηματοειδείς ασκομύκητες, η βιομάζα που είχε αναπτυχθεί σε υγρές καλλιέργειες συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση. Μετά από διαδοχικές πλύσεις με απιονισμένο νερό, ακολούθησε η ταχεία ψύξη της με υγρό άζωτο και η κονιορτοποίηση σε γουδί μέχρι την παραγωγή ~100 mg κονιορτοποιημένου μυκηλίου. Η απομόνωση καθαρού DNA από τα κυτταρικά θραύσματα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του τυποποιημένου πακέτου χημικών αντιδραστηρίων της Sigma – Aldrich (Η.Π.Α), GenElute™ Plant, Genomic DNA Miniprep Kit.

### 2.4.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

---

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του τυποποιημένου εμπορικού σκευάσματος αντιδραστηρίων της εταιρείας Macherey-Nagel, NucleoSpin® Plasmid.

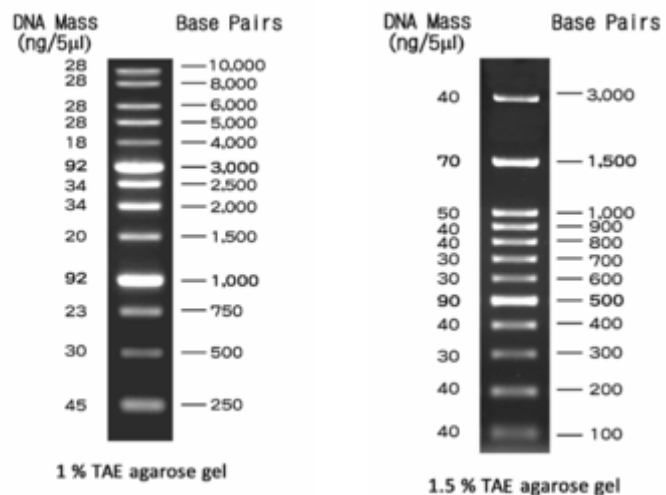
### 2.4.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

---

Ο διαχωρισμός μορίων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μετακίνηση των γραμμικών μορίων DNA μέσα σε πήκτωμα αγαρόζης, με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους, εάν εφαρμοστεί σε αυτά ηλεκτρικό πεδίο (Sambrook et al., 1989). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται από το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA, όπως επίσης και την ένταση του ρεύματος που εφαρμόζεται. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, παρασκευάστηκαν πηκτώματα αγαρόζης συγκέντρωσης 1 % (w.v) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου, για την οπτικοποίηση των ζωνών DNA. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες οπές του πηκτώματος, μετά από ανάμιξή τους με το διάλυμα χρώσης (loading buffer), και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE, κάτω από ηλεκτρική τάση 60-80 Volt για 1 h περίπου. Ακολούθως, το πήκτωμα τοποθετήθηκε επάνω σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (InGenius BioImaging, Syngene, Μεγάλη Βρετανία), προκειμένου να εμφανιστούν και να φωτογραφηθούν οι ζώνες του DNA που προέκυψαν. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των ζωνών

που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μάρτυρα DNA γνωστών μοριακών βαρών. Οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό ήταν ο FastGene® 1 kb DNA Ladder και ο FastGene® 100 bp DNA Ladder, της εταιρείας NIPPON Genetics Europe GmbH (Ελβετία).

**Εικόνα 2.3:** Μάρτυρες μοριακών βαρών DNA (NIPPON Genetics Europe GmbH).



#### 2.4.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η απομόνωση του DNA από πηκτώματα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εμπορικού κιτ αντιδραστηρίων της εταιρείας Sigma, GenElute™ Gel Extraction Kit.

#### 2.4.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Επικαλυπτόμενη PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός επιλεγμένων αλληλουχιών DNA με τη βοήθεια συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές, primers), τα οποία είναι συμπληρωματικά με την αλληλουχία του 3' άκρου καθεμιάς από τις δυο συμπληρωματικές αλυσίδες DNA. Εκτός από τους εκκινητές, για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτούνται επίσης και μια θερμοανθεκτική πολυμεράση, κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και διάλυμα αλάτων που θα εξασφαλίσουν τις βέλτιστες συνθήκες για τη δράση της, όπως επίσης και διαδοχική εναλλαγή θερμοκρασιών. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη επέκταση και των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων, με αποτέλεσμα τον ταχύτερο πολλαπλασιασμό των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους, καθένας από τους οποίους αποτελείται από τα παρακάτω θερμοκρασιακά στάδια: α) αποδιάταξη (denaturation) του DNA στόχου, β) πρόσδεση των εκκινητών (annealing) και γ) επέκταση των εκκινητών (extension). Τα καινούρια μόρια DNA που σχηματίζονται σε κάθε κύκλο, χρησιμοποιούνται στον επόμενο ως μήτρα για την αντιγραφή νέων μορίων, με αποτέλεσμα ο αριθμός των αντιγράφων του τμήματος-στόχου να αυξάνεται εκθετικά. Με το πέρας της αντίδρασης, τα προϊόντα μπορούν να ελεγχθούν, ποσοτικά και ποιοτικά, με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ενός μικρού δείγματος της αντίδρασης.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις PCR επιλέχθηκαν με βάση τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της πολυμεράσης KOD Hot Start (Novagen, Η.Π.Α.) και τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών ( $T_m$ , η θερμοκρασία στην οποία το 50% της αλληλουχίας του εκκινητή είναι μετουσιωμένο), η οποία υπολογίστηκε από τον μαθηματικό τύπο:  $T_m = (wA+xT)*2 + (yG+zC)*4$ , όπου w, x, y και z, ο αριθμός των νουκλεοτιδίων A, T, G και C

αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή TC-512 της εταιρείας TECHNE (Η.Π.Α.), σε τελικό όγκο 50  $\mu\text{L}$ , σύμφωνα με το παρακάτω γενικό πρωτόκολλο:

Συστατικά μίγματος αντίδρασης PCR		Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο		
DNA	$\alpha$ $\mu\text{L}$ (10-500 ng)	Αρχική αποδιάταξη	94-98 °C για 1-9 min	
Εκκινητής forward	1 $\mu\text{L}$	Αποδιάταξη DNA-στόχου (denaturation)	94-98 °C για 10-30 sec	20 – 40 κύκλοι
Εκκινητής reverse	1 $\mu\text{L}$	Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing)	( $T_m-4$ °C) για 20-40 sec	
dNTP's mix	5 $\mu\text{L}$ (8 mM)	Επέκταση εκκινητών (extension)	68-72 °C για 1 min/kb	
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	3 $\mu\text{L}$	Τελική επέκταση και επιδιόρθωση	68-72 °C για 5-15 min	
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης	5 $\mu\text{L}$ (10X)			
Υπερκάθαρο H <sub>2</sub> O	34- $\alpha$ $\mu\text{L}$			
KOD Hot Start πολυμεράση	1 $\mu\text{L}$ (1 U/ $\mu\text{L}$ )			

#### 2.4.6 Απομόνωση εσωνίων από αλληλουχία DNA

Η απομόνωση εσωνίου από το εκάστοτε γονίδιο πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών, συμπληρωματικών ως προς τα άκρα του εσωνίου. Ως μήτρα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR® Blunt, στο οποίο είχε κλωνοποιηθεί το επιθυμητό γονίδιο. Με το πέρας της αντίδρασης, το γραμμικό προϊόν κλωνοποιήθηκε εκ νέου στον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt.

##### 2.4.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκτομή τμημάτων DNA μέσω επικαλυπτόμενων εκκινητών (Splicing by Overlapping Extension PCR, OE-PCR).

Η OE-PCR είναι μια μέθοδος με την οποία μπορεί να επιτευχθεί *in vitro* το μάτισμα τμημάτων DNA (Heckman & Pease, 2007). Τα εσώνια αποτελούν περιοχές των ευκαρυωτικών γονιδίων οι οποίες μεταγράφονται μεν σε RNA, αλλά δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνη, επειδή, κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης του RNA σε mRNA *in vivo*, αυτά απομακρύνονται μέσω μιας διαδικασίας που λέγεται μάτισμα ή μεταμεταγραφική ωρίμανση του RNA (RNA splicing). Μια από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο για το *in vitro* μάτισμα των DNA αλληλουχιών είναι και η OE-PCR, όπου η συνένωση των εξωνίων μεταξύ τους επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών, ενός ζεύγους συμπληρωματικού για τα άκρα του γονιδίου, και των εσωτερικών ζευγών εκκινητών, καθένα από τα οποία διαθέτει μια αλληλουχία συμπληρωματική με το άκρο του εξωνίου-

στόχου, αλλά και μια αλληλουχία συμπληρωματική ως προς τον γειτονικό του (αλληλοεπικαλυπτόμενοι εκκινητές).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Αρχικά, για κάθε εσώνιο κατασκευάστηκε ένα ζεύγος εκκινητών, με επικαλυπτόμενα άκρα. Τα εξώνια απομονώθηκαν με ίσο αριθμό αντιδράσεων PCR, από το αρχικό γονίδιο που είχε κλωνοποιηθεί στο φορέα pCR® Blunt, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε σαν μήτρα για την απομόνωση των εσωνίων. Οι αντιδράσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασιακές συνθήκες κατάλληλες των Tm των εκκινητών και του μήκους του εκάστοτε εξωνίου. Μετά την απομόνωση των γραμμικών προϊόντων των αντιδράσεων αυτών, αυτά συνενώθηκαν με μια τελευταία PCR αντίδραση, παρουσία μόνο του εξωτερικού ζεύγους των εκκινητών. Το «ώριμο» πλέον γονίδιο, μετά την αφαίρεση των εσωνίων, κλωνοποιήθηκε αρχικά στο φορέα pCR® Blunt, και στη συνέχεια στον φορέα pPICZα με στόχο την ετερόλογη έκφραση του, όπως περιγράφεται στα επόμενα Κεφάλαια.

#### 2.4.7 Συνένωση μορίων DNA (ligation)

Η συνένωση μορίων DNA που φέρουν μονόκλωνα και συμπληρωματικά ή ισοτελή άκρα μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA λιγάση. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε η λιγάση της Εταιρείας TAKARA (Ιαπωνία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα τμήματα DNA με ισοτελή άκρα, όπως για παράδειγμα τα προϊόντα της αντίδρασης PCR, κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pCR®Blunt, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

**Πίνακας 2.1:** Αντιδράσεις συνένωσης των επιθυμητών γονιδίων και του φορέα έκφρασης pCR®Blunt τελικού όγκου 10 μl

<b>ΡΔ λιγάσης (10X)</b>	1 μL	Επώαση στους 16 °C για 1-2 h.
<b>Υπερκάθαρο νερό</b>	2 μL	
<b>Προϊόν PCR</b>	5 μL	
<b>Πλασμίδιο pCR®Blunt</b>	1 μL	
<b>Λιγάση (4U/μL)</b>	1 μL	
<b>Συνολικός όγκος</b>	10 μL	

Αντίστοιχα, τμήματα DNA που έφεραν μονόκλωνα και συμπληρωματικά άκρα κλωνοποιήθηκαν στους πλασμιδιακούς φορείς pPICZαA/ pPICZαC σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:



**Πίνακας 2.2:** Αντιδράσεις συνένωσης των επιθυμητών γονιδίων Lac206313 και των φορέων έκφρασης pPICZαA/ pPICZαC τελικού όγκου 20 μl

	1:3	1:7	Αντίδραση ελέγχου 1	Αντίδραση ελέγχου 2
<b>ΡΔ T4 λιγάσης</b>	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
<b>Υπερκάθαρο νερό</b>	13 μl	9 μl	16 μl	17 μl
<b>Επιθυμητό γονίδιο</b>	3 μl	7 μl	-	-
<b>Πλασμίδιο pPICZαA/ pPICZαC</b>	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
<b>T4 λιγάση</b>	1 μl	1 μl	1 μl	-

Επώαση στους  
16 °C για 3-4 h

Καθεμία από τις παραπάνω αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων *E. coli* TOP10.

#### 2.4.8 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, είναι ένζυμα κυρίως βακτηριακής προέλευσης, τα οποία έχουν την ικανότητα να κόβουν μονόκλινα ή δίκλινα μόρια DNA σε ειδικές αλληλουχίες αναγνώρισης, μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων. Ο ρόλος των ενζύμων αυτών είναι να προστατεύουν τα κύτταρα από εισβολή ξένου DNA, η χρήση τους όμως στη γενετική μηχανική είναι τεράστιας σημασίας.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα περιορισμού των εταιρειών TAKARA (Ιαπωνία) και NEB (Η.Π.Α.), σύμφωνα με τα κατάλληλα πρωτόκολλα της εκάστοτε εταιρείας. Τα ένζυμα περιορισμού που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα:

**Πίνακας 2.3:** Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν και οι αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζουν

Ένζυμο περιορισμού	Οργανισμός προέλευσης	Αλληλουχία αναγνώρισης
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> (PY13)	5'... GAATTC...3' 3'... CTTAAG...5'
<i>Clai</i>	<i>Caryophanon latum</i>	5'... ATCGAT...3' 3'... TAGCTA...5'
<i>XbaI</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>	5'... TCTAGA...3' 3'... AGATCT...5'
<i>PmeI</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>	5'... GTTTAAAC...3' 3'... CAAATTG...5'

Σε περίπτωση διπλής πέψης, χρησιμοποιήθηκαν δύο ένζυμα ταυτοχρόνως, με κοινό ρυθμιστικό διάλυμα, εφόσον αυτό ήταν δυνατό, σύμφωνα με τις οδηγίες του εκάστοτε προμηθευτή. Το γενικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού περιγράφεται στον παρακάτω Πίνακα:

**Πίνακας 2.4:** Γενικό πρωτόκολλο αντίδρασης πέψης DNA

DNA	~5 μl (1 mg)
Ένζυμο περιορισμού	1-2 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10x)	2 μl
Υπερκάθαρο νερό	~10 μl

Σε περίπτωση πέψης ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pPICZα με σκοπό τη γραμμικοποίησή του για μετασχηματισμό της ζύμης *Pichia pastoris* ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα:

**Πίνακας 2.5:** Αντίδραση γραμμικοποίησης των πλασμιδίων pPICZαA/pPICZαC τελικού όγκου 100 μl

Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZαA	70 μl
Υπερκάθαρο νερό	18 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου PmeI (10x)	10 μl
PmeI	2 μl

## 2.4.9 Προετοιμασία και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων βακτηρίων και μυκήτων

---

### 2.4.9.1 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* Top10

---

- Ανάπτυξη 1 αποικίας *E.coli* (Top 10) σε 5ml LB, 37°C, 180rpm, 16 ώρες (προκαλλιέργεια)
- Εμβολιασμός 100 ml LB με 1 ml από την προκαλλιέργεια, 37°C, 180 rpm έως ότου το OD<sub>600</sub> να πάρει τιμή 0.4-0.8 (2-4 ώρες)
- 30 λεπτά επώαση σε πάγο

- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση 1500 g, 5 λεπτά
- Επαναδιάλυση των κυττάρων με 12 ml στείρου MgCl<sub>2</sub> (4°C)
- Νέα φυγοκέντρηση 1500 g, 5 λεπτά
- Επαναδιάλυση των κυττάρων με 4 ml στείρου CaCl<sub>2</sub> (4°C)
- 20 λεπτά επώαση σε πάγο
- Προσθήκη 1.9 ml γλυκερόλης 50%, μοίρασμα των κυττάρων σε Eppendorf (~100 μl) και φύλαξη στους -80°C μέχρι την χρήση τους

#### 2.4.9.2 Μετασηματισμός μέσω θερμικού σοκ (*Heat shock*)

---

Η σύντομη έκθεση των επιδεκτικών σε μετασηματισμό κυττάρων *E.coli* σε αυξημένη θερμοκρασία κάνει την μεμβράνη των κυττάρων πιο ρευστή και κατά συνέπεια παροδικά διαπερατή σε ξένο DNA. Στη συγκεκριμένη εργασία ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πλασμιδίου σε 100 μl επιδεκτικών κυττάρων Top10
- Επώαση 30 λεπτών στον πάγο
- Θερμικό σοκ στους 42°C για 1,5 λεπτό
- Άμεση προσθήκη 200 μl θρεπτικού LB, επώαση στους 37°C για 1 ώρα
- Εμβολιασμός τρυβλίων με κατάλληλο αντιβιοτικό

#### 2.4.9.3 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*

---

Αρχικά, εμβολιάστηκαν υγρές καλλιέργειες YPD (2-4) όγκου 50ml (σε κωνικές φιάλες 250ml) με μικρή ποσότητα κυττάρων *P.pastoris*, 30°C, 200rpm, και επωάστηκαν για 16 ώρες (προκαλλιέργεια). Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Χρήση 10 ml από τις προκαλλιέργειες για τον εμβολιασμό 2 θρεπτικών μέσων YPD όγκου 300 ml (σε κωνικές φιάλες 1000 ml), 30°C, 200 rpm έως ότου το OD<sub>600</sub> να πάρει τιμή 1.3-1.5 (2-4 ώρες)
- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση 5000 g, 5 λεπτά
- Επαναδιάλυση σε 300 ml υπερκάθαρου νερού, θερμοκρασίας 4°C
- Νέα φυγοκέντρηση 5000 g, 5 λεπτά
- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 150 ml υπερκάθαρου νερού, θερμοκρασίας 4°C
- Νέα φυγοκέντρηση 5000 g, 5 λεπτά
- Επαναδιάλυση σε 12 ml σορβιτόλης 1 M, θερμοκρασίας 4°C
- φυγοκέντρηση 5000 g, 5 λεπτά

- Τελική επαναδιάλυση των κυττάρων σε σορβιτόλη 1 M, θερμοκρασίας 4°C έως τελικού όγκου 1.5 ml
- Άμεση χρήση των κυττάρων. Τα κύτταρα από την συγκεκριμένη διαδικασία δεν αποθηκεύονται προς μελλοντική χρήση

#### 2.4.9.4 Μετασηματισμός κυττάρων *P. pastoris* με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)

---

Τα κύτταρα που προετοιμάστηκαν με την παραπάνω διεργασία χρησιμοποιήθηκαν σε μετασηματισμούς μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation):

- Ανάμιξη 80 ml επιδεκτικών κυττάρων *P.pastoris* με το γραμμικό πλασμίδιο και ήπια ανάδευση με πιπέτα. Μεταφορά σε ειδική κυβέτα για ηλεκτροδιάτρηση και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά
- Μεταφορά της κυψελίδας στην συσκευή ηλεκτροδιάτρησης GENE PULSER της BIORAD και εφαρμογή του ηλεκτρικού παλμού
- Άμεση προσθήκη 1 ml παγωμένης σορβιτόλης 1M και μεταφορά του διαλύματος σε αποστειρωμένο σωληνάριο. Επώαση στους 30°C για 2 ώρες
- Εμβολιασμός σε τρυβλία YPDS που περιέχουν το αντιβιοτικό ζεοσίνη
- Επώαση στους 30°C για 3-10 ημέρες μέχρι την εμφάνιση ανθεκτικών αποικιών

## 2.5 Μέθοδοι ανάλυσης και χαρακτηρισμού πρωτεϊνών

---

### 2.5.1 Παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από μετασηματισμένα κύτταρα *P. pastoris*

---

Σε συνέχεια του μετασηματισμού των επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris* με τον πλασμδιακό φορέα *ricZaC/ricZaA* που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο, και την επιλογή των μετασηματισμένων κλώνων, η παραγωγή των ετερόλογων πρωτεϊνών μελετήθηκε σε υγρές καλλιέργειες, μικρής ή μεγάλης κλίμακας, των επιλεγμένων κλώνων. Η επαγωγή της έκφρασης των ετερόλογων πρωτεϊνών επιτεύχθηκε με την προσθήκη μεθανόλης στο θρεπτικό υπόστρωμα, αφού η έκφραση των ετερόλογων γονιδίων ελέγχεται από τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (AOX1). Ακολουθώντας, με τη βοήθεια του πεπτιδίου οδηγού του γονιδίου  $\alpha$ - factor του *Saccharomyces cerevisiae* η παραγόμενη πρωτεΐνη εκκρίνεται στο περιβάλλον μέσο, γεγονός που διευκολύνει την απομόνωση της ετερόλογης πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

### 2.5.1.1 Υγρές καλλιέργειες μικρής και μεγάλης κλίμακας για απομόνωση των ετερόλογων πρωτεϊνών

---

Η έκφραση των ετερόλογων πρωτεϊνών από τους κλώνους *P. pastoris* που προέκυψαν από το μετασχηματισμό και ήταν ανθεκτικοί σε ζεοσίνη ελέγχθηκε σε υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας ως εξής: Κάθε αποικία εμβολιάστηκε σε 50 mL θρεπτικού μέσου BMGY, σε κωνικές φιάλες των 250 mL, οι οποίες επωάστηκαν στους 30°C σε αναδευόμενο επωαστήρα σε 180 rpm για 16 h έως ότου επιτευχθεί οπτική απορρόφηση O.D.<sub>600</sub> 2 - 6. Η επαγωγή της έκφρασης επιτεύχθηκε με μεταφορά των κυττάρων σε 50 mL θρεπτικού μέσου BMMY, και επώασή τους για επιπλέον 6 ημέρες. Στο θρεπτικό μέσο προστίθετο καθημερινά 0,5% (v/v) μεθανόλη, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Για την έκφραση του ενζύμου MtPerII στο θρεπτικό μέσο προστέθηκε επίσης 0,1 g L<sup>-1</sup> αίμη, ενώ για την έκφραση του ενζύμου MtLac2 προστέθηκε 0,025 mM CuSO<sub>4</sub>, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Δείγματα της καλλιέργειας λαμβάνονταν καθημερινά για τον προσδιορισμό της κυτταρικής συγκέντρωσης, του ολικού πρωτεϊνικού φορτίου και της ενζυμικής ενεργότητας. Σε περίπτωση που ήταν επιθυμητή η απομόνωση μεγάλης ποσότητας ετερόλογης πρωτεΐνης, οι επιθυμητοί κλώνοι αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας, όπως και προηγουμένως, αλλά με τις εξής διαφοροποιήσεις: οι προκαλλιέργειες ήταν όγκου 50 mL, και οι καλλιέργειες σε θρεπτικό BMMY πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 500 mL σε κωνικές φιάλες των 2 L. Το εξωκυτταρικό υγρό των καλλιεργειών, όγκου τουλάχιστον ενός λίτρου, συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση 1500 g, 10 min, 4 °C.

### 2.5.1.2 Διήθηση, συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκειμένου υγρού της καλλιέργειας

---

Το υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας αφού συλλέχθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω, διηθήθηκε υπό κενό, σε τρία διαδοχικά στάδια: αρχικά με διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια με φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,8 και 0,2 μm (Pall Supor Membrane Disc Filters, Pall Filters), για την απομάκρυνση τυχόν κυττάρων και κυτταρικών θραυσμάτων.

Στη συνέχεια, το εξωκυτταρικό υγρό συμπυκνώθηκε με τη βοήθεια συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 με τη χρήση μεμβρανών κυτταρίνης PM-10, διαμέτρου πόρων 10 kDa (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.). Η υπερδιήθηση πραγματοποιήθηκε έως ότου ο όγκος του συμπυκνωμένου διαλύματος να φτάσει τα 10-20 mL.

Τέλος, προκειμένου να επιτευχθεί ο καθαρισμός της ετερόλογης πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC), το συμπυκνωμένο εξωκυτταρικό υγρό εξισορροπήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Talon με τη μέθοδο της διαπίδυσης από μεμβράνες κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Daltons, Sigma-Aldrich), η οποία βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης. Συνοπτικά, το υπό εξισορρόπηση δείγμα τοποθετήθηκε μέσα σε σωλήνα της ημιπερατής μεμβράνης κυτταρίνης και επωάστηκε υπό ήπια ανάδευση και στους 4 °C για 16 ώρες, σε μεγάλη περίσσεια ρυθμιστικού διαλύματος Talon. Με τον τρόπο αυτό, και εφόσον η μεμβράνη είναι διαπερατή από το νερό και τις μικρομοριακές ενώσεις αλλά όχι από την υπό μελέτη πρωτεΐνη, πραγματοποιείται ανταλλαγή ιόντων μέχρι την αποκατάσταση ισορροπίας στο σύστημα.

### 2.5.1.3 Καθαρισμός των ετερόλογων πρωτεϊνών

---

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ο καθαρισμός των ετερόλογων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο εξής φαινόμενο: σε αλκαλικό περιβάλλον, πρωτεΐνες που φέρουν έξι συνεχόμενα αμινοξικά κατάλοιπα ιστιδίνης (His-tag) είναι αρνητικά φορτισμένες με αποτέλεσμα να προσδένονται σε κατιόντα μετάλλου ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ). Οι ετερόλογες πρωτεΐνες που παράχθηκαν έφεραν τα έξι κατάλοιπα ιστιδίνης, η αλληλουχία των οποίων περιλαμβάνεται σε αυτή των πλασμιδιακών φορέων pCZaA/ pCZaC, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Με αυτό τον τρόπο, οι επιθυμητές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από το υπερκείμενο, αφού συγκρατήθηκαν από στήλη ιόντων κοβαλτίου, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της *P. pastoris*, οι οποίες εκλούστηκαν αμέσως από τη στήλη. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες αποδεσμεύθηκαν από τη στήλη με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (0-100 mM), το οποίο δρα ανταγωνιστικά σε σχέση με τα κατάλοιπα ιστιδίνης για την πρόσδεση στα ιόντα του κοβαλτίου. Πιο αναλυτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε μπορεί να αναλυθεί στα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση της στήλης: Η χρωματογραφική στήλη, η οποία είχε πληρωθεί με 15 mL υλικού χρωματογραφίας Talon® Metal Affinity Resin (Clontech, Η.Π.Α), εξισορροπήθηκε με 300 mL ρυθμιστικού διαλύματος Talon. Η κινητή φάση της χρωματογραφίας ρυθμίστηκε σε όλη τη διάρκεια με την αντλία Econo Gradient της BIORAD (Η.Π.Α.).
2. Φόρτωση του δείγματος: Το εξισορροπημένο και συμπυκνωμένο υπερκείμενο των καλλιιεργειών φορτώθηκε στη στήλη με ροή 2 mL min<sup>-1</sup>. Σε αυτό το στάδιο η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη προσδένεται στα ιόντα κοβαλτίου.
3. Έκπλυση της στήλης: Οι μη προσδεδεμένες πρωτεΐνες εκπλύθηκαν με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος Talon.
4. Έκλυση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης: Οι προσδεδεμένες πρωτεΐνες εκλούστηκαν από τη στήλη με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος Talon με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου, από 5 έως 100 mM. Σε αυτό το στάδιο, λαμβάνονταν κλάσματα όγκου 4 mL, τα οποία αναλύθηκαν περαιτέρω για την ύπαρξη των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, με τη βοήθεια κλασματοσυλλέκτη (Waters, Millipore, Η.Π.Α.).
5. Έκπλυση και εξισορρόπηση της στήλης: Τελικά, η ρητίνη εκπλύθηκε με επαρκή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Talon για την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου και την επαναφορά της στην αρχική κατάσταση.
6. Αποθήκευση της στήλης: Η στήλη, μετά την εκ νέου εξισορρόπησή της, εκπλύθηκε επίσης με 300 mL υπερκάρου νερού, και αποθηκεύθηκε με διάλυμα αιθανόλης 20 % (v/v) στους 4 °C.

Για την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου από το διάλυμα των, καθαρών πλέον, ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, εφαρμόστηκε εκ νέου η μέθοδος της διαπίδυσης από μεμβράνη κυτταρίνης. Οι πρωτεΐνες τελικά αποθηκεύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl, pH 8.

## 2.5.2 Ηλεκτροφορητικές τεχνικές (SDS-PAGE, IEF-PAGE, native PAGE), εμφάνιση πρωτεϊνών και ζυμογραφήματα

---

### 2.5.2.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

---

Σε αυτή τη μέθοδο, για το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών μορίων χρησιμοποιείται πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ενός χημικά αδρανούς πολυμερούς, το οποίο σχηματίζεται με τον πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου σε μακριές αλυσίδες, με εγκάρσιες διακλαδώσεις ομάδων δι-ακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του καταλύτη υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) και του ενεργοποιητή N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλενο-διαμίνης (TEMED). Για την παρασκευή του πήκτωματος χρησιμοποιούνται αποδιατακτικοί παράγοντες, που έχουν ως στόχο την πλήρη αποδιάταξη των υπό μελέτη πρωτεϊνικών μορίων, δηλαδή ο επιφανειοδραστικός παράγοντας SDS και η μερκαπτοαιθανόλη, η οποία ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Το SDS με τη συνδεσή του στα πρωτεϊνικά μόρια, προσδίδει σε όλα τους αρνητικό φορτίο. Έτσι η κινητικότητα των πρωτεϊνών είναι αποκλειστικά συνάρτηση του μοριακού τους βάρους.

Η μετακίνηση των πρωτεϊνικών μορίων κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται διαμέσου δύο επιστοιβαγμάτων πήκτωμάτων. Το πήκτωμα επιστοιβάξης (Stacking gel), στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα προς ανάλυση, λόγω της χαμηλότερης συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου που δημιουργεί μεγαλύτερους πόρους, επιτρέπει σε όλα τα πρωτεϊνικά μόρια, ανεξαρτήτως μεγέθους να διαταχθούν σε μια γραμμή, έτσι ώστε να κινηθούν όλα μαζί προς το ακόλουθο πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel), όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός ανάλογα με το μοριακό βάρος.

Οι ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή Mini-Protean 3 της εταιρείας BIORAD, (H.P.A.), όπως περιγράφεται παρακάτω (Laemmli, 1970):

- Το πήκτωμα διαχωρισμού, μετά την ανάμιξη των συστατικών του, τοποθετήθηκε ανάμεσα σε κατάλληλες γυάλινες πλάκες (10,1 cm × 7,3 cm και 10,1 cm × 8,3 cm), έως ~1,5 cm κάτω από το άκρο τους. Το μίγμα αφέθηκε να πολυμεριστεί για 30 λεπτά περίπου.
- Ακολούθως, μετά την ανάμιξη των συστατικών του πήκτωματος επιστοιβάξης, αυτό τοποθετήθηκε ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες και επάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού. Αμέσως τοποθετήθηκε και η ειδική «χτένα» για το σχηματισμό των θέσεων φόρτωσης, και το μίγμα αφέθηκε να πολυμεριστεί για ~30 min.

**Πίνακας 2.6:** Σύσταση των πηκτωμάτων διαχωρισμού και επιστοιβάξης

Πήκτωμα Διαχωρισμού (Resolving gel)	
Υπερκάθαρο νερό	3,5 mL
0,75M Tris/SDS 0,2% (pH 8,8)	9,4 mL
40% bis – acrylamide (30:1)	5,8 mL
TEMED	30 μL
10% APS (w/v)	90 μL
Πήκτωμα επιστοιβάξης (Stacking gel)	
Υπερκάθαρο νερό	3,0 mL
0,25M Tris/SDS 0,2% (pH 6,8)	3,75 mL
40% bis – acrylamide (30:1)	0,75 mL
TEMED	20 μL
10% APS (w/v)	60 μL

- Οι γυάλινες πλάκες που περιείχαν πλέον τα πηκτώματα της ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες θέσεις της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης, και η συσκευή πληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα SDS running buffer 1X. Η «χτένα» αφαιρέθηκε και τα δείγματα φορτώθηκαν στις θέσεις που είχαν σχηματιστεί.
- Η προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση ήταν η ακόλουθη: Πρωτεϊνικό διάλυμα όγκου 15 μL αναμίχθηκε με 7 μL κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (sample buffer) και το μίγμα επώαστηκε σε βραστό νερό για 5-7 λεπτά περίπου.
- Παράλληλα με τα δείγματα, στη συσκευή φορτώθηκε και κατάλληλος μάρτυρας μοριακών βαρών, προκειμένου να προσδιοριστεί με ακρίβεια το μοριακό βάρος των προς ανάλυση πρωτεϊνών. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Prestained protein marker PiNK (NIPPON Genetics, Ιαπωνία), όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



**Εικόνα 2.4:** Μάρτυρας μοριακών βαρών SDS-PAGE, PiNK (Nippon Genetics).

- Στη συσκευή εφαρμόστηκε ρεύμα έντασης 35 mA/πήκτωμα για 1 h περίπου προκειμένου να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες των εκάστοτε δειγμάτων.



#### 2.5.2.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native PAGE)

---

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εφαρμόστηκε επίσης η μέθοδος του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού πρωτεϊνικών μιγμάτων σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Στη μέθοδο αυτή δεν χρησιμοποιούνται καθόλου αποδιατακτικοί παράγοντες, ούτε στο μίγμα παρασκευής του πηκτώματος, ή στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, αλλά ούτε και στο διάλυμα του δείγματος (sample buffer), προκειμένου οι εξεταζόμενες πρωτεΐνες να αναλυθούν στη φυσική τους τριτοταγή δομή. Σε αυτή τη μέθοδο, το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιείται έχει την εξής σύσταση (10X): 2,5 M γλυκίνη pH 8,3, 250 mM Tris, ενώ το διάλυμα του δείγματος αποτελούνταν από 50% (v/v) γλυκερόλη και 0,1% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης. Τα δείγματα φορτώθηκαν στο πήκτωμα χωρίς να έχουν υποστεί βρασμό. Το μίγμα του πηκτώματος είχε την παρακάτω σύσταση: 14,3 mL dH<sub>2</sub>O, 2 mL 10X ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης, 3,75 mL 40% bis- acrylamide, 20 μL TEMED και 100 μL 10% (w/v) APS, ενώ παρασκευάστηκε ενιαίο, χωρίς διαχωρισμό μεταξύ πηκτώματος επιστοίβαξης και πηκτώματος διαχωρισμού. Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών εφαρμόστηκε ηλεκτρικό ρεύμα έντασης 25 mA/ πήκτωμα για 1 ώρα.

#### 2.5.2.3 Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Isoelectric focusing PAGE, IEF-PAGE)

---

Η ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού των πρωτεϊνικών μορίων με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Τα πηκτώματα που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό, είναι παρασκευασμένα σε κλίση pH, έτσι ώστε, με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, κάθε πρωτεΐνη του δείγματος μετακινείται μέχρι τη θέση εκείνη που αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό της σημείο, οπότε και είναι πλέον μη φορτισμένη, και άρα παραμένει στη θέση αυτή. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό να υπολογιστεί και το άγνωστο ισοηλεκτρικό σημείο μιας δεδομένης πρωτεΐνης.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης Phastsystem της εταιρείας Pharmacia (Σουηδία). Τα πηκτώματα ήταν προπαρασκευασμένα και κάλυπταν εύρος τιμών pH 3-9. Για την εύρεση του ισοηλεκτρικού πεδίου των υπό μελέτη πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε κατάλληλος μάρτυρας ισοηλεκτρικών σημείων pH 3,5-9,3 της εταιρείας GE Healthcare (Broad pI kit, pH 3,0-10,0). Το μίγμα των πρωτεϊνών περιείχε αμυλογλυκοζιδάση (pI 3,50), παρεμποδιστή της τρυψίνης της σόγιας (pI 4,55), β-λακτογλοβουλίνη A (pI 5,20), ανθρακική ανυδράση B βοδιού (pI 5,85) και ανθρώπου (pI 6,55) μυογλοβίνη αλόγου (όξινη τιμή pI 6,85 και βασική τιμή pI 7,35), λεκτίνη φακής (όξινη τιμή pI 8,15, ενδιάμεση τιμή pI 8,45 και βασική τιμή pI 8,65) και τρυψινογόνο (pI 9,30).

#### 2.5.2.4 Εμφάνιση των πρωτεϊνών στα πηκτώματα

---

Με το πέρας της εκάστοτε ηλεκτροφόρησης, η χρώση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους:

α) Με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250: Το πήκτωμα εμβαπτίστηκε σε διάλυμα χρώσης (Staining solution) Coomassie Brilliant Blue G-250 για 20 min και μετά σε διάλυμα αποχρωματισμού

(destaining solution) μέχρι την εμφάνιση των ζωνών, με ήπια ανάδευση καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

β) Με χρώση νιτρικού αργύρου (Blum *et al.*, 1987): Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ευαισθησία, και βασίζεται στην ιδιότητα των ιόντων αργύρου να αντιδρούν με τις πρωτεΐνες. Με την αναγωγή των ιόντων αργύρου σε μεταλλικό άργυρο, με φορμαλδεΐδη, εμφανίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2.7:** Χρώση πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο

	<b>Διάλυμα</b>	<b>Διάρκεια (min)</b>	<b>Στάδιο</b>
<b>1</b>	50% (v/v) CH <sub>3</sub> OH, 12% (v/v) CH <sub>3</sub> COOH	90	Στερέωση πρωτεϊνών
<b>2</b>	50% (v/v) αιθανόλη	20	Έκπλυση οξικού οξέος
<b>3</b>	50% (v/v) αιθανόλη	20	Έκπλυση οξικού οξέος
<b>4</b>	30% (v/v) αιθανόλη	30	Έκπλυση οξικού οξέος
<b>5</b>	H <sub>2</sub> O	2	Έκπλυση
<b>6</b>	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 0,02% (w/v)	2	
<b>7</b>	H <sub>2</sub> O	2 (3X)	Έκπλυση
<b>8</b>	AgNO <sub>3</sub> 0,2% (w/v), 0,075% (v/v) HCHO	20	Χρώση πρωτεϊνών
<b>9</b>	H <sub>2</sub> O	0,5 (2X)	Έκπλυση
<b>10</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 6% (w/v), HCHO 0,02% (w/v), Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 0,02% (w/v)	~20 (έως την εμφάνιση των ζωνών)	Εμφάνιση πρωτεϊνών
<b>11</b>	H <sub>2</sub> O	10	Επιβράδυνση χρώσης
<b>12</b>	50% (v/v) CH <sub>3</sub> OH, 12% (v/v) CH <sub>3</sub> COOH	Αποθήκευση πηκτώματος	Τερματισμός χρώσης

#### 2.5.2.5 Ζυμογραφήματα

Η τεχνική του ζυμογραφήματος βασίζεται στην ανίχνευση των πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί σε ένα πήκτωμα με βάση την ενεργότητά τους σε κάποιο υπόστρωμα. Για την ανίχνευση κατάλληλων ενεργοτήτων χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα υποστρώματα, ενώ οι υπό μελέτη πρωτεΐνες είχαν προηγουμένως ηλεκτροφορηθεί σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (native PAGE). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση κάθε επιθυμητής ενζυμικής ενεργότητας περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

##### I. Λακκάσες

Για τη στερέωση των πρωτεϊνών στο πήκτωμα, γίνεται εμβάπτιση σε 50 ml οξικού οξέος 10% και μεθανόλης 40% για 10 min. Έπειτα, προστίθενται περίπου 20 ml ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4 και 2,5 ml υπόστρωμα ABTS συγκέντρωσης 20 mM.

##### II. Υπεροξειδάσες εξαρτημένες και ανεξάρτητες από το μαγγάνιο

Για τη στερέωση των πρωτεϊνών στο πήκτωμα, γίνεται εμβάπτιση σε 50 ml οξικού οξέος 10% και μεθανόλης 40% για 10 min. Ύστερα, προστίθενται περίπου 20 ml ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4,5 και 2 ml DMAB συγκέντρωσης 25 mM, 1 ml MBTH 50 mM, 0,2 ml θειικό μαγγάνιο συγκέντρωσης 10 mM

και 0,2 ml υπεροξείδιο του υδρογόνου συγκέντρωσης 5 mM. Με αυτόν τον τρόπο αναμένεται η ανίχνευση των πρωτεϊνών που εξαρτώνται από το μαγγάνιο. Η αντίστοιχη διαδικασία εφαρμόζεται και για τις πρωτεΐνες που δεν εξαρτώνται από το μαγγάνιο, χωρίς όμως την προσθήκη του μαγγανίου. Στη θέση του προστίθενται απιονισμένο νερό.

Το πήκτωμα αφήνεται για επώαση μέχρι την εμφάνιση των ζωνών.

### 2.5.3 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών μορίων

---

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών σε διαλύματα πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους: με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976) και με τη μέθοδο Lowry (Lowry et al, 1951).

Στην πρώτη περίπτωση, 25  $\mu$ L πρωτεϊνικού διαλύματος αναμίχθηκε με 1,25 mL αντιδραστηρίου Bradford (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL αιθανόλη, 100 mL  $\pi$ .H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> σε 1 L απιονισμένου νερού), το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, για τη σταθεροποίηση του χρώματος, και φωτομετρήθηκε στα 595 nm έναντι τυφλού διαλύματος.

Στη δεύτερη περίπτωση, παρασκευάστηκε το εξής διάλυμα αντιδραστηρίων: 49 mL 0,2 M NaOH, 49 mL 4% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 mL 1% (w/v) CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O και 1 mL 2% (w/v) Na,K, tartrate. 2,5 mL αυτού του διαλύματος αναμίχθηκαν με 0,5 mL δείγματος και το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,25 mL 50% (v/v) αντιδραστηρίου Folin, και το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 750 nm έναντι τυφλού, το οποίο είχε παρασκευαστεί με το ρυθμιστικό διάλυμα του πρωτεϊνικού διαλύματος.

Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και στις δύο περιπτώσεις επιτεύχθηκε με χρήση κατάλληλης πρότυπης καμπύλης που κατασκευάστηκε με διαφορετικές συγκεντρώσεις αλβουμίνης ορού.

### 2.5.4 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας

---

Η ενεργότητα των οξειδωτικών ενζύμων προσδιορίστηκε με τη χρήση του υποστρώματος ABTS 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS). Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 2 mM ABTS, κατάλληλα αραιωμένο ενζυμικό παρασκεύασμα και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, κατάλληλου pH. Μετά από επώαση 10 λεπτών στους 30 °C, η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 420 nm, και η συγκέντρωση του οξειδωμένου ABTS υπολογίστηκε με τη χρήση του συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας  $\epsilon_{420nm} = 36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις ελέγχου με θερμικά απενεργοποιημένο ένζυμο. Σε περίπτωση μέτρησης ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδάσης, στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε επιπλέον 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit) ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την οξείδωση 1  $\mu$ mol ABTS ανά λεπτό στις παραπάνω συνθήκες.

Η ενζυμική ενεργότητα δοκιμάστηκε σε διαφορετικά υποστρώματα ως εξής: Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικού 50 mM κατάλληλου pH προστέθηκε καθένα από τα υποστρώματα σε τελική συγκέντρωση 2 mM, ένζυμο κατάλληλα αραιωμένο και 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, εάν επρόκειτο για μέτρηση

ενζυμική ενεργότητα υπεροξειδάσης. Το μίγμα της αντίδρασης επωάστηκε σε κατάλληλη θερμοκρασία για 10 λεπτά και στη συνέχεια φωτομετρήθηκε σε κατάλληλο μήκος κύματος για κάθε προϊόν, ως εξής: υδροκινόνη ( $\epsilon_{247} = 21300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), NNNN-τετραμέθυλ-φαινυλενεδιαμίνη ( $\epsilon_{515} = 43160 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), L-DOPA ( $\epsilon_{475} = 3700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), κατεχόλη ( $\epsilon_{450} = 928 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), ασκορβικό οξύ ( $\epsilon_{245} = 10000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 2,6 διμεθοξυφαινόλη ( $\epsilon_{469} = 27500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), πυρογαλλόλη ( $\epsilon_{420} = 3724 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), γουαϊακόλη ( $\epsilon_{456} = 12100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), βερατρυλική αλκοόλη ( $\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $\text{Mn}^{2+}$  ( $\epsilon_{238} = 6500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), ABTS ( $\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) και Reactive Black 5 ( $\epsilon_{558} = 50 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Οι ενζυμικές ενεργότητες υπεροξειδάσης σε υπερκείμενα καλλιεργειών υπολογίστηκαν ως εξής:

Αρχικά, για όγκο αντίδρασης 250  $\mu\text{l}$  προστίθενται 125  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρικού οξέος-γαλακτικού νατρίου 0,1 M pH 4,5. Έπειτα, προστίθενται 25  $\mu\text{l}$  25 mM 2,5-dimethylamino benzoic acid (DMAB), 12,5  $\mu\text{l}$  50 mM 3-methyl-2-benzo-triazolinone hydrazone (MBTH) και 82,5  $\mu\text{l}$  δείγμα κατάλληλα αραιωμένο. Παρασκευάζονται τρεις τέτοιες αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση προστίθενται 5  $\mu\text{l}$  απιονισμένο νερό. Το παραπάνω μίγμα αποτελεί το τυφλό διάλυμα. Στην δεύτερη αντίδραση προστίθενται 2,5  $\mu\text{l}$  5 mM υπεροξείδιο του υδρογόνου και 2,5  $\mu\text{l}$  απιονισμένο νερό. Επειδή απουσιάζει το μαγγάνιο, με την παραπάνω αντίδραση προσδιορίζονται οι υπεροξειδάσες που είναι ανεξάρτητες από αυτό. Στην τρίτη αντίδραση προστίθενται 2,5  $\mu\text{l}$  10 mM θειικό μαγγάνιο ( $\text{MnSO}_4$ ) και 2,5  $\mu\text{l}$  5 mM υπεροξείδιο του υδρογόνου. Με την παραπάνω αντίδραση προσδιορίζονται οι υπεροξειδάσες που εξαρτώνται από το μαγγάνιο, αλλά και οι ανεξάρτητες του μαγγανίου. Ακολουθεί φωτομέτρηση για 3 min στους 25  $^{\circ}\text{C}$  στα 590 nm.

Η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση προϊόντος πραγματοποιείται με χρήση του νόμου Beer-Lambert, όπου  $\epsilon_{590\text{nm}} = 32.900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Η ενζυμική ενεργότητα των εξαρτώμενων από το μαγγάνιο υπεροξειδασών υπολογίζεται με αφαίρεση της ενεργότητας των ανεξάρτητων υπεροξειδασών από την ολική ενεργότητα που προσδιορίστηκε με την τρίτη αντίδραση.

Για τη μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων λιπάσης, χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό υπόστρωμα παρα-νιτρο-φαινυλο-λαυρικό οξύ (paranitrophenyl-lauric acid, pNp-L). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Διάλυμα 1: Ζυγίζονται 90 mg pNp-L και διαλύονται σε 60 ml DMSO
- Διάλυμα 2: Ζυγίζεται 1 g Triton X-100 και 0,5 g αραβικό κόμμα και διαλύονται σε 450 ml ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -κιτρικού οξέος συγκέντρωσης 50 mM, pH 7

Με ανάμιξη 0,1 ml του Διαλύματος 1 σε 5 ml του Διαλύματος 2, προκύπτει το τελικό διάλυμα που χρησιμοποιείται ως το υπόστρωμα της αντίδρασης. Σε τελικό όγκο αντίδρασης 250  $\mu\text{l}$ , προστίθενται 50  $\mu\text{l}$  δείγμα κατάλληλα αραιωμένο, 100  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικό pH 7 και 100  $\mu\text{l}$  διάλυμα υποστρώματος. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 410 nm στους 30 $^{\circ}\text{C}$  για 30 min. Η ενζυμική ενεργότητα λιπάσης υπολογίζεται με τη βοήθεια κατάλληλης πρότυπης καμπύλης παρα-νιτροφαινόλης.

### 2.5.5 Υπολογισμός κινητικών σταθερών

---

Οι κινητικές σταθερές της ενεργότητας υπεροξειδάσης προσδιορίστηκαν για τα υποστρώματα ABTS και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικών 50 mM pH 5. Οι κινητικές σταθερές για το ABTS προσδιορίστηκαν σε σταθερή συγκέντρωση υπεροξειδίου 0.5 mM, ενώ για το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με σταθερή συγκέντρωση ABTS 2 mM. Για τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών λακκάσης, η ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε για διαφορετικές συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων ABTS και 2,6 DMP σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικών 50 mM pH 4.

### 2.5.6 Υπολογισμός βέλτιστης θερμοκρασίας και σταθερότητας ενζύμων

---

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα και τη σταθερότητα των μελετούμενων ενζύμων προσδιορίστηκε μετρώντας την εναπομείνουσα ενεργότητα σε υπόστρωμα ABTS συγκέντρωσης 2 mM. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης προσδιορίστηκε με μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας σε διάφορες θερμοκρασίες (20-70 °C) για 10 min σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών – φωσφορικών 0.1 M κατάλληλου pH. Η θερμοσταθερότητα των ενζύμων προσδιορίστηκε με μετρήσεις της εναπομείνουσας ενζυμικής ενεργότητας όπως αναφέρονται στο κεφάλαιο 2.5.4, μετά από επώαση του καθαρού ενζύμου σε θερμοκρασίες 30-80 °C και pH 8.0, συναρτήσει του χρόνου.

### 2.5.7 Υπολογισμός βέλτιστου pH ενζυμικής ενεργότητας και σταθερότητας σε διαφορετικά pH

---

Το βέλτιστο pH ενζυμικής δράσης προσδιορίστηκε μετρώντας την ενζυμική ενεργότητα στους 30 °C μετά από επώαση 10 λεπτών στην περιοχή pH 3.0-9.0 με τα ακόλουθα ρυθμιστικά διαλύματα: 0.1 M κιτρικού οξέος – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 3.0-5.0), 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.0-7.0) και 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0-9.0). Η σταθερότητα των ενζύμων στο ίδιο εύρος τιμών pH προσδιορίστηκε με μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 2.5.4, σε επιλεγμένα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια 24-ωρης επώασης του καθαρού ενζύμου σε ρυθμιστικά διαλύματα εύρους pH 3.0-9.0 (όπως αναφέρεται παραπάνω) και θερμοκρασία 4 °C.

### 2.5.8 Υπολογισμός ενζυμικής σταθερότητας σε υπεροξείδιο του υδρογόνου

---

Η σταθερότητα του ενζύμου MtPerII σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μελετήθηκε με την επώαση 0.01 μM ενζύμου με διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 8 και στους 26 °C. Η εναπομείνουσα ενεργότητα προσδιορίστηκε σε δείγματα που λήφθηκαν σε επιλεγμένα χρονικά σημεία.

## 2.6 Ενζυμικές αντιδράσεις βιομετατροπής φαινολικών ενώσεων

---

Οι αντιδράσεις πολυμερισμού φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκαν ως εξής: Σε κωνικές φιάλες όγκου 250 mL προστέθηκαν 89 Units mL<sup>-1</sup> εμπορικής λακκάσης Novozym 51003 (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark), 400 mg υποστρώματος και 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 50 mM, pH 6. Η αντίδραση επώαστηκε για 24 h σε ανακινούμενο επωαστήρα στους 30 °C, 180 rpm. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η κατεχόλη, η πυρογαλλόλη και το γαλλικό οξύ. Οι αντιδράσεις ελέγχου πραγματοποιήθηκαν με θερμικά απενεργοποιημένο ένζυμο, προκειμένου να αποκλειστεί πιθανή αυτό-οξειδωση των υποστρωμάτων. Μετά το πέρας των 24 ωρών, το μίγμα διηθήθηκε από φίλτρο υδροφιλικής πολυαιθεροσουλφόνης διαμέτρου πόρων 0.2 μm, και τα στερεά που απομονώθηκαν εκπλύθηκαν με υπερκάθαρο νερό για την απομάκρυνση του ενζύμου και των υπολειπόμενων μονομερών. Το προϊόν της αντίδρασης λυοφιλιώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω αναλύσεις.

Η αντίδραση πολυμερισμού της κατεχόλης με το ένζυμο *MtPerII* πραγματοποιήθηκε με μικρές αποκλίσεις: 400 μg καθαρού ενζύμου προστέθηκαν σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών-κιτρικού 0.1 mM pH 5. Η κατεχόλη προστέθηκε στο μίγμα της αντίδρασης σε τελική συγκέντρωση 100 mM. Προκειμένου να διαφυλαχθεί η σταθερότητα της ετερόλογης υπεροξειδάσης, 50 μL διαλύματος H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM προστέθηκαν σε επιλεγμένα χρονικά σημεία. Το μίγμα επώαστηκε στους 40 °C, 180 rpm για 24 ώρες. Αντιδράσεις ελέγχου πραγματοποιήθηκαν με μίγματα στα οποία απουσίαζε το υπεροξείδιο του υδρογόνου ή το ένζυμο, προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα αυτό-οξειδωσης της κατεχόλης.

Η αντίδραση βιομετατροπής της βουτεΐνης με το ένζυμο *MtLac2* πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 0,19 μg καθαρού ενζύμου και 1,6 mg υποστρώματος διαλυμένου σε 100 μl μεθανόλης σε 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος 0,1 mM φωσφορικών – κιτρικού pH 4. Η αντίδραση επώαστηκε για 24 ώρες στους 40 °C, με ανάδευση 900 rpm. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις ελέγχου με θερμικά απενεργοποιημένο ένζυμο, προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα αυθόρμητης οξειδωσης των υποστρωμάτων. Με το πέρας των 24 ωρών, το μίγμα της αντίδρασης φυγοκεντρήθηκε και το ίζημα, μετά από ξέπλυμα με υπερκάθαρο νερό, επαναδιαλύθηκε σε μεθανόλη.

---

## 2.7 Ανάλυση προϊόντων πολυμερισμού και βιομετατροπής

---

### 2.7.1 Προσδιορισμός θερμικής αντοχής προϊόντων πολυμερισμού

---

#### 2.7.1.1 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (*Differential Scanning Calorimetry, DSC*)

---

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης είναι η μέθοδος με την οποία μελετώνται οι θερμικές μεταπτώσεις ενός πολυμερούς, δηλαδή οι αλλαγές που συμβαίνουν στο μόριο όταν αυτό θερμαίνεται. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς ροής θερμότητας μεταξύ δύο θερμαινόμενων δειγμάτων, δηλαδή του δείγματος προς ανάλυση και ενός δείγματος αναφοράς (Gill et al., 2010). Τα δείγματα (5-15 mg) προετοιμάζονται και σφραγίζονται σε κατάλληλο καψίδιο αλουμινίου, ενώ το δείγμα αναφοράς συνήθως είναι κενό. Τα καψίδια εισάγονται στους κατάλληλους υποδοχείς της συσκευής θερμιδομετρίας και τοποθετούνται σε φούρνο κατάλληλα κατασκευασμένο ώστε να παρέχει ομοιόμορφη θέρμανση, σε θερμοκρασίες έως και 700 °C. Οι υποδοχείς ξεκινούν να θερμαίνονται με σταθερό ρυθμό 10 °C/min, ενώ η ακριβής θερμοκρασία τους παρακολουθείται με τη χρήση θερμοστοιχείων. Η διαφορά ενέργειας που ανιχνεύεται για τη διατήρηση της ίδιας θερμοκρασίας μεταξύ του δείγματος προς ανάλυση και του δείγματος αναφοράς είναι ανάλογη της θερμικής ενέργειας που απορροφάται ή εκλύεται κατά τη διάρκεια μιας θερμικής μετάπτωσης του προς εξέταση μορίου. Για παράδειγμα, η τήξη είναι μια ενδόθερμη διαδικασία, οπότε ο υποδοχέας του προς ανάλυση δείγματος απορροφά περισσότερη θερμότητα για τη διατήρηση της ίδιας θερμοκρασίας σε σχέση με τον υποδοχέα αναφοράς. Η διαφορά της ροής του ρεύματος που απαιτείται για τη διατήρηση της ίδιας θερμοκρασίας στους δύο υποδοχείς ανιχνεύεται από αισθητήρα, και καταγράφεται σαν θετική κορυφή στο διάγραμμα ροής θερμότητας συναρτήσεως της θερμοκρασίας. Αντίστοιχα, μια εξώθερμη αντίδραση, όπως η κρυστάλλωση, καταγράφεται σαν αρνητική κορυφή. Το εμβαδόν που περικλείεται κάτω από τις κορυφές συσχετίζεται με τη μεταβολή της ενθαλπίας ( $\Delta H$ ). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε το όργανο Mettler DSC 1 STARe System (Mettler-Toledo International Inc., Ελβετία) του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πολυμερών του ΕΜΠ. Η θέρμανση περίπου 5 mg υλικού στο θερμοκρασιακό πεδίο 0-400 °C πραγματοποιήθηκε με σταθερό ρυθμό 10 °C min<sup>-1</sup> σε ατμόσφαιρα αζώτου.

#### 2.7.1.2 Θερμοσταθμική ανάλυση (*Thermogravimetric analysis, TGA*)

---

Η θερμοσταθμική ανάλυση είναι μια μέθοδος προσδιορισμού της θερμικής σταθερότητας ουσιών, η οποία μετρά την έκταση και το ρυθμό αλλαγής της μάζας της υπό ανάλυση ουσίας, συναρτήσεως της θερμοκρασίας, σε ελεγχόμενο περιβάλλον (MacCallum, 1985). Με την τεχνική αυτή μπορούν να μελετηθούν δείγματα, τα οποία παρουσιάζουν μεταβολές της μάζας τους συναρτήσεως της θερμοκρασίας, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της διάσπασης ή οξειδωσής τους, ή της εξάτμισης

της περιεχόμενης υγρασίας τους. Η ανάλυση TGA είναι μια πολύ χρήσιμη μέθοδος στη μελέτη των πολυμερών, συμπεριλαμβανομένων των θερμοπλαστικών, των ελαστομερών, των ινών και των φιλμ, καθώς επίσης και των βαφών.

Οι μεταβολές της μάζας του δείγματος συναρτήσει της θερμοκρασίας πραγματοποιούνται με τη βοήθεια ενός αναλυτικού ζυγού τοποθετημένου μέσα σε ένα φούρνο. Η διάταξη αυτή αποτελεί το βασικό όργανο που χρησιμοποιείται για τέτοιου είδους αναλύσεις, και καλείται επίσης θερμοζυγός (thermobalance). Ο θερμοζυγός συνήθως είναι συνδεδεμένος και με κάποιο σύστημα συλλογής και επεξεργασίας των δεδομένων. Τα συλλεχθέντα δεδομένα από την ανάλυση του υπό μελέτη δείγματος συνήθως λαμβάνονται υπό τη μορφή TG θερμογραφημάτων, στα οποία απεικονίζεται η μεταβολή του βάρους του δείγματος συναρτήσει της θερμοκρασίας. Η πρώτη παράγωγος της καμπύλης βάρους που παρουσιάζεται στο θερμογράφημα μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με το ρυθμό μεταβολής του βάρους της υπό ανάλυση ουσίας.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, οι θερμοσταθμικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο θερμοζυγό Mettler TGA/DSC1 (Mettler-Toledo International Inc., Ελβετία) του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πολυμερών του ΕΜΠ. Τα υπό ανάλυση δείγματα θερμάνθηκαν από τους 30 μέχρι τους 800 °C με ρυθμό 10 °C min<sup>-1</sup>, σε ατμόσφαιρα αζώτου με ροή 20 mL min<sup>-1</sup>.

### 2.7.2 Φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-transformed Infrared Spectrometry, FT-IR)

---

Η μέθοδος της υπέρυθρης φασματοσκοπίας βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες. Η προέλευση των απορροφήσεων στο IR φάσμα είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με το ηλεκτρικό δίπολο ενός μορίου. Συγκεκριμένα, οι απορροφήσεις των μορίων στο υπέρυθρο προέρχονται από δύο ειδών δονήσεις των δεσμών τους, δηλαδή από δονήσεις τάσης (stretching vibrations) και δονήσεις κάμψης (bending vibrations), ενώ η απορρόφηση του υπερύθρου επιτυγχάνεται όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία έχει την ίδια συχνότητα με τη συχνότητα του δίπολου. Οι δονήσεις τάσης παράγονται από τη δόνηση δύο μορίων κατά μήκος του άξονα του δεσμού τους, ενώ οι δονήσεις κάμψης προέρχονται από τη μεταβολή της γωνίας μεταξύ δύο δεσμών.

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) είναι μια μέθοδος μεγάλης ευαισθησίας για την αναγνώριση και το χαρακτηρισμό πολύπλοκων μορίων, ενώ επιπλέον είναι και μη καταστρεπτική μέθοδος για το δείγμα. Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο FT-IR αποτελείται από την πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, το συμβολόμετρο Michelson και τον ανιχνευτή υπερύθρου (Κουή και συν., 2015). Το συμβολόμετρο Michelson αποτελείται από δύο κάτοπτρα κάθετα μεταξύ τους, από τα οποία το ένα είναι κινητό, ενώ το άλλο είναι σταθερό. Μεταξύ τους παρεμβάλλεται ο διαχωριστής της δέσμης (beam splitter) σε γωνία 45°. Συνοπτικά, η ακτινοβολία από την πηγή προσκρούει στο διαχωριστή, ο οποίος διαχωρίζει τη δέσμη. Οι δύο δέσμες φωτός ανακλώνται στα δύο κάτοπτρα, ενώνονται, διαπερνούν το δείγμα και προσκρούουν μαζί στον ανιχνευτή. Το σήμα καταγράφεται ως συμβολόγραμμα, και μέσω του μετασχηματισμού Fourier, μετατρέπεται σε συμβατικό φάσμα, το οποίο λαμβάνεται με χρήση κατάλληλου λογισμικού σε υπολογιστή.

Το φάσμα FTIR αποτελείται από δύο κυρίως περιοχές (Κουή και συν., 2015):



- την περιοχή ταυτοποίησης των χαρακτηριστικών ομάδων, η οποία βρίσκεται μεταξύ 4000 – 1400  $\text{cm}^{-1}$ . Στην περιοχή αυτή του φάσματος αποτυπώνονται οι δονήσεις τάσης των ομάδων O-H, N-H, C-H.
- Την περιοχή ταυτοποίησης των δονήσεων σκελετού, η οποία βρίσκεται μεταξύ 1.500-400  $\text{cm}^{-1}$ . Στην περιοχή αυτή αποτυπώνονται οι δονήσεις τάσης των ομάδων C-C, C-O και C-N, καθώς και των δονήσεων κάμψης ολόκληρου του μορίου, που καθιστούν την ερμηνεία των φασμάτων αρκετά πολύπλοκη. Αυτή η περιοχή του φάσματος είναι μοναδική για κάθε ένωση, αφού χαρακτηρίζει το μόριο σαν σύνολο, και γι' αυτόν τον λόγο ονομάζεται περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος.

Οι κυματαριθμοί στους οποίους εμφανίζονται οι κορυφές σε κάθε δείγμα είναι χαρακτηριστικές για τους διαφορετικούς τύπους των χημικών δεσμών και η αντιστοίχιση των κορυφών με συγκεκριμένες χημικές ομάδες πραγματοποιείται με τη βοήθεια πινάκων (Βλ. Παράρτημα A Silverstein *et al.*, 1981).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, τα ξηρά δείγματα κονιορτοποιήθηκαν πλήρως, και για την παρασκευή των δειγμάτων περίπου 10 mg δείγματος αναμίχθηκαν με περίπου 100 mg βρωμιούχο κάλιο έως το σχηματισμό ομοιογενούς μίγματος. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπιέστηκε σε παστίλιες, με τη βοήθεια μηχανικής πρέσας. Η παστίλια, προκειμένου να αναλυθεί κατάλληλα, τοποθετήθηκε στο δειγματοφορέα στερεών δειγμάτων του οργάνου, το οποίο, πριν την ανάλυση, μηδενίστηκε με παστίλια 100 mg καθαρού βρωμιούχου καλίου. Τα φάσματα λήφθηκαν για την περιοχή 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ . Τα φασματοφωτόμετρα υπερέθρου που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση ήταν τα εξής: 1) το MAGNA-IR 560 της Nicolet και εναλλακτικά 2) το Micro FTIR Biorad Excalibur FTS 3000MX με οπτικό μικροσκόπιο Inspect IR Plus.

### 2.7.3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H-NMR}$ )

---

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού βασίζεται στη μέτρηση της απορροφούμενης ακτινοβολίας από τους πυρήνες των ατόμων, που συμβαίνει όταν αυτοί τοποθετηθούν σε ένα ομογενές, στατικό μαγνητικό πεδίο και διεγερθούν από ένα δεύτερο, ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Η απορροφώμενη ακτινοβολία εμπίπτει στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (4-900 MHz), ενώ η συχνότητα της απορροφώμενης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας για συγκεκριμένο πυρήνα (όπως του  $^1\text{H}$ ) εξαρτάται από το μοριακό του περιβάλλον. Ένα τυπικό φασματόμετρο NMR αποτελείται από ένα μαγνήτη, μια γεννήτρια σαρώσεως πεδίου, ένα πομπό και ένα δέκτη ραδιοσυχνοτήτων, ένα σύστημα συλλογής δεδομένων και ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος. Η φασματοσκοπία NMR είναι μια πολύτιμη μέθοδος ταυτοποίησης και χαρακτηρισμού μεγάλου εύρους οργανικών ενώσεων, ενώ χρησιμοποιείται ευρύτατα σε μεγάλο φάσμα επιστημονικών κλάδων και ερευνητικών εφαρμογών.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος  $^1\text{H-NMR}$  για την ταυτοποίηση των προϊόντων ενζυμικής βιομετατροπής της κατεχόλης, της πυρογαλλόλης και του γαλλικού οξέος από τη λακκάση Novozym 51003. Ποσότητα ~5 mg δείγματος διαλυτοποιήθηκε σε δευτεριωμένο DMSO ( $\text{DMSO-d}_6$ ) και η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε από το φασματογράφο του Τομέα

Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, Avance III 600 spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA).

#### 2.7.4 Φασματομετρία μάζας (MS)

---

Η φασματομετρία μάζας είναι μια τεχνική ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων η οποία βασίζεται στον ιονισμό ατόμων ή μορίων ή στην παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων και στην ακόλουθη καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί στο λόγο μάζας/φορτίο ( $m/z$ ) της μελετούμενης ένωσης. Ένα φασματόμετρο μάζας αποτελείται από μια πηγή ιοντισμού (ion source/probe) η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή των ιόντων στο προς ανάλυση δείγμα, έναν αναλυτή μαζών (mass analyzer), ο οποίος είναι υπεύθυνος για το διαχωρισμό των παραγόμενων ιόντων ανάλογα με το λόγο  $m/z$ , έναν ανιχνευτή (detector), και έναν καταγραφέα των φασμάτων, συνήθως έναν απλό υπολογιστή για τον έλεγχο του οργάνου. Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για τον ιονισμό των δειγμάτων είναι αρκετές, ωστόσο στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ο ηλεκτροψεκασμός (electrospray ionization – ESI), όπου τα ιόντα εισέρχονται στον αναλυτή σε αέρια φάση. Η συγκεκριμένη μέθοδος ιονισμού χρησιμοποιείται συχνότερα για ανάλυση βιολογικών μεγαλομορίων, όπως πεπτίδια και πρωτεΐνες, και φυσικών προϊόντων, επειδή είναι μια ήπια μέθοδος μεγάλης ευαισθησίας.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η ανάλυση των προϊόντων βιομετατροπής της βουτεΐνης από την *MtLac2* πραγματοποιήθηκε στο φασματόμετρο μάζας συνδεδεμένο με LC, HPLC-LCQ Fleet/Thermo Scientific με Ion MAX ESI probe του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Τα στερεά δείγματα αναλύθηκαν μετά από διαλυτοποίηση σε μεθανόλη και διήθηση για την απομάκρυνση τυχόν αιωρούμενων στερεών.

#### 2.7.5 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High performance liquid chromatography, HPLC)

---

Η ανάλυση των προϊόντων βιομετατροπής των φλαβονοειδών και η απομόνωσή τους πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (reversed phase chromatography, RPC), με χρήση στήλης C18 και ανιχνευτή UV/Vis diode array detector, ρυθμισμένο στα 280 και 380 nm. Η στήλη εξισορροπήθηκε με 80% οξικό οξύ (διαλύτης A), 20% μεθανόλη (διαλύτης B). Με την εισαγωγή του δείγματος, εφαρμόστηκε το ακόλουθο πρόγραμμα: 0-15 min, στάδιο βαθμίδωσης, από 80% A, 20% B σε 100% B, 15-25 min, ισοκρατικό στάδιο, 100% B, 25-30 min στάδιο βαθμίδωσης, από 100% B σε 80% A, 20% B, 30-60 min ισοκρατικό στάδιο 80% A, 20% B, με σταθερή ροή 0,6 mL min<sup>-1</sup>.

#### 2.7.6 Ιξωδομετρία

---

Η μέθοδος της ιξωδομετρίας βασίζεται στην αρχή ότι τα μακρομόρια αυξάνουν το ιξώδες ενός διαλύματος ακόμη και εάν βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Η αύξηση του ιξώδους

εξαρτάται από το μοριακό βάρος και τη δομή των μακρομορίων. Το σχετικό ιξώδες των διαλυμάτων προσδιορίζεται συγκρίνοντας το χρόνο ροής  $t$  ενός διαλύματος ορισμένου όγκου δια μέσου ενός τριχοειδούς, με το χρόνο ροής  $t_0$  ίσου όγκου καθαρού διαλύτη.

Στην παρούσα διατριβή, η πυκνότητα των πολυφαινολών (intrinsic viscosity, IV, dl g<sup>-1</sup>) προσδιορίστηκε με χρήση DMSO ως διαλύτη, σε συγκέντρωση 0,2 g dl<sup>-1</sup>, σε τριχοειδές ιξωδόμετρο Ubbelohde στους 30 ± 0.1 °C. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και οι τιμές IV προσδιορίστηκαν με την εξίσωση των Solomon-Ciuta (1962):

$$IV = \sqrt{2 \left( \frac{t}{t_0} - \ln \frac{t}{t_0} - 1 \right)}$$

Όπου  $t$  είναι ο χρόνος εκροής του διαλύματος και  $t_0$  είναι ο χρόνος εκροής του διαλύτη.

---

## **2.8 Βιοπληροφορικά εργαλεία, αλγόριθμοι και βάσεις δεδομένων**

---

### **2.8.1 Αλγόριθμοι**

---

Οι στοιχίσεις των αλληλουχιών DNA και πρωτεϊνών, καθώς επίσης και η αναζήτηση ομολόγων τους πραγματοποιήθηκαν με το βιοπληροφορικό εργαλείο BLAST (nucleotide Blast και Protein Blast αντίστοιχα, Altschul et al., 1990) του NCBI (National Center for Biotechnology Information, Η.Π.Α.). Ο σχεδιασμός των εκκινητών πραγματοποιήθηκε επίσης με το εργαλείο Primer Blast.

Η εύρεση του σηματοδοτικού πεπτιδίου έκκρισης σε αλληλουχίες εκκρινόμενων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το εργαλείο SignalP v.4.1 (Petersen et al., 2011) (Center for Biological Sequence Analysis, Δανία).

Η πρόγνωση των θέσεων γλυκοζυλίωσης των ετερόλογων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τα βιοπληροφορικά εργαλεία NetNGlyc v. 1.0 (Gupta et al., 2004), (Center for Biological Sequence Analysis, Δανία) και NetOGlyc v. 4.0 (Steentoft et al., 2013) (Center for Biological Sequence Analysis, Δανία).

Η πρόγνωση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ετερόλογων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το εργαλείο Compute pI/MW του ExPASy Server (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Ελβετία).

### 2.8.2 Βάσεις δεδομένων

---

Η εύρεση πρωτεϊνικών λειτουργικών περιοχών και η λειτουργική ανάλυση πρωτεϊνικών ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με δεδομένα από τη βάση Pfam v.30.0 (European Molecular Biology Laboratory, Γερμανία) (Finn et al., 2016).

Η βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνικών ακολουθιών λακκασών και η κατάταξή τους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη βάση δεδομένων LccED (Laccase and Multicopper Oxidase Engineering Database) v.6.4 (Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart, Γερμανία) (Sirim et al., 2011).

Η βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνικών ακολουθιών υπεροξειδασών και η κατάταξή τους πραγματοποιήθηκε με δεδομένα από τη βάση PeroxiBase (Laboratoire de recherche en sciences vegetales, Universite de Toulouse, Γαλλία) (Fawal et al., 2013).

Η εύρεση πληροφοριών σχετικά με δεδομένα γονιδιώματος του ασκομύκητα *M. thermophila* πραγματοποιήθηκε μέσω της βάσης δεδομένων του DOE Joint Genome Institute (Η.Π.Α.), <http://genome.jgi-psf.org/>, <http://genome.jgi.doe.gov/Spoth2/Spoth2.home.html>, (Berka et al., 2011).

### 2.8.3 Υπολογιστικά πακέτα λογισμικού

---

Η επεξεργασία και οπτικοποίηση των δεδομένων FTIR έγινε με το πρόγραμμα Essential FTIR™ v.3.50. (Operant LLC, Η.Π.Α.). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πακέτο SigmaPlot v.12.5 της SystatSoftware Inc. (Η.Π.Α.). Οι χημικές δομές που παρουσιάζονται στο κείμενο σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του σχεδιαστικού πακέτου ACD/ChemSketch των ACD/Labs (Advanced Chemistry Development, Inc., Καναδάς). Οι υπολογισμοί των κινητικών σταθερών της ενζυμικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού πακέτου GraphPad Prism v.5 της εταιρείας GraphPad Software, Inc. (Η.Π.Α.)

## Κεφάλαιο 3

### Αποτελέσματα και Συζήτηση

#### 3.1 Μικροβιακή αποικοδόμηση κασιίγαρου με χρήση επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων

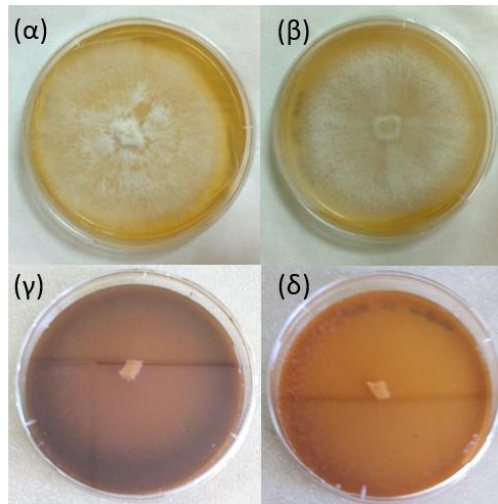
Το υγρό απόβλητο ελαιοτριβείου (κασιίγαρος, ΥΑΕ) παραλήφθηκε από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, και μετά την προκατεργασία του σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.1.5, αναλύθηκε ως προς συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του και ως προς τη σύστασή του σε ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα από τους μικροοργανισμούς για την ανάπτυξή τους. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα:

**Πίνακας 3.1.1:** Σύσταση κασιίγαρου σε θρεπτικά συστατικά και φυσικοχημικές ιδιότητες.

Σύσταση κασιίγαρου	
ρΗ	5,95
Ολικές φαινόλες (ppm γαλλικού οξέος)	3751,2 ± 0,3
Αναγωγικά σάκχαρα (g L <sup>-1</sup> )	24,8 ± 0,7
Γλυκόζη (mg mL <sup>-1</sup> )	15,3 ± 1,9
Οπτική απορρόφηση στα 525 nm (Χρώμα)	42,3
Ολικές πρωτεΐνες (g L <sup>-1</sup> )	3,2 ± 0,3

##### 3.1.1 Προκαταρκτικά πειράματα – Στερεές καλλιέργειες

Ακολούθως, εξετάστηκε η ανάπτυξη των Βασιδιομυκήτων σε στερεές καλλιέργειες με θρεπτικό υπόστρωμα PDA αλλά και ΥΑΕ, σε συγκέντρωση 50% (v/v). Τα αποτελέσματα μετά από 15 ημέρες ανάπτυξης στους 26 °C, φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



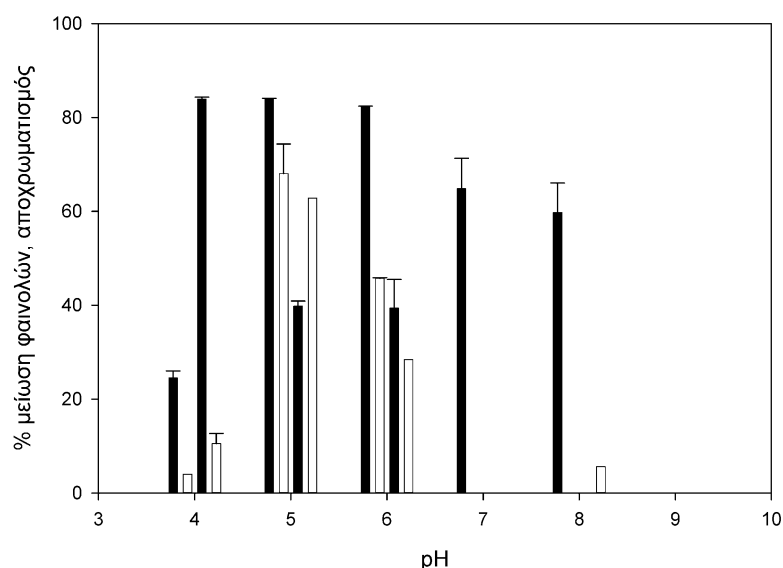
**Εικόνα 3.1.1:** Στερεές καλλιέργειες των στελεχών *P. citrinopileatus* (α, γ) και *I. lacteus* (β, δ) σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (α, β) και YAE (γ, δ) μετά από 15 ημέρες ανάπτυξης στους 26 °C.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.1.1, τα επιλεγμένα στελέχη των βασιδιομυκήτων αποχρωματίζουν το YAE, κάτι που δείχνει την ικανότητά τους στην αποικοδόμηση των φαινολών του αποβλήτου. Από τις στερεές αυτές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν τετράγωνα τεμάχια, κομμένα από τα άκρα της αναπτυσσόμενης αποικίας υπό ασηπτικές συνθήκες, για τον εμβολιασμό των υγρών καλλιεργειών.

### ***3.1.2 Επίδραση αρχικού pH καλλιέργειας στα μελετώμενα στελέχη βασιδιομυκήτων***

---

Στις πρώτες υγρές καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, το YAE χρησιμοποιήθηκε ως μόνη πηγή άνθρακα και ενέργειας σε συγκέντρωση 50% (v/v), χωρίς προσθήκη άλλων θρεπτικών μέσων, σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση του pH στην ανάπτυξη και την ικανότητα αποικοδόμησης των βασιδιομυκήτων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα διαγράμματα που ακολουθούν:



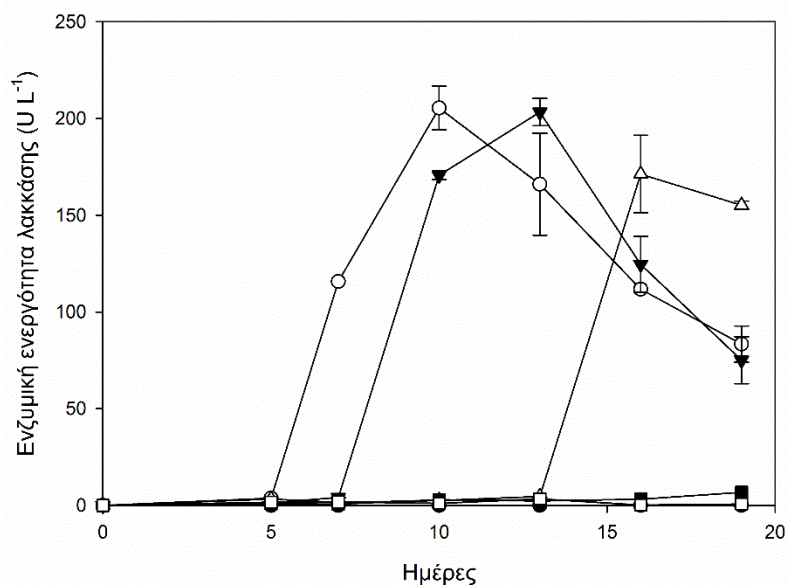
**Εικόνα 3.1.2:** Αποχρωματισμός και μείωση φαινολικών ενώσεων σε καλλιέργειες διαφόρων pH. Μαύρες μπάρες: μείωση φαινολικών από το στέλεχος *P. citrinopileatus*, γκρι ανοιχτές μπάρες: μείωση φαινολικών από το στέλεχος *I. lacteus*, γκρι σκούρες μπάρες: αποχρωματισμός από το στέλεχος *P. citrinopileatus*, λευκές μπάρες: αποχρωματισμός από το στέλεχος *I. lacteus*.

**Πίνακας 3.1.2:** Αποχρωματισμός και μείωση φαινολικών ενώσεων σε καλλιέργειες διαφόρων pH, για τα μελετούμενα στελέχη *P. citrinopileatus* και *I. lacteus*. δ.α.: δεν ανιχνεύθηκε.

pH	Μείωση φαινολών (%)		Αποχρωματισμός (%)	
	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>
4	24,5 ± 1,5	4,02 ± 0,0	83,9 ± 0,39	10,5 ± 2,2
5	84,0 ± 0,1	68,1 ± 6,3	39,8 ± 1,14	62,9 ± 0,0
6	82,3 ± 0,1	45,8 ± 0,1	39,4 ± 6,1	28,5 ± 0,0
7	64,9 ± 6,5	δ.α.	δ.α.	δ.α.
8	59,8 ± 6,2	δ.α.	δ.α.	5,6 ± 0,0
9	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.

Όπως προκύπτει από την Εικόνα 3.1.2 και τον Πίνακα 3.1.2, η τιμή pH στην οποία φαίνεται να επιτυγχάνεται ο υψηλότερος αποχρωματισμός και το υψηλότερο ποσοστό μείωσης των φαινολικών ενώσεων και από τα δύο στελέχη φαίνεται να είναι η 5. Στην τιμή αυτή, το στέλεχος *P. citrinopileatus* καταναλώνει τις φαινολικές ενώσεις σε ποσοστό 84,0%, με ταυτόχρονο αποχρωματισμό 39,8%, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για το *I. lacteus* είναι 68,1% και 62,9%. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την προγενέστερη μελέτη των Ntougias et al., (2012), όπου επιτεύχθηκε αποχρωματισμός της τάξης 60-65% από στελέχη *Pleurotus* spp. Σε αυτή την περίπτωση είναι αξιοσημείωτο ότι απλώς και μόνο η ρύθμιση του pH, χωρίς προσθήκη οποιασδήποτε άλλης ουσίας στην καλλιέργεια (π.χ. κάποια πηγή

άνθρακα, αζώτου, ή κάποιου είδους βιταμίνη), μπορεί να οδηγήσει σε ποσοστό μείωσης των φαινολών του αποβλήτου μεγαλύτερο από 80%, τουλάχιστον από το στέλεχος *P. citrinopileatus*.



**Εικόνα 3.1.3:** Επίδραση αρχικού pH καλλιέργειας στην ενζυμική ενεργότητα λακκάσης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του στελέχους *P. citrinopileatus* σε ΥΑΕ. Μαύροι κύκλοι: pH 4, λευκοί κύκλοι: pH 5, μαύρα τρίγωνα: pH 6, λευκά τρίγωνα: pH 7, μαύρα τετράγωνα: pH 8, λευκά τετράγωνα: pH 9.

Η ενζυμική ενεργότητα λακκάσης παρακολουθούνταν καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Η μέγιστη τιμή της στις καλλιέργειες του στελέχους *P. citrinopileatus* φαίνεται να επιτυγχάνεται τη 10<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας για αρχική τιμή pH 5, νωρίτερα δηλαδή από ότι για τις άλλες συνθήκες, ενώ για το στέλεχος *I. lacteus* η μέγιστη τιμή λαμβάνεται στο τέλος της καλλιέργειας με αρχική τιμή pH 9. Ωστόσο, η ενζυμική ενεργότητα λακκάσης που παράγεται από το στέλεχος *P. citrinopileatus* είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτήν που παράγεται από το *I. lacteus* ( $205.4 \pm 11.3 \text{ U L}^{-1}$  για το *P. citrinopileatus* και  $9.0 \pm 0.4 \text{ U L}^{-1}$  για το *I. lacteus* αντίστοιχα). Ακόμη, η μέγιστη παραγωγή λακκάσης για το *I. lacteus* παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με αρχική τιμή pH 9, δηλαδή σε διαφορετικές συνθήκες από αυτές στις οποίες επιτεύχθηκε η βέλτιστη αποικοδόμηση του αποβλήτου. Αυτό το φαινόμενο ίσως να υποδηλώνει ότι η λακκάση ίσως να μην είναι η κύρια ενζυμική ενεργότητα που ευθύνεται για την αποικοδόμηση του αποβλήτου από αυτό το στέλεχος, και ενδεχομένως να συμμετέχουν σε μεγαλύτερο βαθμό άλλες ενζυμικές ενεργότητες, με βασικότερες τις ενεργότητες των υπεροξειδασών, εξαρτημένων και ανεξάρτητων του μαγγανίου.

Οι τιμές βιομάζας που παρατηρήθηκαν στο τέλος της καλλιέργειας φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:



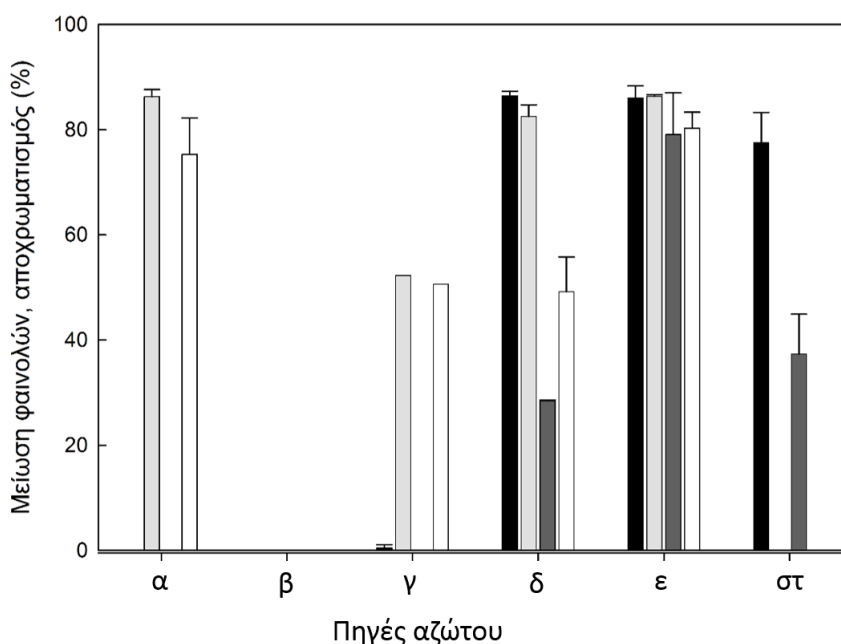
**Πίνακας 3.1.3:** Παραγωγή βιομάζας στο τέλος των καλλιεργειών μετά από ανάπτυξη σε διαφορετικά αρχικά pH. δ.α.: δεν ανιχνεύθηκε.

pH	Βιομάζα <i>P. citrinopileatus</i> (mg mL <sup>-1</sup> )	Βιομάζα <i>I. lacteus</i> (mg mL <sup>-1</sup> )
4	0,63 ± 0,03	δ.α.
5	1,55 ± 0,45	0,80 ± 0,07
6	1,57 ± 0,27	1,62 ± 0,92
7	1,03 ± 0,17	δ.α.
8	2,00 ± 0,14	0,27 ± 0,02
9	0,12 ± 0,12	0,05 ± 0,01

Οι μεγαλύτερες τιμές βιομάζας στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρήθηκαν σε τιμή αρχικού pH 6. Σε συνδυασμό με τα ικανοποιητικά ποσοστά μείωσης φαινολικών ενώσεων και αποχρωματισμού που παρατηρήθηκαν στη συνθήκη αυτή, η τιμή pH 6 επιλέχθηκε για τα παρακάτω πειράματα.

### 3.1.3 Επίδραση διαφορετικών πηγών αζώτου στην ανάπτυξη των μελετούμενων στελεχών βασιδιομυκήτων

Η χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο που χαρακτηρίζει τα ΥΑΕ μπορεί σε πολλές περιπτώσεις να παρεμποδίσει τη μυκηλιακή ανάπτυξη. Συνεπώς, θεωρήθηκε σημαντικό να εξεταστεί η επίδραση της προσθήκης διαφορετικών πηγών αζώτου στη μυκηλιακή ανάπτυξη και στην ικανότητα αποικοδόμησης των βασιδιομυκήτων. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν το τρυγικό διαμμώνιο, το οποίο αποτελεί πηγή αμμωνιακού αζώτου, αλλά σύμφωνα και με παλαιότερες μελέτες ενισχύει την ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων (Srinivasan et al., 1995, Kamada et al., 2002), το νιτρικό κάλιο, μια πηγή νιτρικού αζώτου, το νιτρικό αμμώνιο, το οποίο παρέχει άζωτο σε μορφή νιτρικών αλλά και αμμωνιακών ιόντων, το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) σαν πηγή αμινοξέων, και τέλος το εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού (CSL), ένα σύνθετο, χαμηλού κόστους παραπροϊόν πλούσιο σε αμινοξέα και βιταμίνες που ενισχύει σε μεγάλο βαθμό τη μυκηλιακή ανάπτυξη (Paraspyridi et al., 2012). Τα αποτελέσματα φαίνονται στις παρακάτω εικόνες:

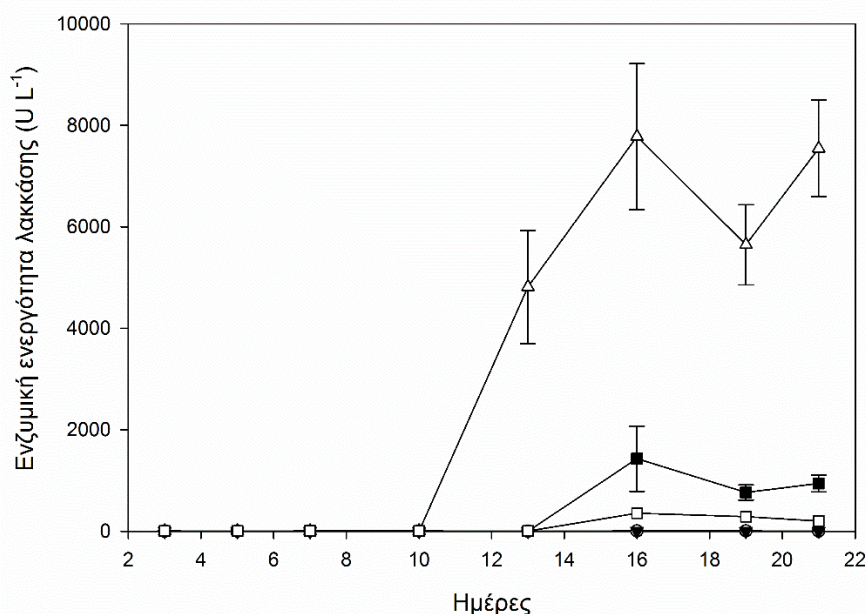


**Εικόνα 3.1.4:** Μείωση φαινολών και αποχρωματισμός (%) κατά την ανάπτυξη των μελετούμενων στελεχών βασιδιομυκήτων σε καλλιέργειες ΥΑΕ με διαφορετικές πηγές αζώτου. Μαύρες μπάρες: μείωση φαινολικών από το στέλεχος *P. citrinopileatus*, γκρι ανοιχτές μπάρες: μείωση φαινολικών από το στέλεχος *I. lacteus*, γκρι σκούρες μπάρες: αποχρωματισμός από το στέλεχος *P. citrinopileatus*, λευκές μπάρες: αποχρωματισμός από το στέλεχος *I. lacteus*. α: τρυγικό διαμμώνιο, β:  $\text{KNO}_3$ , γ:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , δ: εκχύλισμα ζύμης, ε: εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού, στ: χωρίς προσθήκη αζώτου.

**Πίνακας 3.1.4:** Μείωση φαινολών και αποχρωματισμός κατά την ανάπτυξη των μελετούμενων στελεχών βασιδιομυκήτων σε καλλιέργειες με διαφορετικές πηγές αζώτου. δ.α.: δεν ανιχνεύθηκε.

Πηγές αζώτου	Μείωση φαινολών (%)		Αποχρωματισμός (%)	
	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>
Τρυγικό διαμμώνιο	δ.α.	86,27 ± 1,4	δ.α.	75,33 ± 6,9
$\text{KNO}_3$	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0,53 ± 0,1	52,29 ± 0,0	δ.α.	50,66 ± 0,0
Εκχύλισμα ζύμης	86,43 ± 0,88	82,52 ± 2,2	28,45 ± 0,13	49,2 ± 6,6
Εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού	86,06 ± 2,3	86,37 ± 0,28	79,1 ± 7,9	80,28 ± 3,1
Χωρίς προσθήκη αζώτου	77,54 ± 5,8	δ.α.	37,36 ± 7,6	δ.α.

Σε ότι αφορά την αποικοδόμηση του ΥΑΕ, και τα δύο στελέχη έδειξαν ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα, αφού η μείωση των ολικών φαινολών και ο αποχρωματισμός ξεπέρασαν το 80%, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.1.6. Η αποικοδόμηση του ΥΑΕ που επιτεύχθηκε με το συγκεκριμένο πείραμα ξεπέρασε τα αποτελέσματα της μελέτης των Jaouani et al., (2003), όπου, από τα 17 στελέχη που εξετάστηκαν, με προσθήκη πηγής αζώτου, ο μέγιστος αποχρωματισμός που επιτεύχθηκε ήταν 75%. Για το στέλεχος *P. citrinopileatus* η μέγιστη μείωση των ολικών φαινολών παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις όπου στην καλλιέργεια προστέθηκε εκχύλισμα ζύμης ή εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού ( $86,4 \pm 0,9$  % και  $86,1 \pm 2,3$  % αντίστοιχα). Παρόμοια αποτελέσματα επιτεύχθηκαν και στις καλλιέργειες *I. lacteus* με προσθήκη εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού και τρυγικού διαμμωνίου ( $86,4 \pm 0,3$  % και  $86,3 \pm 1,4$  % μείωση των ολικών φαινολών αντίστοιχα). Η προσθήκη εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα αποχρωματισμού και για τα δύο στελέχη ( $79,1 \pm 7,9$  % για το στέλεχος *P. citrinopileatus* και  $80,3 \pm 3,1$  % για το στέλεχος *I. lacteus* αντίστοιχα). Ωστόσο, για το στέλεχος *I. lacteus* παρόμοια αποτελέσματα επιτεύχθηκαν και με το τρυγικό διαμμώνιο ως πηγή αζώτου ( $75,3 \pm 8,9$  %), ενώ χωρίς καμία προσθήκη αζώτου ή με προσθήκη νιτρικού αζώτου το στέλεχος αυτό δεν φάνηκε να αποικοδομεί το ΥΑΕ. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να εξηγεί εν μέρει τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων, αφού σε αυτά δεν είχαν παρατηρηθεί αξιοσημείωτα επίπεδα αποικοδόμησης σε καμιά από τις μελετώμενες συνθήκες. Φαίνεται λοιπόν ότι η έλλειψη πηγής αζώτου είναι ένας παράγοντας που παρεμποδίζει σημαντικά την αποικοδόμηση του ΥΑΕ από το *I. lacteus*. Αντιθέτως, στην περίπτωση του *P. citrinopileatus* η προσθήκη τρυγικού διαμμωνίου ή νιτρικού αζώτου φαίνεται να παρεμποδίζει τη λιγνινολυτική δράση του μικροοργανισμού, εφόσον φαίνεται να αποικοδομεί το ΥΑΕ σε μεγαλύτερο ποσοστό χωρίς προσθήκη αζώτου, σε σχέση με τις δύο αυτές συνθήκες.



**Εικόνα 3.1.5:** Επίδραση των προστιθέμενων πηγών αζώτου στην ενζυμική ενεργότητα λακκάσης του στελέχους *P. citrinopileatus* κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας σε ΥΑΕ. Μαύροι κύκλοι: τρυγικό διαμμώνιο, λευκοί κύκλοι: KNO<sub>3</sub>, μαύρα τρίγωνα: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, λευκά τρίγωνα: εκχύλισμα ζύμης, μαύρα τετράγωνα: εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού, λευκά τετράγωνα: χωρίς προσθήκη αζώτου.

Σε ότι αφορά την παραγωγή λακκάσης, το εκχύλισμα ζύμης φάνηκε να είναι η πηγή αζώτου που οδηγεί σε μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα και για τα δύο είδη, αν και οι μέγιστες τιμές ενζυμικών ενεργοτήτων για τους δύο μικροοργανισμούς διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό. Ο *P. citrinopileatus* έδειξε εξαιρετικά υψηλή παραγωγή λακκάσης με μέγιστο τίτλο τα  $7778 \pm 1440 \text{ U L}^{-1}$  τη 16<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας, ενώ και με εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού ως πηγή αζώτου η παραγόμενη λακκάση ήταν επίσης υψηλή ( $1428 \pm 643 \text{ U L}^{-1}$  τη 16<sup>η</sup> ημέρα). Αντίστοιχα υψηλές ενεργότητες λακκάσης ( $4600 \text{ U L}^{-1}$ ) αναφέρθηκαν και από τους Fenice et al., (2003) για την ανάπτυξη του στελέχους *Panus tigrinus* σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό υπόστρωμα ΥΑΕ, κάτι που επιβεβαιώθηκε και από τη μελέτη των d'Annibale et al., (2006). Στη μελέτη των Koutrotsios and Zervakis (2014), όπου μελετήθηκαν 60 διαφορετικά στελέχη, τα είδη του γένους *Pleurotus* ήταν από τα πιο παραγωγικά σε ότι αφορά τις ενζυμικές ενεργότητες λακκάσης ( $63 \text{ U L}^{-1}$ ), ενώ οι Aggelis et al., (2003) αναφέρουν ότι κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης των ΥΑΕ από το *P. ostreatus*, ανιχνεύθηκε μόνο η ενεργότητα λακκάσης και καμία άλλη λιγνινολυτική ενζυμική ενεργότητα.

Στην περίπτωση του στελέχους *I. lacteus*, η ενεργότητα λακκάσης που ανιχνεύθηκε ήταν ιδιαίτερα χαμηλή, με μέγιστη τιμή τα  $3,9 \pm 0,1 \text{ U L}^{-1}$  τη 13<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας με εκχύλισμα ζύμης ως πηγή αζώτου, ενώ ενεργότητες λακκάσης ανιχνεύθηκαν επίσης στις καλλιέργειες με πηγή αζώτου  $\text{KNO}_3$  αλλά και χωρίς προσθήκη αζώτου.

Από τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, είναι προφανές ότι ο *P. citrinopileatus* είναι ένας οργανισμός με εξαιρετικά ισχυρό λιγνινολυτικό σύστημα που βασίζεται σε ενζυμικές ενεργότητες λακκάσης, ενώ στην περίπτωση του *I. lacteus* η ενζυμική αποικοδόμηση των φαινολικών επιτυγχάνεται μέσω άλλων ενζυμικών ενεργοτήτων, πιθανώς ενζύμων με δράση υπεροξειδάσης. Προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο αυτό, πραγματοποιήθηκαν επίσης μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδασών εξαρτημένων και ανεξάρτητων του μαγγανίου κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ο *P. citrinopileatus* έδειξε ανιχνεύσιμη παραγωγή ενζύμων με ενεργότητα υπεροξειδάσης σε ορισμένες μόνο συνθήκες ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του στελέχους αυτού, ενεργότητα υπεροξειδασών ανιχνεύθηκε μόνο στις καλλιέργειες με εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού ως πηγή αζώτου, με μέγιστες τιμές  $121,53 \pm 0,01 \text{ U L}^{-1}$  την 22<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας για ενεργότητα υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του μαγγανίου, ενώ για την ενεργότητα υπεροξειδάσης εξαρτώμενης από το μαγγάνιο η μέγιστη τιμή που παρατηρήθηκε αντιστοιχεί σε  $96,72 \pm 0,01 \text{ U L}^{-1}$  την 22<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας. Η εικόνα είναι πολύ διαφορετική στην περίπτωση των καλλιεργειών *I. lacteus*, καθώς οι παραχθείσες ενεργότητες από το στέλεχος αυτό φαίνεται να είναι τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερες σε σχέση με τις τιμές των ενεργοτήτων που μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των καλλιεργειών του *P. citrinopileatus*. Συγκεκριμένα, στα υπερκείμενα των καλλιεργειών του *I. lacteus* ανιχνεύθηκαν ενεργότητες υπεροξειδάσης έως και  $6002 \pm 0,01 \text{ U L}^{-1}$  ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 22<sup>η</sup> ημέρα) για υπεροξειδάσες ανεξάρτητες του μαγγανίου και  $513,4 \pm 32,3 \text{ U L}^{-1}$  (τρυγικό διαμμώνιο, 22<sup>η</sup> ημέρα), για υπεροξειδάσες που εξαρτώνται από το μαγγάνιο. Οι ενεργότητες υπεροξειδασών εξαρτώμενων από το μαγγάνιο παρατηρήθηκαν μόνο στην περίπτωση των καλλιεργειών με τρυγικό διαμμώνιο, ενώ ενεργότητα υπεροξειδάσης εξαρτημένης από το μαγγάνιο παρατηρήθηκε σε όλες τις πηγές αζώτου που δοκιμάστηκαν, εκτός από το  $\text{KNO}_3$ . Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι το λιγνινολυτικό σύστημα του *P. citrinopileatus* αποτελείται κυρίως από ενζυμικές ενεργότητες λακκάσης, ενώ τα ένζυμα με ενεργότητα υπεροξειδάσης λειτουργούν μόνο επικουρικά, αφού ενζυμικές ενεργότητες υπεροξειδάσης δεν παρατηρήθηκαν για καμία άλλη πηγή αζώτου, εκτός του εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού, στις καλλιέργειες του στελέχους αυτού. Αντιθέτως, ο *I. lacteus*

φαίνεται να επιτυγχάνει εξίσου υψηλό βαθμό αποικοδόμησης του ΥΑΕ μέσω της παραγωγής ενζύμων με δράση υπεροξειδάσης, ενώ οι λακκάσες εδώ έχουν επικουρικό ρόλο. Άλλωστε, ο *I. lacteus* είναι γνωστό ότι παράγει αρκετά διαφορετικά ένζυμα με δράση υπεροξειδάσης. Σε πρωτεύουσα μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Salvachua et al., (2013a) σχετικά με την παραγωγή ενζύμων αποικοδόμησης του άχυρου, βρέθηκε ότι οι κύριες ενζυμικές ενεργότητες για το στέλεχος *I. lacteus* ήταν οι DyP και MnP, ενώ για το *P. ostreatus* οι λακκάσες και οι VP. Σε επόμενη εργασία τους, οι Salvachua et al., (2013c) εντόπισαν δύο διαφορετικές ενζυμικές ενεργότητες, εκ των οποίων η μία απομονώθηκε, χαρακτηρίστηκε, και βρέθηκε ότι ανήκει στις υπεροξειδάσες αποικοδόμησης βαφών (DyPs). Στη μελέτη αυτή, σε θρεπτικό μέσο επαγωγής των λιγνινολυτικών ενζύμων, η ενεργότητα Mn-εξαρτώμενης υπεροξειδάσης ξεπέρασε τα 300 U L<sup>-1</sup>. Σε εργασία των Novotny et al., (2001), σε σχέση με την ικανότητα αποικοδόμησης βαφών από το *I. lacteus*, η ενεργότητα της Mn-εξαρτώμενης υπεροξειδάσης έφτασε τα 47 U L<sup>-1</sup> σε θρεπτικό μέσο με χαμηλή συγκέντρωση αζώτου. Ωστόσο, σε προγενέστερη εργασία των Novotny et al., (2000) οι συγγραφείς έδειξαν ότι σε θρεπτικό μέσο με υψηλή συγκέντρωση πηγής αζώτου, και συγκεκριμένα με 45 mM τρυγικό διαμώνιο, η ενεργότητα της Mn-εξαρτώμενης υπεροξειδάσης ήταν η βέλτιστη που παρατηρήθηκε και έφτασε τα 970 U L<sup>-1</sup>.

Σε ότι αφορά τις ενζυμικές ενεργότητες που παράγονται από τα δύο στελέχη κατά την ανάπτυξη σε ΥΑΕ, εξετάστηκε επίσης η ενεργότητα λιπάσης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, επειδή στα απόβλητα των ελαιουργείων συνήθως περιέχεται και μια ποσότητα υπολειπόμενων ελαίων, που μπορούν να δράσουν ως επαγωγείς της έκφρασης λιπασών. Οι λιπάσες είναι ένζυμα με ιδιαίτερη βιοτεχνολογική αξία, και γι' αυτό το λόγο η παραγωγή τους από υποστρώματα χαμηλού κόστους θα ήταν μια πιθανώς βιώσιμη λύση στην αξιοποίηση των ΥΑΕ. Άλλωστε, υποστρώματα με βάση τα ΥΑΕ έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λιπασών από άλλα στελέχη (Abrunhosa et al., 2013, D'Annibale et al., 2006, Brozzoli et al., 2009). Ωστόσο, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αξιολογη παραγωγή λιπάσης δεν ανιχνεύθηκε, παρά μόνο στην περίπτωση της ανάπτυξης του *P. citrinopileatus* με εκχύλισμα ζύμης, όπου η ενεργότητα λιπάσης έφτασε τα 70,1 ± 10,3 U L<sup>-1</sup>. Παρόλα αυτά, η παραγωγή λιπασών από στελέχη βασιδιομυκήτων έχει τεκμηριωθεί (Bancerz et al., 2007, Krugener et al., 2009), και μελλοντικές μελέτες ίσως αναδείξουν τους βασιδιομυκήτες ως πιθανούς παραγωγούς λιπασών για βιοτεχνολογική χρήση.

Τα δεδομένα σχετικά με την παραγωγή βιομάζας για κάθε στέλεχος στο τέλος της καλλιέργειας φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 3.1.5:** Παραγωγή βιομάζας στο τέλος των καλλιεργειών μετά από ανάπτυξη με διαφορετικές πηγές αζώτου. δ.α.: δεν ανιχνεύθηκε.

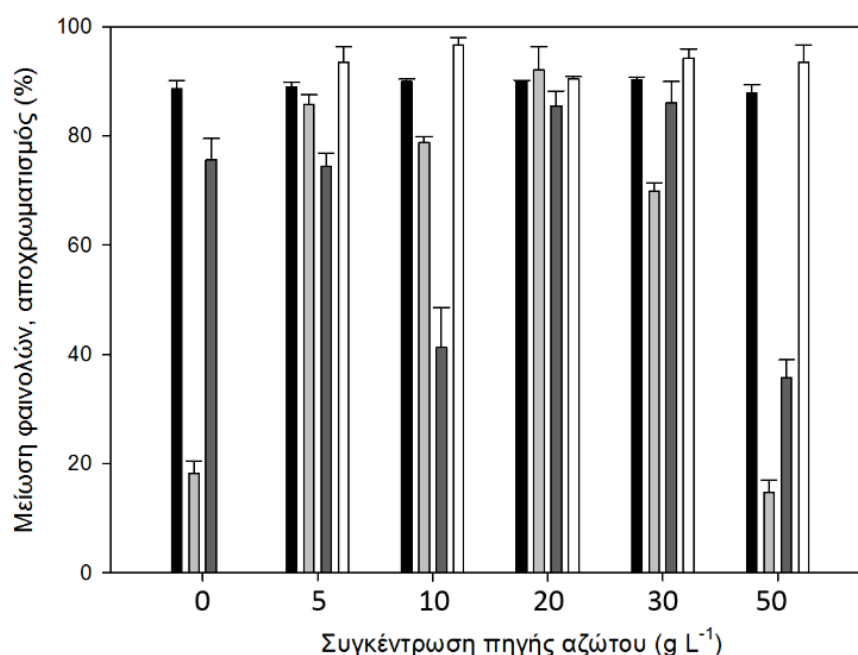
Πηγές αζώτου	Βιομάζα <i>P. citrinopileatus</i> (mg mL <sup>-1</sup> )	Βιομάζα <i>I. lacteus</i> (mg mL <sup>-1</sup> )
Τρυγικό διαμώνιο	δ.α.	49,5 ± 1,9
KNO <sub>3</sub>	δ.α.	0,1 ± 0,03
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	δ.α.	δ.α.
Εκχύλισμα ζύμης	116,9 ± 14,8	δ.α.
Εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού	143,9 ± 18,3	77,3 ± 2,9
Χωρίς προσθήκη αζώτου	4,1 ± 2,6	0,3 ± 0,03

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.1.7, σημαντική ανάπτυξη βιομάζας παρατηρήθηκε και από τα δύο στελέχη στην περίπτωση όπου ως πηγή αζώτου προστέθηκε εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού. Επιπλέον, σημαντική ανάπτυξη βιομάζας παρατηρήθηκε από το στέλεχος *I. lacteus* στις καλλιέργειες όπου είχε προστεθεί τρυγικό διαμμώνιο, ενώ από το στέλεχος *P. citrinopileatus* στις καλλιέργειες με προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης. Σε όλες τις υπόλοιπες συνθήκες η αναπτυχθείσα βιομάζα ήταν αμελητέα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα κατανάλωσης αναγωγικών σακχάρων αλλά και με το προφίλ αποικοδόμησης του αποβλήτου από τους δύο μικροοργανισμούς, όπως προσδιορίστηκαν στην παρούσα διατριβή. Συγκριτικά με άλλες μελέτες, χωρίς προσθήκη αζώτου στο θρεπτικό μέσο, η βιομάζα και των δύο στελεχών εμφανίζεται εντυπωσιακά αυξημένη. Για παράδειγμα, στη μελέτη των Ntougias et al., (2012), η μέγιστη παραγωγή βιομάζας που παρατηρήθηκε ανάμεσα σε 4 μελετώμενα στελέχη Βασιδιομυκήτων ήταν 0,146 g σε καλλιέργειες όγκου 100 mL, δηλαδή 1,46 mg mL<sup>-1</sup>, ενώ στη μελέτη των d'Annibale et al., (2006) του στελέχους *Ranus tigrinus* σε αναδεδυόμενο βιοαντιδραστήρα η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν 4,1 mg mL<sup>-1</sup>. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι, η προσθήκη πηγής αζώτου στο θρεπτικό μέσο ΥΑΕ, ακόμη και εάν πρόκειται για κάποια χαμηλού κόστους προσθετική ουσία, μπορεί να αυξήσει σημαντικά την παραγωγή βιομάζας των Βασιδιομυκήτων με αντίστοιχα ευεργετικά αποτελέσματα τόσο στην αποικοδόμηση του αποβλήτου, όσο και στην παραγωγή βιοτεχνολογικά πολύτιμων ενζύμων.

#### 3.1.4 Επίδραση συγκέντρωσης πηγής αζώτου στην ανάπτυξη των μελετούμενων στελεχών βασιδιομυκήτων

---

Σε συνέχεια του προηγούμενου πειράματος, εξετάστηκε επίσης η συγκέντρωση της πηγής αζώτου στην ανάπτυξη και την αποικοδόμηση του ΥΑΕ από κάθε στέλεχος. Οι πηγές αζώτου που επιλέχθηκαν για το πείραμα αυτό ήταν το τρυγικό διαμμώνιο για το στέλεχος *I. lacteus*, και το εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού για το *P. citrinopileatus*, ως χαμηλού κόστους πηγές αζώτου, στις οποίες παρατηρήθηκε ικανοποιητική αποικοδόμηση του αποβλήτου. Τα αποτελέσματα σχετικά με την αποικοδόμηση του αποβλήτου φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.1.6:** Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων πηγής αζώτου στη μείωση των φαινολών και στον αποχρωματισμό στο τέλος της καλλιέργειας των στελεχών *P. citrinopileatus* και *I. lacteus*. Μαύρες μπάρες: μείωση φαινολικών από το στέλεχος *P. citrinopileatus*, γκρι ανοιχτές μπάρες: μείωση φαινολικών από το στέλεχος *I. lacteus*, γκρι σκούρες μπάρες: αποχρωματισμός από το στέλεχος *P. citrinopileatus*, λευκές μπάρες: αποχρωματισμός από το στέλεχος *I. lacteus*.

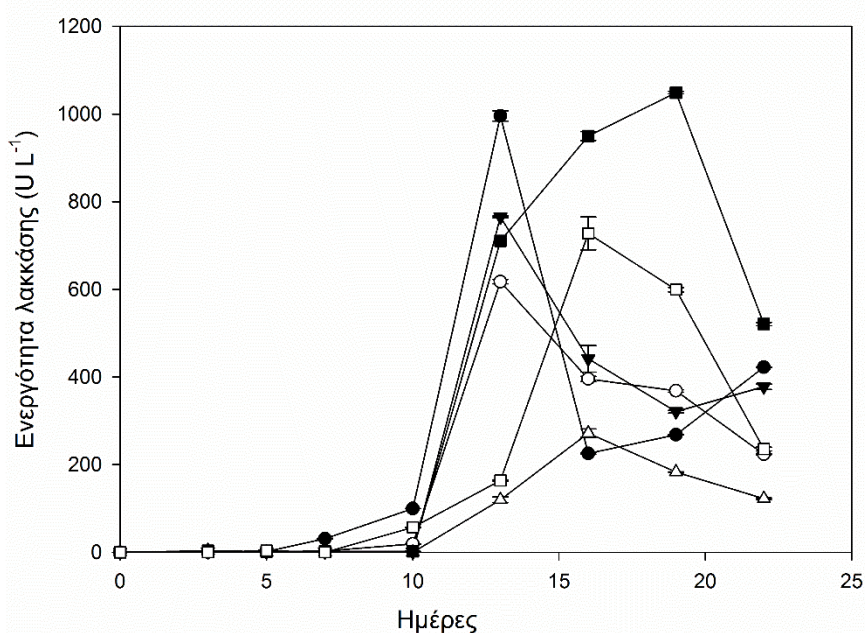
**Πίνακας 3.1.6:** Μείωση φαινολών και αποχρωματισμός ΥΑΕ στο τέλος της καλλιέργειας με διαφορετικές συγκεντρώσεις πηγής αζώτου. δ.α.: δεν ανιχνεύθηκε.

Συγκέντρωση πηγής αζώτου (g L <sup>-1</sup> )	Μείωση φαινολών (%)		Αποχρωματισμός (%)	
	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>I. lacteus</i>
0	88,7 ± 1,4	18,2 ± 2,3	75,7 ± 3,8	δ.α.
5	89,0 ± 0,8	85,7 ± 1,9	74,5 ± 2,4	93,4 ± 2,9
10	89,9 ± 0,5	78,7 ± 1,1	41,3 ± 7,3	96,7 ± 1,3
20	90,0 ± 0,2	92,0 ± 4,3	85,5 ± 2,7	90,4 ± 0,4
30	90,2 ± 0,6	69,9 ± 1,5	86,1 ± 3,9	94,3 ± 1,7
50	87,8 ± 1,7	14,8 ± 2,2	35,7 ± 3,3	93,5 ± 3,2

Σε ότι αφορά το στέλεχος *P. citrinopileatus*, η μέγιστη αποικοδόμηση του αποβλήτου παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού 30 g L<sup>-1</sup>, ενώ για το *I. lacteus* η μεγαλύτερη μείωση του φαινολικού φορτίου παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση τρυγικού διαμμωνίου

20 g L<sup>-1</sup>, αλλά ο βέλτιστος αποχρωματισμός σε συγκέντρωση 10 g L<sup>-1</sup>. Ωστόσο, στις συνθήκες από 5 - 50 g L<sup>-1</sup> η μείωση του φαινολικού φορτίου και ο αποχρωματισμός εμφάνισαν ιδιαίτερα υψηλές τιμές, φαινόμενο που υποδεικνύει ότι έστω και μικρή προσθήκη πηγής αζώτου ενισχύει κατά πολύ τη λιγνινολυτική δραστηριότητα του μικροοργανισμού. Ιδιαίτερη σημασία εδώ φαίνεται να έχει το γεγονός ότι και τα δύο στελέχη εμφάνισαν εξαιρετικά υψηλά ποσοστά αποχρωματισμού και μείωσης των φαινολών, πάνω από 80% και σε πολλές περιπτώσεις πάνω από 90%, κάτι ιδιαίτερα σπάνιο στην προϋπάρχουσα βιβλιογραφία, συγκριτικά με πολλές μελέτες χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου (Ergül et al., 2009, Ntougias et al., 2012, Blázquez et al., 2002, D'Annibale et al., 2006b).

Η παραγωγή λακκάσης παρακολούθηθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας και τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα, για το στέλεχος *P. citrinopileatus*:

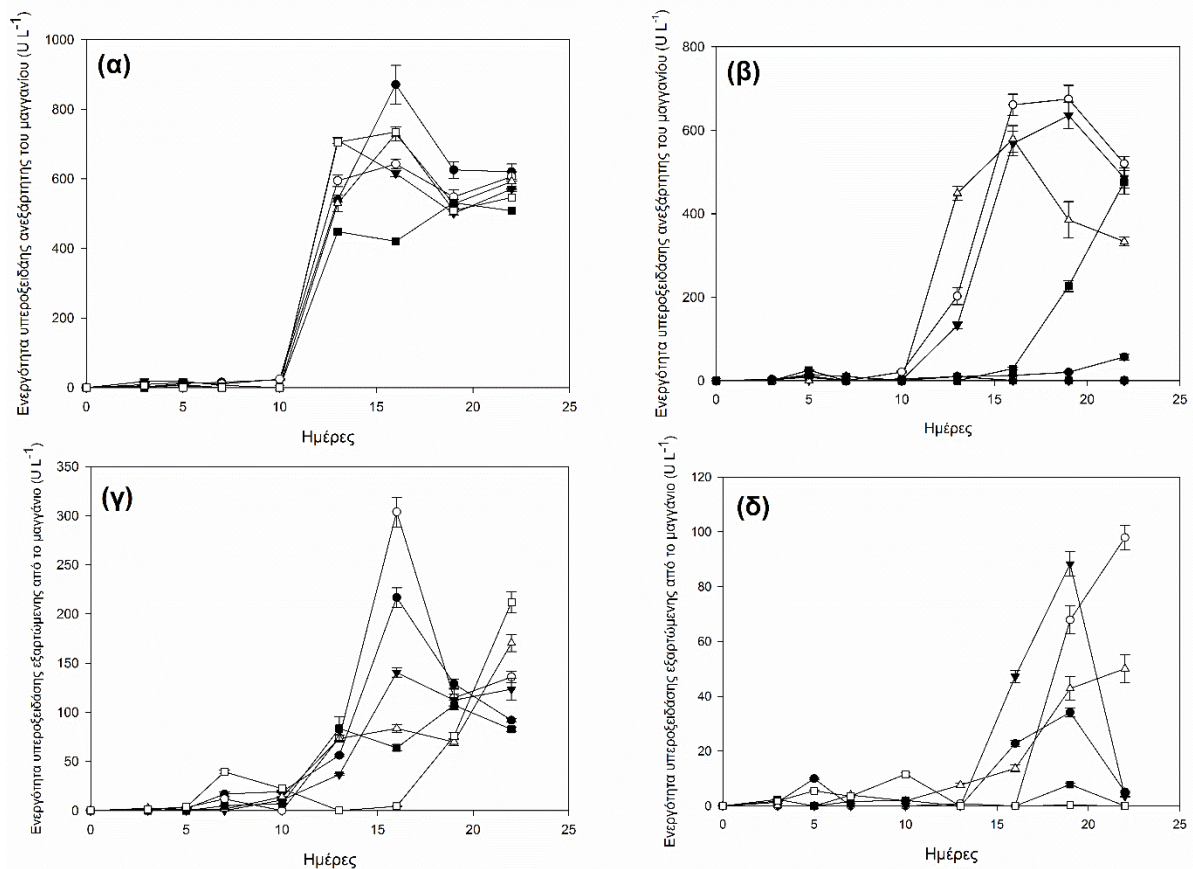


**Εικόνα 3.1.7:** Επίδραση της συγκέντρωσης πηγής αζώτου στην ενζυμική ενεργότητα λακκάσης από τον *P. citrinopileatus*. Μαύροι κύκλοι: χωρίς προσθήκη αζώτου, λευκοί κύκλοι: 5 g L<sup>-1</sup> άζωτο, μαύρα τρίγωνα: 10 g L<sup>-1</sup> άζωτο, λευκά τρίγωνα: 20 g L<sup>-1</sup> άζωτο, μαύρα τετράγωνα: 30 g L<sup>-1</sup> άζωτο, λευκά τετράγωνα: 50 g L<sup>-1</sup> άζωτο.

Η υψηλότερη ενεργότητα λακκάσης στις καλλιέργειες του στελέχους *I. lacteus* (57,4 ± 2,2 U L<sup>-1</sup>, 10<sup>η</sup> ημέρα) παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση πηγής αζώτου 5 g L<sup>-1</sup>, ενώ για το *P. citrinopileatus* η συγκέντρωση πηγής αζώτου όπου παρατηρήθηκε η υψηλότερη ενεργότητα λακκάσης (1048,9 ± 2,9 U L<sup>-1</sup>, 19<sup>η</sup> ημέρα) ήταν τα 30 g L<sup>-1</sup>. Σε προηγούμενη μελέτη των Aggelis et al., (2002), χωρίς προσθήκη αζώτου η παραγωγή λακκάσης από το *I. lacteus* έφτασε τα 8,3 U L<sup>-1</sup> μετά από 31 ημέρες ανάπτυξης, ενώ η μέγιστη παραγωγή λακκάσης που παρατηρήθηκε από τα 8 μελετούμενα στελέχη ήταν 67,3 U L<sup>-1</sup> από το *P. ostreatus*. Το ίδιο στέλεχος ήταν και αυτό που εμφάνισε τη μέγιστη παραγωγή λακκάσης (117,82 U L<sup>-1</sup>) μεταξύ 4 ειδών *Ganoderma* και *Pleurotus* στην εργασία των Ntougias et al., (2012). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής λοιπόν είναι σε συμφωνία με τη σχετική βιβλιογραφία, και καθιστούν σαφή τον κεντρικό ρόλο των λακκασών στην οξειδωση φαινολικών υποστρωμάτων από



τους βασιδιομύκητες του γένους *Pleurotus*. Ωστόσο, αν και οι λακκάσες παράγονται επίσης από το *I. lacteus*, η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται κυρίως μέσω άλλων οξειδωτικών ενζύμων, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.1.8:** Επίδραση της συγκέντρωσης της πηγής αζώτου στην ενζυμική ενεργότητα υπεροξειδασών εξαρτημένων και ανεξάρτητων του μαγγανίου από τα στελέχη *I. lacteus* (β, δ) και *P. citrinopileatus* (α, γ). Μαύροι κύκλοι: χωρίς προσθήκη αζώτου, λευκοί κύκλοι: 5 g L<sup>-1</sup> άζωτο, μαύρα τρίγωνα: 10 g L<sup>-1</sup> άζωτο, λευκά τρίγωνα: 20 g L<sup>-1</sup> άζωτο, μαύρα τετράγωνα: 30 g L<sup>-1</sup> άζωτο, λευκά τετράγωνα: 50 g L<sup>-1</sup> άζωτο.

Τα οξειδωτικά ένζυμα με ενεργότητα υπεροξειδάσης φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των ΥΑΕ, και για τα δύο μελετώμενα στελέχη. Η προσθήκη εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού στην καλλιέργεια του *P. citrinopileatus* σε τελική συγκέντρωση 5 g L<sup>-1</sup> οδήγησε σε ενζυμική ενεργότητα υπεροξειδάσης εξαρτώμενης από το μαγγάνιο (MnP)  $303,7 \pm 15,2$  U L<sup>-1</sup> τη 16<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας. Η προσθήκη αζώτου δεν φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα την παραγωγή υπεροξειδασών ανεξάρτητων του μαγγανίου (MiP) από το *P. citrinopileatus*, καθώς η μέγιστη τιμή τους εντοπίστηκε στην περίπτωση όπου δεν προστέθηκε άζωτο ( $871,1 \pm 55,5$  U L<sup>-1</sup> την 16<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας), αλλά παρόμοια ενεργότητα εντοπίστηκε και με προσθήκη 50 g L<sup>-1</sup> εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού ( $735,0 \pm 4,27$  U L<sup>-1</sup> την 16<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας). Στην περίπτωση του στελέχους αυτού είναι σαφές ότι η προσθήκη εκχυλίσματος επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού οδηγεί στην παραγωγή όλων των απαραίτητων ενζυμικών ενεργοτήτων, σε ικανοποιητική ποσότητα, για την πλήρη αποικοδόμηση του φαινολικού φορτίου των

αποβλήτων ΥΑΕ. Επιπλέον, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η πηγή αζώτου μπορεί να ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για τη διαφορική έκφραση των λιγνινολυτικών γονιδίων, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Kachlishvili et al., 2006).

Σχετικά με το προφίλ παραγωγής υπεροξειδασών από το *I. lacteus*, φαίνεται ότι η προσθήκη έστω και μικρής ποσότητας αζώτου ενισχύει ιδιαίτερα την παραγωγή MiP. Η μέγιστη τιμή MiP παρατηρήθηκε τη 19<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας με προσθήκη 5 g L<sup>-1</sup> πηγή αζώτου (674,9 ± 33,0 U L<sup>-1</sup>). Αντίστοιχα, η ενεργότητα MnP από το *I. lacteus* φάνηκε αυξημένη σε συγκέντρωση πηγής αζώτου 20 g L<sup>-1</sup> (100,2 ± 5,0 U L<sup>-1</sup> την 22<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας).

Σε γενικές γραμμές, η παραγωγή υπεροξειδασών και από τα δύο στελέχη φαίνεται να υπερτερεί σε σχέση με προηγούμενες μελέτες για άλλα στελέχη βασιδιομυκήτων σε καλλιέργειες χωρίς προσθήκη αζώτου. Οι Ntougias et al., (2012), στη μελέτη τους που αφορούσε 4 στελέχη μανιταριών των ειδών *Ganoderma* και *Pleurotus*, προσδιόρισαν τη μέγιστη ενεργότητα Mn- εξαρτημένων υπεροξειδασών στα 29,76 U L<sup>-1</sup>, ενώ των υπεροξειδασών ανεξάρτητων του Mn, στα 36,09 U L<sup>-1</sup>. Αντίστοιχα, οι Ergul et al., (2009) αναφέρουν μέγιστη ενεργότητα Mn-εξαρτημένων υπεροξειδασών 128 U L<sup>-1</sup> από το στέλεχος *T. versicolor*. Στην πρόσφατη εργασία των Koutrotsios and Zervakis (2014), όπου μελετήθηκαν πάνω από 60 στελέχη Βασιδιομυκήτων, οι μεγαλύτερες ενεργότητες που παρατηρήθηκαν ήταν για τις Mn-εξαρτώμενες υπεροξειδάσες 18 U L<sup>-1</sup>, ενώ για τις ανεξάρτητες του Mn υπεροξειδάσες 32 U L<sup>-1</sup>. Τέλος, στη μελέτη των Aggelis et al., (2002), όπου μελετήθηκαν 8 διαφορετικά στελέχη, οι μέγιστες ενεργότητες υπεροξειδασών που ανιχνεύθηκαν ήταν 19,1 U L<sup>-1</sup> για τις Mn- εξαρτώμενες υπεροξειδάσες του *P. ostreatus*, και 16 U L<sup>-1</sup> για τις ανεξάρτητες του Mn υπεροξειδάσες του ίδιου είδους. Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν λοιπόν την υπόθεση ότι ακόμα και ελάχιστη προσθήκη κάποιας πηγής αζώτου χαμηλού κόστους μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση έως και 100 φορές της παραγωγής οξειδοαναγωγικών ενζύμων με βιοτεχνολογική αξία.

Τέλος, στον πίνακα που ακολουθεί φαίνεται η βιομάζα που συλλέχθηκε στο τέλος των καλλιεργειών από καθένα από τα δύο μελετούμενα στελέχη.

**Πίνακας 3.1.7:** Παραγωγή βιομάζας στο τέλος των καλλιεργειών μετά από ανάπτυξη με διαφορετικές συγκεντρώσεις πηγής αζώτου.

Συγκέντρωση πηγής αζώτου (g L <sup>-1</sup> )	Βιομάζα <i>P. citrinopileatus</i> (mg mL <sup>-1</sup> )	Βιομάζα <i>I. lacteus</i> (mg mL <sup>-1</sup> )
0	3,87 ± 0,12	30,33 ± 3,4
5	6,06 ± 0,39	18,4 ± 0,86
10	10,44 ± 0,54	16,6 ± 0,00
20	17,48 ± 0,00	16,01 ± 3,1
30	26,73 ± 1,13	5,43 ± 0,02
50	34,63 ± 0,00	11,28 ± 0,51

#### 3.1.4.1 Μέτρηση φαινολικού φορτίου μυκηλιακής βιομάζας

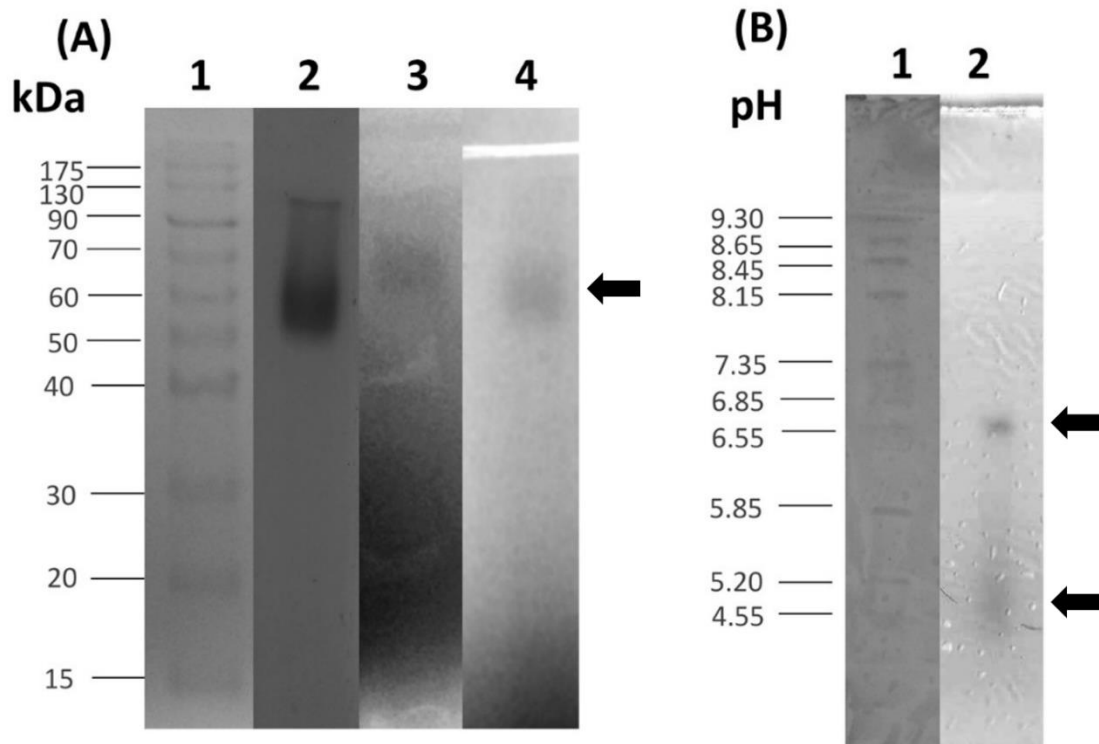
---

Προκειμένου να εξακριβωθεί εάν η παρατηρούμενη μείωση του φαινολικού φορτίου οφείλεται σε πραγματική αποικοδόμηση των φαινολών σε απλούστερες ενώσεις, και όχι σε προσρόφηση αυτών στο αναπτυσσόμενο μυκήλιο, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον μετρήσεις του φαινολικού φορτίου της βιομάζας. Μετά τη διάρρηξη του μυκηλίου με υγρό άζωτο και κονιορτοποίηση σε γουδί, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των φαινολών της βιομάζας σε ρυθμιστικό διάλυμα, και ποσοτικοποίηση αυτών με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Η συγκέντρωση των φαινολών στο μυκήλιο βρέθηκε ίση με  $4,5 \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1}$  για το *P. citrinopileatus* και  $2,1 \pm 0,6 \text{ mg g}^{-1}$  για το *I. lacteus*, ενώ η συγκέντρωση των φαινολών που είχαν καταναλωθεί με το πέρας της καλλιέργειας αντιστοιχούσε σε  $37,1 \pm 1,3 \text{ mg g}^{-1}$  για το *P. citrinopileatus* και  $131,5 \pm 30,9 \text{ mg g}^{-1}$  για το *I. lacteus* αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η μείωση των φαινολών του ΥΑΕ μπορεί όντως να αποδοθεί σε μικροβιακή αποικοδόμηση, και όχι σε πιθανή προσρόφηση τους στο μυκήλιο.

#### 3.1.4.2 Ζυμογραφήματα

---

Σε μια προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των παραγόμενων λιγνινολυτικών ενζύμων κατά τη διάρκεια της μυκηλιακής ανάπτυξης σε ΥΑΕ, πραγματοποιήθηκαν ζυμογραφήματα στα υπερκείμενα καλλιιεργειών των μελετώμενων στελεχών, με κατάλληλα υποστρώματα για την ανίχνευση ενζυμικών ενεργοτήτων λακκάσης και υπεροξειδασών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1.9. Στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών του *I. lacteus* δεν ανιχνεύθηκαν ενζυμικές ενεργότητες. Ωστόσο, στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών του *P. citrinopileatus* ανιχνεύθηκε μια μεγάλη πρωτεϊνική ζώνη με ενεργότητα λακκάσης, και μοριακό βάρος περίπου 55 kDa. Επίσης ανιχνεύθηκε και ενεργότητα υπεροξειδάσης σε μοριακό βάρος που αντιστοιχεί σε 60 kDa. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ενζυμική ενεργότητα λακκάσης του *P. citrinopileatus* οφείλεται σε ένα μόνο ένζυμο, αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση να παράγονται επίσης και δευτερεύοντα ένζυμα με ενεργότητα λακκάσης. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης IEF υποστηρίζουν επίσης την ύπαρξη μιας κύριας ζώνης με pI περίπου 6,5. Επίσης η εμφάνιση μιας θολής ζώνης στο πήκτωμα IEF σε τιμές pI περίπου 4,0 – 5,5 υποστηρίζει την ύπαρξη και άλλων λακκασών, με μικρότερο όμως ρόλο. Στελέχη *Pleurotus* spp. έχει αναφερθεί ότι παράγουν τουλάχιστον τέσσερις λακκάσες σε καλλιιεργειες καθορισμένου θρεπτικού μέσου (Mansur et al., 2003), ενώ για στο γονιδίωμα του *P. ostreatus* έχει αναφερθεί η ύπαρξη 12 γονιδίων λακκασών (Castanera et al., 2012).



**Εικόνα 3.1.9:** Ζυμογραφήματα για τις ενζυμικές ενεργότητες λακκάσης και υπεροξειδασών, σε υπερκείμενα καλλιεργειών του μελετούμενου στελέχους *P. citrinopileatus*. A) SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, 1: μάρτυρας μοριακών βαρών, 2: ανίχνευση ενεργότητας λακκάσης, 3: ανίχνευση ενεργότητας υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του μαγγανίου, 4: ανίχνευση ενεργότητας υπεροξειδάσης εξαρτώμενης από το μαγγάνιο. B) IEF-PAGE ηλεκτροφόρηση, 1: μάρτυρας ισοηλεκτρικών σημείων, 2: ανίχνευση ενεργότητας λακκάσης. Με βέλη υποδηλώνονται οι ζώνες που εμφανίστηκαν με το πέρας των αντιδράσεων.

Αντίστοιχα συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν και για τις ενεργότητες υπεροξειδασών. Στην περίπτωση των ζυμογραφημάτων για ενεργότητα υπεροξειδάσης, ανιχνεύθηκε μόνο μια ζώνη, ανεξάρτητα της παρουσίας μαγγανίου. Η ζώνη αυτή πιθανώς αντιστοιχεί σε ένζυμο με ενεργότητα MiP, ή ευέλικτης υπεροξειδάσης (VP). Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες, στο γονιδίωμα του *P. ostreatus* έχουν ανιχνευθεί εννέα γονίδια υπεροξειδασών, τρία γονίδια MnP και έξι γονίδια VP (Fernandez-Feyo et al., 2014b). Τα γονίδια αυτά υπόκεινται σε διαφορετική έκφραση, εκφράζονται δηλαδή σε διαφορετικές συνθήκες pH και θερμοκρασίας (Fernandez-Feyo et al., 2014b). Ωστόσο τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής υποστηρίζουν την ύπαρξη τουλάχιστον ενός κύριου ενζύμου με ενεργότητα υπεροξειδάσης, το οποίο, σε συνδυασμό με τη λακκάση, μπορεί να είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση των φαινολών του YAE.

---

## **3.2 Μικροβιακή παραγωγή γλυκανών από επιλεγμένα στελέχη βασιδιομυκήτων σε ημισυνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα και σε υπόστρωμα ΥΑΕ**

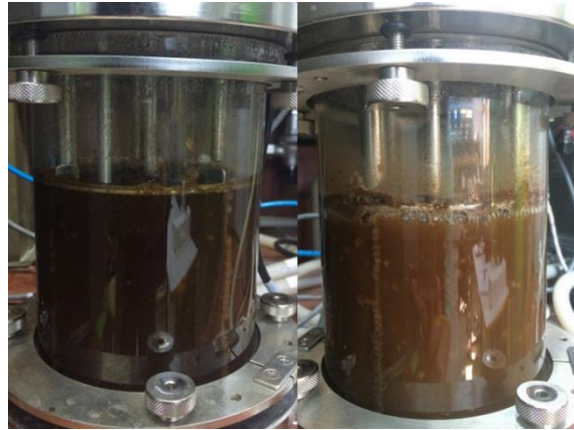
---

Μετά την επιτυχή αποικιοδόμηση του φαινολικού φορτίου του ΥΑΕ, που επιτεύχθηκε από τα στελέχη *P. citrinopileatus* και *I. lacteus*, επιχειρήθηκε η μικροβιακή αξιοποίηση του αποβλήτου, λόγω της ιδιότητάς του να λειτουργεί ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων. Για το σκοπό αυτό, το ΥΑΕ χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων με στόχο την ανάπτυξη βιομάζας για την απομόνωση ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών γλυκανών. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν για το σκοπό αυτό ήταν τα *P. citrinopileatus* LGAM 28684, *G. lucidum* LGAM 9720 και *P. ostreatus* LGAM 1123 τα οποία παραλήφθηκαν από τη Μυκητοθήκη του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, και είναι γνωστά για την ικανότητα παραγωγής γλυκανών που διαθέτουν, τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και στο περιβάλλον μέσο. Τα στελέχη αυτά αναπτύχθηκαν αρχικά σε προκαλλιέργειες των 100 mL σε κωνικές φιάλες με ημισυνθετικό θρεπτικό μέσο, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.1.2, και στη συνέχεια οι πλήρως ανεπτυγμένες καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό βιοαντιδραστήρων 2L με θρεπτικό μέσο ΥΑΕ και προσθήκη πηγής αζώτου, ή με ημισυνθετικό θρεπτικό μέσο, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.1.3. Μετά την ανάπτυξη της βιομάζας, το υγρό της καλλιέργειας παραλήφθηκε και διαχωρίστηκε η βιομάζα από το εξωκυτταρικό υγρό. Η απομόνωση των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.3.1, ενώ για την απομόνωση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών εξετάστηκαν δύο μεθοδολογίες, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.3.2. Τα αποτελέσματα περιγράφονται στα Κεφάλαια που ακολουθούν.

