



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

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων με ενεργότητα
λακκάσης από θαλάσσιους μυκητιακούς συμβιώτες
μεσόφωτων ασπόνδυλων»**



Σιαπέρας Ρωμανός

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

Αθήνα, Φεβρουάριος 2019



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

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων με ενεργότητα
λακκάσης από θαλάσσιους μυκητιακούς συμβιώτες
μεσόφωτων ασπόνδυλων»**



Σιαπέρας Ρωμανός

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

Αθήνα, Φεβρουάριος 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή του Ε.Μ.Π κύριο Ευάγγελο Τόπακα, επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τον τομέα της βιοτεχνολογίας και ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Η εμπιστοσύνη την οποία επέδειξε προς το πρόσωπό μου και η καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας αποτέλεσαν για μένα πηγή έμπνευσης και ισχυρό κίνητρο για την εκπλήρωση της παρούσας εργασίας.

Η παρούσα Διπλωματική δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την αμέριστη βοήθεια και στήριξη του υποψήφιου διδάκτορα του ΕΜΠ Ευστράτιου Νικολάιβιτς τον οποίο και αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα. Η υπομονή του κατά τη διάρκεια της εξοικείωσής μου με τις πειραματικές τεχνικές, το σύνολο των γνώσεων που μου μετέδωσε, η άμεση ανταπόκριση στις απορίες μου και το ειλικρινές ενδιαφέρον του για την πρόοδό μου συντέλεσαν καταλυτικά στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας. Το κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν τόσο σε φιλικό όσο και σε επιστημονικό επίπεδο συντέλεσε στην ομαλή ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξή τους τόσο κατά την εκπόνηση της εργασίας όσο και στα υπόλοιπα φοιτητικά χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα θαλάσσια οικοσυστήματα φιλοξενούν μια πλούσια ποικιλία μικροοργανισμών που αποτελούν τεράστια πηγή πιθανών βιοκαταλυτών με καινοτόμες ιδιότητες, λόγω της προσαρμογής τους στις ξεχωριστές συνθήκες του θαλάσσιου περιβάλλοντος.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διαλογή θαλάσσιων μυκήτων, οι οποίοι αποικοδομούν το πολυχλωριωμένο διφαινύλιο PCB 29, ως προς τη δυνατότητά τους να εκφράζουν ενεργότητες λακκάσης, καθώς και η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός τέτοιων ενζύμων.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε διαλογή μεταξύ 9 μικροοργανισμών για την ανάδειξη του αποτελεσματικότερου παραγωγού λακκάσης σε καλλιέργειες που είχε προστεθεί το PCB 29. Από τους 9 μικροοργανισμούς μόνο ένα στέλεχος, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως στέλεχος *Cladosporium sp.* παρήγαγε αξιοσημείωτη ποσότητα λακκάσης εμφανίζοντας ενεργότητα που έφτασε τα 188,4 U/g πρωτεΐνης.

Έπειτα μελετήθηκε η επαγωγή της έκφρασης λακκάσης σε υγρές καλλιέργειες. Πρώτα μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών ουσιών ως επαγωγείς της ενεργότητας λακκάσης και την καλύτερη επίδραση την παρουσίασε η προσθήκη χαλκού στο μέσο καλλιέργειας αυξάνοντας την ενεργότητα λακκάσης 2,5 φορές σε σχέση με την απουσία επαγωγέα. Λόγω αυτού έγινε μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων χαλκού στην ενεργότητα λακκάσης και η βέλτιστη συγκέντρωση βρέθηκε να είναι 0,25-0,5 mM.

Ακολούθησαν καλλιέργειες του μικροοργανισμού και παραγωγή λακκάσης σε μεγάλες ποσότητες και προσπάθεια απομόνωσης αυτής με χρήση στηλών χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής. Κατά τη διαδικασία αυτή απομονώθηκαν δύο διαφορετικές λακκάσες από το μικροοργανισμό, οι Lac1 και Lac2. Η απομόνωση τους πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια και η ηλεκτροφόρηση των δύο πρωτεϊνών σε SDS-PAGE έδειξε ότι τα μοριακά βάρη των λακκασών Lac1 και Lac2 ήταν 65 και 75 kDA αντίστοιχα.

Η βέλτιστη ενεργότητα παρουσιάστηκε και στα δύο απομονωμένα ένζυμα για pH 3 και 50 °C με βάση μετρήσεις ενεργότητας στο υπόστρωμα ABTS. Ακολούθησε η μελέτη της εκλεκτικότητας υποστρώματος όπου οι δύο λακκάσες παρουσίασαν

μικρές διαφορές με τη Lac1 όμως να οξειδώνει μεγαλύτερο εύρος υποστρωμάτων. Οι δύο λακκάσες έδειξαν αδυναμία να οξειδώσουν το υπόστρωμα L-DOPA.

Τέλος πραγματοποιήθηκε μελέτη της δυνατότητας αποικοδόμησης του ρύπου PCB 29 συγκέντρωσης 1 μM από τις δύο λακκάσες απουσία μεσολαβητή και παρουσία μεσολαβητή ABTS. Η μεγαλύτερη ποσοστιαία απομάκρυνση του PCB ήταν 70,8% και επιτεύχθηκε στις αντιδράσεις της Lac2 παρουσία ABTS. Απουσία μεσολαβητή τα δύο απομονωμένα ένζυμα μείωσαν τη συγκέντρωση του PCB περίπου 29%.

ABSTRACT

Marine ecosystems host a wide variety of microorganisms and contain an enormous pool of potential biocatalysts with novel properties as a result of their adaptation capability in the unique marine environment conditions.

The purpose of this diploma thesis was the screening of marine-derived fungi capable of biodegrading the polychlorinated biphenyl PCB 29 for laccase activity and the isolation and characterization of these enzymes.

Initially screening of nine strains for laccase production was performed in presence of PCB 29. Only one strain, which was identified as *Cladosporium sp.* showed notable laccase activity, reaching 188,4 U/g protein.

Furhermore, several laccase production inducers were tested in liquid cultures of these fungi. Among the different compounds that were tested, copper had the most significant impact causing a 2,5 fold increase in laccase activity compared to the absence of an inducer. The effect of different copper concentrations on laccase activity was also studied showing optimal activity in the concentration range from 0,25 to 0,5 mM.

Microorganism culture and laccase production were scaled up and interconnected to an ion exchange chromatography column to isolate the laccase produced. During this process two different laccases were isolated, Lac 1 and Lac2. Isolated Lac1 and Lac2 whilst a two-stage purification process and SDS-PAGE analysis revealed the molecular weights of the laccases Lac1 and Lac2 to be 65 and 75 kDA respectively.

Both laccases showed optimum activity at pH 3 and 50 °C, based on ABTS enzymatic activity measurements. The substrate specificity of the laccases was studied and both laccases showed similar behavior, however Lac1 oxidized a broader range of substrates than Lac2. Both laccases failed to oxidize the substrate L-DOPA.

Finally, both purified laccases were studied for the degradation of PCB 29 at initial concentration of 1µM in presence and absence of ABTS mediator. The maximum removal percentage of PCB was 70,8% and was measured in the reactions of Lac2 in presence of ABTS. In absence of a mediator both enzymes reduced the PCB concentration by 29%.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

| | |
|--|----|
| Κεφάλαιο 1 – Έμμονοι οργανικοί ρύποι και βιοεξυγίανση | 3 |
| 1.1 Έμμονοι οργανικοί ρύποι | 3 |
| 1.1.1 Πολυχλωριωμένα διφαινύλια | 4 |
| 1.2 Βιοεξυγίανση | 7 |
| 1.2.1 Διεργασίες βιοεξυγίανσης..... | 8 |
| 1.2.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιοεξυγίανσης | 11 |
| 1.3 Μύκητες σε διεργασίες βιοεξυγίανσης..... | 12 |
| 1.3.1 Μύκητες θαλάσσιας προέλευσης | 14 |
| 1.3.2 Μυκητιακά ένζυμα στη βιοεξυγίανση | 16 |
| Κεφάλαιο 2 - Λακκάσες..... | 19 |
| 2.1 Προέλευση και βιολογικός ρόλος λακκασών..... | 19 |
| 2.1.1 Λακκάσες προκαρυωτικής προέλευσης..... | 20 |
| 2.1.2 Λακκάσες φυτικής προέλευσης | 21 |
| 2.1.3 Λακκάσες μυκητιακής προέλευσης..... | 22 |
| 2.2 Δομικά χαρακτηριστικά λακκασών | 23 |
| 2.3 Μηχανισμός κατάλυσης των λακκασών | 26 |
| 2.3.1 Υποστρώματα λακκάσης | 27 |
| 2.3.2 Μεσολαβητές | 29 |
| 2.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες λακκασών..... | 31 |
| 2.4.1 pH | 31 |
| 2.4.2 Θερμοκρασία..... | 32 |
| 2.5 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές λακκασών..... | 32 |
| 2.6 Εφαρμογές μυκητιακών λακκασών σε διεργασίες βιοεξυγίανσης..... | 34 |
| 2.6.1 Αποχρωματισμός βαφών | 34 |
| 2.6.2 Φυτοφάρμακα και ζιζανιοκτόνα | 36 |
| 2.6.3 PCB και χλωροφαινόλες | 37 |
| 2.6.4 Επεξεργασία χαρτοπολτού..... | 39 |

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

| | |
|--------------------------------------|----|
| Κεφάλαιο 3 - Υλικά και Μέθοδοι | 43 |
| 3.1 Υλικά..... | 43 |
| 3.1.1 Μικροοργανισμοί..... | 43 |
| 3.1.2 Θρεπτικά Μέσα | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.1.3 Χημικά αντιδραστήρια – Αναλώσιμα υλικά..... | 43 |
| 3.1.4 Ρυθμιστικά Διαλύματα-Διαλύματα Ηλεκτροφορήσεων..... | 44 |
| 3.1.5 Συσκευές – Όργανα | 45 |
| 3.2 Μέθοδοι | 46 |
| 3.2.1. Καλλιέργειες..... | 46 |
| 3.2.2 Μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων | 48 |
| 3.2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών..... | 49 |
| 3.2.4 Διαλογή μικροοργανισμών με ενεργότητα λακκάσης | 50 |
| 3.2.5 Επαγωγή της ενζυμικής ενεργότητας στις κυτταρικές καλλιέργειες | 51 |
| 3.2.6 Μέθοδοι εξισορρόπησης πρωτεϊνών σε ρυθμιστικά διαλύματα..... | 53 |
| 3.2.7 Παραγωγή λακκάσης..... | 54 |
| 3.2.8 Απομόνωση των λακκασών Lac1 και Lac2 με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής.. | 55 |
| 3.2.9 Βιοχημικός χαρακτηρισμός απομονωμένων λακκασών | 58 |
| 3.2.10 Μελέτη απομονωμένων ενζύμων για την αποικοδόμησης του PCB 29..... | 65 |
| Κεφάλαιο 4 - Αποτελέσματα..... | 69 |
| 4.1 Διαλογή μικροοργανισμών με ενεργότητα λακκάσης | 69 |
| 4.2 Επαγωγή της ενζυμικής ενεργότητας στις κυτταρικές καλλιέργειες | 70 |
| 4.2.1 Επίδραση διαφορετικών επαγωγέων στην έκφραση λακκάσης | 70 |
| 4.2.2 Επίδραση διαφορετικών επαγωγέων στην έκφραση υπεροξειδάσης | 71 |
| 4.2.3 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων χαλκού στην έκφραση λακκάσης | 73 |
| 4.3 Απομόνωση των λακκασών Lac1 και Lac2 με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής..... | 74 |
| 4.3.1 Επιλογή του pH ρυθμιστικού διαλύματος για τη στήλη χρωματογραφίας..... | 74 |
| 4.3.2 Υπολογισμός πρωτεϊνικού φορτίου και ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης στα κλάσματα των στηλών χρωματογραφίας | 76 |
| 4.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός των απομονωμένων λακκασών Lac1 και Lac2 | 80 |
| 4.4.1 Προσδιορισμός Μεγέθους Λακκασών | 80 |
| 4.4.2 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης λακκασών | 81 |
| 4.4.3 Μελέτη εξειδίκευσης της Lac1 και της Lac2 ως προς το υπόστρωμα..... | 83 |
| 4.5 Μελέτη απομονωμένων ενζύμων για την αποικοδόμησης του PCB 29..... | 85 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ | |
| Κεφάλαιο 5 - Συζήτηση Αποτελεσμάτων – Συμπεράσματα | 89 |
| 5.1 Διαλογή μικροοργανισμών με ενεργότητα λακκάσης | 89 |
| 5.2 Επαγωγή της ενζυμικής ενεργότητας στις κυτταρικές καλλιέργειες | 89 |
| 5.2.1 Επίδραση διαφορετικών επαγωγέων στην έκφραση λακκάσης και υπεροξειδάσης | 89 |
| 5.2.2 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων χαλκού στην έκφραση λακκάσης | 91 |

| | |
|---|----|
| 5.3 Απομόνωση των ενζύμων Lac1 και Lac2 | 91 |
| 5.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός των απομονωμένων λακκασών..... | 92 |
| 5.5 Μελέτη της εξειδίκευσης της Lac1 και Lac2 ως προς το υπόστρωμα..... | 93 |
| 5.6 Αποικοδόμηση του PCB 29..... | 94 |
| Κεφάλαιο 6 - Προτάσεις για το μέλλον..... | 97 |

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1 – Έμμονοι οργανικοί ρύποι και βιοεξυγίανση

Από το 1930 έως το 2000, η παγκόσμια παραγωγή ανθρωπογενών χημικών προϊόντων αυξήθηκε από 1 εκατομμύριο σε 400 εκατομμύρια τόνους ανά έτος (WWF, 2017). Οι στατιστικές που δημοσιεύθηκαν από την EUROSTAT το 2013 αποκαλύπτουν ότι, μεταξύ 2002 και 2011, πάνω από το 50% της συνολικής παραγωγής χημικών προϊόντων αποτελούσαν επιβλαβείς για το περιβάλλον ενώσεις και πάνω από το 70% αυτών των ενώσεων έχουν σημαντικό περιβαλλοντικό αντίκτυπο (Gavrilescu, Demnerová, Aamand, Agathos, & Fava, 2014) ενώ μόνο το 10% αυτών διατίθενται με ασφάλεια (Ellouze & Sayadi, 2016).

Η μόλυνση που δημιουργείται από την απελευθέρωση αυτών των ενώσεων στο περιβάλλον προκαλεί διαταραχές στους οργανισμούς και στα οικοσυστήματά τους. Πέραν αυτών, υπάρχει αυξημένη ανησυχία για πιθανές αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία και την οικολογία που προκύπτουν από την παραγωγή, τη χρήση και τη διάθεση πολλών χημικών ουσιών που αξιοποιούνται για τη βελτίωση της ανθρώπινης ζωής αλλά και σε ποικίλλες οικονομικές δραστηριότητες. Οι ουσίες αυτές χαρακτηρίζονται ξενοβιοτικά, δηλαδή χημικές ουσίες που είναι "ξένες στη βιόσφαιρα" και είναι διαθέσιμα σε μικροοργανισμούς στον αέρα, το νερό, το έδαφος και τα ιζήματα. Τα ξενοβιοτικά περιλαμβάνουν φαινόλες (Tišma, Zelić, & Vasić-Rački, 2010), υδρογονάνθρακες (Levin, Viale, & Forchiassin, 2003), βαφές και υγρά απόβλητα (Bhatia, Sharma, Singh, & Kanwar, 2017; Khlifi et al., 2010), φαρμακευτικά προϊόντα (Cabana et al., 2007), χαρτοπολτό (Virk, Sharma, & Capalash, 2012), φυτοφάρμακα και εντομοκτόνα (Magan, Fragoeiro, & Bastos, 2010).

1.1 Έμμονοι οργανικοί ρύποι

Το Περιβαλλοντικό Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών (UNEP, United Nations Environmental Programme) έχει προσδιορίσει ορισμένα χημικά ως ουσίες που προκαλούν πολύ μεγάλη ανησυχία (SVHC, substance of very high concern) και τις χαρακτηρίζει ως ανθεκτικές, βιοσυσσωρεύσιμες και τοξικές (PBT, persistent, bioaccumulative, and toxic). Οι χημικές ουσίες που ταξινομούνται ως PBT δεν διασπώνται εύκολα στο περιβάλλον, συσσωρεύονται στους ιστούς των οργανισμών και είναι τοξικές (O'Sullivan & Megson, 2013).

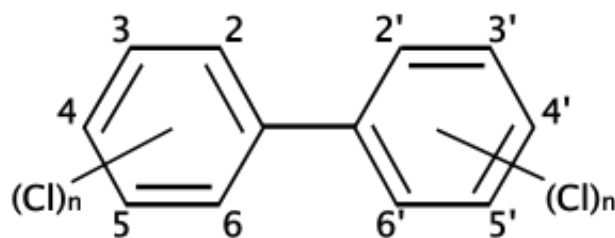
Οι έμμονοι οργανικοί ρύποι (POPs, persistent organic pollutants) αποτελούν υποσύνολο της κατηγορίας PBT όπως και τα ιχνοστοιχεία και οι οργανομεταλλικές ενώσεις και αποτελούν το αντικείμενο της Σύμβασης της Στοκχόλμης του UNEP που εκδόθηκε το 2001. Όπως το όνομα υποδηλώνει οι POPs είναι ενώσεις που είναι οργανικές (φυσικές ή ανθρωπογενείς) στη φύση και αντιστέκονται στη βιολογική, χημική και φωτολυτική αποικοδόμηση (Ritter, Solomon, & Forget, 1995).

Οι βασικές προϋποθέσεις κατηγοριοποίησης μιας ουσίας ως POP είναι να είναι ανθεκτική, βιοσυσσωρεύσιμη, να έχει τη δυνατότητα μεταφοράς σε μεγάλες αποστάσεις και να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία (Secretariat of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, 2009). Για καθένα από αυτά τα κριτήρια, πρέπει να πληρούνται ορισμένοι περιορισμοί προκειμένου μια ουσία να θεωρηθεί υποψήφιος POP. Η ημιζωή άνω των 2 ημερών στον αέρα και 2-6 μηνών στο νερό, το έδαφος ή τα ιζήματα θεωρείται επαρκής για έναν υποψήφιο POP. Η βιοσυσσώρευση είναι η ικανότητα των POPs να απορροφώνται από ζωντανούς οργανισμούς και λόγω της υδροφοβικότητάς τους τείνουν να συσσωρεύονται στους λιπώδεις ιστούς. Η ανθεκτικότητα των POPs στην αποικοδόμηση και η μεγάλη ημιζωή τους τους παρέχουν τη δυνατότητα μεταφοράς σε μεγάλες αποστάσεις. Ωστόσο, η μεταφορά αυτών των χημικών ουσιών δε γίνεται μόνο μέσω του νερού, αλλά και μέσω της ατμόσφαιρας, μολύνοντας απομακρυσμένες και ορεινές τοποθεσίες, καθιστώντας τους POPs παγκόσμιο ζήτημα. Η πρόσληψη POP από τον άνθρωπο συμβαίνει κυρίως μέσω της διατροφής και ιδιαίτερα μέσω της κατανάλωσης ζωικών προϊόντων (Nikolaivits, Dimarogona, Fokialakis, & Torakas, 2017).

1.1.1 Πολυχλωριωμένα διφαινύλια

1.1.1.1 Ορισμός και προέλευση

Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (Polychlorinated biphenyls - PCBs) είναι μια κατηγορία έμμονων οργανικών ρύπων που προκύπτουν από την ένωση δύο δακτυλίων βενζολίου και διαφέρουν στον αριθμό των ατόμων χλωρίου (1 έως 10, Εικόνα 1.2.) που συνδέονται με τους δακτυλίους διφαινυλίου. Τα PCBs είναι μέλη των αλογονωμένων αρωματικών περιβαλλοντικών ρύπων και έχουν εντοπιστεί παγκοσμίως σε διάφορα περιβάλλοντα. (Safe, 1994).



Εικόνα 1.1. Δομή πολυχλωριωμένου διφαινυλίου

Τα μίγματα PCB κατασκευάζονταν ευρέως από το 1930 έως τη δεκαετία του '70 και χρησιμοποιούνταν ως ψυκτικά και μονωτικά μετασχηματιστών, πλαστικοποιητές, βερνίκια κ.ά. (Passatore, Rossetti, Juwarkar, & Massacci, 2014). Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1970, οι περισσότερες κυβερνήσεις απαγόρευσαν την παραγωγή PCBs, αλλά εξακολουθεί να υφίσταται εκτεταμένη μόλυνση του περιβάλλοντος ως συνέπεια τυχαίων διαρροών λόγω ακατάλληλης μεταφοράς, αποθήκευσης και διάθεσης. Μέχρι σήμερα τα PCBs εξακολουθούν να αντιπροσωπεύουν ένα παγκόσμιο πρόβλημα, καθώς είναι ανθεκτικά και βιοσυσσωρεύσιμα. Λόγω των ατμοσφαιρικών μεταφορών, έχουν καταστεί περιβαλλοντικοί ρύποι με πανταχού παρούσα κατανομή, συμπεριλαμβανομένων των πολικών περιοχών και του βόθου των ωκεανών (Beyer & Biziuk, 2010).

1.1.1.2 Τοξική δράση

Τα PCBs ανήκουν στις πιο επιβλαβείς για το περιβάλλον ουδέτερες οργανικές χημικές ουσίες. Είναι ευρέως διαδεδομένα, έμμονα και έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν επιβλαβείς βιολογικές επιδράσεις (McFarland & Clarke, 1989). Δεδομένης της εκτεταμένης έκθεσης του πληθυσμού σε αυτές τις ενώσεις, οι πιθανές επιπτώσεις τους στη δημόσια υγεία είναι σημαντικές. Έχει διαπιστωθεί ότι προκαλούν νευρολογικές, αναπαραγωγικές, ενδοκρινικές και δερματικές παθήσεις, καθώς και πολλές διαφορετικές λοιμώξεις που αποδίδονται στη μείωση των ανοσολογικών αντιδράσεων. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι οι περισσότερες από αυτές τις επιδράσεις οφείλονται σε χρόνια έκθεση σε PCB.

Οι χημικές ιδιότητες που είναι κυρίως υπεύθυνες για πολλές από τις βιομηχανικές εφαρμογές των PCB, δηλαδή η ευφλεκτότά τους, η χημική τους σταθερότητα και η αναμειξιμότητα με οργανικές ενώσεις (δηλ. η λιποφιλικότητα), είναι υπεύθυνες και

για τα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούν. Μόλις εισέλθουν στο περιβάλλον, τα σταθερά PCB αποικοδομούνται σχετικά αργά και υφίστανται ανακύκλωση και μεταφορά μέσα στα διάφορα συστατικά του παγκόσμιου οικοσυστήματος. Επιπλέον, λόγω της λιποφιλικότητας τους βιοσυσσωρεύονται και αυξάνουν τη συγκέντρωσή τους στα υψηλότερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας (Safe, 1994).

Παρόλο που υπάρχουν 209 πιθανές ομοειδείς δομές PCB, ίσως το ήμισυ αυτού του αριθμού είναι υπεύθυνο για σχεδόν όλη τη μόλυνση του περιβάλλοντος που οφείλεται στα PCB. Εάν η πιθανή τοξικότητα, ο περιβαλλοντικός αντίκτυπος και η σχετική αφθονία στους ζωικούς ιστούς χρησιμοποιούνται ως κριτήρια, ο αριθμός των απειλητικών για το περιβάλλον ομοειδών PCB μειώνεται σε περίπου τριάντα έξι (McFarland & Clarke, 1989).

1.1.1.3 Αποικοδόμηση PCB

Οι φυσικές αρωματικές ενώσεις μπορούν να αποικοδομηθούν από πληθώρα μικροοργανισμών. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό, μπορούν να αξιοποιηθούν για την αποικοδόμηση πολλών ανθρωπογενών αρωματικών ουσιών που περιλαμβάνονται σε παρασιτοκτόνα, απορρυπαντικά, έλαια, διαλύτες, χρώματα ή εκρηκτικά (Nikolaivits et al., 2017). Όμως η εμφάνιση χλωριωμένων υποκαταστατών σε πολλές από αυτές τις ενώσεις αυξάνει την ανθεκτικότητά τους στην ενζυμική αποικοδόμηση, λόγω της μειωμένης διαλυτότητάς και της χημικής αντιδραστικότητάς τους (Reineke & Knackmuss, 1988). Κατά συνέπεια, οι χλωριωμένες αρωματικές ενώσεις είναι πιο δύσκολο να αποικοδομηθούν σε σύγκριση με τους αντίστοιχους υδρογονάνθρακες τους. Η ρύπανση από αυτές τις ενώσεις λαμβάνει συχνά χώρα σε θαλάσσια οικοσυστήματα και η εκμετάλλευση μικροοργανισμών που επιβιώνουν σε αυτά μπορεί να είναι μια εφικτή εναλλακτική λύση έναντι των τυπικών μηχανικών μεθόδων.

Η ανάλυση της συγκέντρωσης PCB στα ιζήματα του ποταμού Hudson στις ΗΠΑ παρείχε την πρώτη απόδειξη των διεργασιών αποικοδόμησης PCB που συμβαίνουν φυσικά στα αναερόβια οικοσυστήματα. Μια τέτοια υποβάθμιση έχει ερμηνευθεί ως αποτέλεσμα της αναγωγικής αποχλωρίωσης που μεσολαβείται από διαφορετικούς πληθυσμούς αναερόβιων βακτηρίων (Quensen, Tiedje, & Boyd, 2010).

Η χρήση χειρόμορφων ανιχνευτών PCB σε βιολογικές μεταβολικές διεργασίες και σε μελέτες σε είδη ζώων και φυτών, έδειξε τη δυνατότητα πολλών οργανισμών να μετατρέψουν είτε να συσσωρεύσουν το PCB. Είναι επομένως προφανές ότι τα μόρια PCB, παρά την υψηλή χημική τους σταθερότητα και τη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα τους, υφίστανται φυσικά διεργασίες βιολογικής αποικοδόμησης από βακτήρια, μύκητες και φυτά (Passatore et al., 2014).

1.2 Βιοεξυγίανση

Δεδομένου ότι ένας μεγάλος όγκος μολυσματικών και ανθεκτικών ενώσεων όπως πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAH), πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB), πολυχλωριωμένα διβενζο-p-διοξίνες (PCDD), πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια (PCDFs) και βαρέα μέταλλα διοχετεύονται στο περιβάλλον η επεξεργασία τους αποκτά μείζονα σημασία (Akcil, Erust, Ozdemiroglu, Fonti, & Beolchini, 2015).

Οι συμβατικές τεχνικές που χρησιμοποιούνταν για τη διαχείριση μολυσμένων περιοχών ήταν η εκσκαφή του μολυσμένου εδάφους και η απομάκρυνσή του σε χώρο υγειονομικής ταφής ή η κάλυψη και ο περιορισμός των μολυσμένων τμημάτων μιας περιοχής. Οι μέθοδοι αυτοί παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα. Η πρώτη μέθοδος απλώς μετακινεί τη μόλυνση αλλού και μπορεί να δημιουργήσει σημαντικούς κινδύνους κατά την εκσκαφή, τον χειρισμό και τη μεταφορά των επικίνδυνων υλικών. Επιπλέον, είναι πολύ δύσκολο και όλο και πιο ακριβό να βρεθούν νέοι χώροι υγειονομικής ταφής για την τελική διάθεση του υλικού. Η δεύτερη μέθοδος είναι μια προσωρινή λύση, δεδομένου ότι η μόλυνση παραμένει στο ίδιο σημείο, απαιτώντας παρακολούθηση και συντήρηση των φραγμών απομόνωσης για μεγάλο χρονικό διάστημα, με όλο το κόστος και τη δυνητική ευθύνη που συνεπάγεται αυτό.

Μια καλύτερη προσέγγιση από αυτές τις παραδοσιακές μεθόδους είναι η καταστροφή του ρύπου ή τουλάχιστον η μετατροπή του σε αβλαβείς ουσίες. Ορισμένες τεχνολογίες που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η καύση σε υψηλές θερμοκρασίες και διάφοροι τύποι χημικής αποσύνθεσης (π.χ. καταλυόμενη από βάσεις αποχλωρίωση, υπεριώδης ακτινοβολία). Οι παραπάνω μέθοδοι μπορούν να είναι πολύ αποτελεσματικές στη μείωση των επιπέδων μιας σειράς μολυσματικών ουσιών, αλλά έχουν αρκετά μειονεκτήματα, κυρίως την τεχνολογική τους

πολυπλοκότητα, το κόστος για εφαρμογές μικρής κλίμακας, τη δημιουργία ανεπιθύμητων παραπροϊόντων και την έλλειψη κοινωνικής αποδοχής, ιδίως για την αποτέφρωση που μπορεί να αυξήσει την έκθεση των εργαζόμενων και των κατοίκων της περιοχής σε τοξικούς παράγοντες (Karigar & Rao, 2011; Vidali, 2001).

Η βιοεξυγίανση, κλάδος της περιβαλλοντικής βιοτεχνολογίας, φαίνεται μια ελκυστική εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών τεχνολογιών καθαρισμού. Βιοεξυγίανση είναι η αξιοποίηση της βιοποικιλότητας για την άμβλυση (και όπου είναι δυνατόν, την πλήρη εξάλειψη) των επιβλαβών επιπτώσεων που προκαλούν οι περιβαλλοντικοί ρύποι σε μια δεδομένη τοποθεσία (Reineke & Knackmuss, 1988). Αυτές οι τεχνολογίες έχουν καταστεί ελκυστικές εναλλακτικές λύσεις έναντι των συμβατικών τεχνολογιών καθαρισμού λόγω του σχετικά χαμηλού κόστους κεφαλαίου και της ευρείας κοινωνικής αποδοχής που γνωρίζουν.

1.2.1 Διεργασίες βιοεξυγίανσης

Εξ ορισμού, η βιοεξυγίανση είναι η αξιοποίηση βιοσυστημάτων όπως τα μικρόβια και ανώτεροι οργανισμοί όπως τα φυτά για τη μείωση της πιθανής τοξικότητας χημικών μολυσματικών ουσιών στο περιβάλλον με την αποικοδόμηση, τον μετασχηματισμό και την ακινητοποίηση αυτών των ανεπιθύμητων ενώσεων (Varjani & Patel, 2017). Οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι αυτόχθονες ή μπορούν να απομονωθούν από αλλού και να μεταφερθούν στη μολυσμένη περιοχή. Οι μολυσματικές ενώσεις μετασχηματίζονται από ζωντανούς οργανισμούς μέσω αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα ως μέρος των μεταβολικών διεργασιών τους. Η βιοαποικοδόμηση μιας ένωσης είναι συχνά αποτέλεσμα της δραστηριότητας πολλών οργανισμών (Vidali, 2001).

1.2.1.1 Μεταβολισμός ενώσεων

Ο πρωτογενής μεταβολισμός μιας οργανικής ένωσης ορίζεται ως η χρήση του υποστρώματος ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Αυτό το υπόστρωμα χρησιμεύει ως δότης ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα την ανάπτυξη των μικροβίων. Η εφαρμογή του συμμεταβολισμού για την εξυγίανση ξενοβιοτικών απαιτείται όταν η ένωση δεν μπορεί να αξιοποιηθεί ως πηγή άνθρακα και ενέργειας από το μικροοργανισμό λόγω της φύσης της μοριακής δομής της, η οποία δεν επάγει τα απαιτούμενα καταβολικά ένζυμα. Ο όρος συμμεταβολισμός έχει οριστεί ως ο μεταβολισμός μιας ένωσης που δεν χρησιμεύει ως πηγή άνθρακα και ενέργειας ή ως βασική θρεπτική ουσία και

μπορεί να επιτευχθεί μόνο παρουσία ενός πρωτογενούς, δηλαδή επαγωγικού, υποστρώματος.

Οι αερόβιες διαδικασίες χαρακτηρίζονται από μεταβολικές δραστηριότητες που περιλαμβάνουν το οξυγόνο ως αντιδρών. Οι διοξυγενάσες και οι μονοοξυγενάσες είναι δύο από τα κύρια ένζυμα που χρησιμοποιούνται από τους αερόβιους οργανισμούς κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού των ξενοβιοτικών. Τα αναερόβια μικρόβια εκμεταλλεύονται μια σειρά από αποδέκτες ηλεκτρονίων, οι οποίοι, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα τους και τις επικρατούσες συνθήκες οξειδοαναγωγής, περιλαμβάνουν σίδηρο, μαγγάνιο, θειικό άλας και διοξείδιο του άνθρακα (Boorathy R., 2000).

1.2.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διεργασία

Μια διεργασία βιοεξυγίανσης βασίζεται στις δραστηριότητες αερόβιων ή αναερόβιων ετερότροφων μικροοργανισμών. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες όμως επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη και δραστηριότητα και άρα την αποτελεσματικότητα της διεργασίας, συνεπώς, η εφαρμογή της συχνά απαιτεί το χειρισμό των περιβαλλοντικών παραμέτρων, ώστε να επιτραπεί η ανάπτυξη των μικροβίων και η αποικοδόμηση με ταχύτερο ρυθμό (Vidali, 2001).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τις διεργασίες βιοεξυγίανσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν άμεσα την βιοεξυγίανση είναι οι πηγές ενέργειας (δότες ηλεκτρονίων), οι δέκτες ηλεκτρονίων, τα θρεπτικά συστατικά, το pH, η θερμοκρασία και η παρουσία παρεμποδιστών. Άλλοι παράγοντες που ελέγχουν τους μικροβιακούς πληθυσμούς είναι η περιεκτικότητα σε υγρασία, το διαλυμένο οξυγόνο και η θερμοκρασία (Akcil et al., 2015).

Πίνακας 1.1. Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τις διεργασίες βιοεξυγίανσης (Boorathy R., 2000)

| Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοεξυγίανση |
|---|
| Μικροβιακοί |
| Ανάπτυξη μέχρι την επίτευξη της κρίσιμης βιομάζας |
| Μετάλλαξη και οριζόντια μεταφορά γονιδίων |
| Ενζυμική επαγωγή |
| Εμπλουτισμός του ικανού μικροβιακού πληθυσμού |

| |
|--|
| Παραγωγή τοξικών μεταβολιτών |
| Περιβαλλοντικοί |
| Εξάντληση των προτιμητέων υποστρωμάτων |
| Έλλειψη θρεπτικών |
| Παρεμποδιστικές περιβαλλοντικές συνθήκες |
| Υπόστρωμα |
| Πολύ χαμηλή συγκέντρωση |
| Χημική δομή |
| Τοξικότητα |
| Διαλυτότητα |
| Βιολογική αερόβια vs αναερόβια διεργασία |
| Δυναμικό οξειδοαναγωγής |
| Διαθεσιμότητα δεκτών ηλεκτρονίων |
| Μικροβιακός πληθυσμός που υπάρχει στο χώρο |
| Ανάπτυξη υποστρώματος vs συμμεταβολισμός |
| Τύπος μολυσματικής ουσίας |
| Συγκέντρωση |
| Διαθέσιμη εναλλακτική πηγή άνθρακα |
| Μικροβιακή αλληλεπίδραση (ανταγωνισμός, διαδοχή και θήρευση) |
| Φυσικοχημική βιοδιαθεσιμότητα ρύπων |
| Ρόφηση ισορροπίας |
| Μη αντιστρεπτή ρόφηση |
| Ενσωμάτωση σε χουμικές ουσίες |
| Περιορισμοί μεταφοράς μάζας |
| Διάχυση και διαλυτότητα οξυγόνου |
| Διάχυση θρεπτικών |
| Διαλυτότητα/αναμειξιμότητα σε/με νερό |

1.2.1.2.1 Πηγές ενέργειας

Μία από τις κύριες μεταβλητές που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών είναι η διαθέσιμη οργανική ύλη που χρησιμεύει ως αποθήκη

άνθρακα και ενέργειας. Για παράδειγμα τα υπόγεια εδάφη και ύδατα που έχουν χαμηλότερα επίπεδα οργανικής ύλης έχουν περιορισμένη βιοποικιλότητα και μικρότερους μικροβιακούς πλυθυσμούς.

Το κατά πόσον ένας ρύπος θα χρησιμεύσει ως αποτελεσματική πηγή ενέργειας για έναν αερόβιο ετεροτροφικό οργανισμό είναι συνάρτηση της μέσης κατάστασης οξείδωσης του άνθρακα στο υλικό. Γενικά, οι υψηλότερες καταστάσεις οξείδωσης αντιστοιχούν σε χαμηλότερες ενεργειακές αποδόσεις και συνεπώς η υποβάθμισή τους παρέχει μικρότερη ενεργειακή ώθηση στους μικροοργανισμούς. Επίσης οι μικροβιακοί, περιβαλλοντικοί παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω (Πίνακας 1.1.) σε συνδυασμό με τις ιδιότητες του υποστρώματος επηρεάζουν την περίοδο εγκλιματισμού των μικροβίων σε αυτό. Τέλος η μοριακή δομή και η συγκέντρωση των μολυσματικών ουσιών έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν έντονα την εφικτότητα της βιοεξυγίανσης, το είδος του μικροβιακού μετασχηματισμού που συμβαίνει και αν η ένωση θα χρησιμεύσει ως πρωτεύον, δευτερεύων ή συμμεταβολικό υπόστρωμα (Boorpathy R., 2000).

1.2.1.2.2 Βιοδιαθεσιμότητα

Ο ρυθμός με τον οποίο τα μικροβιακά κύτταρα μπορούν να μετατρέψουν τους ρύπους εξαρτάται από την ταχύτητα πρόσληψης και μεταβολισμού των ρύπων και από το ρυθμό μεταφοράς στο κύτταρο (μεταφορά μάζας). Οι αυξημένες ικανότητες μικροβιακής μετατροπής δεν οδηγούν σε υψηλότερα ποσοστά βιοεξυγίανσης όταν η μεταφορά μάζας είναι ένας περιοριστικός παράγοντας (R. Boorpathy, Manning, & Kulra, 1998). Αυτό φαίνεται να συμβαίνει στα περισσότερα μολυσμένα εδάφη και ιζήματα και μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών (Raj Boorpathy & Manning, 1999), οι οποίες αυξάνουν τη διαθεσιμότητα των ουσιών ώστε να αποικοδομηθούν από τους μικροοργανισμούς.

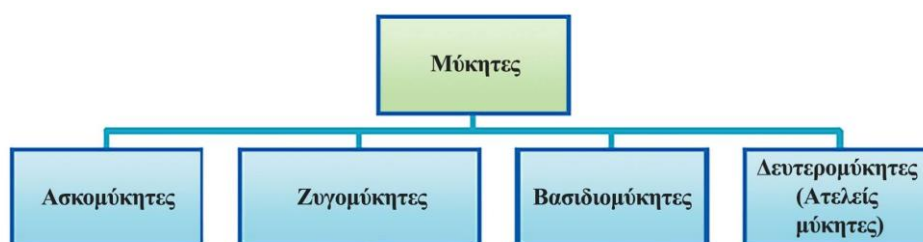
1.2.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιοεξυγίανσης

Οι διεργασίες βιοεξυγίανσης είναι συχνά λιγότερο δαπανηρές, απομακρύνουν μόνιμα τα απόβλητα, εξαλείφουν τη μακροχρόνια ευθύνη της αποθήκευσής και την επικινδυνότητα της μεταφοράς τους, έχουν μεγαλύτερη κοινωνική αποδοχή και μπορούν να συνδυαστούν με άλλες μεθόδους φυσικής ή χημικής επεξεργασίας. Έχουν όμως και τους περιορισμούς τους. Ορισμένες χημικές ουσίες δεν υπόκεινται

σε βιοαποικοδόμηση, για παράδειγμα κάποια βαρέα μέταλλα, ραδιονουκλίδια και ορισμένες χλωριωμένες ενώσεις. Επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις, ο μικροβιακός μεταβολισμός των μολυσματικών ουσιών μπορεί να δημιουργήσει τοξικούς μεταβολίτες. Τέλος η βιοεξυγίανση είναι μια επιστημονικά απαιτητική διαδικασία που πρέπει να προσαρμόζεται στις ειδικές συνθήκες κάθε περίπτωσης, πράγμα που σημαίνει ότι απαιτούνται πρώτα πιλοτικές μελέτες μικρής κλίμακας πριν ξεκινήσει ο καθαρισμός μιάς περιοχής. (Kumar.A, Bisht.B.S, Joshi.V.D, & Dhewa.T, 2011; Vidali, 2001).

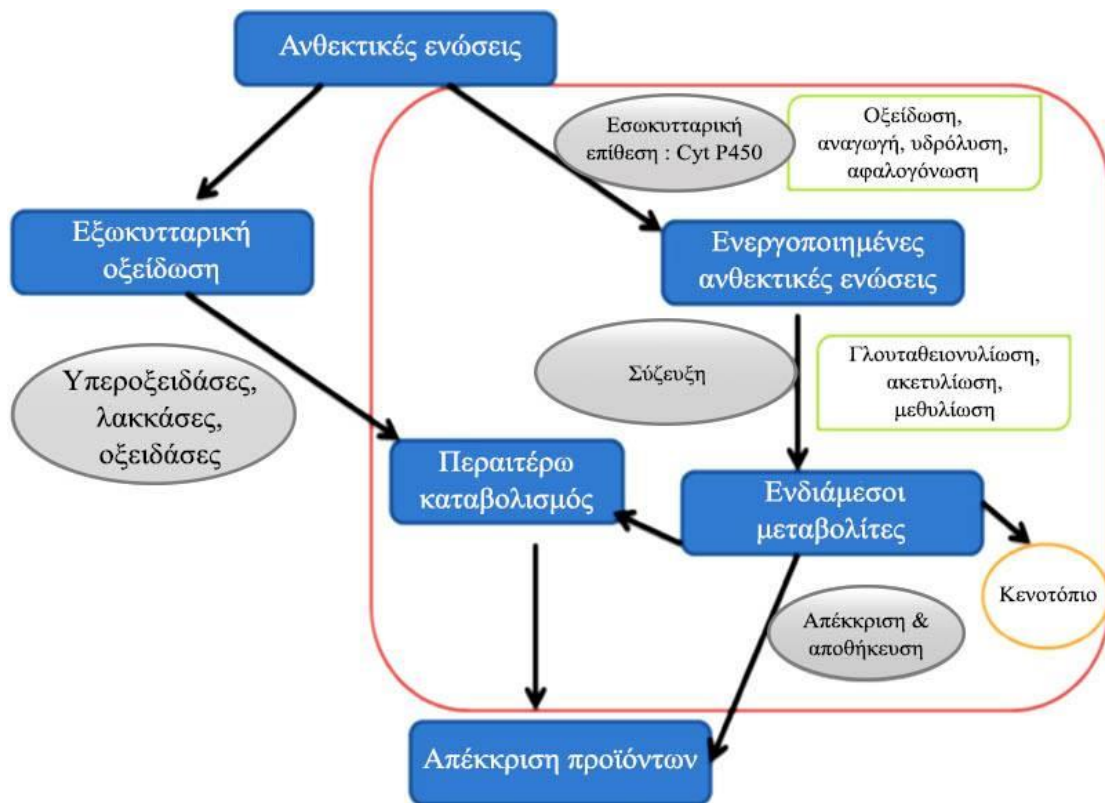
1.3 Μύκητες σε διεργασίες βιοεξυγίανσης

Οι μύκητες είναι μια μεγάλη ομάδα οργανισμών που περιλαμβάνει ζυμες, μούχλα, καθώς και τα πιο γνωστά μανιτάρια. Αυτοί οι οργανισμοί αποτελούν ένα βασίλειο, το οποίο είναι ξεχωριστό από τα φυτά, τα ζώα, τα πρωτόζωα και τα βακτήρια. Η Εικόνα 1.2. περιγράφει τις τέσσερις κύριες κατηγορίες μυκήτων.



Εικόνα 1.2. Ταξινόμηση μυκήτων (Varjani & Patel, 2017)

Οι μύκητες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως αποικοδομητές και συμβιώτες σε όλα τα οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένων του εδάφους και των υδρόβιων βιότοπων, λόγω της μορφολογίας τους και της πλούσιας μεταβολικής δραστηριότητάς τους, γεγονός που τους καθιστά προνομιακούς υποψήφιους για διεργασίες βιοεξυγίανσης σε διάφορες τοποθεσίες. Επιπλέον εμφανίζουν μοναδικά χαρακτηριστικά όπως μεγάλη ικανότητα ανάπτυξης, αυξημένη πρόσβαση σε ενώσεις λόγω μυκηλιακής διακλάδωσης, ικανότητα παραγωγής πλήθους ενζύμων, τόσο εσωκυτταρικών όσο και εξωκυτταρικών, και συσσώρευσης μετάλλων κλπ (Deshmukh, Khardenavis, & Purohit, 2016). Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης απέναντι στις ανθεκτικές, τοξικές ενώσεις παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.3.



Εικόνα 1.3. Μηχανισμοί δράσης μυκήτων για τη βιοεξυγίανση ανθεκτικών, τοξικών ενώσεων (Deshmukh et al., 2016)

Οι μύκητες μπορούν να ευδοκιμήσουν σε εδάφη διαφορετικών κλιματικών συνθηκών, ακόμα και ακραίων, να διαδοθούν μέσω της διασποράς спорίων στον αέρα και να βοηθήσουν στη διατήρηση της ισορροπίας του οικοσυστήματος (Anastasi, Tigini, & Varese, 2013). Έχει αναφερθεί μάλιστα ότι επιβιώνουν σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων που επεξεργάζονται απόβλητα. Λόγω της προσαρμοστικότητας τους μπορούν να αποτελέσουν έναν εναλλακτικό τρόπο καθαρισμού κατά τη διάρκεια του χειμώνα, όταν επικρατούν δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξης για φυτικά συστήματα (Esterhuizen-Londt, Schwartz, & Pflugmacher, 2016). Η έρευνα για τη χρήση μυκήτων σε διεργασίες βιοεξυγίανσης δείχνει ότι μπορούν να υποβαθμίσουν ένα ευρύ φάσμα υλικών και μπορούν να συμβάλλουν στον καθαρισμό του νερού και του εδάφους χωρίς τη δημιουργία μεταβολιτών που είναι επικίνδυνοι για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία (Varjani & Patel, 2017).

Οι μύκητες έχουν αποδεδειγμένα υψηλό δυναμικό στην υποβάθμιση ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους και επομένως χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Ενδεικτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοαποικοδόμηση ρύπων, όπως οι έμμονοι οργανικοί ρύποι (POP), οι βαφές υφασμάτων, οι πετρελαϊκοί υδρογονάνθρακες, τα απόβλητα χαρτοπολτού και χαρτοβιομηχανίας, τα PAHs, τα εντομοκτόνα και τα PPCPs (Deshmukh et al., 2016). Οι μύκητες αποικοδομούν τέτοιους ρύπους χρησιμοποιώντας μια ποικιλία εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών ενζυμικών συστημάτων που περιλαμβάνουν οξειδοαναγωγάσες και κυτόχρωμα P450 για αποτοξικοποίηση και βιοαποικοδόμηση αντίστοιχα (σχήμα τάδε) (Durairaj et al., 2015; Karigar & Rao, 2011). Παρόλη την έρευνα και την πρόοδο που έχει επιτευχθεί σε αυτό τον τομέα, εξακολουθούν να υπάρχουν κάποια στάδια, όπως τα μονοπάτια αποικοδόμησης, που δεν είναι πλήρως κατανοητά. Η ανάπτυξη των τεχνικών της μοριακής βιολογίας συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών και στη σχεδίαση καλύτερων συστημάτων έκφρασης για τη βιοεξυγίανση (Deshmukh et al., 2016).

1.3.1 Μύκητες θαλάσσιας προέλευσης

Τα θαλάσσια οικοσυστήματα έχουν πλούσια ποικιλία μικροοργανισμών και φυσικών πόρων, με εκτιμώμενο αριθμό $3,67 \times 10^{30}$ μικροοργανισμούς (Kennedy et al., 2011) και αποτελούν μια τεράστια πηγή πιθανών βιοκαταλυτών. Αυτοί περιλαμβάνουν οξειδοοδουκτάσες, υδρολάσες, τρανσφεράσες, ισομεράσες, λιγάσες και λυάσες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Lima & Porto, 2016).

Οι βιοκαταλύτες και οι βιοενεργοί μεταβολίτες θαλάσσιας προέλευσης πλεονεκτούν έναντι των χερσαίων, λόγω της προσαρμογής τους στις διακυμάνσεις θερμοκρασίας (-35 με 350 °C) και φωτός, στην υψηλή αλατότητα, στην υψηλή πίεση (μέχρι 111 MPa) και στην ολιγοτροφική φύση του θαλάσσιου περιβάλλοντος (Nikolaivits et al., 2017; Theerachat, Guieysse, Morel, Remaud-Siméon, & Chulalaksananukul, 2018).

Η αλατότητα του κυρίως θαλάσσιου περιβάλλοντος είναι περίπου $\geq 0,6$ M NaCl. Οι υπεραλατόφιλοι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε συγκεντρώσεις NaCl πάνω από 1,7 M και οι αλατόφιλοι στο εύρος 0,85-1,7 M και συνεπώς τα ένζυμά τους είναι ελκυστικά για τη βιοεξυγίανση αποβλήτων από τις βιομηχανίες χαρτοπολτού

και χάρτου και τις κλωστοϋφαντουργικές βιομηχανίες, δεδομένου ότι αυτά τα απόβλητα έχουν συνήθως υψηλή περιεκτικότητα σε άλατα και αλκάλια (Raghukumar, D'Souza-Ticlo, & Verma, 2008). Μεγάλη σημασία έχει και η θερμοσταθερότητα και το μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος λειτουργίας των ενζύμων αυτών των μικροοργανισμών. Οι βιολογικές διεργασίες που μπορούν να διεξαχθούν σε υψηλές θερμοκρασίες έχουν διάφορα πλεονεκτήματα, όπως μειωμένη μικροβιακή μόλυνση, υψηλή διαλυτότητα υποστρώματος, μειωμένο ιξώδες του μίγματος αντίδρασης, και ταχύτερο ρυθμό αντίδρασης (Theerachat et al., 2018). Αντίστοιχα τα πλεονεκτήματα των βιοκαταλυτών από ψυχρόφιλους μικροοργανισμούς περιλαμβάνουν εξοικονόμηση ενέργειας, λόγω των υψηλών ρυθμών καταλυτικής δραστηριότητας σε χαμηλές θερμοκρασίες, χαμηλή βέλτιστη θερμοκρασία και μικρότερη αντίσταση στη θερμική αδράνεια. Ένα παράδειγμα αυτού του οφέλους μπορεί να διαπιστωθεί στη βιοαποκατάσταση της ρύπανσης αργού πετρελαίου σε περιβάλλον χαμηλής θερμοκρασίας (Coulon, McKew, Osborn, McGenity, & Timmis, 2007).

Τα θαλάσσια μικρόβια μπορούν να υποβαθμίσουν μια ποικιλία οργανικών ουσιών και ρύπων και έτσι αποτελούν μια ελκυστική επιλογή για περιβαλλοντικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Li, Singh, Liu, Pan, & Wang, 2014; Panno et al., 2013). Επιπλέον, ορισμένα ένζυμά τους αποκτούν νέες χημικές ή στερεοχημικές ιδιότητες σε σχέση με τους επίγειους ομολόγους τους, όπως η εξειδίκευση του υποστρώματος και η εναντιοεκλεκτικότητα, οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν στην οργανική σύνθεση και στην αποικοδόμηση ρακεμικών μιγμάτων με πιθανές εφαρμογές στην φαρμακευτική βιομηχανία (Nikolaivits et al., 2017).

1.3.1.1 Μεσόφωτα θαλάσσια οικοσυστήματα

Τα μεσόφωτα κοραλλιογενή οικοσυστήματα (mesophotic coral ecosystems - MCE) χαρακτηρίζονται από την παρουσία κοραλλιών που εξαρτώνται από το φως και τη συσχέτιση τους με τις βενθικές κοινότητες μικροοργανισμών και βρίσκονται σε βάθη μεγαλύτερα από το όριο των παραδοσιακών καταδύσεων (S. Kahng, Corpus, & Wagner, 2014). Συγκεκριμένα εντοπίζονται σε βάθος 30-200 m στην ενδιάμεση θαλάσσια ζώνη και η μικροβιολογία αυτών των βιότοπων παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη, ιδιαίτερα όσον αφορά τις μικροβιακές κοινότητες που σχετίζονται

με τα κοράλλια, τα σφουγγάρια και τα φύκια. Αυτή η έλλειψη πληροφοριών οφείλεται στη δύσκολη πρόσβαση και στην κακή αναπαραγωγικότητα των μεθόδων δειγματοληψίας (S. E. Kahng et al., 2010).

Η συσχέτιση των μυκήτων με τα κοράλλια είναι γνωστή από τα μέσα του 1800 και έχουν ανιχνευθεί τόσο σε ρηχά νερά όσο και σε κοράλλια βαθέων υδάτων. Συγκεκριμένες ομάδες που έχουν αναγνωρισθεί περιλαμβάνουν Ασπέργιλλους, Βασιδιομύκητες και Ασκομύκητες (Olson & A Kellogg, 2010). Η έντονη ανησυχία για τη διατήρηση των κοραλλιογενών υφάλων, η αξιοποίηση της τεχνολογικής εξέλιξης και η αναζήτηση μικροοργανισμών και βιοκαταλυτών με καινοτόμες ιδιότητες έχουν οδηγήσει σε μια αύξηση των μελετών των μεσόφωτων θαλλάσιων οικοσυστημάτων και της βιοποικιλότητάς τους.

1.3.2 Μυκητιακά ένζυμα στη βιοεξυγίανση

Η αποτοξικοποίηση των τοξικών οργανικών ενώσεων από διάφορα βακτήρια, μύκητες και ανώτερα φυτά μέσω οξειδωτικής σύζευξης, οφείλεται στις οξειδοαναγωγάσες. Τα μικρόβια εξάγουν ενέργεια μέσω βιοχημικών αντιδράσεων ενεργειακής απόδοσης που μεσολαβούνται από αυτά τα ένζυμα για να διασπάσουν χημικούς δεσμούς και να βοηθήσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα ανηγμένο οργανικό υπόστρωμα (δότης) σε μια άλλη χημική ένωση (δέκτη). Κατά τη διάρκεια τέτοιων αντιδράσεων οξειδοαναγωγής, οι τοξικές οργανικές ενώσεις οξειδώνονται σε αβλαβείς ενώσεις (Karigar & Rao, 2011). Οι οξειδοαναγωγάσες συμμετέχουν στην οξείδωση διαφόρων φαινολικών ουσιών που παράγονται από την αποσύνθεση της λιγνίνης στο έδαφος. Με τον ίδιο τρόπο, μπορούν επίσης να αποτοξικοποιούν ξενοβιοτικά, όπως φαινολικές ή ανλικές ενώσεις, μέσω πολυμερισμού, συμπολυμερισμού με άλλα υποστρώματα ή δέσμευση σε χουμικές ουσίες και έχουν αξιοποιηθεί επίσης για τον αποχρωματισμό και την αποικοδόμηση των συνθετικών βαφών τύπου azo (Park, Park, & Kim, 2006). Οξειδοαναγωγάσες που αξιοποιούνται σε διεργασίες βιοεξυγίανσης παρουσιάζονται στον πίνακα 1.2. Μια οξειδοαναγωγή με μεγάλη βιοτεχνολογική σημασία είναι η λακκάση.

Πίνακας 1.2. Οξειδοαναγωγάσες που αξιοποιούνται σε διεργασίες βιοεξυγίανσης (Karigar & Rao, 2011)

| Οξειδοαναγωγάσες με εφαρμογή σε διεργασίες βιοεξυγίανσης | | |
|--|---|---|
| Όνομασία | Υπόστρωμα | Αντίδραση |
| Οξυγενάσες | | |
| Μονοοξυγενάσες | Αλκένια, στεροειδή, λιπαρά οξέα και αρωματικές ενώσεις | Ενσωμάτωση του ατόμου οξυγόνου στο υπόστρωμα και χρήση υποστρώματος ως αναγωγικού παράγοντα. |
| Διοξυγενάσες | Αρωματικές ενώσεις | Ενσωμάτωση δύο ατόμων οξυγόνου στο υπόστρωμα και διάσπαση δεσμών άνθρακα με το σχηματισμό αλειφατικού προϊόντος |
| | | |
| Λακκάσες (Lac) | Όρθο- και παρα-διφαινόλες, αμινοφαινόλες, πολυφαινόλες, πολυαμίνες, λιγνίνη και αρωματικές διαμίνες | Οξείδωση, αποκαρβοξυλίωση και απομεθυλίωση του υποστρώματος |
| Υπεροξειδάδες | | |
| Υπεροξειδάση λιγνίνης (LiP) | Αλογωμένες φαινολικές ενώσεις, πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις και άλλες αρωματικές ενώσεις | Οξείδωση του υποστρώματος παρουσία συν-υποστρώματος H ₂ O ₂ |
| Υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) | Λιγνίνη και άλλες φαινολικές ενώσεις | Παρουσία Mn ²⁺ και H ₂ O ₂ καταλύεται η οξείδωση του Mn ²⁺ σε Mn ³⁺ το οποίο τελικά οξειδώνει το φαινολικό υπόστρωμα |

| | | |
|------------------------------------|---|--|
| Ευέλικτες υπεροξειδάσες (VP) | Μεθοξύ-βενζόλιο και φαινολικές αρωματικές ενώσεις | Καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα υπόστρωμα που μπορεί να οξειδωθεί |
|------------------------------------|---|--|

Κεφάλαιο 2 - Λακκάσες

Οι λακκάσες είναι από τα λίγα ένζυμα που ξεκίνησαν να μελετούνται από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στις εκκρίσεις του δέντρου *Rhus vernicifera*, της Ιαπωνικής λάκκας (Hikokoikuro, 1883) και λίγα χρόνια αργότερα εντοπίστηκε και στους μύκητες (Thurston, 1994)).

Οι λακκάσες (βενζενεδιόλη: οξειδοαναγωγή οξυγόνου, EC 1.10.3.2) είναι πολυφαινολικές οξειδάσες που περιέχουν πολλαπλούς χαλκούς στο ενεργό τους κέντρο (Chaurasia, Shanker, Yadav, & Yadava, 2013) και παράγονται κατά τη διάρκεια του δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων σε φυσικά υποστρώματα ή καλλιέργειες (Gayazon & Rodakiewicz-Nowak, 1996).

2.1 Προέλευση και βιολογικός ρόλος λακκασών

Οι λακκάσες φέρουν στενή ομοιότητα, ιδιαίτερα στην αλληλουχία αμινοξέων, στην ασκορβική οξειδάση (EC 1.10.3.3) και την σερουλοπλασμίνη (EC 1.16.3.1) που είναι πρωτεΐνη πλάσματος από θηλαστικά (Nunes & Kunamneni, 2018). Έχουν λάβει μεγάλη προσοχή από τους ερευνητές λόγω της ικανότητάς τους να αποικοδομούν μια ποικιλία έμμονων ρύπων. Ενώσεις οι οποίες είναι δομικά παρόμοιες με την λιγνίνη μπορούν να οξειδωθούν από μυκητιακές λακκάσες μαζί με τη σερουλοπλασμίνη και την ακορβική οξειδάση. Όλες είναι μέλη της οικογένειας των οξειδασών που φέρουν πολλαπλά ιόντα χαλκού (multi-copper oxidases, MCOs). Οι MCOs περιλαμβάνουν επιπλέον τη φεροξειδάση (EC 1.16.3.1) και την νιτρωδη αναγωγή (EC 1.7.2.1) (Lawton & Rosenzweig, 2011) και ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των μπλε πρωτεϊνών χαλκού. Οι MCOs τυπικά περιέχουν δύο ή τέσσερα άτομα χαλκού ανά πρωτεϊνικό μόριο και καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης. Σε αυτές τις αντιδράσεις, τα ηλεκτρόνια απομακρύνονται από τα αναγωγικά μόρια υποστρώματος και μεταφέρονται στο οξυγόνο για να σχηματίσουν νερό (Uradhyay, Shrivastava, & Agrawal, 2016). Οι λακκάσες συνεπώς χρησιμοποιούν το ατμοσφαιρικό οξυγόνο ως δότη ηλεκτρονίων αντί του υπεροξειδίου του υδρογόνου που χρησιμοποιείται από τις υπεροξειδάσες, γεγονός που τις καθιστά ελκυστικές για ποικίλες βιομηχανικές εφαρμογές (Nunes & Kunamneni, 2018) αλλά και ανενεργές υπό αναερόβιες συνθήκες (Osman & Cavet, 2008).

Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί περισσότερες από 150 λακκάσες. Με βάση τη βιβλιογραφία, μπορούν να τους αποδοθούν κάποια γενικά χαρακτηριστικά με την επιφύλαξη ότι η πλειονότητα των λακκασών απομονώθηκαν από μύκητες λευκής σήψης, ενώ οι λακκάσες των φυτών έχουν μελετηθεί πολύ λίγο. Ο αριθμός των ισοενζύμων που βρέθηκαν εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας και κυρίως από την παρουσία επαγωγέα στο μέσο. Ο μύκητας *Pleurotus pulmonarius* παράγει τρεις ισομορφές λακκάσης, δύο εκ των οποίων (Icc1 και Icc2) είναι ιδιοστατικές ενώ η ισομορφή Icc3 εντοπίζεται μόνο όταν καλλιεργηθεί ο μύκητας παρουσία επαγωγέων. Αντίστοιχα ο μύκητας *Marasmius quercophilus* στέλεχος 17 παράγει τρεις ιδιοστατικές (constitutive) και τέσσερις επαγόμενες μορφές του ενζύμου (Nunes & Kunamneni, 2018).

Η χρήση του όρου "λακκάση" είναι συγκεχυμένη επειδή ορισμένοι συγγραφείς χρησιμοποιούν αυτή την ονομασία μόνο για εκείνα τα ένζυμα που εκφράζονται από φυτά και μύκητες και εμφανίζουν υψηλή ενεργότητα σε φαινολικές ενώσεις, ενώ άλλοι χρησιμοποιούν αυτόν τον όρο με μια ευρύτερη έννοια για να αναφερθούν σε οποιοδήποτε ένζυμο είναι ικανό να οξειδώσει ένα υπόστρωμα λακκάσης (Nunes & Kunamneni, 2018).

Δραστικότητα λακκάσης έχει αναφερθεί σε φυτά, μερικά έντομα (Dittmer et al., 2004) και μερικά βακτήρια (Claus, 2003). Όμως οι υποψήφιος για βιοτεχνολογικές εφαρμογές λακκάσες, δηλαδή αυτές με υψηλά δυναμικά οξειδοαναγωγής, είναι μυκητιακής προέλευσης. Η φυσιολογική λειτουργία αυτών των βιοκαταλυτών, που είτε εκκρίνονται είτε βρίσκονται εσωκυτταρικά, ποικίλλει στους διάφορους οργανισμούς, αλλά πάντα καταλύουν διεργασίες πολυμερισμού ή αποπολυμερισμού.

2.1.1 Λακκάσες προκαρυωτικής προέλευσης

Συνήθως, οι μύκητες είναι οι πιο αποδοτικοί παραγωγοί λακκάσης και χρησιμοποιούνται εμπορικά μέχρι σήμερα, ενώ λιγότερες μελέτες έχουν διεξαχθεί σε προκαρυώτες (Claus, 2003). Η πρώτη βακτηριακή λακκάση ανακαλύφθηκε το 1993 σε στελέχη του *Azospirillum lipoferum* που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του ρυζιού (Givaudan et al., 1993).

Η πλειονότητα των προκαρυωτικών λακκασών έχουν απομονωθεί από τα γένη *Bacillus* και *Streptomyces* παρά τις αναφορές για δραστηριότητα λακκάσης και σε ορισμένα άλλα βακτηριακά είδη (Ausec, Zakrzewski, Goesmann, Schlutter, & Mandicmulec, 2011). Ενδεικτικά μόνο δύο στελέχη κυανοβακτηρίων, τα *Phormidium valderianum* και *Oscillatoris boryana*, έχουν παρουσιάσει ενεργότητα λακκάσης μέχρι σήμερα αλλά χωρίς να έχει γίνει ακόμα ο καθαρισμός τους. (Afreeen et al., 2017).

Οι προκαρυωτικές λακκάσες ποικίλουν σημαντικά σε μέγεθος (28-180 kDa) και υπάρχουν ως μονομερή, τριμερή ή τετραμερή. Οι μυκητιακές λακκάσες είναι συνήθως γλυκοζυλιωμένες, αλλά η γλυκοζυλίωση των βακτηριακών λακκασών δεν έχει ακόμη διερευνηθεί (Santhanam, Vivanco, Decker, & Reardon, 2011).

Η θέση τους στο κύτταρο καθορίζει ποια υποστρώματα είναι διαθέσιμα και πιθανώς σχετίζεται με τον φυσιολογικό τους ρόλο, ο οποίος στην περίπτωση των προκαρυωτικών λακκασών, συχνά δεν συνδέεται άμεσα με την αποικοδόμηση της λιγνίνης (Santhanam et al., 2011). Ενδεικτικά στα είδη *Bacillus* έχει προταθεί ότι οι λακκάσες εμπλέκονται στο σχηματισμό σπορίων ανθεκτικών στο υπεριώδες (Morozova, Shumakovich, Gorbacheva, Shleev, & Yaropolov, 2007) ενώ σε άλλους προκαρυώτες εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης, στη μελάχρωση, στην παθογένεση και στην παραγωγή μελανίνης (Afreeen et al., 2017).

Οι λακκάσες προκαρυωτικής προελεύσεως έχει αποδειχθεί ότι εκτελούν αντιδράσεις ανάλογες με τους μυκητιακούς ομολόγους τους, παρά το χαμηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής τους και παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες όπως υψηλότερη βέλτιστη θερμοκρασία και pH, αλατοαντοχή και αυξημένη θερμική και χημική σταθερότητα. Τα γενετικά και μοριακά βιολογικά εργαλεία και η πρωτεϊνική μηχανική αξιοποιούνται πιο αποτελεσματικά στα βακτηριακά συστήματα και επιτρέπουν την επίτευξη υψηλότερων αποδόσεων στην παραγωγή ενζύμων και τη δημιουργία πιο αποτελεσματικών και σταθερών βιοκαταλυτών που απαιτούνται για τις συνθήκες βιομηχανικής επεξεργασίας (Martins, Duraõ, Brissos, & Lindley, 2015).

2.1.2 Λακκάσες φυτικής προέλευσης

Όπως ήδη αναφέρθηκε η πρώτη λακκάση ταυτοποιήθηκε στο χυμό του ιαπωνικού δέντρου λάκκας *Rhus vernicifera* (Hikokuro, 1883). Ακολούθως, ενεργότητα λακκάσης αναφέρθηκε σε ποικιλίες φυτών όπως η πατάτα, το μάνγκο, το φασόλι, το ροδάκινο, το πεύκο, το δαμάσκηνο και το σιτάρι (Dwivedi, Singh, Pandey, & Kumar,

2011; Theerachat et al., 2018). Πρόσφατα, πραγματοποιήθηκε ο πρώτος καθαρισμός λακκάσης από τα πράσινα φύκια *Tetracystis aeria* (Otto & Schlosser, 2015).

Αμφότερες οι φυτικές και μυκητιακές λακκάσες είναι γλυκοζυλιωμένα ένζυμα. Οι λακκάσες των φυτών παρουσιάζουν όμως υψηλότερη έκταση γλυκοζυλίωσης (22-45%) και συχνά έχουν και υψηλότερη μοριακή μάζα. Η γλυκοζυλίωση των φυτικών λακκασών είναι χρήσιμη για την κατακράτηση χαλκού, τη θερμική σταθερότητα και τη δραστικότητα του ενζύμου (Dwivedi et al., 2011).

Οι λακκάσες είναι μέλη πολυγονιδιακών οικογενειών στα φυτά (McCaig, Meagher, & Dean, 2005) και συμμετέχουν σε λειτουργίες όπως η επούλωση πληγών και η οξείδωση σιδήρου (Todd & Dean, 2004). Επίσης εμπλέκονται στη σύνθεση της λιγνίνης, στο σχηματισμό κυτταρικού τοιχώματος και καταλύουν τον πολυμερισμό ελευθέρων ριζών των δομικών μονάδων λιγνίνης: p-κουμαρίνη, κωνιφερυλική και σιναπική αλκοόλη (Morozova, Shumakovich, Gorbacheva, et al., 2007; Riva, 2006).

Σε μερικά φυτά αναφέρθηκε η ύπαρξη πολλών μορφών του ενζύμου. Ενδεικτικά οκτώ λακκάσες αναφέρθηκαν στο είδος πεύκου *Pinus taeda* (Dwivedi et al., 2011) και πέντε διαφορετικές λακκάσες φαίνεται ότι εκφράζονται στους ιστούς της λεύκας *Populus trichocarpa* (Borderies et al., 1999).

2.1.3 Λακκάσες μυκητιακής προέλευσης

Οι μύκητες φαίνεται να έχουν περισσότερους παραγωγούς λακκάσης σε σύγκριση με τα φυτά. Οι μυκητιακές λακκάσες παράγονται στα κύτταρα και στη συνέχεια εκκρίνονται και συσσωρεύονται έξω από τις υφές. Έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από εξήντα μυκητιακά στελέχη με ενεργότητα λακκάσης που ανήκουν στους Ασκομύκητες, τους Δευτερομύκητες και κυρίως τους Βασιδιομύκητες (Riva, 2006; Subramanian, Ramesh, & Kalaiselvam, 2014).

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι οι λακκάσες είναι από τα κύρια ένζυμα που εμπλέκονται σε διεργασίες απολιγνιτοποίησης από μύκητες λευκής σήψης (Riva, 2006) αλλά και στην ανάπτυξη και τη μορφογένεση των μυκήτων (Morozova, Shumakovich, Gorbacheva, et al., 2007). Επιπρόσθετα, αυτά τα ένζυμα μπορούν να προστατεύσουν τους παθογόνους μύκητες από τις τοξικές φυτοαλεξίνες και τανίνες, επομένως αποτελούν σημαντικό παράγοντα της παθογόνου δράσης πολλών μυκητιακών ασθενειών (Mayer & Staples, 2002).

Λόγω των ιδιοτήτων του υποστρώματός τους, τα ένζυμα που συμμετέχουν στη διάσπαση της λιγνίνης πρέπει να είναι αποκλειστικά εξωκυτταρικά. Ενώ αυτό ισχύει χωρίς εξαίρεση στις υπεροξειδάσες λιγνίνης και τις υπεροξειδάσες μαγγανίου των μυκήτων λευκής σήψης (Baldrian, 2006), η κατάσταση δεν είναι η ίδια με τις λακκάσες. Αν και οι περισσότερες από τις λακκάσες που έχουν καθαριστεί μέχρι τώρα είναι εξωκυτταρικά ένζυμα, οι λακκάσες των μυκήτων ξύλου βρίσκονται συχνά και ενδοκυτταρικά. Ενδεικτικά στελέχη μυκήτων λευκής σήψης που δοκιμάστηκαν (Blaich & Esser, 1975) παρήγαγαν τόσο εξωκυτταρικές όσο και ενδοκυτταρικές λακκάσες με ισόένζυμα που παρουσιάζουν παρόμοια πρότυπα χρώσης δραστηριότητας μετά από ισοηλεκτρική εστίαση.

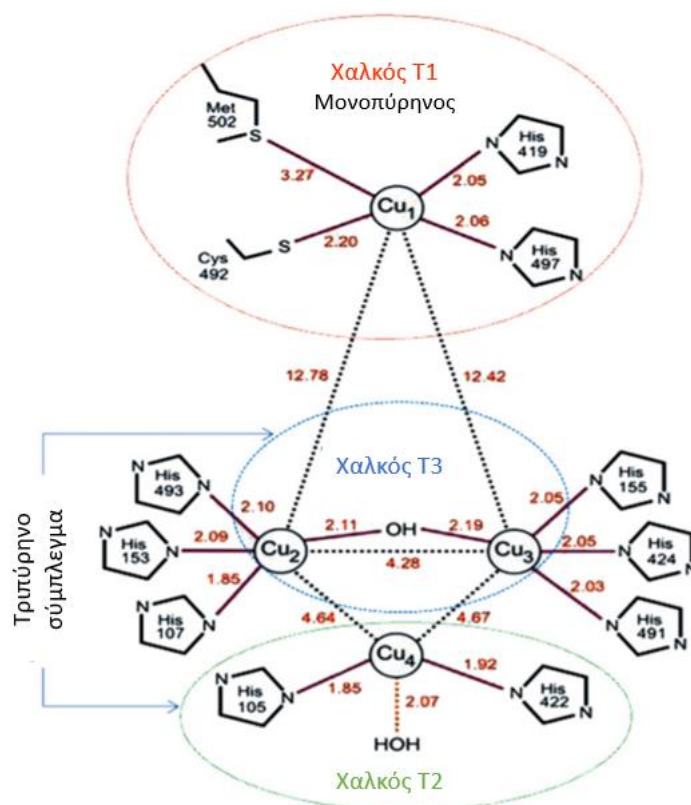
Πίνακας 2.1. Φυσιολογικές λειτουργίες λακκασών

| Φυσιολογικές λειτουργίες λακκασών διαφορετικής προέλευσης | | |
|---|--|-----------------------------|
| Προκαρυωτικές | Φυτικές | Μυκητιακές |
| Ανθεκτικότητα σπορίων | Επούλωση πληγών | Αποικοδόμηση λιγνίνης |
| Παραγωγή μελανίνης | Οξειδωση σιδήρου | Ανάπτυξη και μορφογένεση |
| Συμβολή στην παθογόνο δράση | Σύνθεση λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα | Συμβολή στην παθογόνο δράση |

2.2 Δομικά χαρακτηριστικά λακκασών

Συνήθως οι λακκάσες είναι μονομερείς εξωκυτταρικές γλυκοπρωτεΐνες με εύρος μοριακού βάρους μεταξύ 50 και 140 kDa, και με μεγάλη ποικιλία τόσο σε μέγεθος όσο και σε πρότυπα γλυκοζυλίωσης (Claus, 2004). Οι περισσότερες μυκητιακές λακκάσες περιέχουν συνολικά 520-550 αμινοξέα, χωρίς να συμπεριλαμβάνεται η πεπτιδική αλληλουχία σηματοδότησης (Rivera-Hoyos et al., 2013). Το υδατανθρακικό τμήμα των λακκασών που αποτελείται από μαννόζη, ακετυλογλυκοζαμίνη και γαλακτόζη αποτελεί το 10 με 45% της μάζας της πρωτεΐνης. Αυτή η χαρακτηριστική ομάδα υδατανθράκων πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για τη σταθερότητα του ενζύμου (Su, Fu, Wang, Silva, & Cavaco-Paulo, 2018).

Η καταλυτική δράση των μπλε οξειδασών του χαλκού διασφαλίζεται από την παρουσία διαφορετικών κέντρων χαλκού στο μόριο του ενζύμου. Συγκεκριμένα χαρακτηρίζονται από την παρουσία τουλάχιστον ενός χαλκού τύπου 1 (T1), μαζί με τουλάχιστον τρία επιπρόσθετα ιόντα χαλκού, ένα τύπου 2 (T2) και δύο τύπου 3 (T3) τα οποία δομούν ένα τριπύρρηνο σύμπλεγμα (Εικόνα 2.1.). Τα διαφορετικά κέντρα χαλκού μπορούν να αναγνωριστούν με βάση τις φασματοσκοπικές τους ιδιότητες. Ο χαλκός T1 απορροφά έντονα στα 600 nm και μεταδίδει το μπλε χρώμα, ο χαλκός T2 είναι άορατος στο φάσμα απορρόφησης ενώ τα δύο άτομα χαλκού T3 στα 330 nm (Santhanam et al., 2011). Ένζυμα που στερούνται το άτομο χαλκού T1 και άρα και το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα ονομάζονται «κίτρινες» ή «λευκές» λακκάσες, αλλά αρκετοί συγγραφείς δεν τις κατατάσσουν στις λακκάσες (Baldrian, 2006).



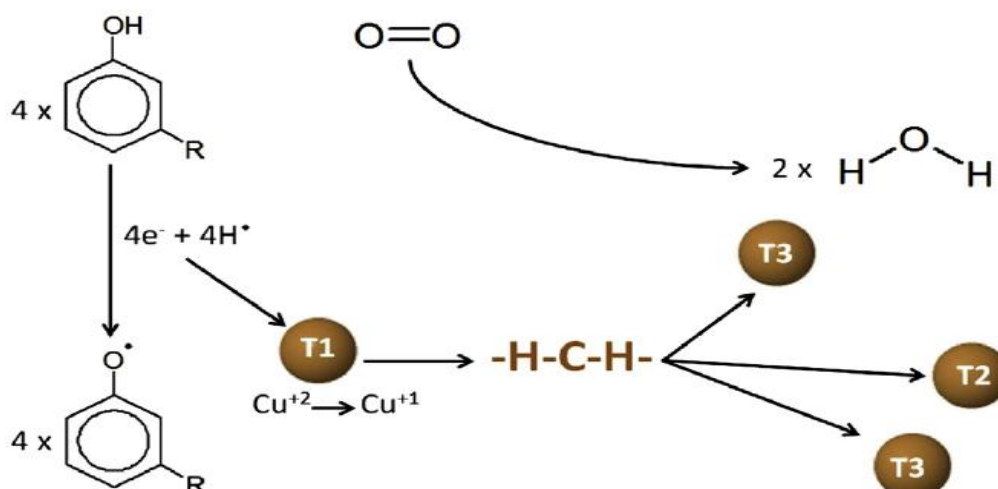
Εικόνα 2.1. Τα ενεργά κέντρα της λακκάσης CotA του *Bacillus subtilis* (Dwivedi et al., 2011)

Ο χαλκός T1 έχει ένα τριγωνικό συντονισμό, με δύο ιστιδίνες, μια κυστεΐνη και μία αξονική θέση συνήθως μεταβλητή. Σε αυτή την αξονική θέση βρίσκεται μια μεθειονίνη στα βακτήρια και μια λευκίνη ή φαινυλαλανίνη στις μυκητιακές λακκάσες. Έχει υποστηριχθεί ευρέως ότι αυτός ο υποκαταστάτης αξονικής θέσης επηρεάζει

έντονα το δυναμικό οξειδωσης του ενζύμου, ενδεχομένως παρέχοντας το μηχανισμό ρύθμισης της δραστηριότητάς του. Μία μετάλλαξη από φαινυλαλανίνη σε μεθειονίνη μείωσε σημαντικά την τιμή του δυναμικού οξειδωσης μιας μυκητιακής λακκάσης από το *Trametes villosa* (Kumar, Phale, Durani, & Wangikar, 2003). Ο χαλκός T1 αποδίδει το τυπικό μπλε χρώμα στις πρωτεΐνες με πολλαπλούς χαλκούς, το οποίο οφείλεται στην έντονη ηλεκτρονική απορρόφηση που προκαλείται από τον ομοιοπολικό δεσμό χαλκού-κυστεΐνης.

Ο χαλκός T2 δεν εμφανίζει απορρόφηση στο ορατό φάσμα και φανερώνει παραμαγνητικές ιδιότητες στις μελέτες παραμαγνητικού συντονισμού ηλεκτρονίων (Electron paramagnetic resonance – EPR). Ο χαλκός T2 μπορεί να απομακρυνθεί επιλεκτικά από το μόριο του ενζύμου και αυτό συνοδεύεται από σημαντική απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας (Malkin, Malmström, & Vänngård, 1969). Είναι στρατηγικά τοποθετημένος κοντά στους χαλκούς T3, ένα διπυρηνικό κέντρο που χαρακτηρίζεται φασματοσκοπικά από προσρόφηση ηλεκτρονίων στα 330 nm (οξειδωμένη μορφή) και από την απουσία σήματος EPR ως αποτέλεσμα της αντι-σιδηρομαγνητικής σύζευξης του ζεύγους χαλκού. Ο χαλκός T3 είναι επίσης το κοινό χαρακτηριστικό της άλλης υπεροικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τις τυροσινάσες και τις αιμοκυανίνες. Ο χαλκός T2 συντονίζεται με δύο και ο T3 με έξι ιστιδίνες. Η ισχυρή αντι-σιδηρομαγνητική σύζευξη μεταξύ των δύο τύπων χαλκού διατηρείται με μια γέφυρα υδροξυλίου (Claus, 2004) όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.1.

2.3 Μηχανισμός κατάλυσης των λακκασών



Εικόνα 2.2. Ο κύκλος κατάλυσης της λακκάσης. Το υπόστρωμα οξειδώνεται από το χαλκό T1 και τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω ενός εξαιρετικά διατηρημένου τριπεπτιδίου HIS-Cys-His στους χαλκούς T2 και T3. Εκεί λαμβάνει χώρα η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. (Rivera-Hoyos et al., 2013)

Οι καταλυτικές ιδιότητες της λακκάσης μπορούν να αποδοθούν στα ακόλουθα τρία βήματα τα οποία αποδίδονται και στην Εικόνα 2.2.:

- i. Ο χαλκός T1 ανάγεται με την αποδοχή ηλεκτρονίων από το αναγωγικό υπόστρωμα.
- ii. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από τον χαλκό T1 στο τριπυρηνικό σύμπλεγμα T2 / T3.
- iii. Το μοριακό οξυγόνο ενεργοποιείται και ανάγεται σε νερό στο σύμπλεγμα T2/T3.

Καθώς η οξείδωση ενός υποστρώματος με ένα ηλεκτρόνιο συμβαίνει παράλληλα με την τετρα-ηλεκτρονιακή αναγωγή του οξυγόνου ο μηχανισμός αντίδρασης δεν μπορεί να είναι εντελώς απλός. Η μείωση του οξυγόνου λαμβάνει χώρα μέσω του σχηματισμού δεσμευμένων ενδιάμεσων οξυγόνου (Zorpellaro, Huang, & Sakurai, 2000) και η λακκάση μπορεί να θεωρηθεί ότι λειτουργεί ως μπαταρία, αποθηκεύοντας ηλεκτρόνια από μεμονωμένες αντιδράσεις οξείδωσης προκειμένου να μειωθεί το μοριακό οξυγόνο. Συνεπώς, η οξείδωση τεσσάρων αναγωγικών μορίων υποστρώματος είναι απαραίτητη για την πλήρη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό (Desai & Nityanand, 2011).

Το δυναμικό αναγωγής ποσοτικοποιεί την τάση ενός μορίου να αποκτά ηλεκτρόνια και εκφράζεται σε σχέση με το πρότυπο ηλεκτρόδιο υδρογόνου σε μονάδες βολτ. Δεδομένου ότι ο χαλκός T1 αποδέχεται τα ηλεκτρόνια από τη μείωση των υποστρωμάτων, τα υποστρώματα που μπορούν να οξειδωθούν απευθείας από τις λακκάσες πρέπει να έχουν δυναμικό ιονισμού χαμηλότερο από ή μόνο ελαφρώς υψηλότερο από το δυναμικό αναγωγής του χαλκού T1. Επομένως, χαμηλά δυναμικά αναγωγής της λακκάσης συνεπάγονται μικρότερο εύρος υποστρώματος στα οποία μπορεί να δράσει (Santhanam et al., 2011). Έτσι, οι λακκάσες με μεγαλύτερο δυναμικό αναγωγής του χαλκού T1 αποκτούν αυξημένο ενδιαφέρον για τη βιοτεχνολογία. Ανάλογα με το δυναμικό οξειδοαναγωγής (redox potential, RP), οι λακκάσες ταξινομούνται σε δύο ομάδες, δηλαδή χαμηλό RP (0,4-0,6 V) και υψηλό RP (0,6-0,8V) (Klonowska et al., 2002).

Δεδομένου ότι η θέση του χαλκού T1 καταλαμβάνει μια ευρεία κοιλότητα στην επιφάνεια του ενζύμου, μπορεί να συνδεθεί σε αυτή μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων. Ο χαλκός T1 παίζει το ρόλο πόρτας που προσφέρει είσοδο σε ένα ηλεκτρόνιο υποστρώματος στην καταλυτική περιοχή. Επιπλέον ελέγχει τον καταλυτικό ρυθμό ενώ κατά τη διάρκεια ολόκληρης της καταλυτικής διαδικασίας η αναγωγή του χαλκού T1 περιορίζει την ταχύτητα. Το δυναμικό οξειδοαναγωγής του χαλκού T1 είναι αρκετά χαμηλό ώστε να επιτρέπει έπειτα την απομάκρυνση των ηλεκτρονίων (Su et al., 2018).

2.3.1 Υποστρώματα λακκάσης

Οι λακκάσες καταλύουν τη μείωση του οξυγόνου σε νερό συνοδευόμενη από την οξείδωση ενός υποστρώματος, τυπικά μιας p-διφαινόλης ή άλλης φαινολικής ένωσης. Είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η λακκάση από το αναγωγικό της υπόστρωμα λόγω του εύρους υποστρωμάτων, το οποίο ποικίλλει από μία λακκάση σε άλλη και επικαλύπτεται με το εύρος υποστρωμάτων ενός άλλου ενζύμου, της τυροσινάσης (EC 1.14.18.1), με τη διαφορά ότι η λακκάση δεν οξειδώνει την τυροσίνη (Baldrian, 2006), καθώς και με των φαινολοξειδασών σε κάποιο βαθμό. Αν και η λακκάση αποκαλείται επίσης διφαινολοξειδάση, οι μονοφαινόλες όπως η 2,6-διμεθοξυφαινόλη ή η γουαϊακόλη είναι συχνά καλύτερα υποστρώματα από τις διφαινόλες όπως η κατεχόλη ή η υδροκινόνη. Τέλος θεωρείται ότι απουσία

υπεροξειδίου του υδρογόνου η συριγγαλδαζίνη οξειδώνεται αποκλειστικά από τις λακκάσες (Harkin, Larsen, & Obst, 2013).

Πίνακας 2.2. Δυναμικό οξειδοαναγωγής (mV) διαφορετικών υποστρωμάτων λακκάσης (Su et al., 2018)

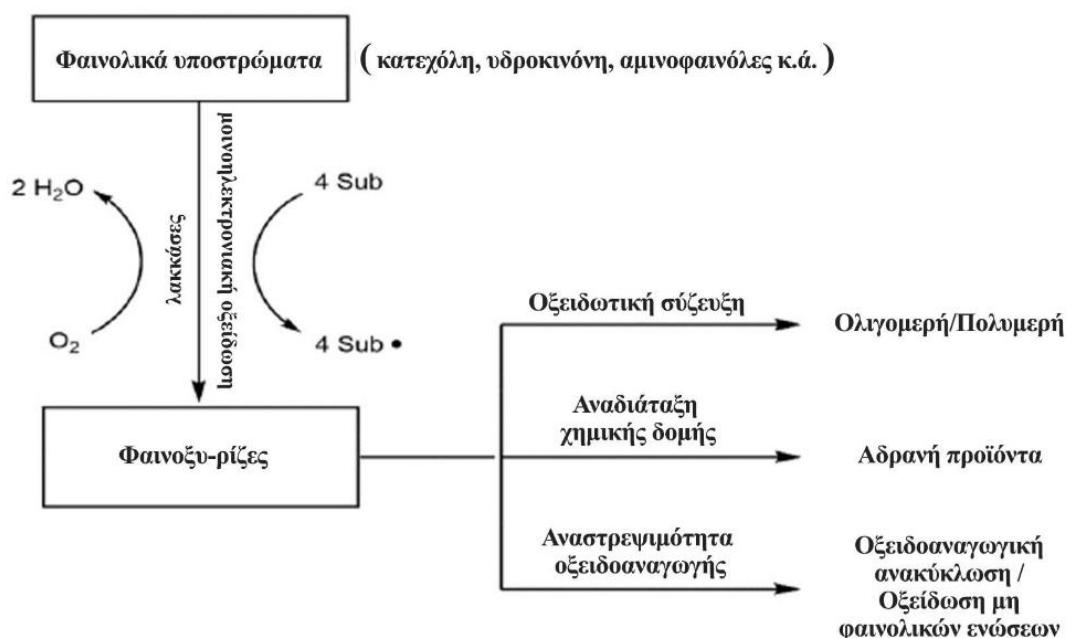
| Υπόστρωμα λακκάσης | Δυναμικό οξειδοαναγωγής (mV) |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| ABTS | 680 |
| Υδροξυβενζοτριαζόλιο (HBT) | 1080 |
| Συριγγαλδαζίνη | 270 |
| Υδροκινόνη | 170 |

Υποστρώματα της λακκάσης είναι φαινολικές ενώσεις, όπως όρθο- και παρα-διφαινόλες, αμινοφαινόλες, πολυφαινόλες, πολυαμίνες και αρωματικές διαμίνες. Οι φαινολικές ομάδες θεωρούνται τυπικά υποστρώματα λακκάσης λόγω του χαμηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής τους (Πίνακας 2.2.). Η αποτελεσματικότητα της οξείδωσης επηρεάζεται από τη φύση και τη θέση των υποκαταστατών στο φαινολικό δακτύλιο. Κατά την οξείδωση του υποστρώματος σχηματίζονται ρίζες που μπορεί στη συνέχεια να αναδιαταχθούν αυθόρμητα οδηγώντας στη διάσπαση του αρωματικού δακτύλιου ή στον πολυμερισμό του (Theerachat et al., 2018).

Τα φαινολικά υποστρώματα που οξειδώνονται από τις λακκάσες χάνουν ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο και σχηματίζουν φαινοξυ-ρίζες που σταθεροποιούνται με συντονισμό στις αντίστοιχες δομές κίνησης ή συνδέονται ομοιοπολικά με ολιγο- ή πολυμερικά προϊόντα αποδίδοντας αδρανή τελικά προϊόντα (Su et al., 2018). Ωστόσο, ανάλογα με τη σταθερότητα της φαινοξυλικής ρίζας, μπορεί να παρατηρηθεί και αναστρεψιμότητα της οξείδωσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα φαινολικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται ως μεσολαβητές λακκάσης. Τα παραπάνω παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.3.

Η οξειδοαναγωγική ανακύκλωση φαινολικών υποστρωμάτων βελτιώνει την ευελιξία της καταλυτικής δράσης των λακκασών επειδή ενώσεις που δεν αποτελούν υποστρώματα λακκάσης μπορούν να χρησιμεύσουν ως στόχοι οξείδωσης (Cañas & Camarero, 2010). Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται

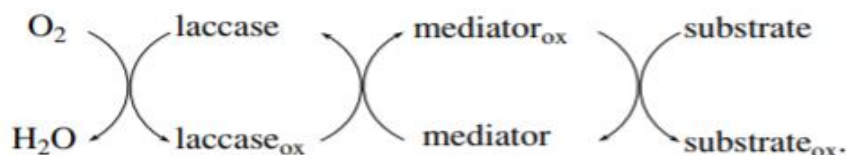
όσο το μέγεθος του υποστρώματος αυξάνει. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην περιορισμένη προσβασιμότητα των εμπλεκόμενων υποστρωμάτων στην ενεργό θέση του ενζύμου και μπορεί να αντισταθμιστεί μέσω της χρήσης του κατάλληλου μεσολαβητή (D'Acunzo & Galli, 2002).



Εικόνα 2.3. Αντίδραση οξείδωσης φαινολικού υποστρώματος καταλυόμενη από λακκάση (Su et al., 2018)

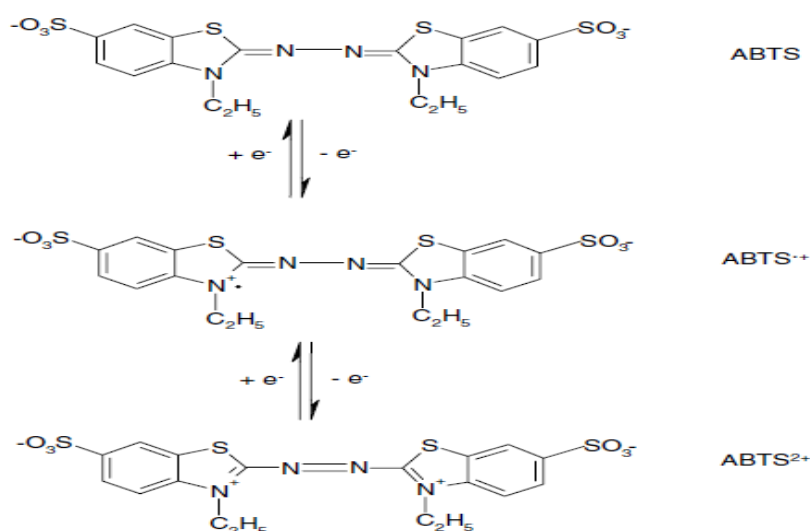
2.3.2 Μεσολαβητές

Οι λακκάσες διαθέτουν σχετικά χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής ($\leq 0,8$ V) σε σύγκριση με τις λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες (N1 V) και αρχικά θεωρούνταν πως η δράση τους θα περιοριζόταν στην οξείδωση του φαινολικού τμήματος της λιγνίνης, το οποίο αποτελεί λιγότερο από το 20% του πολυμερούς λιγνίνης (Kawai, 1990). Επίσης τα μη φαινολικά υποστρώματα που έχουν οξειδοαναγωγικό δυναμικό πάνω από 1,3 V δεν μπορούν να οξειδωθούν απευθείας από λακκάσες. Παρ' όλα αυτά, ο περιορισμός αυτός έχει ξεπεραστεί με τη χρήση μεσολαβητών οξειδοαναγωγής. Η παρουσία ορισμένων ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που δρουν ως μεσολαβητές οξειδοαναγωγής επεκτείνει την καταλυτική δράση της λακκάσης προς πιο ανθεκτικές ενώσεις όπως οι μη-φαινολικές μονάδες λιγνίνης. Η λακκάση οξειδώνει το μεσολαβητή και η οξειδωμένη μορφή του μεσολαβητή δρα ως οξειδωτικό για το υπόστρωμα (Cañas & Camarero, 2010) όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.4.



Εικόνα 2.4. Οξείδωση υποστρώματος από λακκάση παρουσία μεσολαβητή (Morozova, Shumakovich, Shleev, & Yaropolov, 2007)

Από το 1990, όταν βρέθηκε ότι το άλας διαμμωνίου του 2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό) (ABTS) χρησιμεύει ως υπόστρωμα λακκάσης που μεσολαβεί ή ενισχύει την ενζυμική δράση (Chaurasia et al., 2013) το εύρος των ενώσεων που μπορούν να αποτελέσουν υποστρώματα λακκάσης έχει αυξηθεί δραματικά. Η ίδια μελέτη κατέδειξε ότι η λακκάση του *T. hirsuta* παρουσία ABTS και βαφής Remazol blue μπορούσε να οξειδώσει μη φαινολικές ενώσεις λιγνίνης με υψηλά οξειδοαναγωγικά δυναμικά: βεραρυλική αλκοόλη και 1- (3,4-διμεθοξυφαινυλο) -2- (2-μεθοξυφαινοξυ) προπανο-1,3-διόλη. Επιπλέον, η λακκάση παρουσία ABTS μπορεί να αποικοδομεί ένα μοντέλο διμερούς λιγνίνης, 1- (3,4-διμεθοξυφαινυλο)-2-φαινοξυαιθάνιο-1,2-διόλη, δίνοντας βερατραλδεΐδη και βενζαλδεΐδη. Τέλος η αποικοδόμηση του ζιζανιοκτόνου Isoproturon από την λακκάση *Trametes versicolor* παρατηρήθηκε ότι συμβαίνει με πολύ χαμηλό ρυθμό όταν χρησιμοποιείται η λακκάση μόνη της, αλλά παρουσία του μεσολαβητή 1-υδροξυβενζοτριαζολίου (HBT), το ζιζανιοκτόνο αποικοδομήθηκε πλήρως εντός 24 ωρών (Zeng, Qin, & Xia, 2017).



Εικόνα 2.5. Οξείδωση του ABTS παρουσία λακκάσης. Το ABTS οξειδώνεται στην κατιοντική ρίζα ABTS^{•+} και έπειτα στο κατιόν ABTS²⁺ (Morozova, Shumakovich, Shleev, et al., 2007)

Ένας ιδανικός μεσολαβητής οξειδοαναγωγής πρέπει να είναι ένα καλό υπόστρωμα λακκάσης. Οι οξειδωμένες και ανηγμένες μορφές του πρέπει να είναι σταθερές αλλά δεν πρέπει να παρεμποδίζουν την ενζυμική αντίδραση. Επιπλέον, η οξειδοαναγωγική μετατροπή του πρέπει να είναι κυκλική (Morozova, Shumakovich, Shleev, et al., 2007).

Συνεπώς ο συνδυασμός της λακκάσης με μόρια χαμηλού μοριακού βάρους δεν οδηγεί μόνο σε υψηλότερους ρυθμούς και αποδόσεις του μετασχηματισμού υποστρωμάτων αλλά δίνει και τη δυνατότητα οξείδωσης υποστρωμάτων στα οποία το ένζυμο είχε μηδενική ή περιθωριακή δραστηριότητα. Λόγω αυτού πολλοί τεχνητοί μεσολαβητές, από το ABTS που είναι ο πρώτος αναφερόμενος μεσολαβητής λακκάσης (Bourbonnais & Paice, 1990) μέχρι συνθετικούς μεσολαβητές τύπου -NOH- όπως το HBT, έχουν μελετηθεί και έχει καθοριστεί ο μηχανισμός δράσης τους. Η οξείδωση του ABTS φαίνεται στην Εικόνα 2.5. (Kunamneni, Camarero, et al., 2008).

2.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες λακκασών

2.4.1 pH

Η εξειδίκευση και η συγγένεια της λακκάσης με το υπόστρωμα ποικίλλει ανάλογα με τις μεταβολές στο pH. Για τα υποστρώματα των οποίων η οξείδωση δεν περιλαμβάνει ανταλλαγή πρωτονίων (όπως το σιδηροκυανιούχο άλας), η ενεργότητα λακκάσης συχνά μειώνεται καθώς το pH αυξάνεται, ενώ για τα υποστρώματα των οποίων η οξείδωση περιλαμβάνει ανταλλαγή πρωτονίων (όπως η φαινόλη), το προφίλ pH-ενεργότητα της λακκάσης μπορεί να παρουσιάσει ένα βέλτιστο pH, η τιμή του οποίου εξαρτάται από τη λακκάση και όχι από το υπόστρωμα (Dwivedi et al., 2011; Gianfreda, Xu, & Bollag, 1999).

Οι μυκητιακές λακκάσες έχουν ισοηλεκτρικά σημεία (pI) που κυμαίνονται από 3 έως 7, ενώ οι τιμές pI για τις φυτικές λακκάσες κυμαίνονται έως 9. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο ενζύμων είναι ότι τα μυκητιακά ένζυμα παρουσιάζουν βέλτιστο pH μεταξύ των τιμών 3,6 και 5,2, ενώ οι λακκάσες του φυτού *Rhus vernicifera* μεταξύ 6,8 και 7,4. Το χαμηλότερο βέλτιστο pH για τις μυκητιακές λακκάσες μπορεί να οφείλεται στη δυνατότητα των μυκήτων να αναπτύσσονται καλά σε όξινες συνθήκες, ενώ οι λακκάσες των φυτών αντίστοιχα εμφάνισαν το βέλτιστο pH πλησιέστερα στο

φυσιολογικό εύρος λόγω της ενδοκυτταρικής φύσης τους. Έτσι, οι διαφορές στο βέλτιστο pH μπορεί να οφείλονται στην ανομοιότητα των φυσιολογικών λειτουργιών. Εκτός από τη διακύμανσή τους στο pH, αυτά τα ένζυμα διαφέρουν επίσης στη λειτουργία τους. Τα μυκητιακά ένζυμα είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση τοξικών φαινολών από το μέσο στο οποίο αναπτύσσονται οι μύκητες υπό φυσικές συνθήκες, ενώ τα φυτικά ένζυμα εμπλέκονται σε συνθετικές διεργασίες όπως ο σχηματισμός λιγνίνης (Nunes & Kunamneni, 2018) .

2.4.2 Θερμοκρασία

Τα προφίλ θερμοκρασίας της ενεργότητας λακκάσης συνήθως δεν διαφέρουν από άλλων εξωκυτταρικών λιγνινολυτικών ενζύμων με βέλτιστο μεταξύ 50 και 70 °C αλλά έχουν επίσης αναφερθεί λίγα ένζυμα που εμφανίζουν βέλτιστο κάτω από 35 °C (Baldrian, 2006). Για παράδειγμα, η λακκάση του *Ganoderma lucidum* παρουσίασε βέλτιστη ενεργότητα στους 25 °C (M Ko, Y.-E, & Choi, 2001).

Η θερμοκρασιακή σταθερότητα των λακκασών ποικίλλει σημαντικά με το εύρος θερμοκρασίας της ανάπτυξης του οργανισμού προέλευσης. Αντιθέτως το βέλτιστο pH ενεργότητας του ενζύμου δεν ταυτίζεται συνήθως με το βέλτιστο pH ανάπτυξης των μυκήτων. Οι μυκητιακές λακκάσες έχουν συνήθως χαμηλότερη θερμική σταθερότητα από τις βακτηριακές λακκάσες (Baldrian, 2006). Η θερμική σταθερότητα των λακκασών έχει προταθεί ότι συνδέεται με την αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων χαλκού των κέντρων χαλκού και των γεφυρών άλατος καθώς και με το δίκτυο σύνδεσης υδρογόνου στις εσωτερικές πρωτεϊνικές δομές (Dwivedi et al., 2011).

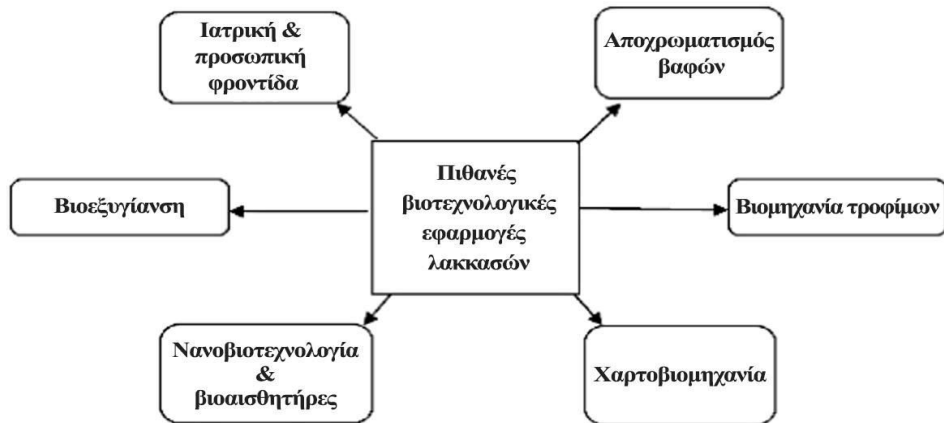
2.5 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές λακκασών

Οι λακκάσες καταλύουν μια πληθώρα αντιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων της αποικοδόμησης των πολυμερών, της οξειδωτικής σύζευξης των φαινολικών ενώσεων και της διάσπασης αρωματικών δακτυλίων, γεγονός που τις καθιστά βιομηχανικά ένζυμα με μεγάλη σημασία (Riva, 2006). Επιπλέον όχι μόνο οξειδώνουν τα φαινολικά και μεθοξυφαινολικά οξέα, αλλά τα αποκαρβοξυλιώνουν και προσβάλλουν τις μεθοξυ ομάδες τους (απομεθυλίωση) (Karigar & Rao, 2011). Τέλος η σημασία των λακκασών ως οξειδωτικών βιοκαταλυτών ενισχύεται από το γεγονός ότι σε αντίθεση με άλλες οξειδοοδουκτάσες, οι αντιδράσεις τους δεν απαιτούν συμπράγοντες

όπως το NAD(P)H και δεν εξαρτώνται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου όπως οι υπεροξειδάσες (Santhanam et al., 2011).

Οι λακκάσες δρουν τόσο σε φαινολικές όσο και σε μη φαινολικές ενώσεις που σχετίζονται με τη λιγνίνη καθώς και σε ανθεκτικούς περιβαλλοντικούς ρύπους και έχουν εφαρμογές στη βιομηχανία χαρτιού και χαρτοπολτού, στην κλωστοϋφαντουργική βιομηχανία, στην υποβάθμιση ξενοβιοτικών και σε διεργασίες βιοεξυγίανσης. Δεδομένου ότι οι λακκάσες καταλύουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων χωρίς επιπλέον συμπαράγοντες, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως βιοαισθητήρες για τον εντοπισμό διαφόρων φαινολικών ενώσεων, οξυγόνου και αζιδίου. Πρόσφατα, η λακκάση χρησιμοποιήθηκε ως βιοκαταλύτης για τη σύνθεση οργανικών ενώσεων, καθώς και στο σχεδιασμό βιοκαυσίμων (Nunes & Kunamneni, 2018). Οι πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές των λακκασών παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.6.

Παρά τις τεράστιες δυνατότητές τους, η χρησιμότητα των λακκασών περιορίζεται από τη χαμηλή διάρκεια ζωής τους και το υψηλό κόστος παραγωγής. Το πρώτο μειονέκτημα μπορεί να ξεπεραστεί με ακινητοποίηση του ενζύμου σε νανοσωματίδια παρέχοντας έτσι υψηλές υπολειμματικές δραστηριότητες σε ένα ευρύ φάσμα pH και θερμοκρασίας (Patel et al., 2014). Τέλος οι θαλάσσιοι μύκητες αποτελούν μια ενδιαφέρουσα πηγή λακκασών με ιδιαίτερες ιδιότητες, όμως οι αναφορές που επικεντρώνονται στις λακάσες από το θαλάσσιο περιβάλλον και τις δυνατές εφαρμογές τους είναι ακόμα περιορισμένες (Theerachat et al., 2018).



Εικόνα 2.6. Πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές λακκασών (Upadhyay et al., 2016)

2.6 Εφαρμογές μυκητιακών λακκασών σε διεργασίες βιοεξυγίανσης

2.6.1 Αποχρωματισμός βαφών

Η αντικατάσταση των φυσικών βαφών από συνθετικές βαφές στην αγορά συνέβη γρήγορα από τα τέλη του 19ου αιώνα λόγω του χαμηλού κόστους παραγωγής τους, της απλής διαδικασίας βαφής και της ποικιλίας χρωμάτων. Σήμερα, οι συνθετικές βαφές χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλές βιομηχανίες και πάνω από 100.000 εμπορικές συνθετικές βαφές με ετήσια παραγωγή περίπου 280.000 τόνων παγκοσμίως είναι διαθέσιμες. Στο νερό, οι χρωστικές ουσίες μπορούν να καταστούν τοξικές και καρκινογόνες καθώς μερικές από αυτές εμφανίζουν χημικές δομές (τύπου αζο) που παράγουν αρωματικές αμίνες και σχετίζονται με γενετικές μεταλλάξεις μετά το μεταβολισμό τους από το ήπαρ και από ορισμένους μικροοργανισμούς στα έντερα των ανώτερων ζώων. Τα μολυσμένα απόβλητα μπορούν επίσης να παρουσιάσουν σημαντική περιεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα ή θείο και να προκαλέσουν αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων, αλλαγή στο pH και πολύ δυσάρεστη οπτική επίδραση σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 0,01 ppm (Gaviria-Arroyave, Osorio-Echavarria, & Gomez-Vanegas, 2018).

Ωστόσο, η επεξεργασία τέτοιων λυμάτων παραμένει ένα δύσκολο έργο λόγω της δομικής πολυπλοκότητας, της τοξικότητας και της υψηλής σταθερότητας των αζοχρωμάτων. Φυσικές και χημικές διεργασίες χρησιμοποιούνται συνήθως για την

επεξεργασία αυτών των αποβλήτων. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι παρουσιάζουν μειονεκτήματα όπως οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις, το υψηλό λειτουργικό κόστος, η χαμηλή απόδοση και μερικές φορές η παραγωγή επικίνδυνων παραπροϊόντων (Theerachat et al., 2018). Πράσινες τεχνολογίες οξείδωσης που χρησιμοποιούν μικρόβια και τα ένζυμα τους για να αντικαταστήσουν τις συμβατικές μεθόδους προσελκύουν αυξανόμενο ενδιαφέρον. Η ενζυμική αποικοδόμηση των βαφών τύπου άζο λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Αρχικά οι βαφές υποβάλλονται στη θραύση των δεσμών αζώ που σχηματίζουν τις αμίνες και έπειτα οι αρωματικές αμίνες καταβολίζονται περαιτέρω σε μικρά μη τοξικά μόρια υπό αερόβιο περιβάλλον (Afreen et al., 2017).

Για τη σταθεροποίηση των βαφών στις ίνες χρησιμοποιούνται τυπικά υψηλές συγκεντρώσεις άλατος ($40-100 \text{ g L}^{-1}$) στα λουτρά βαφής, και αντίστοιχα υψηλές συγκεντρώσεις άλατος βρίσκονται και στα απόβλητα. Πολλά βακτηριακά στελέχη παρουσιάζουν δυνατότητα αποχρωματισμού των βαφών, όμως η εφαρμογή τους στην επεξεργασία λυμάτων είναι περιορισμένη λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αλάτων στα εκχυλίσματα βαφής και της ευαισθησίας που παρουσιάζουν τα βακτήρια σε υψηλή αλατότητα (El Enshasy, Hanari, Abdelgalil, Malek, & Pareek, 2017). Κατά συνέπεια, η διαλογή και η απομόνωση αλατοάνοχων μικροοργανισμών που παράγουν κατάλληλα ένζυμα (όπως η λακκάση) ενεργά σε συνθήκες υψηλής αλατότητας προσέλκυσε αυξανόμενο ενδιαφέρον.

Η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων γίνεται αερόβια και αναερόβια με τη χρήση μυκήτων και βακτηρίων. Έχουν αναφερθεί αποδόσεις που κυμαίνονται στο 70% για διεργασίες αποχρωματισμού και αποικοδόμησης των χρωστικών από αναερόβια βακτηριακά συστήματα (Gaviria-Arroyave et al., 2018) και μεγαλύτερες από 80% από μύκητες λευκής σήψης (He et al., 2017; Rodríguez-Couto, 2012). Πολλοί Βασιδιομύκητες και Ασκομύκητες έχουν αξιοποιηθεί στην αποικοδόμηση χρωστικών ουσιών. Οι μηχανισμοί απομάκρυνσης των χρωστικών από τους μύκητες είναι η φυσική προσρόφηση και η ενζυμική αποικοδόμηση (Ali, Ikramullah, Ghosia, Hameed, & Ahmed, 2008) και το κλειδί για την ενεργό αποικοδόμηση είναι η εξωκυτταρική οξειδωτική δράση του λιγνινολιτικού ενζυμικού τους συστήματος. Γενικά, η πλήρης αποσύνθεση χρωστικών από μικροβιακά κύτταρα διεξάγεται σε δύο στάδια (El

Enshasy et al., 2017). Στο πρώτο στάδιο, η αναγωγική διάσπαση του δεσμού αζώτου μέσω δράσης ενζύμων όπως η λακκάση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή άχρωμων μεταβολιτών. Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο της διαδικασίας αποσύνθεσης, στο οποίο απαιτείται οξειδωμένη κατάσταση.

Στην μυκητιακή επεξεργασία χρησιμοποιείται μια άμεση προσέγγιση είτε με την καλλιέργεια επιλεγμένων μυκήτων είτε με τον καθαρισμό των παραγόμενων εξωκυτταρικών ενζύμων. Η πρώτη μέθοδος παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει στους ερευνητές να παρακάμψουν το στάδιο της απομόνωσης του ενζύμου που μπορεί να είναι αρκετά δύσκολο και ακριβό (Bhatia et al., 2017). Σε τέτοιες περιπτώσεις, απαιτούνται συστήματα βιοαντιδραστήρων που ευνοούν την παραγωγή των ενζύμων μαζί με τον έλεγχο των πιο κρίσιμων μεταβλητών στη διεργασία. Πρόσφατα αναφέρθηκε η απομάκρυνση βαφής Sulfur Black 1 και Indigo Vat Blue συγκέντρωσης 75g/L και 6,5g/L αντίστοιχα σε ποσοστό 69% από το μύκητα λευκής σήψης *Bjerkandera sp.* σε βιοαντιδραστήρα μετά από 36 ώρες και η λιγνινολυτική δραστηριότητα του μικροοργανισμού αναγνωρίστηκε ως ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης της βαφής (Gaviria-Arroyave et al., 2018). Τέλος άλλη περίπτωση που καταδεικνύει τη συμμετοχή της λακκάσης στον αποχρωματισμό είναι 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, Cennamo, & Sannia, 2005).

2.6.2 Φυτοφάρμακα και ζιζανιοκτόνα

Τα φυτοφάρμακα και τα ζιζανιοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργία παρά την υψηλή τους οξυτοξικότητα και τη μεγάλη ανθεκτικότητά τους στο περιβάλλον. Παρόλο που ορισμένα από αυτά, όπως το διχλωροδιφαινυλτριχλωροαιθάνιο (DDT) και το εξαχλωροκυκλοεξάνιο (HCH), απαγορεύονται για γεωργική χρήση, εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται και μεταφέρονται στα υπόγεια ύδατα και το περιβάλλον προκαλώντας καταστροφικές επιπτώσεις στο οικοσύστημα, την ανθρώπινη υγεία και την ποιότητα του εδάφους και των επιφανειακών υδάτων (Levin et al., 2003). Μια ποικιλία μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των *Phanerochaete chrysosporium*, *P. ostreatus*, *Trametes versicolor* και *Conidiobolus 03-1-56*, έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν παρασιτοκτόνα και ζιζανιοκτόνα, όπως το γ-εξαχλωροκυκλοεξάνιο, τη διουρόνη και το ενδοσουλφάνιο (Da Silva Coelho-Moreira

et al., 2013; Ulčnik, Cigić, & Pohleven, 2013). Πολλές πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η λακκάση και η υπεροξειδάση εμπλέκονται στην υποβάθμιση των παρασιτοκτόνων. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι ο *Trametes versicolor* μειώνει τη συγκέντρωση τριβρωμοφαινόλης (TBP) εμφανίζοντας παράλληλα ενεργότητα υπεροξειδάσης και λακκάσης στο μέσο καλλιέργειας, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα ένζυμα ενδέχεται να εμπλέκονται στη διαδικασία βιοαποικοδόμησης (Donoso, Becerra, Martínez, Garrido, & Silva, 2008).

Το έδαφος καλλιέργειας όπου συχνά χρησιμοποιούνται ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα έχει μερικές φορές υψηλή αλατότητα λόγω της άρδευσης ή της χρήσης χημικών λιπασμάτων. Αυτή η υψηλή αλατότητα καθιστά τη διαδικασία βιοαποικοδόμησης δυσκολότερη καθώς επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη και τις δραστηριότητες μη-αλατοάντοχων μικροοργανισμών. Τα μικρόβια που μπορούν να αναπτυχθούν σε αυτές τις σχετικά υψηλές συνθήκες άλατος μαζί με τα ένζυμα τους θα μπορούσαν να είναι μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση για τη βιοεξυγίανση. Ο αλατόφιλος μύκητας *Basidiomycota Dacryopinaxelegans*, που απομονώθηκε από θραύσματα ξύλου τροπικού δάσους στη Βραζιλία, βρέθηκε να αποικοδομεί το ζιζανιοκτόνο διουρόνη παρουσία NaCl. Επίσης, παρήγαγε MnP, LiP και λακκάση, όπου τα προφίλ παραγωγής τους ήταν παρόμοια με εκείνα της αποικοδόμησης διουρίου (Arakaki, Monteiro, Boscolo, Dasilva, & Gomes, 2014). Παρά το γεγονός ότι έχουν αναφερθεί λακκάσες από πολλά χερσαία μυκητιακά και βακτηριακά στελέχη που αποικοδομούν διάφορα ζιζανιοκτόνα, παρασιτοκτόνα και ξενοβιοτικές ενώσεις, οι αναφορές για την βιοαποικοδόμηση τέτοιων ενώσεων από λακκάσες θαλάσσιων οργανισμών είναι αρκετά περιορισμένες.

2.6.3 PCB και χλωροφαινόλες

Ο μεταβολισμός του διφαινυλίου και των PCB δεν πρέπει να θεωρείται μια απλή γραμμική οδός, αλλά μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών καταβολικών γονιδιακών ενοτήτων (Borja, Marie Taleon, Auresenia, & Gallardo, 2005). Το μυκητιακό μονοπάτι αποικοδόμησης του PCB δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί πλήρως. Ένα μη εξειδικευμένο σύστημα εξωκυτταρικών ενζύμων είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στην αποικοδόμηση του PCB από μύκητες λευκής σήψης. Αυτά τα ένζυμα εξελίχθηκαν για να αποικοδομούν την λιγνίνη που αποτελείται από δομικά ανάλογα

του μορίου PCB και ανήκουν στις υπεροξειδάσες λιγνίνης, τις υπεροξειδάσες μαγγανίου και τις λακκάσες (Marco-Urrea & Reddy, 2011).

Η μυκητιακή αποικοδόμηση παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη βακτηριακή δραστηριότητα: τα εμπλεκόμενα ένζυμα έχουν ένα σύστημα προσβολής ελεύθερης ρίζας με χαμηλή εξειδίκευση και δρουν κυρίως στο εξωκυτταρικό περιβάλλον οπότε μπορούν να λειτουργήσουν σε ένα ευρύ φάσμα αρωματικών ενώσεων και περιορίζονται λιγότερο από τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του PCB που είναι συνδεδεμένο με το εδαφικό πλέγμα. Επιπλέον, πολλά μυκητιακά στελέχη συμβιώνουν σε ρίζες, γεγονός που τους παρέχει ένα πλεονέκτημα επιβίωσης και τα καθιστά πιο ανθεκτικά, αυξάνοντας έτσι τις επιδόσεις τους σε μολυσμένες θέσεις (Donnelly & Fletcher, 1995). Όντας νηματοειδείς, οι μύκητες μπορούν να φθάσουν τους ρύπους του εδάφους πιο αποτελεσματικά από τα βακτήρια.

Η πλειοψηφία των εξεταζόμενων μυκητιακών στελεχών φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική έναντι των λιγότερο χλωριωμένων PCB (Field & Sierra-Alvarez, 2008). Οι μύκητες προχωρούν στην περαιτέρω αποικοδόμηση των κύριων μεταβολιτών ωστόσο, η δράση τους φαίνεται να περιορίζεται από την ευαισθησία ορισμένων στελεχών σε υψηλές συγκεντρώσεις PCB που οδηγεί σε μειωμένη αποικοδόμηση ρύπων (Ruiz-Aguilar, M. Fernández-Sánchez, Rodríguez-Vázquez, & Poggi-Varaldo, 2002). Ωστόσο, σε αντίθεση με τα βακτήρια, μερικά στελέχη είναι σε θέση να μεταβολίζουν και υψηλά χλωριωμένες ενώσεων υπό αερόβιες συνθήκες. Ενδεικτικά, τα στελέχη *Doratomyces nanus*, *Doratomyces purpureofuscus*, *Doratomyces verrucisporus*, *Myceliophthora thermophila*, *Phoma eupyrena* και *Thermoascus crustaceus* που απομονώθηκαν από εδάφη πρώην βιομηχανικών περιοχών με υψηλές συγκεντρώσεις PCB έδειξαν αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα και αποικοδομητική ικανότητα (>70 %) ανεξάρτητα του αριθμού των χλωριωμένων υποκαταστατών στο διφαινύλιο (Mouhamadou et al., 2013).

Ο μύκητας *Trametes* έχει αποδειχθεί ότι αποικοδομεί ένα ευρύ φάσμα οργανικών ρύπων, συμπεριλαμβανομένων των PCB, των PAH και των συνθετικών βαφών (Svobodová & Cajthaml, 2012) Αυτή η ικανότητα βιοαποικοδόμησης έχει επανειλημμένα συνδεθεί με τα οξειδωτικά ένζυμά του, όπως υπεροξειδάσες λιγνίνης, υπεροξειδάσες μαγγανίου και λακκάσες (Takagi et al., 2007). Επίσης έχει

αναφερθεί η βιομετατροπή έμμονων οργανικών ρύπων όπως το PCB 118 από δύο θαλάσσιους μύκητες που ανήκουν στο γένος *Penicillium* καθώς και η βιομετατροπή του PCB 118 παρουσία πενταχλωροφαινόλης υψηλής συγκέντρωσης από τον θαλάσσιο μύκητα *Trichoderma harzianum* (Vacondio et al., 2015).

Οι μύκητες που αποικοδομούν τη λιγνίνη και τα ένζυμά τους έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης για την αποτοξίνωση χλωροφαινολών μέσω της μετατροπής τους σε μη τοξικές ή λιγότερο τοξικές ουσίες (Ellouze & Sayadi, 2016). Πολλά είδη μυκήτων θεωρούνται κατάλληλα για την απομάκρυνση χλωριωμένων φαινολικών ενώσεων από τα μολυσμένα περιβάλλοντα. Η δράση των μυκήτων οφείλεται κυρίως στη δράση εξωκυτταρικών ενζύμων οξειδοοξειδοοξειδάσης, όπως η λακκάση, η υπεροξειδάση του μαγγανίου και η υπεροξειδάση της λιγνίνης, τα οποία απελευθερώνονται από το μυκητιακό μυκήλιο στο κοντινό τους περιβάλλον. Ο θαλάσσιος μύκητας *Trichoderma viride Pers NFCCI-2745* που απομονώθηκε από εκβολές που μολύνθηκαν με φαινόλη παρουσίασε τη δυνατότητα παραγωγής λακκάσης ανθεκτικής σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και υψηλής συγκέντρωσης φαινόλης (Lakshmanan M, K Prasanth, & Sadasivan, 2014).

2.6.4 Επεξεργασία χαρτοπολτού

Σε ένα κομμάτι ξύλου, οι ίνες ξύλου είναι κολλημένες μαζί με λιγνίνη. Αυτές οι ίνες μπορούν να διαχωριστούν είτε με αποικοδόμηση και απομάκρυνση της λιγνίνης (χημική πολτοποίηση) είτε με φυσική διάσπαση της ίνας (μηχανική πολτοποίηση). Ο διαχωρισμός των ινών ξύλου μεταξύ τους και στη συνέχεια η επεξεργασία τους σε φύλλα οδηγεί στη διαμόρφωση χαρτιού από ξύλο (Uradhyay et al., 2016). Η λεύκανση του χαρτιού επιτυγχάνεται σήμερα με την επεξεργασία του πολτού με χημικές ουσίες με βάση το χλώριο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό χλωριωμένων αλειφατικών και αρωματικών ενώσεων που θα μπορούσαν να είναι καρκινογόνες, μεταλλαξιογόνες και τοξικές (Taspinar & Kolankaya, 1998). Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί εντατικές μελέτες για την ανάπτυξη ενζυμικών και φιλικών προς το περιβάλλον τεχνολογιών λεύκανσης. Η βιοαποικοδόμηση του χαρτοπολτού έχει επιτευχθεί από συστήματα μεσολαβητή λακκάσης, αλλά η διεύρυνση της χρήσης τους εμποδίζεται από την έλλειψη ενός φθηνού μεσολαβητή (Taspinar & Kolankaya, 1998). Οι λακκάσες επιτυγχάνουν τον

αποπολυμερισμό της λιγνίνης και την απολιγνινοποίηση του πολτού ξύλου (Virk et al., 2012) λόγω της ιδιότητάς του να απομακρύνουν πιθανές τοξικές φαινόλες που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης της λιγνίνης. Αρχικά, η λακκάση δρα σε μικρά φαινολικά κλάσματα λιγνίνης που αντιδρούν με το πολυμερές λιγνίνης και τα οποία στη συνέχεια οδηγούν στην αποικοδόμησή του. Επιπλέον, η προεπεξεργασία του χαρτιού με λιγνινολυτικούς μύκητες αυξάνει την αντοχή του πολτού, ενώ μειώνει την απαιτούμενη ενέργεια για τη μηχανική πολτοποίηση. Ορισμένες άλλες χρήσεις λακκάσης για τη βιομηχανία χαρτοπολτού και χάρτου περιλαμβάνουν τη μείωση του αριθμού κάππα του πολτού και βελτίωση των ιδιοτήτων του παραγόμενου χαρτιού. Η λακκάση που παρήγαγε ο *C. albidus* ήταν αποτελεσματική στη μείωση της περιεκτικότητας λιγνίνης στο ξύλο ευκαλύπτου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βιοπολτοποίηση στη βιομηχανία χάρτου. Η προεπεξεργασία σκληρού ξύλου με τον *Phlebia tremellosa* προκάλεσε αύξηση κατά 80% της αντοχής εφελκυσμού και οι ενεργειακές απαιτήσεις μειώθηκαν 47% μετά από επώαση διάρκειας 4 εβδομάδων με τον *Phlebia brevispora* (Upadhyay et al., 2016).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 3 - Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι ασκομύκητες συμβιώτες ασπόνδυλων (σπόγγιοι, μαλακά κοράλλια, ανεμώνες, εχινόδερμα) και έχουν συλλεχθεί από μεσόφωτα θαλάσσια οικοσυστήματα. Οι μεσόφωτες αυτές περιοχές βρίσκονται στον Ινδικό Ωκεανό, στην Κόκκινη Θάλασσα και στις Ακτές της Ταϊλάνδης. Συνολικά εξετάστηκαν 9 διαφορετικά στελέχη μυκήτων.

3.1.2 Θρεπτικά Μέσα

Για την ανάπτυξη των μυκητιακών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο με εμπορική ονομασία «Marine broth (dehydrated culture media) for microbiology» της εταιρίας Panreac AppliChem (Γερμανία), χωρίς τη χρήση γλυκόζης ή άλλης πηγής άνθρακα. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού σε g/L ήταν η ακόλουθη: βορικό οξύ 0.022, νιτρικό άλας αμμωνίου 0.0016, χλωριούχο ασβέστιο 1.8, χλωριούχο στρόντιο 0.034, εκχύλισμα ζύμης 1, κιτρικό σίδηρο 0,1, χλωριούχο μαγνήσιο 8,8, βακτηριολογική πεπτόνη 5, βρωμιούχο κάλιο 0,08, χλωριούχο κάλιο 0,55, χλωριούχο νάτριο 19,4, φθοριούχο νάτριο 0,0024, ανθρακικό υδρογόνο νάτριο 0,16, φωσφορικό υδρογόνο δινατρίου 0,008, πυριτικό νάτριο 0,004, θειικό νάτριο 3,24.

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

3.1.3 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.). Ο χημικός ρύπος που μελετήθηκε ως προς την αποικοδόμησή του ήταν το

2,4,5-τριχλωροδιφαινύλιο (PCB No29) με μοριακό τύπο $C_{12}H_7Cl_3$, μοριακού βάρους 257,54 g/mol που προμηθεύτηκε από την εταιρία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α).

3.1.4 Ρυθμιστικά Διαλύματα-Διαλύματα Ηλεκτροφόρησης

Στον Πίνακα 3.1. παρουσιάζεται η σύσταση και το pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και στον Πίνακα 3.2. η σύσταση και το pH των διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης.

Πίνακας 3.1. Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων

| Ρυθμιστικό Διάλυμα (P-Δ) | pH | Συστατικά | Συγκέντρωση (mM) |
|-------------------------------------|-----------|----------------------------------|-----------------------------|
| Κιτρικού- Φωσφορικών | 2-5 | Na ₂ HPO ₄ | 100 |
| | | Κιτρικό Οξύ | 100 |
| Φωσφορικών | 6-7 | Na ₂ HPO ₄ | 100 |
| | | NaH ₂ PO ₄ | 100 |
| Tris/HCl | 8-9 | Tris Base | 100 |
| | | HCl (πυκνό) | |
| Πιπεραζίνης | 5,5 | Piperazine | 200 |
| | | HCl (πυκνό) | |
| Bis-Tris | 6-7 | Bis Tris | 20 |
| | | HCl (πυκνό) | |

Πίνακας 3.2. Σύσταση διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης

| Διάλυμα | pH | Σύσταση |
|--|-----------|--|
| P-Δ Δείγματος SDS- Page (Sample buffer) | 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</i> <i>Ηλεκτροφόρησης</i> <i>(Running buffer)</i> | 8,3 | 3,03 g/L <i>Tris-base</i> , 14,4 g/L γλυκίνη, 1 g/L SDS |
| <i>P-Δ X5 Δείγματος</i> <i>native ηλεκτροφόρησης</i> | | 50% v/v γλυκερόλη, 0,1% v/v μπλε της Βρωμοφαινόλης |
| <i>Χρωματισμός</i> <i>Πηκτώματος SDS-PAGE</i> <i>(staining solution)</i> | | 0,4% (w/v) <i>Coomassie G-250</i> , 400 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 500 mL ddH ₂ O |
| <i>Αποχρωματισμός</i> <i>Πηκτώματος SDS-PAGE</i> <i>(destaining solution)</i> | | 200 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 700 mL ddH ₂ O |

3.1.5 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
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- Φωτόμετρο S-22 UV/Vis. Spectrophotometer της BOECO (Γερμανία)
- Φωτόμετρο UV2000, Hitachi (Η.Π.Α.)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.)

- Φυγόκεντροι J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), Sorvall® RC28S, DuPont (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Zentrifuge Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης Nuova II Stir Plate της Thermolyne και Stirrer Magnetic w Hotplate της Biotline scientific (Ελλάδα)
- Ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) και Abs 120-4 (KERN & Sohn GmbH)
- Συσκευή φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices)
- Συσκευή αέριας χρωματογραφίας SHIMADZU GC-17A
- Στήλη αφαλάτωσης PD-10
- Στήλη χρωματογραφίας ιοντοεναλλαγής, Bio-Rad (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

Εκτός των παραπάνω οργάνων, χρησιμοποιήθηκαν και διάφορα εργαστηριακά υλικά όπως, ογκομετρικοί κύλινδροι, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, χωνιά, τρυβλία, erppendorf tubes, falcon tubes, πιπέτες paster και γυάλινα μπουκάλια.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1. Καλλιέργειες

Κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν δύο είδη κυτταρικών καλλιιεργειών, στερεές και υγρές καλλιιεργειες. Οι στερεές είχαν ως στόχο τη διατήρηση και αποθήκευση των εξεταζόμενων μικροοργανισμών ενώ οι υγρές την ανάπτυξη της μυκητιακής βιομάζας για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

3.2.1.1 Στερεές καλλιιεργειες

Για την επιτυχή ανάπτυξη στερεών καλλιιεργειών ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Διαλυτοποίηση του θρεπτικού υλικού με απιονισμένο νερό σε κωνική φιάλη με συνεχή μαγνητική ανάδευση ώστε το τελικό διάλυμα να αποτελείτε από 4% w/v marine broth και 1,5% w/v άγαρ. Το pH του προκύπτον διαλύματος

ρυθμίζεται σε 7,6 με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH).

- Αποστείρωση του διαλύματος σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά και υπό πίεση 0,1 MPa, ύστερα από σφράγιση της ογκομετρικής φιάλης με τη χρήση αλουμινόχαρτου.
- Έκχυση του θρεπτικού μέσου σε τρυβλία petri (περίπου 25 mL θρεπτικού ανά τρυβλίο) κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε ειδικά διαμορφωμένο απαγωγό (laminar flow cabinet). Αφού στερεοποιηθεί το περιεχόμενο κάθε τρυβλίου, πραγματοποιείται ο εμβολιασμός με τους μικροοργανισμούς υπό ασηπτικές συνθήκες και πάλι. Ο εμβολιασμός των μυκητιακών καλλιεργειών διεξήχθη χρησιμοποιώντας μικκύλιο προερχόμενο από απόθεμα γλυκερίνης.
- Τοποθέτηση τρυβλίων σε επωαστήρα στους 27°C για 5 ημέρες.
- Απομάκρυνση τρυβλίων στο πέρας του χρόνου επώασης προς σφράγιση με parafilm για διατήρηση στο ψυγείο στους 4°C.

3.2.1.2 Υγρές καλλιέργειες

Για την επιτυχή ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Διαλυτοποίηση του θρεπτικού υλικού με απιονισμένο νερό σε κωνική φιάλη με συνεχή μαγνητική ανάδευση ώστε το τελικό διάλυμα να αποτελείται από 4% w/v marine broth. Το pH του προκύπτον διαλύματος ρυθμίζεται σε 7,6 με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH).
- Αποστείρωση του διαλύματος σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά και υπό πίεση 0,1 MPa, ύστερα από σφράγιση της ογκομετρικής φιάλης με τη χρήση αλουμινόχαρτου.
- Αφού το διάλυμα έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος γίνεται ο εμβολιασμός του μικροοργανισμού από τρυβλίο σε ασηπτικές συνθήκες.
- Τοποθέτηση φιάλης σε επωαστήρα με θερμοκρασία 27 °C και ανάδευση σε 160 rpm. Ο χρόνος ανάπτυξης των μικροοργανισμών εξαρτάται από το εκάστοτε πείραμα.

3.2.2 Μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων

Οι μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκαν για τα ένζυμα λακκάσης και υπεροξειδάσης. Τα δύο αυτά ένζυμα παράγονται εξωκυτταρικά και άρα λαμβάνονταν δείγματα από το υγρό της καλλιέργειας και φυγοκεντρήθηκαν με σκοπό την απομάκρυνση στερεών που ελήφθησαν κατά την δειγματοληψία. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πλάκα υπεριώδους ακτινοβολίας με την χρήση οργάνου microplate reader Spectra Max 250. Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό υπόστρωμα ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) το οποίο οξειδώνεται από τα δύο αυτά ένζυμα και αποκτά πράσινο χρώμα δίνοντας μέγιστο απορρόφησης στα 420 nm.



Εικόνα 3.1. Συσκευή Microplate reader Spectra Max 250

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την οξείδωση 1 μmole ανά λεπτό αντίδρασης υπό τις παραπάνω συνθήκες. Ο υπολογισμός των Unit του ενζύμου έγινε με χρήση του νόμου Lambert-Beer:

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

Όπου A = απορρόφηση προϊόντος

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

b = απόσταση διαδρομής της δέσμης φωτός από την κυψελίδα σε cm

c = συγκέντρωση προϊόντος

Σημειώνεται ότι το μέγεθος b λαμβάνει την τιμή 0,67 cm και ο συντελεστής $\varepsilon = 3,6 \times 10^4$ για το ABTS.

Συνολικά τα Unit υπολογίστηκαν με τον τύπο:

$$Unit/Lt = \frac{c}{t} \cdot \text{Αραιώση}$$

Όπου το c υπολογίζεται από τον τύπο Lambert-Beer, t = ο χρόνος της αντίδρασης σε λεπτά και Αραιώση = 10 η αραιώση του ενζύμου στον τελικό όγκο της αντίδρασης.

3.2.2.1 Μέτρηση ενεργότητας λακκάσης

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα Κιτρικού-Φωσφορικών pH 4,5 όγκου 200 μL προστέθηκαν 25 μL ενζυμικού διαλύματος 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 °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 15 min. 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 για 10 min πριν προστεθεί στην αντίδραση.

3.2.2.2 Μέτρηση ενεργότητας υπεροξειδάσης

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα Κιτρικού-Φωσφορικών pH 4,5 όγκου 197,5 μL προστέθηκαν 2,5 μL H₂O₂, 25 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 25 μL υδατικού διαλύματος ABTS τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 2 mM. Οι υπόλοιπες συνθήκες ήταν πανομοιότυπες με τη μέτρηση ενεργότητας λακκάσης που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.1.

3.2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης επιλέχθηκε η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος Bradford (Bradford, 1976) βασίζεται στην παρατήρηση ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 465 nm όταν είναι μόνη της στο διάλυμα και η απορρόφηση αυτή μετατοπίζεται στα 595 nm όταν είναι προσδεδεμένη σε πρωτεΐνη. Οι ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

της χρωστικής με την πρωτεΐνη δημιουργούν μια σταθερή ιονική μορφή της χρωστικής που απορροφά στα 595 nm.

Η μέθοδος Bradford μπορεί να αναλυθεί στα παρακάτω βήματα:

- Παρασκευή διαλύματος Bradford ή χρήση εμπορικά διαθέσιμου αντιδραστήριου Bradford, με τη χρωστική Brilliant Blue G-250, φωσφορικό οξύ και μεθανόλη. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο.
- Μέθοδος: Σε erpendorf προσθέτουμε 1 mL διαλύματος Bradford και 50 μ L δείγμα, αναδεύουμε ισχυρά (vortex) και το τοποθετούμε 10 λεπτά σε σκοτεινό μέρος.
- Μέτρηση: Μετά τα 10 λεπτά προσδιορίζεται η απορρόφηση του δείγματος στα 595 nm με φωτόμετρο UV2000, Hitachi. Ως μηδενική απορρόφηση λαμβάνεται η απορρόφηση διαλύματος που στη θέση του δείγματος έχει προστεθεί απιονισμένο νερό. Το πρωτεϊνικό φορτίο προσδιορίζεται μέσα από κατάλληλη καμπύλη αναφοράς.

Η καμπύλη αναφοράς έγινε με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης ορού βοδιού, BSA (bovine serum albumin).



Εικόνα 3.2. Φωτόμετρο UV2000, Hitachi

3.2.4 Διαλογή μικροοργανισμών με ενεργότητα λακκάσης

Στόχος της διαλογής (screening) αποτέλεσε η ανάδειξη του μικροοργανισμού με τη μεγαλύτερη ενεργότητα λακκάσης παρουσία του PCB 29. Οι καλλιέργειες των

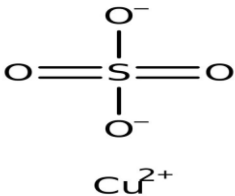
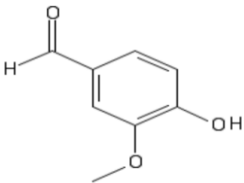
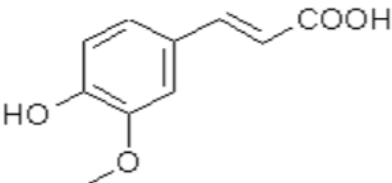
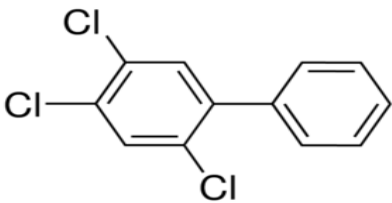
στελεχών έγιναν όπως αναπτύχθηκε στην ενότητα 3.2.1 και προστέθηκε ποσότητα PCB 29 τελικού όγκου 19 μM στις υγρές καλλιέργειες. Η ενεργότητα λακκάσης και υπεροξειδάσης των δειγμάτων μετρήθηκε όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.2. Η διαλογή έγινε σε 9 μικροοργανισμούς που έχουν παρουσιάσει δυνατότητα αποικοδόμησης του PCB 29, από τους οποίους τελικά επιλέχθηκε αυτός με την υψηλότερη έκφραση λακκάσης και συνεχίστηκε η διαδικασία της διπλωματικής εργασίας.

3.2.5 Επαγωγή της ενζυμικής ενεργότητας στις κυτταρικές καλλιέργειες

3.2.5.1 Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών επαγωγέων στην έκφραση λακκάσης και υπεροξειδάσης

Μελετήθηκε η επίδραση ουσιών, οι οποίες βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί πως αυξάνουν την έκφραση λακκασών σε μυκητιακές καλλιέργειες. Η ουσία με τη βέλτιστη επαγωγική δράση προστίθεται στη συνέχεια της διπλωματικής εργασίας στις υγρές καλλιέργειες. Αρχικά πραγματοποιούνται δύο προκαλλιέργειες, δηλαδή δύο κωνικές φιάλες με 50 mL θρεπτικό υλικό η κάθε μια στις οποίες γίνεται εμβολιασμός από τρυβλίο με ένα από τα μυκητιακά στελέχη (προκαλλιέργειες). Μετά από 3 ημέρες επώασης πραγματοποιείται εμβολιασμός ποσότητας 2,5 mL (5% v/v) από τις προκαλλιέργειες σε κωνικές φιάλες που περιέχουν 50 mL θρεπτικού υλικού. Μετά από 3 ημέρες επώασης πραγματοποιείται η προσθήκη των επαγωγέων. Υπήρξαν δύο φιάλες για κάθε επαγωγέα και δύο φιάλες στις οποίες δεν είχε γίνει προσθήκη κανενός επαγωγέα (uninduced). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο Eppendorf πάγκου με σκοπό την απομάκρυνση στερεών που ελήφθησαν κατά την δειγματοληψία (κύτταρα). Τέλος, ένα μέρος του δείγματος οδηγήθηκε σε βρασμό για 10 min. Τα βρασμένα αυτά δείγματα χρησίμευσαν ως δείγματα ελέγχου στις αναλύσεις που ακολούθησαν. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας σε πάγο. Στον Πίνακα 3.3. παρουσιάζονται οι επαγωγείς που χρησιμοποιήθηκαν, η συγκέντρωσή τους στον όγκο της καλλιέργειας και ο συντακτικός τους τύπος.

Πίνακας 3.3. Οι διαφορετικοί επαγωγείς που χρησιμοποιήθηκαν

| Όνομα | Συντακτικός τύπος | Συγκέντρωση mM | Διαλύτης |
|------------------|---|-------------------|----------|
| Χαλκός |  | 0,5 | ddH2O |
| Βανιλίνη |  | 2 | ddH2O |
| Φερουλικό οξύ |  | 2 | ddH2O |
| PCB 29 |  | 0,02 | DMSO |

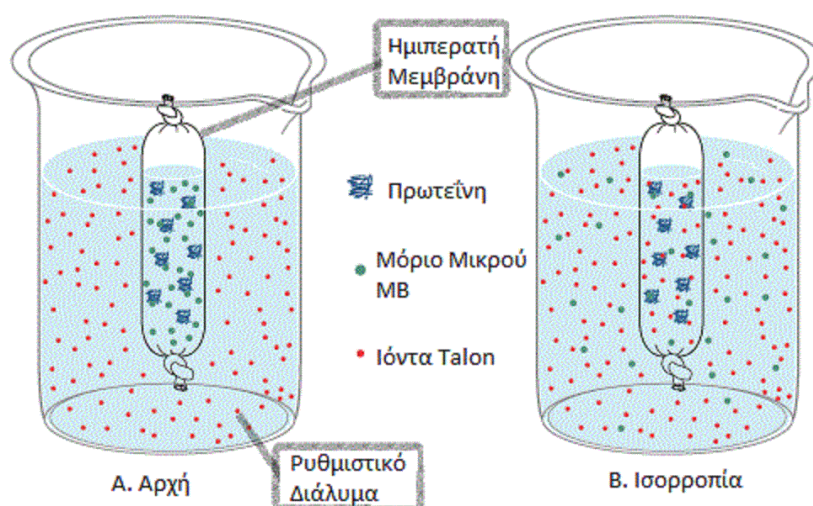
3.2.5.2 Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων χαλκού στην έκφραση λακκάσης

Για τη εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης χαλκού πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε ένα εύρος συγκεντρώσεων χαλκού ακολουθώντας τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.1.2. Μελετήθηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού (0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,5 mM). Για κάθε συγκέντρωση χαλκού προετοιμάσθηκαν δύο φιάλες των 250 mL ώστε να ελέγχεται η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Οι φιάλες επώασθηκαν στους 35 °C για 6 ημέρες.

3.2.6 Μέθοδοι εξισορρόπησης πρωτεϊνών σε ρυθμιστικά διαλύματα

3.2.6.1 Εξισορρόπηση με διαπίδυση (dialysis)

Διαπίδυση ονομάζεται το φυσικό φαινόμενο που πραγματοποιείται όταν δύο μίγματα διαχωρίζονται μεταξύ τους από μία ημιπερατή πορώδη μεμβράνη. Στην περίπτωση μας το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται μέσα σε μια μεμβράνη της οποίας το μέγεθος των πόρων εμποδίζει τη διαφυγή της πρωτεΐνης, άλλα επιτρέπει την ανταλλαγή διαλυμένων συστατικών, είτε μέσω του αέρα σε μειωμένη πίεση είτε μέσω ενός διαλύματος. Τα συστατικά του μίγματος που είναι πολύ ογκώδη και δε μπορούν να περάσουν από τους πόρους της μεμβράνης παραμένουν από τη μία πλευρά αυτής, τη στιγμή που τα μικρότερα συστατικά των μιγμάτων διαχέονται διαμέσου της μεμβράνης από την περιοχή υψηλής συγκέντρωσης στην περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης (Εικόνα 3.3.).



Εικόνα 3.3. Εξισορρόπηση με διαπίδυση. Τα συστατικά του μίγματος που είναι ογκώδη και δεν μπορούν να περάσουν από τους πόρους της μεμβράνης παραμένουν από τη μία πλευρά αυτής, τη στιγμή που τα μικρότερα συστατικά των μιγμάτων διαχέονται διαμέσου της μεμβράνης από την περιοχή υψηλής συγκέντρωσης στην περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης.

Σκοπός της μεθόδου είναι η εξισορρόπηση του υγρού καλλιέργειας στο ρυθμιστικό διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί στο σύστημα χρωματογραφίας ιοντοεναλλαγής (βλ. Ενότητα 3.2.8.1). Το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται εντός προ θερμασμένης μεμβράνης κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Da, Sigma-Aldrich) που είχε παραμείνει για 30 min εντός απιονισμένου νερού

θερμοκρασίας 100 °C. Στη συνέχεια η ασφαλισμένη μεμβράνη τοποθετείται εντός δοχείου που περιέχει περίπου όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 100 φορές μεγαλύτερο από αυτόν του υγρού προς εξισορρόπηση. Η διαδικασία της διαπίδυσης ολοκληρώνεται ύστερα από παραμονή του παραπάνω συστήματος σε σταθερή θερμοκρασία $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 20 h.

3.2.6.2 Εξισορρόπηση με στήλη αφαλάτωσης

Για την αφαλάτωση του εξωκυτταρικού υγρού χρησιμοποιήθηκε η στήλη αφαλάτωσης PD-10 που περιέχει μεμβράνη Sephadex G-25, η οποία επιτρέπει τον γρήγορο διαχωρισμό ουσιών υψηλού μοριακού βάρους από ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους (όπως άλατα). Τα μόρια που είναι μεγαλύτερα από τους μεγαλύτερους πόρους της μεμβράνης της στήλης εξέρχονται πρώτα από την στήλη ενώ μόρια μικρότερα από τους μεγαλύτερους πόρους της μεμβράνης διεισδύουν στους πόρους σε διαφορετικό βάθος. Παρακάτω αναγράφονται τα βήματα της διαδικασίας αφαλάτωσης που εφαρμόστηκε:

- Γέμισμα της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα για την εξισορρόπηση της. Συνολικά χρησιμοποιούνται περίπου 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος.
- Λαμβάνονται 2,5 mL δείγματος και τοποθετούνται στη στήλη αφαλάτωσης.
- Έκλουση με 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος και παραλαβή του διερχόμενου κλάσματος.

3.2.7 Παραγωγή λακκάσης

Αρχικά πραγματοποιούνται δύο προκαλλιέργειες, δηλαδή δύο κωνικές φιάλες με 50 mL θρεπτικό υλικό η κάθε μια στις οποίες γίνεται εμβολιασμός από τρυβλίο με ένα από τα μυκητιακά στελέχη. Μετά από 3 ημέρες επώασης εμβολιασμός 10 mL προκαλλιέργειας σε 5 φιάλες που περιέχουν 200 mL θρεπτικό και προσθήκη χαλκού συγκέντρωσης 0,5 mM στον τελικό όγκο της κάθε φιάλης. Οι καλλιέργειες αυτές τοποθετούνται σε επωαστήρα για 4 ημέρες. Στο πέρας των τεσσάρων ημερών οι καλλιέργειες αφαιρούνται οριστικά και οδηγούνται σε διήθηση, με σκοπό τον διαχωρισμό της στερεάς (βιομάζα) από την υγρή φάση (εξωκυτταρικό υγρό). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε δύο φορές.

3.2.7.1 Κλασμάτωση της καλλιέργειας

Το εξωκυτταρικό υγρό ή 'crude' υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση για 25 min με ταχύτητα 10000 rpm με σκοπό την απομάκρυνση των περισσότερων στερεών. Ακολουθεί φιλτράρισμα του 'crude' χρησιμοποιώντας φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0,8, 0,45 και 0,2 nm διαδοχικά. Τέλος, το φιλτραρισμένο διάλυμα τοποθετείται σε συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.) για συμπύκνωση όπου λαμβάνεται τελική ποσότητα 25 mL διαλύματος (από περίπου 2 L αρχικού όγκου).

3.2.8 Απομόνωση των λακκασών Lac1 και Lac2 με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής

Η μέθοδος της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής βασίζεται στην έλξη ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένα σωματίδια και εφαρμόζεται για ιόντα ή ενώσεις που μπορούν να ιονίζονται, όπως οξέα, βάσεις κ.λπ. και για ενώσεις που αντιδρούν με ιοντικές ομάδες όπως οι πρωτεΐνες. Οι διαχωρισμοί που βασίζονται στην ανταλλαγή ιόντων λαμβάνουν χώρα, κυρίως, σε στήλες οι οποίες αποτελούνται από έναν ιοντοανταλλάκτη (π.χ. ρητίνη). Υπάρχουν δυο τύποι ιοντοανταλλάκτη: ο κατιοντοανταλλάκτης, ο οποίος φέρει αρνητικά φορτισμένες ομάδες, οι οποίες έλκουν θετικά φορτισμένα ιόντα, και ο ανιοντοανταλλάκτης, ο οποίος φέρει θετικά φορτισμένες ομάδες που θα έλξουν αρνητικά φορτισμένα ιόντα. Είναι φανερό ότι, τα μόρια ουσιών που κάτω από ορισμένες συνθήκες χρωματογραφίας, είτε δεν έχουν φορτίο ή έχουν ομώνυμο φορτίο με τη ρητίνη, εκλούνται πρώτα, ενώ ουσίες τα μόρια των οποίων έχουν φορτία αντίθετα μ' αυτά του ανταλλάκτη (ρητίνης) εκλούνται αργότερα. Οι ενώσεις που συγκρατήθηκαν στη στήλη θα εκλουσθούν με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης άλατος. Όσες ενώσεις συγκρατούνται ασθενώς θα εκλουσθούν πρώτα, ενώ όσες συγκρατούνται ισχυρά θα εκλουσθούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις άλατος.

Για κάθε πρωτεΐνη όταν το ισοηλεκτρικό σημείο της ισούται με το pH του συστήματος, τότε ο συνολικός αριθμός των αρνητικών φορτίων ισούται με τον αριθμό των θετικών φορτίων και συνεπώς δεν έχει καθαρό φορτίο. Όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στο ισοηλεκτρικό της σημείο τότε αυτή δεν θα προσδεθεί στην ρητίνη. Σε χαμηλότερες τιμές pH η πρωτεΐνη θα είναι θετικά φορτισμένη και θα προσροφάται σε ρητίνες εναλλαγής κατιόντων, ενώ σε υψηλότερες τιμές pH θα είναι αρνητικά

φορτισμένη και θα προσροφάται σε ρητίνες εναλλαγής ανιόντων (Πουλάς & Σιδέρης, 2015).

Η ρητίνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μια ρητίνη ισχυρής εναλλαγής ανιόντων Q Sepharose Fast Flow και μια ρητίνη ασθενούς εναλλαγής ανιόντων DEAE Cellulose (diethylaminoethyl-cellulose) της εταιρίας Pharmacia Biotech. (Η.Π.Α.), που χρησιμοποιούνται εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες για παρασκευαστικούς διαχωρισμούς πρωτεϊνών τόσο σε ερευνητικές όσο και σε βιομηχανικές εφαρμογές. Η ρητίνες αποθηκεύονταν σε διάλυμα 20% αιθανόλης για διατήρηση.

3.2.8.1 Επιλογή του κατάλληλου pH ρυθμιστικού διαλύματος για την στήλη

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικών τιμών pH ώστε να γίνει επιλογή του καταλληλότερου που θα χρησιμοποιηθεί στην στήλη. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που εξετάστηκαν ήταν τα: i) Piperazine pH 5, ii) Bis-Tris pH 6 και iii) Bis-Tris pH 7, και είχαν όλα συγκέντρωση 20 mM. Τα διαλύματα αυτά ρυθμίστηκαν με διάλυμα υδροχλωρίου. Για την επιλογή του καταλληλότερου pH για την στήλη ακολουθήθηκαν οι παρακάτω διεργασίες :

- Τοποθέτηση του δείγματος που έχει δεχτεί αφαλάτωση στη στήλη με την ρητίνη Q-Sepharose για δέσμευση των πρωτεϊνών.
- Έκπλυση της στήλης με 8 mL ρυθμιστικού διαλύματος.
- Έκπλυση της στήλης με 4 mL ρυθμιστικό διάλυμα με 500 mM χλωριούχο νάτριο.

Τα διερχόμενα κλάσματα των σταδίων i, ii και iii συλλέγονται σε ξεχωριστά falcon tubes και αποθηκεύονται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας σε πάγο T = 4oC. Ακολουθεί μέτρηση της ενεργότητας λακκάσης για κάθε κλάσμα.

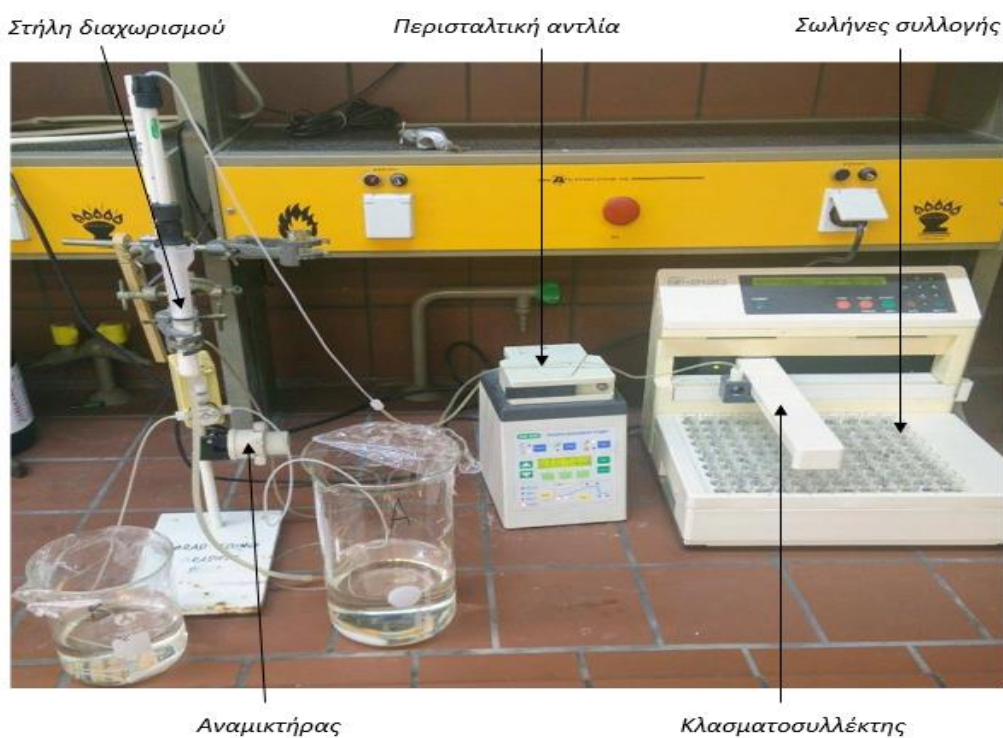
3.2.8.2 Προετοιμασία του συστήματος χρωματογραφίας

Αφού γίνει η επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί και εξισορρόπηση του εξωκυτταρικού υγρού με διαπίδυση (βλ. ενότητα 3.2.8.1), παρασκευάζονται τρία διαλύματα με αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα, τα δύο με χλωριούχο νάτριο καθορισμένης συγκέντρωσης (διαλύματα Β και Γ) και ένα χωρίς (διάλυμα Α). Το χλωριούχο νάτριο είχε συγκέντρωση 500 mM στο διάλυμα Β και 1 M στο διάλυμα Γ.

Τα βασικά τμήματα του συστήματος χρωματογραφίας διαχωρισμού είναι:

- η στήλη διαχωρισμού
- η περισταλτική αντλία
- ο αναμικτήρας
- ο κλασματοσυλλέκτης

Στην Εικόνα 3.4. παρουσιάζεται η οργάνολογία που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 3.4. Σύστημα χρωματογραφίας διαχωρισμού

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ρυθμίζεται από το όργανο της αντλίας. Στην συγκεκριμένη περίπτωση το πρόγραμμα είχε ως εξής:

- ισοκρατική έκλουση 100% Α για 30 λεπτά
- σταδιακή έκλουση από 100% Α έως 100% Β για 100 λεπτά
- ισοκρατική έκλουση 100% Β για 20 λεπτά
- ισοκρατική έκλουση 100% Γ για 20 λεπτά
- ισοκρατική έκλουση 100% Α για 20 λεπτά

Η ροή έκλυσης ήταν σταθερή καθ'όλη την διάρκεια της διαδικασίας και ίση με 4 mL/min. Ο κλασματοσυλλέκτης ρυθμίστηκε έτσι ώστε να συλλέγει κλάσματα των 6 mL.

3.2.8.3 Ανάλυση των εκλούμενων δειγμάτων

Για τα διάφορα δείγματα που συλλέχθηκαν από την στήλη έγινε μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι πρωτεϊνικού φορτίου. Στη συνέχεια, έγινε συλλογή των δειγμάτων στις περιοχές που έδειξαν απορρόφηση στα 280 nm. Τα δείγματα αυτά εξετάστηκαν ως προς την ενζυμική ενεργότητα λακκάσης.

3.2.9 Βιοχημικός χαρακτηρισμός απομονωμένων λακκασών

Τα πειράματα που περιγράφονται στην παρούσα ενότητα εφαρμόζονται για το χαρακτηρισμό των απομονωμένων λακκασών Lac1 και Lac2.

3.2.9.1 Ηλεκτροφορητικές τεχνικές

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

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτη ακρυλαμιδίου αποτελεί ευρύτατα διαδεδομένη μέθοδο για τον διαχωρισμό διαφορετικών πρωτεϊνών που συνυπάρχουν σε ένα δείγμα και επίσης για τον έλεγχο της καθαρότητας πρωτεϊνικών δειγμάτων και την ανίχνευση ανεπιθύμητων προσμίξεων. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σε πήκτη SDS-PAGE είναι μία κλασική μέθοδος για το διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση την κινητικότητά τους εντός πήκτης πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες όπου είναι δυνατός ο προσδιορισμός των μοριακών μαζών των επιμέρους πρωτεϊνικών υπομονάδων. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση τη μοριακή τους μάζα. Στη συγκεκριμένη μέθοδο εφαρμόζεται η χρήση των εξής αποδιατακτικών παραγόντων, οι οποίοι γραμμικοποιούν τις πρωτεΐνες και τους προσδίδουν αρνητικό φορτίο: Το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) που αποτελεί ένα ανιονικό απορρυπαντικό και προαιρετικά η β-μερκαπτοαιθανόλη που αποτελεί αναγωγικό παράγοντα και ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που σταθεροποιούν τη τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, ύστερα από θέρμανση. Η γραμμικοποιημένη, αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη κινείται εντός της πήκτης με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού, προς τον θετικό πόλο. Τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια πρωτεΐνης κινούνται ταχύτερα (Πουλάς & Σιδέρης,

2015). Παράλληλα χρησιμοποιείται πρότυπο δείγμα Pink Pretained Protein Marker της εταιρίας Nippon Genetics Europe που περιέχει πρωτεϊνικά μόρια γνωστού βάρους.

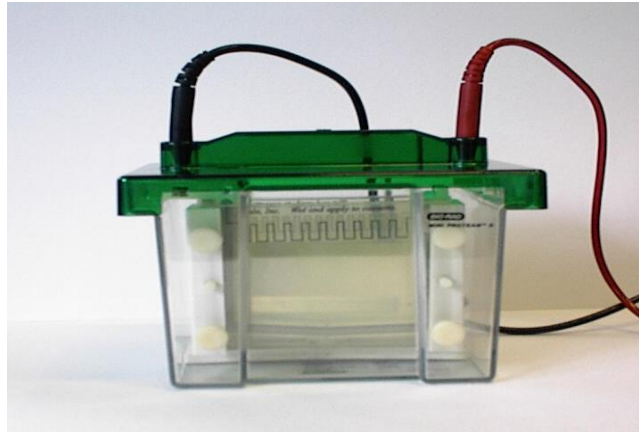
3.2.9.1.1.1 Προετοιμασία της πηκτής SDS-PAGE

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο διαφορετικά φιλμ γέλης. Το φιλμ επιστοίβασης (stacking gel) και το φιλμ διαχωρισμού (resolving gel). Κάθε φιλμ παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη σύσταση που υποδεικνύεται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4. Σύσταση πηκτών

| Πηκτή διαχωρισμού (Resolving gel) | | Πηκτή επιστοίβασης (Stacking gel) | |
|---|------------|---|------------|
| Συστατικό | Όγκος (μL) | Συστατικό | Όγκος (μL) |
| ddH ₂ O | 1750 | ddH ₂ O | 1500 |
| Ρυθμιστικό διάλυμα 0,75 M Tris, 0.2% w/v SDS, pH 8,8 | 4700 | Ρυθμιστικό διάλυμα 0,25 M Tris, 0.2% w/v SDS, pH 6,8 | 1900 |
| 40% bis- acrylamide | 2900 | 40% bis- acrylamide | 380 |
| TEMED | 15 | TEMED | 10 |
| 10% w/v APS | 90 | 10% w/v APS | 30 |

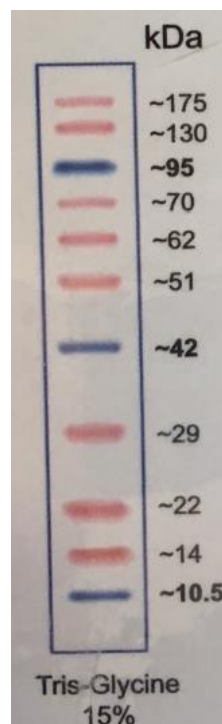
Το διάλυμα του φιλμ διαχωρισμού τοποθετήθηκε πρώτο εντός της πλάκας της συσκευής SDS-PAGE Mini-Protean 3 (Biorad), η οποία είχε τοποθετηθεί σε κάθετη θέση. Μετά την πήξη αυτού (30 λεπτά) τοποθετήθηκε από πάνω το διάλυμα του επόμενου φιλμ, στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η «φόρτωση» του πρωτεϊνικού δείγματος. Σημειώνεται πως το ύψος της πηκτής διαχωρισμού είναι περίπου τριπλάσιο από αυτό της πηκτής επιστοίβασης. Μετά τη στερεοποίηση και των δύο πηκτών πραγματοποιήθηκε συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης και προσθήκη εντός αυτής περίπου 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 8,3 με σύσταση 30,3 g/L Tris, 144 g/L γλυκίνη, 1% w/v SDS.



Εικόνα 3.5. Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

3.2.9.1.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων - Ηλεκτροφόρηση

Σε κάθε δείγμα όγκου 15 μ L προστέθηκαν 7 μ L διαλύματος φόρτωσης (P- Δ Δείγματος SDS-PAGE (Sample buffer), παράγραφος 2.1.4) και ακολούθησε βρασμός του μίγματος για 5 λεπτά. Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου εκτός από τα δείγματα, φορτώθηκαν 7 μ L του πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρου (Εικόνα 3.5). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό 35 mA/πήκτωμα για περίπου 90 min.



Εικόνα 3.6. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών *Pink Prestained Protein Marker* Nippon Genetics Europe.

3.2.9.1.1.3 Χρώση της πηκτής SDS-PAGE και εμφάνιση της θέσης των πρωτεϊνικών μορίων

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών απομακρύνθηκε το πήκτωμα ακρυλαμιδίου από τη συσκευή και εμβαπτίστηκε σε υδατικό διάλυμα χρώσης (staining solution, παράγραφος 3.1.4) για χρονικό διάστημα 20 min, υπό ήπια ανάδευση. Ακολούθησε αποχρωματισμός του πηκτώματος με διαδοχικές πλύσεις με υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution, παράγραφος 3.1.4). Τελικώς η πηκτή αποχρωματίζεται, ενώ το μπλε χρώμα διατηρούν μόνο τα πρωτεϊνικά μόρια.

3.2.9.1.2 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε μη Αποδιατακτικές Συνθήκες (Native PAGE) –

Προσδιορισμός Ενεργότητας των Πρωτεϊνικών Ζωνών

3.2.9.1.2.1 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 και το ρυθμιστικό διάλυμα X5 (ενότητα 3.1.4). 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.

3.2.9.1.2.2 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.

3.2.9.2 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης λακκασών

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

3.2.9.2.1 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των ενζύμων διερευνήθηκε υπολογίζοντας την ενεργότητά τους στο θερμοκρασιακό εύρος 30 έως 65 °C. Το υπόστρωμα και το ένζυμο αραιώθηκαν με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού φωσφορικών pH=4,5 σε τελικό όγκο αντίδρασης 300 μ L. Οι αντιδράσεις επωάστηκαν υπό ανάδευση 900 rpm εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στις μελετώμενες θερμοκρασίες ταυτόχρονα για 10 λεπτά.

Μετά το πέρας της αντίδρασης ο προσδιορισμός του έγχρωμου προϊόντος πραγματοποιήθηκε σε φωτόμετρο UV2000, Hitachi στα 420 nm. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 10 λεπτών πριν προστεθεί στην αντίδραση.

3.2.9.2.2 Εύρεση βέλτιστης τιμής pH δράσης

Η τιμή pH στην οποία τα ένζυμα παρουσιάζουν βέλτιστη για ρυθμιστικό σύστημα που αποτελείται από τα ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικού φωσφορικών, TrisHCl (0,1M) που περιγράφονται στην παράγραφο 3.1.5. Το εύρος τιμών pH που διερευνήθηκε ήταν μεταξύ των τιμών 2-9.

Το υπόστρωμα και το ένζυμο αραιώθηκαν με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος σε τελικό όγκο αντίδρασης 250 μ L. Ο προσδιορισμός της μεταβολής της απορρόφησης έγινε με το πολυφωτόμετρο microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) στα 420 nm. Οι αντιδράσεις επωάστηκαν εντός του φωτόμετρου στους 35 °C και είχαν διάρκεια 15 min. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης

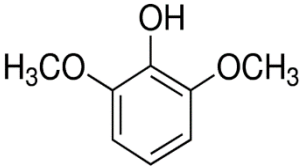
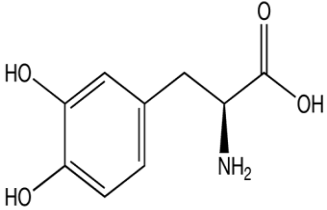
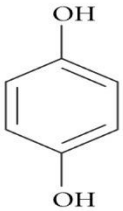
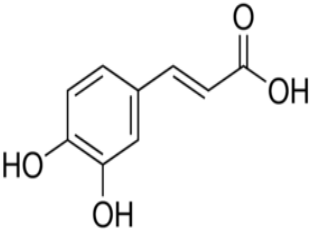
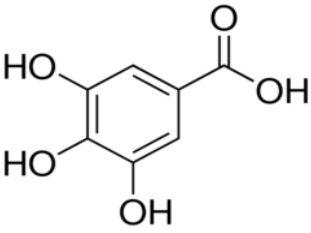
αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 10 λεπτών πριν προστεθεί στην αντίδραση.

3.2.9.3 Μελέτη της εξειδίκευσης της Lac1 και Lac2 ως προς το υπόστρωμα

Όπως έχει αναφερθεί και στο θεωρητικό μέρος οι λακκάσες είναι ένζυμα με μικρή εκλεκτικότητα με αποτέλεσμα να μπορούν να δράσουν σε διαφορετικά υποστρώματα. Για την εξέταση της εξειδικευμένης δράσης της πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σε ένα εύρος υποστρωμάτων και προσδιορίστηκε η ενεργότητα της λακκάσης. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5. Τα διαφορετικά υποστρώματα που μελετήθηκαν

| Υπόστρωμα | Συντελεστής Μοριακής Απορροφητικότητας ($M^{-1} cm^{-1}$) | Μήκος Κύματος (nm) | Συντακτικός Τύπος |
|-------------|--|--------------------------|----------------------|
| Πυρογαλλόλη | 3724 | 400 | |
| Γουαϊακόλη | 12100 | 480 | |
| Κατεχόλη | 928 | 510 | |

| | | | |
|------------------------|-------|-----|---|
| 2,6 Διμέθοξυφαινόλη | 27500 | 470 |  |
| L-DOPA | 3700 | 400 |  |
| Υδροκινόνη | 21300 | 480 |  |
| Καφεϊκό οξύ | 14000 | 400 |  |
| Γαλλικό οξύ | 555 | 400 |  |

Όλα τα υποστρώματα εκτός από το καφεϊκό οξύ, παρασκευάστηκαν ύστερα από διάλυση της αντίστοιχης ουσίας σε απιονισμένο νερό με αρχική συγκέντρωση 20 mM. Το καφεϊκό οξύ διαλύθηκε σε DMSO με αρχική συγκέντρωση 20mM.

Τα αρχικά διαλύματα υποστρωμάτων αραιώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικού pH=4,5. Ο συνολικός όγκος αντίδρασης ήταν 250 μL και τελική συγκέντρωση υποστρώματος 2 mM. Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία T= 35 °C και για 18 ώρες.

Μετά το πέρας της κάθε αντίδρασης φωτομετρήθηκε το προϊόν σε ένα εύρος μήκων κύματος και επιλέχθηκε εκείνο στο οποίο παρουσίαζε μέγιστο, θεωρώντας ως

μηδενική απορρόφηση την απορρόφηση του εκάστοτε τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 10 λεπτών πριν προστεθεί στην αντίδραση.

3.2.10 Μελέτη απομονωμένων ενζύμων για την αποικοδόμησης του PCB 29

3.2.10.1 Αντιδράσεις με το PCB 29

Εξετάστηκε η δυνατότητα αποικοδόμησης του PCB 29 από τις δύο απομονωμένες λακκάσες απουσία μεσολαβητή και παρουσία μεσολαβητή ABTS. Για κάθε μία από τις 3 αντιδράσεις ετοιμάστηκαν δύο δείγματα. Επίσης ετοιμάστηκαν δύο τυφλά δείγματα που περιείχαν το PCB και απενεργοποιημένο ένζυμο που είχε υποστεί πρώτα βρασμό 10 λεπτών. Το PCB διαλύθηκε αρχικά σε διαλύτη DMSO και έπειτα το PCB και οι λακκάσες αραιώθηκαν με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού φωσφορικών pH=4,5 στον τελικό όγκο αντίδρασης. Ο τελικός όγκος αντίδρασης ήταν 500 μ L. Οι αντιδράσεις στον τελικό όγκο περιείχαν 50 μ L του ενζύμου, PCB συγκέντρωσης 1 μ M και μεσολαβητές συγκέντρωσης 0,5 μ M.

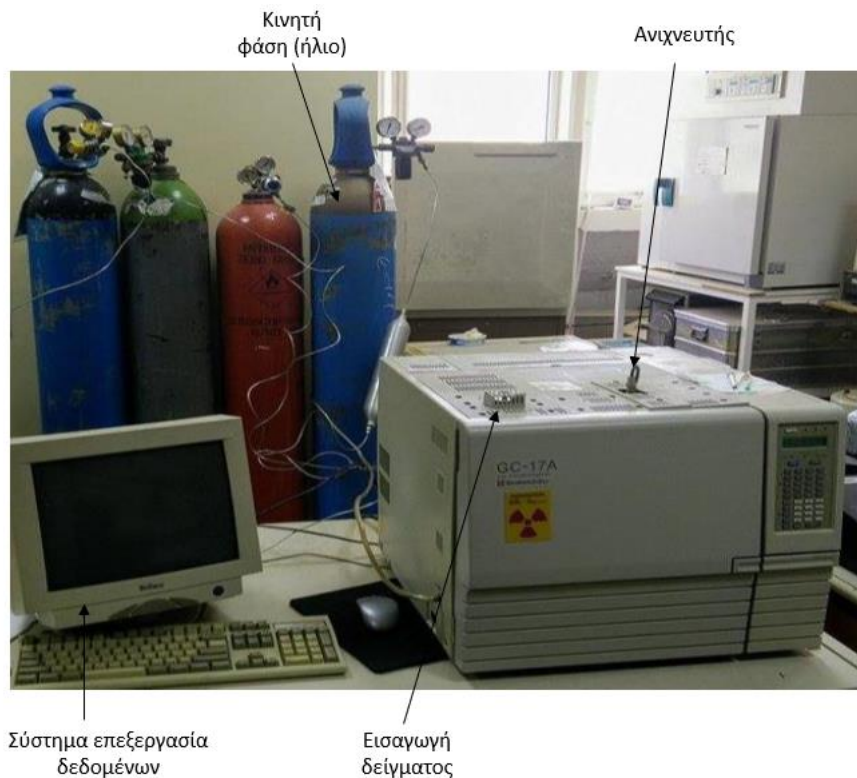
Οι αντιδράσεις επώαστηκαν υπό ανάδευση 900 rpm εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στους 35 °C για 20 ώρες.

3.2.10.2 Ανάλυση του PCB 29

Ο διαχωρισμός στην αέρια χρωματογραφία συμβαίνει στην αέρια φάση, συνεπώς τα στερεά και υγρά δείγματα πρέπει πρώτα να αεριοποιηθούν. Οι ενώσεις που αναλύονται με GC πρέπει να είναι θερμικά σταθερές και με ικανοποιητική πτητικότητα. Συνήθως χρησιμοποιούνται υγρές στατικές φάσεις ενώ η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο (ήλιο, άζωτο, υδρογόνο). Σε αντίθεση με την υγρή χρωματογραφία, η κινητή φάση δεν αλληλοεπιδρά με τα μόρια του αναλυτή. Ο μόνος ρόλος της κινητής φάσης είναι η διακίνηση του αναλυτή κατά μήκος της στήλης.

Τα βασικά τμήματα ενός GC είναι:

- σύστημα παροχής κινητής φάσης (φέρων αέριο)
- σύστημα εισαγωγής δείγματος
- στήλη
- ανιχνευτής
- σύστημα επεξεργασίας δειγμάτων



Εικόνα 3.7. Σύστημα αέριας χρωματογραφίας (GC)

3.2.10.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα από τις αντιδράσεις με το PCB 29 εκχυλίστηκαν με ίσο όγκο οξικού αιθυλεστέρα πριν από την ανάλυση τους στην συσκευή αέριας χρωματογραφίας.

3.2.10.2.2 Πρόγραμμα ανάλυσης δειγμάτων

Το PCB 29 αναλύθηκε με τη χρήση συσκευής SHIMADZU GC-17A που ενσωματώνει τριχοειδή στήλη GC των 30 m Equity®-5. Η κινητή φάση ήταν αέριο ήλιο με ρυθμό ροής 1,8 mL min⁻¹. Δείγματα 1 μL εγχύθηκαν με ή/και χωρίς διαχωρισμό ροής (split/splitless mode) και η θυρίδα έγχυσης διατηρήθηκε στους 280 °C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

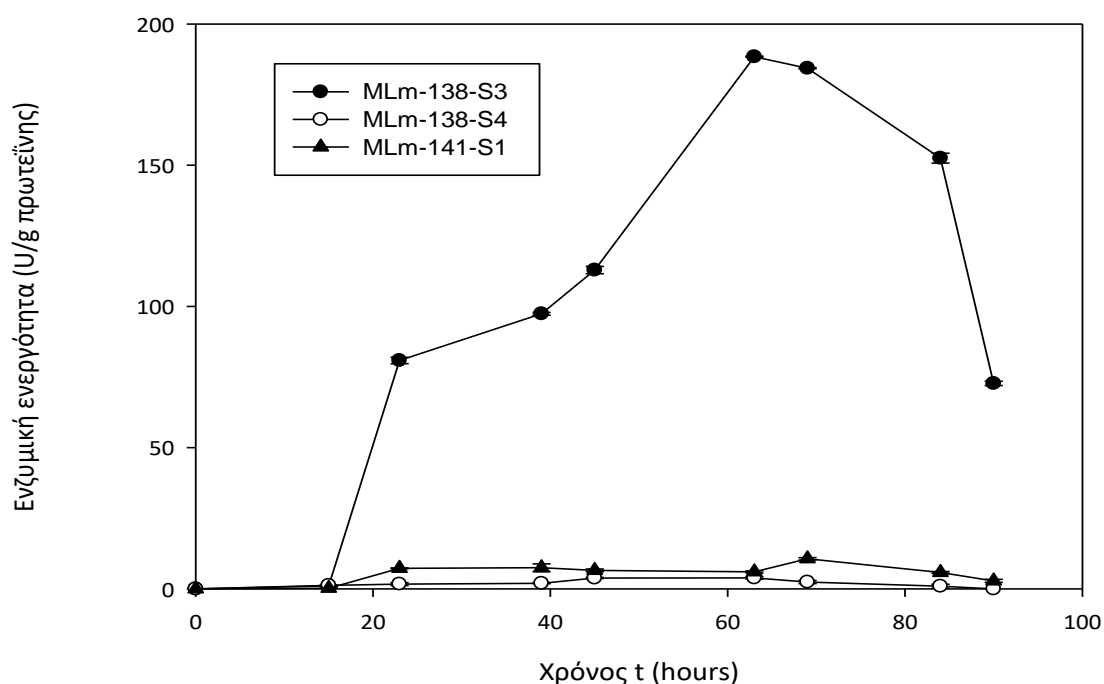
- 90 °C για 3 λεπτά
- Αύξηση στους 220 °C με ρυθμό 30 °C min⁻¹ και διατήρηση σε αυτή τη θερμοκρασία για 1 λεπτό
- Αύξηση στους 280 °C με ρυθμό 25 °C min⁻¹ και διατήρηση σε αυτή τη θερμοκρασία για 2 λεπτά

Η ανίχνευση διεξήχθη με ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων ECD-17 με δραστικότητα 10 mCi, διατηρούμενο στους 300 °C. Ο χρόνος ανάσχεσης του PCB 29 ήταν περίπου 10,12 λεπτά.

Κεφάλαιο 4 - Αποτελέσματα

4.1 Διαλογή μικροοργανισμών με ενεργότητα λακκάσης

Όλα τα μυκητιακά στελέχη (9) υποβλήθηκαν σε διαλογή για το δυναμικό τους στην παραγωγή λακκάσης παρουσία του ρύπου PCB 29 συγκέντρωσης 19 μM υπό τις συνθήκες που περιγράφηκαν στην ενότητα 3.2.4. Τα 9 μυκητιακά στελέχη επιλέχθηκαν ύστερα από διαλογή που πραγματοποιήθηκε σε 44 μυκητιακά στελέχη για την αποικοδόμηση του ρύπου PCB 29. Στο Διάγραμμα 4.1. παρουσιάζεται η ενεργότητα λακκάσης (U/g πρωτεΐνης) συναρτήσει του χρόνου για τον κάθε μικροοργανισμό.



Διάγραμμα 4.1. Ενεργότητα λακκάσης συναρτήσει του χρόνου για τα μυκητιακά στελέχη

Στο Διάγραμμα 4.1. παρουσιάζεται η ενεργότητα λακκάσης των στελεχών MLm138-S3, MLm138-S4 και MLm141-S1 καθώς τα υπόλοιπα 6 στελέχη παρουσίασαν μηδενική ενεργότητα σε όλες τις δειγματοληψίες. Τα δείγματα από τις καλλιέργειες του στελέχους MLm138-S3 εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ενεργότητα λακκάσης φτάνοντας τα 188,4 U/g πρωτεΐνης ενώ η ενεργότητα στα δείγματα των στελεχών MLm138-S4 και MLm141-S1 δεν ξεπερνάει τα 3,9 και 10,6 U/g πρωτεΐνης αντίστοιχα.

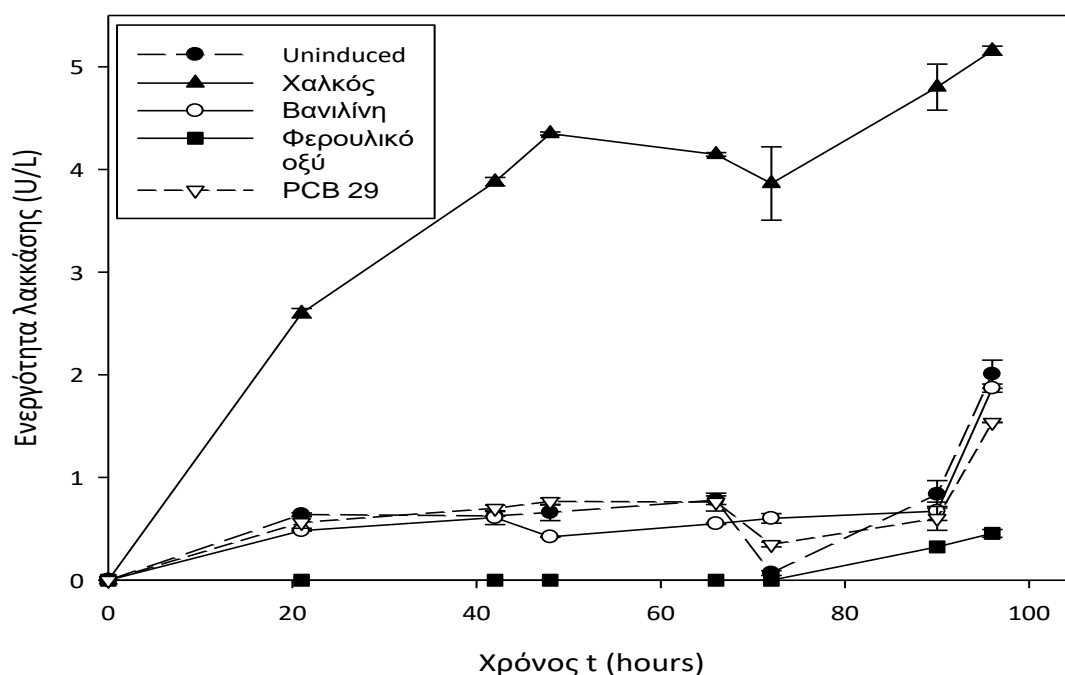
Συνεπώς το στέλεχος MLm138-S3, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως ασκομύκητας *Cladosporium sp.* επιλέχθηκε για τη συνέχιση της διπλωματικής εργασίας.

4.2 Επαγωγή της ενζυμικής ενεργότητας στις κυτταρικές καλλιέργειες

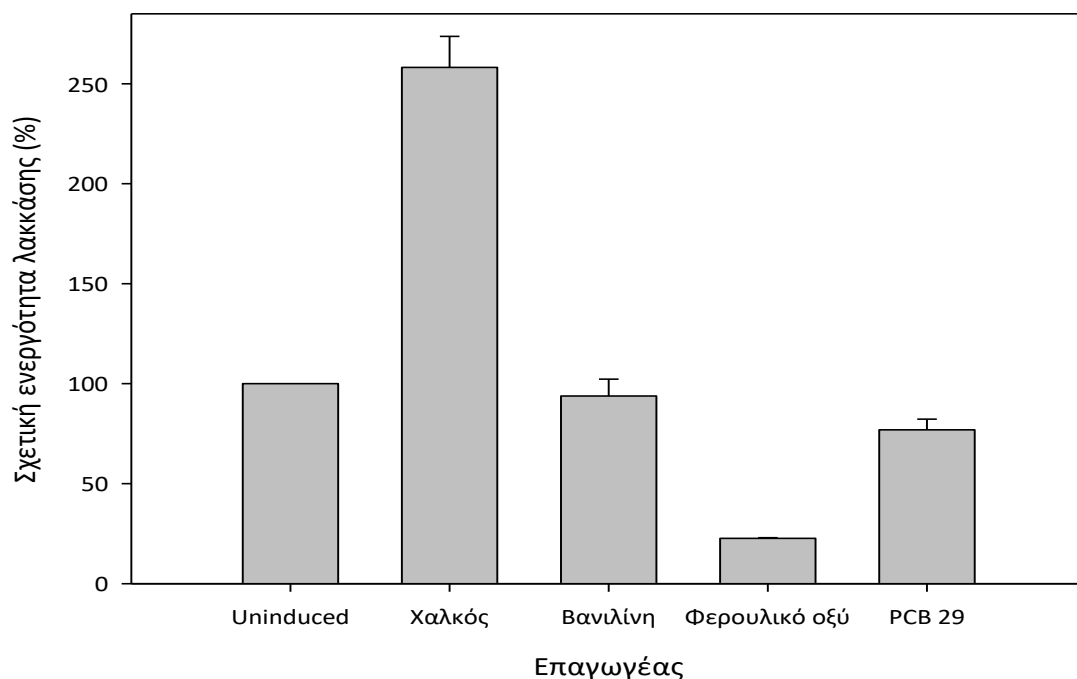
4.2.1 Επίδραση διαφορετικών επαγωγέων στην έκφραση λακκάσης

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας λακκάσης παρουσία επαγωγέων εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.5.1. του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Οι τιμές ενεργότητας λακκάσης σε σχέση με το χρόνο κατά την αντίδραση παρουσία επαγωγέων παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 4.2.

Σημειώνεται πως οι τιμές ενεργότητας λακκάσης που απεικονίζονται στο Διάγραμμα 4.3. υπολογίστηκαν θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα που υπολογίστηκε από την παράλληλη αντίδραση ελέγχου του ενζύμου ή αλλιώς τυφλό δείγμα, η οποία δεν περιείχε επαγωγέα και έχουε υπολογιστεί με βάση τη μέγιστη τιμή ενεργότητας που επιτεύχθηκε για κάθε επαγωγέα.



Διάγραμμα 4.2. Επίδραση διαφορετικών επαγωγέων στην ενεργότητα λακκάσης συναρτήσει του χρόνου.



Διάγραμμα 4.3. Επίδραση διαφορετικών επαγωγέων στην ενεργότητα λακκάσης.

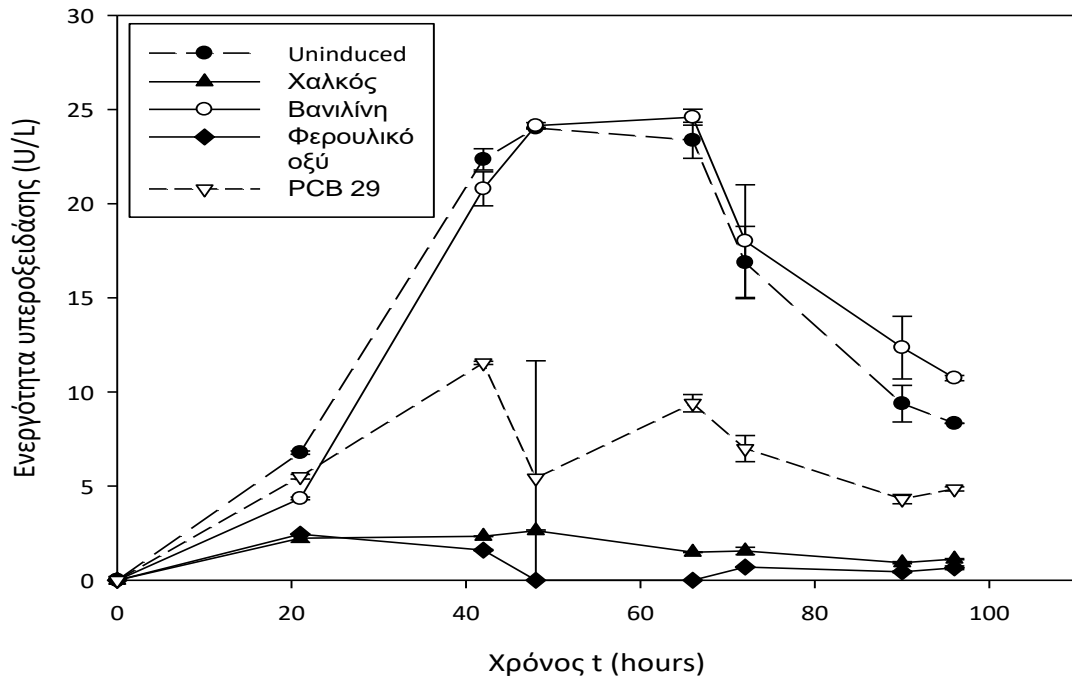
Από τα Διαγράμματα 4.2. και 4.3. προκύπτει ότι ο χαλκός αποτελεί το μοναδικό αποτελεσματικό επαγωγέα της έκφρασης λακκάσης αυξάνοντας την ενεργότητα περίπου 250%. Οι υπόλοιποι επαγωγείς είτε δεν κατάφεραν να αυξήσουν την έκφραση λακκάσης σε σχέση με την αντίδραση ελέγχου είτε είχαν παρεμποδιστική δράση όπως στην περίπτωση του φερουλικού οξέως που μείωσε την ενεργότητα λακκάσης στο 23%. Η προσθήκη βανιλίνης είχε αμελητέα επίδραση μειώνοντας την ενεργότητα λακκάσης στο 93% και τέλος η προσθήκη PCB 29 μείωσε την ενεργότητα στο 76%. Τέλος για κανέναν από τους επαγωγείς δεν παρατηρείται πτώση της ενεργότητας λακκάσης στο πέρας των 96 ωρών.

4.2.2 Επίδραση διαφορετικών επαγωγέων στην έκφραση υπεροξειδάσης

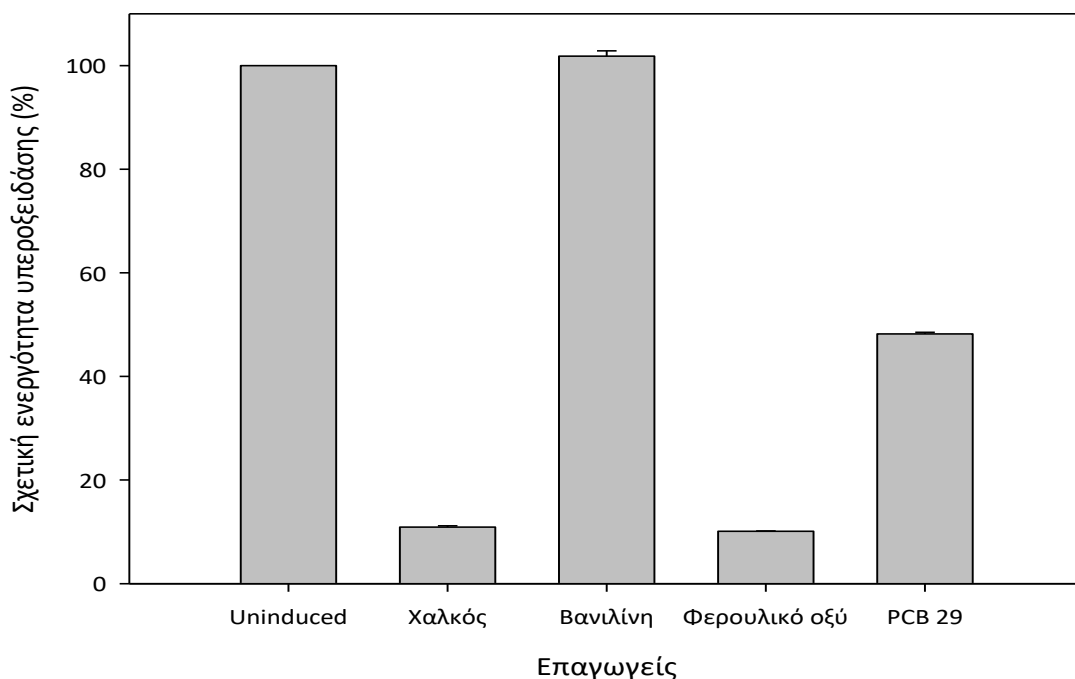
Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας υπεροξειδάσης παρουσία επαγωγέων εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.5.1. του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Οι τιμές ενεργότητας υπεροξειδάσης σε σχέση με το χρόνο κατά την αντίδραση παρουσία επαγωγέων παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 4.4.

Σημειώνεται πως οι τιμές ενεργότητας υπεροξειδάσης που απεικονίζονται στο Διάγραμμα 4.5. υπολογίστηκαν θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα που

υπολογίστηκε από την παράλληλη αντίδραση ελέγχου του ενζύμου ή αλλιώς τυφλό δείγμα, η οποία δεν περιείχε επαγωγέα και έχουε υπολογιστεί με βάση τη μέγιστη τιμή ενεργότητας που επιτεύχθηκε για κάθε επαγωγέα.



Διάγραμμα 4.4. Επίδραση διαφορετικών επαγωγέων στην ενεργότητα υπεροξειδάσης συναρτήσει του χρόνου.

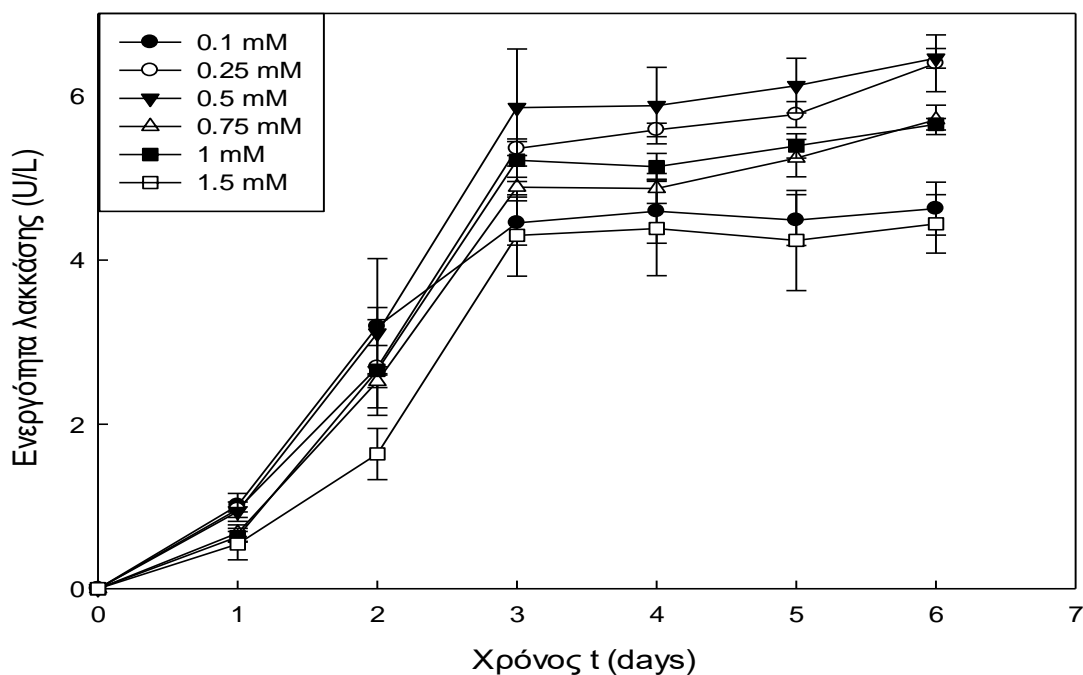


Διάγραμμα 4.5. Επίδραση διαφορετικών επαγωγέων στην ενεργότητα υπεροξειδάσης

Στα Διαγράμματα 4.4. και 4.5. παρατηρούμε πως μόνο η προσθήκη της βανιλίνης κατάφερε να αυξήσει σε μικρό βαθμό την ενεργότητα υπεροξειδάσης στο 102% σε σχέση με την αντίδραση ελέγχου. Ο χαλκός και το φερουλικό οξύ παρουσίασαν έντονη παρεμποδιστική δράση μειώνοντας την ενεργότητα στο 11% και στο 10% αντίστοιχα ενώ η προσθήκη του PCB 29 μείωσε την ενεργότητα περίπου στο 50%. Επίσης σε αντίθεση με την έκφραση ενεργότητας λακκάσης παρατηρούμε πως η ενεργότητα υπεροξειδάσης προσομοιάζει στην κωνοειδή μορφή ξεκινώντας να μειώνεται μετά τις 66 ώρες.

4.2.3 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων χαλκού στην έκφραση λακκάσης

Αφότου διαπιστώθηκε πως ο χαλκός αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό επαγωγέα έκφρασης λακκάσης στις κυτταρικές καλλιέργειες έγινε μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων χαλκού στην έκφραση λακκάσης όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.5.2 και προσπάθεια προσδιορισμού της βέλτιστης συγκέντρωσης χαλκού στο μέσο καλλιέργειας. Η ενεργότητα για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού που εξετάστηκαν φαίνεται στο Διάγραμμα 4.6.



Διάγραμμα 4.6. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων χαλκού στην ενεργότητα λακκάσης συναρτήσει του χρόνου.

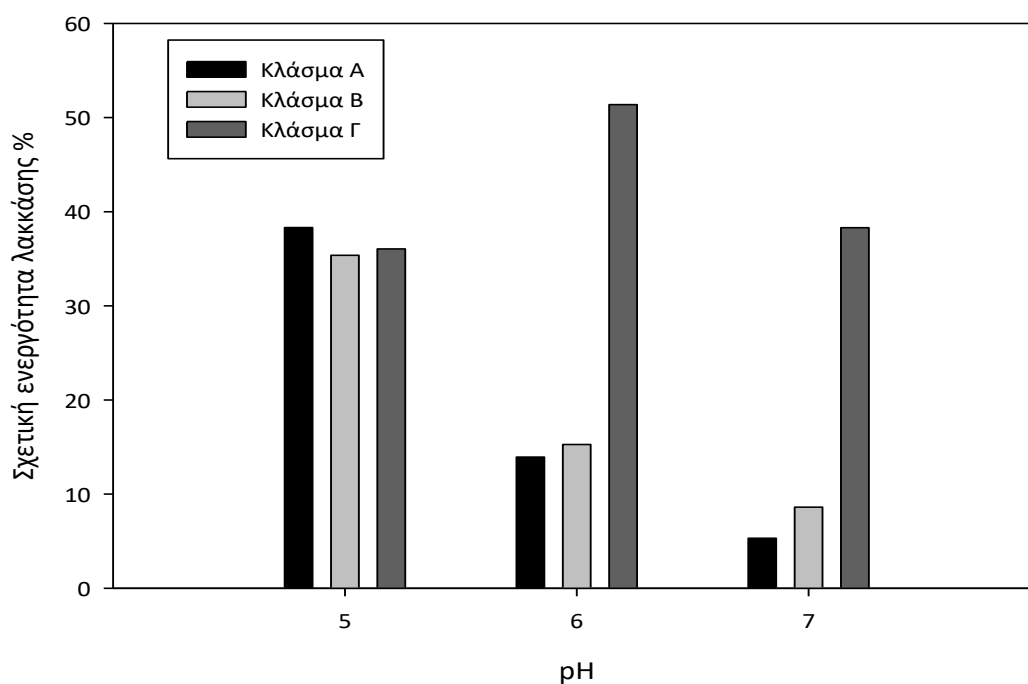
Από το Διάγραμμα 4.6. φαίνεται πως η συγκέντρωση χαλκού στις κυτταρικές καλλιέργειες έχει μικρή επίδραση στην παραγωγή και έκφραση λακκάσης. Ενδεικτικά θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου στη συγκέντρωση χαλκού που η ενεργότητα είναι μέγιστη παρατηρούμε πως η ενεργότητα δεν πέφτει κάτω από το 68% στο εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκε. Οι συγκεντρώσεις χαλκού που επιτυγχάνουν την επίτευξη της μέγιστης παραγωγής λακκάσης είναι 0,25 και 0,5 mM με αμελητέες διαφορές μεταξύ τους. Η μικρότερη ενεργότητα λακκάσης παρατηρήθηκε στη μικρότερη και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση χαλκού, 0,1 και 1,5 mM αντίστοιχα.

4.3 Απομόνωση των λακκασών Lac1 και Lac2 με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής

4.3.1 Επιλογή του pH ρυθμιστικού διαλύματος για τη στήλη χρωματογραφίας

Για την απομόνωση των λακκασών Lac1 και Lac2 πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία εναλλαγής ιόντων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικού pH ώστε να γίνει επιλογή του καταλληλότερου που θα χρησιμοποιηθεί

στην στήλη χρωματογραφίας. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που εξετάστηκαν ήταν τα Piperazine pH 5, Bis-Tris pH 6 και Bis-Tris pH 7 και χρησιμοποιήθηκε ρητίνη ισχυρής εναλλαγής ανιόντων Q-Sepharose. Στο Διάγραμμα 4.7. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις ενεργότητας λακκάσης για τα δύο κλάσματα που προέκυψαν μετά την έκπλυση της στήλης δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης χλωριούχου νατρίου (κλάσμα Α και κλάσμα Β) και για το κλάσμα που προέκυψε μετά την τελική έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου 500 mM (κλάσμα Γ) (βλέπε ενότητα 3.2.8.1). Οι τιμές που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα είναι σχετικές, ποσοστιαίες τιμές ενεργότητας λακκάσης που προσδιορίστηκαν, θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα στο κλάσμα που προέκυψε στην πρώτη έκπλυση της στήλης.



Διάγραμμα 4.7. Ενεργότητα λακκάσης συναρτήσει του χρόνου για το κλάσμα που προέκυψε μετά την αρχική αφαλάτωση (κλάσμα Α) και για το κλάσμα που προέκυψε μετά την τελική έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου 500 mM (κλάσμα Β)

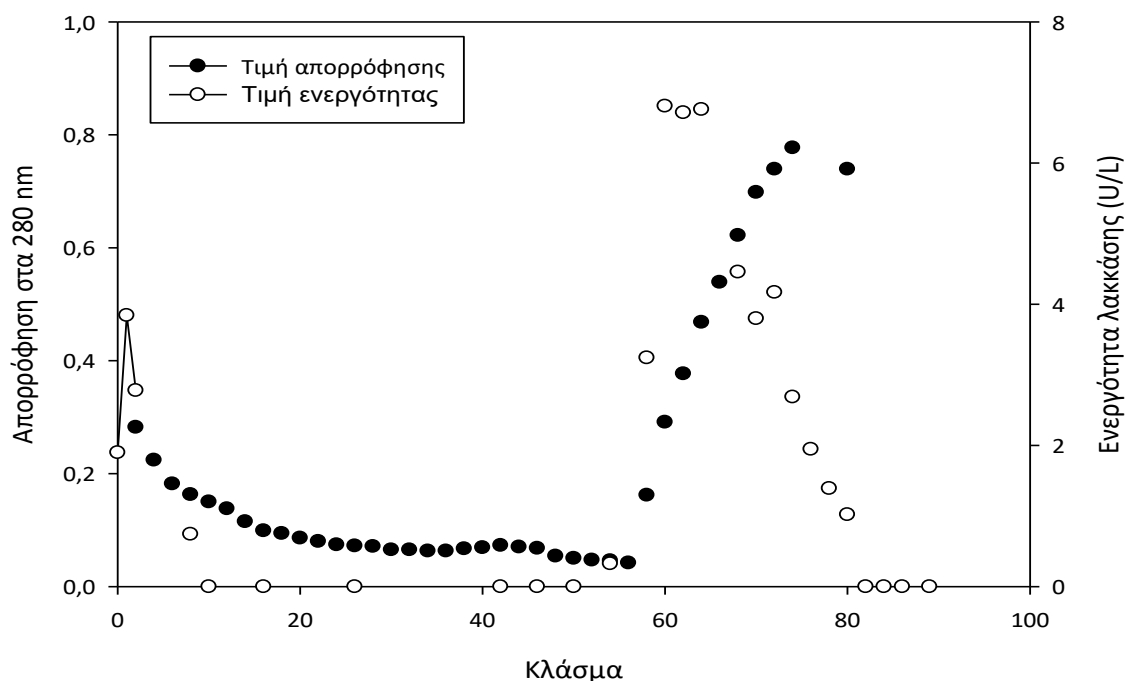
Για τα ρυθμιστικά διαλύματα Bis-Tris με pH 6 και 7 μετρήθηκε παρόμοια συμπεριφορά καθώς το μεγαλύτερο κομμάτι του ενζύμου βγήκε με την έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε χλωριούχο νάτριο συγκέντρωσης 500

mM δείχνοντας πως το ένζυμο συγκρατείται ισχυρά σε αυτό το pH.. Στο ρυθμιστικό διάλυμα Piperazine pH 5 μετρήθηκε παρόμοια ενζυμική ενεργότητα και στα τρία κλάσματα δείχνοντας πως η πρωτεΐνη δε συγκρατήθηκε ισχυρά. Γενικά όσο ισχυρότερη είναι η πρόσδεση της πρωτεΐνης στην ρητίνη τόσο πιο δύσκολη είναι η μετέπειτα απομάκρυνση της από την ρητίνη. Οπότε για την πρώτη στήλη επιλέχθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Piperazine pH 5,5.

4.3.2 Υπολογισμός πρωτεϊνικού φορτίου και ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης στα κλάσματα των στηλών χρωματογραφίας

4.3.2.1 Στήλη χρωματογραφίας με ρυθμιστικό διάλυμα Piperazine pH 5,5

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την στήλη χρωματογραφίας αναφέρεται στην ενότητα 3.2.9.2. Για τα διάφορα δείγματα που συλλέχθηκαν από την στήλη σε σωλήνες έγινε μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι πρωτεϊνικού φορτίου. Τα κλάσματα που έδειξαν απορρόφηση στα 280 nm εξετάστηκαν ως προς την ενζυμική ενεργότητα λακκάσης. Στο Διάγραμμα 4.8. παρουσιάζονται οι απορροφήσεις στα 280 nm και οι ενζυμικές ενεργότητες λακκάσης για τα διάφορα κλάσματα.



Διάγραμμα 4.8. Απορροφήσεις κλασμάτων στα 280 nm και ενζυμική ενεργότητα λακκάσης για διαφορετικά κλάσματα της στήλης

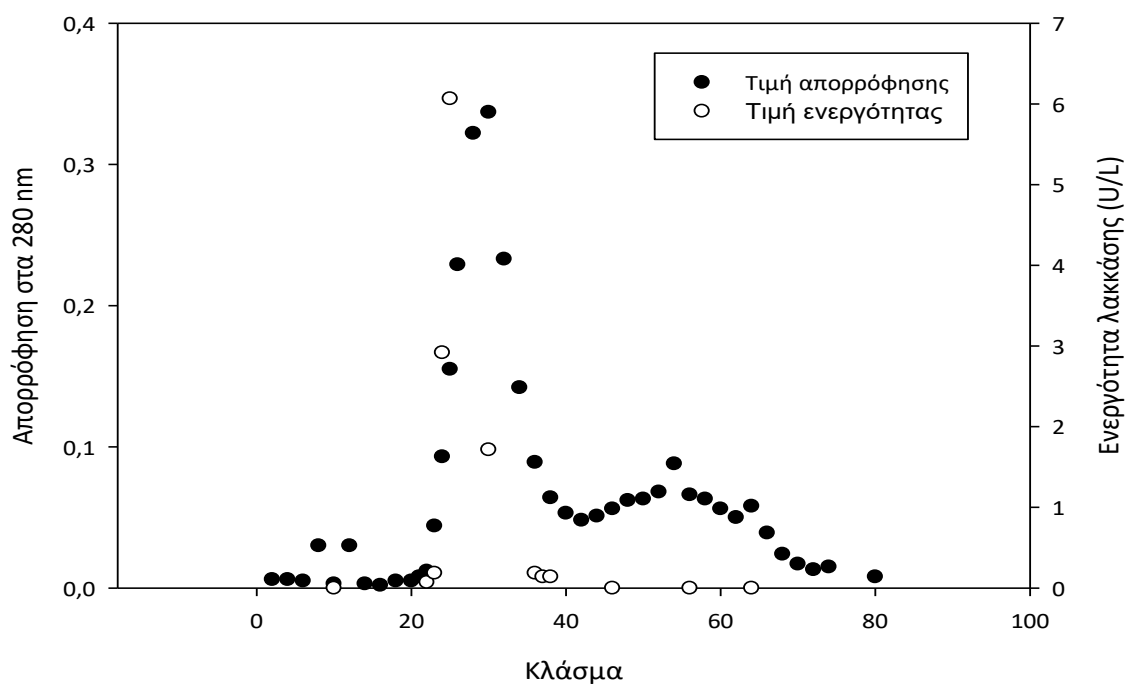
Από τα αποτελέσματα για την ενεργότητα λακκάσης φαίνεται πως παρουσιάζεται ενεργότητα λακκάσης τόσο στα αρχικά κλάσματα πριν ξεκινήσει η ροή ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου όσο και περίπου στα 480 mL διαλύματος (σωλήνας 60) όπου υπάρχει ροή 35% ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου συγκέντρωσης 500 mM. Τα δείγματα πριν ξεκινήσει το πρόγραμμα μέχρι το σωλήνα 9 (κλάσμα 1, K1) και από το σωλήνα 55 έως 76 (κλάσμα 2, K2) συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν ξεχωριστά καθώς υποτέθηκε ότι πρόκειται για δύο διαφορετικές πρωτεΐνες με ενεργότητα λακκάσης. Το κλάσμα 1 συμπυκνώθηκε με συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 σε 12 mL από αρχικό όγκο 104 mL και το κλάσμα 2 σε 20 mL από 126 mL αντίστοιχα. Οι μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας στα δύο κλάσματα έδειξαν ποσοστιαία ανάκτηση πρωτεΐνης 72,3%.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου έδειξε ότι τα δύο κλάσματα K1 και K2 περιείχαν και άλλες πρωτεΐνες οπότε συνεχίστηκε η χρήση στηλών χρωματογραφίας για τον καθαρισμό των κλασμάτων με ενεργότητα λακκάσης.

4.3.2.2 Απομόνωση λακκάσης *Lac2*

4.3.2.2.1 Στήλη χρωματογραφίας με ρυθμιστικό διάλυμα Piperazine pH 5,5

Το κλάσμα K2 τοποθετήθηκε σε στήλη χρωματογραφίας με ρυθμιστικό διάλυμα Piperazine pH 5,5 και ρητίνη ασθενούς εναλλαγής ανιόντων DEAE-Cellulose. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την στήλη χρωματογραφίας αναφέρεται στην ενότητα 3.2.9.2. Για τα διάφορα δείγματα που συλλέχθηκαν από τη στήλη σε σωλήνες έγινε μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι πρωτεϊνικού φορτίου. Τα κλάσματα που έδειξαν απορρόφηση στα 280 nm εξετάστηκαν ως προς την ενζυμική ενεργότητα λακκάσης. Στο Διάγραμμα 4.9. παρουσιάζονται οι απορροφήσεις στα 280 nm και οι ενζυμικές ενεργότητες λακκάσης για τα διάφορα κλάσματα.



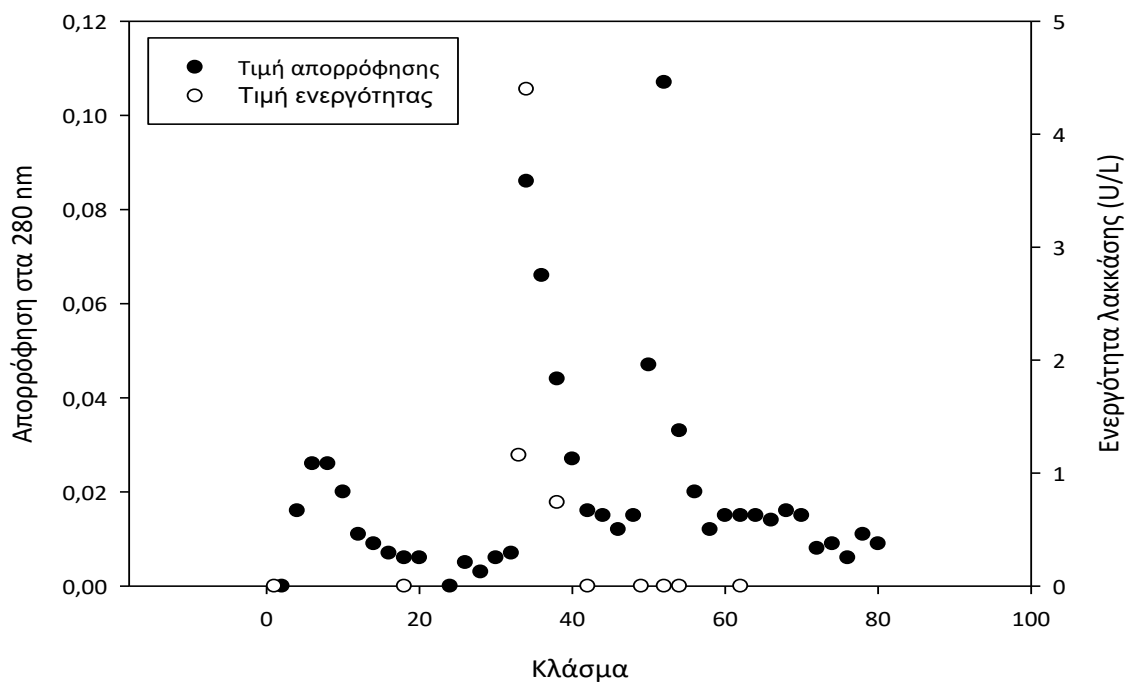
Διάγραμμα 4.9. Απορροφήσεις κλασμάτων στα 280 nm και ενζυμική ενεργότητα λακκάσης για διαφορετικά κλάσματα της στήλης.

Από τα αποτελέσματα για την ενεργότητα λακκάσης φαίνεται πως παρουσιάζεται ενεργότητα λακκάσης περίπου στα 200 mL διαλύματος (κλάσμα 25) όπου υπάρχει ροή 35% ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου συγκέντρωσης 500 mM. Τα δείγματα από το σωλήνα 24 έως 33 συλλέχθηκαν και συμπηκνώθηκαν με συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 σε 17 mL από αρχικό όγκο 60 mL. Οι μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας έδειξαν ποσοστιαία ανάκτηση πρωτεΐνης 52,9%.

4.3.2.3 Απομόνωση λακκάσης *Lac1*

4.3.2.3.1 Στήλη χρωματογραφίας με ρυθμιστικό διάλυμα Bis-Tris pH 7

Το κλάσμα K1 τοποθετήθηκε σε στήλη χρωματογραφίας με ρυθμιστικό διάλυμα Bis-Tris pH 7 και ρητίνη Q-Sepharose. Το πρόγραμμα στο ρυθμιστή της αντλίας τέθηκε στα 90 λεπτά και οι υπόλοιπες συνθήκες παρέμειναν όπως περιγράφονται στην ενότητα 3.2.9.2. Στο Διάγραμμα 4.10. παρουσιάζονται οι απορροφήσεις στα 280 nm και οι ενζυμικές ενεργότητες λακκάσης για τα διάφορα κλάσματα.



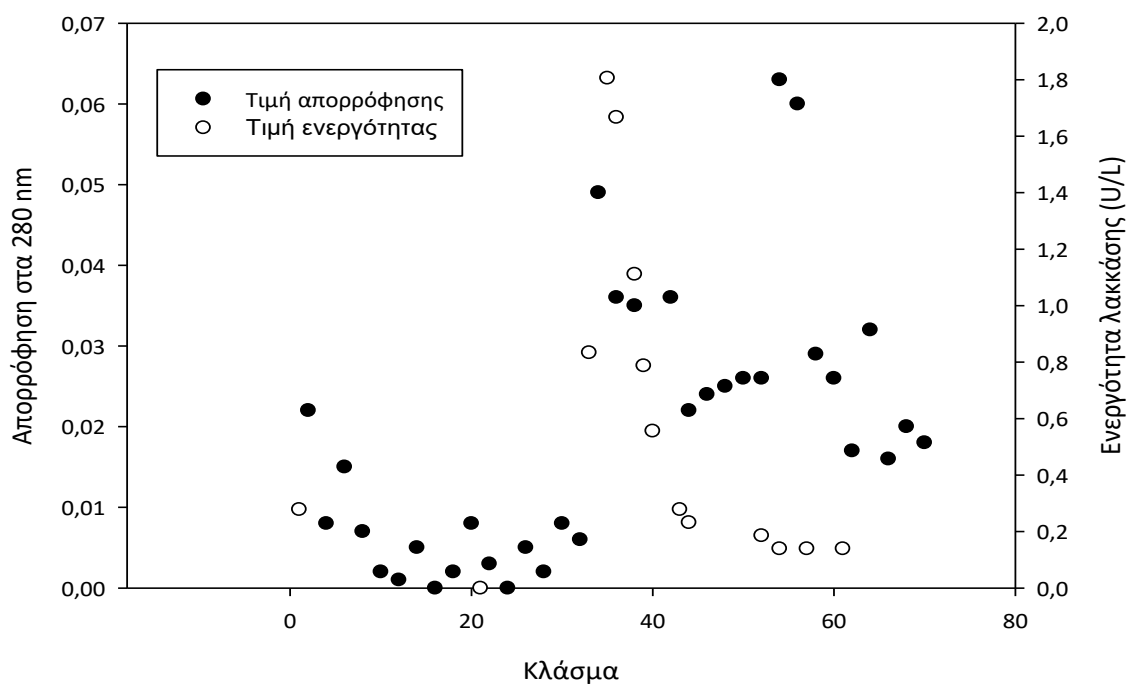
Διάγραμμα 4.10. Απορροφήσεις κλασμάτων στα 280 nm και ενζυμική ενεργότητα λακκάσης για διαφορετικά κλάσματα της στήλης.

Από τα αποτελέσματα για την ενεργότητα λακκάσης φαίνεται πως παρουσιάζεται ενεργότητα λακκάσης περίπου στα 204 mL διαλύματος (κλάσμα 34) όπου υπάρχει ροή 25% ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου συγκέντρωσης 500 mM.

Τα δείγματα από τα κλάσματα 33 έως 38 συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν με συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 σε 8 mL από αρχικό όγκο 36 mL. Οι μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας έδειξαν ποσοστιαία ανάκτηση πρωτεΐνης 60%. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου έδειξε ότι το κλάσμα που συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε δεν ήταν καθαρό καθώς περιείχε και άλλες πρωτεΐνες.

4.3.2.3.2 Στήλη χρωματογραφίας με ρυθμιστικό διάλυμα Bis-Tris pH 6,5

Το κλάσμα που συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε από τη στήλη με ρυθμιστικό διάλυμα Bis-Tris pH 7 τοποθετήθηκε σε νέα στήλη με ρυθμιστικό διάλυμα Bis-Tris pH 6,5 και ρητίνη Q-Sepharose. Στο Διάγραμμα 4.11. παρουσιάζονται οι απορροφήσεις στα 280 nm και οι ενζυμικές ενεργότητες λακκάσης για τα διάφορα κλάσματα.



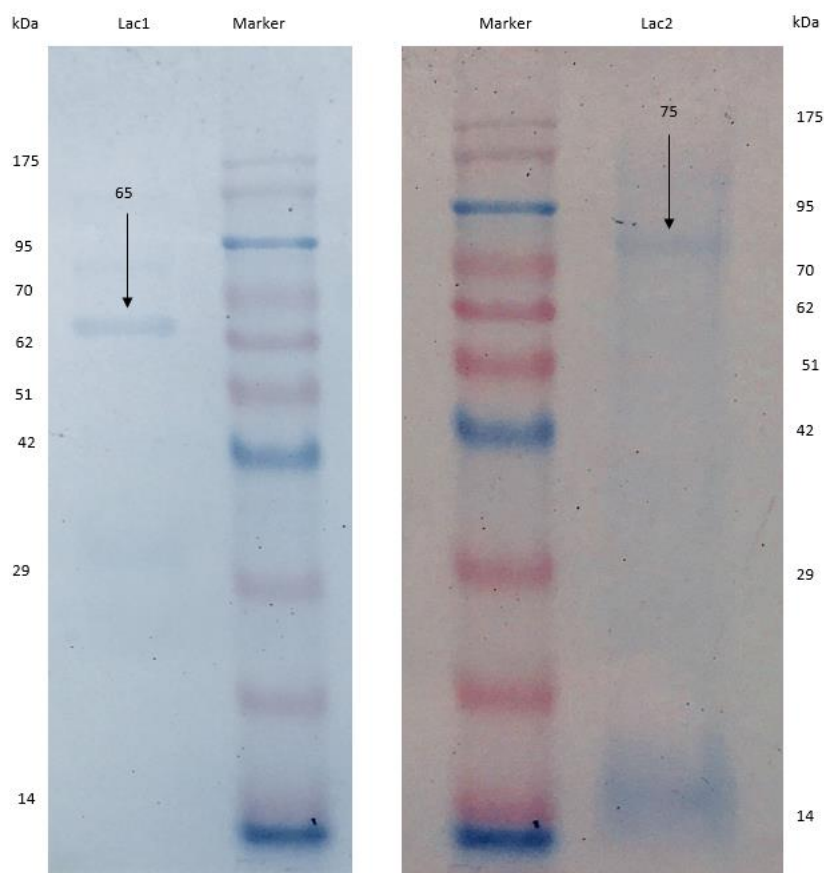
Διάγραμμα 4.11. Απορροφήσεις κλασμάτων στα 280 nm και ενζυμική ενεργότητα λακκάσης για διαφορετικά κλάσματα της στήλης

Από τα αποτελέσματα για την ενεργότητα λακκάσης φαίνεται πως παρουσιάζεται ενεργότητα λακκάσης περίπου στα 210 mL διαλύματος (κλάσμα 35) όπου υπάρχει ροή 17% ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου συγκέντρωσης 500 mM. Τα δείγματα από το σωλήνα 33 έως 40 συλλέχθηκαν και συμπτηκνώθηκαν με συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 σε 10,5 mL από αρχικό όγκο 48 mL. Οι μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας έδειξαν ποσοστιαία ανάκτηση πρωτεΐνης 98%.

4.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός των απομονωμένων λακκασών Lac1 και Lac2

4.4.1 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 Lac1 και Lac2 και για πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνικών μορίων γνωστού μοριακού βάρους. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE παρουσιάζονται στις Εικόνες 4.1. και 4.2.



Εικόνα 4.1. Πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών. Στο πήκτωμα φαίνονται η Lac1, ο Marker και η Lac2 από αριστερά προς τα δεξιά

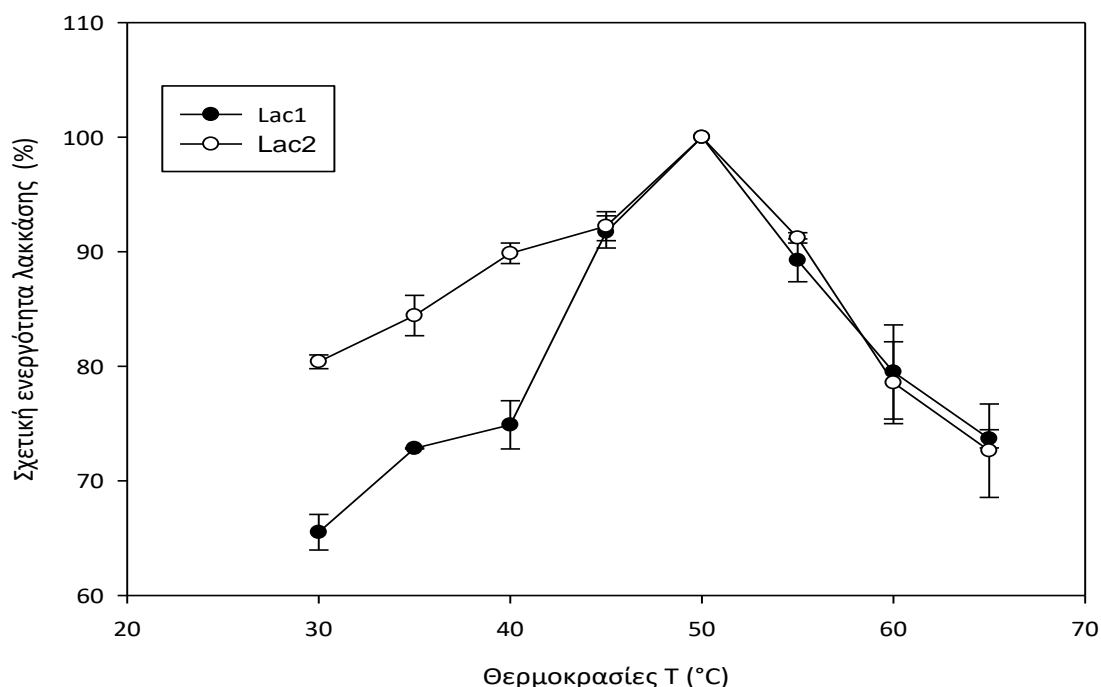
Στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE της Lac1 διακρίνουμε μία πρωτεϊνική ζώνη γεγονός που αποδεικνύει την καθαρότητα της πρωτεΐνης. Το μοριακό βάρος της λακκάσης Lac1 εντοπίζεται περίπου στα 65 kDa. Στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης της Lac2 η πρωτεϊνική ζώνη που διακρίνεται χαμηλά κοντά στα 14 kDa είναι ένδειξη πως ένα μέρος της πρωτεΐνης έχει πρωτεολυθεί κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής της. Το μοριακό βάρος της Lac2 εντόπιζεται περίπου στα 75 kDa.

4.4.2 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης λακκασών

4.4.2.1 Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης

Στο Διάγραμμα 4.13. παρουσιάζονται οι υπολογισμοί υπολειπόμενης ενεργότητας για το κάθε ένζυμο κατά τη διεξαγωγή αντιδράσεων σε διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες, στο εύρος 30 έως 65 °C. Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης των δύο λακκασών εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.9.2.1 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Σημειώνεται πως οι τιμές ενεργότητας στο διάγραμμα είναι σχετικές, ποσοστιαίες

τιμές ενεργότητας του ενζύμου που προσδιορίστηκαν, θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου στη θερμοκρασία που η ενεργότητα είναι μέγιστη.



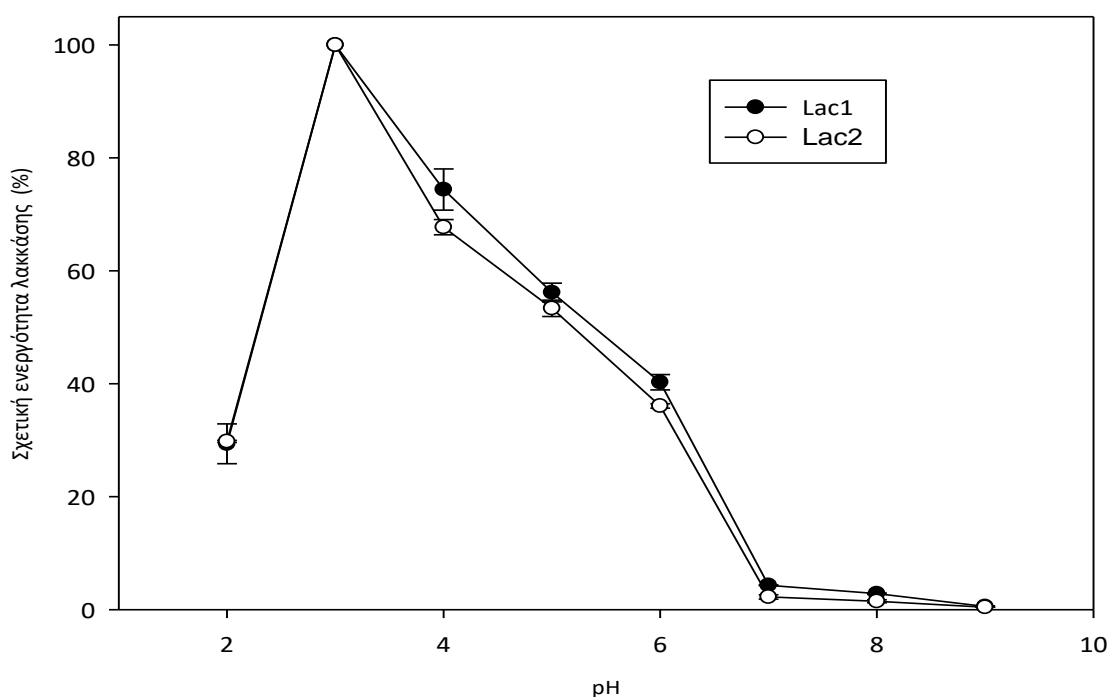
Διάγραμμα 4.13. Επίδραση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στην υπολειπόμενη ενεργότητα των λακκασών Lac1 και Lac2.

Τόσο η λακκάση Lac1 όσο και η λακκάση Lac2 παρουσιάζουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 50 °C και η μεταβολή της θερμοκρασίας προσομοιάζει στην τυπική κωνοειδή μορφή. Στο εύρος θερμοκρασιών που εξετάστηκε η ενεργότητα των δύο ενζύμων δεν έπεσε κάτω από το 65% σε σχέση με τη βέλτιστη θερμοκρασία. Η λακκάση Lac2 φαίνεται να παρουσιάζει μια πιο ομαλή μετάβαση από τις χαμηλότερες θερμοκρασίες στη βέλτιστη σε σχέση με τη λακκάση Lac1 ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες παρουσιάζουν όμοια συμπεριφορά. Συγκεκριμένα η λακκάση Lac1 δεν πέφτει κάτω από το 80% στο θερμοκρασιακό εύρος 30 έως 50 °C ενώ η Lac 2 πέφτει στο 65% στους 30 °C.

4.4.2.2 Βέλτιστο pH δράσης

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 3.2.9.2.2 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι για τον προσδιορισμό της τιμής pH στην οποία τα ένζυμα λειτουργούν βέλτιστα

χρησιμοποιήθηκε ένα ρυθμιστικό σύστημα με εύρος τιμών 2 με 9. Η σύσταση των διαλυμάτων που αποτελούν το ρυθμιστικό σύστημα περιγράφεται επίσης στην παράγραφο 3.1.4 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Η ενεργότητα του κάθε ενζύμου στις διαφορετικές τιμές pH που εξετάστηκαν φαίνεται στο Διάγραμμα 4.12. Σημειώνεται πως οι τιμές ενεργότητας στο διάγραμμα είναι σχετικές, ποσοστιαίες τιμές ενεργότητας του ενζύμου που προσδιορίστηκαν, θεωρώντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου στην τιμή pH που η ενεργότητα είναι μέγιστη.



Διάγραμμα 4.12. Επίδραση του pH της αντίδρασης στην υπολειπόμενη ενεργότητα των λακκάσων Lac1 και Lac2.

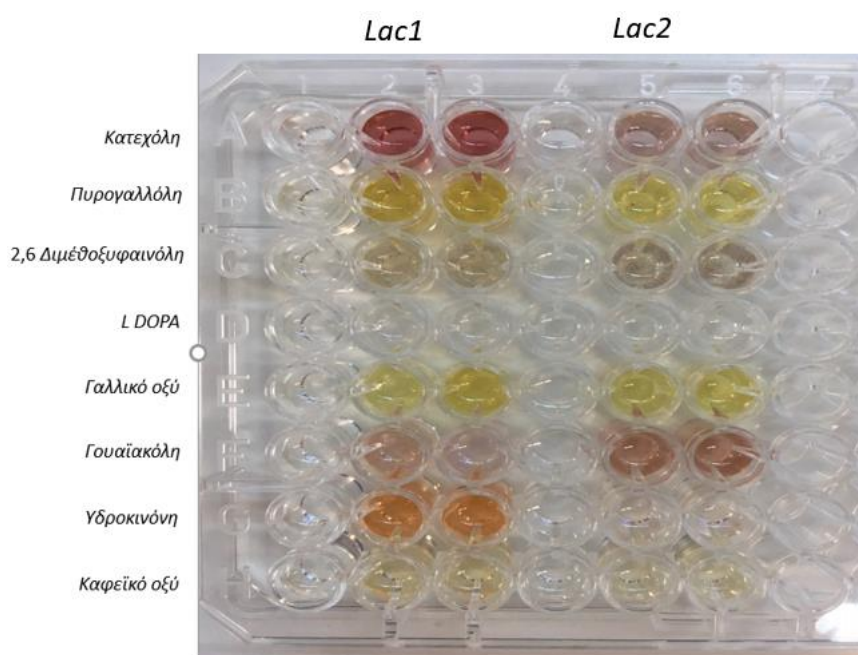
Οι λακκάσες Lac1 και Lac2 εμφανίζουν βέλτιστο pH δράσης στην τιμή 3 και παρόμοια απόκριση στη διακύμανση του pH. Και στις δύο λακκάσες η ενεργότητα για pH 2 πέφτει στο 30% και διατηρείται πάνω από το 50% στο εύρος pH 3 έως 5 ενώ για τιμές pH άνω του 6 μειώνεται σημαντικά.

4.4.3 Μελέτη εξειδίκευσης της Lac1 και της Lac2 ως προς το υπόστρωμα.

Για την εξέταση της εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην ενότητα 3.2.9.3. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε υπόστρωμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1. Παρουσίαση των υποστρωμάτων που οξειδώνονται από τις λακκάσες Lac1 και Lac2

| Υπόστρωμα | Lac1 | Lac2 |
|---------------------|------|------|
| Κατεχόλη | + | + |
| Πυρογαλλόλη | + | + |
| 2,6 Διμέθοξυφαινόλη | + | + |
| L-DOPA | - | - |
| Γαλλικό οξύ | + | + |
| Γουαϊακόλη | + | + |
| Υδροκινόνη | + | - |
| Καφεϊκό οξύ | + | - |



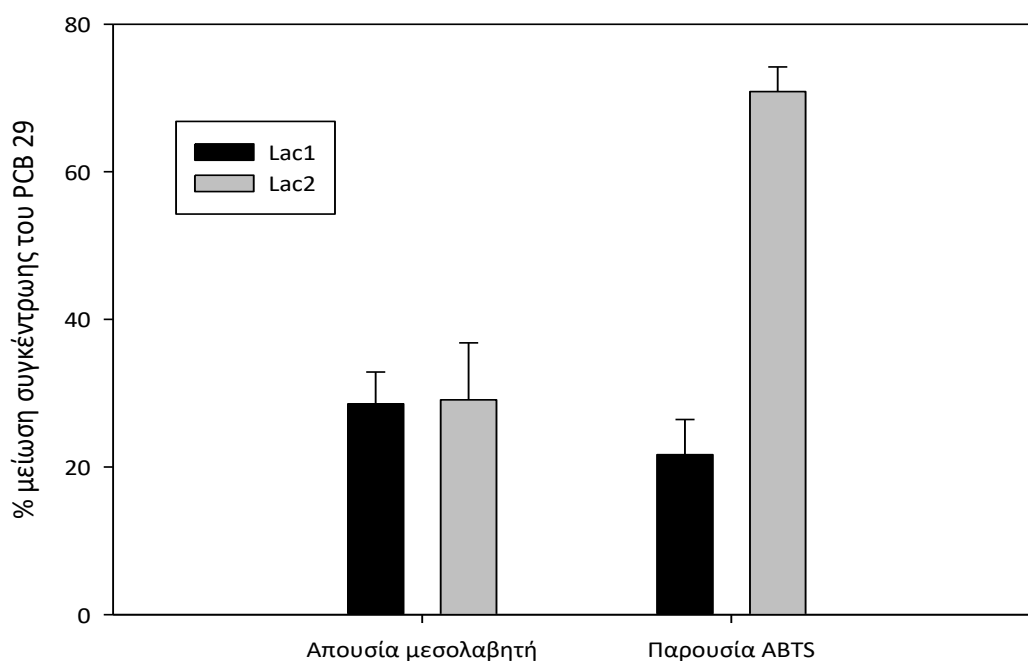
Εικόνα 4.2. Εικόνα των διαφορετικών υποστρωμάτων μετά το πέρας των 18 ωρών

Η λακκάση Lac1 παρουσίασε τη δυνατότητα οξείδωσης μεγαλύτερου εύρους υποστρωμάτων από τη λακκάση Lac2 και σε μεγαλύτερο βαθμό όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.2. αλλά και από τις τιμές απορρόφησης με μόνη εξαίρεση τη γαλλικό οξύ. Μάλιστα στην οξείδωση του γαλλικού οξέως από τη Lac2 παρατηρήθηκε και η μέγιστη ενεργότητα λακκάσης σε σχέση με τα υπόλοιπα εξεταζόμενα υποστρώματα. Στον Πίνακα 4.1. φαίνεται πως η υδροκινόνη και το καφεϊκό οξύ αποτελούν υποστρώματα μόνο της Lac1 ενώ η L DOPA δεν αποτελεί υπόστρωμα κανενός από τα

δύο ένζυμα. Και οι δύο λακκάσες παρουσίασαν βέλτιστη ενεργότητα στα υποστρώματα πυρογαλλόλη και γαλλικό οξύ, μικρή ενεργότητα στην κατεχόλη και το υπόστρωμα της Lac1 με τη μικρότερη ενεργότητα ήταν το καφεϊκό οξύ.

4.5 Μελέτη απομονωμένων ενζύμων για την αποικοδόμησης του PCB 29

Για τη μελέτη της αποικοδόμησης του PCB 29 ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται στην ενότητα 3.2.10. Στο Διάγραμμα 4.14. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις αντιδράσεις των απομονωμένων ενζύμων με το PCB 29 απουσία μεσολαβητή και παρουσία μεσολαβητή ABTS.



Διάγραμμα 4.14. Ποσοστιαία μείωση συγκέντρωσης του PCB 29 μετά το πέρας 20 ωρών

Από το Διάγραμμα 4.14. φαίνεται πως στις αντιδράσεις των λακκασών Lac1 και Lac2 με το PCB 29 απουσία μεσολαβητή παρατηρούνται παρόμοια αποτελέσματα. Συγκεκριμένα ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης του ρύπου 28,5% και 29,1% για τη Lac1 και για τη Lac2 αντίστοιχα. Η μέγιστη ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης του PCB 29 ήταν 70,8% και επιτεύχθηκε από τη λακκάση Lac2 παρουσία του μεσολαβητή ABTS. Στις αντιδράσεις της Lac1 παρουσία του μεσολαβητή ABTS παρατηρείται ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης του PCB 29 21,7%.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ
ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

Κεφάλαιο 5 - Συζήτηση Αποτελεσμάτων – Συμπεράσματα

5.1 Διαλογή μικροοργανισμών με ενεργότητα λακκάσης

Οι μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν είναι μικροοργανισμοί που έχουν παρουσιάσει δυνατότητα αποικοδόμησης του ρύπου PCB 29 και η διαλογή έγινε μεταξύ άλλων για να μελετηθεί η συσχέτιση της παραγωγής λακκάσης και της αποικοδόμησης του ρύπου από τους εξεταζόμενους μύκητες. Η διαλογή μικροοργανισμών θαλάσσιας προέλευσης για την έκφραση και απομόνωση ενζύμων με καινοτόμες ιδιότητες που μπορούν να αξιοποιηθούν σε διεργασίες βιοεξυγίανσης αποτελεί διαδεδομένη ερευνητική μέθοδο και βασίζεται στη βιοχημική ποικιλομορφία αυτών των μικροοργανισμών (Batista-garcía et al., 2017; Lima & Porto, 2016; Nikolaiivits et al., 2017; Theerachat et al., 2018). Η διαλογή αποτέλεσε μια διαδικασία ανάδειξης του μικροοργανισμού με τη μεγαλύτερη έκφραση λακκάσης και η παραγωγή λακκάσης μελετήθηκε στις υγρές καλλιέργειες των μικροοργανισμών παρουσία του ρύπου PCB 29. Αντίστοιχα έχουν πραγματοποιηθεί ερευνητικές εργασίες διαλογής σε μύκητες που έχουν παρουσιάσει δυνατότητα αποχρωματισμού και αποικοδόμησης βαφών για την απομόνωση των λακκασών τους (Dhouib et al., 2005; Kiiskinen, Kruus, & Ratto, 2004). Από τους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν μόνο ένα στέλεχος, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως *Cladosporium sp.* παρουσίασε υψηλή ενεργότητα λακκάσης.

5.2 Επαγωγή της ενζυμικής ενεργότητας στις κυτταρικές καλλιέργειες

5.2.1 Επίδραση διαφορετικών επαγωγέων στην έκφραση λακκάσης και υπεροξειδάσης
Η προσθήκη διαφορετικών ουσιών στις υγρές καλλιέργειες των μικροοργανισμών για τη μελέτη της επαγωγής της ενζυμικής έκφρασης αποτελεί διαδεδομένη ερευνητική μέθοδο (Cavallazzi, Kasuya, & Soares, 2005; Passarini, Ottoni, Santos, Lima, & Sette, 2015). Ο χαλκός αποτέλεσε το μοναδικό αποτελεσματικό επαγωγέα της έκφρασης λακκάσης αυξάνοντας την ενεργότητα 2,5 φορές κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς είναι ο πιο διαδεδομένος επαγωγέας της έκφρασης μυκητιακών λακκασών (Gomaa & Momtaz, 2015; Theerachat et al., 2018). Μάλιστα η προσθήκη χαλκού έχει βρεθεί να αυξάνει το επίπεδο παραγωγής λακκάσης 13 και 20 φορές στις καλλιέργειες των θαλάσσιων μυκήτων *Pestalotiopsis sp. J63* (Chen, Xue, Feng, & Yao, 2011) και *Polygorus brumalis ibrc05015* αντίστοιχα (Theerachat et al., 2018). Το φερουλικό οξύ παρουσίασε αντιθέτως έντονη παρεμποδιστική δράση κατεβάζοντας την ενεργότητα

στο 23% αν και έχει παρατηρηθεί πως δρα ως επαγωγέας της παραγωγής λακκάσης όταν προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας του μύκητα (Bertrand, Martinez-Morales, & Trejo-Hernandez, 2013; Nakade et al., 2012; Subramanian et al., 2014). Μάλιστα η προσθήκη φερουλικού οξέος στις υγρές καλλιέργειες των *Pholiota mutabilis* και *Pycnoporus cinnabarinus* προκάλεσε αύξηση της παραγωγής λακκάσης έως και 3,4 και 2,8 φορές αντίστοιχα (Gianfreda et al., 1999). Η βανιλίνη δεν είχε επαγωγική επίδραση επηρεάζοντας αμελητέα την έκφραση λακκάσης σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Η βανιλίνη αναφέρεται στη βιβλιογραφία πως αποτελεί μεσολαβητή (Rivera-Hoyos et al., 2013) και υπόστρωμα λακκάσης (Zeng et al., 2017) αλλά υπάρχουν περιορισμένες αναφορές επαγωγικής δράσης όταν προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας (Cavallazzi et al., 2005). Η προσθήκη του PCB 29 δεν αύξησε το επίπεδο έκφρασης λακκάσης ή υπεροξειδάσης στις καλλιέργειες, αν και έχουν υπάρξει αναφορές αύξησης της ενεργότητας λακκάσης έως και 20 φορές σε καλλιέργειες του μύκητα *Pleurotus ostreatus* μετά την προσθήκη PCB (Gayosso-Canales, Rodríguez-Vázquez, Esparza-García, & Bermúdez-Cruz, 2012). Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η προσθήκη του PCB 29 είχε μικρή παρεμποδιστική επίδραση στην ενεργότητα των καλλιεργειών και πως δεν αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη και την ενζυμική παραγωγή του μικροοργανισμού όπως είχε διαπιστωθεί και από τη διαλογή των μικροοργανισμών.

Το στέλεχος *Cladosporium sp.* φαίνεται πως παράγει αξιοσημείωτη ποσότητα ιδιοστατικών υπεροξειδασών χωρίς την προσθήκη επαγωγέα στο μέσο καλλιέργειας. Επίσης η προσθήκη βανιλίνης και φερουλικού οξέως επηρέασε την παραγωγή υπεροξειδάσης με παρόμοιο τρόπο με την παραγωγή λακκάσης. Συγκεκριμένα το φερουλικό οξύ είχε ισχυρή παρεμποδιστική επίδραση μειώνοντας την ενεργότητα στο 10,1% ενώ η βανιλίνη είχε πολύ μικρή επίδραση αυξάνοντας την ενεργότητα κατά 1,8%. Η προσθήκη του PCB 29 μείωσε στο μισό την ενεργότητα υπεροξειδάσης ενώ στην ενεργότητα λακκάσης είχε λιγότερο παρεμποδιστική επίδραση. Τέλος η μόνη ουσία που είχε αντίθετο αποτέλεσμα στην επαγωγή της έκφρασης υπεροξειδάσης σε σχέση με την έκφραση λακκάσης ήταν ο χαλκός που μείωσε την ενεργότητα στο 10,9%.

5.2.2 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων χαλκού στην έκφραση λακκάσης

Η συγκέντρωση χαλκού στις κυτταρικές καλλιέργειες φάνηκε πως είχε μικρή επίδραση στην παραγωγή και έκφραση λακκάσης στο εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκε. Βέλτιστες συγκεντρώσεις χαλκού ήταν 0,25-0,5 mM που αποτελούν συνηθισμένες τιμές για μυκητιακές καλλιέργειες (Chen et al., 2011). Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως η μικρότερη ενεργότητα λακκάσης παρατηρείται στη μικρότερη και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση χαλκού, 0,1 και 1,5 mM αντίστοιχα. Ο χαλκός δρα ως επαγωγέας της παραγωγής λακκάσης όμως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι τοξικός για τους περισσότερους μικροοργανισμούς καθώς τα ιόντα χαλκού αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, ένζυμα, νουκλεϊνικά οξέα και μεταβολίτες που σχετίζονται με σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες (Passarini et al., 2015; Subramanian et al., 2014). Ενδεικτικά η παρουσία χαλκού σε συγκεντρώσεις μέχρι 0,5 mM αύξησε 13 φορές την παραγωγή λακκάσης από το θαλάσσιο μύκητα *Pestalotiopsis sp.* ενώ παρατηρήθηκε έντονη μείωση της παραγωγής λακκάσης για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χαλκού (Chen et al., 2011). Η χαμηλή ενεργότητα που παρατηρήθηκε για τη συγκέντρωση 0,1 mM μπορεί να αποδοθεί στη μικρή ποσότητα χαλκού στο θρεπτικό μέσο με αποτέλεσμα τα ιόντα Cu^{2+} να μην επιδρούν στο ενεργό κέντρο της λακκάσης και την υποστήριξη της μεταγραφής του γονιδίου της λακκάσης και της μετα-μεταγραφικής τροποποίησης (Jaber, Md Shah, Mohamed, & Ariff, 2017; Theerachat et al., 2018). Επιπλέον σε καλλιέργειες φυτικών κυττάρων που περιείχαν χαλκό συγκέντρωσης μικρότερης από 100 $\mu\text{g/L}$ παρατηρήθηκε η παραγωγή ανενεργών λακκασών χωρίς χαλκό ή η παραγωγή ενεργών λακκασών μέχρι να τελειώσουν τα αποθέματα χαλκού στην καλλιέργεια (Gianfreda et al., 1999).

5.3 Απομόνωση των ενζύμων Lac1 και Lac2

Οι λακκάσες όπως και τα περισσότερα λιγνινολυτικά ένζυμα είναι ως επί το πλείστον εξωκυτταρικά ένζυμα (Baldrian, 2006; Otto & Schlosser, 2015) και συνεπώς απομονώνονται από το εξωκυτταρικό υγρό των καλλιεργειών (Chmelova & Ondrejovic, 2016; Gaviria-Arroyave et al., 2018; Rezaei, Shahverdi, & Faramarzi, 2017) όπως και στην παρούσα εργασία. Από το *Cladosporium sp.* απομονώθηκαν δύο λακκάσες. Είναι σύνηθες να παράγονται πάνω από μια μορφή αυτού του ενζύμου από ένα μυκητιακό στέλεχος (Morozova, Shumakovich, Gorbacheva, et al., 2007;

Subramanian et al., 2014; Zhuo et al., 2018). Ενδεικτικά στο στέλεχος *Marasmius quercophilus* S17 έχει αναφερθεί η ύπαρξη 7 ισοενζύμων λακκάσης (Nunes & Kunamneni, 2018).

Οι έρευνες απομόνωσης και καθαρισμού λακκάσης από διάφορους μικροοργανισμούς πραγματοποιούνται σε στάδια (Chakroun, Mechichi, Jesus, Dhoub, & Sayadi, 2010; Kiiskinen et al., 2004; Si, Peng, & Cui, 2013) αν και υπάρχουν περιορισμένες αναφορές για την απομόνωση λακκάσης σε ένα στάδιο με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας (Do Rosario Freixo, Karmali, & Arteiro, 2014; Rezaei et al., 2017). Στη συγκεκριμένη εργασία οι δύο λακκάσες απομονώθηκαν σε 2 στάδια με μεθόδους χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής. Η λακκάση Lac1 απομονώθηκε τελικά με ρητίνη Q-Sepharose που εξισορροπήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 6,5 και η λακκάση Lac2 με ρητίνη DEAE-Cellulose που εξισορροπήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 5,5 με τελική ποσοστιαία ανάκτηση ενεργότητας 17% και 23% αντίστοιχα. Αυτές οι δύο ρητίνες χρησιμοποιούνται ευρέως σε πειράματα απομόνωσης λακκασών (Afreen et al., 2017; D'Acunzo & Galli, 2002; M Ko et al., 2001; Zhao, Zhang, Cui, & Zhao, 2012). Ενδεικτικά η ρητίνη Q-Sepharose χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της λακκάσης *rblac1* από το μύκητα *Polyporus brumalis ibrc05015* με ρυθμιστικό διάλυμα pH 7 (Nakade et al., 2012) και η ρητίνη DEAE-Cellulose για την απομόνωση λακκάσης από το μύκητα *Trametes rubescens* με ρυθμιστικό διάλυμα pH 5 και τελική ποσοστιαία ανάκτηση ενεργότητας περίπου 50% (Si et al., 2013).

5.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός των απομονωμένων λακκασών

Η μέγιστη ενεργότητα και για τα δύο απομονωμένα ένζυμα παρατηρήθηκε για pH 3. Βιβλιογραφικά αυτή η τιμή είναι η βέλτιστη για τις περισσότερες μυκητιακές λακκάσες που έχουν εξεταστεί με τη χρήση του υποστρώματος ABTS (Baldrian, 2006), όπως το θαλάσσιο στέλεχος *Cerrena unicolor* MTCC 5159 (Theerachat et al., 2018). Γενικά οι βέλτιστες ενεργότητες παρατηρούνται σε όξινες τιμές pH μέχρι 5,6 (Nunes & Kunamneni, 2018). Η ενεργότητα και των δύο λακκασών Lac1 και Lac2 εμφανίζει σημαντική μείωση για τιμές pH μεγαλύτερες του 6. Συγκεκριμένα για ουδέτερο pH η Lac1 παρουσιάζει ενεργότητα 4% και η Lac2 2% και για βασικές τιμές pH δεν εμφανίζουν ενεργότητα. Παρόμοιο προφίλ pH-ενεργότητας παρουσιάζει και η λακκάση που έχει απομονωθεί από το κυανοβακτήριο *Spirulina platensis* CFTRI

(Afreen et al., 2017) και η έλλειψη ενεργότητας για βασικές τιμές pH αποδίδεται στη δέσμευση ενός ανιόντος υδροξειδίου στο τριπυρηνικό σύμπλεγμα, το οποίο εμποδίζει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το χαλκό T1 στο σύμπλεγμα παρεμποδίζοντας την καταλυτική δράση της λακκάσης (Khlifi et al., 2010; Kunamneni, Plou, Ballesteros, & Alcalde, 2008; Zeng et al., 2017).

