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

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων με ενεργότητα νιτριλάσης από θαλάσσιους μυκητιακούς συμβιώτες μεσόφωτων ασπόνδυλων

Παναγιωτοπούλου Μαργαρίτα

Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος,

επίκουρος καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2018

Αφιερωμένη στους γονείς μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείο υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή κύριου Ευάγγελου Τόπακα. Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης της ερευνητικής διαδικασίας και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνετέλεσαν στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή του Ε.Μ.Π κύριο Ευάγγελο Τόπακα, επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την επιτυχημένη συνεργασία μας. Πρόκειται για έναν καθηγητή με άριστη κατάρτιση στον τομέας της Βιοτεχνολογίας και αξιοσημείωτο ερευνητικό έργο. Η ευκαιρία να δουλέψω υπό την επίβλεψη του και στο περιβάλλον ενός τόσο ενεργού εργαστηρίου με τιμά προσωπικά και τον ευχαριστώ για αυτό.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον υποψήφιο διδάκτορα του Ε.Μ.Π Ευστράτιο Νικολάιβιτς για το ειλικρινές ενδιαφέρον του και την άψογη συνεργασία μας. Η καθοδήγησή του ήταν καθοριστικής σημασίας για την πρόοδο και τη βελτίωσή μου πάνω στο συγκεκριμένο θέμα. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα που μοιράσθηκε μαζί μου την ερευνητική του εμπειρία και τις γνώσεις του, όπως επίσης και για την υπομονή που έδειξε στην έλλειψη εργαστηριακής μου πείρας. Η παρούσα εργασία δε θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς τη συνδρομή του.

Δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας που διαμόρφωσαν ένα κλίμα συνεργασίας καθώς και για τη φιλική και συμβουλευτική τους διάθεση απέναντι σε μένα προσωπικά αλλά και σε όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που μέσα από προσωπικές θυσίες και απεριόριστη υπομονή με στήριξαν με αγάπη και κατανόηση κατά τη διάρκεια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ικανότητας μυκήτων προερχόμενων από θαλάσσια ασπόνδυλα της μεσόφωτης ζώνης για αποικοδόμηση του αδιπονιτριλίου, του ακετονιτριλίου και της 2- αμινο-3-χλώρο-5-κυανοπυριδίνης. Έγινε προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού με τον οποίο πραγματοποιείται η υδρόλυση των νιτριλίων παρακολουθώντας τόσο αυτήν καθεαυτή τη μείωσή τους όσο και την παραγόμενη απ' τη διάσπαση αμμωνία αλλά και με τον προσδιορισμό των ενζυμικών ενεργοτήτων που εκφράζουν.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της διαλογής (screening) με σκοπό την ανάδειξη των αποτελεσματικότερων μυκητιακών στελεχών για την αποικοδόμηση του αδιπονιτριλίου (αρχικής συγκέντρωσης 45 mM). Συγκεκριμένα έγινε ανάπτυξη τους σε διάλυμα αλάτων με μοναδική πηγή αζώτου και άνθρακα το νιτρίλιο αυτό και ανίχνευση της συγκέντρωσης της παραγόμενης από την υδρόλυση του, αμμωνίας. Σε 14 από τα 70 στελέχη η παραγωγή αμμωνίας βρέθηκε μεγαλύτερη ή ίση του 1mM με μόνο το στέλεχος 230-6 να δίνει 8,6 mM, τιμή 2,5 φορές υψηλότερη από το επόμενο σε παραγωγή αμμωνίας στέλεχος, ύστερα από 4 ημέρες.

Ακολούθησαν μελέτες για το στέλεχος αυτό, που ταυτοποιήθηκε ως *Penicillium citreonigrum,* σε δείγματα απευθείας από το μέσο ανάπτυξης όπως έγινε και στη διαλογή (διεργασία με ολόκληρα κύτταρα). Πραγματοποιήθηκε σε βάθος 18 ημερών μέτρηση της παραγόμενης αμμωνίας με την παράλληλη καταγραφή της μείωσης του αδιπονιτριλίου που χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα μέσω συσκευής Αέριας Χρωματογραφίας. Παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του υποστρώματος ενώ αντίστοιχα η παραγωγή αμμωνίας έδειξε αύξηση με το χρόνο με πειραματική αναλογία κατανάλωσης/παραγωγή: 1/1.3. Η υψηλότερη συγκέντρωση αμμωνίας που ανιχνεύθηκε ήταν 25 mM ενώ το αδιπονιτρίλιο ελαττώθηκε συνολικά κατά 41 % από την αρχική του συγκέντρωση. Ακόμα, η μέτρηση της τελικής βιομάζας έδειξε ότι η παρουσία υποστρώματος αδιπονιτριλίου οδήγησε σε διπλασιασμό της. Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για την 2-αμινο-3-χλώρο-5-

κυανοπυριδίνη που ώστόσο δεν κατάφερε να υδρολυθεί και να καταναλωθεί από τα κύτταρα.

Επιπλέον διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν για την μελέτη της ενζυμικής ενεργότητας νιτριλάσης με αξιοποίηση του εσωκυτταρικού υγρού. Σε πρώτη φάση εξετάστηκε η επίδραση της παρουσίας Mg^{2+}. Η μελέτη έδειξε ενζυμική ενεργότητα 18,5 U/g πρωτεΐνης με το μεταλλοκατιόν ενώ απουσία αυτού ήταν μηδενική.

Τέλος δημιουργήθηκαν αντιδράσεις με το ένζυμο παρουσία του αδιπονιτριλίου και του ακετονιτριλίου ως υποστρώματα. Παρατηρήθηκε ότι στον ίδιο χρόνο αντίδρασης το ακετονιτρίλιο υδρολύεται περισσότερο από το αδιπονιτρίλιο με την ενζυμική ενεργότητα να προκύπτει κατά 55 % υψηλότερη με υπόστρωμα 2 mM ACN σε σχέση με το AdN ίδιας συγκέντρωσης.

Abstract

The purpose of this diploma thesis was to study the ability of marine-derived fungi from mesophotic zones to decompose adiponitrile, acetonitrile and 2-amino-3-chloro-5-cyanopyridine. An attempt has been made to understand the mechanism by which the hydrolysis of nitriles is taking place by monitoring both their own concentration decreaze and the ammonia produced but also with the determination of the enzymatic actions they express.

First of all, the screening procedure was performed to evaluate the most effective fungal strains for the degradation of adiponitrile (initial concentration 45 mM). Specifically, they were developed in a mineral medium with the nitrile as the sole source of nitrogen and carbon and the concentration of ammonia produced by its hydrolysis was detected. In 14 of the 70 strains ammonia production was found to be greater than 1 mM with only strain 230-6 giving 8.6 mM, 2.5 times higher than the second most capable strain, after 4 days.

Further studies on this strain, that was identified as *Penicillium citreonigrum*, followed, in samples directly from the mineral medium, as in the screening (whole cell processing). The measurement of the ammonia produced was carried out for longer times (for 429 hours) with the parallel recording of the concentration decrease of adiponitrile used as a substrate using Gas Chromatography. A gradual decrease in the substrate was observed, while ammonia production showed an increase over time with an experimental consumption/production ratio of 1/1.3. The highest ammonia concentration detected was 25 mM whereas adiponitrile declined by 41% from its initial concentration. Moreover, measurment of the final biomass showed that the presence of adiponitrile as a substrate led to doubling its initial weight. The same procedure was followed for 2-amino-3-chloro-5-cyanopyridine which, however, failed to be hydrolysed and consumed by the cells.

Additional processes were performed to study the nitrilase activity by utilizing the intracellular fluid. The effect of the presence of Mg^{2+} was first examined. The study showed an enzymatic activity of 18.5 U/g of protein while with its absence no activity was detected after 24 hours of reaction.

Finally, reactions were created with the enzyme in the presence of adiponitrile and acetonitrile as substrates. It was observed that at the same reaction time acetonitrile's hydrolysis was greater than adiponitrile's with the enzyme activity being 55% higher with a 2mM ACN substrate relative to the same AdN concentration.

Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά των μυκήτων 3

1.2 Θαλάσσιοι μικροοργανισμοί 4

1.2.1 Προέλευση - Κατανομή: 5

1.3 Θαλάσσια προερχόμενοι μύκητες 8

1.3.1 Κατανομή 8

1.3.2 Ιστορικά στοιχεία: 11

1.4 Προϊόντα θαλάσσιων μυκήτων και η δράση τους: 13

1.5 Ενζυμα παραγόμενα από θαλάσσια προερχόμενους μύκητες 17

1.6 Νιτρίλια: Ενώσεις με κυανιούχο ομάδα (Τριπλός δεσμός άνθρακα- αζώτου) 19

1.6.1 Ορισμός- Μηχανισμοί: 19

1.6.2 Επικινδυνότητα 21

1.6.3 Αδιπονιτρίλιο 22

1.6.4 2-amino-3-chloro-5-cyanopyridine 24

1.6.5 Ακετονιτρίλιο 25

1.7 Βιοεξυγίανση 27

1.8 Νιτριλάσες 31

1.8.1 Μυκητιακές Νιτριλάσες 34

1.8.2 Δομή και καταλυτικές ιδιότητες νιτριλάσης 36

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 41

2.1 Υλικά 43

2.1.1 Μικροοργανισμοί 43

2.1.2 Θρεπτικό Υλικό 44

2.1.3 Υποστρώματα 44

2.1.4 Συσκευές – Όργανα – Αναλώσιμα 45

2.1.5 Εμπορικά ένζυμα 47

2.1.6 Ρυθμιστικά Διαλύματα 47

2.2 Μέθοδοι 49

2.2.1 Διαλογή μικροοργανισμών (screening) 49

2.2.1.1 Ανίχνευση αμμωνίας 50

2.2.2 Καλλιέργειες 52

2.2.2.1 Στερεές Καλλιέργειες 52
2.2.2.2 Υγρές Καλλιέργειες 53
2.2.3 Μεταφορά και ανάπτυξη βιομάζας σε ΜΜ με υπόστρωμα νιτριλίου. 54
2.2.4 Διαδικασία Παραλαβής κυττάρων από το ΜΜ 55
2.2.5 Διαδικασία Λύσης κυττάρων 55
2.2.5.1 Πρώτο στάδιο: Διάρρηξη κυτταρικού τοιχώματος (ενζυμικά) 55
2.2.5.2 Δεύτερο στάδιο: Μηχανική Λύση κυτταρικών μεμβρανών με υπερήχους 56
2.2.6 Μελέτη ενζυμικής δράσης 57
2.2.6.1 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας 58
2.2.7 Μελέτη της επίδρασης της παρουσίας Mg^{2+} στην ενζυμική ενεργότητα. 58
2.2.8 Ανάλυση με Χρωματογραφικές Μεθόδους 60
2.2.8.1 Αέρια Χρωματογραφία (GC) 60
2.2.8.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Ανάλυσης (HPLC) 65
2.2.9 Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών 68
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 71
3.1 Διαλογή Μικροοργανισμών (screening) 73
3.2 Μελέτη της ικανότητας αποικοδόμησης αδιπονιτριλίου από τον *P. citreonigrum* 76
3.3 Περαιτέρω διερεύνηση της αποδόμησης Αδιπονιτριλίου 78
3.3.1 Με ανάλυση σε Αέριο Χρωματογράφο 78
3.3.2 Με χρήση της μεθόδου ανίχνευσης NH_3 80
3.3.3 Συσχέτιση αποτελεσμάτων GC-Ανίχνευσης NH_3 82
3.4 Αξιολόγηση παραγόμενης βιομάζας 84
3.5 Μελέτη της επίδρασης της παρουσίας $MgCl_2$ στην ενζυμική ενεργότητα 85
3.6 Μελέτη ενζυμικής υδρόλυσης ακετονιτριλίου και αδιπονιτριλίου 89
ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 93
4.1 Διαλογή μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση του αδιπονιτριλίου 95
4.2 Περαιτέρω ανάλυση του επιλεγμένου στελέχους 230-6 98
4.2.1 Με βάση τα χαρακτηριστικά του 98
4.2.2 Με βάση την ικανότητα βιοαποδόμησης των νιτριλίων που μελετήθηκαν 99
4.3 Επίδραση του Mg^{2+} στην ενζυμική δράση 101
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 103

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Θεωρητικό Μέρος

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά των μυκήτων

Οι μύκητες συγκροτούν ένα από τα έξι βασίλεια των έμβιων όντων (Cavallier-Smith, 1998),και μάλιστα το δεύτερο μεγαλύτερο μετά από αυτό των εντόμων και παρουσιάζουν μοναδικά φυσιολογικά, μορφολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά. Πρόκειται για ευκαρυωτικούς οργανισμούς, που μπορούν να επιβιώσουν στον αέρα, το έδαφος ή το νερό. Όσον αφορά στην μορφολογία τους, περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα με κύριο δομικό συστατικό τον πολυσακχαρίτη χιτίνη (Blackwell, Vilgalys, et al., 2012). Επιπλέον η έλλειψη χλωροπλαστών στο εσωτερικό των κυττάρων -με αποτέλεσμα την αδυναμία διεξαγωγής φωτοσύνθεσης- τους καθιστά ετερότροφους που λαμβάνουν έτοιμες οργανικές ενώσεις που τους είναι απαραίτητες από άλλους οργανισμούς. Ανάλογα με τον τρόπο θρέψης διακρίνονται σε: σαπρόφυτα όταν χρησιμοποιούν ως τροφή, νεκρή οργανική ύλη (αποικοδομητές) και παράσιτα όταν χρησιμοποιούν σαν ξενιστή κάποιο φυτό ή ζώο πάνω στο οποίο ζουν και τρέφονται από αυτό. Κάποιοι μύκητες μπορεί να προκαλέσουν παθογένεια στο ξενιστή ενώ υπάρχουν και οι συμβιώτες που ενδέχεται να είναι ευεργετικοί για το ζώο ή το φυτό όπου αναπτύσσονται (π.χ. μυκόρριζες→ συμβίωση με ρίζες φυτών) (Carris et al., 2012)

Μια ακόμα κατηγοριοποίηση των μυκήτων είναι σε μονοκύτταρους και πολυκύτταρους. Στην πρώτη περίπτωση περιλαμβάνονται οι βλαστομύκητες ή ζυμομύκητες που αποτελούνται από ένα μοναδικό κύτταρο σφαιρικού ή ωοειδούς σχήματος και στον δεύτερο τύπο ανήκουν οι νηματοειδείς ή μυκηλιακοί μύκητες που δημιουργούν υφές και εξελίσσονται σε λεπτές διακλαδώσεις. Τέλος υπάρχουν οι δίμορφοι μύκητες που ανάλογα με τις συνθήκες μπορεί να αναπτυχθούν είτε ως ζύμες είτε με υφές. Μια τελευταία γενική κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών αυτών είναι ως προς τον τρόπο αναπαραγωγής τους σε αγενή ή μονογονικό και εγγενή ή αμφιγονικό (Carris et al., 2012, Πετρίδου, 2017)

Είναι αβέβαιο σήμερα πόσα ακριβώς είναι τα είδη μυκήτων στη Γη, ωστόσο εκτιμάται ότι ανέρχονται στα 1, 5 εκατομμύρια με περίπου 99.000 (Blackwell, 2011,

Hawksworth, 1991) τουλάχιστον να έχουν χαρακτηριστεί. Αυτό συνεπάγεται ότι μόλις ένα 6 με 7 % των οργανισμών αυτών έχει ανακαλυφθεί σήμερα, κι επομένως είναι πολύ μικρή η γνώση για το βασίλειό τους και μακρύς ο δρόμος για την διερεύνησή τους. Αυτό σημαίνει ότι οι μύκητες θα μπορούσαν στο μέλλον να αποτελέσουν πηγή μιας τεράστιας ποικιλίας χημικών ουσιών, ενζύμων και άλλων φυσικών προϊόντων προσφέροντας νέες δυνατότητες σε διάφορους τομείς όπως η ιατρική, η φαρμακευτική, η βιομηχανία τροφίμων κ.α. Φυσικά εδώ και πολλά χρόνια οι αναγνωρισμένοι μύκητες προσφέρουν στους παραπάνω τομείς, όπως ο *Saccharomyces cerevisiae* στα τρόφιμα, ο *Penicillium notatum* από τον οποίο προέρχεται η πενικιλίνη και άλλοι με σπουδαία συμβολή στην παραγωγή αντικαρκινικών ουσιών, βιταμινών κ.τ.λ. Ωστόσο πρέπει να τονιστεί ότι πολλά από τα είδη των μυκήτων που υπάρχουν στον κόσμο ενδέχεται να εξαφανιστούν πριν την ανακάλυψή τους, λόγω της γενικότερης καταστροφής του περιβάλλοντος και του συνακόλουθου αφανισμού φυτών και ζώων που συνιστούν ξενιστές για τους μικροοργανισμούς αυτούς.

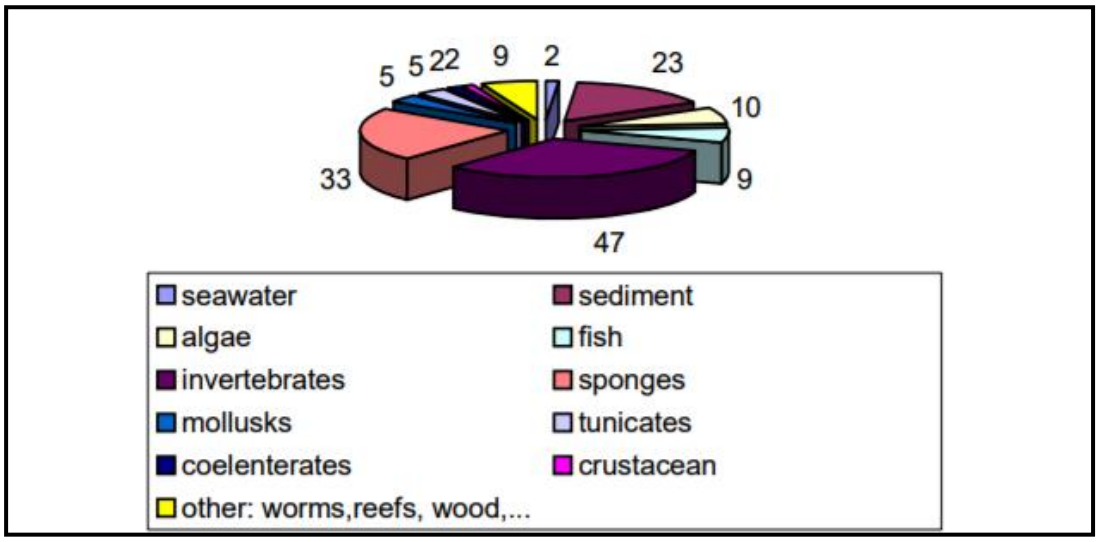
1.2 Θαλάσσιοι μικροοργανισμοί

Όπως είναι γνωστό, το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας της Γης καλύπτεται από νερό, σχηματίζοντας τα ποτάμια, τις θάλασσες, τους ωκεανούς. Η ποικιλομορφία δε των οργανισμών που ζουν στα θαλάσσια οικοσυστήματα είναι τεράστια. Μεταξύ αυτών, οι θαλάσσιες μικροβιακές κοινότητες αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι στον κύκλο της ζωής, συμμετέχοντας στους βιοχημικούς κύκλους (διεργασίες αποικοδόμησης νεκρής οργανικής ύλης, ανακύκλωση θρεπτικών στοιχείων κ.α.) (Bonugli- Santos et al., 2015). Λόγω δε του γεγονότος ότι εδώ και πολλές δεκαετίες οι έρευνες των χημικών και φυσικών προϊόντων επικεντρωνόταν στους θαλάσσιους μακροοργανισμούς, οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί ερευνήθηκαν όχι τόσο διεξοδικά. Παράλληλα βάσει ερευνών έχει αποδειχθεί ότι πολλοί από τους μεταβολίτες που απομονώθηκαν από τους μακροοργανισμούς αυτούς έχουν βιοσυντεθεί από συμβιωτικούς μικροοργανισμούς (Simmons & Gerwick, 2008). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη δυνατότητα που προσφέρουν για εύκολη

καλλιέργεια τους χωρίς τη διαταραχή του θαλάσσιου οικοσυστήματος δίνει ακόμα μεγαλύτερο κίνητρο για την βαθύτερη μελέτη τους.

1.2.1 Προέλευση - Κατανομή:

Οι ωκεανοί και γενικότερα τα θαλάσσια οικοσυστήματα διαθέτουν την πιο μεγάλη ποικιλία ειδών με πάνω από 200.000 ασπόνδυλα και άλγη (Li, 2007) που αποτελούν ''βιότοπο'' για εκατομμύρια μικροοργανισμούς. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το ακόλουθο διάγραμμα (Εικόνα 1.2.1):

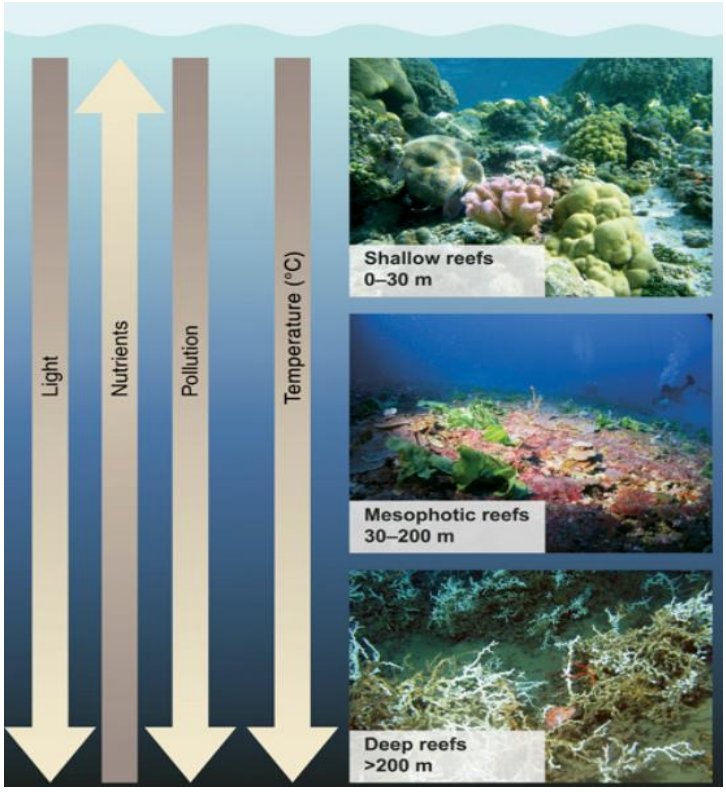


Εικόνα 1.2.1: *Προέλευση των μικροοργανισμών (προσαρμόστηκε από Li 2007)*

Όπως φαίνεται τα ασπόνδυλα κυριαρχούν ως πηγές θαλάσσιων μικροβίων με ποσοστό 47 % έναντι των ψαριών (9 %) , ξυλωδών υποστρωμάτων (9 %) και φυκών (10 %). Πιο συγκεκριμένα το ποσοστό των ασπόνδυλων αναλύεται σε: μαλάκια (mollusks) 5 %, κοιλέντερα (coelenterates: φέρουν κεραίες ή/και πλοκάμια) 2 %, χιτωνόζωα (tunicates) 5 %, οστρακόδερμα (crustacean) 2 % και σπόγγους (sponges) που αποτελούν και την κυριότερη πηγή με ποσοστό 33 % των ασπόνδυλων.

Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στα τα μεσόφωτα κοραλλιογενή συστήματα (MCEs) που ενώ συνιστούν μία τεράστια αποθήκη βιοποικιλότητας ωστόσο παραμένουν σε πολύ μεγάλο ποσοστό ανεξερεύνητα. Πρόκειται για κοινότητες κοραλλιών και άλλων οργανισμών σε βάθη από 30 έως 150-200 m από την επιφάνεια της θάλασσας που δέχονται πολύ χαμηλή ηλιακή ακτινοβολία. Τέτοιες ζώνες εντοπίζονται σε τροπικές περιοχές όπως στην Ερυθρά θάλασσα, τον Ινδικό Ωκεανό, τις ακτές της Ταϊλάνδης αλλά και σε τμήματα της Ανατολικής και Δυτικής Μεσογείου (Ouazzani et al., 2016).

Σε αυτές τις χαμηλού φωτισμού περιοχές εντοπίζονται, μεταξύ άλλων, φύκη, σπόγγοι και κοράλλια με σκληρά κελύφη (scleractinian corals). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι οι ζώνες αυτές είναι πολύ πιο διαδεδομένες από ό, τι πιστευόταν παλαιότερα εμφανίζοντας υψηλότερα ποσοστά κοραλλιού (40-60 %) σε σύγκριση με τιμές χαμηλότερες του 20 % σε μικρότερα βάθη. Ενώ αποτελέσματα ερευνών από τη συλλογή σπόγγων στις περιοχές αυτές οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι 50 % περισσότερα είδη από μεσοφόρα βάθη επέδειξαν βιοδραστικότητα σε σχέση με τα είδη που προέρχονται από αβαθή περιβάλλοντα (Olson et al., 2010). Οι μεσόφωτες θαλάσσιες ζώνες προσελκύουν όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον καθώς οι κοραλλιογενείς ύφαλοι των ρηχών υδάτων διαρκώς υποβαθμίζονται από μια σειρά παραγόντων, όπως η παγκόσμια αλλαγή του κλίματος, η υπεραλίευση και η ρύπανση ενώ οι βαθύτεροι ύφαλοι φαίνεται να επηρεάζονται λιγότερο από φυσικές και ανθρωπογενείς επιπτώσεις. Γι’ αυτό μπορούν να χρησιμεύσουν ως «ασφαλή καταφύγια» για πολλούς οργανισμούς.



Εικόνα 1.2.2: *Κατανομή περιβαλλοντικών παραγόντων (φως,θρεπτικά, μόλνση, θερμοκρασία) μεταξύ των διαφορετικών θαλάσσιων ζωνών (Olson et al., 2010)*

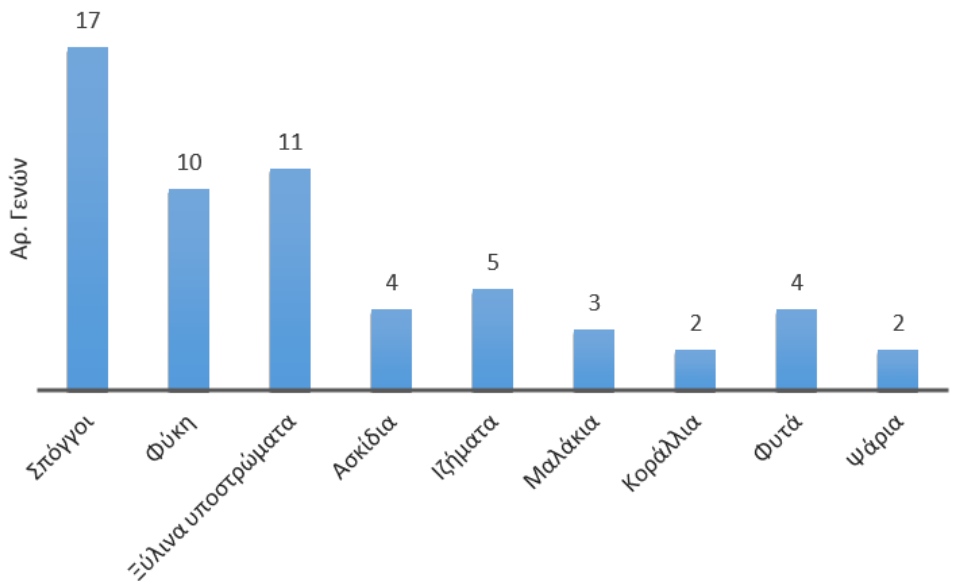
Για κάθε μία ώρα εξερεύνησης των μεσόφωτων βαθών 7 νέα είδη ψαριών εντοπίζονται και εκτιμάται ότι πάνω από 2000 επιπλέον είδη μένει να ανακαλυφθούν σε αυτά τα περιβάλλοντα. Παρόμοιος ή ακόμα μεγαλύτερος αναμένεται ο αριθμός μυκήτων και άλλων μικροβίων που συνδέονται με τους μακροοργανισμούς της μεσόφωτης ζώνης, ευρήματα που θα δώσουν σπουδαίες πληροφορίες για την παγκόσμια βιοποικιλότητα (Wainwright et al., 2017).

1.3 Θαλάσσια προερχόμενοι μύκητες

1.3.1 Κατανομή

Πολλοί από τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων που όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα είναι, στο μεγαλύτερο ποσοστό του, ανεξερεύνητο. Οι θαλάσσιοι μύκητες ταξινομήθηκαν για πρώτη φορά από τον μυκητολόγο J. Kohlmeyer το 1979 σε **υποχρεωτικά** ή **προαιρετικά θαλάσσιους** ανάλογα με την ικανότητα τους για ανάπτυξη και αναπαραγωγή. Συγκεκριμένα στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται αυτοί που επιβιώνουν και παράγουν σπόρια αποκλειστικά στη θάλασσα ή τις εκβολές ποταμών ενώ στη δεύτερη εκείνοι που μπορεί να προέρχονται από γλυκά νερά ή είναι χερσαίας προέλευσης και δύνανται να ζήσουν στο θαλάσσιο περιβάλλον (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979). Ωστόσο γενικά οι μύκητες που απομονώνονται από το θαλάσσιο περιβάλλον δεν καταδεικνύονται ως υποχρεωτικά ή προαιρετικά θαλάσσια είδη, συνεπώς μια ενδεχομένως γενικότερη έκφρασή που μπορεί να τους χαρακτηρίσει είναι: ‘’οι θαλάσσια προερχόμενοι μύκητες ’’ (marine- derived fungi) (Bonugli- Santos et al., 2015).

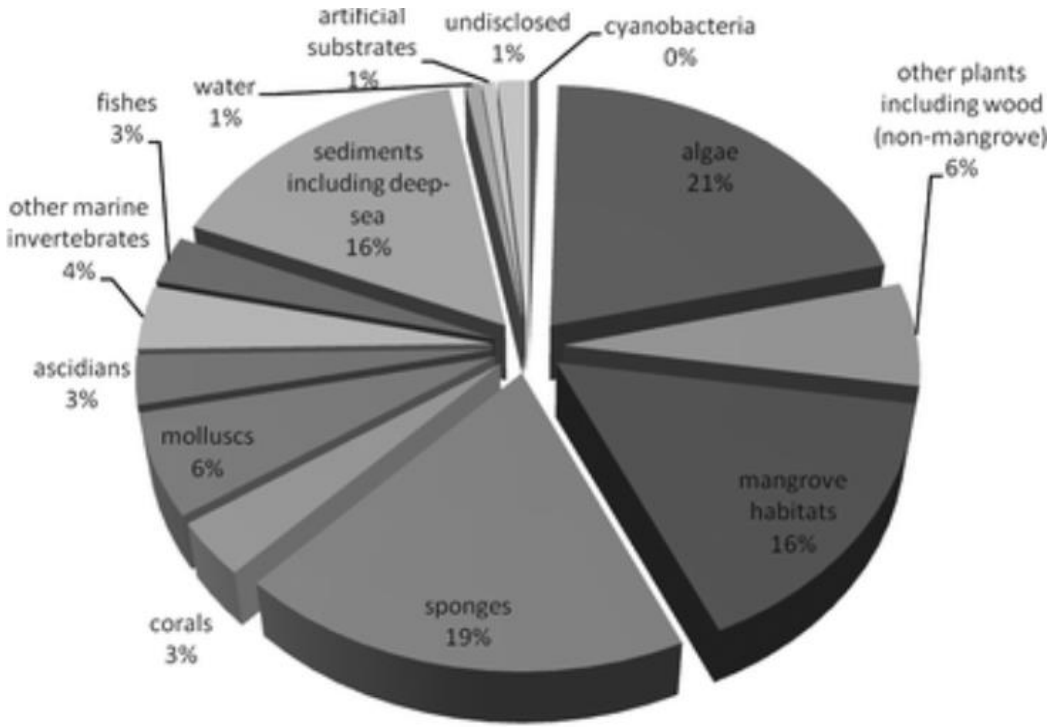
Η κατανομή των θαλάσσια προερχόμενων μυκήτων ως προς την πηγή προέλευση τους συνοψίζεται στο επόμενο γράφημα (Εικόνα 1.3.1) και γίνεται με βάση τον αριθμό των διαφορετικών ειδών που έχουν εντοπιστεί στηριζόμενοι σε βιβλιογραφίες φυσικών προϊόντων που παράγονται από αυτούς (Bugni, 2003):



Εικόνα 1.3.1: *Αριθμός των διακριτών μυκητιακών γενεών με βάση την θαλάσσια πηγή (προσαρμοσμένο από Bugni, 2003)*

Όπως υποδεικνύει το σχετικό ραβδόγραμμα, φαίνεται ότι οι σπόγγοι εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό (17 %) ενώ έπονται τα φύκη και τα ξυλώδη υποστρώματα με σημαντικά ποσοστά. Κατά συνέπεια από τους σπόγγους φαίνεται ότι προέρχεται η μεγαλύτερη ποικιλομορφία ενώ λιγότερο έχουν συνεισφέρει στην προέλευση των μυκήτων τα κοράλλια και τα ψάρια με ποσοστό μόλις 2 %.

