



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Παραγωγή και χαρακτηρισμός μιας
καινοτόμου λακκάσης από το θερμόφιλο
ασκομύκητα *Myceliophthora thermophila***

Ευθυμία Κουτρουφίνη

**Επιβλέπων: Ευάγγελος Τόπακας,
επίκουρος καθηγητής Ε.Μ.Π.**

ΑΘΗΝΑ 2017

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή κύριου Ευάγγελου Τόπακα. Επί τη ευκαιρία της ολοκλήρωσης της ερευνητικής διαδικασίας και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους αποτέλεσαν αρωγοί μου και συνέδραμαν στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ευάγγελο Τόπακα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας και για το συνεχές ενδιαφέρον του κατά την διεξαγωγή της. Η καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας σε συνδυασμό με το ερευνητικό του έργο τον καθιστά παράδειγμα επιβλέποντος και πρότυπο για κάθε νέο ερευνητή. Η ευκαιρία να δουλέψω υπό την επίβλεψη του και στο περιβάλλον ενός τόσο ενεργού εργαστηρίου με τιμά προσωπικά και τον ευχαριστώ για αυτό.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την υποψήφια διδάκτορα του Ε.Μ.Π. Αναστασία Ζέρβα για το ειλικρινές ενδιαφέρον και τη συνεχή βοήθεια της κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα που μοιράσθηκε μαζί μου την ερευνητική της εμπειρία και τις γνώσεις της, όπως επίσης και για την υπομονή που έδειξε στην έλλειψη εργαστηριακής μου πείρας. Η στήριξη της ήταν πολύτιμη για εμένα και η παρούσα εργασία δε θα είχε τη μορφή που έχει σήμερα χωρίς τη συνδρομή της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επίκουρη καθηγήτρια κυρία Αναστασία Δέτση και τον συμφοιτητή μου και διπλωματούχο χημικό μηχανικό Νέστορα Πολύζο που μου εμπιστεύθηκαν τις οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την δοκιμή βιοσύνθεσης της σουλφουρετίνης, οι οποίες ήταν προϊόν προσωπικής τους εργασίας, αλλά και για τη βοήθεια κατά τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος. Επίσης, ευχαριστώ το σύνολο του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για τη φιλοξενία και τη συμβουλευτική διάθεση.

Δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για το κλίμα συνεργασίας που επικρατεί στο εργαστήριο καθώς επίσης για τη φιλική και συμβουλευτική τους διάθεση απέναντι σε όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές και σε μένα προσωπικά.

Τέλος, ευχαριστώ τους δικούς μου ανθρώπους που με στήριξαν προσωπικά με όλους τους τρόπους το διάστημα της διεξαγωγής της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και κατά το σύνολο των σπουδών μου, πράγμα που απαίτησε εκ μέρους τους προσωπικές θυσίες και υπομονή.

Ευθυμία Κουτρουφίνη,

Αθήνα 2017

Περίληψη

Οι λακκάσες (βενζενεδιόλη: οξειδοαναγωγάση οξυγόνου, EC 1.10.3.2) ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των οξειδωτικών ενζύμων που φέρουν πολλαπλούς χαλκούς στο ενεργό τους κέντρο και χρησιμοποιούνται σε πλήθος βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Το ενδιαφέρον για τις λακκάσες αυξάνεται διαρκώς λόγω των πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν ως βιοκαταλύτες και επικεντρώνεται στην έκφραση νέων λακκασών από τις καλύτερες δυνατές πηγές, τη διερεύνηση της δομής, των ιδιοτήτων και του μηχανισμού δράσης τους.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η παραγωγή και ο χαρακτηρισμός μιας καινοτόμου λακκάσης (*MtLac2*) από το θερμοφίλο μύκητα *Myceliophthora thermophila*. Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση φυσικοχημικών παραγόντων κατά την ετερόλογη παραγωγή της *MtLac2* από το μεθυλότροφο ζυμομύκητα *P. pastoris* και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση μεθανόλης (1% v/v) και χαλκού (0,025 mM) όπου επιτυγχάνεται μέγιστη παραγωγή λακκάσης. Η βελτιστοποίηση ως προς τη συγκέντρωση χαλκού αύξησε την παραγωγή του ενζύμου κατά 125% ενώ ως προς τη συγκέντρωση μεθανόλης 35,5%. Επίσης προσδιορίστηκε η βέλτιστη θερμοκρασία επώασης της καλλιέργειας (30 °C).

Στη συνέχεια, η *MtLac2* απομονώθηκε με σκοπό το βιοχημικό χαρακτηρισμό της. Αρχικά προσδιορίστηκε πειραματικά το μοριακό βάρος (80 και 110kDa) και το ισοηλεκτρικό σημείο (pI=4) του ενζύμου. Με επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων και βιοπληροφορικών δεδομένων, η έκφραση του ενζύμου ως δυο πρωτεϊνικά μόρια αποδόθηκε σε διαφορετικά πρότυπα Ο-γλυκοζυλίωσης. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης της *MtLac2* καθώς και η σταθερότητα του ενζύμου στις διακυμάνσεις του pH και της θερμοκρασίας. Η δραστηριότητα του ενζύμου είναι υψηλή στην περιοχή pH 3-4.5, ενώ σε βασικές και ουδέτερες τιμές pH μηδενίζεται. Το ένζυμο παρουσίασε υψηλή ενεργότητα στους 50 °C όπου ο χρόνος ημιζώης του είναι μεγαλύτερος από 24 ώρες, επομένως μπορεί να χαρακτηριστεί ως θερμοφίλο. Κατά τη μελέτη της δράσης του ενζύμου παρουσία οργανικών διαλυτών και παρεμποδιστών, η *MtLac2* παρουσίασε ικανοποιητική ανθεκτικότητα σε όλες τις ενώσεις που δοκιμάστηκαν, ενώ το αζίδιο του νατρίου φάνηκε να επιφέρει την ισχυρότερη παρεμπόδιση. Ο χαρακτηρισμός του ενζύμου ολοκληρώθηκε με τη μελέτη εξειδικευμένης δράσης του σε μεγάλο εύρος φαινολικών υποστρωμάτων, το ABTS και το ασκορβικό οξύ, καθώς και με μελέτη της κινητικής της *MtLac2* στα υποστρώματα ABTS και 2,6-DMP. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η *MtLac2* έχει πιθανότατα χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό καθώς δεν εμφανίζει πολύ υψηλή ενεργότητα στα μελετούμενα υποστρώματα. Ακόμη, το ένζυμο συνολικά παρουσίασε πολύ διαφορετικά καταλυτικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τις περισσότερες χαρακτηρισμένες λακκάσες κυρίως λόγω της υψηλής ενεργότητας που έδειξε στο ασκορβικό οξύ.

Στο τελευταίο μέρος της εργασίας η *MtLac2* αξιολογήθηκε βιοτεχνολογικά σε διάφορες εφαρμογές βιομηχανικού ενδιαφέροντος. Η καινοτόμος λακκάση χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή αποτοξικοποίησης απόβλητου ελαιουργείου (ΥΑΕ), στην ενζυμική τροποποίηση εμπορικής γλυκάνης και στη βιοσύνθεση σουλφουρετίνης από βουτεΐνη. Από τις τρεις εφαρμογές η λακκάση έδρασε βέλτιστα στην οργανική σύνθεση, η οποία κρίθηκε επιτυχής, ενώ στην περίπτωση της ενζυμικής τροποποίησης παρουσίασε μια ένδειξη μεταβολής της δομής της γλυκάνης η οποία

πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Τέλος, στην περίπτωση της αποτοξικοποίησης υγρού αποβλήτου ελαιουργείου, η λακκάση δεν φάνηκε να αποικοδομεί το απόβλητο.

Abstract

Laccases (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) belong to a group of polyphenol oxidases containing multiple coppers in their active site and are used in many biotechnological applications. Interest in laccases is increasing due to the advantages they display as biocatalysts and focuses on the expression of new laccases, the investigation of the structure, properties and their mechanism of action.

The purpose of this thesis was the production and characterization of a novel laccase (*MtLac2*) from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. Firstly, the effect of physicochemical factors in heterologous production of *MtLac2* from the methylotrophic yeast *P. pastoris* was examined. Optimum concentration of methanol (1% v/v) and copper (0,025 mM) concentration was determined. Optimization of copper concentration increased the production of the enzyme by 125%, while optimization of methanol concentration of 35.5%. Optimal incubation temperature (30 °C) was also determined.

Then, the enzyme *MtLac2* was purified in order to be biochemically characterized. At first, molecular weight (80 to 110 kDa) and isoelectric point ($pI = 4$) of the enzyme were determined. After experimental results and bioinformatic data analysis, expression of the enzyme as two protein forms was attributed to different patterns of O-glycosylation. Optimal conditions of *MtLac2* action and the stability of the enzyme in different pH and temperature values was tested. The enzyme activity proved to be high in a range of pH 3-4.5, while in basic and neutral pH values the enzyme was inactive. The enzyme showed high activity at 50 °C and a half-life greater than 24 hours, so it can be classified as thermophilic. The action of the enzyme was also tested in the presence of organic solvents and inhibitors, where the *MtLac2* showed satisfactory resistance in all compounds tested, whereas the sodium azide appeared to be the strongest inhibitor. The characterization of the enzyme was completed with the specific activity study in a range of phenolic substrates, ABTS and ascorbic acid, as well as with the kinetic study of *MtLac2* with ABTS and 2,6-DMP substrates. The results showed that *MtLac2* has probably low redox potential as it did not show remarkable activity in the examined substrates. Furthermore, the enzyme showed very different catalytic characteristics than most laccases mainly due to the high activity observed in the oxidation of ascorbic acid.

Last but not least *MtLac2* was evaluated in various biotechnological applications of industrial interest. The innovative laccase was used in the detoxification of olive mill wastewater (OMW), the enzymatic modification of commercial glucan and in the biosynthesis of sulfuretin. *MtLac2* showed best results in organic synthesis, leading to a successful bioconversion, while in the case of enzymatic modification an indication of change was observed in the glucan structure which should be further investigated. Finally, laccase didn't appear to degrade the olive mill wastewater.

Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1 Εισαγωγή.....	3
1.2 Προέλευση και βιολογικός ρόλος λακκασών	4
1.2.1 Λακκάσες βακτηριακής προέλευσης	4
1.2.2 Λακκάσες μυκητιακής προέλευσης	5
1.2.3 Λακκάσες φυτικής προέλευσης	6
1.3 Δομικά χαρακτηριστικά λακκασών	7
1.4 Καταλυτική δράση Λακκασών	10
1.5 Φυσικοχημικές ιδιότητες λακκασών.....	16
1.6 Βιοτεχνολογική Αξία Λακκασών.....	21
1.7 Παραγωγή λακκάσης μεγάλης κλίμακας.....	31
1.8 Ετερόλογη έκφραση μυκητιακών λακκασών	32
1.9 Ο θερμοφίλος μύκητας <i>Myceliophthora thermophila</i>	36
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
2.1 Υλικά	41
2.1.1 Μικροοργανισμοί.....	41
2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια -Αναλώσιμα Υλικά.....	41
2.1.3 Υλικά- Στήλες Χρωματογραφίας.....	41
2.1.4 Εμπορικά Ένζυμα	42
2.1.5 Ρυθμιστικά Διαλύματα-Διαλύματα Ηλεκτροφορήσεων	42
2.1.6 Θρεπτικά Μέσα Καλλιέργειας.....	44
2.1.7 Συσκευές – Όργανα.....	45
2.2 Μεθοδοι	46
2.2.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα μετασχηματισμένα κύτταρα.....	46
2.2.1.1 Στερεές καλλιέργειες.....	46
2.2.1.2 Υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας	46
2.2.1.3 Υγρές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας	46
2.2.2 Απομόνωση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	47
2.2.2.1 Παραλαβή του εξωκυτταρικού υγρού μίγματος καλλιέργειας (crude).....	47
2.2.2.2 Συμπύκνωση και εξισορρόπηση του μίγματος με διάλυμα Talon	47
2.2.2.3 Καθαρισμός και παραλαβή πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου	48

2.2.2.3 Εξισορρόπηση του διαλύματος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH=8 0,2M	51
2.2.3 Βελτιστοποίηση παραγωγής πρωτεϊνών από τα μετασχηματισμένα κύτταρα.....	51
2.2.3.1 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης μεθανόλης κατά την παραγωγή των πρωτεϊνών	51
2.2.3.2 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης χαλκού κατά την παραγωγή των πρωτεϊνών	51
2.2.3.3 Βελτιστοποίηση συνθηκών θερμοκρασίας κατά την παραγωγή των πρωτεϊνών	51
2.2.4 Μέτρηση συγκέντρωσης κυττάρων με θολοσιμετρία.....	52
2.2.5 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών	52
2.2.5.1 Μέθοδος Bradford.....	52
2.2.5.2 Μέθοδος Lowry	53
2.2.6 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας και εξέταση ενζυμικής δράσης της <i>MtLac2</i>	54
2.2.6.1 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας.....	54
2.2.6.2 Μελέτη της εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα της <i>MtLac2</i>	55
2.2.7 Ηλεκτροφορητικές Τεχνικές	57
2.2.7.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	57
2.2.7.2 Ζυμογράφημα- Προσδιορισμός ενεργότητας των πρωτεϊνικών ζωνών.....	60
2.2.7.3 Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου ((IEF-PAGE, Isoelectric Focusing-PAGE)	60
2.2.8 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης της <i>MtLac2</i>	61
2.2.8.1 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της <i>MtLac2</i>	61
2.2.8.2 Εύρεση βέλτιστης τιμής pH δράσης της <i>MtLac2</i>	62
2.2.9 Μελέτη σταθερότητας της <i>MtLac2</i>	62
2.2.9.1 Προσδιορισμός της θερμοσταθερότητας της <i>MtLac2</i>	62
2.2.9.2 Προσδιορισμός της σταθερότητας της <i>MtLac2</i> σε τιμές pH.....	62
2.2.10 Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis- Menten της <i>MtLac2</i>	63
2.2.11 Μελέτη δράσης της <i>MtLac2</i> παρουσία παρεμποδιστικών παραγόντων	64
2.2.11.1 Επίδραση οργανικών διαλυτών στη δράση της <i>MtLac2</i>	65
2.2.11.2 Προσδιορισμός δράσης της <i>MtLac2</i> παρουσία παρεμποδιστών.....	65
2.2.12 Χρήση καινοτόμου <i>MtLac2</i> σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές	52
2.2.12.1 Δοκιμή αποτοξικοποίησης του επεξεργασμένου ΥΑΕ με χρήση της <i>MtLac2</i>	67
2.2.12.2 Δοκιμή ενζυμικής τροποποίησης (grafting) εμπορικής γλυκάνης με χρήση της εμπορικής λακκάσης Novozym 51003 και της <i>MtLac2</i>	69
2.2.12.3 Δοκιμή βιοσύνθεσης σουλφουρετίνης από βουτεΐνη με τη χρήση της <i>MtLac2</i>	71

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	73
3.1 Βελτιστοποίηση της παραγωγής της λακκάσης από το ζυμομύκητα <i>P.pastoris</i>	75
3.1.1 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο	75
3.1.2 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης χαλκού στο θρεπτικό μέσο	77
3.1.3 Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας επώασης των καλλιεργειών.....	81
3.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της <i>MtLac2</i>	83
3.2.1 Προσδιορισμός του μεγέθους της <i>MtLac2</i>	83
3.2.2 Προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου της <i>MtLac2</i>	84
3.2.3 Βέλτιστο pH δράσης της <i>MtLac2</i>	85
3.2.4 Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της <i>MtLac2</i>	86
3.2.5 Θερμική σταθερότητα της <i>MtLac2</i>	87
3.2.6 Σταθερότητα της <i>MtLac2</i> σε διαφορετικές τιμές pH	90
3.2.7 Προσδιορισμός ενεργότητας της <i>MtLac2</i> παρουσία οργανικών διαλυτών.....	91
3.2.8 Προσδιορισμός ενεργότητας της <i>MtLac2</i> παρουσία παρεμποδιστών.....	92
3.3 Καταλυτικά χαρακτηριστικά της <i>MtLac2</i>	93
3.3.1 Μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα της <i>MtLac2</i> (substrate specificity)	93
3.3.2 Κινητική μελέτη δράσης της <i>MtLac2</i>	95
3.4 Χρήση της <i>MtLac2</i> σε εφαρμογές βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος.....	97
3.4.1 Δοκιμή αποτοξικοποίησης του επεξεργασμένου ΥΑΕ με χρήση της <i>MtLac2</i>	97
3.4.2 Δοκιμή ενζυμικής τροποποίησης (grafting) εμπορικής γλυκάνης με χρήση της εμπορικής λακκάσης Novozym 51003 και της <i>MtLac2</i>	98
3.4.3 Δοκιμή βιοσύνθεσης σουλφουρετίνης από βουτεΐνη με τη χρήση της <i>MtLac2</i>	103
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	107
4.1 Βελτιστοποίηση της παραγωγής της <i>MtLac2</i> από το ζυμομύκητα <i>P.pastoris</i>	109
4.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της <i>MtLac2</i>	110
4.2.1 Μοριακό βάρος και ισοηλεκτρικό σημείο της <i>MtLac2</i>	110
4.2.2 Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης και θερμική σταθερότητα της <i>MtLac2</i>	111
4.2.3 Βέλτιστο pH δράσης και σταθερότητα στη διακύμανση του pH της <i>MtLac2</i>	112
4.2.4 Παρεμπόδιση της δράσης της <i>MtLac2</i>	113
4.3 Καταλυτικά χαρακτηριστικά της <i>MtLac2</i>	114
4.4 Χρήση της <i>MtLac2</i> σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές.....	116
4.4.1 Δοκιμή αποτοξικοποίησης του επεξεργασμένου ΥΑΕ με χρήση της <i>MtLac2</i>	116
4.4.2 Δοκιμή ενζυμικής τροποποίησης (grafting) εμπορικής γλυκάνης με χρήση της εμπορικής λακκάσης Novozym 51003 και της <i>MtLac2</i>	117

4.4.3 Δοκιμή βιοσύνθεσης σουλφουρετίνης από βουτεΐνη με τη χρήση της <i>MtLac2</i>	118
4.5 Μελλοντικοί Στόχοι	118
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	121

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Οι λακκάσες (βενζενεδιόλη: οξειδοαναγωγή οξυγόνου, EC 1.10.3.2) ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των οξειδωτικών ενζύμων που φέρουν πολλαπλούς χαλκούς στο ενεργό τους κέντρο. Ένζυμα που εντάσσονται στην οικογένεια των λακκασών, έχουν απομονωθεί από ανώτερα φυτά (Yoshida, 1883), προκαρυωτικούς οργανισμούς (Claus, 2003, Santhanam, 2011), έντομα (Kramer et al., 2001) αλλά κυρίως από μύκητες (Thurston, 1994, Baldrian, 2005).

Η καταλυτική δράση των λακκασών περιλαμβάνει την οξείδωση διαφόρων υποστρωμάτων όπως διφαινόλες, μεθοξυ-υποκατεστημένες μονοφαινόλες, αρωματικές και αλειφατικές αμίνες, με ταυτόχρονη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Η καταλυτική δράση των λακκασών βασίζεται στο σύμπλεγμα τεσσάρων ατόμων χαλκού που οργανώνονται σε τρία καταλυτικά κέντρα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το αποτέλεσμα της ενζυμικής αντίδρασης είναι η οξείδωση τεσσάρων μορίων του υποστρώματος με αποτέλεσμα την παραγωγή τεσσάρων ριζών και δυο μορίων νερού. Οι παραγόμενες ρίζες μπορούν στη συνέχεια να υποβληθούν σε μη-ενζυμικές αυθόρμητες αντιδράσεις που μπορεί να οδηγούν σε ολιγομερισμούς, πολυμερισμούς, αποπολυμερισμούς και τροποποιήσεις μορίων (Riva, 2006).

Οι λακκάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Ουσιαστικά, μια λακκάση μπορεί να οξειδώσει οποιοδήποτε υπόστρωμα με χαρακτηριστικά παρόμοια μιας p-διφαινόλης. Μερικές μυκητιακές λακκάσες με υψηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής μπορούν επίσης να οξειδώσουν μονοφαινόλες ενώ υπάρχουν και κάποιες που είναι σε θέση να οξειδώνουν μη φαινολικά μόρια όπως το ασκορβικό οξύ (Mayer and Staples, 2002). Ακόμη, στην περίπτωση υποστρωμάτων τα οποία δεν μπορούν να οξειδωθούν, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης ή επειδή έχουν ιδιαίτερα υψηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής, έχουν διατυπωθεί συστήματα λακκάσης-μεσολαβητή με ευρεία χρήση (Kunamneni, 2008).

Λόγω των πλεονεκτημάτων της βιοκατάλυσης γενικότερα αλλά και των συγκεκριμένων ενζύμων ειδικά έναντι άλλων οξειδωτικών ενζύμων, οι λακκάσες είναι ιδιαίτερα ελκυστικά ένζυμα σε ό,τι αφορά τη βιομηχανία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διάφορες εφαρμογές, όπως στα βιοκαύσιμα (Santhanam, 2011), στη βιοεξυγίανση (Hautphenne, 2016), στην οργανική σύνθεση (Kunamneni, 2008), στους βιοαισθητήρες, στη βιομηχανία χάρτου, στη βιομηχανία τροφίμων (Dwivedi, 2010, Couto and Herrera, 2006) κ.α.

Οι λακκάσες που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα προέρχονται κυρίως από βασιδιομύκητες λευκής σήψης. Επομένως, το σύνολο των δομικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία πιθανότατα δεν αντικατοπτρίζει την πραγματική ταυτότητα του ενζύμου. Για αυτό το λόγο πολλοί ερευνητές επιμένουν ότι πρόκειται για μια ομάδα ενζύμων που είναι στην πραγματικότητα πολύ πιο ετερογενής από την εικόνα που έχουμε σήμερα. Η περιορισμένη γνώση που έχουμε για τις λακκάσες σε συνδυασμό με την υψηλή βιοτεχνολογική τους αξία, εγείρει δραστηριότητες που περιλαμβάνουν την αξιολόγηση και διαλογή πηγών λακκάσης, τη μελέτη νέων λακκασών, τη διερεύνηση της δομής του ένζυμου, τη

διαλεύκανση του μηχανισμού μεταφοράς ηλεκτρονίων εντός του ενζύμου και του μηχανισμού μετατροπής του οξυγόνου σε νερό, τη διεξαγωγή έρευνας για τις ηλεκτροχημικές τους ιδιότητες και πολλά άλλα (Shleev, 2005).

1.2 Προέλευση και βιολογικός ρόλος λακκάσων

Οι λακκάσες είναι μια από τις λίγες ομάδες ενζύμων που έχουν μελετηθεί από τα τέλη του 19ου αιώνα. Η πρώτη λακκάση ανιχνεύθηκε σε εκκρίσεις του φυτικού οργανισμού *Rhus vernicifera*, το οποίο είναι ιαπωνικό δέντρο γνωστό με την ονομασία «λάκα» (lacquer tree) (Yoshida, 1883). Λίγα χρόνια αργότερα, αποδείχθηκε ότι το ένζυμο βρίσκεται και σε μύκητες (Bertrand, 1896).

Οι περισσότερες γνωστές λακκάσες προέρχονται από φυτικούς οργανισμούς και μύκητες, όμως βρίσκονται και στα βακτήρια και στα έντομα (Sleev, 2007). Ανάλογα με τον οργανισμό από τον οποίο προέρχονται και από τις συνθήκες ανάπτυξης του, μπορεί να επιτελείται διαφορετικός ρόλος από τις λακκάσες. Από το ευρύ φάσμα λειτουργιών των λακκάσων μπορούμε να διακρίνουμε τρεις βασικές δράσεις: (1) δημιουργία δεσμών στα πολυμερή, (2) αποικοδόμηση πολυμερών και (3) διάσπαση αρωματικού δακτυλίου των αρωματικών ενώσεων (Dwivedi, 2011). Ως εκ τούτου σε κάθε οργανισμό οι λακκάσες έχουν διαφορετικό βιολογικό ρόλο.

1.2.1 Λακκάσες βακτηριακής προέλευσης

Η πρώτη βακτηριακή λακκάση βρέθηκε στο βακτήριο *Azospirillum lipoferum* (Givaudan et al 1993), η οποία συμμετέχει στη μελανογένεση του βακτηρίου. Τα βακτήρια του γένους *Azospirillum* βρίσκονται κατά κύριο λόγο στο χώμα και στις ρίζες χόρτων και σιτηρών. Επίσης, σε άλλη εργασία μελετήθηκε η θερμοσταθερή λακκάση *cotA* του *Bacillus subtilis* και διαπιστώθηκε ότι συνεισφέρει στην παραγωγή της χρωστικής ουσίας που δίνει καφέ χρώμα στα ενδοσπόρια του βακίλου (Martins et al., 2002). Γενικά, αυτή η δράση που εμφανίζουν οι λακκάσες μπορεί να βοηθήσει στην προστασία των σπορίων κατά την έκθεση σε υπεριώδες φως και σε υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Σύμφωνα με αναφορές, πιθανότατα η καλύτερη βακτηριακή λακκάση που έχει χαρακτηριστεί είναι αυτή που απομονώθηκε από το *Sinorhizobium meliloti*, η οποία έχει περιγραφεί ως περιπλασμική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 45 kDa, με ισοηλεκτρικό σημείο σε pH 6.2 και με την ικανότητα να οξειδώνει τη συρινγκαλδαζίνη (Baldrian, 2005, Rosconi et al., 2005).

Σε αντίθεση με τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι λακκάσες που προέρχονται από βακτήρια είναι ενδοκυτταρικές ή περιπλασμικές πρωτεΐνες (Claus, 2003). Χαρακτηρίζονται ως πολύ δραστικά ένζυμα που παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα σε υψηλές τιμές θερμοκρασίας και pH καθώς επίσης και σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων του χλωρίου και του χαλκού. Τέλος, οι ακινητοποιημένες λακκάσες σπορίων είναι συμβατές με το σύνολο σχεδόν των βιομηχανικών εφαρμογών στις οποίες έχουν δοκιμαστεί.

1.2.2 Λακκάσες μυκητιακής προέλευσης

Στους μύκητες οι λακκάσες βρίσκονται ευρέως σε βασιδιομύκητες και ασκομύκητες. Μάλιστα, υποστηρίζεται ότι πρακτικά σε κάθε μύκητα που έχει μελετηθεί, έχει διαπιστωθεί παρουσία λακκάσης (Mayer and Staples, 2002). Οι λακκάσες συναντώνται ευρέως σε μύκητες που αποικοδομούν το ξύλο όπως οι: *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Cerrena maxima*, *Phlebia radiata* κ.α. Ακόμα, υπάρχουν αναφορές απομόνωσης λακκασών από σαπροφυτικούς ασκομύκητες όπως οι: *Myceliophthora thermophila*, *Aspergillus*, *Curvularia* κ.α. (Dwivedi, 2010). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στους περισσότερους από τους μύκητες που έχουν μελετηθεί για την έκφραση λακκάσης, διαπιστώθηκε η πολλαπλή έκφραση λακκασών. Συχνά σε τέτοιες περιπτώσεις, για την απομόνωση και τον προσδιορισμό τους έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, όπως στην περίπτωση του *Cryphonectria parasitica*, όπου με διαγραφή του γονιδίου που ήταν υπεύθυνο για την έκφραση μιας λακκάσης (*lac1*) που εκκρινόταν εξωκυτταρικά, διαπιστώθηκε η ύπαρξη άλλων δύο, μιας εξωκυτταρικής (*lac 3*) και μιας ενδοκυτταρικής (*lac 2*). Οι λακκάσες που προέρχονται από τον ίδιο μύκητα φαίνεται να παρουσιάζουν διαφορές στα μοριακά βάρη (Kim, 1995). Άλλες περιπτώσεις περιλαμβάνουν τον *Rhizoctonia solani*, στον οποίο έχουν ανιχνευθεί τέσσερις διαφορετικές λακκάσες (Wahleithner et al., 1996) και τον *Botrytis cinerea* στον οποίο εκφράζονται τρεις διαφορετικές λακκάσες (Pezet et al., 1992, Pezet, 1998, Mayer and Staples, 2002).

Η υψηλή δραστηριότητα σε λακκάση που έχουν οι βασιδιομύκητες λευκής σήψης του ξύλου υποδεικνύει ότι η κύρια λειτουργία των λακκασών στους βασιδιομύκητες είναι ο αποπολυμερισμός των σύνθετων συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος όπως είναι η λιγνίνη. Εκτός από την υποβάθμιση των βιοπολυμερών, οι λακκάσες στους μύκητες εκτελούν διάφορες άλλες λειτουργίες, όπως η μελανογένεση (για παράδειγμα παραγωγή μελανίνης διϋδροξυναφθαλενίου, που παράγεται κατά το περιβαλλοντικό στρες), ο σχηματισμός καρποσωμάτων, η μυκητιακή μορφογένεση και η παραγωγή σπορίων. Ακόμη, σχετίζεται με την παθογένεση των μυκήτων, καθώς έχει ρόλο στην αλληλεπίδραση του παθογόνου μύκητα με τον ξενιστή, ενώ υπάρχουν αναφορές ότι οι παθογόνοι μύκητες που παρασιτούν σε φυτικούς οργανισμούς παράγουν λακκάσες για να αποτοξικοποιήσουν τα τοξικά παράγωγα του συστήματος άμυνας των φυτών, όπως είναι οι φυτοαλεξίνες και οι τανίνες (Pezet et al., 1992).

Η έκφραση λακκασών στα κύτταρα μυκήτων είναι είτε συνεχής, είτε επαγόμενη ενώ υπάρχουν αναφορές για οργανισμούς στους οποίους παράγονται ταυτόχρονα συνεχείς και επαγόμενες λακκάσες. Με βάση τις αναφορές που υπάρχουν μέχρι στιγμής, οι λακκάσες που έχουν απομονωθεί από μύκητες παρουσιάζουν τυπική δομή ενεργού κέντρου αλλά υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία στη δομή της πρωτεΐνης, ενώ η υδατανθρακική μονάδα στο γλυκοζυλιωμένο ένζυμο διαφέρει εντελώς και σε σύσταση αλλά και ποσοτικά (Mayer and Staples, 2002).

1.2.3 Λακκάσες φυτικής προέλευσης

Μετά την πρώτη λακκάση που απομονώθηκε από την *Rhus vernicifera* ακολούθησαν αναφορές για ποικιλία φυτικών οργανισμών όπως το μάνγκο, το φασόλι, το ροδάκινο, το πεύκο, το δαμάσκηνο, και η συκομουριά. Ακόμη, σε κυτταρικές καλλιέργειες του *Acer pseudoplatanus* παράχθηκε και εκκρίθηκε μια λακκάση (Tezuka et al., 1993), ενώ σε ιστό από τον φυτικό οργανισμό *Pinus taeda* αναφέρθηκε ότι εκφράζονται οκτώ διαφορετικές λακκάσες, (Sato et al., 2001). Μια ακόμη περίπτωση πολλαπλής έκφρασης λακκασών έχει διαπιστωθεί στον ξυλώδη ιστό του οργανισμού *Populus euramericana* όπου εκφράζονται πέντε διαφορετικές λακκάσες (Ranocha et al., 1999). Σε ο,τι αφορά την έκφραση των λακκασών στα φυτά, από τις μέχρι στιγμής αναφορές φαίνεται ότι είναι συνεχής καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην έκφραση κατά την ανάπτυξή τους (Mayer and Staples, 2002).

Παρόλο που η πιθανότητα οι λακκάσες να εμπλέκονται στο σχηματισμό λιγνίνης στους φυτικούς οργανισμούς τέθηκε για πρώτη φορά από το 1958 από τον Freudenberg, εξακολουθεί να είναι υπό μελέτη ο ακριβής ρόλος που επιτελούν. Το 1992 οι Sterjiades et al. απέδειξαν ότι η λακκάση από τον *Acer pseudoplatanus* ήταν σε θέση να πολυμερίσει μονολιγνόλες σε πλήρη απουσία υπεροξειδάσης, η οποία αποτελεί ένζυμο που συνδέεται επίσης με το σχηματισμό της λιγνίνης. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η ερευνητική ομάδα πρότεινε ότι οι λακκάσες εμπλέκονται στα πρώιμα στάδια σχηματισμού της λιγνίνης, ενώ οι υπεροξειδάσες δρουν αργότερα. Ακολούθησαν και άλλες σχετικές μελέτες όπου φαίνεται ότι οι λακκάσες είναι παρούσες κατά το σχηματισμό της λιγνίνης. Σε κάθε περίπτωση δεν έχει ακόμη διαπιστωθεί ο ακριβής ρόλος της λακκάσης στον πολυμερισμό της λιγνίνης (Mayer and Staples, 2002). Εκτός από τη συμμετοχή τους στο σχηματισμό της λιγνίνης, οι λακκάσες των φυτών επιτελούν και άλλους ρόλους όπως η ανασύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, η επούλωση τραυμάτων των φυτών και η οξειδωση του σιδήρου με μετατροπή Fe (II) προς Fe (III). (Dwivedi, 2010)

Επειδή ο ρόλος των λακκασών στα φυτά, όπως αναφέρθηκε, είναι κυρίως ο πολυμερισμός της λιγνίνης, βρίσκονται κυρίως κοντά στα κυτταρικά τοιχώματα των λιγνινοποιητικών κυττάρων. Επομένως, τις περισσότερες φορές βρίσκονται δεσμευμένες στο κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα να μην μπορούν να απομονωθούν εύκολα σε καθαρή μορφή. Για αυτό το λόγο έχουν γίνει προσπάθειες να προσδιοριστεί η ενεργότητα των λακκασών σε εκχυλίσματα των φυτών, οι οποίες ωστόσο δεν μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστες καθώς τα εκχυλίσματα περιέχουν υπεροξειδάσες και πολυφαινολοξειδάσες που δρουν οξειδωτικά σε κοινά υποστρώματα με τις λακκάσες. Για αυτό το λόγο, οι αναφορές που σχετίζονται με φυτικές λακκάσες είναι λιγότερες σε σχέση με αυτές των μυκητιακών λακκασών (Mayer and Staples, 2002).

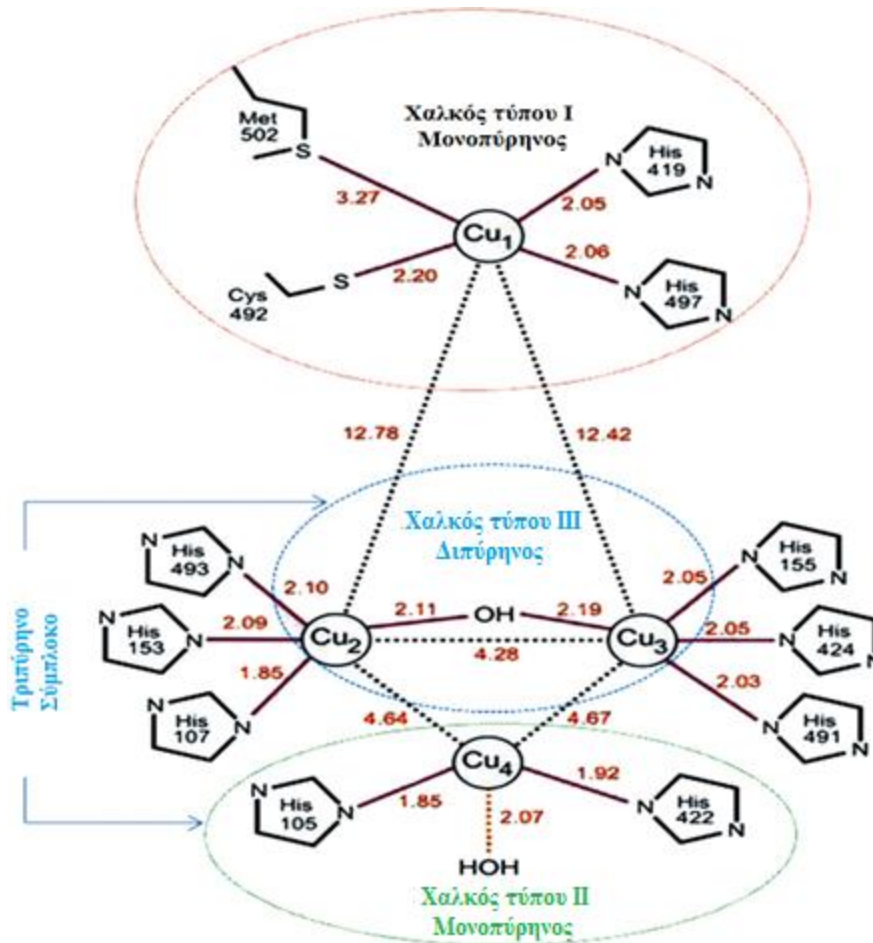
Όπως και στους μύκητες, το ποσοστό γλυκοζυλίωσης των φυτικών λακκασών διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό. Σε γενικές γραμμές, οι λακκάσες των φυτών παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό γλυκοζυλίωσης (22-45%) από αυτές των μυκήτων (10-25%). Η υδατανθρακική μονάδα στην πλειονότητα των φυτικών λακκασών αποτελείται συνήθως από μαννόζη, N-ακετυλογλυκοζαμίνη και γαλακτόζη (Dwivedi, 2010).

1.3 Δομικά χαρακτηριστικά λακκασών

Οι λακκάσες είναι γλυκοπρωτεΐνες με μοριακή μάζα που κυμαίνεται συνήθως από περίπου 50 έως 100 kDa. Η γλυκοζυλίωση αποτελεί πολύ σημαντικό δομικό χαρακτηριστικό καθώς η υδατανθρακική μονάδα σταθεροποιεί τη δομή των κέντρων χαλκού του ενζύμου (Claus, 2004). Ακόμα, η γλυκοζυλίωση προστατεύει το ένζυμο από την πρωτεόλυση, ενισχύει τη σταθερότητά του σε υψηλές θερμοκρασίες και καθοδηγεί την έκκριση του ενζύμου (Rodgers, 2010).

Το καταλυτικό κέντρο των λακκασών περιέχει τέσσερα άτομα χαλκού που δομούνται σε τρία δομικά και λειτουργικά διακριτά κέντρα. Ο χαλκός τύπου I είναι το μονοπυρηνικό κέντρο που εμπλέκεται με την οξειδωση του υποστρώματος, ενώ οι χαλκοί τύπου II και III διαμορφώνουν ένα τριπυρηνικό κέντρο που καταλύει την αναγωγή του ατμοσφαιρικού οξυγόνου σε νερό (Enguita, 2004).

Ο χαλκός τύπου I βρίσκεται σε τριγωνικό συντονισμό με δύο ιστιδίνες και μια κυστεΐνη ενώ υπάρχει και μια θέση σύνδεσης, στην οποία το αμινοξύ που συνδέεται είναι μεταβλητό. Στη βακτηριακή λακκάση CotA έχει βρεθεί σε αυτή τη θέση η μεθειονίνη, ενώ σε άλλες μυκητιακές λακκάσες έχει βρεθεί λευκίνη ή φαινυλαλανίνη. Η συγκεκριμένη αξονική θέση φαίνεται ότι επηρεάζει έντονα το δυναμικό οξειδωσης του ενζύμου. Μάλιστα σε σχετική εργασία μια μετάλλαξη που οδήγησε στην αντικατάσταση της φαινυλαλανίνης με μεθειονίνη μείωσε σημαντικά το δυναμικό οξειδωσης της λακκάσης του *Trametes villosa* (Kumar et al., 2003). Ο χαλκός τύπου I ευθύνεται για το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα των περισσότερων λακκασών, και είναι αποτέλεσμα της έντονης ηλεκτρονικής απορρόφησης που προκαλείται από τον ομοιοπολικό δεσμό χαλκού-κυστεΐνης. Η οξειδωση υποστρώματος λαμβάνει χώρα στο κέντρο του χαλκού τύπου I λόγω του υψηλού του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (Claus, 2004). Οι τιμές των δυναμικών οξειδοαναγωγής σε διαφορετικές λακκάσες έχουν βρεθεί να είναι μεταξύ 430 και 790 mV. Επιπλέον, η καταλυτική απόδοση (k_{cat}/K_m) για την πλειοψηφία των αρωματικών υποστρωμάτων εξαρτάται από το δυναμικό οξειδοαναγωγής του χαλκού τύπου I (Shleev, 2005).



Εικόνα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση των κέντρων χαλκού της λακκάσης CotA του *B. subtilis* (Enguita et al., 2003).

Ο χαλκός τύπου II δεν παρουσιάζει απορρόφηση στο ορατό φάσμα και συνδέεται με δύο ιστιδίνες και ένα μόριο νερού και βρίσκεται «στρατηγικά» τοποθετημένος κοντά στο χαλκό τύπου III, ένα διπύρρηνο κέντρο που χαρακτηρίζεται από οπτική απορρόφηση στα 330 nm. Ο χαλκός τύπου III συντονίζεται με τρεις ιστιδίνες, ενώ μια γέφυρα υδροξυλίων διατηρεί την ισχυρή αντιοξειδωτική σύζευξη μεταξύ των δύο ατόμων χαλκού. (Dwivedi, 2010, Claus, 2004)

Πολλαπλές αλληλουχίες για πάνω από εκατό λακκάσες οδήγησαν στην ταυτοποίηση των τεσσάρων συνεχών περιοχών, L1-L4, οι οποίες αποτελούν την «υπογραφή» των λακκασών, ξεχωρίζοντας τους μέσα στην ευρύτερη κατηγορία των οξειδασών με πολλαπλούς χαλκούς (Kumar et al., 2003).

1.3.1 Λακκάσες με τεταρτοταγή δομή

Αν και οι περισσότερες λακκάσες είναι μονομερείς, υπάρχουν αναφορές και για κάποιες ολιγομερείς λακκάσες. Έτσι, μια κατηγορία ενζύμων παρουσιάζει ομοδιμερική δομή που αποτελείται από δύο ίδιες υπομονάδες. Τέτοια παραδείγματα διμερών ενζύμων έχουν βρεθεί στους *T. villosa* (Yaver, 1996) και *Phellinus ribis* (Min, 2001), στους ασκομύκητες *Rhizoctonia solani* (Wahleithner, 1996) και *Gaeumannomyces graminis* (Edens, 1999), και στον υδάτινο ασκομύκητα *Phoma sp. IHH 01.05.03* (Junghanns, 2009). Ομοδιμερικές λακκάσες των οποίων οι υπομονάδες αντιπροσωπεύουν τους δυο τομείς έχουν απομονωθεί από τους *Pleurotus eryngii* (Wang, 2006) και *Cantharellus cibarius* (Ng and Wang, 2004). Ο διμερισμός φαίνεται ότι είναι απαραίτητος για να μπορέσουν αυτά τα ένζυμα να είναι λειτουργικά.

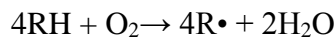
Τετραμερείς λακκάσες έχουν επίσης απομονωθεί από τους βασιδιομύκητες *Agaricus bisporus* D621 (Wood, 1980) και *Armillaria mellea* (Curir, 1997) και από τους ασκομύκητες *Podospora anserina* (Minuth, 1978) και *Aspergillus nidulans* (Kurtz, 1982).

Σε κάθε περίπτωση, οι γνώσεις που έχουμε για τη δομή αλλά και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των λακκασών βασίζεται στη μελέτη των ενζύμων που έχουν απομονωθεί μέχρι τώρα. Με δεδομένο ότι έχουν μελετηθεί κυρίως βασιδιομύκητες λευκής σήψης και σε πολύ μικρότερο βαθμό οι υπόλοιποι οργανισμοί, κάθε είδους γενίκευση μπορεί να αποδειχθεί επισφαλής και βεβιασμένη. Συμπερασματικά, είναι πιθανό οι μελλοντικές μελέτες να υποδείξουν ότι οι λακκάσες είναι πολύ πιο ετερογενείς ως προς τη δομή τους από αυτό που πιστεύεται μέχρι σήμερα (Baldrian, 2005)

1.4 Καταλυτική δράση Λακκασών

Η οξειδοαναγωγική δράση των λακκασών βασίζεται στη δομή τους, και συγκεκριμένα στα κέντρα χαλκού που περιγράφηκαν παραπάνω. Τα κέντρα χαλκού των λακκασών οδηγούν τα ηλεκτρόνια του υποστρώματος στο μοριακό οξυγόνο μέχρι να αναχθεί σε νερό, χωρίς να απελευθερώνεται το υπεροξείδιο που σχηματίζεται ως ενδιάμεσο προϊόν (Claus, 2004). Ο μηχανισμός δράσης τους είναι αρκετά σύνθετος, όμως τα κύρια χαρακτηριστικά του είναι γνωστά. Το υπόστρωμα υφίσταται οξείδωση ενός ηλεκτρονίου με μεταφορά ηλεκτρονίων στο χαλκό που βρίσκεται στη θέση I κοντά στο σημείο σύνδεσης υποστρώματος. Ο χαλκός στη θέση I οξειδώνεται άμεσα ξανά μέσω ενδομοριακής μεταφοράς ηλεκτρονίων στο τριπύρηνο σύμπλεγμα χαλκού. Το ατμοσφαιρικό οξυγόνο συνδέεται στο τριπύρηνο σύμπλεγμα που αποτελείται από τα κέντρα χαλκού τύπου II και III και απελευθερώνεται αφού αναχθεί σε νερό (Rodgers, 2010). Ο μηχανισμός της μεταφοράς ηλεκτρονίων εκτός του ενζύμου δεν έχει κατανοηθεί λεπτομερώς, παρόλο που έχει μελετηθεί εκτεταμένα (Baldrian, 2005).

Οι λακκάσες είναι εξαιρετικά ευέλικτα ένζυμα που καταλύουν μία βασική αντίδραση από την οποία προκύπτουν όλες τους οι δράσεις (Mayer και Staples, 2002). Η συνολική αντίδραση περιγράφεται από την εξίσωση:



Η οξείδωση των υποστρωμάτων «γεννάει» δραστικές ρίζες που μπορούν να συμμετέχουν αυθόρμητα σε μη ενζυμικές αντιδράσεις.

Δημιουργία δεσμών σε μονομερή

Η ενζυμική οξείδωση των φαινολικών ενώσεων και των ανιλινών με λακκάσες δημιουργεί, όπως περιεγράφηκε παραπάνω, ρίζες που αντιδρούν μεταξύ τους για να σχηματίσουν διμερή, ολιγομερή ή πολυμερή σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς ανάμεσα στα άτομα άνθρακα, οξυγόνου και αζώτου (C-C, C-O και O-N). Στην περίπτωση των υποκατεστημένων ενώσεων, η αντίδραση μπορεί να συνοδεύεται από απομεθυλώσεις και αλογονώσεις. Όπως συζητήθηκε παραπάνω, στα ανώτερα φυτά η σύνδεση των φαινολικών προδρόμων από λακκάσες φαίνεται να είναι ένα μέρος στη διαδικασία σχηματισμού της λιγνίνης. Σε μικροοργανισμούς υπάρχουν αναφορές ότι επιτυγχάνεται η δημιουργία δεσμών στα υπολείμματα των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση σπορίων βακίλου, όπου με μετατροπή της τυροσίνης σε διτυροσίνη μέσω λακκάσης φαίνεται να ενισχύεται η ανθεκτικότητα στη UV ακτινοβολία και την υψηλή θερμοκρασία. (Hullo et al., 2001, Martins et al., 2002)

Αποδόμηση πολυμερών

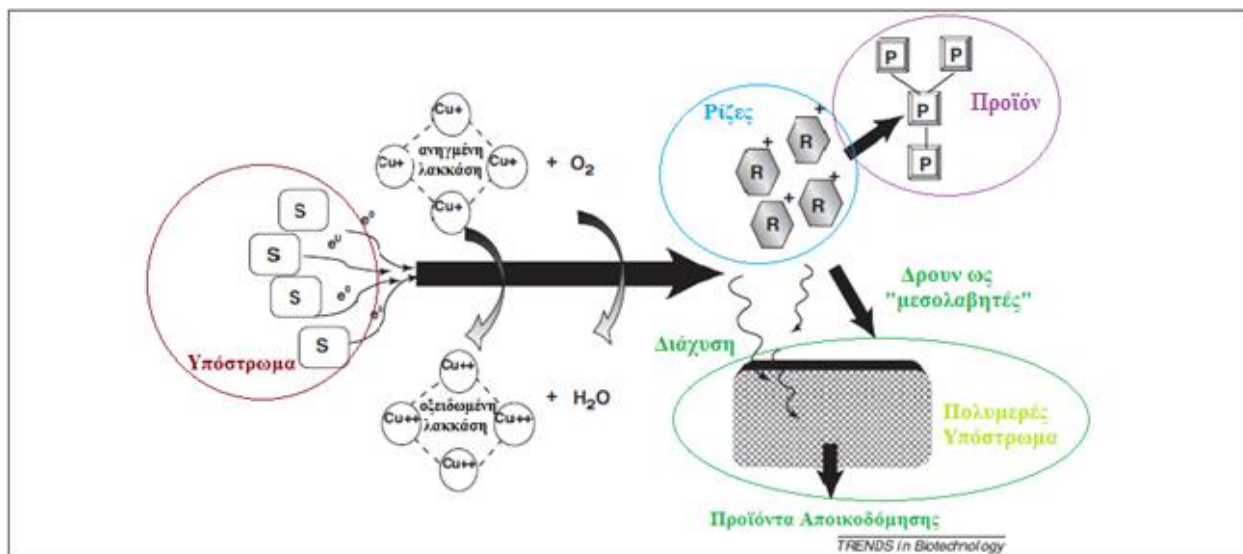
Οι λακκάσες συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των φυσικών πολυμερών, όπως η λιγνίνη ή τα χουμικά οξέα (Claus and Filip, 1998). Σε αυτή την περίπτωση οι ρίζες που παράγονται, οδηγούν στη διάσπαση ομοιοπολικών δεσμών και στην απελευθέρωση των μονομερών. Λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης, τα ένζυμα μπορεί να μην έρχονται σε άμεση επαφή με τα πολυμερή.

Σε αυτή την περίπτωση, οργανικές ενώσεις ή μέταλλα μπορούν επίσης να οξειδωθούν από τις λακκάσες, όπως για παράδειγμα η βερατρυλική αλκοόλη, το 3-υδροξυ-ανθρανιλικό οξύ και το μαγγάνιο, και να λειτουργήσουν ως μεσολαβητές (mediators) του αποπολυμερισμού (Claus et al., 2002). Ο όρος «μεσολαβητής» αναφέρεται σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που μπορούν εύκολα να διαχέονται μακριά από την ενεργή θέση του ενζύμου με αποτέλεσμα να αποφευχθούν οι στερεοχημικές παρεμποδίσεις που αντιμετωπίζουν τα ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση μεγάλων ογκωδών υποστρωμάτων. Αυτοί οι μεσολαβητές μπορούν ανεξάρτητα από το ένζυμο να οξειδώνουν ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους ή με υψηλό δυναμικό ιονισμού.

Η λιγνίνη και οι συνθετικές χρωστικές ουσίες είναι παραδείγματα ενώσεων που δεν οξειδώνονται άμεσα από τις λακκάσες αλλά μπορούν να οξειδωθούν με συστήματα λακκάσης-μεσολαβητή (Santhanam, 2011). Παρόλο που έχει μελετηθεί εκτενώς η χρήση συνθετικών μεσολαβητών όπως του ABTS και της 1-υδροξυβενζοτριαιλαουζόλης (HBT) σε συνέργεια με μυκητιακές λακκάσες, φαίνεται ότι οι συνθετικοί μεσολαβητές έχουν σοβαρά μειονεκτήματα όπως το υψηλό κόστος και ο σχηματισμός τοξικών ενώσεων. Πιο πρόσφατα, αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αναζήτηση φυσικών μεσολαβητών που αποτελούν φθηνότερες και πιο φιλικές προς το περιβάλλον εναλλακτικές λύσεις.

Διάσπαση αρωματικού δακτυλίου

Σε κάποιες περιπτώσεις οι λακκάσες καταλύουν τη διάσπαση του δακτυλίου των αρωματικών ενώσεων. Αυτή η αντίδραση παρουσιάζει ενδιαφέρον ως προς τις εφαρμογές που θα μπορούσε να έχει στην αποικοδόμηση ξενοβιοτικών, όπως είναι για παράδειγμα οι νιτρο-αρωματικοί δακτύλιοι και οι συνθετικές χρωστικές ουσίες (Claus, 2004).



Εικόνα 1.4. Σχηματική αναπαράσταση της καταλυτικής αντίδρασης και των μη ενζυμικών δράσεων που μπορεί να συμμετέχουν οι δραστικές ρίζες (Santhanam, 2011).

1.4.1 Εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα

Σε γενικές γραμμές έχει δειχθεί ότι οι λακκάσες μπορούν να δράσουν σε μεγάλο εύρος υποστρωμάτων με αποτέλεσμα να αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως ένζυμα με μικρή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Με βάση τις κινητικές σταθερές που έχουν προκύψει σε μια πληθώρα πειραματικών δοκιμών μπορούμε να θεωρήσουμε ότι τα πιο τυπικά υποστρώματα για την πειραματική μέτρηση της ενεργότητας των λακκασών είναι: το 2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) (ABTS), η κατεχόλη (CAT), η L-3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη (L-DOPA), η 2,6- διμεθοξυφαινόλη (DMP), η γουαϊακόλη (GUA) και η συρινγκαλδαζίνη (SGZ). (Baldrian, 2005, Santhanam, 2011). Στον Πίνακα 1.4 παρουσιάζονται τα πιο συχνά εξεταζόμενα υποστρώματα λακκασών.

Το δυναμικό αναγωγής του χαλκού τύπου I αποτελεί έναν περιορισμό για το εύρος υποστρωμάτων που μπορούν να δράσουν οι λακκάσες. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το δυναμικό αναγωγής του χαλκού στη θέση I σχετίζεται με την ευαισθησία του ενζύμου να δεχθεί ηλεκτρόνια από το υπόστρωμα. Εφόσον ο χαλκός τύπου I δέχεται ηλεκτρόνια από τα αναγωγικά υποστρώματα, θα πρέπει τα υποστρώματα αυτά να έχουν δυναμικά ιονισμού χαμηλότερα ή ελάχιστα πιο υψηλά από αυτό του ενζύμου. Επομένως, χαμηλά δυναμικά αναγωγής της λακκάσης συνεπάγονται μικρότερο εύρος υποστρώματος στα οποία μπορεί να δράσει (Santhanam, 2011).

Πίνακας 1.4 Ενεργότητα μυκητιακών λακκασών. Η ενεργότητα δίνεται ως ποσοστό (%) της οξείδωσης των υποστρωμάτων σε σχέση με την οξείδωση της 2,6 διμέθοξυφαινόλης (Baldrian, 2005).

Υποστρώματα	Είδη μυκήτων από τα οποία έχει απομονωθεί η εκάστοτε λακκάση														
	Am	Ct	Ch	Cy	Ds	Ma	Me	Mv	Pr	Pe	Pc	Sr	Ts	Tt	Tv
2,6-διμέθοξυφαινόλη	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2-Αμινο-3-(3,4-διυδροξυφαινυλ) προπανικό οξύ		55,9											46,0		
4-αμινοφαινόλη										109,8				26,7	
4-Αμινοφαινυλαμίνη	62,9							14,7		194,8			56,0		
4-υδροξυινδόλη			87,6								107,6				
4-μεθοξυφαινόλη									7,3	9,8				19,8	
4-μεθυλκατεχόλη			69,3	31,4							103,5				
ABTS		76,5	271,7		800,0	288,3	1,4	97,4	284,1	452,0	136,7				27,7
Καφεϊκό οξύ								18,6					95,0	80,2	24,5
Κατεχόλη	74,2		44,9		59,2			34,9	33,1	21,6	74,3	18,3	76,0	27,9	110,7
Φερουλικό οξύ		111,8	48,4						8,5		76,0			116,3	
Γουαϊακόλη	59,7	73,5	107,8	37,9	92,0	122,4	31,0	39,1	9,7		140,9	35,0	64,0	55,8	38,4
Υδροκινόνη		50,0	105,3		80,8			12,9		25,5	62,0		69,0	30,2	56,0
N,N-διμεθυλο-1,4-φαινυλενεδιαμίνη	74,8		1,8					23,4			19,9				237,1
O-ανισιδίνη									45,5						9,3
p-ανισιδίνη										19,3					3,5
Πυρογαλλόλη			24,0	11,8				12,3			34,5		76,0		6,3
Συρινγαλδαζίνη	51,6	120,6				79,2	131,7		126,5						
Συρινγκικό οξύ					115,2				46,9	14,1					
Βανιλλικό οξύ		61,8							7,3	8,1					

Am, *Armillaria mellea* (Rehman & Thurston, 1992), Ct, *Chaetomium thermophilum* (Chefetz et al., 1998), Cy, *Cyathus stercoreus* (Sethuraman et al., 1999), Ds, *Dichomitus squalens c1* (Perie et al., 1998), Ma, *Mauginiella sp.* (Palonen et al., 2003), Me, *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen et al., 2002), Mv, *Myrothecium verrucaria* (Sulistyaningdyah et al., 2004), Pr, *Phellinus ribis* (Min et al., 2001), Pe, *Pleurotus eryngii* (Munoz et al., 1997), Pc, *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert et al., 1996), Sr, *Sclerotium rolfsii SRL1* (Ryan et al., 2003), Ts, *Trametes sanguinea* (Nishizawa et al., 1995), Tt, *Trametes trogii* (Garzillo et al., 1998), Tv, *Trametes versicolor* (Sulistyaningdyah et al., 2004)

Εκτός από τα παραπάνω υποστρώματα, σε λακκάσες έχει επίσης αποδοθεί η κατάλυση της οξειδωσης του Mn^{+2} παρουσία χηλικών παραγόντων. Η λακκάση του μύκητα λευκής σήψης *T. versicolor* καταλύει την αντίδραση οξειδωσης Mn^{+2} σε Mn^{+3} παρουσία πυροφωσφορικού οξέος (Hofer and Schlosser, 1999). Την ίδια αντίδραση έχει αποδειχθεί ότι καταλύει και το ένζυμο του *Stropharia rugosoannulata* παρουσία οξαλικού και μηλονικού οξέος (Schlosser and Hofer, 2002). Με βάση τις παραπάνω αναφορές θεωρείται ότι οι χηλικές ενώσεις μειώνουν το υψηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής του ζεύγους Mn^{+2}/Mn^{+3} και επιτρέπουν στις λακκάσες να δράσουν (Schlosser and Hofer, 2002).

Η μικρή εξειδίκευση σε υπόστρωμα είναι ένας από τους λόγους που η λακκάση παρουσιάζει ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα πλήθος βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Ωστόσο, παράλληλα δημιουργεί αβεβαιότητα κατά τον χαρακτηρισμό των ενζύμων. Οι λακκάσες δρουν σε κοινά υποστρώματα με ένα διαφορετικό ένζυμο που ονομάζεται τυροσινάση. Ακόμη υπάρχουν επικαλύψεις με τα υποστρώματα που δρουν γενικότερα οι φαινολοξειδάσες. Επιπλέον, διαφορετικά ένζυμα που έχουν χαρακτηριστεί ως λακκάσες διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τη συγγένεια που εμφανίζουν στα διαφορετικά υποστρώματα. Σε κάποιες αναφορές προτείνεται η κατηγοριοποίηση των λακκάσων με βάση την προτίμησή τους σε ορθο, παρα-, μετα- υποκατεστημένες φαινόλες (Baldrian, 2005). Επομένως, η εξειδίκευση σε υπόστρωμα δεν αρκεί για να χαρακτηριστεί ένα ένζυμο ως λακκάση, όπως γίνεται σε άλλα ένζυμα.

Προκειμένου, λοιπόν, να θεωρηθεί ότι έχει πραγματοποιηθεί σαφής χαρακτηρισμός της λακκάσης έχει προταθεί ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών (k_{cat}/K_m) με χρήση πολλαπλών υποστρωμάτων. Με βάση τις παρούσες μελέτες στα υπό εξέταση υποστρώματα θα πρέπει να περιλαμβάνονται η συρινγκαλδαζίνη, το ABTS και η κατεχόλη, με τα οποία η λακκάση έχει υψηλή συγγένεια, και κάποια με τα οποία η λακκάση εμφανίζει μικρή ή ακόμη μηδενική συγγένεια, όπως για παράδειγμα η τυροσίνη (Edens et al, 1999, Shin and Lee, 2000).

Συγκεκριμένα το ABTS είναι ένα μη φαινολικό συνθετικό υπόστρωμα το οποίο χρησιμοποιείται ευρύτατα στον προσδιορισμό της ενεργότητας της λακκάσης λόγω των εγγενών πλεονεκτημάτων όπως η απουσία περιορισμών pH και ο υψηλός συντελεστής απόσβεσης του οξειδωμένου προϊόντος ($ABTS^{+}$, $\epsilon_{420nm} = 36.000 M^{-1} cm^{-1}$). Έτσι η οξειδωση του ABTS, απουσία H_2O_2 , έχει γίνει ένα αποδεκτό κριτήριο επιλογής των λακκάσων. Η DMP ή η SGZ, δύο φαινολικά υποστρώματα, χρησιμοποιούνται συχνά για να συμπληρωθεί η μελέτη του ενζύμου (Santhanam, 2011).

1.4.2 Παρεμποδιστές στην καταλυτική δράση των λακκασών

Η καταλυτική δράση των λακκασών μπορεί να αναστέλλεται από μια σειρά ενώσεων, με βάση τα δημοσιευμένα στοιχεία. Αρχικά, οι λακκάσες παρεμποδίζονται από όλες τις ενώσεις που παρεμποδίζουν τις μέταλλο-οξειδάσες. Υπάρχουν αναφορές που περιλαμβάνουν στους αναστολείς μια σειρά από αντιδραστήρια από μικρά ανιόντα όπως το αζίδιο, το κυανίδιο, και το υδροξείδιο. Έχει διατυπωθεί ότι αυτοί οι αναστολείς δεσμεύονται από τους χαλκούς τύπου II και τύπου III, με αποτέλεσμα τη διακοπή της εσωτερικής μεταφοράς ηλεκτρονίων και επομένως την αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου. Άλλοι παρεμποδιστές λακκασών περιλαμβάνουν τα ιόντα μετάλλων (π.χ. Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sn^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} και Zn^{2+}), τα λιπαρά οξέα, την υδροξυγλυκίνη, το κοζικό οξύ, το EDTA, την κυστεΐνη, τη διθειοθρεϊτόλη, τη γλουταθειόνη, τη θειουρία κ.α. Αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν τη δραστηριότητα της λακκάσης δεσμεύοντας τους χαλκούς τύπου II, με τροποποίηση των εναπομεινάντων αμινοξέων ή προκαλώντας μεταβολή στη διαμόρφωση του ενζύμου (Dwivedi, 2010).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω έχει διαπιστωθεί ότι αρκετές σουλφυδρυλικές οργανικές ενώσεις δρουν ως αναστολείς του ενζύμου, όπως για παράδειγμα η διθειοθρεϊτόλη, το θειογλυκολικό οξύ, η κυστεΐνη και το διαιθυλο-διθειοκαρβιμικό οξύ. Ωστόσο, η λακκάση του *T. versicolor* έδειξε ότι το ανασταλτικό αποτέλεσμα ίσως να είναι φαινομενικό και να οφείλεται στη χρήση του ABTS ως υπόστρωμα του ενζύμου καθώς οι σουλφιδρυλικές ενώσεις, σε αντίθεση με το αζίδιο του νατρίου, δε μειώνουν την κατανάλωση οξυγόνου κατά τη διάρκεια της κατάλυσης (Johannes and Majcherczyk, 2000).

Τέλος, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί παρεμπόδιση από βαρέα μέταλλα και χουμικές ουσίες και έχει συνδεθεί με τη βιολογική προέλευση των λακκασών που βρίσκονται φυσικά και στο έδαφος.

1.5 Φυσικοχημικές ιδιότητες λακκασών

1.5.1 pH

Οι μυκητιακές λακκάσες τυπικά επιδεικνύουν βέλτιστη δραστηριότητα σε χαμηλές τιμές pH. Βέβαια η τιμή pH για την οποία η δράση του ενζύμου γίνεται βέλτιστη εξαρτάται και από το υπόστρωμα. Για την οξειδωση του ABTS έχει δειχθεί ότι η βέλτιστη τιμή pH είναι κοντά στο 4 κατά μέσο όρο, ενώ οι φαινολικές ενώσεις όπως η 2,6-διμέθοξυφαινόλη, και η γουαϊακόλη εμφανίζουν υψηλότερες τιμές βέλτιστου pH μεταξύ 4.0 και 7.0 (Πίνακας 1.5). Σε κάθε περίπτωση, η αύξηση του pH παρεμποδίζει το ένζυμο, το οποίο ανάγεται καθώς τα υδροξύλια σχηματίζουν δεσμούς με τους χαλκούς τύπου II και III με αποτέλεσμα να διακόπτεται η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των χαλκών της λακκάσης (Munoz et al., 1997). Επίσης, δεν είναι μόνο ο ρυθμός της αντίδρασης αλλά ακόμη και το είδος των προϊόντων που διαφέρουν ανάλογα με το pH καθώς, εκτός από την καταλυτική αντίδραση, η τιμή του pH επηρεάζει και τις επακόλουθες αντιδράσεις των ριζών που προκύπτουν ως προϊόντα της καταλυτικής δράσης. Η σταθερότητα των μυκητιακών λακκασών είναι γενικά υψηλότερη σε όξινο pH, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις.

1.5.2 Θερμοκρασία

Τα προφίλ θερμοκρασίας της δραστηριότητας της λακκάσης συνήθως δε διαφέρουν από τα υπόλοιπα λιγνολυτικά εξωκυτταρικά ένζυμα που εκφράζουν βέλτιστη συμπεριφορά μεταξύ των 50° και των 70°C (Πίνακας 1.5). Ωστόσο, για κάποια λίγα ένζυμα έχει βρεθεί η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης κάτω από τους 35°C όπως για παράδειγμα η λακκάση του *G. lucidum* που εμφανίζει μέγιστη δραστηριότητα στους 25°C, τιμή που μάλιστα δε σχετίζεται με τη θερμοκρασία ανάπτυξης του οργανισμού.

Η σταθερότητα σε διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες κινείται σε πολύ ευρύ πλαίσιο και μπορεί να διαφέρει σημαντικά από την περιοχή βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης του οργανισμού από τον οποίο προέρχεται η λακκάση. Ο χρόνος ημιζωής στους 50°C κυμαίνεται από κάποια λεπτά για τη λακκάση του *B.cinnerea*, σε χρόνους υψηλότερους από 2-3 ώρες στους *L. edodes* και *A. bisporus*, και φθάνει έως και τις 50 με 70 ώρες στον *Trametes sp.* Αντίστοιχα, ενώ το ένζυμο από τον *G. lucidum* αδρανοποιείται άμεσα στους 60°C, η θερμοσταθερή λακκάση από τον *M. albomyces* παρουσίασε χρόνο ημιζωής πάνω από 5 ώρες. Γενικά, έχει διαπιστωθεί ότι οι μυκητιακές λακκάσες έχουν συνήθως χαμηλότερη θερμική σταθερότητα από τις βακτηριακές λακκάσες. Η θερμική σταθερότητα φαίνεται ότι συνδέεται με την αλληλεπίδραση των ιόντων χαλκού με τις γέφυρες άλατος, καθώς και το δίκτυο δεσμών υδρογόνου στις εσωτερικές δομές τις πρωτεΐνης. (Baldrian, 2005, Dwivedi, 2010).

1.5.3 Οπτικές Ιδιότητες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τυπικά οι λακκάσες έχουν μια κορυφή απορρόφησης UV κοντά στα 600 nm, όμως υπάρχουν πολλές περιπτώσεις λακκασών που έχουν απομονωθεί στις οποίες λείπει από το φάσμα τους η χαρακτηριστική απορρόφηση που προσδίδει ο χαλκός τύπου I.

Οι λακκάσες αυτές διαχωρίζονται σε «κίτρινες» και «λευκές» λακκάσες, ενώ υπάρχουν κάποιοι συγγραφείς που αμφισβητούν το χαρακτηρισμό τους ως λακκάσες. Ωστόσο, εφόσον θεωρούμε τις λακκάσες ως ένζυμα που οξειδώνουν πολυφαινόλες, μεθοξυ-υποκατεστημένες φαινόλες, αρωματικές διαμίνες, και μια σειρά άλλων ενώσεων, αλλά όχι την τυροσίνη, ο όρος «κίτρινη» και «λευκή» λακκάση φαίνεται να επικρατεί στη βιβλιογραφία. Υπάρχουν αναφορές για κίτρινες λακκάσες που έχουν απομονωθεί από το φυτοπαθογόνο ασκομύκητα *G. graminis* και από τους βασιδιομύκητες *A. bisporus* D621, *Phlebia radiata* και *P. ostreatus* D1 (Giardina, 2010). Οι Leontievsky et al. διατύπωσαν την υπόθεση ότι οι κίτρινες λακκάσες σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της πρόσδεσης των αρωματικών προϊόντων αποικοδόμησης της λιγνίνης στις μπλε λακκάσες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μυκήτων σε στερεό μέσο. Συνέπεια της τροποποίησης μπορεί να είναι η αναγωγή των χαλκών τύπου I και II στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και η εξαφάνιση του μπλε χρώματος.

Η ύπαρξη μιας "λευκής λακκάσης" διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στον *Pleurotus ostreatus*. Η λακκάση αυτή περιείχε ένα άτομο χαλκού, ένα άτομο σιδήρου και 2 άτομα ψευδαργύρου στα κέντρα της. Έχουν αναφερθεί ακόμη άλλες περιπτώσεις λευκών λακκασών που απομονώθηκαν από τον *Pycnoporous sanguineus*, τον *T. hirsuta*, και τον *P. radiata* BP-11-2. Η ανάλυση του περιεχομένου μεταλλικού ιόντος στη λακκάση του *T. hirsuta* έδειξε την παρουσία χαλκού και μαγγανίου σε αναλογία 3:1 (Giardina, 2010).

Θα πρέπει να αναφερθεί ξανά σε αυτό το σημείο ότι το σύνολο των ερευνητών που ασχολούνται τα τελευταία χρόνια με τις λακκάσες αναγνωρίζουν ότι κάθε συμπέρασμα που εξάγεται σε σχέση με αυτό το ένζυμο είναι αβέβαιο και μπορεί να αποδειχθεί προσωρινό. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο κύριος όγκος των διαθέσιμων αποτελεσμάτων προέρχεται από λακκάσες που έχουν απομονωθεί από τους βασιδιομύκητες λευκής σήψης, ενώ φαίνεται ότι τελικά το ένζυμο αυτό παρουσιάζει γενικότερα πολύ μεγάλη ετερογένεια. Για παράδειγμα, φαίνεται ότι οι λακκάσες που έχουν απομονωθεί από ασκομύκητες έχουν πολύ διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους (Baldrian, 2005).

Πίνακας 1.5 Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά μυκητιακών λακκασών (Baldrian, 2005).

Είδη	MW (kDa)	Βέλτιστο pH					Km(μM)			Βέλτιστη Θερμοκρασία (°C)	Αναφορά	
		pI	ABTS	DMP	GUA	SYR	ABTS	DMP	GUA			SYR
<i>Agaricus blazei</i>	66	4	2	5.5		6	63	1026	4307	4	57	Ullrich et al.(2005)
<i>Botrytis cinerea</i>	74	4	3.5					100				Slomczynsk et al.(1995)
<i>Ceriporiopsis subvermispora L1</i>	71	3.4	3	4	3		30	2900	1600			Fukushima & Kirk (1995), Wang & Ng (2004b)
<i>Ceriporiopsis subvermispora L2</i>	68	4.8	3	4	5		20	7700	440			Fukushima & Kirk (1995), Wang & Ng (2004b)
<i>Cerrena maxima</i>	57–67	3.5							160–300		50	Koroleva et al. (2001), Shleev et al. (2004)
<i>Chaetomium termophilum</i>	77	5.1					190	96	400	34	60	Chefetz et al. (1998)
<i>Chalara paradoxa</i>	67		4.5	4.5	6.5	6.5	770	14720	10 230	3400		Robles et al. (2002)
<i>Coniothyrium minitans</i>	74	4	3.5				100	100			60	Dahiya et al. (1998)
<i>Coprinus cinereus</i>	58	4	4			6.5	26	26			60–70	Schneider et al. (1999)
<i>Coprinus friesii</i>	60	3.5	5	8			41	41				Heinzkill et al. (1998)
<i>Coriolopsis rigida I</i>	66	3.9	2.5	3			12	328				Saparrat et al. (2002)
<i>Coriolopsis rigida II</i>	66	3.9	2.5	3			11	348				Saparrat et al. (2002)
<i>Daedalea quercina</i>	69	3	2	4	4.5	7	38	48	93	131	70, 55	Baldrian (2004)
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	190	5.6	4.5				26	26	510			Edens et al. (1999)
<i>Lentinula edodes Lcc1</i>	72	3	4	4	4		108	557	917		40	Nagai et al. (2002)

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<i>Magnaporthe grisea</i>	70					6			118	30	Iyer & Chattoo (2003)
<i>Marasmius quercophilus</i>	60	4.0–4.4		4.4		5				80	Farnet et al. (2000)
<i>Marasmius quercophilusw</i>	60	4.8–5.1		5.1		5				80	Farnet et al. (2000)
<i>Marasmius quercophilus</i>	65	3.6				4.5			7	75	Dedeyan et al. (2000)
<i>Marasmius quercophilusz</i>	65		2.6			6.2	8		50	80	Farnet et al., (2002, 2004)
<i>Marasmius quercophilus</i>	60		4			4.5	113		4.2	80	Farnet et al., (2004)
<i>Mauginiella sp.</i>	63	4.8–6.4	2.4	3.5	4						Palonen et al. (2003)
<i>Melanocarpus albomyces</i>	80	4	3.5		5.0–7.5	6.0–7.0				65	Kiiskinen et al. (2002)
<i>Phellinus ribis</i>	152		5	4.0–6.0		6	207	38	11		Min et al. (2001)
<i>Physisporinus rivulosus Lacc 1</i>	66	3.3	2.5	3	3.5	3.5					Hakala et al. (2005)
<i>Physisporinus rivulosus Lacc 2</i>	67	3.3	2.5	3	3.5	3.5					Hakala et al. (2005)
<i>Physisporinus rivulosus Lacc 3</i>	68	3.2	2.5	3	3.5	3.5					Hakala et al. (2005)
<i>Physisporinus rivulosus Lacc 4</i>	68	3.1	2.5	3	3.5	3.5					Hakala et al. (2005)
<i>Pleurotus eryngii I</i>	65	4.1	4.5				1400	7600		55	Munoz et al. (1997)
<i>Pleurotus eryngii II</i>	61	4.2	4.5				400	8000		55	Munoz et al. (1997)
<i>Pleurotus florida</i>	77	4.1						30 000			Das et al. (2000)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	67	3.6				5.8				50	Hublik & Schinner (2000)
<i>Pleurotus ostreatus POXA1b</i>	62	6.9	3	4.5		6	370	260	220		Giardina et al. (1999)
<i>Pleurotus ostreatus POXA1w</i>	61	6.7	3	3.0–5.0	NA	6	90	2100	NA	130	45–65 Palmieri et al. (1997)

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>POXA2</i>	67	4	3	6.5	6	6	120	740	3100	140	25–35	Palmieri et al. (1997)
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>POXA3a</i>	83–85	4.1	3.6	5.5	6.2		70	14 000		36	35	Palmieri et al. (2003)
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>POXA3b</i>	83–85	4.3	3.6	5.5	6.2		74	8800		79	35	Palmieri et al. (2003)
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>POXC</i>	59	2.9	3	3.0–5.0	6	6	280	230	1200	20	50–60	Palmieri et al. (1993, 1997), Sannia et al. (1986)
<i>Pleurotus pulmonarius</i> <i>Lcc2</i>	46		4.0–5.5		6.0–8.0	6.2– 6.5	210		550	12	50	De Souza & Peralta (2003)
<i>Pleurotus sajor-caju</i> <i>IV</i>	55	3.6	2.1				92					Lo et al. (2001)
<i>Rigidoporus lignosus</i> <i>B</i>	55	3.7	3	6.2			80	480				Bonomo et al. (1998)
<i>Rigidoporus lignosus</i> <i>S</i>	60	3.1	3	6.2			49	108				Bonomo et al. (1998)
<i>Thelephora terrestris</i>	66		3.4		4.8	5	16		121	3	45	Kanunfre & Zancan (1998)
<i>Trametes gallica</i> <i>Lac I</i>	60	3.1	2.2	3	4		12	420	405		70	Dong & Zhang (2004)
<i>Trametes gallica</i> <i>Lac II</i>	60	3	2.2	3	4		9	410	400		70	Dong & Zhang (2004)
<i>Trametes pubescens</i> <i>LAP 2</i>	65	2.6					14	72	360	6		Galhaup et al. (2002)
<i>Trametes versicolor</i>	68		2.5	3.5		4	37	15			55	Rogalski et al. (1990), Hofer & Schlosser (1999)
<i>Trametes</i> sp. <i>AH28-2</i> <i>A</i>	62	4.2			4.5		25	25	420		50	Xiao et al. (2003)
<i>Volvariella volvacea</i>	58	3.7	3	4.6		5.6	30	570		10	45	Chen et al. (2004)

ABTS, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), DMP, 2,6-dimethoxyphenol, GUA, 2-methoxyphenol (guaiacol), SYR, 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde [(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)methylene]hydrazine (syringaldazine).

Τα είδη των μυκήτων αναφέρονται όπως στις πρωτότυπες αναφορές

NA, not active → Δεν εμφανίστηκε ενεργότητα

1.6 Βιοτεχνολογική Αξία Λακκασών

Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις κατέχουν κυρίαρχο ρόλο σε πολλές βιομηχανικές διεργασίες, ωστόσο οι περισσότερες από τις συμβατικές τεχνολογίες οξείδωσης έχουν σαν αποτέλεσμα τη διεξαγωγή ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων και ταυτόχρονα συνήθως προϋποθέτουν τη χρήση περιβαλλοντικά επικίνδυνων χημικών ουσιών. Αυτό έχει οδηγήσει τους ερευνητές στην αναζήτηση νέων τεχνολογιών οξείδωσης που θα βασίζονται σε βιολογικά συστήματα όπως η ενζυμική οξείδωση. Ο λόγος που έχει στραφεί η προσοχή των ερευνητών σε τέτοια συστήματα είναι μια σειρά πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν σε σχέση με τη χημική οξείδωση. Τα ένζυμα είναι εξειδικευμένοι και βιοδιασπώμενοι καταλύτες και λόγω της βιολογικής τους προέλευσης μπορούν να λειτουργούν εξαιρετικά αποδοτικά σε ήπιες συνθήκες.

Οι ενζυμικές τεχνικές οξείδωσης μπορούν να εφαρμοσθούν σε ένα ευρύ πεδίο που θα περιλαμβάνει πολλούς βιομηχανικούς τομείς, όπως για παράδειγμα τη βιομηχανία χάρτου, την κλωστοϋφαντουργία και τη βιομηχανία τροφίμων. Ανάμεσα στα οξειδωτικά ένζυμα, αυτά που ανακυκλώνουν το μοριακό οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων φαίνεται να έχουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον (Couto and Herrera, 2006).

Οι λακκάσες συγκεντρώνουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθώς έχουν ως συν-υπόστρωμα το οξυγόνο και ως παραπροϊόν το νερό, αφού δεν απελευθερώνουν το υπεροξείδιο ως ενδιάμεσο προϊόν. Παράλληλα, η χαμηλή εξειδίκευση σε υπόστρωμα τις καθιστά ένζυμα δυνητικά χρήσιμα σε πολλές διαφορετικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Ακόμη, στους μύκητες οι λακκάσες έχουν συνεχή έκφραση στο σύνολο ή τουλάχιστον σε ορισμένα στάδια της ανάπτυξης, που σε συνδυασμό με τη δυνατότητα αύξησης της έκφρασής τους με τη χρήση επαγωγέων σε μυκητιακές καλλιέργειες, επιτρέπουν υψηλή παραγωγικότητα σε ένζυμο. Εκτός από τα παραπάνω πολύ σημαντικό πλεονέκτημα για τη βιομηχανία είναι ότι οι περισσότερες λακκάσες είναι εξωκυτταρικά ένζυμα, πράγμα που καθιστά τις διαδικασίες καθαρισμού ευκολότερες και ταυτόχρονα τους επιτρέπει να εμφανίζουν σημαντικό επίπεδο σταθερότητας στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Τέλος, η ετερογένεια στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, η οποία δυσχεραίνει το στάδιο του χαρακτηρισμού, αποτελεί πολύ σημαντικό πλεονέκτημα για τη χρήση του ενζύμου σε μεγάλο εύρος εφαρμογών. Η σημαντική ποσότητα των δεδομένων που αφορούν τις ιδιότητες των μυκητιακών λακκασών και το ευρύ φάσμα που αυτές καλύπτουν επιτρέπει την επιλογή της καταλληλότερης λακκάσης για μια συγκεκριμένη εφαρμογή (π.χ. βέλτιστη σταθερότητα σε θερμοκρασία ή pH) (Baldrian, 2005).

1.6.1 Βιομηχανία Τροφίμων

Αρκετές φαινολικές ενώσεις (κουμαρικό οξύ, φλαβονοειδή, και ανθοκυανίνες) που συνήθως υπάρχουν σε ποτά (κρασί, χυμό φρούτων και μύρα) μπορεί κατά τη διάρκεια ζωής τους να προκαλέσουν ανεπιθύμητες και επιβλαβείς αλλαγές όπως ο αποχρωματισμός και το θόλωμα με ταυτόχρονη μεταβολή στη γεύση. Οι λακκάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ορισμένες διεργασίες για να ενισχύσουν ή να τροποποιήσουν το χρώμα των τροφίμων ή των ποτών. Μια

ενδιαφέρουσα εφαρμογή των λακκασών περιλαμβάνει την εξάλειψη των ανεπιθύμητων φαινολικών ενώσεων, που μπορεί να ευθύνονται για την αμαύρωση και τη θολότητα σε χυμό φρούτων, μπίρα και κρασί. Παράλληλα έχει προταθεί η χρήση τους για τη βελτίωση προϊόντων με βάση το τσάι, ενώ μπορεί να βελτιώσουν την ποιότητα της γεύσης τροφίμων όπως τα φυτικά έλαια, με την αφαίρεση του διαλυμένου οξυγόνου (Petersen et al, 1996).

1.6.2 Βιομηχανία χάρτου

Η βιομηχανική παρασκευή χάρτου απαιτεί το διαχωρισμό και την αποικοδόμηση της λιγνίνης στον πολτό του ξύλου. Η αύξηση των περιβαλλοντικών ανησυχιών οδηγεί στην αντικατάσταση των συμβατικών μεθόδων που βασίζονται στο χλώριο και είναι ρυπογόνες. Ήδη έχουν υιοθετηθεί βιομηχανικές διεργασίες απολιγνίνωσης με χρήση οξυγόνου, ωστόσο η προ-επεξεργασία του πολτού ξύλου με λιγνολυτικά ένζυμα μπορεί να παρέχει πιο ήπια και καθαρότερη απολιγνίνωση που θα επιτρέψει τη διατήρηση της ακεραιότητας των ινών της κυτταρίνης (Kuhad et al., 1997).

Αν και έχουν διεξαχθεί εκτεταμένες μελέτες για την ανάπτυξη εναλλακτικών συστημάτων βιο-λεύκανσης, λίγες ενζυμικές διεργασίες εμφανίζουν δυνατότητες αντίστοιχες των σύγχρονων τεχνολογιών χημικής λεύκανσης. Μία από τις λίγες εξαιρέσεις σε αυτή τη γενίκευση είναι η ανάπτυξη της τεχνολογίας αποικοδόμησης της λιγνίνης με χρήση συστήματος λακκάσης-μεσολαβητή LMS (laccase mediator system) για χαρτοπολτό τύπου kraft.

Ανάλογα συστήματα έχουν περιγραφεί και για τα ένζυμα υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και υπεροξειδάση εξαρτώμενη από το μαγγάνιο (MnP), όμως το σύστημα της λακκάσης κρίθηκε πιο αποδοτικό και έχει ήδη βρει πρακτικές εφαρμογές, όπως το εμπορικό σκεύασμα Lignozym® (Call and Mücke, 1997). Αρκετοί συγγραφείς εφάρμοσαν το σύστημα LMS για τη βιο-λεύκανση πολτού. Ωστόσο, όλες οι μελέτες επικεντρώθηκαν σε πολτούς ξύλου και λίγα είναι γνωστά σχετικά με την αποτελεσματικότητα των LMS για άλλους πολτούς, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή ειδικών χαρτιών. Με αυτό το σκεπτικό επιχειρήθηκε να διερευνηθεί η δυνατότητα του συστήματος LMS για την αφαίρεση προϊόντων που προέρχονται από λιγνίνη και είναι υπεύθυνα για το χρώμα, από ένα πολτό λιναριού από τον οποίο παρασκευάζεται χαρτί υψηλής ποιότητας. Προέκυψε ότι το σύστημα LMS μπορεί να υποκαθιστά αντιδραστήρια που περιέχουν χλώριο κατά την παρασκευή αυτών των πολτών χάρτου υψηλής τιμής.

1.6.3 Κλωστοϋφαντουργία

Ο κλάδος της κλωστοϋφαντουργίας αντιπροσωπεύει τα δύο τρίτα της συνολικής αγοράς χρωστικών ουσιών και καταναλώνει μεγάλους όγκους νερού και χημικών ουσιών κατά την υγρή επεξεργασία των υφασμάτων. Τα χημικά αντιδραστήρια που μπορεί να χρησιμοποιούνται καλύπτουν πολύ μεγάλο εύρος και κυμαίνονται από ανόργανες ενώσεις έως πολυμερή και βιολογικά προϊόντα.

Υπάρχουν περισσότερες από 100.000 εμπορικά διαθέσιμες βαφές και η ετήσια παραγωγή χρωστικών ουσιών ξεπερνά τους $7 \cdot 10^5$ τόνους. Λόγω της χημικής τους δομής οι χρωστικές είναι ανθεκτικές στο ξεθώριασμα κατά την έκθεση στο φως, το νερό και σε διάφορες χημικές ουσίες και οι περισσότερες από αυτές είναι δύσκολο να αποχρωματισθούν λόγω της συνθετικής τους προέλευσης. Η κυβερνητική νομοθεσία γίνεται όλο και πιο αυστηρή, ιδιαίτερα στις πιο ανεπτυγμένες χώρες, σχετικά με την αφαίρεση των χρωστικών ουσιών από τα βιομηχανικά απόβλητα. Πολλές χρησιμοποιούμενες βαφές είναι κατασκευασμένες από γνωστές καρκινογόνες ουσίες, όπως η βενζιδίνη και άλλες αρωματικές ενώσεις. Οι περισσότερες υπάρχουσες διεργασίες για την επεξεργασία λυμάτων βαφής είναι αναποτελεσματικές και έχουν υψηλό κόστος. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη βιοδιεργασιών χρησιμοποιώντας λακκάσες φαίνεται μια ελκυστική λύση λόγω της δυνατότητάς τους να αποικοδομούν χρωστικές ουσίες διαφόρων χημικών δομών συμπεριλαμβανομένων των συνθετικών χρωστικών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία. (Couto and Herrera, 2006)

Η χρήση των λακκάσων στην κλωστοϋφαντουργία αυξάνεται ραγδαία, αφού εκτός από τον αποχρωματισμό των αποβλήτων, χρησιμοποιείται για τον αποχρωματισμό υφασμάτων (Setti et al., 1999). Το 1996 η εταιρία Novozyme (Novo Nordisk, Δανία) βασίστηκε στην ικανότητα αποχρωματισμού των υφασμάτων που είχε η λακκάση και εισήγαγε μια νέα βιομηχανική εφαρμογή ενζυμικής επεξεργασίας τζιν με σύστημα LMS, το DeniLite®. Πρόκειται για την πρώτη βιομηχανική χρήση λακκάσης και το πρώτο ένζυμο που αποχρωματίζει με τη βοήθεια ενός μορίου που δρα ως μεσολαβητής.

Εκτός από τα παραπάνω, συστήματα λακκάσης με μεσολαβητή χρησιμοποιήθηκαν για να αυξηθεί η αντίσταση συρρίκνωσης του μαλλιού. Παράλληλα, έχουν χρησιμοποιηθεί λακκάσες για την σύνθεση πολυμερών με σκοπό την ανάπτυξη βιοενεργών υλικών και κλωστοϋφαντουργικών χρωστικών (Dwivedi, 2010).

1.6.4 Ιατρική

Η λακκάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση σύνθετων φαρμακευτικών ενώσεων καθώς και ετερομοριακών διμερών αντιβιοτικών μέσω φαινολικής οξείδωσης, φαινολικής οξειδωτικής σύζευξης και οξείδωσης σε συνδυασμό με πυρηνική αμίνωση, όπως τριαζολο (βενζο) κυκλοαλκυλοθειαδιαζίνες (αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικοί παράγοντες), βινβλαστίνη (αντικαρκινικός παράγοντας), μιτομυκίνη, κεφαλοσπορίνες, και διμερή βιντολίνης (θεραπεία νεοπλασματικών νόσων) (Dwivedi, 2010).

Ακόμα έχει βρεθεί ότι η λακκάση μπορεί να έχει σημαντική παρεμποδιστική δράση στην αντίστροφη μεταγραφάση του HIV-1 (Wang and Ng, 2004). Συγκεκριμένα, η λακκάση που απομονώθηκε από καρποσώματα του *Tricholoma giganteum* χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV. Τέλος, οι λακκάσες μπορούν να αποτοξικοποιήσουν το κατεχολικό παράγωγο το οποίο είναι υπεύθυνο για τις δερματίτιδες που προκύπτουν από την επαφή του δέρματος με δηλητηριώδη κισσό ή δηλητήριο βελανιδιάς.

1.6.5 Νανοβιοτεχνολογία

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών έχει ενισχυθεί το επιστημονικό ενδιαφέρον σε εφαρμογές βιο-ηλεκτροχημείας. Η πρόοδος που έχει σημειωθεί σε αυτό τον τομέα έχει εκφραστεί σε αναλυτικές εφαρμογές, όπως στους βιο-αισθητήρες οι οποίοι μπορούν να μετατρέπουν ένα βιοχημικό σήμα σε ποσοτικοποιημένη ηλεκτρική απόκριση που ανιχνεύει, μεταδίδει και καταγράφει πληροφορίες σχετικές με μια φυσιολογική ή βιοχημική αλλαγή και μπορούν να χρησιμοποιούνται σε κλινικές και περιβαλλοντικές αναλύσεις. Οι λακκάσες, που είναι ικανές να καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων χωρίς επιπλέον συμπαράγοντες, έχουν μελετηθεί σε βιο-αισθητήρες για την ανίχνευση φαινολικών ενώσεων, οξυγόνου, αζιδίων, γλυκόζης ή αρωματικών αμινών. Για παράδειγμα, οι μυκητιακές λακκάσες έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του φαινολικού φορτίου φυσικών χυμών ή κατεχίνης στο τσάι. Επιπλέον, έχει επιχειρηθεί η χρήση τους σε βιοαισθητήρες για την ανίχνευση μορφίνης και κωδεΐνης, κατεχολαμινών και φυτικών φλαβονοειδών. (Dwivedi, 2010, Couto and Herrera, 2006).

Η ικανότητα των λακκασών να καταλύουν την αναγωγή του οξυγόνου μέσω ενός άμεσου μηχανισμού χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα οξυγόνου αέριας φάσης στην οποία μία λακκάση από *R. vernicifera* και ασκορβικό οξύ ως υπόστρωμα εγκλείστηκαν σε πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας με αέριο άζωτο. Παρουσία του ασκορβικού οξέος, ο μπλε χαλκός τύπου I των λακκασών ανάγεται και αποχρωματίζεται. Όταν το ένζυμο επαναοξειδώνεται από οξυγόνο, επανέρχεται το μπλε χρώμα που καταγράφεται τόσο οπτικά όσο και φασματοφωτομετρικά στα 610 nm. Δεδομένου ότι αυτός ο βιοαισθητήρας οξυγόνου είναι πολύ ενεργός και σταθερός, προτάθηκε ως ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μέτρηση των επιπέδων του οξυγόνου σε προϊόντα που συσκευάζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και των οποίων η ποιότητα και η ασφάλεια εξαρτώνται αυστηρά από αυτά τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (Gardiol, 1996).

1.6.6 Καλλυντικά

Η χρήση των λακκασών έχει εισαχθεί και στη βιομηχανία καλλυντικών στον τομέα σχεδιασμού προϊόντων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η παρασκευή βαφών μαλλιών που βασίζονται στη λακκάση, αντικαθιστώντας το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και χρησιμοποιώντας το ένζυμο ως οξειδωτικό παράγοντα, με σκοπό να παραχθεί ένα λιγότερο ερεθιστικό και ταυτόχρονα πιο εύχρηστο προϊόν. Ακόμη, αναπτύσσονται παράλληλα και καλλυντικά και δερματολογικά σκευάσματα για λεύκανση του δέρματος, που περιέχουν πρωτεΐνες (Couto and Herrera, 2006).

1.6.7 Βιοκαύσιμα

Μια πρόκληση για την εμπορική εφαρμογή βιοκαυσίμων είναι η αποτελεσματική απελευθέρωση των ζυμώσιμων σακχάρων από την βιομάζα που χρησιμοποιείται σαν πρώτη ύλη. Στα κυτταρικά

τοιχώματα των φυτών η κυτταρίνη είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη. Η λιγνίνη είναι ένα σύνθετο, ετερογενές πολυμερές που σχηματίζει ένα φυσικό εμπόδιο για την κυτταρίνη, συμβάλλοντας στην εγγενή σταθερότητα της βιομάζας. Η απομάκρυνση της λιγνίνης ή της ημικυτταρίνης, προκειμένου να αυξηθεί η προσβασιμότητα της κυτταρίνης κατά την ενζυμική υδρόλυση έχει ονομαστεί «προκατεργασία». Η προκατεργασία της βιομάζας περιλαμβάνει συνήθως θερμοχημικές διαδικασίες (π.χ. υψηλή θερμοκρασία, πίεση, ακραίες τιμές pH). Οι θερμοχημικές διαδικασίες έχουν υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις και ως εκ τούτου υψηλές λειτουργικές δαπάνες, ενώ ταυτόχρονα συνδέονται με την παραγωγή αναστολέων ζύμωσης και με χαμηλές αποδόσεις σε βιομάζα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη (Santhanam et al, 2011).

Οι λακκάσες θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια βιώσιμη και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση για την απομάκρυνση της λιγνίνης. Μελέτες εργαστηριακής κλίμακας δείχνουν ότι οι λακκάσες, μόνες τους ή σε συνδυασμό με μη-τοξικούς, φυσικούς μεσολαβητές, μπορούν να ενισχύσουν τις διεργασίες παραγωγής βιοκαυσίμων στα στάδια της προκατεργασίας, της ζύμωσης και της ανάκτησης παραπροϊόντων. Κάποιοι από αυτούς τους ρόλους συνοψίζονται παρακάτω:

Μείωση φαινομένου μοριακού βάρους της λιγνίνης

Το σύστημα λακκάσης-ABTS οδήγησε στον αποπολυμερισμό Kraft λιγνίνης με αποτέλεσμα μετά από 6 ημέρες επώασης να επέλθει μείωση μοριακού βάρους από 3500 σε 2800 (Bourbonnais R, 1995).

Αύξηση στην απελευθέρωση της γλυκόζης μετά από οξειδωτική κατεργασία με μυκητιακή λακκάση σε προ-επεξεργασμένο με ατμό μαλακό ξύλο

Κατά την οξειδωτική προκατεργασία με λακκάση οι αρωματικές ενώσεις πολυμερίστηκαν και απομακρύνθηκαν. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της απελευθέρωσης της γλυκόζης από την ενζυμική υδρόλυση κατά 11-13%, ανεξάρτητα από το αν η λακκάση χρησιμοποιήθηκε πριν ή ταυτόχρονα με τις κυτταρινάσες. Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η χρήση συστήματος λακκάσης-μεσολαβητή προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση της οξειδωτικής προκατεργασίας. Με την χρήση του N-υδρο-N-φαινυλακεταμιδίου(NHA) ως μεσολαβητή διαπιστώθηκε μέγιστη απελευθέρωση της τάξης του 21% (Palonen, 2004).

Απομάκρυνση των αναστολέων της ζύμωσης που απελευθερώνονται από φυσικοχημικές προκατεργασίες Οι μυκητιακές λακκάσες πολυμερίζουν τους φαινολικούς αναστολείς που παράγονται από την υδρόλυση του ξύλου με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού ζύμωσης των προϊόντων υδρόλυσης που προέρχονται από λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση ετερόλογης έκφρασης μιας μυκητιακής λακκάσης με ξενιστή τον *S. cerevisiae*. Ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* χρησιμοποιήθηκε για την αλκοολική ζύμωση ερυθρελάτης προκατεργασμένης με αραιό οξύ. Καθώς ο ζυμομύκητας μπορούσε να εκκρίνει τη δραστική λακκάση στο ζυμώσιμο μέσο, το ένζυμο με τη δράση του απομάκρυνε τους φαινολικούς αναστολείς της ζύμωσης. Η συγκεκριμένη δράση του ενζύμου είχε σαν αποτέλεσμα

την αύξηση του ρυθμού της ζύμωσης των προϊόντων υδρόλυσης της ερυθρελάτης (Larsson, S. 2001).

1.6.8 Περιβάλλον-Βιοεξυγίανση

Οι λακκάσες έχουν αποδειχθεί χρήσιμες για την απομάκρυνση των τοξικών ενώσεων μέσω της ενζυμικής οξειδωτικής σύζευξης. Η ενζυμική αντίδραση έχει ως προϊόντα τις δραστικές ρίζες οι οποίες αντιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας αδιάλυτες πολύπλοκες δομές οι οποίες μπορούν να απομακρυνθούν με εύκολο και οικονομικό τρόπο από το σύστημα. Οι φαινολικές ενώσεις υπάρχουν στα απόβλητα από διάφορες βιομηχανικές διεργασίες, όπως η μετατροπή του άνθρακα, η διύλιση πετρελαίου και η παραγωγή ελαιόλαδου.

Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχει αποδειχθεί ότι οι λακκάσες που προέρχονται από μύκητες λευκής σήψης μπορούν να καταλύσουν την οξείδωση αλκενίων, καρβαζολίου, N-αιθυλοκαρβαζόλης, φθορενίου, και διβενζοθειοφαινίου, παρουσία HBT και ABTS που δρουν ως μεσολαβητές. Επίσης, έχει δειχθεί ότι οι λακκάσες μπορούν να δράσουν πάνω σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH), οι οποίοι είναι τοξικοί, μεταλλαξογόνοι, ανθεκτικοί περιβαλλοντικοί ρύποι που έχουν την τάση να βιοσυσσωρεύονται (Niku, 2000, Johannes and Majcherczyk, 2000).

Εκτός από την οξείδωση των υποστρωμάτων, έχει βρεθεί ότι οι λακκάσες μπορούν να ακινητοποιήσουν τους ρύπους του εδάφους με σύζευξη του υποστρώματος με χουμικά συστατικά του εδάφους, σε μια διαδικασία που είναι ανάλογη της σύνθεσης χουμικού οξέος που γίνεται στο έδαφος. Με παρόμοιο τρόπο μπορούν να ακινητοποιηθούν τα ξενοβιοτικά που περιλαμβάνουν φαινολικές ενώσεις και ανιλίνες όπως η 3,4-διχλωροανιλίνη, το 2,4,6- τρινιτροτολουένιο ή οι χλωριωμένες φαινόλες. Η ακινητοποίηση μειώνει τη βιολογική διαθεσιμότητα των ξενοβιοτικών και έτσι την τοξικότητά τους.

Βιοαποκατάσταση σε απόβλητα ελαιουργείων

Το απόβλητο επεξεργασίας και παραγωγής ελαιόλαδου (OOMW) είναι ένας τύπος βιομηχανικών λυμάτων που περιέχει πολλές φαινολικές ενώσεις που καλύπτουν ευρύ φάσμα μοριακών μαζών των οποίων οι δομές είναι παρόμοιες με αυτή της λιγνίνης (Martirani et al., 1996). Η ετήσια παραγωγή αυτών των αποβλήτων που προέρχονται από την παραγωγή και επεξεργασία του ελαιόλαδου μπορεί να υπερβεί τα 30 εκατομμύρια κυβικά μέτρα. Τα λύματα αυτά έχουν μαύρο χρώμα, αντιμικροβιακές και φυτοτοξικές ιδιότητες, εξαιτίας της παρουσίας φαινολικών ενώσεων (D'Annibale et al, 2000). Μεταξύ των τεχνολογιών που έχουν αναπτυχθεί για την επεξεργασία του απόβλητου ελαιουργίας (OOMW), όπως αερόβιες και αναερόβιες διεργασίες, η χρήση οξειδωτικών ενζύμων από μύκητες λευκής σήψης φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη λύση για την μείωση του φαινολικού φορτίου.

Σε μια σειρά από έρευνες έχει παρατηρηθεί η ικανότητα της λακκάσης να καταλύει τον πολυμερισμό των φαινολικών που υπάρχουν στα λύματα ελαιουργείου. Έχει αναφερθεί ότι η επεξεργασία των αποβλήτων ελαιουργείων με μύκητες που παράγουν λακκάση πέτυχε να μειώσει το αρχικό φαινολικό φορτίο έως και 78% σε 12-15 ημέρες. Οι λακκάσες επίσης μπορούν να συμμετέχουν στον αποχρωματισμό υγρών απόβλητων ελαιουργείου (YAE) από μαύρο σε κίτρινο-καφέ αλλά και στη μείωση της φυτοτοξικότητάς τους (Dwivedi, 2010). Το 1996 ο Martirani και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η επεξεργασία YAE με τα λιγνολυτικά ένζυμα από το μύκητα *Pleurotus ostreatus* οδήγησαν σε μείωση του φαινολικού περιεχομένου χωρίς όμως να παρατηρηθεί ταυτόχρονα μείωση στην τοξικότητα, πράγμα που απέδωσαν στην παρουσία των οξειδωμένων παραγώγων όπως κινόνες, τα οποία μπορεί να είναι πιο τοξικά από τα αντιδρώντα. Παράλληλα υπάρχουν αναφορές που αποκαλύπτουν την παρεμποδιστική δράση των προϊόντων οξείδωσης στη δράση της λακκάσης. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι οι ορθοκινόνες που παράγονται κατά την οξείδωση της κατεχίνης δρουν παρεμποδιστικά, ενώ και τα μη υδατοδιαλυτά πολυμερή που παράγονται κατά της διάρκεια της αντίδρασης οδηγούν τη λακκάση σε συγκαταβύθιση. Γενικά, οι αναλύσεις και οι μετρήσεις για την επεξεργασία YAE καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα, και τα αποτελέσματα εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση του αποβλήτου και τη μέθοδο προσδιορισμού (Hautphenne, 2016).

Ακόμα, οι ακινητοποιημένες λακκάσες έχουν μελετηθεί πολύ ως μέσο για την απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων από τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων και έχειδειχθεί ότι η απόδοση της οξείδωσης των φαινολικών και η σταθερότητα του ενζύμου είναι υψηλότερες για τα ακινητοποιημένα ένζυμα από ό, τι για τα ελεύθερα (D'Annibale et al, 2000).

Καθώς το φαινολικό φορτίο των YAE είναι πολύ μεγάλο έχουν διεξαχθεί πιο λεπτομερή πειράματα για να αναλυθούν με μεγαλύτερη ακρίβεια διάφορα κλάσματα του αποβλήτου πριν και μετά την επεξεργασία με λακκάσες του *Pycnoporus coccineus* και με ένζυμα από τον *Coriolopsis polyzona* (Jaouani et al., 2005). Χρησιμοποιώντας χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), ο Jaouani και οι συνεργάτες του διαχώρισαν τις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στον YAE σε δύο κατηγορίες, με βάση το μοριακό βάρος, σε χαμηλού μοριακού βάρους LMF (<5 kDa) και υψηλού μοριακού βάρους HMF (> 50 kDa). Μετά

την αντίδραση με το ένζυμο η κορυφή στο φάσμα που αντιστοιχούσε στα φαινολικά χαμηλού μοριακού βάρους εξαφανίστηκε με την ταυτόχρονη αύξηση της κορυφής HMF, πράγμα που σαφώς υποδεικνύει τον πολυμερισμό των προϊόντων χαμηλού μοριακού βάρους.

Όσον αφορά την εναπομένουσα τοξικότητα του αποβλήτου, φαίνεται ότι η μείωση της τοξικότητας δεν είναι ανάλογη με την παρατηρούμενη μείωση των φαινολικών ενώσεων ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις όπου δεν ανιχνεύθηκε μείωση στην τοξικότητα του αποβλήτου μετά την επεξεργασία. Οι ερευνητικές ομάδες απέδωσαν την εναπομένουσα τοξικότητα των επεξεργασμένων λυμάτων στην παρουσία υπολειμματικών φαινολικών ενώσεων όπως οι κινόνες ή παράγωγά τους, ή τα πολυμερή που προκύπτουν από οξειδωτική σύζευξη, και είναι περισσότερο τοξικά από τις αρχικές φαινολικές ενώσεις. Οι διαφορές στα αποτελέσματα για τις διάφορες δοκιμές τοξικότητας πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή, διότι οι παρατηρούμενες διαφορές μπορεί να οφείλονται στη μεταβλητή σύνθεση των ΥΑΕ και την ευαισθησία του οργανισμού που χρησιμοποιείται για τις δοκιμές τοξικότητας του αποβλήτου (Hautphenne, 2016).

1.6.9 Οργανική Σύνθεση

Η χημική σύνθεση χαρακτηρίζεται από διάφορα μειονεκτήματα όπως το υψηλό κόστος, η τοξικότητα των αντιδραστηρίων και οι πολύπλοκες αντιδράσεις πολλών σταδίων. Οι λακκάσες μπορούν να αποδειχθούν πολύ χρήσιμες στη συνθετική χημεία, καθώς υποστηρίζεται ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή σύνθετων πολυμερών και ιατρικών μέσων.

Ενζυμικός πολυμερισμός και ενζυμική ενεργοποίηση πολυμερούς

Η χρήση λακκασών στον ενζυμικό πολυμερισμό έχει κερδίσει την προσοχή των ερευνητών αφού οι λακκάσες και τα συστήματα λακκάσης-μεσολαβητή LMS μπορούν να οδηγήσουν στη σύνθεση πολυμερών που είναι αδύνατο να παραχθούν μέσω της συμβατικής χημικής σύνθεσης. Για παράδειγμα, παρουσία λακκάσης επιτεύχθηκε η παραγωγή πολυκατεχόλης από μονομερή κατεχόλης. Η πολυκατεχόλη είναι ένα πολύτιμο οξειδοαναγωγικό πολυμερές που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πλήθος εφαρμογών μεταξύ των οποίων είναι οι χρωματογραφικές ρητίνες και ο σχηματισμός λεπτών υμενίων που χρησιμοποιούνται στους βιοαισθητήρες. Ακόμη, αδρανή φαινολικά πολυμερή μπορούν επίσης να παραχθούν μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από λακκάση. Αυτά τα πολυμερή βρίσκουν εφαρμογή σε σύνθετα υλικά, ως συγκολλητικά ινών, σε πολυστρωματικά υλικά, λειαντικά, επιχρίσματα και κόλλες (Aktas et al, 2003).

Γενικά, η ενζυμική παρασκευή πολυμερικών φαινολών από λακκάσες έχει ερευνηθεί εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες και θεωρείται βιώσιμη και μη τοξική εναλλακτική λύση έναντι της χημικής σύνθεσης που έχει ως βάση τη φορμαλδεΰδη. Το πολυ-(2,6-διμεθυλο-1,4-οξυφαινυλενιο) ή απλά PPO, χρησιμοποιείται ευρέως ως πλαστικό υψηλής μηχανικής απόδοσης, δεδομένου ότι το πολυμερές έχει εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες. Η λακκάση καταλύει ένα νέο τύπο οξειδωτικού πολυμερισμού του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος, με σχηματισμό των παραγώγων 3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (συριγγικό οξύ) και 3,5-διμεθυλο-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Kunamneni, 2008).

Τα φλαβονοειδή επίσης πολυμερίζονται με πολυφαινολοξειδάσες και λακκάσες. Τα πολυμερή των φλαβονοειδών επέδειξαν καλή αντιοξειδωτική ικανότητα και αναστολή της δράσης του ενζύμου. Ακόμη, έχει αναφερθεί η ικανότητα της λακκάσης να καταλύει τον πολυμερισμό ακρυλαμιδίου παρουσία ή όχι μεσολαβητή (Uyama and Kobayashi, 2006).

Η οξειδωτική μετατροπή των οργανικών ενώσεων από λακκάση

Οι λακκάσες έχουν χρησιμοποιηθεί για να συνθέσουν προϊόντα φαρμακευτικής σημασίας. Ίσως η πιο σημαντική φαρμακευτικά ενεργή ουσία που μπορεί να συντεθεί μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από λακκάση είναι η ακτινοσίνη. Η ακτινοσίνη συντίθεται από το 4-μεθυλο-3-υδροξυανθρανιλικό οξύ. Αυτό το φαρμακευτικό προϊόν έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό στην καταπολέμηση του καρκίνου, καθώς εμποδίζει τη μεταγραφή του DNA των καρκινικών κυττάρων (Ossiadacz, 1999).

Άλλα παραδείγματα του δυναμικού εφαρμογής των λακκασών σε οργανικές συνθέσεις περιλαμβάνουν την οξειδωτική σύζευξη της καταραντίνης και της βιντολίνης από την οποία παράγεται βινβλαστίνη με απόδοση μετατροπής της τάξης του 40%. Η βινβλαστίνη είναι ένα σημαντικό αντικαρκινικό φάρμακο, ιδιαίτερα χρήσιμο στη θεραπεία της λευχαιμίας. Παρόλο που η βινβλαστίνη είναι φυσικό προϊόν και μπορεί να εξαχθεί από το φυτό *Catharanthus roseus* σε μικρές ποσότητες, οι πρόδρομες ενώσεις-δηλαδή η καταραντίνη και η βιντολίνη - βρίσκονται στο φυτό σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η οξειδωτική σύζευξη χρησιμοποιείται και στη σύνθεση διάφορων καινοτόμων ενώσεων που εμφανίζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες, όπως για παράδειγμα τα αντιβιοτικά (Kunamneni, 2008).

Ακόμα οι λακκάσες μπορούν να οξειδώνουν κατεχίνες που είναι οι δομικές μονάδες των τανινών, οι οποίες θεωρούνται σημαντικά αντιοξειδωτικά που περιέχονται στα λαχανικά και τα βότανα. Η ικανότητα που έχουν οι κατεχίνες να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, τις καθιστά σημαντικές για την πρόληψη του καρκίνου, των φλεγμονωδών και των καρδιαγγειακών παθήσεων. Η οξείδωση της κατεχίνης από τη λακκάση έχει οδηγήσει στη σύνθεση προϊόντων με ενισχυμένη αντιοξειδωτική ικανότητα (Kurisawa, 2003).

Τέλος, η λακκάση βρίσκει εφαρμογές στη σύνθεση παραγώγων ορμονών δημιουργώντας διμερή ή ολιγομερή με τη σύζευξη των δραστικών ενδιάμεσων ριζών. Αυτές οι δυνατότητες των λακκασών έχουν αξιοποιηθεί για να απομονωθούν νέα διμερή παράγωγα της ορμόνης β-οιστραδιόλη και της φυτοαλεξίνης ρεσβερατρόλη (Kunamneni, 2008).

1.6.10 Ενζυμική τροποποίηση πολυμερών

Ο όρος αντιδράσεις σύζευξης αναφέρεται σε αντιδράσεις στις οποίες δύο μόρια παρόμοιου μεγέθους ενώνονται με τη χρήση ενός καταλύτη. Αντίστοιχα, η σύζευξη μικρών μορίων σε φυσικά ή συνθετικά πολυμερή αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως επιφανειακή τροποποίηση (grafting).

Οι αντιδράσεις σύζευξης έχουν περιγραφεί από τα μέσα του δέκατου ένατου αιώνα με χρήση μετάλλου ως καταλύτη (Na, Cu, Pd ή Ni), ωστόσο, αυτές οι αντιδράσεις είναι εξαιρετικά ευαίσθητες στην παρουσία νερού ή οξυγόνου. Επιπλέον, αυτές οι χημικές μέθοδοι διεξάγονται συνήθως σε υψηλές θερμοκρασίες, πράγμα που μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη καταστροφή των επιθυμητών δομών και σε σχηματισμό ανεπιθύμητων προϊόντων.

Τα μειονεκτήματα αυτά σε συνδυασμό με τα πλεονεκτήματα των λακκασών ως βιοκαταλύτες που έχουν συζητηθεί παραπάνω οδηγούν την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας σε καινοτόμες ενζυμικές αντιδράσεις σύζευξης με τη χρήση λακκασών (Kudangaa et al, 2011).

Τροποποίηση χιτοζάνης

Η επιφανειακή τροποποίηση έχει επιχειρηθεί σε χιτοζάνη η οποία χρησιμοποιείται στη συσκευασία τροφίμων, ως υλικό επούλωσης τραυμάτων και σε βιοϊατρικές συσκευές λόγω των ιδιοτήτων που εμφανίζει όπως είναι η βιοσυμβατότητα, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες και η ιδιότητα να σχηματίζει υμένα. Προκειμένου να αυξηθεί αντιοξειδωτική ικανότητα της χιτοζάνης, οι δραστικές λειτουργικές ομάδες της χιτοζάνης δηλαδή η πρωτοταγής αμινομάδα στη θέση C2, καθώς και μια δευτερεύουσα ομάδα υδροξυλίου στην θέση C6 τροποποιήθηκαν με τη χρήση λακκάσης με φαινολικά οξέα, όπως το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ, με αποτέλεσμα την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της χιτοζάνης (Bozic et al., 2012).

Τροποποίηση λιγνοκυτταρινούχων υλικών

Οι λακκάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην τροποποίηση ινών λιγνοκυτταρίνης προκειμένου να βελτιωθούν οι χημικές και φυσικές τους ιδιότητες. Αποτελέσματα προκαταρκτικών ελέγχων έδειξαν ότι ίνες πολτού τύπου kraft μπορούν να τροποποιηθούν μετά από οξειδωτική σύζευξη με διάφορα παράγωγα φαινολικών οξέων με τη χρήση λακκασών (Lund and Ragauskas, 2001). Αυτή η ικανότητα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον για να προσκολληθούν χημικά ευέλικτες ενώσεις στις επιφάνειες των ινών, που ενδεχομένως θα οδηγήσουν σε υλικά που θα εμφανίζουν καινούριες ιδιότητες όπως τροποποιημένη υδροφοβικότητα ή ηλεκτρικό φορτίο.

Τροποποίηση Υφασμάτων

Με τη χρήση λακκασών έχει επιχειρηθεί η σύνδεση λειτουργικών μορίων σε υφαντικές ίνες. Για παράδειγμα, με χρήση ενός συστήματος λακκάσης-μεσολαβητή πραγματοποιήθηκε επιφανειακή τροποποίηση με σύζευξη λαυρικού εστέρα του γαλλικού οξέος πάνω σε μαλλί που οδήγησε σε μια νέα λειτουργική πρώτη ύλη με αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές και υδροφοβικές ιδιότητες (Hossain, 2009).

1.7 Παραγωγή λακκάσης μεγάλης κλίμακας

Όπως προκύπτει και από τα παραπάνω, η βιοτεχνολογική αξία της ετερογενούς οικογένειας ενζύμων που χαρακτηρίζονται ως λακκάσες είναι αδιαμφισβήτητη, όμως οι βιοτεχνολογικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές απαιτούν υψηλή παραγωγικότητα σε ένζυμο. Γενικά, οι λακκάσες που εκκρίνονται από στελέχη άγριου τύπου συνήθως δεν είναι κατάλληλες για εμπορικούς σκοπούς κυρίως λόγω των χαμηλών αποδόσεων και διαδικασιών προετοιμασίας, όπως η παρουσία τοξικών επαγωγέων, που καθιστούν την παραγωγή τους οικονομικά ασύμφορη.

Για αυτό το λόγο αναζητούνται συνεχώς τρόποι να μειωθεί το κόστος παραγωγής του ενζύμου και να ενισχυθούν οι αποδόσεις των άγριων στελεχών νηματοειδών μυκήτων που αναπτύσσονται σε βιοαντιδραστήρες (Couto and Herrera, 2007). Ο σκοπός αυτός έχει επιτευχθεί εν μέρει με τη βελτιστοποίηση συνθηκών ανάπτυξης, όπως η τροποποίηση θρεπτικών μέσων και η βελτιστοποίηση της τροφοδοσίας του αντιδραστήρα, με την προσαρμογή των περιβαλλοντικών παραμέτρων που περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση οξυγόνου, και την τιμή του pH και τέλος, με την προσθήκη μορίων που δρουν επαγωγικά ως προς την έκφραση του ενζύμου όπως ο χαλκός, η γλυκερόλη κ.α.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η βέλτιστη μέθοδος παραγωγής του ενζύμου σε ευρεία κλίμακα έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε αντιδραστήρες υγρής φάσης αλλά και σε ζημωτήρες στερεής κατάστασης.

Στην περίπτωση της ανάπτυξης σε βιοαντιδραστήρα με υγρό μέσο καλλιέργειας έχουν μελετηθεί περιπτώσεις ελεύθερων και ακινητοποιημένων κυττάρων. Σε γενικές γραμμές, η ανάπτυξη στελεχών άγριου τύπου σε υγρά μέσα καλλιέργειας συνδυάζει υψηλό κόστος με μέτριες αποδόσεις. Αυτό συμβαίνει καθώς κατά την καλλιέργεια δημιουργούνται ποικίλα προβλήματα όπως οι μεταβολές στο ιξώδες και η άνιση κατανομή του οξυγόνου. Ακόμη, επιβαρυντική είναι η δράση των πρωτεασών που καταστρέφουν το ένζυμο και συνήθως επιβάλλεται η χρήση τεράστιων ποσών νερού ψύξης που επιβαρύνει ιδιαίτερα το κόστος. Από τους αντιδραστήρες υγρής φάσης φαίνεται ότι τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα έδειξαν οι αντιδραστήρες διαλείποντος έργου. Συγκεκριμένα στους αντιδραστήρες διαλείποντος έργου η ρυθμιζόμενη διαθεσιμότητα υποστρώματος μπορεί να ελέγχει αυστηρά το ρυθμό ανάπτυξης. Με αυτό τον τρόπο, η ταχύτητα της αντίδρασης και ο μεταβολισμός των μυκήτων οριοθετούνται, με αποτέλεσμα την αποφυγή της καταστολής του μεταβολισμού και τη μείωση της πρωτεόλυσης (Couto and Herrera, 2007, Galhaur et al, 2002). Από τους μύκητες που έχουν μελετηθεί, ο *Trametes pubescens* παρουσίασε τις μεγαλύτερες αποδόσεις σε υγρό μέσο καλλιέργειας.

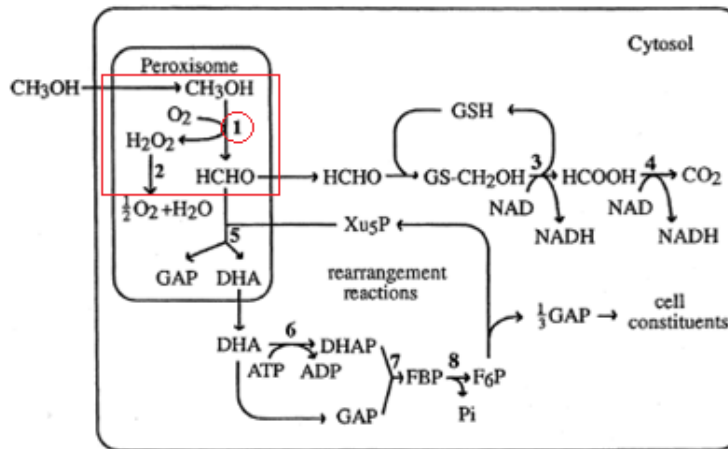
Οι ζυμωτήρες στερεάς κατάστασης αποτελούν μια φθηνή και περιβαλλοντικά ευνοϊκότερη εναλλακτική λύση που ταιριάζει καλύτερα στις φυσικές συνθήκες ανάπτυξης των μυκήτων με απλούστερη επακόλουθη επεξεργασία (Robinson and Nigam, 2003). Ωστόσο, η υγρασία, το pH, η θερμοκρασία και ο αερισμός δεν μπορούν να ρυθμιστούν αποτελεσματικά.

1.8 Ετερόλογη έκφραση μυκητιακών λακκασών

Με βάση τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν τα στελέχη άγριου τύπου σε βιοαντιδραστήρες, η ετερόλογη έκφραση του ενζύμου φαίνεται να είναι καταλληλότερη μέθοδος για παραγωγή ενζύμου σε μεγάλη κλίμακα. Γενικά οι λακκάσες, όπως και άλλα οξειδωτικά ένζυμα, είναι δύσκολο να εκφραστούν σε μη-μυκητιακά συστήματα. Υπάρχουν αναφορές για ετερόλογη έκφραση λακκασών σε νηματοειδείς μύκητες (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* και *Trichoderma reesei*) και ζυμομύκητες (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Kluyveromyces lactis*). Δυστυχώς, η λειτουργική έκφραση των μυκητιακών λακκασών σε βακτήρια (*Escherichia coli*), δεν έχει ακόμη επιτευχθεί καθώς υπάρχουν περιορισμοί που σχετίζονται με τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών, η απόσπαση της μεθειονίνης από την αρχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η γλυκοζυλίωση κ.α. (Kunamneni, 2008).

Ετερόλογη έκφραση στη ζύμη *Pichia pastoris*

Η χρήση της *Pichia pastoris* ως σύστημα έκφρασης πρωτεϊνών βασίζεται στην παρατήρηση ότι ορισμένα από τα ένζυμα που απαιτούνται για το μεταβολισμό της μεθανόλης εκφράζονται σε σημαντικά επίπεδα μόνο όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μεθανόλη. Το ένζυμο αλκοολική οξειδάση (AOX) καταλύει το πρώτο βήμα στο μεταβολισμό της μεθανόλης, δηλαδή την οξείδωση της προς φορμαλδεΐδη και υπεροξειδίου του υδρογόνου (Cereghino and Cregg, 2000).



Εικόνα 1.8. Ο μεταβολισμός της μεθανόλης από τη ζύμη *Pichia pastoris* (Cereghino and Cregg, 2000).

Υπάρχουν δύο γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της αλκοολικής οξειδάσης, τα AOX1 και AOX2. Η πλειοψηφία του ενζύμου παράγεται από το AOX1, το οποίο ρυθμίζεται στο επίπεδο της μεταγραφής ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των διαφορετικών πηγών άνθρακα. Η απουσία γλυκόζης με ταυτόχρονη παρουσία μεθανόλης ενεργοποιεί τον υποκινητή. Η ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης στην *Pichia pastoris* ακολουθεί τρία βήματα: (1) εισαγωγή του γονιδίου ενδιαφέροντος στο φορέα έκφρασης, (2) ενσωμάτωση του φορέα με ομόλογο ανασυνδυασμό στο γονιδίωμα της ζύμης και (3) επιλογή των κυττάρων που εκφράζουν το επιθυμητό γονίδιο. Οι ιδιότητες του υποκινητή AOX1 διευκολύνουν την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών καθώς ο

έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης μπορεί να γίνει με χρήση μεθανόλης ως μοναδική πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο (Cereghino and Cregg, 2000).

Πίνακας 1.8 Ετερόλογη έκφραση λακκασών (Kunamneni, 2008).

Λακκάση	Πηγή	Φορέας	Σχόλια	Αναφορά
MtL	<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Εκκρινόμενη λακκάση ενεργότητας 0.85 U/ml (SGZ). Το ένζυμο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε μερικώς.	Berka et al. (1997)
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Εκκρινόμενη λακκάση ενεργότητας 0.6 U/ml (ABTS).	Bulter et al. (2003)
PO1 PO2	<i>Coriolus hirsutus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Εκκρίθηκε ενεργή λακκάση στο θρεπτικό μέσο.	Kojima et al. (1990)
LCC1 LCC4	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Εκκρίθηκε ενεργή λακκάση στο θρεπτικό μέσο. Τα ένζυμα απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν μερικώς.	Wahleithner et al. (1996)
LCC1	<i>Trametes villosa</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Εκκρίθηκε ενεργή λακκάση στο θρεπτικό μέσο. Το ένζυμο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκαν μερικώς.	Yaver et al. (1996)
LCC1	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Εκκρίθηκε ενεργή λακκάση στο θρεπτικό μέσο.	Jönsson et al. (1997)
LCC1		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα λακκάσης.	Cassland and Jönsson (1999)
LCC2		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Εκκρίθηκε ενεργή λακκάση στο θρεπτικό μέσο.	Cassland and Jönsson (1999)
LCC1			Παραγωγή αιθανόλης από ανεπεξέργαστη 1 ^η ύλη (0.12 U/l)	Larsson et al. (2001)
LCCIV		<i>Pichia pastoris</i>	Εκκρίθηκε ενεργή λακκάση στο θρεπτικό μέσο. Μια επεξεργασμένη έκδοση του ενζύμου απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε εν μέρει.	Gelo-Pujic et al. (1999)

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

		<i>Pichia pastoris</i>	Εκκρινόμενη λακκάση ενεργότητας 0.15 U/ ml(ABTS).	Brown et al. (2002)
LCC1	<i>Coprinus cinereus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Εκκρίθηκαν 8-135 mg ενεργής λακκάσης ανά λίτρο. Το ένζυμο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε μερικώς.	Yaver et al. (1999)
LAC1	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Εκκρίθηκαν 8 mg υπεργλυκοζυλιωμένης ενεργής λακκάσης ανά λίτρο.	Otterbein et al. (2000)
LAC1		<i>Aspergillus niger</i>	Εκκρίθηκαν 70 mg υπεργλυκοζυλιωμένης ενεργής λακκάσης ανά λίτρο.	Record et al. (2002)
LAC 1		<i>Aspergillus oryzae</i>	Εκκρίθηκαν 80 mg υπεργλυκοζυλιωμένης ενεργής λακκάσης ανά λίτρο σε βιοαντιδραστήρα.	Sigoillot et al. (2004)
LAC2	<i>Loblolly pine (Pinus taeda)</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα.	Sato et al. (2001)
PPOA	<i>Marinomonas mediterranea</i>	<i>Escherichia coli</i>	Παραγωγή πρωτεΐνης στον περιπλασματικό χώρο	Sanchez-Amat et al. (2001)
LAC4	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Εκκρίθηκαν 4.85 mg ενεργής λακκάσης ανά λίτρο. Το ένζυμο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε μερικώς.	Soden et al. (2002)
LAC 1 LAC 1	<i>Melanocarpus albomyces</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	Εκκρίθηκαν 920 mg ενεργής λακκάσης ανά λίτρο.	Kiiskinen et al. (2004)
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Εκκρίθηκαν περίπου 3 mg ενεργής λακκάσης ανά λίτρο με ενεργότητα 168 U/l	Kiiskinen et al. (2004)
LAC3	<i>Trametes sp. strain C30</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Σε βιοαντιδραστήρα παράχθηκαν 2 mg ενεργής λακκάσης ανά λίτρο.	Klonowska et al. (2005)

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<i>LCC1</i>	<i>Pycnoporus coccineus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Η παραγωγή λακκάσης προϋποθέτει υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού	Hoshida et al. (2005)
<i>LCC</i>	<i>Tametes trogii</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Εκκρίθηκαν 17 mg ενεργής λακκάσης ανά λίτρο. Η ενεργότητα έφτασε τα 2520 U/l	Colao et al. (2006)
<i>LACB</i>	<i>Trametes sp.</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Υπερέκφραση (1.01 U/mg) ενεργής λακκάσης (32000 U/ml).	Li et al. (2007)
<i>LACD</i>	<i>Trametes sp 420</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Εκκρίθηκε ένζυμο ενεργότητας 8.3×10^4 U/l	Hong et al. (2007)
<i>Ery3</i>	<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Το ανασυνδυασμένο ένζυμο χαρακτηρίστηκε μερικώς.	Rodríguez et al. (2008)
<i>Pel3</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	139 mU/ml σε ακινητοποιημένα κύτταρα και 18°C.	Bleve et al. (2008)

1.9 Ο θερμόφιλος μύκητας *Myceliophthora thermophila*

Οι θερμόφιλοι μύκητες είναι ελκυστικοί για τη βιομηχανία και μπορούν να εξελιχθούν σε πλατφόρμες για την παραγωγή χρήσιμων χημικών ουσιών σε αυξημένες θερμοκρασίες. Ο μύκητας *Myceliophthora thermophila* ή αλλιώς *Sporotrichum thermophile* αναπτύσσεται βέλτιστα στο θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 45°C και 50°C. Η απομόνωση του *M. thermophila* είναι εύκολη από θερμαινόμενες φυτικές βιομάζες που βρίσκονται σε αποικοδόμηση, όπως φύλλα ή άχυρο. Οι καλλιέργειες μικρής ηλικίας έχουν λευκό χρώμα το οποίο αλλάζει σταδιακά σε καστανό γεγονός που οφείλεται στον σχηματισμό και τη γήρανση των σποριών.

Ο *Myceliophthora thermophila* επιδεικνύει εξαιρετική ικανότητα στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης. Η κυτταρινολυτική δραστηριότητα του *M. thermophila* έχει αποδειχθεί ότι είναι πολλές φορές υψηλότερη από τα πιο ενεργά ένζυμα μεσόφιλων μυκήτων. Άλλωστε είναι χαρακτηριστικό ότι ο ρυθμός ανάπτυξής του σε αδιάλυτη κυτταρίνη είναι σχεδόν ίδιος με το ρυθμό ανάπτυξης του σε γλυκόζη (Berka et al., 2011, Bhat και Maheshwari, 1987).

Πρόσφατα ολοκληρώθηκε η αποκωδικοποίηση γονιδιώματος του *Myceliophthora thermophila* (Berka et al., 2011). Η ανάλυση της αλληλουχίας αποκάλυψε ότι ο *M. thermophila* διαθέτει ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων που κωδικοποιούν λιγνινοκυτταρινολυτικά ένζυμα. Ο *M. thermophila* εκκρίνει ένα πολύπλοκο σύστημα υδρολασών για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης, καθώς και οξειδοαναγωγάσες που συνδέονται με την αποικοδόμηση της λιγνίνης. Σε μια πρόσφατη ανασκόπηση αναφέρθηκε η ύπαρξη 30 γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταρρινάσες που ταξινομούνται σε 10 οικογένειες γλυκοζυλ-υδρολασών (GH) καθώς και 66 γονίδια που κωδικοποιούν ημικυτταρινάσες που ταξινομούνται σε 10 οικογένειες GH και 9 οικογένειες υδατανθρακικών εστερασών (CE), σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZy (Carbohydrate-active enzymes database, <http://www.cazy.org/>). Τέλος, η ίδια ανασκόπηση αναφέρεται στην ύπαρξη 35 γονιδίων που κωδικοποιούν βοηθητικά ένζυμα, όπως αφυδρογονάσες της κελλοβιόζης (CDHs), μονοοξυγενάσες πολυσακχαρίτων (LPMOs) και λίγες πολυφαινολοξειδάσες. Μάλιστα, από το σύνολο των ενζύμων που αναφέρθηκαν σχεδόν το 76% των κυτταρινασών και ημικυτταρινασών και το 88% των βοηθητικών ενζύμων εκκρίνονται από τον μικροοργανισμό, ενώ μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό παραμένουν στο εσωτερικό του κυττάρου (Karnaoui, 2014). Τα ένζυμα αυτά μεμονωμένα ή συνεργιστικά μπορούν να συμμετέχουν στην ανάπτυξη προηγμένων τεχνολογιών τόσο στον τομέα των βιοκαυσίμων όσο και σε άλλες εφαρμογές βιομηχανικού ενδιαφέροντος. Γενικά, τα θερμόφιλα ένζυμα εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα και αυξημένη καταλυτική δράση σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Δεδομένου ότι οι υψηλές θερμοκρασίες βοηθούν τη διαλυτοποίηση ορισμένων συστατικών των λιγνοκυτταρινούχων πρώτων υλών και μειώνουν το ιξώδες του πολτών της βιομάζας, τα ένζυμα των θερμόφιλων μυκήτων είναι πολύ δραστικά στην αποικοδόμηση της βιομάζας.

Μόνο μία λακκάση έχει εκφραστεί από αυτό το θερμόφιλο μύκητα η οποία εκφράστηκε επιτυχημένα στον *Saccharomyces cerevisiae* και στον *Aspergillus oryzae*. Το αξιοσημείωτο λιγνινοκυτταρινολυτικό δυναμικό του *M. thermophila*, μαζί με την πρόσφατα δημοσιευμένη αλληλουχία του γονιδιώματος (Berka et al., 2011, Joint Genome Institute DOE, [36](http://genome.jgi-</p>
</div>
<div data-bbox=)

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

psf.org/), προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μελέτη αυτού του οργανισμού, με αποτέλεσμα την απομόνωση και το χαρακτηρισμό και άλλων οξειδοαναγωγικών ενζύμων του μύκητα όπως η υπεροξειδάση *MtPerII* (Zerva et al., 2015).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Υλικά

2.1.1 Μικροοργανισμοί

Για την ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ο μεθυλότροφος μονοκύτταρος ζυμομύκητας *Pichia pastoris* (Invitrogen), το στέλεχος X-33 (γονότυπος: φυσικός τύπος, φαινότυπος: Mut+). Η επιλογή του συγκεκριμένου φορέα οφείλεται στα ποικίλα πλεονεκτήματα που συγκεντρώνει και σχετίζονται με την ετερόλογη έκφραση. Αρχικά, η *Pichia pastoris* μπορεί να αναπτυχθεί σε μεθανόλη ως αποκλειστική ενεργειακή πηγή άνθρακα, η οποία παράλληλα λειτουργεί ως επαγωγέας του υποκινητή *AOX1* και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της έκφρασης της λακκάσης. Ακόμα, υπάρχει η δυνατότητα παραγωγής υψηλών κυτταρικών συγκεντρώσεων με αποτέλεσμα υψηλού επιπέδου έκφρασης πρωτεΐνης. Εκτός από την υψηλή παραγωγή, ο φορέας διευκολύνει την απομόνωση υψηλών συγκεντρώσεων της λακκάσης καθώς εκκρίνεται εξωκυτταρικά. Τέλος, ο *Pichia pastoris* χαρακτηρίζεται από ειδικά λειτουργικά πλεονεκτήματα των ανώτερων συστημάτων έκφρασης, όπως είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (αναδίπλωση και γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών).

2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια-Αναλώσιμα Υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και AppliChem (Γερμανία), και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SCHOTT AG (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.) και ROTH (Η.Π.Α.).

2.1.3 Υλικά-Στήλες Χρωματογραφίας

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες απομονώθηκαν με τη μέθοδο χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου, με χρήση στήλης κοβαλτίου Talon (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.).

2.1.4 Εμπορικά Ένζυμα

Τα εμπορικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν μια ανασυνδυασμένη ενδογλυκοζιδάση *EndoH* (500 U/μL) της εταιρείας BioLabs Inc. και η εμπορική λακκάση *Novozym 51003* της εταιρείας Novo Nordisk A/S.

2.1.5 Ρυθμιστικά Διαλύματα-Διαλύματα Ηλεκτροφορήσεων

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα με τη σύσταση που υποδεικνύουν οι Πίνακες.

Πίνακας 2.1.5.1. Σύσταση Ρυθμιστικών Διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα	pH	Συστατικά	Συγκέντρωση (M)
<i>PΔ υγρών καλλιιεργειών Pichia pastoris</i>	6	K ₂ HPO ₄	1
		KH ₂ PO ₄	1
<i>Talon</i>	8	Tris base	0,5
		NaCl	3
<i>Tris/HCl</i>	8	Tris base HCl(πυκνό)	0,2
<i>PΔ φωσφορικών</i>	2	Na ₂ HPO ₄	0,1
		H ₃ PO ₄	0,1
<i>PΔ κιτρικού-φωσφορικών</i>	3-5	Na ₂ HPO ₄	0,1
		Κιτρικό οξύ	0,1
<i>PΔ φωσφορικών</i>	6-7	Na ₂ HPO ₄	0,1
		NaH ₂ PO ₄	0,1
<i>Tris/ HCl</i>	8-9	Tris base HCl(πυκνό)	0,1
<i>Britton-Robinson</i>	3-9	H ₃ BO ₃	0,04
		H ₃ PO ₄	0,04
		CH ₃ COOH	0,04
		NaOH(0,2M)	

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 2.1.5.2. Σύσταση Διαλυμάτων Ηλεκτροφόρησης

<i>Διάλυμα</i>	<i>pH</i>	<i>Σύσταση</i>
<i>P-Δ Δείγματος SDS-PAGE (Sample buffer)</i>	6,8	3,55 mL 0,25M Tris-Base, 1,8 mL Γλυκερόλη 50% (v/v), 1,8 mL β-Μερκαπτοαιθανόλη, 0,71 g SDS, 2,85 mL μπλε της Βρωμοφαινόλης 0,1 % (w/v)
<i>P-Δ SDS-PAGE Ηλεκτροφόρησης (Running buffer)</i>	8,3	3,03 g/L Tris-base, 14,4 g/L γλυκίνη, 1 g/L SDS,
<i>P-Δ X5 Δείγματος native ηλεκτροφόρησης</i>		50% v/v γλυκερόλη, 0,1% v/v μπλε της Βρωμοφαινόλης
<i>Χρωματισμός Πηκτώματος SDS-PAGE</i>		0,4% (w/v) Coomassie G-250, 400 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 500 mL ddH ₂ O
<i>Αποχρωματισμός Πηκτώματος SDS-PAGE</i>		200 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 700 mL ddH ₂ O
<i>Χρωματισμός Πηκτώματος IEF-PAGE</i>		0,02% (w/v) χρωστική Phast Gel Blue R, 0,1% (w/v) CuSO ₄ , 300 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 600 mL ddH ₂ O
<i>Αποχρωματισμός Πηκτώματος IEF-PAGE</i>		300 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 600 mL ddH ₂ O

2.1.6 Θρεπτικά Μέσα Καλλιέργειας

Τα θρεπτικά μέσα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, παρασκευάστηκαν με απιονισμένο νερό και πριν τον εμβολιασμό τους αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 min υπό πίεση 0,1 MPa.

- Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού χρησιμοποιήθηκε 2 % άγαρ.
- Σε περίπτωση που το θρεπτικό μέσο περιείχε γλυκόζη, αποστειρωνόταν ξεχωριστά σε μορφή σκόνης και ακολουθούσε ανάμιξη υπό στείρες συνθήκες.
- Η αποστείρωση της βιοτίνης που χαρακτηρίζεται ως θερμοευαίσθητη πραγματοποιήθηκε με διήθηση σε φίλτρα σύριγγας πόρων διαμέτρου 0,2 μm. Ακολουθούσε προσθήκη της βιοτίνης στο θρεπτικό μέσο μετά από ψύξη του στους 50-60 °C.

Η σύσταση των θρεπτικών μέσων παρουσιάζεται συνοπτικά στον Πίνακα 2.1.6.

Πίνακας 2.1.6. Σύσταση θρεπτικών μέσων ανάπτυξης του μικροοργανισμού *P. pastoris*

Θρεπτικό Μέσο	Σύσταση
<i>YPD(S)</i>	2% w/v πεπτόνη, 2% w/v D-γλυκόζη, 1% w/v εκχύλισμα ζύμης
<i>BMGY</i>	2% w/v πεπτόνη, 1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,0, 2x10 ⁻⁵ % v/v βιοτίνη, 1,34% w/v YNB, 1% v/v γλυκερόλη
<i>BMMY</i>	2% w/v πεπτόνη, 1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,0, 2x10 ⁻⁵ % v/v βιοτίνη, 1,34% w/v YNB, 0,5% μεθανόλη

YNB: 3,4% w/v Yeast Nitrogen Base (χωρίς αμινοξέα και θειικό αμμώνιο), 10% w/v θειικό αμμώνιο

2.1.7 Συσκευές – Όργανα

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- pH-μετρο 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- Φωτόμετρο UV2000, Hitachi (Η.Π.Α.)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντροι J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), Sorval® RC28S, DuPont (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Συσκευή ξήρανσης υπό κενό
- Συσκευή λυοφιλίωσης CHRIST APLHA 1-4 (B. Braun Biotech International)
- Στήλη βαρύτητας (Biorad, Η.Π.Α.) με ρητίνη TalonR ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου (Clontech, Η.Π.Α.)
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης
- Ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) και Abs 120-4 (KERN & Sohn GmbH)
- Συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG Labtech)
- Αντλία Econo Gradient (Biorad, Η.Π.Α.).
- Κλασμάτοσυλλέκτης (Waters, Millipore, Η.Π.Α.).
- Micro FTIR Biorad Excalibur FTS 3000MX με οπτικό μικροσκόπιο Inspect IR Plus

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα μετασχηματισμένα κύτταρα

Η επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο στέλεχος X-33 της ζύμης *P. pastoris* γίνεται με την προσθήκη μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Η μεθανόλη ενεργοποιεί τον υποκινητή της *AOXI* που υπάρχει στο πλασμίδιο pPICZαA, το οποίο έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα της ζύμης. Επίσης, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, πράγμα που καθιστά τη συλλογή και απομόνωσή της εύκολη, καθώς η κλωνοποίηση του γονιδίου έχει πραγματοποιηθεί στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την αλληλουχία του πεπτιδίου έκκρισης α -factor του *Saccharomyces cerevisiae*, το οποίο ευθύνεται για την εξωκυττάρωση των παραγόμενων πρωτεϊνών.

2.2.1.1 Στερεές καλλιέργειες

Από κατάλληλο προκαταρκτικό έλεγχο που έχει προηγηθεί κατά το μετασχηματισμό των κυττάρων έχει επιλεγθεί το στέλεχος της ζύμης που υπερέχει των άλλων ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου και έχει αποθηκευτεί σε θερμοκρασία -80°C . Κατά τη στερεή καλλιέργεια, τρυβλία πληρώθηκαν με το θρεπτικό υπόστρωμα YPD αμέσως μετά την αποστείρωση του. Μετά τη στερεοποίηση του θρεπτικού μέσου εντός των τρυβλίων ακολούθησε εμβολιασμός με το μικροοργανισμό και επώαση στους 30°C για 24-48 h. Στη συνέχεια τα τρυβλία κλείστηκαν αεροστεγώς και φυλάχθηκαν στους 4°C .

2.2.1.2 Υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας

Αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων που αναπτύχθηκαν στο στερεό θρεπτικό μέσο (YPD), χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολισμό θρεπτικού μέσου BMGY όγκου 50 mL σε γυάλινες κωνικές φιάλες όγκου 250 mL. Οι φιάλες επώασθηκαν στους 30°C υπό ανάδευση 180 rpm για 24 h. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η συγκέντρωση κυττάρων στην προκαλλιέργεια και, αφού επιλέχθηκε κατάλληλος όγκος της (1,5-3 mL), φυγοκεντρήθηκε ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο BMGY που περιέχει γλυκερόλη και επαναδιαλύθηκε σε θρεπτικό μέσο BMMY όγκου 50 mL σε κωνικές φιάλες 250 mL, με στόχο η κυτταρική συγκέντρωση στις νέες καλλιέργειες να αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα με απορρόφηση $\text{OD}_{600\text{nm}}=1$. Στο θρεπτικό μέσο BMMY προστέθηκε θειικός χαλκός (CuSO_4) συγκέντρωσης 0.025 mM καθώς η πρωτεΐνη περιέχει ιόντα χαλκού στο ενεργό της κέντρο. Οι εμβολιασμένες και εμπλουτισμένες με χαλκό καλλιέργειες θρεπτικού μέσου BMMY επώαστηκαν σε θερμοκρασία 30°C υπό ανάδευση 180 rpm. Καθημερινά για την επαγωγή του γονιδίου και την ανάπτυξη του ζυμομύκητα προστίθεντο 250 μL μεθανόλης. Τέλος, επειδή η ανάπτυξη των κυττάρων του ζυμομύκητα *P. pastoris* απαιτεί καλό αερισμό, οι φιάλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεγάλης χωρητικότητας και χρησιμοποιήθηκαν πώματα από βαμβάκι.

2.2.1.3 Υγρές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας

Αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων που αναπτύχθηκαν στο στερεό θρεπτικό (YPD), χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολισμό θρεπτικού μέσου BMGY όγκου 50 mL σε γυάλινες κωνικές φιάλες όγκου 250 mL. Οι φιάλες επώαστηκαν στους 30°C υπό ανάδευση 180 rpm για 24 h. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η συγκέντρωση κυττάρων στην προκαλλιέργεια και, αφού επιλέχθηκε κατάλληλος όγκος της (18-25 mL), φυγοκεντρήθηκε ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο

BMGY που περιέχει γλυκερόλη και επαναδιαλύθηκε σε θρεπτικό μέσο BMMY όγκου 500 mL σε κωνικές φιάλες 2 L. Ο όγκος του εμβολίου κυττάρων από την προκαλλιέργεια επιλέχθηκε τέτοιος ώστε το εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο όγκου 500 mL να έχει απορρόφηση $OD_{600nm}=1$. Στο θρεπτικό μέσο BMMY προστέθηκε θειικός χαλκός ($CuSO_4$) συγκέντρωσης 0.025 mM καθώς η πρωτεΐνη περιέχει ιόντα χαλκού στο ενεργό της κέντρο. Οι εμβολιασμένες και εμπλουτισμένες με χαλκό καλλιέργειες θρεπτικού μέσου BMMY τοποθετήθηκαν προς επώαση σε θερμοκρασία 30°C υπό ανάδευση 180 rpm. Καθημερινά για την επαγωγή του γονιδίου και την ανάπτυξη του ζυμομύκητα προστίθεντο 2,5 mL μεθανόλης. Τέλος, επειδή η ανάπτυξη των κυττάρων του ζυμομύκητα *P. pastoris* απαιτεί καλό αερισμό, οι φιάλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεγάλης χωρητικότητας και χρησιμοποιήθηκαν πάματα από βαμβάκι.

2.2.2 Απομόνωση και καθαρισμός ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών

2.2.2.1 Παραλαβή του εξωκυτταρικού υγρού μίγματος καλλιέργειας (crude)

Μετά τη λήξη του χρόνου επώασης οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν για 10 min σε ταχύτητα 10000 rpm. Η πρωτεΐνη εκκρίνεται εξωκυτταρικά, επομένως απομονώνεται από το υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρωσης. Ωστόσο, το υπερκείμενο υγρό, εκτός της επιθυμητής πρωτεΐνης περιέχει επίσης και το σύνολο των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών του ζυμομύκητα. Προκειμένου να καθαριστεί η ετερόλογη πρωτεΐνη, το εξωκυτταρικό υγρό διηθήθηκε με χάρτινο ηθμό και ακολούθησαν δύο διαδοχικές διηθήσεις υπό κενό σε φίλτρο διαμέτρου 0,8 και 0,2μm. Στο σύνολο της διαδικασίας το υπερκείμενο υγρό διατηρήθηκε σε πάγο για την προστασία της πρωτεΐνης.

2.2.2.2 Συμπύκνωση και εξισορρόπηση του μίγματος με διάλυμα Talon

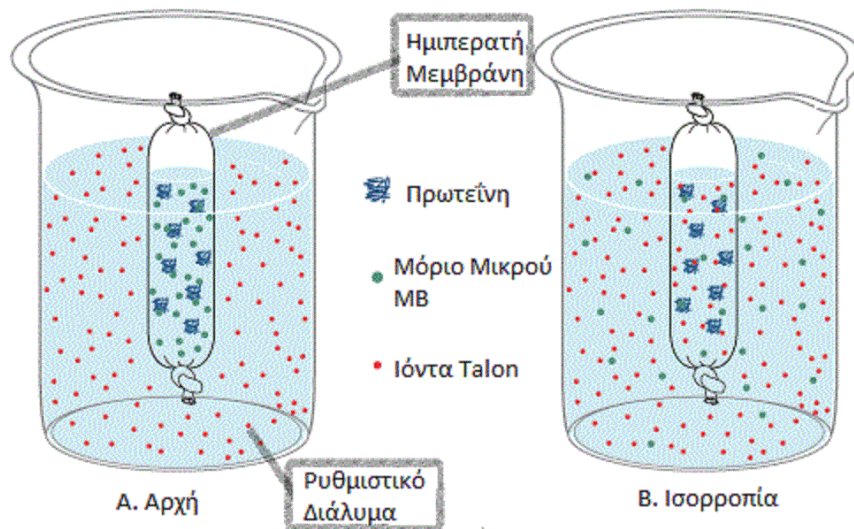
Μετά τη διήθηση του υγρού καλλιέργειας ακολούθησε συμπύκνωση αυτού σε συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (H.P.A.) η οποία επιτρέπει την διέλευση μακρομορίων μικρότερων από 10 kDa. Το αποτέλεσμα είναι μείωση του αρχικού όγκου υγρού σε περίπου 20 mL. Σε όλη τη διάρκεια της συμπύκνωσης, το διάλυμα φυλάσσεται σε πάγο για την προστασία της πρωτεΐνης.

Η εξισορρόπηση του διαλύματος έγινε με τη μέθοδο της διαπίδυσης. Η διαπίδυση είναι μέθοδος διαχωρισμού με μεμβράνες, που βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης και χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση διαλυμένων ουσιών μικρού μοριακού βάρους από ένα διάλυμα. Οι μεμβράνες διαπίδυσης διαχωρίζουν δύο διαλύματα που περιέχουν συστατικά υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους. Καθώς τα όρια μοριακής διαπερατότητας μιας μεμβράνης διαπίδυσης είναι πολύ μικρά, μόνο διαλυμένες ουσίες μικρού μοριακού βάρους μετακινούνται από περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης. Κατά την ισορροπία τα χημικά δυναμικά των διαχεόμενων ουσιών και στις δύο πλευρές της μεμβράνης είναι ίσα.

Πριν τη χρήση της, η μεμβράνη διαπίδυσης ενυδατώθηκε για 30 min σε απιονισμένο νερό θερμοκρασίας 100°C. Στη συνέχεια, το υγρό καλλιέργειας τοποθετήθηκε εντός της ενυδατωμένης ημιπερατής μεμβράνης κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Da, Sigma-Aldrich) και η μεμβράνη ασφαλίστηκε στα άκρα. Η ασφαλισμένη μεμβράνη βυθίστηκε

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

εντός δοχείου που περιείχε όγκο ρυθμιστικού διαλύματος τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερο από αυτόν του υγρού προς εξισορρόπηση (2-4 L). Η μεμβράνη παρέμεινε στο ρυθμιστικό διάλυμα για 24 h, όπου και θεωρείται ότι έχει επέλθει ισορροπία. Στο διάστημα των 24 h το σύστημα αποθηκεύθηκε υπό ήπια ανάδευση στους 4 °C, για την προστασία της πρωτεΐνης.



Εικόνα 2.2.2.2. Εξισορρόπηση με διαπίδυση

2.2.2.3 Καθαρισμός και παραλαβή πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου

Σε αλκαλικό περιβάλλον, τα πρωτεϊνικά μόρια που φέρουν στην αλληλουχία τους έξι συνεχόμενα αμινοξέα ιστιδίνης (6×His-tag), προσδένονται σε κατιόντα μετάλλου (Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}), λόγω της αρνητικής φόρτισης των αμινοξικών καταλοίπων. Στη παρούσα διπλωματική εργασία, η πρωτεΐνη απομονώθηκε με στήλη κοβαλτίου.

Όταν το εξισορροπημένο διάλυμα της πρωτεΐνης διέρχεται μέσω του στερεού στρώματος ρητίνης ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου, τα μόρια της πρωτεΐνης δεσμεύονται από τη ρητίνη, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες εκλύονται από τη στήλη αμέσως. Η αποδέσμευση της πρωτεΐνης από τη ρητίνη γίνεται με χρήση υδατικού διαλύματος ιμιδαζολίου. Το ιμιδαζόλιο του διαλύματος ανταγωνίζεται τα αμινοξέα ιστιδίνης ως προς τη συγγένεια με τη ρητίνη με αποτέλεσμα την αποδέσμευση της πρωτεΐνης. Ανάλογα με το πρωτεϊνικό φορτίο του διαλύματος και την ποσότητα της ρητίνης στη στήλη, ο καθαρισμός έγινε με χρήση στήλης βαρύτητας ή με χρήση αντλίας.

2.2.2.3.1 Καθαρισμός διαλύματος με χαμηλό πρωτεϊνικό φορτίο

Η στήλη βαρύτητας (Biorad, Η.Π.Α.) πληρώνεται με 3 mL ρητίνη ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου TalonR Metal Affinity Resin (Clontech, Η.Π.Α) η οποία διατηρείται σε υδατικό διάλυμα 20% v/v αιθανόλης στους 4°C.

Η διαδικασία καθαρισμού πραγματοποιείται στα παρακάτω στάδια:

- I.** Απομάκρυνση του διαλύματος αιθανόλης από τη στήλη
- II.** Έκπλυση της στήλης και της ρητίνης με 20 mL απιονισμένο H₂O
- III.** Εξισορρόπηση της ρητίνης με έκπλυση αυτής με συνολικά 60 mL ρυθμιστικού διαλύματος Talon (3 διαδοχικές εκπλύσεις με 20 mL ρυθμιστικό διάλυμα έκαστη)
- IV.** Φόρτωση εξισορροπημένου διαλύματος για δέσμευση της πρωτεΐνης από τα ιόντα κοβαλτίου
- V.** Έκπλυση της στήλης με 10 mL ρυθμιστικό διάλυμα Talon
- VI.** Έκπλυση της στήλης με 5 mL υδατικού διαλύματος ιμιδαζολίου 5 mM
- VII.** Έκπλυση της στήλης με 7 mL υδατικού διαλύματος ιμιδαζολίου 100 mM για αποδέσμευση της πρωτεΐνης
- VIII.** Έκπλυση της στήλης με 7 mL υδατικού διαλύματος ιμιδαζολίου 100 mM για αποδέσμευση της εναπομείνουσας πρωτεΐνης
- IX.** Έκπλυση της στήλης με 80 mL απιονισμένο H₂O για απομάκρυνση των αλάτων (4 διαδοχικές εκπλύσεις με 20 mL έκαστη)
- X.** Αποθήκευση της στήλης σε 4°C, ύστερα από προσθήκη περίπου 4 mL υδατικού διαλύματος 20% v/v αιθανόλης.

Τα διερχόμενα κλάσματα των σταδίων IV, V, VI, VII και VIII συλλέγονται σε ξεχωριστά σωληνάκια και αποθηκεύονται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας σε πάγο. Ακολουθεί μέτρηση της ενεργότητας κάθε κλάσματος, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.1, προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της απομονωμένης πρωτεΐνης.

2.2.2.3.2 Καθαρισμός διαλύματος με υψηλό πρωτεϊνικό φορτίο

Η ρύθμιση της ροής της κινητής φάσης της χρωματογραφίας έγινε με χρήση αντλίας Econo Gradient (Biorad, Η.Π.Α.). Για την ανίχνευση των εκλούμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε φωτόμετρο UV ακτινοβολίας (280 nm) ενώ η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με συλλέκτη κλασμάτων (Waters, Millipore, Η.Π.Α.).

Η διαδικασία καθαρισμού πραγματοποιείται στα παρακάτω στάδια:

- I. Εξισορρόπηση της μήτρας της στήλης:** Η στήλη βαρύτητας (Biorad, Η.Π.Α.) πληρώνεται με 15 mL ρητίνη ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου TalonR Metal Affinity Resin (Clontech, Η.Π.Α) και εξισορροπείται με 300 mL ρυθμιστικού διαλύματος Talon.
- II. Φόρτωση του δείγματος:** Το εξισορροπημένο διάλυμα που περιέχει την πρωτεΐνη (περίπου 20 ml) φορτώνεται στη στήλη με σταθερή ροή 2 mL/min και η πρωτεΐνη δεσμεύεται από τα ιόντα κοβαλτίου της στήλης.
- III. Έκπλυση της στήλης:** Η στήλη ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα Talon προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στην ρητίνη.
- IV. Έκλυση προσδεμένων πρωτεϊνών:** Τα πρωτεϊνικά μόρια ανταγωνίζεται το ιμιδαζόλιο το οποίο χρησιμοποιείται για την έκλυση της πρωτεΐνης από τη στήλη. Το άλας προστίθεται με σταθερή ροή 2 mL/min ενώ η συγκέντρωση του στην κινητή φάση αυξάνεται από 0 mM έως 100 mM σε διάρκεια 1 h. Έπειτα, συνεχίζει να προστίθεται ιμιδαζόλιο συγκέντρωσης 100 mM με σταθερή ροή 2 mL/min για 20 min.

Στο στάδιο της έκλυσης της πρωτεΐνης, η έξοδος της στήλης συνδέεται με τον συλλέκτη κλασμάτων. Τα κλάσματα φωτομετρούνται στα 280 nm μηδενίζοντας το φωτόμετρο με το ρυθμιστικό διάλυμα Talon και προσδιορίζονται αυτά που φέρουν την πρωτεΐνη.

- V. Έκπλυση και εξισορρόπηση της μήτρας της στήλης:** Τέλος η ρητίνη εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα Talon (300 mL), προκειμένου να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο και να επανέλθει στην αρχική της κατάσταση. Η αποθήκευση γίνεται εκ νέου σε διάλυμα 20% v/v αιθανόλης στους 4°C.

2.2.2.3 Εξισορρόπηση του διαλύματος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH=8 0,2M

Το διάλυμα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης εξισορροπήθηκε πριν τη χρήση του σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH=8 0,2 M με τη μέθοδο της διαπίδυσης όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.2 Το εξισορροπημένο πρωτεϊνικό διάλυμα αποθηκεύθηκε σε θερμοκρασία 4°C.

2.2.3 Βελτιστοποίηση παραγωγής πρωτεϊνών από τα μετασχηματισμένα κύτταρα

Για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής των πρωτεϊνικών μορίων από την *P. pastoris* εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών παραμέτρων στην έκφραση της ετερόλογης πρωτεΐνης. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία και ανάδευση 180 rpm, σε θρεπτικό μέσο BMMY όγκου 50 mL σε γυάλινες κωνικές φιάλες όγκου 250 mL κλεισμένες με πώματα από βαμβάκι.

2.2.3.1 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης μεθανόλης κατά την παραγωγή των πρωτεϊνών

Για την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης μεθανόλης πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια μικρής κλίμακας όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.1.2. Όλες οι συνθήκες παρέμειναν σταθερές εκτός από τη συγκέντρωση της μεθανόλης. Σε όλες τις φιάλες είχε προστεθεί συγκέντρωση χαλκού 0,8 mM. Μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις μεθανόλης (0,5%-1,0%-1,5% v/v). Για κάθε συγκέντρωση προετοιμάστηκαν δύο φιάλες των 250 mL ώστε να ελέγχεται και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Οι φιάλες επώασθηκαν στους 30 °C για 9 ημέρες και καθημερινά προστίθεντο κατάλληλος όγκος μεθανόλης σε κάθε φιάλη.

2.2.3.2 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης χαλκού κατά την παραγωγή των πρωτεϊνών

Για τη εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης χαλκού πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε δύο εύρη συγκέντρωσης χαλκού όπως περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.2.1.2. Όλες οι συνθήκες παρέμειναν σταθερές εκτός από τη συγκέντρωση του χαλκού. Όλες οι φιάλες τροφοδοτούνταν καθημερινά με τη βέλτιστη συγκέντρωση μεθανόλης όπως προσδιορίστηκε στο προηγούμενο πείραμα. Κατά την πρώτη καλλιέργεια μελετήθηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού (0, 0,1, 0,2, 0,5, 0,8 mM). Για κάθε συγκέντρωση χαλκού προετοιμάστηκαν δύο φιάλες των 250 mL ώστε να ελέγχεται και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Οι φιάλες επώασθηκαν στους 30 °C για 11 ημέρες.

Με βάση τα αποτελέσματα της πρώτης καλλιέργειας επαναλήφθηκε το πείραμα για έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού (0, 0,025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 mM), όπου ξανά για κάθε μια προετοιμάστηκαν δυο φιάλες των 250 mL. Οι φιάλες επώασθηκαν στους 30°C για 9 ημέρες.

2.2.3.3 Βελτιστοποίηση συνθηκών θερμοκρασίας κατά την παραγωγή των πρωτεϊνών

Για τη διερεύνηση βέλτιστης θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια μικρής κλίμακας όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.1.2 στους 23°C και στους 30°C. Όλες οι υπόλοιπες συνθήκες παρέμειναν σταθερές. Όλες οι φιάλες τροφοδοτούνταν καθημερινά με τη βέλτιστη συγκέντρωση

μεθανόλης ενώ ταυτόχρονα περιείχαν τη βέλτιστη συγκέντρωση χαλκού, όπως είχαν προκύψει από τα προηγούμενα πειράματα. Για κάθε θερμοκρασία προετοιμάστηκαν δύο φιάλες των 250 mL ώστε να ελέγχεται και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Ο χρόνος επώασης ήταν 10 ημέρες.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η βέλτιστη συνθήκη, καθημερινά λαμβανόταν δείγμα καλλιέργειας και προσδιοριζόταν η κυτταρική συγκέντρωση (OD_{600nm}). Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε και από το υπερκείμενο υγρό προσδιορίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου.

2.2.4 Μέτρηση συγκέντρωσης κυττάρων με θολοσιμετρία

Η κυτταρική συγκέντρωση προσδιορίζεται σε ημερήσια βάση, προκειμένου να παρακολουθείται η ανάπτυξη του ζυμομύκητα. Το δείγμα καλλιέργειας αραιώνεται με απιονισμένο νερό 20, 50 ή 100 φορές (ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης) σε τελικό όγκο 1 mL. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας $O.D_{600nm}$ πραγματοποιήθηκε με φωτόμετρο UV2000, Hitachi ενώ ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση του απιονισμένου νερού.

Η τιμή της κυτταρικής συγκέντρωσης προκύπτει ως γινόμενο της απορρόφησης του αραιωμένου δείγματος επί την εκάστοτε αραιώση.

2.2.5 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών

2.2.5.1 Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford (Bradford, 1976) βασίζεται στην παρατήρηση ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 465 nm όταν είναι μόνη της στο διάλυμα και η απορρόφηση αυτή μετατοπίζεται στα 595 nm όταν είναι προσδεσμένη σε πρωτεΐνη. Οι ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της χρωστικής με την πρωτεΐνη δημιουργούν μια σταθερή ιονική μορφή της χρωστικής που απορροφά στα 595 nm.

Η μέθοδος Bradford μπορεί να περιγραφεί με τα παρακάτω βήματα:

- **Παρασκευή διαλύματος χρωστικής Bradford:** Σε 50 ml 95% αιθανόλης διαλύονται 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250. Έπειτα προστίθενται 100 ml 85% (w/v) H_3PO_4 και το διάλυμα αραιώνεται σε τελικό όγκο 1L με απιονισμένο νερό.
- **Μέθοδος:** Σε 1,25 mL του διαλύματος χρωστικής Bradford προστίθενται 25 μ L δείγματος. Ακολουθεί ανάμιξη και το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Μέτρηση:** Προσδιορίζεται η απορρόφηση του δείγματος στα 595 nm με φωτόμετρο UV2000, Hitachi. Ως μηδενική απορρόφηση λαμβάνεται η απορρόφηση διαλύματος που στη θέση του δείγματος έχει προστεθεί απιονισμένο νερό. Το πρωτεϊνικό φορτίο προσδιορίζεται μέσα από κατάλληλη καμπύλη αναφοράς.

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς Bradford: Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με εμπορική λευκωματίνη του βόειου ορού (BSA, Bovine Serum Albumin). Η πρωτεΐνη διαλύεται σε απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση 1 mg/mL και έπειτα από κατάλληλες αραιώσεις ετοιμάζονται διαλύματα συγκέντρωσης πρωτεΐνης 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 και 1,0 mg/mL. Πραγματοποιείται η μέθοδος όπως περιγράφεται παραπάνω και για τις γνωστές τιμές συγκέντρωσης πρωτεΐνης λαμβάνονται τιμές απορρόφησης. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων.

2.2.5.2 Μέθοδος Lowry

Η μέθοδος Lowry είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη ποσοτική μέθοδος για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα (Lowry et al., 1951). Βασίζεται στον σχηματισμό σε αλκοολικό περιβάλλον, ενός συμπλόκου που έχει σκούρο μπλε χρώμα, μεταξύ του χαλκού και δομών που διαθέτουν περισσότερους από δυο πεπτιδικούς δεσμούς. Στη χρώση συμμετέχει και το βολφράμιο και ο μόλυβδος, που μέσω της αντίδρασης της φαινόλης, αντιδρούν με την τυροσίνη και την τρυπτοφάνη.

Η μέθοδος Lowry μπορεί να αναλυθεί στα παρακάτω βήματα:

- **Παρασκευή φρέσκου διαλύματος Ε:** Η σύσταση του διαλύματος Ε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

<i>Συστατικό</i>	<i>Προστιθέμενος όγκος(mL)</i>
<i>Υδατικό διάλυμα NaOH 0,2M</i>	4,9
<i>Υδατικό διάλυμα 2% w/v Na₂CO₃</i>	4,9
<i>Υδατικό διάλυμα 1% (w/v) CuSO₄·5H₂O</i>	0,1
<i>Υδατικό διάλυμα 2% Na₃C₆H₅O₇·2H₂O</i>	0,1

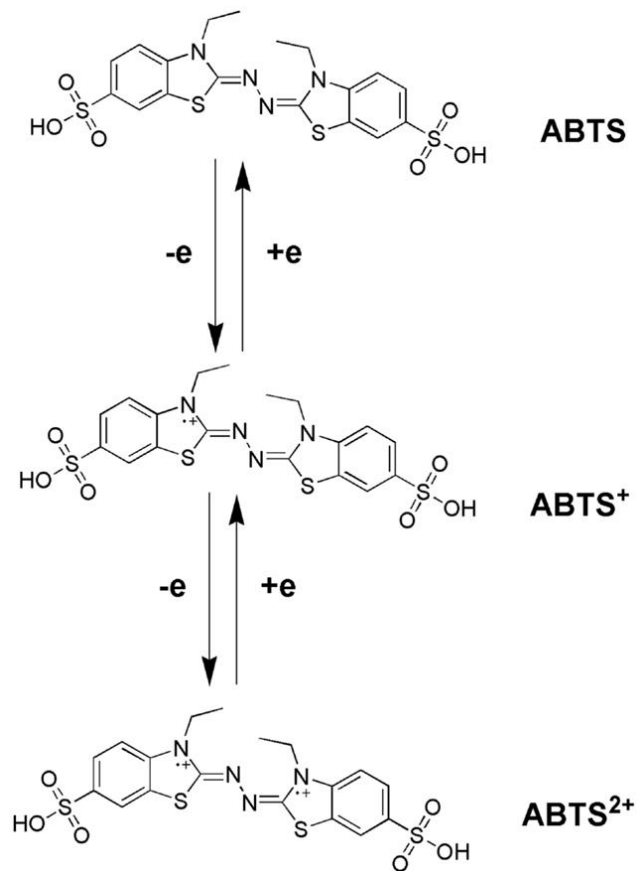
- **Μέθοδος:** Σε 2,5 mL φρέσκου διαλύματος Ε προσθέτουμε 0,5 mL δείγματος. Ακολουθεί ανάδευση και έπειτα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Μετά το πέρας των 10 min προσθέτουμε 0,25 mL υδατικού διαλύματος 50% αντιδραστηρίου φαινόλης Folin-Ciocalteu. Ακολουθεί ανάδευση και έπειτα το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
- **Μέτρηση:** Προσδιορίζεται η απορρόφηση του δείγματος στα 750 nm με φωτόμετρο UV2000, Hitachi. Ως μηδενική απορρόφηση λαμβάνεται η απορρόφηση διαλύματος που στη θέση του δείγματος έχει προστεθεί απιονισμένο νερό. Το πρωτεϊνικό φορτίο προσδιορίζεται μέσα από κατάλληλη καμπύλη αναφοράς.

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς Lowry: Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με εμπορική λευκωματίνη του βόειου ορού (BSA, Bovine Serum Albumin). Η πρωτεΐνη διαλύεται σε απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση 1 mg/mL και έπειτα από κατάλληλες αραιώσεις ετοιμάζονται διαλύματα συγκέντρωσης πρωτεΐνης 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 και 1,0 mg/mL. Πραγματοποιείται η μέθοδος όπως περιγράφεται παραπάνω και για τις γνωστές τιμές συγκέντρωσης πρωτεΐνης λαμβάνονται τιμές απορρόφησης. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων.

2.2.6 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας και εξέταση ενζυμικής δράσης της *MtLac2*

2.2.6.1 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας

Για τη μέτρηση της ενεργότητας της *MtLac2* χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό υπόστρωμα ABTS(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) το οποίο οξειδώνεται από της λακκάσες και αποκτά πράσινο χρώμα δίνοντας μέγιστο απορρόφησης στα 420 nm. Το συνθετικό υπόστρωμα ABTS θεωρείται χαρακτηριστικό υπόστρωμα των λακκασών καθώς προσομοιάζει τη δομή της λιγνίνης η οποία δεν είναι πλήρως προσδιορισμένη. Το υψηλό δυναμικό αναγωγής του συνθετικού υποστρώματος ABTS το καθιστά δότη ηλεκτρονίων για την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου.



Εικόνα 2.2.6.1. Οξείδωση του ABTS παρουσία λακκάσης

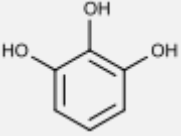
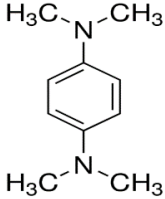
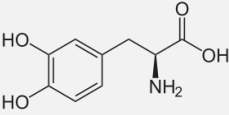
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με βάση τη δοκιμή ενεργότητας που πραγματοποιήθηκε, ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που προκαλεί μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μήκους κύματος 420 nm κατά μία μονάδα σε υπόστρωμα ABTS τελικής συγκέντρωσης 3 mM και pH=4 ανά 1 min αντίδρασης οξείδωσης σε σταθερή θερμοκρασία T=40°C. Ο προσδιορισμός της μεταβολής της απορρόφησης ανά 1 min έγινε με φωτομέτρηση δείγματος 225 μ L υποστρώματος και 25 μ L ενζυμικού διαλύματος με τη συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Η συνολική διάρκεια της αντίδρασης κυμαίνεται από 10-20 min ανάλογα με τη συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 λεπτών πριν προστεθεί στην αντίδραση.

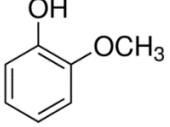
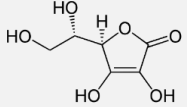
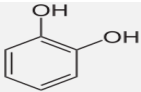
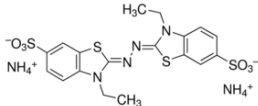
2.2.6.2 Μελέτη της εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα της *MtLac2*

Όπως έχει αναφερθεί και στο θεωρητικό μέρος οι λακκάσες είναι ένζυμα με μικρή εκλεκτικότητα με αποτέλεσμα να μπορούν να δράσουν σε διαφορετικά υποστρώματα. Για την εξέταση της εξειδικευμένης δράσης της *MtLac2* πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σε ένα εύρος υποστρωμάτων και προσδιορίστηκε η ενεργότητα της λακκάσης όταν δρα σε κάθε διαφορετικό υπόστρωμα. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2.6.2.

Πίνακας 2.2.6.2. Μελέτη Εξειδίκευσης ενζύμου

<i>Υπόστρωμα</i>	<i>Συντελεστής Μοριακής Απορροφητικότητας ($M^{-1} cm^{-1}$)</i>	<i>Μήκος Κύματος (nm)</i>	<i>Χημικός Τύπος</i>
<i>Πυρογαλλόλη Pyrogallol</i>	3724	420	
<i>NNNN-τετραμεθυλ- φαινυλοδιαμίνη NNNN-tetramethyl-p-phenylene diamine</i>	43160	515	
<i>L DOPA</i>	3700	475	
<i>Γουαϊακόλη Guaiacol</i>	12100	456	

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

<i>Ασκορβικό οξύ</i> <i>Asc. Acid</i>		245	
<i>2,6Διμέθοξυφαινόλη</i> <i>2,6DMP</i>	27500	469	
<i>Κατεχόλη</i> <i>Catechol</i>	928	450	
<i>ABTS</i>	36000	420	

- Όλα τα υποστρώματα εκτός από το ασκορβικό οξύ, παρασκευάστηκαν ύστερα από διάλυση της αντίστοιχης ουσίας σε απιονισμένο νερό με αρχική συγκέντρωση 20 mM. Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία T=50°C, υπό ανάδευση (900 rpm), για κατάλληλο χρονικό διάστημα και συγκεκριμένη συγκέντρωση ενζύμου. Η συγκέντρωση του ενζύμου που προστίθεται είχε προσδιοριστεί μέσω της μεθόδου Lowry. Τα αρχικά διαλύματα υποστρωμάτων αραιώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικού pH=4. Ο συνολικός όγκος αντίδρασης ήταν 1 mL και τελική συγκέντρωση υποστρώματος 2 mM.

Μετά το πέρας της κάθε αντίδρασης φωτομετρήθηκε το προϊόν σε εκείνο το μήκος κύματος που παρουσιάζει μέγιστο, θεωρώντας ως μηδενική απορρόφηση την απορρόφηση του εκάστοτε τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 λεπτών πριν προστεθεί στην αντίδραση.

- Για την περίπτωση του ασκορβικού οξέος χρησιμοποιήθηκε άλλη μέθοδος καθώς κατά την οξειδωσή του δεν παρουσιάζει μεταβολή στο ορατό φάσμα. Το ασκορβικό οξύ διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικού έτσι ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 0,5 mM. Σε σωληνάκια τύπου Eppendorf προστέθηκε 1 mL διαλύματος ασκορβικού οξέος και 100 μL ενζύμου. Η αντίδραση επώαστηκε σε σταθερή θερμοκρασία T=50°C, υπό ανάδευση(900 rpm), για δέκα λεπτά και συγκεκριμένη συγκέντρωση ενζύμου, η οποία είχε προσδιοριστεί μέσω της μεθόδου Lowry. Μετά το πέρας των 10 λεπτών οι αντιδράσεις

μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες και τους προστέθηκαν 3 mL πυκνού HCL προκειμένου να τερματιστεί η αντίδραση.

Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρήθηκε στα 245 nm, θεωρώντας ως μηδενική απορρόφηση την απορρόφηση του εκάστοτε τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 λεπτών πριν προστεθεί στην αντίδραση.

2.2.7 Ηλεκτροφορητικές Τεχνικές

Το μοριακό βάρος και το ισοηλεκτρικό σημείο του ενζύμου προσδιορίστηκαν πειραματικά με τη βοήθεια ηλεκτροφορητικών τεχνικών. Ακολουθεί περιγραφή των μεθόδων ηλεκτροφόρησης και των προτύπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2.7.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες χρησιμοποιείται ως μέθοδος για το διαχωρισμό πρωτεϊνικών μορίων.

Η πηκτή προκύπτει από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου σε μακριές αλυσίδες αλλά και σε εγκάρσιες διακλαδώσεις, ο οποίος πραγματοποιείται με την προσθήκη καταλύτη (υπερθειικό αμμώνιο-APS) και ενεργοποιητή (*N,N,N,N'*-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη-TEMED).

Οι αποδιατακτικές συνθήκες εξασφαλίζονται με χρήση διαλύματος δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού, και β-μερκαπτοαιθανόλης η οποία ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό αρνητικό φορτίο. Σαν αποτέλεσμα, το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται αμελητέο και τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση από την κάθοδο προς την άνοδο. Κατά αυτόν τον τρόπο η απόσταση που διανύει η πρωτεΐνη εντός της πηκτής εξαρτάται αποκλειστικά από τη μάζα της.

Η ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου με SDS επιτελείται σε ένα πολύ-ρυθμιστικό σύστημα (Multi Buffer System, MBS) διαμέσου δύο πηκτωμάτων (επιστοιβάσεως και διαχωρισμού), με το ένα να επιστοιβάζεται του άλλου. Η πηκτή επιστοιβάσεως επιτρέπει τη δημιουργία μεγάλων πόρων, με αποτέλεσμα τα πολυπεπίδια μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους να μετατοπίζονται με τη ίδια κινητικότητα και να παρατάσσονται στη γραμμή διαχωρισμού των δυο πηκτωμάτων. Στη συνέχεια, οι μικρότεροι πόροι του πηκτώματος διαχωρισμού επιβάλλουν διαφορετική κινητικότητα στα πολυπεπίδια ανάλογα με τη μάζα τους.

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Mini-Protean 3 (Biorad, Η.Π.Α.) και η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω.

2.2.7.1.1 Παρασκευή Πηκτής

Για τη σταθεροποίηση των δύο πηκτωμάτων χρησιμοποιείται ζεύγος γυάλινων πλακών (10,1 cm × 7,3 cm και 10,1 cm × 8,3 cm) που ενώνονται με τη βοήθεια μεταλλικών σφικτήρων και σταθεροποιούνται σε κάθετη θέση με τη βοήθεια κατάλληλης βάσης. Το μίγμα κάθε πηκτής παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στον πίνακα 2.2.7.1.1. Αρχικά, ο χώρος ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες πληρώνεται κατά 70% με το μίγμα της πηκτής διαχωρισμού και αφήνεται περίπου 20 min για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός και να σταθεροποιηθεί. Συνεχίζοντας, ο κενός χώρος πάνω από την πηκτή διαχωρισμού πληρώνεται με την πηκτή επιστοίβασης, στην οποία τοποθετείται και ειδικό χτενάκι για το σχηματισμό θηκών φόρτωσης δειγμάτων και αφήνεται επίσης να πολυμεριστεί.

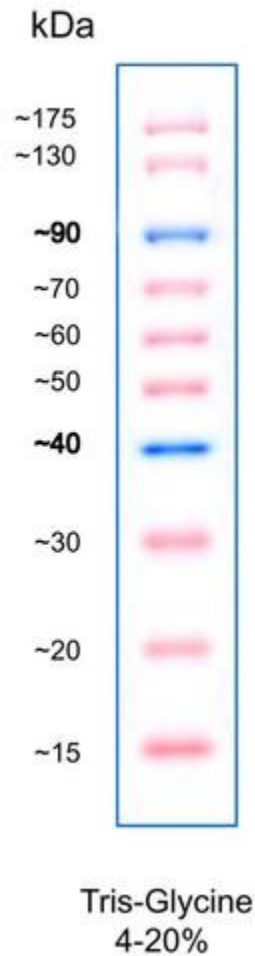
Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού και της πηκτής επιστοίβασης, το σύστημα των γυάλινων πλακών τοποθετείται στη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, στην οποία προστίθενται περίπου 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος (P-Δ SDS-PAGE Ηλεκτροφόρησης (Running buffer) παράγραφος 2.1.5) και αφαιρούνται τα χτενάκια.

Πίνακας 2.2.7.1.1. Σύσταση συστήματος πηκτών ακρυλαμιδίου ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE

Πηκτή διαχωρισμού (Resolving Gel) 12,5%		Πηκτή επιστοίβασης (Stacking Gel) 4%	
ddH₂O	3,5 mL	ddH ₂ O	3 mL
0,75 M Tris, 0.2% w/v SDS, pH 8,8	9,4 mL	0,25 M Tris, 0.2% w/v SDS, pH 6,8	3,75 mL
40% bis-acrylamide	5,8 mL	40% bis-acrylamide	0,75 mL
TEMED	30 μL	TEMED	20 μL
10% w/v APS	90 μL	10% w/v APS	60 μL

2.2.7.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων – Ηλεκτροφόρηση

Τα προς ανάλυση δείγματα όγκου 15 μL (1-5 μg πρωτεΐνης) αναμειγνύονται με 7 μL διαλύματος φόρτωσης (P-Δ Δείγματος SDS-PAGE (Sample buffer Παράγραφος 2.1.5) και ακολουθεί βρασμός για 5-7 min. Εκτός από τα δείγματα, στο πήκτωμα τοποθετούνται και 7 μL πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Pink Prestained Protein Marker Nippon Genetics Europe)-Εικόνα 2.2.7.1.2), για τον προσδιορισμό του βάρους των πρωτεϊνών των δειγμάτων. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό 35 mA/πήκτωμα για περίπου 90 min.



Εικόνα 2.2.7.1.2. Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών Pink Prestained Protein Marker Nippon Genetics Europe.

2.2.7.1.3 Εμφάνιση πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή απομακρύνεται από τις γυάλινες πλάκες και εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης (staining solution-παράγραφος 2.1.5) για 20 min υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αποχρωματισμός της πηκτής με εμβάπτιση σε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution παράγραφος 2.1.5) και διαδοχικές πλύσεις με αυτό μέχρι τον αποχρωματισμό της πηκτής και την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών.

2.2.7.2 Ζυμογράφημα- Προσδιορισμός ενεργότητας των πρωτεϊνικών ζωνών

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί πως η χρωματισμένη ζώνη που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες είναι η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, η πρωτεΐνη ηλεκτροφορήθηκε εξ αρχής σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η παρασκευή του συστήματος πηκτωμάτων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.7.1.1.

2.2.7.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα πρωτεΐνης όγκου 20μL που παρασκευάστηκαν με διαφορετικό τρόπο. Για το πρώτο δείγμα ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.7.1.2. Αντίθετα, στο δεύτερο δείγμα όγκου προστέθηκε όγκος 5 μL από το ρυθμιστικό διάλυμα X5 native (παράγραφος 2.1.5) και έπειτα φορτώθηκε στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Στο πήκτωμα φορτώθηκε επίσης πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνικών, μορίων γνωστού μοριακού βάρους όγκου 7 μL (Pink Prestained Protein Marker Nippon Genetics Europe GmbH).

Τα δύο δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν παράλληλα και μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης είχαν διανύσει ίσες αποστάσεις μέσα στην πηκτή διαχωρισμού.

2.2.7.2.2 Εμφάνιση πρωτεϊνικών ζωνών

Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή χωρίστηκε στη μέση και το τμήμα που περιείχε το βρασμένο δείγμα χρωματίστηκε σύμφωνα με τη διαδικασία της παραγράφου 2.2.7.1.3, ενώ η άλλη εμβαπτίστηκε σε διάλυμα ABTS συγκέντρωσης 2 mM και αφέθηκε σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας περίπου 30 min παρατηρήθηκε μεταβολή του χρώματος που οφείλεται στην οξείδωση του ABTS από το ένζυμο και οι ενεργές ζώνες απέκτησαν έντονο πράσινο χρώμα.

2.2.7.3 Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου ((IEF-PAGE, Isoelectric Focusing-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης είναι μια τεχνική που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Η ισοροπία μεταξύ αρνητικών και θετικών φορτίων σε ένα πρωτεϊνικό μόριο εξαρτάται από το pH του περιβάλλοντος. Έτσι, σε ένα δεδομένο pH, το μόριο κάθε πρωτεΐνης εμφανίζει ηλεκτρικό φορτίο. Η τιμή pH όπου το ηλεκτρικό φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της πρωτεΐνης. Κατά την ισοηλεκτρική εστίαση, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με τη μετακίνηση των πρωτεϊνών, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, σε πηκτή με διαβαθμιζόμενη τιμή pH (πηκτή βαθμίδωσης pH). Η βαθμίδωση του pH στην πηκτή επιτυγχάνεται με την προσθήκη μίγματος ηλεκτρολυτών (αμφολύτες) στο διάλυμα πολυμερισμού του πήγματος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η πρωτεΐνη μετακινείται μέχρι να φτάσει σε μια θέση στην πηκτή, όπου η τιμή pH, γίνεται ίση με το σημείο pI της πρωτεΐνης. Εκεί το μόριο λόγω μηδενικού φορτίου παύει να κινείται επί του ηλεκτρικού πεδίου.

2.2.7.3.1 Η μέθοδος

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε συσκευή ηλεκτροφόρησης Phastsystem της εταιρίας Pharmacia (Σουηδία). Τα πηκτώματα ακρυλαμιδίου ήταν προπαρασκευασμένα και εφοδιασμένα με αμφολύτες που κάλυπταν εύρος τιμών pH από 3,0 έως 9,0. Η μέθοδος διαχωρισμού πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο της εταιρείας. Τα δείγματα πρωτεΐνης φορτώνονται στο πήκτωμα χωρίς προεπεξεργασία με τη βοήθεια ειδικού εξαρτήματος που επιτρέπει τη φόρτωση μέσω τριχοειδών αλληλεπιδράσεων.

Το πρότυπο διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών γνωστών ισοηλεκτρικών σημείων για το εύρος pH 3,5-9,3 ήταν της εταιρίας 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).

2.2.7.3.2 Εμφάνιση πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτή ηλεκτροφόρησης

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτή, χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή μεταφέρεται προσεκτικά σε διάλυμα χρώσης (Staining Solution) Coomassie Brilliant Blue G-250 και αφήνεται υπό ήπια ανάδευση για 20min. Στη συνέχεια, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα αποχρωματισμού με το οποίο γίνονται διαδοχικές πλύσεις μέχρι να αποχρωματιστεί πλήρως και να γίνουν ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες. Η σύσταση διαλυμάτων χρώσης και αποχρωματισμού αναφέρεται στη παράγραφο 2.1.5.

2.2.8 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης της *MtLac2*

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με το συνθετικό υπόστρωμα ABTS τελικής συγκέντρωσης 2 mM.

2.2.8.1 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της *MtLac2*

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της *MtLac2* διερευνήθηκε υπολογίζοντας την ενεργότητά της για θερμοκρασιακές τιμές 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C. Το υπόστρωμα και το ένζυμο αραιώθηκαν με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού φωσφορικών pH=4 σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL. Οι αντιδράσεις επωάστηκαν υπό ανάδευση(900 rpm) εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στις μελετώμενες θερμοκρασίες ταυτόχρονα για 10 λεπτά.

Μετά το πέρας της αντίδρασης ο προσδιορισμός του έγχρωμου προϊόντος πραγματοποιήθηκε σε φωτόμετρο UV2000, Hitachi στα 420 nm. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 λεπτών πριν προστεθεί στην αντίδραση.

2.2.8.2 Εύρεση βέλτιστης τιμής pH δράσης της *MtLac2*

Η τιμή pH στην οποία το ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη δράση μελετήθηκε για δύο διαφορετικά ρυθμιστικά συστήματα. Το εύρος τιμών pH που διερευνήθηκε και για τα δύο συστήματα ήταν μεταξύ των τιμών 3-9. Το πρώτο ρυθμιστικό σύστημα, που αποτελείτο από τα ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικού φωσφορικών, φωσφορικών, TrisHCl(0,1M), και το δεύτερο ρυθμιστικό σύστημα (Britton-Robinson) περιγράφονται στην παράγραφο 2.1.5.

Το υπόστρωμα και το ένζυμο αραιώθηκαν με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος σε τελικό όγκο αντίδρασης 250μL. Ο προσδιορισμός της μεταβολής της απορρόφησης έγινε με το πολυφωτόμετρο microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) στα 420 nm. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν εντός του φωτόμετρου στους 38°C και ήταν δεκάλεπτης διάρκειας. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 λεπτών πριν προστεθεί στην αντίδραση.

Μετά την πρώτη σειρά πειραμάτων ακολούθησε ακόμη μια δοκιμή βέλτιστου pH-όπως περιγράφεται παραπάνω- μόνο για το πρώτο ρυθμιστικό σύστημα και για τις ακόλουθες τιμές pH: 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0.

2.2.9 Μελέτη σταθερότητας της *MtLac2*

2.2.9.1 Προσδιορισμός της θερμοσταθερότητας της *MtLac2*

Για τη μελέτη θερμοσταθερότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε επώαση του ενζύμου στις παρακάτω θερμοκρασίες: 30, 40, 50, 60, 70 και 80°C. Η επώαση πραγματοποιήθηκε εντός θερμαινόμενων επωαστήρων και υδατόλουτρων. Για κάθε θερμοκρασία προετοιμάστηκε ένα σωληνάκι τύπου Eppendorf με το ένζυμο, αραιωμένο με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού φωσφορικών pH=4 σε τελικό όγκο 1 mL.

Πριν την επώαση πραγματοποιήθηκε για κάθε δείγμα δοκιμή ενεργότητας, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.1 με τη συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) στα 420 nm και η τιμή ενεργότητας ορίστηκε ως τιμή για το χρόνο μηδέν. Κατά τους χρόνους επώασης: 1, 2, 4, 8, 24 h απομονώθηκε δείγμα από την κάθε θερμοκρασία και τοποθετήθηκε σε πάγο για άμεση ψύξη. Στη συνέχεια, η ενεργότητα του ενζύμου για κάθε χρονική διάρκεια επώασης προσδιορίζονταν με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.1.

2.2.9.2 Προσδιορισμός της σταθερότητας της *MtLac2* σε τιμές pH

Για τη μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH πραγματοποιήθηκε επώαση του ενζύμου σε τιμές pH 3,4,5,6,7,8,9 χρησιμοποιώντας το 1^ο ρυθμιστικό σύστημα έτσι όπως περιγράφεται στις παραγράφους 2.2.8.2 και 2.1.5.

Για κάθε τιμή pH το ένζυμο αραιώθηκε με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος σε τελικό όγκο 1 mL. Ακόμη κάθε δείγμα περιείχε 0,1 mg εμπορική αλβουμίνη του βόειου ορού (BSA, Bovine Serum Albumin), η οποία είναι αδρανής και χρησιμοποιείται για να ενισχύσει τη σταθερότητα του ενζύμου όταν αυτό βρίσκεται σε μεγάλες αραιώσεις.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πριν την επώαση πραγματοποιήθηκε για κάθε δείγμα δοκιμή ενεργότητας όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.1 με τη συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) στα 420 nm και η τιμή ενεργότητας ορίστηκε ως τιμή για το χρόνο μηδέν. Κατά τους χρόνους επώασης: 1, 2, 4, 8, 24 h απομονώθηκε δείγμα από κάθε τιμή pH και μετρήθηκε άμεσα η ενεργότητα του ενζύμου για κάθε χρονική διάρκεια επώασης με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.1

2.2.10 Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis- Menten της *MtLac2*

Θεωρείται πως στην αντίδραση ισχύει η υπόθεση γρήγορης ισορροπίας και επομένως το ένζυμο ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten, η οποία περιγράφεται από τη σχέση:

$$v = \frac{Vmax \cdot [S]}{Km + [S]} \quad (1)$$

Όπου:

v : η ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο

$[S]$: η συγκέντρωση υποστρώματος

Km : η σταθερά Michaelis-Menten η οποία αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του υποστρώματος που δίνει το μισό της μέγιστης ταχύτητας της αντίδρασης

$Vmax = kcat \cdot Eo$ (2): μέγιστος ρυθμός που μπορεί να επιτευχθεί στο συγκεκριμένο σύστημα αντίδρασης, οποίος είναι ανεξάρτητος της συγκέντρωσης του υποστρώματος

Όπου:

- $kcat$: αριθμός μετατροπής ή ανακυκλίσεως (turnover number) του ενζύμου, δηλαδή η σταθερά που εκφράζει τον αριθμό των μορίων υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ποσότητα ενζύμου που αντιστοιχεί σε ένα ενεργό κέντρο.
- Eo : Η αρχική συγκέντρωση ενζύμου

Από τις σχέσεις (1) και (2) παίρνουμε την παραλλαγμένη διατύπωση της Michaelis-Menten:

$$\frac{v}{Eo} = \frac{kcat \cdot [S]}{Km + [S]} \quad (3)$$

Από τον ορισμό της κινητικής σταθεράς Km , όπως διατυπώθηκε παραπάνω, προκύπτει ότι η σταθερά αυτή αποτελεί δείκτη για τη συγγένεια που παρουσιάζεται μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος: μικρή τιμή της σταθεράς Km σημαίνει ότι για μικρότερη τιμή υποστρώματος η

ταχύτητα της αντίδρασης έχει φτάσει το μισό της μέγιστης, πράγμα που υποδεικνύει μεγάλη συγγένεια μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος. Όπως αναφέρεται παραπάνω, η σταθερά μετατροπής k_{cat} εκφράζει τον αριθμό των μορίων υποστρώματος που καταλύονται ανά μονάδα χρόνου, από εκείνη την ποσότητα του ενζύμου που αντιστοιχεί σε μία ενεργό περιοχή αυτού. Ο λόγος των δύο σταθερών k_{cat}/K_m ονομάζεται σταθερά ειδικεύσεως του ενζύμου και είναι ενδεικτικός για την καταλυτική αποδοτικότητα του ενζύμου.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές για δυο διαφορετικά υποστρώματα: το συνθετικό υπόστρωμα ABTS και την 2,6 DMP. Και για τα δύο υποστρώματα παρασκευάστηκε ένα εύρος διαφορετικών συγκεντρώσεων. Τα υποστρώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων καθώς και το ένζυμο αραιώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού φωσφορικού pH=4. Οι τελικές συγκεντρώσεις και για τα δύο υποστρώματα ήταν 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 4,0, 5,0, 8,0, 10,0 mM. Η μέτρηση των έγχρωμων προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) στα 420 nm για το ABTS και στα 469 nm για το 2,6 DMP όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.1.

Μετά από επεξεργασία των τιμών απορρόφησης ανά λεπτό που λαμβάνονται από το όργανο προκύπτουν οι τιμές ενεργότητας οι οποίες προσαρμόζονται στο μοντέλο Michaelis-Menten (σχέσεις 1 και 3) με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων και σε περιβάλλον GraphPad Prism 5. Από την προσαρμογή στο πρόγραμμα προσδιορίζονται οι τιμές των K_m και V_{max} .

2.2.11 Μελέτη δράσης της *MiLac2* παρουσία παρεμποδιστικών παραγόντων

Οι οργανικοί διαλύτες σε ανάμειξη με υδατικό διάλυμα ελαττώνουν την διαλυτότητα της πρωτεΐνης καθώς δεσμεύονται σε πολικές ομάδες της επιφάνειας της πρωτεΐνης, έτσι ώστε να φαίνεται λιγότερο πολική, ή ελαττώνουν τον αποτελεσματικό αριθμό πολικών ομάδων του διαλύτη. Σαν αποτέλεσμα η δράση των ενζύμων παρεμποδίζεται παρουσία οργανικών διαλυτών. Ωστόσο, τα ένζυμα αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις παρουσία οργανικών διαλυτών επομένως είναι ιδιαίτερα χρήσιμη μια μελέτη του βαθμού της παρεμπόδισης των οργανικών διαλυτών στο ένζυμο. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της μεθανόλης, της αιθανόλης, της ακετόνης και του DMSO στην ενεργότητα της λακκάσης.

Επιπλέον μελετήθηκε και η επίδραση των παρακάτω παρεμποδιστών: EDTA, NaN_3 , SDS, και το άλας NaCl. Ο κάθε ένας από αυτούς έχει διαφορετική παρεμποδιστική δράση. Το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, ή αλλιώς EDTA έχει την ιδιότητα να σχηματίζει σταθερά μεταλλικά σύμπλοκα με το σύνολο των μεταλλικών κατιόντων. Η σταθερότητα αυτών των συμπλόκων οφείλεται στις πολλές θέσεις σύνδεσης του μορίου του EDTA το οποίο αποτελεί ένα τυπικό πολυσχιδή υποκαταστάτη (multidentate ligand). Με αυτό τον τρόπο το EDTA δεσμεύει τα ιόντα χαλκού που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και το καθιστά μη λειτουργικό. Το αζίδιο δεσμεύεται από τους χαλκούς τύπου II και τύπου III, με αποτέλεσμα τη διακοπή της

εσωτερικής μεταφοράς ηλεκτρονίων και επομένως την αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου. Το δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS) είναι μια επιφανειοδραστική ουσία που όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 2.2.7.1 αποδιατάσσει της πρωτεϊνικές αλυσίδες και καταστρέφει την τριτοταγή δομή του ενζύμου άρα και τη λειτουργικότητα του. Τέλος, χλωριούχο νάτριο σε μεγάλες συγκεντρώσεις αποσταθεροποιεί τους ιοντικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα να αποσταθεροποιείται η διαμόρφωση του ενζύμου στο χώρο.

2.2.11.1 Επίδραση οργανικών διαλυτών στη δράση της *MtLac2*

Για τη μελέτη της παρεμποδιστικής δράσης που έχουν οι οργανικοί διαλύτες στην ενεργότητα της *MtLac2* πραγματοποιήθηκε δοκιμή ενεργότητας του ενζύμου παρουσία τεσσάρων οργανικών διαλυτών. Οι διαλύτες και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.2.11.1:

Πίνακας 2.2.11.1: Συγκέντρωση οργανικών διαλυτών

Διαλύτης	Συγκέντρωση στην αντίδραση % v/v
<i>Μεθανόλη</i>	10 και 50
<i>Αιθανόλη</i>	10 και 50
<i>DMSO</i>	10
<i>Ακετόνη</i>	10

Η μέτρηση της ενεργότητας παρουσία του οργανικού διαλύτη πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις όπως περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.6.1 με τη συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) στα 420 nm. Το υπόστρωμα ABTS, το ένζυμο και ο οργανικός διαλύτης αραιώθηκαν με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού φωσφορικών pH=4 σε τελικό όγκο αντίδρασης 250 μ L. Η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος στην αντίδραση ήταν 3 mM. Για κάθε διαφορετικό διαλύτη υπήρχε και το αντίστοιχο τυφλό διάλυμα, του οποίου η απορρόφηση λαμβάνεται ως μηδενική, και παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.1.

Τέλος, σε κάθε σει αντιδράσεων εκτός από τις αντιδράσεις στις οποίες έχει προστεθεί διαλύτης υπάρχει και μια αντίδραση η οποία δεν περιέχει καθόλου διαλύτη και θεωρείται ως «αντίδραση ελέγχου», δηλαδή η αντίδραση στην οποία το ένζυμο δρα χωρίς να δέχεται παρεμπόδιση.

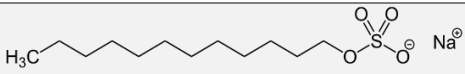
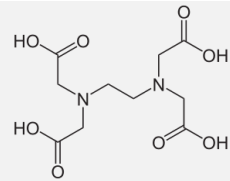
2.2.11.2 Προσδιορισμός δράσης της *MtLac2* παρουσία παρεμποδιστών

Για τη μελέτη της παρεμποδιστικής δράσης που έχουν συγκεκριμένοι παρεμποδιστές στην ενεργότητα της λακκάσης πραγματοποιήθηκε δοκιμή ενεργότητας του ενζύμου παρουσία των εν λόγω παρεμποδιστών. Για κάθε παρεμποδιστή παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα τα οποία

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

αραιώθηκαν κατάλληλα στην αντίδραση. Οι παρεμποδιστές και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.2.11.2:

Πίνακας 2.2.11.2: Συγκέντρωση παρεμποδιστών

Παρεμποδιστής	Συγκέντρωση στην αντίδραση mM	Χημικός τύπος
<i>SDS</i>	0,1 και 1	
<i>Αζίδιο</i>	0,01 και 0,1	$\text{N}^+ \equiv \text{N}^-$
<i>EDTA</i>	1	
<i>NaCl</i>	10 και 100	

Η μέτρηση της ενεργότητας παρουσία των παραπάνω παρεμποδιστών πραγματοποιήθηκε ακριβώς όπως περιγράφεται η μέτρηση ενεργότητας οργανικών διαλυτών στην παράγραφο 2.2.11.1. Τέλος, και σε αυτή την περίπτωση σε κάθε σετ αντιδράσεων εκτός από τις αντιδράσεις που περιείχαν παρεμποδιστή παρασκευάζεται και «αντίδραση ελέγχου», δηλαδή η αντίδραση στην οποία το ένζυμο δρα χωρίς να δέχεται παρεμπόδιση.

2.2.12 Χρήση *MtLac2* σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές

Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος της εργασίας, οι λακκάσες λόγω της μικρής εκλεκτικότητας σε υπόστρωμα που τις χαρακτηρίζει μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ποικίλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας διερευνήθηκε η χρήση της *MtLac2* για την αποτοξικοποίηση επεξεργασμένου υγρού απόβλητου ελαιοτριβείου, την ενζυμική τροποποίηση εμπορικής γλυκάνης με σκοπό την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής της ικανότητας και τη βιοσύνθεση της σουλφουρετίνης από βουτεΐνη.

2.2.12.1 Δοκιμή αποτοξικοποίησης του επεξεργασμένου υγρού απόβλητου ελαιοτριβείου ΥΑΕ με χρήση της *MtLac2*

Για την αποτοξικοποίηση του ΥΑΕ παρασκευάστηκαν δύο ίδιες αντιδράσεις στις οποίες 4 ml επεξεργασμένου ΥΑΕ και το ένζυμο αραιώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού φωσφορικών pH=4 σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 mL. Προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση της αντίδρασης, το σύνολο των συστατικών της αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 min υπό πίεση 0,1 MPa, εκτός από το ένζυμο που αποστειρώθηκε με διήθηση σε φίλτρα σύριγγας πόρων διαμέτρου 0,2 μm. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 40°C σε γυάλινες κωνικές φιάλες των 100 ml προκειμένου να υπάρχει περίσσεια οξυγόνου το οποίο αποτελεί συν-υπόστρωμα του ενζύμου. Εκτός από τις αντιδράσεις που περιείχαν ένζυμο, παρασκευάστηκε και μια «τυφλή» αντίδραση ακριβώς με τον ίδιο τρόπο με τις άλλες δύο με τη διαφορά ότι το ένζυμο πριν προστεθεί στην αντίδραση, είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό. Η διάρκεια επώασης των αντιδράσεων ήταν 7 ημέρες.

Καθημερινά, υπό στείρες συνθήκες απομονωνόταν δείγμα 1,2 mL από τις τρεις κωνικές φιάλες το οποίο φυγοκεντρήθηκε και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό φορτίο και η αντιοξειδωτική ικανότητα (αντιδραστήριο DPPH) όπως αυτές περιγράφονται παρακάτω.

Το υγρό απόβλητο ελαιουργείου (ΥΑΕ) προμηθεύτηκε από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Πριν τη χρήση, το pH ρυθμίστηκε στο 6 με χρήση 3 N NaOH και το απόβλητο φυγοκεντρήθηκε στις 8000 rpm, στους 4 °C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια το απόβλητο διηθήθηκε με χαρτί χρωματογραφίας Whatman no.1, για την αφαίρεση τυχόν αιωρούμενων στερεών, και διατηρήθηκε στους -20 °C μέχρι τη χρήση.

2.2.12.1.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολών κατά Folin - Ciocalteu (A. Waterhouse)

Η μέθοδος Folin - Ciocalteu χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ($H_3PMo_{12}O_{40}$) και φωσφο-βολφραμικά ($H_3PW_{12}O_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξείδωση των φαινολών, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του

βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα Na_2CO_3 . Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τον δείκτη Folin-Ciocalteu εκφράζονται συνήθως σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

- **Μέθοδος** Για τη μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου δείγματος, σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 100 μ L δείγμα μαζί με 7,9 ml απιονισμένο νερό και 500 μ l αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu και ακολουθεί ανάδευση σε vortex. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία 30 s - 8 min και εν συνεχεία προστίθενται 1500 μ L από κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 . Ακολουθεί εκ νέου ανάδευση σε vortex. Το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 30 min σε υδατόλουτρο στους 40°C.
- **Παρασκευή διαλύματος Na_2CO_3 :** Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 200 g άνυδρου Na_2CO_3 σε 800 ml απιονισμένο νερό. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού υπό ανάδευση και εν συνεχεία αφήνεται να ψυχθεί. Προστίθενται μερικοί κρύσταλλοι ένυδρου Na_2CO_3 και το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 24 h. Ακολουθεί διήθηση με ταυτόχρονη μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη 1 L η οποία συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

Μέτρηση: Μετά το πέρας των 30 min προσδιορίζεται η απορρόφηση του δείγματος στα 765 nm με φωτόμετρο UV2000, Hitachi Η τιμή της απορρόφησης δεν πρέπει να ξεπερνά το 1. Ως μηδενική απορρόφηση λαμβάνεται η απορρόφηση διαλύματος που έχει περάσει όλη την πειραματική διαδικασία αλλά στη θέση του δείγματος έχει προστεθεί απιονισμένο νερό. Το πρωτεϊνικό φορτίο προσδιορίζεται μέσα από την καμπύλη αναφοράς.

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς Folin - Ciocalteu: Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με χρήση γαλλικού οξέος. Το γαλλικό οξύ διαλύεται σε υδατικό διάλυμα αιθανόλης 10% v/v σε συγκέντρωση 500 mg/L και έπειτα από κατάλληλες αραιώσεις ετοιμάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 0, 50, 100, 150, 250, 500 mg/L. Πραγματοποιείται η μέθοδος όπως περιγράφεται παραπάνω και για τις γνωστές τιμές συγκέντρωσης γαλλικού οξέος λαμβάνονται τιμές απορρόφησης. Κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων.

2.2.12.1.2 Δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας με το αντιδραστήριο DPPH

Το αντιδραστήριο DPPH (2,2-δι(4-tert-οκτυλφαινυλο)-πυκρλιδραζίλιο) αποτελεί μια από τις λίγες διαθέσιμες εμπορικά σταθερές ρίζες του αζώτου. Όταν βρεθεί το αντιδραστήριο σε περιβάλλον με άλλες ελεύθερες ρίζες αντιδρά με αυτές και εξουδετερώνεται. Λόγω της ισχυρής ζώνης απορρόφησης που εμφανίζει περίπου στα 520 nm, η ρίζα DPPH έχει ένα βαθύ βιολετί χρώμα το οποίο γίνεται άχρωμο ή υποκίτρινο όταν εξουδετερωθεί. Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει τη φωτομετρική παρακολούθηση της αντίδρασης, και ο αριθμός των αρχικών ριζών μπορεί να μετρηθεί από την αλλαγή της οπτικής απορρόφησης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- **Μέθοδος:** Για τη μέτρηση του % ποσοστού αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυγοκεντρημένων δειγμάτων σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 0,5 mL δείγμα μαζί με 0,5 mL DPPH 0,1 mM διαλυμένο σε 95% αιθανόλη. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Εκτός από τα δείγματα παρασκευάζεται τυφλό διάλυμα το οποίο στη θέση του δείγματος περιέχει απιονισμένο νερό και δείγμα ελέγχου, το οποίο στη θέση του δείγματος περιέχει διάλυμα ασκορβικού οξέος συγκέντρωσης 1 mg/mL.

Όταν τα δείγματα βρέθηκαν σε περιβάλλον 50% αιθανόλης εμφάνισαν θολερότητα, η οποία πιθανώς οφείλεται σε ίζημα που καταβυθίστηκε παρουσία του οργανικού διαλύτη. Για αυτό το λόγο μετά το πέρας των 30 λεπτών και πριν την φωτομέτρηση ακολούθησε φυγοκέντρηση διάρκειας 2 λεπτών, προκειμένου το προς φωτομέτρηση δείγμα να είναι διαυγές.

- **Μέτρηση:** Μετά το πέρας των 30 min προσδιορίζεται η απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm με φωτόμετρο UV2000, Hitachi. Η τιμή της απορρόφησης δεν πρέπει να ξεπερνά το 1.

Ο υπολογισμός του ποσοστού (%) αντιοξειδωτικής ικανότητας προκύπτει ως εξής:

$$P(\%) = \frac{1 - Abs(\text{δείγματος}) - Abs(\text{control})}{Abs(\text{τυφλού})} \cdot 100$$

Όπου:

P(%): Το επί τοις εκατό ποσοστό αντιοξειδωτικής ικανότητας

Abs(δείγματος): Η απορρόφηση της αντίδρασης του DPPH με το δείγμα στα 517 nm

Abs(control): Η απορρόφηση της αντίδρασης του DPPH με το ασκορβικό οξύ στα 517 nm

Abs(τυφλού): Η απορρόφηση της αντίδρασης του DPPH με το απιονισμένο νερό στα 517 nm

2.2.12.2 Δοκιμή ενζυμικής τροποποίησης (grafting) εμπορικής γλυκάνης με χρήση της εμπορικής λακκάσης Novozym 51003 και της *MtLac2*

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις για δύο διαφορετικά εμπορικά παρασκευάσματα γλυκανών με την *MtLac2* και με τη Novozym 51003.

- **Εμπορική γλυκάνη καθαρότητας 50%:** Για την περίπτωση της εμπορικής και της ετερόλογης λακκάσης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα (κιτρικού φωσφορικών pH=4 για την *MtLac2* και φωσφορικών pH=6 για τη *Novozym 51003*) αντιδράσεις τελικού όγκου 25 mL που περιείχαν καφεϊκό οξύ συγκέντρωσης 4 mM, το ένζυμο και 50 mg γλυκάνης αδιάλυτης. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν υπό ανάδευση(180 rpm) στους 40 °C για 24 h. Μετά το πέρας της επώασης παραλήφθηκε το ίζημα με φυγοκέντρηση και μετά από τρεις διαδοχικές πλύσεις με απιονισμένο νερό απομονώθηκε και οδηγήθηκε για ξήρανση υπό ψύξη. Τα ξηραμένα ιζήματα χρησιμοποιήθηκαν για να παρασκευαστούν παστίλιες και ακολούθησε ανάλυση φάσματος FTIR.

- **Εμπορική γλυκάνη καθαρότητας 99%:** Για την περίπτωση της εμπορικής και της ετερόλογης λακκάσης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα (κιτρικού φωσφορικών pH=4 για την *MtLac2* και φωσφορικών pH=6 για την εμπορική *Novozym 51003*) αντιδράσεις τελικού όγκου 5 mL που περιέχουν καφεϊκό οξύ συγκέντρωσης 4 mM, το ένζυμο και 1 mL διαλύματος γλυκάνης 10 mg/mL που έχει παρασκευασθεί σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν υπό ανάδευση(180 rpm) στους 40 °C για 24 h. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και απομονώθηκε το ίζημα και το υπερκείμενο υγρό. Στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό καταψύχθηκε για 24 h. Μετά την κατάψυξη το υπερκείμενο υγρό φυγοκεντρήθηκε εκ νέου και απομονώθηκε το ίζημα. Τέλος, στο υπερκείμενο υγρό καταβυθίστηκε η γλυκάνη με προσθήκη 15 mL αιθανόλης και έντονη ανάδευση. Το ίζημα φυγοκεντρήθηκε και μετά από τρεις διαδοχικές πλύσεις με αιθανόλη απομονώθηκε. Τα ιζήματα που απομονώθηκαν και από τις τρεις φυγοκεντρήσεις οδηγήθηκαν για ξήρανση υπό κενό. Τα ξηραμένα ιζήματα χρησιμοποιήθηκαν για να παρασκευαστούν παστίλιες και ακολούθησε ανάλυση φάσματος FTIR.

Πρωτόκολλο διάλυσης εμπορικής γλυκάνης 99%: Για τη διάλυση 1 g γλυκάνης σε απιονισμένου νερού προτίθενται 5 mL αιθανόλης και η γλυκάνη. Το μίγμα μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως το οποίο καλύπτεται με μεμβράνη και βράζει υπό ήπια ανάδευση. Όταν το μίγμα γίνεται διαυγές, αποσύρεται από τη θερμαινόμενη πλάκα, μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 100 mL και προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

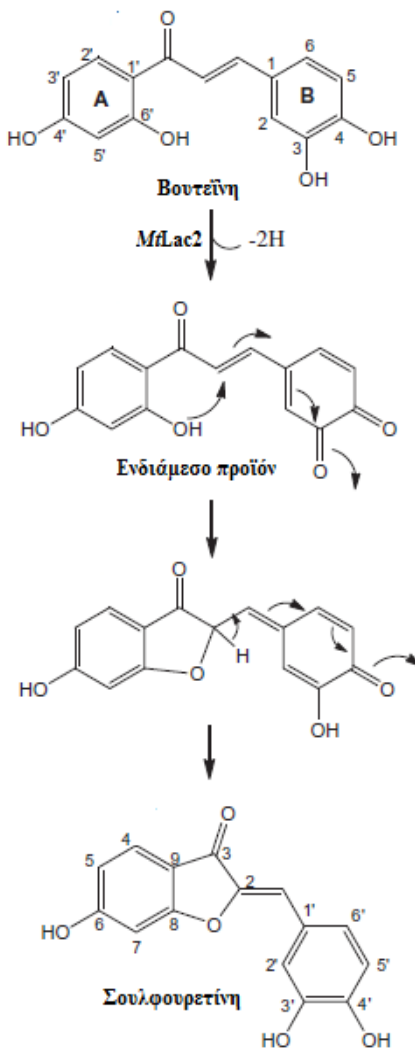
Παρασκευή παστίλιας για φασματοσκοπία FTIR: Τα ξηρά δείγματα κονιορτοποιήθηκαν πλήρως, και 10 mg περίπου αυτών αναμίχθηκαν με περίπου 100 mg βρωμιούχο κάλιο. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπιέστηκε σε παστίλιες, με τη βοήθεια μηχανικής πρέσας. Η παστίλια, τοποθετήθηκε στο δειγματοφορέα στερεών δειγμάτων του οργάνου, Micro FTIR Biorad Excalibur FTS 3000MX με οπτικό μικροσκόπιο Inspect IR Plus, το οποίο, πριν την ανάλυση, μηδενίστηκε

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

με παστίλια 100 mg καθαρού βρωμιούχου καλίου. Τα φάσματα λήφθηκαν για την περιοχή 4000 – 400 cm^{-1} .

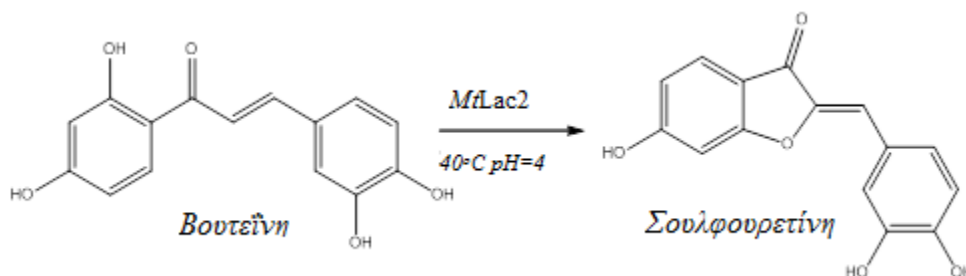
2.2.12.3 Δοκιμή βιοσύνθεσης σουλφουρετίνης από βουτεΐνη με τη χρήση της *MtLac2*

Η βιοσύνθεση της ωρόνης σουλφουρετίνης από την αντίστοιχη χαλκόνη βουτεΐνη καταλυόμενη από πολυφαινολοξειδάση έχει προταθεί ότι περιλαμβάνει τρία στάδια, από τα οποία το ένζυμο δρα μόνο κατά το πρώτο (Εικόνα 2.2.12.3.1). Σε αυτό το στάδιο, η ενζυμική αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των δύο υδροξυλίων του αρωματικού δακτυλίου (B) της βουτεΐνης σε ορθοκινόνη (ενδιάμεσο προϊόν). Η κυκλοποίηση ολοκληρώνεται μέσω του σχηματισμού ενός δακτυλίου βενζοφουρανόνης στο ενδιάμεσο προϊόν και η σουλφουρετίνη σχηματίζεται ως το θερμοδυναμικά σταθερότερο Z-γεωμετρικό ισομερές (Moussouni et al 2010).



Εικόνα 2.2.12.3.1. Αντίδραση βιοσύνθεσης σουλφουρετίνης με χρήση της *MtLac2*

Για τη δοκιμή ενζυμικής σύνθεσης της σουλφουρετίνης παρασκευάστηκαν αντιδράσεις τελικού όγκου 1,5 mL στις οποίες 0,4 mL ενζύμου συγκέντρωσης 0,47 g/mL αραιώθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού φωσφορικού pH=4 και προστέθηκαν 1,6 mg βουτεΐνης. Οι αντιδράσεις επωάστηκαν υπό ανάδευση (900 rpm) στους 40 °C για 24 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα φυγοκεντρήθηκαν και διαχωρίστηκε το στερεό προϊόν από το υπερκείμενο υγρό.



Εικόνα 2.2.12.3.2. Συνθήκες αντίδρασης της βιοσύνθεσης σουλφουρετίνης με χρήση της MfLac2

Σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis προσδιορίστηκε το φάσμα του υπερκείμενου υγρού. Στη συνέχεια με προσθήκη περίσσειας όγκου οξικού αιθυλεστέρα στο υπερκείμενο υγρό εκχυλίστηκε η οργανική φάση, απομονώθηκε και προσδιορίστηκε το φάσμα της σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis.

Το στερεό προϊόν της αντίδρασης, αφού απομονώθηκε, διαλύθηκε σε μεθανόλη. Η ταυτοποίηση δομής του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματομετρία μάζας (LC-MS).

Για τη λήψη των φασμάτων μάζας χρησιμοποιήθηκε το όργανο HPLC-LCQ Fleet/Thermo Scientific του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

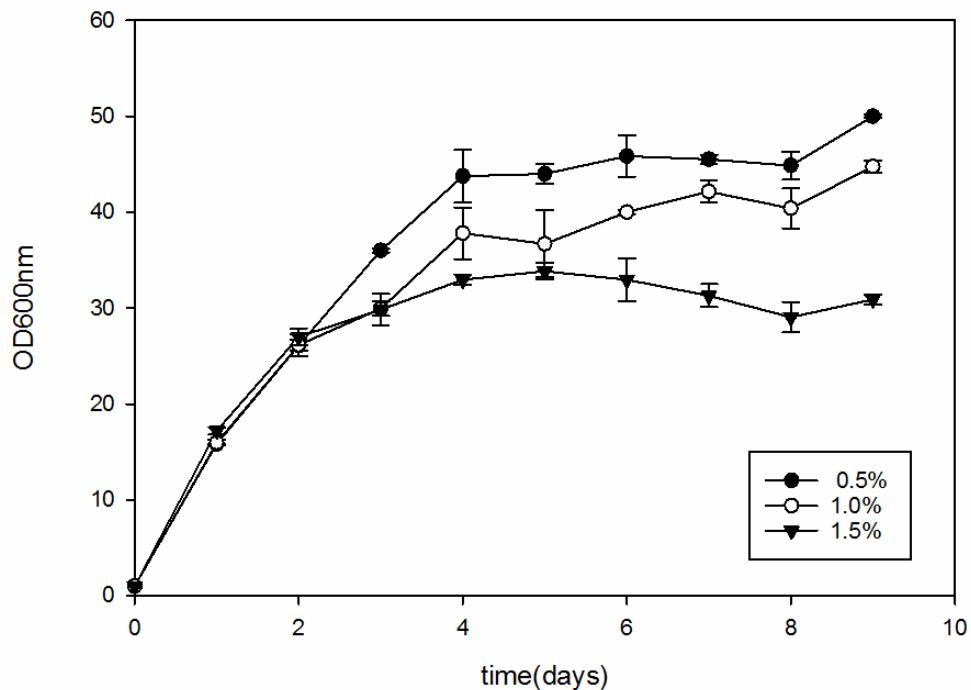
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βελτιστοποίηση της παραγωγής της λακκάσης από το ζυμομύκητα *P.pastoris*

Η ενίσχυση της παραγωγής της *MtLac2* από τη ζύμη *P. pastoris* πραγματοποιήθηκε με τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία και ανάδευση 180rpm, σε θρεπτικό μέσο BMMY. Ο χρόνος επώασης ήταν 9-11 ημέρες ενώ σε κάθε περίπτωση καθημερινά προστίθετο μεθανόλη. Οι παράμετροι ως προς τους οποίους έγινε η βελτιστοποίηση ήταν η συγκέντρωση μεθανόλης, η συγκέντρωση χαλκού και η θερμοκρασία επώασης της καλλιέργειας.

3.1.1 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο

Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο. Το θρεπτικό μέσο είχε συγκέντρωση χαλκού 0,8 mM και η θερμοκρασία επώασης ήταν 30°C. Μελετήθηκε η παραγωγή ενζύμου για συγκέντρωση μεθανόλης 0,5%, 1,0% και 1,5% (v/v). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στις εικόνες 3.1.1.1 και 3.1.1.2.

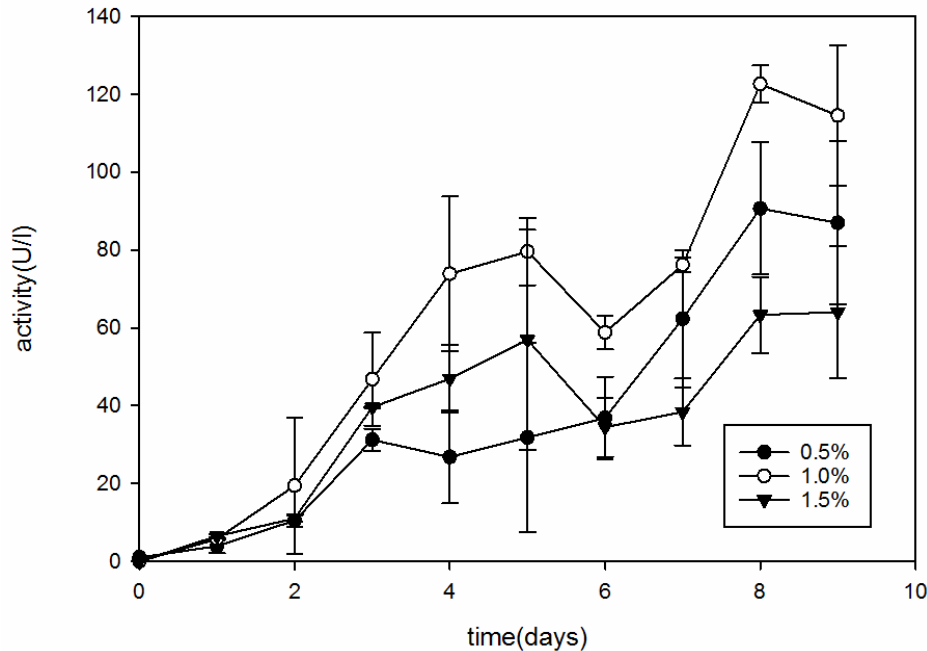


Εικόνα 3.1.1.1. Μεταβολή της οπτικής πυκνότητας κυττάρων (OD_{600nm}) για κάθε συγκέντρωση μεθανόλης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Από την εικόνα 3.1.1.1 φαίνεται η μεταβολή στην οπτική πυκνότητα των κυττάρων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας για κάθε συγκέντρωση μεθανόλης. Η βέλτιστη συγκέντρωση μεθανόλης για την ανάπτυξη του ζυμομύκητα είναι η χαμηλότερη που μελετήθηκε, δηλαδή η χρήση μεθανόλης 0,5% (v/v). Αυτό το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο καθώς η μεθανόλη που χρησιμοποιείται ως μοναδική πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο είναι τοξική για το ζυμομύκητα

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει η εικόνα 3.1.1.2 που περιγράφεται η μεταβολή της ενεργότητας της *MtLac2* στο υπερκείμενο της καλλιέργειας όταν αυτό δρα στο συνθετικό υπόστρωμα ABTS.



Εικόνα 3.1.1.2. Μεταβολή της ενεργότητας της *MtLac2* του υπερκείμενου της καλλιέργειας(activity(U/l)) για κάθε συγκέντρωση μεθανόλης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

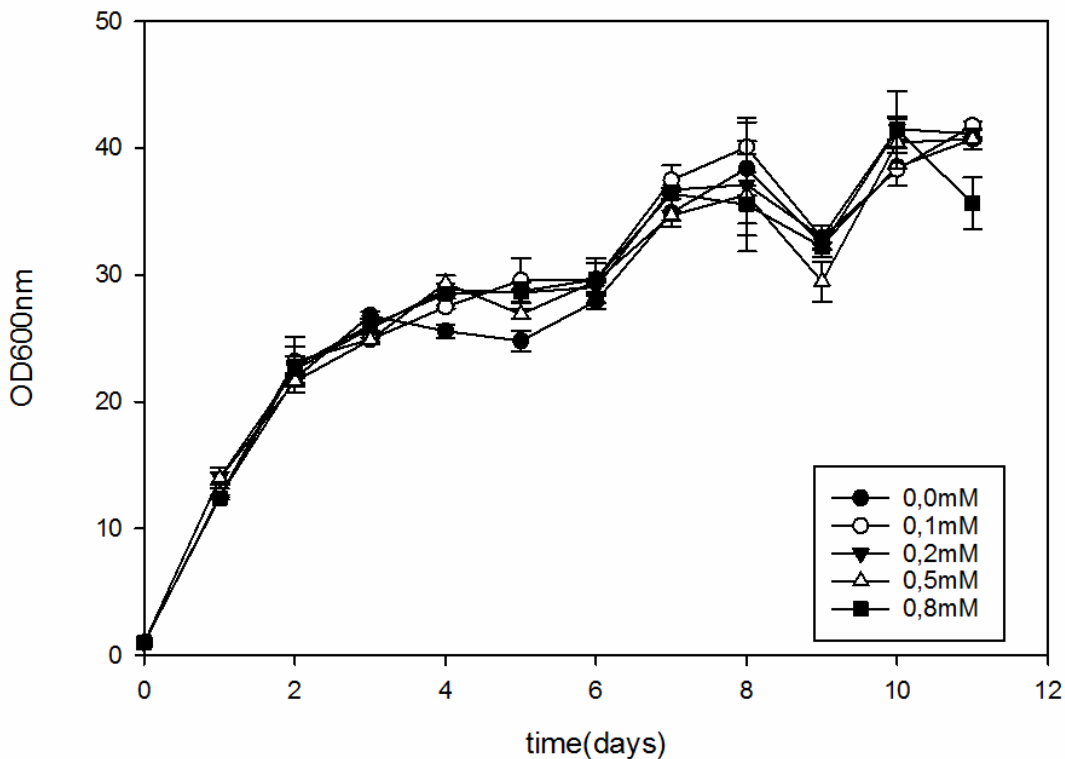
Από την εικόνα 3.1.1.2 προκύπτει ότι η συγκέντρωση μεθανόλης που οδηγεί σε μέγιστη παραγωγή λακκάσης είναι η συγκέντρωση 1,0% v/v. Ακόμη, η βέλτιστη τιμή ενεργότητας επιτυγχάνεται την 8^η μέρα της καλλιέργειας, ενώ στη συνέχεια εμφανίζεται μείωση στην ενεργότητα. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ζυμομύκητα τα θρεπτικά συστατικά καταναλώνονται και η αύξηση των κυττάρων οδηγεί σε σχηματισμό τοξικών παραπροϊόντων του δευτερογενούς μεταβολισμού. Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα τη λύση κάποιων κυττάρων και την απελευθέρωση πρωτεϊνών που δρουν επί της ετερόλογης πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή της.

Αξίζει να σημειωθεί ότι από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις δύο εικόνες η συγκέντρωση μεθανόλης που επιτυγχάνει τη βέλτιστη ανάπτυξη του μικροοργανισμού δεν συμπίπτει με την συγκέντρωση μεθανόλης που οδηγεί στην μέγιστη παραγωγή λακκάσης. Η βελτιστοποίηση αναφέρεται στην παραγωγή της *MtLac2* και για αυτό το λόγο η συγκέντρωση που επιλέχθηκε για την παραγωγή της πρωτεΐνης ήταν 1,0% v/v.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

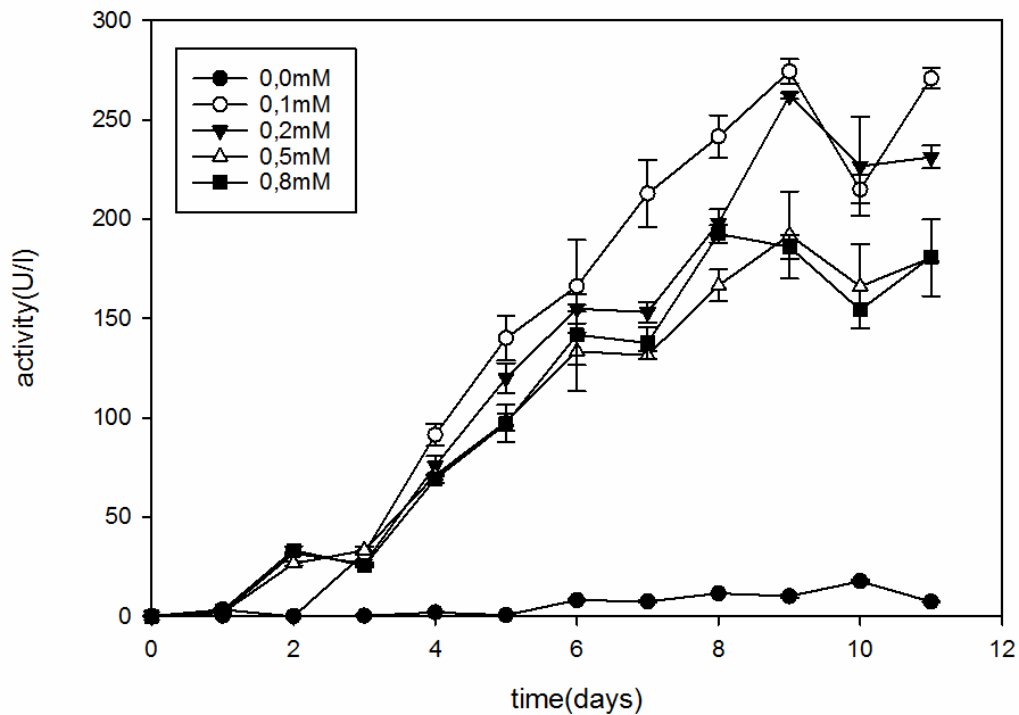
3.1.2 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης χαλκού στο θρεπτικό μέσο

Διατηρώντας την ταχύτητα της ανάδευσης στα 180 rpm, τη θερμοκρασία στους 30°C και με συγκέντρωση μεθανόλης 1,0% v/v, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του χαλκού στην παραγωγή του ενζύμου. Για να προσδιορισθεί η βέλτιστη συγκέντρωση χαλκού στο θρεπτικό μέσο έγιναν δύο διαφορετικές δοκιμές. Στο πρώτο πείραμα μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0, 0,1, 0,2, 0,5, 0,8 mM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες 3.1.2.1 και 3.1.2.2.



Εικόνα 3.1.2.1. Μεταβολή της οπτικής πυκνότητας κυττάρων (OD600nm) για κάθε συγκέντρωση χαλκού κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Από την εικόνα 3.1.2.1 φαίνεται η μεταβολή στην οπτική πυκνότητα των κυττάρων μέσα στο διάστημα των έντεκα ημερών για κάθε συγκέντρωση χαλκού. Παρά τις μικρές διακυμάνσεις που υπάρχουν φαίνεται ότι η συγκέντρωση χαλκού πρακτικά δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του ζυμομύκητα. Οι καμπύλες ακολουθούν ίδια πορεία και οι διαφορές που εμφανίζονται οφείλονται σε παράγοντες που δεν ελέγχονται αυστηρά κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (π.χ. αερισμός της φιάλης). Η εικόνα 3.1.2.2 που ακολουθεί απεικονίζει τη μεταβολή της ενεργότητας της *MtLac2* του υπερκείμενου την καλλιέργειας όταν αυτό δρα στο συνθετικό υπόστρωμα ABTS.

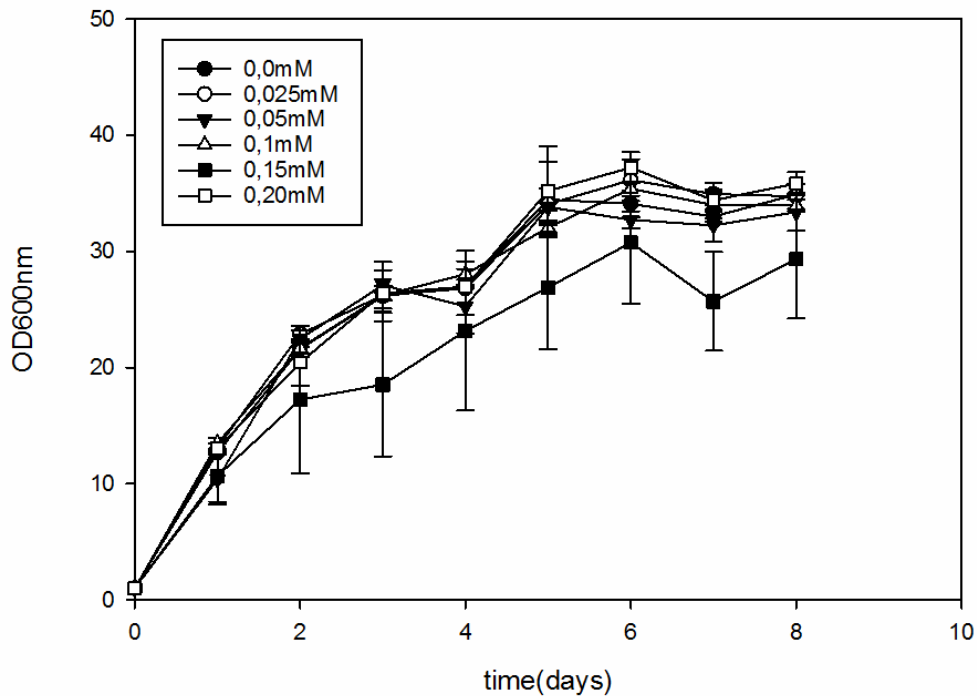


Εικόνα 3.1.2.2. Μεταβολή της ενεργότητας της *MtLac2* του υπερκειμένου της καλλιέργειας (activity(U/l)) για κάθε συγκέντρωση χαλκού κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Από την εικόνα 3.1.2.2 προκύπτει ότι η συγκέντρωση χαλκού για την επίτευξη της μέγιστης παραγωγής σε λακκάση είναι η συγκέντρωση 0,1 mM. Σε γενικές γραμμές, φαίνεται ότι με μείωση της συγκέντρωσης χαλκού εμφανίζεται αύξηση στην ενεργότητα της λακκάσης του υπερκειμένου της καλλιέργειας και επομένως αύξηση στην παραγωγή του ενζύμου. Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν η συγκέντρωση χαλκού είναι μηδενική, πρακτικά δε φαίνεται να υπάρχει παραγωγή λακκάσης. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο καθώς, όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, το ενεργό κέντρο των λακκασών εμπεριέχει τέσσερα άτομα χαλκού οργανωμένα σε τρία κέντρα, στα οποία στηρίζεται και η καταλυτική τους δράση. Η βέλτιστη τιμή ενεργότητας εμφανίζεται την 9^η μέρα της καλλιέργειας, ενώ μετά την 10^η ημέρα παρατηρείται μείωση στην ενεργότητα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

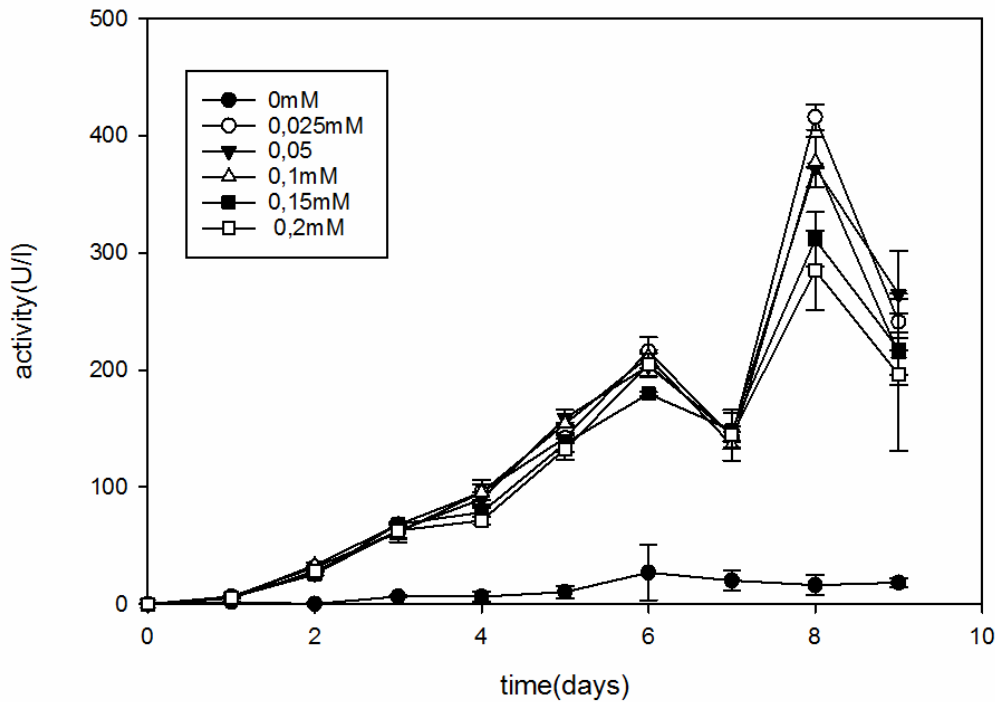
Από το πρώτο πείραμα βελτιστοποίησης της συγκέντρωσης χαλκού, η μέγιστη τιμή ενεργότητας βρέθηκε σε συγκέντρωση 0,1 mM. Εφόσον δεν προέκυψαν συγκεντρώσεις χαλκού ανάμεσα στη μηδενική και τη μέγιστη, κρίθηκε σκόπιμο να επαναληφθεί το πείραμα σε ένα νέο εύρος συγκεντρώσεων χαλκού. Στο δεύτερο πείραμα μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 mM. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στις εικόνες 3.1.2.3 και 3.1.2.4.



Εικόνα 3.1.2.3. Μεταβολή της οπτικής πυκνότητας κυττάρων (OD600nm) για κάθε συγκέντρωση χαλκού κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Στην εικόνα 3.1.2.3 απεικονίζεται η μεταβολή στην οπτική πυκνότητα των κυττάρων μέσα στο διάστημα των εννέα ημερών για τις συγκεντρώσεις χαλκού που μελετήθηκαν και ανήκουν στο εύρος 0-0.2 mM. Όπως και στην εικόνα 3.1.2.1, είναι εμφανές ότι η ύπαρξη χαλκού στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του ζυμομύκητα. Συγκεκριμένα για συγκέντρωση χαλκού 0,15 mM φαίνεται η οπτική πυκνότητα να είναι μικρότερη, όμως επειδή αυτή η εικόνα επικρατεί από την πρώτη ημέρα, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος και το θεωρητικό υπόβαθρο, φαίνεται ότι η εικόνα αυτή οφείλεται σε σφάλμα κατά τον εμβολιασμό. Η εικόνα 3.1.2.4 που ακολουθεί, απεικονίζει τη μεταβολή της ενεργότητας της λακκάσης του υπερκείμενου την καλλιέργειας όταν δρα στο συνθετικό υπόστρωμα ABTS.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 3.1.2.4. Μεταβολή της ενεργότητας του υπερκείμενου της καλλιέργειας(activity(U/l)) για κάθε συγκέντρωση χαλκού κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

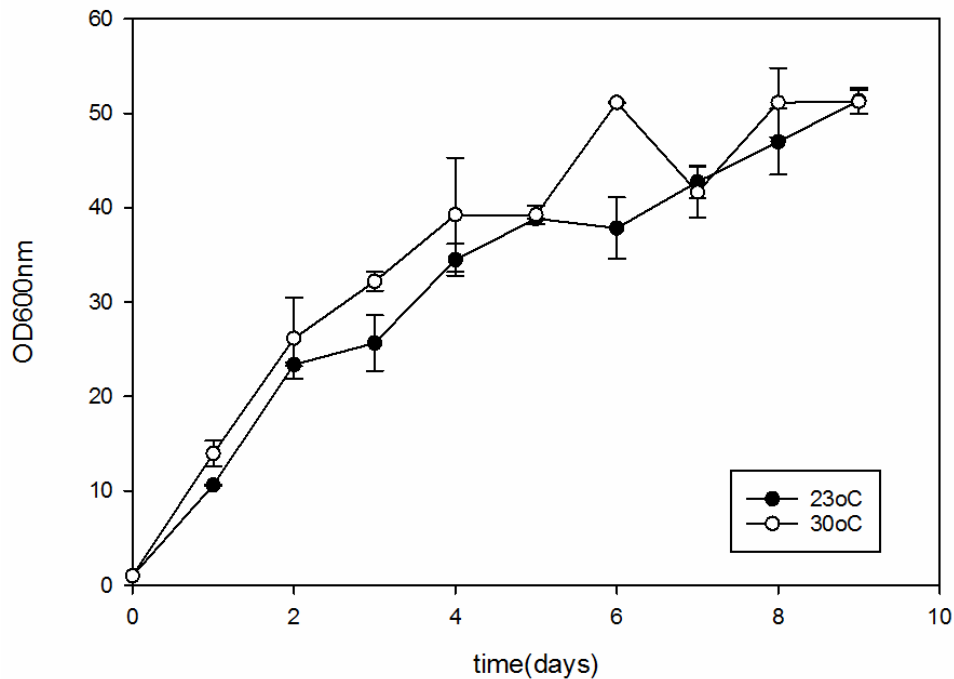
Από την εικόνα του διαγράμματος 3.1.2.4. εξάγεται ότι, στο εύρος χαλκού που μελετήθηκε η παραγωγή ενζύμου κατά το δεύτερο πείραμα, οι συγκεντρώσεις χαλκού δίνουν παρόμοια αποτελέσματα. Το μέγιστο ενεργότητας για όλες τις συγκεντρώσεις χαλκού εμφανίζεται την 8^η ημέρα όπου παρατηρείται ότι η βέλτιστη συγκέντρωση χαλκού είναι 0,025 mM. Ακόμη, και σε αυτό το πείραμα, μηδενική συγκέντρωση χαλκού φαίνεται ότι οδηγεί σε πρακτικά μηδενική παραγωγή ενζύμου.

Συνολικά, αξιολογώντας τα αποτελέσματα και των δύο πειραμάτων, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η παρουσία χαλκού είναι απαραίτητη για την παραγωγή της *MtLac2* ενώ ταυτόχρονα με τη μείωση της συγκέντρωσης του χαλκού επιτυγχάνεται αύξηση στην παραγωγή της λακκάσης. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι για πολύ μικρές συγκεντρώσεις χαλκού οι διαφορές στην παραγωγή του ενζύμου αμβλύνονται.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

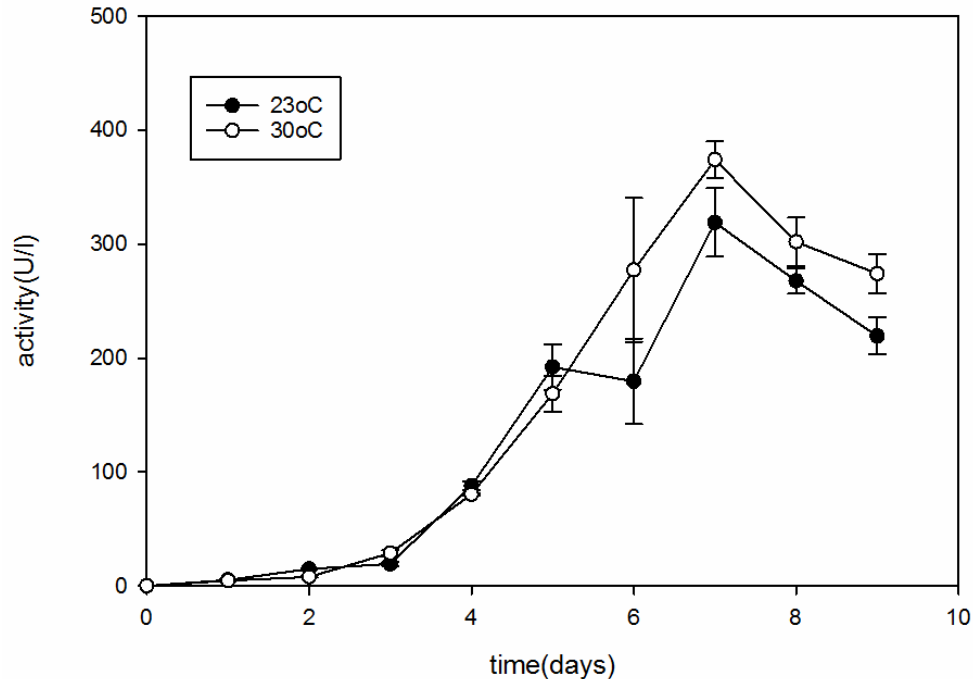
3.1.3 Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας επώασης των καλλιιεργειών

Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων, διατηρώντας την ταχύτητα της ανάδευσης στα 180 rpm, τη με συγκέντρωση μεθανόλης 1,0% v/v και με συγκέντρωση χαλκού 0,025 mM, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της επίδρασης της θερμοκρασίας στην παραγωγή του ενζύμου. Για το σκοπό αυτό οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 23°C και στους 30°C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες 3.1.3.1 και 3.1.3.2.



Εικόνα 3.1.3.1. Μεταβολή της οπτικής πυκνότητας κυττάρων (OD600nm) για τις υπό μελέτη θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Από την εικόνα 3.1.3.1 φαίνεται η μεταβολή στην οπτική πυκνότητα των κυττάρων μέσα στο διάστημα των εννέα ημερών για τις δύο θερμοκρασίες επώασης των καλλιιεργειών. Από τις δύο θερμοκρασίες που μελετήθηκαν η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του ζυμομύκητα είναι οι 30°C, χωρίς όμως να υπάρχει μεγάλη μεταβολή ανάμεσα στις δύο θερμοκρασίες. Η εικόνα 3.1.3.2 που ακολουθεί υποδεικνύει τη μεταβολή της ενεργότητας της λακκάσης του υπερκείμενου της καλλιέργειας όταν αυτό δρα στο συνθετικό υπόστρωμα ABTS και στις δύο θερμοκρασίες.



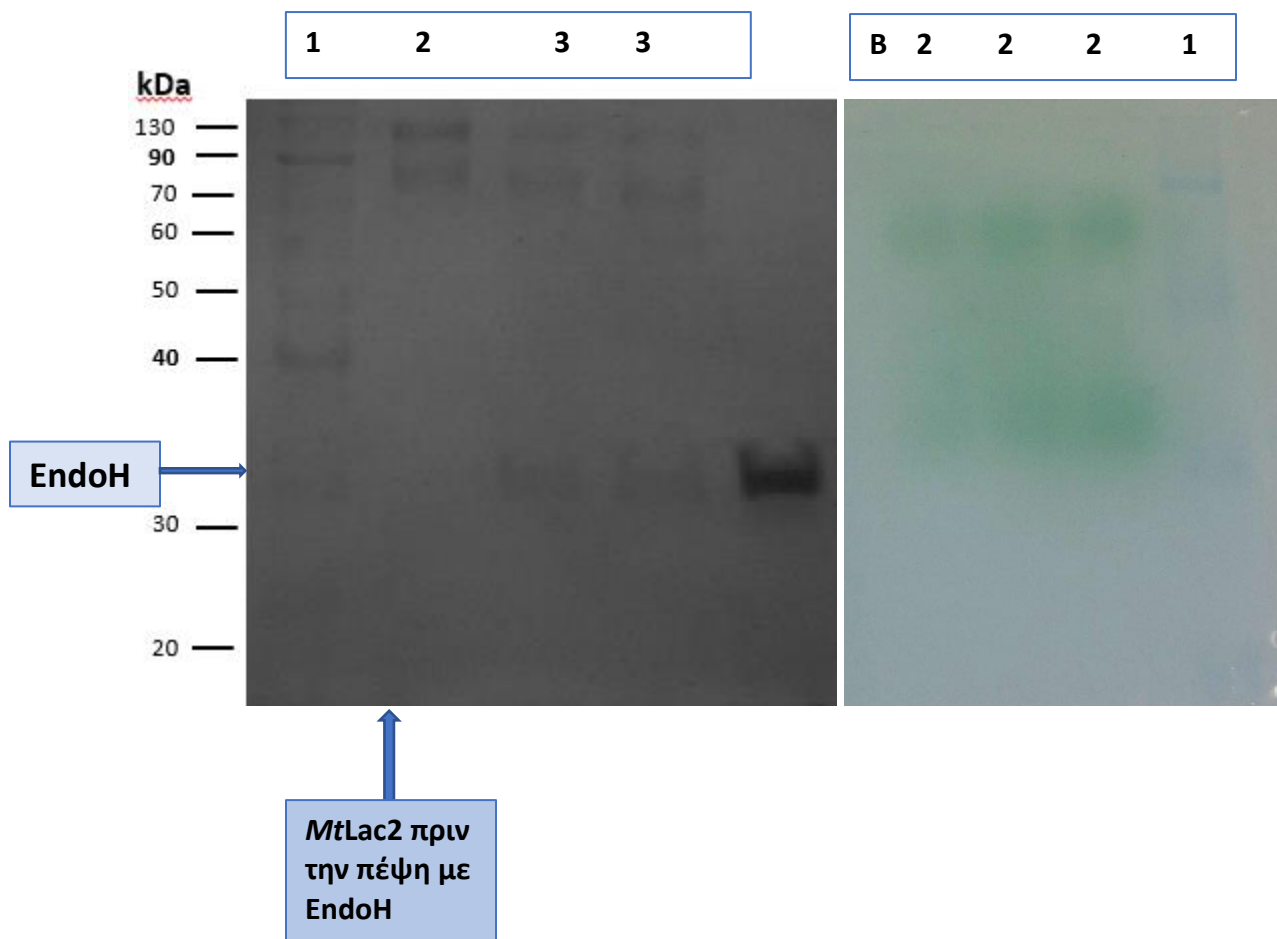
Εικόνα 3.1.3.2. Μεταβολή της ενεργότητας της *MtLac2* του υπερκείμενου της καλλιέργειας (activity(U/l)) για τις υπό μελέτη θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Η εικόνα 3.1.3.2 παρουσιάζει την ενζυμική ενεργότητα του υπερκείμενου των καλλιεργειών στο συνθετικό υπόστρωμα ABTS. Όπως προκύπτει από την εικόνα, μέχρι την πέμπτη ημέρα καλλιέργειας δεν υπάρχουν διαφορές στην ενεργότητα του υπερκείμενου υγρού, που μεταφράζεται ευθέως σε παραγωγή ενζύμου. Μετά την πέμπτη ημέρα καλλιέργειας διαφοροποιείται η ενεργότητα για τις δύο θερμοκρασίες, και όπως στην περίπτωση της κυτταρικής ανάπτυξης, έχουμε αυξημένη ενεργότητα στους 30°C σε σχέση με τους 23°C. Η αυξημένη παραγωγή ενζύμου συνεχίζεται μέχρι την έβδομη μέρα, όπου και εμφανίζεται η μέγιστη ενεργότητα, αλλά και μετά το μέγιστο. Μια τέτοια εικόνα δικαιολογείται καθώς περισσότερα κύτταρα ανά όγκο είναι επόμενο να παράγουν περισσότερο ένζυμο. Ωστόσο, η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή του ενζύμου δεν ταυτίζεται απαραίτητα με τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού από τον οποίο παράγεται. Το ένζυμο επηρεάζεται ακόμη από τη δράση των πρωτεασών, η οποία σε χαμηλές θερμοκρασίες πιθανώς επιβραδύνεται με αποτέλεσμα την επιβράδυνση στην καταστροφή του ενζύμου που μεταφράζεται σε μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου. Ακόμα, σε χαμηλότερες θερμοκρασίες το παραγόμενο ένζυμο παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα. Σε αυτό το πείραμα φαίνεται ότι τα πλεονεκτήματα που μπορεί να προσφέρει η ετερόλογη έκφραση σε χαμηλή θερμοκρασία δεν υπερκαλύπτουν το κενό που δημιουργείται από τη μειωμένη συγκέντρωση κυττάρων.

3.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της *MtLac2*

3.2.1 Προσδιορισμός του μεγέθους της *MtLac2*

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου SDS-PAGE. Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του ενζύμου, χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνικών μορίων γνωστού μοριακού βάρους. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε για το καθαρισμένο ένζυμο, και για το ενζυμικό παρασκεύασμα που προέκυψε μετά από επώαση με την ενδογλυκοζιδάση EndoH. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες παρουσιάζεται στην εικόνα 3.2.1α.



Εικόνα 3.2.1. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών. α) Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) από πέψη με EndoH. β) Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης απουσία αποδιατακτικών παραγόντων μετά την εμβάπτιση σε ABTS. 1: Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών. 2: Απομονωμένη *MtLac2*. 3: *MtLac2* μετά την πέψη με EndoH.

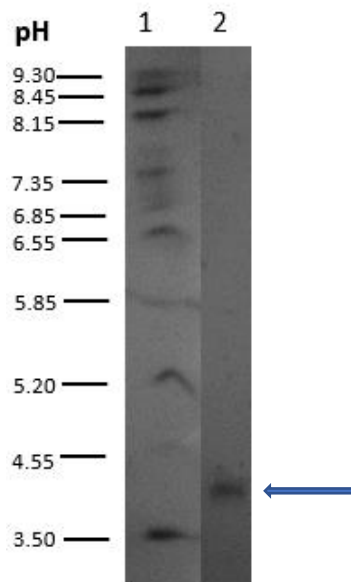
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως προκύπτει από την εικόνα, διακρίνονται δύο πρωτεϊνικές ζώνες, διαφορετικού μοριακού βάρους. Η πρώτη εντοπίζεται κοντά στο θεωρητικό μοριακό βάρος (80 kDa) ενώ η δεύτερη εντοπίζεται σε μοριακό βάρος γύρω στα 110 kDa. Από την εικόνα 3.2.1α εξάγεται ότι η πέψη με EndoH δεν μετέβαλλε το μοριακό βάρος του ενζύμου.

Προκειμένου να διευκρινιστεί εάν και οι δύο ζώνες που εμφανίζονται στο πήκτωμα εμφανίζουν ενεργότητα λακκάσης, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση απουσία αποδιατακτικών παραγόντων. Στην Εικόνα 3.2.1β απεικονίζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης απουσία αποδιατακτικών παραγόντων. Από την εικόνα 3.2.1β προκύπτει ότι και οι δύο ζώνες που εμφανίζονται κατά την ηλεκτροφόρηση έχουν ενεργότητα στο συνθετικό υπόστρωμα ABTS καθώς έχουν αποκτήσει έντονο πράσινο χρώμα. Η παρουσία περισσότερων της μιας ζώνης στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE που όμως εμφανίζουν ενεργότητα λακκάσης, πιθανόν υποδηλώνει την έκφραση ισομορφών της *MtLac2* που οφείλονται σε διαφορετικά πρότυπα γλυκοζυλίωσης από το ενδοκυτταρικό σύστημα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της *P. pastoris*.

3.2.2 Προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου της *MtLac2*

Ο προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου της *MtLac2*, έγινε με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου (IEF-PAGE) για εύρος pH από 3 έως 10 έτσι όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.2.7.3. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζεται στην εικόνα 3.2.2.



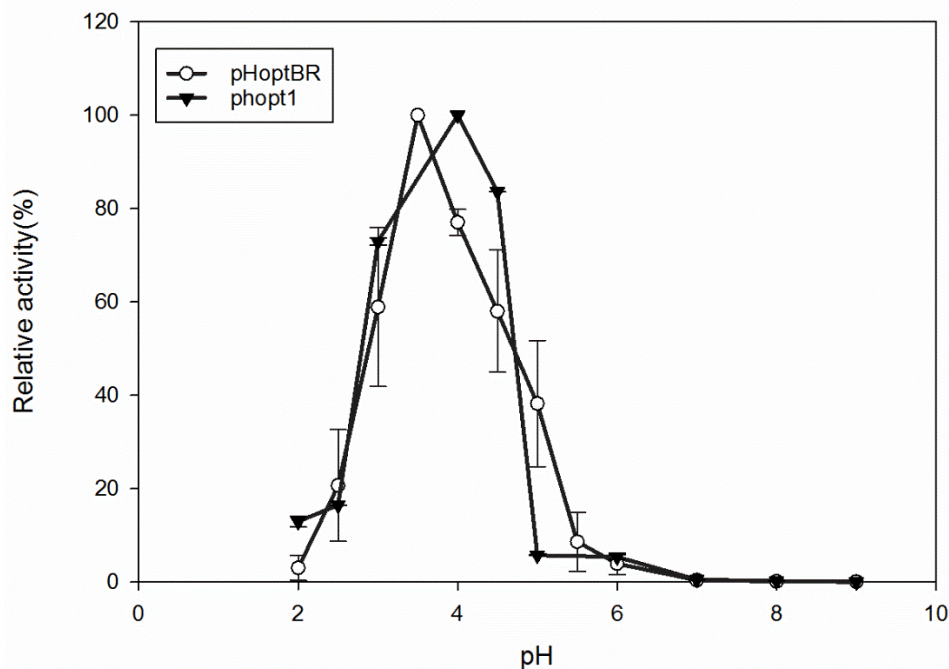
Εικόνα 3.2.2. Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (IEF-PAGE) **1:** Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών. **2:** Απομονωμένη *MtLac2*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην εικόνα 3.2.2 απεικονίζεται το πήκτωμα μετά την εμφάνιση της ζώνης που υποδεικνύει το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης. Το ισοηλεκτρικό σημείο, έτσι όπως προσδιορίστηκε πειραματικά έχει τιμή pH κοντά στο 4. Είναι πολύ σημαντικό να τονισθεί ότι το γεγονός ότι προσδιορίστηκε ένα ισοηλεκτρικό σημείο σε συνδυασμό με το αποτέλεσμα του ζυμογραφήματος επιβεβαιώνει ότι η δεύτερη ζώνη που εμφανίζεται στην ηλεκτροφόρηση παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων αποδίδεται στην *MtLac2* και η διαφοροποίηση οφείλεται στα πρότυπα γλυκοζυλίωσης του φορέα.

3.2.3 Βέλτιστο pH δράσης της *MtLac2*

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.2.8.2 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι για τον προσδιορισμό της τιμής pH στην οποία το ένζυμο λειτουργεί βέλτιστα χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά ρυθμιστικά συστήματα. Η σύσταση των διαλυμάτων που αποτελούν τα ρυθμιστικά συστήματα περιγράφεται επίσης στην παράγραφο 2.1.5 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Η ενεργότητα του ενζύμου στις διαφορετικές τιμές pH που εξετάστηκαν και για τα δύο ρυθμιστικά συστήματα φαίνεται στην εικόνα 3.2.3. Σημειώνεται πως οι τιμές ενεργότητας στην εικόνα είναι σχετικές, ποσοστιαίες τιμές ενεργότητας του ενζύμου που προσδιορίστηκαν, θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου στην τιμή pH που η ενεργότητα είναι μέγιστη.

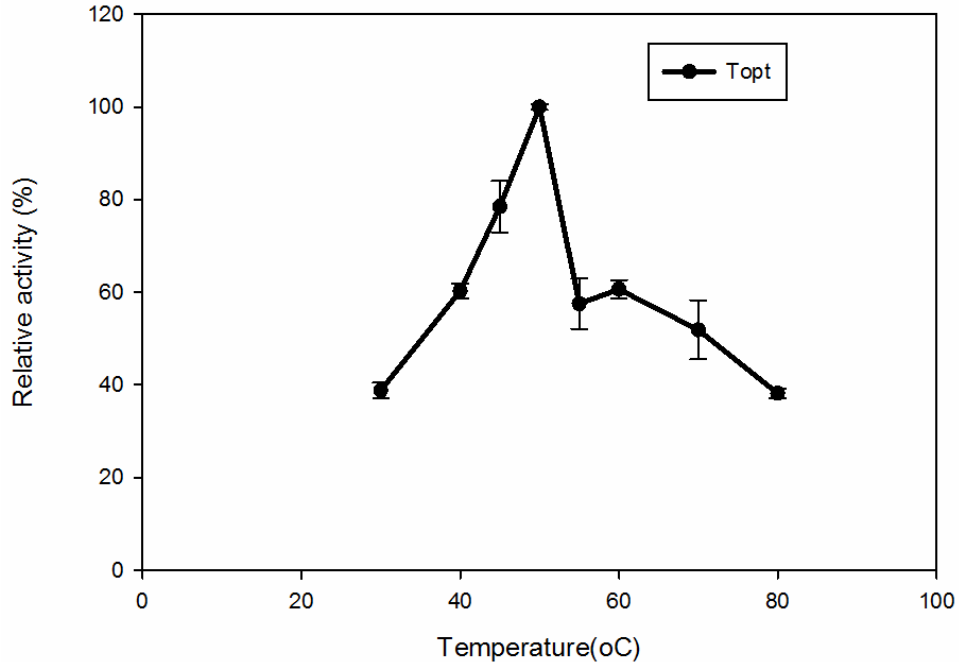


Εικόνα 3.2.3. Μεταβολή στην ενεργότητα της *MtLac2* βάσει του pH της αντίδρασης. pHopt: 1^ο ρυθμιστικό σύστημα. pHoptBR: ρυθμιστικό σύστημα Britton-Robinson

Από την εικόνα 3.2.3 προκύπτει ότι με βάση το πρώτο ρυθμιστικό σύστημα, η τιμή pH στην οποία το ένζυμο δρα βέλτιστα αντιστοιχεί σε pH=4, ενώ με βάση το ρυθμιστικό σύστημα Britton-Robinson το βέλτιστο pH είναι αυτό που έχει τιμή pH=3,5. Μικρές διαφορές ανάμεσα στα δύο ρυθμιστικά συστήματα είναι αναμενόμενες και συναντώνται στην πλειονότητα των δοκιμών προσδιορισμού βέλτιστου pH δράσης ενζύμου. Οι καμπύλες που έχουν σχηματιστεί έχουν τυπική κωνοειδή μορφή. Ακόμη, είναι πολύ σημαντικό να τονισθεί ότι το ένζυμο φαίνεται ιδιαίτερα ευαίσθητο στις διακυμάνσεις pH, και ειδικά για το πρώτο ρυθμιστικό σύστημα, για τιμές pH μεγαλύτερες από 4,5 και μικρότερες από 3 έχει πολύ μικρή ενεργότητα, ενώ σε βασικά pH δε φαίνεται να έχει ενεργότητα. Συγκεκριμένα για πολύ όξινα pH (2 και 2,5) η ενεργότητα είναι κοντά στο 15% της βέλτιστης, για τις τιμές pH 5 και 6 είναι λίγο μεγαλύτερη από το 5%, ενώ για ουδέτερο και βασικά pH, η ενεργότητα πρακτικά μηδενίζεται. Η εικόνα που παρουσιάζει το ρυθμιστικό σύστημα Britton-Robinson είναι πιο ομαλή αλλά και πάλι η ενεργότητα σε τιμές pH μεγαλύτερες του 6 είναι σχεδόν μηδενική. Η παρατήρηση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς αναδεικνύει σε ποιο εύρος pH μπορεί να χρησιμοποιηθεί η *MtLac2*.

3.2.4 Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της *MtLac2*

Με βάση τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της βέλτιστης τιμής pH για τη δράση του ενζύμου, χρησιμοποιώντας το 1^ο ρυθμιστικό σύστημα και τιμή pH=4 στην αντίδραση πραγματοποιήθηκε η δοκιμή βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου. Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της *MtLac2* εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.8.1 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Η ενεργότητα του ενζύμου στις διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας που εξετάστηκαν εμφανίζεται στην εικόνα 3.2.4. Σημειώνεται πως οι τιμές ενεργότητας στην εικόνα είναι σχετικές, ποσοστιαίες τιμές ενεργότητας του ενζύμου που προσδιορίστηκαν, θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου στη θερμοκρασία που η ενεργότητα είναι μέγιστη.



Εικόνα 3.2.4. Μεταβολή στην ενεργότητα της *MiLac2* βάσει της θερμοκρασίας δράσης.

Από την εικόνα 3.2.4 προκύπτει ότι το ένζυμο παρουσιάζει τη μέγιστη ενεργότητα στους 50°C. Στη χαμηλότερη θερμοκρασία που μελετήθηκε (30°C) όπως και στην υψηλότερη (80°C) η δράση του ενζύμου είναι κάτω από το 50% σε σχέση με τη βέλτιστη θερμοκρασία. Από τους 30 μέχρι τους 50°C φαίνεται να υπάρχει μια ομαλή μετάβαση στο μέγιστο της ενεργότητας, ενώ αντίθετα ανεβαίνοντας μόλις 5 βαθμούς πάνω από τους 50°C η τιμή της ενεργότητας μειώνεται κατακόρυφα και συνεχίζει να πέφτει βαθμιαία μέχρι τους 80°C. Η μεταβολή της θερμοκρασίας προσομοιάζει στην τυπική κωνοειδή μορφή ενώ είναι εμφανές ότι το ένζυμο επηρεάζεται έντονα από την αύξηση της θερμοκρασίας σε τιμές πάνω από τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης.

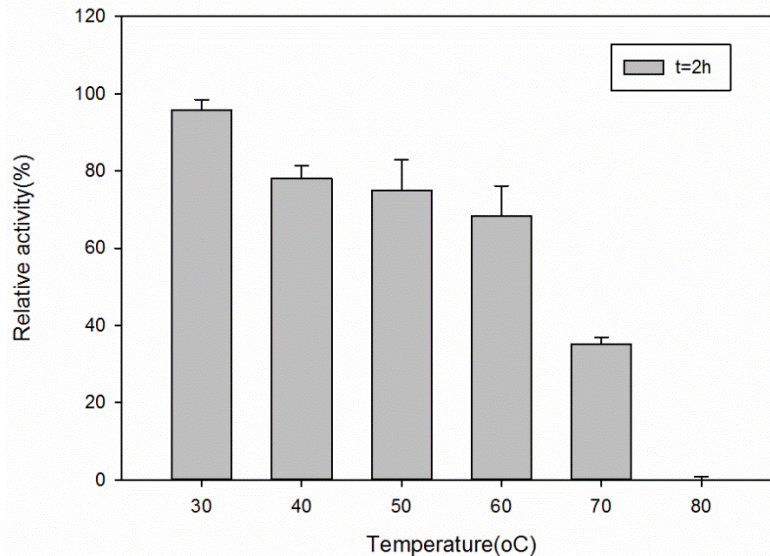
3.2.5 Θερμική σταθερότητα της *MiLac2*

Για τον προσδιορισμό της θερμικής σταθερότητας εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.9.1 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Οι τιμές της εναπομείνουσας ενεργότητας που υπολογίστηκαν μετά την επώαση του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες διακρίνονται στα ραβδογράμματα των εικόνων 3.2.5.1, 3.2.5.2 και 3.2.5.3. Οι παρακάτω εικόνες αντιστοιχούν σε χρονικά διαστήματα επώασης διάρκειας 2, 8 και 24 ωρών.

Σημειώνεται πως οι τιμές ενεργότητας που απεικονίζονται στα ραβδογράμματα υπολογίστηκαν θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα που έχει το ένζυμο πριν την επώαση του. Το ένζυμο υπό

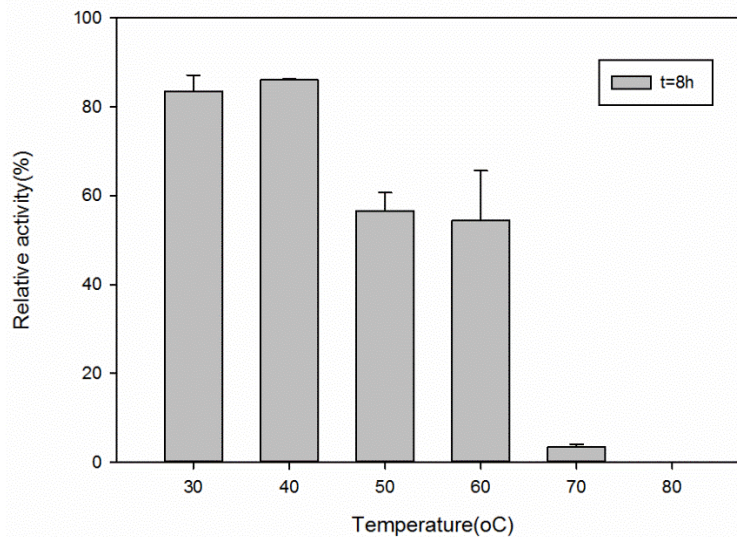
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

κανονικές συνθήκες φυλάσσεται στους 4°C, επομένως στις εικόνες φαίνονται οι απώλειες σε ενεργότητα του ενζύμου όταν αυτό επωάζεται σε υψηλές θερμοκρασίες.



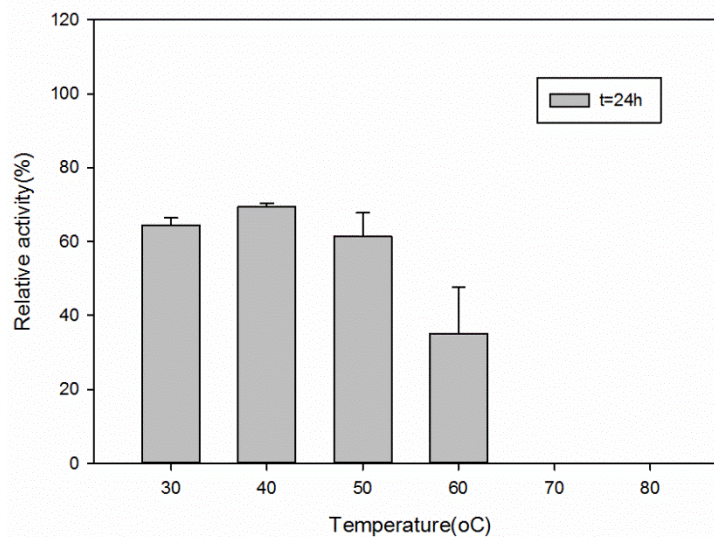
Εικόνα 3.2.5.1. Μεταβολή στην εναπομείνασα ενεργότητα της *MtLac2* σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία επώασης του ενζύμου μετά το πέρας 2 ωρών στο θερμοκρασιακό εύρος 30-80°C.

Από την εικόνα προκύπτει ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης παρατηρείται μείωση στην ενεργότητα του ενζύμου, όπως είναι αναμενόμενο. Πιο συγκεκριμένα, μετά το πέρας 2 ωρών, η ενεργότητα του ενζύμου στους 30°C φαίνεται σχεδόν αμετάβλητη. Ακόμη, η εναπομείνασα ενεργότητα που παρατηρείται στο θερμοκρασιακό εύρος 40-60°C είναι άνω του 70%. Αντίθετα σε υψηλότερες θερμοκρασίες φαίνεται ότι το ένζυμο αποσταθεροποιείται έντονα καθώς στους 70°C η ενεργότητα είναι χαμηλότερη από το 40% ενώ στους 80°C, το ένζυμο έχει καταστραφεί πλήρως και η ενεργότητα του είναι μηδενική.



Εικόνα 3.2.5.2. Μεταβολή στην ενεργότητα της *MiLac2* σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία επώασης του ενζύμου μετά το πέρας 8 ωρών στο θερμοκρασιακό εύρος 30-80°C.

Μετά το πέρας 8 ωρών, η ενεργότητα του ενζύμου που επώαστηκε στους 30°C έχει μειωθεί στο 80%, ενώ αντίθετα για τους 40°C φαίνεται ότι ενώ στις πρώτες δύο ώρες επώασης υπήρξε μείωση ενεργότητας, η εναπομένουσα ενεργότητα παραμένει σταθερή στο ίδιο επίπεδο μέχρι τις 8 ώρες. Ακόμη, για θερμοκρασίες 50°C και 60°C το ένζυμο εξακολουθεί να παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά, και η ενεργότητά του μετά το πέρας 8 ωρών μόλις ξεπερνάει το 50%. Στους 70°C η ενεργότητα τείνει να φτάσει μηδενικές τιμές καθώς το ένζυμο εξακολουθεί να αποσταθεροποιείται έντονα στις υψηλές θερμοκρασίες.



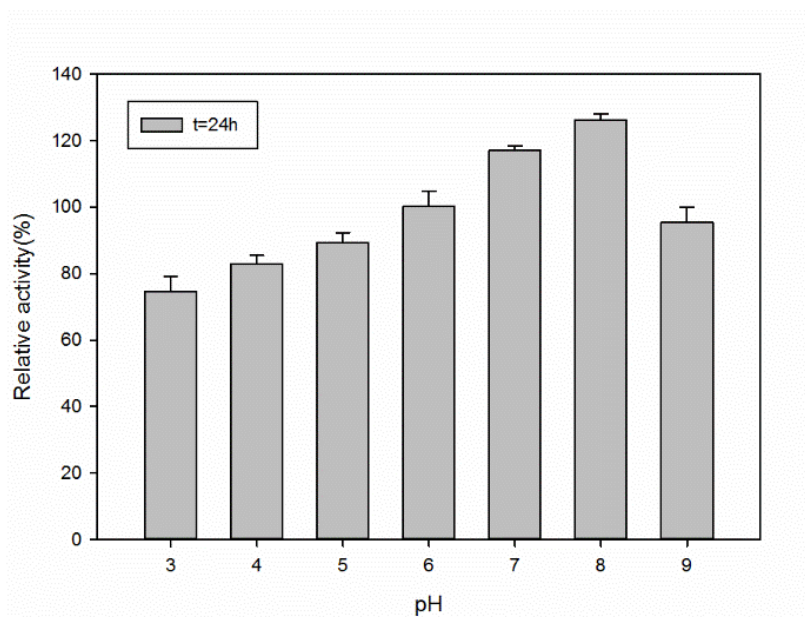
Εικόνα 3.2.5.3. Μεταβολή στη σχετική ενεργότητα της *MiLac2* σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία επώασης του ενζύμου μετά το πέρας 24 ωρών στο θερμοκρασιακό εύρος 30-80°C.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά το πέρας των 24 ωρών και την ολοκλήρωση του πειράματος η εναπομένουσα ενεργότητα του ενζύμου στο θερμοκρασιακό εύρος 30-50°C έχει διατηρηθεί σε επίπεδα υψηλότερα από το 60%. Στους 60°C το ένζυμο παρουσιάζει ενεργότητα περίπου 35%, ενώ όπως ήταν αναμενόμενο και από την προηγούμενη εικόνα, στους 70°C το ένζυμο έχει αδρανοποιηθεί πλήρως.

3.2.6 Σταθερότητα της *MtLac2* σε διαφορετικές τιμές pH

Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας της *MtLac2* σε διαφορετικές τιμές pH εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.9.2 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Οι τιμές της εναπομένουσας ενεργότητας που υπολογίστηκαν μετά την επώαση των ενζύμων για 24 ώρες διακρίνονται στο ραβδόγραμμα της εικόνας 3.2.6. Σημειώνεται πως οι τιμές ενεργότητας που απεικονίζονται υπολογίστηκαν θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου μετά από την πρώτη ώρα επώασης στα διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα.



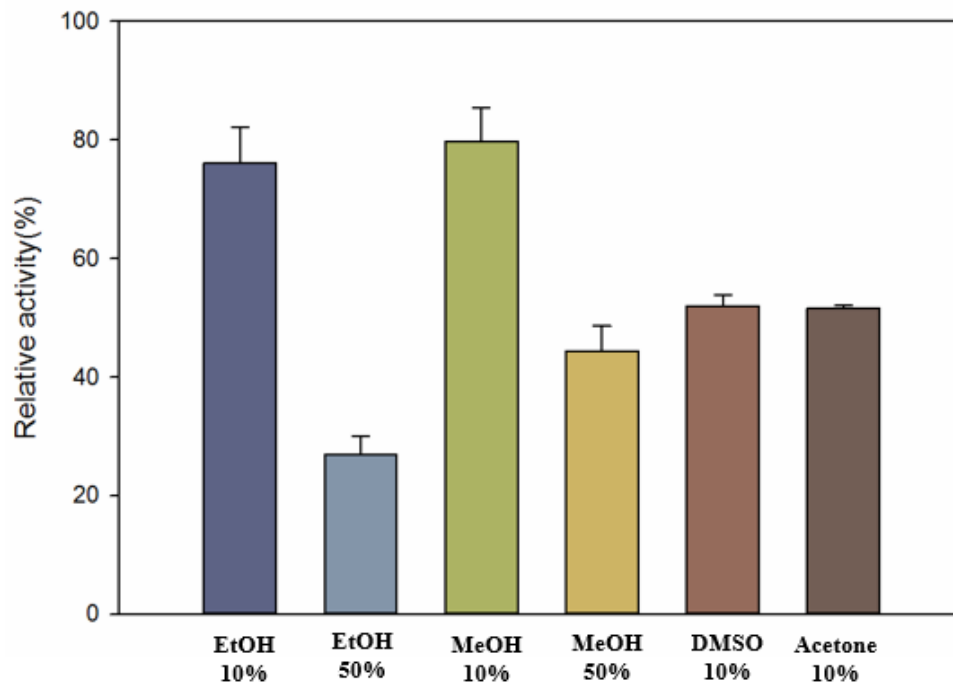
Εικόνα 3.2.6. Μεταβολή στη σχετική ενεργότητα της *MtLac2* μετά από επώαση 24 ωρών σε ρυθμιστικά διαλύματα εύρους pH 3-9.

Μετά το πέρας των 24 ωρών και την ολοκλήρωση του πειράματος η εναπομένουσα ενεργότητα του ενζύμου είναι υψηλή σε όλο το εξεταζόμενο εύρος. Στο εύρος τιμών pH 3-5 παρατηρείται η μικρότερη εναπομένουσα ενεργότητα η οποία είναι σε επίπεδα υψηλότερα από 75% και φθάνει στο 90% για pH=5. Στο εύρος 6-8 φαίνεται ότι το ένζυμο έχει τη βέλτιστη σταθερότητα και εξακολουθεί η εναπομένουσα ενεργότητα να αυξάνεται σχεδόν γραμμικά με την αύξηση του pH με αποτέλεσμα το μέγιστο να εμφανίζεται στο pH=8. Τέλος για την τιμή pH=9 η εναπομένουσα ενεργότητα μειώνεται και φαίνεται να αντιστοιχεί στις τιμές ενεργότητας που παρατηρήθηκαν για pH 5 και 6.

3.2.7 Προσδιορισμός ενεργότητας της *MtLac2* παρουσία οργανικών διαλυτών

Για τον προσδιορισμό της δράσης της *MtLac2* παρουσία οργανικών διαλυτών εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.11.1 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Οι τιμές της ενεργότητας παρατηρήθηκαν κατά την αντίδραση του ενζύμου παρουσία των οργανικών διαλυτών παρουσιάζονται στην εικόνα 3.2.7.

Σημειώνεται πως οι τιμές ενεργότητας που απεικονίζονται στο ραβδόγραμμα υπολογίστηκαν θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα που υπολογίστηκε από την παράλληλη αντίδραση ελέγχου του ενζύμου, η οποία δεν περιείχε διαλύτη.



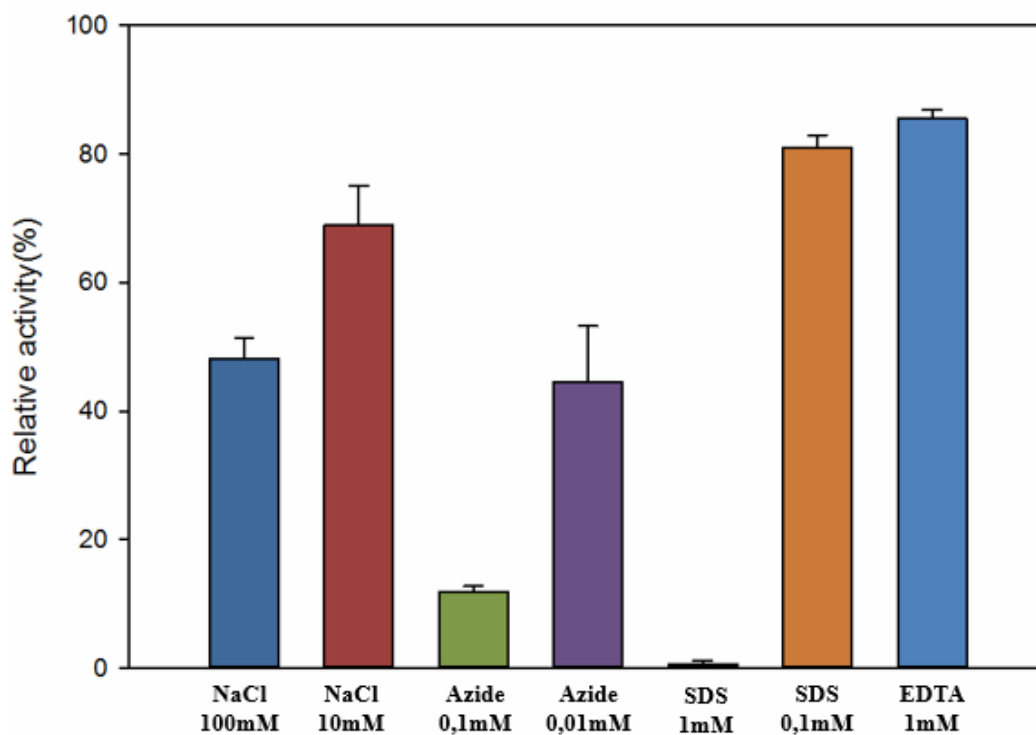
Εικόνα 3.2.7. Μεταβολή της ενεργότητας της *MtLac2* παρουσία οργανικών διαλυτών.

Σε συγκέντρωση διαλύτη 10% κατ' όγκο στην αντίδραση, η ενεργότητα της *MtLac2* επηρεάζεται σε διαφορετικό βαθμό για κάθε διαλύτη. Σε μια προσπάθεια ομαδοποίησης των αποτελεσμάτων παρατηρείται ότι η μεθανόλη και η αιθανόλη παρεμποδίζουν λιγότερο τη δράση του ενζύμου, σε σχέση με το DMSO και την ακετόνη όπου η ενεργότητα του ενζύμου υποδιπλασιάζεται παρουσία των διαλυτών. Οι διαλύτες στους οποίους το ένζυμο παρουσίασε μεγαλύτερη ανοχή μελετήθηκαν και σε συγκέντρωση 50% κατ' όγκο όπου η παρεμπόδιση ήταν σαφώς ισχυρότερη, περισσότερο στην περίπτωση της αιθανόλης όπου η ενεργότητα έχει μειωθεί κατά περίπου 75%, και λιγότερο στην περίπτωση της μεθανόλης, όπου το ένζυμο δρα με ενεργότητα χαμηλότερη του 50% της αντίδρασης ελέγχου.

3.2.8 Προσδιορισμός ενεργότητας της *MtLac2* παρουσία παρεμποδιστών

Για τον προσδιορισμό της δράσης της *MtLac2* παρουσία οργανικών διαλυτών εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.11.2 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Οι τιμές της ενεργότητας του ενζύμου κατά την αντίδραση παρουσία παρεμποδιστών παρουσιάζονται στην εικόνα 3.2.8.

Σημειώνεται πως οι τιμές ενεργότητας που απεικονίζονται στο ραβδόγραμμα υπολογίστηκαν θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα που υπολογίστηκε από την παράλληλη αντίδραση ελέγχου του ενζύμου, η οποία δεν περιείχε παρεμποδιστή.



Εικόνα 3.2.8. Μεταβολή της ενεργότητας της *MtLac2* παρουσία παρεμποδιστών.

Από την εικόνα 3.2.8 προκύπτει ότι ο πιο ισχυρός παρεμποδιστής της δράσης του ενζύμου είναι το αζίδιο, το οποίο στη χαμηλή συγκέντρωση που μελετήθηκε (0,01 mM), υποδιπλασίασε σχεδόν την ενεργότητα του ενζύμου ενώ σε συγκέντρωση 0,1 mM στην αντίδραση η ενεργότητα του ενζύμου μειώθηκε στο 10% της αρχικής. Ισχυρός παρεμποδιστής είναι και το SDS σύμφωνα με την εικόνα 3.2.8. Μάλιστα η μεταβολή της συγκέντρωσης του SDS από 0,1 mM σε 1 mM επηρεάζει πολύ έντονα τη δράση του ενζύμου, καθώς παρουσία 0,1 mM SDS η ενεργότητα της *MtLac2* είναι περίπου 80% της αρχικής ενεργότητας, ενώ προσθήκη 1 mM SDS οδηγεί σε μηδενική ενεργότητα. Το EDTA σε συγκέντρωση 1 mM μειώνει την ενεργότητα στο 80%. Τέλος,

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

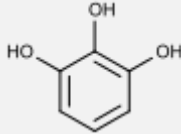
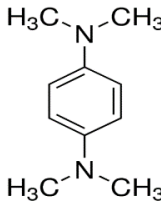
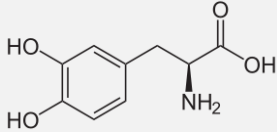
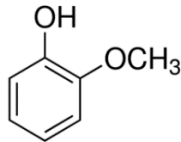
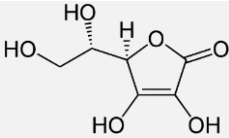
η παρεμποδιστική δράση του NaCl μελετήθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και διαπιστώθηκε ότι σε συγκέντρωση 10 mM η ενεργότητα του ενζύμου είναι περίπου 70% ενώ για συγκέντρωση 100 mM, αγγίζει το 50% της ενεργότητας του ενζύμου στην αντίδραση ελέγχου.

3.3 Καταλυτικά χαρακτηριστικά της *MtLac2*

3.3.1 Μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα της *MtLac2* (substrate specificity)

Για την εξέταση της εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα της *MtLac2* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.2 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Από τις δοκιμές ενεργότητας που πραγματοποιήθηκαν στους 50°C και σε τιμή pH=4 προέκυψε η κατ' όγκο ενεργότητα του διαλύματος του ενζύμου. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Lowry που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.5.2. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε υπόστρωμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.1.

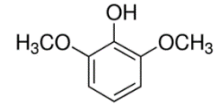
Πίνακας 3.3.1. Ενεργότητα της *MtLac2* σε διάφορα υποστρώματα

Υπόστρωμα	Ενεργότητα (U/mg)	Χημικός Τύπος
<i>Πυρογαλλόλη</i> <i>Pyrogallol</i>	0.469	
<i>NNNN-τετραμεθυλ-φαινολενεδιαμίνη</i> <i>NNNN-tetramethyl-p-phenylene diamine</i>	0.371	
<i>L-DOPA</i>	0.013	
<i>Γουαϊακόλη</i> <i>Guaiacol</i>	0.008	
<i>Ασκορβικό οξύ</i> <i>Asc. Acid</i>	56.802	

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

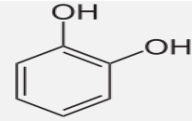
2,6Διμεθοξυφαινόλη
2,6DMP

0.095



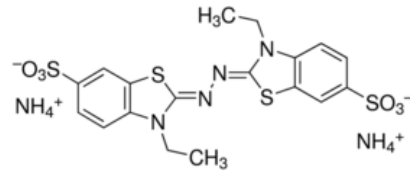
Κατεχόλη
Catechol

0.313



ABTS

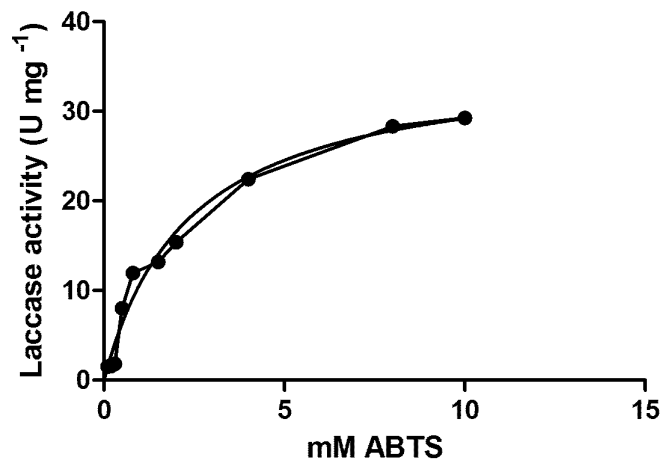
6.221



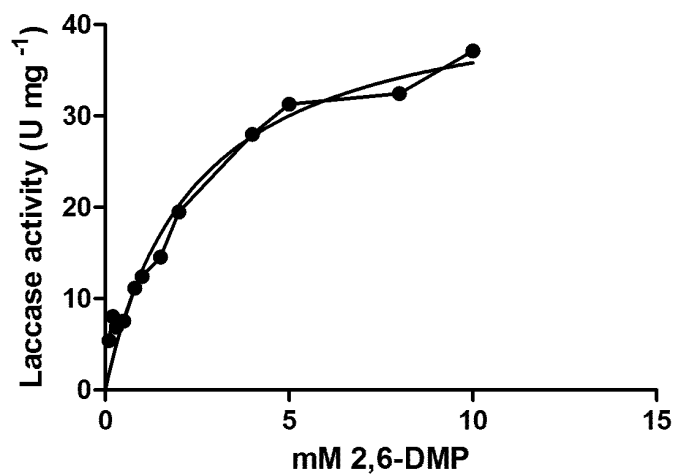
Από τα υποστρώματα που μελετήθηκαν η μικρότερη ενεργότητα ανιχνεύθηκε στη γουαϊακόλη, ενώ για την L-DOPA και τη 2,6 διμεθοξυφαινόλη υπολογίστηκε επίσης μικρή ενεργότητα. Στην πυρογαλλόλη, την κατεχόλη και την NNNN-τετραμεθυλ-φαινυλενεδιαμίνη το ένζυμο εμφανίζει μέση τιμή ενεργότητας που βέβαια είναι υψηλότερη στην πυρογαλλόλη και χαμηλότερη και από τα τρία, στην κατεχόλη. Σημαντικά υψηλότερη είναι η ενεργότητα του ενζύμου στο συνθετικό υπόστρωμα ABTS το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα αναφοράς για το βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου και αποτελεί χαρακτηριστικό υπόστρωμα για τις λακκάσες. Τέλος, ιδιαίτερα σημαντική και καινοτόμος είναι η συμπεριφορά της *MtLac2* έναντι του ασκορβικού οξέος, όπου η ενεργότητα του ενζύμου φάνηκε ιδιαίτερα υψηλή. Το ασκορβικό οξύ δεν αποτελεί ένα από τα τυπικά υποστρώματα των λακκασών, ωστόσο έχουν καταγραφεί περιπτώσεις λακκασών που οξειδώνουν το ασκορβικό οξύ (Mayer and Staples, 2002, Baldrian, 2005). Σε κάθε περίπτωση αυτή η ιδιότητα της, καθιστά τη *MtLac2* πολύ ιδιαίτερη.

3.3.2 Κινητική μελέτη δράσης της *MtLac2*

Για τις κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις οξείδωσης του συνθετικού υποστρώματος ABTS και της 2,6 διμέθοξυφαινόλης (2,6 DMP). Η προσαρμογή των δεδομένων των αντιδράσεων στην εξίσωση Michaelis-Menten και ο υπολογισμός των κινητικών σταθερών έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 της GraphPad Software. Ακολουθούν οι καμπύλες συσχέτισης της συγκέντρωσης υποστρώματος με την ενεργότητα της *MtLac2* για κάθε υπόστρωμα έτσι όπως προέκυψαν από την προσαρμογή τους στο μοντέλο Michaelis-Menten.



Εικόνα 3.2.2.1. Προσαρμογή των αποτελεσμάτων της μελέτης της κινητικής της *MtLac2* σε ABTS στην εξίσωση Michaelis-Menten.



Εικόνα 3.3.2.2. Προσαρμογή των αποτελεσμάτων της μελέτης της κινητικής της *MtLac2* σε 2,6-DMP στην εξίσωση Michaelis-Menten.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι υπολογισμένες κινητικές σταθερές που εξάγονται από τις καμπύλες, παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 3.3.2.

Πίνακας 3.3.2 Κινητικές σταθερές για τα υπό εξέταση υποστρώματα

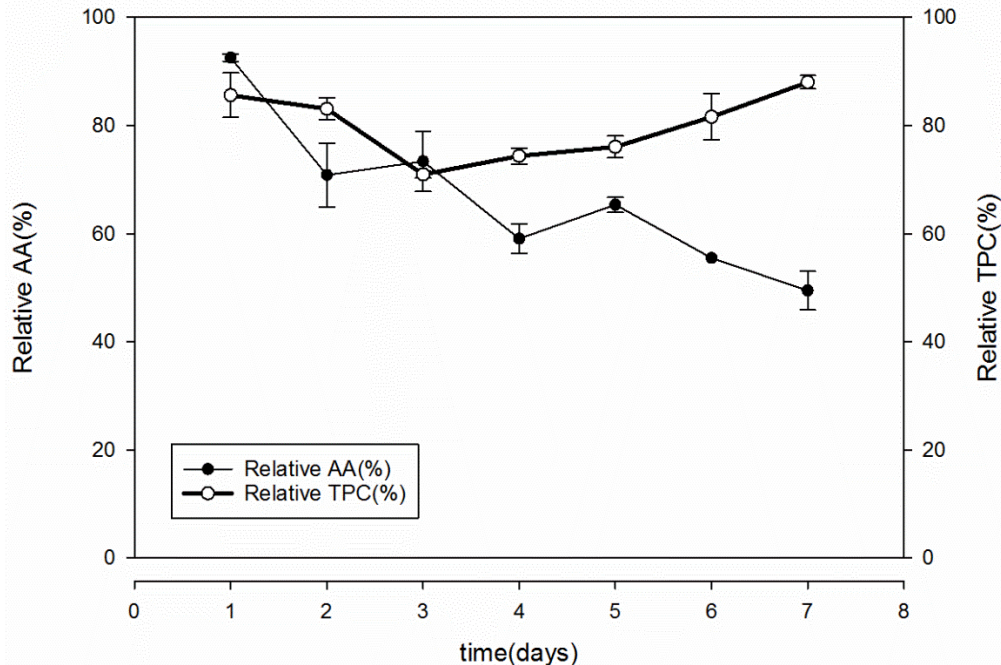
<i>Δομή</i>	<i>Υπόστρωμα</i>	<i>Σταθερές</i>		
		K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
	ABTS	2,37 ± 0,4	54,18 ± 3,5	22,9 ± 4,1
	2,6 DMP	2,41 ± 0,5	66,68 ± 4,8	27,7 ± 5,5

3.4 Χρήση της *MtLac2* σε εφαρμογές βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος

3.4.1 Δοκιμή αποτοξικοποίησης του επεξεργασμένου υγρού απόβλητου ελαιουργείου (ΥΑΕ) με χρήση της *MtLac2*

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η συγκεκριμένη *MtLac2* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές βιοεξυγίανσης αποβλήτων υψηλού φαινολικού φορτίου, πραγματοποιήθηκε δοκιμή αποτοξικοποίησης επεξεργασμένου ΥΑΕ, όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.12.1 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Καθώς η επεξεργασία του ΥΑΕ διήρκησε 7 ημέρες, οι συνθήκες επιλέχθηκαν με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και οι αντιδράσεις έγιναν στο βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου (pH=4) και σε θερμοκρασία 40°C όπου το ένζυμο είχε υψηλή ενεργότητα και ταυτοχρόνως ικανοποιητική σταθερότητα. Για να εκτιμηθεί η επίδραση της *MtLac2* στο επεξεργασμένο ΥΑΕ, προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό φορτίο (Total Phenolic Content) και η αντιοξειδωτική ικανότητα (Antioxidant Activity) του επεξεργασμένου αποβλήτου όπως περιγράφονται στις παραγράφους 2.2.12.1.1 και 2.2.12.1.2. και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 3.4.1.

Σημειώνεται πως τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστά της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του ολικού φαινολικού φορτίου της αντίδρασης ελέγχου στην το ένζυμο προστέθηκε απενεργοποιημένο.



Εικόνα 3.4.1. Μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του ολικού φαινολικού φορτίου του ΥΑΕ κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του με τη *MtLac2*. **TPC:** ολικό φαινολικό φορτίο (Total Phenolic Content). **AA:** αντιοξειδωτική ικανότητα (Antioxidant Activity)

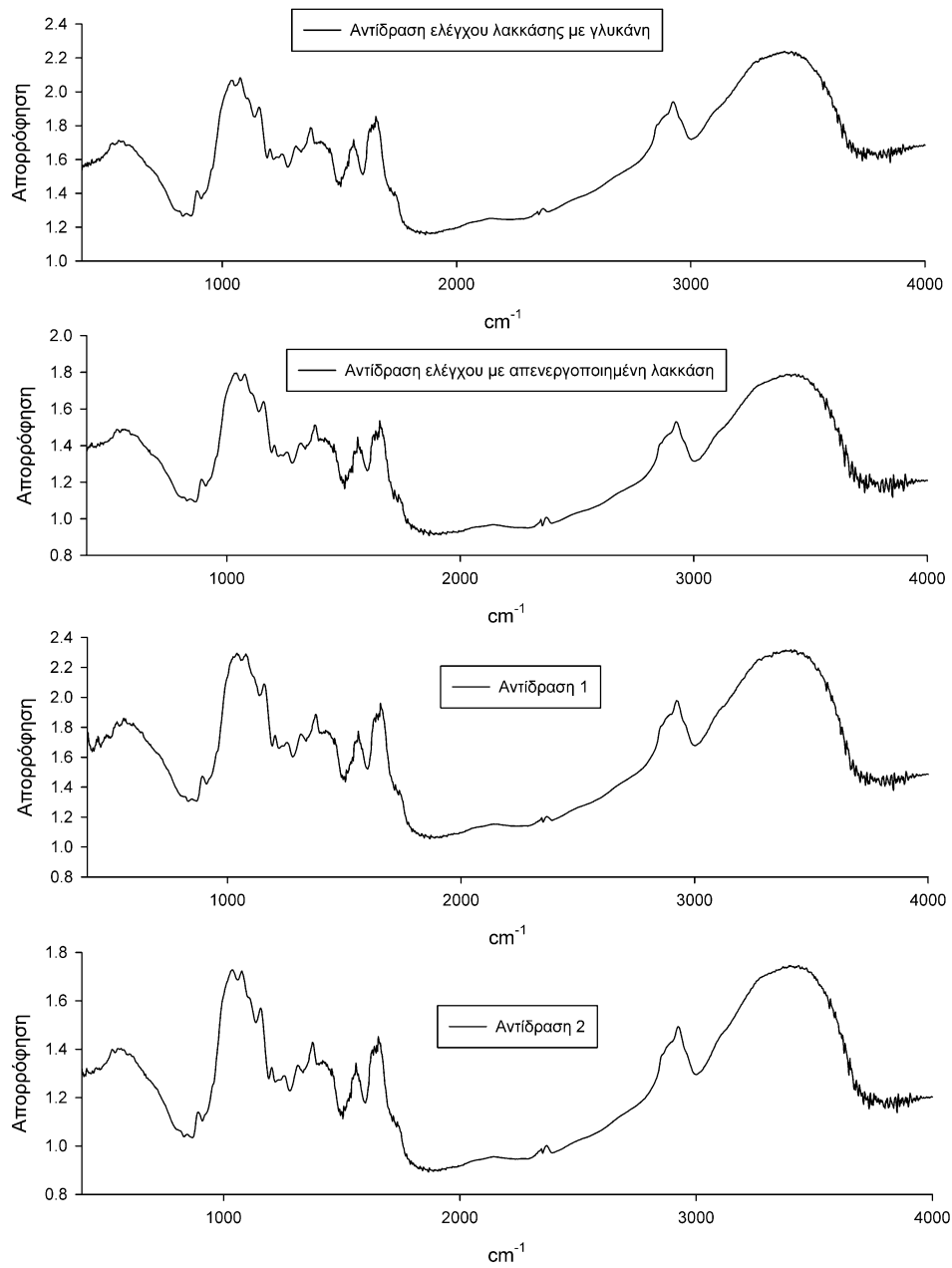
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την επεξεργασία του ΥΑΕ με τη *MtLac2* και παρουσιάζονται στην εικόνα 3.4.1, είναι διαφορετικά από τα επιθυμητά. Η δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας υποδεικνύει ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του αποβλήτου μειώνεται σταδιακά, ενώ το ολικό φαινολικό φορτίο δεν αλλάζει σημαντικά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το ένζυμο δεν κατάφερε να απομακρύνει τις φαινόλες του αποβλήτου, με αποτέλεσμα τη διατήρηση τους στα αρχικά επίπεδα. Παράλληλα, η οξείδωση των φαινολών του ΥΑΕ σε κινόνες μείωσε την αντιοξειδωτική ικανότητα του αποβλήτου. Συμπερασματικά, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο ένζυμο δεν επέφερε σημαντικές μεταβολές στο συγκεκριμένο απόβλητο, όμως αυτό δεν σημαίνει ότι αντενδείκνυται συνολικά για την επεξεργασία αποβλήτων.

3.4.2 Δοκιμή ενζυμικής τροποποίησης (grafting) εμπορικής γλυκάνης με χρήση της εμπορικής λακκάσης Novozym 51003 και της *MtLac2*

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η *MtLac2* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές τροποποίησης πολυμερών (grafting), πραγματοποιήθηκε αρχικά η δοκιμή τροποποίησης εμπορικής γλυκάνης καθαρότητας 49%, όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.12.2 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Όπως και στην περίπτωση του ΥΑΕ, οι συνθήκες επιλέχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα του βιοχημικού χαρακτηρισμού του ενζύμου και οι αντιδράσεις, που διήρκησαν 24 h, πραγματοποιήθηκαν στο βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου (pH=4) και σε θερμοκρασία 40 °C όπου το ένζυμο είχε υψηλή ενεργότητα και ταυτοχρόνως ικανοποιητική σταθερότητα. Επίσης, κρίθηκε σκόπιμο να συγκριθούν τα αποτελέσματα με την εμπορική λακκάση Novozym 51003. Για το εμπορικό ένζυμο η θερμοκρασία επώασης ήταν η ίδια και η αντίδραση έλαβε χώρα σε pH=6. Για να εκτιμηθεί η ικανότητα των ενζύμων να τροποποιήσουν τη δομή της γλυκάνης λήφθηκαν τα φάσματα FTIR των προϊόντων όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.12.2., τα οποία παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.4.2.1 και 3.4.2.2.

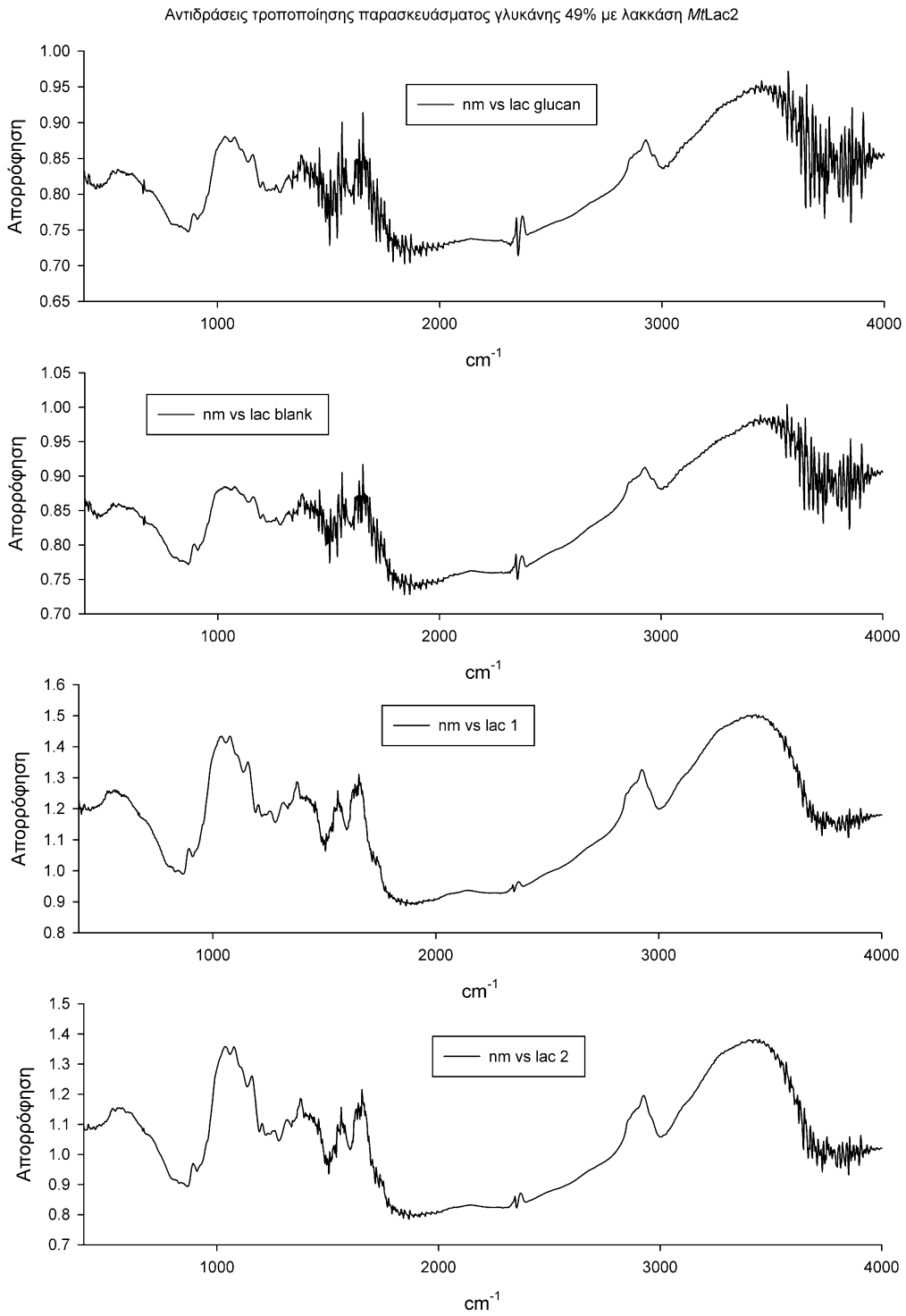
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αντιδράσεις τροποποίησης παρασκευάσματος γλυκάνης 49% με λακκάση Novozym 51003



Εικόνα 3.4.2.1. Δοκιμή τροποποίησης της γλυκάνης 49% με λακκάση Novozym 51003.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

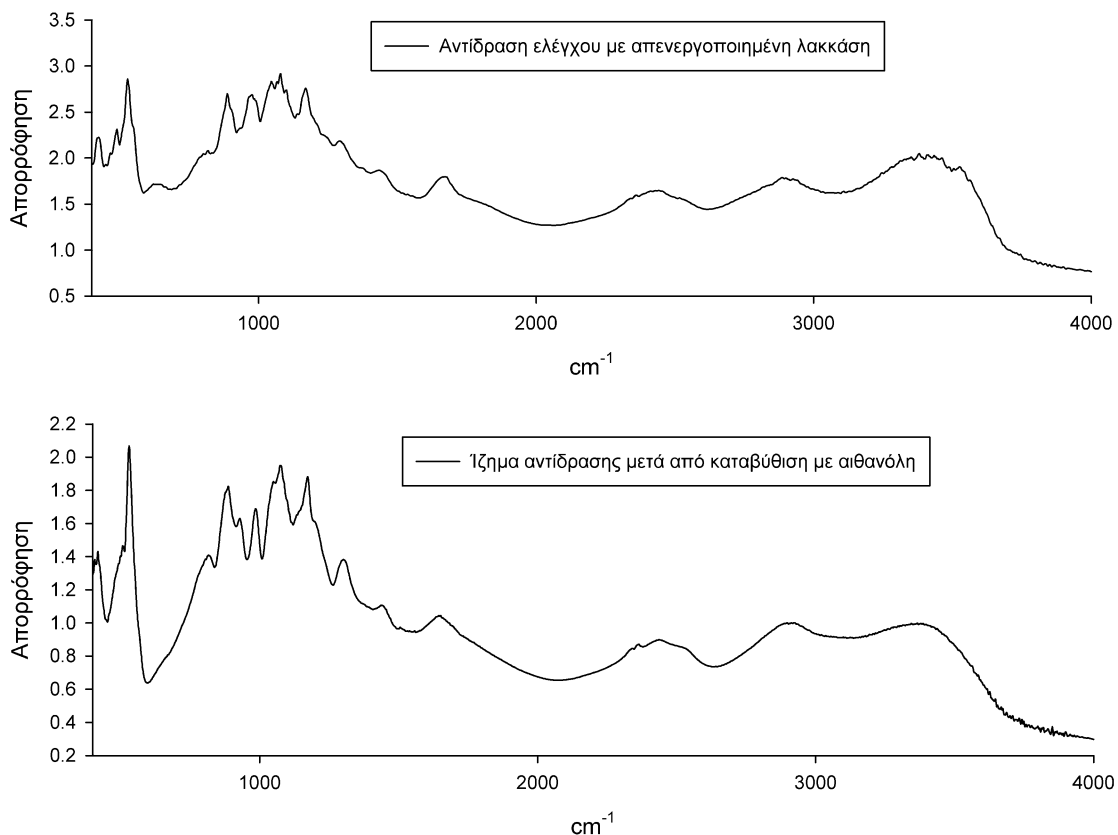


Εικόνα 3.4.2.2. Δοκιμή τροποποίησης της γλυκάνης 49% με την *MtLac2*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

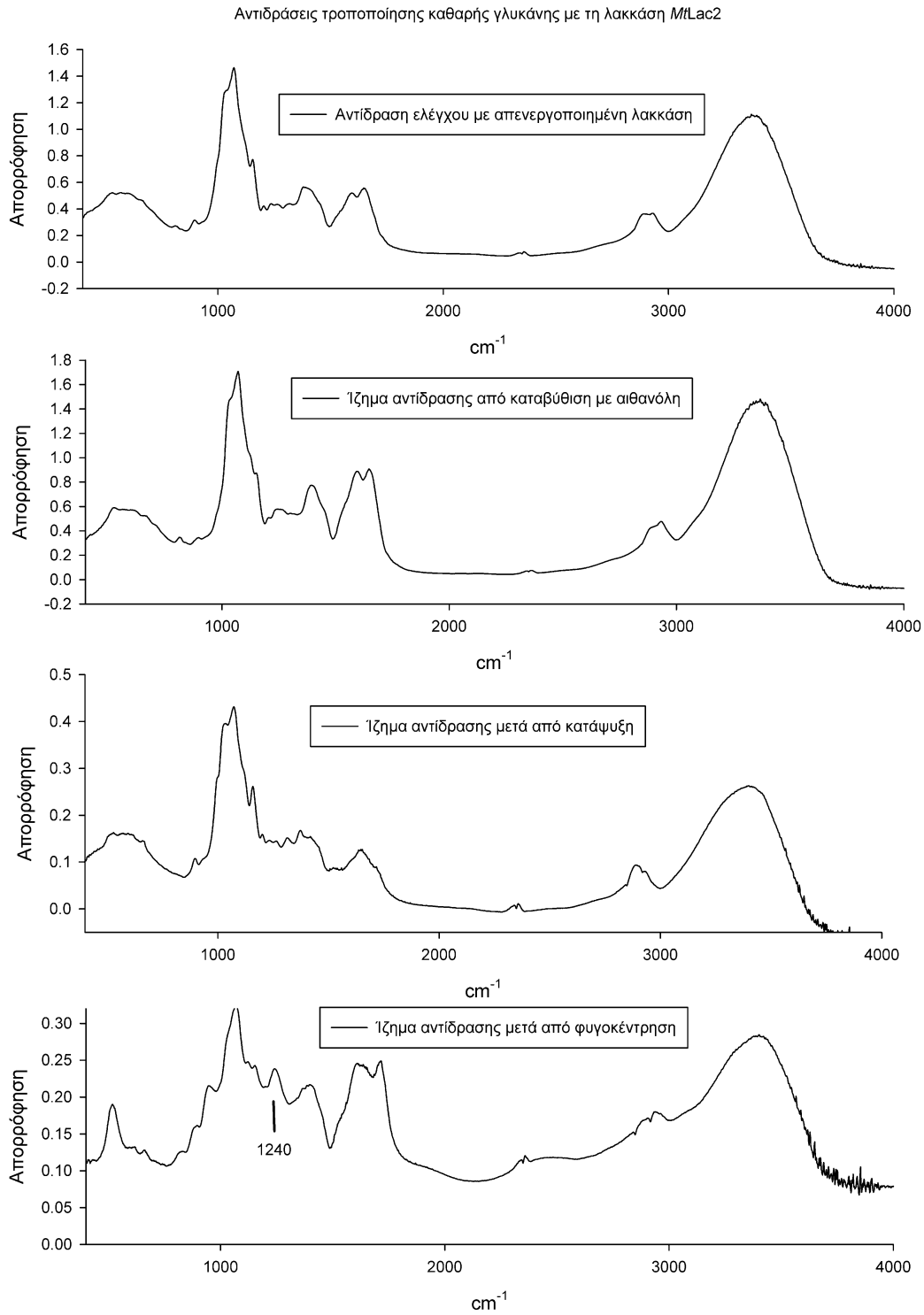
Από τις Εικόνες 3.4.2.1 και 3.4.2.2 φαίνεται ότι δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στο φάσμα πριν και μετά την επεξεργασία με την εμπορική λακκάση, αλλά ούτε και με την *MtLac2*. Ωστόσο, δεν μπορούσε να γίνει σαφές εάν η εικόνα αυτή σήμαινε αποτυχία των ενζύμων να τροποποιήσουν τη γλυκάνη ή εάν οι προσμίξεις του εμπορικού σκευάσματος γλυκάνης χαμηλής καθαρότητας που αποτυπώνονταν στα φάσματα, αλλοίωσαν το αποτέλεσμα της αντίδρασης. Το αποτέλεσμα αυτό στάθηκε ως έναυσμα για την επανάληψη του πειράματος με δύο διαφοροποιήσεις: τη χρήση εμπορικής γλυκάνης υψηλής καθαρότητας (99%) και την διάλυση της γλυκάνης με κατάλληλο πρωτόκολλο ώστε να μεγιστοποιηθεί η προσβασιμότητα του ενζύμου στο πολυσακχαρικό μακρομόριο. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.2.12.2 και τα φάσματα FTIR που προέκυψαν παρατίθενται στις Εικόνες 3.4.2.3 και 3.4.2.4.

Αντιδράσεις τροποποίησης καθαρής γλυκάνης με την εμπορική λακκάση Novozym 51003



Εικόνα 3.4.2.3. Δοκιμή τροποποίησης της γλυκάνης 99% με λακκάση Novozym 51003.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



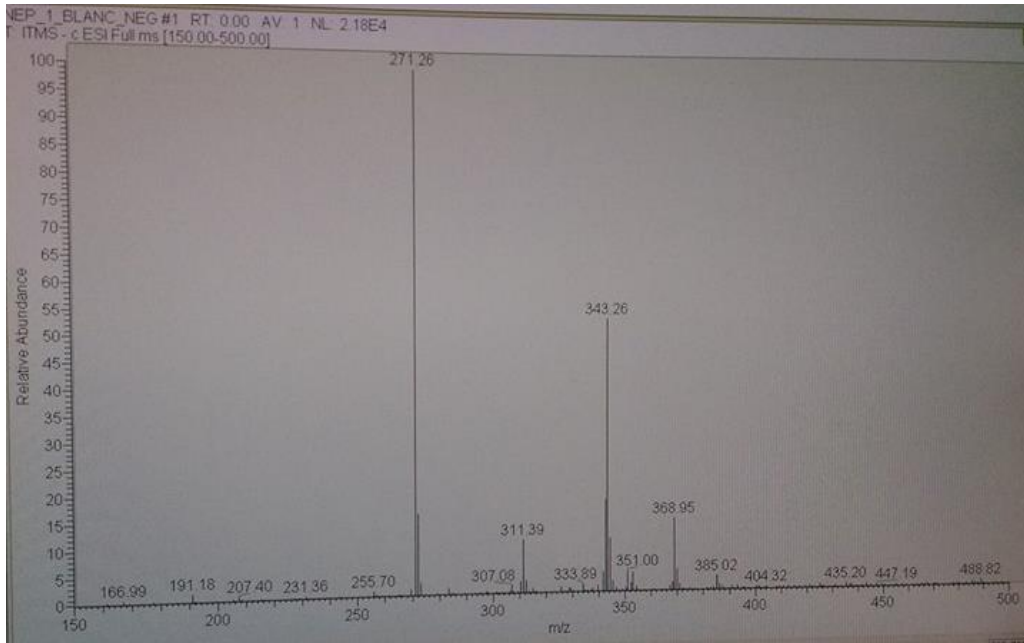
Εικόνα 3.4.2.4. Δοκιμή τροποποίησης της γλυκάνης 99% με Mtlac2.

Από τις Εικόνες 3.4.2.3 και 3.4.2.4 φαίνεται ότι δεν υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στο φάσμα πριν και μετά την επεξεργασία με την εμπορική λακκάση. Στην περίπτωση της *MtLac2* επίσης δε διακρίνεται μεγάλη διαφορά ανάμεσα στα φάσματα που παρουσιάζονται. Τη μόνη εξαίρεση αποτελεί το φάσμα του του στερεού προϊόντος που απομονώθηκε με φυγοκέντρηση αμέσως μετά την αντίδραση. Πρέπει να σημειωθεί ότι μόνο του το γεγονός ότι η διαλυμένη γλυκάνη μετά την αντίδραση με την *MtLac2* έχει στερεό προϊόν μπορεί να θεωρηθεί ελπιδοφόρα ένδειξη, η οποία ενισχύεται από το φάσμα όπου εμφανίζεται μια κορυφή στα 1240 cm^{-1} . Η κορυφή αυτή μπορεί να οφείλεται σε δεσμό C-O οξέος. Ωστόσο, πρέπει να υπογραμμιστεί ότι η εικόνα αυτή αποτελεί μόνο μια ένδειξη ότι μπορεί να υπάρχει κάποια μεταβολή στη δομή του πολυσακχαριτικού μακρομορίου καθώς δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση το καφεϊκό οξύ να έχει προσροφηθεί στη γλυκάνη. Ακόμη, πρέπει να υπογραμμισθεί ότι η ποσότητα του στερεού προϊόντος που απομονώθηκε με φυγοκέντρηση ήταν πάρα πολύ μικρή με αποτέλεσμα το φάσμα να έχει πολύ χαμηλές απορροφήσεις, γεγονός που κλονίζει την αξιοπιστία του.

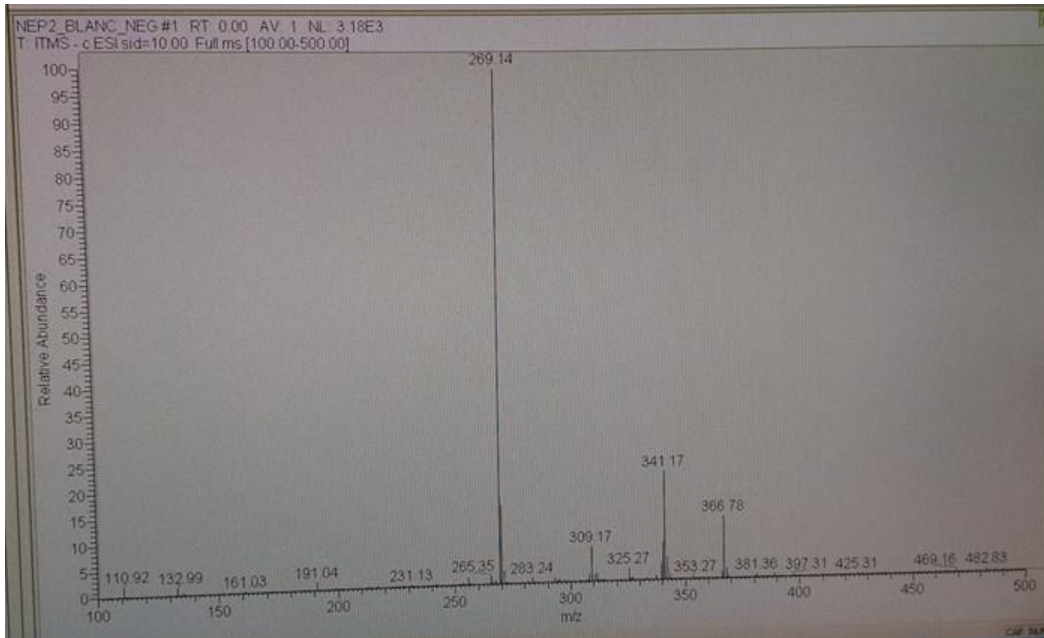
3.4.3 Δοκιμή βιοσύνθεσης σουλφουρετίνης από βουτεΐνη με τη χρήση της *MtLac2*

Από τα αποτελέσματα του βιοχημικού χαρακτηρισμού κρίθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί αν η *MtLac2* θα μπορούσε να εφαρμοστεί στον τομέα της οργανικής σύνθεσης. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε δοκιμή βιοσύνθεσης σουλφουρετίνης από βουτεΐνη με τη χρήση της *MtLac2* όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.12.3 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Όπως και στις παραπάνω εφαρμογές, η αντίδραση, που διήρκησε 24 ώρες, πραγματοποιήθηκε σε pH=4 και σε θερμοκρασία $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η αντίδραση είχε στερεό προϊόν το οποίο διαλυτοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.12.3 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι και στη συνέχεια λήφθηκε φάσμα MS το οποίο παρουσιάζεται στις Εικόνες 3.4.3.1, 3.4.3.2 και 3.4.3.3.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

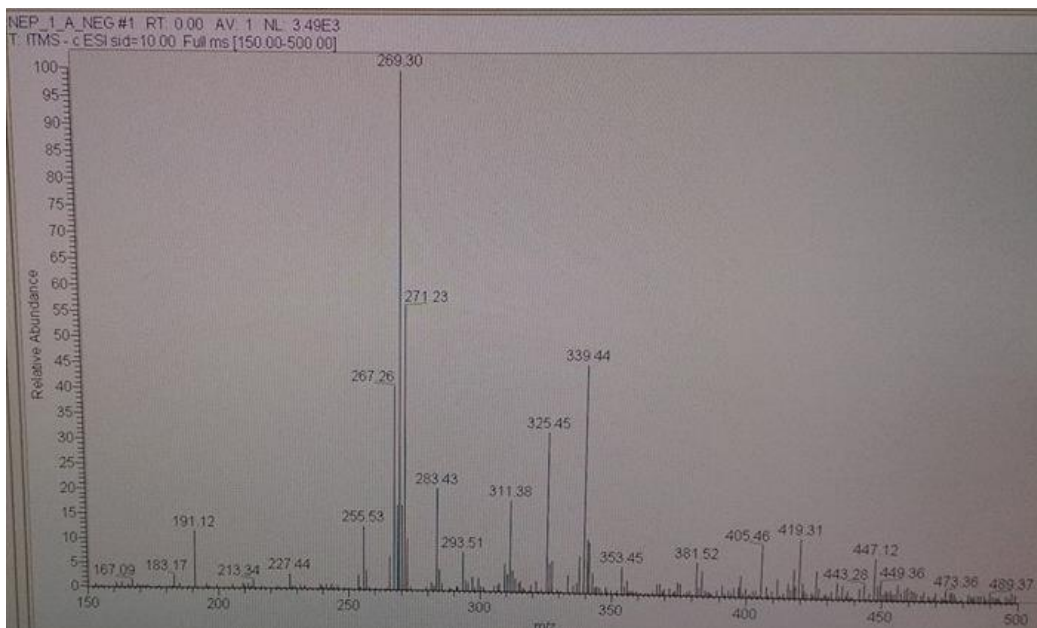


Εικόνα 3.4.3.1. Φάσμα MS της βουτεΐνης με απενεργοποιημένο ένζυμο (αρνητικό)



Εικόνα 3.4.3.2. Φάσμα MS της σουλφουρετίνης με απενεργοποιημένο ένζυμο (αρνητικό)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 3.4.3.3. Φάσμα MS του προϊόντος της αντίδρασης της βουτεΐνης με την *MtLac2* (αρνητικό)

Το ακριβές μοριακό βάρος της βουτεΐνης είναι 272,25 και της σουλφουρεΐνης 270,24. Στο παραπάνω φάσμα MS της βουτεΐνης το ιόν βάσης εμφανίζεται σε $m/z = 271,26$. Αντίστοιχα, το ιόν βάσης της σουλφουρεΐνης εμφανίζεται σε $m/z = 269,14$. Από την Εικόνα 3.4.3.3, που αναφέρεται στο προϊόν της αντίδρασης προκύπτει ότι το ιόν βάσης εμφανίζεται σε $m/z=269,30$ ενώ εμφανίζεται και η κορυφή που αναφέρεται στη βουτεΐνη σε $m/z= 271$. Η κορυφή $m/z= 269$ που εμφανίζεται στο φάσμα του στερεού προϊόντος της αντίδρασης θα μπορούσε να αποδοθεί στη σουλφουρεΐνη, με βάση το φάσμα αναφοράς της Εικόνας 3.4.3.2. Ακόμα, και η κορυφή $m/z= 267,26$ θα μπορούσε να οφείλεται στη σουλφουρεΐνη ως θυγατρική κορυφή που προέκυψε από απώλεια H_2 . Το αποτέλεσμα της φασματογραφίας μάζας είναι σημαντική ένδειξη ότι η *MtLac2* κατάφερε να οξειδώσει το OH της βουτεΐνης και οδήγησε στην σύνθεση σουλφουρεΐνης ως προϊόν οξειδωτικής κυκλοποίησης της βουτεΐνης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Βελτιστοποίηση της παραγωγής της *MtLac2* από το ζυμομύκητα *P.pastoris*

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας επιχειρήθηκε να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες καλλιέργειας του μεθυλότροφου ζυμομύκητα *P. pastoris* ώστε να αυξηθεί η παραγωγή της *MtLacII*. Γενικά, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι κατά την ετερόλογη έκφραση μιας πρωτεΐνης πρέπει να αναπτύσσεται συγκεκριμένη στρατηγική διαδικασία που είναι προσαρμοσμένη στο επιθυμητό προϊόν, στο φορέα έκφρασης και στα ειδικά χαρακτηριστικά του βιοαντιδραστήρα, σε περιπτώσεις καλλιέργειών μεγάλης κλίμακας. Στα πλαίσια της προσπάθειας προσαρμογής των χαρακτηριστικών της καλλιέργειας, έχουν διατυπωθεί στρατηγικές με σκοπό την ενίσχυση της παραγωγής επιθυμητών προϊόντων μεταβολισμού του *P. pastoris* (Looser, 2014). Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκαν η συγκέντρωση μεθανόλης και χαλκού στην καλλιέργεια και η θερμοκρασία επώασης με σκοπό την ενίσχυση της παραγωγής της *MtLac2*. Η επίδραση που ασκεί η κάθε παράμετρος στην παραγωγή του ενζύμου ελέγχθηκε διατηρώντας όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους του πειράματος σταθερές.

Από τα αποτελέσματα που αφορούν στη συγκέντρωση μεθανόλης, η βέλτιστη συγκέντρωση βρέθηκε η 1,0% v/v η οποία αύξησε την παραγωγή σε ένζυμο από 90,7 U/l στα 122,7 U/l δηλαδή κατά 35,5% σε σχέση με το αρχικό πρωτόκολλο. Μάλιστα πρέπει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση αυτή αναχάιτισε ελαφρώς την ανάπτυξη του ζυμομύκητα, ο οποίος παρουσίασε βέλτιστη ανάπτυξη στη συγκέντρωση 0,5% v/v, όμως επιτεύχθη ο στόχος της μέγιστης παραγωγής ενζύμου. Σε πρόσφατη ερευνητική εργασία, η μελέτη επίδρασης της μεθανόλης στην παραγωγή ανασυνδυασμένης β-ξυλοζιδάσης του *S. ruminantium* στο ζυμομύκητα *P. pastoris* έδειξε ότι με συγκέντρωση 1,0% v/v στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας επιτεύχθηκε η μέγιστη παραγωγή ενζύμου (Dehnavi, 2016).

Στη συνέχεια, διατηρώντας τη βέλτιστη συγκέντρωση μεθανόλης 1,0% v/v ελέγχθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του χαλκού σε εύρος συγκεντρώσεων 0-0,8 mM. Αυτή η παράμετρος παρουσίασε τη μεγαλύτερη επίδραση στην παραγωγή του ενζύμου καθώς μετά την πραγματοποίηση και των δύο πειραμάτων προκύπτει ότι με τη βέλτιστη συγκέντρωση χαλκού, η οποία είναι 0,025 mM, επιτεύχθηκε επιπλέον αύξηση στην παραγωγή του ενζύμου κατά 125%. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης απουσία χαλκού είναι πρακτικά μηδενικά. Η ύπαρξη χαλκού στο θρεπτικό μέσο είναι πολύ σημαντική καθώς, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η καταλυτική δράση της λακκάσης βασίζεται στα τέσσερα άτομα χαλκού όπου πραγματοποιείται η εσωτερική μεταφορά ηλεκτρονίων και δομούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Γενικά, έχει επιχειρηθεί η βελτιστοποίηση της εξωκυτταρικής δραστηριότητας λακκασών με προσθήκη θεικού χαλκού στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας του ζυμομύκητα *P. pastoris*. Η ανασυνδυασμένη λακκάση του μύκητα *C. bulleri* παράχθηκε στον *P. pastoris* σε επίπεδο 600-720 U/L απουσία χαλκού ενώ μετά από μελέτη επίδρασης της συγκέντρωσης του χαλκού στο μέσο καλλιέργειας διαπιστώθηκε ότι σε συγκέντρωση 0,4mM CuSO_4 επιτυγχάνεται πολλαπλάσια ενεργότητα 7200 U/L (Garg, 2012).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της θερμοκρασίας στις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα. Από το έλεγχο θερμοκρασίας διαπιστώθηκε ότι στους 30°C επιτυγχάνεται η βέλτιστη ανάπτυξη του ζυμομύκητα και μέγιστη παραγωγή σε *MtLac2*. Είναι σύνηθες η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού να ταυτίζεται με τη μέγιστη παραγωγή ενζύμων. Ωστόσο η παραγωγή λειτουργικών ενζύμων εξαρτάται από τη θερμοκρασία με πολλούς τρόπους. Η χαμηλότερη θερμοκρασία στο περιβάλλον της καλλιέργειας σε κάποιες περιπτώσεις αυξάνει τη σταθερότητα των ενζύμων. Ακόμα, η διατήρηση της θερμοκρασίας σε χαμηλά επίπεδα θα μπορούσε να επιβραδύνει τη δράση των πρωτεασών με αποτέλεσμα μεγαλύτερη παραγωγή λειτουργικού ενζύμου. Συμπερασματικά, είναι προφανές ότι η θερμοκρασία του μέσου καλλιέργειας επιδρά ποικιλοτρόπως στην παραγωγή του ενζύμου και επομένως είναι σκόπιμη η διαδικασία βελτιστοποίησης, ακόμη και αν στην παρούσα εργασία δεν επιτεύχθηκε αύξηση της παραγωγής της *MtLac2* αφού πρόκειται για τη θερμοκρασία επώασης που είχε επιλεγεί εξ αρχής.

4.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της *MtLac2*

4.2.1 Μοριακό βάρος και ισοηλεκτρικό σημείο της *MtLac2*

Το θεωρητικό μοριακό βάρος της *MtLac2* έτσι όπως προκύπτει από επεξεργασία της αλληλουχίας του γονιδίου (<http://genome.jgi.doe.gov/cgi-bin/dispGeneModel?db=Spoth2&id=2063133>) με βιοπληροφορικά εργαλεία είναι 72 kDa και το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο αντίστοιχα εκτιμάται στην τιμή 5,23 (http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool). Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, το εύρος μοριακών βαρών 50-70 kDa θεωρείται συνηθισμένο με βάση τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από χαρακτηρισμένες λακκάσες, ενώ το ισοηλεκτρικό σημείο συνήθως βρίσκεται κοντά στην τιμή pH=4 (Baldrian, 2005). Από την εικόνα 3.2.1α προκύπτει ότι το δείγμα που εξετάζεται περιέχει δύο πρωτεϊνικά μόρια. Το ένα μόριο έχει μοριακό βάρος 80 kDa το οποίο βρίσκεται κοντά στη θεωρητική τιμή, ενώ υπάρχει ένα ακόμη μόριο το οποίο έχει μοριακό βάρος 110 kDa, δηλαδή αρκετά μεγαλύτερο από το αναμενόμενο. Επίσης στην εικόνα 3.2.1β φαίνεται ότι και τα δύο πρωτεϊνικά μόρια εμφανίζουν ενεργότητα στο συνθετικό υπόστρωμα ABTS, που είναι χαρακτηριστικό υπόστρωμα δράσης των λακκασών. Τέλος, το ισοηλεκτρικό σημείο προσδιορίστηκε κοντά στην τιμή 4 (εικόνα 3.2.2) η οποία αποτελεί τυπική τιμή ισοηλεκτρικού σημείου για τις λακκάσες, και η απόκλιση της σε σχέση με τη θεωρητική τιμή 5,23 είναι συνήθης σε πειράματα προσδιορισμού του ισοηλεκτρικού σημείου.

Από τον ασκομύκητα *M. thermophila* έχει επίσης εκφραστεί ετερόλογα μια ακόμη λακκάση σε φορείς έκφρασης τον *A. oryzae* (Berka et al, 1998) και τον ζυμομύκητα *S. Cerevisiae* (Bulter et al, 2003). Τα αποτελέσματα αυτών των ανασυνδυασμένων ενζύμων και η απόκλισή τους από τα θεωρητικά κινούνται σε κοινό πλαίσιο με τα εξεταζόμενα πειραματικά αποτελέσματα. Το μοριακό βάρος της ανασυνδυασμένης λακκάσης από τον *A.oryzae* που προσδιορίστηκε με SDS-PAGE μετά από επώαση του ενζύμου με N-γλυκοζιδάση είχε μοριακό βάρος 73 kDa και το ισοηλεκτρικό σημείο προσδιορίστηκε στην τιμή 4.2 (Berka et al, 1998). Αντίστοιχα, το μοριακό βάρος της ανασυνδυασμένης λακκάσης που εκφράστηκε σε *S. cerevisiae* προσδιορίστηκε με

SDS-PAGE στα 110 kDa, ενώ το ένζυμο που παράχθηκε χωρίς να έχει γλυκοζυλιωθεί στο N-άκρο του, είχε μοριακό βάρος 80 kDa. (Bulter et al, 2003).

Έχει ιδιαίτερη σημασία να σχολιασθεί η παρουσία περισσότερων της μιας ζώνης στην πηκτή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE. Λαμβάνοντας υπόψη ότι και τα δύο πρωτεϊνικά μόρια εμφανίζουν ενεργότητα λακκάσης, είναι πιθανή η έκφραση ισομορφών της ανασυνδυασμένης λακκάσης που οφείλονται σε διαφορετικά πρότυπα γλυκοζυλίωσης από το ενδοκυτταρικό σύστημα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της *P. pastoris*. Η υπόθεση ότι τα δύο πρωτεϊνικά μόρια είναι αποτέλεσμα διαφοροποιημένης γλυκοζυλίωσης του ίδιου ενζύμου ενισχύεται από το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης ισοηλεκτρικής εστίασης αφού το ισοηλεκτρικό τους σημείο είναι κοινό. Η πέψη του ενζύμου με την N-γλυκοζιδάση EndoH είχε σκοπό να απομακρύνει τις υδατανθρακικές μονάδες που ενδεχομένως βρίσκονταν στις θέσεις N-γλυκοζυλίωσης. Στην εικόνα 3.2.1α φαίνεται ότι το μοριακό βάρος του ενζύμου δε μεταβάλλεται αισθητά πριν και μετά την πέψη με την *EndoH* και συμπεραίνεται πως η ύπαρξη των δύο διαφορετικού μοριακού βάρους *MtLac2* δεν οφείλεται σε N-γλυκοζυλίωση κατά την ετερόλογη έκφρασή τους από το ζυμομύκητα *P. pastoris*. Ωστόσο, αυτή η διαπίστωση δεν απορρίπτει την υπόθεση για διαφορετικά πρότυπα γλυκοζυλίωσης καθώς το ένζυμο θα μπορούσε να έχει υποστεί O-γλυκοζυλίωση, όπου η χρήση της *EndoH* δεν επιτυγχάνει την απομάκρυνση των υδατανθρακικών του αλυσίδων. Μάλιστα, μετά από επεξεργασία της αλληλουχίας του γονιδίου με ειδικά βιοπληροφορικά εργαλεία προκύπτει ότι στο πρωτεϊνικό μόριο υπάρχει μία προβλεπόμενη θέση N-γλυκοζυλίωσης (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) ενώ υπάρχουν 8 θέσεις O-γλυκοζυλίωσης (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). Επομένως, είναι ενισχυμένη η πιθανότητα η μεγάλη αύξηση του μοριακού βάρους της *MtLac2* να οφείλεται σε O-γλυκοζυλίωση.

4.2.2 Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης και θερμική σταθερότητα της *MtLac2*

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της *MtLac2* είναι οι 50°C, θερμοκρασία στην οποία το ένζυμο παρουσιάζει ικανοποιητική σταθερότητα, διατηρώντας την ενεργότητα του σε επίπεδα της τάξης του 60% μετά από εικοσιτετράωρη επώαση. Βέβαια, όπως είναι αναμενόμενο, η βέλτιστη θερμική σταθερότητα παρατηρείται στις χαμηλότερες θερμοκρασίες που εξετάστηκαν, 30 και 40°C, όπου η ενεργότητα διατηρείται μέχρι και 70%.

Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, τα προφίλ θερμοκρασίας της δραστηριότητας των λιγνολυτικών εξωκυτταρικών ενζύμων, όπως είναι οι λακκάσες, εκφράζουν βέλτιστη συμπεριφορά στο θερμοκρασιακό εύρος 50°-70°C (Baldrian, 2005). Επομένως, το προφίλ θερμοκρασίας δραστηριότητας της *MtLac2* μπορεί να χαρακτηριστεί ως τυπικό για τις λακκάσες. Ωστόσο, υπάρχουν και εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα, όπως είναι η λακκάση του *M. grisea* (Iyer and Chattoo, 2003) η οποία εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 30°C και η λακκάση του *P. ostreatus POXA2* που παρουσίασε βέλτιστο για το εύρος 25-35°C, ή οι λακκάσες που απομονώθηκαν *M. quercophilus* και τον *T. gallica* που παρουσίασαν βέλτιστο ενεργότητας στους 80°C και τους 70°C αντίστοιχα (Baldrian, 2005).

Ωστόσο, η θερμική σταθερότητα του ενζύμου συνήθως είναι σημαντικότερη για την επιλογή της θερμοκρασίας κατάλυσης, όπως συνέβη και στις εφαρμογές της παρούσας εργασίας. Οι λακκάσες παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές στη θερμική τους σταθερότητα, με αποτέλεσμα να έχουν χρόνους ημιζωής από λίγα λεπτά έως ημέρες. Η πρώτη λακκάση του *M. thermophila* όταν εκφράστηκε στον *A. oryzae* παρουσίασε μικρότερη θερμοσταθερότητα καθώς στις 17 ώρες στους 50°C το ένζυμο έχει αποσταθεροποιηθεί πλήρως με αποτέλεσμα να μην έχει ενεργότητα (Berka et al, 1998), σε αντίθεση με την *MtLac2* η οποία όπως αναφέρθηκε, μετά από 24 ώρες, δηλαδή σημαντικά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα εξέτασης, διατηρεί το 60% της ενεργότητας. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η εικόνα είναι ανάλογη, δηλαδή η *MtLac2* παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα από τη λακκάση του *A. Oryzae*. Το ίδιο ένζυμο εκφρασμένο σε *S. cerevisiae* επίσης είναι ανενεργό στους 50°C μετά από 24 ώρες επώασης (Bulter et al, 2003). Το ενδιαφέρον για θερμοσταθερά ένζυμα αυξάνεται συνεχώς, με αποτέλεσμα την απομόνωση ενζύμων από θερμοφίλους μικροοργανισμούς, χωρίς όμως να επιβεβαιώνεται πάντα ότι η θερμοσταθερότητα ενός ενζύμου συνδέεται με τις συνθήκες ανάπτυξης του οργανισμού από τον οποίο προέρχεται (Baldrian, 2005). Ακόμη τα αποτελέσματα που αφορούν στη θερμική σταθερότητα της *MtLac2* είναι πολύ καλύτερα από ένζυμα που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από άλλους ασκομύκητες, όπως τον *T. atroviride*, η λακκάση του οποίου μετά από 24 ώρες επώασης απενεργοποιήθηκε πλήρως στους 50 και 60°C, ενώ για τους 40°C διατήρησε σχεδόν το 30% της ενεργότητας της, σε αντίθεση με την *MtLac2* που διατηρεί το 70% της ενεργότητάς της (Chakroun, 2010).

4.2.3 Βέλτιστο pH δράσης και σταθερότητα στη διακύμανση του pH της *MtLac2*

Το προφίλ δραστηριότητας του ενζύμου, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, υποδεικνύει ότι το ένζυμο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στη διακύμανση του pH. Ως βέλτιστο pH προσδιορίστηκε η τιμή pH=4 με βάση το πρώτο ρυθμιστικό σύστημα, ενώ με βάση το ρυθμιστικό σύστημα Britton-Robinson το βέλτιστο pH είναι αυτό που έχει τιμή pH=3,5. Πολύ σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η λακκάση παρουσιάζει κατακόρυφη πτώση της ενεργότητας όταν το pH της αντίδρασης δε βρίσκεται εντός του εύρους 3-4,5, πράγμα που αποτελεί σημαντικό παράγοντα περιορισμού για τη χρήση του ενζύμου σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Ωστόσο, είναι σύνηθες οι λακκάσες να δρουν βέλτιστα σε όξινο περιβάλλον και η αύξηση του pH να παρεμποδίζει το ένζυμο, καθώς σε υψηλό pH τα υδροξύλια σχηματίζουν δεσμούς με τους χαλκούς τύπου II και III με αποτέλεσμα να διακόπτεται η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των χαλκών της λακκάσης (Munoz et al., 1997).

Ακόμη, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι το βέλτιστο pH δράσης εξαρτάται από το υπόστρωμα το οποίο χρησιμοποιείται κατά την δοκιμή ενεργότητας. Για αυτό το λόγο, στη σύγκριση βέλτιστου pH μεταξύ ενζύμων είναι σημαντικό οι δοκιμές ενεργότητας να έχουν γίνει με το ίδιο υπόστρωμα. Η πρώτη λακκάση του *M. thermophila* όταν εκφράστηκε στον *A. oryzae* παρουσίασε βέλτιστη τιμή ενεργότητας στο συνθετικό υπόστρωμα ABTS για τη μικρότερη μελετώμενη τιμή pH=2.7. Γενικά, στις χαρακτηρισμένες μυκητιακές λακκάσες, η βέλτιστη τιμή pH κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 2-4.5 (Baldrian, 2005) και στον *P. ribis* έχει καταγραφεί βέλτιστο pH=5 (Min et al, 2001).

Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και για τη θερμοκρασία, η σταθερότητα σε pH είναι πολύ σημαντική για την επιλογή των συνθηκών του περιβάλλοντος κατάλυσης. Στη βιβλιογραφία, με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που αφορούν λακκάσες αναφέρεται ότι οι λακκάσες είναι πιο σταθερές σε όξινα pH, ωστόσο υπάρχουν εξαιρέσεις. Για παράδειγμα, οι θερμοσταθερές λακκάσες που απομονώθηκαν από το μύκητα λευκής σήψης *P. sanguineus*, έδειξαν ότι αυξανόμενου του pH η σταθερότητα των ενζύμων αυξανόταν και σε τιμές 7 και 8 η ενεργότητα έπειτα από 24 ώρες ήταν της τάξης του 100%, όπως συμβαίνει με τη *MtLac2* (Ramírez-Cavazos et al., 2014).

4.2.4 Παρεμπόδιση της δράσης της *MtLac2*

Η παρουσία οργανικών διαλυτών σε συγκέντρωση 10% μείωσε τη δραστηριότητα της *MtLac2*. Συγκεκριμένα, οι διαλύτες DMSO και ακετόνη προκάλεσαν την υψηλότερη αναστολή (~50%), ενώ η μεθανόλη και η αιθανόλη μείωσαν την ενεργότητα του ενζύμου κατά 20-25%. Η αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης και μεθανόλης στο 50% μείωσε σημαντικά την ενεργότητα της *MtLac2*. Η παρεμποδιστική δράση των οργανικών διαλυτών οφείλεται στην αλλαγή που επιφέρουν στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης καθώς η παρουσία οργανικού διαλύτη ειδικά σε υψηλές συγκεντρώσεις συνδέεται με απώλεια νερού από τη δομή της πρωτεΐνης και διείδυση του διαλύτη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί σε πολλές λακκάσες, όπως η ανασυνδυασμένη καινοτόμος λακκάση από τον *B. amyloliquefaciens* που εξετάστηκε για τους ίδιους διαλύτες και έδειξε παρόμοια συμπεριφορά αλλά μικρότερη ανθεκτικότητα (Chen et al., 2015).

Το αζίδιο του νατρίου είναι πολύ συνηθισμένος παρεμποδιστής της δράσης των λακκασών και έχει μελετηθεί σε πολλές ερευνητικές εργασίες. Η παρεμποδιστική του δράση οφείλεται στην ιδιότητά του να δεσμεύεται από τα κέντρα χαλκού, διακόπτοντας την εσωτερική μεταφορά ηλεκτρονίων και καθιστώντας το ένζυμο μη λειτουργικό. Το αζίδιο του νατρίου παρεμποδίζει πολύ έντονα την δράση της *MtLac2* από πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, όπως στην περίπτωση της λακκάσης του *T. versicolor* που για συγκέντρωση 0,1 mM NaN_3 παρατηρήθηκε πλήρης παρεμπόδιση στη δράση της λακκάσης στο συνθετικό υπόστρωμα ABTS, ενώ για συγκέντρωση 0,01 mM, η παρεμπόδιση αγγίζει το 90% (Johannes et al., 2000). Το αζίδιο του νατρίου είναι ο ισχυρότερος παρεμποδιστής της *MtLac2*, η οποία όμως παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από εκείνη του *T. versicolor*, καθώς υπάρχει ποσοστό 10% εναπομένουσας ενεργότητας για συγκέντρωση του αζιδίου 0,1 mM ενώ για συγκέντρωση 0,01 mM η παρεμπόδιση είναι της τάξης του 50%. Ακόμη, η *MtLac2* φαίνεται να παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα και στο EDTA καθώς σε συγκέντρωση 1 mM η παρεμπόδιση είναι μικρότερη από 20%. Συνήθως η παρεμπόδιση από αυτό το χειλικό παράγοντα είναι ισχυρότερη στις λακκάσες όπως στην περίπτωση της ανασυνδυασμένης λακκάσης του ασκομύκητα *B. aclada* που όταν εκφράστηκε σε *P. pastoris* η σχετική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία 1 mM EDTA ήταν 6,8% (Kittel et al., 2012). Το SDS παρουσίασε την πιο έντονη μεταβολή δραστηριότητας με την αύξηση της συγκέντρωσης, καθώς αυξάνοντας τη συγκέντρωση από 0,1 mM σε 1 mM η παρεμπόδιση έγινε από 20% σχεδόν πλήρης.

Το SDS αποτελεί αποδιατακτικό παράγοντα των πρωτεϊνών και εφόσον καταστρέφει τη δομή της λακκάσης, την καθιστά μη λειτουργική. Συμπερασματικά αποτελεί παρεμποδιστή της δράσης όλων των ενζύμων. Πιο συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι παρεμποδίζει τις λακκάσες των *D. squalens*, *M. quercophilus*, *P. pulmonarius* και άλλων (Baldrian, 2005).

Τέλος, στην παρούσα εργασία το ένζυμο παρεμποδίζεται κατά 50% για συγκέντρωση NaCl 100 mM και 30% παρουσία NaCl 10 mM. Οι περισσότερες λακκάσες αναστέλλονται έντονα σε συγκέντρωση ιόντων χλωρίου της τάξης των 100 mM. Παρόλο που το χλωριούχο νάτριο εξετάστηκε σε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση από τους υπόλοιπους παρεμποδιστές, η παρεμπόδιση της *MtLac2* είναι σχετικά υψηλή σε σχέση με τις λακκάσες άλλων ασκομυκήτων. Για παράδειγμα, για υποδιπλασιασμό της ενεργότητας, στη λακκάση του ασκομύκητα *L. wrightii* απαιτήθηκε συγκέντρωση NaCl 140 mM (Mueangtoom et al., 2010), στην πρώτη ανασυνδυασμένη λακκάση του *M. thermophila* χρειάστηκε συγκέντρωση 600 mM (Xu, 1996) και στην ανασυνδυασμένη λακκάση του ασκομύκητα *B. aclada* 1400 mM. Η υψηλή παρεμπόδιση της λακκάσης από το ιόντα χλωρίου μειώνει τη δυνατότητα εφαρμογής του ενζύμου για τον αποχρωματισμό συνθετικών χρωστικών ουσιών, τη βιοεξυγίανση αποβλήτων, πολλές συνθετικές αντιδράσεις και άλλες εφαρμογές.

4.3 Καταλυτικά χαρακτηριστικά της *MtLac2*

Τα καταλυτικά χαρακτηριστικά της *MtLac2* διαφέρουν σημαντικά από τα περισσότερα ένζυμα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Αρχικά, σε ό,τι αφορά την εξειδίκευση της δράσης του ενζύμου, η *MtLac2* μελετήθηκε σε μια σειρά από υποστρώματα που θεωρούνται τυπικά υποστρώματα λακκάσης και στο ασκορβικό οξύ.

Το ένζυμο εμφάνισε ενεργότητα σε όλα τα υποστρώματα, με τη μικρότερη ενεργότητα να εμφανίζεται στη γουαϊακόλη, την L-DOPA και τη 2,6 DMP. Η *MtLac2* έδρασε καλύτερα στην κατεχόλη, την πυρογαλλόλη, και τη NNNN-τετραμεθυλο-φαινυλοδιαμίνη. Η ενεργότητα στο συνθετικό υπόστρωμα ABTS, το οποίο αποτελεί τυπικό υπόστρωμα για λακκάσες και χρησιμοποιείται στις περισσότερες ερευνητικές εργασίες ως υπόστρωμα αναφοράς για το χαρακτηρισμό τους, ήταν σημαντικά υψηλότερη από τα παραπάνω υποστρώματα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που αφορούν στη δράση της *MtLac2* στα παραπάνω υποστρώματα, δε φαίνεται να παρουσιάζει μια τυπική εικόνα καθώς, όπως φαίνεται στον πίνακα 4.1, συνηθίζεται η ενεργότητα των μυκητιακών λακκασών στην γουαϊακόλη και στη 2,6 DMP να είναι υψηλότερη από την κατεχόλη και την πυρογαλλόλη. Ακόμη, από τον πίνακα 4.1 αλλά και από το σύνολο της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι η ενεργότητα σε ABTS είναι υψηλότερη και πολλές φορές σημαντικά (*Mauginiella* sp.) από τα υπόλοιπα υποστρώματα. Ωστόσο, στην περίπτωση της *MtLac2* η διαφορά είναι πολύ μεγαλύτερη και από τις πιο ακραίες περιπτώσεις.

Πίνακας 4.3. Σχετική ενεργότητα μυκητιακών λακκασών. Η σχετική ενεργότητα υπολογίζεται θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα στη 2,6 διμεθοξυφαινόλη.

Είδη	Σχετική ενεργότητα (%)					Αναφορά
	2,6DMP	Γουαϊακόλη	Πυρογαλλόλη	Κατεχόλη	ABTS	
<i>C. stercoreus</i>	100	37,9	11,8	-	271,7	Sethuraman et al. (1999)
<i>D. squalens c1</i>	100	92,0	-	59,2	114,4	Perie et al. (1998)
<i>P.cinnabarinus</i>	100	140,9	34,5	74,3	452,0	Eggert et al. (1996)
<i>S. rolfsii SRL1</i>	100	35,0	-	18,3	136,7	Ryan et al. (2003)
<i>Mauginiella sp.</i>	100	122,4	-	-	800,0	Palonen et al. (2003)
<i>M. thermophila</i>	100	8,4	493,7	329,5	6548,4	Παρούσα εργασία

Ακόμη, ίσως το πιο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της *MtLac2* που προέκυψε από τη μελέτη της εξειδικευμένης δράσης της είναι η συμπεριφορά της στο ασκορβικό οξύ, όπου η ενεργότητα που παρουσιάζει είναι ιδιαίτερα υψηλή. Το ασκορβικό οξύ δεν αποτελεί τυπικό υπόστρωμα των λακκασών και δεν συνηθίζεται να παρουσιάζεται σε αποτελέσματα που αφορούν την εξειδικευμένη δράση τους. Ωστόσο έχουν καταγραφεί περιπτώσεις που λακκάσες εμφανίζουν ενεργότητα σε ασκορβικό οξύ, όπως οι λακκάσες από τους *A. bisporus*, *A. mellea*, *B. cinerea*, *L. piperatus* (Baldrian, 2005). Η διαφορά της *MtLac2* είναι η πολύ υψηλή ενεργότητα που έχει στο ασκορβικό οξύ, που σε συνδυασμό με τη διαφορετική συμπεριφορά που έχει επιδειξεί και στα υπόλοιπα υποστρώματα, φαίνεται ότι την διαφοροποιεί έντονα από την τυπική καταλυτική συμπεριφορά που έχουν τα ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των λακκασών.

Επιπροσθέτως, και από την κινητική μελέτη προέκυψαν αποτελέσματα διαφορετικά από τα συνήθη που αφορούν σε λακκάσες. Σε σύγκριση με άλλες χαρακτηρισμένες λακκάσες από τη βιβλιογραφία, η *MtLac2* έχει αρκετά υψηλή τιμή K_m (2,37 mM). Το εύρος της τιμής της K_m των περισσότερων χαρακτηρισμένων λακκασών για το συνθετικό υπόστρωμα ABTS είναι από 10-300 μ M (Baldrian, 2005). Καθώς η τιμή της K_m υποδεικνύει την συγγένεια του υποστρώματος με το ένζυμο, συμπεραίνουμε ότι η *MtLac2* δεν αλληλοεπιδρά με το συνθετικό υπόστρωμα ABTS τόσο καλά όσο οι περισσότερες λακκάσες. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές που η τιμή της K_m είναι παρόμοια με την παρούσα λακκάση όπως η ανασυνδυασμένη λακκάση του *P. sajor-caju* η οποία εκφράστηκε ετερόλογα σε *P. pastoris* η τιμή της K_m υπολογίστηκε ίση με 2.5 mM (Soden et al, 2002). Όσο αναφορά την αποτελεσματικότητα του ενζύμου, έτσι όπως εκφράζεται από την τιμή της k_{cat} , φαίνεται ότι στη βιβλιογραφία αναφέρονται τιμές που διαφέρουν κατά πολλές τάξεις μεγέθους (Baldrian, 2005). Ωστόσο, παρόμοια αποτελεσματικότητα με την *MtLac2*

προσδιορίστηκε για την ανασυνδυασμένη λακκάση του βασιδιομύκητα *C. Comatus* $k_{cat}/K_m=25,6s^{-1} mM^{-1}$ (Gu et al, 2014).

Η τιμή της K_m για τη 2,6-DMP ποικίλει πολύ περισσότερο στις χαρακτηρισμένες λακκάσες. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται λακκάσες με μικρότερη τιμή K_m από την παρούσα ($K_m=2.41$ mM), όπως οι λακκάσες των *B. cinereal* με $K_m=0.1$ mM (Slomczynsk et al., 1995) και *D. quercina* με $K_m=0,048$ mM (Baldrian, 2004), λακκάσες με παρόμοια τιμή K_m , όπως οι λακκάσες των *C. subvermispora L1* με $K_m=2,9$ mM (Wang & Ng, 2004b) και *P. ostreatus POXA1w* με $K_m=2,1$ mM (Palmieri et al., 1997) και υψηλότερες τιμές όπως στη λακκάση του *C. paradoxa* με $K_m=14,7$ mM (Robles et al., 2002) και του *P. ostreatus POXA3a* με $K_m=14$ mM (Palmieri et al., 2003).

4.4 Χρήση της *MtLac2* σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές

Η αυξημένη προσοχή που έχουν κερδίσει οι λακκάσες τα τελευταία είκοσι χρόνια οφείλεται στα πλεονεκτήματα που συγκεντρώνουν και τις καθιστούν χρήσιμες σε ποικίλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Η συγκεκριμένη οικογένεια ενζύμων μπορεί να οξειδώνει μεγάλο εύρος υποστρωμάτων χρησιμοποιώντας ως συνυπόστρωμα το μοριακό οξυγόνο και παράγοντας ως παραπροϊόν νερό, μπορεί να απομονωθεί σχετικά εύκολα και έχει πολύ μεγάλη ποικιλία σε βιοχημικά χαρακτηριστικά. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας διερευνήθηκε η χρήση της *MtLac2* σε τρία πεδία που υπάρχουν αναφορές χρήσης λακκάσων. Πιο συγκεκριμένα η *MtLac2* χρησιμοποιήθηκε ως καταλύτης για την αποτοξικοποίηση επεξεργασμένου υγρού απόβλητου ελαιουργείου (ΥΑΕ), την ενζυμική τροποποίηση εμπορικής γλυκάνης με σκοπό την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής της ικανότητας και τη βιοσύνθεση της σουλφουρετίνης από βουτεΐνη.

4.4.1 Δοκιμή αποτοξικοποίησης του επεξεργασμένου υγρού απόβλητου ελαιουργείου ΥΑΕ με χρήση της *MtLac2*

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η δοκιμή αποτοξικοποίησης του ΥΑΕ, η οποία ελέγχθηκε με την παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Έχει αναφερθεί ότι η επεξεργασία των αποβλήτων ελαιουργείων με μύκητες που παράγουν λακκάση μπόρεσε να μειώσει το αρχικό φαινολικό φορτίο έως και 78% σε 12-15 ημέρες. Οι λακκάσες επίσης μπορούν να συμμετέχουν στον αποχρωματισμό του ΥΑΕ από μαύρο σε κίτρινο-καφέ αλλά και στη μείωση της φυτοτοξικότητάς του (Dwivedi, 2010). Η οξείδωση των φαινολικών ενώσεων με λακκάσες δημιουργούν, όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, ρίζες που αντιδρούν μεταξύ τους για να σχηματίσουν διμερή, oligομερή ή πολυμερή σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς ανάμεσα στα άτομα άνθρακα, οξυγόνου και αζώτου. Η αποτοξικοποίηση βασίζεται στον πολυμερισμό των φαινολών του ΥΑΕ και στην απομόνωσή τους. Μια τέτοια δράση θα μπορούσε να έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ΥΑΕ. Από τα αποτελέσματα του πειράματος, έτσι όπως απεικονίζονται στην εικόνα 3.4.1, φαίνεται ότι κατά την αντίδραση η αντιοξειδωτική ικανότητα μειώνεται αντί να αυξάνεται. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί σε οξείδωση των φαινολών του ΥΑΕ σε κινόνες που οδηγεί στη μείωση της αντιοξειδωτικής

ικανότητας. Η *MtLac2* πιθανότατα οξειδωσε τις φαινόλες σε κινόνες αλλά δεν πέτυχε των πολυμερισμό τους. Η υπόθεση ενισχύεται από τα αποτελέσματα των καταλυτικών χαρακτηριστικών του ενζύμου, όπου διαφαίνεται ότι το συγκεκριμένο ένζυμο έχει περιορισμένο οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Συμπερασματικά, η *MtLac2* δε φαίνεται ότι συγκεντρώνει τα χαρακτηριστικά που απαιτούνται από μια λακκάση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε απόβλητα υψηλού φαινολικού φορτίου. Ωστόσο, προκειμένου να διαπιστωθεί η χρησιμότητα της στη βιοεξυγίανση αποβλήτων πρέπει να πραγματοποιηθεί μια σειρά από επιπλέον πειράματα.

4.4.2 Δοκιμή ενζυμικής τροποποίησης (grafting) εμπορικής γλυκάνης με χρήση της εμπορικής λακκάσης Novozym 51003 και της *MtLac2*

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η χρήση της *MtLac2* με σκοπό την τροποποίηση της δομής εμπορικής γλυκάνης. Η τροποποίηση της δομής του πολυσακχαρίτη επιχειρήθηκε με τη μέθοδο της σύζευξης καφεϊκού οξέος στη γλυκάνη με χρήση του ενζύμου (grafting). Παρόμοιες ερευνητικές εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί σε χιτοζάνη που τροποποιήθηκε μέσω λακκάσης με αντιδραστικά φαινολικά οξέα, όπως το γαλακτικό και το καφεϊκό οξύ, με αποτέλεσμα την αύξηση της αντιοξειδωτικής της ικανότητας (Bozic, 2012). Καθώς δεν έχει αναφερθεί δοκιμή τροποποίησης γλυκάνης με τη μέθοδο της σύζευξης ενώσεων μικρού μοριακού βάρους (grafting), το πείραμα πραγματοποιήθηκε τόσο με την *MtLac2* όσο και με την εμπορική λακκάση Novozym 51003. Από το πείραμα προέκυψε ότι η εμπορική λακκάση Novozym 51003 απέτυχε να τροποποιήσει τη δομή του πολυσακχαρίτη, ενώ και για την *MtLac2* υπάρχει μια ένδειξη ότι μπορεί να υπάρχει κάποια μεταβολή καθώς στο φάσμα FTIR του στερεού προϊόντος που απομονώθηκε με φυγοκέντρηση εντοπίζεται μια κορυφή στα 1240 cm^{-1} που μπορεί να οφείλεται σε δεσμό C-O οξέος. Ωστόσο, η κορυφή αυτή δεν μπορεί να αποτελέσει τίποτα παραπάνω από αφορμή για περαιτέρω διερεύνηση, καθώς δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα απλής προσρόφησης του καφεϊκού οξέος στο πολυμερές. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι στην εικόνα της καταβυθισμένης με αιθανόλη γλυκάνης δεν διαφαίνεται καμία μεταβολή στο φάσμα του πολυμερούς. Ακόμη, στο εν λόγω φάσμα που απεικονίζεται στην εικόνα 3.4.2.4 οι απορροφήσεις είναι ιδιαίτερα χαμηλές με αποτέλεσμα να μπορεί να αμφισβητηθεί οποιοδήποτε συμπέρασμα που εξάγεται από αυτό. Επομένως, το πιο πιθανό συμπέρασμα είναι ότι και τα δύο ένζυμα δεν κατάφεραν να τροποποιήσουν τη δομή της γλυκάνης. Ωστόσο, η πιθανότητα η *MtLac2* να έχει επιτύχει κάποια μεταβολή πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Σε κάθε περίπτωση, το συγκεκριμένο πείραμα δεν έχει αναφερθεί ποτέ σε γλυκάνες με αποτέλεσμα να είναι δύσκολος ο σχεδιασμός του πειράματος, που θα επιτύχει τη μετατροπή. Πρέπει επίσης να τονισθεί ότι σε αντίθεση με την περίπτωση του ΥΑΕ, φαίνεται πως η επιτυχία του πειράματος δεν καθορίζεται τόσο έντονα από το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ενζύμου καθώς η εμπορική λακκάση δεν φαίνεται να έχει επιφέρει κάποια μετατροπή στη δομή της γλυκάνης. Επομένως πρέπει να εξεταστούν αναλυτικά οι παράμετροι του πειράματος εάν αποφασισθεί η επανεξέτασή του.

4.4.3 Δοκιμή βιοσύνθεσης σουλφουρετίνης από βουτεΐνη με τη χρήση της *MtLac2*

Από τα αποτελέσματα του βιοχημικού χαρακτηρισμού κρίθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί αν η *MtLac2* θα μπορούσε να εφαρμοστεί στον τομέα της οργανικής σύνθεσης. Η οργανική σύνθεση χαρακτηρίζεται από διάφορα μειονεκτήματα, όπως το υψηλό κόστος των αντιδραστηρίων, οι πολύπλοκες αντιδράσεις πολλών σταδίων και η τοξικότητα των αντιδραστηρίων. Η καταλυτική συμπεριφορά των λακκασών μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην σύνθεση ενώσεων, όπως εν προκειμένω στην οξειδωτική κυκλοποίηση της βουτεΐνης με αποτέλεσμα την παραγωγή σουλφουρετίνης. Το στερεό προϊόν της αντίδρασης της λακκάσης με τη βουτεΐνη αναλύθηκε με Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματομετρία μάζας (LC-MS) και από το αποτέλεσμα που προέκυψε φαίνεται ότι το κύριο προϊόν της αντίδρασης συμπίπτει με τη σουλφουρετίνη ενώ υπάρχει και εναπομένον αντιδρόν. Για να χαρακτηριστεί η ανάλυση της αντίδρασης ολοκληρωμένη θα πρέπει να δρομολογηθεί ο διαχωρισμός του κύριου προϊόντος από το την βουτεΐνη και να ταυτοποιηθεί εκ νέου ότι πρόκειται για τη σουλφουρετίνη. Ωστόσο, από τα αποτελέσματα στα πλαίσια της παρούσας εργασίας φαίνεται ότι τα ιδιαίτερα καταλυτικά χαρακτηριστικά της *MtLac2* βρίσκουν εφαρμογή στο πεδίο της οργανικής σύνθεσης. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω από την μελέτη εξειδικευμένης δράσης και την κινητική μελέτη του ενζύμου φαίνεται ότι πιθανότατα το ένζυμο έχει χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Ενώ στην περίπτωση της αποτοξικοποίησης του ΥΑΕ αυτό είχε αρνητική επίδραση, στη βιομετατροπή της βουτεΐνης επιτρέπει στο ένζυμο να δρα εκλεκτικά και να οξειδώνει μόνο την ομάδα υδροξυλίου που έχει ως αποτέλεσμα την επιθυμητή κυκλοποίηση που οδηγεί στη σύνθεση της σουλφουρετίνης, αντί να οξειδώσει σε κινόνες όλα τα διαθέσιμα υδροξύλια του μορίου.

Συμπερασματικά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ομάδα ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια των λακκασών έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά που επιτρέπουν στις λακκάσες σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Χρησιμοποιώντας την *MtLac2* σε τρεις διαφορετικές εφαρμογές που ανήκουν στο ευρύτερο πεδίο εφαρμογών των λακκασών αποδείχθηκε ότι το ένζυμο με βάση τα ιδιαίτερα καταλυτικά του χαρακτηριστικά έδρασε βέλτιστα στο πεδίο της οργανικής σύνθεσης.

4.5 Μελλοντικοί Στόχοι

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας επιτεύχθηκε η βελτιστοποίηση της παραγωγής της *MtLac2* μέσω της μελέτης της επίδρασης της συγκέντρωσης μεθανόλης και χαλκού στο μέσο καλλιέργειας αλλά και της θερμοκρασίας επώασης. Καθώς τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση στην παραγωγή του ενζύμου προτείνεται να ερευνηθεί η περαιτέρω βελτιστοποίηση του συστήματος με τη μελέτη της επίδρασης άλλων παραμέτρων όπως το pH, η ανάδευση, ο αερισμός και άλλα. Σε αμέσως επόμενο στάδιο θα ήταν σκόπιμη η κλιμάκωση της διαδικασίας με επώαση σε βιοαντιδραστήρα και την αριστοποίηση της διεργασίας παραγωγής του ενζύμου σε βιοαντιδραστήρα. Η χρήση του βιοαντιδραστήρα θα δώσει τη δυνατότητα για καλύτερο έλεγχο των συνθηκών της καλλιέργειας και μεγαλύτερη παραγωγή σε ένζυμο σε λιγότερο χρόνο.

Ακόμη, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ικανοποιητική απομόνωση και χαρακτηρισμός του ενζύμου. Στα πλαίσια του χαρακτηρισμού θα μπορούσαν να συντελεστούν κάποια

συμπληρωματικά πειράματα όπως η επίδραση των μετάλλων στη δράση του ενζύμου ή η κινητική μελέτη και άλλων υποστρωμάτων. Ωστόσο, με βάση τα καινοτόμα καταλυτικά χαρακτηριστικά που συγκεντρώνει η MtLac2 θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να επιτευχθεί, εάν είναι δυνατόν, αποκρυπτογράφηση της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου και συσχέτιση της κρυσταλλικής δομής και της καταλυτικής του λειτουργικότητας. Ακόμη, η συγκρυστάλλωση του ενζύμου με υποστρώματα θα αποσαφήνιζε την ιδιαίτερη καταλυτική συμπεριφορά που επέδειξε στα πλαίσια της παρούσας πειραματικής εργασίας.

Παρόλα αυτά, το σημαντικότερο πεδίο που προκύπτει ότι χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση με βάση την παρούσα εργασία σχετίζεται με τις εφαρμογές του ενζύμου. Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προέκυψε ότι η MtLac2 συγκεντρώνει χαρακτηριστικά που την καθιστούν ικανή να συμμετέχει σε αντιδράσεις που σχετίζονται με την οργανική σύνθεση. Θα ήταν επιθυμητή η χρήση του ενζύμου στη βιοσύνθεση επιπλέον φλαβονοειδών όμως και ευρύτερα στον τομέα της οργανικής σύνθεσης. Ακόμη, κρίνεται σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί η MtLac2 σε αντιδράσεις οξειδωτικής σύνθεσης μεγάλης κλίμακας προκειμένου να αριστοποιηθεί η διεργασία. Ωστόσο, τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα που έδειξε η χρήση της λακκάσης στον τομέα της οργανικής σύνθεσης δε θα πρέπει να αποκλείσουν και την εφαρμογή του ενζύμου σε άλλους τομείς.

Τέλος, η MtLac2 είναι η δεύτερη λακκάση που εκφράστηκε ετερόλογα και χαρακτηρίστηκε από τον ασκομύκητα *M. thermophila*. Η πρώτη λακκάση η οποία εκφράστηκε στον *A. oryzae* (Berka et al, 1998) υπάρχει διαθέσιμη εμπορικά (Novozym 51003) και χρησιμοποιείται σε πολύ μεγάλο εύρος εφαρμογών. Εκτός από τις δύο λακκάσες, πολύ λίγα οξειδωτικά ένζυμα του ασκομύκητα *M. thermophila* έχουν χαρακτηριστεί όπως η υπεροξειδάση MtPerII (Zerva, 2015). Με βάση και τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φαίνεται πως ο ασκομύκητας *M. thermophila* παράγει καινοτόμα ένζυμα με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που μπορούν να αξιοποιηθούν σε πολύ μεγάλο εύρος βιομηχανικών εφαρμογών. Για αυτό το λόγο και μετά από την πρόσφατα δημοσιευμένη αλληλουχία του γονιδιώματος (Berka et al., 2011, Joint Genome Institute DOE, <http://genome.jgi-psf.org/>) κρίνεται ιδιαίτερα χρήσιμο να απομονωθούν και να υπερεκφραστούν ετερόλογα και άλλα αντίστοιχα ένζυμα προερχόμενα από τον *M. thermophila*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aktas N., Tanyolac A.** 2003. Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. *Bioresource Technology*. 87:209-214.
- Baldrian P.** 2004. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63: 560–563.
- Baldrian P.** 2005. Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 30(2):215–42.
- Berka et al.** 2011. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nature Biotechnology*. 29: 922–927.
- Berka R. M. P., Schneider E. J., Golightly S. H., Brown M., Madden K. M., Brown T., Halkier K., Mondorf K., Xu F.** 1997. Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:3151-3157.
- Bertrand, G.** 1896. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*. 123:463-465.
- Bhat K.M., Maheshwari R.** 1987. *Sporotrichum thermophile* Growth, Cellulose Degradation, and Cellulase Activity. *Applied Environmental Microbiology*. 53(9):2175-82.
- Bleve G., Lezzi C., Mita G., Rampino P., Perrotta C., Villanova L., Grieco F.** 2008 Molecular cloning and heterologous expression of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* in free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79:731-741.
- Bonomo R. P., Boudet A. M., Cozzolino R., Santoro E., Rizzarelli A. M., Sterjiades R., Zapalla R.** 1998. A comparative study of two isoforms of laccase secreted by the “white-rot” fungus *Rigidoporus lignosus*, exhibiting significant structural and functional differences. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 71: 205–211.
- Bourbonnais R.** 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3- ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied Environmental Microbiology*. 61:1876–1880.
- Bozic M., Gorgieva S., Kokol V.** 2012. Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*. 87: 2388– 2398.
- Bradford M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248–254.

- Brown M. A., Zhao Z., Mauk A. G.** 2002. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorganica Chimica Acta*. 331:232-238.
- Bulter T., Alcalde M., Sieber V., Meinhold P., Schlachtbauer C., Arnold F. H.** 2003. Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:987-995.
- Call H.P., Mücke I.** 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems (LignozymR process). *Journal of Biotechnology*. 53:163-202.
- Cassland P., Jönsson L. J.** 1999. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52:393-400.
- Cereghino J.L., Cregg J.M.** 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*. 24(1):45-66.
- Chakroun H., Mechichi T., Martinez M.J., Dhouib A., Sayadi S.** 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: An application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry*. 45(4):507-513.
- Chefetz B., Chen Y., Hadar Y.** 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3175-3179.
- Chen S., Ge W., Buswell J. A.** 2004. Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *European Journal of Biochemistry*. 271: 318-328.
- Claus H.** 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*. 179:145-50.
- Claus H.** 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 35(1-2):93-96.
- Claus H., Faber G., König H.** 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:672-678.
- Claus H., Filip Z.** 1998. Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*. *Acta Hydrochimie Hydrobiologie*. 26:180-185.

- 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*. 5:31.
- Couto S.R., Herrera J.L.T.** 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*. 24(5): 500–513.
- Couto S.R., Toca-Herrera J.L.** 2007. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. 25:558–569.
- Curir P, Thurston CF, Daquila F, Pasini C, Marchesini A .**1997. Characterization of a laccase secreted by *Armillaria mellea* pathogenic for *Genista*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 35:147–153.
- D'Annibale A., Stazi S.R., Vinciguerra V., Giovannozzi Sermanni G.** 2000. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology*. 77(2–3): 265–273.
- Dahiya J. S., Singh D., Nigam P.** 1998. Characterisation of laccase produced by *Coniothyrium minitans*. *Journal of Basic Microbiology*. 38: 349–359.
- Das N., Chakraborty T. K., Mukherjee M.** 2000. Purification and characterization of laccase-1 from *Pleurotus florida*. *Folia Microbiologica*. 45: 447–451.
- Dedeyan B., Klonowska A., Tagger S., Tron T., Iacazio G., Gil G., Le Petit J.** 2000. Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 925–929.
- Dehnavi E., Ranaei Siadat S.O., Roudsari M.F, Khajeh K.** 2016. Cloning and high-level expression of β -xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in *Pichia pastoris* by optimizing of pH, methanol concentration and temperature conditions. *Protein Expression and Purification*, 124:55-61.
- Dong J. L., Zhang Y. Z.** 2004. Purification and characterization of two laccase isoenzymes from a ligninolytic fungus *Trametes gallica*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 34: 179–194.
- Dwivedi N.U., Singh P., Pandey V.P., Kumar A.** 2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 68(2):117–128
- Edens W.A., Goins T.Q., Dooley D., Henson J.M.** 1999. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied Environmental Microbiology*. 65: 3071–3074.

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. *Applied Environmental Microbiology*. 62: 1151–1158

Enguita F.J., Martins L.O., Henrique A.O., Carrondo M.A., 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry*. 278(21):19416-25

Enguita F.J., Marçal D., Martins L.O., Grenha R., Henriques A.O., Lindley P.F., Carrondo M.A. 2004. Substrate and Dioxygen Binding to the Endospore Coat Laccase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 23472-23476

Felby C, Pedersen L.S., Nielsen B.R. 1997. Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases. *Holzforschung*. 51:281–6.

Farnet A.M., Criquet S., Tagger S., Gil G., Le Petit J. 2000. Purification, partial characterization, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Canadian Journal of Microbiology*. 46:189–194.

Farnet A.M., Criquet S., Pocachard E., Gil G., Ferre E. 2002. Purification of a new isoform of laccase from a *Marasmius quercophilus* strain isolated from a cork oak litter. (*Quercus suber* L.). *Mycologia*. 94:735–740.

Farnet A.M., Criquet S., Cigna M., Gil G., Ferre E. 2004. Purification of a laccase from *Marasmius quercophilus* induced with ferulic acid: reactivity towards natural and xenobiotic aromatic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*. 34: 549–554.

Fukushima Y., Kirk T. K. 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvemispora* lignin degrading system. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 872–876.

Galhaup C., Goller S., Peterbauer C.K., Strauss J., Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*. 148: 2159–2169.

Gardiol A.E., Hernandez R.J., Reinhammar B., Br. Hate B.R. 1996. Development of gas phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*. 18:347-352.

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*. 12:75.

Garzillo A.M.V., Colao M.C., Caruso C., Caporale C., Celletti D., Buonocore V. 1998. Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49: 545–551.

- Gelo-Pujic M., Kim H. H., Butlin N. G., Palmore G. T.** 1999. Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:5515-5521.
- Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G., Sannia G.** 1999. Protein and gene structure of ablue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*. 341: 655–663.
- Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G.** 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67:369–3851 34: 1–5.
- Givaudan. A., Effose A., Faure D., Potier P., Bouillant M.L. Bally R.** 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters*. 108: 205-210.
- 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
- Hakala TK., Lundell T., Galkin S., Majjala P., Kalkkinen N., Hatakka A.** 2005. Manganese peroxidases., laccases and oxalicacid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 461–468.
- Hautphenne C., Penninckx M., Debaste F.** 2016. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. *Environmental Technology & Innovation*. 5: 250–266.
- Heinzkill 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: 1601–1606.
- Hofer C., Schlosser D.** 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn^{+2} to Mn^{+3} catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Letters*. 451:186–190.
- Hong Y. Z., Zhou H. M., Tu X. M., Li J. F., Xiao Y. Z.** 2007. Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete *Trametes* sp 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Current Microbiology*. 54:260-265.
- Hoshida H., Fujita T., Murata K., Kubo K., Akada R.** 2005. Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 69:1090-1097
- Hossain KhMG, Gonzalez M.D., Lozano G.R., Tzanov T.** 2009. Multifunctional modification of wool using an enzymatic process in aqueous-organic media. *Journal of Biotechnology*. 141:58-63.

- Hublik G., Schinner F.** 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 330–336.
- Hullo M.F., Moszer I., Danchin A., Martin-Verstraete I.** 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal of Bacteriology*. 183:5426–5430.
- Hüttermann A, Mai C, Kharazipour A.** 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55:387–94.
- Iyer G., Chattoo B. B.** 2003. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters*. 227: 121–126.
- Jaouani A., Guillén F., Penninckx M.J., Martínez A.T., Martínez M.J.** 2005. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme Microbiology and Technology*. 36 (4):478–486.
- Johannes C, Majcherczyk A.** 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*. 78:193–199.
- Johannes C., Majcherczyk A.** 2000. Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(2): 524–528.
- Jönsson L. J, Saloheimo M., Penttilä M.** 1997. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris*. *Current Genetics*. 32:425–430.
- Junghanns C., Pecyna M. J., Böhm D., Jehmlich N., Martin C., von Bergen M., Schauer F., Hofrichter M. and Schlosser D.** 2009. Biochemical and molecular genetic characterisation of a novel laccase produced by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84(6): 1095-1105.
- Kanunfre C.C., Zancan G.T.** 1998. Physiology of exolaccase production by *Thelephora terrestris*. *FEMS Microbiology Letters*. 161:151–156.
- Karnaouri, A., Topakas, E., Antonopoulou, I., & Christakopoulos, P.** 2014. Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. *Frontiers in Microbiology*. 5:281.
- Kiiskinen L.L., Kruus K., Bailey M., Ylosmaki E., Siika-Aho M., Saloheimo M.** 2004. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterisation of the purified. *Microbiology*. 150:3065-3074.

- Kiiskinen L.L., Viikari L., Kruus K.** 2002. Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:198–204.
- Kim D.H., Rigling D., Zhang L., Van Alfen, N.K.** 1995. A new extracellular laccase of *Cryphonectria parasitica* is revealed by deletion of Lac 1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8:259–266.
- Kittl R., Mueangtoom K., Gonaus C., Khazaneh S.T., Sygmund C., Haltrich D., Ludwiga R.** 2012. A chloride tolerant laccase from the plant pathogen ascomycete *Botrytis aclada* expressed at high levels in *Pichia pastoris*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 157(2): 304–314.
- Klonowska A., Gaudin C., Asso M., Fournel A., Reglier M., Tron T.** 2005. LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast. *Enzyme and Microbial Technology*. 36:34–41.
- Kojima Y., Tsukuda Y., Hawaii Y., Tsukamoto A., Sugiura J., Sakaino M., Kita Y.** 1990. Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Journal of Biological Chemistry*. 265:15224–15230.
- Koroleva O.V., Yavmetdinov I. S., Shleev S. V., Stepanova E. V., Gavrilova V. P.** 2001. Isolation and study of some properties of laccase from the Basidiomycetes *Cerrena maxima*. *Biochemistry (Moscow)*. 66: 618–622.
- Kramer K.J., Kanost M.R., Hopkins T.L., Jiang H., Zhu Y.C., Xu R., et al.** 2001. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron*. 57(2):385–92.
- Kudangaa T., Nyanhongob G.S., Guebitzb G.M., Burtona S.** 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: Review. *Enzyme and Microbial Technology*. 48:195–208
- Kuhad R.C., Singh A, Eriksson K.E.L.** 1997. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell wall. In: Eriksson KEL, editor. *Biotechnology in the Pulp and paper industry*. *Advances in biochemical engineering biotechnology Springer Verlag*. Chapter 2.
- Kumar S.V.S., Phale P.S., Durani S., Wangikar P.P.** 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering*. 83:386–394.
- Kunamneni A., Camarero S., García-Burgos C., J Plou F., Ballesteros A., Alcalde M.** 2008. Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*. 7:32
- Kurisawa M., Chung J.E., Uyama H., Kobayashi S.** 2003. Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). *Macromolecular Bioscience*. 3:758–764.

- Kurtz M.B., Champe S.P.** 1982. Purification and characterization of the conidial laccase of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*. 151:1338–1345.
- Larsson S., Cassland P., Jönsson L. J.** 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:1163-1170.
- Li F., Hong Y. Z., Xiao Y. Z., Xu Y. H., Fang W.** 2007. High production of laccase B from *Trametes sp.* in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23:741-745.
- Lo SC., Ho Y.S., Buswell J.A.** 2001. Effect of phenolic monomerson the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* and partial characterization of a major laccase component. *Mycologia*. 93:413–421.
- Looser V., Bruhlmann B., Bumbak F., Stenger C., Costa M., Camattari A., Fotiadis D., K. Kovar K.** 2015. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*. 33(6): 1177-1193.
- Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193 (1): 265–75.
- Lund M.1., Ragauskas A.J.** 2001. Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55(6):699-703.
- Martins L.O., Soares C.M., Pereira M.M., Teixeira M, Costa T, Jones G.H., Henriques A.O.** 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biological Chemistry*. 277(21):18849-59.
- Martirani L., Giardina P., Marzullo L., 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.
- Mayer A.M., Staples R.C.** 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60(6):551-65.
- 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*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 392:279–286.
- Minuth W., Klischies M., Esser K.** 1978. The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. Structural differences between laccases of high and low molecular weight. *European Journal of Biochemistry*. 90:73–82.

- Moussouni S., Detsi A., Majdalani M., Makris P. D., 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. *Tetraedron Letters*. 51(31): 4076-4078.
- Mueangtoom K., Kittl R., Mann O., Haltrich D., Ludwig R.** 2010. Low pH dye decolorization with ascomycete *Lamprospora wrightii* laccase. *Biotechnology Journal*. 5:857–870
- Muñoz C., Guillén F., Martínez A. T., Martínez M. J.** 1997. Induction and Characterization of Laccase in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology*. 34(1): 1-5.
- Munoz C., Guillen F., Martinez A.T., Martinez M.J.** 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn⁺² oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 2166–2174.
- Nagai M., Sato T., Watanabe H., Saito K., Kawata M., Enei H.** 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes* and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 327-335.
- Ng T.B., Wang H.X.** 2004. A homodimeric laccase with unique characteristics from the yellow mushroom *Cantharellus cibarius*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313:37–41.
- Niku P.M.L., Viikari L.** 2000. Enzymatic oxidation of alkenes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 10:435-444.
- Nishizawa Y., Nakabayashi K., Shinagawa E.** 1995. Purification and characterization of laccase from white-rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 80: 91–93.
- Ossiadacz J., Al-Adhami A.J.H., Bajraszewska D., Fischer P., Peczynska-Czoch W.** 1999. On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. *Journal of Biotechnology*. 72:141-149.
- Otterbein L., Record E., Longhi S., Asther M., Moukha S.** 2000. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *European Journal of Biochemistry*. 267:1619-1625
- Palmieri G., Cennamo G., Faraco V., Amoresano A., Sannia G., Giardina P.** 2003. A typical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 220–230.
- Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A., Sannia G.** 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 31301–31307.

- Palonen H., Saloheimo M., Viikari L., Kruus K.** 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella sp.* *Enzyme Microbiology and Technology*. 33: 854–862.
- Palonen H., Viikari L.** 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and Bioengineering*. 86:550–557.
- Perie F.H., Reddy G.V.B., Blackburn N.J., Gold M.H.** 1998. Purification and characterization of laccases from the whiterot basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 353: 349–355.
- Petersen B.R., Mathiasen T. E., Peelen B., Andersen H.** 1996. Use of laccase for deoxygenation of oil-containing product such as salad dressing. *PCT international application*. WO 9635768 A1.
- Pezet R.** 1998. Purification and characterization of a 32-kDa laccaselike stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters*. 167:203–208.
- Pezet R., Pont V., Hoang-Van K.** 1991. Evidence for oxidative detoxication of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 39:441–450.
- Pezet R., Pont V., Hoang-Van K.** 1992. Enzymatic detoxication of stilbenes by *Botrytis cinerea* and inhibition by grape berries *proanthocyanidins*. In: Verhoeff, K., Malathrakis, N.E., Williamson, B. (Eds.), *Recent Advances in Botrytis Research*. Pudoc Scientific, Wageningen, pp. 87–92.
- Ramírez-Cavazos L.I., Junghanns C., Ornelas-Soto N., Cárdenas-Chávez D.L., Hernández-Luna C., Demarche P., Enaud E., García-Morales R., Agathos S.N., Parra R.** 2014. Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 108: 32-42.
- Ranocha P., McDougall G., Hawkins S., Sterjiades R., Borderies G., Stewart D., Cabanes-Macheteau M., Boudet A.M., Goffner D.** 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases—a divergent gene family—in poplar. *European Journal of Biochemistry*. 259:485–495.
- Record E., Punt P. J., Chamkha M., Labat M., van Den Hondel C. A., Asther M.** 2002. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *European Journal of Biochemistry*. 269:602-609
- Rehman A.U., Thurston C.F.** 1992. Purification of laccase-I from *Armillaria mellea*. *Journal of General Microbiology*. 138:1251–1257
- Riva S.** 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*. 24(5):219-226.

- Robinson T., Nigam P.** 2003. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13:197–220
- Robles A., Lucas R., Martinez-Canamero M., Ben Omar N., Perez R., Galvez A.** 2002. Characterisation of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (*syn. Thielavopsis*) *paradoxa* CH32. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 516–522.
- Rodgers C.J.1., Blanford C.F., Giddens S.R., Skamnioti P., Armstrong F.A., Gurr S.J.** 2010. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?. *Trends in Biotechnology*. 28(2):63-72.
- Rodríguez E., Ruiz-Dueñas F. J., Kooistra R., Ram A., Martínez A. T., Martínez M. J.** 2008. Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the pel 3 encoded protein. *Journal of Biotechnology*. 134:9-19.
- Rogalski J., Dawidowicz A.L., Leonowicz A.** 1990. Purification and immobilization of the inducible form of extracellular laccase of the fungus *Trametes versicolor*. *Acta Biotechnologica*. 10:261–269.
- Rosconi F., Fraguas L.F., Martinez-Drets G., Castro-Sowinski S.** 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme and Microbial Technology*. 36:800–807.
- Ryan S., Schnitzhofer W., Tzanov T, Cavaco-Paulo A., Gubitz G.M.** 2003. An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolorization. *Enzyme Microbiology and Technology*. 33: 766–774.
- Sanchez-Amat A., Lucas-Elio P., Fernandez E., Garcia-Borron J. C., Solano F.** 2001. Molecular cloning and functional characterisation of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1547:104-116
- Santhanam N., Vivanco J.M., Decker S.R., Reardon K.F.** 2011. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends in Biotechnology*. 29(10): 480-489.
- Saparrat M. C. N., Guillen F., Arambarri A. M., Martinez A. T., Martinez M. J.** 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Corioloopsis rigida*. *Applied Environmental Microbiology*. 68: 1534–1540.
- Sato Y., Wuli B., Sederoff R., Whetten R.** 2001. Molecular cloning and expression of eight cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Journal of Plant Research*. 114:147–155.

- Schlosser D, Höfer C.** 2002. Laccase-catalyzed oxidation of Mn^{2+} in the presence of natural Mn^{3+} chelators as a novel source of extracellular H_2O_2 production and its impact on manganese peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(7):3514-21.
- Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A, Autio K.** 2006. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science* 43:152–9.
- Sethuraman A., Akin D.E., Eriksson K.E.L.** 1999. Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52: 689–697.
- Setti L, Giuliani S, Spinozzi G, Pifferi P.G.** 1999. Laccase catalyzed oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazine and methoxyphenols. *Enzyme and Microbial Technology*. 25:285–9.
- Shin K.S., Lee Y.J.** 2000. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 384:109–115.
- Shleev S. V., Morozova O., Nikitina O., Gorshina E. S., Rusinova T., Serezhenkov V. A., Burbaev D. S., Gazaryan I. G., Yaropolov A. I.** 2004. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie*. 86: 693–703.
- Shleev S., Jarosz-Wilkolazka A., Khalunina A., Morozova O., Yaropolov A., Ruzgas T., Gorton L.** 2005. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. *Bioelectrochemistry*. 67(1):115-124.
- Shleev S., Nikitina O., Christenson A., Reimann C.T., Yaropolov A. I., Ruzgas T., Gorton L.** 2007. Characterization of two new multiforms of *Trametes pubescens* laccase. *Bioorganic Chemistry*. 35(1):35–49.
- Sigoillot C., Record E., Belle V., Robert J. L., Lévassieur A., Punt P. J., van Den Hondel C. A., Fournel A., Sigoillot J. C., Asther M.** 2004. Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64:346-352
- Slomczynski D., Nakas J. P., Tanenbaum S.W.** 1995. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 907–912.
- Soden D.M., O'Callaghan J., Dobson A.D.W.** 2002. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology*. 148:4003–4014.
- Souza C.G.M., Peralta R.M.** 2003. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of Basic Microbiology*. 43: 278–286.

- Sterjiades R., Dean J.F.D., Eriksson K.E.L.** 1992. Extracellular laccases and peroxidases from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell-suspension cultures. *Plant Physiology*. 99:1162-1168.
- Sulistyaningdyah W.T., Ogawa J., Tanaka H., Maeda C., Shimizu S.** 2004. Characterization of alkaliphilic laccase activity in the culture supernatant of *Myrothecium verrucaria* 24G-4 in comparison with bilirubin oxidase. *FEMS Microbiology*. 230:209-214.
- Tezuka K., Hayashi M., Ishikara H., Onozaki K., Nishimura M., Takahashi N.** 1993. Occurrence of heterogeneity on N-linked oligosaccharides attached to sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) laccase of excretion. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 29:395-402.
- Thurston C.F.** 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140(1):19-26.
- Ullrich R., Huang L. M., Dung N. L., Hofrichter M.** 2005. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67: 357-363.
- Uyama H., Kobayashi S.** 2006. Enzymatic synthesis of polyesters via polycondensation. *Advances in Polymer Science*. 194:133-158.
- Wahleithner J.A., Xu F., Brown K.M., Brown S.H., Golightly E.J., Halkier T., Kauppinen S., Pederson A., Schneider P.** 1996. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 29:395-403.
- Wang H. X., Ng T. B.** 2004. A novel laccase with fair thermostability from the edible wild mushroom (*Albatrella dispansus*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 319: 381-385.
- Wang H.X., Ng T.B.** 2006. Purification of a laccase from fruitingbodies of the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69:521-525.
- Waterhouse A.L.** 2001. Determination of Total Phenolics. In: *Wrolstad, R.E., Ed., Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons. New York. 11.1.1-11.1.8.
- Wood D.A.** 1980. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology*. 117:327-338.
- Xiao Y.Z., Tu X.M., Wang J., Zhang M., Cheng Q., Zeng W.Y., Shi Y.Y.** 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60:700-707.
- 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

Yaver D. S., Xu F., Golightly E. J., Brown K. M., Brown S. H., Rey M. W., 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*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:834-841.

Yaver D.S., Overjero M.D., Xu F., Nelson B.A., Brown K.M., Halkier T., Bernauer S., Brown S.H., Kauppinen S. 1999. Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase lcc 1. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:4943-4948.

Yoshida H. 1883. Chemistry of Lacquer (Urishi) part 1. *Journal of the Chemical Society (Tokyo)*. 43:472–86.

Zavarzina A.G., Leontievsky A.A., Golovleva L.A., Trofimov S.Y. 2004. Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: an in vitro study. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 359–369.

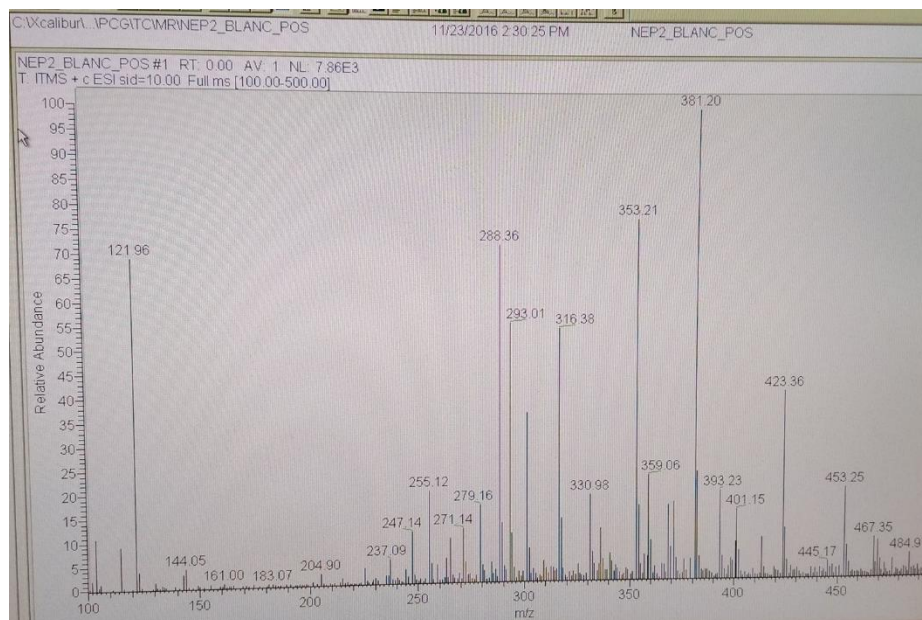
Zerva A., Christakopoulos P., Topakas E. 2015. Characterization and application of a novel class II thermophilic peroxidase from *Myceliophthora thermophila* in biosynthesis of polycatechol. *Enzyme and Microbial Technology*. 75-76: 49-56.

Παράρτημα

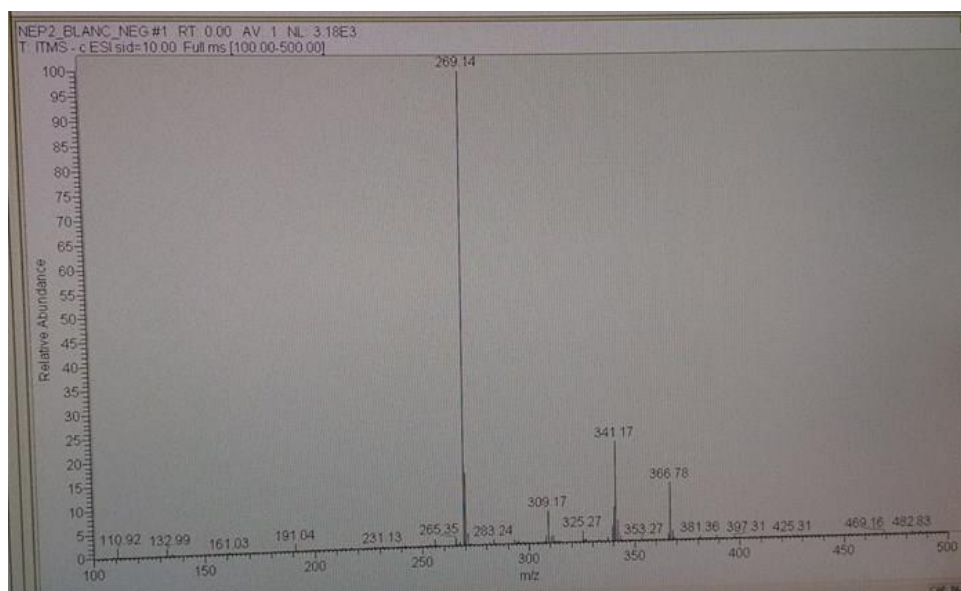
Π.1. Φάσματα μάζας φλαβονοειδών

(Z)-2-(3,4-διϋδροξυβενζυλιδενο)-6-υδροξυβενζοφουραν-3(2H)-όνη (σουλφουρετίνη)

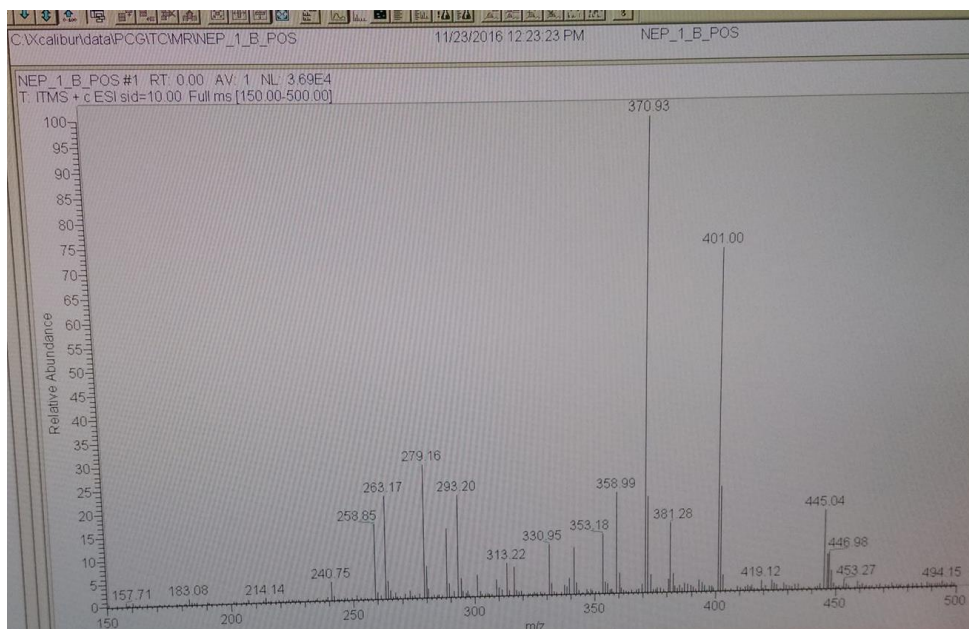
(Ακριβές Μοριακό Βάρος: 270.05)



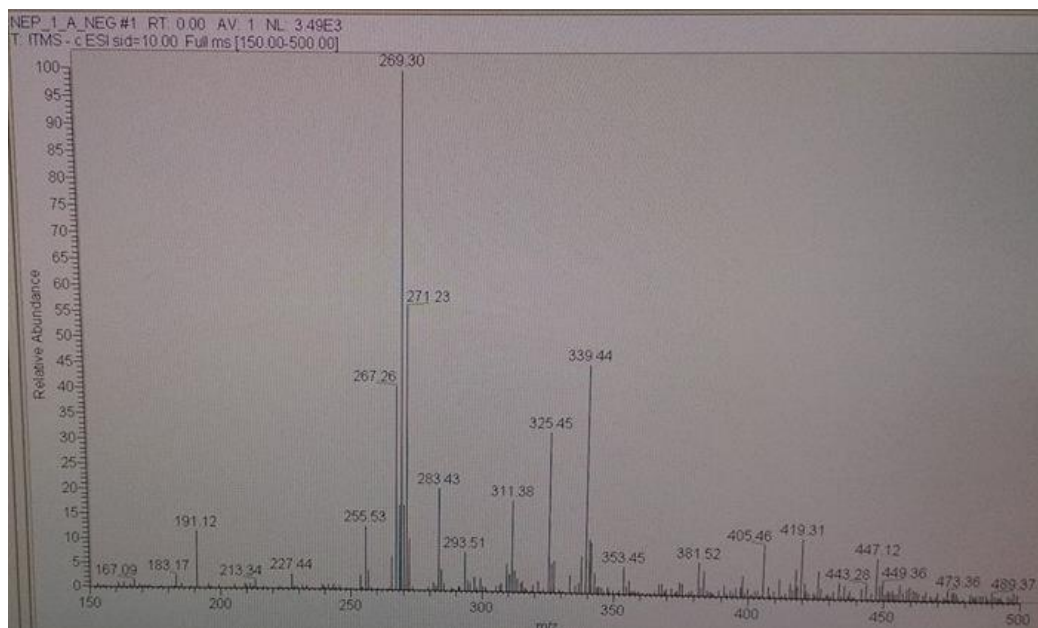
Εικόνα Π.1. Φάσμα MS της σουλφουρετίνης με απενεργοποιημένο ένζυμο (θετικό)



Εικόνα Π.2. Φάσμα MS της σουλφουρετίνης με απενεργοποιημένο ένζυμο (αρνητικό)



Εικόνα Π.3. Φάσμα MS του προϊόντος της αντίδρασης της βουτεΐνης με την *M1Lac2* (αρνητικό)



Εικόνα Π.4. Φάσμα MS του προϊόντος της αντίδρασης της βουτεΐνης με την *M1Lac2* (αρνητικό)

Π.2. Βασικές Οδηγίες Υγιεινής και Ασφάλειας

A. Χημικά

Γενικά

Αποφυγή απευθείας επαφής με τα χημικά αντιδραστήρια Χρήση ποδιάς, γαντιών, γυαλιών

Γνώση χαρακτηριστικών κάθε αντιδραστηρίου Μελέτη φύλλων MSDS (material safety data sheets)

Πτητικά αντιδραστήρια Χρήση απαγωγού

Αποθήκευση

Προστασία από ήλιο και θέρμανση Κατάλληλα ντουλάπια - όχι ράφια πάνω από τους πάγκους του εργαστηρίου

Φύλαξη σύμφωνα με τις οδηγίες κάθε αντιδραστηρίου

Πτητικά αντιδραστήρια Ντουλάπια κάτω από απαγωγούς

Απόβλητα

Υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες Απόρριψη στο σύστημα αποχέτευσης και έκπλυση με μεγάλη ποσότητα νερού

Οργανικοί διαλύτες Συλλογή σε γυάλινα μπουκάλια και ασφαλής απόρριψη

Στερεά απόβλητα, διηθητικά χαρτιά, άδεια πλαστικά Απόρριψη σε πλαστικές σακούλες και στη συνέχεια στα σκουπίδια

Σπασμένα γυαλικά, σύριγγες, μυτερά αντικείμενα, άδεια γυάλινα φιαλίδια, μπουκάλια χημικών ουσιών Τοποθέτηση σε ειδικούς και επισημασμένους κάδους και σε πλαστική συσκευασία που θα είναι ασφαλής για τους εργαζόμενους στην καθαριότητα

- **Αξίδιο του Νατρίου** OSHA: Hazardous by definition of Hazard Communication Standard (29 CFR 1910.1200)
→ Ιδιαίτερα οξείας τοξικότητας υλικό
→ Φύλαξη σε ντουλάπια κάτω από απαγωγούς
→ Πολύ προσεκτικοί χειρισμοί

A.1. Καρκινογόνα

bis-acrylamide

IARC 2B : η ουσία είναι ενδεχόμενα καρκινογόνος για τον άνθρωπο.

- ΥΠΟΧΡΕΩΤΙΚΗ χρήση εργαστηριακής ποδιάς και γαντιών.
- Μεταφορά του κουτιού που περιέχει τα καρκινογόνα με γάντια από το ψυγείο στον απαγωγό και άνοιγμα μόνο εντός του απαγωγού.
- Χρήση πάντοτε μέσα στον απαγωγό.
- Τα γάντια που έρχονται σε επαφή με καρκινογόνο ή δοχείο που περιέχει καρκινογόνο δεν χρησιμοποιούνται σε άλλη εργασία και αποβάλλονται άμεσα στη συνέχεια.
- Τα μολυσμένα tips που ήρθαν σε επαφή με το ακριλαμίδιο αποβάλλονται σε ειδικό κάδο και τα γυαλικά και οι συσκευές ηλεκτροφόρησης πλένονται με άφθονο νερό και απορρυπαντικό, φυλάσσονται ξεχωριστά και χρησιμοποιούνται μόνο για τις ηλεκτροφορήσεις.

B. Βιολογικό Υλικό

Κατηγοριοποίηση Βιολογικών Παραγόντων

Pichia pastoris (Invitrogen)

Στέλεχος X-33

(γονότυπος: φυσικός τύπος,

φαινότυπος: Mut+)

Βιολογικός παράγοντας ομάδας 1 → απίθανο να προκαλέσει ασθένεια στον άνθρωπο

Εργαστηριακή Πρακτική Εργαστηρίου τύπου P1

- Μετά την ανάπτυξη μικροοργανισμών να καθαρίζονται με αλκοόλη όλα τα όργανα/ μικροόργανα που χρησιμοποιήθηκαν.
- Μετά το πείραμα οι πάγκοι να καθαρίζονται με αλκοόλη ή αραιωμένη χλωρίνη.
- Χρήση πλαστικών και αντικειμένων μίας χρήσης.
- Άμεση απόρριψη στερεών και υγρών μολυσμένων αποβλήτων (π.χ. τρυβλία, πλαστικά).
- Αποστείρωση στερεών και υγρών μολυσμένων αποβλήτων πριν την απόρριψη τους.
- Πλύση χεριών με νερό και αιθανόλη μετά από κάθε χειρισμό.