### **3.2.1 Ανάπτυξη βιομάζας βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου**

---

Οι υγρές καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα 2 L φάνηκε ότι ήταν ιδιαίτερα αποδοτικές και για τα τρία στελέχη από άποψη παραγόμενης βιομάζας, και για τα δύο θρεπτικά υποστρώματα που δοκιμάστηκαν. Το θρεπτικό μέσο ΥΑΕ με προσθήκη πηγής άνθρακα φαίνεται ότι μπορεί να υποστηρίξει την παραγωγή ικανοποιητικής ποσότητας βιομάζας και από τα τρία στελέχη. Η βιομάζα που παράχθηκε από το στέλεχος *P. ostreatus* μετά από 13 ημέρες ανάπτυξης σε ημισυνθετικό θρεπτικό μέσο ήταν  $4,87 \text{ mg mL}^{-1}$ , ενώ σε θρεπτικό μέσο ΥΑΕ ήταν  $8,38 \text{ mg mL}^{-1}$ . Σε αυτή την περίπτωση, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.2.3, η μείωση των φαινολών ήταν  $43,6 \pm 0,7 \%$ , και ο αποχρωματισμός του μέσου ήταν  $11,1 \pm 1,1 \%$ . Παρόλα αυτά ο αποχρωματισμός του μέσου καλλιέργειας ΥΑΕ ήταν ορατός, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.2.1.



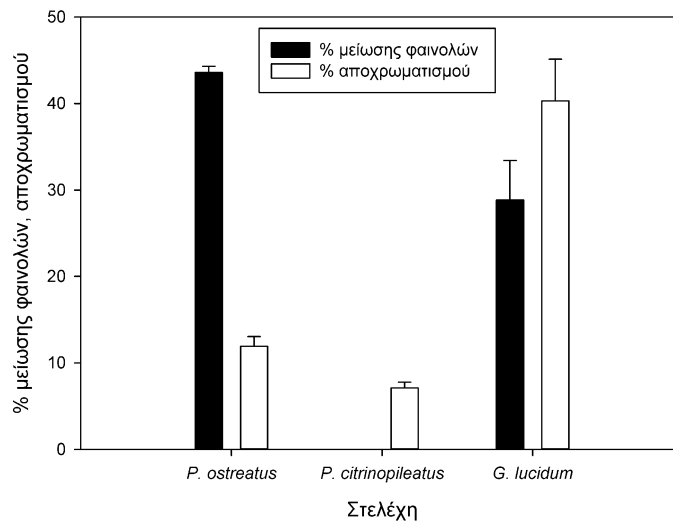
**Εικόνα 3.2.1:** Ανάπτυξη του στελέχους *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα 2L με θρεπτικό μέσο ΥΑΕ. Αριστερά φαίνεται ο βιοαντιδραστήρας την πρώτη ημέρα καλλιέργειας και δεξιά την τελευταία ημέρα καλλιέργειας.

Η παραγωγή βιομάζας από το *G. lucidum* ήταν  $2,65 \text{ mg mL}^{-1}$  σε ημισυνθετικό θρεπτικό μέσο, αλλά  $4,2 \text{ mg mL}^{-1}$  σε θρεπτικό μέσο ΥΑΕ, μετά από 6 ημέρες ανάπτυξης. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η ανάπτυξη του στελέχους στο βιοαντιδραστήρα την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας.



**Εικόνα 3.2.2:** Ανάπτυξη βιομάζας σε βιοαντιδραστήρα 2 L από το στέλεχος *G. lucidum* την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας σε ημισυνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα (αριστερά) και θρεπτικό μέσο ΥΑΕ (δεξιά).

Στην περίπτωση της ανάπτυξης σε ΥΑΕ, λαμβάνοντας υπόψη και τη χαμηλή ποσότητα βιομάζας που παράχθηκε, η μείωση των ολικών φαινολών ήταν μόλις  $19,4 \pm 4,6 \%$ , αλλά ο αποχρωματισμός του μέσου ήταν  $47,56 \pm 4,8 \%$  στο τέλος της καλλιέργειας, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.2.3. Αντίστοιχα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του *P. citrinopileatus* σε βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό μέσο ΥΑΕ, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των ολικών φαινολών του μέσου μετά από 4 ημέρες ανάπτυξης, ενώ ο αποχρωματισμός που παρατηρήθηκε ήταν μόλις  $7,1 \pm 0,6 \%$ . Ωστόσο, η παραχθείσα βιομάζα ήταν  $6,19 \text{ mg mL}^{-1}$ , ενώ για τις καλλιέργειες με ημισυνθετικό θρεπτικό μέσο η τελική ποσότητα της παραγόμενης βιομάζας ήταν  $5,97 \text{ mg mL}^{-1}$ .

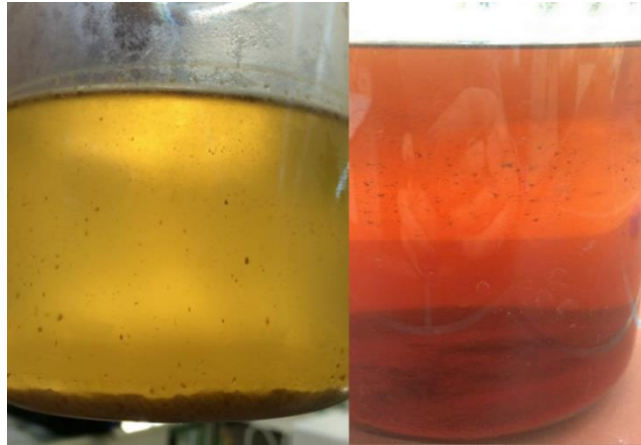


**Εικόνα 3.2.3:** Αποικοδόμηση του ΥΑΕ από τα τρία μελετώμενα στελέχη βασιδιομυκήτων στο τέλος της καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα 2L.

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω αποτελέσματα, τα επίπεδα αποικοδόμησης του ΥΑΕ δεν ήταν τόσο υψηλά όσο έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Olivieri et al., 2012, Tsioupras et al., 2002) αλλά και από τα προηγούμενα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Ενδεικτικά, οι Olivieri et al., (2012) αναφέρουν μείωση των φαινολικών έως και 68% με τη βοήθεια του στελέχους *P. ostreatus*, ενώ οι Tsioupras et al., (2002) αναφέρουν αποικοδόμηση 69-76% με διάφορα στελέχη *Pleurotus*. Επιπλέον, σε προηγούμενα πειράματα της παρούσας εργασίας επιτεύχθηκε μείωση των φαινολών και αποχρωματισμός του αποβλήτου σε ποσοστό άνω του 90% (Κεφάλαιο 3.1) με τα στελέχη *P. citrinopileatus* και *I. lacteus*. Το φαινόμενο αυτό υποδηλώνει ότι ίσως να είναι απαραίτητη η μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων, προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή αποικοδόμηση του ΥΑΕ. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η βυθισμένη καλλιέργεια ίσως είναι πιο αποδοτική σε ότι αφορά την παραγωγικότητα, καθώς η αύξηση της βιομάζας ήταν σημαντικά πιο γρήγορη σε σχέση με τις καλλιέργειες στερεάς κατάστασης, στις οποίες ο πλήρης σχηματισμός των καρποσωμάτων μπορεί να διαρκέσει έως και δύο μήνες (Fan et al., 2008).

### 3.2.2 Απομόνωση εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών

Τα αποτελέσματα της απομόνωσης των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS) φαίνονται στον Πίνακα 3.2.1. Η απομόνωση των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε στο τέλος της καλλιέργειας και τα στερεά προϊόντα που προέκυψαν αναλύθηκαν ως προς τη σύστασή τους σε α-, β-, και ολικές γλυκάνες, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.3.3. Στην παρακάτω Εικόνα φαίνεται η καταβύθιση με αιθανόλη του εξωκυτταρικού πολυσακχαριτικού κλάσματος από τις καλλιέργειες του στελέχους *P. ostreatus*.



**Εικόνα 3.2.4:** Καταβύθιση των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών των καλλιεργειών *P. ostreatus* με ημισυνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα (αριστερά) και ΥΑΕ (δεξιά).

Σε γενικές γραμμές, η ποσότητα των στερεών προϊόντων που απομονώθηκαν ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στις περιπτώσεις όπου η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα ΥΑΕ, σε σχέση με τις καλλιέργειες σε ημισυνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.2.1.

**Πίνακας 3.2.1:** Συγκέντρωση απομονωμένων εξωκυτταρικών πολυσακχαριτικών κλασμάτων για τις καλλιέργειες καθενός από τα μελετούμενα στελέχη.

Συγκέντρωση εξωκυτταρικών πολυσακχαριτικών κλασμάτων ( $\text{mg mL}^{-1}$ )		
Στελέχη	Καλλιέργειες ημισυνθετικού μέσου	Καλλιέργειες ΥΑΕ
<i>P. ostreatus</i>	15,9	18,8
<i>P. citrinopileatus</i>	1,2	19,7
<i>G. lucidum</i>	2,53	21,02



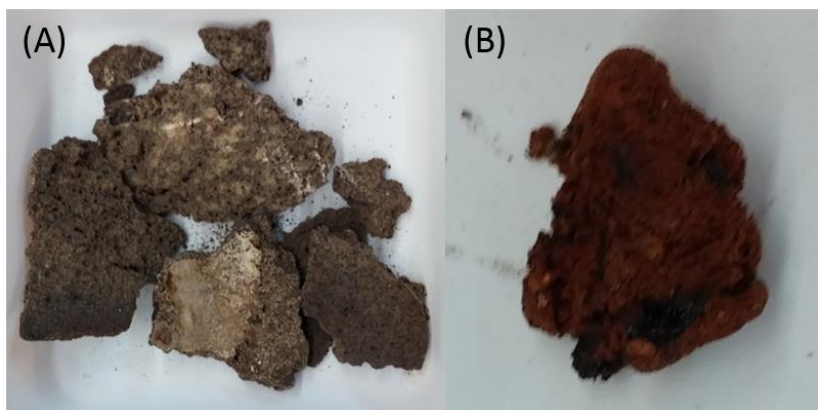
**Πίνακας 3.2.2:** Συγκέντρωση εξωκυτταρικών πολυσακχαρικών κλασμάτων που απομονώθηκαν μετά το τέλος των υγρών καλλιιεργειών των μελετούμενων στελεχών βασιδιομυκήτων.

	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. citrinopileatus</i>	<i>G. lucidum</i>
<b>Καλλιέργειες ημισυνθετικού μέσου</b>			
<b>Ολικές γλυκάνες (% w/w)</b>	4,57 ± 0,08	6,62 ± 0,16	37,92 ± 2,8
<b>α- γλυκάνες (% w/w)</b>	0,27 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,34 ± 0,01
<b>β- γλυκάνες (% w/w)</b>	4,3 ± 0,06	6,16 ± 0,15	37,58 ± 2,86
<b>Καλλιέργειες ΥΑΕ</b>			
<b>Ολικές γλυκάνες (% w/w)</b>	1,91 ± 0,2	2,4 ± 0,4	2,01 ± 0,65
<b>α- γλυκάνες (% w/w)</b>	0,46 ± 0,03	0,52 ± 0,01	0,48 ± 0,03
<b>β- γλυκάνες (% w/w)</b>	1,45 ± 0,17	1,87 ± 0,4	1,52 ± 0,07

Ωστόσο, τα κλάσματα που απομονώθηκαν από τις καλλιέργειες με ημισυνθετικό μέσο φάνηκε να έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικές γλυκάνες σε σχέση με τα κλάσματα που απομονώθηκαν από τις καλλιέργειες σε ΥΑΕ, σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2.2. Αυτό πιθανώς οφείλεται στη διαδικασία απομόνωσης που ακολουθήθηκε, αφού για την απομόνωση των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών εφαρμόστηκε μια απλή καταβύθιση με αιθανόλη, η οποία, στην περίπτωση των καλλιιεργειών σε ΥΑΕ, πιθανώς οδήγησε σε καταβύθιση πολλών άλλων συστατικών του θρεπτικού μέσου, όπως για παράδειγμα εξωκυτταρικών πρωτεϊνών που παράγονται από τους μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης σε ΥΑΕ, οξειδωτικών ενζύμων που παράγονται από τους μικροοργανισμούς για την οξείδωση των φαινολών του ΥΑΕ, αλλά και οργανικών οξέων ή άλλων προϊόντων του δευτερογενούς μεταβολισμού των βασιδιομυκήτων ή ακόμη και συστατικών του ίδιου του θρεπτικού μέσου.

Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα, σε όλες τις περιπτώσεις η περιεκτικότητα των κλασμάτων εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών σε β- γλυκάνες ήταν υψηλότερη από ότι σε α- γλυκάνες. Τα πολυσακχαρικά κλάσματα του *G. lucidum* μετά από ανάπτυξη σε ημισυνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα ήταν αυτά με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε γλυκάνες, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι το κλάσμα εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών του στελέχους αυτού απομονώθηκε σαν μια ουσία παρόμοια με πήκτωμα, κάτι που έχει παρατηρηθεί επίσης και για άλλους βασιδιομυκήτες (Santos-Neves et al., 2008). Το στέλεχος *P. ostreatus* φαίνεται να είναι το πιο παραγωγικό σε εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες σε σχέση με τα άλλα δύο, αφού στις καλλιέργειες του στελέχους αυτού απομονώθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών, αν και με σχετικά χαμηλή συγκέντρωση γλυκανών. Η παραγόμενη ποσότητα των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν και από τα τρία στελέχη είναι συγκρίσιμη με αυτή που αναφέρεται στη βιβλιογραφία

για άλλα είδη (Lee et al., 2003). Ενδεικτικά οι Lee et al., (2003) αναφέρουν παραγωγή εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών  $5,3 \text{ g L}^{-1}$  από το μύκητα *Grifola frondosa* σε συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα 5 L. Στην περίπτωση των καλλιεργειών με ημισυνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα του στελέχους *P. citrinopileatus* η παραγωγή εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών φάνηκε μεγαλύτερη από αυτή που αναφέρεται σε προηγούμενη μελέτη από τους Wang et al., (2005) από το ίδιο είδος ( $0,56 \text{ mg mL}^{-1}$ ).



**Εικόνα 3.2.5:** Κλάσματα που παρελήφθησαν μετά την καταβύθιση των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών με αιθανολη, όπως περιγράφεται στο κείμενο. (A) *Pleurotus ostreatus* 1123 εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες μετά από ανάπτυξη σε απόβλητο (B) *Pleurotus citrinopileatus* 28684 εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες μετά από ανάπτυξη σε καθαρή πηγή άνθρακα.

### 3.2.3 Απομόνωση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών

---

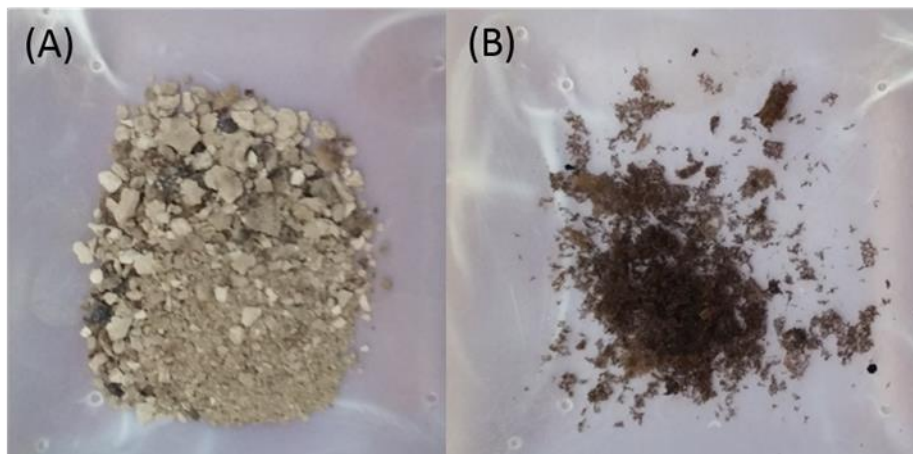
Αρχικά η ακατέργαστη βιομάζα που παραλήφθηκε από τις υγρές καλλιέργειες, μετά από ξήρανση, αναλύθηκε ως προς τη σύστασή της σε γλυκάνες. Τα αποτελέσματα για κάθε στέλεχος φαίνονται στους Πίνακες 3.2.2, 3.2.3, και 3.2.4. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, η περιεκτικότητα της βιομάζας σε β-γλυκάνες φαίνεται να υπερτερεί έναντι της περιεκτικότητας σε α-γλυκάνες, γεγονός που μπορεί να αποτελέσει πλεονέκτημα των βασιδιομυκήτων ως πηγή απομόνωσης β-γλυκανών σε σχέση με άλλες πηγές. Το στέλεχος *P. ostreatus* φαίνεται να συγκεντρώνει στη βιομάζα τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα γλυκανών σε σχέση με τα άλλα στελέχη, αν και με μικρή διαφορά. Τα στελέχη *P. ostreatus* και *G. lucidum* συγκέντρωσαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα γλυκανών στη βιομάζα που αναπτύχθηκε σε ΥΑΕ σε σχέση με τη βιομάζα που αναπτύχθηκε στο ημισυνθετικό θρεπτικό μέσο. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικό για την περίπτωση της αξιοποίησης του ΥΑΕ μέσω παραγωγής γλυκανών από μανιτάρια, διότι φαίνεται πως το ΥΑΕ ή κάποιο από τα συστατικά του επάγει την παραγωγή ενδοκυτταρικών γλυκανών, τουλάχιστον σε αυτά τα στελέχη. Ωστόσο, αν και στο στέλεχος *P. citrinopileatus* φάνηκε ότι η περιεκτικότητα της βιομάζας σε γλυκάνες ήταν μεγαλύτερη στην περίπτωση που αυτή είχε αναπτυχθεί σε ημισυνθετικό μέσο ξυλόζης, σε σχέση με το θρεπτικό μέσο ΥΑΕ, οι διαφορές που παρατηρούνται είναι εξαιρετικά μικρές. Αυτό σημαίνει ότι, σε ό,τι αφορά την παραγωγή γλυκανών βιομάζας από τα τρία μελετώμενα στελέχη, το ΥΑΕ μπορεί να αντικαταστήσει τις καθαρές πηγές άνθρακα χωρίς σημαντικές αλλαγές στη σύσταση της βιομάζας.

Τα δύο πρωτόκολλα απομόνωσης των ενδοκυτταρικών γλυκανών εφαρμόστηκαν στην ξηρή βιομάζα που παραλήφθηκε από κάθε καλλιέργεια, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.3.2. Από το πρωτόκολλο Α προέκυψαν δύο πολυσακχαριτικά κλάσματα σε κάθε περίπτωση, ένα υδατοδιαλυτό και ένα αλκαλι-διαλυτό κλάσμα. Από την εφαρμογή του Πρωτοκόλλου Β προέκυψε ένα μόνο υδατοδιαλυτό πολυσακχαριτικό κλάσμα. Με την εφαρμογή και των δύο πρωτοκόλλων τελικά ελήφθη επίσης και ένα στερεό υπόλειμμα. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το τελικό στάδιο καταβύθισης των απομονωμένων υδατοδιαλυτών και αλκαλι-διαλυτών πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν από τη βιομάζα του *P. ostreatus* με το πρωτόκολλο Α, μετά από ανάπτυξη σε ημισυνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα.



**Εικόνα 3.2.6:** Καταβύθιση με αιθανόλη των απομονωμένων υδατοδιαλυτών (αριστερά) και αλκαλι-διαλυτών (δεξιά) κλασμάτων μετά από την εφαρμογή του πρωτοκόλλου Α στην ξηρή βιομάζα του *P. ostreatus* μετά από ανάπτυξη σε ημισυνθετικό θρεπτικό μέσο.

Στην περίπτωση του στελέχους *P. citrinopileatus*, και συγκεκριμένα στην περίπτωση της βιομάζας που αναπτύχθηκε σε ημισυνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα, δεν απομονώθηκε κανένα πολυσακχαριτικό κλάσμα με καμία από τις δύο μεθόδους, σε κατάλληλη ποσότητα ώστε να μπορεί να αναλυθεί ως προς τη σύστασή του σε γλυκάνες. Στην Εικόνα 3.2.7β φαίνεται το απομονωμένο πολυσακχαριτικό κλάσμα που λήφθηκε με το πρωτόκολλο Α, το οποίο όμως λόγω μικρής ποσότητας (37 mg) δεν ήταν δυνατό να αναλυθεί περαιτέρω.



**Εικόνα 3.2.7:** Πολυσακχαριτικά κλάσματα που παρελήφθησαν μετά τον καθαρισμό της βιομάζας του *P. citrinopileatus* 28684, όπως περιγράφεται στο κείμενο. (A) Πολυσακχαρίτες από καθαρισμό της βιομάζας που αναπτύχθηκε σε απόβλητο ελαιουργείου (B) Απομονωμένο κλάσμα πολυσακχαριτών βιομάζας μετά από ανάπτυξη σε καθαρή πηγή άνθρακα.

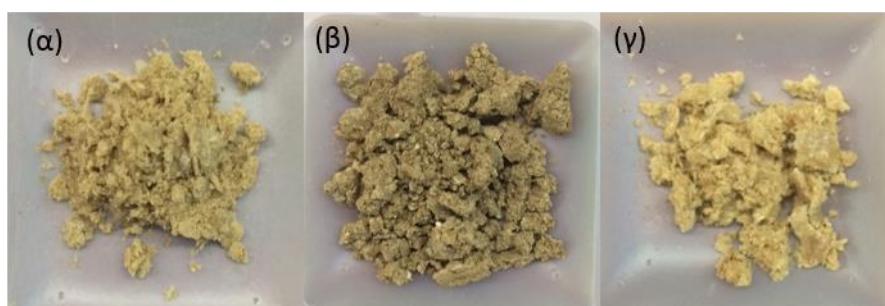
Η εικόνα για τους πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από τη βιομάζα που είχε αναπτυχθεί σε ΥΑΕ είναι τελείως διαφορετική, καθώς σε αυτή την περίπτωση τα απομονωμένα κλάσματα ήταν σαφώς μεγαλύτερα σε ποσότητα. Με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου Α η μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκανών παρατηρήθηκε στο αλκαλι-διαλυτό κλάσμα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2.3.

**Πίνακας 3.2.3:** Σύσταση σε γλυκάνες των πολυσακχαρικών κλασμάτων από τις καλλιέργειες *P. citrinopileatus*. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε και με τα δύο πρωτόκολλα.

Καλλιέργειες ημισυνθετικού μέσου	Ακατέργαστη βιομάζα (% w/w)	Υδατοδιαλυτό κλάσμα (% w/w)	Καθαρισμός (fold)	Απόδοση (%)	Άλκαλι-διαλυτό κλάσμα (% w/w)	Καθαρισμός (fold)	Απόδοση (%)
<b>Ολικές γλυκάνες</b>	6,49 ± 0,24 <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>
<b>α- γλυκάνες</b>	0,56 ± 0,09 <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>
<b>β- γλυκάνες</b>	5,93 ± 0,34 <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>
<b>Καλλιέργειες ΥΑΕ</b>							
<b>Ολικές γλυκάνες</b>	6,13 ± 0,24 <sup>1,2</sup>	12,58 ± 1,1 <sup>1</sup> 31,71 ± 1,37 <sup>2</sup>	2,06 ± 0,25 <sup>1</sup> 2,26 ± 0,05 <sup>2</sup>	1,3 ± 0,17 <sup>1</sup> 2,37 ± 0,05 <sup>2</sup>	22,77 ± 2,73 <sup>1</sup> δ.α. <sup>2</sup>	3,71 ± 0,3 <sup>1</sup> δ.α. <sup>2</sup>	3,32 ± 0,27 <sup>1</sup> δ.α. <sup>2</sup>
<b>α- γλυκάνες</b>	1,36 ± 0,02 <sup>1,2</sup>	6,07 ± 0,39 <sup>1</sup> 15,72 ± 0,59 <sup>2</sup>	4,47 ± 0,22 <sup>1</sup> 5,08 ± 0,21 <sup>2</sup>	2,9 ± 0,15 <sup>1</sup> 5,33 ± 0,22 <sup>2</sup>	2,12 ± 0,01 <sup>1</sup> δ.α. <sup>2</sup>	1,56 ± 0,03 <sup>1</sup> δ.α. <sup>2</sup>	1,4 ± 0,03 <sup>1</sup> δ.α. <sup>2</sup>
<b>β- γλυκάνες</b>	4,77 ± 0,26 <sup>1,2</sup>	6,51 ± 0,68 <sup>1</sup> 15,99 ± 0,72 <sup>2</sup>	1,37 ± 0,21 <sup>1</sup> 1,44 ± 0,06 <sup>2</sup>	0,89 ± 0,14 <sup>1</sup> 1,51 ± 0,06 <sup>2</sup>	20,65 ± 2,72 <sup>1</sup> δ.α. <sup>2</sup>	4,32 ± 0,34 <sup>1</sup> δ.α. <sup>2</sup>	3,87 ± 0,3 <sup>1</sup> δ.α. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Αποτελέσματα του πρωτοκόλλου Α, <sup>2</sup>αποτελέσματα του πρωτοκόλλου Β, δ.α.: δεν ανιχνεύθηκε.

Με την εφαρμογή του Πρωτοκόλλου Β ωστόσο το μοναδικό υδατοδιαλυτό κλάσμα που παραλήφθηκε ήταν πλούσιο σε γλυκάνες, με περιεκτικότητα που ξεπέρασε το 30% (w/w). Με το Πρωτόκολλο Β επιπλέον, φαίνεται να επιτυγχάνονται μεγαλύτερες αποδόσεις ανάκτησης των γλυκανών, αν και στα επιμέρους κλάσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή του πρωτοκόλλου Α (υδατοδιαλυτό και αλκαλι-διαλυτό) φαίνεται επίσης αυξημένη η περιεκτικότητα των γλυκανών (πάνω από 20 % w/w). Μια σημαντική διαφορά που παρατηρείται στα αποτελέσματα των δύο μεθοδολογιών είναι ότι στο κλάσμα που παραλήφθηκε από το Πρωτόκολλο Β, οι συγκεντρώσεις α και β γλυκανών είναι σχεδόν παρόμοιες, ενώ στο αρχικό υλικό υπερτερούσαν οι β γλυκάνες. Αυτό φαίνεται να αποτελεί μειονέκτημα της μεθόδου αυτής, σε περίπτωση που είναι επιθυμητή η επιλεκτική απομόνωση των β γλυκανών. Αντιθέτως, με την εφαρμογή του Πρωτοκόλλου Α παρατηρείται μεγαλύτερη απόδοση στην ανάκτηση των β γλυκανών σε σχέση με τις α γλυκάνες, τουλάχιστον στο αλκαλι-διαλυτό κλάσμα. Στην Εικόνα 3.2.8 φαίνονται τα πολυσακχαριτικά κλάσματα που προέκυψαν με την εφαρμογή του Πρωτοκόλλου Α σε ακατέργαστα δείγματα βιομάζας του στελέχους *P. citrinopileatus* που είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο ΥΑΕ. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού και με τις δύο μεθόδους βρίσκονται σε συμφωνία με αντίστοιχα δεδομένα από τη βιβλιογραφία (Liu et al., 2010, Smiderle et al., 2006, Tong et al., 2009). Για παράδειγμα, οι Tong et al., (2009) αναφέρουν 3,32% απόδοση ανάκτησης των πολυσακχαριτών της βιομάζας, χρησιμοποιώντας καρποσώματα *P. ostreatus* ως αρχικό υλικό. Αντίστοιχα, οι Smiderle et al., (2006) αναφέρουν αποδόσεις 0,9-3,7% για την απομόνωση διαφορετικών πολυσακχαριτικών κλασμάτων από μανιτάρια *Flammulina velutipes*. Τέλος, στη μελέτη των Liu et al., (2010) επιτεύχθηκε απόδοση 7,1-8,2% από μυκήλιο που είχε αναπτυχθεί σε υγρές καλλιέργειες 100 mL τριών στελεχών *Pleurotus*, μετά από αριστοποίηση της διεργασίας απομόνωσης των πολυσακχαριτών. Φαίνεται λοιπόν ότι τα αποτελέσματα που επιτεύχθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή σχετικά με την απομόνωση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών του μυκηλίου του στελέχους *P. citrinopileatus* κυμαίνονται στα ίδια περίπου επίπεδα, σε κάποιες περιπτώσεις ελαφρώς χαμηλότερα, με αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία για απομόνωση πολυσακχαριτών από καρποσώματα ή από μυκήλια που είχαν αναπτυχθεί σε υγρές καλλιέργειες με καθορισμένα θρεπτικά υποστρώματα.



**Εικόνα 3.2.8:** Πολυσακχαριτικά κλάσματα που απομονώθηκαν μετά από καθαρισμό με το πρωτόκολλο Α από τη βιομάζα *P. citrinopileatus* μετά από ανάπτυξη σε ΥΑΕ. α) Υδατοδιαλυτό κλάσμα, β) Στερεό κλάσμα, γ) Αλκαλι-διαλυτό κλάσμα.

Η ακατέργαστη βιομάζα του στελέχους *P. ostreatus* φάνηκε να περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα γλυκανών σε περίπτωση που αυτή είχε αναπτυχθεί σε ημισυνθετικό θρεπτικό μέσο σε σχέση με αυτήν που είχε αναπτυχθεί σε ΥΑΕ, ωστόσο η διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν σχετικά μικρή, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2.3. Στο άλκαλι-διαλυτό κλάσμα που προέκυψε από την εφαρμογή του Πρωτοκόλλου Α, στη βιομάζα που προήλθε από ανάπτυξη σε ημισυνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα, η περιεκτικότητα των ολικών γλυκανών ήταν  $15,71 \pm 0,93\%$  (w/w), ενώ η περιεκτικότητα σε α-γλυκάνες ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με την περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες. Ωστόσο, άλκαλι-διαλυτό κλάσμα στην περίπτωση της βιομάζας που είχε αναπτυχθεί σε ΥΑΕ δεν εντοπίστηκε, φαινόμενο που υποδεικνύει ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ενδοκυτταρικών γλυκανών που παράγονται από το στέλεχος αυτό ενδέχεται να εξαρτώνται από τις συνθήκες ανάπτυξης της βιομάζας, τουλάχιστον εν μέρει.

**Πίνακας 3.2.4:** Σύσταση σε γλυκάνες των απομονωμένων πολυσακχαριτικών κλασμάτων από τις καλλιέργειες *P. ostreatus*. Η απομόνωση των πολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε και με τα δύο πρωτόκολλα.

Καλλιέργειες ημισυνθετικού μέσου	Ακατέργαστη βιομάζα (% w/w)	Υδατοδιαλυτό κλάσμα (% w/w)	Καθαρισμός (fold)	Απόδοση (%)	Άλκαλι-διαλυτό κλάσμα (% w/w)	Καθαρισμός (fold)	Απόδοση (%)
<b>Ολικές γλυκάνες</b>	8,68 ± 2,1 <sup>1</sup>	19,6 ± 2,1 <sup>1</sup>	2,36 ± 0,81 <sup>1</sup>	20,92 ± 7,1 <sup>1</sup>	15,71 ±	1,88 ± 0,56 <sup>1</sup>	1,7 ± 0,5 <sup>1</sup>
	2,59 ± 0,33 <sup>2</sup>	42,87 ± 1,96 <sup>2</sup>	16,7 ± 1,4 <sup>2</sup>	13,28 ± 1,1 <sup>2</sup>	0,93 <sup>1</sup> δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>
<b>α- γλυκάνες</b>	3,36 ± 0,09 <sup>1</sup>	10,59 ± 0,71 <sup>1</sup>	3,15 ± 0,12 <sup>1</sup>	28,03 ± 1,1 <sup>1</sup>	10,57 ±	3,15 ± 0,16 <sup>1</sup>	2,85 ± 0,14 <sup>1</sup>
	1,64 ± 0,06 <sup>2</sup>	9,77 ± 0,02 <sup>2</sup>	5,97 ± 0,19 <sup>2</sup>	4,75 ± 0,15 <sup>2</sup>	0,83 <sup>1</sup> δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>
<b>β- γλυκάνες</b>	5,32 ± 0,21 <sup>1</sup>	9,01 ± 1,39 <sup>1</sup>	1,9 ± 0,11 <sup>1</sup>	16,92 ±	5,14 ± 0,1 <sup>1</sup>	1,06 ± 0,05 <sup>1</sup>	0,96 ± 0,04 <sup>1</sup>
	0,95 ± 0,27 <sup>2</sup>	33,1 ± 1,9 <sup>2</sup>	36,2 ± 8,46 <sup>2</sup>	0,92 <sup>1</sup> 28,83 ± 6,7 <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>
<b>Καλλιέργειες ΥΑΕ</b>							
<b>Ολικές γλυκάνες</b>	7,58 ± 0,45 <sup>1</sup>	33,32 ± 0,9 <sup>1</sup>	4,4 ± 0,14 <sup>1</sup>	27,63 ± 0,9 <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>
	4,65 ± 0,54 <sup>2</sup>	20,82 ± 0,06 <sup>2</sup>	4,51 ± 0,5 <sup>2</sup>	12,72 ± 1,5 <sup>2</sup>			
<b>α- γλυκάνες</b>	1,1 ± 0,05 <sup>1</sup>	2,9 ± 0,11 <sup>1</sup>	2,92 ± 0,12 <sup>1</sup>	18,3 ± 0,78 <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>
	0,78 ± 0,0 <sup>2</sup>	2,37 ± 0,14 <sup>2</sup>	3,05 ± 0,19 <sup>2</sup>	8,58 ± 0,52 <sup>2</sup>			
<b>β- γλυκάνες</b>	6,48 ± 0,06 <sup>1</sup>	30,42 ± 0,8 <sup>1</sup>	4,7 ± 0,16 <sup>1</sup>	29,49 ±	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>	δ.α. <sup>1,2</sup>
	3,87 ± 0,55 <sup>2</sup>	18,45 ± 0,21 <sup>2</sup>	4,82 ± 0,74 <sup>2</sup>	1,03 <sup>1</sup> 13,59 ± 2,1 2			

<sup>1</sup> Αποτελέσματα του πρωτοκόλλου Α, <sup>2</sup>αποτελέσματα του πρωτοκόλλου Β, δ.α.: δεν ανιχνεύθηκε.



Σε ότι αφορά τα συγκριτικά αποτελέσματα των δύο μεθόδων, στην περίπτωση του *P. ostreatus*, με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου Α επιτεύχθηκαν υψηλότερες αποδόσεις ανάκτησης γλυκανών, σχεδόν 30% για την περίπτωση των β-γλυκανών της βιομάζας μετά από ανάπτυξη σε ΥΑΕ, σημαντικά υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με αυτά που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Carbonero et al., 2006, Santos-Neves et al., 2008, Amaral et al., 2008), αλλά συγκρίσιμα μόνο με τη μελέτη των Lee et al. (2007). Στην εν λόγω εργασία, δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης (με αιθανόλη, κρύο ή ζεστό νερό) σε δύο διαφορετικά αρχικά υλικά (καρποσώματα, μυκήλιο) του στελέχους *P. citrinopileatus*, και η μέγιστη απόδοση που επιτεύχθηκε ήταν 51,66% για τα καρποσώματα και 39,85% για το μυκήλιο. Αντίστοιχα λοιπόν και στα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, τα πολυσακχαριτικά κλάσματα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκανών ήταν αυτά που προέκυψαν από την εφαρμογή του Πρωτοκόλλου Β, αφού σε αυτή την περίπτωση ανιχνεύθηκε ολική περιεκτικότητα γλυκανών πάνω από 40 % (w/w). Σε γενικές γραμμές, και τα δύο πρωτόκολλα που δοκιμάστηκαν φάνηκε να λειτουργούν καλά για τη βιομάζα του στελέχους αυτού, δεδομένου ότι σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκαν οι υψηλότερες περιεκτικότητες γλυκανών στα απομονωμένα κλάσματα, σε σχέση με τα άλλα στελέχη. Στην επόμενη εικόνα φαίνονται τα κλάσματα που προέκυψαν από την ακατέργαστη βιομάζα μετά την εφαρμογή του Πρωτοκόλλου Α.



**Εικόνα 3.2.9:** Πολυσακχαριτικά κλάσματα που προέκυψαν από τον καθαρισμό της βιομάζας *Pleurotus ostreatus* LGAM 1123 μετά την ανάπτυξή του σε ΥΑΕ. (Α) Υδατοδιαλυτό κλάσμα, (Β) Άλκαλι-διαλυτό κλάσμα (Γ) Στερεό κλάσμα.

Σε ότι αφορά την ακατέργαστη βιομάζα του στελέχους *G. lucidum*, οι περιεκτικότητες γλυκανών που ανιχνεύθηκαν ήταν οι μικρότερες σε σχέση με τα άλλα στελέχη, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τους εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες. Ωστόσο, οι γλυκάνες της βιομάζας του στελέχους αυτού, ανεξαρτήτως συνθηκών καλλιέργειας, φαίνεται να περιέχουν συντριπτικά περισσότερες β-γλυκάνες σε σχέση με τις α-γλυκάνες, αφού οι τελευταίες, σε όλα τα δείγματα βρέθηκαν να είναι κάτω από 1% (w/w), όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.2.5.

**Πίνακας 3.2.5:** Σύσταση σε γλυκάνες των πολυσακχαριτικών κλασμάτων από τις καλλιέργειες *G. lucidum*. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε και με τα δύο πρωτόκολλα.

Καλλιέργειες ημισυνθετικού μέσου	Ακατέργαστη βιομάζα (% w/w)	Υδατοδιαλυτό κλάσμα (% w/w)	Καθαρισμός (fold)	Απόδοση (%)	Άλκαλι-διαλυτό κλάσμα (% w/w)	Καθαρισμός (fold)	Απόδοση (%)
<b>Ολικές γλυκάνες</b>	5,36 ± 0,36 <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	5,58 ± 0,36 <sup>1</sup>	1,05 ± 0,14 <sup>1</sup>	4,79 ± 0,63 <sup>1</sup>
	6,2 ± 0,72 <sup>2</sup>	49,1 ± 5,6 <sup>2</sup>	7,9 ± 1,8 <sup>2</sup>	36,61 ± 8,4 <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>
<b>α- γλυκάνες</b>	0,17 ± 0,01 <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	0,08 ± 0,004 <sup>1</sup>	0,44 ± 0,02 <sup>1</sup>	2,03 ± 0,1 <sup>1</sup>
	0,83 ± 0,04 <sup>2</sup>	0,51 ± 0,04 <sup>2</sup>	0,71 ± 0,03 <sup>2</sup>	3,23 ± 0,15 <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>
<b>β- γλυκάνες</b>	5,19 ± 0,35 <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	5,5 ± 0,4 <sup>1</sup>	1,07 ± 0,15 <sup>1</sup>	4,88 ± 0,69 <sup>1</sup>
	5,39 ± 0,27 <sup>2</sup>	48,58 ± 5,7 <sup>2</sup>	9,05 ± 1,5 <sup>2</sup>	41,4 ± 6,9 <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>
<b>Καλλιέργειες ΥΑΕ</b>							
<b>Ολικές γλυκάνες</b>	4,83 ± 0,5 <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	4,68 ± 0,6 <sup>1</sup>	0,98 ± 0,02 <sup>1</sup>	7,62 ± 0,7 <sup>1</sup>
	5,56 ± 0,33 <sup>2</sup>	14,96 ± 1,45 <sup>2</sup>	2,7 ± 0,42 <sup>2</sup>	14,34 ± 2,23 <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>
<b>α- γλυκάνες</b>	0,12 ± 0,02 <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	0,06 ± 0,003 <sup>1</sup>	0,5 ± 0,03 <sup>1</sup>	3,91 ± 0,84 <sup>1</sup>
	0,13 ± 0,0 <sup>2</sup>	0,64 ± 0,04 <sup>2</sup>	5,04 ± 0,31 <sup>2</sup>	26,72 ± 1,64 <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>
<b>β- γλυκάνες</b>	4,7 ± 0,48 <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	δ.α. <sup>1</sup>	4,62 ± 0,57 <sup>1</sup>	0,99 ± 0,2 <sup>1</sup>	7,7 ± 0,72 <sup>1</sup>
	5,43 ± 0,33 <sup>2</sup>	14,32 ± 1,41 <sup>2</sup>	2,65 ± 0,42 <sup>2</sup>	14,05 ± 2,23 <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>	δ.α. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Αποτελέσματα του πρωτοκόλλου Α, <sup>2</sup>αποτελέσματα του πρωτοκόλλου Β, δ.α.: δεν ανιχνεύθηκε.

Ωστόσο, σε όλα τα δείγματα του στελέχους αυτού το Πρωτόκολλο Β φαίνεται να είναι κατά πολύ αποδοτικότερο έναντι του Α. Με την εφαρμογή του Πρωτοκόλλου Β στην ξηρή βιομάζα του *G. lucidum* μετά από ανάπτυξη σε ημισυνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα παραλήφθηκε το υδατοδιαλυτό πολυσακχαριτικό κλάσμα με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε γλυκάνες της παρούσας διδακτορικής διατριβής, σχεδόν 50% (w/w), με εξίσου καλή απόδοση ανάκτησης, σε υψηλότερα ποσοστά από αυτά που αναφέρονται σε προγενέστερες μελέτες (Carbonero et al., 2006, Santos-Neves et al., 2008, Amaral et al., 2008). Στο κλάσμα αυτό, η συντριπτική πλειοψηφία των γλυκανών είναι β-γλυκάνες, αφού η περιεκτικότητα των α-γλυκανών είναι σχεδόν 0,5 % (w/w). Οι αντίστοιχες αποδόσεις που αναφέρονται σε προγενέστερες μελέτες είναι 7,7-7,8% από καρποσώματα δύο στελεχών *Pleurotus* από τους Carbonero et al., (2006), 9,2% και 6,1% για το υδατοδιαλυτό και το μη υδατοδιαλυτό κλάσμα πολυσακχαριτών από καρποσώματα του *Pleurotus florida* μετά από ανάπτυξη σε άχυρο, από τη μελέτη των Santos-Neves et al., (2008), και τέλος 2,4-5,9% απόδοση για τα διάφορα πολυσακχαρικά κλάσματα που απομονώθηκαν από βασιδιοκάρπια *Ganoderma resinaceum*, μετά από κατεργασία με υδατικό και αλκαλικό διάλυμα. Φαίνεται λοιπόν ότι οι αποδόσεις που επιτεύχθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι αρκετά υψηλότερες από αυτές που αναφέρονται σε προγενέστερες μελέτες, ακόμα και στην περίπτωση που οι μύκητες είχαν αναπτυχθεί σε ΥΑΕ. Μετά από σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο διαφορετικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το Πρωτόκολλο Β είναι αρκετά αποτελεσματικό στην απομάκρυνση των α-γλυκανών από αυτό το στέλεχος, ακόμη και χωρίς τη χρήση α-αμυλάσης, και χωρίς τη χρονοβόρα διαδικασία πολλών σταδίων από τα οποία αποτελείται το Πρωτόκολλο Α.

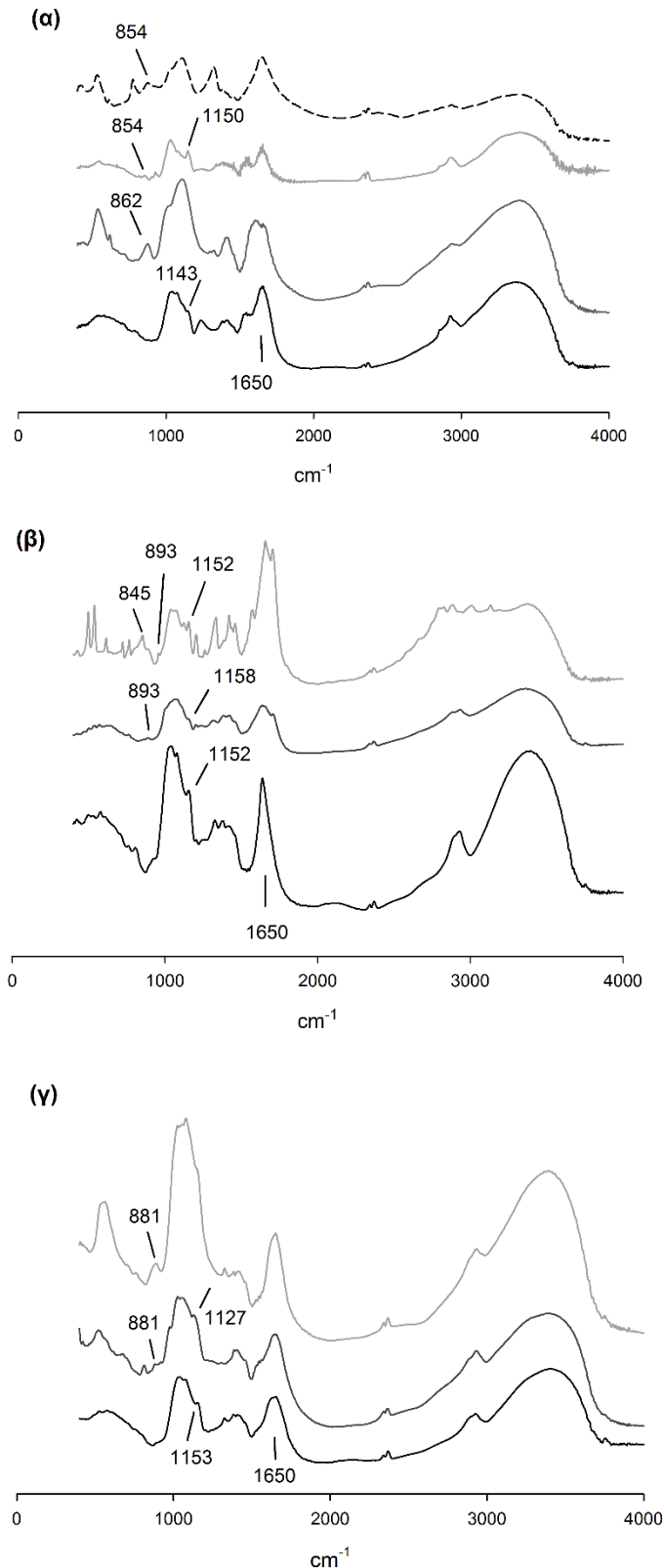
### 3.2.4 Ανάλυση φασμάτων FT-IR των απομονωμένων πολυσακχαρικών κλασμάτων

---

Από τα απομονωμένα πολυσακχαρικά κλάσματα επιλέχθηκαν κάποια για περαιτέρω ανάλυση με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας FT-IR. Τα φάσματα που προέκυψαν φαίνονται στην Εικόνα 3.2.10. Στα φάσματα όλων των δειγμάτων εμφανίζεται μια ευρεία κορυφή στα 3300-3400  $\text{cm}^{-1}$ , η οποία αντιστοιχεί στις ελεύθερες υδροξυλομάδες ενός μεγαλομορίου, κάτι που υποδεικνύει την ύπαρξη πολυσακχαριτών μεγάλου μοριακού βάρους (Chai et al., 2013). Οι κορυφές στα 881 και 893  $\text{cm}^{-1}$  που εμφανίζονται στα φάσματα των δειγμάτων EPS από τις καλλιέργειες των στελεχών *P. citrinopileatus* και *G. lucidum* με ημισυνθετικό μέσο αλλά και με μέσο ΥΑΕ, αντιστοιχούν σε β-γλυκοζιδικούς δεσμούς, κάτι που υποδεικνύει την ύπαρξη μορίων β-γλυκανών (Synytsya et al., 2009, Han et al., 2008, Fan et al., 2009). Οι κορυφές στα 854, 862 και 845  $\text{cm}^{-1}$  υποδεικνύουν την ύπαρξη μορίων α-γλυκανών στα φάσματα των δειγμάτων των στελεχών *P. ostreatus* και *P. citrinopileatus* (Synytsya and Novak, 2014, Han et al., 2008, Fan et al., 2009). Επίσης, οι κορυφές στα 520-550  $\text{cm}^{-1}$  στο δείγμα EPS του *P. ostreatus* μπορεί να αποτελεί ένδειξη της παρουσίας α-γλυκανών, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Synytsya and Novak, 2014, Synytsya et al., 2009). Οι κορυφές στα 1127, 1153, 1152, 1158, 1150 και 1143  $\text{cm}^{-1}$  αντιπροσωπεύουν την τάση του δεσμού C-O-C του δακτυλίου πυρανόζης των σακχάρων (Synytsya et al., 2009, Fan et al., 2009). Η κορυφή στα 1650  $\text{cm}^{-1}$ , η οποία εμφανίζεται σε όλα τα δείγματα, αντιστοιχεί στο δεσμό C-N των αμινοξέων, και άρα υποδεικνύει την παρουσία πρωτεϊνικών μορίων στα δείγματα (Synytsya et al., 2009). Τέλος, οι κορυφές στα 2920-2930  $\text{cm}^{-1}$

αντιστοιχούν στις ομάδες  $-CH_2$  των λιπιδίων, όπως έχει αναφερθεί (Synytsya et al., 2009), και πιθανώς οφείλονται σε υπολειπόμενα έλαια που περιέχονται στα ΥΑΕ.

Από την ανάλυση FT-IR φάνηκε μια πρωτεϊνική επιμόλυνση σε όλα τα δείγματα, παρά τις επαναλαμβανόμενες επώσεις με αντιδραστήριο Sevag, όπως αναφέρεται και αλλού (Synytsya et al., 2009). Αυτό συμβαίνει επειδή οι γλυκάνες στα μανιτάρια συχνά εμφανίζονται με τη μορφή πρωτεογλυκανών, σε σύμπλοκο δηλαδή με πρωτεΐνες, και γι' αυτό το λόγο η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών μπορεί να είναι δύσκολη (Mu et al., 2012). Όπως αναφέρεται και στην εργασία των Mu et al., (2012), οι πολλαπλές επώσεις με αντιδραστήριο Sevag δεν επιτυγχάνουν την πλήρη απομάκρυνση των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα το τελικό πολυσακχαριτικό κλάσμα να περιέχει πρωτεΐνες σε τελικό ποσοστό 6,28-14,07%, ενώ οι Synytsya et al., (2009), μετά από ανεπιτυχείς κατεργασίες με αντιδραστήριο Sevag, κατάφεραν να μειώσουν το συνολικό ποσοστό αζώτου των απομονωμένων πολυσακχαριτικών κλασμάτων με κατεργασία με φαινόλη, όμως η διαδικασία αυτή ήταν επιτυχής μόνο στην περίπτωση των αλκαλι-διαλυτών κλασμάτων και όχι των υδατοδιαλυτών. Σχετικά με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, σε ό,τι αφορά την απομάκρυνση των πρωτεϊνών, το πρωτόκολλο Α δεν φαίνεται να υπερτερεί του πρωτοκόλλου Β, παρά τα πολλαπλά βήματα επώασης με αντιδραστήριο Sevag, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτό το στάδιο της διαδικασίας θα μπορούσε να παραληφθεί χωρίς να επηρεάσει σημαντικά το τελικό προϊόν. Επιπλέον, στην περίπτωση των γλυκανών που απομονώθηκαν με το πρωτόκολλο Α, η επώαση με α-αμυλάση δεν ήταν αποτελεσματική στην πλήρη απομάκρυνση των α-γλυκανών από τα απομονωθέντα δείγματα. Η απόδοση των α-γλυκανών στα τελικά κλάσματα ποικίλλει από 0,63% στο αλκαλι-διαλυτό κλάσμα της βιομάζας του *P. citrinopileatus* έως 29,29% στο υδατοδιαλυτό κλάσμα της βιομάζας του *P. ostreatus*. Οι αντίστοιχες αποδόσεις που επιτεύχθηκαν με το πρωτόκολλο Β ήταν από 2,86% έως 28,13%, γεγονός που υποδεικνύει ότι η χρήση εμπορικής α-αμυλάσης, ένα χρονοβόρο στάδιο της διαδικασίας, το οποίο επιπλέον ανεβάζει και το κόστος, θα μπορούσε να παραληφθεί χωρίς σημαντική διαφοροποίηση στις αποδόσεις α-γλυκανών.



**Εικόνα 3.2.10:** Φάσματα FT-IR των απομονωμένων κλασμάτων πολυσακχαριτών, από τα στελέχη *P. ostreatus* (α), *G. lucidum* (β) και *P. citrinopileatus* (γ). Οι μαύρες και σκούρες γκρι γραμμές αντιπροσωπεύουν τα φάσματα FT-IR των πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν από τη μυκηλιακή βιομάζα και τα EPS, αντίστοιχα, και απομονώθηκαν από καλλιέργειες ημισυνθετικού θρεπτικού μέσου. Οι ανοιχτές γκρι και οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τα φάσματα FT-IR των πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν από τη μυκηλιακή βιομάζα και τα εξωκυτταρικά πολυσακχαριτικά κλάσματα, αντίστοιχα, τα οποία έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο ΥΑΕ.

---

### 3.3 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός επιλεγμένων λιγνινολυτικών ενζύμων από μύκητες – Βιοτεχνολογικές εφαρμογές

---

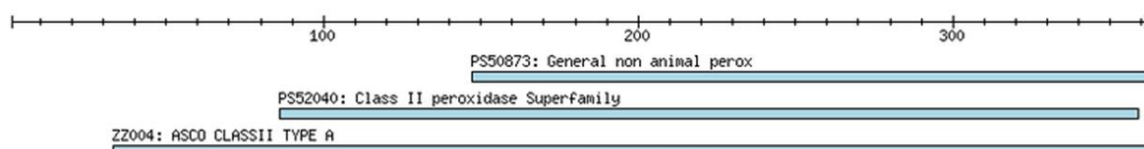
#### 3.3.1 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός της υπεροξειδάσης MtPerII του *M. thermophila*. Εφαρμογή του ενζύμου στη βιομετατροπή της κατεχόλης.

---

##### 3.3.1.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

---

Ο θερμόφιλος νηματοειδής ασκομύκητας *M. thermophila* έχει αρχίσει να συγκεντρώνει το ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια σε ότι αφορά το ενζυμικό του δυναμικό που σχετίζεται με την αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης. Το αξιοσημείωτο λιγνινοκυτταρινολυτικό δυναμικό του μύκητα αυτού σε συνδυασμό με το πρόσφατα δημοσιευμένο γονιδίωμά του καθιστά το μικροοργανισμό αυτό σημαντική πηγή καινούριων λιγνινολυτικών ενζύμων με πιθανά καινούριες ιδιότητες, μεταξύ αυτών και θερμόφιλα ένζυμα με ποικίλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Η δημοσιευμένη ανάλυση των εκκρινόμενων ενζύμων του μύκητα (Berka et al., 2011), αναφέρει ένα πλήθος εξωκυτταρικών πρωτεϊνών που υπερεκφράζονται όταν ο οργανισμός αναπτύσσεται σε λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα. Ανάμεσα σε αυτά περιλαμβάνεται και μια πρωτεΐνη που αντιστοιχεί στο Model ID 2111272 (accession no. XM\_003664226). Η πρωτεϊνική αλληλουχία αυτή εμφανίζει ομοιότητα με γνωστές υπεροξειδάσες ασκομυκήτων Τάξης II, με βάση την κατάταξη της βάσης δεδομένων PeroxiBase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του υπολογιστικού εργαλείου Pfam (Finn et al., 2009) η πρωτεΐνη φέρει σημαντική ομοιότητα με υπεροξειδάσες αίμης, κοινό χαρακτηριστικό των οποίων είναι μια α-έλικα. Η βιοπληροφορική ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας δείχνει μια μικρή ομοιότητα με άλλες χαρακτηρισμένες υπεροξειδάσες βασιδιομυκήτων (30% ομοιότητα με υπεροξειδάσες του *Pleurotus eryngii*, 27% ομοιότητα με υπεροξειδάση της λιγνίνης του *Phanerochaete chrysosporium* και 31% ομοιότητα με υπεροξειδάση του μαγγανίου του *Phlebia radiata*). Το γονίδιο 2111272 επιλέχθηκε για ετερόλογη έκφραση στη ζύμη *Pichia pastoris* σκοπό τη μελέτη των ιδιοτήτων του. Η βιοπληροφορική ανάλυση του γονιδίου και της πρωτεϊνικής ακολουθίας πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των εργαλείων που αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2.8.



**Εικόνα 3.3.1.1:** Αποτελέσματα της στοίχισης με το εργαλείο PeroxiScan της βάσης δεδομένων PeroxiBase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>)

Το γονίδιο αποτελείται από δύο εξώνια, ένα εξώνιο 993 ζευγών βάσεων και ένα 96 ζευγών βάσεων στα οποία παρεμβάλλεται ένα εσώνιο 96 ζευγών βάσεων.

```
ATGAAGATCAGATATGTATTCCTCCTCCTCGGCCTCGCTTCGCCTGGGGTCTCTCGGACTCTCCTGGGTATGAACAA
ATCTCTCGCCGGAGAAATCTCACCCGCCGCCGGAAGCGTCAGACAGGGGAACCTCTAGCGGACCTCAGCACCCCTCC
CTGACGCCGCTCTGTACCCGGCGGGCTGGACGATCAAGAACATTCTGCTCGGCAACCGCGCGCCGTATCACCGCAG
GACCTGACCACCGTCTACACGGCCCCGGGACCGCTCGACAGCTCCGAATGCCGCCGCGAGACCTGCTGCGTGTGGA
AGTACATCGCAGACGCCATGGCTACGTCTTCCGCGACGGCGCCGGCAGGTGTAACGAGCTCGCGCGCCAGGGCGGT
CCGCCTGGGCTTCATGACGCCGGCACGTGGTCTGAAGTCCGCGGGCGGCGGCGCCGATGGGTCCGTCCTCTTG
GCTCCCAGTGAGCTGGCGCGGGACGACAACCGCGCCCTCGAGGTCGTCGCGGCACAAATGGCGGCCTGGTACGCG
GAGTGGCGGGCCCCGCGGCGCCCGCATGGCCGACCTGATCCAGATGGGCGCGGTGGTAGCAGCCGCGTCATGCCCGC
TGGGCCCCCGGGCACGCGCCTTCGTCGGGCGCAACGACAGTGCCACACCCGCCCTCCGGACCGGCTCCCTCGGC
CGCCAACAGCGACGCCCGCGCGCTGGCGGGCGCTGTTTGCTGACAAGACGCTCAGCCTCGGCGAGCTTGTGCGCCCTC
GTCGGTGGCCACACCACAGCGTTCAGCGGTTCTTCGACCCGCTCGCCGCGGGTCCCCCGAGGACTCTACGCCGGG
CGTCTGGGACACCCTACTACAACCAGACGGCCAGCTCGGATCCTCCGACGGGCGTGTTCGTTTCCCGAGCGACC
TGGCGCTGTGCAATACCCCCCGCGCGTGAGCTGTGGCAAACATTTGCGAATGCGCAGGCTGTGTGGAATGATGTG
AGCTTCATTTTGCATGTGTATTTTTCATGCGTCTTCTTCTTTTCACTGGTGAGAGACAGGAAGAGACAAGGTGCTA
ATGCTGGCTTGAGGACTTTGCGGCTGCGTACGTACACCTTAGCGTGCTCGGTGTTGAGCACATCAATGACCTGACAG
AGTGCACCGGTGTGCTGCCATTGTCGGGTGA
```

**Εικόνα 3.3.1.2:** Το γονίδιο 2111272 όπως απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *M. thermophila*. Με γκρι χρώμα σημειώνεται το εσώνιο που διακόπτει την αλληλουχία. Οι υπογραμμισμένες ακολουθίες αντιστοιχούν στα σημεία του γονιδίου για τα οποία σχεδιάστηκαν οι συμπληρωματικοί εκκινητές.

Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, η ώριμη πρωτεϊνική αλληλουχία, μετά την αφαίρεση του πεπτιδίου έκκρισης, αποτελείται από 343 αμινοξέα, τα οποία αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος 36085,5 Da σύμφωνα με την πρόβλεψη του αλγορίθμου Compute MW/ρΙ του ExpASy server. Με τον ίδιο αλγόριθμο υπολογίστηκε και το θεωρητικό ρΙ της πρωτεΐνης 5,06.

```
MKIRYVFLFLGLASPGVSRRTLLGMNKSLAGEISPAAAKRQT
GELLADLSTLPDAALSPAGWTIKNILLGNRAAVSPQDLTTVY
TAPGPLDSSECRRETCCVWKYIADAMATSF RDGAGRCNEL
ARQAVRLGFHDAGTWSKSAGGGGADG SVLLAPSELARDD
NRALEVVAQAQMAAWYAEWRPRGARMADLIQMGAVVAA
ASCPLGPRARAFVGRNDSATPAPPDRLPSAANS DAAALAA
FADKTLSLGELVALVGAHTTSVQRFFDPLAAGSPQDSTPGV
WDTLYYNQTASSDPPQGVFRFPSDLALSQYPPARELWQTFA
NAQAVWNDDFAAAYVHLSVLGVEHINDLTECTGVLP LSG
```

**Εικόνα 3.3.1.3:** Πρωτεϊνική αλληλουχία του γονιδίου 2111272. Με πορτοκαλί χρώμα σημειώνεται η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο πεπτιδίο έκκρισης, όπως αυτό προβλέφθηκε από τον αλγόριθμο SignalP. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται τα αμινοξέα που φέρουν *N*-γλυκοζυλίωση, σύμφωνα με την πρόβλεψη του αλγορίθμου Net-N-Glyc. Με μπλε χρώμα σημειώνονται οι θέσεις *O*-γλυκοζυλίωσης, όπως προβλέφθηκαν από τον αλγόριθμο Net-N-Glyc.

### 3.3.1.2 Απομόνωση γονιδίου *MtPerII* από το γονιδίωμα του *M. thermophila*

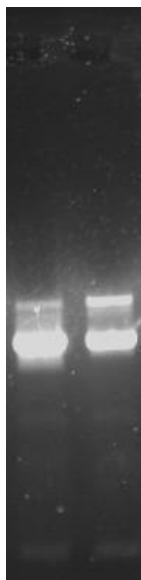
Το γονίδιο 2111272 απομονώθηκε από γονιδιακό DNA του *M. thermophila* με PCR με χρήση των κατάλληλων εκκινητών *MtPerII*-F και *MtPerII*-R:

Forward: 5'-GCATCGATGCGGACTCTCCTGGGTATGAAC-3'

Reverse: 5'-CGTCTAGACCCGACAATGGCAGCACACC-3'

Όπου σημειώνονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *ClaI* και *XbaI* αντίστοιχα, οι οποίες προστέθηκαν προκειμένου να διευκολυνθεί η περαιτέρω κλωνοποίηση του γονιδίου στους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς. Οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο		
Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 2 min	
Αποδιάταξη DNA-στόχου (denaturation)	95 °C για 20 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing)	62 °C για 10 sec	
Επέκταση εκκινητών (extension)	68 °C για 30 sec	
Τελική επέκταση και επιδιόρθωση	68 °C για 1 min	

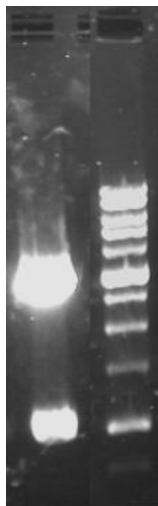


**Εικόνα 3.3.1.4:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR με μήτρα το απομονωμένο DNA του *M. thermophila*. Η έντονη ζώνη που αντιστοιχεί στο γονίδιο *MtPerII* κόπηκε και απομονώθηκε για περαιτέρω κλωνοποίηση στο pCR®Blunt.



### 3.3.1.3. Κλωνοποίηση σε pCR®Blunt και αφαίρεση εσωνίων

Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο φορέα pCR®Blunt (Invitrogen) προκειμένου να επιβεβαιωθεί η σωστή αλληλουχία του με πέψη με περιοριστικά ένζυμα (το αποτέλεσμα της οποίας φαίνεται στην Εικόνα 3.3.1.5) και αλληλούχιση του ενθέματος.



**Εικόνα 3.3.1.5:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 0,5% του προϊόντος της πέψης, όπως περιγράφεται στο κείμενο. Στην Εικόνα φαίνονται οι ζώνες με μοριακό βάρος 1200 ζεύγη βάσεων, η οποία αντιστοιχεί στο γονίδιο ενδιαφέροντος και ζώνη 3500 ζευγών βάσεων που αντιστοιχεί στον πλασμιδιακό φορέα pCR®Blunt.

Προκειμένου να απομακρυνθεί ένα εσώνιο 96 ζευγών βάσεων το οποίο περιλαμβάνεται στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου 2111272, πραγματοποιήθηκε η τεχνική της επικαλυπτόμενης PCR (overlapping PCR) με τη χρήση των παρακάτω εκκινητών:

e1R 5'-CGCAGCGCAAAGTCATCATTCCACACAGCCTGCGC-3'

e2F 5'-GACTTTGCCGCTGCGTACGT-3'

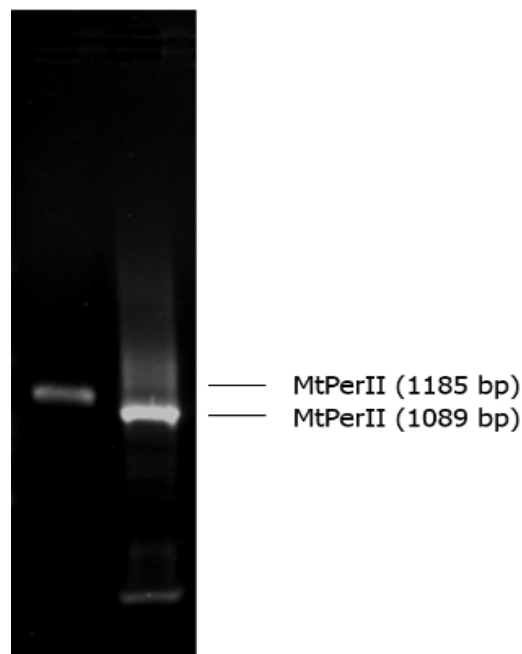
όπου σημειώνονται οι θέσεις των επικαλύψεων. Στο πρώτο στάδιο, τα δύο εξώνια (ένα 993 ζευγών βάσεων και ένα 96 ζευγών βάσεων) απομονώθηκαν σε ξεχωριστές αντιδράσεις, με τη χρήση των εκκινητών *MtPerII-F* και *MtPerII-e1R* για την απομόνωση του πρώτου εξωνίου και *MtPerII-e2F* και *MtPerII-R* για την απομόνωση του δεύτερου εξωνίου. Οι συνθήκες που ακολουθήθηκαν για τις αντιδράσεις αυτές φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα:

Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο		
Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 2 min	
Αποδιάταξη DNA-στόχου (denaturation)	95 °C για 20 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing)	60 °C για 10 sec	
Επέκταση εκκινητών (extension)	68 °C για 20 sec	
Τελική επέκταση και επιδιόρθωση	68 °C για 1 min	

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, και οι κατάλληλες ζώνες που αντιστοιχούσαν στα εξώνια κόπηκαν και το DNA απομονώθηκε. Στη συνέχεια, τα εξώνια συνενώθηκαν σχηματίζοντας το «ώριμο» γονίδιο, λόγω των συμπληρωματικών τους αλληλουχιών και ενισχύθηκαν περαιτέρω, σε μια μόνο αντίδραση OE-PCR, με τους αρχικούς εκκινητές (*MtPerII-F* και *MtPerII-R*) με τις παρακάτω συνθήκες:

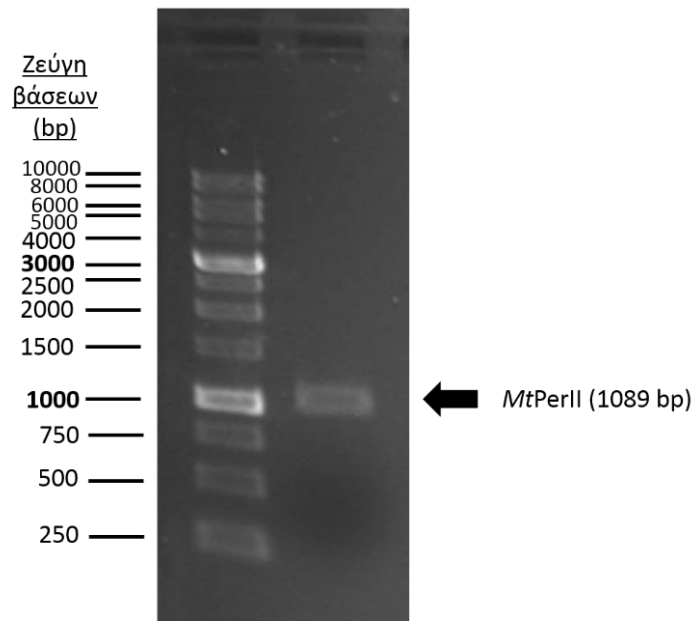
Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο		
Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 2 min	
Αποδιάταξη DNA-στόχου (denaturation)	95 °C για 20 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing)	62 °C για 10 sec	
Επέκταση εκκινητών (extension)	68 °C για 20 sec	
Τελική επέκταση και επιδιόρθωση	68 °C για 1 min	

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης και το αποτέλεσμα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.1.6:** Προϊόν της επικαλυπτόμενης PCR (σειρά 2) και αρχικό γονίδιο (σειρά 1).

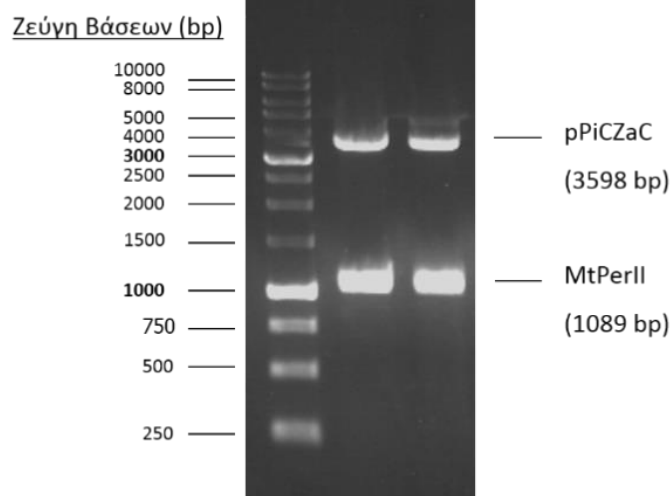
Το προϊόν της PCR απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pCR®Blunt προκειμένου να επιβεβαιωθεί εκ νέου η ορθή του αλληλουχία, με πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα και αλληλούχιση.



**Εικόνα 3.3.1.7:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος της επικαλυπτόμενης PCR, μετά την κλωνοποίηση στον φορέα pCR®Blunt, κόψιμο και απομόνωση της κατάλληλης ζώνης 1089 bp.

#### 3.3.1.4 Κλωνοποίηση σε pPICZα και γραμμικοποίηση του ανασυνδυασμένου φορέα

Ακολούθως το πλέον «ώριμο» γονίδιο κόπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *Cla*I, *Xba*I και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pPICZαC (Invitrogen) ανάμεσα στην αλληλουχία έκκρισης α-factor του *Saccharomyces cerevisiae* και της αλληλουχίας His-tag. Ο ανασυνδυασμένος φορέας πολλαπλασιάστηκε σε κύτταρα *E. coli*, απομονώθηκε και η ορθή ενσωμάτωση του γονιδίου επιβεβαιώθηκε με πέψη με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (Εικόνα 3.3.1.8) και αλληλούχιση.



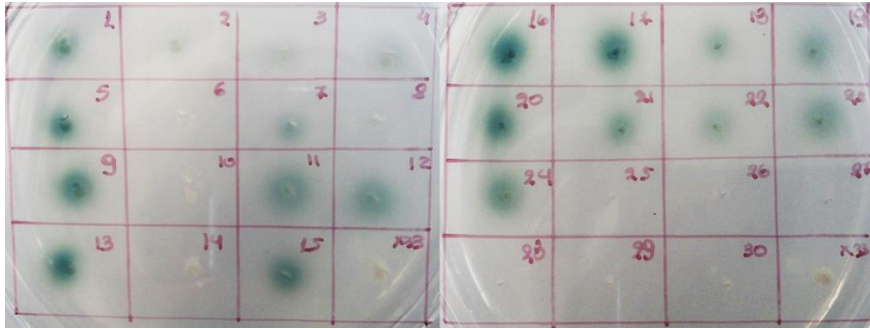
**Εικόνα 3.3.1.8:** Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της πέψης με *Clal*, *XbaI* του φορέα pPiCZaC (3600 ζεύγη βάσεων) που περιέχει το "ώριμο" γονίδιο 2111272 (1090 ζεύγη βάσεων).

Στη συνέχεια ο ανασυνδυασμένος φορέας γραμμικοποιήθηκε με τη βοήθεια του ενζύμου *PmeI*, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για το μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*, με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης.

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο YPDS με ζεοσίνη, για την επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.4.1. Οι ανθεκτικές αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία ανακαλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο YPD με ζεοσίνη. Οι στερεές καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των ακόλουθων στερεών και υγρών καλλιέργειών.

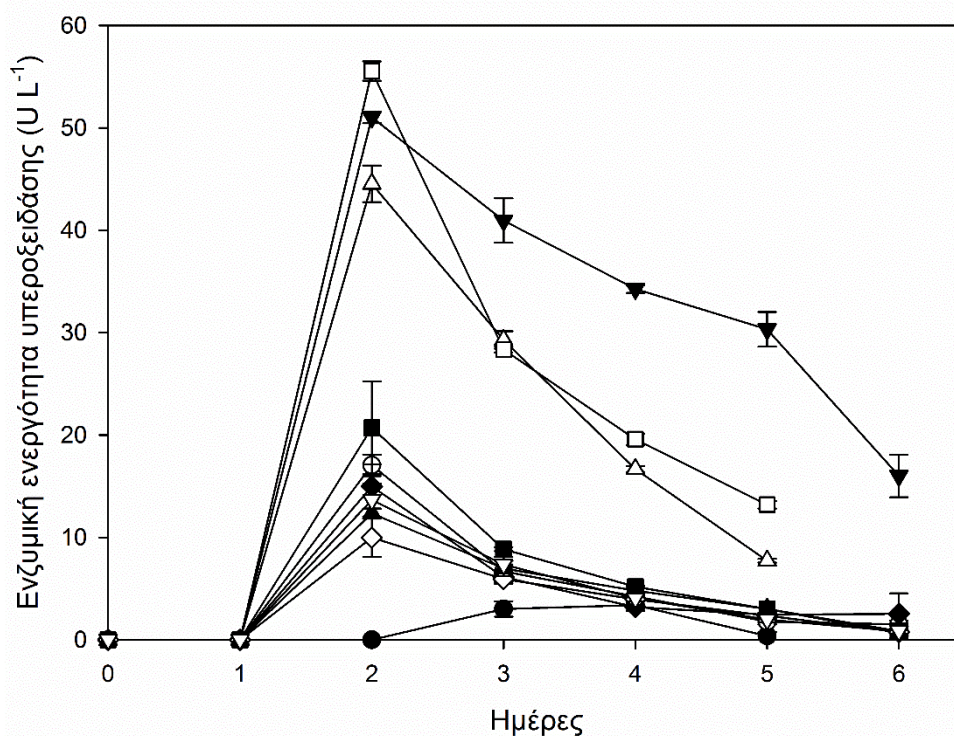
#### 3.3.1.5 Ανάλυση μετασχηματισμένων κλώνων *P. pastoris* και μελέτη έκφρασης της ετερόλογης *MtPerII*

Οι κλώνοι *P. pastoris* που ήταν ανθεκτικοί σε ζεοσίνη εξετάστηκαν ως προς την παραγωγή του ανασυνδυασμένου ενζύμου σε στερεές καλλιέργειες, με θρεπτικό MM με προσθήκη ABTS, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.4.1. Μετά από ανάπτυξη 4 ημερών στους 30 °C, με καθημερινή προσθήκη 100 μL μεθανόλης, οι αποικίες που είχαν προκύψει καλύφθηκαν με μία σταγόνα διαλύματος H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM, και τα τρυβλία επωάστηκαν για 10 λεπτά, ούτως ώστε να αναπτυχθεί το πράσινο χρώμα. Το αποτέλεσμα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.1.9:** Ανάπτυξη ανασυνδυασμένων κλώνων *P. pastoris* σε θρεπτικό υλικό MM με προσθήκη ABTS και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, για έλεγχο της ενεργότητας της MtPerII σε κάθε κλώνο. Δεξιά κάτω φαίνεται το αποτέλεσμα για το φυσικό στέλεχος X33.

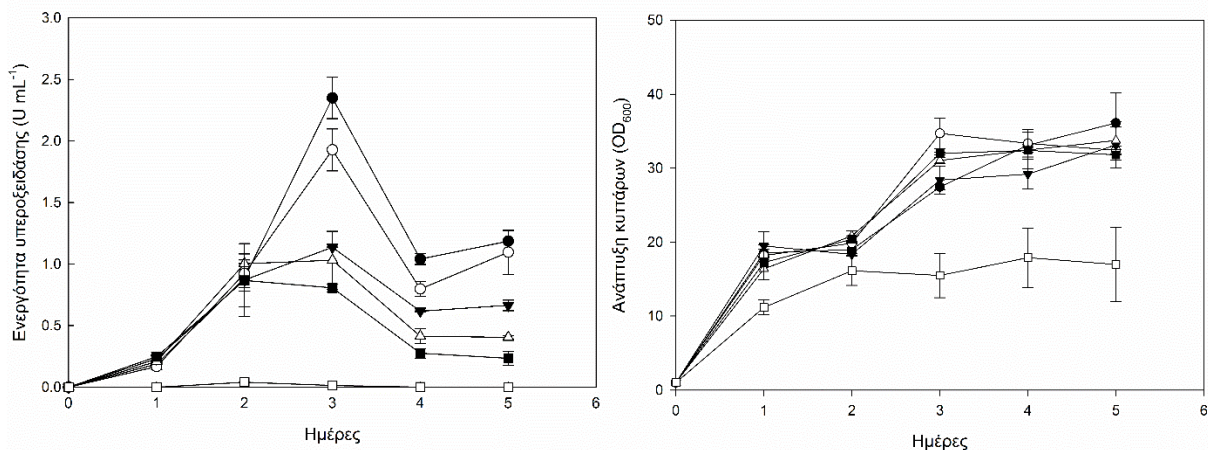
Ορισμένοι από τους κλώνους που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία MM επιλέχθηκαν προκειμένου να εξεταστεί η παραγωγή του ανασυνδυασμένου ενζύμου σε υγρές καλλιέργειες μικρού όγκου. Όπως περιγράφεται και στο Κεφάλαιο 2.5.1.1, τα κύτταρα αρχικά αναπτύχθηκαν σε 50 mL υγρού θρεπτικού μέσου BMGY και η βιομάζα που αναπτύχθηκε μεταφέρθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο 50 mL BMMY, στο οποίο προστέθηκε μεθανόλη 0,5 % (v/v) σε καθημερινή βάση. Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδάσης, λαμβάνονταν καθημερινά δείγματα, το υπερκείμενο των οποίων εξετάστηκε ως προς την ικανότητα οξείδωσης του ABTS με προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Οι κλώνοι που επιλέχθηκαν ήταν οι 1, 7, 11, 13, 16, 18, 22, 29 και 30. Τα αποτελέσματα ως προς την παραγόμενη ενεργότητα υπεροξειδάσης για κάθε κλώνο φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.1.10:** Ενεργότητα υπεροξειδάσης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας για τους επιλεγμένους κλώνους. Μαύροι κύκλοι: Στέλεχος αγρίου τύπου X33, λευκοί κύκλοι: κλώνος 1, μαύρα τρίγωνα: κλώνος 7, λευκά τρίγωνα: κλώνος 11, μαύρα τετράγωνα: κλώνος 13, λευκά τετράγωνα: κλώνος 16, μαύροι ρόμβοι: κλώνος 18, λευκοί ρόμβοι: κλώνος 22, μαύρα τρίγωνα: κλώνος 29, λευκά τρίγωνα: κλώνος 30.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.3.1.10, όλοι οι εξεταζόμενοι κλώνοι εμφάνισαν έστω και μικρή ενεργότητα υπεροξειδάσης, η οποία πήρε τη μέγιστη τιμή της τη δεύτερη ημέρα της καλλιέργειας, σε αντίθεση με το φυσικό στέλεχος X33. Η μέγιστη ενεργότητα υπεροξειδάσης παρατηρήθηκε από τον Κλώνο 16 ( $55,56 \pm 0,9 \text{ U L}^{-1}$ ), ωστόσο ο κλώνος 7 επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη, καθώς εμφάνισε εξίσου υψηλή ενεργότητα υπεροξειδάσης ( $51,05 \pm 0,6 \text{ U L}^{-1}$ ), αλλά και εξακολούθησε να παράγει υψηλότερη ενεργότητα από τους υπόλοιπους κλώνους και τις επόμενες ημέρες.

Ακολούθως, εξετάστηκε η επίδραση συγκεκριμένων παραμέτρων στην έκφραση της ενεργότητας υπεροξειδάσης από τον Κλώνο 7, με στόχο τη βελτιστοποίηση της παραγωγής του ετερόλογου ενζύμου. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η συγκέντρωση της μεθανόλης, η θερμοκρασία ανάπτυξης των καλλιεργειών και η προσθήκη αίμης στο θρεπτικό μέσο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.1.11:** Επίδραση διαφόρων παραμέτρων στην ενεργότητα της ετερόλογης *MtPerII* (α) και στην κυτταρική ανάπτυξη (β). Η αίμη προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο σε συγκέντρωση 0,1 g L<sup>-1</sup>. Μαύροι κύκλοι: 23 °C, 0,5% (v/v) μεθανόλη, λευκοί κύκλοι: 23 °C, 1% (v/v) μεθανόλη, μαύρα τρίγωνα: 30 °C, 0,5% (v/v) μεθανόλη, λευκά τρίγωνα: 30 °C, 1% (v/v) μεθανόλη, μαύρα τετράγωνα: 30 °C, 1,5% (v/v) μεθανόλη, λευκά τετράγωνα: 30 °C, 0,5% (v/v) μεθανόλη, χωρίς προσθήκη αίμης.

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι η προσθήκη αίμης στο θρεπτικό μέσο αυξάνει κατά πολύ την ενεργότητα της παραγόμενης *MtPerII*, αλλά ενισχύει επίσης και την κυτταρική ανάπτυξη. Η αίμη είναι μια ομάδα πορφυρίνης που περιέχει σίδηρο και βρίσκεται στο ενεργό κέντρο των υπεροξειδασών, αφού παίζει κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης. Η αύξηση της ενεργότητας που παρατηρείται με προσθήκη 0,1 g L<sup>-1</sup> αίμης στο θρεπτικό μέσο, από 0,04 U mL<sup>-1</sup> σε  $1,14 \pm 0,002$  U mL<sup>-1</sup> είναι αρκετά σημαντική, και υποδεικνύει ότι η έλλειψη αίμης από το θρεπτικό μέσο μπορεί να είναι ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας στην παραγωγή του ετερόλογου ενζύμου. Η μειωμένη κυτταρική ανάπτυξη που παρατηρείται στις περιπτώσεις των καλλιεργειών χωρίς προσθήκη αίμης μπορεί να οφείλεται στη συσσώρευση ανενεργής ετερόλογης πρωτεΐνης, η οποία, ελλείψει αίμης, δεν μπορεί να λάβει τη σωστή τριτοταγή δομή και έτσι ενδεχομένως να συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και να παρεμποδίζει την κυτταρική ανάπτυξη. Ακόμη, η ανάπτυξη των κυττάρων σε χαμηλότερη θερμοκρασία φαίνεται να οδηγεί σε μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου, αφού η ανάπτυξη στους 23 °C ( $2,35 \pm 0,17$  U mL<sup>-1</sup>,  $1,93 \pm 0,17$  U mL<sup>-1</sup>) οδήγησε σε μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα σε σχέση με την ανάπτυξη στους 30 °C ( $1,14 \pm 0,002$  U mL<sup>-1</sup>,  $1,03 \pm 0,24$  U mL<sup>-1</sup> και  $0,81 \pm 0,003$  U mL<sup>-1</sup>), όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Macaulay-Patrick, et al., 2005), χωρίς όμως να επηρεάζεται η κυτταρική ανάπτυξη. Τέλος, η προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης μεθανόλης δεν οδήγησε σε μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου, καθώς για την περίπτωση της ανάπτυξης στους 30 °C η βέλτιστη συγκέντρωση μεθανόλης βρέθηκε ότι ήταν 1% (v/v), ενώ στην περίπτωση της ανάπτυξης στους 23 °C η βέλτιστη συγκέντρωση μεθανόλης βρέθηκε να είναι η 0,5 % (v/v).

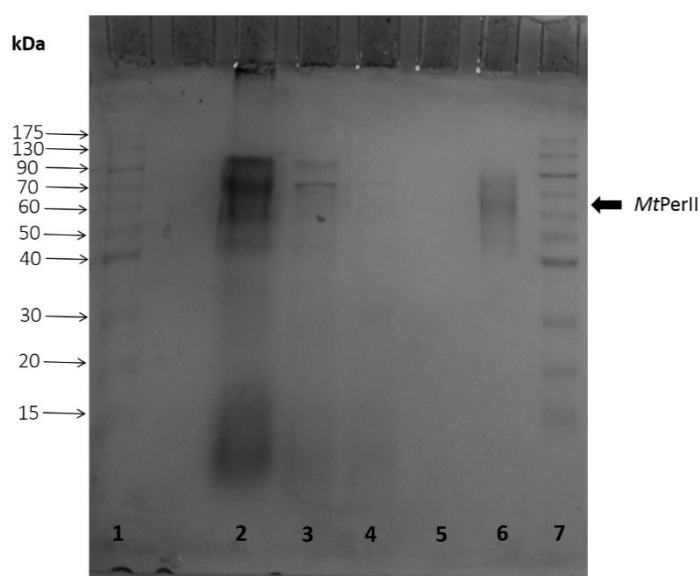
Συνεπώς, οι καλλιέργειες που ακολούθησαν για απομόνωση και καθαρισμό της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκαν στους 23 °C με προσθήκη 0,5% (v/v) μεθανόλης καθημερινά και με 0,1 g L<sup>-1</sup> αίμης στο θρεπτικό μέσο.

### 3.3.1.6 Παραγωγή και απομόνωση της ετερόλογης MtPerII

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό της ετερόλογης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες όγκου 1 L στις συνθήκες που προαναφέρθηκαν. Μετά από τρεις ημέρες ανάπτυξης, όπου και παρατηρήθηκε η μέγιστη ενεργότητα υπεροξειδάσης, το υγρό της καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε, και το υπερκείμενο διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 2.5.1.2. Πριν τη συμπύκνωση, η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών στο υπερκείμενο της καλλιέργειας βρέθηκε  $0,111 \text{ mg mL}^{-1}$ . Ακολούθως, το υγρό εξισορροπήθηκε για 16 ώρες σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα Talon®, και η πρωτεΐνη απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.5.1.3. Η τελική συγκέντρωση του απομονωμένου ενζύμου ήταν  $0,407 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Η απόδοση της παραγωγής του ετερόλογου ενζύμου είναι τουλάχιστον 2,5 φορές υψηλότερη από αυτήν που αναφέρεται σε προγενέστερες μελέτες σχετικές με την ετερόλογη έκφραση γονιδίων υπεροξειδασών, όπου ως ξενιστές είχαν χρησιμοποιηθεί οι μικροοργανισμοί *Aspergillus nidulans* (Larrondo et al., 2001), *P. pastoris* (Gu et al., 2003, Jiang et al., 2008b) και *E. coli* (Bao et al., 2012). Συγκεκριμένα, η παραγωγή MnP του *P. chrysosporium* που εκφράστηκε σε *P. pastoris* έφτασε τα  $0,031 \text{ mg mL}^{-1}$  (Gu et al., 2003), ενώ σε μια μελέτη όπου ως ξενιστής χρησιμοποιήθηκε ο *Aspergillus nidulans* (Larrondo et al., 2001), η παραγωγή πρωτεΐνης που επιτεύχθηκε ήταν  $7 \text{ mg L}^{-1}$ .

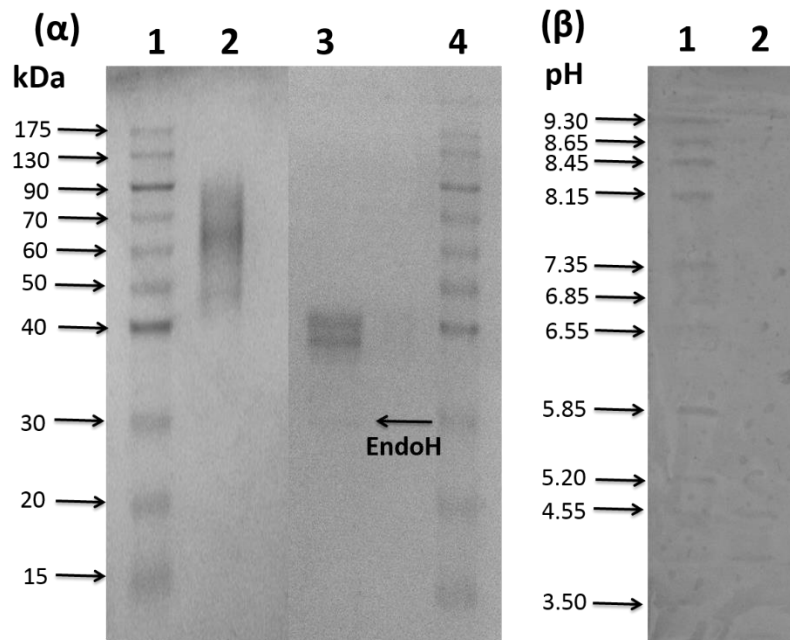
Η καθαρότητα του απομονωμένου ενζύμου ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.1.12.



**Εικόνα 3.3.1.12:** SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια του καθαρισμού της ετερόλογης πρωτεΐνης MtPerII. Σειρές 1 και 7: Μάρτυρες μοριακών βαρών, σειρά 2: συμπυκνωμένο υπερκείμενο της καλλιέργειας του μετασηματισμένου κλώνου *P. pastoris*, σειρά 3: Κλάσμα έκπλυσης της στήλης, σειρά 4: Έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα Talon®, σειρά 5: προσθήκη ιμιδαζολίου 5 mM, σειρά 6: καθαρή πρωτεΐνη MtPerII.



Η ετερόλογη πρωτεΐνη *MtPerII* μετά τον καθαρισμό εμφανίζεται σαν μια μεγάλη, θολή όμως ζώνη στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, η οποία αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος περίπου 65 kDa. Το μοριακό βάρος που βρέθηκε πειραματικά παρουσιάζει μεγάλη διαφορά από το θεωρητικά υπολογισμένο μοριακό βάρος των 38.5 kDa, συνυπολογίζοντας τα πρόσθετα 2.5 kDa του επίτοπου *myc* και της «ουράς» πολύ-ιστιδίνης. Η διαφορά μεταξύ του θεωρητικού και του πειραματικού μοριακού βάρους της πρωτεΐνης μπορεί να οφείλεται σε υπεργλυκοζυλίωση, φαινόμενο πολύ κοινό στις περισσότερες χαρακτηρισμένες υπεροξειδάσες. Άλλωστε, η ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας με τους αλγορίθμους NetNGlyc 1.0 και NetOGlyc 4.0, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.8, αποκάλυψε την ύπαρξη 3 *N*- και 9 *O*- θέσεων γλυκοζυλίωσης αντίστοιχα. Προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι προβλέψεις των αλγορίθμων, η ετερόλογη καθαρή πρωτεΐνη *MtPerII* επώαστηκε με ενδογλυκοζιδάση H (*endo H*) προκειμένου να απομακρυνθεί η *N*-γλυκοζυλίωση. Επιπλέον, η πρωτεΐνη αναλύθηκε και με IEF-PAGE προκειμένου να βρεθεί το ισοηλεκτρικό της σημείο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.1.13:** α) SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση της καθαρής πρωτεΐνης *MtPerII* (σειρά 2) και του μίγματος της πέψης με ενδογλυκοζιδάση H (σειρά 3). Σειρές 1,4: μάρτυρες μοριακών βαρών. β) IEF-PAGE ηλεκτροφόρηση της καθαρής πρωτεΐνης *MtPerII* (σειρά 2). Σειρά 1: Μάρτυρας ισοηλεκτρικών σημείων.

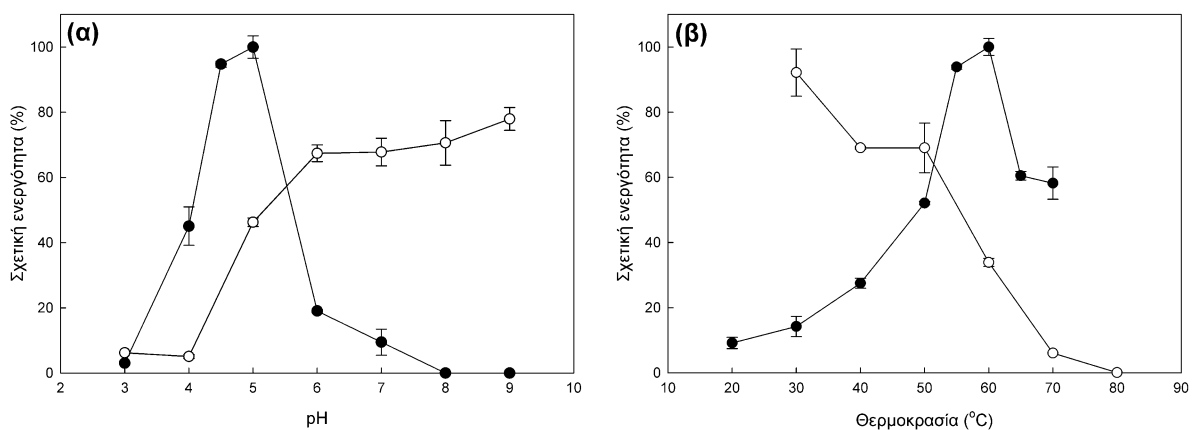
Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.3.1.13α, η καθαρή πρωτεΐνη *MtPerII* μετά την πέψη με ενδογλυκοζιδάση H εμφανίζεται σε πολύ χαμηλότερο μοριακό βάρος που αντιστοιχεί περίπου στα 40 kDa, δηλαδή αρκετά πιο κοντά στο θεωρητικό μοριακό της βάρος. Άρα φαίνεται ότι η θολή ζώνη που εμφανίστηκε στην αρχική ηλεκτροφόρηση, καθώς και το αυξημένο μοριακό βάρος της *MtPerII*, οφείλονται κατά κύριο λόγο στην προσθήκη μεγάλων σακχαρικών ομάδων στις θέσεις γλυκοζυλίωσης του ενζύμου. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την εργασία των Gu et al., (2003) με την MnP του *P. chrysosporium*, οι οποίοι έδειξαν ότι ο βαθμός και η έκταση της γλυκοζυλίωσης διαφέρει μεταξύ της φυσικής πρωτεΐνης και της ετερόλογης. Παρόμοια

αποτελέσματα επιτεύχθηκαν και από τους Larrondo et al., (2001) όπου η πέψη με ενδογλυκοζιδάση F οδήγησε σε μια φαινομενική μείωση του μοριακού βάρους. Άλλωστε, είναι γνωστό ότι οι ζύμες που χρησιμοποιούνται για μελέτες ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών, όπως η *P. pastoris* και η *S. cerevisiae*, γλυκοζυλιώνουν τις παραγόμενες πρωτεΐνες με πολύ διαφορετικό τρόπο από τους φυσικούς ξενιστές τους, κάτι που εξαρτάται από το μηχανισμό Golgi του κυττάρου. Η γλυκοζυλίωση μπορεί να διαφέρει ακόμα και ανάμεσα σε κύτταρα του ίδιου πληθυσμού (Daly et al., 2005), γεγονός που, σε συνδυασμό με τον αριθμό των προβλεπόμενων θέσεων γλυκοζυλίωσης για την *MtPerII*, μπορεί να εξηγήσει εν μέρει την εμφάνιση της θολής ζώνης που εμφανίστηκε στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

Στην Εικόνα 3.3.1.13β φαίνεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης IEF-PAGE για την καθαρή πρωτεΐνη. Η *MtPerII* εμφανίζεται σε δύο ζώνες εδώ, με ισοηλεκτρικά σημεία 4,5 και 4, δηλαδή κάπως χαμηλότερα από το προβλεπόμενο ισοηλεκτρικό σημείο, σε συμφωνία όμως με τις περισσότερες γνωστές λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες, οι οποίες διαθέτουν όξινα ισοηλεκτρικά σημεία (Vares et al., 1995). Ακόμη έχει αναφερθεί η έκφραση ενζύμων σε πάνω από μία ισομορφή και για άλλες υπεροξειδάσες που απομονώθηκαν από τους φυσικούς τους ξενιστές, όπως αναφέρουν οι de la Rubia et al., για την MnP του *Phlebia radiata* (de la Rubia et al., 2002).

### 3.3.1.7 Χαρακτηρισμός της ετερόλογης υπεροξειδάσης *MtPerII*

Μετά την απομόνωση της *MtPerII* ακολούθησε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου. Αρχικά επιχειρήθηκε η εύρεση του βέλτιστου pH και θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου, καθώς επίσης και η σταθερότητά του σε ένα εύρος τιμών θερμοκρασίας και pH. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.1.14:** Ενζυμική ενεργότητα και σταθερότητα της υπεροξειδάσης *MtPerII* σε διαφορετικά pH (α) και θερμοκρασίες (β). Μαύροι κύκλοι: Σχετική ενεργότητα επί της μέγιστης σε εύρος θερμοκρασιών και pH. Λευκοί κύκλοι: Σχετική υπολειπόμενη ενεργότητα της *MtPerII* μετά από επώαση 24 ωρών (α) ή 8 ωρών (β).

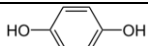
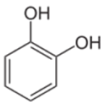
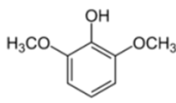
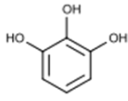
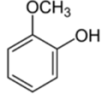
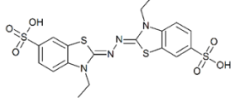
Από την παραπάνω εικόνα είναι προφανές ότι οι βέλτιστες συνθήκες για τη δράση της υπεροξειδάσης είναι οι τιμές pH 5 και θερμοκρασίας 60 °C. Επιπλέον, φαίνεται ότι το ένζυμο εμφανίζει αξιόλογο

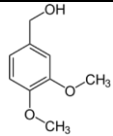
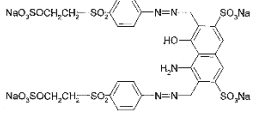
βαθμο θερμοσταθερότητας, καθώς διατηρεί το 70% της ενεργότητάς του μετά από επώαση 8 ωρών στους 50 °C. Τα χαρακτηριστικά αυτά συμβαδίζουν με τα περισσότερα ένζυμα που έχουν χαρακτηριστεί από τον *M. thermophila*, σε προηγούμενες ερευνητικές προσπάθειες (Karnaouri et al., 2014).

Η σημασία της θερμοσταθερότητας του ενζύμου αυτού γίνεται προφανής μέσω της σύγκρισης των χαρακτηριστικών της *MtPerII* με τις περισσότερες γνωστές και χαρακτηρισμένες λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες των βασιδιομυκήτων, οι οποίες στην πλειοψηφία τους εμφανίζουν μεσόφιλο χαρακτήρα (Nagasaki et al., 2008, Wang et al., 2002), ο οποίος δεν είναι ο επιθυμητός για βιοκαταλύτες εμπορικών διεργασιών. Για παράδειγμα, μια VP του βασιδιομύκητα *B. adusta* έδειξε να χάνει πλήρως την ενεργότητά της μετά από επώαση 20 λεπτών στους 65 °C (Wang et al., 2002). Οι υπεροξειδάσες του μύκητα *Ceriporiopsis sp.* αναφέρθηκε ότι διατηρούν πάνω από το 60% της ενεργότητάς τους στους 60 °C, αλλά η επώαση που πραγματοποιήθηκε στο πείραμα αυτό ήταν 10 λεπτά (Nagasaki et al., 2008). Σε προηγούμενες πειραματικές προσπάθειες, έχει επιχειρηθεί η βελτίωση της θερμοσταθερότητας τέτοιων ενζύμων με χρήση τεχνολογιών όπως η κατεθυνόμενη εξέλιξη (Garcia-Ruiz et al., 2012) ή η ακινητοποίηση (Mateo et al., 2007).

Στη συνέχεια, σε μια προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης του βιοκαταλυτικού δυναμικού της *MtPerII*, δοκιμάστηκε η ενεργότητα της υπεροξειδάσης σε ένα εύρος διαφορετικών υποστρωμάτων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

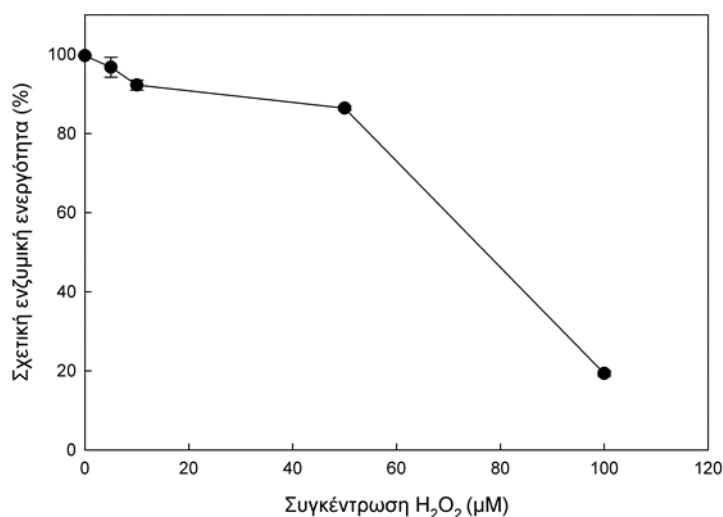
**Πίνακας 3.3.1.1:** Ειδική ενεργότητα της υπεροξειδάσης *MtPerII* σε διάφορα υποστρώματα. δ.α.: δεν ανιχνεύθηκε.

Υποστρώματα (2 mM)	Ειδική ενεργότητα (U mg <sup>-1</sup> )	Δομές υποστρωμάτων
Υδροκινόνη	4,13 ± 0,4	
Κατεχόλη	0,63 ± 0,09	
2,6 διμεθοξυφαινόλη	0,55 ± 0,09	
Πυρογαλλόλη	2,46 ± 0,01	
Γουαϊακόλη	0,49 ± 0,02	
ABTS	178,64 ± 0,51	
Mn <sup>2+</sup>	δ.α.	

Βερατρυλική αλκοόλη	δ.α.	
Reactive Black 5	δ.α.	

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η βέλτιστη ενεργότητα της υπεροξειδάσης εμφανίζεται έναντι του υποστρώματος ABTS, ωστόσο εμφανίζει επίσης και μια μικρότερη συγγένεια για μια ποικιλία φαινολικών υποστρωμάτων, όπως η 2,6 διμεθοξυφαινόλη, η κατεχόλη και η γουαϊακόλη. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε καμία ενεργότητα έναντι των υποστρωμάτων της βερατρυλικής αλκοολής, του  $Mn^{2+}$  ή του Reactive Black 5, το οποίο σημαίνει ότι η *MtPerII* δεν ανήκει σε καμία από τις κυριότερες ομάδες λιγνινολυτικών υπεροξειδασών, όπως οι LiP, MnP και VP. Αντιθέτως, τα βιοκαταλυτικά χαρακτηριστικά της *MtPerII* είναι παρόμοια με των γενικών υπεροξειδασών (generic peroxidases, GP), όπως η GP 112162 του *Ceriporiopsis subvermispota* (Fernandez-Fueyo et al., 2012), ή η υπεροξειδάση CiP του *Coprinus cinereus* (Abelskov et al., 1997). Αυτό το ένζυμο λοιπόν είναι το πρώτο του είδους του το οποίο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από το μύκητα *M. thermophila*.

Σε μια προσπάθεια διερεύνησης του βιοκαταλυτικού δυναμικού της *MtPerII* σχετικά με βιομηχανικές εφαρμογές, επιχειρήθηκε επίσης η διαλεύκανση της σταθερότητας της υπεροξειδάσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$ . Το ένζυμο επώαστηκε με  $H_2O_2$  σε περίσσεια 500 (5  $\mu M$ ), 1000 (10  $\mu M$ ), 5000 (50  $\mu M$ ) και 10000 (100  $\mu M$ ) φορές. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.1.15:** Σχετική ενζυμική ενεργότητα της *MtPerII* μετά από επώαση 24 ωρών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$ .

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, το ένζυμο παραμένει σταθερό μετά από επώαση 24 ωρών σε συγκεντρώσεις  $H_2O_2$  έως και 5000 φορές μεγαλύτερες, διατηρώντας το 86% της ενεργότητάς του. Ωστόσο, η ενεργότητα πέφτει κάτω από 20% με επώαση του ενζύμου με 10000 φορές περισσότερο

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού, η *MtPerII* εμφανίζει μια αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα έναντι του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Παρόμοιες μελέτες αναφέρουν ότι οι χρόνοι ημιζωής των υπεροξειδίων παρουσία περίσσειας H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> κυμαίνονται σε εύρος μερικών λεπτών (Bao et al., 2012, Garcia-Ruiz et al., 2012, Linde et al., 2014), έως και μιας ώρας, ακόμη και μετά από προσπάθειες βελτίωσης του χαρακτηριστικού αυτού με τεχνολογίες κατευθυνόμενης εξέλιξης. Στην προκειμένη περίπτωση, η ανθεκτικότητα της *MtPerII* σε πολύ υψηλή περίσσεια H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα για έναν πιθανό βιομηχανικό βιοκαταλύτη, αφού μπορεί εν δυνάμει να μειώσει κατά πολύ τα κόστη μιας εμπορικής διεργασίας, μειώνοντας το κόστος του βιοκαταλύτη.

Τα κινητικά χαρακτηριστικά της υπεροξειδάσης υπολογίστηκαν για τα υποστρώματα ABTS και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

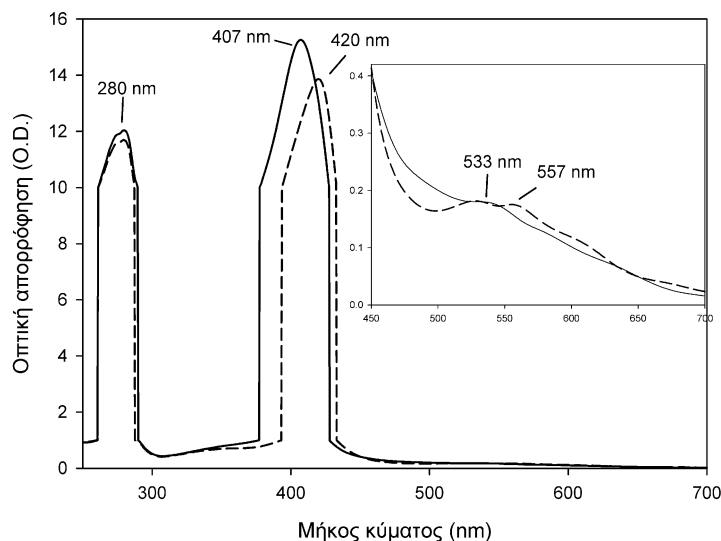
**Πίνακας 3.3.1.2:** Κινητικές σταθερές του ενζύμου *MtPerII*. Οι κινητικές σταθερές προσδιορίστηκαν στους 60 °C για το ABTS με προσθήκη σταθερής συγκέντρωσης 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ενώ για το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με σταθερή συγκέντρωση ABTS 2 mM.

Υποστρώματα	$K_m$ (μM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mM min <sup>-1</sup> )	$k_i$ (μM)
ABTS (υψηλής συγγένειας)	464,2 ± 32	186,2 ± 3,5	401,2 ± 28,7	-
ABTS (χαμηλής συγγένειας)	12509 ± 2054	509,1 ± 46,0	40,7 ± 7,6	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	26,07 ± 6,5	168,7 ± 13,8	6470,1 ± 1695,8	121 ± 2,9

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.3.1.2, η οξειδωση του υποστρώματος ABTS ακολουθεί διπλή σιγμοειδή καμπύλη, επιτρέποντας τον προσδιορισμό δύο διαφορετικών σετ κινητικών παραμέτρων. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το υπόστρωμα αυτό μπορεί επίσης να οξειδωθεί σε ένα δεύτερο σημείο του ενζύμου, εκτός του ενεργού κέντρου, όπως έχει αναφερθεί και για άλλες λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες, κυρίως γενικές υπεροξειδάσες και VP (Heinfling et al., 1998b, Fernandez-Fueyo et al., 2012, 2014a). Σε γενικές γραμμές, οι κινητικές παράμετροι σταθερής κατάστασης και για τα δύο υποστρώματα της *MtPerII* φαίνονται υψηλότερες σε σχέση με τις γνωστές λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες από βασιδιομύκητες (Nagasaki et al., 2008, Moreira et al., 2006). Οι τιμές  $K_m$  για την *MtPerII* που προσδιορίστηκαν στην παρούσα διατριβή είναι παρόμοιες με την VP VPL2 του *Pleurotus eryngii* (0,54 mM για το ABTS και 0,051 mM για το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Garcia-Ruiz et al., 2012), την DyP φυσικού τύπου του *Auricularia auricula-judae* (283 μM για το ABTS, Linde et al., 2014) και την VP (BadVP) του *Bjerkandera adusta* (17 μM για το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Liers et al., 2013), και άλλες. Σχετικά με την καταλυτική αποτελεσματικότητά της, η *MtPerII* εμφανίζει μια τιμή  $k_{cat}/K_m$  και για τα δύο υποστρώματα (401,2 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> και 6470,1 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> για το ABTS και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αντίστοιχα), συγκρίσιμες με τα προαναφερθέντα ένζυμα, όπως η VPL2 του *P. eryngii* (410 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> για το ABTS και 2650 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> για το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Garcia-Ruiz et al., 2012), η DyP του *A. auricula-judae* (2300 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> για το ABTS, Linde et al., 2014), η BadVP

του *B. adusta* ( $3,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$  για το  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Liers et al., 2013) και η υπεροξειδάση του *Coprinopsis cinerea* CiP ( $1,6 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$ , Liers et al., 2013).

Τέλος, προσδιορίστηκαν τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της ετερόλογης *MtPerII*, με λήψη φάσματος απορρόφησης στο UV/Vis. Τα αποτελέσματα πριν και μετά την προσθήκη υψηλής περιόσεως  $\text{H}_2\text{O}_2$  φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.1.16:** Φάσμα UV/Vis της *MtPerII*. Συμπαγής γραμμή: Καθαρή *MtPerII* σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris – HCl pH 8, διακεκομμένη γραμμή: καθαρή *MtPerII* μετά την προσθήκη περιόσεως  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

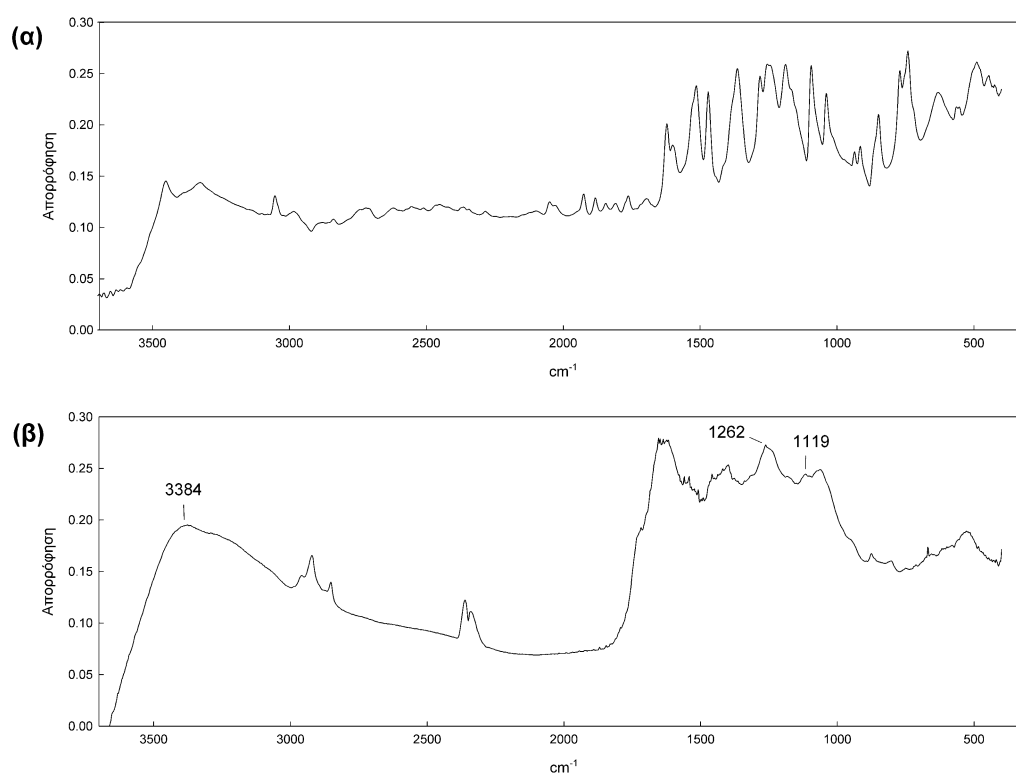
Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, η καθαρή πρωτεΐνη εμφανίζει μια ζώνη Soret στα 407 nm, ενδεικτική του περιβάλλοντος της αίμης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, και ακόμα μια ευρεία κορυφή στα 533 nm. Η τιμή  $A_{407}/A_{280}$  (RZ) του ενζύμου βρέθηκε ότι είναι 1,27. Η προσθήκη περιόσεως  $\text{H}_2\text{O}_2$  φαίνεται να οδηγεί σε μια μετατόπιση της ζώνης Soret από τα 407 nm στα 420 nm, και στην εμφάνιση μιας επιπλέον κορυφής στα 557 nm. Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του ενζύμου σε γενικές γραμμές μοιάζουν αρκετά με αυτά των υπεροξειδασών από βασιδιομύκητες. Η εμφάνιση της κορυφής στα 407 nm και η μετατόπισή της στα 420 nm μετά από προσθήκη περιόσεως  $\text{H}_2\text{O}_2$  είναι χαρακτηριστικά που έχουν αναφερθεί σε προγενέστερες μελέτες και για άλλες υπεροξειδάσες αίμης από βασιδιομύκητες (Linde et al., 2014, Roberts et al., 2011).

### 3.3.1.8 Οξειδωτικός πολυμερισμός της κατεχόλης με χρήση της *MtPerII*

Όπως προέκυψε και από τα παραπάνω αποτελέσματα, η *MtPerII* φαίνεται να είναι μια πρωτεΐνη με πολλά χαρακτηριστικά βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος, σημαντικότερα από τα οποία είναι η θερμοανθεκτικότητά της και η εξαιρετικά υψηλή ανθεκτικότητά της σε υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου. Με τα δεδομένα αυτά, επιχειρήθηκε η εφαρμογή του ενζύμου στη σύνθεση προϊόντων βιοτεχνολογικής αξίας. Πιο συγκεκριμένα, οι υπεροξειδάσες, κατά την οξείδωση των φαινολών, παράγουν φαινοξυ- ρίζες οι οποίες μπορούν να συμμετέχουν σε περαιτέρω μη- ενζυμικές

αντιδράσεις, όπως ο διμερισμός ή και ο ολιγομερισμός. Η ιδιότητά τους αυτή έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την περιβαλλοντικά φιλική παραγωγή φαινολικών πολυμερών, τα οποία λόγω των φασματοσκοπικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων τους θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν καινοτόμα υλικά για την κατασκευή βιοαισθητήρων, ηλεκτρονικών υλικών, επαναφορτιζόμενων μπαταριών, θερμοάντοχων υλικών κ.α. (Ward et al., 2004). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιχειρήθηκε η οξειδωση της κατεχολης προς σχηματισμό πολυμερών προϊόντων της.

Ο οξειδωτικός πολυμερισμός της κατεχολης μέσω της *MtPerII* πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.6. Μετά από αντίδραση 24 ωρών το ίζημα που είχε σχηματιστεί απομονώθηκε με διήθηση, εκπλύθηκε με υπερκάθαρο νερό και ξηράνθηκε με λυοφιλίωση, ενώ στις αντιδράσεις ελέγχου δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή. Το προϊόν ήταν μια λεπτή σκόνη σκούρου καφέ χρώματος, η οποία στη συνέχεια αναλύθηκε με φασματοσκοπία FT-IR, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.7.2. Τα φάσματα που προέκυψαν φαίνονται στην Εικόνα 3.3.1.17.

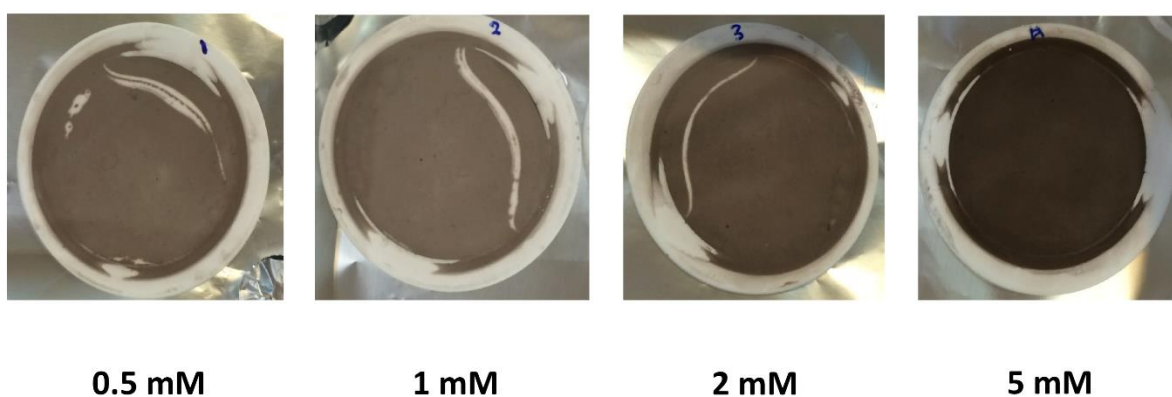


**Εικόνα 3.3.1.17:** Φάσματα FT-IR α) του μονομερούς της κατεχολης και β) της πολυκατεχολης που συντέθηκε ενζυμικά με την *MtPerII*. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε κυματιριθμούς χαρακτηριστικών χημικών ομάδων.

Η ευρεία κορυφή που φαίνεται στα 3384 cm<sup>-1</sup> στην Εικόνα 3.3.1.17β αντιπροσωπεύει τους φαινολικούς δεσμούς O-H της κατεχολης. Οι κορυφές που εμφανίζονται στο εύρος 1400-1600 cm<sup>-1</sup> αντιστοιχούν στην δόνηση των δεσμών C=C του αρωματικού δακτυλίου. Η παρουσία του φαινυλαιθερικού δεσμού υποδηλώνεται από τις κορυφές στα 1262 cm<sup>-1</sup> και 1119 cm<sup>-1</sup> (Dubey et al., 1998). Η παρουσία πολύ λιγότερων κορυφών στο φάσμα της πολυκατεχολης σε σύγκριση με το φάσμα του

μονομερούς της κατεχόλης υποδεικνύει ότι το προϊόν που παράχθηκε ήταν πολύ πιο άκαμπτο από το αρχικό υπόστρωμα (Aktas et al., 2003), και άρα αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη για το σχηματισμό κάποιου πολυμερούς μορίου. Ωστόσο, η ευρεία κορυφή στα  $3384\text{ cm}^{-1}$  υποδηλώνει ότι πολλές ομάδες  $\text{-OH}$  της κατεχόλης είναι ακόμα ελεύθερες και άρα διαθέσιμες προς σχηματισμό και άλλων αιθερικών δεσμών, κάτι που θα μπορούσε να οδηγήσει στην επέκταση του πολυμερούς (Aktas et al., 2003).

Προκειμένου να εξεταστεί η υπεροχή της *MtPerII* στον πολυμερισμό της κατεχόλης, σε ότι αφορά την ανθεκτικότητα σε  $\text{H}_2\text{O}_2$ , οι αντιδράσεις πολυμερισμού επαναλήφθηκαν με προσθήκη μιας ποσότητας  $\text{H}_2\text{O}_2$  στην αρχή της αντίδρασης μόνο. Με το πέρας της αντίδρασης το μίγμα διηθήθηκε με φίλτρο διαμέτρου πόρων  $0,2\ \mu\text{m}$  και το προϊόν που συγκρατήθηκε από το φίλτρο εκπλύθηκε με απιονισμένο νερό και λυοφιλιώθηκε, προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως η υγρασία. Το αποτέλεσμα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.1.18:** Προϊόντα της αντίδρασης πολυμερισμού της κατεχόλης από την *MtPerII* με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις  $\text{H}_2\text{O}_2$ , όπως σημειώνονται.

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, το χρώμα του προϊόντος δείχνει όλο και πιο σκούρο με αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $\text{H}_2\text{O}_2$ , γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανότατα η ποσότητα του προϊόντος αυξάνεται με αυξανόμενη συγκέντρωση  $\text{H}_2\text{O}_2$ , έως και  $5\text{ mM}$ . Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι στην περίπτωση της *MtPerII*, μπορεί να εξαλειφθεί, τουλάχιστον εν μέρει, η ανάγκη για σταδιακή προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$ , αφού συγκεντρώσεις έως και  $5\text{ mM}$  δεν φαίνονται να επηρεάζουν τη σταθερότητά της, το οποίο αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.



### 3.3.2 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός της λακκάσης *MtLac2*. Εφαρμογή του ενζύμου στη βιομετατροπή φλαβονοειδών.

---

#### 3.3.2.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

---

Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 3.3.1, ο ασκομύκητας *M. thermophila* είναι μια σημαντική πηγή θερμόφιλων ενζύμων αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, ενώ η δημοσίευση της αλληλουχίας του γονιδιώματός του προσφέρει ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη και ανάλυση του πολύτιμου ενζυμικού του οπλοστασίου. Εκτός από την πρωτεΐνη *MtPerII*, από τα δεδομένα του μεταγραφώματος του μικροοργανισμού εντοπίστηκε και ένα ακόμη γονίδιο ενδιαφέροντος που πιθανώς εμπλέκεται στην οξειδωτική αποικοδόμηση φαινολικών υποστρωμάτων, το οποίο επίσης φαίνεται να υπερεκφράζεται κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε αγροτικά παραπροϊόντα. Το γονίδιο αυτό αντιστοιχεί στο Model ID 2063133 (accession no. XM\_001226707), το οποίο εμφανίζει ομοιότητα με γνωστές λακκάσες και οξειδάσες του ασκορβικού οξέος. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων LccED (Sirim et al., 2011) η υποθετική πρωτεΐνη κατατάσσεται στην Υπεροικογένεια 6 των πολυφαινολικών οξειδασών, όπου κατατάσσονται κυρίως οι αλκοολικές οξειδάσες των μυκήτων και των φυτών, και συγκεκριμένα στην οικογένεια HFAM20, στην οποία περιλαμβάνονται κυρίως οξειδάσες του L-ασκορβικού οξέος και λακκάσες. Η αλληλουχία της υποθετικής πρωτεΐνης εμφανίζει χαμηλή ομοιότητα με διάφορες γνωστές πολυφαινολικές οξειδάσες, γεγονός που αποτελεί μια ένδειξη για πιθανώς καινοτόμα βιοχημική δράση. Η υποθετική πρωτεΐνη *MtLac2* όπως ονομάστηκε, εμφανίζει 28% ομοιότητα με την οξειδάση του ασκορβικού του κολοκυθιού (*Cucurbita pepo*, accession no. P37064, Messerschmidt et al., 1992), 29% ομοιότητα με τη λακκάση-2 (LCC2) του ασκομύκητα *Rhizoctonia solani* (accession no. Q02075, Wahleithner et al., 1996), 31% ομοιότητα με την MnP (PEM2) του βασιδιομύκητα *Phlebia radiata* (accession no. Q70LM3, Hilden et al. 2005) και 31% με την υπεροξειδάση PER του βασιδιομύκητα *Coprinopsis cinerea* (accession no. P28314, Baunsgaard et al. 1993). Με τα δεδομένα αυτά, η υποθετική πρωτεΐνη επιλέχθηκε ως μια υποψήφια πολυφαινολική οξειδάση και το αντίστοιχο γονίδιο, το οποίο ονομάστηκε *lac*, κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε στη ζύμη *P. pastoris* με στόχο την απομόνωση και το βιοχημικό χαρακτηρισμό του.

ATGTTACTTTGAAACTATCTATTCTGCTTGCCTTGCCTGCTGCTGATGCCGGAACCTTTGTCCATGATGAACAGTTCCATCCCGGAC  
 CATATTCAGGGTATCCGTTGCCAGGTGCCCTCGGCTTGCAGAACCGGGAAGACGTTGTCGTAACGGGACCTCACCGGGGCTGCCAT  
 ACACCTTCTCCTGGCGTAGGACTTGGATCCGCTGTCTACAATGACATGAATGACCGGAACTTAGCATGTTGAGTAGAGCAGCGCTTCTGTAC  
 TCATGGAATGCACGGGCACTGATGAGACTCGCAGCATTGGCACGGCCTTTCTCAGCGATTGCCCCGTTCTCCGACGGGACACCATCCGCAAC  
 GCAATGGCCATACCGCCCGGGCACTTCTCGACTACGAAATCTGACCGAACGAGAAGACGAGGGACATACTTACCATTCACACGTGGG  
 CATGCAGGCGTGAAGTGCACCGGGCCCTTGTATCGTGGAGGACTGTGGATCATCACCGTACCCTACGACGACGAGCGAATACTGATTCCA  
 AGACCATTCCAGAAGAGCGATCTCGAAATGATTCAAGGCTGACGTCACGCGATTACGTTGACGGCGGAGACACGGGGTATCTACTGA  
 ACGGACGGGGCTCTCGCCGAACCAAGCAGCGCTCAGGGCCGACCGGCGAAGCCAGCGGCTTCTTTGGAAGCCACCGTTTCTCAAATTT  
 CCGCGGGGTGATGGCACCTCCAACCTCTGGGATGGGATACGTTGGCGATGATCAGATCGAACCTCCAACCTGACTGCACTCTCCGGTCACTGA  
 TGTGAGCCGGGCAAGACTTACCGGCTCCGCTTATTGGTGCCACAGGCTGTCCCTTTGACGATGGTTTCGAGGATCACAACGATCTCAC  
 TATTGTTAGGTCGACGGCAGCGAGTACAATGCGCCGTAACGGTTGACCATATCCAGCTCGGCGGAGGTCAACGTTTCGACGTTCTCTCCG  
 CACCAAGACGGCCGAGGAGCTCAGATGCAACGGGACAAGACCACCTATTCTCTGCAATTTGAAACCGCGATCGTCCCGATCCCTACCGCG  
 GCTATGGCGTCTACGGTATAATCTCGGCACTCCGGTCCCGCCGCCCCACGACTCCGCGCTCACTCTCCCGCCGAAGTCAACAACCTGGC  
 TGAATACACTTCCAGCCACTTCACTCTCGAGCAGCTTGTCTCCACGGCCGAAGAGGTCACCCGCGCGTCACTTCTGAAGCCGAGCAA  
 AGATCGACCCTGCAACCGGTCGCTTGTCTGGAAGCTCGCGCATGACCTGGACTGACATGTCACGCGACAAGCCGGTGTAGTCGACATAT  
 ACGAGCGGGGAGGCCCGCATGCCGGACTATGCCGCGCGCTGACCAACTACGGCTGGGATCCGGCAACGAAGCTGTTCCCGCGGAAGA  
 AAGACGAGGTGCTCGAGATTGTATCCAGAACACGGGATCGCATACAGCGGTGCCAGCGCATGTCGAGACGACCCCTCCACGCCAC  
 GGTCAGCACTTCTACGATGTTGGCAGTGGGCCCGGCAAGTACGATCCGAGGCCAATAACGCCAAGCTGGCGAGCTTTGGGATACCGGCCAAT  
 CAAGCGGGACAGCAATGGTGTACCGGTACGGCGAAGGCAAGGTGGCGCCGCGAGCCGGCCGGTGGAGGGCGTGGAGGATGAAG  
 ATGAACAATCTGGCGTGTGGATGGTGCATGTCACATTCTGGCACACATGATCATGGTTGAGTATATTAACCTGATGCTCATTGCGTAGCTT  
 GTGCTTTGCCGGATGGCATTGCTGACATGAGGCTGTGTTCTCAGGCATGGAAACGATCTGGGTGGTTCGGAGACGCCGAGGACATGTCACA  
 ATTCCGTTGTCTGTGAGCCAGAATACTTACATACGGCGGCGAGCTTACGGAATGATACACACGCCCCAGAGGTTTATCACTATTTCGACG  
 ACACGAACAATGTTGTGCCGCGGGGCGGGGATAGTGAGGATCCGGTCACTAA

**Εικόνα 3.3.2.1:** Το γονίδιο 2063133 όπως απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *M. thermophila*. Με γκρι χρώμα σημειώνονται τα εσώνια που διακόπτουν την αλληλουχία. Οι υπογραμμισμένες ακολουθίες αντιστοιχούν στα σημεία του γονιδίου για τα οποία σχεδιάστηκαν οι συμπληρωματικοί εκκλητήρες.

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, το γονίδιο αποτελείται από 2093 ζεύγη βάσεων. Η αλληλουχία διακόπτεται από 2 εσώνια μεγέθους 58 και 82 ζευγών βάσεων. Η ώριμη πρωτεϊνική αλληλουχία, μετά την αφαίρεση του πεπτιδίου έκκρισης, αποτελείται από 629 αμινοξέα, τα οποία αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος 69790,86 Da σύμφωνα με την πρόβλεψη του αλγορίθμου Compute MW/ρΙ του ExprASy server. Με τον ίδιο αλγόριθμο υπολογίστηκε και το θεωρητικό ρΙ της πρωτεΐνης 5,15.

MLLSKLSILLAKWLSVAVYAGTLVHDEQFIPDHILRVSAQVPSACENRED  
 VVVNGTSPGPAIHLLPGARTWIRVYNDMNDRLNSMHWHLGSRFPF  
 SDGTPSATQWPIPPGHFFDYEILTEPEDAGTYFYHSHVGMQALSCTGPLI  
 VEDCGSSPYHYDDERILLFQDFHFKSDLEMIQGLTSTQFTWTGETRGILL  
 NGRGVSPNQAAVQGRPEASGFFGSHRFSNFRAGDGTSNSWDGIRGD  
 DQIEPPTDCTLPVIDVEPGKTYRLRFIGATGLSLLTMGFEDHNDLTIVQVD  
 GSEYNAPVTVDHIQLGGGQRFVLLRTKTAELRCNGDKTTYFLQFETR  
 DRPDPYRGYGVRLRYNLGTPVPAAPTTPALTLPAEVNNWLEYTFQPLHPSS  
 SLSPTAEVTRRVILEAEQKIDPATGRLVWKLAMHTWTDMSRDKPVLVDI  
 YERGEAAMPDYAAALTNYGWDPATKLFPAKKDEVLEIVIQTGSHYSGAS  
 GIVETHPFHAHQHFYDVGSGPGKYDPEANNAKLASLGYRPIKRDITM  
 VYRYGEGKVAPGEPAGWRAWRMKMNPNPVGWVMVHCHILAHMIMG  
 METIWWVGDAAEDIVTIPLSVSQNYFTYGGSVYGNDDTHAPEVYHYFDDTN  
 KCCAAGAGDSEDSGH

**Εικόνα 3.3.2.2:** Πρωτεϊνική αλληλουχία του γονιδίου 2063133. Με πορτοκαλί χρώμα σημειώνεται η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο πεπτίδιο έκκρισης, όπως αυτό προβλέφθηκε από τον αλγόριθμο SignalP. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται τα αμινοξέα που φέρουν N-γλυκοζυλίωση (1), σύμφωνα με την πρόβλεψη του αλγορίθμου NetNGlyc. Με μπλε χρώμα σημειώνονται οι θέσεις O- γλυκοζυλίωσης (8), όπως προβλέφθηκαν από τον αλγόριθμο NetOGlyc.

### 3.3.2.2 Απομόνωση γονιδίου *MtLac2* από το γονιδίωμα του *M. thermophila*

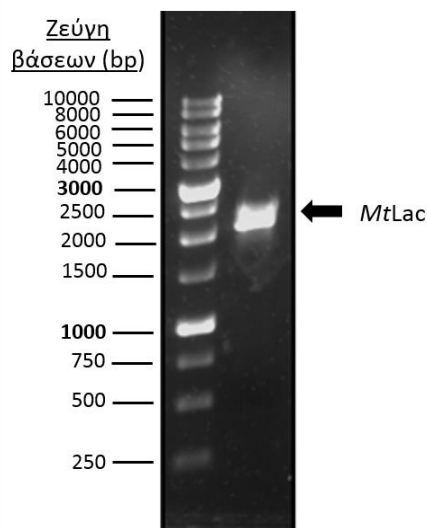
Το γονίδιο 2063133 απομονώθηκε από γονιδιακό DNA του *M. thermophila* με PCR με χρήση των κατάλληλων εκκινητών *MtLac2*-F και *MtLac2*-R:

Forward: 5'- GCGAATTCGGAACCTCTTGCCATGATGAACAG-3'

Reverse: 5'- GCTCTAGATGACCGGAATCCTCACTATCC-3'

Όπου σημειώνονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *EcoRI* και *XbaI* αντίστοιχα, οι οποίες προστέθηκαν προκειμένου να διευκολυνθεί η περαιτέρω κλωνοποίηση του γονιδίου στους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς. Οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο		
Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 2 min	
Αποδιάταξη DNA-στόχου (denaturation)	95 °C για 20 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing)	50 °C για 10 sec	
Επέκταση εκκινητών (extension)	68 °C για 40 sec	
Τελική επέκταση και επιδιόρθωση	68 °C για 1 min	



**Εικόνα 3.3.2.3:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR με μήτρα το απομονωμένο DNA του *M. thermophila*. Η ζώνη που αντιστοιχεί στο γονίδιο *MtLac2* κόπηκε και απομονώθηκε για περαιτέρω κλωνοποίηση στο pCR®Blunt.

Στη συνέχεια, η ζώνη που αντιστοιχεί στο γονίδιο *MtLac2* κόπηκε από το πήκτωμα και το DNA απομονώθηκε και καθαρίστηκε, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.4.4. Η αλληλουχία που απομονώθηκε ενσωματώθηκε στην περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης του πλασμιδίου pCR® Blunt

με τη βοήθεια της T4 λιγάσης, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.4.7. Ακολούθως, οι ανθεκτικοί σε αντιβιοτικό κλώνοι που αναπτύχθηκαν απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, και κατόπιν το πλασμιδιακό DNA τους απομονώθηκε και κόπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *XbaI*, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η σωστή ενσωμάτωση του ενθέματος.

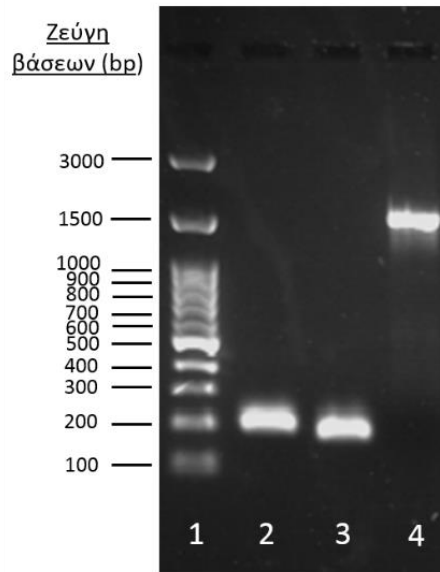
### 3.3.2.3 Απομόνωση των εξωνίων του γονιδίου *MtLac2*

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το γονίδιο *MtLac2* αποτελείται από τρία εξώνια 258, 1498 και 197 ζευγών βάσεων, τα οποία διακόπτονται από δύο εσώνια, 58 και 82 ζευγών βάσεων. Τα τρία εξώνια απομονώθηκαν σε τρεις ξεχωριστές αντιδράσεις PCR, το καθένα με το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών, το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο των οποίων περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο	Εξώνιο 1	Εξώνιο 2	Εξώνιο 3	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 2 min	95 °C για 2 min	95 °C για 2 min	
Αποδιάταξη DNA-στόχου (denaturation)	95 °C για 20 sec	95 °C για 20 sec	95 °C για 20 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing)	50 °C για 10 sec	50 °C για 10 sec	50 °C για 10 sec	
Επέκταση εκκινητών (extension)	68 °C για 10 sec	68 °C για 20 sec	68 °C για 10 sec	
Τελική επέκταση και επιδιόρθωση	68 °C για 2 min	68 °C για 2 min	68 °C για 2 min	

Για την απομόνωση του εξωνίου 1 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *MtLac2-F* (5'-GCGAATTCGGAACCTTGTCCATGATGAACAG -3') και *MtLac2-e1R* (5'-AAGGCCGTGCCAATGCATGCTAAGGTTCCG GTCATTC -3'), για την απομόνωση του εξωνίου 2 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *MtLac2-e2F* (5'-CATTGGCACGGCCTTTCTCAG -3') και *MtLac2-e2R* (5'-CAGATC GTTTCATGCCCATGATCATGTGTGCCAGAATGTG -3') και για την απομόνωση του εξωνίου 3 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *MtLac2-e3F* (5'-GCATGGAAA CGATCTGGGTGG -3') και *MtLac2-R* (5'-GCTCTAGATGACCGGAATCCTCACTATCC -3').

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

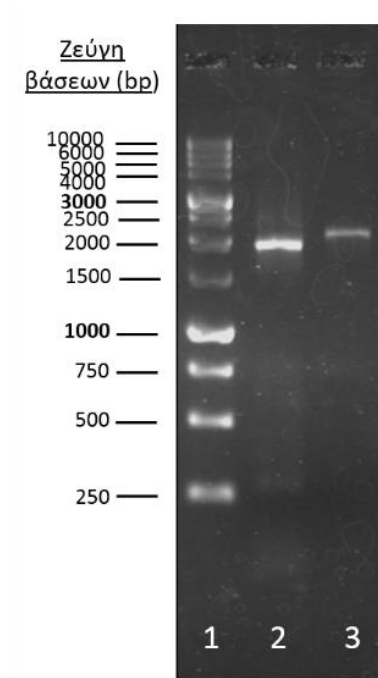


**Εικόνα 3.3.2.4:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την απομόνωση των εξωνίων του γονιδίου *MtLac2*. Σειρά 1: Μάρτυρας μοριακών βαρών, σειρά 2: Εξώνιο 1, 258 ζεύγη βάσεων, σειρά 3: Εξώνιο 3, 196 ζεύγη βάσεων, σειρά 4: Εξώνιο 2, 1498 ζεύγη βάσεων.

Ακολουθως, οι τρεις ζώνες που αντιστοιχούσαν στα τρία εξώνια κόπηκαν και το DNA απομονώθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.4.2. Τα εξώνια συνενώθηκαν για το σχηματισμό του «ώριμου» γονιδίου με μια αντίδραση OE-PCR με τους αρχικούς εκκινητές (*MtLac2-F* και *MtLac2-R*), ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

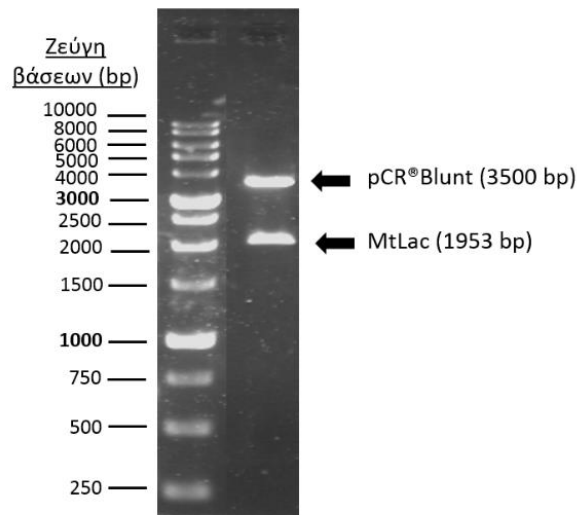
Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο		
Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 2 min	
Αποδιάταξη DNA-στόχου (denaturation)	95 °C για 20 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing)	50 °C για 10 sec	
Επέκταση εκκινητών (extension)	68 °C για 50 sec	
Τελική επέκταση και επιδιόρθωση	68 °C για 1 min	

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και το αποτέλεσμα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.2.5:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της OE-PCR για την «ωρίμανση» του γονιδίου *MtLac2*. Σειρά 1: Μάρτυρας μοριακών βαρών, σειρά 2: *MtLac2* μετά την OE-PCR, σειρά 3: αρχικό γονίδιο *MtLac2*.

Στην Εικόνα 3.3.2.5 φαίνεται η διαφορά του μεγέθους των γονιδίων *MtLac2* πριν και μετά την αφαίρεση των εσωνίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αφαίρεση των εσωνίων ήταν επιτυχής. Το «ώριμο» γονίδιο αναμένεται να έχει μέγεθος 1953 ζεύγη βάσεων ενώ το αρχικό γονίδιο είχε μέγεθος 2093 ζεύγη βάσεων, δηλαδή τα δύο μόρια διαφέρουν κατά 140 ζεύγη βάσεων, όπως φαίνεται και στην ηλεκτροφόρηση. Στη συνέχεια, η κατάλληλη ζώνη κόπηκε από το πήκτωμα, το DNA καθαρίστηκε και κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt προκειμένου να επιβεβαιωθεί η σωστή του αλληλουχία. Το αποτέλεσμα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.2.6:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της διπλής πέψης του πλασμιδίου pCR® Blunt με το γονίδιο MtLac2, με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *XbaI*.

#### 3.3.2.4 Κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης *ricZaA* και γραμμικοποίηση του ανασυνδυασμένου φορέα

---

Με το πέρας της διαδικασίας αυτής, το ώριμο πλέον γονίδιο *MtLac2* κόπηκε από τον φορέα pCR® Blunt με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *XbaI* και κλωνοποιήθηκε εκ νέου στον φορέα *ricZaA*, ανάμεσα στην αλληλουχία έκκρισης *a-factor* του *Saccharomyces cerevisiae* και της αλληλουχίας His-tag. Ο ανασυνδυασμένος φορέας πολλαπλασιάστηκε σε κύτταρα *E. coli*, απομονώθηκε και η ορθή ενσωμάτωση του γονιδίου επιβεβαιώθηκε με πέψη με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, ηλεκτροφόρηση του προϊόντος και αλληλούχιση.

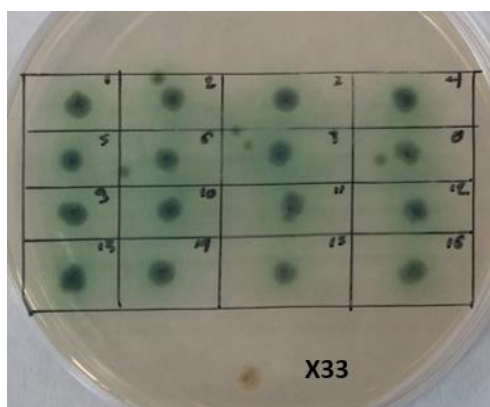
Ακολούθως, ο ανασυνδυασμένος φορέας γραμμικοποιήθηκε με το ένζυμο *PmeI* προκειμένου να διευκολυνθεί ο ανασυνδυασμός του στο γονιδίωμα της *P. pastoris*. Ο γραμμικοποιημένος φορέας χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*, με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.4.9.4. Οι ανθεκτικές στη ζεοσίνη αποικίες που προέκυψαν ανακαλλιεργήθηκαν εκ νέου σε τρυβλία με ζεοσίνη, και οι καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια για τις στερεές και υγρές καλλιέργειες που ακολούθησαν.

#### 3.3.2.5 Ανάλυση μετασχηματισμένων κλώνων *P. pastoris* και μελέτη έκφρασης της ετερόλογης MtLac2.

---

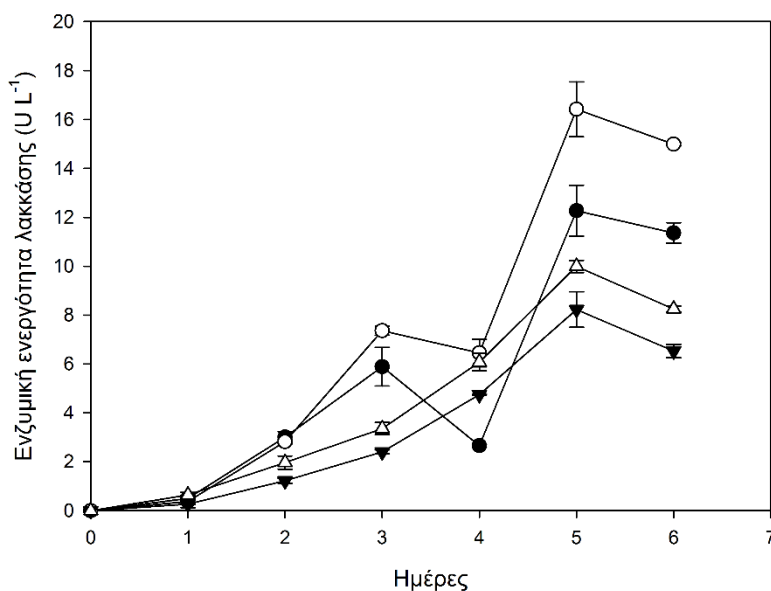
Οι κλώνοι *P. pastoris* που ήταν ανθεκτικοί σε ζεοσίνη απομονώθηκαν και ανακαλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο MM, με προσθήκη μεθανόλης και υποστρώματος ABTS, προκειμένου να ανιχνευθεί η ενεργότητα του παραγόμενου ενζύμου. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 4 ημέρες στους 30 °C, με καθημερινή προσθήκη 100 μL μεθανόλης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την παραγωγή

δακτυλίου πράσινου χρώματος γύρω από τις αναπτυσσόμενες αποικίες. Το αποτέλεσμα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.2.7:** Ανάπτυξη ανασυνδυασμένων κλώνων *P. pastoris* σε θρεπτικό μέσο MM με προσθήκη ABTS για ανίχνευση της ετερόλογης *MtLac2*. Δεξιά κάτω φαίνεται το αποτέλεσμα για το στέλεχος φυσικού τύπου X33.

Οι τέσσερις πρώτοι κλώνοι επιλέχθηκαν και αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες BMGY και ακολούθως BMMY 50 mL, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.5.1.1, προκειμένου να εξεταστεί επιπλέον η παραγωγή της ετερόλογης *MtLac2*. Το υπερκείμενο των καθημερινών δειγμάτων που λαμβάνονταν αναλύθηκε ως προς την ενεργότητα λακκάσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το ABTS. Τα αποτελέσματα ως προς την ενζυμική ενεργότητα λακκάσης για κάθε κλώνο φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

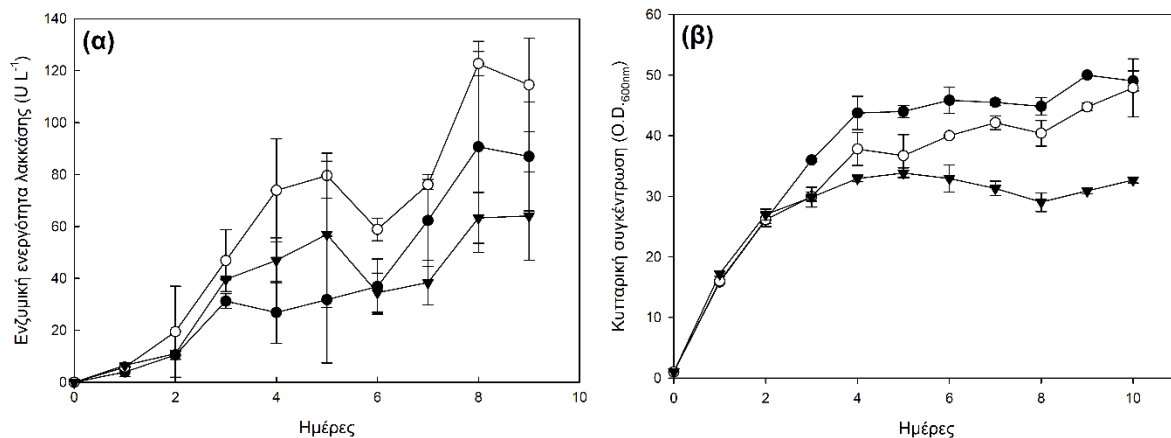


**Εικόνα 3.3.2.8:** Ενζυμική ενεργότητα λακκάσης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας για τους επιλεγμένους κλώνους. Μαύροι κύκλοι: κλώνος 1, λευκοί κύκλοι: κλώνος 2, μαύρα τρίγωνα: κλώνος 3, λευκά τρίγωνα: κλώνος 4.



Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.2.8 όλοι οι εξεταζόμενοι κλώνοι εμφάνισαν χαμηλή ενεργότητα λακκάσης, η οποία έλαβε τη μέγιστη τιμή της την 5<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας, σε όλες τις περιπτώσεις. Η μέγιστη παραγωγή λακκάσης παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες του κλώνου lac2, ( $16,4 \pm 1,1 \text{ U L}^{-1}$ ), οπότε ο κλώνος αυτός επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη.

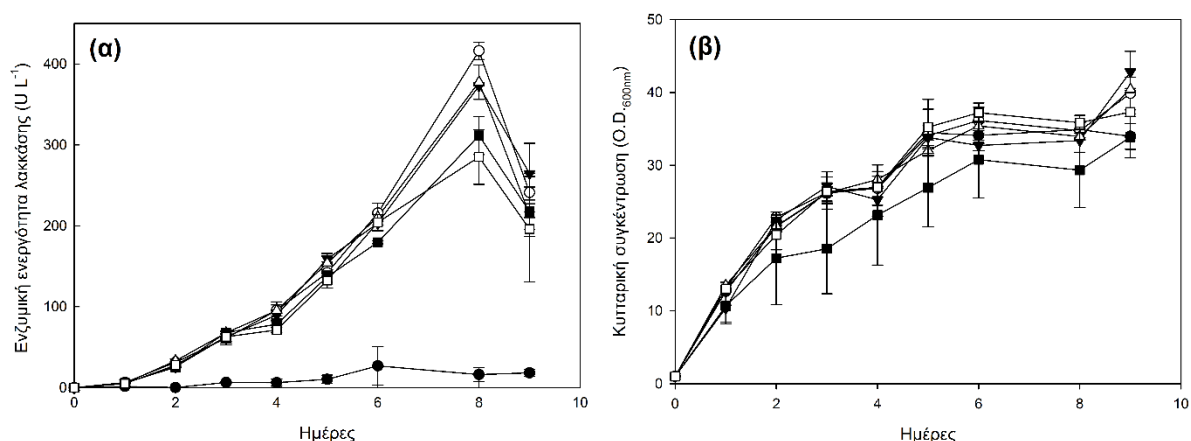
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων με σκοπό τη βελτιστοποίηση της παραγωγής της ετερόλογης *MtLac2* από το μετασηματισμένο κλώνο lac2, σε υγρές καλλιέργειες BMMY μικρού όγκου (50 mL). Σε όλες τις περιπτώσεις λαμβάνονταν καθημερινά δείγματα και το υπερκείμενο εξεταζόταν ως προς την ενζυμική ενεργότητα λακκάσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το ABTS. Η πρώτη παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η συγκέντρωση της προστιθέμενης μεθανόλης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.2.9:** Επίδραση της προστιθέμενης συγκέντρωσης μεθανόλης στην παραγωγή ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης (α) και κυτταρικής συγκέντρωσης (β) από την ανασυνδυασμένη ζύμη *P. pastoris*. Μαύροι κύκλοι: 0,5% (v/v) μεθανόλη, λευκοί κύκλοι: 1% (v/v) μεθανόλη, μαύρα τρίγωνα: 1,5% (v/v) μεθανόλη.

Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι η βέλτιστη συγκέντρωση προστιθέμενης μεθανόλης είναι η 1% (v/v), καθώς σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκαν οι μέγιστες ενζυμικές ενεργότητες λακκάσης καθ'όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, οι οποίες κορυφώθηκαν την 8<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας ( $122,72 \pm 4,7 \text{ U L}^{-1}$ ). Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό, καθώς πολύ υψηλή συγκέντρωση μεθανόλης μπορεί να αποβεί τοξική για τα κύτταρα, όπως φαίνεται και από την ελαφρώς μειωμένη κυτταρική συγκέντρωση καθ'όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας στην περίπτωση όπου η συγκέντρωση της προστιθέμενης μεθανόλης ήταν 1,5 % (v/v), ενώ πολύ χαμηλή συγκέντρωση μεθανόλης μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή επαγωγή και έκφραση του ετερόλογου γονιδίου. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται και στη μελέτη των Li et al., (2014), όπου η βελτιστοποίηση της προστιθέμενης ποσότητας μεθανόλης οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης λακκάσης κατά 50% και πάνω, ενώ στη μελέτη των Hong et al., (2002) η συγκέντρωση της προστιθέμενης μεθανόλης φαίνεται να επηρεάζει την παραγωγή της ετερόλογης λακκάσης κατά 5 φορές.

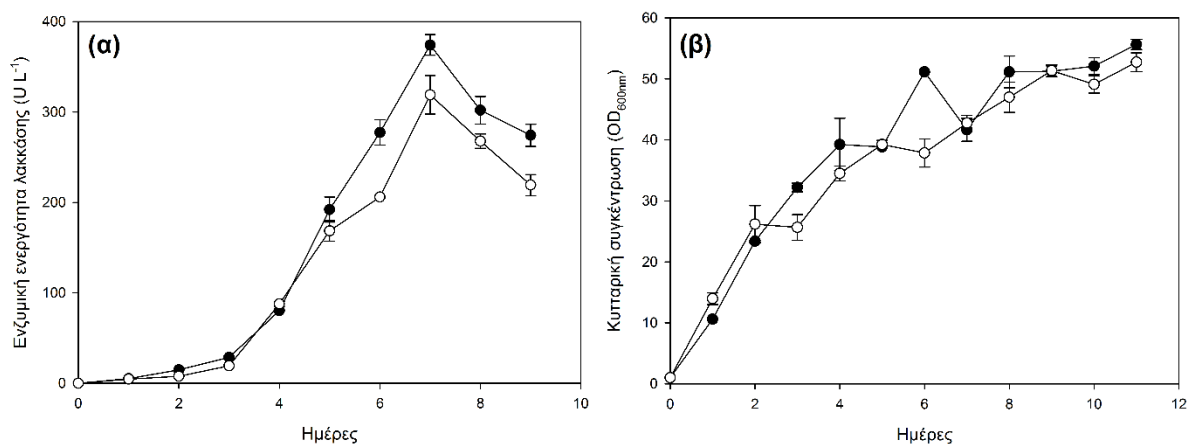
Η επόμενη παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η προσθήκη χαλκού στο θρεπτικό μέσο. Καθώς οι λακκάσες είναι γνωστό ότι περιέχουν άτομα χαλκού στο ενεργό τους κέντρο, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην κατάλυση, είναι πιθανό η έλλειψη του χαλκού από το θρεπτικό μέσο να αποτελεί έναν σημαντικό περιοριστικό παράγοντα στην παραγωγή του ετερόλογου ενζύμου. Η σημασία της προστιθέμενης συγκέντρωσης χαλκού στις καλλιέργειες με στόχο την παραγωγή λακκάσης είναι προφανής και από πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών (Garg et al., 2012, Huang et al., 2011, Halaburgi et al., 2011). Τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση του χαλκού στην παραγόμενη ενζυμική ενεργότητα λακκάσης φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.2.10:** Επίδραση της προστιθέμενης συγκέντρωσης χαλκού στην παραγωγή ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης (α) και κυτταρικής συγκέντρωσης (β) από την ανασυνδυασμένη ζύμη *P. pastoris*. Μαύροι κύκλοι: χωρίς προσθήκη χαλκού, λευκοί κύκλοι: 0,025 mM CuSO<sub>4</sub>, μαύρα τρίγωνα: 0,05 mM CuSO<sub>4</sub>, λευκά τρίγωνα: 0,1 mM CuSO<sub>4</sub>, μαύρα τετράγωνα: 0,15 mM CuSO<sub>4</sub>, λευκά τετράγωνα: 0,2 mM CuSO<sub>4</sub>.

Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι έστω και μικρή προσθήκη χαλκού στην καλλιέργεια αυξάνει κατά πολύ την παραγόμενη ετερόλογη λακκάση, καθώς η ενζυμική ενεργότητα εμφανίζεται κατά τουλάχιστον 7 φορές μεγαλύτερη, ενώ η κυτταρική ανάπτυξη δεν φαίνεται να επηρεάζεται ιδιαίτερα σε όλες τις συγκεντρώσεις χαλκού που δοκιμάστηκαν. Από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις χαλκού, η μικρότερη που δοκιμάστηκε (0,025 mM) φαίνεται να οδηγεί στη βέλτιστη ενζυμική ενεργότητα ( $416,2 \pm 10,7 \text{ U L}^{-1}$ ), η οποία σε όλες τις περιπτώσεις κορυφώνεται την 8<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας. Η ενζυμική ενεργότητα της ετερόλογης λακκάσης που επιτεύχθηκε εδώ είναι ανάλογη με προηγούμενες αναφορές, όπως για παράδειγμα στην εργασία των Garg et al., (2012) με την ετερόλογη έκφραση της λακκάσης του μύκητα *Cyathus bulleri* στην *P. pastoris*, όπου η προσθήκη της βέλτιστης συγκέντρωσης χαλκού οδήγησε σε αυξημένη ενεργότητα λακκάσης κατά 12 φορές.

Η τελευταία παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η θερμοκρασία επώασης των καλλιεργειών, καθώς, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 3.3.1, χαμηλότερη θερμοκρασία ανάπτυξης μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να οδηγήσει σε αυξημένη ενεργότητα των ετερόλογων ενζύμων (Macaulley-Patrick, et al., 2005). Στο πείραμα αυτό, εξετάστηκαν δύο θερμοκρασίες, 23 και 30 °C, και τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.2.11:** Ενζυμική ενεργότητα λακκάσης (α) και κυτταρική συγκέντρωση (β) κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες. Μαύροι κύκλοι: 23 °C, λευκοί κύκλοι: 30 °C.

Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι η μείωση της θερμοκρασίας επώασης των καλλιεργειών όντως οδηγεί σε υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα λακκάσης, αλλά σε μικρό μόνο βαθμό ( $374,2 \pm 11,4$  U L<sup>-1</sup> στους 23 °C συγκριτικά με  $319,06 \pm 21,3$  U L<sup>-1</sup> στους 30 °C), ενώ η κυτταρική ανάπτυξη δεν φαίνεται να επηρεάζεται. Σε αυτό το πείραμα, η ενζυμική ενεργότητα φαίνεται να κορυφώνεται την 7<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας, και για τις δύο θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν. Σε προγενέστερη μελέτη οι Hong et al., (2002) αναφέρουν αύξηση κατά 4 φορές της παραγόμενης λακκάσης Icc1 από τον *T. versicolor* στην *P. pastoris*, χαμηλώνοντας τη θερμοκρασία από τους 30 °C στους 20 °C. (Hong et al., 2002).

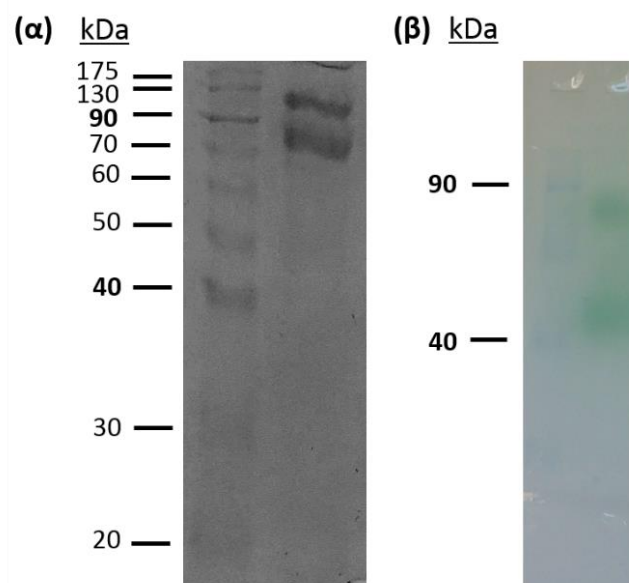
Σε γενικές γραμμές, μετά τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων των καλλιεργειών για την παραγωγή της ετερόλογης *MtLac2*, η υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα που παρατηρήθηκε ήταν  $416,2 \pm 10,7$  U L<sup>-1</sup>, σχετικά χαμηλότερη από τις αποδόσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, καθώς σε άλλες μελέτες ετερόλογης έκφρασης λακκασών στην *P. pastoris* οι διακυμάνσεις που αναφέρονται είναι αρκετά υψηλές. Οι αποδόσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία κυμαίνονται από 60,1 U L<sup>-1</sup> για την *Lac2* του *Coprinus comatus* (Gu et al., 2014) έως και πάνω από 1000 U L<sup>-1</sup>, όπως για παράδειγμα στη μελέτη των Garg et al., (2012), όπου αναφέρεται ως μέγιστη ενζυμική ενεργότητα τα 7200 U L<sup>-1</sup> για την ετερόλογη έκφραση της λακκάσης Icc του *Cyanthus bulleri* (Garg et al., 2012), των Colao et al., (2006) όπου αναφέρεται παραγωγή 2520 U L<sup>-1</sup> της Icc1 του *Trametes trogii* σε καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, αλλά μόνο 173 U L<sup>-1</sup> σε καλλιέργειες σε φιάλες, και τέλος η μελέτη των Soden et al., (2002) όπου αναφέρεται ενζυμική ενεργότητα 10.200 U L<sup>-1</sup> για την ετερόλογη έκφραση της *Lac4* του *Pleurotus sajor-caju*.

### 3.3.2.6 Παραγωγή και απομόνωση της ετερόλογης *MtLac2*

Μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών παραγωγής της ετερόλογης *MtLac2* ακολούθησαν καλλιέργειες μεγάλου όγκου (1 L) στις βέλτιστες συνθήκες που προαναφέρθηκαν (23 °C, 1% (v/v)

μεθανόλη, 0,025 mM CuSO<sub>4</sub>), για την απομόνωση και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης. Μετά από 7 ημέρες καλλιέργειας, οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.5.1.2. Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ακινητοποιημένου μετάλλου, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.5.1.3. Τελικά, η συγκέντρωση του καθαρού ενζύμου που παραλήφθηκε ήταν 0,566 mg mL<sup>-1</sup>. Η συγκέντρωση αυτή είναι παρόμοια με αυτήν που αναφέρεται στη βιβλιογραφία για τον καθαρισμό ετερόλογων λακκασών από την *P. pastoris*. Ενδεικτικά, οι Soden et al., (2002) αναφέρουν τελική συγκέντρωση 0,5 mg mL<sup>-1</sup> για τη λακκάση Lac4 του *Pleurotus sajor-caju*, ενώ οι Colao et al., (2006) αναφέρουν συγκέντρωση 0,14 mg mL<sup>-1</sup> για την καθαρή λακκάση lcc1 του *T. trogii*.

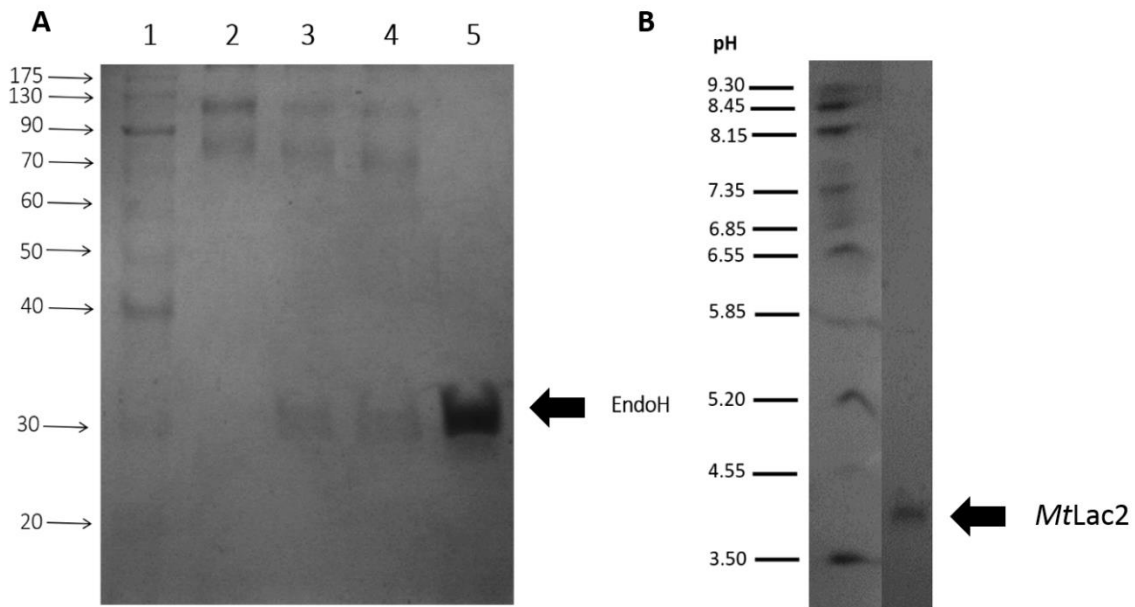
Η καθαρότητα του ενζύμου ελέγχθηκε με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.2.12:** (α) SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση της καθαρής *MtLac2*. (β) Native PAGE ηλεκτροφόρηση της καθαρής *MtLac2*. Η εμφάνιση των ζωνών πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση του πηκτώματος σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM φωσφορικών-κιτρικού pH 4, με 2 mM ABTS.

Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι η καθαρή *MtLac2* εμφανίζεται σε δύο ζώνες, με μοριακά βάρη 80 και 110 kDa, δηλαδή με μεγαλύτερα μοριακά βάρη από το θεωρητικά προβλεπόμενο μοριακό βάρος των 75 kDa. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι δύο αυτές ζώνες αφορούν την ίδια πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκε επίσης και ζυμογράφημα σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.3.2.12 β. Στην Εικόνα αυτή εμφανίζονται δύο ζώνες με διαφορετικά μοριακά βάρη, οι οποίες όμως εμφανίζουν και οι δύο ενεργότητα έναντι του υποστρώματος ABTS. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι όντως και οι δύο ζώνες που φαίνονται στην ηλεκτροφόρηση αφορούν την *MtLac2*, και πιθανόν η εικόνα αυτή, σε συνδυασμό με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος από το αναμενόμενο, να οφείλεται σε υπεργλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι ζύμες που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών, τείνουν να υπεργλυκοζυλιώνουν τα προϊόντα τους (Daly, 2005), και πιο συγκεκριμένα να οδηγούν σε ετερογενή γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την παραγωγή ισοενζύμων με

πολλά διαφορετικά μοριακά βάρη. Προκειμένου να ελεγχθεί η υπόθεση αυτή, πραγματοποιήθηκε πέψη της καθαρής *MtLac2* με ενδογλυκοζιδάση H, η οποία αφαιρεί την N- γλυκοζυλίωση, και τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF-PAGE), προκειμένου να βρεθεί το ισοηλεκτρικό σημείο της ετερόλογης *MtLac2*. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.2.13:** A) SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση της καθαρής *MtLac2* (σειρά 1), της καθαρής *MtLac2* μετά από πέψη με ενδογλυκοζιδάση H (EndoH, σειρές 3,4) και της ενδογλυκοζιδάσης H που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη (σειρά 5). Στη σειρά 1 φαίνεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών. B) IEF-PAGE ηλεκτροφόρηση της καθαρής πρωτεΐνης *MtLac2*.

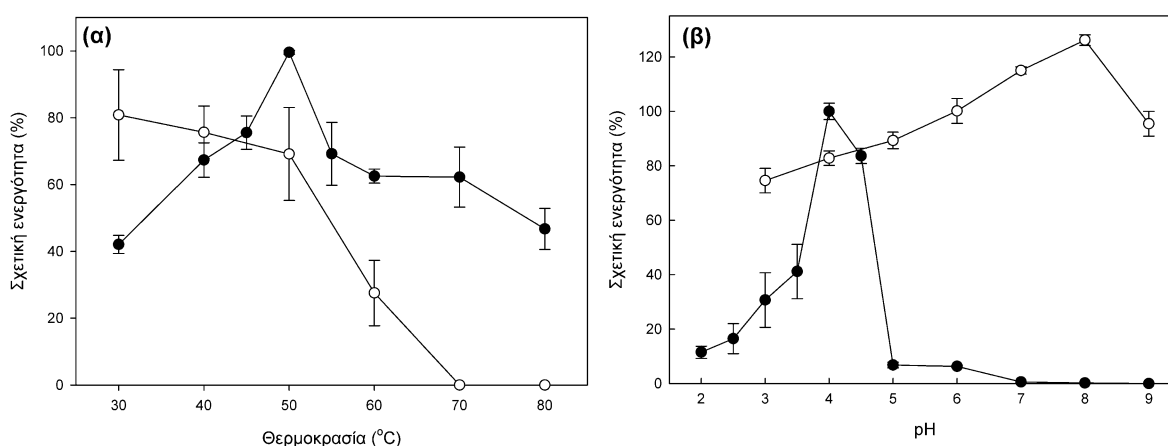
Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, το μοριακό βάρος της *MtLac2* δείχνει να είναι λίγο μικρότερο μετά την πέψη με ενδογλυκοζιδάση H, ωστόσο εξακολουθεί να εμφανίζεται σε δύο ζώνες στο πήκτωμα. Αυτό το αποτέλεσμα είναι εν μέρει αναμενόμενο, καθώς η *MtLac2* διαθέτει 1 μόνο θέση N-γλυκοζυλίωσης αλλά 8 θέσεις O-γλυκοζυλίωσης, όπως προβλέφθηκε με τους αλγόριθμους NetNGlyc και NetOGlyc (Κεφάλαιο 3.3.2.1), ενώ η ενδογλυκοζιδάση H μπορεί να αφαιρέσει μόνο την N- γλυκοζυλίωση. Το αποτέλεσμα αυτό δεν είναι σπάνιο σε μελέτες ετερόλογης έκφρασης λακκασών, καθώς οι λακκάσες εμφανίζονται με τη μορφή γλυκοπρωτεϊνών ακόμα και στους φυσικούς τους ξενιστές (Yoshitake et al., 1993). Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν σε ετερόλογη έκφραση λακκασών από μύκητες στην *P. pastoris* αναφέρουν σημαντική μείωση του μοριακού βάρους των ενζύμων μετά από πέψη με ενδογλυκοζιδάσες (Colao et al., 2006, Soden et al., 2002, Hong et al., 2002, Gu et al., 2014).

Στην Εικόνα 3.3.2.13B φαίνεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης ισοηλεκτρικής εστίασης. Στο πήκτωμα αυτό, η καθαρή *MtLac2* εμφανίζεται σαν μία και μόνο ζώνη, γεγονός που αποδεικνύει ότι πρόκειται όντως για μία μόνο καθαρή πρωτεΐνη, η οποία πιθανότατα έχει υποστεί ετερογενή O-γλυκοζυλίωση. Το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης φαίνεται να είναι περίπου 4, εμφανίζει δηλαδή μια διαφορά με το θεωρητικά προβλεπόμενο (5,15), συμφωνεί ωστόσο με προηγούμενες αναφορές

που στην πλειοψηφία τους συμφωνούν σε όξινα ισοηλεκτρικά σημεία για τις μελετώμενες λακκάσες, όπως 4,38 για τη Lac4 του *P. sajor-caju* (Soden et al., 2002), ή για τις λακκάσες τεσσάρων βασιδιομυκήτων που μελετήθηκαν από τους Heinzkill et al., (1998), οι οποίες εμφανίζουν ισοηλεκτρικά σημεία μικρότερα του 3,6.

### 3.3.2.7 Χαρακτηρισμός της ετερόλογης λακκάσης MtLac2

Μετά τον επιτυχή καθαρισμό της MtLac2 ακολούθησε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου. Αρχικά διερευνήθηκε η καταλυτική δράση του ενζύμου σε ένα εύρος διαφορετικών τιμών pH και θερμοκρασιών, καθώς και η σταθερότητά του σε αυτές τις συνθήκες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.2.14:** Ενζυμική ενεργότητα (μαύροι κύκλοι) και σταθερότητα (λευκοί κύκλοι) της λακκάσης MtLac2 σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασιών (α) και pH (β). Η υπολειπόμενη ενεργότητα για κάθε συνθήκη εκφράζεται ως ποσοστό % της μέγιστης. Η σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες εκφράζεται ως σχετική ενεργότητα % μετά από επώαση 24 ωρών σε κάθε θερμοκρασία ή pH.

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα, οι βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της MtLac2 φαίνεται να είναι οι 50 °C, ωστόσο το ένζυμο διατηρεί πάνω από το 60% της ενεργότητάς του στο εύρος των 60-70 °C, ενώ δείχνει να διατηρεί σχεδόν το 70% της ενεργότητάς του μετά από επώαση 24 ωρών στους 50 °C. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι πρόκειται για ένα θερμοφιλό ένζυμο, όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς ο φυσικός του ξενιστής είναι ένας θερμοφίλος μικροοργανισμός. Η σημασία των θερμοφίλων ενζύμων είναι τεράστια σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, οπότε η θερμοφιλή φύση της MtLac2 θα μπορούσε να είναι μια εξαιρετικά χρήσιμη ιδιότητα σε πιθανή εμπορική εφαρμογή του βιοκαταλύτη αυτού. Η μοναδικότητα του ενζύμου αυτού γίνεται ακόμη πιο εμφανής αν ληφθούν υπόψη τα προγενέστερα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου οι θερμοφιλικές λακκάσες είναι εξαιρετικά σπάνιες: για παράδειγμα, στη μελέτη των Gu et al., (2014) που αφορά στις λακκάσες Lac3 και Lac4 του *Coprinus comatus*, η ενεργότητα φαίνεται να πέφτει κοντά στο 0 με επώαση σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 50 °C μετά από μόλις μια ώρα επώασης, ενώ σε αντίστοιχη εργασία των Garg et al., (2012) ο χρόνος ημιζωής της λακκάσης

του *Cyanthus bulleri* στους 50 °C είναι μόλις 2,3 ώρες. Οι Soden et al., (2002) αναφέρουν ότι η ενεργότητα της λακκάσης του *Pleurotus sajor-caju* μειώνεται στο 25% της αρχικής τιμής της μετά από επώαση μόλις μιας ώρας στους 45 °C. Ακόμη και προσπάθειες κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης δεν φαίνεται να μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά τη θερμοσταθερότητα των λακκασών (Garcia-Ruiz et al., 2010), τουλάχιστον όχι χωρίς αντίστοιχη πτώση της ενεργότητας του ενζύμου.

Από την Εικόνα 3.3.2.14 φαίνεται επίσης ότι το βέλτιστο pH δράσης της λακκάσης είναι το 4, ωστόσο η ενεργότητά του διατηρείται σε ποσοστό πάνω από 80% σε pH 4,5, αλλά μειώνεται απότομα σε pH μεγαλύτερα του 5 ή μικρότερα του 4. Το δεδομένο αυτό συμφωνεί σε γενικές γραμμές με τη βιβλιογραφία, καθώς οι περισσότερες γνωστές λακκάσες εμφανίζουν βέλτιστη δράση σε όξινα pH (Soden et al., 2002, Garg et al., 2012, Colao et al., 2006, Gu et al., 2014).

### 3.3.2.8 Ανθεκτικότητα της *MtLac2* έναντι παρεμποδιστών

Η επίδραση διαφόρων παρεμποδιστικών παραγόντων στην ενεργότητα της *MtLac2* μελετήθηκε με προσθήκη των ουσιών αυτών στο μίγμα της αντίδρασης σε διάφορες συγκεντρώσεις και μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το ABTS σε συγκέντρωση 2 mM. Οι αντιδράσεις ελέγχου πραγματοποιήθηκαν χωρίς καμία προσθήκη. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 3.3.2.1:** Επίδραση παρεμποδιστών και οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα της *MtLac2*. Στις αντιδράσεις ελέγχου δεν προστέθηκε καμία επιπλέον ουσία. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 40 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 4.

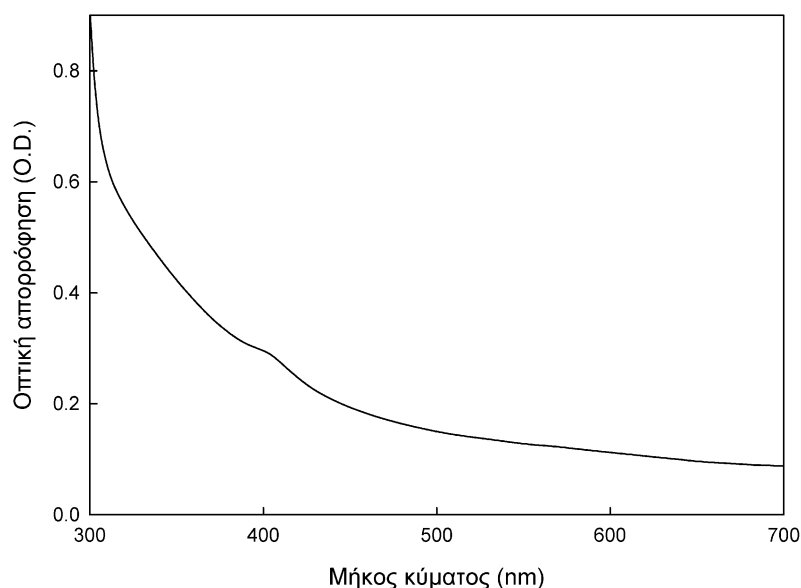
Παρεμποδιστές	Σχετική ενεργότητα (%)	Οργανικοί Διαλύτες	Σχετική ενεργότητα (%)
Αντίδραση ελέγχου	100	Αντίδραση ελέγχου	100
NaCl 10 mM	68,9 ± 6,1	Αιθανόλη 10 % (v/v)	76,0 ± 6,1
NaCl 100 mM	48,1 ± 3,3	Αιθανόλη 50 % (v/v)	27,0 ± 3,1
NaN <sub>3</sub> 0,01 mM	44,6 ± 8,6	Μεθανόλη 10 % (v/v)	79,8 ± 5,7
NaN <sub>3</sub> 0,1 mM	11,8 ± 0,9	Μεθανόλη 50 % (v/v)	44,4 ± 4,3
EDTA 1 mM	85,6 ± 1,4	DMSO 10 % (v/v)	51,9 ± 2,0
SDS 0,1 mM	80,9 ± 2,0	Ακετόνη 10 % (v/v)	51,5 ± 0,6
SDS 1 mM	1,1 ± 0,3		

Η ενζυμική ενεργότητα της λακκάσης φαίνεται να παρεμποδίζεται σχεδόν πλήρως σε συγκέντρωση SDS 1 mM, καθώς η ένωση αυτή είναι γνωστό ότι αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες. Ακόμη, το NaN<sub>3</sub>

φαίνεται να παρεμποδίζει έντονα την ενζυμική ενεργότητα, όπως έχει παρατηρηθεί και για τις περισσότερες γνωστές λακκάσες (Liu et al., 2010b), καθώς προσδένεται στους χαλκούς Τύπου II και III των λακκασών και διακόπτει τη ροή των ηλεκτρονίων. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι λακκάσες παρεμποδίζονται επίσης και από το EDTA, αλλά σε μικρότερο βαθμό, καθώς η ένωση αυτή δρα σαν χηλικός παράγοντας με τάση να δεσμεύει τα μόρια χαλκού του ενεργού κέντρου των λακκασών και άρα να τις παρεμποδίζει (More et al., 2011, Lorenzo et al., 2005). Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την *MtLac2*. Η ανθεκτικότητα της *MtLac2* στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες που δοκιμάστηκαν σε συγκέντρωση 10 % (v/v) φαίνεται να είναι άνω του 50%, φαινόμενο ιδιαίτερα ικανοποιητικό που θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο σε ενδεχόμενη εμπορική αξιοποίηση του ενζύμου σε αντιδράσεις οργανικής σύνθεσης. Ωστόσο, σε συγκέντρωση αιθανόλης 50 % (v/v) η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται σημαντικά.

### 3.3.2.9 Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της *MtLac2*

Επιπλέον, μελετήθηκαν τα οπτικά χαρακτηριστικά της *MtLac2*, και πιο συγκεκριμένα η οπτική απορρόφηση διαλύματος καθαρής πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 20 mM pH 8, σε ένα εύρος μηκών κύματος από 300-700 nm. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.2.15:** Φάσμα απορρόφησης UV/Vis της καθαρής *MtLac2* σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 20 mM pH 8.

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω Εικόνα, το φάσμα απορρόφησης της *MtLac2* εμφανίζει μια μοναδική κορυφή στα 402 nm, σε αντίθεση με τις περισσότερες «μπλε» λακκάσες, οι οποίες συνήθως εμφανίζουν μια κορυφή στα 610 nm περίπου (Sadhasivam et al., 2008), χαρακτηριστική του Cu (II) Τύπου I. Οι «μπλε» λακκάσες εμφανίζουν επίσης και μια κορυφή στα 325 nm, η οποία οφείλεται στο ζεύγος των Cu(III) Τύπου III. Ωστόσο, καμία από αυτές τις κορυφές δεν εμφανίζεται στα φάσμα της

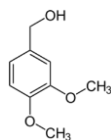
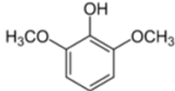
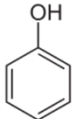

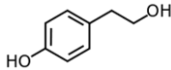
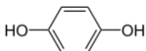
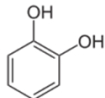


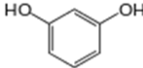
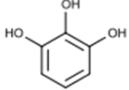
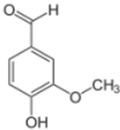
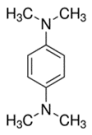
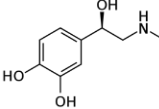
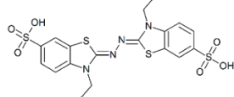
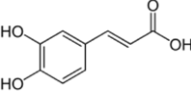
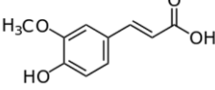
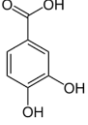
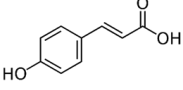
MtLac2. Αντίθετα, η απουσία κορυφών στο εύρος 450-700 nm είναι χαρακτηριστική των «κίτρινων» λακκασών (Leontievsky et al., 1997, Mot et al., 2012, Ike et al., 2015).

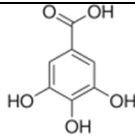
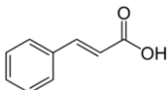
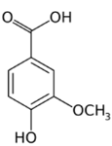
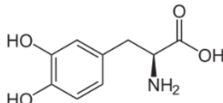
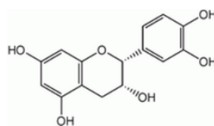
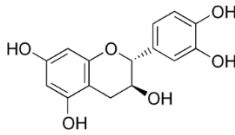
### 3.3.2.10 Καταλυτικά χαρακτηριστικά της MtLac2

Προκειμένου να διερευνηθεί η καταλυτική δράση της MtLac2, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις 24 ωρών σε πολλά διαφορετικά υποστρώματα, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.5.4. Με το πέρας της αντίδρασης, λήφθηκαν τα φάσματα των μιγμάτων, στο ορατό (350-750 nm). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 3.3.2.2:** Οξείδωση διαφορετικών υποστρωμάτων από την MtLac2 σε αντιδράσεις 24 ωρών. Με (-) σημειώνονται οι αντιδράσεις που δεν έδωσαν ανιχνεύσιμη διαφορά οπτικής απορρόφησης στο ορατό φάσμα, ενώ με (+) σημειώνονται οι αντιδράσεις όπου το φάσμα ήταν διαφορετικό μετά το πέρας της αντίδρασης. Με (+/-) σημειώνονται οι περιπτώσεις όπου η διαφορά δεν ήταν σαφής.

Υποστρώματα (2 mM)	Οξείδωση	Δομές υποστρωμάτων
<b>Αρωματικές αλκοόλες</b>		
Βερατρυλική αλκοόλη	-	
<b>Μονοφαινόλες</b>		
2,6 διμεθοξυφαινόλη	+	
Φαινόλη	-	
Γουαϊακόλη	+	
Τυροσόλη	-	
<b>Διφαινόλες</b>		
Υδροκινόνη	+	
Κατεχόλη	+	

Ρεζορκινόλη	-	
<b>Τριφαινόλες</b>		
Πυρογαλλόλη	+	
<b>Αρωματικές αλδεΐδες</b>		
Βανιλίνη	-	
<b>Αμίνες</b>		
NNNN-τετραμεθυλ- φαινυλενεδιαμίνη	++	
Επινεφρίνη	+	
<b>Αρωματικές άζο-ενωσεις</b>		
ABTS	++	
<b>Αρωματικά καρβοξυλικά οξέα</b>		
Καφεϊκό οξύ	+	
Φερουλικό οξύ	+/-	
Πρωτο-κατεχουϊκό οξύ	+	
π- κουμαρικό οξύ	-	


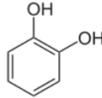
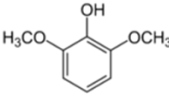
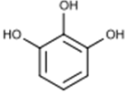

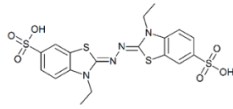
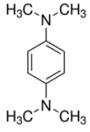
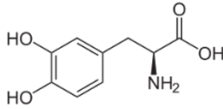
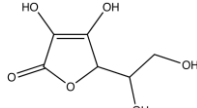
Γαλλικό οξύ	+	
Κινναμικό οξύ	-	
Βανιλλικό οξύ	-	
L-DOPA	+	
<b>Φλαβονοειδή</b>		
Επικατεχίνη	+	
Κατεχίνη	+	

Στον παραπάνω πίνακα είναι εμφανής μια πρώτη εικόνα της καταλυτικής εξειδίκευσης της *MtLac2*. Η βερατρυλική αλκοόλη δεν οξειδώθηκε από τη λακκάση, όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς ελάχιστες μόνο λακκάσες είναι ικανές για την οξείδωσή της, συνήθως με τη βοήθεια κάποιου μορίου-διαμεσολαβητή (Bourbonnais and Paice, 1990, Larson et al., 2013), καθώς το μόριο αυτό αντιπροσωπεύει ένα από τα μονομερή του μη φαινολικού τμήματος της λιγνίνης. Η φαινόλη και η τυροσόλη, ως αντιπρόσωποι των μονοφαινολικών υποστρωμάτων, δεν οξειδώνονται από τη λακκάση, ωστόσο το ένζυμο μπορεί να οξειδώσει τις μεθοξυ-φαινόλες, όπως τη γουαϊακόλη και τη 2,6-διμεθοξυφαινόλη. Η βανιλίνη και το βανιλλικό οξύ, αν και διαθέτουν φαινολικό δακτύλιο και μεθοξυ-ομάδα, δεν οξειδώνονται από τη λακκάση. Οι διφαινόλες, πλην της ρεζορκινόλης, οξειδώνονται από τη λακκάση, όπως επίσης και η πυρογαλλόλη, αλλά και το γαλλικό οξύ, που αντιπροσωπεύουν τα τριφαινολικά υποστρώματα. Σε γενικές γραμμές το ένζυμο δείχνει μια προτίμηση στα κατεχολικά υποστρώματα, όπως είναι η κατεχόλη, οι κατεχίνες, το πρωτο-κατεχουϊκό οξύ και το καφεϊκό οξύ. Επιπλέον, το ένζυμο οξειδώνει και υποστρώματα που διαθέτουν αμινομάδες, όπως οι περισσότερες γνωστές λακκάσες (Reiss et al., 2013), όπως η L-DOPA, η οξείδωση της οποίας οδηγεί στην παραγωγή μελανίνης (Tišma et al., 2009), η επινεφρίνη και η NNNN-τετραμεθυλοφαιλυλενεδιαμίνη. Ανάμεσα σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν, η πιο έντονη οξείδωση παρατηρήθηκε στην NNNN-τετραμεθυλοφαιλυλενεδιαμίνη και στο ABTS. Το ABTS είναι ένα συνθετικό υπόστρωμα το οποίο είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των λακκασών και των λιγνινολυτικών υπεροξειδασών, και χρησιμεύει ιδιαίτερα στη σύγκριση των καταλυτικών ιδιοτήτων των διαφόρων ενζύμων στη βιβλιογραφία, καθώς, λόγω της

χαμηλής εξειδίκευσης των περισσότερων λακκασών ως προς τα υποστρώματα που είναι ικανές να οξειδώσουν, το εύρος των υποστρωμάτων έναντι των οποίων δρα το κάθε ένζυμο ξεχωριστά μπορεί να διαφέρει σε μεγάλο βαθμό. Έτσι, το ABTS παίζει το ρόλο ενός κοινού σημείου αναφοράς για τις περισσότερες λακκάσες.

Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός της ειδικής ενζυμικής ενεργότητας της *MtLac2* για επιλεγμένα υποστρώματα, με στόχο να εξακριβωθεί το καταλυτικό δυναμικό του ενζύμου. Η μέτρηση της ενζυμικής της ενεργότητας πραγματοποιήθηκε στις βέλτιστες συνθήκες, έναντι επιλεγμένων υποστρωμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν όλα σε συγκέντρωση 2 mM. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 3.3.2.3:** Ειδική ενεργότητα της *MtLac2* έναντι διαφόρων υποστρωμάτων. δ.α.: δεν ανιχνεύθηκε.

Υποστρώματα (2 mM)	Ειδική ενεργότητα (U mg <sup>-1</sup> )	Δομές υποστρωμάτων
Υδροκινόνη	δ.α.	
Κατεχόλη	0,31 ± 0,052	
2,6 διμεθοξυφαινόλη	0,095 ± 0,005	
Πυρογαλλόλη	0,47 ± 0,05	
Γουαϊακόλη	0,008 ± 0,0	
ABTS	6,22 ± 0,25	
NNNN-τετραμεθυλ-φαιλυλενεδιαμίνη	0,37 ± 0,025	
L-DOPA	0,013 ± 0,001	
Ασκορβικό οξύ	56,8 ± 1,81	

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, το ένζυμο εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές ειδικής ενζυμικής ενεργότητας έναντι του ασκορβικού οξέος και του ABTS, ενώ τα δι- και τριφαινολικά υποστρώματα οξειδώνονται ελάχιστα. Επίσης, εδώ είναι ακόμα πιο εμφανής η δράση της λακκάσης έναντι των αμινών (NNNN-τετραμεθυλο- φαινυλενεδιαμίνη), ενώ τα υποστρώματα με κατεχολική διάταξη των υδροξυλίων (κατεχόλη, L-DOPA) φαίνονται να οξειδώνονται πιο εύκολα σε σχέση με τις μη κατεχολικές διφαινόλες (υδροκινόνη). Εξαιρετικά υψηλή φαίνεται και η τιμή της ειδικής ενζυμικής ενεργότητας έναντι του ασκορβικού οξέος, γεγονός που υποδεικνύει ότι το ένζυμο αυτό πιθανώς δεν είναι μια λακκάση παρόμοια με τις λακκάσες των βασιδιομυκήτων, αλλά μοιάζει περισσότερο με πολυφαινολική οξειδάση (LMCO- Laccase-Like Multicopper oxidase) (Reiss et al., 2013), και επίσης υπογραμμίζει τη μοναδικότητα του ενζύμου.

Οι κινητικές παράμετροι της ενζυμικής δράσης της *MtLac2* υπολογίστηκαν για δύο υποστρώματα, το ABTS και τη 2,6 διμεθοξυφαινόλη. Η προσαρμογή των αποτελεσμάτων στην εξίσωση Michaelis-Menten πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 5, με το οποίο υπολογίστηκε επίσης και το τυπικό σφάλμα των υπολογισθέντων παραμέτρων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα:

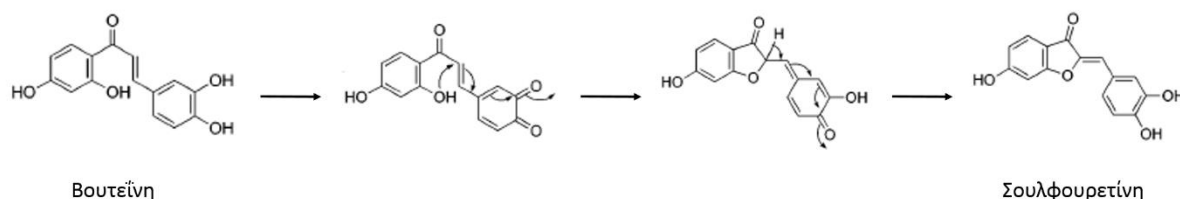
**Πίνακας 3.3.2.4:** Κινητικές παράμετροι της ενζυμικής δράσης της *MtLac2*. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 50 °C, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.5.5.

Υποστρώματα	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
ABTS	2,37 ± 0,4	54,18 ± 3,5	22,9 ± 4,1
2,6-DMP	2,41 ± 0,5	66,7 ± 4,8	27,7 ± 5,5

Σε γενικές γραμμές, το  $K_m$  που υπολογίστηκε και για τα δύο υποστρώματα είναι αρκετά μεγαλύτερο από αυτό που αναφέρεται στη βιβλιογραφία για τις περισσότερες λακκάσες των Βασιδιομυκήτων (Mot et al., 2012, Sadhasivam et al., 2008, Garg et al., 2012, Colao et al., 2006, Gu et al., 2014), και μοιάζει μόνο με τη λακκάση *lac4* ( $K_m = 2,5$  mM για το ABTS) του *P. sajor-caju* από τη μελέτη των Soden et al. (2002). Ωστόσο, η λακκάση μοιάζει να έχει παρόμοια συγγένεια για τα δύο υποστρώματα. Οι τιμές  $K_{cat}/K_m$  που εμφανίζει η λακκάση είναι παρόμοιες και στα δύο υποστρώματα, και ανάλογες με τη λακκάση *Lac3* του *Coprinus comatus* (25,625 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> για το ABTS, Gu et al., 2014). Φαίνεται λοιπόν ότι η λακκάση οξειδώνει και τα δύο υποστρώματα με παραπλήσια ταχύτητα και αποτελεσματικότητα.

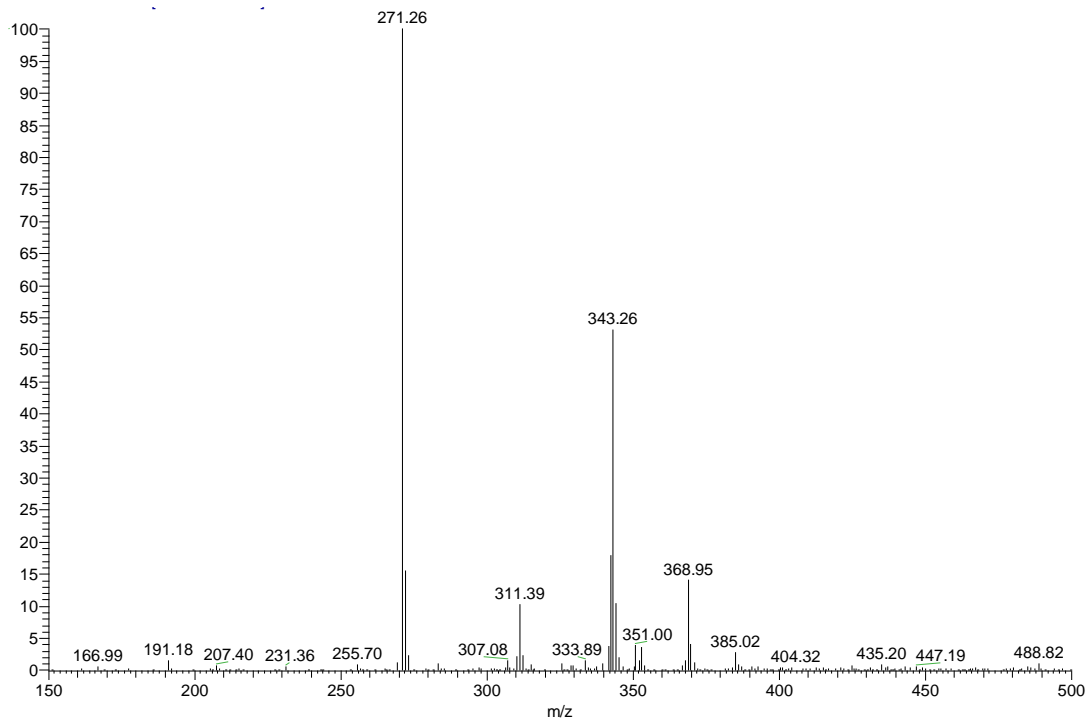
### 3.3.2.11 Βιομετατροπή φυσικών φλαβονοειδών

Μετά την ολοκλήρωση του χαρακτηρισμού της *MtLac2*, το ένζυμο δοκιμάστηκε στη βιομετατροπή της φυσικής χαλκόνης βουτεΐνης στην ωρόνη σουλφουρετίνη. Οι ωρόνες είναι μια υποκατηγορία φλαβονοειδών ενώσεων που απαντώνται στα φυτά και είναι υπεύθυνες για το χρώμα των ανθέων (Ono et al., 2006). Η βιοτεχνολογική τους αξία είναι μεγάλη, καθώς έχει δειχθεί ότι εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία βιολογικών δράσεων, μεταξύ άλλων αντικαρκινική δράση (Lawrence et al., 2003), αντιβακτηριακή (Hadj-esfandiari et al., 2007), και ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση (Detsi et al., 2009). Στη φύση, οι ωρόνες βιοσυντίθενται από πρόδρομες ενώσεις χαλκονών, με τη βοήθεια του ενζύμου συνθετάση της ωραιοσιδίνης (Aureusidin synthase, AS). Η AS είναι μια πολυφαινολική οξειδάση με εξειδικευμένη δράση ενάντια στις χαλκόνες, ενώ η δραστηριότητά της έναντι φαινολικών και άλλων τυπικών υποστρωμάτων των πολυφαινολικών οξειδασών είναι ελάχιστη ή μηδενική (Nakayama et al., 2000). Καθώς η απομόνωση των ωρωνών από φυτά είναι δύσκολη και οικονομικά ασύμφορη, έχει επιχειρηθεί η σύνθεση αυτών των ενώσεων από τις πρόδρομες ενώσεις τους στο εργαστήριο σε προηγούμενες ερευνητικές προσπάθειες (Sanchez-Gonzalez and Rosazza, 2006, Moussouni et al., 2010), με χρήση ενζύμων ως βιοκαταλυτών. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται ο μηχανισμός της αντίδρασης μετατροπής της βουτεΐνης σε σουλφουρετίνη:

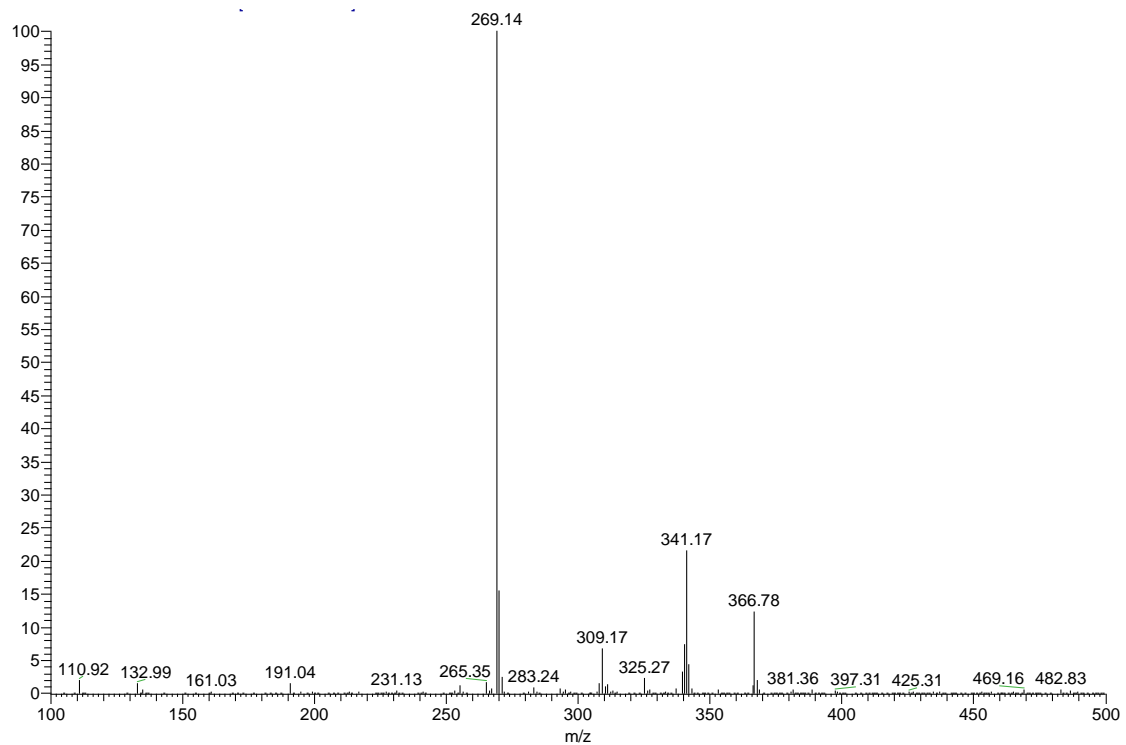


**Εικόνα 3.3.2.17:** Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης οξειδωτικής κυκλοποίησης της χαλκόνης βουτεΐνης στην ωρόνη σουλφουρετίνη, από το ενζυμικό εκχύλισμα του *Aspergillus alliaceus*. Μόνο το πρώτο στάδιο της αντίδρασης θεωρείται ότι καταλύεται ενζυμικά, ενώ τα επόμενα αφορούν σε αυθόρμητες αντιδράσεις (Sanchez-Gonzalez and Rosazza, 2006).

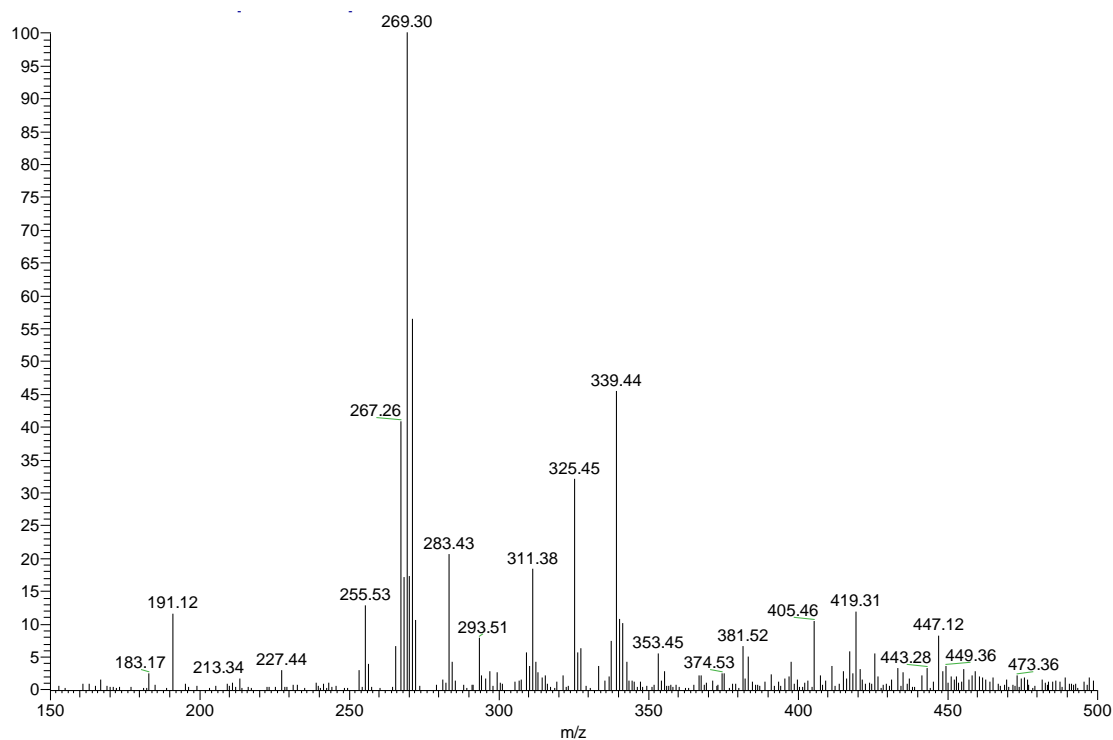
Η αντίδραση βιομετατροπής της βουτεΐνης με την *MtLac2* πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.6. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το ίζημα που προέκυψε σε κάθε περίπτωση μετά από φυγοκέντρηση διαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη, και λήφθηκαν φάσματα ESI-MS, τα οποία παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες:



**Εικόνα 3.3.2.18.** Φάσμα LC-MS του μίγματος αντίδρασης με απενεργοποιημένο ένζυμο (Αντίδραση ελέγχου 1).



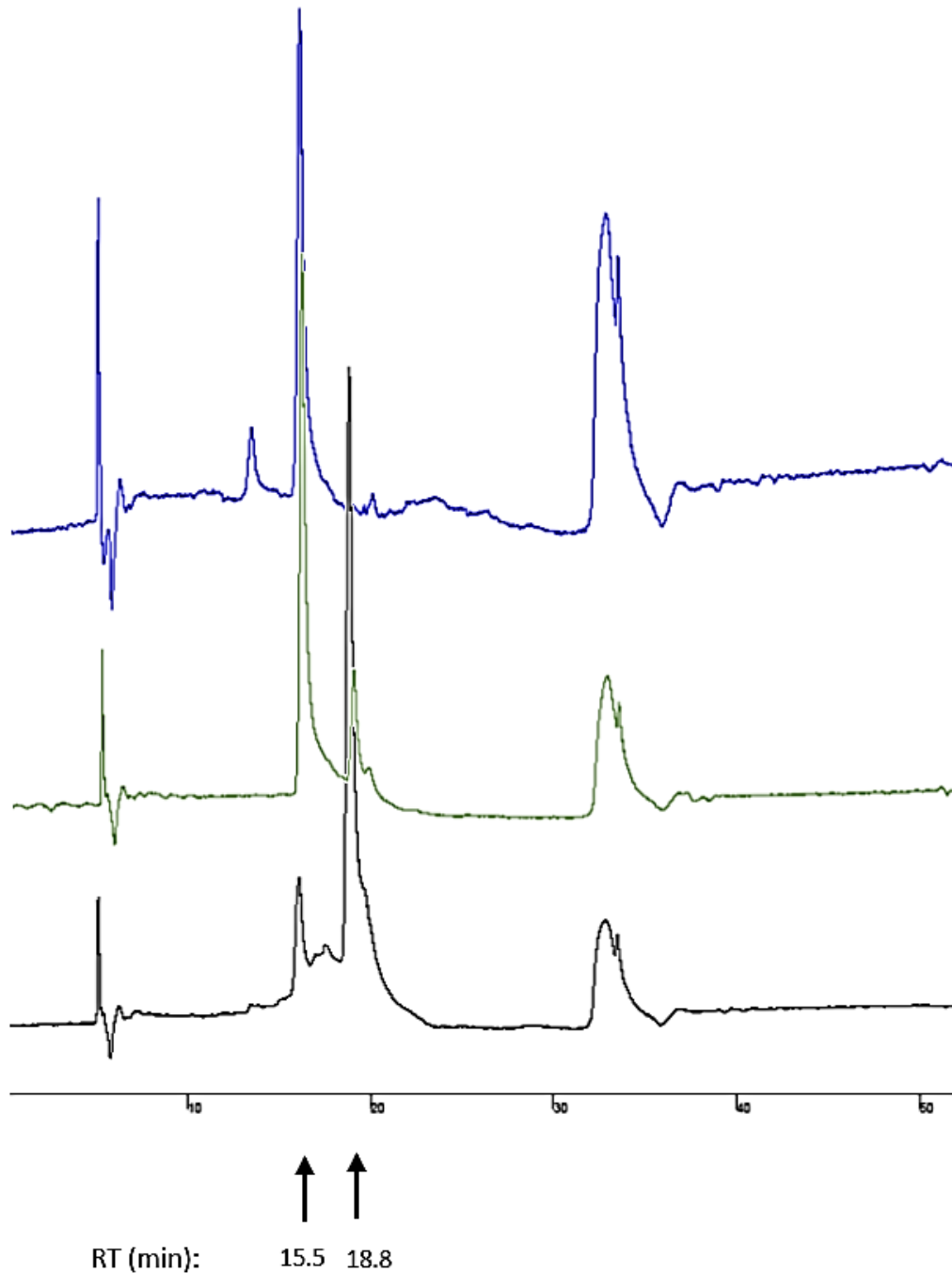
**Εικόνα 3.3.2.19.** Φάσμα LC-MS του μίγματος της αντίδρασης με χημικά συνθετική σουλφουρετίνη αντί για βουτεΐνη, και απενεργοποιημένο ένζυμο (Αντίδραση ελέγχου 2).



**Εικόνα 3.3.2.20.** Φάσμα LC-MS του προϊόντος της αντίδρασης της βουτεΐνης με την *MtLac2*

Το ακριβές μοριακό βάρος της βουτεΐνης είναι 272,25 και της σουλφουρετίνης 270,24. Ωστόσο, στα φάσματα των αντιδράσεων ελέγχου που λήφθηκαν, οι κύριες κορυφές της βουτεΐνης και της σουλφουρετίνης εμφανίζονται σε  $m/z$  271,26 και 269,14 αντίστοιχα, λόγω της απώλειας ενός ατόμου Η. Στο φάσμα που προέκυψε από το μίγμα της αντίδρασης μετά από 24 ώρες φαίνεται μια κύρια κορυφή σε  $m/z$  269,30 η οποία πιθανότατα οφείλεται στη σουλφουρετίνη, όπως προκύπτει από το φάσμα της αντίδρασης ελέγχου 2, ενώ εμφανίζεται και μια μικρότερη κορυφή σε  $m/z$  271,23, η οποία μπορεί να αποδοθεί στη βουτεΐνη που δεν αντέδρασε. Ακόμα, και η κορυφή  $m/z$  267,26 θα μπορούσε πιθανώς να οφείλεται στη σουλφουρετίνη μετά την απώλεια 3 ατόμων Η. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ισχυρές ενδείξεις ότι η βιομετατροπή της βουτεΐνης σε σουλφουρετίνη με τη δράση της *MtLac2* όντως ήταν επιτυχής, και μάλιστα η σουλφουρετίνη φαίνεται να είναι το κύριο προϊόν της αντίδρασης. Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα αυτά, ακολούθησε ανάλυση των ίδιων δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.7.5. Τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:





**Εικόνα 3.3.2.21:** Χρωματογραφήματα HPLC όπως προέκυψαν από φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 280 nm, των ιζημάτων των αντιδράσεων βιομετατροπής με την *MtLac2*, διαλυτοποιημένα σε μεθανόλη. Μπλε γραμμή: Αντίδραση ελέγχου 1 με θερμικά απενεργοποιημένο ένζυμο και βουτεΐνη, πράσινη γραμμή: Αντίδραση ελέγχου 2 με θερμικά απενεργοποιημένο ένζυμο και προσθήκη χημικά συνθεσιμμένης σουλφουρετίνης στο μίγμα της αντίδρασης αντί για βουτεΐνη, μαύρη γραμμή: Αντίδραση βιομετατροπής της βουτεΐνης με *MtLac2*. Στην Εικόνα σημειώνονται οι χρόνοι παραμονής της βουτεΐνης και της σουλφουρετίνης.

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, στα χρωματογραφήματα διακρίνονται ξεκάθαρες κορυφές οι οποίες προέκυψαν από τις αντιδράσεις ελέγχου και αντιστοιχούν σε χρόνους παραμονής 15,5 min για τη βουτεΐνη και 18,8 min για τη σουλφουρετίνη. Στο χρωματογράφημα της αντίδρασης

βιομετατροπής διακρίνεται μια ξεκάθαρη κορυφή σε χρόνο παραμονής 18,8 min η οποία πιθανότατα αντιστοιχεί στη σουλφουρετίνη, όπως προκύπτει μετά από σύγκριση με το χρωματογράφημα της αντίδρασης ελέγχου, ενώ εμφανίζεται και μια μικρότερη κορυφή που αντιστοιχεί στο χρόνο παραμονής της βουτεΐνης, και υποδεικνύει την ύπαρξη υπολειπόμενης βουτεΐνης που δεν αντέδρασε. Περιληπτικά, τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα παραπάνω αποτελέσματα των φασμάτων LC-MS και υποδηλώνουν την επιτυχία της βιομετατροπής της βουτεΐνης σε σουλφουρετίνη με την *MtLac2*. Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί επιπλέον ότι στο φάσμα της αντίδρασης ελέγχου 2, που αφορά στη χημικά συντεθειμένη σουλφουρετίνη, εκτός από την κορυφή σε χρόνο παραμονής 18,8 min που αποδίδεται στην ένωση αυτήν, εμφανίζεται επίσης και μια κορυφή σε χρόνο παραμονής 15,5 min η οποία αντιστοιχεί στη βουτεΐνη. Αυτό πιθανώς συμβαίνει επειδή η χημική σύνθεση της σουλφουρετίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση βουτεΐνης σαν πρόδρομη ένωση, οπότε είναι αναμενόμενο να υπάρχει και σε αυτό το δείγμα υπολειπόμενη βουτεΐνη που δεν αντέδρασε. Αντίστοιχα αποτελέσματα σχετικά με την οξειδωτική κυκλοποίηση χαλκονών σε ωρόνες έχουν επιτευχθεί και σε προγενέστερες μελέτες από ενζυμικά εκχυλίσματα των *Aspergillus alliaceus* (Sanchez-Gonzalez and Rosazza, 2006), όπου η υπεύθυνη ενζυμική ενεργότητα για την κυκλοποίηση θεωρήθηκε ότι είναι μια οξειδάση της κατεχόλης, αλλά και κρεμμυδιού (Moussouni et al., 2010), όπου η υπεύθυνη ενζυμική ενεργότητα θεωρήθηκε η δράση υπεροξειδάσης. Ωστόσο, στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται η βιομετατροπή της βουτεΐνης σε σουλφουρετίνη από ένα απομονωμένο ένζυμο, καθώς όλες οι προγενέστερες προσπάθειες αφορούσαν σε ενζυμικά εκχυλίσματα, στα οποία δεν μπορεί να είναι ξεκάθαρη η ενζυμική ενεργότητα που είναι υπεύθυνη για την αντίδραση βιομετατροπής. Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής σχετικά με την καταλυόμενη από την *MtLac2* οξειδωτική κυκλοποίηση της βουτεΐνης σε σουλφουρετίνη, υποστηρίζουν τη σημαντική βιοτεχνολογική αξία του ενζύμου σε εκλεπτυσμένες εφαρμογές οργανικής σύνθεσης και υπογραμμίζουν το δυναμικό των ενζύμων αυτών ως «πράσινες» εναλλακτικές λύσεις σε παραδοσιακές τεχνικές χημικής σύνθεσης.

### 3.3.3 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση της εμπορικής λακκάσης *Novozym 51003* από τον *M. thermophila* στον ολιγομερισμό φαινολικών ενώσεων

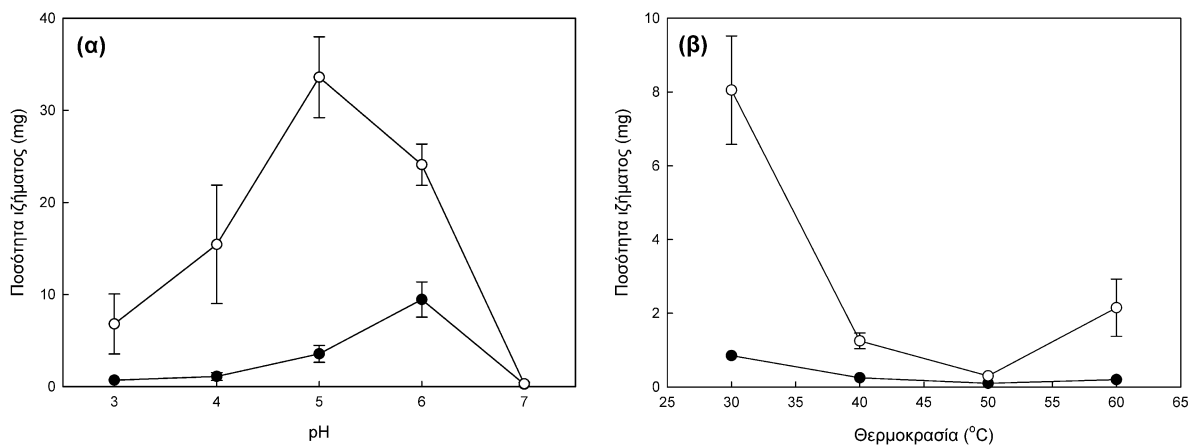
---

Όπως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα Κεφάλαια, οι εφαρμογές των λακκασών είναι ποικίλες και εξαιρετικά ενδιαφέρουσες από βιοτεχνολογική σκοπιά. Προκειμένου να αναπτυχθεί μια ενδιαφέρουσα βιοτεχνολογικά εφαρμογή για την αξιοποίηση φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται σε αφθονία σε αγροτοβιομηχανικά απόβλητα, όπως τα ΥΑΕ, στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιχειρήθηκε η οξείδωση τέτοιων ενώσεων με χρήση μιας εμπορικής λακκάσης του *M. thermophila*. Στόχος της συγκεκριμένης πειραματικής ενότητας ήταν η παραγωγή πιθανώς χρήσιμων προϊόντων, όπως είναι τα φαινολικά πολυμερή, με καινοτόμες ιδιότητες για διάφορες εφαρμογές, χρησιμοποιώντας περιβαλλοντικά φιλικές μεθόδους και διεργασίες. Οι φαινολικές ενώσεις που επιλέχθηκαν για αυτό το σκοπό ήταν η κατεχόλη, η πυρογαλλόλη και το γαλλικό οξύ.

#### 3.3.3.1 Επίδραση του pH και της θερμοκρασίας στη βιομετατροπή φαινολικών ενώσεων.

---

Αρχικά δοκιμάστηκε η ικανότητα πολυμερισμού των φαινολικών ενώσεων από τη λακκάση *Novozym 51003* του *M. thermophila*, σε αντιδράσεις μικρού όγκου (25 mL) οι οποίες επώαστηκαν για 24 ώρες. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ο σχηματισμός σκουρόχρωμου ιζήματος με το πέρας της αντίδρασης, φαινόμενο που υποδεικνύει ότι είτε το μοριακό βάρος, είτε οι φυσικοχημικές ιδιότητες των παραγόμενων προϊόντων ήταν υπεύθυνα για τη μείωση της υδατοδιαλυτότητας. Αφού επιβεβαιώθηκε ότι κάποιου είδους βιομετατροπή όντως συμβαίνει, στη συνέχεια διερευνήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες στις οποίες αυτή πραγματοποιείται, χρησιμοποιώντας ως κριτήριο την ποσότητα του παραγόμενου ιζήματος. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν το pH της αντίδρασης και η θερμοκρασία, και τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



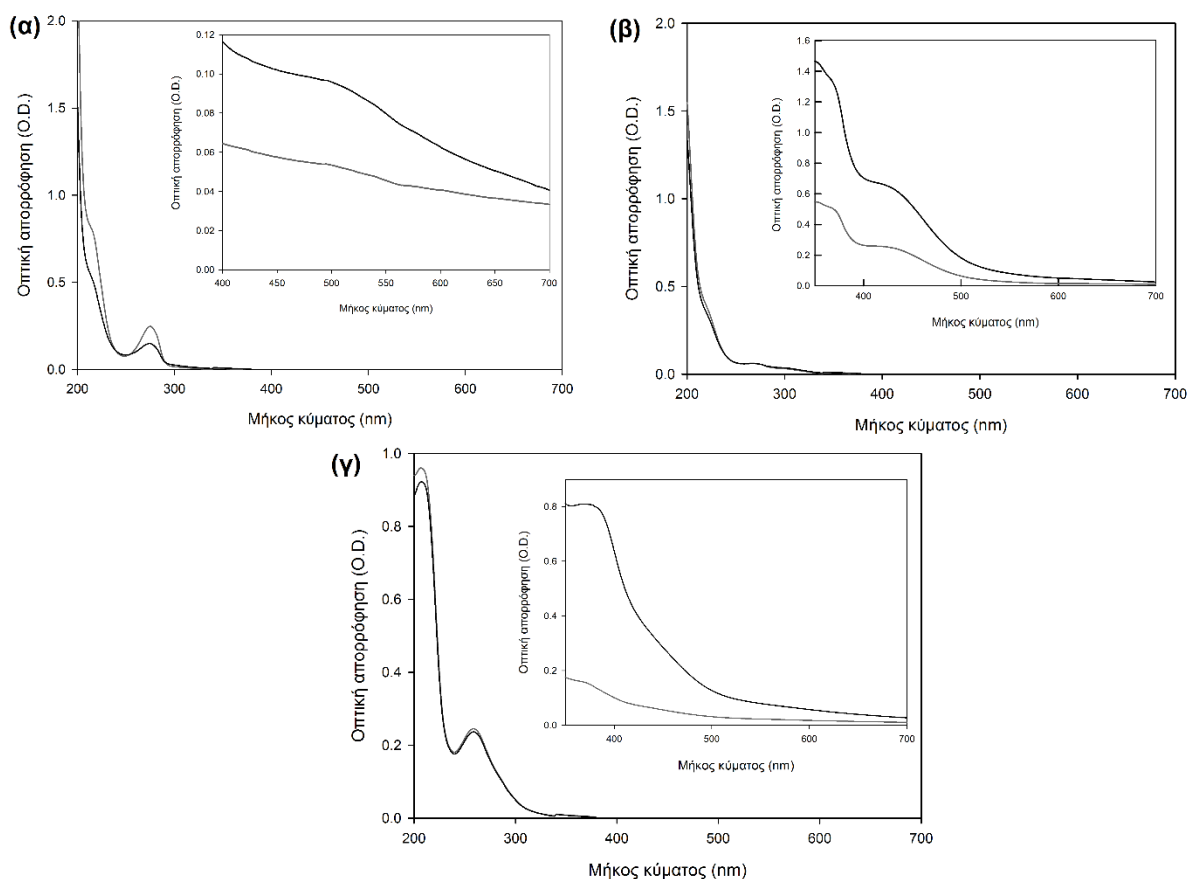
**Εικόνα 3.3.3.1:** Επίδραση του pH (α) και της θερμοκρασίας (β) στην ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος μετά την οξείδωση της κατεχόλης (μαύροι κύκλοι) και της πυρογαλλόλης (λευκοί κύκλοι) από τη λακκάση Novozym 51003 του *M. thermophila*.

Όπως φαίνεται και από την παραπάνω εικόνα, αν και η λακκάση είναι ένα θερμοφίλο ένζυμο, η βέλτιστη θερμοκρασία για τις αντιδράσεις βιομετατροπής της κατεχόλης και της πυρογαλλόλης βρέθηκε να είναι οι 30 °C. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει, να οφείλεται στην υψηλότερη διαλυτότητα του οξυγόνου που παρατηρείται σε αυτή τη θερμοκρασία, σε σχέση με υψηλότερες θερμοκρασίες, κάτι που οδηγεί σε μεγαλύτερη παραγωγή προϊόντος, καθώς είναι γνωστό ότι το οξυγόνο αποτελεί επίσης υπόστρωμα για τη δράση της λακκάσης. Οι βέλτιστες τιμές pH που παρατηρήθηκαν ήταν παραπλήσιες, δηλαδή η τιμή pH 5 ήταν η καλύτερη για τη βιομετατροπή της πυρογαλλόλης, ενώ η τιμή 6 για τη βιομετατροπή της κατεχόλης. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για τις επόμενες αντιδράσεις, όπως επίσης και για τη βιομετατροπή του γαλικού οξέος, ήταν 30 °C, pH 6.

Το ίζημα που απομονώθηκε από τις αντιδράσεις βιομετατροπής της κατεχόλης εξετάστηκε ως προς τη διαλυτότητά του σε διάφορους διαλύτες. Η σκόνη αυτή βρέθηκε να είναι αδιάλυτη σε νερό και υδατικά διαλύματα, και στο οξικό οξύ, αλλά και σε διάφορους οργανικούς διαλύτες όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, η ακετόνη, το εξάνιο και η μεθυλ-αιθυλ-κετόνη. Από τους διαλύτες που δοκιμάστηκαν το προϊόν της βιομετατροπής φάνηκε να είναι διαλυτό μόνο σε DMSO, τετραϋδροφουράνιο και διμεθυλφορμαμίδιο, και σε μικρότερο βαθμό σε καυστικό νάτριο συγκέντρωσης 1 M.

### 3.3.3.2 Βιομετατροπή φαινολικών ενώσεων και χαρακτηρισμός των προϊόντων

Ακολούθως, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε μεγαλύτερο όγκο, 100 mL, με σκοπό την απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας προϊόντων. Αρχικά λήφθηκαν φάσματα UV/Vis των διαλυμάτων των αντιδράσεων, μετά το πέρας των 24 ωρών, και το αποτέλεσμα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.3.2:** UV/Vis φάσματα των αντιδράσεων βιομετατροπής της κατεχόλης (α), της πυρογαλλόλης (β) και του γαλλικού οξέος (γ). Οι γκρι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις αντιδράσεις ελέγχου, όπου η λακκάση που χρησιμοποιήθηκε είχε απενεργοποιηθεί θερμικά, ενώ οι μαύρες γραμμές αντιπροσωπεύουν τα διαλύματα των αντιδράσεων μετά το πέρας 24 ωρών. Τα φάσματα UV/Vis λήφθηκαν μετά από αραιώση 100 φορές των μιγμάτων, ενώ στην περιοχή του ορατού, που παρουσιάζεται στα ενθέματα, δεν πραγματοποιήθηκε καμία αραιώση.

Με την πρόοδο της αντίδρασης, όλα τα μίγματα άλλαξαν χρώμα από άχρωμο σε σκούρο καφέ, κατά τη διάρκεια της οξειδωσης της κατεχόλης και της πυρογαλλόλης, και σε μαύρο κατά την οξειδωση του γαλλικού οξέος, όπως αναφέρεται συνήθως για την οξείδωση φαινολικών ουσιών (Sun et al., 2013). Η αντίδραση της κατεχόλης δείχνει μια σταθερά αυξημένη οπτική απορρόφηση στο ορατό φάσμα σε σχέση με την αντίδραση ελέγχου, με μια ευρεία κορυφή στα 463 nm. Το οξειδωμένο γαλλικό οξύ εμφανίζει μια σημαντική αύξηση της απορρόφησης στα 385 nm σε σχέση με την αντίδραση ελέγχου. Η οξειδωμένη πυρογαλλόλη εμφανίζει κορυφές στις ίδιες περιοχές του φάσματος UV με αυτές της αντίδρασης ελέγχου, αλλά δείχνει και δύο επιπλέον κορυφές στα 370 και 430 nm.

Ακολούθως, από τις αντιδράσεις απομονώθηκαν τα αδιάλυτα προϊόντα, τα οποία ζυγίστηκαν μετά από έκπλυση και ξήρανση. Η οξειδωτική μετατροπή της κατεχόλης, της πυρογαλλόλης και του γαλλικού οξέος απέδωσαν 105 mg, 142 mg και 18,6 mg προϊόντων αντίστοιχα, με αποδόσεις 26,3% για το προϊόν οξείδωσης της κατεχόλης, 4,7% για το προϊόν οξείδωσης του γαλλικού οξέος και 35,5%

για το προϊόν οξείδωσης της πυρογαλλόλης. Σε αντίθεση με άλλες προσπάθειες πολυμερισμού φαινολικών ενώσεων με χρήση λακκασών από Βασιδιομύκητες (Aktas and Tanyolac, 2003, Lopez et al., 2013), στην παρούσα εργασία η χρήση οργανικών διαλυτών δεν ήταν απαραίτητη ούτε στο στάδιο της αντίδρασης αλλά ούτε και στο στάδιο της απομόνωσης των προϊόντων. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το ίζημα που απομονώθηκε από καθεμία από τις αντιδράσεις βιομετατροπής, μετά από ξήρανση:



**Εικόνα 3.3.3.3:** Τα στερεά ίζηματα που απομονώθηκαν μετά από τις αντιδράσεις βιομετατροπής των τριών φαινολικών ενώσεων, (α) κατεχόλη, (β) πυρογαλλόλη και (γ) γαλλικό οξύ.

Το βάρος των προϊόντων που μετρήθηκε αντιστοιχεί προφανώς μόνο στα αδιάλυτα πολυμερή ή ολιγομερή των αντιδράσεων, τα οποία λόγω υψηλού μοριακού βάρους ή διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων καθιζάνουν και άρα απομακρύνονται από το υδατικό περιβάλλον της αντίδρασης. Το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε, τουλάχιστον εν μέρει, να εξηγήσει τις χαμηλές αποδόσεις που επιτεύχθηκαν, ειδικά σε ότι αφορά την οξείδωση του γαλλικού οξέος, δεδομένου ότι τα διαλυτά πολύ- ή ολιγομερή δεν προσμετρώνται μεν στο ίζημα, αλλά είναι υπεύθυνα για την αλλαγή του χρώματος των αντιδράσεων, όπως φαίνεται και από τα φάσματα UV/Vis. Πιθανές διαφορές χρώματος θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν ένα μέτρο ποσοτικοποίησης αυτών των διαλυτών πολύ- ή ολιγομερών στο υπερκείμενο της αντίδρασης. Η αλλαγή του χρώματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης θα μπορούσε επίσης να οφείλεται και στο σχηματισμό κινονών από τη δράση του ενζύμου (Rouet-Mayer et al., 1990).

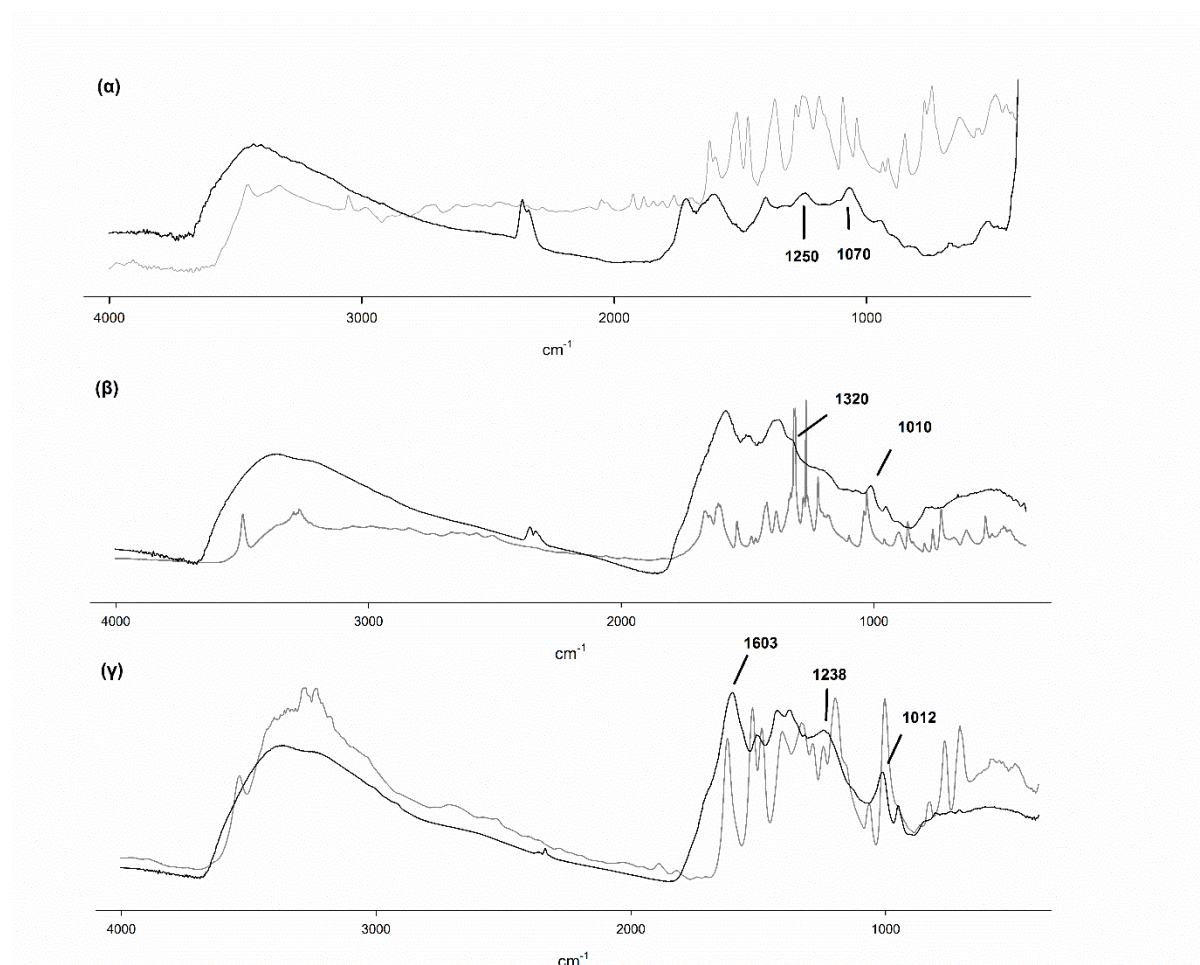
### 3.3.3.3 Φασματομετρική ανάλυση των προϊόντων

---

#### FT-IR φασματοσκοπία

Ακολούθως, λήφθηκαν φάσματα FT-IR και των τριών προϊόντων και των αντίστοιχων υποστρωμάτων τους, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.7.2. Τα φάσματα και των τριών προϊόντων ήταν σαφώς πιο ομαλά σε σχέση με τα αντίστοιχα υποστρώματα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.3.4. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι στα προϊόντα η κινητικότητα των πλευρικών υποκαταστατών είναι μειωμένη και άρα το τελικό προϊόν είναι πιο άκαμπτο, όπως συμβαίνει συνήθως στα πολυμερή. Σε όλες τις περιπτώσεις οι έντονες κορυφές των μονομερών στην περιοχή 3000-3600 cm, οι οποίες συνήθως οφείλονται στις ομάδες -OH των φαινολών, στα φάσματα των προϊόντων αντικαθίστανται με μια ευρεία κορυφή στα

3400 cm. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται συχνά σε φάσματα πολυμερών φαινολικών ουσιών και αποδίδεται στη μεγαλύτερη ακαμψία του μορίου, λόγω ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, και στην περιορισμένη κινητικότητα των εναπομείναντων μονάδων υδροξυλίου (Aktas et al., 2003).



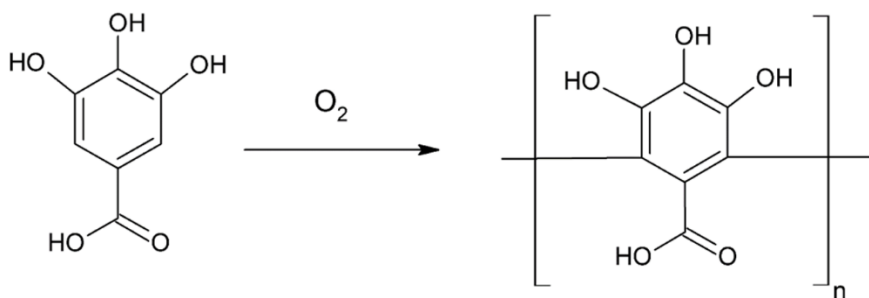
**Εικόνα 3.3.3.4:** Φάσματα FT-IR των προϊόντων βιομετατροπής και των αντίστοιχων υποστρωμάτων τους για τις φαινολικές ενώσεις (α) κατεχόλη, (β) γαλλικό οξύ, (γ) πυρογαλλόλη. Οι γκρι γραμμές αντιπροσωπεύουν τα φάσματα των υποστρωμάτων, ενώ οι μαύρες γραμμές των προϊόντων. Στα φάσματα σημειώνονται επίσης χαρακτηριστικές κορυφές.

Το προϊόν βιομετατροπής της κατεχόλης εμφανίζει χαρακτηριστικές κορυφές στο εύρος 1000-1300  $\text{cm}^{-1}$  τα οποία συμφωνούν με την ύπαρξη αιθερικού δεσμού C-O-C, όπως αναφέρεται και σε άλλες μελέτες (Sun et al., 2013, Aktas et al., 2003, Dubey et al., 1998). Συγκεκριμένα, οι κορυφές στα 1250 και 1070  $\text{cm}^{-1}$  υποδηλώνουν την ύπαρξη φαινυλ-αιθερικών δεσμών, όπως αναφέρουν και οι Dubey et al., (1998). Μια κορυφή στα 1606  $\text{cm}^{-1}$  υποδεικνύει την ύπαρξη δεσμών C=O των κινόνων που σχηματίζονται από την οξειδωτική δράση της λακκάσης. Στο φάσμα του προϊόντος βιομετατροπής του γαλλικού οξέος δεν παρατηρούνται αντίστοιχες κορυφές που να αντιστοιχούν σε αιθερικό δεσμό, γεγονός που έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη μελέτη των Lopez et al., (2013), και άρα τα μόρια του γαλλικού οξέος φαίνεται να συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς C-C. Σε ότι αφορά το φάσμα του προϊόντος βιομετατροπής της πυρογαλλόλης, μια κορυφή που εμφανίζεται στα 1603  $\text{cm}^{-1}$  πιθανώς αντιστοιχεί στο δεσμό C=O της κινόνης που σχηματίζεται από τη δράση της λακκάσης, όπως

αναφέρθηκε και προηγουμένως. Οι υπόλοιπες κορυφές που εμφανίζονται, στα 3381, 1374, 1238 και 1012  $\text{cm}^{-1}$ , αντιστοιχούν με αυτές που έχουν αναφερθεί σε προγενέστερη μελέτη για το μόριο της πουρπουρογαλλίνης (Miyazaki et al., 2004), η οποία αποτελεί προϊόν διμερισμού της πυρογαλλόλης.

#### Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H-NMR}$ )

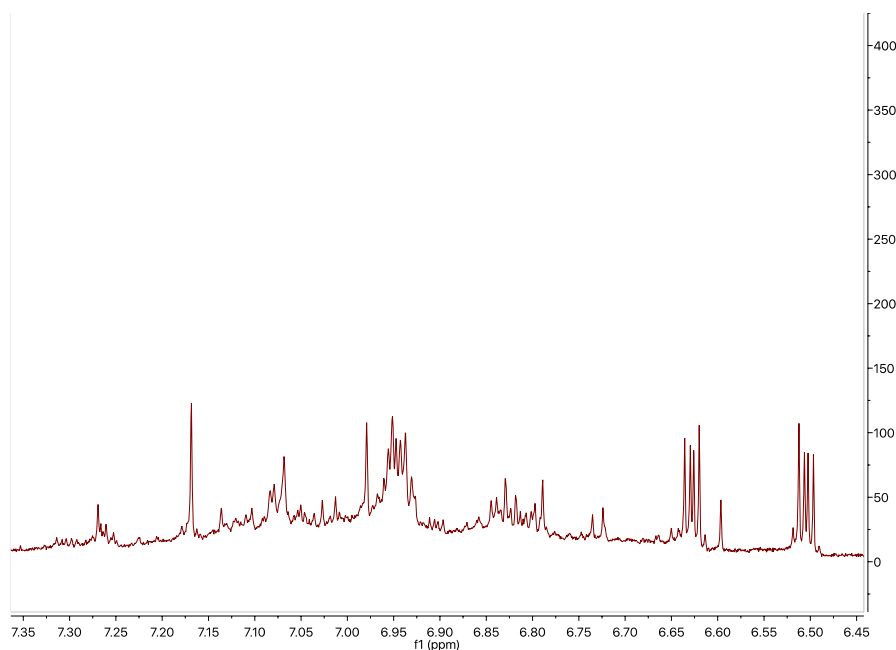
Η λήψη φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  των τριών προϊόντων βιομετατροπής έδειξε να επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας FT-IR. Αρχικά, για το προϊόν βιομετατροπής του γαλλικού οξέος, στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  που λήφθηκε δεν ανιχνεύθηκαν κορυφές που να αντιστοιχούν σε πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου, σε αντίθεση με το πρόδρομο γαλλικό οξύ, το φάσμα του οποίου εμφανίζει μια κορυφή στα 6,81 ppm η οποία αντιστοιχεί σε δύο αρωματικά πρωτόνια. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να συμφωνούν με τα αντίστοιχα αποτελέσματα των Lopez et al., (2013), όπου ο πολυμερισμός του γαλλικού οξέος με τη λακκάση του *T. versicolor* οδήγησε στο σχηματισμό ενός ημιαγωγικού υλικού (Lopez et al., 2013). Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό με τα δεδομένα από τη φασματοσκοπία FT-IR, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα μόρια του γαλλικού οξέος συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς C-C για να σχηματίσουν το αντίστοιχο πολυμερές, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4.5.



**Εικόνα 3.3.3.5:** Προτεινόμενη δομή του προϊόντος πολυμερισμού του γαλλικού οξέος από τη λακκάση *Novozym 51003*.

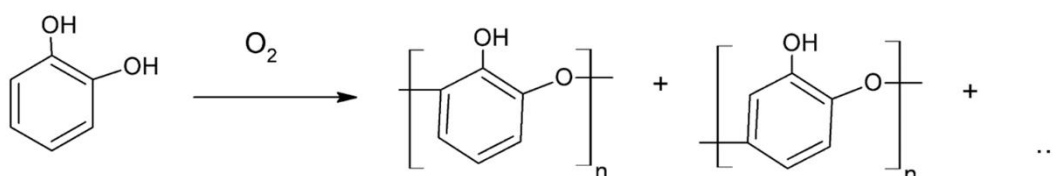
Το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του προϊόντος βιομετατροπής της κατεχόλης αποτελείται από πολλές κορυφές στην αρωματική περιοχή μεταξύ των 6,2 και 7,5 ppm, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.3.6.





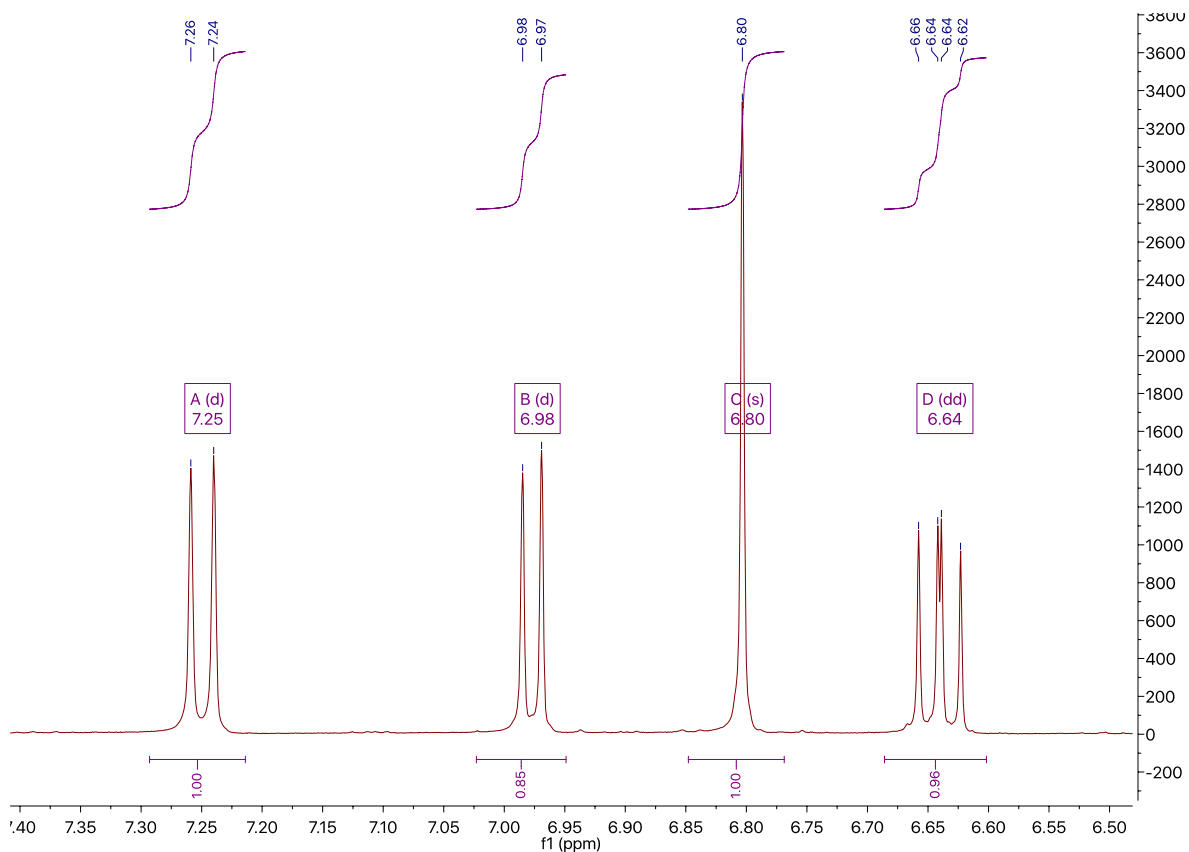
**Εικόνα 3.3.3.6:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του προϊόντος βιομετατροπής της κατεχόλης.

Η πολυπλοκότητα του φάσματος δεν επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της μοριακής δομής του προϊόντος. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των φασματοσκοπιών  $^1\text{H-NMR}$ , FT-IR και των προγενέστερων βιβλιογραφικών δεδομένων (Sun et al., 2013, Marczewska et al., 2013), οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η οξειδωτική μετατροπή της κατεχόλης καταλήγει σε ένα πολύπλοκο πολυμερές μόριο, επειδή οι άνθρακες που συμμετέχουν στο δεσμό μεταξύ των μονομερών μπορεί να βρίσκονται σε πάνω από μία θέση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.3.7.



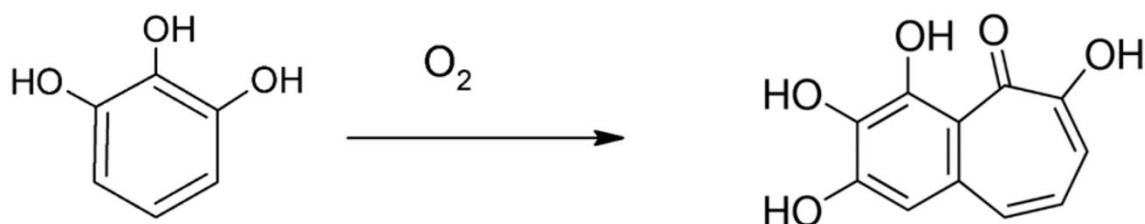
**Εικόνα 3.3.3.7:** Προτεινόμενη δομή του προϊόντος πολυμερισμού της κατεχόλης από τη λακκάση Novozym 51003.

Το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του προϊόντος βιομετατροπής της πυρογαλλόλης είναι αρκετά διαφορετικό από αυτό της πρόδρομης πυρογαλλόλης. Στο φάσμα της πυρογαλλόλης ανιχνεύθηκαν μόνο δύο κορυφές στα 6,32 και 6,15 ppm, λόγω της συμμετρικής μορφής του μορίου, το οποίο περιλαμβάνει μόνο δύο είδη πρωτονίων. Ωστόσο, στο φάσμα του προϊόντος βιομετατροπής, εμφανίζεται μόνο ένα αρωματικό πρωτόνιο με μια κορυφή στα 6,80 ppm, ενώ τα υπόλοιπα έχουν αντικατασταθεί από αλκενυλ-υδρογόνα, με κορυφές στα 7,25, 6,98 και 6,64 ppm, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.3.8.



**Εικόνα 3.3.3.8:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του προϊόντος βιομετατροπής της πυρογαλλόλης.

Οι κορυφές που φαίνονται στο φάσμα του προϊόντος βιομετατροπής της πυρογαλλόλης αντιστοιχούν σε αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, για το διμερές της πυρογαλλόλης, την πουρπουρογαλλίνη (Miyazaki et al., 2004). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, η προτεινόμενη δομή για το προϊόν βιομετατροπής της πυρογαλλόλης αντιστοιχεί στη δομή του διμερούς της (πουρπουρογαλλίνη) και φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 3.3.3.9:** Προτεινόμενη δομή του προϊόντος πολυμερισμού της πυρογαλλόλης από τη λακκάση Nonozym 51003.

### 3.3.3.4 Εκτίμηση μοριακού βάρους των προϊόντων

Ο πειραματικός προσδιορισμός των μοριακών βαρών των πολυμερών προϊόντων, δηλαδή της πολυκατεχόλης και του πολύ-γαλλικού οξέος, επιχειρήθηκε με ιξωδομετρία και με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Gel Permeation Chromatography, GPC), και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

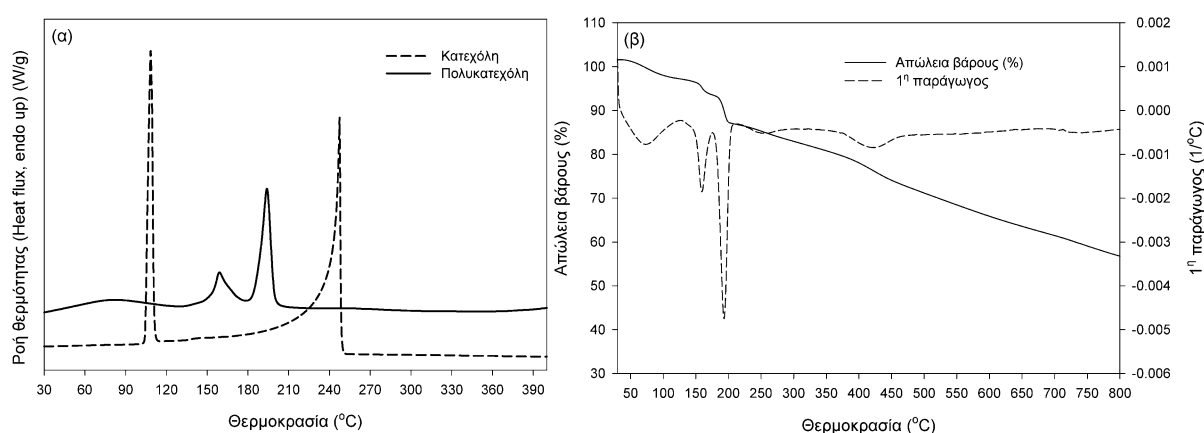
**Πίνακας 3.3.3.1:** Αποτελέσματα GPC και ιξωδομετρίας για την πολυκατεχόλη και το (πολύ)γαλλικό οξύ που συντέθηκαν με τη λακκάση.

	$\overline{M}_n$ (Da)	$\overline{M}_w$ (Da)	PDI	IV (dL g <sup>-1</sup> )
Πολυκατεχόλη	1700	26240	15,4	0,102 ± 0,013
(Πολύ)γαλλικό οξύ	2160	7600	3,5	0,058 ± 0,002

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.3.3.1, η τιμή IV της πολυκατεχόλης φαίνεται να είναι σχεδόν διπλάσια αυτής του πολύ-γαλλικού οξέος, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο ρυθμός του πολυμερισμού πιθανώς μειώνεται με αυξανόμενη πολυπλοκότητα των μονομερών, αφού το πολύ-γαλλικό οξύ εμφανίζει μικρότερο μοριακό βάρος αλλά και απόδοση προϊόντος μετά από 24 ώρες αντίδρασης. Τα αποτελέσματα της ιξωδομετρίας βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, όπως αυτά εκφράζονται με το μέσο μοριακό βάρος ( $\overline{M}_w$ ). Η μεγαλύτερη τιμή  $\overline{M}_w$  που παρατηρήθηκε για την πολυκατεχόλη αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη τιμή IV, ενώ αντίστοιχα η μικρότερη τιμή  $\overline{M}_w$  του πολύ-γαλλικού οξέος συνοδεύεται από μια μικρότερη τιμή IV. Ο συντελεστής κατανομής μοριακών βαρών, (polydispersity index, PDI) στην περίπτωση της πολυκατεχόλης εμφανίζεται ιδιαίτερα αυξημένος, σε σχέση με προηγούμενες αναφορές, καθώς σε προγενέστερες μελέτες πολυμερισμού της κατεχόλης οι τιμές  $\overline{M}_n$  που αναφέρονται για τα προϊόντα είναι έως και 2660 Da, με σχετικά μικρού εύρους κατανομή, αφού εμφανίζουν δείκτες PDI έως 1,2 (Sun et al., 2013, Kim et al., 2011., Aktas et al., 2003). Η ανακολουθία αυτή πιθανώς οφείλεται στις συνθήκες της αντίδρασης. Ωστόσο, ο συντελεστής PDI για το πολυγαλλικό οξύ φαίνεται να είναι αρκετά μικρότερος, ενώ αυτή είναι και η πρώτη φορά στη βιβλιογραφία που αναφέρονται αποτελέσματα χρωματογραφίας μοριακής διήθησης για πολυμερή γαλλικού οξέος. Λαμβάνοντας υπόψη τα μοριακά βάρη των μονομερών κατεχόλης και γαλλικού οξέος, μπορεί να υπολογιστεί και ο βαθμός πολυμερισμού για τα δύο προϊόντα, ο οποίος προσδιορίστηκε 12,7 για το πολύ-γαλλικό οξύ και 15,5 για την πολυκατεχόλη.

### 3.3.3.5 Θερμικά χαρακτηριστικά των προϊόντων του πολυμερισμού

Τα θερμικά χαρακτηριστικά των προϊόντων βιομετατροπής διερευνήθηκαν με χρήση των μεθοδολογιών διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC) και θερμοσταθμικής ανάλυσης (Thermogravimetric analysis, TGA), όπως περιγράφονται στα Κεφάλαια 2.7.1.1 και 2.7.1.2. Οι αναλύσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν στα προϊόντα της βιομετατροπής, αλλά και στα μονομερή τους, προκειμένου να ανιχνευθούν πιθανές επιμολύνσεις των μονομερών στα απομονωμένα προϊόντα. Η κατεχόλη έδειξε θερμοκρασία τήξης στους  $106.2 \pm 0.7$  °C και σημείο βρασμού στους  $244.6 \pm 0.1$  °C, σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Fiege et al., 2000), ενώ οι αντίστοιχες κορυφές δεν ανιχνεύθηκαν στο διάγραμμα του προϊόντος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.3.10.



**Εικόνα 3.3.3.10:** Καμπύλες θερμικής ανάλυσης (α) διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) και (β) θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA) για την ενζυμικά συντεθειμένη πολυκατεχόλη.

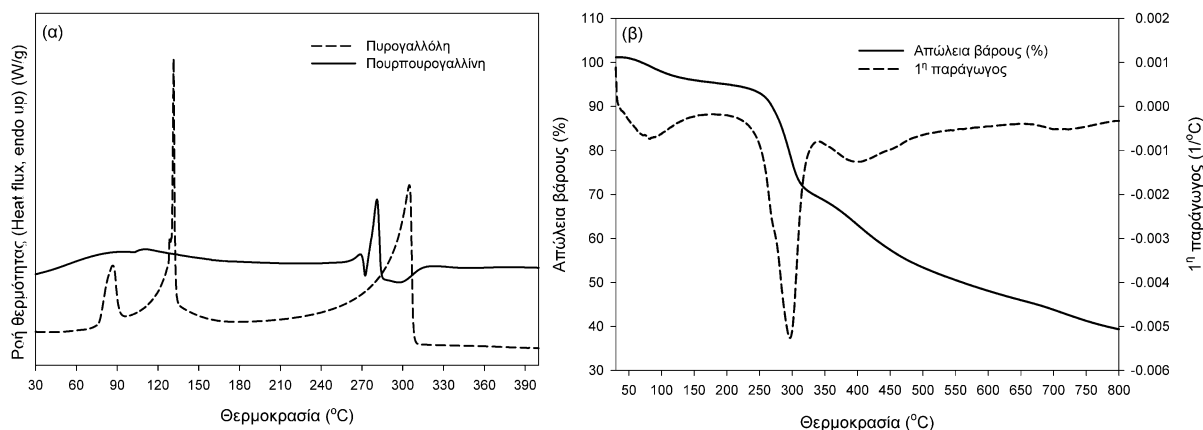
Η πολυκατεχόλη εμφανίζει μια ευρεία ενδόθερμη κορυφή στο εύρος 60–120 °C, η οποία μπορεί να αποδοθεί στην απομάκρυνση της εναπομείνουσας υγρασίας στο δείγμα, και επιπλέον δύο διακριτές ενδόθερμες κορυφές, μια μικρή κορυφή στους  $158.6 \pm 0.3$  °C και μια μεγαλύτερη κορυφή στους  $193.4 \pm 0$  °C με ολική ενθαλπία ( $\Delta H$ ) αντίστοιχη με  $239.1 \pm 1.9$  J g<sup>-1</sup>. Αυτό το φαινόμενο της τήξης δύο σταδίων, μπορεί να οφείλεται στη δημιουργία κρυστάλλων διαφορετικών μεγεθών, ως αποτέλεσμα της δημιουργίας μακρομορίων με διαφορετικά μοριακά βάρη ή και είδη, ή ακόμη και στη δημιουργία μικρών ή και ατελών κρυστάλλων (Jamshidi et al., 1988, Vougiouka et al., 2012, 2013). Η ανάλυση της πολυκατεχόλης με DSC πραγματοποιήθηκε επίσης και από τους Aktas et al. (2003), με αποτέλεσμα ένα μικρότερο σημείο τήξης, γύρω στους 125 °C, το οποίο πιθανώς οφείλεται στο μικρότερο μοριακό βάρος του προϊόντος (813 Da), σε σχέση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής.

Ακολούθως, τα δεδομένα από τις μετρήσεις DSC συμπληρώθηκαν και με ανάλυση TGA, προκειμένου να προσδιοριστεί η θερμική αντοχή της πολυκατεχόλης. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.3.3.10β, η πολυκατεχόλη εμφανίζει μια μικρή απώλεια βάρους της τάξης του 3-4% έως τους 140 °C, η οποία οφείλεται σε υπολειπόμενη υγρασία του δείγματος, και κατόπιν ξεκινά η αποικοδόμηση της πολυκατεχόλης, η οποία φαίνεται να εμφανίζει τρία διακριτά στάδια, με μέγιστες τιμές στους 157.6, 190.9 και 424.4 °C. Τα πρώτα δύο στάδια συμπίπτουν με τις ενδόθερμες κορυφές που

παρατηρήθηκαν στην DSC ανάλυση, γεγονός που υποδηλώνει απώλεια βάρους κατά την τήξη. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να οφείλεται είτε στην περαιτέρω απώλεια μορίων νερού παγιδευμένων ανάμεσα στα μόρια του πολυμερούς, στην αυξανόμενη τάση ατμών των μορίων που πλέον βρίσκονται σε αέρια κατάσταση, ή σε μερική αποικοδόμηση του πολυμερούς κατά την τήξη (Gabbott, 2008). Η εικόνα αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς στη βιβλιογραφία υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη θερμική συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της TGA ανάλυσης (Nabid et al., 2010, Aktas et al., 2003, Dubey et al., 1998). Όμως σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίζεται μια μικρή απώλεια βάρους, <10%, έως τους 150 °C, η οποία αποδίδεται στην απώλεια υγρασίας, και στη συνέχεια ξεκινά η αποικοδόμηση, της οποίας ο αριθμός των σταδίων, ο ρυθμός και η σταθερότητα του μορίου, συνήθως εξαρτώνται από το είδος του μονομερούς και το είδος του ενζύμου.

Σε ότι αφορά τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής για την πολυκατεχόλη, παρουσιάζει ενδιαφέρον ο ρυθμός αποικοδόμησης, ο οποίος εμφανίζεται ιδιαίτερα χαμηλός για θερμοκρασίες από 200 °C και πάνω, σε σύγκριση με συμβατικά πολυμερή υλικά, ενώ το υπόλειμμα που βρέθηκε για θερμοκρασία έως και 800 °C ήταν 57%, ελαφρώς υψηλότερο δηλαδή από αυτό που βρέθηκε στην εργασία των Aktas et al. (2003), όπου σημειώθηκε απώλεια βάρους 65% για πολυκατεχόλη συντεθειμένη με λακκάση υψηλού δυναμικού από τον *T. versicolor*. Επίσης, η ενζυμική σύνθεση πολυκατεχόλης με χρήση άλλων καταλυτών, όπως υπεροξειδάση HRP (Dubey et al., 1998), υπεροξειδάση σόγιας (Dubey et al., 1998) και πορφυρίνη (Nabid et al., 2010), είχαν ως αποτέλεσμα προϊόντα τα οποία εμφάνισαν υπόλειμμα λιγότερο του 40% στις ίδιες συνθήκες. Η σύγκριση αυτή υποδηλώνει ότι η πολυκατεχόλη που συντέθηκε στην παρούσα διατριβή εμφανίζει υψηλότερη σταθερότητα, σε σχέση με παρόμοια μόρια που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

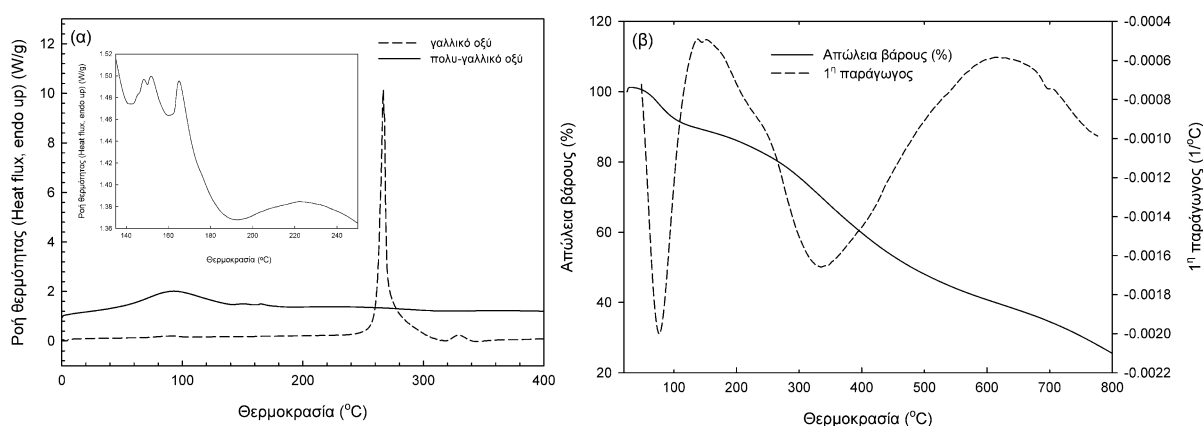
Οι δοκιμασίες θερμικής αντοχής της ενζυμικά συντεθειμένης πουργουρογαλλίνης έδωσαν αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά της πολυκατεχόλης. Οι ενδόθερμες κορυφές του μονομερούς, της τήξης ( $131.7 \pm 2.5$  °C) και του βρασμού ( $303.3 \pm 0.4$  °C), ήταν σε συμφωνία με τα χαρακτηριστικά της πυρογαλλόλης, όπως αναφέρονται από τον κατασκευαστή, και δεν ανιχνεύθηκαν στην καμπύλη DSC της πουργουρογαλλίνης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.3.11α. Η πουργουρογαλλίνη έδειξε μια ενδόθερμη κορυφή σε υψηλότερη θερμοκρασία από την πολυκατεχόλη, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.3.11α, δηλαδή στους  $280.15 \pm 0.1$  °C, με ολική ενθαλπία  $\Delta H_{total} = 103.2 \pm 0.9$  J g<sup>-1</sup>. Σχετικά με την καμπύλη του TGA, (Εικόνα 3.3.3.11β), μια μικρή απώλεια βάρους παρατηρήθηκε επίσης στους 140 °C, η οποία οφείλεται στην περιεχόμενη υγρασία του δείγματος. Ακολούθως, παρατηρούνται δύο στάδια απώλειας βάρους, το πρώτο στους 295.2 °C, δηλαδή σε υψηλότερη θερμοκρασία από αυτό της πολυκατεχόλης, και το δεύτερο στους 402 °C, το οποίο σχετίζεται με την αποικοδόμηση, η οποία οδήγησε σε υπόλειμμα μικρότερο του 40% για θερμοκρασίες έως και 800 °C.



**Εικόνα 3.3.3.11:** Καμπύλες θερμικής ανάλυσης (α) DSC και (β) TGA της ενζυμικά συντεθειμένης πουρπουρογαλλίνης.

Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι η απώλεια βάρους κατά την τήξη της πουρπουρογαλλίνης, στους 295 °C, ήταν σημαντικά υψηλότερη (30%) από την αντίστοιχη της πολυκατεχόλης (13%), γεγονός που θα πρέπει να αποδοθεί στην ταυτόχρονη αποικοδόμηση των μορίων διμερούς, λόγω της πιο υψηλής θερμοκρασίας τήξης.

Τέλος, σχετικά με τη θερμική συμπεριφορά του πολύ-γαλλικού οξέος, η τήξη του μονομερούς στους 266 °C δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα των πολυμερών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.3.12, ενώ και εδώ εμφανίζεται μια ευρεία κορυφή στους 100 °C λόγω της εξάτμισης της υπολειπόμενης υγρασίας. Σε αντίθεση με τη θερμική συμπεριφορά της πολυκατεχόλης, το πολύ-γαλλικό οξύ εμφανίζει μόνο δύο μικρές ενδόθερμες κορυφές στους 147 και 165 °C, χωρίς να συνοδεύονται με αντίστοιχη απώλεια βάρους, όπως φαίνεται από το διάγραμμα του TGA (Εικόνα 3.3.3.12β.)



**Εικόνα 3.3.3.12:** Καμπύλες θερμικής ανάλυσης (α) DSC και (β) TGA του ενζυμικά συντεθειμένου πολύ-γαλλικού οξέος.

Στην καμπύλη DSC του πολύ-γαλλικού οξέος δεν εμφανίζεται ξεκάθαρη ενδόθερμη κορυφή, όπως στην περίπτωση της πολυκατεχόλης, και αυτό το γεγονός μπορεί να αποδοθεί στον άμορφο χαρακτήρα του πολύ-γαλλικού οξέος σε συνδυασμό με το χαμηλότερο μοριακό του βάρος, όπως προέκυψε από τις μετρήσεις ιξωδομετρίας και χρωματογραφίας μοριακής διήθησης (Κεφάλαιο 3.3.3.4). Ο ρυθμός αποικοδόμησης εμφάνισε μια μέγιστη τιμή στους 331 °C, και είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υπολείμματος 25% στους 800 °C. Όπως και στις περιπτώσεις της πολυκατεχόλης και της πουργουρογαλλίνης, και εδώ η αποικοδόμηση συνέβη με σχετικά αργό ρυθμό, επιβεβαιώνοντας την σχετικά υψηλή θερμική αντοχή των ενζυμικά συντεθειμένων πολυμερών. Ειδικά στην περίπτωση του πολύ-γαλλικού οξέος, το υπόλειμμα που απέμεινε πάνω από τους 200 °C ήταν πάνω από 80%, ένα αποτέλεσμα εξίσου ικανοποιητικό με αυτά των προηγούμενων προσπαθειών ενζυμικού πολυμερισμού με τη λακκάση του *T. versicolor* (López et al., 2013).

## Κεφάλαιο 4

### Γενικά Συμπεράσματα – Μελλοντικές προκλήσεις

---

#### **4.1 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση μικροβιακού δυναμικού λιγνινολυτικών μυκήτων**

---

##### **4.1.1 Μικροβιακή αποικοδόμηση ΥΑΕ με χρήση επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων**

---

Η μικροβιακή αποικοδόμηση του ΥΑΕ επιχειρήθηκε στην παρούσα εργασία με τη χρήση επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων, τα οποία προμηθεύτηκαν από τη Μυκητοθήκη του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα στελέχη επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενη μελέτη των Koutrotsios and Zervakis (2014) οι οποίοι εξέτασαν την ικανότητα αποικοδόμησης του ΥΑΕ 39 στελεχών βασιδιομυκήτων προκειμένου να ξεχωρίσουν τα πιο αποδοτικά. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, σε μια προσπάθεια επίτευξης υψηλότερων επιπέδων αποικοδόμησης, εξετάστηκε μια σειρά παραμέτρων που επιδρούν στην παραγωγή βιομάζας από τα στελέχη αυτά, αλλά και στην επαγωγή των απαραίτητων λιγνινολυτικών ενζύμων. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η ρύθμιση συγκεκριμένων απλών παραμέτρων κατά την ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων σε ΥΑΕ, μπορεί να αυξήσει τη μείωση του φαινολικού φορτίου και τον αποχρωματισμό του αποβλήτου σε εξαιρετικά υψηλό βαθμό, ο οποίος ξεπέρασε το 90%. Ωστόσο, από τις παραμέτρους που δοκιμάστηκαν, η πιο σημαντική φάνηκε να είναι η πηγή αζώτου, καθώς σε αυτή την περίπτωση επιτεύχθηκαν και τα υψηλότερα ποσοστά αποικοδόμησης και από τα δύο μελετούμενα στελέχη. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν πράγματι εντυπωσιακές, τόσο σε ότι αφορά τη διάσπαση των φαινολικών ενώσεων (για παράδειγμα στις καλλιέργειες του *I. lacteus* η αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων αυξήθηκε κατά 73,8%) όσο και στον αποχρωματισμό του αποβλήτου, όπου για το ίδιο στέλεχος η αύξηση ήταν της τάξης του 96,7%, ενώ για το στέλεχος *P. citrinopileatus* τα ποσοστά αυτά ήταν αρκετά χαμηλότερα. Εξίσου σημαντικές ήταν και οι διαφορές που παρατηρήθηκαν και στην παραγωγή των λιγνινολυτικών ενζύμων αλλά και στην παραγωγή βιομάζας. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν εν μέρει αναμενόμενα, καθώς από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι τα ΥΑΕ περιέχουν συνήθως πολύ μικρές ποσότητες αζώτου, οι οποίες για κάποιους οργανισμούς δεν επαρκούν για την κάλυψη των μεταβολικών τους αναγκών. Προηγούμενες μελέτες σχετικά με την επίδραση της πηγής αζώτου στην παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων αναφέρουν αντικρουόμενα αποτελέσματα (Grinhut et al., 2011, Jing, 2010, Kachlishvili et al., 2006, Mansur et al., 1998), και γι' αυτό το λόγο θεωρήθηκε απαραίτητη η διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων πηγών αζώτου στην ανάπτυξη και το προφίλ αποικοδόμησης των *P. citrinopileatus* και *I. lacteus*. Οι πηγές αζώτου που επιλέχθηκαν να εξεταστούν



ήταν τέτοιες που να περιλαμβάνουν όλες τις δυνατές μορφές πρόσληψης του αζώτου, δηλαδή άζωτο σε μορφή νιτρικών ιόντων, αμμωνιακών ιόντων, και αμινοξέων. Το νιτρικό άζωτο προστέθηκε με τη μορφή  $\text{KNO}_3$ , ενώ το αμμωνιακό άζωτο με το τρυγικό διαμμώνιο. Η ένωση αυτή επιλέχθηκε επειδή έχει βρεθεί σε προγενέστερες μελέτες ότι αυξάνει την ανάπτυξη και την παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων από βασιδιομύκητες (Srinivasan et al., 1995, Kamada et al., 2002). Το  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  επιλέχθηκε προς εξέταση επειδή περιέχει άζωτο σε μορφή νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων. Οι οργανικές μορφές αζώτου που επιλέχθηκαν ήταν το εκχύλισμα ζύμης, το οποίο είναι πλούσιο σε αμινοξέα, ενώ το εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού επιλέχθηκε ως μια σύνθετη πηγή αζώτου, χαμηλού κόστους, η οποία είναι πλούσια σε αμινοξέα αλλά και βιταμίνες, και έχει δειχθεί ότι προάγει την ανάπτυξη βιομάζας από τους βασιδιομύκητες (Paraspyridi et al., 2012). Λαμβάνοντας υπόψη τα εξαιρετικά αποτελέσματα που επιτεύχθηκαν στα εν λόγω πειράματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η προσθήκη κάποιας πηγής αζώτου μπορεί να οδηγήσει στην επίτευξη έως και πλήρους αποικοδόμησης των ΥΑΕ. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία φάνηκε ότι η πηγή αζώτου που μπορεί να λειτουργήσει πιο αποτελεσματικά για το σκοπό αυτό, μπορεί να είναι και μια χαμηλού κόστους πρώτη ύλη, όπως για παράδειγμα το παραπροϊόν κάποιας άλλης διεργασίας. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε το εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού, με εξαιρετικά αποτελέσματα, καθώς στην περίπτωση του στελέχους *P. citrinopileatus* αποδείχθηκε η πιο αποδοτική πηγή αζώτου από όσες εξετάστηκαν, ενώ και για το στέλεχος *I. lacteus* έδωσε εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Η διακύμανση των ενζυμικών ενεργοτήτων ανάλογα με τις εξεταζόμενες πηγές αζώτου είναι επίσης μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση που προέκυψε από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Σχετικά με τις ενζυμικές ενεργότητες λακκάσης, για τα στελέχη του γένους *Pleurotus* είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της λιγνίνης, και στην παρούσα εργασία το δεδομένο αυτό επιβεβαιώθηκε, με την επίτευξη ιδιαίτερα υψηλών ενεργοτήτων λακκάσης, άνω των  $1000 \text{ U L}^{-1}$ . Αντίστοιχες ενεργότητες λακκάσης δεν έχουν βρεθεί για το στέλεχος *I. lacteus* σε συνθήκες επαγωγής (Xu et al., 2009; Salvachua et al., 2013). Ωστόσο, στην παρούσα εργασία ο *I. lacteus* βρέθηκε ότι παράγει ένζυμα με ενεργότητα λακκάσης σε μικρό βαθμό, όπως έχει αναφερθεί (Novotný et al., 2000), αν και είναι προφανές από τα αποτελέσματα ότι ο σημαντικός βαθμός αποικοδόμησης του ΥΑΕ επιτυγχάνεται από το στέλεχος αυτό με την παραγωγή άλλων οξειδωτικών ενζύμων. Αξιοσημείωτη είναι επίσης η παρατήρηση ότι τα στελέχη που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία φαίνεται να έχουν «επιλέξει» δύο διακριτές ενζυμικές στρατηγικές για την αποικοδόμηση της λιγνίνης, ο μὲν *P. citrinopileatus* μέσω της παραγωγής ιδιαίτερα μεγάλων ποσοτήτων λακκάσης, και ο δε *I. lacteus* μέσω της παραγωγής κυρίως υπεροξειδασών. Ωστόσο, φαίνεται ότι και οι δύο αυτές στρατηγικές είναι εξίσου αποδοτικές στην περίπτωση της αποικοδόμησης των ΥΑΕ υψηλού φαινολικού φορτίου.

Ωστόσο, καθώς τα πειράματα της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκαν με μια μικρή προκατεργασία του αρχικού ΥΑΕ, τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνευθούν με προσοχή. Παρά την σχεδόν πλήρη αποικοδόμηση του αποβλήτου από τα δύο εξεταζόμενα στελέχη, θα πρέπει να επισημανθεί το γεγονός ότι αυτό επιτεύχθηκε σε αποστειρωμένο μέσο καλλιέργειας. Η αποστείρωση του μέσου και η καλλιέργεια των στελεχών υπό ασηπτικές συνθήκες είναι ένα χρονοβόρο και ενεργοβόρο χαρακτηριστικό της διεργασίας, το οποίο, σε ενδεχόμενη μεταφορά της σε μεγάλη κλίμακα, ίσως να πρέπει να παραληφθεί ή να τροποποιηθεί. Σε προγενέστερες σχετικές μελέτες έχει δειχθεί ότι τα αποτελέσματα μπορεί να είναι αρκετά διαφορετικά στην περίπτωση όπου χρησιμοποιείται μη αποστειρωμένο υλικό (Fountoulakis et al., 2002). Βέβαια, προβλήματα που

σχετίζονται με την αύξηση του κόστους της διεργασίας μπορούν ενδεχομένως να αντιμετωπιστούν με την ταυτόχρονη αξιοποίησή του, όπως για παράδειγμα με την απομόνωση κάποιου χρήσιμου προϊόντος από τις καλλιέργειες αυτές, όπως θα αξιολογηθεί παρακάτω. Επιπλέον, η αραίωση του ΥΑΕ προκειμένου να είναι δυνατή η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να αποτελέσει ένα επιπλέον πρόβλημα, ειδικά στις μεσογειακές χώρες όπου η διαθεσιμότητα νερού δεν είναι απεριόριστη καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Ένα ακόμη πρόβλημα για την βιομηχανική αξιοποίηση της διεργασίας αυτής είναι η εποχιακή παραγωγή του αποβλήτου, καθώς επίσης και οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στη σύστασή του από χρονιά σε χρονιά.

#### 4.1.2 Παραγωγή γλυκανών από λιγνινολυτικούς μύκητες

---

Σε συνέχεια των ιδιαίτερα ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων που επιτεύχθηκαν σχετικά με την αποικοδόμηση των ΥΑΕ, επιχειρήθηκε κατόπιν η αξιοποίηση του αποβλήτου με την προσπάθεια απομόνωσης βιοδραστικών ουσιών από τις καλλιέργειες των βασιδιομυκήτων. Η παραγωγή γλυκανών από βασιδιομύκητες και η βιολογική τους δράση είναι καλά τεκμηριωμένη στη διεθνή βιβλιογραφία (Chen and Seviour, 2007), ωστόσο οι περισσότερες μελέτες αφορούν σε απομόνωση γλυκανών από τα καρποσώματα βασιδιομυκήτων που έχουν αναπτυχθεί σε στερεή καλλιέργεια (Tong et al., 2009, Sun et al., 2012, Ruthes et al., 2015). Τα τελευταία χρόνια συγκεντρώνεται επίσης και ένας όγκος ερευνητικών εργασιών που αφορούν στην απομόνωση πολυσακχαριτών, κυρίως β-γλυκανών, από υγρή καλλιέργεια (Wang et al., 2005, Ruthes et al., 2015), με στόχο κυρίως την απομόνωση τόσο των ενδοκυτταρικών, όσο και των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών. Ωστόσο, οι δύο αυτές διεργασίες δεν έχουν δοκιμαστεί ποτέ σε συνδυασμό, προκειμένου να επιτευχθεί ο διπλός στόχος της αποικοδόμησης του ΥΑΕ με ταυτόχρονη αξιοποίησή του για παραγωγή πολυσακχαριτών από βασιδιομύκητες, αν και υπάρχουν κάποιες αναφορές για αντίστοιχες προσπάθειες σε στελέχη ασκομυκήτων (Crognale et al., 2003). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή λοιπόν, επιχειρήθηκε για πρώτη φορά η αποικοδόμηση του ΥΑΕ με ταυτόχρονη παραγωγή και απομόνωση ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών από στελέχη βασιδιομυκήτων. Εάν επιχειρηθεί μια σύγκριση των προφίλ αποικοδόμησης μεταξύ των καλλιεργειών σε φιάλες με στόχο την αποικοδόμηση του ΥΑΕ, και των αποτελεσμάτων της μυκηλιακής ανάπτυξης και παραγωγής πολυσακχαριτών σε βιοαντιδραστήρα με ΥΑΕ ως πηγή άνθρακα, είναι προφανής η διαφορά μεταξύ της μείωσης του φαινολικού φορτίου και του αποχρωματισμού στις δύο πειραματικές ενότητες, κυρίως για το στέλεχος *P. citrinopileatus* το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στις δύο ερευνητικές προσπάθειες. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν εν μέρει αναμενόμενο, καθώς οι καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας που πραγματοποιήθηκαν με στόχο την απομόνωση των πολυσακχαριτών, αναπτύχθηκαν για πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τις καλλιέργειες σε φιάλες, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με στόχο την αποικοδόμηση του αποβλήτου. Χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα το στέλεχος *P. citrinopileatus*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία και στις δύο πειραματικές ενότητες, στην περίπτωση των καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρα με στόχο την απομόνωση των πολυσακχαριτών δεν παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών ενώσεων, ενώ ο αποχρωματισμός έφτασε μόλις το 7,1%. Οι αντίστοιχες τιμές για το πείραμα της αποικοδόμησης του ΥΑΕ ήταν 90,2% για τη μείωση του φαινολικού φορτίου και 86,1% για τον αποχρωματισμό. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εξηγηθεί εάν ληφθεί υπόψη η διάρκεια της καλλιέργειας σε κάθε περίπτωση: ενώ για την αποικοδόμηση του

αποβλήτου η διάρκεια της καλλιέργειας ήταν 22 ημέρες, για την παραγωγή γλυκανών σε βιοαντιδραστήρα με ΥΑΕ η διάρκεια ήταν μόλις 4 ημέρες. Στο διάστημα αυτό, η βιομάζα έπρεπε να συλλεχθεί από το βιοαντιδραστήρα, καθώς η ανάπτυξή της ήταν τέτοια, τόσο σε ότι αφορά την ποσότητα, όσο και την μορφολογία της ανάπτυξης η οποία ήταν σε μορφή συσσωματωμάτων, που δεν επέτρεπε πλέον την ομοιογενή κατανομή του θρεπτικού υλικού και του οξυγόνου. Επιπλέον, οι καλλιέργειες αυτές έπρεπε να τερματιστούν κατά την εκθετική φάση της ανάπτυξης, προκειμένου να είναι δυνατή η απομόνωση εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών, πριν γεννηθεί η ανάγκη να αποικοδομηθούν από τον ίδιο το μικροοργανισμό για παραγωγή ενέργειας. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τα άλλα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή πολυσακχαριτών. Έτσι, ενώ η παραγωγή πολυσακχαριτών από τους βασιδιομύκητες μπορεί να χαρακτηριστεί ικανοποιητική, η ταυτόχρονη αποικοδόμηση του ΥΑΕ δεν ήταν εξίσου αποδοτική όσο στα προηγούμενα πειράματα. Από την παρατήρηση αυτή γίνεται προφανής η ανάγκη αριστοποίησης όλων των παραμέτρων της διεργασίας, με λεπτομερή συντονισμό όλων των παραμέτρων που επιδρούν συνδυαστικά στη μυκηλιακή ανάπτυξη, προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Με την επιτυχημένη παραγωγή μικροβιακών ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθοδολογίας για την απομόνωση των πολυσακχαριτών αυτών σε καθαρή μορφή. Η επιθυμητή μεθοδολογία θα πρέπει επιπλέον να είναι χαμηλού κόστους, προκειμένου να μπορεί να εφαρμοστεί σε επίπεδο βιομηχανικής παραγωγής, αλλά να είναι και περιβαλλοντικά φιλική, για παράδειγμα με την αποφυγή χρήσης μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών, οι οποίοι θα πρέπει στη συνέχεια να απορριφθούν σε περιβαλλοντικούς αποδέκτες. Στη σύγχρονη βιβλιογραφία παρατίθενται πολυάριθμες μέθοδοι για την απομόνωση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών από βασιδιομύκητες (Maity et al., 2014, Mandal et al., 2010, Santos-Neves et al., 2008, Smiderle et al., 2006, Sun et al., 2012), ωστόσο οι περισσότερες μέθοδοι αναφέρονται στην απομόνωση από καρποσώματα (Amaral et al., 2008, Carbonero et al., 2006, Liu et al., 2012b), ενώ υπάρχουν και κάποιες αναφορές για μεθόδους απομόνωσης από μυκήλιο που έχει αναπτυχθεί σε υγρή καλλιέργεια (Lee et al., 2003, 2007, Liu et al., 2010). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, οι οποίες επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές μεθοδολογίες δύο διαφορετικών προσεγγίσεων: Στην μεν μέθοδο των Wei et al., (2008) τα στάδια καθαρισμού είναι αρκετά απλά, ενώ αποφεύγεται η υπέρμετρη χρήση οργανικών διαλυτών, ενώ η μέθοδος των Synytsya et al., (2009) περιλαμβάνει πολλά στάδια καθαρισμού, εξειδικευμένα για την απομάκρυνση των αναμενόμενων προσμίξεων, όπως είναι οι α-γλυκάνες, οι οποίες απομακρύνονται με τη χρήση εμπορικού ενζύμου, και οι πρωτεΐνες, οι οποίες απομακρύνονται με τη χρήση του αντιδραστηρίου Sevag, το οποίο αποτελείται από τους οργανικούς διαλύτες χλωροφόρμιο και βουτανόλη. Οι μεθοδολογίες αυτές έχουν αναπτυχθεί για την απομόνωση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών από καρποσώματα βασιδιομυκήτων, άρα η τροποποίησή τους για τη βέλτιστη απομόνωση από μυκήλιο είναι μια προφανής ανάγκη. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικά, καθώς η απλούστερη και πιο περιβαλλοντικά φιλική μέθοδος των Wei et al., (2008) έδειξε εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα με τη μέθοδο των Synytsya et al., (2009), ή και καλύτερα αποτελέσματα σε κάποιες περιπτώσεις, επιτυγχάνοντας αποδόσεις έως και πάνω από 40%, αρκετά μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Carbonero et al., 2006, Santos-Neves et al., 2008, Amaral et al., 2008). Τα αποτελέσματα αυτά είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για τη μελλοντική εφαρμογή των διεργασιών αυτών σε βιομηχανικό

επίπεδο. Αν και τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δεν είναι παρά μια πρώτη προσπάθεια διερεύνησης της δυνατότητας εφαρμογής τέτοιων μεθόδων σε ερευνητικό επίπεδο, η προσαρμογή των διαδικασιών καθαρισμού σε μεγάλη κλίμακα και η δοκιμή αυτοματοποιημένων μεθόδων απομόνωσης θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια ενοποιημένη, πιθανώς οικονομικά συμφέρουσα, διαδικασία ανάπτυξης των μυκήτων και παραλαβής του μυκηλίου, απομόνωσης και καθαρισμού των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, με ταυτόχρονη παραλαβή του υγρού κλάσματος και ταυτόχρονη απομόνωση και αξιοποίηση και των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών. Συγκεκριμένα για τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, η παραγωγή των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική για το στέλεχος *G. lucidum*, χωρίς να έχει προηγηθεί κανένα στάδιο βελτιστοποίησης της παραγωγής τους. Συγκεκριμένα, το κλάσμα εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών που παραλήφθηκε από τις καλλιέργειες του στελέχους αυτού, περιείχε υψηλή συγκέντρωση β-γλυκανών, άνω του 30%, με ταυτόχρονη ελάχιστη περιεκτικότητα α-γλυκανών, κάτω του 0,5%, χωρίς να εφαρμοστεί κάποια ιδιαίτερη μέθοδος καθαρισμού, με μια απλή καταβύθιση με αιθανόλη. Το αποτέλεσμα αυτό είναι πολύ ενθαρρυντικό για τη μελλοντική αξιοποίηση τέτοιων διεργασιών παραγωγής, ενώ η βελτιστοποίηση των παραμέτρων αναμένεται να οδηγήσει στην περαιτέρω αύξηση των αποδόσεων παραγωγής.

---

## **4.2 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση ενζυμικού δυναμικού λιγνινολυτικών μυκήτων**

---

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ως πηγή προέλευσης λιγνινολυτικών ενζύμων με πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές επιλέχθηκε ο θερμοφίλος ασκομύκητας *M. thermophila*. Οι λόγοι που οδήγησαν στην επιλογή του οργανισμού αυτού σχετίζονται κυρίως με τη θερμοφιλή φύση του, η οποία τον καθιστά ιδανικό οργανισμό για την απομόνωση θερμοφίλων ενζύμων, ένα χαρακτηριστικό ιδιαίτερα επιθυμητό σε βιομηχανικές εφαρμογές, που προσδίδει σταθερότητα στον εκάστοτε βιοκαταλύτη. Επιπλέον, το γονιδίωμα του οργανισμού αυτού είναι αποκωδικοποιημένο (Berka et al., 2011), με επιπλέον διαθέσιμα δεδομένα μεταγραφώματος σε συνθήκες ανάπτυξης σε λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα, γεγονός που διευκόλυνε πολύ την εύρεση γονιδιακών αλληλουχιών που υπερεκφράζονται κατά την ανάπτυξη σε τέτοια υποστρώματα. Η λιγνινολυτική δράση του οργανισμού δεν έχει τεκμηριωθεί βιβλιογραφικά, και δεν υπάρχουν αναφορές για ένζυμα με λιγνινολυτική δράση, εκτός από μια λακκάση (Berka et al., 1997). Ωστόσο, η λακκάση αυτή λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της παράγεται σήμερα σε βιομηχανική κλίμακα και είναι διαθέσιμη εμπορικά από την εταιρεία Novo Nordisk A/S με το εμπορικό όνομα Novozym 51003. Όλα αυτά τα δεδομένα καθιστούν τον *M. thermophila* ιδιαίτερα ελκυστικό οργανισμό για την εύρεση νέων καινοτόμων βιοκαταλυτών με πιθανώς λιγνινολυτική δράση.

#### 4.2.1 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός λιγνινολυτικών ενζύμων του μύκητα *M. thermophila*

---

Οι γονιδιακές αλληλουχίες που απομονώθηκαν από το γονιδίωμα του *M. thermophila* και κλωνοποιήθηκαν σε *P. pastoris* στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν δύο, και αφορούσαν σε μια υπεροξειδάση Τάξης II (*MtPerII*) και σε μια πολυφαινολική οξειδάση (*MtLac2*). Οι αλληλουχίες αυτές κρίθηκαν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες για παραγωγή και χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων των αντίστοιχων ενζύμων, κυρίως λόγω των χαμηλών ποσοστών ομοιότητας που παρουσίασαν τα γονίδια αυτά, με τις αλληλουχίες γνωστών χαρακτηρισμένων ενζύμων από τη βιβλιογραφία. Μετά την κλωνοποίηση και τον ομόλογο ανασυνδυασμό των γονιδίων στο γονιδίωμα της ζύμης *P. pastoris*, τα αντίστοιχα ένζυμα απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν πλήρως. Από τον χαρακτηρισμό τους προέκυψαν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα συμπεράσματα και στις δύο περιπτώσεις: κανένα από τα δύο αυτά ένζυμα δεν εμφάνισε βιοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες ταυτόσημες με άλλα χαρακτηρισμένα ένζυμα της βιβλιογραφίας. Αντιθέτως, ενώ κάποια από τα φυσικοχημικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ενζύμων αυτών μπορούν να επιτρέψουν την κατάταξή τους σε κάποια ευρύτερη ταξινόμηση μονάδα οξειδωτικών ενζύμων, οι διαφορές που παρουσιάζονται είναι εντυπωσιακές. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της υπεροξειδάσης *MtPerII*, φάνηκε ότι η οξειδωση των υποστρωμάτων συμβαίνει, εκτός από το ενεργό κέντρο όπου εντοπίζεται η αίμη, και στην επιφάνεια του ενζύμου σε χαμηλότερο βαθμό, όπως αποκάλυψαν τα δεδομένα της κινητικής μελέτης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι στην περίπτωση της *MtPerII* η οξειδωση των υποστρωμάτων πρέπει να περιλαμβάνει έναν μηχανισμό LRET, όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 1.2.4.1 για τις LiPs. Ωστόσο, η *MtPerII* δεν μπορεί να οξειδώσει τη βερατρυλική αλκοόλη, όπως συμβαίνει με τις LiPs, ούτε το μαγγάνιο, όπως συμβαίνει με τις MnPs, αλλά ούτε και βαφές υψηλού οξειδωτικού δυναμικού όπως ισχύει για τις VPs και DyPs, οπότε η υπεροξειδάση αυτή δεν μπορεί να ταξινομηθεί σε καμία από αυτές τις γνωστές και τεκμηριωμένες κατηγορίες. Ωστόσο, η *MtPerII* μπορεί να οξειδώσει μια πληθώρα άλλων φαινολικών υποστρωμάτων, ιδιότητα που την καθιστά εξαιρετικό βιοτεχνολογικό εργαλείο για πολλές συνθετικές εφαρμογές. Επιπλέον, η *MtPerII* φάνηκε να είναι εξαιρετικά θερμοσταθερό ένζυμο, ενώ και τα δεδομένα που προέκυψαν σχετικά με την ανθεκτικότητά της σε υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου ήταν εντυπωσιακά, καθώς υπερβαίνουν κατά πολύ τις τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Όλα αυτά τα πειραματικά δεδομένα υπογραμμίζουν την καινοτομία του βιοκαταλύτη αυτού, και ανοίγουν νέα πεδία ανακάλυψης καινούριων ενζύμων με ξεχωριστές ιδιότητες, τα οποία πιθανώς θα διευρύνουν τις υπάρχουσες γνώσεις σχετικά με τα οξειδωτικά ένζυμα και την εξάπλωσή τους, ειδικά στο φύλο των Ασκομυκήτων.

Σε γενικές γραμμές, αντίστοιχα συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν και για την *MtLac2*. Το ένζυμο αυτό, ενώ διαθέτει χαλκό στο ενεργό κέντρο του, όπως προέκυψε από τη βιοπληροφορική ανάλυση αλλά και τη μελέτη επίδρασης της προσθήκης χαλκού στο μέσο καλλιέργειας της γενετικά τροποποιημένης *P. pastoris*, ωστόσο φαίνεται να διαφέρει αρκετά από τις περισσότερες γνωστές λακκάσες. Καταρχάς, τα φασματοσκοπικά του χαρακτηριστικά μοιάζουν περισσότερο με τις κίτρινες ή λευκές λακκάσες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, καθώς από το φάσμα απορρόφησής του απουσιάζει η χαρακτηριστική κορυφή στα 610 nm των τυπικών μπλε λακκασών. Επίσης, τα φυσικοχημικά και βιοχημικά του χαρακτηριστικά, όπως το βέλτιστο pH και η θερμοκρασία δράσης, το μοριακό βάρος και το ισοηλεκτρικό σημείο, όπως επίσης και η εκτενής γλυκοζυλίωση, είναι όμοια

με αυτά των περισσότερων γνωστών λακκασών, αν και η θερμοσταθερότητά του είναι μεγαλύτερη από άλλα ένζυμα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Ωστόσο, σε ότι αφορά τα καταλυτικά του χαρακτηριστικά, παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές με τις περισσότερες γνωστές λακκάσες, οι οποίες και σε αυτή την περίπτωση υπογραμμίζουν τη μοναδικότητα του βιοκαταλύτη αυτού. Ενώ το ένζυμο είναι ικανό να οξειδώνει τυπικά υποστρώματα των λακκασών, όπως είναι το ABTS, κατεχολικά και μεθοξυ-φαινολικά υποστρώματα και αμίνες, εμφανίζει μια εξαιρετικά υψηλή ειδική ενεργότητα στην οξείδωση του ασκορβικού οξέος, χαρακτηριστικό που δεν είναι συνηθισμένο ανάμεσα στις λακκάσες της βιβλιογραφίας. Ασυνήθιστη επίσης είναι και η ομοιότητα της συγγένειας που εμφανίζεται ανάμεσα στο ABTS και τη 2,6-DMP, καθώς οι περισσότερες λακκάσες δείχνουν συνήθως μια πιο έντονη προτίμηση στο ένα ή το άλλο υπόστρωμα. Ο συνδυασμός όλων αυτών των πειραματικών δεδομένων δεν διευκολύνει το χαρακτηρισμό του ως λακκάση, ενώ τονίζει την καινοτομία του βιοκαταλύτη αυτού. Με την ανακάλυψη τέτοιων καινοτόμων βιοκαταλυτών, υπογραμμίζεται η ανάγκη ανακάλυψης και χαρακτηρισμού όλο και περισσότερων νέων ενζύμων από διαφορετικούς οργανισμούς, καθώς όπως φαίνεται η γνώση για την ενζυμική αποικοδόμηση του φαινολικού κλάσματος της φυτικής βιομάζας είναι σε γενικές γραμμές ελλιπής. Καθώς αντίστοιχα δεδομένα που αντιτίθενται στον παραδοσιακό ορισμό ενός ενζύμου ως λακκάση συσσωρεύονται συνεχώς, τείνει και διεθνώς να επικρατήσει η καθιέρωση πιο γενικών όρων για την περιγραφή των ενζύμων αυτών, όπως πιο πρόσφατα ο όρος πολυφαινολική οξειδάση ή laccase-like multicopper oxidase (LMCO, Reiss et al., 2013).

#### 4.2.2 Εφαρμογές λιγνινολυτικών ενζύμων

---

Προκειμένου να εξεταστεί το βιοτεχνολογικό δυναμικό των ενζύμων αυτών, το καθένα χρησιμοποιήθηκε σε μια βιοτεχνολογική εφαρμογή, στο πεδίο της οργανικής σύνθεσης. Επιπλέον, στα πλαίσια εξερεύνησης της βιοτεχνολογικής αξιοποίησης του ενζυμικού δυναμικού των λιγνινολυτικών μυκήτων, δοκιμάστηκε επίσης και μια εμπορική λακκάση στην δυνατότητα σύνθεσης καινοτόμων υλικών.

Αρχικά η ετερόλογη υπεροξειδάση του *M. thermophila*, MtPerII εφαρμόστηκε στη σύνθεση φαινολικού πολυμερούς, και συγκεκριμένα πολυκατεχόλης. Τα μοναδικά χαρακτηριστικά της υπεροξειδάσης αυτής την καθιστούν ένα εξαιρετικό εργαλείο σε τέτοιες εφαρμογές, καθώς η θερμοσταθερότητά της, αλλά κυρίως η ανθεκτικότητά της σε υψηλές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$ , μπορούν εν δυνάμει να οδηγήσουν σε καλύτερες αποδόσεις μετατροπής των υποστρωμάτων και μεγαλύτερη συγκέντρωση τελικού προϊόντος, σε σχέση με τις παραδοσιακές υπεροξειδάσες οι οποίες παρεμποδίζονται έντονα από υψηλές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$ . Η MtPerII φάνηκε ότι διαθέτει ικανότητα πολυμερισμού της κατεχόλης προς το σχηματισμό ενός αδιάλυτου στο νερό προϊόντος, γεγονός το οποίο, σε συνδυασμό με την ικανότητα του ενζύμου να οξειδώνει ένα πλήθος φαινολικών υποστρωμάτων, υποδηλώνει ότι το ένζυμο θα μπορούσε να δοκιμαστεί επίσης και στον οξειδωτικό πολυμερισμό άλλων φαινολικών ενώσεων προς σχηματισμό καινοτόμων προϊόντων, τα οποία είναι εξαιρετικά δύσκολο να παραχθούν με παραδοσιακές μεθόδους οργανικής σύνθεσης. Τα φαινολικά πολυμερή είναι προϊόντα μεγάλης αξίας, επειδή διαθέτουν μοναδικές φασματοσκοπικές και ηλεκτρικές ιδιότητες. Τέτοια υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θερμοανθεκτικά υλικά, βιοαισθητήρες, ή επικαλύψεις ηλεκτροδίων και άλλων ηλεκτρονικών προϊόντων (Ward et al., 2004),

αλλά η πιο σημαντική εφαρμογή τους είναι η παραγωγή καινοτόμων ρητινών, χωρίς να είναι αναγκαία η χρήση της τοξικής φορμαλδεΐδης.

Με την επιτυχία της παραγωγής της πολυκατεχόλης από την *MtPerII*, δοκιμάστηκε επίσης η δυνατότητα σύνθεσης πολυφαινολών και από την εμπορική λακκάση *Novozym 51003*, η οποία προέρχεται επίσης από το μύκητα *M. thermophila*. Γενικά οι λακκάσες είναι οξειδωτικά ένζυμα που προτιμώνται σε συνθετικές εφαρμογές σε σχέση με τις υπεροξειδάσες, καθώς δεν απαιτούν την προσθήκη  $H_2O_2$  και το μόνο παραπροϊόν της δράσης τους είναι το νερό. Η συγκεκριμένη λακκάση διαθέτει υψηλό οξειδωτικό δυναμικό και μπορεί να οξειδώσει μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων και άρα να χρησιμοποιηθεί σε μια μεγάλη ποικιλία εφαρμογών, οπότε και επιλέχθηκε για να δοκιμαστεί στον οξειδωτικό πολυμερισμό της κατεχόλης και άλλων φαινολικών υποστρωμάτων, όπως η πυρογαλλόλη και το γαλλικό οξύ. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, η κατεχόλη και το γαλλικό οξύ πολυμερίστηκαν προς το σχηματισμό μορίων μεγάλου μοριακού βάρους, ενώ το προϊόν οξείδωσης της πυρογαλλόλης ήταν το διμερές της, η πουρπουρογαλλίνη. Η πουρπουρογαλλίνη έχει δείχθει ότι διαθέτει σημαντική βιολογική δράση και ιδιαίτερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Miyazaki et al., 2004, Ku and Bae, 2014, Sugiyama et al., 1993), οπότε είναι προφανής η σημασία της παραγωγής της με περιβαλλοντικά φιλικές μεθόδους οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρήση βιοκαταλυτών. Τα προϊόντα του οξειδωτικού πολυμερισμού της κατεχόλης και του γαλλικού οξέος έδειξαν ικανοποιητική θερμοσταθερότητα, η οποία στην περίπτωση της πολυκατεχόλης ήταν υψηλότερη από αυτή που είχε επιτευχθεί σε προηγούμενες ερευνητικές προσπάθειες. Τα πολυφαινολικά προϊόντα της δράσης της λακκάσης έχουν δοκιμαστεί σε διάφορες εφαρμογές, όπως για την παραγωγή βαφών μαλλιών (Jeon et al., 2010) ή υφασμάτων (Sun et al., 2013, Kim et al., 2011). Η υψηλή αντιοξειδωτική τους ικανότητα τα καθιστά υποψήφια για χρήση σε εφαρμογές που σχετίζονται με τη βιομηχανία τροφίμων ή καλλυντικών, η ακόμη και φαρμακευτικών προϊόντων (Kurisawa et al., 2003). Η ηλεκτρική αγωγιμότητα των πολυφαινολών είναι ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό τους που θα μπορούσε να εφαρμοστεί στην κατασκευή βιοαισθητήρων (Marczewska and Przegalinski, 2013, Nabid et al., 2010). Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής υποστηρίζουν την υπεροχή των ενζύμων σαν εργαλεία σύνθεσης πολυμερών, λόγω της παρατήρησης ότι η δομή και οι ιδιότητες του επιθυμητού προϊόντος κάθε φορά μπορούν, έως ένα βαθμό τουλάχιστον, να ελεγχθούν με την επιλογή του κατάλληλου βιοκαταλύτη αλλά και του κατάλληλου μονομερούς. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η χρήση οξειδωτικών ενζύμων, όπως οι λακκάσες και οι υπεροξειδάσες, σε συνθετικές εφαρμογές, είναι μια ελκυστική εναλλακτική λύση στις παραδοσιακές μεθόδους χημικής σύνθεσης. Οι βιοκαταλύτες αυτοί προσφέρουν τη δυνατότητα σύνθεσης καινοτόμων υλικών με σχετικά χαμηλό κόστος και με περιβαλλοντικά φιλικές μεθόδους. Ειδικά για τα οξειδωτικά ένζυμα, το βασικό τους πλεονέκτημα είναι ότι προσφέρουν τη δυνατότητα εκμετάλλευσης διαφόρων απλών φαινολικών ενώσεων ως μονομερών πρώτων υλών για τη σύνθεση πολυμερών. Τέτοιου είδους απλές φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε αφθονία σε λιγνινοκυτταρινούχα παραπροϊόντα διαφόρων βιομηχανιών, όπως η βιομηχανία χαρτιού και χαρτοπολτού, ή η παραγωγή ελαιολάδου, και άρα μπορούν να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες με χαμηλό κόστος.

Η ετερόλογη λακκάση *MtLac2*, λόγω του χαμηλότερου οξειδοαναγωγικού δυναμικού που επέδειξε, δοκιμάστηκε σε μια ελαφρώς διαφορετική εφαρμογή οργανικής σύνθεσης, και συγκεκριμένα στη βιομετατροπή της χαλκόνης βουτεΐνης στην ωρόνη σουλφουρετίνη. Από τη σύγκριση των φασμάτων ESI-MS φάνηκε ότι το κύριο προϊόν ενζυμικής βιομετατροπής της βουτεΐνης ήταν όντως η σουλφουρετίνη, αν και εντοπίστηκαν και κάποιες ακόμη μικρότερες κορυφές. Με την υγρή

χρωματογραφία υψηλής απόδοσης επιβεβαιώθηκε το αποτέλεσμα αυτό, και επιπλέον κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός της εναπομείνουσας βουτεΐνης στην αντίδραση, από την παραγόμενη σουλφουρετίνη. Η επιτυχία της σύνθεσης σουλφουρετίνης από την *MtLac2* υπογραμμίζει τη βιοτεχνολογική αξία του ενζύμου αυτού σε ιδιαίτερες αντιδράσεις βιομετατροπής, όπου η εκλεκτικότητα παίζει σημαντικότερο ρόλο από την υψηλή οξειδωτική ικανότητα. Πιο συγκεκριμένα, λόγω ακριβώς του χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού της *MtLac2* το ένζυμο ήταν σε θέση να επιφέρει την επιθυμητή μετατροπή του μορίου της βουτεΐνης, με ταυτόχρονη ελάχιστη, έως και αμελητέα, παραγωγή άλλων παραπροϊόντων. Αντίστοιχα, μια άλλη λακκάση με υψηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, όπως η εμπορική λακκάση που χρησιμοποιήθηκε στα παραπάνω πειράματα πολυμερισμού, κατά πάσα πιθανότητα δεν θα ήταν σε θέση να επιτύχει την οξειδωτική κυκλοποίηση, αφού η δράση της πιθανώς θα οδηγούσε σε σχηματισμό πολλών διαφορετικών προϊόντων, μεταξύ αυτών και διμερή, ολιγομερή, ή κινόνες. Τα συμπεράσματα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι είναι αναγκαία η εύρεση όλο και περισσότερων νέων βιοκαταλυτών με καινοτόμες ιδιότητες, οι οποίοι θα χρησιμοποιούνται ανάλογα με την επιθυμητή εφαρμογή. Άλλωστε, είναι γνωστό ότι στις εφαρμογές οργανικής σύνθεσης γενικά προτιμώνται οι βιοκαταλύτες που μπορούν να δράσουν επιλεκτικά επί των υποστρωμάτων τους και να παράξουν προϊόντα υψηλής καθαρότητας. Έτσι, τα συμπεράσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αναδεικνύουν την ανάγκη επέκτασης των ερευνητικών προσπαθειών προς νέες οδούς ανακάλυψης καινούριων ενζύμων, με βέλτιστες αποδόσεις σε εκλεπτυσμένες αντιδράσεις βιομετατροπής.

---

### 4.3 Μελλοντικές προκλήσεις

---

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής και τα συμπεράσματα που προέκυψαν, όπως περιγράφηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια, προκύπτει μια σειρά περαιτέρω ερευνητικών προκλήσεων με κύριο στόχο την επέκταση και την περαιτέρω αξιοποίησή τους:

- Σε ότι αφορά την αξιοποίηση της διεργασίας αποικοδόμησης ΥΑΕ με χρήση στελεχών βασιδιομυκήτων, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η προσαρμογή των καλλιεργειών σε διεργασίες μεγάλης κλίμακας. Η εξέταση επιπλέον παραμέτρων που επιδρούν στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όπως είναι η αποστείρωση του υλικού, κρίνεται αναγκαία. Επίσης, θα μπορούσε να καταστεί εφικτή και η αξιοποίηση του υγρού κλάσματος των καλλιεργειών των Βασιδιομυκήτων σε ΥΑΕ, με το πέρας της καλλιέργειας. Το εξωκυτταρικό υγρό των καλλιεργειών αυτών, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, είναι πλούσιο σε λιγνινολυτικά ένζυμα, και θα μπορούσε πιθανά να αξιοποιηθεί για την περαιτέρω κατεργασία του ΥΑΕ *in situ*, ή και να αξιοποιηθεί σε άλλες εφαρμογές βιοεξυγίανσης, όπως η αποικοδόμηση βαφών.
- Σχετικά με την παραγωγή πολυσακχαριτών από ανάπτυξη βασιδιομυκήτων σε ΥΑΕ, θα ήταν χρήσιμη η αριστοποίηση των παραμέτρων ανάπτυξης για τη βέλτιστη παραγωγή τους με ταυτόχρονη αποικοδόμηση του αποβλήτου. Από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής προέκυψε ότι η αξιοποίηση τόσο του υγρού κλάσματος όσο και της αναπτυσσόμενης βιομάζας με στόχο την απομόνωση βιοδραστικών ουσιών είναι εφικτή, ενώ τα προϊόντα αυτά είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω σε εφαρμογές φαρμακευτικού ή και διατροφικού ενδιαφέροντος.



- Η ετερόλογη υπεροξειδάση του θερμοφίλου μύκητα *M. thermophila* MtPerII θα μπορούσε να δοκιμαστεί σε πειράματα κατευθυνόμενης εξέλιξης για την επέκταση του εύρους των υποστρωμάτων που μπορεί να οξειδώσει, με στόχο την επίτευξη της οξείδωσης υποστρωμάτων υψηλού οξειδωτικού δυναμικού. Επιπλέον, θα μπορούσε να δοκιμαστεί σε εφαρμογές οργανικής σύνθεσης, καθώς λόγω της ασυνήθιστης σταθερότητάς της σε υψηλές θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις  $H_2O_2$ , ίσως αποδειχθεί πιο συμφέρουσα οικονομικά εναλλακτική λύση σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται παραδοσιακές υπεροξειδάσες βασιδιομυκήτων. Ακόμη, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχαν πιθανές δομικές μελέτες του ενζύμου αυτού, προκειμένου να εξακριβωθεί ο μηχανισμός δράσης του και να συγκριθεί με άλλες γνωστές υπεροξειδάσες της βιβλιογραφίας. Μια τέτοια μελέτη θα μπορούσε επίσης να φανεί εξαιρετικά χρήσιμη στη διαλεύκανση των φυλογενετικών σχέσεων των μυκητιακών υπεροξειδασών και να εξηγήσει τη σχέση μεταξύ των ενζύμων που προέρχονται από τους βασιδιομύκητες και με αυτά των ασκομυκήτων. Η MtPerII θα μπορούσε επίσης να δοκιμαστεί σε εφαρμογές κατασκευής ενζυμικών ηλεκτροδίων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοαισθητήρες, λόγω του εύρους φαινολικών ενώσεων που μπορεί να οξειδώσει, αλλά και του εύρους  $H_2O_2$  στο οποίο μπορεί να παραμένει ενεργή.
- Η παραγωγή φαινολικών πολυμερών με χρήση οξειδωτικών ενζύμων, λακκασών και υπεροξειδασών, αν και κρίθηκε επιτυχής από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, βρίσκεται ακόμη σε πρωταρχικό επίπεδο και χρήζει περαιτέρω ερευνητικής προσπάθειας προκειμένου να κατασκευαστούν εμπορεύσιμα προϊόντα. Για παράδειγμα, είναι αναγκαία η εξέταση της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων, όπως ο διαλύτης, η αναλογία ενζύμου/υποστρώματος και η διάρκεια της αντίδρασης στη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Ακόμη, θα είχε ενδιαφέρον η εξέταση και άλλων χαρακτηριστικών των πολυμερών προϊόντων, όπως η μηχανική αντοχή και η ηλεκτρική αγωγιμότητα, προκειμένου να αξιολογηθεί η δυνατότητα χρήσης τους ως καινοτόμα υλικά. Η έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση θα μπορούσε πιθανά να οδηγήσει στην παραγωγή των επιθυμητών υλικών κατά παραγγελία, αλλά και σε βιοενεργές ενώσεις με ιδιαίτερες ιδιότητες για χρήση σε συγκεκριμένες εφαρμογές φαρμακευτικού ή άλλου ενδιαφέροντος.
- Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενα κεφάλαια, η πολυφαινολική οξειδάση MtLac2 εμφανίζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν ότι το ένζυμο αυτό θα μπορούσε να αναδειχθεί σε βιοκαταλύτη σημαντικού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Η MtLac2 θα μπορούσε να δοκιμαστεί και σε άλλες εφαρμογές οργανικής σύνθεσης, με φλαβονοειδή ή άλλα υποστρώματα, καθώς η δυνατότητα αξιοποίησής της σε τέτοιου είδους εφαρμογές κατέστη προφανής από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Ωστόσο, εκτός από την περίπτωση των εφαρμογών οργανικής σύνθεσης, το ένζυμο θα μπορούσε να δοκιμαστεί και σε άλλου τύπου εφαρμογές. Για παράδειγμα, η πολύ υψηλή ειδική ενεργότητα που έδειξε το ένζυμο ως προς το ασκορβικό οξύ, θα μπορούσε να βρει εφαρμογή στο σχεδιασμό και την κατασκευή βιοαισθητήρα ασκορβικού οξέος, με ακινητοποίησή του σε κατάλληλο ηλεκτρόδιο, όπως έχει αναφερθεί και για άλλα ένζυμα (Wen et al., 2012).

## Κεφάλαιο 5

### Βιβλιογραφία

- Κουή, Μ., Αβδελίδης, Ν., Θεοδωρακέας, Π., Χειλάκου, Ε.** (2015). Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση. [Κεφάλαιο Συγγράμματος]. Στο Κουή, Μ., Αβδελίδης, Ν., Θεοδωρακέας, Π., Χειλάκου, Ε. 2015. Μη καταστρεπτικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι εξέτασης των υλικών. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 7. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/6175>
- Abdel-Hamid, A. M., Solbiati, J. O., Cann, I. K. O.** (2013). Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. *Advances in Applied Microbiology*, 82, 1–28.
- Abelskov A.K., Smith A.T., Rasmussen C.B., Dunford H.B., Welinder K.G.** (1997). pH dependence and structural interpretation of the reactions of *Coprinus cinereus* peroxidase with hydrogen peroxide, ferulic acid, and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). *Biochem (Mosc)*, 36:9453-63
- Abrunhosa, L., Oliveira, F., Dantas, D., Goncalves, C., Belo, I.** (2013). Lipase production by *Aspergillus ibericus* using olive mill wastewater. *Bioprocess. Biosys. Eng.* 36, 285-291.
- Aggelis G., Ehalotis C., Nerud F., Stoychev I., Lyberatos G., Zervakis G.** (2002). Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(2-3): 353-360.
- Aggelis G., Iconomou D., Christou M., Bokas D., Kotzailias S., Christou G., Tsagou V., Papanikolaou S.** (2003). Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research* 37(16): 3897-3904
- Akihisa T., Nakamura Y., Tagata M., editors. et al.** (2007). Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Chem Biodivers*, 4:224–31
- Aktas N., Tanyolac A.** (2003). Reaction conditions for laccase catalysed polymerization of catechol. *Bioresour Technol*, 87:209-214.
- Aktas N., Sahiner N., Kantoglu O., Salih B., Tanyolac A.** (2003). Biosynthesis and characterization of laccase catalyzed poly(catechol). *J Polym Environ*, 11:123-8
- Aktas N., Çiçek H., Ünal A.T., Kibarer G., Kolankaya N., Tanyolaç A.** (2001). Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1- naphthol. *Bioresour Technol*, 80:29-36.
- Alarcón, J., Águila, S.** (2006). Lovastatin production by *Pleurotus ostreatus*: Effects of the C:N Ratio. *Z.Naturforsch.* 61c: 95-98.
- Albuquerque, J. A, Gonzalvez, J., Garcia, D., Cegarra, J.** (2004). Agrochemical characterization of “alpeorujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction, *Bioresour. Technol.* 91:195.
- Allendorf D.J., Yan J., Ross G.D., Hansen R.D., Baran J.T., Subbarao K., Wang L., Haribabu B.** (2005). C5a-mediated leukotriene B4- amplified neutrophil chemotaxis is essential in tumor immunotherapy facilitated by anti-tumor monoclonal antibody and b-glucan. *Journal of Immunology* 174: 7050–7056.
- Alper, N., Acar, J.** (2004). Removal of phenolic compounds in pomegranate juices using ultrafiltration and laccase-ultrafiltration combinations. *Nahrung*, 48, 184–187.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Amaral, A. E., Carbonero, E. R., Simao, R., de, C. G., Kadowaki, M. K., Sasaki, G. L., et al.** (2008). An unusual water-soluble -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. *Carbohydrate Polymers*, 72:473–478.
- Ander, P., Marzullo, L.** (1997). Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *Journal of Biotechnology*, 53, 115–131.

- Antorini M., Herpoel-Gimbert I., Choinowski T., Sigoillot J.C., Asther M., Winterhalter K., Piontek K.** (2002). Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. *Biochim Biophys Acta* 1594: 109–114.
- Asgher M., Bhatti H.N., Ashraf M., Legge R.L.** (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, 19: 771–783.
- Azbar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoglu, A., Sengul, F., Ozer, A.** (2004). A review of waste management options in olive oil production, *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 34:209.
- Baborova P., Moder M., Baldrian P., Cajthamlova K., Cajthaml T.** (2006). Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res Microbiol*, 157: 248-253.
- Baciocchi, E., Gerini, M. F., Lanzalunga, O., Lapi, A., Piparo, M. G. L., Mancinelli, S.** (2001). Isotope-effect profiles in the oxidative N-demethylation of N, N-dimethylanilines catalyzed by lignin peroxidase and a chemical model. *European Journal of Organic Chemistry*, 2001, 2305–2310.
- Baeta-Hall, L., Sáágua, M.C., Bartolomeu, M.L., Anselmo, A.M., Rosa M.F.** (2005). Biodegradation of olive oil husks in composting aerated piles. *Bioresource Technol*, 96 (1): 69–78
- Baldrian P., Valásková V., Merhautová V., Gabriel J.** (2005). Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in microbiology* 156(5-6): 670-676.
- Baldrian P.** (2006). Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30(2): 215-242.
- Bancerz, R., Ginalska, G.** (2007). A novel thermostable lipase from Basidiomycete *Bjerkandera adusta* R59: characterization and esterification studies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 553e560.
- Banerjee U.C., Vohra R.M.** (1991). Production of laccase by *Curvularia* sp. *Folia Microbiol* 36: 343–346.
- Bao X., Liu C., Fang J., Li X.** (2001). Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Carbohydr Res.* 332:67–74.
- Bao X., Liu A., Lu X., Li J. J.** (2012). Direct over-expression, characterization and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stability study of active *Pleurotus eryngii* versatilis peroxidase in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 34(8): 1537-1543.
- Baunsgaard L., Dalbøge H., Houen G., Rasmussen E. M., Welinder K. G.** (1993). Amino acid sequence of *Coprinus macrorhizus* peroxidase and cDNA sequence encoding *Coprinus cinereus* peroxidase. *European Journal of Biochemistry* 213(1): 605-611.
- Berka R.M., Grigoriev I.V., Otilar R., Salamov A., Grimwood J., Reid I., Ishmael N., John T., Darmond C., Moisan M.C., Henrissat B., Coutinho P.M., Lombard V., Natvig D.O., Lindquist E., Schmutz J., Lucas S., Harris P., Powlowski J., Bellemare A., Taylor D., Butler G., de Vries R.P., Allijn I.E., van den Brink J., Ushinsky S., Storms R., Powell A.J., Paulsen I.T., Elbourne L.D., Baker S.E., Magnuson J., Laboissiere S., Clutterbuck A.J., Martinez D., Wogulis M., de Leon A.L., Rey M.W., Tsang A.** (2011). Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nat Biotechnol.* 29(10):922-7. doi: 10.1038/nbt.1976.
- Bertrand G.** (1896). Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *C. R. Hebd. Seances Acad Sci* 123: 463–465.
- Bhatt M., Cajthaml T., Sasek V.** (2002). Mycoremediation of PAH-contaminated soil. *Folia Microbiol.* 47:255–258.
- Blaich R., Esser K.** (1975). Function of enzymes in wood destroying fungi. 2. Multiple forms of laccase in white rot fungi. *Arch Microbiol* 103: 271–277.
- Blánquez, P., Caminal, G., Sarrà, M., Vicent, M.T., Gabarrell, X.** (2002). Olive oil mill waste waters decoloration and detoxification in a bioreactor by the white rot fungus *Phanerochaete flavid-alba*. *Biotechnol. Prog.* 18, 660-662.
- Blodig W., Smith A.T., Doyle W.A., Piontek K.** (2001). Crystal structures of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in *Escherichia coli* and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism. *J Mol Biol* 305: 851–861.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93–99. doi:10.1002/elps.1150080203

- Bobek, P., Ondreička R., Klvanová J., Ozdín Ľ.** (1994). Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) decreases serum and liver cholesterol and increases cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase activity and fecal excretion of neutral sterols and bile acids in hypercholesterolemic rats. *Nutrition Research* 14(11): 1683-1688.
- Bobek, P., Galbavy, S.** (2001). Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *British J. Biomed. Sci.* 58 (3): 164–168.
- Boh B., Berovic M., Zhang J., Zhi-Bin L.** (2007). *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnol Annu Rev* 13:265–301.
- Bollag J.M., Chu H.L., Rao M.A., Gianfreda L.** (2003). Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. *J Environ Qual* 32: 63–69.
- Boudet A.M.** (2000). Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiol Biochem* 38: 81–96.
- Bourbonnais R., Paice M.G.** (1988) Veratryl alcohol oxidases from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem J* 255:445–450
- Bourbonnais, R., Paice M. G.** (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267(1): 99-102.
- Bourbonnais R., Paice M.G.** (1996). Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi J* 79: 199–204.
- Bradford M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Brown G.D., Gordon S.** (2005). Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans. *Cellular Microbiology* 7: 471–479.
- Brown G.D., Taylor P.R., Reid D.M., Willment J.A., Williams D.L., Martinez-Pomares L., Wong S.Y., Gordon S.** (2002). Dectin-1 is a major  $\beta$ -glucan receptor on macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 196: 407–412.
- Brozzoli, V., Crognale, S., Sampedro, I., Federici, F., D'Annibale, A., Petruccioli, M.** (2009). Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresour. Technol.* 100, 3395-3402.
- Burton S.** (2003). Laccases and phenol oxidases in organic synthesis. *Curr Org Chem* 7:1317-1331.
- Byss M., Elhottova D., Triska J., Baldrian P.** (2008). Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: Influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study. *Chemosphere* 73(9): 1518-1523.
- Cabana H., Agathos S.N.** (2007). Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: a review. *Eng Life Sci* 7:429–456.
- Call, H. P., Call, S.** (2005). New generation of enzymatic delignification and bleaching. *Pulp and Paper Canada*, 106, 45–48.
- Cegarra, J., Paredes, C., Roig, A., Bernal, M. P., Garcia, D.** (1996). Use of olive mill wastewater compost for crop production, *Int. Biodeterioration & Biodegradation* 38:193.
- Cajthaml T., Moder M., Kacer P., Sasek V. Popp P.** (2002). Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *J.Chromatogr. A* 974: 213–222.
- Cajthaml T., Erbanova P., Sasek V., Moeder M.** (2006). Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benz[a]anthracene by a ligninolytic fungus. *Chemosphere* 64:560–564.
- Cajthaml T., Kresinova Z., Svobodova K., Moder M.** (2009). Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere.* 75(6):745-50.
- Camarero S., Böckle B., Martínez M.J., Martínez A.T.** (1996) Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Appl Environ Microbiol* 62:1070–1072
- Camarero S., Sarkar S., Ruiz-Duenas F. J., Martinez M. J., Martinez A. T.** (1999). Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *Journal of Biological Chemistry* 274(15): 10324-10330.

- Camarero S., Ruiz-Duenas F.J., Sarkar S., Martinez M.J., Martinez A.T.** (2000) The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases. *FEMS Microbiol Lett*, 191:37–43.
- Canales M, Lobos S, Vicuna R.** (1998) Molecular modeling of manganese peroxidase from the lignin-degrading fungus *Ceriporiopsis subvermispota* and structural comparison with other peroxidases. *Electronic J Biotechnol*, 1, published August 15.
- Caputo A.C., Scacchia F., Pelagagge P.M.** (2003). Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions *Appl Therm Eng*, 23:197–214.
- Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Smiderle, F. R., Rosado, F. R., Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Iacomini M.** (2006). A  $\beta$ -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydr. Polym.* 66(2), 252-257.
- Castanera R., Pérez G., Omarini A., Alfaro M., Pisabarro A. G., Faraco V., Amore A., Ramírez L.** (2012). Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 78(11): 4037-4045
- Chai, R., Qiu, C., Liu, D., Qi, Y., Gao, Y., Shen, J., Qiu, L.** (2013).  $\beta$ -Glucan Synthase Gene Overexpression and  $\beta$ -Glucans Overproduction in *Pleurotus ostreatus* Using Promoter Swapping. *PLoS ONE* 8(4), e61693.
- Chang S. T, Buswell J. A.** (1999). *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetideae): A mushrooming medicinal mushroom. *Int J Med Mushrooms*. 1:139–46.
- Chang S. T, Buswell J. A.** (2008). Safety, quality control and regulational aspects relating to mushroom nutraceuticals. *Proc. 6th Intl. Conf. Mushroom Biology and Mushroom Products*. 188–95. GAMU GmbH, Krefeld, Germany.
- Chang, Y. W., Lu, T. J.** (2004). Molecular characterization of polysaccharides in hotwater extracts of *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Journal of Food and Drug Analysis*, 12, 59–67.
- Chang A., Scheer M., Grote A., Schomburg I., Schomburg D.** (2009). BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res* 37: D588-592.
- Chatjipavidis, I., Antonakou, M., Demou, D., Flouri, F., Balis, C.** (1996). Bio-fertilization of olive oil mills liquid wastes. The pilot plant in Messinia, Greece, *Int. Biodeterioration & Biodegradation* 38:183
- Chen, J., Zhang, L., Nakamura, Y., Norisuye, T.** (1998). Viscosity behavior and chain conformation of a (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucan from *Ganoderma lucidum*. *Polymer Bulletin*, 41, 471–478.
- Chen D. H, Shiou W. Y, Wang K. C, editors. et al.** (1999). Chemotaxonomy of triterpenoid pattern of HPLC of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*. *J Chin Chem Soc.* 46:47–51.
- Chen H.** (2006). Recent advances in azo dye degrading enzyme research. *Curr Protein Pept Sci* 7:101–111
- Chen, J., Seviour, R.** (2007). Medicinal importance of fungal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)- glucans. *Mycological Research*, 111, 635–652.
- Chen Y., Bicker W., Wu J., Xie M. Y., Lindner W.** (2010). *Ganoderma* species discrimination by dual-mode chromatographic fingerprinting: A study on stationary phase effects in hydrophilic interaction chromatography and reduction of sample misclassification rate by additional use of reversed-phase chromatography. *J Chromatogr.* 1217(8):1255–65.
- Chen, S. et al.** (2012). Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat. Commun.* 3:913.
- Cheng X., Jia R., Li P., Tu S., Zhu Q., Tang W., Li X.** (2007) Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. *Enzyme Microb Technol* 41:258–264
- Chien C. M, Cheng J. L, Chang W. T, editors. et al.** (2004). Polysaccharides of *Ganoderma lucidum* alter cell immunophenotypic expression and enhance CD56+ NK-cell cytotoxicity in cord blood. *Bioorg Med Chem.* 12:5603–9.
- Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K. H., Piontek, K.** (1999). The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxyl group on the C $\beta$  of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle. *Journal of Molecular Biology*, 286, 809–827.

- Chu, K.T., Xia, L., Ng, T.B.** (2005). Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. *Peptides* 26:2098–2103.
- Claus H.** (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol* 179: 145–150.
- Colao, M. C., Lupino S., Garzillo A. M., Buonocore V., Ruzzi M.** (2006). Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microbial Cell Factories* 5(1): 31.
- Colpa D. I., Fraaije M. W., van Bloois E.** (2014). DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41(1): 1-7.
- Coviello, T., Palleschi, A., Grassi, M., Matricardi, P., Bocchinfuso, G., Alhaique, F.** (2005). Scleroglucan: A versatile polysaccharide for modified drug delivery. *Molecules*, 10:6–33.
- Crognale S., Federici F., Petruccioli M.** (2003). beta-Glucan production by *Botryosphaeria rhodina* on undiluted olive-mill wastewaters. *Biotechnol Lett* 25(23): 2013-2015.
- da Luz J.M.R., Paes S.A., Nunes M.D., da Silva Md.C.S., Kasuya M.C.M.** (2013). Degradation of oxo-biodegradable plastic by *Pleurotus ostreatus*. *PLOS ONE* 8(8): e69386
- da Luz J.M.R., Paes S.A., Ribeiro K.V.G., Mendes I.R., Kasuya M.C.M.** (2015). Degradation of green polyethylene by *Pleurotus ostreatus*. *PLOS ONE* 10(6): e0126047.
- Daly R., Hearn M.T.W.** (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 18:119-38
- D'Annibale A., Celletti D., Felici M., Dimattia E., Giovannozzi- Sermanni G.** (1996). Substrate specificity of laccase from *Lentinus edodes*. *Acta Biotechnol* 16: 257–270.
- D'Annibale, A., Sermanni, G.G., Federici, F., Petruccioli, M.** (2006a). Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresour. Technol.* 97, 1828-1833.
- D'Annibale, A., Quaratino, D., Federici, F., Fenice, M.** (2006b). Effect of agitation and aeration on the reduction of pollutant load of olive mill wastewater by the white-rot fungus *Panus tigrinus*. *Biochem. Eng. J.* 29, 243e249.
- Dashtban M., Schraft H., Syed T. A., Qin W.** (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol.*, 1(1):36-50.
- Davila-Vazquez G., Tinoco R., Pickard M.A., Vazquez-Duhalt R.** (2005). Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzyme and Microbial Technology* 36:223-231.
- de la Rubia, T., Linares A., Pérez J., Muñoz-Dorado J., Romera J., Martínez J.** (2002). Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavid-alba*. *Research in Microbiology* 153(8): 547-554.
- Delcour, J.A., Vanhamel, S., Hoseney, R.C.** (1991). Physicochemical and functional properties of rye nonstarch polysaccharides. II. Impact of a fraction containing water-soluble pentosans and proteins on glutenstarch loaf volumes. *Cereal Chemistry* 68:72–76.
- De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R.** (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry* 104(2): 858-867.
- Dermeche S., Nadour M., Larroche C., Moulti-Mati F., Michaud P.** (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry* 48(10): 1532-1552.
- Detsi A., Majdalani M., Kontogiorgis C. A., Hadjipavlou-Litina D., Kefalas P.** (2009). Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17(23): 8073-8085.
- Di Lecce G., Cassano A., Bendini A., Conidi C., Giorno L., Toschi T. G.** (2014). Characterization of olive mill wastewater fractions treatment by integrated membrane process. *J Sci Food Agric* 94(14): 2935-2942.
- Doyle W.A., Blodig W., Veitch N.C., Piontek K., Smith A.T.** (1998). Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 37:15097–15105
- Du, W., Yu, H., Song, L., Zhang, J., Weng, C., Ma, F., Zhang, X.** (2011). The promoting effect of byproducts from *Irpex lacteus* on subsequent enzymatic hydrolysis of bio-pretreated cornstalks. *Biotechnology for Biofuels* 4(1): 37.

- Dubey S., Singh D., Misra R.A.** (1998) Enzymatic synthesis and various properties of poly(catechol). *Enzyme Microb Technol*, 23:432-437
- Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Brown S.H., Ostergaard P., Schneider P., Yaver D.S., Pedersen A.H., Davies G.J.** (1998). Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 angstrom resolution. *Nat Struct Biol* 5: 310–316.
- Edens W.A., Goins T.Q., Dooley D., Henson J.M.** (1999). Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Appl Environ Microbiol* 65: 3071–3074.
- Eggert C., Temp U., Dean J.F.D., Eriksson K.E.L.** (1995). Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. *FEBS Lett* 376: 202–206
- Eggert C., Temp U., Eriksson K.E.L.** (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62: 1151–1158.
- Ergül, F.E., Sargin, S., Öngen, G., Sukan, F.V.** (2009). Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 1-6.
- Fahraeus G.** (1961). Monophenolase and polyphenolase activity of fungal laccase. *Biochim Biophys Acta* 54: 192–194.
- Fahraeus G., Ljunggren H.** (1961). Substrate specificity of a purified fungal laccase. *Biochim Biophys Acta* 46: 22–32.
- Falade A. O., Nwodo U. U., Iweriebor B. C., Green E., Mabinya L. V., Okoh A. I.** (2016). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiologyopen*. doi:10.1002/mbo3.394.
- Falch B.H., Espevik T., Ryan L., Stokke B.T.** (2000). The cytokine stimulating activity of (1/3)-b-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. *Carbohydrate Research* 329: 587–596.
- Fan, L., Soccol, C. R., Pandey, A.** (2008). Mushroom Production. In: Pandey, A., Soccol, C. R., Larroche, C. (eds.) *Current Developments in Solid-state Fermentation*, pp. 253-274. Springer New York, New York.
- Fan, Y., He, X., Zhou, S., Luo, A., He, T., Chun, Z.** (2009). Composition analysis and antioxidant activity of polysaccharide from *Dendrobium denneanum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 45(2), 169-173.
- Fang, Z., Liu X., Chen L., Shen Y., Zhang X., Fang W., Wang X., Bao X., Xiao Y.** (2015). Identification of a laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels* 8(1): 54.
- Faraco V, et al.** (2008). Heterologous expression of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus* in *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:1329–1335
- Farmer V.C., Henderson M.E.K., Russell J.D.** (1960). Aromatic-alcoholoxidase activity in the growth medium of *Polystictus versicolor*. *Biochem J* 74:257–262
- Farrell, R. L., Murtagh, K. E., Tien, M., Mozuch, M. D., Kirk, T. K.** (1989). Characterization of lignin peroxidase isoenzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 322–328.
- Fawal N., Li Q., Savelli B., Brette M., Passaia G., Fabre M., Mathé C., Dunand D.** (2013) PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. *Nucleic Acids Res.* Jan;41(Database issue):D441-4. PMID:23180785
- Fenice M., Giovannozzi Sermanni G., Federici F., D'Annibale A.** (2003). Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology* 100(1): 77-85.
- Fernandez-Fueyo E., Ruiz-Duenas F.J., Miki Y., Martinez M.J., Hammel K.E., Martinez A.T.** (2012). Lignin-degrading peroxidases from genome of selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *J Biol Chem*, 287:16903-16
- Fernandez-Fueyo E., Ruiz-Duenas F. J., Martinez M. J., Romero A., Hammel K. E., Medrano F. J., Martinez A. T.** (2014a). Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnol Biofuels.* 7(1):2.
- Fernández-Fueyo E., Castanera R., Ruiz-Dueñas F. J., López-Lucendo M. F., Ramírez L., Pisabarro A. G., Martínez A. T.** (2014b). Ligninolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: Differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. *Fungal Genetics and Biology* 72: 150-161.

- Fernández-Fueyo E., Ruiz-Dueñas F. J., López-Lucendo M. F., Pérez-Boada M., Rencoret J., Gutiérrez A., Pisabarro A. G., Ramírez L., Martínez A. T.** (2016). A secretomic view of woody and nonwoody lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology for Biofuels* 9(1): 49.
- Ferreira P., Medina M., Guillén F., Martínez M.J., van Berkel W.J.H., Martínez A.T.** (2005) Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochem J* 389:731–738
- Ferreira P., Hernández-Ortega A., Herguedas B., Rencoret J., Gutiérrez A., Martínez M.J., Jiménez-Barbero J., Medina M., Martínez A.T.** (2010) Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem J* 425:585–593
- Ferreira-Leitao V.S., Godinho da Silva J., Bon E.P.S.** (2003) Methylene Blue and Azure B oxidation by horseradish peroxidase: a comparative evaluation of class II and class III peroxidases. *Applied Catalysis B: Environmental* 42:213–221
- Fiege, H., Voges, H.W., Hamamoto, T., Umemura, S., Iwata, T., Miki, H., Fujita, Y., Buysch, H.J., Garbe, D., Paulus, W.** (2000) Phenol derivatives. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, , doi: 10.1002/14356007.a19\_313.
- Finn R.D., Coghill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Mistry J., Mitchell A.L., Potter S.C., Punta M., Qureshi M., Sangrador-Vegas A., Salazar G.A., Tate J., Bateman A.** (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research, Database Issue* 44:D279-D285
- Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Parrella, A., Temussi, F.** (2004), Olive oil mill wastewater treatment using a chemical and biological approach, *J. Agric. Food Chem.* 51:5151.
- Fleet, G. H., Manners, D. J.** (1976). Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 94, 180–192.
- Froehner S.C., Eriksson K.E.L.** (1974). Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase. *J Bacteriol* 120: 458–465.
- Fountoulakis M. S., Dokianakis S. N., Kornaros M. E., Aggelis G. G., Lyberatos G.** (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 36(19): 4735-4744.
- Fukuzawa M., Yamaguchi R., Hide I., editors. et al.** (2008). Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of *Ganoderma lucidum* (Reishi Houshi) to its anti-tumor activity. *Biol Pharm Bull.* 31:1933–7.
- Furukawa, T., Bello, F. O., Horsfall, L.** (2014). Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation. *Frontiers in Biology*, 9, 448–471.
- Gabbott P.** (2008) *Principles and Applications of Thermal Analysis*. Blackwell, Oxford, England, UK, 1, p. 101.
- Galiatsatou P., Metaxas M., Arapoglou D., Kasselouri-Rigopoulou V.** (2002). Treatment of olive mill waste water with activated carbons from agricultural by-products. *Waste Management* 22(7): 803-812.
- Gao Y., Gao H., Chan E., editors. et al.** (2005). Antitumor activity and underlying mechanisms of ganopoly, the refined polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*, in mice. *Immunol Invest.* 34:171–98
- Garavaglia S., Cambria M.T., Miglio M., Ragusa S., Lacobazzi V., Palmieri F., D'Ambrosio C., Scaloni A., Rizzi M.** (2004). The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J Mol Biol* 342: 1519–1531.
- García-Castello, E., Cassano, A., Criscuoli, A., Conidi, C., Drioli, E.** (2010). Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system. *Water Res*, 44:3883–3892
- García-Ruiz, E., Maté, D., Ballesteros, A., Martínez, A. T., Alcalde M.** (2010). Evolving thermostability in mutant libraries of ligninolytic oxidoreductases expressed in yeast. *Microbial Cell Factories* 9: 17-17
- García-Ruiz E, Gonzalez-Perez D, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez AT, Alcalde M.** (2012) Directed evolution of a temperature-, peroxide- and alkaline pH-tolerant versatile peroxidase. *Biochem J*, 441:487-98
- Garg, N., Bieler, N., Kenzom, T., Chhabra, M., Ansorge-Schumacher, M., Mishra S.** (2012). Cloning, sequence analysis, expression of *Cyathus bulleri* laccase in *Pichia pastoris* and characterization of recombinant laccase. *BMC Biotechnology* 12(1): 1-12
- Gassara-Chatti F., Brar S. K., Ajila C. M., Verma M., Tyagi R. D., Valero J. R.** (2013). Encapsulation of ligninolytic enzymes and its application in clarification of juice. *Food Chemistry* 137: 18-24.



- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.** (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server, (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. pp. 571-607 Full text - Copyright Humana Press.
- Ge, Q., Zhang, A. Q., Sun, P. L.** (2010). Isolation, purification and structural characterization of a novel water-soluble glucan from the fruiting bodies of *Phellinus baumii* Pilat. *Journal of Food Biochemistry*, 34:1205–1215.
- Gelegenis J., Georgakakis D., Angelidaki I., Christopoulou N., Goumenaki M.** (2007). Optimization of biogas production from olive-oil mill wastewater, by codigesting with diluted poultry-manure. *Applied Energy* 84(6): 646-663.
- Gernjak W., Maldonado M. I., Malato S., Cáceres J., Krutzler T., Glaser A., Bauer R.** (2004). Pilot-plant treatment of olive mill wastewater (OMW) by solar TiO<sub>2</sub> photocatalysis and solar photo-Fenton. *Solar Energy* 77(5): 567-572.
- Giardina, P., Aurilia, V., Cannio, R., Marzullo, L., Amoresano, A., Siciliano, R., Pucci, P., Sannia, G.** (1996). The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *European Journal of Biochemistry*, 235: 508–515.
- Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G., Sannia, G.** (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*1. *Biochemical Journal*, 341:655–663.
- Gill, P., Moghadam, T. T., Ranjbar, B.** (2010). Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques*, JBT 21(4): 167-193.
- Glumoff, T., Harvey, P., Molinari, S., Goble, M., Frank, G., Palmer, J. M., et al.** (1990). Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* molecular and kinetic characterization of isozymes. *European Journal of Biochemistry*, 187, 515–520.
- Goetghebeur, M., Brun, S., Galzy, P., Nicolas, M.** (1993) Benzyl alcohol oxidase and laccase synthesis in *Botrytis cinerea*. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:1380–1381
- Gonzalez A. G, Leon F, Rivera A, Munoz C. M, Bermejo J.** (1999). Lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *J Nat Prod.* 62:1700–1.
- Gonzalez-Lopez, J., Pozo, C. Martinez-Toledo, V., Rodelas, B., Salmeron, V.** (1996). Production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in wastewater from olive oil mills (alpechin). *Int. Biodeterioration & Biodegradation* 38:271.
- González-Palma, I., Escalona-Buendía, H. B., Ponce-Alquicira, E., Téllez-Téllez, M., Gupta, V. K., Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J.** (2016). Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanol extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages. *Frontiers in Microbiology*, 7:1099.
- Gu, C., Zheng, F., Long, L., Wang, J., Ding, S.** (2014). Engineering the Expression and Characterization of Two Novel Laccase Isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by Fusing an Additional Ten Amino Acids Tag at N-Terminus. *PLOS ONE* 9(4): e93912.
- Gu L., Lajoie C., Kelly C.** (2003) Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog*, 19:1403-9
- Gu Y.H., Takagi Y., Nakamura T., Hasegawa T., Suzuki I., Oshima M., Tawaraya H., Niwano Y.** (2005). Enhancement of radioprotection and anti-tumor immunity by yeast-derived β-glucan in mice. *Journal of Medical Food* 8: 154–158.
- Gübitz G.M., Paulo A.C.** (2003). New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers. *Curr Opin Biotechnol* 14(6):577-582.
- Guillén F., Martínez A.T., Martínez M.J.** (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 209:603–611
- Guillén F., Martínez A.T., Martínez M.J., Evans C.S.** (1994) Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 41:465–470
- Gunde-Cimerman, N., Friedrich, J., Cimerman, A., Benicki, A.** (1993). Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG-CoA reductase: production of mevinolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 111: 203 - 206.

- Gunde-Cimerman, N., Cimerman, A.** (1995). *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. *Exp. Mycol.* 19(1): 1-6.
- Gupta R., Jung E., Brunak S.** (2004). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation.
- Hadj-esfandiari N., Navidpour L., Shadnia H., Amini M., Samadi N., Faramarzi M. A., Shafiee A.** (2007). Synthesis, antibacterial activity, and quantitative structure–activity relationships of new (Z)-2-(nitroimidazolylmethylene)-3()-benzofuranone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17(22): 6354-6363.
- Hakulinen N., Kiiskinen L.L., Kruus K., Saloheimo M., Paananen A., Koivula A., Rouvinen J.** (2002) Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Struct Biol* 9: 601–605.
- Halaburgi, V. M., Sharma, S., Sinha, M., Singh, T. P., Karegoudar T. B.** (2011). Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochemistry* 46(5): 1146-1152.
- Hammel K.E., Cullen D.** (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr Opin Plant Biol* 11: 349-355.
- Han, M. D., Han, Y. S., Hyun S. H., Shin, H. W.** (2008) Solubilization of water-insoluble beta-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *J. Environ. Biol.* 29(2), 237-242.
- Haralampidis K., Trojanowska M., Osbourn A. E.** (2002). Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 75:31–49.
- Harazono K., Nakamura K.** (2005) Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. *Chemosphere* 59:63–68
- Harkin J.M., Larsen M.J., Obst J.R.** (1974) Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Mycologia* 66: 469–476.
- Hatakka A.** (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev*, 13:125–35.
- Hatakka A.** (2001) Biodegradation of lignin. In: Hofrichter M, Steinbuchel A, editors. *Biopolymers. Vol. 1—Lignin, humic substances and coal.* Weinheim, Germany. Wiley-VCH, p. 129–80.
- Hayashi M., Wada K., Munakata K.** (1981). New nematocidal metabolites from a fungus *Irpex lacteus*. *Agric.Biol.Chem.* 45:1527–1529.
- Heinfling A., Martinez M. J., Martinez A. T., Bergbauer M., Szewzyk U.** (1998). Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 64(8): 2788-2793.
- Heinfling A., Ruiz-Dueñas F.J., Martinez M., Bergbauer M., Szewzyk U., Martinez A.T.** (1998b) A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Lett*, 428:141-6
- Heinze M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P., Anke T.** (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology* 64(5): 1601-1606.
- Heckman K.L., Pease L.R.** (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols* 2: 924–932
- Hernández-Ortega A., Ferreira P., Martínez A. T.** (2012). Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93(4): 1395-1410.
- Hilden K., Martinez A. T., Hatakka A., Lundell T.** (2005). The two manganese peroxidases Pr-MnP2 and Pr-MnP3 of *Phlebia radiata*, a lignin-degrading basidiomycete, are phylogenetically and structurally divergent. *Fungal Genet Biol* 42(5): 403-419.
- Hilden K., Hakala T.K., Lundell T.** (2009). Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnol Lett* 31: 1117-1128.
- Hirano T., Honda Y., Watanabe T., et al.** (2000) Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:1958–1962

- Ho Y. W., Yeung J. S., Chiu P. K., Tang W. M., Lin Z. B., Man R. Y., Lau C. S. (2007).** *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide reduced the production of proinflammatory cytokines in activated rheumatoid synovial fibroblast. *Mol Cell Biochem.* 301:173–9.
- Hofrichter M. (2002).** Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30(4): 454-466.
- Hofrichter M., Ullrich R., Pecyna M.J., Liers C., Lundell T. (2010)** New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 871–897.
- Holker U., Dohse J., Hofer M. (2002).** Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiol* 47: 423–427.
- Hong, F., Meinander N. Q., Jönsson L. J. (2002).** Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 79(4): 438-449.
- Horisberger, M., Lewis, B. A., Smith, F. (1972).** Structure of a (1→3)-β-d-glucan (pseudonigeran) of *Aspergillus niger* NNRL 326 cell wall. *Carbohydrate Research*, 23:183–188.
- Huang S.S., Song H.G. (2000).** Biodegradation of pyrene by the white rot fungus, *Irpex lacteus*. *J.Microbiol.Biotechnol.* 10:344–348.
- Huang, W.T., Tai, R., Hseu, R.S., Huang C.T. (2011).** Overexpression and characterization of a thermostable, pH-stable and organic solvent-tolerant *Ganoderma fornicatum* laccase in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* 46(7): 1469-1474.
- Hung, W. T., Wang, S. H., Chen, C. H., Yang, W. B. (2008).** Structure determination of β-glucans from *Ganoderma lucidum* with matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *Molecules*, 13:1538–1550.
- Ike, P. T. L., Moreira, A. C., de Almeida, F. G., Ferreira, D., Birolli, W. G., Porto, A. L. M., Souza, D. H. F. (2015).** Functional characterization of a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*. *SpringerPlus* 4(1): 654
- Ikeda R., Sugihara J., Uyama H., Kobayashi S. (1996).** Enzymatic oxidative polymerization of 2,6-dimethylphenol. *J Macromol* 29:8702-8705.
- Ikeda R., Tanaka H., Uyama H., Kobayashi S. (1998).** Laccase-catalyzed polymerization of acrylamide. *Macromol Rapid Commun* 19:423-425.
- Ishibashi K., Miura N.N., Adachi Y., Ohno N., Yadomae T. (2001).** Relationship between solubility of grifolan, a fungal 1,3-beta-D-glucan, and production of tumor necrosis factor by macrophages in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:1993–2000.
- Iyer G., Chattoo B.B. (2003).** Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol Lett* 227: 121–126.
- Ivancich, A., Mazza, G., Desbois, A. (2001).** Comparative electron paramagnetic resonance study of radical intermediates in turnip peroxidase isozymes. *Biochemistry*, 40, 6860–6866.
- Iwahara S., Nishihira T., Jomori T., Kuwahara M., Higuchi T. (1980)** Enzymic oxidation of α, β-unsaturated alcohols in the side chains of lignin-related aromatic compounds. *J Ferment Technol* 58:183–188
- Iwahara K., Hirata M., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M. (2000).** Free-radical polymerization of acrylamide by manganese peroxidase produced by the white-rot basidiomycete *Bjerkandera adusta*. *Biotechnology Letters* 22(17): 1355-1361.
- Jamshidi, K., Hyon, S., Ikada, Y. (1988)** Thermal characterization of polylactides. *Polymer*, 29, 2229–2234.
- Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthourhout, M., Penninckx, M.J. (2003).** Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 802e809.
- Javier-Benitez, F., Beltran-Heredia, J., Acero, J. L., Pinilla, M. L. (1997).** Simultaneous photodegradation and ozonation plus UV radiation of phenolic acids -major pollutants in agroindustrial wastewaters, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 70:253.
- Jeon, J.R., Kim, E.J., Murugesan, K., Park, H.K., Kim, Y.M., Kwon, J.H., Kim, W.G., Lee, J.Y., Chang, Y.S. (2010)** Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colourations driven by homo- or hetero-polymer synthesis. *Microb. Biotechnol.*, 3, 324–335.
- Ji Z., Tang Q., Zhang J., Yang Y., Jia W., Pan Y. (2007).** Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *J Ethnopharmacol.* 112:445–50.

- Jiang J., Grieb B., Thyagarajan A., Sliva D.** (2008). Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-kappaB signaling. *Int J Mol Med.* 21:577–84.
- Jiang F, Kongsaree P, Charron R, Lajoie C, Xu H, Scott G, et al.** (2008b) Production and separation of manganese peroxidase from heme amended yeast cultures. *Biotechnol Bioeng*, 99:540-9
- Johannes C., Majcherczyk A., Huttermann A.** (1996) Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 313–317.
- Johannes C., Majcherczyk A.** (2000) Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl Environ Microbiol* 66: 524–528.
- Kachlishvili, E., Penninckx, M., Tsiklauri, N., Elisashvili, V.** (2006). Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 391-397.
- Kamada, F., Abe, S., Hiratsuka, N., Wariishi, H., Tanaka, H.** (2002). Mineralization of aromatic compounds by brown-rot basidiomycetes - mechanisms involved in initial attack on the aromatic ring. *Microbiology*, 148, 1939-1946.
- Karacsonyi, S., Kuniak, L.** (1994). Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble  $\beta$ -d-glucan. *Carbohydrate Polymers.* 24:107–111.
- Karnaouri, A., Topakas, E., Antonopoulou, I., Christakopoulos, P.** (2014). Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. *Frontiers in Microbiology*, 5, 281. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00281>
- Kasinath A., Novotny C., Svobodova K., Patel K.C., Ssek V.** (2003). Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 32:167–173.
- Kawagishi, H., Inagaki, R., Kano, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T., et al.** (1990). Formolysis of a potent antitumor (1→6)- $\beta$ -d-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydrate Polymers*, 12:393–403.
- Kersten P.J.** (1990). Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2936-2940.
- Kersten, P., Cullen, D.** (2014) Copper radical oxidases and related extracellular oxidoreductases of wood-decay Agaricomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 72, 124–130.
- Khoufi, S., Aloui, F., Sayadi S.** (2008). Extraction of antioxidants from olive mill wastewater and electro-coagulation of exhausted fraction to reduce its toxicity on anaerobic digestion. *J Hazard Mater*, 151 (2–3):531–539.
- Kiho T., Matsushita M., Usui S., Ukai S.** (1998). Biological activities of (1/3)-b-D-glucans with reducing glucose side chains. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62: 570–572.
- Kiho, T., Yoshida, I., Nagai, K., Ukai, S., Hara, C.** (1989). (1→3)- $\beta$ -d-glucan from an alkaline extract of *Agrocybe cylindracea*, and antitumor activity of its O- (carboxymethyl)ated derivatives. *Carbohydrate Research*, 189:273–279.
- Kiiskinen L.L., Viikari L., Kruus K.** (2002). Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 198–204.
- Kim S. J., Ishikawa K., Hirai M., Shoda M.** (1995). Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79(6): 601-607.
- Kim S.J., Shoda M.** (1999) Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* dec 1 involved in decolorization of dyes. *Appl Environ Microbiol* 65:1029–1035
- Kim, S., Silva, C., Evtuguin, D., Gamelas, J.F., Cavaco-Paulo, A.** (2011) Polyoxometalate/laccase-mediated oxidative polymerization of catechol for textile dyeing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89, 981–987.
- Kirk, T. K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K. E., Farrell, R. L.** (1986a). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 27–32.

- Kirk, T. K., Tien, M., Kersten, P. J.** (1986b). Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. Mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol  $\beta$ -aryl ether substructure of lignin. *Biochemical Journal*, 236, 279–287.
- Ko E.M., Leem Y.E. & Choi H.T.** (2001). Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 98–102.
- Kobayashi H., Yoshida R., Kanada Y., Fukuda Y., Yagyu T., Inagaki K., Kondo T., Kurita N., Suzuki M., Kanayama N., Terao T.** (2005). Suppressing effects of daily oral supplementation of  $\beta$ -glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 131: 527–538.
- Kogan, G.** (2000). (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 23: 107-152
- Kokol V., Doliska A., Eichlerova I., Baldrian P., Nerud F.** (2007) Decolorization of textile dyes by whole cultures of *Ischnoderma resinotum* and by purified laccase and Mn-peroxidase. *Enzyme Microb Technol* 40:1673–1677
- Kontogiorgos, V., Biliaderis, C.G., Kiosseoglou, V., Doxastakis, G.** (2004). Stability and rheology of egg-yolk-stabilized concentrated emulsions containing cereal  $\beta$ -glucans of varying molecular size. *Food Hydrocolloids* 18:987–998.
- Kournikakis B., Mandeville R., Brousseau P., Ostroff G.** (2003). Anthrax-protective effects of yeast  $\beta$  1,3 glucans. *Medscape General Medicine* 5: 1.
- Koutrotsios G., Zervakis G. I.** (2014). Comparative Examination of the Olive Mill Wastewater Biodegradation Process by Various Wood-Rot Macrofungi. *BioMed Research International* 2014: 14.
- Krugener, S., Zelena, K., Zorn, H., Nimtz, M., Berger, R.G.** (2009). Heterologous expression of an extra-cellular lipase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 57, 16e21.
- Ku, S.K., Bae, J.S.** (2014) Antiplatelet and antithrombotic activities of purpurogallin in vitro and in vivo. *BMB Rep.* 47, 376–381.
- Kubota T., Asaka Y., Miura I., Mori H.** (1982). Structures of ganoderic acids A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Helv Chim Acta.* 65:611–9.
- Kurisawa M., Chung J.E., Uyama H., Kobayashi S.** (2003). Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). *Macromol Biosci* 3:758-764.
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5
- Lafka, T.A., Lazou A.E., Sinanoglou V.J., Lazos E.S.** (2011). Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes *Food Chem*, 125:92–98
- Lan J., Huang X., Hu M., Li Y., Qu Y., Gao P., Wu D.** (2006) High efficient degradation of dyes with lignin peroxidase coupled with glucose oxidase. *J Biotechnol* 123:483–490
- Larrondo L.F., Lobos S., Stewart P., Cullen D., Vicuna R.** (2001) Isoenzyme multiplicity and characterization of recombinant manganese peroxidases from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 67(5):2070-5
- Larson, T. M., Anderson A. M., Rich J. O.** (2013). Combinatorial evaluation of laccase-mediator system in the oxidation of veratryl alcohol. *Biotechnol Lett* 35(2): 225-231.
- Lawrence N. J., Rennison D., McGown A. T., Hadfield J. A.** (2003). The total synthesis of an aurone isolated from *Uvaria hamiltonii*: aurones and flavones as anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 13(21): 3759-3763.
- Lazaridou, A., Biliaderis C.G.** (2007). Molecular aspects of cereal  $\beta$ -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Journal of Cereal Science* 46(2): 101-118.
- Lee, B. C., Bae, J. T., Pyo, H. B., Choe, T. B., Kim, S. W., Hwang, H. J., Yun, J. W.** (2003) Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme Microb. Technol.* 32(5), 574-581.
- Lee, Y.L., Huang, G.W., Liang, Z.C., Mau, J.L.** (2007) Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *LWT - Food Sci. Technol.* 40(5), 823-833.

- Leontievsky, A. A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J. K., Pozdnyakova, N. N., Myasoedova, N. M., Kalkkinen, N., Golovleva, L. A., Cammack, R., Thurston, C. F., Hatakka, A.** (1997). Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 156: 9–14.
- Lesage-Meesen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J. C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J-L., Asther, M., Labat, M.** (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems, *Food Chem.* 75:501.
- Levasseur A., Drula E., Lombard V., Coutinho P. M. and Henrissat B.** (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels* 6(1): 41.
- Li, Q., Pei J., Zhao L., Xie J., Cao F., Wang G.** (2014). Overexpression and characterization of laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 50(2): 163-170.
- Li Z., Liu J., Zhao Y.** (2005). Possible mechanism underlying the antiherpetic activity of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. *J Biochem Mol Biol.* 38(1):34–40.
- Liang J., Melican D., Cafro L., Palace G., Fisetta L., Armstrong R., Patchen M.L.** (1998). Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity. *International Journal of Immunopharmacology* 20: 595–614.
- Liers C., Bobeth C., Pecyna M., Ullrich R., Hofrichter M.** (2010). DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(6): 1869-1879.
- Liers C., Pecyna M. J., Kellner H., Worrlich A., Zorn H., Steffen K. T., Hofrichter M., Ullrich R.** (2013). Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(13): 5839-5849.
- Lin S. C.** (2000). Beijing, China: Chinese Agricultural Press, Medicinal Fungi of China-Production and Products Development.
- Lincoff G.H.** (1981). The Audubon Society Field Guide to North American Mushrooms, pp. 467–468. Alfred A. Knopf Publishing, New York.
- Linde D., Coscolín C., Liers C., Hofrichter M., Martínez A. T. and Ruiz-Dueñas F. J.** (2014). Heterologous expression and physicochemical characterization of a fungal dye-decolorizing peroxidase from *Auricularia auricula-judae*. *Protein Expression and Purification* 103: 28-37.
- Linde D., Ruiz-Duenas F. J., Fernandez-Fueyo E., Guallar V., Hammel K. E., Pogni R., Martinez A. T.** (2015). Basidiomycete DyPs: Genomic diversity, structural-functional aspects, reaction mechanism and environmental significance. *Arch Biochem Biophys* 574: 66-74.
- Liu L., Dean J.F.D., Friedman W.E., Eriksson K.E.L.** (1994). Laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissue. *Plant J* 6: 213–224.
- Liu, X., Zhou, B., Lin, R., Jia, L., Deng, P., Fan, K., Wang, G., Wang, L., Zhang, J.** (2010) Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus sp.* mycelium. *Int. J. Biol. Macromol.* 47(2), 116-119.
- Liu, Z., D. Zhang, Z. Hua, J. Li, G. Du and J. Chen** (2010b). Improvement of laccase production and its properties by low-energy ion implantation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 33(5): 639-646.
- Liu X et al** (2011) Crystal structure and biochemical features of EfeB/YcdB from *Escherichia coli* O157: ASP235 plays divergent roles in different enzyme-catalyzed processes. *J Biol Chem* 286:14922–14931
- Liu D., Gong J., Dai W., Kang X., Huang Z, et al.** (2012). The Genome of *Ganoderma lucidum* Provide Insights into Triterpene Biosynthesis and Wood Degradation. *PLoS ONE* 7(5): e36146. doi:10.1371/journal.pone.0036146
- Liu J., Sun Y., Yu H., Zhang C., Yue L., Yang X., Wang L., Liu J.** (2012b). Purification and identification of one glucan from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus* (Fr.) Singer). *Carbohydrate Polymers* 87(1): 348-352.
- Lo H.C., Tsai F.A., Wasser S.P., Yang J.G., Huang B.M.** (2006). Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. *Life Science* 78: 1957–1966.

- Lobos S, Larram J, Salas L, Cullen D, Vicuna R.** (1994) Isoenzymes of manganese dependent peroxidase and laccase produced by the lignin degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology*, 14:2691–8.
- Lopez, M. J., Ramos-Cormenzana, A.** (1996). Xanthan production from olive-mill wastewaters, *Int. Biodeterioration & Biodegradation* 38:263.
- Lopez, M. J., Moreno, J., and Ramos-Cormenzana, A.** (2001). *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters, *Water Res.* 35:1828.
- Lopez C, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM** (2004) Dye decolorization by manganese peroxidase in an enzymatic membrane bioreactor. *Biotechnol Prog* 20:74–81
- López, J., Hernández-Alcántara, J.M., Roquero, P., Montiel, C., Shirai, K., Gimeno, M., Bárzana, E.** (2013) *Trametes versicolor* laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 97, 100–105.
- Lorenzo, M., Moldes D., Rodríguez Couto S., Sanromán M. A.** (2005). Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere* 60(8): 1124-1128.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Lund M., Ragauskas A.J.** (2001). Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:699-703.
- Lundell, T., Wever, R., Floris, R., Harvey, P., Hatakka, A., Brunow, G., & Schoemaker, H.** (1993). Lignin peroxidase L3 from *Phlebia radiata*. Pre-steady-state and steady-state studies with veratryl alcohol and a non-phenolic lignin model compound 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy) propane-1,3-diol. *European Journal of Biochemistry*, 211, 391–402.
- Lyly, M., Salmenkallio-Marttila, M., Suortti, T., Autio, K., Poutanen, K., Lahteenmaki, L.** (2003). Influence of oat  $\beta$ -glucan preparations on the perception of mouthfeel and on rheological properties in beverages prototypes. *Cereal Chemistry* 80:536–541.
- Ma J., Ye Q., Hua Y., editors. et al.** (2002). New lanostanoids from the mushroom *Ganoderma lucidum*. *J Nat Prod.* 65:72–5.
- MacCallum, J. R.** (1985). Thermogravimetric analysis of polymers for assessing thermal degradation. *Thermochimica Acta* 96(2): 275-281.
- Macauley-Patrick, S., M. L. Fazenda, B. McNeil and L. M. Harvey** (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22(4): 249-270.
- Madejón E., Galli E., Tomati U.** (1998). Composting of wastes produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica*, 42:135–146
- Mai C., Kues U. and Militz H.** (2004). Biotechnology in the wood industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 477-494.
- Maity P., Samanta S., Nandi A. K., Sen I. K., Paloi S., Acharya K. and Islam S. S.** (2014). Structure elucidation and antioxidant properties of a soluble  $\beta$ -d-glucan from mushroom *Entoloma lividoalbum*. *International Journal of Biological Macromolecules* 63: 140-149.
- Mandal S., Maity K.K., Bhunia S.K., et al.** (2010). Chemical analysis of new water-soluble (1 $\rightarrow$ 6),(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ , $\beta$ -glucan and water insoluble (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glucan (Calocyban) from alkaline extract of an edible mushroom, *Calocybe indica* (Dudh Chattu). *Carbohydr Res* 345:2657-63.
- Manios, Maniadaki, Kalogeraki, Mari, Terzakis, Magiatis, Mikros, Agalias, Spanos, and Manios** (2004). Co-composting olive residuals and green waste on Crete, *Biocycle International* 45(2):65.
- Mansur M., Arias M. E., Copa-Patiño J. L., Flärdh M. and González A. E.** (2003). The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia* 95(6): 1013-1020.
- Martínez M. J., Ruiz-Dueñas F. J., Guillén F. and Martínez Á. T.** (1996). Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* 237(2): 424-432.

- Martinez A.T., Speranza M., Ruiz-Duenas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillen F., Martinez M.J., Gutierrez A., del Rio J.C.** (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8: 195-204.
- Marques, I.P.** (2001). Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent re-use in irrigation, *Desalination* 137:233.
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R.** (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol*, 40:1451-63.
- Marczewska, B., Przegalinski, M.** (2013) Poly(catechol) electroactive film and its electrochemical properties. *Synth. Met.*, 182, 33–39.
- Martín García, A.I., Moumen A., Yáñez Ruiz D.R., Molina Alcaide E.** (2003). Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Anim Feed Sci Technol*. 107:61–74.
- Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D., Huang, K., & Chapman, J.** (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology*, 22, 695–700.
- Martinez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M. J., Gutierrez, A., et al.** (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International of Microbiology*, 8, 195–204.
- Martirani L, Giardina P, Marzullo L and Sannia G.** (1996). Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 30(8): 1914-1918
- Marzullo L., Cannio R., Giardina P., Santini M. T. and Sannia G.** (1995). Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *Journal of Biological Chemistry* 270(8): 3823-3827.
- Matos, A. J., Bezerra R.M., Dias A.A.** (2007). Screening of fungal isolates and properties of *Ganoderma applanatum* intended for olive mill wastewater decolourization and dephenolization. *Lett Appl Microbiol* 45(3): 270-275.
- Mau J. L, Lin H. C, Chen C. C.** (2001). Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Res Int.* 34:521–6.
- Mayell M.** (2001). Maitake extracts and their therapeutic potential. *Alternative Medicine Review* 6: 48–60.
- McIntyre D.D., Vogel H.J.** (1993). Structural studies of pullulan by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Starch* 45:406-10.
- Medeiros, S. D. V., Cordeiro, S. L., Cavalcanti, J. E. C., Melchuna, K. M., da Silva Lima, A. M., Filho, I. A., et al.** (2012). Effects of purified *Saccharomyces cerevisiae* (1→3)-b-glucan on venous ulcer healing. *International Journal of Molecular Science*, 13:8142–8158.
- Mehta, R.** (2012). Bioremediation of textile waste water. *Colourage*, 59, 46.
- Messerschmidt, A., R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, L. Avigliano, R. Petruzzelli, A. Rossi and A. Finazzi-Agró** (1992). Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 224(1): 179-205.
- Messerschmidt A.** (1997). *Multi-Copper Oxidases*. World Scientific, Singapore.
- Miller, G. L.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3): 426-428
- Min K.L., Kim Y.H., Kim Y.W., Jung H.S., Hah Y.C.** (2001). Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Arch Biochem Biophys* 392: 279–286.
- Miralles P., Chisvert A., Salvador A.** (2015). Determination of hydroxytyrosol and tyrosol by liquid chromatography for the quality control of cosmetic products based on olive extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 102: 157-161.
- Misaki, A., Kakuta, M., Sasaki, T., Tanaka, M., Miyaji, H.** (1981). Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: Antitumor action of periodate-modified, branched (1-3)-b-d-glucan of *Auricularia auricular-judae*, and other polysaccharides containing (1-3)-glycosidic linkages. *Carbohydrate Research*, 92, 115–129.



- Misaki, A., Kawaguchi, K., Miyaji, H., Nagae, H., Hokkoku, S., Kakuta, M., et al.** (1984). Structure of pestalotan, a highly branched (1-3)-b-d-glucan elaborated by *Pestalotia* sp. 815, and the enhancement of its antitumor activity by polyol modification of the side chains. *Carbohydrate Research*, 129:209–227.
- Mitrakas, M., Papageorgiou, G., Docoslis, A., Sakellaropoulos, G.** (1996). Evaluation of various pretreatment methods for olive mill wastewaters, *European Water Pollution Control* 6:10.
- Miyazaki, K., Arai, S., Iwamoto, T., Takasaki, M. Tomoda, A.** (2004). Metabolism of pyrogallol to purpurogallin by human erythrocytic hemoglobin. *Tohoku. J. Exp. Med.* 203, 319–330.
- Miyazawa N., Okazaki M., Ohga S.** (2008). Antihypertensive effect of *Pleurotus nebrodensis* in spontaneously hypertensive rats. *J Oleo Sci* 57(12): 675-681.
- Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., et al.** (1990). Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agricultural Biological Chemistry*, 54:2889–2896.
- Mohorcic M, Teodorovic S, Golob V, Friedrich J** (2006) Fungal and enzymatic decolorisation of artificial textile dye baths. *Chemosphere* 63:1709–1717
- Moilanen, A. M., Lundell, T., Vares, T., & Hatakka, A.** (1996). Manganese and malonate are individual regulators for the production of lignin and manganese peroxidase isozymes and in the degradation of lignin by *Phlebia radiata*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 792–799
- Molina-Alcaide E., Yáñez-Ruiz D. R.** (2008). Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Animal Feed Science and Technology* 147(1–3): 247-264.
- Molino B.F., Haydar S.N., Yang Z., Michels P.C., Hemenway M.S., Rich J.O., Khmelnitsky Y.** (2004). Preparation of novel cyclosporins. Patent WO2004082629 A2.
- Molitoris H.P., Esser K.** (1970). The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserine*. V. Properties of laccase I after further purification. *Arch Mikrobiol* 72: 267–296.
- Moncalvo J. M.** (2000). Systematics of *Ganoderma*. In: *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. Wallingford, UK: CAB International. pp. 23–45.
- Morales M, Mate MJ, Romero A, Jesus Martinez M, Martinez AT, Ruiz-Duenas FJ.** (2012). Two oxidation sites for low redox potential substrates: a direct mutagenesis, kinetic, and, crystallographic study on *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase. *J Biol Chem* 287:41053–41067
- More S. S., Renuka P. S., Pruthvi K., Swetha M., Malini S., Veena S. M.** (2011) Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp., *Enzyme Research*, vol. 2011, Article ID 248735, 7 pages., doi:10.4061/2011/248735
- Moreira PR, Bouillenne F, Almeida-Vara E, Malcata FX, Fre`re JM, Duarte JC** (2006) Purification, kinetics and spectral characterisation of a new versatile peroxidase from a *Bjerkandera* sp. isolate. *Enzyme Microb Technol* 38: 28–33
- Moş, A. C., M. Pârvu, G. Damian, F. D. Irimie, Z. Darula, K. F. Medzihradzsky, B. Brem and R. Silaghi-Dumitrescu** (2012). A “yellow” laccase with “blue” spectroscopic features, from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Process Biochemistry* 47(6): 968-975.
- Moussouni S., Detsi A., Majdalani M., Makris D. P. and Kefalas P.** (2010). Crude peroxidase from onion solid waste as a tool for organic synthesis. Part I: Cyclization of 2',3,4,4',6'-pentahydroxy-chalcone into aureusidin. *Tetrahedron Letters* 51(31): 4076-4078.
- Mu, H., Zhang, A., Zhang, W., Cui, G., Wang, S., Duan, J.** (2012) Antioxidative properties of crude polysaccharides from *Inonotus obliquus*. *Int. J. Mol. Sci.* 13(7), 9194-9206
- Muheim A, Leisola MSA, Schoemaker HE** (1990) Aryl-alcohol oxidase and lignin peroxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *J Biotechnol* 13:159–167
- Munoz C., Guillen F., Martinez A. T. and Martinez M. J.** (1997). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. *Appl Environ Microbiol.* 63(6):2166-74.
- Nabid, M., Zamiraei, Z., Sedghi, R, Nazari, S.** (2010) Synthesis and characterization of poly(catechol) catalyzed by porphyrin and enzyme. *Polym. Bull.*, 64, 855–865.,

- Nagasaki K., Kumazawa M., Murakami S., Takenaka S., Koike K., Aoki K.** (2008). Purification, characterization, and gene cloning of *Ceriporiopsis* sp. strain MD-1 peroxidases that decolorize human hair melanin. *Applied and Environmental Microbiology* 74(16): 5106-5112.
- Nakayama T., Yonekura-Sakakibara K., Sato T., Kikuchi S., Fukui Y., Fukuchi-Mizutani M., Ueda T., Nakao M., Tanaka Y., Kusumi T., Nishino T.** (2000). Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science* 290(5494): 1163-1166.
- Ng S.H., Mohd Zain M.S., Zakaria F., Wan Ishak W.R., Wan Ahmad W.A.N.** (2015). Hypoglycemic and antidiabetic effect of *Pleurotus sajor-caju* aqueous extract in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *BioMed Research International*. 2015:214918. doi:10.1155/2015/214918.
- Nicotra S., Cramarossa M.R., Mucci A., Pagnoni U.M., Riva S., Forti L.** (2004). Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophila* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron* 60:595-600.
- Nishitoba T., Sato H., Kasai T., Kawagishi H., Sakamura S.** (1984). New bitter C27 and C30 terpenoids from fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi) *Agric Biol Chem.* 48:2905-7.
- Novak, M., Vetvicka, V.** (2008). Beta-glucans, history, and the present: Immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *Journal of Immunotoxicology*, 5:47-57.
- Novotny C., Erbanova P., Cajthaml T., Rothschild N., Dosoretz C., Sasek V.** (2000). *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 54:850-853.
- Novotny C., Rawal B., Bhatt M., Patel M., Sasek V., Molitoris H. P.** (2001). Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology* 89: 113-122.
- Novotny C., Svobodova K., Kasinath A., Erbanova P.** (2004b). Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. *Internat.Biodeter.Biodegr.* 54:215-223.
- Novotny, C., Cajthaml T., Svobodova K., Susla M., Sasek V.** (2009). *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential - review. *Folia Microbiologica* 54(5): 375-390.
- Ntougias S., Baldrian P., Ehalotis C., Nerud F., Antoniou T., Merhautova V. and Zervakis G. I.** (2012). Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera *Ganoderma* and *Pleurotus*. *Chemosphere* 88(5): 620-626.
- Ntougias S., Gaitis F., Katsaris P., Skoulika S., Iliopoulos N. and Zervakis G. I.** (2013). The effects of olives harvest period and production year on olive mill wastewater properties – Evaluation of *Pleurotus* strains as bioindicators of the effluent's toxicity. *Chemosphere* 92(4): 399-405.
- Ntougias S., Baldrian P., Ehalotis C., Nerud F., Merhautová V. and Zervakis G. I.** (2015). Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi – Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. *Bioresource Technology* 189: 121-130
- Olivieri, G., Marzocchella A., Salatino P., Giardina P., Cennamo G. and Sannia G.** (2006). Olive mill wastewater remediation by means of *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Engineering Journal* 31(3): 180-187.
- Olivieri G., Russo M. E., Giardina P., Marzocchella A., Sannia G. and Salatino P.** (2012). Strategies for dephenolization of raw olive mill wastewater by means of *Pleurotus ostreatus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39(5): 719-729
- Ono E., Fukuchi-Mizutani M., Nakamura N., Fukui Y., Yonekura-Sakakibara K., Yamaguchi M., Nakayama T., Tanaka T., Kusumi T. and Tanaka Y.** (2006). Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29): 11075-11080.
- Ooi, V. E. C., Liu, F.** (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7:715-729.
- Oyetayo, F.L., Akindahunsi, A.A., Oyetayo, V.O.** (2007). Chemical profile and amino acids composition of edible mushrooms *Pleurotus sajor-caju*. *Nutr. Health* 18:383-389.
- Oz N. A., Uzun A. C.** (2015). Ultrasound pretreatment for enhanced biogas production from olive mill wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry* 22: 565-572.
- Padmesh TVN, Vijayaraghavan K, Sekaran G, Velan M** (2005) Batch and column studies on biosorption of acid dyes on fresh water macro alga *Azolla filiculoides*. *J Hazard Mater* 125:121-129

- Paliwal, R., Rawat, A. P., Rawat, M., Rai, J. P.** (2012). Bioligninolytic: recent updates for biotechnological solution. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 1865–1889.
- Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A. and Sannia G.** (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272(50): 31301–31307
- Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B. and Sannia G.** (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 920–924.,
- Palmieri G, et al.** (2003). Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 33:220–230.
- Papaspyridi, L., Sbokov, E., Christakopoulos, P.** (2012). Effect of carbon and nitrogen sources on the production of dietary fibers and glucans by submerged cultures of two Greek mushroom species, *Ganoderma australe* and *Pleurotus ostreatus*. *Acta Aliment.* 41, 200–210.
- Paraskeva C. A., Papadakis V. G., Tsarouchi E., Kanellopoulou D. G. and Koutsoukos P. G.** (2007). Membrane processing for olive mill wastewater fractionation. *Desalination* 213(1–3): 218–229.
- Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sanchez-Monedero, M.A., and Bernal, M.P.** (1999). Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes, *Bioresour. Technol.* 67:111.
- Paredes, C., Bernal, M.P., Roig, A., and Cegarra, J.** (2001). Effects of olive mill wastewater addition in composting of agroindustrial and urban wastes. *Biodegradation* 12:225.
- Parlavantza, M., Balis, C., Flouri, F., Chatjipavlidis, I., Belivanis, N., and Blyssides, A.** (1994). Composting of olive mill wastes in Sitia, Crete, (In Greek), in: Proc. Of Int. Symposium, Geot. I.Ch. Of Gr, Sitia, Crete, Greece, pp.174–184.
- Paterson R. R.** (2006). *Ganoderma*-a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*. 67(18):1985–2001.
- Patrabansh, S., Madan, M.** (1999). Mineral content of the fruiting bodies of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer cultivated on different kinds of biomass. *Acta Biotechnol.* 19:101–109.
- Pérez-Boada M., Doyle W. A., Ruiz-Dueñas F. J., Martínez M. J., Martínez A. T. and Smith A. T.** (2002). Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of in vitro folding. *Enzyme and Microbial Technology* 30(4): 518–524.
- Perez-Boada M, Ruiz-Duenas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T, Martinez MJ, Piontek K, Martinez AT** (2005) Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *J Mol Biol* 354, 385–402.
- Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G, Nielsen H.** (2011), SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8:785–786, 2011 doi: 10.1038/nmeth.1701
- Piontek, K., Glumoff, T., Winterhatter, K.** (1993). Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 315, 119–124.
- Piontek K., Antorini M., Choinowski T.** (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90- angstrom resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem* 277: 37663–37669.
- Piscitelli A., Giardina P., Mazzoni C., Sannia G.** (2005). Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:428–439.
- Pizzul, L., Castillo, M. D. P., Stenström, J.** (2009). Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation*, 20, 751–759.
- Pozdnyakova N. N., Chernyshova M. P., Grinev V. S., Landesman E. O., Koroleva O. V. and Turkovskaya O. V.** (2016). Degradation of fluorene and fluoranthene by the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 52(6): 621–628.
- Pulido J. M. O.** (2016). A review on the use of membrane technology and fouling control for olive mill wastewater treatment. *Science of The Total Environment* 563–564: 664–675.
- Rai HS, Bhattacharyya MS, Singh J, Bansal TK, Vats P, Banerjee UC.** (2005) Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Crit Rev Environ Sci Technol* 35:219–238

- Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sanchez, M., and Lopez, M. J.** (1995). Bioremediation of alpechin, *Int. Biodeterioration & Biodegradation* 35:249.
- Ramos-Cormenzana, A., Juarez-Jimenez, B., and Garcia-Pareja, M. P.** (1996). Antimicrobial activity of olive-mill waste waters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater, *Int. Biodeterioration and Biodegradation* 38:283.
- Reiss, R., J. Ihssen, M. Richter, E. Eichhorn, B. Schilling and L. Thöny-Meyer** (2013). Laccase versus Laccase-Like Multi-Copper Oxidase: A comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra *PLOS ONE* 8(6): e65633.
- Ricci L.C., Comasseto V., Andrade L.H., Capelari M., Cass Q.B., Porto A.L.M.** (2005). Biotransformations of aryl alkyl sulfides by whole cells of white-rot basidiomycetes. *Enzyme Microb. Technol.* 36:937–946.
- Rigas F., Dritsa V.** (2006). Decolorization of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 39:120–124.
- Rinaldi, M., Rana, G., Introna, M.** (2003). Olive-mill wastewater spreading in southern Italy: effects on a durum wheat crop. *Field Crops Research* 84:319.
- Rivas, J.F., Beltran, F. J., Gimeno, G., and Frades, J.** (2001). Treatment of olive oil mill wastewater by Fenton's reagent, *J. Agric. Food Chem.* 49:1873.
- Roberts JN, Singh R, Grigg JC, Murphy ME, Bugg TD, Eltis LD** (2011) Characterization of dye-decolorizing peroxidases from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Biochemistry* 50:5108–5119
- Rodriguez A., Falcon M.A., Carnicero A., Perestelo F., Delafuente G., Trojanowski J.** (1996). Laccase activities of *Penicillium chrysogenum* in relation to lignin degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 45: 399–403.
- Rodriguez E., Pickard M.A., Vazquez-Duhalt R.** (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr Microbiol* 38: 27–32.
- Rodriguez E., Nuero O., Guillen F., Martinez A. T. and Martinez M. J.** (2004). Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biol Biochem* 36.
- Romero E, Ferreira P, Martínez AT, Martínez MJ** (2009) New oxidase from *Bjerkandera* arthroconidial anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. *Biochim Biophys Acta* 1794:689–697
- Rouet-Mayer, M.A., Ralambosoa, J., Philippon P.** (1990) Roles of o-quinones and their polymers in the enzymic browning of apples. *Phytochemistry*, 29, 435–440
- Rovenský, J., Stančíková, M., Švík, K., Bauerová K., Jurčovičová, J.** (2009). The effects of  $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus ostreatus* on methotrexate treatment in rats with adjuvant arthritis. *Reumatol. Inter.*
- Rozzi, A., Malpei, F.** (1996). Treatment and disposal of olive mill effluents, *Int. Biodeterioration & Biodegradation* 38:135.
- Rothschild N., Novotny C., Sasek V., Dosoretz C.G.** (2002). Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*): isolation and characterization of lignin peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 31:627–633.
- Ruiz-Duenas F. J., Camarero S., Perez-Boada M., Martinez M. J. and Martinez A. T.** (2001). A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 2):116-22.
- Ruiz-Duenas FJ, Morales M, Perez-Boada M, Choinowski T, Martinez MJ, Piontek K & Martinez AT** (2007) Manganese oxidation site in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase: a site-directed mutagenesis, kinetic, and crystallographic study. *Biochemistry* 46, 66–77.
- Ruiz-Duepas, F.J., Fernandez, E., Martvnez, M.J., Martinez, A.T.** (2011). *Pleurotus ostreatus* heme peroxidases: an in silico analysis from the genome sequence to the enzyme molecular structure. *C. R. Biol.* 334:795–805
- Ruthes A. C., Smiderle F. R., Iacomini M.** (2015). d-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers* 117: 753-761.
- Saavedra M., Benitez E., Cifuentes C. and Nogales R.** (2006). Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation* 17(1): 93-102
- Sabbah, I., Marsook, T., Basheer, S.** (2004). The effect of pretreatment on anaerobic activity of olive mill wastewater using batch and continuous systems, *Process Biochem.* 39:1947.

**Sack U, Hofrichter M, Fritsche W.** (1997) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*. FEMS Microbiol Lett, 152:227–34.

**Sadhasivam, S., Savitha S., Swaminathan K., Lin F.-H.** (2008). Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. Process Biochemistry 43(7): 736-742

**Saez-Jimenez V, Baratto MC, Pogni R, Rencoret J, Gutierrez A, Ignacio Santos J, Martinez AT, Javier Ruiz-Duenas F.** (2015). Demonstration of lignin-to-peroxidase direct electron transfer a transient-state kinetics, directed mutagenesis, EPR and NMR study. J Biol Chem 290:23201–23213.

**Salvachúa, D., Martínez A. T., Tien M., López-Lucendo M. F., García F., de los Ríos V., Martínez M. J., Prieto A.** (2013a). Differential proteomic analysis of the secretome of *Irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. Biotechnology for Biofuels 6(1): 115.

**Salvachúa, D., Prieto A., Martínez Á. T., Martínez M. J.** (2013b). Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw. Applied and Environmental Microbiology 79(14): 4316-4324.

**Salvachua D, Prieto A, Martinez AT, Martinez MJ** (2013c) Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw. Appl Environ Microbiol 79:4316–4324

**Salvachua D., Prieto A., Mattinen M.-L., Tamminen T., Liitia T., Lille M., Willfor S., Martinez A. T., Martinez M. J. and Faulds C. B.** (2013d). Versatile peroxidase as a valuable tool for generating new biomolecules by homogeneous and heterogeneous cross-linking. Enzyme and Microbial Technology 52(6-7): 303-311.

**Salvachua D., Katahira R., Cleveland N. S., Khanna P., Resch M. G., Black B. A., Purvine S. O., Zink E. M., Prieto A., Martinez M. J., Martinez A. T., Simmons B. A., Gladden J. M. and Beckham G. T.** (2016). Lignin depolymerization by fungal secretomes and a microbial sink. Green Chemistry 18(22): 6046-6062.,

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T,** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed., 3. vol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 253p.

**Sanchez-Gonzalez M., Rosazza J. P. N.** (2006). Biocatalytic synthesis of butein and sulfuretin by *Aspergillus alliaceus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(13): 4646-4650.

**Sanodiya B. S, Thakur G. S, Baghel R. K, Prasad G. B, Bisen P. S.** (2009). *Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological macrofungus. Curr Pharm Biotechnol. 10(8):717–42.

**Santos-Neves, J. C., Pereira, M. I., Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Gorin, P. A. J., Sasaki, G. L., Iacomini, M.** (2008) A gel-forming  $\beta$ -glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. Carbohydr. Res. 343(9), 1456-1462.

**Sasek V., Novotny C., Vampola P.** (1998). Screening for efficient organopollutant fungal degraders by decolorization. Czech Mycol. 50, 303–311.

**Sato H., Nishitoba T., Shirasu S., Oda K., Sakamura S.** (1986). Ganoderiol A and B, new triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi) Agric Biol Chem. 50:2887–90.

**Scheibner M, Hulsdau B, Zelena K, Nimitz M, de Boer L, Berger RG, Zorn H** (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodonius* degrade beta-carotene. Appl Microbiol Biotechnol 77:1241–1250

**Schoemaker, H. E., Lundell, T., Hatakka, A., Piontek, K.** (1994). The oxidation of veratryl alcohol, dimeric lignin models and lignin by lignin peroxidase: the redox cycle revisioned. FEMS Microbiology Reviews, 13, 321–332.

**Seviour R.J., Stasinopoulos S.J., Auer D.P.F.** (1992). Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. Critical Reviews in Biotechnology 12: 279–298.

**Shabtay A., Hadar Y., Eitam H., Brosh A., Orlov A., Tadmor Y., Izhaki I. and Kerem Z.** (2009). The potential of *Pleurotus*-treated olive mill solid waste as cattle feed. Bioresource Technology 100(24): 6457-6464.

**Shakeri M., Sugano Y. and Shoda M.** (2008). Stable repeated-batch production of recombinant dye-decolorizing peroxidase (rDyP) from *Aspergillus oryzae*. Journal of Bioscience and Bioengineering 105(6): 683-686.

**Shiba T., Xiao L., Miyakoshi T., Chen C.L.** (2000). Oxidation of isoeugenol and coniferyl alcohol catalyzed by laccase isolated from *Rhus vernicifera* Stokes and *Pycnoporus coccineus*. J Mol Catal B: Enzym 10:605-615.

- Shin K.S.** (2004). The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent. *J.Microbiol.* 42:37–41
- Shin K.S., Kim Y.H., Lim J.S.** (2005) Purification and characterization of manganese peroxidase of the white rot fungus *Irpex lacteus*. *J.Microbiol.* 43, 503–509.
- Shin E.H., Choi H.T., Song H.G.** (2007). Biodegradation of endocrine-disrupting bisphenol a by white rot fungus *Irpex lacteus*. *J.Microbiol. Biotechnol.* 17, 1147–1151.
- Shleev SV, Morozova O, Nikitina O, Gorshina ES, Rusinova T, Serezhnikov VA, Burbaev DS, Gazaryan IG, Yaropolov AI** (2004) Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie* 86: 693–703.
- Shrivastava, B., P. Nandal, A. Sharma, K. K. Jain, Y. P. Khasa, T. K. Das, V. Mani, N. J. Kewalramani, S. S. Kundu, R. C. Kuhad** (2012). Solid state bioconversion of wheat straw into digestible and nutritive ruminant feed by *Ganoderma* sp. rckk02. *Bioresource Technology* 107: 347-351.
- Shrivastava R, Christian V, Vyas BRM** (2005) Enzymatic decolorization of sulfonaphthalein dyes. *Enzyme Microb Technol* 36:333–337
- Sierra J., Marti E., Montserrat G., Cruaras R., Garau M.A.** (2001) Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal *Sci Total Environ*, 279 (1–3), pp. 207–214
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C.** (1981) Spectrometric identification of organic compounds. 7th ed., John Wiley & Sons Inc., USA pp: 95-98
- Singh D, Chen S.** (2008) The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 81: 399-417.
- Sirim D., Wagner F., Wang L., Schmid R.D. & Pleiss J.** (2011). The Laccase Engineering Database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases.
- Skendi, A., Biliaderis, C.G., Lazaridou, A., Izydorczyk, M.S.** (2003). Structure and rheological properties of water soluble  $\beta$ -glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena byzantina*. *Journal of Cereal Science* 38, 15–31.
- Sletmoen, M., & Stokke, B. T.** (2008). Higher order structure of (1,3)- $\beta$ -d-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities. *Biopolymers*, 89, 310–321.
- Slomczynski D, Nakas JP, Tanenbaum SW** (1995) Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61–34. *Appl Environ Microbiol* 61: 907–912.
- Smiderle, F. R., Carbonero, E. R., Mellinger, C. G., Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Iacomini, M.** (2006) Structural characterization of a polysaccharide and a  $\beta$ -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry* 67(19), 2189–2196.
- Smirnov SA, Koroleva OV, Vavrilova VP, Belova AB, Klyachko NL** (2001) Laccases from basidiomycetes: physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. *Biochemistry (Mosc)* 66: 774–779.
- Smith AT, Doyle WA, Dorlet P, Ivancich A.** (2009). Spectroscopic evidence for an engineered, catalytically active Trp radical that creates the unique reactivity of lignin peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16084–16089.
- Soden D. M., O'Callaghan J. and Dobson A. D.** (2002). Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology* 148(Pt 12): 4003-4014.
- Solomon, O.F., Ciuta, I.Z.** (1962) Détermination de la viscosité intrinsèque de solutions de polymères par une simple détermination de la viscosité. *J. Appl. Polym. Sci.*, 6, 683. doi: 10.1002/app.1962.070062414 .
- Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE** (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev* 96: 2563–2605.
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., Misaki, A.** (1985). Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agricultural Biological Chemistry*, 49, 2641–2653.
- Song H.G.** (1997) Biodegradation of aromatic hydrocarbons by several white-rot fungi. *J.Microbiol.* 35, 66–71.
- Song, L., Ma F., Zeng Y., Zhang X., Yu H.** (2013). The promoting effects of manganese on biological pretreatment with *Irpex lacteus* and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology* 135: 89-92.

- Souza CGM, Peralta RM** (2003) Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *J Basic Microbiol* 43: 278–286.
- Srebotnik E, Messner K and Foisner R.** (1988) Penetrability of white rot-degraded pine wood by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 54: 2608- 2614.
- Srinivasan, C., Dsouza, T.M., Boominathan, K., Reddy, C.A.,** (1995). Demonstration of laccase in the white rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4274-4277.
- Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Lavery SB, Clausen H,** (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J*, 32(10):1478-88. (doi: 10.1038/emboj.2013.79. Epub 2013 Apr 12)
- Strittmatter E, Liers C, Ullrich R, Wachter S, Hofrichter M, Plattner DA, Piontek K** (2013) First crystal structure of a fungal high-redox potential dye-decolorizing peroxidase: substrate interaction sites and long-range electron transfer. *J Biol Chem* 288:4095–4102
- Su C. H, Yang Y. Z, Ho H, Hu C. H, Sheu M. T.** (2001) High-performance liquid chromatographic analysis for the characterization of triterpenoids from *Ganoderma*. *J Chromatogr Sci.*, 39:93–100.
- Sugano Y** (2009) DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell Mol Life Sci* 66:1387–1403
- Sugano Y, Muramatsu R, Ichiyanaagi A, Sato T, Shoda M** (2007) DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family: ASP171 replaces the distal histidine of classical peroxidases. *J Biol Chem* 282(50): 36652-36658.
- Sugano Y, Matsushima Y, Shoda M** (2006) Complete decolorization of the anthraquinone dye Reactive Blue 5 by the concerted action of two peroxidases from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:862–871 classical peroxidases. *J Biol Chem* 282:36652–36658
- Sugano Y, Nakano R, Sasaki K, Shoda M** (2000) Efficient heterologous expression in *Aspergillus oryzae* of a unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, of *Geotrichum candidum* Dec 1. *Appl Environ Microbiol* 66:1754–1758
- Sugiura, T., Yamagishi, K., Kimura, T., Nishida, T., Kawagishi, H., Hirai, H.** (2009). Cloning and homologous expression of novel lignin peroxidase genes in the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 1793–1798.
- Sugiyama, H., Fung, K.P., Wu, T.W.** (1993) Purpurogallin as an antioxidant protector of human erythrocytes against lysis by peroxyl radicals. *Life Sci.* 53, 139–143.
- Sun, Y., Yu, H., Zhang, C., Yue, L., Yang, X., Liu, J., et al.** (2012). Purification and identification of one glucan from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus* (Fr.) Singer). *Carbohydrate Polymers*, 87, 348–352.
- Sun, X., Bai, R., Zhang, Y., Wang, Q., Fan, X., Yuan, J., Cui, L., Wang, P.** (2013) Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenolic compounds. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 171, 1673–1680.
- Sutherland GRJ, Schick Zapanta L, Tien M, Aust SD.** (1997) Role of calcium in maintaining the heme environment of manganese peroxidase. *Biochemistry*, 36:3654–62.
- Sundaramoorthy M, Kishi K, Gold MH, Poulos TL.** (1994) The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. *J Biol Chem*, 269:32759–67.
- Sundaramoorthy M, Kishi K, Gold MH, Poulos TL.** (1997) Crystal structures of substrate binding sites mutants of manganese peroxidase. *J Biol Chem*, 272:17574–80.
- Svobodova K., Erbanova P., Sklenar J., Novotny Č.** (2006) The role of Mn-dependent peroxidase in dye decolorization by static and agitated cultures of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiol.* 51, 573–578.
- Svobodova K., Majcherczyk A., Novotny Č., Kues U.** (2008). Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Biores.Technol.* 99, 463–471.
- Synytsya, A., Mícková, K., Jablonsky, I., Sluková, M., Copíková, J.** (2008) Mushrooms of genus *Pleurotus* as a source of dietary fibres and glucans for food supplements. *Czech J. Food Sci.*, 26, 441–446.
- Synytsya An, Mícková K, Synytsya Al, et al.** (2009) Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity *Carbohydr Polym*, 76:548-56
- Synytsya, A., Novák M.** (2013). Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate Polymers* 92(1): 792-809.
- Synytsya, A., Novak M.** (2014). Structural analysis of glucans. *Annals of Translational Medicine* 2(2): 17.

- Tabata, K., Ito, W., Kojima, T., Kawabata, S., Misaki, A.** (1981). Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* Fries. *Carbohydrate Research*, 89, 121–135.
- Tada, R., Adachi, Y., Ishibashi, K., & Ohno, N.** (2009). An unambiguous structural elucidation of a 1,3- $\beta$ -D-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments. *Carbohydrate Research*, 344, 400–404.
- Takahara J** (2004) Enzymic manufacture of polyphenylene oxide (PPO). Patent JP2004313057 A2.
- Tam SC, Yip KP, Fung KP, Chang ST.** (1986). Hypotensive and renal effects of an extract of the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Life Science* 38: 1155–1161.
- Tamagawa Y, Yamaki R, Hirai H et al** (2006) Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere* 65:97–101
- Tello M, Corsini G, Larrondo LF, Salas L, Lobos S, Vicuna R.** (2000) Characterization of three new manganese peroxidase genes from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochim Biophys Acta*,1490:137–44.
- Thakur A, Rana M, Lakhanpal T. N, Ahmad A, Khan M. I.** (2007) Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: Lectin from *Ganoderma lucidum*. *Biochim Biophys Acta*. 1770:1404–12.
- Thitipraphunkul K, Uttapap D, Piyachomkwan K, et al.** (2003) A comparative study of edible canna (*Canna edulis*) starch from different cultivars. Part II. Molecular structure of amylose and amylopectin. *Carbohydr Polym*, 54:489-98.
- Thurston CF** (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19–26.
- Tien, M., Kirk, K.** (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science*, 221, 661–663.
- Timofeevski SL, Nie G, Reading NS, Aust SD.** (2000) Substrate specificity of lignin peroxidase and a S168W variant of manganese peroxidase. *Arch Biochem Biophys*, 373:147–53.
- Tinoco R, Verdin J, Vazquez-Duhalt R** (2007) Role of oxidizing mediators and tryptophan 172 in the decolorization of industrial dyes by the versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *J Mol Catal B Enzym* 46:1–7
- Tišma, M., Zelić B., Vasić-Rački Đ., Žnidaršič-Plazl P., Plazl I.** (2009). Modelling of laccase-catalyzed L-DOPA oxidation in a microreactor. *Chemical Engineering Journal* 149(1–3): 383-388.
- Tong, H., Xia, F., Feng, K., Sun, G., Gao, X., Sun, L., Jiang, R., Tian, D., Sun, X.** (2009) Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresour. Technol.* 100(4) 1682-1686
- Torres E., Ayala M., de Weert S. and Lokman B. C.** (2010). *Biocatalysis based on heme peroxidases*, Springer Berlin Heidelberg: 315-333.
- Torres E., Bustos-Jaimes I., Le Borgne S.** (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catal B-Environ* 46: 1–15.
- Tsagaraki, E., Lazarides, H. N. and Petrotos, K. B.** (2007). Olive mill wastewater treatment. In: Oreopoulou, V. and Russ, W. (Eds) *Utilization of byproducts and treatment of waste in the food industry*. Springer Publ. Co. p. 133-157
- Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D. and Aggelis G.** (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresour Technol.* 84(3):251-7.
- Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K., & Orita, K.** (1984). Krestin (PSK). *Cancer Treating Review*, 11, 131–155.
- Tsutsumi Y., Haneda T., Nishida T.** (2001) Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 42:271–276
- Tuor U., Wariishi H., Schoemaker H.E., Gold M.H.** (1992) Oxidation of phenolic arylglycerol  $\beta$ -aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an  $\alpha$ -carbonyl model compound. *Biochemistry*, 31: 4986–95.
- Ukai, S., Yokoyama, S., Hara, C., & Kiho, T.** (1982). Structure of an alkali-soluble polysaccharide from the fruit body of *Ganoderma japonicum* Lloyd. *Carbohydrate Research*, 105, 237–245.



- Yan J, Allendorf DJ, Brandley B.** (2005). Yeast whole glucan particle (WGP)  $\beta$ -glucan in conjunction with antitumour monoclonal antibodies to treat cancer. *Expert Opinion in Biological Therapy* 5:691–702.
- Yoshida T, Tsuge H, Konno H, Hisabori T, Sugano Y** (2011) The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue. *FEBS J* 278:2387–2394
- Yoshitake A, Katayama Y, Nakamura M, Iimura Y, Kawai S & Morohoshi N** (1993) N-Linked carbohydrate chains protect laccase-III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. *J Gen Microbiol* 139: 179–185
- Younis, A. M., Wu F. S., El Shikh H. H.** (2015). Antimicrobial activity of extracts of the oyster culinary medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Higher Basidiomycetes) and identification of a new antimicrobial compound. *Int J Med Mushrooms* 17(6): 579-590.
- Yu GJ, Wang M, Huang J, Yin YL, Chen YJ, et al.** (2012) Deep insight into the *Ganoderma lucidum* by comprehensive analysis of its transcriptome. *PLoS ONE* 7(8): e44031. doi:10.1371/journal.pone.0044031
- Yu GJ, Yin YL, Yu WH, Liu W, Jin YX, Shrestha A, et al.** (2015) Proteome exploration to provide a resource for the investigation of *Ganoderma lucidum*. *PLoS ONE* 10(3): e0119439. doi:10.1371/journal.pone.0119439
- Valli K, Wariishi H, Gold MH** (1992) Degradation of 2, 7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 174:2131–2137
- Van Der Hem L, Van Der Vliet A, Bocken C. F. M, Kino K, Hoitsma A. J, Tax W. J. M.** (1995) Lingzhi-8: Studies of a new immunomodulating agent. *Transplantation*, 60:438–43.
- Varela E, Martínez AT, Martínez MJ** (1999) Molecular cloning of arylalcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochem J* 341:113–117
- Varela E, Böckle B, Romero A, Martínez AT, Martínez MJ** (2000) Biochemical characterization, cDNA cloning and protein crystallization of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus pulmonarius*. *Biochim Biophys Acta* 1476:129–138
- Vares, T., Kalsi M., Hatakka A.** (1995). Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. *Applied and Environmental Microbiology* 61(10): 3515-3520.
- Vilaplana-Pérez, C., Auñón, D., García-Flores, L. A., Gil-Izquierdo, A.** (2014). Hydroxytyrosol and potential uses in cardiovascular diseases, cancer, and AIDS. *Frontiers in Nutrition*, 1, 18. <http://doi.org/10.3389/fnut.2014.00018>
- Vlyssides A.G., Bouranis D.L., Loizidou M., Karvouni G.** (1996) Study of a demonstration plant for the co-composting of olive-oil processing wastewater and solid residue *Bioresource Technol*, 56, pp. 187–193
- Vlyssides A.G., Loizidou M., Gimouhopoulos K., Zorpas A.** (1998) Olive oil processing wastes production and their characteristics in relation to olive oil extraction methods *Fresen Environ Bull*, 7 (5–6), pp. 308–313
- Vlyssides A.G., Loizides M., Karlis P.K.** (2004) Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *J Clean Prod*, 12 (6), pp. 603–611
- Vouyiouka, S., Filgueiras, V., Papaspyrides, C., Pinto, J., Lima, E.** (2012) Morphological changes of poly(ethylene terephthalate-co-isophthalate) during solid state polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.*, 124, 4457–4465.
- Vouyiouka, S., Theodoulou, P., Symeonidou, A., Papaspyrides, C.D., Pfaendner, R.** (2013) Solid state polymerization of poly(lactic acid): Some fundamental parameters. *Polym. Degrad. Stab.*, 98, 2473–2481.
- Wachtel-Galor S, Buswell J. A, Tomlinson B, Benzie I. F. F.** (2004) Lingzhi polyphorous fungus. In: *Herbal and Traditional Medicine: Molecular Aspects of Health*. New York: Marcel Dekker Inc., pp. 179–228.
- Wachtel-Galor S, Yuen J, Buswell JA, et al.** (2011). *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi): A Medicinal Mushroom. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, Chapter 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92757/?report=classic>
- Wahleithner JA, Xu F, Brown KM, Brown SH, Golightly EJ, Halkier T, Kauppinen S, Pederson A & Schneider P** (1996) The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* 29: 395–403
- Wang H, Ng T. B.** (2006) Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides*, 27:27–30.

- Wang, J. C., Hu, S. H., Liang, Z. C., Yeh, C. J.** (2005) Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(6) 759-766.
- Wang, H., Ng, T.B.** (2004) Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides*, 25, 1-5.
- Wang H, Ng T. B, Ooi V. E. C.** (1998) Lectins from mushrooms. *Mycol Res.*, 102:897-906.
- Wang Y, Vazquez-Duhalt R, Pickard MA** (2002) Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Curr Microbiol* 45:77-87
- Wang, X., & Zhang, L.** (2009). Physicochemical properties and antitumor activities for sulfated derivatives of lentinan. *Carbohydrate Research*, 344, 2209-2216.
- Wang, T., Deng, L., Li, S., & Tan, T.** (2007). Structural characterization of a water-insoluble (1→3)- $\alpha$ -d-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum*. *Carbohydrate Polymers*, 67, 133-137.
- Ward G, Parales RE, Dosoretz CG.** (2004) Biocatalytic synthesis of polycatechols from toxic aromatic compounds. *Environ Sci Technol*, 38(18):4753-7
- Wariishi H, Akaleswaran L, Gold MH.** (1988) Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry*, 27:5365-70.
- Wariishi H, Valli K, Gold MH.** (1989) Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*, 28:6017-23.
- Wariishi H, Valli K, Gold MH.** (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem*, 267:23688-95
- Wariishi H, Nonaka D, Nishihashi S, Hirahashi T, Ito K.** (2006) Enzymic preparation of polyphenylene oxides. Patent JP2006280259 A2.
- Wasser, S. P.** (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumour and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 258-274.
- Wasser S. P, Coates P, Blackman M, Cragg G, Levine M, Moss J, White J.** (2005) Encyclopedia of Dietary Supplements. New York: Marcel Dekker, Reishi or Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) pp. 680-90.
- Waterhouse AL.** (2001) Determination of Total Phenolics, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wiley
- Wei D, Zhang L, Williams DL, Browder IW,** 2002b. Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism. *Wound Repair and Regeneration* 10: 161-168.
- Wei, S., Helsper, J. P. F. G., Van Griensven, L. J. L. D.** (2008) Phenolic compounds present in medicinal mushroom extracts generate reactive oxygen species in human cells in vitro. *Int. J. Med. Mushrooms*. 10(1), 1-13.
- Welinder, K. G.** (1992). Superfamily of plant, fungal, and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2, 388-393.
- Wen Y., Xu J., Liu M., Li D. and He H.** (2012). Amperometric vitamin C biosensor based on the immobilization of ascorbate oxidase into the biocompatible sandwich-type composite flm. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167(7): 2023-2038.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., & Agathos, S. N.** (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22, 161-187.
- Whittaker MM, Kersten PJ, Nakamura N, Sanders-Loehr J, Schweizer ES, Whittaker JW.** 1996. Glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is a new radical-copper oxidase. *J Biol Chem* 271:681- 687. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.2.681>
- Whittaker, J. W.** (2003) Free radical catalysis by galactose oxidase. *Chem. Rev.* 103, 2347-2363.
- Wiater, A., Paduch, R., Pleszczynska, M., Prochniak, K., Choma, A., Kandefer-Szerszen, M., et al.** (2011).  $\beta$ -(1→3)-d-Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. *Biotechnology Letters*, 33, 787-795.
- Wong, D. W. S.** (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157, 174-209.

- Wood DA** (1980) Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J Gen Microbiol* 117: 327–338.
- Wood, P.J.**, (2002). Relationships between solution properties of cereal  $\beta$ -glucans and physiological effects—a review. *Trends in Food Science & Technology* 13, 313–320.
- Wu Y, Wang D.** (2009). A new class of natural glycopeptides with sugar moiety-dependent antioxidant activities derived from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *J Proteome Res.*,8:436–42.
- Xu F** (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 35: 7608–7614.
- Xu F, Shin WS, Brown SH, Wahleithner JA, Sundaram UM & Solomon EI** (1996) A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim Biophys Acta* 1292: 303–311.
- Xu F, Kulys JJ, Duke K, Li KC, Krikstopaitis K, Deussen HJW, Abbate E, Galinyte V & Schneider P** (2000) Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl Environ Microbiol* 66: 2052–2056.
- Xu, C., F. Ma, X. Zhang and S. Chen** (2010). Biological pretreatment of corn stover by *Irpex lacteus* for enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(20): 10893-10898.
- Xue, Z., Zhai, L., Yu, W., Wang, H., Kou, X., Peng, L. and Hu, D.** (2015), Antitumor and immunomodulatory activity of *Pleurotus eryngii* extract. *Journal of Food Biochemistry*, 39: 19–27. doi:10.1111/jfbc.12096
- Yangui T., Dhoubib A., Rhouma A., Sayadi S.** (2009) Potential of hydroxytyrosol-rich composition from olive mill wastewater as a natural disinfectant and its effect on seeds vigour response *Food Chem*, 117, pp. 1–8
- Yaropolov AI, Skorobogat'ko OV, Vartanov SS, Varfolomeyev SD:** Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl Biochem Biotechnol* 1994, 49:257-280.
- Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K & Dalboge H** (1996) Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl Environ Microbiol* 62: 834–841.
- Yoshida H** (1883) Chemistry of lacquer (Urushi). Part 1. *J Chem Soc* 43: 472–486.
- Yu G, Wen X, Li R, Qian Y** (2006) In vitro degradation of a reactive azo dye by crude ligninolytic enzymes from non-immersed liquid culture of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochem* 41:1987–1993
- Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., & Cheung, P. C. K.** (2011). Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids*, 25, 196–206.
- Zhao J. D, Zhang X. Q.** Importance, distribution and taxonomy of Ganodermataceae in China. *Proceedings of Contributed Symposium, B 5th International Mycological Congress, Vancouver. 1994 1994 August 14-21*
- Zhou X, Lin J, Yin Y, Zhao J, Sun X, Tang K.** Ganodermataceae: Natural products and their related pharmacological functions. *Am J Chin Med.* 2007,35:559–74.
- Zhu, F., B. Du and B. Xu** (2016). A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids* 52: 275-288.
- Zollinger H** (1991) *Colour chemistry: synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments*, 5th edn. VCH Publishers, Weinheim, pp 187–246
- Zorn H., Peters T., Nimitz M. and Berger R. G.** (2005). The secretome of *Pleurotus sapidus*. *Proteomics* 5(18): 4832-4838
- Zubieta C et al** (2007) Crystal structures of two novel dye-decolorizing peroxidases reveal a beta-barrel fold with a conserved heme-binding motif. *Proteins* 69:223–233

## Παράρτημα Α

Πίνακας απορροφήσεων των χαρακτηριστικών χημικών ομάδων στο υπέρυθρο οι οποίες οφείλονται σε έκταση (stretch) ή κάμψη (bending) των χημικών δεσμών.

(<http://www2.ups.edu/faculty/hanson/Spectroscopy/IR/IRfrequencies.html>).

Χαρακτηριστική ομάδα	Τύπος δόνησης	Απορρόφηση (cm <sup>-1</sup> )	Ένταση
<b>Αλκοόλες</b>			
O-H	(έκταση δεσμού, Η-δεσμευμένο)	3200-3600	Ισχυρή, πλατιά κορυφή
O-H	(έκταση, ελεύθερα Η)	3500-3700	Ισχυρή, στενή
C-O	έκταση	1050-1150	Ισχυρή
<b>Αλκάνια</b>			
C-H	έκταση	2850-3000	Ισχυρή
-C-H	κάμψη	1350-1480	Ποικίλει
<b>Αλκένια</b>			
=C-H	έκταση	3010-3100	Μέτρια
=C-H	κάμψη	675-1000	Ισχυρή
C=C	έκταση	1620-1680	Ποικίλει
<b>Αλκύλ-αλογονίδια</b>			
C-F	έκταση	1000-1400	Ισχυρή
C-Cl	έκταση	600-800	Ισχυρή
C-Br	έκταση	500-600	Ισχυρή
C-I	έκταση	500	Ισχυρή
<b>Αλκίνια</b>			
C-H	έκταση	3300	Ισχυρή, στενή κορυφή
	έκταση	2100-2260	Ποικίλει, δεν παρουσιάζεται σε συμμετρικά αλκίνια
<b>Αμίνες</b>			
N-H	έκταση	3300-3500	Μέτρια (οι πρωτοταγείς αμίνες παρουσιάζουν 2 κορυφές, οι δευτεροταγείς παρουσιάζουν 1 αρκετά ασθενή κορυφή)
C-N	έκταση	1080-1360	Μέτρια-ασθενής
N-H	κάμψη	1600	Μέτρια
<b>Αρωματικοί δεσμοί</b>			
C-H	έκταση	3000-3100	Μέτρια
C=C	έκταση	1400-1600	Μέτρια-ασθενής, πολλαπλές κορυφές
<b>Καρβονύλια</b>			
C=O	έκταση	1670-1820	Ισχυρή
<b>Αιθέρες</b>			
C-O	έκταση	1000-1300 (1070-1150)	Ισχυρή
<b>Νιτρίλια</b>			
CN	έκταση	2210-2260	Μέτρια
<b>Νιτρικά</b>			
N-O	έκταση	1515-1560 & 1345-1385	Ισχυρή, δύο κορυφές

Απορροφήσεις χημικών ομάδων που περιέχουν καρβonyλια (C=O)			
Χαρακτηριστική ομάδα	Τύπος δόνησης	Απορρόφηση (cm <sup>-1</sup> )	Ένταση
<b>Καρβonyλια</b>			
C=O	έκταση	1670-1820	Ισχυρή
<b>(Η σύζευξη μετατοπίζει τις απορροφήσεις σε χαμηλότερα μήκη κύματος)</b>			
<b>Καρβοξυλικά οξέα</b>			
C=O	έκταση	1700-1725	Ισχυρή
O-H	έκταση	2500-3300	Ισχυρή, πλατιά κορυφή
C-O	έκταση	1210-1320	Ισχυρή
<b>Αλδεύδες</b>			
C=O	έκταση	1740-1720	Ισχυρή
=C-H	έκταση	2820-2850 & 2720-2750	Μέτρια, δύο κορυφές
<b>Αμίδια</b>			
C=O	έκταση	1640-1690	Ισχυρή
N-H	έκταση	3100-3500	Μη υποκατεστημένα αμίδια παρουσιάζουν δύο κορυφές
N-H	κάμψη	1550-1640	
<b>Ανυδρίτες οξέος</b>			
C=O	έκταση	1800-1830 & 1740-1775	Δύο κορυφές
<b>Εστέρες</b>			
C=O	έκταση	1735-1750	Ισχυρή
C-O	έκταση	1000-1300	Δύο ή περισσότερες κορυφές
<b>Κετόνες</b>			
ακυκλικές	έκταση	1705-1725	Ισχυρή
κυκλικές	έκταση	3-membered - 1850 4-membered - 1780 5-membered - 1745 6-membered - 1715 7-membered - 1705	Ισχυρή
α,β-μη-υποκατεστημένες	έκταση	1665-1685	Ισχυρή
Άκυλ-κετόνες	έκταση	1680-1700	Ισχυρή