Μεταγενέστερες έρευνες έδειξαν ακόμη μεγαλύτερο ποσοστό των χαρακτηρισμένων μυκήτων να προέρχονται από σπόγγους (19 %) και φύκη (21 %) και μικρότερα ποσοστά για άλλα ασπόνδυλα (Εικόνα 1.3.2).



Εικόνα 1.3.2: *Πηγές μυκητιακών στελεχών που έχουν χαρακτηριστεί χημικά (Rateb & Ebel, 2011)*

Θαλάσσια μυκητιακά συστήματα, έχουν εντοπιστεί, λοιπόν σε διάφορα υποστρώματα όπως άλγη, σπόγγους, ξύλο, μαλάκια, κοράλλια, φυτά, ψάρια και αποτελούν σημαντική πηγή ενζύμων με τεράστιο βιομηχανικό και περιβαλλοντικό ενδιαφέρον. Οι μικροοργανισμοί αυτοί διαθέτουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε ακραίες συνθήκες που συχνά συναντώνται στους ωκεανούς όπως η αλατότητα και οι υψηλές πιέσεις. Ακόμα ένα μεγάλο κλάσμα της θαλάσσιας βιόσφαιρας είναι ανοξικό ή μερικώς ανοξικό. Οι μύκητες ωστόσο, έχει αποδειχθεί και από την χερσαία μελέτη στελεχών, ότι μπορούν να ζήσουν σε χαμηλές περιεκτικότητες οξυγόνου χάρη σε ένα σύνολο κυτταρικών και γωνιδιωματικών προσαρμογών που επιτελούνται (Embley, 2006). Η ποικιλομορφία, επιπλέον, των μυκήτων στα διάφορα υδατικά συστήματα συνδέεται με περιβαλλοντικά φαινόμενα όπως οι άνεμοι, οι βροχές και οι πλημμύρες που οδηγούν συχνά χερσαίους μικροοργανισμούς στη θάλασσα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από την μεγάλη ομοιότητα στα μορφολογικά χαρακτηριστικά θαλάσσιων μυκήτων με τους χερσαίους ομολόγους τους. Αυτό υποδεικνύει ότι ορισμένοι μύκητες μπορούν να πραγματοποιούν σχετικά εύκολα τη μετάβαση από το έδαφος ή την επιφάνεια του

νερού προς τα βάθη θαλασσών και ωκεανών χάρη και στην ικανότητα τους να μεταβάλλουν την σύνθεση της μεμβράνης τους για να αντέξουν την αυξημένη υδροστατική πίεση (Richards et al. 2012, Bonugli- Santos et al. 2015). Εκτιμάται ότι τα είδη των θαλάσσιων μυκήτων ανέρχονται σήμερα σε 1500 έναντι των 250.000 που αποδίδονται στους χερσαίους, ενώ μέχρι σήμερα λιγότερα από 500 είδη ανώτερων θαλάσσιων νηματοειδών μυκήτων έχουν χαρακτηριστεί (Murugaiyan, 2015).

1.3.2 Ιστορικά στοιχεία:

Οι πρώτες έρευνες έγιναν σε δείγματα θαλασσινού νερού στην περιοχή της Σαρδηνίας από τον Giuseppe Brotzu, το 1945. Εκείνη την εποχή η επιδημία του τύφου είχε χτυπήσει πολλές Ιταλικές πόλεις. Ο Brotzu, ωστόσο, παρατήρησε ότι οι κάτοικοι της συγκεκριμένης περιοχής παρότι συνήθιζαν να κολυμπούν και να τρέφονται από οργανισμούς στα μολυσμένα από λύματα νερά στο λιμάνι της περιοχής, σπάνια αρρώσταιναν. Ξεκίνησε λοιπόν μία έρευνα για μικροοργανισμούς με αντιμικροβιακή δράση στα συγκεκριμένα νερά, που ενδεχομένως να παρεμπόδιζαν την ανάπτυξη του βακτηρίου *Salmonella typhi*. Κατάφερε να απομονώσει έναν θαλάσσιο μύκητα που εμφάνιζε πράγματι αντιβακτηριδιακή δράση, τον *Cephalosporium acremonium* (σημερινή ονομασία: *Acremonium chrysogenum*) (Orrù et al. 2002, Bugni, 2003). Ακολούθησε μια περίοδος κατά την οποία οι έρευνες περιορίστηκαν στους ακτινομύκητες, ωστόσο το ενδιαφέρον ανανεώθηκε για τους θαλάσσιους μύκητες όταν η κυκλοσπορίνη Α απομονώθηκε από τον *Tolypocladium inflatum* το 1976 και εγκρίθηκε για κλινική χρήση ως ανοσοκατασταλτικό το 1983. Παρά το γεγονός ότι η κεφαλοσπορίνη C απομονώθηκε από θαλάσσιο μύκητα, μελέτες όσον αφορά στη χημεία των οργανισμών αυτών ήταν σπάνιες μέχρι τα μέσα του 1990 οπότε και ξεκίνησε μια σχεδόν εκθετική ανάπτυξη. Η βιοδραστική ουσία sicayne ήταν πιθανότατα το πρώτο

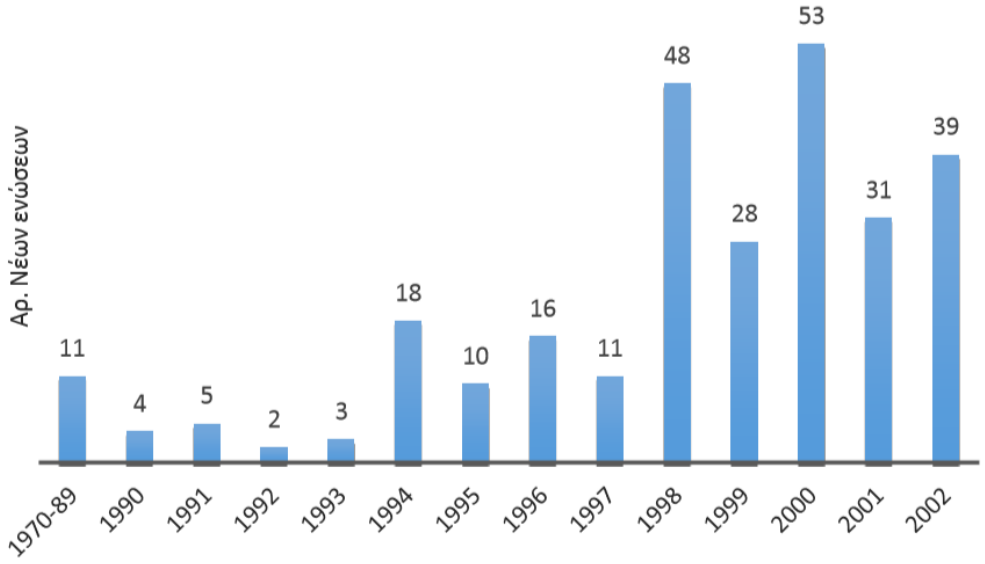
αντιβιοτικό που απομονώθηκε από έναν θαλάσσιο βασιδιομύκητα, τον *Halocyphina villosa*, γεγονός που πραγματοποιήθηκε το 1981 (Bugni, 2003, Li, 2007).

Οι μοναδικές ιδιότητες του θαλάσσιου περιβάλλοντος θεωρούνται σημαντικές για τη θαλάσσια βιοτεχνολογία καθώς μεταξύ άλλων η καλή προσαρμογή σε τέτοια οικοσυστήματα θα βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων γονιδίων ενώ και οι βιοτεχνολογικές διαδικασίες παραγωγής επηρεάζονται από τις ειδικές προσαρμογές των οργανισμών στο περιβάλλον τους. Οι φυσικοί παράγοντες που επηρεάζουν τους θαλάσσιους μύκητες είναι (Swathi et al. 2013): α) αλατότητα και pH, β) χαμηλό δυναμικό νερού, γ) υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων νατρίου, δ) χαμηλή θερμοκρασία, ε) ολιγοτροφικές θρεπτικές συνθήκες και στ) υψηλή υδροστατική πίεση, που είναι μοναδικά στο περιβάλλον της θάλασσας.

1.4 Προϊόντα θαλάσσιων μυκήτων και η δράση τους:

Είναι γεγονός ότι η μελέτη των θαλάσσιων μυκήτων είχε τεθεί σε δεύτερη μοίρα για χρόνια, λόγω κυρίως του μικρού αριθμού τους αλλά και του μη απόλυτου διαχωρισμού των μικροοργανισμών αυτών σε αυστηρά θαλάσσιους και μη (έχει ήδη αναφερθεί ότι πολλοί μύκητες μπορούν να επιβιώσουν σε διαφορετικά περιβάλλοντα). Ωστόσο αυτό έχει αλλάξει τα τελευταία χρόνια καθώς έχει αποδειχθεί ότι η κατηγορία αυτή μικροβίων αποτελεί πηγή εξαιρετικών φυσικών προϊόντων. Μάλιστα ενώ πολλοί μύκητες μπορούν να επιβιώνουν τόσο σε θαλάσσια οικοσυστήματα όσο και σε χερσαία ή οικοσυστήματα γλυκών νερών, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος με την ύπαρξη αλάτων και άλλων ιδιαιτεροτήτων οδηγεί στην παραγωγή διαφορετικών μεταβολιτών. Έτσι ο ίδιος μύκητας παράγει μοναδικούς μεταβολίτες όταν διαβιεί σαν θαλάσσιος, τους οποίους δεν μπορεί να συνθέσει όταν βρεθεί σε άλλα περιβάλλοντα.

Το τελευταίο διάστημα, έχουν χαρακτηριστεί όλο και περισσότερα νέα φυσικά προϊόντα από θαλάσσιους μύκητες αποδεικνύοντας ότι δύνανται να παράγουν ένα μεγάλο αριθμό ενδιαφερόντων μεταβολιτών με συχνά σημαντικές βιοδραστικές ικανότητες και μπορεί να είναι υποψήφιοι για το ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Ως τα τέλη του 1992 αναφέρθηκαν περίπου 15 μεταβολίτες μυκήτων και περίπου 270 ενώσεις περιγράφηκαν μέχρι το 2002 (Imhoff, 2016). Ενδεικτικά ο αριθμός των νέων καταγεγραμμένων ενώσεων κάθε χρόνο από το 1970 έως και το 2002 φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα (Εικόνα 1.4.1) με το άθροισμα τους να ξεπερνά τις 270 ενώσεις.



Εικόνα 1.4.1: *Αριθμός των νέων καταγεγραμμένων ενώσεων από θαλάσσιους μύκητες ετησίως (προσαρμοσμένο από: Bugni, 2003)*

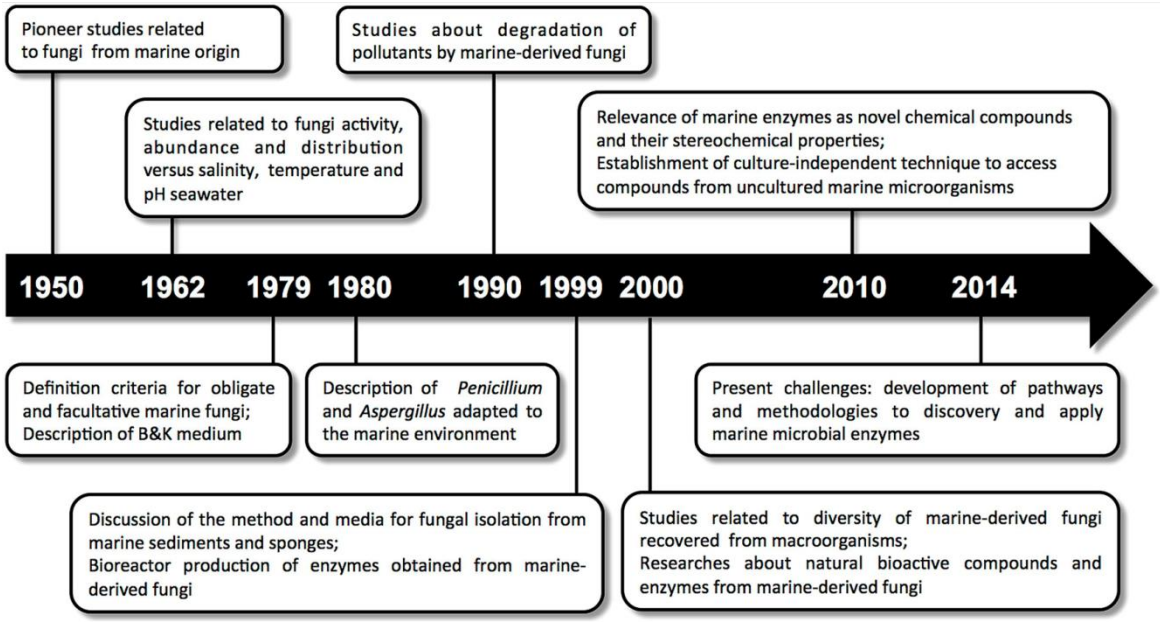
Κατά την περίοδο 2000-2005, περίπου 100 νέοι θαλάσσιοι μυκητιακοί μεταβολίτες αναφέρθηκαν και ο αριθμός αυτός έφτασε τους 690 κατά την περίοδο από το 2006 έως το 2010. Αυτή η τάση συνεχίζεται με επίκεντρο κυρίως τα μέλη των μυκητιακών γενεών Penicillium και Aspergillus που παρήγαγαν και τις περισσότερες από τις περιγραφόμενες νέες ενώσεις (Imhoff, 2016).

Πρέπει να τονιστεί ότι από το σύνολο των μεταβολιτών που έχουν αναφερθεί από θαλάσσιους μύκητες και βακτήρια, το 30 % αυτών επιδεικνύει βιολογική δραστικότητα. Ιδιαίτερα για τους μύκητες έχει παρατηρηθεί ότι αποτελούν πολύ καλύτερη πηγή ενώσεων με αντικαρκινική δράση (57 %) απ' ότι αντιβακτηριδιακή δράση (22 %). Δεδομένου δε ότι η προέλευση των μικροοργανισμών έχει καθοριστική επίδραση στην συμπεριφορά τους, έχει καταγραφεί πως το 62 % των βιοενεργών ενώσεων, παραλαμβάνεται από μύκητες προερχόμενους από σπόγγους έναντι μικρότερων ποσοστών των μικροβίων προερχόμενων από άλλες θαλάσσιες πηγές (Li, 2007). Ενδεικτικά μια κατανομή των βιολογικών δράσεων των θαλάσσιων μικροοργανισμών παρατίθεται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1.4.1):

Πίνακας 1.4.1: *Κατανομή των βιολογικών δράσεων των θαλάσσιων μικροοργανισμών (προσαρμοσμένο από Li, 2007)*

Biological activities	Bacteria			Fungi		
	No.	%	Origin	No.	%	Origin
Antitumor	17	37	alcyonarian (2) Alga (1); fish (1) mollusk (2) sediment (8) sponge (1) tunicate (1) wood (1)	18	57	alga (6) mollusk (1) reef (1) sediment (2) fish (1) sponge (5) wood (1)
Antibacterial	21	45	alga (3); mollusk (1) Sediment (8) Sponge (4); tunicate (1) Water (3);worm(1)	7	22	sediment (2) sponge (5)
Antiviral	2	4	sediment (2)	1	3	phanerogam (1)
Antifungal	-		-	2	6	Alga (1); Wood (1)
Anti-inflammatory	1	2	jellyfish (1)	1	3	crab (1)
Enzymatic inhibition	4	8	mollusk (1) sediment (1) undefined (1) water (1)	2	6	sponge (10) wood (1)
Others	2	4	mollusk (1) undefined (1)	1	3	sediment (1)
Sub-total	19	40	sediment only	5	16	sediment only
Sub-total	5	11	sponges only	20	62	sponges only
Sub-total	4	9	algae only	7	22	algae only
Total	47	100	-	32	100	-

Πρόσφατα δε, στοιχεία που απομονώθηκαν από μύκητες χρησιμοποιήθηκαν στη βιομηχανία καλλυντικών. Τα προερχόμενα από τη θάλασσα μυκητιακά καροτενοειδές και κοζικό οξύ χρησιμοποιούνται ως συστατικά σε φυσικές χρωστικές ουσίες και σε προϊόντα λεύκανσης του δέρματος (Hong et al. 2015).



Εικόνα 1.4.2: *Χρονολόγιο της θαλάσσιας μυκολογίας: μια σύντομη περιγραφή των σχετικών επιστημονικών συμβάντων που σχετίζονται με τους μύκητες που προέρχονται από τη θάλασσα και τα ένζυμα τους (προσαρμοσμένο από Bonugli-Santos, 2015).*

1.5 Ενζυμα παραγόμενα από θαλάσσια προερχόμενους μύκητες

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα έχει αποδοθεί στους θαλάσσιους μύκητες ένα ευρύ φάσμα δραστηριοτήτων τόσο αντιβακτηριδιακών όσο και αντι-ιικών , αντικαρκινικών, αντιφλεγμονωδών κ.α. πολλές από τις οποίες μπορούν να αποδοθούν στα παραγόμενα από αυτούς, ένζυμα. Οι αναφορές σε ένζυμα προερχόμενα από θαλάσσιους μύκητες ξεκίνησε να γίνεται με μεγαλύτερη συχνότητα από το 1999-2000 (Bonugli- Santos, 2015). Οι ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν στο θαλασσινό περιβάλλον συντελούν σε διαφοροποιήσεις μεταξύ των ενζύμων από θαλάσσιους έναντι των αντίστοιχων από τους χερσαίους μικροοργανισμούς. Όλες αυτές οι ιδιαιτερότητες που χαρακτηρίζουν την θαλάσσια μυκητιακή κοινότητα της προσδίδουν μια εξαιρετική δυναμική προς την παραγωγή ενζύμων με, ενδεχομένως, χρήσιμες τεχνολογικές ή/και ιατροφαρμακευτικές ιδιότητες. Ενδεικτικά τα θαλάσσια μυκητιακά συστήματα παράγουν ξυλανάσες, υπεροξειδάσες λιγνίνης, υπεροξειδάσες μαγγανίου και λακκάσες που προκαλούν καταστροφή σε σύνθετες ενώσεις όπως βιομηχανικές τοξίνες και συστατικά αργού πετρελαίου(Atalla et al., 2010) . Ακόμα, ιδιαίτερη αναφορά γίνεται σε μύκητες που ζουν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και παράγουν ένζυμα (πρωτεάσες, κυτταρινάσες, λιπάσες και πουλουλανάσες) ικανά να ενεργούν σε έντονα αλκαλικές συνθήκες με τεράστια σημασία σε πληθώρα βιομηχανικών εφαρμογών χάρη στην εξαιρετική αντοχή τους. Χαρακτηριστικά, οι πρωτεάσες βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή στην βιομηχανία παρασκευής απορρυπαντικών ενώ μαζί με τις λιπάσες αξιοποιούνται στη γαλακτοκομική βιομηχανία. Οι ξυλανάσες παράγονται κατά κύριο λόγο από μύκητες και χρησιμοποιούνται σε βιομηχανίες τροφίμων, ζωοτροφών, ποτών, κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων και την επεξεργασία αποβλήτων. Τέλος, τα κυτταρινολυτικά ένζυμα έχουν ποικίλες εφαρμογές όπως σε ζυμώσεις για παραγωγή αιθανόλης, στην παρασκευή απορρυπαντικών, χημικών, χαρτοπολτού/χαρτιού, στην κλωστοϋφαντουργία, τις ζωοτροφές και τη βιομηχανία τροφίμων (Moubasher et al. 2016).

Μερικές από τις κατηγορίες των θαλάσσιων μυκητιακών ενζύμων και των εφαρμογών τους απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1.5.1):

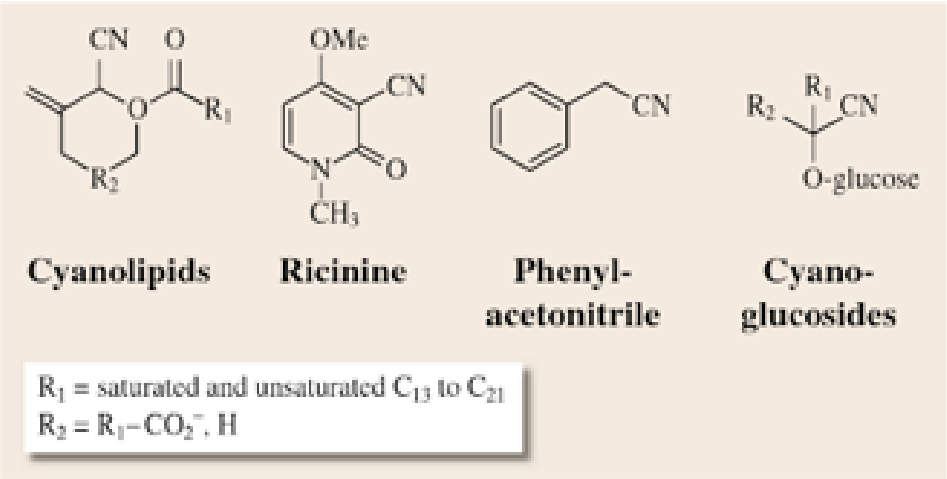
Πίνακας 1.5.1: *Λεπτομέρειες θαλάσσιων ενζύμων προερχόμενων από μύκητες (προσαρμοσμένα από Parte et al. 2017)*

Enzyme	Enzyme Source	Enzyme Function and/or Application
Alkaline protease	*Scopulariopsis* spp.	Useful in detergent formulations
Alginate lyase, amylase, cellulase, chitinase, fructosyl-amino-oxidase, fucoidanase, glucanase, galactosidase, glucosidase, glucosaminidase, hexose-aminidase, inulinase, keratinase, ligninase, lipase, nuclease, phytase, polygalacturonase, protease, speroxide dismutase, and xylanase	*Pestalotiopsis* sp., *Aureobasidium pullulans* N13d, *Penicillium janthinellum* P9, *Debaryomyces hansenii* C-11, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium canescens*, *Trichoderma aureviride* KMM4630, *Aspergillus awamori* BTMFW032, *Penicillium melinii*, *Flavodon flavus*, etc.	Implicated in Fungal Marine Biotechnology (Biotechnology—hydrolytic and oxidative enzymes; Environmental Biotechnology—enzymes degrading textile effluents and polycyclic hydrocarbons; and Industrial Biotechnology—enzymes related to manufacture of chemical, fuel, food [dairy, baking], beverage, agriculture related, textiles, cosmetics, etc.)
Amylase, cellulase, chitinase, gelatinase, lipase	14 Fungal genera: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Cephalosporium*, *Humicola*, *Gymnoascus*, *Endomysis*, *Zygorhynchus*, *Trichoderma*, *Zalerion*, *Pleospora*, *Chaetomium*, *Phoma*, *Botryphialophora*, unidentified	Significant role in remineralization and several industrial applications
Laccase, lipase, cellulase, peroxidase, manganese peroxidase	*Nigrospora* species and *Arthopyrenia* species—marine sponge *Trematosphaeria mangrovei*	Cause breakdown of several environmental compounds, such as industrial toxins and crude oil components; active role in ecological cycles of coastal ecosystem, significance in bioremediation
L-Glutaminase	Marine *Beauveria* sp.	Anticancer properties
Uncoupling protein 1 (UCP1)	*U. pinnatifida*, *Hijikia fusiformis*, and *Sargassum fulvellum*	Antiobesity enzyme
Tannase (tannin acyl hydrolase)	*Aspergillus awamori* BTMFW032	Hydrolysis of ester and depside bonds to synthesize gallic acid and glucose; gallic acid is a substrate for production of antibacterial drug trimethoprim, synthesis of propyl gallate, an antioxidant used in food industry; and catechin gallates are used in manufacture of instant tea, coffee-flavored soft drinks, flavor improvement in grape wine, beer, and fruit juice clarification, to enhance antioxidant activity of green tea, cleavage of polyphenolics, determination of structure of naturally occurring gallic acid esters
Cellulase, xylanase, and pectinase	*Alternaria alternata*, *Aspergillus terreus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Emericella nidulans*, *Fusarium solani*, *Cochliobolus australiensis*	Implicated in food, feed, beverage, textile industries and in waste treatment; fermentation of sugars and ethanol; for production of detergents, chemicals, pulp and paper; required in textile industry, animal feed, and food industry

1.6 Νιτρίλια: Ενώσεις με κυανιούχο ομάδα (Τριπλός δεσμός άνθρακα-αζώτου)

1.6.1 Ορισμός- Μηχανισμοί:

Τα νιτρίλια αποτελούν ένα σύνολο οργανικών ενώσεων που φέρουν την κυανιούχο ομάδα (-C≡ N) στο μόριό τους. Πρόκειται για ενώσεις που υπάρχουν φυσικά και συντίθενται από μύκητες, βακτήρια, φυτά, έντομα κ.α. Τα φυτά και οι μικροοργανισμοί μπορούν να συνθέσουν τόσο αλειφατικά όσο και αρωματικά νιτρίλια όπως αυτά που φαίνονται στη συνέχεια (Εικόνα 1.6.1):



Εικόνα 1.6.1: *Οργανικά νιτρίλια που υπάρχουν στην φύση (προσαρμοσμένο από De Oliveira et al. 2015)*

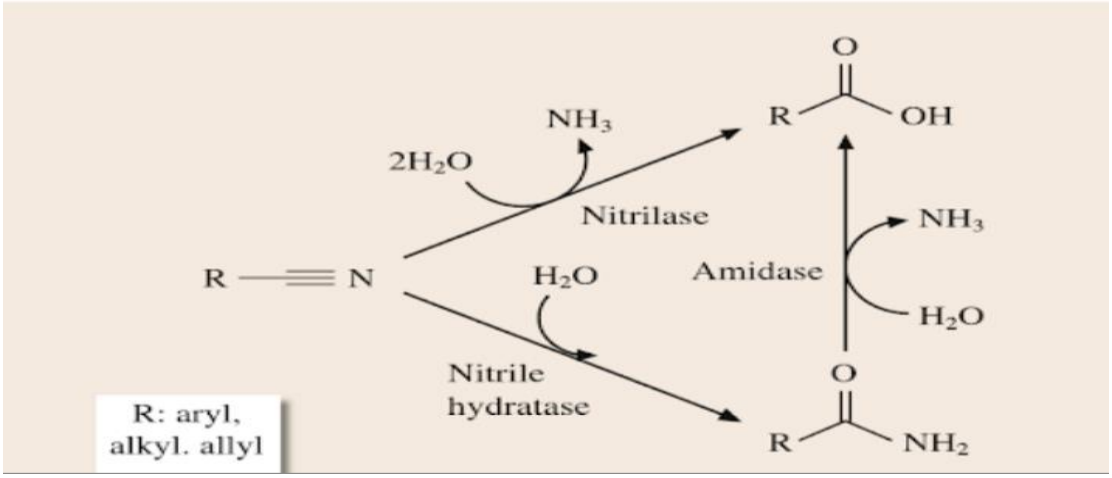
Οι ενώσεις αυτές προσφέρουν στους οργανισμούς όχι μόνο μία αποθήκη αζώτου αλλά και προστασία έναντι φυτοφαρμάκων.

Τα νιτρίλια μπορούν να συντεθούν χημικά, μέσω ορισμένων αντιδράσεων, όπως η προσθήκη ιόντος κυανιδίου σε αλκυλαλογονίδια, η αντίδραση Strecker, η αντίδραση Sandmeyer και η αντίδραση αρυλαλογονιδίων με κυανιούχο χαλκό (Gong et al., 2012). Όσον αφορά στα ενζυμικά μονοπάτια που οδηγούν στο σχηματισμό των νιτριλίων λίγα πράγματα είναι γνωστά. Έχει εντοπιστεί ότι το

ένζυμο αφυδρογονάση της αλδοξίμης είναι υπεύθυνο για τη σύνθεσή τους σε μικροοργανισμούς που υποβαθμίζουν τις αλοξίμες (De Oliveira et al., 2015).

Εξαιτίας της κυανομάδας τους, τα περισσότερα νιτρίλια είναι εξαιρετικά τοξικά, μεταλλαξιογόνα και καρκινογόνα, ωστόσο η ενζυμική υδρόλυση αυτών των ενώσεων είναι μια αναγνωρισμένη μέθοδος για την αξιοποίηση ενός ευρέος φάσματος χρήσιμων αμιδίων, καρβοξυλικών οξέων και συνάμα μια αποτελεσματική μέθοδος για την αποικοδόμηση εξαιρετικά τοξικών νιτριλίων σε περιβαλλοντικά απόβλητα και ρύπους (Gong et al., 2012).

Αναφορικά τώρα με τον μεταβολισμό των ενώσεων με την κυανιούχο ομάδα, διεξάγεται ένα πλήθος αντιδράσεων από τις οποίες ξεχωρίζει η υδρόλυση. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται από τα ένζυμα νιτριλάσες ή τις υδρατάσες του νιτριλίου (δύο μονοπάτια), δράση που ακολουθείται από αυτή της αμιδάσης. Σχηματικά οι δράσεις των τριών ενζύμων φαίνονται στη συνέχεια (Εικόνα 1.6.2):



Εικόνα 1.6.2: *Ενζυμική υδρόλυση νιτριλίων με δύο τρόπους (προσαρμοσμένο από De Oliveira et al. 2015)*

Η ενζυμική υδρόλυση αποτελεί το κοινότερο μονοπάτι στον μικροβιακό μεταβολισμό των νιτριλίων.

1.6.2 Επικινδυνότητα

Έγινε ήδη νωρίτερα αναφορά στον ορισμό και τα χαρακτηριστικά των νιτριλίων ενώ πρέπει να τονιστεί η διαφοροποίησή τους στη βιβλιογραφία από τις αντίστοιχες ανόργανες ενώσεις που φέρουν την χαρακτηριστική κυανιούχο ομάδα και αναφέρονται ως κυανίδια, με κυριότερο παράδειγμα το υδροκυάνιο (HCN).

Τα νιτρίλια συνιστούν ενώσεις με ευρεία χρήση σε ποικίλους τομείς. Αποτελούν προϊόντα, παραπροϊόντα ή απόβλητα γεωργικών, χημικών, φαρμακευτικών βιομηχανιών καθώς και της επεξεργασίας ορυκτών καυσίμων. Ενδεικτικά στον τομέα της φαρμακευτικής περισσότερα από 30 προϊόντα, περιέχοντα νιτρίλια, κυκλοφορούν στην αγορά ενώ για επιπλέον 20 πραγματοποιούνται κλινικές μελέτες. Οι εφαρμογές τους απλώνονται σε ένα μεγάλο φάσμα, από την βιλνταγλιπτίνη που δρα σαν αντιδιαβητικό φάρμακο, ως την ανασταζόλη που συμβάλλει στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού (Ramteke et al. 2013). Επιπλέον οι χημικές βιομηχανίες κάνουν εκτεταμένη χρήση τους για την παραγωγή πολυμερών, με κυριότερα το ακρυλονιτρίλιο και το αδιπονιτρίλιο (βλ. ενότητα 1.6.3) που είναι απαραίτητα στην παραγωγή του πολυακρυλονιτριλίου και του nylon 66, τη σύνθεση του ακρυλαμιδίου, του νικοτιναμιδίου, κυανοβαλεραμιδίου κ.α. Μια σειρά δε, από διαλύτες, εκχυλιστικά, παρσιτοκτόνα παρασκευάζονται με ενώσεις νιτριλίου (Kao et al. 2006). Το NBR (καουτσούκ) που είναι συμπολυμερές βουταδιενίου με ακρυλονιτρίλιο, αξιοποιείται σε μια τεράστια γκάμα εφαρμογών χάρη στην υψηλή αντοχή και ελαστικότητα που παρέχει. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ζώνες αυτοκινήτου, τα γάντια μιας χρήσης, οι σωλήνες, οι δακτύλιοι στεγανοποίησης, το συνθετικό δέρμα οι συγκολλητικές ουσίες και πολλά άλλα. Ειδικά για το καουτσούκ η κατανάλωση κυρίως από την Κίνα, την Ιαπωνία και τις Η.Π.Α. είναι εξαιρετικά υψηλή . Ενδεικτικά ως το 2017 καταναλώθηκαν στην Κίνα περισσότερες από 645 χιλ. τόνοι καουτσούκ (Ramteke et al. 2013).

Στην πλειοψηφία τους, ωστόσο, τα νιτρίλια θεωρούνται ενώσεις θανατηφόρες, καρκινογόνες και μεταλλαξογόνες, προκαλώντας ενδεχομένως προβλήματα υγείας όπως αναπνευστικά, ναυτίες, σπασμούς ή ακόμα και σκελετικές παραμορφώσεις και κώμα. Πειράματα σε αρουραίους με αλειφατικά νιτρίλια (ακετονιτρίλιο, ακρυλονιτρίλιο κ.α.) έδειξαν ότι η τοξικότητά τους οδήγησε σε αλλαγές στην κινητική και νευρολογική τους συμπεριφορά (Fang et al. 2015). Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τη σοβαρή περιβαλλοντική μόλυνση που έχει η επιφέρει η εκτεταμένη παραγωγή και συνεχής χρήση προϊόντων αυτών των ενώσεων καθιστά αναγκαία τη εφαρμογή συγκεκριμένων ενεργειών καθώς νιτρίλια έχουν ανιχνευθεί τόσο σε λύματα μονάδων επεξεργασίας νερού όσο και σε δείγματα από θάλασσες και χερσαίες περιοχές.

1.6.3 Αδιπονιτρίλιο

Πρόκειται για μία οργανική ένωση με μοριακό τύπο $C_6H_8N_2$ δηλαδή φέρει δύο κυανιούχες ομάδες (δινιτρίλιο). Είναι ένα ιξώδες άοσμο υγρό και αποτελεί σπουδαίο πρόδρομο για τον σχηματισμό του πολυμερούς nylon-6,6. Κατά συνέπεια είναι ένωση με μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον. Με την υδρόλυσή του σε ουδέτερο pH αποφεύγεται η συμπαραγωγή ρυπογόνων αλάτων, εν αντιθέσει με την όξινη ή βασική κατάλυση (Levy-Shil et al. 1995). Με την επίδραση μιας νιτριλάσης, το αδιπονιτρίλιο μπορεί να μετατραπεί πρώτα σε μονονιτριλό μονο-οξύ το κυανοβαλερικό οξύ (CVA) και στη συνέχεια στο αντίστοιχο δυοξύ, το λεγόμενο αδιπικό οξύ. Η σχετική σειρά αντιδράσεων είναι η εξής (Levy-Shil et al. 1995):

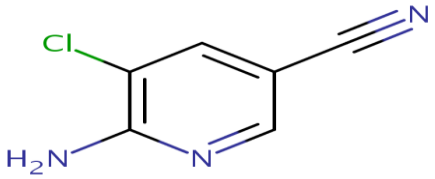
$$\underset{\text{adiponitrile}}{NC\text{-}(CH_2)_4\text{-}CN} \rightarrow \underset{\text{cyanovaleric acid}}{NC\text{-}(CH_2)_4\text{-}COOH} \rightarrow \underset{\text{adipic acid}}{HOOC\text{-}(CH_2)_4\text{-}COOH}$$

Πρέπει να αναφερθεί, ωστόσο, ότι από τη βιβλιογραφία αναφέρονται περιπτώσεις δράσης των νιτριλασών επιλεκτικά σε μία μόνο από τις χαρακτηριστικές ομάδες των δινιτριλίων.

Η συγκεκριμένη ένωση μπορεί να απελευθερωθεί στο περιβάλλον μέσω λυμάτων ή εκπομπών του από μεταποιητικές βιομηχανίες, από την εξαμεθυλενοδιαμίνη ή το nylon-6,6. Εάν η απελευθέρωσή του γίνει στο έδαφος, τότε η αερόβια βιοαποικοδόμηση μπορεί να αποτελέσει σπουδαίο μηχανισμό απομάκρυνσής του. Το ίδιο ισχύει και για την απελευθέρωσή του στο νερό. Αποτελέσματα από μία μελέτη βιοεξυγίανσης σε ποταμό στους 20 °C με μη εγκλιματισμένους μικροοργανισμούς, έδειξαν για την ένωση χρόνο ημι-ζωής την μία εβδομάδα. Εάν απελευθερωθεί στην ατμόσφαιρα αναμένεται να υπάρχει σχεδόν αποκλειστικά στη φάση ατμών. Στην περίπτωση αυτή η αποικοδόμηση του είναι πιθανή μέσω αντίδρασης των ατμών του με φωτοχημικά παραγόμενες ρίζες υδροξυλίου. Ενώ μπορεί να συμβεί κάποια απώλεια με υγρή εναπόθεση. Σε τυπικές ατμοσφαιρικές συνθήκες ο χρόνος ημιζωής της αντίδρασης αυτής εκτιμάται στις 11,6 ημέρες. Λόγω της τοξικότητας του, οι εργαζόμενοι λαμβάνουν πρόσθετες προφυλάξεις για την αποφυγή κάθε είδους προσωπικής μόλυνσης όταν εργάζονται γύρω από αυτή την ένωση. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο παράγοντας βιοσυσσώρευσης για το αδιπονιτρίλιο υπολογίζεται BCF < 1 γεγονός που δηλώνει ότι η ένωση δεν συσσωρεύεται σημαντικά στους υδρόβιους οργανισμούς ενώ οι αντίστοιχοι για την εδαφική του προσρόφηση (παράγοντες Koc) εκτιμώνται σε εύρος τιμών 9-16 (Howard, 1990). Οι τιμές αυτές ερμηνεύονται ως μεγάλη κινητικότητα του αδιπονιτριλίου στο έδαφος αλλά και αδυναμία προσρόφησης του από αιωρούμενα σωματίδια και ιζήματα στο νερό.

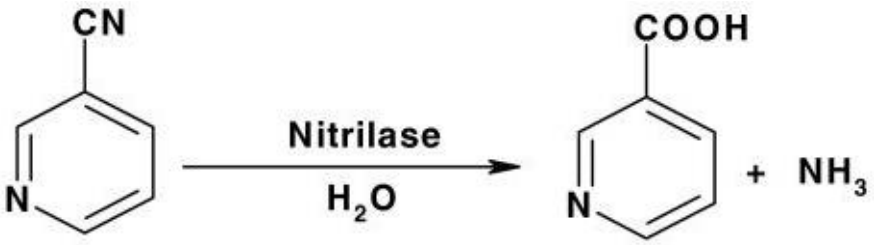
1.6.4 2-amino-3-chloro-5-cyanopyridine

Το νιτρίλιο αυτό είναι ετεροκυκλικό με χημικό τύπο $C_6H_4ClN_3$ και ανήκει στην κατηγορία των πυριδινών και ειδικότερα στις κυανοπυριδίνες.



Οι πυριδίνες είναι ετεροκυκλικές, αρωματικές, οργανικές ενώσεις αποτελούμενες από άνθρακα, άζωτο και υδρογόνο. Η πυριδίνη συνιστά ένα άχρωμο, εύφλεκτο υγρό και αποτελεί πρόδρομη ένωση για πολλά φαρμακευτικά προϊόντα, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, σαν οργανικός διαλύτης αλλά και για την in vitro σύνθεση του DNA. Ωστόσο θεωρείται επιβλαβής για την υγεία σε περίπτωση εισπνοής, κατάποσης ή επαφής με το δέρμα με επακόλουθα της δηλητηρίασης, πονοκεφάλους, ζαλάδες, ανορεξία. Σε υψηλές δόσεις θεωρείται ναρκωτική ουσία, ενώ πιθανολογείται η καρκινογόνος και γονιδιοτοξική δράση της.

Με την επίδραση νιτριλάσης στις κυανοπυριδίνες παράγεται το αντίστοιχο οξύ και αμμωνία όπως φαίνεται και σχηματικά στη συνέχεια (Εικόνα 1.6.3).



Εικόνα 1.6.3: *Υδρόλυση κυανοπυριδίνης από νιτριλάση (Cong et al, 2012)*

1.6.5 Ακετονιτρίλιο

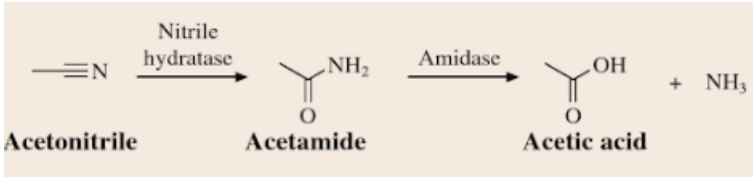
Πρόκειται για το απλούστερο νιτρίλιο με συντακτικό τύπο CH_3CN. Είναι ένα τοξικό, άχρωμο υγρό με μια οσμή που μοιάζει με αιθέρα και μια γλυκιά γεύση καμένου. Η βιομηχανική παραγωγή του στηρίζεται κυρίως στην αμινοξείδωση προπενίου όπου και προκύπτει σαν παραπροϊόν της παραγωγής προπενονιτριλίου (Shah et al. 2015):

$$2CH_2{=}CH\text{-}CH_3 + 3NH_3 + 3/2O_2 \rightarrow 3\ CH_3\text{-}\ CN\ (ACN) + 3H_2O$$

Ενώ στην περίπτωση του ακετονιτριλίου αυτό γίνεται και με καταλυτική αμινοξείδωση αιθανίου:

$$2CH_3CH_3 + 2NH_3 + 3O_2 \rightarrow 2CH_3CN + 6H_2O$$

Όσον αφορά στην υδρόλυση του ακετονιτριλίου, για πρώτη φορά το 1980 εντοπίστηκε το ένζυμο υδρατάση του ακετονιτριλίου στο βακτήριο *Rhodococcus rhodochrous* J1 που είχε την ικανότητα να καταλύει την βιομετατροπή του ακετονιτριλίου σε ακεταμίδιο ενώ με τη δράση της αμιδάσης στη συνέχεια παραλαμβάνεται οξικό οξύ και αμμωνία (Εικόνα 1.6.4):



Εικόνα 1.6.4: *Βιοδιάσπαση ακετονιτριλίου από τη συνδυαστική δράση υδρατάσης του νιτριλίου και αμιδάσης (προσαρμοσμένο από De Oliveira et al. 2015)*

Πρόκειται για μια εξαιρετικά επικίνδυνη ουσία και πρέπει να αντιμετωπίζεται με προσοχή καθώς μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα υγείας. Αναφλέγεται εύκολα με θερμότητα, σπινθήρες ή φλόγες και εκλύει πολύ τοξικούς ατμούς κυανιούχου υδρογόνου (Gasparetto et al. 2012). Διαλύεται εύκολα στο νερό, ενώ δύναται να αντιδράσει με αυτό, με ατμό ή οξέα για την παραγωγή εύφλεκτων ατμών που μπορούν να σχηματίσουν εκρηκτικά μείγματα όταν εκτίθενται στον αέρα. Οι ατμοί του είναι βαρύτεροι από τον αέρα και μπορούν να ταξιδεύουν σε χαμηλές ή περιορισμένες περιοχές. Υπάρχει ένα σύνολο δεδομένων για την οξεία τοξικότητα του ακετονιτριλίου για υδρόβιους οργανισμούς. Οι επικυρώσιμες πληροφορίες αναφέρουν διάφορα είδη υδρόβιων ασπόνδυλων από διαφορετικές ταξονομικές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των αρθροπόδων, των πλατυελμινθων, των μαλάκιων και των δακτυλιοσκωλήκων. Ενώ ορίζεται η μη επιβλαβής προβλεπόμενη συγκέντρωσή του (Predicted no-effect concentration (PNEC)) για τους υδρόβιους οργανισμούς σε PNEC= 0,73 mg/l. Για τιμές μικρότερες ή ίσες αυτής δεν υπάρχουν αρνητικές επιδράσεις (Spanish Ministry of Health, 2002).

Το ακετονιτρίλιο χρησιμοποιείται για την παρασκευή φαρμάκων, αρωμάτων, προϊόντων από καουτσούκ, παρασιτοκτόνων, σαν διαλύτης εκχύλισης του βουταδιενίου, για την κατασκευή φωτογραφικού φίλμ ενώ αποτελεί δημοφιλή επιλογή σαν κινητή φάση στην HPLC (Gasparetto et al. 2012). Χρησιμοποιείται επίσης για την εξαγωγή λιπαρών οξέων από ζωικά και φυτικά έλαια. Πριν από την εργασία με ακετονιτρίλιο, θα πρέπει να παρέχεται κατάρτιση των εργαζομένων για ασφαλή χειρισμό.

1.7 Βιοεξυγίανση

Η χημική κατάλυση των ενώσεων που συνιστούν ρύπο εμφανίζει σοβαρά μειονεκτήματα. Κρίνεται, από πλευράς κόστους, αναποτελεσματική λόγω των ανεπιθύμητων αντιδράσεων που οδηγούν συχνά σε επίσης ανεπιθύμητα παραπροϊόντα, λόγω ακόμα των απαιτήσεων σε υψηλές θερμοκρασίες, πιέσεις και της ανάγκης επομένως για κοστοβόρα συστήματα ψύξης και όλα αυτά με επιζήμιες για τον άνθρωπο και το περιβάλλον επιπτώσεις. Είναι συνεπώς επιτακτική η ανάγκη για στροφή προς βιοκαταλυτικές μεθόδους.

Ο όρος βιοεξυγίανση χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αποδόμηση – καταστροφή ρύπων που εντοπίζονται στο νερό, το έδαφος, σε ιλύες, με την αξιοποίηση διαφόρων οργανισμών ή ενζύμων τους. Η όλη διεργασία βασίζεται σε βιολογικούς μηχανισμούς, διαμορφώνοντας τις κατάλληλες συνθήκες (οξυγόνο, pH, υγρασία) ώστε οι μικροοργανισμοί να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας τους ρύπους σαν πηγή των θρεπτικών συστατικών που χρειάζονται. Είναι αποδεδειγμένο ότι στην πλειοψηφία τους οι οργανικοί ρυπαντές, συνθετικοί και φυσικοί, δύνανται να αποικοδομηθούν από μικροοργανισμούς, αυτόχθονες ή εξωγενείς.

Τρεις είναι οι βασικές κατηγορίες βιοεξυγίανσης ως προς την καταλληλότητα των μικροβίων ή τις συνθήκες (Αποστολάκη et al. 2005):

1. Εγγενής Βιοεξυγίανση: Αποτελεί την οικονομικότερη αλλά και βραδύτερη μέθοδο καθώς πρόκειται για φυσική εξυγίανση με μικρόβια που ήδη υπάρχουν στο πεδίο χωρίς δε μεταβολή των συνθηκών οξυγόνου και υγρασίας που επικρατούν.
2. Βιοδιέγερση: Η διαφοροποίηση με την προηγούμενη περίπτωση είναι ότι ενώ μπορεί να υπάρχουν οι απαραίτητοι μικροοργανισμοί, απαιτείται ταχύτερη αποδόμηση των ρύπων ή αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών. Γίνεται προσθήκη θρεπτικών στοιχείων και οξυγόνου.
3. Βιοαύξηση: Στη μέθοδο αυτή γίνεται προσθήκη μη αυτοχθόνων μικροοργανισμών για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην αποδόμηση

των ρύπων. Έτσι υπάρχει το πλεονέκτημα ότι ανάλογα με το είδος τους ρύπου επιλέγονται τα κατάλληλα μικρόβια για την αποικοδόμηση. Ωστόσο απαιτείται ρύθμιση των περιβαλλοντικών συνθηκών ώστε οι προστιθέμενοι μικροοργανισμοί να μπορέσουν να συναγωνιστούν τους αυτόχθονες και να μην πεθάνουν πριν προλάβουν να αποδομήσουν σε σημαντικό βαθμό τους ρυπαντές.

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την βιοεξυγίανση κατατάσσονται στις παρακάτω κατηγορίες (Vidali, 2001):

- Αερόβιοι (παρουσία οξυγόνου). Μερικοί μικροοργανισμοί με αποδεδειγμένη ικανότητα αποδόμησης οργανικών ενώσεων (μικροβιοκτόνων, υδρογονανθράκων, αλκανίων , πολυαρωματικών) αυτής της ομάδας είναι οι *Pseudomonas, Alcaligenes, Sphingomonas, Rhodococcus* και *Mycobacterium.*

- Αναερόβιοι (απουσία οξυγόνου):Βρίσκουν εξίσου ευρεία εφαρμογή με τους αερόβιους. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί μια ολοένα αυξανόμενη τάση χρησιμοποίησής τους για τη διάσπαση των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCBs) στα ιζήματα ποταμών, για αποχλωρίωση του τριχλωροαιθυλενίου (TCE) και του χλωροφορμίου.

- Λιγνινολυτικοί μύκητες: όπως ο *Phanaerochaete chrysosporium* έχουν την ικανότητα να διασπούν ένα μεγάλο εύρος ισχυρά τοξικών ρύπων.

- Μεθυλότροφοι μικροοργανισμοί: Είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί που για την ανάπτυξή τους αξιοποιούν ενώσεις με ένα μόνο άτομο άνθρακα (π.χ. μεθάνιο, μεθανόλη, μεθυλαμίνες κ.α.) σαν πηγή άνθρακα και ενέργεια. Το ένζυμο που διενεργεί την βιοκατάλυση του μεθανίου, η μονοξυγενάση του μεθανίου, μπορεί να δράσει σε πολλά υποστρώματα και χρησιμοποιείται σε διάφορους ρύπους όπως οι χλωριωμένοι αλιφατικοί υδρογονάνθρακες TCE και 1,2 DCE. Ενώ η αφυδρογονάση της μεθανόλης και η NAD εξαρτώμενη

αλδεϋδική αφυδρογονάση αποτελούν επίσης βιοκαταλυτικά ένζυμα των μικροβίων αυτών.

Προϋπόθεση για τη πραγματοποίηση της βιοαποικοδόμησης είναι ο μικροοργανισμός να έρθει σε επαφή με το ρύπο, κάτι που συχνά δεν είναι εύκολο, λόγω της ανομοιόμορφης κατανομής τους στο χώρο. Για ορισμένα βακτήρια αυτό αντιμετωπίζεται μέσω μιας ιδιαίτερης συμπεριφοράς, χημική φύσεως, που τα ''ωθεί'' να κινηθούν προς τον ρύπο. Οι μύκητες από την άλλη σχηματίζουν νηματοειδείς δομές προς τον ρύπο.

Ωστόσο πέρα από την απαίτηση για επαφή τους με την ένωση προς βιοεπεξεργασία υπάρχουν κάποιες ακόμα περιβαλλοντικές παράμετροι για να δράσουν οι μικροοργανισμοί: α) χαμηλή τοξικότητα, β) ικανοποιητική διαθεσιμότητα σε νερό, γ) ύπαρξη των απαραίτητων αποδεκτών e^- και θρεπτικών (άζωτο, φώσφορος), δ) κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και pH.

Η βιοεξυγίανση συνιστά μια φυσική διεργασία γι' αυτό και γίνεται εύκολα αποδεκτή για την διαχείριση αποβλήτων που περιέχουν μολυσμένα υλικά. Οι μικροοργανισμοί που δύνανται να αποικοδομήσουν τους ρυπαντές, αυξάνονται σε αριθμό παρουσία αυτών ενώ όταν οι δεύτεροι αποδομηθούν, ο πληθυσμός τους αρχίζει να μειώνεται. Τα προϊόντα δε, της βιομετατροπής είναι συνήθως αβλαβή και περιλαμβάνουν διοξείδιο του άνθρακα, νερό και κυτταρική βιομάζα. Επιπλέον η βιοεξυγίανση μπορεί να διεξάγεται επί τόπου χωρίς, συνήθως, να προκαλεί σοβαρή διαταραχή στις φυσιολογικές δραστηριότητες, εξαλείφοντας έτσι πιθανούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον (Vidal, 2001). Έτσι αντί να γίνεται μεταφορά των ρύπων από ένα περιβαλλοντικό μέσο σε άλλο, π.χ. από το έδαφος στο νερό ή τον αέρα, είναι δυνατή η πλήρης καταστροφή τους. Τέλος η βιοεξυγίανση μπορεί να αποδειχθεί φθηνότερη από άλλες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό επικίνδυνων αποβλήτων.

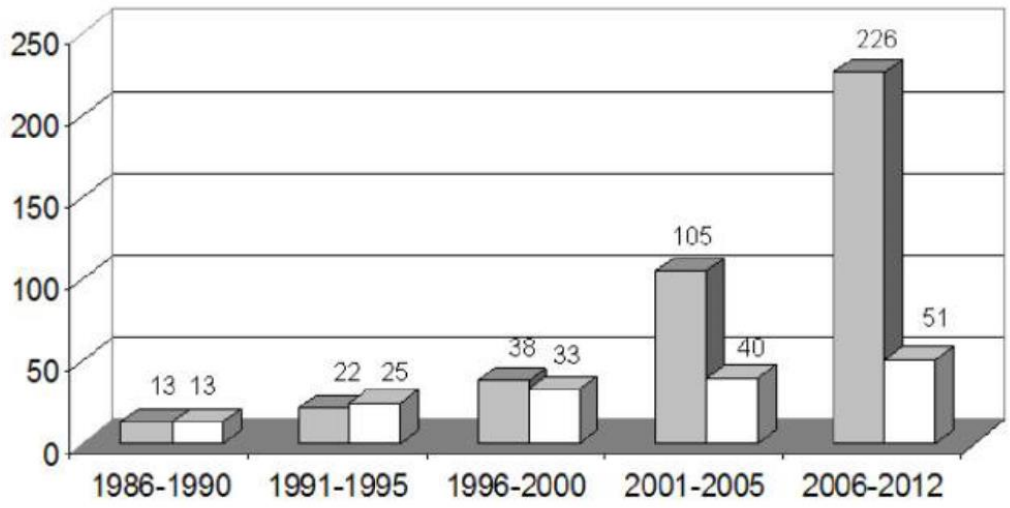
Συνεπώς η βιοεξυγίανση εμφανίζει σπουδαία πλεονεκτήματα για την εξάλειψη επιβλαβών ουσιών και την βιομετατροπή τους προς άλλες αβλαβείς ενώσεις, διεργασία που όπως προαναφέρθηκε μπορεί να πραγματοποιηθεί από διάφορα κύτταρα και ένζυμα. Τα ένζυμα, μάλιστα έχουν μικρότερες απαιτήσεις για τη ρύθμιση των αντιδράσεων ενώ προσφέρουν υψηλές παραγωγικότητες μέσω της ενίσχυσης του ρυθμού τους.

Παράλληλα έγινε νωρίτερα αναφορά στα νιτρίλια και την ευρεία χρήση τους σε ένα τεράστιο φάσμα βιομηχανιών, με αποτέλεσμα και την μεγάλη συμβολή τους στην δημιουργία ρύπων. Μεταξύ λοιπόν των μηχανισμών που μπορούν να αξιοποιηθούν για την βιοεξυγίανση, περιλαμβάνονται και εκείνοι που βιομετατρέπουν νιτρίλια. Συγκεκριμένα μία ποικιλία μικροοργανισμών που μελετήθηκαν, βρέθηκαν αποτελεσματικοί στον μεταβολισμό ορισμένων οργανικών ενώσεων του νιτριλίου. Μάλιστα ένας υπολογίσιμος αριθμός ενζύμων με νιτριλολυτική δράση έχει χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση ακρυλονιτριλίου από βιομηχανικά λύματα παραγωγής ακρυλαμιδίου, ενώ έχει συμμετάσχει και σε επιχειρήσεις αποδόμησης κυανιούχων ζιζανιοκτόνων (Chen et al. 2009).

1.8 Νιτριλάσες

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, ο καταβολισμός των νιτριλίων μπορεί να ακολουθήσει δύο διακριτά μονοπάτια. Είτε μέσω μίας νιτριλάσης, να πραγματοποιηθεί απευθείας μετατροπή του νιτριλίου στο αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ με παραγωγή και NH_3, είτε με τη δράση μιας υδρατάσης του νιτριλίου να παραχθεί το αντίστοιχο αμίδιο και στη συνέχεια με την επέμβαση μιας αμιδάσης να γίνει υδρόλυση αυτού προς το αντίστοιχο οξύ και αμμωνία.

Με την πάροδο του χρόνου, η βιοκατάλυση με τη μεσολάβηση των παραπάνω ενζύμων προσελκύει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των ερευνητών και επιχειρηματιών (Εικόνα 1.8.1).



Εικόνα 1.8.1: *Αριθμός δημοσιεύσεων πάνω στην έρευνα για τις νιτριλάσες από το 1986 έως το 2012 (προσαρμοσμένο από Gong et al 2012)*

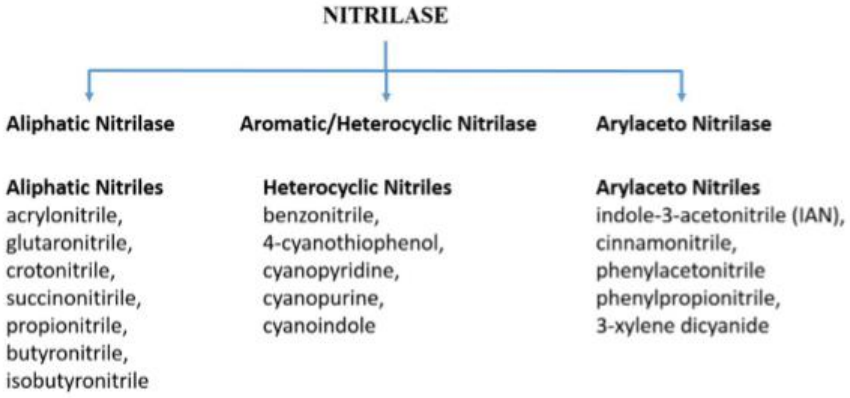
Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες σχετικά με την εφαρμογή νιτριλάσης στη χημική σύνθεση, καθώς η πρώτη νιτριλάση ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1960. Πρώτα ανακαλύφθηκε στα φυτά (1958) και μετά στα βακτήρια (1964). Πάνω από 30 νιτριλάσες έχουν αναφερθεί από διάφορους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων μέχρι το 2009 (De Oliveira et al., 2009). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων πέντε δεκαετιών, περιγράφηκαν ποικίλοι οργανισμοί παραγωγής νιτριλάσης, μεταξύ των οποίων βακτήρια, νηματοειδείς μύκητες, ζύμες και φυτά, ενώ μερικά από αυτά τα εργοστάσια κυττάρων αξιοποιήθηκαν για την εμπορική παραγωγή καρβοξυλικών οξέων σε βιομηχανική κλίμακα. Δύο αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αποτελούν, η επιτυχής βιομηχανική παραγωγή νικοτινικού οξέος (Lonza, China) και (R) - (-) - αμυγδαλικού οξέος (Mitsubishi Rayon, Ιαπωνία, BASF, Γερμανία) με τη χρήση νιτριλάσης που απέδειξαν την μεγάλη οικονομική δυναμική του ενζύμου (Gong et al., 2012).

Ωστόσο η μικροβιακή νιτριλάση ως «πράσινος καταλύτης» για την παραγωγή χρήσιμων ενώσεων με εμπορική αξία και άλλες καταλυτικές εφαρμογές είναι ευκολότερη στον έλεγχο από πλευράς βιοτεχνολογικής εφαρμογής.

Η λειτουργικότητα του ενζύμου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις συνθήκες pH και θερμοκρασίας. Έτσι για την επίτευξη της βιοκατάλυσης το βέλτιστο pH κυμαίνεται στην περιοχή 7.0-8.0 ενώ η θερμοκρασία στο εύρος από 30 °C έως 55°C. Οι συνθήκες αυτές ισχύουν για νιτριλάσες προερχόμενες από τα περισσότερα βακτήρια και μύκητες, λίγες είναι δε αυτές που μπορούν να λειτουργήσουν σε ακραίες συνθήκες (Gong et al. 2012).

Επιπλέον λόγω της υδροφοβικότητας των περισσότερων ντριλίων, συχνά χρησιμοποιούνται οργανικοί συνδιαλύτες για την επίτευξη της βιοκατάλυσης. Έχει, συνεπώς, μελετηθεί εκτενώς ο βαθμός αντοχής των νιτριλασών στους οργανικούς διαλύτες και έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να λειτουργήσουν σε μέσα με υψηλό ποσοστό αυτών. Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις που ο διαλύτης μπορεί να επηρεάσει την πρωτεϊνική δομή καταστρέφοντας τη λειτουργικότητα του ενζύμου, ενώ μπορεί να επιδράσει και στην εναντιοεκλεκτικότητά του (Chen at al. 2009), γι' αυτό και η ενζυμική υδρόλυση σε οργανικούς διαλύτες απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Με βάση, τώρα, την εξειδίκευση του υποστρώματος των νιτριλασών από διαφορετικές πηγές, αυτές κατατάσσονταν σε αλιφατικές, αρωματικές/ετεροκυκλικές και αρυλακετο-νιτριλάσες (Εικόνα 1.8.2):



Εικόνα 1.8.2: *Κατηγοριοποίηση νιτριλασών ως προς την εξειδίκευση υποστρώματος (προσαρμοσμένο από Nigam et al. 2017)*

Πέρα από τη χρήση τους στη σύνθεση βασικών καρβοξυλικών οξέων όπως το *p*-αμινο βενζοϊκό οξύ, το ακρυλικό οξύ, το νικοτινικό οξύ, το ινδολο-3-οξικό οξύ και στη βιομηχανική παραγωγή ακρυλαμιδίου, νικοτιναμίδης και ορισμένων άλλων αμινοξέων τα τελευταία χρόνια, τα ένζυμα υδρόλυσης νιτριλίου διερευνώνται για τη χρήση τους στη μονάδα επεξεργασίας κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων για τη βελτίωση της ποιότητας των φίλτρων ελαχιστοποιώντας την πρακτική των σκληρών χημικών ουσιών για σκοπούς επεξεργασίας. Τα ενζυμικά αυτά συστήματα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την αποικοδόμηση κυανιδίων από ζιζανιοκτόνα που εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα του οικοσυστήματος (Nigam et al., 2017).

1.8.1 Μυκητιακές Νιτριλάσες

Σε παλαιότερες μελέτες, η δραστηριότητα νιτριλάσης αναφέρθηκε σε αρκετά μυκητιακά στελέχη από τα γένη *Fusarium, Gibberella, Aspergillus* και *Penicillium*, τα οποία μπορούν να υδρολύσουν την ινδόλη-3-ακετονιτρίλιο (IAN) σε ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) (Gong et al. 2016). Ωστόσο, λίγες πληροφορίες σχετικά με τη μυκητιακή νιτριλάση είναι διαθέσιμες τις επόμενες δεκαετίες. Πιο συγκεκριμένα, μόνο στέλεχος *F. solani* αναφέρθηκε ικανό να αποικοδομήσει τα ζιζανιοκτόνα 3,5-διβρωμο-4-υδροξυβενζονιτρίλιο (βρωμοξυνύλιο) και 3,5-διιωδο-4-υδροξυβενζονιτρίλιο (ioxynil) (Hsu et al., 1979)). Ακολούθησε καθαρισμός και χαρακτηρισμός μιας νιτριλάσης από το μύκητα *F. solani* IMI 196840, που απομονώθηκε από έδαφος επεξεργασμένο με βρωμοξυνίλιο και μπορεί να αναπτυχθεί με βενζονιτρίλιο ως μοναδική πηγή άνθρακα και αζώτου. Αναλύθηκε η σημασία της νιτριλάσης από το *F. solani* IMI 196840 στην διάσπαση των ζιζανιοκτόνων στο περιβάλλον. Έκτοτε, το συγκεκριμένο ένζυμο ήταν η μοναδική χαρακτηρισμένη μυκητιακή νιτριλάση για περισσότερο από δέκα χρόνια μέχρι την εμφάνιση της νιτριλάσης από τον *F. oxysporum f. sp. melonis* το 1989 (Gong et al. 2012). Αργότερα, μια ομάδα από την Τσεχική Δημοκρατία πραγματοποίησε έρευνες, κυρίως για μυκητιακές νιτριλάσες. Οι νιτριλάσες από τους *A. niger* K10 και *F. solani* O1, που χρησιμοποιήθηκαν από αυτή την ομάδα, αποδείχθηκαν ελπιδοφόροι βιοκαταλύτες στον μετασχηματισμό νιτριλίου (Winkler et al. 2009). Και οι δύο αυτές νέες μυκητιακές νιτριλάσες καθαρίστηκαν, ακινητοποιήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση καρβοξυλικών οξέων. Επιπλέον, η προαναφερθείσα από τον *F. solani* IMI 196840 νιτριλάση διερευνήθηκε περαιτέρω. Ο πίνακας που ακολουθεί (Πίνακας 1.8.1) δείχνει ορισμένους αναφερόμενους νηματοειδείς μύκητες με δραστικότητα νιτριλάσης.

Πίνακας 1.8.1: *Καταγεγραμμένοι νηματοειδείς μύκητες με ενεργότητα νιτριλάσης (προσαρμοσμένο από Gong et al. 2012)*

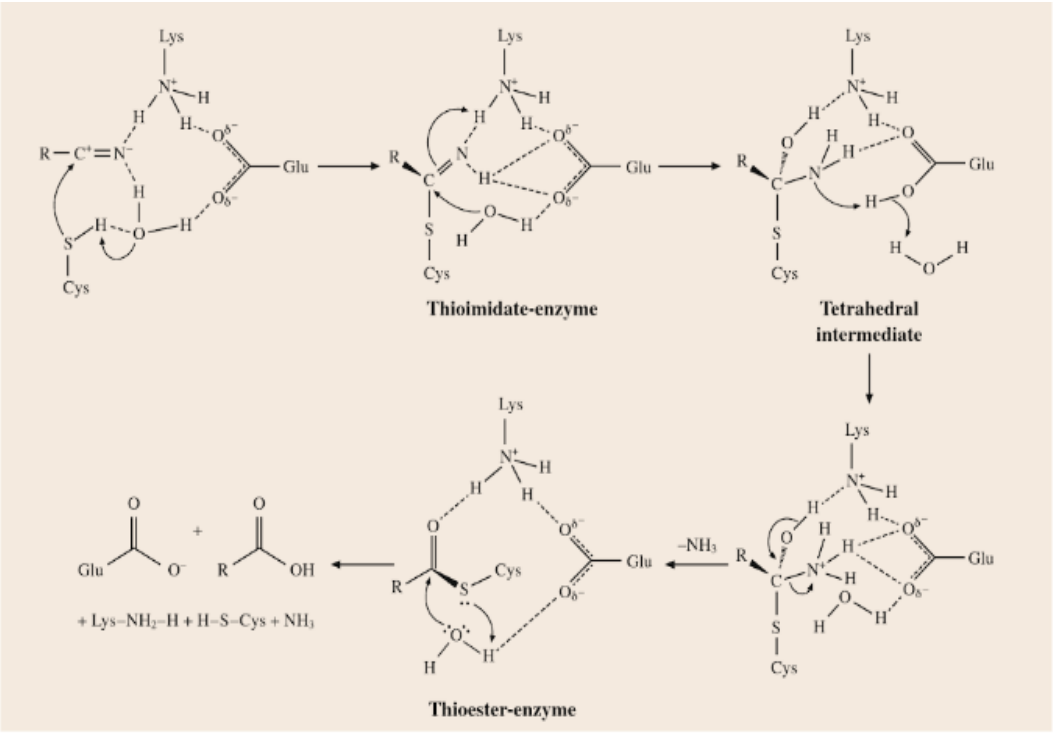
Filamentous fungi	Formation type	Molecular weight (kDa)	Optimum pH / temperature (°C)	Stability pH / temperature (°C)	Substrate specificity	*Km*(M)
A. furmigatus	Inducible	-	-	-	α-Aminophenylacetonitrile	-
F. oxysporum f sp. *melonis*	Inducible	550	- / 40	6-11 / below 40	Aromatic nitriles	1.7×10^{-2}
A. niger K10	Inducible	>650	8 / 45	7.2-9 / below 30	Aromatic nitriles	4.7×10^{-3}
F. solani O1	Inducible	580	8 / 50	7 -9 / 35-50	Aromatic nitriles	1.4×10^{-3}
F. solani IMI 196840	Inducible	550	8 / 45	7.8-9.1 / below 50	Aromatic nitriles	-

Ωστόσο μέχρι και σήμερα το πεδίο των μυκητιακών νιτριλασών παραμένει στον μεγαλύτερο βαθμό ανεξερεύνητο, με μόνο μερικά στοιχεία από την βιομετατροπή νιτριλίων από νηματοειδείς μύκητες, καθιστώντας την περαιτέρω έρευνα πολλά υποσχόμενη. Ενδεικτικά ένα από τα λίγα παραδείγματα παραλαβής νιτριλάσης από θαλάσσιο μύκητα είναι αυτή του βραζιλιάνικου μυκητιακού στελέχους *Aspergillus sydowii* CBMAI 934 που απομονώθηκε από τον θαλάσσιο σπόγγο *Chelonaplysilla erecta* και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μπορούσε να βιοαποδομήσει το μεθυλ-φαινυλ-ακετονιτρίλιο προς τη σύνθεση του αντίστοιχου οξέος (Gong et al. 2016).

1.8.2 Δομή και καταλυτικές ιδιότητες νιτριλάσης

Ο προτεινόμενος μηχανισμός της καταλυτικής δράσης της νιτριλάσης λειτουργεί ως εξής (Petříčková, 2013, De Oliveira et al. 2015) (Εικόνα 1.8.3):

Στο ενεργό κέντρο του ενζύμου υπάρχει μια συγκεκριμένη καταλυτική τριάδα αμινοξέων: κυστεΐνη- γλουταμινικό οξύ- λυσίνη και ένα μόριο νερού. Επιπροσθέτως διαθέτουν μία σουλφιδρυλική ομάδα, απαραίτητη για την βιολογική δραστικότητα και γι' αυτό χαρακτηρίζονται και ως ένζυμα θειόλης (Nigam et al. 2017). Η πρώτη αλληλεπίδραση γίνεται μέσω σύνδεσης του υποστρώματος (νιτρίλιο) με την πρωτονιωμένη λυσίνη με δεσμό υδρογόνου. Επιπλέον δημιουργείται δεσμός υδρογόνου μεταξύ του νιτριλίου και του νερού. Με δεσμό υδρογόνου συνδέονται επίσης με το νερό κυστεΐνη και γλουταμινικό οξύ. Το τελευταίο δε συνδέεται με τον ίδιο τρόπο και με την λυσίνη, σταθεροποιώντας περισσότερο τη δομή του καταλυτικού κέντρου. Σε πρώτη φάση ο ηλεκτρονιόφιλος άνθρακας της κυανομάδας προσεγγίζει την πυρηνόφιλη σουλφιδρυλική ομάδα της κυστεΐνης, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο θειοϊμιδίου- ενζύμου. Ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας της κυστεΐνης ενισχύεται από τη εξ αρχής σύνδεση της με το μόριο νερού. Στη συνέχεια πραγματοποιείται υδρόλυση του συμπλόκου προς ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο. Έπειτα γίνεται πρωτονίωση του αζώτου του τετραέδρου με άτομο υδρογόνου που δεσμεύεται από το γλουταμινικό οξύ. Η πρωτονίωση αυτή ευνοεί την απομάκρυνση αμμωνίας και προάγει τον σχηματισμό ενός συμπλόκου θειοεστέρα- ενζύμου. Τέλος το παραπάνω σύμπλοκο υδρολύεται από ένα μόριο νερού προς το σχηματισμό του αντίστοιχου ελεύθερου καρβοξυλικού οξέος.



Εικόνα 1.8.3: *Προτεινόμενος μηχανισμός ενζυμικής υδρόλυσης νιτριλίου από νιτρλάση (προσαρμοσμένο από De Oliveira et al. 2015)*

Οι νιτριλάσες δεν χρειάζονται, για να δράσουν, την παρουσία κάποιου συμπαράγοντα ή μιας προσθετικής ομάδας.

Αντιθέτως, η υδρατάση του νιτριλίου (NHase), που αποτελεί επίσης ένζυμο που διασπά νιτρίλια, φέρει ένα μεταλλικό κατιόν στο ενεργό της κέντρο που φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο. Το ιόν αυτό μπορεί να είναι Fe^{3+} ή Co^{2+}, γι' αυτό και τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας διακρίνονται σε εξαρτώμενες από σίδηρο(III) και σε εξαρτώμενες από κοβάλτιο (II). Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις υδρατασών των νιτριλίων που χρειάζονται και τα δύο κατιόντα για να δράσουν. Η σημασία των μεταλλοκατιόντων για την λειτουργικότητα του ενζύμου είναι διπλή. Αφενός αποτελούν εξαιρετικούς καταλύτες για την ενυδάτωση της κυανιούχου ομάδας και αφετέρου συμβάλλουν στην σταθερότητα και ευκαμψία των πολυπεπτιδικών αλυσίδων (α- και β- υπομονάδες) του ενζύμου.

Πιο συγκεκριμένα για τη δομή της, όλοι οι συνδέτες που συντονίζονται γύρω στο μεταλλικό ιόν βρίσκονται αποκλειστικά στην α- υπομονάδα. Πρόκειται για τα άτομα

θείου τριών κυστεϊνών, και δύο άζωτα από τα αμινοξέα σερίνη και κυστεΐνη. Η οκταεδρική διαμόρφωση συμπληρώνεται με ένα ιόν υδροξειδίου (OH^-). Ο τρόπος δράσης της υδρατάσης είναι ο εξής (De oliveira et al. 2015):

- Το πυρηνόφιλο υδροξείδιο στοχεύει στο ηλεκτρονιόφιλο άτομο άνθρακα της χαρακτηριστικής ομάδας του νιτριλίου στο υπόστρωμα και δημιουργείται σε δύο στάδια το σταθερό αμίδιο.

Φυσικά πέρα από τα παραπάνω χαρακτηριστικά του ενεργού κέντρου που ακολουθούν σε γενικές γραμμές αυτή τη δομή, οι νιτριλάσες όπως όλα τα ένζυμα, εμφανίζουν εξειδίκευση σε συγκεκριμένα υποστρώματα ανάλογα και με την προέλευσή τους. Για την αποτελεσματικότερη, κατά συνέπεια αποικοδόμηση βιομηχανικών αποβλήτων που περιέχουν διάφορα νιτρίλια, είναι επιθυμητό να χρησιμοποιείται μια μικτή καλλιέργεια μικροοργανισμών που παράγουν νιτριλάσες (Fan et al. 2017). Ωστόσο σήμερα γίνονται σημαντικές έρευνες για την ανακάλυψη ή/και τροποποίηση νιτριλασών ώστε να δρουν σε μεγαλύτερο φάσμα ενώσεων του νιτριλίου προσφέροντας έτσι σπουδαίες δυνατότητες στην βιοκατάλυση.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πειραματικό Μέρος

Πειραματικό Μέρος

Υλικά και Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν

2.1 Υλικά

2.1.1 Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διπλωματική εργασία οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι νηματοειδείς μύκητες. Πρόκειται για οργανισμούς συμβιώτες ασπόνδυλων (σπόγγοι, μαλακά κοράλλια, ανεμώνες, εχινόδερμα), που έχουν συλλεχθεί από μεσόφωτα θαλάσσια οικοσυστήματα. Με τον όρο μεσόφωτες, χαρακτηρίζονται οι εξαρτώμενες από το φως κοινότητες κοραλλιών και άλλων οργανισμών σε βάθη από 30 έως 150 m από την επιφάνεια της θάλασσας. Ουσιαστικά οριοθετούνται ανάλογα με το βάθος στο οποίο διεισδύει το φως. Τέτοιες ζώνες εντοπίζονται σε τροπικές περιοχές όπως στην Ερυθρά θάλασσα, τον Ινδικό Ωκεανό, τις ακτές της Ταϊλάνδης αλλά και σε τμήματα της Ανατολικής και Δυτικής Μεσογείου (Ouazzani et al., 2016).

Συνολικά τα στελέχη που μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα διάσπασης νιτριλίων ήταν 70.

2.1.2 Θρεπτικό Υλικό

Για την διατήρηση των μυκήτων χρησιμοποιήθηκαν στερεές καλλιέργειες σε μίγμα άγαρ και του θρεπτικού υλικού με εμπορική ονομασία «Marine broth (dehydrated culture media) for microbiology» ενώ για την ανάπτυξη, όπως αναφέρεται και στη συνέχεια έγινε χρήση μόνο του παραπάνω εμπορικού σκευάσματος. Το θρεπτικό αυτό μέσο έχει την εξής σύσταση (g/l): Βορικό οξύ - 0,022 / Νιτρικό Αμμώνιο - 0,0016 / Χλωριούχο Ασβέστιο - 1,8 / Χλωριούχο Στρόντιο - 0,034 / Εκχύλισμα ζύμης - 1,0 / Κιτρικός Σίδηρος - 0,1 / Χλωριούχο Μαγνήσιο - 8,8 / Βακτηριολογική Πεπτόνη - 5,0 / Βρωμιούχο Κάλιο - 0,08 / Χλωριούχο Κάλιο - 0,55 / Χλωριούχο Νάτριο - 19,4/ Φθοριούχο Νάτριο -0,0024 / Όξινο Ανθρακικό Νάτριο - 0,16 / Όξινο Φωσφορικό Νάτριο - 0,008 / Πυριτικό Νάτριο - 0,004 / Θειικό Νάτριο - 3,24. Το υλικό αυτό είναι προϊόν παραγωγής της εταιρίας Panreac AppliChem (Γερμανία) και απαιτεί φύλαξη σε δροσερό και ξηρό μέρος.

2.1.3 Υποστρώματα

Τα τρία υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την διαπίστωση της δράσης του ενζύμου νιτριλάση ήταν τα εξής νιτρίλια:

- **Αδιπονιτρίλιο (AdN):** Με μοριακό τύπο $C_6H_8N_2$ και μοριακό βάρος 108,14 g/mol. Το αντιδραστήριο προμηθεύτηκε από την εταιρία Sigma- Aldrich (Η.Π.Α.) σε υγρή μορφή με συγκέντρωση 8,8 M (stock). Το αδιπονιτρίλιο χρησιμοποιήθηκε, ως υπόστρωμα, σε όλη την πειραματική διαδικασία, από την διαλογή μέχρι και το σύνολο των μεθόδων επαγωγής της ενζυμικής ενεργότητας.

- **2-amino-3-chloro-5-cyanopyridine:** Με μοριακό τύπο $C_6H_4ClN_3$ και μοριακό βάρος 153,57 g/mol. Το αντιδραστήριο προμηθεύτηκε επίσης από την εταιρία Sigma- Aldrich (Η.Π.Α.) σε στερεή μορφή. Η χρησιμοποίηση του περιορίστηκε σε δοκιμές κατά τη διεργασία διαλογής και σαν υπόστρωμα σε υγρές καλλιέργειες παράλληλα με το αδιπονιτρίλιο. Ωστόσο δεν έγινε περαιτέρω χρήση του στις μεθόδους επαγωγής της ενζυμικής ενεργότητας. Για την εφαρμογή του γινόταν δημιουργία stock συγκέντρωσης 500 mM με διάλυση του αντιδραστηρίου σε Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Για τα πειράματα πραγματοποιούνταν η κατάλληλη αραίωση κάθε φορά με το DMSO.
- **Ακετονιτρίλιο:** Με μοριακό τύπο C_2H_3N και μοριακό βάρος 41,05 g/mol. Το αντιδραστήριο αυτό προμηθεύτηκε από την εταιρία Fisher Scientific (Αγγλία) σε υγρή μορφή και συγκέντρωση 19,15 M (stock). Η χρήση του συγκεκριμένου αντιδραστηρίου έγινε αποκλειστικά κατά την εφαρμογή των μεθόδων επαγωγής της ενζυμικής ενεργότητας.

2.1.4 Συσκευές – Όργανα – Αναλώσιμα

Στη συνέχεια απαριθμούνται τα διάφορα όργανα και συσκευές που επιστρατεύτηκαν για την διεκπεραίωση της διπλωματικής εργασίας καθώς και άλλα αναλώσιμα υλικά που εντάσσονται στον εργαστηριακό εξοπλισμό:

- 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)
- 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.), ψυχόμενη φυγόκεντρος ALC 4239R (High refrigerated centrifuge) (Ιταλία) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Centrifuge Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Συσκευή ξήρανσης υπό κατάψυξη Christ ALPHA 1-4, B. Braun Biotec. International, Melsungen, (Γερμανία)
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης Nuova II Stir Plate της Thermolyne και Stirrer Magnetic w Hotplate της Bioline scientific (Ελλάδα)
- Ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) και Abs 120-4 (KERN & Sohn GmbH)
- Συσκευή Υπερήχων Vibra-Cell Processor VC 505, Sonics (Η.Π.Α)
- Συσκευή φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices) SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG Labtech)
- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης HPLC SHIMADZU LC20AD
- Συσκευή αέριας χρωματογραφίας SHIMADZU GC-17A

Εκτός από τα παραπάνω όργανα- συσκευές, χρησιμοποιήθηκε ένα πλήθος εργαστηριακών υλικών όπως: ποτήρια ζέσως, κωνικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι, τρυβλία, eppendorf tubes, falcon tubes, πιπέτες paster, μπουκάλια αποστείρωσης, χωνιά, δοκιμαστικοί σωλήνες κ.α.

2.1.5 Εμπορικά ένζυμα

Το εμπορικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν μία λυτικάση (lyticase) από την εταιρία Sigma- Aldrich (Η.Π.Α.) ενεργότητας (5297 U/mg πρωτεΐνης).

2.1.6 Ρυθμιστικά Διαλύματα

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ρυθμιστικά διαλύματα (ΡΔ):

- **ΡΔ Borax**: Για τη δημιουργία του χρειάστηκε ένυδρο τετραβορικό Νάτριο με χημικό τύπο $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ και μοριακό βάρος 381,4 g/mol. Η συγκέντρωση του διαλύματος που παρασκευάστηκε ήταν 1,5 mM ενώ τέλος πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH στο 9,5 με HCl.
- **ΡΔ φωσφορικών (KH_2PO_4/K_2HPO_4)** : Το buffer αυτό παρασκευάστηκε ως μίγμα των εξής δύο διαλυμάτων:
    1. Δ/μα KH_2PO_4(όξινο): MW= 174,18 g/mol, τελική συγκέντρωση 200 mM.
    2. Δ/μα K_2HPO_4(βασικό): MW=136,09 g/mol, τελική συγκέντρωση 200 mM.

  Τέλος έγινε σταδιακή προσθήκη του ενός διαλύματος στο άλλο με ταυτόχρονη παρακολούθηση του pH μέχρι την τιμή 7,5. Έτσι δημιουργήθηκε το Stock διάλυμα (200mM). Για τη χρήση του στα διάφορα πειραματικά στάδια γινόταν αραίωση 10 φορές καθώς απαιτούνταν συγκέντρωση 20 mM.

- **ΡΔ Tris-HCl**: Διάλυμα tris(hydroxymethyl)aminomethane (Τρομεθαμίνης) (MW= 121,14 g/mol) τελικής συγκέντρωσης 500 mM. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH στο 7 με πυκνό HCl. Έτσι δημιουργήθηκε

το Stock Tris-HCl buffer. Για τη χρήση του στα διάφορα πειραματικά στάδια γινόταν αραίωση 10 φορές καθώς απαιτούνταν συγκέντρωση 50 mM.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Διαλογή μικροοργανισμών (screening)

Για την μελέτη των διαφόρων στελεχών μυκήτων και την επιλογή εκείνου με την μεγαλύτερη ενεργότητα νιτριλάσης, δημιουργήθηκε ένα κατάλληλο διάλυμα αλάτων (Mineral Medium – MM) (modified Czapek-Dox) το οποίο δεν προσφέρεται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών λόγω της σύστασής του (Πίνακας 2.2.1):

Πίνακας 2.2.1: *Σύσταση διαλύματος Αλάτων (MM)*

Χημική Ένωση	Σύσταση (% w/v)
$MgSO_4.7H_2O$	0,05
KCl	0,05
K_2HPO_4	0,1
NaCl	2
$FeSO_4 . 7H_2O$	0,001
$CoCl . 6H_2O$	0,0001
$ZnSO_4 . 7H_2O$	0,00067

Μετά τη δημιουργία του MM πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH≈ 7,4 και το διάλυμα οδηγήθηκε για αποστείρωση σε αυτόκαυστο Labo Autoclave στους 121 °C για 20 min. Τονίζεται ότι όλες οι αποστειρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε αυτές τις συνθήκες οπότε δε θα αναφέρονται ξανά στη συνέχεια.

Μελετήθηκαν 70 στελέχη οπότε το παραπάνω διάλυμα μοιράστηκε σε falcons (2 για κάθε στέλεχος) με την τοποθέτηση 10 mL αυτού σε καθένα. Για κάθε στέλεχος το ένα falcon (A) θα αποτελούσε το control, καθώς το διάλυμα που δημιουργήθηκε δεν περιελάμβανε άμεσα πηγές άνθρακα, αζώτου κ.τ.λ. ενώ στο άλλο (B) προστέθηκε ορισμένη ποσότητα αδιπονιτριλίου (45 mM) ως μοναδική πηγή αζώτου και άνθρακα. Ακολούθησε εμβολιασμός, υπό ασηπτικές συνθήκες, των falcons με τα στελέχη από τα τρυβλία όπου είχαν ήδη αναπτυχθεί και οδηγήθηκαν για επώαση. Η πρώτη δειγματοληψία έγινε μετά από 48 περίπου ώρες. Από κάθε falcon

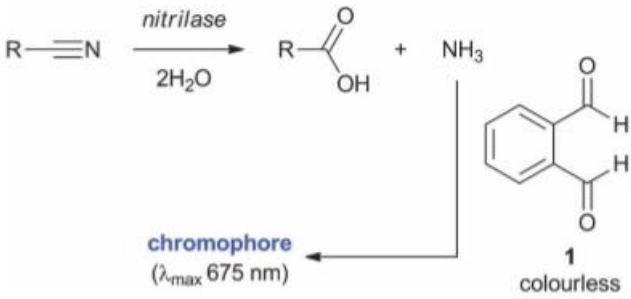
παρελήφθησαν 350 μl, εισήχθησαν σε eppendorfs και φυγοκεντρήθηκαν για περίπου 10 min (12500 rpm). Ακολούθησε η ανίχνευση αμμωνίας.

2.2.1.1 Ανίχνευση αμμωνίας

Η διαδικασία παρασκευής των απαιτούμενων διαλυμάτων περιγράφεται στη συνέχεια και έγινε με τον ίδιο τρόπο σε όλες τις φάσεις της πειραματικής διεργασίας όπου χρειάστηκε να διαπιστωθεί η παραγωγή αμμωνίας:

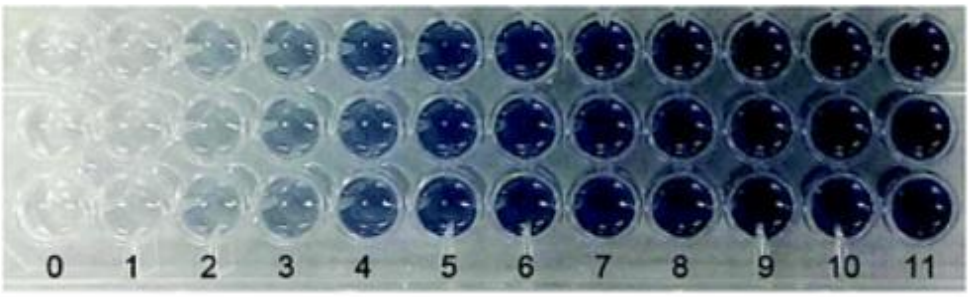
- Δημιουργία διαλύματος ο-φθαλαλδεϋδης (OPA): Απαιτούνται 2 mg OPA/ mL δ/τος τα οποία διαλύονται αρχικά σε μεθανόλη (0,2g/mL μεθανόλης). Αφού γίνει η διάλυση, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα borax (βλ. παράγραφο 2.1.6) ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος που απαιτείται για δεδομένο αριθμό δειγμάτων.
- Σε κάθε αντίδραση η αναλογία όγκων $\delta/\tau o\varsigma\ OPA/DMSO$ είναι $1/1{,}4$
- Για την μέτρηση ακολουθούνται τα εξής βήματα:
  1) Σε μικροπλάκα 96 κυψελών (96 – well plate) τοποθετούνται αρχικά 240 μl του παρασκευασμένου διαλύματος OPA – DMSO που έχει παρασκευαστεί με βάση την παραπάνω αναλογία
  2) Έπειτα προστίθενται 50 μl του δείγματος
  3) Τέλος δημιουργείται διάλυμα τριχλωροξικού οξέος (TCA) 10 % w/v από το οποίο προστίθενται επίσης 50 μl.

Η αμμωνία έχει την ιδιότητα να σχηματίζει ένα ενδιάμεσο χρωμοφόρο σύμπλοκο με το αντιδραστήριο ο–φθαλαλδεϋδη (OPA) (Εικόνα 2.2.1) παρουσία θειώδους άλατος (παρέχεται με την προσθήκη του DMSO) σε βασικό ρυθμιστικό διάλυμα (borax).



Εικόνα 2.2.1: *Απεικόνιση της ενζυμικής δράσης : Η νιτριλάση υδρολύει το νιτρίλιο προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ και αμμωνία. Η αμμωνία αντιδρά με το OPA και σχηματίζεται ένα χρωμοφόρο (μπλε) σύμπλοκο (Black et al. 2015)*

Ωστόσο στο βασικό περιβάλλον όπου δημιουργείται, το ενδιάμεσο αυτό, είναι άχρωμο. Έτσι γίνεται η προσθήκη, στο τέλος, του τριχλωροξικού οξέος (TCA) ώστε το pH από βασικό που είναι αρχικά να γίνει όξινο και το σύμπλοκο αποκτά ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα (Εικόνα 2.2.2).



Εικόνα 2.2.2*: Ενδεικτική απεικόνιση μικροπλάκας με αντιδράσεις OPA- NH_3, σε βασικό περιβάλλον (άχρωμο) αλλά και σε όξινο, με μια σειρά οξέων που οδηγούν σε διαφορετικές αποχρώσεις του μπλε.*

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε λοιπόν για τα διαφορετικά στελέχη και έγινε φωτομέτρηση σε συσκευή microplate reader στα 675 nm. Από τη διαδικασία αυτή επιλέχθηκε ένα στέλεχος με το οποίο και συνεχίστηκε η πειραματική διαδικασία.

2.2.2 Καλλιέργειες

Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δύο μορφές κυτταρικής καλλιέργειας: στερεή και υγρή. Αρχικά δημιουργήθηκαν οι στερεές καλλιέργειες για τα στελέχη που θα μελετούνταν με σκοπό την διατήρηση/συντήρηση των μυκήτων και στη συνέχεια διαμορφώθηκαν οι υγρές καλλιέργειες για να πραγματοποιηθεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών κι έτσι να παραχθεί αρκετή βιομάζα για τις πειραματικές μετρήσεις που θα ακολουθούσαν.

2.2.2.1 Στερεές Καλλιέργειες

Για τη δημιουργία μίας στερεής καλλιέργειας ακολουθείται η εξής διαδικασία:

I. Αρχικά πραγματοποιείται διαλυτοποίηση του θρεπτικού υλικού Marine Broth (βλ. παράγραφο 2.1.2) σε απιονισμένο νερό, σε κατάλληλη ποσότητα ώστε το τελικό διάλυμα να έχει σύσταση 4% w/v σε θρεπτικό.
II. Ακολουθεί ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 7,6 με την προσθήκη καυστικού νατρίου (NaOH) και προσθήκη άγαρ ώστε το τελικό διάλυμα να έχει 1,5 % w/v άγαρ.
III. Το διάλυμα εισάγεται σε κωνική φιάλη, κλείνεται κατάλληλα με αλουμινόχαρτο και οδηγείται για αποστείρωση .
IV. Κάτω από ασηπτικές συνθήκες, γίνεται απόχυση του αποστειρωμένου διαλύματος σε τρυβλία petri (περίπου 25 ml ανά τρυβλίο). Τα τρυβλία κλείνονται και αφήνονται για λίγα λεπτά έως ότου στερεοποιηθεί το υλικό.
V. Έπειτα πραγματοποιείται εμβολιασμός τους με τον μικροοργανισμό υπό ασηπτικές συνθήκες.
VI. Τέλος τα εμβολιασμένα τρυβλία εισάγονται σε επωαστήρα στους 27 °C για πέντε ημέρες.

2.2.2.2 Υγρές Καλλιέργειες

Για τη δημιουργία των υγρών καλλιεργειών ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με τις στερεές με την παρασκευή διαλύματος του θρεπτικού Marine Broth (4 % w/v, pH= 7,6 ± 0,2). Το προκύπτον διάλυμα σφραγίζεται με βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και οδηγείται για αποστείρωση. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, αφού το υλικό επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, πραγματοποιείται εμβολιασμός από τις στερεές καλλιέργειες απευθείας στο θρεπτικό υλικό, με χρήση κρίκου, υπό ασηπτικές συνθήκες. Έπειτα από τον εμβολιασμό οι καλλιέργειες οδηγούνται σε ανακινούμενο επωαστήρα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι συνθήκες στον επωαστήρα είναι : θερμοκρασία 27 °C και ανάδευση 160 rpm. Ο χρόνος ανάπτυξης των μικροοργανισμών εξαρτάται από το εκάστοτε πείραμα (Στο παρόν πείραμα αφήνονται 48 περίπου ώρες στο θρεπτικό).

Σημειώνεται ότι οι συνθήκες επώασης που εφαρμόστηκαν ήταν κάθε φορά αυτές που προαναφέρθηκαν οπότε δεν θα αναφέρονται ξανά στην συνέχεια.

2.2.3 Μεταφορά και ανάπτυξη βιομάζας σε ΜΜ με υπόστρωμα νιτριλίου.

Ύστερα από 48 ώρες επώασης οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε falcon tubes των 50 mL και οδηγούνται για φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο TJ-6 της Beckman Coulter για 15 min. Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και προστίθεται ίση ποσότητα από το αποστειρωμένο ΜΜ που χρησιμοποιήθηκε και κατά τη διαλογή (βλ. παράγραφο 2.2.1). Πραγματοποιείται ξανά φυγοκέντρηση και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού με σκοπό ουσιαστικά την έκπλυση της βιομάζας από τυχόν υπολείμματα του θρεπτικού της καλλιέργειας. Σε δύο κωνικές φιάλες (A, C) εισάγονται από 50 mL του ΜΜ ενώ στην μία από αυτές (A) προστίθεται και το προς μελέτη νιτρίλιο. Η άλλη φιάλη (C) αποτελεί το control. Η βιομάζα μοιράζεται στις κωνικές που οδηγούνται στον επωαστήρα. Για τη διαδικασία αυτή τα νιτρίλια που χρησιμοποιήθηκαν σαν υποστρώματα ήταν το αδιπονιτρίλιο και η 2- amino- 3- chloro- 5- cyanopyridine (βλ. παράγραφο 2.1.3).

Πρέπει να αναφερθεί ότι εκτός των καλλιεργειών των 50 mL, που δημιουργήθηκαν αρκετές φορές, δοκιμάστηκε και η ανάπτυξη σε μεγαλύτερες καλλιέργειες όγκου 200 mL. Σε κάθε περίπτωση, κατά τη χρήση του αδιπονιτριλίου ως υποστρώματος η επιθυμητή συγκέντρωση ήταν 45 mM ενώ για την 2- amino- 3- chloro- 5- cyanopyridine τα 5 mM.

2.2.4 Διαδικασία Παραλαβής κυττάρων από το ΜΜ

Μετά το πέρας 4-5 ημερών διατήρησης των κυττάρων στο ΜΜ μέσα στον επωαστήρα, γίνεται παραλαβή της βιομάζας των κωνικών φιαλών A και C ακριβώς όπως περιγράφηκε προηγουμένως για την μεταφορά από το θρεπτικό στο ΜΜ (βλ. παράγραφο 2.2.3) Έπειτα γίνεται στα κύτταρα προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών συγκέντρωσης 20 mM (βλ. παράγραφο 2.1.6). Πραγματοποιείται εκ νέου φυγοκέντρηση για ξέπλυμα των κυττάρων, απόρριψη του ρυθμιστικού διαλύματος κι έτσι παραλαμβάνονται τα κύτταρα. Στην περίπτωση των μεγαλύτερων καλλιεργειών (200 mL) οι απαιτούμενες φυγοκεντρήσεις γίνονται στην μεγάλη φυγόκεντρο δαπέδου J2-21 επίσης της εταιρίας Beckman Coulter σε, ειδικά για την συσκευή, tubes χωρητικότητας έως 250 mL.

2.2.5 Διαδικασία Λύσης κυττάρων

2.2.5.1 Πρώτο στάδιο: Διάρρηξη κυτταρικού τοιχώματος (ενζυμικά)

Παρασκευάζεται ορισμένη ποσότητα διαλύματος D- Sorbitol (MW=182,17 g/mol) και $MgCl_2.6H_2O$ (MW= 203,3 g/mol) σε ΡΔ φωσφορικών (20 mM) ώστε η συγκέντρωση της σορβιτόλης να είναι 1,2 M και του $MgCl_2$ 0,5 mM. Το ισοτονικό διάλυμα που δημιουργείται μπορεί να συμβάλλει στην οσμωτική σταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης, προστατεύοντάς την από διάρρηξη. Αποτρέπεται έτσι η απώλεια σημαντικών εσωκυτταρικών ουσιών. Αυτό στη συνέχεια προστίθεται στη βιομάζα που έχει παραληφθεί (βλ. παράγραφο 2.2.4). Συγκεκριμένα σε 3 g βιομάζας αντιστοιχούν 10 mL δ/τος. Τα falcons με τη βιομάζα βρίσκονται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας σε πάγο. Ακολουθεί προσθήκη του ενζύμου λυτικάση (lyticase) (βλ. παράγραφο 2.1.5) για να επιφέρει την αρχική ρήξη στο κυτταρικό τοίχωμα (ενζυμική λύση). Η αναλογία για την απαιτούμενη ποσότητα του ενζύμου είναι: 200 μL ενζύμου για 10 mL δ/τος. Έπειτα τα falcons εισάγονται σε επωαστήρα στους 30 °C για 1 με 1:30 h υπό ήπια ανάδευση. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού

πραγματοποιείται εκ νέου φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.

2.2.5.2 Δεύτερο στάδιο: Μηχανική Λύση κυτταρικών μεμβρανών με υπερήχους

Για την οριστική διάρρηξη των κυττάρων και την παραλαβή του εσωκυτταρικού υγρού χρησιμοποιείται η μηχανική διεργασία των υπερήχων που αποτελεί ισχυρότερη μέθοδο από την ενζυμική. Η συσκευή υπερήχων περιλαμβάνει:

• Τη συσκευή που παράγει υπερηχητικά κύματα και

• Ένα ηχόδιο που μεταφέρει τα υπερηχητικά κύματα στο διάλυμα των κυττάρων.

Η διεργασία αυτή στηρίζεται στη χρήση ήχου υψηλής συχνότητας (ultrasound) που δημιουργείται από έναν υπερηχητικό μετατροπέα. Αυτός μετατρέπει την ηλεκτρική ενέργεια που παρέχεται από τη γεννήτρια, σε μηχανικούς κραδασμούς. Τα υπερηχητικά κύματα μέσω του μεταδότη φτάνουν στο υγρό των κυττάρων. Το διάλυμα υφίσταται έτσι υπερηχητική σπηλαίωση με τη βίαιη δημιουργία ασύμμετρων φυσαλίδων που προκαλούν ισχυρές διατμητικές τάσεις επιφέροντας τη λύση των κυττάρων (Bystryak et al., 2015). Το μειονέκτημα στην περίπτωση των υπερήχων είναι ότι αυξάνει η θερμοκρασία του διαλύματος με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος αλλοίωσης ή και καταστροφής ουσιών (π.χ. ευαίσθητα ένζυμα) που επιθυμούμε ενδεχομένως να μελετήσουμε. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με τη χρήση παγόλουτρου μέσα στο οποίο τοποθετείται το ποτήρι με το κυτταρικό διάλυμα και παραμένει σε όλη τη διάρκεια που εφαρμόζονται οι υπέρηχοι. Συμπληρωματικά για την αντιμετώπιση της αύξησης της θερμοκρασίας, η εφαρμογή των υπερήχων γίνεται κατά διαστήματα αφήνοντας χρόνο στο μεταξύ ώστε να χαμηλώνει και πάλι η θερμοκρασία του μεταδότη και του κυτταρικού διαλύματος.

Για την εφαρμογή, λοιπόν, των υπερήχων, τα κύτταρα που παραλήφθηκαν από τις φιάλες C και A επαναιωρούνται στο ΡΔ των K_2HPO_4/KH_2PO_4 συγκέντρωσης 20 mM και εισάγονται σε ποτήρια ζέσεως, εντός παγόλουτρου. Ο όγκος του

ρυθμιστικού δ/τος που προστίθεται είναι περίπου πενταπλάσσιος του διαλύματος D- Sorbitol και $MgCl_2.6H_2O$ στο ΡΔ που χρησιμοποιείται πριν την προσθήκη του ενζύμου. Η εφαρμογή υπερήχων γίνεται τρεις φορές για κάθε δείγμα. Η συσκευή ρυθμίζεται ώστε κάθε 16 sec να λειτουργεί για 8 sec. Καθ' όλη τη διάρκεια της εφαρμογής, τα ποτήρια ζέσεως βρίσκονται μέσα στο παγόλουτρο για αποφυγή αύξησης της θερμοκρασίας.

2.2.6 Μελέτη ενζυμικής δράσης

Μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας με υπερήχους το υγρό μεταφέρεται από τα ποτήρια ζέσεως σε νέα falcon tubes που εισάγονται στην φυγόκεντρο TJ-6 της Beckman Coulter για 20 min (max speed) και το υπερκείμενο/ εσωκυτταρικό υγρό που παραλαμβάνεται και περιέχει το ένζυμο, διατηρείται σε πάγο.

Από τα δείγματα αυτά, λαμβάνεται μικρή ποσότητα και οδηγείται για βρασμό, για 10 min με σκοπό την απενεργοποίηση της ενζυμικής ενεργότητας. Οι νιτριλάσες όπως και τα περισσότερα ένζυμα αδυνατούν να δράσουν σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες καθώς υφίστανται μετουσίωση, δηλαδή πρακτικά καταστροφή της τριτοταγούς δομής του πρωτεϊνικού μορίου με αποτέλεσμα απώλεια και της λειτουργικότητας που είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη δομή.

2.2.6.1 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας

Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας δημιουργούνται αντιδράσεις του 1 mL καθεμία, τόσο για το εσωκυτταρικό υγρό προερχόμενο από το control (C) όσο και για το υγρό προερχόμενο από την κωνική φιάλη που περιείχε το νιτρίλιο (A) σαν μοναδική πηγή αζώτου και άνθρακα (βλ. παράγραφο 2.2.3). Για αντίδραση του 1mL η αναλογία είναι : 920 μL (δ/τος Tris-HCl+ μελετώμενο νιτρίλιο) και 80μL ένζυμο (το υγρό που παραλαμβάνεται από τους υπερήχους). Το νιτρίλιο που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις αυτές είναι το αδιπονιτρίλιο (βλ. παράγραφο 2.1.3). Για κάθε αντίδραση δημιουργείται και το control της που περιέχει το απενεργοποιημένο ένζυμο (μετά το βρασμό). Οι αντιδράσεις αυτές τοποθετούνται σε θερμαινόμενο ανακινούμενο επωαστήρα Eppendorf Thermomixer Comfort στους 35 °C και 900 rpm. Στη συνέχεια παραλαμβάνονται δείγματα των 50 μL σε χρόνους 15, 30, 60 min για μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας με τη μέθοδο ανίχνευσης αμμωνίας (βλ. παράγραφο 2.2.1.1).

2.2.7 Μελέτη της επίδρασης της παρουσίας Mg^{2+} στην ενζυμική ενεργότητα.

Για την πραγματοποίηση αυτού του assay έγινε δημιουργία δύο υγρών καλλιεργειών των 100 mL έκαστη. Μετά από 48 ώρες επώασης για την μία μόνο από τις καλλιέργειες έγιναν οι διεργασίες διαχωρισμού της βιομάζας από το θρεπτικό και μετακίνησης της στο διάλυμα των αλάτων. Έτσι πλέον υπήρχαν μία κωνική φιάλη με την βιομάζα να αναπτύσσεται στο θρεπτικό υλικό Marine Broth (Full Medium- FM) (βλ. παράγραφο 2.1.2) και την άλλη να περιέχει τη βιομάζα στο διάλυμα αλάτων (Mineral Medium-MM) (βλ. παράγραφο 2.2.1). Και στις δύο φιάλες προστέθηκε AdN για τελική συγκέντρωση 45 mM και οδηγήθηκαν ξανά για επώαση. Μετά από 3 ημέρες στον επωαστήρα πραγματοποιήθηκαν όλες οι διεργασίες παραλαβής και λύσης των κυττάρων που περιγράφηκαν στις παραγράφους 2.2.4 και 2.2.5 με τη διαφορά ότι εκτός από το εσωκυτταρικό υγρό

(Intracellular) που παραλήφθηκε στο τέλος, έγινε συλλογή και του εξωκυτταρικού υγρού (Extracellular) (υπερκείμενο υγρό της πρώτης φυγοκέντρησης των καλλιεργειών) και του υγρού που παραλαμβάνεται ως υπερκείμενο μετά και τη διεργασίας της ενζυμικής λύσης (Hydrolysis). Συνολικά λοιπόν συλλέχθηκαν 6 υγρά δείγματα σε falcon tubes των 50 mL, τρία προερχόμενα από ανάπτυξη σε FM και τρία από το MM. Ελήφθησαν δείγματα του 1 mL από το καθένα και οδηγήθηκαν για βρασμό για 10 min με σκοπό την απενεργοποίηση του ενζύμου (blank samples). Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα όγκου 3 mL συγκεντρώσεων 1,7 , 3,3 και 6,7 mM AdN σε ΡΔ Tris-HCl 50 mM και άλλα τρία με τις ίδιες συγκεντρώσεις σε AdN, αλλά αυτή τη φορά σε ΡΔ Tris-HCl με 2% w/v $MgCl_2.6H_2O$.

Σε ειδική μικροπλάκα 96 κυψελών (96 – well plate) τοποθετήθηκαν αντιδράσεις όγκου 250 μL για καθένα από τα 6 υγρά (Extracel., Intracel. Hydrol.) και τα αντίστοιχα 6 blank, για καθεμία από τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις AdN τόσο σε απλό ΡΔ όσο και σε ΡΔ με χλωριούχο μαγνήσιο. Σε κάθε θέση τοποθετήθηκαν 230 μL υποστρώματος και 20 μL ενζύμου (τα υγρά που συλλέχθηκαν). Η μικροπλάκα με τις αντιδράσεις καλύφθηκε με κατάλληλο καπάκι και τοποθετήθηκε για 24 ώρες σε φούρνο στους 27 °C. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα πραγματοποιήθηκε η διεργασία ανίχνευσης αμμωνίας με τη συσκευή φωτομέτρησης microplate reader για την μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας.

2.2.8 Ανάλυση με Χρωματογραφικές Μεθόδους

Γενικά ο όρος «Χρωματογραφία (Chromatography)» περιλαμβάνει ένα σύνολο διεργασιών ανάλυσης και διαχωρισμού, που στηρίζονται στην ιδιότητα των συστατικών ενός μίγματος να κατανέμονται διαφορετικά μεταξύ μιας στατικής φάσης(στερεή ή υγρή) και μιας κινητής φάσης (υγρή ή αέρια). Κάθε συστατικό ‘’έλκεται’’ περισσότερο από μία εκ των δύο φάσεων κι έτσι κινείται ταχύτερα (έλξη με κινητή φάση) ή βραδύτερα (έλξη με στατική φάση). Έτσι διαφοροποιούνται οι ταχύτητες των συστατικών που κινούνται κατά μήκος της χρωματογραφικής στήλης(Παππά, 2004).

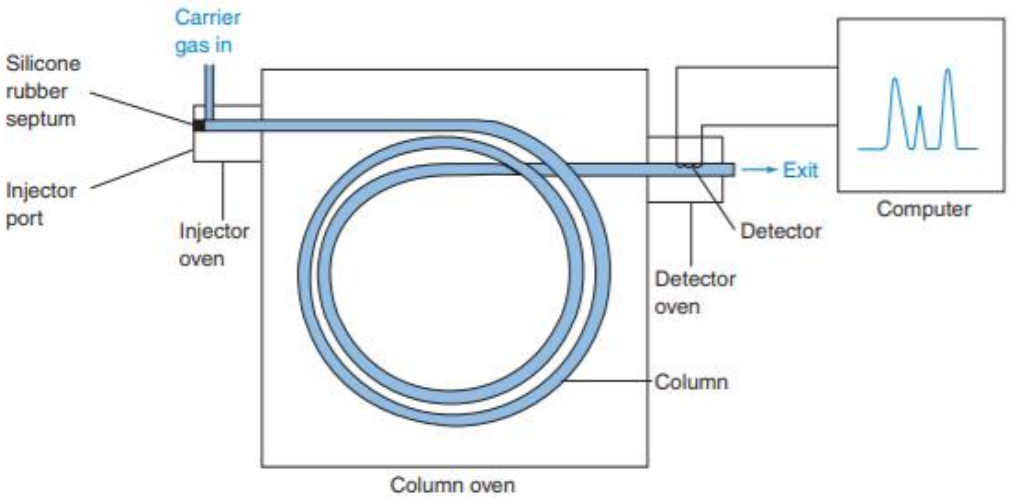
2.2.8.1 Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Στην Αέρια Χρωματογραφία η μελετώμενη ουσία μεταφέρεται από αέρια κινητή φάση που ονομάζεται φέρον αέριο, εντός της στήλης. Λόγω του γεγονότος ότι ο διαχωρισμός γίνεται στην αέρια φάση, κάθε στερεό ή υγρό δείγμα προς ανάλυση, πρέπει να αεριοποιείται. Επιπλέον για ανάλυση με GC απαιτείται το δείγμα να είναι θερμικά σταθερό και ικανοποιητικά πτητικό. Ο πιο κοινός τύπος αέριας χρωματογραφίας είναι η GLC (Gas-Liquid-Chromatography) όπου η στατική φάση είναι ένα μη πτητικό υγρό, ενώ υπάρχει και GSC (Gas-Solid-Chromatography) όπου η στατική φάση είναι στερεή. Η κινητή φάση δε, είναι ένα αδρανές αέριο (H_2, N_2, He) (Harry, 2007, Παππά,2004).

Τα βασικά τμήματα ενός συστήματος GC είναι:

- Εισαγωγέας δείγματος (Injector)
- Στήλη (Column)
- Ανιχνευτής (Detector)
- Σύστημα παροχής φέροντος αερίου(carrier gas)
- Σύστημα επεξεργασίας δεδομένων

Ένα ενδεικτικό σχήμα με τα βασικά τμήματα της διάταξης φαίνεται στη συνέχεια (Εικόνα 2.2.3):



Εικόνα 2.2.3: *Σχηματική απεικόνιση των βασικών τμημάτων ενός Αέριου Χρωματογράφου (Harris, 2007).*

2.2.8.1.1 Προετοιμασία Δειγμάτων με απευθείας εκχύλιση

Πριν την εφαρμογή της ανάλυσης, έγινε δημιουργία δύο υγρών καλλιεργειών (100 mL έκαστη) του επιλεγμένου στελέχους (βλ. παράγραφο2.2.2.2). Ακολούθησε επώαση και μεταφορά της βιομάζας από το θρεπτικό υλικό στο ΜΜ. Συγκεκριμένα το διάλυμα αλάτων μοιράστηκε σε τέσσερις κωνικές φιάλες των 250 mL (50 mL σε καθεμία). Στις δύο πρώτες κωνικές μοιράστηκε η βιομάζα της μίας υγρής καλλιέργειας και στην μία από αυτές προστέθηκε αδιπονιτρίλιο ώστε να έχει συγκέντρωση 45 mM. Το περιεχόμενο της άλλης κωνικής χρησιμοποιήθηκε σαν control. Στις άλλες δύο έγινε η αντίστοιχη εργασία για το νιτρίλιο 2-amino- 3-chloro-5-cyanopyridine για τελική συγκέντρωση 4 mM. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα. Για 18 περίπου ημέρες γινόταν λήψη δείγματος 500 μL από τις κωνικές για ανάλυση με GC. Αρχικά τα 500 μL από κάθε κωνική μεταφέρονταν σε eppendorf tubes των 1,5 mL και οδηγούνταν στην ψυχόμενη φυγόκεντρο ALC 4239R για περίπου 15 min (12500 rpm). Έπειτα γινόταν μεταφορά του υπερκείμενου υγρού των δειγμάτων σε νέα eppendorfs. Με τον τρόπο αυτό διαχωρίζονταν το εξωκυτταρικό υγρό από τα κύτταρα. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν εκχύλιση όλων των δειγμάτων (εξωκυτταρικού υγρού και κυττάρων) με ίσο όγκο οξικού αιθυλεστέρα. Τέλος γινόταν αραίωση των εκχυλισμάτων -10 φορές για τα εξωκυτταρικά , 5 φορές για τα εσωκυτταρικά - και έγχυση τους στην συσκευή GC. Αναφέρεται ότι ο χρόνος ανάσχεσης για το AdN είναι περίπου 8,5 min και για την κυανοπυριδίνη 11,3 min. Παράλληλα με τη διεργασία αυτή λαμβάνονταν δείγματα από τις κωνικές και για ανίχνευση αμμωνίας (βλ. παράγραφο 2.2.1.1).

2.2.8.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων με μεθανόλυση

Από τα τρία ενζυμικά υγρά της διεργασίας με το $MgCl_2$ (βλ. παράγραφο 2.2.7) (Extracellular, Intracellular και Hydrolysis') αυτό που έδωσε τις υψηλότερες τιμές κατά την ανίχνευση αμμωνίας επεξεργάστηκε περαιτέρω με τη διεργασία της μεθανόλυσης. Αρχικά πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό και στη συνέχεια συμπύκνωση του υγρού σε συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400. Για το συμπυκνωμένο υγρό έγινε βρασμός μικρής ποσότητας (για τυφλό) και έπειτα δημιουργία αντιδράσεων 1mL με υποστρώματα αδιπονιτρίλιο και ακεντονιτρίλιο σε buffer Tris- HCl-$MgCl_2$ (2%) (920 μL ΡΔ+υπόστρωμα και 80 μL ενζύμου) σε συγκεντρώσεις 1, 2 και 5 mM. Οι αντιδράσεις τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενο ανακινούμενο επωαστήρα Eppendorf Thermomixer Comfort στους 35 °C, 900 rpm και έγινε παραλαβή δείγμάτων για μέτρηση αμμωνίας μετά από 2, 5 και 24 ώρες. Επίσης δημιουργήθηκαν δείγματα των 2 mL αδιπικού, οξικού οξέος, αδιπονιτριλίου και ακετονιτριλίου για τις συγκεντρώσεις αυτές στο ίδιο ΡΔ χωρίς ωστόσο την προσθήκη ενζύμου, για να χρησιμοποιηθούν σαν πρότυπα. Για τις αντιδράσεις και τα πρότυπα εφαρμόστηκαν οι παρακάτω μέθοδοι:

- Μέθοδος 1η :

Για την πραγματοποίηση της μεθανόλυσης παρασκευάστηκαν 10 mL του εξής διαλύματος: 8 % w/v HCL σε μίγμα MeOH/H_2O (85:15 v/v)(M). Έπειτα για καθένα από τα παραπάνω δείγματα έγινε σε falcon tubes των 15 mL ανάμιξη: 0,2 mL δείγματος + 1,5 mL MeOH + 0,3 mL δ/τος M. Στη συνέχεια τα falcon tubes οδηγήθηκαν για αποστείρωση για 1 h στους 100 °C και ακολούθησε εκχύλισή τους με διαλύτη εξάνιο. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές προσθήκη 1 mL εξανίου στα δείγματα, ανάδευση σε vortex, παραλαβή οργανικής φάσης και μερική εξάτμισή της σε μικροφυγόκεντρο πάγκου Centrifuge Eppendorf 3200. Οι συνολικές ποσότητες που συλλέχθηκαν από τις εκχυλίσεις των 8 δειγμάτων εγχύθηκαν στην συσκευή GC (βλ. παραγράφους 2.2.8.1 και 2.2.8.1.3).

- Μέθοδος 2η :

Από τα δείγματα παραλήφθηκαν 200 μL, τοποθετήθηκαν σε eppendorf tubes τα οποία παρέμειναν ανοικτά και καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο στο οποίο ανοίχτηκαν μικρές οπές. Έπειτα οδηγήθηκαν σε υπερκαταψύκτη για 15 min και τέλος στην συσκευή του Freeze Drying με λειτουργία στους -40°C. Αφέθηκαν εκεί για 19 περίπου ώρες.

Παρασκευάστηκε διάλυμα όγκου 2 mL MeOH:HCL (92:8) και μετά το πέρας των 19 ωρών προστέθηκαν σε καθένα από τα, στερεά πλέον, δείγματα από 0,25 mL του παραπάνω διαλύματος και τα μίγματα μετά από ανάδευση τοποθετήθηκαν για 15 min σε υδατόλουτρο στους 60 °C. Ακολούθως παρασκευάστηκαν 2 mL διαλύματος $CaCL_2$ 5% w/v σε H_2O και μετά την παραμονή στο υδατόλουτρο προστέθηκαν από 0,25 mL αυτού σε κάθε δείγμα. Τέλος έγινε εκχύλιση με 0,1 mL εξάνιο στο κάθε δείγμα τέσσερις φορές. Οι ποσότητες που συλλέχθηκαν από την εκχύλιση εγχύθηκαν στην GC.

2.2.8.1.3 Πρόγραμμα Ανάλυσης δειγμάτων

Χρησιμοποιήθηκε συσκευή SHIMADZU GC-17A με ενσωματωμένη τριχοειδή στήλη 30 m Equity®-5 και η κινητή φάση ήταν αέριο ήλιο (He). Δείγματα 1μL εγχέονταν με διαχωρισμό ροής (split mode) 1:5 και η θυρίδα έγχυσης διατηρούνταν στους 280 °C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

- 70°C για 3 min
- Αύξηση στους 210 °C με ρυθμό 15 °C/min και διατήρηση στη θερμοκρασία αυτή για 1 min
- Αύξηση στους 280 °C με ρυθμό 30 °C/min και διατήρηση στη θερμοκρασία αυτή για 3 min

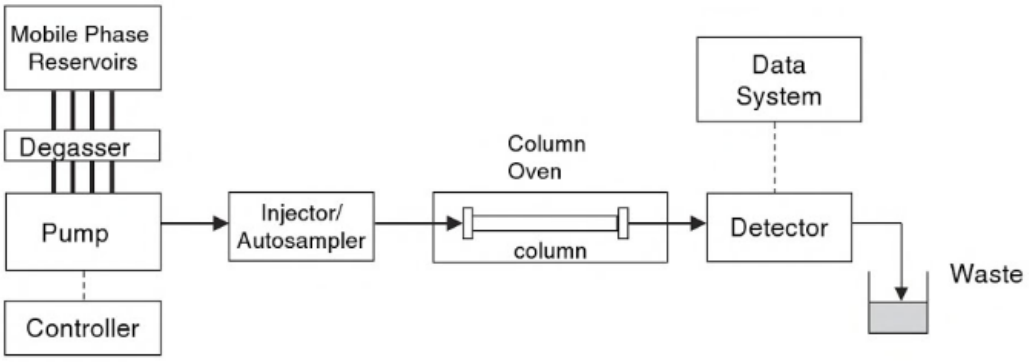
Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (Flame Ionization Detector/FID) που είναι κατάλληλος για οργανικές ουσίες, διατηρούμενο στους 300 °C.

2.2.8.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Ανάλυσης (HPLC)

Όπως υποδηλώνει και το όνομά της η HPLC ανήκει στις υγρές χρωματογραφικές μεθόδους, όπου δηλαδή η κινητή φάση είναι υγρή. Αποτελεί μια δημοφιλή τεχνική ανάλυσης για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε συστατικού ενός μίγματος. Η HPLC είναι μια προηγμένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας στήλης στην οποία ο διαλύτης συνήθως διέρχεται διαμέσου της στήλης με τη βοήθεια της βαρύτητας. Αντίθετα με την τεχνική HPLC ο διαλύτης θα αναγκαστεί κάτω από υψηλές πιέσεις (μέχρι 400 atm) να κινηθεί και το δείγμα να διαχωριστεί σε διαφορετικά συστατικά ανάλογα με τη σχετική συγγένεια ως προς τις δύο φάσεις (Thammana, 2016).

Η διαμόρφωση της οργανολογίας της HPLC στηρίχτηκε στην Αέρια Χρωματογραφία. Ένα σύστημα ανάλυσης HPLC περιλαμβάνει(Παππά, 2004):

- Δεξαμενή διαλύτη/ διαλυτών(κινητή φάση)
- Σύστημα άντλησης της κινητής φάσης από τη δεξαμενή προς τη στήλη και μετά στον ανιχνευτή
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος στη στήλη
- Στήλη
- Προστήλη
- Ανιχνευτές (RID για δείκτη διάθλασης, DAD για UV/Vis)
- Σύστημα επεξεργασίας δεδομένων (Η/Υ)



Εικόνα 2.2.4: *Σχηματική απεικόνιση ενός συστήματος HPLC με τα βασικά μέρη του (Dong, 2006)*

Η σύσταση της κινητής φάσης μπορεί να είναι σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης, οπότε έχουμε ισοκρατική έκλουση (isocratic elution), ενώ όταν αλλάζει βαθμιαία έχουμε σταδιακή έκλουση (gradient elution). Η επιτυχία μίας ανάλυσης με HPLC εξαρτάται από το είδος και την ισχύ των αλληλεπιδράσεων των συστατικών του δείγματος με τον διαλύτη και την στατική φάση. Μερικά από τα βασικά γνωρίσματα που πρέπει να διαθέτει ένας διαλύτη για να είναι κατάλληλος να χρησιμοποιηθεί σαν κινητή φάση είναι μεταξύ άλλων: η δύναμη και η εκλεκτικότητά του, η υψηλή καθαρότητα, η συμβατότητα του με τον ανιχνευτή, η

εύκολη ανάκτησή του αν απαιτείται, να είναι αναμίξιμος με άλλους διαλύτες κ.α. (Παππά, 2004).

2.2.8.2.1 Προετοιμασία Δειγμάτων

Το αδιπονιτρίλιο και το ακετονιτρίλιο μελετήθηκαν ως προς την ενζυμική τους διάσπαση με την HPLC. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν αντιδράσεις (βλ. παράγραφο 2.2.6.1) με υποστρώματα τόσο AdN σε ΡΔ Tris-HCl όσο και ακετονιτριλίου στο ίδιο ΡΔ συγκέντρωσης 2 mM. Παράλληλα παρασκευάστηκαν κάποια δείγματα αδιπονιτριλίου, αδιπικού οξέος, ακετονιτριλίου και οξικού οξέος όλα συγκέντρωσης 2 mM σε buffer χωρίς την προσθήκη ενζύμου, για να χρησιμοποιηθούν σαν αναφορά.

2.2.8.2.2 Πρόγραμμα Ανάλυσης δειγμάτων

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η HPLC SHIMADZU LC-20AD εξοπλισμένη με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20A. Ο διαλύτης έκλουσης ήταν H_2SO_4 σε υπερκάθαρο H_2O (187 μL οξέος σε 1L νερού) και η ροή του 0,6 mL/min. Η χρωματογραφική στήλη ήταν η HPLC Organic Acid Analysis Column , Aminex HPX-87H Ion Exclusion column (300mm x 7,8mm). Η ανίχνευση των νιτριλίων και των παραγόμενων οξέων επιχειρήθηκε με ανιχνευτή μέτρησης της διαφοράς του δείκτη διάθλασης μεταξύ κινητής φάσης και της εξόδου της στήλης (Refractive Index Detector-RID). Πρέπει να σημειωθεί ότι στην μέθοδο αυτή έγινε επίσης χρήση φούρνου σε θερμοκρασία 65°C και μίας προστήλης που προηγείτο της στήλης. Η προστήλη είναι μικρή στήλη από το ίδιο υλικό με την κύρια στήλη και έχει ρόλο κυρίως προστατευτικό γι' αυτήν.

2.2.9 Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Παράλληλα με τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας μέσω των αντιδράσεων και της ανίχνευσης αμμωνίας που αναλύθηκαν νωρίτερα, πραγματοποιήθηκε και μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των δειγμάτων. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό είναι η Bradford. Πρόκειται για μία σύντομη και αξιόπιστη μέθοδο η οποία βασίζεται στη χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G 250 που αλλάζει χρώμα (από κόκκινο σε μπλε) όταν συνδέεται με πρωτεϊνες. Το σύμπλοκο χρωστικής- πρωτεΐνης απορροφά στα 595 nm (Bradford, 1976).

Για τις μετρήσεις απορρόφησης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Προσθήκη σε eppendorf tube 1 mL του διαλύματος Bradford και 50 μL δείγματος.
- Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος σε vortex και αφέθηκε σε σκοτεινό μέρος για 10 min.
- Μετά το πέρας των 10 min γίνεται φωτομέτρηση στα 595 nm.
- Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την χρήση καμπύλης αναφοράς που έγινε με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης ορού βοδιού, BSA (bovine serum albumin).

Πειραματικό Μέρος

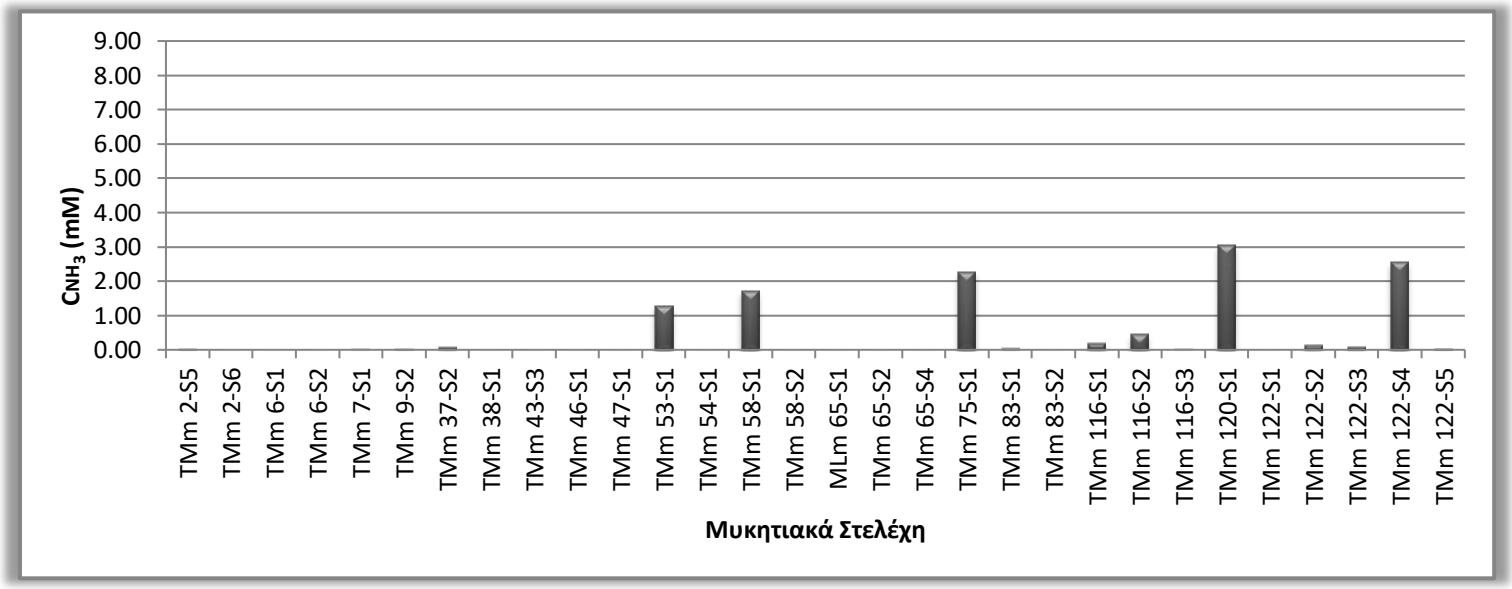
Πειραματικό Μέρος

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

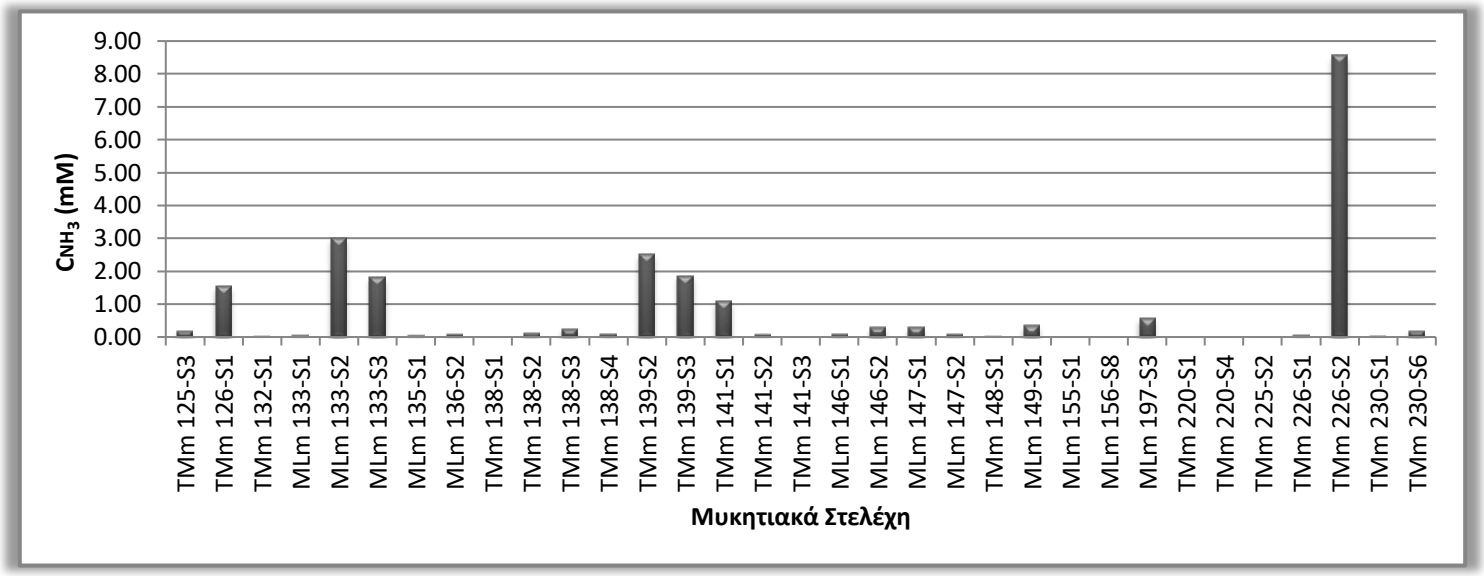
Αποτελέσματα

3.1 Διαλογή Μικροοργανισμών (screening)

Όλα τα μυκητιακά στελέχη (70) μελετήθηκαν ως προς το δυναμικό αποικοδόμησης του αδιπονιτριλίου, έμμεσα, μετρώντας την παραγόμενη αμμωνία από τη διεργασία βιομετατροπής, σε βάθος 2, 3 και 4 ημερών, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 2.1 (πειραματικό). Στα ακόλουθα διαγράμματα (Διάγραμμα 3.1.1, Διάγραμμα 3.1.2) παρατίθενται οι συγκεντρώσεις της παραγόμενης αμμωνίας για τα 70 διαφορετικά στελέχη, ύστερα από 4 ημέρες παραμονής τους στο ΜΜ (Mineral Medium) όπου είχε προστεθεί αδιπονιτρίλιο σαν μοναδική πηγή αζώτου και άνθρακα.

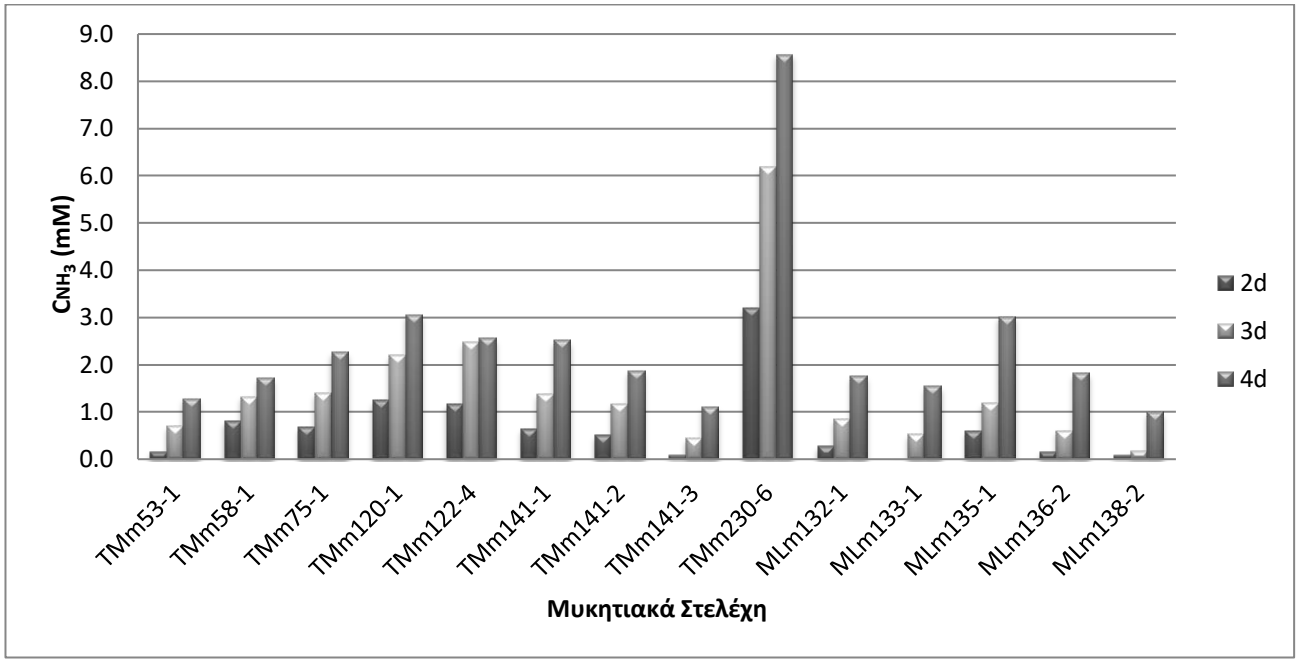


Διάγραμμα 3.1.1: *Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της παραγόμενης αμμωνίας ύστερα από 4 ημέρες παραμονής στο ΜΜ με το αδιπονιτρίλιο για τα διαφορετικά στελέχη(τα πρώτα 35).*



Διάγραμμα 3.1.2*: Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της παραγόμενης αμμωνίας ύστερα από 4 ημέρες παραμονής στο ΜΜ με το αδιπονιτρίλιο για τα διαφορετικά στελέχη(τα υπόλοιπα35).*

Οι απορροφήσεις που μετρήθηκαν με τη χρήση του microplate reader στα 675 nm μετατράπηκαν σε συγκεντρώσεις αμμωνίας μέσω καμπύλης αναφοράς (κλίση: 4,294=C/A). Από τα αποτελέσματα της παραπάνω διεργασίας ξεχώρισαν 14 από τα 70 στελέχη καθώς έδωσαν συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή ίσες του 1 mM την 4^{η} ημέρα και συνεπώς θεωρήθηκε ότι εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ικανότητα ως προς την αποικοδόμηση του αδιπονιτριλίου. Για τα στελέχη αυτά απεικονίζονται στο ακόλουθο γράφημα (Διάγραμμα 3.1.3) οι συγκεντρώσεις της παραγόμενης αμμωνίας και για τις τρεις ημέρες που πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις.



Διάγραμμα 3.1.3: *Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης της παραγόμενης αμμωνίας σε βάθος 2,3 και 4 ημερών στο ΜΜ με το αδιπονιτρίλιο για τα στελέχη με το υψηλότερο δυναμικό αποικοδόμησης του υποστρώματος.*

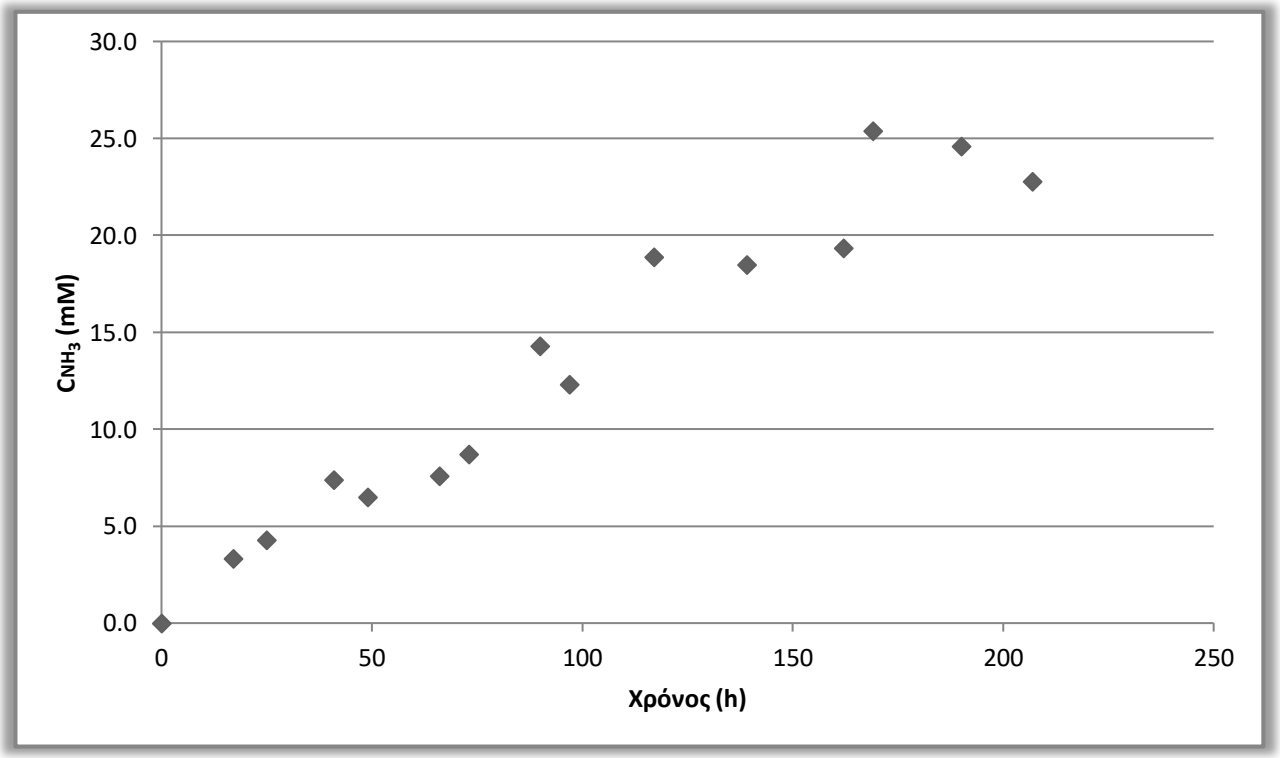
Συνολικά από τα στελέχη αυτά, όπως φαίνεται πιο πάνω, αυτό που ξεχώρισε είναι το στέλεχος 230-6 το οποίο έδωσε με διαφορά υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης αμμωνίας. Ενδεικτικά ήδη την 2^{η} ημέρα έδωσε συγκέντρωση αμμωνίας 2,7 φορές υψηλότερη από το επόμενο σε συγκέντρωση στέλεχος, την 3^{η} 2,5 , και την 4^{η} ημέρα σχεδόν 3 φορές υψηλότερη τιμή από το αμέσως επόμενο σε συγκέντρωση στέλεχος και 8,6 φορές υψηλότερη από το λιγότερο ικανό από τα 14 επιλεγμένα στελέχη.

Αναφέρεται ότι για τα 14 στελέχη που ξεχώρισαν έγινε επανάληψη της διεργασίας της διαλογής, αυτή τη φορά με υπόστρωμα το 2-amino-3-chloro-5-cyanopyridine που ωστόσο δεν έδωσε ένδειξη για την παραγωγή αμμωνίας. Λόγω ενδεχομένως της τοξικότητας του, το υπόστρωμα αυτό δεν κατάφερε να υδρολυθεί από τα στελέχη.

Για το επιλεγμένο στέλεχος έγινε μερική ταυτοποίηση και βρέθηκε ότι πρόκειται για τον μικροοργανισμό του γένους *Penicillium* και πιθανότατα το είδος *citreonigrum.* Το στέλεχος αυτό μελετήθηκε περαιτέρω.

3.2 Μελέτη της ικανότητας αποικοδόμησης αδιπονιτριλίου από τον *P. citreonigrum*

Με τη διαδικασία της διαλογής που προηγήθηκε ο μύκητας *P. citreonigrum* έδειξε μία αξιοσημείωτη δυναμική στην αποικοδόμηση του αδιπονιτριλίου. Για τον μικροοργανισμό λοιπόν αυτό έγινε περαιτέρω διερεύνηση της συγκεκριμένης ικανότητας. Σε αντίθεση με την διαλογή – όπου τμήμα του τρυβλίου όπου βρίσκονταν οι μικροοργανισμοί μεταφέρθηκε απευθείας στο ΜΜ –, εδώ πραγματοποιήθηκαν οι διαδικασίες παρασκευής υγρής καλλιέργειας και μετά από 48 ώρες επώασης, η εισαγωγή της βιομάζας στο ΜΜ με το αδιπονιτρίλιο (βλ. παραγράφους 2.2.2.2, 2.2.3). Ακολούθησε μέτρηση, σε βάθος χρόνου με τακτικές δειγματοληψίες, της παραγόμενη αμμωνίας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στη συνέχεια (Διάγραμμα 3.2.1):



Διάγραμμα 3.2.1: *Απεικόνιση της πορείας παραγωγής αμμωνίας από τον P. Citreonigrum σε διάστημα 207 ωρών.*

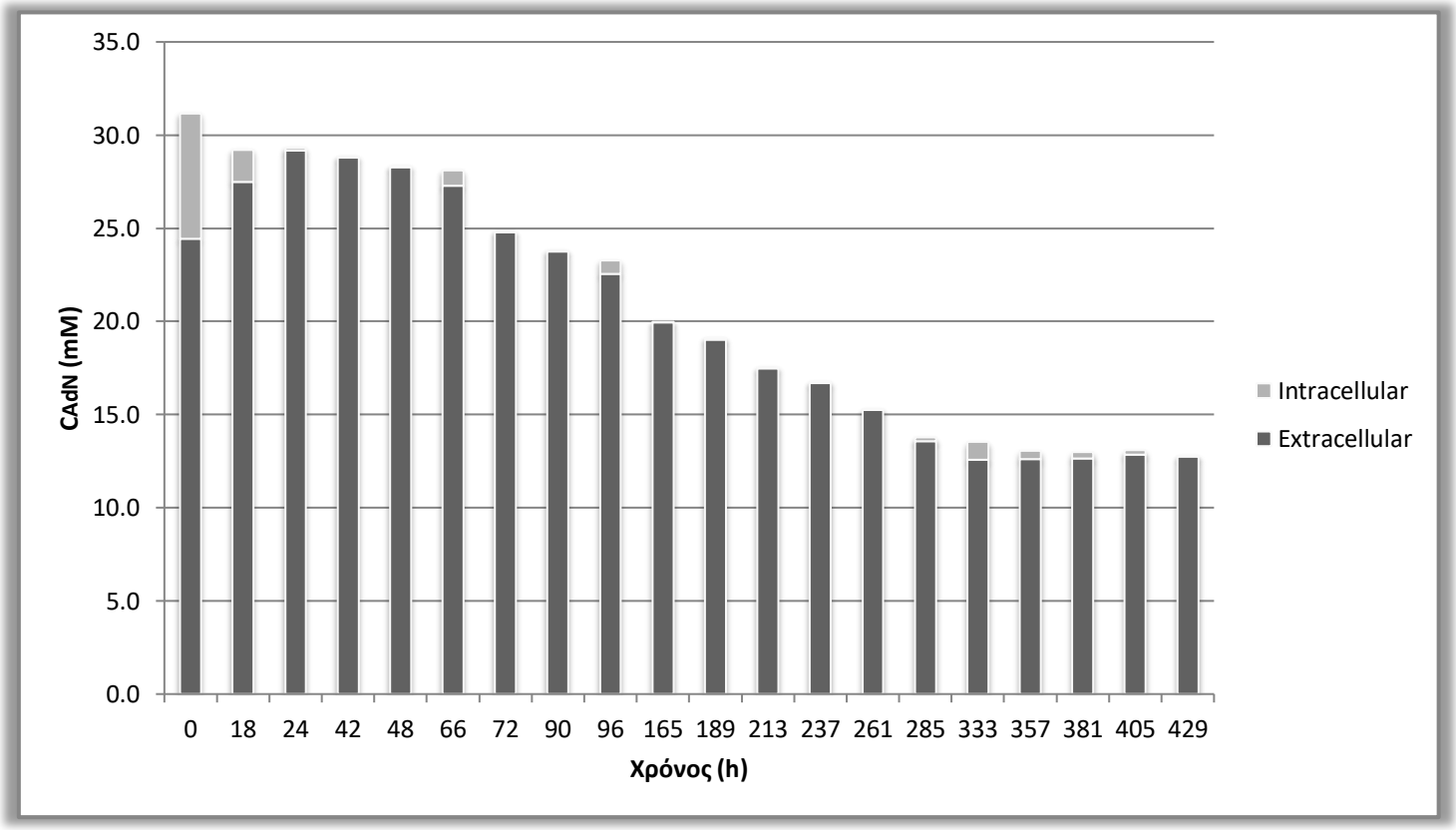
Αποτελέσματα

Όπως φαίνεται παραστατικά στο διάγραμμα η συγκέντρωση της παραγόμενης αμμωνίας διαρκώς αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου μέχρι και τις 7 περίπου ημέρες (169 h). Μετά το πέρας του χρόνου αυτού η τιμή αρχίζει να μειώνεται. Παρατηρούμε λοιπόν ότι ο μικροοργανισμός έχει την ικανότητα για περίπου μία εβδομάδα να αξιοποιεί το αδιπονιτρίλιο ως πηγή αζώτου, διασπώντας το και παράγοντας όλο και περισσότερη αμμωνίας. Οι τιμές στο παραπάνω γράφημα αυξάνονται σχεδόν αλλά όχι απόλυτα γραμμικά. Ο λόγος απόκλισης από την γραμμικότητα οφείλεται στο γεγονός ότι παράλληλα με την παραγωγή της αμμωνίας πραγματοποιείται και ορισμένη κατανάλωση της για τις κυτταρικές λειτουργίες.

3.3 Περαιτέρω διερεύνηση της αποδόμησης Αδιπονιτριλίου

3.3.1 Με ανάλυση σε Αέριο Χρωματογράφο

Η δημιουργία, παραλαβή και προετοιμασία των δειγμάτων καθώς και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στον Αέριο Χρωματογράφο, περιγράφηκε αναλυτικά στην παραγράφους 2.2.8.1.1 και 2.2.8.1.3. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθόδου συνοψίζονται στη συνέχεια (Διάγραμμα 3.3.1):



Διάγραμμα 3.3.1.: *Διαγραμματική απεικόνιση της υπολογιζόμενης συγκέντρωσης του αδιπονιτριλίου σε εκχυλισμένο με οξικό αιθυλεστέρα, εσωκυτταρικό και εξωκυτταρικό υγρό του P. Citreonigrum με χρήση Αέριας Χρωματογραφίας (GC) σε διάστημα 18 περίπου ημερών.*

Αποτελέσματα

Η μετατροπή από την ένδειξη της κορυφής του χρωματογραφήματος σε συγκέντρωση έγινε μέσω καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε με βάση πρότυπα διαλύματα αδιπονιτριλίου γνωστών συγκεντρώσεων που εγχύθηκαν στην GC. Όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, και ειδικά από το γράφημα, η ποσότητα του αδιπονιτριλίου ήταν σχεδόν αμελητέα στο εσωκυτταρικό υγρό από την αρχή της διεργασίας. Θεωρητικά αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς το αδιπονιτρίλιο αναμένεται να αποικοδομείται ενζυμικά από τα κύτταρα οπότε δεν πρέπει να ανιχνεύεται στον εσωκυτταρικό χώρο. Αντίθετα στο εξωκυτταρικό υγρό, με εξαίρεση κάποιες αποκλίσεις λόγω, ενδεχομένως, πειραματικού σφάλματος παρουσιάζει σταδιακή μείωση με την πάροδο του χρόνου, μέχρι που σταθεροποιείται. Η συνολική μείωση από την αρχική συγκέντρωση που καταγράφηκε προκύπτει περίπου 41 % .

3.3.2 Με χρήση της μεθόδου ανίχνευσης NH_3

Παράλληλα με την ανάλυση με GC πραγματοποιούνταν και παραλαβή δειγμάτων για ανίχνευση αμμωνίας με τη μέθοδο που αναλύθηκε στην παράγραφο 2.2.1.1. Από τη διεργασία αυτή υπολογίστηκε η συγκέντρωση της παραγόμενης αμμωνίας σε βάθος 429 ωρών.

Πίνακας 3.3.2: *Μελέτη της βιομετατροπής του αδιπονιτριλίου από τον P.citreonigrum σε βάθος 429 ωρών, μέσω της μέτρησης της συγκέντρωσης της παραγόμενης αμμωνίας παράλληλα με την παρακολούθηση της μεταβολής του υποστρώματος με την GC.*

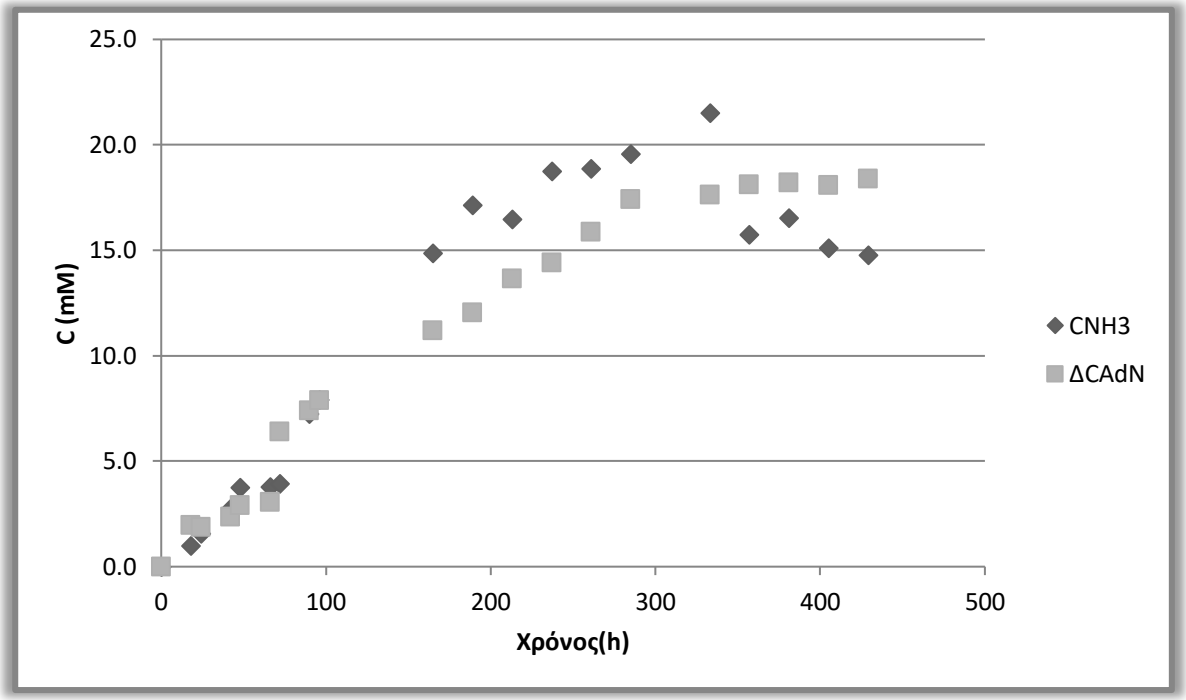
Χρόνος (h)	C_{NH_3} (mM)
24	1,6
42	2,8
48	3,7
66	3,8
72	3,9
90	7,2
96	7,9
165	14,9
189	17,1
213	16,5
237	18,8
261	18,9
285	19,6
333	21,5
357	15,8
381	16,5
405	15,1
429	14,8

Όπως γίνεται αντιληπτό από τις τιμές της συγκέντρωσης, η παραγωγή αμμωνίας εμφανίζει συνολικά μία αύξηση με την πάροδο του χρόνου όπως ήταν αναμενόμενο, μέχρι και τις 333 ώρες όπου έχουμε την υψηλότερη τιμή. Οι επόμενες μετρήσεις εμφανίζουν διακυμάνσεις και σταδιακή μείωση της παραγωγής. Ωστόσο η ολοένα αυξανόμενη παραγωγή αμμωνίας μέχρι τη μέγιστη

τιμή υπολογίζεται αυτή τη φορά στις 13 περίπου ημέρες δηλαδή 6 περίπου περισσότερες ημέρες σε σχέση με την πρώτη μελέτη που έγινε για την ικανότητα του μυκητιακού στελέχους να βιομετατρέπει το αδιπονιτρίλιο (Διάγραμμα 3.2.1). Αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι κατά την πρώτη εφαρμογή της ανίχνευσης αμμωνίας, η πτώση που παρατηρήθηκε μετά τις 169 h ενδεχομένως να οφειλόταν σε κάποια διακύμανση στο σύστημα και επομένως ο χρόνος αυτός δεν αποτελούσε το όριο για την μέγιστη βιοαποικοδομητική ικανότητα του μύκητα. Παράλληλα συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν από την μέθοδο στις δύο περιπτώσεις, παρατηρείται ότι αυτές ενώ ακολουθούν την ίδια σχεδόν γραμμική πορεία με το χρόνο, εμφανίζονται, στην δεύτερη περίπτωση, συνολικά μικρότερες για τους ίδιους χρόνους παραλαβής δείγματος. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι ενώ στην πρώτη εφαρμογή της μεθόδου γινόταν άμεσα στα δείγματα μέτρηση αμμωνίας, στην δεύτερη τα δείγματα λαμβάνονταν παράλληλα με τα αντίστοιχα για GC που απαιτούσαν έπειτα επιπλέον επεξεργασία. Οπότε υπήρχε, για μικρό χρόνο, παραμονή των δειγμάτων σε ψύξη. Ίσως στο διάστημα αυτό μέρος της παραγόμενης αμμωνίας να καταναλωνόταν από τα κύτταρα του δείγματος.

3.3.3 Συσχέτιση αποτελεσμάτων GC-Ανίχνευσης NH_3

Στο ακόλουθο γράφημα (Διάγραμμα 3.3.2) απεικονίζονται συνδυαστικά τα αποτελέσματα των δύο παραπάνω αναλύσεων που έγιναν παράλληλα για τα δείγματα.



Διάγραμα 3.3.2.: *Ταυτόχρονη απεικόνιση της κατανάλωσης του αδιπονιτριλίου όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της GC, με την υπολογιζόμενη συγκέντρωση της παραγόμενης αμμωνίας μέσω της διεργασίας ανίχνευσης με χρήση microplate σε βάθος 429 ωρών.*

Στο διάγραμμα αυτό παρατίθενται οι συγκεντρώσεις της παραγόμενης αμμωνίας στους διάφορους χρόνους παραλαβής δείγματος και η καταναλισκόμενη συγκέντρωση αδιπονιτριλίου με το χρόνο (σχέση με την τιμή του σε χρόνο μηδέν) για να είναι τα δύο μεγέθη άμεσα συγκρίσιμα. Έτσι παρατηρείται ότι η συγκέντρωση του υποστρώματος μειώνεται όλο και περισσότερο από δείγμα σε δείγμα σε σχέση με την αρχική της τιμή (σε χρόνο 0) ενώ συνοδεύεται και από όλο και μεγαλύτερη απελευθέρωση αμμωνίας. Όπως αναμένεται θεωρητικά δεδομένου ότι το αδιπονιτρίλιο είναι δινιτρίλιο, για κάθε 1 mM NH_3 που παράγεται θα έχουν καταναλωθεί 0,5 mM αυτού (αναλογία ½). Πειραματικά προκύπτει για την περιοχή

του γραφήματος όπου υπάρχει μια σταθερότητα των τιμών, για χρόνους από 165 μέχρι και 333 h μια αναλογία 1/1,3.

Όπως αναφέρθηκε και στο πειραματικό μέρος οι παραπάνω διαδικασίες εφαρμόστηκαν παράλληλα με το αδιπονιτρίλιο και για την 2-amino-3-chloro-5-cyanopyridine σαν υπόστρωμα. Ωστόσο τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας δεν είχαν καμία ουσιαστική μεταβολή μεταξύ του πρώτου (σε 0 h) και του τελευταίου (σε 429 h) δείγματος που παραλήφθηκε ενώ κάποιες ενδεικτικές τιμές συγκέντρωσης αμμωνίας που υπολογίστηκαν ήταν σχεδόν μηδενικές. Αυτό δηλώνει ότι το συγκεκριμένο νιτρίλιο δεν δύναται να αποικοδομηθεί από τον μικροοργανισμό μας.

3.4 Αξιολόγηση παραγόμενης βιομάζας

Μετά το πέρας των 17 περίπου ημερών διεξαγωγής των παραπάνω διεργασιών, οι τέσσερις κωνικές φιάλες (2 control και 2 με τα υποστρώματα) από τις οποίες παραλαμβάνονταν δείγματα, οδηγήθηκαν για διήθηση υπό κενό και ζυγίστηκε η βιομάζα που συγκρατήθηκε από το φίλτρο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.4.1):

Πίνακας 3.4.1: *Καταγραφή της τελικής βιομάζας που παράχθηκε ύστερα από 17 ημέρες παραμονής στο ΜΜ παρουσία αδιπονιτριλίου (A_R) και 2-amino-3-chloro-5-cyanopyridine (P_R). Τα A_B,P_B αποτελούν τις φιάλες με το στέλεχος χωρίς ύπαρξη νιτριλίου και αποτέλεσαν τα control για τις μετρήσεις.*

	Καθαρή Βιομάζα (g)
A_B	**0,29**
A_R	**0,56**
P_B	**0,24**
P_R	**0,27**

Τα δείγματα A_B, A_R αντιστοιχούν στις φιάλες control (B-Blank) και με το AdN (R-Reaction) και τα P αντίστοιχα στις κωνικές για την πυριδίνη.

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω τιμές, όσον αφορά στο αδιπονιτρίλιο, η παρουσία του ως υπόστρωμα οδήγησε σε ανάπτυξη τον μικροοργανισμό σχεδόν διπλασιάζοντας την βιομάζα σε σχέση με το σύστημα από το οποίο απουσίαζε το νιτρίλιο (αύξηση 93 % επί της βιομάζας του control). Αυτό το γεγονός αποτελεί μία ακόμα επιβεβαίωση της ικανότητας του στελέχους να αποδομεί το αδιπονιτρίλιο και να χρησιμοποιεί τα προϊόντα της διάσπασης για να επιβιώσει και να αναπτυχθεί. Αντίθετα , απ’ ότι παρατηρείται για το αδιπονιτρίλιο, στην περίπτωση της πυριδίνης η τελική βιομάζα δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη διαφοροποίηση με και χωρίς την ύπαρξή της. Η διαφορά βάρους του control από τη φιάλη με το συγκεκριμένο νιτρίλιο είναι μόλις 10 %. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει την παρατήρηση ότι ο μικροοργανισμός δεν μπόρεσε να καταναλώσει το νιτρίλιο αυτό.

3.5 Μελέτη της επίδρασης της παρουσίας $MgCl_2$ στην ενζυμική ενεργότητα

Για τη μελέτη της επίδρασης που έχει το $MgCl_2$ στην ενεργότητα της νιτριλάσης πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού ταυτόχρονα σε δύο διαφορετικά μέσα [θρεπτικό υλικό (FM) και διάλυμα αλάτων (MM)] παρουσία αδιπονιτριλίου (45 mM). Ακολούθησε ένα σύνολο διεργασιών που αναλύεται στην παράγραφο (πειραματικό) και εφαρμόστηκε στο εσωκυτταρικό (Intracellular) , το εξωκυτταρικό υγρό (Extracellular) (υπερκείμενο υγρό της πρώτης φυγοκέντρησης των καλλιεργειών) και στο υγρό που παρελήφθη ως υπερκείμενο μετά και τη διαδικασία της ενζυμικής λύσης (Hydrolysis) από τις καλλιέργειες και των δύο μέσων (FM, MM). Πιο συγκεκριμένα μετά την παραλαβή των παραπάνω υγρών έγινε με τη μέθοδο Bradford (βλ. πειραματικό) φωτομέτρησή τους στα 595 nm. Τα αποτελέσματα της μέτρησης μετά από ποσοτικοποίηση μέσω καμπύλης αναφοράς φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.5.1):

Πίνακας 3.5.1: *Καταγραφή της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης για τα τρία υγρά (extracellular, intracellular,Hydrolysis) που παραλήφθηκαν ύστερα από ανάπτυξη του μυκητιακού στελέχους σε Full και Mineral Medium (FM,MM αντίστοιχα) παρουσία αδιπονιτριλίου.*

	Πρωτεϊνική Συγκέντρωση (mg/mL)	
	FM	**MM**
Extracellular	0,12	0,08
Hydrolysis	0,69	0,54
Intracellular	0,56	0,68

Ακολούθησε δημιουργία αντιδράσεων για τα παραπάνω υγρά με συγκεντρώσεις 1,7, 3,3 και 6,7 mM AdN σε ΡΔ Tris-HCl 50 mM αλλά και σε ΡΔ Tris-HCl με 2% w/v $MgCl_2.6H_2O$ και τέλος έγινε για τα δείγματα μέτρηση αμμωνίας (βλ. παράγραφο 2.2.7). Οι συγκεντρώσεις της παραγόμενης αμμωνίας που καταγράφηκαν 24 ώρες μετά την δημιουργία των αντιδράσεων παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.5.2), παρουσία και απουσία $MgCl_2$ για τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αδιπονιτριλίου:

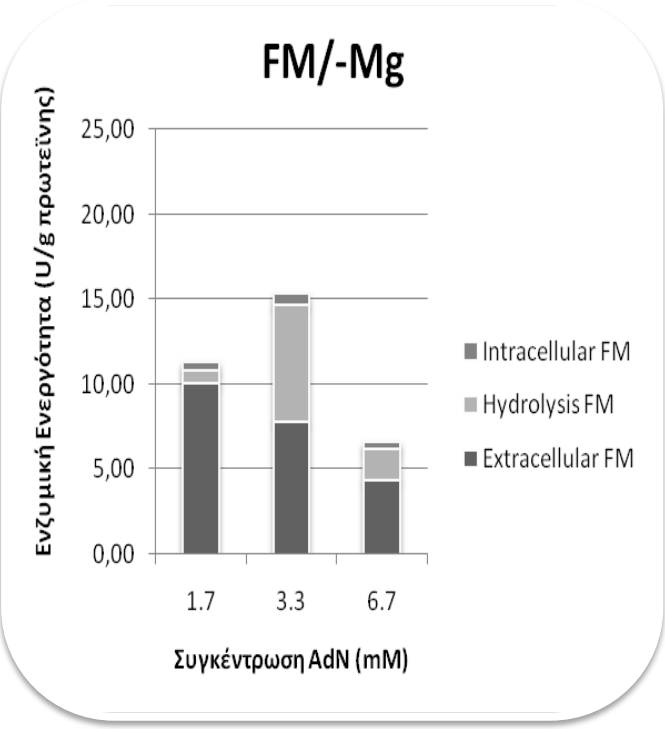
Πίνακας 3.5.2: *Καταγραφή των συγκεντρώσεων της παραγόμενης αμμωνίας για τα τρία υγρά της διεργασίας (extracellular, intracellular,Hydrolysis) για το FM και το MM παρουσία και απουσία $MgCL_2$ για συγκεντρώσεις 1.7, 3.3 και 6.7 mM AdN ύστερα από 24 ώρες αντίδρασης βιομετατροπής.*

	C_{NH_3} (mM)											
Συγκέντρωση AdN (mM)	**Extracellular**				**Hydrolysis**				**Intracellular**			
	FM		**MM**		**FM**		**MM**		**FM**		**MM**	
	- Mg	+Mg	- Mg	+Mg	- Mg	+Mg	- Mg	+Mg	- Mg	+Mg	- Mg	+Mg
1.7	0,14	0,00	0,00	0,01	0,06	0,44	0,30	0,57	0,03	0,40	0,00	1,46
3.3	0,11	0,07	0,00	0,00	0,54	0,63	0,12	0,00	0,04	0,70	0,00	1,18
6.7	0,06	0,02	0,00	0,00	0,15	0,20	0,00	0,00	0,03	0,58	0,09	0,69

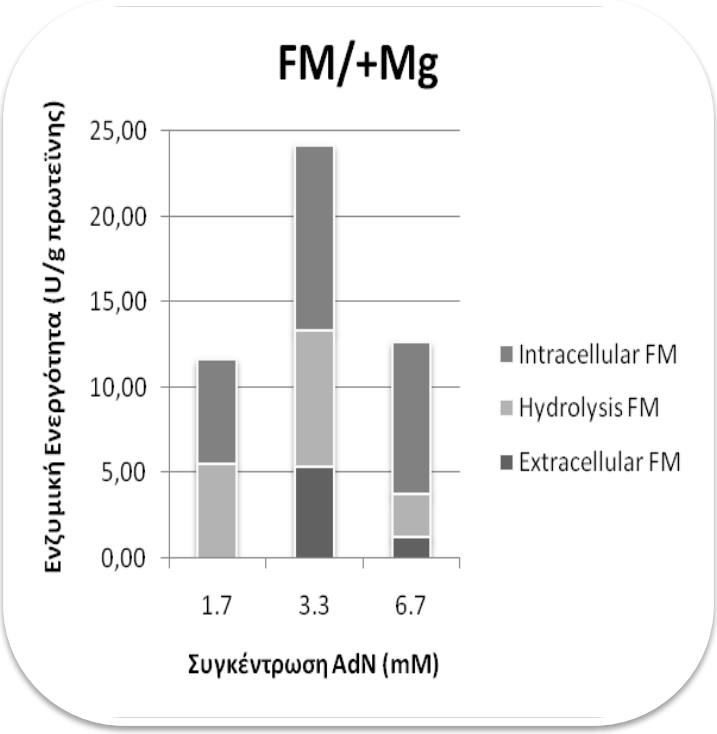
Όπως φαίνεται με μια πρώτη παρατήρηση στα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα στην περίπτωση του εξωκυτταρικού υγρού οι τιμές είναι συνολικά χαμηλές, ιδιαίτερα για το MM που είναι πρακτικά μηδενικές, ενώ για τα άλλα δύο υγρά εμφανίζουν κάποιες αξιόλογες τιμές.

Για την αποτελεσματικότερη μελέτη της επίδρασης του $MgCl_2$ στην ενζυμική ενεργότητα, έγινε μετατροπή των παραπάνω τιμών σε Units/g ενζύμου αξιοποιώντας τις τιμές πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του Πίνακα 3.5.1. Η ενζυμική μονάδα Unit ορίζεται ως το ποσό του ενζύμου που προκαλεί την παραγωγή 1 μmole προϊόντος (αμμωνίας) σε 1 min. Για την άμεση σύγκριση των υπολογισμένων ενεργοτήτων λαμβάνοντας υπ' όψιν όλες τις παραμέτρους (είδος υγρού,

συγκέντρωση υποστρώματος, MM-FM), γίνεται στη συνέχεια διαγραμματική απεικόνιση τους (Διαγράμματα 3.5.1 έως 3.5.4):

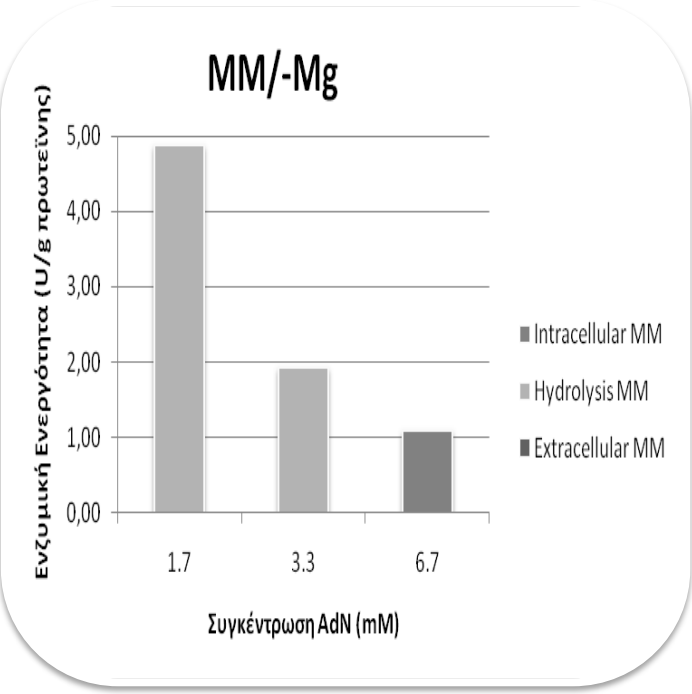


Διάγραμμα 3.5.1: *Απεικόνιση της ενζυμικής ενεργότητας για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AdN σε FM απουσία $MgCl_2$.*

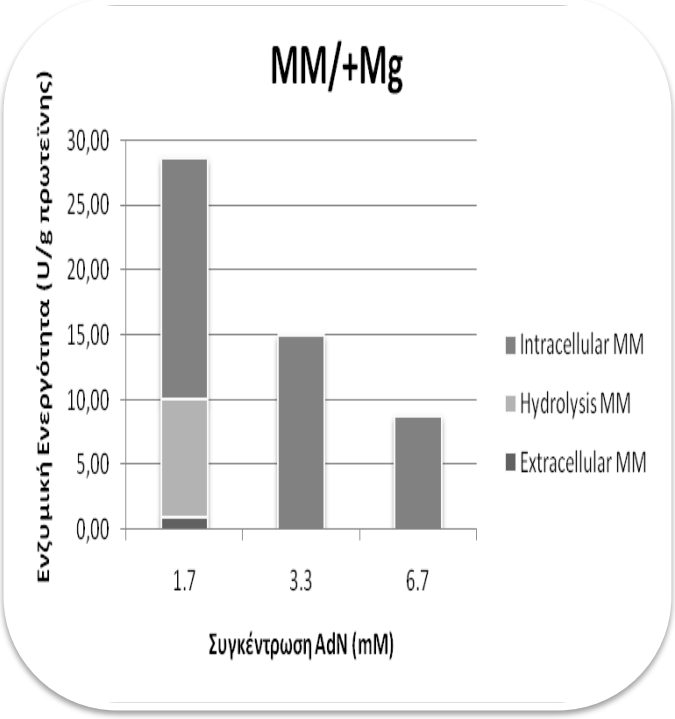


Διάγραμμα 3.5.2: *Απεικόνιση της ενζυμικής ενεργότητας για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AdN σε FM παρουσία $MgCl_2$.*

Όσον αφορά στο Full Medium (FM) φαίνεται ότι από τα τρία υγρά τις μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας παρουσιάζει το εσωκυτταρικό παρουσία $MgCl_2$ για συγκεντρώσεις υποστρώματος 3.3 και 6.7 mM ενώ για τη χαμηλότερη συγκέντρωση 1.7 mM το εξωκυτταρικό, απουσία του $MgCl_2$.



Διάγραμμα 3.5.3: *Απεικόνιση της ενζυμικής ενεργότητας για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AdN σε MM απουσία $MgCl_2$.*



Διάγραμμα 3.5.4: *Απεικόνιση της ενζυμικής ενεργότητας για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AdN σε MM παρουσία $MgCl_2$.*

Αντίστοιχα για το MM φαίνεται ξεκάθαρα από την πολύ μεγάλη διαφορά στην τάξη μεγέθους των τιμών ενεργότητας, ότι παρουσία του $MgCl_2$ αυτές είναι εξαιρετικά υψηλότερες για το εσωκυτταρικό και το προερχόμενο από την υδρόλυση ενώ για το εξωκυτταρικό είναι ουσιαστικά μηδενικές και στις δύο περιπτώσεις.

Συνολικά αξιολογώντας και τα τέσσερα γραφήματα προέκυψε ότι η παρουσία του $MgCl_2$ οδήγησε σε υψηλότερες ενζυμικές ενεργότητες και μάλιστα στην περίπτωση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού στο MM είχαμε τα μεγαλύτερα αποτελέσματα, ειδικά για το εσωκυτταρικό υγρό. Προκύπτει δηλαδή ότι η έκφραση του ενζύμου στο MM είναι περισσότερη.

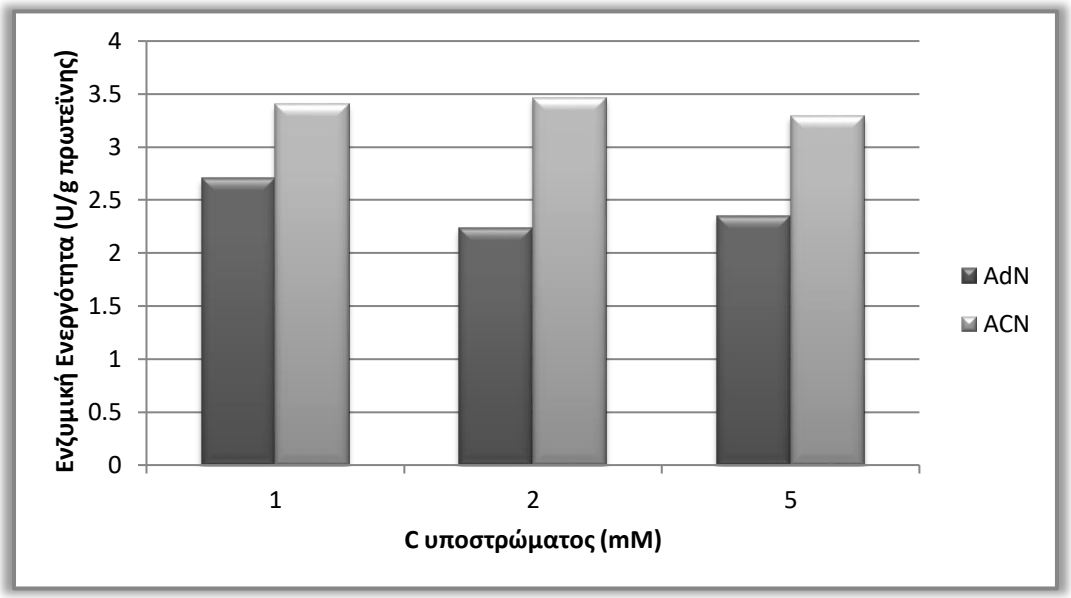
3.6 Μελέτη ενζυμικής υδρόλυσης ακετονιτριλίου και αδιπονιτριλίου

Το ακετονιτρίλιο (ACN) αποτελεί το απλούστερο νιτρίλιο και μελετήθηκε ως προς την ενζυμική του υδρόλυση παράλληλα με το αδιπονιτρίλιο. Αρχικά έγινε ανάπτυξη του μυκητιακού στελέχους σε καλλιέργειες όγκου 200 mL, σε αντίθεση με τις προηγούμενες μεθόδους όπου η καλλιέργεια του μικροοργανισμού είχε γίνει σε μικρότερους όγκους (50 mL). Σκοπός των μεγαλύτερων καλλιεργειών ήταν η παραλαβή περισσότερης βιομάζας. Ακολούθησαν οι διαδικασίες που περιγράφονται στο πειραματικό μέρος για την παραλαβή και λύση των κυττάρων. Τέλος έγινε συμπύκνωση του εσωκυτταρικού υγρού που παραλήφθηκε και δημιουργήθηκαν αντιδράσεις του σε ΡΔ Tris-HCl με $MgCl_2.6H_2O$ καθώς διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του Mg^{2+} οδηγεί σε υψηλότερες ενζυμικές ενεργότητες (βλ. παράγραφο 3.5). Στις αντιδράσεις αυτές ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν το ακετονιτρίλιο και το αδιπονιτρίλιο σε συγκεντρώσεις 1, 2 και 5 mM. Στη συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανίχνευσης αμμωνίας μετά από 24 h από την δημιουργία των αντιδράσεων (Πίνακας 3.6.1):

Πίνακας 3.6.1: *Παρατήρησης της βιομετατροπής ακετονιτριλίου και αδιπονιτριλίου συγκεντρώσεων 1, 2, και 5 mM από το στέλεχος 230-6 μέσω προσδιορισμού της συγκέντρωσης της παραγόμενης αμμωνίας ύστερα από 24 ώρες αντιδράσεων βιομετατροπής του εσωκυτταρικού υγρού.*

	C_{NH_3}(mM)	
$C_{υποστρ.}$(mM)	And	ACN
1	0,099	0,125
2	0,082	0,127
5	0,086	0,120

Όπως φαίνεται από τις τιμές του παραπάνω πίνακα, η παραγωγή αμμωνίας εμφανίζεται μεγαλύτερη στην περίπτωση της χρήσης ακετονιτριλίου έναντι του αδιπονιτριλίου ως υποστρώματος. Αυτό αποτυπώνεται και σε τιμές ενζυμικής ενεργότητας στο ακόλουθο γράφημα (Διάγραμμα 3.6.1):



Διάγραμμα 3.6.1: *Απεικόνιση της ενζυμικής ενεργότητας ως προς τη συγκέντρωση υποστρώματος για το ακετονιτρίλιο και το αδιπονιτρίλιο.*

Παρατηρείται λοιπόν ότι στον ίδιο χρόνο αντίδρασης το ακετονιτρίλιο υδρολύεται γρηγορότερα έναντι του αδιπονιτριλίου. Συγκεκριμένα η ενζυμική ενεργότητα με βάση το διάγραμμα προκύπτει κατά 26 , 55 και 40 % υψηλότερη με υπόστρωμα το ακετονιτρίλιο για τις τρεις συγκεντρώσεις αντίστοιχα. Επιπλέον το συγκεκριμένο δεν αποτελεί δινιτρίλιο αλλά φέρει μία μόνο κυανιούχο ομάδα. Συνεπώς υδρολύεται με αναλογία 1/1 ως προς την συγκέντρωση της παραγόμενης αμμωνίας. Οπότε πρακτικά όση αμμωνία παράγεται τόση είναι και η συγκέντρωση του ακετονιτριλίου που έχει υδρολυθεί.

Όπως προαναφέρθηκε, για την μελέτη αυτή έγινε προσπάθεια παραλαβής περισσότερης βιομάζας, χρησιμοποιώντας μεγαλύτερες καλλιέργειες από όλες τις προηγούμενες διαδικασίες, προκειμένου να προκύψουν και αντίστοιχα μεγαλύτερες ενζυμικές ενεργότητες. Παρόλα αυτά η πρωτεϊνική συγκέντρωση που παραλήφθηκε και εν συνεχεία οι ενζυμικές ενεργότητες που υπολογίστηκαν για το αδιπονιτρίλιο εμφανίζονται σημαντικά χαμηλότερες και για τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του (1, 2 και 5 mM), έναντι των αντιδράσεων για συγκεντρώσεις 1.7, 3.3 και 6.7 mM (Διαγράμμα 3.5.4). όπου είχε προηγηθεί ανάπτυξη σε μικρότερες καλλιέργειες. Αυτό ίσως να οφείλεται στην μη αποτελεσματική διαχείριση της

μεγαλύτερης ποσότητας βιομάζας από τις μεγάλες καλλιέργειες. Πιθανόν να χάθηκαν σημαντικές ποσότητες κατά τις εκπλύσεις λόγω του μεγάλου όγκου υγρού και να μην έγινε σε ικανοποιητικό βαθμό η διάρρηξη, στη συνέχεια, των κυττάρων. Όσον αφορά στις αντιδράσεις που δημιουργήθηκαν, στο assay της παραγράφου 3.5 οι αντιδράσεις εισήχθησαν για 24 ώρες σε επωαστήρα στους 27 ℃ πριν την μέτρηση αμμωνίας ενώ στο συγκεκριμένο, τοποθετήθηκαν για τον ίδιο χρόνο σε ανακινούμενο επωαστήρα στου 35 ℃ και 900 rpm. Ενδεχομένως λοιπόν ο διαφορετικός χειρισμός των αντιδράσεων να επηρέασε την παραγόμενη αμμωνία και κατά συνέπεια τις υπολογισμένες ενζυμικές ενεργότητες.

Σημειώνεται ότι για τις παραπάνω αντιδράσεις των δύο νιτριλίων έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των παραγώμενων, από την υδρόλυση, οξέων (αδιπικό και οξικό αντίστοιχα) με την HPLC (βλ. παράγραφο 2.2.8.2). Ωστόσο δεν έγινε δυνατή η ανίχνευση των προϊόντων αυτων μέσω της μεθόδου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συζήτηση- Συμπεράσματα

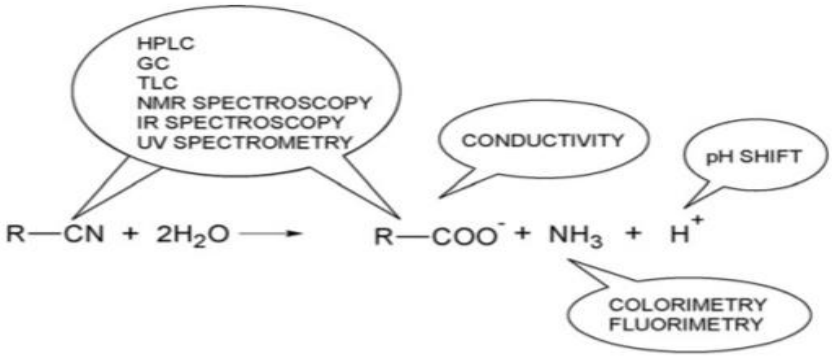
4.1 Διαλογή μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση του αδιπονιτριλίου

Η διαλογή (screening) στην μικροβιολογία αποτελεί γενικά τη μέθοδο μέσω της οποίας επιλέγονται οι μικροοργανισμοί που διαθέτουν τα πιο ικανοποιητικά χαρακτηριστικά ως προς μια συγκεκριμένη διαδικασία, ανάμεσα σε πλήθος μικροβίων. Στη συγκεκριμένη εργασία αποτέλεσε τη διαδικασία ανάδειξης του πιο αποτελεσματικού μυκητιακού στελέχους ως προς την αποικοδόμηση του αδιπονιτριλίου. Η μέθοδος της διαλογής που αναφέρεται και στις περισσότερες ερευνητικές εργασίες σχετικά με την βιομετατροπή νιτριλίων περιλαμβάνει σε πρώτη φάση, τον εμβολιασμό και την επώαση των διαφορετικών στελεχών σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό (π.χ. Czapek-Dox medium) από το οποίο απουσιάζει οποιαδήποτε πηγή αζώτου και όπου γίνεται προσθήκη του προς μελέτη νιτριλίου (Kaplan et al. 2006, Wu et al. 2012, Nageshwar et al. 2011, Gong et al. 2012). Στις περισσότερες μάλιστα εργασίες διαλογής αναφέρεται αρχικά η δημιουργία στερεής καλλιέργειας μικτών μικροβιακών πληθυσμών, σε θρεπτικό χωρίς πηγή αζώτου όπου προστίθεται το μελετώμενο νιτρίλιο ώστε να παρατηρηθεί ποια στελέχη θα ευνοηθούν περισσότερο για ανάπτυξη (enrichment culture) και ακολουθεί η δημιουργία υγρών καλλιεργειών για αυτά με το συγκεκριμένο υπόστρωμα (Martínková et al., 2008, Gong et al., 2012). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία διαφοροποιείται στο γεγονός ότι τα μυκητιακά στελέχη από τρυβλία όπου συντηρούνταν εισήχθησαν απευθείας για ανάπτυξη σε τροποποιημένο μέσο (Czapek-Dox medium) ενισχυμένο με άλατα, από το οποίο απουσίαζε κάθε πηγή αζώτου αλλά και άνθρακα-ενέργειας (Badoei-Dalfard et al. 2016, Xue et al. 2016, Santoshkumar et al. 2010). Δηλαδή δεν επρόκειτο για θρεπτικό υλικό. Σε αυτό έγινε προσθήκη μόνο του προς μελέτη νιτριλίου (αδιπονιτρίλιο). Συνεπώς στο μέσο αυτό θα μπορούσαν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν μόνο τα στελέχη που θα ήταν ικανά να αποδομήσουν το νιτρίλιο.

Σε δεύτερη φάση, λοιπόν, γίνεται η αξιολόγηση της ικανότητας αποικοδόμησης του νιτριλίου από τα διαφορετικά στελέχη. Στην βιβλιογραφία αναφέρονται ποικίλες μέθοδοι για το σκοπό αυτό. Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού της κατανάλωσης του υποστρώματος και του παραγόμενου προϊόντος που

χρησιμοποιούνται για τη διαλογή περιλαμβάνουν τεχνικές όπως φασματομετρία μάζας, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), Υγρή και Αέρια Χρωματογραφία που ωστόσο αποδεικνύονται δαπανηρές και χρονοβόρες, ειδικά στην περίπτωση που επιθυμείται η διαλογή ανάμεσα σε πολύ μεγάλο αριθμό στελεχών (Gong et al., 2012, Black et al., 2015, Xue et al., 2016).

Στην παρούσα εργασία ο βαθμός ικανότητας των στελεχών στην αποδόμηση του αδιπονιτριλίου στηρίχθηκε στην ανάλυση NH_3. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται συνήθως με χρήση της αντίδρασης φαινόλης-υποχλωριώδους άλατος, καθώς και των μεθόδων που βασίζονται στο $CoCl_2$, του Nessler και της Ινδοφαινόλης (Gong et al., 2012). Πέραν αυτών, όμως, έχουν αναπτυχθεί διάφορες δοκιμασίες υψηλής απόδοσης (High- Throughput techniques) για τη δραστηριότητα νιτριλάσης συμπεριλαμβανομένης της χρήσης των δεικτών pH ή του σχηματισμού ενός χρωμοφόρου ή φθορίζοντος συμπλόκου για τη μέτρηση της παραγωγής οξέων και αμμωνίας (Banerjee et al. 2002, Martínková et al., 2008, Gong et al. 2012, Black et al., 2015, Xue et al. 2016). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι έχει αναπτυχθεί μέθοδος για την ταχεία διαλογή βακτηρίων που αποικοδομούν αλειφατικά νιτρίλια και βασίζεται στο pH. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι κάποιοι δείκτες pH όπως το ερυθρό της φαινόλης, το μπλε βρωμοθυμόλης και η φαινολοφθαλεΐνη, ήταν ευαίσθητοι στην απελευθέρωση της αμμωνίας από τα βακτήρια που χρησιμοποιούσαν το νιτρίλιο (Santoshkumar et al., 2010).



Εικόνα 4.1.1: *Μέθοδοι ανίχνευσης της ικανότητας βιομετατροπής των νιτριλίων (Martínková et al., 2008)*

Έτσι λοιπόν και στο συγκεκριμένο πείραμα αξιοποιήθηκε η ανάλυση υψηλής απόδοσης. Το αδιπονιτρίλιο που χρησιμοποιήθηκε σαν μοναδική πηγή αζώτου στο medium με τους μικροοργανισμούς, όπως έχει ήδη αναφερθεί, φέρει δύο ομάδες $C \equiv N$ που με την επίδραση της νιτριλάσης δίνουν NH_3 και δυοξύ. Η αμμωνία έχει την ιδιότητα να σχηματίζει ένα ενδιάμεσο χρωμοφόρο σύμπλοκο με το αντιδραστήριο ο- φθαλαλδεϋδη (OPA) που με την προσθήκη του τριχλωροξικού οξέος (TCA) αποκτά ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα (βλ. παράγραφο 2.2.1.1).Η επιλογή του τελικού οξέος καθορίζει την απόχρωση του τελικού διαλύματος. Το TCA από πειράματα αποδείχθηκε ότι δίνει την καλύτερη αντίθεση με την δημιουργία ενός μπλε-μαύρου αποτελέσματος (Black et al., 2015).Τονίζεται ότι το χρωμοφόρο ενδιάμεσο που δημιουργείται μπορεί να καταβυθιστεί κατά την παραμονή του, ωστόσο η αραίωση που γίνεται στο διάλυμα του OPA με το DMSO το καθιστά κατάλληλο για ποσοτικές μετρήσεις με φασματοσκοπία UV/ορατού (Hu et al., 2014). Επειδή ακολουθήθηκε μία μόνο μέθοδος διαλογής, δεν είναι δυνατόν να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για το εάν πρόκειται για την αποτελεσματικότερη. Σίγουρα όμως αποτέλεσε μία γρήγορη μέθοδο έναντι μεθόδων όπως η ανάλυση με HPLC ή GC.

Όπως αποτυπώνεται στα αποτελέσματα της διαλογής το στέλεχος 230-6 παρουσίασε από την αρχή τις υψηλότερες τιμές παραγόμενης αμμωνίας γεγονός που διατηρήθηκε σε βάθος 4 ημερών που έγιναν μετρήσεις, ξεχωρίζοντας από τα υπόλοιπα 69 στελέχη που μελετήθηκαν συνολικά ως προς την ικανότητά του να διασπά το αδιπονιτρίλιο.

4.2 Περαιτέρω ανάλυση του επιλεγμένου στελέχους 230-6

4.2.1 Με βάση τα χαρακτηριστικά του

Το στέλεχος 230-6 που ξεχώρισε από τη διεργασία της διαλογής ταυτοποιήθηκε μερικώς και βρέθηκε ότι πρόκειται για τον Ασκομύκητα *Penicillium citreonigrum.* Δεδομένου ότι στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν στελέχη από τα μεσόφωτα θαλάσσια οικοσυστήματα (στα 30 με 150 m από την επιφάνεια) προκύπτει άμεσα ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός μπορεί να εντοπιστεί σε τέτοιες περιοχές. Από την επιστημονική έρευνα ωστόσο έχει προκύψει ότι ο μικροοργανισμός αυτός εντοπίζεται και σε ιζήματα σε πολύ μεγαλύτερα βάθη (4.000-5.700 m από την επιφάνεια) (Singh et al. 2010). Στα βάθη αυτά που προσεγγίζουν το βυθό οι μικροοργανισμοί επιβιώνουν αποικοδομώντας νεκρή οργανική ύλη σε συνθήκες εξαιρετικά αυξημένης υδροστατικής πίεσης και πολύ χαμηλών θερμοκρασιών. Πρόκειται συνεπώς για έναν μικροοργανισμό με υψηλή ανθεκτικότητα στις ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Για τον μύκητα αυτό δεν έχει πραγματοποιηθεί ιδιαίτερη μελέτη ως προς τις βιοκαταλυτικές του δράσεις, παρά μόνο για την παραγωγή β-φρουκτοφουρανοζιδασών (Ffase) και φρουκτοολιγοσακχαριτών (FOS) (Nascimento et al. 2016) ενώ έχει μελετηθεί για την παραγωγή του νευροτοξικού μεταβολίτη CTV (citreoviridin) που μπορεί να προκαλέσει παράλυση, σπασμούς, ακόμα και θάνατο ενώ υπάρχουν αναφορές για τη σύνδεσή του με τη νόσο beriberi (Shiratori et al., 2017).

Από την επιστημονική έρευνα γύρω από τις μυκητιακές νιτριλάσες, έχει διαπιστωθεί και μελετηθεί η ικανότητα βιομετατροπής των νιτριλίων από μυκητιακά στελέχη του γένους *Pencillium,* ήδη από το 1960 με τη διαπίστωση της ικανότητας στελεχών του να διασπάσουν το Indole- 3- acetonitrile (Gong et al., 2012, Petříčková, 2013). Ενδεικτικά αναφέρεται ο *P. multicolor* που έχει ξεχωρίσει μεταξύ πολλών διαφορετικών μικροβίων για την υδρόλυση του βενζονιτριλίου και των 2 και 3- κυανοπυριδίνης (Kaplan et al. 2006, Vejvoda et al. 2006, Vejvoda et al. 2008, Bezouška et al. 2011, Yusuf et al. 2013, Martínková et al. 2009). Επιπλέον νιτριλάσες έχουν απομονωθεί από τον *P. chrysogenum* (Bezouška et al. 2011), τους

P. digitatum και *marneffei* (Ricano-Rodriguez & Ramirez- Lepe, 2015). Ενώ, πιο ειδικά, θαλάσσια μυκητιακά στελέχη *P. raistrickii* και *P. decaturense* έχει διαπιστωθεί ότι δύνανται να αποικοδομήσουν το φαινυλακετονιτρίλιο (Ferreira et al., 2016). Οι νιτριλάσες που έχουν ανιχνευθεί από τη βιβλιογραφία στους μύκητες αυτού του γένους αναφέρεται ότι ανήκουν στην κατηγορία των αρωματικών/ετεροκυκλικών ενώσεων (Petříčková, 2013). Τα ευρήματα αυτά συντελούν, επίσης, στο ότι μύκητες αυτού του γένους αναμένεται να παράγουν νιτριλάσες.

4.2.2 Με βάση την ικανότητα βιοαποδόμησης των νιτριλίων που μελετήθηκαν

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε και διαπιστώθηκε η ικανότητα του συγκεκριμένου μύκητα να βιομετατρέπει αδιπονιτρίλιο και ακετονιτρίλιο με την παραγωγή νιτριλασών. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε μέσω της ανίχνευσης αμμωνίας ότι ο μύκητας δύναται για δύο περίπου εβδομάδες να διασπά το αδιπονιτρίλιο, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την ανάλυση με τη χρήση Αέριας Χρωματογραφίας όπου διαπιστώθηκε η διαρκής μείωση του αδιπονιτριλίου στο ίδιο χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα στο AdN πραγματοποιήθηκε στο διάστημα αυτό μείωση της συγκέντρωσης του κατά 41 % περίπου. Αντίστοιχα από αντιδράσεις που παρασκευάστηκαν για την μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας με AdN και ACN διαπιστώθηκε η ικανότητα υδρόλυσης και του ακετονιτριλίου με την ανίχνευση αμμωνίας και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το αδιπονιτρίλιο. Το παράδοξο στις παραπάνω διεργασίες είναι ότι δεν κατέστη δυνατή, μέσω των αναλύσεων με GC και HPLC, η ανίχνευση του αδιπικού και του οξικού οξέος που παράγονται αντίστοιχα από την διάσπαση των δύο υποστρωμάτων. Όσον αφορά στην αδυναμία ανίχνευσης του αδιπικού οξέος ως προϊόντος διάσπασης του αδιπονιτριλίου, ίσως πρέπει να εξεταστεί η πιθανότητα εκλεκτικής δράσης της νιτριλάσης στη μία από τις δύο κυανιούχες ομάδες του

υποστρώματος προς παραγωγή κυανοβαλερικού οξέος, περίπτωση που αναφέρεται στην βιβλιογραφία για τα δινιτρίλια (Chen at al. 2009, De Oliveira et al. 2015, Martínková & Veselá, 2014). Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι στόχος των πειραματικών διεργασιών που πραγματοποιήθηκαν ήταν η διερεύνηση της ικανότητας βιοαποικοδόμησης νιτριλίων, που συνιστούν ρύπους, και όχι η παραλαβή και αξιοποίηση των προϊόντων της βιομετατροπής.

Τέλος, επισημαίνεται ότι στην βιβλιογραφία αναφέρεται η βιοδιάσπαση του αδιπονιτριλίου σε ένα βήμα από το ένζυμο νιτριλάση ενώ του ακετονιτριλίου σε δύο βήματα, από το συνδυασμό των ενζύμων υδρατάση του νιτριλίου και αμιδάση (De Oliveira et al., 2015, Li et al. 2007, Feng et al. 2009). Εφόσον λοιπόν από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό μπορούν να πραγματοποιηθούν και οι δύο βιομετατροπές, αυτό σημαίνει πιθανόν είτε ότι παράγει το σύνολο αυτών των ενζύμων είτε ότι το ακετονιτρίλιο αποδομείται και σε ένα βήμα, από την νιτριλάση. Για τη διαπίστωση αυτή απαιτούνται διαδικασίες για την ανίχνευση του παραγόμενου ενδιάμεσου ακεταμιδίου στην περίπτωση των δύο σταδίων .

4.3 Επίδραση του Mg^{2+} στην ενζυμική δράση

Σε πολλές ερευνητικές εργασίες έχει μελετηθεί η επίδραση διαφόρων ιόντων μετάλλων (Mn^{2+}, Ni^{2+}, Mg^{2+}, Ba^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+} κ.α.) στην ενζυμική ενεργότητα. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών έχουν δείξει μεταξύ άλλων ότι το Mg^{2+} μπορεί να ενισχύσει την παραγωγή βιομάζας και να διεγείρει την ενζυμική δραστικότητα της νιτριλάσης (Badoei-Dalfard et al. 2016, Chen et al. 2015, Yusuf et al. 2015). Πιο συγκεκριμένα στη βιβλιογραφία αναφέρονται αυξήσεις από 6 έως 10 % στην ενζυμική ενεργότητα παρουσία Mg^{2+} σε σχέση με την περίπτωση απουσίας κάθε μεταλλοκατιόντος (Chen et al. 2015, Han et al. 2016). Αξίζει να σημειωθεί ότι στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκαν ένζυμα προερχόμενα από θαλάσσιους μικροοργανισμούς. Συνεπώς πέρα από τη γενικότερη αναφορά στην ενίσχυση της ενεργότητας που προσφέρουν τα άλατα μετάλλων, στην περίπτωση των θαλάσσιων ενζύμων πιθανόν να, προωθούν ακόμα περισσότερο την δράση τους, αφού φυσικά αυτά δρουν σε περιβάλλον υψηλής αλατότητας και η έρευνα έχει δείξει ότι τα χαρακτηριστικά τους διαφοροποιούνται συχνά από τα προερχόμενα από χερσαίους αντίστοιχους μικροοργανισμούς (Velmurugan & Lee, 2012, Chi et al., 2009).

Στην παρούσα εργασία, η προσθήκη Mg^{2+} στο ρυθμιστικό διάλυμα κατά τη δημιουργία των αντιδράσεων για το ένζυμο έδειξε, ύστερα από 24 ώρες, ενίσχυση της ενζυμικής ενεργότητας για το εσωκυτταρικό υγρό (από μηδέν σε 18,5 U/g) αλλά και το υγρό προερχόμενο από το στάδιο της ενζυμικής λύσης κατά 85 % σε ΜΜ ενώ για το FM οι διαφοροποιήσεις ήταν σημαντικά μικρότερες. Αυτό δείχνει ότι στο περιβάλλον του ΜΜ η ενζυμική έκφραση είναι μεγαλύτερη σε σχέση με το περιβάλλον του θρεπτικού υλικού (FM), πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης ανάγκης σε πηγές άνθρακα και αζώτου. Φυσικά οι ενεργότητες που μετρήθηκαν ήταν συνολικά πολύ μικρές ωστόσο στον χρόνο των 24 ωρών η απουσία του ιόντος έδειξε την πλήρη απουσία ενζυμικής ενεργότητας οπότε αποτελούν μια ένδειξη βελτίωσης της ενζυμικής δράσης. Όσον αφορά στο εξωκυτταρικό υγρό η ενεργότητα ήταν σχεδόν μηδενική στην περίπτωση του ΜΜ, με και χωρίς την παρουσία του μαγνησίου ενώ στο FM παρατηρήθηκε και μικρή πτώση της ενεργότητας παρουσία αυτού.

Συζήτηση- Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

Acharya, A. (1999). Biodegradation of acetonitrile. In: Studies on bacterial degradation of acetonitrile and 1,2-dichloroethane. *Department Of Microbiology & Biotechnology Centre. Faculty of Science.* M. S. University Of Baroda. Baroda -390 002 India

Asano, Y. (1982). Enzymatic Studies on the Degradation of Acetonitrile by Arthrobacter sp. J-1. In: Studies on the microbial degradation of nitrile compounds. *Kyoto University*, pp. 39-69. Chapter II

Atalla, M. M., Zeinab, H. K., Eman, R. H., Amani, A. Y., Abd, E., & AtyAbeer, A. (2010). Screening of some marine-derived fungal isolates for lignin degrading enzymes (LDEs) production. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1: 591–599.

Badoei-Dalfard, A., Karami, Z., Ramezani-pour, N.(2016). Bench scale production of nicotinic acid using a newly isolated Stenotrophomonas maltophilia AC21 producing highly-inducible and versatile nitrilase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133: S552–S559

Badoei-Dalfard, A., Karami, Z., Ramezani-pour, N. (2016). Production and Characterization of a Nitrilase from Pseudomonas aeruginosa RZ44 and its Potential for Nitrile Biotransformation. *Iranian Journal of Biotechnology*, 14(3): 142–153

Banerjee, A., Sharma, R., Banerjee, U.C. (2002). *Applied Microbiology and Biotechnology,* 60: 33–44

Bezouška, K., Kaplan, O., Plíhal, O., Ettrich, R., Kulik, R., Vaněk, O., Kavan, D., Benada, O., Malandra, A., Šveda, O., Veselá, A.B., Rinágelová, A., Slámová, K., Cantarella, M., Felsberg, J., Dušková, J., Dohnálek, J., Kotik, M., Křen, V., Martínková, L. (2011). Heterologous expression, purification and characterization of nitrilase from Aspergillus niger K10. *BMC Biotechnology* 11:2

Black, G.W., Brown, N. L., Perry, J.J. B., Randall, P.D., Turnbulla, G., Zhanga, M.(2015). A high-throughput screening method for determining the substrate scope of nitrilases. *Chem. Commun*., 51: 2660-2662

Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3…5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98:426-438

Blackwell, M., R. Vilgalys, T.Y. James, and J.W. Taylor. (2012). Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc.. http://tolweb.org/Fungi/2377/2012.01.30 in The Tree of Life Web Project, http://tolweb.org/

Bonugli-Santos, R. C., Vasconcelos, M. R. dos S., Passarini, M. R. Z., Vieira, G. A. L., Lopes, V. C. P., Mainardi, P. H., … Sette, L. D. 2015. Marine-derived fungi: Diversity of enzymes and biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR).

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.

Bugni T.S. (2003). Investigation of marine-derived fungi for bioactive natural products. *PhD thesis*,*University of Utah*, Utah, USA.

Bystryak, S., Santockyte, R., Peshkovsky, A. (2015). Cell disruption of S. Cerevisiae by scalable high-intensity ultrasound. *Biochemical Engineering Journal*, 99: 99-106.

Carris, L. M., C. R. Little, and C. M. Stiles. (2012). Introduction to Fungi. *The Plant Health Instructor*

Cavalier-Smith T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 73(3): 203-266

Chen, Z., Chen, H., Ni, Z., Tian, R., Zhang, T., Jia, J., Yang, S. (2015). Expression and Characterization of a Novel Nitrilase from Hyperthermophilic Bacterium Thermotoga maritima MSB8. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(10): 1660–1669

Chen, J., Zheng, R.C., Zheng, Y.G., Shen, Y.C. (2009). Microbial Transformation of Nitriles to High-Value Acids or Amides. *In: Biotechnology in China I: From Bioreaction to Bioseparation and Bioremediation*. Springer-Verlag. 113: 33-77.

Chi Z., Chi Z., Zhang T., Liu G., Li J., Wang X. (2009). Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnol. Adv.* 27 236–255

De Oliveira, J. R., Reagli Seleghim, M.H., Meleiro Porto, A.L. (2015). Biotransformation of Nitriles by Marine Fungi. *In: Handbook of Marine Biotechnology. Edit. Se- Kwon, K.,* Springer, New York , pp.677-710.

Dong, M.W. (2006). Modern HPLC for practicing scientists. *John Wiley & Sons*. New Jersey

Electronic Supplementary Material (ESI) for ChemComm Supplementary Information *The Royal Society of Chemistry 2014*

Embley TM. (2006). Multiple secondary origins of the anaerobic lifestyle in eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.BBiol.Sci*.361:1055–67

Fan, H., Chen, L., Sun, H., Wang, H., Liu, Q., Ren, Y., Wei, D.(2017). Characterization of a novel nitrilase, BGC4, from Paraburkholderia graminis showing wide-spectrum substrate specificity, a potential versatile biocatalyst for the degradation of nitriles. *Biotechnology Letters*, 39:1725–1731

Fang, S., An, X., Liu, H., Cheng, Y., Hou, N., Feng, L., Huang, X., Li, C.(2015). Enzymatic degradation of aliphatic nitriles by Rhodococcus rhodochrous BX2, a versatile nitrile-degradating bacterium. *Bioresource Technology* , 185: 28-34

Feng, Y-S., Lee, C-M. (2009). The potential of the acetonitrile biodegradation by Mesorhizobium sp. F28. *Journal of Hazardous Materials*, 164:646-650

Ferreira, I.M., Birolli, G.W., Alvarenga, N., Mouad, A.M., Porto, L.M. (2016). Brazilian Marine-Derived Microorganisms: Biocatalytic Discoveries and Applications in Organic Chemistry. *In: Marine OMICS: Principles and Applications. Edit. Se-Kwon, K.,* CRC Press

Gasparetto, J.C., Pontarolo, R., De Francisco, T.M.G.(2012).Acetonitrile:Properrties, Exposure, Metabolism and Toxicity. *Nove Science Publisher*, New York

Gong, J.S., Lu, Z.M., Li, H., Shi, J.S., Zhou, Z.M., Xu, Z.H. (2012). Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research. *Microb. Cell Fact,* 11: 142

Gong, J.S., Shi, J.S., Xu, Z.H. (2016). Chapter 26: Biocatalysis: Nitrilases in Organic Sythesis. In*: Green Biocatalysis. Edit. : Patel, R.N., John Wiley & Sons*. New York, pp. 629-642

Han, R.,Chen, C., Wang, F., Liu, Y., Gong, X.Y.J., Ma, L. (2016). Whole-cell biotransformation with recombinant nitrilase for enantioselective production of (R)-o-Chloromandelic acid. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4: 75-89

Harris, D.C.,(2007). Chapter 24: Gas Chromatography. *In: Quantitative chemical analysis. (Seventh ed.). W. H. Freeman and Company*. pp. 528-555.

Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95:641-655.

Hong, J.-H., Jang, S., Mok Heo, Y., Min, M., Lee, H., Lee, Y.M., Lee, H., and Kim, J.J. (2015). Investigation of Marine-Derived Fungal Diversity and Their Exploitable Biological Activities. *Marine Drugs,* 13, 4137-4155

Howard, P.H., (1990). Handbook of Environmental Fate and Exposure Data For Organic Chemicals, Vol 2, CRC Press

Hsu, J.C., Camper, N.D.(1979) Degradation of ioxynil by a soil fungus, Fusarium solani. *Soil Biol Biochem*, 11:19–22

Hu, H., Liang, Y., Li, S., Guo, Q., Wu, C. (2014). A Modified o-Phthalaldehyde Fluorometric Analytical Method for Ultratrace Ammonium in Natural Waters Using EDTA-NaOH as Buffer. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol.2014

Imhoff, F.J. (2016). Natural Products from Marine Fungi—Still an Underrepresented Resource. *Marine Drugs*, MDPI,14, 19.

International Agency for Research on Cancer (IARC).(2007). Pyridine Summary & Evaluation. *IPCS INCHEM*.

Kao, C.M., Chen, K.F., Liu, J.K., Chen, S.C. (2006). Enzymatic degradation of nitriles by Klebsiella oxytoca. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 71: 228–233

Kaplan O, Nikolaou K, Pinvejcová A, Martínková L (2006) Hydrolysis of nitriles and amides by filamentous fungi. *Enzyme Microb Technol*, 38:260–264

Kaplan O, Petříčková, A., Veselá, A.B., Martínková, L. (2013). A Comparative Study of Nitrilases Identified by Genome Mining. *Molecular Biotechnology*, 54: 996–1003

Kohlmeyer J, Kohlmeyer E (1979) Marine mycology. The higher fungi. *Academic Press,* New York

Levy-Schil, S., Soubrier, F., Crutz-Le Coq, A. M., Faucher, D., Crouzet, J., Petre, D. (1995).Aliphatic nitrilase from a soil-isolated Comamonas testosteroni sp.: gene cloning and overexpression, purification and primary structure. *Gene,* 161, 15-20.

Li, H. (2007). Chemical investigations of Natural Products from Australian Marine Sponge-Derived Fungi.Thesis (PhD Doctorate), Griffith University, Brisbane

Li, Q., and Wang, G. (2009). Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges. Microbiol. Res. 164, 233–241.

Li, T., Liu, J., Bai, R., Ohandja, D. G., Wong, F.S. (2007). Biodegradation of organonitriles by adapted activated sludge consortium with acetonitrile-degrading microorganisms. *WATER RESEARCH*, 41:3465– 3473

Martínková, L., Vejvoda, V., Kaplan, O., Kubáč, D., Malandra, A., Cantarella, M., Bezouška, K., Křen, V. (2009) Fungal nitrilases as biocatalysts: recent developments. *Biotechnol Adv,* 27(6): 661–670

Martínková, L., Vejvoda, Křen, V. (2008). Selection and screening for enzymes of nitrile metabolism. *Journal of Biotechnology*, 133: 318–326

Martínková, L., Veselá, A.B. (2014). Hydrolysis of Nitriles to Carboxylic Acids. *In: Faber,K., Fessner, W.D., Turner, N.J. editors. Science of Synthesis: Biocatalysis in Organic Synthesis vol 1,* pp. 277-302

Moubasher, A. A. H., Ismail, M. A., Hussein, N. A., & Gouda, H. A. (2016). Enzyme producing capabilities of some extremophilic fungal strains isolated from different habitats of Wadi El-Natrun, Egypt. Part 2: Cellulase, xylanase and pectinase. *European Journal of Biological Research*, 6, 103–111.

Murugaiyan, K., (2015). Marine Fungal Diversity and Bioprospective. *In: Handbook of Marine Biotechnology. Edit. Se- Kwon, K., Springer, New York*, pp. 12-25

Nageshwar, Y. V. D., Sheelu, G., Shambhu, R.R., Muluka, H., Mehdi, N., Malik, M.S., Kamal, A.(2011). Optimization of nitrilase production from Alcaligenes faecalis MTCC 10757 (IICT-A3): effect of inducers on substrate specificity. *Bioprocess Biosyst Eng*, 34:515–523

Nascimento, A.K.C., Cavalcanti, M.T.H., Gonçalves, C.N., Porto,A.L.F. (2016). Screening of fungi from the genus Penicillium for production of β-fructofuranosidase and enzymatic synthesis of fructooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 134.

Nigam, V.K., Arfi, T., Kumar, V., Shukla, P. (2017). Bioengineering of Nitrilases Towards Its Use as Green Catalyst: Applications and Perspectives. *Indian Journal of Microbiology,* 57(2): 131-138.

Olson, J.B., Kellogg, C.A. (2010). Microbial ecology of corals, sponges, and algae in mesophotic coral environments. *FEMS Microbiology Ecology*. 73:17–30

Orrù, B., Fruciano, E., Riva, A. 2002. Giuseppe Brotzu and the Discovery of Cephalosporins. *8th Eurorean Conference of Medical and Health Libraries, Cologne*

Ouazzani, J., Benayahu, Y., Trougakos, I.(2016). Seeking the fountain of youth in the twilight zone. Science Letters. *The Marine Biologist*

Parte, S., Sirisha, V.L., D' Souza, J.S. (2017). Chapter Four - Biotechnological Applications of Marine Enzymes From Algae, Bacteria, Fungi, and Sponges. *Advances in Food and Nutrition Research*, 80: 75-106

Petříčková, M.A., (2013). Structure and biocatalytic properties of nitrilases from filamentous fungi. *Department of Biochemistry. Faculty of Science. Charles University of Prague*

Ramteke, P., Maurice, Joseph, B., Wadher, B., (2013). Nitrile-converting enzymes: An eco-friendly tool for industrial biocatalysis. *Wiley Online Library*

Richards, T. A., Jones, M., Leonard, G., Bass, D.2012. Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity. *Annual Review on Marine Science*, 4:495-522

Rateb, M.E., Ebel, R. (2011). Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat. Prod. Rep.,* 28 (2): 290-344

Ricano-Rodriguez, J., Ramirez- Lepe, M. (2015). Purification and characterization of a cyanide-degrading nitrilase from Trichoderma harzianum VSL291. Turkish *Journal of Biology,* 39: 248-257

Rocha-Martn, J., Harrington, C., Dobson, A.D.W., O'Gara, F.(2014).Emerging Strategies and Integrated Systems Microbiology Technologies for Biodiscovery of Marine Bioactive Compounds.Marine Drugs. 12(6), 3516-3559

Santoshkumar M, Nayak A, Anjaneya O, Karegoudar T.(2010). A plate method for screening of bacteria capable of degrading aliphatic nitriles. J *Ind Microbiol Biotechnol*, 37:111–115.

Shiratori, N., Kobayashi, N., Tulayakui, P., Sugiura, Y., Takino, M., Endo, P., Sugita-Konishi, Y. (2017). Occurrence of Penicillium brocae and Penicillium citreonigrum, which Produce a Mutagenic Metabolite and a Mycotoxin Citreoviridin, Respectively, in Selected Commercially Available Rice Grains in Thailand. *Toxins* , 9(6), 194

Simmons T.L., Gerwick W.H. 2008. Anticancer drugs of marine origin. In Oceans and human health: Risks and remedies from the seas. *New York: Academic*, pp. 432-452

Singh, P., Verma, P., Raghukumar, C., Shouche, Y. (2010). Phylogenetic diversity of culturable fungi from the deep-sea sediments of the Central Indian Basin and their growth characteristics. *Fungal diversity,* 40(1):89-102

Sonbol, S. A., Ferreira, A. J. S., Siam, R.(2016). Red Sea Atlantis II brine pool nitrilase with unique thermostability profile and heavy metal tolerance. Sonbol et al. *BMC Biotechnology,* 16:14

Spanish Ministry of Health (2002), Acetonitrile. Summary Risk Assessment Report (PDF), Ispra (VA), *Italy: European Chemicals Bureau, Special Publication*

Swathi, J., Narendra, K., Sowjanya, K. M. and Krishna Satya, A. 2013. Marine fungal metabolites as a rich source of bioactive compounds. *African Journal of Biochemistry,* 7(10): 184-196

Thammana, M. (2016). A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Research & Reviews: *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Volume 5. Issue 2.

Vejvoda, V., Kaplan, O., Bezouška, K., Pompach, P., Sŭlk, M., Cantarella, M., Benada, O., Uhnakova, B., Rinágelová, A., Lutz-Wahl, S., Fischer, L., Křen, V., Martínková, L. (2008). Purification and characterization of a nitrilase from Fusarium solani O1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 50: 99–106

Vejvoda, V., Kaplan, O., Charvátová-Pinvejcová, A., Martínková, L. (2006). Hyperinduction of nitrilases in filamentous fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33:891–896

Velmurugan N., Lee Y. S. (2012). "Enzymes from marine fungi: current research and future prospects," *in Marine Fungi and Fungal-like Organisms (Marine and Freshwater Botany) ed. Jones E. B. G., editor*. (Berlin: Walter de Gruyter) 441–474

Vidali M. (2001). Bioremediation. An overview, *Pure Appl. Chem*. 73(7): 1163-1172.

Wainwright, B.J.,Zahn, G.L., Spalding, H.L., Sherwood, A.R., Smith, C.M., Amend, A.S. (2017). Fungi associated with mesophotic macroalgae from the 'Au'au Channel, west Maui are differentiated by host and overlap terrestrial communities. *PeerJ* 5:e3532

Winkler, M., Kaplan, O., Vejvoda, V., Klempier, N., Martínková, L.(2009). Biocatalytic application of nitrilases from Fusarium solani O1 and Aspergillus niger K10. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 59:243–247

Wu, Y., Gong, J.S., Lu, Z.M., Li, H., Zhu, X.Y., Li, H., Shi, J.S., Xu, Z.H. (2012). Isolation and characterization of Gibberella intermedia CA3-1, a novel and versatile nitrilase- producing fungus. *Journal of Basic Microbiology*. 53: 934–941

Xue, Y.-P., Yang, Y.-K., Lv, S.-Z., Liu, Z.-Q., Zheng, Y.-G.(2016). High-throughput screening methods for nitrilases. *Appl. Microbiol. Biotechnol* . 100:3421–3432

Yusuf, F., Chaubey, A., Jamwal, U., Parshad, R.(2013). A New Isolate from Fusarium proliferatum (AUF-2) for Efficient Nitrilase Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*171:1022–1031

Yusuf, F., Chaubey, A., Raina, A., Jamwal, U., Parshad, R. (2013). Enhancing nitrilase production from Fusarium proliferatum using response surface methodology. *SpringerPlus* 2:290

Yusuf, F., Jamwal, U., Rather, I.A., Chaubet, A. (2015). Cloning and functional characterization of nitrilase from Fusarium proliferatum AUF-2 for detoxification of nitriles. *Functional and Integrative Genomics* 15(4)

Αποστολάκη, Μ., Γενειατάκης, Ε., Διαλυνάς, Ε., Κενανάκης, Γ., Μακρυπόδης, Γ., Μαυράκης, Ε., Μυρίλλα, Α., Τζαγκαράκη, Ε., Χάβας, Γ.(2005).Βιοεξυγίανση Χώρων Διάθεσης Απορριμάτων. Επιμέλεια: Τσαγκαράκης, Κ., *Τεχνικό Επιμελητήριο Ελλάδος,* Τμήμα Ανατολικής Κρήτης.

Πετρίδου, Ε. Γενική Μυκητολογία. Γενική Βακτηριολογία- Γενική Μυκητολογία- Μυκοτοξικώσεις. *Τμήμα Κτηνιατρικής. Σχολές Επιστημών Υγείας.* Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης