



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

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αξιοποίηση ενζυμικού
συστήματος βασιδιομυκήτων
σε εφαρμογές
βιοαποικοδόμησης**

Πεντάρη Χριστίνα

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

ΑΘΗΝΑ 2018

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή κυρίου Ευάγγελου Τόπακα. Η ερευνητική εργασία στο σύνολό της αποτέλεσε μία μοναδική εμπειρία, εποικοδομητική και πολυεπίπεδη, από την οποία αποκόμισα πλήθος γνώσεων και βιωμάτων. Επί τη ευκαιρία της ολοκλήρωσης αυτής της εμπειρίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους αποτέλεσαν αρωγοί και συνέβαλλαν με τον τρόπο τους στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ευάγγελο Τόπακα, ο οποίος πρώτος με εισήγαγε στο χώρο της βιοτεχνολογίας. Το ειλικρινές ενδιαφέρον και η ουσιαστική καθοδήγηση που προσέφερε ήταν παραδειγματικά. Η ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω υπό την επίβλεψή του, στο περιβάλλον ενός τόσο ενεργού εργαστηρίου με τιμά ιδιαίτερα και τον ευχαριστώ προσωπικά για αυτό.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την διδάκτορα Αναστασία Ζέρβα για την βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής μου εργασίας. Την ευχαριστώ προσωπικά για το αμείωτο ενδιαφέρον, την παρουσία, την υποστήριξη και τα τεράστια αποθέματα υπομονής της. Οι εμπειρίες, οι γνώσεις και οι συμβουλές που μοιράστηκε μαζί μου ήταν πολύτιμες ενώ το ήθος και ο χαρακτήρας της θα αποτελέσουν παράδειγμα για την μετέπειτα πορεία μου.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, οι οποίοι ήταν πρόθυμοι να βοηθήσουν σε κάθε δυσκολία. Το κλίμα συνεργασίας μέσα στο εργαστήριο, η ενεργή τους παρουσία, η συμβουλευτική τους διάθεση και η θετική τους ενέργεια είναι μερικά μόνο από τα στοιχεία που μου μετέδωσαν, και τους ευχαριστώ για το λόγο αυτό.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτριο Ζουράρη για την αμέριστη βοήθειά του, αναλαμβάνοντας τη διεξαγωγή πειραμάτων για τον προσδιορισμό του φαινόμενου πρότυπου δυναμικού των λακκασών αλλά και την μετάδοση των γνώσεών του πάνω στο κομμάτι αυτό. Παράλληλα, ευχαριστώ θερμά, για τη συμβολή της, την υποψήφια διδάκτορα Ιωάννα Κωστοπούλου, η οποία ανέλαβε τη διεξαγωγή των πειραμάτων φασματοσκοπίας NMR.

Επιπλέον θα ήθελα να απονείμω ευχαριστίες στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τους καθηγητές κύριο Δημήτριο Κέκκο και κύριο Χαράλαμπο Σαρίμβη, για το χρόνο που διέθεσαν να διαβάσουν το κείμενο της διπλωματικής μου εργασίας και τις χρήσιμες υποδείξεις τους επί αυτού.

Τέλος ευχαριστώ από καρδιάς τους δικούς μου ανθρώπους, συγγενείς και φίλους, οι οποίοι μου στάθηκαν με τον δικό τους ιδιαίτερο τρόπο, τόσο το τελευταίο αυτό εξάμηνο της διεξαγωγής της διπλωματικής, όσο και όλα τα προηγούμενα χρόνια των σπουδών μου. Οι θυσίες, η υπομονή και το ψυχικό τους σθένος μου δίνουν δύναμη να συνεχίζω την προσωπική προσπάθεια για να πετυχαίνω τους στόχους μου.

Πεντάρη Χριστίνα

Αθήνα 2018

Περίληψη

Οι λακκάσες αποτελούν οξειδοαναγωγικά ένζυμα, που συναντώνται στο λιγνινολυτικό ενζυμικό σύστημα των Βασιδιομυκήτων, με σημαντικές προοπτικές αξιοποίησης σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως το κομμάτι κατεργασίας και αξιοποίησης λιγνοκυταρινούχου βιομάζας. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε το ενζυμικό λιγνινολυτικό σύστημα του Βασιδιομύκητα λευκής σήψης *Pleurotus citrinopileatus*. Πραγματοποιήθηκαν βιοχημικός χαρακτηρισμός των καθαρών λακκασών *PcLac1* και *PcLac2* του μύκητα και ακινητοποίηση των ενζύμων του υπερκείμενου της καλλιέργειάς του και τέλος εξετάστηκαν βιοτεχνολογικές εφαρμογές των ενζυμικών παρασκευασμάτων.

Οι λακκάσες *PcLac1* και *PcLac2*, με μοριακά βάρη 40 και 80 kDa και φαινόμενα πρότυπα οξειδοαναγωγικά δυναμικά 250 και 200 mV αντίστοιχα, παρουσιάζουν χαρακτηριστικές απορροφήσεις γύρω στα 330 nm, με την *PcLac1* να έχει απορρόφηση και στα 610 nm, ενώ η *PcLac1* έχει ισοηλεκτρικό σημείο pI 3,5. Οι βέλτιστες συνθήκες δράσης είναι σε pH 4,5 και 55°C για την *PcLac1* και σε pH 4 και 55°C για την *PcLac2*, βάσει μετρήσεων με ABTS. Οι δύο λακκάσες οξειδώνουν υδροβενζόλες και υδροξικιναιμικά οξέα, με την *PcLac1* να παρουσιάζει ενεργότητα 0,08 U/mg για την 2,6-DMP και την υδροκινόνη ενώ η *PcLac2* έχει 0,05 και 0,09 U/mg για την κατεχόλη και την υδροκινόνη αντίστοιχα. Οι σταθερές K_M και V_{max} είναι ίσες με 61 και 165 μM και 2,4 και 4,6 U/mg για τις *PcLac1* και *PcLac2* ως προς το ABTS, ενώ τα αντίστοιχα μεγέθη για την 2,6-DMP είναι 672 και 1070 μM και 0,36 και 0,04 U/mg. Λειτουργική σταθερότητα παρατηρείται σε pH 5-9 για την *PcLac1* και σε pH 5-8 για την *PcLac2*. Η λακκάση *PcLac1* διατηρεί το 70% της ενεργότητάς της μετά από επώαση 2 h στους 50°C και 4 h στους 40°C, ενώ αντίστοιχα η *PcLac2* δεν είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες αλλά διατηρεί το 90% της ενεργότητάς της, μετά από 24 h στους 30°C. Παρουσία οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, DMSO, 1,4-διοξάνη), η *PcLac1* παρεμποδίζεται ακόμα και σε 10% περιεκτικότητάς τους ενώ η *PcLac2* είναι σταθερή σε διαλύματα 10% των διαλυτών. Οι λακκάσες παρεμποδίζονται έντονα παρουσία SDS 1mM και NaN_3 , ενώ η *PcLac1* ενεργοποιείται σε Cu 0,25 mM και H_2O_2 1 mM. Οι αποδόσεις που λαμβάνονται από την αξιοποίηση των ενζύμων σε αντιδράσεις σύνθεσης είναι 36% (mg προϊόντος/mg υποστρώματος) ως προς το σιναπικό και 6,8% ως προς το φερουλικό για την *PcLac1* αλλά και 81,5% ως προς το σιναπικό για την *PcLac2*, χωρίς ωστόσο να ταυτοποιηθούν οι ενώσεις στα στερεά προϊόντα.

Τα ένζυμα του εξωκυτταρικού υγρού της καλλιέργειας (15,8 mg/mL πρωτεΐνης) ακινητοποιήθηκαν σε CLEAs, με χρήση θειικού αμμωνίου, ως παράγοντα κατακρήμνισης, και 100 mM γλουταραλδεΐδης για την σχηματισμό σταυροδεσμών, οπότε και επετεύχθη ανάκτηση της ενζυμικής ενεργότητας 60%. Τα CLEAs των λακκασών δρουν βέλτιστα σε pH 3, σε αντίθεση με το ελεύθερο ενζυμικό παρασκεύασμα όπου δρα σε pH 4, και 40 °C. Η ακινητοποίηση βελτιώνει τη σταθερότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος κατά την επώαση στους 50 και 60°C αλλά και στην περίπτωση επώασης σε οργανικούς διαλύτες αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, DMSO και 1,4-διοξάνη. Δοκιμάστηκε τέλος η χρήση ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζυμικού παρασκευάσματος για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργείου, με το ελεύθερο ενζυμικό παρασκεύασμα να πετυχαίνει έως και 35% αποχρωματισμό του YAE και έως 65% μείωση φαινολικών ενώσεων, ενώ τα CLEAs εμφάνισαν αντίστοιχα 20-30% αποχρωματισμό και 10% μείωση φαινολικού φορτίου.

Abstract

Laccases, as oxidoreductive enzymes, are part of the lignolytic enzyme system of Basidiomycetes, with great prospect of use in biotechnological applications, such as in the field of lignocellulosic biomass treatment and utilization. In the context of this thesis, the enzymatic lignolytic system of the white rot Basidiomycete *Pleurotus citrinopileatus* was studied. Purified fungal laccases, *PcLac1* and *PcLac2*, were biochemically characterized while the enzymes of the culture supernatant were immobilized and the resulting enzymatic preparations were used in different biotechnological applications.

Laccases *PcLac1* and *PcLac2*, with molecular weights 40 and 80 kDa as well as formal potentials of 250 and 200 mV respectively, show characteristic absorbance at about 330 nm, while *PcLac1* also absorbs at 610 nm. The isoelectric point of *PcLac1* is at pI 3,5. *PcLac1* showed optimum activity at pH 4,5 and 55°C whereas optimum conditions for *PcLac2* were pH 4 and 55°C, based on ABTS enzymatic activity measurements. The two laccases oxidize hydrobenzoles and hydroxycinnamic acids, as *PcLac1* shows optimized activity with 2,6-DMP and hydroquinone (0,08 U/mg), while *PcLac2* has activity of 0,05 and 0,09 U/mg for catechol and hydroquinone respectively. Michaelis-Menten constants K_M and V_{max} equal to 61 and 165 μM as well as 2,4 and 4,6 U/mg for *PcLac1* and *PcLac2* using ABTS as substrate, while the corresponding measurements for 2,6-DMP are 672 and 1070 μM as well as 0,36 and 0,04 U/mg. Furthermore *PcLac1* shows better stability at pH 5 to 9, whereas *PcLac2* is more stable at pH 5 to 8. Regarding temperature stability, *PcLac1* preserves 70% of its activity after 2 h incubation at 50°C and 4 h at 40°C. However, *PcLac2* preserves 90% of its activity after 24 h incubation at 30°C, even though it is not stable in high temperatures. In the presence of organic solvents (methanol, ethanol, acetone, DMSO, 1,4-dioxane), *PcLac1* is inhibited even at concentrations of 10% (v/v), while *PcLac2* is stable at the same concentrations. Laccases are also strongly inhibited by 1mM SDS and NaN_3 , while the activity of *PcLac1* is enhanced by 0,25 mM Cu and 1 mM H_2O_2 . The enzymes were finally used in organic synthesis reactions. The mass yields (mg of product/mg of substrate) were 36% in regard to sinapic acid and 6,8% in regard to ferulic acid for *PcLac1*, whereas *PcLac2* yielded 81,5% in regard to sinapic acid. However, the nature of the solid products was not identified.

The enzymes of the fungal supernatant (15,8 mg/mL protein) were immobilized with the formation of CLEAs, using ammonium sulfate as precipitant, and 100 mM of glutaraldehyde, as the cross-linking agent, achieving 60% activity recovery. Laccase CLEAs show optimal activity at pH 3, in contrast to the non-immobilized enzymatic preparation, which shows higher activity at pH 4, and 40 °C. The immobilization of the enzymes improves their stability during incubation at 50 and 60°C, as well as in the presence of organic solvents (methanol, ethanol, acetone, DMSO, 1,4-dioxane). Finally, the immobilized enzyme preparation was tested to the detoxification of oil mill wastewater (OMW), by which the non-immobilized enzymes achieved up to 35% decolorization of OMW as well as 65% reduction of the total phenolic compounds, while CLEAs showed respectively 20 to 30% decolorization and 10% reduction on the phenolic content.

Πίνακας περιεχομένων

1 Θεωρητικό Μέρος	11
1.1 Εισαγωγή	11
1.2 Βασιδιομύκητες και <i>Pleurotus</i>	12
1.2.1 Γενικά Χαρακτηριστικά για τους Βασιδιομύκητες	12
1.2.2 Το Γένος <i>Pleurotus</i>	13
1.2.2.1 Γενικά Στοιχεία για το Γένος <i>Pleurotus</i>	13
1.2.2.2 Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές των Μυκήτων του Γένους <i>Pleurotus</i>	13
1.2.2.1 <i>Pleurotus citrinopileatus</i>	15
1.3 Λιγνίνη	16
1.3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά	18
1.3.2 Βιοσύνθεση Λιγνίνης	19
1.3.3 Αποικοδόμηση Λιγνίνης	20
1.4 Υγρά Απόβλητα Τριφασικού Ελαιουργείου	23
1.4.1 Λειτουργία Ελαιουργείου και Παραγωγή Υγρών Αποβλήτων	23
1.4.2 Γενικά Χαρακτηριστικά Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου	23
1.4.3 Περιβαλλοντικές Επιπτώσεις Απόρριψης Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου	24
1.4.4 Μέθοδοι Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου	24
1.4.5 Αξιοποίηση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου	25
1.5 Ενζυμικό Σύστημα Αποικοδόμησης της Λιγνίνης από Βασιδιομύκητες	26
1.5.1 Λακκάσες	26
1.5.1.1 Προέλευση και Βιολογικός Ρόλος Λακκασών	28
1.5.1.2 Μυκητιακές Λακκάσες	30
1.5.1.3 Παραγωγή Λακκασών	31
1.5.1.4 Δομικά Χαρακτηριστικά Λακκασών	32
1.5.1.4.1 Καταλυτικό Κέντρο	32
1.5.1.5 Φυσικοχημικές Ιδιότητες Λακκασών	34
1.5.1.6 Αναγωγικά Υποστρώματα των Λακκασών, Προϊόντα Οξειδωσης και Παρεμπόδιση	35
1.5.1.7 Καταλυτική Δράση Λακκασών	37
1.5.1.8 Παράγοντες οξειδοαναγωγής – Μεσολαβητές	38
1.5.1.9 Βιοτεχνολογική Αξιοποίηση Λακκασών	40
1.5.1.9.1 Περιβαλλοντική Βιοτεχνολογία	41
1.5.1.9.2 Εφαρμογές Σύνθεσης	42
1.5.1.9.3 Αποχρωματισμός Βαφών	44
1.5.1.9.4 Τεχνολογία Τροφίμων	45
1.5.1.9.5 Χαρτοβιομηχανία – Βιομηχανία Υφασμάτων	46
1.5.1.9.6 Οργανική Χημεία- Ιατρική- Νανοτεχνολογία	46
1.5.2 Υπεροξειδάσες	47
1.5.2.1 Υπεροξειδάσες Λιγνίνης (EC 1.11.1.14. diarylpropane:oxygen, hydrogen peroxide oxidoreductases, LiP)	47

1.5.2.2 Υπεροξειδάσες του Μαγγανίου (EC 1.11.1.13. Mn(II):H ₂ O ₂ oxidoreductases, MnP)	48
1.5.2.3 Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές Υπεροξειδασών	49
1.6 Ακίνητοποίηση Ενζύμων.....	50
1.6.1 Τεχνικές Ακίνητοποίησης.....	50
1.6.1.1 Προσρόφηση	51
1.6.1.2 Ακίνητοποίηση με Ομοιοπολικούς Δεσμούς.....	51
1.6.1.3 Ακίνητοποίηση Συγγένειας.....	51
1.6.1.4 Παγίδευση	52
1.6.2 Σχηματισμός Συσσωματωμάτων Ενζύμων μέσω Σταυροδεσμών (CLEAs).....	52
1.6.2.1 Εφαρμογές Ακίνητοποίησης Λακκασών/Υπεροξειδασών σε CLEAs	53
1.7 Στόχος.....	55
2. Υλικά και μέθοδοι.....	56
2.1 Υλικά	56
2.1.1 Μικροοργανισμοί	56
2.1.2 Χημικά Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά	56
2.1.2.1 Υγρά απόβλητα Ελαιουργείου	56
2.1.3 Υλικά – Στήλες Χρωματογραφίας	57
2.1.4 Ρυθμιστικά Διαλύματα – Διαλύματα Ηλεκτροφόρησης	57
2.1.5 Συσκευές – Όργανα	58
2.2 Μέθοδοι.....	59
2.2.1 Καθαρισμός και Συμπύκνωση Ενζυμικού Εκχυλίσματος και Πρωτεϊνών	59
2.2.1.1 Παραλαβή και Συμπύκνωση Υπερκείμενου Υγρού Καλλιέργειας.....	59
2.2.1.2 Συμπύκνωση – Εξισορρόπηση – Καθαρισμός Απομονωμένων Πρωτεϊνών	60
2.2.2 Μέθοδος Lowry για Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνών	62
2.2.3 Χαρακτηρισμός Καθαρών Πρωτεϊνών.....	63
2.2.3.1 Μέτρηση Ενζυμικής Ενεργότητας Λακκάσης	63
2.2.3.2 Αξιολόγηση Οξειδωσης Υποστρωμάτων (Screening).....	64
2.2.3.3 Μελέτη Εξειδίκευσης ως προς το Υπόστρωμα.....	64
2.2.3.4 Ηλεκτροφορητικές Τεχνικές.....	66
2.2.3.4.1 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμιδίου υπό Αποδιατακτικές Συνθήκες (SDS-PAGE)	67
2.2.3.4.1.1 Παρασκευή Πηκτώματος	67
2.2.3.4.1.2 Προετοιμασία Δειγμάτων – Ηλεκτροφόρηση	68
2.2.3.4.1.3 Εμφάνιση Πρωτεϊνικών Ζωνών στο Πήκτωμα Πολυακρυλαμιδίου	69
2.2.3.4.2 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε μη Αποδιατακτικές Συνθήκες (Native PAGE) – Προσδιορισμός Ενεργότητας των Πρωτεϊνικών Ζωνών	69
2.2.3.4.2.1 Προετοιμασία Δειγμάτων-Ηλεκτροφόρηση.....	69
2.2.3.4.2.2 Εμφάνιση Πρωτεϊνικών ζωνών.....	70
2.2.3.4.3 Ηλεκτροφόρηση Ισοηλεκτρικής Εστίασης σε Πήκτωμα Ακρυλαμιδίου (IEF-PAGE, Isoelectric Focusing-PAGE).....	70

2.2.3.4.3.1 Η Μέθοδος.....	70
2.2.3.4.3.2 Εμφάνιση Πρωτεϊνικών Ζωνών στο Πήκτωμα Ηλεκτροφόρησης	70
2.2.3.5 Εύρεση Βέλτιστων Συνθηκών Δράσης Απομονωμένων Λακκασών	71
2.2.3.5.1 Εύρεση Βέλτιστης Τιμής pH Δράσης	71
2.2.3.5.2 Εύρεση Βέλτιστης Θερμοκρασίας Δράσης	71
2.2.3.6 Μελέτη Σταθερότητας Λακκασών.....	72
2.2.3.6.1 Μελέτη Σταθερότητας σε Τιμές pH.....	72
2.2.3.6.2 Μελέτη Θερμοκρασιακής Σταθερότητας	72
2.2.3.7 Προσδιορισμός Κινητικών Σταθερών Michaelis-Menten των Λακκασών	72
2.2.3.8 Επίδραση Παρεμποδιστικών Παραγόντων στην Ενεργότητα των Λακκασών	74
2.2.3.8.1 Επίδραση Οργανικών Διαλυτών στην Ενεργότητα των Λακκασών	74
2.2.3.8.2 Προσδιορισμός Ενεργότητας Λακκασών Παρουσία Παρεμποδιστών.....	74
2.2.3.9 Προσδιορισμός Φάσματος UV/Vis Καθάρων Ενζύμων.....	74
2.2.3.10 Προσδιορισμός Φαινόμενου Πρότυπου Οξειδοαναγωγικού Δυναμικού E ₀ Λακκασών	75
2.2.4 Ακίνητοποίηση Ενζυμικού Συμπυκνώματος.....	76
2.2.4.1 Πρωτόκολλο Διαδικασίας Ακίνητοποίησης με Σχηματισμό CLEAs	76
2.2.4.1.1 Προσδιορισμός Ενεργότητας σε Ίζημα και Υπερκείμενο Υγρό.....	77
2.2.4.2 Βελτιστοποίηση Συνθηκών Ακίνητοποίησης Ενζύμων σε CLEAs	77
2.2.4.2.1 Βελτιστοποίηση ως προς το Ενζυμικό Φορτίο	78
2.2.4.2.2 Βελτιστοποίηση ως προς το Μέσο Κατακρήμισης	78
2.2.4.2.3 Βελτιστοποίηση ως προς τη Συγκέντρωση Γλουταραλδεϋδης.....	78
2.2.4.3 Προσαρμογή Διαδικασίας Ακίνητοποίησης για Παραγωγή Μεγάλης Κλίμακας (Scale-up).....	78
2.2.5 Χαρακτηρισμός Συμπυκνώματος Εξωκυτταρικού Ενζυμικού Παρασκευάσματος Καλλιέργειας και Ακίνητοποιημένου Ενζυμικού Παρασκευάσματος.....	79
2.2.5.1 Μέτρηση Ενζυμικής Ενεργότητας	79
2.2.5.2 Εύρεση Βέλτιστων Συνθηκών Δράσης Λακκασών	79
2.2.5.2.1 Εύρεση Βέλτιστης Τιμής pH δράσης	79
2.2.5.2.2 Εύρεση Βέλτιστης Θερμοκρασίας Δράσης	79
2.2.5.3 Μελέτη Σταθερότητας.....	79
2.2.5.2.1 Μελέτη Θερμοκρασιακής Σταθερότητας	80
2.2.5.2.2 Μελέτη Σταθερότητας σε Οργανικούς διαλύτες	80
2.2.6 Χρήση Ενζυμικών Παρασκευασμάτων σε Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές.....	80
2.2.6.1 Χρήση Ενζυμικού Συμπυκνώματος και Ακίνητοποιημένων Ενζύμων για Αποτοξικοποίηση Υγρών Αποβλήτων Τριφασικού Ελαιουργείου	80
2.2.6.1.1 Προετοιμασία Αντιδράσεων και Επάωση.....	80
2.2.6.1.2 Δειγματοληψία και Μετρήσεις Αποτοξικοποίησης.....	81
2.2.6.1.2.1 Αποχρωματισμός ΥΑΕ	81
2.2.6.1.2.2 Μέτρηση Ολικών Φαινολικών Ενώσεων με τη Μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	81
2.2.6.2 Χρήση Απομονωμένων Ενζύμων σε Αντιδράσεις Σύνθεσης.....	82
2.2.6.2.1 Ποιοτικός Έλεγχος Δράσης των Λακκασών σε Αναγωγικά Υποστρώματα	82

2.2.6.2.2 Επιλογή Υποστρωμάτων και Καθορισμός Συνθηκών Αντιδράσεων Σύνθεσης.....	83
2.2.6.2.3 Παραλαβή Προϊόντων Σύνθεσης και Προσδιορισμός Δομής	84
3. Αποτελέσματα.....	85
3.1 Χαρακτηρισμός Καθαρών Πρωτεϊνών <i>PcLac1</i> και <i>PcLac2</i>	85
3.1.1 Παρακολούθηση Οξειδωσης Υποστρωμάτων	85
3.1.2 Μελέτη Εξειδίκευσης ως προς το Υπόστρωμα	86
3.1.3 Αποτελέσματα Ηλεκτροφορητικών Τεχνικών.....	87
3.1.3.1 Προσδιορισμός Μεγέθους Λακκασών.....	87
3.1.3.2 Προσδιορισμός Ισοηλεκτρικού σημείου Λακκασών.....	88
3.1.4 Βέλτιστες Συνθήκες Δράσης	89
3.1.4.1 Βέλτιστη Τιμή pH.....	89
3.1.4.2 Βέλτιστη Θερμοκρασία Δράσης	91
3.1.5 Συνθήκες Λειτουργικής Σταθερότητας.....	92
3.1.5.1 Σταθερότητα σε Τιμές pH	92
3.1.5.2 Θερμοκρασιακή Σταθερότητα	93
3.1.6 Προσδιορισμός Κινητικών Σταθερών Michaelis-Menten	94
3.1.7 Επίδραση Παρεμποδιστικών Παραγόντων στην Ενεργότητα των Λακκασών	97
3.1.7.1 Επίδραση Οργανικών Διαλυτών.....	97
3.1.7.2 Επίδραση Παρεμποδιστών	98
3.1.8 Φάσμα <i>UV/Vis</i> Καθαρών Λακκασών	100
3.1.9 Φαινόμενο Πρότυπο Οξειδοαναγωγικό Δυναμικό E_0	101
3.2 Ακίνητοποίηση Εξωκυτταρικού Ενζυμικού Παρασκευάσματος	102
3.2.1 Βελτιστοποίηση Συνθηκών Διαδικασίας Ακίνητοποίησης Ενζύμων σε <i>CLEAs</i>	102
3.2.1.1 Βελτιστοποίηση ως προς το Ενζυμικό Φορτίο	102
3.2.1.2 Βελτιστοποίηση ως προς το Μέσο Κατακρήμνισης.....	103
3.2.1.3 Βελτιστοποίηση ως προς τη Συγκέντρωση Γλουταραλδεϋδης.....	103
3.2.2 Παραγωγή <i>CLEAs</i> σε Μεγάλη Κλίμακα.....	104
3.2.3 Βιοχημικός Χαρακτηρισμός Συμπυκνώματος Εξωκυτταρικού Ενζυμικού Παρασκευάσματος Καλλιέργειας και Ακίνητοποιημένου Ενζυμικού Παρασκευάσματος.....	105
3.2.3.1 Βέλτιστες Συνθήκες Δράσης	105
3.2.3.1.1 Βέλτιστη Τιμή pH Δράσης.....	105
3.2.3.1.2 Βέλτιστη Θερμοκρασία Δράσης.....	106
3.2.3.2 Μελέτη Συνθηκών Λειτουργικής Σταθερότητας	106
3.2.3.2.1 Μελέτη Θερμοκρασιακής Σταθερότητας	107
3.2.3.2.2 Μελέτη Σταθερότητας σε Οργανικούς Διαλύτες	108
3.3 Χρήση Ενζυμικών Παρασκευασμάτων σε Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές	110
3.3.1 Χρήση Ελεύθερου και Ακίνητοποιημένου Ενζυμικού Συμπυκνώματος <i>Crude</i> και Ακίνητοποιημένου Ενζύμου για Αποτοξικοποίηση Υγρών Αποβλήτων Τριφασικού Ελαιουργείου.....	110
3.3.2 Χρήση Απομονωμένων Ενζύμων σε Αντιδράσεις Σύνθεσης.....	113
4 Συζήτηση Αποτελεσμάτων – Γενικά Συμπεράσματα.....	116

4.1 Χαρακτηρισμός Λακκασών <i>PcLac1</i> και <i>PcLac2</i>	117
4.2 Ακίνητοποίηση Ενζυμικού Εκχυλίσματος Καλλιέργειας	119
4.2.1 Παράγοντες Βελτιστοποίησης Σχηματισμού CLEAs	120
4.2.2 Μεταβολή Λειτουργικών Ιδιοτήτων των Ακίνητοποιημένων Λακκασών	122
4.3 Αξιοποίηση Ενζυμικών Παρασκευασμάτων σε Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές	123
4.3.1 Αξιοποίηση Υπερκείμενου Υγρού Καλλιέργειας και Ακίνητοποιημένων Ενζύμων για Αποτοξικοποίηση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου	123
4.3.2 Αντιδράσεις Σύνθεσης Φαινολικών Ολιγο- ή Πολυμερών από τις Λακκάσες <i>PcLac1</i> και <i>PcLac2</i>	124
4.4 Μελλοντικοί Στόχοι	126
5 Βιβλιογραφία	127
6 Παράρτημα	137
6.1 Παράρτημα Α: Φάσματα Απορρόφησης από το Πείραμα Αξιολόγησης Οξειδωσης Υποστρωμάτων.	137
6.1.1 Οξείδωση υποστρωμάτων από την λακκάση <i>PcLac1</i>	137
6.1.2 Οξείδωση υποστρωμάτων από την λακκάση <i>PcLac2</i>	142
6.2 Παράρτημα Β: Διαγράμματα βολταμμογραφίας των 6 πρώτων αρμονικών συναρτήσεων	150
6.3 Παράρτημα Γ: Διαγράμματα Φασματοσκοπίας NMR	158
6.4 Παράρτημα 4: Πιθανά Προϊόντα Σύνθεσης από Οξείδωση Λακκασών με Υποστρώματα το Συναπικό Οξύ και το Φερουλικό Οξύ	161

1 Θεωρητικό Μέρος

1.1 Εισαγωγή

Η λιγνίνη συνιστά ένα από τα πιο συνήθη πολυμερή στη φύση και αποτελεί συστατικό της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, το οποίο όμως δεν είναι επιδεκτικό σε μικροβιακή αποικοδόμηση. Ως εκ τούτου αποτελεί εμπόδιο στην αξιοποίηση κλασμάτων της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Για τον λόγο αυτό η μικροβιακή αποικοδόμηση της λιγνίνης έχει λάβει ιδιαίτερη προσοχή τα τελευταία χρόνια. Οι μύκητες προσελκύουν το ενδιαφέρον για αξιοποίηση σε εφαρμογές «πράσινης χημείας», καθώς διαθέτουν ενζυμικά συστήματα, τα οποία κατόπιν απομόνωσης και ενδεχόμενων τροποποιήσεων έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν επιλεκτικά τη λιγνίνη δίχως να επηρεάζουν κυτταρινούχες δομές. Η ικανότητα αυτή βρίσκει εφαρμογή σε τομείς όπως η βιολογική κατεργασία χαρτοπολτού, η βελτίωση της πεπτικότητας σε αγροτικά κατάλοιπα που προορίζονται για ζωοτροφές, η βιοαποκατάσταση οικοσυστημάτων ή και η μετατροπή λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε βιομηχανικό προϊόν (Blanchette, 1984).

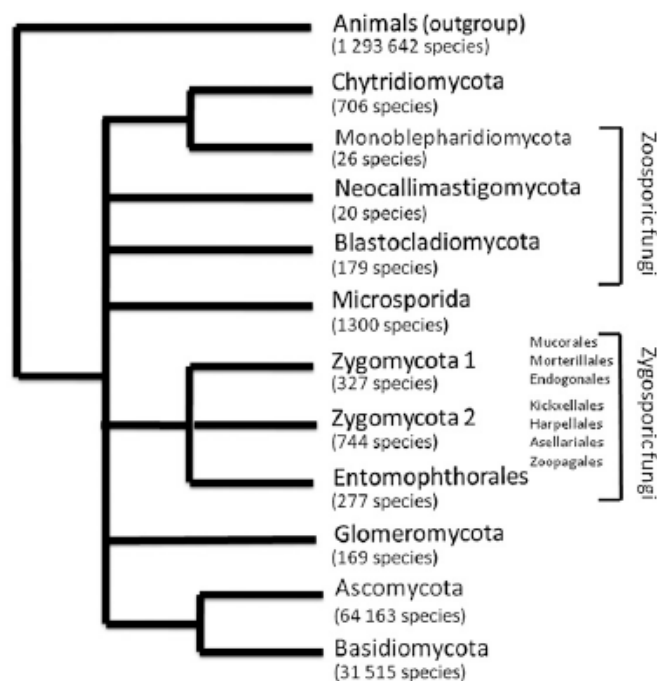
Οι Βασιδιομύκητες αποτελούν μια κατηγορία μυκήτων που θεωρούνται οι πλέον τυπικοί οργανισμοί για την αποικοδόμηση της λιγνίνης. Συγκεκριμένα οι Βασιδιομύκητες λευκής σήψης παράγουν εξωκυτταρικά ποικίλες μορφές ισοενζύμων οξειδασών, όπως λακκάσες, και υπεροξειδασών. Οι λακκάσες και οι υπεροξειδάσες, εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης του περιβάλλοντος προς σχηματισμό συστατικών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μεταβολισμό του ίδιου οργανισμού καθώς και από όλους τους υπόλοιπους οργανισμούς του περιβάλλοντος οικοσυστήματος (Kersten & Cullen, 2007).

Οι λακκάσες ανήκουν στην οικογένεια των πολυφαινολικών οξειδασών χαλκού. Τα ένζυμα αυτά παράγονται κυρίως από Βασιδιομύκητες λευκής σήψης προκειμένου να αποικοδομήσουν ενώσεις της λιγνίνης, συμβάλλοντας κατά αυτόν τον τρόπο στην ανακύκλωση αυτού του βιοπολυμερούς. Αναφορικά με τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές των λακκασών, τα ένζυμα είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν σε διαλυτή μορφή ή ακινητοποιημένα. Συνήθως αξιοποιούνται για αποτοξικοποίηση ρύπων οργανικής προέλευσης στο έδαφος αλλά και για απομάκρυνση φαινολικών ή αρωματικών ενώσεων από αστικά ή βιομηχανικά απόβλητα. Παράλληλα, με τη χρήση λακκασών ακινητοποιημένων σε κλάσματα του εδάφους, οι ρύποι οργανικής προέλευσης στα εδάφη οξειδώνονται σε λιγότερο τοξικές μορφές πολυμερών και, κατόπιν κατάλληλων μετατροπών, είναι δυνατόν ως ενώσεις να ενσωματωθούν με τις χημικές ενώσεις του εδάφους (Leonowicz et al., 2001).

Όπως είναι κατανοητό, όλες εκείνες οι εφαρμογές βιοκατάλυσης από λακκάσες παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον, ωστόσο δεν είναι ακόμα οικονομικά ελκυστικές. Το κόστος αξιοποίησης των λακκασών είναι αυξημένο, αφενός λόγω των μεγάλων ποσοτήτων ενζύμων που απαιτούνται, αφετέρου λόγω μειωμένης σταθερότητας των ενζύμων σε βιοτεχνολογικές διεργασίες. Συνεπώς στο προσκήνιο εμφανίζονται ολοένα και περισσότερο τα ακινητοποιημένα ένζυμα καθώς επιδεικνύουν πλήθος πλεονεκτημάτων. Μερικά από τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης είναι η εύκολη ανάκτηση, η αυξημένη σταθερότητα και αντοχή στις συνθήκες της αντίδρασης, ο ταχύτατος διαχωρισμός των ενζύμων από το αντιδρόν μίγμα αλλά και η ανθεκτικότητα σε ακραίες τιμές θερμοκρασίας, pH και υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος.

1.2 Βασιδιομύκητες και *Pleurotus*

Οι μύκητες είναι οι κυρίαρχοι αποικοδομητές στα περισσότερα χερσαία οικοσυστήματα. Η αξία των οργανισμών αυτών είναι μεγάλη στον τομέα των βιοτεχνολογικών εφαρμογών, καθώς χρησιμοποιούνται ως πηγή ενζύμων και φαρμακευτικών ουσιών ενώ αποτελούν οργανισμούς- μοντέλα για πειραματικούς σκοπούς. Οι κύριοι βιότοποι στους οποίους αναπτύσσονται είναι το έδαφος, το νερό αλλά και ολόκληροι οργανισμοί με τους οποίους συμβιώνουν και δρουν συνεργιστικά. Ενώ ιστορικά θεωρούνταν ότι ανήκουν στο φυτικό βασίλειο, λόγω της μορφής και της έλλειψης προφανούς κινητικότητας, πλέον έχουν αναγνωριστεί ως ξεχωριστό βασίλειο. Οι περισσότεροι μύκητες δεν έχουν μαστίγιο (flagella), είναι ευκαρυώτες που σχηματίζουν νηματοειδείς υφές και αλληλεπιδρούν με όλες τις κύριες ομάδες μικροοργανισμών. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων μούχλες, ζύμες και μανιτάρια (Blackwell, 2011, Bowman et al., 1992).



Εικόνα 1.2.1 Μυκητιακά φύλα και προσεγγιστικός αριθμός ειδών σε κάθε φύλλο. (Blackwell, 2011)

Χωρίς αμφιβολία οι Βασιδιομύκητες περιλαμβάνουν ένα μεγάλο ποσοστό των ειδών της μυκητιακής βιοποικιλότητας (Εικόνα 1.2.1). Στη κατηγορία των Βασιδιομυκήτων περιλαμβάνονται μικροοργανισμοί που προκαλούν παθογένεια στα φυτά, μύκητες του θαλάσσιου περιβάλλοντος αλλά και πολλοί οργανισμοί λειχήνων (Blackwell, 2011).

1.2.1 Γενικά Χαρακτηριστικά για τους Βασιδιομύκητες

Βασιδιομύκητες ονομάζονται οι μύκητες των οποίων τα σπόρια παράγονται επάνω σε μικροσκοπικές ροπαλόμορφες βάσεις (βασίδια). Αναπτύσσονται πάνω σε ξυλώδη ύλη, σε έδαφος αλλά έχουν εντοπισθεί και σε θαλάσσια οικοσυστήματα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί θεωρείται ότι έχουν κυρίαρχο ρόλο στον κύκλο του άνθρακα των οικοσυστημάτων, αποικοδομώντας λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα και εφοδιάζοντας τον ίδιο τον οργανισμό αλλά και περιβάλλοντες οργανισμούς με αναγκαία θρεπτικά για την ανάπτυξή τους (Blackwell, 2011, Kersten & Cullen, 2007).

Οι Βασιδιομύκητες αποτελούν μια από τις πιο ενδιαφέρουσες κατηγορίες μυκήτων λόγω της ικανότητάς τους να προσαρμόζονται σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και να διατηρούν τη λιγνινολυτική τους δράση. Θεωρούνται οι πλέον τυπικοί οργανισμοί για την αποικοδόμηση της λιγνίνης και αυτός είναι ένας από τους κύριους λόγους για τους οποίους έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Μεταξύ των Βασιδιομυκήτων οι μύκητες λευκής σήψης είναι εκείνοι που παρουσιάζουν την ικανότητα να παράγουν οξειδωτικά ένζυμα ως συστατικά ενός συνολικού λιγνινολυτικού συστήματος για την βιοαποικοδόμηση της λιγνίνης (Pelaez, 1995).

1.2.2 Το Γένος *Pleurotus*

1.2.2.1 Γενικά Στοιχεία για το Γένος *Pleurotus*

Τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* (Pleurotaceae, Ανώτεροι Βασιδιομύκητες) κατατάσσονται στην κατηγορία των βρώσιμων λιγνινολυτικών μανιταριών. Οι μύκητες του γένους *Pleurotus* επιδεικνύουν υψηλή διατροφική αξία, φαρμακευτικές ιδιότητες ενώ αξιοποιούνται και σε βιοτεχνολογικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές. Είναι γνωστά επίσης ως oyster mushroom ή hiratake. Οι οργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται συνήθως στις βόρειες εύκρατες ζώνες και χαρακτηρίζονται από τη λευκή σάρκα του σώματος, η οποία έχει τη μορφή κελύφους, με λευκά στίγματα σπορίων που ενώνονται με πτυχώσεις. Οι πρώτοι μύκητες του γένους αυτού που απέκτησαν εμπορικό ενδιαφέρον ήταν ο *P. ostreatus*, λόγω της πλούσιας περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, ίνες, υδατάνθρακες, βιταμίνες και άλατα με ταυτόχρονη χαμηλή θερμιδική αξία, αλλά και ο *P. eryngii* (Cohen et al., 2002).

Χαρακτηριστικό των μυκήτων του γένους *Pleurotus* είναι η εύκολη διαδικασία παραγωγής και καλλιέργειας. Τα είδη του *Pleurotus* είναι στην ουσία σαπροφυτικοί μύκητες που αναπτύσσονται πάνω στο ξύλο ή πάνω σε νεκρή φυτική βιομάζα, ενώ στο μέσο ανάπτυξης συχνά αξιοποιούνται υποστρώματα που περιλαμβάνουν λιγνίνη και κυτταρίνη. Ωστόσο η ικανότητα του κάθε είδους να αναπτύσσεται στο εν λόγω μέσο εξαρτάται από την ικανότητά του να εκκρίνει μια σειρά από ένζυμα (υπεροξειδάσες, λακκάσες, κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, ξυλανάσες) που συνιστούν το σύστημα αποικοδόμησης της φυτικής βιομάζας του οργανισμού (Cohen et al., 2002).

1.2.2.2 Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές των Μυκήτων του Γένους *Pleurotus*

Τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* διαθέτουν υψηλή θρεπτική αξία καθώς αποτελούν βασική πηγή πρωτεΐνης. Εν συντομία τα μανιτάρια αυτά παρουσιάζουν δυνατότητες εφαρμογής στον φαρμακευτικό τομέα, αφού διαθέτουν αντιβακτηριακές, αντι-ιικές, αντικαρκινικές ή και ανοσοποιητικές δράσεις. Ως προς τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές, το λιγνινολυτικό σύστημα είναι αυτό που έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον για συστηματική επιστημονική έρευνα. Έως τώρα έχουν χαρακτηριστεί τρεις βασικές οικογένειες λιγνινολυτικών ενζύμων: οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnP), οι «ευέλικτες» υπεροξειδάσες (versatile peroxidase, VP) και οι λακκάσες. Το λιγνινολυτικό ενζυμικό σύστημα των ειδών του γένους *Pleurotus* φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενο, ως προς τις περιβαλλοντικές εφαρμογές. Τέτοιες εφαρμογές είναι για παράδειγμα η βιομετατροπή αγροτικών αποβλήτων με σκοπό την αξιοποίησή τους ως προϊόντα ζωοτροφής ή ακόμα η βιοαποικοδόμηση οργανικών, ξενοβιοτικών και βιομηχανικών ρύπων (Cohen et al., 2002).

Οι μύκητες του γένους *Pleurotus* έχουν υψηλή αξία στον τομέα της φαρμακευτικής ενώ θεωρούνται «φαρμακευτικά» μανιτάρια. Από τους οργανισμούς αυτούς έχουν απομονωθεί συστατικά τα οποία φαίνεται να έχουν αντιμικροβιακές, αιματολογικές, αντι-ιικές, αντικαρκινικές, υποτασικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, κυτταρικά συστατικά ή δευτερεύοντες μεταβολίτες των μυκήτων συμβάλλουν στην ενδυνάμωση του ανοσοποιητικού του ξενιστή, με αποτέλεσμα να αξιοποιούνται για την αντιμετώπιση μεγάλου εύρους ασθενειών (Cohen et al., 2002). Παραδείγματα ουσιών που προέρχονται από μανιτάρια του γένους *Pleurotus* και βρίσκουν εφαρμογή στον τομέα της φαρμακευτικής είναι η β-D-γλυκάνη και γλυκοπεπτίδια από τον *P. ostreatus* (Bobek & Galbavy, 2001, Karacsonyi & Kuniak, 1994, Li et al., 1994), πολυσακχαρίτες του *P. citrinopileatus* (Zhang et al., 1994), λοβαστατίνη από τους μύκητες *P. eryngii* και *P. cornucopiae* (Gunde-Cimerman & Cimerman, 1995).

Άλλη μία χρήση των μανιταριών του γένους *Pleurotus* αφορά στην ποιοτική βελτίωση αγροτικών αποβλήτων για χρήση σε ζωοτροφές. Η κυρίαρχη αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων αφορά στην ενίσχυση της θρεπτικότητας των ζωοτροφών, κυρίως των μηρυκαστικών. Η αξιοποίηση των μυκήτων λευκής σήψης έγκειται στη βελτίωση της πεπτικότητας των λιγνοκυτταρινούχων υλικών, ιδίως μέσω της βιολογικής απολιγνινοποίησης, στην αύξηση της διατροφικής αξίας και τον εμπλουτισμό σε πρωτεϊνικά συστατικά (Cohen et al., 2002). Χαρακτηριστικά αναφέρεται η μείωση του περιεχομένου της λιγνίνης κατά 51% σε δείγματα ανεπεξέργαστου άχυρου με χρήση μυκήτων *Pleurotus ostreatus* (Lindenfelser et al, 1979) ή η βελτίωση της θρεπτικής αξίας σε υπολείμματα καλλιεργειών ρυζιού και βάμβακος με στόχο την αξιοποίηση σε ζωοτροφές (Hutterman et al, 2000).

Τέλος ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην βιοαποκατάσταση οικολογικών συστημάτων. Με τον όρο βιοαποκατάσταση αναφερόμαστε στη διαδικασία με την οποία επικίνδυνα τοξικά απόβλητα μετατρέπονται με βιολογικό τρόπο σε ακίνδυνες ενώσεις ή μειώνονται κάτω από τα ανώτερα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης που θέτει η νομοθεσία. Διάφορα είδη από τα μανιτάρια *Pleurotus* έχει διαπιστωθεί ότι διασπούν τόσο φαινολικούς όσο και μη φαινολικούς ρύπους και ξενοβιοτικές ενώσεις όπως PAHs, βιομηχανικές βαφές, και άλλους ρύπους του εδάφους. Η προσθήκη των μυκήτων αυτών σε αγροτικά απόβλητα και μολυσμένα εδάφη αποτελούν παραδείγματα εφαρμογών βιοαποκατάστασης των οικοσυστημάτων. Η δράση τους θα μπορούσε αφενός να αποικοδομήσει τους ρύπους, αφετέρου η απολιγνινοποίηση των αγροτικών αποβλήτων θα συνέβαλε στην ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών στο συγκεκριμένο μέσο, οι οποίοι να είναι σε θέση να αποικοδομήσουν πιο πολύπλοκους ρύπους (Rodriguez et al., 2004, Cohen et al., 2002).

Οι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες εν προκειμένω είναι ρύποι με μεταλλαξογόνα και καρκινογόνα δράση, αποτελούνται από τρεις ή περισσότερους βενζοϊκούς δακτυλίους, οι οποίοι ενώνονται σε γραμμική, γωνιακή ή συμπλεγματική διάταξη. Η αποικοδόμηση και αποτοξικοποίηση αυτών περιλαμβάνει οξειδωτικά ένζυμα, μη επιλεκτικά ως προς το υπόστρωμα, τα προϊόντα οξείδωσης των οποίων δεν θα είναι απαραίτητα χρήσιμα ως πηγή άνθρακα ή ενέργειας για το κύτταρο. Δεδομένης της δομής της λιγνίνης και της δράσης του λιγνινολυτικού ενζυμικού συστήματος των μυκήτων πάνω σε αυτή, διερευνάται η εφαρμογή των μυκήτων του γένους *Pleurotus* για την αποικοδόμηση των PAHs, τόσο σε υγρές

καλλιέργειες όσο και σε καλλιέργειες στερεής φάσης. Η χρήση των μυκήτων αυτών στοχεύει συγκεκριμένα στον μεταβολισμό της αρχικής δομής των PAHs, σπάζοντας τους αρωματικούς δακτυλίους ώστε να δημιουργούνται ενώσεις διαθέσιμες προς περαιτέρω επεξεργασία και αποικοδόμηση. Ο μύκητας *Pleurotus ostreatus*, για παράδειγμα, επιτυγχάνει αποικοδόμηση έως και 80% του συνολικού φορτίου των PAHs του εδάφους, μέσα σε διάστημα 35 ημερών επώασης του μύκητα στο μέσο (Bogan et al., 1999). Αντίστοιχα οι οργανισμοί *P. eryngii* και *P. pulmonarius* αποικοδομούν έως και το 75% της αρωματικής ένωσης βενζο-(α)-πυρένιο σε συγκέντρωση 100μM (Rodriguez et al., 2004). Η έλλειψη γνώσεων σχετικά με τη γενετική των οργανισμών αυτών συνιστά ανασταλτικό παράγοντα στην αξιοποίησή τους, εφόσον δυσχεραίνεται η γενετική τροποποίηση και η ετερόλογη έκφραση των γονιδίων τους. Ωστόσο η έρευνα κινείται και προς αυτές τις κατευθύνσεις (Rodriguez et al., 2004, Cohen et al., 2002).

1.2.2.1 *Pleurotus citrinopileatus*

Ο μύκητας του είδους *Pleurotus citrinopileatus*, γνωστός και ως yellow oyster mushroom, είναι ένα βρώσιμομανιτάρι, ευρέως διαδεδομένο σε Κίνα, Ινδία και Ιαπωνία. Χαρακτηρίζεται από την ελκυστική όψη, το κίτρινο χρώμα, την έντονη οσμή και την εύθραυστη υφή του. Τα μικύλλια αυτού του μύκητα αναπτύσσονται σε νεκρή ύλη από δέντρα και σε κορμούς πλατύφυλλων δέντρων (Rosnina et al., 2016, Lee et al., 2007).



Εικόνα 1.2.2.1.1 Νηματοειδείς υφές από μύκητα του είδους *Pleurotus citrinopileatus*. (<http://www.mycobank.org/MB/303973>, 17/08/2018)



Εικόνα 1.2.2.1.2 Μύκητας του είδους *Pleurotus citrinopileatus*.
(<http://www.eol.org/pages/1016971/overview>, 17/08/2018)

Το εμπορικό ενδιαφέρον προς τον μύκητα πηγάζει από την υψηλή περιεκτικότητα αυτού σε αμινοξέα και άλατα. Τα μικύλλια του μανιταριού χρησιμοποιούνται ως συστατικό τροφίμων, ως βελτιωτικό αρώματος των τροφίμων ή ακόμη και ως λειτουργικό συστατικό με φαρμακευτική και θρεπτική αξία. Ο μύκητας έχει αντι-ιικές ιδιότητες ενώ εκχυλίσματα υδατοδιαλυτών υδρογονανθράκων από τον μύκητα εμφανίζουν αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Αναφέρεται επιπλέον η απομόνωση λεκτίνης από καλλιέργεια του μύκητα, με ανασταλτική δράση στην αντίστροφη μεταγραφάση του HIV-1 (Li et al., 2008, Lee et al., 2007, Wang et al., 2005, Cohen et al., 2002). Μία τελευταία εφαρμογή είναι η αποτελεσματική δράση του μύκητα στην αποικοδόμηση της βαφής reactive dye blue-BF-R σε ποσοστό 45% διαλυμάτων με 0,5 g βαφής/L και η αξιοποίηση για την κατεργασία υγρών αποβλήτων που την περιλαμβάνουν (Santos et al., 2004).

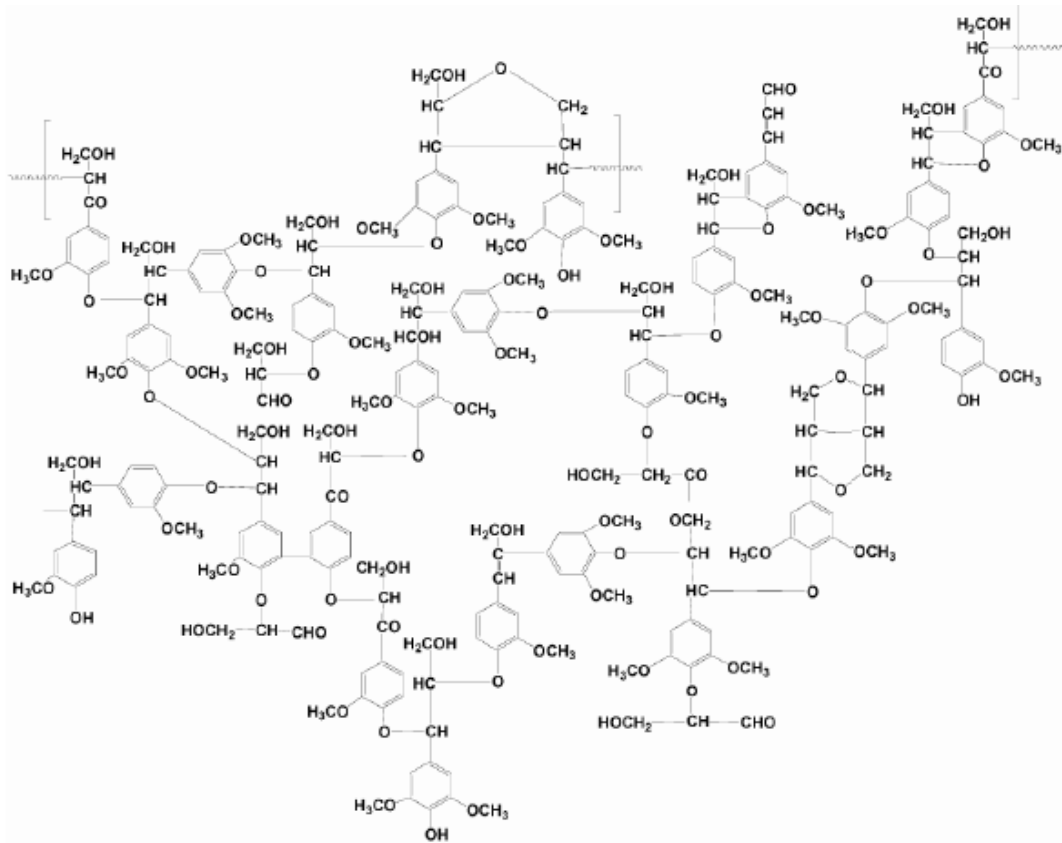
1.3 Λιγνίνη

Η βιοαποικοδόμηση των συστατικών μερών της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη, επιτυγχάνεται με τη χρήση ενζύμων. Η μετατροπή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης έχει ήδη μελετηθεί και έχει διαπιστωθεί ότι ένα μεγάλο πλήθος μικροοργανισμών παράγει μια σειρά από υδρολάσες με τις οποίες προκύπτουν δι- και μονοσακχαρίτες από τους πολυσακχαρίτες της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Ωστόσο η έκταση της βιοαποικοδόμησης των πολυσακχαριτών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συχνότητα της παρουσίας της λιγνίνης, της οποίας ρόλος είναι να προστατεύει τους φυτικούς ιστούς από μικροβιακές επιθέσεις μέσω των υδρολασών (Leonowicz et al., 2001).

Οι λακκάσες έχουν μεν χαρακτηριστεί ως ένζυμα που καταλύουν την οξείδωση φαινολών και πολυφαινολών ωστόσο οι φαινολικές υπομονάδες δεν συνιστούν μεγάλο ποσοστό των λιγνιτικών δομών. Αυτό επαγωγικά σημαίνει ότι εάν η οξείδωση από τις λακκάσες περιορίζεται σε φαινολικές ενώσεις, η αποικοδόμηση του συνόλου της λιγνίνης, η οποία απαιτεί διάσπαση του συνόλου των δεσμών του τρισδιάστατου πολυμερούς, φαντάζει αδύνατη. Μαζί με τις λακκάσες εμφανίζονται συνήθως στους μύκητες και οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης, οι οποίες οξειδώνουν τόσο φαινολικές όσο και μη φαινολικές δομές και άρα σε

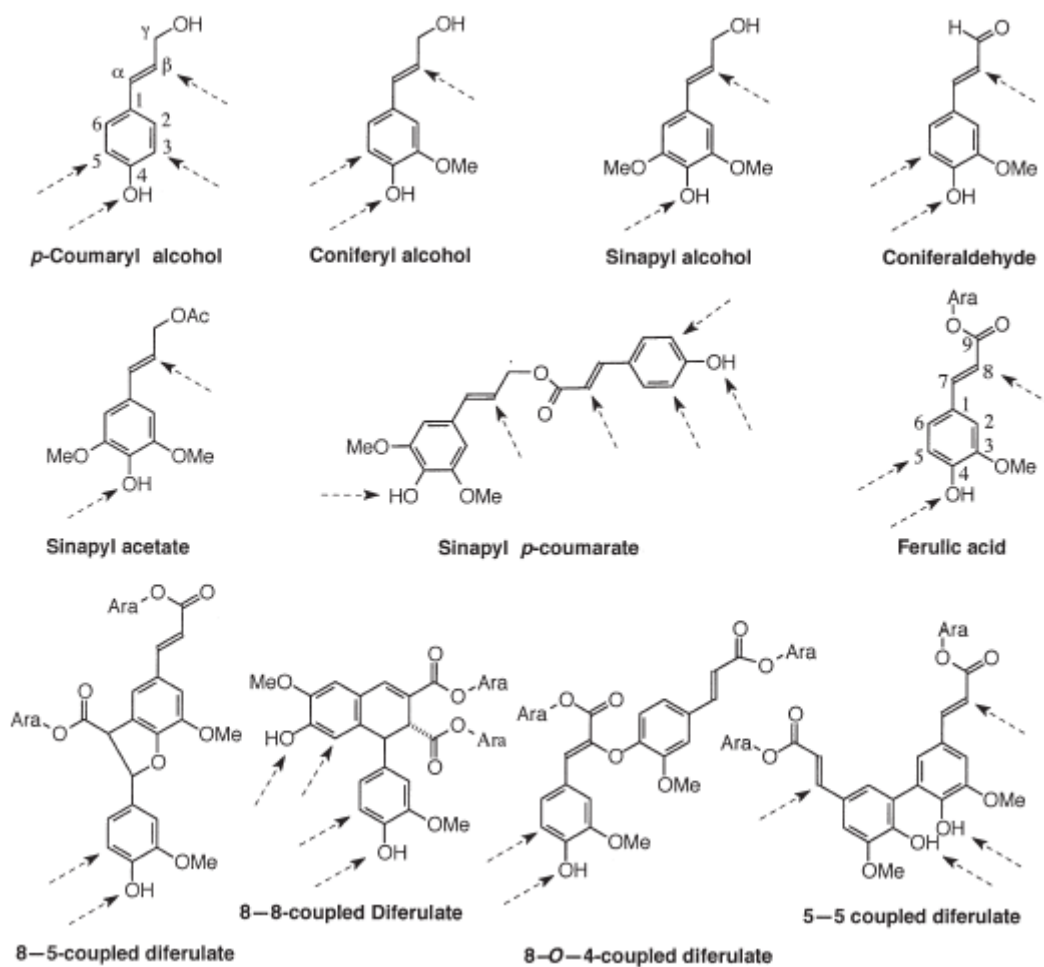
συνδυασμό με τις λακκάσες έχουν αποτελεσματικότερη δράση (Grabber, 2005, Bourbonnais & Paice, 1990).

Δεδομένου ότι η ογκώδης δομή της λιγνίνης αποτρέπει την απευθείας αλληλεπίδραση με τα ένζυμα, φαίνεται ότι μικρότερα μόρια δρουν ως οξειδοαναγωγικά μέσα μεταξύ του ενεργού κέντρου του ενζύμου και των λιγνιτικών δομών, προκαλώντας αποικοδόμηση του πολυμερούς. Οι πιο αποδοτικοί μεσολαβητές για την αποικοδόμηση της λιγνίνης είναι οι αζωτούχες ετεροκυκλικές δομές που περιλαμβάνουν τις ομάδες N-OH, και πιο συγκεκριμένα η ένωση N-Υδροξυβενζοτριαζόλη (N-hydroxybenzotriazole), (Riva, 2006).



Εικόνα 1.3.1 Απεικόνιση χαρακτηριστικής δομής της λιγνίνης (Brebū & Vasile, 2010).

αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε βιομηχανικές διεργασίες. Το ενδιαφέρον στρέφεται στους Βασιδιομύκητες λευκής σήψης καθώς στη δράση εκείνων βασίζεται κυρίως η εκτενής αποικοδόμηση της λιγνίνης. Οι μύκητες λευκής σήψης γενικά επιδεικνύουν μεγαλύτερη λιγνινολυτική ενεργότητα σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς, εξαιτίας της παρουσίας των λακκασών. Η αποικοδόμηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας θεωρείται ότι πραγματοποιείται από τους μύκητες λευκής σήψης μέσω μια διαδικασίας γνωστής ως «ενζυμική καύση» (Huang et al., 2011, Maciel et al., 2010, Riva, 2006).



Εικόνα 1.3.1.1 Αντιπροσωπευτικές δομές πρόδρομων ενώσεων της λιγνίνης. Ara: ομάδες αραβινοφουρανόζης. Τα βέλη διακεκομμένης γραμμής υποδεικνύουν τις πιθανές θέσεις σύζευξης των ενώσεων κατά τον πολυμερισμό της λιγνίνης (Grabber, 2005).

1.3.2 Βιοσύνθεση Λιγνίνης

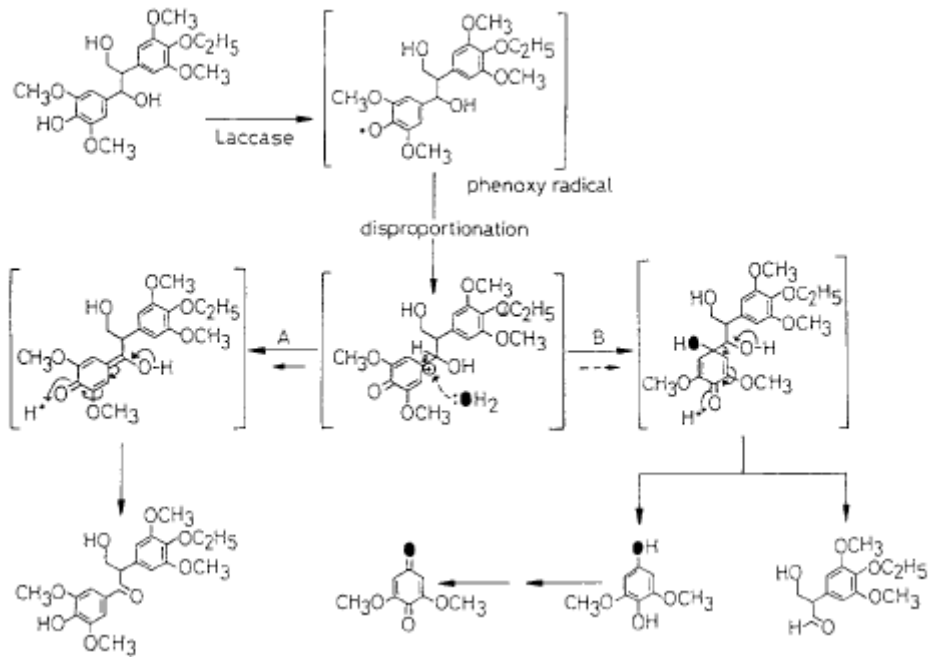
Η βιοσύνθεση της λιγνίνης στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών ιστών συνιστά μια διαδικασία στην οποία εμπλέκονται οξειδοαναγωγικά ένζυμα όπως και οι λακκάσες. Πιο συγκεκριμένα λακκάσες και υπεροξειδάσες των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών σχηματίζουν φαινοξυ-ρίζες της μονολιγνόλης. Οι εν λόγω ρίζες συζεύγνυνται σε διμερείς ενώσεις κινονών και εν συνεχεία μέσω άλλων ενζυμικών δράσεων σχηματίζουν διλιγνόλες. Οι φαινόλες αυτές με τη σειρά τους μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες και σχηματίζουν εν συνεχεία ολιγολιγνόλες. Η επανάληψη των αντιδράσεων αυτών οδηγεί τελικά στον σχηματισμό της λιγνίνης (Higuchi, 1989).

1.3.3 Αποικοδόμηση Λιγνίνης

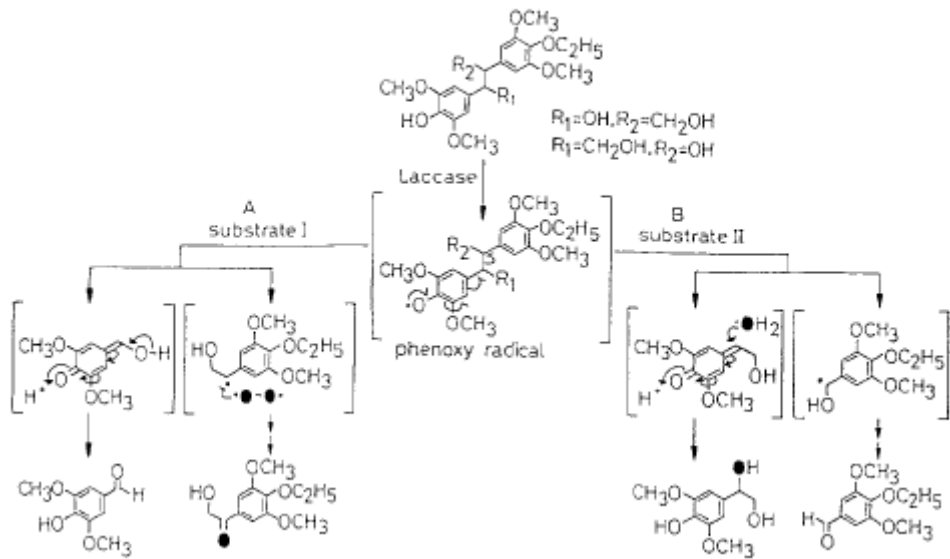
Οι Βασιδιομύκητες σήψης του ξύλου διεισδύουν στους ιστούς της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας προκειμένου να αποκτήσουν πρόσβαση στα αξιοποιήσιμα συστατικά υδρογονανθρακικής φύσεως. Μάλιστα οι Βασιδιομύκητες λευκής σήψης παρουσιάζουν ένα πολύπλευρο μηχανισμό ενζύμων τα οποία δρουν συνεργιστικά και με τη βοήθεια δευτερευόντων μεταβολιτών των μυκήτων αποικοδομούν αποτελεσματικά τα κλάσματα της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Συγκεκριμένα υπάρχουν τρεις κατηγορίες ενζύμων του μηχανισμού αυτού. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα ένζυμα που αποικοδομούν τους ιστούς του ξύλου ή τα πρωτοταγή προϊόντα αποικοδόμησης, στα οποία περιλαμβάνονται κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, λακκάσες, υπεροξειδάσες, protococatechuate-3,4 διοξυγενάσες. Στην δεύτερη ομάδα συναντώνται ένζυμα όπως οξειδάσες της αρυλικής αλκοόλης ή γλυοξαλικές οξειδάσες (aryl alcohol oxidase, glyoxal oxidase), τα οποία συνεργάζονται με τα ένζυμα της πρώτης ομάδας, παρέχοντας για παράδειγμα H_2O_2 στις υπεροξειδάσες, δίχως ωστόσο να επιτίθενται απευθείας στους ιστούς ξύλου. Στην τρίτη κατηγορία ξεχωρίζουν ένζυμα όπως η οξειδάση της γλυκόζης ή η αφυδρογονάση της κελλεβιόζης (cellobiose:quinine oxidoreductase ή cellobiose dehydrogenase). Πρόκειται στην ουσία για ένζυμα τα οποία συμβάλλουν στο να ενώνουν τα μεταβολικά μονοπάτια κατά τη μετατροπή των υψηλού μοριακού βάρους συστατικών της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Καθένα από τα ένζυμα αυτά, συμπεριλαμβανομένων και των λακκασών, είναι σε θέση να δράσουν μόνα τους ή και σε συνέργεια (Leonowicz et al., 2001).

Από το λιγνινολυτικό σύστημα έχουν ξεχωρίσει ως ένζυμα οι λακκάσες και οι υπεροξειδάσες, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να καταλύσουν τη διάσπαση ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ ατόμων άνθρακα ή άνθρακα με οξυγόνο στα σύνθετα πολυμερή της λιγνίνης. Οι ρίζες που παράγονται από τη δράση των ενζύμων συμμετέχουν σε πλήθος αυθόρμητων αντιδράσεων ενώ είναι σε θέση να διασπασούν ακόμα και αρωματικούς δακτυλίους. Οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου επιτίθενται σε αρωματικές δομές της λιγνίνης μέσω αντιδράσεων με κατιόντα Mn^{3+} , οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης οξειδώνουν απευθείας τα αρωματικά τμήματα της λιγνίνης ενώ οι λακκάσες οξειδώνουν κατά προτίμηση φαινολικές δομές λιγνίνης σε φαινόξυ-ρίζες οι οποίες εν συνεχεία σχηματίζουν κινόνες. Οι αντιδράσεις που ακολουθούν τον σχηματισμό των ριζών είναι δυνατόν να οδηγήσουν τόσο σε αποικοδόμηση των αλυσίδων και των αρωματικών δακτυλίων όσο και σε απομεθυλίωση. Ωστόσο οι λακκάσες επιδρούν πάνω στα πολυμερή της λιγνίνης με διαφορετικό τρόπο από ότι οι υπεροξειδάσες. Για τον προσδιορισμό των σταδίων της βιομετατροπής της λιγνίνης χρησιμοποιούνται χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης πάνω στα προϊόντα της αποικοδόμησης (Leonowicz et al., 2001).

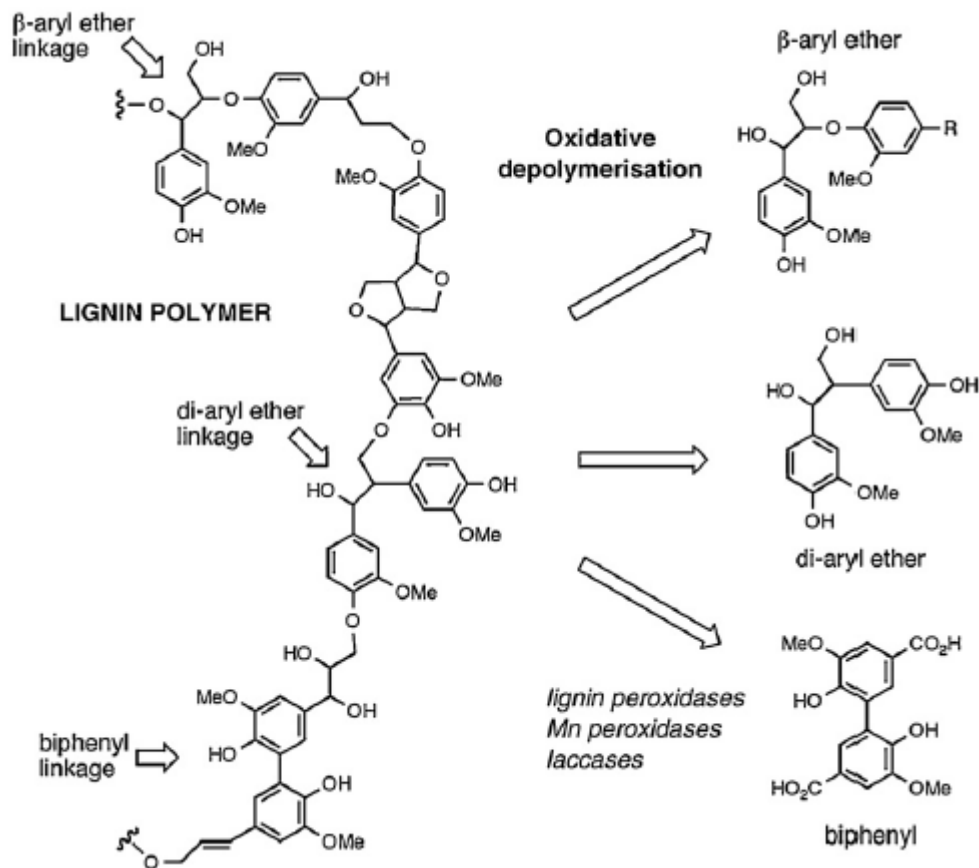
Μελετώντας τη δομή των προϊόντων αποικοδόμησης έχει επικρατήσει η θεώρηση ότι μέσω της παραγωγής φαινόξυ-ριζών από τη δράση λακκασών ενεργοποιούνται τρία είδη αντιδράσεων. Πρώτη είναι η σχάση του δεσμού $C_\alpha-C_\beta$ (Εικόνα 1.3.3.2), η δεύτερη είναι η σχάση του δεσμού μεταξύ φαινολικών και αρυλικών ομάδων (Εικόνα 1.3.3.1-B) και η τρίτη η C_α οξείδωση του αρωματικού δακτυλίου (Εικόνα 1.3.3.1-A). Μεσομερείς μορφές των φαινόξυ-ριζών που σχηματίζονται, δημιουργούν δεσμούς με παρα- ή ορθο-κινόνες, προϊόντα που ακολούθως υπόκεινται σε απομεθυλίωση και αποσύνθεση σε μονομερή. Τα μονομερή αυτά βρίσκονται σε εξαιρετικά ασταθή κατάσταση, γεγονός το οποίο ενεργοποιεί τον πολυμερισμό (Leonowicz et al., 2001).



Εικόνα 1.3.3.1 Πιθανοί μηχανισμοί για α οξείδωση του αρωματικού δακτυλίου (A) και για τη σχάση του δεσμού μεταξύ φαινολικών και αρυλικών ομάδων (B) από λακκάσες (Higuchi, 1990).

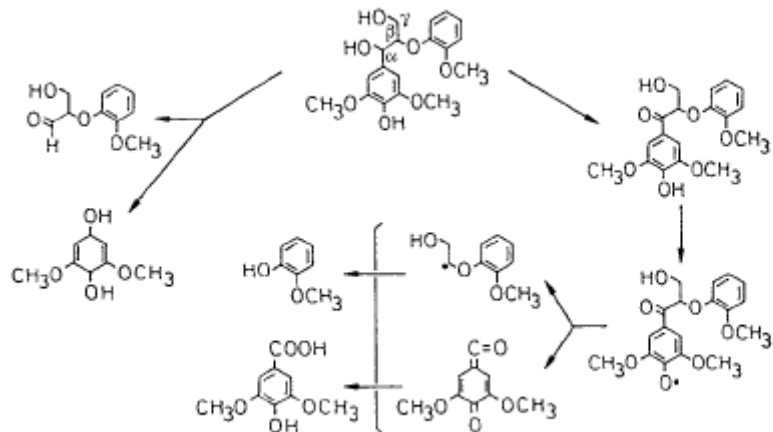


Εικόνα 1.3.3.2 Πιθανός μηχανισμός σχάσης του δεσμού $C_\alpha-C_\beta$ σε φαινολικό β -1 συστατικό από λακκάση (Higuchi, 1990).



Εικόνα 1.3.3.3 Σχηματική αναπαράσταση αποπολυμερισμού λιγνίνης από κλάσματα λιγνίνης (Bugg et al., 2011).

Αναφορικά με τη διάσπαση προπυλικών πλευρικών αλυσίδων με β -1 και β -O-4 δεσμούς, η υπεροξειδάση της λιγνίνης και η λακκάση καταλύουν τη διάσπαση των δεσμών C_{α} - C_{β} της προπυλικής πλευρικής αλυσίδας. Παράλληλα οι υπεροξειδάσες αλλά και ορισμένες λακκάσες διαχειρίζονται και τους δεσμούς β -O-4 (aryl-glycerol- β -aryl ether). Η διάσπαση των δεσμών φαίνεται να ακολουθεί μηχανισμό οξείδωσης ενός ηλεκτρονίου των αρωματικών δακτυλίων μη φαινολικών αρωματικών ενώσεων προς σχηματισμό κατιοντικών ελευθέρων ριζών, οι οποίες, ως ασταθείς, υπόκεινται σε αυθόρμητες αντιδράσεις. Σε ότι αφορά τη διάσπαση αρωματικών δακτυλίων, και στην περίπτωση αυτή ο μηχανισμός διάνοιξης του δακτυλίου είναι η οξείδωση ενός ηλεκτρονίου της αρωματικής δομής από όπου προκύπτει η κατιοντική ρίζα. Η δράση αυτή παρατηρείται τόσο σε λακκάσες όσο και σε υπεροξειδάσες (Bugg et al., 2011, Higuchi, 1993).



Εικόνα 1.3.3.4 Πιθανός μηχανισμός διάσπασης πλευρικής αλυσίδας σε φαινολική λιγνινική δομή β-O-4 από λακκάση (Higuchi, 1990).

1.4 Υγρά Απόβλητα Τριφασικού Ελαιουργείου

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου είναι αποτέλεσμα της επεξεργασίας του ελαιοκαρπού για την παραλαβή ελαίου. Τα απόβλητα αυτά αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους ρύπους σε μεσογειακά περιβάλλοντα, καθώς περιέχουν υψηλό οργανικό φορτίο και παρουσιάζουν φυτοτοξικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες οι οποίες δυσχεραίνουν την βιοαποικοδόμησή του. Οι μεσογειακές χώρες είναι εκείνες που κατεχοχόν επιβαρύνονται από τέτοιου είδους απόβλητα εφόσον κατέχουν το 95% της παγκόσμιας παραγωγής σε ελαιόλαδο (Aktas et al., 2001).

1.4.1 Λειτουργία Ελαιουργείου και Παραγωγή Υγρών Αποβλήτων

Η διαδικασία παραγωγής ελαίου από ελαιοκαρπούς ξεκινά από την παραλαβή και το πλύσιμο των καρπών, οι οποίοι στη συνέχεια οδηγούνται προς σπάσιμο και άλεση παράγοντας την ελαιοζύμη. Ακολουθεί η μάλαξη της ελαιοζύμης υπό ήπια θέρμανση και με προσθήκη νερού. Σειρά έχει η παραλαβή του ελαίου, για την οποία έχουν αναπτυχθεί τρεις τεχνικές (παραδοσιακή μέθοδος, τριών φάσεων, δύο φάσεων). Τέλος πραγματοποιείται ο καθαρισμός αυτού από στερεά σωματίδια διαλυμένα στην υγρή φάση και ο τελικός διαχωρισμός του ελαιολάδου από φυτικά υγρά (Sierra et al., 2001).

Τα υγρά απόβλητα παράγονται κατά βάση κατά την διαδικασία παραλαβής του ελαίου. Η παραδοσιακή μέθοδος συνιστά μια ασυνεχή διεργασία που διαφοροποιείται σε δύο φάσεις με την πίεση των αλεσμένων καρπών. Η διαδικασία τριών φάσεων αποτελεί μια συνεχή διεργασία κατά την οποία η ελαιοζύμη τοποθετείται σε τριφασικό φυγοκεντρικό διαχωριστήρα, από όπου διαχωρίζονται μεταξύ τους το ελαιόλαδο (1^η φάση), τα απόνερα (ή κατσίγαρος, 2^η φάση) και ο ελαιοπυρήνας (3^η φάση). Αντίθετα, το διφασικό σύστημα παραλαβής παράγει ως προϊόντα το ελαιόλαδο και τον ελαιοπυρήνα, στον οποίο ενσωματώνονται τα απόνερα. Ιδιαίτερα στην περίπτωση του τριφασικού ελαιουργείου χρησιμοποιούνται πολύ μεγάλες ποσότητες νερού (Sierra et al., 2001).

1.4.2 Γενικά Χαρακτηριστικά Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου χαρακτηρίζονται κυρίως από το ιώδες-σκουρό καφέ έως μαύρο χρώμα και την έντονη μυρωδιά ελαιολάδου. Γενικά χαρακτηριστικά αυτών είναι η

υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, το pH στο εύρος 4,5-6, το βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD) 35-100 g/L, το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) 40-220 g/L και ο ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) 22-64 g/L. Επιπλέον ως προς τη σύσταση αναφέρεται η περιεκτικότητα σε λίπη (0,3-23 g/L), ανόργανα στοιχεία (5-14 g/L), πολυφαινόλες (0,5-24 g/L), N (5-15 g/L), P (0,3-1,1 g/L), K (2,7-7,2 g/L), Ca (0,12-0,75 g/L), Mg (0,1-0,4 g/L), Na (0,04-0,9 g/L) και στερεά (5,5-17,6%). Τα χαρακτηριστικά ωστόσο των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου διαφοροποιούνται και εξαρτώνται από πλήθος παραγόντων όπως είναι για παράδειγμα η χρησιμοποιούμενη μέθοδος παραγωγής του ελαίου. Άλλοι παράγοντες που αναφέρονται είναι χαρακτηριστικά του εδάφους, του κλίματος, των ελαιόδεντρων, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, η χρήση λιπασμάτων και παρασιτοκτόνων, η διαδικασία συγκομιδής και αποθήκευσης του ελαιοκαρπού, ακόμη και η θέση δειγματοληψίας για τον χαρακτηρισμό του αποβλήτου (Paraskeva & Diamadoroulos, 2006, Sierra et al., 2001).

1.4.3 Περιβαλλοντικές Επιπτώσεις Απόρριψης Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου

Όπως είναι κατανοητό, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που προαναφέρθηκαν είναι σε θέση να προκαλέσουν αλλοιώσεις και επιβάρυνση στο οικοσύστημα του αποδέκτη όπου διατίθενται. Παράλληλα, το υψηλό οργανικό φορτίο διακρίνεται σε ενώσεις άμεσα διασπώμενες όπως σάκχαρα και οργανικά οξέα, σε βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή και σε δύσκολα διασπώμενα συστατικά όπως οι φαινόλες. Πιο συγκεκριμένα οι φαινολικές ενώσεις που συναντώνται αποτελούν είτε απλές φαινόλες και φλαβονοειδή ή πολυφαινόλες. Ιδιαίτερα οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες για την παρουσία βιοτοξικών φαινομένων στους αποδέκτες. Στις περιβαλλοντικές επιπτώσεις συγκαταλέγονται επιπλέον η καταστροφή της ικανότητας αυτοκαθαρισμού του οικοσυστήματος, η οπτική ρύπανση και τα προβλήματα δυσσομίας, ο ευτροφισμός, ο χρωματισμός των υδάτων, η πρόκληση ανοξικών συνθηκών αλλά και μεταβολές στο πορώδες του εδάφους. Τέλος τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων διαθέτουν σημαντικές φυτοτοξικές και βιοτοξικές ιδιότητες που επηρεάζουν το περιβάλλον απόρριψης (Paraskeva & Diamadoroulos, 2006, Sierra et al., 2001).

Στα πλαίσια της Ευρωπαϊκής ένωσης δεν υπάρχει σαφής νομοθεσία για την διαχείριση υγρών αποβλήτων ελαιουργείου, με αποτέλεσμα κάθε χώρα να καθορίζει τις αντίστοιχες οδηγίες. Για παράδειγμα στην Ιταλία η απόρριψη των αποβλήτων άνευ επεξεργασίας σε χερσαίους αποδέκτες είναι επιτρεπτή υπό συνθήκες, ενώ στην Ελλάδα απαγορεύεται δια νόμου. Ωστόσο γίνεται προσπάθεια από ευρωπαϊκές επιτροπές να συγκροτηθούν οδηγίες που να θέτουν πρότυπα και κανονισμούς για την προστασία χερσαίων και υδάτινων αποδεκτών. Τέτοιες οδηγίες είναι παραδείγματος χάρη η οδηγία για την προστασία του εδάφους (Soil Framework Directive - COM, 2006, 232) και αντίστοιχα για την προστασία των υδάτων (Water Framework Directive - 2000/60/EC) και των υπόγειων υδροφορέων (Groundwater Directive - 2006/118/EC), (Komnitsas & Zaharaki, 2012).

1.4.4 Μέθοδοι Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου

Η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου έχει αποτελέσει σπουδαίο αντικείμενο μελέτης, προκειμένου να πληρούνται οι προδιαγραφές για την απόρριψη αυτών σε εδαφικούς και υδάτινους αποδέκτες. Για τον σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί τεχνικές και μεθοδολογίες οι οποίες παρουσιάζονται ακολούθως (Paraskeva & Diamadoroulos, 2006).

- Φυσικοχημικές κατεργασίες: Οι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν φυγοκέντριση, φιλτράρισμα, κροκίδωση, απορρόφηση, πήξη. Με τις τεχνικές αυτές επιτυγχάνεται 30-50% μείωση του COD.
- Αναερόβια χώνευση: Στις τεχνολογίες αυτές απαιτούνται τεχνικές αραίωσης και διάλυσης, ρύθμιση αλκαλικότητας, προσθήκη θρεπτικών. Σημειώνεται 60-80% μείωση του COD για υδραυλικό χρόνο παρακράτησης 2-5 μέρες.
- Αναερόβια χώνευση κατόπιν φυσικοχημικής προκατεργασίας: Η μέθοδος περιλαμβάνει προκατεργασία με φιλτράρισμα, συσσωμάτωση, απορρόφηση σε κοκκώδη ενεργό άνθρακα, οζονισμό. Παρατηρείται 50-70% αύξηση αποτελεσματικότητας στην απομάκρυνση COD, με συνολική απομάκρυνση που φτάνει το 95% αλλά και 90% μείωση του φαινολικού φορτίου.
- Αναερόβια χώνευση κατόπιν αερόβιας προκατεργασίας: Η προκατεργασία περιλαμβάνει ανάπτυξη στο μέσο επιλεγμένων στελεχών αερόβιων μικροοργανισμών. Σημειώνεται 40-60% μείωση του COD κατά την προκατεργασία, 60-90% μείωση των φαινολών, μείωση της τοξικότητας.
- Αερόβια επεξεργασία: Η τεχνολογία αυτή συμπεριλαμβάνει δεξαμενές ενεργού ιλύος και τεχνητούς υγρότοπους. Επιτυγχάνεται μείωση του COD 58-74%
- Συνδυασμένες βιολογικές διεργασίες: Συνδυάζονται σε αυτές 2 ή 3 στάδια επεξεργασίας. Το COD ελαττώνεται κατά 90%, αντίστοιχα και το φαινολικό φορτίο.
- Συγχώνευση (Codigestion): Βιολογική επεξεργασία του κασίγαρου με άλλα απόβλητα (κοπριά από χοιροστάσια, λυματολάσπη, οικιακά απόβλητα, απόβλητα σφαγείων). Παρατηρείται 75-90% απομάκρυνση του COD, ανάλογα με την αραίωση που επέρχεται και την μετέπειτα επεξεργασία.
- Οξείδωση και μέθοδοι ενισχυμένης οξείδωσης: Οι διαδικασίες περιλαμβάνουν οζονισμό/H₂O₂, UV ακτινοβολία/H₂O₂, οξείδωση υγρού αέρα, οξείδωση Fenton, ηλεκτροχημική οξείδωση. Παρατηρείται 40-60% μείωση COD υπό φυσιολογικές συνθήκες οξείδωσης και 70-99% για ενισχυμένη οξείδωση.
- Συνδυασμένες μέθοδοι: Πρόκειται για συνδυασμούς μεθόδων βιολογικής κατεργασίας, οξειδοαναγωγικών τεχνικών και τεχνολογιών μεμβρανών. Με αυτές μπορεί να επιτευχθεί 80-99% μείωση COD.
- Κομποστοποίηση: Πραγματοποιείται κομποστοποίηση με λυματολάσπη ή άλλα αγροτικά και βιομηχανικά απόβλητα. Σχηματίζονται σε μεγάλο βαθμό χουμικές ενώσεις και η κομποστοποίηση επιδεικνύει υψηλούς δείκτες βλάστησης.

Επίσης οι μύκητες του γένους *Pleurotus* έχουν αξιοποιηθεί επιτυχώς στην κατεργασία υγρών αποβλήτων ελαιουργείου, κυρίως στο κομμάτι της μείωσης του ολικού φαινολικού φορτίου (Paraskeva & Diamadoroulos, 2006).

1.4.5 Αξιοποίηση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου

Μία ελκυστική τακτική για την μείωση του όγκου των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου που απορρίπτονται στο περιβάλλον αποτελεί η χρησιμοποίηση αυτών σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Για παράδειγμα η επαναχρησιμοποίηση του ΥΑΕ στο έδαφος ως λίπασμα αποτελεί κοινή εφαρμογή για την αξιοποίησή του. Λόγω της πλούσιας οργανικής ύλης που περιέχει σε συνδυασμό με τα θρεπτικά συστατικά, το ΥΑΕ μπορεί να ανανεώσει τα συστατικά του εδάφους και να ευνοήσει την ανάπτυξη των φυτών. Ωστόσο χρειάζεται να δοθεί προσοχή στην προκατεργασία του για την μείωση της φυτοτοξικότητας των εν λόγω αποβλήτων. Παράλληλα το ΥΑΕ αξιοποιείται σε εφαρμογές παραγωγής βιοαερίων ή ακόμη και για την

παραγωγή ενεργού άνθρακα από υπολείμματα υγρών αποβλήτων ελαιουργείου (Paraskeva & Diamadopoulos, 2006, Aktas et al., 2001).

1.5 Ενζυμικό Σύστημα Αποικοδόμησης της Λιγνίνης από Βασιδιομύκητες

Το ενζυμικό σύστημα αποικοδόμησης της λιγνίνης αποτελεί ένα εξωκυτταρικό ενζυμικό σύστημα που περιλαμβάνει διαφορετικές κατηγορίες ενζύμων, μεταξύ των οποίων είναι οι λακκάσες, οι υπεροξειδάσες και οι οξειδάσες που παράγουν H_2O_2 . Τα ενζυμικά αυτά συστήματα επιδεικνύουν διαφορετική συμπεριφορά ανάλογα με το είδος και το γένος του οργανισμού από τον οποίο προέρχονται αλλά και τις συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα. Τα ένζυμα που είναι συνήθως υπεύθυνα για την αποικοδόμηση της λιγνίνης είναι οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP), οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnP) και οι λακκάσες, μια κατηγορία φαινολοξειδασών που περιέχουν χαλκό στο ενεργό τους κέντρο. Έως τώρα οι μύκητες που αποικοδομούν το ξύλο (wood-rotting fungi), όπως για παράδειγμα οι μύκητες λευκής και μαλακής σήψης, είναι από τους λίγους μικροοργανισμούς για τους οποίους είναι γνωστό ότι αποικοδομούν εκτενώς τη λιγνίνη. Εξαιτίας αυτού οι εν λόγω οργανισμοί προσελκύουν το ενδιαφέρον για την παραγωγή και αξιοποίηση μυκητιακών λακκασών και υπεροξειδασών σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, με στόχο μειωμένες απαιτήσεις σε ενέργεια και χημικά αντιδραστήρια στις διεργασίες (Maciel et al., 2010, Heinzkill et al., 1998).

Τα λιγνινολυτικά ένζυμα των Βασιδιομυκήτων επιτελούν σημαντικότατο ρόλο στον παγκόσμιο κύκλο του άνθρακα και βρίσκουν εφαρμογή σε ένα πλούσιο εύρος διεργασιών. Ενδεικτικά τα χημικά προϊόντα, τα καύσιμα, η χημεία τροφίμων, η γεωργία, η παραγωγή υφάσματος και χάρτου αλλά και η βιομηχανία καλλυντικών αποτελούν μερικούς από τους τομείς στους οποίους αξιοποιούνται. Παράλληλα τα λιγνινολυτικά ένζυμα των Βασιδιομυκήτων λευκής σήψης είναι χρήσιμα και σε εφαρμογές βιοαποικοδόμησης ρύπων και βιοαποκατάστασης οικοσυστημάτων, χάρη στην ικανότητά τους να διασπούν διάφορες ξενοβιοτικές ενώσεις και να συνθέτουν πολυμερή (Maciel et al., 2010).

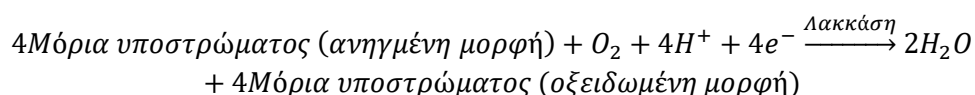
1.5.1 Λακκάσες

Οι λακκάσες (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) ανήκουν στην κατηγορία των πολυφαινολικών οξειδασών, οι οποίες περιέχουν άτομα χαλκού στο ενεργό τους κέντρο (multicopper oxidases). Τα άτομα χαλκού είναι αυτά που προσδίδουν την οξειδοαναγωγική ικανότητα στο ένζυμο. Οι λακκάσες χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο προκειμένου να οξειδώνουν ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, από αρωματικές έως και ανόργανες ενώσεις, παράγοντας νερό ως παραπροϊόν. Η πρώτη παρατήρηση αυτών έγινε το 1883 από τον Yoshida, ο οποίος διέκρινε ότι ο γαλακτώδης χυμός του ιαπωνικού δέντρου *Rhus vernicifera* σκληραίνει παρουσία αέρα. Έκτοτε η παρουσία της λακκάσης έχει διαπιστωθεί και σε άλλους φυτικούς οργανισμούς, μερικά έντομα και ορισμένα βακτήρια αλλά κυρίως σε μύκητες, από όπου προέρχονται και οι πιο βιομηχανικά αξιοποιήσιμες λακκάσες (Huang et al., 2011, Maciel et al., 2010, Giardina et al., 2010, Baldrian, 2006, Riva, 2006).

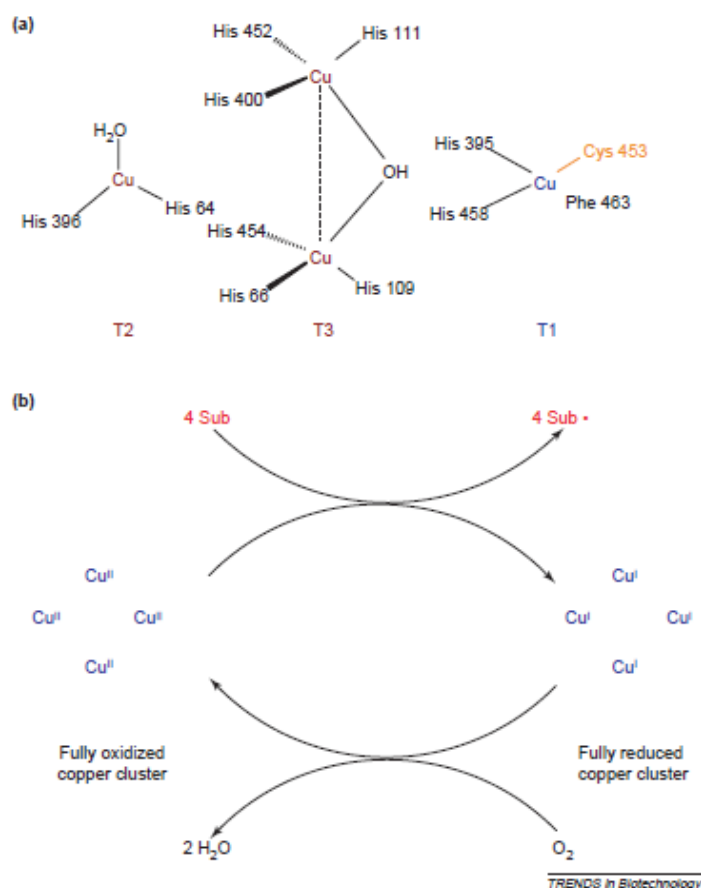
Οι λακκάσες περιέχουν συνήθως τρεις τύπους χαλκού, ένας από τους οποίους τους δίνει το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα, λόγω της έντονης ηλεκτρονιακής απορρόφησης των δεσμών Cu-Cu (Εικόνα 1.5.1.1-a). Παρόμοια ένζυμα στα οποία απουσιάζει ο χαλκός που ευθύνεται για το μπλε χρώμα, καλούνται κίτρινες ή άσπρες λακκάσες, ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο αν

πρόκειται για πραγματικές λακκάσες. Μία υπόθεση είναι ότι οι κίτρινες λακκάσες σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της πρόσδεσης αρωματικών προϊόντων της αποικοδόμησης της λιγνίνης στις μπλε λακκάσες, κυρίως κατά την ανάπτυξη της μυκητιακής βιομάζας σε στερεό μέσο. Συνέπεια της τροποποίησης αυτής είναι ενδεχομένως η αναγωγή των χαλκών των θέσεων T1 και T2 του ενεργού κέντρου καθώς και η απουσία του μπλε χρώματος. Ως ένζυμα καταλύουν την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό, η οποία συνοδεύεται από την αντίστοιχη οξειδωση του υποστρώματος, συνήθως μιας p υποκατεστημένης διυδροξυφαινόλης ή άλλης φαινολικής ένωσης. Ενδιαφέρον προκαλεί επιπλέον το γεγονός ότι οι κίτρινες λακκάσες οξειδώνουν ακόμα και μη φαινολικές μορφές της λιγνίνης απευθείας με την παρουσία οξυγόνου αλλά απουσία μορίου μεσολαβητή (Παράγραφος 1.5.1.8), (Huang et al., 2011, Giardina et al., 2010, Baldrian, 2006, Riva, 2006, Leonowicz et al., 2001).

Ως οξειδωτικά ένζυμα παρουσιάζουν μικρή εξειδίκευση ως προς τα αναγωγικά υποστρώματα, και προτιμούν το οξυγόνο ως οξειδωτικό υπόστρωμα, το οποίο ανάγεται σε νερό κατά ένα μηχανισμό μεταφοράς τεσσάρων ηλεκτρονίων (Halaburgi, 2011), (Εικόνα 1.5.1.1-b) :



Οι περισσότερες λακκάσες που έχουν μελετηθεί είναι μυκητιακής προέλευσης, και κυρίως προέρχονται από τους μύκητες λευκής σήψης (More et al., 2011). Οι λακκάσες παρουσιάζουν ενεργή δομή τόσο σε υδατικά διαλύματα, όσο και σε ακινητοποιημένη ή διαλυτή μορφή σε οργανικούς διαλύτες. Τα προϊόντα της οξειδωτικής δράσης των λακκάσων υπόκεινται σε οξειδωτική σύζευξη, στην οποία οφείλεται η σύνθεση πλήθους φυσικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα χουμικών ενώσεων, λιγνίνης, ταννινών, μελανινών, αλκαλοϊδών (Gianfreda et al., 1999). Τέλος σημειώνεται ότι οι λακκάσες είναι συνήθως το πρώτο ένζυμο που εκκρίνεται από τον μύκητα στο μέσο ανάπτυξης και οξειδώνει μόνο εκείνα τα συστατικά της λιγνίνης με ελεύθερη φαινολική ομάδα προς σχηματισμό φαινοξικών ριζών, που δρουν στη συνέχεια ως μέσα οξειδωσης χαμηλού μοριακού βάρους (Maciel et al., 2010).



Εικόνα 1.5.1.1 Δομή ενεργού κέντρου και καταλυτικός κύκλος της λακκάσης. (α) Δομή του καταλυτικού κέντρου από λακκάση του ενζύμου *Trametes versicolor* που αποτελείται από τέσσερα άτομα χαλκού. Ο χαλκός τύπου 1 (T1) προσδίδει το τυπικό μπλε χρώμα στην πρωτεΐνη και είναι εκεί όπου πραγματοποιείται η οξείδωση του υποστρώματος. Τα αποσπώμενα ηλεκτρόνια μεταφέρονται, πιθανότατα μέσω ενός ισχυρά προστατευμένου μοτίβου τριπεπτιδίου Ιστιδίνης-Κυστεΐνης-Ιστιδίνης (His-Cys-His), στην περιοχή των χαλκών τύπου 2 (T2) και τύπου 3 (T3). Οι χαλκοί T2 και T3 σχηματίζουν μια τριπύρνηνη δομή όπου λαμβάνει χώρα η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου και η απελευθέρωση των μορίων νερού. (β) Σχηματική αναπαράσταση του καταλυτικού κύκλου της λακκάσης από τον οποίο παράγονται αφενός δύο μόρια νερού κατά την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου και αφετέρου τέσσερες ελεύθερες ρίζες από την αναγωγή στην περιοχή T1 τεσσάρων μορίων του αντίστοιχου υποστρώματος. Sub• : ελεύθερη ρίζα του οξειδωμένου υποστρώματος (Riva, 2006).

1.5.1.1 Προέλευση και Βιολογικός Ρόλος Λακκασών

Η παρουσία και δράση των λακκασών έχει επιβεβαιωθεί σε περισσότερα από 60 στελέχη από μύκητες διαφορετικών τάξεων, σε φυτικούς οργανισμούς, σε βακτήρια αλλά και στο έδαφος ενώ φαινολοξειδάσες με ιδιότητες παρόμοιες των λακκασών έχουν απομονωθεί και από έντομα. Βασικός ρόλος των φυτικών λακκασών είναι η συμμετοχή στη σύνθεση πολυμερών της λιγνίνης μέσω μηχανισμών ελευθέρων ριζών. Αντίθετα οι μυκητιακές λακκάσες συμμετέχουν σε δράσεις που αφορούν περισσότερο την αποικοδόμηση της λιγνίνης ή ακόμη και τη μορφογένεση του μικροοργανισμού. Για παράδειγμα, υπάρχουν περιπτώσεις μυκητιακών λακκασών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την παραγωγή του πράσινου χρώματος των κονιδίων (σπόρια που παράγουν ορισμένοι μύκητες στις υφές τους), άλλες λακκάσες εμπλέκονται στην σύνθεση χρωστικών ενώσεων, ενώ είναι δυνατόν το ένζυμο να ευθύνεται για την παραγωγή μια πολυφαινολικής κολλοειδούς ουσίας που συγκρατεί τις μυκητιακές υφές ενωμένες. Οι λακκάσες συμμετέχουν και σε αλληλεπιδράσεις με περιβάλλοντες μικροοργανισμούς αλλά και σε μηχανισμούς άμυνας. Κατά τη λιγνινόλυση παράγονται δραστικά και εξαιρετικά τοξικά προϊόντα από τα οποία το μυκητιακό μικύλλιο

χρειάζεται προστασία. Η λακκάση παρέχει αυτή την προστασία, πολυμερίζοντας τα τοξικά προϊόντα και μειώνοντας έτσι τη δραστηρότητά τους. Τα ένζυμα αυτά συναντώνται και σε βακτήρια (Alexandre & Zhulin, 2000, Martins et al., 2002, Claus, 2003, Givaudan et al., 2004), δίχως ωστόσο να αποτελούν κοινά ένζυμα προκαρυωτικών μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα τα βακτηριακά ένζυμα που προσομοιάζουν σε λακκάσες βρίσκονται εσωκυτταρικά ή στην περιπλαστική μεμβράνη των εν λόγω μικροοργανισμών (Baldrian, 2006, Gianfreda et al., 1999, Thurston, 1994).

Συγκεκριμένα για τις μυκητιακές λακκάσες, είναι γεγονός ότι αποτελούν τα περισσότερα σε αριθμό λιγνινολυτικά ένζυμα του εδάφους, τα οποία μάλιστα συνεισφέρουν και στον κύκλο του άνθρακα. Οι μυκητιακές λακκάσες συμμετέχουν στη μετατροπή της λιγνίνης δασικών απορριμμάτων, όχι μόνο οξειδώνουν φαινολικά και μεθοξυφαινολικά οξέα αλλά παράλληλα συμβάλουν στην αποκαρβοξυλίωσή τους, καθώς επιτίθενται στις μεθοξυλομάδες προκαλώντας απομεθυλίωση ή απομεθοξυλίωση, ενώ συμβάλλουν και στη σύνθεση των χουμικών ενώσεων του εδάφους (soil humus). Τα φυτικά βιοπολυμερή, περιλαμβανομένων των μακρομορίων της λιγνίνης και μη, διασπώνται από μικροοργανισμούς σε μονομερείς μονάδες και οι φαινόλες που προκύπτουν οξειδώνονται προς κινόνες με τη βοήθεια φαινολοξειδασών (συμπεριλαμβανομένων και των λακκασών) σχηματίζοντας εν τέλει χουμικές ενώσεις. Οι αντιδράσεις των μυκητιακών λακκασών επομένως είναι δυνατόν να οδηγήσουν τόσο σε αποπολυμερισμό των χουμικών ενώσεων όσο και σε σχηματισμό αυτών από μονομερείς πρόδρομες ενώσεις. Η διττή δράση πολυμερισμού και αποπολυμερισμού των λακκασών πιθανώς υπονοεί ότι η αποικοδόμηση της λιγνίνης από μύκητες που παράγουν λακκάσες γίνεται μέσω πιο περίπλοκων ενζυμικών μηχανισμών. Οι εν λόγω μηχανισμοί συμπεριλαμβάνουν τη συνέργεια και άλλων ενζύμων και την αξιοποίηση μη ενζυμικών συστατικών τα οποία αλληλεπιδρούν, προκειμένου να δημιουργηθεί μια ισορροπία μεταξύ ενζυμικού πολυμερισμού και αποπολυμερισμού της λιγνίνης (Baldrian, 2006, Leonowicz et al., 2001, Gianfreda et al., 1999).

Παράλληλα λακκάσες απελευθερώνονται και σε περιβάλλοντα που πραγματοποιείται κομποστοποίηση, όπου συμμετέχουν τόσο στην αποικοδόμηση λιγνίνης και χουμικών οξέων όσο και στον σχηματισμό τους. Σε υδάτινα περιβάλλοντα η εμφάνιση και δράση των λακκασών ελέγχεται έντονα από τη συγκέντρωση του οξυγόνου ενώ ο ρόλος τους είναι αντικειμενικά ο ίδιος με τις προηγούμενες περιπτώσεις. Ωστόσο πέρα από την αποικοδόμηση της λιγνίνης και τον μεταβολισμό χουμικών οξέων, οι λακκάσες επιτελούν πλήθος άλλων σημαντικών ρόλων. Ένας από αυτούς είναι η αλληλεπίδραση του μύκητα, από τον οποίο προέρχονται, με άλλους μικροοργανισμούς του εδάφους όπως μύκητες ή βακτήρια (παραδείγματος χάριν *Trichoderma sp.*). Τέλος οι λακκάσες συνεισφέρουν και στην παθητική άμυνα του μικροοργανισμού καθώς συμβάλουν στον σχηματισμό μελανινών ή ακόμη και στην αποικοδόμηση αντιβιοτικών που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μύκητα (Baldrian, 2006).

Ως προς τον κυτταρικό εντοπισμό των λακκασών, παρά το ότι οι περισσότερες λακκάσες που έχουν απομονωθεί είναι εξωκυτταρικές, λακκάσες των μυκήτων λευκής σήψης συνήθως εντοπίζονται και εσωκυτταρικά (Baldrian, 2006). Αντιπροσωπευτικές είναι οι περιπτώσεις των μικροοργανισμών *Trametes versicolor* (Schlosser et al., 1997), *Agaricus bisporus* (Wood, 1980), *Phanerochaete chrysosporium* (Dittmet et al., 1997) και *Suillus granulatus* (Günther et

al., 1998) οι οποίοι παράγουν λακκάσες τόσο στα εξωκυτταρικά όσο και στα εσωκυτταρικά κλάσματα της καλλιέργειας, με την πλειοψηφία να εντοπίζεται στο υπερκείμενο της καλλιέργειας. Παράλληλα, κλάσματα ενεργότητας λακκάσης στους μικροοργανισμούς *N.crassa*, *Rigidoporus lignosus* και ένα από τα ισοένζυμα λακκάσης στον *Pleurotus ostreatus* πιθανότατα εντοπίζονται στο εσωτερικό ή στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροοργανισμών (Froehner & Eriksson, 1974, Nicole et al., 1992, 1993, Palmieri et al., 2000). Αντίστοιχα ο Βασιδιομύκητας λευκής σήψης *Irpex lacteus* (Svobodová, 2005), η ζύμη *C. neoformans* (Zhu et al., 2001) και τα σπόρια του *Trichoderma spp.* (Holker et al., 2002) παρουσιάζουν ενεργότητα λακκάσης αποκλειστικά στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Ο εντοπισμός της λακκάσης σε κάθε περίπτωση εξαρτάται άμεσα από τη φυσιολογική της λειτουργία και καθορίζει στην ουσία το εύρος των υποστρωμάτων που είναι διαθέσιμα προς το ένζυμο. Οι εσωκυτταρικές λακκάσες ή οι βακτηριακές λακκάσες που βρίσκονται στον περιπλασμικό χώρο, εικάζεται ότι συνεισφέρουν στον μετασχηματισμό χαμηλού μοριακού βάρους φαινολικών ενώσεων εντός του κυττάρου. Επιπλέον οι λακκάσες των κυτταρικών τοιχωμάτων ή ακόμη εκείνες που εντοπίζονται σε σπόρια, σχετίζονται με τον σχηματισμό μελανίνης και άλλων προστατευτικών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος (Baldrian, 2006).

1.5.1.2 Μυκητιακές Λακκάσες

Ενώ οι περισσότερες χαρακτηρισμένες λακκάσες προέρχονται από μύκητες, ωστόσο υπάρχουν και αρκετοί μύκητες οι οποίοι δεν παράγουν αξιοσημείωτες ποσότητες λακκάσων ή στους οποίους οι λακκάσες παράγονται από μερικά μόνο είδη, ενώ δεν έχει καταγραφεί παραγωγή των ενζύμων από κατώτερα είδη μυκήτων (*Zygomycetes*, *Chytridiomycetes*), (Baldrian, 2006). Μύκητες που παράγουν λακκάσες ανήκουν κυρίως στις τάξεις των Βασιδιομυκήτων, Ασκομυκήτων και Δευτερομυκήτων. Οι κυριότεροι μύκητες οι οποίοι εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης είναι οι μύκητες λευκής σήψης και μία συγγενική κατηγορία σαπροτροφικών μυκήτων που προκαλούν αποσύνθεση απορριμμάτων (litter- decomposing saprotrophic fungi), όπως είναι για παράδειγμα τα είδη που προκαλούν αποικοδόμηση της λιγνίνης. Ωστόσο λακκάσες υπάρχουν και σε μη λιγνολυτικούς μύκητες. Μάλιστα όλα τα είδη μυκήτων λευκής σήψης παράγουν λακκάσες, σε διαφορετικό βαθμό το καθένα, ενώ τα ένζυμα αυτά έχουν απομονωθεί από πολλά διαφορετικά είδη. Αναφορικά με τους μύκητες καφέ σήψης (brown-rot fungi), ενώ δεν έχει απομονωθεί λακκάση από τα είδη αυτά, έχει παρατηρηθεί ενεργότητα του ενζύμου, οπότε ο ρόλος των λακκάσων στους μύκητες καφέ σήψης δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος (Baldrian, 2006, Gianfreda et al., 1999).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχει πλήθος αναφορών για παραγωγή λακκάσων από Ασκομύκητες, δεν έχει πραγματοποιηθεί έως τώρα μία συστηματική έρευνα σχετικά με την απαρίθμηση των ειδών των ασκομυκήτων που παράγουν λακκάσες. Πέρα από τα είδη Ασκομυκήτων τα οποία είναι παθογόνα για τους φυτικούς οργανισμούς, λακκάσες παράγονται και από Ασκομύκητες του εδάφους καθώς επίσης και των γλυκών νερών. Γονίδια λακκάσων υπάρχουν και στα είδη Ασκομυκήτων, που σχετίζονται στενά με μύκητες που αποικοδομούν το ξύλο, οι οποίοι συμμετέχουν στην αποικοδόμηση νεκρής φυτικής βιομάζας σε αλατώδη έλη. Αξιοσημείωτο είναι ακόμη το γεγονός ότι έως τώρα λακκάση έχει απομονωθεί μόνο από το μικροοργανισμό *Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans*, ο οποίος κατατάσσεται στις ζύμες (Williamson, 1994, Zhu et al., 2001, Ikeda et al., 2003). Οι ζύμες ωστόσο, αποτελούν από φυσιολογικής άποψης μία ειδική κατηγορία τόσο Ασκομυκήτων όσο και Βασιδιομυκήτων. Επιπλέον έχουν γίνει προσπάθειες για τον εντοπισμό λιγνιολυτικών

ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων και των λακκασών, σε εκτομυκορριζικούς μύκητες (Cairney & Burke, 1998, Burke & Cairney, 2002, Baldrian, 2006).

1.5.1.3 Παραγωγή Λακκασών

Μία από τις πιο γνωστές τεχνικές που ακολουθείται με στόχο την παραγωγή λακκασών είναι η προσθήκη επαγωγέων στο μέσο καλλιέργειας. Η παραγωγή λακκασών επηρεάζεται έντονα από την παρουσία επαγωγέων και από παράγοντες που σχετίζονται με αυτούς όπως η χημική φύση της ουσίας, η ποσότητα ή και ο χρόνος στον οποίο προστίθεται στο μέσο. Φυσικά πλήθος ενώσεων δρουν ως επαγωγείς για την έκκριση λακκασών, μεταξύ των οποίων είναι φαινολικές ενώσεις που σχετίζονται αυστηρά με τη λιγνίνη ή παράγωγα αυτής αλλά και εκχυλίσματα από διαφορετικές προελεύσεις. Στην περίπτωση του μικροοργανισμού *Pleurotus ostreatus* για παράδειγμα, το φερουλικό οξύ έχει αποτελεσματική δράση ως επαγωγέας (Leonowicz et al., 1978). Δεδομένου ότι ο χαλκός αποτελεί το κατεξοχήν συστατικό του ενεργού κέντρου του ενζύμου, καλλιέργειες στις οποίες απουσιάζει ή που έχουν περιορισμένες ποσότητες χαλκού οδηγούν στην παραγωγή ανενεργών λακκασών χωρίς χαλκό (laccase aporoprotein) ή στην παραγωγή ενεργών λακκασών έως εξαντλήσεως των αποθεμάτων του μετάλλου (Gianfreda et al, 1999).

Η συμβατική παραγωγή μυκητιακών λακκασών ωστόσο, δεν χρησιμοποιείται για εμπορικούς σκοπούς σε εφαρμογές μεγάλης κλίμακας, τόσο λόγω χαμηλών αποδόσεων όσο και εξαιτίας της τοξικότητας ορισμένων επαγωγέων. Το πρόβλημα αυτό προσπαθεί να επιλύσει η επιστημονική έρευνα με τεχνολογίες γενετικής μηχανικής, σε μια προσπάθεια βιομηχανικής παραγωγής ανασυνδυασμένων λακκασών. Η γενετική τροποποίηση απαιτεί την κλωνοποίηση των γονιδίων που φέρουν την γενετική πληροφορία για τα ένζυμα και έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε διαφορετικούς ξενιστές. Μια ανασυνδυασμένη λακκάση είναι δυνατόν να εκφραστεί με ομόλογους ή ετερόλογους φορείς. Συγκριτικά, η ετερόλογη έκφραση είναι προτιμότερη για την παραγωγή λακκασών μεγάλης κλίμακας, από την παραγωγή με προσθήκη επαγωγέων. Η ετερόλογη έκφραση παρέχει τη δυνατότητα έκκρισης διαφορετικών λακκασών από έναν επιλεγμένο ξενιστή, για τον οποίο βελτιστοποιούνται τόσο οι συνθήκες ζύμωσης όσο και ο καθαρισμός του ενζύμου, ενώ ελέγχονται πιο εύκολα παράμετροι ασφαλείας και απόρριψης αποβλήτων. Ο ιδανικός ξενιστής στην προκειμένη περίπτωση οφείλει μεταξύ άλλων να έχει αυξημένη ικανότητα παραγωγής λακκασών, μηδενική παραγωγή τοξινών, καλή γενετική σταθερότητα, απλές διατροφικές απαιτήσεις και να εξυπηρετεί ως προς τις διαδικασίες αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης των πρωτεϊνών (Gianfreda et al., 1999).

Οι αποδόσεις παραγωγής των ενζύμων εξαρτώνται από τις συνθήκες ανάπτυξης των μυκήτων, όπως για παράδειγμα η παρουσία επαγωγέων σύνθεσης πρωτεϊνών, ο χρόνος επαγωγής, οι γενετικές τροποποιήσεις και οι γενετικοί χειρισμοί, η συγκέντρωση του αζώτου, η παρουσία και τροποποίηση της λιγνίνης, αλλά και η παρουσία ή όχι φωτεινής ακτινοβολίας. Οι διαδικασίες καθαρισμού των μυκητιακών λακκασών αποτελείται κυρίως από τέσσερα ή πέντε βήματα που περιλαμβάνουν συμπύκνωση του μέσου της καλλιέργειας με διαδικασίες υπερδιήθησης ή κατακρήμνισης, η οποία ακολουθείται από δύο ή τρία βήματα καθαρισμού μέσω στήλης ιοντοανταλλαγής ή χρωματογραφίας συγγένειας (affinity chromatography), (Gianfreda et al, 1999).

1.5.1.4 Δομικά Χαρακτηριστικά Λακκασών

Χαρακτηριστικό αρκετών μυκητιακών ειδών είναι η παραγωγή ισοενζύμων των λακκασών. Ειδικά στην περίπτωση των μυκήτων λευκής σήψης, η πλειοψηφία παράγει περισσότερα του ενός ισοένζυμα. Συγκεκριμένα το φαινόμενο παρατηρείται στα είδη *Coprinus plicatilis*, *Fomes fomentarius*, *Heterobasidion annosum*, *Hypholoma fasciculare*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Leptoporus litschaueri*, *Panus stipticus*, *Phellinus igniarius*, *Pleurotus corticatus*, *P. ostreatus*, *Polyporus brumalis*, *Stereum hirsutum*, *Trametes gibbosa*, *T. hirsuta* και *T. versicolor* (Blaich & Esser, 1975). Ορισμένα μυκητιακά είδη, όπως για παράδειγμα τα *Corioloropsis rigida*, *Dichomitus squalens*, *Physisporinus rivulosus* και *Trametes gallica*, παράγουν ισοένζυμα τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια ως προς τα δομικά και καταλυτικά χαρακτηριστικά τους. Ωστόσο πλήθος συγγραφέων και ερευνητών έχουν αναφέρει διαφορετικές ιδιότητες λακκασών οι οποίες προέρχονται από τα ίδια είδη μικροοργανισμών. Οι διαφορετικές ιδιότητες δικαιολογούνται τόσο από την παραγωγή διαφορετικών ισοενζύμων όσο και από διαφορετικά γονίδια του ίδιου μύκητα από όπου πηγάζουν διαφορετικές λακκάσες. Η παραγωγή διαφορετικών ισοενζύμων δηλαδή αιτιολογείται σε μοριακή βάση από την παρουσία πολλαπλών γονιδίων λακκασών σε μύκητες (Baldrian, 2006).

Ως προς τη δομή του ενζύμου το καταλυτικό κέντρο δεν φαίνεται να διαφοροποιείται ιδιαίτερα ανάλογα με τον μικροοργανισμό από τον οποίο προέρχεται η λακκάση, σε αντίθεση με την υπόλοιπη δομική μονάδα του ενζύμου (Maciel et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, οι περισσότερες λακκάσες παρουσιάζουν δομή μονομερούς πρωτεΐνης. Ωστόσο αρκετές είναι και οι περιπτώσεις λακκασών με ομοδιμερική δομή, δηλαδή το πρωτεϊνικό μόριο αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες, για τις οποίες το μοριακό βάρος είναι ανάλογο των μονομερικών λακκασών, όπως συμβαίνει με τις λακκάσες των οργανισμών *Phellinus ribis* (Min et al., 2001), *Pleurotus pulmonarius* (De Souza & Peralta, 2003), *Trametes villosa* (Yaver et al., 1996), *C. cibarius* (Ng & Wang, 2004), *Rhizoctonia solani* (Wahleithner et al., 1996). Επιπλέον υπάρχουν και οι περιπτώσεις Ασκομυκήτων οι οποίοι δίνουν ολιγομερικές λακκάσες των τριών όμοιων υπομονάδων, όπως συμβαίνει με τους ασκομύκητες *G. graminis*, (Edens et al., 1999) και *M. indicum* (Thakker et al., 1992) ή και λακκάσες ετεροολιγομερών δομών όπως των *P. anserina* (Molitoris & Esser, 1970) και *A. mellea* (Curir et al., 1997).

Παρά το μεγάλο πλήθος λακκασών και υπολοίπων οξειδασών του χαλκού που έχουν μελετηθεί, δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ακριβής μηχανισμός μεταφοράς ηλεκτρονίων ή οι λεπτομέρειες σχετικά με την αναγωγή του οξυγόνου. Συγκρίνοντας τις δομικές διαφοροποιήσεις σε ένζυμα με υψηλό πρότυπο δυναμικό οξειδαναγωγής E_0 με αντίστοιχα μικρού δυναμικού, παρατηρείται ότι οι δομικές διαφορές κατά τον συντονισμό του χαλκού T1 πιθανώς να οφείλονται για τα διαφορετικά δυναμικά (Piontek et al., 2002, Garavaglia et al., 2004). Καθίσταται επομένως μια αρχική βάση για τη συσχέτιση της δομής του ενεργού κέντρου του ενζύμου με το υπόστρωμα που οξειδώνει κατά προτίμηση. Ωστόσο κάτι τέτοιο δυσχεραίνεται από την ετερογένεια της δομής των λακκασών ως πρωτεϊνών (Baldrian, 2006).

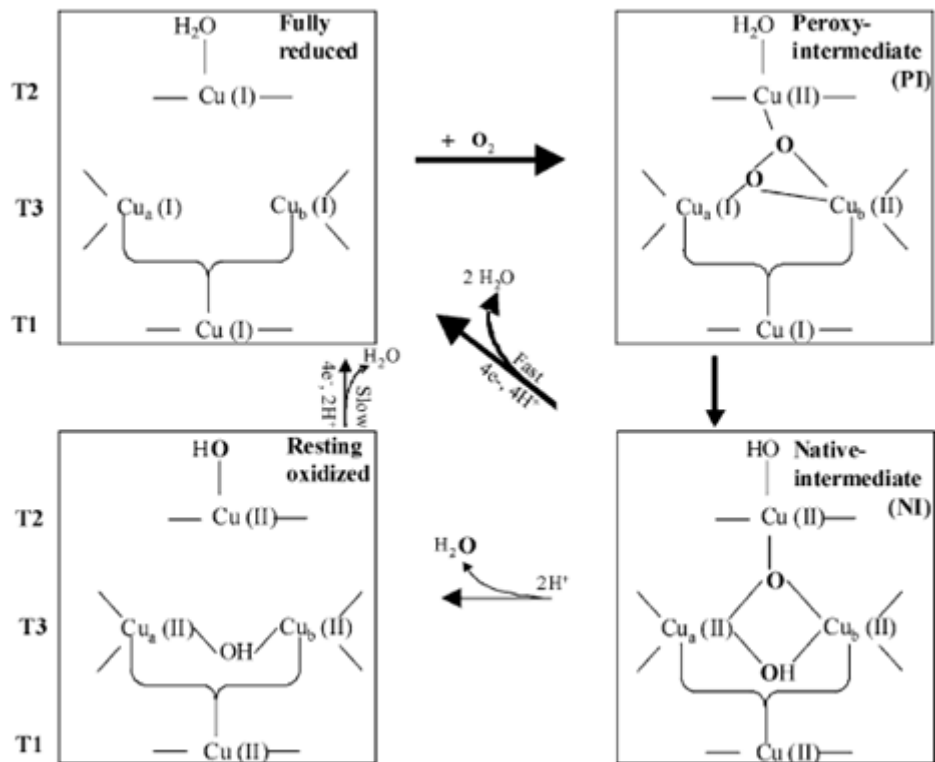
1.5.1.4.1 Καταλυτικό Κέντρο

Η καταλυτική δράση των πολυφαινολικών οξειδασών του χαλκού, και άρα των λακκασών, οφείλεται στα διαφορετικά κέντρα χαλκού τα οποία υπάρχουν στο μόριο του ενζύμου. Συγκεκριμένα σε κάθε πολυφαινολική οξειδάση του χαλκού συναντάται τουλάχιστον ένας τύπος T1 (type-1) χαλκού, μαζί με τουλάχιστον τρία πρόσθετα ιόντα χαλκού, ένα τύπου T2

(type-2) και δύο τύπου T3 (type-3), τα οποία δομούν ένα τριπύρρηνο σύμπλεγμα. Στην περίπτωση των λακκασών συναντάμε τέσσερα άτομα χαλκού ομαδοποιημένα σε τρεις κατηγορίες, τις T1, T2 και T3. Τα άτομα χαλκού διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το σήμα παραμαγνητικού συντονισμού ηλεκτρονίων (electron paramagnetic resonance – EPR). Ο χαλκός T1 ευθύνεται για το μπλε χρώμα των λακκασών, έχοντας χαρακτηριστική απορρόφηση στα 610 nm, ενώ ο T2 είναι άχρωμος και δεν είναι δυνατό να εντοπισθεί φασματοφωτομετρικά, αλλά μέσω σήματος EPR. Οι δύο χαλκοί T3 είναι διαμαγνητικοί και παρουσιάζουν ένα φάσμα απορρόφησης γύρω στα 330 nm (Baldrian, 2006, Maciel et al., 2010).

Η καταλυτική δράση χωρίζεται σε τρία διακριτά βήματα. Πρώτα πραγματοποιείται η αναγωγή του χαλκού μέσω του αναγωγικού υποστρώματος, ακολουθεί η εσωτερική μεταφορά ηλεκτρονίων από τον χαλκό της θέσης T1 στην τριπύρρηνη δομή των χαλκών T2 και T3 και τέλος η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό στις θέσεις T2 και T3. Το μοριακό οξυγόνο προσδένεται στη θέση T2 και σε έναν από τους χαλκούς της θέσης T3, όπου συμβαίνει μια «ασύμμετρη» ενεργοποίηση. Μάλιστα η μορφή των δεσμών που σχηματίζονται με το O₂ φαίνεται να παρεμποδίζουν την πρόσβαση άλλων οξειδωτικών παραγόντων πέραν του μοριακού οξυγόνου. Κατά τη διάρκεια της καταλυτικής δράσης, στη φάση της μόνιμης κατάστασης, δεν εντοπίζεται υπεροξείδιο γύρω από την λακκάση, ενισχύοντας την θεώρηση του μηχανισμού της αναγωγής τεσσάρων ηλεκτρονίων του μοριακού οξυγόνου. Το αντίθετο ωστόσο φαίνεται να ισχύει ως προς την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, καθώς οι προτιμήσεις των λακκασών κυμαίνονται σε μεγάλο εύρος, από ανόργανα ή οργανικά μεταλλικά συμπλέγματα, φερροκυανίδιο (ferrocyanide), ανιλίνες, βενζοθειόλες, φαινόλες αλλά και άλλες ανόργανες, οργανικές ή βιολογικές ενώσεις, αρκεί βέβαια το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των ενώσεων αυτών να μην είναι υψηλό (>1V), (Gianfreda et al., 1999).

Η αναγωγή του χαλκού της θέσης T1 είναι το στάδιο που καθορίζει τον ρυθμό στην καταλυτική διαδικασία. Συγκεκριμένα η διαφορά δυναμικού μεταξύ του πρότυπου δυναμικού του χαλκού T1 και του αναγωγικού υποστρώματος καθορίζει τον ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων προς τις θέσεις T2 και T3. Το πρότυπο δυναμικό του χαλκού T1 κυμαίνεται στο εύρος 420-790 mV, με χρήση κανονικού ηλεκτροδίου υδρογόνου (Normal Hydrogen Electrode – NHE). Οι διακυμάνσεις στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του χαλκού της θέσης T1 αποδίδονται σε ένα συνονθύλευμα παραγόντων όπως η γεωμετρία συντονισμού του χαλκού ή η φύση των στοιχείων γύρω από το ενεργό κέντρο, που επηρεάζουν την προσβασιμότητα του διαλύτη ή τους δεσμούς με το υδρογόνο. Η κοιλότητα της θέσης T1 έχει αρκετά μεγάλο πλάτος ώστε να μπορεί να προσδεθεί σε αυτή μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, χωρίς να σχηματίζονται ισχυροί δεσμοί εντός αυτής με το υπόστρωμα (Giardina et al., 2010). Η δομή των θέσεων T2 και T3 παρουσιάζει δύο κανάλια. Το πρώτο οδηγεί στους δύο χαλκούς της θέσης T3 και επιτρέπει στο μοριακό οξυγόνο να εισέλθει και να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο. Το δεύτερο κατευθύνεται προς τα ιόντα χαλκού της θέσης T2 και επιτρέπει στα παραγόμενα μόρια νερού να κινηθούν προς το κύριο σώμα του διαλύτη (Giardina et al., 2010).



Εικόνα 1.5.1.4.1.1 Μηχανισμός αναγωγής του μοριακού οξυγόνου σε νερό από τις πολυφαινολικές οξειδάσες. Έντονα βέλη: υποδεικνύουν τα βήματα που πραγματοποιούνται κατά τον καταλυτικό κύκλο των ενζύμων. Λεπτά βέλη: υποδεικνύουν τα βήματα που είναι δυνατόν να παρατηρηθούν πειραματικά αλλά δεν αποτελούν μέρος του καταλυτικού κύκλου. Το ενδιάμεσο προϊόν υπεροξειδίου (peroxy-intermediate) είναι ένα ανηγμένο είδος με $2e^-$ και το εγγενές ενδιάμεσο προϊόν (native-intermediate) είναι ένα ανηγμένο είδος, με $4e^-$ (Giardina et al., 2010).

1.5.1.5 Φυσικοχημικές Ιδιότητες Λακκασών

Οι γνώσεις στο πεδίο των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των μυκητιακών λακκασών βασίζονται κυρίως στη μελέτη απομονωμένων και χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών, οι οποίες προέρχονται κατά κύριο λόγο από βασιδιομύκητες λευκής σήψης. Το μέγεθος μιας τυπικής λακκάσης είναι περίπου 60-70 kDa και παρουσιάζει συνήθως όξινο ισοηλεκτρικό σημείο στο εύρος pH 2,6-6,9. Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των μυκητιακών λακκασών κυμαίνεται περίπου στα 0,4-0,8V ως προς ηλεκτρόδιο κανονικού υδρογόνου (normal hydrogen electrode [NHE]). Σε γενικές γραμμές ωστόσο παρατηρείται μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των μυκητιακών λακκασών, ιδίως όσον αφορά στο μοριακό τους βάρος (Baldrian, 2006, Gianfreda et al., 1999).

Ως εξωκυτταρικά ένζυμα οι λακκάσες κατατάσσονται στις γλυκοπρωτεΐνες, με βαθμό γλυκοζυλίωσης συνήθως 10 με 25%, αν υπάρχουν και περιπτώσεις με υψηλότερα ποσοστά, όπως αυτές των λακκασών των οργανισμών *Coriolorpsis fulvocinnerea* με 32% (Shleev et al., 2004), *P. pulmonarius* με 44% (De Souza & Peralta, 2003), και *Botrytis cinnerea* με 49% (Slomczynski et al., 1995). Τα σάκχαρα που συναντώνται συχνότερα είναι η αραβινόζη, η μαννόζη, η ξυλόζη, η γαλακτόζη και η φρουκτόζη. Η γλυκάνες συνδέονται με δεσμό αζώτου με την πολυπεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου. Πέραν των δομικών χαρακτηριστικών που προσδίδει στο ένζυμο, η γλυκοζυλίωση προστατεύει την λακκάση από την πρωτεολυτική

αποικοδόμηση. Αυτή ακριβώς η γλυκοζυλίωση των λακκασών ωστόσο αποτελεί και ένα από τα βασικά προβλήματα για την ετερόλογη έκφραση του ενζύμου (Baldrian, 2006).

Ένα από τα βασικά προβλήματα της βιομηχανικής αξιοποίησης των λακκασών είναι η χαμηλή διαλυτότητα που παρουσιάζουν τα υποστρώματα του ενζύμου στο νερό. Συνεπώς το ενδιαφέρον έχει κεντρίσει η διερεύνηση της δράσης του ενζύμου σε μη συμβατικά μέσα αντίδρασης με περιορισμένο περιεχόμενο σε νερό. Τέτοιες είναι οι περιπτώσεις συστημάτων νερού-οργανικού διαλύτη, όπου έχει καταγραφεί ότι φτάνουν μέχρι και σε 50% περιεκτικότητα σε οργανικό διαλύτη. Υπό της συνθήκες αυτές έχει παρατηρηθεί ότι οι μέγιστοι ρυθμοί που εμφανίζονται είναι δυνατόν να παραμένουν της ίδιας τάξης μεγέθους με τους αντίστοιχους των υδατικών διαλυμάτων. Ωστόσο επηρεάζεται σε εξαιρετικά μεγάλο βαθμό η σταθερότητα του ενζύμου από την παρουσία του διαλύτη. Παράλληλα οι λακκάσες είναι λειτουργικές και σε άπολους διαλύτες με χαμηλή περιεκτικότητα νερού, με την προϋπόθεση ότι έχει προηγηθεί συμπλοκοποίηση του ενζύμου με αμφιφιλικά αλκυλιωμένα πολυμερή ή ακινητοποίηση αυτών σε στερεά μέσα (Riva, 2006).

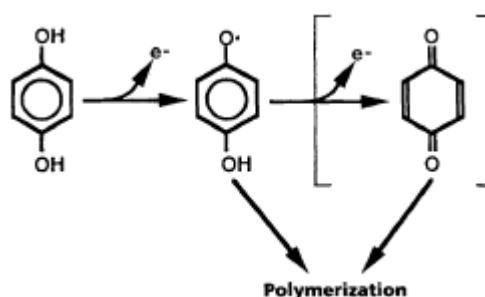
1.5.1.6 Αναγωγικά Υποστρώματα των Λακκασών, Προϊόντα Οξειδωσης και Παρεμπόδιση

Σε γενικές γραμμές οι λακκάσες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, το οποίο μάλιστα ποικίλει από λακκάση σε λακκάση. Παράλληλα τα υποστρώματα του ενζύμου επικαλύπτονται και με τα αντίστοιχα υποστρώματα ενός άλλου ενζύμου, της μονο-οξυγενάσης τυροσινάσης της μονοφαινόλης (monophenol mono-oxygenase tyrosinase – EC 1.14.18.1.). Ως εκ τούτου οι λακκάσες είναι δύσκολο να κατηγοριοποιηθούν ως προς τα αναγωγικά υποστρώματά τους. Παρά το γεγονός ότι παλαιότερα ονομαζόντουσαν διφαινολικές οξειδάσες, μονοφαινόλες όπως η 2,6-διμεθοξυ-φαινόλη ή η γουαϊακόλη αποτελούν συνήθως καλύτερα υποστρώματα για τις λακκάσες από ότι οι διφαινόλες, όπως η κατεχόλη ή η υδροκινόνη, ενώ η συρινγκαλδαζίνη (syringaldazine [N,N'-bis(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzylidene hydrazine)]) αποτελεί μοναδικό υπόστρωμα για τις λακκάσες, δεδομένης της απουσίας υπεροξειδίου του υδρογόνου προς αποφυγή οξειδωσης από υπεροξειδάσες. Συνεπώς οι λακκάσες θεωρούνται οι οξειδάσες εκείνες οι οποίες οξειδώνουν πολυφαινόλες, μεθοξύ- υποκατεστημένες φαινόλες, αρωματικές διαμίνες, βενζοθειόλες καθώς και ένα μεγάλο εύρος άλλων ενώσεων, καθιστώντας ωστόσο σαφές ότι δεν οξειδώνουν την τυροσίνη κατά τον τρόπο που την οξειδώνουν οι τυροσινάσες (Baldrian, 2006).

Η οξειδωση του υποστρώματος από τη λακκάση συνιστά στην ουσία μια αντίδραση ενός ηλεκτρονίου από την οποία προκύπτει μια ελεύθερη ρίζα. Το αρχικό προϊόν της αντίδρασης είναι συνήθως ένα ασταθές ενδιάμεσο, οπότε είτε υφίσταται μια δεύτερη ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση, όπως στην περίπτωση μετατροπής φαινολών σε κινόνες, είτε υπόκειται σε μη ενζυμικές αντιδράσεις, όπως η υδρογόνωση ή τέλος παίρνει μέρος σε αντιδράσεις πολυμερισμού δίνοντας ένα άμορφο, αδιάλυτο προϊόν που προσομοιάζει με μελανίνη. Τελικά η οξειδωση του ενός ηλεκτρονίου του υποστρώματος συζεύγνυται με την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό για την οποία απαιτούνται τέσσερα ηλεκτρόνια. Συνεπώς ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν είναι δυνατόν να είναι ευθύς και προσομοιάζει με τη λειτουργία μπαταρίας, καθώς αποθηκεύονται ηλεκτρόνια από μεμονωμένες

αντιδράσεις οξείδωσης ώστε να διοχετευθούν προς την αναγωγή του οξυγόνου (More et al., 2011, Thurston, 1994).

Οι αντιδράσεις των λακκασών δίνουν σε πρώτη φάση ενδιάμεσα προϊόντα οξείδωσης υπό τη μορφή ελευθέρων ριζών. Σε δεύτερη φάση πραγματοποιείται η σύζευξη ελευθέρων ριζών, από όπου προκύπτουν διμερή και ολιγομερή προϊόντα, μέσω δεσμών άνθρακα-άνθρακα ή άνθρακα-οξυγόνου μεταξύ φαινολικών μορίων ή δεσμών άνθρακα-αζώτου ή αζώτου-αζώτου μεταξύ αρωματικών αμινών. Η αποτελεσματικότητα της ενζυμικής τροποποίησης του υποστρώματος εξαρτάται αυστηρά τόσο από τη φύση και το μοριακό βάρος της υποκατεστημένης ομάδας όσο και από τη θέση αυτής στον αρωματικό δακτύλιο. Για παράδειγμα αυξανόμενου του μοριακού βάρους της υποκατεστημένης ομάδας μειώνεται η δραστηριότητα της λακκάσης (Riva, 2006, Gianfreda et al., 1999).



Εικόνα 1.5.1.6.1 Τυπική αντίδραση με λακκάση, κατά την οποία μία διφαινόλη (εδώ υδροκινόνη) υπόκειται σε οξείδωση ενός ηλεκτρονίου, οπότε και δημιουργείται μια ελεύθερη ρίζα. Η κινόνη σχηματίζεται από δεύτερη ενζυμική αντίδραση ή από αυθόρμητες αντιδράσεις με ρίζες. Εν συνεχεία οι κινόνες και οι ελεύθερες ρίζες είναι δυνατόν να υποστούν πολυμερισμό (Thurston, 1994).

Πιο συγκεκριμένα, είδη τα οποία ανήκουν στο γένος *Pleurotus* φαίνεται να παρουσιάζουν προτίμηση ως προς τα ακόλουθα υποστρώματα: 4-Υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλ-οξικό οξύ, Κατεχόλη, 1,4-Βενζοϋδροκινόνη, ABTS (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), 2,4,6- Τριμεθυλοφαινόλη, 2,6-Διμεθοξυφαινόλη (2,6-Dimethoxyphenol, 2,6-DMP), 2-Μεθοξυ-1,4-βενζοϋδροκινόνη, 2-Μεθοξυφαινόλη (Γουαϊακόλη), 2-Μεθυλ-1,4-βενζοϋδροκινόνη, 3,4-Διϋδροξυβενζοϊκό οξύ, 3,5-Κυκλοεξαδιεν-1,2-διόλη, 4-Υδροξυμεθυλο-2-μεθοξυφαινόλη, 4-(Υδροξυπροπ-1-ενυλο)-2-μεθοξυφαινόλη (Κονιφερυλική αλκοόλη), 4-Αμινοφαινόλη, 4-Αμινοφαινυλαμίνη, Υδραζόνες όπως η συρινγκαλδαζίνη, 4-Υδροξυ-3,5-διμεθοξυβενζοϊκό οξύ (Συριγγικό οξύ), 4-Υδροξυ-3-μεθοξυ-βενζοϊκό οξύ (Βανιλλικό οξύ), 4-Μεθοξυανιλίνη, 4-Μεθοξυφαινόλη, Ανθρακένιο και Φθορανθένιο (Baldrian, 2006).

Η παρεμπόδιση των λακκασών παρατηρείται παρουσία ενώσεων όπως ανιόντα αζιδίου, κυανιδίου, υδροξειδίου, τα οποία συνδέονται στις θέσεις T2/T3 και διακόπτουν την εσωτερική μεταφορά ηλεκτρονίων. Τα ανιόντα OH^- παρεμποδίζουν την κατάλυση κυρίως σε αλκαλικά pH. Ενώσεις όπως λιπαρά οξέα, ιόντα μετάλλων, υδροξυγλυκίνη, αντιδραστήρια σουλφυδρυλίου (sulfhydryl reagents), Κοζικό οξύ (Kojic acid), Δεσφεροξαμίνες (desferal) ή και κατιονικοί παράγοντες τεταρτοταγούς αμμωνίας (cationic quaternary ammonium detergents), προκαλούν παρεμπόδιση μέσω τροποποιήσεων της αλυσίδας των αμινοξέων, σχηματισμό χηλικών δεσμών με τον χαλκό του ενεργού κέντρου ή μέσω άλλων δράσεων

μετασηματισμού του ενζύμου (Gianfreda et al., 1999). Αντίστοιχα παρεμπόδιση της δράσης λακκασών που προέρχονται από το γένος *Pleurotus* παρατηρείται από τις ακόλουθες ενώσεις και στοιχεία: Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , 2-Μερκαπτοαιθανόλη, ομάδες κυανίου CN^- , υδροξυλαμίνες, Κοζικό οξύ, NaN_3 , SDS. Τα δεδομένα προκύπτουν από λακκάσες των ειδών *Pleurotus eryngii* (Munoz et al., 1997), *Pleurotus ostreatus* (Palmieri et al., 1997, Giardina et al., 1999, Pozdnyakova et al., 2004, Das et al., 2000) και *Pleurotus pulmonarius* (De Souza & Peralta, 2003).

1.5.1.7 Καταλυτική Δράση Λακκασών

Παρά το γεγονός ότι οι μυκητιακές λακκάσες οξειδώνουν ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, οι κινητικές σταθερές K_M και k_{cat} του μοντέλου Michaelis – Menten έχουν προσδιορισθεί για περιορισμένο αριθμό ενώσεων, με κύριες το ABTS (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) και τις φαινολικές ενώσεις 2,6-DMP, γουαϊακόλη και συρινγκαλδαζίνη. Οι λακκάσες επιδεικνύουν υψηλή συγγένεια για υποστρώματα όπως το ABTS ή τη συρινγκαλδαζίνη με αντίστοιχες χαμηλές τιμές της κινητικής σταθεράς K_M των Michaelis-Menten, ενώ για υποστρώματα όπως η γουαϊακόλη ή η DMP η οξείδωση είναι συγκριτικά πιο αργή και η σταθερά Michaelis-Menten K_M λαμβάνει υψηλότερες τιμές. Χαμηλές τιμές K_M παρουσιάζουν επίσης τα υποστρώματα σιναπικό οξύ, υδροκινόνη, συρινγικό οξύ (syringic acid) ενώ αντίθετα υψηλότερες τιμές παρατηρούνται για πάρα-υποκατεστημένες φαινόλες, το βανιλικό οξύ ή τις αλδεΐδες αυτών. Επιπλέον έχουν εντοπισθεί και λακκάσες που οξειδώνουν πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, ωστόσο με χαμηλές κινητικές σταθερές. Χαρακτηριστικά για την οξείδωση των υποστρωμάτων ABTS, 2,6-Διμεθοξυφαινόλη, Γουαϊακόλη και Συρινγκαλδαζίνη από μυκητιακές λακκάσες, η κινητική σταθερά K_M (μM) λαμβάνει μέσες τιμές 18-100, 100-880, 121-1600 και 11-131 αντίστοιχα, και η παράμετρος k_{cat} (s^{-1}) κατά αντιστοιχία 5220-41460, 815-6000, 115-3960, 18400-25500 (Baldrian, 2006).

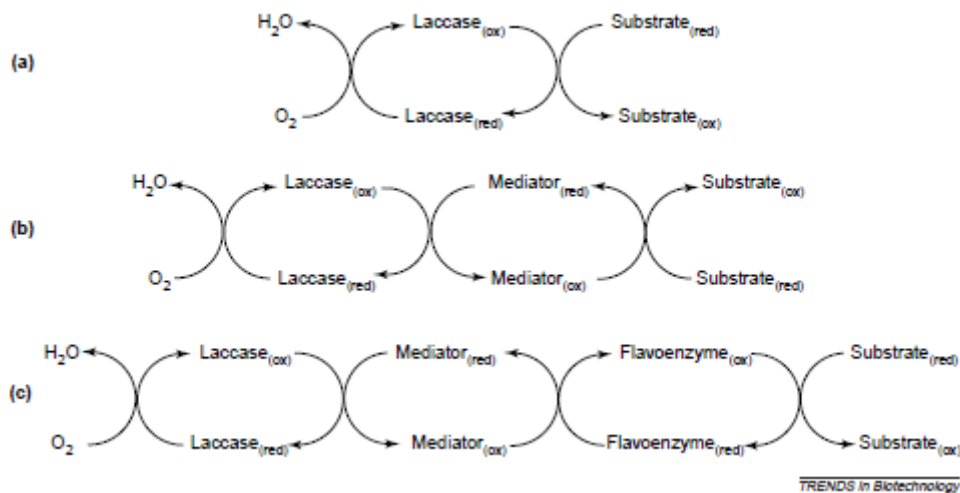
Τυπικά το βέλτιστο pH δράσης των λακκασών κυμαίνεται στην όξινη περιοχή. Ενώ για το ABTS το βέλτιστο pH είναι χαμηλότερο του 4, για φαινολικές ενώσεις όπως την DMP, την γουαϊακόλη ή την συρινγκαλδαζίνη, το εύρος μεταφέρεται μεταξύ pH 4 ως 7. Αντίστοιχα η κατεχόλη οξειδώνεται από τις λακκάσες σε pH 3,5-6,2 ενώ η υδροκινόνη σε pH 3,6-4,0. Οι μεταβολές στο pH επηρεάζουν την εξειδίκευση και την συγγένεια των λακκασών με το υπόστρωμα. Για τις μυκητιακές λακκάσες το βέλτιστο pH κυμαίνεται μεταξύ 3-7 ως προς φαινορικά υποστρώματα. Η συμπεριφορά αυτή στο προφίλ pH-ενεργότητας αποδίδεται σε δύο αντίρροπες δράσεις. Η μεν πρώτη αποδίδεται στη διαφορά οξειδοαναγωγικού δυναμικού του υποστρώματος και της θέσης T1 της λακκάσης και σχετίζεται με τον ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων, που ευνοείται σε υψηλότερα pH. Η δεύτερη δράση προκύπτει από τη σύνδεση ανιόντος υδροξειδίου στις θέσεις T2-T3, οπότε και επέρχεται παρεμπόδιση ενζυμικής ενεργότητας σε υψηλά pH. Σε γενικές γραμμές οι λακκάσες παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα σε αλκαλικά περιβάλλοντα, πιθανότατα λόγω της παρεμπόδισης της αυτό-οξείδωσης από ανιόντα OH^- . Σημειώνεται ακόμη ότι όχι μόνο ο ρυθμός της αντίδρασης αλλά και τα προϊόντα αυτής εξαρτώνται από το pH, καθώς η τιμή αυτού είναι δυνατόν να μεταβάλλει τις αντιδράσεις μεταξύ πρωταρχικών ελευθέρων ριζών που σχηματίζουν οι λακκάσες (Baldrian, 2006, Gianfreda et al., 1999).

Αναφορικά με τη θερμοκρασία, τα προφίλ των λακκασών δεν διαφέρουν ιδιαίτερα από τα θερμοκρασιακά προφίλ άλλων εξωκυτταρικών λιγνινολυτικών ενζύμων. Η βέλτιστη θερμοκρασία εντοπίζεται μεταξύ 50-70 °C, ενώ λίγες είναι οι περιπτώσεις ενζύμων που λειτουργούν καλύτερα σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 35°C. Ωστόσο η θερμοκρασία αυτή δε σχετίζεται σε καμία περίπτωση με την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μύκητα (Baldrian, 2006). Ως προς τη θερμοκρασιακή σταθερότητα τα δεδομένα ποικίλουν. Για παράδειγμα ο χρόνος ημίσειας ζωής στους 50 °C είναι κυμαίνεται από μερικά λεπτά, όπως συμβαίνει με την περίπτωση των λακκασών του οργανισμού *B. cinnerea* (Slomczynski et al., 1995), σε 2-3 ώρες για τις λακκάσες των οργανισμών *L. edodes* και *A. bisporus* (Wood, 1980, D'Annibale et al., 1996) έως και 50-70 ώρες, όπως έχει διαπιστωθεί για λακκάσες που προέρχονται από τα είδη *Trametes sp.* (Smirnov et al., 2001).

1.5.1.8 Παράγοντες οξειδοαναγωγής – Μεσολαβητές

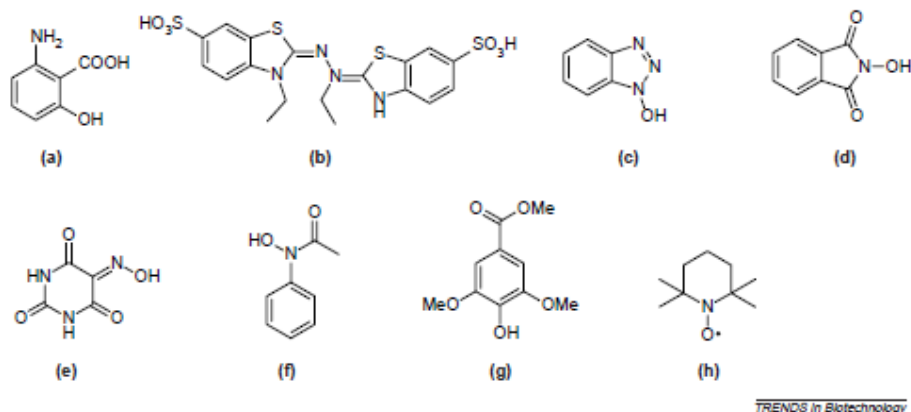
Ένα ακόμα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της καταλυτικής δράσης των λακκασών αποτελούν οι παράγοντες οξειδοαναγωγής ή μεσολαβητές (redox mediators). Το σύστημα παραγόντων οξείδωσης (mediator system) βασίζεται στην συντονισμένη δράση μυκητιακών λακκασών και ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (στην ξένη βιβλιογραφία αναφέρονται ως mediators). Κατά τη δράση του εν λόγω συστήματος σχηματίζονται σταθερές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες με τη σειρά τους οξειδώνουν άλλες ενώσεις, που δεν αποτελούν τυπικά υποστρώματα για τις λακκάσες, λόγω του χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού των ενζύμων. Εκτός του ότι επιτρέπουν την οξείδωση ενώσεων που δεν συνιστούν υπόστρωμα των λακκασών, όπως για παράδειγμα το μη φαινολικό κομμάτι της λιγνίνης, οι μεσολαβητές διαχέονται μακριά από το μικκύλιο, φτάνοντας σε σημεία μη προσιτά από το ίδιο το ένζυμο (Baldrian, 2006, Johannes & Majcherczyk, 2000).

Πολλές από τις ενώσεις που δρουν ως παράγοντες οξειδοαναγωγής στη φυσική αποικοδόμηση της λιγνίνης από μύκητες λευκής σήψης προέρχονται από οξειδωμένες μονάδες λιγνίνης ή από τον ίδιο το μεταβολισμό του μύκητα. Οι πιο συνήθεις ενώσεις που χρησιμοποιούνται στα συστήματα αυτά είναι το ABTS και το HBT (1-hydroxybenzotriazole). Το ABTS και το HBT οξειδώνονται από λακκάσες στις μορφές της κατιοντικής ρίζας $ABTS^+$, του κατιόντος $ABTS^{2+}$ και της ελεύθερης ρίζας HBT^{\cdot} αντίστοιχα. Οι οξειδωμένες μορφές των ενώσεων δρουν ως οξειδωτικά για τις ενώσεις-στόχους. Χαρακτηριστικά αναφέρονται οι ενώσεις-στόχοι συρινγκαλδεΐδη (syringaldehyde), ακετοσυρινγκόνη (acetosyringone), βανιλίνη (vanillin), ακετοβανιλλόνη (acetovanillone), μεθυλικός βανιλλεστέρας (methyl vanillate), π-κουμαρικό οξύ (p-coumaric acid). Το υψηλό κόστος των μεσολαβητών και η τοξικότητα των ενδιαμέσων που σχηματίζονται αποτελούν τα βασικά μειονεκτήματα των συστημάτων λακκασών-μεσολαβητών, στρέφοντας την έρευνα προς συστήματα με μεσολαβητές φυσικής προέλευσης (Baldrian, 2006, Johannes & Majcherczyk, 2000).

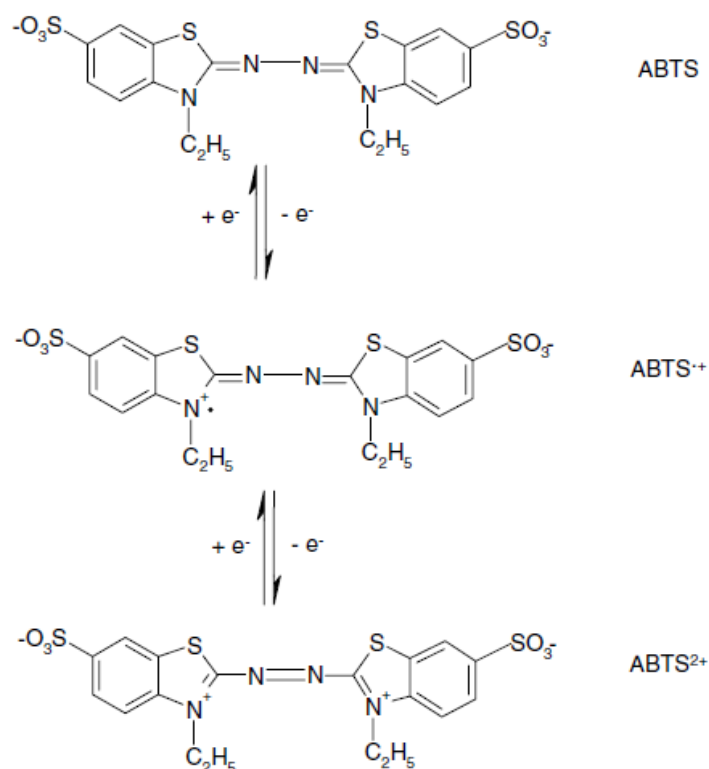


Εικόνα 1.5.1.8.1 Σχηματική αναπαράσταση των οξειδοαναγωγικών κύκλων που καταλύονται από λακκάσες απουσία (a) ή παρουσία (b-c) χημικών ενδιάμεσων προϊόντων που δρουν ως μέσα οξείδωσης (mediator) (Riva, 2006).

Οι διαφορετικοί μεσολαβητές χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς οξείδωσης των υποστρωμάτων. Για παράδειγμα ενώσεις όπως το ABTS ακολουθούν μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίων, ομάδες N-OH αξιοποιούν μηχανισμούς μεταφοράς υδρογόνων μέσω ριζών ενώ αντίθετα ενώσεις όπως η TEMPO (Εικόνα 1.3.1.8.2 – (h)) ακολουθούν διαφορετικό μηχανισμό, που βασίζεται σε ιοντική οξείδωση (Riva, 2006).



Εικόνα 1.5.1.8.2 Παραδείγματα μεσολαβητών (mediators) για τις λακκάσες. (a) Υδροξυ-ανθρανιλικό οξύ (Hydroxyanthranilic acid, HAA), (b) ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), (c) N-Υδροξυβενζο-τριαζόλη (N-hydroxybenzo-triazole, HBT), (d) N-υδροξυφθαμίδιο (N-hydroxyphthaimide - HPI), (e) Βιολουρικό οξύ (violuric acid, VLA), (f) N-υδοξακετανιλίδιο (N-hydroxyacetanilide, NHA), (g) Μεθυλικός εστέρας του 4-υδροξυ-3,5-διμεθοξυ-βενζοϊκού οξέος (methyl ester of 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-benzoic acid, syringic acid), (h) TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-yloxy), (Riva, 2006).



Εικόνα 1.5.1.8.3 Σχηματισμός κατιοντικών ριζών από την αφαίρεση ενός και δύο ηλεκτρονίων από το ABTS (Munteanu et al., 2007).

1.5.1.9 Βιοτεχνολογική Αξιοποίηση Λακκασών

Οι λακκάσες αποτελούν μία κατηγορία πολλά υποσχόμενων ενζύμων, ως προς τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Κάτι τέτοιο οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι για τη δράση τους οι λακκάσες δεν απαιτούν την προσθήκη ή την σύνθεση ενός χαμηλού μοριακού βάρους συμπαραγόντα (cofactor), όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου στην περίπτωση των υπεροξειδασών, καθώς το συνυπόστρωμά τους, το οξυγόνο, υπάρχει φυσικά στο περιβάλλον τους. Ένα δεύτερο προτέρημα μπορεί να θεωρηθεί η παρουσία και η δράση του ενζύμου εξωκυτταρικά, καθιστώντας την απομόνωση και των καθαρισμό των λακκασών πιο εύκολη, ενώ αξιοσημείωτη είναι και η σταθερότητα που επιδεικνύει το ένζυμο στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Τέλος, η δυνατότητα επαγόμενης έκφρασης των λακκασών στους περισσότερους μύκητες αποτελεί ένα επιπλέον πλεονέκτημα για την χρήση αυτών σε βιοτεχνολογικές διεργασίες (Baldrian, 2006).

Οι βιομηχανικές διεργασίες ως προς το πλείστον απαιτούν ένζυμα με συγκεκριμένες λειτουργικές ιδιότητες. Για παράδειγμα τα ένζυμα αυτά πρέπει να διατηρούν την ενεργότητά τους υπό ακραίες συνθήκες pH και θερμοκρασίας ή σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών διαλυτών, καθώς οι δεύτεροι συνήθως προκαλούν λανθασμένη αναδίπλωση του ενζύμου, αναγκάζοντάς το να χάσει τη λειτουργικότητά του (Huang et al., 2011, Bagewadi et al., 2017). Προκειμένου οι εν δυνάμει εφαρμογές των λακκασών να γίνουν αποδεκτές είναι ανάγκη να ληφθούν υπόψη ορισμένες παράμετροι που αφορούν το ίδιο το ένζυμο. Έτσι για παράδειγμα χρειάζεται να εξετασθεί η φύση και ο τύπος τοξικών ενώσεων που επηρεάζουν τη δράση λακκασών αλλά και η φύση των προϊόντων που σχηματίζονται από λακκάσες. Παράγοντες προς εξέταση είναι ακόμα η σταθερότητα των συσσωματωμάτων χουμικών ενώσεων ως

προς περαιτέρω αποικοδόμηση από μικροβιακές δράσεις ή και η ικανότητα των λακκασών να τροποποιούν μίγματα διαφορετικών χημικών συστατικών (Gianfreda et al., 1999).

Οι βιομηχανικές εφαρμογές των λακκασών περιλαμβάνουν αποχρωματισμό βαφών σε βιομηχανίες βαφών ή υφασμάτων και κλωστοϋφαντουργίας, βιολεύκανση χαρτοπολτού, αποτοξικοποίηση ρύπων και βιοαποικοδόμηση για την απολύμανση βιομηχανικών υγρών αποβλήτων, κατασκευή βιοαισθητήρων και κυψελίδων παραγωγής βιοκαυσίμων (biofuel cell), οργανικές συνθέσεις, βιοαποκατάσταση του εδάφους από φυτοφάρμακα και εντομοκτόνα αλλά και αξιοποίηση σε ιατρικά διαγνωστικά εργαλεία και στην τεχνολογία τροφίμων (Huang et al., 2011, Bagewadi et al., 2017, Riva, 2006). Άλλες ενδιαφέρουσες προς μελέτη εφαρμογές περιλαμβάνουν τον εντοπισμό νευροδιαβιβαστών κατεχολαμίνης όπως η ντοπαμίνη, η νορεπινεφρίνη ή η οξειδωμένη μορφή της μορφίνης. Ωστόσο ένα σοβαρό μειονέκτημα της αξιοποίησης μυκητιακών λακκασών είναι τα χαμηλά επίπεδα παραγωγής τους, εμπόδιο το οποίο αντιμετωπίζεται μέσω τεχνικών ετερόλογης έκφρασης, σε ξενιστές με ικανότητα παραγωγής υψηλών ποσοστών εξωκυτταρικών ενζύμων (More et al., 2011).

1.5.1.9.1 Περιβαλλοντική Βιοτεχνολογία

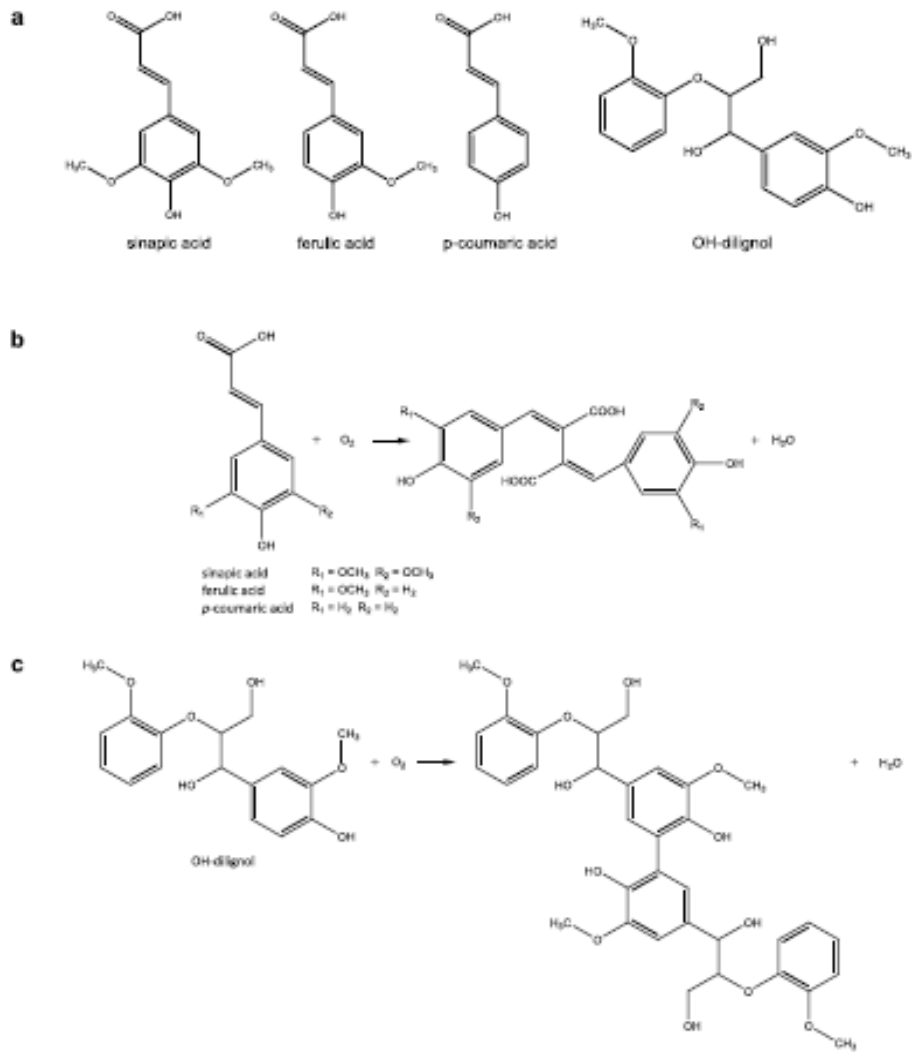
Τα λιγνινολυτικά ένζυμα βρίσκουν εφαρμογή συχνά στο κομμάτι της βιοαποκατάστασης βιολογικών συστημάτων ή αλλιώς στην «πράσινη βιοαποικοδόμηση». Η βιοαποκατάσταση έγκειται στον σχηματισμό χουμικής ύλης από οξείδωση φαινολικών παραγώγων προς αδιάλυτα και σταθερά πολυμερικά συσσωματώματα καθώς και στην απομάκρυνση τοξικών ενώσεων με χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των πρόδρομων ενώσεων των χουμικών προϊόντων. Η αξιοποίηση των λακκασών στην αποτοξικοποίηση των ρύπων του εδάφους βασίζεται στην ικανότητά τους να καταλύουν τη σύζευξη ξενοβιοτικών συστατικών σε χουμικές ενώσεις έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η ενσωμάτωση των ρύπων στο έδαφος. Οι ξενοβιοτικές ουσίες, τις οποίες οι λακκάσες είναι σε θέση να ακινητοποιήσουν είναι μεταξύ άλλων φαινολικές ενώσεις, ανιλίνες ή χλωριωμένες φαινόλες (Baldrian, 2006). Ανάλογη είναι και η δράση των λακκασών σε μολυσμένα ύδατα, με στόχο την ακινητοποίηση φαινολικών ρύπων σε αδιάλυτα συσσωματώματα και την μετέπειτα απομάκρυνσή τους (Maciel et al., 2010, Gianfreda et al., 1999).

Χάρη στο μεγάλο εύρος εξειδίκευσης που επιδεικνύουν ως προς το υπόστρωμα, οι λακκάσες είναι σε θέση να οξειδώσουν πλήθος ξενοβιοτικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων χλωριωμένων φαινολών, βαφών, φυτοφαρμάκων και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Παραδείγματος χάρη, λακκάσες από το μύκητα *Pleurotus ostreatus* αποικοδομούν υδροξυ-πολυχλωριωμένες διφαινόλες (hydroxyl PCBs) σε αντιδρώντα μίγματα με pH 4 (Keum & Li, 2004). Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην αποικοδόμηση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs), οι οποίοι προέρχονται από αποθέσεις φυσικού πετρελαίου ή από χρησιμοποίηση ορυκτών καυσίμων, από εκπομπές από λάστιχα αυτοκινήτων ή δασικές πυρκαγιές αλλά και από βιομηχανικές διεργασίες και φαίνεται να απειλούν τη δημόσια υγεία καθώς σχετίζονται με μεταλλάξεις, ανάπτυξη καρκίνου ή κυτοτοξικές ιδιότητες (Maciel et al., 2010, Gianfreda et al., 1999). Άλλες εφαρμογές στις οποίες οι λακκάσες έχουν ενεργό ρόλο είναι η αποτοξικοποίηση παραπροϊόντων αγροτικών διεργασιών, όπως απόβλητα ελαιουργείου ή πούλπας από καφέ (Baldrian, 2006). Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση των λακκασών του μύκητα *Panus tigrinus* ως προς την απομάκρυνση οργανικού φορτίου, τοξικών φαινολών και χρώματος σε αγροτοβιομηχανικά

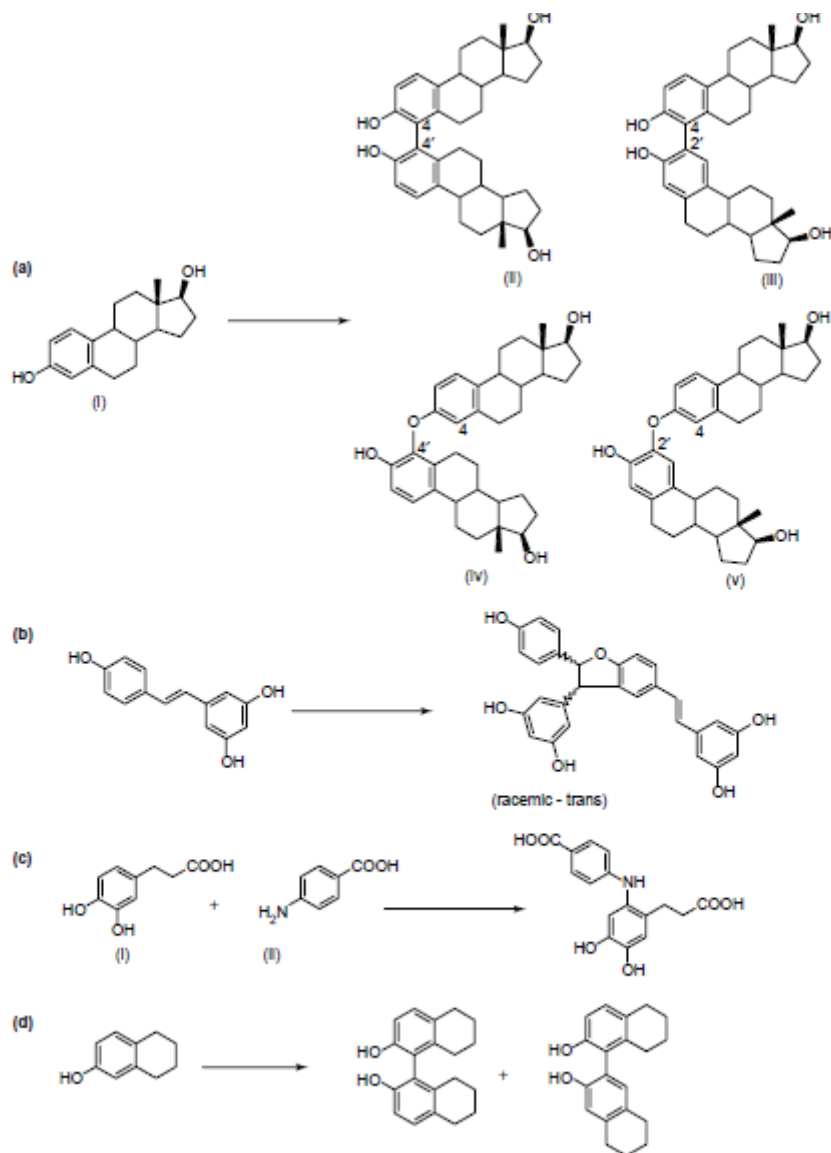
απόβλητα ελαιουργείου (D'Annibale, 2004). Αντίστοιχη είναι και η δράση των λακκασών του *Pleurotus ostreatus*, χάρη στις οποίες μειώνεται το φαινολικό φορτίο των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου από 4,4 σε 0,6 g/L (Aggelis et al, 2003).

1.5.1.9.2 Εφαρμογές Σύνθεσης

Η χρήση μεσολαβητών, τα οποία δρουν ως μέσα οξειδωσης, έχουν ως αποτέλεσμα την οξείδωση μη φαινολικών υποκαταστατών και συγκεκριμένα ομάδων βενζυλικής αλκοόλης σε ενώσεις που προσομοιάζουν λιγνιτικές δομές. Έχει καταγραφεί η οξείδωση βενζυλικών (benzylic), αλλυλικών (allylic), προπαργυλικών (propargyl) και αλειφατικών (aliphatic) αλκοολών σε αντίστοιχες αλδεΐδες και κετόνες. Πιο συγκεκριμένα, οι φαινολικές ρίζες υπόκεινται σε αντιδράσεις αυτό-σύζευξης σχηματίζοντας διμερή, μέσω δεσμών μεταξύ ανθράκων και μεταξύ άνθρακα-οξυγόνου και από τη μορφή αυτή είναι σε θέση να προχωρήσουν προς σχηματισμό ολιγομερών και πολυμερών. Ωστόσο στις περιπτώσεις αυτές είναι κατανοητό το γεγονός ότι οι αποδόσεις είναι σχετικά μικρότερες ενώ παρατηρείται και ετερογένεια σε έναν βαθμό του τελικού προϊόντος (Riva, 2006). Λακκάσες του μικροοργανισμού *Rychnororus cinnabarinus* συνθέτουν παράγωγα του 3-(3,4-διυδροξυ-φαίνυλο)-προπιονικού οξέος (Ponzoni et al., 2007) ενώ λακκάσες του *Trametes versicolor* συνθέτουν αρωματικές αλδεΐδες (Fritz-Langhals & Kunath, 1998), συμβάλλουν στον πολυμερισμό της 1-ναφθόλης (Akta et al., 2001), και της κατεχόλης (Akta & Tanyolac, 2003), ενώ συμμετέχουν και στη σύνθεση 3,4-διυδρο-7,8-διυδροξυ-2H-διβενζολοφουρανο-1-ονών (Hajdok et al., 2007).



Εικόνα 1.5.1.9.2.1 (α) Ενώσεις υδροξυκιναμικών οξέων και OH-διλιγνόλης. (β) Πιθανός μηχανισμός για σχηματισμό προϊόντος μετά την οξειδωτική δράση λακκάσης (σχηματισμός διμερών από υδροξυκιναμικά οξέα). (γ) Πιθανός μηχανισμός για σχηματισμό προϊόντος μετά την οξειδωτική δράση λακκάσης (σχηματισμός διμερών από OH-διλιγνόλη), (Perna et al., 2018).



TRENDS in Biotechnology

Εικόνα 1.5.1.9.2.2 Παραδείγματα εφαρμογών σύνθεσης από λακκάσες. (a) Διμερή προϊόντα που λαμβάνονται από την οξείδωση της ένωσης β-οιστραδιόλη (β-estradiol), (b) διμερή προϊόντα που λαμβάνονται με την οξείδωση της ρεσβερατρόλης της φυτοαλεξίνης (phytoalexin resveratrol), (c) προϊόν αντίδρασης σύζευξης που λαμβάνεται από την ένωση διυδροκαφεϊκό οξύ (dihydrocaffeic acid), (i) και από την ένωση 4-αμινοβενζοϊκό οξύ (4-aminobenzoic acid), (ii), (d) διμερή προϊόντα που λαμβάνονται από την οξείδωση της ουσίας τετραϋδρο-2-ναφθόλη (tetrahydro-2-naphthol), (Riva, 2006).

1.5.1.9.3 Αποχρωματισμός Βαφών

Σε υγρά απόβλητα από βιομηχανίες υφασμάτων, οι βαφές γίνονται ορατές ακόμη και σε συγκεντρώσεις 0,005 mg/L ενώ παράλληλα ορισμένες βαφές και παραπροϊόντα αυτών είναι τοξικές και καρκινογόνες. Επιπλέον πολλές αζο-βαφές είναι δυνατόν να σχηματίσουν καρκινογόνες ενώσεις υπό αναερόβιες συνθήκες περιβάλλοντος. Μάλιστα σε υδάτινα οικοσυστήματα προκαλούν πρόβλημα καθώς μειώνουν την ποσότητα της ηλιακής ακτινοβολίας που διατίθεται σε φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς και μειώνουν τα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου διαταράσσοντας τις ισορροπίες του οικοσυστήματος. Η απομάκρυνση των βαφών από τα υγρά απόβλητα είναι επομένως αντικείμενο μελέτης μείζονος σημασίας για την επιστημονική κοινότητα, περισσότερο ίσως από την απομάκρυνση

διαλυτών άχρωμων οργανικών ενώσεων. Οι υπάρχουσες φυσικές ή χημικές μέθοδοι επεξεργασίας θεωρούνται ακριβές, μη αποδοτικές και περιβαλλοντικά μη ελκυστικές. Πιο συγκεκριμένα, οι μεν μέθοδοι φυσικής απομάκρυνσης, όπως η προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα ή η συσσωμάτωση και κατακρήμνιση, απαιτούν μεταφορά των συστατικών της βαφής σε διαφορετική φάση. Οι δε χημικές μέθοδοι, όπως η χημική απορρόφηση, η χημική ή φωτοχημική αποικοδόμηση, απαιτούν τη χρήση αντιδραστηρίων που σε αρκετές περιπτώσεις οδηγούν σε σχηματισμό ανεπιθύμητων παραπροϊόντων. Παράλληλα οι διεργασίες ενεργού ιλύος παρουσιάζονται ως αναποτελεσματικές εφόσον το σύνολο των μικροοργανισμών αδυνατεί να αποικοδομήσει το ποσοστό των βαφών που απορροφάται στις κυτταρικές μεμβράνες τους. Οι εμπορικές βαφές (αζο-βαφές, ετεροκυκλικές και πολυμερικές βαφές) δεν είναι πάντοτε ευπαθείς σε μικροβιακές δράσεις αερόβιας επεξεργασίας λόγω της σταθερής χημικής δομής τους. Ως εκ τούτου δοκιμάζονται νέα συστήματα αποικοδόμησης τα οποία βασίζονται σε ενζυμικές δράσεις, όπως για παράδειγμα η αποικοδόμηση από μυκητιακές λακκάσες (Champagne, 2010, Wong & Yu, 1999).

Περίπου το 60-70% των συνθετικών βαφών που χρησιμοποιούνται για εμπορικές εφαρμογές περιέχουν έναν ή περισσότερους αζοδεσμούς (-N=N-) που ενώνουν τις υποκατεστημένες αρωματικές δομές (azo dyes). Οι λακκάσες παρουσιάζουν πλεονέκτημα ως προς τον αποχρωματισμό των βαφών λόγω υψηλής καταλυτικής επίδοσης, του ευρέος φάσματος υποστρωμάτων και ανοχής σε πλήθος φυσικοχημικών παραμέτρων, ενώ απαιτούν λιγότερο χρόνο δράσης συγκριτικά με την περίπτωση κατεργασίας με κύτταρα μικροοργανισμών. Στον τομέα αυτόν αξιοποιούνται και τα συστήματα λακκασών με μεσολαβητές τα οποία είναι περισσότερο αποτελεσματικά καθώς στοχεύουν σε ένα ακόμα μεγαλύτερο φάσμα υποστρωμάτων (Bagewadi et al., 2017). Περιπτώσεις όπου εντοπίζεται η συγκεκριμένη δράση των λακκασών είναι για παράδειγμα στο εξωκυτταρικό μίγμα λακκασών από τον οργανισμό *Pleurotus ostreatus*, το οποίο αποικοδομεί την βαφή Ramazol Brilliant Blue R (RBBR) έως και σε ποσοστό 70% υπό βέλτιστες συνθήκες (Palmieri et al., 2005). Μία δεύτερη περίπτωση είναι η λακκάση του *Trichoderma harzianum*, η οποία αποικοδομεί τις βαφές malachite green, methylene blue και congo red, αρχικής συγκέντρωσης 200 mg/mL, σε ποσοστά 100%, 90% και 60% και σε χρόνους 16, 18 και 20 h αντίστοιχα, κατόπιν ακινητοποίησης σε μήτρα sol-gel και παρουσία μεσολαβητή 1-υδροξυβενζοτριάζολη (HBT), (Bagewadi et al., 2017). Τέλος λακκάσες του μύκητα *Trametes versicolor* αποικοδομούν βαφές ανθρακινόνης όπως τις Dispersed blue 3 (0,072 mM, αποχρωματισμός 75%) και Reactive blue 19 (0,036 mM, αποχρωματισμός 74%) και την αζο-βαφή Acid red 27 (0,036 mM, αποχρωματισμός 51%) σε θερμοκρασία 23°C και pH 5 (Champagne & Ramsay, 2010).

1.5.1.9.4 Τεχνολογία Τροφίμων

Στη βιομηχανία τροφίμων οι λακκάσες χρησιμοποιούνται συνήθως για να ενισχύσουν ή να βελτιώσουν την εμφάνιση ως προς το χρώμα του τροφίμου ή ποτού. Ακόμη βρίσκουν εφαρμογή στον εντοπισμό κατεχόλης στο τσάι ή ασκορβικού οξέος, τον προσδιορισμό του επιπέδου μόλυνσης σε μούστο και κρασί από μύκητες όπως τον *Botrytis cinerea*, ή ακόμα και τον σχηματισμό γέλης από πηκτίνη ζαχαρότευτλων (Maciel et al., 2010). Λακκάσες του μικροοργανισμού *P. cinnabarinus* χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό πηκτής (gelation) από πηκτίνες τεύτλων, μέσω οξειδωτικής σύζευξης των φερουλ-ομάδων (feruloyl groups), (Micard & Thibault, 1999). Λακκάσες χρησιμοποιούνται επίσης για κατεργασία χυμών φρούτων και ποτών (όπως μπύρα ή κρασί), με στόχο την απομάκρυνση φαινολικών ενώσεων,

οι οποίες είναι υπαίτιες για αντιδράσεις ενζυμικής αμαύρωσης και θολότητα, αν και στις περιπτώσεις αυτές τα ένζυμα πρέπει να είναι ακινητοποιημένα, ώστε να απομακρύνονται από το προϊόν μιας και δεν έχουν λάβει έγκριση για χρήση ως πρόσθετο τροφίμων. Επιπλέον το ένζυμο χρησιμοποιείται και κατά την παρασκευή πώματος φελλού για τα μπουκάλια κρασιού, εφόσον η λακκάση περιορίζει με τη δράση της τη χαρακτηριστική κηλίδα φελλού και τη στυπτικότητα που αφήνεται στα παλαιωμένα μπουκάλια κρασιού (Bagewadi et al., 2017, Huang et al., 2011, Riva, 2006, Gianfreda et al., 1999).

1.5.1.9.5 Χαρτοβιομηχανία – Βιομηχανία Υφασμάτων

Στη χαρτοβιομηχανία οι λακκάσες έχουν τη δυνατότητα να αποπολυμερίζουν τη λιγνίνη και να απολιγνινοποιούν πολτούς- πούλπα ξύλου ή χάρτου, απουσία χλωρίνης, σε διεργασίες βιοπολυτοποίησης. Διαδεδομένη είναι πλέον η περίπτωση της αξιοποίησης των λακκασών που προέρχονται από τον μύκητα *Trametes versicolor* για τη βιολογική παραγωγή χαρτοπολτού, μαζί με τη δράση μεσολαβητών όπως το ABTS ή την 1-υδροξυβενζοτριάζολη (HBT), (Bourbonnais et al., 1997). Μία δεύτερη εφαρμογή στον τομέα αυτό είναι η χρήση συστημάτων λακκασών και παραγόντων οξειδωσης στη λεύκανση των χαρτοπολτών, με στόχο να συνδέονται στην επιφάνεια των ινών χημικά ευπροσάρμοστες ενώσεις, επιτρέποντας την εκ νέου χρήση του ανακυκλωμένου πολτού. Λακκάσες των μικροοργανισμών *P. cinnabarinus* και *T. versicolor* παρουσία HBT προκαλούν ισχυρή απολιγνινοποίηση αλκαλικού πολτού λιναρόσπορου (alkaline flax pulp), αυξάνοντας κατά 10% τη φωτεινότητα λευκού χρώματος στο υπό επεξεργασία υλικό (Camarero et al., 2004). Ένας ακόμα τομέας βιολογικών εφαρμογών αφορά στη βιομηχανία υφασμάτων. Συγκεκριμένα οι λακκάσες μέσω συστημάτων με μεσολαβητές παρέχουν τη δυνατότητα ενζυμικής τροποποίησης σε διεργασία λεύκανσης βαφών, σε βιομηχανίες υφασμάτων και βαφών, αντικαθιστώντας τις υπάρχουσες τεχνικές οι οποίες φαίνεται να είναι αναποτελεσματικές και οικονομικά ασύμφορες. Η μέθοδος βασίζεται στην δυναμική των λακκασών να αποικοδομούν τα συστατικά αυτά, ακόμη και στην περίπτωση συνθετικών βαφών (Maciel et al., 2010).

1.5.1.9.6 Οργανική Χημεία- Ιατρική- Νανοτεχνολογία

Η οργανική χημεία, η ιατρική, η φαρμακευτική, η κοσμετολογία και η νανοτεχνολογία είναι μερικοί ακόμα τομείς στους οποίους βρίσκουν εφαρμογή οι λακκάσες. Οι λακκάσες για παράδειγμα αξιοποιούνται ως βιοκαταλύτες για οργανικές συνθέσεις και ενζυμικό πολυμερισμό, παράγοντας προϊόντα που έως τώρα δεν ήταν εφικτό να παραχθούν χημικά. Παράλληλα η οξείδωση λειτουργικών ομάδων, η σύζευξη φαινολών και στεροειδών, η σύνθεση ιατρικών παραγόντων (αναισθητικές ουσίες, αντιφλεγμονώδεις, καταπραϋντικές, αντιβιοτικά), η δημιουργία δεσμών άνθρακα-αζώτου για σύνθεση πολύπλοκων φυσικών συστατικών είναι μερικές μόνο από τις δράσεις των λακκασών που βρίσκουν εφαρμογή στους προαναφερθέντες τομείς. Επιπλέον πρόσφατα αναπτύχθηκε νέα ενζυμική μέθοδος η οποία διακρίνει στιγμιαία τη μορφίνη από την κωδεΐνη σε δείγματα φαρμακευτικών σκευασμάτων (Maciel et al., 2010) αλλά γνωστή είναι και η αξιοποίηση λακκασών του *Pleurotus ostreatus* για εντοπισμό κατεχολαμίνων, σε συνέργεια με υπεροξειδάσες (Leite et al, 2003).

Επιπλέον υπάρχουν επιστημονικές έρευνες οι οποίες πραγματεύονται την ακινητοποίηση των λακκασών αφενός στην κάθοδο κελιών βιοκαυσίμων, παρέχοντας ενέργεια για μικρά

συστήματα μετάδοσης, αφετέρου σε μικροσκοπικά κελιά βιολογικών καυσίμων σε ιατρικές εφαρμογές, οι οποίες απαιτούν πηγή ενέργειας σε εμφυτεύματα στο ανθρώπινο σώμα (Maciel et al., 2010). Στη βιβλιογραφία συναντάται η κατασκευή κελιού βιοκαυσίμων με αξιοποίηση λακκασών, μέσω ενός ηλεκτροδίου οξυγόνου. Το ηλεκτρόδιο επεξεργάζεται βιοχημικά σήματα και μεταβάλλει την ηλεκτροχημική του ενεργότητα με την μεταβολή του pH, που προκαλείται από ενζυμική δράση. Τέτοιου είδους συστήματα παρέχουν τη δυνατότητα αποτελεσματικής επεξεργασίας πολυσηματικής πληροφορίας από το ανθρώπινο σώμα ώστε να προσαρμόσει ανάλογα την απελευθέρωση ενέργειας από το εμφυτευμένο κελί βιοκαυσίμων (Amir et al., 2008).

1.5.2 Υπεροξειδάσες

Οι υπεροξειδάσες αποτελούν γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν ως προσθετική ομάδα την πρωτοπορφυρίνη (protoporphyrin) IX. Τόσο οι λακκάσες όσο και οι υπεροξειδάσες καταλύουν την οξείδωση φαινολικών ενώσεων και αρωματικών αμινών μέσω αντιδράσεων ενός ηλεκτρονίου, σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες. Οι διαφορές στη δράση τους έγκεινται σε διαφορετικές προσθετικές ομάδες που έχουν στο μόριό τους καθώς επίσης και στο ότι οι λακκάσες έχουν χαμηλότερο οξειδαναγωγικό δυναμικό (Heinzkill et al., 1998).

1.5.2.1 Υπεροξειδάσες Λιγνίνης (EC 1.11.1.14. diarylpropane:oxygen, hydrogen peroxide oxidoreductases, LiP)

Οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης, αρχικά γνωστές ως λιγνινάσες, ανήκουν στην οικογένεια των οξειδοαναγωγασών. Ως ένζυμα εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στον Βασιδιομύκητα *Phanerochaete chrysosporium* και έκτοτε έχουν καταγραφεί σε πολλά είδη Βασιδιομυκήτων λευκής σήψης και Ακτινομυκήτων. Πρόκειται για εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, με μοριακή μάζα από 38 έως 47 kDa, που περιέχουν αίμη στο μόριό τους, εξαρτώνται από την παρουσία H_2O_2 και επιδεικνύουν υψηλό οξειδαναγωγικό δυναμικό και χαμηλό βέλτιστο pH δράσης. Οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης έχουν μεγάλο εύρος υποστρωμάτων μεταξύ των οποίων είναι και πολυμερικές ενώσεις, ενώ δεν παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Ως ένζυμα είναι ικανά να οξειδώνουν μεθοξυλιωμένους αρωματικούς δακτυλίους, απουσία ελεύθερης φαινολικής ομάδας, δημιουργώντας κατιοντικές ρίζες. Οι ρίζες στην συνέχεια δρουν με ποικίλους τρόπους, όπως σχάση δακτυλίου, απομεθυλίωση ή και διμερισμός φαινολών. Πιο συγκεκριμένα οι υπεροξειδάσες καταλύουν αρκετές οξειδώσεις στις αλκυλικές πλευρικές ομάδες ενώσεων που σχετίζονται με τη λιγνίνη, σπάνε τους δεσμούς μεταξύ ανθράκων σε πλευρικές ομάδες υπομονάδων της λιγνίνης, ενώ οξειδώνουν και βερατρυλικές αλκοόλες (veratryl alcohols), ενώσεις σχετικές με αλδεΐδες ή κετόνες και συνδράμουν στην υδροξυλίωση μονάδων βενζυλικού μεθυλενίου. Δεν απαιτούν την παρουσία μεσολαβητών, ωστόσο η καταλυτική τους δράση βασίζεται στην ύπαρξη υπεροξειδίου (Maciel et al., 2010, Leonowicz et al., 2001, Heinzkill et al., 1998).

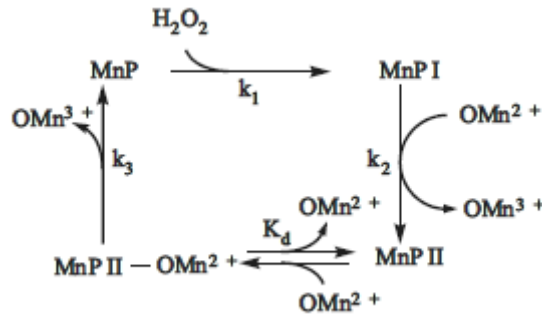
Στις αντιδράσεις υπεροξειδασών λιγνίνης σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει η βερατρυλική αλκοόλη. Η ένωση αυτή είτε δρα ως παράγοντας οξείδωσης είτε ρυθμίζει τη δράση του ενζύμου προστατεύοντας το από την ενδεχόμενη βλαπτική επίδραση που μπορεί να έχουν η περίσσεια του H_2O_2 ή των φαινολικών. Επιπλέον τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας είναι σε θέση να διασπασούν αρωματικούς δακτυλίους μέσω μιας αρχικής αφαίρεσης ενός ηλεκτρονίου, με επακόλουθη ενσωμάτωση οξυγόνου στο μόριο. Η βέλτιστη ενεργότητα για τις υπεροξειδάσες της λιγνίνης συναντάται σε χαμηλά pH, μεταξύ 2,5 και 3, ενώ το

ισοηλεκτρικό σημείο εντοπίζεται μεταξύ του εύρους pI 3-5. Στην περίπτωση απομονωμένων ενζύμων, οι υπεροξειδάσες παρουσιάζουν μια προτίμηση προς υψηλά μεθυλιωμένες λιγνίνες, οι οποίες και αποπολυμερίζονται προς κλάσματα χαμηλότερου μοριακού βάρους. Αντίθετα λιγνίνη που περιέχει φαινολικούς δακτυλίους παρουσιάζει την τάση να επαναπολυμερίζεται παρουσία των υπεροξειδασών λιγνίνης. Τελικά η λιγνίνη που αποικοδομείται από τα συγκεκριμένα ένζυμα παρέχει το κατάλληλο υπόστρωμα για τις λακκάσες, οπότε είναι εύλογο να θεωρείται ότι οι δύο αυτές κατηγορίες δρουν συνεργιστικά σε ορισμένα μονοπάτια βιομετατροπής της λιγνίνης (Leonowicz et al., 2001).

1.5.2.2 Υπεροξειδάσες του Μαγγανίου (EC 1.11.1.13. Mn(II):H₂O₂ oxidoreductases, MnP)

Οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου αποτελούν ένζυμα τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των οξειδοαναγωγασών. Η κατηγορία αυτή των ενζύμων μοιάζει με τις υπεροξειδάσες της λιγνίνης καθώς πρόκειται για εξωκυτταρικά ένζυμα, γλυκοζυλιωμένα, που περιέχουν αίμη ως προσθετική ομάδα. Εκφράζονται από μικροοργανισμούς με πολλαπλές μορφές, με μοριακό βάρος από 40 έως 48 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο μεταξύ 2,9 και 7,0. Η ανακάλυψή τους έπεται των υπεροξειδασών λιγνίνης και μάλιστα εντοπίστηκαν στον ίδιο μύκητα και προσδιορίστηκαν ως ένα δεύτερο ένζυμο αποικοδόμησης της λιγνίνης. Περαιτέρω έρευνα αποκάλυψε ότι οι υπεροξειδάσες αυτές εκκρίνονται από όλους σχεδόν τους Βασιδιομύκητες λευκής σήψης ή αποικοδόμησης ρύπων του εδάφους, αλλά όχι σε άλλους μύκητες ή βακτήρια (Maciel et al., 2010, Leonowicz et al., 2001, Heinzkill et al., 1998).

Ο καταλυτικός κύκλος των υπεροξειδασών του μαγγανίου είναι αντίστοιχος με αυτόν των υπεροξειδασών της λιγνίνης. Η δράση των ενζύμων περιλαμβάνει σιδηρούχα ένζυμα καθώς και τις οξειδοαναγωγικές καταστάσεις της υπεροξειδάσης Ένωση I και Ένωση II. Η καταλυτική τους δράση βασίζεται στην οξείδωση του κατιόντος Mn²⁺ σε Mn³⁺, το οποίο με τη σειρά του οξειδώνει φαινολικές ενώσεις σε ρίζες φαινοξυλίου, ανάγοντας τις Ενώσεις I και II. Το προϊόν Mn³⁺ έχει υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό και δημιουργεί σύμπλοκα με χηλικούς οργανικούς διαλύτες, τους οποίους παράγει ο ίδιος ο μύκητας, και σε αυτή την κατάσταση είναι σε θέση να διαχυθεί και να δράσει ως μέσο οξείδωσης φαινολικών δομών λιγνίνης. Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του συστήματος των υπεροξειδασών του μαγγανίου είναι συγκριτικά χαμηλότερο από αυτό των υπεροξειδασών της λιγνίνης και παρουσιάζει προτίμηση ως προς την οξείδωση φαινολικών ενώσεων. Σημειώνεται ακόμα ότι οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν αρωματικές ενώσεις, όπως η λιγνίνη, απευθείας σε διοξείδιο του άνθρακα. Επιπλέον τα εν λόγω ένζυμα παράγουν, κατά περιπτώσεις, H₂O₂ κατά την οξείδωση ορισμένων θειολών και NAD(P)H₂. Τέλος έχει παρατηρηθεί και η περίπτωση αυτό-κατάλυσης, απουσία εξωτερικού υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω οξείδωσης οργανικών οξέων, προς παραγωγή φαινοξυλικών ριζών που επιδρούν πάνω στη δομή της λιγνίνης (Maciel et al., 2010, Leonowicz et al., 2001, Heinzkill et al., 1998).



Εικόνα 1.5.2.2.1 Μηχανισμός καταλυτικού σχηματισμού οξαλικών συμπλόκων Mn³⁺ από υπεροξειδάσεις μαγγανίου. Τα οξαλικά σύμπλοκα αναπαρίστανται με OMn²⁺ και OMn³⁺ (Leonowicz et al., 2001).

1.5.2.3 Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές Υπεροξειδάσων

Οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης και του μαγγανίου έχουν τη δυνατότητα να αξιοποιηθούν στην παραγωγή αρωματικών συστατικών, ιδιότητα χρήσιμη στις διεργασίες επεξεργασίας τροφίμων. Για παράδειγμα, διαλύματα υπεροξειδάσων από τον μύκητα *Lepista irina* αποικοδομούν το β,β-καροτένιο (β,β-carotene), προς σχηματισμό ενώσεων όπως β-λιονόνη (β-Ionone), β-κυκλοσιτράλη (β-cyclocitral), διυδροακτινιδιολές (dihydroactinidiolide) και 2-υδροξυ-2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξανόνη (2-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanone), οι οποίες χρησιμοποιούνται ως αρωματικά πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων (Zorn et al., 2003). Υπάρχουν επιπρόσθετα αναφορές για αποχρωματισμό υγρών αποβλήτων από εγκαταστάσεις παραγωγής χάρτου. Οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης διαθέτουν επίσης ικανότητα αποχρωματισμού βαφών ενώ οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου αποχρωματίζουν διάφορους τύπους συνθετικών βαφών σε υδατικά μέσα ή σε βιοαντιδραστήρες στερεάς κλίνης. Οι μύκητες *Lentinus* sp παράγουν MnP και LiP, οι οποίες σε pH 3,5 και 5 αποικοδομούν σε ποσοστό 70% τις βαφές RBBR και cibacron blue 3GA σε διάστημα 6 ωρών (Gomes et al, 2009). Παράλληλα, ένζυμα MnP από τον *Trametes versicolor* αποικοδομούν τις αζο-βαφές Amaranth, Reactive black 5 (RB5) και Cibacron brilliant yellow (Champagne and Ramsay, 2005). Επιπλέον, οι MnP παρουσιάζουν αποτελεσματική δράση και στην αποικοδόμηση ενώσεων όπως αζο-, ετεροκυκλικές, πολυμερικές βαφές, διχλωροδιφαινυλοτριχλωροαιθάνιο (1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4-chlorophenyl) ethane, DDT), 2,4,6-τρινιτροτολουόλιο (2,4,6-trinitrotoluene, TNT) και PAHs.

Υπεροξειδάσες ωστόσο εμφανίζονται και στον τομέα της οργανικής χημείας, της ιατρικής και της νανοτεχνολογίας. Στην περίπτωση των LiP, η εφαρμογές που κερδίζουν έδαφος αφορούν βιοαισθητήρες πολυμερικών φαινολών ή λιγνίνης. Επιπλέον οι LiP του μικροοργανισμού *Phanerochaete chrysosporium* χρησιμοποιούνται για την απευθείας βιοηλεκτροκαταλυτική αναγωγή του H₂O₂ όταν αυτές βρίσκονται ακινητοποιημένες σε ηλεκτρόδια γραφίτη (Christenson et al, 2004). Στη συνθετική χημεία τα ένζυμα αυτά προτείνονται για χρήση σε καλλυντικά και δερματολογικά παρασκευάσματα. Αναφορικά με εφαρμογές βιοαποκατάστασης, οι MnP συμβάλλουν στον πολυμερισμό ακρυλαμιδίου και την αποικοδόμηση συρενίου, που αποτελεί βιομηχανικό πολυμερές και έναν από τους κύριους ρύπους για έδαφος και ύδατα (Maciel et al., 2010). Οι MnP από τους οργανισμούς *Phanerochaete chrysosporium* και *Pleurotus eryngii* αποικοδομούν το λιγνινικό κομμάτι του πολτού από λιναρόσπορο (Sigoillot et al, 2005). Χαρακτηριστική είναι τέλος η αξιοποίηση των υπεροξειδάσων του μύκητα λευκής σήψης *Phanerochaete chrysosporium* για την

βιοαποικοδόμηση DDT (1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl) Ethane), ένωση η οποία συνιστά περιβαλλοντικό ρύπο (Bumpus & Aust, 1987).

1.6 Ακίνητοποίηση Ενζύμων

Η αξιοποίηση των ενζύμων ως βιοκαταλύτες έχει πλέον εδραιωθεί σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, σε μεγάλο μάλιστα εύρος από τομείς που στρέφονται προς την «πράσινη χημεία», λόγω του απλού τρόπου παραγωγής και της εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα. Ωστόσο για την βιομηχανική αξιοποίηση των ενζύμων απαιτείται η ενίσχυση της παραγωγικότητας και του χρόνου ζωής τους προκειμένου να είναι σε θέση να σχεδιασθούν και να τεθούν σε εφαρμογή μεγάλης κλίμακας διεργασίες, οι οποίες να παρουσιάζουν οικονομικό ενδιαφέρον. Δύο κρίσιμοι παράγοντες που χρήζουν βελτιστοποίησης είναι η διατήρηση της δομικής σταθερότητας του ενζύμου καθώς και η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής του. Τομείς όπως οι βιομετατροπές, οι διαγνωστικές αναλύσεις, η φαρμακευτική, η επιστήμη των τροφίμων, οι περιβαλλοντικοί έλεγχοι, είναι αυτοί που επωφελούνται ιδιαίτερα από την ακίνητοποίηση των ενζύμων (Datta et al., 2013).

Η ακίνητοποίηση των ενζύμων παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω της αυξημένης διαθεσιμότητας που προσδίδει στα ένζυμα και άρα την μείωση της απαιτούμενης ποσότητας ενζύμου και του κόστους. Πρόκειται στην ουσία για μία διαδικασία δέσμευσης του ενζύμου σε μία φάση διαφορετική από αυτή στην οποία βρίσκεται το υπόστρωμα και το προϊόν. Οι φορείς της ακίνητοποίησης χρειάζεται να συνδυάζουν ένα πλήθος από χαρακτηριστικά όπως χαμηλό κόστος, χημική αδράνεια, φυσική αντοχή και σταθερότητα. Απαραίτητη είναι ακόμη η ικανότητα να αυξάνουν την ενζυμική ενεργότητα και να μειώνουν τόσο τυχόν παρεμπόδιση από το προϊόν της αντίδρασης, όσο και φαινόμενα απορρόφησης και μικροβιακής επιμόλυνσης. Ως φορείς για την ακίνητοποίηση χρησιμοποιούνται συνήθως αδρανή πολυμερή και ανόργανα υλικά (Datta et al., 2013).

Με την επιλογή της κατάλληλης τεχνικής ακίνητοποίησης είναι δυνατόν να αυξηθεί ο ρυθμός της αντίδρασης παρουσία υδρόφοβου υποστρώματος, να σταθεροποιηθεί το ένζυμο σε υδρόφοβο περιβάλλον, να ενισχυθεί η θερμική σταθερότητα του ενζύμου αλλά και να αποτραπεί η απενεργοποίηση του ενζύμου. Άλλα πλεονεκτήματα που της ακίνητοποίησης είναι η βελτιωμένη δράση του ενζύμου στις συνθήκες της αντίδρασης καθώς επίσης και η μεγαλύτερη σταθερότητα σε πιο ακραίες συνθήκες pH. Επιπρόσθετα, το προϊόν της αντίδρασης διαχωρίζεται εύκολα από το ακίνητοποιημένο ένζυμο. Κατά αυτόν τον τρόπο, ιδίως για προϊόντα φαρμακευτικού τύπου, με τη χρήση ακίνητοποιημένου ενζύμου το προκύπτον προϊόν δεν ενέχει κίνδυνο αλλεργικών αντιδράσεων προς τον χρήστη (Datta et al., 2013, Sheldon, 2011).

1.6.1 Τεχνικές Ακίνητοποίησης

Για την ακίνητοποίηση ενζύμων υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι μεθοδολογιών: η πρόσδεση σε μήτρα ακίνητοποίησης, η παγίδευση ή εγκλεισμός σε οργανικό ή ανόργανο πολυμερές και ο σχηματισμός σταυροδεσμών μεταξύ των ενζυμικών μορίων. Είναι κατανοητό ότι δεν υπάρχει μία μοναδική καθολική μέθοδος για την ακίνητοποίηση των ενζύμων καθώς πολλοί παράγοντες παίζουν ρόλο στην επιτυχία της ακίνητοποίησης. Ως εκ τούτου πρέπει να δοθεί προσοχή κατά την επιλογή της μεθόδου, των υλικών και των συνθηκών της ακίνητοποίησης προκειμένου να επέλθουν τα επιθυμητά αποτελέσματα (Matijosyte et al., 2010).

1.6.1.1 Προσρόφηση

Η προσρόφηση των ενζύμων βασίζεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και ιοντικούς δεσμούς με άλατα. Κατά τη φυσική ακινητοποίηση το μέσο ακινητοποίησης εμβαπτίζεται σε διάλυμα που περιέχει το ένζυμο και αφήνεται ώστε να σχηματισθούν οι δεσμοί. Εναλλακτικά το ένζυμο ακινητοποιείται δια ξήρανσης σε επιφάνεια ηλεκτροδίου. Με τέτοιου είδους τεχνικές το ένζυμο προστατεύεται από φαινόμενα συσσωμάτωσης, πρωτεόλυσης και αλληλεπιδράσεων με υδροφοβικές διεπιφάνειες. Έχουν καταγραφεί και έρευνες πάνω σε φιλικά προς το περιβάλλον μέσα ακινητοποίησης όπως ίνες από καρύδα, οι οποίες έχουν υψηλή κατακράτηση υγρασίας αλλά και υψηλή ικανότητα ανταλλαγής κατιοντικού φορτίου. Πορώδη υλικά κατεργασμένα με θειόλη μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως φορείς ακινητοποίησης, αφού διαθέτουν μεγαλύτερη επιφάνεια απορρόφησης ανά μονάδα όγκου που ενδείκνυνται για οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Επιπλέον, μοριακά κόσκινα κατεργασμένα με σιλάνιο αποτελούν ένα μέσο ακινητοποίησης, στο οποίο τα ένζυμα προσδένονται με δεσμούς υδρογόνου (Datta et al., 2013).

1.6.1.2 Ακινητοποίηση με Ομοιοπολικούς Δεσμούς

Η ομοιοπολική σύνδεση των ενζύμων σε κάποιο μέσο ακινητοποίησης αποδίδεται αφενός στα αμινοξέα των πλευρικών ομάδων των ενζύμων, όπως η αργινίνη, το ασπαραγινικό οξύ, η ιστιδίνη, αφετέρου σε λειτουργικές ομάδες όπως ιμιδαζόλιο (imidazole), ινδολύλιο (indolyl), φαινολικά υδροξύλια (phenolic hydroxyl) και άλλες. Επιφάνειες τροποποιημένες με πεπτίδια είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε υψηλότερη ειδική ενεργότητα και σταθερότητα καθώς επίσης και ελεγχόμενο προσανατολισμό των πρωτεϊνών. Υλικά τα οποία αναφέρεται ότι χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή είναι μεταξύ άλλων η αγαρόζη βρωμιούχου κυανίου (Cyanogen bromide agarose), η ρητίνη ιοντοανταλλαγής ενεργοποιημένη με βρωμοκυανίδιο (cyanogens bromide activated sepharose), η γλουταραλδεΐδη (glutaraldehyde), το silica gel. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί και πορώδη μέσα ακινητοποίησης από πυρίτιο και χιτοζάνη. Νεότερες τεχνολογίες στο κομμάτι της ακινητοποίησης με ομοιοπολικούς δεσμούς είναι οι βιοκαταλυτικές μεμβράνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με ένζυμα επικαλυμμένα από σιλικόνη. Η παραγωγή συσσωματωμάτων ενζύμων με σταυροδεσμούς είναι μια επίσης διαδεδομένη μέθοδος ακινητοποίησης και επιτυγχάνεται μέσω κροκίδωσης από υδατικά διαλύματα του ενζύμου με την προσθήκη οργανικών διαλυτών ή ιονικών πολυμερών. Το αποτέλεσμα είναι η υψηλότερη θερμική σταθερότητα και σημαντική αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής καθώς χάρη στους σταυροδεσμούς διατηρούνται οι δομικές και λειτουργικές ιδιότητες των ενζύμων (Datta et al., 2013).

1.6.1.3 Ακινητοποίηση Συγγένειας

Τέτοιου είδους τεχνικές εκμεταλλεύονται την εκλεκτικότητα του ενζύμου ως προς το μέσο ακινητοποίησης υπό διαφορετικές φυσικοχημικές συνθήκες. Η ακινητοποίηση επιτυγχάνεται με δύο τρόπους. Κατά τον πρώτο τρόπο η μήτρα ακινητοποίησης δέχεται προκατεργασία και προσδένεται σε μέσο σύνδεσης συγγένειας, το οποίο συγκρατεί στη συνέχεια το ένζυμο. Κατά τον δεύτερο τρόπο το ένζυμο συζεύγνυται με μια ουσία η οποία με τη σειρά της αναπτύσσει σχέσεις συγγένειας με τη μήτρα ακινητοποίησης. Οι τεχνικές αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί και σε διεργασίες καθαρισμού των ενζύμων. Επιπλέον σύνθετα μέσα που έχουν αναπτυχθεί συγκρατούν πολύ μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου. Τέτοια μέσα είναι για παράδειγμα οι πορώδεις σφαίρες από silica με επικάλυψη χιτοζάνης ή τα πολυστρωματικά

υλικά κονκαναβαλίνης Α με δεσμούς αγαρόζης. Τέλος ο σχηματισμός μέσωσ ακινητοποίησης με διαστρωμάτωση βιοσυγγένειας αυξάνει την χωρητικότητα σε ένζυμα και βελτιώνει τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης. Οι ιδιότητες αυτές προκύπτουν από τον σχηματισμό μη ομοιοπολικών δεσμών όπως οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι δεσμοί υδρογόνου ή οι δεσμοί van der Waals (Datta et al., 2013).

1.6.1.4 Παγίδευση

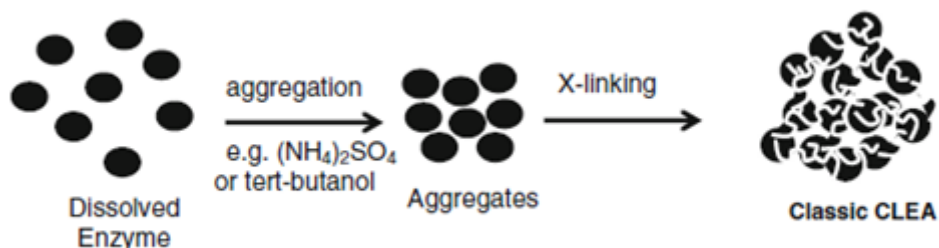
Η παγίδευση συνιστά τον εγκλεισμό των ενζύμων μέσω ομοιοπολικών και μη δεσμών σε συμπλέγματα γέλης ή ινών. Υβριδικοί φορείς άλατος αλγινικού οξέος-ζελατίνης-ασβεστίου (alginate-gelatin-calcium) οδηγούν σε αποδοτικό εγκλεισμό των ενζύμων, αποτρέποντας τη διαφυγή των ενζύμων και βελτιώνοντας τη μηχανική σταθερότητα του βιοκαταλύτη. Επίσης η παγίδευση σε νανοδομές βρίσκει εφαρμογή σε τομείς όπως η βιοφαρμακευτική, οι βιοαισθητήρες, τα βιοκαύσιμα. Η μεσοπορώδης silica είναι ένα ακόμη αποτελεσματικό μέσο για την παγίδευση ενζύμων, καθώς παρουσιάζει ιδιότητες όπως υψηλό ποσοστό επιφάνειας ανά όγκο, ενιαία και ομοιόμορφη κατανομή πόρων και υψηλή χωρητικότητα απορρόφησης (Datta et al., 2013).

1.6.2 Σχηματισμός Συσσωματωμάτων Ενζύμων μέσω Σταυροδεσμών (CLEAs)

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, ο σχηματισμός συσσωματωμάτων ενζύμων μέσω σταυροδεσμών (cross-linked enzyme aggregates – CLEAs) αποτελεί μια διαδεδομένη τεχνική ακινητοποίησης ενζύμων που βασίζεται στον σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών. Η αξιοποίηση των ακινητοποιημένων ενζύμων συμβάλλει στην ανάπτυξη «πράσινων» τεχνολογιών με σκοπό την ελαχιστοποίηση των παραγόμενων αποβλήτων και τη χρήση τοξικών αντιδραστηρίων. Η παρασκευή των CLEAs πραγματοποιείται εύκολα από ανεπεξέργαστα ενζυμικά συμπυκνώματα ενώ ως τεχνική επιφέρει βελτιωμένο χρόνο αποθήκευσης, λειτουργική σταθερότητα ως προς τη μετουσίωση υπό θέρμανση ή από οργανικούς διαλύτες, προστασία από αυτό-πρωτεόλυση και σταθερότητα έναντι διαφυγής στο υδατικό μέσο. Τα CLEAs παρουσιάζουν υψηλή παραγωγικότητα (κιλό προϊόντος ανά κιλό βιοκαταλύτη) ενώ εύκολα ανακτώνται και επαναχρησιμοποιούνται. Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη μέθοδος ακινητοποίησης δεν απαιτεί μία στερεή μήτρα για ακινητοποίηση, οι παραγόμενοι βιοκαταλύτες παρουσιάζουν υψηλή ενζυμική ενεργότητα ανά μονάδα όγκου. Τέλος η τεχνική αυτή παρέχει την δυνατότητα της συν-ακτινητοποίησης περισσότερων του ενός ενζύμου ούτως ώστε τα παραγόμενα CLEAs να χρησιμοποιούνται για την κατάλυση πλήθους βιομετατροπών, ανεξαρτήτως της διαδοχής των αντιδράσεων (Hassani et al., 2013, Sheldon, 2011).

Η παραγωγή των CLEAs πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, την κατακρήμνιση του ενζύμου και την ακινητοποίηση με παράγοντα σχηματισμού σταυροδεσμών. Κατά την πρώτη φάση το ένζυμο προστίθεται σε κατάλληλο διάλυμα του παράγοντα κατακρήμνισης προκειμένου τα ένζυμα να περάσουν από τη διαλυτή μορφή σε στερεή φάση υπό τη μορφή συσσωματωμάτων. Σε δεύτερη φάση προστίθεται στο ενζυμικό διάλυμα κατάλληλη ποσότητα διαλύματος γλουταραλδεΐδης, με στόχο την σταθεροποίηση των πρωτεϊνών στα συσσωματώματα. Η γλουταραλδεΐδη αποτελεί παράγοντα με τον οποίο σχηματίζονται οι σταυροδεσμοί στα πρωτεϊνικά μόρια και προτιμάται για το χαμηλό κόστος και την διαθεσιμότητά της. Σε γενικές γραμμές οι εν λόγω δεσμοί παράγονται μέσω αντιδράσεων των ελεύθερων αμινομάδων σε υπολείμματα λυσίνης στην επιφάνεια γειτονικών ενζυμικών

μορίων με τη βοήθεια ολιγομερών ή πολυμερών της γλουταραλδεΐδης με αποτέλεσμα να πραγματοποιούνται αλδολικές συμπυκνώσεις. Άλλες διαλδεΐδες με απλούστερη χημεία που είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως τέτοιοι παράγοντες είναι η ένωση πολυαλδεΐδη της δεξτράνης (dextran polyaldehyde), (Sheldon, 2011).



Εικόνα 1.6.2.1 Σχηματική αναπαράσταση παραγωγής CLEA (Sheldon, 2011).

Κατά τη διαδικασία παραγωγής CLEAs υπεισέρχονται πολλοί παράγοντες που παίζουν ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα της ακινητοποίησης. Τέτοιες παράμετροι είναι το pH, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση, η ανάδευση, διάφορα πρόσθετα, ο παράγοντας κατακρήμνισης και ο παράγοντας σχηματισμού των δεσμών. Για παράδειγμα ο παράγοντας κατακρήμνισης καθορίζει αφενός την ποσότητα του ενζύμου που πέφτει ως ίζημα, αφετέρου το ποσοστό της ενεργότητας που ανακτάται μετά την κατακρήμνιση. Επιπλέον ο λόγος του παράγοντα σχηματισμού δεσμών προς την ποσότητα του ενζύμου επηρεάζει το μέγεθος του συσσωματώματος, την ενεργότητα και τη σταθερότητα αυτού. Χαμηλός λόγος συνεπάγεται ανεπαρκή σχηματισμό δεσμών και άρα ευάλωτα CLEAs στη διαφυγή του ενζύμου, ενώ υψηλό ποσοστό είναι δυνατόν να οδηγήσει σε ολική απώλεια ενεργότητας. Σε περίπτωση χαμηλής ενζυμικής συγκέντρωσης ο σχηματισμός δεσμών υποβοηθείται με την προσθήκη μιας δεύτερης αδρανούς πρωτεΐνης όπως της αλβουμίνης βόειου ορού (bovine serum albumin, BSA). Δείκτες που καθορίζουν την βιωσιμότητα της διαδικασίας παραγωγής CLEAs μπορούν να θεωρηθούν η ανάκτηση ενεργότητας σε σχέση με το μη ακινητοποιημένο ένζυμο καθώς και το κόστος του ενζύμου ανά κιλό προϊόντος (Sheldon, 2011).

Αναφορικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των CLEAs, μία από τις βασικότερες ιδιότητες των ετερογενών αυτών καταλυτών είναι το μέγεθος των σωματιδίων, το οποίο κυμαίνεται από 5 έως 50μm, προσδίδοντας σε αυτά την ικανότητα φιλτραρίσματος. Επιπλέον τα CLEAs συνιστούν πορώδη υλικά και άρα υπάρχει το ενδεχόμενο να παρατηρούνται φαινόμενα διάχυσης που να καθορίζουν τον ρυθμό της αντίδρασης. Η λειτουργική σταθερότητα, που χαρακτηρίζει τα CLEAs, δικαιολογείται από το γεγονός ότι οι σταυροδεσμοί διατηρούν την τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών (Sheldon, 2011).

1.6.2.1 Εφαρμογές Ακινητοποίησης Λακκασών/Υπεροξειδάσων σε CLEAs

Στην βιβλιογραφία αναφέρεται πλήθος εφαρμογών στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί CLEAs από λακκάσες ή υπεροξειδάσες. Στην περίπτωση των λακκασών για παράδειγμα, ακινητοποιημένες λακκάσες αξιοποιούνται στην βιοαποικοδόμηση ξενοβιοτικών ενώσεων,

σε οργανικές συνθέσεις, στη λεύκανση του χαρτοπολλτού ή στον αποχρωματισμό βαφών και γενικότερα σε διεργασίες βιοαποκατάστασης οικοσυστημάτων (Arsenault A. et al., 2011). Για παράδειγμα, με τη βοήθεια μεσολαβητών, CLEAs λακκάσων από τον μύκητα *Coriolorpsis polyzona* οξειδώνουν απλές αλκοόλες ενώ συμβάλλουν στην αποτοξικοποίηση των υδάτων που περιέχουν τις ενώσεις bisphenol A, nonylphenol, triclosan σε αρχική συγκέντρωση 5mg/mL, σε θερμοκρασία δωματίου, pH 5 και 150 min δράσης (Cabana H. et al., 2007). Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα είναι και η καταλυτική αερόβια οξείδωση του αμύλου σε καρβοξυ-άμυλο, το οποίο αξιοποιείται ως βιοαποικοδομήσιμο υποκατάστατο πολυακρυλικών ενώσεων για απορρόφηση ρύπων σε υδάτινους φορείς (Sheldon et al., 2007). Επιπλέον στη βιβλιογραφία αναφέρεται και η παρασκευή CLEAs με μαγνητικές ιδιότητες (συσσωμάτωση CLEAs με μαγνητικά νανοσωματίδια), με τα οποία παρατηρείται επιτυχημένη αποικοδόμηση αντιβιοτικών και φαρμακευτικών ενώσεων και αποχρωματισμός βαφών (Sheldon, 2011). CLEAs από λακκάσες των *Trametes versicolor*, *Tramete villosa* και *Agaricus bisporus* οξειδώνουν γραμμικές C₅-C₁₀ αλειφατικές αλκοόλες σε υδατικά διαλύματα με pH 4 (Matijosyte et al., 2010). Επιπλέον, μαγνητικά CLEAs από λακκάσες του οργανισμού *Cerrena unicolor* αξιοποιούνται για την αποικοδόμηση τετρακυκλίνης, οξυτετρακυκλίνης, αμπικιλίνης, σουλφαμεθοξαζόλης και ερυθρομυκίνης, με αποικοδόμηση 80% για την τετρακυκλίνη, απουσία μεσολαβητή, σε pH 6, 25°C και 12 ώρες, μειώνοντας παράλληλα την αντιμικροβιακή δράση των υπολοίπων (Yang et al., 2017).

Στην περίπτωση των υπεροξειδασών γίνεται αναφορά για χρήση των CLEAs σε εφαρμογές αποχρωματισμού υγρών αποβλήτων, στον τομέα των βιοαισθητήρων και σε διεργασίες σύνθεσης (Sheldon, 2011). Μάλιστα γίνεται λόγος για την παραγωγή CLEAs από υπεροξειδάση (HRP, EC 1.11.1.7), προερχόμενη από ρίζες χρένου (horseradish roots) *Armoracia rusticana* ή *Cochlearia armoracia*, τα οποία σε συνδυασμό με οξειδώσεις από οξειδάσες της χοληστερόλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές στον τομέα των βιοαισθητήρων (Sulek et al., 2011). Τέλος, η παραγωγή CLEAs με συνδυασμό δύο ενζύμων, υπεροξειδάσης του οργανισμού *Bjerkandera adusta* και οξειδάσης της γλυκόζης από τον *Aspergillus niger*, βρίσκει εφαρμογή στην αποικοδόμηση χημικών, τα οποία προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές, όπως τα bisphenol A, nonylphenol, 17 α -ethinylestradiol και η ορμόνη 17 β -οιστραδιόλη. Μάλιστα επιτυγχάνεται ολική απομάκρυνση της bisphenol A (10 mg/mL) σε διάστημα 43 ωρών, αλλά και απομάκρυνση της οιστρογονικής δραστηριότητας υπολοίπων ενώσεων σε ποσοστό πάνω από 55% (Taboada-Puig et al., 2011).

1.7 Στόχος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στη μελέτη του ενζυμικού συστήματος αποικοδόμησης της λιγνίνης από επιλεγμένα στελέχη Βασιδιομυκήτων ελληνικών ενδιατημάτων και την αξιοποίηση του ενζυμικού συστήματος σε εφαρμογές βιοαποικοδόμησης. Η εργασία που πραγματοποιήθηκε είναι δυνατόν να διακριθεί σε δύο μέρη. Στο μεν πρώτο παρελήφθησαν δύο διαφορετικά μίγματα ενζύμων που είχαν απομονωθεί από καλλιέργεια του μύκητα *Pleurotus citrinopileatus*, ο οποίος είχε αναπτυχθεί σε υγρά απόβλητα ελαιουργείου. Ακολούθησε περαιτέρω καθαρισμός των ενζύμων αυτών με χρήση στηλών ιοντοανταλλαγής οπότε ελήφθησαν τα μίγματα των λακκασών *PcLac1* και *PcLac2*. Πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των ενζύμων ως προς τα φυσικοχημικά και βιοχημικά τους χαρακτηριστικά και τέλος εξετάστηκε το ενδεχόμενο αξιοποίησης των ενζύμων αυτών σε εφαρμογές οργανικής σύνθεσης από υδροξυκιναμικά οξέα (hydroxycinnamic acids). Στο δεύτερο κομμάτι της εργασίας παρελήφθη ακατέργαστο το εξωκυτταρικό ενζυμικό μίγμα του μύκητα *Pleurotus citrinopileatus*, καθαρίστηκε από στερεά υπολείμματα και συμπυκνώθηκε. Σε πρώτη φάση δοκιμάστηκε η ακινητοποίηση των ενζύμων του παρασκευάσματος σε συσσωματώματα με σταυροδεσμούς (CLEAs) και ακολούθησε στοιχειώδης βελτιστοποίηση της διαδικασίας. Τα σχηματιζόμενα CLEAs μαζί με το ελεύθερο ενζυμικό συμπύκνωμα χαρακτηρίστηκαν ως προς ορισμένες βιοχημικές παραμέτρους. Τέλος εξετάστηκε η αξιοποίηση των ακινητοποιημένων ενζύμων σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές αποικοδόμησης φαινολικών ρύπων.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Μικροοργανισμοί

Οι καθαρές λακκάσες *PcLac1* και *PcLac2* καθώς και το υπερκείμενο της καλλιέργειας, που αποτελούν το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής παρελήφθησαν από υγρή καλλιέργεια του μύκητα *Pleurotus citrinopileatus*. Τα στελέχη των Βασιδιομυκήτων παραλήφθηκαν από τη Μυκητοθήκη του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπεύθυνος της οποίας είναι ο Αναπληρωτής καθηγητής του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής Γεώργιος Ζερβάκης, και ήταν το *Pleurotus citrinopileatus* LGAM 28684. Τα στελέχη παρελήφθησαν και διατηρούνταν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA στους 4 °C.

Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου της υγρής καλλιέργειας διαλύθηκε ποσότητα προκατεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιουργείου σε τελική συγκέντρωση 50% (v/v) με τη χρήση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, 50 mM, pH 6, σε τελικό όγκο 100 mL σε γυάλινες κωνικές φιάλες Erlenmeyer (όγκου 250 mL), στις οποίες προστέθηκαν και 30g/L εκχύλισμα βύνης (yeast extract, YE). Η αποστείρωση όλων των μέσων ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο Labo Autoclave σε θερμοκρασία 121°C και για 20min. Για τον εμβολιασμό τους, χρησιμοποιήθηκαν τετράγωνα τεμάχια άγαρ πλευράς 6mm, τα οποία είχαν αποκοπεί από τα άκρα αναπτυσσόμενης στερεής καλλιέργειας, υπό ασηπτικές συνθήκες, (1 τεμάχιο ανά 30 mL καλλιέργειας). Μετά τον εμβολιασμό, οι κωνικές φιάλες επωάστηκαν στους 27°C, σε συνθήκες σκότους και με ήπια ανάδευση 80 rpm, για 22 ημέρες.

Η καλλιέργεια του μύκητα, η παραλαβή του υπερκείμενου και η απομόνωση των λακκασών *PcLac1* και *PcLac2* πραγματοποιήθηκαν από τη Δρ Α. Ζέρβα στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τομέα Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Κλάσματα του υπερκείμενου της καλλιέργειας με υψηλή περιεκτικότητα σε *PcLac1* ή *PcLac2* παραλήφθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικά ενζυμικά κλάσματα στην παρούσα διπλωματική εργασία.

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 σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), SCHOTT AG (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.) και ROTH (Η.Π.Α.).

2.1.2.1 Υγρά απόβλητα Ελαιουργείου

Το υγρό απόβλητο ελαιουργείου (YAE) τριφασικού διαχωριστήρα προμηθεύτηκε από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και ήταν προσφορά του Αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής Γεωργίου Ζερβάκη. Η σύστασή του και οι φυσικοχημικές του ιδιότητες περιγράφονται στη μελέτη των Ntougias et al., 2013. Το pH είχε ρυθμιστεί στο 6 με 3 N NaOH και είχε υποστεί επεξεργασία με φυγοκέντρωση και διήθηση για την αφαίρεση τυχόν αιωρούμενων στερεών, ενώ αποθηκεύτηκε στους -20 °C μέχρι τη

χρήση. Η προκατεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου είχε προηγουμένως πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τομέα Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Το διάλυμα παρελήφθη έτοιμο προς χρήση στα πειράματα που ακολούθησαν.

2.1.3 Υλικά – Στήλες Χρωματογραφίας

Ο καθαρισμός των απομονωμένων ενζύμων *PcLac1* και *PcLac2* πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωματογραφικής στήλης ιοντοανταλλαγής DEAE –cellulose HiPrep DEAE FF 16/10 (General Electric).

2.1.4 Ρυθμιστικά Διαλύματα – Διαλύματα Ηλεκτροφορήσεων

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα για τις ηλεκτροφορήσεις περιγράφονται στον Πίνακα 2.1.4.1.

Πίνακας 2.1.4.1 Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων και διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης.

Ρυθμιστικό Διάλυμα	pH	Συστατικά
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών	2	Na ₂ HPO ₄ 100 mM H ₃ PO ₄ 100 mM
Ρυθμιστικό Διάλυμα Κιτρικού- Φωσφορικών	3-5	Na ₂ HPO ₄ 100 mM Κιτρικό Οξύ 100 mM
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών	6-7	Na ₂ HPO ₄ 100 mM NaH ₂ PO ₄ 100 mM
Tris/HCl	8-9	Tris Base 100 mM HCl (πυκνό) 100 mM
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών	6	K ₂ HPO ₄ 500 mM KH ₂ PO ₄ 500 mM
Ρυθμιστικό Διάλυμα Πιπεραζίνης	5,7	Piperazine 200 mM HCl (πυκνό) 100 mM
Ρυθμιστικό Διάλυμα Bis-Tris	7	Bis-Tris 200 mM HCl (πυκνό) 100 mM
<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

2.1.5 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.)
- Φωτόμετρο HitachiU-2900 spectrophotometer (Hitachi High-Tech, Japan)
- Σύστημα παραγωγής υπερκιάθρου 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 Λυοφιλίωσης CHRIST ALPHA 1-4 (B. Braun Biotech International)
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευση
- 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.)

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Καθαρισμός και Συμπύκνωση Ενζυμικού Εκχυλίσματος και Πρωτεϊνών

2.2.1.1 Παραλαβή και Συμπύκνωση Υπερκείμενου Υγρού Καλλιέργειας

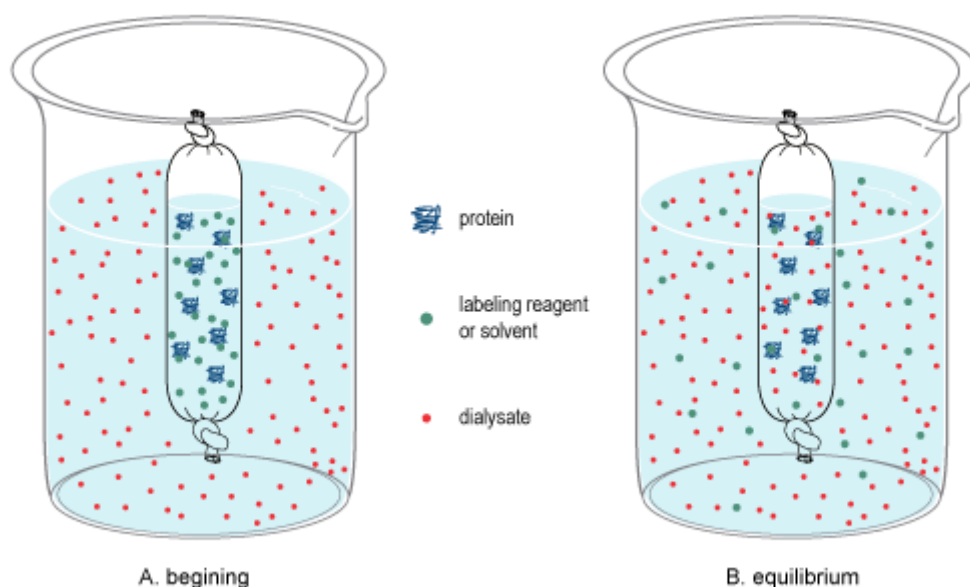
Με το πέρας της επώασης του μύκητα στο μέσο ανάπτυξης οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν για 10 min σε 10000 rpm. Οι προς μελέτη πρωτεΐνες εκκρίνονται εξωκυτταρικά, επομένως λαμβάνονται με το υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρωσης. Ωστόσο, το υπερκείμενο υγρό, εκτός των επιθυμητών ενζύμων περιέχει επίσης και το σύνολο των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών του μύκητα καθώς επίσης και συστατικών του μέσου καλλιέργειας και μεταβολιτών του μικροοργανισμού. Προκειμένου να απομακρυνθούν τα συστατικά αυτά, το εξωκυτταρικό υγρό διηθήθηκε με χάρτινο ηθμό και ακολούθησαν δύο διαδοχικές διηθήσεις υπό κενό σε φίλτρο διαμέτρου 0,8 και 0,2μm. Καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας το υπερκείμενο υγρό διατηρήθηκε σε πάγο.

Μετά τη διήθηση του υγρού καλλιέργειας ακολούθησε συμπύκνωση αυτού σε συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.) η οποία επιτρέπει την διέλευση μακρομορίων μικρότερων από 10 kDa. Το αποτέλεσμα ήταν η μείωση του αρχικού όγκου υγρού (1L) σε περίπου 20 mL. Σε όλη τη διάρκεια της συμπύκνωσης, το διάλυμα διατηρήθηκε σε πάγο. Ο καθαρισμός της μεμβράνης πραγματοποιήθηκε με διάλυμα NaOH 10% και κατόπιν 350 mL απιονισμένο H₂O. Τέλος, η μεμβράνη αποθηκεύτηκε σε υδατικό διάλυμα 20% αιθανόλης.

Μετά τη συμπύκνωση ακολούθησε η εξισορρόπηση του ενζυμικού παρασκευάσματος σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με τη μέθοδο της διαπίδυσης. Η διαπίδυση (dialysis)

αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού η οποία βασίζεται στις αρχές της ώσμωσης. Πρόκειται για μία μέθοδο διαχωρισμού με ημιπερατές μεμβράνες η οποία απομακρύνει διαλυμένες ουσίες μικρού μοριακού βάρους από ένα διάλυμα. Συγκεκριμένα οι μεμβράνες διαπίδυσης οριοθετούν δύο διαλύματα που περιέχουν συστατικά υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους. Ανάλογα με τα όρια μοριακής διαπερατότητας μιας μεμβράνης διαπίδυσης, μόνο διαλυμένες ουσίες μικρού μοριακού βάρους μετακινούνται από περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης, δια μέσω της μεμβράνης από το ένα διάλυμα στο άλλο, έως την αποκατάσταση δυναμικής ισορροπίας. Με την μέθοδο της διαπίδυσης επιτυγχάνεται η εναλλαγή ρυθμιστικών διαλυμάτων του πρωτεϊνικού παρασκευάσματος, με στόχο την εξισορρόπηση του πρωτεϊνικού διαλύματος σε ρυθμιστικό διάλυμα συμβατό με τα περαιτέρω βήματα του καθαρισμού.

Πριν τη χρήση της, η ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Da, Sigma-Aldrich) ενυδατώθηκε για 30 min σε απιονισμένο νερό θερμοκρασίας 100°C. Στη συνέχεια, το υγρό καλλιέργειας τοποθετήθηκε εντός της ενυδατωμένης μεμβράνης διαπίδυσης και η μεμβράνη ασφαλίστηκε στα άκρα. Η ασφαλισμένη μεμβράνη βυθίστηκε εντός δοχείου που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6 K_2HPO_4/KH_2PO_4 , όγκου τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερο από αυτόν του υγρού προς εξισορρόπηση (2 L). Η μεμβράνη παρέμεινε στο ρυθμιστικό διάλυμα για 24 h υπό ήπια ανάδευση και σε θερμοκρασία 4°C, οπότε και θεωρείται ότι έχει επέλθει ισορροπία. Με το πέρας της διαδικασίας ελήφθη το εξισορροπημένο διάλυμα, μοιράσθηκε σε erpendorf των 1,5 mL και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη. Το διάλυμα αποτελεί το υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα πειράματα.



Εικόνα 2.2.1.1.1. Εξισορρόπηση με διαπίδυση. (<https://chem.libretexts.org>)

2.2.1.2 Συμπύκνωση – Εξισορρόπηση – Καθαρισμός Απομονωμένων Πρωτεϊνών

Για τις πρωτεΐνες *PcLac1* και *PcLac2* λήφθηκαν δύο διαφορετικά ενζυμικά παρασκευάσματα, ένα για την κάθε λακκάση, τα οποία έρχηζαν περαιτέρω καθαρισμού. Οι διαδικασίες που περιγράφονται ακολούθως πραγματοποιήθηκαν για καθένα από τα δύο ενζυμικά διαλύματα

ξεχωριστά ενώ οι όποιες διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο περιπτώσεων επισημαίνονται επιτόπου.

Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση σε συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.) όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.1.1. Ακολούθησε η εξισορρόπηση του διαλύματος με τη μέθοδο της διαπίδυσης, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.1.1, με εξισορρόπηση σε ρυθμιστικό διάλυμα πιπεραζίνης-HCl pH 5,7, όγκου τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερο από αυτόν του υγρού προς εξισορρόπηση (2L). Η μεμβράνη παρέμεινε στο ρυθμιστικό διάλυμα για 24 h υπό ήπια ανάδευση και σε θερμοκρασία 4°C, οπότε και θεωρείται ότι έχει επέλθει ισορροπία. Με το πέρας της διαδικασίας ελήφθη το εξισορροπημένο διάλυμα σε κωνική φιάλη και αποθηκεύτηκε σε πάγο.

Στην επόμενη φάση πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του ενζυμικού διαλύματος, με χρωματογραφική στήλη ιοντοανταλλαγής DEAE –cellulose, η οποία φέρει θετικό φορτίο, με 20 mL όγκο κλίνης (στο ενδιάμεσο της ρητίνης όπου εισέρχεται το δείγμα). Με την εξισορρόπηση του πρωτεϊνικού διαλύματος το pH που επιλέχθηκε ήταν μεγαλύτερο από το pI της πρωτεΐνης (μάλιστα πρέπει να πληρείται η συνθήκη $pH \geq pI + 1$) οπότε η πρωτεΐνη φορτίστηκε αρνητικά αποκτώντας την ικανότητα να προσκολλάται στην στήλη ιοντοανταλλαγής. Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

I. Εξισορρόπηση μήτρας της στήλης:

- 1) 100 mL H₂O με ροή 5 mL/min
- 2) 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος πιπεραζίνης-HCl pH 5,7 20 mM (Ρυθμιστικό Διάλυμα Εξισορρόπησης) με ροή 5 mL/min

II. Φόρτωση δείγματος στη στήλη:

- 3) 20 mL εξισορροπημένου διαλύματος πρωτεΐνης με ροή 5 mL/min

III. Έκπλυση στήλης

- 4) Ρυθμιστικό διάλυμα πιπεραζίνης-HCl pH 5,7 20 mM (Ρυθμιστικό Διάλυμα Εξισορρόπησης) με ροή 5 mL/min. Κατά τη ροή του ρυθμιστικού συλλέγονται κλάσματα των 10 mL για τα οποία ελέγχουμε την απορρόφηση UV ακτινοβολίας στα 280 nm. Η ροή του Ρυθμιστικού Διαλύματος Εξισορρόπησης συνεχίζεται έως ότου $OD_{280nm}=0$ (ως τυφλό χρησιμοποιούμε το Ρυθμιστικό Διάλυμα Εξισορρόπησης). Κατά το βήμα αυτό απομακρύνονται πρωτεΐνες και λοιπά κατάλοιπα που δεν προσδένονται στην ρητίνη.

IV. Έκλυση προσδεμένων πρωτεϊνών

- 5) Από 0 έως 1 min διέρχεται ρυθμιστικό διάλυμα πιπεραζίνης-HCl pH 5,7 20 mM (Ρυθμιστικό Διάλυμα Εξισορρόπησης) με ροή 5 mL/min.

6) Από 1 έως 100 min διέρχεται ρυθμιστικό διάλυμα πιπεραζίνης-HCl pH 5,7 20 mM (διάλυμα A) και διάλυμα 0,5 M NaCl σε διάλυμα πιπεραζίνης-HCl pH 5,7 20 mM (διάλυμα B), με βαθμίδωση από 0% B σε 50% B και ροή 5 mL/min.

7) Από 100 έως 121 min διέρχεται διάλυμα A και διάλυμα B, με βαθμίδωση από 50% B σε 100% B και ροή 5 mL/min.

Κατά τη βαθμίδωση από 0 έως 100% B συλλέγονται τα κλάσματα ανά 10 mL και σε αυτά προσδιορίζεται ποιοτικά η ενεργότητα αυτών (Παράγραφος 2.2.3.1), προκειμένου να προσδιορισθεί σε ποια κλάσματα έχει εκλουσθεί η πρωτεΐνη.

V. Έκλυση και εξισορρόπηση της μήτρας της στήλης

8) Διέρχονται 100 mL διαλύματος NaCl 1 M σε διάλυμα πιπεραζίνης-HCl pH 5,7 20 mM με ροή 5 mL/min, με στόχο να καθαριστεί από πρωτεϊνικά κατάλοιπα

9) Διέρχονται 100 mL απιονισμένο H₂O με ροή 5 mL/min

10) Διέρχονται 100 mL διαλύματος αιθανόλης 20%. Με το πέρας της διαδικασίας η στήλη είναι έτοιμη προς αποθήκευση.

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.). Τέλος οι μετρήσεις της ενεργότητας πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG Labtech).

Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν στο στάδιο της έκλυσης των προσδεμένων πρωτεϊνών και στα οποία προσδιορίστηκε η ενεργότητα της λακκάσης συγκεντρώθηκαν σε κωνική φιάλη. Το διάλυμα της πρωτεΐνης συμπυκνώθηκε εκ νέου με συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.) έως τελικού όγκου 20 mL (Παράγραφος 2.2.1.1).

Μετά τη συμπύκνωση του ενζυμικού παρασκευάσματος ακολούθησε η εξισορρόπηση του διαλύματος με τη μέθοδο της διαπίδυσης, προκειμένου η πρωτεΐνη να αποθηκευτεί σε ουδέτερο pH. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.1.1. Η ασφαλισμένη μεμβράνη βυθίστηκε εντός δοχείου που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα Bis-Tris-HCl pH 7 20 mM, όγκου 2 L. Η μεμβράνη παρέμεινε στο ρυθμιστικό διάλυμα για 24 h υπό ήπια ανάδευση και σε θερμοκρασία 4°C. Με το πέρας της διαδικασίας ελήφθη το εξισορροπημένο διάλυμα, μοιράσθηκε σε erpendorf των 1,5 mL και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Από την παραπάνω διαδικασία λαμβάνονται τα συμπυκνώματα των καθαρών λακκασών P_cLac1 και P_cLac2 τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα.

2.2.2 Μέθοδος Lowry για Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνών

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:

I. Παρασκευή φρέσκου διαλύματος E: Η σύσταση του διαλύματος E περιγράφεται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 2.2.2.1 Αναλογίες διαλυμάτων για παρασκευή διαλύματος E

Συστατικό	Προστιθέμενος όγκος (mL)
Υδατικό διάλυμα NaOH 0,2M	9,8
Υδατικό διάλυμα 4% w/v Na ₂ CO ₃	9,8
Υδατικό διάλυμα 1% w/v CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2
Υδατικό διάλυμα 2% w/v Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	0,2

II. Μέθοδος: Σε 1,25 mL φρέσκου διαλύματος E προστίθενται 0,25 mL δείγματος. Ακολουθεί ανάδευση και έπειτα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Μετά το πέρας των 10 min προσθέτουμε 0,125 mL υδατικού διαλύματος 50% αντιδραστήριου φαινόλης Folin-Ciocalteu. Ακολουθεί ανάδευση και έπειτα το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.

III. 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. Η βέλτιστη καμπύλη της μεθόδου που προσδιορίστηκε είναι $[mg/mL \text{ πρωτεΐνης}] = 0,5893 \cdot OD_{750nm}$, $R^2 = 0,97$.

2.2.3 Χαρακτηρισμός Καθαρών Πρωτεϊνών

Τα πειράματα που περιγράφονται στην παρούσα ενότητα εφαρμόζονται για τον χαρακτηρισμό τόσο του ενζύμου Pclac1 όσο και του ενζύμου Pclac2, των καθαρών πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων που παρασκευάστηκαν.

2.2.3.1 Μέτρηση Ενζυμικής Ενεργότητας Λακκάσης

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των λακκασών 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.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την οξείδωση 1 μmole ανά 1 min αντίδρασης οξείδωσης υπό τις παραπάνω συνθήκες. Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα Κιτρικού-Φωσφορικών (pH 3 για την *PcLac1* και pH 4 για την *PcLac2*) όγκου 200 μL προστέθηκαν 25 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραίωσης και 25 μL υδατικού διαλύματος ABTS τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 2 mM. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 250 μL , η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 35°C και η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 420 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Η συνολική διάρκεια της αντίδρασης ήταν 10min. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση.

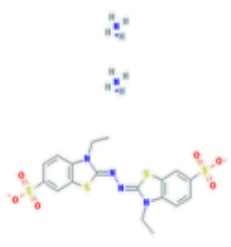
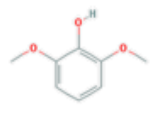
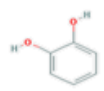
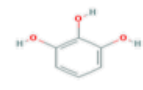
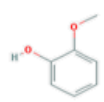
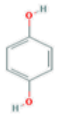
2.2.3.2 Αξιολόγηση Οξείδωσης Υποστρωμάτων (Screening)

Στόχος της διαδικασίας είναι ο ποιοτικός προσδιορισμός για κάθε ένζυμο ενός φάσματος φαινολικών υποστρωμάτων, τα οποία φαίνεται να οξειδώνουν. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε η συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices), με τη βοήθεια της οποίας ελήφθη σε κάθε μέτρηση ένα φάσμα απορροφήσεων στο εύρος 250-750 nm. Σε πρώτη φάση επιλέχθηκαν τα υποστρώματα και παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 20 mM. Σε επόμενη φάση προετοιμάστηκαν οι αντιδράσεις με τις λακκάσες, σε συνθήκες όσον το δυνατόν πλησιέστερες στις βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου, όπου σε 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος Κιτρικού-Φωσφορικών (pH 3 για την *PcLac1* και pH 4 για την *PcLac2*) προστίθενται 25 μL ενζυμικού διαλύματος και 25 μL διαλύματος υποστρώματος με τελική συγκέντρωση στον αντιδρών όγκο 2 mM. Η επώαση των αντιδράσεων έγινε στους 55°C και μετρήσεις ελήφθησαν στους χρόνους 5 min, 10 min, 28 h. 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 min πριν προστεθεί στην αντίδραση. Σημειώνεται ότι, μόνο για τα αντιβιοτικά υποστρώματα (Αμπικιλίνη, Τετρακυκλίνη, Ριφαμπικίνη), στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2 mg/mL.

2.2.3.3 Μελέτη Εξειδίκευσης ως προς το Υπόστρωμα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι λακκάσες αποτελούν ένζυμο με μικρή εκλεκτικότητα ως προς το αναγωγικό υπόστρωμα. Για την εξέταση της εξειδικευμένης δράσης των λακκασών *PcLac2* και *PcLac1* πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σε ένα εύρος υποστρωμάτων και προσδιορίστηκε η ενεργότητα αυτών καθώς δρουν σε καθένα υπόστρωμα. Τα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.3.3.1.

Πίνακας 2.2.3.3.1 Υποστρώματα για την μελέτη εξειδίκευσης της δράσης των λακκασών *PcLac2* και *PcLac1*.

Υπόστρωμα	Συντελεστής Μοριακής Απορροφητικότητας ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	Μήκος Κύματος Απορρόφησης Προϊόντος Οξείδωσης λ (nm)	Χημικός Τύπος
ABTS	36000	420	
2,6-Διμεθοξυφαινόλη	27500	469	
Κατεχόλη	928	450	
Πυρογαλλόλη	3724	420	
Γουαϊακόλη	12100	456	
Υδροκινόνη	21300	247	

Τα υποστρώματα παρασκευάστηκαν ύστερα από διάλυση της αντίστοιχης ουσίας σε απιονισμένο νερό με αρχική συγκέντρωση 20 mM. Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία $T=40^{\circ}C$, υπό ανάδευση, για κατάλληλο χρονικό διάστημα και συγκεκριμένη συγκέντρωση ενζύμου. Η συγκέντρωση του ενζύμου που προστέθηκε είχε προσδιοριστεί μέσω της μεθόδου Lowry (Παράγραφος 2.2.2.2). Για τα υποστρώματα πέραν της υδροκινόνης, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Σε 200μL ρυθμιστικού

διαλύματος Κιτρικού-Φωσφορικών (pH 3 για την P_cLac1 και pH 4 για την P_cLac2) προστίθενται 25 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 25 μL διαλύματος υποστρώματος με τελική συγκέντρωση στον αντιδρών όγκο 2 mM. Ο συνολικός όγκος αντίδρασης στις περιπτώσεις αυτές ήταν 250 μL και τελική συγκέντρωση υποστρώματος 2 mM. Μετά το πέρας της κάθε αντίδρασης φωτομετρήθηκε το προϊόν σε εκείνο το μήκος κύματος που παρουσιάζει μέγιστο το προϊόν οξείδωσης (Πίνακας 2.2.3.3.1). 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 min πριν προστεθεί στην αντίδραση.

Η διαφοροποίηση στην περίπτωση της υδροκινόνης έγκειται στο γεγονός ότι η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε erpendorf σε τελικό όγκο 1mL. Σε 875μL ρυθμιστικού διαλύματος Κιτρικού-Φωσφορικών (pH 3 για την P_cLac1 και pH 4 για την P_cLac2) προστέθηκαν 25μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 100 μL διαλύματος υποστρώματος με τελική συγκέντρωση στον αντιδρών όγκο 2 mM. Η επώαση πραγματοποιήθηκε χρήσει θερμαινόμενου ανακινούμενου επωαστήρα Eppendorf Thermomixer (1200rpm) ενώ η μέτρηση έγινε σε φωτόμετρο UV2000, Hitachi (H.Π.Α.).

Οι απορροφήσεις των αντιδράσεων οξείδωσης, σε καθορισμένο χρόνο αντίδρασης για κάθε υπόστρωμα και κάθε ένζυμο, συσχετίζονται με τη συγκέντρωση της υπό οξείδωση ουσίας του ενζύμου με τον νόμο των Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

όπου A = η απορρόφηση του δείγματος

ε = ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας εκφρασμένος σε $M^{-1} \cdot cm^{-1}$

b = η απόσταση της διαδρομής της ακτινοβολίας μέσα στο δείγμα εκφρασμένη σε cm

c = η συγκέντρωση της ουσίας εκφρασμένη σε M

Σημειώνεται ότι το μέγεθος b λαμβάνει την τιμή 0,67 cm όταν οι μετρήσεις της απορρόφησης πραγματοποιούνται στο microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices), ενώ ισούται με 1 cm στην περίπτωση των μετρήσεων στο φωτόμετρο UV2000, Hitachi (H.Π.Α.).

Στη συνέχεια η συγκέντρωση διαιρείται με τον χρόνο επώασης οπότε προκύπτουν τα units του ενζύμου ανά λίτρο αντίδρασης. Στο σημείο αυτό λαμβάνεται υπόψη η αραιώση του ενζύμου κατά την προσθήκη στον αντιδρών όγκο και έτσι προκύπτει τελικά το ζητούμενο μέγεθος Units/mL.

2.2.3.4 Ηλεκτροφορητικές Τεχνικές

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

2.2.3.4.1 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πήκτωμα Πολυακρυλαμιδίου υπό Αποδιατακτικές Συνθήκες (SDS-PAGE)

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

Το πήκτωμα προκύπτει από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου σε μακρές αλυσίδες αλλά και σε εγκάρσιες διακλαδώσεις, ο οποίος πραγματοποιείται με την προσθήκη καταλύτη (υπερθεϊικό 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 μετακινούνται με κατεύθυνση από την κάθοδο προς την άνοδο. Κατά αυτόν τον τρόπο η απόσταση που διανύει η πρωτεΐνη εντός του πήκτωματος εξαρτάται αποκλειστικά από τη μάζα της.

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

2.2.3.4.1.1 Παρασκευή Πηκτώματος

Για την ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE παρασκευάστηκε πήκτωμα που αποτελείτο από δύο τμήματα. Για τη σταθεροποίηση των δύο πήκτωμάτων χρησιμοποιήθηκε ζεύγος γυάλινων πλακών (10,1 cm × 7,3 cm και 10,1 cm × 8,3 cm) που στερεώθηκαν με τη βοήθεια μεταλλικών σφικτήρων και σταθεροποιήθηκαν σε κάθετη θέση με τη βοήθεια κατάλληλης βάσης. Το μίγμα κάθε πήκτωματος παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται στον Πίνακα 2.2.3.4.1.1.1. Αρχικά, ο χώρος ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες πληρώθηκε κατά 70% με το μίγμα του πήκτωματος διαχωρισμού και αφέθηκε περίπου 20 min για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός και να σταθεροποιηθεί. Συνεχίζοντας, ο κενός χώρος πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού πληρώθηκε με το πήκτωμα επιστοιβάσης, στο οποία τοποθετήθηκε και ειδικό χτενάκι για το σχηματισμό θηκών φόρτωσης δειγμάτων και αφέθηκε επίσης να πολυμεριστεί.

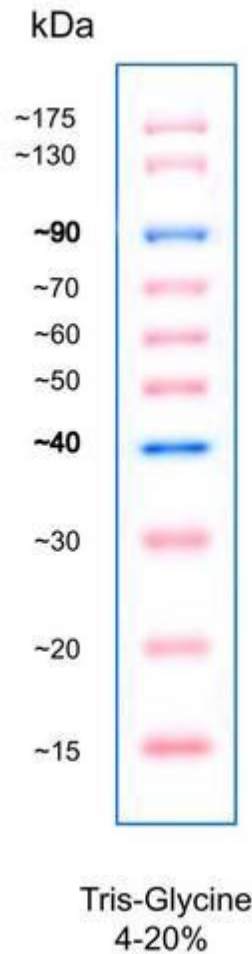
Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού και του πήκτωματος επιστοιβάσης, το σύστημα των γυάλινων πλακών τοποθετήθηκε στη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, στην οποία προστέθηκαν περίπου 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος (P-Δ SDS-PAGE Ηλεκτροφόρησης Running buffer, Πίνακας 2.1.4.1) και αφαιρέθηκαν τα χτενάκια.

Πίνακας 2.2.3.4.1.1.1 Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού και πηκτώματος επιστοίβασης για την ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE.

Πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving gel) 12,5%	
Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (mL)
ddH ₂ O	3,5
0,75 M Tris, 0,2% w/v SDS, pH 8,8	9,4
40% bis-acrylamide	5,8
TEMED	0,03
10% w/v APS	0,09
Πήκτωμα επιστοίβασης (Stacking gel) 4%	
Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (mL)
ddH ₂ O	3
0,25 M Tris, 0,2% w/v SDS, pH 6,8	3,75
40% bis-acrylamide	0,75
TEMED	0,02
10% w/v APS	0,06

2.2.3.4.1.2 Προετοιμασία Δειγμάτων – Ηλεκτροφόρηση

Τα προς ανάλυση δείγματα όγκου 15 μ L (1-5 μ g πρωτεΐνης) αναμίχθηκαν με 7 μ L διαλύματος φόρτωσης δείγματος SDS-PAGE (Sample buffer, Πίνακας 2.1.4.1) και ακολούθησε βρασμός για 5-7 min. Εκτός από τα δείγματα, στο πήκτωμα τοποθετήθηκαν και 7 μ L πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Pink Prestained Protein Marker Nippon Genetics Europe), εικόνα 2.2.3.4.1.2.1), για τον προσδιορισμό του βάρους των πρωτεϊνών των δειγμάτων. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση υπό 35 mA/πήκτωμα για περίπου 90 min.



Εικόνα 2.2.3.4.1.2.1 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης προτύπου διαλύματος πρωτεϊνών Pink Prestained Protein Marker Nippon Genetics Europe.

2.2.3.4.1.3 Εμφάνιση Πρωτεϊνικών Ζωνών στο Πήκτωμα Πολυακρυλαμιδίου

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα απομακρύνθηκε από τις γυάλινες πλάκες και εμβαπτίστηκε σε διάλυμα χρώσης (staining solution, Πίνακας 2.1.4.1) για 20 min υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αποχρωματισμός του πηκτώματος με εμβάπτιση σε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution, Πίνακας 2.1.4.1) και διαδοχικές πλύσεις με αυτό μέχρι τον αποχρωματισμό του πηκτώματος και την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών.

2.2.3.4.2 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε μη Αποδιατακτικές Συνθήκες (Native PAGE) – Προσδιορισμός Ενεργότητας των Πρωτεϊνικών Ζωνών

2.2.3.4.2.1 Προετοιμασία Δειγμάτων-Ηλεκτροφόρηση

Σε αυτή τη μέθοδο, το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιείται περιλαμβάνει (10X) 2,5 M γλυκίνη pH 8,3, 250 mM Tris, ενώ το διάλυμα του δείγματος αποτελούνταν από 50% (v/v) γλυκερόλη και 0,1% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης. Τα δείγματα φορτώθηκαν στο πήκτωμα χωρίς να έχουν υποστεί βρασμό. Το μίγμα του πηκτώματος είχε την παρακάτω σύσταση: 14,3 mL dH₂O, 2 mL 10X ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης, 3,75 mL 40% bis- acrylamide, 20 μL TEMED και 100 μL 10% (w/v) APS, ενώ παρασκευάστηκε ενιαίο, χωρίς διαχωρισμό μεταξύ πηκτώματος επιστοίβασης και πηκτώματος διαχωρισμού. Για τον

διαχωρισμό των πρωτεϊνών εφαρμόστηκε ηλεκτρικό ρεύμα έντασης 25 mA/ πήκτωμα για 1 ώρα.

2.2.3.4.2.2 Εμφάνιση Πρωτεϊνικών ζωνών

Η τεχνική του ζυμογραφήματος βασίζεται στην ανίχνευση των πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί σε ένα πήκτωμα με βάση την ενεργότητά τους σε κάποιο υπόστρωμα. Για την ανίχνευση κατάλληλων ενεργοτήτων χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα υποστρώματα, ενώ οι υπό μελέτη πρωτεΐνες είχαν προηγουμένως ηλεκτροφορηθεί σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (native PAGE). Κατά τη διαδικασία ανίχνευσης της ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης, οι πρωτεΐνες στερεώθηκαν στο πήκτωμα, με εμβάπτιση σε 50 ml οξικού οξέος 10% και μεθανόλης 40% για 10 min. Έπειτα, προστέθηκαν περίπου 20 ml ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4 και 2,5 ml υπόστρωμα ABTS συγκέντρωσης 20 mM. Το πήκτωμα αφέθηκε για επώαση μέχρι την εμφάνιση των ζωνών.

2.2.3.4.3 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 ισορροπία 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 πήκτωμα με διαβαθμιζόμενη τιμή pH (πήκτωμα βαθμίδωσης pH). Η βαθμίδωση του pH στο πήκτωμα επιτυγχάνεται με την προσθήκη μίγματος ηλεκτρολυτών (αμφολύτες) στο διάλυμα πολυμερισμού. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η πρωτεΐνη μετακινείται μέχρι να φτάσει σε μια θέση στο πήκτωμα, 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.

2.2.3.4.3.1 Η Μέθοδος

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε συσκευή ηλεκτροφόρησης Phastsystem της εταιρίας Pharmacia (Σουηδία). Τα πήκτωμα 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 φορτώθηκαν στο πήκτωμα χωρίς προεπεξεργασία.

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

2.2.3.4.3.2 Εμφάνιση Πρωτεϊνικών ζωνών στο Πήκτωμα Ηλεκτροφόρησης

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών στο πήκτωμα, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα

μεταφέρθηκε προσεκτικά σε διάλυμα χρώσης (Staining Solution) Coomassie Brilliant Blue G-250 και αφέθηκε υπό ήπια ανάδευση για 20min. Στη συνέχεια, το πήκτωμα εμβαπτίσθηκε σε διάλυμα αποχρωματισμού με το οποίο έγιναν διαδοχικές πλύσεις μέχρι να αποχρωματιστεί πλήρως και να γίνουν ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες. Η σύσταση διαλυμάτων χρώσης και αποχρωματισμού αναφέρεται στον Πίνακα 2.1.5.2.

2.2.3.5 Εύρεση Βέλτιστων Συνθηκών Δράσης Απομονωμένων Λακκασών

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης των απομονωμένων λακκασών χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις υδατικό διάλυμα του συνθετικού υποστρώματος ABTS με τελική συγκέντρωση 2 mM στον όγκο της αντίδρασης. Οι απορροφήσεις της μέτρησης ενεργότητας των λακκασών μετατρέπονται σε ενεργότητα του ενζύμου σε Units/mL (Παράγραφος 2.2.3.3). Έπειτα για κάθε ένζυμο εντοπίζεται η μέγιστη ενεργότητα μεταξύ των συνθηκών και προσδιορίζεται η υπολειπόμενη ενεργότητα ως ο επί τοις εκατό λόγος της ενεργότητας στη συγκεκριμένη συνθήκη προς τη μέγιστη ενεργότητα που παρατηρείται.

2.2.3.5.1 Εύρεση Βέλτιστης Τιμής pH Δράσης

Η τιμή pH στην οποία το ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη δράση μελετήθηκε για το ρυθμιστικό σύστημα που αποτελείτο από τα ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικού-φωσφορικών, φωσφορικών, Tris-HCl (0,1M), (Πίνακας 2.1.4.1). Το εύρος τιμών pH που διερευνήθηκε ήταν μεταξύ των τιμών 2-9.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην Παράγραφο μέτρησης ενζυμικής ενεργότητας 2.2.3.1. Η αραίωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίστηκε βάσει μετρήσεων ενζυμικής ενεργότητας (μέθοδος Lowry, Παράγραφος 2.2.2). 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 35°C για 10 min. 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 min πριν προστεθεί στην αντίδραση.

2.2.3.5.2 Εύρεση Βέλτιστης Θερμοκρασίας Δράσης

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των δύο λακκασών διερευνήθηκε υπολογίζοντας την ενεργότητά της για θερμοκρασιακές τιμές 20-30-40-50-60-70°C. Κατά την προετοιμασία της αντίδρασης προστέθηκαν σε 800μL ρυθμιστικού διαλύματος Κιτρικού-Φωσφορικών (pH 3 για το ένζυμο Pclac1, pH 4 για το ένζυμο Pclac2) 100 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραίωσης και 100 μL υποστρώματος, ώστε τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 1 mL. Η αραίωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίστηκε βάσει μετρήσεων ενζυμικής ενεργότητας (μέθοδος Lowry, Παράγραφος 2.2.2). Οι αντιδράσεις επώαστηκαν υπό ανάδευση(1200 rpm) εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στις μελετώμενες θερμοκρασίες ταυτόχρονα για 10 min. 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 min πριν προστεθεί στην αντίδραση.

2.2.3.6 Μελέτη Σταθερότητας Λακκασών

Για την μελέτη της σταθερότητας των απομονωμένων λακκασών σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH, τα ένζυμα επώαστηκαν σε καθορισμένες συνθήκες για 24 h και ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνταν μέτρηση της ενεργότητάς τους. Οι μετρήσεις ενεργότητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν όπως ορίζει η μέθοδος της Παραγράφου 2.2.3.1.

2.2.3.6.1 Μελέτη Σταθερότητας σε Τιμές pH

Για τη μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου σε διαφορετικές τιμές pH πραγματοποιήθηκε επώαση του ενζύμου σε τιμές pH 2,3,4,5,6,7,8,9 χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό σύστημα που αποτελείται από τα ρυθμιστικά διαλύματα Κιτρικού-Φωσφορικών, φωσφορικών, Tris-HCl (0,1 M) (Πίνακας 2.1.4.1). Για κάθε τιμή pH το ένζυμο αραιώθηκε σε σωληνάκι τύπου erpendorf με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος σε τελικό όγκο 1 mL. Η επώαση των δειγμάτων των ρυθμιστικών διαλυμάτων με τα ένζυμα πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4°C. Στους χρόνους επώασης 0-0,5-1-2-4-8-24 h ελήφθη δείγμα από κάθε τιμή pH και μετρήθηκε άμεσα η ενζυμική ενεργότητα.

2.2.3.6.2 Μελέτη Θερμοκρασιακής Σταθερότητας

Για τη μελέτη της θερμοκρασιακής σταθερότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε επώαση του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30-40-50-60-70°C. Για κάθε τιμή θερμοκρασίας το ένζυμο αραιώθηκε σε σωληνάκι τύπου erpendorf με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος Φωσφορικών $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7 σε τελικό όγκο 1 mL. Η επώαση πραγματοποιήθηκε εντός θερμαινόμενων επωαστήρων και υδατόλουτρων. Στους χρόνους επώασης 0-0,5-1-2-4-8-24 h ελήφθη δείγμα από κάθε θερμοκρασία και μετρήθηκε άμεσα η ενζυμική ενεργότητα.

2.2.3.7 Προσδιορισμός Κινητικών Σταθερών Michaelis-Menten των Λακκασών

Για την εφαρμογή του κινητικού μοντέλου Michaelis-Menten θεωρούμε ότι έχουμε απλή αναντίστροφη δράση ενός ενζύμου E με ένα υπόστρωμα S προς σχηματισμό ενός προϊόντος P:



Το ES αποτελεί το ενδιάμεσο σύμπλοκο που σχηματίζεται με την πρόσφυση του S στην αντίστοιχη ενεργό περιοχή του E. Γίνεται η παραδοχή ότι η διάσπαση του ES οδηγεί στον σχηματισμό του προϊόντος δίχως τη δυνατότητα επανασχηματισμού του ES, το οποίο εξασφαλίζεται για πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις του προϊόντος από το υπόστρωμα. Δηλαδή η μελέτη της ταχύτητας της ενζυμικής δράσης είναι εφικτή κατά το αρχικό στάδιο της δράσης. Άλλες σημαντικές παραδοχές που ισχύουν είναι ότι υπάρχει μόνο ένα υπόστρωμα ενώ το ένζυμο είναι απαλλαγμένο από κάθε άλλη μορφή δραστηριότητας. Παράλληλα δεχόμαστε ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου ES δεν αλλοιώνει σημαντικά την συγκέντρωση του υποστρώματος S, οπότε αναφερόμαστε σε μεγάλη περίσσεια υποστρώματος σε σχέση με το ένζυμο. Τέλος θεωρούμε ότι το σύμπλοκο ES βρίσκεται σε συνθήκες μόνιμης κατάστασης, με την ταχύτητα σχηματισμού του να είναι ίση με την ταχύτητα εξαφάνισής του.

Η εξίσωση Michaelis – Menten ορίζεται ως ακολούθως :

$$u = \frac{u_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

όπου u : η ταχύτητα της δράσης

u_{max} : η μέγιστη ταχύτητα δράσης όταν ολόκληρη η ποσότητα του ενζύμου βρίσκεται στην μορφή [ES]

[S]: η συγκέντρωση του υποστρώματος

K_M : η σταθερά Michaelis – Menten .

Η σταθερά Michaelis – Menten ορίζεται από τη σχέση:

$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

όπου k_1 : η σταθερά ταχύτητας σχηματισμού του συμπλόκου ES

k_2 : ή k_{cat} η σταθερά ταχύτητας διάσπασης του συμπλόκου ES προς το προϊόν P

k_{-1} : η σταθερά ταχύτητας διάσπασης του συμπλόκου ES προς E και S.

Αντίστοιχα η μέγιστη ταχύτητα δράσης εκφράζεται από τη σχέση:

$$u_{max} = k_2 \cdot [E_T]$$

όπου $[E_T]$: η αρχική συγκέντρωση του ενζύμου.

Το διάγραμμα Michaelis – Menten αποτελεί τη γραφική αναπαράσταση της ταχύτητας της ενζυμικής δράσης ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Πρόκειται για παραβολική σχέση δι-παραμετρικού τύπου (Shuler & Kargi, 2005).

Οι κινητικές σταθερές των ενζύμων προσδιορίστηκαν για δύο διαφορετικά υποστρώματα, το συνθετικό υπόστρωμα ABTS και την ένωση 2,6-DMP. Η κινητική της λακκάσης *PcLac1* εξετάστηκε στο εύρος συγκεντρώσεων 1-5000 μM για το ABTS και 5-5000 μM για την 2,6-DMP ενώ για τη λακκάση *PcLac2* οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις ήταν 10-5000 και 100-5000 μM .

Κατά την προετοιμασία της κάθε αντίδρασης προστέθηκαν σε 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος Κιτρικού-Φωσφορικών (pH 3 για το ένζυμο *PcLac1*, pH 4 για το ένζυμο *PcLac2*) 25 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραίωσης και 25 μL υποστρώματος, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι τα 250 μL . Η αραίωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίστηκε βάσει μετρήσεων ενζυμικής ενεργότητας (μέθοδος Lowry, Παράγραφος 2.2.2.2). Ο προσδιορισμός της μεταβολής της απορρόφησης λόγω σχηματισμού έγχρωμων προϊόντων έγινε με το πολυφωτόμετρο microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) στα 420nm για το ABTS και στα 469nm για την 2,6-DMP. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 35°C για 10 min. 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 min πριν προστεθεί στην αντίδραση.

Οι μέσες τιμές ενεργότητας εν συνεχεία προσαρμόζονται στο μοντέλο Michaelis-Menten με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, με τη βοήθεια του λογισμικού GraphPad Prism 5. Από την

προσαρμογή στο πρόγραμμα προσδιορίζονται οι τιμές των κινητικών παραμέτρων Michaelis – Menten, K_m , V_{max} και k_{cat} .

2.2.3.8 Επίδραση Παρεμποδιστικών Παραγόντων στην Ενεργότητα των Λακκασών

Για την μελέτη της δράσης των απομονωμένων λακκασών παρουσία παρεμποδιστικών παραγόντων, παρασκευάσθηκαν διαλύματα ρυθμιστικού διαλύματος Κιτρικού-Φωσφωρικών (pH 3 για το ένζυμο *PcLac1*, pH 4 για το ένζυμο *PcLac2*) με κάθε παρεμποδιστικό παράγοντα. Οι μετρήσεις ενεργότητας των δειγμάτων πραγματοποιούνται όπως ορίζει η μέθοδος της Παραγράφου 2.2.3.1 με τη διαφορά ότι αντί για 200μL ρυθμιστικού διαλύματος προστίθενται κάθε φορά 200μL μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος με τον παρεμποδιστικό παράγοντα.

2.2.3.8.1 Επίδραση Οργανικών Διαλυτών στην Ενεργότητα των Λακκασών

Μελετήθηκε η παρεμποδιστική δράση τεσσάρων οργανικών διαλυτών πάνω στην ενεργότητα των ενζύμων, της μεθανόλης, της αιθανόλης, της ακετόνης και της 1,4-διοξάνης σε περιεκτικότητες 10 και 50% και του DMSO σε περιεκτικότητα 10%. Για κάθε διαφορετικό διαλύτη υπήρχε και το αντίστοιχο τυφλό διάλυμα, του οποίου η απορρόφηση λαμβάνεται ως μηδενική, και παρασκευάσθηκε όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.3.1. Τέλος, σε κάθε σετ 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, μαζί με το αντίστοιχο τυφλό διάλυμα αυτής.

2.2.3.8.2 Προσδιορισμός Ενεργότητας Λακκασών Παρουσία Παρεμποδιστών

Στο παρόν πείραμα μελετήθηκε η παρεμποδιστική δράση έξι παρεμποδιστών στην ενεργότητα των ενζύμων. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν τα NaCl (10 και 100 mM), NaN₃ (0,01 και 0,1 mM), EDTA (1 και 10 mM), SDS (0,1 και 1 mM), Cu (0,25 και 2,5 mM) και H₂O₂ (1 και 5 mM).

Για κάθε διαφορετικό παρεμποδιστή μετρήθηκε και το αντίστοιχο τυφλό διάλυμα, του οποίου η απορρόφηση λαμβάνεται ως μηδενική, και παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.3.1. Τέλος, σε κάθε σειρά αντιδράσεων εκτός από τις αντιδράσεις στις οποίες έχει προστεθεί παρεμποδιστής υπάρχει και η αντίστοιχη «αντίδραση ελέγχου», δηλαδή η αντίδραση στην οποία το ένζυμο δρα χωρίς να δέχεται παρεμπόδιση, μαζί με το αντίστοιχο τυφλό διάλυμα αυτής.

2.2.3.9 Προσδιορισμός Φάσματος UV/Vis Καθαρών Ενζύμων

Στο παρόν πείραμα ελήφθη το φάσμα UV/Vis ακτινοβολίας του ενζυμικού διαλύματος του ενζύμου προκειμένου να εξεταστούν οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις αυτού. Για την διεξαγωγή του πειράματος κάθε ενζυμικό παρασκεύασμα συμπυκνώθηκε με φυγοκέντρηση, χρήσει καταλλήλων φίλτρων σε σωληνάκια τύπου Eppendorf (Amicon Ultra-0.5 centrifugal filters, Merck, Germany), με τη βοήθεια μικροφυγοκέντρου πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία). Το φάσμα ελήφθη στο εύρος 200-750 nm, με χρήση του φασματοφωτόμετρου HitachiU-2900 spectrophotometer (Hitachi High-Tech, Japan).

2.2.3.10 Προσδιορισμός Φαινόμενου Πρότυπου Οξειδοαναγωγικού Δυναμικού E_0 Λακκασών

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία αξιοποιείται η μέθοδος της κυκλικής βολταμετρίας εναλλασσόμενου ρεύματος διαταραχής μεγάλου πλάτους με μετασχηματισμό Fourier (large amplitude Fourier transform alternating current cyclic voltammetry, FTacV) για τον προσδιορισμό του φαινόμενου πρότυπου οξειδοαναγωγικού δυναμικού των λακκασών. Στη συγκεκριμένη μέθοδο, εναλλασσόμενο ρεύμα μεγάλου πλάτους υπερτίθεται σε ράμπα γραμμικού δυναμικού, δίνοντας ενισχυμένη απόκριση στην οποία να μπορεί να γίνει επεξεργασία με μετασχηματισμό Fourier, αποκαλύπτοντας ηλεκτροχημικά και κινητικά χαρακτηριστικά των υπό εξέταση ηλεκτροενεργών ειδών. Το πείραμα και η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε από τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτριο Ζουράρη, υπό την εποπτεία του καθηγητή Αντώνιου Καραντώνη, στο Εργαστήριο Φυσικοχημείας και Εφαρμοσμένης Ηλεκτροχημείας του τομέα Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών της σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ.

Τα βολταμετρικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ένα ηλεκτροχημικό κελί τριών ηλεκτροδίων το οποίο αποτελείται από ένα ηλεκτρόδιο δίσκου υαλώδους άνθρακα (carbon electrode GC) επιφάνειας $0,785 \text{ mm}^2$ ως ηλεκτρόδιο εργασίας, μία ράβδο πλατίνας με επικάλυψη τιτανίου διαμέτρου $1,6 \text{ mm}$ με επικάλυψη τιτανίου ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο, και ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl, KCl κορ. (+0.197 V vs NHE). Το υδατικό διάλυμα όγκου περίπου 3 mL αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού άλατος 100 mM (pH 4) (PENTA) το οποίο λειτούργησε ως φέρων ηλεκτρολύτης.

Οι βολταμετρικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ποτενσιοστάτη PAR 263A Potentiostat συνδεδεμένο σε προγραμματιζόμενη γεννήτρια AFG 5101 Tektronix. Όλα τα διαλύματα απαερώθηκαν για τουλάχιστον 10 min πριν την διεξαγωγή του πειράματος προς αποφυγή αναγωγής οξυγόνου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου ή την δημιουργία καταλυτικών ρευμάτων λόγω αντιδράσεων με το οξυγόνο. Κατά την διεξαγωγή των μετρήσεων είχε εξασφαλιστεί η κυκλοφορία αέριου αζώτου πάνω από την επιφάνεια του διαλύματος στο ηλεκτροχημικό κελί. Η θερμοκρασία του κελιού διατηρείται σταθερή μέσω λουτρού σταθερής θερμοκρασίας (FALC WB-MD5), ενώ καταγράφεται κατά τη διάρκεια του πειράματος προς επιβεβαίωση της σταθερότητας αυτής. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από τα πειράματα FTacV, πραγματοποιήθηκε μέσω προγράμματος που έχει αναπτυχθεί στο Εργαστήριο φυσικοχημείας και εφαρμοσμένης ηλεκτροχημείας του τομέα Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών της σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ.

Το ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (glassy carbon electrode) επιδέχθηκε κατεργασία στίλβωσης με βελούδο χρήσει $0,3 \mu\text{m}$ και $0,05 \mu\text{m}$ Al_2O_3 . Το ηλεκτρόδιο κατόπιν πλύθηκε με απιονισμένο νερό και ακολούθως υποβλήθηκε σε υπερήχους σε απεσταγμένο νερό για 5 min . Στη συνέχεια το ηλεκτρόδιο πλύθηκε ξανά με απιονισμένο νερό. Όγκος $1 \mu\text{L}$ ενζυμικού διαλύματος αφέθηκε στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας προς ξήρανση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε άλλη μία φορά προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Στη συνέχεια $1 \mu\text{L}$ Nafion αφέθηκε να στεγνώσει απάνω στην επικαθήμενη ποσότητα του ενζύμου στο ηλεκτρόδιο έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η ακινητοποίηση (Zouraris D. et al., 2018).

Τα πειράματα FTacV πραγματοποιήθηκαν με υπέρθεση μιας μεγάλου πλάτους ημιτονοειδούς διαταραχής σταθερής συχνότητας f σε δυναμικό που εφαρμόζεται γραμμικά. Τα προκύπτοντα βολταμογραφήματα επεξεργάστηκαν με μετασχηματισμούς Fourier και κάθε αρμονική συνιστώσα ελήφθη με αντίστροφο μετασχηματισμό Fourier στην αντίστοιχη αρμονική συχνότητα kf . Για στοιχειώδεις αντιστρεπτές αντιδράσεις κάθε αρμονική συνιστώσα αποτελείται από κορυφές k . Στην περίπτωση των μονών αρμονικών ($k=1, 3, 5$, κλπ), το φαινόμενο πρότυπο δυναμικό αντιστοιχεί στην τιμή εκείνη του δυναμικού όπου παρατηρείται η μέγιστη από της κορυφές μεγαλύτερης έντασης. Για την περίπτωση των ζυγών αρμονικών ($k=2, 4, 6$, κλπ), το φαινόμενο πρότυπο δυναμικό οξειδοαναγωγής αντιστοιχεί στην τιμή εκείνη του δυναμικού όπου παρατηρείται το ελάχιστο μεταξύ των κορυφών με την μεγαλύτερη ένταση.

Όλα τα φαινόμενα πρότυπα δυναμικά προσδιορίστηκαν σε κάθε θερμοκρασία λαμβάνοντας υπόψη τον θερμοκρασιακό συντελεστή $-1.01 \text{ mV}/^\circ\text{C}$ του ηλεκτροδίου αναφοράς Ag/AgCl, KCl κορ. (Sawyer D.T. et al., 1995).

2.2.4 Ακίνητοποίηση Ενζυμικού Συμπυκνώματος

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκε ως μέθοδος ακίνητοποίησης ο σχηματισμός συσσωματωμάτων λακκασών με σταυροδεσμούς (cross-linked laccase aggregates – CLEAs), με τη βοήθεια γλουταραλδεΐδης ως παράγοντα σχηματισμού των σταυροδεσμών.

Για την ακίνητοποίηση χρησιμοποιήθηκε το ενζυμικό συμπύκνωμα όπως απομονώθηκε, καθαρίστηκε και συμπυκνώθηκε, βάσει της παραγράφου 2.2.1.1.

Τα πειράματα ακίνητοποίησης των ενζύμων πραγματοποιήθηκαν σε τρεις φάσεις. Σε πρώτη φάση μελετήθηκε το πρωτόκολλο παραγωγής CLEAs και προσδιορίστηκαν οι συνθήκες για την επιτυχή εφαρμογή του. Σε επόμενη φάση επιχειρήθηκε η βελτιστοποίηση της διαδικασίας ως προς τρεις παράγοντες, τους παράγοντες κατακρήμνισης (precipitants), τη συγκέντρωση της γλουταραλδεΐδης και το ενζυμικό φορτίο. Τέλος προσδιορίστηκαν οι τροποποιήσεις που χρειάστηκε να γίνουν στο πρωτόκολλο προκειμένου να προσαρμοστεί η διαδικασία για παραγωγή CLEAs σε μεγαλύτερη κλίμακα. Με τις τροποποιήσεις αυτές στόχος ήταν η παραγωγή CLEAs δεκαπλάσιου όγκου.

2.2.4.1 Πρωτόκολλο Διαδικασίας Ακίνητοποίησης με Σχηματισμό CLEAs

Ακολουθως παρατίθενται τα βήματα τις διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παραγωγή CLEAs.

1. Σε δοκιμαστικό σωληνάκι τύπου erpendorf των 1,5mL προστίθενται 90 μL από τον παράγοντα κατακρήμνισης και 10 μL από το ενζυμικό παρασκεύασμα. Το μίγμα αναμιγνύεται και επώάζεται για 15min στους 25°C , σε θερμαινόμενο ανακινούμενο επωαστήριο Eppendorf Thermomixer Comfort (1200rpm).
2. Με το πέρας των 15 min προστίθενται 5 μL γλουταραλδεΐδης κατάλληλης συγκέντρωσης. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 3 h στους 25°C , σε θερμαινόμενο ανακινούμενο επωαστήριο Eppendorf Thermomixer Comfort (1200rpm).

3. Με το πέρας των 3 h προστίθενται στο σωληνάκι 900 μL ρυθμιστικού διαλύματος Φωσφορικών $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ pH 6, με στόχο την επαναιώρηση των συσσωματωμάτων και των καθαρισμό των CLEAs από τυχόν ενώσεις που δεν έχουν προσδεθεί. Ακολουθεί εκ νέου ανάδευση του διαλύματος.

4. Το μίγμα στην συνέχεια φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία) και διαχωρίζεται το υπερκείμενο υγρό από το προκύπτον ίζημα (CLEAs).

5. Για την αξιοποίηση των CLEAs, το ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος Φωσφορικών $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ pH 6.

2.2.4.1.1 Προσδιορισμός Ενεργότητας σε Ίζημα και Υπερκείμενο Υγρό

Προκειμένου να εξακριβωθεί η επιτυχία εφαρμογής του πρωτοκόλλου εξετάστηκε η ενεργότητα του ενζύμου στα σχηματιζόμενα CLEAs (ίζημα) και στο αντίστοιχο υπερκείμενο υγρό.

Κατά τη μέτρηση της ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα Κιτρικού-Φωσφορικών pH 4 όγκου 200 μL προστέθηκαν 25 μL ενζυμικού εναιωρήματος CLEAs (πρόκειται για το διάλυμα που παράχθηκε στο βήμα 5 της μεθοδολογίας) κατάλληλης αραιώσης και 25 μL υδατικού διαλύματος ABTS τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 2 mM. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 250 μL , η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 35 $^\circ\text{C}$ και ο προσδιορισμός της μεταβολής της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 420nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Η συνολική διάρκεια της αντίδρασης ήταν 10 min. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά τα CLEAs είχαν απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθούν στην αντίδραση.

Παράλληλα μετρήθηκε και η ενεργότητα σε δύο επιπλέον δείγματα αναφοράς. Το μεν πρώτο ήταν το αρχικό ενζυμικό παρασκεύασμα, χωρίς την επέμβαση από παράγοντα κατακρήμνισης και γλουταραλδεΐδη, το οποίο μετρήθηκε σε κατάλληλη αραιώση. Το δε δεύτερο παρασκευάστηκε όπως ορίζει το πρωτόκολλο ακινητοποίησης με τη διαφορά ότι στο βήμα 2 αντί για προσθήκη 5 μL γλουταραλδεΐδης προστέθηκαν 5 μL ρυθμιστικού διαλύματος Κιτρικού-Φωσφορικών pH 4. Στόχος των μετρήσεων αυτών είναι να προσδιορισθεί το ποσοστό της ενεργότητας που διατηρούν τα ένζυμα μετά την ακινητοποίηση, συγκριτικά με το αρχικό πρωτεϊνικό συμπύκνωμα. Επιπλέον μελετάται το κλάσμα των ενζύμων που έχει περάσει στην στερεή φάση των συσσωματωμάτων και εκείνο των ενζύμων που έχουν διαφύγει στο υπερκείμενο υγρό. Οι δύο αυτές παράμετροι καθορίζουν την επιτυχία της ακινητοποίησης.

2.2.4.2 Βελτιστοποίηση Συνθηκών Ακινητοποίησης Ενζύμων σε CLEAs

Όπως είναι κατανοητό στην διαδικασία σχηματισμού των CLEAs εμπλέκονται πλήθος παραγόντων, καθένας από τους οποίους συμβάλει σε κάποιο βαθμό στην επιτυχία του εγχειρήματος. Στην προκειμένη περίπτωση επιλέχθηκαν τρεις παράγοντες βελτιστοποίησης της διαδικασίας, δοκιμάστηκε το πρωτόκολλο για καθένα από τους παράγοντες αυτούς και τέλος μετρήθηκε η ενζυμική ενεργότητα των σχηματιζόμενων CLEAs όπως περιγράφεται στην

Παράγραφο 2.2.4.1.1. Στόχος ήταν να εντοπισθούν οι συνθήκες εκείνες στις οποίες τα ακινητοποιημένα ένζυμα παρουσιάζουν τη μέγιστη δυνατή ενεργότητα ενώ στο υπερκείμενο υγρό παρατηρείται η ελάχιστη δυνατή απώλεια ενζύμου.

2.2.4.2.1 Βελτιστοποίηση ως προς το Ενζυμικό Φορτίο

Σε πρώτη φάση εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του ενζυμικού παρασκευάσματος που χρησιμοποιείται για ακινητοποίηση στην ενζυμική ενεργότητα των CLEAs. Οι τιμές ενζυμικής συγκέντρωσης που εξετάστηκαν ήταν 15,8 g/mL, 7,9 g/mL και 3,16 g/mL πρωτεΐνης ενώ κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν θειικό αμμώνιο ως παράγοντας κατακρήμνισης και γλουταραλεϋδη 100 mM.

2.2.4.2.2 Βελτιστοποίηση ως προς το Μέσο Κατακρήμνισης

Κατά την μελέτη του συγκεκριμένου παράγοντα εξετάστηκαν 5 μέσα κατακρήμνισης. Καθένα από αυτά έχει διαφορετική επίδραση πάνω στο ένζυμο και με διαφορετική ένταση οπότε και εξετάζεται η αποτελεσματικότητα της κατακρήμνισης καθώς και η ενδεχόμενη απενεργοποίηση του ενζύμου. Οι υπό εξέταση παράγοντες κατακρήμνισης είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, η πολυαιθυλενο-γλυκόλη (Polyethylene glycol – PEG) και το θειικό αμμώνιο. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν ενζυμικό διάλυμα συγκέντρωσης 15,8 g/mL πρωτεΐνης και γλουταραλεϋδη 100 mM.

Οι παράγοντες μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν από εμπορικά αντιδραστήρια. Για την παρασκευή κορεσμένων διαλυμάτων PEG και θειικού αμμωνίου, κάθε ουσία διαλύθηκε σε απιονισμένο νερό, υπό ανάδευση και θέρμανση, σε ποσότητα που ορίζεται από τα όρια διαλυτότητάς της.

2.2.4.2.3 Βελτιστοποίηση ως προς τη Συγκέντρωση Γλουταραλδεϋδης

Η σημασία της μελέτης του παράγοντα αυτού έγκειται στο ότι ο σχηματισμός των σταυροδεσμών μεταξύ των ενζύμων χρειάζεται να είναι επαρκής ώστε να συγκρατεί όσο το δυνατόν περισσότερο ενζυμικό φορτίο, ωστόσο μεγάλες συγκεντρώσεις γλουταραλδεϋδης είναι δυνατόν να παρεμποδίσουν την ενζυμική δράση. Οι εξεταζόμενες συγκεντρώσεις γλουταραλδεϋδης ήταν 10, 50, 100 και 200 mM ενώ κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν ενζυμικό διάλυμα συγκέντρωσης 15,8 g/mL πρωτεΐνης και θειικό αμμώνιο ως παράγοντας κατακρήμνισης.

2.2.4.3 Προσαρμογή Διαδικασίας Ακινητοποίησης για Παραγωγή Μεγάλης Κλίμακας (Scale-up)

Ακολουθως παρατίθεται το πρωτόκολλο όπως τροποποιήθηκε για την παραγωγή CLEAs σε μεγαλύτερη κλίμακα, 10 φορές μεγαλύτερου όγκου.

1. Σε δοκιμαστικό σωλήνα falcon των 15 mL προστίθενται 900 μ L από τον παράγοντα κατακρήμνισης και 100 μ L από το ενζυμικό παρασκεύασμα. Το μίγμα αναμιγνύεται και επωάζεται για 15 min στους 25°C, με περιστρεφόμενο επωαστήριο (200 rpm).
2. Με το πέρας των 15 min προστίθενται 50 μ L γλουταραλδεϋδης κατάλληλης συγκέντρωσης. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 3 h στους 25°C, με περιστρεφόμενο επωαστήριο (200 rpm).

3. Με το πέρασ των 3 h προστίθενται στο σωληνάκι 9 mL ρυθμιστικού διαλύματος Φωσφορικών $K_2HPO_4-KH_2PO_4$ pH 6, με στόχο την επαναιώρηση των συσσωματωμάτων και των καθαρισμό των CLEAs από τυχόν ενώσεις που δεν έχουν προσδεθεί. Ακολουθεί εκ νέου ανάδευση του διαλύματος.

4. Το μίγμα στην συνέχεια φυγοκεντρείται και διαχωρίζεται το υπερκείμενο υγρό από το προκύπτον ίζημα (CLEAs).

5. Για την αξιοποίηση των CLEAs, το ίζημα χρησιμοποιείται σε εναιώρημα σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος Φωσφορικών $K_2HPO_4-KH_2PO_4$ pH 6.

2.2.5 Χαρακτηρισμός Συμπυκνώματος Εξωκυτταρικού Ενζυμικού Παρασκευάσματος Καλλιέργειας και Ακίνητοποιημένου Ενζυμικού Παρασκευάσματος

Τα πειράματα που περιγράφονται στην παρούσα ενότητα εφαρμόστηκαν για τον χαρακτηρισμό τόσο του εξωκυτταρικού ενζυμικού παρασκευάσματος που παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.1.1, όσο και του ακίνητοποιημένου ενζύμου στα CLEAs.

2.2.5.1 Μέτρηση Ενζυμικής Ενεργότητας

Η μέθοδος για την μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας είναι ίδια με την μέθοδο που περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.3.1. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Κιτρικού-Φωσφορικών (Πίνακας 2.1.4.1), pH 3 για το διάλυμα ακίνητοποιημένων ενζύμων και pH 4 για το ενζυμικό συμπύκνωμα.

2.2.5.2 Εύρεση Βέλτιστων Συνθηκών Δράσης Λακκασών

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης των διαλυμάτων του ελεύθερου και του ακίνητοποιημένου ενζύμου χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις υδατικό διάλυμα του συνθετικού υποστρώματος ABTS με τελική συγκέντρωση 2 mM στον όγκο της αντίδρασης.

2.2.5.2.1 Εύρεση Βέλτιστης Τιμής pH Δράσης

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της βέλτιστης τιμής pH δράσης τόσο στην περίπτωση των ελεύθερων όσο και των ακίνητοποιημένων λακκασών είναι ίδια με αυτή που περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.3.5.1. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 40 °C, τόσο για το ελεύθερο όσο και για το ακίνητοποιημένο ενζυμικό παρασκεύασμα.

2.2.5.2.2 Εύρεση Βέλτιστης Θερμοκρασίας Δράσης

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης τόσο στην περίπτωση των ελεύθερων λακκασών όσο και των ακίνητοποιημένων ενζύμων είναι ίδια με αυτή που περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.3.5.2. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Κιτρικού-Φωσφορικών (Πίνακας 2.1.4.1), pH 3 για το διάλυμα ακίνητοποιημένων ενζύμων και pH 4 για το ενζυμικό συμπύκνωμα.

2.2.5.3 Μελέτη Σταθερότητας

Για την μελέτη της σταθερότητας τόσο στην περίπτωση των ελεύθερων λακκασών όσο και των ακίνητοποιημένων ενζύμων, τα ένζυμα επώαστηκαν σε καθορισμένες συνθήκες για 24 h και ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνταν μέτρηση της ενεργότητας αυτών. Οι

μετρήσεις ενεργότητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν όπως ορίζει η μέθοδος της Παραγράφου 2.2.3.1.

2.2.5.2.1 Μελέτη Θερμοκρασιακής Σταθερότητας

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της θερμοκρασιακής σταθερότητας τόσο στην περίπτωση των ελεύθερων όσο και των ακινητοποιημένων λακκασών είναι ίδια με αυτή που περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.3.6.2. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Κιτρικού-Φωσφορικών (Πίνακας 2.1.4.1), pH 3 για το διάλυμα ακινητοποιημένων ενζύμων και pH 4 για το ενζυμικό συμπύκνωμα.

2.2.5.2.2 Μελέτη Σταθερότητας σε Οργανικούς διαλύτες

Για τη μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες πραγματοποιήθηκε επώαση του ενζύμου σε διαλύματα με 50% οργανικό διαλύτη. Οι οργανικοί διαλύτες που εξετάστηκαν είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, το DMSO και η διοξάνη. Για κάθε οργανικό διαλύτη το ένζυμο αραιώθηκε σε σωληνάκι τύπου erpendorf σε διάλυμα με 50% οργανικό διαλύτη και 50% ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7 (Πίνακας 2.1.4.1) σε τελικό όγκο 1 mL. Η επώαση των δειγμάτων των διαλυμάτων με τους οργανικούς διαλύτες και τα ένζυμα πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4°C και υπό ανάδευση προκειμένου το εναιώρημα των CLEAs να είναι όσο το δυνατόν ομοιογενές κατά την επώαση. Στους χρόνους επώασης 0-0,5-1-2-4-8-24 h ελήφθη δείγμα για κάθε διαλύτη και μετρήθηκε άμεσα η ενζυμική ενεργότητα όπως ορίζει η Παράγραφος 2.2.3.1.

2.2.6 Χρήση Ενζυμικών Παρασκευασμάτων σε Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές

Στην ενότητα αυτή εξετάστηκε η αξιοποίηση σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές τόσο των δύο καθαρών ενζύμων που απομονώθηκαν, *PcLac1* και *PcLac2*, όσο και του ενζυμικού συμπυκνώματος όπως παρασκευάστηκε στην Παράγραφο 2.2.1.1 και των ακινητοποιημένων ενζύμων CLEAs. Στην περίπτωση του ενζυμικού συμπυκνώματος και των ακινητοποιημένων ενζύμων εξετάστηκε η αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων τριφασικού ελαιουργείου (ΥΑΕ-κατσίγαρος). Αντίστοιχα για την περίπτωση των απομονωμένων ενζύμων εξετάστηκαν οι αντιδράσεις σύνθεσης μέσω οξείδωσης φαινολικών ενώσεων.

2.2.6.1 Χρήση Ενζυμικού Συμπυκνώματος και Ακινητοποιημένων Ενζύμων για Αποτοξικοποίηση Υγρών Αποβλήτων Τριφασικού Ελαιουργείου

Στις αντιδράσεις εξετάστηκαν η επίδραση της συγκέντρωσης των υγρών αποβλήτων και του H_2O_2 στην δράση των ακινητοποιημένων και μη ενζύμων.

2.2.6.1.1 Προετοιμασία Αντιδράσεων και Επώαση

Για τις ανάγκες του πειράματος προηγήθηκε παραγωγή CLEAs σε μεγαλύτερη κλίμακα όπως ορίζει η Παράγραφος 2.2.4.3.

Τόσο για το ενζυμικό συμπύκνωμα όσο και για το ακινητοποιημένο ένζυμο εξετάστηκαν τέσσερις συνθήκες αντίδρασης:

1. ΥΑΕ 50%, απουσία H_2O_2
2. ΥΑΕ 20%, απουσία H_2O_2

3. YAE 50%, παρουσία H_2O_2 , 5 mM στην αντίδραση

4. YAE 20%, παρουσία H_2O_2 , 5 mM στην αντίδραση

Κάθε μία από τις συνθήκες αυτές περιλάμβανε ένα διπλό δείγμα αντίδρασης και ένα τυφλό διάλυμα (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση.

Η αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 5 mL και πραγματοποιήθηκαν εντός σωλήνων Falcon των 50 mL προκειμένου να εξασφαλισθεί επαρκής ανάδευση και αερισμός. Τόσο το ενζυμικό συμπύκνωμα όσο και το ακινητοποιημένο ένζυμο εισήχθησαν χωρίς περαιτέρω αραίωση στην αντίδραση. Τα αντιδραστήρια αποστειρώθηκαν πριν τη χρήση ενώ η προετοιμασία των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε σε στείρες συνθήκες προς αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Η επώαση των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 35°C υπό ανάδευση 200 rpm, με περιστρεφόμενο επωαστήρα για 7 ημέρες.

2.2.6.1.2 Δειγματοληψία και Μετρήσεις Αποτοξικοποίησης

Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν καθημερινά υπό στείρες συνθήκες και από κάθε αντίδραση λαμβάνονταν 300 μ L δείγματος.

Για κάθε δείγμα μετρήθηκε σε πρώτη φάση ο αποχρωματισμός των YAE και έπειτα οι συνολικές φαινολικές ενώσεις που περιείχε.

2.2.6.1.2.1 Αποχρωματισμός YAE

Ο αποχρωματισμός των YAE προσδιορίστηκε ποιοτικά μετρώντας την απορρόφηση των δειγμάτων και συγκρίνοντας πως αυτή μεταβάλλεται με τον χρόνο. Τα δείγματα των ακινητοποιημένων ενζύμων φυγοκεντρώνταν με μικροφυγοκέντρο πάγκου και λαμβάνονταν 250 μ L του υπερκείμενου για τη φωτομέτρηση. Ο προσδιορισμός της μεταβολής της απορρόφησης έγινε με το πολυφωτόμετρο Spectra Max 250 (Molecular Devices) στα 525 nm.

2.2.6.1.2.2 Μέτρηση Ολικών Φαινολικών Ενώσεων με τη Μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος προσδιορίζει τις συνολικές φαινολικές ενώσεις του δείγματος εκφρασμένες ως προς γαλλικό οξύ (Waterhouse A., 2001).

I. Αντιδραστήρια

- Γαλλικό οξύ
- Na_2CO_3
- EtOH
- H_2O
- Διάλυμα Folin-Ciocalteu

II. Παρασκευή διαλύματος Na_2CO_3

Σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 200 g άνυδρου Na_2CO_3 σε 800 ml απιονισμένο νερό. Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού υπό ανάδευση και εν συνεχεία αφέθηκε να ψυχθεί. Προστέθηκαν κατόπιν μερικοί κρύσταλλοι ένυδρου Na_2CO_3 και το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 24 h. Ακολούθησε διήθηση με ταυτόχρονη μεταφορά του

διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη 1 L η οποία συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

III. Παρασκευή διαλύματος Γαλλικού οξέος (stock solution)

Σε ογκομετρική φιάλη 100 ml προστέθηκαν:

- 0,500 g Γαλλικού οξέος
- 10 ml EtOH
- απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή

Το διάλυμα διατηρείται μέχρι δύο εβδομάδες στο ψυγείο.

IV. Καμπύλη αναφοράς Γαλλικού οξέος

Σε ογκομετρικές φιάλες των 100 ml προστέθηκαν 0,1,2,3,5 και 10 ml από το stock διάλυμα Γαλλικού οξέος και ακολούθησε συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Οι περιεκτικότητες των διαλυμάτων που προέκυψαν ήταν 0, 50, 100, 150, 250, 500 mg/L αντίστοιχα. Ακολούθησε φωτομέτρηση των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης στα 765 nm.

V. Μέτρηση ολικού φαινολικού φορτίου δείγματος

1. Προστέθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα:

- 100 μL δείγμα κατάλληλα αραιωμένο (ή πρότυπο)
- 7,9 ml απιονισμένο νερό
- 500 μl αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu

Ακολούθησε ανάδευση σε vortex

2. Το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία 30 s - 8 min και εν συνεχεία προστέθηκαν 1500 μL από το διάλυμα Na_2CO_3 . Ακολούθησε ανάδευση και πάλι σε vortex.

3. Το δείγμα αφέθηκε σε ηρεμία για 30 min σε υδατόλουτρο στους 40°C.

4. Ακολούθησε φωτομέτρηση του δείγματος σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης στα 765 nm με τυφλό, αντιστοίχως παρασκευασμένο δείγμα όπου στη θέση των 100 μL δείγματος, προσθέτουμε 100 μL απιονισμένο νερό.

2.2.6.2 Χρήση Απομονωμένων Ενζύμων σε Αντιδράσεις Σύνθεσης

Σε πρώτη φάση διερευνήθηκε η ικανότητα πολυμερισμού διαφόρων υποστρωμάτων και από τις απομονωμένες λακκάσες *PcLac1* και *PcLac2*. Έπειτα έγινε επιλογή των υποστρωμάτων και πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις σύνθεσης, από τις οποίες τέλος παραλήφθηκε το προϊόν και αναλύθηκε περαιτέρω.

2.2.6.2.1 Ποιοτικός Έλεγχος Δράσης των Λακκασών σε Αναγωγικά Υποστρώματα

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων οξειδωσης των υποστρωμάτων (Παράγραφος 2.2.3.2) επιλέχθηκαν τα υποστρώματα εκείνα τα οποία φαίνεται να οξειδώνονται από κάθε ένζυμο. Τα υποστρώματα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.6.2.1.1.

Πίνακας 2.2.6.2.1.1 Αναγωγικά υποστρώματα για έλεγχο της δράσεις των λακκασών *PcLac1* και *PcLac2*.

α/α	Υπόστρωμα	Μάζα υποστρώματος (mg)	Όγκος αντίδρασης (mL)
<i>PcLac1</i>			
1	Φερουλικό Οξύ	25	8
2	Σιναπικό Οξύ	25	8
<i>PcLac2</i>			
1	Κατεχόλη	50	4
2	Γαλλικό Οξύ	50	4
3	Καφεϊκό Οξύ	50	4
4	Σιναπικό Οξύ	25	8

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα Κιτρικού-Φωσφορικών (pH 4 για την λακκάση *PcLac1* και pH 5 για την *PcLac2*) και οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σωληνάκια falcon των 50 mL. Οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων των καθαρών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,52 mg/mL για την λακκάση *PcLac1* και 0,28 mg/mL πρωτεΐνης για την *PcLac2*. Στην περίπτωση των αντιδράσεων (1) και (2) για την λακκάση *PcLac1* και (4) για την *PcLac2*, η διάλυση των φαινολικών υποστρωμάτων επιτεύχθηκε σε 7,5% DMSO (600 μ L DMSO, 7150 μ L ρυθμιστικού διαλύματος) και έπειτα προστέθηκαν 250 μ L ενζύμου. Για τις αντιδράσεις (1) και (2) της λακκάσης *PcLac2* προστέθηκαν 250 μ L ενζύμου σε 3750 μ L ρυθμιστικού διαλύματος. Για την αντίδραση (3) η ποσότητα του καφεϊκού οξέος διαλύθηκε σε διάλυμα 20% Αιθανόλης (800 μ L EtOH, 2950 μ L ρυθμιστικό διάλυμα), το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε, συλλέχθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν σε αυτό 250 μ L ενζυμικού διαλύματος. Παράλληλα παρασκευάστηκαν κατά τον ίδιο τρόπο και τα αντίστοιχα τυφλά των αντιδράσεων για κάθε μία περίπτωση υποστρώματος τα οποία είχαν σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση. Σε κάθε περίπτωση το pH των αντιδράσεων διορθώθηκε με NaOH 1 N. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση 220 rpm για χρονική διάρκεια 24 h, με τη βοήθεια περιστρεφόμενου επωαστήρα.

2.2.6.2.2 Επιλογή Υποστρωμάτων και Καθορισμός Συνθηκών Αντιδράσεων Σύνθεσης

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα επιλέχθηκαν ως βέλτιστα τα υποστρώματα σιναπικό οξύ και φερουλικό οξύ για το ένζυμο *PcLac1* και για το ένζυμο *PcLac2* το σιναπικό οξύ. Αρχικά μετρήθηκε η ενεργότητα των ενζυμικών συμπυκνωμάτων (Παράγραφος 2.2.3.1) προκειμένου οι ποσότητες που θα χρησιμοποιηθούν στις αντιδράσεις των δύο ενζύμων να έχουν παρόμοια ενεργότητα ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα. Η ενζυμική ενεργότητα των διαλυμάτων των καθαρών λακκασών προσδιορίστηκε 4,9 Units/mL για την λακκάση *PcLac1* και 1,2 Units/mL για την *PcLac2*.

Για την περίπτωση του ενζύμου *PcLac1* 25 mg κάθε υποστρώματος διαλυτοποιήθηκαν σε 7,5% DMSO (600 μ L DMSO, 7150 μ L ρυθμιστικού διαλύματος) και έπειτα προστέθηκαν 130 μ g ενζύμου (1,23 Units). Στην περίπτωση της λακκάσης *PcLac2* 25 mg του υποστρώματος διαλυτοποιήθηκαν σε 7,5% DMSO (600 μ L DMSO, 6150 μ L ρυθμιστικού διαλύματος) και στη συνέχεια προστέθηκαν 350 μ g ενζύμου (1,50 Units).

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα Κιτρικού-Φωσφορικών (pH 4 για την λακκάση *PcLac1* και pH 5 για την *PcLac2*) και οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα εντός σωλήνων falcon των 50 mL. Σε κάθε περίπτωση το pH των αντιδράσεων προσαρμόστηκε στην κατάλληλη τιμή με NaOH 1 N. Οι αντιδράσεις επωάστηκαν στους 35°C υπό ανάδευση 200 rpm για χρονική διάρκεια 24 h, με τη βοήθεια περιστρεφόμενου επωαστήρα.

2.2.6.2.3 Παραλαβή Προϊόντων Σύνθεσης και Προσδιορισμός Δομής

Με το πέρας των αντιδράσεων σύνθεσης τα falcon φυγοκεντρήθηκαν για 10 min. Το ίζημα συλλέχθηκε και επαναιωρήθηκε σε 20 mL απιονισμένο νερό. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση για 10 min. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 επιπλέον φορές. Συλλέχθηκε το καθαρό πλέον ίζημα και τοποθετήθηκε στην υπερκατάψυξη (-80°C) για τουλάχιστον 45 min. Τα δείγματα στην συνέχεια υποβλήθηκαν σε λυοφιλίωση (freeze drying). Το τελικό στερεό προϊόν συλλέχθηκε, ζυγίστηκε και ακολούθησε η ενόργανη ανάλυση για τον προσδιορισμό της δομής και την ταυτοποίηση των ενώσεων που σχηματίστηκαν από τις αντιδράσεις.

3. Αποτελέσματα

3.1 Χαρακτηρισμός Καθαρών Πρωτεϊνών *PcLac1* και *PcLac2*

3.1.1 Παρακολούθηση Οξειδωσης Υποστρωμάτων

Ως αποτελέσματα στο συγκεκριμένο πείραμα ελήφθησαν, για την οξείδωση του κάθε υποστρώματος στην κάθε μία αντίδραση, το φάσμα απορρόφησης από τα 250 ως τα 750nm. Τα φάσματα αυτά μετρήθηκαν στους χρόνους 10 min, 5 h και 28 h. Αφού αφαιρέθηκαν οι απορροφήσεις των τυφλών αντιδράσεων από τις αντίστοιχες απορροφήσεις των αντιδράσεων με την κάθε λακκάση, κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα του φάσματος απορρόφησης για κάθε υπόστρωμα και κάθε ένζυμο στους τρεις αυτούς χρόνους. Το σύνολο των διαγραμμάτων αυτών παρατίθενται στο παράρτημα Α.

Από τα φάσματα απορρόφησης διακρίνονται οι προτιμήσεις του κάθε ενζύμου ως προς τα οξειδωτικά υποστρώματα. Στον Πίνακα 3.1.1.1 συνοψίζονται τα υποστρώματα που εξετάστηκαν και επισημαίνεται ποια εξ αυτών οξειδώνονται από τις λακκάσες *PcLac1* και *PcLac2* αντίστοιχα. Το ένζυμο *PcLac1* για παράδειγμα, φαίνεται να προτιμά κατεχολικές δομές και υδροξυκιναμικά οξέα με υδροξύλιο σε ορθο-υποκατάσταση. Επιπλέον το ένζυμο οξειδώνει ενώσεις διμεθοξυ-υποκατεστημένες, αλλά όχι φαινολικές αλκοόλες, αμίνες αλδεΐδες ή υδροβενζοϊκά οξέα. Αντίστοιχα για την λακκάση *PcLac2*, παρατηρούμε ότι προτιμώνται φαινολικές ενώσεις με κατεχολική δομή. Ως εκ τούτου υδροξυκιναμικά οξέα (hydroxycinnamic acids) οξειδώνονται από το ένζυμο όταν σε αυτά εντοπίζεται υδροξύλιο σε όρθο- υποκατάσταση. Αντίστοιχες ενώσεις με μικρότερη αλειφατική ομάδα προσδεμένη στον αρωματικό δακτύλιο (βανιλίνη) αλλά και υδροξυβενζοϊκά οξέα επίσης οξειδώνονται. Η οξείδωση των υποστρωμάτων ευνοείται όταν η υποκατάσταση είναι σε θέσεις όρθο- και πάρα και λιγότερο σε μέτα-. Παράλληλα δεν οξειδώνονται ενώσεις όπως η φαινόλη ή η ανιλίνη, οι οποίες υπολείπονται υδροξυλίου στην όρθο- θέση.

Πίνακας 3.1.1.1 Συνοπτική παρουσίαση υποστρωμάτων τα οποία οξειδώνονται από τις λακκάσες *PcLac1* και *PcLac2*.

a/a	Υπόστρωμα	<i>PcLac1</i>	<i>PcLac2</i>
Υδροξυβενζόλες			
1	Φαινόλη	-	-
2	Κατεχόλη	+	+
3	Ρεσορκινόλη	-	-
4	Υδροκινόνη	-	+
5	Χλωροκατεχόλη	-	+
6	Πυρογαλλόλη	+	+
Μεθοξυφαινόλες			
7	Γουαϊακόλη	-	-
8	2,6-Διμεθοξυφαινόλη	+	+
Φαινολικές αλκοόλες			
9	Τυροσόλη	-	-
10	3,4- Διμεθοξυβενζυλο-αλκοόλη	-	+
Φαινολικές αμίνες			
11	Ανιλίνη	-	-
12	Τυροσίνη	-	-
Φαινολικές αλδεΐδες			
13	Βανιλίνη	-	-
Φλαβονοειδή			
14	Κερσετίνη	+	+
Υδροξυκινναμικά οξέα			
15	Καφεϊκό οξύ	+	+
16	Φερουλικό οξύ	+	+
17	Σιναπικό οξύ	+	+
18	π-Κουμαρικό οξύ	-	-
Υδροξυβενζοϊκά οξέα			
19	Βανιλλικό οξύ	-	+
20	Γαλλικό οξύ	-	+
Λοιπά οξέα			
21	ABTS	+	+
22	Ασκορβικό οξύ	-	-
Κρεσόλες			
23	ο-Κρεσόλη	-	-
24	μ-Κρεσόλη	-	-
25	π-Κρεσόλη	-	+
Αντιβιοτικά			
26	Αμπικιλίνη	-	-
27	Τετρακυκλίνη	-	-
28	Ριφαμπικίνη	+	+

3.1.2 Μελέτη Εξειδίκευσης ως προς το Υπόστρωμα

Ως αποτελέσματα στις συγκεκριμένες μετρήσεις λαμβάνονται οι απορροφήσεις των αντιδράσεων σε καθορισμένο χρόνο αντίδρασης για κάθε υπόστρωμα και κάθε ένζυμο. Συνολικά οι υπολογισμοί που πραγματοποιούνται έχουν ως αρχή τη μέτρηση της απορρόφησης A, ως τη διαφορά της απορρόφησης της αντίδρασης του κάθε ενζύμου από

την απορρόφηση της αντίστοιχης τυφλής αντίδρασης. Από τον νόμο των Lambert-Beer προσδιορίζεται η συγκέντρωση του οξειδωμένου προϊόντος και στη συνέχεια υπολογίζεται η μέση ενεργότητα του ενζύμου σε Units/mg, όπως ορίζεται στην Παράγραφο 2.2.3.3. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.2.1.

Πίνακας 3.1.2.1 Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τις μετρήσεις εξειδίκευσης των λακκασών ως προς το υπόστρωμα. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις προκύπτουν από επεξεργασία μετρήσεων διπλών δειγμάτων.

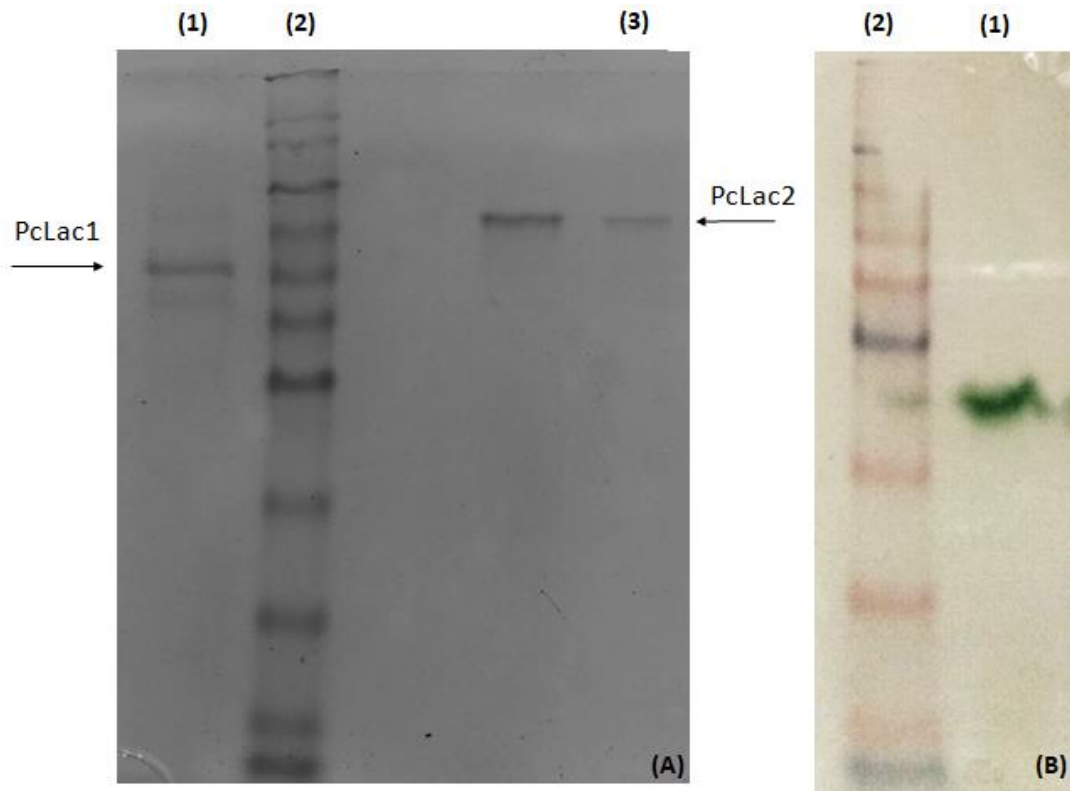
Υπόστρωμα	<i>PcLac1</i> Units/mg	<i>PcLac2</i> Units/mg
ABTS	1,5±0,1	4,8±0,3
2,6 DMP	0,08±0,0	0,019±0,003
Κατεχόλη	0,06±0,01	0,05±0,01
Πυρογαλόλη	0,02±0,01	0,0390±0,0003
Γουαϊακόλη	0,003±0,0	0,0006±0,0002
Υδροκινόνη	0,079±0,003	0,09±0,02

Από τα υπό μελέτη υποστρώματα, η λακκάση *PcLac1* δίνει την μικρότερη ενεργότητα για τη γουαϊακόλη. Ακολουθεί η πυρογαλόλη με ενεργότητα 0,020 Units/mg και η κατεχόλη με 0,06 Units/mg. Για τα υποστρώματα 2,6-DMP και υδροκινόνη, η *PcLac1* παρουσιάζει μεγαλύτερη ενεργότητα, τη τάξεως των 0,08 Units/mg ενώ πολύ μεγαλύτερη είναι η ενεργότητα για την οξείδωση του ABTS (1,5 Units/mg). Στην περίπτωση της λακκάσης *PcLac2*, το ένζυμο παρουσιάζει την ελάχιστη ενεργότητα για την γουαϊακόλη και αμέσως υψηλότερη για την 2,6-DMP (0,019 Units/mg). Ακόμη μεγαλύτερη ενεργότητα παρουσιάζει για την πυρογαλόλη (0,039 Units/mg) και την κατεχόλη (0,05 Units/mg) ενώ εμφανίζει ακόμα καλύτερη εξειδίκευση ως προς την υδροκινόνη, με ενεργότητα (0,09 Units/mg). Ωστόσο η ενεργότητα που υπολογίζεται ως προς ABTS είναι πολύ μεγαλύτερη συγκριτικά με την αντίστοιχη των υπολοίπων υποστρωμάτων (4,8 Units/mg).

3.1.3 Αποτελέσματα Ηλεκτροφορητικών Τεχνικών

3.1.3.1 Προσδιορισμός Μεγέθους Λακκασών

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των πρωτεϊνικών μορίων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου SDS-PAGE. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε για τα καθαρά ένζυμα *PcLac1* και *PcLac2* και για πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνικών μορίων γνωστού μοριακού βάρους. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.1.3.1.1.

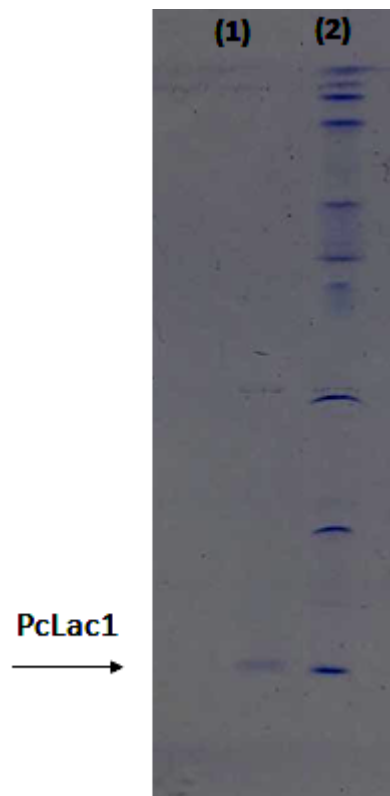


Εικόνα 3.1.3.1.1 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών. (Α) Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης παρουσία αποδιατακτικών συνθηκών SDS-PAGE. (Β) Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης απουσία αποδιατακτικών παραγόντων μετά την εμφάπτιση σε ABTS. (1) *Pclac1*, (2) Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών, (3) *Pclac2*.

Στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE διακρίνουμε για κάθε ένζυμο μία πρωτεϊνική ζώνη. Το μοριακό βάρος της λακκάσης *Pclac1* εντοπίζεται περίπου στα 40 kDa ενώ για την λακκάση *Pclac2* είναι 80 kDa. Από το ζυμογράφημα της Εικόνας 3.1.3.1.1-(Β) παρατηρούμε ότι η ζώνη της λακκάσης *Pclac1* αντιστοιχεί σε χαμηλότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνη (περίπου 35 kDa) ενώ η λακκάση *Pclac2* δεν έδωσε ορατή πρωτεϊνική ζώνη. Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα για το μοριακό βάρος των ενζύμων, ωστόσο η ηλεκτροφόρηση απουσία αποδιατακτικών συνθηκών επιβεβαιώνει το γεγονός ότι εμφανίζεται μία και μόνο πρωτεϊνική ζώνη με ενεργότητα λακκάσης.

3.1.3.2 Προσδιορισμός Ισοηλεκτρικού σημείου Λακκασών

Ο προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου των *Pclac1* και *Pclac2* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου (IEF-PAGE), στο εύρος τιμών pH από 3,0 έως 9,0, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.3.4.3. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.1.3.2.



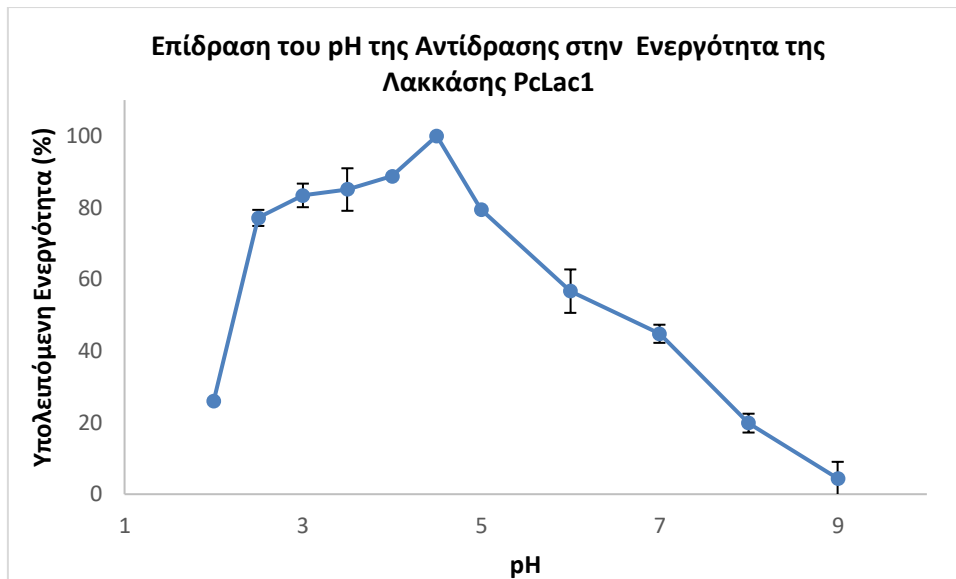
Εικόνα 3.1.3.2 Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (IEF-PAGE). (1) *Pclac1*, (2) Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών

Η Εικόνα 3.1.3.2 απεικονίζει το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου μετά την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών. Το ισοηλεκτρικό σημείο της λακκάσης *Pclac1* είναι περίπου pI 3,5, ενώ για την λακκάση *Pclac2* δεν παρατηρήθηκε ορατή πρωτεϊνική ζώνη κατά την ηλεκτροφόρηση.

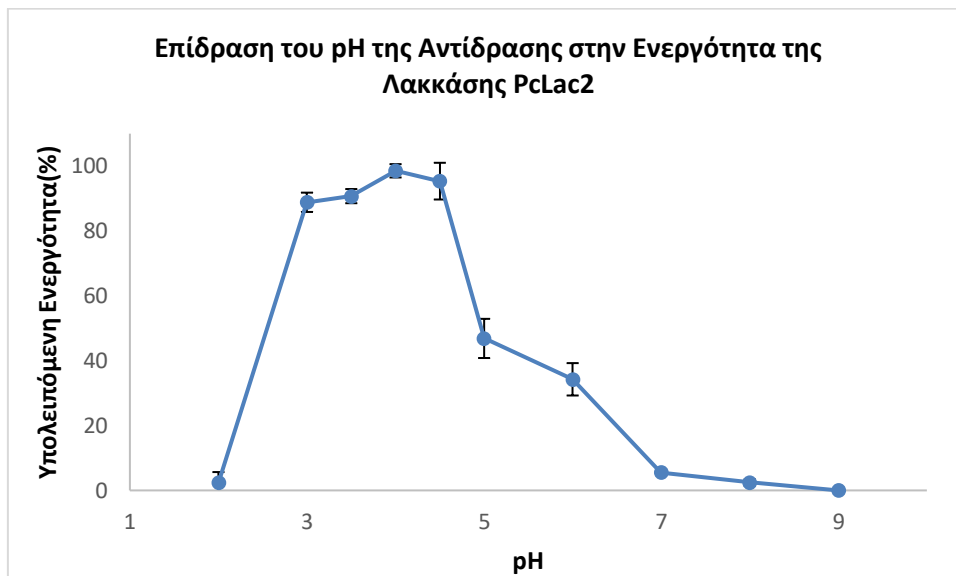
3.1.4 Βέλτιστες Συνθήκες Δράσης

3.1.4.1 Βέλτιστη Τιμή pH

Στις ακόλουθες Εικόνες (Εικόνες 3.1.4.1.1 και 3.1.4.1.2) παρουσιάζονται οι υπολογισμοί υπολειπόμενης ενεργότητας για την κάθε λακκάση, κατά τη διεξαγωγή αντιδράσεων σε διαφορετικές συνθήκες pH, στο εύρος pH 2 έως 9.



Εικόνα 3.1.4.1.1 Επίδραση της τιμής pH της αντίδρασης στην υπολειπόμενη ενεργότητα της λακκάσης Pclac1. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε μετρήσεις τριπλών δειγμάτων.

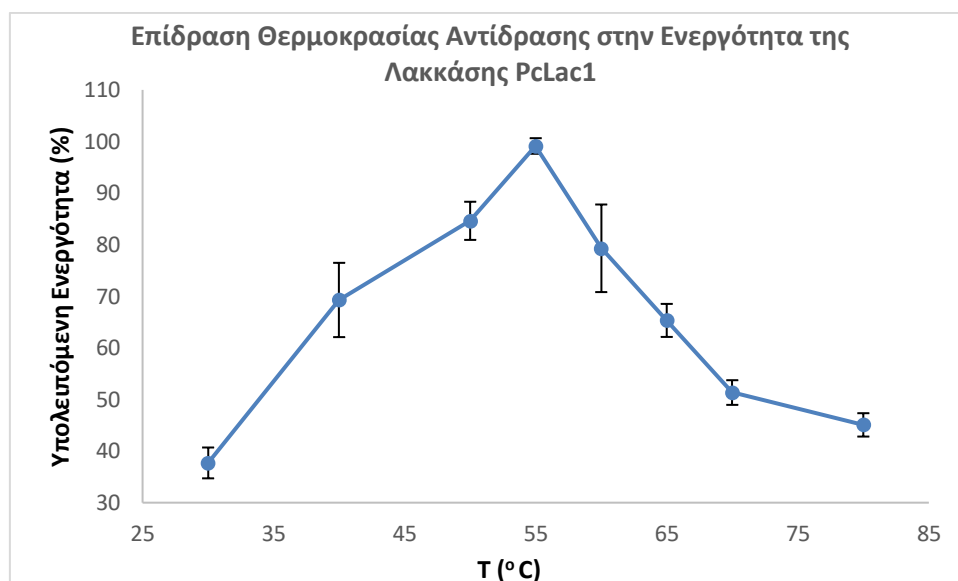


Εικόνα 3.1.4.1.2 Επίδραση της τιμής pH της αντίδρασης στην υπολειπόμενη ενεργότητα της λακκάσης Pclac2. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε μετρήσεις τριπλών δειγμάτων.

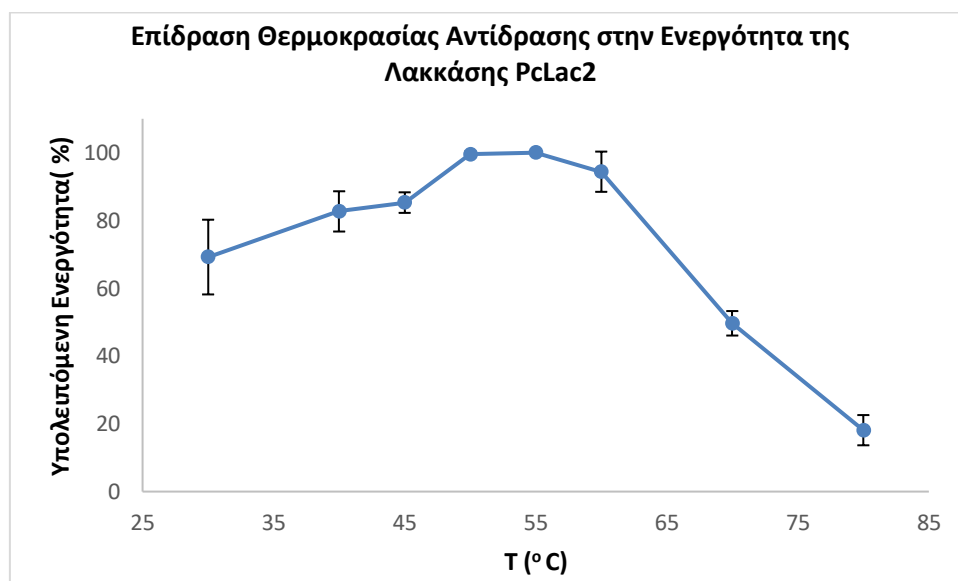
Η λακκάση Pclac1 εμφανίζει βέλτιστο pH δράσης στην τιμή 4,5. Η ενεργότητα του ενζύμου διατηρείται σε ποσοστό 80% και άνω, στο εύρος pH 2,5 έως 5. Για pH 6 το ένζυμο έχει 60% ενεργότητα ενώ πρακτικά για pH 9 η ενεργότητα είναι μηδενική. Αντίστοιχη είναι και η περίπτωση της λακκάσης Pclac2, η οποία παρουσιάζει βέλτιστο pH δράσης στο pH 4. Μάλιστα στο εύρος pH3 με pH4,5 το ένζυμο εμφανίζει ενεργότητα πάνω από 80%, ενώ για μικρότερες ή μεγαλύτερες τιμές pH η ενεργότητα μειώνεται σημαντικά. Συγκεκριμένα για την τιμή pH 5 η ενεργότητα είναι μικρότερη του 50% ενώ για pH 2, 7, 8 και 9 είναι πρακτικά μηδενική. Το πλεονέκτημα συνεπώς της λακκάσης Pclac1 έγκειται στο γεγονός ότι παρουσιάζει καλύτερη δραστηριότητα στα εύρη pH 2-3 και 5-7, συγκριτικά με την Pclac2.

3.1.4.2 Βέλτιστη Θερμοκρασία Δράσης

Στις ακόλουθες εικόνες (Εικόνες 3.1.4.2.1 και 3.1.4.2.2) παρουσιάζονται οι υπολογισμοί υπολειπόμενης ενεργότητας για το κάθε ένζυμο κατά τη διεξαγωγή αντιδράσεων σε διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες, στο εύρος 30 έως 80°C.



Εικόνα 3.1.4.2.1 Επίδραση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στην ενεργότητα της λακκάσης *PcLac1*. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία μετρήσεων τριπλών δειγμάτων.



Εικόνα 3.1.4.2.2 Επίδραση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στην ενεργότητα της λακκάσης *PcLac2*. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία μετρήσεων τριπλών δειγμάτων.

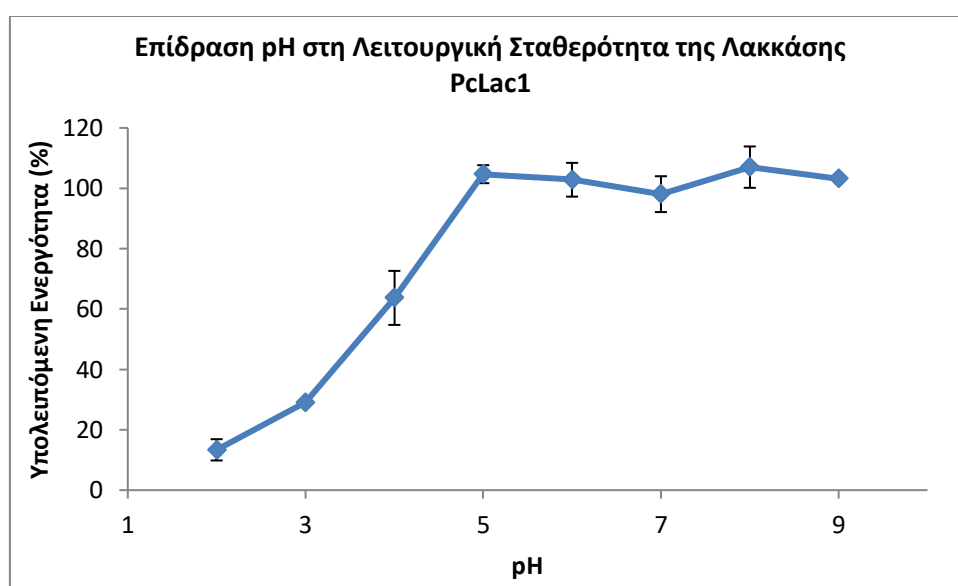
Τόσο η λακκάση *PcLac1* όσο και η λακκάση *PcLac2* παρουσιάζουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 55°C. Πιο συγκεκριμένα η λακκάση *PcLac1* εμφανίζει άνω του 60% της ενεργότητάς της στο εύρος 40-70°C ενώ στους 30 και στους 80°C η ενεργότητα είναι της τάξεως του 40%. Η λακκάση *PcLac2* έχει πάνω από 80% ενεργότητα στο θερμοκρασιακό εύρος 40-60°C. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (30°C) παρουσιάζει 70% ενεργότητα ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες δράσης η ενεργότητα μειώνεται στο 50% (70°C) φτάνοντας το 20% στους 80°C. Το γεγονός ότι το ένζυμο *PcLac1* παρουσιάζει χαμηλή ενεργότητα σε

χαμηλές θερμοκρασίες (30 και 40°C) αιτιολογείται πιθανώς από το ότι η λακκάση απαιτεί περισσότερη ενέργεια στις συνθήκες αυτές προκειμένου να αποκτήσει την απαιτούμενη κινητικότητα για να είναι δραστική. Το φαινόμενο αυτό δεν είναι τόσο έντονο στην περίπτωση της *PcLac2*, η οποία ωστόσο παρεμποδίζεται περισσότερο σε υψηλότερες θερμοκρασίες (70 και 80°C).

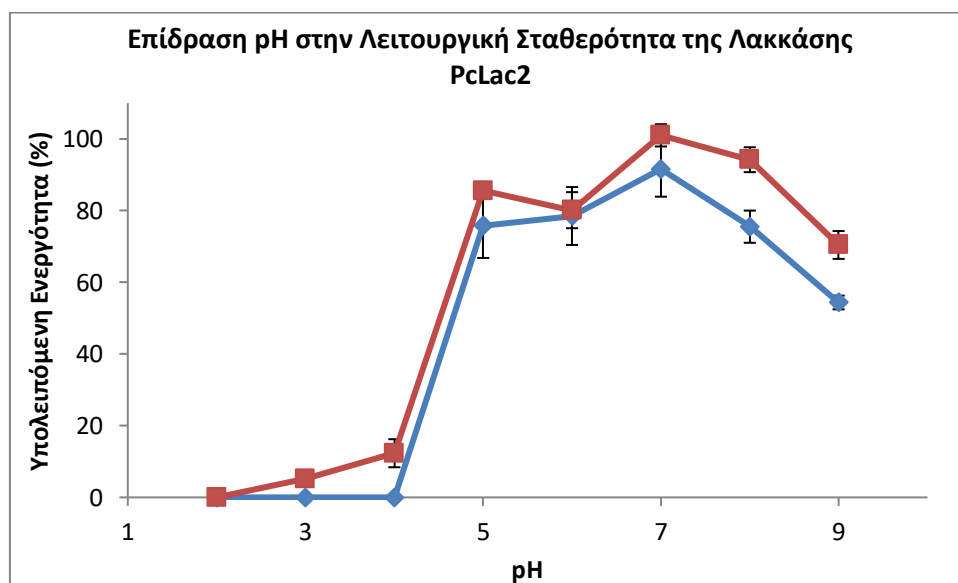
3.1.5 Συνθήκες Λειτουργικής Σταθερότητας

3.1.5.1 Σταθερότητα σε Τιμές pH

Στις ακόλουθες εικόνες (Εικόνες 3.1.5.1.1 και 3.1.5.1.2) παρουσιάζονται οι υπολογισμοί υπολειπόμενης ενεργότητας για το κάθε ένζυμο, μετά από επώαση σε διαφορετικές συνθήκες pH για 24 h, στους 4°C. Ως 100% ενεργότητα θεωρείται η ενεργότητα που μετράται στον χρόνο 0.



Εικόνα 3.1.5.1.1 Επίδραση του pH στην λειτουργική σταθερότητα της λακκάσης *PcLac1* κατόπιν επώασης 24 h. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε μετρήσεις τριπλών δειγμάτων.

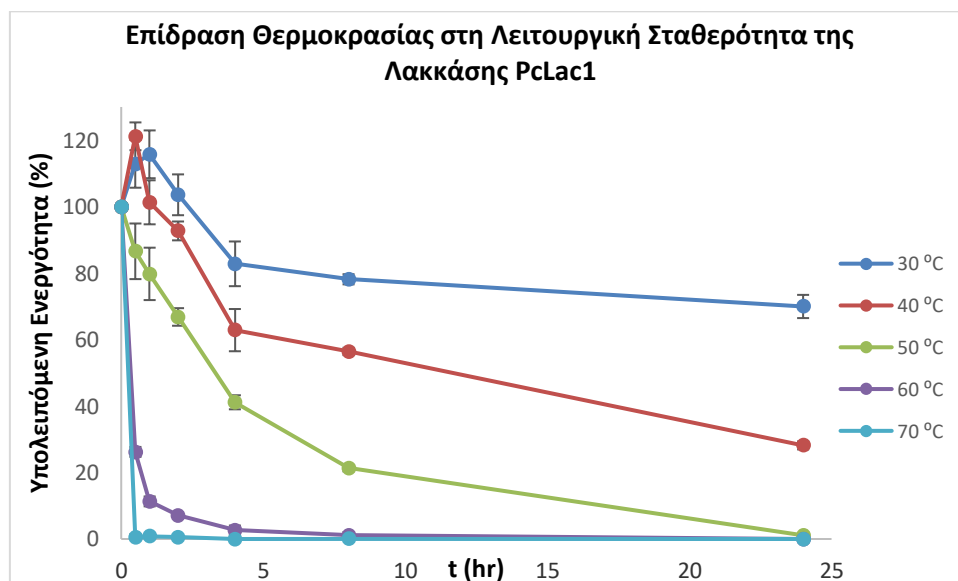


Εικόνα 3.1.5.1.2 Επίδραση του pH στην λειτουργική σταθερότητα της λακκάσης Pclac2 κατόπιν επώασης 8 (κόκκινη γραμμή) και 24 h (μπλε γραμμή). Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε μετρήσεις τριπλών δειγμάτων.

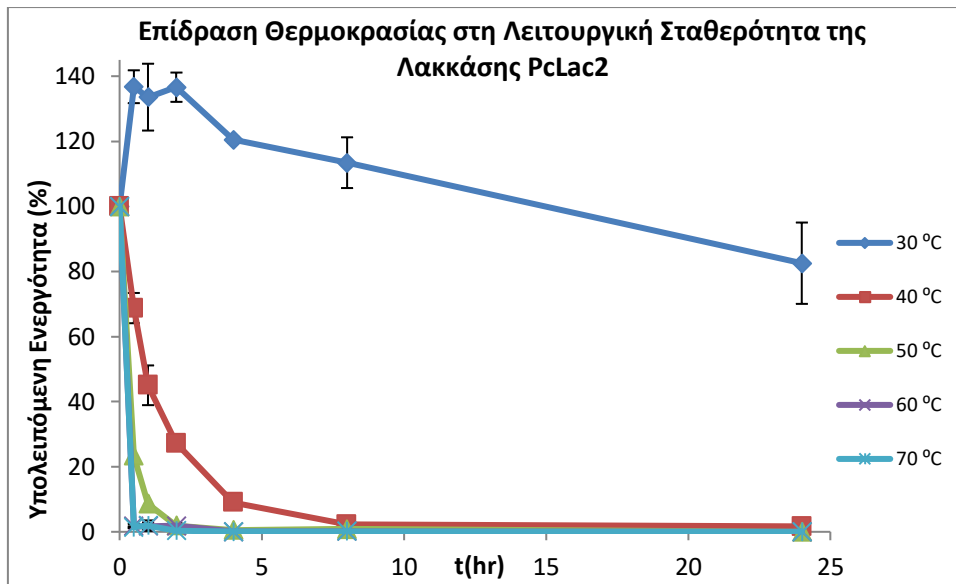
Η λακκάση Pclac1 παρουσιάζει ικανοποιητική σταθερότητα στο εύρος pH 5 έως 9. Μάλιστα στο εύρος αυτό διατηρεί πάνω από το 95% της ενεργότητάς της μετά από 24 h επώασης. Ωστόσο μείωση του pH κάτω από pH 5 επιφέρει ανάλογη μείωση της σταθερότητας, με το ένζυμο να παρουσιάζει ενεργότητα περίπου 60%, 30% και 10% μετά από 24 h επώασης σε pH 4, 3 και 2 αντίστοιχα. Η λακκάση Pclac2 παρουσιάζει καλύτερη λειτουργική σταθερότητα στο pH 7, όπου διατηρεί πάνω από το 90% της ενεργότητάς της μετά από 24 h επώασης. Στον ίδιο χρόνο το ένζυμο διατηρεί πάνω από το 70% της ενεργότητας στο εύρος pH 5 ως 8 ενώ αντίθετα σε pH 9 η ενεργότητα πέφτει περίπου στο 50%. Στα όξινα pH 2 με 4 η λακκάση χάνει το 80% της ενεργότητάς της εντός 4 h επώασης.

3.1.5.2 Θερμοκρασιακή Σταθερότητα

Στις ακόλουθες εικόνες (Εικόνες 3.1.5.2.1 και 3.1.5.2.2) παρουσιάζονται οι υπολογισμοί υπολειπόμενης ενεργότητας για το κάθε ένζυμο, κατά την επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες, στο εύρος 30 έως 70°C, για 24 h. Για λόγους σύγκρισης μεταξύ των υπολογισμών ορίζουμε ως 100% ενεργότητα την ενεργότητα που μετράται στον χρόνο 0.



Εικόνα 3.1.5.2.1 Επίδραση της θερμοκρασίας στη λειτουργική σταθερότητα της λακκάσης Pclac1 μετά από 24 h επώασης. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις βασίζονται σε μετρήσεις τριπλών δειγμάτων.

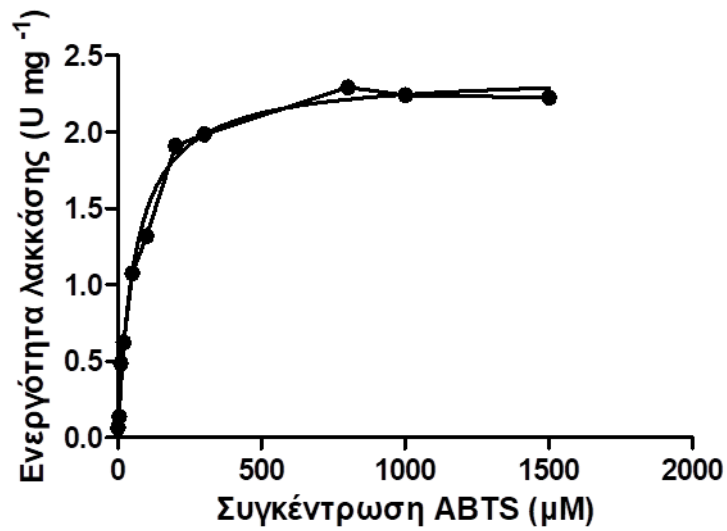


Εικόνα 3.1.5.2.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στη λειτουργική σταθερότητα της λακκάσης *Pclac2* μετά από 24 h επώασης. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις βασίζονται σε μετρήσεις τριπλών δειγμάτων.

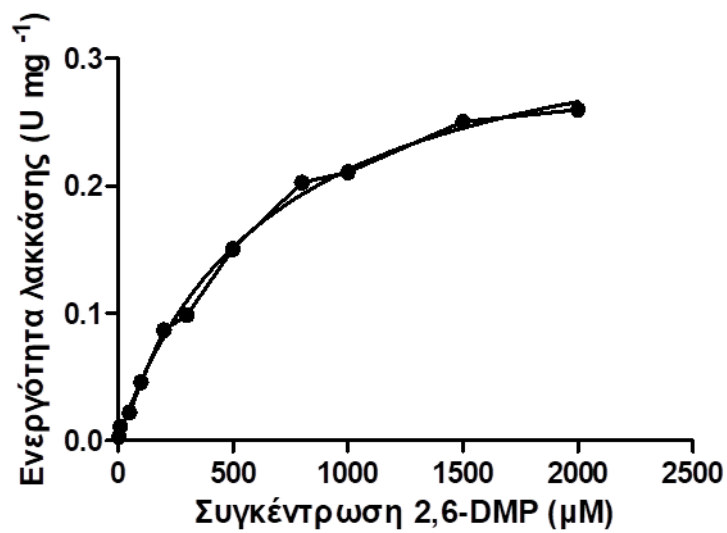
Η σταθερότητα των ενζύμων αυξάνεται μειούμενης της θερμοκρασίας. Η μέγιστη σταθερότητα των ενζύμων λαμβάνεται κατόπιν επώασης σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, στην προκειμένη περίπτωση τους 30°C. Στη θερμοκρασία αυτή παρατηρείται ομαλή πτωτική πορεία της ενεργότητας, με την λακκάση *Pclac1* να διατηρεί το 70% της ενεργότητάς της στις 24 h ενώ η λακκάση *Pclac2* να διατηρεί στον ίδιο χρόνο το 82,5% της ενεργότητάς της. Ωστόσο η λακκάση *Pclac1* διατηρεί το 50% της ενεργότητας στους 40°C στις 8 h ενώ η ενεργότητα έχει μειωθεί κατά 60% κατόπιν επώασης στους 50°C για 4 h. Για την περίπτωση της *Pclac2*, η ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίζεται μικρότερη του 10% μετά από 1 h επώασης στους 50, 60 και 70°C ενώ στον ίδιο χρόνο επώασης στους 40°C έχει χαθεί το 50% της ενεργότητας. Συγκρίνοντας τις δύο λακκάσες, η *Pclac1* δείχνει μεγαλύτερη σταθερότητα από την *Pclac2* σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Αντίθετα η μεν *Pclac2* επιδεικνύει μεγαλύτερη σταθερότητα όταν διατηρείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

3.1.6 Προσδιορισμός Κινητικών Σταθερών Michaelis-Menten

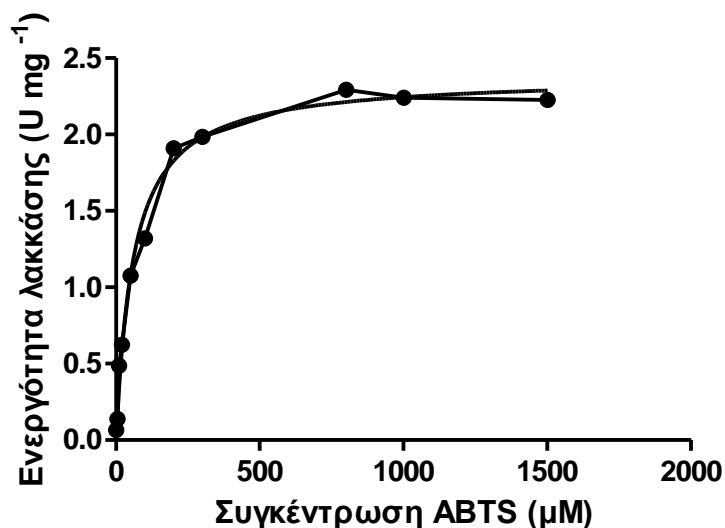
Για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων προηγήθηκε ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και για τα δύο ένζυμα μέσω της μεθόδου Lowry, προκειμένου να προσδιοριστεί η ενζυμική ενεργότητα σε μονάδες Units/mg πρωτεΐνης. Ακολούθως παρατίθενται οι εικόνες με την προσαρμογή των δεδομένων στο μοντέλο Michaelis-Menten για κάθε μία από τις λακκάσες και κάθε υπόστρωμα.



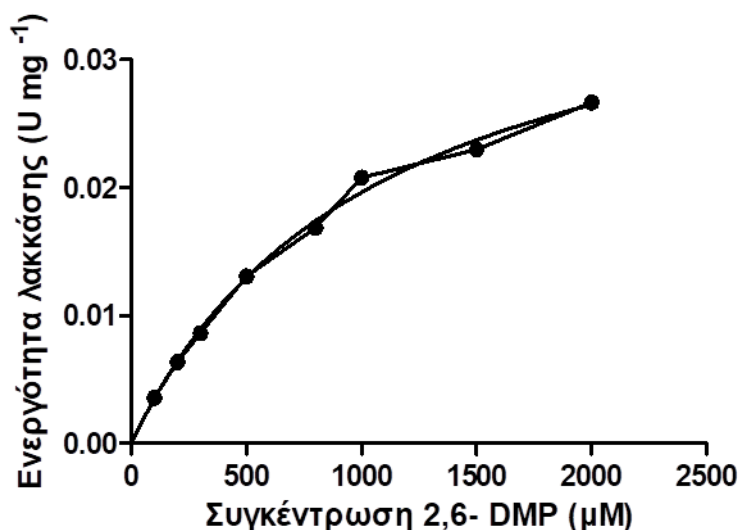
Εικόνα 3.1.6.1 Προσαρμογή δεδομένων στο μοντέλο Michaelis-Menten για την οξείδωση του υποστρώματος ABTS από την λακκάση *PcLac1* ($R^2=0,99$).



Εικόνα 3.1.6.2 Προσαρμογή δεδομένων στο μοντέλο Michaelis-Menten για την οξείδωση του υποστρώματος 2,6-DMP από την λακκάση *PcLac1* ($R^2=0,99$).



Εικόνα 3.1.6.3 Προσαρμογή δεδομένων στο μοντέλο Michaelis-Menten για την οξείδωση του υποστρώματος ABTS από την λακκάση *PcLac2* ($R^2=0,99$).



Εικόνα 3.1.6.3 Προσαρμογή δεδομένων στο μοντέλο Michaelis-Menten για την οξείδωση του υποστρώματος 2,6-DMP από την λακκάση *PcLac2* ($R^2=0,99$).

Από την προσαρμογή των δεδομένων λαμβάνουμε τα κινητικά μεγέθη K_M και V_{max} . Το μέγεθος k_{cat} υπολογίζεται ως το γινόμενο του V_{max} με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών όπως αυτό προσδιορίζεται πειραματικά. Το μοριακό βάρος για την λακκάση *PcLac1* είναι 40000 mg/mole ενώ για την *PcLac2* υπολογίζεται 80000 mg/mole.

Πίνακας 3.1.6.1 Συνοπτική παρουσίαση κινητικών παραμέτρων του μοντέλου Michaelis-Menten για τις δύο λακκάσες και τα αντίστοιχα υποστρώματα.

Λακκάση	Υπόστρωμα	K_M (μM)	V_{\max} (U/mg)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)
<i>PcLac1</i>	ABTS	61±7	2,38±0,06	95±2	1,6±0,2
	2,6-DMP	672±56	0,36±0,01	14,2±0,5	0,021±0,002
<i>PcLac2</i>	ABTS	165±15	4,6±0,1	369±9	2,2±0,2
	2,6-DMP	1070±105	0,041±0,002	3,3±0,2	0,0030±0,0003

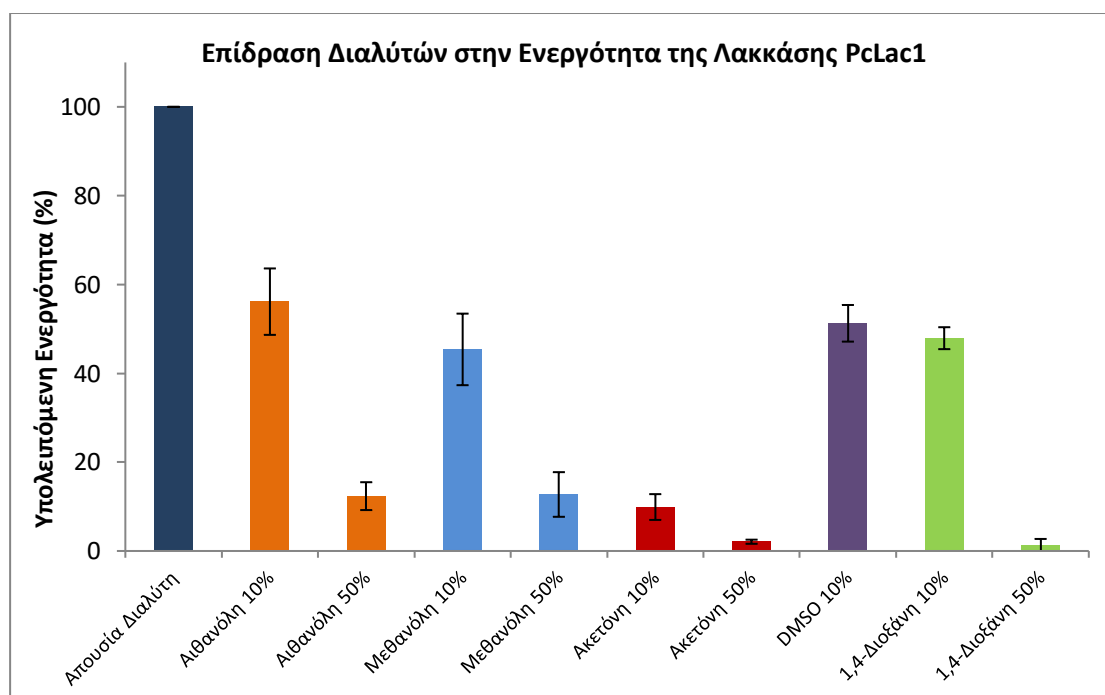
Συγκριτικά για τα δύο υποστρώματα, τόσο η λακκάση *PcLac1* όσο και η *PcLac2* δίνουν υψηλές τιμές K_M και αντίστοιχα χαμηλές τιμές V_{\max} για το υπόστρωμα 2,6-DMP, ενώ το αντίστροφο συμβαίνει για το ABTS. Η *PcLac1* φαίνεται να έχει υψηλότερη συγγένεια ως προς τα δύο υποστρώματα, σε σχέση με την *PcLac2*.

3.1.7 Επίδραση Παρεμποδιστικών Παραγόντων στην Ενεργότητα των Λακκασών

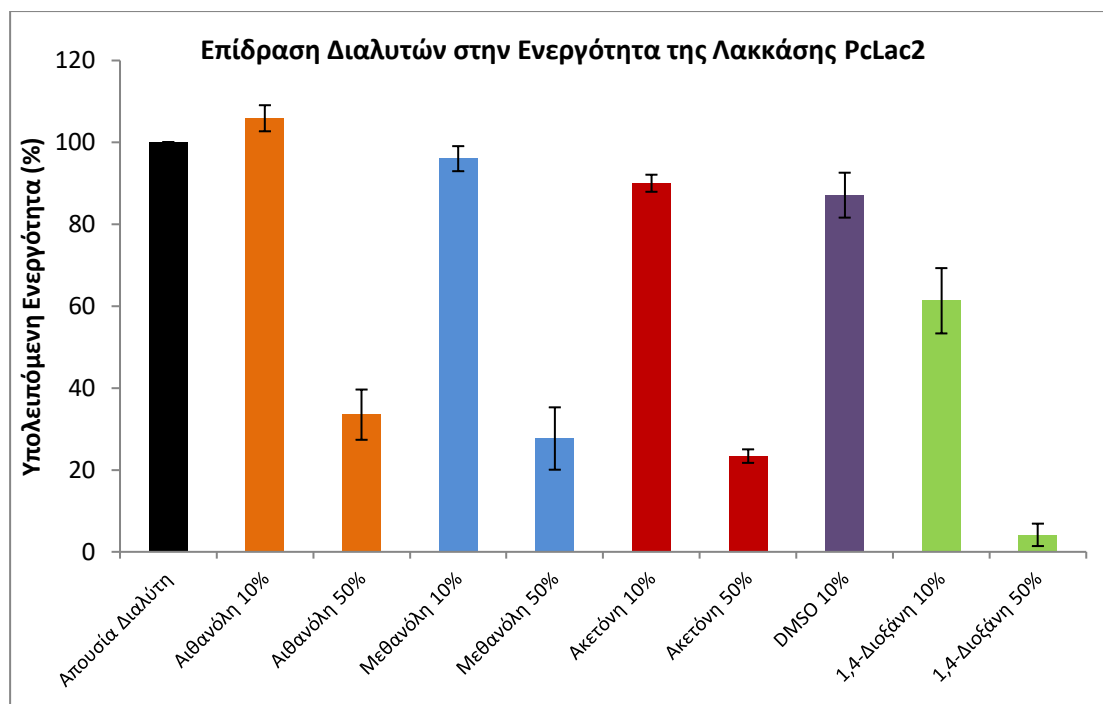
Στα πειράματα μελέτης της δράσης των λακκασών παρουσία παρεμποδιστικών παραγόντων προσδιορίζεται για κάθε συνθήκη και κάθε ένζυμο η ενεργότητα του ενζύμου σε Units/mL. Για κάθε ένζυμο λαμβάνεται ως 100% ενεργότητα η ενεργότητα της αντίδρασης στην οποία απουσιάζει ο παρεμποδιστικός παράγοντας, βάσει της οποίας προσδιορίζεται η υπολειπόμενη ενεργότητα.

3.1.7.1 Επίδραση Οργανικών Διαλυτών

Στις ακόλουθες εικόνες (3.1.7.1.1 και 3.1.7.1.2) παρουσιάζονται οι υπολογισμοί της υπολειπόμενης ενεργότητας για το κάθε ένζυμο σε αντιδράσεις υπό την επίδραση διαφορετικών διαλυτών.



Διάγραμμα 3.3.7.1.1 Επίδραση διαφορετικών διαλυτών στην ενεργότητα της λακκάσης *PcLac1*. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται στην επεξεργασία τριπλών δειγμάτων.

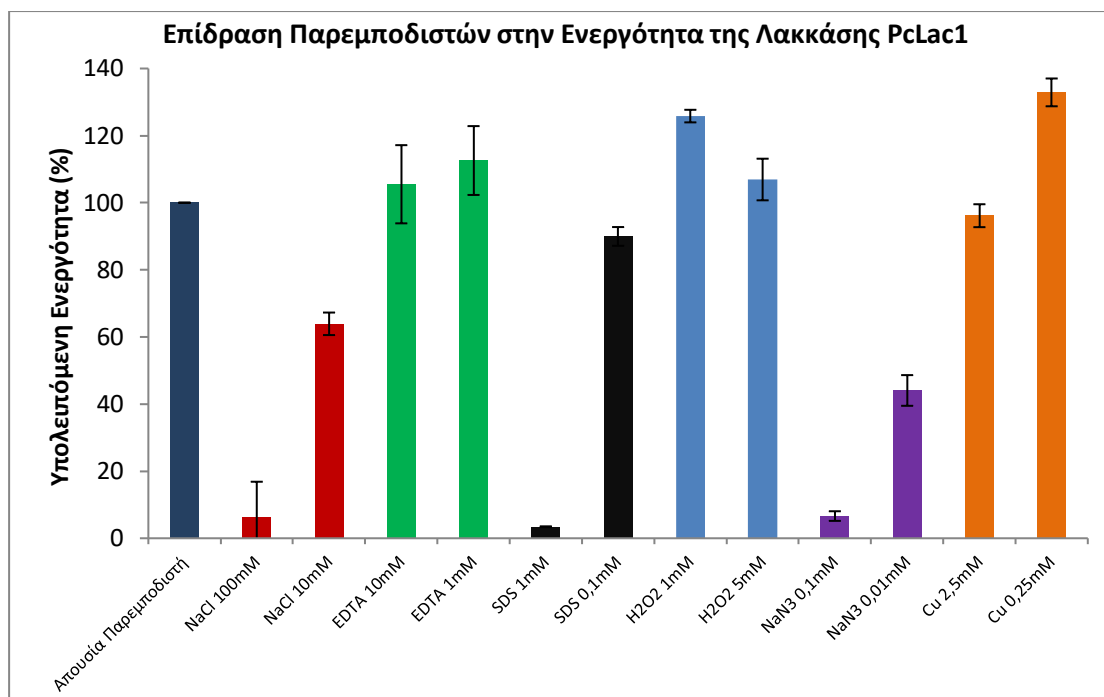


Εικόνα 3.1.7.1.2 Επίδραση διαφορετικών διαλυτών στην ενεργότητα της λακκάσης *Pclac2*. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται στην επεξεργασία τριπλών δειγμάτων.

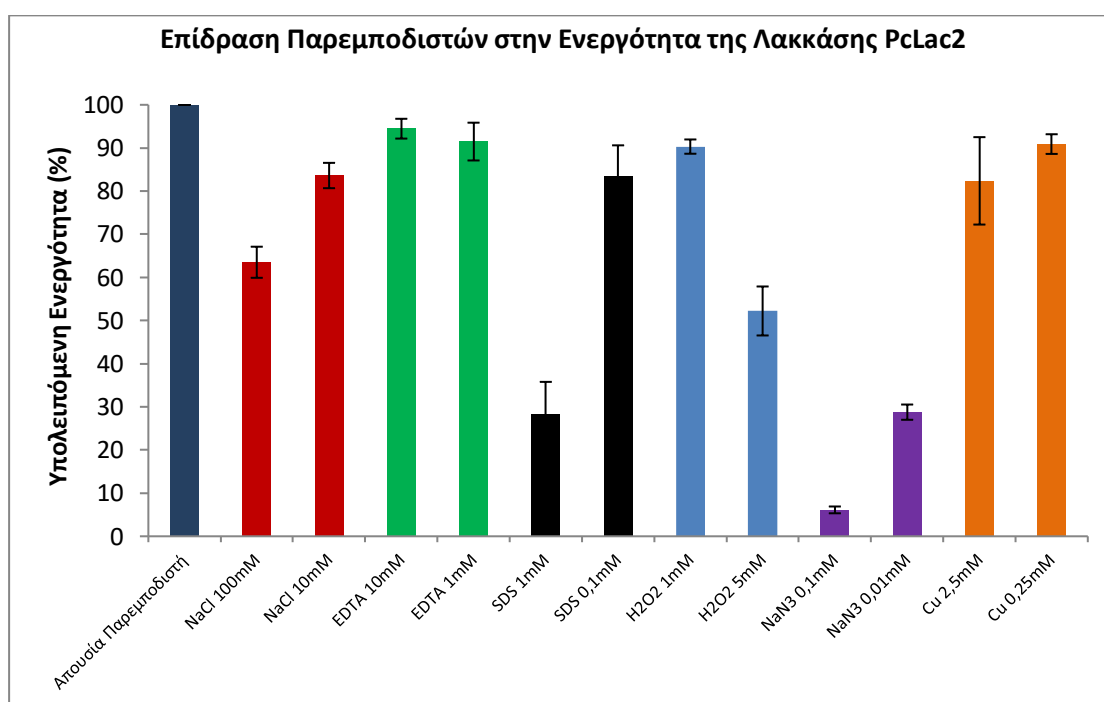
Η λακκάση *Pclac1* φαίνεται να είναι ασταθής με την παρουσία των υπό εξέταση διαλυτών. Το συμπέρασμα βασίζεται στο γεγονός ότι το ένζυμο διατηρεί μόνο ένα ποσοστό της τάξης του 50% της ενεργότητάς του για περιεκτικότητες 10% των διαλυτών αιθανόλη, μεθανόλη, DMSO και 1,4-διοξάνη. Μάλιστα η ακετόνη αλλά και περιεκτικότητες 50% των υπολοίπων διαλυτών οδηγούν σε απώλεια ενεργότητας της λακκάσης 90% και άνω. Στην περίπτωση της λακκάσης *Pclac2*, το ένζυμο παρουσιάζεται περισσότερο σταθερό παρουσία διαλυτών. Η παρουσία μεθανόλης και αιθανόλης σε περιεκτικότητα 10% στην αντίδραση δεν επηρεάζει τη δράση της, ενώ με αντίστοιχη περιεκτικότητα σε DMSO και ακετόνη το ένζυμο διατηρεί το 80% της ενεργότητάς του. Ωστόσο παρουσία των διαλυτών σε περιεκτικότητα 50% το ένζυμο έχει απώλεια τουλάχιστον του 50% της ενεργότητάς του.

3.1.7.2 Επίδραση Παρεμποδιστών

Στις ακόλουθες Εικόνες (3.1.7.2.1 και 3.1.7.2.2) παρουσιάζονται οι υπολογισμοί της υπολειπόμενης ενεργότητας για το κάθε ένζυμο σε αντιδράσεις υπό την επίδραση διαφορετικών διαλυτών.



Εικόνα 3.1.7.2.1 Επίδραση διαφορετικών παρεμποδιστών στην ενεργότητα της λακκάσης Pclac1. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται στην επεξεργασία τριπλών δειγμάτων.



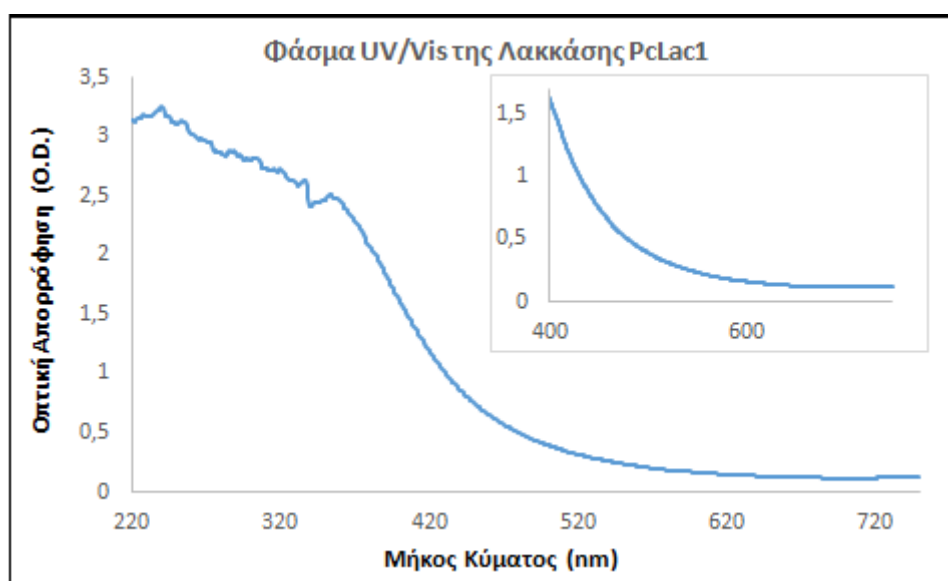
Εικόνα 3.1.7.2.2 Επίδραση διαφορετικών παρεμποδιστών στην ενεργότητα της λακκάσης Pclac2. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται στην επεξεργασία τριπλών δειγμάτων.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι οι δύο λακκάσες συμπεριφέρονται με διαφορετικό τρόπο, παρουσία των ίδιων παρεμποδιστικών παραγόντων. Η λακκάση Pclac1 για παράδειγμα, φαίνεται να ενεργοποιείται σε αντιδράσεις όπου συμπεριλαμβάνονται οι παράγοντες EDTA, H₂O₂ 1 mM και Cu, πετυχαίνοντας μάλιστα 1,3 φορές αύξηση της ενεργότητάς της για 0,25 mM Cu. Μικρή παρεμπόδιση της τάξης του 10% εντοπίζεται για παράγοντες όπως SDS 0,1

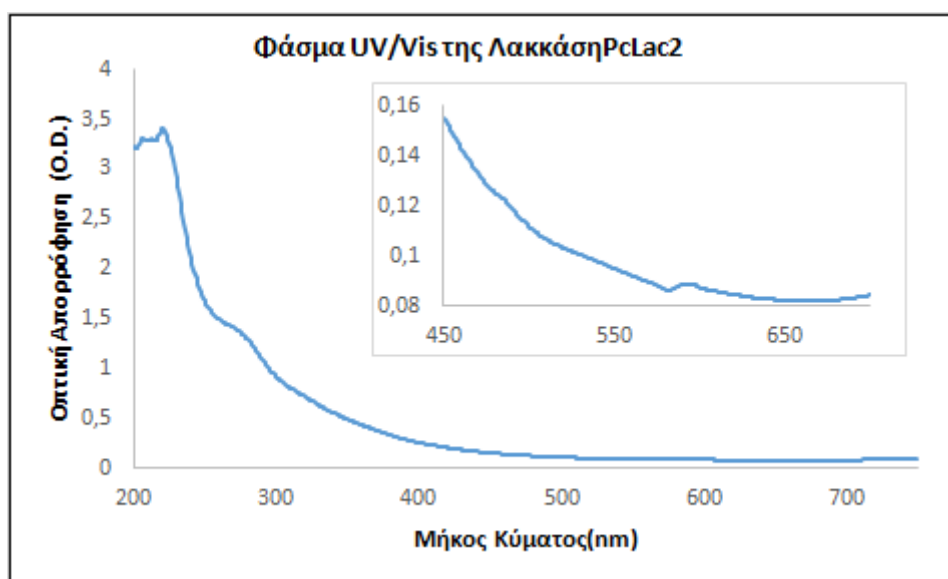
mM ή H_2O_2 5 mM ενώ η απώλεια της ενεργότητας αυξάνεται σε 40 και 60% παρουσία NaCl 10 mM και NaN_3 0,01 mM αντίστοιχα. Τέλος παρατηρείται ολοκληρωτική παρεμπόδιση της ενζυμικής δράσης για τις περιπτώσεις των NaCl 100 mM, SDS 1 mM και NaN_3 0,1 mM. Αντιθέτως, η λακκάση Pclac2 χάνει το 20% της ενεργότητάς της παρουσία των παραγόντων NaCl 10 mM, EDTA, SDS 0,1 mM, H_2O_2 1 mM και Cu. Πιο έντονη παρεμπόδιση της τάξεως του 40 με 50% παρατηρείται από τις ενώσεις NaCl 100 mM και H_2O_2 5 mM ενώ απώλεια ενεργότητας 70% και άνω παρατηρείται με την παρουσία SDS 1 mM και NaN_3 .

3.1.8 Φάσμα UV/Vis Καθαρών Λακκασών

Στις εικόνες 3.1.8.1 και 3.1.8.2 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis ορατής-υπεριώδους ακτινοβολίας, από τα 200 ως τα 750nm και για κάθε μία από τις δύο λακκάσες.



Εικόνα 3.1.8.1 Φάσμα απορρόφησης στην περιοχή ορατής-υπεριώδους ακτινοβολίας UV/Vis (220-750 nm) για την λακκάση Pclac1.



Εικόνα 3.1.8.2 Φάσμα απορρόφησης στην περιοχή ορατής-υπεριώδους ακτινοβολίας UV/Vis (220-750 nm) για την λακκάση Pclac2.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί κατά την περιγραφή του καταλυτικού κέντρου της λακκάσης, ο χαλκός της θέσης T1 παρουσιάζει χαρακτηριστική απορρόφηση γύρω στα 610 nm ενώ αντίστοιχα οι χαλκοί της θέσης T3 εμφανίζουν απορρόφηση κοντά στα 330 nm. Στην περίπτωση της λακκάσης *PcLac1* δεν παρατηρείται χαρακτηριστική απορρόφηση στα 610 nm ενώ στην περιοχή των 330 nm καταγράφεται μία μικρή κορυφή. Ως εκ τούτου η λακκάση *PcLac1* πιθανώς συγκαταλέγεται στις κίτρινες λακκάσες. Αντίστοιχα η λακκάση *PcLac2* εμφανίζει μια κορυφή μικρής έντασης γύρω στα 300 nm και στα 600. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η λακκάση *PcLac2* ανήκει στις μπλε λακκάσες.

3.1.9 Φαινόμενο Πρότυπο Οξειδοαναγωγικό Δυναμικό E_0

Τα πειράματα προσδιορισμού του προτύπου οξειδοαναγωγικού δυναμικού E_0 πραγματοποιήθηκαν από τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτριο Ζουράρη, στο Εργαστήριο Φυσικοχημείας και Εφαρμοσμένης Ηλεκτροχημείας του τομέα Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών της σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Η μέθοδος FTacV εφαρμόσθηκε και για τις δύο λακκάσες για μέγιστο πλάτος διαταραχής A 180 mV, με ρυθμό σάρωσης ν ίσο με 50 mV/s σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συχνότητας. Στον πίνακα 3.1.9.1 παρατίθενται τα ευρήματα για τις μέσες τιμές των προτύπων οξειδοαναγωγικών δυναμικών των ενζύμων *PcLac1* και *PcLac2*. Τα διαγράμματα βολταμογραφίας των έξι πρώτων αρμονικών συναρτήσεων των ενζύμων, στις διαφορετικές θερμοκρασίες, συμπεριλαμβάνονται στο παράρτημα Β.

Πίνακας 3.1.9.1 Φαινόμενα πρότυπα οξειδοαναγωγικά δυναμικά των λακκασών *PcLac1* και *PcLac2*.

<i>PcLac1</i>		
T (°C)	$E^{0'}_1$ (mV)	$E^{0'}_2$ (mV)
30	262,0±7,1	-152,9±21,8
35	257,6±10,3	-155,9±19,6
39	256,2±10,7	-158,1±20,1
43	267,3±23,0	-144,4±13,4
<i>PcLac2</i>		
T (°C)	$E^{0'}_1$ (mV)	$E^{0'}_2$ (mV)
33	198,6±17,8	-303,5±23,8
35	195,8±19,2	-303,4±5,2
38	196,6±13,6	-309,6±12,5
42	196,9±14,3	-306,9±10,9

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων, τόσο η λακκάση *PcLac1* όσο και η *PcLac2* παρουσιάζουν δύο πρότυπα οξειδοαναγωγικά δυναμικά. Στην περίπτωση της *PcLac1* οι οξειδοαναγωγικές κορυφές εμφανίζονται η μία περί τις 260 mV και η δεύτερη γύρω στα -150 mV. Αντίστοιχα για την *PcLac2* η πρώτη κορυφή προσδιορίζεται περίπου στα 200 ενώ η δεύτερη γύρω στα -300mV. Το θετικό φαινόμενο πρότυπο δυναμικό είναι εκείνο που εκφράζει την ικανότητα της λακκάσης να οξειδώνει τα αναγωγικά υποστρώματα, συνεπώς *PcLac1* έχει ελαφρώς υψηλότερο δυναμικό σε σχέση με την *PcLac2*, ωστόσο η διαφορά τους δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή.

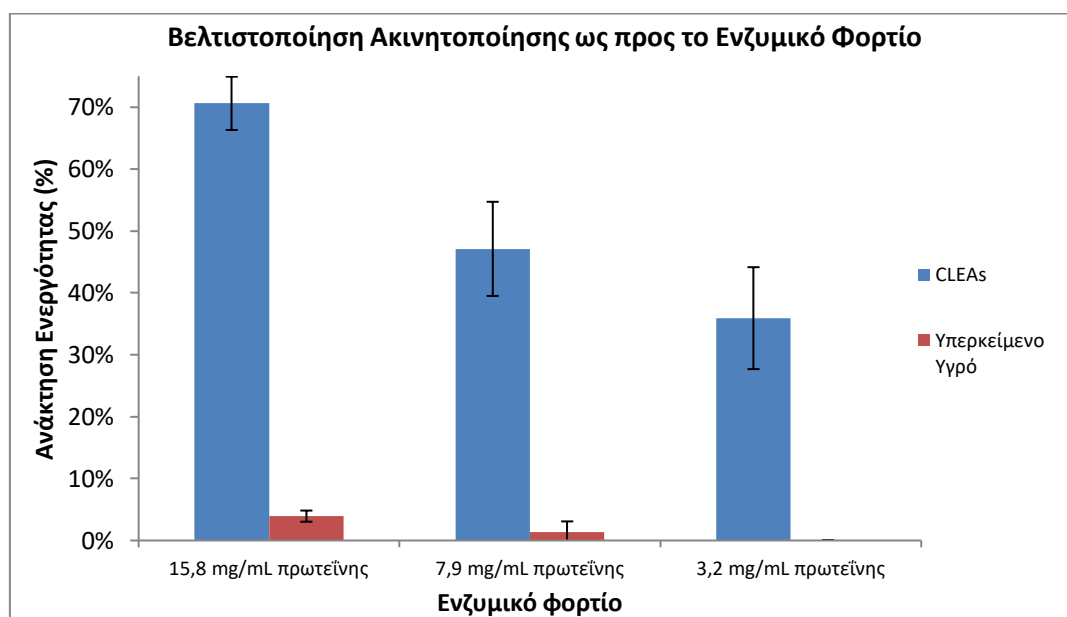
3.2 Ακίνητοποίηση Εξωκυτταρικού Ενζυμικού Παρασκευάσματος

3.2.1 Βελτιστοποίηση Συνθηκών Διαδικασίας Ακίνητοποίησης Ενζύμων σε CLEAs

Για την ακίνητοποίηση του ενζυμικού παρασκευάσματος της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σχηματισμού CLEAs υπό διαφορετικές συνθήκες ενζυμικού φορτίου, διαφορετικούς παράγοντες κατακρήμνισης και διαφορετικές συγκεντρώσεις γλουταραλδεΐδης. Για κάθε συνθήκη προσδιορίζεται η ενεργότητα του ενζύμου σε Units/mL (Παράγραφος 2.2.3.3) και εξετάζεται η ανάκτηση ενεργότητας με σκοπό τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών ακίνητοποίησης.

3.2.1.1 Βελτιστοποίηση ως προς το Ενζυμικό Φορτίο

Η μελέτη της βελτιστοποίησης της παραγωγής των CLEAs πραγματοποιήθηκε για συγκέντρωση γλουταραλδεΐδης 100 mM ενώ ως μέσο κατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε θειικό αμμώνιο. Για λόγους σύγκρισης μεταξύ των συνθηκών παρουσιάζονται ως αποτελέσματα για κάθε ενζυμικό φορτίο η επί τοις εκατό ενεργότητα που ανακτάται κατά την ακίνητοποίηση των ενζύμων και η ενεργότητα του υπερκείμενου του μίγματος κατόπιν της ακίνητοποίησης, προκειμένου να ελεγχθεί τυχόν διαφυγή του ενζύμου από τα CLEAs. Ως 100% ενεργότητα θεωρούμε την αρχική ενεργότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος.

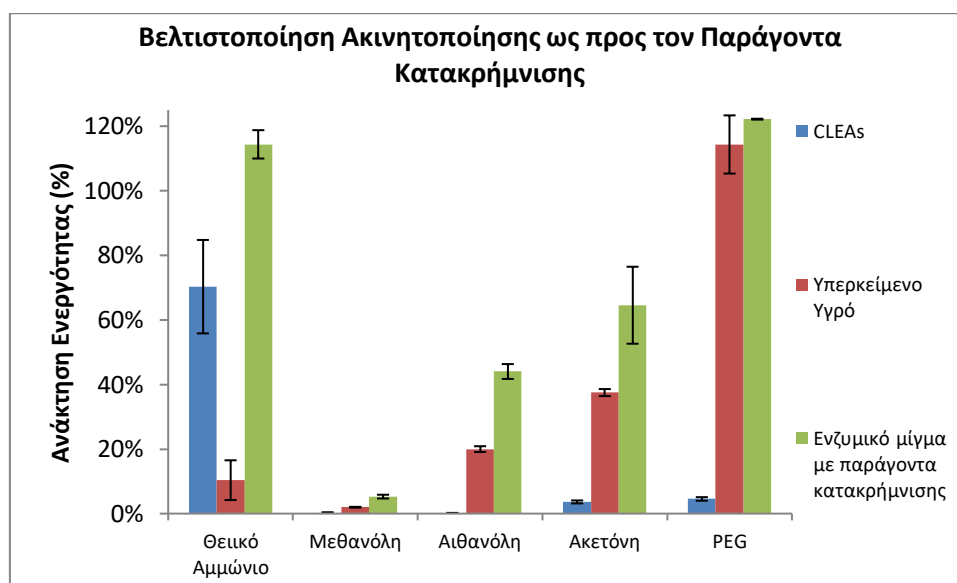


Εικόνα 3.2.1.1.1 Επίδραση ενζυμικού φορτίου στην ανάκτηση ενζυμικής ενεργότητας κατά την ακίνητοποίηση των ενζύμων σε CLEAs. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων προκύπτουν από επεξεργασία διπλών δειγμάτων και διπλών μετρήσεων ανά δείγμα.

Στο εύρος πρωτεϊνικής συγκέντρωσης που ελέγχεται, παρατηρείται αύξηση στην ανάκτηση ενεργότητας του ενζύμου αυξανόμενης της συγκέντρωσης. Χρησιμοποιώντας ενζυμικό παρασκεύασμα συγκέντρωσης 15,8 mg/mL πρωτεΐνης, η ενεργότητα ήταν μεγαλύτερη στα CLEAs, 67% έναντι 47% συγκριτικά με την πρωτεϊνική συγκέντρωση 7,9 mg/mL. Ωστόσο από τα 7,9 mg/mL στα 15,8 mg/mL παρατηρείται αύξηση της ενεργότητας στο υπερκείμενο της τάξεως του 5%. Παράλληλα, σε ακόμα χαμηλότερη συγκέντρωση (3,2 mg/mL) η ανάκτηση ενεργότητας είναι της τάξης του 35%, ενώ δεν παρατηρείται διαφυγή του ενζύμου στο υπερκείμενο.

3.2.1.2 Βελτιστοποίηση ως προς το Μέσο Κατακρήμνισης

Στο πείραμα μελέτης της επίδρασης του μέσου κατακρήμνισης στην ανάκτηση ενεργότητας χρησιμοποιήθηκαν γλουταραλδεΐδη 100 mM και ενζυμικό παρασκεύασμα συγκέντρωσης 15,8 mg/mL. Για λόγους σύγκρισης μεταξύ των συνθηκών παρουσιάζονται ως αποτελέσματα για κάθε παράγοντα κατακρήμνισης το ποσοστό ανάκτησης ενεργότητας τόσο για το ακινητοποιημένο ένζυμο όσο και για το υπερκείμενο του μίγματος κατόπιν της ακινητοποίησης, προκειμένου να ελεγχθεί τυχόν διαφυγή του ενζύμου από τα CLEAs. Παράλληλα παρατίθενται και υπολογισμοί ενεργότητας του ενζύμου μετά την επαναδιάλυσή του, χωρίς την προσθήκη γλουταραλδεΐδης, προκειμένου να εξετασθεί μεμονωμένα η επίδραση του παράγοντα κατακρήμνισης στην ενεργότητα των ενζύμων. Ως 100% ενεργότητα θεωρούμε την ενεργότητα του εξωκυτταρικού ενζυμικού παρασκευάσματος.



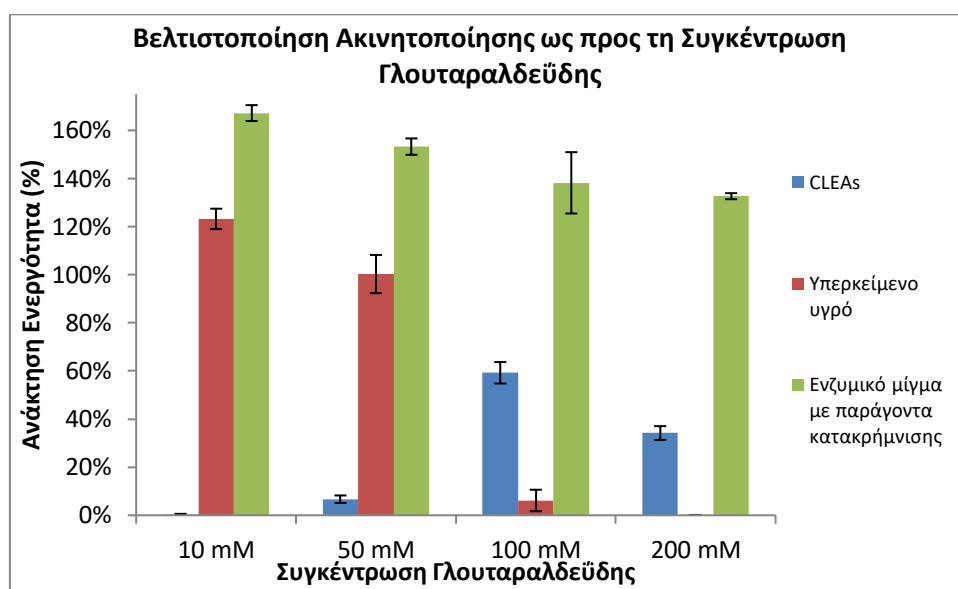
Εικόνα 3.2.1.2.1 Επίδραση του παράγοντα κατακρήμνισης στην απόδοση ανάκτησης ενζυμικής ενεργότητας κατά την ακινητοποίηση των ενζύμων σε CLEAs. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων προκύπτουν από επεξεργασία διπλών δειγμάτων και διπλών μετρήσεων ανά δείγμα.

Είναι εμφανές ότι μόνο το θειικό αμμώνιο ως παράγοντας κατακρήμνισης είναι σε θέση να επιφέρει ικανοποιητικά ποσοστά ανάκτησης ενεργότητας στα CLEAs (70%), με ταυτόχρονη μείωση της ενεργότητας στο υπερκείμενο (10%). Παράλληλα το θειικό αμμώνιο δεν επηρεάζει αυτή καθαυτή την ενεργότητα του εξωκυτταρικού ενζυμικού παρασκευάσματος, ανεξάρτητα από την ακινητοποίηση. Η χρήση μεθανόλης για τον ίδιο σκοπό δεν ενδείκνυται καθώς παρεμποδίζει τη δράση του ίδιου του ενζυμικού παρασκευάσματος, σε ποσοστό πάνω από 95%. Παρεμπόδιση της τάξεως του 50 % και 60% στην ενεργότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος παρατηρείται και στις περιπτώσεις της αιθανόλης και της ακετόνης αντίστοιχα. Τέλος για την περίπτωση του PEG γίνεται η παρατήρηση ότι ενώ ενεργοποιεί τα ένζυμα του παρασκευάσματος, αυξάνοντας την ενεργότητα κατά 1,2 φορές, δεν επιφέρει ικανοποιητική κατακρήμνιση ώστε τα ένζυμα να ακινητοποιηθούν σε CLEAs.

3.2.1.3 Βελτιστοποίηση ως προς τη Συγκέντρωση Γλουταραλδεΐδης

Για την μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης της γλουταραλδεΐδης στην απόδοση ανάκτησης ενεργότητας κατά την ακινητοποίηση σε CLEAs χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα 15,8 mg/mL πρωτεΐνης και θειικό αμμώνιο ως παράγοντας κατακρήμνισης.

Για λόγους σύγκρισης μεταξύ των συνθηκών παρουσιάζονται ως αποτελέσματα για κάθε συγκέντρωση γλουταραλδεΐδης το ποσοστό ανάκτησης ενεργότητας τόσο για το ακινητοποιημένο ένζυμο όσο και για το υπερκείμενο του παρασκευάσματος κατόπιν της ακινητοποίησης, προκειμένου να ελεγχθεί τυχόν διαφυγή του ενζύμου από τα CLEAs. Παράλληλα παρατίθενται και υπολογισμοί ενεργότητας του ενζύμου μετά την επαναδιάλυσή του, χωρίς την προσθήκη γλουταραλδεΐδης, προκειμένου να εξετασθεί μεμονωμένα η επίδραση του παράγοντα κατακρήμνισης στην ενεργότητα των ενζύμων. Ως 100% ενεργότητα θεωρούμε την ενεργότητα του εξωκυτταρικού ενζυμικού παρασκευάσματος.



Εικόνα 3.2.1.3.1 Επίδραση της συγκέντρωσης της γλουταραλδεΐδης στην απόδοση ανάκτησης ενζυμικής ενεργότητας κατά την ακινητοποίηση των ενζύμων σε CLEAs. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων προκύπτουν από επεξεργασία διπλών δειγμάτων και διπλών μετρήσεων ανά δείγμα.

Η συγκέντρωση γλουταραλδεΐδης 100 mM δίνει το υψηλότερο ποσοστό ανάκτησης ενεργότητας στο ακινητοποιημένο ένζυμο, της τάξης του 60% έναντι 0%, 7% και 34% για τις συγκεντρώσεις 10, 50 και 200 mM αντίστοιχα. Αυξάνοντας την συγκέντρωση της γλουταραλδεΐδης, μεγαλύτερη ποσότητα των ενζύμων του παρασκευάσματος εκτίθεται στον παράγοντα αυτόν συμμετέχοντας στον σχηματισμό σταυροδεσμών και άρα σχηματίζονται περισσότερα συσσωματώματα ακινητοποιημένου ενζύμου. Για τον λόγο αυτόν αυξάνεται η ανάκτηση ενεργότητας στα CLEAs. Ωστόσο σε συγκέντρωση 200 mM ο σχηματισμός σταυροδεσμών έχει περιορίσει σε τέτοιο βαθμό την κινητικότητα των ενζύμων ώστε να χάνεται μέρος της δραστηριότητας στα σχηματιζόμενα CLEAs. Παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλουταραλδεΐδης παρατηρείται αντίστοιχη μείωση στην ανάκτηση ενεργότητας στο υπερκείμενο υγρό, φτάνοντας σε ποσοστό 6% για συγκέντρωση 100 mM γλουταραλδεΐδης.

3.2.2 Παραγωγή CLEAs σε Μεγάλη Κλίμακα

Η ακινητοποίηση του εξωκυτταρικού ενζυμικού παρασκευάσματος πραγματοποιήθηκε με παράγοντα κατακρήμνισης το θειικό αμμώνιο, συγκέντρωση γλουταραλδεΐδης 100 mM και ενζυμικό φορτίο 15,8 mg/mL πρωτεΐνης. Η ανάκτηση ενεργότητας στα παραγόμενα CLEAs προσδιορίζεται στο εύρος 40-54% ενώ για τα αντίστοιχα δείγματα των υπερκείμενων υγρών, το ποσοστό ανάκτησης κυμαίνεται μεταξύ 15 και 20%. Όπως είναι αναμενόμενο η

ενεργότητα των CLEAs είναι μειωμένη σε σχέση με την παραγωγή μικρότερης κλίμακας. Η εν λόγω μείωση του ποσοστού ανάκτησης ενεργότητας αποδίδεται στην δυσκολία διαχείρισης του μεγαλύτερου όγκου ώστε να επέλθει ικανοποιητικός σχηματισμός σταυροδεσμών κατά την προσθήκη γλουταρελδεΐδης, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης. Επιπλέον κατά την απομόνωση των CLEAs με φυγοκέντριση σχηματίζονται μεγαλύτερα συσσωματώματα των ακινητοποιημένων ενζύμων, επιφέροντας πιο έντονα φαινόμενα διάχυσης κατά την πραγματοποίηση των αντιδράσεων και άρα χαμηλότερα ποσοστά ενεργότητας.

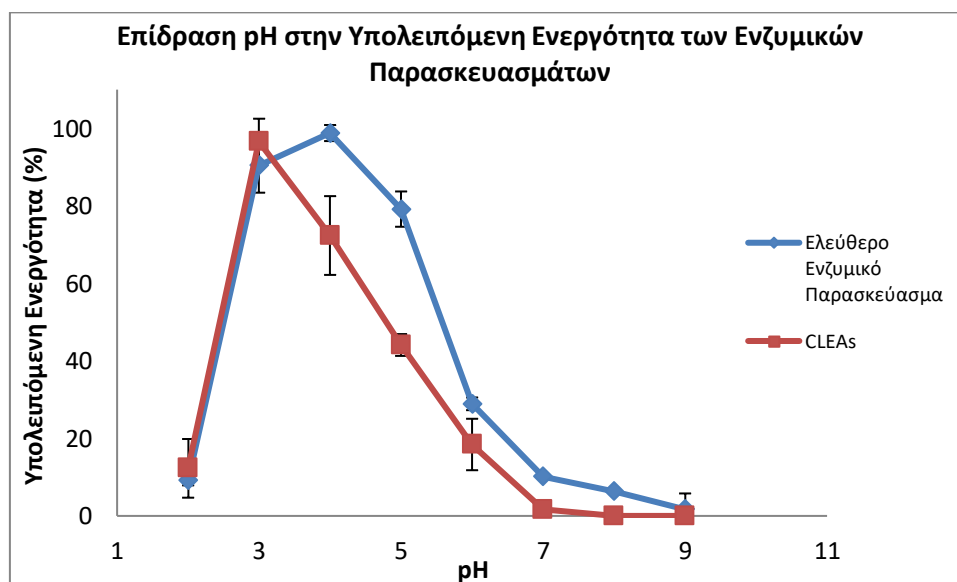
3.2.3 Βιοχημικός Χαρακτηρισμός Συμπυκνώματος Εξωκυτταρικού Ενζυμικού Παρασκευάσματος Καλλιέργειας και Ακινητοποιημένου Ενζυμικού Παρασκευάσματος

3.2.3.1 Βέλτιστες Συνθήκες Δράσης

Στα πειράματα προσδιορισμού των βέλτιστων συνθηκών δράσης προσδιορίζεται για κάθε συνθήκη η ενεργότητα των λακκασών σε Units/mL (Παράγραφος 2.2.3.3). Για κάθε ενζυμικό παρασκεύασμα εντοπίζεται η μέγιστη ενεργότητα μεταξύ των συνθηκών και βάσει αυτής προσδιορίζεται η επί τοις εκατό υπολειπόμενη ενεργότητα.

3.2.3.1.1 Βέλτιστη Τιμή pH Δράσης

Στην ακόλουθη εικόνα παρουσιάζονται οι υπολογισμοί υπολειπόμενης ενεργότητας σε διαφορετικά pH αντίδρασης, για την περίπτωση των CLEAs και του ελεύθερου ενζυμικού παρασκευάσματος.



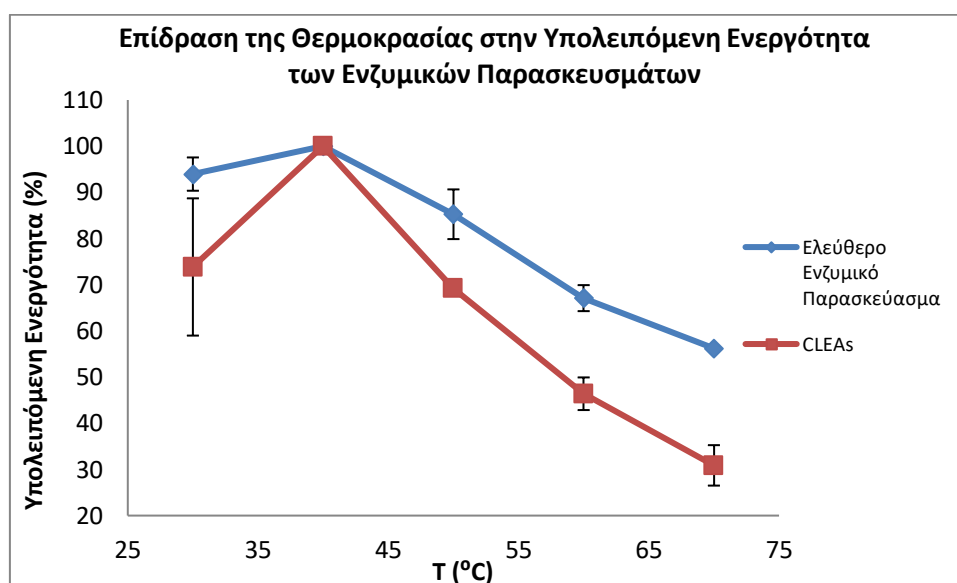
Εικόνα 3.2.3.1.1.1 Επίδραση του pH της αντίδρασης στην υπολειπόμενη ενεργότητα του ελεύθερου και του ακινητοποιημένου ενζυμικού παρασκευάσματος. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε επεξεργασία μετρήσεων τριπλών δειγμάτων.

Όπως φαίνεται από τους παρατιθέμενους υπολογισμούς το βέλτιστο pH δράσης για το ελεύθερο ενζυμικό παρασκεύασμα εντοπίζεται σε pH 4. Στο εύρος pH 3-5 το ενζυμικό παρασκεύασμα δρα με πάνω από το 80% της ενεργότητάς του, σε pH 6 έχει χάσει το 40% ενώ

για πιο όξινα pH (pH 2) αλλά και πιο βασικά (pH 7-9) η ενεργότητα είναι χαμηλότερη του 20%. Ωστόσο μετά την ακινητοποίηση των ενζύμων η βέλτιστη τιμή δράσης μετατοπίζεται σε περισσότερο όξινες συνθήκες (pH 3). Για ακόμη πιο όξινο pH (pH 2) η ενεργότητα μειώνεται απότομα στο 20% ενώ αυξάνοντας το pH πέρα από το pH 3 παρατηρούμε ομαλή μείωση της ενεργότητας στο 80% για pH 4, περίπου στο 40% για pH 5 φτάνοντας μηδενικά επίπεδα στο εύρος pH 7-9.

3.2.3.1.2 Βέλτιστη Θερμοκρασία Δράσης

Στην ακόλουθη εικόνα παρουσιάζονται οι υπολογισμοί υπολειπόμενης ενεργότητας σε διαφορετικές θερμοκρασίες αντίδρασης, για την περίπτωση των CLEAs και του ελεύθερου ενζυμικού παρασκευάσματος.



Εικόνα 3.2.3.1.2.1 Διαγραμματική αναπαράσταση μεταβολής της υπολειπόμενης ενεργότητας ως προς τη θερμοκρασία αντίδρασης του ελεύθερου και του ακινητοποιημένου ενζυμικού παρασκευάσματος. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις που υπολογίζονται βασίζονται σε επεξεργασία μετρήσεων διπλών δειγμάτων.

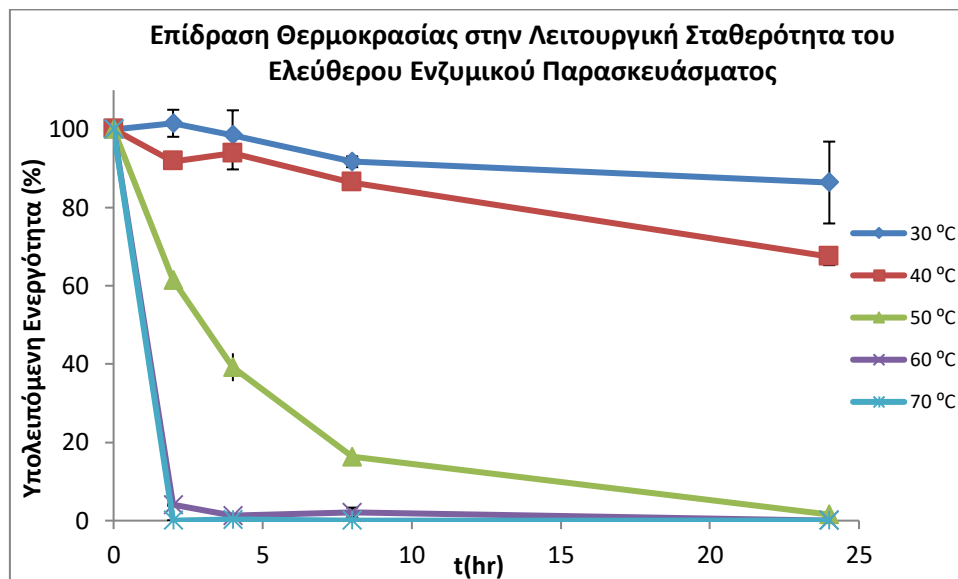
Όπως φαίνεται από τους παρατιθέμενους υπολογισμούς η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τόσο για το ελεύθερο ενζυμικό παρασκεύασμα όσο και για το ακινητοποιημένο ένζυμο εντοπίζεται στους 40°C. Στην περίπτωση του ελεύθερου ενζυμικού παρασκευάσματος πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι τα ένζυμα παρουσιάζουν πάνω από το 80% της ενεργότητάς τους στο εύρος 30-50°C. Ωστόσο η ενεργότητα μειώνεται στο 70% σε θερμοκρασία δράσης 60°C και στο 55% για θερμοκρασία 70°C. Η ακινητοποίηση ωστόσο δεν φαίνεται να βελτιώνει με κάποιο τρόπο την ενεργότητα των ενζύμων ως προς τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Στο εύρος 30-50°C τα CLEAs αξιοποιούν το 70% και άνω της ενεργότητας, στους 60°C η ενεργότητα έχει μειωθεί σε ποσοστό χαμηλότερο του 50% ενώ στους 70°C προσδιορίζεται μικρότερη του 30%.

3.2.3.2 Μελέτη Συνθηκών Λειτουργικής Σταθερότητας

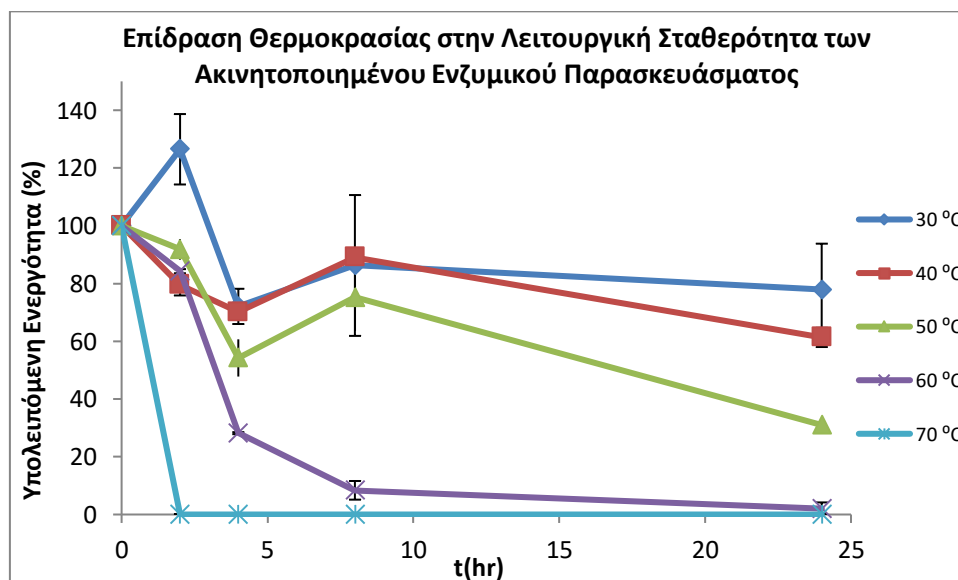
Στα πειράματα προσδιορισμού των συνθηκών λειτουργικής σταθερότητας προσδιορίζεται για κάθε συνθήκη και κάθε ένζυμο η ενεργότητα του ενζύμου σε Units/mL (Παράγραφος 2.2.3.3). Για κάθε ενζυμικό παρασκεύασμα εντοπίζεται η μέγιστη ενεργότητα μεταξύ των συνθηκών και βάσει αυτής προσδιορίζεται η επί τοις εκατό υπολειπόμενη ενεργότητα.

3.2.3.2.1 Μελέτη Θερμοκρασιακής Σταθερότητας

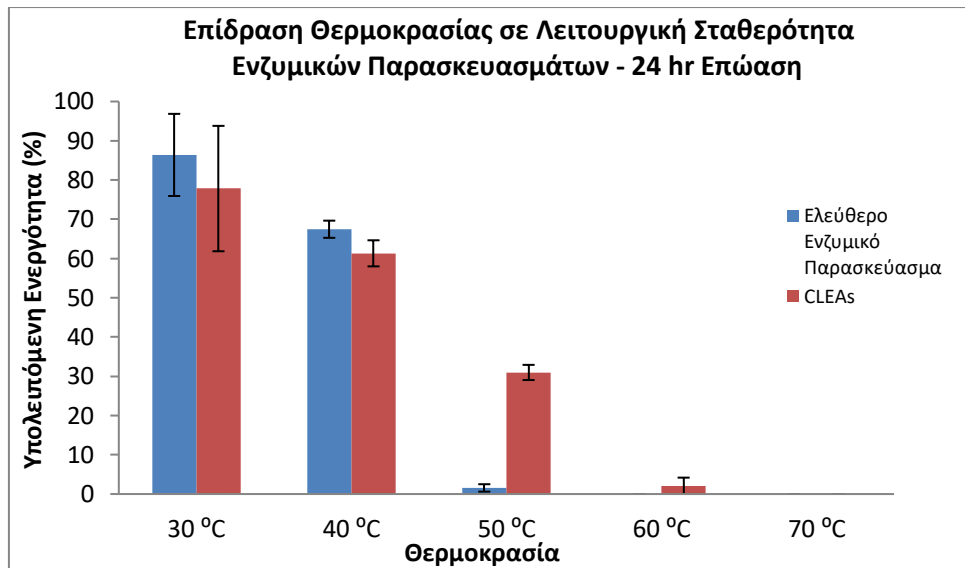
Στις ακόλουθες εικόνες (3.2.3.2.1.1 και 3.2.3.2.1.2) παρουσιάζονται οι υπολογισμοί υπολειπόμενης ενεργότητας για το κάθε ενζυμικό παρασκεύασμα για την κάθε συνθήκη. Στην Εικόνα 3.2.3.2.1.3 συνοψίζονται τα αποτελέσματα τόσο του ελεύθερου ενζυμικού παρασκευάσματος όσο και του ακινητοποιημένου, που αφορούν τις 24 h επώασης. Για λόγους σύγκρισης μεταξύ των υπολογισμών θεωρούμε ως 100% ενεργότητα την ενεργότητα που μετράται στον χρόνο 0.



Εικόνα 3.2.3.2.1.1 Επίδραση θερμοκρασίας στη λειτουργική σταθερότητα του ελεύθερου ενζυμικού παρασκευάσματος, κατόπιν επώασης σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε μετρήσεις διπλών δειγμάτων.



Εικόνα 3.2.3.2.1.2 Επίδραση θερμοκρασίας στη λειτουργική σταθερότητα των ακινητοποιημένων σε CLEAs ενζύμων, κατόπιν επώασης σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε μετρήσεις διπλών δειγμάτων.

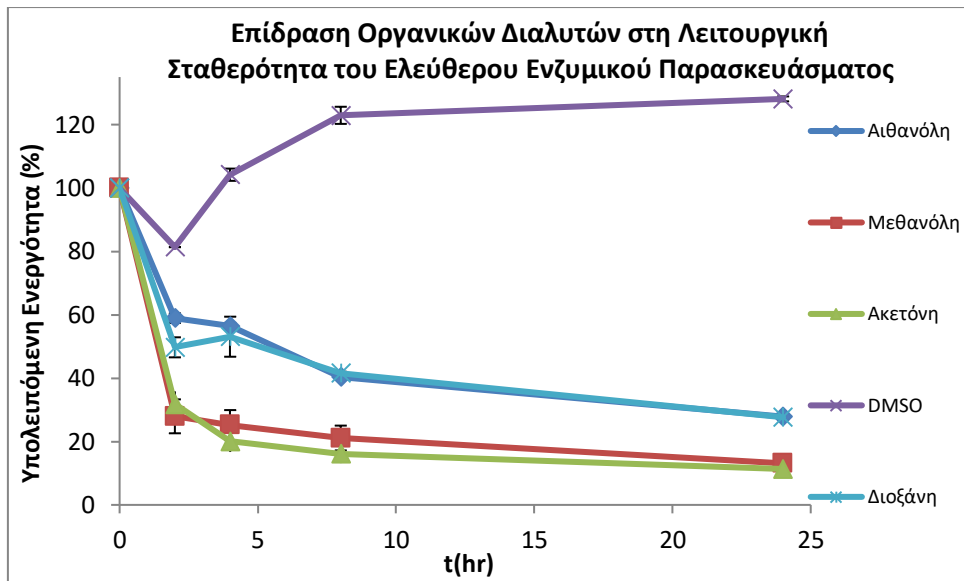


Εικόνα 3.2.3.2.1.3 Επίδραση θερμοκρασίας στη λειτουργική σταθερότητα του ελεύθερου ενζυμικού παρασκευάσματος και των ακινητοποιημένων σε CLEAs ενζύμων, κατόπιν επώασης σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας για 24 h. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων βασίζονται σε μετρήσεις διπλών δειγμάτων.

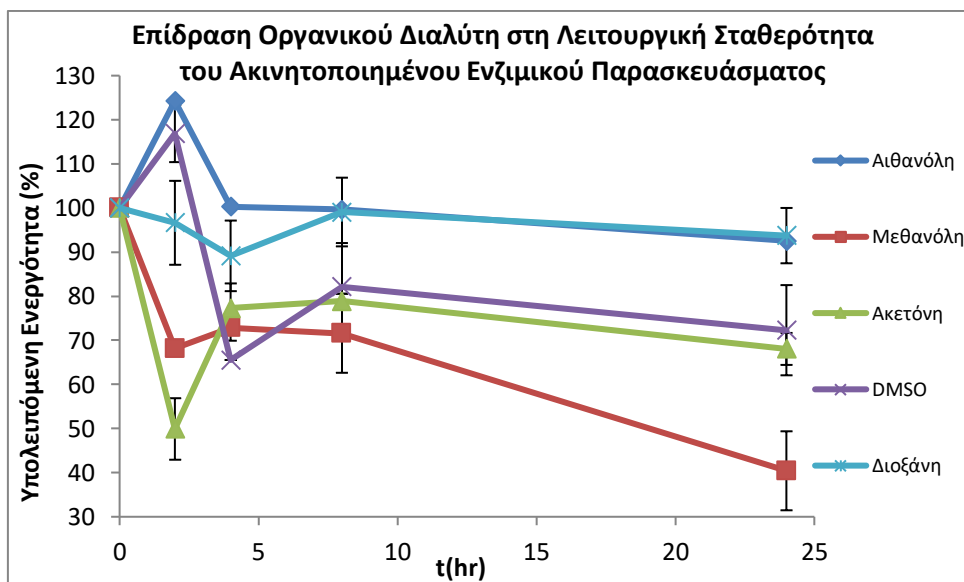
Τόσο το ελεύθερο ενζυμικό παρασκεύασμα όσο και τα CLEAs επιδεικνύουν καλύτερη θερμοκρασιακή σταθερότητα όταν επωάζονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Πιο αναλυτικά το ελεύθερο ενζυμικό παρασκεύασμα διατηρεί το 90% της ενεργότητάς του μετά από επώαση στους 30°C για 24 h, ενώ στους 40°C στον ίδιο χρόνο διατηρεί το 86%. Σε θερμοκρασία ωστόσο 50°C χάνεται το 40% της ενεργότητας μετά από χρόνο επώασης 2 h ενώ μειώνεται κάτω από 10% μετά από 1 h στους 60°C και 70°C. Στην περίπτωση ωστόσο που το ένζυμο έχει ακινητοποιηθεί σε CLEAs παρατηρούμε αυξημένη σταθερότητα σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Εν προκειμένω με επώαση 24 h στους 30°C τα CLEAs διατηρούν το 80% της ενεργότητάς τους ενώ αντίστοιχα στους 40°C η υπολειπόμενη ενεργότητα μειώνεται στο 60%, ποσοστά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα του ελεύθερου ενζυμικού παρασκευάσματος. Αξιοσημείωτα είναι τα αποτελέσματα για τις υψηλότερες θερμοκρασίες εφόσον μετά από επώαση στους 50°C για 8 h διατηρείται το 75% της ενεργότητας και αντίστοιχα το 80% μετά από 2 h επώασης στους 60°C, ενώ για τους 70°C το ποσοστό διατηρείται πάνω από 10% μετά από 1 h επώαση.

3.2.3.2.2 Μελέτη Σταθερότητας σε Οργανικούς Διαλύτες

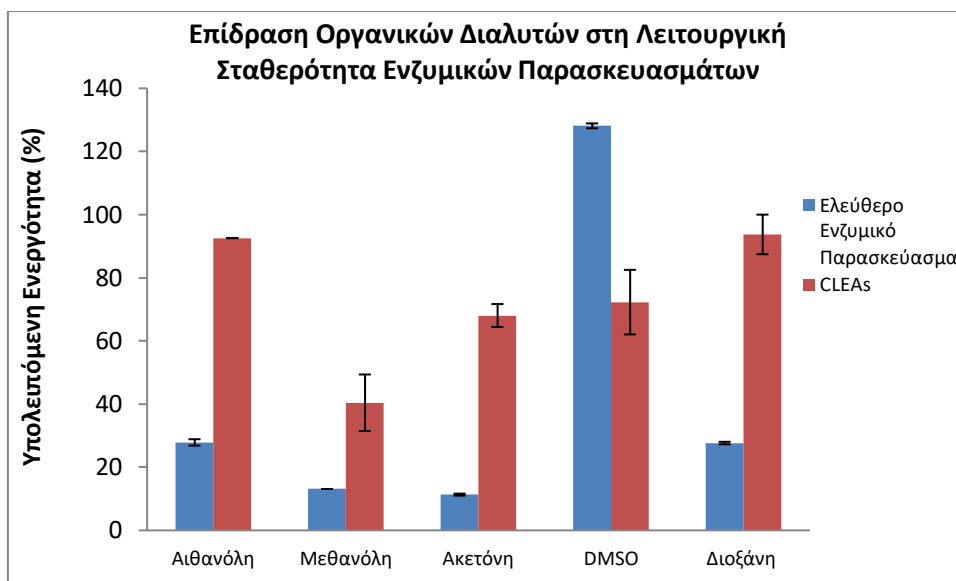
Στις ακόλουθες εικόνες (3.2.3.2.2.1 και 3.2.3.2.2.2) παρουσιάζονται οι υπολογισμοί υπολειπόμενης ενεργότητας για κάθε ενζυμικό παρασκεύασμα και για κάθε συνθήκη. Στην Εικόνα 3.2.3.2.2.3 συνοψίζονται τα αποτελέσματα τόσο του ελεύθερου ενζυμικού παρασκευάσματος όσο και του ακινητοποιημένου, που αφορούν τις 24 h επώασης. Για λόγους σύγκρισης μεταξύ των υπολογισμών θεωρούμε ως 100% ενεργότητα την ενεργότητα που μετράται στον χρόνο 0.



Εικόνα 3.2.3.2.2.1 Επίδραση διαφορετικών οργανικών διαλυτών στη λειτουργική σταθερότητα του ελεύθερου ενζυμικού παρασκευάσματος. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις που υπολογίζονται βασίζονται σε μετρήσεις διπλών δειγμάτων.



Εικόνα 3.2.3.2.2.2 Επίδραση διαφορετικών οργανικών διαλυτών στη λειτουργική σταθερότητα των ακίνητοποιημένων σε CLEAs ενζύμων. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις που υπολογίζονται βασίζονται σε μετρήσεις διπλών δειγμάτων.



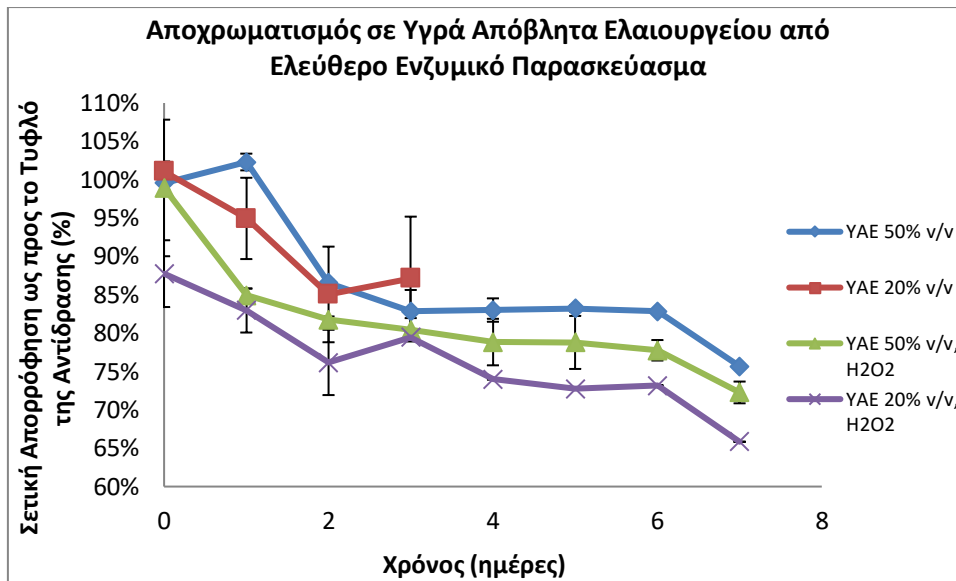
Εικόνα 3.2.3.2.2.3 Επίδραση οργανικών διαλυτών στη λειτουργική σταθερότητα του ελεύθερου ενζυμικού παρασκευάσματος και των ακινητοποιημένων σε CLEAs ενζύμων κατόπιν επώασης σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες για 24 h. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις που υπολογίζονται βασίζονται σε μετρήσεις διπλών δειγμάτων.

Κατά την μελέτη λειτουργικής σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες το ελεύθερο ενζυμικό παρασκεύασμα χάνει το 10% της ενεργότητάς του μετά από 24 h επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα της μέγιστης σταθερότητάς του. Με χρήση διαλύτη DMSO στις 24 h επώασης η ενεργότητα αυξάνεται περίπου κατά 1,3 φορές ενώ σε αντίθετη περίπτωση η επώαση σε αιθανόλη μειώνει την ενεργότητα κάτω από 60% ήδη για 2 h επώασης. Στον ίδιο χρόνο το αντίστοιχο ποσοστό είναι μικρότερο του 50% για τις περιπτώσεις της μεθανόλης, της ακετόνης και της 1,4-διοξάνης. Τα αποτελέσματα διαφέρουν αισθητά μετά την ακινητοποίηση των ενζύμων σε CLEAs. Συγκεκριμένα, το δείγμα αναφοράς διατηρεί την ενεργότητά του στο 100% στις 24 h ενώ αντίστοιχη είναι και η υπολειπόμενη ενεργότητα για 24ωρη επώαση σε αιθανόλη και 1,4-διοξάνη. Ωστόσο η ενεργότητα διατηρείται σε υψηλά επίπεδα και στις περιπτώσεις των υπολοίπων διαλυτών, φτάνοντας το 80% για 24 h σε DMSO, 70% για 24 h σε ακετόνη αλλά και 70% για 2 h σε μεθανόλη. Συνεπώς γίνεται εμφανές ότι η ακινητοποίηση των ενζύμων συμβάλλει δραστικά στην διατήρηση της ενζυμικής ενεργότητας των CLEAs έναντι των οργανικών διαλυτών.

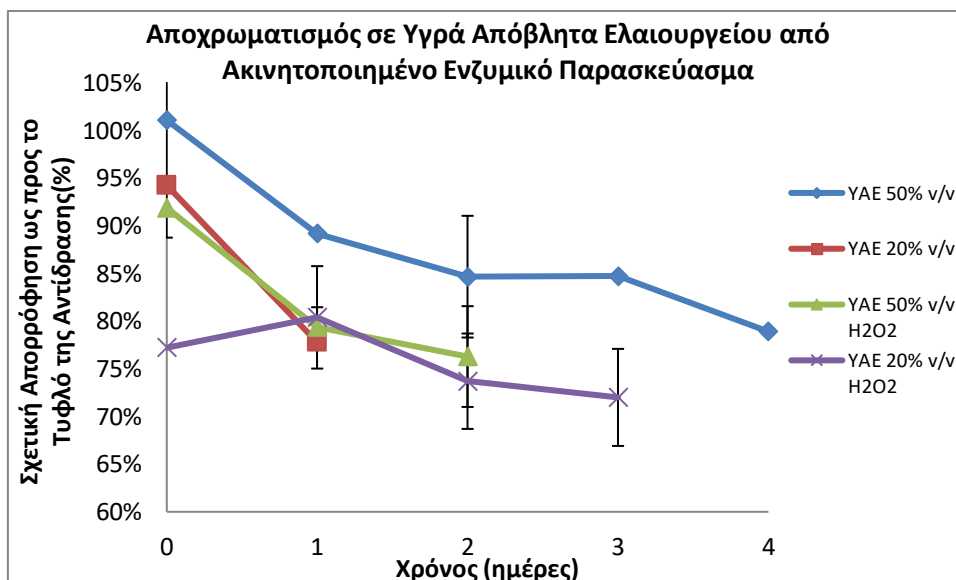
3.3 Χρήση Ενζυμικών Παρασκευασμάτων σε Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές

3.3.1 Χρήση Ελεύθερου και Ακινητοποιημένου Ενζυμικού Συμπυκνώματος Crude και Ακινητοποιημένου Ενζύμου για Αποτοξικοποίηση Υγρών Αποβλήτων Τριφασικού Ελαιουργείου

Κατά την πρώτη φάση του πειράματος λαμβάνονταν οι απορροφήσεις στα 525 nm με στόχο να εξεταστεί ο αποχρωματισμός των ΥΑΕ. Στις ακόλουθες εικόνες (3.3.1.1 και 3.3.1.2) παρουσιάζονται οι υπολογισμοί για τη σχετική απορρόφηση κάθε συνθήκης σε σχέση με το αντίστοιχο τυφλό, κατά τη διάρκεια 7 ημερών του πειράματος. Η μεταβολή της σχετικής απορρόφησης στο χρονικό διάστημα των 7 ημερών εκφράζει τον αποχρωματισμό των ΥΑΕ.



Εικόνα 3.3.1.1 Αποχρωματισμός υγρών αποβλήτων ελαιουργείου σε περιεκτικότητα 50% και 20% v/v, παρουσία και μη υπεροξειδίου, από το εξωκυτταρικό ενζυμικό παρασκεύασμα. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις βασίζονται σε επεξεργασία τετραπλών μετρήσεων.

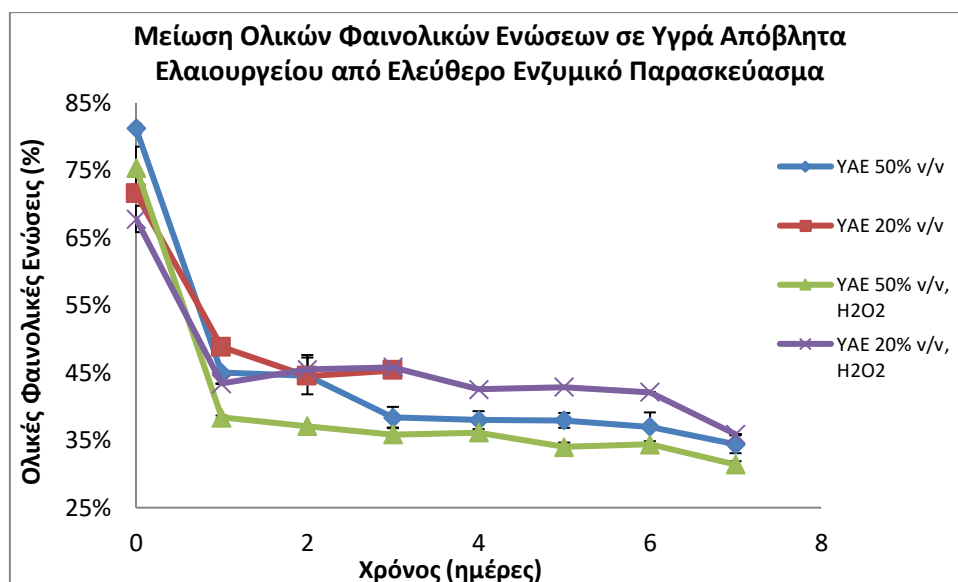


Εικόνα 3.3.1.2 Αποχρωματισμός υγρών αποβλήτων ελαιουργείου σε περιεκτικότητα 50% και 20% v/v, παρουσία και μη υπεροξειδίου, από τα ακινητοποιημένα σε CLEAs ένζυμα. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις βασίζονται σε επεξεργασία τετραπλών μετρήσεων.

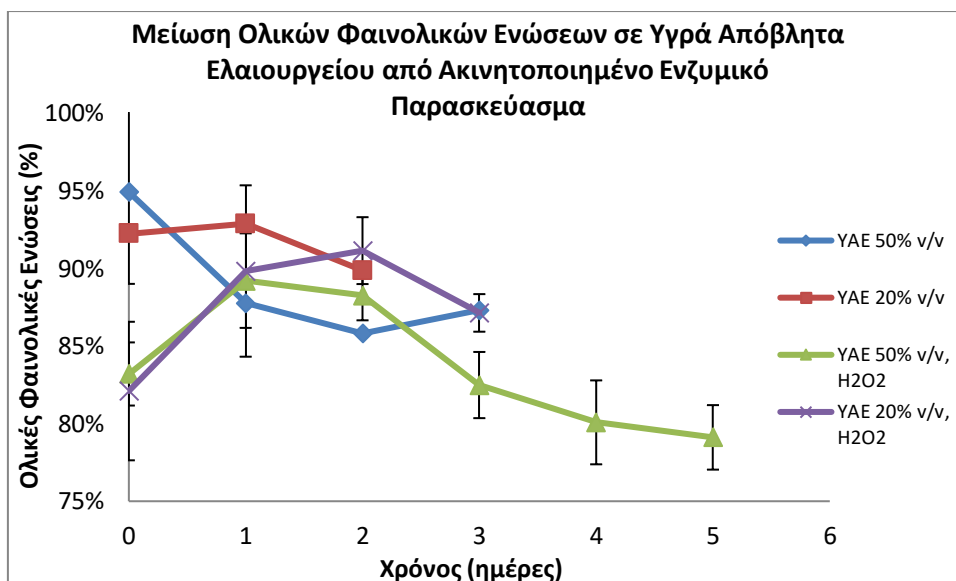
Στα δείγματα του ελεύθερου ενζυμικού παρασκευάσματος η παρουσία υπεροξειδίου παρουσιάζει μικρή συνεισφορά στον αποχρωματισμό του κασίγαρου, αυξάνοντας τον συνολικό αποχρωματισμό κατά 10%. Τα καλύτερα αποτελέσματα αποχρωματισμού σημειώνονται για υγρά απόβλητα ελαιουργείου αραιώσεως 20%(v/v), παρουσία υπεροξειδίου για το ελεύθερο ενζυμικό παρασκεύασμα με σχετική απορρόφηση στο 65% της αρχικής. Στα δείγματα αραιώσεως 50%(v/v) υγρών αποβλήτων ελαιουργείου μετρώνται μικρότερα ποσοστά αποχρωματισμού συγκριτικά με την αραιώση 20%(v/v), με τη διαφορά να κυμαίνεται στο εύρος 5-10%. Τα CLEAs επιφέρουν μεν αποχρωματισμό αλλά σε μικρότερα ποσοστά από ότι το ελεύθερο ένζυμο, με το συνολικό ποσοστό απορρόφησης να διατηρείται πάνω από 70%. Μάλιστα σε αραιώση 50%(v/v) του YAE ο αποχρωματισμός γίνεται

περισσότερο αισθητός παρουσία υπεροξειδίου, οπότε λαμβάνουμε απορρόφηση μικρότερη από 80%, έναντι 85% στην περίπτωση απουσίας υπεροξειδίου (2 ημέρες). Ωστόσο παρατηρείται ότι παρά τον αρχικό αποχρωματισμό οι απορροφήσεις από μια χρονική στιγμή και έπειτα σημειώναν αύξηση, σε κάθε συνθήκη. Το γεγονός αποδίδεται πιθανώς στον σχηματισμό κινόνων από τις ελεύθερες ρίζες των οξειδώσεων, οι οποίες αυξάνουν τα ποσοστά οπτικής απορρόφησης στα υπό μέτρηση δείγματα. Σημειώνεται ότι σε 5 από τις αντιδράσεις αποχρωματισμού παρουσιάστηκε επιμόλυνση από μύκητα καθιστώντας αδύνατη τη λήψη δείγματος.

Σε επόμενη φάση του πειράματος προσδιορίστηκε η ολική μείωση των φαινολικών του κασιόγαρου, ως προς γαλλικό οξύ, βάσεις της Παραγράφου 2.2.6.1.2.2. Στις ακόλουθες Εικόνες (3.6.1.3 και 3.6.1.4) παρουσιάζονται οι υπολογισμοί των ολικών φαινολικών εκφρασμένων ως προς γαλλικό οξύ, για τις 7 μέρες διεξαγωγής του πειράματος. Το ποσοστό των φαινολικών προκύπτει ως ο επί τοις εκατό λόγος της συγκέντρωσης των φαινολικών εκάστου δείγματος προς τη συγκέντρωση του αντίστοιχου τυφλού.



Εικόνα 3.3.1.3 Μείωση συνολικών φαινολικών, εκφρασμένων ως προς γαλλικό οξύ, σε υγρά απόβλητα ελαιουργείου σε περιεκτικότητα 50% και 20% v/v, παρουσία και μη υπεροξειδίου, από το εξωκυτταρικό ενζυμικό παρασκεύασμα. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις βασίζονται σε επεξεργασία τετραπλών μετρήσεων.



Εικόνα 3.3.1.4 Μείωση συνολικών φαινολικών, εκφρασμένων ως προς γαλλικό οξύ, σε υγρά απόβλητα ελαιουργείου σε περιεκτικότητα 50% και 20% v/v, παρουσία και μη υπεροξειδίου, από τα ακίνητοποιημένα σε CLEAs ένζυμα. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις βασίζονται σε επεξεργασία τετραπλών μετρήσεων.

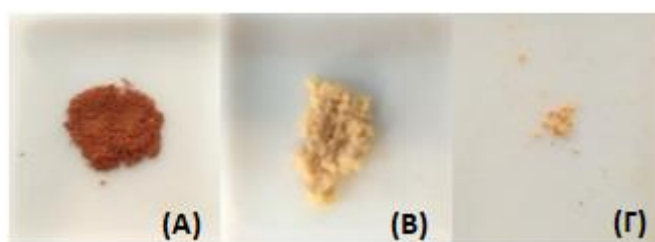
Το ελεύθερο ενζυμικό παρασκεύασμα φαίνεται να συμβάλλει ικανοποιητικά στην μείωση των ολικών φαινολικών, επιτυγχάνοντας τελικό ποσοστό της τάξεως του 35%, ανεξαρτήτως αραίωσης του υγρού αποβλήτου ή της παρουσίας υπεροξειδίου. Ωστόσο η δράση των ενζύμων φαίνεται να διακόπτεται ήδη μετά την τρίτη μέρα λόγω απενεργοποίησης αυτών, παρατήρηση η οποία συνάδει με τα αποτελέσματα των πειραμάτων λειτουργικής σταθερότητας σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Ωστόσο τα CLEAs δεν δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς τη μείωση των ολικών φαινολικών. Ακόμη και στην περίπτωση χρήσης υπεροξειδίου, η μείωση δεν ξεπερνά το 15 με 20%. Το γεγονός ότι η παρουσία υπεροξειδίου δεν συμβάλλει δραστικά ούτε στη μείωση των φαινολικών ούτε στον αποχρωματισμό, υποδεικνύει ότι στο εξωκυτταρικό παρασκεύασμα δεν υπήρχε σημαντικό ποσοστό υπεροξειδαδών, οι οποίες να ενεργοποιούνται με το υπεροξείδιο.

Συμπερασματικά, το εξωκυτταρικό ενζυμικό παρασκεύασμα παρουσιάζει ικανοποιητική δράση τόσο κατά των αποχρωματισμό, όσο και την μείωση των ολικών φαινολικών του παρασκευάσματος. Ωστόσο οι συγκεκριμένες μετρήσεις δεν είναι ενθαρρυντικές προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η αξιοποίηση των ακίνητοποιημένων ενζύμων σε CLEAs για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργείου. Οι τροποποιήσεις που απαιτούνται ώστε να κινηθούμε προς την κατεύθυνση αυτή αφορούν αφενός στη διαδικασία παρασκευής των CLEAs, ώστε να μεταβάλουμε τις λειτουργικές τους ιδιότητες, αφετέρου στις συνθήκες της αντίδρασης, με στόχο τη βελτιστοποίηση της δράσης τους.

3.3.2 Χρήση Απομονωμένων Ενζύμων σε Αντιδράσεις Σύνθεσης

Στα πλαίσια των δοκιμών για εφαρμογές σε αντιδράσεις σύνθεσης χρησιμοποιήθηκαν τα απομονωμένα ένζυμα *PcLac1* και *PcLac2*. Τα μονομερή των συνθέσεων που εξετάστηκαν ήταν η κατεχόλη, το γαλλικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το σιναπικό οξύ και το καφεϊκό οξύ. Από αυτά, το καφεϊκό οξύ δεν έδωσε αδιάλυτο στερεό ίζημα στον όγκο της αντίδρασης. Η κατεχόλη και το γαλλικό οξύ, ενώ σχημάτισαν αδιάλυτα πολυμερή, η ποσότητα αυτών δεν ήταν μετρήσιμη.

Μετά το πέρας των αντιδράσεων σύνθεσης από τα μονομερή φερουλικό και σιναπικό οξύ, το στερεό προϊόν απομονώθηκε, καθαρίστηκε και ξηράνθηκε κι έπειτα ελήφθησαν οι αντίστοιχες ζυγίσεις. Τα στερεά προϊόντα που προέκυψαν φαίνονται στην παρακάτω Εικόνα.



Εικόνα 3.3.2.1 Στερεά προϊόντα των αντιδράσεων πολυμερισμού με τις λακκάσες *PcLac1* και *PcLac2*. (A): Προϊόν οξείδωσης του σιναπικού οξέος με την *PcLac2*, (B): προϊόν οξείδωσης του σιναπικού οξέος με την *PcLac1*, (Γ): προϊόν οξείδωσης του φερουλικού οξέος με την *PcLac1*

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι ενώσεις των προϊόντων σύνθεσης τα δείγματα αναλύθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Η μέθοδος προσδιορίζει τον αριθμό των ατόμων και το είδος των δεσμών που τα συνδέει, χρησιμοποιώντας ακτινοβολία ραδιοσυχνότητας ώστε να προκληθούν μεταβάσεις μεταξύ των ενεργειακών καταστάσεων του πυρήνα των ατόμων. Τα πειράματα της φασματοσκοπίας NMR πραγματοποιήθηκαν από την υποψήφια διδάκτορα Ιωάννα Κωστοπούλου, υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας Αναστασίας Δέτση, στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τομέα Χημικών Επιστημών της σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ. Τα διαγράμματα τις φασματοσκοπίας NMR παρατίθενται στο Παράρτημα Γ.

Στον επόμενο Πίνακα (3.3.2.1) παρουσιάζονται οι συνολική μάζα των προϊόντων και οι υπολογισμοί των λόγων (i) της μάζας του ενζύμου προς τον όγκο της αντίδρασης, (ii) την μάζα του προϊόντος προς την ενεργότητα του ενζύμου σε Units και (iii) τη μάζα του προϊόντος προς τη μάζα του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος (απόδοση αντίδρασης).

Πίνακας 3.3.2.1 Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων και δεικτών αποτελεσματικότητας αναφορικά με τις αντιδράσεις σύνθεσης των λακκάσων *PcLac2* και *PcLac1* σε φαινολικά υποστρώματα.

Λακκάση Υπόστρωμα	<i>PcLac1</i> Σιναπικό οξύ	<i>PcLac1</i> Φερουλικό οξύ	<i>PcLac2</i> Σιναπικό οξύ
$m_{\text{προϊόντος}}$ (mg)	9,0	1,7	20,3
$m_{\text{προϊόντος}}/V_{\text{αντίδρασης}}$ (mg/mL)	0,11%	0,02%	0,25%
$m_{\text{προϊόντος}}/ \text{Ενζυμική ενεργότητα αντίδρασης}$ (mg/Unit)	0,73%	0,14%	1,40%
$m_{\text{προϊόντος}}/m_{\text{υποστρώματος}}$ (mg/mg)	36,0%	6,8%	81,2%

Παρατηρούμε ότι το σιναπικό οξύ δίνει υψηλότερα ποσοστά μάζας προϊόντος προς μάζα υποστρώματος συγκριτικά με το φερουλικό οξύ. Μάλιστα στην περίπτωση της λακκάσης *PcLac2* φτάνει σε ποσοστό 81,2%. Το κάθε ένζυμο φαίνεται να οξειδώνει με διαφορετικό τρόπο τα υποστρώματα, οδηγώντας σε διαφορετικά προϊόντα οξείδωσης, παρά το γεγονός ότι και τα δύο ένζυμα έχουν ενεργότητα λακκάσης. Το συμπέρασμα προκύπτει από το διαφορετικό χρώμα που έχουν τα προϊόντα οξείδωσης, εν προκειμένω υποκίτρινο για την λακκάση *PcLac1* και καφέ-κόκκινο για την λακκάση *PcLac2*. Τα αδιάλυτα πολυμερή που

σχηματίστηκαν σε κάθε περίπτωση συνιστούν ένα μίγμα ολιγομερών, όπως προκύπτει από διαδοχικούς πολυμερισμούς των φαινολικών ριζών που σχηματίζονται από τη δράση των λακκασών. Ως εκ τούτου τα φάσματα NMR που ελήφθησαν ήταν αρκετά πολύπλοκα με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ταυτοποίηση των ενώσεων των πολυμερών.

4 Συζήτηση Αποτελεσμάτων – Γενικά Συμπεράσματα

Τις τελευταίες δεκαετίες η επιστημονική έρευνα στρέφεται ολοένα και περισσότερο προς την ανακάλυψη καινοτόμων μεθόδων στο πλαίσιο της περιβαλλοντικής μηχανικής και στην ανάπτυξη οικολογικών βιομηχανικών διεργασιών. Οι προσπάθειες στοχεύουν στην ανάπτυξη σύγχρονων βιοδιυλιστηρίων, τα οποία θα κατεργάζονται λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα για παραγωγή βιοκαυσίμων νέας γενιάς, καθώς και εμπορικών χημικών ενώσεων (Roth & Spiess, 2015). Βιολογικοί παράγοντες, όπως μικροοργανισμοί και βιοκαταλύτες, αποτελούν τα βασικά εργαλεία για το σκοπό αυτό, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Σε αυτό το πλαίσιο, η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματεύεται τη μελέτη του λιγνινολυτικού ενζυμικού συστήματος σε επιλεγμένα στελέχη Βασιδιομυκήτων και την αξιοποίησή του σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Η βιοαποικοδόμηση της λιγνίνης είναι μια σημαντική εφαρμογή των ενζύμων αυτών. Η λιγνίνη αποτελεί ένα από τα πιο συνήθη βιοπολυμερή και παρουσιάζει μεγάλη δυσκολία ως προς την βιοαποικοδόμηση και την αξιοποίησή της σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Παράλληλα αποτελεί βιομηχανικό παραπροϊόν, όπως στην περίπτωση της βιομηχανίας χάρτου, ενώ είναι και βασικό συστατικό ανεπεξέργαστων αγροτικών και αστικών υπολειμμάτων, με τις παραγόμενες ποσότητες του πολυμερούς αυτού να σημειώνουν αύξηση. Ενώ η κύρια τακτική αξιοποίησής της είναι η χρήση της ως καύσιμη ύλη, με σκοπό την ανάκτηση του ενεργειακού περιεχομένου της, η λιγνίνη πλέον αντιμετωπίζεται ως ανανεώσιμη πρώτη ύλη σε διεργασίες βιοδιύλισης, με στόχο να αντικαταστήσει τη βιομάζα που αξιοποιείται και στον τομέα των τροφίμων (Brebū & Vasile, 2010, Roth & Spiess, 2015).

Οι Βασιδιομύκητες λευκής σήψης έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν αποδοτικά τη λιγνίνη και να τροποποιούν ένα μεγάλο εύρος από φαινολικούς και αρωματικούς ρύπους. Οι μύκητες αυτοί είναι ευρέως διαδεδομένοι και παρουσιάζουν τη δυνατότητα οικονομικής παραγωγής σε ήπιες συνθήκες καλλιέργειας, ενώ τα ένζυμα και οι μεταβολίτες τους παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές (More et al., 2011). Οι Βασιδιομύκητες του γένους *Pleurotus* εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία και διάφορες ιδιότητες, προσελκύοντας το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Επιπλέον, οι μύκητες αυτοί οξειδώνουν ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων και έχουν τη δυνατότητα να καλλιεργούνται εύκολα, ακόμα και σε ύλη από παραπροϊόντα άλλων βιομηχανικών διεργασιών. Εμπόδια στην περαιτέρω εμπορική εφαρμογή των μυκήτων αυτών αποτελούν η δυσκολία ετερόλογης έκφρασης γονιδίων από τα είδη αυτά, για την παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων σε μεγάλες ποσότητες (Cohen et al., 2002), καθώς και η περιορισμένη επιδεκτικότητα σε γενετικές τροποποιήσεις, για τον σχεδιασμό στελεχών με νέες επιθυμητές ιδιότητες (Rosnina et al., 2016).

Τα λιγνινολυτικά ένζυμα διαθέτουν ελκυστικά φυσικοχημικά και καταλυτικά χαρακτηριστικά για εφαρμογή σε βιώσιμες τεχνολογίες, ενώ προέρχονται από ανανεώσιμη ύλη, είναι αποικοδομήσιμα και καταλύουν ένα μεγάλο εύρος διεργασιών σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης. Παράλληλα η βιοκατάλυση πλεονεκτεί ως προς τη χημειο-, την τοπο- και την στερεο-εκλεκτικότητα των ενζυμικών δράσεων, ενώ οι διεργασίες βιοκατάλυσης χαρακτηρίζονται από μειωμένες ενεργειακές απαιτήσεις και μειωμένο όγκο αποβλήτων. Οι λακκάσες εν προκειμένω κεντρίζουν το ενδιαφέρον λόγω της ικανότητάς τους να τροποποιούν τη λιγνίνη αλλά και πλήθος άλλων ρύπων και υποστρωμάτων με

βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον (Sheldon, 2011, Arsenault, 2011). Στην ουσία, τα ένζυμα αυτά αποτελούν ένα σημαντικό, εν δυνάμει, εργαλείο για την επίτευξη «πράσινων διεργασιών» στην βιοτεχνολογική βιομηχανία.

4.1 Χαρακτηρισμός Λακκάσων *PcLac1* και *PcLac2*

Οι λακκάσες *PcLac1* και *PcLac2*, με μοριακά βάρη 40 και 80 kDa και φαινόμενα πρότυπα οξειδοαναγωγικά δυναμικά 250 και 200 mV αντίστοιχα, παρουσιάζουν χαρακτηριστικές απορροφήσεις γύρω στα 330 nm, με την *PcLac1* να απορροφά και στα 610 nm. Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα το μοριακό βάρος της *PcLac1* είναι μικρότερο από το τυπικό μέγεθος για τις λακκάσες (60-80kDa), ωστόσο αναφέρονται και άλλες περιπτώσεις λακκάσων με χαμηλότερο μοριακό βάρος, όπως η λακκάση του *Pleurotus pulmonarius* Lcc2 (46 kDa) και η λακκάση του *Tricholoma giganteum* (43 kDa) (Baldrian, 2006). Τα πρότυπα οξειδοαναγωγικά δυναμικά που μετρήθηκαν είναι πολύ μικρότερα από τα δυναμικά που συναντώνται στις λακκάσες (400-800 mV), γεγονός το οποίο δικαιολογεί την οξειδωση περιορισμένου μόνο εύρους φαινολικών και αρωματικών υποστρωμάτων, που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για λακκάσες. Αντίστοιχα, το ισοηλεκτρικό σημείο της *PcLac1* (pI 3,5) κυμαίνεται στο αναμενόμενο εύρος pH 2,6-6,9, όπως ανάλογες είναι οι περιπτώσεις λακκάσων του *Pleurotus ostreatus* (pI 3,6) και *Pleurotus sajor-caju* IV (pI 3,6), (Baldrian, 2006). Άλλες περιπτώσεις είναι η λακκάση του μύκητα λευκής σήψης *Pycnoporus cinnabarinus* με ισοηλεκτρικό σημείο pI 3,7 (Eggert et al., 1996), οι λακκάσες από τους μικροοργανισμούς *Panaeolus sphinctrinus*, *Panaeolus papilionaceus*, *Coprinus friesii* και *Polyporus pinsitus*, με pI 3,5 (Heinzkill et al., 1998) αλλά και λακκάσες των βασιδιομυκήτων *Trametes ochracea*, *Trametes hirsuta*, *Cerrena maxima* και *Coriolopsis fulvocinerea* με το ισοηλεκτρικό σημείο να κυμαίνεται μεταξύ pH 3,5 και 4,7 (Shleev et al., 2004).

Οι βέλτιστες συνθήκες δράσης είναι pH 4,5 και 55°C για την *PcLac1* και pH 4 και 55°C για την *PcLac2*, βάσει των ενζυμικών μετρήσεων με ABTS. Οι συγκεκριμένες συνθήκες δράσης είναι συνήθεις για τους Βασιδιομύκητες του ίδιου γένους, όπως είναι οι περιπτώσεις των λακκάσων του *Pleurotus eryngii* (pH 4,5, 55°C), *Pleurotus ostreatus* (pH 3, 45-60°C) και *Pleurotus pulmonarius* (pH 4-5,5, 50°C), (Baldrian, 2006). Ωστόσο ανάλογα χαρακτηριστικά συναντώνται και σε λακκάσες από άλλους μύκητες, όπως η κίτρινη λακκάση του *Ganoderma fornicatum* με βέλτιστο pH στο 2,5 και βέλτιστη θερμοκρασία στους 55°C (Huang et al., 2011), η κίτρινη λακκάση του μύκητα *Cladosporium cladosporioides* με βέλτιστες συνθήκες δράσης pH 3,5 και 40-70°C (Halaburgi et al., 2011), αλλά και η λακκάση του *Paraconiothyrium variable*, για την οποία οι βέλτιστες συνθήκες είναι pH 4,8 και 50°C (Forootanfar et al., 2011).

Οι δύο λακκάσες οξειδώνουν κυρίως υδροβενζόλες και υδροξικινναμικά οξέα. Ωστόσο διαφορετικές λακκάσες παρουσιάζουν αισθητές διαφορές ως προς την καταλυτική τους δράση. Από πειραματικά δεδομένα προέκυψε ότι οι όρθο-υποκατεστημένες ενώσεις (γουαϊακόλη, καφεϊκό οξύ, διυδροξυφαινυλαλανίνη, γαλλικό οξύ, πυρογαλλόλη) συνιστούν καλύτερα υποστρώματα σε σχέση με παρα-υποκατεστημένες ενώσεις (π-κρεσόλη, υδροκινόνη) ενώ μικρότεροι ρυθμοί σημειώθηκαν για ενώσεις με μέτα-υποκατάσταση (ορκινόλη, ρεσορκινόλη). Τα αποτελέσματα αφορούν λακκάσες των *L. litschaueri* και *P. brumalis* (Blaich & Esser, 1975). Ανάλογα αποτελέσματα ελήφθησαν από λακκάσες των μυκήτων *T. versicolor*, *P. anserina*, *Pyricularia oryzae*, *Ganoderma lucidum* (Baldrian, 2006). Οι παραπάνω παρατηρήσεις συνάδουν με τα αποτελέσματα των πειραμάτων εξειδίκευσης

ως προς το υπόστρωμα, από τα οποία οι βέλτιστες μετρήσεις ήταν, για την *PcLac1*, ενεργότητα 0,08 U/mg για την 2,6-DMP και την υδροκινόνη ενώ για την *PcLac2*, 0,05 και 0,09 U/mg για την κατεχόλη και την υδροκινόνη αντίστοιχα. Για λόγους σύγκρισης των προτιμήσεων σε υπόστρωμα από λακκάσες του γένους *Pleurotus* παρατίθενται ακολούθως αποτελέσματα που αφορούν λακκάσες του μύκητα *Pleurotus eryngii* (Munoz et al., 1997). Θέτοντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου με υπόστρωμα την 2,6-DMP, παρατηρείται αντίστοιχη ενζυμική ενεργότητα για την 4-Αμινοφαινόλη, διπλάσια ενεργότητα για την 4-Αμινοφαινυλαμίνη, τριπλάσια για το ABTS, ενώ πέφτει στο 25% για την υδροκινόνη και στο 20% για την κατεχόλη και την *p*-ανισιδίνη. Ακόμη χαμηλότερη ενεργότητα παρουσιάζεται για τα υποστρώματα 4-Μεθοξυφαινόλη (10%), συρινγικό οξύ (14%) και βανιλλικό οξύ (8%), (Baldrian, 2006).

Οι σταθερές K_M , V_{max} και k_{cat} για τις δύο λακκάσες *PcLac1* και *PcLac2* παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.6.1. Στον Πίνακα 4.1.1 παρατίθενται δεδομένα της κινητικής παραμέτρου K_M από λακκάσες των μυκήτων του γένους *Pleurotus*, από τα οποία φαίνεται ότι οι *PcLac1* και *PcLac2* δίνουν δεδομένα που συνάδουν με τη βιβλιογραφία. Αντίστοιχα δεδομένα λαμβάνουμε για τη λακκάση του *Ganoderma fornicatum*, για την οποία η κινητική παράμετρος K_M είναι 103,6 μM για το ABTS και 1263,4 μM για την 2,6-DMP (Huang et al., 2011). Η λακκάση του μύκητα *Trichoderma harzianum* παρουσιάζει κινητικές παραμέτρους K_M 0,5 mM και V_{max} 285 U/mg ως προς το ABTS (Bagewadi et al., 2017). Επιπλέον οι λακκάσες των *Panaeolus sphinctrinus*, *Panaeolus papilionacaeus*, *Coprinus friesii* και *Polyporus pinsitus* έχουν K_M ως προς το ABTS 32, 51, 41 και 22 μM αντίστοιχα (Heinzkill et al., 1998). Τέλος η λακκάση του *Paraconiothyrium variable* παρουσιάζει παραμέτρους K_M και V_{max} ίσες με 203 μM και 40 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, μετρούμενες ως προς ABTS (Forootanfar et al., 2011).

Πίνακας 4.1.1 Τιμές κινητικής παραμέτρου K_M για λακκάσες που προέρχονται από Βασιδιομύκητες του γένους *Pleurotus* (Baldrian, 2006).

Προέλευση Λακκάσης	K_M (μM)	
	ABTS	2,6 DMP
<i>Pleurotus eryngii</i> I	-	1400
<i>Pleurotus eryngii</i> II	-	400
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA1b	370	260
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA1w	90	2100
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA2	120	740
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA3a	70	14000
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA3b	74	8800
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXC	280	230
<i>Pleurotus pulmonarius</i> Lcc2	210	-
<i>Pleurotus sajor-caju</i> IV	92	-

Λειτουργική σταθερότητα παρατηρείται σε pH 5-9 για την *PcLac1* και σε pH 5-8 για την *PcLac2*. Η λακκάση *PcLac1* διατηρεί το 70% της ενεργότητάς της μετά από επώαση 2 h στους 50°C και 4 h στους 40°C, ενώ αντίστοιχα η *PcLac2* δεν είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες αλλά διατηρεί το 90% της ενεργότητάς της, μετά από 24 h στους 30°C. Τα χαρακτηριστικά λειτουργικής σταθερότητας των λακκάσων εξαρτώνται άμεσα από την προέλευση του ενζύμου και είναι ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του μύκητα που τις παράγει. Ωστόσο

παρατηρείται μεγαλύτερη σταθερότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες (20-40°C), όπου η θερμότητα δεν προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών, και σε βασικά pH, καθώς τα υδροξύλια προστατεύουν τις λακκάσες από φαινόμενα αυτοξείδωσης (Baldrian, 2006). Για παράδειγμα, η λακκάση του μύκητα *Ganoderma fornicatum* παρουσιάζει ανάλογη συμπεριφορά, με λειτουργική σταθερότητα έως και σε θερμοκρασία 60°C και σε εύρος pH 3 έως 10 (Huang et al., 2011).

Παρουσία οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, DMSO, 1,4-διοξάνη), η *PcLac1* παρεμποδίζεται ακόμα και σε συγκέντρωση 10% (v/v) ενώ η *PcLac2* είναι σταθερή σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις των διαλυτών. Οι οργανικοί διαλύτες αλληλεπιδρούν με τις άπολες ομάδες του μορίου της λακκάσης, μειώνοντας την ισχύ των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης και η ισορροπία των πρωτεϊνών να μετατοπίζεται προς την μετουσιωμένη κατάσταση. Η αιθανόλη έχει μεγαλύτερη τάση να διαλυτοποιεί τα ένζυμα, συγκριτικά με την ακετόνη, με αποτέλεσμα η αιθανόλη να οδηγεί σε υψηλότερα ποσοστά μετουσίωσης των λακκασών.

Παράλληλα οι λακκάσες παρεμποδίζονται έντονα παρουσία 1mM SDS και NaN_3 , ενώ η *PcLac1* ενεργοποιείται σε 0,25 mM Cu και 1 mM H_2O_2 . Οι χημικές ενώσεις δρουν ως παρεμποδιστές με διάφορους μηχανισμούς. Τα χλωριούχα άλατα παρεμποδίζουν τη δράση των λακκασών αυξάνοντας την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Παράλληλα το NaN_3 σχηματίζει δεσμούς με το ενεργό κέντρο της λακκάσης, τροποποιώντας τη δομή της, ενώ το EDTA αποτελεί χηλικό παράγοντα, που καταλαμβάνει τα ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου. Το SDS είναι μια επιφανειοδραστική ουσία που αποδιατάσσει τις πρωτεϊνικές αλυσίδες, καταστρέφει την τριτοταγή δομή του ενζύμου και συνεπώς μειώνει τη λειτουργικότητα του. Τέλος τα ιόντα χαλκού, όταν βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις ενεργοποιούν τις λακκάσες, διευκολύνοντας τις αντιδράσεις του καταλυτικού κέντρου. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις ωστόσο δρα ανασταλτικά, όπως συμβαίνει και με την περίπτωση του υπεροξειδίου (Arsenault, 2011, Cabana et al., 2007). Παραδείγματα λακκασών με ανάλογη συμπεριφορά είναι η λακκάση του *Ganoderma fornicatum*, που παρεμποδίζεται ισχυρά από το NaN_3 , ενώ η ενεργότητα δεν επηρεάζεται παρουσία EDTA, διατηρείται στο 80% παρουσία 50% μεθανόλης, αιθανόλης και DMSO μετά από 3 h επώαση και πέφτει στο 20% στην περίπτωση της ακετόνης (Huang et al., 2011), η λακκάση του *Pycnoporus cinnabarius*, που παρεμποδίζεται πλήρως από την παρουσία 0,1 mM NaN_3 (Eggert et al., 1996) και τέλος η λακκάση του *Paraconiothyrium variable*, η οποία παρουσιάζει 1,5 φορές μεγαλύτερη ενεργότητα παρουσία Cu^{2+} 10 mM (Forootanfar et al., 2011).

4.2 Ακίνητοποίηση Ενζυμικού Εκχυλίσματος Καλλιέργειας

Η μεθοδολογία ακίνητοποίησης των ενζύμων σε συσσωματώματα με τον σχηματισμό σταυροδεσμών παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων τεχνικών ακίνητοποίησης. Η μέθοδος είναι απλή, εφαρμόζεται τόσο σε καθαρά ένζυμα όσο και σε εξωκυτταρικά μίγματα καλλιέργειας ενώ αποτελεί μια τεχνική που συνδυάζει μερικό καθαρισμό και ακίνητοποίηση του ενζύμου. Επιπλέον, ο σχηματισμός CLEA εφαρμόζεται σε ποικιλία ενζύμων και μάλιστα με υψηλά ποσοστά ανάκτησης ενεργότητας. Τα στοιχεία αυτά μεταφράζονται σε χαμηλό κόστος παραγωγής, άμεση διάθεση στην αγορά, δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης αλλά και βελτιωμένη λειτουργική σταθερότητα των βιοκαταλύτων (Sheldon, 2011). Παράλληλα η ακίνητοποίηση σε CLEAs παρέχει το πλεονέκτημα

χρησιμοποίησης των ενζύμων σε διεργασίες συνεχούς ροής, μειώνοντας το κόστος των διεργασιών και αύξηση της ενεργότητας ανά μονάδα όγκου βιοκαταλύτη, λόγω απουσίας στερεής μήτρας ακινητοποίησης (Hassani et al., 2013, Sheldon et al., 2007).

4.2.1 Παράγοντες Βελτιστοποίησης Σχηματισμού CLEAs

Τα ένζυμα του εξωκυτταρικού υγρού της καλλιέργειας (15,8 mg/mL πρωτεΐνης) ακινητοποιήθηκαν σε CLEAs, με χρήση θειικού αμμωνίου ως παράγοντα κατακρήμνισης, και 100 mM γλουταραλδεΐδης για τον σχηματισμό σταυροδεσμών, οπότε και επετεύχθη ανάκτηση της ενζυμικής ενεργότητας 60%. Ανάλογα με τις βιοχημικές και δομικές ιδιότητες της κάθε λακκάσης, οι συνθήκες σχηματισμού των CLEAs μπορεί να διαφέρουν από ένζυμο σε ένζυμο. Για παράδειγμα, το pH, το είδος και η συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης, το είδος και η συγκέντρωση του παράγοντα σχηματισμού σταυροδεσμών, ο χρόνος επώασης, η θερμοκρασία, η ανάδευση, αποτελούν παράγοντες καθοριστικούς για την επιτυχία της ακινητοποίησης. Συνεπώς, ο σχεδιασμός της μεθόδου παραγωγής των CLEAs τροποποιείται σε κάθε περίπτωση με βάση τα χαρακτηριστικά και τις ιδιομορφίες του βιοκαταλύτη.

Η παρουσία διαφορετικών παραγόντων κατακρήμνισης έχει σημαντική επίδραση τόσο ως προς την αδρανοποίηση ή την ενεργοποίηση της λακκάσης, όσο και ως προς την επιτυχία της κατακρήμνισης. Στην προκειμένη περίπτωση, το ενζυμικό παρασκεύασμα ενεργοποιείται παρουσία PEG και θειικού αμμωνίου, ενώ για τους υπόλοιπους παράγοντες χάνει σημαντικό ποσοστό της ενεργότητας (40% και άνω). Παράλληλα, ο σχηματισμός CLEAs πραγματοποιείται μόνο παρουσία θειικού αμμωνίου. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα για περιπτώσεις επιτυχούς ακινητοποίησης σε CLEAs ποικίλουν και η επιλογή κατάλληλου παράγοντα κατακρήμνισης σχετίζεται άμεσα με τη φύση και τις ιδιότητες της λακκάσης. Για παράδειγμα, η λακκάση του μύκητα *Corioloropsis polyzona* παρουσιάζει περίπου 120% ανάκτηση ενεργότητας μετά από επώαση σε θειικό αμμώνιο (55%w/v), pH 7 και 20°C, 60% για την αιθανόλη (79%w/v), 100% για την ακετόνη (67% w/v) και 130% για επώαση στις ίδιες συνθήκες σε PEG (100%w/v), (Cabana, et al., 2007). Η λακκάση του μύκητα *Coriolus versicolor* παρουσιάζει, μετά το στάδιο της κατακρήμνισης, ανάκτηση ενεργότητας 0% για μεθανόλη, 47% για αιθανόλη, 58% για την ακετόνη, 140% για το θειικό αμμώνιο και 186% για την περίπτωση του PEG (Schoeenaart et al., 2004). Για τις λακκάσες των *Trametes versicolor* και *Agaricus bisporus*, η κατακρήμνιση πραγματοποιείται από θειικό αμμώνιο και PEG, ενώ για τον *Trametes villosa* η αιθανόλη και η ακετόνη επιφέρουν ικανοποιητική κατακρήμνιση των λακκασών. Τα υψηλά ποσοστά ανάκτησης ενεργότητας, παρουσία παραγόντων κατακρήμνισης, οφείλονται ενδεχομένως στην απομάκρυνση φυσικών παρεμποδιστών ή πρόσθετων του ενζυμικού διαλύματος με την προσθήκη του παράγοντα (Matijosyte et al., 2010).

Η συγκέντρωση του παράγοντα σχηματισμού σταυροδεσμών επιδρά στην αποτελεσματικότητα της ακινητοποίησης, λόγω της δυνατότητας αδρανοποίησης του ενζύμου, ανάλογα με το είδος της χημικής ένωσης. Ως παράδειγμα παρατίθεται η ακινητοποίηση σε CLEAs των λακκασών του μύκητα λευκής σήψης *Corioloropsis polyzona*, με ενεργότητα 1 Unit/mL. Συγκεντρώσεις γλουταραλδεΐδης υψηλότερες των 200 μM σταθεροποιούν σε τέτοιο βαθμό την τρισδιάστατη δομή των ενζύμων, με αποτέλεσμα η λακκάση να αδυνατεί να διαμορφώσει κατάλληλα το ενεργό κέντρο, ώστε να

πραγματοποιηθεί η οξειδωση του υποστρώματος. Αντίστοιχα, συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 100 μM προκαλούν μεν τη δημιουργία δεσμών, αλλά αυτοί είναι ανεπαρκείς ως προς τον αριθμό, με αποτέλεσμα τα ένζυμα να μη συγκρατούνται στα συσσωματώματα (Cabana et al., 2007).

Το γεγονός ότι μετά την ακινητοποίηση η βέλτιστη ανάκτηση ενεργότητας είναι της τάξεως του 60%, αφήνει το περιθώριο τροποποιήσεων στη διαδικασία παραγωγής CLEAs. Το είδος του παράγοντα σχηματισμού δεσμών, πρόσθετες ενώσεις που προστατεύουν το ένζυμο κατά την ακινητοποίηση αλλά και οι συνθήκες επώασης αποτελούν επιπλέον παράγοντες που θα μπορούσαν να εξετασθούν, με στόχο την ανάκτηση μεγαλύτερης ενζυμικής ενεργότητας στο ακινητοποιημένο ένζυμο. Η χρήση της γλουταραλδεΐδης, αν και έχει κυριαρχήσει στη μεθοδολογία σχηματισμού CLEAs, παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα, το σημαντικότερο εκ των οποίων είναι το ενδεχόμενο διαρροής του συγκεκριμένου παράγοντα από το ακινητοποιημένο σύστημα στο περιβάλλον, προκαλώντας τοξικά φαινόμενα. Παράλληλα, η γλουταραλδεΐδη αποτελεί ένα μικρό, δραστικό μόριο που μπορεί να διεισδύσει στην πρωτεϊνική δομή και να παρεμποδίσει την καταλυτική δράση, δεσμεύοντας αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Σαν εναλλακτικός παράγοντας σχηματισμού δεσμών χρησιμοποιείται η χιτοζάνη, ένα ανανεώσιμο πολυμερές που προκύπτει από την χιτίνη. Η χιτοζάνη περιέχει υψηλό ποσοστό αμινομάδων, οι οποίες ευνοούν τον σχηματισμό σταυροδεσμών μεταξύ των ενζύμων, χαρακτηρίζεται από υψηλή μηχανική αντοχή και αντίσταση στη χημική αποικοδόμηση, ενώ παράλληλα αποτελεί υλικό βιοσυμβατό και βιοαποικοδομήσιμο. Η ακινητοποίηση λακκασών του μύκητα *Coriolopsis polyzona*, με μέσο κατακρήμνισης το θειικό αμμώνιο και παράγοντα σχηματισμού δεσμών τη χιταζάνη, βελτίωσε τη λειτουργική σταθερότητα του ενζύμου. Για παράδειγμα, ενώ το ελεύθερο ένζυμο έχει ανάκτηση ενεργότητας της τάξης του 20%, τα CLEAs λακκασών με τη χρήση χιτοζάνης παρουσιάζουν 80-100% ανάκτηση ενεργότητας, μετά από 24 h επώαση στους 40°C και pH 3 (Arsenault, 2011).

Το pH του διαλύματος κατακρήμνισης αποτελεί έναν ακόμα παράγοντα πρωταρχικής σημασίας για την επιτυχή ακινητοποίηση των πρωτεϊνών. Με την προσθήκη του παράγοντα κατακρήμνισης, το υδατικό στρώμα διαλυτοποίησης γύρω από την πρωτεΐνη μειώνεται, καθώς ο παράγοντας απομακρύνει σταδιακά τα μόρια νερού από την επιφάνεια του διαλύτη. Η πρωτεΐνη, έχοντας λιγότερη υγρασία στο μόριό της, συσσωματώνεται χάρη σε ηλεκτροστατικές έλξεις και δυνάμεις διπόλων και καθιζάνει. Παράλληλα, όταν το pH του διαλύματος εξισωθεί με το ισοηλεκτρικό σημείο της λακκάσης, το ένζυμο παύει να φέρει φορτίο και καθιζάνει. Οι λακκάσες του μύκητα *Trametes versicolor*, εμφανίζουν χαμηλή ανάκτηση ενεργότητας σε βασικά pH, απομακρυσμένα από το ισοηλεκτρικό σημείο, για τον *Trametes villosa* η ανάκτηση ενεργότητας σε pH 8 είναι ικανοποιητική, ενώ για τον *Agaricus bisporus* η ανάκτηση ενεργότητας φτάνει μέχρι και 350%, σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο. Ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει την ανάκτηση ενεργότητας είναι ο χρόνος επώασης για τον σχηματισμό σταυροδεσμών. Οι λακκάσες του μύκητα *Trametes versicolor* παρουσιάζουν καλύτερα αποτελέσματα μετά από 19 με 27 h επώασης (40-50% ανάκτηση ενεργότητας), για τον *Trametes villosa* ο βέλτιστος χρόνος ποικίλει από 1 h έως 27 ώρες ανάλογα τον χρησιμοποιούμενο παράγοντα σχηματισμού δεσμών, ενώ σε κάθε περίπτωση η ανάκτηση ενεργότητας είναι μεγαλύτερη του 100% (Matijosyte et al., 2010).

Μία ακόμα τεχνική σταθεροποίησης των CLEAs είναι ο σχηματισμός περιβάλλοντος πολυμερικού δικτύου από χιτοζάνη και 3-αμινοπροπυλοτριεθοξυσιλάνη (3-aminopropylthriethoxysilane), η οποία έχει εφαρμοσθεί και στην περίπτωση των λακκασών. Η θερμική σταθερότητα των CLEAs αυξήθηκε περισσότερο από 30 φορές σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο σε pH 3 και 40°C καθώς επίσης βελτιώθηκε και η υπολειπόμενη ενεργότητα παρουσία παρεμποδιστικών παραγόντων (5 φορές αύξηση υπολειπόμενης ενεργότητας παρουσία EDTA, 15 για τη μεθανόλη και 20 φορές για την ακετόνη), (Hassani et al., 2013). Παράλληλα, η δράση και η λειτουργική σταθερότητα των CLEAs ενισχύονται, σε ορισμένες περιπτώσεις, με την συν-ακινητοποίηση πρόσθετων ενώσεων στο συσσωμάτωμα, όπως η αδρανής πρωτεΐνη BSA ή πολυϊονικά πολυμερή. Τέτοια είναι η περίπτωση των CLEAs της λακκάσης από τον μύκητα *Coriolopsis polyzona*. Τα συν-ακινητοποιημένα ένζυμα παρουσιάζουν αυξημένη υπολειπόμενη ενεργότητα, παρουσία παρεμποδιστών όπως NaN₃, EDTA, μεθανόλη και ακετόνη, καθώς επίσης και αυξημένη θερμική σταθερότητα, σε σχέση με τα CLEAs που περιέχουν μόνο τη λακκάση. Η συμπεριφορά των συν-ακινητοποιημένων ενζύμων εξηγείται από το μικροπεριβάλλον που δημιουργεί η αδρανής πρωτεΐνη γύρω από τη λακκάση, εφόσον ενισχύεται ο σχηματισμός των σταυροδεσμών (Cabana, et al., 2007). Τέλος στη συν-ακινητοποίηση χρησιμοποιούνται και παράγοντες που παρεμποδίζουν τη δράση πρωτεασών όπως το φαίνυλο-μέθυμο-σουλφονυλο-φθορίδιο (PMSF). Η προσθήκη 100 μL των 200 mM PMSF σε CLEAs λακκασών του *Trametes versicolor* ενισχύει την ανάκτηση ενεργότητας από 22 σε 58%, κατά την ακινητοποίηση μεγαλύτερης κλίμακας (Matijasyte et al., 2010).

4.2.2 Μεταβολή Λειτουργικών Ιδιοτήτων των Ακινητοποιημένων Λακκασών

Κατά την ακινητοποίηση του ενζυμικού παρασκευάσματος επιτυγχάνεται ανάκτηση ενεργότητας της τάξεως του 60%. Η μειωμένη ανάκτηση είναι εν μέρει αναμενόμενη, αφενός λόγω της περιορισμένης κινητικότητας των ενζύμων, αφετέρου χάρη στα φαινόμενα μεταφοράς μάζας που αναπτύσσονται. Ωστόσο τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι ποικίλα. Η λακκάση του μύκητα *Coriolopsis polyzona* ακινητοποιείται με επιτυχία σε CLEAs, με παράγοντα σχηματισμού δεσμών την γλουταραλδεΐδη και παράγοντα κατακρήμνισης την ένωση PEG. Η ανάκτηση ενεργότητας μετά την ακινητοποίηση είναι της τάξης του 60%, η οποία συνάδει και με άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα (Cabana et al., 2007). Τα CLEAs των λακκασών του μύκητα *Trametes versicolor* εμφανίζουν ανάκτηση ενεργότητας 50% (παράγοντας κατακρήμνισης η 2-προπανάλη, 19 h επώαση), για τον *Trametes villosa* η ανάκτηση ενεργότητας φτάνει το 148% (παράγοντας κατακρήμνισης η διοξάνη, 3 h επώαση), ενώ για τον *Agaricus bisporus* η ανάκτηση ενεργότητας είναι 350% (παράγοντας κατακρήμνισης η διοξάνη, 27 h επώαση), (Matijasyte et al., 2010).

Τα CLEAs των λακκασών δρουν βέλτιστα σε pH 3 και 40 °C, σε αντίθεση με το ελεύθερο ενζυμικό παρασκεύασμα, το οποίο παρουσιάζει βέλτιστο σε pH 4. Παράλληλα, η ακινητοποίηση βελτιώνει τη σταθερότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος κατά την επώαση στους 50 και 60°C. Στην βιβλιογραφία συναντώνται πολλές περιπτώσεις CLEAs λακκασών που εμφανίζουν υψηλότερη θερμική σταθερότητα σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο. Το γεγονός οφείλεται στην παρουσία πολλαπλών δεσμών στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, οι οποίοι αποτρέπουν την αποδιάταξη της πρωτεϊνικής αλυσίδας της λακκάσης σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (Cabana et al., 2007).

Η ακινητοποίηση σε CLEAs προστατεύει τα ένζυμα κατά την επώαση σε αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, διοξάνη, αλλά όχι στην περίπτωση του DMSO. Η άμορφη δομή των CLEAs περιορίζει τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας των παρεμποδιστών προς το καταλυτικό κέντρο των ενζύμων. Ωστόσο η δομή των CLEAs δεν είναι δυνατόν να περιορίσει τη διάχυση μικρομοριακών ενώσεων όπως το Cl^- και NaN_3 , ωστόσο η σταθερότητα των συσσωματωμάτων περιορίζει τη μετουσίωση των πρωτεϊνών από υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Για τον λόγο αυτό η σταθερότητα των CLEAs αυξάνεται παρουσία οργανικών διαλυτών, ωστόσο η παρεμπόδιση από άλατα ή χηλικούς παράγοντες συνήθως δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη συγκεκριμένη τεχνική ακινητοποίησης (Arsenault, 2011). Τα CLEAs από τη λακκάση του μύκητα *Coriolorpsis polyzona* έχουν περίπου 80 και 50% υπολειπόμενη ενεργότητα παρουσία NaN_3 30 και 150 μM αντίστοιχα, ενώ το ελεύθερο ένζυμο παρουσιάζει ολική παρεμπόδιση. Η υπολειπόμενη ενεργότητα του ελεύθερου ενζύμου κυμαίνεται στο εύρος 40-55% για την ελεύθερη λακκάση και 80-95% για τα CLEAs στις περιπτώσεις παρεμπόδισης από EDTA (10 μM), μεθανόλη (25% v/v) και ακετόνη (25% v/v), (Cabana et al., 2007).

4.3 Αξιοποίηση Ενζυμικών Παρασκευασμάτων σε Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές

4.3.1 Αξιοποίηση Υπερκείμενου Υγρού Καλλιέργειας και Ακινητοποιημένων Ενζύμων για Αποτοξικοποίηση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου παράγονται σε μεγάλες ποσότητες, στις περιοχές όπου οι ελαιουργικές δραστηριότητες είναι συχνές. Οι μεσογειακές χώρες, εν προκειμένω, παράγουν 30 εκ. m^3 /έτος, ενώ στην Ελλάδα η παραγωγή ΥΑΕ φτάνει τα 1,5 εκ. m^3 /έτος. Τα ΥΑΕ συνήθως διατίθενται σε υδάτινους ή εδαφικούς αποδέκτες, ωστόσο διαθέτουν χαρακτηριστικά, όπως χαμηλό κόστος και υψηλό περιεχόμενο σε μεταλλικά στοιχεία, τα οποία τα καθιστούν χρήσιμη ύλη για την παραγωγή οργανικών λιπασμάτων. Όμως, το υψηλό περιεχόμενο των αποβλήτων σε φαινολικές ενώσεις προκαλεί φυτοτοξικά φαινόμενα, εμποδίζοντας την βιοτεχνολογική αξιοποίησή τους. Οι υπάρχουσες φυσικές ή χημικές τεχνικές επεξεργασίας χαρακτηρίζονται από χαμηλές αποδόσεις και υψηλό κόστος. Συνεπώς, οι λιγνινολυτικοί μύκητες και τα ενζυμικά τους συστήματα αποτελούν μία ελκυστική εναλλακτική αποικοδόμησης φαινολικών και αρωματικών ενώσεων των ΥΑΕ, συμβάλλοντας αποτελεσματικά στην αποτοξικοποίηση και τον αποχρωματισμό τους. Μάλιστα η ενζυμική κατεργασία των ΥΑΕ υπερέρχει της κατεργασίας από καλλιέργειες μυκήτων, καθώς ελαττώνει τον χρόνο επεξεργασίας των λυμάτων. Ακόμη, η χρήση λακκασών υπερέρχει αυτής των υπεροξειδασών, οι οποίες απαιτούν για τη δράση τους την παρουσία υπεροξειδίου (Jaouani et al., 2005, Casa et al., 2003, Tsioulpas et al., 2002).

Τα ενζυμικά παρασκευάσματα του ακινητοποιημένου και του ελεύθερου ενζύμου έδωσαν διαφορετικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, το ελεύθερο ενζυμικό παρασκεύασμα πέτυχε έως και 35% αποχρωματισμό του ΥΑΕ και έως 65% μείωση φαινολικών ενώσεων, ποσοστά ενθαρρυντικά αν συγκριθούν με αυτά της βιβλιογραφίας. Η λακκάση του μύκητα *Rychnoporus coccineus*, για παράδειγμα, πετυχαίνει ίδια ποσοστά αποτοξικοποίησης υγρών αποβλήτων ελαιουργείου, σε σύγκριση με τον ίδιο τον μύκητα, γεγονός το οποίο υποδεικνύει την επιτυχή αξιοποίηση του ενζύμου σε ανάλογες βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Jaouani et al., 2005). Ο μύκητας *Lentinula edodes* παράγει λακκάση, η οποία επιφέρει έως και 65% μείωση των

ολικών φαινολικών ενώσεων σε ΥΑΕ (Casa et al., 2003). Στελέχη από τον μύκητα *Pleurotus ostreatus*, τα οποία αναπτύσσονται σε υγρή καλλιέργεια με ΥΑΕ, παράγουν λακκάσες οι οποίες προκαλούν 69-76% συνολική μείωση των φαινολικών ενώσεων στο ΥΑΕ, αποχρωματισμό και μείωση της φυτοτοξικότητας του αποβλήτου (Tsioupras et al., 2002).

Τα CLEAs, κατά την πειραματική διαδικασία, απέδωσαν 20-30% αποχρωματισμό του ΥΑΕ και 10% μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου. Σε ανάλογη εργασία των D'Annibale et al. (1999), η λακκάση του μύκητα λευκής σήψης *Lentinula edodes* ακινητοποιήθηκε σε μήτρα χιτοζάνης και σταθεροποιήθηκε με το σχηματισμό σταυροδεσμών μέσω γλουταραλδεϋδης. Το ακινητοποιημένο ένζυμο επέφερε μερικό αποχρωματισμό του ΥΑΕ, μείωση των συνολικών φαινολικών ενώσεων κατά 67% καθώς επίσης και μερική αποτοξικοποίηση των λυμάτων, σε διεργασία διαλείποντος έργου, διάρκειας 24 ωρών (D'Annibale et al., 1999). Αν και τα αποτελέσματα, για την αξιοποίηση των CLEAs των ενζύμων της καλλιέργειας στην αποτοξικοποίηση των ΥΑΕ, δεν είναι ικανοποιητικά, ωστόσο μπορούν να αναζητηθούν άλλες εφαρμογές που θα αξιοποιούν το ενζυμικό παρασκεύασμα, και μάλιστα παρουσία οργανικών διαλυτών, μιας και παρουσία αυτών τα CLEAs έχουν υψηλή λειτουργική σταθερότητα.

4.3.2 Αντιδράσεις Σύνθεσης Φαινολικών Ολιγο- ή Πολυμερών από τις Λακκάσες *PcLac1* και *PcLac2*

Οι βιομηχανικές διεργασίες οξειδωσης, με βάση τα συστήματα των λακκασών, αυξάνονται σημαντικά τα τελευταία χρόνια, δίνοντας έμφαση στην εκμετάλλευση της συνθετικής ικανότητάς των συγκεκριμένων βιοκαταλυτών. Συγκεκριμένα η έρευνα στρέφεται προς μια αποδοτική προσέγγιση σύνθεσης ομο- και ετερο-διμερών ενώσεων από φαινολικά παράγωγα ή παράγωγα αμινών, με διεργασίες φιλικές προς το περιβάλλον, οι οποίες κατά βάση αξιοποιούν λακκάσες (Riva, 2006). Για παράδειγμα, η λιγνίνη αποτελείται από αρωματικές δομές, υπό τη μορφή φαινυλοπροπανοειδών. Τα τελευταία χρόνια η αποικοδόμηση της λιγνίνης στοχεύει στη βιώσιμη παραγωγή νέων προϊόντων και στην ανάκτηση πολύτιμων αρωματικών συστατικών. Για τον σκοπό αυτό αξιοποιούνται λυγνινολυτικά ένζυμα, μεταξύ των οποίων και λακκάσες, οι οποίες καταλύουν οξειδώσεις φαινολικών ενώσεων, ανάλογων με αυτές που συναντώνται σε λιγνινικές δομές. Οι ενζυμικές φαινολικές οξειδώσεις σχηματίζουν φαινοξικές ρίζες στη δομή της λιγνίνης, οι οποίες συμμετέχουν με τη σειρά τους σε μη ενζυμικές αντιδράσεις, όπως πολυμερισμοί ελευθέρων ριζών, αποπολυμερισμοί και τροποποιήσεις λειτουργικών δομικών ομάδων (Perna et al., 2018).

Οι αποδόσεις, που λαμβάνονται από την αξιοποίηση των λακκασών *PcLac1* και *PcLac2* σε αντιδράσεις σύνθεσης, είναι 36% (mg προϊόντος/mg υποστρώματος) ως προς το σιναπικό και 6,8% ως προς το φερουλικό για την *PcLac1* αλλά και 81,5% ως προς το σιναπικό για την *PcLac2*, χωρίς ωστόσο να ταυτοποιηθούν και να χαρακτηριστούν οι ενώσεις στα στερεά προϊόντα. Το φερουλικό και το σιναπικό οξύ συγκαταλέγονται στα φυσικά υδροξυκιναμικά οξέα και έχουν διαφορετικό βαθμό μεθοξυλίωσης (Perna et al., 2018). Οι εν λόγω ενώσεις παρουσιάζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση και βρίσκουν εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετα (Gharras, 2007), ενώ παράλληλα χρησιμοποιούνται και ως πρόδρομες ενώσεις για τον σχηματισμό άλλων χημικών ενώσεων, όπως της βανιλίνης, του βανιλλικού οξέος, της βανιλλικής αλκοόλης, π-υδροξυβενζαλδεϋδης ή του καφεϊκού οξέος

από το φερουλικό οξύ, μέσω αποδοτικότερων και οικονομικότερων διεργασιών (Mathew & Abraham, 2004). Πολυμερή, εποξειδία, αλκολοβενζόνες, είναι μερικά μόνο από τα προϊόντα που σχηματίζονται από τα υδροξυκιναμικά οξέα μέσω μικροβιακών και ενζυμικών δράσεων ενώ παράλληλα τα διμερή φερουλικού και σιναπικού οξέος σχηματίζουν ισχυρούς σταυροδεσμούς, ιδιότητα η οποία μπορεί να φανεί χρήσιμη σε ορισμένες εφαρμογές, όπως το σχηματισμό δεσμών μεταξύ πολυσακχαριτών (Rouau, 2003). Για παράδειγμα, τριμερείς και τετραμερείς δομές του φερουλικού οξέος έχουν την ικανότητα να δημιουργούν σταυροδεσμούς μεταξύ τριών και τεσσάρων πολυσακχαριδικών αλυσίδων, συνθέτοντας ένα δίκτυο πολυσακχαριτών (Bunzel, 2010). Επιπλέον, ολιγομερή του σιναπικού οξέος αναστέλουν τη δράση πρωτεασών (Monien et, 2006). Πολλά από τα προϊόντα σύνθεσης από υδροξυκιναμικά οξέα μέσω ενεργότητας λακκάσης, δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμη ενώ οι φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών μπορεί να αποβούν πολύτιμες για τον σχεδιασμό νέων βιοτεχνολογικών εφαρμογών.

Σε αντίστοιχη περίπτωση, οι λακκάσες των μικροοργανισμών *Trametes versicolor* (Tv) και *Ganoderma lucidum* (Gl) οξειδώνουν το σιναπικό και το φερουλικό οξύ, συνθέτοντας αντίστοιχα διμερή και τριμερή προϊόντα. Τα προφίλ μεταξύ των προϊόντων του κάθε υποστρώματος παρουσιάζουν ομοιότητες, παρά το γεγονός ότι η οξείδωση πραγματοποιείται από λακκάσες διαφορετικών οργανισμών. Οι μάζες των προϊόντων των Tv και Gl υποδεικνύουν τον σχηματισμό διμερών και τριμερών ενώσεων των αρχικών υποστρωμάτων αλλά και αντίστοιχων ενώσεων, στις οποίες απουσιάζουν οι καρβοξυλομάδες. Κατά την οξείδωση σιναπικού οξέος, για παράδειγμα, παρουσιάζονται δύο διαφορετικά ισομερή της ίδιας διμερούς ένωσης αλλά και δύο διμερή προϊόντα στα οποία εικάζεται ότι λείπει μία καρβοξυλική ομάδα. Ο σχηματισμός β-β' δεσμών είναι η κύρια αντίδραση μεταξύ των ριζών σιναπικού οξέος και το κύριο προϊόν είναι δεϋδροδισιναπικές λακτόνες (dehydrodisinapic lactone). Αντίστοιχα οι ρίζες φερουλικού οξέος σχηματίζουν β-β' δεσμούς, παράγοντας λακτόνες δεϋδροδιφερουλικού οξέος.

Τα τελικά προϊόντα των οξειδώσεων προκύπτουν μέσω των μη ενζυμικών δράσεων, με αποτέλεσμα οι τελικοί πιθανοί συνδυασμοί να είναι πολυάριθμοι. Η ανάλυση των παραγόμενων προϊόντων οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι μεταξύ των ριζών πραγματοποιούνται και τροποποιήσεις των δομών, όπως αποκαρβοξυλίωσεις. Πιο συγκεκριμένα, στο αρχικό στάδιο της αντίδρασης σχηματίζονται διμερή προϊόντα, ενώ σχεδόν ταυτόχρονα πραγματοποιείται και η αποκαρβοξυλίωση αυτών. Σε επόμενο στάδιο σχηματίζονται τριμερή και τετραμερή προϊόντα, με περαιτέρω τροποποιήσεις αποκαρβοξυλίωσης. Η πολυπλοκότητα των προφίλ των προϊόντων αυξάνεται καθώς μειώνεται ο αριθμός των μεθοξυλικών ομάδων του αρωματικού δακτυλίου. Το γεγονός αιτιολογείται από την στερεοχημική παρεμπόδιση που προκαλείται από τις μεθοξυλομάδες, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό λιγότερων προϊόντων. Τέλος, η συγγένεια των λακκασών με τα υποστρώματα αυξάνεται, αυξανόμενου του βαθμού μεθοξυλίωσης, με τις λακκάσες να έχουν καλύτερη συγγένεια με το σιναπικό οξύ από ότι με το φερουλικό (Perna et al., 2018). Στο Παράρτημα Δ παρατίθενται εικόνες με τις δομές πιθανών προϊόντων, από τις αντιδράσεις σύνθεσης των δύο λακκασών για το σιναπικό και το φερουλικό οξύ, βασισμένες στη μελέτη των Perna et al. (2018).

4.4 Μελλοντικοί Στόχοι

Τα ενζυμικά λιγνινολυτικά συστήματα, και πιο συγκεκριμένα οι λακκάσες, παρουσιάζουν μεγάλη δυναμική ως προς την αξιοποίηση σε βιοτεχνολογικές ή περιβαλλοντικές εφαρμογές. Η βιοαποκατάσταση και βιοαποτοξικοποίηση συστημάτων, η γεωργία και η κτηνοτροφία, οι οργανική σύνθεση, η χημεία τροφίμων, η φαρμακευτική, η κοσμετολογία, η βιοϊατρική είναι μερικοί μόνο από τους τομείς στους οποίους η παρουσία των λακκασών είναι πολύτιμη. Ωστόσο παράγοντες όπως η έλλειψη επαρκών αποθεμάτων του ενζύμου, η περιορισμένη λειτουργική σταθερότητα και διάρκεια ζωής αλλά και το υψηλό κόστος των μεσολαβητών οξείδωσης αποτελούν εμπόδιο για την εμπορική αξιοποίηση των λακκασών σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Οι λακκάσες αποτελούν ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την προκατεργασία και αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Ως βιοκαταλύτες έχουν τη δυναμική να υποστηρίξουν διεργασίες βιοδιύλισης, αυξάνοντας τις ενεργειακές αποδόσεις και την οικονομική βιωσιμότητα. Συνεπώς η έρευνα στρέφεται στην οικονομική παραγωγή λακκασών μέσω ετερόλογης έκφρασης σε ξενιστές αλλά και στην τροποποίησή τους με χημικά μέσα ή εργαλεία κυτταρικής και πρωτεϊνικής μηχανικής, προκειμένου να ενισχυθεί η δραστηριότητά τους. Παράλληλα τεχνολογίες ανασυνδυασμού του DNA στοχεύουν σε τροποποιήσεις στη δομή των λακκασών, τέτοιες ώστε η αποδοτικότητα των λακκασών να αυξάνεται και να στοχεύει σε πιο εξειδικευμένες δράσεις. Τέλος η ακινητοποίηση των λακκασών αποτελεί μέσο για την αύξηση της απόδοσης των συστημάτων που αξιοποιούν τα ένζυμα, εφόσον παράγονται περισσότερο σταθεροί βιοκαταλύτες με αυξημένη διάρκεια ζωής και χαμηλό κόστος παραγωγής (Couto & Herrera, 2006, Maciel et al., 2010). Γίνεται φανερό ότι με τη χρήση λιγνινολυτικών ενζύμων, στόχος είναι η αντικατάσταση συμβατικών χημικών διεργασιών σε αρκετές βιομηχανίες, με κριτήρια την ενεργειακή και οικονομική βιωσιμότητά τους. Παράλληλα, με την ανακάλυψη νέων λακκασών αλλά και με την τροποποίηση των ήδη υπάρχουσων, αναμένεται ο σχεδιασμός νέων εφαρμογών, που θα επιφέρουν καινοτομίες στις βιοδιεργασίες και θα δώσουν νέες κατευθύνσεις στη βιοτεχνολογική έρευνα (Roth & Spiess, 2015).

5 Βιβλιογραφία

Aggelis G., Iconomou D., Christou M., Bokas D., Kotzailias S., Christou G., Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process, 2003, *Water Research*, Vol. 37, pp. 897–904

Aktas E.S, Imre S., Ersoy L., Characterization and lime treatment of olive mill wastewater, 2001, Elsevier Science Ltd., *Water Research*, Vol. 35, No. 9, pp. 2336–2340

Aktaş N., Çiçek H., Ünal A.T., Kibarer G., Kolankaya N., Tanyolaç A., Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol, 2001, *Bioresource Technology*, Vol. 80, pp. 29–36

Aktas N., Tanyolac A., Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol, 2003, *Bioresource Technology*, Vol. 87, pp. 209–214

Alexandre G., Zhulin I.B., Laccases are widespread in bacteria, 2000, *Trends in Biotechnology*, Vol. 18, pp. 41–42

Amir L., Tam T.K., Pita M., Meijler M.M., Alfonta L., Katz E., Biofuel Cell Controlled by Enzyme Logic Systems, 2008, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 131, No. 2, pp. 826–832

Arsenault A., Cabana H., Jones J.P., Laccase-Based CLEAs: Chitosan as a Novel Cross-Linking Agent, 2011, *Enzyme Research*, Vol. 2011, Article ID 376015, 10 pages

Bagewadi Z.K., Mulla S.I., Ninnekar H.Z., Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization, 2017, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, Vol. 15, pp. 139–150

Baldrian P., Fungal laccases – occurrence and properties, 2006, Blackwell Publishing Ltd., *Federation of European Microbiological Societies FEMS Microbiol Rev* 30, pp 215–242

Blackwell M., The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?, 2011, *American Journal of Botany*, Vol. 98, No. 3, pp. 426-438

Blaich R., Esser K., Function of enzymes in wood destroying fungi -2-Multiple forms of laccase in white rot fungi, 1975, *Archives of Microbiology*, Vol. 103, pp. 271–277

Blanchette R.A., Screening Wood Decayed by White Rot Fungi for Preferential Lignin Degradation, 1984, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 48, No. 3, pp. 647-653

Bobek P., Galbavy S., Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon, *British Journal of Biomedical Science*, Vol. 58, pp. 164–168

Bogan B.W., Lamar R.T., Burgos W.D., Tien M., Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo(alpha) pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils, 1999 *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 28, pp. 250–254

Bourbonnais R., Paice M.G., Oxidation of non-phenolic substrates - An expanded role for lactase in lignin biodegradation, 1990, Elsevier Science Publishers, *FEBS Letters*, Vol. 267, No. 1, pp. 99-102

Bourbonnais R., Paice M.G., Freiermuth B., Bodie E., Borneman S., Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds, 1997, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, pp. 27–32

Bowman B.H., Taylor J.W., Brownlee A.G., Lee J., Shi-Da Lu, White T.J., Molecular Evolution of the Fungi: Relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes, and Chytridiomycetes, 1992, *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 9, No. 2, pp. 285-296

Brebu M., Vasile C., Thermal Degradation of Lignin – A Review, 2010, *Cellulose Chemistry and Technology*, Vol. 44, No. 9, pp. 353-363

Bugg T.D.H., Ahmad M., Hardiman E.M., Singh R., The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation, 2011, *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 22, pp. 394–400

Bumpus J.A., Aust S.D., Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane] by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, 1987, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 53, No. 9, pp. 2001-2008

Bunzel M., Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers, 2010, *Phytochem Rev*, Vol. 9, pp. 47–64

Burke R.M., Cairney J.W.G., Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi, 2002, *Mycorrhiza*, Vol. 12, pp. 105–116

Cabana H., Jones J.P., Agathos S.N., Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals, 2007, Elsevier B.V., *Journal of Biotechnology*, Vol. 132, pp. 23–31

Cairney J.W.G., Burke R.M., Do ecto- and ericoid mycorrhizal fungi produce peroxidase activity?, 1998, *Mycorrhiza*, Vol. 8, pp. 61–65

Camarero S., Garcia O., Vidal T., Colom J., del Rio J.C., Gutierrez A., Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system, 2004, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 35, pp 113–120

Casa R., D’Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S.R, Sermanni G.G., Cascio B.L., Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability, 2003, *Chemosphere*, Vol. 50, pp. 959–966

Champagne P.P., Ramsay J.A., Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*, 2005, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 69, No. 3, pp. 276-285

Champagne P.P., Ramsay J.A., Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads, 2010, Elsevier Ltd., *Bioresource Technology* 101, pp. 2230–2235

Christenson A., Dimcheva N., Ferapontova E.E., Gorton L., Ruzgas T., Stoica L., Shleev S., Yaropolov A.I., Haltrich D., Thorneley R.N.F., Aust S.D., Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes, 2004, *Electroanalysis*, Vol. 16, No. 13-14, pp. 1074-1092

Claus H., Laccases and their occurrence in prokaryotes, 2003, *Archives of Microbiology*, Vol. 179, pp. 145–150

Cohen R., Persky L., Hadar Y., Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*, 2002, Springer-Verlag, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 58, pp. 582-594

Curir P., Thurston C.F., Daquila F., Pasini C., Marchesini A., Characterization of a laccase secreted by *Armillaria mellea* pathogenic for Genista, 1997, *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 35, pp. 147–153

Das N., Chakraborty T.K., Mukherjee M., Purification and characterization of laccase-1 from *Pleurotus florida*, 2000, *Folia Microbiologica*, Vol. 45, pp. 447–451

Datta S., Christena L.R., Rajaram Y.R.S., *Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials*, 2013, Springer Berlin Heidelberg, 3 Biotech, Vol. 3, pp. 1–9

De Souza C.G.M., Peralta R.M., Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium, 2003, *Journal of Basic Microbiology*, Vol. 43, pp. 278–286

Dittmer J.K., Patel N.J., Dhawale S.W., Dhawale S.S., Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency, 1997, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 149, pp. 65–70

D’Annibale A., Celletti D., Felici M., Dimattia E., Giovannozzi-Sermanni G., Substrate specificity of laccase from *Lentinus edodes*, 1996, *Acta Biotechnologica*, Vol. 16, pp 257–270

D’Annibale A., Stazi S.R., Vinciguerra V., Di Mattia E., Sermanni G.G., Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment, 1999, *Process Biochemistry*, Vol. 34, pp. 697–706

D’Annibale A., Ricci M., Quaratino D., Federic F., Fenice M., *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater, 2004, *Research in Microbiology*, Vol. 155, pp. 596–603

Edens W.A., Goins T.Q., Dooley D., Henson J.M., Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, 1999, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, pp. 3071–3074

Eggert C., Temp U., Eriksson K.E.L., The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase, 1996, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 4, pp. 1151–1158

Fritz-Langhals E., Kunath B., Synthesis of aromatic aldehydes by laccase mediator assisted oxidation, 1998, *Tetrahedron Letters*, Vol. 39, pp. 5955–5956

Froehner S.C., Eriksson K.E.L., Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase, 1974, *Journal of Bacteriology*, Vol. 120, pp. 458–465

Forootanfar H., Faramarzi M.A., Shahverdi A.R., Yazdi M.T., Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*, 2011, *Bioresource Technology*, Vol. 102, pp. 1808–1814

Garavaglia S., Cambria M.T., Miglio M., Ragusa S., Lacobazzi V., Palmieri F., D’Ambrosio C., Scaloni A., Rizzi M., The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair, 2004, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 342, pp. 1519–1531

- Gharras H.**, Polyphenols: food sources, properties and applications – a review, 2009, *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 44, pp. 2512–2518
- Gianfreda L., Xu F., Bollag J.M.**, Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes, 1999, CRC Press LLC, *Bioremediation Journal*, vol. 3:1, pp. 1-26
- Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G., Sannia G.**, Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*, 1999, *Biochemical Journal*, Vol. 341, pp. 655–663
- Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G.**, Laccases: a never-ending story, 2010, *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 67, pp. 369-386
- Givaudan A., Effosse A., Faure D., Potier P., Bouillant M.L., Bally R.**, Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for a laccase in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*, 2004, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 108, pp. 205–210
- Gomes E., Aguiar A.P., Carvalho C.C., Bonfá M.R.B., Da Silva R., Boscolo M.**, Ligninases production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes, 2009, *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 40, No. 1, pp. 31-39
- Grabber J.H.**, How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies, 2005, *Crop Science Societh of America*, Vol. 45, pp. 820–831
- Gunde-Cimerman N., Cimerman A.**, *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaril coenzyme A reductase – lovastatin, 1995, *Experimental Mycology*, Vol. 19, pp. 1–6
- Günther H., Perner B., Gramss G.**, Activities of phenol oxidizing enzymes of ectomycorrhizal fungi in axenic culture and in symbiosis with Scots pine (*Pinus sylvestris L.*), 1998, *Journal of Basic Microbiology*, Vol. 38, pp. 197–206
- Hajdok S., Leutbecher H., Greiner G., Conrad J., Beifuss U.**, Laccase initiated oxidative domino reactions for the efficient synthesis of 3,4-dihydro-7,8-dihydroxy-2 *H*-dibenzofuran-1-ones, 2007, *Tetrahedron Letters*, Vol. 48, pp. 5073–5076
- Hassani T., Ba S., Cabana H.**, Formation of enzyme polymer engineered structure for laccase and cross-linked laccase aggregates stabilization, 2013, Elsevier Ltd, *Bioresource Technology*, Vol. 128, pp. 640–645
- Heinzkill M., Bech L., Halkier T., Schneider P., Anke T.**, Characterization of Laccases and Peroxidases from Wood-Rotting Fungi (Family *Coprinaceae*), 1998, *American Society for Microbiology, Applied and Environmental Microbiology*, Vol 64, No. 5, pp. 1601–1606
- Higuchi T.**, Mechanisms of Lignin Degradation by Lignin Peroxidase and Laccase of White-Rot Fungi, 1989, ACS Symposium series, American Chemistry Society, doi: 10.1021/bk-1989-0399.ch035
- Higuchi T.**, Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation, 1990, Springer Verlag, *Wood Science and Technology*, Vol. 24, pp.23-63
- Higuchi T.**, Biodegradation mechanism of lignin by wite-rot basidiomycetes, 1993, Elsevier Science Publishers, *Journal of Biotechnology*, Vol. 30, pp. 1-8
- Holker U., Dohse J., Hofer M.**, Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*, 2002, *Folia Microbiologica*, Vol. 47, pp. 423–427

- Huang W.T., Tai R., Hseu R.S., Huang C.T.**, Overexpression and characterization of a thermostable, pH-stable and organic solvent-tolerant *Ganoderma fornicatum* laccase in *Pichia pastoris*, 2011, Elsevier Ltd., Process Biochemistry 46, pp 1469–1474
- Hüttermann A., Hamza A.S., Chet I., Majcherczyk A., Fouad T., Badr A., Cohen R., Persky L., Hadar Y.**, Recycling of agricultural wastes by white-rot fungi for the production of fodder for ruminants, 2000, Agro-Food Ind Hi-Tech, Vol. Nov/Dec, pp. 29–32
- Ikeda R., Sugita T., Jacobson E.S., Shinoda T.**, Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals, 2003, Microbiology and Immunology, Vol. 47, pp. 271–277
- Jaouani A., Guillen F., Penninckx M. J., Martinez A. T., Martinez M. J.**, Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater, 2005, Enzyme and Microbial Technology, Vol. 36, pp. 478–486
- Johannes C., Majcherczyk A.**, Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems, 2000, American Society for Microbiology, Applied and Environmental Microbiology, Vol 66, No. 2, pp. 524–528
- Karacsonyi S., Kuniak L.**, Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble beta-D-glucan., 1994, Carbohydrate Polymers, Vol. 24, pp. 107–111
- Kersten P., Cullen D.**, Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, 2007, Fungal Genetics and Biology, Vol. 44, pp. 77–87
- Keum Y.S., Li Q.X.**, Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxyl-polychlorinated biphenyls, 2004, Chemosphere, Vol. 56, pp. 23–30
- Komnitsas K., Zaharaki D.**, Pre-treatment of olive mill wastewaters at laboratory and mill scale and subsequent use in agriculture: Legislative framework and proposed soil quality indicators, 2012, Resources, Conservation and Recycling, Vol. 69, pp. 82–89
- Lee Y.L., Huang G.W., Liang Z.C., Mau J.L.**, Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*, 2007, Elsevier Ltd., LWT- Food Science and Technology, Vol. 40, pp 823-833
- Leite O.D., Lupetti K.O., Fatibello-Filho O., Vieira I.C., de Barbosa A.M.**, Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccaseperoxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines, 2003, Talanta, Vol. 59, pp. 889–96
- Leonowicz A., Cho N.S., Luterek J., Wilkolazka A., Wasilewska M.W., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J.**, Fungal laccase: properties and activity on lignin, 2001, Journal of Basic Microbiology, Vol. 41, No. 3–4, pp. 185–227
- Li Y.R., Liu Q.H., Wang H.X., Ng T.B.**, A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*, 2008, Elsevier B.V., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1780, pp. 51–57
- Li H., Zhang L., Dong L., Cao J.**, Preparation and immunologic competence of glycopeptides components from *Pleurotus ostreatus* fungi, 1994, Shaandong Yike Daxue Hsueh Pao, Vol. 32, pp. 343–346
- Lindenfelser L.A., Detroy R.W., Ramstack J.M., Worden K.A.**, Biological modification of the lignin and cellulose components of wheat straw by *Pleurotus ostreatus*, 1979, Developments of Industrial Microbiology, Vol. 20, pp. 541–551

- Maciel M.J.M., Silva A.C., Ribeiro H.C.T.**, Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review, 2010, *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 13, No. 6 <http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue6-fulltext-2>
- Martins L.O., Soares C.M., Pereira M.M., Teixeira M., Costa T., Jones G.H., Henriques A.O.**, Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat, 2002, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, pp. 18849–18859
- Mathew S., Abraham E.T.**, Ferulic Acid: An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in its Release and Their Applications, 2004, *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 24, pp. 59–83
- Matijosyte I., Arends I.W.C.E., Vries S., Sheldon R.A.**, Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases, 2010, Elsevier B.V., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 62, pp. 142–148
- Micard V., Thibault J.F.**, Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins, 1999, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 39, pp. 265–73
- Min K.L., Kim Y.H., Kim Y.W., Jung H.S., Hah Y.C.**, Characterization of a novel laccase produced by the wood rotting fungus *Phellinus ribis*, 2001, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 392, pp. 279–286
- Molitoris H.P., Esser K.**, The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserine*. Properties of laccase I after further purification, 1970, *Archiv fur Mikrobiologie*, Vol. 72, pp. 267–296
- Monien B.H., Henry B.L., Hindle M., U.R.**, Novel chemo-enzymatic oligomers of cinnamic acids as direct and indirect inhibitors of coagulation proteinases, 2006, pp. 7988-7998
- Munoz C., Guillen F., Martinez A.T., Martinez M.J.**, Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation., 1997, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, pp. 2166–2174
- Munteanu F.D., Basto C., Gubitz G.M., Cavaco-Paulo A.**, Staining of wool using the reaction products of ABTS oxidation by Laccase: Synergetic effects of ultrasound and cyclic voltammetry, 2007, *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 14, pp. 363–367
- Ng T.B., Wang H.X.**, A homodimeric laccase with unique characteristics from the yellow mushroom *Cantharellus cibarius*, 2004, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 313, pp. 37–41
- Nicole M., Chamberland H., Geiger J.P., Lecours N., Valero J., Rio B., Ouellette G.B.**, Immunocytochemical localization of laccase L1 in wood decayed by *Rigidoporus lignosus*, 1992, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, pp. 1727–1739
- Nicole M., Chamberland H., Rioux D., Lecours N., Rio B., Geiger J.P., Ouellette G.B.**, A cytochemical study of extracellular sheaths associated with *Rigidoporus lignosus* during wood decay, 1993, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, pp. 2578–2588
- Ntougias S., Gaitis F., Katsaris P., Skoulika S., Iliopoulos N., Zervakis G. I.**, The effects of olives harvest period and production year on olive mill wastewater properties – Evaluation of *Pleurotus* strains as bioindicators of the effluent’s toxicity, 2013 *Chemosphere*, Vol. 92, No. 4, pp. 399-405.

- Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A., Sannia G.**, A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*, 1997, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, pp. 31301–31307
- Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B., Sannia G.**, Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*, 2000, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, pp. 920–924
- Palmieri G., Cennamo G., Sannia G.**, Remazol brilliant blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system, 2005, *Enzyme Microbial Technology*, Vol. 36, pp. 17–24
- Paraskeva P., Diamadopoulos E.**, Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review, 2006, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 81, pp. 1475-1485
- Pelaez F., Martinez M.J., Martinez A.T.**, Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation, 1995, *Mycological Research*, Vol. 99, NO. 1, pp. 37-42
- Perna V., Agger J.W., Holck J., Meyer A.S.**, Multiple Reaction Monitoring for quantitative laccase kinetics by LC-MS, 2018, *SCIENTIFIC REPORTS*, 8:8114, DOI:10.1038/s41598-018-26523-0
- Piontek K., Antorini M., Choinowski T.**, Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90- angstrom resolution containing a full complement of coppers, 2002, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, pp. 37663–37669
- Ponzoni C., Beneventi E., Cramarossa M.R., Raimondi S., Trevisi G., Pagnoni U.M., Riva S., Forti L.**, Laccase-catalyzed dimerization of hydroxystilbenes, 2007, *Advanced Synthesis and Catalysis*, Vol. 349, pp. 1497–1506
- Pozdnyakova N.N., Rodakiewicz-Nowak J., Turkovskaya O.V.**, Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1, 2004, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 30, pp. 19–24
- Riva S.**, Laccases: blue enzymes for green Chemistry, 2006, Elsevier Ltd., *TRENDS in Biotechnology* Vol.24 No.5, pp 219-226
- Rodriguez E., Nuero O., Guillen F., Martinez A.T., Martinez M.J.**, Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase, 2004, Elsevier Ltd., *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 36, pp. 909–916
- Rosnina A.G., Tan Y.S., Abdullah N., Vikineswary S.**, Morphological and molecular characterization of yellow oyster mushroom, *Pleurotus citrinopileatus*, hybrids obtained by interspecies mating, 2016, Springer Science, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 32, No. 18
- Roth S, Spiess A.C.**, Laccases for biorefinery applications: a critical review an challenges and perspectives, 2015, *Bioprocess Biosyst Eng*, DOI 10.1007/s00449-015-1475-7
- Rouau X., Cheynier V., Surget A., Gloux D., Barron C., Meudec E., Montero J.L., Criton M.**, A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran, 2003, *Phytochemistry*, Vol. 63, pp. 899–903
- Santos A.Z., Neto J.M.C., Tavares C.R., Costa S.M.**, Screening of filamentous fungi for the decolorization of a commercial reactive dye, 2004, *Journal of Basic Microbiology*, Vol. 44, pp. 288–295
- Sawyer D.T., Sobkowiak A., Roberts J.L.**, *Electrochemistry for chemists*, 1995, Wiley

Schlosser D., Grey R., Fritsche W., Patterns of ligninolytic enzymes in *T. versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood, 1997, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 47, pp. 412–418

Schoevaart R., Wolbers M.W., Golubovic M., Ottens M., Kieboom A.P.G., Rantwijk F., Wielen L.A.M., Sheldon R.A., Preparation, Optimization, and Structures of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs), 2004, Wiley Periodicals, *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, Vol. 87, No. 6, pp. 754-762

Sheldon R.A., Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), 2011, Springer, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 92, pp. 467–477

Sheldon R.A., Sorgedraeger, Janssen M.H.A., Use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) for performing biotransformations, 2007, *Chemistry Today*, Vol. 25, No. 1, pp 62-67

Shleev S.V., Morozova O., Nikitina O., Gorshina E.S., Rusinova T., Serezhenkov V.A., Burbaev D.S., Gazaryan I.G., Yaropolov A.I., Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes, 2004, *Biochimie*, Vol. 86, pp. 693–703

Schuler M.L., Kargi F., Μηχανική Βιοδιεργασιών – Βασικές Έννοιες, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα, 2005, Κεφ. 3

Sierra J., Marti E., Montserrat G., Cruanas R., Garau M.A., Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal, 2001, *The Science of the Total Environment*, Vol. 279, pp 207-214

Sigoillot C., Camarero S., Vidal T., Record E., Asther M., Pérez-Boada M., Martínez M.J., Sigoillot J.C., Asther M., Colom J.F., Martínez, Á.T., Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps, 2005, *Journal of Biotechnology*, Vol. 115, No. 4, pp. 333-343

Slomczynski D., Nakas J.P., Tanenbaum S.W., Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61–34, 1995, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, pp. 907–912

Smirnov S.A., Koroleva O.V., Vavrilova V.P., Belova A.B., Klyachko N.L., Laccases from basidiomycetes: physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds, 2001, *Biochemistry (Mosc)*, Vol. 66. pp. 774–779

Sulek F., Fernandez D.P., Knez Z., Habulin M., Sheldon R.A., Immobilization of horseradish peroxidase as crosslinked enzyme aggregates (CLEAs), 2011, Elsevier Ltd., *Process Biochemistry*, Vol. 46, pp. 765–769

Sunil S.More, Renuka P. S., Pruthvi K., SwethaM., S.Malini, and Veena S. M., Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus sp.*, 2011, *Enzyme Research*, Volume 2011, Article ID 248735, 7 pages

Svobodovva K., The implications of ligninolytic enzymes in the decolorization of synthetic dyes by the white-rot fungus *Irpex lacteus*, 2005, PhD Thesis, Charles University, Prague, Czech Republic

Taboada-Puig R., Junghanns C., Demarche P, Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M., Agathos S.N., Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors, 2011, Elsevier Ltd., *Bioresource Technology*, Vol. 102, pp. 6593–6599

- Thakker G.D., Evans C.S., Rao K.K.**, Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena, 1992, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 37, pp. 321–323
- Thurston C.F.**, The structure and function of fungal laccases, 1994, *Microbiology*, Vol. 140, pp. 19-26
- Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D., Aggelis G.**, Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity, 2002, *Bioresource Technology*, Vol. 84, pp. 251–257
- Halaburgi V.M., Sharma S., Sinha M., Singh T.P., Karegoudar T.B.**, Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications, 2011, Elsevier Ltd., *Process Biochemistry* 46, pp 1146–1152
- Wahleithner J.A., Xu F., Brown K.M., Brown S.H., Golightly E.J., Halkier T., Kauppinen S., Pederson A., Schneider P.**, The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*, 1996, *Current Genetics*, Vol. 29, pp. 395–403
- Wang J.C., Hu S.H., Liang Z.C., Yeh C.J.**, Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect, 2005, Springer-Verlag, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 67, pp. 759–766
- Waterhouse A.**, Determination of Total Phenolics, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001, Wiley
- Williamson P.R.**, Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans* – identification as a laccase, 1994, *Journal of Bacteriology*, Vol. 176, pp. 656–664
- Wong Y., Yu J.**, Laccase-catalyzed Decolorization of Synthetic Dyes, 1999, Elsevier Science Ltd., *Water Research*. Vol. 33, No. 16, pp. 3512-3520
- Wood D.A.**, Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*, 1980, *Journal of General Microbiology*, Vol. 117, pp. 327–338
- Yang J., Lin Y., Yang X., Ng T.B., Ye X., Lin J.**, Degradation of tetracycline by immobilized laccase and the proposed transformation pathway, 2017, Elsevier B.V., *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 322, pp. 525–531
- 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.**, Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*, 1996, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, pp.834–841
- Zhang L., Fei S., Zhang Y.**, The influence of chemical modification on antiviral (CB5) activity of polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus*, 1994, *Sheng Wu Hua Hsueh Zazhi*, Vol. 10, pp. 150–154
- Zhu X.D., Gibbons J., Garcia-Rivera J., Casadevall A., Williamson P.R.**, Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor, 2001, *Infection and Immunity*, Vol. 69, pp. 5589–5596
- Zorn H., Langhoff S., Scheibner M., Nimitz M., Berger R.G.**, A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β , β -Carotene to flavor compounds, 2003, *Biological Chemistry*, Vol. 384, No. 7, pp. 1049-1056
- Zouraris D., Dimarogona M., Karnaouri A., Topakas E., Karantonis A.**, Direct electron transfer of lytic polysaccharide monoxygenases (lpmos) and determination of their formal potentials by large

amplitude fourier transform alternating current cyclic voltammetry, 2018, Bioelectrochemistry, Vol. 124, pp. 149-155

Γκατζάρου Ε., Αποικοδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιουργείου με χρήση λιγνινολυτικών μυκήτων, 2014, Διπλωματική εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών

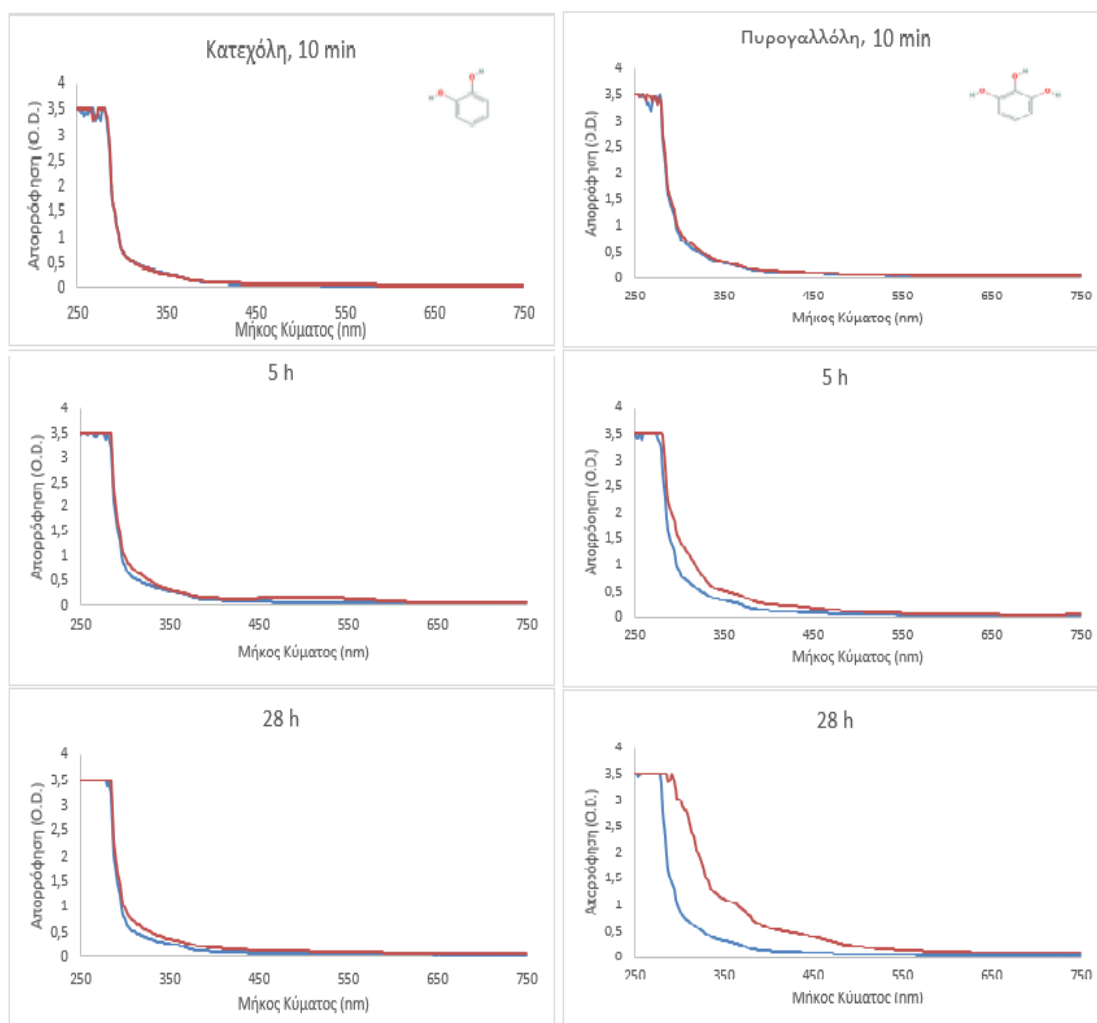
Χρυσοβαλάντου Ν., Αξιολόγηση τριφασικής και διφασικής μεθόδου ελαιοποίησης του ελαιοκαρπού, 2010, Διεπιστημονικό – Διατμηματικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών «ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ», Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

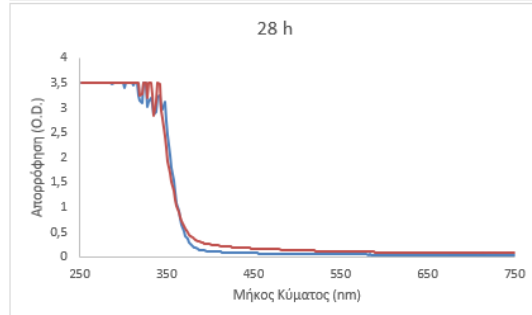
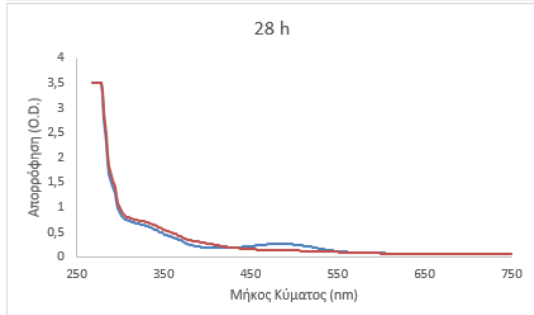
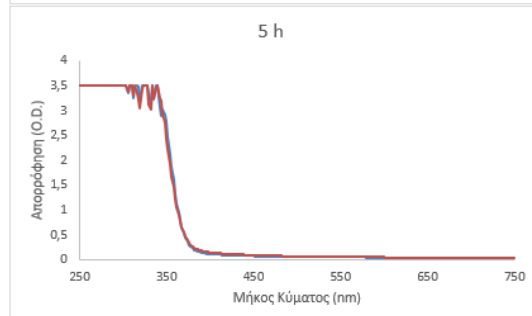
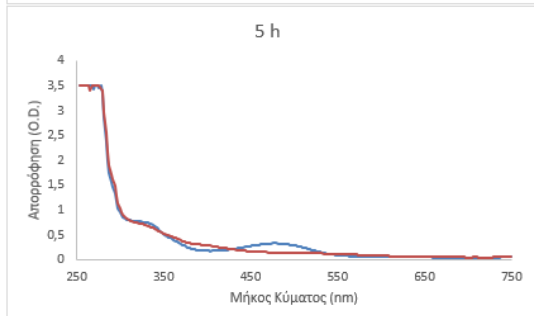
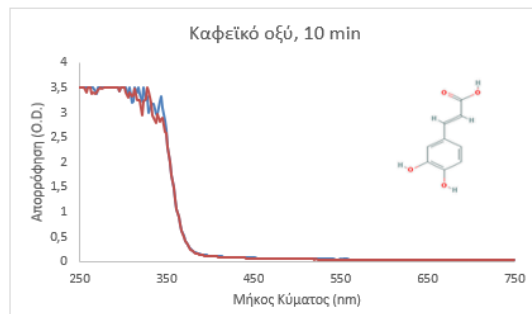
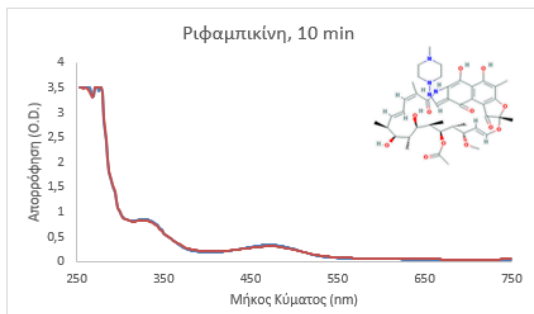
6 Παράρτημα

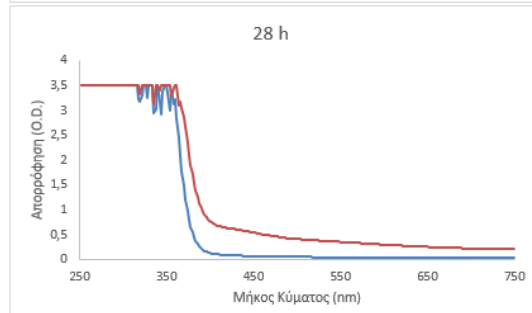
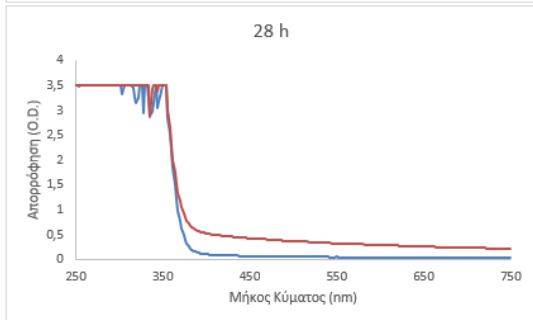
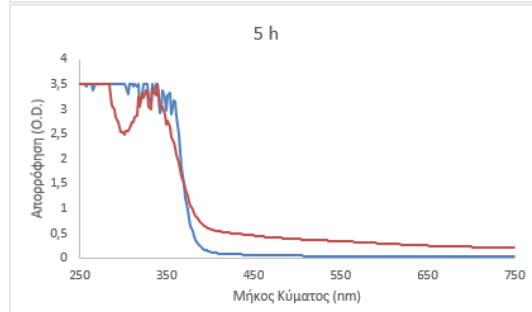
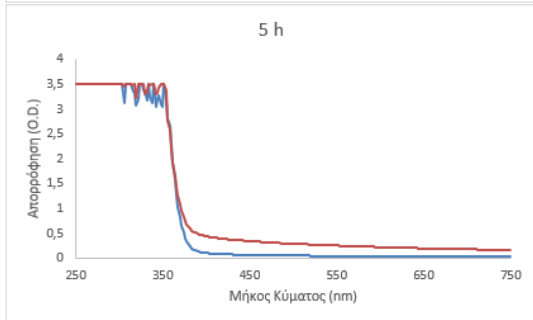
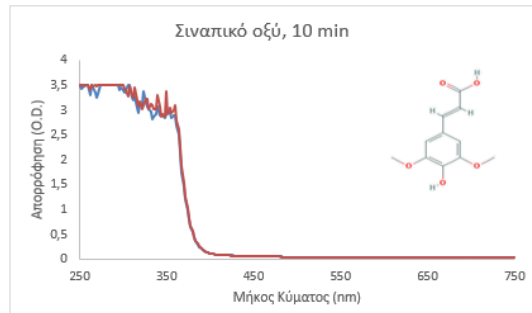
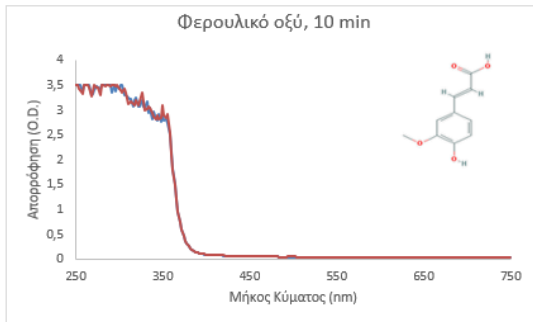
6.1 Παράρτημα Α: Φάσματα Απορρόφησης από το Πείραμα Αξιολόγησης Οξειδωσης Υποστρωμάτων.

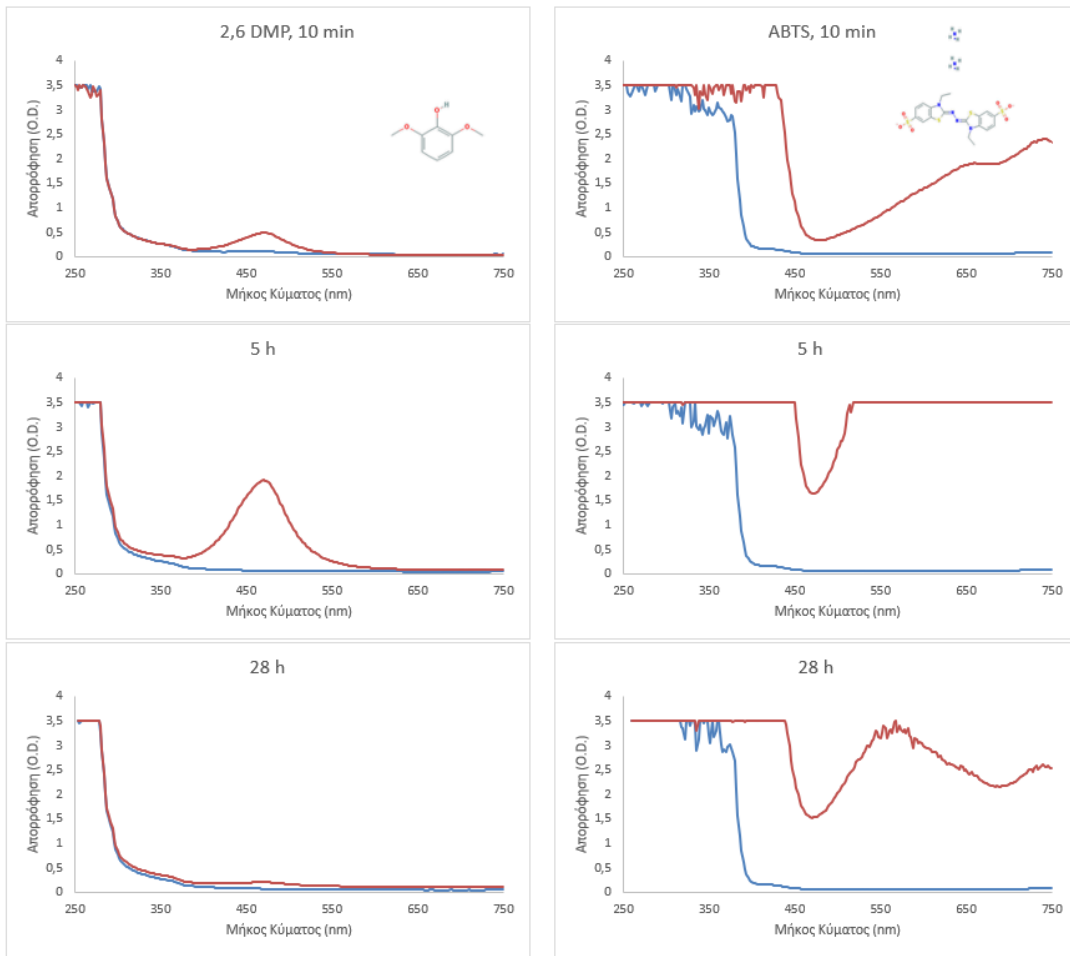
Η κόκκινη γραμμή αντιστοιχεί στα δείγματα του ενζύμου και η μπλε στα αντίστοιχα τυφλά.

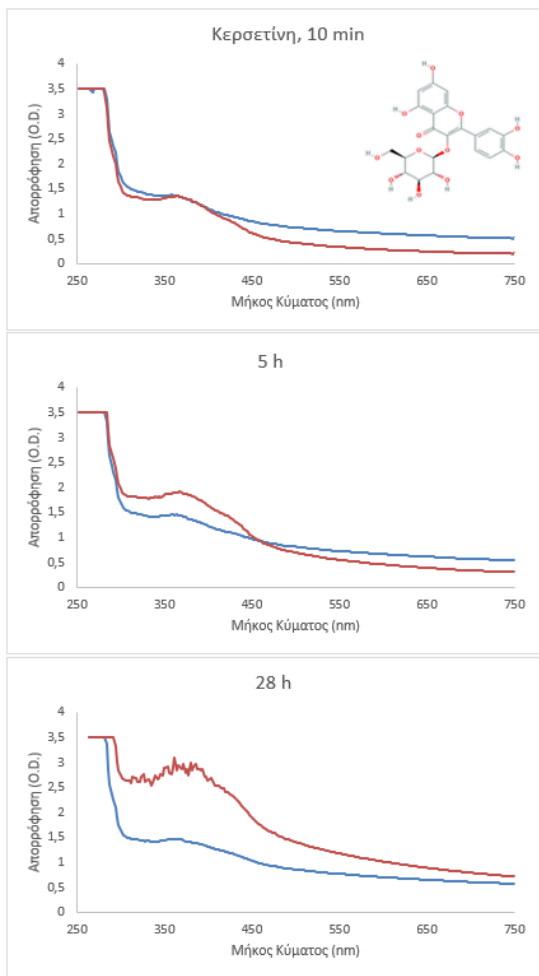
6.1.1 Οξείδωση υποστρωμάτων από την λακκάση *PcLac1*



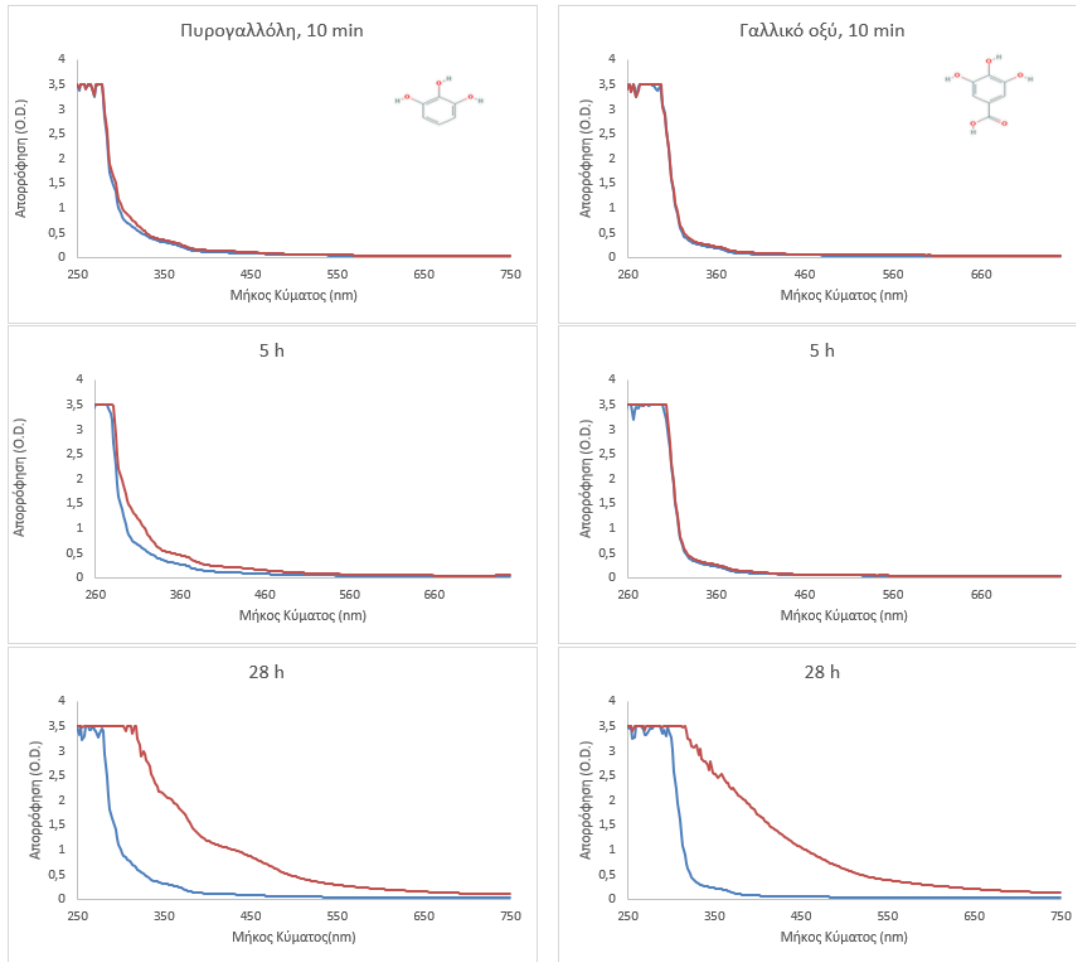


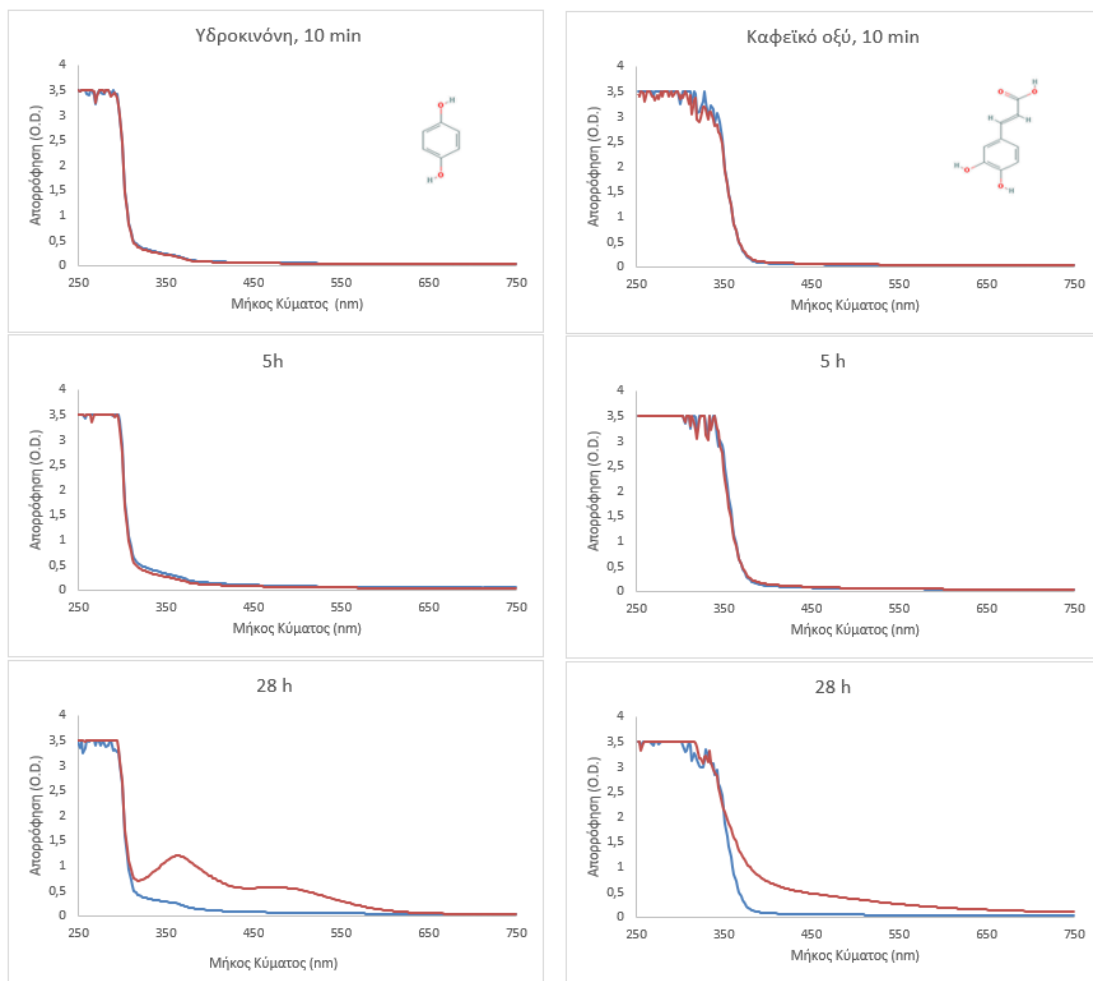


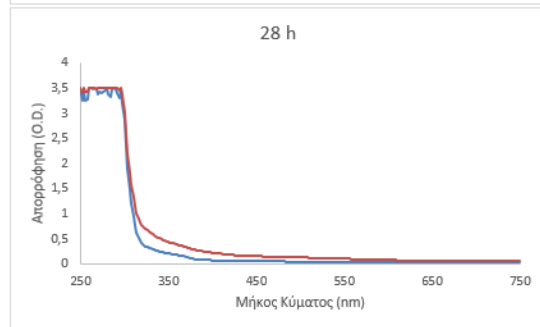
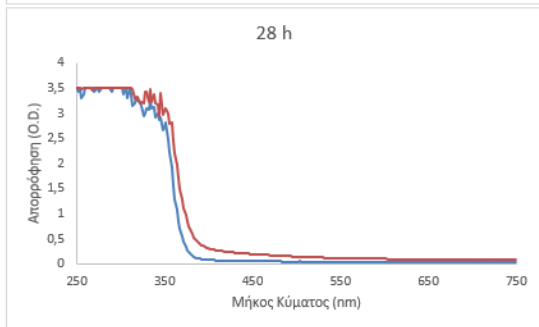
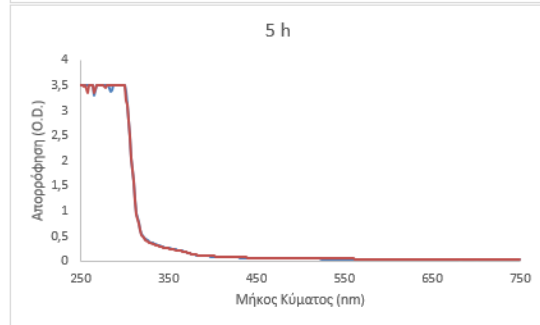
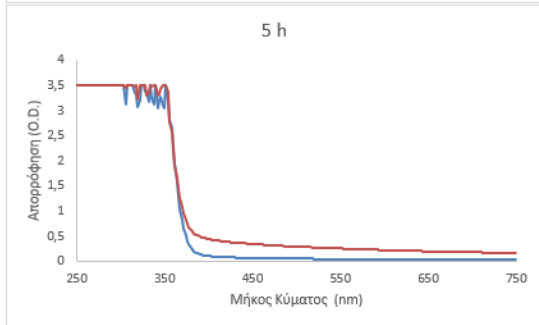
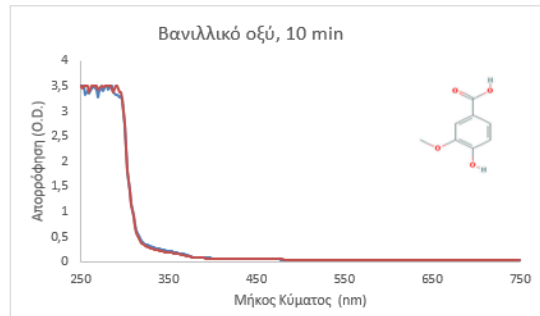
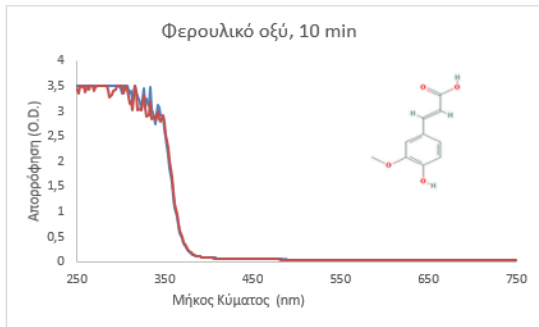


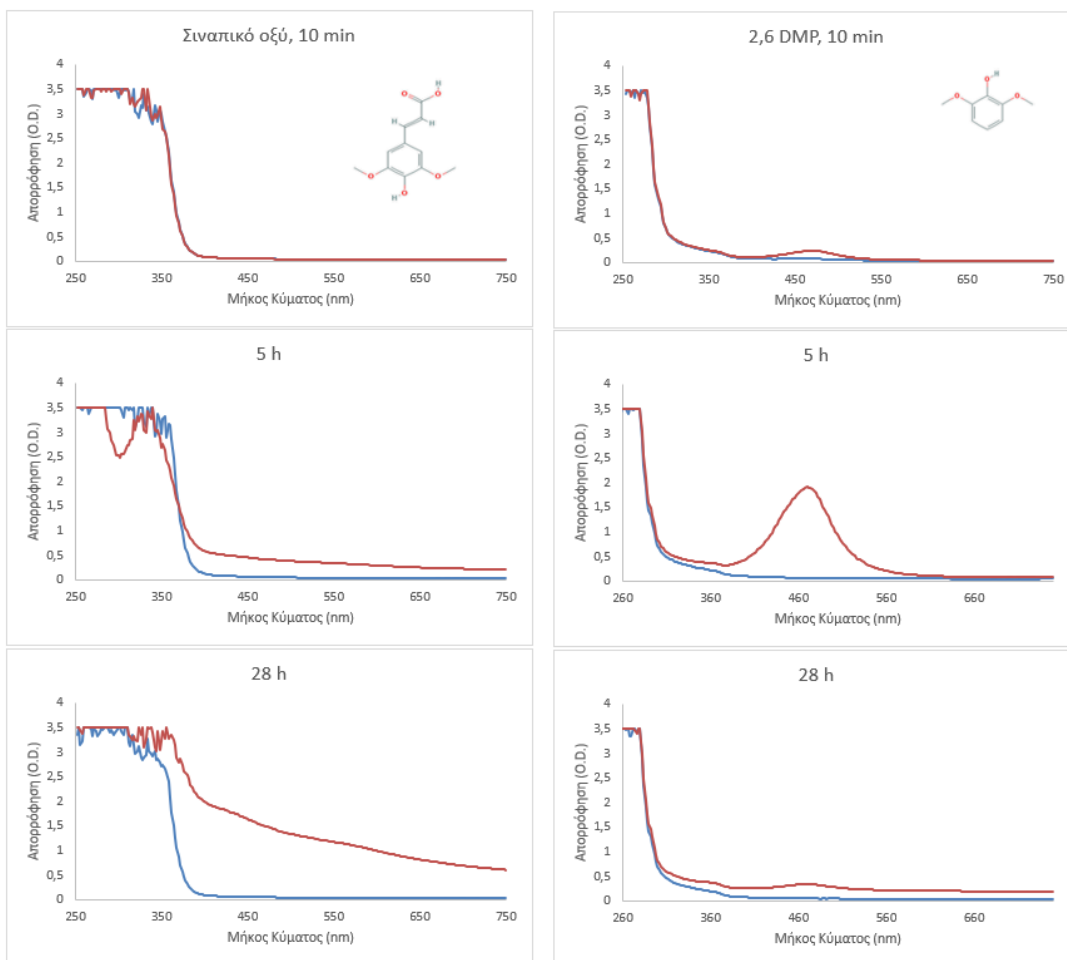


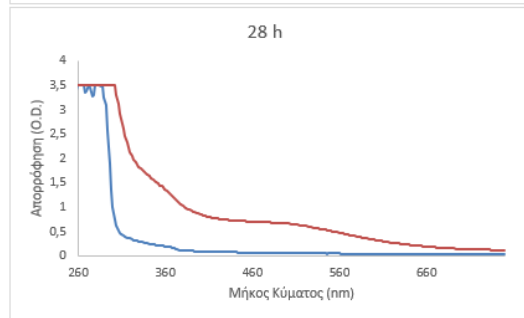
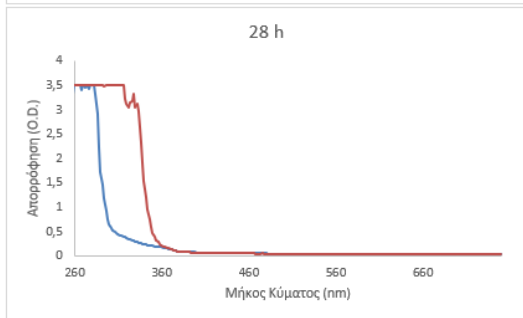
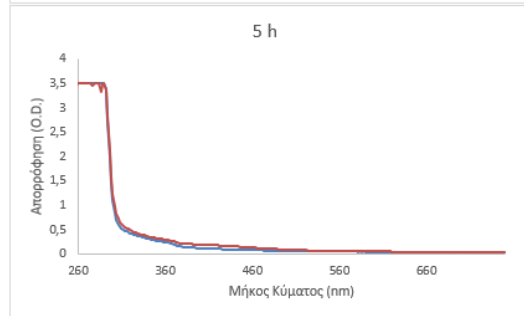
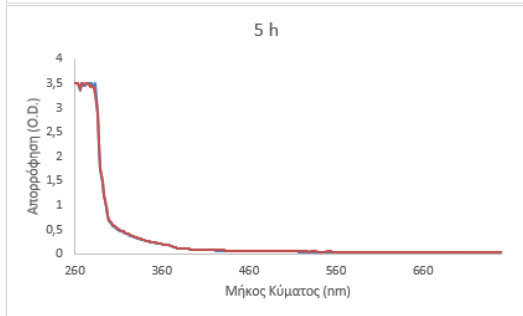
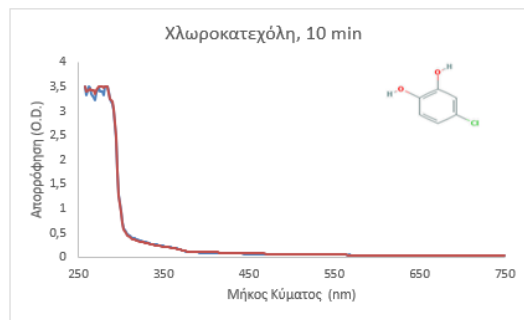
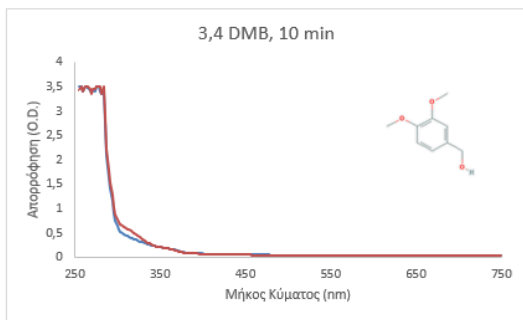
6.1.2 Οξείδωση υποστρωμάτων από την λακκάση *PcLac2*

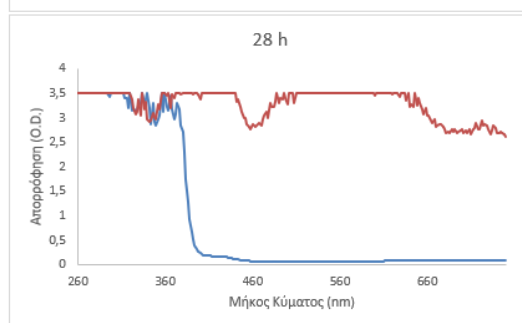
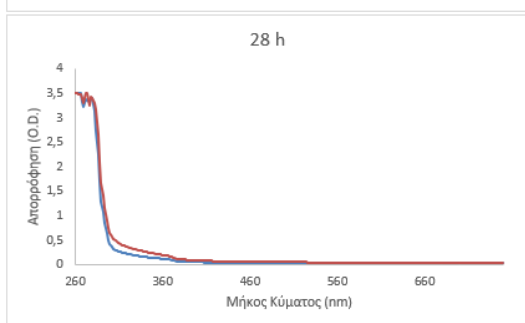
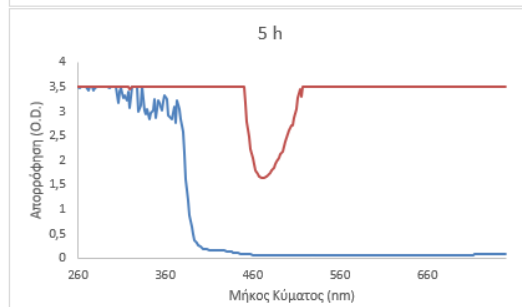
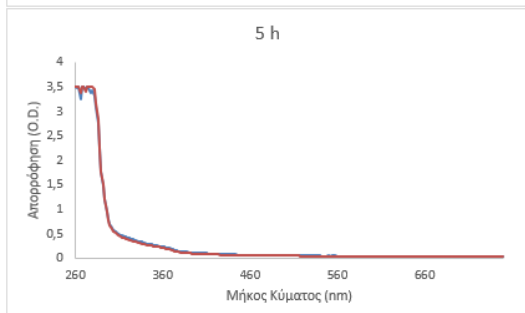
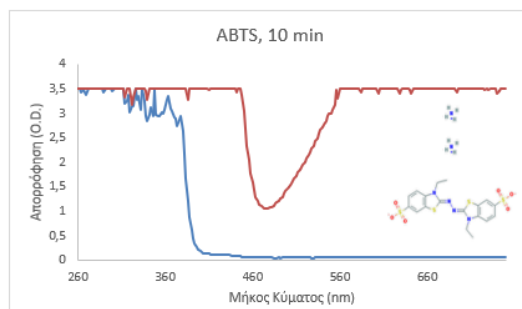
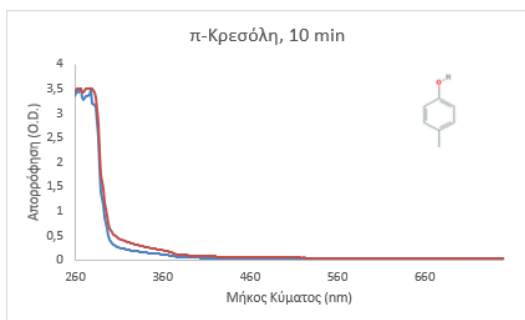


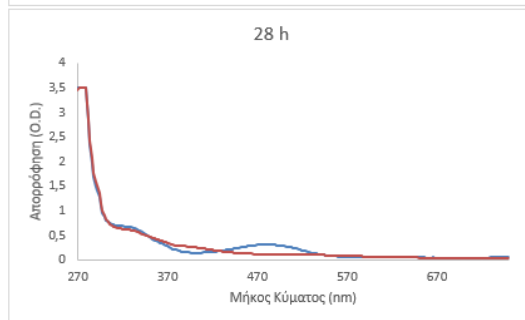
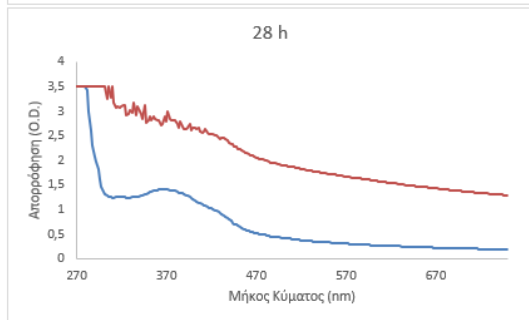
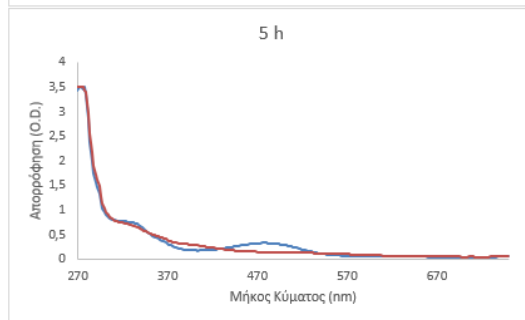
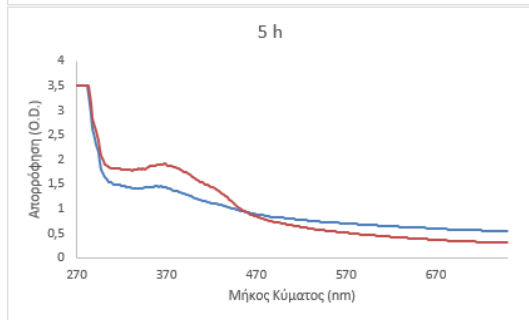
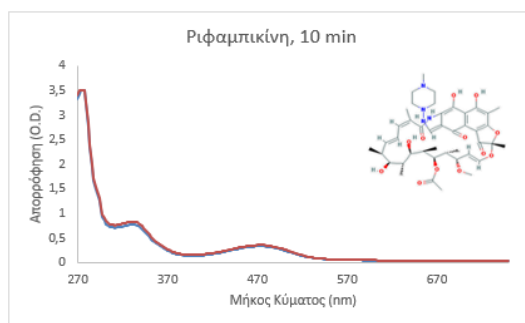
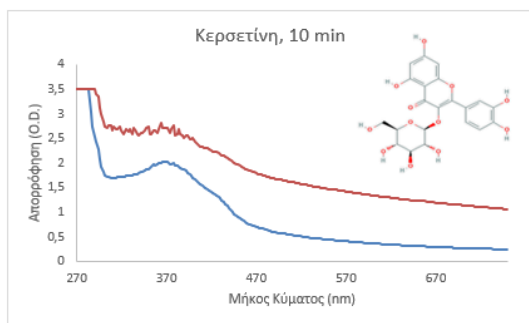


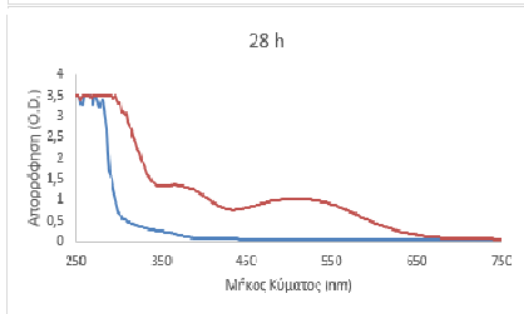
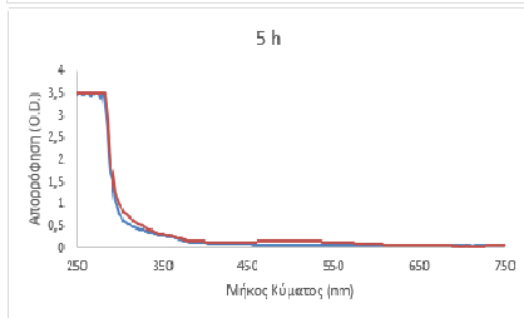
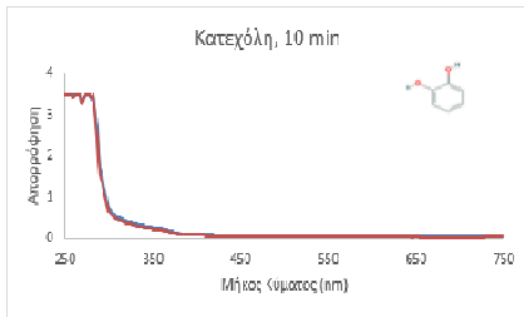




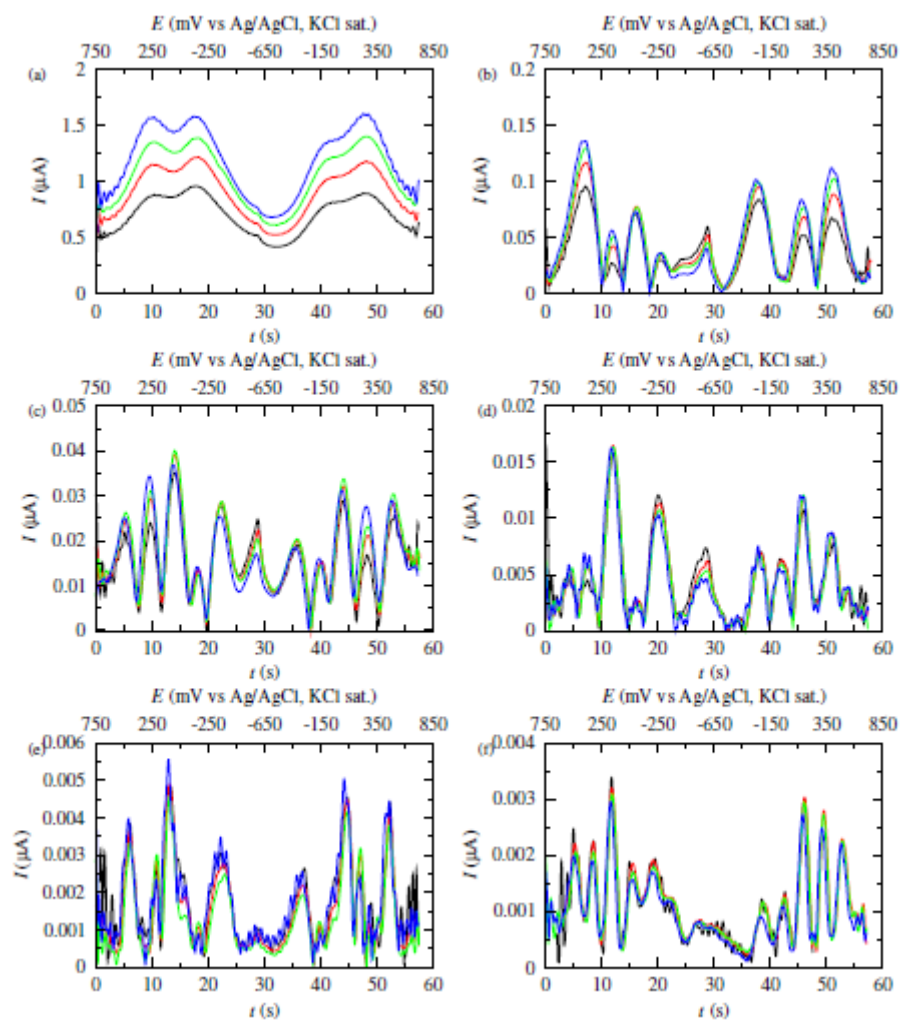




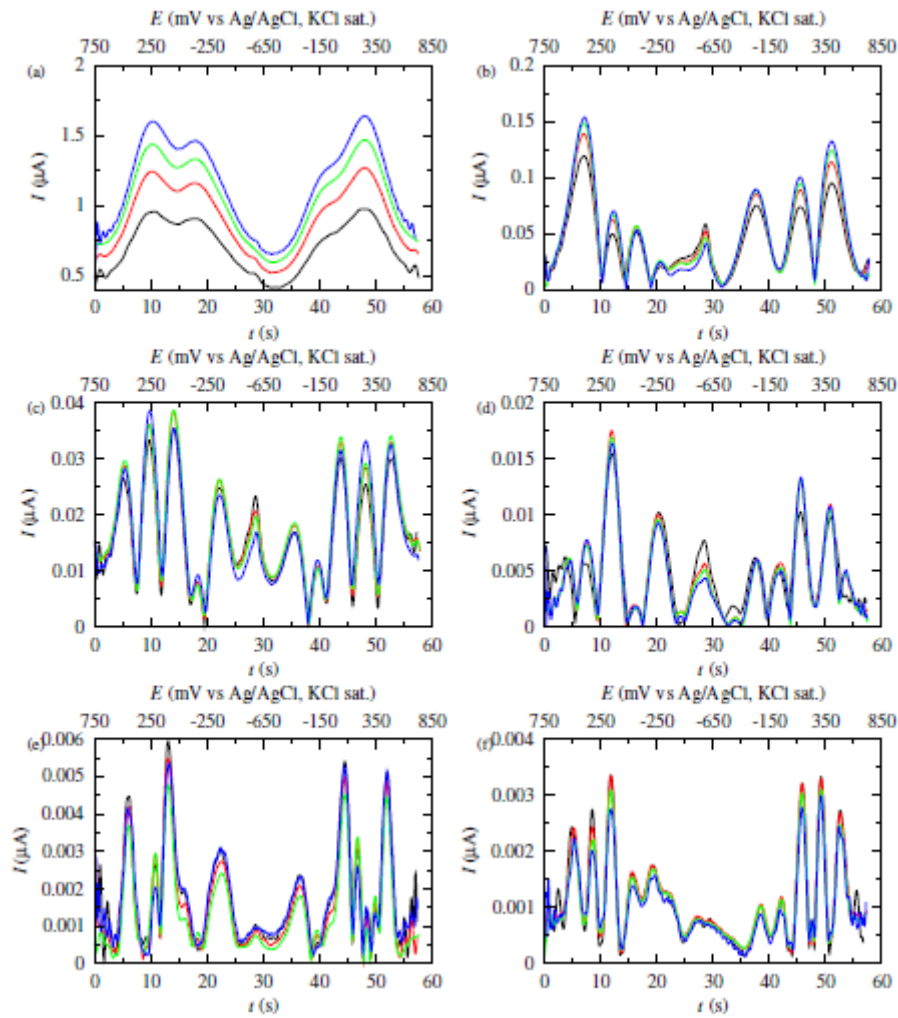




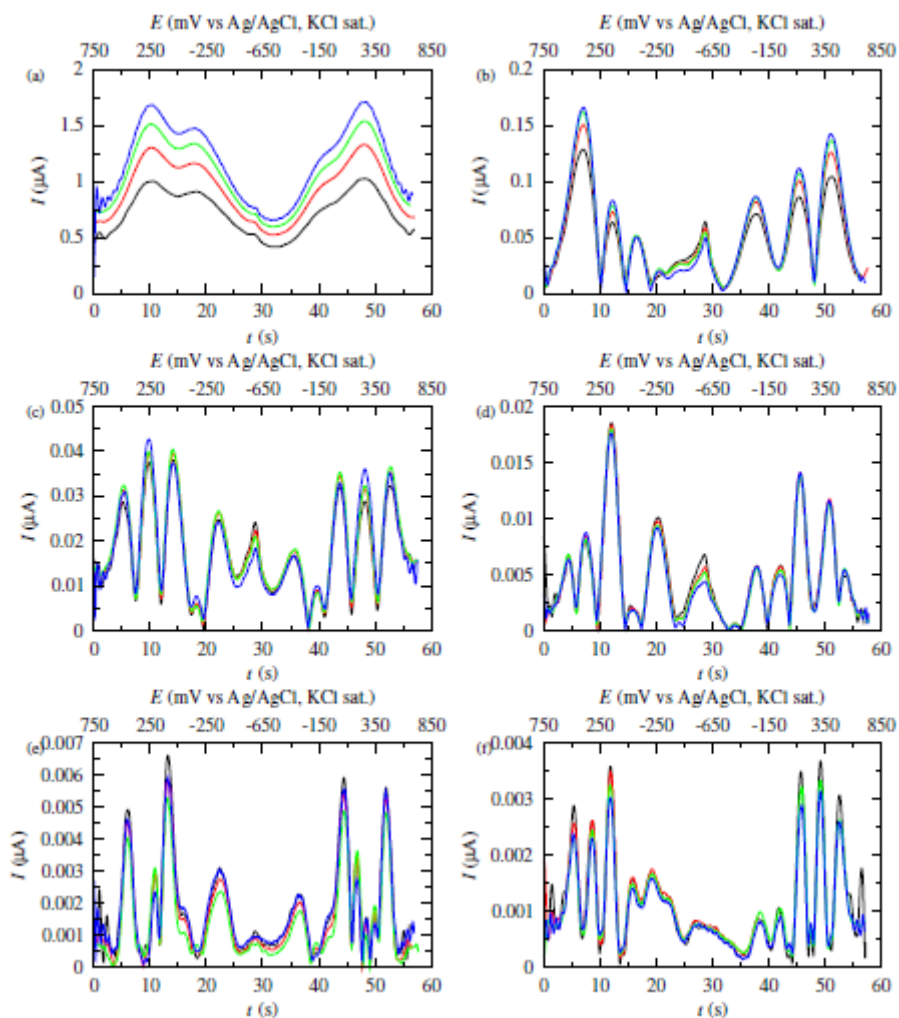
6.2 Παράρτημα Β: Διαγράμματα βολταμμογραφίας των 6 πρώτων αρμονικών συναρτήσεων



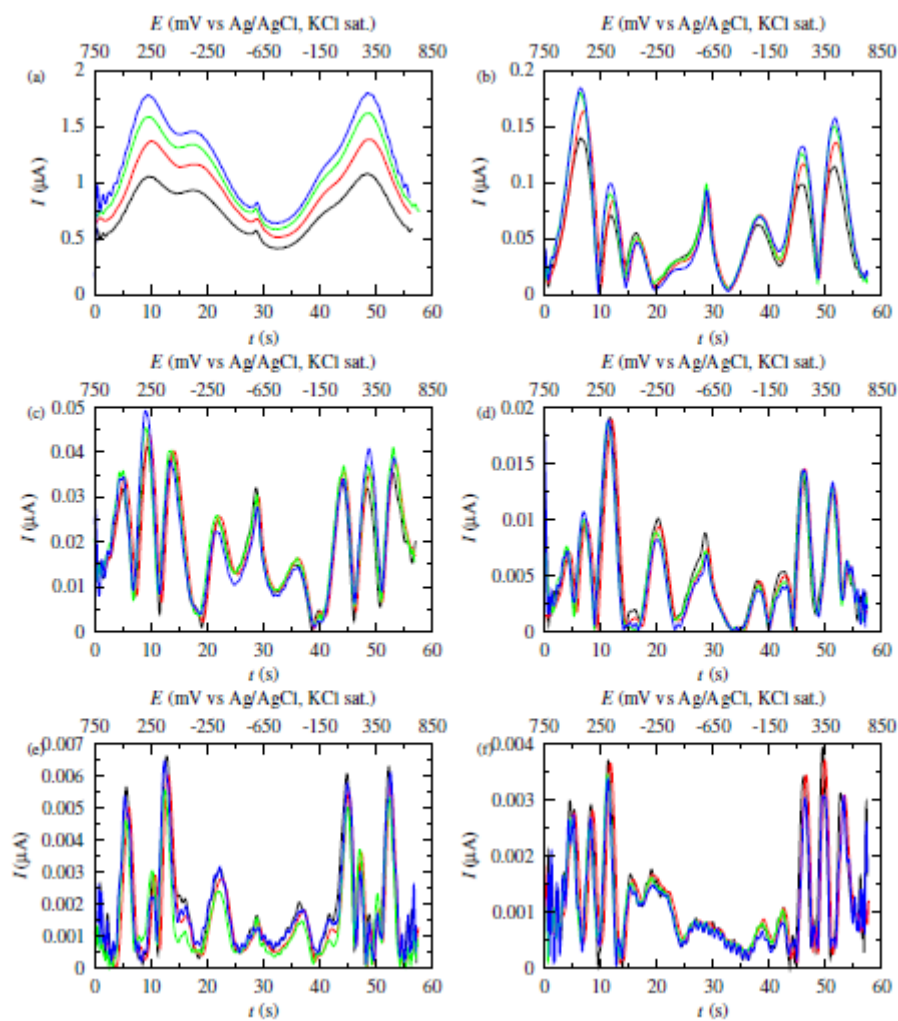
Διάγραμμα 6.2.1 Οι 6 πρώτες αρμονικές όπως προκύπτουν από τη μέθοδο FTacV για το ένζυμο Pclac1, χρήσει ταχύτητας σάρωσης 50 mV/s, διαφοράς δυναμικού 180 mV και συχνότητας 6 (μαύρη καμπύλη), 9 (κόκκινη καμπύλη), 12 (πράσινη καμπύλη) και 16 Hz (μπλε καμπύλη) σε απαερωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού pH 4.0, 100 mM και θερμοκρασία 30°C.



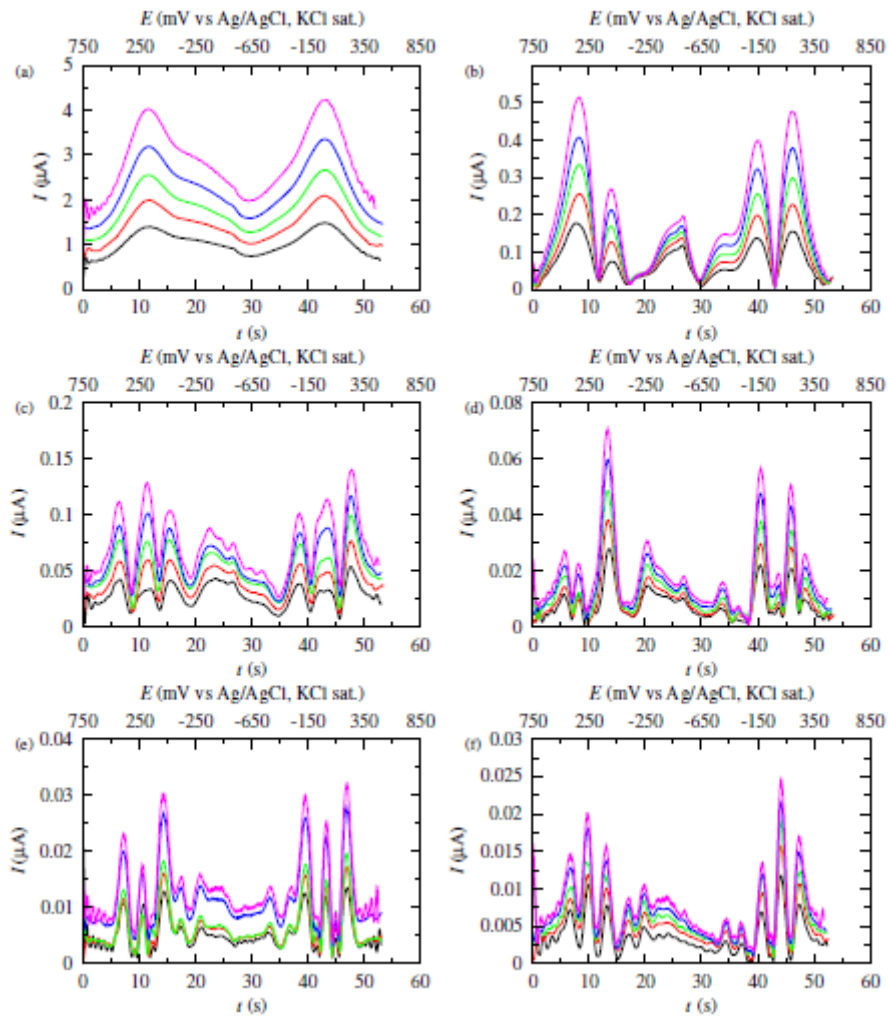
Διάγραμμα 6.2.2 Οι 6 πρώτες αρμονικές όπως προκύπτουν από τη μέθοδο FTacV για το ένζυμο Pclac1, χρήσει ταχύτητας σάρωσης 50 mV/s, διαφοράς δυναμικού 180 mV και συχνότητας 6 (μαύρη καμπύλη), 9 (κόκκινη καμπύλη), 12 (πράσινη καμπύλη) και 16 Hz (μπλε καμπύλη) σε απαερωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού pH 4.0 ,100 mM και θερμοκρασία 33°C.



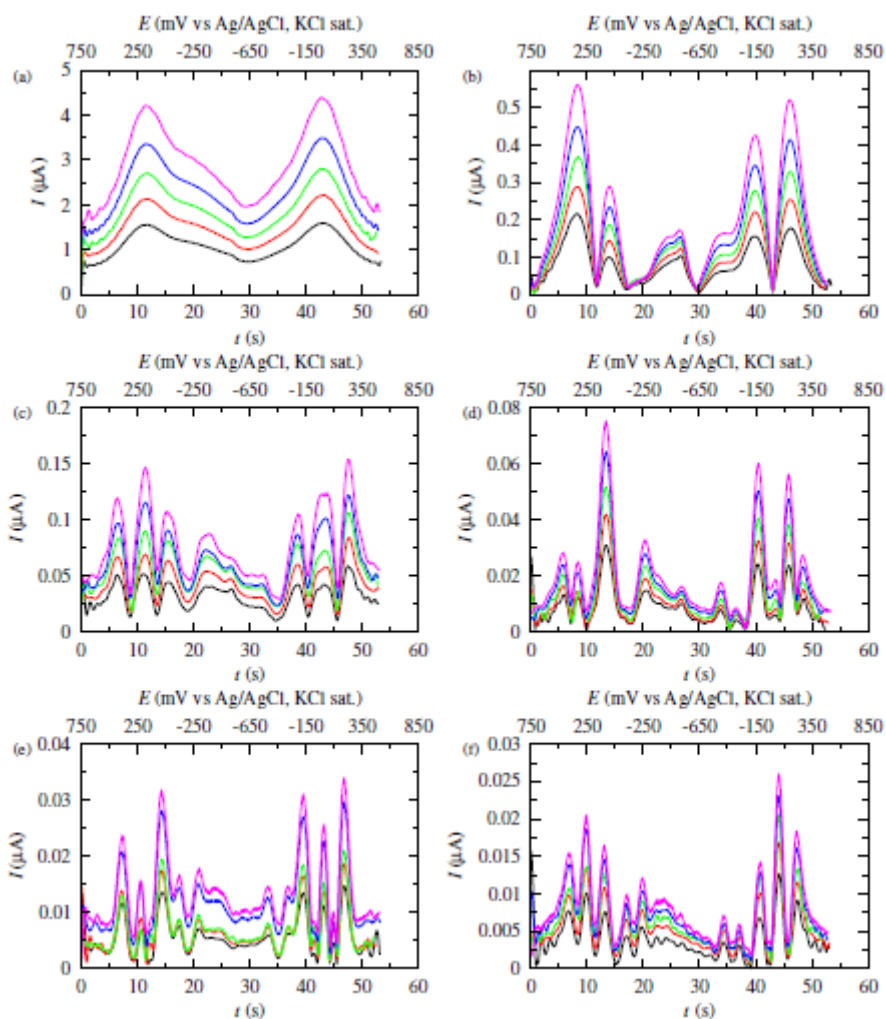
Διάγραμμα 6.2.3 Οι 6 πρώτες αρμονικές όπως προκύπτουν από τη μέθοδο FTacV για το ένζυμο Pclac1, χρήσει ταχύτητας σάρωσης 50 mV/s, διαφοράς δυναμικού 180 mV και συχνότητας 6 (μαύρη καμπύλη), 9 (κόκκινη καμπύλη), 12 (πράσινη καμπύλη) και 16 Hz (μπλε καμπύλη) σε απασερωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού pH 4.0, 100 mM και θερμοκρασία 39°C.



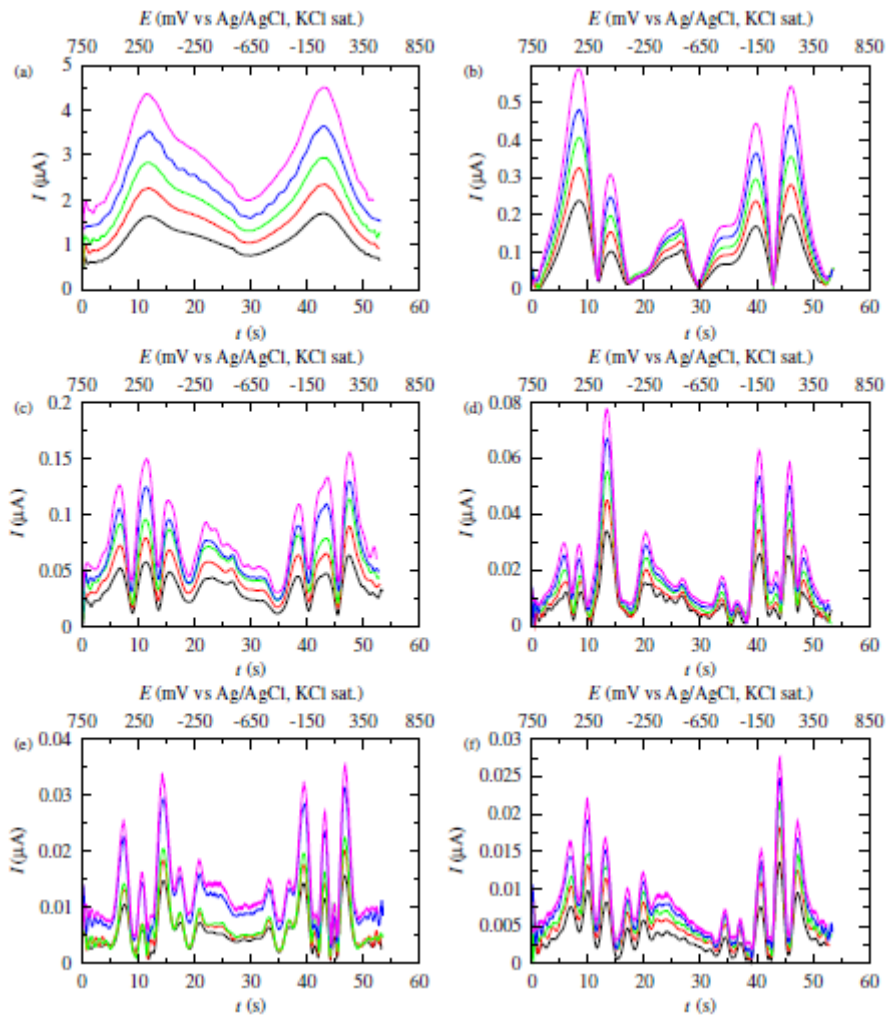
Διάγραμμα 6.2.4 Οι 6 πρώτες αρμονικές όπως προκύπτουν από τη μέθοδο FTacV για το ένζυμο PcLac1, χρήσει ταχύτητας σάρωσης 50 mV/s, διαφοράς δυναμικού 180 mV και συχνότητας 6 (μαύρη καμπύλη), 9 (κόκκινη καμπύλη), 12 (πράσινη καμπύλη) και 16 Hz (μπλε καμπύλη) σε απαερωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού pH 4.0, 100 mM και θερμοκρασία 43°C.



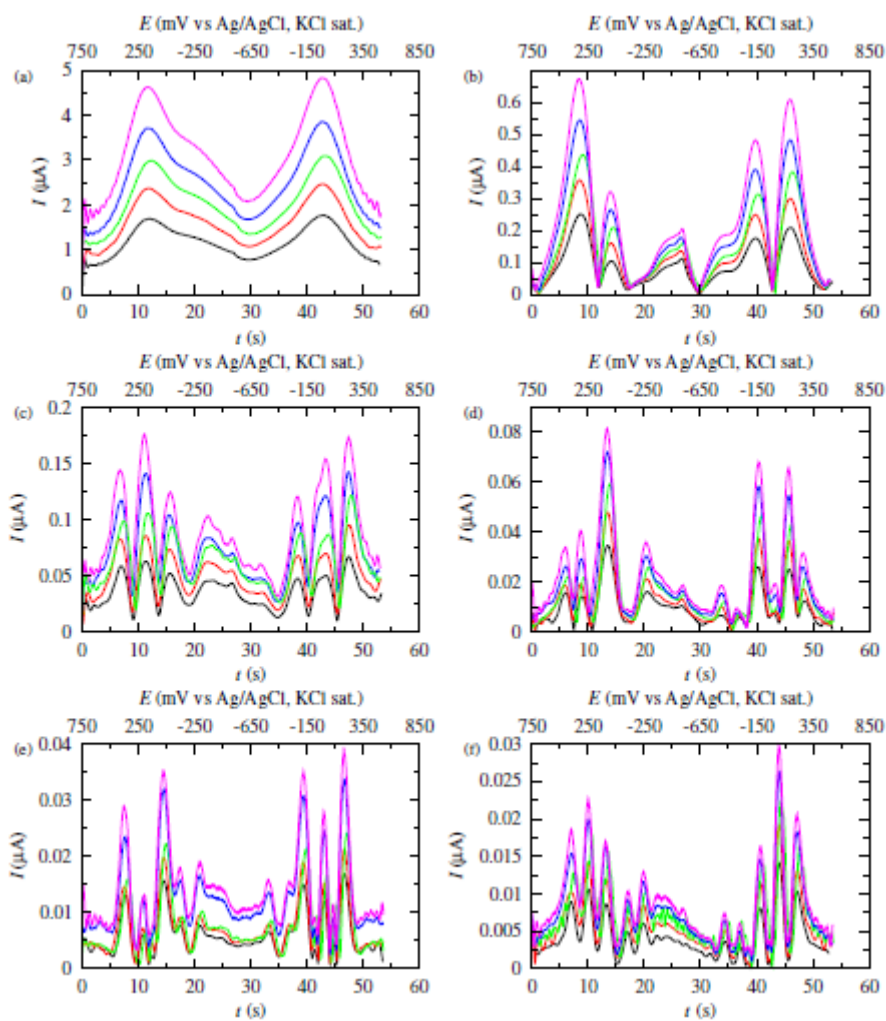
Διάγραμμα 6.2.5 Οι 6 πρώτες αρμονικές όπως προκύπτουν από τη μέθοδο FTacV για το ένζυμο Pclac2, χρήσει ταχύτητας σάρωσης 50 mV/s, διαφοράς δυναμικού 180 mV και συχνότητας 6 (μαύρη καμπύλη), 9 (κόκκινη καμπύλη), 12 (πράσινη καμπύλη), 16 (μπλε καμπύλη) και 21 Hz (μωβ καμπύλη) σε απαερωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού pH 4.0 ,100 mM και θερμοκρασία 33°C.



Διάγραμμα 6.2.6 Οι 6 πρώτες αρμονικές όπως προκύπτουν από τη μέθοδο FTacV για το ένζυμο Pclac2, χρήσει ταχύτητας σάρωσης 50 mV/s, διαφοράς δυναμικού 180 mV και συχνότητας 6 (μαύρη καμπύλη), 9 (κόκκινη καμπύλη), 12 (πράσινη καμπύλη), 16 (μπλε καμπύλη) και 21 Hz (μωβ καμπύλη) σε απαερωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού pH 4.0, 100 mM και θερμοκρασία 35°C.

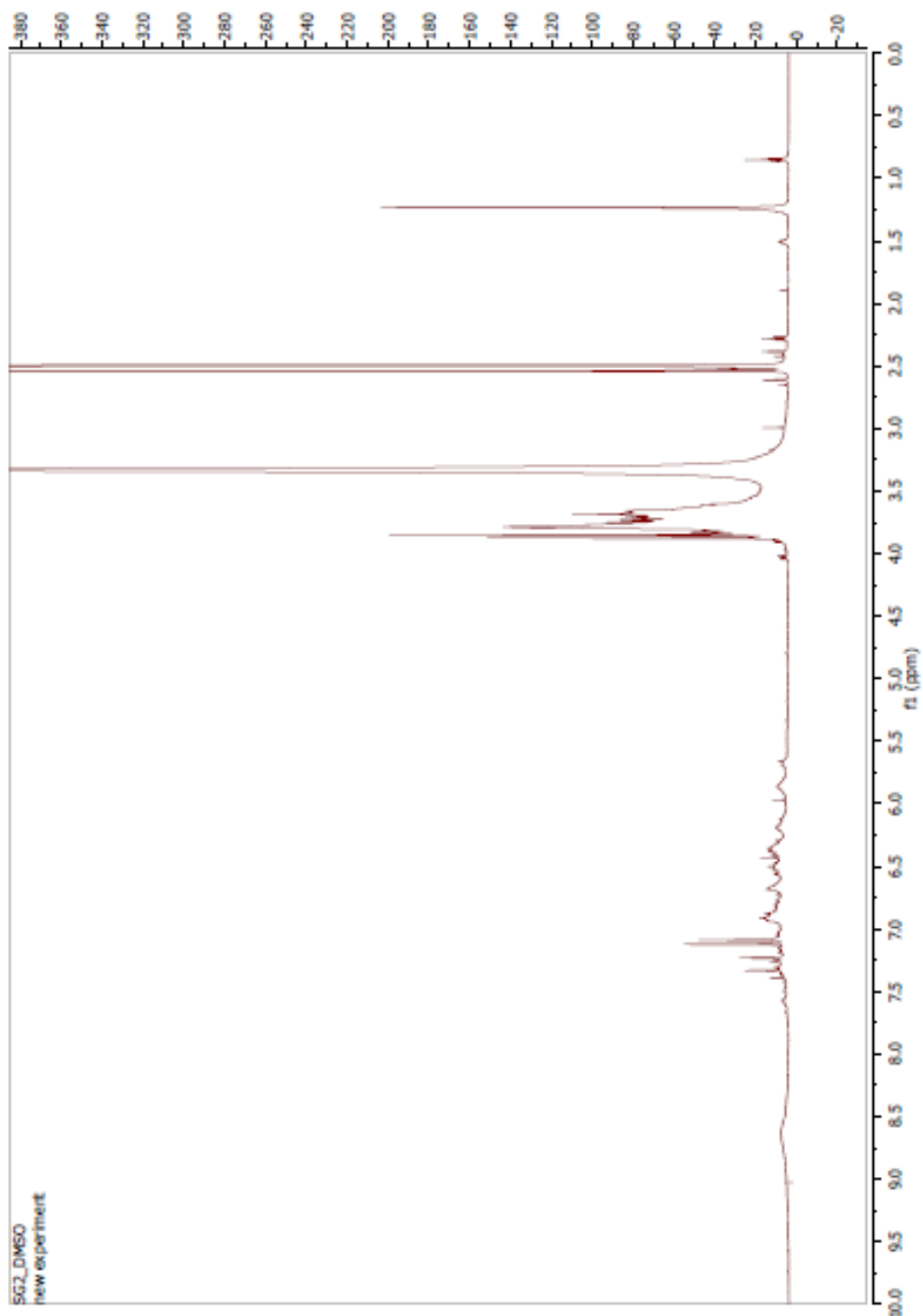


Διάγραμμα 6.2.7 Οι 6 πρώτες αρμονικές όπως προκύπτουν από τη μέθοδο FAcV για το ένζυμο Pclac2, χρήσει ταχύτητας σάρωσης 50 mV/s, διαφοράς δυναμικού 180 mV και συχνότητας 6 (μαύρη καμπύλη), 9 (κόκκινη καμπύλη), 12 (πράσινη καμπύλη), 16 (μπλε καμπύλη) και 21 Hz (μωβ καμπύλη) σε απαερωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού pH 4.0 ,100 mM και θερμοκρασία 38°C.

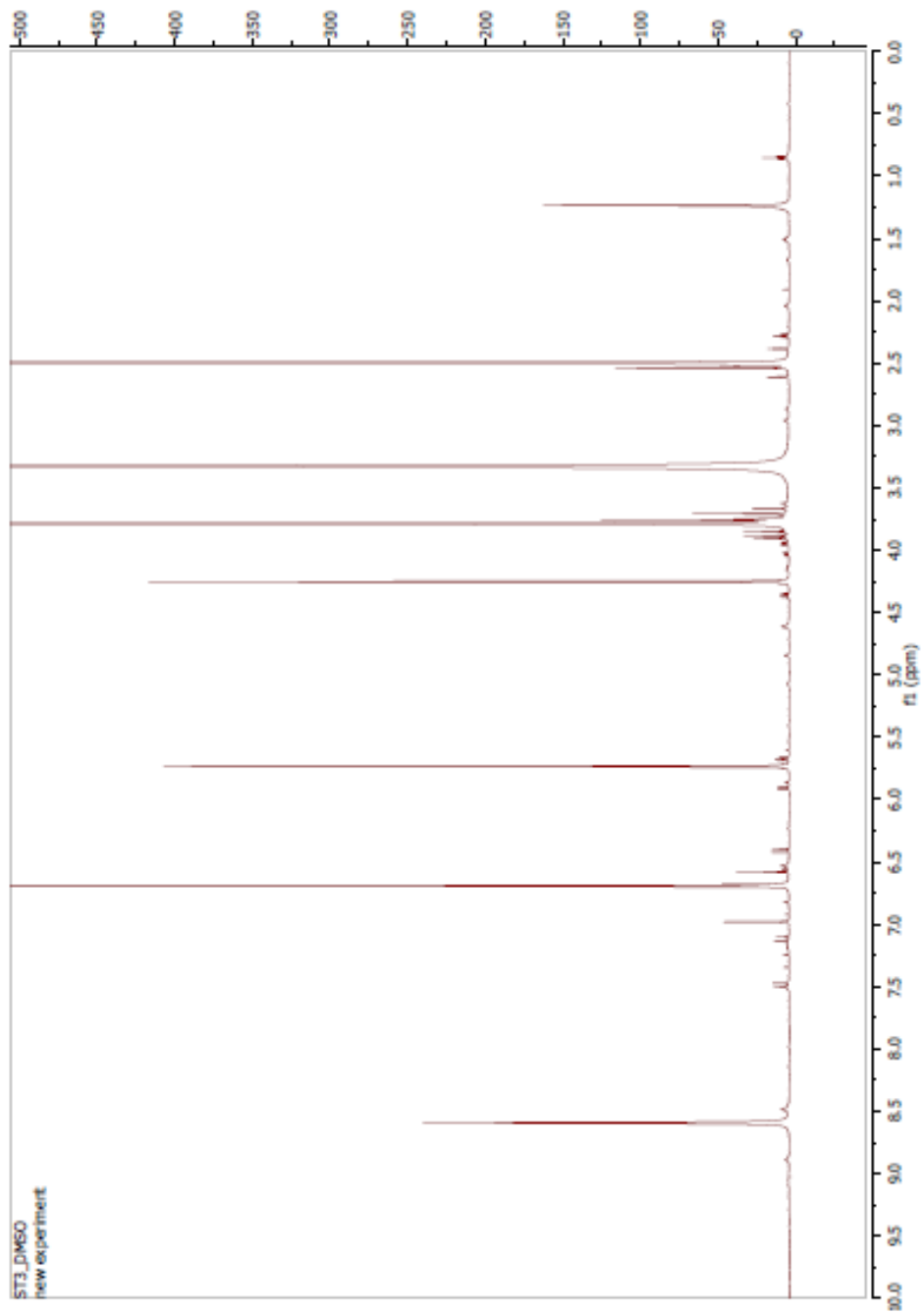


Διάγραμμα 6.2.8 Οι 6 πρώτες αρμονικές όπως προκύπτουν από τη μέθοδο FTacV για το ένζυμο Pclac2, χρήση ταχύτητας σάρωσης 50 mV/s, διαφοράς δυναμικού 180 mV και συχνότητας 6 (μαύρη καμπύλη), 9 (κόκκινη καμπύλη), 12 (πράσινη καμπύλη), 16 (μπλε καμπύλη) και 21 Hz (μωβ καμπύλη) σε απαιρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού pH 4.0 ,100 mM και θερμοκρασία 42°C.

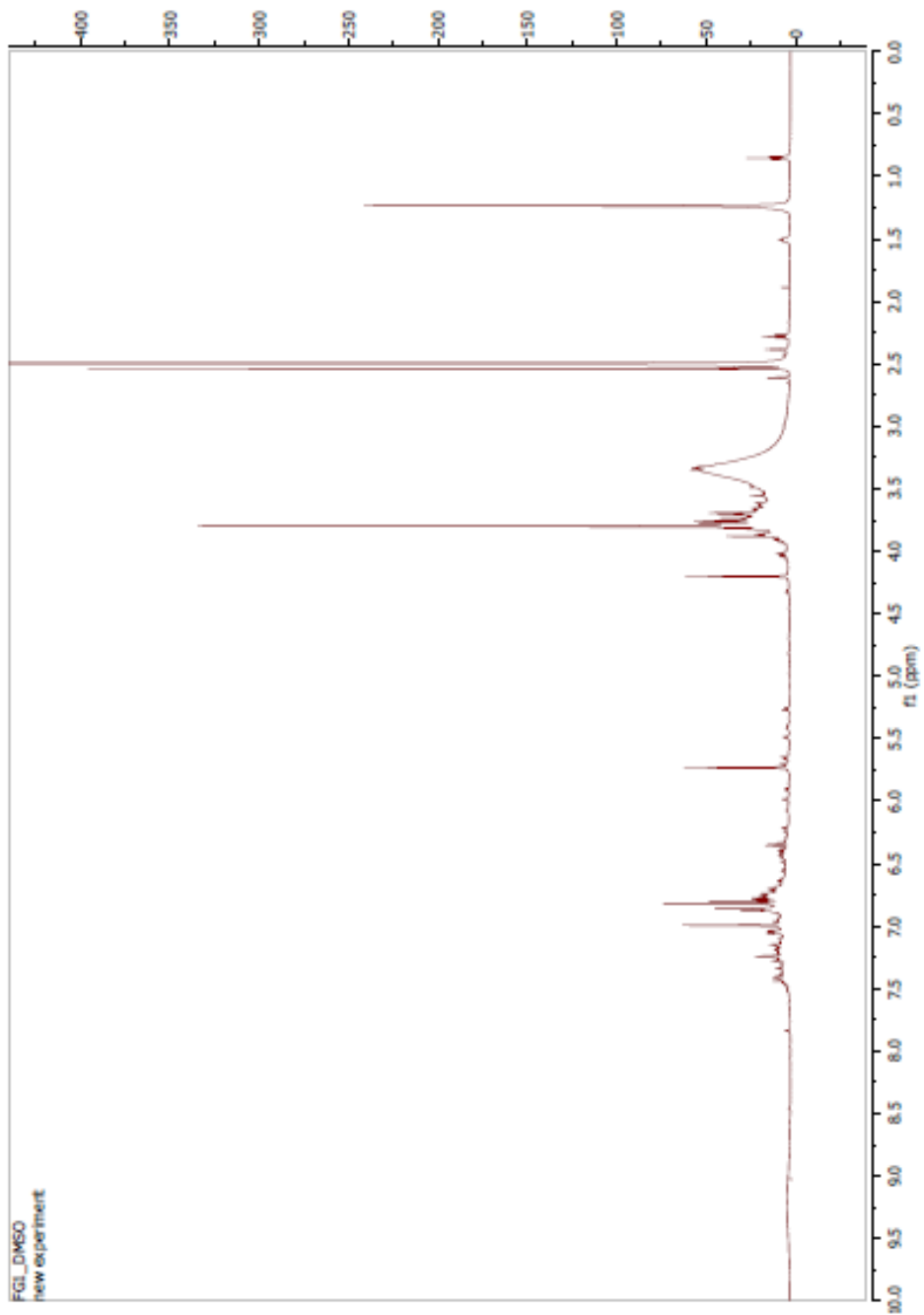
6.3 Παράρτημα Γ: Διαγράμματα Φασματοσκοπίας NMR



Εικόνα 6.3.1 Διάγραμμα φασματοσκοπίας NMR από τα προϊόντα σύνθεσης της λακκάσης *PCLac1* από μονομερή σιναπτικού οξέος.

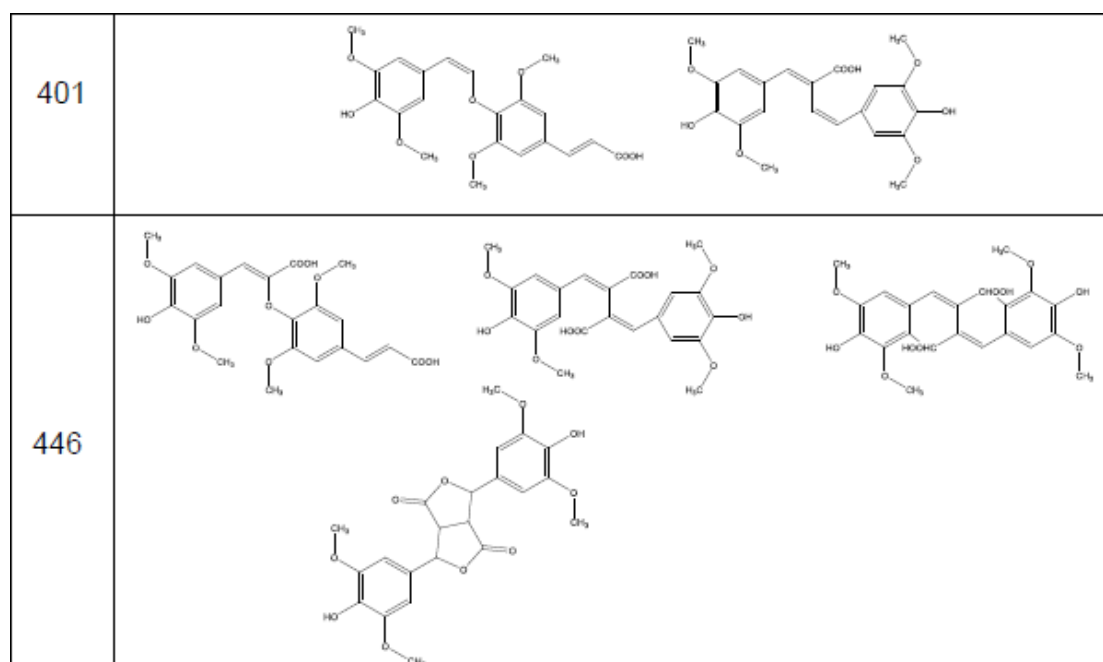


Εικόνα 6.3.2 Διάγραμμα φασματοσκοπίας NMR από τα προϊόντα σύνθεσης της λακκάσης *PcLac2* από μονομερή σιναπτικού οξέος.

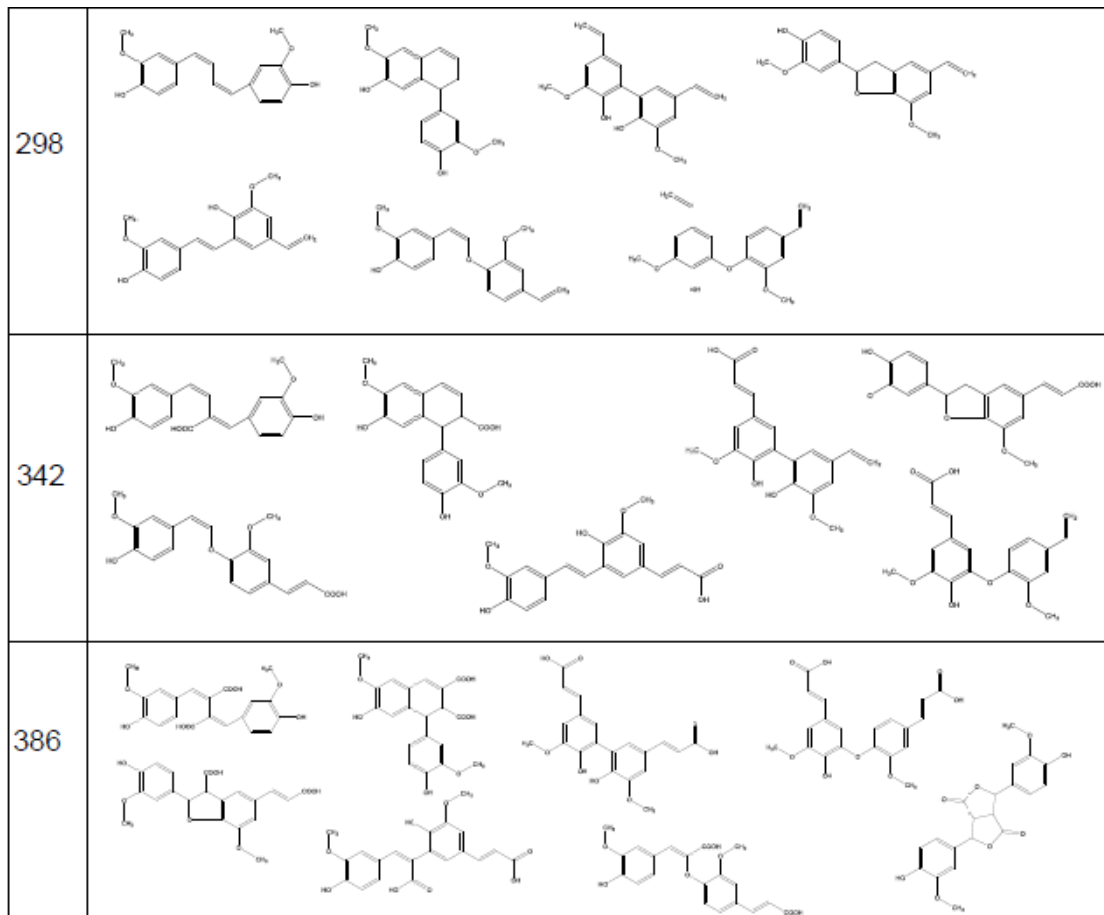


Εικόνα 6.3.3 Διάγραμμα φασματοσκοπίας NMR από τα προϊόντα σύνθεσης της λακκάσης *PcLac1* από μονομερή φερούλικού οξέος.

6.4 Παράρτημα 4: Πιθανά Προϊόντα Σύνθεσης από Οξείδωση Λακκασών με Υποστρώματα το Σιναπικό Οξύ και το Φερουλικό Οξύ



Πίνακας 6.4.1 Πιθανές δομές των προϊόντων οξείδωσης του σιναπικού οξέος από λακκάσες. Το διμερές του σιναπικού οξέος με μοριακό βάρος 446 g/mol και το αποκαρβοξυλιωμένο πολυμερές μοριακού βάρους 402 g/mol ανταποκρίνονται στις μάζες των προϊόντων που προσδιορίζονται με ενόργανη ανάλυση (Perna et al., 2018).



Πίνακας 6.4.2 Πιθανές δομές των προϊόντων οξείδωσης του φερουλικού οξέος από λακκάσες. Το διμερές του φερουλικού οξέος, με μοριακό βάρος 386 g/mol, το αποκαρβοξυλιωμένο πολυμερές, μοριακού βάρους 342 g/mol, και το δι-αποκαρβοξυλιωμένο πολυμερές, με μοριακό βάρος 298 g/mol, ανταποκρίνονται στις μάζες των προϊόντων που προσδιορίζονται με ενόργανη ανάλυση (Perna et al., 2018).