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης και για τα δύο ένζυμα είναι 50 °C. Γενικά το προφίλ θερμοκρασίας-ενεργότητας λακκάσης δε διαφέρει από των υπόλοιπων εξωκυτταρικών λιγνινολυτικών ενζύμων παρουσιάζοντας βέλτιστο στο εύρος 50 έως 70 °C (Baldrian, 2006). Ενδεικτικά οι λακκάσες που έχουν απομονωθεί από τους μύκητες *Pleurotus pulmonarius* και *Pleurotus florida* παρουσιάζουν βέλτιστο στους 50 °C (Afreen et al., 2017). Τέλος η λακκάση του μύκητα λευκής σήψης *Trametes versicolor* παρουσιάζει παρόμοια χαρακτηριστικά με τις Lac1 και Lac2 με μέγιστη ενεργότητα για pH 3 και 50 °C (Desai & Nityanand, 2011).

Τα μοριακά βάρη προσδιορίστηκαν με πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών και βρέθηκαν 65 και 75 kDA για τη Lac1 και τη Lac2 αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι κοντά στο εύρος τιμών 60-70 kDA που παρουσιάζουν οι περισσότερες μυκητιακές λακκάσες αν και υπάρχουν αναφορές λακκάσων με χαμηλότερα (43 kDA) (Baldrian, 2006) και ψηλότερα (140 kDA) (Rivera-Hoyos et al., 2013) μοριακά βάρη. Επίσης λακκάση που απομονώθηκε από Ασκομύκητα *Cladosporium cladosporioides* είχε μοριακό βάρος 75 kDA (M. Halaburgi, Sharma, Sinha, Singh, & Karegoudar, 2011) όπως και η Lac2.

5.5 Μελέτη της εξειδίκευσης της Lac1 και Lac2 ως προς το υπόστρωμα

Οι δύο λακκάσες παρουσιάζουν διαφορές ως προς την καταλυτική τους δράση, κάτι το οποίο είναι γενικό γνωρισμά αυτής της ομάδας ενζύμων και έχει παρατηρηθεί και στα ισοένζυμα λακκάσης του μύκητα *T. Versicolor* (Svobodová & Cajthaml, 2012). Το υπόστρωμα L-DOPA δεν οξειδώθηκε από καμία από τις δύο λακκάσες αν και υπάρχουν αναφορές πως οξειδώνεται από λακκάσες και τυροσινάσες σε ντοπακινόνη (Tisma, Plazi, Plazi, & Zelic, 2008). Και οι δύο λακκάσες παρουσίασαν βέλτιστη ενεργότητα στα υποστρώματα πυρογαλλόλη και γαλλικό οξύ που είναι όρθο-υποκατεστημένες ενώσεις που περιέχουν 3 υδροξύλια συνδεδεμένα στον αρωματικό

τους δακτύλιο και αποτελούν συνηθισμένα υποστρώματα λακκασών (Afreen et al., 2017; Baldrian, 2006; Dwivedi et al., 2011; Kiiskinen et al., 2004) ενώ οξειδωσαν και τη γουαϊακόλη. Η γουαϊακόλη αναφέρεται βιβλιογραφικά πως οξειδώνεται από τις λακκάσες, και μάλιστα με γρήγορους ρυθμούς αντίδρασης (Bonugli-santos, Durrant, & Sette, 2010), και πως εμφανίζει και επαγωγική δράση σε καλλιέργειες του θαλάσσιου μύκητα *C. unicolor* (Theerachat et al., 2018). Η λακκάση Lac2 δεν κατάφερε να οξειδώσει τα υποστρώματα υδροκινόνη και καφεϊκό οξύ. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί πως σε παρα-υποκατεστημένες ενώσεις όπως η υδροκινόνη παρουσιάζονται μικρότεροι ρυθμοί οξείδωσης (Blaich & Esser, 1975). Αντίστοιχα αργοί ρυθμοί οξείδωσης έχουν αναφερθεί και για το καφεϊκό οξύ αν και ανήκει στις όρθο-υποκατεστημένες φαινολικές ενώσεις (Senthivelan, Kanagaraj, & Panda, 2016) και έχει αναφερθεί πως δρα και ως μεσολαβητής για τις λακκάσες (Nunes & Kunamneni, 2018). Τέλος και τα δύο ένζυμα παρουσίασαν χαμηλή ενεργότητα στην κατεχόλη. Παρόμοια αποτελέσματα από απομονωμένες μυκητιακές λακκάσες έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες ερευνητικές εργασίες (Atalla, Kheiralla, Hamed, Youssry Amani, & Abd El Aty, 2013; Zhao et al., 2012).

5.6 Αποικοδόμηση του PCB 29

Η ικανότητα βιοαποικοδόμησης των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων από μύκητες έχει επανειλημμένα συνδεθεί με τα εξωκυτταρικά οξειδωτικά τους ένζυμα, όπως οι λακκάσες (Takagi et al., 2007). Ενδεικτικά η μείωση των επιπέδων του PCB από το βασιδιομύκητα *Pleurotus Ostreatus* έχει συνδεθεί με την ενεργότητα λακκάσης του μικροοργανισμού (Gayosso-Canales et al., 2012). Η αποικοδόμηση του PCB από τις λακκάσες έχει εξεταστεί με προσθήκη του PCB στο μέσο καλλιέργειας των μικροοργανισμών (Gayosso-Canales et al., 2012; Novotny et al., 2004) αλλά και με αντιδράσεις των απομονωμένων ενζύμων με το ρύπο (Barrios-Estrada et al., 2018; Nakagawa, Sakamoto, Kikuchi, Sato, & Ñ, 2010) αλλά ο μηχανισμός της ενζυμικής αποικοδόμησης των PCBs δεν έχει διελευκανθεί ακόμα (Borja et al., 2005). Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν αντιδράσεις των απομονωμένων λακκασών Lac1 και Lac2 με το ρύπο απουσία μεσολαβητή και παρουσία μεσολαβητή ABTS σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 4,5 στους 35 °C για 20 ώρες. Απουσία μεσολαβητή παρατηρήθηκε παρόμοια ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης του ρύπου γύρω στο

28% και για τις δύο λακκάσες. Παρουσία ABTS η ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης του ρύπου από τη Lac2 αυξήθηκε στο 70,8% που ήταν και το βέλτιστο αποτέλεσμα. Αντιθέτως η προσθήκη ABTS στις αντιδράσεις της λακκάσης Lac1 με το PCB 29 οδήγησε σε μειωμένη μείωση του ρύπου 21,7%. Η παρουσία του ABTS έχει αναφερθεί πως ενισχύει την αποικοδόμηση των υδροξυ-παράγωγων του PCB (OH-PCBs) από απομονωμένες λακκάσες των μυκήτων *Trametes versicolor* και *Pleurotus ostreatus* (Barrios-Estrada et al., 2018; Keum & Li, 2004). Επίσης η παρουσία μεσολαβητών επιτρέπει την οξείδωση πιο υψηλά χλωριωμένων διφαινυλίων από τις λακκάσες (Marco-Urrea & Reddy, 2011).

Κεφάλαιο 6 - Προτάσεις για το μέλλον

Για τις δύο απομονωμένες λακκάσες Lac1 και Lac2 προτείνονται:

- Καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Cladosporium sp.* σε βιοαντιδραστήρα και παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας λακκάσης
- Περαιτέρω βιοχημικός χαρακτηρισμός των δύο λακκασών (κινητικοί παράμετροι, ισηλεκτρικό σημείο, ανάλυση θερμοσταθερότητας, παρεμπόδιση δράσης)
- Αμινοξική αλληλούχιση των δύο πρωτεϊνών
- Μελέτη της ικανότητας τους για αποδόμηση και σε άλλους ρύπους όπως βαφές τύπου αζο και χλωροφαινολικές ενώσεις

Για τη μελέτη της αποικοδόμησης του PCB 29 πρέπει να γίνει προσπάθεια ταυτοποίησης των μεταβολιτών που προκύπτουν από τις αντιδράσεις του PCB 29 με τι απομονωμένες λακκάσες και εύρεση του πιθανού μηχανισμού της αντίδρασης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afreen, S., Shamsi, T. N., Baig, M. A., Ahmad, N., Fatima, S., Qureshi, M. I., ... Fatma, T. (2017). A novel multicopper oxidase (laccase) from cyanobacteria: Purification, characterization with potential in the decolorization of anthraquinonic dye. *PLoS ONE*, *12*(4), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175144>
- Akcil, A., Erust, C., Ozdemiroglu, S., Fonti, V., & Beolchini, F. (2015). A review of approaches and techniques used in aquatic contaminated sediments: Metal removal and stabilization by chemical and biotechnological processes. *Journal of Cleaner Production*, *86*, 24–26. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.08.009>
- Ali, N., Ikramullah, Ghosia, L., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Decolorization of Acid red 151 by *Aspergillus niger* SA1 under different physicochemical conditions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *24*, 1099–1105. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9581-6>
- Anastasi, A., Tigrini, V., & Varese, G. C. (2013). The Bioremediation Potential of Different Ecophysiological Groups of Fungi. In E. M. Goltapeh, Y. R. Danesh, & A. Varma (Eds.), *Fungi as Bioremediators* (pp. 29–49). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33811-3_2
- Arakaki, R. L., Monteiro, D. A., Boscolo, M., Dasilva, R., & Gomes, E. (2014). Halotolerance , ligninase production and herbicide degradation ability of basidiomycetes strains Materials and Methods Fungal cultures HPLC analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(4), 1207–1214.
- Atalla, S., Kheiralla, Z., Hamed, E., Youssry Amani, A., & Abd El Aty, A. (2013). Characterization and kinetic properties of the purified *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *20*, 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.001>
- Ausec, L., Zakrzewski, M., Goesmann, A., Schlutter, A., & Mandic-mulec, I. (2011). Bioinformatic Analysis Reveals High Diversity of Bacterial Genes for Laccase-Like Enzymes. *PLoS ONE*, *6*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025724>
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology*

- Reviews*, 30(2), 215–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
- Barrios-Estrada, C., Rostro-Alanis, M. D. J., Muñoz-gutiérrez, B. D., Iqbal, H. M. N., Kannan, S., & Parra-saldívar, R. (2018). Emergent contaminants : Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review. *Science of the Total Environment*, 612, 1516–1531. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.013>
- Batista-garcía, A., Vinoth, V., Ariste, A., Tovar-herrera, O. E., Savary, O., Peidro-guzm, H., ... Cabana, H. (2017). Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial effluents, 198. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.010>
- Bertrand, B., Martinez-Morales, F., & Trejo-Hernandez, M. R. (2013). Fungal Laccases: Induction and Production. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3), 473–488. <https://doi.org/10.41718/ACP.2013.16.2.6>
- Beyer, A., & Biziuk, M. (2010). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 209, 209. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6883-8>
- Bhatia, D., Sharma, N. R., Singh, J., & Kanwar, R. S. (2017). Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47(19), 1836–1876. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1393263>
- Blaich, R., & Esser, K. (1975). Function of Enzymes in Wood Destroying Fungi II . Multiple Forms of Laccase in White Rot Fungi, 277, 271–277.
- Bonugli-santos, R. C., Durrant, L. R., & Sette, L. D. (2010). Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. *Fungal Biology*, 114(10), 863–872. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.08.003>
- Boopathy R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74(1), 63–67. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3)
- Boopathy, R., & Manning, J. (1999). Surfactant-enhanced bioremediation of soil

- contaminated with 2,4,6- trinitrotoluene in soil slurry reactors. *Water Environment Research*, 71(1), 119–124.
<https://doi.org/10.2175/106143099X121580>
- Boopathy, R., Manning, J., & Kulpa, C. F. (1998). A laboratory study of the bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene- contaminated soil using aerobic/anoxic soil slurry reactor. *Water Environment Research*, 70(1), 80–86.
<https://doi.org/10.2175/106143098X126919>
- Borderies, Á., Stewart, D., Ranocha, P., Mcdougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., ... Goffner, D. (1999). Biochemical characterization , molecular cloning and expression of laccases ± a divergent gene family ± in poplar, 495, 485–495.
- Borja, J., Marie Taleon, D., Auresenia, J., & Gallardo, S. (2005). Polychlorinated Biphenyls and Their Biodegradation. *Process Biochemistry*, 40, 1999–2013.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.006>
- Bourbonnais, R., & Paice, M. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, 267, 99–102.
- Bradford, M. M. (1976). Sistema séptico domiciliario | Rotomoldeo en Colombia Tanques Plasticos En Colombia Rotoplast. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cabana, H., Jiwan, J. L. H., Rozenberg, R., Elisashvili, V., Penninckx, M., Agathos, S. N., & Jones, J. P. (2007). Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere*, 67(4), 770–778. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.037>
- Cañas, A. I., & Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*, 28(6), 694–705. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.002>
- Cavallazzi, J. R. P., Kasuya, C. M., & Soares, M. A. (2005). SCREENING OF INDUCERS

FOR LACCASE PRODUCTION BY LENTINULA EDODES IN LIQUID MEDIUM, 383–387.

- Chakroun, H., Mechichi, T., Jesus, M., Dhouib, A., & Sayadi, S. (2010). Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride* : Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry*, 45(4), 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.009>
- Chaurasia, P. K., Shanker, R., Yadav, S., & Yadava, S. (2013). A review on mechanism of laccase action. *Trade Science Inc*, 7(2), 66–71. Retrieved from www.tsijournals.com%3Earticles%3Ea-review-on-mechanism-of-laccase-action
- Chen, H.-Y., Xue, D., Feng, X.-Y., & Yao, S.-J. (2011). Screening and Production of Ligninolytic Enzyme by a Marine-Derived Fungal *Pestalotiopsis* sp. J63. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165, 1754–1769. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9392-y>
- Chmelova, D., & Ondrejovic, M. (2016). Purification and characterization of extracellular laccase produced by *Ceriporiopsis subvermispora* and decolorization of triphenylmethane dyes. *Journal of Basic Microbiology*, 1173–1182. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600152>
- Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 179(3), 145–150. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0510-7>
- Claus, H. (2004). Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron*, 35(1–2), 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.029>
- Coulon, F., McKew, B. A., Osborn, A. M., McGenity, T. J., & Timmis, K. N. (2007). Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environmental Microbiology*, 9(1), 177–186. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01126.x>
- D’Acunzo, F., & Galli, C. (2002). Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems . Solubility and steric issues Oxidation of phenols by laccase and laccase-

- mediator systems Solubility and steric issues. *European Journal of Biochemistry*, (December 2017), 4–10. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03256.x>
- Da Silva Coelho-Moreira, J., Bracht, A., Souza, A., Oliveira, R., Sá-Nakanishi, A., de Souza, C., & Peralta, R. (2013). Degradation of Diuron by *Phanerochaete chrysosporium*: Role of Ligninolytic Enzymes and Cytochrome P450. *BioMed Research International*, 2013, 251354. <https://doi.org/10.1155/2013/251354>
- Desai, S. S., & Nityanand, C. (2011). Microbial Laccases and their Applications: A Review. *Asian Journal of Biotechnology*, 3(2), 98–124.
- Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., & Purohit, H. J. (2016). Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 56(3), 247–264. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6>
- Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., Hmidi, R., Labat, M., ... Luminy, A. De. (2005). Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 1415–1423. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-5774-z>
- Dittmer, N. T., Suderman, R. J., Jiang, H., Zhu, Y., Gorman, M. J., Kramer, K. J., & Kanost, M. R. (2004). Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.08.003>
- Do Rosario Freixo, M., Karmali, A., & Arteiro, J. M. (2014). Production, purification and characterization of laccase from *Pleurotus ostreatus* grown on tomato pomace. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (March), 245–254. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0813-4>
- Donnelly, P. K., & Fletcher, J. S. (1995). PCB metabolism by ectomycorrhizal fungi. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 507–513. <https://doi.org/10.1007/BF00192592>

- Donoso, C., Becerra, J., Martínez, M., Garrido, N., & Silva, M. (2008). Degradative ability of 2,4,6-tribromophenol by saprophytic fungi *Trametes versicolor* and *Agaricus augustus* isolated from Chilean forestry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(7), 961–968. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9559-4>
- Durairaj, P., Malla, S., Nadarajan, S. P., Lee, P. G., Jung, E., Park, H. H., ... Yun, H. (2015). Fungal cytochrome P450 monooxygenases of *Fusarium oxysporum* for the synthesis of ω -hydroxy fatty acids in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, *14*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0228-2>
- Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P., & Kumar, A. (2011). Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Structure – function relationship among bacterial , fungal and plant laccases. “*Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic,*” *68*(2), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>
- El Enshasy, H. A., Hanapi, S. Z., Abdelgalil, S. A., Malek, R. A., & Pareek, A. (2017). Mycoremediation: Decolourization Potential of Fungal Ligninolytic Enzymes. In R. Prasad (Ed.), *Mycoremediation and Environmental Sustainability: Volume 1* (pp. 69–104). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68957-9_5
- Ellouze, M., & Sayadi, S. (2016). White-Rot Fungi and their Enzymes as a Biotechnological Tool for Xenobiotic Bioremediation. *Management of Hazardous Wastes*. <https://doi.org/10.5772/64145>
- Esterhuizen-Londt, M., Schwartz, K., & Pflugmacher, S. (2016). Using aquatic fungi for pharmaceutical bioremediation: Uptake of acetaminophen by *Mucor hiemalis* does not result in an enzymatic oxidative stress response. *Fungal Biology*, *120*(10), 1249–1257. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.009>
- Field, J., & Sierra-Alvarez, R. (2008). Microbial Transformation and Degradation of Polychlorinated Biphenyls. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, *155*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.10.016>

- Gaviria-Arroyave, M. I., Osorio-Echavarria, J., & Gomez-Vanegas, N. A. (2018). Evaluating the scale-up of a reactor for the treatment of textile effluents using *Bjerkandera* sp. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (88), 80–90. <https://doi.org/10.17533/udea.redin.n88a09>
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2014). Emerging Pollutants in the Environment: Present and Future Challenges in Biomonitoring, Ecological Risks and Bioremediation. *New Biotechnology*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.01.001>
- Gayazov, R., & Rodakiewicz-Nowak, J. (1996). Semi-continuous Production of Laccase by *Phlebia radiata* in Different Culture Media. *Folia Microbiologica*, 41(6), 480–484. <https://doi.org/10.1007/BF02814662>
- Gayosso-Canales, M., Rodríguez-Vázquez, R., Esparza-García, F. J., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2012). PCBs stimulate laccase production and activity in *Pleurotus ostreatus* thus promoting their removal. *Folia Microbiologica*, 57(2), 149–158. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0106-9>
- Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J.-M. (1999). Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal*, 3(1), 1–26. <https://doi.org/10.1080/10889869991219163>
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M. L., & Bally, R. (1993). Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters*, 108(2), 205–210. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06100.x>
- Gomaa, O. M., & Momtaz, O. A. (2015). Copper induction and differential expression of laccase in *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 285–292. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120120118>
- Harkin, J. M., Larsen, M. J., & Obst, J. R. (2013). Mycological Society of America Use of Syringaldazine for Detection of Laccase in Sporophores of Wood Rotting Fungi,

66(3), 469–476.

He, X.-L., Song, C., Li, Y.-Y., Wang, N., Xu, L., Han, X., & Wei, D. (2017). Efficient degradation of Azo dyes by a newly isolated fungus *Trichoderma tomentosum* under non-sterile conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *150*, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.043>

Hikorokuro, Y. (1883). LXIII.- Chemistry of Lacquer (urushi). *Journal of the American Chemical Society*, *43*(47), 472–486.

Jaber, S., Md Shah, U. K., Mohamed, A. Z., & Ariff, A. (2017). Optimization of Laccase Production by Locally Isolated *Trichoderma muroiana* IS1037 Using Rubber Wood Dust as Substrate. *Bioresources*, *12*, 3834–3849. <https://doi.org/10.15376/biores.12.2.3834-3849>

Kahng, S., Copus, J., & Wagner, D. (2014). Recent advances in the ecology of mesophotic coral ecosystems (MCEs). *Current Opinion in Environmental Sustainability*, *7*, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2013.11.019>

Kahng, S. E., Spalding, H. L., Brokovich, E., Wagner, D., Weil, E., Hinderstein, L., & Toonen, R. J. (2010). Community ecology of mesophotic coral reef ecosystems, 255–275. <https://doi.org/10.1007/s00338-010-0593-6>

Karigar, C. S., & Rao, S. S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. *Enzyme Research*, *2011*(1). <https://doi.org/10.4061/2011/805187>

Kawai, S. (1990). DEGRADATION OF PHENOLIC LIGNIN MODEL COMPOUNDS BY LACCASE OF *OORIOLOUS VERSICOLOR*. In *DEGRADATION MECHANISMS OF LIGNIN SUBSTRUCTURE MODEL COMPOUNDS BY CORIOLOUS VERSICOLOR* (pp. 71–81). Kyoto University Research Information Repository. <https://doi.org/10.14989/doctor.r7099>

Kennedy, J., O’Leary, N. D., Kiran, G. S., Morrissey, J. P., O’Gara, F., Selvin, J., & Dobson, A. D. W. (2011). Functional metagenomic strategies for the discovery of

- novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *Journal of Applied Microbiology*, 111(4), 787–799.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05106.x>
- Keum, Y. S., & Li, Q. X. (2004). Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls, 56, 23–30.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.02.028>
- Khelifi, R., Belbahri, L., Woodward, S., Ellouz, M., Dhouib, A., Sayadi, S., & Mechichi, T. (2010). Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1–3), 802–808.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.079>
- Kiiskinen, L., Kruus, K., & Ratto, M. (2004). Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology*, 640–646.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02348.x>
- Klonowska, A., Gaudin, C., Fournel, A., Asso, M., Le Petit, J., Giorgi, M., & Tron, T. (2002). Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete c30. *European Journal of Biochemistry*, 269(24), 6119–6125.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03324.x>
- Kumar, A., Bisht, B. S., Joshi, V. D., & Dhewa, T. (2011). Review on Bioremediation of Polluted Environment : A Management tool. *International Journal of Environmental Science*, 1(6), 1079–1093. <https://doi.org/Article>
- Kumar, S. V. S., Phale, P. S., Durani, S., & Wangikar, P. P. (2003). Combined Sequence and Structure Analysis of the Fungal Laccase Family. *Biotechnology and Bioengineering*, 5(57). <https://doi.org/10.1002/bit.10681>
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, 7(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-32>
- Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). Laccases and Their

- Applications: A Patent Review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2(1), 10–24.
<https://doi.org/10.2174/187220808783330965>
- Lakshmanan M, D., K Prasanth, G., & Sadasivan, C. (2014). Potential of the salt-tolerant laccase-producing strain *Trichoderma viride* Pers. NFCCI-2745 from an estuary in the bioremediation of phenol-polluted environments. *Journal of Basic Microbiology*, 54. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200394>
- Lawton, T. J., & Rosenzweig, A. C. (2011). *Detection and Characterization of a Multicopper Oxidase from Nitrosomonas europaea*. *Methods in Enzymology: Research on Nitrification and Related Processes Part B* (1st ed., Vol. 496). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386489-5.00017-8>
- Levin, L., Viale, A., & Forchiassin, A. (2003). Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00091-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00091-4)
- Li, L., Singh, P., Liu, Y., Pan, S., & Wang, G. (2014). Diversity and biochemical features of culturable fungi from the coastal waters of Southern China. *AMB Express*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0060-9>
- Lima, R. N., & Porto, A. L. M. (2016). *Recent Advances in Marine Enzymes for Biotechnological Processes*. *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 78). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.06.005>
- M. Halaburgi, V., Sharma, S., Sinha, M., Singh, T., & Karegoudar, T. B. (2011). Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochemistry*, 46, 1146–1152. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.002>
- M Ko, E., Y.-E, L., & Choi, H. (2001). Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 98–102.
<https://doi.org/10.1007/s002530100727>

- Magan, N., Fragoeiro, S., & Bastos, C. (2010). Environmental Factors and Bioremediation of Xenobiotics Using White Rot Fungi. *Mycobiology*, 38(4), 238. <https://doi.org/10.1093/nq/156.18.318-k>
- Malkin, R., Malmström, B. G., & Vänngård, T. (1969). The Reversible Removal of one Specific Copper(II) from Fungal Laccase. *European Journal of Biochemistry*, 7(2), 253–259. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb19600.x>
- Marco-Urrea, E., & Reddy, C. (2011). Degradation of Chloro-organic Pollutants by White Rot Fungi. In *Microbial Degradation of Xenobiotics* (pp. 31–66). https://doi.org/10.1007/978-3-642-23789-8_2
- Martins, L. M., Duraó, P., Brissos, V., & Lindley, P. F. (2015). Laccases of prokaryotic origin : enzymes at the interface of protein science and protein technology. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1822-x>
- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase : new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, 551–565.
- McCaig, B. C., Meagher, R. B., & Dean, J. F. D. (2005). Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 221(5), 619–636. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1472-6>
- McFarland, V. A., & Clarke, J. U. (1989). Environmental Occurrence , Abundance , and Potential Toxicity of Polychlorinated Biphenyl Congeners : Considerations for a Congener-Specific Analysis. *Environmental Health Perspectives*, 81, 225–239.
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., & Yaropolov, A. I. (2007). “Blue” laccases. *Biochemistry (Moscow)*, 72(10), 1136–1150. <https://doi.org/10.1134/S0006297907100112>
- Morozova, O. V, Shumakovich, G. P., Shleev, S. V, & Yaropolov, Y. I. (2007). Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5), 523–535. <https://doi.org/10.1134/S0003683807050055>

- Mouhamadou, B., Faure, M., Sage, L., Marçais, J., Souard, F., & Geremia, R. (2013). Potential of autochthonous fungal strains isolated from contaminated soils for degradation of polychlorinated biphenyls. *Fungal Biology*, *117*, 268–274. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.02.004>
- Nakade, K., Nakagawa, Y., Yano, A., Konno, N., Sato, T., Sakamoto, Y., & Avery, S. (2012). Effective induction of pblac1 laccase by copper ion in *Polyporus brumalis* ibrc05015. *Fungal Biology*, *117*(1), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.11.005>
- Nakagawa, Y., Sakamoto, Y., Kikuchi, S., Sato, T., & A, A. Y. (2010). A chimeric laccase with hybrid properties of the parental *Lentinula edodes* laccases. *Microbiological Research*, *165*(5), 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.08.006>
- Nikolaivits, E., Dimarogona, M., Fokialakis, N., & Topakas, E. (2017). Marine-derived biocatalysts: Importance, accessing, and application in aromatic pollutant bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, *8*(FEB), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00265>
- Novotny, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E., & Sasek, V. (2004). Ligninolytic fungi in bioremediation : extracellular enzyme production and degradation rate \check{e} ne \check{a} s. *Soil Biology & Biochemistry*, *36*, 1545–1551. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.019>
- Nunes, C. S., & Kunamneni, A. (2018). *Laccases-properties and applications. Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00007-1>
- O’Sullivan, G., & Megson, D. (2013). *Brief Overview: Discovery, Regulation, Properties, and Fate of POPs. Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59424-2.00001-3>
- Olson, J., & A Kellogg, C. (2010). Microbial ecology of corals, sponges, and algae in mesophotic coral environments. *FEMS Microbiology Ecology*, *73*, 17–30. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00862.x>

- Osman, D., & Cavet, J. S. (2008). *Copper Homeostasis in Bacteria*. *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 65). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00608-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00608-4)
- Otto, B., & Schlosser, D. (2015). First laccase in green algae : Purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from *Tetracystis aeria*, (August 2014). <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2144-9>
- Palmieri, G., Cennamo, G., & Sannia, G. (2005). Remazol Brilliant Blue R Decolourisation by the Fungus *Pleurotus ostreatus* and Its Oxidative Enzymatic System. *Enzyme and Microbial Technology*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.026>
- Panno, L., Bruno, M., Voyron, S., Anastasi, A., Gnani, G., Miserere, L., & Varese, G. C. (2013). Diversity, ecological role and potential biotechnological applications of marine fungi associated to the seagrass *Posidonia oceanica*. *New Biotechnology*, 30(6), 686–694. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.01.010>
- Park, J. W., Park, B. K., & Kim, J. E. (2006). Remediation of soil contaminated with 2,4-dichlorophenol by treatment of minced shepherd's purse roots. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50(2), 191–195. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0119-8>
- Passarini, M. R. Z., Ottoni, C. A., Santos, C., Lima, N., & Sette, L. D. (2015). Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 and *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330. *AMB Express*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0106-7>
- Passatore, L., Rossetti, S., Juwarkar, A. A., & Massacci, A. (2014). Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): State of knowledge and research perspectives. *Journal of Hazardous Materials*, 278, 189–202. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.051>
- Patel, S., Kalia, V., Choi, J.-H., Haw, J., Kim, I.-W., & Lee, J.-K. (2014). Immobilization of Laccase on SiO₂ Nanocarriers Improves Its Stability and Reusability. *Journal of*

Microbiology and Biotechnology, 24. <https://doi.org/10.4014/jmb.1401.01025>

Quensen, J. F., Tiedje, J. M., & Boyd, S. A. (2010). Reductive dechlorination. *Annual Review of Microbiology*, 242(Vc), 10–11.

Raghukumar, C., D'Souza-Ticlo, D., & Verma, A. K. (2008). Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: An emerging role of marine-derived fungi. *Critical Reviews in Microbiology*, 34(3–4), 189–206.
<https://doi.org/10.1080/10408410802526044>

Reineke, W., & Knackmuss, H. J. (1988). Microbial degradation of haloaromatics. *Annual Review of Microbiology*, 42, 263–287.

Rezaei, S., Shahverdi, A. R., & Faramarzi, M. A. (2017). Isolation , one-step affinity purification , and characterization of a polyextremotolerant laccase from the halophilic bacterium *Aquisalibacillus elongatus* and its application in the delignification of sugar beet pulp. *Bioresource Technology*, 230, 67–75.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.036>

Ritter, L., Solomon, K. R., & Forget, J. (1995). A REVIEW OF SELECTED PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS, (December). [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(74\)80007-2](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(74)80007-2)

Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24(5), 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.03.006>

Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Delgado-Boada, J. M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, 27(3–4), 67–82.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>

Rodríguez-Couto, S. (2012). A promising inert support for laccase production and decolouration of textile wastewater by the white-rot fungus *Trametes pubescens*. *Journal of Hazardous Materials*, 233, 158–162.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.07.003>

- Ruiz-Aguilar, G., M. Fernández-Sánchez, J., Rodríguez-Vázquez, R., & Poggi-Varaldo, H. (2002). Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Advances in Environmental Research - ADV ENVIRON RES*, 6, 559–568. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(01\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(01)00102-2)
- Safe, S. H. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 24(2), 87–149. <https://doi.org/10.3109/10408449409049308>
- Santhanam, N., Vivanco, J. M., Decker, S. R., & Reardon, K. F. (2011). Expression of industrially relevant laccases: Prokaryotic style. *Trends in Biotechnology*, 29(10), 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.005>
- Secretariat of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. (2009). STOCKHOLM CONVENTION ON (POPs) Text and Annexes as amended. *United Nations Environment Programme (UNEP) International Environment House 11–13, Chemin Des Anémones CH-1219, Châtelaine Geneva, Switzerland* Ssc@pops.Int – [Www.Pops.Int](http://www.Pops.Int).
- Senthivelan, T., Kanagaraj, J., & Panda, R. C. (2016). Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21(1), 19–38. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0278-7>
- Si, J., Peng, F., & Cui, B. (2013). Purification , biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. *Bioresource Technology*, 128, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.085>
- Su, J., Fu, J., Wang, Q., Silva, C., & Cavaco-Paulo, A. (2018). Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 294–307. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354353>
- Subramanian, J., Ramesh, T., & Kalaiselvam, M. (2014). Fungal Laccases – Properties

and Applications : A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 5(2), 8–16.

Svobodová, K., & Cajthaml, T. (2012). Laccase activity profiling and gene expression in PCB-degrading cultures of *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 71, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.03.005>

Takagi, S., Shirota, C., Sakaguchi, K., Suzuki, J., Sue, T., Nagasaka, H., ... Sonoki, S. (2007). Exoenzymes of *Trametes versicolor* can metabolize coplanar PCB congeners and hydroxy PCB. *Chemosphere*, 67(9), 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.090>

Taşpinar, A., & Kolankaya, N. (1998). Optimization of Enzymatic Chlorine Removal from Kraft Pulp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 15–21. <https://doi.org/10.1007/s001289900723>

Theerachat, M., Guieysse, D., Morel, S., Remaud-Siméon, M., & Chulalaksananukul, W. (2018). Laccases from Marine Organisms and Their Applications in the Biodegradation of Toxic and Environmental Pollutants: a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1–29. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2829-9>

Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140(1 994), 19–26. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu024>

Tisma, M., Plazl, I., Plazi, P., & Zelic, B. (2008). Modelling of L-DOPA Oxidation Catalyzed by Laccase. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, (February), 307–313.

Tišma, M., Zelić, B., & Vasić-Rački, Đ. (2010). White-rot fungi in phenols, dyes and other xenobiotics treatment – a brief review. *Croat. J. Food Sci. Technol*, 2(2), 34–47.

Todd, J., & Dean, J. F. D. (2004). Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*, 42, 27–33.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.10.011>

Ulčnik, A., Cigić, I., & Pohleven, F. (2013). Degradation of lindane and endosulfan by fungi, fungal and bacterial laccases. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1389-y>

Upadhyay, P., Shrivastava, R., & Agrawal, P. K. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3>

Vacondio, B., Birolli, W., Ferreira, I., H.R. Selegim, M., Gonçalves, S., Vasconcellos, S., & L.M. Porto, A. (2015). Biodegradation of pentachlorophenol by marine-derived fungus *Trichoderma harzianum* CBMAI 1677 isolated from ascidian *Didemnum ligulum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.03.005>

Varjani, S. J., & Patel, R. K. (2017). Fungi: A Remedy to Eliminate Environmental Pollutants. In R. Prasad (Ed.), *Mycoremediation and Environmental Sustainability: Volume 1* (pp. 53–67). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68957-9_4

Vidali, M. (2001). Bioremediation . An overview *. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163–1172.

Virk, A. P., Sharma, P., & Capalash, N. (2012). Use of laccase in pulp and paper industry. *Biotechnology Progress*, 28(1), 21–32. <https://doi.org/10.1002/btpr.727>

WWF. (2017). Toxic Chemicals.

Zeng, S., Qin, X., & Xia, L. (2017). Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. *Biochemical Engineering Journal*, 119, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.016>

Zhao, D., Zhang, X., Cui, D., & Zhao, M. (2012). Characterisation of a Novel White Laccase from the Deuteromycete Fungus *Myrothecium verrucaria* NF-05 and Its Decolourisation of Dyes. *PLoS ONE*, 7(6).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038817>

Zhuo, R., Yu, H., Yuan, P., Fan, J., Chen, L., Li, Y., & Ma, F. (2018). Heterologous expression and characterization of three laccases obtained from *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 for removal of environmental pollutants. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 499–510.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.055>

Zoppellaro, G., Huang, H.-W., & Sakurai, T. (2000). Kinetic studies on the reaction of the fully reduced laccase with dioxygen.pdf. *Inorganic Reaction Mechanisms*, 2(2), 79–84.

Πουλάς, Κ., & Σιδέρης, Σ. (2015). *Εργαστηριακές Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών*.

ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ.